

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.002

抗菌肽人 β 防御素3融合糖类结合域的真核表达和对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 N315 的抑菌作用*

黄洁雯¹ 宋 珍² 郭晓奎^{1,2} 李擎天^{2Δ}

(1 上海交通大学医学院免疫学与微生物学系 上海 200025; 2 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验系 上海 200025)

摘要 目的:研究重组真核抗菌肽人 β 防御素3-糖类结合域(human β defensin 3 - carbohydrate-binding domain, hBD3-CBD)对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) N315 的抑菌作用。**方法:**用重叠延伸剪接技术将抗菌肽和融合抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD1、hBD3-CBD2 的基因序列克隆入真核表达载体 pVAX1 并转染 HEK293T 细胞, 通过逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、Western blot 方法检测其表达情况; 并通过感染后细菌计数和上清液白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)浓度来检测抗菌肽转染 HEK293T 细胞对 MRSA N315 的抑制作用。**结果:**抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD1、hBD3-CBD2 转染 HEK293T 细胞后均有表达; 感染后 6 和 12 小时, hBD3、hBD3-CBD1 和 hBD3-CBD2 均显示出对 MRSA N315 的抑菌作用; 感染后 12 小时, hBD3-CBD1 和 hBD3-CBD2 的抑菌作用优于 hBD3, hBD3-CBD1 和 hBD3-CBD2 之间的抑菌作用没有差异; 感染后 6 和 12 小时, hBD3、hBD3-CBD1、hBD3-CBD2 的细胞上清液 IL-6 浓度显著低于对照组, 而 hBD3-CBD1 和 hBD3-CBD2 两组之间的 IL-6 浓度未见差异。**结论:**真核表达抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 对 MRSA N315 对 HEK293T 细胞的感染有显著抑制作用, 且重组抗菌肽 hBD3-CBD 的直接抑菌作用优于 hBD3。

关键词:抑菌作用; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 抗菌肽; 真核表达

中图分类号: R378, R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)31-6006-05

The Eukaryotic Expression of Antimicrobial Peptide Human β Defensin 3 - Carbohydrate-binding Domain and the Inhibition on Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* N315 *

HUANG Jie-wen¹, SONG Zhen², GUO Xiao-kui^{1,2}, LI Qing-tian^{2Δ}

(1 Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 Department of Laboratory Medicine, Ruijin hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the inhibition effects of recombinant eukaryotic antimicrobial peptide human β defensin 3 - carbohydrate-binding domain (hBD3-CBD) against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) N315. **Methods:** Gene splicing by overlap extension was used to combine antimicrobial peptide and fusion antimicrobial peptide gene hBD3, hBD3-CBD1 and hBD3-CBD2 with eukaryotic vector pVAX1; the recombinant plasmids were transfected in HEK293T cells and reverse transcription PCR and western blot were used to detect the plasmid expressions; bacterial counting and supernatant IL-6 concentration were analyzed to show the inhibition on MRSA N315 from antimicrobial peptide transfected HEK293T cells. **Results:** Antimicrobial peptide hBD3, hBD3-CBD1 and hBD3-CBD2 could be expressed in transfected HEK293T cells; hBD3, hBD3-CBD1 and hBD3-CBD2 showed the bactericidal activities against MRSA N315 at 6 and 12 hours after the infection; the bactericidal activities in hBD3-CBD1 and hBD3-CBD2 were stronger than that in hBD3; there was no difference in the bactericidal activities between hBD3-CBD1 and hBD3-CBD2; the supernatant IL-6 concentration in hBD3, hBD3-CBD1 and hBD3-CBD2 were lower than that in the control group, and there was no difference in the IL-6 concentration between hBD3-CBD1 and hBD3-CBD2. **Conclusions:** Eukaryotic expressed antimicrobial peptides hBD3 and hBD3-CBD can significantly inhibit the infection on HEK293T cells by MRSA N315; the direct inhibition effects of recombinant antimicrobial peptide hBD3-CBD were stronger than that of hBD3.

Key words: Inhibitory effect; Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; Antimicrobial peptide; Eukaryotic expression

Chinese Library Classification (CLC): R378, R965 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)31-6006-05

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81000708)

作者简介: 黄洁雯(1985-), 女, 实验师, 主要研究方向: 细菌感染与免疫, 电话: 021-63846590-776469, E-mail: huangjiawen627@sjtu.edu.cn

△通讯作者: 李擎天, 电话: 021-63846590-776561, E-mail: qingtianli@sjtu.edu.cn

(收稿日期: 2014-04-19 接受日期: 2014-05-12)

前言

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是导致人类难治性感染的主要病原体之一。目前,全球范围内不同地区 MRSA 在金黄色葡萄球菌感染所占的比重各有不同,但多数地区都在 60 %以上^[1,2]。面对以 MRSA 等为代表的耐药性病原菌感染的蔓延趋势,在开发新的抗生素或抗生素联合治疗方案之外,研发新类型的抗菌制剂也是一种有很大潜力的努力方向。

抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)是对多种病原体具有广谱的抑菌活性的小分子量蛋白质^[3]。抗菌肽的作用速度很快,因此有望成为很好的用于抑菌治疗的候选制剂。抗菌肽快速抑制微生物病原体的精确机制尚不明朗^[4]。人 β 防御素 3(human β defensin 3, hBD3)是重要的人体抗菌肽,在防御素家族中, hBD3 在人生理性血清盐浓度下仍有稳定的抑菌能力,因而被认为最有可能成为未来的抗菌制剂候选^[5]。在已有报道的抗菌肽 hBD3 的可能抑菌机制中,重要机制之一是通过与细菌表面的糖类物质结合,进而发挥其抑菌作用。抗菌肽与细菌的作用力强弱取决于抗菌肽的糖类结合能力,这是建立在糖类结合域(Carbohydrate-binding domain, CBD)基础上的^[6]。因此,我们在本研究中尝试将编码 CBD 的寡核苷酸^[7,8]和 hBD3 基因片段进行重组进而得到 hBD3-CBD,然后将重组序列克隆入真核表达载体 pVAX1,并通过 HEK293T 细胞保护试验对其抑菌作用进行评估。

我们引入真核表达载体 pVAX1 的原因在于:目前抗菌肽的基础和临床研究的重要瓶颈之一是其作为小分子多肽,稳定性差且化学合成的成本昂贵。由于抗菌肽的分子量小,因而通过多条引物相互连接的方案,可以人工得到所需的抗菌肽基因序列,并可以对序列进行任意修饰^[9]。而真核质粒 pVAX1 是包括 HIV 等病原体的基因疫苗研究中较常用的表达载体,它可

以在原核细胞中大量扩增并在真核细胞中高效表达,是研究真核表达抗菌肽的理想材料^[10]。HEK293T 细胞则是 HEK293 细胞的衍生株, HEK293 细胞经常用于腺病毒以及真核表达载体的转染,用脂质体的方法可以将候选基因转入该细胞进行稳定表达和瞬时表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株、载体和细胞 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 N315、大肠埃希菌 DH5 α 由本实验室保存;真核表达质粒 pVAX 1 来自纽约洛克菲勒大学 Diamond 艾滋病研究中心的 David D. Ho 博士;HEK293T 细胞购自中国科学院细胞生物学研究所。

1.1.2 试剂和仪器 脂质体转染试剂盒 LipTM2000 和细菌、细胞培养基、6 孔细胞培养板购自上海 Invitrogen 公司;PCR 扩增试剂购自北京天根生化科技有限公司;Western blot 等试剂购自上海生工生物工程股份有限公司;其他分子生物学试剂购自上海舒济生物科技有限公司;PCR 扩增仪器来自 Eppendorf 公司;Western blot 结果检测仪器为 GE 公司的 Image Quant LAS 4000 mini 成像仪。

1.2 方法

1.2.1 设计并构建重组表达质粒 通过重叠延伸剪接技术(Gene splicing by overlap extension, SOE)来构建重组基因片段。重叠延伸剪接技术是一种通过 DNA 链的交错延伸而实现基因拼接的分子生物学实验方法,可将不同来源的 DNA 片段连在一起,广泛应用于产生突变基因、杂合基因、构建突变文库、融合基因、基因敲除等。根据待合成的重组基因序列,设计 14 条 DNA 引物,并由上海 Invitrogen 公司合成(如表 1 所示)。引物之间设计为反向重复序列,其中引物 1-6 用于 hBD3,引物 1-4 和 7-10 用于 hBD3-CBD1,引物 1-4 和 11-14 用于

表 1 构建重组片段所用的引物序列
Table 1 Primer sequences used in recombinant fragments construction

编号 No.	目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequences
1	hBD3, hBD3-CBD1, hBD3-CBD2	CCCAAGCTTAGTATGGGCATCATTAACACCCTGCAGAAGTAC
2	hBD3, hBD3-CBD1, hBD3-CBD2	CGCAGCGTCCGCCGCGCACGCGCAATAGTACTTCTGCAG
3	hBD3, hBD3-CBD1, hBD3-CBD2	GGACGCTGCGCCGTGCTAGGTCCTGCCTGCCAAGGAGGAAC
4	hBD3, hBD3-CBD1, hBD3-CBD2	GGTGGAGCACTTGCCGATCTGTTCTCTCTTG
5	hBD3	AGTGCTCCACCCGCGCCGCAAGTGCTGTTCGAGGAAGAA
6	hBD3	CGGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGGTGTTTCTTCTCTGCG
7	hBD3-CBD1	GTGCTCCACCCGCGCCGCAAGTGCTGTTCGAG
8	hBD3-CBD1	GCCTCCGCCTTTCTTCTCTGCGACAGC
9	hBD3-CBD1	AGGCGGAGGCCAGCACGACGGCAACTTCGTGGTCTAC
10	hBD3-CBD1	CGGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGGTGTTAGACCACGA
11	hBD3-CBD2	GTGCTCCACCCGCGCCGCAAGTGCTGTTCGAGGAAGAAAGGCGGAG
12	hBD3-CBD2	AGTCCTCGTCGGAGCCGGCGTTGTTGGGCTCGCTCCGCCTTT
13	hBD3-CBD2	GACGAGGACTGCGTGCTGCTCCTGAAGAACGGCCAGTGAACG
14	hBD3-CBD2	CGGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGGTGTTCTTCCACTG

hBD3-CBD2。在引物 6、10 和 14 中添加了 6× his 的基因序列作为后续检测的标签。

使用北京天根生化科技有限公司的 2× Taq PCR Master Mix 试剂,通过一系列的 PCR 扩增将各引物借助于共同重叠区连接在一起,得到 3 个基因片段 hBD3、hBD3-CBD1 和 hBD3-CBD2。所有 PCR 反应进行 30 个循环,每个循环分别为 94℃ 30 秒,58℃ 30 秒,72℃ 40 秒。通过 3 个片段两端(即引物 1、6、10 和 14)带有的 *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切位点,将 3 个重组基因片段分别克隆入真核表达载体 pVAX1,转化入大肠埃希菌 DH5α 株,通过卡那霉素进行阳性克隆筛选。

1.2.2 重组抗菌肽在 HEK 293 T 细胞中的表达 用逆转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法^[11]和 Western blot 的方法^[12]检查 HEK 293T 细胞中抗菌肽的表达。使用含有 15%胎牛血清的 1640 培养基,将 HEK 293T 细胞在 6 孔细胞培养板中进行转染。通过脂质体转染法转染试剂 LipTM2000 将重组质粒 pVAX1/hBD3、pVAX1/hBD3-CBD1、pVAX1/hBD3-CBD2 以及 pVAX1 (阴性对照) 转染入 HEK293T 细胞。24 小时后,将 4 组细胞离心收集后用于各自特定引物的 RT-PCR 扩增。2 天孵育后,离心收集另 4 组细胞。细胞裂解物在 10%的甘氨酸 SDS-PAGE 中进行电泳分离,然后将蛋白转印到硝酸纤维素膜上进行 Western blot 检测。用于检测的鼠抗 His6 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体(Abcam 公司)的稀释度均为 1:1500。

1.2.3 真核表达抗菌肽的抑菌能力 在 Invitrogen 的 6 孔细胞培养板中检测抗菌肽的抑菌作用。以上述脂质体方法将纯化后的 pVAX1、pVAX1/hBD3、pVAX1/hBD3-CBD1 和 pVAX1/hBD3-CBD2 转染入 2×10⁶ 的 HEK 293 T 细胞。24 小时后,

在每个转染的 HEK 293 T 细胞孔中加入 1×10⁵ 的 MRSA N315(1×10⁶CFU 浓度,100 μL 体积)。经过 3、6 和 12 小时后,将感染后的体系分为两个部分。一部分通过连续稀释平板计数法计算菌落数以测量抗菌肽的抑菌作用;另一部分上清液用 ELISA 的方法进行细胞因子 IL-6 的分析,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。分别进行三次独立实验,结果以平均数±标准差表示。

1.2.4 统计学分析 所有的分析数据由 3 次独立的重复实验中得出,使用 SPSS17.0 进行统计学分析。细菌计数和细胞因子浓度的数值用 Student-Newman-Keuls t 检验进行分析,P<0.05 时具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的构建和真核表达

将通过重叠延伸剪接技术构建出的抗菌肽和融合抗菌肽基因片段 hBD3、hBD3-CBD1 和 hBD3-CBD2 克隆入真核表达载体 pVAX1 中(图 1A-C)。质粒上带有巨细胞病毒启动子,来控制相关基因的转录,并有 poly(A)序列以在真核细胞中高效表达和修饰。通过 RT-PCR,转染 pVAX1/hBD3 和 pVAX1/hBD3-CBD1、pVAX1/hBD3-CBD2 的 HEK293T 细胞中有相应大小的扩增产物(图 1D)。在 Western blot 检测中,hBD3 和 hBD3-CBD1、hBD3-CBD2 分别检测出分子量为 6.2kDa 和 8.0kDa、9.3kDa 的抗 his6 条带,而 pVAX1 转染的细胞中没有检出任何条带(图 1E-G)。

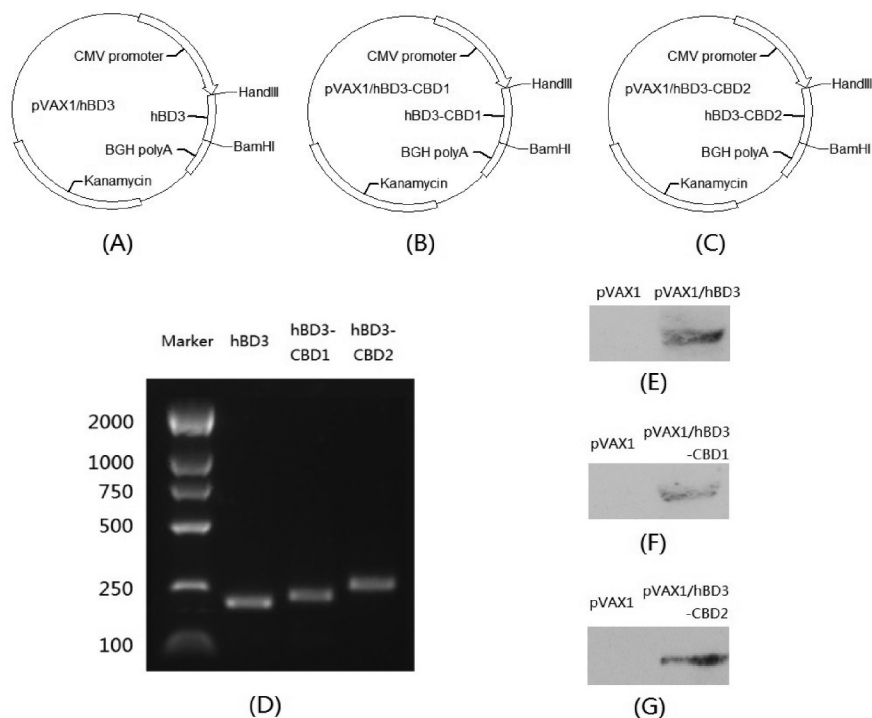


图 1 重组质粒的构建和真核表达

Fig. 1 Construction and eukaryotic expression of recombinant plasmids

注:(A-C)重组质粒 pVAX1/hBD3、pVAX1/hBD3-CBD1 和 pVAX1/hBD3-CBD2;(D)转染细胞 HEK293T 的重组质粒逆转录 PCR 电泳结果;(E-G)转染细胞 HEK293T 的重组质粒表达 Western blot 结果。

Note: (A-C) Recombinant plasmid pVAX1/hBD3, pVAX1/hBD3-CBD1 and pVAX1/hBD3-CBD2; (D) Reverse transcription PCR electrophoresis of recombinant plasmids in transfected HEK293T cells; (E-G) Western blot results of recombinant plasmids in transfected HEK293T cells.

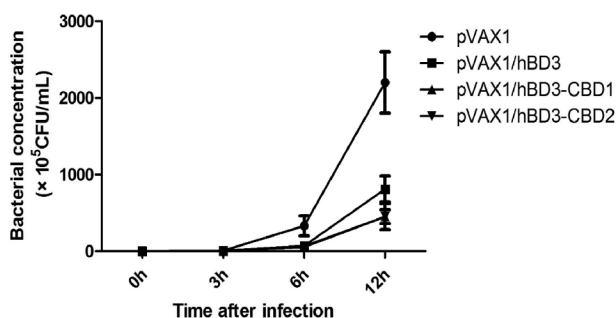


图2 感染后各组 MRSA N315 计数

Fig. 2 MRSA N315 counting after infection

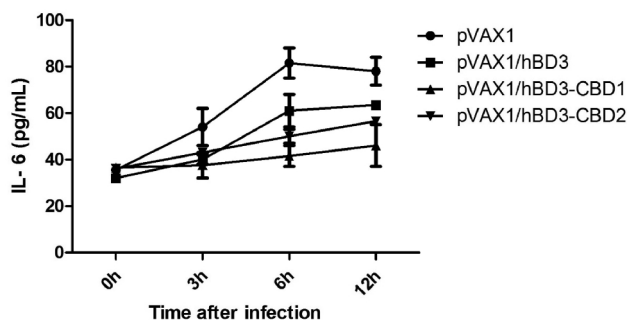


图3 感染后各组细胞培养上清 IL-6 浓度

Fig. 3 Cell culture supernatants IL-6 concentrations after infection

2.2 抗菌肽抑菌能力评价

如图2所示,根据菌落计数实验,在感染6和12小时,pVAX1/hBD3、pVAX1/hBD3-CBD1和pVAX1/hBD3-CBD2组的抑菌作用明显高于pVAX1组。在感染12小时,pVAX1/hBD3和pVAX1/hBD3-CBD1、pVAX1/hBD3-CBD2的抑菌能力有显著差异。重组质粒pVAX1/hBD3-CBD1和pVAX1/hBD3-CBD2之间的抑菌能力则没有差异。

通过ELISA方法对每一组转染的HEK293T细胞的培养上清液进行细胞因子IL-6浓度的检测。如图3所示,在感染6、12小时后,pVAX1组的转染HEK293T细胞的培养上清液中IL-6的浓度较感染前明显增加。感染6和12小时后,转染pVAX1/hBD3和pVAX1/hBD3-CBD1、pVAX1/hBD3-CBD2的细胞上清液中IL-6的浓度明显低于pVAX1组。转染融合肽hBD3-CBD1和hBD3-CBD2的两组之间的IL-6浓度未见差异。

3 讨论

抗菌肽是机体在进化上保守的先天免疫反应的重要组成部分之一。随着越来越多的细菌耐药性的产生,抗菌肽已成为许多实验室的研究热点^[13]。此外,抗菌肽也有可能作为免疫调节剂用于提高免疫力^[14]。MRSA是细菌性病原体中耐药性扩散最严重、造成危害性最大的“超级细菌”之一,对其感染和耐药性的控制备受关注。抗菌肽是一种可能治疗由MRSA引起的各种感染的抑菌制剂^[15]。在生理状态下,人的皮肤能够产生包括hBD3在内的多种抗菌肽并对入侵细菌做出防御反应。已有研究证明,抗菌肽对革兰阳性的MRSA的显著抑菌作用与其在生理盐浓度下的净电荷及其糖类结合域^[16]与MRSA表面的肽聚糖成分^[17]的作用有关。

由于抗菌肽的分子量小,不容易引起机体的免疫反应,这有利于将其作为抗菌制剂投入临床。小分子量抗菌肽应用的一个不利因素是其稳定性不佳,限制了其抑菌作用的有效性和持久性^[18];然而,小分子量的特征却给利用重叠延伸剪接技术方法重组真核表达抗菌肽提供了更好的可行性。本研究重组完成了3个真核表达的抗菌肽质粒pVAX1/hBD3、pVAX1/hBD3-CBD1和pVAX1/hBD3-CBD2,并对其作用进行了评估。上皮细胞是人体组织对细菌的第一道防御屏障^[19],本研究选择了HEK293T细胞作为MRSA感染模型的真核细胞。这类细胞来自人类胚胎肾细胞,具有稳定的繁殖能力和较高的转染率,被广泛应用于细胞生物学研究。本研究重组完成的所有真核

pVAX1质粒可在HEK293T细胞中表达。在这项研究中,pVAX1/hBD3、pVAX1/hBD3-CBD1和pVAX1/hBD3-CBD2质粒能抑制HEK293T细胞中的MRSA感染,显示了这些真核表达的抗菌肽质粒作为一种抗感染药物具有一定的应用前景。

本研究中,pVAX1/hBD3、pVAX1/hBD3-CBD1和pVAX1/hBD3-CBD2质粒转染的细胞和阴性对照(pVAX1转染细胞)相比,对MRSA N315生长具有显著的抑制作用。在感染12小时,质粒pVAX1/hBD3-CBD1、pVAX1/hBD3-CBD2组的抑菌能力高于pVAX1/hBD3组。抗菌肽和敏感细菌病原体间的亲和力在其相互作用中至关重要。CBD结构域类似于肽聚糖结合蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRP),可以与细菌细胞壁的糖链相互作用,有利于在细菌局部形成较高有效浓度的抗菌肽^[20]。因此,用CBD结合抗菌肽可能增强后者的潜在生物学活性。有研究发现,阻断肽结合域的hBD3的抑菌能力被抑制,这从另一个角度表明CBD在hBD3识别蛋白质中起着非常重要的作用^[21]。肽聚糖是细菌细胞壁的最丰富的组成成分,这种成分在人类细胞中不存在^[22]。因此,在今天“后抗生素时代”开发新的抗菌试剂时,有必要给予肽聚糖识别蛋白(如在本研究中的CBD)更多的关注。

本研究以IL-6浓度测定来表示各组细胞发生的炎症反应。IL-6在炎症部位产生,并在急性炎症反应期中起关键作用^[23]。通常认为IL-6是一种重要的炎症因子,本研究中,IL-6是由MRSA N315感染的HEK293T细胞所分泌的,是哺乳动物上皮细胞产生免疫反应的关键因子。结合其他研究^[24, 25]可以认为,本研究中所用的抗菌肽可以减少实验细胞感染后的应激反应,起到抑制细菌感染的作用。

本文结果显示,将hBD3基因导入体细胞可能提供一种新的可用于其他疾病如顽固性传染疾病的基因治疗策略^[26]。目前,包括hBD3在内的抗菌肽在感染性疾病、自身免疫性疾病^[27]乃至肿瘤^[28]治疗中的作用均有新的发现。我们认为,抗菌肽最有潜力的治疗候选之一是皮肤和软组织感染。本文结果表明真核表达的hBD3等抗菌肽对皮肤细胞的MRSA感染具有一定的抑制作用。同时,真核表达的抗菌肽的低分子量和高抑菌效果对未来应用研究提供了良好的可行性和广泛的实用性。

重组和融合技术是疫苗和其他生物制剂研发的基本技术方法。这些方法可以增加和融合不同来源、具有不同功能的不同成分。目前,虽有一些抗菌肽已经进入临床试验,但美国食品和药物管理局还没有批准任何融合抗菌肽用于局部或全身的

医学治疗^[29],从抗菌肽的实验室研究和临床研究结果到将其推送临床,还有相当多的工作要做。

参考文献(References)

- [1] Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46 (Suppl 5): S344
- [2] Klein EY, Sun L, Smith DL, et al. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a national observational study[J]. Am J Epidemiol, 2013, 177(7): 666
- [3] Tavares LS, Silva CS, de Souza VC, et al. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides[J]. Front Microbiol, 2013, 4: 412
- [4] Guilhemelli F, Vilela N, Albuquerque P, et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance[J]. Front Microbiol, 2013, 4: 353
- [5] Lippross S, Klueter T, Steubesand N, et al. Multiple trauma induces serum production of host defence peptides[J]. Injury, 2012, 43(2): 137
- [6] Eckert JK, Kim YJ, Kim JI, et al. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity[J]. Immunity, 2013, 39(4): 647
- [7] Tsutsui S, Tasumi S, Suetake H, et al. Carbohydrate-binding site of a novel mannose-specific lectin from fugu (*Takifugu rubripes*) skin mucus[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006, 143(4): 514
- [8] Sherif S, Chang CY, Ezekowitz RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil[J]. Nat Struct Biol, 1994, 1(11): 789
- [9] Wang LN, Yu B, Han GQ, et al. Design, expression and characterization of recombinant hybrid peptide Attacin-Thanatin in *Escherichia coli*[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(7): 3495
- [10] Li QT, Zhu YZ, Chu JY, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor DNA prime-protein boost strategy to enhance efficacy of a recombinant pertussis DNA vaccine [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(11): 1487
- [11] Ishimoto H, Mukae H, Date Y, et al. Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia [J]. Eur Respir J, 2006, 27(2): 253
- [12] Yi N, Li N. Transient expression of chicken antimicrobial peptides by mouse mammary carcinoma cells C127 [J]. Protein Pept Lett, 2010, 17(12): 1517
- [13] Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections[J]. Biopolymers, 2005, 80(6): 717
- [14] Haney EF, Hancock RB. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications[J]. Biopolymers, 2013, 100(6): 572
- [15] Fedders H, Podschun R, Leippe M. The antimicrobial peptide Ci-MAM-A24 is highly active against multidrug-resistant and anaerobic bacteria pathogenic for humans [J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(3): 264
- [16] Guillen D, Sanchez S, Rodriguez-Sanoja R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(5): 1241
- [17] Dziarski R, Kashyap DR, Gupta D. Mammalian peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating two-component systems and modulate microbiome and inflammation[J]. Microb Drug Resist, 2012, 18(3): 280
- [18] Tam JP, Lu YA, Yang JL. Antimicrobial dendrimeric peptides[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(3): 923
- [19] Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines [J]. Mol Immunol, 2007, 44(12): 3100
- [20] Someya S, Kakuta M, Morita M, et al. Prediction of carbohydrate-binding proteins from sequences using support vector machines [J]. Adv Bioinformatics, 2010: 289301
- [21] Kisich KO, Howell MD, Boguniewicz M, et al. The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3 [J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(10): 2368
- [22] Chang CI, Deisenhofer J. The peptidoglycan recognition proteins LCa and LCx[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(11): 1395
- [23] Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation [J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8 (Suppl 2): S3
- [24] Gunther J, Esch K, Poschadel N, et al. Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha [J]. Infect Immun, 2011, 79(2): 695
- [25] Haisma EM, Rietveld MH, de Breij A, et al. Inflammatory and antimicrobial responses to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound infection model [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82800
- [26] Suzuki Y, Inokuchi S, Takazawa K, et al. Introduction of human beta-defensin-3 into cultured human keratinocytes and fibroblasts by infection of a recombinant adenovirus vector [J]. Burns, 2011, 37(1): 109
- [27] Kaneda Y, Yamaai T, Mizukawa N, et al. Localization of antimicrobial peptides human beta-defensins in minor salivary glands with Sjogren's syndrome[J]. Eur J Oral Sci, 2009, 117(5): 506
- [28] Wang K, Wang JH, Baskaran H, et al. Effect of human beta-defensin-3 on head and neck cancer cell migration using micro-fabricated cell islands[J]. Head Neck Oncol, 2012, 4: 41
- [29] Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs[J]. Curr Eye Res, 2005, 30(7): 505