

## 摘要

人  $\alpha$ -防御素 5 (Human defensin 5, HD5) 作为宿主先天免疫和适应性免疫的效应分子, 因具有抗多种微生物感染、抑制肿瘤增殖和免疫调节等活性而受到广泛关注。然而, HD5 分子内的 3 对二硫键大大增加了其化学合成的难度和费用, 从而限制了 HD5 的临床应用。因此, 本研究对 HD5 进行原核表达, 同时从增强 HD5 生物活性的角度出发, 对 HD5 进行分子改造。

有研究显示, HD5 发挥宿主免疫保护作用的同时, 会促进病毒感染。本研究从增强 HD5 生物活性的角度出发, 将 HD5 蛋白分子中促进病毒感染的关键氨基酸突变为正电荷氨基酸, 即第 19 位缬氨酸和第 29 位亮氨酸均突变为精氨酸并命名为 mHD5, 并通过原核表达的方式制备重组表达蛋白 rmHD5。重组 HD5 蛋白同样采用原核表达制备并命名为 rHD5。对 rHD5 和 rmHD5 进行活性分析, 包括结合新冠病毒受体结合基序 (Receptor binding motif, RBM) 活性、抑菌活性、抗氧化活性和溶血活性。Pull down 实验表明 rHD5 可结合新冠病毒及其变体的刺突蛋白受体结合基序。通过微量热涌动 (Microscale thermophoresis, MST) 检测 rHD5 和 rmHD5 分别结合德尔塔株新冠病毒刺突蛋白的受体结合基序 (Delta-RBM) 和奥密克戎株新冠病毒刺突蛋白受体结合基序 (Omicron-RBM) 的能力, 结果表明重组 rmHD5 结合 Delta-RBM 和 Omicron-RBM 的能力均强于 rHD5。rmHD5 结合 Delta-RBM 的能力比 rHD5 增强 9 倍, rmHD5 结合 Omicron-RBM 的能力比 rHD5 增强了 45%, 但 rmHD5 与 Omicron-RBM 二者之间仅存在微摩尔级别的结合。与 Delta-RBM 相比, rHD5 结合 Omicron-RBM 的能力降低 31 倍, 我们推测可能是由于新冠病毒向逃逸宿主防御的方向突变, 导致奥密克戎株新冠病毒与带高度负电荷的血管紧张素转换酶 (Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE2) 的结合增强以及与正电性的 HD5 结合减弱。已有的研究表明 HD5 主要通过静电作用结合高度糖基化的 ACE2 受体, 我们推测 mHD5 会增强结合 ACE2 的能力。因此, 我们通过 Hawdock 网站对 mHD5 与 ACE2 的结合能力进行预测。首先将野生型 HD5 (PDB: 1ZMP) 突变为 mHD5, 拉氏图显示 mHD5 中所有氨基酸均处于合理范围内, 表明 mHD5 的结构合理。使用 PyMOL 软件比对 HD5 和 mHD5 的结构, 结果显示二者具有相似的三维结构, 且 mHD5 具有稳定的二聚体结构。通过 Hawdock 在线网站对 HD5 及

mHD5 单体与 ACE2 进行对接后经 MM/GBSA 动力学分析发现，与 HD5 相比，mHD5 与 ACE2 的结合能力更强，推测 rmHD5 可能具有更强的抑制新冠病毒感染的能力。在抑菌方面，rHD5 和 rmHD5 对受试的革兰氏阴性菌均具有一定的抑菌活性。其中 rmHD5 对耐卡那霉素的弗格森埃希菌 (*Escherichia fergusonii*)，奇异变形杆菌 (*Bacillus mirabilis*)，铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的抑制能力强于 rHD5，但对肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的抑制能力与 rHD5 相比稍有减弱。在抗氧化能力方面，rHD5 和 rmHD5 对 1,1-二苯基-2,2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 和 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 自由基均有较强的清除能力，且二者对 DPPH 自由基的清除效果呈浓度依赖性，在浓度为 17.5  $\mu\text{M}$  时，rHD5 和 rmHD5 对 DPPH 的清除率分别为 85.66% 和 88.53%，而对 ABTS 自由基的清除率均在 99.4% 以上。溶血性检测显示，在抗氧化检测的最大浓度 17.5  $\mu\text{M}$  时，rHD5 和 rmHD5 对小鼠红细胞表现出极低的溶血活性，表明二者均具有良好的安全性。

本研究对 rHD5 及 rmHD5 结合新冠病毒受体结合基序活性、抑菌活性、抗氧化活性及溶血性进行检测。结果显示，rHD5 和 rmHD5 均具有良好的生物活性和安全性。且与 rHD5 相比，本研究获得的 rmHD5 具有显著增强的生物活性，为其在化妆品，食品保鲜，免疫制剂等产品中的应用提供理论支持。

**关键词：**HD5，突变体，原核表达，活性分析

# 目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
目录.....	V
缩略词表.....	VII
1 前言.....	1
1.1 防御素概述.....	1
1.2 人防御素 5 概述.....	2
1.2.1 HD5 在细菌感染中的作用.....	3
1.2.2 HD5 在病毒感染中的作用.....	5
1.2.3 HD5 的免疫调节作用.....	6
1.2.4 HD5 在肿瘤发展中的作用.....	7
1.2.5 HD5 的修饰与改造.....	8
1.2.6 HD5 等防御素的原核表达.....	9
1.3 研究背景及意义.....	10
2 材料与方法.....	11
2.1 实验材料和仪器.....	11
2.1.1 实验菌种.....	11
2.1.2 质粒.....	11
2.1.3 分析网站及软件.....	11
2.1.4 实验试剂.....	12
2.1.5 实验常用溶液配制.....	13
2.1.6 实验仪器.....	14
2.2 实验方法.....	15
2.2.1 引物设计.....	15
2.2.2 基因扩增.....	15
2.2.3 琼脂糖凝胶电泳.....	16
2.2.4 目的基因胶回收.....	16
2.2.5 质粒双酶切.....	17
2.2.6 载体酶切后纯化回收.....	17
2.2.7 目的基因与线性化载体连接.....	18
2.2.8 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞.....	18
2.2.9 菌液 PCR 检测.....	18
2.2.10 重组质粒提取.....	19
2.2.11 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞.....	20
2.2.12 重组蛋白原核表达.....	20
2.2.13 重组蛋白纯化.....	20
2.2.14 GST pull down 实验.....	22
2.2.15 微量热涌动检测结合能力.....	23
2.2.16 抑菌活性检测.....	23
2.2.17 DPPH 自由基清除能力检测.....	24

2.2.18 ABTS+自由基清除能力检测.....	24
2.2.19 溶血活性分析.....	24
3 结果与分析.....	27
3.1 原核表达载体的构建.....	27
3.2 重组蛋白的诱导表达.....	29
3.3 rHD5 及 rmHD5 在新冠病毒感染中的作用.....	31
3.3.1 rHD5 结合多种新冠病毒的受体结合基序.....	31
3.3.2 rHD5 及 rmHD5 与新冠病毒 RBMs 的亲合力检测.....	31
3.3.3 mHD5 生物信息学分析.....	34
3.4 rHD5 及 rmHD5 蛋白具有抑菌活性.....	36
3.5 rHD5 及 rmHD5 蛋白具有良好的抗氧化活性.....	37
3.5.1 rHD5 及 rmHD5 具有较强的 DPPH 自由基清除活性.....	37
3.5.2 rHD5 及 rmHD5 具有较强的 ABTS 自由基清除活性.....	38
3.6 rHD5 及 rmHD5 溶血活性分析.....	39
4 讨论.....	41
4.1 防御素的制备方式.....	41
4.2 rHD5 及 rmHD5 的生物活性.....	41
4.3 rHD5 及 rmHD5 的安全性.....	43
5 结论.....	45
参考文献.....	47
致谢.....	55

## 缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
G-	Gram-negative bacteria	革兰氏阴性菌
G+	Gram-positive bacteria	革兰氏阳性菌
OD	Optical density	吸光度
CD	Crohn's disease	克罗恩病
VC	Vitamin C	抗坏血酸
PT	Pertussis toxin	百日咳毒素
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MST	Microscale thermophoresis	微量热涌动
RBM	Receptor binding motif	受体结合基序
HD5	Human defensin 5	人 $\alpha$ 防御素 5
HD6	Human defensin 6	人 $\alpha$ 防御素 6
HNP1	Human Neutrophil Peptide-1	人中性粒细胞防御素-1
HNP2	Human Neutrophil Peptide-2	人中性粒细胞防御素-2
HNP3	Human Neutrophil Peptide-3	人中性粒细胞防御素-3
HNP4	Human Neutrophil Peptide-4	人中性粒细胞防御素-4
MMP7	Matrix metalloproteinase 7	基质金属蛋白酶 7
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2	血管紧张素转换酶 2
Tcd A	Clostridium difficile toxin A	艰难梭菌肠毒素
Tcd B	Clostridium difficile toxin B	艰难梭菌细胞毒素
<i>E. coil</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	金黄色葡萄球菌
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	1, 1 - 二苯基 - 2 - 三硝基苯肼
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2, 2 - 联氮 - 二 (3 - 乙基 - 苯并噻唑 - 6 - 磺酸)

# 1 前言

## 1.1 防御素概述

防御素是指 2-5 kDa 大小的富含半胱氨酸的阳离子短肽，广泛存在于植物，昆虫和哺乳动物中。1980 年，Lehrer 和他的同事从兔肺巨噬细胞分离出来第一个哺乳动物防御素<sup>[1]</sup>。1985 年，Lehrer 将防御素定义为哺乳动物来源的，由二硫键稳定且具有广泛抗菌、真菌和病毒活性的中性粒细胞同源肽<sup>[2, 3]</sup>。

防御素家族包含三个不同的种类： $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\theta$ -防御素。虽然 $\alpha$ -和 $\beta$ -防御素在人类和其他哺乳动物中都有表达，但 $\theta$ -防御素只存在于非人类灵长类动物中，如恒河猴和橄榄狒狒<sup>[4, 5]</sup>。到目前为止，已经鉴定出六种人 $\alpha$ -防御素，根据基因组成和来源的不同， $\alpha$ -防御素又被分为人中性粒细胞多肽 1-4（HNP1、HNP2、HNP3 和 HNP4）和人肠防御素 5-（HD5 和 HD6）<sup>[6, 7]</sup>。HNP1-3 富含半胱氨酸、精氨酸和芳香族残基，在中性粒细胞的嗜天青颗粒中含量丰富，占总颗粒蛋白的 30%-50%<sup>[3, 8]</sup>。HNP4 含有 33 个氨基酸，与 HNP1-3 具有结构相似性和相同的半胱氨酸框架。然而，HNP4 与 HNP1-3 在氨基酸序列上存在显著差异，这也导致了它们在功能上的显著差异<sup>[9]</sup>。肠源性防御素 HD5 和 HD6 主要在肠道潘氏细胞中表达<sup>[10, 11]</sup>。在健康女性阴道液、鼻腔、支气管上皮细胞、化生潘氏细胞也检测到了 HD5 的表达<sup>[12-14]</sup>。尽管髓源性和肠源性 $\alpha$ -防御素具有不同的残基组成，但它们具有保守的二硫键骨架和相似的三维结构<sup>[15]</sup>（图 1-1）。

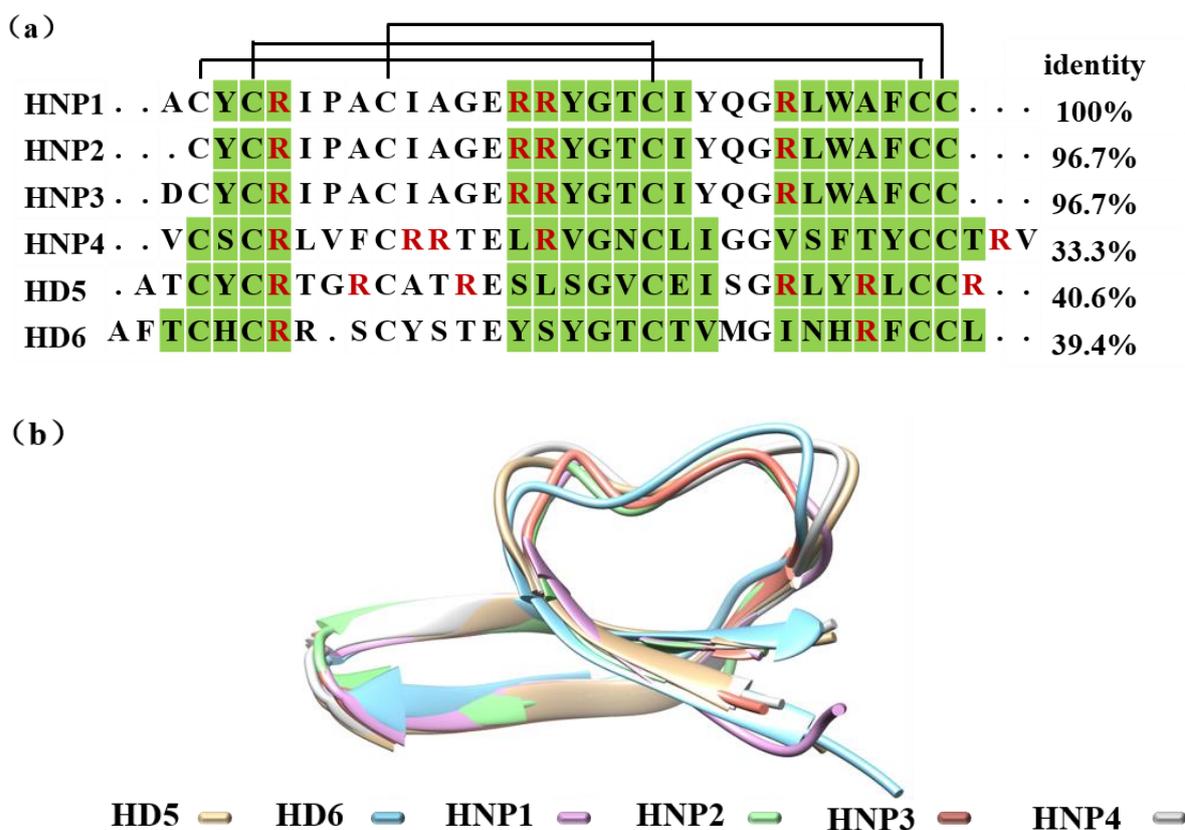


图 1-1 6 种人  $\alpha$ -防御素的序列比对<sup>[16]</sup>和结构比对

Figure 1-1 Sequence and structure comparison of six human alpha-defensins

6 种人  $\alpha$ -防御素具有保守的二硫键和相似的三维结构。(a) 精氨酸用红色字母显示，参与形成二硫键的氨基酸用绿色背景显示，二硫键用黑色线条标注，右侧为以 HNP1 为参照，6 种  $\alpha$ -防御素的序列相似性；(b) 6 种人  $\alpha$ -防御素具有相似的三维结构。HNP1 (PDB: 2PM1)，G16<sup>D</sup>A-HNP2 (1ZMH)，HNP3 (1DFN)，HNP4 (1ZMM)，HD5 (1ZMP)，HD6 (1ZMQ)。

## 1.2 人防御素 5 概述

HD5 是一种由小肠隐窝基底部的潘氏细胞 (Paneth cell, PC) 组成型分泌的广谱性宿主防御肽<sup>[17,18]</sup>。HD5 的成熟肽由 32 个氨基酸残基组成，富含精氨酸和半胱氨酸，在生理 pH 下带 4 个正电荷，其氨基酸序列中 6 个半胱氨酸形成 3 对二硫键，其成键方式为 C1-C5，C2-C4，C3-C6，且空间上呈  $\beta$ -片层样结构。HD5 以前肽的形式储存在分泌小泡中，并被 Paneth 细胞胰蛋白酶切割<sup>[12]</sup>。而其同系物小鼠防御素由基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase 7, MMP7) 加工，并以加工后的形式储存在潘氏细胞颗粒中<sup>[19]</sup>。HD5 广谱抗菌、抗病毒，抑制肿瘤增殖以及免疫调节的能力奠定了其作为宿主关键免疫效应分子的基础。

### 1.2.1 HD5 在细菌感染中的作用

HD5 通过多种机制抑制细菌感染（图 1-2）。Furci 等发现，肠道生理浓度范围内的 HD5 可以导致大量艰难梭菌细胞损伤<sup>[20]</sup>。此外，HD5 转基因小鼠对致死剂量的鼠伤寒沙门氏菌的口服攻击具有显著抗性<sup>[21]</sup>。在溶液中，HD5 中存在多种寡聚状态，四聚体是溶液中最稳定的形式，而二聚体被证明是溶液中最活跃的形式<sup>[22-24]</sup>。除寡聚状态外，阳离子残基、二硫键以及手性也是影响 HD5 抗菌活性的重要因素<sup>[25-28]</sup>。HD5 的一种可能的杀菌机制是通过造孔和膜渗透破坏膜<sup>[29]</sup>，已有研究显示，HD5 具有中和细菌脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）的能力<sup>[30, 31]</sup>。Awang 等通过计算在原子水平上揭示了 HD5 吸附到 LPS 膜表面的机理<sup>[32]</sup>。为了展示蛋白质渗透和膜孔形成的微观信息，研究人员采用转向分子动力学解释了二聚体 HD5 在 LPS 膜上穿孔通过的机制。HD5 上的精氨酸与脂质头部基团（LPS 的顶部）相互作用，然后将这些带电部分拖入疏水核心，导致形成充满水的孔隙，精氨酸-脂质 A 头部基团相互作用在延缓 HD5 通过中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。Jung 等采用全原子分子动力学模拟和分子力学泊松-玻尔兹曼表面积分析 HD5 与革兰氏阴性细菌内膜的内在结合证明了 HD5 破坏细菌细胞膜的机制<sup>[34]</sup>。Awang 及其同事使用脂质 A3-脱氧-d-甘露糖-辛酮酸（3-deoxy-d-manno-octulosonic acid, KDO）作为膜模型进行分子动力学研究了 HD5 与细菌膜轴上五个位置的结合机制。精氨酸是 KDO（即内外小叶的磷酸盐）紧密结合的关键成分<sup>[35]</sup>。HD5 对革兰氏阳性菌的抗菌效果比革兰氏阴性菌强。膜破坏机制是 HD5 抑制革兰氏阴性菌被广泛接受的观点，而革兰氏阳性菌（Gram-positive bacteria, G+）的细胞壁远比革兰氏阴性菌（Gram-negative bacteria, G-）细胞壁厚很多，HD5 对 G-的膜破坏机制似乎不适用于 HD5 抑制 G+。对其他防御素的研究显示，越来越多的人认为防御素通过靶向 G+脂质 II 抑制细菌细胞壁合成<sup>[36-38]</sup>。

HD5 的抗菌效果具有菌株特异性。HD5 对大肠杆菌的抑制是非结构依赖的，但非结构性的 HD5 对金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*）的抑制作用大为减弱<sup>[39]</sup>。HD5 对 *S. aureus* ATCC 29213 菌株的抑菌效果强于 *S. aureus* ATCC 25923<sup>[40]</sup>。这些差异可能反映了防御素和不同微生物膜成分之间的结合差异。HD5 抑菌作用对离子强度的敏感性可能与细菌的膜结构有关，HD5 对金黄色葡萄球菌的抑制作用和对离子强度的敏感性低于大肠杆菌<sup>[27]</sup>，这可能由于 HD5 的革兰氏阴性菌 LPS 的静电作用受到

阳离子的干扰。克罗恩疾病 (Crohn's disease, CD) 患者回肠滤泡相关上皮粘附侵袭性大肠杆菌 *E. coli* LF82 与 HD5 之间存在拮抗作用<sup>[39]</sup>, CD 患者潘氏细胞  $\alpha$ -防御素的表达及加工受损<sup>[41-43]</sup>, 这可能破坏了 HD5 与肠道共生菌群的平衡从而导致粘膜屏障受损。

HD5 还可以通过抑制细菌毒素来影响感染。Giesemann 等表明 HD5 与艰难梭菌细胞毒素 (Clostridium difficile toxin B, Tcd B) 高亲和力结合抑制其活性, 而不抑制艰难梭菌肠毒素 (Clostridium difficile toxin A, Tcd A) 细胞毒性<sup>[44]</sup>。Fischer 等发现 HD5 不仅能有效抑制 Tcd B, 还可以抑制 Tcd A 和艰难梭菌二元毒素的细胞毒性<sup>[45]</sup>。这种差异可能是由于后者使用 HD5 重组蛋白, 而前者使用含杂蛋白的细胞提取物, 杂质蛋白的广泛结合影响了 HD5 与 Tcd A 的结合。百日咳杆菌中的百日咳毒素 (Pertussis toxin, PT) 介导百日咳杆菌对活细胞环磷酸腺苷信号的干扰, 而 HD5 处理降低了这种影响<sup>[46]</sup>。除了对毒素的中和作用, HD5 可以通过促进热不稳定毒素的解折叠, 提高毒素对蛋白水解酶的敏感性<sup>[47]</sup>。PT 的酶亚单位也是热不稳定的, 这是其从内质网运输到胞质溶胶的必要条件<sup>[48]</sup>, 由防御素介导的去折叠增加可能是另一种抑制机制。此外, 李斯特菌溶血素以胆固醇依赖的方式介导溶血, 这种作用也可以被 HD5 抑制<sup>[49]</sup>。

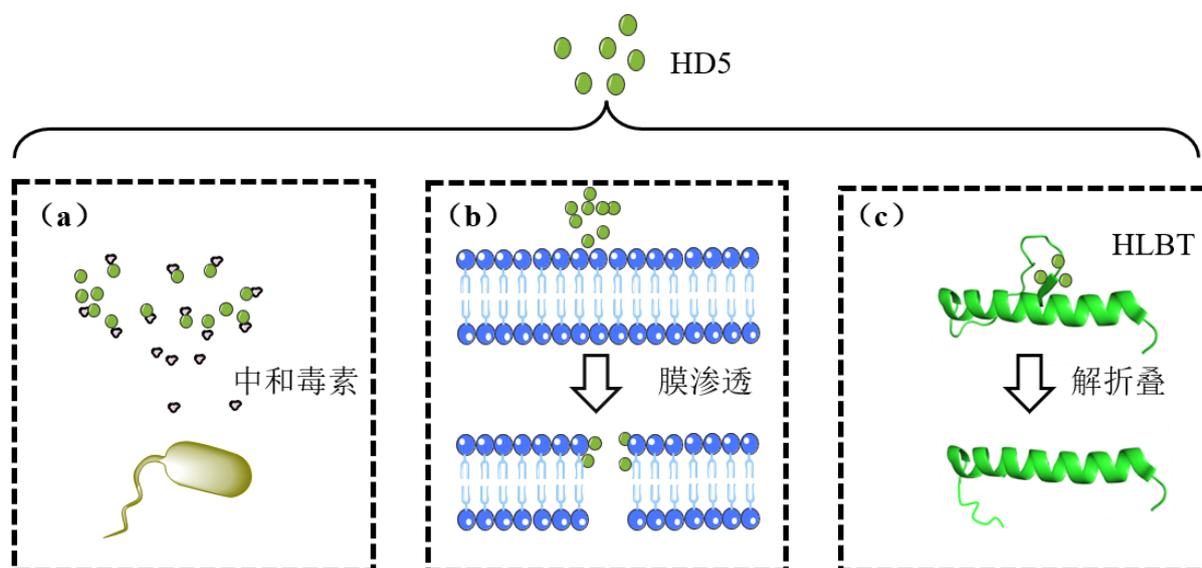


图 1-2 HD5 在细菌感染中的作用<sup>[33, 47, 50]</sup>

Figure 1-2 Role of HD5 in bacterial infection

HD5 通过多种机制抑制细菌感染, (a) HD5 可直接中和细菌毒素; (b) HD5 可在细菌细胞膜上造孔导致细胞内容物渗漏; (c) HD5 可通过促进热不稳定毒素 (HLBT) 解折叠从而提高 HLBT 对蛋白水解酶的敏感性。

## 1.2.2 HD5 在病毒感染中的作用

HD5 是皮肤和粘膜乳头瘤病毒感染的有效拮抗剂，其通过从内体小泡逃逸而不是阻断病毒颗粒结合或内化的方式阻断病毒感染<sup>[51]</sup>。与皮肤乳头瘤病毒相比，生殖器型人乳头瘤病毒对 HD5 的抑制更为敏感<sup>[52]</sup>。HD5 以剂量依赖性地方式与病毒结合，稳定衣壳并减少内质网转运来阻断 JC 多瘤病毒感染<sup>[53]</sup>，但不影响病毒与宿主细胞的附着。尽管 JC 多瘤病毒与 BK 多瘤病毒具有高度的序列一致性，但是它们与 HD5 的结合机制不同。HD5 对 BK 多瘤病毒的抑制不是通过稳定衣壳而是通过聚集病毒粒子并抑制其与宿主细胞受体的结合来实现的<sup>[54]</sup>。两种高度相似的病毒被 HD5 以不同机制抑制的原因可能是着两种多瘤病毒附着细胞的受体不同。Wiens 等发现 HD5 处理会阻断 16 型人乳头瘤病毒 (Human papilloma virus-16, HPV-16) 弗林酶切割和次要衣壳蛋白 L2 上 RG-1 表位的暴露，推测可能是 HD5 结合 L1 在空间上阻碍了弗林酶进入 L2 上的切割位点，从而导致人乳头瘤病毒假病毒颗粒滞留在体内<sup>[55]</sup>。在 HPV-16 的感染过程中，HD5 处理使病毒衣壳蛋白免于降解，并且 HD5 可以改变病毒衣壳和基因组在早期内涵体下游的运输，将进入细胞的病毒基因组和衣壳从反式高尔基体运输至溶酶体<sup>[56]</sup>。腺病毒也能被包膜病毒中和<sup>[57-60]</sup>，Nguyen 等开发了评估腺病毒进入细胞过程中脱壳动力学的方法，揭示了 HD5 阻断人病毒脱壳和基因组暴露，病毒在溶酶体中积累是脱壳失败的结果<sup>[61]</sup>。腺病毒对 HD5 的敏感是种属特异性的，腺病毒-A, -B1, -B2, -C, 和-E 类型对 HD5 的中和敏感，而-D 和 -F 腺病毒型对 HD5 的中和具有抗性<sup>[57, 60]</sup>。通过解析 HD5 与防御素敏感性和抗性腺病毒的复合物结构发现，HD5 与腺病毒衣壳的六邻体蛋白的多个柔性区域结合，在六邻体顶部观察到最强的 HD5 密度。由于 HD5 敏感型嵌合体的五邻体碱基的内在无序性，无法获得高精度的复合物结构，分子动力学模拟表征了 HD5 二聚体在稳定五邻体碱基和纤维之间结合的作用，这种稳定作用可以防止尾丝蛋白释放从而稳定衣壳<sup>[58]</sup>。

对于包膜病毒，HD5 可以阻断单纯疱疹病毒感染的多个步骤，HD5 是唯一在病毒结合、穿透和细胞进入后的步骤都参与有效阻断单纯疱疹病毒感染的  $\alpha$ -防御素<sup>[62]</sup>。HD5 还可以通过与单纯包疱疹病毒 DNA 结合影响病毒基因组的复制和转录<sup>[62]</sup>。此外，HD5 可以以剂量依赖的方式抑制巨细胞病毒感染，而在病毒进入后加入 HD5 没有显著的抑制作用，表明 HD5 抑制巨细胞病毒附着和进入<sup>[63]</sup>。HD5 对新冠病毒的感染抑制也

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/526131143052011010>