

大鼠 β -防御素 2 真核表达载体构建及转染大鼠角膜上皮细胞的研究

但 婧^{1,2}, 宋秀胜², 杨燕宁¹, 李 霞²

基金项目:湖北省卫生和计划生育科研项目(No. WJ2015MB194)
作者单位:¹(430060)中国湖北省武汉市,武汉大学人民医院眼科中心;²(445000)中国湖北省恩施市,恩施自治州中心医院眼科中心

作者简介:但婧,博士研究生,研究方向:眼表疾病。

通讯作者:宋秀胜,毕业于武汉大学,博士,主任医师,研究方向:眼表疾病. aep993@126.com

收稿日期:2016-10-24 **修回日期:**2017-02-20

Construction of rat beta defensin - 2 eukaryotic expression vector and expression in the transfected rat corneal epithelial cell

Jing Dan^{1,2}, Xiu-Sheng Song², Yan-Ning Yang¹, Xia Li²

Foundation item: Health and family planning research project of Hubei province (No. WJ2015MB194)

¹Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China

Correspondence to: Xiu - Sheng Song. Department of Ophthalmology, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China. aep993@126.com

Received:2016-10-24 Accepted:2017-02-20

Abstract

• **AIM:** To construct a recombinant eukaryotic expression vector of rat beta defensin-2 (rBD-2), transfect it into the rat corneal epithelial cells with lipofection, determine the expression of target gene in the transfected cells, and discuss the potentiality of recombinant plasmid expressed in corneal epithelial cells, hoping to provide an experimental foundation for further study on the antimicrobial activity of rBD-2 *in vitro* and *in vivo* and to assess the probability of defensins as a new application for infectious corneal diseases in the future.

• **METHODS:** The synthetic rBD-2 DNA fragment was inserted between the *XhoI* and *BamHI* restriction enzyme cutting sites of eukaryotic expression vector pIRES2-ZsGreen1 to construct the recombinant plasmid pIRES2-ZsGreen1-rBD-2, then transformed it into *E. coli* DH5 α , positive clones were screened by kanamycin and identified with restriction endonucleases and sequencing analysis. Transfection into the rat corneal epithelial cells was performed by lipofection. Then the experiment was

divided into three groups: rat corneal epithelial cell was transfected with the recombinant plasmid pIRES2-ZsGreen1-rBD-2, rat corneal epithelial cell was transfected with the empty plasmid pIRES2-ZsGreen1 and the non-transfected group. The inverted fluorescence microscope was used to observe the transfection process. At last, the level of rBD-2 mRNA expressed in the transfected cells and the control groups are compared by the real-time fluorescence relative quantitative PCR.

• **RESULTS:** The recombinant eukaryotic expression vector of pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 was successfully constructed. The level of rBD-2 mRNA in transfected cells was significantly higher than that in control groups through the real-time fluorescence relative quantitative PCR.

• **CONCLUSION:** The recombinant eukaryotic expression vector pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 could be transfected into rat corneal epithelial cells, and exogenous rBD-2 gene could be transcribed into mRNA in the transfected cells.

• **KEYWORDS:** rat beta defensin - 2; eukaryotic expression vector; recombinant plasmid; rat corneal epithelial cell

Citation: Dan J, Song XS, Yang YN, *et al.* Construction of rat beta defensin-2 eukaryotic expression vector and expression in the transfected rat corneal epithelial cell. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(3):422-426

摘要

目的:应用基因工程技术构建含大鼠 β -防御素2(rat beta defensin 2, rBD-2)目的基因的真核重组质粒,通过脂质体法转染大鼠角膜上皮细胞,检测目的基因在转染细胞中的表达,探讨应用该载体获得重组 rBD-2 在眼表细胞中表达的可行性,并为进一步研究 rBD-2 的体内外抗微生物活性提供实验基础,以期对感染性角膜病防治提供新方法。

方法:将采用 PAS(PCR-based Accurate Synthesis)的方法合成 rBD-2 DNA 片段连接到真核表达载体 pIRES2-ZsGreen1 的 *XhoI*与 *BamH I* 酶切位点之间,构建 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 真核重组表达载体,重组质粒转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,卡那霉素筛选出阳性克隆子,经酶切、测序鉴定重组载体构建成功后,采用脂质体法转染大鼠角膜上皮细胞,此处实验分为三组即重组载体 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 转染的大鼠角膜上皮细胞组、未转染的空细胞组以及空载体 pIRES2-ZsGreen1 所转染的大鼠角膜上皮细胞组,在倒置荧光显微镜下观察细胞

转染情况,最后经实时荧光定量 RT-PCR 相对定量法检测各组转染细胞中 rBD-2 基因 mRNA 的表达差异。

结果:成功构建 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 真核重组质粒,应用实时荧光定量 RT-PCR 相对定量法检测到重组质粒 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 转染组的大鼠角膜上皮细胞中 rBD-2 基因的 mRNA 表达水平明显多于另两组。

结论:应用基因工程技术构建的 rBD-2 真核表达载体 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2,通过脂质体法转染大鼠角膜上皮细胞,能够使外源 rBD-2 基因在大鼠角膜上皮细胞中被转录成 mRNA。

关键词:大鼠 β -防御素 2;真核表达载体;重组质粒;大鼠角膜上皮细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.3.8

引用:但婧,宋秀胜,杨燕宁,等.大鼠 β -防御素 2 真核表达载体构建及转染大鼠角膜上皮细胞的研究.国际眼科杂志 2017; 17(3):422-426

0 引言

防御素是动植物及昆虫体内具有的一种古老的、对多种致病微生物有高效杀伤作用的阳离子多肽^[1]。哺乳动物的防御素可分 α 、 β 、 θ 三类^[2],人体中第一个发现的可被诱导性表达的防御素是 hBD-2^[3],细菌产物(如脂多糖、磷壁酸等)、真菌、创伤、炎性介质(如 IL-1 β 、TNF- α 等)等通过 NF- κ B 和 AP-1 所介导的信号传导通路来诱导 hBD-2 的表达^[4-6]。大鼠 β 防御素 2 (rat beta defensin 2, rBD-2) 是 hBD-2 的同源体^[7]。

本实验通过基因工程技术构建 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 真核表达载体,通过脂质体法转染大鼠角膜上皮细胞,应用实时荧光定量 RT-PCR 技术相对定量法比较实验组与对照组转染细胞中 rBD-2 目的基因在 mRNA 表达量上的差异,探讨应用该载体获得重组 rBD-2 在角膜上皮细胞表达的可能性,并为进一步研究 rBD-2 体内外抗微生物活性提供实验基础,以期为感染性角膜病防治提供新方法。

1 材料和方法

1.1 材料 原代大鼠角膜上皮细胞(武汉普诺赛 Procell),大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(Takara),pIRES2-ZsGreen1 真核表达质粒载体(Clontech),Biowest 琼脂糖(西班牙),6 \times DNA 上样缓冲液(上海碧云天),溴化乙锭 EB(Sigma),10 \times TAE 缓冲液、焦碳酸二乙酯 DEPC(Amersco),薄型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(GENERAY Biotechnology),小规模质粒提取试剂盒(北京天根),金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒(康为世纪),DMEM/F12 液体培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、PBS 缓冲液(Hyclone),优级胎牛血清(杭州四季青),Opti-MEM 培养基(GIBCO),LipofectamineTM2000(Invitrogen),T4 DNA Ligase、RNAiso Plus、DL2000 DNAMarker(Takara),Xho I 酶、BamH I 酶及相应 buffer、SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix 2 \times (Fermentas),All-in-one First-strand cDNA synthesis kit(Genecopoeia),余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 rBD-2 的合成 根据从 NCBI 基因库中获取的 rBD-2 基因的 mRNA 序列(216bp),采用 PAS (PCR-based Accurate Synthesis)法合成基因 rBD-2 双链

DNA 序列,序列的 5' 端加上 XhoI 酶切位点(CTCGAG)和 Kozark 序列(GCCACC,是用来增强真核基因的翻译效率),3' 端加上 BamHI 酶切位点(GGATCC)。目的基因合成过程由金斯瑞生物科技公司完成,设计序列含 234 个核苷酸,如下所示:CTCGAGGCCACCATGAGGACTCTCTGCTCTCTGCTGCTGATAGGCTGCCTCCTTTTCTCCTATGCCA CTCCGGTTGCTGGAATTCTAGGACCTCTTCGAATACAAAC AGATTATCATCGATGTCTAAGAGAGAAAGGGTTCTGTCTC AATGCTGTTTGTCTCCTCGTTCTACCTTGTGTTGTGGGTACCTG TTTCCCATACAAGTTCTACTGTTGCAAGTTTAAAAGATGA GGATCC。

1.2.2 重组质粒的构建 真核表达载体 pIRES2-ZsGreen1 经 Xho I 和 BamH I 双酶切后行 10g/L 琼脂糖凝胶电泳,纯化 pIRES2-ZsGreen1 大片段后在 T4DNA 连接酶的作用下构建 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒。

1.2.3 重组质粒的鉴定 重组质粒 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经卡那霉素筛选出阳性克隆,根据小规模质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,提取的质粒经 Xho I 和 BamH I 双酶切后行 15g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定及测序鉴定。

1.2.4 大鼠角膜上皮细胞的传代培养 购买的原代大鼠角膜上皮细胞镜下观察细胞生长状态良好,达到 80% 融合,进行传代。在超净工作台中,吸出培养液,用 PBS 缓冲液轻轻漂洗细胞 2 次,去除细胞表面的血清成分及代谢物质。加入预温为 37 $^{\circ}$ C 的 2.5g/L 胰蛋白酶-0.02% EDTA 混合消化液约 1~2mL。于倒置显微镜下观察细胞的形状变化,待细胞开始收缩变圆,细胞间隙增大时,即可以吸出消化液,加入终止液(含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM/F12 液)。用吸管轻轻吹打瓶壁,使细胞脱落,将细胞悬液吸入 15mL 无菌离心管中,1000r/min 离心 5min。弃去上清液,用全细胞培养液(含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM/F12 液)重新悬浮细胞,按照 1:3 比例传代,接种到 25cm² 细胞培养瓶中。细胞置于 37 $^{\circ}$ C 饱和湿度、5% CO₂ 恒温细胞培养箱中静置培养,2d 后换液,以后每 2~3d 更换养液,每天观察细胞的生长情况。

1.2.5 重组质粒的扩增 将甘油保存的含重组质粒 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 的大肠杆菌接种于含卡那霉素的 LB 平板上,置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养过夜,次日挑取单个菌落接种于 200mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中,置 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。根据金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒说明书提取重组质粒。

1.2.6 细胞转染 取处于对数生长期,生长状态良好的大鼠角膜上皮细胞,以每孔 2 \times 10⁵ 个接种于细胞培养 6 孔板。待细胞贴壁 24h 后,按照 Invitrogen 公司的 LipofectamineTM2000 转染步骤进行转染。此处实验分为三组:重组质粒 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 转染大鼠角膜上皮细胞组、空质粒 pIRES2-ZsGreen1 转染大鼠角膜上皮细胞组、未转染的空细胞组。48h 后在倒置荧光显微镜下观察荧光。

1.2.7 细胞总 RNA 的提取 转染 48h 后收集 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒转染组、空质粒 pIRES2-ZsGreen1 转染组及未经转染组的细胞,根据 Takara RNAiso Plus 试剂说明书提取各组细胞总 RNA,分光光度

计测定 RNA 纯度。

1.2.8 逆转录 PCR 在 All-in-one First-strand cDNA 合成试剂盒的指导下,每组各取 1μg RNA 行逆转录反应。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 选择 Rat β-actin 基因做内参对照,各设计一对特异性引物(表 1),以该引物扩增后所得产物大小分别为 Rat β-actin (240bp) 和 rBD-2 (121bp)。反应体系包括:4μL cDNA (10×稀释),0.4μL 正向引物,0.4μL 反向引物,10μL SYBR Green/Flourescein qPCR Master Mix (2X),5.2μL 超纯水。反应条件:50℃ 2min,95℃ 10min,后 95℃ 30s,60℃ 30s 循环 40 次。各取 10μL 产物于 15g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。获得溶解曲线图及 Tm 值、扩增曲线及各组各孔 Ct 值,利用相对定量 ΔΔCt 法比较三组细胞中 rBD-2 基因在 mRNA 水平的表达差异。

统计学分析:采用 SPSS17.0 软件进行分析,数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对各样本 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 平均值采用独立样本 t 检验进行两组间差异比较,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 的鉴定

2.1.1 重组质粒 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 酶切电泳结果 图 1 示构建的 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 真核表达载体经 Xho I、BamH I 双酶切后,15g/L 琼脂糖凝胶电泳可见一条约 250bp 大小的条带与一条约 5 000bp 大小的条带,分别与前述含有目标基因 rBD-2 的设计序列 (234bp) 和质粒 pIRES2-ZsGreen1 (5300bp) 大小相仿。

2.1.2 测序结果 pIRES2-ZsGreen1 质粒中插入的 rBD-2 基因序列与要求合成序列完全一致,目的基因的插入方向正确。pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒核苷酸序列为 GGAGCTGCAGGGGAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGTTCGCCACTCTGACTTGAGCGTCCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCTATGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTTCTGGCCCTTTTGTCTGGCCCTTTTGTCTCATGTTCCTTTCTGTCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC GCCATGCATTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGCTGACTTTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGCGGTGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTGAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGGCGAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTACTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGGCCACCATGAGGACTCTCTGCTCTCTGCTGCTGATAGGCTGCCTCCTTTTCTCCTATGCCACTCCGTTGCTGGAATTCTAGGACCTCTTCGAATACA

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

引物名称	碱基序列(5'-3')	产物大小(bp)
Rat β-actin Forward	CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
Rat β-actin Reverse	TAAAGACCTCTATGCCAACACACT	
rBD-2 Forward	CCTCCTTTTCTCCTATGCCA	121
rBD-2 Reverse	AGAACGAGGACAAACAGCAT	

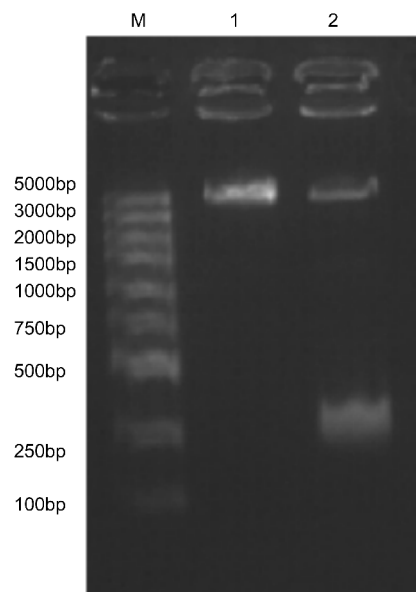


图 1 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒酶切图 M; DNA Marker; 5000bp, 3000bp, 2000bp, 1500bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp; 1; pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒 DNA; 2; pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒用 XhoI 和 BamHI 双酶切后。

AACAGATTATCATCGATGTCTAAGAGAGAAAGGGTTCTGTCTCAATGCTGTTTGTCTCCTCGTTCTACCTTGTGTTGGGTACTGTTTCCCATACAAGTTCTACTGTTGCAAGTTTAAAAGATGAGGATCCGCCCCCTCCTCCTCCCCCCCCCTAA, 下划线处为目的基因 rBD-2 核苷酸序列,测序图见图 2。

2.2 大鼠角膜上皮细胞转染结果 转染 48h 后, pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒转染组及 pIRES2-ZsGreen1 空质粒转染组细胞由于 ZsGreen1 基因的表达而在倒置荧光显微镜下发出绿色荧光,正常细胞组无荧光(图 3,4)。

2.3 rBD-2 基因的 mRNA 在转染细胞中的表达

2.3.1 逆转录 RT-PCR 结果 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒转染组、pIRES2-ZsGreen1 空质粒转染组及无转染组三组各提取的细胞总 RNA 经紫外分光光度计检测 OD260/280 值分别为 1.86、1.86、1.88,说明所提取的 RNA 纯度较好。计算所得 RNA 浓度分别为 0.497、0.463、0.496μg/μL。逆转录后,以 10 倍稀释的 cDNA 为模板,分别利用 Rat β-actin 内参基因和 rBD-2 基因的特异性引物扩增,产物经 15g/L 琼脂糖凝胶电泳检测在各组均分别可见 250bp 左右和 100bp 左右的条带,与 Rat β-actin 基因(产物 240bp)和 rBD-2 基因(产物 121bp)所要扩增的产物大小相符合(图 5,6)。

2.3.2 实时荧光定量 RT-PCR 结果 rBD-2 组和 Rat β-actin 组的溶解曲线均呈单峰型,Tm 值分别为 79.31 和 87.48,说明扩增产物的特异性好,产物单一;各孔扩增曲线基本平行且均进入平台期,说明扩增效率较一致。各组均每次实验重复 3 孔,重复 3 次实验,得到每孔 Ct 值,根据相

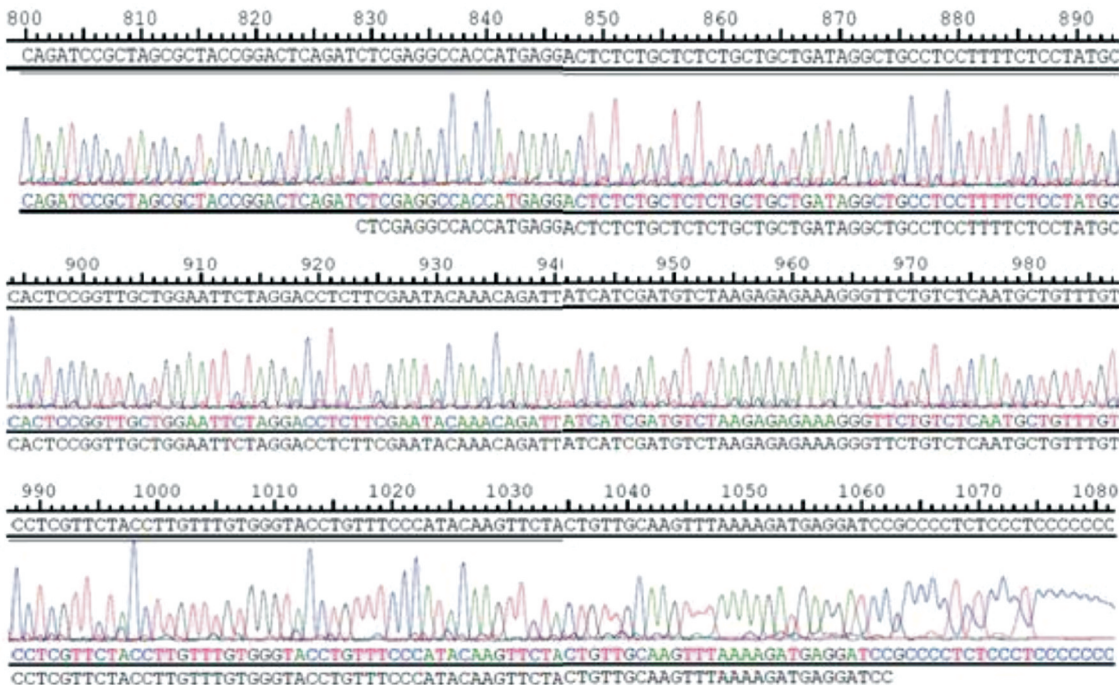


图2 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒测序图。

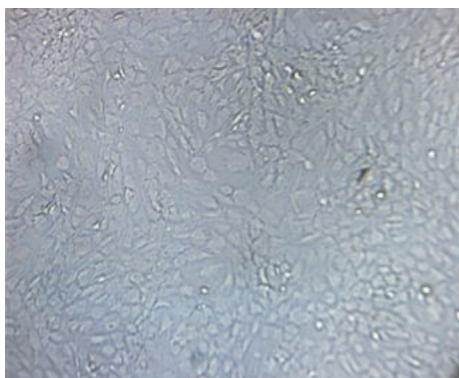


图3 正常大鼠角膜上皮细胞 (×100)。

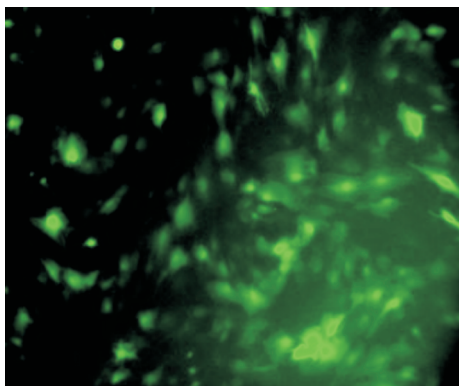


图4 大鼠角膜上皮细胞中绿色荧光蛋白表达 (×100)。

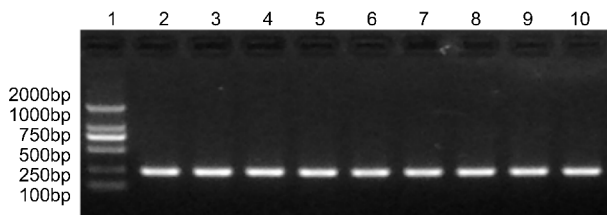


图5 各组 Rat β -actin 基因扩增电泳结果 1:Marker DL2000: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp; 2 ~ 4: pIRES2-ZsGreen1 空质粒转染组; 5 ~ 7: 未转染细胞组; 8 ~ 10: pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒转染组。

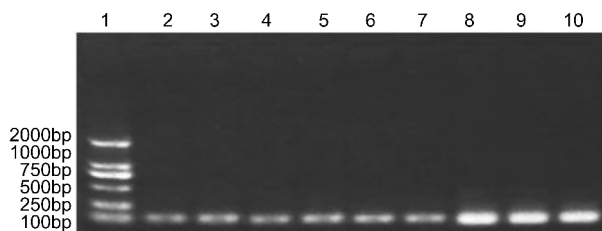


图6 各组 rBD-2 基因扩增电泳结果 1:Marker DL2000: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp; 2 ~ 4: pIRES2-ZsGreen1 空质粒转染组; 5 ~ 7: 未转染细胞组; 8 ~ 10: pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒转染组。

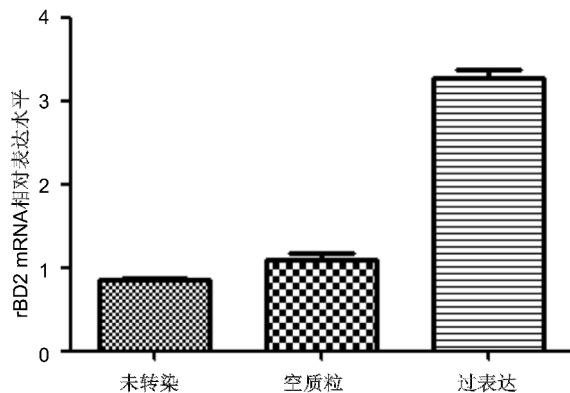


图7 各组细胞 rBD-2 mRNA 相对表达水平。

对定量 $\Delta\Delta Ct$ 法比较三组细胞中 rBD-2 基因在 mRNA 水平的表达差异, 获得三组细胞各 3 个样品的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 平均值, 未转染组为 0.851326 ± 0.268376 , 空质粒组为 1.094708 ± 0.137091 , 过表达组为 3.279380 ± 0.150571 , 进行两组间独立样本 t 检验, 结果可见 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 重组质粒过表达组 rBD-2 mRNA 水平明显高于 pIRES2-ZsGreen1 空质粒转染组和未转染正常细胞组, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明外源 rBD-2 基因能够在大鼠角膜上皮细胞中被转录成 mRNA (图 7)。

3 讨论

防御素对多种微生物具有抗性,带正电的防御素能与细胞膜上带负电的成分相互吸引而结合,其两亲性特点使其能穿插于细胞膜上,导致膜上孔道形成或膜溶解,从而扰乱细胞膜的通透性及细胞能量状态^[8],该特殊的作用机制使病原体不易对其产生耐受,且又是机体本身的一种活性物质,不易产生抗性,此外还可以调节机体的免疫应答和炎症反应,促进伤口修复^[9],因此被认为是一种很有前景的新型抗微生物药物,也是目前的研究热点,赵俊丽等^[10]以大肠埃希菌泌尿系感染大鼠为模型,发现经逆行膀胱灌注给予脂质体包裹的 hBD-2 重组真核表达载体 (pCAGG-hBD2),能显著减少膀胱及尿液中活菌数目及泌尿道的炎症反应。Shen 等^[11]以慢病毒为载体经气管将 rBD-2 基因转入大鼠肺组织,发现 rBD2 基因的过表达能抑制绿脓杆菌导致的肺组织中促炎细胞因子表达而增加抗炎细胞因子的表达,从而保护绿脓杆菌感染导致的肺组织损伤。但目前尚未有利用基因工程技术介导外源防御素基因在眼部疾病防治方面的报道。因此,本研究先行细胞实验以探讨外源 rBD-2 基因在大鼠角膜上皮细胞中表达的可能性,为后续实验奠定基础。

实验中通过酶切电泳及测序分析证实 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 真核表达载体构建成功,真核表达载体 pIRES2-ZsGreen1 能表达绿色荧光蛋白,通过在荧光显微镜中发出绿色荧光证实载体被转入目的细胞,结果直接明显。应用实时荧光定量 RT-PCR 相对定量法证实带有 rBD-2 目的基因的重组载体转染的大鼠角膜上皮细胞中 rBD-2 的 mRNA 表达水平明显高于另两组,说明外源 rBD-2 基因可以在大鼠角膜上皮细胞内转录成 mRNA。但是,该实验结果并不足以说明外源 rBD-2 基因可以在大鼠角膜上皮细胞中表达,还需进一步实验检测 rBD-2 基因在蛋白质水平的表达,为后续实验检测 rBD-2 在体内外的抗

菌活性及治疗实验动物感染性角膜炎的效果提供实验基础,以期为感染性角膜病的防治提供新方法。

综上所述,本实验成功构建了 pIRES2-ZsGreen1-rBD-2 真核表达载体,并将其转入大鼠角膜上皮细胞,证实外源 rBD-2 基因可以在大鼠角膜上皮细胞内转录成 mRNA。

参考文献

- 1 Aerts AM, Francois IEJA, Cammue BPA, et al. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2069-2079
- 2 Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J* 2011;278:3942-3951
- 3 Harder J, Bartels J, Christophere E, et al. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861
- 4 Vongsa RA, Zimmerman NP, Dwinell MB. CCR6 regulation of the actin cytoskeleton orchestrates human beta defensin-2- and CCL20-mediated restitution of colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 2009;284:10034-10045
- 5 Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, et al. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917; a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 2004;72:5750-5758
- 6 Pazgier M, Hoover DM, Yang D, et al. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1294-1313
- 7 Jia HP, Mills JN, Barahmand-Pour F, et al. Molecular cloning and characterization of rat genes encoding homologues of human beta-defensins. *Infect Immun* 1999;67:4827-4833
- 8 Arash I, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:381-390
- 9 Semple F, Dorin JR. beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun* 2012;4:337-348
- 10 赵俊丽,王俭勤,王志平. 人 beta-防御素-2 基因治疗大鼠泌尿系感染的实验研究. *中华泌尿外科杂志* 2011;32(8):846-849
- 11 Shen Z, Fang L, Zhao L, et al. beta-defensin 2 ameliorates lung injury caused by *Pseudomonas* infection and regulates proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rat. *Int J Mol Sci* 2014;15:13372-13387