

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00512

防御素的生物学特性及其抗病基因工程

付蓝宝^{1,2}, 于嘉林¹, 刘伟华²

1. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;
2. 中国农业科学院作物科学研究所, 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081

摘要: 防御素是一种富含半胱氨酸的小分子多肽, 对细菌等微生物具有广谱抗性, 且作用机制特殊。迄今为止, 国内外在防御素方面进行了大量的研究, 已经从各类生物体中分离出不同种类的防御素, 并在基因工程和医药领域呈现广泛的应用前景。文章对防御素的分类、生物学特性, 包括哺乳动物 α -、 β -、 θ -防御素、昆虫以及植物防御素的分子结构及抗菌活性进行了综述, 阐述了防御素的膜作用及与细胞内复合物结合的作用机制。总结和归纳了防御素基因的分离、表达研究进展及动、植物防御素基因在抗病基因工程领域的应用, 并对防御素在未来的生物制药和植物抗病基因工程方面的应用前景进行了展望。

关键词: 防御素; 抗病; 基因工程

Biological characteristics of defensin and its disease-resistance genetic engineering

FU Lan-Bao^{1,2}, YU Jia-Lin¹, LIU Wei-Hua²

1. The State Key Laboratory for Agro-biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. National Key Facilities for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Defensin is a kind of cysteine-rich small peptide, which has a broad spectrum of resistance to bacteria with a special resistance mechanism. So far, a large number of studies on defensins have been reported, and the different types of defensins have been isolated from various organisms. A broad prospect of application on defensins has been displayed both in genetic engineering and medicine field. This article reviewed the classification and the biological characteristics of defensins, including mammalian α -, β -, θ -defensins, insect defensins, and plant defensins. The molecular structures, antibacterial activities, and antibacterial mechanisms of these defensins were summarized. The two mechanisms of defensin, including independent membrane mechanism and targeting of intracellular compounds by defensins, are expounded. This paper also summarized the researches on isolation and expression of defensin genes and disease resistance genetic engineering of mammal and plant defensins. A prospect of the future applications of defensin both in biopharmaceutical sciences and plant disease resistance genetic engineering was discussed.

Keywords: defensin; disease resistance; genetic engineering

收稿日期: 2010-11-01; 修回日期: 2011-01-27

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2008ZX08002-001)资助

作者简介: 付蓝宝, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: fulanbao@163.com

通讯作者: 刘伟华, 博士, 研究员, 研究方向: 小麦分子遗传与基因工程。E-mail: liuw@caas.net.cn

1 防御素的种类及生物学特性

生物在病原体侵染时,自身会产生一系列的拮抗物质,以阻止病害的传播和病原微生物的进一步侵染,这种系统被称为防御系统。编码这些拮抗物质的基因统称为防御基因。防御素(Defensin)就是这样的一种拮抗物质,在生物机体抵御病原体的防御反应过程中产生,是一种能抗微生物和一些恶性细胞的短肽^[1,2]。防御素通常由29~54个氨基酸组成,其中包括6~8个保守半胱氨酸,可通过半胱氨酸分子间二硫键使肽环形成反向平行的 β 片状结构,或含有一个 α 螺旋结构^[2]。防御素分子结构稳定且具有广谱的抗菌活性。根据分子结构特征和来源的不同,动物防御素可分为 α -防御素、 β -防御素和 θ -防御素3种^[3-5],除此之外,还有昆虫防御素和植物防御素。

1.1 动物防御素

α -防御素:由美国Lehrer实验室1980年从兔肺巨噬细胞中首先分离得到,是一种阳离子性极强的小分子抗菌肽。 α -防御素主要存在于哺乳动物有关组织和细胞中^[6]。 α -防御素分子由29~35个氨基酸组成,富含精氨酸,6个半胱氨酸以Cys-1-Cys-6、Cys-2-Cys-4、Cys-3-Cys-5方式形成3对分子内二硫键,其中Cys-1-Cys-6对二硫键连接N端和C端的半胱氨酸形成分子大环,所以 α -防御素的一级结构一般为圆形^[7]。体外实验显示, α -防御素具有广谱的抗菌活性,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、厌氧菌、某些真菌、梅毒螺旋体和钩端螺旋体、分支杆菌等均具有很强的抗菌活性。但 α -防御素在受到盐浓度及血清成分影响的情况下其抗菌活性会降低^[8]。在兔的中性粒细胞中共发现有6种 α -防御素,即RabNP-1、-2、-3a、-3b、-4、-5,这些防御素总量占细胞蛋白质总量的15%~20%。其中兔防御素NP-1是抗菌谱最广泛的防御素之一,其多肽一级结构为:VVCAC RRALC LPRER RAGFC RIRGRTHPLC CRR。高级结构中可以形成3对分子内二硫键。

β -防御素:在牛的气管黏膜上皮细胞中首先分离出来,后又在牛粒性白细胞中发现了13种与其序列高度相似的防御素,因其共有序列与 α -防御素不同,故被命名为 β 防御素^[4]。 β 防御素分子一般由38~42个氨基酸残基组成,6个半胱氨酸残基配对形

成3个二硫键,连接方式为:Cys-1-Cys-5、Cys-2-Cys-4、Cys-3-Cys-6。序列中部有一个保守的脯氨酸和一个甘氨酸,这是 α -防御素所不具有的。 β -防御素的信号序列和前体序列一样,而 α -防御素先由信号肽合成前片段,然后再形成成熟肽。 β -防御素分子量相对较小而且具有明显的半胱氨酸排列的特征,对维持此类分子的三级结构具有重要意义^[9]。 β -防御素对革兰氏阳性和阴性菌均有广谱的抗菌活性,但研究显示,在高盐浓度和酸性条件下, β -防御素将失去抗菌活性。同时,有些 β -防御素对一些真菌和病毒也有抗性作用。

θ -防御素:是从猕猴的白细胞中首先分离出来,为一种环状结构的分子,多分布在吞噬细胞内。 θ -防御素通常由12个氨基酸残基组成,分子内由6个半胱氨酸形成3对二硫键,以Cys-1-Cys-6、Cys-2-Cys-5、Cys-3-Cys-4的方式连接形成环状结构^[10]。研究证明, θ -防御素不仅具有细菌、真菌抗性,而且还具有抗滤过性病原体 and 抗毒素的作用。此外,在受到盐浓度及血清成分影响下 α -和 β -防御素的抗菌活性会降低,但 θ -防御素的抗菌活性几乎不受影响, θ -防御素分子的环状结构可能是其保持稳定活性的原因^[6]。

1.2 昆虫防御素

昆虫防御素是1989年由法国学者Hoffmann等人首先分离得到,它与兔子肺吞噬细胞防御素分子同源。昆虫防御素大量存在于昆虫血淋巴液中,至今已在昆虫纲动物体内发现了数十种防御素和抗菌肽。成熟的昆虫防御素一般含有34~43个氨基酸,其分子链中在Cys-3与Cys-4之间有3个保守的Gly残基。此外,其分子内的3对二硫键配对也与 α -和 β -防御素不同,分别为Cys-1-Cys-4、Cys-2-Cys-5、Cys-3-Cys-6。研究表明,昆虫防御素能够抵抗细菌的感染,但仅对抗革兰氏阳性菌表现抗性,对革兰氏阴性菌几乎无作用;昆虫防御素对真核细胞无作用,而且也未见昆虫防御素抗病毒感染的报道^[7]。

1.3 植物防御素

植物防御素是从小麦和大麦中被首先分离获得。目前所发现的植物防御素大量存在于植物的叶片、果实和种子中。植物防御素分子一般含有45~54个氨基酸,具有复杂的三维折叠模式,分子内有4

对二硫键。植物防御素分子结构与昆虫和人的防御素相似,其二硫键的配对连接方式为Cys-1-Cys-8、Cys-2-Cys-5、Cys-3-Cys-6、Cys-4-Cys-7,其中3个二硫键形成的位置是处于整条多肽链的疏水核心。植物防御素的抗谱不够广,目前只发现其对真菌、某些细菌和昆虫具有抗性,未见抗病毒感染的报道;且有些植物防御素无论对革兰氏阳性或阴性菌均无明显的杀伤效应^[2]。

2 防御素的作用机理

目前对防御素的抑菌机理虽未明确定论,两种不同的抗菌作用机制被提出,一种是独立的膜机制,另一种是防御素结合细胞内的复合物的机制。

独立膜机制的观点认为,带正电荷的防御素与带负电荷的细菌细胞膜相互吸引,并相互结合,从而破坏了磷脂双分子层的完整性,引起靶细胞膜出现裂隙。于是,二聚或多聚的防御素进入细胞膜,形成了跨膜的离子通道,细胞膜的通透性及细胞能量状态受到了破坏,导致细胞膜去极化,呼吸作用受到抑制以及细胞ATP含量下降,离子和大分子物质通过细菌的细胞膜,最终导致靶细胞死亡^[6,11~13]。

通常认为,防御素的作用机制是由独立的膜机制进行的。但近年的研究显示,防御素结合细胞内复合物的作用机制也有一定的作用。人类防御素的杀菌机制并不能完全用简单的膜破裂模型来解释,而是一种更为细微的作用模式。 α -防御素选择性的杀死革兰氏阴性细菌,而 β -防御素则对革兰氏阳性菌的作用更有效^[14,15]。人的 β -防御素带有更多的负电荷,因此仅仅因为防御素所带的阳离子并不能解释这种对细菌株系的选择性作用;且已有研究显示,防御素的杀菌作用并不都与肽结构有关。人类防御素HD-5对于大肠杆菌的抗菌活性表现出结构非特异性,而对金黄色葡萄球菌来说,无结构特性的多肽抗菌活性则大大降低^[16,17];通过对HNP1和HD-5的研究显示,与原始状态的L-型肽分子相比,全部由D-型氨基酸组成的 α -防御素对金黄色葡萄球菌的抗菌活性有很大程度的降低,但对于大肠杆菌的抗菌活性却没有大的变化^[18]。由此表明, α 防御素在对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌机制上有所不同,微生物的细胞膜并不是防御素唯一的结合目标,金黄色葡萄球菌中可能存在某种未知物质能与防御素

进行相互作用^[18]。最新的研究证明,HNP1与一种前期合成细胞壁的重要物质脂质II(Lipid II)存在功能互作。多种抗菌物质均能结合脂质II,从而影响细胞壁的合成和细胞膜的功能,如乳链菌肽(Nisin)^[19]。乳链菌肽能高度结合脂质II,形成的复合物可以在细胞膜上形成孔洞。当加入脂质II合成抑制剂的时候,乳链菌肽和HNP1的抗菌活性均大大降低。与链菌肽类似,HNP1也与脂质II结合,形成的复合体在细菌的细胞膜上形成孔洞,从而影响细胞膜的功能^[20]。

3 防御素基因的克隆与功能研究

防御素在自然界中广泛存在,利用分子克隆及基因表达等手段,可以获得一些天然不易提取的产物。例如,甜椒(*Capsicum annuum* L.)中存在的一种防御素CADEF1, Li等^[21]通过对此防御素cDNA的克隆,并通过质粒转化大肠杆菌进行蛋白表达,并证实了其对棉花黄萎病存在着抗菌活性。

防御素虽然为广谱抗性,但来源不同的防御素存在较大的抗谱差异,与昆虫或植物的防御素相比,哺乳动物的防御素具有更广的抗谱^[2]。动物防御素通常对细菌、真菌、被膜病毒,以及某些恶性肿瘤细胞均有广谱的毒杀效应^[22~25]。防御素的广谱抗菌活性尤其是动物防御素的基因分离与功能研究更加受到关注。曹光成等^[26]已经成功克隆出了兔防御素NP-1基因,并将该基因连接在植物表达载体上,在不同水平上检测到防御素基因的表达。中国科学院遗传与发育生物学研究所用转基因小球藻(*Chlorella ellipsoide* C.)为生物反应器生产兔防御素NP-1蛋白,并获得了成功。且已经建立了单细胞真核藻类小球藻高效表达系统,将抗菌谱最广泛的防御素之一的兔防御素NP-1基因转入小球藻,并得到表达。经PCR和Southern检测,NP-1基因已整合到转基因小球藻基因组中。抑菌实验表明表达的防御素有抑菌活性,转基因小球藻总蛋白提取液能够明显抑制枯草杆菌,大肠杆菌和镰刀菌的生长^[27~29]。此研究为NP-1的大规模提取、纯化以及抗生素类新药的开发奠定了基础。

随着基因工程的发展,快速合成DNA片段、定向修改、设计生物基因的方法得到应用,可以快速克隆得到各种防御素的基因。已经有多种动物、植物和昆虫防御素的基因被分离出来,并在基因工程上得到了应用。Mahanama等^[30]在鲍鱼(*Haliotis*

discus H.)中发现了一种新的防御素能在血细胞、腮和消化管中大量表达,是无脊椎动物防御素领域中的一个重大进步。

近年来的一些防御素基因的分离、细胞定位与组织表达见表 1。

通过克隆的防御素基因构建原核表达载体,并利用转化将防御素基因导入大肠杆菌进行原核表达,可以对表达蛋白的抗菌活性进行检测。目前已经有多种防御素基因在大肠杆菌等细菌中成功表达,并

检测出其抗菌活性。近年来一些新防御素基因的原核表达和抗菌情况见表 2。

4 防御素在基因工程方面的应用

随着人们对防御素生物学特性与功能的逐步认识,防御素基因的遗传转化与应用研究取得了较大进展。高等植物抗病基因工程的主要方法是克隆外源相关的抗病基因,转入植物基因组中进行表达,

表 1 一些防御素基因的克隆、细胞定位及组织表达

防御素基因	防御素种类	来 源	基因长度(bp)	细胞定位及组织表达	文献
<i>NP-1</i>	α -防御素	兔子	190	中性粒细胞	[26]
<i>pBD-1</i>	β -防御素	猪	298	几乎所有的组织和细胞	[31]
<i>eBD-1</i>	β -防御素	马	151	肝脏,心脏,脾脏等	[32]
<i>AiBD</i>	动物防御素	扇贝	531	血细胞和腮	[33]
<i>reBD-1</i>	β -防御素	驯鹿	372	舌,瘤胃和睾丸	[34]
<i>DEFA1</i>	α -防御素	马	340	小肠和潘氏细胞	[35]
鲍鱼防御素基因	无脊椎动物防御素	鲍鱼	198	血细胞,腮和消化管	[30]
<i>Def3</i>	昆虫防御素	锥螬	96	脂肪体,肠和唾液腺	[36]
<i>Def4</i>	昆虫防御素	锥螬	92	脂肪体和胃	[36]
<i>PJD1</i>	甲壳纲动物防御素	龙虾	656	心脏,神经等	[37]
<i>PJD2</i>	甲壳纲动物防御素	龙虾	673	心脏,神经等	[37]
<i>GdB</i>	植物防御素	银杏	534	果实	[38]
<i>PsDef1</i>	植物防御素	松树	252	幼芽	[39]
<i>Sm-AMP-D1/Sm-AMP-D2</i>	植物防御素	繁缕	580/591	种子	[40]
<i>PvD1</i>	植物防御素	菜豆	314	种子	[41]

表 2 一些防御素基因的原核表达和抗菌情况

基因来源	转化受体	检测方法	抗性鉴定	文献
兔 <i>NP-1</i>	大肠杆菌	SDS-PAGE	未检测	[42]
人 <i>HNP-1</i>	大肠杆菌	ELISA	未检测	[43]
人 <i>HNP-1</i>	金黄色葡萄球菌	免疫杂交	无活性	[44]
人 <i>hBD2</i>	大肠杆菌	SDS-PAGE、Western 杂交	未检测	[45]
马 <i>DEFA1</i>	大肠杆菌	辐射扩散实验	抗多种革兰氏阳性和阴性菌,以及酵母白色念珠菌	[35]
人 <i>hBD3-4</i>	大肠杆菌	SDS-PAGE	未检测	[46]
豇豆种子	大肠杆菌	HPLC, α -淀粉酶抑制试验	抑制害虫 α -淀粉酶	[47]
斑蛙 <i>Dpd</i>	大肠杆菌	抑菌实验	抑制多种革兰氏阳性和阴性菌	[48]
玉米 <i>Pdc1</i>	大肠杆菌	FTIR, 抑菌实验	能抑制镰刀菌	[49]
毛豆 <i>TvD1</i>	大肠杆菌	SDS-PAGE 抑菌实验	抗多种真菌,对 <i>Pheaoisariopsis personata</i> 抗性最强	[50]
瓜蒌 <i>TDEF1</i>	大肠杆菌	SDS-PAGE 抑菌实验	抗尖孢镰刀菌	[51]

从而提高植物对病害的抗性。这种方法已经取得了一定的成功,但也还存在一些不足:一方面,很多抗病基因的抗谱不够广,往往只能抗一种病害或相近的几种病;另一方面,一些病原菌的抗病基因尚未找到或已有的抗病效果不够理想。防御素具有广谱的微生物抗性,可能赋予转化受体对细菌、真菌与病毒病的抗性。由于防御素具有独特的抗微生物机制,微生物不易产生耐受性,因此防御素基因在抗病基因工程上有着巨大潜力。

已有的研究证明,免防御素NP-1 能抗革兰氏阳性与阴性细菌、分枝杆菌、多种真菌和一些被膜病毒;此外, NP-1 还表现出对一些恶性细胞的毒杀作用。其它哺乳动物的防御素虽然也具有较广的抗谱,但相对于免防御素NP-1、NP-2,则显得要窄些。兔的NP-1 比HNP-1 的抗菌活性强 5~10 倍,其原因为兔的NP-1 分子中含有 9 个净正电荷,而HNP-1 分子中仅含有 3 个净正电荷^[4]。免防御素NP-1 的作用机制非常独特,从抗性机理来看,免防御素不易引起生理小种的变异进化。Fu等^[52]将免防御素基因NP-1

导入烟草(*Nicotiana tabacum* L.), 证明转基因植株能有效抵抗烟草青枯病原菌的侵袭,通过Northern Blotting检测,发现转基因的mRNA水平越高则其抗性越强。赵世民等^[53]通过农杆菌介导法将免防御素基因NP-1 导入毛白杨(*Populus tomentosa* C.), 体外抑菌实验表明,转基因毛白杨植株组织提取物对枯草杆菌、农杆菌LBA4404 以及立枯病原菌等多种微生物均有不同程度的抗性,其中对枯草杆菌和农杆菌的抗性最为明显。Zhang等^[54]通过农杆菌介导法将NP-1 基因导入番茄(*Cyphomandra betacea* S.), 证明转基因植株能有效抵抗番茄青枯病(bacterial wilt of tomato)的侵袭。除此之外, NP-1 基因还在玉米、小麦、新疆棉、香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)等植物中进行了表达,并获得了一定程度的抗病性(表 3)。

5 展 望

防御素具有广谱的抗菌活性且由于特殊的作用机制不会产生耐药性,因此防御素在医药生产方面上有着巨大潜力。

表 3 防御素基因在植物抗病基因工程上的应用

基因来源	转化受体	转化方法	分子检测	抗病性鉴定	文献
芥子 <i>BjD</i>	烟草	农杆菌	Southern、Northern 杂交	抗疫霉病菌和串珠镰刀菌	[55]
芥子 <i>BjD</i>	花生	农杆菌	Southern、Northern 杂交	抗晚期叶斑病	[55]
大丽花 <i>DmAMP1</i>	木瓜	基因枪	ELISA、Western 杂交	抗疫霉菌	[56]
大丽花 <i>DmAMP1</i>	水稻	农杆菌	Southern、Northern、Western 杂交, ELISA	抗稻瘟病菌、立枯丝核菌	[57]
人 <i>hBD-2</i>	拟南芥	农杆菌	PCR, ELISA	抗灰霉病菌	[58]
大丽花 <i>DmAMP1</i>	拟南芥	农杆菌	ELISA, Northern 杂交	<i>Fusarium.culmorum</i> 抑菌活性	[59]
植物防御素 <i>alfAFP</i>	土豆	农杆菌	ELISA	抗 <i>Verticillium dahliae</i>	[60]
人 <i>HNP-1</i>	烟草	农杆菌	Southern 杂交, ELISA	抗低浓度的 TMV	[61]
萝卜 <i>RsAFP2</i>	烟草	农杆菌	PCR 免疫杂交	抗 <i>Alternaria luteus</i>	[62]
兔 <i>NP-1</i>	烟草	农杆菌	Southern、Northern 杂交	抗烟草青枯病原菌	[52]
兔 <i>NP-1</i>	番 茄	农杆菌	Southern、Northern 杂交	抗番茄青枯病	[54]
兔 <i>NP-1</i>	毛白杨	农杆菌	PCR, Southern 杂交 体外抑菌实验	抗枯草杆菌、农杆菌 及立枯病原菌	[53]
兔 <i>NP-1</i>	菊 花	农杆菌	Southern 杂交	未鉴定	[63]
兔 <i>NP-1</i>	香石竹	农杆菌	抗生素检测, PCR	绿色木霉抑菌活性	[64]
兔 <i>NP-1</i>	百 合	农杆菌	PCR	未鉴定	[65]
兔 <i>NP-1</i>	玉 米	基因枪	PCR, Southern 杂交	抗玉米大斑病	[66]
兔 <i>NP-1</i>	小 麦	基因枪	PCR, Southern 杂交	未鉴定	[67]
兔 <i>NP-1</i>	小 麦	花粉管通道	PCR, Southern 杂交	抗白粉病、条锈 和叶锈病	[68]

人防御素hBD-1 是上皮组织最重要的一种抗菌肽, 它的基因表达与 20 多种人体疾病相关。最近的研究显示, hBD-1 作为一种机制特殊的抑菌剂, 以及 *DEFB1* 的诱导剂和抑制剂, 对于一些 *DEFB1* 相关的反应具有一定的调节作用。对于过敏反应, 感染和癌症等 *DEFB1* 相关的病症来说, hBD-1 是维护人体健康的一个坚实的屏障^[69]。

从萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 和大丽花 (*Dahlia merckii* L.) 中获得了两种植物防御素 *Rs*-AFP2 和 *Dm*-AMP1, 这些防御素除了对真菌和酵母菌有抗菌活性外, 对人类的白色念球菌也有一定的抗性。因此植物防御素除了在农学上的应用外, 在医药学上也有重要作用。

大规模生产与纯化是防御素应用面临的重要问题。比利时Leuven大学Jan Sels^[70]的研究证明, 拟南芥的PTGS-MAR系统能够过量表达转入的防御素基因, 包括非植物领域的人类HBD2, 并能从第一代转基因植物的叶片中获得了可观数量的活性物质, 因此PTGS-MAR表达系统在防御素的生产和生物制药方面具有巨大的应用潜力。随着相关研究的不断深入, 防御素在植物抗病基因工程和生物制药等方面可能发挥更大的作用。

参考文献(References):

- [1] Crovella S, Antcheva N, Zelezetsky I, Boniotto M, Pacor S, Verga Falzacappa MV, Tossi A. Primate β -defensins-structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*, 2005, 6(1): 7–21. [DOI](#)
- [2] 傅荣昭, 李文彬, 孙勇如. 防御素的研究进展. 农业生物技术学报, 1996, 4(12): 348–353.
- [3] Kim C, Kaufmann SHE. Defensin: a multifunctional molecule lives up to its versatile name. *Trends Microbiol*, 2006, 14(10): 428–431. [DOI](#)
- [4] Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of β -defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun*, 2000, 68(1): 113–119. [DOI](#)
- [5] Selsted ME, Miller CW, Novotny MJ, Morris WL, Koefler HP. Molecular analysis of myeloperoxidase deficiency shows heterogeneous patterns of the complete deficiency state manifested at the genomic, mRNA, and protein levels. *Blood*, 1993, 82(4): 1317–1322. [DOI](#)
- [6] 王立刚, 王立贤, 程笃学. 动物防御素研究进展. 中国畜牧兽医, 2007, 34(3): 85–89. [DOI](#)
- [7] 余兴邦, 郭锁链, 乌翠兰, 李大竣, 呼格吉勒图, 鄂优. 防御素研究进展. 动物医学进展, 2006, 27(8): 47–51. [DOI](#)
- [8] Ashitani J, Nakazato M, Mukae H, Taniguchi H, Date Y, Matsukura S. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor induces production of human neutrophil peptides in lung cancer patients with neutropenia. *Regul Pept*, 2000, 95(1–3): 87–92. [DOI](#)
- [9] 龙晶, 杜立新. 哺乳动物防御素研究进展. 中国畜牧兽医, 2007, 34(8): 137–140. [DOI](#)
- [10] Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, 2005, 6(6): 551–557. [DOI](#)
- [11] Yount NY, Wang MS, Yuan J, Banaiee N, Ouellette AJ, Selsted ME. Rat neutrophil defensins. Precursor structures and expression during neutrophilic myelopoiesis. *J Immunol*, 1995, 155(9): 4476–4484. [DOI](#)
- [12] Torres AM, Kuchel PW. The β -defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon*, 2004, 44(6): 581–588. [DOI](#)
- [13] Lehrer RI. Multispecific myeloid defensins. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(1): 16–21. [DOI](#)
- [14] Ericksen B, Wu ZB, Lu WY, Lehrer RI. Antibacterial activity and specificity of the six human α -defensins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1): 269–275. [DOI](#)
- [15] Zou GZ, de Leeuw E, Li C, Pazgier M, Li CQ, Zeng PY, Lu WY, Lubkowski J, Lu WY. Toward understanding the cationicity of defensins: Arg and Lys versus their non-coded analogs. *J Biol Chem*, 2007, 282(27): 19653–19665. [DOI](#)
- [16] de Leeuw E, Burks SR, Li XQ, Kao JPY, Lu WY. Structure-dependent functional properties of human defensin 5. *FEBS Lett*, 2007, 581(3): 515–520. [DOI](#)
- [17] Maemoto A, Qu XQ, Rosengren KJ, Tanabe H, Henschen-Edman A, Craik DJ, Ouellette AJ. Functional analysis of the α -defensin disulfide array in mouse cryptdin-4. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 44188–44196. [DOI](#)
- [18] Wei G, de Leeuw E, Pazgier M, Yuan WR, Zou GZ, Wang JF, Ericksen B, Lu WY, Lehrer RI, Lu WY. Through the looking glass, mechanistic insights from enantiomeric human defensins. *J Biol Chem*, 2009, 284(42): 29180–29192. [DOI](#)
- [19] Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(4): 321–332. [DOI](#)
- [20] de Leeuw E, Li CQ, Zeng PY, Li C, Diepeveen-de Buin M, Lu WY, Breukink E, Lu WY. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett*, 2010, 584(8): 1543–1548. [DOI](#)
- [21] Li DH, Li JZ. Antifungal activity of a recombinant defensin CADEF1 produced by *Escherichia coli*. *World J Mi-*

- crobiol Biotechnol*, 2009, 25(11): 1911–1918. DOI
- [22] Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 1993, 155(2): 408–413. DOI
- [23] Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood*, 1986, 68(6): 1407–1410. DOI
- [24] Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins, natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 1985, 76(4): 1427–1435. DOI
- [25] Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci*, 1993, 2(8): 1301–1312. DOI
- [26] 曹光诚, 李文彬, 傅荣昭, 舒群芳, 孙勇如. 兔防御素基因NP-1 (即MCP-1)的克隆及其植物中表达载体的构建. 高技术通讯, 1997, 7(6): 9–12. DOI
- [27] 李霞, 王义琴, 萨其拉, 张丽明, 李文彬, 孙勇如. 防御素基因工程研究进展. 中国生物工程杂志, 2003, 23(3): 6–9. DOI
- [28] Chen Y, Wang Y, Sun Y, Zhang L, Li W. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr Genet*, 2001, 39(5–6): 356–370. DOI
- [29] 张小宇, 王鹏, 赵世民, 李霞, 沈昕, 孙勇如, 储成才, 王义琴. 利用椭圆小球藻硝酸还原酶缺失突变体为生物反应器表达兔防御素NP-1蛋白. 遗传, 2006, 28(12): 1580–1584. DOI
- [30] De Zoysa M, Whang I, Lee Y, Lee S, Lee JS, Lee J. Defensin from disk abalone *Haliotis discus discus*: molecular cloning, sequence characterization and immune response against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(2): 261–266. DOI
- [31] Zhang GL, Wu H, Shi JS, Ganz T, Ross CR, Blecha F. Molecular cloning and tissue expression of porcine β -defensin-1. *FEBS Lett*, 1998, 424(1–2): 37–40. DOI
- [32] Davis EG, Sang YM, Blecha F. Equine β -defensin-1: full-length cDNA sequence and tissue expression. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 99(1–2): 127–132. DOI
- [33] Zhao JM, Song LS, Li CH, Ni DJ, Wu LT, Zhu L, Wang H, Xu W. Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Mol Immunol*, 2007, 44(4): 360–368. DOI
- [34] Yang YF, Wang CY, Zhao YF, Yu XB. Reindeer β -defensin-1: Full-length cDNA cloning and tissue expression. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 131(1–2): 137–139. DOI
- [35] Bruhn O, Regenhard P, Michalek M, Paul S, Gelhaus C, Jung S, Thaller G, Podschun R, Leippe M, Grötzinger J, Kalm E. A novel horse α -defensin: gene transcription, recombinant expression and characterization of the structure and function. *Biochem J*, 2007, 407(2): 267–276. DOI
- [36] Waniek PJ, Castro HC, Sathler PC, Miceli L, Jansen AM, Araújo CAC. Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): Gene expression and peptide-structure modeling. *J Insect Physiol*, 2009, 55(9): 840–848. DOI
- [37] Pisuttharachai D, Yasuie M, Aono H, Yano Y, Murakami K, Kondo H, Aoki T, Hirono I. Characterization of two isoforms of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* defensin cDNA. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(4): 434–438. DOI
- [38] Shen GA, Pang YZ, Wu WS, Miao ZQ, Qian HM, Zhao LX, Sun XF, Tang KX. Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba*. *J Plant Physiol*, 2005, 162(10): 1160–1168. DOI
- [39] Kovaleva V, Kiyamova R, Cramer R, Krynytskyy H, Gout I, Filonenko V, Gout R. Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. *Peptides*, 2009, 30(12): 2136–2143. DOI
- [40] Slavokhotova AA, Odintsova TI, Rogozhin EA, Musolyamov AK, Andreev YA, Grishin EV, Egorov TA. Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds. *Biochimie*, 2011, 93(3): 450–456. DOI
- [41] Games PD, dos Santos IS, Mello ÉO, Diz MSS, Carvalho AO, de Souza-Filho GA, Da Cunha M, Vasconcelos IM, Ferreira Bdos S, Gomes VM. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 2008, 29(12): 2090–2100. DOI
- [42] 徐文生, 许杨. 兔防御素NP1 在大肠杆菌中的表达. 南昌大学学报(理科版), 2003, 27(3): 295–298. DOI
- [43] 张满朝, 郑国, 许政凯, 洪孟民. 在大肠杆菌中表达人防御素-1. 生物化学杂志, 1997, 13(3): 264–269. DOI
- [44] Reichhart JM, Petit I, Legrain M, Dimarcq JL, Keppi E, Lecocq JP, Hoffmann JA, Achstetter T. Expression and secretion in yeast of active insect defensin, an inducible antibacterial peptide from the fleshfly *Phormia terranova*. *Invertebr Reprod Dev*, 1992, 21(1): 15–24. DOI
- [45] Xu ZN, Peng L, Zhong ZX, Fang XM, Cen PL. High-level expression of a soluble functional antimicrobial peptide, human β -defensin 2, in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(2): 382–386. DOI

- [46] Chen HQ, Fan LM, Xu ZN, Yin XF, Cen PL. Efficient production of soluble human beta-defensin-3-4 fusion proteins in *Escherichia coli* cell-free system. *Process Biochem*, 2007, 42(3): 423-428. [DOI](#)
- [47] Dos Santos IS, Carvalho Ade O, de Souza-Filho GA, do Nascimento VV, Machado OLT, Gomes VM. Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. *Protein Expr Purif*, 2010, 71(1): 8-15. [DOI](#)
- [48] Xu W, Faisal M. Defensin of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Molecular structure, *in vitro* expression, antimicrobial activity, and potential functions. *Mol Immunol*, 2010, 47(11-12): 2138-2147. [DOI](#)
- [49] Kant P, Liu WZ, Pauls KP. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides*, 2009, 30(9): 1593-1599. [DOI](#)
- [50] Vijayan S, Guruprasad L, Kirti PB. Prokaryotic expression of a constitutively expressed *Tephrosia villosa* defensin and its potent antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(6): 1023-1032. [DOI](#)
- [51] Li DH, Jian GL, Zhang YT, Ai TM. Bacterial expression of a *Trichosanthes kirilowii* defensin (TDEF1) and its antifungal activity on *Fusarium oxysporum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(1): 146-151. [DOI](#)
- [52] Fu RZ, Peng YF, Cao GC, Ma JS, Chen CX, Zhang LM, Li WB, Sun YR. Expression of rabbit defensin NP-1 gene in transgenic tobacco plants and its activity against bacterial wilt. *Chin Sci Bull*, 1998, 43(18): 1544-1550. [DOI](#)
- [53] 赵世民, 祖国诚, 刘根齐, 黄敏仁, 徐金相, 孙勇如. 通过农杆菌介导法将兔防御素NP-1基因导入毛白杨(*P. tomentosa*). *遗传学报*, 1999, 26(6): 711-714. [DOI](#)
- [54] Zhang XH, Guo DJ, Li WB, Zhang LM, Sun YR. Construction of transgenic tomato containing NP-1 gene through *Agrobacterium*-mediated transformation and *in vitro*, *in vivo* antibacterial activity against *Fusarium oxysporum*. *High Technol Lett*, 2000, 6(3): 76-79. [DOI](#)
- [55] Swathi Anuradha T, Divya K, Jami SK, Kirti PB. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(11): 1777-1786. [DOI](#)
- [56] Zhu YJ, Agbayani R, Moore PH. Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin *DmAMP1* improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. *Planta*, 2007, 226(1): 87-97. [DOI](#)
- [57] Jha S, Tank HG, Prasad BD, Chattoo BB. Expression of *Dm-AMP1* in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Transgenic Res*, 2009, 18(1): 59-69. [DOI](#)
- [58] Aerts AM, Thevissen K, Bresseleers SM, Sels J, Wouters P, Cammue BPA, François IEJA. *Arabidopsis thaliana* plants expressing human beta-defensin-2 are more resistant to fungal attack: functional homology between plant and human defensins. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(8): 1391-1398. [DOI](#)
- [59] François IEJA, De Bolle MFC, Dwyer G, Goderis IJWM, Wouters PFJ, Verhaert PD, Proost P, Schaaper WMM, Cammue BPA, Broekaert WF. Transgenic expression in *Arabidopsis* of a polypeptide construct leading to production of two different antimicrobial proteins. *Plant Physiol*, 2002, 128(4): 1346-1358. [DOI](#)
- [60] Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J, Rommens CM. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(12): 1307-1310. [DOI](#)
- [61] 张满朝, 郑国铝. 人防御素-1转基因烟草的获得及其抗TMV的初步观察. *植物学报*, 1997, 39(6): 574-576. [DOI](#)
- [62] Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torreken S, van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 1995, 7(5): 573-588. [DOI](#)
- [63] 傅荣昭, 刘敏, 梁红健, 张纯花, 薛淮, 孙勇如. 通过根癌农杆菌介导法获得菊花转基因植株. *植物生理学报*, 1998, 24(1): 72-76. [DOI](#)
- [64] 何秋伶, 陈英, 戴咏梅, 杨春霞, 黄敏仁. 转GFP-NPI基因香石竹. *分子植物育种*, 2007, 5(3): 314-318. [DOI](#)
- [65] 李宝平, 苏仙荣, 李文彬, 孙勇如. 兔防御素NP-1基因转化百合的研究. *山西师大学报(自然科学版)*, 1999, 13(1): 49-52.
- [66] 张文河, 赵倩, 于静娟, 朱登云, 敖光明. 转兔防御素基因(NP-1)玉米植株的获得及其抗病性分析. *农业生物技术学报*, 2003, 11(4): 342-346. [DOI](#)
- [67] 郭殿京, 傅荣昭, 李文彬, 陈颖, 张晓东, 张利明, 孙勇如. 小麦中外源基因瞬时表达调控研究及兔防御素(NP-1)基因的转化. *遗传学报*, 1999, 26(2): 168-173. [DOI](#)
- [68] 周春江, 葛荣朝, 赵宝存, 黄占景, 沈银柱, 何聪芬. 利用花粉管通道法将兔防御素NP-1基因导入小麦的研究. *华北农学报*, 2007, 22(2): 26-28. [DOI](#)
- [69] Prado-Montes de Oca E. Human β -defensin 1: A restless warrior against allergies, infections and cancer. *In J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(6): 800-804. [DOI](#)

- [70] Sels J, Delauré SL, Aerts AM, Proost P, Cammue BP, De Bolle MF. Use of a PTGS-MAR expression system for efficient in planta production of bioactive *Arabidopsis thaliana* plant defensins. *Transgenic Res*, 2007, 16(4): 531–538. [DOI](#)