

综述

抗菌肽在脓毒症治疗中的应用进展

许 垚, 马 帅, 丁 峰

上海交通大学医学院附属第九人民医院肾脏科, 危重肾脏病研究室, 上海 200011

[摘要] 脓毒症是一种严重的全身炎症反应综合征, 临幊上常见于感染、大面积烧伤和外科术后患者; 可继发脓毒性休克及多器官功能衰竭, 病死率高, 预后较差, 目前尚无有效的治疗手段。传统的抗生素在杀伤细菌的过程中可使脂多糖等致炎因子大量释放入血, 进一步加剧免疫系统的失调, 而近年来多重耐药菌的出现更是为脓毒症的治疗带来严峻的挑战。抗菌肽是一类两亲性阳离子多肽, 对细菌、真菌及病毒等具有广泛的杀伤作用, 同时能够中和内毒素, 并通过其免疫调节作用抑制炎症细胞因子的产生, 在脓毒症的治疗中展现出了良好的应用前景。该文综述了抗菌肽在脓毒症治疗中的应用进展及相关分子机制。

[关键词] 抗菌肽; 脓毒症; 治疗

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.08.022 **[中图分类号]** R631 **[文献标志码]** A

Progress of antimicrobial peptides in the treatment of sepsis

XU Yao, MA Shuai, DING Feng

Division of Nephrology and Unit of Critical Care Nephrology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

[Abstract] Sepsis is a severe systemic inflammatory response syndrome, and is common in the patients with infection, extensive burn injury and major surgery. As it may cause multiple organ dysfunction and septic shock, it is always accompanied with high mortality and poor prognosis. Currently there's no effective medication available for treatment of sepsis. During the process of killing bacteria, the classical antibiotics lead to release of a large quantity of proinflammatory cytokines, such as lipopolysaccharide, which exacerbates the malfunction of immune system. Furthermore, the growing number of multi-resistant bacteria present a new challenge to the management of sepsis. Antimicrobial peptides (AMPs) are small, cationic, and amphipathic peptides with broad-spectrum microbicidal activity against bacteria, fungi and viruses. In addition, they also can neutralize endotoxin and suppress inflammatory cascade through multiple immunomodulation, which potentially serves as a promising alternative approach for sepsis treatment. This review briefly summarizes the progress of AMPs in the treatment of sepsis as well as the relevant mechanisms.

[Key words] antimicrobial peptides; sepsis; treatment

脓毒症是机体对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍, 其发病机制尚不明确, 涉及复杂的炎症级联反应、免疫系统紊乱和凝血功能障碍等多器官的病理生理学改变。目前还未找到灵敏而特异的早期诊断指标及行之有效的治疗方法, 是现代医学面临的一项重大难题。流行病学研究显示, 全球每年约有 1 800 万脓毒症患者, 意味着每 1 000 人中就有 3 例; 其在院死亡率为 20% ~ 45%^[1], 高于心肌梗死、前列腺癌、乳腺癌以及艾滋病, 且发病率仍在以每年 1.5% ~ 8.0% 的趋势递增^[1]。因此, 目前急需寻求新的突破点来有效地改善脓毒症患者的预后, 降低死亡率。近年来, 抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 以其优越的广谱抗菌活性及免疫调节作

用而成为临床学者关注的热点, 本文综述了抗菌肽在脓毒症治疗中的最新进展。

1 抗菌肽的结构与功能

1.1 结构特征

抗菌肽是机体固有免疫的重要组成部分, 来源广泛, 广泛存在于昆虫、动物、植物和微生物中, 也可通过基因工程、酶解、化学修饰等方法人工合成。抗菌肽是一类两亲性阳离子小分子多肽, 一般具有以下特征^[2]: ①相对分子质量小 (Mr 2 000 ~ 7 000)。②热稳定性好 (100 °C, 15 min)。③携带一定量的正电荷 (+2 ~ +9)。④无免

[基金项目] 国家自然科学基金(81270850, 81470990); 上海市浦东新区卫生与计划生育委员会联合攻关项目(PW2015D-4); 上海交通大学医工交叉重点项目(YG2014ZD06) (National Natural Science Foundation of China, 81270850, 81470990; United Tackling Program of Health and Family Planning Commission in Shanghai Pudong New Area, PW2015D-4; Key Program of Biomedical Engineering Cross Research Foundation of Shanghai Jiao Tong University, YG2014ZD06)。

[作者简介] 许 垚 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: 499384215@qq.com。

[通信作者] 丁 峰, 电子信箱: dingfeng@sjtu.edu.cn。



疫原性。通常抗菌肽可依据氨基酸组成及二级结构的不同分成4类：① α -螺旋结构：分子内有 α -螺旋结构，如天蚕素(cecropins)、蛙皮素(magainins)等。② β -折叠型结构：该类抗菌肽具有反平行的 β -折叠结构，分子内有2~6个二硫键。如 β -防御素，广泛存在于不同的上皮组织中，可能参与上皮和黏膜的抗感染防御。③线性结构：缺少典型的二级结构，多由15~34个氨基酸残基组成，如从蜜蜂体内分离到的apidaecins。④环链结构：该类抗菌肽在C末端有一个分子内二硫键，而N末端为线状结构，如青蛙皮肤细胞产生的brevinins和bactenecins。

1.2 功能特性

抗菌肽具有广谱抗菌特性，对革兰阳性和革兰阴性细菌均有效，且杀菌速度快；对真菌、病毒、寄生虫以及肿瘤细胞亦有不同程度的杀伤作用。与传统抗生素相比，抗菌肽的显著优越性在于其免疫调节能力，如提高巨噬细胞吞噬能力，促进淋巴细胞增殖，趋化单核细胞、未成熟树突状细胞和T辅助细胞等，对机体固有免疫及获得性免疫均有增强作用^[3]。基于以上特点，抗菌肽在脓毒症治疗中的应用前景日益得到重视，有望成为传统抗生素的替代物，开辟新的治疗思路。

2 抗菌肽在脓毒症中的作用机制

2.1 防御素与cathelicidins家族

人体自身产生的防御素(defensins)可分为 α 和 β 2个亚组，广泛存在于中性粒细胞、小肠帕内特细胞(Paneth cell)、巨噬细胞、上皮细胞以及角质细胞中。其中 α -防御素有6种，包括人中性粒细胞来源的HNP(human neutrophil peptide)1~4和由帕内特细胞产生的人防御素5~6^[3]；人 β -防御素(human β -defensin, HBD)有4种，即HBD1~4，主要分布于呼吸系统、消化系统及泌尿生殖系统的上皮细胞之中。抗菌肽既可以在固有免疫系统组成性表达，又能在炎症反应中经Toll样受体激活诱导产生(例如HNP1~3、HBD2)^[4]。

Cathelicidins是一类具备 α 螺旋结构的抗菌肽家族，可由单核细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞以及多种上皮细胞产生，广泛分布于机体黏膜上皮和体液(汗液、泪液、胃酸、乳汁、呼吸道分泌物等)中。人源性cathelicidins仅发现了一组，即hCAP18(human cationic antibacterial protein of 18 kDa)。hCAP18经蛋白酶3(protease 3)水解后可得到多种不同长度的活性多肽^[5]，例如目前研究最为

深入的由37个氨基酸构成的抗菌肽LL-37。

2.2 抗菌肽的抗菌机制

首先，在脓毒症中抗菌肽能够直接作用于微生物的细胞膜，通过电荷相互作用及其疏水性影响脂质双分子层结构、改变膜通透性，进而打破渗透压平衡导致细菌崩解死亡；目前常用聚集体(aggregate channel)、环孔(toroid)、桶板(barrel-stave)和地毯(carpet-like)4种模型来解释该作用过程^[5]。此外，抗菌肽还能通过与胞质内的靶分子特异性结合、干扰细胞代谢来发挥抗菌作用，主要包括抑制细胞呼吸、干扰或抑制DNA及蛋白质的合成、影响细菌细胞壁合成、阻碍有丝分裂以及降低胞内酶活性等^[5, 20]。

需要强调的是，在生理浓度的盐溶液及体液中，若有带负电荷的糖胺聚糖等物质存在，多种抗菌肽(如LL-37)的灭菌能力是受抑制的^[6]，但其免疫调节能力仍然保留。因此，近年来逐渐倾向于认为抗菌肽在脓毒症中的保护作用更多地依赖于调节免疫系统及对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、磷壁酸等致炎因子的中和作用。

2.3 抗菌肽的免疫调节机制

β -防御素HBD2能够趋化表达CCR6受体的未成熟树突状细胞和CD8 $^{+}$ T细胞^[7]；HBD1~3均可与免疫细胞表面的TLR-4相互作用，经NF- κ B通路下调炎症反应；HNP1~3趋化单核细胞、CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T细胞，刺激树突状细胞的分化和成熟^[8, 10]，从而连接固有免疫和获得性免疫，促进两者间的交互联系，增强机体的抗感染能力。除了直接趋化作用之外，cathelicidins可选择地上调某些有益细胞因子的表达，如IL-8、巨噬细胞趋化蛋白1和3(macrophage chemoattractant protein 1 and 3)，以及T细胞趋化因子RANTES等；抑制中性粒细胞凋亡；提高CD4 $^{+}$ T细胞的反应性；调节p38、ERK1/2、JNK等多个炎症信号转导通路^[9]，有效减少LPS诱导的TNF- α 、IL-1、IL-6、NO等促炎因子的产生；同时与GM-CSF和IL-1S等分子共同作用，参与炎症级联反应中的免疫调节。

2.4 抗菌肽的中和作用

抗菌肽对LPS、磷壁酸等的中和能力是其在脓毒症中发挥作用的另一重要途径。LPS是脓毒症发生发展过程中炎症级联反应的重要启动因子，LPS经由血浆结合蛋白(lipopopolysaccharide binding protein, LBP)转运至细胞表面，与CD14/MD-2/TLR-4受体复合物结合继而诱发炎



症反应。抗菌肽可通过直接作用于 LPS 分子、与 LBP 竞争性结合 LPS、干扰 LPS 与 CD14 受体结合等途径抑制 LPS 对机体的损伤, 减少前促炎因子生成和释放, 继而发挥其抗炎保护效应^[11, 23-25], 这一过程主要通过静电作用及疏水作用实现; 并且抗菌肽对内毒素的中和作用与其疏水性、携带净正电荷量、 α -螺旋结构及羧基末端酰化比例呈正相关^[12]。近来还有研究提示, 硫酸乙酰肝素 (heparin sulfate, HS) 是脓毒症及脓毒性休克的重要损伤相关分子模式 (danger-associated molecular pattern, DAMP), 部分抗菌肽可能通过中和 HS, 阻断 HS 与 TLR-4 的结合, 抑制其下游通路激活, 从而控制炎症反应^[13]。

3 抗菌肽与脓毒症的临床研究

3.1 抗菌肽与脓毒症发病的相关性

脓毒症及多种炎症疾病的发生与防御素等内源性抗菌肽的分泌水平改变相关。一项观察性研究^[14]发现, 足月新生儿 HBD2 分泌水平要高于早产儿, 并且与月龄和出生体重相关; 在纳入调查的 31 名早产儿中有 7 名出现了迟发型脓毒症 (late-onset sepsis), 这一现象与其体内 HBD2 不足相关; 该研究同时发现, 新生儿脓毒症患者体内 HNP1 ~ 3、乳铁蛋白 (lactoferrin)、肝素结合蛋白 (heparin-binding protein, HBP) 以及杀菌 / 通透性增加蛋白 (bactericidal/permeability increasing protein, BPI) 的表达水平平均有所提高。其中 BPI 是一种存在于白细胞中的对 LPS 有高亲和力的抗菌肽, 在脓毒症中可通过中和内毒素发挥保护作用。

此外, 有研究人员分别测定了严重脓毒症患者与健康人群血浆 BPI 水平, 及 BPI 与中性粒细胞比值, 发现 BPI 与脓毒症中持续性低组织灌注具有相关性, 并可作为一种风险信号提示多器官功能障碍的发生^[15]。抗菌肽与脓毒症发病的相关性为临床应用抗菌肽治疗脓毒症提供了理论依据。

3.2 抗菌肽与脓毒症的遗传易感性

在一项针对我国汉族人群的遗传多态性研究中^[16], 研究人员调查了 179 名重型脓毒症患者及 233 名健康对照, 分析其基因组中 α -防御素基因 DEFA1 和 DEFA3 的拷贝数变化; 结果显示, 实验人群 DEFA1/DEFA3 的基因拷贝数在 2 ~ 15 之间变动, 其中拷贝数越高者 (>8 个拷贝) 越倾向于患重型脓毒症, 同时血浆 HNP1 ~ 3、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的水平也越低。这一现象提示拷贝数变异很有可能成为预测重型脓毒症风险的基因标志物, 并为脓毒

症的个体化治疗提供新的靶点。

3.3 抗菌肽治疗脓毒症的效果

TLF (talactoferrin) 是一种重组人乳铁蛋白来源的抗菌肽。在 2013 年一项双盲、随机对照的Ⅱ期临床试验中^[17], 研究人员选择了 194 名至少有一项器官功能衰竭的脓毒症患者, 分为实验组和安慰剂对照组, 实验组给予口服 TLF- α 治疗; 结果显示, 实验组患者的 28 d、180 d 死亡率低于对照组, 并且 TLF 的作用在 APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) 评分高的重症脓毒症患者 (APACHE II >25) 中更为显著, 而在相对轻的患者 (APACHE II <19) 中实验组与对照组的死亡率相仿, 差异无统计学意义。但遗憾的是, 后期继续进行的Ⅱ / Ⅲ期临床试验由于反馈数据提示 TLF 实验组表现出了高于对照组的死亡率而被迫提前终止。试验失败的原因尚不完全清楚, 但可能的解释是, 重型脓毒症患者通常都伴有消化系统功能紊乱, 因此口服或许并不是抗菌肽应用于治疗的合适途径。

近期的另一项利用抗菌肽治疗脓毒症的临床试验是使用骨化三醇 (calcitriol) 来促进 cathelicidins 的表达水平^[18]。研究纳入了 67 例脓毒症或脓毒性休克患者进行随机对照实验, 结果发现实验组 cathelicidins 的 mRNA 水平上调, 但与安慰剂组相比较, 血浆内抗菌肽的水平并没有明显差异。研究人员分析认为原因在于骨化三醇的用量和治疗时机选择不够理想, 或许还有抗菌肽的转录后调控机制存在, 如特定 miRNA 可能参与 cathelicidins 的转录后调控。

4 问题与展望

脓毒症的病理生理过程涉及以免疫失衡为中心的复杂炎症信号网络, 且受个体差异、遗传因素及基础疾病等多方面的影响, 给治疗带来了巨大的挑战和不可控性。未来脓毒症抗感染治疗的发展将主要集中在以下 4 个层面: ①寻找新的抗菌分子, 在杀伤病原体的同时并不直接与其作用, 从而避免菌体崩解时毒素释放入血。②利用能够多点调控炎症反应的分子来控制过度的炎症级联反应; 以往有不少研究试图通过干预单一炎症介质来治疗脓毒症, 均没有取得成效。③发现具有选择性的免疫调节剂, 既能抑制有害促炎因子, 又能保留甚至增强机体正常的抗感染免疫功能。④最大限度降低药物本身的不良反应。

基于以上几点, 抗菌肽无疑有着巨大的发展潜力, 但目前要将其应用于脓毒症的临床治疗还存在许多亟待解决



的问题。

首先,很多抗菌肽治疗脓毒症的临床研究仍处于起步阶段,尚需继续大量搜集相关临床数据,且毒理学研究也远不够深入;抗菌肽在实际应用中所需的治疗剂量、治疗时间窗、给药途径等都不完全清楚。前文已经提到,尽管口服、局部注射等方式在前期实验中收效明显,但Ⅲ期临床试验并不能支持其疗效^[17,19]。

第二,抗菌肽的来源广泛、组成复杂多变,为了更好地将其应用于治疗,人工合成安全高效的抗菌肽,还需要对其结构与功能的关系进行更深入的研究。抗菌肽中和内毒素、调节免疫的功能与肽链的空间结构、氨基酸组

成、电荷量、疏水特性等都有着密不可分的关系^[21]。以chensinin-1b(一种林蛙皮肤来源的天然抗菌肽)为例,改变其N末端、C末端的序列将会显著影响其与细菌胞膜和LPS的相互作用^[22],且N末端效应更为明显;这些同时也提示了抗菌肽的应用需要结合疾病背景进行个体化的治疗,而非一概而论。

第三,应当重视抗菌肽的耐药现象。目前已发现多种细菌可通过胞膜结构的排斥作用、改变膜流动性和带电性以及降解、泵出等机制来削弱抗菌肽的杀菌效应^[26]。

综上所述,我们仍需对抗菌肽的作用及相关机制展开更为全面深入的研究,以期为脓毒症的治疗带来新的希望。

参·考·文·献

- [1] Stoller J, Halpin L, Weis M, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008–2012[J]. *J Crit Care*, 2016, 31(1): 58–62.
- [2] Martin L, van Meegern A, Doemming S, et al. Antimicrobial peptides in human sepsis[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 404.
- [3] Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins[J]. *Pharmaceuticals* (Basel), 2014, 7(5): 545–594.
- [4] Yamaguchi Y, Ouchi Y. Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases[J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2012, 88(4): 152–166.
- [5] Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 194.
- [6] Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity[J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(4): 802–808.
- [7] 王欢,金莉莉,王秋雨.抗菌肽中和脂多糖调节免疫功能的分子机制[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(1):137-139.
- [8] Uppu DS, Ghosh C, Haldar J. Surviving sepsis in the era of antibiotic resistance: are there any alternative approaches to antibiotic therapy?[J]. *Microb Pathog*, 2015, 80: 7–13.
- [9] Agier J, Efenberger M, Brzezińska-Błaszczyk E. Cathelicidin impact on inflammatory cells[J]. *Cent Eur J Immunol*, 2015, 40(2): 225–235.
- [10] Wang F, Qiao L, Lv X, et al. Alarm in human α -defensin HNP1 activates plasmacytoid dendritic cells by triggering NF- κ B and IRF1 signaling pathways[J]. *Cytokine*, 2016, 83: 53–60.
- [11] Martinez de Tejada G, Heinbockel L, Ferrer-Espada R, et al. Lipoproteins/peptides are sepsis-inducing toxins from bacteria that can be neutralized by synthetic anti-endotoxin peptides[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14292.
- [12] Bhattacharjya S. NMR structures and interactions of antimicrobial peptides with lipopolysaccharide: connecting structures to functions[J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(1): 4–15.
- [13] Martin L, Schmitz S, De Santis R, et al. Peptide 19-2.5 inhibits heparan sulfate-triggered inflammation in murine cardiomyocytes stimulated with human sepsis serum[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127584.
- [14] Berkstedt I, Herwald H, Ljunggren L, et al. Elevated plasma levels of antimicrobial polypeptides in patients with severe sepsis[J]. *J Innate Immun*, 2010, 2(5): 478–482.
- [15] Balakrishnan A, Marathe SA, Joglekar M, et al. Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization[J]. *Innate Immun*, 2013, 19(4): 339–347.
- [16] Chen Q, Hakimi M, Wu S, et al. Increased genomic copy number of DEFA1/DEFA3 is associated with susceptibility to severe sepsis in Chinese Han population[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(6): 1428–1434.
- [17] Guntupalli K, Dean N, Morris PE, et al. A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of lactoferrin in patients with severe sepsis[J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(3): 706–716.
- [18] Leaf DE, Raed A, Donnino MW, et al. Randomized controlled trial of calcitriol in severe sepsis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(5): 533–541.
- [19] Heinbockel L, Sánchez-Gómez S, Martínez de Tejada G, et al. Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of peptide Pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(3): 1480–1487.
- [20] 尹昆仑,王嘉榕,孙红宾.抗菌肽的研究进展及应用前景[J].中国生化药物杂志,2015,36(5):181-185.
- [21] Reinhardt A, Neundorf I. Design and application of antimicrobial peptide conjugates[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 701.
- [22] Dong W, Dong Z, Mao X, et al. Structure-activity analysis and biological studies of chensinin-1b analogues[J]. *Acta Biomater*, 2016, 37: 59–68.
- [23] Uppu DS, Haldar J. Lipopolysaccharide neutralization by cationic-amphiphilic polymers through pseudoaggregate formation[J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(3): 862–873.
- [24] Heinbockel L, Palacios-Chaves L, Alexander C, et al. Mechanism of Hb γ -35-induced an increase in the activation of the human immune system by endotoxins[J]. *Innate Immun*, 2015, 21(3): 305–313.
- [25] Bello G, Eriksson J, Terry A, et al. Characterization of the aggregates formed by various bacterial lipopolysaccharides in solution and upon interaction with antimicrobial peptides[J]. *Langmuir*, 2015, 31(2): 741–751.
- [26] Joo HS, Fu CI, Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, 371(1695): 20150292.

[收稿日期] 2016-12-01

[本文编辑] 瞿麟平

