

· 综述 ·

LL-37 抗菌肽及其与牙周病的关系

苏瑞英^{1,2} 陈珊珊^{1,2}综述 赵蕾²审校

(1. 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 2. 四川大学华西口腔医院牙周科 成都 610041)

[摘要] 牙周病是一种微生物感染导致的牙周组织炎症破坏性疾病, 先天性免疫防御功能正常与否与牙周炎的发展转归息息相关。组织蛋白酶抑制素 cathelicidin 是一种内源性抗菌肽, 人源阳离子抗菌肽(hCAP)-18和 LL-37 是迄今发现的唯一的 cathelicidin 家族成员, 而前者是其前体形式, 后者则是具有活性的成熟形式。本文就 hCAP-18 和 LL-37, LL-37 的功能, LL-37 与牙周病的关系等研究进展作一综述。

[关键词] LL-37; 抗菌肽; 组织蛋白酶抑制素; 牙周病; 先天免疫

[中图分类号] Q 51 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.03.012

Antimicrobial peptide LL-37 and its relationship between periodontal disease Su Ruiying^{1,2}, Chen Shanshan^{1,2}, Zhao Lei². (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Periodontal disease is a chronic inflammatory disease that leads to destruction of the periodontium. The abnormal innate immune defense and outcome of periodontal disease is closely related. Cathelicidin is one of endogenous peptide, hCAP-18 and LL-37 is the only member of the cathelicidin family known to exist in human. The former is regarded as an inactive precursor, and the latter is the active mature form. In this review, we emphasize on the hCAP-18, the function of LL-37 and its relationship between periodontal disease.

[Key words] LL-37; antimicrobial peptide; cathelicidin; periodontal disease; innate immunity

口腔是全身细菌储量最为丰富的微生境之一。在正常情况下, 微生物与宿主之间存在着共生和拮抗的平衡关系, 而内源性抗菌肽在宿主抵抗病原微生物的先天性免疫防御中发挥着重要的作用。相对于普通抗生素而言, 宿主内源性抗菌肽具有抗菌活性高, 抗菌谱广, 不易产生耐药性等特点。人的内源性抗菌肽主要包括组织蛋白酶抑制素 cathelicidin 和防御素, 而人源阳离子抗菌肽(human cationic antimicrobial peptide, hCAP)-18和 LL-37 是至今为止发现的人体唯一存在的 cathelicidin 家族成员, 具有广谱抗菌和免疫活性, 在宿主先天性防御体系中的作用日益受到学者关注。

1 LL-37

1.1 LL-37 的结构和调控

在正常情况下, LL-37 以非活性 hCAP-18 前

体蛋白形式储存于中性粒细胞过氧化酶阴性颗粒中。当受到外界刺激后, 非活性 hCAP-18 前体蛋白释放至细胞外, 通过水解蛋白酶-3 的作用脱去其 N 端保守片段, 成为具有 37 个氨基酸 α -螺旋结构的 LL-37 活性片段。LL-37 可通过 α -螺旋插入细菌的细胞膜, 破坏膜的完整性, 造成细菌溶解死亡^[1]。

编码 LL-37 的结构基因 cathelicidin 抗菌肽 (cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP), 包含保守的 cathelin 序列和 C 端富于变化的抗菌结构域 LL-37。camp 基因启动子区域含有一个白细胞介素(interleukin, IL)-6 表达核因子(nuclear factor, NF)-IL-6 的识别位点, IL-6 可能通过蛋白酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子通路或大鼠肉瘤病毒蛋白/促丝裂原激活蛋白激酶级联活化 NF-IL-6, 从而调节 LL-37 基因的表达^[2]。hCAP-18 和 IL-6 可在 mRNA 和蛋白质水平共表达于各种鳞状上皮细胞。即在炎症反应过程中, 宿主细胞在分泌 IL-6 的同时, 可通过 IL-6 上调 hCAP-18 的表达, 使机体对病原微生物的侵袭作出快速的免疫防御反应。

[收稿日期] 2011-01-07; [修回日期] 2012-02-03
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471890); 高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金资助项目(200806101107)
[作者简介] 苏瑞英(1983—), 女, 黑龙江, 硕士
[通讯作者] 赵蕾, Tel: 028-85501439

1.2 LL-37 的来源和分布

hCAP-18 和 LL-37 主要由骨髓内的中幼粒细胞和晚幼粒细胞合成,外周血成熟的中性粒细胞无 hCAP-18 和 LL-37 的合成功能。当有炎症刺激时,上皮细胞亦可诱导表达 LL-37。LL-37 主要分布于人体易受到微生物侵袭的皮肤、消化道和呼吸道等黏膜组织中,是先天性免疫防御屏障的重要组成部分^[3]。在健康的牙龈组织中,LL-37 仅少量表达,且主要来源于溶解的中性粒细胞^[4]。在炎症牙龈的上皮和结缔组织中,LL-37 呈强阳性,原因可能是局部中性粒细胞浸润显著增加^[5]。

2 LL-37 的功能

2.1 中和脂多糖

先天免疫的一个重要功能是识别和清除体内存在的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。菌斑、牙石、唾液和龈沟液以及炎症牙龈组织和病变牙骨质中存在的 LPS,在牙周疾病发生发展中起着广泛的生物学作用。牙龈卟啉单胞菌的 LPS 可促进牙周膜成纤维细胞吞噬胶原。伴放线嗜血杆菌的 LPS 可使人牙龈成纤维细胞停滞于 G₂ 期,抑制其 DNA 的合成,从而抑制其对根面的附着^[6]。LPS 可与其配体 LPS 结合蛋白(LPS binding protein, LBP)结合宿主细胞表面抗原 CD14,形成 LPS-LBP-CD14 复合体。该复合体与细胞表面的 Toll 样受体结合后激活 NF- κ B 信号传导通路,激发一系列级联炎症反应^[7-8]。

LL-37 是体内唯一具有中和 LPS 作用的抗菌肽。LL-37 阻断 LPS 与大鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞的结合,既可抑制 LPS 诱导的活性氧簇、肿瘤坏死因子- α 蛋白及其 mRNA 的表达,也可抑制 LPS 介导的一氧化氮和组织因子的产生^[9]。体内注射半乳糖胺可显著提高 CD1 小鼠对 LPS 的敏感性,即 3 μ g 的 LPS 可使小鼠在 4~6 h 内死亡;然而,同时注射 200 μ g 的 LL-37,则可使小鼠的存活率提高 50%以上。LL-37 还可与 LPS 中带负电荷的基团结合,抑制 LPS 与 LBP 间的相互作用,阻止 LPS 向 CD14 传递,消除 LPS 的生物学活性。LL-37 也可与 CD14 分子的两个负电荷结构域相互作用,部分阻断 LPS 与 CD14 阳性细胞的结合。Inomata 等^[10]发现,牙龈成纤维细胞中的 LL-37 可有效抑制牙龈卟啉单胞菌-LPS 诱导的 IL-6、8,半胱氨酸-X-半胱氨酸趋化因子配体-10 基因在牙龈成纤维细胞中的表达。

2.2 免疫趋化

LL-37 除参与先天性免疫外,还可通过免疫趋化参与机体的获得性免疫。LL-37 可趋化中性粒细胞、单核细胞和胸腺依赖淋巴细胞。在炎症时,受 IL-8 激活的中性粒细胞会继续释放 LL-37,从而趋化更多的中性粒细胞。如此循环不已,LL-37 的水平不断升高。

有关 LL-37 趋化免疫细胞,参与获得性免疫反应调控机制的研究^[11]结果如下。1)LL-37 可诱导宿主细胞分泌单核细胞趋化蛋白-1、IL-8、IL-8RB 和半胱氨酸-X-半胱氨酸趋化因子受体-4 等趋化因子,同时抑制肿瘤坏死因子- α 的生成,即 LL-37 在阻断细菌产物诱导炎症反应的同时趋化更多的巨噬细胞杀灭细菌。2)LL-37 可通过 G-蛋白-磷脂酶 C 信号通路趋化肥大细胞,促进肥大细胞脱颗粒并释放组胺和前列腺素等促炎递质,从而使血管通透性增加,有利于免疫细胞穿过血管上皮向感染部位聚集,且肥大细胞也会分泌抗菌肽。3)树突细胞成熟后可连接先天性免疫和获得性免疫,LL-37 可影响这一精密的成熟过程,从而对其趋化。4)目前,LL-37 至少可激活甲酰胺类受体-1、表皮生长因子受体和 P₂X₇ 三种趋化受体来趋化免疫细胞,其中 P₂X₇ 是核苷酸门控通道 P₂X 家族成员之一。LL-37 可通过特异性结合直接激活甲酰胺类受体-1 和 P₂X₇, all-D-LL-37 (LL-37 的类似物)可转录激活表皮生长因子受体。5)LL-37 可诱导细胞外信号调节激酶以及单核细胞和角质形成细胞中 P38 激酶信号通路的激活。

3 LL-37 与牙周病

3.1 LL-37 在牙周炎牙龈组织中的表达

健康者与牙周炎者在牙龈组织中的 LL-37 表达量存在明显差异。Türkoğlu 等^[12]检测了牙周健康者、成人牙周炎(adult periodontitis, AP)患者和侵袭性牙周炎(aggressive periodontitis, AgP)患者龈沟液中 LL-37 的表达,结果健康者龈沟液中仅存有少量的 LL-37,而且主要以前体蛋白形式(相对分子质量约 1.8 \times 10⁴)出现,与髓过氧化物酶具有明显的相关性。LL-37 在各型牙周炎患者的龈沟液中均有明显增加,且与菌斑指数、探诊出血指数、探诊深度和临床附着水平具有相关性。Puklo 等^[13]利用蛋白质印迹技术进一步比较 AgP 和 AP 患者龈沟液样本中 LL-37 表达差异的研究显示,AP 患者龈沟液中的 LL-37 的水平均高于健

康对照组, 然而 AgP 患者龈沟液中仅有未加工的 cathelicidin 水平高于健康对照组, 且 36% 的 AgP 患者缺乏成熟的 LL-37。以上研究提示了 LL-37 在牙周炎免疫防御反应中的可能作用, 并在一定程度上解释了 AgP 患者的临床表现往往与其组织破坏程度不相符的原因。

在 AgP 和 AP 患者龈沟液中都有明显增加的大小约 1.1×10^4 相对分子质量的 LL-37 部分水解片段, 其中 AgP 患者的抗菌肽片段亮度与 LL-37 的质量有明显的相关性, 甚至 14% 的 AgP 患者没有任何与 LL-37 抗体反应的蛋白质痕迹; 而在正常健康人的龈沟液中, 却没有 1.1×10^4 相对分子质量的 LL-37 部分水解片段。这提示在牙周炎患者的龈沟液中, 存在着另外一种牙周致病菌的抗菌肽作用模式。通过分析 LL-37 蛋白质反应带的模式和牙周菌斑中的特异致病菌间的关系发现, 1.1×10^4 相对分子质量的蛋白条带与牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌和齿垢密螺旋体这三种细菌的蛋白质水解酶有关, 是这三种致病菌降解 LL-37 至 1.1×10^4 相对分子质量的结果。 1.1×10^4 相对分子质量的抗菌肽的质量越大, 说明该龈沟中可降解 LL-37 的牙周致病菌亦越多。此外, 中间普雷沃菌的数量亦与 LL-37 密切相关^[5]。

3.2 LL-37 与牙周致病菌

LL-37 具有广谱抗菌作用, 对革兰阴阳性菌甚至某些真菌和病毒均具有抑制作用。如 LL-37 可有效地抑制具核梭杆菌、伴放线嗜血杆菌、二氧化碳嗜纤维菌、大肠埃希菌和绿脓杆菌等^[13]。LL-37 还通过介导宿主细胞分泌 IL-2、IL-12 和干扰素- γ 激活单核-巨噬细胞和自然杀伤细胞等, 从而吞噬或杀伤病原菌。当 LL-37 与 α -防御素协同作用时, 可增加 5 倍的抗菌能力。

尽管 LL-37 是一种宿主内源性抗菌肽, 其杀菌机制与普通抗菌素有异, 但在长期的生物进化过程中, 部分牙周致病菌还是形成了抵抗 LL-37 抗菌作用的逃逸机制。Puklo 等^[5]发现, 牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌和齿垢密螺旋体可降解 LL-37 至 1.1×10^4 相对分子质量的 LL-37 片段。常温下, 5 L 的牙龈卟啉单胞菌悬液可降解 LL-37 约 2 L ($15 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$); 而在同等条件下, 变异链球菌、伴放线嗜血杆菌和齿垢密螺旋体却没有该功能。当 LL-37 与大肠埃希菌共孵育时, 加入牙龈卟啉单胞菌可以使 LL-37 对大肠埃希菌的抑菌率 ($20 \text{ L} \cdot 15 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) 由 99% 降至 20% 以下, 牙龈卟啉

单胞菌的精氨酸特异性蛋白水解酶是降解 LL-37 的重要毒力成分; 然而, 牙龈卟啉单胞菌降解 LL-37 的能力对其自身不具有保护作用。当牙龈卟啉单胞菌与唾液共培养时, 这种降解能力会被抑制, 使 LL-37 重新恢复对大肠埃希菌的抑制作用 ($40 \text{ L} \cdot 15 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 时高达 90% 以上); 而在炎症深处唾液无法到达的地方, 牙龈卟啉单胞菌方可发挥作用。Ji 等^[14]证实, 牙龈卟啉单胞菌在牙周炎的形成过程中无法作为一种独立菌属生长, 必须与其他菌属共同作用形成致病性菌斑生物膜方可发挥其毒力作用。牙龈卟啉单胞菌在菌斑生物膜形成和协助其他菌群的定植上发挥了重要的保护机制作用^[15]。由此推断, 牙龈卟啉单胞菌降解 LL-37 是为帮助其友邻菌具核梭杆菌躲避 LL-37 的作用, 从而更有利于自身生存。

3.3 LL-37 与重度牙周组织破坏

Kostmann 综合征是一种严重的先天性中性粒细胞减少症, 分为 A、M 和 T 三型, 均伴有严重的牙周炎, 患者往往因反复感染而死亡。Pütsep 等^[16]在以 A、M 和 T 型的 Kostmann 综合征患者各 1 名, 轻型局部散在 Kostmann-like 患者 1 名, 接受了骨髓移植的患者 1 名, 周期性中性粒细胞减少症患 1 名等 Kostmann 综合征患者与 22 名健康者为试验对象进行的研究中发现: 1) 3 名 A、M 和 T 型患者血液中的 hCAP-18 仅为健康人的 1%~2%, 其唾液和中性粒细胞中没有 hCAP-18 和 LL-37, 且同时伴 α -防御素的缺乏 (这 3 名患者均伴有严重的早发性牙周炎, 且其严重程度逐年加重); 2) Kostmann-like 患者血液中的 hCAP-18 为健康人的 10%, 其唾液中的 hCAP-18 和 LL-37 明显下降, 且伴有一定程度的牙周破坏; 3) 接受骨髓移植患者的中性粒细胞中的 hCAP-18 正常, 血液中的 hCAP-18 为健康人的 70%, 其牙周状态良好^[17]; 4) 所有受试者血液中的乳铁蛋白质量和其氧化暴发能力均正常, 这 6 名患者都不伴有其他临床感染。该研究提示, 这 6 名 Kostmann 综合征患者的抗感染能力正常, 其口腔中牙周状态的差异与 LL-37 的功能缺乏与否具有相关性, LL-37 的作用与维持牙周组织的健康密切相关。

Kostmann 综合征患者因其弹性蛋白酶基因突变, 而使中性粒细胞提早在早幼粒细胞或中幼粒细胞阶段成熟, 因此使产生 hCAP-18 和 LL-37 的晚幼粒细胞数量减少, 影响了 LL-37 的表达。同时, 在 LL-37 的编码基因 camp 的上游序列也发

现了调节器或基序变异所导致的调节器与基序结合力增加, 导致提前关闭或禁止了 hCAP-18 和 LL-37 的合成。LL-37 不仅具有广谱抗菌作用, 同时也有其特异性。当其缺乏时虽不致命, 却会产生针对某种菌群紊乱的临床表现^[18-19]。在 Kostmann 综合征患者的牙周袋内, 就存在因伴放线嗜血杆菌过度生长所导致的菌群紊乱^[16-17]。

4 结语

尽管口腔中存在着牙周致病菌和共生菌, 但在大多数情况下, 牙龈上皮仍可保持健康状态而不伴有临床症状, 缘于 LL-37 在其中发挥了重要的免疫调节作用。LL-37 既可及时有效地识别牙周致病菌, 阻止和杀灭致病菌侵入上皮细胞, 还可以中和 LPS 并减少其对牙周组织的破坏, 趋化免疫细胞, 参与机体的免疫防御反应; 而某些缺乏 LL-37 的系统性疾病患者, 则可伴发严重的牙周组织破坏。

5 参考文献

[1] Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(9): 1408-1425.

[2] Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(1): 39-48.

[3] Frohm NM, Sandstedt B, Sørensen O, et al. The human cationic antimicrobial protein(hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(5): 2561-2566.

[4] Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 146(2): 218-225.

[5] Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, et al. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2008, 23(4): 328-335.

[6] Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(9): 5211-5220.

[7] Golec M. Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleio-

tropic peptide[J]. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14(1): 1-4.

[8] Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases[J]. *J Periodontol*, 2008, 79(8 Suppl): 1592-1600.

[9] Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, et al. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(21): 2377-3292.

[10] Inomata M, Into T, Murakami Y. Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by *Porphyromonas gingivalis* cells and extracts in human gingival fibroblasts[J]. *Eur J Oral Sci*, 2010, 118(6): 574-581.

[11] Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7[J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 3044-3052.

[12] Türkoğlu O, Emingil G, Küttükçüler N, et al. Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2009, 80(6): 969-976.

[13] Ji S, Hyun J, Park E, et al. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils[J]. *J Periodontol Res*, 2007, 42(5): 410-419.

[14] Ji S, Kim Y, Min BM, et al. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria[J]. *J Periodontol Res*, 2007, 42(6): 503-510.

[15] Gutner M, Chaushu S, Balter D, et al. Saliva enables the antimicrobial activity of LL-37 in the presence of proteases of *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(12): 5558-5563.

[16] Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, et al. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: An observation study[J]. *Lancet*, 2002, 360(9340): 1144-1149.

[17] Carlsson G, Wahlin YB, Johansson A, et al. Periodontal disease in patients from the original Kostmann family with severe congenital neutropenia[J]. *J Periodontol*, 2006, 77(4): 744-751.

[18] Nizet V, Ohtake T, Lauth X, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection[J]. *Nature*, 2001, 414(6862): 454-457.

[19] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults[J]. *Cell*, 1996, 86(6): 973-983.

(本文编辑 刘世平)