

核糖核酸酶 5 在宿主防御中的作用及机制

孙德森, 钱钰玲, 许正平*

(浙江大学医学院 环境医学研究所; 分子医学研究中心, 杭州 310058)

摘要 抗菌肽是机体天然免疫的重要组成部分。核糖核酸酶 5 (ribonuclease 5, RNASE5; 又名 angiogenin) 属于核糖核酸酶 A 超家族, 是一个分泌型小分子蛋白质, 广泛分布于机体需要抵御外界病原微生物的组织中。RNASE5 对病毒、细菌以及真菌都存在抑制效应, 具有广谱抗菌特点, 但其表达和活性受到宿主生理状态和外界环境多层次的调控。RNASE5 存在多样的抗微生物作用机制, 其带正电荷的理化特性破坏微生物细胞壁, 而其核糖核酸酶活性则是杀伤真菌所必须的。除了直接作用于微生物外, RNASE5 还可作为重要因子调节宿主免疫功能, 参与多种病理过程。本文综述了 RNASE5 的结构、生物活性与功能、作用特点与机制, 并讨论了在其研究中存在的问题, 以期今后的研究提供新思路和新方向。

关键词 核糖核酸酶 5; 抗菌肽; 抗菌机制; 宿主防御

中图分类号 Q71

The Role and Working Mechanism of Ribonuclease 5 in Host Defense

SUN De-Sen, QIAN Yu-Ling, XU Zheng-Ping*

(Institute of Environmental Medicine; Research Center for Molecular Medicine,
Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract Antimicrobial peptides are key components of the innate immune system. Ribonuclease 5 (RNASE5, also named as angiogenin), the fifth member of the ribonuclease A superfamily, is a secreted small protein and widely distributed in the tissues that resist pathogenic microorganisms. As a multifunctional antimicrobial peptide, RNASE5 exhibits broad-spectrum antimicrobial activity, including growth inhibition of viruses, bacteria and fungi. However, its expression and activity are regulated by the physiological states of host and the external environment at multiple levels. Mechanistically, RNASE5 mainly plays its antimicrobial role through its positively charged physicochemical properties and ribonuclease activity. Besides killing microorganisms directly, RNASE5 also regulates host defense and immune functions in a variety of pathological processes. Here, we systematically review the structure and biological activity of RNASE5 in host defense, as well as discuss the existing problems and future directions for further research.

Key words ribonuclease 5 (RNASE5); antimicrobial peptide; mechanism of bactericidal; host defense

人体栖息的微生物是机体不可或缺的组成部分。成人约 2 平方米的皮肤表面上定居着大约 1×10^{12} 个微生物, 而肠道内定植的微生物总数可达 4×10^{13} 个, 包括真菌、细菌、古生菌、原虫以及少量的病毒, 与人体细胞总数相近^[1]。因此, 人类机体被认为是一个由大量原核细胞和真核细胞组成的异常复杂的“超级生物体”。那么, 机体是如何维持这种复杂而多样的微生物动态平衡, 同时又能阻止病原菌入侵而保持内环境无菌状态? 目前认为, 作为机体第一道防线的表皮细胞会分泌多种抗菌肽

收稿日期: 2018-11-09; 修回日期: 2018-12-25; 接受日期: 2019-01-10

国家自然科学基金 (No.31770867, 31570786) 和浙江省自然科学基金 (No. LY17H160021, LY18H030006) 资助

* 通讯作者 Tel: 0571-88208008; E-mail: zpxu@zju.edu.cn

Received: November 9, 2018; Revised: December 25, 2018;

Accepted: January 10, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31770867, 31570786) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY17H160021, LY18H030006)

* Corresponding author Tel: 0571-88208008; E-mail: zpxu@zju.edu.cn

(antimicrobial peptides, AMP) 来调控机体微生物稳态^[2-4]。截至 2019 年 1 月 3 日, 抗菌肽数据库 (<http://aps.unmc.edu/AP>) 收录了 3 048 种不同来源的抗菌肽。其中, 有 128 种来自于人类, 包括防御素家族、C 型凝集素家族、组织蛋白酶抑制素和核糖核酸酶 A 家族等^[2, 5]。虽然有不少关于抗菌肽的来源、分类方式、生物学活性、作用机制和应用研究等的报道, 但是对于特定抗菌肽缺乏全面和深入的进展性综述。

核糖核酸酶 5 (ribonuclease 5, RNASE5), 亦称血管生成素 (angiogenin, ANG) 是因为其强有力的促血管生成能力而被发现的, 属于核糖核酸酶 A 家族的第 5 个成员^[6-8]。前期研究主要关注 RNASE5 在肿瘤血管生成中的作用和机制。此后发现, 该蛋白质具有抗菌活性, 并因此被收录到抗菌肽数据库中 (第 2 067 号抗菌肽)^[5]。本文将从 RNASE5 的结构、抗微生物活性、作用机制和免疫调节功能等几个方面, 系统地阐述 RNASE5 在宿主防御中的最新研究进展。

1 核糖核酸酶 5 的结构与表达分布

RNASE5 的蛋白质由 1 个外显子编码。研究发现, 从低等脊椎动物到高等哺乳生物中均有该基因 (Fig. 1), 提示其执行着重要的生物学功能。人基因组中只含有 1 个 *RNASE5* 基因, 但其他物种中存在着数量不等的同源基因。例如, 模式动物斑马鱼基因组中有 5 个核糖核酸酶基因 (*zebrafish* *Rnase* 1-5, *ZF-Rnase* 1-5)^[9]。小鼠基因组中为 5 个 *RNASE5* 同源基因 (*Ang1*、*Ang2*、*Ang4*、*Ang5* 和 *Ang6*) 和 3 个假基因 (*Ang-ps1-3*)。牛基因组则存在 3 个 *RNASE5* 同源基因 (*Ang1*、*Ang2* 和 *Ang3*)^[8, 10, 11]。人 *RNASE5* 位于染色体 14q11.2, 与 *RNASE4* 共享同一个启动子区域, 构成人基因组中比较特殊的基因结构^[12, 13]。*RNASE5* 启动子区域含有大量与宿主防御相关转录因子的结合位点, 如 B 细胞 κ 轻链基因增强子核因子 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, NF- κ B)、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription, STAT3)、FBJ 小鼠骨肉瘤病毒癌基因同源基因 (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, FOS) 等, 提示其与宿主防御密切相关^[14]。

RNASE5 的 N 端包含 1 段经典信号肽, 可引导该蛋白质分泌到细胞外。成熟的 RNASE5 是由 123 个氨基酸组成的分泌型单链碱性蛋白质, 相对分子

量约为 14 kD, 带有 11 个正电荷, 等电点 $pI > 9.5$, 符合抗菌肽的一般特性^[5, 6]。RNASE5 的强碱性使得其能与带负电荷的生物分子发生静电相互作用^[5]。蛋白质序列分析表明, RNASE5 与牛胰核糖核酸酶 A (RNase A) 之间的序列一致性达到 33%; 同时保留了该家族的基本结构特点, 包括由 His-13、Lys-40 和 His-114 组成的酶催化位点, 以及由 6 个半胱氨酸残基形成的 3 个二硫键; 存在 Ser-28、Ser-37 和 Ser-87 共 3 个磷酸化位点^[15]。然而, RNASE5 的 C 端氨基酸残基阻挡其与底物的结合能力, 导致 RNASE5 的核糖核酸酶活性仅为 RNase A 酶活性的百万分之一^[16, 17]。有意思的是, 该微弱的核糖核酸酶活性对其生物学功能的发挥至关重要^[18]。目前认为, RNASE5 的强碱性、与酶活性等特性是其发挥抗菌活性的基础。

RNASE5 广泛分布于机体需要抵御外界病原微生物的组织中, 包括肠道、皮肤组织、乳腺、泪腺、唾液腺和膀胱等。在皮肤组织中, 人足跟的角质细胞中提取可溶性 RNASE5 浓度为 57 ± 38 ng/g 角质细胞, 约为皮肤特异性抗菌肽核糖核酸酶 7 的 $1/5$ ^[19]; 在母乳中, 人 RNASE5 在初乳期可达到 $18 \mu\text{g/mL}$, 之后维持在 $2 \mu\text{g/mL}$ 左右^[20], 而不同来源牛奶中的牛 RNASE5 含量从 2 至 $19 \mu\text{g/mL}$ 不等^[21, 22]; 流泪情况下, 眼泪中 RNASE5 的含量约为 $100 \sim 300 \text{ pg/mL}$ 。而正常湿润眼眶中的 RNASE5 的含量应该会更高^[23]; 尿液中, RNASE5 的含量大约为 425 ng/g 尿液蛋白质^[24]; 在肠腔中, 本实验室未发表的结果显示, 结肠黏膜层 RNASE5 的表达量约为 $20 \sim 100 \mu\text{g/g}$ 组织蛋白质; 在人体血液中, RNASE5 含量维持在 $336.14 \pm 142.83 \text{ ng/mL}$, 且在炎症情况下含量会显著上升^[25]。现有的 mRNA 表达结果显示, RNASE5 在人体的不同组织中均有表达, 且在肝中高表达 (Fig. 2)^[26]。以上结果提示, 作为一种分泌蛋白质, RNASE5 的表达和功能发挥部位有差异性。

2 核糖核酸酶 5 的抗微生物谱

2003 年, Hooper 等^[27]发现, RNASE5 可作为抗菌肽调控肠道菌群。他们发现, 小鼠的肠道潘氏细胞可分泌 RNASE5 同源蛋白质——血管生成素 4 (angiogenin 4, Ang 4), 其产生主要由多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 所诱导, 是第 1 个由肠道益生菌控制产生的抗菌肽, 并且该蛋白质和 RNASE5 蛋白均能有效抑制单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 的生长。Walker 等^[28]发

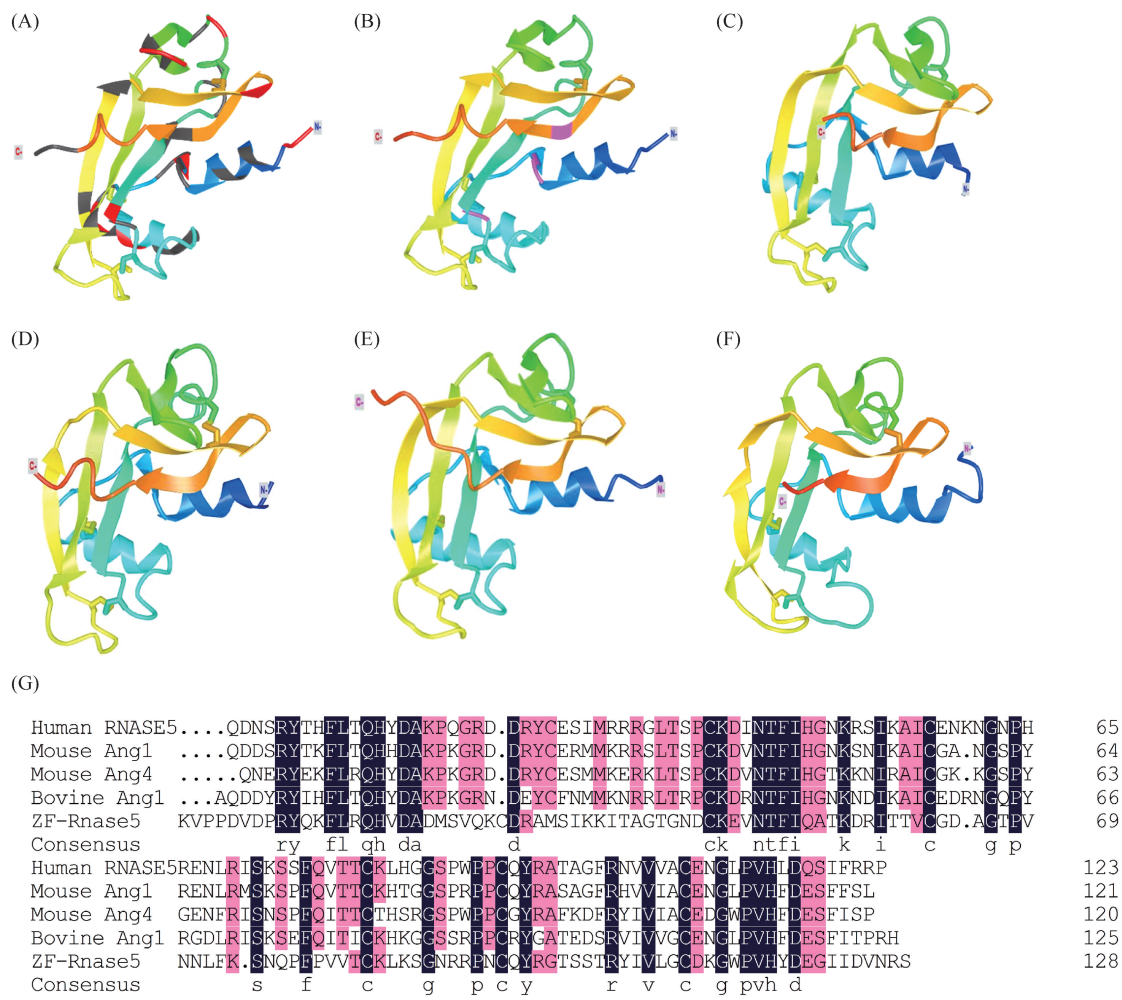


Fig.1 Crystal structures and amino acid sequence alignment of human RNASE5, mouse Ang1, mouse Ang4, bovine Ang1 and ZF-Rnase 5 The file with PDB ID 1B1I (human RNASE5), 2BWK (mouse Ang1), 2J4T (mouse Ang4), 1AGI_A (bovine Ang1) and 3LJE_A (ZF-Rnase5) were retrieved from a protein database (<http://www.rcsb.org>) and visualized with Cn3D. (A) Ribbon model shows charge characteristics of RNASE5, the positive charge was shown in black and the negative charge was shown in red. (B) Ribbon model of RNASE5, the three main catalytic residues (His-13, Lys-40, and His-114) were highlighted in purple. (C-F) Ribbon representation of the structures of mouse Ang1 (C), mouse Ang4 (D), bovine Ang1 (E) and ZF-Rnase5 (F). (G) Amino acid sequence alignment of human RNASE5 (GenBank; AAL67710.1), mouse Ang1 (GenBank; BAE35521.1), mouse Ang4 (GenBank; BAE22968.1), bovine Ang1 (GenBank; AAI11624.1) and ZF-Rnase5 (PDB; 3LJE_A)

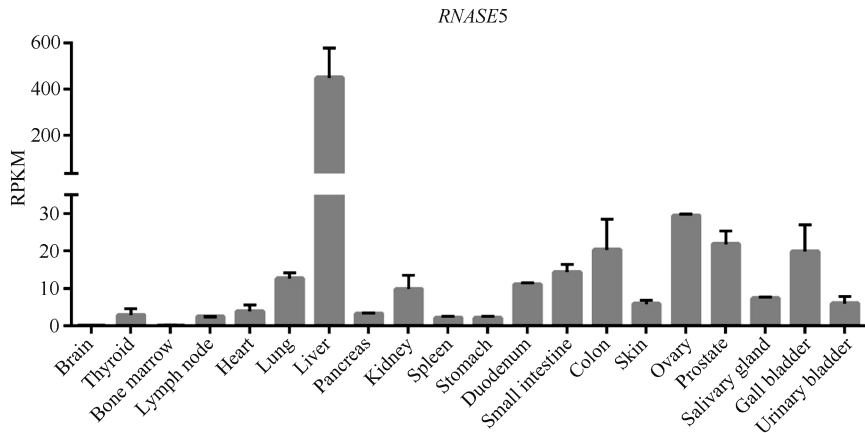


Fig.2 Tissue-specific expression of RNASE5 across a representative set of all major human organs and tissues RPKM, reads per kilobase per million mapped reads

现,从小鼠肠道中获取的新鲜隐窝分泌液杀伤沙门氏菌的效率达 70%,而 Ang4 单克隆抗体处理可以显著抑制分泌液的抗菌活性,提示 Ang4 具有较强的抗菌活性。同时,与其他抗菌肽类似,Ang4 蛋白可通过破坏细菌细胞膜的完整性而达到杀菌作用^[28]。后续研究发现,人源和鼠源 RNASE5 蛋白也可以显著地抑制白色念珠菌(*Candida albicans*)^[19, 27]和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)^[27]生长。

回顾文献发现,RNASE5 对病毒、细菌、真菌甚至寄生虫均有不同程度的杀伤作用(Table 1)。Bedoya 等^[29]比较了 RNase A 家族不同成员抗 HIV 病毒活性,发现 RNASE5 (0.7 $\mu\text{mol/L}$)可以显著降低病毒复制活性,效果优于家族的其它成员;人 RNASE5 对肺炎链球菌的最小杀菌浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$,对粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的最小杀菌浓度约为 10 $\mu\text{mol/L}$,而该浓度对李斯特单胞菌的抑制效率只有约 50%;牛 Rnase5 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和粪肠球菌则未表现出抑菌效应(> 71 $\mu\text{mol/L}$)^[21, 27]。另外,作为同源基因的 Ang4

蛋白对粪肠球菌和李斯特单胞菌的最小杀菌浓度仅为人 RNASE5 的一半(1 $\mu\text{mol/L}$),而其对大肠杆菌、白色念珠菌以及肺炎链球菌则无明显抑制作用^[27]。该研究说明,在进化过程中,小鼠分化出具有不同抗菌活性的 RNASE5 同源基因,维持机体菌群的稳定。除了抗病毒和细菌外,RNASE5 还对真菌具有杀伤活性,且活性显著优于细菌。体外杀菌实验表明,人 RNASE5 对白色念珠菌的最低杀菌浓度为 0.07 $\mu\text{mol/L}$,远低于 HIV 病毒的 0.7 $\mu\text{mol/L}$ 和细菌的 2 $\mu\text{mol/L}$ ^[27]。另外,斑马鱼 ZF-Rnase5 对革兰氏阴性菌,如大肠杆菌、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)作用显著,3 $\mu\text{mol/L}$ 就达到 80%左右杀菌效果,而此浓度对革兰氏阳性菌则无效^[9]。综上所述,RNASE5 具有广谱的抗微生物活性。需要指出的是,目前 RNASE5 对不同微生物的杀伤活性仍存在争议,例如 Avdeeva 等^[30]未能重复 RNASE5 对肺炎链球菌和白色念珠菌的最小杀菌浓度,对该结论仍需要更准确和系统的评价。

Table 1 The antimicrobial activity of RNASE5

Family	Concentration	Species	Efficiency	Reference
Human RNASE5	0.7 $\mu\text{mol/L}$	HIV virus	82%-91%	[29]
	2 $\mu\text{mol/L}$	<i>S. pneumoniae</i>	99%	[27, 30 (controversial data)]
	10 $\mu\text{mol/L}$	<i>E. faecalis</i>	About 80%	[27]
	10 $\mu\text{mol/L}$	<i>L. monocytogenes</i>	About 50%	[27]
Mouse RNASE5	0.07 $\mu\text{mol/L}$	<i>C. albicans</i>	99%	[27]
	1 $\mu\text{mol/L}$	<i>C. albicans</i>	99%	[27]
	2 $\mu\text{mol/L}$	<i>S. pneumoniae</i>	99%	[27]
	1 $\mu\text{mol/L}$	<i>E. faecalis</i>	99%	[27]
Mouse Ang4	4.3 $\mu\text{mol/L}$	<i>L. monocytogenes</i>	99%	[27]
	28 $\mu\text{mol/L}$	<i>E. coli</i>	99%	[28]
	64 $\mu\text{mol/L}$	<i>S. typhimurium</i>	95%	[28]
Cow RNASE5	55 $\mu\text{mol/L}$	<i>C. albicans</i>	90%	[21]
ZF-Rnase5	3 $\mu\text{mol/L}$	<i>E. coli</i>	90%	[9]
	3 $\mu\text{mol/L}$	<i>P. fluorescens</i>	80%	[9]

3 核糖核酸酶 5 的抗微生物机制

研究普遍认为,抗菌肽的杀菌机制与其结构特点和理化特性密切相关^[5, 31]。首先,目前发现的大多数抗菌肽富含赖氨酸、精氨酸等碱性氨基酸,等电点 pI 大于 7,表现出较强的阳离子性,使得其可与阴离子性的细菌细胞壁结合;而有一些阴离子抗菌肽,它们则可以依赖 Zn²⁺ 等二价阳离子与细菌外壁结合^[32]。其次,抗菌肽一般具有两亲性,既含有一个亲水基团,可与水或带负电的物质结合;又含有一个

疏水基团可与脂质相互作用。这些特性有利于抗菌肽与细菌的细胞壁、细胞膜等膜结构结合进而破坏其完整性,导致细胞裂解而释放内容物。例如,经典的人 β -防御素 3(human β -defensin 3,hBD-3)^[33]、再生胰岛衍生蛋白 3 γ (regenerating islet-derived protein 3 gamma,Reg3 γ)^[34]、以及阴极诱导素抗菌肽 LL37(cathelicidin anti-microbial peptide LL-37,LL-37)^[35]均通过该作用机制发挥抗菌活性。当然,抗菌肽也可以进入细胞,通过与细胞内核酸和蛋白质等靶点相互作用,从而影响转录和翻译等生命活动,在不破

坏膜结构的情况下引起细菌死亡。例如,人分泌型白细胞蛋白酶抑制剂(human secretory leucoprotease inhibitor, SLPI)^[36]、富组蛋白5(histatin 5)^[37]等。正如前面所述,RNASE5具有抗菌肽经典的结构特点,同时又具有核糖核酸酶活性,因此我们认为,其可以通过上述两种方式杀伤微生物。

RNASE5可以直接破坏微生物的膜结构。Walker等^[28]将小鼠Ang4与沙门氏菌共孵育后,发现沙门氏菌的细胞膜出现膜泡样结构,且90%以上菌体的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色呈阳性。Harris等^[21]用荧光标记的牛RNASE5与白色念珠菌共孵育。荧光显微镜下发现,该蛋白质可以结合到菌丝表面。本室未发表的数据显示,将重组RNASE5蛋白与大肠杆菌孵育后,免疫荧光检测显示,蛋白质富集在细菌表面,且生理盐溶液能减少吸附并显著降低其抗菌能力,提示带正电荷的RNASE5蛋白通过亲和吸附,结合到带负电荷的微生物表面从而将其杀伤。

RNASE5还可以通过其核糖核酸酶活性发挥杀菌活性。Harris等^[21]发现,RNASE5可以显著抑制白色念珠菌的生长。但是通过PI染色检测,并未发现细胞通透性的显著变化,且培养液中也未检测到细胞内容物增多,提示其对白色念珠菌的杀伤作用并不是直接破坏细胞壁和细胞膜结构。Abtin等^[19]发现,核糖核酸酶抑制剂(核糖核酸酶抑制蛋白、小分子化合物焦碳酸二乙酯和苯并红紫)均可以显著抑制RNASE5的酶活性,同时也可以干扰该蛋白质对白色念珠菌的杀菌活性,提示其酶活性在对白色念珠菌的杀伤过程中是必须的。此外,在细胞感染HIV病毒后2 h,加入RNASE5可以显著降低细胞内病毒复制,说明RNASE5可以进入细胞干扰RNA病毒的复制。虽然其具体作用机制还有待深入研究,但是其同源蛋白质研究结果提示,它可能通过核糖核酸酶活性降解病毒RNA^[29]。

虽然RNASE5存在多样抗微生物作用机制,但是其对特定微生物的杀伤机制可能存在一定的偏好性。本文认为,RNASE5可能通过其核糖核酸酶活性干扰RNA病毒的复制,通过其正电荷吸附性破坏细菌细胞壁结构,而对于真菌的杀伤作用是其阳离子特性和核糖核酸酶活性共同作用的结果。

4 核糖核酸酶5的抗微生物活性调节

正常肠道和机体表面都存在一个复杂而动态的微生物群落,而抗菌肽是机体维持共生菌群动态平

衡的重要手段。有意思的是,越来越多研究发现,抗菌肽的表达和活性也是受到精密调控的^[4]。

RNASE5的表达受到机体内共生菌和细菌代谢产物的调控。Hooper等^[27]发现,小鼠断奶前肠道Ang4表达水平较低,断奶后随着小鼠肠道菌群的逐步建立,其表达水平显著上调,说明Ang4表达受到共生菌的调控。例如,多形拟杆菌可以显著促进Ang4的mRNA和蛋白质水平;进一步研究发现,分离小肠隐窝后,用革兰氏阴性菌细胞壁成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激,Ang4的表达显著上调。Levy等^[38]研究发现,肠道共生细菌的代谢产物牛磺酸,可激活肠上皮细胞的核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白6(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 6, NLRP6)炎性小体,进一步通过下游白细胞介素18(interleukin 18, IL-18)信号通路上调RNASE5的表达;而代谢产物组胺和精胺则能阻断这一通路。Kulka等^[39]在体外培养的肥大细胞系中发现,大肠杆菌的刺激能显著促进RNASE5的合成和分泌。因此,RNASE5和微生物之间存在一种动态平衡关系。

RNASE5的抗微生物活性受到多方面的调控。首先,核糖核酸酶抑制蛋白(ribonuclease inhibitor, RI)能与RNASE5结合而抑制其酶活性,进而保护细胞免受其酶活性产生的细胞毒性威胁,可作为RNASE5调控方式的补充^[40-42];Abtin等^[19]发现,皮肤角质层中的蛋白酶能降解RI,从而释放出游离的RNASE5,促进其杀菌作用。其次,RNASE5的抗微生物活性受到环境的盐浓度和pH值影响。例如,RNASE5的抗微生物活性在NaCl浓度小于50 mmol/L的时候不受影响,而当NaCl浓度从75 mmol/L增加到150 mmol/L时,其杀菌活性逐渐失去(<1%)^[27]。事实上,防御素家族等其他抗菌肽家族也表现出盐敏感性^[43]。以上现象提示,在不同生理条件下,机体可以通过体液盐浓度调节抗菌肽的活性,从而选择性杀伤有害菌,保护益生菌。同时,pH值也会影响RNASE5的抗菌活性。例如,当缓冲液pH值从7下降到4时,会显著提高牛RNASE5杀伤白色念珠的活性,可能与酸性环境下RNASE5表面更多的正电荷有利于与微生物表面的结合有关^[21]。最后,RNASE5的抗微生物活性可能需要通过与其他蛋白质的协同作用。有研究显示,15 $\mu\text{g/mL}$ 牛核糖核酸酶混合蛋白(RNASE 5和RNASE 4)无法杀伤大肠杆菌(*Escherichia coli* K-12),但加入8 $\mu\text{g/mL}$ 乳铁传递蛋白(lactoferrin)后,

可显著增加对大肠杆菌的杀伤效果,而 8 $\mu\text{g/mL}$ 乳铁传递蛋白本身也不足以杀伤大肠杆菌^[44]。因此,在生理条件下,RNASE5 受多方面因素的影响进而选择性地调控特定微生物的含量。

5 核糖核酸酶 5 调节宿主防御与免疫功能

目前认为,机体在外源微生物入侵情况下分泌的抗菌肽,不仅可直接杀伤侵入的微生物,而且可作为一种信号触发宿主启动下游防御和免疫功能^[3, 5, 45]。因此,有学者提出“宿主防御肽”比“抗菌肽”更为恰当^[46]。RNASE5 除了直接杀伤微生物外,还可以调控宿主防御和免疫功能,参与多种病理过程。

RNASE5 可以调节炎症反应程度。Tschesche 等^[47]通过体外研究发现,仅纳摩尔浓度的 RNASE5 蛋白就能显著抑制多型核白细胞的脱颗粒,但不影响其趋化、吞噬和产生氧化应激等功能。随后, Schmaldienst 等^[48]在外周血液循环系统中证实了 RNASE5 的上述效应。即 RNASE5 可以调节机体炎症反应的发生速度,避免因过度免疫反应而导致的机体损害。此外, Lee 等^[49]发现, RNASE5 可以调控角膜成纤维细胞炎症因子的表达。其机制可能是 RNASE5 阻止 NF- κ B 活化和进入细胞核,从而抑制下游炎症因子的表达。但是, RNASE5 在宿主防御和免疫中的调控网络仍有待进一步完善。

RNASE5 参与多种与宿主防御相关疾病的发病过程。炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种由肠道微生物紊乱而引发遗传易感个体异常免疫应答的慢性疾病。有研究显示,炎症性肠病患者血清中 RNASE5 含量显著高于健康对照者^[50],而牛奶中分离的 Rnase5 能够显著改善大鼠肠炎症状^[51];阴道是一个由多种微生物组成的微生态系统, Spear 等^[52]发现,患有性传播疾病妇女的宫颈阴道灌洗液中, RNASE5 水平显著升高;局部免疫功能失调是干眼综合症的主要病因之一,有研究发现眼泪中 RNASE5 的含量与干眼综合症的恶性程度呈负相关^[23]。以上证据支持 RNASE5 作为抗菌肽参与一些宿主防御相关疾病的发病过程,但是缺乏深入的机制研究。

6 问题与展望

从 RNASE5 被定义为抗菌肽开始,其宿主防御功能及其作用机制研究就受到广泛的关注。虽然目前对 RNASE5 的抗微生物谱、抗微生物机制以及免

疫调节作用等有了一定了解,但距离真正揭开其在宿主防御中的功能机制仍路途漫漫:

第一, RNASE5 的抗微生物谱仍不完整。目前, RNASE5 的抗菌活性仅基于特定标准菌种实验获得,未有系统和全面的研究。随着微生物高通量测序技术的发展,今后可以利用 RNASE5 敲除小鼠和动物疾病模型,深入挖掘生理和病理条件下受 RNASE5 调控的微生物种群,并通过体外实验验证。

第二, RNASE5 的抗菌机制仍有待深入挖掘。RNASE5 具有抗菌肽的基本结构特征,又具有独特的核糖核酸酶活性,使得其杀伤微生物的作用机制可以有多多样性。为此,我们一方面需要阐明 RNASE5 与细菌膜表面相互作用的机制,并明确细菌内的 RNA 底物;另一方面揭示 RNASE5 杀菌的选择性及内在机制。

第三, RNASE5 抗微生物活性的生理和病理意义。虽然 RNASE5 表达水平和多种与宿主防御相关疾病密切相关,但是其作用途径和机制仍不明确。例如,在肠道中, RNASE5 这个抗菌肽是通过调控整个肠道微生态稳态还是作用于特定菌群而影响肠炎等疾病的发病过程? 作为一个在多种组织器官表达的蛋白质, RNASE5 的作用及机制是普遍的还是存在特异性?

虽然对 RNASE5 抗微生物功能及机制了解不够深入,但该蛋白质具有明显的临床转化应用空间。抗生素滥用导致微生物耐药性已经成为临床不可回避的问题,而作为进化中保守的机体自身分泌的抗菌肽, RNASE5 具有抗菌谱广、不易产生耐药性和生物相容性好等特点,可作为一类新的抗感染药物以及一些菌群失调相关疾病的治疗新策略。

因此,利用当前新兴的技术和方法,进一步系统和全面地理解 RNASE5 的功能机制,将为 RNASE5 在宿主防御中的基础、转化和临床应用研究带来新的契机。

参考文献 (References)

[1] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans [J]. Cell, 2016, **164**(3): 337-340

[2] Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine [J]. Nat Rev Immunol, 2012, **12**(7): 503-516

[3] Mukherjee S, Hooper LV. Antimicrobial defense of the intestine [J]. Immunity, 2015, **42**(1): 28-39

[4] Mukherjee S, Vaishnava S, Hooper LV. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, **65**(19): 3019-3027

[5] Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins [J].

- Pharmaceuticals (Basel), 2014, **7**(5): 545-594
- [6] Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, *et al.* Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells [J]. *Biochemistry*, 1985, **24**(20): 5480-5486
- [7] Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, **40**(7): 619-624
- [8] Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, **48**(5): 399-410
- [9] Pizzo E, Merlino A, Turano M, *et al.* A new RNase sheds light on the RNase/angiogenin subfamily from zebrafish [J]. *Biochem J*, 2011, **433**(2): 345-355
- [10] Koczera P, Martin L, Marx G, *et al.* The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(8): pii:E1278
- [11] Cho S, Beintema JJ, Zhang J. The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories [J]. *Genomics*, 2005, **85**(2): 208-220
- [12] Rosenberg HF, Dyer KD. Human ribonuclease 4 (RNase 4): coding sequence, chromosomal localization and identification of two distinct transcripts in human somatic tissues [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**(21): 4290-4295
- [13] Dyer KD, Rosenberg HF. The mouse RNase 4 and RNase 5/ang 1 locus utilizes dual promoters for tissue-specific expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(3): 1077-1086
- [14] Sheng J, Luo C, Jiang Y, *et al.* Transcription of angiogenin and ribonuclease 4 is regulated by RNA polymerase III elements and a CCCTC binding factor (CTCF)-dependent intragenic chromatin loop [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(18): 12520-12534
- [15] Hoang TT, Raines RT. Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(2): 818-831
- [16] Harper JW, Vallee BL. A covalent angiogenin/ribonuclease hybrid with a fourth disulfide bond generated by regional mutagenesis [J]. *Biochemistry*, 1989, **28**(4): 1875-1884
- [17] Lee FS, Vallee BL. Characterization of ribonucleolytic activity of angiogenin towards tRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **161**(1): 121-126
- [18] Leland PA, Staniszewski KE, Park C, *et al.* The ribonucleolytic activity of angiogenin [J]. *Biochemistry*, 2002, **41**(4): 1343-1350
- [19] Abtin A, Eckhart L, Mildner M, *et al.* Degradation by stratum corneum proteases prevents endogenous RNase inhibitor from blocking antimicrobial activities of RNase 5 and RNase 7 [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, **129**(9): 2193-2201
- [20] Ionova II, Komolova GS, Shalygina AM, *et al.* Angiogenin content in human milk in the early period of lactation [J]. *Vopr Pitan*, 2001, **70**(1): 7-9
- [21] Harris P, Johannessen KM, Smolenski G, *et al.* Characterisation of the anti-microbial activity of bovine milk ribonuclease 4 and ribonuclease 5 (angiogenin) [J]. *Int Dairy J*, 2010, **20**(6): 400-407
- [22] Komolova GS, Fedorova TV. [Milk angiogenin (Review)] [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2002, **38**(3): 229-236
- [23] Kim WS, Wee SW, Lee SH, *et al.* Angiogenin for the Diagnosis and Grading of Dry Eye Syndrome [J]. *Korean J Ophthalmol*, 2016, **30**(3): 163-171
- [24] Eissa S, Swellam M, Labib RA, *et al.* A panel of angiogenic factors for early bladder cancer detection: enzyme immunoassay and Western blot [J]. *J Urol*, 2009, **181**(3): 1353-1360
- [25] Yu D, Cai Y, Zhou W, *et al.* The Potential of Angiogenin as a Serum Biomarker for Diseases: Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Dis Markers*, 2018, **2018**: 1984718
- [26] Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, **13**(2): 397-406
- [27] Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, *et al.* Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity [J]. *Nat Immunol*, 2003, **4**(3): 269-273
- [28] Walker CR, Hautefort I, Dalton JE, *et al.* Intestinal intraepithelial lymphocyte-enterocyte crosstalk regulates production of bactericidal angiogenin 4 by Paneth cells upon microbial challenge [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e84553
- [29] Bedoya VI, Boasso A, Hardy AW, *et al.* Ribonucleases in HIV type 1 inhibition: effect of recombinant RNases on infection of primary T cells and immune activation-induced RNase gene and protein expression [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006, **22**(9): 897-907
- [30] Avdeeva SV, Chernukha MU, Shaginyan IA, *et al.* Human angiogenin lacks specific antimicrobial activity [J]. *Curr Microbiol*, 2006, **53**(6): 477-478
- [31] Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013, **6**(12): 1543-1575
- [32] Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2009, **10**(6): 585-606
- [33] Bohling A, Hagge SO, Roes S, *et al.* Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3 [J]. *Biochemistry*, 2006, **45**(17): 5663-5670
- [34] Lehotzky RE, Partch CL, Mukherjee S, *et al.* Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(17): 7722-7727
- [35] Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, *et al.* Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity [J]. *Biochem J*, 1999, **341**(Pt 3): 501-513
- [36] Miller KW, Evans RJ, Eisenberg SP, *et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor binding to mRNA and DNA as a possible cause of toxicity to *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1989, **171**(4): 2166-2172
- [37] den Hertog AL, van Marle J, van Veen HA, *et al.* Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane [J]. *Biochem J*, 2005, **388**(Pt 2): 689-695
- [38] Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling [J]. *Cell*, 2015, **163**(6): 1428-1443
- [39] Kulka M, Fukuishi N, Metcalfe DD. Human mast cells synthesize and release angiogenin, a member of the ribonuclease A (RNase A) superfamily [J]. *J Leukocyte Biol*, 2009, **86**(5): 1217-1226
- [40] Pizzo E, Sarcinelli C, Sheng J, *et al.* Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival [J]. *J Cell Sci*, 2013, **126**(Pt 18): 4308-4319
- [41] Haigis MC, Kurten EL, Raines RT. Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(3): 1024-1032
- [42] Thomas SP, Hoang TT, Ressler VT, *et al.* Human angiogenin is a potent cytotoxin in the absence of ribonuclease inhibitor [J]. *RNA*, 2018, **24**(8): 1018-1027
- [43] Bals R, Wang X, Wu Z, *et al.* Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung [J]. *J Clin Invest*, 1998, **102**(5): 874-880
- [44] Murata M, Wakabayashi H, Yamauchi K, *et al.* Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin [J]. *J Dairy Sci*, 2013, **96**(8): 4891-4898
- [45] Mangoni ML, McDermott AM, Zasloff M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations [J]. *Exp Dermatol*, 2016, **25**(3): 167-173
- [46] Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(12): 1551-1557
- [47] Tschesche H, Kopp C, Horl WH, *et al.* Inhibition of degranulation of polymorphonuclear leukocytes by angiogenin and

its tryptic fragment [J]. J Biol Chem, 1994, **269** (48): 30274-30280

[48] Schmaldienst S, Oberpichler A, Tschesche H, *et al.* Angiogenin: a novel inhibitor of neutrophil lactoferrin release during extracorporeal circulation [J]. Kidney Blood Press Res, 2003, **26**(2) : 107-112

[49] Lee SH, Kim KW, Joo K, *et al.* Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts [J]. BMC Ophthalmol, 2016, **16**: 57. doi: 10.1186/s12886-016-0235-z

[50] Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, *et al.* Serum angiogenin in inflammatory bowel disease [J]. Dig Dis Sci, 2004, **49**(11-12): 1758-1762

[51] Kanwar JR, Kanwar RK, Stathopoulos S, *et al.* Comparative activities of milk components in reversing chronic colitis [J]. J Dairy Sci, 2016, **99**(4) : 2488-2501

[52] Spear GT, Kendrick SR, Chen HY, *et al.* Multiplex immunoassay of lower genital tract mucosal fluid from women attending an urban STD clinic shows broadly increased IL1 β and lactoferrin [J]. PLoS One, 2011, **6**(5) : e19560