

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.50.022 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

陈洁, 陈莉莉, 杜星颜, 刘加荣. 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导人皮肤角质形成细胞 $\beta$ -防御素的体外表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(50): 9431-9436.

## 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导人皮肤角质形成细胞 $\beta$ -防御素的体外表达\*\*\*

陈洁, 陈莉莉, 杜星颜, 刘加荣

**文章亮点:** 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对皮肤角质形成细胞免疫分子 $\beta$ -防御素及Toll样受体的表达有着确定的诱导效应, 肯定了其在增强上皮内源性抗感染能力的潜力及应用前景。

**关键词:** 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 组织工程;  $\beta$ -防御素; Toll样受体; 角质形成细胞

### 摘要

**背景:** 人 $\beta$ -防御素在皮肤的固有免疫中占据重要地位, 同时由于其广谱的抗菌活性, 从而成为抗感染临床研究中的热点。

**目的:** 观察原代培养人皮肤角质形成细胞在浓度梯度肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的刺激下, 其免疫分子 $\beta$ -防御素及Toll样受体的表达情况。

**方法:** 取8例30岁以下患者包皮组织, 分别原代培养获取角质形成细胞, 并采用浓度梯度肿瘤坏死因子 $\alpha$ (10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/L}$ )进行刺激, 实时荧光定量PCR检测 $\beta$ -防御素1, 2, 3及Toll样受体2, 4的基因表达水平。

**结果与结论:** 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对 $\beta$ -防御素1, 2, 3基因表达均有明显诱导作用, 且在150  $\mu\text{g/L}$ 时达到最大效应( $P < 0.05$ ), 相对于对照组分别出现明显的升高, 而在200  $\mu\text{g/L}$ 时又出现明显降低, 呈现出浓度依赖性趋势。肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导角质形成细胞后, Toll样受体2, 4的表达规律类似于 $\beta$ -防御素。结果可见肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对体外培养的皮肤角质形成细胞有显著的免疫诱导效应。

### Expression of human beta-defensins in skin keratinocytes under the induction of tumor necrosis factor alpha

Chen Jie, Chen Li-li, Du Xing-yan, Liu Jia-rong

### Abstract

**BACKGROUND:** Human  $\beta$ -defensin plays an important role in the innate immune of the skin. Because of its broad spectrum antibiotic activity, human  $\beta$ -defensin has become one of the hotspots in the clinical anti-inflammation research.

**OBJECTIVE:** To show the inducible expression of human  $\beta$ -defensin and Toll-like receptor in human skin keratinocytes by graded concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ).

**METHODS:** Healthy foreskin tissue samples were obtained from eight patients aged less than 30 years undergoing prepucectomy. Cultured primary human skin keratinocytes from the foreskin were stimulated with graded concentrations of TNF- $\alpha$  (10, 50, 100, 150, and 200  $\mu\text{g/L}$ ). Real-time PCR was performed to quantify mRNA expression of  $\beta$ -defensin 1, 2, 3 and Toll-like receptor 2, 4 from the stimulated cells.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, the expressions of  $\beta$ -defensin 1, 2, 3 and Toll-like receptor 2, 4 in keratinocytes induced by TNF- $\alpha$  were up-regulated apparently and the strongest inducible effect was at the concentration of 150  $\mu\text{g/L}$  ( $P < 0.05$ ) and down-regulated again at the concentration of 200  $\mu\text{g/L}$ , presenting a dose-dependent manner. Skin keratinocytes showed a marked inductive capacity to produce human  $\beta$ -defensin 1, 2, 3 and Toll-like receptor 2, 4 in response to TNF- $\alpha$ .

Chen J, Chen LL, Du XY, Liu JR. Expression of human beta-defensins in skin keratinocytes under the induction of tumor necrosis factor alpha. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(50): 9431-9436.

华中科技大学同济医学院附属协和医院口腔科, 湖北省武汉市 430022

陈洁★, 女, 1986年生, 湖北省随州市人, 汉族, 华中科技大学同济医学院附属协和医院在读硕士, 主要从事口腔黏膜组织工程研究。  
c123321j@126.com

通讯作者: 刘加荣, 博士, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院口腔科, 湖北省武汉市 430022  
kqyyjr@yahoo.com.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344 (2012)50-09431-06

收稿日期: 2012-04-08  
修回日期: 2012-05-28  
(20120208002/M·W)

Department of  
Stomatology, Union  
Hospital, Tongji  
Medical College,  
Huazhong University  
of Science and  
Technology, Wuhan  
430022, Hubei  
Province, China

Chen Jie★, Studying  
for master's degree,  
Department of  
Stomatology, Union  
Hospital, Tongji  
Medical College,  
Huazhong University  
of Science and  
Technology, Wuhan  
430022, Hubei  
Province, China  
c123321j@126.com

Corresponding  
author: Liu Jia-rong,  
Doctor, Associate  
professor,  
Department of  
Stomatology, Union  
Hospital, Tongji  
Medical College,  
Huazhong University  
of Science and  
Technology, Wuhan  
430022, Hubei  
Province, China  
kqyyljr@yahoo.  
com.cn

Supported by: the  
Major International  
Cooperation Program  
of the National  
Natural Science  
Foundation of China,  
No. 31110103905\*;  
the National Natural  
Science Foundation  
of China, No.  
30970740\*; the  
National Natural  
Science Foundation  
of China for the  
Youth, No.  
81000424\*

Received: 2012-04-08  
Accepted: 2012-05-28

## 0 引言

皮肤是抵抗外界微生物的第一道防线,除了作为物理屏障外,皮肤上皮组织的角质形成细胞还可以分泌抗菌多肽,参与先天性免疫<sup>[1]</sup>。人防御素是近年来研究较多的抗菌肽,它不仅具有广谱抗菌活性,而且能够通过Toll样受体的介导,连接先天和获得性免疫应答,保护上皮组织不受病原微生物入侵,成为抗感染研究热点之一<sup>[2-3]</sup>。由于外源性 $\beta$ -防御素获取难度大、费用昂贵,在体内的活性可能被体液抑制等原因,难以应用于临床,故探索内源性 $\beta$ -防御素的诱导表达对于临床抗感染治疗具有重要意义。

肿瘤坏死因子 $\alpha$ 是单核-巨噬细胞受细菌毒素、组织损伤和肿瘤激活时产生的细胞毒性蛋白,具有广泛的生物学活性,是很强的炎症细胞因子<sup>[4-5]</sup>。实验在体外培养人皮肤角质形成细胞,利用梯度浓度肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导角质形成细胞,实时定量PCR检测角质形成细胞 $\beta$ -防御素1, 2, 3 mRNA的表达,为体内 $\beta$ -防御素的诱导分泌及在抗感染免疫中的应用提供研究基础。

## 1 材料和方法

设计: 体外分子水平实验。

时间及地点: 实验于2010年7月至2011年8月在华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室完成。

材料:

主要试剂和仪器:

| 试剂及仪器                 | 来源                     |
|-----------------------|------------------------|
| KSFM 培养基、胰蛋白酶         | Gibco, 美国              |
| Dispase II、二甲基亚砷      | Sigma, 美国              |
| 肿瘤坏死因子 $\alpha$       | Peptrotech, 美国         |
| Trizol、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒 | TAKARA, 日本             |
| 引物                    | 宝生物工程(大连)有限公司          |
| MTT 试剂盒               | 武汉博士德生物工程有限公司          |
| CO <sub>2</sub> 培养箱   | NUAIRE, 美国             |
| 倒置相差显微镜               | Olympus, 日本            |
| 台式低温冷冻高速离心机           | Eppendorf, 德国          |
| 实时荧光定量 PCR 仪          | Applied Biosystems, 美国 |
| 酶标仪                   | Tecan, 瑞士              |

标本: 选取在华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科行包皮切除术的30岁以下健康患者, 无菌条件下取包皮组织8份。患者同意用于科学研究, 并签署知情同意书。

实验方法:

皮肤角质形成细胞的体外培养: 无菌条件下取包皮组织, 30 min内将标本组织转移至超净工作台, 按照Liu等<sup>[6-7]</sup>的方法获取原代角质形成细胞。标本经PBS(含100 U/L青霉素, 100 U/L链霉素)彻底冲洗, 去除皮下脂肪组织, 用无菌眼科剪将上皮组织剪成条索状, 置于1.2 U/mL dispase II中4℃过夜消化。次日超净台内轻轻刮下表皮, 置于无菌安瓿瓶内充分剪碎, 于0.25%胰蛋白酶中37℃消化15 min, 终止消化后吹打成细胞悬液, 200目无菌不锈钢滤网过滤, 1 000 r/min离心5 min去除消化液, KSFM培养液重悬细胞, 37℃, 体积分数为5% CO<sub>2</sub>条件下静置培养。细胞融合至85%左右传代。原代培养的角质形成细胞会混有少量梭形成纤维细胞, 传代时, 根据这两种细胞不同的消化特性, 先使用0.25%胰蛋白酶消化1 min, 弃去消化液, 去除已被消化脱落的成纤维细胞, 继续加入0.25%胰蛋白酶消化2.0-3.0 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃去上清, KSFM培养液重悬细胞, 继续培养。角质形成细胞传至第2, 3代时即已较纯, 可选取用于后续实验检测<sup>[8]</sup>。

MTT检测肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对细胞的毒性作用: 取第2, 3代角质形成细胞以 $2 \times 10^4$ 密度种96孔板, 待细胞融合至约85%时, 加入梯度浓度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ , 实验组选择质量浓度分别为10, 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/L, 对照组选择空白对照。37℃孵育24 h后, 无菌条件下加入5 g/L的MTT, 37℃避光孵育4 h, 每孔加入150  $\mu$ L二甲基亚砷溶解结晶, 酶标仪检测490 nm波长处的吸光度值。

梯度浓度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导角质形成细胞: 取第2, 3代生长良好的角质形成细胞, 均匀接种于6孔板, 待细胞融合至约85%时, 使用梯度浓度的肿瘤坏死因子 $\alpha$  37℃孵育24 h, 所设实验分组与MTT实验相同, 按照RNA提取试剂盒, 提取细胞总RNA, 使用紫外线分光光度仪检测各样本RNA浓度, 分别取500 ng RNA反转录为cDNA。反转录反应条件为37℃ 15 min, 85℃

5 s, 4 °C 终止反应, 反应体系按照反转录试剂盒说明书进行, 将得到的反应液保存于-20 °C, 准备用于下一步的PCR反应。实验重复3次。

**Real-time PCR:** 使用 StepOnePlus™ Real-Time PCR体系, Sybgreen荧光定量联机运行软件为StepOne Software v2.1, 按照TAKARA real-time PCR说明书混合样品, 即10  $\mu$ L体系包含50 ng的总RNA以及Premix、ROX Dye、灭菌双蒸水和200 nmol/L的引物, 每个样本使用3个复孔。 $\beta$ -防御素1, 2, 3及Toll样受体2, 4的引物序列见表1, 使用GAPDH作为内参。

表1  $\beta$ -防御素1, 2, 3及Toll样受体2, 4的引物序列  
Table 1 Primer sequences of human  $\beta$ -defensin (HBD) 1, 2, 3 and Toll-like receptor 2, 4

| Gene  | F(5'-3')                              | R(5'-3')                          | Product size |
|-------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| HBD-1 | GAT CAT TAC AAT TGC<br>GTC AGC AGT GG | CTC ACT TGC AGC ACT<br>TGG CCT TC | 112 bp       |
| HBD-2 | ATC TCC TCT TCT CGT<br>TCC TC         | ACC TTC TAG GGC AAA<br>AGA CT     | 126 bp       |
| HBD-3 | TGT TTG CTT TGC TCT<br>TCC TG         | CTT TCTT CGG CAG<br>CAT TTT C     | 179 bp       |
| TLR2  | TGT GAA CCT CCA GGC<br>TCT            | GTC CAT ATT TCC CAC<br>TCT CAG G  | 256 bp       |
| TLR4  | ACA GAA GCT GGT GGC<br>TGT G          | TCT TTA AAT GCA CCT<br>GGT TGG    | 291 bp       |
| GAPDH | GGC ACA GTC AAG GCT<br>GAG AAT G      | ATG GTG GTG AAG<br>ACG CCA GTA    | 143 bp       |

**反应程序:** 95 °C 预变性30 s, 95 °C 变性5 s, 60 °C 退火30 s。40个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 到95 °C 每1 min 升高1 °C 制作熔解曲线。实验重复3次。反应数据被计算机收集并输出。

**主要观察指标:**  $\beta$ -防御素1, 2, 3及Toll样受体2, 4的基因表达水平。

**统计学分析:** 使用SPSS 17.0软件进行数据分析: 实验组与对照组之间的比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 原代细胞培养结果** 刚接种的细胞为圆形, 混杂有少量体积较大不规则细胞。细胞接种约第3天, 细胞折光性强, 形态多样, 大多为椭圆形, 轮廓清晰光滑。随着细胞贴壁后集落增殖, 数个角质形成细胞形成小簇, 细胞逐渐伸展, 轮廓变得不规则, 细胞变平变大, 折光性减低, 细胞核清晰, 可见核分裂相。细胞长满单层后, 呈多边形, 细胞间紧密连接呈典型的铺路石状, 见图1。

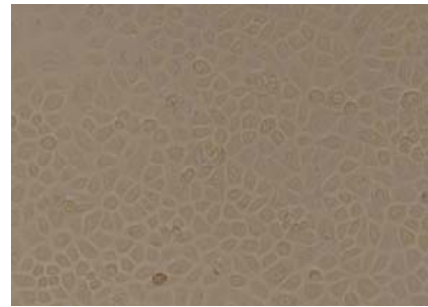


Figure 1 Primary culture of keratinocytes at 10 d ( $\times 200$ )  
图1 培养第10天原代角质形成细胞 ( $\times 200$ )

**2.2 MTT检测细胞增殖情况** 各组细胞的增殖情况见图2。由图2可见肿瘤坏死因子 $\alpha$  37 °C 孵育24 h后, 角质形成细胞的增殖速率明显低于空白对照组( $P < 0.05$ ), 最低降至空白对照组的1/3, 随着质量浓度升高, 各组间差异无显著性意义。由于肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对细胞的增殖有一定的抑制作用, 这便为其在后阶段的应用中浓度的选择上给予一定的指导意义, 提示所选择的浓度梯度需控制在一定范围内。

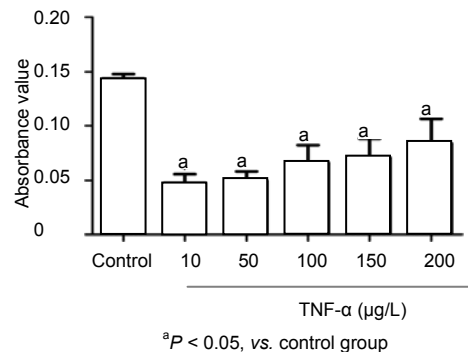


Figure 2 Effect of graded concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) on the proliferation of keratinocytes

图2 不同质量浓度肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对细胞增殖效应的影响

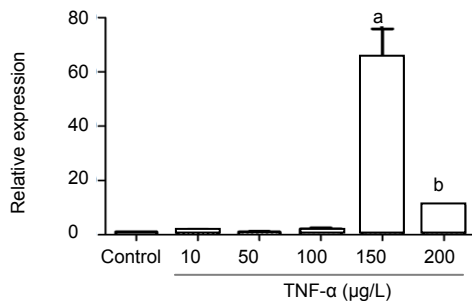
**2.3 Real-time PCR检测结果** 各组 $\Delta$ Ct值见表2, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值进行单因素方差分析, 各目的基因的相对表达量见图3, 图4。由图3可见浓度梯度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激角质形成细胞24 h后, 在150  $\mu$ g/L质量浓度 $\beta$ -防御素的表达量有最显著的增加, 随着质量浓度升高至200  $\mu$ g/L,  $\beta$ -防御素的表达量又明显降低。相对于对照组,  $\beta$ -防御素3升高约1 000多倍( $P < 0.05$ ),  $\beta$ -防御素2升高约900多倍( $P < 0.005$ ),  $\beta$ -防御素1升高约60多倍( $P < 0.05$ )。由图4可见Toll样受体的表达量与 $\beta$ -防御素的趋势相同, 于150  $\mu$ g/L显著升高, 而在200  $\mu$ g/L又明显降低, 与对照组相比, 在使用浓度梯度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激后, Toll样受体2升高约200多倍( $P < 0.005$ ),

Toll样受体4升高约60多倍( $P < 0.005$ )。由上述结果可见, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对这两类免疫分子在角质形成细胞的表达均有显著的诱导促进作用。

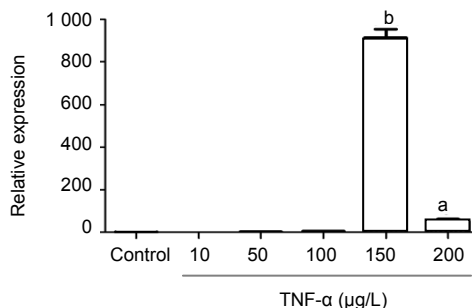
表2 不同处理组各目的基因 Real-time PCR  $\Delta$ Ct 值  
Table 2  $\Delta$ Ct value of target genes in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group         | HBD-1            | HBD-2            | HBD-3            | TLR2             | TLR4            |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Control       | 5.80 $\pm$ 0.05  | 11.67 $\pm$ 0.25 | 11.61 $\pm$ 0.08 | 6.63 $\pm$ 0.16  | 8.16 $\pm$ 0.13 |
| 10 $\mu$ g/L  | 5.19 $\pm$ 0.10  | 15.03 $\pm$ 0.22 | 7.81 $\pm$ 0.05  | 7.34 $\pm$ 0.17  | 6.22 $\pm$ 0.05 |
| 50 $\mu$ g/L  | 5.83 $\pm$ 0.08  | 9.81 $\pm$ 0.07  | 7.08 $\pm$ 0.02  | 5.26 $\pm$ 0.03  | 4.18 $\pm$ 0.07 |
| 100 $\mu$ g/L | 4.81 $\pm$ 0.11  | 8.81 $\pm$ 0.10  | 6.15 $\pm$ 0.11  | 4.88 $\pm$ 0.05  | 4.90 $\pm$ 0.07 |
| 150 $\mu$ g/L | -0.22 $\pm$ 0.12 | 1.83 $\pm$ 0.06  | 0.95 $\pm$ 0.07  | -1.13 $\pm$ 0.04 | 2.20 $\pm$ 0.77 |
| 200 $\mu$ g/L | 2.37 $\pm$ 0.03  | 5.98 $\pm$ 0.25  | 3.64 $\pm$ 0.10  | 2.64 $\pm$ 0.09  | 7.03 $\pm$ 0.06 |

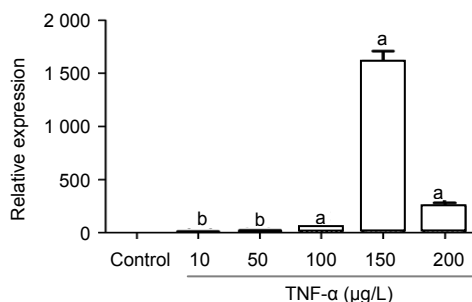
HBD: human  $\beta$ -defensin



A: expression of HBD-1



B: Expression of HBD-2

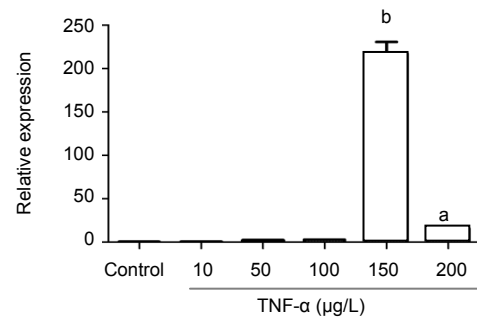


C: Expression of HBD-3

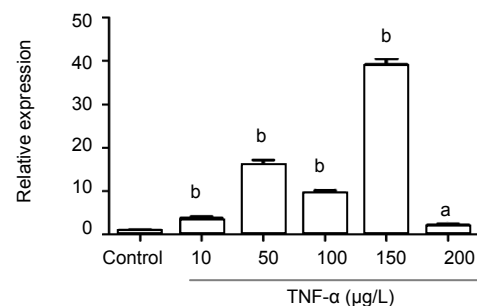
<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.005$ , vs. control group

Figure 3 Expression of human  $\beta$ -defensin (HBD) in skin keratinocytes under the induction of graded concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )

图3 不同质量浓度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 处理后 $\beta$ -防御素的表达水平



A: Expression of TLR2



B: Expression of TLR4

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.005$ , vs. control group

Figure 4 Expression of Toll-like receptor (TLR) in skin keratinocytes under the induction of graded concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )

图4 不同质量浓度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 处理后Toll样受体的表达水平

### 3 讨论

皮肤的天然特性之一就是分泌内源性的抗菌肽来抵御病原微生物感染, 防御素作为皮肤抵御微生物感染的重要成分, 具有广谱的抗菌活性, 能够识别各类G<sup>+</sup>、G<sup>-</sup>菌, 以及真菌和某些病毒<sup>[9-10]</sup>。它不仅通过直接杀伤各类病原物质而发挥重要的固有免疫效应, 还可通过趋化因子受体活化T细胞和树突状细胞而成为沟通固有免疫与获得性免疫的桥梁<sup>[11-12]</sup>。 $\beta$ -防御素对病原微生物的作用是直接破坏或诱导杀伤及吞噬作用, 其免疫反应是不伴随炎症损伤的。且这种固有免疫反应过程中, 病原菌很难对其产生耐药性<sup>[13]</sup>, 这些特性均增加了其在临床应用中的价值<sup>[14-15]</sup>, 为今后设计新类型的抗菌药物提供了可能<sup>[16-17]</sup>。皮肤固有免疫密切相关的 $\beta$ -防御素有3类, 分别是 $\beta$ -防御素1, 2, 3。 $\beta$ -防御素1在各类上皮组织固有表达, 如肺、肾及角化的上皮组织,  $\beta$ -防御素1表达水平比较恒定, 不因正常或慢性炎症感染而发生明显变化<sup>[18-19]</sup>。而 $\beta$ -防御素2是发现的第一个具有可以通过炎症因子调节的特性,  $\beta$ -防御素2表达受各种炎性递质

或细胞因子刺激发生明显变化<sup>[20]</sup>。 $\beta$ -防御素3则是在受到各类炎症因素刺激的情况下才表达<sup>[21-22]</sup>。

本实验体外分离培养人皮肤角质形成细胞,利用肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导 $\beta$ -防御素的表达,结果显示,肿瘤坏死因子 $\alpha$ 不仅可以诱导 $\beta$ -防御素2,3的表达,同时可以使 $\beta$ -防御素1的表达增加, $\beta$ -防御素3经诱导后表达水平最强,其次为 $\beta$ -防御素2,而 $\beta$ -防御素1对外界的诱导反应相对较弱。这种趋势可以解释为 $\beta$ -防御素1在角质形成细胞是固有表达,而 $\beta$ -防御素2,3是由炎症因子诱导表达,所以前者对外界的反应相对后两者较弱一些。可见肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对皮肤角质形成细胞免疫分子的表达有着确定的诱导效应,肯定了其在增强上皮内源性抗感染能力研究中的潜力及应用前景。本实验选择出了最佳的诱导条件,即选取150  $\mu\text{g/L}$ 的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导角质形成细胞24 h,可使其内免疫分子 $\beta$ -防御素及Toll样受体的诱导表达效果达到最大。这一研究结果可用于指导后期体内实验,为研究提高上皮组织内免疫分子如防御素表达的研究提供依据,进而为提高上皮组织抗感染能力的研究奠定基础。

Toll样受体是一类重要的模式识别受体,表达于各类免疫细胞及某些非免疫细胞表面参与固有免疫,目前在哺乳动物中已发现Toll样受体的12个亚类<sup>[23]</sup>。Toll样受体2及Toll样受体4这两类为目前研究最多最为成熟的两类,与上皮组织免疫防御功能密切相关,发挥着相互协同的作用。研究表明,Toll样受体2主要通过识别 $G^+$ 菌的磷壁酸和脂蛋白以及某些病毒的抗原决定簇<sup>[24]</sup>,Toll样受体4主要通过识别 $G^-$ 菌的脂多糖成分、热休克蛋白等内源性抗原以及病毒信封蛋白来发挥固有免疫作用<sup>[25]</sup>。

Paolillo等<sup>[26]</sup>研究使用Toll样受体2中和抗体封闭Toll样受体2后, $\beta$ -防御素对外界的反应性表达降低,提示Toll样受体2是实现 $\beta$ -防御素的诱导效应的途径之一。Birchler等<sup>[27]</sup>则更深入地探讨了Toll样受体与 $\beta$ -防御素之间联系的分子机制。使用失活突变型白细胞介素1受体相关蛋白酶2,抑制Toll样受体2,同样证明了这一结论。Redfern等<sup>[28]</sup>用各种Toll样受体激动剂刺激体外培养的眼表皮细胞,证明Toll样受体2,4,5等的激动剂可升高 $\beta$ -防御素2的表达。本实验中,肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对Toll样受体2,4的诱导表达也出现了跟 $\beta$ -防御素相同的规律,均在150  $\mu\text{g/L}$ 时出现最佳诱导效应,且对Toll样受体2的诱导效应强于Toll样受体4。提示 $\beta$ -防御素对外界的反应性表达可能依赖Toll样受体途径,然而具体的信号通路还不是很明确,提示有必要在前述研究基础上进一步深入研究 $\beta$ -防御素和Toll样受体的相互联系机制。

致谢: 特别感谢武汉市协和医院泌尿外科医生为本研究提供充足的组织标本。

#### 4 参考文献

- [1] Bangert C, Brunner PM, Stingl G. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol*. 2011;29(4):360-376.
- [2] Schaubert J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3 Suppl 2):R13-18.
- [3] Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, et al. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*. 2010;135(1):1-11.
- [4] Kwon S, Vandenplas ML, Figueiredo MD, et al. Differential induction of Toll-like receptor gene expression in equine monocytes activated by Toll-like receptor ligands or TNF- $\alpha$ . *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;138(3):213-217.
- [5] Shin JE, Choi Y. *Treponema denticola* suppresses expression of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells through inhibition of TNF $\alpha$  production and TLR2 activation. *Mol Cells*. 2010;29(4):407-412.
- [6] Liu J, Lamme EN, Steegers-Theunissen RP, et al. Cleft palate cells can regenerate a palatal mucosa in vitro. *J Dent Res*. 2008;87(8):788-792.
- [7] Liu JR, JW Von den Hoff, AM Kuijpers-Jagtman, et al. Huazhong Keji Daxue Xuebao: Yixueban. 2011;40(5):558-561.  
刘加荣, JW Von den Hoff, AM Kuijpers-Jagtman, 等. 4种支架构建复合式口腔黏膜的组织学特点[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2011, 40(5): 558-561.
- [8] Zhou ZT, Huang JY, Zhou XJ. *Linchuang Kouqiang Yixue Zazhi*. 2003;19(9):520-523.  
周曾同, 黄吉燕, 周晓健. 人口腔黏膜异常增生上皮细胞体外培养体系的研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(9): 520-523.
- [9] Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res*. 1999;45(6):785-794.
- [10] Okumura K. Cathelicidins—Therapeutic antimicrobial and antitumor host defense peptides for oral diseases. *Japanese Dental Science Review*. 2011;47(1):67-81.
- [11] Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999;286(5439):525-528.
- [12] Steinstraesser L, Kraneburg U, Jacobsen F, et al. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*. 2011;216(3):322-333.
- [13] Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(3):217-225.
- [14] Ajesh K, Sreejith K. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. *Peptides*. 2009;30(5):999-1006.
- [15] Dinulos JG, Mentele L, Fredericks LP, et al. Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(1):161-166.

- [16] Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol.* 2007;44(12): 3100-3111.
- [17] Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011;29(9):464-472.
- [18] Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, et al. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun.* 1998;66(9):4222-4228.
- [19] Prado-Montes de Oca E. Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(6):800-804.
- [20] Liu L, Wang L, Jia HP, et al. Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene.* 1998;222(2):237-244.
- [21] Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 2001;276(8): 5707-5713.
- [22] Saitoh M, Abiko Y, Shimabukuro S, et al. Correlated expression of human beta defensin-1, -2 and -3 mRNAs in gingival tissues of young children. *Arch Oral Biol.* 2004;49(10): 799-803.
- [23] Essakalli M, Atouf O, Bennani N, et al. Toll-like receptors. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57(5):430-438.
- [24] Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, et al. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine.* 2011;29(17):3341-3355.
- [25] Ueta M, Nochi T, Jang MH, et al. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribute to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J Immunol.* 2004;173(5):3337-3347.
- [26] Paolillo R, Romano Carratelli C, Sorrentino S, et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9(11):1265-1271.
- [27] Birchler T, Seibl R, Büchner K, et al. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol.* 2001;31(11):3131-3137.
- [28] Redfern RL, Reins RY, McDermott AM. Toll-like receptor activation modulates antimicrobial peptide expression by ocular surface cells. *Exp Eye Res.* 2011;92(3):209-220.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 国家自然科学基金重大国际合作研究项目(31110103905), 国家自然科学基金(30970740), 国家自然科学基金青年基金(81000424)。

**作者贡献:** 实验设计为刘加荣, 实验实施为陈洁, 实验评估为陈莉莉, 资料收集为杜星颜。陈洁成文, 陈莉莉审校, 刘加荣对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 包皮组织标本由华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科提供, 患者同意用于科学研究, 并获得华中科技大学同济医学院伦理委员会的许可。

**文章要点:** ①实验确立了炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对体外原代培养的皮肤角质形成细胞具有明显的免疫诱导效应。②实验从理论上证明了适当浓度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 可增强皮肤上皮组织的抗感染能力。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。