论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410080

电离辐射对小鼠肠道隐窝素4表达的影响及意义

曹 乐,王 成,申明强,王艾平,陈 芳,耿 放,陈 默,张乃心,粟永萍,程天民,王军平 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,防原医学教研室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医药工程技术研究中心)

[摘要] **目的** 检测小鼠受电离辐射后隐窝素4(cryptdin 4, Crp4)的表达变化,探讨其在电离辐射肠损伤中的生物学意义。**方法** 8周龄BALB/c小鼠采用随机数字表法分为两组,未辐照组($n=5$)和辐照组($n=15$),辐照组给予8 Gy X射线全身一次性照射,分别于照后9、24、72 h取小鼠小肠组织和眼球血。免疫组织化学染色和Western blot分析小鼠小肠Paneth细胞隐窝素Crp4的表达变化,鲎试剂法检测小鼠血清LPS水平。化学合成Crp4多肽,采用涂布克隆计数法分析Crp4对肠道条件致病菌(大肠杆菌、粪肠球菌)和益生菌(乳酸杆菌、双歧杆菌)的抗菌活性;同时,观察Crp4对LPS诱导促炎因子IL-1β生成的影响。**结果** 与对照组相比,小鼠电离辐射后小肠Crp4表达水平升高,72 h升高尤为显著($P<0.01$);辐照小鼠血清LPS含量在9 h后显著增加($P<0.05$),72 h后升高最为明显($P<0.01$);Crp4对条件致病菌(大肠杆菌、粪肠球菌)的抗菌活性显著强于益生菌(乳酸杆菌、双歧杆菌),并能抑制LPS诱导单核巨噬细胞IL-1β的生成($P<0.01$)。**结论** 电离辐射可以诱导小鼠肠道隐窝素Crp4的表达上调,Crp4表达上调可发挥调节肠道菌群、减轻机体炎症反应的作用。

[关键词] 电离辐射;隐窝素4;抗菌;LPS;IL-1β
[中图法分类号] R322.45;R392.3;R818.02 [文献标志码] A

Alteration and significance of small intestinal cryptdin 4 in ionizing-radiated mice

Cao Le, Wang Cheng, Shen Mingqiang, Wang Aiping, Chen Fang, Geng Fang, Chen Mo, Zhang Naixin, Su Yongping, Cheng Tianmin, Wang Junping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of ionizing radiation on the expression of mouse cryptdin 4 (Crp4) and explore the biological significance. **Methods** BALB/c mice (8 weeks old) were randomly divided into a control group ($n=5$) and a radiated group ($n=15$), and the radiated group was treated by total-body ionizing radiation (8 Gy X-ray). The small intestinal tissue and eyeball blood were collected before and after ionizing radiation (at 9, 24, and 72 h respectively). Immunohistochemical assay and Western blot analysis were employed to detect the alteration of Crp4 in mouse small intestine. Quantitative chromogenic tachypleus amebocyte lysate test was used to analyze the alteration of lipopolysaccharide (LPS) in blood serum. Crp4 peptide was obtained through chemical synthesis. Colony counting was employed to assess the antibacterial activity of Crp4 against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum*. Also, the effect of Crp4 on the release of IL-1β from mouse RAW264.7 cells after LPS simulation was evaluated. **Results** The expression of Crp4 in the mouse small intestine was increased after ionizing radiation, and the alteration was the most remarkable at 72 h ($P<0.01$). The serum LPS level of the radiated mice was significantly increased after 9 h ($P<0.05$), and peaked after 72 h ($P<0.01$).

[基金项目] 全军后勤科研重点项目(BWS11J009);国家自然科学基金(81271898,81172600)
[通信作者] 王军平,E-mail: wangjunping@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141210.1627.001.html(2014-12-10)

Conditional pathogenic bacteria (*Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*) were more sensitive to Crp4 than probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*). Moreover, it was found that Crp4 could decrease the release of IL-1β from RAW264.5 cells stimulated with LPS. **Conclusion** Ionizing radiation can induce the up-regulation of Crp4 expression, which might play an important role in the regulation of the intestinal flora and relieve of the inflammatory responses.

[**Key words**] ionizing radiation; cryptdin 4; antibacterial activity; LPS; IL-1β

Supported by the Key Projects of Logistic Scientific Research of PLA (BWS11J009) and the National Natural Science Foundation of China (81271898, 81172600). Corresponding author: Wang Junping, E-mail: wangjunping@tmmu.edu.cn

小肠是辐射敏感器官,急性放射病及腹部恶性肿瘤患者放疗后容易发生放射性肠炎。人肠道内约有1 000种微生物(10^{14} CFU),构成了复杂的肠道微生态[1]。其中,肠道条件致病菌与益生菌之间的平衡与机体健康密切相关[2-3]。研究表明,机体受到电离辐射后,以兼性需氧菌为主的条件致病菌在肠道中比例显著增高[4]。增多的致病菌可通过破损肠黏膜侵入机体,释放大量毒素,造成肠源性感染、内毒素血症以及多器官功能衰竭防御素是一类内源性阳离子短肽,具有显著的抗菌、抗病毒活性[5-6]。哺乳动物肠腔内,除机械性肠黏膜屏障外,由肠隐窝Paneth细胞分泌的防御素(在小鼠中被称为隐窝素)是另一道抵制微生物入侵的天然免疫屏障。研究发现,防御素的含量并不恒定,多数防御素在机体发生感染和炎症时表达水平会发生明显改变,从而参与机体免疫反应调节[7-8]。然而,在放射性肠炎发生过程中肠道防御素的作用尚不清楚。为此,本实验观察急性辐射损伤小鼠肠道隐窝素4(cryptdin 4, Crp4)的表达变化,并在体外探讨Crp4的抗菌活性和中和LPS的能力,旨在为深入研究肠道防御素在放射性肠炎发生、发展中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

RIPA Buffer、多聚甲醛、抗体封闭奶粉购自Sigma公司;Crp4兔源多抗由本所制备[9];免疫组化二抗、DAB显色剂购自北京中杉金桥;Western blot二抗、显色剂、β-actin一抗购自碧云天公司;Crp4合成肽由杭州中肽合成;TSB、RCM、MRS培养基购自OXOID公司;基质显色鲎试剂盒购自厦门鲎试剂公司;IL-1β ELISA试剂盒购自博士德生物公司。

1.2 实验动物分组及模型的建立

8周龄健康雌性BALB/c小鼠20只,体质量18.8~21.4 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。采用随机数字表法将小鼠分两组:未辐照组(辐照前,$n=5$)和辐照组($n=15$),饲养3 d适应环境后开始进行实验。用1%的戊巴比妥麻醉小鼠后,辐照组小鼠给予8 Gy X线全身辐照,2 Gy/min,共照射4 min。分别在辐照后9、24、72 h取材,每组5只。

1.3 免疫组化检测Crp4的表达

取小肠组织2 cm,经过固定、脱水、石蜡包埋切片,烤片45 min后,依次用二甲苯脱蜡、梯度浓度酒精复水、柠檬酸盐热修复、3%过氧化氢消除内源性过氧化氢酶的活性,用山羊血清封闭20 min,加入兔源Crp4多克隆抗体(1∶800),放入湿盒4 ℃过夜。次日,用PBS洗涤3次,加入抗兔的二抗(1∶1 000)37 ℃孵育45 min。PBS洗涤3次后用DAB显色,苏木精复染后封片。

1.4 Western blot检测Crp4的表达

取小肠组织3 cm快速称量后置于预冷的玻璃匀浆器中,按比例加入组织蛋白提取液,在冰上用匀浆器充分裂解组织,冰上静置30 min,12 000 × *g* 离心15 min,收集上清,BCA法测蛋白浓度,调整蛋白浓度至10 μg/μL。配置12%聚丙烯酰胺凝胶,按每孔等量样本10 μL上样,浓缩胶80 V,分离胶120 V进行电泳分离蛋白。电泳分开条带后用湿转法将蛋白转到PVDF膜上,用5%奶粉37 ℃封闭1 h,用一抗稀释液以1∶300和1∶1 000分别稀释Crp4抗体及β-actin抗体,4 ℃孵育过夜。次日,用PBST洗涤3次,10 min/次,加入二抗(1∶1 000),37 ℃孵育1 h;PBST洗涤3次,10 min/次,用ECL发光剂显影成像。将β-actin作为内参,用Quantity One软件分析Crp4与β-actin的灰度比值,比较蛋白相对表达量的变化情况。

1.5 液相色谱质谱联用(LC-MS)确认Crp4合成肽纯度

Crp4的氨基酸序列:GLLCYCRKGHCKRGERVR-GTCGIRFLYCCPRR。6个半胱氨酸以Cys1-Cys6/Cys2-Cys4/Cys3-Cys5方式连接,形成3对定向二硫键。化学合成Crp4后,用灭菌超纯水将其定容到200 μg/mL。吸取100 μL用(Agilent 1260)进行色谱分析:色谱柱300 Extend-C18 column(150 mm × 2.1 mm × 3.5 μm),保护柱(2.1 mm × 12.5 mm)。用含0.1%三氟乙酸的5% ~40%乙腈溶液进行梯度洗脱,速度0.25 mL/min。采用Agilent 6410系统计量带电离子数和质荷比,用Agilent MS1.0工作站采集数据并分析出峰情况和相

对分子质量。

1.6 涂布克隆计数法分析 Crp4 抗菌性

单克隆细菌分别用对应培养基进行培养:大肠杆菌(ATCC 25922)和粪肠球菌(ATCC 29212)用 TSB 培养基(pH=7.4),乳酸杆菌(ATCC 314)用 MRS 培养基(pH=6.4),双歧杆菌(ATCC 11863)用 RCM 培养基(pH=8.5)。菌株分别加入 5 mL 培养基,37 ℃摇床过夜(200 r/min),得到细菌种子液。次日,按 1∶100 将细菌种子液接种到 10 mL 培养基中,置于 37 ℃摇床至光密度 D(600)值在 0.5 左右。取 1 mL 菌液 4 ℃低温离心沉淀(8 000 × g, 5 min),用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH=7.4)重悬细菌,定细菌量至 10^6 CFU/mL。将细菌接种至 96 孔板,每孔 90 μL;加入 10 μL 8 ~ 0.25 μmol/L 2 倍倍比稀释的 Crp4。37 ℃孵箱反应 1 h 后,从每孔取出 50 μL 混合液,加入到 450 μL 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液中,继续稀释 100 倍。吸出 100 μL 菌液,分别均匀涂布于对应的 TSB、MRS 和 RCM 培养板上,37 ℃孵箱 16 h,计数克隆菌量。按细菌死亡率 =(对照菌量 − 处理组菌量)/对照菌量 ×100%,计算并比较 Crp4 对 4 种细菌的半数致死浓度(LD_{50})和 90% 致死浓度(LD_{90})。Crp4 浓度依次为 0.25、0.5、1、2、4、8 μmol/L;实验重复 3 次,每次 2 个复孔。

1.7 基质显色鲎试剂检测辐照小鼠血清 LPS 变化

无菌摘取小鼠眼球取血,4 ℃低温4 000 × g 离心 10 min,吸取血清冻存于 −80 ℃冰箱中。各取 100 μL 稀释 2 倍的血清,加入 100 μL 鲎试剂,37 ℃水浴锅中孵育 1 h 后,分别加入 100 μL 显色基质,37 ℃水浴锅中孵育 6 min。依次加入 500 μL 偶氮化试剂 1、2、3,静置 5 min。从每管中取 200 μL 混合液加入 96 孔板,用酶标仪检测波长 545 nm 处的光密度值[D(545)]反映 LPS 的含量。

1.8 ELISA 检测 Crp4 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放 IL-1β 的影响

用含 10% FBS、1% 谷氨酰胺的 DMEM 高糖培养液培养小鼠 RAW264.7 细胞,置于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱。贴壁融合约 70% 时收取细胞,用培养基重悬细胞,按 5 × 10^4/孔将细胞接种于 24 孔板。细胞贴壁后换无血清培养基饥饿 12 h。吸去上清,对照组加入无血清培养基,阳性对照组(LPS)加入 100 ng/mL LPS,Crp4 组加入 25 μg/mL 抗菌肽,Crp4 干扰组(Crp4 + LPS)加入 100 ng/mL LPS 和 25 μg/mL Crp4;每个孔液体总量均为 1 mL。药物刺激 24 h 后,收集细胞上清,2 000 × g 4 ℃低温离心 10 min 去沉淀,用小鼠 IL-1β ELISA 试剂盒检测上清中 IL-1β 的含量。

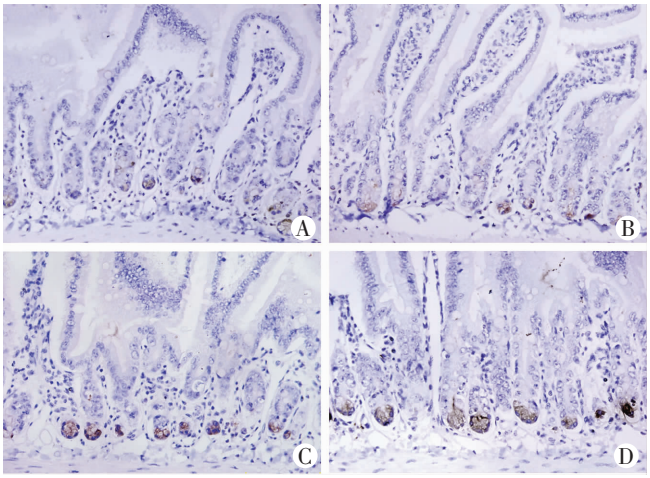
1.9 统计学分析

实验每次设置复孔,独立实验重复 3 次。采用 SPSS 17.0 统计软件,两组间比较用 t 检验,多组间用单因素方差分析。

2 结果

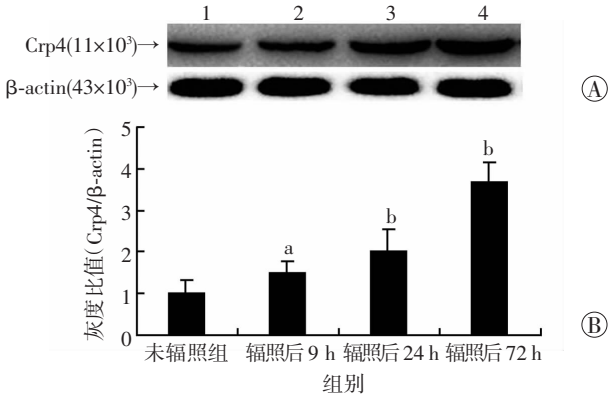
2.1 电离辐射显著促进肠道 Crp4 的表达

电离辐射前,Crp4 组成性表达于小肠绒毛基底部隐窝处,含量相对较低。8 Gy X 射线全身一次性辐照处理后,Crp4 的表达随时间推移逐渐增加。辐照后 72 h,Crp4 的变化尤为明显(图 1)。与免疫组化结果相似,Western blot 同样检测到 Crp4 表达具有时间依赖性升高趋势(图 2)。对蛋白条带进行灰度半定量分析可知,与未辐照组小鼠相比,辐照后 9 h 小鼠小肠 Crp4 的表达即明显增高(P < 0.05),辐照后 24 h 和 72 h 时 Crp4 的增加尤为明显(P < 0.01)。



A:未辐照组;B:辐照后 9 h 组;C:辐照后 24 h 组;D:辐照后 72 h 组

图 1 免疫组化观察辐照小鼠肠道 Crp4 的表达变化 (S-P ×400)



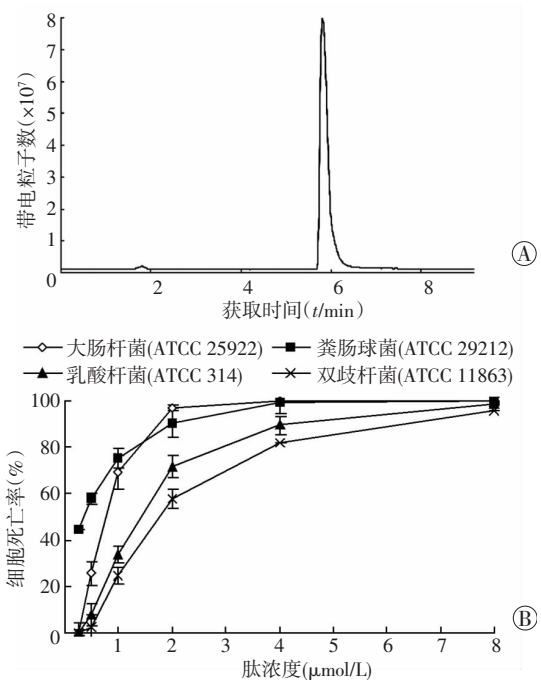
A: Western blot 检测结果 1:未辐照组;2 ~ 4:分别为辐照后 9、24、72 h;;B: 灰度值半定量分析 a:P < 0.05,b:P < 0.01,与未辐照组比较

图 2 Western blot 检测小鼠肠道 Crp4 的表达变化

2.2 Crp4 具有选择性抗肠道条件性致病菌活性

采用LC-MS技术检测化学合成 Crp4(报告纯度

92.2%)在水溶状态下的出峰情况和质荷比。Crp4 进样后仅于 6 min 左右呈现单一峰型(图 3A),通过质荷换算得到的分子量为 3 755.6,与理论分子量 3 755.5 吻合。Crp4 抗菌活性呈现明显的剂量依赖性增加,它对 G^+ 和 G^- 细菌均有较高的的致死率(图 3B)。相比之下,Crp4 对 G^+ 致病菌活性更强,尤其是在低剂量条件下(<1 μmol/L)。此外,Crp4 抗条件致病菌活性明显强于抗益生菌活性,无论是致半数或 90% 细菌死亡,Crp4 抗乳酸杆菌和双歧杆菌所需剂量要明显高于抗大肠杆菌和粪肠球菌所需剂量(表 1)。



A: Crp4 合成肽的 LC-MS 分析图;B:Crp4 抗菌曲线

图 3　Crp4 抗菌活性检测

表 1　Crp4 对 4 种细菌的半数致死浓度和 90%致死浓度
(μmol/L, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

菌种	LD_{50}	LD_{90}
大肠杆菌(ATCC 25922)	0.78 ± 0.04	1.75 ± 0.05
粪肠球菌(ATCC 29212)	0.35 ± 0.05	1.96 ± 0.03
乳酸杆菌 (ATCC 314)	1.43 ± 0.04[ab]	4.22 ± 0.03[ab]
双歧杆菌(ATCC 11863)	1.76 ± 0.05[ab]	6.35 ± 0.04[ab]

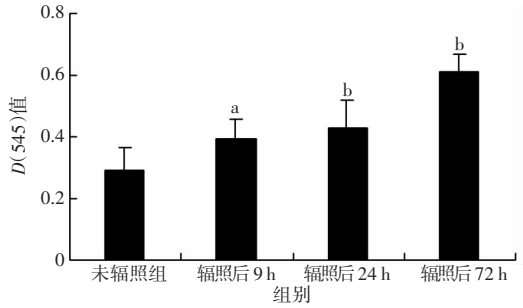
a:$P<0.01$, 与大肠杆菌比较;b: $P<0.01$,与粪肠球菌比较

2.3　辐照对小鼠血清 LPS 的影响

与未辐照组比较,辐照小鼠血清 LPS 含量在 9 h 后显著升高($P<0.05$),72 h 后升高明显($P<0.01$,图 4)。

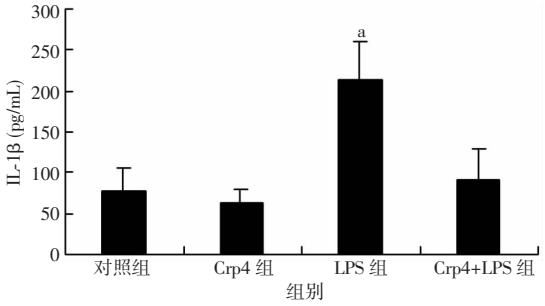
2.4　Crp4 抑制 LPS 诱导单核巨噬细胞分泌 IL-1β

100 ng/mL LPS 可显著促进小鼠 RAW264.7 细胞表达和分泌促炎因子 IL-1β($P<0.01$),而 Crp4 能阻断 LPS 对 IL-1β 的诱导表达作用($P<0.01$,图 5)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与辐照前比较

图 4　辐照小鼠血清 LPS 变化情况



a:$P<0.01$,与其他 3 组比较

图 5　Crp4 对 LPS 的中和作用

3　讨论

哺乳动物小肠是宿主吸收食物营养的重要器官,也是微生物定植的理想场所。然而,与毗邻的结肠相比,小肠内的细菌定植密度相对较低,Paneth 细胞在其中发挥着关键作用。类胆碱兴奋剂、细菌及其菌膜成分均可刺激 Paneth 细胞脱颗粒,释放抗菌分子进入肠腔[10]。Crp4 是小鼠小肠 Paneth 细胞分泌的一种阳离子抗菌肽,属于哺乳动物 α 防御素家族。本实验显示,小鼠在电离辐照(8 Gy X 射线)刺激下,小肠 Crp4 含量显著增加。Gorbunov 等[11] 用小鼠辐照模型(9.25 Gy γ 射线)发现小肠 Paneth 细胞受辐照后自噬增强、胞内颗粒增多,但没有直接证据显示增多的颗粒内含 Crp4。相比之下,支持细菌诱导 Crp4 增高的证据更充分:由于对电离辐射的敏感度不同,小鼠受辐照后肠道益生菌减少、条件致病菌增多[12],而后者及其毒素均能诱导小肠隐窝增强 Crp4 的表达。本研究显示,受照后小鼠小肠 Crp4 表达上调的同时伴随着血清 LPS 的显著升高,提示辐照后条件性致病菌的增多可能会自发诱导小肠 Crp4 的表达增高。

细胞和组织的辐射敏感性与其增生能力成正比,肠道对电离辐射高度敏感,这与肠黏膜细胞多处于 M 期、G_2 期及 S 后期密切相关。对增殖活跃的肠道菌群而言,不同的菌属对电离辐照的敏感性亦不同。小鼠辐照后"益生菌减少、条件致病菌增多"反映肠道益生菌比条件致病菌对射线更敏感。与此相对应的是

“Crp4的选择性杀菌”。业已认可抗菌肽的抗菌机制：两亲性阳离子肽以正电荷静电吸附于细菌的负电荷磷脂膜上，利用成簇的疏水性官能团插入并破坏菌膜的完整性，致使细菌在内外渗透压作用下破裂[13]。先前对抗菌肽选择性杀菌的研究主要集中在G^-和G^+之间的差异，净电荷占优势的抗菌肽对G^-更为有效，如人β防御素3[14]；疏水性强的抗菌肽则对G^+菌更有效，如人肠道防御素HD5。本研究显示Crp4抗G^+粪肠球菌的能力要强于抗G^-大肠杆菌，尤其在低浓度条件下，说明在抗菌反应中Crp4的疏水性占据主要作用。有趣的是，G^-大肠杆菌比G^+乳酸杆菌和双歧杆菌对Crp4更敏感。虽然具体机制尚未确认，根据先前对耐受抗菌肽细菌的研究[15]，以下两种解释较为合理：①乳酸杆菌及双歧杆菌通过类似于修饰LPS、酰化脂质A等措施减少了菌膜表面负电荷，规避Crp4的静电吸附；②细菌分泌出干扰分子拮抗Crp4。

防御素的表达与机体炎症密切相关[16]。生理状态下，机体炎症因子IL-1β处于平衡状态；IL-1β过多则促进炎症发生、导致组织坏死；IL-1β缺乏则致机体极易被细菌感染。诱导受体IL-1RII、拮抗受体IL-1ra、溶解性受体sIL-1 RII和一套复杂的分子内级联通路均参与了IL-1β的表达调控[17]。本研究结果显示，小鼠肠道防御素能通过中和LPS，参与IL-1β的表达调控。既往研究显示人髓源性防御素1～3均可以中和细菌致死毒素LF(炭疽芽孢杆菌)、白喉毒素DT和假单胞菌内毒素A，减缓毒素的细胞效应。至于Crp4能否中和其他致病菌毒素，则有待进一步验证。

综上所述，小鼠肠道Crp4在电离辐射诱导下表达增强，它具有显著的选择性抗菌和LPS中和能力，是限制肠道菌群失调以及炎症反应放大的理想因子。在电离辐射肠损伤中，依靠Paneth细胞分泌的有限Crp4来维持肠道内稳态显然是杯水车薪。临床研究显示，慢性肠炎、腹泻、Crohn肠病等均与肠道防御素的缺乏相关[18-19]。显然，口服靶向肠道的外源性Crp4具有重要意义。本研究为给后续药物设计奠定了基础。

参考文献：

[1] Neish A S. Microbes in gastrointestinal health and disease [J]. Gastroenterology, 2009, 136(1): 65－80.

[2] 吴小平, 贺杰. 肠道菌群失调与肠外疾病[J]. 医学新知杂志, 2014, 24(3): 188－189, 194.

[3] 席春晖, 冯志松. 肠道菌群在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(11): 1953－1955.

[4] 张英春, 韩雪, 单毓娟, 等. 益生菌抑制致病菌作用的机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1306－1313.

[5] Rosengren K J, Daly N L, Fornander L M, *et al*. Structural and functional characterization of the conserved salt bridge in mammalian paneth cell-defensins: solution structures of mouse CRYPTDIN-4 and (E15D)-CRYPTDIN-4[J]. J Biol Chem, 2006, 281(38): 28068－28078.

[6] Ayabe T, Satchell D P, Wilson C L, *et al*. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria[J]. Nat Immunol, 2000, 1(2): 113－118.

[7] Klotman M E, Chang T L. Defensins in innate antiviral immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(6): 447－456.

[8] Crovella S, Antcheva N, Zelezetsky I, *et al*. Primate beta-defensins--structure, function and evolution[J]. Curr Protein Pept Sci, 2005, 6(1): 7－21.

[9] Porter E M, Liu L, Oren A, *et al*. Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules[J]. Infect Immun, 1997, 65(6): 2389－2395.

[10] Satoh Y, Habara Y, Ono K, *et al*. Carbamylcholine- and catecholamine-induced intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts[J]. Gastroenterology, 1995, 108(5): 1345－1356.

[11] Gorbunov N V, Kiang J G. UP-regulation of autophagy in small intestine Paneth cells in response to total-body gamma-irradiation[J]. J Pathol, 2009, 219(2): 242－252.

[12] 刘霞, 梁振明, 杨景云, 等. ^{60}Co辐射后肠道菌群改变的实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2002, 25(3): 10.

[13] Wilmes M, Cammue B P, Sahl H G, *et al*. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation[J]. Nat Prod Rep, 2011, 28(8): 1350－1358.

[14] Nuding S, Zabel L T, Enders C, *et al*. Antibacterial activity of human defensins on anaerobic intestinal bacterial species: a major role of HBD-3[J]. Microbes Infect, 2009, 11(3): 384－393.

[15] Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? [J]. Trends Microbiol, 2002, 10(4): 179-186.

[16] Rumio C, Besusso D, Palazzo M, *et al*. Degranulation of paneth cells *via* toll-like receptor 9[J]. Am J Pathol, 2004, 165(2): 373－381.

[17] Shi J, Aono S, Lu W, *et al*. A novel role for defensins in intestinal homestasis: regulation of IL-1beta secretion[J]. J Immunol, 2007, 179(2): 1245－1253.

[18] Ramasundara M, Leach S T, Lemberg D A, *et al*. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(2): 202－208.

[19] Kelly P, Bajaj-Elliott M, Katubulushi M, *et al*. Reduced gene expression of intestinal alpha-defensins predicts diarrhea in a cohort of African adults[J]. J Infect Dis, 2006, 193(10): 1464－1470.

(**收稿**:2014-10-15;**修回**:2014-11-14)

(编辑　吴培红)