

DOI:10.13350/j.cjpb.231103

• 论著 •

LL-37 慢病毒过表达载体和 RAW264.7-LL-37 稳转细胞株的构建*

曲玲霖, 李智慧, 杨斌斌**

(潍坊医学院 医学检验学院, 山东潍坊 261053)

【摘要】 **目的** 构建 LL-37 慢病毒过表达载体, 稳定转染 RAW264.7 细胞株, 并检测 LL-37 在胞内 mRNA 和蛋白表达情况。 **方法** 根据 GenBank 数据库获取抗菌肽 LL-37 的蛋白编码基因序列, 同时选择合适的酶切位点并设计特异性的上、下游引物, PCR 扩增目的基因。用 SalI、Age I 限制性内切酶对载体和目的基因进行双酶切, 将酶切目的片段与载体进行重组。重组质粒冰水浴 30 min, 42 °C 热激 1.5 min、冰上放置 2 min 后转化入 DH5 α 感受态细胞。将感受态细胞在不含氨苄的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 1 h。将转化菌在含氨苄平板上进行筛选, 阳性菌落进行 PCR 和测序鉴定, 鉴定正确的菌落进行扩增并大量抽提质粒。将 20 μ g GV 载体质粒、15 μ g pHelper 1.0 载体质粒、10 μ g pHelper 2.0 载体质粒与转染试剂混合后共转染 293T 细胞, 收集细胞上清液, 经离心、过滤后保存。将包装浓缩后的慢病毒按照 MOI=100 稳转 RAW264.7 细胞株, 并用嘌呤霉素筛选 LL-37 慢病毒过表达 RAW264.7 细胞株。分别采用 RT-PCR 和间接免疫荧光技术检测转染成功的 RAW264.7 细胞中 mRNA 和蛋白表达情况。 **结果** 成功获得 7 487 bp 的线性化载体和 164 bp 的 LL-37 PCR 片段, 成功构建 LL-37 慢病毒过表达载体。将重组质粒转化到 DH5 α 感受态细胞中, 经 PCR 和测序鉴定重组质粒构建正确。经包装浓缩后的慢病毒成功稳转 RAW264.7 细胞株, 并用嘌呤霉素筛选出 LL-37 慢病毒过表达 RAW264.7 细胞株。RT-PCR 检测携带重组质粒的慢病毒转染的 RAW264.7 细胞, 胞内 mRNA 有良好表达丰度, LL-37 基因的表达丰度为 9 074.883 ($P < 0.01$)。加入 LL-37 抗体的细胞株组在 CQ1 荧光拍照下能够观察到荧光, 空白组和阴性对照组无此荧光, 表明稳转 LL-37 RAW264.7 细胞株构建成功。 **结论** 成功构建 LL-37 慢病毒过表达载体并获得在胞膜及包浆均有大量表达 LL-37 的慢病毒稳转 RAW264.7 细胞株, 为 LL-37 相关作用机制研究奠定了基础。

【关键词】 LL-37; 慢病毒; RAW264.7; 稳转细胞株**【中图分类号】** R373**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)11-1252-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Nov.; 18(11):1252-1256, 1263.]

Construction of LL-37 eukaryotic expression vector and lentiviral stabilization of RAW264.7 cell line

QU Linglin, LI Zhihui, YANG Binbin (Department of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China)***

【Abstract】 **Objective** LL-37 lentiviral overexpression vector was constructed, RAW264.7 cell line was transfected stably, and the expression of LL-37 in intracellular mRNA and protein was detected. **Methods** Obtain the protein coding gene sequence of antimicrobial peptide LL-37 from the GenBank database, select appropriate restriction endonuclease sites, and design specific upstream and downstream primers for PCR amplification of the target gene. Double restriction endonucleases of SalI and Age I were used to cleave the vector and target gene, and the target fragment was recombined with the vector. The recombinant plasmid was then transformed into DH5 α competent cells after being immersed in ice water for 30 minutes, subjected to heat shock at 42 °C for 1.5 minutes, and placed on ice for 2 minutes. Incubate competent cells in LB medium without ampicillin at 37 °C and 200 r/min for 1 hour. The transformed bacteria were screened on a plate containing ampicillin. Positive colonies were identified by PCR and sequencing, and the correct colonies were amplified and a large number of plasmids were extracted. 20 μ g GV vector plasmid, 15 μ g pHelper 1.0 vector plasmid and 10 μ g pHelper 2.0 vector plasmid were mixed with transfection reagent and transfected to 293T cells. The cell supernatant was collected, centrifuged, filtered, and stored. The packaged and concentrated lentivirus was stably transfected into RAW264.7 cell line according to MOI=100, and LL-37 lentivirus overexpressing RAW264.7 cell line was screened with puromycin. RT-PCR and indirect immunofluorescence techniques were used to detect mRNA and protein expression in

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81802055); 山东省自然科学基金项目(No. ZR2016HB70)。** **【通讯作者】** 杨斌斌, E-mail: bin_bin_yang@126.com**【作者简介】** 曲玲霖(1999-), 女, 山东威海人, 在读硕士研究生, 主要研究方向为临床检验诊断学。E-mail: qu_ling_lin@163.com

successfully transfected RAW264.7 cells, respectively. **Results** A linearization vector of 7487 bp and a LL-37 PCR fragment of 164 bp were successfully obtained, and a LL-37 lentivirus overexpression vector was successfully constructed. The recombinant plasmid was transformed into DH5 α competent cells, and the correct construction of the recombinant plasmid through PCR and sequencing was confirmed. The packaged and concentrated lentivirus was successfully stably transformed into RAW264.7 cell line, and LL-37 lentivirus overexpressing RAW264.7 cell line was screened with puromycin. RT-PCR detection showed good expression abundance of intracellular mRNA in RAW264.7 cells transfected with recombinant plasmid lentivirus, and the expression abundance of LL-37 gene was 9074.883 ($P < 0.01$). The cell line group added with LL-37 antibody was able to observe fluorescence under CQ1 fluorescence photography, while the blank group and negative control group did not show this fluorescence, indicating the successful construction of stable LL-37 RAW264.7 cell line. **Conclusion** The LL-37 lentivirus overexpression vector was successfully constructed and a stable transfected RAW264.7 cell line that expressed LL-37 extensively in both the cell membrane and cytoplasm was obtained, laying the foundation for the study of LL-37 related mechanisms of action.

【Key words】 LL-37; Lentivirus; RAW264.7; Stabilize cell lines

抗菌肽(AMP)是作为天然抗生素的一大类化合物,广泛分布在整个生物体中,主要分布在粘液层中^[1]。在许多生物体中,抗菌肽在宿主对微生物病原体的先天防御中表现出广泛的活性^[2]。它们可作为广谱抗菌剂,对抗革兰氏阳性和阴性细菌、病毒和真菌^[3]。哺乳动物 AMP 包括 cathelicidin 和 defensin 家族,LL-37 是在人类中表达的宿主防御肽的 cathelicidin 家族的唯一成员。除了抗菌特性外,许多研究表明 LL-37 还参与多种生物活性,包括组织修复、炎症反应、趋血因子和趋化因子诱导,对多种癌细胞系具有抗癌作用。此外,有研究表明 LL-37 在促进或抑制肿瘤生长方面表现出复杂而矛盾的作用^[2]。LL-37 由许多细胞类型产生,如巨噬细胞、NK 细胞、中性粒细胞和上皮细胞^[4]。LL-37 给药通过抑制巨噬细胞的活化和焦亡、炎性细胞因子的产生和细菌生长来提高 CLP 脓毒症小鼠的存活率^[5]。VitD+PBA 刺激巨噬细胞分泌或旁分泌 LL-37 以介导其细胞内作用,包括增强吞噬作用和激活自噬^[6-7]。巨噬细胞可促进 LL-37 的表达和释放,LL-37 通过 Wnt/ β -catenin 通路激活结肠癌细胞,促进结肠癌细胞的体外增殖^[8]。

鉴于 LL-37 的众多生物学作用,本实验以此为研究对象,通过核苷酸序列合成质粒,通过 PCR 扩增目的基因,构建 LL-37 过表达慢病毒载体,并在 RAW264.7 真核细胞系中稳定过表达 LL-37,以期 LL-37 的作用机制研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞和载体 感受态细胞 DH5 α ,人胚胎肾上皮细胞 HEK-293T 和小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 均为本实验室保存;GV656 载体,pHelper 1.0 载体及 pHelper 2.0 载体均购自中国 Genechem 公司

1.2 主要试剂琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和无内毒素质粒大提试剂盒购自中国 TIANGEN 公司;2 \times Fast SYBR Green qPCR Master Mix 购自中国 Servicebio 公司;PrimeSTAR HS DNA polymerase 购自日本 TaKaRa 公司;嘌呤霉素购自中国 Genechem 公司;DAPI 购自中国 Solarbio 公司;Taq Plus DNA polymerase 和同源重组试剂盒购自中国 Vazyme 公司;LB 肉汤购自中国 hopebio 公司;SalI、Age I 限制性核酸内切酶购自美国 NEB 公司;转染试剂购自中国 Genechem 公司;DMEM 购自以色列 Biological Industries 公司;胎牛血清 FBS 购自中国 ExCell Bio 公司;4%多聚甲醛购自中国 sinoreagent 公司;0.2% Triton X-100 购自美国 SIGMA 公司;羊血清购自美国 Invitrogen 公司;BSA 购自中国 sangon 公司;琼脂糖购自中国 baygene 公司;LL-37 抗体购自美国 proteintech 公司;抗兔 IgG (H+L) 抗体购自美国 Invitrogen 公司。

2 方法

2.1 引物设计及目的基因的获取扩增 根据 GenBank 数据库,获取抗菌肽 LL-37 的蛋白编码基因序列,同时选择合适的酶切位点并设计特异性的上、下游引物,引物中含有 SalI、Age I 两个酶切位点。

LL-37-F: CCGGATCCCCGGGTACCGGTCCG-CACCATGCTGCTGGGCGACTTCTTC; LL-37-R: AACTGACACACTTAGTCGACTTAGCTCTCGGT TCTGGGC。质粒及引物均由 Genechem 公司制作合成。将 10 μ L 5 \times PS Buffer,4 μ L dNTP Mix,1 μ L 上游引物,1 μ L 下游引物,0.2 μ L 模板(200 ng/ μ L),0.5 μ L PrimeSTAR HS DNA polymerase,33.3 μ L ddH₂O 混匀后,置于 PCR 仪中进行反应。反应条件如下:98 $^{\circ}$ C,5 min;98 $^{\circ}$ C,10 s,58 $^{\circ}$ C,10 s,72 $^{\circ}$ C,1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C,8 min。

2.2 慢病毒载体的构建及鉴定使用 限制性内切酶

Sal I 和 Age I 在 37 °C 条件下对 PCR 扩增的目的基因片段及载体酶切 3h, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (80 V 电泳 25min) 后用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 按同源重组试剂盒说明冰水浴中配制反应体系, 37 °C 反应 30 min。将 PCR 产物和线性化载体进行交换, 随后在冰水浴中冷却 5 min。取 10 μL 产物加入 100 μL DH5α 中, 冰水浴 30 min、42 °C 热激 1.5 min、冰上放置 2 min。然后加入到 500 μL 不含氨苄的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 1 h。取菌液涂布在含氨苄的固体培养基上, 于 37 °C 恒温培养箱中 13 h, 挑取单个菌落至 20 μL 的 PCR 鉴定体系中。反应体系: 上下游引物分别 0.5 μL, 2 × Taq Plus Master Mix 10 μL, ddH₂O 9 μL。反应条件: 95 °C, 5 min; 95 °C, 30 s, 56 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 22 个循环; 72 °C, 8 min。将鉴定正确的菌落在含氨苄的 LB 液体培养基中培养过夜并测序, 测序正确的菌液转接于含氨苄的 LB 液体培养基中培养过夜后进行质粒抽提。

2.3 慢病毒包装及浓缩 将以 10% 血清培养基培养的 HEK293T 细胞按照 4 × 10⁵ 个细胞/mL 接种于 10 cm 细胞培养皿中, 待密度达 70% ~ 80% 时, 更换为 2% 血清的培养基。将总体积为 1 mL 的转染体系 (GV 载体质粒 20 μg + pHelper 1.0 载体质粒 15 μg + pHelper 2.0 载体质粒 10 μg + 吉凯转染试剂) 于室温下温育 15 min 后滴加到培养皿中, 培养 8 h 后弃掉培养基, PBS 清洗一次后弃掉, 换成 2% 血清的培养基。48 h 后收集细胞上清, 4 °C、4 000 g 离心 10 min, 用 0.45 μm 无菌滤膜过滤病毒液。将滤液于 4 °C、25 000 r/min (离心半径 10.38 cm) 离心 2 h, 弃去上清, 加入病毒对应体积保存液重悬, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 分装后于 -80 °C 冰箱保存。

2.4 慢病毒感染 RAW264.7 细胞将状态良好的 RAW264.7 细胞按照 3 × 10⁴ ~ 5 × 10⁴ 细胞/mL 每孔 1 mL 接种于 12 孔板中进行培养, 当细胞长满至孔底面积的 15% ~ 30% 时, 根据预试验结果, 按照 MOI = 100 进行感染, 感染 16 h 后弃去原培养基, 更换新培养基继续培养, 72 h 后更换为含嘌呤霉素的培养基。

2.5 Real-Time PCR 检测 RAW264.7 细胞中 LL-37 基因 mRNA 的表达对细胞进行总 RNA 抽提及逆转录, 并按以下比例配置 Real-Time PCR 反应体系: 2 × Fast SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL, Forward Primer 0.4 μL, Reverse Primer 0.4 μL, cDNA 1 μL, Nuclease-Free Water 8.2 μL。按 95 °C, 30 s, 1 个循环; 95 °C, 5 s, 60 °C, 30 s, 40 个循环; 95 °C, 15 s, 1 个循环的反应程序进行。运用 2^{-ΔΔCt} 法分析数据, 反映出 mRNA 在胞内的相对表达水平。

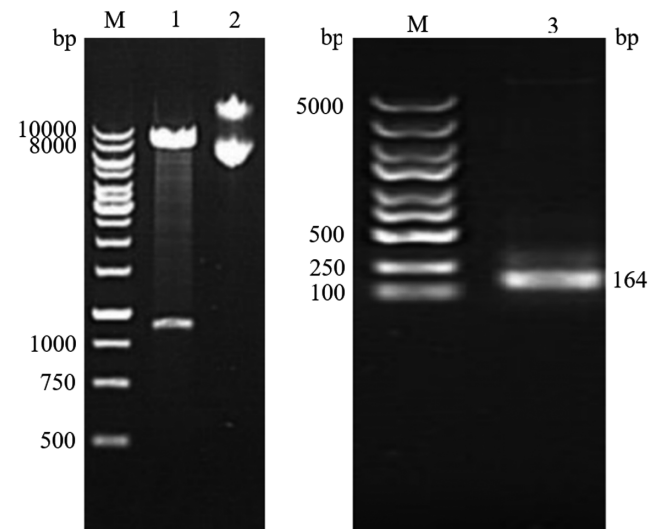
2.6 间接免疫荧光法检测 RAW264.7 细胞中 LL-

37 蛋白的表达将对数期已感染细胞制成 1.5 × 10⁴ 的单细胞悬液, 接种于 96 孔板中培养, 当细胞铺满板底时 PBS 清洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min, PBS 浸泡 2 min; 用 0.2% Triton 浸泡 5 min, PBS 清洗 2 次, 每次 5 min; 滴加封闭液 (含 5% BSA, 10% 羊血清的 PBS), 在湿盒内室温封闭 30 min; 滴加一抗, 置于湿盒内, 于 37 °C 孵育 60 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 滴加二抗, 置于湿盒内于 37 °C 孵育 45 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 蒸馏水清洗一次; 加入 DAPI 室温放置 10 ~ 15 min, PBS 清洗 2 次, 每次 5 min; 每孔加入 100 μL PBS, CQ1 荧光拍照观察。

结果

1 载体及目的基因的鉴定

使用限制性内切酶 Sal I 和 Age I 对载体及 LL-37 的 PCR 片段进行双酶切, 分别对载体酶切产物、未酶切载体及 LL-37 的 PCR 片段进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1。成功获得 7 487 bp 的线性化载体和 164 bp 的 LL-37 PCR 片段, 与预期相同。



M DNA 标志物 1 载体酶切产物 2 载体未酶切 3 PCR 扩增抗菌肽 LL-37 片段

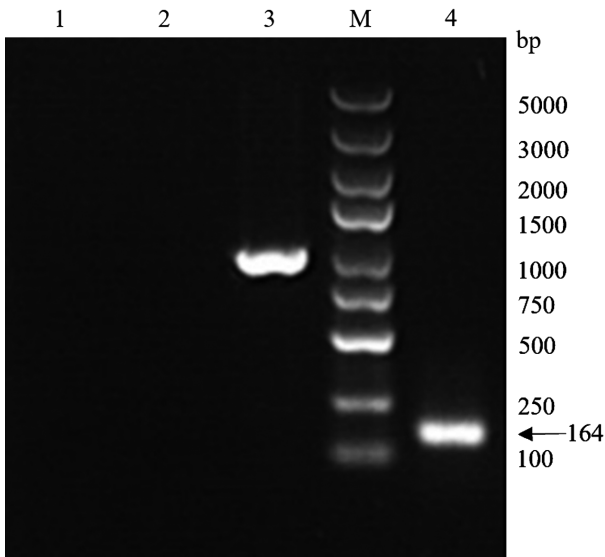
图 1 载体和目的基因的 PCR 及酶切分析

M DNA marker 1 The product of carrier enzyme digestion 2 Non-digested vector 3 PCR fragment of antimicrobial peptide LL-37

Fig. 1 PCR digestion electrophoresis results of vector and target gene

2 菌落 PCR 和测序鉴定

鉴定正确的酶切片段连接后转化入 DH5α 中, 经氨苄抗生素筛选并进行菌落 PCR, 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如图 2。LL-37 转化子的条带位置与之正确的条带位置相同, 菌落 PCR 鉴定正确。对 PCR 鉴定正确的菌落进行测序, 结果与预期一致 (图 3), 多肽 LL-37 慢病毒过表达载体构建成功。



1 空白对照 2 阴性对照 3 阳性对照 M DNA 标志物
4 LL-37 转化子

图 2 菌落 PCR 鉴定

1 Blank control 2 Negative control 3 Positive control M DNA marker 4 LL-37 transformant

Fig. 2 Results of colony PCR identification

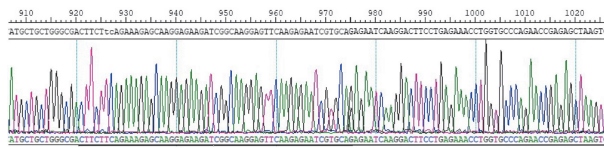


图 3 重组转化子测序结果

Fig. 3 Sequencing results of recombinant transformants

3 RT-PCR 检测 RAW264.7 细胞中的 LL-37 mRNA 转录水平

将携带空载体的慢病毒与携带重组质粒的慢病毒分别转染 RAW264.7 细胞,用 RT-PCR 检测胞内 mRNA 的转录水平,结果如图 4。NC 组 LL-37 基因的表达丰度($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 1.028,重组质粒组 LL-37 基因的表达丰度($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 9 074.883($P < 0.01$)。

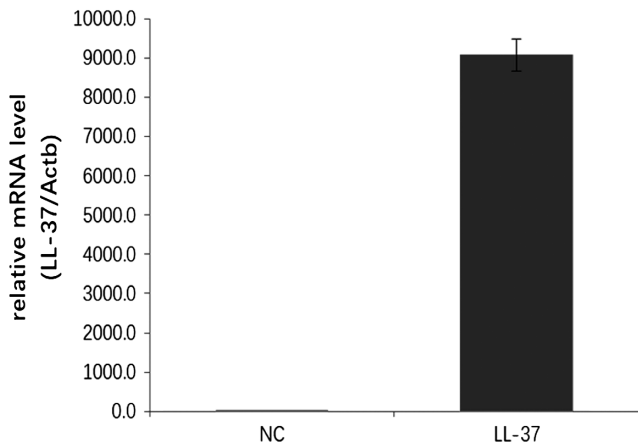


图 4 RT-PCR 检测 RAW264.7 细胞中 LL-37 mRNA 的表达
Fig. 4 RT-PCR detects the expression of mRNA within cells

4 免疫荧光法检测 RAW264.7 细胞株抗菌肽的表达

采用免疫荧光法检测 RAW264.7 细胞株中抗菌肽的表达,结果如图 5。加入 LL-37 抗体的细胞株组在 CQ1 荧光拍照下能够观察到荧光,空白组和阴性对照组无此荧光,表明稳转 LL-37RAW264.7 细胞株构建成功。

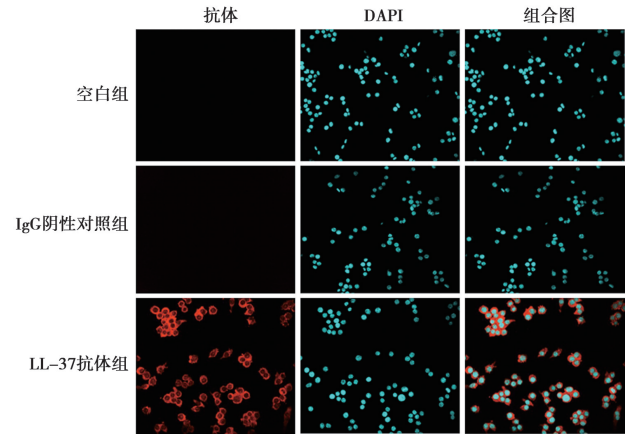


图 5 免疫荧光法检测 RAW264.7 细胞中抗菌肽的表达 (400×)
Fig. 5 Immunofluorescence detection of the expression of antimicrobial peptides in each cell line group (400×)

讨论

LL-37 是 1995 年在人类白细胞中发现的一种 α -螺旋肽,由 37 个氨基酸组成^[9],是人 cathelicidin 抗菌肽(CAMP, hCAP18)的 C 端肽,可增加机体对微生物入侵的抵抗力,并在趋化性、细胞分化、调节细胞凋亡、促进伤口闭合和血管生成方面发挥重要的生理功能^[10-11]。LL-37 可减少活化的中性粒细胞释放促炎介质,增加中性粒细胞 ROS 的产生和吞噬作用^[12],可直接与 LPS 结合并中和其生物活性,有利于控制炎症和减少内毒素影响^[13-14]。

LL-37 在不同程度上影响自身免疫性疾病和癌症等疾病的发生发展^[15]。在银屑病的发炎皮肤中 LL-37 过度表达,自身 DNA 从垂死的细胞中释放出来,由于电荷相反,LL-37 和自身 DNA 聚集并形成稳定的复合物。随后,LL-37-DNA 复合物激活浆细胞样树突状细胞(pDC),pDC 分泌 I 型干扰素并触发自身炎症级联反应^[16]。此外,由于 LL-37 在银屑病关节炎(PsA)患者的滑液中高度上调,已成为自身抗体的靶标,代表 PsA 中的一种新型自身抗原^[17]。

有研究表明,许多人类恶性肿瘤,如乳腺癌、卵巢癌和肺癌,其发展或进展与 LL-37 的过表达有关,而在胃癌中 LL-37 具有一定的抑制作用^[18]。宿主防御肽 LL-37 在多种类型癌症中是肿瘤细胞生长和转移的调节剂。在卵巢癌中,LL-37 分别通过 FPR2 非依赖性和依赖性途径促进细胞增殖和侵袭性。在乳腺癌和肺癌中,LL-37 主要通过 ErbB 介导的途径促进细

胞增殖和转移,包括通过上调 ErbB2 或 EGFR 反式激活来敏化 ErbB 信号传导。然而,在 LL-37 表达下调的胃癌中,这种肽通过涉及蛋白酶体抑制和 BMP 信号激活抑制细胞增殖^[18]。

LL-37 在机体抵抗病原体感染过程中发挥重要作用。LL-37 不仅通过穿孔细胞质细菌膜发挥强大的抗菌作用,同时通过抑制病毒复制周期的早期步骤参与抗病毒过程^[19-21]。LL-37 还通过破坏病毒膜来对抗病毒,如流感病毒、鼻病毒和呼吸道合胞病毒^[22-25]。目前,细菌对传统抗生素产生耐药性在抗感染治疗中非常普遍^[26]。而且抗生素在治疗感染时有许多副作用^[27],其杀灭细菌后引起 LPS 急剧升高,使免疫系统大量分泌细胞因子并导致致死性休克^[28]。因此,迫切需要具有抗菌和抗炎活性的新型药物。LL-37 可作为传统抗生素的替代品或与导致多种耐药细菌的抗生素结合使用,除了具有抗菌和中和 LPS 的特性外,还可直接或间接地影响和调节参与炎症过程的各种细胞群的活性,并通过吸引中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞到病原体所在部位来加剧炎症过程。在没有炎症或促炎刺激的情况下,LL-37 可能具有很少或轻微的促炎作用^[29]。LL-37 可通过下调 IL-10 表达上调 IL-12p40 表达,导致巨噬细胞分化等的促炎反应^[30],通过调节 IL-1 β 信号传导促进炎症细胞因子的产生^[31]。在活跃的炎症过程,例如过敏性接触性皮炎中,LL-37 具有抗炎作用,可能下调引起组织损伤的免疫反应^[32]。LL-37 的抗炎作用包括对不同细胞类型中的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-12 反应的拮抗作用^[17,31,33],且通过阻断巨噬细胞和树突状细胞中 TLR-4 受体复合物的功能降低 LPS 存在下的炎症细胞因子产生^[34-35]。因此,LL-37 在不同条件下发挥促进炎症或抑制炎症的功能,调节和维持微环境的动态平衡。

鉴于 LL-37 的众多生物学特性与其对巨噬细胞的调节作用,本研究成功构建了 LL-37 慢病毒过表达载体并获得在胞膜及包浆均有大量表达 LL-37 的慢病毒稳转 RAW264.7 细胞株,为 LL-37 相关作用机制研究奠定了基础。

【参考文献】

[1] Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(4): 802-808.
[2] Lu F, Zhu Y, Zhang G, et al. Renovation as innovation: Repurposing human antibacterial peptide LL-37 for cancer therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 944147.
[3] Pinheiro da Silva F, Machado MC. The dual role of cathelicidins in systemic inflammation [J]. *Immunol Lett*, 2017, 182: 57-60.
[4] Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of

LL-37 in inflammation and autoimmune disease [J]. *J Immunol*, 2013, 191(10): 4895-901.
[5] Nagaoka I, Tamura H, Reich J. Therapeutic potential of cathelicidin peptide LL-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 5973.
[6] Wan M, van der Does AM, Tang X, et al. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95(6): 971-981.
[7] Rekha RS, Rao Muvva SS, Wan M, et al. Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages [J]. *Autophagy*, 2015, 11(9): 1688-1699.
[8] Pan XH, Quan WW, Wu JL, et al. Antimicrobial peptide LL-37 in macrophages promotes colorectal cancer growth [J]. *Chin J Oncol*, 2018, 40(6): 412-417.
[9] Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, et al. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(1): 195-199.
[10] Chen X, Zou X, Qi G, et al. Roles and mechanisms of human cathelicidin LL-37 in cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(3): 1060-1073.
[11] Chinipardaz Z, Zhong JM, Yang S. Regulation of LL-37 in Bone and periodontium regeneration [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(10): 1533.
[12] Alalwani SM, Sierigk J, Herr C, et al. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(4): 1118-1126.
[13] Braff MH, Hawkins MA, Di Nardo A, et al. Structure-function relationships among human cathelicidin peptides; dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities [J]. *J Immunol*, 2005, 174(7): 4271-4278.
[14] De Yang, Chen Q, Schmidt AP, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7): 1069-1074.
[15] Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease [J]. *J Immunol*, 2013, 191(10): 4895-4901.
[16] Dombrowski Y, Schaubert J. Cathelicidin LL-37: a defense molecule with a potential role in psoriasis pathogenesis [J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(5): 327-330.
[17] Barlow PG, Li Y, Wilkinson TS, et al. The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(3): 509-520.
[18] Wu WK, Wang G, Coffelt SB, et al. Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(8): 1741-1747.
[19] Sancho-Vaello E, Gil-Carton D, Fran ois P, et al. The structure of the antimicrobial human cathelicidin LL-37 shows oligomerization and channel formation in the presence of membrane mimics [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17356. (下转 1263 页)

- high mobility group protein B1 group (HMGB1)/toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*,2020,26:e918617.
- [10] Kihara N,de la Fuente SG,Fujino K,et al. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats[J]. *Gut*,2003,52(5):713-719.
- [11] Zhang XY,Zhao HM,Liu Y,et al. Sishen Pill maintained colonic mucosal barrier integrity to treat ulcerative colitis via Rho/ROCK signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2021,21(1):1-12.
- [12] Marinho S,Illanes M,Avila-Rom n J,et al. Anti-Inflammatory effects of rosmarinic acid-loaded nanovesicles in acute colitis through modulation of NLRP3 inflammasome [J]. *Biomolecules*,2021,11(2):162-178.
- [13] Liu M,Wang Y,Guan G,et al. Dietary supplementation of ancientino ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress[J]. *Nutrients*,2023,15(12):2798-2817.
- [14] 伍建中,李修琴,莫双铭,等. 复方蒲螵提取物对溃疡性结肠炎大鼠菌群的干预作用[J]. *中国兽医杂志*,2023,59(2):126-133.
- [15] Liu Y,Zhou M,Yang M,et al. Pulsatilla chinensis saponins ameliorate inflammation and dss-induced ulcerative colitis in rats by regulating the composition and diversity of intestinal flora [J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2021,11(1):1-11.
- [16] Cheng S,Li H,Huang Y,et al. Lactobacillus gasseri jm1 isolated from infant feces alleviates colitis in mice via protecting the intestinal barrier[J]. *Nutrients*,2022,15(1):139-156.
- [17] 李润林,赵道远,李盼盼,等. 百里香酚与迷迭香酸组合对脂多糖攻毒大鼠生长性能、炎症反应和肠道健康的影响[J]. *动物营养学报*,2022,34(3):2009-2022.
- [18] Vitali R,Mancuso AB,Palone F,et al. PARP1 activation induces HMGB1 secretion promoting intestinal inflammation in mice and human intestinal organoids[J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(8):7096-7105.
- [19] Lin L,Li J,Song Q,et al. The role of HMGB1/RAGE/TLR4 signaling pathways in cigarette smoke-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Immun Inflamm Dis*,2022,10(11):e711-e726.
- [20] Zuo T,Yue Y,Wang X,et al. Luteolin relieved DSS-Induced colitis in mice via HMGB1-TLR-NF- κ B signaling pathway[J]. *Inflammation*,2021,44(2):570-579.
- [21] Arab HH,Eid AH,Mahmoud AM,et al. Linagliptin mitigates experimental inflammatory bowel disease in rats by targeting inflammatory and redox signaling[J]. *Life Sci*,2021,273(1):1-14.

【收稿日期】 2023-07-14 【修回日期】 2023-09-25

(上接 1256 页)

- [20] Steinstraesser L,Tippler B,Mertens J,et al. Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides[J]. *Retrovirology*,2005,2:2.
- [21] Bergman P,Walter-Jallow L,Broliden K,et al. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication[J]. *Curr HIV Res*,2007,5(4):410-415.
- [22] Tripathi S,Teclé T,Verma A,et al. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins[J]. *J Gen Virol*,2013,94(Pt 1):40-49.
- [23] Currie SM,Findlay EG,McHugh BJ,et al. The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus [J]. *PLoS One*,2013,8(8):e73659.
- [24] Currie SM,Gwyer Findlay E,McFarlane AJ,et al. Cathelicidins have direct antiviral activity against respiratory syncytial virus *in vitro* and protective function *in vivo* in mice and humans[J]. *J Immunol*,2016,196(6):2699-710.
- [25] Sousa FH,Casanova V,Findlay F,et al. Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus[J]. *Peptides*,2017,95:76-83.
- [26] Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years[J]. *Chest*,2001,119(2 Suppl):397S-404S.
- [27] Sun Y,Shang D. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation [J]. *Mediators Inflamm*,2015,2015:167572.
- [28] Tjabringa GS,Aarbiou J,Ninaber DK,et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor [J]. *J Immunol*,2003,171(12):6690-6696.
- [29] Davidson DJ,Currie AJ,Reid GS,et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization[J]. *J Immunol*,2004,172(2):1146-1156.
- [30] van der Does AM,Beekhuizen H,Ravensbergen B,et al. LL-37 directs macrophage differentiation toward macrophages with a proinflammatory signature[J]. *J Immunol*,2010,185(3):1442-1449.
- [31] Yu J,Mookherjee N,Wee K,et al. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1 β , augments immune responses by multiple pathways[J]. *J Immunol*,2007,179(11):7684-7691.
- [32] Di Nardo A,Braff MH,Taylor KR,et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization[J]. *J Immunol*,2007,178(3):1829-1834.
- [33] Chen X,Takai T,Xie Y,et al. Human antimicrobial peptide LL-37 modulates proinflammatory responses induced by cytokine milieu and double-stranded RNA in human keratinocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2013,433(4):532-537.
- [34] Brown KL,Poon GF,Birkenhead D,et al. Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses [J]. *J Immunol*,2011,186(9):5497-505.
- [35] Di Nardo A,Braff MH,Taylor KR,et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization[J]. *J Immunol*,2007,178(3):1829-1834.

【收稿日期】 2023-05-09 【修回日期】 2023-08-01