

特约综述



抗菌蛋白或抗菌肽在促进伤口愈合、防止伤口感染和调节伤口炎症中起着至关重要的作用。目前我们的研究重点包括：(1)抗菌蛋白REG3A/RegIII γ 促进皮肤伤口愈合的功能机制；(2)Th17细胞因子调节REG3A/RegIII γ 的信号转导机制；(3)REG3A在皮肤病发生过程中的致病机理；(4)皮肤共生菌或病原菌介导Toll-like receptors(TLRs)诱导REG3A/RegIII γ 的调控机理。

http://faculty.ecnu.edu.cn/laiyiping/Info_cn.html

胰岛再生源蛋白(Reg)在组织修复中的功能和调控机制

蒋子威 李长伟 雷 虎 全艳春 赖玉平*

(华东师范大学生命科学学院微生物与免疫学实验室, 上海 200241)

摘要 胰岛再生源蛋白(regenerating islet-derived protein, Reg)是一个多功能分子, 在多种生理、病理活动中发挥重要作用。该文主要综述Reg蛋白在组织损伤后促进细胞增殖、抑制炎症因子过表达、调控细胞凋亡和抑制病原微生物生长和扩散的功能及调控机制, 为治疗组织损伤提供新思路和新途径。

关键词 胰岛再生源蛋白; 组织修复; 细胞增殖; 抑制炎症; 抑制细菌

胰岛再生源蛋白(regenerating islet-derived protein, Reg)又称为胰石蛋白(pancreatic stone protein, PSP)或胰腺炎相关蛋白(pancreatitis-associated protein, PAP), 该蛋白家族属于C-类凝集素(C-type lectin)家族。大量的研究表明Reg蛋白能够促进细胞增殖、抑制炎症和细胞凋亡, 并与癌症的发生和神经发育有关。最近还发现Reg还能作为一种抗菌蛋白, 控制肠道菌群的扩散和防止病原菌感染肠道。虽然Reg蛋白功能繁多, 但是结合本实验室的研究方向, 本文主要探讨Reg在组织修复过程中, 促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、防止伤口感染和发炎的功能及其调节机制, 并将展望Reg潜在的应用前景。

白PSP。1984年, Keim等^[1]发现大鼠胰腺插管1天后或用蓝皮素和牛磺刺激引发胰腺炎后胰腺内均会分泌出一种蛋白, 并将其命名为胰腺炎相关蛋白PAP。随后, Terazono等^[2]在胰腺90%切除的大鼠的再生胰岛cDNA文库中分离到一个编码165 aa的基因, 该基因所编码的蛋白具有促进胰腺再生的能力, 因此将其编码基因命名为再生基因(regenerating gene), 又称为Reg基因。而在1991年, Rouquier等^[4]通过克隆获得了大鼠PSP基因序列, 通过与Reg基因序列比对后发现两者为同一蛋白, 于是又称为PSP/Reg。在人、大鼠和小鼠体内目前都已发现了Reg蛋白, 在豚鼠、狗、猪、牛、兔等哺乳动物体内也有同源蛋

1 Reg的命名、分类和结构

1979年, de Caro等^[1]在慢性钙化性胰腺炎病人胰腺结石和胰液中提取出一种蛋白并命名为胰石蛋

国家自然科学基金(No.81072422, No.31170867)和上海市科委(No.11QA1401900)资助项目。

*通讯作者。Tel: 021-54342908, E-mail: yplai@bio.ecnu.edu.cn

白存在。如在豚鼠中发现Reg蛋白的同源蛋白,命名为胰岛再生相关蛋白(islet neogenesis associated protein, INGAP)^[5]。尽管不同的研究小组对所发现的Reg蛋白命名各不相同,但近年来逐渐将其统一归类为Reg家族蛋白。

目前,从哺乳动物中分离鉴定的Reg蛋白共有17种,表1所列为人、小鼠和大鼠中所发现的Reg蛋白。根据这些蛋白的一级结构,Reg家族蛋白可分为四类:I型、II型、III型和IV型。人和大鼠体内未发现RegII蛋白,但有两种RegI蛋白。小鼠RegIII蛋白中除了 α 、 β 、 γ 外,还有第四类 δ ,但对其功能机理几乎没有研究报道。Reg家族中I型、II型和III型基因定位于人染色体2p12或鼠染色体6C3或大鼠4q33-q34,只有IV型Reg基因定位于人染色体1p12-p13或鼠染色体3F3或大鼠2q34。对Reg基因的结构分析表明,所有Reg基因,均由6个外显子和5个内含子组成,说明该基因在进化上比较保守,可能源自同一个祖先基因。在人REG3A基因的6个外显子中,外显子2含有三个小外显子,因而能够转录出三种不同mRNA,并且这三种mRNA在表达方式上也有很大差异,在胃癌和肝癌细胞中分别表达不同的mRNA,

这可能是与5'端选择性剪切有关^[27]。同样的情况在大鼠RegIIIa中也存在,通过选择性剪切,RegIIIa能够表达2种mRNA^[28]。

Reg家族蛋白的氨基酸序列与其他凝集素序列的相似性为16%~26%,含有一个N端信号肽和保守的Zn²⁺依赖的而非Ca²⁺依赖的C-类凝集素结构域^[30]。因此,Reg家族蛋白在分类上属于C-类凝集素超家族VII。在所有C-类凝集素中,Reg家族蛋白的分子量是最小的,仅有一个信号肽和与信号肽连接的碳水化合物识别域,而其他C-类凝集素除了上述结构外,还含有其它功能域。

2 Reg蛋白促进组织修复

Reg家族蛋白参与多种生理和病理代谢,目前已发现其在炎症、糖尿病、肿瘤等疾病组织中均有表达。尤其在组织受损后,Reg蛋白起到多种不同的功能(图1),从而促进受损组织的修复。

2.1 Reg蛋白促进细胞增殖

组织受损后,细胞增殖是促进伤口愈合的前提条件。自从Terazono等^[3]发现 β 细胞增殖与Reg蛋白有关联,并将这一基因命名为regenerating gene

表1 Reg家族分类、蛋白长度及染色体定位

Table 1 Members of Reg family, length of protein and chromosome location

名称 Species	别名 Synonyms	蛋白全长(aa) Protein length(aa)	染色体定位 Chromosome location
<i>Homo sapiens</i>			
REG1 α (REG1A) ^[6-7]	PSP, PTP, PSPS, PSPS1	166	2p12 ^[8-9]
REG1 β (REG1B) ^[10]	REGL, PSPS2, REGH	166	2p12
REG3 α (REG3A) ^[11]	HIP, REG-III, REG3, PAPI, HIP/PAP	175	2p12 ^[12]
REG3 γ (REG3G) ^[13]	PAP1B	175	2p12 ^[14]
REG4 ^[15]	REG-IV, RELP, GISP	158	1p13.1-p12 ^[16]
<i>Mus musculus</i>			
RegI ^[3]	PTP, PTP1, lithostathine-1, PSP, PSP1, PSP	165	6C-D ^[17]
RegII ^[18]	REG-2, PSP, PSP2, lithostathine-2, PTP, PTP2	173	6C3
RegIII α (RegIII α) ^[18]	PAP2, lithostathine-3	175	6C3
RegIII β (RegIII β) ^[19]	PAP, PAPI	175	6C
RegIII γ (RegIII γ) ^[18]		175	6C3
RegIII δ (RegIII δ) ^[20]	Ingaprp	174	6C3
RegIV ^[21]	RELP, REG-4	157	3F3 ^[21]
<i>Rattus norvegicus</i>			
RegI ^[3]	Lithostatin, PSP, RegI, Rgp1, PTP, lithostathine	165	4q33-q34 ^[22]
RegIII α (RegIII α) ^[23]	PAP2, PapII, REG3, lithostathine-3	174	4q33-q34
RegIII β (RegIII β) ^[24]	PAP, PAPI, REG-2, peptide 23	175	4q33-q34
RegIII γ (RegIII γ) ^[25]	PAP3, PAPIII	174	4q33-q34
RegIV ^[26]	REG4	157	2q34

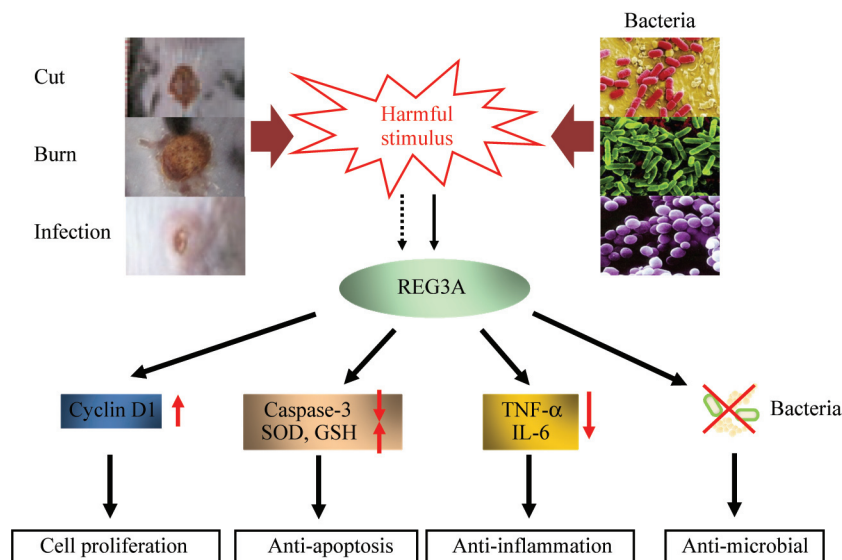


图1 Reg蛋白在组织修复中的功能
Fig.1 Functions of Reg protein in tissue repair

后, Reg蛋白的促增殖作用就成了一个研究热点。Francis等^[29]对体外分离获得的胰岛细胞的生长情况进行观察后发现, Reg mRNA表达和胰岛再生有显著正相关性, 可能通过促进 β 细胞增殖来诱导胰岛再生。不过Smith等^[30]在重复Terazono的实验中却发现虽然90%的胰腺被切除后大鼠胰腺内的确有Reg蛋白表达, 但是在假操作的大鼠胰腺中Reg蛋白也同样有表达, 却对胰腺生长没有促进作用。因此怀疑Reg蛋白与 β 细胞增殖并没有直接联系。不过随后的大量实验数据均证明Reg蛋白的确能够促进 β 细胞增殖^[31-32]。

Reg蛋白不仅在胰腺受损后促进 β 细胞增殖, 而且也能作为肝再生因子促进肝再生。在小鼠肝脏被切除后, 将少量的来自REG3A(即HIP/PAP)超表达转基因小鼠的肝细胞移植到肝切除野生型小鼠或在肝切除野生型小鼠中注射小剂量的REG3A就足够使肝脏快速再生^[33]。除了促进切除肝的再生, REG3A在急性肝功能衰竭中能够防止肝细胞凋亡或死亡, 从而有望成为治疗急性肝功能衰竭的药物之一^[34]。另外, 在胃肠黏膜受损后Reg蛋白的表达增加, 促进病变黏膜的愈合。而我们的研究也发现, Reg蛋白在皮肤被割伤后能够通过促进角质形成细胞的增殖来促进伤口愈合(待发表结果)。综上所述, Reg蛋白在多种组织受损后的修复过程中起着至关重要的作用, 有望成为治疗组织损伤的新药物。

2.2 Reg蛋白调节损伤组织中炎症因子的表达

适度的炎症反应是防止伤口感染、促进伤口愈合所必需的。然而, 如果炎症反应过度, 会延缓伤口的愈合, 严重的甚至导致伤口溃烂或伤口周边组织坏死和机体器官衰竭。因此, 调节炎症因子的适度表达对组织损伤后的伤口愈合也非常重要。Keim等^[2]在1984年发现在人胰腺炎患者和正常胰腺提取液中都有Reg蛋白存在, 但正常人胰腺中Reg蛋白含量比较低。当胰腺受损引起炎症反应后, Reg蛋白表达量迅速升高, 急性胰腺炎患者体内REG1A(PSP)的表达量要远远高于慢性胰腺炎患者^[35], 说明REG1A对控制急性胰腺炎的发生有一定的调节作用。另外, Vasseur等^[36]发现PAP1对炎症产生的早期也有很强的调节作用。在胰腺损伤实验中PAP1能够抑制TNF α 诱导的巨噬细胞活化和TNF α 激活的NF- κ B信号通路, 从而降低急性胰腺炎发生的可能性。更为重要的是Reg蛋白能够降低伴随着急性胰腺炎发生的急性肺衰竭的损伤程度。胰腺炎发生过程中因补体激活后活化的单核巨噬细胞、多核中性粒细胞释放炎症因子引起急剧的炎症反应, 不仅会损伤胰腺而且也会导致急性肺衰竭。而Heller等^[37]研究发现肺组织中灌注REG3A能够显著保护由N-甲酰-甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(fMLP)诱导的急性肺衰竭及血栓素的分泌, 从而在一定程度上减缓了病情的恶化。当然, Reg蛋白的这种抗炎症作用不仅发生在

胰腺、肺等部位,而且也参与了调节肠道炎症的发生。Gironella等^[38]将肠炎病人病发组织进行体外培养并加入50 ng/mL REG3A孵育24 h后,前炎症因子TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、IL-18、IL-12和IL-8均明显下降(19%~55%),说明REG3A能够抑制肠炎病人炎症的恶化。综上所述,Reg蛋白对于急性炎症的发生具有一定的抑制作用,能缓解炎症因子的过度产生所造成的组织损伤。

2.3 Reg蛋白调控细胞凋亡

Reg蛋白在组织修复中的另一重要功能是调控细胞凋亡。Reg家族中RegI和RegIII均能抑制由TNF α 激活的Fas诱导的细胞凋亡。在AR42J细胞中过表达RegI能够明显减轻TNF- α 的促凋亡作用^[39]。而HIP/PAP(REG3A)也能保护大剂量的对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)所诱导的肝细胞凋亡。当体内注射1 000 mg/kg APAP后, HIP/PAP转基因小鼠24 h内存活率接近80%,而野生型小鼠仅有25%。在野生型小鼠体内注射HIP/PAP蛋白后,同样也能降低由APAP诱导的小鼠死亡数,在高剂量APAP注射后保护效果尤为明显。检测生化指标后发现在HIP/PAP转基因鼠中,注射APAP后谷丙转氨酶、谷草转氨酶和Caspase-3的含量仅为对照组一半,而超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽还原酶(GSH)含量显著高于对照组,显示出HIP/PAP蛋白能够对APAP诱导的凋亡起到很好的保护作用^[33]。另外,最近还有报道显示REG4对辐射造成的凋亡有抑制作用。随着辐射剂量增大,小鼠大肠中RegIV表达量逐渐增加。在辐射前24 h单次注射RegIV能够明显减少凋亡细胞数量,并且存活下来的细胞中隐窝细胞RegIV表达量最高,说明RegIV能够保护隐窝细胞,减少辐射诱导的凋亡^[40]。

2.4 Reg蛋白抑制细菌生长

防止受损部位感染是保证受损组织正常修复的先决条件。Reg蛋白作为一种多功能蛋白,不仅在组织受损后能够促进细胞增殖,抑制炎症和调控细胞凋亡,还能作为抗菌蛋白抑制损伤组织处的细菌生长。早在1991年, Iovanna等^[24]就发现0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的PAP可以使大肠杆菌聚集在一起,并抑制其增殖。然而,接下来很长一段时间,科学家们研究的注意力并没有放在Reg的抗菌功能上,而是专注于Reg在胰腺和肝脏损伤或癌症发生过程中的功能。直到2006年, Heather等^[41]发现当RegIII γ 或REG3A与 10^5 ~ 10^6 CFU/mL

李斯特菌或粪肠球菌共同孵育2 h后,随着浓度增加,细菌存活率明显下降,2.5 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白就有明显抑菌效果;当达到5 $\mu\text{mol/L}$ 时,李斯特菌存活率仅为1%。电镜扫描发现Reg蛋白能够作用于细菌的细胞膜,在膜上穿孔而使细菌细胞壁破裂,细胞质流出。而Reg蛋白的这一杀菌机制与目前发现的大多数阳离子抗菌肽的杀菌机理相似,因此,从那时开始,RegIII γ 或REG3A才真正从理论上被定义为抗菌蛋白。而RegIII γ 或REG3A的抗菌作用有一定的选择性,它更易与革兰氏阳性细菌细胞膜结合,同时也能结合少部分革兰氏阴性细菌(如鼠伤寒沙门氏菌、绿脓杆菌)的细胞膜。

那么,为什么RegIII蛋白能够选择性结合革兰氏阳性细菌的细胞膜呢?主要是由于革兰氏阳性菌与阴性菌细胞壁的组成成分不同所导致的。革兰氏阳性细菌外壁较厚,有大量肽聚糖。这些肽聚糖是由N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、N-乙酰胞壁酸(MurNAc)和短肽交联的杂多糖;而革兰氏阴性细菌中细胞外壁较薄,肽聚糖含量较少。Pull down实验显示,加入不溶性肽聚糖后,RegIII γ 与肽聚糖一起存在于沉淀中,上清中并没有检测到RegIII γ ;但将沉淀的肽聚糖洗涤后,RegIII γ 重新出现于上清中;另外,加入可溶性肽聚糖能够与不溶性肽聚糖竞争性结合RegIII γ 。这些实验结果都说明RegIII γ 能够特异地与肽聚糖结合^[41]。革兰氏阳性细菌胞外肽聚糖层较厚,因而更易与RegIII γ 或HIP/PAP结合,并促进其对细胞壁的穿孔作用。

对RegIII γ 或REG3A的空间结构分析发现Reg蛋白的N端残基能够形成一个柔软的线状结构,会影响其抗菌活性。将N端11个氨基酸残基切除后并没有影响Reg与肽聚糖的结合能力,反而大大提高了Reg蛋白的杀菌活性^[42]。对其空间结构进一步分析发现,在REG3A的C-类凝集素特征结构域“长线环”内有两个二级结构域:“1环(Loop 1, 107~121 aa)”和“2环(Loop 2, 130~145 aa)”。在其他C-类凝集素如甘露糖结合蛋白(mannose binding protein, MBP)中,2环内有一个三个氨基酸组成的序列(EPN或QPD),这个序列对于MBP在Ca²⁺依赖条件下与糖链结合至关重要。在RegIII γ 或REG3A中,2环上并没有“EPN”序列,反而在1环上发现了EPN(114~116 aa)。外源加入人工合成肽聚糖时, E114、N116在异核单量子相干谱中出现明显位移,但是并不能与Ca²⁺离子结合,说明这是

一种独特的不依赖于钙离子的活性结构域^[43]。而且RegIII蛋白的EPN域与肽聚糖结合时,肽聚糖糖链越长,结合越牢固^[42]。

3 Reg蛋白的调节表达

虽然大量的研究报道显示Reg蛋白在多种内脏组织受损后会大量表达,但是组织受损过程中Reg蛋白被调节表达的机理并不明确。2008年,Zheng等^[44]研究发现IL-22能够诱导小肠上皮细胞(IECs)中RegIII β 和RegIII γ 的表达来抑制鼠类柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*)感染结肠,从而保护结肠上皮免受损伤。紧接着,Pichert等^[45]发现,在右旋糖酐硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎模型中,IL-22能够激活STAT3信号通路。而STAT3是RegIII蛋白表达的重要调节因子,因为基因芯片数据显示在STAT3^{IEC-KO}小鼠中RegIII蛋白的表达远远低于正常小鼠中RegIII蛋白的表达。随后,Sekikawa等^[46]发现在结肠癌细胞中IL-22也能激活STAT3、PI3K和MAPK信号通路,而REG1 α 的表达不仅依赖于STAT3的激活,而且部分依赖于MAPK的激活(图2),但是PI3K对IL-22诱导的REG1 α 没有影响。

在肠道中除了IL-22能够诱导RegIII蛋白的表达外,Toll样受体(TLRs)信号通路中的MyD88对RegIII蛋白的表达也起了重要的调节作用。*MyD88*基因敲除小鼠回肠末端RegIII γ 的表达量远远低于野生型小鼠回肠末端RegIII γ 的表达量,从而导致李斯特菌感染

*MyD88*基因敲除小鼠回肠末端的机率大大增加^[47]。为什么小鼠*MyD88*基因被敲除后,小鼠肠道中RegIII γ 的表达量会降低呢?在肠道中是什么激活MyD88来诱导RegIII γ 的表达呢?Brandl等^[48]将广谱抗生素甲硝唑、新霉素和万古霉素三种混合抗生素(MNV)注射到小鼠结扎的回肠中,3 d后发现回肠末端RegIII γ 表达消失;注射恩诺沙星和克林霉素后回肠末端RegIII γ 的表达量仅为未处理组的15%左右,而且用耐万古霉素粪肠球菌(VRE)感染MNV处理的结扎回肠时,VRE存活率为100%。这些实验结果说明小鼠肠道细菌通过激活TLR-MyD88信号通路诱导抗菌蛋白RegIII γ 的表达,从而抑制耐万古霉素粪肠球菌的生长(图2)。当给回肠注射抗生素后,肠道细菌急剧减少,所诱导的RegIII γ 的量也随着大大降低,这样就使得病原菌在肠道中的存活率显著增高^[48]。

上述关于Reg蛋白的调节表达研究仅仅局限于肠道RegIII的调节表达机制的研究。而在胰腺腺泡细胞中,*PAPI(REGI)*基因的活化依赖于p8转录因子^[36]。在诱导急性胰腺炎过程中,将Cerulein注射到野生型小鼠12, 18 h后,胰腺中*PAPI(REGI)*的表达量显著增加,而p8敲除小鼠中*PAPI(REGI)*的表达量只是适度增加,远远低于野生型小鼠,说明*PAPI(REGI)*基因的最优活化依赖于p8转录因子。另外,聚(ADP核糖)聚合酶(PARP)能够与Reg启动子上的顺式元件相结合,形成活跃的转录DNA/蛋白复合体,从而增强Reg基因的转录^[49]。

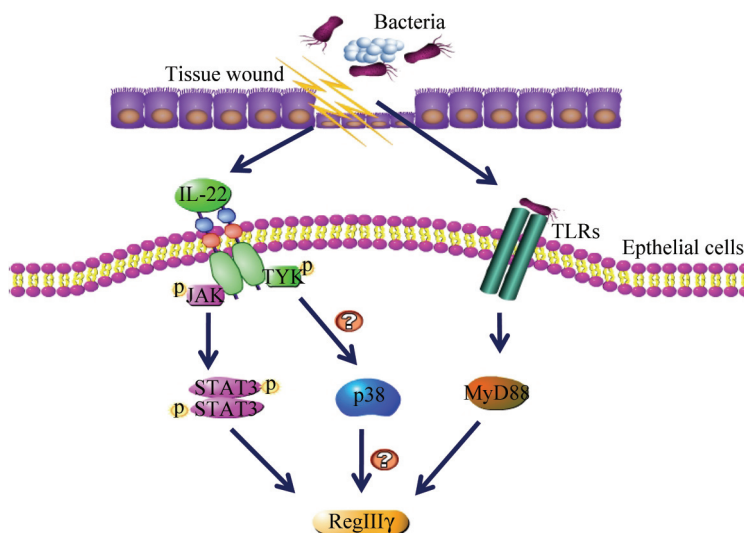


图2 Reg蛋白的调节表达

Fig.2 The regulation of Reg expression

4 Reg在组织修复中所介导的信号通路

Reg的表达受多个信号通路的调节,那么Reg在组织受损过程中又能够激活或调节哪些信号通路来参与组织修复呢?接下来我们将详细阐述Reg蛋白促进组织修复的作用机制。

4.1 Reg受体

Reg蛋白虽然属于C-类凝集素超家族,但是在体外无论有无钙离子存在均不能与甘露糖和半乳糖结合^[50],说明其与一般C-类凝集素不同,而也排除了甘露糖结合受体(mannose binding receptor)为Reg受体的可能性。2000年, Kobayashi等^[51]在大鼠胰岛cDNA文库中筛选出一个RegI受体,该受体基因全长2 760 bp,编码919 aa,分子量为104 682 kDa。根据氨基酸序列分析显示该受体为II型跨膜蛋白,具有868 aa的膜外区域和22 aa的跨膜区。该基因与多发性外生性骨疣(multiple exostoses, EXT)家族有同源性,尤其是与EXT样基因3(EXTL3)有97%同源性。免疫印迹检测到在肝脏、肾脏、胃、小肠、大肠、肾上腺、大脑、脑垂体中均有该受体表达,说明RegI可能参与体内多器官的活动^[51]。

除了EXTL3被鉴定为RegI受体外,其他Reg蛋白受体目前尚无文献明确报道。免疫荧光染色发现,RegIII蛋白能与大鼠肺巨噬细胞NR8383细胞膜表面结合,说明巨噬细胞中能够表达RegIII蛋白受体^[52],但巨噬细胞上与RegIII结合的受体是不是EXTL3,目前仍未知。另外,REG4能够激活EGFR磷酸化,推测EGFR也有可能为REG4的受体。

4.2 Reg调节PI3K/ATF-2或EGFR-Akt-AP1信号通路促进细胞增殖

Takasawa等^[53]用RegI刺激RINm5F细胞后,ATF-2表达量上调6倍,ATF磷酸化量也显著增加。将RegI受体转染细胞后,加入RegI刺激后使ATF-2启动子活性提高了1 000倍。同时,cyclin D1启动子活性随着RegI剂量的增加而增加。将ATF-2表达载体与cyclin D1受体共转染RINm5F细胞后,cyclin D1启动子活性进一步增强,但当ATF-2结合位点突变后,RegI作用效果明显降低,说明RegI通过激活ATF-2调节cyclin D1表达。而将RegI基因敲除后,Reg^{-/-}胰岛中ATF-2的磷酸化减少,细胞增殖能力也随着降低。另外,PI3K抑制剂wortmannin和LY294002能够部分抑制RegI诱导的ATF-2的磷酸化/活化。这些实验结果说明RegI通过激活PI3K/ATF-2途径来诱导cyclin D1,

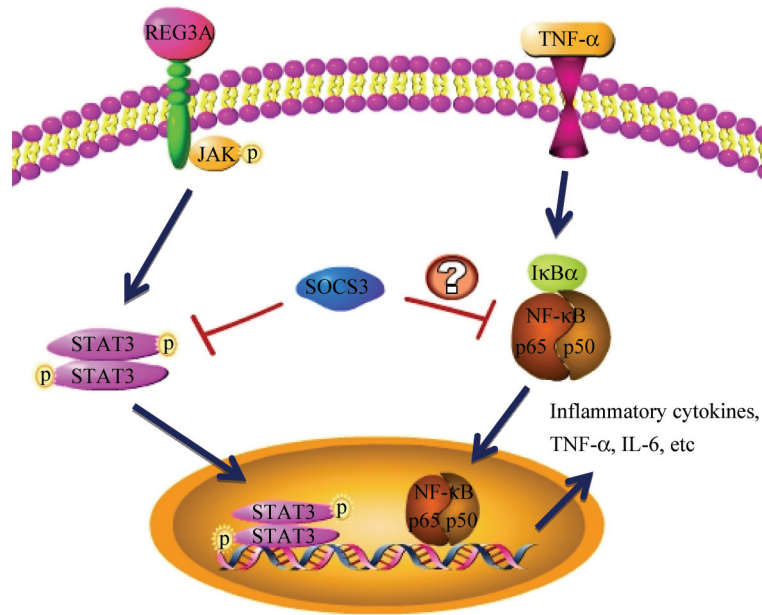
至于RegI是通过激活PI3K来激活ATF-2,从而诱导cyclin D1,还是RegI只需激活PI3K或ATF-2其中一个信号分子就能诱导cyclin D1的表达,从而促进细胞增殖或组织再生,仍需进一步研究。

除了Takasawa等^[51]发现的RegI能调节PI3K/ATF-2来促进细胞增殖,Bishnupuri等^[54]还发现重组的RegIV蛋白与EGF作用类似,对结肠癌细胞HCT116和HT29均有促增殖作用。RegIV能够使EGFR的Tyr992和Tyr1068以及Akt的Thr308和Ser473快速磷酸化。RegIV激活EGFR和Akt后能提高激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)的转录活性,而酪氨酸激酶抑制剂AG1478能够抑制RegIV诱导的AP-1表达。以上结果说明RegIV通过激活EGFR和Akt,提高AP-1水平,促进细胞增殖。至于EGFR是否是RegIV的唯一受体,需利用EGFR基因敲除小鼠来证明。

4.3 Reg调节JAK/STAT3/SOCS3信号通路抑制炎症

Reg蛋白能够抑制TNF- α 诱导的炎症因子如TNF- α 和IL-6的过表达。在AR-42J细胞中,30 nmol/L的PAP1(REG3A)通过调节蛋白质的重新合成(*de novo synthesis*),诱导STAT3的快速磷酸化和核转移及SOCS3的大量表达来抑制TNF- α 诱导的炎症因子的表达。而JAK的特异性抑制剂AG490能够拯救被PAP1所抑制的TNF- α 和IL-6的表达(图3)^[55]。这些实验结果说明PAP1(REG3A)可能通过调节JAK/STAT3/SOCS3信号通路来调节TNF- α 所诱导的炎症发生。而Vasseur等^[36]发现在小鼠肺泡巨噬细胞中Reg蛋白通过抑制NF- κ B入核来阻止TNF- α 诱导的TNF- α 和IL-6的表达,但REG3A是否通过激活JAK/STAT3来诱导SOCS3抑制NF- κ B入核,还需进一步验证。

但有趣的是Viterbo等^[52]却在鼠巨噬细胞中发现了相反的现象。重组PAP2(RegIII α)蛋白在大鼠NR8383巨噬细胞中反而能够提高IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10表达,并且具有剂量依赖效应,而IL-12、IL-15、IL-18没有变化。用抑制剂BAY11抑制NF- κ B后,PAP2完全失去了诱导IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的能力,说明在大鼠巨噬细胞中PAP2通过激活NF- κ B途径来诱导前炎症因子的表达^[52]。然而在不同细胞中RegIII蛋白的作用完全相反揭示了Reg的功能可能具有种属、组织或细胞特异性,在小鼠腺泡细胞中抑制炎症功能而在大鼠巨噬细胞中

图3 Reg蛋白调节TNF α 诱导的炎症因子Fig.3 Reg proteins regulate TNF α -induced inflammatory cytokines

反而能促进炎症因子的表达。另外内源性外源性Reg蛋白刺激可能也是造成两种相反结论的原因之一。

5 总结和展望

组织受损后,若受损部位伤口愈合慢或不愈,伤口就很容易被微生物感染并引发炎症现象,从而影响组织修复,严重的甚至导致伤口溃烂或伤口周边组织坏死,可能危及病人的生命。因此对组织受损后的伤口进行合理治理,以便伤口的快速愈合迫在眉睫。而伤口治理所需花费已成为各个国家医疗卫生系统的主要支出,并且有日益上升的趋势。据美国医疗系统2010年的研究调查报告显示:美国每年在促进伤口愈合、防止伤口感染和发炎所花经费为200亿美元,已成为该国医疗保险的巨大负担。在我国因手术后伤口难以愈合而导致的伤口感染和发炎也是医院中常见的病例,由此引发的其他疾病也不断上升,严重威胁着国民健康。因此迫切需要对伤口愈合的调控机制进行深入研究,以便促进伤口修复,从而防止伤口感染和发炎。Reg蛋白作为一个多功能分子,具有促进细胞增殖、调控细胞凋亡、抑制损伤部位炎症因子的过表达以及抑制病原微生物生长的功能,必将使其成为治疗组织受损的新型药物。然而,鉴于Reg蛋白的这种多功能有一定的组

织、细胞特异性,因此应对Reg蛋白在不同受损组织中的功能和作用机理做更深入的研究。另外,Reg蛋白作为免疫因子IL-22信号通路的下游分子,可能将成为治疗由IL-22引起的自身免疫病所引起组织损伤的很好的靶标分子,因而将避免由IL-22抗体治疗自身免疫疾病所引起的免疫抑制。

参考文献 (References)

- 1 de Caro A, Lohse J, Sarles H. Characterization of a protein isolated from pancreatic calculi of men suffering from chronic calcifying pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 87(4):1176-82.
- 2 Keim V, Rohr G, Stöckert HG, Haberich FJ. An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion* 1984; 29: 242-9.
- 3 Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y. A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem* 1988; 263(5): 2111-4.
- 4 Rouquier S, Verdier JM, Iovanna J, Dagorn JC, Giorgi D. Rat pancreatic stone protein messenger RNA. Abundant expression in mature exocrine cells, regulation by food content, and sequence identity with the endocrine reg transcript. *J Biol Chem* 1991; 266(2): 786-91.
- 5 Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, *et al*. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest* 1997; 99(9): 2100-9.
- 6 Watanabe T, Yonekura H, Terazono K, Yamamoto H, Okamoto

- H. Complete nucleotide sequence of human *reg* gene and its expression in normal and tumoral tissues. *J Biol Chem* 1990; 265(13): 7432-9.
- 7 Giorgi D, Bernard JP, Rouquier S, Iovanna J, Sarles H, Dagorn JC. Secretory pancreatic stone protein messenger RNA. *J Clin Invest* 1989; 84: 100-6.
- 8 Gharib B, Fox MF, Bartoli C, Giorgi D, Sansonetti A, Swallow DM. Human regeneration protein/lithostathine genes map to chromosome 2p12. *Ann Hum Genet* 1993; 57(Pt 1): 9-16.
- 9 Perfetti R, Hawkins AL, Griffin CA, Egan JM, Zenilman ME, Shuldiner AR. Assignment of the human pancreatic regenerating (REG) gene to chromosome 2p12. *Genomics* 1994; 20(2): 305-7.
- 10 Moriizumi S, Watanabe T, Unno M, Nakagawara K, Suzuki Y, Miyashita H, *et al.* Isolation, structural determination and expression of a novel *reg* gene, human *regI* beta. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1217(2): 199-202.
- 11 Dusetti NJ, Frigerio JM, Fox MF, Swallow DM, Dagorn JC, Iovanna JL. Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the human pancreatitis-associated protein (PAP) gene. *Genomics* 1994; 19(1): 108-14.
- 12 Lasserre C, Simon MT, Ishikawa H, Diriong S, Nguyen VC, Christa L, *et al.* Structural organization and chromosomal localization of a human gene (HIP/PAP) encoding a C-type lectin overexpressed in primary liver cancer. *Eur J Biochem* 1994; 224: 29-38.
- 13 Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26): 16899-903.
- 14 Laurine E, Manival X, Montgelard C, Bideau C, Bergé-Lefranc JL, Erard M, *et al.* PAP IB, a new member of the Reg gene family: Cloning, expression, structural properties, and evolution by gene duplication. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1727: 177-87.
- 15 Hartupee JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518(3): 287-93.
- 16 Kämäräinen M, Heiskala K, Knuutila S, Heiskala M, Winqvist O, Andersson LC. RELP, a novel human REG-like protein with up-regulated expression in inflammatory and metaplastic gastrointestinal mucosa. *Am J Pathol* 2003; 163(1): 11-20.
- 17 Narushima Y, Unno M, Nakagawara K, Mori M, Miyashita H, Suzuki Y, *et al.* Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma. *Gene* 1997; 185(2): 159-68.
- 18 Unno M, Yonekura H, Nakagawara K, Watanabe T, Miyashita H, Moriizumi S, *et al.* Structure, chromosomal localization, and expression of mouse *reg* genes, *reg I* and *reg II*. A novel type of *reg* gene, *reg II*, exists in the mouse genome. *J Biol Chem* 1993; 268: 15974-82.
- 19 Itoh T, Teraoka H. Cloning and tissue-specific expression of cDNAs for the human and mouse homologues of rat pancreatitis-associated protein (PAP). *Biochim Biophys Acta* 1993; 1172(1/2): 184-6.
- 20 Abe M, Nata K, Akiyama T, Shervani NJ, Kobayashi S, Tomioka-Kumagai T, *et al.* Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene* 2000; 246(1/2): 111-22.
- 21 Kawai J, Shinagawa A, Shibata K, Yoshino M, Itoh M, Ishii Y. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* 2001; 409(6821): 685-90.
- 22 Stephanova E, Tissir F, Dusetti N, Iovanna J, Szpirer J, Szpirer C. The rat genes encoding the pancreatitis-associated proteins I,II and III (Pap1, Pap2, Pap3), and the lithostathin/pancreatic stone protein/regeneration protein (Reg) colocalize at 4q33-->q34. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72(1): 83-5.
- 23 Frigerio JM, Dusetti NJ, Keim V, Dagorn JC, Iovanna JL. Identification of a second rat pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning, gene structure, and expression during acute pancreatitis. *Biochemistry* 1993; 32(35): 9236-41.
- 24 Iovanna J, Orelle B, Keim V, Dagorn JC. Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem* 1991; 266(36): 24664-9.
- 25 Frigerio JM, Dusetti NJ, Garrido P, Dagorn JC, Iovanna JL. The pancreatitis associated protein III (PAP III), a new member of the PAP gene family. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1216(2): 329-31.
- 26 Namikawa K, Fukushima M, Murakami K, Suzuki A, Takasawa S, Okamoto H, *et al.* Expression of Reg/PAP family members during motor nerve regeneration in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332(1): 126-34.
- 27 Itoh T, Sawabu N, Motoo Y, Funakoshi A, Teraoka H. The human pancreatitis-associated protein(PAP)-encoding gene generates multiple transcripts through alternative use of 5' exons. *Gene* 1995; 155: 283-7.
- 28 Vasseur S, Frigerio JM, Dusetti NJ, Keim V, Dagorn JC, Iovanna JL. Two transcripts are generated from the Pancreatitis Associated Protein II gene by alternative splicing in the 5' untranslated region. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1261: 272-4.
- 29 Francis PJ, Southgate JL, Wilkin TJ, Bone AJ. Expression of an islet regenerating (*reg*) gene in isolated rat islets: Effects of nutrient and non-nutrient growth factors. *Diabetologia* 1992; 35(3): 238-42.
- 30 Smith FE, Bonner-Weir S, Leahy JL, Laufgraben MJ, Ogawa Y, Rosen KM, *et al.* Pancreatic Reg/pancreatic stone protein (PSP) gene expression does not correlate with beta-cell growth and regeneration in rats. *Diabetologia* 1994; 37(10): 994-9.
- 31 Sanchez D, Mueller CM, Zenilman ME. Pancreatic regenerating gene I and acinar cell differentiation: Influence on cellular lineage. *Pancreas* 2009; 38(5): 572-7.

- 32 Huszarik K, Wright B, Keller C, Nikoopour E, Krougly O, Lee-Chan E, *et al.* Adjuvant immunotherapy increases beta cell regenerative factor Reg2 in the pancreas of diabetic mice. *J Immunol* 2010; 185(9): 5120-9.
- 33 Lieu HT, Batteux F, Simon MT, Cortes A, Nicco C, Zavala F, *et al.* HIP/PAP accelerates liver regeneration and protects against acetaminophen injury in mice. *Hepatology* 2005; 42(3): 618-26.
- 34 Moniaux N, Song H, Darnaud M, Garbin K, Gigou M, Mitchell C, *et al.* Human hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein cures fas-induced acute liver failure in mice by attenuating free-radical damage in injured livers. *Hepatology* 2011; 53(2): 618-27.
- 35 Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Sakai Y, Sobajima H, *et al.* Serum pancreatic stone protein in pancreatic diseases. *Int J Pancreatol* 1993; 13(2): 97-103.
- 36 Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, *et al.* p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 7199-207.
- 37 Heller A, Fiedler F, Schmeck J, Lück V, Iovanna JL, Koch T. Pancreatitis-associated protein protects the lung from leukocyte-induced injury. *Anesthesiology* 1999; 91(5): 1408-14.
- 38 Gironella M, Iovanna JL, Sans M, Gil F, Peñalva M, Closa D, *et al.* Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. *Gut* 2005; 54(9): 1244-53.
- 39 Malka D, Vasseur S, Bödeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P, *et al.* Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation. *Gastroenterology* 2000; 119(3): 816-28.
- 40 Bishnupuri KS, Luo Q, Sainathan SK, Kikuchi K, Sureban SM, Sabarinathan M, *et al.* Reg IV regulates normal intestinal and colorectal cancer cell susceptibility to radiation-induced apoptosis. *Gastroenterology* 2010; 138(2): 616-26.
- 41 Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006; 313: 1126-30.
- 42 Mukherjee S, Partch CL, Lehotzky RE, Whitham CV, Chu H, Bevins CL, *et al.* Regulation of C-type lectin antimicrobial activity by a flexible N-terminal prosegment. *J Biol Chem* 2009; 284(8): 4881-8.
- 43 Lehotzky RE, Partch CL, Mukherjee S, Cash HL, Goldman WE, Gardner KH, *et al.* Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(17): 7722-7.
- 44 Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008; 14(3): 282-9.
- 45 Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, *et al.* STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009; 206(7): 1465-72.
- 46 Sekikawa A, Fukui H, Suzuki K, Karibe T, Fujii S, Ichikawa K, *et al.* Involvement of the IL-22/REG Ialpha axis in ulcerative colitis. *Lab Invest* 2010; 90(3): 496-505.
- 47 Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIIIgamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 2007; 204(8): 1891-900.
- 48 Brandl K, Plitas G, Mihu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, *et al.* Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* 2008; 455(7214): 804-7.
- 49 Okamoto H. Recent advances in physiological and pathological significance of tryptophan-NAD⁺ metabolites: Lessons from insulin-producing pancreatic beta-cells. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 243-52.
- 50 Zenilman ME, Chen J, Danesh B, Zheng QH. Characteristics of rat pancreatic regenerating protein. *Surgery* 1998; 124(5): 855-63.
- 51 Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, *et al.* Identification of a receptor for Reg (Regenerating Gene) protein, a pancreatic b-cell regeneration factor. *J Biol Chem* 2000; 275(15): 10723-6.
- 52 Viterbo D, Bluth MH, Lin YY, Mueller CM, Wadgaonkar R, Zenilman ME. Pancreatitis-associated protein 2 modulates inflammatory responses in macrophages. *J Immunol* 2008; 181: 1948-58.
- 53 Takasawa S, Ikeda T, Akiyama T, Nata K, Nakagawa K, Shervani NJ, *et al.* Cyclin D1 activation through ATF-2 in Reg-induced pancreatic beta-cell regeneration. *FEBS Lett* 2006; 580(2): 585-91.
- 54 Bishnupuri KS, Luo Q, Murmu N, Houchen CW, Anant S, Dieckgraefe BK. Reg IV activates the epidermal growth factor receptor/Akt/AP-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas. *Gastroenterology* 200; 130(1): 137-49.
- 55 Folch-Puy E, Granel S, Dagorn JC, Iovanna JL, Closa D. Pancreatitis-Associated Protein I Suppresses NF- κ B Activation through a JAK/STAT-Mediated Mechanism in Epithelial Cells. *J Immunol* 2006; 176: 3774-9.

Functions and Underlying Mechanisms of Regenerating Islet-derived Proteins in Tissue Repair

Jiang Ziwei, Li Changwei, Lei Hu, Quan Yanchun, Lai Yuping*

(Laboratory of Microbiology and Immunology, School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract Regenerating islet-derived protein (Reg) is a multi-functional molecule and plays an important role in several physiological and pathological reactions. Here we focus on functions of Reg in tissue repair and discuss how Reg induces cell proliferation, regulates excessive inflammation or cell apoptosis, and inhibits pathogen growth and diffusion. Furthermore, we summarize the underlying mechanisms by which Reg responses to tissue injury. Our review provides new insights into pathways contributing to tissue repair, and may ultimately lead to the development of new forms of treatment.

Key words regenerating islet-derived proteins (Regs); tissue repair; cell proliferation; anti-inflammation; anti-bacteria

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81072422, No.31170867) and the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No.11QA1401900)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54342908, E-mail: yplai@bio.ecnu.edu.cn