

文章编号: 1004-0374(2012)04-0321-07

鱼类 β -防御素的研究进展

郭洪燕, 杨桂文, 安利国*

(山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性生物学重点实验室, 济南 250014)

摘要: β -防御素是一种具有六个保守的半胱氨酸位点的阳离子两性小分子多肽, 是抗菌肽的重要成员。随着基因组研究的不断深入, 目前在鱼类中发现了 20 个 β -防御素基因, 其基因结构均是由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 并且具有广谱抗菌活性及抗病毒活性。主要从分子结构、组织分布、基因结构、生物学活性以及生物进化等方面对鱼类 β -防御素的研究概况进行综述。

关键词: 鱼类; β -防御素; 基因结构; 生物学活性; 生物进化

中图分类号: Q939.92

文献标志码: A

Research advances in fish β -defensins

GUO Hong-Yan, YANG Gui-Wen, AN Li-Guo*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Resistance Biology, College of Life Sciences,
Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China)

Abstract: β -defensins as one significant member of antimicrobial peptides (AMPs), are characterized by small, cationic and amphipathic with six conserved cysteine residues. With the development of genomics, twenty β -defensin genes have been found in fish up to now. They, which lyse a broad spectrum of pathogens such as bacteria and viruses, all have the same gene organisation within the coding region of three exons and two introns. This article will summarize the research achievement of β -defensins from its structure, tissue distribution, gene structure, biological activity to biological evolution.

Key words: fish; β -defensin; gene structure; biological activity; biological evolution

脊椎动物的免疫系统由天然免疫系统和特异性免疫系统组成, 鱼类是低等的脊椎动物, 虽然具有特异性免疫, 但是不同鱼类的特异性免疫能力也有差别。海洋生物的特异性免疫形成时间比较晚, 所以在孵化后的 2~3 个月, 它们都依赖天然免疫系统^[1-4]。另外, 特异性免疫反应的时间较长, 还要依赖外界温度, 对于变温型的脊椎动物, 如鱼类, 天然免疫的作用更重要^[5]。

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 是天然免疫系统的重要成员, 在防御外界病原菌感染时具有重要作用。 β -防御素 (β -defensin) 是广泛分布在植物、昆虫、脊椎动物中的一种富含半胱氨酸的阳离子小分子抗菌肽。最早的 β -防御素是在牛的气管黏膜上皮细胞中发现的牛气管抗菌肽 (TAP), 因其氨基酸序列与 α -防御素不同, 故被命名为 β -防御素^[6]。

β -防御素主要分布于呼吸道、胃肠道、生殖道表面和腺体中, 形成抵抗病原体的第一道重要防线。目前对人类 β -防御素的研究较多, 其成熟肽一般由 36~42 个氨基酸残基组成, 主要在各种组织的上皮细胞中表达^[7-10]。人的 β -防御素除了能够直接杀灭细菌、病毒、酵母菌之外, 还具有其他生物学活性, 包括吸引单核细胞、T 淋巴细胞、未成熟的树突状细胞, 并促进树突状细胞成熟和分化, 以及诱导细胞因子和趋化因子的表达^[7-8]。 β -防御素在鱼类中

收稿日期: 2011-12-26; 修回日期: 2012-01-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070586); 济南市高校自主创新项目(200906020)

*通信作者: E-mail: anlg@sdu.edu.cn; Tel: 0531-86180143

的研究还比较少,尤其是功能方面。近年来随着鱼类基因组学研究的不断深入,在鱼类中也发现多个 β -防御素基因:斑马鱼3个,河豚2个,凹鼻鲀2个^[11],虹鳟4个^[12],青鳉1个^[13],牙鲆5个^[14],点带石斑鱼1个^[15],海鲤1个^[16]。

本文主要从分子结构、组织分布、基因结构、生物学活性以及生物进化等方面介绍鱼类 β -防御素的研究概况,为今后 β -防御素的研究提供一定的理论依据。

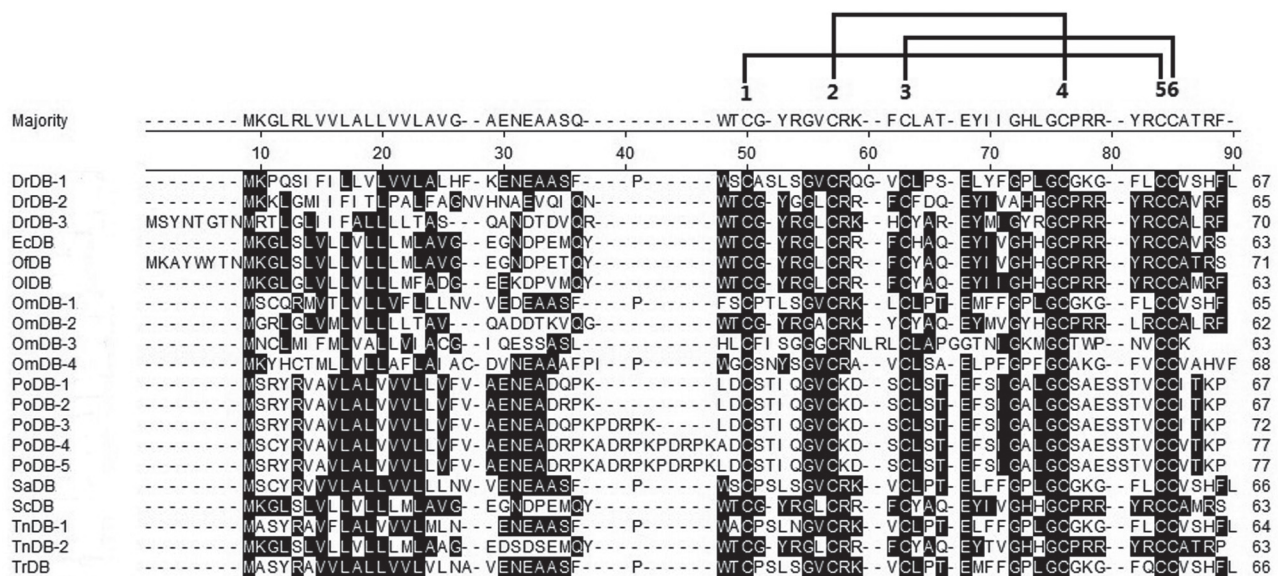
1 鱼类 β -防御素的分子结构

脊椎动物的防御素一般具有六个保守的半胱氨酸位点。根据六个保守的半胱氨酸的位置以及形成二硫键的连接方式不同将防御素分为三个亚家族: α -防御素、 β -防御素和 θ -防御素^[17]。 α -防御素的二硫键连接方式是C1-C6、C2-C4、C3-C5; β -防御素的连接方式为C1-C5、C2-C4、C3-C6。另外, θ -防御素是一个包含三个二硫键的环肽,目前仅在非人灵长类中发现,如恒河猴^[18]。成熟的 θ -防御素是通过 α -防御素前体多肽的9个氨基酸片段剪

接和环化形成一个环肽段,一般认为是由两个半 α -防御素组成的^[19]。早期进化的脊椎动物如鱼类和鸟类中都没有发现 α -防御素和 θ -防御素,这说明防御素其他亚家族可能由 β -防御素的原始基因复制分化而来^[20]。

鱼类 β -防御素的成熟肽一般由39~45个氨基酸残基组成,前体分子由62~77个氨基酸残基组成,信号序列和前导序列含有22~38个氨基酸残基。在整个氨基酸序列中只有8个氨基酸是高度保守的:一是位于N末端的2个甘氨酸,二是C末端的6个半胱氨酸(图1)。保守的6个半胱氨酸残基形成3个二硫键的稳定结构,连接方式为C1-C5、C2-C4、C3-C6^[21-22],形成了3股反向平行的 β 片层结构(图2)。二硫键和 β 片层结构可以使小分子防御素紧密联结以防御蛋白酶水解,所以在富含蛋白酶的吞噬溶酶体环境中仍能保持其特性。这也是防御素区别于其他抗微生物肽的主要因素^[23-24]。

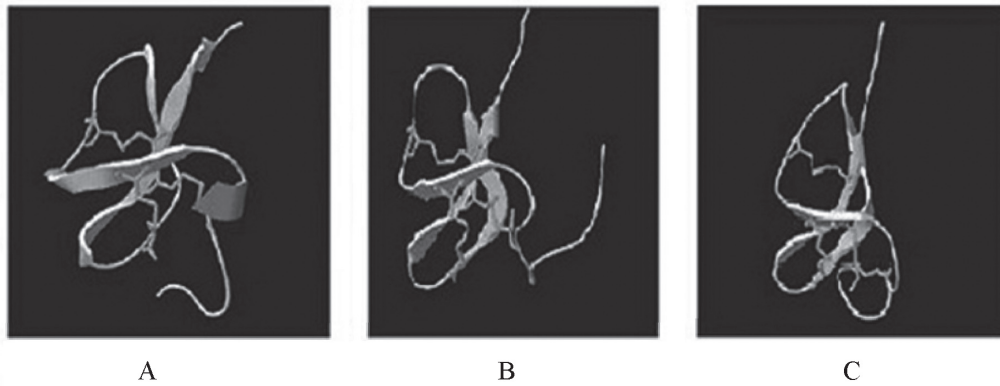
α -防御素的前导序列一般较长,是由45个氨基酸残基组成的带有负电荷的肽段,用来中和成熟肽所带的正电荷,从而阻止合成和加工过程中的自



Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid black) residues that match the Consensus exactly.

利用MegAlign软件对20条 β -防御素蛋白氨基酸序列进行多序列比对,其中黑色部分代表相同的氨基酸。Dr(斑马鱼, DB-1 NP_001075022.1、DB-2 NP_001075023.1、DB-3 NP_001075024.1), Ec(点带石斑鱼, AAN02164.1), Om(虹鳟, DB-1 CBB12546.1、DB-2 CBB12547.1、DB-3 CBB12548.1、DB-4 CBB12549.1), Of(横带石鲷, ADJ21805.1), Oi(青鳉, NP_001153910.1), Po(褐牙鲆, DB-1 ADA84138.1、DB-2 ADA84139.1、DB-3 ADA84143.1、DB-4 ADA84141.1、DB-5 ADA84142.1), Sc(鳊鱼, ACO88907.1), Tr(红鳍东方鲀, CAJ57646.1), Tn(凹鼻鲀, DB-1 CAJ57644.1、DB-2 CAJ57645.1), Sa(海鲤, FM158209.1)。

图1 鱼类 β -防御素氨基酸序列分析



A: 斑马鱼 β -防御素-1; B: 斑马鱼 β -防御素-2; C: 斑马鱼 β -防御素-3

图2 斑马鱼 β -防御素空间结构^[5]

身细胞毒作用^[25]。 β -防御素的前导序列很短,除牙鲆外,已发现的鱼类 β -防御素都缺失前导序列。 β -防御素一般都是富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽,但最近在鱼类中发现了非阳离子 β -防御素——牙鲆的 β -防御素-1、-2、-3^[14]。除鱼类外,在昆虫中也发现了非阳离子防御素,例如家蚕^[26]和雌性壁虱^[27]。壁虱的防御素-2和家蚕的BmdefA的等电点分别为4.44和4.12。壁虱的防御素-2具有抗革兰氏阴性菌如大肠杆菌和革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌的抗菌活性^[27]。SMH模型(分析大多数抗菌肽抗菌活性机制)认为阳离子抗菌肽通过与微生物的阴离子细胞膜组件(革兰氏阳性菌的黏多糖或者革兰氏阴性菌的脂多糖)相结合来发挥其抗菌活性^[28]。但SMH模型很难解释阴离子防御素的抗菌机制,可能它们具有不同于阳离子防御素的抗菌机理,这些都需要进一步研究。

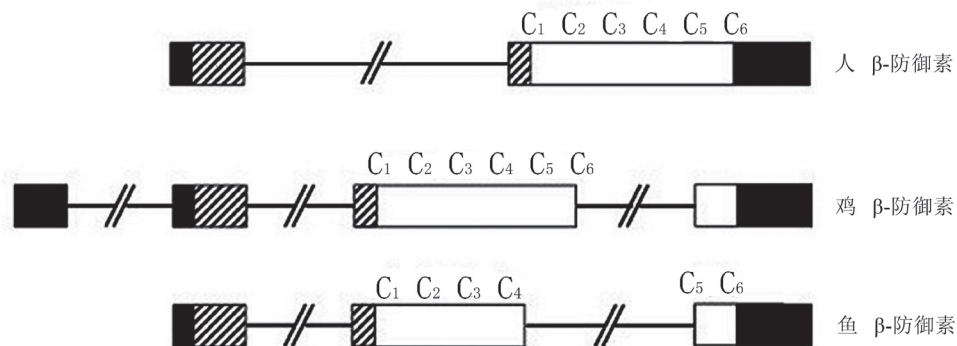
2 鱼类 β -防御素的分布

鱼类 β -防御素基因属于差异表达基因,不同物种中具有不同的表达模式。斑马鱼 β -防御素-1和 β -防御素-3基因在皮肤、性腺、肠、鳃、脾、肌肉、肝脏中均有表达,但 β -防御素-2基因仅在肠中表达^[11]。海鲤的 β -防御素基因在皮肤中表达量最高,其次是外周白细胞和头肾,而在外周血中基本不表达。虹鳟的 β -防御素基因在不同组织中差异表达^[12,29],青鳉的 β -防御素基因主要在眼、肝脏、头肾、血液、脾脏和鳃中表达^[13]。而石斑鱼的 β -防御素基因仅在垂体和睾丸中表达^[15]。总之,鱼类 β -防御素基因主要在以下组织中表达:一是与外周微环境密切相关的组织,比如皮肤和鳃;二

是免疫相关的组织,比如腹腔白细胞、头肾(鱼类的主要造血器官)和胸腺。2011年,Cuesta等^[16]将人类和鱼类 β -防御素通过生物信息学分析发现鱼类 β -防御素与HBD4(人 β -防御素-4)的亲缘关系最近,这说明鱼类 β -防御素可能在结构和功能上与HBD4类似。目前人类 β -防御素的结构及功能已经研究得比较清楚,可以根据HBD4的结构和功能来推测鱼类 β -防御素的相关特征。HBD4主要在睾丸、附睾、胃窦、子宫、中性粒细胞、甲状腺、肺、肾、牙龈和初级角质细胞中表达,鱼类的 β -防御素的表达模式也与HBD4相似,以后可以考虑根据HBD4的功能来研究鱼类 β -防御素的相关功能。

3 鱼类 β -防御素的基因结构

鱼类 β -防御素的基因结构很相似,其编码区都是由三个外显子和两个内含子组成^[11,13],不同于鸟类和哺乳动物 β -防御素的基因结构。在人类和鸟类中,6个保守的半胱氨酸位于一个外显子内,而鱼类 β -防御素的6个半胱氨酸分布在两个外显子中,前4个半胱氨酸定位于第二个外显子上,后2个定位在第三个外显子上。另外人类 β -防御素的成熟肽完全由一个外显子编码,而鱼类和鸟类 β -防御素成熟肽由两个外显子共同编码^[11](图3)。人类基因组中有5个 β -防御素基因群组,而啮齿动物和狗中包含4个不同的群组^[29]。在鸡中,至少14个 β -防御素基因定位在染色体3q3.5~3.7 86.0 kb的 β -防御素基因群组上^[30-31]。斑马鱼的 β -防御素-1和 β -防御素-2在21号染色体上,而 β -防御素-3在15号染色体上^[11],这说明鱼类基因组中也存在



人、鸡和鱼 β -防御素的基因结构图，其中黑色实体框代表非编码区，斜线框代表前体肽，空白框代表成熟肽。

图3 β -防御素基因结构图^[5]

多重性 β -防御素位点。

4 鱼类 β -防御素的生物学活性

首先，鱼类 β -防御素的生物学活性主要体现在抗菌活性和抗病毒活性两方面。虹鳟的四个 β -防御素基因在大多数组织中差异表达，用polyI:C刺激虹鳟的头肾白细胞4 h后发现表达量上升，24 h时恢复到正常水平^[29]。而细菌刺激后只有肠中的 β -防御素-2和鳃中 β -防御素-3明显上调。这说明虹鳟的 β -防御素具有明显的抗病毒和抗菌活性。牙鲆的 β -防御素-1细菌刺激后在头肾中表达上调，其重组蛋白具有明显的抗大肠杆菌的抗菌活性^[14]。青鳉的 β -防御素在LPS刺激后表达量上调，具有明显的抗革兰氏阴性菌的抗菌活性^[13]。海鲤的 β -防御素细菌刺激后在头肾白细胞中表达上调，其重组蛋白对革兰氏阳性菌枯草杆菌和革兰氏阴性菌鳗弧菌具有明显的抗菌活性，并且发现具有趋化作用。另外，还发现海鲤中的 β -防御素不同于其他鱼类的 β -防御素，其对革兰氏阳性菌的抗菌活性高于革兰氏阴性菌^[16]。总之，鱼类的 β -防御素重组抗菌肽抗菌活性检测发现，对下列细菌具有显著的抗菌活性：藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、弗氏弧菌、鳗弧菌、嗜水气单胞菌、温和气单胞菌和绿脓假单胞菌^[13-15]。

其次，某些 β -防御素也可以通过上调其他基因的表达来协同发挥抗菌活性。虹鳟的 β -防御素-1基因，其重组肽能上调*Mxl*基因的表达，协同发挥抗病毒活性，并且具有明显的抗出血性白血病病毒的生物学活性^[12]。

另外，某些鱼类的 β -防御素基因还具有其他生物学活性。石斑鱼的 β -防御素能同时在垂体和

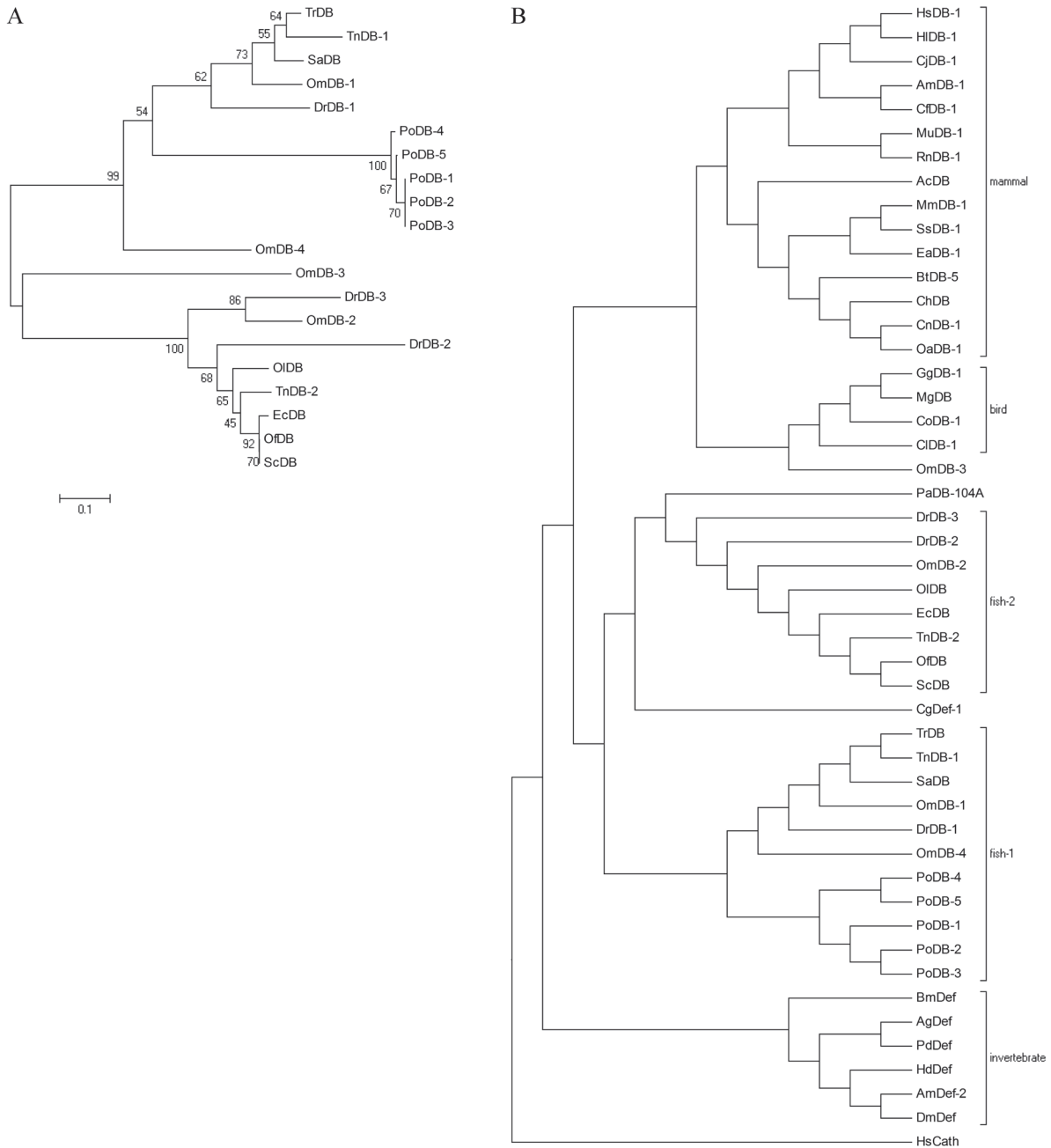
睾丸中表达，除具有抗菌和抗病毒的免疫活性之外，还可参与到内分泌系统和生殖系统中发挥作用^[15]。

目前的数据显示，不同鱼的 β -防御素在不同组织中表达，具有不同的生物学功能，但都具有抗菌和抗病毒的免疫活性，就像人的 β -防御素一样。目前对鱼类 β -防御素生物学活性的研究主要集中在免疫活性方面，其他的生物学功能研究较少，但是人类 β -防御素的研究比较深入，可以参考人类已知的 β -防御素的功能进一步探讨鱼类 β -防御素的生物学活性。

5 鱼类 β -防御素的遗传进化分析

从NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查询得到46条 β -防御素的蛋白序列，包括哺乳动物16条，鸟类4条，鱼类20条，无脊椎动物6条。以氨基酸序列比对结果为基础，采用MEGA 4.0软件构建系统进化树。采用最大似然法(Maximum Likelihood Method)运行如下参数：Possion correction模式，缺口设置为Pairwise Deletion，校检参数为Bootstrap = 1000(图4)。图4A是将查询得到的20条鱼类 β -防御素的蛋白序列分析比对得到的结果，发现鱼类的 β -防御素可以分为两大类：第一类包括斑马鱼DB-1，虹鳟DB-1，海鲤、红鳍东方鲀、凹鼻鲀DB-1，牙鲆的5条 β -防御素，虹鳟DB-4；第二类包括斑马鱼DB-2和DB-3，虹鳟DB-2，青鳉、凹鼻鲀DB-2，点带石斑鱼、横带石鲷、鳊鱼、虹鳟DB-3。

图4B是将查询得到的46条 β -防御素蛋白序列分析比对得到的结果。采用人的cathelicidin作为外群，分析发现鱼类的 β -防御素也分为两大类，



采用MEGA 4.0软件通过最大似然法构建系统发育树, 校检参数为Bootstrap=1000。A为鱼类β-防御素的系统发育树, 仅对鱼类的20条防御素蛋白序列进行分析; B为各物种β-防御素的系统发育树, 将查询得到的46条各物种的β-防御素的蛋白序列进行分析。其中鱼类的20条β-防御素与图1中的信息一致, 其他物种的β-防御素信息如下: HsDB-1, *Homo sapiens*, AAB49758.1; MuDB-1, *Mus musculus*, NP_031869.1; AmDB-1, *Ailuropoda melanoleuca*, XP_002929992.1; AgDef, *Anopheles gambiae*, ABD18596.1; AcDB, *Anser cygnoides*, ACC78295.1; AmDef-2, *Apis mellifera*, NP_001011638.1; BmDef, *Bombyx mori*, NP_001037370.1; BtDB-5, *Bos taurus*, NP_001124233.1; CjDB-1, *Callithrix jacchus*, XP_002756801.1; CfDB-1, *Canis lupus familiaris*, NP_001107185.1; ChDB, *Capra hircus*, ABF71365.1; CnDB-1, *Cervus nippon*, ADK74772.1; ClDB-1, *Chinchilla lanigera*, AAM97293.1; CoDB-1, *Coturnix japonica*, ADQ74866.1; CgDef-1, *Crassostrea gigas*, ACS91536.1; DmDef, *Drosophila melanogaster*, NP_523672.1; EaDB-1, *Equus asinus*, ABX82806.1; GgDB-1, *Gallus gallus*, NP_989981.1; HdDef, *Haliotis discus discus*, ACZ15982.1; HlDB-1, *Hylobates lar*, AAK61465.1; MmDB-1, *Macaca mulatta*, NP_001027990.1; MgDB, *Meleagris gallopavo*, AAG09213.1; OaDB-1, *Ovis aries*, AAB61995.1; PaDB-104A, *Papio anubis*, NP_001140184.1; PdDef, *Polistes dominulus*, ADB85559.1; RnDB-1, *Rattus norvegicus*, NP_113998.1; SsDB-1, *Sus scrofa*, NP_999003.1; HsCath, *Homo sapiens*, AAH55089.1。

图4 β-防御素系统发育树

与图 4A 中得到的结果相同。并且发现鱼类 β - 防御素中的第一类与无脊椎动物中的牡蛎亲缘关系较近, 第二类与哺乳动物中的棕獬的亲缘关系较近。这可以说明第一类是比较原始基因, 而第二类是进化后的基因, 后者可能是由前者进化而来。鱼类作为比较低等的脊椎动物, 处于无脊椎动物和脊椎动物的过渡期, 可能同时具有无脊椎动物和脊椎动物中的一些基因, 所以研究鱼类的 β - 防御素对于了解 β - 防御素基因在物种进化过程中的地位具有重要意义。除鱼类 β - 防御素分为两大分支之外, 哺乳动物、无脊椎动物和鸟类也都各成一分支。这说明 β - 防御素具有一定的物种保守性, 在同一物种中的相似性更高。根据系统发育树还发现, 鱼类中的 β - 防御素是独立于其他物种的分支, 说明鱼类 β - 防御素的种类比较复杂, 与其他物种的相似性不高。外群的存在证明了鱼类的 β - 防御素还是属于防御素的大家族。目前关于 β - 防御素的系统分类还没有相关介绍, 通过系统发育树得到的结果也只能简单地将鱼类的 β - 防御素分为两类, 至于其系统分类还需要进一步的分析研究。

6 总结与展望

抗菌肽是天然免疫系统的重要组成部分, 具有反应时间快、耐药性、广谱抗菌活性等优点。现在越来越多的病原菌对抗生素产生耐药性, 抗菌肽作为抗生素的替代品成为不可阻挡的趋势。 β - 防御素作为抗菌肽的重要成员, 具有广谱抗细菌和抗病毒活性, 对于防御外界病原微生物的侵害具有重要作用。随着基因组学研究的进展, β - 防御素的研究也越来越多, 本文主要分析了鱼类 β - 防御素的分子特征、基因结构、生物学活性等方面的内容, 发现鱼类 β - 防御素具有显著的抗菌和抗病毒活性, 但是其他方面的生物学功能研究较少。后期应深入研究鱼类 β - 防御素在其他方面的生物学功能以及其发挥生物学作用的机制。

近些年来, 随着养殖环境的恶化、养殖密度的增大, 鱼类病害不断发生, 造成了巨大的经济损失, β - 防御素在水产养殖业上的应用也是后续要解决的问题。 β - 防御素虽然具有广谱抗菌活性, 但是其表达量还是较低的, 要想得到大范围的应用, 需要通过基因工程的方法进行大量生产。如何通过基因工程的方法得到具有生物学活性的 β - 防御素也是目前需要解决的一大问题。

[参 考 文 献]

- [1] Schroder MB, Villena AJ, Jorgensen TO. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev Comp Immunol*, 1998, 22(5-6): 507-17
- [2] Chantanachookhin C, Seikai T, Tanaka M. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture*, 1991, 99: 143e55
- [3] Castillo A, Sanchez C, Dominguez J, et al. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17(5): 419-24
- [4] Petrie-Hanson L, Ainsworth AJ. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001, 81(1-2): 113-27
- [5] Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(8-9): 827-39
- [6] Diamond G, Zasloff M, Eck H, et al. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(9): 3952-6
- [7] Guani-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
- [8] Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*, 2009, 30(3): 131-41
- [9] Pazzier M, Hoover DM, Yang D, et al. Human β -defensins. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(11): 1294-313
- [10] Yang D, Biragyn A, Kwak LW, et al. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*, 2002, 23(6): 291-6
- [11] Zou J, Mercier C, Koussounadis A, et al. Discovery of multiple β -defensin like homologues in teleost fish. *Mol Immunol*, 2007, 44(4): 638-47
- [12] Falco A, Chico V, Marroqui L, et al. Expression and antiviral activity of a β -defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences. *Mol Immunol*, 2008, 45(3): 757-65
- [13] Zhao JG, Zhou L, Jin JY, et al. Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF- κ B and Sp1 of a medaka β -defensin. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(4): 624-37
- [14] Nam BH, Moon JY, Kim YO, et al. Multiple β -defensin isoforms identified in early developmental stages of the teleost *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(2): 267-74
- [15] Jin JY, Zhou L, Wang Y, et al. Antibacterial and antiviral roles of a fish β -defensin expressed both in pituitary and testis. *PLoS One*, 2010, 5(12): e12883
- [16] Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Molecular and functional characterization of the gilthead seabream β -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity. *Mol Immunol*, 2011, 48(12-13): 1432-8
- [17] Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral

- immunity. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6): 447-56
- [18] Tang YQ, Yuan J, Osapay G, et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science*, 1999, 286(5439): 498-502
- [19] Tran D, Tran PA, Tang YQ, et al. Homodimeric θ -defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3079-84
- [20] Semple CA, Rolfe M, Dorin JR. Duplication and selection in the evolution of primate β -defensin genes. *Genome Biol*, 2003, 4(5): R31
- [21] 高真贞, 董开忠. 人防御素研究进展. *西北民族大学学报*, 2007, 2 (66): 62-6
- [22] Boniotto M, Tossi A, Delpero M, et al. Evolution of the β defensin 2 gene in primates. *Genes Immunol*, 2003, 4(4): 251-7
- [23] Kluver E, Adermann K, Schulz A. Synthesis and structure-activity relationship of β -defensins, multi-functional peptides of the immune system. *J Pept Sci*, 2006, 12(4): 243-57
- [24] Krishnakumari V, Sharadadevi A, Singh S, et al. Single disulfide and linear analogues corresponding to the carboxy-terminal segment of bovine β -defensin-2: effects of introducing the β -hairpin nucleating sequence d-pro-gly on antibacterial activity and biophysical properties. *Biochemistry*, 2003, 42(31): 9307-15
- [25] Michaelson D, Rayner J, Couto M, et al. Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J Leukoc Biol*, 1992, 51(6): 634-9
- [26] Wen H, Lan X, Cheng T, et al. Sequence structure and expression pattern of a novel anionic defensin-like gene from silkworm (*Bombyx mori*). *Mol Biol Rep*, 2009, 36(4): 711-6
- [27] Lai R, Lomas LO, Jonczy J, et al. Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem J*, 2004, 379(Pt 3): 681-5
- [28] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-95
- [29] Casadei E, Wang T, Zou J, et al. Characterization of three novel β -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Immunol*, 2009, 46(16): 3358-66
- [30] Lynn DJ, Higgs R, Lloyd AT, et al. Avian β -defensin nomenclature: a community proposed update. *Immunol Lett*, 2007, 110(1): 86-9
- [31] Xiao Y, Hughes AL, Ando J, et al. A genome-wide screen identifies a single β -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 56