

抑菌蛋白 Reg3A 的表达纯化与功能

高洋 郑文岭* 石嵘 彭翼飞 周琳华 马文丽

(南方医科大学 基因工程研究所 广东 广州 510515)

摘要: 利用原核表达系统表达人源抑菌蛋白 Reg3A, 经包涵体的复性和纯化获得有体外抑菌功能的活性抑菌蛋白, 并对其体外抑菌功能进行初步研究。构建 Reg3A 原核表达载体 PET-32a-Reg3A 转化补充稀缺 tRNA 基因的表达菌株大肠杆菌 BL21-Codonplus, 阳性重组子采用诱导培养基诱导 5 h 后, 采用超声破碎的方法提取包涵体蛋白, 经包涵体蛋白的纯化和透析复性后通过 Ni-NTA 亲和层析交换柱, 获得纯度达 95% 的蛋白质。Western blot 鉴定显示在 15 kD 处有特异性条带。使用纯化后的蛋白进一步进行抑菌圈实验和抑菌活性实验, 对获得蛋白的体外抑菌活性进行评估, 从而为进一步进行 Reg3A 蛋白功能的评估及应用奠定基础。

关键词: 抑菌蛋白 Reg3A, 包涵体复性, 抑菌活性

Expression and functional characterization of Reg3A protein in *Escherichia coli*

GAO Yang ZHENG Wen-Ling* SHI Rong PENG Yi-Fei ZHOU Lin-Hua
MA Wen-Li

(Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: In order to express and characterize the biological function of protein Reg3A, the partial coding sequence without signal peptide of Reg3A gene were sub-cloned into vector of pET-32a to construct recombinant prokaryotic expression vector pET-32a-Reg3A. After induction with IPTG, the strain of *E. coli* BL21-Codonplus was transformed successfully with recombinant constructs, which was found to be expressing the recombinant protein in high yield and existed in the form of inclusion bodies. The inclusion body dissolved in urea was refolded into natural conformation after dialysis. The expressed protein was purified by Ni-NTA column. The purified protein, about 95% purity, was confirmed by Western blot. It was further demonstrated that the recombinant protein could effectively inhibited growth of Gram positive bacteria, which indicated that our recombinant Reg3A retained anti-bacterial activity. The cloning and expression of the Reg3A proteins provide basis for further charac-

terization of the Reg3A biological function.

Keywords: Reg3A protein, Inclusion body refolding, Antibacterial activity

肠道不仅是消化、吸收营养物质的场所,而且还具有重要的免疫防御功能。宿主黏膜分泌的多种抗菌蛋白形成了针对病原微生物的有效防卫屏障,在肠道微生物菌落的控制和清除中发挥主要作用^[1]。近年来,由于滥用抗生素而导致的耐药菌感染日益严重,这不仅破坏了患者肠道正常菌群之间的平衡,使人体的抗病能力下降,从而增加患者的易感性,而且会诱导耐药菌的产生,严重威胁患者生命。随着肠道固有免疫研究的深入,人体产生的一系列具有杀菌作用的蛋白分子受到了高度重视^[2],这些蛋白质分子在消化道中对一定种类的有害细菌以及病毒病原体具有杀灭作用,对肠道固有菌群以及微生态环境干扰较小^[2],有望成为治疗耐药菌感染的新药。

Reg 基因家族,最早发现自人胰腺 β 细胞的 cDNA 表达文库,该基因家族包含 I、II、III、IV 4 个成员,是编码 158–175^[3] 个氨基酸的分泌型蛋白因子,其表达由 5' 端上游非翻译区的 IL-6 应答元件进行调控^[4]。

在消化道固有菌群的研究中,Heather L. Cash 等^[5]发现在小鼠小肠的共生菌群可以诱导小鼠小肠上皮细胞表达一种对革兰氏阳性菌具有直接杀伤作用的蛋白 Reg3 γ ,并证明其人类同源蛋白 Reg3A 也有相同作用,该蛋白可以与革兰氏阳性菌的肽聚糖壁特异性结合,以补体杀伤的模式对革兰氏阳性菌的细胞壁进行作用,促使细菌的肽聚糖壁裂解,达到杀菌目的;但该蛋白的 CBD 并没有类似于补体的募集区,是一种对 G⁺ 菌具有直接杀伤作用的肠道内单体蛋白免疫因子。Hooper 等^[6]对鼠源 Reg3 γ 和人类 Reg3A 在大肠杆菌进行了克隆表达,并对其蛋白质的结构和功能进行了初步研究,探讨了这两种蛋白的糖配基可以特异性地与甘露糖作用,并初步推测认为 Reg3A 是补体系统的重要补充。Katharina Brand 等^[7]发现,使用抗生素治疗的小鼠其 Reg3 γ 蛋白表达水平显著下降,且小鼠对耐药菌的易感度与

Reg3 γ 蛋白表达程度呈反比线性关系,而与抗生素使用强度成正比线性关系,从而可知 Reg3A 蛋白是一种重要的肠道平衡因子。

本研究采用具有四环素抗性的稀缺 tRNA 基因补充型表达菌株大肠杆菌 BL21-Codonplus 表达目的蛋白,有效提高了外源基因在原核表达系统中的表达水平,初步摸索了该蛋白包涵体的透析复性条件,最终获得具备生物活性的纯品蛋白质,为后续制备该蛋白的多克隆抗体以及该基因的功能研究奠定了基础。

1 方法与材料

1.1 实验材料

原核表达载体 pET-32a、Reg3A 真核表达载体 pCDNA3.1-Reg3A、表达菌株大肠杆菌 BL21-Codonplus (补充 ArgU, IleY, and LeuW tRNA 基因)、大肠杆菌 DH5 α 、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 野生型大肠杆菌 E44A 及肠球菌 *Enterococcus faecium* (Efm) 由本研究室保存;各种限制性内切酶、T4 连接酶、高保真 DNA 聚合酶及 DNA Marker 购自大连宝生物工程公司;鼠抗 8XHis 单克隆标签抗体购自碧云天;羊抗鼠 IgG 购自 Bioworld;其它试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白原核表达载体的构建: 表达载体为 pET-32a,该载体以 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切,回收载体片段。采用 PCR 方法从质粒 pCDNA3.1-Reg3A 中截短扩增 Reg3A 基因,上游引物为 5'-GGAATTCGATGTCCAAAAGG-3'(下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点),下游引物为 5'-CGGTTCGACGTGAACCTTTCAGACATA-3'(下划线部分为 *Sal* I 酶切位点)。反应体系: cDNA 模板 200 ng, *Taq* DNA 聚合酶 5 U, dNTPs (终浓度各 200 μ mol/L) 2.5 μ L, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ L, 上、下游引物(终浓度 0.4 μ mol/L)各 1 μ L, 补充无菌去离子水至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min;

94 °C 30 s, 56 °C 15 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。该 PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切回收纯化后与 pET32a 载体连接构建为 pET-32a-Reg3A 质粒载体。

1.2.2 pET-32a-Reg3A 质粒载体转化表达菌株 BL21-Codonplus 及鉴定: 以常规的氯化钙法转化。将所构建的 pET-32a-Reg3A、载体转化于表达菌株 BL21-Codonplus, 以四环素抗性(Tet^r)与卡那霉素抗性(Kan^r)双抗培养基筛选, 以常规的细菌小量质粒提取方法提取阳性克隆的质粒, 酶切鉴定, 测序。

1.2.3 Reg3A 基因在大肠杆菌中的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳鉴定: 将表达菌株阳性克隆转接至 10 mL 液体 LB 抗性培养基(含 0.1%四环素, 0.1%卡那霉素)中, 37 °C 振荡过夜培养, 测 $OD_{600}>0.8$, 取 500 μ L 培养物于 50 mL LB 培养基(含 0.1%四环素, 0.1%卡那霉素)中, 37 °C 振荡培养 4 h 左右, OD_{600} 约为 0.8, 加入 100 μ L 的 IPTG 诱导表达 5 h。同理用导入空质粒载体的菌株作为阴性对照。收集诱导后的菌液 50 mL 于 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 加 1.6 mL TE 缓冲液重悬菌体, 分装在 1.5 mL 的离心管中, 每管 200 μ L 取阳性重组子表达株与阴性对照各一份以 12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 初步鉴定表达情况。

1.2.4 包涵体的破碎与分离: 阳性重组子表达菌株培养液经 IPTG 诱导表达后, 离心收集菌体, 用包涵体洗涤缓冲液(20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 0.05% TritonX-100, 0.5 mol/L NaCl, 2 mol/L 尿素)重悬, 磁力搅拌 20 min, 使菌体分散均匀, 冰浴超声破菌体(200 W 2 s/次, 间隔 9 s, 重复 200 次)。将超声破碎的菌液 13 000 r/min、4 °C 离心弃上清, 沉淀即为包涵体, 用 PBS 缓冲液洗涤沉淀后再使用包涵体洗涤液洗涤 3 次, 洗涤过程中在冰浴中充分搅拌 30 min, 将悬浊液在 4 °C、13 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 所得沉淀即为制备好的包涵体, 通过 SDS-PAGE 分析包涵体的纯度。

1.2.5 包涵体的纯化与复性: 洗涤后包涵体溶解于包涵体溶解液(50 mmol/L pH 9.0 的 Tris-HCl, 50%

尿素, 100 mmol/L DTT), 37 °C 水浴中搅拌 1 h。4 °C、13 000 r/min 离心 30 min, 收集上清。将上述上清液加入截留分子量为 3 kD 的透析袋, 调整蛋白浓度在 2 g/L 以下, 置于尿素浓度为 6、4、2、1 mol/L 的梯度复性液中搅拌透析过夜。每个尿素梯度透析复性 12 h, 取出透析样品再分别放入 1 000 mL 复性液 2 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Arg, 1 mmol/L GSH, 0.1 mmol/L GSSG, 4 mol/L Urea)、复性液 3、复性液 4 及 PBS 中各透析 12 h, 透析后的液体 4 °C、13 000 r/min 离心 30 min。收集上清。将复性后的样品用 3 kD 的 Millipore 超滤浓缩柱浓缩后, 采用 Ni-NTA 亲和层析法进行纯化, 收集样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 Western blot 分析: 以 12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 8XHis 标签抗体 1:1 000 和辣根过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 1:2 000 进行 Western blot 鉴定。

1.2.7 抑菌圈实验: 制备 6 mm 直径的圆滤纸片, 1×10^5 Pa 干燥灭菌 2 h。然后把配制好的各种适宜浓度(2.0、1.5、1.0、0.5 g/L)的 Reg3A 蛋白溶液, 每 100 张纸片加入 0.5 mL 药液, 使它均匀浸润。用玻棒将耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)培养物密集均匀地涂布整个平板, 将含有 Reg3A 蛋白溶液的滤纸片分别贴于平板表面, 30 °C 培养 48 h, 观察纸片周围抑菌圈直径大小判断金黄色葡萄球菌对该蛋白各浓度的敏感程度。

1.2.8 Reg3A 抑菌活性实验: 取相同生长期的 3 种受试菌(耐甲氧西林金葡萄、肠球菌、野生型大肠杆菌)各 10 μ L, 浓度为 10^6 CFU/mL, 分别加到 10 mL 含不同浓度 Reg3A 蛋白的 LB 溶液中。从上述菌悬液中各取 250 μ L 于 96 孔板上, 使用添加相同体积的蛋白保存液的培养基的孔为参比, 用酶标仪在 600 nm 波长下测定其 OD 值。测定后将 96 孔板用保鲜膜包好加盖大小合适的铝箔, 以保持水分并防止外界污染。包好的 96 孔板置于 37 °C 培养箱中摇床培养, 每隔 2 h 测定并记录菌悬液的 OD 值, 直至细菌生长达到稳定期。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增、鉴定及克隆

Reg3A CDS 区全长 527 bp, 去除真核细胞信号肽 77 bp, Reg3A 基因扩增全长 450 bp, 结果见图 1。Reg3A 基因经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切回收纯化。pET-32a 载体经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后, 载体片段大小约为 5 500 bp。

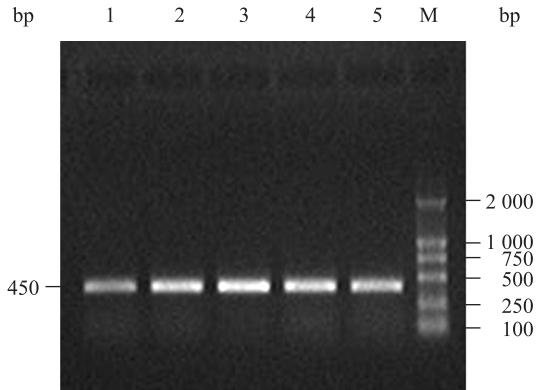


图 1 Reg3A 基因的 PCR 结果

Fig. 1 PCR products of Reg3A gene

注: 1: Reg3A 基因的 RT-PCR 产物; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1: RT-PCR products of human Reg3A gene; M: DL2000 DNA marker.

2.2 pET-32a-Reg3A 质粒载体的鉴定

pET-32a 与 Reg3A 基因连接转化稀缺 tRNA 基因表达菌株大肠杆菌 BL21-Codonplus, 以扩增 Reg3A 基因的引物进行 PCR 鉴定, 电泳结果中出现 450 bp 的特异性条带即为目的基因, 对应的菌落即为阳性克隆, 阳性克隆提取质粒, 以 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切进一步鉴定, 排除假阳性可能, 实验结果见图 2。筛选到的阳性克隆质粒测序结果与质粒 pCDNA3.1-Reg3A 目的基因序列一致。

2.3 Reg3A 的表达鉴定

阳性克隆菌株经 IPTG 诱导 4 h 后, 提取蛋白质进行 SDS-PAGE, 将转入空载体的表达菌株蛋白提取物做为阴性对照, 从蛋白电泳结果(图 3)可知, 1 号泳道的阴性重组子菌株未见外源基因表达, 2、3、4 泳道的阳性目的基因重组子菌株获得成功表达, 表达水平较高, 目的蛋白分子量大小约 14 kD, 与预期结果一致。

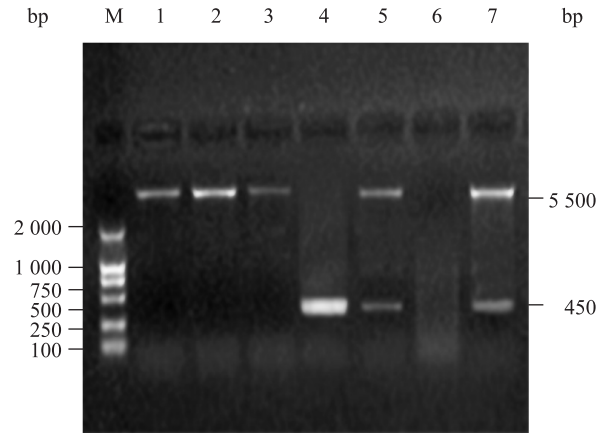


图 2 大肠杆菌转化子的 PCR 鉴定及重组载体的酶切验证
Fig. 2 PCR result of *E. coli* transformant and restriction enzyme digestion of recombinant plasmid

注: 1-3: 空载体双酶切鉴定; 4: 阳性克隆子的菌落 PCR 鉴定; 5、7: 筛选菌株质粒提取后的 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切鉴定图谱; 6: 假阳性克隆; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1-3: Control vector digested with *EcoR* I and *Sal* I; 4: PCR identification result of *E. coli* transformant; 5,7: Positive clones digested with *EcoR* I and *Sal* I; 6: Negative clone digested with *EcoR* I and *Sal* I; M: DL2000 DNA marker.

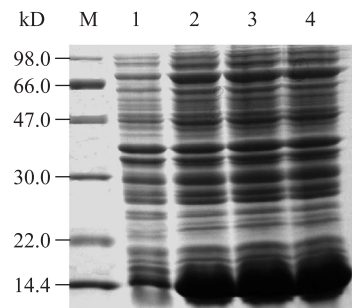


图 3 Reg3A 基因表达 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed Reg3A protein

注: 1: 空载体转化表达菌株诱导 4 h 的蛋白图谱; 2-4: 阳性重组子诱导表达 4 h 的蛋白图谱; M: 蛋白分子量标准.

Note: 1: Negative control induced with IPTG for 4 h; 2-4: Recombinant transformant induction with IPTG for 4 h; M: Protein marker.

2.4 包涵体的破碎与分离

制备成功的包涵体, 取 20 μ L 溶解液通过 SDS-PAGE 初步分析包涵体的纯度以及回收效果, 将转入空载体的表达菌株蛋白提取物做为阴性对照, 电泳结果如图 4 所示, 可见包涵体经初步洗涤后, 获得初步纯化, 回收效果较好; 阴性对照菌株不存在由于外源基因表达而形成的包涵体。所获得

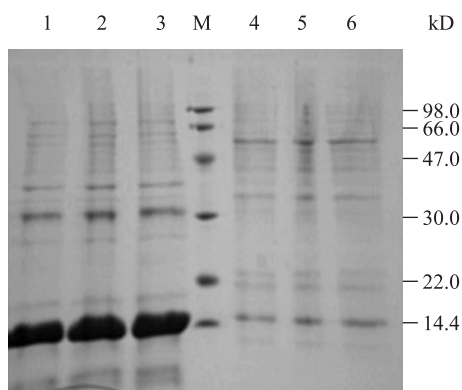


图4 Reg3A 蛋白的包涵体分离与纯化

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the Reg3A inclusion bodies after isolation and purification

注: 1-3: 重组子诱导后蛋白的包涵体初步纯化结果; 4-6: 空载体转化诱导的阴性对照。

Note: 1-3: The Inclusion bodies purification results expression by transformant; 4-6: The Inclusion bodies purification results of negative control.

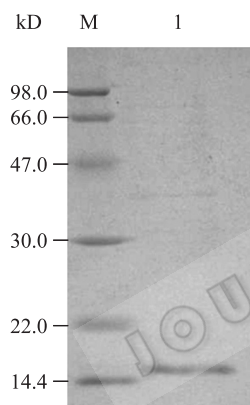


图5 Reg3A 包涵体复性纯化结果

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of renaturated Reg3A protein

注: 1: 包涵体蛋白亲和和复性的结果; M: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Renaturated Reg3A protein after Ni-His affinity chromatography; M: Protein marker.

的包涵体经过梯度复性后, 取可溶物经 Ni-NTA 亲和层析法层析, 获得纯度较高的 Reg3A 蛋白, 电泳结果见图 5。

2.5 Western blot 分析

采用小鼠单克隆 8XHis 标签抗体(Abcam)和羊抗鼠 IgG-HRP 进行 Western blot, 鉴定分析融合蛋白 Reg3A, 其中 8XHis 标签单克隆抗体可与融合蛋白的 8XHis 标签发生特异性反应。反应结果见图 6。

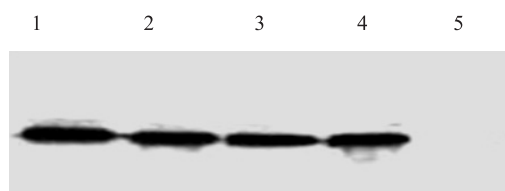


图6 Reg3A 蛋白的 Western blot 结果

Fig. 6 Western blot analysis of the expression product

注: 1-4: 纯化后蛋白的 Western blot 结果, 在约 15 kD 处有特异性条带; 5: 空载体诱导纯化蛋白的 Western blot 结果, 在 15 kD 处无特异性结果。

Note: 1-4: Specific bands of purification Reg3A protein at 15 kD; 5: The result of negative control in Western blot.

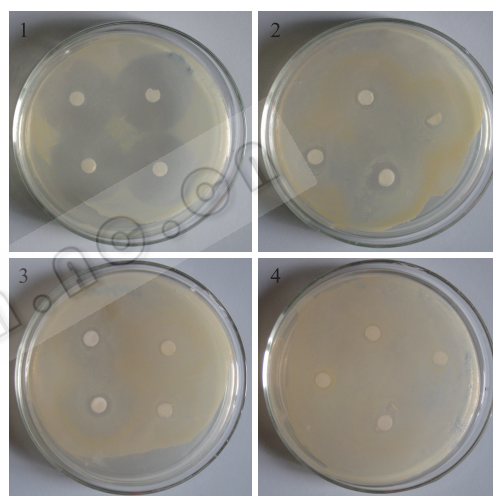


图7 抑菌圈实验结果

Fig. 7 Result of zone of inhibition test

注: 1: 2.0 g/L Reg3A 蛋白药敏纸片抑菌效果; 2: 1.5 g/L Reg3A 药敏纸片抑菌效果; 3: 1.0 g/L Reg3A 药敏纸片抑菌效果; 4: 0.5 g/L Reg3A 药敏纸片抑菌效果。

Note: 1: Inhibition zone of 2.0 g/L Reg3A protein; 2: Inhibition zone of 1.5 g/L Reg3A protein; 3: Inhibition zone of 1.0 g/L Reg3A protein; 4: Inhibition zone of 0.5 g/L Reg3A protein.

2.6 抑菌圈实验

然后把制好的各种适宜蛋白浓度(2.0、1.5、1.0、0.5 g/L)的药敏纸片分别贴于均匀涂布耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌的平板, 由图 7 可见, 本蛋白在 2.0 g/L 以上时有显著的抑菌效果。

2.7 Reg3A 抑菌活性实验

从细菌 OD 值可以得出 2.0 g/L 的 Reg3A 对金黄色葡萄糖菌以及肠球菌等革兰氏阳性菌有较强的抑制作用, 对革兰氏阴性菌抑制作用不显著(图 8)。

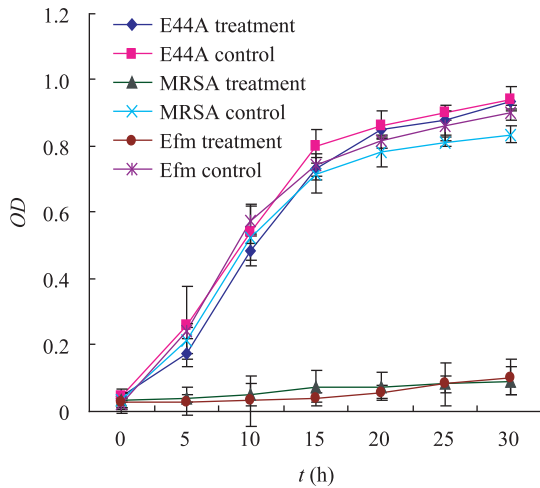


图8 3种受试菌的体外抑制效果

Fig. 8 Three tested strains' growth curves under 2.0 g/L Reg3A protein

注: Reg3A重组蛋白在抑制培养基中的终浓度统一为2.0 g/L, 每2 h记录培养孔OD值每个处理重复3次。

Note: Final concentration of Reg3A recombinant protein in the in the medium is 2.0 g/L, record each well's OD value per 2 h.

3 讨论

肠道免疫系统是在防御病原微生物以及与有益菌群共生的复杂条件下发展出来的, 对肠道微生物的控制是一个动态平衡的过程^[8], 这一过程需要共生菌群与肠道免疫系统细胞之间信号的互通。研究表明, 肠道Toll样受体(Toll-like receptor TLR)细胞信号转导途径对肠道免疫系统的激活和各种抗菌蛋白的表达调控具有至关重要的作用^[9]。肠道上皮细胞膜表面的一系列TLR通路受体可以识别肠道内细菌的脂多糖(Lipopolysaccharide LPS)、脂磷壁酸(Lipoteichoic acid LTA)、鞭毛抗原蛋白以及病毒富含CpG岛的DNA片段, 通过TLR通路中MyD88等下游信号分子, 最终激活转录因子NF- κ B^[10], 开启各种免疫相关因子(包括各种杀菌蛋白)的表达。通过该信号通路调控表达的固有免疫蛋白因子可以直接作用于肠道内微生物, 实现对有害病原的抑制或者杀灭^[11], 也可以通过激活肠道其他的免疫细胞达到间接调控肠道内微生态环境的目的。

Reg3A蛋白在肠道中的正常表达依赖于肠道菌群中革兰氏阴性菌LPS等抗原物质对TRL信号通路

一定程度的刺激, 过度使用抗生素将对肠道正常菌落分布的微生态平衡造成破坏, 干扰维持抑菌蛋白基因表达水平的信号通路, Reg3A的表达水平下降, 加之抗生素对耐药菌杀伤能力较弱, 所以将抗生素应用于耐药菌感染的治疗, 不仅收效甚微而且通常会造成病情恶化^[12]。

真核表达系统和原核系统的密码子偏好性有所不同, 本研究将Reg3A蛋白克隆于稀缺tRNA基因补充型的原核表达系统, 进行大量表达, 并进行复性以及纯化回收, 通过针对耐药菌的体外抑菌实验对获得的具有生物活性的Reg3A蛋白进行了抑菌效果的初步测评, 结果显示: Reg3A对革兰氏阳性耐药细菌有显著的抑制效果, 但对革兰氏阴性耐药细菌的抑制效果并不明显, 这主要是由于Reg3A蛋白在与菌体识别时主要是依赖其C端结构域与细菌细胞壁肽聚糖的结合作用^[13]。由于革兰氏阴性菌的细胞壁肽聚糖含量较低, 所以影响了Reg3A蛋白与其结合。

Reg3A分子在消化道感染炎症疾病中起着重要的作用, 特别是在慢性结肠炎(Inflammatory bowel disease, IBD)患者的Payer淋巴结组织表达谱芯片中都发现其表达显著升高^[14], 通过MyoD88缺陷型小鼠的动物模型研究表明, 以Reg3A分子为代表的各种抗菌蛋白是固有免疫系统的重要组成部分, 这些分子不仅对病原体的感染增殖过程有着直接的抑制作用, 对于感染后宿主炎症进程的发展、组织损伤的修复与再生^[15]同样有着重要的调控作用。其表达下调或功能缺陷可导致各种肠道疾病的发生和炎症进程的反复损伤。但当肠道感染发生时各种固有免疫蛋白变化的始动因素及反馈调节等表达调控机制还有待进一步探讨。

同时, 固有免疫蛋白因子对各种肠道感染疾病的治疗有着广阔的前景。多种肠道固有免疫蛋白对肠道细菌有直接或间接的杀灭抑制作用。肠道细菌的存在是肠道感染发生的前提条件, 肠道黏膜的免疫应答可有效抵御病原体的侵入与增殖。目前的消化道感染治疗仍采用大规模抗生素治疗, 这样不仅存在明显的毒副作用, 而且极易产生严重的细菌耐

药问题, 因此使用肠道固有蛋白免疫因子治疗消化道感染是一种毒副作用小、成本低廉的新型治疗方案。但目前将固有免疫蛋白应用于临床治疗仍存在一些关键性问题亟待解决: (1) 还没有对各种固有免疫蛋白的效能, 以及消化道内杀菌效果进行有效的测评; (2) 缺乏人源固有免疫蛋白的高效表达平台和消化道内给药系统^[16]。所以进一步明确固有免疫蛋白因子的相关功能并搭建高效免疫蛋白的给药系统, 具有十分重要的临床和科学意义。

参 考 文 献

- [1] Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, et al. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2009, 24(2): 202–208.
- [2] Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6): 447–456.
- [3] Nata K, Liu Y, Xu LQ, et al. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human *REG* family gene, *REG III*[J]. *Gene*, 2004, 340(1): 161–170.
- [4] Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease[J]. *Immunity*, 2008, 29(6): 947–957.
- [5] Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin[J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1126–1130.
- [6] Mukherjee S, Partch CL, Lehotzky RE, et al. Regulation of C-type lectin antimicrobial activity by a flexible N-terminal prosegment[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(8): 4881–4888.
- [7] Brandl K, Plitas G, Mihu CN, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits[J]. *Nature*, 2008, 455(7214): 804–807.
- [8] Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2005, 21(2): 147–151.
- [9] Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease[J]. *J Immunol*, 2005, 174(8): 4453–4460.
- [10] Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(3): 179–190.
- [11] Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(6): 551–557.
- [12] Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 343(26): 1925–1932.
- [13] Comstock LE. Importance of glycans to the host-bacteroides mutualism in the mammalian intestine[J]. *Cell Host and Microbe*, 2009, 5(6): 522–526.
- [14] Willing BP, Finlay BB. Gut microbiology: fitting into the intestinal neighbourhood[J]. *Current Biology*, 2009, 19(11): R457–R459.
- [15] Simon MT, Pauloin A, Normand G, et al. HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway[J]. *FASEB J*, 2003, 17(11): 1441–1450.
- [16] Cantone I, Marucci L, Iorio F, et al. A yeast synthetic network for *in vivo* assessment of reverse-engineering and modeling approaches[J]. *Cell*, 2009, 137(1): 172–181.