文章编号:1000-5404(2009)07-0565-04

论著

脂多糖结合蛋白/CD14结合位点的初步定位

徐 智[1],李 琦[1],冯起甲[1],钱桂生[1],徐顺贵[1],李昆霖[2],王兴胜[2],吴国明[1] (第三军医大学:[1]新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037,[2]大坪医院野战外科研究所呼吸内科,重庆 400042)

摘 要:目的 应用噬菌体随机12肽库、DNAStar分析软件、亲和实验及竞争抑制实验初步定位脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)与CD14的结合位点。**方法** 以CD14为筛选分子,联合应用噬菌体肽库展示技术、噬菌体ELISA鉴定、LBP竞争抑制实验及DNA测序推导LBP/CD14结合位点的展示肽序列,采用DNAStar分析软件比对所获展示肽序列与LBP一级结构,初步定位LBP/CD14结合位点并人工合成其模拟肽。采用ELISA检测该模拟肽与CD14的亲和力及与LBP的竞争抑制活性。**结果** DNAStar比对结果表明,经噬菌体肽库筛选获得的8条展示肽氨基酸序列与LBP第252~263位氨基酸有一定相似性。LBP第252~263位氨基酸具有结合位点的特性,即有良好的亲水性、可及性、可塑性及抗原性,该部位可能是LBP/CD14的结合位点。体外活性实验表明,模拟肽FHRNHRSPVTLL可与CD14有良好的亲和力,有较强的与LBP竞争结合CD14的活性。**结论** LBP第252~263位氨基酸的模拟肽FHRNHRSPVTLL与CD14有良好的亲和力及有较强的与LBP竞争结合CD14的活性,具有LBP/CD14结合位点的生物学特性,LBP/CD14结合位点初步定位在该区域。

关键词: 脂多糖结合蛋白;CD14;噬菌体肽库;模拟肽;内毒素
中图法分类号: Q503; Q513; Q782 **文献标识码:** A

Preliminary locating for CD14 binding site with lipopolysaccharide binding protein

XU Zhi[1], LI Qi[1], FENG Qi-jia[1], QIAN Gui-sheng[1], XU Shun-gui[1], LI Kun-lin[2], WANG Xing-sheng[2], WU Guo-ming[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Respiratory Diseases, Institute of Field Surgery Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate CD14 binding site with lipopolysaccharide binding protein (LBP) by phage peptide library display, DNAStar software analyses, affinity test and LBP competitive inhibition experiments. **Methods** With CD14 as a target molecule, phage peptide library display, phage ELISA, LBP competitive inhibition experiments and DNA screening for testing sequences were jointly adopted to deduct the display peptide sequences of the binding site of LBP/CD14. The display peptide sequences were matched with primary structure of LBP by DNAStar analysis software, to initially locate CD14 binding site with LBP and synthesis its mimic peptide. The affinity activity and competitive inhibition activity of mimic peptide were detected by ELISA. **Results** DNAStar software analyses indicated that the sequences of 8 peptides obtained by phage peptide library were similar to 252 to 263 amino acids of LBP, and satisfactory hydrophilicity, accessibility, flexibility and antigenicity were seen in this amino acid fragment of LBP. The binding site of LBP/CD14 might locate in this fragment. *In vitro* activity test indicated that mimic peptide (FHRNHRSPVTLL) had satisfactory affinity activity to CD14 and competitive inhibition activity to LBP. **Conclusion** The mimic peptide (FHRNHRSPVTLL) of the 252 to 263 amino acid fragment of LBP has satisfactory affinity activity to CD14 and competitive inhibition activity to LBP. It displays the bioactivity of the binding site of LBP/CD14 and indicates CD14 binding site with LBP is locate in this region preliminarily.

Key words: lipopolysaccharide binding protein; CD14; phage peptide library; mimic peptides; endotoxin

脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein,LBP)/CD14增敏系统由LBP和mCD14构成。G^-菌入血后,LBP将脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)单体从其多聚体中转运到mCD14,加速LPS与mCD14的结合。在细胞对LPS的应答过程中,LBP可

基金项目:国家自然科学基金(30500230)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500230)
作者简介:徐 智,男,四川省乐山市人,博士,主治医师,主要从事急性肺损伤发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68755320
通信作者:吴国明,E-mail: wu_guoming@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-09-01;修回日期:2008-10-02

增强 LPS 对含 mCD14 细胞的刺激作用。正常情况时人体内毒素的水平很低,即使在 G^- 杆菌脓毒血症时,血浆中 LPS 浓度也仅在 0.01 ~ 1 ng/ml 水平。如此低水平的 LPS 的致炎作用需依赖于 LBP/CD14 增敏系统[1]。LBP/CD14 增敏系统位于 LPS 致炎信号通路的上游,拮抗 LBP/CD14 增敏系统能有效地抑制 LPS 致炎作用。但近年采用抗 LBP 抗体、抗 CD14 抗体、sCD14 等方法[2,3]在拮抗 LBP/CD14 系统的同时也抑制了 LBP 对 LPS 的清除作用,因此有必要寻找新的拮抗靶点。由于 LBP/CD14 对 LPS 的增敏作用需依赖 LBP 与 CD14 的结合,因此封闭 CD14 与 LBP 的结合位点可能具有抑制 LPS 的致炎作用而不影响 LBP 中和 LPS 的优点。但目前对 CD14 与 LBP 的结合位点具体的氨基酸序列及在一级结构上的定位尚不明确。本研究旨在联合应用噬菌体随机显示肽库技术、DNAStar 分析软件、亲和及竞争抑制实验初步定位 LBP/CD14 的结合位点,为进一步分析、鉴定该结合位点的功能及其在抗内毒素性炎症反应中的作用提供实验数据,为内毒素血症,尤其是内毒素性 ARDS 和 MODS 提供一种有效的生物学防治策略。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

噬菌体随机 12 肽库(New England Biolabs 公司,美国),肽库的滴度为 1.5×10^{13} pfu/ml,随机多样性为 2.7×10^9,受体菌为 *E. coli* ER2738;rhLBP(recombinant human LBP)和 rhCD14(recombinant human CD14),山羊抗人 LBP 单克隆抗体购自 R&D 公司;LPS(*E. coli*,O111:B4)和 PMA(Sigma 公司);PCR Kit(TaKaRa 公司);TNF-α ELISA 试剂盒和 HRP 标记兔抗鼠单克隆抗体(晶美公司,美国)。其他试剂均为国产分析纯。超净工作台(苏州净化设备一厂),CO_2 孵箱(Forma scientific,美国),PCR 扩增仪(GENE 公司,美国),凝胶成像系统(Alphalmager TM2200 型,Alpha Inotech 公司,美国)。

1.2 亲和筛选及噬菌体的富集

参照 New England Biolabs 公司产品使用手册描述的方法进行噬菌体的亲和筛选和富集。CD14 包被液浓度为 100 μg/ml,第 1、2 轮采用酸洗脱,第 3、4 轮采用 LBP 竞争性洗脱。

1.3 噬菌体克隆与 CD14 结合活性的鉴定

按文献[4]方法进行阳性噬菌斑的扩增和噬菌体克隆与 CD14 结合活性的测定。

1.4 DNA 序列测定及人工多肽合成

取结合活性高的噬菌体克隆制备单链 DNA,试剂盒提供 96gⅢ测序引物 5′-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3′,应用 Sanger 双脱氧终止法测定阳性噬菌体克隆的 DNA 序列,使用 ABI PRISM 3730 型 DNA 全自动测序仪测序,测序试剂为 BigDye terminator。根据外源 DNA 序列推导融合表达的 12 肽序列。

应用美国 ABI 431A 多肽合成仪,采用 FMOC 固相合成法合成模拟肽。模拟肽合成时,在其 C 端添加 NH_2,N 端进行乙酰化修饰,以增加模拟肽的稳定性。

1.5 LBP 表面特性参数预测及二级结构预测

LBP 多肽序列来自 NCBI 网站 GenBank 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。采用生物信息分析软件 DNAStar 的 Kyte-Doolittle 等方案进行表面特性分析,采用 Chou-Fasman 预测方案和 Garnier-Robson 法分析 LBP 二级结构。

1.6 CD14 亲和实验

用包被液稀释后的模拟肽包被微孔板,每个浓度设 3 个孔(100 μl/孔),微孔板置于密封的湿盒中,4 ℃过夜。弃包被液,每孔加满封闭液,4 ℃封闭 2 h。弃封闭液,TBST 洗板 6 次,加入 CD14(终浓度分别为 0.1、1、10 μg/ml, 100 μl/孔),37 ℃孵育 2 h。TBST 洗板 3 次,加入 100 μl 稀释鼠抗人 CD14 抗体(1∶500 稀释),室温振荡 1 h。TBST 洗板 3 次,加入 100 μl 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠抗体(1∶2 500 稀释),室温振荡 1 h。TBST 洗板 3 次,每孔加 100 μl OPD 显色液,37 ℃避光 15 min。加 50 μl 终止液。用酶标仪记录光密度 $D(495)$ 值,计算各模拟肽 $D(495)$ 与阴性对照 $D(495)$ 的比值。

1.7 LBP 竞争抑制实验

每孔 100 μl CD14 包被,封闭液封闭,分别将 LBP(终浓度 10 μg/ml,50 μl)与模拟肽(终浓度分别为 0.1、1、10 μg/ml,50 μl)加入酶标板,室温结合 2 h,洗板 3 次后加入 100 μl 1∶500 稀释的山羊抗人 LBP 单抗,室温结合 1 h,洗板 3 次后加入 100 μl 1∶2 500 稀释的兔抗山羊抗体,洗板 3 次后加入 OPD 显色液,37 ℃避光 15 min,加入 50 μl 终止液,测 $D(495)$ 值,并计算竞争抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{D(495)_{\text{对照孔}} - D(495)_{\text{实验孔}}}{D(495)_{\text{对照孔}}} \times 100\%$$

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,组间均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 噬菌体的筛选与富集

以 CD14 为目标分子在 12 肽库中进行亲和筛选,前 2 轮酸洗脱,得到与 CD14 高亲和力的噬菌体克隆,后 2 轮采用 LBP 竞争性洗脱,得到与 LBP 竞争性结合 CD14 的噬菌体克隆。根据每轮淘选前加入的噬菌体量与洗脱后的噬菌体量计算回收率,比较 4 轮淘选的噬菌体回收率,显示第 1 ~ 4 轮淘选所得的噬菌体回收率逐步提高。经 4 轮筛选,回收率从 3.5×10^{-6} 增加到 5.2×10^{-2},噬菌体得到了有效的富集。

2.2 噬菌体克隆与 CD14 结合活性的鉴定

经 4 轮淘选后,随机挑选 100 个克隆,采用 ELISA 鉴定噬菌体展示多肽与 CD14 的结合力,结果显示有 73 个噬菌体克隆所展示的多肽与 CD14 有较高的结合力[$D(495)$ 值高于对照组 5 倍以上,其中 25 个噬菌体克隆的 $D(495)$ 值高于对照组 20 倍以上],说明淘选有良好效果。阴性对照未显色。

2.3　阳性噬菌体克隆融合肽 DNA 序列测定和同源性分析

将上述 25 个与 CD14 结合活性最强的噬菌体克隆提取单链 DNA,进行 DNA 测序,并推导 DNA 序列编码的氨基酸,即为噬菌体表达的 12 肽序列。测序结果表明,25 株噬菌体克隆呈现 8 种不同编码的氨基酸序列(表 1)。共有序列为 FHRHPPX-PTLXX,其中第 1 ~ 3 位的 FHR 氨基酸高度保守,第 4 ~ 6 位和第 8 ~ 10 位氨基酸具有相对保守性。说明 12 肽中有 9 个氨基酸可能是构成 LBP 与 CD14 结合表位的骨架结构。

表 1　与 CD14 有高亲和力的 25 个噬菌体克隆呈现的多肽

序列号	氨基酸序列	克隆号
序列 1	**F H R** W *P* T W *P* L P S P	15,21,33,80,55, 71, 86,90
序列 2	A A **F H R** A H H L T S P	56,17
序列 3	M **H R** *H P P* P I *T L* P L	92,72,40
序列 4	**F H** S N W *P* K G S T S L	30,24
序列 5	**F** P W *H* F F S *P* Q *L* R G	2,18,47
序列 6	M **H R** *H P P* P I *T* T A A	66,78,53
序列 7	**F H R** W *P* T W *P T* S F S	9,12
序列 8	M **H R** P H F N *P T L* A T	62,67

加粗字母代表高度保守,斜体字母代表相对较高的保守性

2.4　8 条多肽在 LBP 一级结构上的定位

采用 DNAStar 基因分析软件,将上述 8 条多肽的氨基酸序列与 LBP 一级结构的氨基酸序列进行比对。结果显示:LBP 的第 252、253、254、256 位氨基酸与上述 8 条多肽相应的氨基酸高度匹配,而第 259、263 位氨基酸也有较高的匹配度。提示 LBP 与 CD14 的结合位点可能位于 LBP 的第 252 ~ 263 位氨基酸,其序列为 FHRNHRSPVTLL(图 1)。

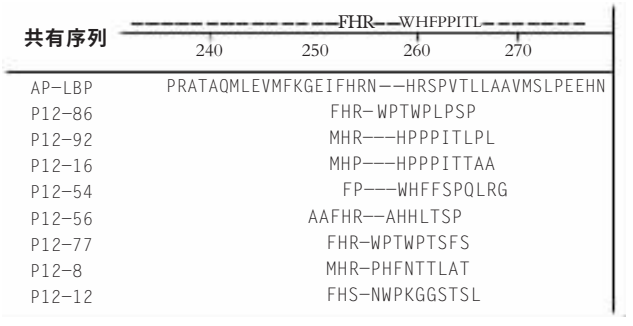


图 1　8 条多肽在 LBP 一级结构上定位的预测

2.5　LBP 表面特性的参数预测及二级结构预测

LBP 的亲水性、可及性、可塑性及抗原性预测结果表明,在 LBP 第 250 ~ 260 位及第 436 ~ 446 位氨基酸兼具亲水性、可及性、可塑性及抗原性,其中第 250 ~ 260 位氨基酸与上述 8 条多肽在 LBP 一级结构上定位(第 252 ~ 263 位)的预测基本吻合(表 2)。

采用 DNAStar 基因分析软件的 Chou-Fasman 和 Garnier-Robson 法进行 LBP 二级结构分析。结果表明 LBP 属于一种混合型蛋白,其中 α-螺旋约占 37.4%,β-片层约占 47.4%,转角(Turn)约占 7.7%,无规则卷曲(Coil)约占 7.5%。在第 260 位附近存在 β-片层结构,容易出现结合位点。这上述 8 条多肽在 LBP 一级结构上定位(第 252 ~ 263 位)的预测与 BP 表面特性的参数预测基本符合。

表 2　LBP 表面特性的单参数预测结果

表面特性	表位
亲水性	22 ~ 25, 36 ~ 44, **63 ~ 81, 94 ~ 98, 109 ~ 124, 147 ~ 155, 182 ~ 195**, 198 ~ 200, 203 ~ 208, 210 ~ 214, **250 ~ 259**, 269 ~ 276,291 ~ 299, **306 ~ 323**, 330 ~ 338, 356 ~ 359, **373 ~ 378**, 406 ~ 414, **437 ~ 446**, 476 ~ 479
可及性	37 ~ 39, **73 ~ 77, 92 ~ 96, 113 ~ 119, 148 ~ 153**, 184 ~ 189, 208 ~ 212, 235 ~ 239, **252 ~ 258**, 269 ~ 275, 294 ~ 297, **307 ~ 312, 319 ~ 321**, 331 ~ 335, 360 ~ 362, **372 ~ 337**, 410 ~ 414, **436 ~ 444**
可塑性	18 ~ 22, 27 ~ 29, 35 ~ 38, 51 ~ 54, 60 ~ 66, **72 ~ 75**, 94 ~ 101, **105 ~ 121**, 125 ~ 128, **144 ~ 162**, 184 ~ 196, 203 ~ 212,218 ~ 224, 235 ~ 238, **255 ~ 260**, 270 ~ 274, 304 ~ 306, **309 ~ 314, 317 ~ 323**, 340 ~ 346, 352 ~ 356, **370 ~ 377**, 394 ~ 400, 402 ~ 408, 411 ~ 416, **438 ~ 444**
抗原性	24 ~ 28, 34 ~ 40, 53 ~ 55, 58 ~ 68, **70 ~ 78, 96 ~ 98, 105 ~ 121**, 125 ~ 133, **145 ~ 172**, 185 ~ 212, 220 ~ 224, 226 ~ 230, 234 ~ 239,**251 ~ 260**, 269 ~ 275, **303 ~ 325**, 332 ~ 335, 339 ~ 346, 352 ~ 358, **370 ~ 379**, 394 ~ 397, 402 ~ 416, **438 ~ 446**

加粗字体代表具有良好表面特性的表位,下划线部分代表兼具 4 种表面特性的表位

2.6　模拟肽与 CD14 亲和力检测

ELISA 法检测模拟肽 FHRNHRSPVTLL 与 CD14 的结合活性,结果显示模拟肽在高(10 μg/ml)、中(1 μg/ml)剂量时,其 D(495)值明显高于对照孔 D(495)($P<0.01$),为对照孔的 6 ~ 17 倍,表明 LBP 模拟肽在高、中剂量时与 CD14 有良好的结合活性(表 3)。

表 3　不同剂量模拟肽与 CD14 亲和力检测比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	D(495)
模拟肽 10 μg/ml 组	0.57 ± 0.05[a]
模拟肽 1 μg/ml 组	0.25 ± 0.06[a]
模拟肽 0.1 μg/ml 组	0.05 ± 0.03
阴性对照组	0.03 ± 0.02

a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

2.7　模拟肽与 LBP 竞争抑制活性检测

ELISA 法检测模拟肽 FHRNHRSPVTLL 与 LBP 竞争结合 CD14 的活性,结果显示模拟肽高(10 μg/ml)、中(1 μg/ml)和低(0.1 μg/ml)剂量组的竞争抑制率分别是 57.4%、45.6% 和 5.9%。模拟肽在高、中剂量时,其 D(495)值明显低于 LBP 对照组 D(495)值($P<0.01$),模拟肽在高、中剂量时对 LBP 的竞争抑制率明显高于低剂量组($P<0.01$)。见表 4。

表 4　不同剂量模拟肽与 LBP 竞争抑制活性检测比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	D(495)
模拟肽 10 μg/ml 组	0.29 ± 0.04[b]
模拟肽 1 μg/ml 组	0.37 ± 0.04[b]
模拟肽 0.1 μg/ml 组	0.64 ± 0.03[a]
LBP 对照组	0.68 ± 0.02

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 LBP 对照组比较

3　讨论

LBP/CD14 被称为 LPS 的增敏系统。在 LBP/CD14 存在的条件下,极微量的 LPS 即可诱发炎症因

子释放,而敲除 LBP/CD14 或拮抗 LBP/CD14 则可显著抑制 LPS 的致炎效应。LBP 属Ⅰ型急性期反应蛋白,是一种分子量为(58~60)×10^3的糖蛋白,由肝脏合成并释放入血。正常情况下血清中 LBP 为 0.5~10.0 mg/L,急性期反应时可增高至 50~200 mg/L[5]。LBP 主要起着将 LPS 单体从其多聚体中转运到 mCD14 的作用。mCD14 是一种分子量为 55×10^3的糖蛋白,通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚固于细胞膜,主要分布于成熟单核细胞和巨噬细胞表面,起着将 LPS 致炎信号向细胞内传递的作用[6,7]。

研究发现,LBP 通过其肽链 N 端与 LPS 结合,该结构域定位在第 91~100 个氨基酸残基之间[8]。而 LBP 肽链的 C 端可能包含与 CD14 结合的结构域,当肽链 C 端缺失时,小剂量的 LPS 不能刺激细胞产生炎性细胞因子。LBP 肽链的 C 端由第 198~456 个氨基酸残基组成,与 CD14 结合的结构域目前尚未准确定位[9]。因此,有必要深入研究 LBP 肽链 C 端的结构与功能,寻找 LBP 与 CD14 的结合位点,并通过合成模拟肽以封闭该位点。封闭该位点的优点在于既可拮抗 LBP/CD14 对 LPS 的增敏效应,又不影响 LBP 对 LPS 的清除及中和作用。

本研究采用噬菌体随机肽库展示技术筛选 LBP 与 CD14 的结合位点,以 CD14 为筛选分子对噬菌体随机 12 肽库进行了 4 轮亲和筛选,CD14 浓度逐轮减少,目的在于筛选得到高亲和力的噬菌体克隆。前 2 轮采用酸洗脱,后 2 轮采用 LBP 竞争性洗脱,这样得到的噬菌体克隆可与 LBP 竞争性结合 CD14,结果显示每一轮淘洗噬菌体数量都有较高的富集。在最后的淘洗产物中随机挑选 100 个克隆进行亲和实验,阳性克隆高达 73 个,其中有 25 个克隆 D(495)值高于对照组 20 倍以上,说明其与 CD14 有较高的亲和力。

将上述 25 个克隆进行基因测序,得到 8 条 12 肽序列。我们通过生物信息软件 DNAStar 将这 8 条多肽序列与 LBP 一级氨基酸序列进行比对,结果表明这 8 条多肽序列与 LBP 第 252~263 位氨基酸有较高的匹配度,提示 LBP 与 CD14 的结合位点可能位于 LBP 的第 252~263 位氨基酸,其序列为 FHRNHRSPVTLL。进一步用 DNAStar 软件分析了 LBP 的表面特性及二级结构,结果表明在 LBP 第 250~260 位氨基酸兼具亲水性、可及性、可塑性及抗原性,其中在第 260 位附近存在 β-片层结构,容易出现结合位点,这与上述 8 条多肽在 LBP 一级结构上定位(第 252~263 位)的预测基本吻合。

人工合成模拟肽 FHRNHRSPVTLL,并进行该模拟肽在不同浓度与 CD14 亲和力及与 LBP 竞争抑制活性鉴定。结果表明 LBP 模拟肽在高、中剂量时不但与 CD14 有良好的结合活性,而且对 LBP 的竞争抑制率分别达 57.4%、45.6%,显著高于低剂量组(P<0.01)。

以上结果表明,LBP 的第 252~263 位氨基酸(序列为:FHRNHRSPVTLL)附近区域有良好表面特性(兼具亲水性、可及性、可塑性及抗原性),在第 260 位附近存在 β-片层结构,容易出现结合位点。由噬菌体肽库筛选获得的 8 条多肽序列与该区域的氨基酸序列有较高的匹配度。人工合成该区域的模拟肽(FHRNHRSPVTLL)也表现出与 CD14 高亲和力及特异性竞争抑制 LBP 的生物学活性,表明 LBP 与 CD14 的结合位点可能位于 LBP 的第 252~263 位氨基酸附近。

参考文献:

[1] Finberg R W, Re F, Popova L, *et al*. Cell activation by Toll-like receptors: role of LBP and CD14[J]. J Endotoxin Res, 2004, 10(6): 413-418.

[2] Spek C A, Verbon A, Aberson H, *et al*. Treatment with an anti-CD14 monoclonal antibody delays and inhibits lipopolysaccharide-induced gene expression in humans *in vivo*[J]. J Clin Immunol, 2003, 23(2): 132-140.

[3] Kitchens R L, Thompson P A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions[J]. J Endotoxin Res, 2005, 11(4): 225-229.

[4] 冯起甲,徐 智,吴国明,等. 脂多糖结合蛋白与 CD14 结合位点模拟肽的初步筛选[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(16):1572-1575.

[5] Cunningham S C, Malone D L, Bochicchio G V, *et al*. Serum lipopolysaccharide-binding protein concentrations in trauma victims[J]. Surg Infect (Larchmt), 2006, 7(3): 251-261.

[6] 徐 涛,曾邦雄,李世忠. 脂多糖对大鼠中性粒细胞基质金属蛋白酶-8 mRNA 表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2008,43(3): 566-567.

[7] 葛继晖,索爱琴,许予明,等. β 淀粉样蛋白诱导大鼠小胶质细胞脂多糖受体 CD14 和肿瘤坏死因子-α mRNA 的表达[J]. 郑州大学学报:医学版,2008,43(5):924-927.

[8] Zweigner J, Schumann R R, Weber J R. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response[J]. Microbes Infect, 2006, 8(3): 946-952.

[9] Iovine N, Eastvold J, Elsbach P, *et al*. The carboxyl-terminal domain of closely related endotoxin-binding proteins determines the target of protein-lipopolysaccharide complexes[J]. J Biol Chem, 2002, 277(10): 7970-7978.

(编辑 张 维)