DOI:10.16016/j.1000-5404.201409130

论著

# BPI-LL37抗菌融合蛋白质表达载体的构建与功能鉴定

袁培淞[1],朱 明[1],郭 韡[1],邢 伟[1],李向云[1],何 静[2],梁华平[1],蒋东坡[3],徐 祥[1,2],黄 宏[1,2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1],细胞治疗中心[2],ICU[3])

[摘要] **目的** 构建杀菌/通透性增加蛋白和LL37抗菌蛋白的融合蛋白(BPI-LL37)表达载体,获得针对脓毒症治疗的多效抗菌融合蛋白,为脓毒症治疗提供新的措施。**方法** 通过PCR方法从杀菌/通透性增加蛋白(bactericidal/permeability-increasing protein,BPI)和LL37基因的cDNA中扩增并修饰获得需要的$rBPI_{21}$和LL37活性片断,构建$rBPI_{21}$-LL37/ LL37-$rBPI_{21}$融合蛋白的表达载体,构建的表达载体(pLVX-Tight-Puro)上的BPI和LL37基因之间通过柔性片段(GGSGG)连接。之后使用PolyJet™体外DNA转染试剂转染人肺腺癌细胞A549。通过Western blot检测真核细胞A549表达融合蛋白的水平,通过抑菌试验验证此融合蛋白的分泌与抗菌能力。**结果** 经限制内酶切酶切、DNA电泳和DNA测序证明融合蛋白表达载体(pLVX-Tight-Puro-BPI-LL-37)构建成功;Western blot检测结果表明融合蛋白$rBPI_{21}$-LL37/ LL37-$rBPI_{21}$能被真核细胞A549细胞表达,融合蛋白大小介于25~30 $\times 10^3$;抑菌试验进一步验证此融合蛋白具有抑制细菌生长的生物学效应。**结论** 构建的两种$rBPI_{21}$-LL37/ LL37-$rBPI_{21}$表达载体能够成功转染入人的体细胞,并表达和分泌具有抗菌活性的融合蛋白,该融合蛋白有潜力成为治疗脓毒症的新药。

[关键词] 抗菌蛋白;融合蛋白;杀菌/通透性增加蛋白;LL37;抗菌;脓毒症
[中图法分类号] R394-33; R977.6; R978.69 [文献标志码] A

# Expression vector construction and antibacterial efficacy of BPI-LL37 antibacterial fusion protein

Yuan Peisong[1], Zhu Ming[1], Guo Wei[1], Xing Wei[1], Li Xiangyun[1], He Jing[2], Liang Huaping[1], Jiang Dongpo[3], Xu Xiang[1,2], Huang Hong[1,2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, [2]Cell Therapy Center, [3]ICU, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the expression vector of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)-LL37 antibacterial fusion protein and prepare the antibacterial fusion protein, so as to explore a novel clinical intervention strategy for curing sepsis. **Methods** PCR was used to obtain $rBPI_{21}$ and LL37 active segments from cDNA of BPI gene and LL37 gene. The $rBPI_{21}$ and LL37 DNA segments were linked with a flexible linker (GGSGG) and cloned into expression vector pLVX-Tight-Puro, and then the recombinant vector was transferred into A549 cells using PolyJet™ *in vitro* DNA transfection reagent. The expression of the antibacterial fusion protein in the A549 cells was identified by Western blotting, and the antibacterial efficacy was assayed by bacterial inhibitory test. **Results** Expression vector pLVX-Tight-Puro-BPI-LL-37 was successfully constructed and identified by DNA electrophoresis after restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Western blot assay showed that $rBPI_{21}$-LL37/LL37-$rBPI_{21}$ fusion protein [$(25-30)\times 10^3$] was stably expressed in the A549 cells. The bacterial inhibition test showed that the fusion protein could inhibit bacterial growth. **Conclusion** The expression vector pLVX-Tight-Puro-BPI-LL-37 is successfully constructed

[基金项目] 国家自然基金面上项目(81372059,81372027);国家重点基础研究发展规划项目(2012GB518105);重庆市基础与前沿研究计划院士专项项目(CSTC2014JCYJYS0003);重庆市应用开发(重点)项目(CSTC2014YYKFB10006)

[通信作者] 徐 祥,电话:(023)68757412,E-mail:xiangxu@ymail.com
黄 宏,电话:(023)68757410,E-mail:huanghongcq@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1122.002.html(2015-03-27)

and introduced into human somatic cells to secrete fusion protein with antibacterial activity, and the fusion protein may be potential drug for treating sepsis.

[**Key words**] antibacterial protein; fusion protein; bactericidal/permeability-increasing protein; LL37; antibacterial; sepsis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372059, 81372027), the Project of Key State Basic Research Development Program (2012GB518105), the Basic and Frontier Research Project for Academicians of Chongqing (CSTC2014JCYJYS0003), and the Key Application Development Project of Chongqing (Key Grant) Project (CSTC2014YYKFB10006). Corresponding author: Xu Xiang, Tel: 86-23-68757412, E-mail: xiangxu@ymail.com, Huang Hong, Tel: 86-23-68757410, E-mail: huanghongcq@163.com

脓毒症是以因感染诱发的全身炎症反应综合征为表现的一组临床综合征,其发病率高,死亡率高,发病率占人口的3%,一旦病情进展至严重脓毒症或脓毒性休克,其病死率高达30%~70%。针对脓毒症治疗的复杂性和各国、各地区治疗中的不规范性,国际上多个组织先后联合发布2004版和2008版脓毒症治疗指南(surviving sepsis campaign, SSC)。SSC治疗指南推荐的脓毒症临床治疗措施主要是从源头控制脓毒症病理生理过程的相应措施和支持治疗,其中,从源头控制脓毒症的措施主要为使用有效的抗菌药物控制感染,这一考虑主要是基于脓毒症发展快、变化大,细胞信号转导途径与调控机制复杂,因此,从源头阻断病原体分子的诱导作用不失为一种有效的策略[1]。杀菌/通透性增加蛋白(bactericidal/permeability-increasing protein, BPI)是脓毒症研究中难得的展现出应用前景的药物。由BPI改良而来的重组蛋白($rBPI_{21}$)通过中和内毒素,竞争性抑制脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP),和对革兰阴性菌特异的杀灭作用发挥作用。近年的研究指出,在严重脓毒症病例的血培养结果中,革兰阳性菌的比例上升,病原微生物组成复杂,且多有耐药性;细菌的结构成分,如LPS仍然是诱发脓毒症的发生、发展的重要因素。另一方面,由于$rBPI_{21}$多肽分子量较小,容易被血浆蛋白降解,因此,其应用可能受限。为此,我们期望能找到一种既可以抗耐药菌株又能中和毒素的脓毒症治疗的新药。LL-37是另一种被广泛研究的抗菌蛋白,具有广谱抗病原微生物活性和不易耐药的特性,对革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌和病毒都有杀灭作用。为此,我们将$rBPI_{21}$与LL37两个基因片断进行融合,构建$rBPI_{21}$-LL37/ LL37-$rBPI_{21}$表达载体,获得较大片段的多肽,最终以期获新的具有抗毒、广谱抗菌活性和不耐药的BPI-LL37/ LL37-BPI融合蛋白(抗菌剂),为脓毒症治疗寻找新的药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

菌株大肠杆菌 *E. coli* TOP10,甲基化缺陷的HST04菌株均由本实验室保存备用;肺炎克雷伯杆菌由大坪医院提供;肺腺癌细胞株A549细胞株由本实验室保存备用。质粒pLVX-Tight-Puro(Clontech® #632162),pMD19-T(TaKaRa® #6013)分别购自Clontech与TaKaRa公司。

CAMP基因[OriGene Homo Sapiens cathelicidin antimicrobial peptide as transfection-ready DNA(NM_004345),#SC117446],BPI基因[YRGene Homo Sapiens bactericidal/permeability-increasing protein(BC040955),#SHC25891]。限制性内切酶(TaKaRa产品),DNA连接试剂盒(TaKaRa产品,#6220Q),BPI多克隆抗体[Sigma-Aldrich产品, Anti-BPI(61-75) antibody produced in rabbit #B2188],CAMP多克隆抗体[Abcam产品, Anti-Cathelicidin antibody Rabbit ploYclonal (ab 64892)],第二抗体(联科生物,Goat anti-Rabbit IgG HRP conjugated #3104019),其余常用试剂均为国产分析纯。

主要仪器:PCR仪(C1000TM Thermal Cycler,Bio-Rad),Western blot半干燥转移装置(Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad),印记显影系统(ChemiDoc™ MP Imaging System,Bio-Rad),紫外分光光度计(岛津UVmini-1240)

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 为获取目的基因BPI(1~193)和LL37,使用PCR反应从cDNA模板中扩增出加入了酶切位点的目的片段,引物序列见表1。使用DNA连接试剂盒将PCR的反应产物连接到pMD19-T载体上。

1.2.2 重组质粒(表达载体)的构建 点突变与片段删除。$rBPI_{21}$是BPI野生型蛋白的N端$21\times10^3$的蛋白,该重组片段保留了野生型的生物学活性。与野生型不同的是,$rBPI_{21}$存在第132位(C132A)突变[2],该变化使得$rBPI_{21}$比野生型具有更强的抗菌能力。据此,通过PCR法,使用点突变引物(表2)将T载体上的野生型BPI(1~193 aa)基因片段的第132位半胱氨酸突变为丙氨酸,得到$rBPI_{21}$。同样使用PCR法,使用片段突变引物(表2)删除LL37基因中无功能的Cathelicidin家族保守片段[3]。T载体结构如图1。

**表 1　PCR 引物**

| |
|---|
| ①含有信号肽的 BPI(1～193aa)的引物(目的片段:705 bp) |
| 上游:5′-ATGGATCCTGGAGGATGAGAGAGAACATGGCCAGG-3′(*Bam*HⅠ) |
| 下游:5′-GCTCTAGAACCACCTGAACCACCCAGAGTCTGGAAATA-3′(*Xba*Ⅰ) |
| ②不含信号肽的 BPI(1～193aa)引物(目的片段:606 bp) |
| 上游:5′-GCTCTAGAGGTGGTTCAGGTGGTGTCAACCCTGGCGTC-3′(*Xba*Ⅰ) |
| 下游:5′-CGACGCGTCTACAGAGTCTGGAAATAAGGTTGCAGCTCGG-3′(*Mlu*Ⅰ) |
| ③含有信号肽和 Cathelindin 家族保守片段的 LL37 引物(目的片段:540 bp) |
| 上游:5′-ATGGATCCGCAGACATGGGGACCATGAAGACC-3′ (*Bam*HⅠ) |
| 下游:5′-GCTCTAGAGGACTCTGTCCTGGGTACAAGATTCCG-3′ (*Xba*Ⅰ) |
| ④不含信号肽和保守片段的 LL37 引物(目的片段:123 bp) |
| 上游:5′-GCTCTAGACAGGTCCTCAGCTACAAGGAAGC-3′(*Xba*Ⅰ) |
| 下游:5′-CGACGCGTCTAGGACTCTGTCCTGGGTAC-3′(*Mlu*Ⅰ) |

**表 2　突变引物序列**

| |
|---|
| ①BPI(1-193)C132A 点突变: |
| FT:ACCATCACCGCCTCCAGCTGCAGCAGCCACATCAACAGTGTC |
| FS:CAGCAGCCACATCAACAGTGTC |
| RT:GCAGCTGGAGGCGGTGATGGTGGGCTTGCCTGACGTGGGG |
| RS:TGGGCTTGCCTGACGTGGGG |
| ②删除 CAMP 家族保守片段:(被删除片段长度:312 bp) |
| FT: CCTCTGGCCATCATTGCCCTGCTGGGTGATTTCTTCCGG |
| FS: CTGCTGGGTGATTTCTTCCGG |
| RT:GGCAATGATGGCCAGAGGCATCACCAGGCCCAGCAGCA |
| RS: CATCACCAGGCCCAGCAGCA |

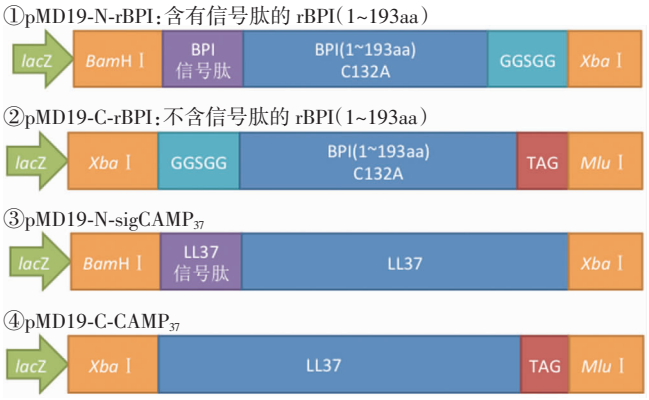



**图 1　T 载体结构**

表达载体 pLVX-Tight-Puro 含有一个受四环素调控的 CMV 启动子,多克隆位点提供的 *Bam*HⅠ, *Xba*Ⅰ, *Mlu*Ⅰ酶切位点,用 HST 04 菌株扩增载体去掉 *Xba*Ⅰ位点的甲基化后可供使用。使用 *Bam*HⅠ/*Xba*Ⅰ双酶切 pMD19-N-rBPI 和 pMD19-N-sigCAMP37,将酶切产物各自克隆入 pLVX-Tight-Puro 载体的 *Bam*HⅠ和 *Xba*Ⅰ酶切位点之间,构成 pLVX-N-rBPI 和 pLVX-N-sigCAMP37,再使用 *Xba*Ⅰ/*Mlu*Ⅰ双酶切 pMD19-C-CAMP37 和 pMD19-C-rBPI,酶切产物分别克隆入 pLVX-N-rBPI 和 pLVX-N-sigCAMP37 的 *Xba*Ⅰ和 *Mlu*Ⅰ酶切位点之间,构成 pLVX-rBPI$_{21}$-LL37 和 pLVX- sigCAMP37-rBPI$_{21}$ 重组质粒(图 2)。

鉴定使用 *Bam*HⅠ/*Mlu*Ⅰ双酶切重组质粒,以鉴定目的片段是否成功连接。后由华大基因公司对载体 DNA 完成测序。




**图 2　表达载体结构**

1.2.3　细胞转染　瞬时转染用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养 A549 细胞于 25 cm$^2$ 培养瓶内,转染前 24 h 消化细胞,按 2×10$^5$/孔的密度接种于 6 孔板内,细胞培养 24 h 后更换为新鲜培养基,后分别用 pLVX-rBPI$_{21}$-CAMP 和 pLVX- sigCAMP37-rBPI$_{21}$ 质粒转染细胞,根据 PolyJet™ 体外 DNA 转染试剂(PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent)试剂说明书进行转染。转染 24 h 后更换为含 500 ng/mL 四环素的 RPMI1640 完全培养基以诱导目的蛋白表达。转染 48 h 后更换一半培养基以保持培养基中的营养。转染 72 h 后收集上清抑菌试验,并提取细胞总蛋白通过 Western blot 鉴定融合蛋白是否表达。

1.2.4　重组融合蛋白鉴定　应用 Western blot 免疫印迹技术检测重组融合蛋白 BPI-LL37 与 LL37-BPI 的表达。将 60 μg 细胞总蛋白用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后,使用半干转仪将蛋白转印至 PVDF 膜,根据目的蛋白的理论分子量,参照预染蛋白 Marker 切出包含目的蛋白的 PVDF 膜,含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 6 mL 封闭 60 min,之后用 1% 脱脂奶粉稀释第一抗体,BPI 抗体与 Cathelicidin 抗体均以 1∶500 比例稀释。去掉 PVDF 膜的封闭液,使用稀释的第一抗体工作液替代之,4 ℃下持续摇动过夜。取出 PVDF 膜,10 mL TTBS 摇动洗涤 4 次,每次 15 min。使用 1% 脱脂奶粉稀释第二抗体,稀释比例 1∶5 000。将 PVDF 从 TTBS 中取出,放入第二抗体工作液中室温持续摇动 60 min。取出膜, 10 mL TTBS 摇动洗涤 4 次,每次 15 min。取出 PVDF 膜,滴加适量显迹液,使用显影系统获取印记图像。

1.2.5　抑菌试验　为了验证融合蛋白是否具有抑制细菌生长的能力。分别将培养的对青霉素耐药的大肠杆菌 Top10 和野生型的肺炎克雷伯杆菌用 PBS 洗

涤,再悬浮于PBS中达到约$3\times10^8$/mL的浓度。然后将大约$3\times10^6$个细菌与100体积的转染了表达载体的细胞的培养上清混合。37 ℃,60 r/min培养6 h,两种细菌分布用氨苄青霉素(100 μg/mL)和阿米卡星(100 μg/mL)作为阳性对照。用PBS洗去培养基,再悬浮于PBS中,使用紫外分光光度计测量溶液在600 nm处的光密度值$D(600)$[4]。

### 1.3 统计学处理

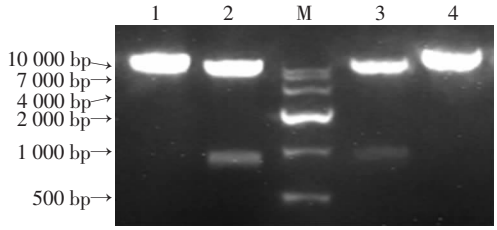
数据处理采用SPSS 20.0统计软件,组间两两比较使用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

酶切结果我们分别用*Bam*HⅠ和*Bam*HⅠ/*Mlu*Ⅰ单、双酶切表达载体,结果如图3,可见克隆的基因片段已经成功连接至载体。

重组质粒pLVX-rBPI$_{21}$-CAMP和pLVX-sigCAMP37-rBPI$_{21}$经过测序,其序列与目的基因序列完全一致,说明重组表达载体构建成功。

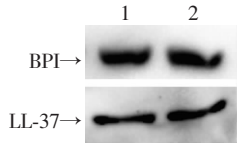



1:*Bam*HⅠ单酶切pLVX-rBPI$_{21}$-CAMP;2:*Bam*HⅠ/*Mlu*Ⅰ双酶切pLVX-rBPI$_{21}$-CAMP;M:DNA标准;3:*Bam*HⅠ单酶切pLVX-sig-CAMP37-rBPI$_{21}$;4:*Bam*HⅠ/*Mlu*Ⅰ双酶切pLVX-sigCAMP37-rBPI$_{21}$

**图3 *Bam*HⅠ和*Bam*HⅠ/*Mlu*Ⅰ单、双酶切表达载体鉴定结果**

### 2.2 重组融合蛋白的表达

本研究构建了由柔性片段(GGSGG)所连接的由rBPI$_{21}$和LL-37融合蛋白,其结构如图2。使用Western blot检测出了融合蛋白的BPI和LL-37片段,证明其融合成功(图4),融合蛋白大小介于25~30$\times10^3$。




1:BPI-LL37;2:LL37-BPI

**图4 Western blot检测融合蛋白表达**

### 2.3 重组融合蛋白的功能鉴定

通过抑菌试验验证了融合蛋白的杀菌功能。对于青霉素耐药的大肠杆菌Top10,与对照组(0.241±0.008)相比,氨苄青霉素组(0.236±0.008)对细菌的生长没有抑制作用;而BPI-LL37融合蛋白组(0.172±0.008)和LL37-BPI融合蛋白组(0.175±0.008)细菌生长明显受到抑制,与对照组和氨苄青霉素组相比差异均具有统计学意义($P<0.05$)。应用野生型的肺炎克雷伯杆菌的抑菌试验也观察到了一致的结果。BPI-LL37融合蛋白组(0.163±0.022)和LL37-BPI融合蛋白组(0.244±0.070)中细菌生长受到了明显抑制,与对照组(0.530±0.057)相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

## 3 讨论

脓毒症是由致病微生物的结构成分和毒素诱发的全身性炎症反应综合征。近年的研究指出,在严重脓毒症病例的血培养结果中,有62%的患者分离出革兰阴性菌,革兰阳性菌的比例则上升到了47%[5]。病原微生物组成复杂,且多有耐药性,为此,我们期望能找到一种可以解决上述问题的抗菌剂。

BPI是一种存在于人类多形核白细胞颗粒内的$55\times10^3$的阳离子蛋白,它是脂多糖结合蛋白(LPS-binding protein,LBP/CD14)的竞争性抑制剂,可以中和内毒素,并且对革兰阴性菌具有细胞毒作用,动物实验证实其对于内毒素血症[6]、肺炎[7]等感染性疾病都有治疗效果。进一步的研究发现,由其N端$21\times10^3$片段组成的重组蛋白(rBPI$_{21}$)具有完整的内毒素中和能力以及抑制细胞因子表达、中性粒细胞活化和凝血过程等作用[8],且抗菌能力较$55\times10^3$的野生型更强[2]。之后的研究观察到rBPI$_{21}$在肺炎、脓毒症动物模型中发挥了保护效应[9],并发现其在脓毒症中发挥的保护效应更多的是依赖其抗菌能力而非抗内毒素作用[10]。更重要的是其在临床试验中也显示了治疗效果[11-12]。目前rBPI$_{21}$的商品[奥培巴坎,Neuprex(opebacan),XOMA公司]已于2006年9月获得欧盟理事会(EC)罕见病用药批准,用于治疗细菌感染性脑膜炎,其第2期临床研究已完成。由德克萨斯大学西南医学中心(University of Texas Southwestern Medical Center)的Joseph Minei主持的rBPI$_{21}$用于治疗烧伤的2期临床研究已完成,但数据尚未发表。

LL-37是Cathelicidin抗菌蛋白(cathelicidin antimicrobial peptide,CAMP)家族的唯一成员,它可以被多种组织和细胞分泌,具有广谱抗病原微生物活性和不易耐药的特性,对革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌和病毒都有作用。近年来的研究还发现了LL-37具有免疫调节和促愈的作用[13]。

本实验通过构建BPI-LL37/ LL37-BPI表达载体,获得了新的片段较大,具有抗毒、广谱抗菌活性和不耐药融合蛋白(抗菌剂)。实验结果显示,我们构建的

BPI-LL37 和 LL37-BPI 表达载体,可以转染入人的体细胞并顺利地表达;并通过抑菌试验进一步证实该融合蛋白具有较强的杀菌作用。

同时,我们发现两种结构的融合蛋白对大肠杆菌的生长抑制能力大致相似,对肺炎克雷伯杆菌的抑制作用的差异无统计学意义,提示两种蛋白的结构和功能在上述两种融合方案中未受到明显的影响,两种蛋白很可能保留了例如炎症调节等融合前的特性。因此,该融合蛋白的免疫调节作用,尚值得进一步的实验探讨。另外,由于尚无高纯度的蛋白样品,而蛋白大小的差异,载体表达效率不同等因素影响各组间的可比性,故本研究未比较融合蛋白与单独的 $rBPI_{21}$、LL37 以及两种单一蛋白联用的抗菌活性,我们将在后续的工作中完善相关研究。

对于抗细菌感染治疗来说,药物耐药是近年来凸显的重要问题,该问题在脓毒症高发的 ICU 则表现得更甚。2014 年世界卫生组织发布的首份全球抗生素耐药报告中指出,对于中国所在的西太平洋区域,在造成脓毒症等严重疾病的细菌中,大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药程度很高。肺炎克雷伯菌对第 3 代头孢菌素的耐药性也很广泛。且根据报告,在该区域有些地方,多达 80% 的金黄色葡萄球菌感染对甲氧西林具有耐药性,标准的抗生素治疗无效。因此,挖掘新药物的需求越来越迫切,也有了一些突破,如近来的研究发现的噬菌体 GP67 蛋白等[14]。在此方面,我们的研究证明了该融合蛋白对青霉素耐药细菌也有抑菌活性,提示对于传统抗生素的耐药问题,改良已知抗菌物质也是一条可行的解决路径。且难度较小,成本也较低。

此外,新兴的细胞治疗研究在近年取得了长足的发展,已有来源于动物模型的研究确证干细胞移植对于脓毒症也有治疗作用[15]。而本研究所构建的融合蛋白为慢病毒过表达载体,将进一步包装成为病毒后通过感染细胞手段修饰有应用前景但又难于转染的载体细胞,如骨髓基质干细胞,以获得组织修复和抗炎、抗毒功能增强型骨髓基质干细胞,干细胞分泌的重组蛋白质 BPI-LL37/ LL37-BPI 不仅具有中和细菌内毒素的作用,还具有杀菌的功能,此外,干细胞还具有炎症调节和组织修复功能,由此以建立脓毒症治疗的新措施,为干细胞移植在脓毒症治疗中的应用探索出新的出路。

**参考文献:**

[1] 周红, 刘鑫, 郑江. 脓毒症治疗——挑战与机遇并存[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(2): 91 – 94.

[2] Horwitz A H, Leigh S D, Abrahamson S, *et al*. Expression and characterization of cysteine-modified variants of an amino-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein[J]. Protein Expr Purif, 1996, 8(1): 28 – 40.

[3] Chiu J, March P E, Lee R, *et al*. Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(21): e174.

[4] 王慧娟, 何云燕, 夏云, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 gyrA 基因高效反义肽核酸序列筛选及其体外抗菌活性观察[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(14): 1442 – 1446.

[5] Angus D C, van-der-Poll T. Severe sepsis and septic shock[J]. N Engl J Med, 2013, 369(9): 840 – 851.

[6] Alexander S, Bramson J, Foley R, *et al*. Protection from endotoxemia by adenoviral-mediated gene transfer of human bactericidal/permeability-increasing protein[J]. Blood, 2004, 103(1): 93 – 99.

[7] Holweg A, Schnare M, Gessner A. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the innate defence of the lower airways[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(4): 1045 – 1050.

[8] Domingues M M, Santos N C, Castanho M A. Antimicrobial peptide $rBPI_{21}$: a translational overview from bench to clinical studies[J]. Curr Protein Pept Sci, 2012, 13(7): 611 – 619.

[9] Srivastava A, Casey H, Johnson N, *et al*. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein $rBPI_{21}$ protects against pneumococcal disease[J]. Infect Immun, 2007, 75(1): 342 – 349.

[10] Schlag G, Redl H, Davies J, *et al*. Protective effect of bactericidal/permeability-increasing protein ($rBPI_{21}$) in baboon sepsis is related to its antibacterial, not antiendotoxin, properties[J]. Ann Surg, 1999, 229(2): 262 – 271.

[11] Levin M, Quint P A, Goldstein B, *et al*. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein ($rBPI_{21}$) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. $rBPI_{21}$ Meningococcal Sepsis Study Group[J]. Lancet, 2000, 356(9234): 961 – 967.

[12] Demetriades D, Smith J S, Jacobson L E, *et al*. Bactericidal/permeability-increasing protein ($rBPI_{21}$) in patients with hemorrhage due to trauma: results of a multicenter phase II clinical trial. $rBPI_{21}$ Acute Hemorrhagic Trauma Study Group[J]. J Trauma, 1999, 46(4): 667 – 677.

[13] Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, *et al*. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide[J]. Cell Immunol, 2012, 280(1): 22 – 35.

[14] Osmundson J, Montero-Diez C, Westblade L F, *et al*. Promoter-specific transcription inhibition in Staphylococcus aureus by a phage protein[J]. Cell, 2012, 151(5): 1005 – 1016.

[15] Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen P S, *et al*. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production[J]. Nat Med, 2009, 15(1): 42 – 49.

(收稿:2014-09-18;修回:2014-10-16)

(编辑 王 红)