DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.014

论著

文章编号:1000-5404(2004)10-0882-04

CD14与TLR4相互作用的实验研究

胡承香,杨清武,吕凤林,徐 祥 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨CD14与TLR4(toll-like receptor 4, TLR4)在介导LPS膜信号转导中的相互作用。方法 通过PCR分别克隆CD14 cDNA和TLR4胞外区cDNA,构建其酵母表达载体,将载体共转化酵母细胞行酵母双杂交实验。同时,应用Pull-down和免疫共沉淀实验在体外及体内进一步鉴定CD14与TLR4的相互作用。结果 PCR扩增获得了CD14 cDNA和TLR4胞外区cDNA,并成功地构建了pGADT7 AD-CD14和pGBKT7 BD-TLR4酵母双杂交质粒。酵母双杂交系统检测显示pGADT7 AD-CD14和pGBKT7 BD-TLR4质粒均无自主激活报告基因LacZ表达的能力,在酵母细胞中CD14和TLR4之间存在相互作用。Pull-down结果也显示,在体外反应体系中,CD14和TLR4间存在相互作用。免疫共沉淀实验结果表明,在哺乳动物细胞(HEK 293)这一体内反应体系中,CD14与TLR4间也存在交互作用。结论 在酵母细胞、体外反应体系和哺乳动物细胞(HEK 293)中,CD14与TLR4之间存在物理上的相互作用。

关键词:CD14;TLR4;酵母双杂交系统;内毒素;脓毒症
中图法分类号:R392.11;R394-33;R446.9 文献标识码:A

Experimental study of the interaction between toll-like receptor 4 and CD14

HU Cheng-xiang, YANG Qing-wu, LU Feng-lin, XU Xiang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the interaction between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) in LPS induced membrane signal transduction mediated by TLR4. Methods CD14 cDNA and TLR4 extracellular cDNA, cloned by PCR, were inserted respectively into pGADT7 AD and pGBKT7 BD to construct their yeast expression vectors. The interaction between CD14 and TLR4 was identified by yeast two-hybrid system and glutathione-S-transferase (GST) pull-down test and coimmunoprecipitation assay. Results CD14 cDNA and TLR4 extracellular cDNA were obtained. pGADT7 AD-CD14 and pGBKT7 BD-TLR4 yeast expression vectors were constructed successfully. Yeast two-hybrid system and glutathione-S-transferase (GST) pull-down and coimmunoprecipitation results showed that the interaction between CD14 and TLR4 might occur in yeast cell *in vitro* and in mammalian cells (*in vivo*). Conclusion The interaction between TLR4 and CD14 in yeast cell, *in vitro* reaction system, and mammal cells (HEK 293), confirmed by yeast two-hybrid system and glutathione-S-transferase (GST) pull-down test and coimmunoprecipitation assay, is not only helpful to further clarify the mechanism of LPS membrane signal transduction, but also provides a new idea for the treatment and prevention of G^- sepsis.

Key words: CD14; TLR4; yeast two-hybrid system; LPS; sepsis

LPS (lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞外膜的主要成份,也是免疫和炎症反应细胞的强大激活剂,是引起革兰阴性菌脓毒症的主要病原因子[1]。有关LPS激活免疫细胞的信号转导机制一直是免疫分子识别、炎症反应和创伤外科领域的研究热点和难点。但至今未能完全阐明。研究表明,CD14是LPS的受体,参与LPS的信号转导,在介导LPS的病理生理效应中具有重要的作用。它是一种GPI膜锚定蛋白,缺乏跨膜区和胞内结构,不能将胞外信号转导至胞内。由此提示在细胞膜上肯定存在LPS信号转导的"共受

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203);国家自然科学基金资助项目(30170968);全军医学科研"十五"计划青年基金项目(01Q105)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054203), the National Natural Science Foundation of China (30170968) and the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (01Q105)
作者简介:胡承香(1965-),女,重庆市石柱县人,实验师,主要从事创伤感染与免疫方面的研究。电话:(023)68757431;E-mail:xiangxiangyue@yahoo.com.cn.
通信作者:杨清武,电话:(023)68757343
收稿日期:2003-07-09;修回日期:2003-09-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体”。TLR4 (toll-like receptor 4)的发现和研究为该领域的研究带来了新的曙光。TLR4 是 TLRs 中的成员之一, 属 IL-1R (interleukin-1 receptor)超家族。它是一种胞外区富含亮氨酸重复序列、胞内区与 IL-1 受体同源的跨膜受体, 具有 IL-1R 超家族的典型结构特点[2]。研究证实, TLR4 是哺乳动物 LPS 的受体和信号转导分子, 在介导 LPS 的病理生理效应中具有重要作用[3~7]。那么, TLR4 是否为 CD14 的共受体? 它们在介导 LPS 的信号转导中作用模式怎样? 既然 TLR4 是一种跨膜受体, LPS 的信号是否通过 CD14 与 TLR4 间的相互作用将胞外信号转导至胞内的? 这些问题均未阐明。酵母双杂合系统是近些年来发展起来的一种用于研究蛋白质之间相互作用的新型生物学技术。该系统可用于研究两个已知蛋白质之间的相互作用[8]。为此, 本研究拟利用 PCR 克隆 CD14 cDNA 和 TLR4 胞外区 cDNA, 并构建相应的酵母表达载体, 后利用酵母双杂交系统研究 CD14 与 TLR4 间是否存在相互作用。同时, 在体内外行免疫共沉淀及 Pull-down 实验进一步验证 CD14 与 TLR4 间的相互作用, 本实验的实施将为进一步阐明 LPS 的膜信号转导机制提供新的理论依据, 也为革兰阴性菌脓毒症的防治提供新手段。

1　材料与方法

1.1　质粒、菌株及酵母双杂交系统

质粒 pcDNA3/HuCD14 由美国 Eisai 研究所杨桦博士提供, 人 TLR4 cDNA 质料由意大利 Mario Negri 研究所 Marta Muzio 教授提供。大肠杆菌 DH5α 由本室保存。酵母双杂交系统为 CLONTECH 公司产品。

1.2　工具酶及主要试剂

pGEM-T 载体购自 Promega 公司, PCR 试剂盒、内切酶和 T4 DNA 连接试剂盒购自 Takara 公司。兔抗-His 多克隆抗体和羊抗兔 IgGs 抗体购自 Santa Cruz 公司。pGEX-4T-1, T-vector 试剂盒和免疫沉淀分析全套试剂盒购自 Clonetech 公司。pET-16b-CD14 表达载体与 His 以及 GST-TRL4 和 His-CD14 融合蛋白由本实验室表达。其余生化试剂均为国产分析纯。

1.3　PCR 扩增目的基因片段

根据人 CD14 和 TLR4 胞外区 DNA 序列, 并分别去掉二者信号肽部分的碱基序列。设计如下引物:

上游引物 P1: 5′-CGGGATCCACCCACGCCAGAACCTTGTGAG-3′;

上游引物 P2: 5′-GGAATTCCATATGGAGCTGAATTTCTAC-3′;

下游引物 P3: 5′-GGAATTCCTGTCTTGGATCTTAGGCAAAGC-3′;

下游引物 P4: 5′-GGGATCCTTAGATATTCAAACTCAGCAC-3′。

其中 P1 和 P3 扩增 CD14 cDNA, 上下游引物中分别导入 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ酶切位点, 同时加上相应的保护碱基。P2 和 P4 扩增 TLR4 胞外区 cDNA, 在上下游引物中分别引入 *Nde*Ⅰ和 *Bam*HⅠ酶切位点, 同时加上相应的保护碱基。分别以质粒 pcDNA3/Hu CD14 和 TLR4 cDNA 质粒为模板, 进行 PCR 反应, 条件为: 94 ℃变性 5 min 后, 进入 30 个循环: 94 ℃, 30 s; 60 ℃, 50 s; 72 ℃, 1.5 min, 最后 72 ℃延伸 10 min, 4 ℃保存。

1.4　酵母双杂交系统重组质粒的构建

将上述 PCR 产物分别插入 pGEM-T 载体, 转化宿主菌 DH5α, 提取质粒后, 分别以 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ和 *Nde*Ⅰ和 *Bam*HⅠ酶切, 回收相应片段, 分别插入 pGADT7 AD 和 pGBKT7 BD 相同的位点, 构建成 pGADT7 AD-CD14 和 pGBKT7 BD-TLR4 质粒, 并进行酶切和 DNA 测序鉴定。

1.5　双质粒转化酵母细胞

制备酵母菌 Y187 感受态, 取出 100 μl 与待检测的质粒 DNA 各 5~10 μg 混合, 转入 0.2 cm 的电转杯, 冰浴 5 min, 于 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪 1 500 V, 25 μF, 200 Ω 条件下电转化, 立即加入 1 ml 冰浴山梨醇, 将菌液分别涂布相应的 SD(营养缺陷培养基)平板上, 30 ℃温育 3~5 d, 观察转化菌的生长。

1.6　滤纸法 β-半乳糖苷酶活性分析

待平板上克隆培养至直径 2~3 mm 时, 刮取单个克隆菌落直接涂到滤纸上, 将滤纸移入液氮池中冷冻 1 min, 室温下解冻, 置于另一张预先在 Z 缓冲液/X-gal 溶液[100 ml Z 缓冲液($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 16.1 g/L, $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 5.5 g/L, KCl 0.75 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.246 g/L, pH 7.0), 0.27 ml β-巯基乙醇, 1.67 ml X-gal 储存液]中浸泡过的滤纸上, 室温温育直至出现蓝色克隆。

1.7　Pull-down 实验鉴定 CD14 与 TLR4 间的相互作用

将本实验室已构建的 GST-TLR4 和 His-CD14 融合蛋白的原核表达质粒分别转化入 DH5α 大肠杆菌, IPTG 诱导表达, 离心收集细菌, PBS 重悬, 超声破菌。将包被有抗 GST 抗体的琼脂糖 4B 胶头加入到 GST-TLR4 的细胞裂解液中混匀, 离心收集胶头, 冰浴 PBS 液洗涤后, 加入 K-IBP 缓冲液(142.5 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA, 0.2% NP-40), 后加入 His-CD14 的细胞裂解液, 同时以 His tag p27Kipl 作阴性对照, 12 ℃孵浴 2 h, K-IBP 缓冲液洗涤, 离心后加 PBS 重悬, 煮沸 2~3 min, 离心, 上清行 SDS-PAGE, PAGE 转膜后用抗 His 抗体行 Westem blot。

1.8　免疫共沉淀实验检测 TLR4 与 CD14 在哺乳动物细胞内的交互作用

TLR4 胞外区 cDNA 和 CD14 cDNA 分别亚克隆进入 pCMV-MYC 和 pCMV-HA 质粒, 制成融合表达载体: pCMV-MYC-TLR4 和 pCMV-HA-CD14, 然后将这两个质粒共转染进 HEK-293 细胞。利用抗-HA 和抗-MYC 单克隆抗体按照 Clonetech 公司提供的操作指导行免疫共沉淀分析测试。

2　结果

2.1　PCR 获得的 CD14cDNA 和 TLR4 胞外区 cDNA

PCR 产物分别取 2 μl 作 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示: 在约 1.1 kb 处有一明亮的条带, 这与设计的 CD14 cDNA 的大小相一致。在约 1.8 kb 处有一明亮的条带, 这与设计的 TLR4 胞外区 cDNA 的大小相一致。

2.2　重组质粒的构建和鉴定

构建的 pGADT7 AD-CD14 和 pGBKT7 BD-TLR4 重组质粒转化 DH5α 后, 提取质粒, 酶切鉴定表明, 重组质粒能够切出大小

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

与 PCR 产物相一致的 DNA 片段。测序结果表明，pGADT7 AD-CD14 和 pGBKT7 BD-TLR4 重组质粒中 CD14 和 TLR4 的阅读框和序列完全正确，酵母表达载体构建成功。

2.3 酵母双杂交系统检测结果

按标准的酵母双杂交系统说明书的方法，分别检测了 pGADT7 AD-CD14 和 pGBKT7 BD-TLR4 质粒的自主激活酵母菌 Y187 报告基因 LacZ 的能力和 TLR4 与 CD14 间的相互作用。结果显示，单独将 pGADT7 AD-CD14 或 pGBKT7 BD-TLR4 分别转化酵母菌 Y187 均不能激活报告基因 LacZ 的表达，克隆为白色，无自主激活报告基因表达的能力。另外，pGADT7 AD-CD14 与 pGBKT7 BD、pGBKT7 BD-TLR4 与 pGADT7 AD 共转化酵母菌 Y187 也不能激活报告基因 LacZ 的表达，克隆为白色，说明 TLR4 与 AD、CD14 与 BD 间不发生相互作用。而 pGADT7 AD-CD14 和 pGBKT7 BD-TLR4 共转化时，能够激活报告基因 LacZ 的表达，克隆为蓝色，结果与阳性对照一致(表 1)，提示 CD14 与 TLR4 之间发生相互作用。

表 1 用酵母双杂交系统分析 **TLR4** 和 **CD14** 间的相互作用

Tab 1 Assay of interaction between TLR4 and CD14 by yeast two-hybrid system

Group	SD/Trp-	SD/Leu-	SD/Trp-Leu-	SD/Trp-Leu-His-	X-gal
pGBKT7 BD-TLR4	+	-	-	-	white
pGADT7 AD-CD14	-	+	-	-	white
pCL1	-	+	-	-	blue
pGADT7 AD-T+pGBKT7 BD-53	+	+	+	+	blue
pGADT7 AD-CD14+pGBKT7 BD-TLR4	+	+	+	+	blue
pGADT7 AD-+pGBKT7 BD-TLR4	+	+	+	-	white
pGADT7 AD-CD14+pGBKT7 BD	+	+	+	-	white
pGBKT7 BD+pGADT7 AD	+	+	+	-	white

Note: + yeast clone, - no yeast clone; SD/Trp-: SD selective medium/ Trp- tryptophan negative; SD/Leu-: SD selective medium/ Leu- leucine negative; SD/Trp-Leu-: SD selective medium/ Trp- tryptophan negative Leu- leucine negative; SD/Trp-Leu-His-: SD selective medium/ Trp- tryptophan negative Leu-leucine negative histidine negative; X-gal: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside

2.4 Pull-down 实验结果

Western blot 结果显示，在体外，GST-TLR4 胞外结构域能与 His-CD14 相互作用，包被有抗 GST 抗体的琼脂糖 4B 胶头能够吸附 GST-TLR4 融合蛋白，通过 TLR4 和 CD14 的相互作用，间接地将 His-CD14 吸附下来。相反，胶头则不吸附 His-p27kipl(图 1)。

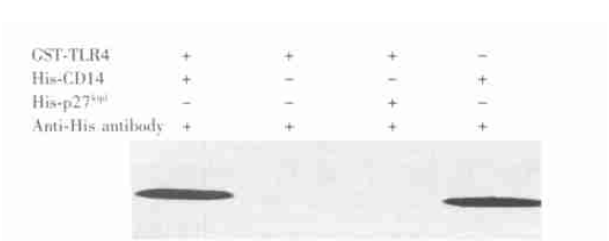


图 1 **Pull-down** 实验鉴定 **TLR4** 与 **CD14** 间的相互作用

Fig 1 Assay of interaction between TLR4 and CD14 by GST-Pull-down

2.5 免疫共沉淀测试结果

为了更进一步地确定 TLR4 与 CD14 在哺乳动物细胞内是否存在交互作用，将 pCMV-MYC-TLR4 和 pCMV-HA-CD14 质粒共转染进 HEK-293 细胞后，破碎细胞抽提裂解物与抗-HA 抗体行免疫沉淀试验，随后用抗-MYC 抗体实施 Western blot 测定，同时用未插入质粒的转染细胞提取物做对照。结果显示：在经抗--HA 抗体沉淀的蛋白中发现了 MYC-TLR4，表明 TLR4 与 CD14 在哺乳动物细胞内存在交互作用(图 2)。



1: Extraction solution of cells transfected pCMV-MYC-TLR4 and pCMV-HA-CD14 detected by anti-MYC antibody; 2: Extraction solution of cells transfected pCMV-MYC and pCMV-HA detected by anti-MYC antibody after anti-HA precipitating; 3: HEK-293 cells extraction solution detected by anti-MYC; 4: Extraction solution of cells transfected pCMV-MYC-TLR4 and pCMV-HA-CD14 detected by anti-MYC antibody after anti-HA precipitating

图 2 免疫共沉淀实验鉴定 **TLR4** 与 **CD14** 间的交互作用

Fig 2 Assay of interaction between TLR4 and CD14 by immunoprecipitation

3 讨论

酵母双杂交技术是一项新兴的分子生物学新技术，自从 Fields 和 Song 发现以来，这一研究蛋白质间相互作用的新技术得到了广泛的应用。其基本原理为：真核细胞基因转录激活因子的转录激活作用是由功能相对独立的 DNA 结合结构域(binding domain，BD)和转录活化结构域(activation domain，AD)共同完成的，这两个结构域通过共价或非共价连接建立的空间联系是转录因子激活靶基因转录的关键。根据这一特点，如果将可能存在相互作用的两种蛋白 X 和 Y 分别与 BD 和 AD 以杂合蛋白的形式在酵母中共表达并分布于细胞核中，X 和 Y 之间的相互作用就可以将 BD 和 AD 在空间结构上重新连接为一个整体，进而激活报告基因的转录和表达。与其他研究蛋白相互作用的方法相比，具有高灵敏度、能在真核生物水平模拟蛋白间的作用、相对简便、快速。因此，该技术已在信号转导、细胞凋亡、细胞周期与分化、基因表达调控及蛋白质自身特性等方面的研究得到广泛运用[9]。为了证实 CD14 与 TLR4 之间的相互作用，本实验首先将 CD14 与 AD 融合、TLR4 与 BD 融合构建酵母表达载体。另外，在本实验中为减少靶蛋白对酵母菌的毒性，而且 TLR4 属于跨膜蛋白，能与 CD14 发生相互作用只能是其胞外区，因此我们在构建载体 TLR4-BD 融合表达载体

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时, 只选用了 TLR4 的胞外区蛋白。结果显示, CD14 或TLR4 单独转化酵母细胞以及 CD14 与 BD、TLR4 与 AD 载体共转化酵母细胞均不能激活 LacZ 报告基因的表达, 而 CD14 和 TLR4 共转化时, 则可激活报告基因 LacZ 的表达, 说明在酵母系统中 CD14 与 TLR4 之间存在相互作用。但值得注意的是, 酵母双杂交存在假阳性较高等缺点, 为此我们进一步应用 GST Pull-down 实验和免疫共沉淀分析实验验证 CD14 与 TLR4 之间的相互作用。结果也显示, 在体外反应体系和哺乳类细胞(HEK 293)中, CD14 与 TLR4 之间存在相互作用。至于这种相互作用的强弱程度会不会受外界因素的影响? 二者相互作用的结构域如何? 我们将作进一步研究。

关于 LPS 膜受体信号转导的分子机制, 一直是研究的热点和难点。Ulevitch 等提出了一套完整的学说, 认为 LPS 首先与 LPS 结合蛋白(LPS binding protein, LBP)、CD14 形成 LPS-LBP-CD14 复合物, 再通过跨膜分子将信号转导至细胞内。CD14 与多种跨膜信号受体不同, 缺乏跨膜和胞内区, 不能直接将信号转导到细胞内。目前认为, LPS 受体属于"多构件受体", 包含至少两种以上的蛋白。CD14 是主要的配基结合构件, 其他蛋白介导 LPS 和 CD14 结合后的跨膜信号[10]。既然 TLR4 是 LPS 的跨膜信号转导分子, 那么它们之间的关系和作用模式怎样?

我们认为可能有两种不同模式: 第一种假设为 TLR4 不直接和 LPS 结合, LPS 与 CD14 结合后, 通过与其相互作用(直接/间接)使构形发生改变, 将信号转导至细胞内; 另一种为 CD14 使 LPS 直接与 TLR4 结合, 起"聚集和传递"LPS 的作用。研究表明 LPS 刺激细胞后, CD14 与 TLR4 均表达增加, 而且 CD14 明显可调 TLR4 介导 LPS 对细胞 NF-kB 的激活效应[11]。Jiang 等[12] 利用能量共振转移技术研究发现, 细胞在 LPS 作用后, CD14 与 TLR4 相互接近, 产生能量淬灭, 这些均提示 CD14 与 TLR4 间可能存在相互作用。CD14 与 TLR4 的胞外区均含有亮氨酸多重复序列, 这些区域可能在二者蛋白相互作用中具有重要作用[13]。但都没有直接的证据来证实。本研究首次运用酵母双杂交技术、Pull-down 实验和免疫共沉淀测试分析方法初步证实 CD14 与 TLR4 确实存在相互作用, 为上述第一种假说提供了实验依据, 也为进一步阐明 LPS 的膜信号转导机理奠定了理论基础。这种相互作用可能在机体未受到 LPS 作用的情况下较微弱、短暂, 执行着机体对外界细菌的"监视"功能。若在 LPS 的作用下, 二者相互作用更为强大, 导致炎症信号级联放大效应, 引起机体炎症反应失控, 导致机体损伤。诚然, 我们也不排除细胞膜上还有其他信号分子参与 LPS 的信号转导, 要彻底揭示 LPS 的信号转导机制可能还需要长时间的研究。同时, 本研究也表明可通过阻断 CD14 — TLR4 的结合, 产生部分阻断 LPS 的膜信号转导的效应, 在一定程度上阻断 LPS 对机体的损伤效应, 为脓毒症的防治提供新的手段。

参考文献:

[1] Wenzel R P, Pinsky M R, Ulevitch R J, *et al*. Current understanding of sepsis[J]. Clin Infect Dis, 1996, 22(3): 407—412.

[2] Smirnova I, Poltorak A, Chan E K, *et al*. Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor4 locus(TLR4)[J]. Genome Biol, 2000, 1(1): 1—10.

[3] Poltorak A, Smirnoval I, He X, *et al*. Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region[J]. Blood Cells Mol Dis, 1998, 24(3): 340—355.

[4] Poltorak A, Smirnova I, Clisch R, *et al*. Limits of a deletion spanning TLR4 in C57BL/10ScCr mice[J]. Endotoxin Res, 2000, 6(1): 51—56.

[5] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al*. Cutting edge: Toll-like receptor 4(TLR4)- deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 3749—3752.

[6] Beutler B, Poltorak A. Positional cloning of LPS, and the general role of toll-like receptors in the innate immune response[J]. Eur Cytokine Netw, 2000, 11(2): 143—152.

[7] Chow J C, Young D W, Golenbock D T, *et al*. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction[J]. J Biol Chem, 1999, 274(16): 10689—10692.

[8] 张　迪, 霍克克, 顾科隆, 等. 酵母双杂交技术研究进展[J]. 高技术通讯, 2000, 10(3): 98—101.

[9] 张树民, 陈英碚. 酵母双杂交体系的新发展[J]. 国外医学遗传学分册, 1999, 22(5): 225—227.

[10] 姜　勇. 内毒素激活内皮细胞的信号机制的研究进展[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(1): 76—78.

[11] Fature E, Equils O, Sieling P A, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kB through toll-like receptor 4 (TLR4) in cultured human dermal endothelial cells different expression of TLR4 and TLR2 in the endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(15): 11058—11063.

[12] Jiang Q, Akashi S, Miyake K, *et al*. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappaB[J]. J Immunol, 2000, 165(7): 3541—3544.

[13] Aderem A, Uleviteh R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response[J]. Nature, 2000, 406(6797): 782—787.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net