

不可分型流感嗜血杆菌脂肽 P4 诱导气道上皮细胞分泌黏蛋白的机制

王 剑¹, 李 旒^{2*}, 李 晶², 周定耕², 王 彪²

(1. 南华大学附属第一医院急诊科, 衡阳 421001; 2. 南华大学附属第二医院急诊科)

摘要: **目的** 研究不可分型流感嗜血杆菌脂肽 P4 诱导气道上皮细胞分泌黏蛋白 MUC5AC 的作用及机制。**方法** 培养人气道上皮细胞 NCI-H292, 用不同浓度的 P4 孵育细胞, 检测黏蛋白 5AC (MUC5AC) 的分泌及 mRNA 表达、ROS 的产生及肿瘤坏死因子 α 转化酶 (TACE) 的活性; 分析 Duox1 p47^{phox} 和 P67^{phox} 亚基亚细胞转位和表皮生长因子受体 (EGFR) 的磷酸化。**结果** 0、30、50 和 100 ng/mL P4 作用 NCI-H292 细胞 24 h 后, 可诱导其分泌 MUC5AC 并表达其 mRNA, 并促进 p47^{phox} 和 P67^{phox} 亚基转位至细胞膜、增高细胞内 ROS 的含量, 同时可上调 TACE 的酶活性及诱导 EGFR 磷酸化。NADPH 氧化酶抑制剂可抑制 ROS 产生; 而 ROS 抑制剂处理则可降低 TACE 的酶活性; 沉默 TACE 表达后可抑制 EGFR 磷酸化, 而 EGFR 抑制剂处理可降低 MUC5AC 分泌。**结论** P4 经 Duox1/ROS/TACE/EGFR 诱导人 NCI-H292 细胞分泌 MUC5AC。

关键词: 不可分型流感嗜血杆菌; 脂肽 P4; 表皮生长因子受体; 肿瘤坏死因子 α 转化酶; 黏蛋白 5AC
中图分类号: R56 文献标识码: A

Nontypeable *Haemophilus lipopeptide* P4 induces the secretion of MUC5AC in airway epithelial cells

WANG Jian, LI Ni, LI Jing, et al

(Department of Emergency Surgery, The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan China)

Abstract: **Objective** To underly the mechanism of the effect of *Nontypeable Haemophilus lipopeptide* P4 on the secretion of MUC5AC in airway epithelial cells. **Methods** Human airway epithelial cell line NCI-H292 was incubated with different concentration of P4. The concentrations of secreted MUC5AC and the expression of MUC5AC mRNA, the production of reactive oxygen species (ROS) and the enzymatic activity of tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) were tested. The cell membrane localization of p47^{phox} and P67^{phox} subunits of Duox1 and the phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) were analyzed. **Results** 30, 50 and 100 ng/mL of P4 increased the expression and secretion of MUC5AC after 24 h of incubation. In addition, P4 could induce the p47^{phox} and P67^{phox} translocation from cytosol to plasma membrane and upregulate the intracellular ROS level. Moreover, P4 could also promote the enzymatic activity of TACE and phosphorylation of EGFR. Pretreatment of the NADPH oxidase inhibitor significantly abrogated the ROS level, and ROS inhibitor could further decrease the enzymic activity of TACE, while silence of TACE could inhibit P4-induced EGFR phosphorylation. Furthermore, the EGFR inhibitor treatment could decrease the MUC5AC secretion. **Conclusion** P4 induces the expression and secretion of MUC5AC via Duox1/ROS/TACE/EGFR signaling pathway in NCI-H292 cells.

Key words: nontypeable haemophilus; P4; epithelial growth factor receptor; tumor necrosis factor- α converting enzyme; MUC5AC

收稿日期: 2017-03-23; 修回日期: 2017-06-12

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31500156); 湖南省卫生厅科研基金 (B2014-054)。

* 通讯作者, E-mail: lini1283@163.com.

不可分型流感嗜血杆菌 (*nontypeable Haemophilus, NTHi*) 是定植于鼻咽和后口咽上呼吸道的一种无荚膜革兰阴性多形杆菌, 当机体免疫力降低时, 寄居于儿童鼻咽部的 NTHi 可通过咽鼓管到达中耳, 导致急性中耳炎^[1]。而成人则可引起慢性支气管炎以及 COPD 急性发作^[2]。因此, 开展 NTHi 的致病机制研究, 对防治 NTHi 的相关疾病或并发症具有重要意义。NTHi 缺乏荚膜, 细菌的脂蛋白在 NTHi 的致病过程中发挥重要作用。P4 蛋白是几乎存在于所有流感嗜血杆菌菌株中 (含 NTHi) 高度保守的一种外膜蛋白。研究表明, P4 蛋白锚定于外膜上, 并在 NTHi 的致病过程中发挥重要作用^[3]。NTHi 感染后, 最显著的特征是诱导呼吸道上皮细胞过度分泌黏液。在气道黏液中, 黏蛋白 5AC (MUC5AC) 是主要的分泌型黏蛋白, 由杯状细胞分泌, 它主要存在于气道表面上皮细胞层, 在器官与主支气管中表达较多, 而在细支气管 (<1mm) 以及肺上皮细胞中无表达^[4]。黏蛋白作为固有免疫系统的一道非特异性屏障, 在维持气道功能等方面发挥重要作用^[5]。但在某些病理条件, 黏液的过度分泌可引起呼吸道管腔阻塞、引发严重的气流受限, 从而导致呼吸道反复感染^[6]。研究证实, NTHi 感染机体后可上调气道上皮细胞分泌 MUC5AC, 从而参与与支气管哮喘和 COPD 急性发作。但这些研究多局限于以 NTHi 为整体作为研究对象, 而对于 NTHi 菌体上的外膜蛋白在 MUC5AC 的分泌中发挥何种作用目前尚不明确。本研究旨在观察 NTHi 膜脂蛋白 P4 对 MUC5AC 分泌有无影响, 并初步探讨其机制。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料 NTHi 脂肽 P4 购自德国 Microcollections, MUC5AC ELISA 检测试剂盒购自 R&D Systems。鼠抗人表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体 (磷酸化及非磷酸化) 购自 Cell signaling。Apocynin、AG1478 购自 Calbiochem。二亚苯基碘 (DPI)、N-乙酰-半胱氨酸 (NAC)、2', 7'-二氯二氢荧光黄二乙酸酯 (H2DCFDA) 以及肿瘤坏死因子 α 转化酶 (TACE) 抑制剂 TAPI 购自 Sigma-Adrich。TACE 活性检测试剂盒购自 Anaspec。鼠抗人 p47^{phox} 及兔抗人 p67^{phox} 抗体, 鼠抗人 β -actin 抗体以及 HRP 标记兔抗鼠 IgG 抗体购自 Santa Cruz, Duox1 和 TACE siRNA 由广州 RiboBio Co.Ltd 合成。

1.2 细胞培养 人气道上皮细胞 NCI-H292 (ATCC, Manassas, VA) 采用含有 10% 胎牛血清, 1% 葡萄糖, 1% 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 基中, 置于含 5% CO₂ 的恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。

1.3 实时定量 PCR 采用 GE 公司提供的试剂盒提取细胞总 RNA (RNA Spin Mini RNAisolation kits, Buckinghamshire, UK), 随后获取 1 μ g RNA 将其逆转录为 cDNA。将 cDNA、SYBR Green Master Mix、引物等反应体系置于实时定量 PCR 仪 (Chromo4, Bio-Rad) 上对基因进行扩增。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 随后进入 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s。本文所用的引物为: 5'-CCT-TCGACGGACAGAGCTAC-3' (正向) 和 5'-TCTCGGT-GACAACACGAAAG -3' (反向); GAPDH: 5'-CAAT-GACCCCTTCATTGACC-3' (正向) 和 5'-GATCTCGCT CCTGGAAGATG-3'。根据靶基因与内参 GAPDH 的 Δ Ct 值计算 MUC5AC 的相对表达倍数。

1.4 ELISA 细胞处理结束后, 获取 NCI-H292 细胞测定其分泌至培养上清中的 MUC5AC 浓度, 其检测方法按照试剂盒提供的双抗体夹心法进行, 最后根据标准曲线计算 MUC5AC 的总量。

1.5 Western blot 按照参考文献提供的方法提取细胞膜蛋白^[7], 即将细胞重悬浮于含有蛋白酶抑制剂的 relaxation buffer 中 (100 mM KCl、3 mM NaCl、3.5 mM MgCl₂、1 mM EGTA、10 mM Hepes、0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)。经超声破碎后, 4 $^{\circ}$ C 600 \times g 离心 10 min 以去除细胞核即未破碎细胞。获取上清液后 4 $^{\circ}$ C 100,000 \times g 超速离心 30 min, 继续用 relaxation buffer 重悬浮沉淀并充分震荡后再次 4 $^{\circ}$ C 100,000 \times g 超速离心 30 min, 上清即为细胞膜成分。细胞总蛋白的提取按参考文献提供的方法进行^[8]。所获取的膜蛋白或总蛋白通过测定其浓度后, 获取 50 μ g 蛋白在 12% 浓度的分离胶中进行 SDS-PAGE, 电泳结束后将其转印至硝酸纤维素膜上, 并用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h, 最后分别加入相应一抗以及二抗, 化学发光、显影 (Amersham Bioscience, NJ, USA)。

1.6 分子探针检测 ROS 产生 NCI-H292 细胞处理完毕后, PBS 洗涤 1 次, 随后加入 H2DCFDA 染液 (5 μ mol/L) 室温下避光孵育 30min, 每隔 10min 轻微震荡 1 次, 使探针和细胞充分作用。孵育结束后 800 rpm 离心洗涤 3 次以去除未结合的残余的探针。

在荧光酶标仪 (Synergy HT, Bio-Tec) 下测定细胞内的荧光强度,并计算其荧光相对强度 (激发波长 485 nm,发射波长 530 nm)。

1.7 转染与 RNA 干扰 将约 10^5 个 NCI-H292 细胞接种于 6 孔板中过夜培养。随后按照厂家提供的实验步骤加入终浓度为 10nmol/L 的 Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) 试剂将 siRNA 转染至细胞中。本研究所用的 siRNA 按照参考文献提供的序列合成^[7],其中 Duox1 的干扰序列为: 5'-GGACUUAUCCUGGCUAGAGTT-3' (正义链) 和 5'-CUCUAGCCAGGAUAAGUCCTG-3' (反义链); TACE 的干扰序列为: 5'-GGUUUAAAGGCUAUGGAATT-3' (正义链) 和 5'-UCCAUAGCCUUUAAAACCTG-3' (反义链)。

1.8 TACE 活性分析 采用荧光共振能量转移法间接测定 TACE 的酶活性,其步骤按照试剂盒的方法进行。在该试剂盒中提供了一种底物 QXL™ 520/5-FAM, TACE 能特异性切割该底物,从而使荧光分子 5-FAM 无法被 QXL™ 520 淬灭,其荧光强度与 TACE 的活性成正比,通过测定器荧光强度间接测定 TACE 的活性 (激发波长 490nm,发射波长 520nm),结果以相对活性表示。

1.9 统计学方法 所有计量资料以均数±标准差表示,并使用 GraphPad Prizm 6.0 统计软件 (San Diego, CA) 分析数据,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 NTHi P4 对 NCI-H292 细胞分泌表达 MUC5AC 的影响 ELISA 结果显示,阳性对照组采用 5 ng/mL LPS 处理后, MUC5AC 分泌水平较高。而用不同浓度脂肽 P4 处理后,随着 P4 浓度的递增, MUC5AC 分泌水平逐渐增多,当 P4 浓度为 100 ng/mL 时, MUC5AC 高达 (439.65 ± 18.57) ng/mL (图 1A)。实时定量 PCR 也显示:不同浓度的 P4 脂肽处理细胞后,对 MUC5AC mRNA 的诱导情况有所不同,随着 P4 浓度的递增, MUC5AC mRNA 的表达水平逐渐增多 (图 1B)。

2.2 Duox1/ROS 参与 MUC5AC 分泌 图 2A 所示,30~50 ng/mL P4 处理后可显著诱导提高细胞内 ROS 水平 (图 2A),也可明显促进 NOX 酶体 (催化 ROS 产生的关键酶) 的 p47^{phox} 和 p67^{phox} 亚基从细胞

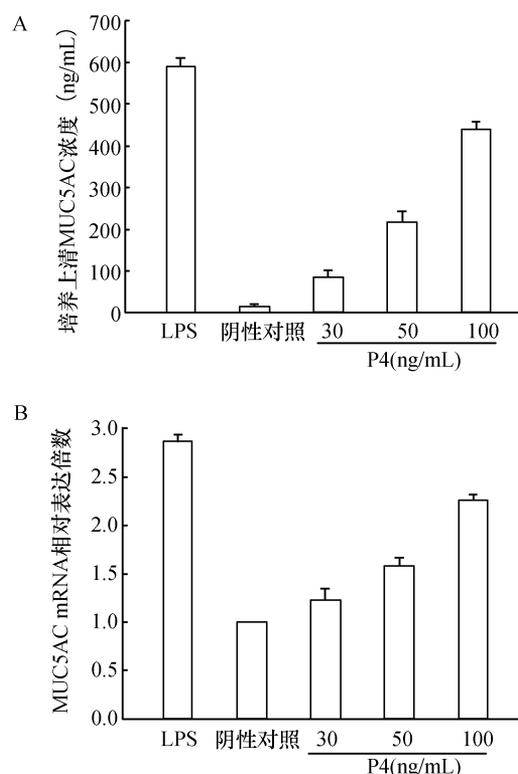


图 1 不同浓度 P4 诱导 NCI-H292 细胞表达分泌 MUC5AC 的影响

A: 细胞分泌 MUC5AC 蛋白; B: 细胞表达 mRNA。
与阴性对照组 (0 ng/mL) 相比, * $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 。

浆转位至细胞膜 (图 2B), 表明 P4 可激活 NOX。而采用 1mmol/L NOX 抑制剂 (抑制 NOX 酶体组装) Apocynin 处理后,可显著抑制 p47^{phox} 和 p67^{phox} 的转位以及 ROS 的产生 (图 2A、B)。而采用 siRNA 干扰 Duox1 (NOX 亚型) 表达后, NCI-H292 细胞中 ROS 的水平明显减少 (图 2C), 同时伴有 MUC5AC 的降低 (图 2D), 表明 P4 诱导 ROS 产生以及 MUC5AC 分泌与激活 NOX 家族中 Duox1 有关。此外,采用 ROS 抑制剂 NAC 预处理细胞后,发现 MUC5AC 的分泌显著降低 (图 2E), 表明 MUC5AC 分泌受 ROS 调控。

2.3 P4 经 ROS 增强 TACE 活性 用不同浓度 P4 处理 NCI-H292 细胞 30 min 后,结果显示,随着 P4 浓度的递增, TACE 的酶活性逐渐增高,当 P4 浓度为 100 ng/mL 时, TACE 的酶活性增加了 2.51 倍 (图 3A)。而采用 siRNA 干扰 Duox1 表达后, TACE 的酶活性明显降低 (图 3B)。此外,采用不同浓度 ROS 抑制剂 NAC 预处理后也得到了类似的结果 (图 3C)。而采用 TACE siRNA 处理后,可明显抑制 P4 诱导 MUC5AC 的分泌 (图 3D)。

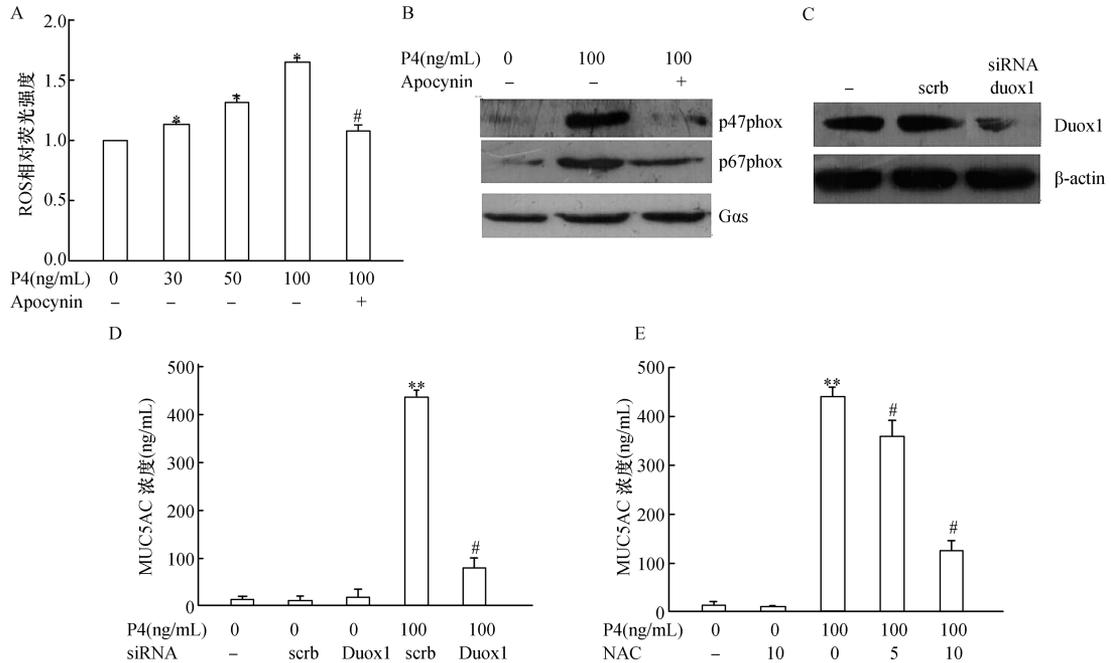


图2 Duox1/ROS 通路在介导 MUC5AC 分泌中的影响

A: Apocynin 对 P4 处理后 ROS 含量的影响。与 0 ng/mL P4 组相比, * : $P < 0.05$, 与 100 ng/mL P4 组相比, #: $P < 0.05$;
 B: P4 对 NCI-H292 细胞膜上 p47^{phox} 和 P67^{phox} 表达的影响,同时采用 Gα 蛋白(Gαs)作为内参;C:干扰 Duox1 表达后对 ROS 或 MUC5AC 分泌的影响,与对照 siRNA(scrambled siRNA, scrb)组相比, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$;Duoxi siRNA(D)或 ROS 抑制剂 NAC(E)对 MUC5AC 分泌的影响。与 0 ng/mL P4 组相比, ** : $P < 0.01$, 与 100 ng/mL P4 组相比, #: $P < 0.05$ 。

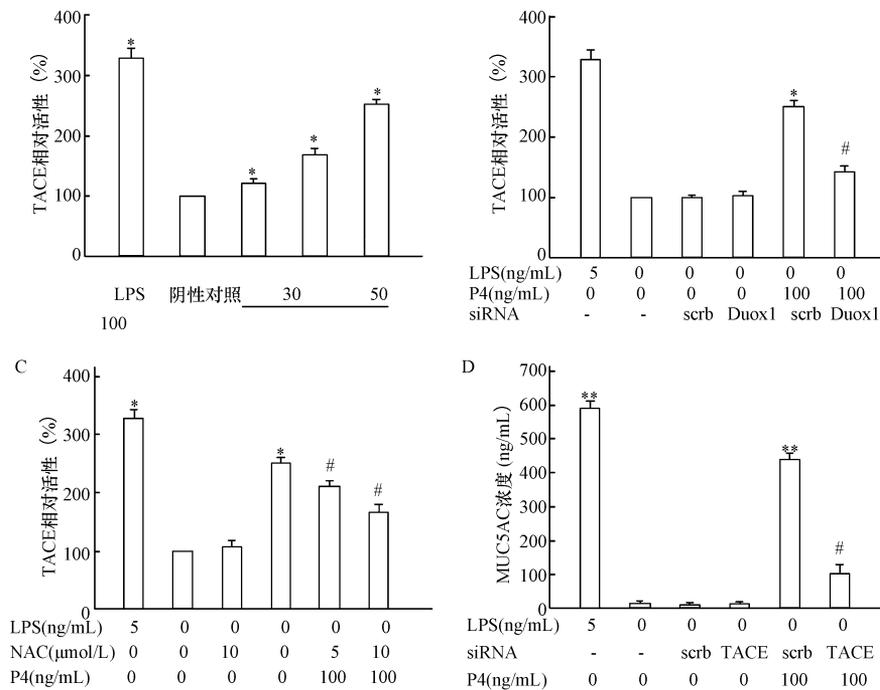


图3 P4 经 ROS/TACE 诱导 MUC5AC 分泌

A:不同浓度 P4 对细胞上清中 TACE 酶活性的影响。与阴性对照组(0 ng/mL)相比, * : $P < 0.05$;
 B: NCI-H292 细胞转染 Duox1 siRNA 后对 TACE 酶活性变化的影响。与 scrb 组相比, * : $P < 0.05$, 与 100 ng/mL P4+scrb 组相比, #: $P < 0.05$;
 C:不同浓度 ROS 抑制剂 NAC 对 TACE 的酶活性的影响,与阴性对照组(0 ng/mL)相比, * : $P < 0.05$;与 100 ng/mL P4 组相比, #: $P < 0.05$ 。
 D:转染 TACE siRNA 后对 TACE 酶活性变化的影响。与 scrb 组相比, ** : $P < 0.01$, 与 100 ng/mL P4+scrb 组相比, #: $P < 0.05$ 。

2.4 P4 诱导 MUC5AC 分泌与 EGFR 激活有关

不同浓度 P4 刺激鼻黏膜细胞 0~1 h, 细胞内磷酸化 EGFR 含量显著增多, 30~60 min 后达到峰值。而采用 10 μmol/L TACE 抑制剂 TAPI 处理后, EGFR 磷酸化水平明显受到抑制(图 4A), 而采用 5 μg/mL EGFR 中和抗体预处理细胞 30 min 后, 结果发现可显著下调 MUC5AC 的水平(图 4B), 此外, EGFR 抑制剂 AG-1478 处理(10 μmol/L)也得到了类似结果(图 4C), 以上结果表明 EGFR 的激活与 MUC5AC 分泌有关。

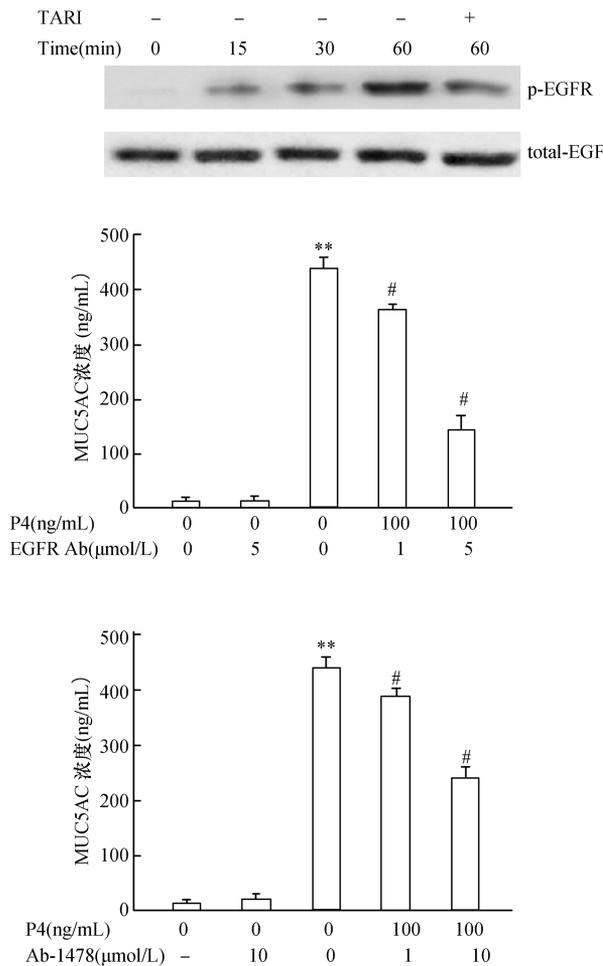


图 4 P4 诱导 MUC5AC 分泌与 EGFR 激活有关

A: P4 刺激对 EGFR 的磷酸化的影响; B: EGFR 中和抗体对细胞上清中 MUC5AC 含量的影响。与 0 ng/mL P4 组相比, **: $P < 0.01$, 与 100 ng/mL P4 组相比, #: $P < 0.05$ 。C: EGFR 抑制剂 AG-1478 对 MUC5AC 分泌的影响。与 0 ng/mL P4 组相比, **: $P < 0.01$, 与 100 ng/mL P4 组相比, #: $P < 0.05$ 。

3 讨 论

研究 NTHi 与宿主免疫系统相互作用, 直接采

用活菌感染细胞或提取其细胞膜成分作用于细胞更真实接近体内的实际情况, 而本研究采用 P4 脂肽代替, 其主要原因有两方面: 第一, NTHi 在细胞培养基内生长速度和细胞生长速度不一致, 难以控制感染复数。第二, 提取细胞膜成分时, 涉及到 NTHi 的培养和去垢剂使用等多个环节, 大大增加了内毒素污染的几率^[9]。而气道上皮细胞本身对内毒素非常敏感, 一旦膜脂蛋白中混有内毒素, 很难用常规手段去除^[9]。由于细菌膜脂蛋白发挥免疫刺激活性主要取决于其 N 末端的 Pam3-Cys 结构而非氨基酸序列, 而基于其 N 端通用结构人工合成的 P4 具有几乎所有膜脂蛋白的致炎活性^[10], 因此可作为 NTHi 膜脂蛋白的替代品而被本研究所采用。

调控 MUC5AC 分泌的分子众多, 但不同的刺激因素所激活的信号通路有所不同。EGFR 是一种跨膜型酪氨酸激酶, 分子量 170 KD。其胞外区可与多种配体结合, 随后可由单体转化为二聚体, 其胞内区具有激酶活性, 可诱导下游多种底物磷酸化。本研究也证实, NCI-H292 细胞在静息状态下, EGFR 磷酸化水平极低, 而给予 100 ng/mL P4 作用 30 min 后即可诱导 EGFR 磷酸化, 并持续至 2h 以上。随后采用 EGFR 激酶抑制剂 AG1478 处理, 或者采用 EGFR 特异性中和抗体封闭其受体表位后, MUC5AC 的产生均受到明显抑制。这说明 EGFR 信号通路参与了 P4 作用后 MUC5AC 的表达, 且该过程依赖于配体和 EGFR 的结合。

EGFR 与相应的配体(如 TGF-α)结合后, 可活化其胞内区域促进 MUC5AC 分泌。研究表明, 香烟提取物、革兰阴性细菌的 LPS 都是通过这种机制激活 EGFR 诱导黏蛋白 MUC5AC 表达上调^[11]。EGFR 常见的配体分子包括双向调节蛋白、表皮调节素、肝素结合生长因子和 TGF-α 等。在这一过程中, TACE 发挥了关键作用。TACE 属于金属水解蛋白家族的膜结合型整合素样金属蛋白酶, 它可促进前体 TGF-α 分子的成熟, 后者随后可与 EGFR 通过配体—受体相互作用而诱导 EGFR 磷酸化^[12]。本研究当中, 我们也发现 P4 作用 NCI-H292 细胞 30min 后即可增高 TACE 的酶活性, 而采用 TACE siRNA 处理后, 可明显抑制 P4 诱导 MUC5AC 的分泌, 此外, TACE 抑制剂 TAPI 处理后也能抑制 EGFR 的磷酸化, 这表明 P4 通过 TACE/EGFR 促进 MUC5AC 的分泌。

本研究证实, P4 处理后 30min 后, 即可显著上

调细胞内 ROS 的水平,采用 ROS 抑制剂处理后, TACE 活性明显降低,这表明 TACE 上游的激活有赖于 ROS 的产生。而 ROS 的产生又受 NOX 家族蛋白 Duox 的调控。Duox 由一个膜结合细胞色素 b558, gp91^{phox} 和 p22^{phox} 以及 4 个胞浆成分 p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} 和 Rac1/2 组成,其中 gp91^{phox} 是其催化核心部分,有研究表明, Duox1 在 LPS 诱导的 MUC5AC 分泌中发挥重要作用^[13]。本研究也发现, P4 处理 NCI-H292 细胞后可促进 Duox1 的装配,即 p47^{phox} 和 p67^{phox} 转位至细胞膜上, 与 gp91^{phox} 等而形成具有催化功能的酶复合体。而采用 siRNA 沉默其表达,或采用抑制 NOX 酶体组装的抑制剂 Apocynin 处理后,ROS 的分泌以及 MUC5AC 的产生明显减少,以上结果表明 P4 诱导 MUC5AC 的分泌受 Duox1/ROS/TACE 通路的调控。

总之,本研究证实 P4 可诱导气道上皮细胞分泌 MUC5AC。这表明 NTHi 感染后,可能通过促进 MUC5AC 的过度分泌而加重某些阻塞性疾病的病情。若气道内炎症状态持续存在,黏液合成进一步增多,随后又有利于病原菌定植,从而形成恶性循环,加速病情恶化^[14]。既然 P4 脂肽在 NTHi 中发挥重要作用,同时 P4 也具备了良好的免疫原性与抗原性,并且在疫苗的研制当中体现出了良好的效果^[15],从这种意义上讲,以 P4 为分子靶标的药物开发,有望为 NTHi 感染后的防控提供新的思路。

参考文献:

- [1] Collins S, Litt DJ, Flynn S, et al. Neonatal invasive Haemophilus influenzae disease in England and Wales: epidemiology, clinical characteristics, and outcome [J]. Clin Infect Dis, 2015, 60(12): 1786-1792.
- [2] Finney LJ, Ritchie A, Pollard E, et al. Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on Haemophilus influenzae [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014, 9: 1119-1132.
- [3] Su YC, Mukherjee O, Singh B, et al. Haemophilus influenzae P4 interacts with extracellular matrix proteins promoting adhesion and serum resistance [J]. J Infect Dis, 2016, 213(2): 314-323.
- [4] Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, et al. Muc5b is required for airway defence [J]. Nature, 2014, 505(7483): 412-416.
- [5] Plotkowski MC, Bajolet-Laudinat O, Puchelle E. Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa [J]. Eur Respir J, 1993, 6(6): 903-916.
- [6] Chillappagari S, Preuss J, Licht S, et al. Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction [J]. Respir Res, 2015, 16(1): 85.
- [7] Shao MX, Nadel JA. Dual oxidase 1-dependent MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(3): 767-772.
- [8] Dickinson JD, Alevy Y, Malvin NP, et al. IL13 activates autophagy to regulate secretion in airway epithelial cells [J]. Autophagy, 2016, 12(2): 397-409.
- [9] Magalhaes PO, Lopes AM, Mazzola PG, et al. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review [J]. J Pharm Pharm Sci, 2007, 10(3): 388-404.
- [10] Green BA, Baranyi E, Reilly TJ, et al. Certain site-directed, nonenzymatically active mutants of the Haemophilus influenzae P4 lipoprotein are able to elicit bactericidal antibodies [J]. Infect Immun, 2005, 73(7): 4454-4457.
- [11] Zhang Y, Zhu M, Yang Z, et al. The human Cathelicidin LL-37 induces MUC5AC mucin production by airway epithelial cells via TACE-TGF- α -EGFR pathway [J]. Exp Lung Res, 2014, 40(7): 333-342.
- [12] Lisi S, D'Amore M, Sisto M. ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity [J]. Immunol Lett, 2014, 162(1 Pt A): 159-169.
- [13] Li W, Yan F, Zhou H, et al. P. aeruginosa lipopolysaccharide-induced MUC5AC and CLCA3 expression is partly through Duox1 in vitro and in vivo [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63945.
- [14] Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, et al. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface [J]. Sci Rep, 2015, 5: 8163.
- [15] Hotomi M, Ikeda Y, Suzumoto M, et al. A recombinant P4 protein of Haemophilus influenzae induces specific immune responses biologically active against nasopharyngeal colonization in mice after intranasal immunization [J]. Vaccine, 2005, 23(10): 1294-1300.

(本文编辑:秦旭平)