

李 辉, 果双双, 孟春花, 等. 猪髓样细胞触发因子 1 CDR 区的克隆、表达及生物活性[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1100-1106.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.023

猪髓样细胞触发因子 1 CDR 区的克隆、表达及生物活性

李 辉¹, 果双双², 孟春花¹, 周亚文³, 施振旦¹

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018; 3. 青岛职业技术学院, 山东 青岛 266555)

摘要: 本研究旨在探讨重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白对猪肺泡巨噬细胞受到脂多糖(LPS)刺激后炎症因子表达状态的改变。首先克隆猪 *TREM-1* 基因 CDR 区, 然后构建重组载体并转入 BL21(DE3) 中, IPTG 诱导表达、纯化并复性猪 *TREM-1* 基因 CDR 蛋白。将不同浓度复性的重组蛋白添加到 1 000 ng/ml LPS 处理的猪肺泡巨噬细胞培养液中, 然后通过荧光定量 PCR 方法分别测定主要促炎症因子(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-16、IL-18 及 TNF α) 的表达规律。结果显示, 重组猪 *TREM-1* CDR 区蛋白可显著降低由 LPS 诱导的主要促炎症因子的表达。表明重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白具有抑制炎症反应的生物学活性。

关键词: 猪; 髓样细胞触发因子 1; 肺泡巨噬细胞; 促炎症因子

中图分类号: S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1100-07

Cloning and expression of the CDR area from swine triggering receptor expressed on myeloid cells 1 and its bioactivity

LI Hui¹, GUO Shuang-shuang², MENG Chun-hua¹, ZHOU Ya-wen³, SHI Zhen-dan¹

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 3. Qingdao Polytechnical College, Qingdao 266555, China)

Abstract: In the present study, the changes of proinflammatory cytokines expression were investigated in lipopolysaccharides (LPS)-stimulated porcine alveolar macrophages by recombinant *TREM-1* CDR protein. Swine *TREM-1* CDR area was cloned and inserted into prokaryotic expression vector. After IPTG induction of BL21(DE3) competent cell, the recombinant swine *TREM-1* CDR protein was purified. Serial concentrations of recombinant protein were supplemented into the culture medium of 1 000 ng/ml LPS treated porcine alveolar macrophages. The expressions of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16, IL-18 and TNF α) were analyzed using QRT-PCR. Results showed that proinflammatory cytokines were down-regulated by the recombinant swine *TREM-1* CDR protein at the concentration of 1 000 ng/ml. The results suggest that recombinant swine *TREM-1* CDR protein is bioactive in inhibiting inflammatory response.

Key words: swine; triggering receptor expressed on myeloid cells; alveolar macrophage; proinflammatory cytokine

收稿日期: 2016-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31402080); 江苏省自然科学基金项目(BK20151365)

作者简介: 李 辉(1982-), 男, 山东惠民人, 博士, 副研究员, 主要从事动物繁殖研究。(Tel) 025-84390772; (E-mail) lhlydk@126.com.

通讯作者: 施振旦, (E-mail) zdshi@scau.edu.cn

髓样细胞触发受体 1 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 1, *TREM-1*) 是 2000 年发现的一种新型免疫球蛋白超家族(IgSF)成员, 分子量(含糖基)约为 30 000, 主要分布在外周血中性粒细

胞和单核细胞亚群等天然免疫反应的效应细胞上,还选择性地表达于肺泡等其他吞噬细胞表面^[1]。研究表明,TREM-1受体在炎症反应中起着重要作用^[2-3],适度表达有助于加速机体对病原体的清除,然而过度激活则使TREM-1与其下游细胞因子形成一个正反馈的自分泌调节回路,促使炎症反应增强放大,导致过度的炎症反应^[4-7],最终导致机体细胞损伤和多脏器功能衰竭,严重时危及动物的生命。因此TREM-1被认为是整个炎症反应中的关键触发节点^[8]。

降低TREM-1基因的表达,部分阻断其信号通路,可改变炎症的发生规律,抑制炎症过度反应的发生,提高动物的生存率^[9-10]。例如,通过RNAi的方式,抑制体内TREM-1的表达可以下调TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-8等促炎症因子的分泌,对炎症反应具有抑制作用^[11-12]。而通过对小鼠注射重组TREM-1蛋白可以实现同样的作用。例如,通过注射TREM-1的胞外域合成肽段LP17可保护内毒素血症的小鼠免于死亡,而对于大鼠来说,则可以显著改善血流力学状态,减轻中毒症状,并且能调节TNF- α 、IL-1 β 等促炎症因子的释放,提高大鼠的生存率^[13-14]。给LPS致休克小鼠注射人TREM-1-Ig(Fc)融合蛋白,可以显著降低外周血中TNF- α 和IL-1 β 的浓度,对内毒素休克小鼠有显著的保护作用^[15]。

对TREM-1的胞外域晶体结构的研究发现其胞外域呈V形,与抗体、T细胞受体等免疫球蛋白结构域具有同源性,在分子表面有3个抗体等效互补决定区(Antibody-equivalent complementarily determining region,CDR),即蛋白发挥作用的关键活性区域,且3个CDR区在不同的物种中具有较高的保守性^[16-18]。据统计,当前在规模化养猪场中,猪链球菌、副猪嗜血杆菌和猪传染性胸膜炎是最主要的几种细菌性传染病,由于含有血清型,再加上抗生素滥用导致细菌耐药性的产生,使这些疾病的防治十分困难^[19]。因此,本研究利用重组TREM-1基因CDR区,从阻断TREM-1信号通路方面进行研究,以为猪细菌性疾病的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

载体和菌株:pMD18-T载体购自TaKaRa, *Esche-*

richia coli DH5 α , BL21(DE3)感受态菌株购自南京鼎国生物科技公司,pRSET-A原核表达载体由本实验室保存。

试剂和酶类:限制性内切酶Hind III、Xho I、高保真DNA聚合酶,DNA Marker、M-MLV反转录酶、T4 DNA连接酶为TaKaRa产品。阴离子交换层析填料DEAE-650M购自东曹生物科技公司。所用的LB培养基、氨苄青霉素、IPTG及其他试剂均为常规试剂。RPMI-1640、FBS均为Gibco产品,LPS、双抗购自Sigma。荧光定量SYBR Green Master Mix购自Roche公司,细胞总RNA提取试剂盒、质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自天根生物科技公司。引物合成和序列测定在上海生工生物工程有限公司进行。

1.2 方法

1.2.1 猪TREM-1基因CDR区的序列扩增 猪TREM-1基因的3个CDR区均坐落于该基因的第2外显子中,因此,根据GenBank中收录的猪TREM-1基因的序列设计引物,以猪基因组DNA作为模板,PCR扩增猪TREM-1基因的CDR区,引物设计时分别在5'端引入Hind III、Xho I 2个酶切位点,以方便后面的载体构建。PCR产物经琼脂糖凝胶回收纯化后,TA克隆入pMD18-T载体中,转化DH5 α 感受态菌株,挑取阳性克隆并测序。测序正确后命名为pMD18-CDR并提取质粒备用。

1.2.2 猪TREM-1基因CDR区原核表达载体的构建 分别用限制性内切酶Hind III/Xho I双酶切pMD18-CDR和pRSET-A原核表达载体,琼脂糖凝胶回收CDR片段和pRSET-A载体。将两片段按10:1的比例混匀后,按说明书要求加入T4 DNA连接酶及缓冲液,混匀后16℃水浴连接过夜。连接完成后转化DH5 α 感受态菌株,挑取阳性克隆,扩大培养后,提取质粒,经酶切和测序鉴定正确后,命名为pRSET-CDR,提取质粒备用。

1.2.3 重组猪TREM-1基因CDR区的表达纯化

将构建的pRSET-CDR表达载体转化BL21(DE3)宿主菌后涂板,并于37℃培养箱中倒置培养。待长出单菌落后,挑取阳性菌落,接种于5 ml LB培养基中,在37℃、200 r/min的摇床中培养。待细菌OD₆₀₀值达到0.6时,用终浓度为0.1 mmol/L的IPTG诱导5 h,表达重组蛋白,并通过SDS-PAGE分析重组蛋白的表达情况和分子量大小。

确定表达后,进行大量蛋白制备。扩大培养后,4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min,收集细菌沉淀。收集的菌体加入含有 100.0 mmol/L NaH₂PO₄、10.0 mmol/L Tris-HCl 的缓冲液后,用涡旋仪重悬直至无明显的细菌团块,然后反复冻融,直至菌体破裂释放出 DNA 使溶液变粘稠后,在冰浴条件下超声波破碎 5 s,间隔 5 s,功率 500 W,破碎次数 60 次。待液体不再粘稠且呈半透明状后在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集的沉淀即为包涵体蛋白。然后将获得的包涵体蛋白经过包涵体洗涤液(100.0 mmol/L NaH₂PO₄、10.0 mmol/L Tris-HCl、4 mol/L 尿素)重悬后,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,收集沉淀。最终将包涵体沉淀用溶解液(100.0 mmol/L NaH₂PO₄、10.0 mmol/L Tris-HCl、8 mol/L 尿素)彻底溶解,并离心除去不溶杂质后备用。

经软件预测,所表达的重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白的等电点为 6 左右,因此采用阴离子交换树脂 DEAE-650M 进行纯化。纯化过程为:经过 2 个柱体积平衡液(10.0 mmol/L Tris-HCl,pH 为 8.0,

8 mol/L 尿素)柱平衡-上样-5 个柱体积洗涤缓冲液(10.0 mmol/L Tris-HCl,200.0 mmol/L NaCl,pH 为 8.0,8 mol/L 尿素)洗涤-洗涤缓冲液洗脱(10 mmol/L Tris-HCl,1 mol/L NaCl,pH 为 8.0,8 mol/L 尿素)后获得纯化蛋白。纯化蛋白经过复性后用 0.22 μm 细菌滤器过滤除菌,调整至合适浓度备用。

1.2.4 猪肺泡巨噬细胞的分离培养及功能检测

猪肺泡巨噬细胞的分离参照文献[20]进行。复苏后的猪肺泡巨噬细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度为每孔 1.5×10⁶,每孔滴入 2 ml 含有 10% FBS、1% 双抗的 RPMI-1640,然后放入 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞贴壁后,更换分别含有 0 ng/ml、1 000 ng/ml 和 2 000 ng/ml 脂多糖(LPS)的新 RPMI-1640 培养液,共 3 个重复。培养 12 h 后,收集细胞提取总 RNA,反转录获得 cDNA。首先采用普通 PCR 技术对猪肺泡巨噬细胞中各相关促炎症因子(IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-16、IL-18 及 TNFα)的表达进行定性检测。进而利用 QRT-PCR 技术检测 LPS 刺激后上述各炎症因子的变化规律,引物见表 1。

表 1 本试验中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| 基因名称 | 引物序列(5'→3') | 退火温度(℃) | 产物长度(bp) | 登录号 |
|---------|--|---------|----------|----------------|
| CDR | F:CTCGAGGCTGCCACTGAACTACC R:AAGCTT CTA GTAGAACAGGATGA | 60 | 335 | KC688694.1 |
| IL-1β | F:AGGGACATGGAGAAGCGATTT R:TTCTGCTTGAGAGGTGCTGATG | 58 | 108 | XM_005655197 |
| IL-2 | F:CAGTGTTFAGTAGAAGAACTC R:TGACAAAAGGTAATCCATTGTT | 58 | 212 | JN851821.1 |
| IL-4 | F:ACATCTACAGACACCACAC R:TTTAGCCCTTCCAAGAAGTC | 58 | 136 | NM_214123 |
| IL-6 | F:TGTGAGAAGTATGAGAAGTG R:ACTCTTCTGGAGGTAGTC | 58 | 184 | NM_001252429.1 |
| IL-8 | F:TTCCTGCTTTCTGCAGCTCTCT R:GGGTGAAAGGCTGTGGAATG | 58 | 102 | NM_213867.1 |
| IL-10 | F:GCCTTGTCAGAGATGATCCAGTT R:TTCTCCCCAGGGAGTTCAC | 58 | 101 | NM_214041.1 |
| IL-12 | F:GAAGCAGACAGATGTGGAG R:GGAATCACTTTACAGGAAGC | 58 | 143 | NM_214013 |
| IL-18 | F:AAAATGTCTACTCTCTCCTG R:ACTCAAAGTATCTTATCATC | 59 | 142 | XM_005667327.1 |
| TNFα | F:GCTGCCCTTCCACCAACG R:CACTGAGTCGATCATCCTTCTCC | 59 | 198 | NM_214022.1 |
| β-actin | R:CTTCTGGGCATGGAGTCC F:GGCCGATGATCTTGATCTTC | 58 | 201 | XM_003357928.2 |

下划线为引入的酶切位点;F:*Xho* I; R:*Hind* III;方框中为终止密码子。

1.2.5 重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白的生物活性测定 细胞复苏及接种方式参照方法 1.2.4 所述。待细胞贴壁后,更换含有 1 000 ng/ml LPS,并添加重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白至终浓度分别为 0 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml 和 1 μ g/ml,3 个重复。处理 12 h 后,收集细胞,提取总 RNA,反转录获得 cDNA。利用 QRT-PCR 检测猪巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-16、IL-18 及 TNF α 等炎症相关因子的表达,引物见表 1。

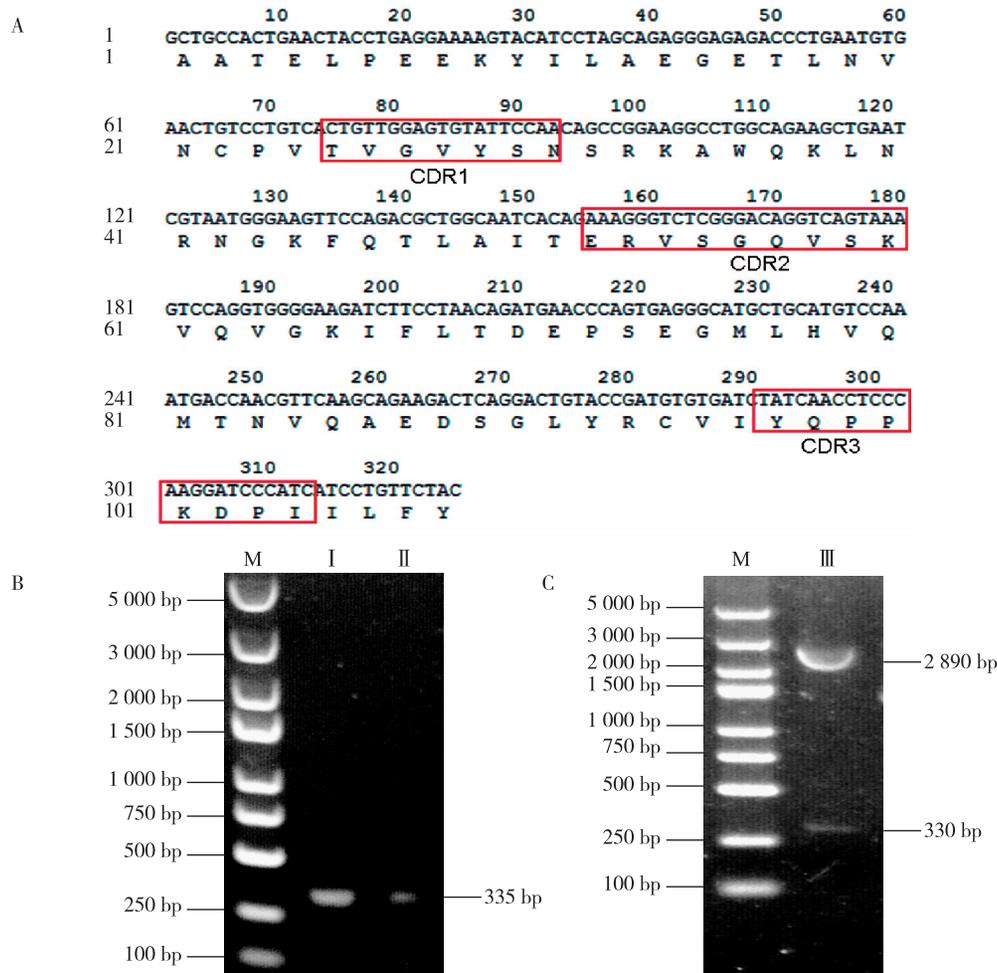
1.3 数据分析

运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目的基因的相对表达量,用内参 β -actin 进行标准化处理。促炎症因子不同处理间采用统计软件 SPSS 进行单因子方差分析,并用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 猪 *TREM-1* 基因 CDR 区序列的扩增及表达载体的构建

CDR 区核酸序列及所编码蛋白如图 1A 所示。以猪基因组 DNA 为模板扩增出猪 *TREM-1* 基因 CDR 区序列,经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可以清晰地看到 1 条长度为 335 bp 的条带(图 1B),其中 CDR 区长 324 bp,酶切位点长 11 bp。经测序后,与 GenBank 中收录的序列比对后发现同源为 100%,并且包括引入的酶切位点和终止密码子(TAG),因此可以用于表达载体的构建。利用 DNAMAN 分析发现,所克隆的 CDR 区序列编码的蛋白质分子量约为 17 000。经过酶切和连接,将扩增得到的 CDR 区



A 为 *TREM-1* 基因 CDR 区全序列、编码蛋白及 3 个 CDR 区所在位置;B 中条带 I 和 II 均为 *TREM-1* 基因 CDR 区序列;C 中条带 III 为 pRSET-CDR。M:DL5000。

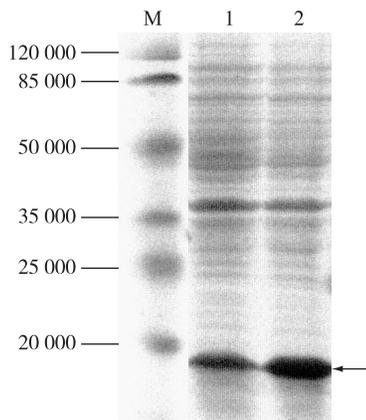
图 1 猪 *TREM-1* CDR 区序列的克隆及重组质粒的酶切

Fig.1 The cloning of swine *TREM-1* CDR and double enzymatic digestion of the recombinant plasmid pRSET-CDR

片段接入 pRSET-A 载体中, 构建成 pRSET-CDR。对阳性重组质粒 pRSET-CDR 进行双酶切验证, 双酶切后可切出大小分别约为 330 bp (CDR 区) 和 2 890 bp (pRSET-A 载体) 2 条条带 (图 1C), 测序结果也进一步确认 CDR 区序列已插入到设计位点, 并且碱基序列无突变产生。证明所构建的表达载体是正确的, 可用于重组蛋白的表达。

2.2 重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白的表达纯化

表达载体 pRSET-CDR 转化表达菌株 BL21 (DE3), 挑取阳性菌落, 扩大培养至 OD_{600} 为 0.6, 后经终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 诱导, 离心收集菌体, 裂解细菌后进行 SDS-PAGE 分析, 从电泳图片可发现重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白成功表达 (图 2A), 且分子量符合预期。后经扩大培养, 获得更多重组蛋白以备后续试验。获得的蛋白包涵体溶解于 8 mol/L 尿素中, 经过离子交换纯化, 获得较高纯度的重组蛋白。



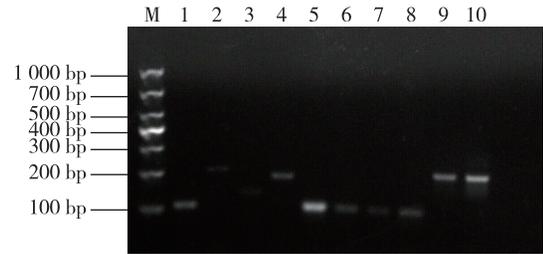
M: 标准分子量; 条带 1、2 均为重组 *TREM-1* CDR 区蛋白。

图 2 重组猪 *TREM-1* CDR 区蛋白的表达

Fig.2 The expression of recombinant swine *TREM-1* CDR protein

2.3 猪肺泡巨噬细胞的功能鉴定

普通 PCR 结果显示, IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-16、IL-18 及 TNF α 等炎症相关因子均可在细胞中表达 (图 3)。而 QRT-PCR 检测结果显示, 经过不同浓度 (0 ng/ml、1 000 ng/ml 和 2 000 ng/ml) LPS 刺激后, 除 IL-2 和 IL-18 外, 其余各因子的表达量均上调, 并且呈现出与 LPS 浓度相关的剂量效应。但是, LPS 浓度为 1 000 ng/ml 和 2 000 ng/ml 对基因表达的影响差异不显著 (图 4)。



1~10 分别为 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-18、TNF α 和 β -actin; M: DNA marker。

图 3 猪肺泡巨噬细胞中促炎症因子的表达

Fig.3 The expression of proinflammatory cytokines in porcine alveolar macrophages

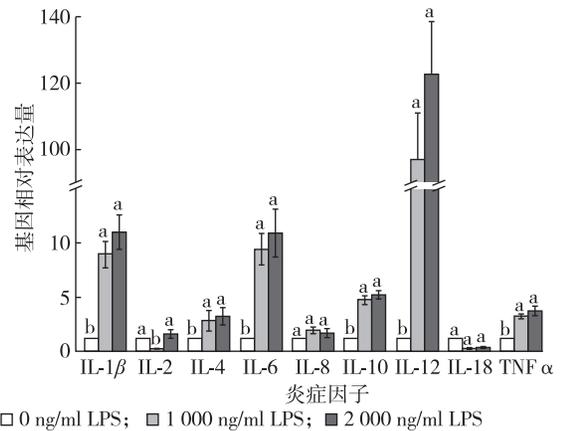


图 4 LPS 刺激猪肺泡巨噬细胞后各主要促炎症因子的表达

Fig.4 The expression patterns of proinflammatory cytokines in porcine alveolar macrophages after LPS stimulation

2.4 重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白的生物活性测定

采用浓度为 1 000 ng/ml 的 LPS 对猪肺泡巨噬细胞进行刺激, 同时分别添加不同浓度 (0 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml 和 1 μ g/ml) 的重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白。培养结束后, 通过对各炎症因子的表达检测 (图 5) 发现, IL-1 β 在添加重组蛋白前后无明显表达差异。而 TNF α 的表达在终浓度为 100 ng/ml 的重组蛋白处理时, 表现出突然上调, 而后随着浓度的进一步升高, 其表达水平下调至本底水平, 可能为检测误差所致, 因此我们判定重组蛋白对 TNF α 的表达也无显著调节作用。然而本研究发现重组猪 *TREM-1* CDR 区蛋白对 LPS 诱导的 IL-1 β 和 TNF α 无显著抑制作用。我们推测, 可能是体内环境差异所致。动物活体实验时, 由于动物机体具

有完整的免疫调控机制,可以全方位动员机体的免疫系统,因此可以发挥出较好的活性。体外分离培养的肺泡巨噬细胞虽然具有某些促炎症因子的分泌和应答 LPS 刺激的功能,毕竟与体内环境无可比拟。值得注意的是,IL-2、IL-6 和 IL-10 在低浓度重组蛋白作用下,促炎症因子表达量上调,而随着重组蛋白浓度的增加,表达量迅速下降(图 5)。此结果证明重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 区蛋白具有抑制 LPS 诱导的炎症因子表达的功能。

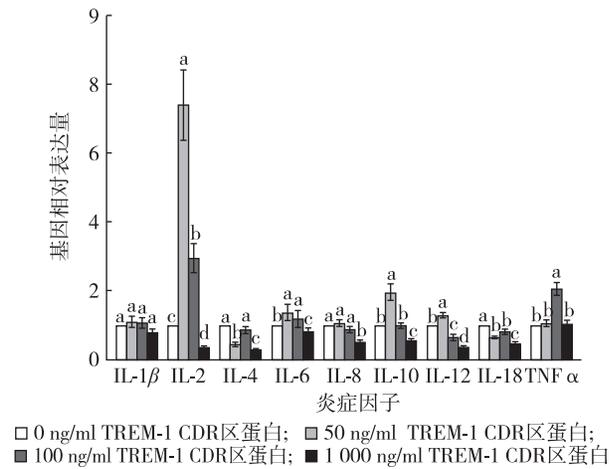


图 5 不同浓度重组猪 *TREM-1* CDR 区蛋白对 LPS 刺激的猪肺泡巨噬细胞中主要促炎症因子表达的影响

Fig.5 The effect of different concentrations of recombinant swine *TREM-1* CDR protein on the expression of pro-inflammatory cytokines in LPS stimulated porcine alveolar macrophages

3 讨论

本研究克隆并表达了猪 *TREM-1* 基因长度为 324 bp 的 CDR 区域,重组蛋白的分子量约为 17 000。在猪肺泡巨噬细胞上的研究结果证明,重组猪 *TREM-1* 基因 CDR 蛋白可以显著降低 ILs 等因子的表达。然而本研究发现,重组猪 *TREM-1* CDR 区蛋白对 LPS 诱导的 TNF α 的表达无明显抑制作用。我们推测,可能是体内外环境差异所致。在动物体内试验中,具有完整的免疫调控机制,可以全方位动员机体的免疫系统,因此可以发挥出较好的活性。我们分离出的无增殖能力的肺泡巨噬细胞,虽然具有某些促炎症因子的分泌和应答 LPS 刺激的功能,毕竟与体内环境无可比拟。本试验结果初步证明了重组猪 *TREM-1* CDR 蛋白具有抗炎症反应

的能力,在实际生产中具有较可观的应用前景。

动物机体受到细菌及其产物如脂多糖、肽聚糖等病原相关模式分子(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)感染后,可通过机体细胞表面的各种模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)将免疫细胞激活而产生炎症反应,释放多种促炎症因子^[21-22]。适度的炎症反应,有助于机体免疫系统的动员,加速病原体的清除。当 *TREM-1* 过度表达,将导致炎症反应过度,损伤动物机体甚至危及生命,降低 *TREM-1* 的表达或阻断 *TREM-1* 的信号通路,减轻炎症反应。

目前已公认的 *TREM-1* 信号通路为:*TREM-1* 在其配体的作用下活化,使跨膜区赖氨酸残基与 DAP12 接头蛋白的天冬氨酸残基偶联,进而活化 DAP12 的胞质区的酪氨酸活化基序磷酸化,并与脾酪氨酸激酶(SyK)的 SH2 结构域结合而使信号向下游传导^[2]。SyK 能使大麻素受体和生长因子受体结合蛋白磷酸化,从而激活磷脂酰肌醇 3 激酶(P13K)以及胞外信号调节激酶信号,引起细胞内 Ca²⁺ 动员,同时激活 T 细胞核因子、AP-1 和 NF- κ B 等转录因子,最终导致细胞促炎症因子的表达^[8,23]。在 *TREM-1* 的信号通路中,其配体在触发信号传导的过程中起着至关重要的作用。然而迄今为止其天然配体仍然未知。近期研究发现可溶 *TREM-1* (Soluble *TREM-1*, s*TREM-1*) 可与血小板结合,并且这种结合可被人工合成的 LP17 肽段阻断^[24]。s*TREM-1* 与 *TREM-1* 有相同的胞外域(也有人认为 s*TREM-1* 是 *TREM-1* 中的胞外域脱落形成^[25])。因此,也有研究指出 *TREM-1* 的配体可能是血小板表面或者血液中的某种成分^[26]。结合本研究及前期的研究,我们可以推测,LP17、*TREM-1*-Ig(Fc) 以及重组 *TREM-1* CDR 蛋白都具有相似的作用,即:作为 *TREM-1* 的拮抗剂,竞争结合体内的配体,起到削弱 *TREM-1* 信号的作用。总之,上述的研究结果为我们提供了新的视角,为畜牧业实际生产中对细菌性疾病的防治提供了新的靶点。

参考文献:

- [1] BOUCHON A, DIETRICH J, COLONNA M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by *TREM-1*, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes [J]. *J Immunol*, 2000, 164 (10):4991-4995.
- [2] COLONNA M, FACCHETTI F. *TREM-1* (triggering receptor ex-

- pressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, 187 (Suppl 2):397-401.
- [3] COLONNA M. TREMs in the immune system and beyond [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3 (6):445-453.
- [4] BLEHARSKI J, KIESSLER V, BUONSANTI C, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response [J]. *J Immunol*, 2003, 170 (7):3812-3818.
- [5] NETEA M G, AZAM T, FERWERDA G, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 80 (6):1454-1461.
- [6] RADSAK M P, SALIH H R, RAMMENSEE H G, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (8):4956-4963.
- [7] WANG Y S, LI X J, ZHAO W O. TREM-1 is a positive regulator of TNF-alpha and IL-8 production in U937 foam cells [J]. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2012, 12 (2):94-101.
- [8] DOWER K, ELLIS D K, SARAF K, et al. Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (5):3520-3534.
- [9] WANG F, LIU S, WU S, et al. Blocking TREM-1 signaling prolongs survival of mice with pseudomonas aeruginosa induced sepsis [J]. *Cellular Immunology*, 2012, 272 (2):251-258.
- [10] ZANZINGER K, SCHELLACK C, NAUSCH N, et al. Regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression on mouse inflammatory monocytes [J]. *Immunology*, 2009, 128 (2):185-195.
- [11] GIBOT S, MASSIN F, MARCOU M, et al. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice [J]. *European Journal of Immunology*, 2007, 37 (2):456-466.
- [12] 闵安杰. RNA 干扰沉默 TREM-1 对脆弱类杆菌脂多糖炎症反应的抑制作用及其机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2007.
- [13] GIBOT S. TREM-1 expression during major abdominal surgery: comment on the Gonzalez-Roldan et al paper [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12 (29):4767.
- [14] GIBOT S. The therapeutic potential of TREM-1 modulation in the treatment of sepsis and beyond [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006, 7 (5):438-442.
- [15] 王海滨. 人源性 TREM-1-Ig 融合蛋白对内毒素休克小鼠的保护作用[D]. 上海:第二军医大学, 2006.
- [16] RADAEV S, KATTAH M, ROSTRO B, et al. Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1[J]. *Structure*, 2003, 11 (12):1527-1535.
- [17] KELKER M S, FOSS T R, PETI W, et al. Crystal structure of human triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 342 (4):1237-1248.
- [18] KELKER M S, DEBLER E W, WILSON I A. Crystal structure of mouse triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.76 Å [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 344 (5):1175-1181.
- [19] 何启盖. 当前养猪业中主要细菌病的研究现状 [J]. *现代畜牧兽医*, 2010(3):42-43.
- [20] 孟春花, 曹少先, 苏磊, 等. 猪肺泡巨噬细胞的分离、纯化和冷冻保存研究 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(11):198-201.
- [21] UENISHI H, SHINKAI H, MOROZUMI T, et al. Polymorphisms in pattern recognition receptors and their relationship to infectious disease susceptibility in pigs [J]. *BMC Proceedings*, 2011, 5 (Suppl 4):27.
- [22] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124 (4):783-801.
- [23] ORMSBY T, SCHLECKER E, FERDIN J, et al. Btk is a positive regulator in the TREM-1/DAP12 signaling pathway [J]. *Blood*, 2011, 118 (4):936-945.
- [24] HUMPHREY M B, DAWS M R, SPUSTA S C, et al. TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, 21 (2):237-245.
- [25] GOMEZ-PINA V, SOARES-SCHANOSKI A, RODRIGUEZ-ROJAS A, et al. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes [J]. *J Immunol*, 2007, 179 (6):4065-4073.
- [26] HASELMAYER P, GROSSE-HOVEST L, VON LANDENBERG P, et al. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation [J]. *Blood*, 2007, 110 (3):1029-1035.

(责任编辑:陈海霞)