

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00892

## CCR5 膜外一、二襻模拟肽的淘选及其对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的作用

郑慧敏,陈青青,弓雪莲,郭葆玉\*

第二军医大学药学院生化药学教研室,上海 200433

**[摘要]** **目的:**筛选与 CC 趋化因子受体 5(CC chemokine receptor 5,CCR5)第一、二膜外襻特异结合的模拟肽,并将其应用在实验性自身免疫性脑脊髓炎的小鼠模型(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE),来观察使用模拟肽后 EAE 模型小鼠的治疗效果。**方法:**用噬菌体随机 7 肽库筛选与 CCR5 特异结合的多肽序列,用 ELISA 鉴定其结合活性并进行 DNA 测序分析;接着合成与其氨基酸序列一致的模拟肽,腹腔内注射至 EAE 小鼠。取小鼠脊髓组织,通过 H-E 染色,观察模拟肽组和 EAE 对照组小鼠脊髓组织病理学改变。**结果:**随机挑出 20 个噬菌体克隆进行鉴定,ELISA 分析显示其中 18 个克隆与 CCR5 有较强的结合活性,将其阳性噬菌体克隆进行测序,从中得到重复率极高的 4 段小分子肽,它们分别为 STFTTTTL(SL)、TPITQLL (TL)、SLPLPKP (SP)、QTSSAAL(QL)。对照组 EAE 小鼠的平均临床评分为 3 分,模拟肽组 EAE 小鼠的平均临床评分为 1 分。H-E 染色后,经病理分析 EAE 组小鼠的脊髓内有大量的炎症细胞浸润,白质脱髓鞘改变明显。而模拟肽组小鼠有较少的炎症细胞浸润,且没有白质脱髓鞘改变。4 段短肽分别具有抑制、延迟发生 EAE 的作用,其平均抑制率为 43% (EAE 组为 83%,两者比较有统计学差异, $P<0.05$ )。**结论:**筛选的 CCR5 模拟肽具有对 EAE 明显的抑制作用,提示 CCR5 可能在 EAE 的发病进程中发挥着重要的作用。

**[关键词]** CCR5;模拟肽;实验性自身免疫性脑脊髓炎

**[中图分类号]** R 593.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0892-06

### Screening for simulation peptide specifically binding to the first and the second extra-cellular domain of CCR5 and its therapeutic effect on mice with autoimmune encephalomyelitis

ZHENG Hui-min, CHEN Qing-qing, GONG Xue-lian, GUO Bao-yu\*

Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To screen for simulation peptide binding specifically to the first and the second extra-cellular domain of CC chemokine receptor 5 (CCR5), and to observe their therapeutic effect on mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods:** Phage display peptide library was used to screen for peptide sequence binding specifically to CCR5; ELISA was used to identify its binding activity and analyze its DNA sequence. The simulation peptide was synthesized and was injected into abdominal cavity of the EAE mice. Spinal cord tissues were obtained and the pathologic changes were studied by H-E staining in EAE control group and simulation peptide group. **Results:** Twenty phage clones were randomly chosen for identification and ELISA showed that there were eighteen clones had a strong binding activity with CCR5. The positive clones were sequenced and four peptides of high frequency were obtained: STFTTTTL, TPIPQLL, SLPLPKP, and QTSSAAL. Mean clinical score of mice in the EAE model group was 3 and that of the simulation peptide group was 1. H-E staining found that the spinal cord tissues in EAE model group had great number of inflammatory cells and evident demyelination changes; the simulation peptide group had less inflammatory cells and no demyelination changes. The four short peptides had an effect of suppressing and delaying the development of EAE, with the average inhibition rate being 43% ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The screened CCR5 simulation peptide has evident inhibitory effect against EAE, indicating that CCR5 may play an important role in the course of multiple sclerosis (MS).

**[KEY WORDS]** CCR5; simulation peptide; experimental autoimmune encephalomyelitis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8): 892-897]

**[收稿日期]** 2009-01-09 **[接受日期]** 2009-04-01

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30572200/c030207040). Supported by National Natural Science Foundation of China (30572200/c030207040).

**[作者简介]** 郑慧敏, 硕士生, 药师, E-mail: zhm1216@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871330, E-mail: byguo1632000@yahoo.com.cn

CC趋化因子受体5(CC chemokine receptor 5, CCR5)是G蛋白偶联受体,常位于炎症细胞的表面,为7次跨膜的蛋白,和相应的配体结合后经偶联GTP结合蛋白而发挥生物学效应。CCR5基因位于人染色体3p21.3上,全长1.9 kb,编码352个氨基酸,呈 $\alpha$ 螺旋。研究证明阻断CCR5可以抑制HIV感染宿主细胞,CCR5是HIV进入巨噬细胞的辅助受体。因此通过降低或缺失CCR5的作用从而抑制HIV的感染将是非常有效的方法。近几年来,越来越多的人群调查和实验研究结果表明,CCR5- $\Delta$ 32缺失的个体拥有正常的免疫和炎症反应,并且对HIV-1的感染表现出显著的抵御能力<sup>[1]</sup>。此外,以CCR5为靶点的HIV受体拮抗剂近年来备受关注,这些拮抗剂因与CCR5的特异性结合作用,从而抑制经由CCR5的HIV感染。

小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型是公认的研究多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的实验动物模型。早在1944年Ferraro总结一系列的实验结果指出,EAE和人的脱髓鞘有相似之处。大规模临床观察发现,在MS患者复发期的活动性病变部位中,CCR5及其受体在MS的病程中可能起重要作用。更进一步的研究表明,MS患者的巨噬细胞主要表达CCR2和CCR5,而实质中活化的T细胞和胶质细胞主要表达CXC趋化因子受体3(CXCR3)和CCR5。由此可见,CCR5、CCR2等多种趋化因子受体参与了炎症细胞的招募和介导<sup>[2-3]</sup>。此外,国外有报道<sup>[4]</sup>称CCR5- $\Delta$ 32突变人群的MS发病率降低或发病率延迟。因此,深入研究CCR5在MS中确切的作用机制显得尤为重要。

噬菌体展示肽库技术是一种用于筛选功能性多肽的生物技术。利用肽库技术可在不依赖结构信息的情况下,从大量可能的短肽组合中筛选得到功能性短肽,直接通过亲和筛选,从随机肽库中获得与靶蛋白结合的噬菌体克隆,是探寻高亲和力生物活性配体分子的有力工具。本实验利用噬菌体展示肽库技术,从噬菌体7肽库中,以亲和筛选方法筛选高度亲和CCR5第一和第二膜外羧氨基酸序列的特异性结合的短肽,以其作为治疗MS的导向分子,成功建立了合适的EAE动物模型,探讨了CCR5模拟肽对EAE的疗效。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及试剂 Ph. D. -7<sup>TM</sup>(噬菌体表面展

示肽库试剂盒)购自BioLabs公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗M13噬菌体抗体及其底物2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)[2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]储液为Pharmacia公司产品。免疫抗原MOG35-55(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)由美联(西安)生物科技有限公司合成,经质谱及HPLC色谱分析,纯度>95%,完全弗氏佐剂(CFA, Sigma),与百日咳毒素(PT)均购自上海生物制品研究所。CCR5第一、二膜外羧氨基酸序列合成模拟肽由上海吉尔生化有限公司合成(分别为ST11、TT11)。

1.2 实验动物及分组 雌性C57BL/6小鼠60只,4~6周龄,体质量11~15 g(第二军医大学实验动物中心提供)。按照随机对照的原则将小鼠分为4组: EAE组10只,正常对照组10只,CCR5第一羧模拟肽组30只(模拟肽SP组10只,模拟肽QL组10只,模拟肽SL组10只),CCR5第二羧模拟肽10只(模拟肽TL组)。

1.3 亲和淘选 参照Ph. D. -7<sup>TM</sup>噬菌体展示肽库使用手册进行。筛选过程中各步骤均无菌操作。用pH 8.6的NaHCO<sub>3</sub>包被液将ST11、TT11分别稀释至浓度为100  $\mu$ g/ml,加入96微孔板中,150  $\mu$ l/孔,4 $^{\circ}$ C轻微震荡,孵育过夜。倒掉每板中的包被液,板倒置在干净的纸巾上用力拍甩以除去残余溶液。每孔加满封阻液,4 $^{\circ}$ C作用至少1 h。除去封阻液。再用TBST[Tris-HCl缓冲液+0.1%(V/V) Tween-20]缓冲液快速洗板6次。从原始库中取出10  $\mu$ l与100  $\mu$ l TBST混合后,分别加入ST11、TT11包被的微孔内,100  $\mu$ l/孔,共12孔,室温温和摇动60 min。倾倒除去未结合的噬菌体,用TBST缓冲液洗板10次,加入非特异性缓冲液0.2 mol/L甘氨酸(glycine, pH 2.2),1 mg/ml牛血清白蛋白(BSA)分离已结合的分子:温和摇动20 min,收集洗脱液,然后加入180  $\mu$ l 1 mol/L Tris-HCl(pH 9.1)中和上述洗脱液<sup>[5-6]</sup>。取1  $\mu$ l测定洗脱物的滴度。剩余洗脱物加入20 ml ER2738培养物中(菌体应处于对数前期),37 $^{\circ}$ C剧烈摇动培养4.5 h。将扩增培养物经聚乙二醇(PEG)/NaCl浓缩纯化后进行噬菌体滴度测定,并进行下一轮淘选。如此进行3轮淘选。

1.4 噬菌体滴度测定 将待测噬菌体进行系列稀释,取10  $\mu$ l噬菌体与200  $\mu$ l对数生长期的ER2738菌液混匀,室温放置5 min;将上述混合的噬菌体-菌

液与 3 ml 顶层琼脂混匀,并加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside, IPTG)和  $\beta$ -半乳糖苷酶的显色底物(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside, X-gal)混匀,立即铺到 37℃ 预热的 LB 平板上,室温放置约 5 min,凝固后放入 37℃ 培养箱中培养过夜,计数蓝色噬菌斑数,乘以稀释倍数,即得每 10  $\mu$ l 原液的噬菌体滴度。

1.5 噬菌体的浓缩纯化 培养物 4℃、 $1.1 \times 10^6 \times g$  离心 10 min。上清液转入另一离心管中再 4℃ 离心(转速、时间同上)。将上清的上部 80% 转入一新鲜离心管,加入 1/6 体积的 PEG/NaCl。让噬菌体 4℃ 沉淀过夜。4℃、 $1.1 \times 10^6 \times g$  离心,PEG 沉淀 15 min。倒掉上清液,再短暂 4℃、 $1.1 \times 10^6 \times g$  离心,吸去残留上清液。沉淀物重悬于 1 ml TBS 中,4℃、 $1.1 \times 10^6 \times g$  离心 5 min 使残余细胞沉淀。上清转入另一新鲜微量离心管中,用 1/6 体积的 PEG/NaCl 再沉淀。冰上孵育 60 min。4℃、 $1.1 \times 10^6 \times g$  离心 10 min,弃上清,再短暂 4℃、 $1.1 \times 10^6 \times g$  离心,吸去残余上清。沉淀物重悬于 200  $\mu$ l TBS,0.02%  $\text{NaN}_3$  中。4℃、 $1.1 \times 10^6 \times g$  离心 1 min,沉淀任何残余的不溶物,上清即为纯化的噬菌体。第三轮筛选后随机选取 20 个克隆进行如上纯化,用于 ELISA 测定<sup>[7-8]</sup>。

1.6 ELISA 法鉴定特异短肽的结合活性 ST11、TT11 分别作为包被抗原;取 100  $\mu$ l/ml 包被聚乙烯反应板,4℃ 孵育过夜。加入浓缩纯化的 1~20 号噬菌体(TBST 1:1 000 稀释),37℃ 反应 1 h, TBST 洗板 6 次,加入 HRP 标记的抗 M13 抗体(在封阻液中 1:5 000 稀释),37℃ 反应 1 h, TBST 洗板 6 次,加入显色底物液 ABTS- $\text{H}_2\text{O}_2$ ,37℃、10 min,加入终止液,测 405 nm 光密度。

1.7 噬菌体单链 DNA 的提取和序列测定 参照噬菌体展示肽库说明书中的方法提取噬菌体单链 DNA, DNA 序列测定由上海基康生物技术有限公司完成,根据插入的 DNA 序列得到与 ST11、TT11 结合的 7 肽氨基酸序列。

1.8 EAE 的诱导 用 0.01 mol/L 的 PBS 将 MOG35-55 稀释成 100  $\mu$ l/25  $\mu$ l,再用 CFA 将结核分枝杆菌稀释成 300  $\mu$ l/50  $\mu$ l,加入 PBS 25  $\mu$ l。将三者用注射器抽打至油包水状态,制成诱导 EAE 的抗原乳剂。正常对照组用 PBS 作为对照。3 组小鼠分别腹股沟皮下注射相应抗原,100  $\mu$ l/只,记免疫当

天为第 0 天,于第 0、2 天给予小鼠腹腔注射百日咳毒素 200  $\mu$ l/只<sup>[9]</sup>。

1.9 体质量监测及神经功能评分 自免疫当天开始,每日称体质量,观察小鼠的摄食情况,并进行神经功能评分。采用通用的 0~5 级评分法:0 级,不发病;1 级,小鼠尾部张力降低或麻痹;2 级,小鼠尾部麻痹,后肢无力;3 级,小鼠后肢瘫痪;4 级,小鼠四肢瘫痪,人为翻身不能复位;5 级,濒死状态或发病后死亡。

1.10 模拟肽注射液的制备及给予 EAE 模型小鼠腹腔注射 噬菌体表面结合 CCR5 多肽氨基酸序列经上海吉尔生化有限公司合成后,用 PBS 将其稀释成 2.5 mg/ml,自 EAE 组小鼠免疫后第 3 天,各模拟肽组分别注射 SP、QL、SL、TL,1 次/d,每次 200  $\mu$ l。

1.11 组织取材与病理学检查 在 EAE 小鼠发病的高峰期,腹腔注射 2% 的戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉所有小鼠,在无菌条件下开胸腔,暴露心脏,经左心室灌注 PBS 至肝脏变白,然后改用 4% 多聚甲醛灌注固定,随后立即取出脑和脊髓浸入甲醛中固定。常规石蜡包埋后制成 5  $\mu$ m 厚的切片,H-E 染色,并在光镜下观察炎性细胞浸润及脱髓鞘改变<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

2.1 亲和筛选与 CCR5 特异结合的噬菌体 经过三轮筛选,噬菌体投入产出比逐渐升高,说明与 CCR5 亲和的噬菌体富集明显(表 1)。从表 1 中可以看出第二轮筛选产出率明显提高,CCR5 膜外第一襟,第二轮比第一轮高  $2.02 \times 10^2$  倍,CCR5 膜外第二襟,第二轮比第一轮高  $1.71 \times 10^2$  倍。

2.2 结合噬菌体的 ELISA 鉴定 从第三轮筛选出的噬菌体中随机挑选 20 个克隆,扩增后进行 ELISA 检测,结果表明有 18 个克隆均为阳性克隆,说明 CCR5 模拟肽和噬菌体有很好的亲和力,筛选使与 CCR5 特异性结合的噬菌体得到了有效富集。如图 1A、1B 所示。

2.3 结合克隆的序列分析 分别测定所得到的 18 个与 CCR5 具亲和力的阳性噬菌体克隆的氨基酸序列,其中第一膜外襟中 SLPLPKP、STFTTTL、QTSSAAL 多肽序列分别占了 6、6、5 个,第二膜外襟中全部都是 TPITQLL 多肽序列。表明特异性克隆得到了富集。将得到的多肽序列通过 GenBank 进行在线分析,未发现与已知的蛋白质具有同源性,可能这 3

种多肽是通过模拟 CC 趋化因子的表位而与细胞膜表面的 CCR5 结合, 如 RANTES (regulated on activation

normal T cell expressed and secreted)、MIP (macrophage inflammatory protein)1 $\alpha$ 、MIP 1 $\beta$  等。

表 1 第一、二膜外褶筛选后噬菌体克隆的富集率

Tab 1 Recovery rates of the first and second extracellular domain phage clones during panning

Round	The first extracellular domain			The second extracellular domain		
	Selected phages/ TU(Input)	Eluted phages/ TU(Output)	Ratio	Selected phages/ TU(Input)	Eluted phages/ TU(Output)	Ratio
1	$2.0 \times 10^{11}$	$3.4 \times 10^3$	$1.70 \times 10^{-8}$	$2.0 \times 10^{11}$	$3.8 \times 10^3$	$1.90 \times 10^{-8}$
2	$2.0 \times 10^{11}$	$6.9 \times 10^5$	$3.45 \times 10^{-6}$	$2.0 \times 10^{11}$	$6.5 \times 10^5$	$3.25 \times 10^{-6}$
3	$2.0 \times 10^{11}$	$2.8 \times 10^8$	$1.40 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{11}$	$2.5 \times 10^8$	$1.25 \times 10^{-3}$

TU: Transducing unit

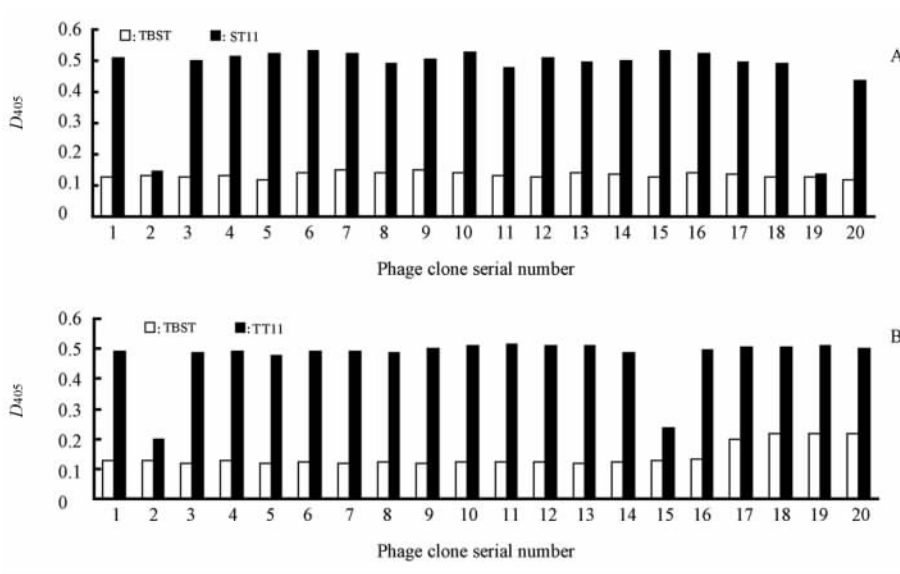


图 1 第一(A)、二膜外褶(B)的结合克隆经 ELISA 鉴定的 20 个克隆的光密度值

Fig 1 Identification of the first(A) and second (B) extracellular domain binding phage clones after three rounds of selection by ELISA

TBST: Tris-HCl+0.1% Tween-20; ST11, TT11: Simulation peptide

2.4 EAE 组小鼠及 CCR5 模拟肽组小鼠的发病情况 C57BL/6 小鼠诱导 EAE 后, EAE 组小鼠自免疫 13 d 后开始发病, 约在第 25 天达到发病高峰, 发病率为 83%, 表现为食欲下降, 体质量减轻, 活动量减少, 精神萎靡。同时, EAE 组小鼠中枢神经系统受损症状明显, 表现为尾部无力拖垂, 步履蹒跚, 后肢瘫痪, 行动困难。小鼠以前肢向前爬行时, 剑突以后部分着地, 双后肢拖拉在后, 足面朝上, 病情进一步发展可表现为四肢瘫痪。EAE 组小鼠最高临床评分为 4 分, 临床评分的平均分为 3 分。且在发病过程中, 其体质量普遍下降, 下降的程度与临床评分具有一致性。与 EAE 小鼠相比 CCR5 模拟肽组小鼠的状况较好, 在 EAE 组小鼠发病时, CCR5 模拟肽组小鼠在给药期间与正常对照组相比, 无明显变

化, 表现为食欲良好, 活动正常, 体质量正常增加。仅在给药第 10 天后表现为尾巴拖垂, 临床评分的平均分为 1 分。见图 2。

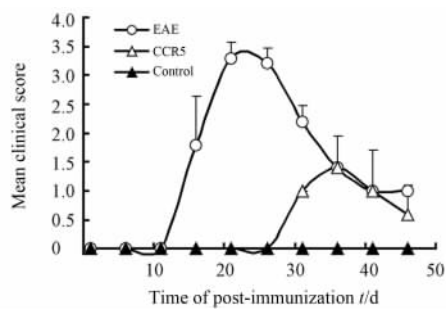


图 2 3 组小鼠的神经功能评分

Fig 2 Clinical nerve function score of three groups

EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; CCR5: CC chemokine receptor 5.  $n = 10, \bar{x} \pm s$

2.5 病理学检查 H-E染色结果显示,正常对照组小鼠脊髓未见明显异常(图3A)。EAE组小鼠脊髓的实质中有大量的炎症细胞浸润,以淋巴细胞和中性粒细胞为主,病变主要集中在脊髓腰膨大的白质区,在白质区可见大小不等的髓鞘脱失区,而且髓鞘

脱失区程度与EAE小鼠临床症状的严重程度直接相关(图3B、3E)。而给予CCR5模拟肽组小鼠脊髓的实质中仅有少量的炎症细胞浸润,且没有髓鞘脱失(图3C、3D、3F)。正常对照组小鼠脊髓未见明显异常(图3A)。

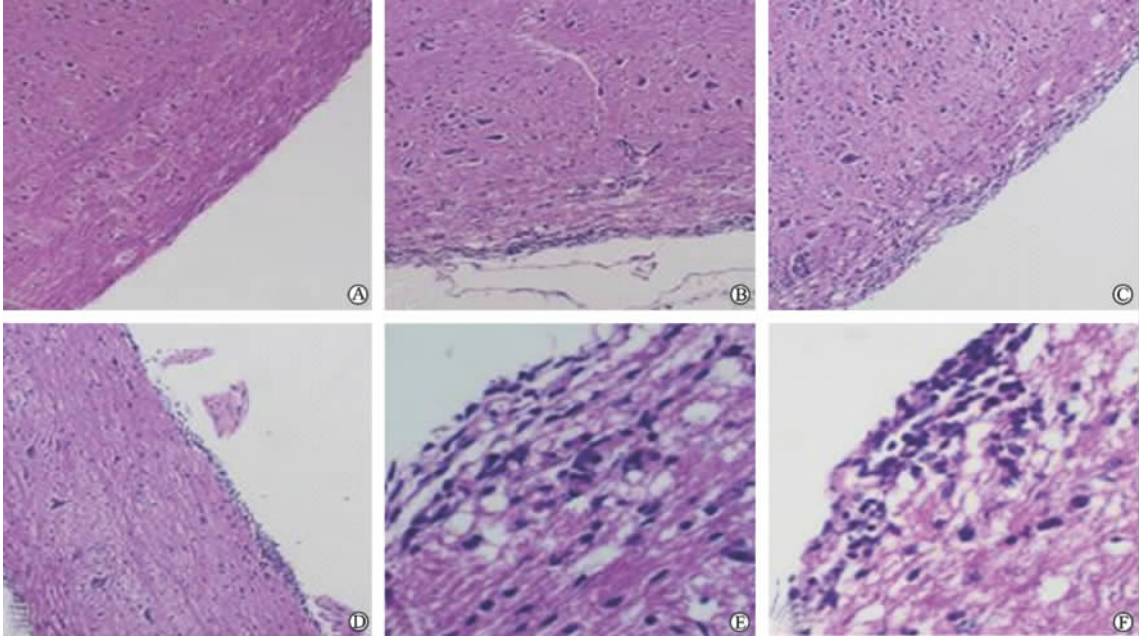


图3 小鼠脊髓组织的病理检查结果

Fig 3 Pathological analysis of spinal cord tissues of C57BL/6 mice from different groups(H-E)  
A: Control group; B, E: EAE group; C, D, F: CCR5 group. Original magnification:  $\times 100$ (A-D);  $\times 400$ (E, F)

2.6 4段肽对小鼠发病率的影响 EAE组小鼠的发病率为83%,约第20天时达发病高峰。而CCR5模拟肽组小鼠平均发病率为43%,并且在注射模拟肽后约第40天才达到发病高峰,可见明显延迟了EAE小鼠的发病,说明CCR5组小鼠发病率明显低于EAE组小鼠发病率( $P < 0.05$ ,表2)。

### 3 讨论

CCR5是趋化因子受体超家族的重要成员之一,CCR5胞外有4个部分:游离的N端,第一、二、三外襻。趋化因子RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 等主要是与CCR5的胞外部分结合,而且这种结合抑制了经由CCR5的HIV-1感染,因此我们的筛选也是以CCR5的膜外部分为靶点<sup>[1]</sup>。在研究HIV-1感染人体的过程时发现,R5嗜性的HIV-1主要是通过其膜蛋白gp120与细胞表面的辅助受体CCR5的N端和膜外第二襻(extracellular loop 2, ECL2)相互作用,从而介导HIV-1进入细胞内,因而我们也就以筛选到能与CCR5的N端和第二、三外襻结合的阳性噬菌体作为目标<sup>[11-12]</sup>。小鼠CCR5膜外第一、二襻分别编码14和28个氨基酸,我们将其分别合成多肽用于噬菌体展示库模拟肽的筛选。

表2 各组小鼠发病率的比较

Tab 2 Comparison of attack rate in each group

Group	n	Mass m/g	Clinical score	Attack rate(%)
EAE	10	14.25 $\pm$ 0.30 $\Delta$	3.1 $\pm$ 0.99 $\Delta$	83 $\Delta$
SP	10	17.36 $\pm$ 0.37*	1.5 $\pm$ 0.85*	45*
ST	10	17.41 $\pm$ 0.52*	1.6 $\pm$ 0.54*	46*
QL	10	17.28 $\pm$ 0.46*	1.4 $\pm$ 0.37*	43*
TL	10	17.85 $\pm$ 0.65*	1.2 $\pm$ 0.65*	41*
Control	10	19.92 $\pm$ 0.76	0	0

$\Delta P < 0.05$  vs control group; \*  $P < 0.05$  vs EAE group

本文通过筛选 CCR5 膜外第一、二羧阳性结合的噬菌体克隆,经过测序纯化后的 4 段亲和短肽,将其应用于小鼠 EAE 模型,从而研究其对 EAE 的抑制作用。实验结果表明,4 段短肽分别具有抑制、延缓发生 EAE 的作用。其平均抑制率为 43%,效果显著( $P < 0.05$ )。以此可以说明与 CCR5 竞争结合的模拟肽在 EAE 的发病过程中具有非常重要的作用。

本研究的结果提示:7 个氨基酸残基的小肽也能起到拮抗 CCR5 膜外羧的作用。其机制可能是:(1)拮抗了膜外第一、二羧的功能;(2)结合后使膜外第一、二羧的构象发生变化,从而抑制了 EAE 的作用。

有关趋化因子和其受体对 MS 的作用机制和作用效果有待进一步的评价,本研究探讨的趋化因子的亲和短肽对 EAE 的作用效果显著,从而为 MS 的治疗提供了一条新的途径。

#### [参考文献]

- [1] Wang F Y, Zhang T Y, Luo J X, He G A, Gu Q L, Xiao F. Selection of CC chemokine receptor 5-binding peptide from a phage display peptide library[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70:2035-2041.
- [2] Sørensen T L, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik V A, et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103:807-815.
- [3] Stern J N, Illés Z, Reddy J, Keskin D B, Fridkis-Hareli M, Kuchroo V K, et al. Peptide 15-mers of defined sequence that substitute for random amino acid copolymers in amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:1620-1625.
- [4] Otaegui D, Ruíz-Martínez J, Olaskoaga J, Emparanza J I, López de Munain A. Influence of CCR5-Δ32 genotype in Spanish population with multiple sclerosis[J]. *Neurogenetics*, 2007, 8:201-205.
- [5] Kurakin A, Wu S, Bredesen D E. Target-assisted iterative screening of phage surface display cDNA libraries[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 264:47-60.
- [6] Zang L, Shi L, Guo J, Pan Q, Wu W, Pan X, et al. Screening and identification of a peptide specifically targeted to NCI-H1299 from a phage display peptide library[J]. *Cancer Lett*, 2009, 281:64-70.
- [7] Vyroubalova E C, Hartley O, Mermod N, Fisch I. Identification of peptide ligands to the chemokine receptor CCR5 and their maturation by gene shuffling[J]. *Mol Immunol*, 2006, 43:1573-1578.
- [8] Zhao S W, Shen P P, Zhou Y, Wei Y, Xin X B, Hua Z C. Selecting peptide ligands of microcystin-LR from phage displayed random libraries[J]. *Environ Int*, 2005, 31:535-541.
- [9] Hofstetter H H, Karulin A Y, Forsthuber T G, Ott P A, Tary-Lehmann M, Lehmann P V. The cytokine signature of MOG-specific CD4 cells in the EAE of C57BL/6 mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 170:105-114.
- [10] 王菊蓉, 张 冉, 王 栋, 邱 磊, 郭满盈, 弓雪莲, 等. C57BL/6 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27:1089-1091.
- Wang J R, Zhang R, Wang D, Qiu L, Guo M Y, Gong X L, et al. Establishment of experimental autoimmune encephalomyelitis model in C57BL/6 mice[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27:1089-1091.
- [11] Fox R J, Kivisäkk P, Lee J C, Tucky B, Lucchinetti C, Rudick R A, et al. Chemokine receptors as biomarkers in multiple sclerosis[J]. *Dis Markers*, 2006, 22:227-233.
- [12] Eltayeb S, Berg A L, Lassmann H, Wallström E, Nilsson M, Olsson T, et al. Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: insight into mechanisms of MOG-induced EAE[J]. *J Neuroinflammation*, 2007, 4:14.

[本文编辑] 尹 茶