

以重组 TACE 胞外功能域从噬菌体随机肽库中筛选 TACE 的抑制肽 Screening of TACE Peptide Inhibitors from a Phage Display Random 15-Peptide Library by Recombinant TACE Ectodomain

黄 巍, 李凌波, 韩 玲, 张 慧, 杨渝珍*

HUANG Wei, LI Ling-Bo, HAN Ling, ZHANG Hui and YANG Yu-Zhen*

华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系, 武汉 430030

Department of Biochemistry & Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

摘 要 肿瘤坏死因子转换酶(TACE)是加工裂解 TNF- α 前体的关键酶,参与了许多炎症的发生发展过程。为通过肽库筛选得到 TACE 的抑制肽,首先制备筛选靶分子,用 RT-PCR 从人外周血单核细胞中分别扩增出 TACE 的催化区(T800)和整个胞外区(T1300),然后分别克隆至 pET-28a 和 pET-28c 中,转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达出带有 His-tag 的目的蛋白,两者均为包涵体,变性复性后过 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱得到纯度达 90% 的重组蛋白。以纯化的重组 T800 和 T1300 分别筛选噬菌体展示随机 15 肽库,对筛选克隆进行 ELISA 检测、竞争抑制实验和序列分析。从两个独立的筛选过程中得到一个相同的阳性克隆序列“TRWL VYFSRPYL VAT”,固相 Fmoc 法合成该短肽,观察其在 LPS 诱导人单核细胞产生 sTNF- α 中的作用。结果表明,筛选到的短肽可显著抑制 TACE 的活性,减少 TNF- α 的分泌,抑制率可达 60.3%,为抗炎小分子药物的设计和改造提供线索和依据。

关键词 肿瘤坏死因子转换酶, 胞外功能域, 噬菌体展示, 抑制肽

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0030-06

Abstract Tumour necrosis factor- α converting enzyme(TACE) is the major protease responsible for processing proTNF from membrane-anchored precursor into secreted TNF- α . It was validated that TACE is involved in many diseases such as arthritis, multiple sclerosis and Alzheimers, therefore it represents a novel and significant target for therapeutic intervention in a variety of inflammatory and neuroimmunological diseases. To obtain the recombinant TACE ectodomain and use it as a selective molecule for the screening of TACE peptide inhibitors, the cDNA coded for catalytic domain(T800) and full-length ectodomain(T1300) of TACE were amplified by RT-PCR, the expression plasmid was constructed by inserting T800/T1300 into plasmid pET-28a/pET-28c and transformed into *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE and Western blotting analysis revealed that T800/T1300 was highly expressed in the form of inclusion body being induced by IPTG. After Ni^{2+} -NTA resin affinity chromatography, the purity of the recombinant T800/T1300 protein was more than 90%. T800 and T1300 protein were used in the screening of TACE-binding peptides from the phage display random 15-peptide library. After four rounds of biopanning, the positive phage clones were analyzed by ELISA, competitive inhibition assay and DNA sequencing. A common amino acid sequence-TRWL VYFSRPYL VAT was found and synthesized. The synthetic peptide was shown to bind to TACE and inhibit the TNF- α release from LPS-stimulated human pe-

Received: July 16, 2004; Accepted: October 12, 2004.

This work was supported by Grant from The National Sciences Foundation of China(No.30070722).

* Corresponding author. Tel: 86-27-83657513; E-mail: yangyz@mails.tjmu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30070722)。

ripheral blood mononuclear cells(PBMC) up to 60.3% . FACS analysis revealed that the peptide mediated the accumulation of TNF- α on LPS-stimulated PBMC surface. These results demonstrate that the TACE-binding peptide is an effective antagonist of TACE and the deduced motif might be applied to molecular design of anti-inflammation drugs.

Key words TACE, ectodomain, phage display, peptide inhibitor

体内的 TNF- α 以跨膜型和分泌型两种状态存在,分泌型 TNF- α (sTNF- α)是由跨膜型 TNF- α (mTNF- α)在蛋白水解酶的作用下裂解释放出来的。研究表明,加工水解 mTNF- α 的关键酶为 TNF- α 前体转换酶(tumour necrosis factor- α converting enzyme, TACE),该酶可在特定位点(Ala76-Val77)水解 TNF- α 前体即 mTNF- α ,释放出可溶性的 sTNF- α 。TACE 对 sTNF- α 的产生处于主导地位,通过基因敲除技术敲除 TACE 的小鼠 T 细胞释放 sTNF- α 的能力下降 80% ~ 90%^[1]。sTNF- α 是介导炎症反应的主要细胞因子,因此,在考虑临床上如何减缓和控制 sTNF- α 所引起的毒副作用时,可选择 TACE 作为一个新的研究靶标。

TACE 属于解整合素金属蛋白酶 ADAM(A Disintegrin And Metalloprotease)家族一员,是一种在体内广泛分布的跨膜蛋白,其开放阅读框编码 824 个氨基酸,可分为信号序列、前肽区、金属蛋白酶区、解整合素区、EGF 样区、跨膜区和胞浆尾等几个部分^[1,2]。成熟的 TACE 胞外功能结构域只包括金属蛋白酶催化结构域、解整合素结构域和 EGF 样结构域几个部分,其前肽区在 TACE 的成熟过程中被 furin 等前蛋白转换酶去除^[3]。

我们先前已对 TACE 抑制剂作了一些研究,发现中药制剂热毒清、反义核酸和氧肟酸类化合物可分别在转录、翻译及翻译后的水平上抑制 TACE,减少 sTNF- α 的产生和杀伤效应^[4]。在此基础上,进一步借助噬菌体肽库技术进行 TACE 肽类抑制剂的研究。本文首先克隆表达 TACE 的胞外功能结构域,经分离纯化后的重组蛋白作为噬菌体肽库的筛选分子,根据筛选出来的阳性克隆序列合成短肽并观察其是否能抑制 TACE 的活性。

1 材料和方法

1.1 材料

TrizolRNA 分离试剂盒为 GIBCO/BRL 公司产品, Titan RT-PCR 试剂盒为 Roche 公司产品, Sephaglas 凝胶条带回收纯化试剂盒购自 Pharmacia 公司, Ni²⁺-NTA 亲和层析柱为上海申能博彩生物公司产品。原核表达载体 pET-28a/c、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)为本室保存。抗 TACE 金属蛋白酶区多克隆

抗体由美国 Milla 教授惠赠。噬菌体 15 肽库(随机肽展示于丝状噬菌体 fd-tet 的 pIII 蛋白)、K91 菌株和噬菌体载体 fUSE3 由美国 Missouri 大学 GP. Smith 教授惠赠。人单核细胞由健康自愿者提供的外周血分离获得。HRP 标记的抗 M13 单克隆抗体购自 Pharmacia 公司, hTNF- α 检测试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 TACE 胞外功能结构域的克隆和表达载体的构建

淋巴细胞分层液分离人外周血单核细胞,用含 10% FCS 的 RPMI-1640 调整细胞浓度至 2×10^6 /mL,取 5mL 细胞悬浮液培养 2h,弃上清,用 37℃ PBS 轻洗,加 8mL 含 LPS(1mg/L)的 RPMI-1640 继续培养 6h。用 Trizol 试剂提取 LPS 刺激后的单核细胞总 RNA,通过 RT-PCR 分别扩增出两段 TACE 胞外功能结构域,其中一段涵盖整个 TACE 的胞外功能区,另一段仅包含 TACE 的催化区,根据两段基因的碱基数目,分别命名为 T1300 和 T800。合成 4 条引物, P1 为 5'-cacgaattcagagctgacccagatcccat-3', 含 EcoR I 酶切位点; P2 为 5'-gggtgtcgaacttagcggttttgaacacactcct-3', 含 Sal I 位点; P3 为 5'-cacggatccttctgtgacccagatcccatgaag-3', 含 BamH I 酶切位点; P4 为 5'-ctagaattcctacatcctgtactcgtttctcac-3', 含 EcoR I 位点。T800 用引物 P1 和 P2 扩增, PCR 条件为:先 50℃ 30min, 94℃ 4min; 然后 94℃ 40s, 55℃ 40s, 72℃ 1min, 30 个循环; 最后 72℃ 7min。T1300 用引物 P3 和 P4 扩增, PCR 条件将上述延伸时间稍延长即可。PCR 产物酶切后分别与 pET-28a 和 pET-28c 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,通过酶切和测序鉴定阳性克隆。

1.3 重组蛋白的表达、纯化及检测

将重组 TACE 表达质粒用常规 CaCl₂ 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。用含 Kan 的 LB 平皿筛选阳性克隆后接种于含 Kan 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜。按 1:100 比例将培养菌液加至含 Kan 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡, 当培养基 OD 值达到 0.3 ~ 0.4 时, 加入 1mmol/L 终浓度的 IPTG, 诱导表达 4h 后离心收集菌体。PBS 重悬菌体, 超声破碎后, 包涵体溶解于含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 8 mol/L 尿素和 100 mmol/L 2-巯基乙醇的溶液中。溶解的蛋白质按

1:100 的比例在复性液(含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 100 μmol/L ZnCl₂, 100 mmol/L Arginine, and 0.002% NaN₃)中复性, 4℃, 72h。复性蛋白用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化, 10% SDS-PAGE 分析蛋白质表达和纯化效果。SDS-PAGE 结果转印到硝酸纤维素膜上, 用抗 TACE 的多克隆抗体进行蛋白质印迹, 具体操作参照相关文献。将纯化后的重组蛋白定量, 过滤除菌, 分装后置 -70℃ 冻存。

1.4 噬菌体展示 15 肽库的筛选

参照文献并稍作修改^[5], 分别以 T800 和 T1300 重组蛋白(20mg/L)包被酶标板, 2% BSA 37℃ 封闭 1h, 洗板后加入肽库, 100μL/孔, 室温振摇吸附 15min, 用 PBST(0.1% Tween-20)抽洗 10 次, 弃去未结合的噬菌体; 每孔加入 100μL 洗脱液(0.2mol/L Glycine-HCl, 1 mg/mL BSA, pH2.2), 室温振摇 10min, 用 15μL 中和液(1mol/L Tris-HCl, pH9.1)中和; 取 5μL 中和后的噬菌体测滴度, 剩下的噬菌体全部用于感染 200μL 新鲜制备处于对数早期(OD 值 0.4~0.5)的 K91 宿主菌, 再接种到含 20mg/L 四环素的 LB 培养基中振摇过夜, 提取噬菌体用于下一轮筛选。共进行 4 轮筛选, 从第二轮开始, 洗液中 Tween-20 的含量提高至 0.5%, 并且扩增后的库在与包被蛋白结合前, 先与等体积的 5% BSA 混合, 37℃ 作用 1h。最后一轮洗脱下来的噬菌体感染 K91 后铺板, 随机挑取共 32 个克隆, 扩增后收集噬菌体, 置 4℃ 备用。

1.5 阳性噬菌体克隆的 ELISA 鉴定、竞争抑制实验和序列分析

分别以 T800 和 T1300 重组蛋白(10mg/L)包被酶标板, 4℃ 过夜, 2% BSA 37℃ 封闭 1h。预先将纯化的噬菌体上清(10¹⁰ 噬菌体转化单位)50μL 及 50μL 2% 的 BSA 混合后, 加入酶标板, 37℃ 作用 1h, PBST(0.5% Tween-20)洗 5 次, 每次 2~3min, 加入 1:5000 稀释的 HRP-鼠抗 M13 抗体 100μL, 以 TMB 为底物, 测定 A_{450nm} 的吸光度值。通过竞争抑制实验检测噬菌体克隆与靶蛋白的特异结合性, 将噬菌体上清与等体积含 10μg 的 T800 或 T1300 混合, 加入酶标板, 其余操作同上述 ELISA 检测。用 NaI 法提取阳性噬菌体克隆的单链 DNA 进行序列分析(上海博亚生物技术公司), 测序引物为 5'-TGAATTTTCTGTAT-GAGG-3'。

1.6 固相 Fmoc 法合成 TACE 结合肽

由西安美联生物技术公司协助完成, 采用固相 Fmoc 法合成, 合成产物采用 HPLC 纯化, 通过质谱分

析测定其分子量。

1.7 合成肽与 TACE 的结合活性

T1300 重组蛋白具有天然 TACE 的酶活性^[6], 通过 ELISA 法检测合成肽与 T1300 的结合活性, 可在一定程度上代表合成肽与天然 TACE 的结合活性。以合成肽(10mg/L)包被酶标板, 4℃ 过夜, 常规洗板封闭, 然后加入系列稀释的 T1300 重组蛋白, 以抗 TACE 的多克隆抗体为一抗, 以酶标羊抗兔多抗为二抗, 以 TMB 为底物, 测定 A_{450nm} 的吸光度值。以酶标孔是否产生阳性反应及吸光度值的大小来判断合成肽与 TACE 的结合活性, 其中阳性反应以测定孔(合成肽包被)的 A_{450nm} 值 ≥ 对照孔(BSA 包被)2 倍为判断依据。

1.8 合成肽对 LPS 刺激的 PBMC 分泌 TNF-α 的抑制作用

人外周血单核细胞的分离和处理参照文献并稍作修改^[7], ELISA 检测参照厂家的说明书。淋巴细胞分层液分离人外周血单核细胞, 用 RPMI-1640 调整细胞浓度至 5 × 10⁵/mL, 以 1mL/孔接种 24 孔细胞培养板, 培养 2h 后做如下实验: 分别往培养孔加入终浓度为 0.5、2、5、10、20 和 50mg/L 的肽, 作用 30min 后加入 2.5mg/L 的 LPS, 刺激 6h 后收集上清液用 ELISA 检测 sTNF-α, 同时设立阴性对照组(不加 LPS)和阳性对照组(加 LPS 但不加肽), 每个实验孔重复 2 次, 取平均值。实验结果以抑制率表示: 抑制率(%) = [(阳性组 OD 值 - 实验组 OD 值)/(阳性组 OD 值 - 阴性组 OD 值)] × 100%。

1.9 FACS 检测 LPS 刺激 PBMC 后 mTNF-α 的变化

用 PBS 将上述未刺激、LPS 刺激和 LPS + 合成肽处理 6h 后的细胞, 分别从培养孔吹打下来, 离心收集后再用 PBS 洗 2 遍, 加入以 PBA(含 1% BSA 的 PBS)按 1:100 稀释的抗 TNF-α 的单克隆抗体, 4℃ 作用 1h; 然后 PBS 洗 2 次, 加入 1:60 稀释的荧光二抗, 4℃ 结合 1h, PBS 洗 2 次, 细胞悬浮于 0.5mL 的 PBS 进行流式细胞术(FACS)检测膜型 TNF-α 的变化。

2 结果

2.1 TACE 胞外功能结构域的克隆和表达载体的构建

T800 为 TACE 催化结构域, 其 cDNA 片段长 798bp; T1300 为含催化区的整个 TACE 胞外功能结构域, 其 cDNA 片段长约 1300bp, RT-PCR 扩增出相应大小的两个片段, 分别将两个片段与 pET-28a/c 连

接,应用酶切和 PCR 鉴定阳性克隆(图 1)。测序结果表明,所克隆的 TACE 胞外功能结构域与文献报道完全一致。

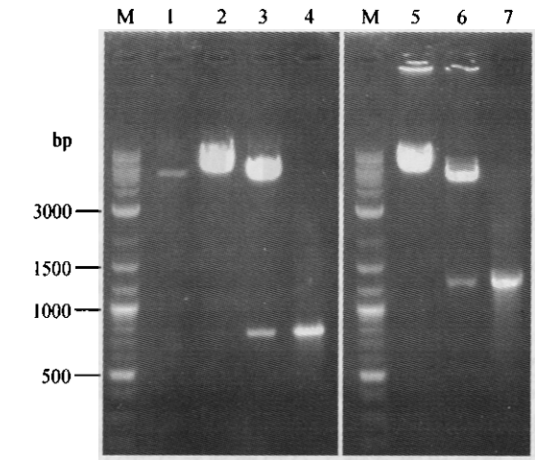


图 1 质粒 pET-T800/pET-T1300 的酶切鉴定
Fig.1 Enzyme analysis of plasmid pET-T800/pET-T1300
M: markers; 1: pET-28a/*EcoR* I; 2: pET-T800/*EcoR* I; 3: pET-T800/*EcoR* I + *Bam* H I; 4: pET-T800/PCR; 5: pET-T1300/*EcoR* I; 6: pET-T1300/*EcoR* I + *Bam* H I; 7: pET-T1300/PCR.

2.2 TACE 胞外功能结构域的表达纯化和鉴定

将质粒 pET-T800 和 pET-T1300 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 结果显示,在 35kD 和 55kD 处有明显的表达带。将菌体超声破碎,分析表明两种表达产物均主要为包含

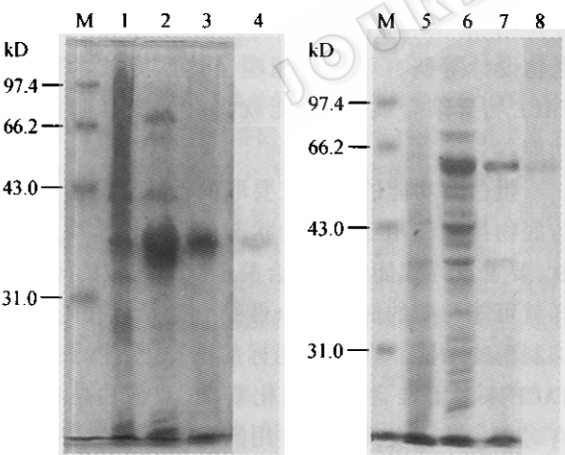


图 2 T800/T1300 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析
Fig.2 SDS-PAGE and Western Blotting analysis of T800/T1300 protein
M: protein molecular mass marker; 1: non-induced T800; 2: induced T800; 3: purified T800; 4: Western blot of T800; 5: non-induced T1300; 6: induced T1300; 7: purified T1300; 8: Western blot of T1300.

体,变性复性后用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱纯化,可分别在相应位置获得单一的条带,凝胶图像扫描分析表明,两种表达产物的纯度可达 90% 以上。蛋白质印迹结果表明,表达产物均可与抗 TACE 多克隆抗体产生颜色反应(图 2)。

2.3 TACE 特异结合肽的筛选鉴定与序列分析

分别以固相化的 T800 和 T1300 作为筛选分子,对噬菌体肽库进行 4 轮“吸附-洗脱-扩增”的淘洗。从第 4 轮筛选后得到的菌落中随机分别挑选 12 和 20 个克隆,用 ELISA 法测定噬菌体分别与各自筛选分子的结合活性,挑选其中吸光度值较高的克隆进行竞争抑制实验,以 fUSE3 为阴性对照,每个样品设 3 个平行。结果有 6 个噬菌体克隆被检测出对重组 TACE 很强的特异结合能力(图 3),其中 C2、C3、C8、C9 和 C10 由 T800 筛选出来,C27 由 T1300 筛选出来。测序分析表明,C2、C8、C9、C10 和 C27 的碱基序列完全相同,其对应的短肽序列为:N 端-TRWLVYF-SRPYLVAT-C 端。

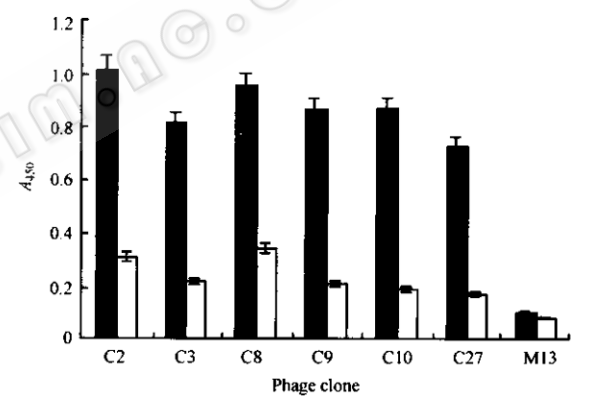


图 3 用 ELISA 法检测与 T800/T1300 重组蛋白特异结合的噬菌体
Fig.3 Evaluation of binding specificity of phage clones to T800/T1300 by ELISA
 $A_{450} : \bar{x} \pm \text{SD}, n = 3$. ■: phage alone; □: phage + $10\mu\text{g}$ T800/T1300.

2.4 TACE 结合肽的合成与鉴定

按照以上的一致性序列化学合成该短肽,产物经 HPLC 纯化后,纯度达 95% (图 4)。质谱分析表明,实际检测的分子量为 1873.0,与理论分子量 (1872.14) 一致。

2.5 合成肽与 TACE 的结合活性

ELISA 检测结果表明,合成肽可与 1 ~ 100 mg/L 的 T1300 都产生阳性反应,并且随着 T1300 浓度的增大,相应的 A_{450} 值也增大,提示合成肽具有与 TACE 的结合活性,这为合成肽抑制 TACE 的活性创造了条件。

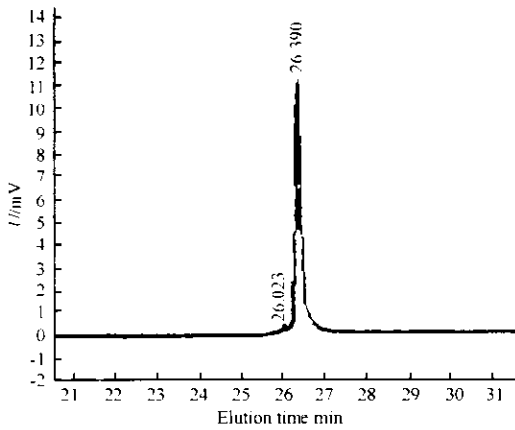


图4 用 HPLC 法分析合成肽的纯度

Fig.4 Purity analysis of synthetic peptide isolated by HPLC

2.6 合成肽抑制 LPS 刺激的 PBMC 产生 sTNF-α

为检测通过筛选噬菌体肽库得到的 TACE 结合肽是否具有生物学功能,以 LPS 刺激 PBMC 产生 sTNF-α 为实验模型,采用 ELISA 检测 PBMC 上清中 sTNF-α 的变化。结果表明,合成的短肽具有抑制 sTNF-α 产生的功能,随着肽的浓度加大,上清中 sTNF-α 减少。合成肽浓度在 50 mg/L 时,可使 sTNF-α 的产生下降 60.3%,其 IC₅₀ 约为 10mg/L(图 5)。

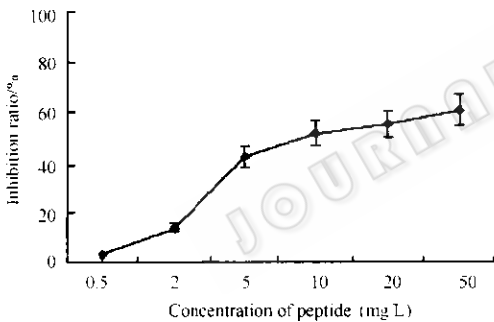


图5 合成肽对 sTNF-α 释放的抑制作用

Fig.5 Inhibition of sTNF-α release from LPS-stimulated PBMC by synthetic peptide

2.7 合成肽增加 LPS 刺激的 PBMC 表面 mTNF-α 的量

用 FACS 检测 PBMC 表面 mTNF-α 的变化,以进一步确证 sTNF-α 的减少是由于 TACE 水解 mTNF-α 的能力下降所致。结果显示,由于 TACE 受其结合肽的抑制,其水解 mTNF-α 产生 sTNF-α 的能力降低,因而细胞表面 mTNF-α 的平均荧光强度 (Mean Fluorescence Units, MFU) 相应增加(图 6)。

3 讨论

在炎症的产生过程中,机体内过量的 sTNF-α 起

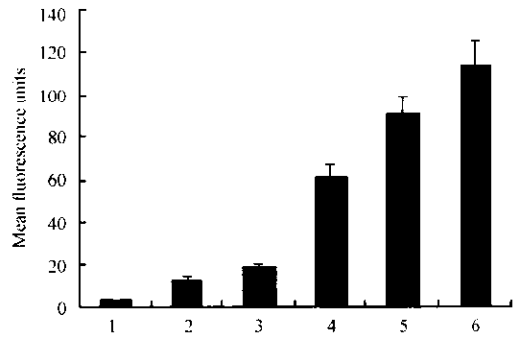


图6 合成肽促使 mTNF-α 在胞膜表面集聚

Fig.6 Synthetic peptide-mediated accumulation of mTNF-α on LPS-stimulated PBMC surface

1: without LPS; 2: LPS; 3: LPS + 2mg/L peptide; 4: LPS + 10mg/L peptide; 5: LPS + 20mg/L peptide; 6: LPS + 50mg/L peptide.

着主要诱导促进作用,要控制炎症减缓病情,必须要降低 sTNF-α 的水平或阻断其作用的发挥。TACE 抑制剂可以通过抑制 mTNF-α 向 sTNF-α 的转换,从源头上减少 sTNF-α 的产生,从而有效地降低 sTNF-α 的水平,为抗炎治疗提供新的手段。

噬菌体肽库技术具有简便易行、高通量筛选的特点,可以在预先不知道任何肽序列信息的情况下,只根据肽与靶分子结合能力的大小,生物淘选出各种靶分子的特异性结合肽,这种筛选出来的结合肽比理论推算和设计出来的更符合实际情况。现在,肽库技术已广泛应用于蛋白质分子间识别及相互作用、酶反应底物分析、酶抑制剂、疫苗及小分子药物设计等研究领域。用噬菌体肽库技术筛选出 TACE 特异结合肽,很可能就具有抑制其酶活性的功能。

蛋白酶功能的发挥主要取决于其催化活性中心与底物接触和相互作用的状态,因此,筛选酶的抑制肽,要重点寻找能特异结合酶催化结构域的短肽,这样就可能与酶的底物竞争性结合酶活性中心,从而抑制酶的功能。在筛选靶标的选择上,考虑到天然 TACE 来源困难且提取纯化复杂,其蛋白结构中还有对催化功能发挥不起作用的胞内部分⁸,因此,不适宜用作抑制肽的筛选分子。为得到充足而且高效的筛选靶分子,对 TACE 进行胞外功能结构域的克隆表达和纯化,通过筛选这些关键分子的结合肽来获得能抑制天然 TACE 功能的拮抗肽。

催化结构域和解整合素结构域是天然成熟的 TACE 蛋白发挥催化裂解底物和分子识别的关键区段,因此也是其抑制剂发挥作用的理想靶位点,被选作我们筛选抑制肽的靶分子。在筛选策略上,为减

少实验误差和其它可能影响筛选的干扰因素,使实验结果具有重复性,我们分别用两个重组 TACE 结构域作为筛选分子进行独立实验,然后从中寻找共有序列。筛选出的 6 个吸光度最高的克隆中有 5 个的序列完全相同,并且这个相同序列恰恰来自以上两个独立的筛选过程,鉴于两个筛选分子含有一个相同的酶区结构域,推测该序列短肽可能特异结合 TACE 的酶催化活性区,因而很可能会影响酶的活性。通过化学合成该序列短肽,体外实验表明此肽确实可以有效地抑制 TACE 的活性,减少 sTNF- α 的释放。

我们下一步拟对另外几个筛选出来的肽进行活性检测,并借助计算机建模等方法对所有我们已经获得的 TACE 肽类抑制剂和其它抑制剂进行分析比较,阐明 TACE 与这些效应分子相互作用的机理,为改造修饰和设计出更特异、效力更高的 TACE 小分子药物奠定基础。有关 TACE 抑制肽的整体动物实验亦在进一步研究中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 1997, **385**(6618):729 - 733
- [2] Moss ML, Jin SL, Milla ME *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 1997, **385**(6618):733 - 736
- [3] Srour N, Lebel A, McMahon S *et al.* TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett*, 2003, **554**(3):275 - 283
- [4] Zhu KL(朱孔黎), Yang YZ(杨渝珍), Han L(韩玲) *et al.* The study on different acting mechanisms of three types of TACE inhibitors in converting of pro-TNF α into sTNF α . *Chinese Journal of Immunology*(中国免疫学杂志), 2003, **19**(11):752 - 756
- [5] Smith GP. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Method in Enzymology*, 1993, **217**:228 - 257
- [6] Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T *et al.* CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF- α -converting enzyme. *J Immunol*, 2000, **165**(12):6703 - 6709
- [7] Solomon KA, Covington MB, Decicco CP *et al.* The fate of pro-TNF- α following inhibition of metalloproteinase-dependent processing to soluble TNF- α in human monocytes. *J Immunol*, 1997, **159**: 4524 - 4531
- [8] Reddy P, Slack JL, Davis R *et al.* Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem*, 2000, **275**(19):14608 - 14614