# 从噬菌体展示的构象限制性随机肽库中筛选有 trkB 结合活性的小肽*

马仲才① 吴晓兰① 曹明媚① 潘 卫① 朱分禄①
陈景山② 戚中田①**

(①第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433; ②Department of Psychology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06508, USA)

**摘要** 脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)能够促进多种神经元的存活和分化, 在神经退行性疾病的治疗中具有广阔的应用前景, 但由于其分子量大而无法穿过血脑屏障, 限制了其临床应用. 以表达于 NIH 3T3 细胞上的 BDNF 受体 trkB 为靶分子, 从噬菌体展示的随机肽库中筛选与 trkB 有亲和力的小肽, 采用不表达 trkB 的 NIH 3T3 细胞预吸附和最后一轮筛选以 1 μg/mL 的 BDNF 竞争性洗脱策略, 使能与 trkB 天然构象结合、又能有效拮抗 BDNF 与 trkB 结合的特异性噬菌体得到了有效富集, 获得了 5 种 trkB 结合小肽, 它们有核心序列 CRA/TXφXXφXXC(X 代表随机残基, φ 为 T, L 或 I). 对展示有 5 种外源小肽的噬菌体进行了初步生物活性测定, 未发现有 BDNF 样活性, 反而能剂量依赖性地拮抗 BDNF 的生物功能. 依据其中一个克隆序列(C1)合成的肽也证实有拮抗 BDNF 的作用, 表明获得的 5 种小肽可能为 trkB 受体拮抗剂. 这些 trkB 拮抗性小肽在治疗神经母细胞瘤和慢性痛以及神经生物学研究中具有应用前景, 同时也为构建二级噬菌体展示肽库、继续筛选 BDNF 模拟小肽奠定了基础.

**关键词** 噬菌体展示 随机肽库 脑源性神经营养因子 trkB 拮抗剂

Barde 等人[1]首次在猪脑中发现了脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 它与神经生长因子、神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)、NT-4/5 等同属神经营养素家族. BDNF 能够促进中脑多巴胺能神经元、运动神经元、胆碱能神经元等的存活和分化, 保护其不受神经毒物、缺血等因素的损伤, 在神经系统分化和出生后正常生理功能的维持中具有重要作用. BDNF 在靶细胞上有两种受体, 一种是高亲和力受体 trkB, 另一种是 p75 神经营养素受体, 后者是神经营养素家族成员共用的低亲和力受体, BDNF 的神经营养和神经保护活性是由 trkB 介导的[2]. 由于其广泛的神经营养和神经保护活性, 同时近年来还发现 BDNF 在帕金森病(Parkinson's disease, PD)和阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者中的表达水平明显下降[3], 所以它在 PD, AD, 肌萎缩性脊髓侧索硬化症等神经退行性疾病的治疗中具有广阔的应用前景[4]. 但是, BDNF 在实际应用中受到了两个因素的限制: (ⅰ)较大的分子量难以穿过血脑屏障; (ⅱ)血浆半衰期短. 解决上述问题的可能途径之一是发展能够穿过血脑屏障、又具

2001-12-31 收稿, 2002-02-25 收修改稿
* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39825116, 30070168)
** 联系人, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

有良好药代动力学特性的小分子量 BDNF 模拟肽[5,6].

应用噬菌体展示肽库技术实现蛋白质微化来开发小分子量多肽药物是近年来十分活跃的研究领域[7]. 利用该技术分别获得了促红细胞生成素[8]和促血小板生成素[9]的模拟小肽, 它们的长度均只有天然分子的十分之一左右, 与天然分子无一级序列上的同源性, 但能够激活各自的受体, 在体内外都具有相应的生物活性. 这两项具有重要意义的进展为噬菌体展示肽库技术的应用开辟了新的领域[10].

本研究以表达于细胞上的 trkB 为靶分子, 从噬菌体展示的构象限制性随机肽库中筛选具有 trkB 结合活性的小肽, 为最终获得能够模拟 BDNF 活性的小肽奠定基础.

# 1 材料与方法

## 1.1 表达大鼠 trkB 的 NIH 3T3 细胞(NIH 3T3/trkB)

由克隆有全长大鼠 trkB cDNA 的 pCMV5-rat trkB 质粒 (New York 大学 M. Chao 教授惠赠) 构建 pcDNA3.1(+)-rat trkB 真核表达载体, 转染小鼠胚胎成纤维细胞 NIH 3T3, 用 G418 筛选获得 NIH 3T3/trkB, RT-PCR 和免疫细胞化学检测证实了 trkB 的表达.

## 1.2 噬菌体展示随机 9 肽库的扩增和纯化

噬菌体展示随机 9 肽库 pⅧ9aa-Cys 由意大利 IRBM 研究所 P. Monici 教授惠赠[11], 编码随机 9 肽的基因插入 f1 丝状噬菌体 pⅧ基因, 展示类型为 8+8, 随机方式为 NNN, 在随机序列两侧各接有一个半胱氨酸(Cys)密码子, 展示的外源随机肽的序列为 Cys-$X_9$-Cys, 库容为 $1\times10^8$ TU, 重组噬菌粒带氨苄青霉素抗性. 宿主菌为 XL1-blue (*recA*1 *endA*1 *gyrA96 thi hsd*R17 ($rK^-mK^+$) *supE*44 *relA1 lac*$^-$ F′[*proAB lacI*$^q$ *lacZ* ΔM15 Tn10 (*tet*$^r$)]). 噬菌体肽库的扩增、纯化和定量按文献[11]和[12]进行.

## 1.3 噬菌体肽库的筛选

参照文献[13]和[14], 略有改动. 取含 $10^{10}$ TU 随机肽库噬菌体先与 $10^7$ 个用 pcDNA3.1(+) 空载体转染的 NIH 3T3 细胞(NIH 3T3/c) 混匀, 37℃缓慢振荡孵育 1 h, 离心取上清, 以去除与 NIH 3T3/c 细胞结合的噬菌体. 将上清加入到包被有 NIH 3T3/trkB 细胞($4\times10^5$/孔)的 96 孔酶联板中, 37℃结合 1 h, 用含 0.1% (*v*/*v*)Tween 20 的 PBS 洗涤 10 次, 加入 100 μL 洗脱液 (0.1 mol/L HCl-Gly 缓冲液, pH 2.2, 含 1 mg/mL BSA), 室温放置 15 min, 吸至微量离心管中, 立即加入 14 μL 中和液(1 mol/L Tris 溶液, pH 9.0), 使洗脱液至中性. 酶联板中则加入 100 μL 细胞裂解液(PBS, 30 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA), 37℃振荡孵育 1 h, 吸出与洗脱液混合, 感染宿主菌 XL-1 blue, 扩增噬菌体, 纯化后进行下一轮筛选. 共进行 4 轮筛选, 通过增加洗涤次数和升高 Tween 20 的浓度使洗涤强度逐轮加大, 前 3 轮使用上述酸洗脱和细胞裂解法收获噬菌体, 第 4 轮用 1 μg/mL 的重组人 BDNF 进行竞争性洗脱.

筛选过程中用克隆形成法监测投入和产出的噬菌体数量: 噬菌体感染宿主菌 XL-1 blue, 37℃慢摇 1 h 后涂四环素和氨苄青霉素双抗性 2×YT 平板, 37℃倒置培养过夜, 计数菌落数, 以噬菌体转导单位 (TU) 数作为样品所含的噬菌体数量.

用细胞 ELISA 方法检测每轮筛选产物与 trkB 的亲和力: 相同量的每轮筛选产物和原始肽库(经 NIH 3T3/c 预吸附)加入到包被有 NIH 3T3/trkB 细胞的酶联板中, 同上进行结合和洗涤, 洗涤条件同第 4 轮, 然后加入 HRP 标记的抗丝状噬菌体 pⅧ蛋白多克隆抗体, 邻苯二胺(OPD)

显色, 492 nm 处测 $A$ 值.

### 1.4　单克隆噬菌体与 trkB 结合活性测定

随机挑取第 4 轮筛选出的噬菌体克隆感染宿主菌进行扩增和纯化, 同上述细胞 ELISA 法测定与 trkB 的结合活性.

竞争结合实验: $10^{11}$ 新扩增的单克隆噬菌体和 10 ng/mL BDNF 同时加入包被了 NIH 3T3/trkB 细胞的酶联板中, 4℃孵育 2 h, 洗涤, 加入抗人 BDNF 抗体, 37℃反应 1 h, 洗去未结合的抗体, 加 HRP-IgG, 37℃ 结合 1 h, OPD 显色, 测 $A_{492nm}$. 以加相同体积的 TBS 为空白对照 ($A_0$), 计算结合抑制率按下式, 即结合抑制率(%) = $(A_0-A_{样品})/A_0 \times 100\%$.

### 1.5　DNA 序列测定和多肽序列分析

在 DNA 自动测序仪上测定插入多肽的基因序列, 推导对应的氨基酸序列, 用 http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ 提供的 BLAST 程序分析蛋白质同源性.

### 1.6　生物活性的初步测定

用 MTT 法检测噬菌体克隆单独以及与 10 ng/ml 的 BDNF 合用, 对 NIH 3T3/trkB 细胞在 0.5%浓度的血清培养条件下增殖活性的影响, BDNF 和辅助噬菌体 M13KO7 分别作为阳性和阴性对照, TBS 作为空白对照.

按照文献[15]分离 8 天龄鸡胚背根神经结(dorsal root ganglia, DRG), 参照文献[16]评价噬菌体对 DRG 神经突起生长的影响.

### 1.7　合成肽功能的鉴定

将含有结合 trkB 活性的 C1 克隆序列送赛百盛公司(北京)合成短肽. 合成肽经梯度稀释后, 检测不同浓度时拮抗 BDNF 的促 NIH 3T3/trkB 细胞增殖的活性, 方法同第 1.6 小节所述. 用 Logit 方法计算出 $IC_{50}$ 值[17], 推算合成肽与 trkB 受体的 Kd 值, 即亲和力[8].

### 1.8　统计学方法

实验数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 先作两组数据的方差齐性分析. 方差齐性时, 用 $t$ 检验, 方差不齐时, 用 Mann-Whitney 检验比较均数差异的显著性. $P < 0.05$ 为有显著性差异.

## 2　结果

### 2.1　能够结合 trkB 的小肽的筛选

在筛选过程中, 对每轮的投入/产出比等指标进行了监测, 结果示于表 1.

表 1　4 轮筛选的投入/产出比等指标的比较 a)

| | 筛选轮数 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| $I_A/I_0$/% | 3.1% | 51.7% | 80.0% | 92.3% |
| $O/I_0$ | $5.8 \times 10^{-6}$ | $1.1 \times 10^{-4}$ | $2.1 \times 10^{-3}$ | $1.2 \times 10^{-3}$ |
| $L/O$/% | 13.5% | 36.3% | 63.1% | – |

a) $I_0$ 示投入的噬菌体数; $I_A$ 示 $I_0$ 经 NIH 3T3/c 吸附后的噬菌体数; $L$ 示细胞裂解液中噬菌体数; $O$ 示筛选结束后产出的噬菌体数. 以上数据为 3 次实验中的一次典型结果

在筛选过程中, (ⅰ) $I_A/I_0$ 的百分比逐轮升高. 第 1 轮时, 未经筛选的原始肽库在 NIH 3T3/c 吸附后, 噬菌体量只剩下 3.1%, 表明大部分噬菌体因结合于 NIH 3T3/c 表面的分子而被

除去. 第 4 轮时 $I_A/I_0$ 百分比升至 92.3%, 表明经过 3 轮 NIH 3T3/c 吸附筛选后有效去除了肽库中与 NIH 3T3/c 表面分子结合的噬菌体. 该指标的变化也间接表明与 NIH 3T3/trkB 细胞特异性结合的噬菌体得到了富集. (ⅱ) $O/I_0$ 值也即投入/产出比逐轮升高, 但第 4 轮较第 3 轮有所降低. 投入/产出比是衡量肽库筛选富集效果最直接的指标, 由第 1 轮的 $5.8\times10^{-6}$ 升至第 3 轮的 $2.1\times10^{-3}$, 表明筛选的富集效果是显著的. (ⅲ) $L/O$ 百分比逐轮升高, 表明细胞裂解液中所含的噬菌体量在整个产出肽库中占的比例越来越高.

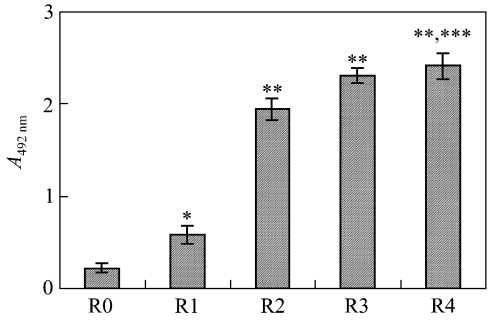



图 1 每轮筛选产物 trkB 的亲和力分析

R0~R4 分别示筛选前及第 1 ~ 4 轮筛选产物. 结果为 3 次实验的平均值, 以 $\bar{X}$ ±SD 表示. 与 R0 比较, * 示 $P<0.05$, ** 示 $P<0.001$; 与 R3 比较, *** 示 $P>0.05$

每轮筛选后的噬菌体肽库与 trkB 的亲和力也逐轮升高, 从第 2 轮开始尤为显著 ($P<0.001$), 但第 4 轮筛选产物的亲和力较第 3 轮并无显著性升高($P>0.05$)(图 1). 该结果进一步证明与 trkB 亲和力高的噬菌体得到了富集.

## 2.2 第 4 轮单克隆噬菌体与 trkB 的亲和力

从第 4 轮筛选出的肽库中随机挑取的 20 个克隆中, 18 个克隆与 trkB 有较高的亲和力, 而辅助噬菌体 M13KO7 与 trkB 无明显的亲和力, 说明筛选使与 trkB 特异性结合的噬菌体得到了有效富集, 而噬菌体的外壳蛋白不参与与 trkB 的结合. 18 个高亲和力克隆中有 17 个能够明显抑制 BDNF 与 trkB 的结合, 辅助噬菌体则几乎无抑制作用(图 2). 上述结果表明, 经过 4 轮筛选, 获得的大部分噬菌体所展示的外源肽不但与 trkB 有高亲和力, 并且它们与 trkB 的结合位点与 BDNF 的相同.

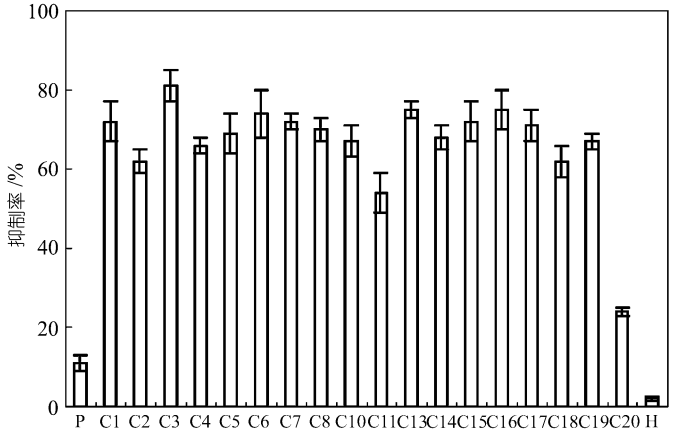



图 2 第 4 轮获得的噬菌体克隆对 BDNF 结合 trkB 的抑制作用

P 示未筛选的原始肽库; H 示辅助噬菌体, C1 ~ C20 示噬菌体克隆. 结果为 3 次实验的平均值, 以 $\bar{X}$ ±SD 表示

## 2.3 阳性克隆的序列分析

测定 17 个高亲和力噬菌体克隆的外源随机 9 肽的基因序列, 推导出相应的氨基酸序列(表 2). C1~C3 三个克隆出现的频率较高, 表明特异性克隆得到了富集, 也证明了本研究的亲和筛

选是有效的. 5 种多肽中, 除了 C10 展示的多肽, 其余 4 种之间可以找到同源性. C2, C3, C7 噬菌体展示的多肽有核心序列 CRA/TXϕXXϕXXC(X 代表随机残基, ϕ为 T, L 或 I), C3 噬菌体克隆出现的频率最高(8/17). C1 噬菌体展示的的小肽序列与上述 3 条肽的差别较大, 但其 C 端-ARC 正是另外 3 个肽 N 端 CRA-的颠倒. 可以推测, 由于 C-C 间形成二硫键后, 线性肽变成了环肽, 这时 C 端的-ARC 和 N 端的 CRA-在多肽空间结构的形成以及受体结合中的作用是相同的. CRA 基序可能在与 trkB 的结合中比较重要.

在 BDNF 一级序列中未发现这 5 条多肽的同源区.

表 2　展示于阳性噬菌体表面的随机多肽的推导氨基酸序列 a)

| 克隆 | 氨基酸序列 | 出现频率 |
|---|---|---|
| C1 | CSMAHPYF**AR**C | 4 |
| C2 | C**RA**L**I**VF**T**PTC | 3 |
| C3 | C**RA**N**I**GG**T**HAC | 8 |
| C7 | C**RT**M**L**LA**L**LFC | 1 |
| C10 | CSPGSIHTLVC | 1 |

a) 黑体示保守残基, 下画线示半胱氨酸

## 2.4　生物活性的初步测定

BDNF 对野生型 NIH 3T3 的增殖无明显影响, 当 NIH 3T3 表达 trkB 后可获得对 BDNF 的反应性, BDNF 能够明显促进其增殖, 这可以作为检测 BDNF 活性的一个简便而又非常特异的模型[18]. BDNF 可以剂量依赖性地促进 NIH 3T3/trkB 细胞在极低浓度血清培养条件下的有丝分裂, 而对 NIH 3T3/c 无明显影响(图 3).

C1 噬菌体克隆对 NIH 3T3/trkB 细胞的增殖无明显影响(图 4), 反而能剂量依赖性地拮抗 BDNF 的促 NIH 3T3/trkB 细胞增殖的活性, $IC_{50}$ 约为 0.16 nmol/L, 相同数量的辅助噬菌体无此作用(图 5), C2, C3, C7, C10 噬菌体克隆的作用与 C1 相似(结果未示).

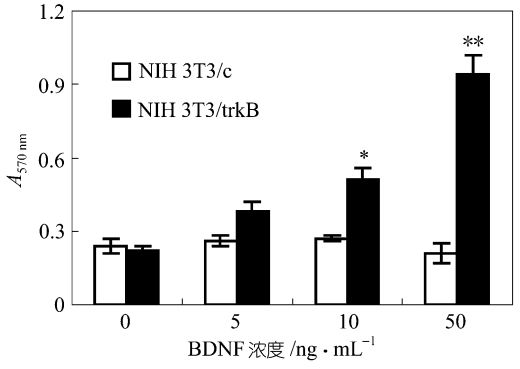



图 3　BDNF 作用 72 h 对 NIH 3T3/trkB 和 NIH 3T3/c 细胞增殖的影响

$n$=3, $\bar{X}$ ±SD, 与 NIH 3T3/c 组比较, * 示 $P$<0.05, ** 示 $P$<0.01

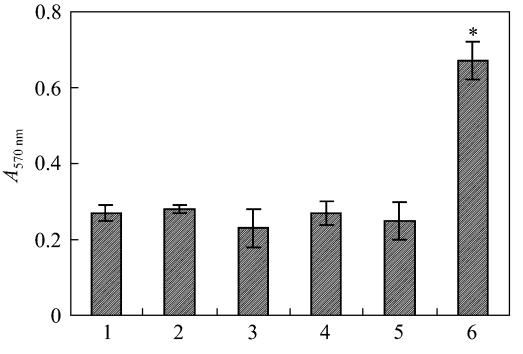



图 4　C1 噬菌体克隆对 NIH 3T3/trkB 细胞增殖的影响

1 示 TBS 缓冲液; 2 示辅助噬菌体; 3~5 分别示 $10^9$, $10^{10}$, $10^{11}$ 个 C1 噬菌体; 6 示 10 ng/ml BDNF. 结果为 3 次实验的平均值, 以 $\bar{X}$ ±SD 表示. 与 TBS 比较, * 示 $P$<0.01

在鸡胚 DRG 模型中也未观察到展示有 5 种小肽的噬菌体有促进神经突起生长的作用(结果未示).

### 2.5 C1 合成肽的功能鉴定

根据筛选得到的 5 个克隆中的 C1 序列合成了 C1 肽: CSMAHPYFARC. 实验结果表明, C1 合成肽也能剂量依赖性地拮抗 BDNF 的促 NIH 3T3/trkB 细胞增殖的活性(图 6), 与噬菌体克隆的结果相似, $IC_{50}$ 约为 54.6 nmol/L, 即肽与 trkB 受体的亲和力(Kd)约为 $5.46\times10^{-8}$ mol/L.

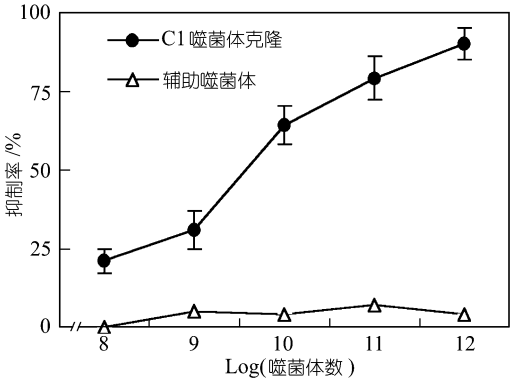



图 5 C1 噬菌体克隆对 10 ng/mL BDNF 促 NIH 3T3/trkB 细胞增殖活性的抑制作用

结果为 3 次实验的平均值, 以 $\bar{X}$ ±SD 表示

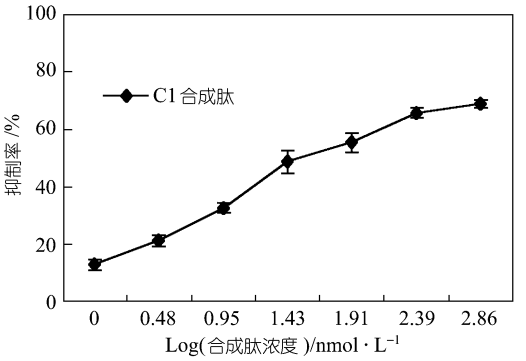



图 6 C1 合成肽对 10 ng/mL BDNF 促 NIH 3T3/trkB 细胞增殖活性的抑制作用

结果为 3 次实验的平均值, 以 $\bar{X}$ ±SD 表示

## 3 讨论

本研究所用的构象限制性肽库[19]特点是随机 9 肽两侧各有一个 Cys 残基, 在噬菌体表面形成二硫键[11], 它与受体的亲和力比线性肽库要高. 对于筛选受体配基, 使用构象限制性肽库比使用完全随机肽库更容易获得成功.

由于纯化膜受体比较复杂, 而且受体的天然构象容易发生改变, 并导致胞膜与胞浆内的结构暴露等的不足, 本研究采用了直接表达于细胞上的受体来筛选靶分子, 并且在每轮用 NIH 3T3/trkB 筛选前, 肽库先用空载体转染的 NIH 3T3 细胞进行预吸附, 去除与细胞表面其他分子结合的无关噬菌体, 加速阳性噬菌体的富集速度. 在最后一轮筛选时则采用较高浓度的 BDNF 进行竞争性洗脱, 特异性洗脱占据 BDNF 结合位点的噬菌体. Koivunen 等人[20]发现用酸洗脱不能把一些亲和力高的噬菌体洗脱下来, 通过裂解细胞回收细胞碎片可获得残留的噬菌体. 结果发现, 细胞裂解液中确实含有未被酸洗脱下来的噬菌体, 并且所含的噬菌体数量在整个产出库中的比例逐轮升高.

投入/产出比、每轮筛选产物和最后一轮单克隆噬菌体的亲和力分析均表明, 以上改进是有效的, 与 trkB 特异性结合的噬菌体得到了有效富集, 并且最后得到的噬菌体绝大多数与 trkB 上 BDNF 结合位点结合.

大部分筛选到的噬菌体展示的小肽在结构上相似, 含有核心序列 **CR**A/TX ϕ XX ϕ XX**C**(X 代表随机残基, ϕ 为 T, L 或 I). 对这些小肽的序列进一步分析发现, 核心序列中含有 3 种性质的氨基酸: 能形成二硫键的一对半胱氨酸、疏水性氨基酸(丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸)和碱性氨基酸(精氨酸), 而这 3 种性质的氨基酸恰恰是天然 BDNF 蛋白结合 trkB 所必需的结构元件[21]. BDNF 与 trkB 的结合只是通过一些特殊位点进行的, 这些特殊位点在一级序

列上是不连续的, 而是经过折叠等过程形成高级结构后在空间上形成一个局部的连续表面, 再参与结合[22]. 筛选到的小肽只有 11 个残基, 却包含了 BDNF 与 trkB 结合的 3 种必须构件, 在一级序列上与 BDNF 又无同源性, 所以它们模拟的是 BDNF 结合 trkB 的空间构象表位.

对展示于噬菌体上的 5 种小肽的生物活性进行了初步测定, 并未发现它们具有 BDNF 样活性, 反而对 BDNF 的生物活性有拮抗作用. 合成肽实验也证实有剂量依赖性的拮抗 BDNF 的作用, 说明它们可能是 trkB 受体拮抗剂. C1 合成肽与 trkB 受体的亲和力($5.46 \times 10^{-8}$ mol/L)比 C1 噬菌体克隆与 trkB 的亲和力($1.6\times10^{-10}$ mol/L)低, 原因可能是噬菌体两侧的固有氨基酸稳定了展示的 C1 肽的结构, 增强了肽与受体的亲和力. 没有生物活性的原因可能是长度太短, 使得它们只模拟了 BDNF 结合 trkB 所需的构象, 而未能模拟到激活 trkB 所需的结构信息.

这些具有 trkB 拮抗活性的小肽同样具有药物发展前景. 预后不良、恶性程度高的神经母细胞瘤中往往同时表达高水平的 BDNF 和 trkB, 二者形成自分泌/旁分泌环路, BDNF 成为瘤细胞的生长刺激因子, 同时又能促进瘤细胞出现转移和化疗耐受表型[23], 所以, trkB 拮抗性小肽在神经母细胞瘤的治疗中可能会有一定的价值. BDNF 在外周神经能引起痛觉过敏[24,25], trkB 拮抗剂也有可能用于慢性痛的治疗. 另外, 特异性的 trkB 拮抗剂还能用以阻断 trkB 的功能, 以研究 $p75^{NTR}$ 介导的生物效应. 所以, 这些具有 trkB 拮抗活性的小肽具有重要的研究意义.

综上所述, 本研究以表达于完整细胞上的 trkB 受体为靶分子, 进行了从噬菌体展示肽库中筛选有 trkB 结合活性的小肽的尝试, 使与 trkB 有亲和力的噬菌体得到了有效富集, 获得了 5 种 trkB 结合小肽, 发现了 trkB 结合配基的核心序列. 虽然在生物活性测定中发现 5 种小肽均为 trkB 拮抗剂, 但它们也具有应用前景, 并且为下面的研究奠定了基础: 在核心序列的保守残基中间和两侧添加随机氨基酸, 构建二级噬菌体展示肽库; 继续筛选获得包含结构信息更多的 trkB 高亲和力小肽, 最终找到具有药物发展前景的 BDNF 模拟肽.

**致谢**　感谢美国 New York 大学的 M. Chao 教授, 意大利 IBRM 研究所的 P. Monici 教授提供了有关的实验材料; 感谢本室赵平博士、曹洁博士、陈秋莉和仇晓芳实验师在实验中给予的帮助.

## 参　考　文　献

1 Barde Y A, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from brain. EMBO J, 1982, 1: 549~553

2 Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. Curr Opin Cell Biol, 1995, 7: 148~155

3 Murer M G, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prog Neurobiol, 2001, 63: 71~124

4 Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. Brain Res Brain Res Rev, 1998, 27: 1~39

5 Wu D, Pardridge W M. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 254~259

6 Lindsay R M, Altar C A, Cedarbaum J M, et al. The therapeutic potential of neurotrophic factors in the treatment of Parkinson's disease. Exp Neurol, 1993, 124: 103~118

7 Lowman H B. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. Ann Rev Bioghys Struct, 1997, 26: 401~424

8 Wrighton N C, Farrell F X, Chang R, et al. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. Science,

1996, 273: 458~463
9 Cwirla S E, Balasubramanian P, Duffin D J, et al. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as poten as the natural cytokine. Science, 1997, 276: 1696~1699
10 Ma Z C, Wu X L, Qi Z T. Applications of phage-displayed peptide libraries in the study of cellular signal transduction. Chemistry of Life, 2001, 21: 434~436
11 Luzzago A, Felici F, Tramomtano A, et al. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, Ⅰ. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. Gene, 1993, 128: 51~57
12 Smith G P, Scott J K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods Enzymol, 1993, 2217: 228~257
13 Doorbar J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. J Mol Biol, 1994, 244: 361~369
14 Souriau C, Gracy J, Chiche L, et al. Direct selection of EGF mutants displayed on filamentous phage using cells over-expressing EGF receptor. Biol Chem, 1999, 380: 451~458
15 Davies A M. Neurotrophic factor bioassay using dissociated neurons. In: Rush R A, ed. Nerve growth factors. Boston: John Wiley and Sons, 1989. 95~109
16 Arakawa T, Haniu M, Narhi L O, et al. Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. J Bilo Chem, 1994, 269: 27833~27839
17 DeLean A, Munson P J, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. Am J Physiol, 1978, 235: E97~102
18 Klein R, Nanduri V, Jing S, et al. The trkB tryosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-s. Cell, 1991, 66: 395~403
19 Ladner R C. Constrained peptides as binding entities. Trends Biotechnol, 1995, 13: 426~430
20 Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. Biotechnology (NY), 1995, 13: 265~270
21 Ibanez C F. Neurotrophic factors: from structure-function studies to designing effective therapeutics. Trends Biotechnol, 1995, 13: 217~227
22 Ibanez C F, Ilag L I, Murray-Rust J, et al. An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. EMBO J, 1993, 12: 2281~2293
23 Maris J M, Matthay K K. Molecular biology of neuroblastoma. J Clin Oncol, 1999, 17: 2264~2279
24 Miki K, Fukuoka T, Tokunaga A, et al. Differential effect of brain-derived neurotrophic factor on high-threshold mechanosensitivity in a rat neuropathic pain model. Nuerosci Lett, 2000, 278: 85~88
25 Shu X Q, Linas A, Mendell L M. Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study. Pain, 1999, 80: 463~470