

The Interaction Between Recombinant Protein F Derived from Nontypeable *Haemophilus influenzae* and Lipoprotein(a)

Liu En^{1,2}, Li Weng-long^{1,2}, Han Run-lin^{1,2,*}

¹College of Veterinary Science, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, China

²Research Center of Plasma Lipoprotein Immunology, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, China

Email address:

han-runlin@163.com (Han Run-lin), liuen1989xiaoxiang@163.com (Liu En)

To cite this article:

Liu En, Li Weng-long, Han Run-lin. The Interaction Between Recombinant Protein F Derived from Nontypeable *Haemophilus influenzae* and Lipoprotein(a). *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*. Vol. 3, No. 6, 2015, pp. 338-343.

doi: 10.11648/j.ajcem.20150306.11

Abstract: Protein F (PF) is a surface plasminogen (Plg) receptor on the nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi). Plg via its lysine binding sites (LBS) can bind to PF. Apolipoprotein(a) [Apo(a)] is one component of Lipoprotein(a) [Lp(a)]. It has Kringle (K) domains, which contain LBS and has a high homology with Plg. Therefore, we speculated that Lp(a) might bind to Plg receptor on the surface of NTHi, subsequently competitively inhibiting the interaction of NTHi with Plg. In this study, recombinant PF (rPF) and its C-terminal lysine residue-deleted variant (rPFΔK) were expressed in *E. coli* BL21. The interactions of rPF with Plg and Lp(a) were tested by ELISA. The results showed that rPF could bind to Plg and Lp(a). The binding capacity of rPF was significantly higher than that of rPFΔK. The interactions of rPF with Plg and Lp(a) could be inhibited by EACA. 2 mmol/L of EACA significantly inhibited the binding of rPF to Plg, while 0.2 mmol/L of EACA could significantly reduce the binding of rPF to Lp(a). 50 ng/100 μL Lp(a) could significantly inhibit the interaction of rPF with Plg. In addition, affinity chromatography assay followed by Western blotting was also used to study the interaction. In overall, C-terminal lysine residue of rPF and the lysine binding sites (LBS) of Plg and Lp(a) should be responsible for these specifically bindings. Lp(a) could combine with rPF consequently inhibiting the interaction of Plg with rPF. This revealed that Lp(a) might play a role in anti-NTHi infection.

Keywords: Nontypeable *Haemophilus Influenzae*, Plasminogen, Lipoprotein(a), Recombinant Protein F

重组不可分型流感嗜血杆菌F蛋白与脂蛋白(a)的相互作用

刘恩^{1,2}, 李文龙^{1,2}, 韩润林^{1,2,*}

¹兽医学院, 内蒙古农业大学, 呼和浩特, 中国

²血浆脂蛋白免疫学研究中心, 内蒙古农业大学, 呼和浩特, 中国

邮箱

han-runlin@163.com (韩润林), liuen1989xiaoxiang@163.com (刘恩)

摘要: F蛋白 (Protein F, PF)是不可分型流感嗜血杆菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi) 表面的一种纤溶酶原(Plg)受体。Plg利用自身的赖氨酸结合位点(LBS)与PF结合。脂蛋白(a) [Lipoprotein(a), Lp(a)]中的载脂蛋白[Apolipoprotein(a), Apo(a)]与Plg都具有K结构域,两者高度同源。基于此,本实验研究了PF与Plg、Lp(a)的相互作用,并推测Lp(a)通过与NTHi上的Plg受体结合,竞争性抑制NTHi与Plg的结合。本实验利用大肠杆菌BL21表达得到重组PF(rPF)及缺失末端赖氨酸残基的PFΔk(rPFΔk)。通过ELISA试验检测rPF与Plg、Lp(a)的相互作用,结果显示:rPF能够与Plg、Lp(a)结合,且rPF组与Plg、Lp(a)的结合显著高于rPFΔk组。6-氨基己酸(EACA)能够抑制rPF与Plg、Lp(a)的结合,当浓度达到2 mmol/L时EACA对rPF与Plg结合的抑制作用显著增强。对rPF与Lp(a)结合的抑制在浓度为0.2 mmol/L时明显增强。Lp(a)浓度达到50 ng/100 μL时,能够显著的抑制rPF与Plg结合。此外,亲和色谱层析和Western blot也证明rPF与Plg、Lp(a)的特异性结合主要是通过Plg、Lp(a)的LBS与rPF羧基末端的赖氨酸残基作用进行的。Lp(a)对rPF与Plg结合的竞争性抑制作用表明Lp(a)在抗NTHi感染过程中可能具有重要作用。

关键词: 不可分型流感嗜血杆菌, 纤溶酶原, 脂蛋白(a), 重组F蛋白

1. 引言

流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*, Hi) 发现于1892年, 是一种革兰阴性球杆菌, 可以引起不同的疾病。根据荚膜多糖的有无可以分为荚膜型 (可分型) 及非荚膜型 (不可分型)。荚膜是侵袭性Hi主要的毒力因子, 荚膜型菌株又分为六个型 (a-f), 其中b型 (Hib) 毒力最强[1]。二十世纪九十年代Hib结合疫苗的应用使得由Hib引起的侵袭性疾病的发病率显著降低[2]。和荚膜型Hi不同, 不可分型流感嗜血杆菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi) 是人体特别是儿童呼吸道内的共栖菌, 很少引起侵袭性疾病[3]。NTHi也是一种条件致病菌, 当宿主免疫功能降低时能够造成感染。NTHi主要引起呼吸道局限性疾病如急性中耳炎、支气管炎、鼻窦炎等[4-5]。和许多病原菌一样, NTHi能够利用P1g黏附到宿主的胞外基质 (ECM) 对其进行破坏, 进而对宿主造成损伤。

P1g是一种单链糖蛋白, 是人体纤溶系统的重要组成部分。P1g由791个氨基酸构成, 分子量大约为90 kD, 具有7个结构域[6]。构成P1g的7个结构域中有5个Kringle结构域 (K1, K2, K3, K4, K5), 这5个结构域中都包含LBS, 此位点可识别P1g受体羧基末端的赖氨酸残基, 而赖氨酸或赖氨酸类似物 (如EACA, 氨甲环酸等) 可竞争性抑制P1g与其受体的结合[7]。包括铜绿假单胞菌, 伯氏疏螺旋体, 肺炎链球菌, 金黄色葡萄球菌和白色念珠菌在内的大多数病原微生物都能同时表达几种不同的P1g受体。已有的研究发现, NTHi表面的E蛋白[8]、天冬氨酸酶[9]及新发现的P4蛋白[10]都是NTHi上的P1g受体。PF是NTHi菌体细胞表面的结构蛋白, 由293个氨基酸残基组成, 成熟的PF分子量为30.1 kD[11], 其羧基末端具有一个赖氨酸残基。研究表明PF参与了NTHi逃避宿主补体免疫的过程, 促进了NTHi与P1g、层粘连蛋白 (Laminin, Ln)、玻粘连蛋白 (Vitronectin, Vn) 及支气管上皮细胞的结合[12]。

Lp(a)是一种特殊的血浆脂蛋白, 由Apo(a)和LDL通过二硫键连接而成。Apo(a)中的K结构域与P1g的K结构域高度同源。Apo(a)中也具有很强的LBS, 能够结合赖氨酸及其类似物。韩润林教授提出的Lp(a)抗感染假说指出: Lp(a)可能竞争性的抑制细菌与P1g的结合, 从而抑制病原菌在宿主中的扩散[13]。

本研究将从NTHi基因组中扩增出的 *hpf* 片段连入 pGEX-6p-1 表达载体并将其转入 *E. coli* BL21 中, 诱导表达出 rPF 及缺失羧基末端赖氨酸残基的 rPF Δk。在此基础上对 rPF 与 P1g、Lp(a) 的相互作用进行初步研究, 为进一步证实 Lp(a) 抗感染机制提供了依据。

2. 材料与方法

2.1. 菌株和试剂

NTHi ATCC49247 购自卫生部临床检验中心; 表达载体 pGEX-6p-1 购自上海林渊生物科技有限公司; 限制性内切

酶 *Bam*H I、*Not* I、DL 5 000 DNA Marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物科技有限公司; Lp(a)、羊抗人 Apo(a) 多抗购自 Biomedical Technologies Inc 公司; EACA、羊抗人 LDL 多抗购自 Sigma 公司; P1g、鼠抗人纤溶酶原单抗、驴抗山羊 IgG-HRP 购自 R&D Systems 公司; 山羊抗鼠 IgG-HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司; Pierce® Glutathione Agarose、GST-probe-HRP、Pierce® BCA 蛋白测定试剂盒购自 Thermo 公司; 大肠杆菌 *E. coli* BL21、Prescission 酶、引物合成均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。所用引物见下表:

表1 引物列表。

Target gene	Primer: Sequence (5' -3')	PCR product/bp
	F: CGCGGATCCAAATTTAAAGTCGTAACCACT	
<i>Hpf</i>	R1: ATTTGCGGCCGCTCATTTTCCGAATCCTTTAAC	837
<i>hpf</i> Δk	R2: ATTTGCGGCCGCTCATCCGAATCCTTTAACATGG	834

注: 上游引物为共用引物; 下划线处为 *Bam*H I 及 *Not* I 酶识别位点

2.2. 目的基因的克隆及连接转化

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明进行 NTHi 基因组 DNA 的提取。以提取的基因组 DNA 为模板, 利用引物 F、R1 扩增 *hpf* 基因; 利用引物 F、R2 扩增 *hpf* Δk 基因。PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30s; 55℃ 退火 30s; 72℃ 延伸 1min, 30 个循环; 72℃ 总延伸 2min。

将 PCR 扩增得到的产物纯化后进行双酶切。将酶切产物进行纯化, 连接到 pGEX-6p-1 表达载体上, 构建 pGEX-6p-1-*hpf*、pGEX-6p-1-*hpf* Δk 重组表达载体, 并转入感受态 *E. coli* BL21 中。

利用通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 并将阳性菌送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 对测序结果正确的菌株进行冻存保菌。

2.3. rPF、rPF Δk 的诱导表达、鉴定及纯化

2.3.1. rPF、rPF Δk 的诱导表达

取含有 pGEX-6p-1-*hpf*、pGEX-6p-1-*hpf* Δk 重组表达载体的工程菌 *E. coli* BL21 接种于 20 mL LB/Amp (Amp 含量为 100 μg/mL) 液体培养基中, 于恒温摇床上 37℃, 200 rpm 振荡培养 16 h; 转接至 400 mL 培养基中, 37℃、200 rpm 振荡培养至 $0.6 \leq OD_{600\text{nm}} \leq 0.8$; 向培养基中加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L), 30℃、300 rpm, 恒温摇床振荡 3 h 进行诱导培养。

将诱导后的菌液离心收集沉淀并用 PBS 重悬, 置于 -80℃ 冰箱冻融 3 次; 将冻融的菌悬液融化后加入 PMSF (1 mmol/L), 溶菌酶 (0.2 mg/mL), DNA 酶 (20 μg/mL), 震荡 30 min; 4℃、10 000 rpm 离心 20 min, 收集破碎后的菌沉淀和菌上清。

2.3.2. SDS-PAGE鉴定

取样制备诱导前、诱导后及诱导破碎后菌上清、菌沉淀的电泳样品并进行SDS-PAGE电泳（4%浓缩胶，12%分离胶）。电泳完成后，经考马斯亮兰染色、脱色、照相。

2.3.3. 重组蛋白rPF、rPF Δ k的纯化

将得到的裂解后的菌上清用Wash buffer稀释后进行过柱：上清稀释液穿流3次；然后用Wash buffer对结合在柱填料上的蛋白进行清洗，除去杂蛋白；最后加入2倍体积的Elution buffer，封住出口，室温孵育20 min；然后收集洗脱液并用6个柱体积的Elution buffer洗脱结合在柱子上的蛋白，收集洗脱液。得到的洗脱液过夜透析去除杂质。

将透析得到的rPF、rPF Δ k用PEG 20 000进行浓缩后测定蛋白含量，并分装保存。

2.4. rPF、rPF Δ k标签（GST）的切除

按照2 U/100 μg的量向已知含量的rPF和rPFΔk蛋白液中加入Prescission酶，4 °C孵育24 h；然后将蛋白液加入已经用Cut buffer平衡的柱子中，封住出口在室温下孵育30 min；打开出口收集流出液，并用4个柱体积的Cut buffer洗脱目的蛋白进行收集。将切除标签后的蛋白过夜透析、浓缩并测定含量，分装保存。

2.5. 标签切除效果的Western-blot检测

rPF、rPF-GST、rPF Δ k、rPF Δ k-GST原液各取10 μL用PBS进行如下稀释：rPF、rPF Δ k为20 μg/mL；rPF-GST、rPF Δ k-GST为37.3 μg/mL（同摩尔数）。取上述各浓度的蛋白液作样后进行SDS-PAGE电泳（浓缩胶4%，分离胶10%）。电泳后利用半干转法将蛋白转移到NC膜上，将NC膜放入5%的脱脂乳-TBST中室温封闭1.5 h；加入用2%脱脂乳-TBST稀释（1:2500）的GST标签抗体，室温孵育1.5 h；加入发光试剂，然后进行成像操作。

2.6. 酶联免疫吸附试验（ELISA）检测rPF、rPF Δ k与Plg、Lp(a)的结合

2.6.1. ELISA检测rPF、rPF Δ k与Plg的结合

将rPF、rPF Δ k稀释为20 μg/mL，按照100 μL/孔将rPF、rPF Δ k包被在酶标板中室温孵育1.5 h；TBST洗板3次，5 min/次；向酶标板各孔中加入1%BSA-TBST室温封闭1.5 h；对应各孔加入不同浓度的Plg（10、50、100 ng/100 μL）100 μL/孔，室温孵育1.5 h；将鼠抗人Plg单抗（TBST 1:2 000稀释）加入对应各孔，100 μL/孔，室温孵育1.5 h；将山羊抗鼠IgG-HRP（TBST 1:3 000稀释）加入对应孔中，100 μL/孔，室温孵育1.5 h；加入四甲基联苯胺（TMB）显色液，室温作用5 min；加入终止液，于酶标仪上测定OD_{450 nm}。

2.6.2. ELISA检测rPF、rPF Δ k与Lp(a)的结合

实验方法如1.6.1所述。rPF、rPF Δ k浓度为20 μg/mL，Lp(a)浓度梯度为10、50、100 ng/100 μL。使用一抗山

羊抗人Apo(a)多抗（TBST 1:4 000稀释）；二抗驴抗山羊IgG-HRP（TBST 1:1 000稀释）。

2.6.3. 亲和色谱层析检测rPF、rPF Δ k与Lp(a)的结合

在三根已加入GST填料的层析柱中分别加入50 μg的rPF、rPF Δ k以及相应的PBS。然后向每个层析柱中加入1 mL血浆，作用30 min后用Wash buffer洗去未结合的杂蛋白。向三根层析柱中加入10U的Prescission酶，4 °C孵育24 h，用Cut buffer洗脱目的蛋白。

将上述得到的洗脱液处理后作样进行SDS-PAGE，而后用湿转电转仪将蛋白转移到NC膜上，剩余操作同1.5。检测Lp(a)使用的一抗为羊抗人Apo(a)，二抗为驴抗羊IgG-HRP；检测rPF/rPF Δ k使用的是GST-probe-HRP抗体。

2.7. ELISA检测EACA对rPF与Plg、Lp(a)结合的抑制

2.7.1. ELISA检测EACA对rPF、rPF Δ k与Plg结合的抑制

实验步骤及抗体使用与1.6.1操作一致。Plg的浓度为100 ng/100 μL，EACA终浓度为0、0.2、2.0 mmol/L。剩余步骤同1.6.1

2.7.2. ELISA检测EACA对rPF、rPF Δ k与Lp(a)结合的抑制

实验步骤及抗体使用与1.6.2一致。Lp(a)的浓度为100 ng/100 μL，EACA终浓度依次为0、0.2、2.0 mmol/L。剩余步骤同1.6.2

2.8. ELISA检测Lp(a)对rPF与Plg结合的抑制

实验步骤与1.6.1一致。Plg的浓度为100 ng/100 μL，Lp(a)终浓度为0、50、100、200 ng/100 μL。一抗、二抗的使用及稀释比例均与1.6.1所述一致。

注：ELISA检测结果采用SAS软件进行统计分析，并进行t检验。

3. 结果

3.1. 标签切除效果的Western-blot检测

由于标签蛋白本身分子量过大（26 kD），为了不影后续对目的蛋白的研究，使用Prescission酶对标签蛋白进行剪切。利用GST标签抗体对重组蛋白标签的切除效果进行检测，rPF-GST、rPF Δ k-GST大小为56 kD，切除标签后的rPF、rPF Δ k大小为30 kD。rPF-GST、rPF Δ k-GST在预期位置均有明显条带，而rPF、rPF Δ k预期大小处完全没有条带（见图1）。说明利用Prescission酶对重组蛋白实施的标签切除很干净。

3.2. ELISA检测rPF、rPF Δ k与Plg、Lp(a)的结合

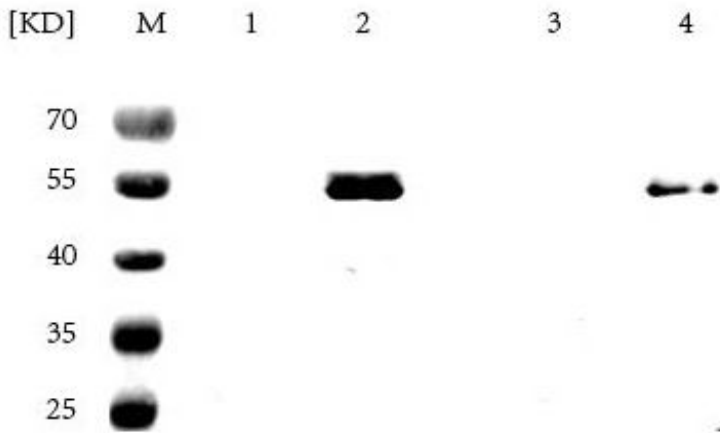
3.2.1. ELISA检测rPF、rPF Δ k与Plg的结合

ELISA检测纯化后的rPF、rPF Δ k与Plg之间的相互作用，结果（见图2A）表明：rPF、rPF Δ k与Plg的结合均具有一定的浓度依赖性，随着Plg浓度的升高结合值也在增大；同Plg浓度下，相比于rPF Δ k，rPF与Plg的结合能力显著增强（ $p < 0.01$ ）。

3.2.2. ELISA检测rPF、rPF Δ k与Lp(a)的结合

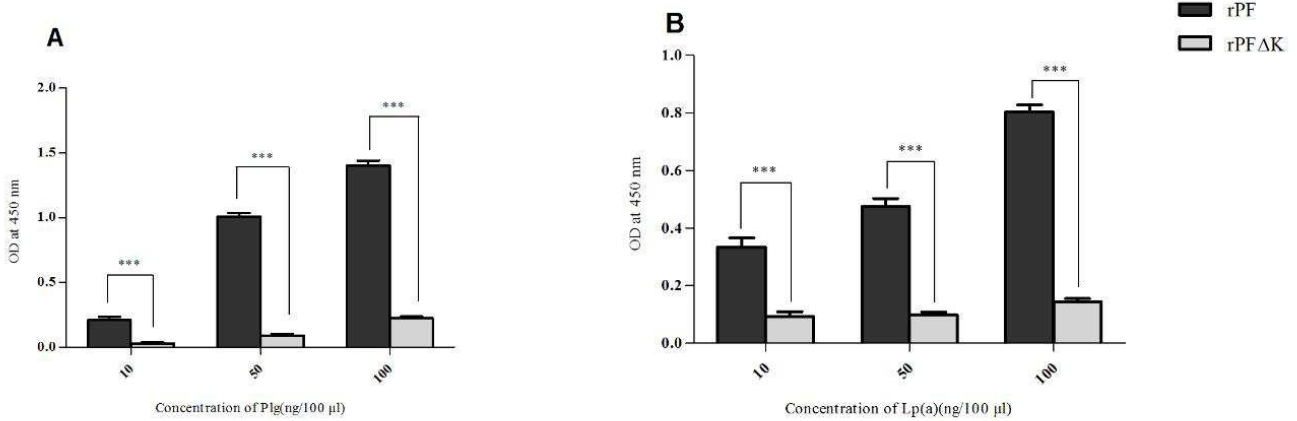
rPF、rPF Δ k与Lp(a)的ELISA检测结果（见图2B）表明：rPF、rPF Δ k与Lp(a)的结合具有浓度依赖性，在10-100

ng/100 μL浓度范围内rPF、rPF Δ k与Lp(a)的结合值随Lp(a)浓度的增高而增高。相比于rPF Δ k，rPF与Lp(a)的结合值在各浓度水平下均明显升高 ($p < 0.01$)。



M: 蛋白质分子质量标准; 1: 切除标签的rPF; 2: 未切除标签的rPF; 3: 切除标签的rPFΔk; 4: 未切除标签的rPFΔk

图1 重组蛋白标签切除的Western-blot分析。



A: rPF、rPFΔk与Plg的结合 B: rPF、rPFΔk与Lp(a)的结合 ***: ($p < 0.01$)

图2 ELISA检测rPF、rPF Δ k与Plg、Lp(a)的结合。

3.2.3. 亲和色谱层析检测rPF、rPF Δ k与Lp(a)的结合

将亲和色谱层析得到的洗脱液进行Western检测，由结果（见图3）可知：rPF、rPF Δ k与Lp(a)均结合，但在

亮度上具有明显的差异。这表明rPF羧基末端的赖氨酸残基是主要的结合位点。

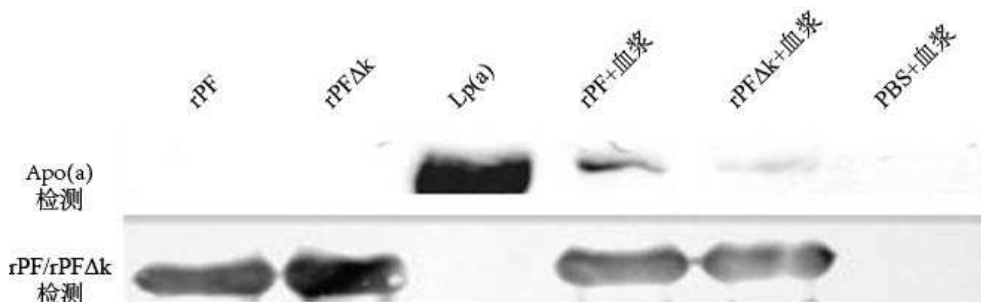
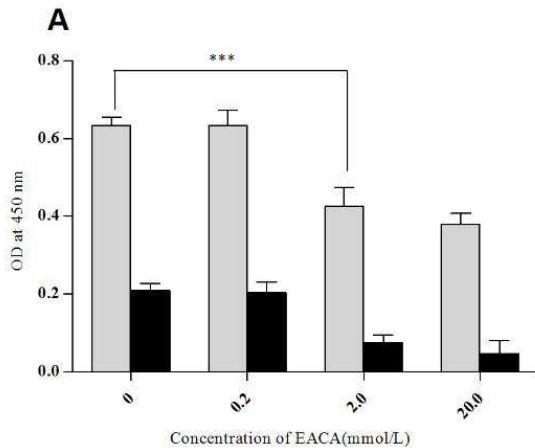


图3 Western blot 检测rPF、rPF Δ k与Lp(a)的结合。

3.3. ELISA检测EACA对rPF、rPF Δ k与P1g、Lp(a)结合的抑制

3.3.1. ELISA检测EACA对rPF、rPF Δ k与P1g结合的抑制

ELISA检测EACA对rPF、rPF Δ k与P1g结合的抑制结果(见图4A)表明:随着EACA浓度的增高,rPF与P1g的结合值在不断降低,当EACA浓度为2.0 mmol/L时,其抑制作用较浓度为0 mmol/L时具有显著性差异($p < 0.01$)。



A: EACA对rPF, rPFΔk与P1g结合的抑制 B: EACA对rPF, rPFΔk与Lp(a)结合的抑制 ***: $p < 0.01$

3.3.2. ELISA检测EACA对rPF、rPF Δ k与Lp(a)结合的抑制

ELISA检测EACA对rPF、rPF Δ k与Lp(a)结合的抑制,结果(见图4B)表明:随着EACA浓度的增高,rPF与Lp(a)的结合值在不断降低,当EACA浓度为0.2 mmol/L时,其抑制作用较EACA浓度为0 mmol/L时具有显著性差异($p < 0.01$)。

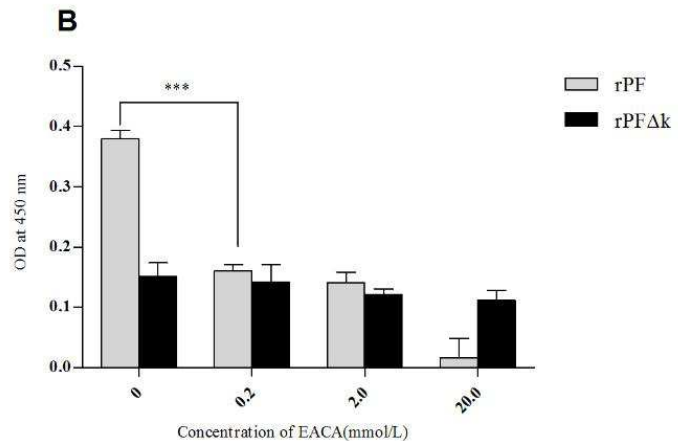


图4 EACA对rPF, rPF Δ k与P1g、Lp(a)结合的抑制。

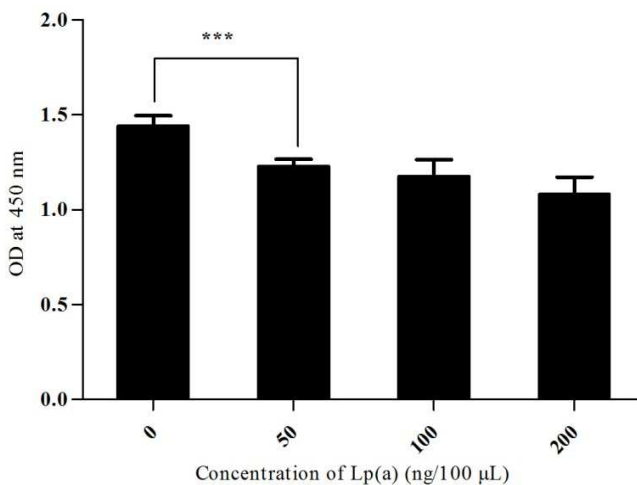


图5 Lp(a)对rPF与P1g结合的抑制 ***: $p < 0.01$ 。

3.4. ELISA检测Lp(a)对rPF与P1g结合的抑制

ELISA检测Lp(a)对rPF与P1g结合的抑制作用试验结果(见图5)表明:Lp(a)对rPF与P1g结合的抑制具有一定的浓度依赖性,当Lp(a)浓度达到50 ng/100 μL时,抑制作用显著增强($p < 0.01$)。

4. 讨论

PF是一种羧基末端含有赖氨酸残基的菌体表面蛋白。P1g、Lp(a)均具有LBS,能够与赖氨酸及其类似物相结合

[14],由本实验的研究结果可知,rPF能够与P1g、Lp(a)结合,并且EACA能够抑制这种结合作用。rPF Δ k与P1g、Lp(a)的结合值明显降低,说明rPF与P1g、Lp(a)的结合作用主要是通过rPF羧基末端的赖氨酸残基与P1g、Lp(a)上的LBS特异性结合而形成的。

此外,本研究发现rPF Δ k与P1g、Lp(a)仍然具有结合值。这说明rPF内部的其他赖氨酸残基也参与了与P1g、Lp(a)的结合作用,但发挥主要作用的是羧基末端的赖氨酸残基,这一点通过ELISA及亲和色谱层析等检测方法均得到了证实。

Lp(a)抑制rPF与P1g结合作用的研究表明,Lp(a)能够竞争性的抑制P1g与rPF的结合,当Lp(a)浓度达到50 ng/100 μL时,就能够产生显著的抑制作用。

人们对于Lp(a)与肾脏疾病及动脉粥样硬化等疾病关系的研究有所突破[15],但Lp(a)具体的生理作用仍不明确。通过本实验的研究可知Lp(a)能够抑制细菌表面PF与P1g的结合,由此推断Lp(a)能够阻断细菌利用P1g侵袭宿主的途径,在抵抗NTHi感染方面具有重要作用。

参考文献

- [1] Watt JP, Wolfson LJ, Henkle E, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates[J]. Lancet, 2009, 374(9693): 903-911.

- [2] Morris SK, Moss WJ, Halesa N, et al. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2008, 8(7): 435 - 443.
- [3] Erwin AL, Smith AL. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior[J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15(8): 355 - 362.
- [4] Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children[J]. *Pediatric Infectious Diseases*, 2009, 28(1): 43 - 48.
- [5] Turk DC. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*[J]. *J Med Microbiol*, 1984, 18:1 - 16.
- [6] Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK. Bacterial plasminogen activators and receptor[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(5):531-552.
- [7] Redlitz A, Plow EF. Receptors for plasminogen and t-PA: an update[J]. *Baillieres Clinical Haematology*, 1995, 8(2):313-327.
- [8] Barthel D, Singh B, Riesbeck K, et al. *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity[J]. *Immunology*, 2012, 188(1): 379-385.
- [9] Sjostrom I, Grondahl H, Falk G, et al. Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1324(2): 182 - 190.
- [10] Su YC, Mukherjee O, Singh B, et al. *Haemophilus influenzae* P4 interacts with extracellular matrix proteins promoting adhesion and serum resistance[Z]. <http://jid.oxfordjournals.org>, 2015-8-7.
- [11] Jalalvand F, Su YC, Mörgelin M, et al. *Haemophilus influenzae* protein F mediates binding to laminin and human pulmonary epithelial cells[J]. *Infectious Diseases*, 2013, 207(5): 803-813.
- [12] Su YC, Jalalvand F, Mörgelin M, et al. *Haemophilus influenzae* acquires vitronectin via the ubiquitous protein F to subvert host innate immunity[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87 (6): 1245 - 1266.
- [13] Han RL. Plasma lipoproteins are important components of the immune system[J]. *Microbiol Immunol*. 2010, 54 (4): 246-253.
- [14] Boeryd B. Action of heparin and plasminogen inhibitor (EACA) on metastatic tumour spread in an isologous system[J]. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1965, 65(3):395-404.
- [15] Mclean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen[J]. *Nature*, 1987, 330(6144):132-137.