

• 论 著 •

应用 siRNA 技术抑制产肠毒素大肠杆菌 LT 基因表达的研究*

付 瑞, 刘 华, 段 勇, 王玉明, 单 斌

(昆明医科大学第一附属医院检验科, 云南昆明 650032)

摘要:目的 应用小干扰 RNA(siRNA)技术抑制产肠毒素大肠杆菌(ETEC)LT 基因的表达。方法 针对 LT 基因设计 siRNAs 序列, 在 ETEC 培养过程中, 将针对 LT 的 siRNA、非特异性对照 siRNA、阴性对照 siRNA 和 LB 培养基分别加入 siRNA 组(siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组)、siRNA-coa3 组、siRNA-NC 组和空白对照组, 分 3 个时间点加入, 每次 1 nmol。在首次加入 siRNA 后 45 min(A 时间点)、90 min(B 时间点)、135 min(C 时间点)留取菌液, 应用实时荧光定量 PCR 检测上述 3 个时间点 5 组 LT mRNA 的表达水平。应用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组和空白对照组在 3 个时间点的 LT 蛋白表达水平。结果 实时荧光定量 PCR 结果显示, siRNA-LT1 在 A、B、C 3 个时间点对 LT mRNA 表达的抑制率分别为 70.9%、70.1%、72.5%, siRNA-LT2 在 A、B、C 3 个时间点对 LT mRNA 表达的抑制率分别为 70.1%、69.2%、70.5%, siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组对 LT mRNA 表达的抑制率与相应处理时间的 siRNA-NC 组、siRNA-coa3 组、空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Western Blot 结果显示, siRNA-LT1 和 siRNA-LT2 在 A、B、C 3 个时间点对 LT 蛋白表达的抑制率分别为 43.1%、18.4%、5.0% 和 38.2%、15.4%、30.1%。结论 针对 LT 基因设计合成的 siRNA 在体外能有效地抑制 LT 基因的表达。

关键词:产肠毒素大肠杆菌; 不耐热肠毒素; 小干扰 RNA 技术; RNA 干扰

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)08-1009-04

The study of using siRNA technology to silence expression of LT gene of Enterotoxigenic Escherichia coli*

Fu Rui, Liu Hua, Duan Yong, Wang Yuming, Shan Bin

(Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To inhibit the expression of LT gene of Enterotoxigenic Escherichia coli by siRNA technology. **Methods** The distinctive LT siRNAs were designed according to the LT sequence. During the process of cultivation, siRNA targeting the LT gene, non-specific control siRNA, negative control siRNA and culture medium were added into siRNA group(siRNA-LT1 group, siRNA-LT2 group), siRNA-coa3 group, siRNA-NC group and blank control group, respectively, and three times in each group(1 nmol each time). After siRNA added at the first time, bacteria was collected in 45 min (A), 90 min (B) and 135 min (C) time points. The expression of mRNA in three time points (A, B and C) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The protein level of LT in siRNA-LT1 group, siRNA-LT2 group and blank control group were detected by Western blot in three time points. **Results** The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that inhibition of siRNA-LT1 on the expression of LT mRNA at the three time points(A, B and C) were 70.9%, 70.1%, 72.5% respectively, and inhibition of siRNA-LT2 on the expression of LT mRNA at the three time points(A, B and C) were 70.1%, 69.2% and 70.5% respectively. In the three time points (A, B and C) the inhibition rate of the expression of LT mRNA in siRNA-LT1 group and siRNA-LT2 group were statistically lower than that in the siRNA-NC group, siRNA-coa3 group and blank control group ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that in siRNA-LT1 group the inhibitory rate of expression of LT protein in the three time points were 43.1%, 18.4% and 5.0%, respectively; in the siRNA-LT2 group were 38.2%, 15.4% and 30.1%, respectively. **Conclusion** The specific siRNA could inhibit the expression of LT gene in vitro.

Key words: Enterotoxigenic Escherichia coli; heat-labile enterotoxin; small interfering RNA technology; RNA interference

产肠毒素大肠杆菌(ETEC)是一种致病型的大肠埃希菌, 全球每年因感染 ETEC 发生腹泻的人数约为 6.5 亿^[1], 在发展中国家, 5 岁以下儿童每年因感染 ETEC 发生腹泻的人数约为 2.1 亿, 其中约有 38 万因该疾病死亡^[2]。目前, 临床治疗 ETEC 感染性腹泻的主要方法是应用抗菌药物及补液。但随着抗菌药物的广泛使用, 出现了大量的耐药菌株, 限制了抗菌药物的应用, 并且细菌之间耐药基因的播散在全世界范围内已

成为一个日益严重的问题。因此, 寻找新的治疗方法迫在眉睫。不耐热肠毒素(LT)是 ETEC 的主要毒力因子, 可以将它作为 ETEC 感染性腹泻治疗研究的新方向, 即通过减少 LT 的产生来治疗 ETEC 感染性腹泻。RNA 干扰(RNAi)是序列特异的双链 RNA(dsRNA)介导同源 mRNA 降解, 使细胞表现出特定基因缺失表型的过程^[3]。本实验拟设计小干扰 RNA(siRNA), 抑制 LT 基因的表达。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460322); 云南省内设研究机构科技计划项目(2011WS0048)。 作者简介: 付瑞, 女, 检验医师, 主要从事临床检验诊断方面研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 ETEC 菌株 CVCC196 购自中国兽医药品监察所。

1.2 仪器与试剂 RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR® Premix DimerEraser™ (批号 DRR091A) 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司, 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白测定试剂盒、放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液均购自碧云天生物技术研究所, 鼠抗 LT 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 Santa 公司, 兔抗 β -actin 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 加强型电化学发光 (ECL) 检测试剂盒购自美国 Millipore 公司。聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪 (7300 型) 购自美国 ABI 公司, Tanon 3500 紫外凝胶成像系统及配套软件购自上海天能科技有限公司, X 射线胶片及 X-omAT1000 型洗片机购自美国 Kodak 公司。

1.3 方法

1.3.1 siRNA 的设计与合成 根据 LT 基因序列 (JX504011.1), 应用 BLOCK-iT RNAi Designer 设计软件设计 2 对特异性的 siRNA 序列, 参照文献 [4] 合成 1 对非特异性对照 siRNA, 阴性对照序列为上海吉玛制药技术有限公司设计, 见表 1。合成工作交由上海吉玛制药技术有限公司完成。

1.3.2 siRNA 导入 ETEC 共分为 5 组, 实验组: siRNA-LT1, siRNA-LT2; 非特异性对照组: siRNA-coa3; 阴性对照组: siRNA-NC; 空白对照组: LB 培养基。将血平板上生长良好的单个菌落接种至 10 mL LB 液体培养基, 置于 37 °C 孵箱, 180 r/min 振摇培养 30 min。将该菌液均匀地分装至 5 支含 1 mL 培养基的玻璃试管中, 继续振摇培养 15 min 后, 第 1 次向菌液中加入 siRNA, 培养 45 min 后, 留取 1 mL 菌液备用; 第 2 次加入 siRNA, 培养 45 min 后, 留取 1 mL 菌液备用; 第 3 次加入 siRNA, 培养 45 min 后, 留取 1 mL 菌液备用。即共加入 3 次 siRNA, 每次间隔 45 min, 于首次加入 siRNA 后的 45 min、90 min 和 135 min (A、B、C) 3 个时间点留取菌液。本实验在 ETEC 的对数生长期间断加入 siRNA, 对新繁殖的细菌进行干扰, 同时在不同时间留取菌液进行实验, 观察干扰效果是否与作用时间有关。

1.3.3 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR 消化细菌细胞壁, 提取总 RNA, 去除基因组 DNA: 取 RNA 1 g (体积小于或

等于 7 L), 5×gDNA Eraser Buffer 2 L, gDNA Eraser 1 L, 加 RNase-free Water 至 10 L, 置于 42 °C, 加热 2 min。合成 cDNA 第 1 链: 上述溶液 10 L, RNase-free Water 4 μ L, 5×Prime-Script 缓冲液 4 μ L, RT Prime Mix 1 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L, 总体积为 20 μ L。于扩增仪 50 °C 15 min, 85 °C 5 s 进行逆转录, 得到 cDNA。用在线引物设计软件 Web Primer (斯坦福大学 SGD) 设计实时荧光定量 PCR 的扩增引物, 交由上海生工公司合成, 上游引物: 5'-TGA TCA CGC GAG AGG AAC AC-3', 下游引物: 5'-ACG CAG AAA CCT CCT GTT CA-3', 扩增片段长 221 bp。实时荧光定量 PCR 扩增体系: SYBR® Premix DimerEraser™ 试剂 (2×) 10 μ L、正向引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ L、反向引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ L、ROX Reference Dye 试剂 (50×) 0.4 μ L、cDNA 模板 2 μ L, 去 RNA 酶水 6.4 μ L, 总体积为 20 L。扩增程序: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 34 s, 共 40 个循环。内参选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 基因, 引物设计: 上游引物为 5'-TCG GCA TCA TCG AAG GTC TG-3', 下游引物为 5'-TGC CAT TCA GTT CTG GCA GT-3', 扩增片段长 177 bp, 扩增条件同上。扩增产物用含 0.5 μ g/mL 溴乙锭 (EB) 的 2% 琼脂糖凝胶在 1×TAE 电泳缓冲液中电泳, 电压 80 V, 电泳 40 min。采用 $2 - \Delta\Delta Ct$ 法计算 LT mRNA 表达的抑制率, $\Delta Ct = Ct$ 目的基因 - Ct 内参基因, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{siRNA} - \Delta Ct_{空白对照}$, 抑制率 = $(1 - 2 - \Delta\Delta Ct) \times 100\%$ 。

1.3.4 总蛋白的提取及蛋白质印记法 (Western blot) 消化细菌细胞壁, 4 °C, 4 000 g 离心 5 min, 弃上清。加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂, 每 10 min 用漩涡振荡器震荡 1 次, 重复 3 次。4 °C, 4 000 g 离心 30 min, 取上清液经超滤浓缩后置于 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 行蛋白分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。鼠抗 LT 单克隆抗体按 1:200 进行稀释, 兔抗 β -actin 多克隆抗体按 1:3 000 进行稀释, 室温孵育 0.5 h, 置于 4 °C 过夜。羊抗鼠 IgG 抗体按 1:2 000 进行稀释, 羊抗兔 IgG 抗体按 1:5 000 进行稀释, 室温孵育 1 h。用化学发光法显色, 将胶片用扫描仪进行扫描, 应用上海天能科技有限公司 GIS 凝胶图像处理系统测定各蛋白条带的灰度值, 以目的条带与内参 β -actin 条带的灰度值之比作为 LT 蛋白表达的相对表达水平。

表 1 LT、非特异性对照及阴性对照的 siRNA 序列

siRNA	正义/反义链	位置
siRNA-LT1	5'-CAA ACC GGC UUU GUC AGA UAU GAU GTT 5'-CAU CAU AUC UGA CAA AGC CGG UUU GTT	199~223
siRNA-LT2	5'-AGU GCU CAC UUA GCA GGA CAG UCU ATT 5'-UAG ACU GUC CUG CUA AGU GAG CAC UTT	256~280
siRNA-coa3	5'-CGC AUU AGC AGU UGC AUC UAG CUU ATT 5'-UAA GCU AGA UGC AAC UGC UAA UGC GTT	
siRNA-NC	5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT	

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计学分析, 计量资料以均数表示, 对数据进行正态性检验和方差齐性检验, 若符合正态分布且方差齐, 则选用方差分析; 若呈非正态分布或方差不齐, 则选用多个独立样本的秩和检验及后续的两个独立样本的秩和检验; 计数资料以百分率表示, 组

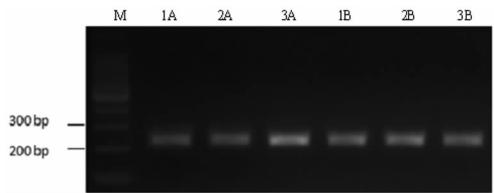
间比较采用 χ^2 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 结果 琼脂糖凝胶电泳结果显示, LT 基因及内参基因扩增产物与预期的扩增产物大小一致, 无

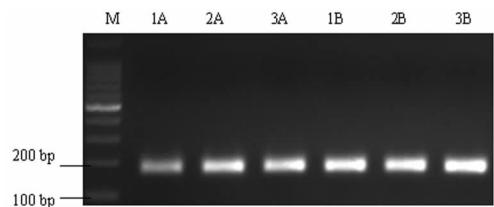
明显非特异性条带,见图 1~2。siRNA-LT1、siRNA-LT2、siRNA-NC 及 siRNA-coa3 在 A、B、C 3 个时间点对 LT mRNA 表达的抑制率见表 2,siRNA-LT1、siRNA-LT2 对 LT mRNA 表达的抑制率与相应处理时间的 siRNA-NC、siRNA-coa3、LB 培养基组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。GAPDH cDNA 扩增产物凝胶电泳,见图 2。

2.2 Western blot 检测结果 对 siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组和 LB 培养基组在 3 个时间点的 LT 蛋白进行 Western blot 检测,见图 3~4。siRNA-LT1 在 A、B、C 3 个时间点对 LT 蛋白表达的抑制率分别为 43.1%、18.4%、5.0%,siRNA-LT2 在 A、B、C 3 个时间点对 LT 蛋白表达的抑制率分别为 38.2%、15.4%、30.1%。



M 为 DNA 标记物,1A、2A、3A 分别为 siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组、siRNA-coa3 组在 A 时间点表达的 RNA;1B、2B、3B 分别为 siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组、siRNA-coa3 组在 B 时间点表达的 RNA。

图 1 LT cDNA 扩增产物凝胶电泳



M 为 DNA 标记物,1A、2A、3A 分别为 siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组、siRNA-coa3 组在 A 时间点表达的 RNA;1B、2B、3B 分别为 siRNA-LT1 组、siRNA-LT2 组、siRNA-coa3 组在 B 时间点表达的 RNA。

图 2 GAPDH cDNA 扩增产物凝胶电泳

表 2 不同时间点各组 LT mRNA 表达的抑制率(%)

组别	A	B	C
siRNA-LT1 组	70.9	70.1	72.5
siRNA-LT2 组	70.1	69.2	70.5
siRNA-NC 组	9.9	15.9	0.0
siRNA-coa3 组	0.0	0.0	11.2

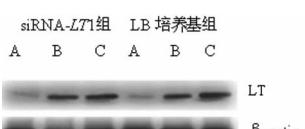


图 3 Western blot 检测 siRNA-LT1 组与 LB 培养基组在 A、B、C 3 个时间点的蛋白表达分析图

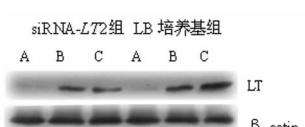


图 4 Western blot 检测 siRNA-LT2 组与 LB 培养基组在 A、B、C 3 个时间点的蛋白表达分析图

3 讨 论

RNAi 是序列特异的 dsRNA 介导同源 mRNA 降解,使细胞表现出特定基因缺失表型的过程。目前普遍认为 RNAi 是生物基因组抵抗外来遗传元件入侵的一种保护性机制,当病毒基因、人工转入基因、转座子等外源基因随机整合到宿主细胞基因组内,并利用宿主细胞进行转录时,常产生一些 dsRNA。细胞中的 RNA 酶Ⅲ家族核酸酶 Dicer 依赖三磷酸腺苷(ATP),将这些 dsRNA 切割成约 21~23 碱基对的 siRNA,siRNA 的一条链与 Argonaute 亚家族蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合物(RISC),有活性的 RISC 中的 siRNA 反义链与同源 mRNA 分子上的靶序列结合,在酶的催化作用下,将其切割、降解^[4]。同时,siRNA 可以作为引物与靶 mRNA 结合,并在 RNA 聚合酶(RdRP)的作用下将单链 mRNA 转变为双链,随后 Dicer 酶再对其进行切割,导致靶 mRNA 的降解^[5]。这种聚合酶链反应使细胞内的 siRNA 数量明显增加,新产生的 siRNA 可再次参与上述循环,从而明显增强了对基因表达的抑制作用。随着 RNAi 机制的阐明,该技术在真核细胞及病毒基因功能的研究中得到了广泛的应用。近期有研究表明,原核生物可能含有类似真核生物 RNAi 的调节机制。细菌中大部分小 RNA(sRNA)分子可通过与靶 mRNA 结合,引起靶 mRNA 降解,从而在转录后水平调节细菌基因的表达,影响细菌的生理功能^[6~7]。此外,科学家在许多细菌及大多数古细菌的基因组中发现了一类成簇的、规律间隔的短回文重复序列(CRISPR),且在 CRISPR 附近总是定位着一些与 CRISPR 有密切关系的基因,将其命名为 CRISPR 相关(cas)基因,CRISPR/cas 系统(CASS)则由 CRISPR 及 cas 蛋白两部分组成^[8]。Makarova 等^[9]对 CRISPR 及 cas 基因进行比较基因组学分析,认为 CASS 防御噬菌体及质粒入侵的机制与真核生物的 RNAi 机制类似。近几年,siRNA 技术也逐渐被应用于原核生物。严燕国等^[10]通过电穿孔法将 5 对特异的 siRNA 导入幽门螺旋杆菌中,对 CagA mRNA 表达的抑制率达 68.7%,Western blot 结果也显示 CagA 蛋白表达水平低于干扰前。同年,该研究组又对幽门螺旋杆菌 vacA 基因进行 RNAi,对 vacA mRNA 表达的抑制率达 77%。汤谨等^[11]以 blakpc-2 为目标基因设计合成 siRNA,用电转移法将 siRNA 分别导入 2 株产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶-2(KPC-2)的肺炎克雷伯菌中,结果显示 siRNA 对 blakpc-2 mRNA 的抑制率达 82%。龚凤云等^[12]针对铜绿假单胞菌 mexB 基因设计合成特异性 siRNA 分子,并构建 pGPU6/GFP/Neo-siRNA 重组质粒,将其电转入铜绿假单胞菌,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 MexB mRNA 表达量的变化,结果显示干扰后 MexB mRNA 表达量明显下降。

汤谨等^[11]以 blakpc-2 为目标基因设计合成特异性 siRNA 及非特异性 siRNA,结果显示非特异性 siRNA 对目的基因也有抑制效果。因此,本实验尝试设计一对非特异性 siRNA (siRNA-coa3),实验结果显示在 A、B 时间点 siRNA-coa3 对 LT 基因的抑制率为 0.0%,在 C 时间点的抑制率为 11.2%。同时,阴性对照 siRNA-NC 在 A、B 时间点的抑制率分别为 9.9%、15.9%,在 C 时间点的抑制率为 0.0%。可见阴性及非特异性的 siRNA 对目的基因有一定的干扰作用,且与时间有关。目前 siRNA 干扰技术通常用于真核生物,在原核生物中的运用还不够成熟,出现该结果可能与 siRNA 的设计有关。本实验针对 LT 基因设计了 2 对特异性的 siRNA,实验结果显示 siRNA-LT1 的干扰效果较 siRNA-LT2 好,这可能与它们鸟嘌呤与胞嘧啶(G+C)的含量有关,或者与它(下转第 1014 页)

核分枝杆菌,结核分枝杆菌也以多种方式逃避巨噬细胞的杀伤,尤其重要的是结核分枝杆菌可调控巨噬细胞的凋亡。作为结核分枝杆菌在体内存活的宿主细胞,巨噬细胞的凋亡情况从一定程度上决定了结核分枝杆菌的命运,对结核病的发生、发展及预后都具有重要影响^[6]。本研究结果显示,在治疗前结核病患者的 Mono 与 Mono% 均明显高于体检健康者,治疗 1 个月时明显降低,但在治疗 2、3 个月时 Mono 与治疗 1 个月时比较无明显变化,提示在疾病初期,单核细胞在单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)作用下快速到达炎症区域,使 Mono 明显增加^[7]。在吞噬病原体后,巨噬细胞可以通过自身凋亡来消除结核分枝杆菌赖以生存的环境,抑制其在宿主体内的进一步生长和繁殖^[8-9],使得单核细胞在治疗早期明显降低。随着治疗的进行,在抗结核药物的作用下,感染受到控制,Monos 不再增加,而结核分枝杆菌对单核细胞凋亡的抑制作用使得 Mono 保持在一个相对稳定的水平。

此外,值得注意的是,本研究结核病患者在治疗 1 个月和 2 个月时,上述 7 项指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明结核病患者治疗 1~2 个月期间外周血中 WBC、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞均保持在稳定的水平。该定期出现的原因,以及其是否与结核病的病情或抗结核治疗方案有关(处于第 2 个强化治疗期),将有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis[J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4(3): 288-293.

(上接第 1011 页)

们所针对的靶序列的位置有关。LT mRNA 表达量的检测结果显示,2 对特异性 siRNA 在 B 时间点抑制效果均比 A 和 C 时间点差,这可能与细菌的繁殖周期有关,在 B 时间点细菌处于对数生长期,活菌数量较多,导致加入 siRNA 的量与活菌数的比值相对较低。但在该实验中 siRNA-LT1 对 LT 蛋白表达的抑制效果是 C 点最差,由于目前可参考的相关文献和实验条件较少,该问题还需进一步研究。

参考文献

- [1] Yavzori M, Porath N, Ochana O, et al. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli in stool specimens by polymerase chain reaction [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998, 31(4): 503-509.
- [2] Tamura K, Sakazaki R, Murase M, et al. Serotyping and categorisation of Escherichia coli strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia[J]. *J Med Microbiol*, 1996, 45(5): 353-358.
- [3] Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, et al. RNA interference in the clinic: challenges and future directions[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(1): 59-67.
- [4] Zhe Ren, Shen Li, Qiao-li Wang, et al. Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relation and relative expression levels of RR Mrna[J]. *Virologica Sinica*, 2011, 26(1): 40-46.
- [5] Merritt WM, Bar-Eli M, Sood AK. The dicey role of Dicer: implications for RNAi therapy[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2571-

- [2] Torrado E, Cooper AM. What do we really know about how CD4 T cells control Mycobacterium tuberculosis[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(7): e1002196[2011-07-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829359>.
- [3] Eum SY, Kong JH, Hong MS, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB[J]. *Chest*, 2010, 137(1): 122-128.
- [4] 姜丽娜, 姚春艳, 金齐力, 等. 结核病患者中性粒细胞表面 Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 的表达及意义[J]. 蚌埠医学院学报, 2012, 37(6): 624-626.
- [5] 龙敏, 罗军, 龙北国, 等. 结核杆菌诱导的凋亡中性粒细胞对人巨噬细胞活性的影响[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(9): 748-750.
- [6] 刘云霞, 张万江. 结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(6): 617-622.
- [7] 何非. C 反应蛋白和脂蛋白对人外周血单核细胞趋化蛋白-1 及其受体表达的影响[D]. 南方医科大学, 2009.
- [8] 韦莉, 金齐力, 刘勇, 等. 结核分枝杆菌 P19 对巨噬细胞 TLR-2 表达及分布的影响[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(12): 1158-1161.
- [9] Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death [J]. *Immunity*, 2008, 29(2): 283-294.

(收稿日期:2015-01-08)

2574.

- [6] Soper T, Mandin P, Majdalani N, et al. Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq[J]. *Proc Natl Sci USA*, 2010, 107(21): 9602-9607.
- [7] De Lay N, Gottesman S. A complex network of small non-coding RNAs regulate[J]. *Mol Microbiol*, 2012, 86(3): 524-538.
- [8] Takeuchi N, Wolf YI, Makarova KS, et al. Nature and intensity of selection pressure on CRISPR-associated genes[J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(5): 1216-1225.
- [9] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic m-achinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of acti-on [J]. *Bio Direct*, 2006, 1(7): 1-26.
- [10] 严燕国, 詹文华, 赵刚, 等. CagA 对幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞分泌 IL-8 水平的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(4): 801-805.
- [11] 汤谨, 蒋燕群. KPC 酶在肺炎克雷伯菌碳青霉烯类耐药中的研究[J]. 检验医学, 2010, 25(12): 940-944.
- [12] 龚凤云, 王丽丽, 宋莹, 等. siRNA 干扰铜绿假单胞菌 MexA-MexB-OprM 外排泵 mexB 基因表达的研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2011, 31(9): 796-800.

(收稿日期:2015-01-28)