

# 深度测序技术分析布鲁菌感染巨噬细胞 RAW264.7 早期转录组学变化

刘倩宏<sup>1,2</sup>, 韩文瑜<sup>2\*</sup>

(1. 吉林农业科技学院动物科学学院, 吉林 132101; 2. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062)

**摘要:** 本研究试图寻找参与布鲁菌胞内感染相关的宿主相关基因, 为从感染宿主角度阐述布鲁菌的致病机制奠定基础。布鲁菌感染小鼠巨噬细胞后, 利用数字基因表达谱技术筛选小鼠巨噬细胞感染布鲁菌 16M 株的差异表达基因, 并利用荧光定量 PCR 对差异表达基因进行验证。差异表达基因经 GO Term、KEGG 分析, 识别感染后显著富集的信号通路。在感染后 4 h, 筛选出差异表达基因 3 576 个, 其中 58% 的基因表现上调。并且 NOD 凋亡信号通路、溶酶体信号通路、NOD 受体信号通路、Fc $\gamma$ R-介导的吞噬通路、p53 信号通路、内质网蛋白处理相关通路被显著富集。利用数字基因表达谱技术成功分析巨噬细胞感染布鲁菌后转录组学变化, 为布鲁菌致病机制的逐步阐述奠定基础。

**关键词:** 深度测序; 转录组学; 布鲁菌; 感染

中图分类号: S852.614

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)11-1810-08

## Deep Sequencing-based Early Transcriptome Analysis of the RAW264.7 Cell with the *Brucella* Infection

LIU Qian-hong<sup>1,2</sup>, HAN Wen-yu<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science, Jilin Agricultural and Technology College, Jilin 132101, China;  
2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** This experiment was designed to screen the genes of host involved *Brucella* intracellular infection and lay a foundation for elaborating the pathogenic mechanism. The murine macrophages were infected with *Brucella melitensis* 16M strains, and then the differently expressed genes of macrophages were screened with the digital gene expression profiling technology. The genes differently expressed were verified with the quantitative real-time PCR. Then the genes were analyzed with the GO Term and KEGG to screen the signals significantly enriched. There were 3 576 genes expressed significantly difference 4 hours post infection, approximately 58% genes were up-regulated. NOD-like receptor signaling pathway, lysosome pathway, Fc gamma R-mediated phagocytosis, p53 signaling pathway, apoptosis pathway and protein processing in the endoplasmic reticulum pathway were enriched. Transcriptomics profile of murine macrophages infected with *Brucella melitensis* 16M strain was successfully analyzed.

**Key words:** Deep sequencing-based expression; transcription; *Brucella*; infection

布鲁菌病是由布鲁菌引起的一种人兽共患病。动物感染布鲁菌后, 表现为关节炎、波浪热、全身多

组织器官、胎膜的发炎、坏死和肉芽肿的形成, 怀孕母畜流产、甚至不孕, 公畜产生睾丸炎、附睾炎等症

收稿日期: 2012-04-12

基金项目: 中国农业部资助(2009ZX08009-163B)

作者简介: 刘倩宏(1973-), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 博士, 讲师, 主要从事布鲁菌病的相关研究, E-mail: qianhongliu@126.com

\* 通讯作者: 韩文瑜, E-mail: hanwy@jlu.edu.cn

状;人感染后也表现为波浪热、关节肿大、变形、不孕、不育等症状<sup>[1]</sup>。该病曾被用作生物恐怖战剂,给养殖业、人类健康及食品安全带来巨大威胁。

巨噬细胞作为机体的免疫细胞,构成机体防御力量的一个因素,是对抗外界病原微生物入侵的第一道防线。布鲁菌作为兼性胞内寄生菌,可以在巨噬细胞内增殖、复制,调节巨噬细胞的凋亡,阻止吞噬体-溶酶体融合,逃逸宿主细胞的防御机制<sup>[2-3]</sup>。多数的研究者是从病原菌的角度进行研究,但在感染过程中宿主细胞也发挥着非常重要的作用,关于宿主在感染方面所发挥的作用仍不明<sup>[4-6]</sup>。

数字基因表达谱技术(Digital gene expression profiling, DGE)是以标签(tag)为基础的新一代高通量测序技术,通过 4 碱基识别酶 *Nla* III 酶切双链 cDNA,分离 polyA 产生短链原始标签(Short raw tags),每个标签 21 bp。最终样品中所有基因的表达水平是由 Short raw tags 通过测序来决定的。由于 DGE 技术其无偏差的本性,更具有敏感性、客观性,因此更能客观的反应细胞的生物学状态,尤其适合于比较 2 个样本的基因表达水平的差异<sup>[7-9]</sup>。

在本研究中,利用 DGE 技术分析小鼠巨噬细胞 RAW264.7 感染布鲁菌 16M 菌株后的基因表达水平变化,试图识别参与布鲁菌感染的宿主基因,为布鲁菌致病机制的逐步阐述奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养条件

将 *B. melitensis* 16M 菌株(王兴龙实验室馈赠)于 37 °C 条件下,在 TSA(Tryptic soy agar)平板划线分离培养,将单菌落在 TSB(Tryptic soy broth)液体培养基中增殖到对数生长期,4 °C 保存,备用。

### 1.2 细胞培养与试剂

小鼠巨噬细胞 RAW264.7(本实验室保存)培养在 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)液体培养基中,其中添加 10% 小牛血清,根据细胞生长情况每 3~5 d 传代 1 次,15 代以后弃掉。试验前将 RAW264.7 细胞铺在 24 孔细胞培养板上,每孔细胞浓度大约为  $2.5 \times 10^5$  个,每孔加入 DMEM 培养液 0.5 mL。

### 1.3 巨噬细胞的感染与存活试验

本试验所用方法已经被广泛描述过<sup>[10-11]</sup>。按 1 000 : 1 的比例对细胞进行侵袭,室温 200 × g 离

心 5 min,37 °C 孵育 20 min,用 PBS 洗涤 3 次后,加入含有庆大霉素( $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )的 DMEM 培养基,分别于感染后 4、24、36、48 h 结束。用 0.1% Triton X-100 裂解细胞,将裂解物在 TSA 平板上培养 3 d 后进行菌落计数。

### 1.4 RNA 提取及检测

收集未感染、感染后 4 h 细胞,利用 Trizol 裂解细胞, $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后提取细胞总 RNA,其余操作根据 Promega 公司操作手册进行,最后用无 RNase 水洗脱 RNA。提取 RNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度、 $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$  检测其完整性,检测合格后 -80 °C 备用。

### 1.5 Tag 标签制备及测序

利用 Oligo(dT) 磁珠吸附纯化提取总 RNA 中的 mRNA,并以 Oligo(dT) 引导反转录合成双链 cDNA。利用 *Nla* III 酶识别并切断 cDNA 上的 CATG 位点,利用磁珠沉淀纯化带有 cDNA 3' 端的片段,将其 5' 末端连接 Illumina 测序接头 1。Illumina 接头 1 与 CATG 位点的结合处是 *Mme* I 酶的识别位点,酶切 CATG 位点下游 17 bp 处,产生带有接头 1 的 Tag。通过磁珠沉淀去除没有加上接头的 3' 片段,在 Tag 3' 末端连接 Illumina 接头 2,从而获得两端连有不同接头序列的 21 bp 标签 library。经过 15 循环的 PCR 线性扩增后,通过电泳纯化 95 碱基条带。解链后,单链分子被加到 Illumina 测序芯片(Flowcell)上并固定,每条分子经过原位扩增成为一个单分子簇(Cluster)测序模板,加入 4 色荧光标记的 4 种核苷酸,采用边合成边测序法(Sequencing by synthesis, SBS)测序。每个通道将产生数百万条原始读本(Read),Read 的测序读长为 35 bp。

### 1.6 识别差异表达基因

利用软件检索 mRNA 上所有的 CATG 位点,生成 CATG+17 nt 碱基的参考标签数据库。然后将全部净标签(Clean Tag)与参考标签数据库比对,允许最多 1 个碱基错配,对其中唯一比对到 1 个基因的标签(Unambiguous Tags)进行基因注释,统计每个基因对应的原始 Clean Tag 数,然后对原始 Clean Tag 数做标准化处理,获得标准化的基因表达量。对差异检验的 *P* value 作多重假设检验校正,通过控制 FDR(False Discovery Rate)来决定 *P* 值的阈值<sup>[12]</sup>。在分析中,差异表达基因定义为  $\text{FDR} \leq 0.01$  且倍数差异在 2 倍及以上的基因。

### 1.7 荧光定量 PCR 验证差异表达基因

分别提取未感染、布鲁菌感染 RAW264.7 细胞后 4 h 的总 RNA,用反转录酶(TaKaRa 公司)将 RNA 反转录成 cDNA,20  $\mu\text{L}$  反应体系,包括 1  $\mu\text{L}$  AMV 反转录酶,1 $\times$ AMV buffer 1  $\mu\text{L}$ ,反应条件:42  $^{\circ}\text{C}$  1 h,75  $^{\circ}\text{C}$  15 min。反转录成的 cDNA -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

荧光定量 PCR 试验使用北京天恩泽公司即用

型荧光定量 PCR 试剂盒进行,按说明书操作进行,反应在 ABI7000 荧光定量 PCR 仪上进行。以 *GADPH* 基因作为内参,进行数据的标准化处理。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 qPCR MagicMix(2 $\times$ ),10  $\mu\text{L}$ ;上/下游引物,各 0.5  $\mu\text{L}$ ;模板(cDNA)1  $\mu\text{L}$ ;加超纯水补足体积到 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  15 s,56  $^{\circ}\text{C}$  15 s,40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  30 s。反应所用引物见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 反应所用引物

Table 1 The system of digestion reaction

基因 Gene	上游引物/下游引物 (5'→3') Left primer/Right primer (5'→3')	PCR 产物长度/bp Length of PCR products
Dpp7 (NM_031843.2)	GGATGCCTTTCAGCAAATC TGGCGAGCACAGTAAATG	148
Rab71l ( NM_144875.2 )	TTCACAGGTTGGACAGAAAC GGGTGGACAAAGACATCAC	117
Bax ( NM_007527.3 )	TGGAGATGAACTGGACAGC AAAGTAGAAGAGGGCAACCA	150
Aifm1 ( NM_012019.2 )	TGGAGCAGAGGTGAAGAGTA CCCGCCGATAACTGTAAT	105
Ly96 ( NM_016923.2 )	GGTCTTCCTGGCGAGTTTA CCACTGTTGCTTCTCAGATTC	108
Tnf ( NM_013693.2 )	TCTTCTCATTCCTGCTTGTG CTTGGTGGTTTGCTACGAC	197
Mapk3 ( NM_011952.2 )	GCTCTTTCCTAAATCTGACTCC CTGTTCCAGGTAAGGGTGA	114
Defb1 ( NM_007843.3 )	ATCTGTCAGCCCAACTACCT TGAGAATGCCAACACCTG	142
Ctsk ( NM_007802.3 )	CAGGATGTGGGTGTTCAA GTTATGGGCAGAGATTTGCT	186
Ctss ( NM_021281.2 )	ATCTTGTGTCGGATGGGT CCCTGGTATTTACACCTCAGT	139
Pstpip1 ( NM_011193.2 )	GAACAACCTGGAGAGAGCGA CTCATCATCCTTGACACACTG	155
Cxcl2 ( NM_009140.2 )	GACTTCAAGAACATCCAGAGC TTTCCAGGTCAGTTAGCCTT	175
Pon2 (NM_183308.2 )	TCTGAGTTTGCTGGGCATC AGGTGGCAGTTTGGAAAGGT	113
Gmppa (NM_133708.3 )	TTCGTGCTCAATGCTGAC GCTGGGTTTCTCCACATAGT	185
Tlr2 NM_011905.3	GAGATGTGTCGCAATCA GCTCCAGAGATGAACGAAA	169

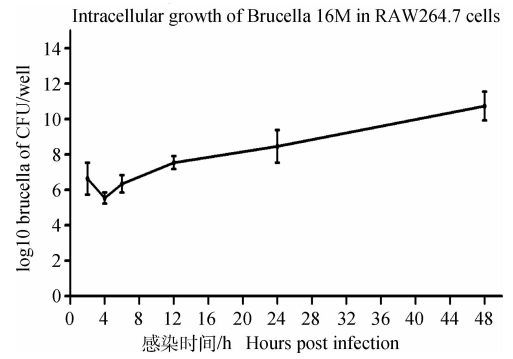
## 2 结果

### 2.1 布鲁菌在胞内生存的两相性

在细胞感染细菌后 2、4、6、12、24 h,通过菌落计数试验表明,胞内细菌的生长呈现两相性,在感染后 4 h 胞内细菌数量达到最低,此后细菌数量逐步上升,在感染后 48 h 达到最高(图 1)。

### 2.2 差异表达基因的识别与筛选

$FDR \leq 0.01$  且倍数差异在 2 倍及以上的基因被认为是差异表达基因。在感染后 4 h,与对照组相比有 3 576 个基因的表达出现了显著变化(GSE28190),其中 2 058 个序列出现了显著上调,1 518 个序列出现了显著下调。这些显著变化的基因都是与免疫、信号传导、炎症、凋亡、细胞膜、转录调控和胞内攻击相关的,主要基因的变化情况见表 2。



以 MOI 1000 感染细胞,胞内细菌的数量用每孔内 CFU 计算,试验重复 3 次

RAW264.7 macrophage cells were infected with strain 16M at a MOI of 1 000, the number of live intracellular bacteria was determined by the number of CFU/well, the results were representative for one experiment of total three similar experiments

图 1 布鲁氏菌 16M 菌株在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 内的增殖曲线

Fig. 1 Intracellular growth of *B. melitensis* 16M in RAW264.7 macrophages

表 2 感染后 4 h 重要差异表达的基因

Table 2 Significant differentially expressed genes at 4 hours post infection

转录 ID Transcript ID	log <sub>2</sub> 值(感染 4 h/对照) log <sub>2</sub> ratio(4 h/control)	描述 Description
gi 229576821 ref NM_010546.2	5.424 627 189	Inhibitor of kappaB kinase beta
gi 118130221 ref NM_145827.3	4.750 021 747	NLR family, pyrin domain containing 3
gi 117606363 ref NM_008689.2	4.231 136 054	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105
gi 6755862 ref NM_011631.1	3.522 265 215	Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1
gi 118130747 ref NM_008361.3	3.156 259 317	Interleukin 1 beta
gi 226246626 ref NM_011950.2	2.582 062 61	Mitogen-activated protein kinase 13
gi 164698427 ref NM_013653.3	2.342 179 411	Chemokine (C-C motif) ligand 5
gi 133892368 ref NM_013693.2	2.107 977 571	Tumor necrosis factor
gi 118130527 ref NM_009140.2	2.004 230 53	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
gi 157951673 ref NM_009688.2	1.331 930 584	X-linked inhibitor of apoptosis
gi 141801771 ref NM_011639.3	1.013 641 456	Thyroid hormone receptor interactor 6
gi 6680412 ref NM_008360.1	-2.042 003 48	Interleukin 18
gi 226958664 ref NM_013654.3	-2.540 190 34	Chemokine (C-C motif) ligand 7
gi 93102422 ref NM_011952.2	-2.825 316 61	Mitogen-activated protein kinase 3
gi 253314486 ref NM_001163138.1	-8.066 089 19	Caspase recruitment domain family, member 6
gi 87239966 ref NM_007769.2	7.327 438 883	Deleted in malignant brain tumors 1

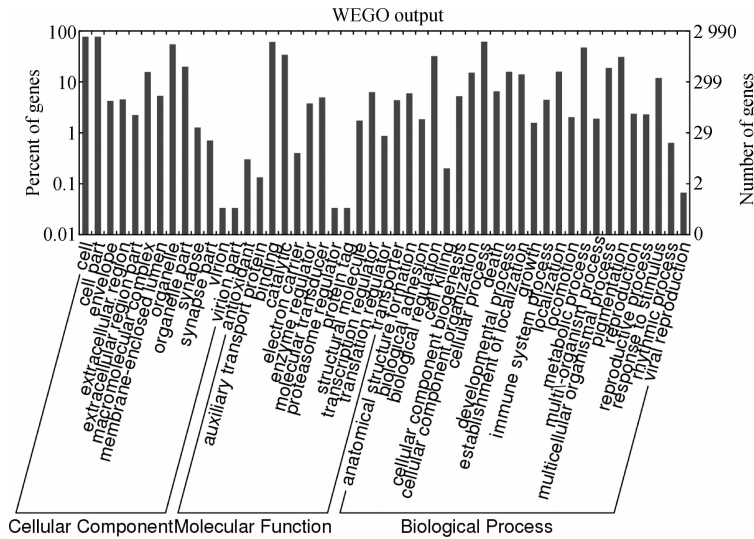
(续表 2 Continued)

gi 146149127 ref NM_133826.4	6.514 738 106	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit H
gi 31981424 ref NM_031843.2	4.929 358 966	Dipeptidylpeptidase 7
gi 115270982 ref NM_018822.3	2.767 589	N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (sulfamidase)
gi 110225378 ref NM_007379.2	2.438 541 818	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
gi 262205477 ref NM_010498.3	-1.432 2	Iduronate 2-sulfatase
gi 141802324 ref NM_011930.3	-2.993 48	Chloride channel 7
gi 109689715 ref NM_008640.2	-2.576 19	Lysosomal-associated protein transmembrane 4A
gi 268370149 ref NM_001136091.2	-3.070 389 328	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 protein A3
gi 171184397 ref NM_016722.3	-3.150 312 367	Galactosamine (N-acetyl)-6-sulfate sulfatase
gi 89242145 ref NM_008720.2	-3.210 804 836 492 0	Niemann Pick type C1
gi 261244939 ref NM_028710.3	-3.272 215 88	Arylsulfatase G
gi 254588017 ref NM_026193.2	-3.272 215 882	Adaptor-related protein complex AP-4, beta 1
gi 261244939 ref NM_028710.3	-3.544 718 41	Arylsulfatase G
gi 30794139 ref NM_028295.1	2.567 914 207	Protein disulfide isomerase associated 5
gi 160333215 ref NM_001110500.1	2.564 623 768	Calnexin
gi 112293263 ref NM_007952.2	2.039 345 579	Protein disulfide isomerase associated 3
gi 238637321 ref NM_019449.2	-1.177 7	unc-93 homolog B1 ( <i>C. elegans</i> )
gi 229608950 ref NM_144875.2	-1.381 185 75	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
gi 146134405 ref NM_016906.4	-2.082 313 19	Sec61 alpha 1 subunit ( <i>S. cerevisiae</i> )
gi 146134405 ref NM_016906.4	-2.082 313 19	Sec61 alpha 1 subunit ( <i>S. cerevisiae</i> )
gi 254540167 ref NM_001163434.1	-2.145 687 67	Heat shock protein 5
gi 148747259 ref NM_024456.4	-2.581 458 91	RAB5C, member RAS oncogene family
gi 156151432 ref NM_001102404.1	-3.544 718 41	Acid phosphatase 5, tartrate resistant
gi 226958444 ref NM_008048.3	8.543 032	Insulin-like growth factor binding protein 7
gi 118131034 ref NM_015733.4	4.157 200 221	Caspase 9
gi 86198317 ref NM_007630.2	4.060 300 51	Cyclin B2
gi 119672895 ref NM_007631.2	3.997 825 629	Cyclin D1
gi 80751174 ref NM_009829.3	2.698 120 048	Cyclin D2
gi 110227585 ref NM_007633.2	2.440 310 735	Cyclin E1
gi 80861470 ref NM_001037134.1	2.404 543 193	Cyclin E2
gi 70906458 ref NM_009831.2	2.197 939 378	Cyclin G1
gi 133891757 ref NM_007611.2	2.119 945 152	Caspase 7
gi 121949761 ref NM_001033161.2	1.624 355 939	TNFRSF1A-associated via death domain
gi 158508720 ref NM_007915.4	1.066 009	Etoposide induced 2.4 mRNA
gi 31981322 ref NM_012019.2	-3.188 072 348	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1

## 2.3 感染早期 RAW264.7 细胞的转录组学变化

以  $P \text{ value} \leq 0.05$  为阈值,满足此条件的 GO term 定义为在差异表达基因中显著富集的 GO term。通过 GO 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使的主要生物学功能。本研究注释的比对一致性的序列分布在 100 多个类别中,比如与免疫防御、生长、代谢、凋亡及生物化学反应等有关的类别(图 2)。在所处的细胞位置本体中,与内质网相关的基因有 305 个显著变化,占据整个变化基因的 9.4%;61 个与溶酶体相关的基因变化显著,占据整

个变化基因的 1.9%;在与早期溶酶体有关的基因中有 18 个变化显著,占据整个变化基因的 0.6%。这些基因都是与宿主细胞的吞噬功能相关的,宿主细胞的吞噬功能对于布鲁菌的早期感染是至关重要的。在所处的基因的分子功能本体中,与金属离子结合相关的基因变化显著,但是变化最显著的基因集中在与结合和催化活性相关的基因上。在所处的参与生物过程本体中,与细胞程序性死亡和凋亡相关的基因变化显著,但变化最显著的基因集中在与细胞新陈代谢和细胞过程相关的基因上。



2990 个序列向 WEGO 数据库映射,一致性序列被分为分子功能、生物学过程、细胞组分 3 类

2990 transcripts were aligned to the WEGO database. Every transcript was assigned to at least one GO term. Consensus sequences were grouped into three major functional categories, namely cellular components, cellular function and biological process

图 2 感染后 4 h WEGO 数据库分析结果

Fig. 2 GO annotations of non-redundant consensus sequences 4 h postinfection

在生物体内,不同基因相互协调行使其生物学,基于 Pathway 的分析有助于更进一步了解基因的生物学功能。 $FDR \leq 0.05$  的 Pathway 定义为在差异表达基因中显著富集的 Pathway。通过 Pathway 显著性富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。结果显示,凋亡、溶酶体、NOD 受体、Fc  $\gamma$ R-介导的吞噬通路、p53 信号通路、内质网蛋白处理相关通路被显著富集,这些通路都是与免疫、凋亡、布鲁菌在胞内的吞噬、定殖和成熟相关的。

## 2.4 荧光定量 PCR 结果

为了验证 DGE 结果,随机选取 15 个序列,用荧光定量 PCR 的方法来检测其表达水平的变化是否与测序结果一致。*GAPDH* 被用作对照,它在各个样本中的表达量不变。荧光定量 PCR 与 DGE 结果见图 3。

## 3 讨论

布鲁菌 16M 在感染后 4 h,在胞内的存活量显示最低,此后又开始增殖(图 1),这一点与 He 等的报道不同<sup>[6]</sup>。在 He 等人的报道中,布鲁菌在感染细胞的 24 h 时,胞内的细菌量达到最低,此后开始增殖,这可能是由于不同的培养环境及试验条件造成的。但本研究的结果与其他学者的结果相同<sup>[13-14]</sup>。

在感染后 4 h 多数基因(2 058 个)表现上调,1 518 个基因表现下调,上调基因占到变化基因总数的 58%,这与 He 等的研究结果不同<sup>[6]</sup>。在 He 等的研究中,在感染后 4 h,上调基因数量占到变化基因总数的 19%。这些不同可能是由于芯片技术是预先设计探针,由于探针设计的有限性及局限性,可能导致结果的差异。而 DGE 技术,只要是在转录

过程中出现的基因,如果在表达量上存在差异的话,就可以被检测出来。并且一些基因只在一定条件下(比如感染等)才转录,芯片技术对于这些无法预知

的基因是不能事先设计探针的。因此,采用 DGE 技术来比较感染组与未感染组两个样本之间的差异表达基因,更具有客观性。

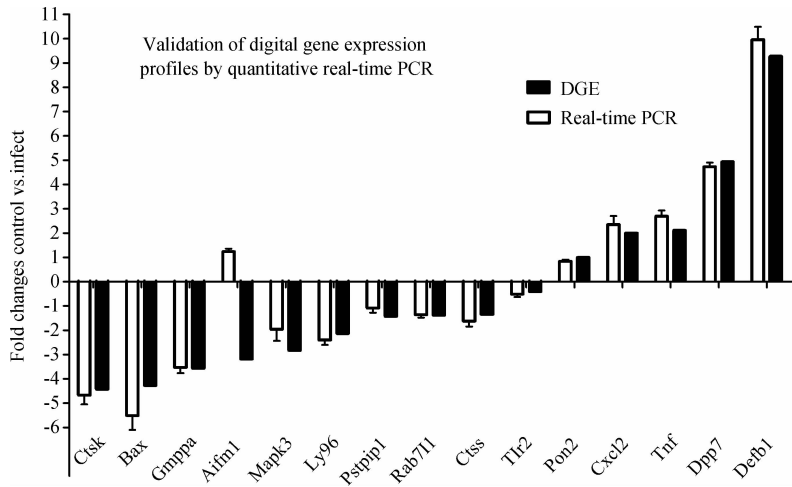


图 3 荧光定量 PCR 验证差异表达基因

Fig. 3 Validation of digital gene expression profiles by quantitative real-time PCR at 4 h postinfection

在 NOD 受体信号通路和 TLR 信号通路中,很多基因上调表达,比如 *Ikbkb*、*Nfkb1*、*Myd88*、*Irf7*、*Hsp90b1*、*Il1b*、*Tbk1*、*Stat1*、*Ccl5*、*Map2k2*、*Ripk1* 和 *Tnf*(表 2),这个结果与先前的报道相符<sup>[4,6]</sup>。这些上调表达的基因都是与炎症、趋化因子和转录相关的,布鲁菌在感染细胞后,诱导产生了一系列强烈的炎症反应,以试图清除胞内的细菌。

*TLR2* 基因表达在感染后 4 h 与对照组相比没有显著差异,这与 He 等的报道不符,He 等报道,*TLR2* 基因表达在感染后 4 h 表现上调。虽然多数研究认为,TLRs 在对抗病原菌感染中发挥重要作用,但哪一个 TLRs 在对抗感染中发挥作用,各个研究的报道不尽一致。TLRs 通过骨髓分化因子(Myeloid differentiation primary response gene 88, *Myd88*)和白介素-1 受体相关激酶(Interleukin-1 receptor-associated kinase, *IRAK*) 转导信号。*Myd88* 在 TLR 介导的活化核转录因子(NF- $\kappa$ B)分子中发挥重要作用,并且诱导前炎症因子 TNF- $\alpha$  的产生。*Mal* 也被称作 TIR 功能区的受体蛋白(TIR domain-containing adapter protein, *TIRAP*),在召集白介素-1 受体相关激酶-1(Interleukin-1 receptor-associated kinase, *IRAK1*) *IRAK1*、*IRAK4* 和 *TRAF6* 中发挥重要作用,是前炎症因子 NF- $\kappa$ B 转移的核心因素。肿瘤坏死因子受体相关因子 6(*TRAF6*)对于 *TLR2*、*TLR4* 激活 NF- $\kappa$ B 是必需的,*IRF3* 和 *IRF7* 的活化是需要 *TBK1* 的。*IRF3* 和 *IRF7* 都是由 *IKK*-相关激酶活化的转录因子,在

诱导 I 型干扰素表达方面发挥重要作用。

髓样分化蛋白-2(MD-2)在 TLR4 和 LPS 信号传导系统中发挥重要作用。TLR4 是 LPS 跨膜信号转导的主要受体,TLR4 介导的 LPS 信号转导需要 MD-2 的辅助。MD-2 在 TLR4 介导的内毒素识别和信号转导过程中发挥重要调控作用。在 LPS 跨膜信号传导中,MD-2 及 TLR4 为必不可少的蛋白分子;只有在 3 种蛋白分子同时表达于细胞膜时,才能达到最大的信号活化强度;MD-2 蛋白可能作为一种调节分子,能改变跨膜蛋白 TLR4 的空间构象,使 TLR4 具有或放大其对 LPS 的信号传导能力。*CD14* 是 LPS 的识别受体,*CD14*、MD-2 和 TLR4 都参与内毒素活化细胞的过程,特别是 MD-2 在识别内毒素方面发挥关键作用。

LPS 是布鲁菌的重要毒力因子之一,在布鲁菌的致病性方面发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。然而,本研究中 MD-2、TLR4 在感染后 4 h 表现下调。显然,识别 LPS 的级联反应减弱了,宿主细胞对布鲁菌的增殖能够产生识别,但由布鲁菌的毒力因子刺激宿主产生的、对抗感染的免疫应答反应却没有被强烈的激发起来,TLRs 还没有被充分的活化。这些可能导致宿主细胞与病原菌之间处于一种对峙状态,导致感染的持续存在。

*Myd88* 在感染后 4 h 表现上调,然而 *Myd88* 分子的下游分子,比如 *IRAK4*、*TRAF6* 和 *MKK* 分子都表现下调;并且 *Myd88* 分子的一些上游分子,比如 *CD14*、MD-2 和 TLR4 也表现下调。作者试图用

负调控来解释这种现象。炎症因子的大量产物的释放对宿主细胞会造成很大伤害,在严重的情况下可能会致宿主细胞死亡。因此,炎症反应受到严格的负调控机制的调节,使宿主细胞保持一种相对平衡的状态。并且基因在转录水平上的上调/下调表达,也不仅仅受到一个单一信号通路的调节和控制,而是多信号通路系统的协调、叠加作用。

p53 代谢通路作为压力反应信号,被显著富集。半胱天冬酶 (Caspase) 是一种在凋亡过程中被激活的蛋白分解酶,在凋亡细胞内的信息传递中发挥重要作用。Caspase 家族是细胞凋亡过程中的关键元件,其激活与超常表达均引起细胞凋亡。Caspase-8 与 Caspase-3 在 Caspase 级联反应中处于核心地位,分别发挥起始者与执行者的作用,是细胞凋亡发生的关键步骤及一切凋亡信号传导的共同通路。Caspase-3 处于凋亡有序级联反应的下游,是 Caspase 家族中的最重要的凋亡执行者之一,它的活化是凋亡进入不可逆阶段标志。在感染后 4 h, Caspase-3、Caspase-8 均没有发生显著变化。

本研究对小鼠巨噬细胞感染布鲁菌后的动态转录组学轮廓进行了描述。宿主细胞对于病原菌的调节,不是一个基因在发挥作用,而是一个有机调控的网络在发挥作用。本研究为进一步阐述宿主在对抗感染过程中发挥的作用提供了基础,一些关键基因在感染中发挥的作用的研究将陆续展开。

## 4 结 论

本研究利用 DGE 技术对小鼠巨噬细胞感染布鲁菌后的早期转录组学变化进行了研究。研究发现:在 3 576 个显著变化的基因中,58% 的基因显著上调。经分析,与免疫、凋亡、布鲁菌胞内吞噬、定殖和成熟相关的通路显著富集。

## 参考文献:

- [1] 吴清民. 兽医传染病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001.
- [2] FERNANDEZ-PRADA C M, ZELAZOWSKA E B, NIKOLICH M, et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis [J]. *Infect Immun*, 2003, 71:2110-2119.
- [3] STARR T, NG T W, WEHRLY T D, et al. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment [J]. *Traffic*, 2008, 9:678-694.
- [4] ESKRA L, MATHISON A, SPLITTER G, et al. Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus* [J]. *Infect Immun*, 2003, 71:1125-1133.
- [5] COVERT J, MATHISON A J, ESKRA L, et al. *Brucella melitensis*, *B. neotomae* and *B. ovis* elicit common and distinctive macrophage defense transcriptional responses [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2009, 234:1450-1467.
- [6] HE Y, REICHOW S, RAMAMOORTHY S, et al. *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages [J]. *Infect Immun*, 2006, 74:5035-5046.
- [7] T'HOEN P A, ARIYUREK Y, THYGESEN H H, et al. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36:e141.
- [8] MOROZOVA O, MARRA M A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics [J]. *Genomics*, 2008, 92:255-264.
- [9] ROSSETTI C A, GALINDO C L, EVERTS R E, et al. Comparative analysis of the early transcriptome of *Brucella abortus*-infected monocyte-derived macrophages from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis [J]. *Res Vet Sci*, 2011, 91(1):40-51.
- [10] WU Q, PEI J, TURSE C, et al. Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival [J]. *BMC Microbiol*, 2006, 6:102.
- [11] PEI J, FICHT T A. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture [J]. *Infect Immun*, 2004, 72:440-450.
- [12] BENJAMINI Y, YEKUTIELI D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency [J]. *Ann Stat*, 2001, 29: 1165-1188.
- [13] 吴小艳. CIP 与 WDR1 对布鲁氏菌侵袭和巨噬细胞功能影响初步研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- [14] 王玉飞. IV 型分泌系统调控布鲁氏菌胞内生存的分子机制研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- [15] SÁ J C, SILVA T M, COSTA E A, et al. The virB-encoded type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 159 (1-2): 130-140.