

利用酵母双杂交系统筛选与人 RIPK1 互作的牛分枝杆菌蛋白

徐翩翩,唐亦然,孟祥苗,毕斯琪,胡燕萍,杨 杨*,宋厚辉* (浙江农林大学 动物科技学院/动物医学院, 浙江 杭州 311300)

摘要:为探索牛分枝杆菌通过 RIPK1 来调节细胞凋亡的作用机制,本试验利用分子克隆技术构建诱饵质粒 pGBKT7-RIPK1,并通过 PEG/LiAc 转化法将该质粒转入酵母菌中,经 Western blot 验证 RIPK1 在酵母菌中的表达情况后,使用该重组酵母菌筛选牛分枝杆菌基因组文库;筛选所得阳性克隆经互补验证、测序分析以及免疫共沉淀法,最终确定可与 RIPK1 互相作用的牛分枝杆菌蛋白。结果表明,成功构建诱饵质粒 pGBKT7-RIPK1,该诱饵质粒可在酵母菌中表达 RIPK1 蛋白;用该酵母菌筛选牛分枝杆菌基因组文库共获得 16 个阳性克隆;这些阳性克隆经互补验证、测序和 BLAST 对比后共发现翻译正确的 7 个牛分枝杆菌蛋白;分别构建 RIPK1 和牛分枝杆菌候选蛋白的真核表达载体,经免疫共沉淀验证后发现可与 RIPK1 互作的 3 个牛分枝杆菌蛋白,分别为 Mb0869c、Mb0383c 和 Mb2314,本研究为进一步研究牛分枝杆菌通过 RIPK1 调节细胞凋亡的作用机制提供数据支持。

关键词:RIPK1;牛分枝杆菌;细胞凋亡;酵母双杂交系统

中图分类号:Q812;R535 文献标志码:A 文章编号:1005-4545(2020)09-1770-07

DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2020.09.16

Screening of *Mycobacterium bovis* proteins interacting with RIPK1 by yeast two-hybrid system

XU Pian-pian, TANG Yi-ran, MENG Xiang-miao, BI Si-qi, HU Yan-ping, YANG Yang*, SONG Hou-hui* (College of Animal Science and Technology/College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of *Mycobacterium bovis* regulating apoptosis by RIPK1, the bait plasmid pGBKT7-RIPK1 was constructed by molecular cloning technology and then transferred into yeast by PEG/LiAc transformation method. After verification of RIPK1 expression in yeast by western blotting, the recombinant yeast strain was used to screen the genomic library of *Mycobacterium bovis* to obtain positive colonies which can interact to RIPK1. Through complementary verification, sequencing analysis and immunoprecipitation, candidate proteins of *Mycobacterium bovis* that can interact to RIPK1 was finally determined. The results showed that the bait plasmid pGBKT7-RIPK1 was successfully constructed and RIPK1 was expressed. 16 positive colonies were obtained by screening *Mycobacterium bovis* genomic library with the recombinant yeast strain. After complementary verification, sequencing and blast comparison, 7 proteins of *Mycobacterium bovis* were found. The recombinant eukaryotic expression vectors containing RIPK1 and 7 proteins of *Mycobacterium bovis* were constructed, and immunoprecipitation assay was performed. The results showed that Mb0869c, Mb0383c and Mb2314 interact to RIPK1. This provides data support for further study on the mechanism of regulation of apoptosis by *Mycobacterium bovis*.

收稿日期:2019-10-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31502034);浙江省自然科学基金资助项目(LQ15C180002)

作者简介:徐翩翩(1995-),女,硕士。

*通讯作者, E-mail: yyang@zafu.edu.cn; songhh@zafu.edu.cn

Keywords: RIPK1; *Mycobacterium bovis*; apoptosis; yeast two-hybrid system

* Corresponding authors, E-mail: yyang@zafu.edu.cn; songhh@zafu.edu.cn

牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*, *M. bovis*)主要引起牛结核病,同时也是常见的人结核病的病原,严重危害动物健康和人类食品安全^[1]。和结核分枝杆菌一样,牛分枝杆菌栖息和繁殖的主要细胞是巨噬细胞,同时巨噬细胞也是宿主抵御分枝杆菌感染传播的重要屏障。决定感染结果的一个关键机制是牛分枝杆菌诱导和改变肺泡巨噬细胞死亡途径的能力^[2]。为了控制牛分枝杆菌复制,肺泡巨噬细胞试图启动细胞凋亡^[3],从而导致细菌繁殖的抑制、细菌杀灭的增加、炎症的减轻和抗原提呈的增强^[4]。然而,强毒株如结核分枝杆菌和牛分枝杆菌能够触发坏死样细胞死亡,这种死亡常与分枝杆菌的大量复制、严重炎症反应以及疾病的发展有关^[5]。有研究表明强毒株的这种将细胞凋亡转变成细胞坏死能力与 TNF- α 信号通路有关,但是目前强毒株对 TNF- α 通路的调控机制并不清楚^[6]。

RIPK1 是一种多结构域蛋白,包含一个 N 端激酶结构域、中间结构域和 C 端死亡结构域(death domain, DD)。C 端死亡结构域可与死亡结构域相关蛋白(FADD)和其他含 DD 的蛋白质相互作用,招募 Caspase-8 蛋白,引起细胞凋亡^[7]。在 TNF- α 信号下,N 端激酶结构域与 TRAF2 互作,参与 NF- κ B 激活。中间结构域中包含 1 个 RHIM 结构,可与 PIRK3 结合,引起坏死样细胞死亡^[8]。因此,RIPK1 在 TNF- α 信号通路中起着重要作用,决定着细胞存活、凋亡还是死亡。本研究运用酵母双杂交技术,以 RIPK1 蛋白为诱饵,筛选牛分枝杆菌基因组文库,寻找可与 RIPK1 互作蛋白,为进一步深入探索牛分枝杆菌通过 RIPK1 调节细胞凋亡的作用机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及细胞株 大肠杆菌 DH5 α 、p3 \times Flag-CMV-7.1、pCMV-myc 真核表达载体、人 HEK293T 细胞均由本实验室保存;酵母菌 Y2H Gold 及 Y187、酵母双杂交相关质粒 pGADT7、pGBKT7、pGBKT7-p53、pGBKT7-Lam 均购自 Clontech 公司。

1.2 主要试剂 2 \times Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;DNA Marker、

GoldenView 核酸染料、质粒小提试剂盒、PCR 纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Ligation high Ver.2 购自 TOYOBO 公司;蛋白 Marker、抗生素及胎牛血清购自 Thermo Fisher 公司;限制性内切酶 Nco I、EcoR I、Hind III、Xba I、Kpn I 购自 NEB 公司;酵母试验相关试剂,如酵母选择缺陷培养基、X- α -gal、AbA、酵母转化试剂盒、酵母质粒提取试剂盒均购自 Clontech 公司;鼠源抗 Flag 单克隆抗体、兔源抗 myc 单克隆抗体购自 Sigma 公司。

1.3 人 RIPK1 基因的扩增 根据 NCBI 发布的人 RIPK1 基因序列,利用 Vector NTI 设计特异性引物(表 1)。以人 HEK293T 细胞的 cDNA 为模板,PCR 扩增 RIPK1 基因序列,反应体系如下:cDNA 1 μ L,2 \times Phanta Max Master Mix 25 μ L,上下游引物各 1 μ L,ddH₂O 补足至 50 μ L。设置 PCR 反应条件如下:预热 94 $^{\circ}$ C 3 min;变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 60 $^{\circ}$ C 1 min,延伸 68 $^{\circ}$ C 30 s,循环 35 次;总延伸 68 $^{\circ}$ C 7 min。经 1%琼脂糖核酸电泳验证 PCR 产物。

1.4 诱饵质粒 pGBKT7-RIPK1 的构建 使用限制性内切酶 Nco I 和 EcoR I 酶切质粒 pGBKT7 和纯化后的 PCR 产物,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。纯化回收酶切产物,用 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h 后,转到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,并涂布于含卡那霉素(Kana)抗性的 LB 平板上过夜培养。挑取单菌落,经菌落 PCR 筛选阳性克隆,扩大培养后提取质粒,经双酶切验证正确后,将重组质粒送至浙江有康生物科技有限公司测序。

1.5 重组酵母菌的构建 用 PEG/LiAc 转化法将构建成功的诱饵质粒 pGBKT7-RIPK1 和空载体 pGBKT7 分别转入到酵母菌 Y2H Gold 感受态细胞中,涂布于 SD/-Trp(SDO)平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d,将 2 种重组酵母菌分别命名为 Y2H Gold__RIPK1 和 Y2H Gold__Vec。挑取酵母菌 Y2H Gold__RIPK1 菌落接种于 5 mL SD/-Trp 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C,200 r/min 过夜培养后,转接入 50 mL YPAD 培养液中继续培养,直至 D_{600} 值达到 0.4~0.6。收集菌液,用 Urea/SDS 法提取酵母菌蛋白。使用兔源 Myc 单克隆抗体经 Western blot 检测 RIP1 蛋白表达情况。

1.6 筛选与 RIPK1 互作的牛分枝杆菌蛋白 扩大培养酵母菌 Y2H Gold__RIPK1 菌液至 D_{600} 值至

0.8,与1 mL牛分枝杆菌基因组文库共同转接于含有kana的2×YPDA中,在30℃低转速培养20~24 h。菌液离心弃上清后,10 mL 0.5×YPDA重悬。每200 μL菌液涂于SD/-Trp/-Leu/X-α-gal/AbA(DDO/X/A)平板上,30℃培养3~5 d后在平板上挑取蓝色阳性克隆,接种到在筛选更严格的营养缺陷培养基SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal/AbA(QDO/X/A)平板上,30℃培养3~5 d后阳性克隆挑取菌落扩大培养,保菌并提取酵母质粒。

1.7 阳性克隆的互补验证及测序 为排除所筛选到的牛分枝杆菌基因能够自激活而造成假阳性的可能,进行了回补试验复筛。将提取的pGADT7-X质粒分别和pGBKT7-RIP1及空载体pGBKT7两两组合转化到酵母菌Y2H Gold中,菌液涂于DDO/X和QDO/X/A的平板中,30℃培养3~5 d后,观察菌落颜色及生长情况。将回补验证中正确的阳性克隆质粒送至测序公司测序,所得基因序列在BLAST上与牛分枝杆菌基因组对比,找出有意义的基因序列。

1.8 免疫共沉淀法验证蛋白的互相作用

1.8.1 真核表达载体的构建 根据NCBI提供的牛分枝杆菌的基因序列以及人RIPK1的基因序列,分别设计相应引物(表1)。扩增目的片段,分别重组到真核载体p3×Flag-CMV-7.1和pCMV-myc。扩增方法及质粒构建步骤参考1.3。

1.8.2 免疫共沉淀法 HEK 293T细胞以 8×10^5 个/孔接种于6孔板,使用Lipofectamine 2000转染试剂转染相应质粒。转染24 h后,加入300 μL NP40裂解细胞,收取细胞总蛋白,检测蛋白浓度,取50 μL作为input使用。取400 μg细胞蛋白加入结合Flag抗体的protein G beads,翻转孵育4℃ 2 h,PBS缓冲液清洗5次后,加入蛋白上样缓冲液煮沸5 min,作为IP使用。通过Western blot检测蛋白互作情况。

2 结果

2.1 构建含有RIPK1基因的诱饵质粒 以293T细胞的cDNA作为模板,利用PCR技术扩增RIPK1的基因片段,扩增获得的片段大小为2 010 bp(图1),符合预期大小。经酶切酶连后转入大肠杆菌DH5α中,挑选单菌落克隆,经菌落PCR验证,得到2个阳性克隆(图2)。将阳性克隆扩增,提取质粒进行双酶切验证,所得2条目的条带大小与预期一致(图3)。经测序结果显示与已公布的基因序列完全相同,表明诱饵质粒pGBKT7-RIPK1构建成功。

表1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
pGBKT7-RIPK1-F	CCCATGGAGCAACCAGACATGTCCTT
pGBKT7-RIPK1-R	CGCGAATTCGTTCTGGCTGACGTAAATC
Myc-RIPK1-F	CCGGAATTCTGCAACCAGACATGTCCT
Myc-RIPK1-R	CGGGGTACCTTAGTTCTGGCTGACGTA
Flag-Mb0383c-F	CCCAAGCTTATGGCGATCTGGGCC
Flag-Mb0383c-R	CGGGGTACCTCAATGTCGAGTTAAGTA-ATCCTTG
Flag-Mb0869c-F	CCCAAGCTTATGCCGAGCTGGCC
Flag-Mb0869c-R	GCTCTAGATCACAGAATGTAGTCCAG-GCGGGTC
Flag-Mb2314-F	CCCAAGCTTATGCGCTGGCGGCTT
Flag-Mb2314-R	CGGGGTACCCTATGCAGTGCCACGG
Flag-Mb1465-F	CCCAAGCTTATGTCGTTCTGTTTCGCGG
Flag-Mb1465-R	GCTCTAGACTATACCGAAAATCCTGAC-CGGTAAGGA
Flag-Mb0949c-F	GACAAGCTTATGGCCATACCCGTCG
Flag-Mb0949c-R	CGCGGATCCAGGCAGCAGCAGCGTAC
Flag-Mb0446c-F	CCCAAGCTTGTGCGGTACAGTCC
Flag-Mb0446c-R	GCTCTAGATTAGGTCAAGTCCCAGACTT-GCAG
Flag-Mb0667-F	CCCAAGCTTGTGATGGGCGGAACCTAC
Flag-Mb0667-R	GCTCTAGATCATGTCACGCTCACCT-TCACCG

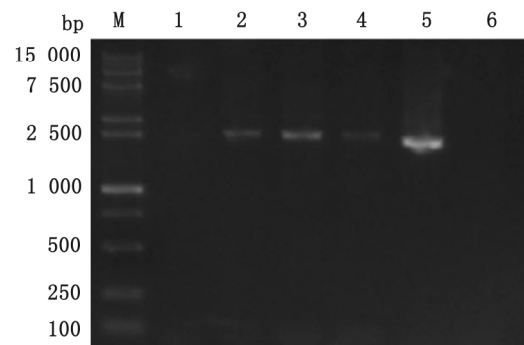


图1 RIPK1目的片段PCR扩增 M.DL15000 DNA Marker;1~6.RIPK1基因片段温度梯度55~65℃

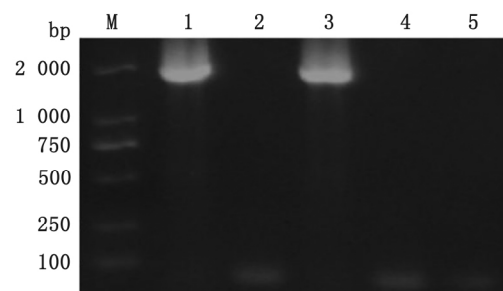


图2 重组质粒pGBKT7-RIPK1的PCR鉴定 M.DL2000 DNA Maker;1~4.pGBKT7-RIPK1;5.阴性对照

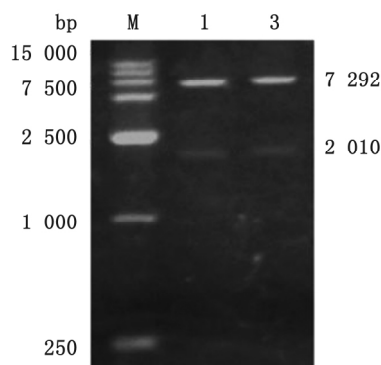


图3 重组质粒 pGBKT7-RIPK1 酶切验证 M, DL15000 DNA Maker; 1~3. 质粒 pGBKT7-RIPK1

2.2 诱饵蛋白 RIP1 在酵母菌中的表达情况 收集重组酵母菌 Y2H Gold_RIPK1, 破裂菌体后 Urea/SDS 法提取酵母蛋白, 经 Western blot 检测发现 RIPK1 可在酵母菌中表达, 蛋白大小为 97 500 (图 4), 说明重组酵母菌 Y2H Gold_RIPK1 构建成功。

2.3 筛选牛分枝杆菌基因组文库 使用重组酵母菌 Y2H Gold_RIPK1 与牛分枝杆菌基因组文库混合培养 24 h 后, 涂于 DDO/X/A 平板上。30℃ 培养 5 d 后在 DDO/X/A 平板上共发现 52 个蓝色菌落。将这 52 个蓝色菌落涂布于 QDO/X/A 中进行再次筛选, 30℃ 培养 5 d 后发现 16 个蓝色菌落, 确定为

阳性克隆。

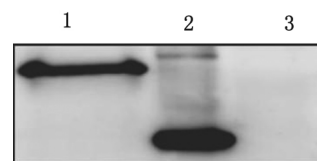


图4 Western blot 检测 RIPK1 在酵母菌中的表达情况 1. Y2H Gold_RIPK1; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照

2.4 回补验证阳性克隆 将所获得的 pGADT7-X 质粒和 pGBKT7-RIPK1 及空载体 pGBKT7 两两组合转染到酵母菌 Y2H Gold 中, 分别涂布于 DDO/X 和 QDO/X/A 平板上。若 pGADT7-X 和 pGBKT7-RIPK1 互作则共转后在 DDO/X 和 QDO/X/A 平板上均长出蓝色菌落, 而 pGADT7-X 和空载体 pGBKT7 共转后在 DDO/X 和 QDO/X/A 长出白色菌落或不长菌, 则说明所筛选获得的阳性克隆不会自激活, 是能够与 RIP1 互相作用的 (图 5)。回补验证筛选共得到 9 个阳性克隆。经测序以及 BLAST 比对后, 共获得翻译正确的 7 个牛分枝杆菌蛋白, 分别为 Mb0869c、Mb0383c、Mb2314、Mb1465、Mb0446c、Mb0667 和 Mb0949。

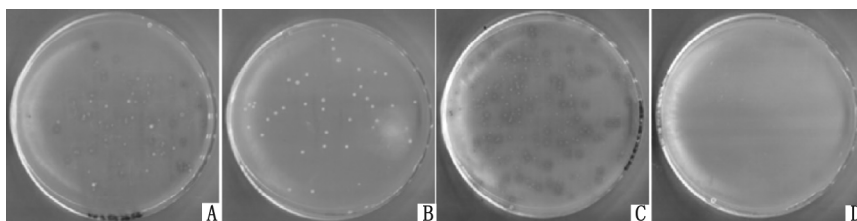


图5 阳性克隆互补验证 A. pGADT7-X 和 pGBKT7-RIPK1 在 DDO/X 平板生长; B. pGADT7-X 和 pGBKT7-RIPK1 在 QDO/X/A 平板生长; C. pGADT7-X 和 pGBKT7 在 DDO/X 平板生长; D. pGADT7-X 和 pGBKT7 在 QDO/X/A 平板生长

2.5 真核表达载体的构建 以牛分枝杆菌基因组作为模板, PCR 扩增上述 7 个分枝杆菌基因片段, 经酶切酶连将其分别插入到真核表达载体 p3 × Flag-CMV-7.1 上 (图 6)。同样, 以 HEK293T 细胞 cDNA 为模板, 扩增 RIPK1 基因片段, 将其插入到真核表达载体 pCMV-Myc 上 (图 7)。

2.6 免疫沉淀法验证分枝杆菌候选蛋白与 RIPK1 互作情况 将构建好的重组质粒转入 HEK 293T 细胞中, 转染 24 h 后, 运用免疫共沉淀技术验证 7 个牛分枝杆菌蛋白与 RIPK1 的互作情况。结果发

现, 在 7 个蛋白中有 3 个蛋白可以在 HEK 293T 中与 RIPK1 互作, 分别为 Mb0869c、Mb0383c 和 Mb2314 (图 8)。

3 讨论

在分枝杆菌感染的巨噬细胞中, 来自分枝杆菌细胞壁的多种成分可以通过 TLR2 介导的信号途径刺激 TNF- α 产生^[9]。TNF- α 作用于细胞膜表面 TNF 受体, 并进一步诱导宿主发生 Caspase 8 介

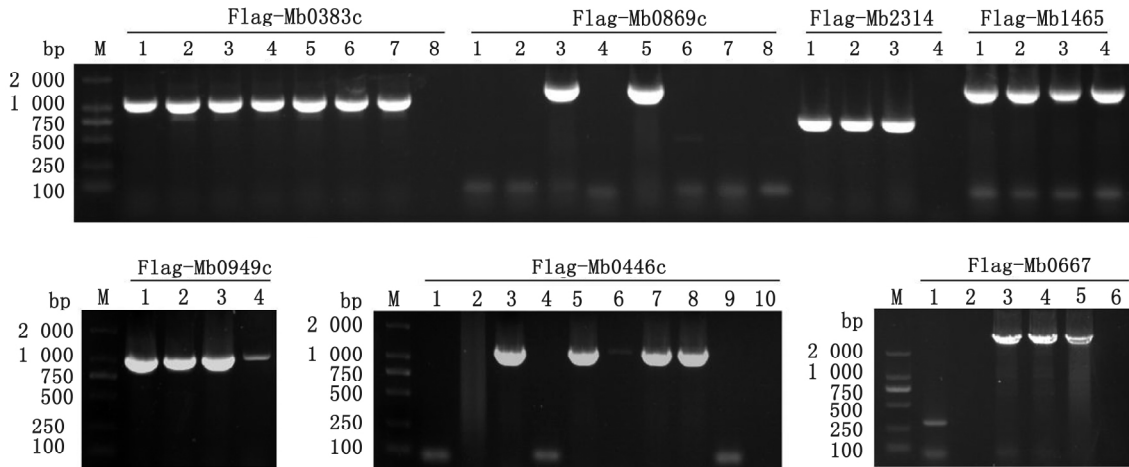


图6 含有牛分枝杆菌基因的真核表达载体 PCR 验证

导的外源性细胞凋亡^[10]。细胞凋亡的发生可降低分枝杆菌传播^[11]。由凋亡分枝杆菌感染的巨噬细胞产生胞外小泡携带抗原,可被未感染的树突状细胞吞噬。MHC-I 和 CD1 将这些抗原进一步呈现给 CD8⁺T 细胞,从而激活 T 淋巴细胞并触发适应性免疫^[12]。有研究表明,结核分枝杆菌 H37Rv 等强毒株诱导的巨噬细胞凋亡比无毒或弱毒的分枝杆菌菌株少,可能是通过激活膜表面 TNFR2,来逃避 TNF- α 依赖性凋亡^[13],并通过增加 Bcl-2 家族成员 MCL-1 蛋白的表达来抑制内源性细胞凋亡^[14]。Bcl-2 家族蛋白,位于线粒体膜可阻断线粒体释放细胞色素 C。此外,多种分枝杆菌基因可抑制宿主细胞凋亡。例如,在结核分枝杆菌中,NuoG 编码一个

I 型 NADH 脱氢酶亚单位,可抑制 *M.kanssii* 导致的人和小鼠巨噬细胞凋亡^[15]。

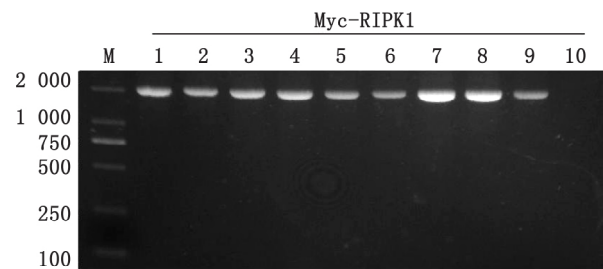


图7 含有 RIPK1 基因真核表达载体 PCR 验证 M. DL2000 DAN Marker;1~9.PIPK1 基因插入真核表达载体 PCMV-Myc;10.阴性对照

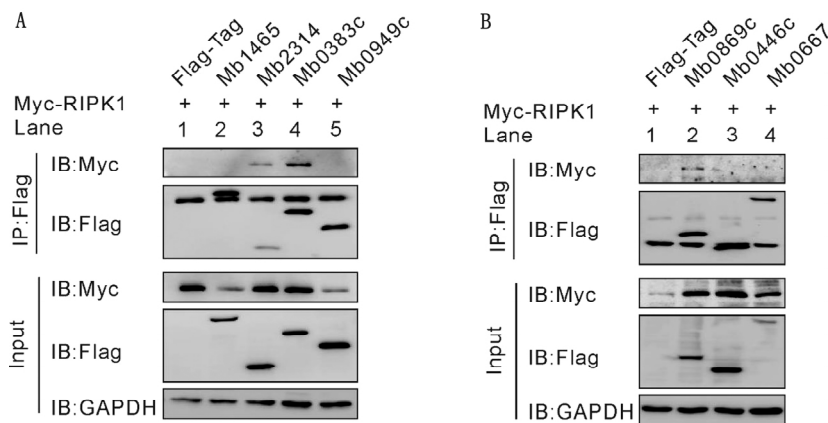


图8 Co-IP 对 RIPK1 与牛分枝杆菌候选蛋白互作验证

TNF- α 也被认为是线粒体活性氧的有效诱导物。高浓度 TNF- α 通过 RIPK1-RIPK3-MLKL 诱导 PGAM5-DRP-1 依赖性细胞死亡。在感染初期,ROS 增加巨噬细胞杀微生物活性的同时,也可迅速

导致感染分枝杆菌的巨噬细胞坏死,将分枝杆菌释放到有利于生长的细胞外环境中^[16]。坏死样细胞死亡也是一种程序性坏死,可作为细胞凋亡的后备或竞争者。最近一项研究发现,抑制 RIPK3 或

MLKL不能保护细胞免于死亡,而是将TNF- α 诱导的坏死样细胞死亡转变为依赖于RIPK1的延迟性凋亡^[17]。在TNF- α 刺激TNFR1后,TRADD与RIPK1、TRAF2/5和cIAP1/2形成膜近端超分子结构复合体I(Complex I)^[18]。cIAPS引起RIPK1或TRAF2的多泛素化,从而导致NF- κ B转移到细胞核,诱导其靶基因转录。RIPK1脱氨或抑制cIAPS蛋白的活性则促进Complex I向Complex II a转化,Complex II a含有RIPK1、FADD、Caspase-8和TRADD^[18]。在Complex II a中,Caspase-8被激活并启动凋亡。如果Caspase-8的活性被抑制,RIPK1和RIPK3与FADD和Caspase-8在Complex II b中组装,其中RIPK1磷酸化RIP3,并进一步招募MLKL,导致坏死样细胞死亡^[19]。无毒或弱毒性的分枝杆菌菌株倾向于诱导细胞凋亡,而强毒的分枝杆菌菌株倾向于将细胞凋亡转变为坏死样细胞死亡,这有利于病原体并有助于分枝杆菌传播^[20]。因此推断在感染的某些阶段,强毒株可能分泌一种毒力因子作用于TNF- α 信号通路的某个分子上,来阻断Complex II a的生成,从而抑制细胞凋亡。

鉴于RIPK1是TNF- α 信号通路中决定细胞命运的重要因素,因此,本研究尝试寻找牛分枝杆菌上是否存在可与RIPK1互作的某些蛋白,从而调节细胞凋亡的发生。构建诱饵质粒pGBKT7-RIPK1,通过酵母双杂交筛选和免疫共沉淀验证最终确定了3个能和RIPK1互作的牛分枝杆菌蛋白,分别为Mb0869c、Mb0383c和Mb2314。Mb0869c在序列上与结核分枝杆菌Rv0846c同源性高达99.8%,Rv0846c被报道参与结核分枝杆菌对铜的代谢^[21]。虽然在Uniprot数据库中可搜索到Mb0383c和Mb2314,但未见任何关于这两个蛋白功能的报道。因此,该试验为后续深入研究牛分枝杆菌通过RIPK1调控细胞凋亡的作用机制提供了参考数据。

参考文献:

- [1] RIVIERE J, CARABIN K, LE STRAT Y, et al. *Bovine tuberculosis* surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013: a survey-based review[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 173(3/4): 323-331.
- [2] BEHAR S M, DIVANGAHI M, REMOLD H G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9): 668-674.
- [3] BEHAR S M, MARTIN C J, BOOTY M G, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4(3): 279-287.
- [4] LIU M, LI W, XIANG X, et al. *Mycobacterium tuberculosis* effectors interfering host apoptosis signaling [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(7): 883-891.
- [5] LERNER T R, BOREL S, GREENWOOD D J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* replicates within necrotic human macrophages [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(3): 583-594.
- [6] ABEBE M, DOHERTY T M, WASSIE L, et al. Expression of apoptosis-related genes in an Ethiopian cohort study correlates with tuberculosis clinical status [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(1): 291-301.
- [7] MEMG H, LIU Z, LI X, et al. Death-domain dimerization-mediated activation of RIPK1 controls necroptosis and RIPK1-dependent apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(9): E2001-E2009.
- [8] OFENGEIM D, YUAN J. Regulation of RIP1 kinase signaling at the crossroads of inflammation and cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(11): 727-736.
- [9] UNDERHILL D M, OZINSKY A, SMITH K D, et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(25): 14459-14463.
- [10] FLYNN J L, CHAN J. Immunology of tuberculosis [J]. *Ann Rev Immunol*, 2001, 19: 93-129.
- [11] BEHAR S M, MARTIN C J, BOOTY M G, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4(3): 279-287.
- [12] SCHAIBLE U E, WINAU F, SIELING P A, et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis [J]. *Nat Med*, 2003, 9(8): 1039-1046.
- [13] RAKOTOSAMIMANANA N, DOHERTY T M, ANDRIAMIHANTASOA L H, et al. Expression of TNF- α -dependent apoptosis-related genes in the peripheral blood of malagasy subjects with tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61154.
- [14] ABDALLAH A M, BESTEBROER J, SAVAGE N D, et al. Mycobacterial secretion systems ESX-1 and ESX-5 play distinct roles in host cell death and inflammasome activation [J]. *J Immunol*, 2011, 187(9): 4744-4753.
- [15] VELMURUGAN K, CHEN B, MILLER J L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells [J]. *PLoS*

- Pathog, 2007, 3(7): e110.
- [16] ROCA FJ, RAMAKRISHNAN. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species[J]. Cell, 2013, 153(3): 521-534.
- [17] REMIJSSEN Q, GOOSENS V, GROOTJANS S, et al. Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2014(5): e1004.
- [18] HAN J, ZHONG C Q, ZHANG D W. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system[J]. Nat Immunol, 2011, 12(12): 1143-1149.
- [19] VANDENABEELE P, DECLERCK W, VAN H F, et al. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis[J]. Sci Signal, 2010, 115(3): re4.
- [20] JAYACHANDRAN R, BOSEDASGUPTA S, PIETERS J. Surviving the macrophage: tools and tricks employed by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2013, 374: 189-209.
- [21] ROWLAND J L, NIEDERWEIS M. A multicopper oxidase is required for copper resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Bacteriol, 2013, 195(16): 3724-3733.

(上接第 1769 页)

- [14] ELISABETE M, RAFAEL C, FERNANDO B, et al. Integrin content of extended β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 Years in a single hospital in Madrid, Spain[J]. Am Soc Microbiol, 2005, 49(5): 1823.
- [15] 魏取好, 蒋晓飞, 吕元. 细菌整合子研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2008(1): 1-5+40.
- [16] 朱丽芳. 肺炎克雷伯菌 463 株的临床分布和药敏分析[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(15): 2404-2406.
- [17] 林琳, 刘佳坤, 王晶. ICU 产 ESBLs 肺炎克雷伯杆菌与整合子相关性研究[J]. 医学与哲学(B), 2016, 37(1): 74-75+97.
- [18] RECH G D, HALL R M. Gene cassettes a new class of mobile element[J]. Microbiology, 1995, 141(12): 3015-3027.
- [19] 李彦媚, 赵喜红, 徐泽智, 等. 新型细菌耐药元件—整合子系统[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(1): 1-7.
- [20] 李春红, 孙小轩, 王桂花, 等. 肺炎克雷伯菌整合子的分布及耐药基因携带情况[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(18): 2602-2604.
- [21] 张紫恒, 赵峡, 于广利, 等. 细菌荚膜多糖的化学结构[J]. 生命的化学, 2011, 31(5): 688-696.
- [22] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 236.
- [23] 童明庆, 戴传箴, 赵旺胜, 等. 小鼠细菌性支气管肺炎模型的建立[J]. 南京医学院学报, 1994(1): 1-4.
- [24] 庞露, 肇丽梅, 于莹, 等. 左氧氟沙星对肺炎克雷伯菌感染小鼠的治疗作用[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(3): 173-175.
- [25] YA-CHUN T, MINC, MING K O C, et al. Genetic requirements for *Klebsiella pneumoniae*-induced liver abscess in an oral infection model[J]. Infect Immun, 2009, 77(7): 2657-2671.