

甲基化芯片筛选结核感染相关基因及后续验证*

陈豪, 张晶雅, 胡雪姣, 陆小军, 王军, 周燕虹, 应斌武, 周静[△]

四川大学华西医院 实验医学科(成都 610041)

【摘要】 目的 筛选活动性结核患者 DNA 甲基化水平显著变化的基因并进行验证。方法 ①纳入年龄与性别匹配的 9 例活动性结核患者、3 例潜伏性结核患者和 3 例健康对照, 将人血中单个核细胞 DNA 与芯片杂交, 比较结核组与健康组的甲基化差异基因, 并对差异基因进行 GO 功能和 Pathway 功能分析, 以及与表达芯片进行联合分析; ②收集年龄与性别匹配的活动性结核与健康对照各 60 例, 分别提取全血 DNA, 使用焦磷酸测序方法对甲基化芯片预测出的结核病相关基因(*TLR1*、*TLR2*、*TLR4*)进行甲基化程度检测。结果 ①活动性结核患者与健康对照对比, 大部分呈现甲基化下调状态, GO 分析和 Pathway 分析结果显示, 甲基化差异基因的功能主要富集在白细胞分化、凋亡、自噬、细胞因子调节及炎症反应等与结核密切相关的生物过程中; ②待验证的 3 个基因 *TLR1*、*TLR2*、*TLR4* 包含 10 个 CpG 位点, 其中 *TLR1* 基因的 CpG1 位点($P < 0.001$)呈现高甲基化状态, *TLR4* 基因的 CpG2 位点($P = 0.012$)呈现低甲基化状态。结论 在结核分枝杆菌感染过程中存在基因组 DNA 的甲基化状态改变, 以低甲基化变化为主。其中 *TLR1* 基因呈现高甲基化状态, *TLR4* 呈现低甲基化状态, 提示上述基因可能在结核病的发生发展过程中具有一定的作用。

【关键词】 结核分枝杆菌 DNA 甲基化 甲基化芯片 焦磷酸测序技术 活动性结核病

Methylation Analysis and Validation of Whole Genome DNA in Active Tuberculosis CHEN Hao, ZHANG Jing-ya, HU Xue-jiao, LU Xiao-jun, WANG Jun, ZHOU Yan-hong, YING Bin-wu, ZHOU Jing[△]. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: zhoujinghuaxi@163.com

【Abstract】 Objective To screen and identify the gene of DNA methylation in patients with active tuberculosis. **Methods** ① This study enrolled 9 cases of active tuberculosis patients (including 3 newly diagnosed tuberculosis patients and 6 cases of retreatment of active tuberculosis patients), 3 cases of latent tuberculosis patients and 3 cases of healthy controls. Genome DNA was extracted from Peripheral Blood Mononuclear Cell and following bisulfite conversion treatment. After hybridization with the Illumina HD 450K Infinium Methylation BeadChip, the results were compared between patients group and control group, GO and Pathway analysis were performed to evaluate the function of differentially expressed genes; ② We further enrolled 60 cases of active tuberculosis patients and 60 cases of health controls (their age and gender were matched). By using pyrosequencing method to detect the methylation levels of candidate genes (*TLR1*, *TLR2*, *TLR4*) screened by gene chip. **Results** ① Compared with healthy controls, we found that most of them were showed demethylation status. GO and Pathway analysis showed that the functions of the differentially methylated regions related genes were mainly enriched in the biological processes of the regulation of leukocyte apoptosis, cytokine regulation and inflammatory response which were closely related to tuberculosis. ② There were 10 CpG sites involved in the verified tuberculosis related genes (*TLR1*, *TLR2*, *TLR4*), the CpG sites of *TLR1* gene showed the hypermethylation status ($P < 0.001$), the CpG sites of *TLR4* gene showed demethylation status ($P = 0.012$). **Conclusions** The present study demonstrated that in the course of MTB infection, the methylation status of genomic DNA was altered, and most of the Differentially Methylated Regions (DMRs) were showed status of demethylation. *TLR1* gene and *TLR4* gene may play an important role in the occurrence and development of tuberculosis.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) DNA methylation Methylation microarrays Pyrosequencing Active tuberculosis

由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*,

MTB)引起的结核病(tuberculosis, TB)目前位居由单一病原引起患者死亡的传染病之首^[1]。研究结果表明:机体对于 MTB 感染所产生的炎症反应的动

* 国家自然科学基金(No. 81472026, No. 81672095)资助

[△] 通信作者, E-mail: zhoujinghuaxi@163.com

态平衡状态是决定 MTB 感染后疾病结局的一个重要因素^[2]。然而,人们对 TB 发生发展的分子机制仍未完全阐明,对 MTB 感染过程中所涉及的细胞信号传导、免疫应答调控机制进行研究将有助于深入了解 TB 的发病机制,同时,这也为 TB 早期诊断的新标记物的筛选以及寻求更有效的 TB 诊疗方法提供了新的思路。

DNA 甲基化修饰为生命体重要的表观遗传修饰模式,病原体感染机体后可通过影响免疫细胞的 DNA 甲基化状态,激活/抑制宿主免疫应答,导致疾病的发生发展^[3]。目前,已有多项研究表明 DNA 甲基化模式参与 TB 发病^[4-7],然而,产生这种甲基化改变的具体机制和该变化在结核感染过程中的作用尚未被完全阐明。

本课题组使用甲基化芯片的方法对活动性结核病患者全基因组甲基化水平进行检测,旨在筛选出结核病相关甲基化差异基因,同时利用生物信息学方法对差异基因的功能进行初步预测,为进一步阐明 TB 的发病机制提供数据支撑,同时筛选出具有研究价值的 TB 相关甲基化差异基因,为课题组后期研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

甲基化芯片实验:共纳入 15 例(2015 年 12 月至 2016 年 4 月期间就诊于四川大学华西医院),包括 9 例活动性结核患者,其中初诊结核 3 例(初治组)和复治结核 6 例(复治组);3 例结核潜伏感染者(潜伏组);3 例健康对照(年龄与性别匹配,健康组)。验证实验:随机纳入同时期在四川大学华西医院就诊的活动性结核患者和健康对照各 60 例(年龄与性别匹配)。各组人群均无亲缘关系。

两部分实验受试者明确诊断后及时采集外周静脉血,均采集空腹(禁食 12 h)静脉血,样本体积均为 10 mL,使用 EDTA 抗凝。所有受试者均自愿参加并签署知情同意书,本研究由四川大学华西医院伦理委员会授权[授权号:198(2014)]。

1.2 实验方法

1.2.1 人外周血单个核细胞分离 外周抗凝全血与 Hank's 液按体积比 1:1 混合,将稀释血液缓慢铺于 Ficoll 液上(Ficoll 和稀释液体积比为 3:4);2 200 r/min 离心 20 min,吸取单个核细胞层于另一个新的无菌离心管中;加适量 Hank's 混匀,离心 $2\ 000\times g$,4 min,去上清,备用。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采用 QIAamp DNA Mini Kit(50)(QIAGEN,德国)提取基因组 DNA,收集后的 DNA 溶液 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻存,备用。

1.2.3 Infinium 450k 甲基化芯片检测 经亚硫酸胺酸盐处理后的基因组 DNA 与 Illumina HD 450k Infinium Methylation BeadChip 芯片进行杂交,芯片购于 Illumina 公司。

1.2.4 芯片数据处理 将 Beta Score 通过 $\log\left[\frac{\beta}{1-\beta}\right]$ 公式转换后,采用 Limma 检验计算样本组之间比较的 P 值,Benjamini&Hochberg 方法进行多重检验纠正计算错误发现率(FDR),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,比较结核组与健康组的甲基化差异基因。并对差异基因进行 GO 功能和 Pathway 功能分析,以及与 mRNA 芯片(Illumina 公司)进行联合分析。

1.2.5 验证实验甲基化检测 目的基因待测甲基化差异片段及相关 CpG 位点与芯片分析定位相同或被包含其中,均位于相应基因启动子区域。甲基化 PCR 引物及焦磷酸测序引物设计使用 PyroMark Assay Design 2.0 软件。引物序列合成及生物素标记由成都擎科梓熙生物技术有限公司提供技术支持。DNA 经亚硫酸氢钠修饰与纯化后,完成 PCR 扩增并进行焦磷酸测序。

1.3 统计学方法

采用卡方检验对结核组和健康对照组甲基化差异位点(CpG)进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲基化芯片实验

2.1.1 差异甲基化位点及基因的筛选 CpG 的分析结果显示:全基因组甲基化状态在初治组(T123)、复治组(T456789)、潜伏组(L123)和健康组(C123)间的比较均有差异,其中,结核组(初治组+复治组)vs. 潜伏组、潜伏组 vs. 健康组、结核组(初治组+复治组)vs. 健康组,前者大部分呈现 CpG 位点的甲基化水平降低。差异甲基化位点的样本聚类分析图见图 1。

甲基化差异片段(DMRs)的进一步分析显示:活动性结核患者与健康对照相比,共发现 1 106 个($P<0.05$)DMRs,涵盖 718 个基因,其中,816 个呈现甲基化下调状态的片段,290 个呈现上调状态的片段;1 106 个 DMRs 在 22 条常染色体和 X、Y 两条性染色体上均有分布,作为人类基因密度最高的

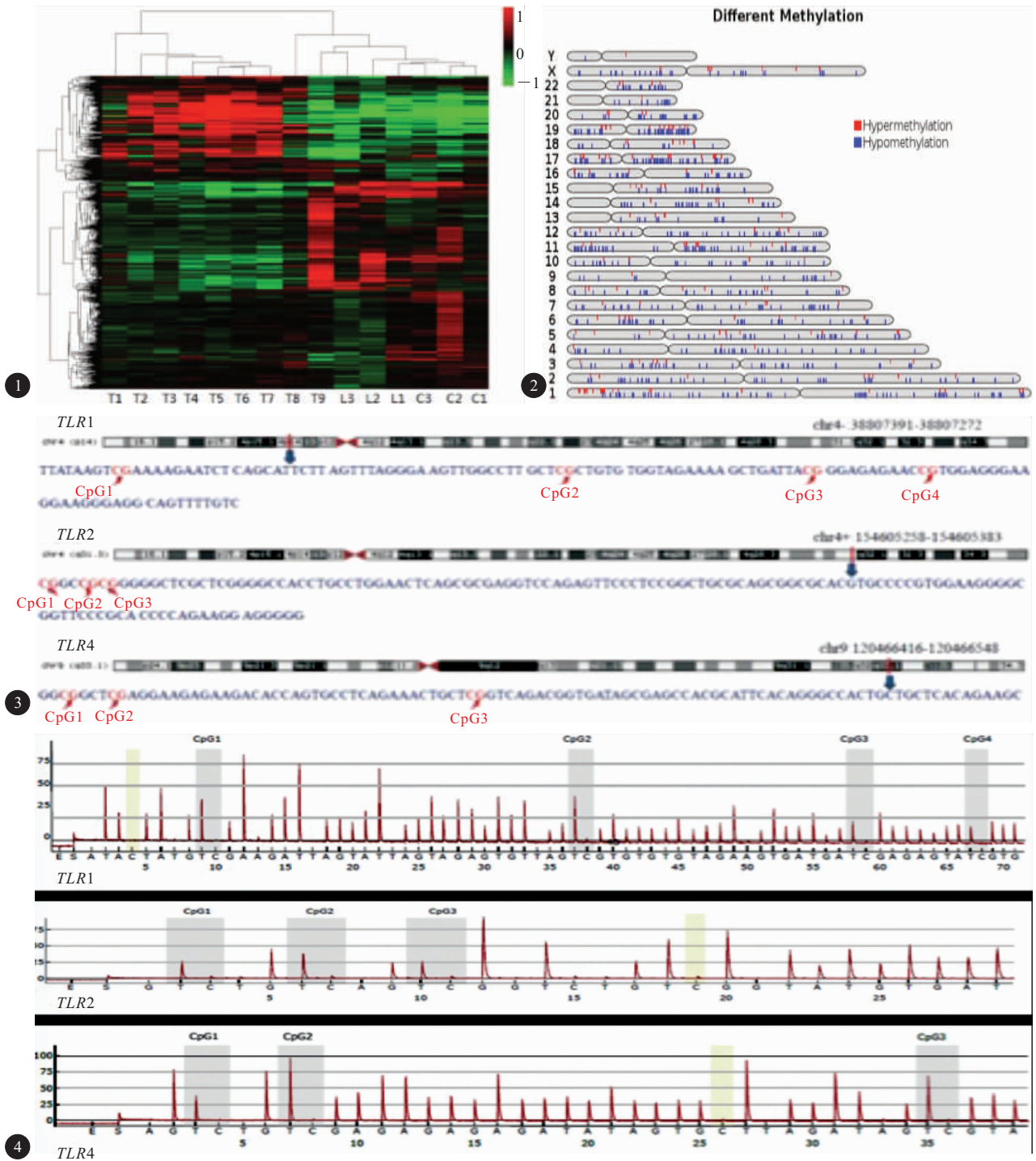


图 1 甲基化差异位点(CpG)分析

图 2 甲基化差异片段(DMRs)分析

图 3 目标片段及待测 CpG 位点信息

图 4 焦磷酸测序结果图

Fig 1 Analysis of differential methylation point (CpG)

Fig 2 Analysis of differential methylated regions (DMRs)

Fig 3 Target fragment and information to be tested for CpG loci

Fig 4 Pyrosequencing results

Fig 1: Each CpG locus with an average of 0 standard and deviation is 1, two groups which the difference of average beta score ≥ 0.2 , $P < 0.05$ were chose to do clustering analysis. The results showed that the methylation level of most loci was increased (red) in the control group, while most loci in the active tuberculosis group showed low methylation status (green). The methylation level of the two groups was significantly different ($P < 0.05$); Fig 2: The distribution of 1 106 differential methylated regions (DMRs) on 24 chromosomes (22 autosomal + X and Y sex chromosomes). Red represents high DMRs and blue represents low DMRs. Most of the DMRs showed low methylation status compared with the health group

19 号染色体,其 GC 含量高,拥有最高的 DMRs 分布密度,而 Y 染色体作为决定男性性别的染色体拥有最低的 DMRs 分布密度。见图 2。

DMRs 覆盖的基因区域包括:转录起始位点上游 >2 000 bp(启动子上游区域)、转录起始位点上游 <2 000 bp(启动子区)、5'UTR、第一个外显子、基因主体区(除外第一个外显子)和 3'UTR 区;其中,51.7%的 DMRs 位于基因主体区域,其次为转录起始位点上游区域(30.2%),DMRs 分布最少的区域为 3'UTR 区,仅占 3.9%。DMRs 在结构基因中的分布情况详见表 1。

2.1.2 差异甲基化位点的功能分析

2.1.2.1 GO 功能富集分析 本次实验的 GO 分析结果表明,与甲基化差异基因相关的 GO 条目共有 1 473 个,其中 27 个(FDR<0.05)GO 条目有显著意义,共涉及 693 个甲基化差异基因。其中,甲基化差异基因主要富集于转录、转录调节、代谢和信号

转导相关的生物过程。值得注意的是,此次分析中差异基因相关的 GO 条目还分布在白细胞分化、细胞因子调节及炎症反应等与 TB 密切相关的生物过程中,包括:白细胞介素(IL)-6 信号通路、B 细胞凋亡过程的负调控、天然免疫反应、凋亡过程、滤泡辅助型 T 细胞分化和急性炎症反应。甲基化差异基因的 GO 分析结果详见表 2。

表 1 DMRs 在结构基因中的分布情况

Table 1 Distribution of DMRs in structural genes

DMRs position	Up-regulation DMRs	Down-regulation DMRs
The upstream region of the TSS >2 000 bp	46	157
The upstream region of the TSS <2 000 bp	33	98
5'UTR	22	67
The first exon	17	51
The main domain of gene	168	404
3'UTR	4	39

TSS: Transcription start site

表 2 GO 功能富集分析结果列表

Table 2 List of GO functional analysis results

GO name	The number of differential genes in GO	P	FDR
Regulation of transcription, DNA-dependent	95	4.275 79×10 ⁻¹⁴	1.057 4×10 ⁻¹⁰
Transcription, DNA-dependent	100	2.997 05×10 ⁻¹¹	3.705 86×10 ⁻⁸
Small molecule metabolic process	76	1.858 64×10 ⁻⁹	1.532 14×10 ⁻⁶
Signal transduction	62	9.02707×10 ⁻⁹	5.580 98×10 ⁻⁶
Negative regulation of B cell apoptotic process	50	2.277 43×10 ⁻⁷	0.000 112 642
Biological_process	41	3.524 33×10 ⁻⁷	0.000 145 261
Innate immune response	32	4.939 96×10 ⁻⁷	0.000 174 522
Cellular protein metabolic process	35	8.881 1×10 ⁻⁷	0.000 274 537
T follicular helper cell differentiation	35	1.788 22×10 ⁻⁶	0.000 450 397
RNA processing	13	1.932 09×10 ⁻⁶	0.000 450 397
Retina vasculature morphogenesis in camera-type eye	5	2.003 39×10 ⁻⁶	0.000 450 397
Interleukin-6-mediated signaling pathway	37	5.906 86×10 ⁻⁶	0.001 159 883
Oxidation-reduction process	37	6.097 24×10 ⁻⁶	0.001 159 883
Positive regulation of transcription, DNA-dependent	31	3.164 13×10 ⁻⁵	0.005 589 203
Gene expression	37	3.498 96×10 ⁻⁵	0.005 768 619
Apoptotic process	34	5.680 19×10 ⁻⁵	0.008 779 443
Acute inflammatory response	5	6.320 84×10 ⁻⁵	0.009 194 958
Multicellular organismal development	28	9.729 46×10 ⁻⁵	0.012 765 292
Lipid metabolic process	14	0.000 102 061	0.012 765 292
Transport	25	0.000 103 237	0.012 765 292
Phosphorylation	14	0.000 147 071	0.017 319 329
Protein transport	24	0.000 181 274	0.020 376 823
Inflammatory response	21	0.000 214 396	0.023 052 198
Ion transport	14	0.000 272 957	0.028 125 896
Carbohydrate metabolic process	22	0.000 314 09	0.031 069 779
Anatomical structure morphogenesis	10	0.000 367 685	0.034 972 537
Regulation of catalytic activity	10	0.000 403 408	0.036 949 21

2.1.2.2 KEGG 功能富集分析 针对甲基化差异基因进行 KEGG Pathway 功能富集分析显示,由于

芯片分析纳入的样本数量少,此次分析结果仅有 Metabolic pathways 的 FDR 值小于 0.05 外,其他

Pathway 分析结果的 FDR 值均无显著性。为避免功能基因筛选过程中被遗漏,经讨论后本次分析以 $P < 0.05$ 作为 Pathway 分析结果有意义的界值。分析结果显示:甲基化差异基因共涉及 244 条信号通路,共 23 条 ($P < 0.05$) 信号通路符合上述筛选条件,涉及 228 个甲基化差异基因。其中,有 22 个甲基化差异基因与结核通路相关,除此之外,甲基化差

异基因还被包括在肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、调节自噬、JAK 激酶/信号转导子和转录激活子(JAK-STAT)信号通路和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K-Akt)信号通路等与结核病相关的信号通路中。甲基化差异基因的 KEGG Pathway 功能富集分析结果详见表 3。

2.1.2.3 甲基化与 mRNA 芯片的联合分析 经查

表 3 KEGG Pathway 功能富集分析结果列表
Table 3 List of KEGG Pathway functional analysis results

Pathway name	The number of differential genes in Pathway	P	FDR
Metabolic pathways	76	8.181 58 × 10 ⁻¹³	1.996 31 × 10 ⁻¹⁰
Glycerolipid metabolism	7	0.001 675 528	0.151 446 495
RNA degradation	8	0.001 862 047	0.151 446 495
Regulation of autophagy	5	0.003 231 673	0.197 132 056
Tuberculosis	22	0.004 075 917	0.198 904 739
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	7	0.006 055 146	0.208 913 135
Osteoclast differentiation	10	0.007 174 229	0.208 913 135
Jak-STAT signaling pathway	11	0.007 695 74	0.208 913 135
Glycerophospholipid metabolism	8	0.008 530 762	0.208 913 135
Cysteine and methionine metabolism	5	0.008 562 014	0.208 913 135
Apoptosis	5	0.0108 556 77	0.240 798 663
Parkinson's disease	10	0.012 878 106	0.261 854 831
Collecting duct acid secretion	4	0.017 040 755	0.319 841 869
TNF signaling pathway	4	0.019 493 81	0.339 749 251
Hippo signaling pathway	10	0.021 714 454	0.342 194 504
Glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series	3	0.022 438 984	0.342 194 504
Protein digestion and absorption	7	0.025 891 103	0.371 613 485
PI3K-Akt signaling pathway	4	0.028 244 393	0.382 868 444
Fructose and mannose metabolism	4	0.031 653 206	0.403 195 658
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	5	0.034 689 128	0.403 195 658
Glutamatergic synapse	8	0.034 701 266	0.403 195 658
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6	0.041 604 061	0.461 426 859
Vibrio cholerae infection	5	0.043 948 727	0.466 238 673

阅文献和课题组的严格筛选,将 *TLR1*、*TLR2* 和 *TLR4* 作为进行后续验证的甲基化差异基因。

2.2 验证实验

2.2.1 目标片段 本实验共纳入 *TLR1*、*TLR2*、*TLR4* 三个基因,共涉及 10 个 CpG 位点(均位于启动子区),待测片段与甲基化芯片分析片段相同或被包含于其中。目标片段碱基序列及待测 CpG 位点信息如图 3 所示。

2.2.2 焦磷酸测序结果图 目标基因片段的焦磷酸测序结果如图 4 所示,各碱基信号峰清晰,读取序列与目标片段碱基序列相符,说明焦磷酸测序反应成功。另外,质控位点(黄色 C/A 位点)无反应信号峰,说明 DNA 亚硫酸氢盐处理转化完全,检测结果可以真实反映待测 CpG 位点的甲基化状态。

2.2.3 待测 CpG 位点的统计学分析结果 *TLR1* 基因的 CpG1 位点 ($P < 0.001$) 呈现高甲基化状态, *TLR4* 基因的 CpG2 位点 ($P = 0.012$) 呈现低甲基化状态。 *TLR2* 基因的 CpG 位点甲基化状态无改变。

3 讨论

既往的研究已经证实位于基因启动子区的 CpG 岛或散在的 CpG 位点甲基化状态的改变拥有调控基因表达的作用^[3,8],到目前为止基于 DNA 甲基化的研究也主要聚焦于这些功能区 CpG 位点。然而,本研究分析结果发现仅有 11.8% 的 DMRs 位于启动子区(转录起始位点上游 $< 2\ 000$ bp),高于 SHARMA 等^[9]的研究结果。对于其他基因功能区,包括 5'UTR 区、第一个外显子、3'UTR 区,均有

差异性 CpG 位点的分布,提示这些区域很可能是潜在的 MTB 感染过程中的作用靶点,其参与 TB 的发生发展主要通过调控相关基因表达来实现。除此之外,我们还发现约 18.4% 的 DMRs 位于基因启动子上游(转录起始位点上游 >2 000 bp)区域。顺式作用元件增强子和沉默子等可远离基因的转录起始位点(1~40 kb)^[10],这些差异性 CpG 位点是否通过影响其功能来发挥作用还需相关实验进一步验证。

对 DMRs 所在基因进行的功能富集分析结果发现,差异基因主要富集在几个基因家族,包括细胞代谢、免疫反应、自噬、DNA 复制和修复。Toll 样受体作为识别 MTB 细胞壁成分的重要模式识别受体,其相关基因包括 *TLR1*、*TLR2* 和 *TLR4* 均发现甲基化模式改变。研究表明,MTB 抗原可与 *TLR2*、*TLR4*、*TLR9* 或 *TLR1/TLR6* 与 *TLR2* 形成的异二聚体结合,并选择性地上调患者单核细胞 TLR 的表达;*TLR1*、*TLR2*、*hsTLR1*、*TLR4* 和 *TLR6* mRNA 的表达水平均上调,且 CD3⁺ 和 CD4⁺ 细胞中 *hsTLR1* mRNA 的表达水平也上调^[11]。

本研究发现 *TLR1* 基因存在高甲基化 CpG 位点、*TLR4* 基因存在低甲基化 CpG 位点,而 *TLR2* 基因待测 CpG 位点甲基化状态无改变。有研究已表明,*TLR1* 的一种单核苷酸多态性与各民族对 TB 的耐药性有关^[12],这种非同义多态性位于细胞外结构中,导致天冬酰胺变成丝氨酸^[13],这种氨基酸改变被认为会影响 TLR 的折叠机制及其配体结合效率,并损害其与 *TLR2* 形成异源二聚体的能力,从而导致免疫反应降低。*TLR2* 和 *TLR4* 是结核病中研究率最高的 TLRs。*TLR4* 可诱导激活含 TIR 结构域的衔接蛋白/髓样分化初级反应 88 (TIRAP-MyD88)-依赖的信号转导通路,活化下游核因子(NF)- κ B 激酶抑制剂(IKK)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)和 NF- κ B 信号通路,从而诱导促炎细胞因子的释放^[14]。在随后的内吞作用过程中,*TLR4* 可触发 Toll 样受体相关分子/ Toll 样受体相关的干扰素活化子(TRAM-TRIF)-依赖的信号通路,诱导 TANK 结合激酶 1(TBK1)、干扰素调节因子 3(IRF3)活化,以及 I 型干扰素的释放^[15]。抑制细胞表面 *TLR4* 受体后,可减弱 TRAM-TRIF-依赖的信号通路对脂多糖(LPS)刺激所做出的反应,然而却不影响 TIRAP-MyD88-依赖的信号转导通路^[16]。*TLR2* 介导的信号传导可能存在特定的微生物诱导方式。*TLR2* 作为 MyD88 和 TIRAP 的适配器与

之结合后^[17],可激活 NF- κ B 信号通路诱导 IL-12 和 TNF- α 等炎症因子分泌^[18],起到抗 MTB 的作用。*TLR2* 基因表达异常可影响其异源二聚体的形成及其与配体的结合,这可能会影响宿主的先天性免疫反应,从而改变宿主对 TB 的易感性。在巨噬细胞和树突状细胞内,*TLR2* 可以激活 NF- κ B 和促炎因子的释放,单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌的脂膜酸和嗜酸乳杆菌感染可通过 *TLR2* 诱导 I 型干扰素的产生^[19]。

在结核研究领域,DNA 甲基化的研究仍处于前期探索阶段,由于 TB 发病的复杂性和多因素性,以及 TB 易受后天因素如压力、营养、共感染等影响,必然导致其发病的过程与表观遗传学密不可分,因此,深入探究 DNA 甲基化在其中发挥的作用很有价值,该领域的研究很可能进一步揭示 TB 的发病机制。

参 考 文 献

- [1] WHO: Global tuberculosis report 2016. World Health Organization. <http://www.who.int/en/>.
- [2] WALZ L G, RONACHER K, HANEKOM W, *et al.* Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*,2011,11(5):343-354.
- [3] BIERNE H, HAMON M, COSSART P. Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*,2012,2(12):a010272.
- [4] CHEN Y, HSIAO C, CHEN C, *et al.* Aberrant Toll-like receptor 2 promoter methylation in blood cells from patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect*,2014,69(6):546-557.
- [5] PACIS A, TAILLEUX L, LAMBOURNE J, *et al.* Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. *Cold Spring Harb Lab Bio Rv*,2015,5(12):1801-1811.
- [6] ANDRAOS C, KOORSEN G, KNIGHT JC, *et al.* Vitamin D receptor gene methylation is associated with ethnicity, tuberculosis, and TaqI polymorphism. *Human Immunol*, 2011,72(3):262-268.
- [7] MA F, XU S, LIU X, *et al.* The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat Immunol*, 2011,12(9):861-869.
- [8] BAYARSAIHAN D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res*,2011,90(1):9-17.
- [9] SHARMA G, SOWPATI DT, SINGH P, *et al.* Genome-wide non-CpG methylation of the host genome during M. tuberculosis infection. *Sci Rep*,2016,6:25006.
- [10] MASTON GA, EVANS SK, GREEN MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*,2006,7:29-59. (下转第 775 页)

- Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(4): 237-247.
- [5] WAYNE P. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 26th informational supplement. CLSI M100-S26. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- [6] SUN K, XU X, YAN J, *et al.* Evaluation of six phenotypic methods for the detection of carbapenemases in gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. *Ann Lab Med*, 2017, 37(4): 305-312.
- [7] PASTERAN F, GONZALEA LJ, ALBORNOZ E, *et al.* Triton Hodge Test: improved protocol for modified hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(3): 640-649.
- [8] PASTERAN F, TIJET N, MELANO RG, *et al.* Simplified protocol for carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(12): 3908-3911.
- [9] WOODFORD N, ELLINGTON MJ, COELHO JM, *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.*. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27(4): 351-353.
- [10] DALLENNE C, DA CA, DECRE D, *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(3): 490-495.
- [11] VOETS GM, FLUIT AC, SCHARRINGA J, *et al.* A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and OXA beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 37(4): 356-359.
- [12] SMITH CA, ANTUNES NT, STEWART NK, *et al.* Structural basis for enhancement of carbapenemase activity in the OXA-51 family of class D beta-lactamases. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(8): 1791-1796.
- [13] LIVERMORE DM, WOODFORD N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3(5): 489-495.

(2018 - 03 - 28 收稿, 2018 - 07 - 10 修回)

编辑 汤洁

(上接第 736 页)

- [11] CHANG JS, HUGGETT JF, DHEDA K, *et al.* Mycobacterium tuberculosis induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary tuberculosis. *J Immunol*, 2006, 176(5): 3010-3018.
- [12] SCHURZ H, DAYA M, MÖLLER M, *et al.* TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139711 [2017-11-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139711>.
- [13] MA X, LIU Y, GOWEN BB, *et al.* Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One*, 2007, 2(12): e1318 [2017-11-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001318>.
- [14] LATZ E, VISINTIN A, LIEN E, *et al.* The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface. *J Endotoxin Res*, 2003, 9(6): 375-380.
- [15] HUSEBYE H, HALAAS Ø, STENMARK H, *et al.* Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J*, 2006, 25(4): 683-692.
- [16] KAGAN JC, SU T, HORNG T, *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*, 2008, 9(4): 361-368.
- [17] ARJI N, MUSSON M, IRAQI G, *et al.* Genetic diversity of TLR2, TLR4, and VDR loci and pulmonary tuberculosis in Moroccan patients. *J Infect Dev Ctries*, 2014, 8(4): 430-440.
- [18] REILING N, HOLSCHER C, FEHRENBACH A, *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)-2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, 2002, 169(7): 3480-3484.
- [19] WEISS G, RASMUSSEN S, ZEUTHEN LH, *et al.* Lactobacillus acidophilus induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a Toll-like receptor-2-dependent mechanism. *Immunology*, 2010, 131(2): 268-281.

(2018 - 03 - 14 收稿, 2018 - 07 - 03 修回)

编辑 余琳