DOI:10.13350/j.cjpb.240303 · 论著 ·

基于生物信息学分析的结核病诊断及治疗新型生物标志物的筛选*

刘柯妤[1],骆婷婷[1],沈世杰[1],邓思齐[1],Saeed El-Ashram[2],曹城彰[1],张万江[1],陈瑞平[3],王优月[3],吴江东[1**],宋雯[3**]
(1.石河子大学医学院新疆地方病与民族疾病教育部重点实验室,新疆石河子 832000;
2.卡夫雷尔谢赫大学理学院;3.新疆建设兵团第九师医院感染科)

【摘要】 **目的** 利用生物信息学方法筛选结核病诊断和治疗的潜在新型生物标志物。 **方法** 从美国基因表达数据库(the Gene Expression Omnibus,GEO)下载数据集GSE34608和GSE54992用于筛选结核病的差异表达基因(DEG),通过R软件对DEGs进行基因本体论(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析,登陆STRING网站进行差异表达基因间的蛋白-蛋白相互作用(Protein-Protein Interaction,PPI)分析,并利用Cytoscape软件分析PPI的关键模块和关键基因。利用基因数据集GSE116542、GSE34608、GSE25435筛选共同差异表达miRNA(DE miRNA),采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)验证筛选的关键基因,采用Cytoscape软件构建DEG-DE miRNA网络。 **结果** 共筛选出379个差异表达基因,其中225个基因表达上调,154个基因表达下调。这些DEGs主要与先天免疫反应、炎症反应、NOD样受体信号通路及吞噬体等有关。从中筛选出10个关键基因(STAT1、DDX58、TLR8、TLR7、SAMD9L、IFI44、IFI44L、XAF1、UBE2L6、IFITM1),其中STAT1、SAMD9L和IFI44被验证。两个miRNA用于构建DEG-DE miRNA网络。 **结论** 共筛选出379个差异表达基因,其中的10个关键基因可能成为结核病诊断和治疗的新生物标志物。

【关键词】 结核病;生物标志物;生物信息学分析;关键基因;miRNA
【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2024)03-0263-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Mar.; 19(3): 263-269,274.]

Bioinformatics-based identification of novel biomarkers for tuberculosis diagnosis and treatment

LIU Keyu[1], LUO Tingting[1], SHEN Shijie[1], DENG Siqi[1], Saeed ElAshram[2], CAO Chengzhang[1], ZHANG Wanjiang[1], CHEN Ruiping[3], WANG Youyue[3], WU Jiangdong[1], SONG Wen[3] (1. *Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases Cooperated by Education Ministry with Xinjiang Province, Shihezi* 832000, *Xinjiang, China*; 2. *Faculty of Science, Kafrelsheikh University, Kafr El-Sheikh, Egypt* 33511; 3. *Department of Infectious Diseases, Hospital of the Ninth Division of the Xinjiang Construction Corps*)*,**

【Abstract】 **Objective** To search for potential novel biomarkers for the diagnosis and treatment of tuberculosis (TB) by bioinformatics methods. **Methods** The datasets GSE34608 and GSE54992 were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, the GEO2R online tool was used to screen differentially expressed genes (DEGs) of tuberculosis. And the DEGs were enriched for Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways by R softwarecluster profile package. The STRINGwas used to analyze Protein-Protein Interaction (PPI) of DEGs, and utilized the Cytoscape software plug-in APP Molecular Complex Detection (MCODE) to create a cluster network and identify the top module. The CytoHubba plug-in discovered the top ten hub genes and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was utilized to validate these hub genes. Finally, the gene datasets GSE116542, GSE34608, GSE25435 were used to screen for co-differentially expressed miRNAs (DE miRNAs). To predict miRNA target genes, the DE miRNAs were submitted to TargetScan, miRDB, and miRWalk, and used the Venn online tool to look for common genes among DEGs and DE miRNAs target genes. Then the DEG-DE miRNA network was constructed using Cytoscape software. **Results** A total of 379 DEGs were screened, of which 225 were up-regulated and 154 were down-regulated. These DEGs were mainly associated with innate immune response, inflammatory response,

* 【基金项目】 新疆建设兵团九师科技计划项目(No. 2021JS010);兵团重点领域科技攻关计划项目(No. 2023AB053);兵团指导性科技计划项目(No. 2022ZD043)。
** 【通讯作者】 吴江东,E-mail:1556874645@qq.com;宋 雯,E-mail:318348287@qq.com
【作者简介】 刘柯好(1998-),女,四川乐山人,硕士研究生,主要从事结核病的研究。E-mail:2543761844@qq.com
刘柯好和骆婷婷为共同第一作者。

NOD-like receptor signaling pathway, phagosome, etc. Ten hub genes (STAT1, DDX58, TLR8, TLR7, SAMD9L, IFI44, IFI44L, XAF1, UBE2L6, IFITM1) were screened, of which STAT1, SAMD9L and IFI44 were validated. Two miRNAs (hsa-miR-361-5p and hsa-miR-425-3p) were selected for the construction of the DEG-DE miRNA network. **Conclusion** A total of 379 DEGs were screened out, of which 10 hub genes may become novel biomarkers for the diagnosis and treatment of tuberculosis.

【Key words】 Tuberculosis; biomarkers; bioinformatics analysis; hub genes; miRNA

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的一种慢性传染病。在许多国家和地区,结核病仍然是导致疾病和死亡的一个重要原因[1]。高效、准确的诊断是防治结核病最有效的方法之一。结核病临床诊断方法主要包括Mtb镜检、Mtb培养、干扰素释放试验(IGRA)等,但这些方法或不敏感或耗时久[2-3]。生物标志物能在短时间内观察到,并且可以替代并合理预测临床相关终点或难以观察的中间结果,因此广泛运用于疾病的诊断和治疗,如支气管哮喘、系统性红斑狼疮、败血症等[4-6]。同时,也可用于结核病的诊断、治疗和控制[7]。本研究采用生物信息学方法从多个基因数据集中筛选关键基因,为结核病的临床诊断、治疗提供新的生物标志物。

材料与方法

1 数据集选择和数据集处理

从GEO中下载基因表达数据集GSE34608[8]和GSE54992[9],以及miRNA表达数据集GSE116542、GSE34608和GSE25435[9](数据集微阵列信息如表1),运用GEO2R在线网络工具筛选差异表达基因(DEG)和差异表达miRNA(DE miRNA),阈值设定为$P<0.05$和$|\log \text{fold change (FC)}|>1$。运用Venn在线网络工具查找共同表达的差异基因和共同表达的差异miRNA,并用微生信在线网站构建火山图将其可视化。

表1 基因表达数据集和miRNA数据集微阵列信息
Table 1 Gene expression dataset and miRNA dataset microarray information

类型 Type	数据集 Dataset	国家 Country	来源 Source	样品 Sample		平台 Platform
				正常 Normal	结核病 Tuberculosis	
mRNA	GSE34608	德国	血液	18	8	GPL6480 Platform (Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (Probe Name version))
	GSE54992	中国	血液	6	9	GPL570 Platform ([HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array)
	GSE116542	中国	血液	8	11	GPL19117 Platform ([miRNA-4] Affymetrix Multi-species miRNA-4 Array)
miRNA	GSE34608	德国	血液	8	8	GPL7731 platforms (Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B (Feature Number version))
	GSE25435	中国	血液	3	3	GPL10850 Platform (Agilent-021827 Human miRNA Microarray (V3) (miRBase release 12.0 miRNA ID version))

2 DEGs的Go和KEGG富集分析

Go功能分析通常在三个层面进行:生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)。KEGG是一个全面的数据库,包含新陈代谢、其他细胞过程、机体功能和人类疾病的信息[10]。利用R软件的cluster profile文件包进行Go和KEGG通路分析,$P<0.05$和FDR<0.05认为具有统计学意义。通过微生信在线网站对富集结果进行可视化。

3 PPI网络的构建以及关键模块和关键基因的筛选

筛选出的DEGs上传至STRING数据库用于构建蛋白-蛋白互作网络(PPI),设置交互得分<0.4。利用Cytoscape软件的MCODE插件和CytoHubba插件筛选顶层模块和关键基因。

4 DE miRNAs-DEGs网络的构建

将所有DE miRNAs上传至TargetScan、miRDB、miWalk网站,预测miRNA的靶基因。此外,使用Venn在线工具筛选靶基因和DEGs的共同基因,并将这些基因导入Cytoscape软件,构建DEG-DE miRNA网络。

5 Thp-1细胞的培养和诱导分化

人白血病单核细胞系(Human leukemia monocytic cell line, THP-1)分离自1岁急性单核细胞白血病患儿外周血,被广泛用于炎症和免疫的研究[11-12]。取实验室保存的THP-1细胞用THP-1专用培养基(Procell公司产品)在37 ℃、5% CO_2条件下培养。

用 160 nmol/L phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)诱导 THP-1 细胞分化为巨噬细胞，24 h 后丢弃含 PMA 的培养基，用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次，补充新的培养基。

6 BCG 侵染和 RNA 提取

卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin，BCG)和 Mtb 诱导的免疫应答非常相似，在建立人类感染模型时，BCG 接种被认为是 Mtb 感染的替代[13]。使用 BCG 对 THP-1 进行侵染，感染复数(MOI)为 10。感染 4 h 后用 PBS 洗涤细胞 3 次，在 THP-1 专用培养基中培养 24 h。使用超纯 RNA 试剂盒(DNase I (CWBIO 中国公司产品)提取总 RNA，使用 PerfectStart® Uni RT&qPCR 试剂盒(TransGen Biotech 中国公司产品)将 RNA 反转录为 cDNA。

7 qRT-PCR 验证关键基因

使用 PerfectStart® Uni RT&qPCR 试剂盒(TransGen Biotech 中国公司产品)和 QuantStudio Real-Time PCR 系统进行实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品)。内参基因选择 β-actin。$2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法用于确定 RNA 的相对表达水平。引物序列见表 2。

表 2 引物序列
Table 2 The sequences of primer

基因名称 Name	前序列 Forward sequence(5′-3′)	后序列 Reverse sequence(5′-3′)
STAT1	CAGCTTGACTCAAAATTCCTGGA	TGAAGATTACGCTTGCTTTTCCT
DDX58	TGTGCTCCTACAGGTTGTGGA	CACTGGGATCTGATTCGCAAAA
TLR8	ATGTTCCTTCAGTCGTCAATGC	TTGCTGCACTCTGCAATAACT
TLR7	CACATACCAGACATCTCCCCA	CCCAGTGGAATAGGTACACAGTT
SAMD9L	GAAACAGGAGCACTCAATCTCA	CAGCCTTACTGGTGATTTTCACA
IFI44	TTTTCGATGCGAAGATTCACTGG	CCTGATGCGTTACATGCCCTT
IFI44L	TCTGCCATTTATGTTGTGTGACA	CAGGTGTAATTGGTTTACGGGAA
XAF1	GCTCCACGAGTCCTACTGTG	GTTCACTGCGACAGACATCTC
UBE2L6	TGGACGAGAACGGACAGATTT	GGCTCCCTGATATTCGGTCTATT
IFITM1	TCAACATCCACAGCGAGACC	TGTCACAGAGCCGAATACCAG
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

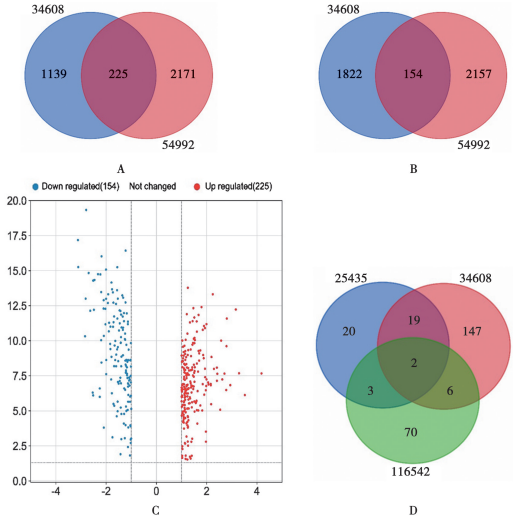
8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。方差分析中实验组与对照组的比较采用 Student's t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。组间差异性采用 Graph Pad Prism 7.0 可视化。

结 果

1 结核病差异表达基因的筛选

在数据集 GSE34608 和 GSE54992 中共有 3 340 个 DEGs(1 364 个上调和 1 976 个下调)和 4 707 个 DEGs(2 396 个上调和 2 311 个下调)($P<0.05$ 和 |log fold change(FC)|>1)。通过 Venn 网站筛选出两个数据集的共同 DEGs 397 个(225 个上调和 154 个下调)(图 1A-C)。GSE116542、GSE34608 和 GSE25435 中分别发现了 81、174 和 44 个 DE miRNA，并筛选出两个共同 DE miRNA(hsa-miR-361-5p 和 hsa-miR-421-5p)，表达均上调(图 1D)。



A 显示上调的共同 DEGs 数量的 VENN 图 B 显示下调的共同 DEGs 数量的 VENN 图 C 上调和下调 DEGs 的火山图 D 共同 DE miRNA 的 VENN 图

图 1 DEGs 和 DE miRNAs 的筛选

A Venn diagram showing the number of the upregulated common DEGs B The downregulated common DEGs C Volcano plot for upregulated and downregulated DEGs D Venn diagram for common DE miRNAs

Fig. 1 Identification of DEGs and DE miRNAs

2 Go 及 KEGG 富集分析

运用 R 软件对 DEGs 进行富集分析。Go 分析显示，在 BP，上调的 DEGs 主要富集在固有免疫反应、免疫反应、炎症反应、肿瘤坏死因子产生的正向调节、炎症反应的正向调节等；在 CC 中，上调的 DEGs 富集区域主要包括质膜、细胞质、胞浆、胞外区等；MF 中下调的 DEGs 主要与蛋白结合相关(图 2A-C 和表 3)。KEGG 通路分析显示，下调的 DEGs 在癌症中显著富集于蛋白聚糖。相比之下，上调的 DEGs 在 NOD 样受体信号通路、吞噬体和百日咳中显著增加(图 2D-E 和表 4)。

表 4 DEGs 的 KEGG 富集分析
Table 4 KEGG pathway analysis of DEGs

类别 Category	通路名称 Term	富集数 Count	P 值 P Value	标准 P 值 FDR
KEGG_PATHWAY	hsa04621:NOD-like receptor signaling pathway	10	5.04E-04	0.043620888
KEGG_PATHWAY	hsa04145:Phagosome	9	6.45E-04	0.043620888
KEGG_PATHWAY	hsa05133:Pertussis	7	3.75E-04	0.043620888
KEGG_PATHWAY	hsa05205:Proteoglycans in cancer	10	6.49E-05	0.013232768

注：除 KEGG_PATHWAY 为 KEGG 的 Go 富集分析下调外，其余均为上调。

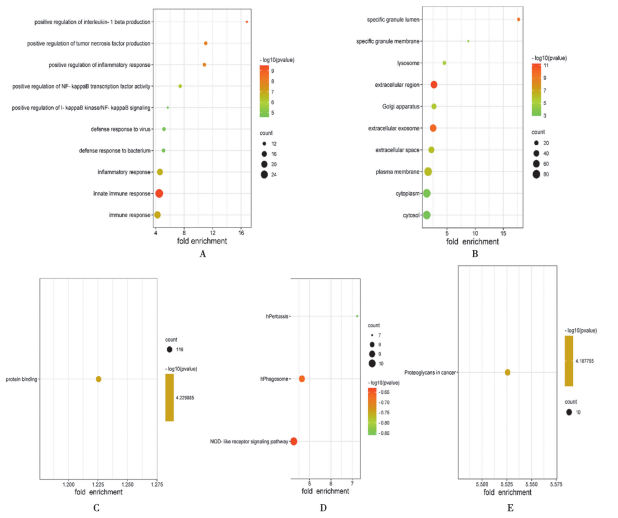
中国病原生物学杂志 2024年3月 第19卷第3期
Journal of Pathogen Biology Mar. 2024, Vol. 19, No. 3

表 3 DEGs 的 Go 富集分析

Table 3 Go enrichment analysis of DEGs

类别 Category	通路名称 Term	富集数 Count	*P* 值 *P value*	标准 *P* 值 FDR
BP	GO:0045087～innate immune response	27	3.11E-10	4.70E-07
BP	GO:0006955～immune response	21	1.23E-07	3.73E-05
BP	GO:0006954～inflammatory response	19	1.82E-07	4.60E-05
BP	GO: 0032760 ～ positive regulation of tumor necrosis factor production	12	1.14E-08	5.25E-06
BP	GO:0050729～positive regulation of inflammatory response	12	1.39E-08	5.25E-06
BP	GO:0051092～positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	12	6.53E-07	1.41E-04
BP	GO:0051607～defense response to virus	12	2.24E-05	0.003309244
BP	GO:0042742～defense response to bacterium	12	2.52E-05	0.003309244
BP	GO:0032731～positive regulation of interleukin-1 beta production	11	8.99E-10	6.80E-07
BP	GO:0043123～positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	11	2.47E-05	0.003309244
BP	GO:0071222～cellular response to lipopolysaccharide	11	2.59E-05	0.003309244
BP	GO: 0032496 ～ response to lipopolysaccharide	10	2.84E-05	0.003309244
BP	GO:0032757～positive regulation of interleukin-8 production	7	4.74E-05	0.005125991
BP	GO:0032755～positive regulation of interleukin-6 production	7	5.99E-04	0.045365583
BP	GO:0045429～positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	6	1.28E-04	0.012115656
BP	GO: 0019731～antibacterial humoral response	6	3.10E-04	0.026076733
BP	GO:1903428～positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process	5	2.68E-05	0.003309244
BP	GO:0002224～toll-like receptor signaling pathway	5	8.88E-05	0.008966537
BP	GO:0002227～innate immune response in mucosa	5	1.66E-04	0.014774427
BP	GO:0050832～defense response to fungus	5	4.02E-04	0.032003925
CC	GO:0005886～plasma membrane	83	7.54E-07	5.84E-05
CC	GO:0005737～cytoplasm	78	6.33E-04	0.011626084
CC	GO:0005829～cytosol	76	0.001045409	0.018004262
CC	GO:0005576～extracellular region	57	5.72E-12	1.77E-09
CC	GO:0070062～extracellular exosome	56	9.55E-11	1.48E-08
CC	GO:0005615～extracellular space	43	1.06E-06	6.58E-05
CC	GO:0005794～Golgi apparatus	30	2.39E-06	1.24E-04
CC	GO:0005764～lysosome	14	1.44E-05	5.59E-04
CC	GO:0035580～specific granule lumen	11	5.30E-10	5.48E-08
CC	GO:0035579～specific granule membrane	8	3.51E-05	0.001088308
CC	GO:0034774～secretory granule lumen	8	1.55E-04	0.00370647
CC	GO:0072562～blood microparticle	8	6.38E-04	0.011626084
CC	GO:1904724～tertiary granule lumen	7	1.76E-05	6.05E-04
CC	GO:0070821～tertiary granule membrane	7	8.89E-05	0.002504558
CC	GO: 0030667 ～ secretory granule membrane	7	5.25E-04	0.01085952
CC	GO:0098794～postsynapse	7	0.001137303	0.018556001
CC	GO: 1904813 ～ ficolin-1-rich granule lumen	7	0.001533392	0.023767569
CC	GO: 0035577 ～ azurophil granule membrane	6	2.79E-04	0.006181982
CC	GO:0030141～secretory granule	6	0.00313778	0.046319608
CC	GO:0042581～specific granule	5	6.38E-06	2.83E-04
CC	GO:0042582～azurophil granule	4	1.11E-04	0.002870653
MF	GO:0005515～protein binding	116	5.89E-05	0.019032617

注:除 MF 为 DEGs 的 Go 富集分析下调外,其余均为上调。



A Go-BP 富集分析 B Go-CC 富集分析 C Go-MF 富集分析 D 上调 DEGs 的 KEGG 通路分析 E 下调 DEGs 的 KEGG 通路分析

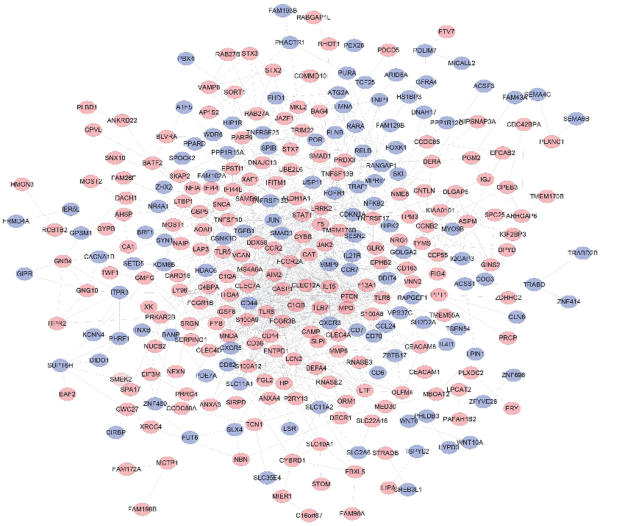
图 2 DEGs 的 Go 和 KEGG 富集分析

A The result of Go-BP enrichment analysis B The result of Go-CC enrichment analysis C The result of Go-MF enrichment analysis D KEGG pathway analysis of upregulated DEGs E KEGG pathway analysis of downregulated DEGs

Fig. 2 Go and KEGG enrichment analysis of DEGs

3 关键基因和顶层模块的筛选

利用 STRING 网站构建 PPI 网络,包括 307 个节点和 1 072 个边线,72 个 DEGs 被排除在外,结果如图 3。应用 Cytoscape 软件的 CytoHubba 插件在 PPI 网络中筛选出 10 个关键基因,分别为 STAT1、DDX58、TLR8、TLR7、SAMD9L、IFI44、IFI44L、XAF1、UBE2L6、IFITM1。由 MCODE 插件筛选出顶层模块(图 4A,B)。

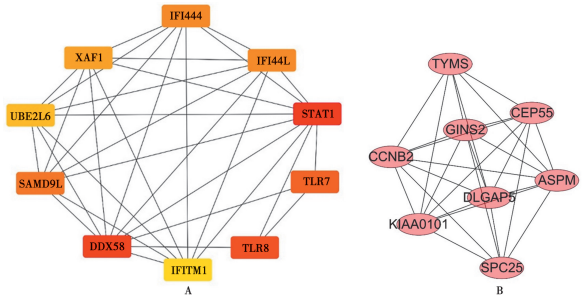


注:红色节点代表上调基因,蓝色节点代表下调基因。

图 3 DEGs 的 PPI 网络

Notes: The red nodes represent upregulated genes, and the blue nodes represent downregulated genes.

Fig. 3 The PPI network of DEGs



A PPI网络中筛选的10个关键基因 B PPI网络中获得的顶部模块,红色节点代表上调基因

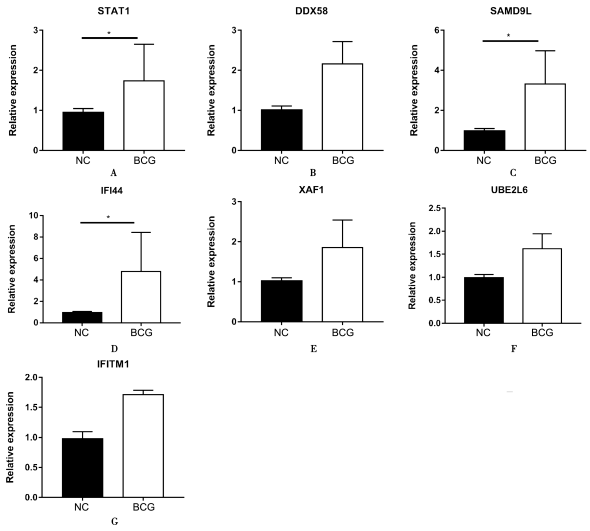
图4 关键基因的筛选

A The 10 hub genes B The top module obtained from the PPI network. Red nodes represent upregulated genes

Fig. 4 Identification of hub genes

4 关键基因的验证

利用PMA诱导Thp-1细胞分化,提取总RNA,采用qRT-PCR验证关键基因的表达水平,其中3个关键基因SATAT1,SAMD9L和IFI44表达水平显著上调,与之前的预测一致(图5A-G)。



A STAT1相对表达量 B DDX58相对表达量 C SAMD9L相对表达量 D IFI44相对表达量 E XAF1相对表达量 F UBE2L6相对表达量 G IFITM1相对表达量。a组间比较,$P<0.05$。

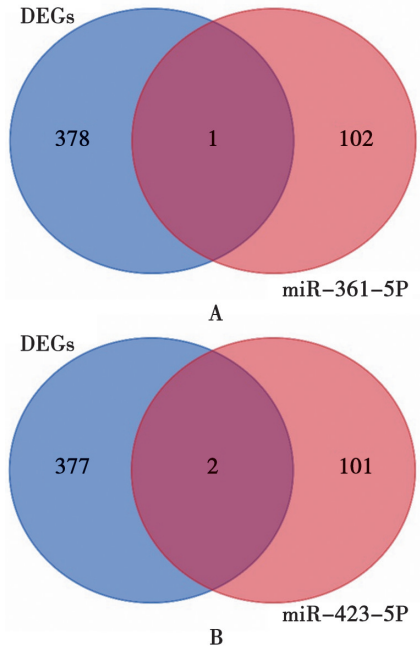
图5 qRT-PCR检测hub基因

A STAT1 B DDX58 C SAMD9L D IFI44 E XAF1 F UBE2L6 G IFITM1. a $P<0.05$.

Fig. 5 The relative expression level of hub genes

5 DEG-DE miRNA网络的构建

登陆TargetScan、miRDB和miRWalk网站检索miRNA的靶基因,登陆Venn网站寻找这些靶基因和DEGs的重叠基因。结果显示,hsa-miR-361-5p的靶基因与DEGs存在一个重叠基因,hsa-miR-423-5p与DEGs存在两个重叠基因(图6A,B)。运用Cytoscape软件构建DE miRNA-DEGs网络PPI网络,结果如图7。

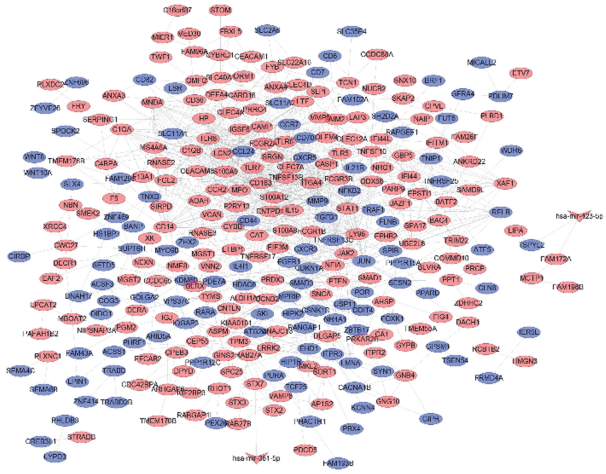


A VENN图筛选has-miR-361-5p靶基因与DEGs的共同基因 B VENN图筛选hsa-miR-423-5p靶基因与DEGs的共同基因

图6 基因筛选VENN图

A VENN diagram screened the common genes between has-miR-361-5p target genes and DEGs B VENN diagram screened the common genes between hsa-miR-423-5p target genes and DEGs

Fig. 6 VENN diagram of the gene screen



注:红色节点代表上调基因,蓝色节点代表下调基因,红色四边形代表上调的miRNA。

图7 基于DEGs和DE miRNA的PPI网络

Notes: The red nodes represent up-regulated genes, the blue nodes represent down-regulated genes, and the red quadrilateral represent up-regulated miRNAs.

Fig. 7 The PPI network based on DEGs and DE miRNA

讨 论

结核病仍然是全球性的公共卫生问题,基于基因表达数据库挖掘相关差异表达基因和信号通路的生物信息学方法对于寻找结核病诊断和治疗的生物标志物至关重要。

本研究从GEO数据库中下载了两个表达谱数据

集 GSE34608 和 GSE54992，使用 Venn 在线工具从两个数据集中确定了 379 个共同 DEGs。对差异表达基因进行 Go 和 KEGG 富集分析，以更好地了解其在生物学过程中的作用。Go 富集分析显示，DEGs 主要富集在固有免疫反应、免疫反应、炎症反应、肿瘤坏死因子产生的正向调节炎症反应的正向调节、蛋白结合等方面。KEGG 富集分析显示，差异表达基因主要与 NOD 样受体信号通路、吞噬体和蛋白聚糖等相关。结核病是一种慢性炎症性疾病。细胞因子是结核炎症反应中的宿主细胞成分[14]。Mtb 感染后，巨噬细胞发生凋亡以清除细胞内细菌，并激活宿主的固有和适应性免疫反应[15]，与细胞凋亡相关的蛋白分泌也发生改变。NOD 样受体（NLR）与炎症性疾病相关[16]，吞噬体在固有免疫和适应性免疫中发挥重要作用[17]。富集分析显示这些差异表达基因与 Mtb 感染后的胞内反应有关，在这些 DEGs 中有可能筛选出结核相关的生物标志物。

应用 STRING 构建 PPI 网络，CytoHubba 插件识别出 10 个与结核病高度相关的关键基因，包括 STAT1、DDX58、TLR8、TLR7、SAMD9L、IFI44、IFI44L、XAF1、UBE2L6 和 IFITM1。qRT-PCR 显示其中 3 个基因（STAT1、SAMD9L 和 IFI44）在 Mtb-BCG 感染后表达水平显著升高。信号转导与转录激活因子 1（signal transducer and activator of transcription 1，STAT1）是干扰素（IFN）信号传导的关键组成部分，在细胞因子、生长因子和激素（如 IFN 和 IL-6）的刺激下介导各种细胞功能[18]。STAT1 是应答 IFN-γ 和宿主防御 Mtb 的关键介质[19]。已有研究表明，在 Mtb 感染的早期阶段，磷酸化的 STAT1 可促进下游凋亡因子的转录激活[20]。然而 Mtb 感染后磷酸化 STAT1 迅速升高，但仅持续数小时。连续数天，未磷酸化的 STAT1 表达增加，抑制细胞凋亡，使 Mtb 逃避宿主免疫反应[21]。此外，STAT1 在肿瘤发展中发挥双重作用，抑制和促进肿瘤生长[18]。SAMD9L 是一个与多种临床疾病相关的 7 号染色体基因，包括 MIRAGE 综合征、共济失调-全血血细胞减少综合征、骨髓增生异常相关综合征和白血病单体 7 综合征。SAMD9L 具有抗增殖特性，在乳腺癌、肝细胞癌和鳞状细胞癌中发挥抑制作用，并受到 p53 通路的抑制[22]。研究表明，SAMD9L 在人血中表达显著升高，且 SAMD9L 可抑制 Mtb 感染后的细胞坏死[23]。干扰素诱导蛋白 44（interferon-induced protein 44，IFI44）是 I 型干扰素的关键基因，可能在自身免疫性疾病的发病机制中发挥作用[24]。然而，IFI44 在 Mtb 感染中的作用尚不清楚。de Oyarzabal 等[25] 报道 IFI44 在 TST 阳性和 TST 阴性细胞中表达不同，IFN 治疗 6 个月后 IFI44 表达下降。因此，在这些关键基因中，STAT1 是结核病生物标志物的首选，STAT1 及相关分子可能是活动性 TB 发生发展的潜在生物标志物[26]。目前关于 SAMD9L 和 IFI44 在结核病中的研究尚少，这两个基因在结核病中的发病机制尚不清楚，一些类似研究认为 SAMD9L 可作为潜在的 TB 标志物[23,26-27]。

其他关键基因如 DExD/H-box 解旋酶 58（DDX58/RIG-I），是一种病毒 RNA 模式识别受体，调节 I 型 IFN 的产生，维持免疫稳态，并在抗病毒免疫中发挥作用[28]。I 型 IFN 通过在巨噬细胞中产生 NO 来保护 Mtb[29]。为了逃逸宿主防御机制，Mtb 进化抑制自分泌 I 型 IFN 信号。TLR7 和 TLR8 是 toll 样受体（TLR）家族成员。TLR7 识别相应配体后通过 MyD88 通路进行信号转导，引起 DC 细胞、T 细胞、巨噬细胞的细胞反应，并分泌 IL、TFN、IFN 等细胞因子抵抗 Mtb 侵袭[30]。此外，激活 TLR7 可促进细胞自噬，清除细胞内 Mtb。TB 的易感性与 TLR8 多态性相关[31]。研究表明，TLR4 和 TLR8 异源二聚化通过 TLR8 配体（如微生物 RNA）参与 Mtb 的识别，诱导 Th1 反应[32]。IFI44L（interferon-induced protein 44-like）是 I 型干扰素刺激基因（type I interferon- stimulating gene，ISG），属于 IFI44 家族，在抗病毒活性中发挥重要作用。有研究发现 IFI44L 在人巨噬细胞内 Mtb 的正向调节和清除中起重要作用，敲除 IFI44L 可影响 Mtb 在细胞内的存活[33]。XIAP-相关因子 1（XAF1）尚未被发现在结核病（TB）的发病机制中发挥作用，Mtb 可能通过增加 XAE1 的表达来诱导免疫细胞凋亡，但尚需通过序列实验进行验证[27]。泛素结合酶 E2L6（UBE2L6）与结核病中的蛋白质泛素化和 I 型干扰素相关。I 型 IFN 能引起 UBE2L6 的上调，UBE2L6 可抑制 Mtb 感染后巨噬细胞的凋亡[34]。IFITM 家族包括干扰素诱导跨膜蛋白 1（IFITM1），抑制 IFITM1 可抑制 IFN-γ 的抗增殖作用[35]。这些基因大多参与结核病的发生、发展或炎症反应，其作为结核病生物标志物的可行性有待深入研究。

本研究筛选出两个与结核有关的 DE miRNA（hsa-mir-361-5p 和 hsa-mir-421-5p）。最近的研究表明，hsa-mir-361-5p 通过参与增殖、凋亡、转移和耐药等生物学过程，在乳腺癌、宫颈癌等恶性肿瘤的发生和进展中起重要作用[36-37]。有研究认为，与病毒性疾病相比，has-mir-361-5p 显著上调可能是结核病所独有[38]。此外，has-mir-421-5p 可通过靶向低氧反应抑制剂（hypoxia response inhibitors，HRR）破坏炎症和抗炎过程的平衡，维持 hif 介导的炎症基因的持续过表达[39]。

综上所述，本研究共筛选出两个与结核有关的DE miRNA（hsa-miR-361-5p 和 hsa-miR-421-5p），富集分析显示差异表达基因主要与蛋白质和细胞因子分泌以及炎症反应相关。同时发现10个关键基因，其中3个（STAT1、SAMD9L 和 IFI44）经 qRT-PCR 验证。上述基因可能成为新的结核病诊断和治疗的生物标志物。DEG-DE miRNA PPI 网络有助于阐明结核病发生发展的分子机制，为结核病的发病机制研究提供了一种新的方法。

【参考文献】

[1] WHO. Global tuberculosis report 2021[R]. Geneva: World Health Organization, 2021.

[2] Acharya B, Acharya A, Gautam S, et al. Advances in diagnosis of tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(5): 4065-4075.

[3] Yang Q, Chen Q, Zhang M, et al. Identification of eight-protein biosignature for diagnosis of tuberculosis[J]. Thorax, 2020, 75(7): 576-583.

[4] Kunc P, Fabry J, Lucanska M, et al. Biomarkers of bronchial asthma[J]. Physiol Res, 2020, 69(Suppl 1): S29-S34.

[5] Capecchi R, Puxeddu I, Pratesi F, et al. New biomarkers in SLE: from bench to bedside[J]. Rheumatology (Oxford), 2020, 59(Suppl5): v12-v18.

[6] Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: A review[J]. Crit Care, 2010, 14(1): R15.

[7] Lech G, Slotwinski R, Slodkowski M, et al. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(5): 1745-1755.

[8] Maertzdorf J, Weiner JR, Mollenkopf HJ, et al. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(20): 7853-7858.

[9] Cai Y, Yang Q, Tang Y, et al. Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92340.

[10] Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D353-D361.

[11] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)[J]. Int J Cancer, 1980, 26(2): 171-176.

[12] Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(1): 37-45.

[13] Minassian AM, Ronan EO, Poyntz H, et al. Preclinical development of an in vivo BCG challenge model for testing candidate TB vaccine efficacy[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19840.

[14] Dorhoi A, Kaufmann S H. Perspectives on host adaptation in response to *Mycobacterium tuberculosis*: modulation of inflammation[J]. Semin Immunol, 2014, 26(6): 533-542.

[15] Lam A, Prabhu R, Gross CM, et al. Role of apoptosis and autophagy in tuberculosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(2): L218-L229.

[16] Saxena M, Yeretssian G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer[J]. Front Immunol, 2014, 5: 327.

[17] Dean P, Heunis T, Hartlova A, et al. Regulation of phagosome functions by post-translational modifications: a new paradigm[J]. Curr Opin Chem Biol, 2019, 48: 73-80.

[18] Zhang Y, Liu Z. STAT1 in cancer: friend or foe? [J]. Discov Med, 2017, 24(130): 19-29.

[19] Deng M, Lv XD, Fang ZX, et al. The blood transcriptional signature for active and latent tuberculosis[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 321-328.

[20] Yi XH, Zhang B, Fu YR, et al. STAT1 and its related molecules as potential biomarkers in *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(5): 2866-2878.

[21] Yao K, Chen Q, Wu Y, et al. Unphosphorylated STAT1 represses apoptosis in macrophages during *Mycobacteriumtuberculosis* infection[J]. J Cell Sci, 2017, 130(10): 1740-1751.

[22] Davidsson J, Puschmann A, Tedgard U, et al. SAMD9 and SAMD9L in inherited predisposition to ataxia, pancytopenia, and myeloid malignancies[J]. Leukemia, 2018, 32(5): 1106-1115.

[23] Zhang XJ, Xu HS, Li CH, et al. Up-regulated SAMD9L modulated by TLR2 and HIF-1alpha as a promising biomarker in tuberculosis[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(10): 2935-2946.

[24] Shen L, Lan L, Zhu T, et al. Identification and validation of IFI44 as key biomarker in lupus nephritis[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 762848.

[25] de Oyarzabal E, Garcia-Garcia L, Rangel-Escareno C, et al. Expression of USP18 and IL2RA is increased in individuals receiving latent tuberculosis treatment with isoniazid[J]. J Immunol Res, 2019, 2019: 1297131.

[26] Perumal P, Abdullatif MB, Garlant HN, et al. Validation of differentially expressed immune biomarkers in latent and active tuberculosis by real-time PCR[J]. Front Immunol, 2020, 11: 612564.

[27] Liu S, Ren W, Yu J, et al. Identification of Hub genes associated with diabetes mellitus and tuberculosis using bioinformatic analysis[J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 4061-4072.

[28] Xian H, Yang S, Jin S, et al. LRRC59 modulates type I interferon signaling by restraining the SQSTM1/p62-mediated autophagic degradation of pattern recognition receptor DDX58/RIG-I[J]. Autophagy, 2020, 16(3): 408-418.

[29] Banks DA, Ahlbrand SE, Hughitt VK, et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits autocrine type I IFN signaling to increase intracellular survival[J]. J Immunol, 2019, 202(8): 2348-2359.

[30] Nguyen H, Gazy N, Venketaraman V. A role of intracellular Toll-like receptors (3, 7, and 9) in response to *Mycobacterium tuberculosis* and co-infection with HIV[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17).

[31] Bao M, Yi Z, Fu Y. Activation of TLR7 inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* survival by autophagy in RAW 264.7 macrophages[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(12): 4222-4229.

[32] Thada S, Horvath GL, Muller MM, et al. Interaction of TLR4 and TLR8 in the innate immune response against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1560.

（下转 274 页）

白提取过程中通过将缓冲液的PH值维持在7.0左右以维持HilD蛋白的稳定性。此外,可以添加2%甘油和2%蔗糖作为保护剂。HilD通过凝胶过滤层析柱纯化后大量丢失,因此通过透析的方法去除咪唑。该方法纯化的蛋白具有生物活性,之后用于晶体培养。HilD未培养出晶体,而HilD与*hilA*复合物成功培养了晶体,晶体形状均一,但复合物晶体生长相对缓慢,晶体小。由此可见*hilA*能够稳定HilD蛋白,有利于晶体生长。对晶体进一步优化,但尚未获得性质均一,单晶性好用于X线衍射的晶体。后期将继续进行晶体优化。虽然HilD的功能已经被广泛研究,但其结构仍未被解析,且数据库中并不存在高度同源的结构。因此解析鼠伤寒沙门菌转录调控因子HilD的结构对于进一步分析HilD发挥功能的机制具有重要意义。

【参考文献】

[1] Lou L, Zhang P, Piao R, et al. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 270.

[2] Zhou D, Chen LM, Hernandez L, et al. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization[J]. Mol Microbiol, 2001, 39(2): 248-260.

[3] Olekhnovich IN, Kadner RJ. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella* enterica activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion[J]. J Bacteriol, 2007, 189(19): 6882-6890.

[4] Chubiz JEC, Golubeva YA, Lin D, et al. FliZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella* enterica serovar typhimurium[J]. J Bacteriol, 2010, 192(23): 6261-6270.

[5] Mouslim C, Hughes KT. The effect of cell growth phase on the regulatory cross-talk between flagellar and Spi1 virulence gene expression[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(3): e1003987.

[6] Banda MM, Zavala-Alvarado C, Perez-Morales D, et al. SlyA and HilD counteract H-NS-mediated repression on the ssrAB virulence operon of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and thus promote its activation by OmpR [J]. J Bacteriol, 2019, 201(8): 10.1128.

[7] Perez-Morales D, Banda MM, Chau NYE, et al. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*[J]. PLoS Pathog, 2017, 13(7): e1006497.

[8] Jiang L, Feng L, Yang B, et al. Signal transduction pathway mediated by the novel regulator LoiA for low oxygen tension induced *Salmonella typhimurium* invasion[J]. PLoS Pathog, 2017, 13(6): e1006429.

[9] Deng X, Ran L, Wu S, et al. Laboratory-based surveillance of non-typhoidal *Salmonella* infections in Guangdong Province, China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(4): 305-312.

[10] 陈棕棕,骆水娟,夏雅红,等. 一起鼠伤寒沙门菌引起食源性暴发事件的药敏及同源性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(18): 2218-2221.

[11] 王会波,张爽,李颖,等. 2018-2021年北京市某区腹泻病例中沙门菌主要型别与耐药特征分析[J]. 中国预防医学杂志, 2023, 24(7): 653-656.

[12] Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella*-the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival [J]. Cell Microbiol, 2009, 11(11): 1579-1586.

[13] Srikumar S, Kroger C, Hebrard M, et al. RNA-seq brings new insights to the intra-macrophage transcriptome of *Salmonella typhimurium*[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(11): e1005262.

[14] Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella* enterica serovar *typhimurium*[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(3): 691-705.

[15] Akbar S, Schechter LM, Lostroh CP, et al. AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella typhimurium* [J]. Mol Microbiol, 2003, 47(3): 715-728.

[16] Darwin KH, Miller VL. Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*[J]. EMBO J, 2001, 20(8): 1850-1862.

[17] Schechter LM, Damrauer SM, Lee CA. Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the hilA promoter[J]. Mol Microbiol, 1999, 32(3): 629-642.

[18] Olekhnovich IN, Kadner RJ. DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella* enterica serovar *typhimurium*[J]. J Bacteriol, 2002, 184(15): 4148-4160.

【收稿日期】 2023-10-12 **【修回日期】** 2024-01-02

(上接269页)

[33] Jiang H, Tsang L, Wang H, et al. IFI44L as a forward regulator enhancing host antituberculosis responses[J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 5599408.

[34] Gao J, Li C, Li W, et al. Increased UBE2L6 regulated by type 1 interferon as potential marker in TB[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(24): 11232-11243.

[35] Yang G, Xu Y, Chen X, et al. IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma[J]. Oncogene, 2007, 26(4): 594-603.

[36] Han J, Yu J, Dai Y, et al. Overexpression of miR-361-5p in triple-negative breast cancer (TNBC) inhibits migration and invasion by targeting RQCD1 and inhibiting the EGFR/PI3K/Akt pathway [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2019, 19(1): 52-59.

[37] Ma F, Song H, Guo B, et al. MiR-361-5p inhibits colorectal and gastric cancer growth and metastasis by targeting staphylococcal nuclease domain containing-1 [J]. Oncotarget, 2015, 6(19): 17404-17416.

[38] Ndzi EN, Nkenfou CN, Mekue LM, et al. MicroRNA hsa-miR-29a-3p is a plasma biomarker for the differential diagnosis and monitoring of tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2019, 114: 69-76.

[39] Abdolahi S, Hosseini M, Rezaei R, et al. Evaluation of miR-200c-3p and miR-421-5p levels during immune responses in the admitted and recovered COVID-19 subjects[J]. Infect Genet Evol, 2022, 98: 105207.

【收稿日期】 2023-09-25 **【修回日期】** 2023-11-29