

DOI:10.13350/j.cjpb.240304

• 论著 •

鼠伤寒沙门菌转录调控因子 HilD 的蛋白纯化及与 *hilA* 启动子 DNA 复合物晶体培养*

刘晴, 谢荣现, 范丙乾, 李冰清**, 贾海红**

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所), 山东济南 250062)

【摘要】 目的 本研究将获取鼠伤寒沙门菌毒力转录调控因子 HilD 的蛋白, 培养 HilD 蛋白晶体, 为进一步分析 HilD 功能机制和靶向胞内沙门菌药物研发奠定基础。方法 以鼠伤寒沙门菌转录调控因子 HilD 生物信息学分析为基础, 使用鼠伤寒沙门菌 14028S 菌株作为模板进行分子克隆, 构建 *hilD*-pG101 重组质粒, 使用原核体系表达 HilD, 通过镍柱亲和层析柱和透析获取纯化蛋白。EMSA 实验验证 HilD 活性。使用晶体培养试剂盒进行晶体培养。结果 成功构建了 HilD 原核表达系统, HilD 是一种碱性蛋白, 在蛋白提取过程中需要将缓冲液的 pH 值维持在 7.0 左右以维持 HilD 蛋白的稳定性, 还需添加 2% 甘油和 2% 蔗糖进行保护。*hilA* 能够稳定 HilD 蛋白, 有利于晶体的生长。结论 成功获取 HilD 纯化蛋白, 实验证明具有生物活性, 培养出 HilD 与 *hilA* 启动子 DNA 的复合物晶体, 复合物的培养为 HilD 结构解析奠定了基础。

【关键词】 鼠伤寒沙门菌; HilD; 原核表达; 晶体培养

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)03-0270-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Mar.; 19(3): 270-274.]

Purification of transcription regulator HilD protein from *Salmonella typhimurium* and complex crystal culture with *hilA* promoter DNA

LIU Qing, XIE Rongxian, FAN Bingqian, LI Bingqing, JIA Haihong (School of Clinical and Basic Medicine & Institute of Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

【Abstract】 **Objective** HilD is a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium* virulence. In this study, we will obtain the protein and culture the crystal structure of HilD. This study laid a foundation for further research on the functional mechanism of HilD and the development of drugs targeting intracellular salmonella. **Methods** Based on the bioinformatics analysis of the transcriptional regulatory factor HilD of *S. typhimurium*, the recombinant plasmid *hilD*-pG101 was constructed using *S. typhimurium* 14028S as a template, and *hilD* was expressed in prokaryotic system. The purified protein was obtained by nickel affinity chromatography and dialysis. HilD activity was verified by EMSA assay. Crystal culture was performed using a crystal culture kit. **Results** The prokaryotic expression system of HilD was successfully constructed. HilD is a kind of basic protein, and the pH value of buffer should be maintained at about 7.0 to maintain the stability of HilD protein during protein extraction. In addition, it is necessary to add 2% glycerin and 2% sucrose for protection. *hilA* can stabilize HilD protein and facilitate crystal growth. **Conclusion** The purified HilD protein was successfully obtained and proved to be biologically active. The complex crystal of HilD and *hilA* promoter DNA was cultured. The culture of the complex laid a foundation for the structure analysis of HilD.

【Key words】 *Salmonella typhimurium*; HilD; prokaryotic expression; crystal culture

*** 鼠伤寒沙门菌是一种常见的食源性病原菌, 能够导致胃肠炎和全身性系统疾病等。沙门菌的毒力岛 1 (Salmonella pathogenicity Island 1, SPI-1) 在沙门菌入侵宿主细胞的过程中发挥关键作用。SPI-1 由一个 40 kb 的区域组成, 包含 39 个基因, 能够编码 T3SS-1 分泌系统及其效应蛋白^[1]。在入侵前, 沙门菌通过 T3SS-1 将 SopB、SopE、AvrA 等效应蛋白注入宿主细胞内, 促进沙门菌与宿主细胞表面黏附, 诱导宿主细胞肌动蛋白细胞骨架重排, 诱发早期沙门菌维持性囊泡

(Salmonella-Containing Vacuoles, SCV) 的形成^[1-2]。

转录调控因子 HilD 是 SPI-1 毒力基因表达的主

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 31900124, 32170034)。

** **【通讯作者】** 贾海红, E-mail: jiahh18@126.com

李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com

【作者简介】 刘晴 (1999-), 女, 湖南人, 硕士在读, 主要研究方向: 微生物致病蛋白的结构和功能研究。E-mail: 15608436703@139.com

要调控元件。HilD 属于 AraC/XylS 家族的成员,具有该蛋白家族高度相似的 C 端结构域和双螺旋-转角-螺旋 DNA 结合基序等特点^[3]。SPI-1 中的鞭毛调控因子 FliZ 能够上调 HilD; HilD 与 *flhDC* 的启动子相结合,促进 FlhDC 的表达;而 FlhDC 又是位于 FliZ 上游的一个转录调控因子,因此 SPI-1 的毒力和鞭毛调控系统以 HilD 为中介,形成一个正反馈调节通路^[4-5]。SsrAB 是 *ssrA* 和 *ssrB* 的转录操纵子,其位于 SPI-2 上,能够直接诱导 SPI-2 基因的表达。在 LB 培养中生长时, HilD 能够拮抗 H-NS 对 *ssrAB* 的沉默作用,促进 *ssrAB* 的表达^[6]。而 SsrB 直接与 *hilD* 启动子区域相结合抑制其转录, HilD 与 SsrAB 形成一个负反馈调节,该反馈调节抑制了 SPI-1 毒力基因的表达,促进了 SPI-2 基因的表达^[7]。LoiA 位于 SPI-14 上,是 SPI-14 的关键毒力因子,低氧条件下 LoiA 与 HilD 的启动子相结合激活 HilD 的表达^[8]。鞭毛调控系统、SPI-2 和 SPI-14 均能够通过调控 HilD 参与 SPI-1 毒力基因的表达, HilD 在 SPI-1 毒力基因表达的调控系统中占据重要地位。目前 HilD 的功能已经被广泛研究,但是结构数据库(PDB)中暂无 HilD 结构,且无高度同源的结构,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 发挥功能的机制依旧具有重要意义。

本研究以生物信息学为基础,构建了 HilD 原核表达体系,对 HilD 蛋白进行提取,通过透析的方法去除咪唑,并使用 EMSA 实验证明提取的 HilD 蛋白具有生物活性。获得的 HilD 蛋白用于晶体培养,为其结构和功能研究奠定基础。

材料和方法

1 材料

1.1 菌株和载体 大肠埃希菌感受态 BL21 细胞由本实验制备和保存。鼠伤寒沙门菌 14028s 菌株从美国 ATCC 公司购买。由 pET15b 改造的载体 pG101 (氨苄抗性, N 端 His 标签, PP 酶切位点位于 His 标签与目的基因序列之间)由本实验保存。

1.2 试剂和仪器 引物序列由铂尚公司合成、KOD 酶、限制性内切酶和 T4 连接酶从美国 Thermo 公司购买;氨苄青霉素和 IPTG 购于索莱宝公司;Hampton Research 蛋白晶体普筛试剂盒购于美国 Hampton Research 公司;SDS-PAGE 凝胶试剂盒购于雅酶生物科技有限公司;DNA 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购于天根生化科技有限公司。

2 方法

2.1 HilD 蛋白的生物信息学预测分析 从 UniProt 数据库中得到 HilD 蛋白的氨基酸序列,使用 ExPASy-

ProtParam tool 对 HilD 蛋白的基本理化性质进行预测。

2.2 HilD 蛋白二级结构预测 使用 SOPMA 在线网站对 HilD 蛋白进行二级结构预测。

2.3 构建 *hilD*-pG101 重组质粒和表达菌株

2.3.1 *hilD* 的 PCR 扩增 使用 DNA star 软件设计 *hilD* 引物;上游引物序列: HilD-BamHI-5': ATA GGATCCATGGAAAATGTAACCTTTGT (下划线标出 BamHI 酶切位点);下游引物序列: HilD-XhoI-3T: ATACTCGAGATGGTTCGCCATTTTATGA (下划线标出 XhoI 酶切位点)引物由铂尚公司合成。PCR 反应体系: ddH₂O 34 μ L、上下游引物各 0.6 μ L、Mg²⁺ 3 μ L、鼠伤寒沙门菌 14028s(模板)1 μ L、dNTPs 5 μ L、10x buffer 5 μ L、KOD 酶 1 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 29 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定并进行切胶回收。

2.3.2 *hilD*-pG101 重组质粒构建 PCR 胶回收产物和载体使用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 进行双酶切,对酶切后产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,切胶并回收。连接反应体系: pG101 载体 2 μ L、*hilD* 酶切产物 10 μ L、T4 连接酶 1.5 μ L、T4 连接酶 Buffer 1.5 μ L。混匀后置于 22 $^{\circ}$ C 连接 3 h。

2.3.3 *hilD*-pG101 重组质粒的转化与表达鉴定 将连接产物全部加入大肠埃希菌感受态 BL21 细胞中,冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 冰浴 2 min, 加入 1 mL LB 放至 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱,以 200 r/min 进行振荡培养 1 h。离心去上清,吹打混匀,均匀涂布于带有氨苄抗性的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单个菌落加入带氨苄的 LB 中培养 2 h,加入 1 μ L IPTG 培养 2 h。进行 12% SDS-PAGE 电泳,阳性重组菌株由铂尚公司测序。

2.4 HilD 蛋白纯化 将菌株接种于 LB 培养基中过夜培养,转接至 1 L 带有氨苄抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 培养至 A₆₀₀ 值为 0.4 左右时, 16 $^{\circ}$ C 降温 1 h, 加入 120 μ L IPTG 诱导 6~8 h。将菌液在 4 000 r/min 的转速下离心 20 min, 去除上清, 加入 40 mL 的重悬 buffer (25 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 2% 甘油, 2% 蔗糖, pH 7.0 左右) 悬浮菌体, 加入 200 μ L PMSF 蛋白酶抑制剂、1 mL DNase, 超声破碎, 破碎后菌液在 14 000 r/min 的转速下离心 50 min, 将上清倒入镍柱中, 流穿 2 次, 使用重悬 buffer 洗涤 2 次, 加入 Elution buffer (25 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L 咪唑, 2% 甘油, 2% 蔗糖, pH 7.0 左右) 竞争性洗脱蛋白, 收取蛋白, 进行 12% SDS-PAGE 鉴定。

2.5 EMSA 实验 使用 *hilA* 启动子引物(上游引物序列:*hilA*-5':CTCTATTGCAATGAGGCCAAG;下游引物序列:*hilA*-3':CAGGAACAGGATTAAATGTGG)进行启动子扩增,对 PCR 产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定并进行切胶回收,获得 *hilA* 的启动子片段。将 HiID 蛋白稀释到 0.37 mg/mL, *hilA* DNA 稀释至 6 ng/μL,每个反应体系中加入 2 μL *hilA* DNA,依次加入 0 μL、2 μL、4 μL、6 μL、8 μL、10 μL 的 HiID 蛋白,使用 CAB Buffer 补齐至 20 μL,将反应物充分混匀,置于 4 °C 反应 10 min。使用 EMSA 胶,80 V 恒压,150 min。通过 gel-Red 和考马斯亮蓝染色观察结果。

2.6 晶体培养合成 *hilA* DNA 序列的引物如下 *hilA*-5':GATATCATTATTTTGCAAAAAAATATAAAAATAAG;*hilA*-3':CTTATTTTATATTTTTTGCAAAATAATGATATC,该序列由铂尚公司合成。将 *hilA*-5'和 *hilA*-3'启动子序列 1:1 混合,95 °C 10 min,自然降温至室温形成 DNA 双链。使用晶体试剂盒进行 HiID、HiID 与 *hilA* DNA 复合物晶体培养。培养条件为:0.08 M Sodium chloride,0.02 M Mangesium chloride hexahydrate,0.04 M Sodium cacodylate trihydrate pH 7.0,40% V/V (+/-)-2-Methyl-2,4-pentandiol,0.012 M Spermine tetrahydrochloride。

结 果

1 HiID 蛋白理化性质分析

从 UniProt 数据库中获取 HiID 蛋白的氨基酸序列;MENVTFVSNHQRPAAADNLQKLKSLLTNTRQQIKSQTTQVTKNLYVSSFTLVCFRSGKLTISNNHDTIYCDEPGMLVVKKEQVVNVTLEEVNGHMDFDILEIPTQRLGALYALIPNEQQTKMAVPTEKAKKIFYTPDFPARREVF EHLKTAFSCTKDTSKGCSNCNNKSCIENEELIPYFLLFLLTAFRLRPESYEILSSAQITLKERVYNISSSPSRQWKLTDVADHIFMSTSTLKRKLAEEGTSFSDIYLSARMNQAALLLRIGNHNVAVALKCGYDSTSYFIQCFKKYFKTTPSTFIKMANH。

使用 ExPASy-ProtParam tool 网站对 HiID 进行分析,结果显示 HiID 蛋白全长由 309 个氨基酸构成,相对分子质量为 35 ku,等电点 8.89,是一种碱性蛋白,提示在蛋白提取过程中应注意 pH。其不稳定系数为 43.62,表明蛋白不稳定。HiID 蛋白含有 8 个半胱氨酸和 7 个甲硫氨酸。

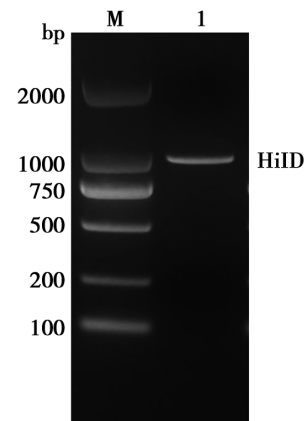
2 HiID 蛋白二级结构预测

用 SOPMA 在线网站对 HiID 蛋白进行二级结构

预测(图 1),预测结果显示 α-螺旋(Hh)约占 42.72%,β-折叠(Ee)约占 18.12%,β-转角(Tt)约占 6.15%,无规则卷曲(Cc)约占 33.01%,提示该蛋白较为紧密。



图 1 SOPMA 在线网站预测 HiID 蛋白二级结构
Fig. 1 Prediction of HiID protein secondary structure by SOPMA online website



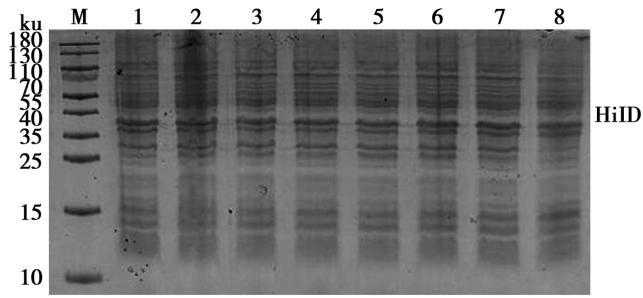
M DNA 标志物(DL2000) 1 *hilD* PCR 产物
图 2 *hilD* 基因 PCR 扩增
M DNA marker 1 *hilD* PCR product
Fig. 2 *pcr* amplification of *hild* gene

3 *hilD* 基因扩增

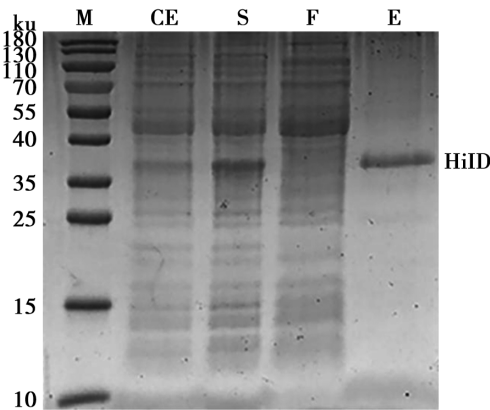
使用特异性引物对鼠伤寒沙门菌转录调控因子 *hilD* 进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,大小为 910 bp 左右,结果与预期相符。

4 HiID 原核表达构建及蛋白纯化

PCR 扩增获得的的目的基因产物,经回收、酶切、连接得到重组质粒。将重组质粒进行转化,挑选阳性重组菌株,加入 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。在 35 ku 左右有过表达条带(图 3)。测序结果分析与目的蛋白基因一致。之后将该菌株进行扩大培养,获取 HiID 蛋白(图 4)。



M 蛋白分子质量标准 1~7 HiID 重组菌株克隆 8 阴性对照
图 3 不同单克隆菌株表达目的蛋白 test 分析
M Protein molecular weight standard 1-7 HiID recombinant strain cloning 8 Negative control
Fig. 3 Analysis of target protein test expressed by different monoclonal strains



M 蛋白分子质量标准 CE 重组菌超声破碎总蛋白 S 重组菌超声破碎上清 F 镍柱流穿液 E 镍柱蛋白洗脱液
图 4 Ni_2^+ 柱纯化的 HiID 蛋白 SDS-PAGE 分析
M Protein molecular quality standard CE Recombinant bacteria ultrasonic crushing total protein S Recombinant bacteria ultrasonic crushing supernatant F Nickel column flow fluid E nickel column protein eluent
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of HiID protein purified by Ni_2^+ column

5 HiID 生物活性鉴定

为检测 HiID 的活性,将该蛋白与基因扩增获得的 *hilA* 363 bp 启动子片段(图 5A)结合,进行 EMSA 实验。结果显示 HiID 能够结合 *hilA*(图 5B),HiID 具有生物活性。

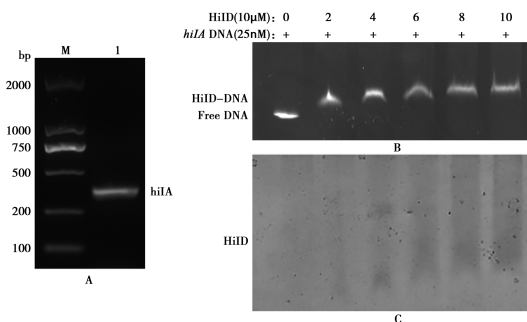


图 5 HiID EMSA 实验(A)*hilA* 基因 PCR 扩增(B) gel-Red 染色(C)考马斯亮蓝染色
Fig. 5 HiID EMSA experiment(A) PCR amplification of *hilA* gene(B) gel-Red staining(C) Coomassie bright blue staining

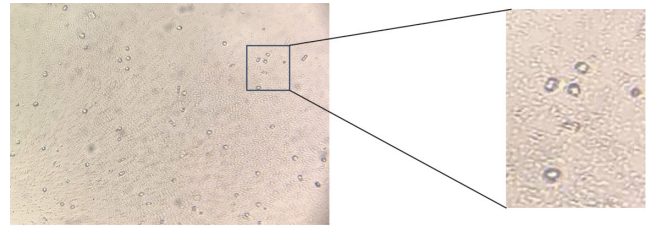


图 6 HiID 与 *hilA* 启动子 DNA 复合物晶体
Fig. 6 complex crystal of HiID and *hilA* promoter DNA

6 晶体培养

HiID 蛋白通过透析的方法去除咪唑,然后浓缩进行晶体普筛。用 Hampton Research 晶体培养试剂盒对 HiID 和 HiID 与 *hilA* 混合物进行晶体普筛。一个月以后,HiID 与 *hilA* 启动子 DNA 的复合物晶体生长。HiID 晶体普筛板上未生长。

讨论

鼠伤寒沙门菌是一种常见的食源性病原菌,人和动物通过摄入被污染的水和食物而感染,可以导致肠胃炎、食物中毒等多种疾病。沙门菌有 2 600 多种血清型,而鼠伤寒沙门菌是我国最常检测出来的血清型之一^[9]。近年来,我国多个地区都有报导因感染鼠伤寒沙门菌导致腹痛、腹泻、畏寒、呕吐等症状^[10-11]。鼠伤寒沙门菌导致的公共卫生问题不容忽视。

鼠伤寒沙门菌通过 III 分泌系统分泌效应因子促进鼠伤寒沙门菌的入侵、胞内生存与繁殖同时能够逃避宿主的免疫杀伤作用。其 III 分泌系统又包括 T3SS-1 和 T3SS-2, T3SS-1 主要由 SPI-1 编码, T3SS-2 由 SPI-2 编码^[12]。SPI-1 主要在鼠伤寒沙门菌入侵宿主细胞的过程中发挥作用,而 SPI-2 主要在鼠伤寒沙门菌的胞内生存过程中发挥作用^[13]。SPI-1 编码的毒力因子是入侵宿主细胞的过程中必不可少的。SPI-1 毒力基因的表达受到转录因子 HilA 调控,而转录因子 HilA 受到 HiID、HilC、RtsA 形成的前环反馈系统的调控,其中 HiID 发挥主要作用, HilC 和 RtsA 发挥辅助作用^[14]。此外 HiID 能够独立于 HilA 直接调控 *InvF* 的表达, *InvF* 通过与 *SicA* 相互作用激活 *SigDE*、*sicAsipBCDA* 和 *SopE*^[15-16]。由此可见转录调控 HiID 在调控 SPI-1 毒力基因的表达中发挥重要作用。研究表明 HiID 能够结合 *hilA* 的启动子,促进 *HilA* 蛋白的表达^[17], HiID 其能识别的最小片段为 34 bp^[18]。由此可见转录调控因子 HiID 在调控 SPI-1 毒力基因的表达中发挥重要作用。

本研究通过分子克隆从鼠伤寒沙门菌 14028s 中获得了 *hilD* 基因序列,通过基因重组获得了 *hilD*-pG101 重组质粒,并成功构建了 HiID 原核表达体系。由于 HiID 等电点为 8.89,是一种碱性蛋白,因此在蛋

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] Olekhovich 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 nontyphoidal *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.

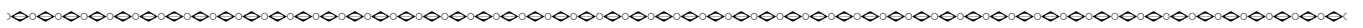
[15] Akbar S,Schechter LM,Loistroh CP, et al. AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella typhimurium* [J]. Mol Microbiol,2003,47(3):715-728.

[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] Olekhovich 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