DOI:10.16016/j.1000-5404.201512189

高危型人乳头状瘤病毒感染与阴道菌群的相关性研究

潘 颖[1],盛华芳[2],康 玲[1],马 啸[1],郑慧敏[2],周宏伟[2],刘木彪[1] (510282 广州,南方医科大学珠江医院妇产科[1];510515 广州,南方医科大学公共卫生学院环境卫生学系[2])

[摘要] **目的** 探索高危型人乳头瘤状病毒(high-risk human papillomavirus, HR-HPV)感染阴性与阳性女性之间阴道菌群构成的差异。**方法** 采集2014年9月至2015年9月间于我科就诊的33例未感染HR-HPV(HPV$^-$)女性及98例感染HR-HPV(HPV$^+$)患者的阴道分泌物,分别对每个样本进行细菌总基因组DNA提取、16S rRNA V4区基因扩增及采用Illumina高通量测序技术对扩增的PCR产物进行测序等步骤,然后通过BIPES、TSC、GAST等程序,分析阴道菌群物种丰度和结构,并对两组女性的阴道菌群构成进行比较。**结果** HPV$^-$组女性阴道菌群以乳酸杆菌为优势菌属,占81.54%,同时含有少量的加德纳菌属、链球菌属、普氏菌属等。HPV$^+$组患者阴道菌群中乳酸杆菌属则显著减少(40.48%),加德纳菌属显著增加(32.35%),同时普氏菌属、奇异菌属、厌氧球菌属等多种厌氧菌属相对丰度也有所增加。在HPV$^+$组女性的阴道菌群中发现布鲁菌属的存在,而HPV$^-$组中未见此菌属。**结论** 阴道菌群失调与HR-HPV感染之间存在相关性,HR-HPV感染者阴道菌群中乳酸杆菌属显著减少,加德纳菌属等多种厌氧菌属过度增殖,并发现有布鲁菌属存在。

[关键词] 人乳头状瘤病毒;阴道菌群;高通量测序

[中图法分类号] R322.65; R372; R373.9 [文献标志码] A

Correlation of high-risk human papillomavirus infection and diversity of vaginal microbiota

Pan Ying[1], Sheng Huafang[2], Kang Ling[1], Ma Xiao[1], Zheng Huimin[2], Zhou Hongwei[2], Liu Mubiao[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510282; [2]Faculty of Environmental Health, College of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the diversities of the vaginal microbiota in high-risk human papillomavirus (HR-HPV)-positive (HPV$^+$) and HR-HPV-negative (HPV$^-$) women from the point of view of bacterial community structure. **Methods** A total of 131 vaginal swabs were collected from 33 HPV$^-$ women and 98 HPV$^+$ patients who visited in our hospital between September 2014 and September 2015. The total DNA of microbes from the samples were isolated for amplifying the 16S rRNA V4 hypervariable region by PCR and pyrosequencing by Illumina. BIPES, TSC and GAST were used to analyze the information of the vaginal microbiota from the samples. **Results** *Lactobacillus* was the predominant genus in HPV$^-$ women (81.54%), with a small quantity of *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Prevotella* and other genus. The amount of *Lactobacillus* was decreased (40.48%) and that of *Gardnerella* increased (32.35%) significantly in the HPV$^+$ women. Moreover, the relative abundances of *Prevotella*, *Atopobium*, and *Anaerococcus* were increased in different degrees. Brucella was the taxon only found in HPV$^+$ women but not in HPV$^-$ women. **Conclusion**

[通信作者] 刘木彪,E-mail: liumb1972@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160407.0836.008.html(2016-04-07)

Vaginal dysbacteriosis is associated with HR-HPV infection. The HR-HPV infected patients have *Lactobacillus* decreased significantly, *Gardnerella* and a variety of anaerobic bacteria proliferated excessively, and Brucella existence.

[**Key words**] human papillomavirus; vaginal microbiota; high-throughput sequencing

Corresponding author: Liu Mubiao, E-mail: liumb1972@126.com

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤,目前已公认,高危型人乳头状瘤病毒(high-risk human papillomavirus, HR-HPV)持续感染是宫颈癌的致病因素。当阴道感染 HR-HPV 后,大多数女性的阴道微环境可以自行将病毒清除,只有少数女性的 HPV 病毒可以长时间存在于阴道微环境中。而阴道菌群作为维护阴道微环境稳定的重要因素,其在 HR-HPV 持续感染过程中是否扮演一定作用一直被人们所关注。然而,阴道微生物研究的主要障碍是阴道菌群的鉴定,早期研究主要建立在传统培养技术的基础上。阴道菌群多为厌氧菌,培养条件苛刻,故传统的细菌培养法准确率低,菌谱窄。近年来,变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis,DGGE)、荧光原位杂交等分子生物学技术在微生物群落研究中的应用愈加广泛。然而这些传统分子生物学技术同样具有其局限性,耗时长、工作量大,且不能完整地反映整个群落的结构信息,甚至存在重要信息缺失的可能。Barcoded Paired-End Illumina Sequencing (BIPES)法[1]作为新一代测序方法,具有成本低廉,操作简单、重现性好等优点,能快速、简便的获得全面的、结构化的菌群结构信息。本研究拟采用该方法对 HR-HPV 感染阴性和阳性者阴道菌群进行检测,以期获得相对全面的阴道菌群结构信息,从而将其与 HR-HPV 感染之间的相关性做一分析比较。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 9 月至 2015 年 9 月间于南方医科大学珠江医院妇产科健康体检或诊治的女性 131 例,根据宫颈液基细胞学、HR-HPV 筛查(HC-Ⅱ法)和宫颈活检病理结果分为 2 组:① HPV 阴性组(HPV^-组)33 例:均为健康体检者,细胞学及 HR-HPV 检查均阴性;② HPV 阳性组(HPV^+组)98 例:HR-HPV 均阳性,其中低级别宫颈上皮内瘤变 26 例,高级别宫颈上皮内瘤变 40 例,宫颈癌 32 例。

所有研究对象纳入标准:年龄 21~65 岁;有性生活史 3 年及以上;非月经期、妊娠期及产褥期妇女;除外合并免疫缺陷疾病史;除外低危型 HPV 感染者;同时需满足以下条件:48 h 内无阴道冲洗;3 d 内无性生活史、阴道放药史;1 个月内未系统使用抗生素或抗真菌药。

1.2 材料及方法

1.2.1 主要试剂 阴道拭子基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克公司);蛋白酶 K(Sigma 公司);Ex-*taq* PCR 试剂盒(宝生物公司)。

1.2.2 标本采集 以无菌棉拭子于阴道穹窿处旋转 10~15 s,待拭子充分吸收分泌物后小心放入干燥无菌试管中,避免接触外阴及阴道口,用于 16S rRNA 基因提取。

1.2.3 总 DNA 提取 采用阴道拭子基因组 DNA 试剂盒提取样本总 DNA,具体步骤参考说明书。DNA 提取后置于 -20 ℃冰箱保存。

1.2.4 16S rRNA-V4 区的 PCR 扩增及 Illumina 测序

以提取的 DNA 为模板,扩增其 16S rRNA V4 区的基因片段。所用引物序列为:5′-GAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3′和 3′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-5′。PCR 的扩增体系为:10 × Buffer 2.5 μL,dNTP 2 μL,Mg^{2+} 1.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,Ex-*Taq* 0.25 μL,模板 0.5 μL,灭菌去离子水 17.25 μL。PCR 的扩增条件为:94 ℃预变性 2 min,再以 94 ℃变性30 s,54 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,连续 30 个循环后 72 ℃延伸 5 min,4 ℃保存。将扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,以相等的终浓度将样品混合均匀,送至深圳华大基因进行双末端 100 bp 测序,测序平台为 Illumina HiSeq 2 000。

1.2.5 生物信息学分析 对原始测序数据以 BIPES[1]程序进行预处理,反向互补组装 V4 序列;采用两阶段聚类(Two-stage-clustering,TSC)[2]方法,提取出每个操作分类单元(operational taxonomy units,OTU)的代表序列后利用 GAST 对 OTU 进行分类,用于样品间的相似性分析,再进行后续的 Alpha、Beta、聚类分析。Alpha 多样性描述样品中微生物的种类和数量,

其中 PD_whole_tree 指数代表样品物种的丰富度,而 Shannon 指数同时受到物种丰富度和均度的影响。Beta 多样性展示样品菌群之间的相似度,基于 Unifrac 距离[3],利用 QIIME[4] 软件进行阴道菌群主成分分析。每个点表示一个样品的整体菌群,而点与点之间的距离通过比较两个菌群之间的序列相似度获得[3]。两点间距离越小,表明这两个样品存在的物种多样性差异越小。通过 linear discriminant analysis (LDA) coupled with effect size measurements (LEfSe)[5] 分析两组间阴道菌群群落结构及菌属差异。LEfSe 是一种新开发的统计方法,可以识别基因组特性,描述两个或两个以上的生物条件(或类)之间的差异,适用于寻找微生物群落标志物[5]。

2 结果

2.1 测序信息

本研究测序样品 131 个,共获得 971 007 条序列,平均每个样品 7 412 条。

2.2 Alpha 多样性

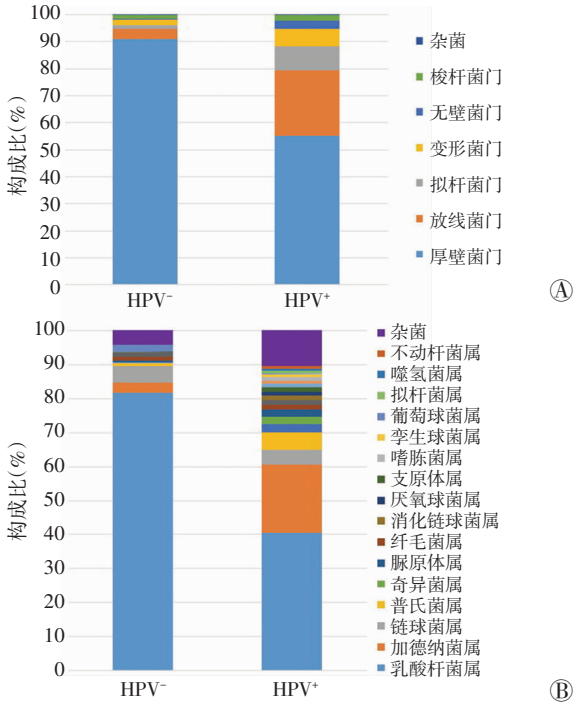
HPV^- 组和 HPV^+ 组的 PD_whole_tree 指数分别为 61.94 和 67.37,两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。而两组的 Shannon 指数分别为 45.30 和 72.97,HPV^+ 组的 Shannon 指数明显升高,且差异具有统计学意义($P<0.01$),表明 HPV^+ 组内菌群构成与阴性组差异有统计学意义。

2.3 菌群结构

对所有样品中微生物的 16S rRNA 基因 V4 区序列进行 Illumina 测序,共检测到 22 个菌门。在门水平(图 1A),HPV^- 组中阴道菌群 90% 以上都是由厚壁菌门(Firmicutes)组成,其余 21 个菌门只占不到 10%。HPV^+ 组中厚壁菌门减少至 55.16%,放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变性菌门(Proteobacteria)、无壁菌门(Tenericutes)增加,分别占阴道菌群的 24.03%、8.94%、6.31%、3.38%。对两组阴道菌群在属水平进一步分析(图 1B),HPV^- 组中以乳酸杆菌(Lactobacillus)为优势菌属,占 81.54%,同时还包括加德纳菌属(Gardnerella)、链球菌属(Streptococcus)、普氏菌属(Prevotella)等其他菌属,但含量较少。在 HPV^+ 组中,乳酸杆菌属含量显著下降(40.48%),同时加德纳菌属相对丰度显著上升,由 3.01% 增加至 19.87%,这二者为构成阴道菌群的主要菌属。与 HPV^- 组相比,普氏菌属、奇异菌属(Atopobium)、脲原体属(Ureaplasma)、纤毛菌属(Sneathia)、消化链球菌属(Peptostreptococcus)、厌氧球菌属(Anaerococcus)、支原体属(Mycoplasma)含量均增加,并出现布鲁氏菌属(Brucella)。

2.4 Beta 多样性

经 PCoA 主成分分析显示(图 2):基于 Weighted Unifrac 距离,HPV^- 组(红色)分布较为紧凑,菌群结构相似度高,HPV^+ 组(蓝色)分布广泛,个体差异大。且两组间菌群能明显分开,表明两组间菌群结构差异有统计学意义。



A:门水平 B:属水平

图 1 两组阴道菌群相对丰度及微生物群落整体结构比较

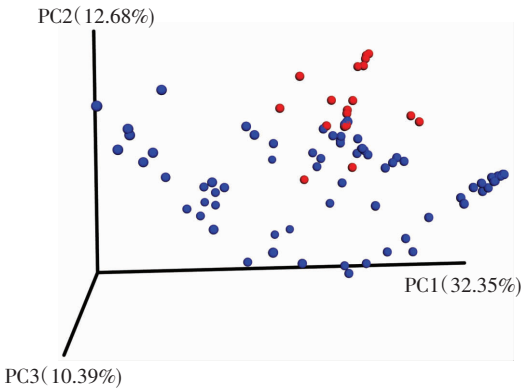


图 2 两组阴道菌群 Weighted Unifrac 聚类图

2.5 菌群统计学分析

对两组阴道菌群进行 LEfSe 分析(图 3)显示:乳

酸杆菌在 HPV^- 组中富集,而加德纳菌属、普氏菌属、奇异菌属、厌氧球菌属、拟杆菌属(Bacteroides)、不动杆菌属(Acinetobacter)等在阳性组中显著增加,且于 HPV^+ 组中检测到布鲁菌属的存在。

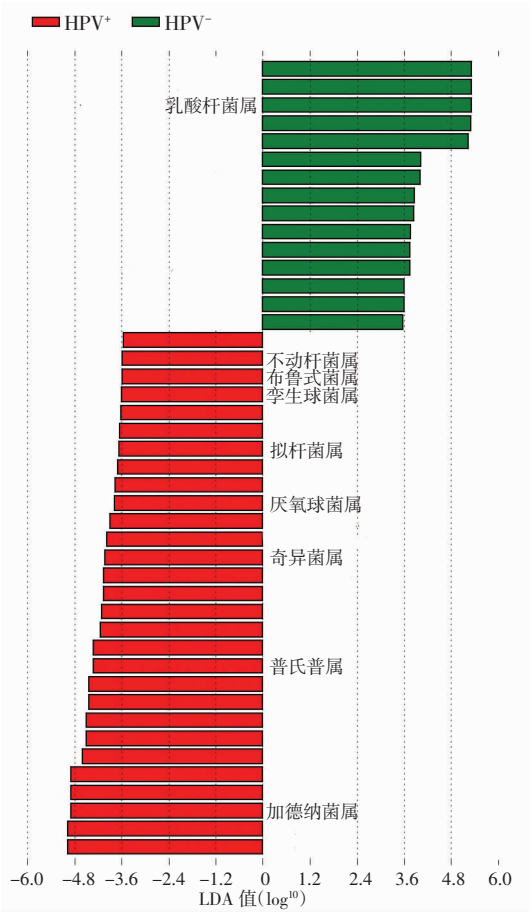


图 3 两组间差异菌属的 LEfSe 统计分析

3 讨论

研究已证实 HR-HPV 感染是宫颈癌发生发展的必要因素,但由 HR-HPV 感染发生发展至宫颈癌是一个漫长的,中间阶段可逆转的过程,导致持续性感染的原因目前尚不明确[6]。Illumina 高通量测序技术是一种采用专有的可逆终止子化学方法对数百万片段进行大规模测序的新型测序技术[7]。本研究利用该技术对阴道分泌物中的阴道菌群进行检测,突破传统方法难以培养和分离鉴定菌群的缺陷,可以获得全面、系统、结构化、准确的阴道微生物群落结构信息。

本研究发现感染 HR-HPV 者阴道微生物的群落结构与未感染者明显不同,前者的物种多样性显著增加,主要表现为乳酸杆菌属的减少及加德纳菌属含量的增加。正常情况下,阴道微生物中乳酸杆菌属处于优势地位,对维持阴道微生态平衡,抑制病原微生物生长,增强阴道局部抗感染、抗肿瘤能力起重要作用。一方面,乳酸杆菌通过竞争性占位与阴道黏膜上皮细胞受体结合,定植于阴道黏膜上皮细胞表面,形成空间性占位保护作用。同时分泌大量细胞外多聚糖、细胞壁肽聚糖,形成生物被膜,达到阻止病原体黏附和侵袭的目的[8-9]。另一方面,乳酸杆菌通过多种代谢产物,如乳酸、H_2O_2、细菌素、细菌素样物质、生物表面活性物质等,起到抑制致病菌生长、增强抗感染能力的作用[10-13]。更有研究表明,乳酸杆菌可以刺激机体免疫细胞产生多种细胞因子,调节机体的免疫应答[14]。因此,乳酸杆菌减少,阴道微生态平衡破坏,病原微生物异常增殖,可能使得 HR-HPV 易感性增加,促进 HR-HPV 的持续性感染,导致宫颈病变的发生。

加德纳菌属虽是构成非 HPV 感染女性阴道菌群之一,但在感染者中的构成比大大提高。加德纳菌属可利用不替调节分子 CD59 激活 P38-撕裂元-蛋白激酶通路,释放细胞溶解素(vaginolysin,VLY),导致阴道上皮细胞死亡,从而使乳酸杆菌定植减少[15]。一项 Meta 分析[16]已经证实, HPV 的感染与细菌性阴道病(BV)相关,同时 BV 患者的阴道菌群变化也主要表现为加德纳菌属的大量增殖。除了加德纳菌属含量增加外,普氏菌属、奇异菌属、厌氧球菌属、拟杆菌属、不动杆菌属等厌氧菌属也在感染组中富集。厌氧菌的过度生长,抑制了产 H_2O_2 乳酸杆菌的生长,减少了 H_2O_2 及乳酸等代谢产物的产生,降低了阴道局部抗感染能力。这与 McNicol 等[17]的研究结果是一致的。McNicol 等[17]发现 HPV 的感染与过度增殖的厌氧菌有关,且认为阴道菌群失调可增强 HPV 病毒的表达,并最终导致宫颈细胞学的改变。同时纤毛菌属、脲原体属、支原体均有不同程度的增加。Lee 等[18]认为纤毛菌属与 HPV 感染关系密切,甚至可考虑其视为 HR-HPV 感染的微生物标志物。脲原体属、支原体含量的增加,表明支原体感染可能在 HR-HPV 感染的过程中起到一定的作用。

此外,本研究在感染高危型 HPV 的女性阴道菌群中发现了布鲁菌属的存在,而在阴性对照组中没有。布鲁菌归属于变形菌门,它可以引起人的关节炎、心内膜炎、脑膜炎等。研究表明,巨噬细胞、树突状细胞及某些上皮细胞是布鲁菌感染的主要靶细胞[19]。被感染后,布鲁菌能产生大量毒力因子[20-22],通过抑制溶酶体与吞噬体结合,逃逸巨噬细胞的杀伤,在胞内寄生并大量繁殖,最终形成慢性感染[23-24]。与此同时,它

能在宿主组织细胞内产生分解具有氧化杀菌作用的分解酶,如 H_2O_2 酶;还能抑制巨噬细胞的活化、细胞因子的分泌和抗原的提呈[25-27],适应性免疫应答机制受抑制[28-29],免疫功能遭受破坏。布鲁菌可以引起机体免疫功能的破坏和毒素的释放,是否是增加 HR-HPV 在宿主宫颈细胞内定植、整合以及致瘤作用的关键尚不得而知,需要进一步的研究加以证实。

综上所述,HR-HPV 感染与阴道菌群失调密切相关。当然,菌群失调究竟是 HR-HPV 持续感染的原因抑或结果,尚需探索。BV 与支原体感染可能在 HR-HPV 感染的过程中发挥一定的作用,因此在临床中应注重 BV 及支原体感染的治疗,预防 HR-HPV 的感染。对于已经感染 HR-HPV 的患者,可考虑通过补充阴道中的乳酸杆菌,抑制病原菌的生长,改善阴道内环境,恢复阴道微生态平衡,加速 HR-HPV 的清除。而本研究中发现感染者阴道菌群中布鲁菌属的存在,是否意味着该菌属的出现与 HPV 持续性感染具有必然联系,也为我们下一步研究提供了新方向。

参考文献:

[1] Zhou H W, Li D F, Tam N F, *et al*. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity[J]. ISME J, 2011, 5(4): 741-749. DOI: 10.1038/ismej.2010.160

[2] Jiang X T, Zhang H, Sheng H F, *et al*. Two-stage clustering (TSC): a pipeline for selecting operational taxonomic units for the high-throughput sequencing of PCR amplicons[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30230. DOI: 10.1371/journal.pone.0030230

[3] Hamady M, Lozupone C, Knight R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data[J]. ISME J, 2010, 4(1): 17-27. DOI: 10.1038/ismej.2009.97

[4] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nat Methods, 2010, 7(5): 335-336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303

[5] Segata N, Izard J, Waldron L, *et al*. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol, 2011, 12(6): R60. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60

[6] Schlecht N F, Kulaga S, Robitaille J, *et al*. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia[J]. JAMA, 2001, 286(24): 3106-3114. DOI: 10.1001/jama.286.24.3106.

[7] 秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 445-457. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.2011.04.013

[8] McMillan A, Dell M, Zellar M P, *et al*. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011, 86(1): 58-64. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.016

[9] Boris S, Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens[J]. Microbes Infect, 2000, 2(5): 543-546. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00313-0

[10] Reid G, Heinemann C, Velraeds M, *et al*. Biosurfactants produced by Lactobacillus[J]. Methods Enzymol, 1999, 310: 426-433. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)10033-8

[11] Ocana V S, Pesce-De-Ruiz-Holgado A A, Nader-Macias M E. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal Lactobacillus salivarius strain[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(12): 5631-5635.

[12] Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, *et al*. Defense factors of vaginal lactobacilli[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 185(2): 375-379. DOI: 10.1067/mob.2001.115867

[13] Boskey E R, Cone R A, Whaley K J, *et al*. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source[J]. Hum Reprod, 2001, 16(9): 1809-1813. DOI: 10.1093/humrep/16.9.1809

[14] Matsuzaki T. Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 41(2): 133-140. DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00046-4

[15] Patterson J L, Stuii-Lane A, Girerd P H, *et al*. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of Gardnerella vaginalis relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes[J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 2): 392-399. DOI: 10.1099/mic.0.034280-0

[16] Gillet E, Meys J F, Verstraelen H, *et al*. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11: 10. DOI: 10.1186/1471-2334-11-10

[17] McNicol P, Paraskevas M, Guijon F. Variability of polymerase chain reaction-based detection of human papillomavirus DNA is associated with the composition of vaginal microbial flora[J]. J Med Virol, 1994, 43(2): 194-200. DOI: 10.1002/jmv.1890430218

[18] Lee J E, Lee S, Lee H, *et al*. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63514. DOI: 10.1371/journal.pone.0063514

[19] Wang X, Lin P, Yin Y, *et al*. Brucella suis vaccine strain S2-infected immortalized caprine endometrial epithelial cell lines induce non-apoptotic ER-stress[J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(3): 399 – 409. DOI: 10.1007/s12192-014-0564-x

[20] Gil-Ramirez Y, Conde-Alvarez R, Palacios-Chaves L, *et al*. The identification of wadB, a new glycosyltransferase gene, confirms the branched structure and the role in virulence of the lipopolysaccharide core of Brucella abortus[J]. Microb Pathog, 2014, 73: 53 – 59. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.06.002

[21] Turtaut F, Lopez M, Ouahrani-Bettache S, *et al*. Oxo- and thiooxo-imidazo[1, 5-c]pyrimidine molecule library: beyond their interest in inhibition of Brucella suis histidinol dehydrogenase, a powerful protection tool in the synthesis of histidine analogues[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(21): 5008 – 5010. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.09.020

[22] Soler-Llorens P, Gil-Ramirez Y, Zabalza-Barangua A, *et al*. Mutants in the lipopolysaccharide of Brucella ovis are attenuated and protect against B. ovis infection in mice[J]. Vet Res, 2014, 45: 72. DOI: 10.1186/s13567-014-0072-0

[23] Barquero-Calvo E, Conde-Alvarez R, Chacon-Diaz C, *et al*. The differential interaction of Brucella and ochrobactrum with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5893. DOI: 10.1371/journal.pone.0005893

[24] Rambow-Larsen A A, Petersen E M, Gourley C R, *et al*. Brucella regulators: self-control in a hostile environment[J]. Trends Microbiol, 2009, 17(8): 371 – 377. DOI: 10.1016/j.tim.2009.05.006

[25] Wei P, Cui G, Lu Q, *et al*. A20 promotes Brucella intracellular growth *via* inhibition of macrophage cell death and activation[J]. Vet Microbiol, 2015, 175(1): 50 – 57. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.11.006

[26] Wei P, Lu Q, Cui G, *et al*. The role of TREM-2 in internalization and intracellular survival of Brucella abortus in murine macrophages[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2015, 163(3/4): 194 – 201. DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.12.007

[27] Cui G, Wei P, Zhao Y, *et al*. Brucella infection inhibits macrophages apoptosis via Nedd4-dependent degradation of calpain2[J]. Vet Microbiol, 2014, 174(1/2): 195 – 205. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.08.033

[28] Barrionuevo P, Cassataro J, Delpino M V, *et al*. Brucella abortus inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2[J]. Infect Immun, 2008, 76(1): 250 – 262. DOI: 10.1128/IAI.00949-07

[29] Guo F, Zhang H, Chen C, *et al*. Autophagy favors Brucella melitensis survival in infected macrophages[J]. Cell Mol Biol Lett, 2012, 17(2): 249 – 257. DOI: 10.2478/s11658-012-0009-4

(收稿:2015-12-29;修回:2016-03-15)

(编辑 邓强庭)