

DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.089

• 实验研究 •

转录组分析布鲁氏杆菌患者外周血免疫基因的表达情况

白贺霞¹, 左明明¹, 盘晓芳¹, 赵新芳², 韩璇雪¹

摘要:目的 通过生物信息学分析方法探讨布鲁氏杆菌病的关键失调免疫基因和分子机制。方法 从 GSE69597 中获取布鲁氏杆菌病患者全血转录组表达数据。通过差异分析筛选布鲁氏杆菌病患者和对照之间的差异表达基因(DEGs), 并利用 *import* 数据库调取 DEGs 中免疫相关的基因集(*immune-DEGs*)。通过 *Enrichr* 在线富集工具对 *immune-DEGs* 进行富集分析。构建 *immune-DEGs* 的蛋白质-蛋白质互作(PPD)网络, 并鉴定网络中的高度互联的核心(*hub*)基因。利用 qRT-PCR 验证 *hub* 基因的表达, 并绘制 *hub* 基因的 ROC 曲线。使用 ssGSEA 算法评估布鲁氏杆菌病患者中免疫细胞的评分, 并通过流式细胞术检测血液样本中免疫细胞的水平。结果 共获得 390 个 *immune-DEGs*, 富集结果中发现了 T 细胞受体信号通路和 Th17 细胞分化等。在 10 个 *hub* 基因中 IFNG 和 TNF 在布鲁氏杆菌组中显著高表达。ROC 曲线表明 IFNG 对布鲁氏杆菌病具有良好诊断意义。此外, 活化型 CD₄ T 细胞、效应型 CD₄ T 细胞、效应记忆型 CD₈ T 细胞和 2 型 T 辅助细胞因子在布鲁氏杆菌患者中明显增多。流式细胞术检测发现与健康对照组相比, 布鲁氏杆菌病患者外周血中 Th2 和 Th17 细胞比例增高, Th1 和 Treg 细胞比例则降低。结论 本研究结果不仅提高了我们对布鲁氏杆菌感染后机体免疫反应的认识, 还为诊断和治疗布鲁氏杆菌病提供了更多的方向。

关键词:布鲁氏杆菌病; 免疫基因; 生物信息学

中图分类号: R378.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2021)08-0709-06

Transcriptome analysis of immune genes in the peripheral blood in patients with *Brucella* infection

BAI He-xia¹, ZUO Ming-ming¹, PAN Xiao-fang¹, ZHAO Xin-fang², HAN Xuan-xue¹

(1. Department of Acupuncture and Moxibustion, Changji 831100, China;

2. The First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: This study aimed to explore the key dysfunctional immune genes and molecular mechanisms of brucellosis by using bioinformatics analysis. Whole blood transcriptome expression data from patients with brucellosis were acquired from GSE69597. Differentially expressed genes (DEGs) between patients with brucellosis and controls were screened through differential analysis, and immune related gene sets (*immune-DEGs*) in the DEGs were called with the *import* database. Enrichment analysis of *immune-DEGs* was performed with the *enrichr* online enrichment tool. To construct a protein-protein interaction (PPI) network of *immune-DEGs* and identify the highly interconnected core (*hub*) genes in the network, we used qRT-PCR to verify the expression of the *hub* genes, and we plotted ROC curves of the *hub* genes. The scoring of immune cells in patients with brucellosis was evaluated with the ssGSEA algorithm, and the levels of immune cells in blood samples were detected by flow cytometry. A total of 390 *immune-DEGs* were obtained, and the T cell receptor signaling pathway and Th17 cell differentiation were found in the enrichment results. Among the ten *hub* genes, IFNG and TNF had significantly higher expression in the *Brucella* group. The ROC curves indicated a good diagnostic value of IFNG for brucellosis. In addition, activated CD₄ T cells, effector CD₄ T cells, effector memory CD₈ T cells and type 2 T helper cytokines were significantly elevated in patients with *Brucella*. Flow cytometry analysis identified higher proportions of Th2 and Th17 cells, and lower proportions of Th1 and Treg cells, in the peripheral blood in patients with brucellosis than healthy controls. The results of this study not only improve understanding of the immune response after *Brucella* infection but also provide directions for the diagnosis and treatment of brucello-

自治区青年科学基金(No. WWJWY-202020)

第一作者: 白贺霞, Email: 26822965@qq.com;

ORCID: 0000-0002-1164-9775

作者单位: 1. 昌吉市人民医院中医针灸科, 昌吉 831100;

2. 石河子大学医学院第一附属医院, 石河子 832000

sis.

Keywords: Brucellosis; immune gene; bioinformatics

Supported by the Autonomous Region Youth Science Fund (No. WWJWY-202020)

布鲁氏杆菌病是最常见的人兽共患传染病之一,每年有 50 多万人感染布鲁氏杆菌病。尽管人们已经努力尝试控制布鲁氏杆菌病的传播,但它仍然世界上大多数地方流行,特别是在发展中国家^[1-3]。布鲁氏杆菌病是由布鲁氏杆菌引起的^[4-6],人类是这种细菌的随机宿主。我国所有省市自治区均有人感染布鲁氏杆菌的病例报告,但发病人群仍以牧民为主。近些年来,新疆地区人和家畜的布鲁氏杆菌病发病率均呈急速的高发病趋势,据不完全统计每年新疆因布鲁氏杆菌病导致的直接经济损失可达上亿元。

人类免疫系统与布鲁氏杆菌之间的相互作用对于病原体的清除或存活是必不可少的^[7-8]。先天免疫和适应性免疫反应都参与了对布鲁氏杆菌感染的防控,这主要依赖于细胞介导的免疫反应。因此,抗原提呈细胞(巨噬细胞和树突状细胞)的贡献以及 CD₄ 和 CD₈ T 淋巴细胞的诱导在这些免疫反应中起着至关重要的作用。大量证据及经验表明,复杂疾病的特征受到多个基因相互作用的共同影响^[9-12]。而目前对布鲁氏杆菌病的免疫分子失调机制仍然未达成共识。需要更深入的研究来探讨布鲁氏杆菌感染过程中的免疫分子失调以及潜在的调控机制。

本文从 GEO 数据库中获取布鲁氏杆菌病患者和对照组的基因表达谱数据,整合了对布鲁氏杆菌病患者和健康人的外周血的免疫相关差异表达基因。通过生物信息学分析方法探讨布鲁氏杆菌病的关键失调免疫基因和分子机制。

1 材料与方法

1.1 数据来源 从美国国家生物信息中心(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)GEO 公共数据库调取 GSE69597 获取布鲁氏杆菌病人及健康对照的全血转录组表达数据。

1.2 差异免疫基因的鉴定 使用 R 语言 DESeq2 对布鲁氏杆菌病患者和对照之间的基因表达进行差异分析,设置筛选条件 $P < 0.05$ 鉴定差异表达基因(DEGs)。使用 *import* 数据库调取差异表达基因中免疫相关的基因集(immune-DEGs)。

1.3 免疫基因集 GO 和 KEGG 富集分析 使用

Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) 在线富集工具对鉴定到的 immune-DEGs 进行生物功能(GO)和 KEGG 信号途径分析。 $P < 0.05$ 为富集有统计学意义。

1.4 免疫基因集蛋白网络互作分析(PPI)及核心(hub)调控基因的鉴定 我们将 immune-DEGs 上传到 STRING 数据库,并筛选综合得分 > 0.4 的蛋白质-蛋白质互作(PPI)网络。用 Cytoscape 软件(3.8.0 版)鉴定 PPI 网络中连接度最高的前 10 个基因为核心(hub)基因。

1.5 ROC 曲线 我们使用 SPSS 24.0 对 hub 基因进行受试者工作特征(Receiver Operating Characteristic, ROC)曲线分析。曲线下面积越大,则基因的诊断能力越强。

1.6 样本收集 各收集 10 例急性期首次确诊的布鲁氏杆菌患者及健康对照的外周血样本。所有的样本均获得了患者的知情同意并获得了昌吉市人民医院的伦理委员会批准。

1.7 实时定量 PCR(qRT-PCR)检测 TNF 和 IFNG 的 mRNA 水平 利用 Trizol (Invitrogen) 制备 20 例外周血样本的总 RNA。根据制造商的说明利用 Primescript™ RT Reagent Kit(TaKaRa)逆转录为 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa)试剂盒进行 qRT-PCR 反应。以 GAPDH 为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法进行数据分析。所有的实验均进行了 3 次重复。

1.8 单样本基因集富集分析(ssGSEA) 我们使用 ssGSEA 算法来评估布鲁氏杆菌患者及对照的全血中 28 种免疫细胞的免疫评分。 $P < 0.05$ 表明布鲁氏杆菌患者与对照组之间的免疫细胞含量差异有统计学意义。

1.9 流式细胞术检测 Th1/Th2/Th17 细胞和 Treg 细胞比例 取 5 例布鲁氏杆菌患者和 5 例健康对照的 100 μ L EDTA 抗凝外周血加入流式管中,分别加入 5 μ L 流式抗体 CD₄-PECY7、CD₂₅-BB515 和 CD₁₂₇-PE 用作 Treg 细胞的检测;CD₄-FITC、CD₁₈₃-PECY5 和 CD₁₉₆-PE 用作 Th1/Th2/Th17 细胞的检测,抗体均购自美国 BD 公司,混匀室温避光孵育 15 min 后,加入溶血素 2 mL。室温孵育 5 min 后,1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗 1 遍后,加入 300 μ L

PBS 重悬上流式机(美国贝克曼,DXflex)检测。

2 结果

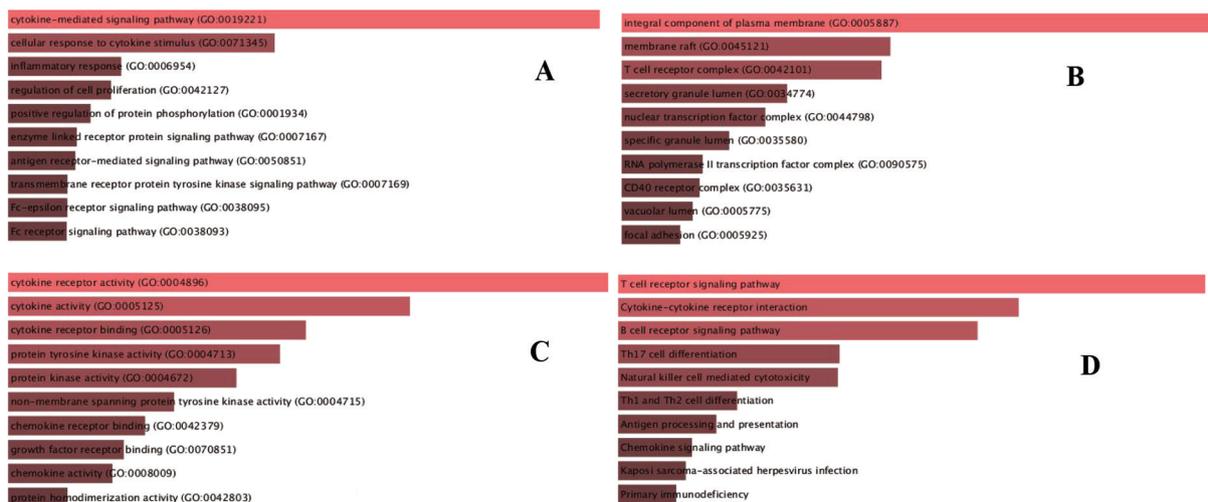
2.1 差异免疫基因的鉴定 我们共鉴定到布鲁氏杆菌病患者与对照之间的差异表达的基因($P < 0.05$)有 4 924 个,其中上调表达基因 2 510 个,下调基因 2 414 个。通过 import 数据库筛选出免疫相关的差异表达基因共 390 个,上调基因 208 个,下调基因 182 个。见表 1,展示了上调和下调变化倍数最大的前十个差异表达基因。

2.2 免疫基因的 GO 和 KEGG 富集分析 GO 功能注释分析结果表明,对于 390 个免疫相关 mRNAs 的靶点,生物过程(BP)最丰富的术语是“cytokine-mediated signaling pathway(细胞因子介导的信号通路)”(图 1A)和“cellular response to cytokine stimulus(细胞对细胞因子刺激的反应)”,细胞组分(CC)中的“integral component of plasma membrane(质膜的组成部分)”和“T cell receptor complex(T 细胞受体复合物)”(图 1B),以及分子功能(MF)中的“cytokine receptor activity(细胞因子受体活性)”和“protein tyrosine kinase activity(蛋白酪氨酸激酶活性)”(图 1C)。KEGG 途径分析结果表明,富集最高的几条通路是 T cell receptor signaling pathway(T 细胞受体信号通路),B cell receptor signaling pathway(B 细胞受体信号通路),Th17 cell differentiation(Th17 细胞分化)(图 1D)。

表 1 差异表达基因

Tab.1 Differentially expressed genes

ID 号	基因	log2FoldChange (差异系数)	P 值
ENSG00000131142	CCL25	2.143 934 087	1.27×10^{-5}
ENSG00000107562	CXCL12	1.687 858 938	0.001 084 301
ENSG00000089685	BIRC5	1.603 547 875	2.38×10^{-10}
ENSG00000138755	CXCL9	1.473 620 111	2.77×10^{-8}
ENSG00000145147	SLIT2	1.422 949 738	0.018 965 664
ENSG00000049247	UTS2	1.417 526 988	0.000 119 516
ENSG00000011201	KAL1	1.370 246 952	8.17×10^{-5}
ENSG00000081985	IL12RB2	1.234 053 196	7.17×10^{-13}
ENSG00000111537	IFNG	1.195 906 401	3.46×10^{-11}
ENSG00000196415	PRTN3	1.159 850 068	0.000 120 351
ENSG00000211930	IGHD3-3	-0.882 993 742	0.030 939 907
ENSG00000158270	COLEC12	-0.891 621 914	0.000 740 867
ENSG00000211672	IGLV4-3	-0.918 471 267	0.018 570 25
ENSG00000113594	LIFR	-0.920 019 361	0.116 019 395
ENSG00000121853	GHSR	-0.938 140 109	0.184 974 936
ENSG00000108691	CCL2	-0.989 525 653	0.001 642 49
ENSG00000108700	CCL8	-0.991 017 196	0.019 109 408
ENSG00000106178	CCL24	-1.089 525 561	0.104 454 791
ENSG00000161055	SCGB3A1	-1.232 978 442	0.002 754 878
ENSG00000171119	NRTN	-1.275 790 939	0.003 378 37

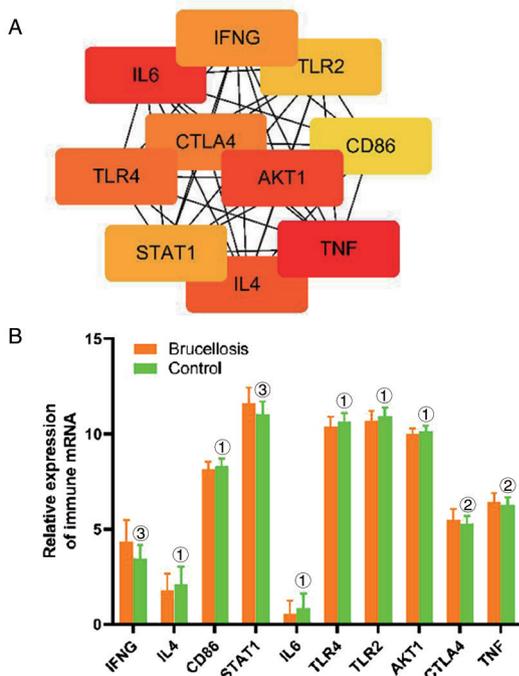


注:A 差异基因参与的生物学进程;B 差异基因参与的细胞成分;C 差异基因参与的分子功能;D 差异基因参与的信号通路

图 1 差异基因参与的功能和信号通路

Fig.1 Function and signal pathways of differentially expressed genes

2.3 免疫基因集 PPI 和 *hub* 基因的鉴定 为了在上述 390 个免疫相关差异表达基因中识别 *hub* 基因,我们筛选了在 PPI 网络中连接度最大的前 10 个基因(图 2A)。包括 TNF、IL6、AKT1、IL4、TLR4、CTLA4、IFNG、STAT1、TLR2 和 CD₈₆。与正常对照(Control)组相比,IFNG、STAT1、CTLA4 和 TNF 在布鲁氏杆菌患者组中显著高表达,其余的则是低表达(图 2B)。



A: 预测到的 *hub* 基因; B: 预测的 *hub* 基因 mRNA 表达水平柱状图; ①: $P < 0.05$; ②: $P < 0.01$; ③: $P < 0.001$ 。

图 2 差异基因 PPI 和 *hub* 基因网络的构建
Fig.2 Construction of PPI and *hub* gene networks

2.4 *hub* 基因的 ROC 曲线 ROC 曲线结果显示, IFNG 的曲线下面积大于 0.7, 说明其对布鲁氏杆菌具有良好的诊断意义, 其余基因的曲线下面积均小于 0.7, 见图 3。

2.5 关键基因的验证 收集布鲁氏杆菌患者和健康对照的外周血样本, 利用 qRT-PCR 的实验方法检测 IFNG 和 TNF 的 mRNA 水平。结果发现, 与对照组比较, IFNG 和 TNF 在布鲁氏杆菌患者中表达上调有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4)。进一步说明他们对布鲁氏杆菌具有良好的诊断意义。

2.6 单样本基因集富集分析(ssGSEA) 单样本基因集富集分析结果显示全血中与 control(对照组)组相比 Activated CD₄ T(活化型 CD₄ T 细胞)、Effector memory CD₄ T(效应型 CD₄ T 细胞)、Effector memory CD₈ T(效应记忆型 CD₈ T 细胞)、

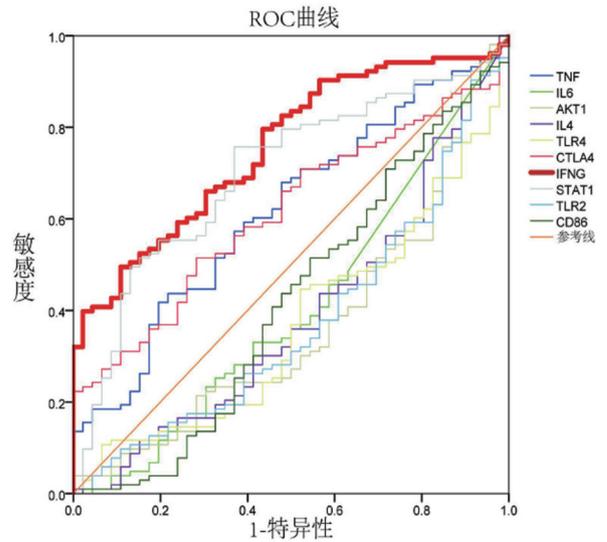


图 3 *hub* 基因 ROC 曲线
Fig.3 ROC curves of *hub* genes

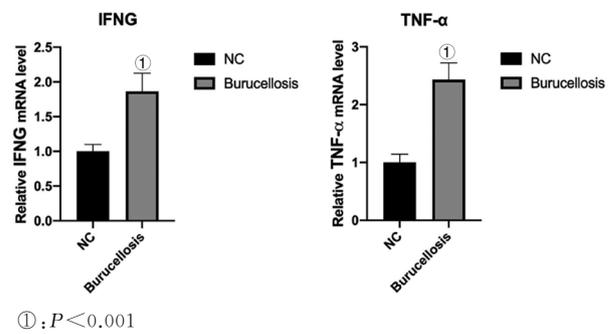


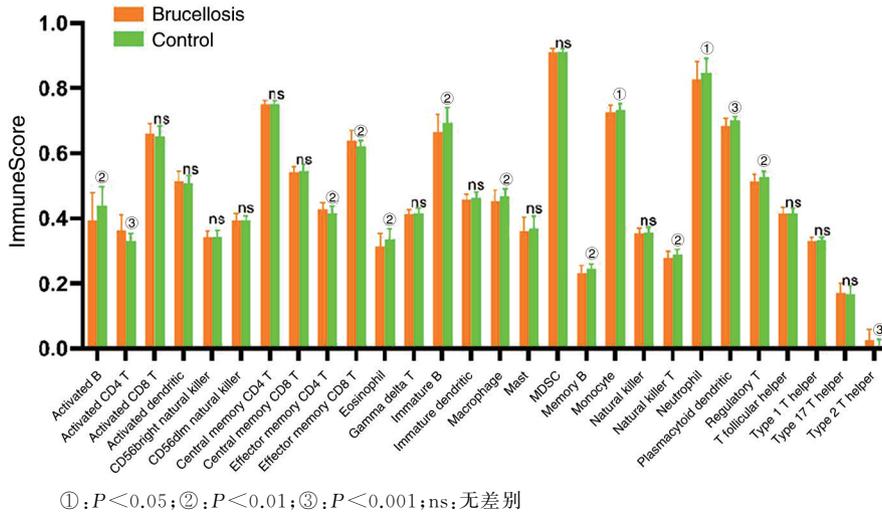
图 4 验证关键失调基因
Fig.4 Validation of key dysfunctional genes

Type 2 T helper(2 型 T 辅助细胞因子-Th2)在布鲁氏杆菌患者组有显著上升; 而效应型 B 细胞(Activated B)、嗜酸性粒细胞(Eosinophil)、未成熟 B 细胞(Immature B)、巨噬细胞(Macrophage)、记忆 B 细胞(Memory B)、自然杀伤 T 细胞(Natural killer T, NKT)、中性粒细胞(Neutrophil)、浆细胞树突状细胞(Plasmacytoid dendritic)、调节性 T 细胞-Treg(Regulatory T)则下降, 见图 5。

2.7 流式细胞术验证 Th1/Th2/Th17 细胞和 Treg 细胞比例 流式结果显示, 与健康对照组相比, 布鲁氏杆菌患者外周血中 Th2 和 Th17 细胞比例增高, 而 Th1 细胞和 Treg 细胞比例则降低, 见图 6。

3 讨论

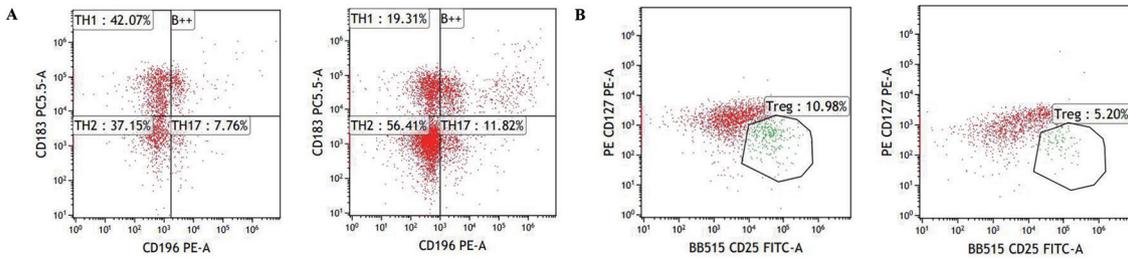
随着全球对布鲁氏杆菌病研究的深入, 发现免疫损伤在该病的发生发展, 尤其是慢性化中起重要作用^[13]。宿主免疫反应在功能上分为先天性和适应性免疫。而布鲁氏杆菌为胞内寄生菌, 故以适应



①: P < 0.05; ②: P < 0.01; ③: P < 0.001; ns: 无差别

图 5 单样本基因集富集分析

Fig.5 Enrichment analysis of the single sample gene set



A: Th1/Th2/Th17 细胞比例; B: Treg 细胞比例

图 6 流式细胞术检测 Th1/Th2/Th17 细胞和 Treg 细胞比例

Fig.6 Flow cytometry detection of the ratio of Th1/Th2/Th17 cells and Treg cells

性细胞免疫为主^[14]。而适应性免疫由 T 淋巴细胞(细胞免疫)以及 B 淋巴细胞(体液免疫)组成^[15]。我们的分析结果发现,活化和未成熟型 B 细胞在布鲁氏杆菌患者显著低表达,而活化的 CD₄⁺ T 细胞和 CD₈⁺ T 细胞均在人布鲁氏杆菌病患者中显著高表达。布鲁氏杆菌感染宿主后,人体对病原学的清除,主要是 T 淋巴细胞在其中发挥了关键作用。T 淋巴细胞由不同的细胞亚群组成,各亚群 T 细胞通过分泌动态平衡的多种不同细胞因子来维持人体正常的免疫功能,一旦这种平衡被打破就可以导致机体内免疫紊乱^[16]。作为适应性免疫应答的一部分,CD₈⁺ T 细胞通过鉴定和杀死受损宿主细胞来控制细胞内感染^[17-18]。CD₄⁺ T 细胞在外来抗原作用下分化为各种效应 T 细胞参与免疫应答。Zheng 等^[19]研究发现,与健康受试者个体相比,人布鲁氏杆菌病患者中 CD₄⁺ T 细胞和 CD₈⁺ T 细胞的比例显著升高。因此,我们认为人布鲁氏杆菌病患者存在 T 淋巴细胞免疫功能异常,CD₄⁺ T 和 CD₈⁺ T 细胞可能是影响布鲁氏杆菌病进展的重要因素。

另一方面,本研究通过 PPI 网络鉴定了 10 个 hub 基因。其中,IFN- γ 和 TNF 在布鲁氏菌病患者中显著高表达,TNF 在 PPI 网络中处于最核心的调控地位。当人体感染病原体后,在不同的细胞因子和环境作用下,CD₄⁺ T 细胞可以分化成不同类型细胞,如 Th1, Th2, Th17, Treg 等细胞亚群释放 IFN、TNF、IL-4 等细胞因子,进一步诱导细胞免疫或体液免疫应答^[20]。在 Mosmann 描述 Th1/Th2“二分法”概念中,布鲁氏杆菌病再次被用作感染与干扰素- γ (IFN- γ)产生相关的模型^[21]。因此,细胞免疫和 Th1 细胞因子(IFN- γ , 肿瘤坏死因子 α)在布鲁氏杆菌感染结果中的关键作用得到了证实。而本研究通过 ROC 曲线同样验证了这一结果。

在 KEGG 富集结果中鉴定了 T 细胞受体信号通路和 Th17 细胞分化的显著富集。CD₄⁺ T 细胞的三个亚群, Th1、Th2 和 Th17,是细胞内细菌免疫反应的中心参与者。IL-17A 是 Th17 细胞产生的标志性细胞因子^[22-25]。虽然 Th1 细胞在布鲁氏杆菌病中的保护作用已被证明,但确定 Th17 细胞在

布鲁氏杆菌免疫中的确切作用正在成为一个活跃的研究领域。而我们的数据分析显示, Th17 信号通路与布鲁氏杆菌病的发生发展有着密切关系。

综上所述, 为了能更好的明确布鲁氏杆菌感染后宿主体内的免疫调控, 为今后患者的有效诊治提供可靠的理论依据。我们通过生物信息学分析了布鲁氏杆菌感染对免疫的影响。鉴于宿主对布鲁氏杆菌的应答主要由免疫细胞介导, 因此阐明感染患者体内免疫细胞的调控机制, 以及明确调控宿主体内免疫细胞的靶点, 可以为将来设计针对布鲁氏杆菌的药物和疫苗提供是至关重要的理论基础。

利益冲突: 无

引用本文格式: 白贺霞, 左明明, 盘晓芳, 等. 转录组分析布鲁氏杆菌患者外周血免疫基因的表达情况[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(8): 709-714. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.089

参考文献:

- [1] Byndloss MX, Tsohis RM. *Brucella* Virulence factors and immunity[J]. Rev Anim Biosci, 2016, 4(111): 1-15. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111326
- [2] Memish ZA, Balkhy HH. Brucellosis and international travel [J]. J Travel Doctor, 2004, 11(1): 49-55. DOI: 10.2310/7060.2004.13551
- [3] Galinska EM, Zagorski J. Brucellosis in humans-etiology, diagnostics, clinical forms[J]. Ann Agric Environ Med, 2013, 20(2): 8-233. DOI: 10.2166/wst.2013.207
- [4] Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview[J]. Int J Infect Dis, 2003, 7(3): 173-182. DOI: 10.1016/S1201-9712(03)90049-X
- [5] Golshani M, Buozari S. A review of Brucellosis in Iran: epidemiology, risk factors, diagnosis, control, and prevention[J]. Iran Biomed J, 2017, 21(6): 349-359. DOI: 10.18869/acadpub.ijb.21.6.349
- [6] Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection[J]. Crit Rev Immunol, 2006, 26(5): 42-607. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v26.i5.30
- [7] Golding B, Scott D E, Scharf O, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus* [J]. Microbes Infection, 2001, 3(1): 43-48. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01350-2
- [8] Dornand J, Gross A, Lafont V, et al. The innate immune response against *Brucella* in humans[J]. Veter Microbiol, 2002, 90(1/4): 383-394. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00223-7
- [9] Gorvel JP. *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll[J]. Microbes Infect, 2008, 10(9): 1010-1013. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.07.007
- [10] Peck A, Mellins ED. Precarious balance: Th17 Cells in host defense[J]. Infec Immun, 2010, 78(1): 8-32. DOI: 10.1128/IAI.00929-09
- [11] Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, et al. CD4⁺ T Cells: differentiation and functions[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 12(12): 135-925. DOI: 10.1155/2012/925135
- [12] Skendros P, Pappas G, Boura P. cell-mediated immunity to human brucellosis [J]. Microbial infect, 2011, 13(2): 134-142. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.10.015
- [13] Macgregor P, Szoor B, Savill NJ, et al. Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(6): 431-438. DOI: 10.1038/nrmicro2779
- [14] Medzhitov R, Janeway CJ. Innate immune recognition: mechanisms and pathways [J]. Immunol Rev, 2010, 173(1): 89-97. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x
- [15] Hofmeyr SA. An overview of the immune system [J]. Nursing standard official newspaper of the royal college of nursing, 2009, 23(15/17): 47-56. DOI: 10.7748/ns2008.12.23.15.47.c6738
- [16] Pollock KM, Montamat-Sicotte DJ, Grass L, et al. PD-1 Expression and cytokine secretion profiles of mycobacterium tuberculosis-specific CD4⁺ T-cell subsets; potential correlates of containment in HIV-TB co-infection [J]. PLoS One, 2016, 11(1): 146-905. DOI: 10.1371/journal.pone.0146905
- [17] Apmso O, Oliveira FS, Carvalho NB, et al. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- γ knockout than IL-12 β 2-microglobulin double-deficient mice [J]. Clin Develop Immunol, 2012, 2(4): 494-589. DOI: 10.1155/2012/589494
- [18] Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, et al. *Brucella* spp non-canonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system [J]. Microbial Cell Factories, 2006, 5(1): 1-13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13
- [19] Zheng R, Xie S, Niyazi S, et al. Meta-analysis of the changes of peripheral blood T cell subsets in patients with brucellosis [J]. J Immunol Res, 2018, 5(17): 1-10. DOI: 10.1155/2018/8439813
- [20] 张文林, 张建军, 姚明荣, 等. Th1, Th2, Th17 和 Treg 研究现状 [J]. 医药前沿, 2012, 2(13): 29-30. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1752.2012.13.024
- [21] Tangye SG, Deenick EK, Palendira U, et al. T cell-B cell interactions in primary immune deficiencies [J]. An NY Acad Sci, 2012, 12(50): 1-13. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06361.x
- [22] Richards DF, Fernandez M, Caulfield J, et al. Glucocorticoids drive human CD8⁺ T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production [J]. Eur J Immunol, 2015, 30(8): 2344-2354. DOI: 10.1002/1521-4141
- [23] Szczepanik AM, Funes S, Petko W, et al. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line [J]. J Neuroimmunol, 2001, 113(1): 49-62. DOI: 10.1016/S0165-5728(00)00404-5
- [24] Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. Th17 cells in human disease [J]. Immunol Rev, 2008, 223(1): 87-113. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x
- [25] Sarah L. Gaffen. structure and signaling in the IL-17 receptor family [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(8): 567-556. DOI: 10.1038/nri2625