# 肺炎链球菌触发肺域型上皮细胞微丝肌动蛋白重排的钙信号转导机制

徐邦牢 读 一兵 湖广州市第一人民医院检验科袁 东 广州 510180日重庆医科大学检验系表 重庆 400016 冤

摘要**陪**1的 通过体外实验研究肺炎链球菌渊.pn**爱**E否可通过肺型上皮细胞渊549**第**5信号转导途径触发微丝肌动蛋白 渊-actin**%**血胞骨架重排**微**曲导致 S.pn 对 A549 细胞的侵袭遥 方法 采用 F-actin 特异性 FITC-phalloidin 荧光染料**微**察 S.pn 作用 A549 细胞前后 F-actin 细胞骨架重排情况**我**人重排百分率表示E用 F-actin 细胞骨架重排抑制剂细胞松弛素 D 预处理 A549 细胞**微**察 S.pn 对 A549 细胞的侵袭E使用 Ca<sup>2+</sup> 信号转导抑制剂 dantrolene 预处理 A549 细胞**微**察其与 F-actin 细胞骨架重排百分率间是否存在剂量依赖关系曰用 Fura-2/AM 荧光探针负载 A549 细胞后测定 S.pn 粘附 A549 细胞 30**希**0**%**0 min 的胞内[Ca<sup>2+</sup>],遥 结果 S.pn 作用 A549 细胞后**我** FITC-phalloidin 荧光染色**表**-actin 细胞骨架呈黄绿 色块状聚集田-actin 细胞骨架重排抑制剂细胞松弛素 D 可明显降低 S.pn 对 A549 细胞的侵袭**截**-其浓度为 0.25 滋/ml 时袁 未得到可测的细菌数①a<sup>2+</sup> 信号转导抑制剂可部分抑制 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排**混**与 F-actin 细胞骨架重排百 分率间存在量效关系 B.pn 粘附 A549 细胞 30**%**0**%**0 min 后的胞内[Ca<sup>2+</sup>],高于对照[渊87.4依7.3 nmol/L**驾**;达到饱和袁 分别为渊87.5 **依**8.1 **窝粥**48.2 **依**5.6 **冤**L渊57.2 **依**7.5 **S**mol/L遥 结论 S.pn 可通过 Ca<sup>2+</sup> 细胞信号转导途径触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排**动**带子2 细胞

关键词院链球菌载肺炎日肺/细胞学日上皮细胞日微丝肌动蛋白白钙信号日细胞支架

中图分类号隙378.14 文献标识码隐 文章编号院000-2588(2004)02-0168-04

Calcium signaling events in Streptococcus pneumoniae invasion of human type 域 pneumocytes XU Bang-lao<sup>1</sup>, YIN Yi-bing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, First Municipal Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China; <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To study whether Streptococcus pneumoniae (S.pn) can provoke filamentous actin (F-actin) rearrangements in vitro through calcium signaling pathways in type 域 pneumocytes (A549 cells), resulting in S.pn invasion of the cells. Method After FITC-phalloidin labeling of F-actin, F-actin rearrangements were observed by S.pn adhesion to type pneumocyte A549 cells. S.pn invasion of A549 cells was determined by pretreating A549 cells with cytochalasin D. To investigate whether F-actin rearrangements could be blocked by Ca<sup>2+</sup> inhibitors, A549 cells were pretreated with Ca<sup>2+</sup> inhibitors dantrolene, and loaded in Fura-2/AM probe to determine the concentration of cytosolic free calcium by S.pn adhesion to A549 cells after 30, 60, and 90 min respectively. Results Intact S.pn can promote F-actin rearrangements. Cytochalasin D was able to prevent S.pn invasion of A549 cells. No invasion of A549 cell can be determined at 0.25 滋/ml of cytochalasin D. One subset of the inhibitors of Ca<sup>2+</sup> signal transductionmolecules blocked F-actin rearrangements dose-dependently, and S.pn adhesion of A549 cells for 30, 60, and 90 min increased cytosolic free calcium, reaching 渊87.5 依8.1 冤渊48.2 依5.6 毫and 渊57.2 依7.5 毫nmol/L, respectively. They were higher than of the control group. Conclusion S.pn can provoke F-actin rearrangements through Ca<sup>2+</sup> signaling pathways, which further leads to S.pn invasion of A549 cells.

Key words: Streptococcus pneumoniae; lung/cytology; epithelial cells; filamentous actin; calcium signaling; cytoskeleton

肺炎链球菌 渊treptococcus pneumoniae 3.pn 爱 一种常见的革兰氏阳性致病菌素所致临床发病率和死 亡率均较高 電程目前 动于多糖荚膜疫苗免疫原性较 弱及耐药现象的出现表 预防及治疗具有一定的局限 性遥有文献资料报道 教 致病性大肠埃希氏菌及沙门 氏菌等 革兰氏阴性致病菌粘附宿主细胞可使胞内 [Ca<sup>2+</sup>], 增加 动 此触发微丝肌动蛋白渊-actin **%** 即胞骨 架重排 动 而侵袭宿主细胞 電遥Ca<sup>2+</sup> 除具有信号转导 功能外 衰 又具有直接参与由细胞内肌动蛋白引起的兴

收稿日期院003-10-12

基金项目隔离自然科学基金渊0170050冤

Supported by National Natural Science Foundation of China渊0170050冤 作者简介除新牢渊969-冤躬袁002年毕业于重庆医科大学藏士 章技师魂话随20-81048078衰-mail: xubanglao@hotmail.com

# 1 材料和方法

## 1.1 实验菌株

S.pn 为标准菌株 S芋型囊的自中国科学院菌种保藏中心遥讨该菌的生物学特征鉴定结果如下隙 網究 镜检查示革兰氏染色阳性袁在 C+Y 半合成培养基中成双和链状生长囊 端相对 表端相背 E 湖 第 印 來 示半透明 光滑 第 兩 平 小菌落 表 围 可 见 草绿色溶血环 表 8 h

第2期

后菌落中央出现脐窝状凹陷日渊冤生化反应示胆汁溶菌试验渊究药糖分解试验渊究

1.2 实验细胞株

肺域型上皮细胞渊5499%的自中科院上海细胞所 细胞库遥

1.3 主要试剂及配制

1.3.1 C+Y 半合成 S.pn 培养基 含 Yeast 抽提物 <sup>喻</sup>表 抽滤灭菌分装表 益保存表用于培养 S.pn遥培养条件院 37 益恒温水浴静置培养遥

1.3.2 RPMI-1640 细胞培养基 用于培养 A549 细胞遥 每升培养液中含 RPMI 1640 粉剂 10.4 g 渊构自 GIBCO 完 IEPES 4.8 g 渊构自中科院上海生化所东风 生化技术公司 完 IaHCO<sub>3</sub> 2.0 g 尧 经 灭活的胎牛血清 渊 CS 冤 00 ml 斋 霉素及链霉素各 100 U/ml 袁 問节 pH 7.4 袁 抽滤 灭菌 表 表 20 益 保存遥

1.3.3 FCS 购自杭州四季青生物工程材料研究所表 级表 支原体 遥 初 用前 56 益 希 0 min 灭活补体 遥 20 益 分装冻存遥

1.3.4 胰酶 购自 Serva遥容于 pH 7.4 的 PBS 溶液 袁次 度为 0.25% 袁曲滤灭菌袁 益保存遥

1.3.5 Fura-2/AM 购自 Sigma遥用 DMSO 溶解分装 后-20 益避光保存载浓度为 1 mg/ml遥使用时终浓度为 5 滋nol/L遥

1.3.6 测钙离子用 D-Hanks 液 NaCl 8.0 g表H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
0.6 g表Cl 0.4 g表laHCO<sub>3</sub> 0.42 g表IgSO窑/H<sub>2</sub>O 0.197 g袁
Na<sub>2</sub>HPO窑l 2H<sub>2</sub>O 0.1185 g表lucose 5.0 g袁用去离子水
800 ml 溶解式調 pH 7.6 表后定容至 1 000 ml式曲滤灭
菌素 益分装保存遥

1.3.7 负载液 含 10% FCS 発.5% BSA 的 RPMI-1640 培养基式调 pH 至 7.6 表曲滤灭菌表 益分装保存遥

1.3.9 细胞内钙离子测定液 含 0.2%BSA **尧**.1 mmol/L EGTA 的 D-Hanks 液 **溒**周 pH 7.6 **溒**曲滤灭菌 **袁** 益分装 保存遥

1.3.10 FITC-phalloidin 购自 Sigma遥用含 1%DMSO 的 PBS 溶液渊H7.4 配制款度为 5 滋/ml表)装袁20 益 避光保存遥

1.3.11 信号转导抑制剂 dantrolene 购自 Sigma遥用 DMSO 溶解袁分装袁 20 益避光保存遥原始浓度为 10 000 滋nol/L遥

1.3.12 多聚甲醛溶液 称取多聚甲醛 0.4 g 電子烧杯 中 动入 80 ml 0.01 mol/L PBS 溶液 动加热至 60 益左 右 载持续搅拌 载 其完全溶解 动入少许 1 mol/L NaOH 溶液至清亮 载 0.01 mol/L PBS 定容至 100 ml 载 H 7.4遥 室温放置遥 1.3.13 胰蛋白胨 - 植胨琼脂血平板的制备 称取胰 蛋白胨 15.0 g袁植物蛋白胨 5.0 g表<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g表laCl 5.0 g袁lucose 2.5 g袁琼脂粉 15.0 g袁加入双蒸水 800 ml 溶解载调节 pH渊.3 ( 2 爱分装袁21 益灭菌 15 min袁 益 保存遥将上述 TSA 培养基》程固态冤和热溶化专当冷至 50 益左右时载加入 5%的去纤维绵羊血毒摇匀衰到血平 板袁 益保存遥

1.3.14 细胞松弛素 D 购自 Sigma 通用 DMSO 溶解袁 原液浓度为 1 mg/ml袁20 益分装保存遥

1.3.15 玉型胶原酶 购自 Sigma遥用含 10%FCS 的 RPMI-1640 培养液配制款度为 0.25% 费曲滤灭菌遥4 益 保存遥

1.4 方法

1.4.1 S.pn 培养 将 S.pn 接种于 C+Y 培养基中袁7 益 水浴静置培养至对数生长中后期渊<sub>600</sub>=0.4袁为 10<sup>8</sup> 菌落 形成单位/ml 延用于整个实验时表离心渊 500 r/min尧 10 min 衰 再用预冷的 PBS 洗 3 次袁不含双抗 RPMI-1640 悬浮至 10<sup>8</sup> 菌落形成单位/ml遥

1.4.2 A549 培养 将 A549 细胞接种于含适量 RPMI-1640 培养液的培养瓶或培养板孔中表用于整个 实验遥

1.4.3 S.pn 作用于 A549 细胞后 F-actin 的 FITCphalloidin 荧光染色 将 A549 细胞接种于带小块盖 玻片的 24 孔培养板孔中蒙持其呈单层生长后载 W出孔 内培养液载 PBS 轻轻冲洗 3 次日加入用不含双抗的 RPMI-1640 培养液悬浮的对数生长中后期 S.pn 菌 液囊 圣轻混匀袁7 益尧%CO2 孵箱中温育 2 hE夹出小 盖玻片袁用 PBS 轻轻冲洗 5 次袁%多聚甲醛室温固 定 15 min曰用 PBS 轻轻冲洗 5 次袁沥干水份 渊初干 燥雾 每张盖玻片上加 10 滋 FITC-phalloidin 荧光染 料蓉 温潮湿暗盒中静置 40 min日用 PBS 轻轻冲洗 5 次载 可日用无荧光软布擦净其背面 衰 于洁净无荧光 载玻片上载荧光显微镜下观察 F-actin 重排情况遥同时 设不受 S.pn 感染的 A549 细胞作为对照遥

1.4.4 信号传导抑制剂 dantrolene 预处理 A549 细胞 后 F-actin 的 FITC-phalloidin 荧光染色 同 1.4.3遥只 是在加入 S.pn 前袁分别加入预先用 RPMI-1640 稀释 混匀并使其成梯度浓度的抑制剂 蒙处理 A549 细胞 30 min 蒙 加入 S.pn 混匀 蒙 续 作用 2 h遥荧光镜下观 察 F-actin 的重排情况遥

 后袁用 PBS 轻轻冲洗 3 次曰加入用不含双抗的 RPMI-1640 培养液悬浮的对数生长中后期 S.pn 菌 液袁轻轻混匀曰用水平式离心机 1 000 r/min 离心 10 min袁以促进其粘附 A549日7 益尧%CO<sub>2</sub> 孵箱中温育 2 h 后载用无菌 PBS 轻轻洗 3 次日加入含 1%FCS尧0 U/ml 青霉素尧00 U/ml 庆大霉素的 RPMI-1640 培 养液日7 益尧%CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 1 h袁以充分杀死胞外 S.pn日用无菌 PBS 洗 3 次载加入 100 滋 0.25% 胰酶使 贴壁细胞悬浮袁再加入 400 滋 0.025% TritonX-100 裂 解细胞 3 min袁0 倍稀释后吸取 100 滋涂布琼脂血平 板 <sup>吨</sup>日7 益尧% CO<sub>2</sub> 孵箱培养过夜载十数平板上的菌 落数遥.pn 侵袭入 A549 的个数 = 平板上计数的菌落 数 / 每培养孔的细胞数遥

1.4.7 细胞松弛素 D 对 S.pn 侵袭入 A549 细胞的作 用 同 1.4.6 方法運加入 S.pn 前朝不同浓度的细胞 松弛素 D 处理 A549 细胞 2 h 就后再加入 S.pn 继续 温育 2 h 朝祥计数侵入 A549 的 S.pn 数遥

1.4.8 A549 细胞内[Ca<sup>2+</sup>]; 测定 用 0.25% 胰酶消化贴 壁单层 A549 - Hanks 液洗 3 次曰用 2 ml 负载液悬浮 细胞 动入 10 滋 Fura-2/AM 溶液 激浓度为 5 滋 nol/L 冤 混匀 袁7 益水浴避光振荡 40 min遥将负载后细胞用含 0.2% BSA 的 D-Hanks 液洗 3 次 司 细胞内钙测定液 悬浮细胞 遥 由 蓝 染色检查细胞活力 >90% 哪 長 调整 细胞数至 2 伊 0% ml 遥 测定前将仪器比色器恒定在 37 益 袁分别扫描标准品及负载后细胞悬液的激发波 长和发射波长以判断负载是否成功 意择负载后细胞 悬液的激发波长和发射波长为测定波长遥胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>由 下式计算除Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>(nmol/L)=K<sub>d</sub>伊F-F<sub>min</sub>)/(F<sub>max</sub>-F) 式中 K<sub>d</sub> 为 Fura-2/Ca<sup>2+</sup> 的解离常数 式 37 益时为 224 nmol/L袁 F 为在不同条件下测定的荧光强度值  $\square_{max}$  为加入终 浓度为 0.1% TrtonX-100 后的最大荧光强度值  $词_{min}$ 为在  $F_{max}$ 基础上再加入终浓度为 5 nmol/L EGTA 时 的最小荧光强度值 <sup>min</sup>

1.4.9 S.pn 作用 A549 后的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>测定 将 A549 接种 于 24 孔培养板孔遥单层贴壁渊的 5伊0<sup>5</sup>/ 孔**%**后吸出孔 内液体袁各孔加入无双抗 RPMI-1640 培养液悬浮的 S.pn 菌液 渊的 10<sup>8</sup> 菌落形成单位 /ml**%** 7 益尧% CO<sub>2</sub> 分别温育 30**%**0**%**0 min**救**集 12 孔细胞于一塑料试 管中遥收集细胞方法院 注意育后用无菌 PBS渊H 7.4冤 洗涤细胞 6 次曰用含 0.25% 胶原酶的 RPMI-1640 温 育消化细胞 10 min曰再用含 5% FCS 的 PBS 洗 2 次袁 负载并测定计算 A549 细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的方法同 1.4.8遥 1.4.10 统计学处理

使用 SAS 软件进行相关系数的计算袁组间比较 采用方差分析遥

## 2 结果

2.1 完整的 S.pn 触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重 排

Spn 作用 A549 细胞后衰-actin 经 FITC-phalloidin 染色呈圆形深黄色聚集 渊图 1 第 7 对照细胞无上述变 化衰呈现均匀黄色荧光外观渊图 2 第 3



图 1 完整的 S.pn 作用 A549 细胞 2 h 后 F-actin 在荧光显微镜下呈黄色并圆形聚集源放大倍数隙 #00冤 Fig.1 Round aggregation of yellow F-actin in A549 cells observed under fluoroscopy after intact S.pn adhesion of A549 for 2 h渊 riginal magnification:伊00冤

图 2 对照 A549 细胞内 F-actin 在荧光显微镜下呈黄色并均匀分布 源放大倍数 7月00 冤

Fig.2 Even distribution of yellow F-actin in control A549 cells observed under fluoroscopy 湖riginal magnification:伊00冤

2.2 F-actin 重排与 S.pn 侵袭 A549 细胞的关系

分别用 0尧.10尧.25 和 0.50 滋/ml 细胞松弛素 D 预处理 A549袁.pn 侵袭数分别为 渊52 依1 第4 % 10 第6 和 0 CFU/ 孔袁不同浓度细胞松弛素 D 预处理 A549 细胞后的侵袭数与对照组渊 胞松弛素 D 浓度 为 0 滋/ml 定较有显著差异渊<0.001 9 遥细胞松弛素 D 可明显减低 S.pn 对 A549 的侵袭式而且其浓度增加 至 0.25 滋/ml 时表未得到可测的侵袭数表提示 F-actin 细胞骨架重排可导致 S.pn 侵袭 A549 细胞遥 2.3 S.pn 触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排钙信 号转导机制

2.3.1 Ca<sup>2+</sup> 抑制剂 dantrolene 对 F-actin 重排的抑制作

用 分别用 0尧0尧5尧0 和 100 滋nol/L dantrolene 预 处理 A549衰-actin 的重排百分率 渊 冤分别为 100尧 75.77 依.76尧0.21依.05尧1.57依.13 和 15.21依.74表下同 浓度 Ca<sup>2+</sup> 抑制剂 dantrolene 预处理 A549 细胞后的 F-actin 的重排百分率与对照组 渊antrolene 浓度为 0 滋nol/L冤比较有显著差异渊<0.001冤子-actin 细胞骨 架重排与信号转导抑制剂 dantrolene 间存在剂量依 赖关系遥图 3 显示用 Ca<sup>2+</sup>抑制剂 dantrolene 预处理 A549 细胞后衰在荧光显微镜下 F-actin 细胞骨架重排 被部分抑制 图 4 显示 DMSO 对重排无影响遥



图 3 Dantrolene 预处理后 F-actin 聚集被部分抑制源放大倍数) 200 第 Fig.3 F-actin aggregation partly inhibited by 25 滋nol/L dantrolene) 郑riginal magnification: 伊00 冤 图 4 DMSO 作用 A549 细胞后 F-actin 不发生聚集源版大倍数) 200 第 Fig.4 F-actin without aggregation after DMSO treatment of A549 cells 渊riginal magnification: 伊00 冤

2.3.2 Fura-2/AM 标准液和负载后 A549 细胞悬液扫 描 Fura-2/AM 标准液和负载后 A549 细胞悬液的激发 波长分别为 375 和 350 nm蒙射波长为 485 和 485 nm遥 2.3.3 对照 549 细胞[Ca<sup>2+</sup>]; 细胞外[Ca<sup>2+</sup>]; 为 1.3 mmol/L 时衰时照 A549 细胞的胞内[Ca<sup>2+</sup>]; 为渊94.1依7.4冤mol/L 渊=4冤测定液中不含 Ca<sup>2+</sup>并加入 0.1 mmol/L EGTA 时衰 549 细胞的胞内[Ca<sup>2+</sup>]; 为渊66.6 依0.8冤nmol/L 渊=4冤定者比较无显著意义遥

2.3.4 S.pn 作用于 A549 细胞后胞内[Ca<sup>2+</sup>]; 测定 S.pn 粘附 A549 细胞 30充0充0 min 后的胞内 [Ca<sup>2+</sup>]; 高于 对照[渊87.4依7.3 nmol/L冤 <0.001]并达到饱和表分别 为渊87.5依8.1冤 348.2依5.6冤 367.2依7.5 S mol/L遥

3 讨论

病原菌侵袭宿主细胞是传染过程建立的重要环 节之一袁病原菌通常借助宿主细胞 F-actin 细胞骨架 的高度可塑性及其运动功能而侵袭细胞<sup>嚼</sup> 研究 S.pn 是否通过 F-actin 细胞骨架侵袭宿主细胞及其信号转 导机制衰寸于阐明其致病机制有重要意义遥 3.1 S.pn 触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排及

F-actin 细胞骨架重排在 S.pn 侵袭 A549 细胞中的作用

本研究证实完整的 S.pn 可触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排袁这与文献所报道的关于革兰 氏阴性病原菌作用于宿主细胞后的结果有类似之处袁 也是到目前为止袁首次描述 S.pn 触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排的形态学特征遥为进一步研究 F-actin 细胞骨架重排在 S.pn 侵袭 A549 细胞中的作 用衰1们用不同浓度的细胞松弛素 D 预处理 A549 细 胞觀察侵袭数的变化表现随抑制剂浓度增大表袭 数明显降低表并在浓度为 0.25 滋/ml 时表得到可测 的侵袭数袁提示 F-actin 细胞骨架重排在 S.pn 侵袭 A549 细胞中起着非常重要的作用表可直接影响 S.pn 侵袭 A549 细胞遥

3.2 S.pn 触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排的钙 信号转导机制

目前为止袁献中尚无关于 S.pn 可触发 A549 细 胞 F-actin 细胞骨架重排机制的报道遥我们通过研究 发现 S.pn 可通过钙信号转导途径触发 A549 细胞 F-actin 细胞骨架重排囊-actin 细胞骨架重排百分率 与该抑制剂间存在剂量依赖关系袁\_者变化呈高度负 相关袁相关系数为 r=-0.86遥S.pn 作用于 A549 细胞可 引起胞内[Ca2+]; 的变化袁.pn 粘附 A549 细胞 30尧0尧 90 min 后胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sup>i</sup>均比对照组约高3倍载由此提示 S.pn 粘附 A549 细胞可使胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 增加衰-actin 细 胞骨架发生重排是由 S.pn 粘附 A549 细胞后触发钙 信号转导途径引起的遥其最可能的机制为院.pn 粘附 A549 细胞 装 胞内 [Ca2+]; 增加 式 Ca2+ 可影响多种 F-actin 结合蛋白活性<sup>喻意题</sup>.pn 很可能通过钙信号转 导使多种 F-actin 结合蛋白活性发生变化袁活性变化 大小与 F-actin 细胞骨架重排百分率成比例袁但有关 S.pn 通过 Ca<sup>2+</sup> 信号转导途径引起与 F-actin 细胞骨架 重排相关的 A549 细胞是何种蛋白的变化 我及其与 A549 细胞内 Ca2+ 振荡的调节或相关关系还有待进 一步研究遥

**浙**转 176 页冤

原始序列的大量信息<sup>喇-12</sup> 遥本研究中衰采用 IUAC 正则表达式的方法表示调控元件模块衰在较大程度上放宽对保守片段之间距离的情况下衰毁索结果中假阳性的出现仍然较少衰误示该方法的特异性可能较高遥

对于上述两种方法获得的序列表明进行转录因子 位置权重矩阵的评估遥从结果上看袁许多序列含有 RFX 及 NFY 转录因子结合位点式的明在进行过程中 反应元件有相当的保守性遥

#### 参考文献院

- 咱暂 Davidson EH, Rast JP, Oliveri P, et al. A genomic regulatory network for development咱暂Science, 2002, 295(5560): 1669-78.
- 咱暂 Berman BP, Nibu Y, Pfeiffer BD, et al. Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the Drosophila genome 咱暂 Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(2): 757-62.
- 咱暂 Ghosh D. Object-oriented transcription factors database (ooTFD) 咱暂

Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 308-10.

- 咱暂 Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences咱暂J Mol Biol, 1981, 147: 195-7.
- 咱暂 Wingender E, Dietze P, Karas H, et al. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites咱暂 Nucleic Acids Res, 1996, 24(1): 238-41.
- 喻暂 Quandt K, Frech K, Karas H, et al. MatInd and MatInspector要New fast and sensitive tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data 咱暂 Nucleic Acids Res, 1995, 23(23): 4878-84.
- 咱暂 van-den Elsen PJ, Peijnenburg A, van Eggermond MC, et al. Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and class II genes咱暂Immunol Today, 1998, 19(7): 308-12.
- **咱**暂 van Helden J, Rios AF, Collado-Vides J. Discovering regulatory elements in non-coding sequences by analysis of spaced dyads **咱**暂 Nucleic Acids Res, 2000, 28(8): 1808-18.
- 响暂 Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, et al. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach 咱暂 Cancer, 1996, 77(8 Suppl): 1620-7.
- 咱0暂Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, et al. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons咱暂Science, 2000, 288(5463): 136-140.
- 咱1暂Gottgens B, Barton LM, Gilbert JG, et al. Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers咱暂Nat Biotechnol, 2000, 18(2): 181-6.
- 响2暂Rebeiz M, Reeves NL, Posakony JW. SCORE: a computational approach to the identification of cis-regulatory modules and target genes in whole-genome sequence data. Site clustering over random expectation哺暂Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(15): 9888-93.
- 咱3暂Pennacchio LA, Rubin EM. Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences 咱暂Nat Rev Genet, 2001, 2(2): 100-9.

## **洮**接 171 页冤

#### 参考文献院

- 咱暂 Gillespie SH. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination 咱暂 J Med Microbiol, 1989, 28(9): 237-48.
- 咱暂 Dytoc M, Fedorko L, Sherman PM. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing Escherichia coli in vitro咱暂Gastroenterology, 1999, 106(21): 1150-61.
- 咱暂 Philpott DJ, Ismaili A, Dytoc MT. Increased adherence of Escherichia coli RDEC-1 to human tissue culture cells results in the activation of host signaling pathways 咱暂 J Infect Dis, 1995, 172 (13): 136-43.
- 咱暂 Lacks SA. Study of genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus 咱暂Biochem Biophys Acta, 1960, 39(7): 508-17.
- 咱暂 Peiffer I, Servin AL, Bernet-Camard MF. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) by the diffusely adhering strain Escherichia coli C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human

intestinal INT407 cells咱暂Infect Immun, 1998, 66(9): 4036-42.

- 喻暂 Paton JC. Molecular analysis of the pathogenicity of streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins n虧Annu Rev Microbiol, 1993, 47(22): 89-115.
- 咱暂 刘振伟. 用 Fura-2 测定缺氧时海马细胞内游离钙离子浓度的变化 194, 16(3): 141-3.
- **喀**暂 Dana JP, Ismaili A, Dytoc MT, et al. Increased adherence of Escherichia coli RDEC-1 to human tissue culture cells results in the activation of host signaling pathways 咱暂 J Infect Dis, 1998, 172 (1): 136-43.
- 咱暂 Mitchell TJ. Celluar microbiology: an integrated approach to understanding pathogenesis of infection咱暂J Cell Sci, 2000, 113(pt19): 3355-6.
- 咱0暂杨建一. 医学细胞生物学鸣1暂北京:人民卫生出版社, 2000. 127-48.
- 咱1暂Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell function by bacterial pathogens咱暂Science, 1997, 276(5313): 718-25.