

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002046

Beclin-1、P62、LC3B 在肺炎链球菌感染小鼠肺部中的表达变化

陈晓丽, 幸 宇, 廖礼超, 张文芳, 张知博, 邓世雄

(重庆医科大学基础医学院法医学与生物医学信息研究室、法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨自噬相关蛋白 Beclin-1、P62 及微管相关蛋白轻链 3B(microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B) 在肺炎链球菌感染小鼠肺部中的表达及意义。**方法:**生长至对数生长期的肺炎链球菌标准株 D39 用无菌 PBS 调节浓度为 1.5×10^9 CFU/mL, 采用鼻滴的方法对 50 只 SPF 级雌性 Balb/c 鼠(6~8 周, 16~20 g)进行处理, 分别在感染后 0、6、12、24、48 h 收集 Balb/c 小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及肺组织, 瑞氏-吉姆萨染色进行 BALF 细胞计数, HE 染色观察肺组织病理学改变, Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin-1、P62、LC3B 在肺组织中的表达水平, 免疫荧光观察 LC3B 在肺组织中的表达情况。**结果:**HE 染色显示, 小鼠鼻饲肺炎链球菌后 12 h 及 24 h 后肺组织内出现大量炎症细胞浸润。BALF 中总细胞数量及中性粒细胞数量于感染后 6 h 开始增高[(1.280 ± 0.506) vs. (6.272 ± 1.312), $P=0.000$; (0.000 ± 0.000) vs. (3.456 ± 1.308), $P=0.000$], 在 12 h 时达到高峰[(1.280 ± 0.506) vs. (19.456 ± 0.997), $P=0.000$; (0.000 ± 0.000) vs. (15.040 ± 1.012), $P=0.000$], 48 h 后基本恢复正常水平[(1.280 ± 0.506) vs. (3.520 ± 0.933), $P=0.005$; (0.000 ± 0.000) vs. (0.128 ± 0.175), $P=0.835$]。Western blot 结果显示:自噬相关蛋白 Beclin-1 于感染后 6 h 开始增加[(0.626 ± 0.078) vs. (0.921 ± 0.093), $P=0.002$], 48 h 时达到最高水平[(0.626 ± 0.078) vs. (1.884 ± 0.158), $P=0.000$];自噬相关蛋白 P62 于感染后 6 h 开始减少[(2.915 ± 0.094) vs. (2.275 ± 0.269), $P=0.000$], 48 h 时降低至最低水平[(2.915 ± 0.094) vs. (1.178 ± 0.142), $P=0.000$];自噬相关蛋白 LC3B 于感染后 12 h 开始升高[(0.747 ± 0.197) vs. (1.429 ± 0.318), $P=0.006$], 24 h 时达到高峰[(0.747 ± 0.197) vs. (2.002 ± 0.451), $P=0.000$], 48 h 后降低[(0.747 ± 0.197) vs. (1.563 ± 0.501), $P=0.002$]。免疫荧光显示:小鼠感染后 12 h 与 24 h, 肺组织中 LC3B 蛋白表达水平增加。**结论:**肺炎链球菌感染小鼠肺部后激活自噬的发生, 且自噬在免疫调节过程中发挥着重要作用。

【关键词】自噬;肺炎链球菌肺炎;Beclin-1;P62;微管相关蛋白轻链 3B**【中图分类号】**R563.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-02-27

Changes in the expression of Beclin-1, P62, and LC3B in the lungs of mice infected with *Streptococcus pneumoniae*

Chen Xiaoli, Xing Yu, Liao Lichao, Zhang Wenfang, Zhang Zhibo, Deng Shixiong

(Laboratory of Forensic Medicine and Biomedical Information, Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of autophagy-related proteins, Beclin-1, P62, and microtubule-associated protein light chain 3B(LC3B), in the lungs of mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. **Methods:** A standard strain of *Streptococcus pneumoniae* (D39) in the logarithmic growth phase was adjusted to a concentration of 1.5×10^9 CFU/mL by sterilized phosphate-buffered saline; then the resulting solution was administered to 50 specific pathogen-free female Balb/c mice aged 6–8 weeks and with a weight of 16–20 g by intranasal instillation. The bronchoalveolar lavage fluid(BALF) and lung tissues of the Balb/c mice were collected at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h after infection. Cells in the BALF were counted after Wright-Giemsa staining; pathological changes in the lung tissues were evaluated after hematoxylin-eosin(HE) staining. Western blot was used to determine the expression levels of autophagy related proteins Beclin-1, P62, and LC3B in the lung tissues. Immunofluorescence assay was employed to observe

the expression of LC3B in the lung tissues. **Results:** HE staining showed massive inflammatory cell infiltration in the lung tissues of the mice at 12 h and 24 h after intranasal instillation of *Streptococcus pneumoniae*. The total cell count and neutrophil count in the BALF increased significantly at 6 h after infection

作者介绍:陈晓丽, Email: chenxiaoli1992@163.com,

研究方向:法医学病理学。

通信作者:邓世雄, Email: dengshixiong1963@163.com。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190402.0900.004.html>

(2019-04-03)

(6.272 ± 1.312 and 3.456 ± 1.308 , respectively, both $P=0.000$), reached a peak at 12 h (19.456 ± 0.997 and 15.040 ± 1.012 , respectively, both $P=0.000$), and decreased to a normal level at 48 h (3.520 ± 0.933 and 0.128 ± 0.175 , $P=0.005$ and 0.835 , respectively), as compared with the baseline levels of 1.280 ± 0.506 and 0.000 ± 0.000 , respectively. Western blot results showed that the autophagy-related protein Beclin-1 increased from 6 h after infection (0.921 ± 0.093 , $P=0.002$) and reached a peak at 48 h (1.884 ± 0.158 , $P=0.000$) compared with the baseline level of 0.626 ± 0.078 ; the autophagy-related protein P62 decreased from 6 h after infection (2.275 ± 0.269 , $P=0.000$) and decreased to a trough level at 48 h (1.178 ± 0.142 , $P=0.000$) compared with the baseline level of 2.915 ± 0.094 ; the autophagy-related protein LC3B increased from 12 h after infection (1.429 ± 0.318 , $P=0.006$), reached a peak at 24 h (2.002 ± 0.451 , $P=0.000$), and decreased after 48 h (1.563 ± 0.501 , $P=0.002$), as compared with the baseline level of 0.747 ± 0.197 . Immunofluorescence assay showed that the expression of LC3B protein increased at 12 h and 24 h after infection. **Conclusion:** After infecting the lungs of mice, *Streptococcus pneumoniae* activates autophagy, which plays an important role in the immune modulation in mice.

【Key words】autophagy; *Streptococcus pneumoniae*; Beclin-1; P62; microtubule-associated protein 1 light chain 3B

肺炎链球菌是社区获得性肺炎的常见致病菌,可适应人体环境并寄宿于健康人体的上呼吸道^[1]。肺炎链球菌易侵袭婴幼儿、老年人及免疫功能缺陷者,引起细菌性肺炎、菌血症、脑膜炎等相关疾病^[2]。肺炎链球菌所致疾病是儿童死亡的主要原因,在儿童死因中占 11%,全球每年约 80 万小于 5 岁的儿童死于肺炎链球菌所致感染^[3]。肺炎链球菌疾病是宿主与细菌相互作用的结果,最终导致细胞和组织损伤,甚至宿主死亡^[4]。自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损细胞器及蛋白质,并维持细胞内环境稳定的过程,被分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬^[5]。自噬在应激反应、神经退行性疾病、癌症、衰老及炎症中发挥着一定的作用^[6]。研究显示,肺炎链球菌感染细胞模型中存在细胞自噬现象,其具体机制尚不完全清楚^[7]。本研究采用鼻饲 D39 肺炎链球菌建立小鼠肺炎链球菌肺部感染模型,探讨自噬相关蛋白 Beclin-1、P62 和微管相关蛋白轻链 3B(microtubule-associated protein light chain 3B,LC3B) 是否参与肺炎链球菌感染小鼠肺部过程,以进一步阐释肺炎链球菌肺炎过程中自噬的调控机制,为肺炎链球菌肺炎的防治提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

肺炎链球菌标准株 D39 由重庆医科大学医学检验、临床检验诊断学教育部重点实验室惠赠。肺炎链球菌标准株 D39 于 TSB 液体培养基 37 ℃、5%CO₂ 恒温环境中生长至对数生长期,3 500 r/min 离心 10 min,无菌 PBS 洗涤 2 次,调节菌液

浓度至 1.5×10^9 CFU/mL。

1.2 实验动物

重庆医科大学动物中心健康成年清洁级雌性 Balb/c 小鼠 50 只(6~8 周龄,18~20 g),动物许可证号[SYXK(渝)2017-0023]。饲养环境为 SPF 级动物寄养室,饲养温度为(22 ± 2) ℃,相对湿度(55 ± 10)%,12 h 光照,自由饮水进食。

1.3 主要的试剂

Anti-LC3A/B(Western Blot)、Anti-p62 购自万类生物;Anti-Beclin-1 购自 Santa Cruz 公司;Anti-LC3B(免疫荧光)购自 Cell Signaling 公司;Anti-β-actin 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 实验动物分组及处理

50 只 SPF 级雌性 Balb/c 麻醉状态下鼻腔滴注浓度为 1.5×10^9 CFU/mL 的肺炎链球菌 D39 20 μL,于感染后 0、6、12、24、48 h 5 个时间点各随机抽取小鼠 10 只,麻醉状态下,用 1 mL 无菌 PBS 液进行支气管肺泡灌洗(回抽率>80%),提取支气管肺泡灌洗液(BALF),每个时间点 5 只;另外 5 只取出左肺上叶-80 ℃冻存,右肺上叶及右肺下叶固定在 4%甲醛溶液中。

1.5 肺组织病理检查

右肺上叶于 4%多聚甲醛溶液中固定 48 h,梯度乙醇脱水后常规石蜡包埋,切片,HE 染色后光学显微镜下观察。参照文献方法^[8]对肺组织炎症浸润程度进行评分。

1.6 BALF 细胞计数

BALF 用 4 ℃离心机 3 500 r/min 离心 10 min,取沉淀,用 500 μL 无菌 PBS 混匀,进行细胞涂片及瑞氏-吉姆萨染色,在光学显微镜下进行总细胞及中性粒细胞计数。

1.7 Western blot 免疫印迹法检测自噬相关蛋白 Beclin-1、P62、LC3B 的表达

常规提取左肺上叶总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,以 50 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转膜 0.5~1 h,5%脱脂奶粉 37 ℃恒温摇床封闭 2 h;一抗 4 ℃孵育过夜;1%TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,二抗 37 ℃恒温摇床孵育 2 h,1%TBST 洗

膜 3 次,每次 5 min,ECL 化学发光试剂盒显色。使用图像分析软件 ImageQuantTL 对光密度进行分析,最终结果以 Beclin-1、P62、LC3B 和内参 β -actin 的光密度比值表示。

1.8 免疫荧光法检测 LC3B

小鼠右下肺组织经 4%多聚甲醛固定,10%、20%、30%蔗糖溶液梯度脱水,冰冻切片机切片。PBS 溶液清洗 3 次,每次 10 min,荧光封闭液 37 °C 恒温箱封闭 30 min;加入一抗工作液于 4 °C 过夜,用 PBS 溶液代替一抗工作液设立阴性对照;37 °C 恒温箱复温 1 h,PBS 溶液清洗 3 次,每次 10 min;加入二抗 37 °C 恒温箱孵育 1 h,PBS 溶液清洗 3 次,每次 10 min;DAPI 染色 5 min,PBS 清洗 3 次,每次 10 min。使用荧光显微镜观察 LC3B 荧光变化。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

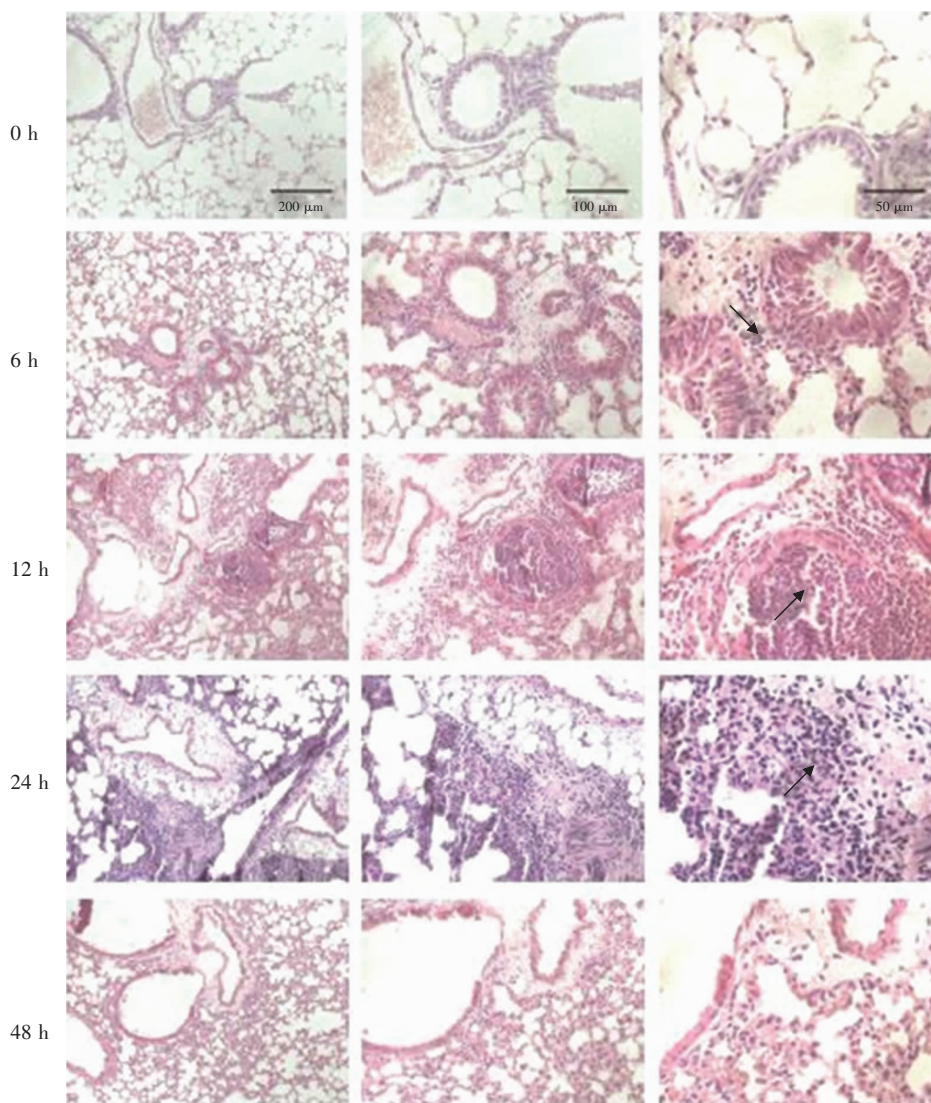
2 结果

2.1 肺组织病理检查

鼻腔滴注 1.5×10^9 CFU/mL 的肺炎链球菌 D39 20 μ L 6 h 后,小鼠血管周围、支气管、细支气管周围出现炎症细胞浸润。随着时间的推移,炎症细胞浸润加重,肺泡间隔增厚,肺泡结构破坏,血管壁增厚(图 1)。其肺组织炎症浸润程度评分如图 2 所示。

2.2 BALF 中总细胞及中性粒细胞计数

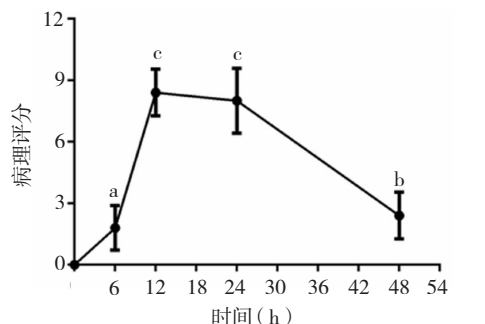
正常小鼠 BALF 中,主要以单核细胞为主。肺炎链球菌感染小鼠 6 h 后,BALF 中总细胞数量及中性粒细胞数量开始增高[(1.280 ± 0.506) vs. (6.272 ± 1.312), $P=0.000$; (0.000 ± 0.000) vs. (3.456 ± 1.308), $P=0.000$],在 12 h 时达到高峰[(1.280 ± 0.506) vs. (19.456 ± 0.997), $P=0.000$; (0.000 ± 0.000) vs. (15.040 ± 1.012), $P=0.000$],48 h 后基本恢复正常水平



注:↗, 炎症细胞浸润

图 1 小鼠鼻腔滴注浓度为 1.5×10^9 CFU/mL D39 20 μ L 后不同时间点肺组织病理切片

[(1.280 ± 0.506) vs. (3.520 ± 0.933), $P=0.005$; (0.000 ± 0.000) vs. (0.128 ± 0.175), $P=0.835$]; 如图 3 所示。



a: 与 0 h 组比较, $P<0.05$; b: 与 0 h 组比较, $P<0.01$; c: 与 0 h 比较, $P<0.001$

图 2 小鼠鼻腔滴注浓度为 1.5×10^9 CFU/mL D39 20 μ L 后不同时间点肺组织病理评分 ($n=5$)

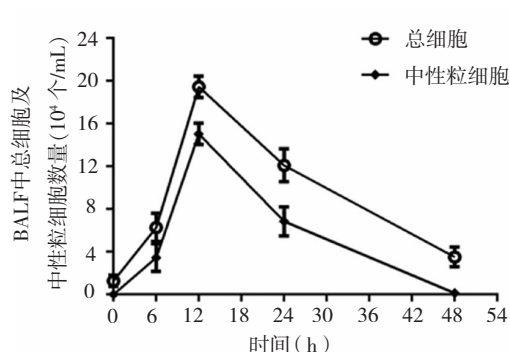


图 3 小鼠鼻腔滴注浓度为 1.5×10^9 CFU/mL D39 20 μ L 后不同时间点支气管肺泡灌洗液中总细胞及中性粒细胞计数情况 ($n=5$)

2.4 肺组织中 Beclin-1、P62 及 LC3B 蛋白表达水平的变化

Western blot 结果显示,肺炎链球菌感染小鼠后,肺组织中 Beclin-1 蛋白逐渐增高,感染后 48 h 仍处于较高水平 [(0.626 ± 0.078) vs. (1.884 ± 0.158), $P=0.000$]; 肺组织中 P62 蛋白于感染后 6 h 降低 [(2.915 ± 0.094) vs. (2.275 ± 0.269), $P=0.000$], 感染后 12 h 较感染后 0 h 组明显降低 [(2.915 ± 0.094) vs. (1.564 ± 0.228), $P=0.000$], 至 48 h 仍处于较低水平 [(2.915 ± 0.094) vs. (1.178 ± 0.142), $P=0.000$]; 肺组织中 LC3B 蛋白于感染后 12 h 增高 [(0.197 ± 0.088) vs. (1.429 ± 0.318), $P=0.006$], 至 24 h 达到高峰 [(0.747 ± 0.197) vs. (2.002 ± 0.451), $P=0.000$], 48 h 时较 24 h 有所降低, 但仍高于 0 h 时水平 [(0.747 ± 0.197) vs. (1.563 ± 0.501), $P=0.002$]; 如图 4、图 5 所示。

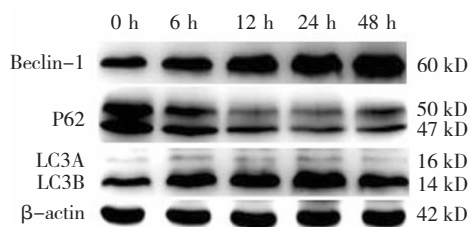
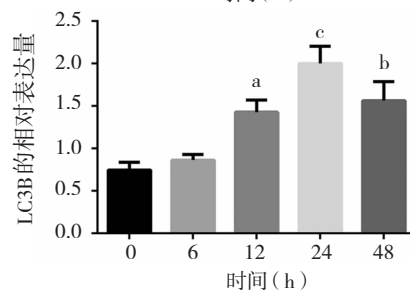
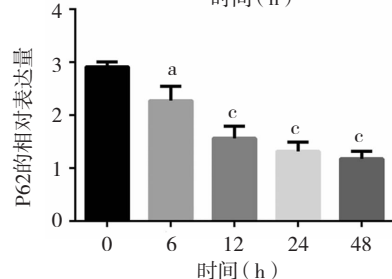
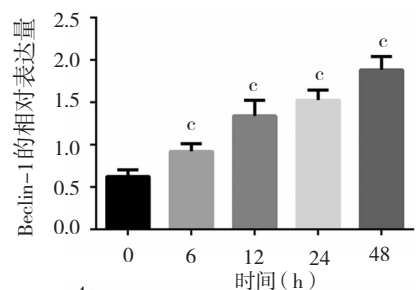


图 4 Western blot 检测不同时间点小鼠肺组织中 Beclin-1、P62、LC3B 蛋白的表达



a: 与 0 h 组比较, $P<0.05$; b: 与 0 h 组比较, $P<0.01$; c: 与 0 h 比较, $P<0.001$

图 5 小鼠鼻腔滴注浓度为 1.5×10^9 CFU/mL D39 20 μ L 后不同时间点小鼠肺组织中 Beclin-1、P62、LC3B 蛋白的表达 ($n=5$)

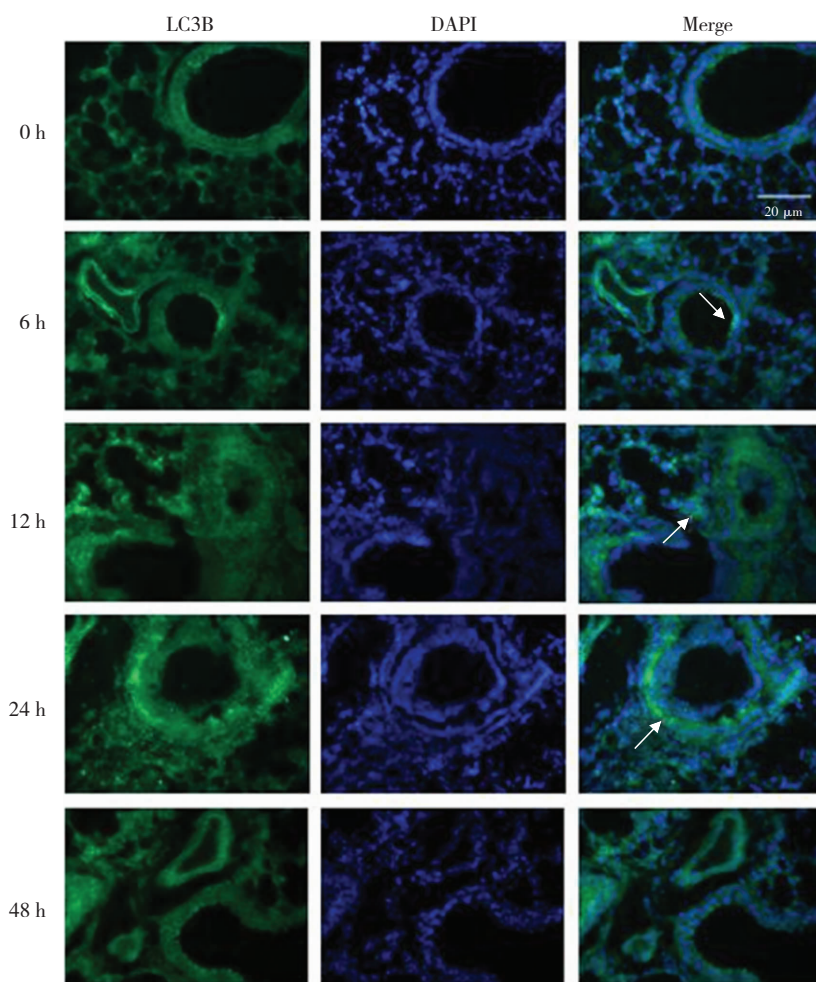
2.5 免疫荧光法观察 LC3B 的表达

LC3B 在肺炎链球菌感染小鼠肺部后各个时间点均有表达,其中 12 h 与 24 h 较 0 h 比较,LC3B 的荧光信号明显增强,自噬细胞的数量增多 [(3.333 ± 1.528)% vs. (27.667 ± 6.658)%, $P=0.000$; (3.333 ± 1.528)% vs. (35.000 ± 2.000)%, $P=0.000$]; 如图 6、图 7 所示。

3 讨论

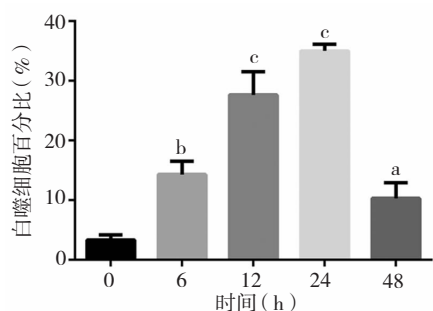
肺炎链球菌是呼吸道内的常驻菌,在机体抵抗力下降时,特别是婴幼儿及年老体弱者,细菌更易侵袭致病,且预后大多不良^[2]。肺炎链球菌是儿童呼吸道感染的常见致病菌,在全球小于 5 岁儿童中具有很高的致病率和致死率^[3]。近年来因肺炎链球菌的耐药性逐渐增加、个体抵抗力低及诊治不及时等原因,最终引起的死亡成为目前医疗纠纷的案例之一。研究肺炎链球菌感染小鼠肺部模型,可为临床肺炎疾病的防治与法医学鉴定的病理诊断提供实验依据。

肺炎链球菌可经呼吸进入下呼吸道,引起肺炎



注: /, LC3B 荧光信号增强

图 6 免疫荧光观察不同时间点小鼠肺组织中 LC3B 蛋白的表达 (400 ×)



a: 与 0 h 组比较, $P < 0.05$; b: 与 0 h 组比较, $P < 0.01$;
c: 与 0 h 比较, $P < 0.001$

图 7 不同时间点自噬细胞百分比 ($n=3$)

或中耳炎,也可经上皮细胞引起局部感染或菌血症^[9]。本实验建立肺炎链球菌感染小鼠肺部模型,结果显示,肺组织及 BALF 中出现大量炎症细胞浸润,其中以中性粒细胞为主,提示小鼠肺部出现炎症反应,与 Gomez 等^[10]肺炎链球菌感染小鼠肺部模型研究结果一致。当细菌入侵机体呼吸道,机体可通过不同途径清除入侵的病原菌,呼吸道上皮细胞与肺泡巨噬

细胞分别可以通过纤毛运动、分泌黏液和吞噬作用清除部分病原菌,并在协同作用下合成趋化因子及其他细胞因子激活中性粒细胞,使中性粒细胞向感染部位聚集^[9-12]。本实验发现,在感染后 12 h 与 24 h,肺泡间隔增厚,肺泡结构破坏,血管壁明显增厚,支气管、细支气管管腔内大量炎症细胞聚集,其中以中性粒细胞为主,提示在此期间,肺部炎症浸润最明显,中性粒细胞在清除肺炎链球菌过程中发挥着重要作用。

最近研究发现,真核细胞的自噬体具有清除病原微生物的功能,是上皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞清除病原微生物的机制之一,参与炎症的发生并在炎症反应过程中具有重要作用^[13-15]。自噬是一种保守的细胞内降解途径,可通过双层膜将自身受损细胞器、蛋白质以及入侵病原菌包裹运输至溶酶体降解,维持细胞内环境稳定,包括自噬双层膜的形成、自噬体的形成、自噬体的运输与融合以及自噬体的降解 4 个阶段^[16-17]。细胞吞噬细菌后,一方面,自噬

相关蛋白可促进包裹细菌的吞噬体与溶酶体结合,另一方面,自噬相关蛋白可捕获细胞内游离的细菌形成自噬体,并运输至溶酶体与溶酶体结合^[18]。

Beclin-1 属于自噬相关蛋白家族,与Ⅲ类磷脂酰肌醇 3 激酶(Class Ⅲ PI3K)相结合构成自噬双层膜,并作为信号分子促进其他自噬相关蛋白的聚集,是参与调节自噬形成起始阶段的关键蛋白^[19-21]。P62 是自噬相关蛋白之一,在自噬形成过程中,P62 作为底物不断被消耗,因而 P62 是反映自噬活性的关键蛋白^[22]。LC3B 是自噬特异性蛋白参与并调节自噬体的形成,是反映自噬活性的标志性蛋白^[23]。本研究通过鼻腔滴注肺炎链球菌,建立肺炎链球菌感染小鼠肺部模型,结果显示,在感染后 12、24 及 48 h 肺组织中自噬相关蛋白 Beclin-1 及 LC3B 的表达明显升高,P62 的表达明显降低,与 Li^[13]和 Ullah^[24]等结果一致,提示肺炎链球菌可激活小鼠肺组织发生自噬,自噬活动在感染后 12~48 h 期间最明显。相关研究表明,肺炎链球菌可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路从而激活 A549 细胞发生自噬,而通过药物抑制自噬后,细胞对细菌的清除减少,提示自噬活动能增强细胞对病原菌的清除^[13]。

综上所述,肺炎链球菌感染小鼠肺部后,可激活肺部发生自噬,而自噬的激活可能促进机体对细菌的清除,从而改善肺组织的损伤。而自噬在肺炎链球菌肺炎中具体的作用机制如何,需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia[J]. *Lancet*, 2009, 374(9700): 1543-1556.
- [2] Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease[J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4(3): 144-154.
- [3] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates[J]. *Lancet*, 2009, 374(9693): 893-902.
- [4] Hirst RA, Kadioglu A, O'callaghan C, et al. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(2): 195-201.
- [5] Czaja MJ, Ding WX, Donohue TM Jr, et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver[J]. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1131-1158.
- [6] Nighot P, Ma T. Role of autophagy in the regulation of epithelial cell junctions[J]. *Tissue Barriers*, 2016, 4(3): e1171284.
- [7] Ogawa M, Matsuda R, Takada N, et al. Molecular mechanisms of Streptococcus pneumoniae-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1-mediated K63-linked ubiquitination[J]. *Cell Microbiol*, 2018, 20(8): e12846.
- [8] Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, et al. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(3): 912-922.
- [9] Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution[J]. *Chest*, 2012, 142(2): 482-491.
- [10] Gomez JC, Dang H, Martin JR, et al. Nrf2 Modulates Host Defense during Streptococcus pneumoniae Pneumonia in Mice[J]. *J Immunol*, 2016, 197(7): 2864-2879.
- [11] Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens[J]. *Eur Respir J*, 2004, 23(2): 327-333.
- [12] Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, et al. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(2): 395-405.
- [13] Li P, Shi J, He Q, et al. Streptococcus pneumoniae induces autophagy through the inhibition of the PI3K-I/Akt/mTOR pathway and ROS hypergeneration in A549 cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122753.
- [14] Yuan K, Huang C, Fox J, et al. Autophagy plays an essential role in the clearance of Pseudomonas aeruginosa by alveolar macrophages[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 2): 507-515.
- [15] Chargui A, Cesaro A, Mimouna S, et al. Subversion of autophagy in adherent invasive Escherichia coli-infected neutrophils induces inflammation and cell death[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51727.
- [16] Zhou XJ, Zhang H. Autophagy in immunity: Implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory diseases[J]. *Autophagy*, 2012, 8(9): 1286-1299.
- [17] Cui J, Jin S, Wang RF. The BECN1-USP19 axis plays a role in the crosstalk between autophagy and antiviral immune responses[J]. *Autophagy*, 2016, 12(7): 1210-1211.
- [18] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 323-335.
- [19] Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin1 complexes[J]. *Biochimie*, 2008, 90(2): 313-323.
- [20] Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, et al. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond[J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 6-17.
- [21] Au AK, Aneja RK, Bayir H, et al. Autophagy Biomarkers Beclin 1 and p62 are Increased in Cerebrospinal Fluid after Traumatic Brain Injury[J]. *Neurocrit Care*, 2017, 26(3): 348-355.
- [22] Schmitz KJ, Ademi C, Bertram S, et al. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status[J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1): 189.
- [23] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 445-544.
- [24] Ullah I, Ritchie ND, Evans TJ. The interrelationship between phagocytosis, autophagy and formation of neutrophil extracellular traps following infection of human neutrophils by Streptococcus pneumoniae[J]. *Innate Immun*, 2017, 23(5): 413-423.

(责任编辑:唐秋姗)