DOI:10.16016/j.2097-0927.202304046

牛磺熊去氧胆酸通过抑制内质网应激诱导的凋亡促进类鼻疽菌的清除

赵光强[1],南栋琪[2],袁思琪[2],饶承龙[2],邢贞泉[1],王 彬[1],方 瑶[3],毛旭虎[2,4],李 倩[2,4] 572022 海南 三亚,三亚市人民医院(四川大学华西三亚医院)呼吸内科[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室[2],创伤与化学中毒全国重点实验室[4];430070 武汉,解放军中部战区总医院呼吸与危重症医学科[3]

[**摘要**] **目的** 拟通过类鼻疽菌感染 RAW264.7 巨噬细胞模型,探讨牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid,TUDCA)促进类鼻疽菌胞内清除的作用机制。**方法** 类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞后 8 h,设置未感染组和类鼻疽菌感染组,在不同浓度 TUDCA 处理条件下,采用流式细胞仪检测类鼻疽菌诱导细胞凋亡的情况;同时使用另外一种内质网应激抑制剂 4-PBA,通过 Annexin-V/PI 双染法和 MTT 细胞增殖实验分别检测类鼻疽菌感染对宿主细胞凋亡和增殖的影响;进一步使用 siRNA 干扰内质网应激关键基因 CHOP,设置 siC 对照组和 siCHOP 干扰组,通过 Western blot 和流式细胞仪检测类鼻疽菌感染后 Caspase-3、Caspase-12 等细胞凋亡相关蛋白的表达水平及细胞凋亡情况;通过细菌胞内生存实验分析 TUDCA 通过抑制内质网应激减少其诱导的细胞凋亡、增强巨噬细胞对类鼻疽菌胞内清除作用的机制。**结果** 在不同浓度 TUDCA 处理下,100 μmol/L 或 200 μmol/L TUDCA 可明显减少类鼻疽菌感染诱导的 RAW264.7 细胞凋亡数量($P<0.05$)。分别使用两种内质网应激抑制剂 TUDCA 和 4-PBA 均可降低类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡($P<0.05$)。在 siC 对照组,相较于未感染时类鼻疽菌感染后 Caspase-3 和 Caspase-12 表达明显增加。在 siCHOP 干扰组,细胞凋亡相关蛋白的表达显著低于 siC 对照组,TUDCA 处理后细胞凋亡相关蛋白表达水平与未加 TUDCA 药物相比无明显差异。流式细胞仪检测结果也显示,TUDCA 能够减少类鼻疽菌感染后诱导的细胞凋亡($P<0.05$),但在 siCHOP 干扰组中,TUDCA 对类鼻疽菌感染诱导的凋亡无明显改变。细菌胞内生存计数结果显示,在 siC 对照组加入 TUDCA 能够增加宿主细胞对类鼻疽菌的清除($P<0.05$),而在 siCHOP 干扰组中 TUDCA 的处理对类鼻疽菌胞内增殖无明显影响。**结论** 在类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞模型中,TUDCA 能够通过抑制巨噬细胞内质网应激诱导的凋亡,促进巨噬细胞对类鼻疽菌的胞内清除。

[**关键词**] 类鼻疽菌;牛磺熊去氧胆酸;内质网应激;细胞凋亡
[**中图法分类号**] R285.5; R329.28; R378.99 [**文献标志码**] A

TUDCA promotes intracellular clearance of *Burkholderia pseudomallei* by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RAW264.7 cells

ZHAO Guangqiang[1], NAN Dongqi[2], YUAN Siqi[2], RAO Chenglong[2], XING Zhenquan[1], WANG Bin[1], FANG Yao[3], MAO Xuhu[2,4], LI Qian[2,4] [1]Department of Respiratory Diseases, Sanya People's Hospital (West China Sanya Hospital, Sichuan University), Sanya, Hainan Province, 572022; [2]Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy and Medical Laboratory, [4]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Department of Respiratory and Critical Care Medicine, General Hospital of Center Theater of PLA, Wuhan, Hubei Province, 430070, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the action mechanism of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) promoting intracellular clearance of *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) in RAW264.7 macrophages. **Methods** After TUDCA of different concentrations were used to treat RAW264.7 cells pre-

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(32270190);海南省自然科学基金面上项目(821MS162)
[**通信作者**] 李 倩,E-mail:liqianjane@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

infected with *B. pseudomallei* for 8 h or not, flow cytometry was applied to detect the apoptosis of the infected and control cells. In addition, another endoplasmic reticulum stress (ERS) inhibitor 4-PBA was used to detect the apoptosis and proliferation of host cells after *B. pseudomallei* infection with Annexin-V/PI double staining and MTT cell proliferation assay. Furthermore, after transfected with CHOP siRNA, Western blotting and flow cytometry were employed to detect the effect of TUDCA on the expression levels of Caspase-3 and Caspase-12 and the changes in apoptotic rate after *B. pseudomallei* infection, respectively. Finally, the effect of TUDCA on intracellular multiplication of infected RAW264.7 cells were observed to estimate the CFU value in the presence and absence of CHOP siRNA. **Results** Under different concentrations of TUDCA, 100 or 200 μmol/L TUDCA significantly reduced *B. pseudomallei*-induced apoptosis in RAW264.7 cells ($P<0.05$). Meanwhile, both TUDCA and 4-PBA treatment could decrease the apoptosis induced by *B. pseudomallei* infection by ERS ($P<0.05$). Further, the expression levels of Caspase-3 and Caspase-12 were obviously increased after *B. pseudomallei* infection compared with uninfected groups, but their expression levels in the siCHOP group was significantly lower than that in the siC group. Besides, flow cytometry also showed that TUDCA could reduce apoptosis induced by *B. pseudomallei* infection ($P<0.05$), but no significant effect of TUDCA on apoptosis was observed under CHOP knockdown. Finally, intracellular CFU assay indicated that TUDCA treatment promoted the host cell clearance of *B. pseudomallei* ($P<0.05$), but no such effect was observed in siCHOP group. **Conclusion** In *B. pseudomallei* infected RAW264.7 cells, TUDCA promotes the intracellular clearance of the bacteria by inhibiting ERS-induced apoptosis.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; tauroursodeoxycholic acid; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (32270190) and the General Program of Natural Science Foundation of Hainan Province (821MS162). Corresponding author: LI Qian, E-mail: liqianjane@163.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*,简称类鼻疽菌)是高致死性热带传染病类鼻疽(melioidosis)的病原菌,随着全球气候的变化、交通的便利、经贸文化交流的频繁,其人群感染发生率逐年增高,估计目前全球年发病数 165 000 例,年病死 89 000 例[1-2]。类鼻疽菌感染可累及身体几乎所有器官和组织,导致急性败血症比例约占 60%,病死率超 30%,慢性感染病程可迁延数年甚至数十年[3]。同时,鉴于类鼻疽菌的高耐药性和无疫苗使用,WHO 将其列为 B 类生物战剂,美国疾病控制与预防中心(CDC)将其归为Ⅰ类病原体[4],加强类鼻疽菌感染防控与临床诊治新策略的研究迫在眉睫[5]。

内质网是真核细胞合成蛋白质、脂质和贮存钙离子的主要细胞器。当细胞内出现内质网腔内错误折叠、未折叠蛋白聚集或钙离子平衡紊乱等状况时,细胞会通过调节内质网功能维持其内环境稳态,从而触发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)[6]。牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid,TUDCA)是熊胆汁的有效成分,由牛磺酸与熊去氧胆酸在肝脏内缩合而成,目前美国 FDA 已批准 TUDCA 用于临床治疗胆囊胆固醇结石、胆管炎、肝硬化等肝脏相关疾病。除此以外,TUDCA 还被报道对流感病毒、心血管疾病、骨关节炎、肾病等疾病具有改善作用[7-9]。最近有研究表明,TUDCA 还可通过抑制 ERS,有效保护肝细胞和恢复葡萄糖稳态,在肥胖、胰岛素抵抗和糖尿病的发病机制中发挥关键作用[10]。本研究以类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞为模型,研究 TUDCA 通过调节巨噬细胞 ERS 诱导的凋亡,促进类鼻疽菌胞内清除的作用及机制,为探索新的类鼻疽有效治疗方案提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞及主要试剂

类鼻疽菌 BPC006 由本实验室鉴定并保存;RAW264.7 细胞保存于本室;胎牛血清、DMEM 培养基、HEPES 培养基、Opti-MEM™ 培养基购买自 Gibco 公司;Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG、RNaseZap™ RNase 去污溶液、TRIzol™ 试剂、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent、SuperSignal™ West Pico PLUS 化学发光底物、Silencer siRNA、Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒购买自 Thermo Fisher 公司;逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购买自 TaKaRa 公司;β-actin、CHOP、Caspase-3、Caspase-12 等蛋白抗体购买自 Invitrogen 公司;PVDF 膜、Cell Counting Slides 购买自 BIO-RAD 公

司;TUDCA 购买自 Solarbio 公司;4-PBA 购买自 Sigma 公司;FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 购买自 BD Biosciences 公司;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购买自 Beyotime 公司。

1.2 Annexin-V/PI 双染法及流式细胞术检测细胞凋亡

设置未感染组、TUDCA(0、20、100、200 μmol/L)处理条件下的类鼻疽菌感染组。感染前各孔加入相应工作浓度的 TUDCA 预处理 RAW264.7 细胞 24 h。挑取已验证的 BPC006 单克隆菌落于 LB 培养基中,200 r/min 摇床培养过夜。次日,加入 BPC006 菌液(感染复数 MOI = 10)共孵育 1 h,弃去培养基,加入 PBS 清洗 3 次,再加入含 250 μg/mL 卡那霉素和相应工作浓度 TUDCA 的 DMEM 完全培养基,继续培养至 8 h 后,加入 800 μL 0.25%胰酶消化后收集细胞,PBS 洗细胞 2 次;加入 1×Binding Buffer 重悬细胞,调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL,取 100 μL 细胞悬液至 1.5 mL EP 管中,每管避光加入 FITC Annexin V 和 Propidium Iodide 各 5 μL,混匀后室温孵育 15 min;各管中加入 400 μL 的 1×Binding Buffer,避光混匀后使用 BD cytoflex 流式细胞仪测定结果。

设置未感染组和类鼻疽菌感染组,分别在 PBS、TUDCA 和 4-PBA 的处理条件下进行实验。感染前根据分组分别加入 PBS 或 100 μmol/L 的 TUDCA 或 250 μmol/L 的 4-PBA 预处理 RAW264.7 细胞 24 h。感染及收样方法同上。

设置 siC 对照组和 siCHOP 干扰组,在 PBS 或 TUDCA 处理条件下进行实验。根据分组使用 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 将 siRNA 转染入 RAW264.7 细胞中,转染过夜后,加入 100 μmol/L TUDCA 处理 RAW264.7 细胞 24 h,感染及收样方法同上。

1.3 MTT 检测细胞增殖

RAW264.7 细胞铺板至 96 孔板,使用 100 μmol/L 的 TUDCA 或 250 μmol/L 的 4-PBA 预处理 24 h,设置感染组和非感染组,感染方式同上。弃培养基,使用 PBS 洗细胞 2 次,每孔加入 10 μL MTT 溶液,混匀后将 96 孔板置于细胞培养箱中孵育 4 h。弃去上清,每孔加入 100 μL Formazan 溶解液,置于摇床上低俗震荡 10 min 至 Formazan 结晶全部溶解,使用酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔光密度值,以反映细胞增殖情况。

1.4 Western blot 实验

设置 siC 对照组和 siCHOP 干扰组,提取各组 RAW264.7 细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,加入 5×SDS 上样 buffer 并调节蛋白浓度一致后加入金属浴加热变性,保存于-20 ℃。取 20 μg 总蛋白样品上样进行 SDS-PAGE 电泳,半干转法将胶上的蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,使用 Bio-Rad 化学发光分子成像仪采集结果。

分别在未感染、类鼻疽菌感染、类鼻疽菌感染加 TUDCA 处理条件下进行实验。根据分组使用 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 将 siRNA 转染入 RAW264.7 细胞中,转染 12 h 后,加入 100 μmol/L TUDCA 处理 RAW264.7 细胞 24 h,类鼻疽菌感染、收样及 Western blot 检测方法同上。

1.5 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

设置 siC 对照组和 siCHOP 干扰组,使用 TRIzol 提取细胞总 RNA,并测定 RNA 浓度及纯度。使用 TaKaRa 逆转录试剂盒,以 10 μL 的反应体系将提取的 mRNA 逆转录为 cDNA,反应条件为 7 ℃ 15 min;85 ℃ 5 s。使用 20 μL 的 SYBR Green 荧光 PCR 反应体系进行 qRT-PCR 检测 CHOP mRNA 的表达水平,反应条件为 95 ℃预变性 1 min;95 ℃ 5 s,进行 40 个循环;用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算结果。引物序列 CHOP:上游引物 5′-GAGCCAGAATAACAGCCGGA-3′,下游引物 5′-CAAGGTGAAAGGCAGGGACT-3′,β-actin:上游引物 5′-CTGAGCACACAGCTGGACTG-3′,下游引物 5′-AAGCTGGTGGTACCTGATGC-3′。

1.6 细菌胞内生存实验

设置 siC 对照组和 siCHOP 干扰组,在 PBS 或 TUDCA 处理条件下进行实验,感染前 24 h 分别加入 PBS 或 100 μmol/L TUDCA 预处理 RAW264.7 细胞。感染方式同上,用灭菌 PBS 清洗 3 次,加入 0.1% Triton X-100 裂解细胞,倍比稀释细胞裂解液后取 10 μL 稀释液涂布于 LB 平板,于 37 ℃恒温培养箱,孵育 36 h 后,进行菌落计数。

1.7 统计学分析

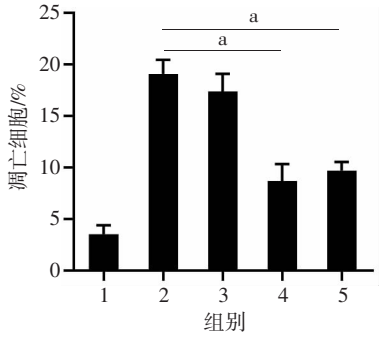
各实验均进行 3 次独立重复,采用 GraphPad Prism 5.0 软件作图,采用 Student's t 检验或方差分析对定量结果进行统计学差异分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUDCA 减少类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡

如图 1 所示,与未感染组相比,类鼻疽菌感染可引起 RAW264.7 细胞凋亡,凋亡细胞占比 18%。经 20 μmol/L TUDCA 处理后,类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡与未加 TUDCA 药物相比差异无统计学意义,而当提升 TUDCA 浓度至 100 μmol/L 时,经处理后的 RAW264.7 细胞凋亡呈现明显抑制,凋亡细胞占比下降,相较未加 TUDCA 药物和 20 μmol/L 药物处理组差

异具有统计学意义($P<0.05$)。进一步提升TUDCA浓度至200 μmol/L,细胞凋亡抑制率未见明显提升。以上结果表明,TUDCA浓度达100 μmol/L时可有效抑制类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡。



1:未感染组;2~5:类鼻疽菌感染组,TUDCA处理浓度分别为0、20、100、200 μmol/L;a: $P<0.01$

图1 TUDCA减少类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡

2.2 TUDCA通过抑制内质网应激减少类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡

使用另一种内质网应激抑制剂4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, 4-PBA)进行处理,分别通过Annexin-V/PI双染法及MTT细胞增殖实验检测类鼻疽菌感染后细胞增殖能力及凋亡情况。如图2所示,TUDCA或4-PBA处理均可显著降低类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡($P<0.05$);相反地,在TUDCA或4-PBA的作用下,类鼻疽菌感染后细胞增殖能力显著增强($P<0.05$)。该结果表明,抑制巨噬细胞内质网应激可减少类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡的发生,并能在一定程度上维持细胞的增殖能力。

为了进一步验证TUDCA是否通过抑制内质网应激来发挥作用,采用siRNA敲降内质网应激关键蛋白CHOP。在TUDCA预处理后,通过Western blot及Annexin-V/PI双染法分别检测类鼻疽菌感染后细胞凋亡相关蛋白(Caspase-3和Caspase-12)的表达水平及细胞凋亡数量的变化。结果显示,在siC对照组或siCHOP干扰组中,类鼻疽菌感染后与未感染相比,Caspase-3表达明显增加,其中siCHOP干扰组中细胞凋亡相关蛋白的表达显著低于siC对照组;在类鼻疽菌感染条件下,siC对照组中加入TUDCA后Caspase-3和Caspase-12的表达低于PBS处理的结果,而siCHOP干扰组中,TUDCA处理对细胞凋亡相关蛋白水平的影响与PBS处理无明显差异,见图3A~C。

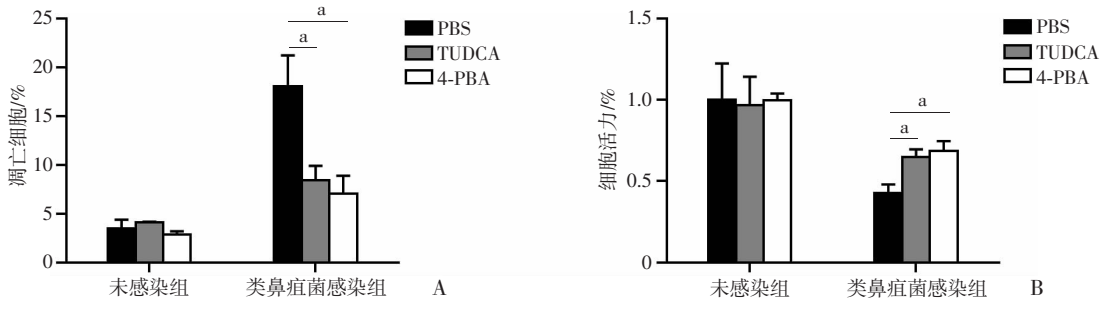
同时,流式细胞仪检测结果显示(图3D),类鼻疽菌感染后siCHOP干扰组细胞凋亡数量显著低于siC对照组($P<0.05$);在siC对照组中,与PBS处理相比,TUDCA处理使类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡数量显著降低($P<0.05$),而在siCHOP干扰组中,加入TUDCA对类鼻疽菌感染诱导的凋亡数量无明显作用。以上结果提示,TUDCA通过抑制巨噬细胞内质网应激从而降低类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡。

2.3 TUDCA通过抑制类鼻疽菌感染导致的细胞凋亡促进巨噬细胞对类鼻疽菌的清除

为了探究TUDCA抑制类鼻疽菌感染所致巨噬细胞凋亡,对类鼻疽菌胞内存活的作用,进行了类鼻疽菌胞内生存实验,发现在siC对照组中加入TUDCA处理后,宿主细胞对类鼻疽菌的清除明显增强($P<0.05$),而在siCHOP干扰组,与PBS对照相比,TUDCA对类鼻疽菌胞内增殖无明显影响(图4)。以上结果显示,TUDCA通过抑制内质网应激,进而减少类鼻疽菌感染诱导的巨噬细胞凋亡,促进巨噬细胞对类鼻疽菌的清除。

3 讨论

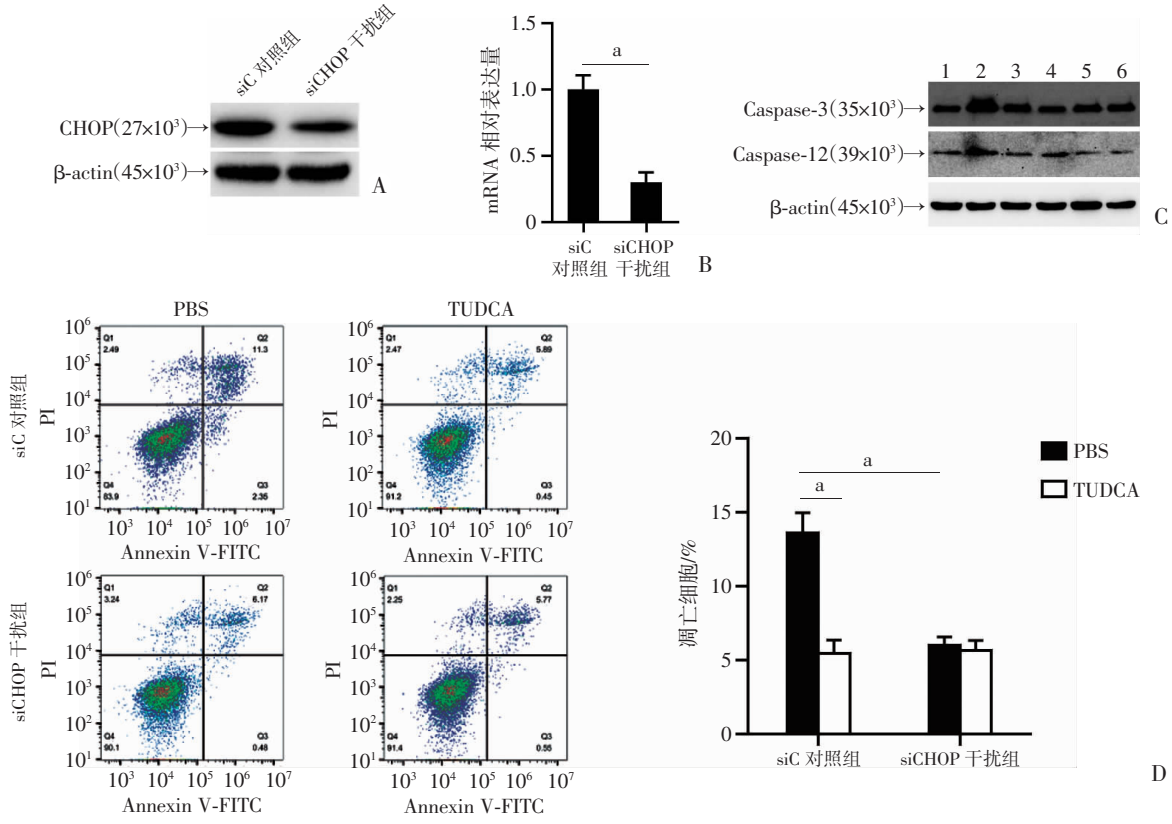
类鼻疽菌作为一种胞内寄生菌,能够极快地侵入宿主多种细胞,尤其是吞噬细胞,包括巨噬细胞、单核细胞和中性粒细胞等。这些吞噬细胞不仅不能发挥吞噬和清除作用,反而被类鼻疽菌所劫持,作为"特洛伊木马"成为其逃避宿主防御系统攻击和抗菌药物杀伤的场所,为类鼻疽菌的增殖和播散提供便利,造成感染



a: $P<0.01$

A:Annexin-V/PI双染法及流式细胞术检测各组细胞凋亡的变化;B:MTT细胞增殖实验检测细胞增殖能力

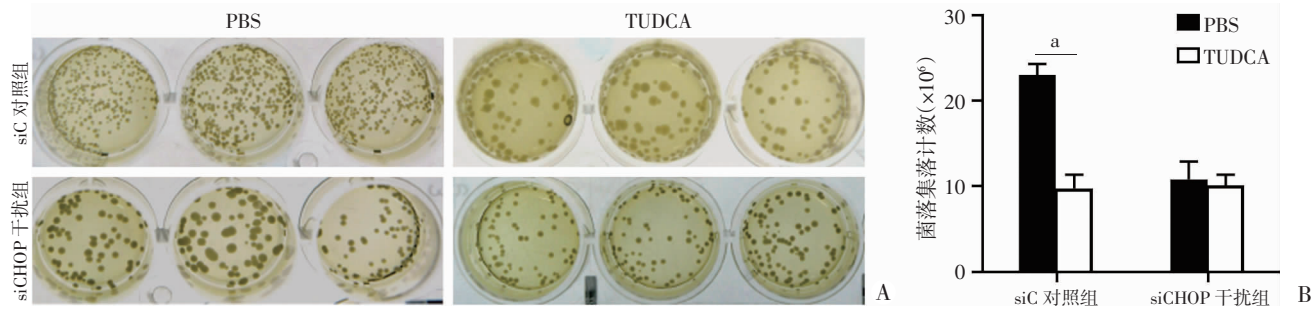
图2 内质网应激抑制剂可抑制类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡



a: $P<0.01$

A:Western blot 检测 CHOP 蛋白表达;B:qRT-PCR 检测 CHOP mRNA 表达量;C:Western blot 检测 Caspase-3 和 Caspase-12 蛋白表达水平　1~3:siC 对照组,其中 2 为 PBS 处理加类鼻疽菌感染,3 为 TUDCA 处理加类鼻疽菌感染;4~6:siCHOP 干扰组,其中 5 为 PBS 处理加类鼻疽菌感染,6 为 TUDCA 处理加类鼻疽菌感染;D:Annexin-V/PI 双染法及流式细胞术检测细胞凋亡情况

图 3　TUDCA 通过抑制宿主细胞内质网应激降低类鼻疽菌感染诱导的细胞凋亡



A:类鼻疽菌在 LB 平板上的菌落图像;B:平板菌落数统计结果　a: $P<0.01$

图 4　TUDCA 通过抑制内质网应激诱导的细胞凋亡从而促进类鼻疽菌的清除

以及反复不愈[11-12]。此外,由于病原体特殊的生物学特性,其感染和免疫机制不明确,在预防和控制方面仍存在许多问题。临床治疗面临的最大困境是“顽固性耐药”。基因组分析表明,类鼻疽菌等具有特殊双染色体结构的病原微生物,遗传结构多变,对宿主环境适应性强,发生基因突变的概率高,使得类鼻疽菌在对多种临床常用抗生素存在天然耐药的同时,对目前临床一线治疗药物(复方新诺明、头孢他啶)也逐渐出现耐药,导致治疗失败和病情恶化[13],因此,迫切需要寻找解决临床治疗的新策略。

内质网应激是细胞基于内质网的结构与功能对各种胞内外的刺激产生的一系列生物学反应,促使机体更有效地适应环境,维持细胞内环境稳态[6]。内质网应激主要通过适应性反应-非折叠蛋白反应(unfolding protein response, UPR)的增强来恢复内质网蛋白处理的能力,后者反馈调节内质网应激。UPR 作为内质网

应激反应信号通路最重要和最保守的组成部分,包含有3种位于内质网膜上的信号感受分子,分别是IRE1、ATF6和PKR-PERK,这3种激酶通过感受内质网中的蛋白伴侣Bip的浓度水平调节胞浆或者内质网内的刺激信号,如非折叠蛋白、异种蛋白、病原菌等,进而激活通路下游的转录因子XBP1的mRNA的剪切,影响下游基因的表达,包括Bip、ERdj4和CHOP[14-15]。近年来,内质网参与病原菌致病过程的相关机制研究开始为人们关注,ERS被认为参与了先天免疫信号通路的调节和宿主对入侵微生物的防御[16]。最近的证据表明,某些细菌利用内质网环境成为利于其细胞内生存的避难所,如军团菌、布鲁氏菌、衣原体和辛卡尼亚菌。有研究报道,含有军团菌的液泡通过内吞途径与内质网膜融合,并在巨噬细胞吞噬后干扰液泡成熟以允许其细胞内复制[17-18]。SMITH等[19]发现布鲁氏菌通过效应蛋白TcpB影响UPR水平从而引起内质网重构,促进布鲁氏菌的胞内生存能力。此外,也有文献报道内质网应激通路在结核分枝杆菌持久性感染中起着重要作用,研究显示eIF2α/CHOP通路参与巨噬细胞内结核分枝杆菌的胞内存活[20]。但值得关注的是,病原菌感染诱导的内质网应激是有利于病原菌的胞内存活还是有利于宿主对病原菌感染的防御,至今尚无定论,一方面细胞内的细菌可利用宿主内质网作为复制增殖的场所,但另一方面,细菌产生的毒素,如志贺毒素、霍乱毒素[21-22],也会破坏内质网结构与功能,引起过度的内质网应激,进而诱导宿主先天免疫系统识别感染细胞、触发防御反应,以清除细菌。

内质网应激的下游反应具有高度复杂性,包括活性氧的产生、自噬的诱导、细胞凋亡的启动和先天免疫反应的激活。据报道,布鲁氏菌TcpB蛋白可诱导内质网应激,但也可与Toll样受体信号转导通路的MAL(MyD88-adapter-like)相互作用,抑制NF-κB信号通路的激活[23-24]。在强烈或持续的刺激条件下,内质网应激反应不能保护细胞,最终将导致细胞凋亡,进而影响细菌的胞内复制和增殖。已有文献报道结核分枝杆菌、幽门螺旋杆菌、布鲁氏菌和李斯特菌等感染可引起内质网应激诱导的特异性凋亡反应,但具体机制尚不清楚[16]。SEIMON等[25]在结核分枝杆菌感染后形成的富含巨噬细胞的肉芽肿组织中检测到了ERS和凋亡的发生;PILLICH等[26]发现,李斯特菌通过分泌溶细胞素LLO诱导ERS下游所有信号通路,导致内质网应激诱导的凋亡反应。这些证据提示细菌感染导致的内质网应激诱导的凋亡反应有益于感染的进行,可能的原因是诱导巨噬细胞发生凋亡反应,而不是发生坏死或焦亡,可以降低炎症的产生,进一步减少炎性细胞的浸润,更利于细菌在宿主细胞内的增殖、播散。本课题组在前期研究中发现类鼻疽菌感染后可以诱导巨噬细胞发生ERS和凋亡,但两者之间的关系还未进一步探讨;另外通过小鼠和细胞模型发现TUDCA能够促进类鼻疽菌的清除,但具体作用机制未阐明清楚。因此,本研究在此基础上进一步探讨了类鼻疽感染引起的ERS与细胞凋亡的关系,以及TUDCA促进类鼻疽菌清除的分子机制,结果表明类鼻疽菌通过激活ERS诱导细胞凋亡,而TUDCA能够抑制ERS,干扰凋亡,促进类鼻疽菌的胞内清除反应。

近年来,调节内质网应激反应的药物已用于治疗炎症性疾病和癌症[27]。在此基础上,越来越多的研究也在不断探索该类药物是否也能用于胞内菌或病毒感染的辅助治疗,如结核病、布鲁氏菌病等需要长期使用抗生素治疗的感染性疾病。与上述两种疾病类似,目前类鼻疽的临床治疗方案分为2个阶段,急性期常使用头孢他啶或美罗培南静脉滴注2周,后期需要口服复方磺胺甲噁唑长达6个月,且复发率高,治疗效果不佳。TUDCA商品名为滔罗特,在临床上主要用于治疗肝胆结石症、乙型肝炎等肝脏相关疾病[28]。本研究证实,TUDCA可通过抑制巨噬细胞内质网应激,减少细胞凋亡,促进巨噬细胞对类鼻疽菌的胞内清除。这意味着TUDCA作为一种临床常用的、安全可靠的药物,可能在类鼻疽菌感染的临床治疗中发挥潜在作用,为将来制定抗类鼻疽感染的有效治疗方案提供了重要的理论指导。

综上所述,本研究从细菌与宿主细胞互作的层面,以类鼻疽菌、内质网应激、凋亡三者之间的角度,进一步发现了类鼻疽菌通过诱导内质网应激促进宿主细胞凋亡,而TUDCA能够通过抑制内质网应激干扰凋亡的发生,从而促进类鼻疽菌的胞内清除作用。本研究旨在探讨抗类鼻疽菌感染的可能的、新的治疗方法,为将来制定类鼻疽菌感染的防治手段提供重要的理论依据。

参考文献:

[1] WIERSINGA W J, VIRK H S, TORRES A G, *et al*. Melioidosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 1-22. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.

[2] BIRNIE E, VIRK H S, SAVELKOEL J, *et al*. Global burden of melioidosis in 2015: a systematic review and data synthesis [J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(8): 892-902. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30157-4.

[3] VIRK H S, MUKHOPADHYAY C, WIERSINGA W J. Melioidosis: a neglected cause of community-acquired pneumonia[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2020, 41(4): 496-508. DOI: 10.1055/s-0040-1710570.

[4] ROTZ L D, KHAN A S, LILLIBRIDGE S R, *et al*. Public health assessment of potential biological terrorism agents[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(2): 225-230. DOI: 10.3201/eid0802.010164.

[5] 毛旭虎, 林容, 方瑶, 等. 类鼻疽诊断与治疗专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2022. 40(10): 577-583.
MAO X H, LIN R, FANG Y, *et al*. Expert consensus on diagnosis and treatment of melioidosis[J]. Chin J Infect Dis, 2022. 40(10): 577-583.

[6] CHOVATIYA R, MEDZHITOV R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis[J]. Mol Cell, 2014, 54(2): 281-288. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.030.

[7] HEUBI J E, WIECHMANN D A, CREUTZINGER V, *et al*. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in the prevention of total parenteral nutrition-associated liver disease [J]. J Pediatr, 2002, 141(2): 237-242. DOI: 10.1067/mpd.2002.125802.

[8] OZCAN U, YILMAZ E, OZCAN L, *et al*. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Science, 2006, 313(5790): 1137-1140. DOI: 10.1126/science.1128294.

[9] DE MIGUEL C, SEDAKA R, KASZTAN M, *et al*. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) abolishes chronic high salt-induced renal injury and inflammation[J]. Acta Physiol (Oxf), 2019, 226(1): e13227. DOI: 10.1111/apha.13227.

[10] ELIA A E, LALLI S, MONSURRÒ M R, *et al*. Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis[J]. Eur J Neurol, 2016, 23(1): 45-52. DOI: 10.1111/ene.12664.

[11] GASSIEP I, ARMSTRONG M, NORTON R. Human melioidosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2): e00006-e00019. DOI: 10.1128/CMR.00006-19.

[12] ALLWOOD E M, DEVENISH R J, PRESCOTT M, *et al*. Strategies for intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*[J]. Front Microbio, 2011, 2: 170. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00170.

[13] WIERSINGA W J, CURRIE B J, PEACOCK S J. Melioidosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(11): 1035-1044. DOI: 10.1056/nejmra1204699.

[14] LEE A S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress [J]. Methods, 2005, 35(4): 373-381. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.10.010.

[15] HILLARY R F, FITZGERALD U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis[J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 48. DOI: 10.1186/s12929-018-0453-1.

[16] CELLI J, TSOLIS R. Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? [J]. Nat Rev Microbiol, 2014, 13: 71-82. DOI: 10.1038/nrmicro3393.

[17] KAGAN J C, ROY C R. *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(12): 945-954. DOI: 10.1038/ncb883.

[18] ROBINSON C G, ROY C R. Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(5): 793-805. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00666.x.

[19] SMITH J A, KHAN M, MAGNANI D D, *et al*. *Brucella* induces an unfolded protein response *via* TcpB that supports intracellular replication in macrophages[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(12): e1003785. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003785.

[20] LIM Y J, CHOI J A, CHOI H H, *et al*. Endoplasmic reticulum stress pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the survival of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28531. DOI: 10.1371/journal.pone.0028531.

[21] LEE S Y, LEE M S, CHERLA R P, *et al*. Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells [J]. Cell Microbiol, 2008, 10(3): 770-780. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01083.x.

[22] CHO J, LEE A H, PLATZER B, *et al*. RETRACTED: the unfolded protein response element IRE1α senses bacterial proteins invading the ER to activate RIG-I and innate immune signaling[J]. Cell Host Microbe, 2013, 13(5): 558-569. DOI: 10.1016/j.chom.2013.03.011.

[23] SENGUPTA D, KOBLANSKY A, GAINES J, *et al*. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL [J]. J Immunol, 2010, 184(2): 956-964. DOI: 10.4049/jimmunol.0902008.

[24] SNYDER G A, DEREDGE D, WALDHUBER A, *et al*. Crystal structures of the Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domains from the *Brucella* protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry[J]. J Biol Chem, 2014, 289(2): 669-679. DOI: 10.1074/jbc.M113.523407.

[25] SEIMON T A, KIM M J, BLUMENTHAL A, *et al*. Induction of ER stress in macrophages of tuberculosis granulomas[J]. PLoS One, 2010. 5(9): e12772. DOI: 10.1371/journal.pone.0012772.

[26] PILLICH H, CHAKRABORTY T, MRAHEIL M A. Cell-autonomous responses in *Listeria monocytogenes* infection [J]. Future Microbiol, 2015, 10(4): 583-597. DOI: 10.2217/fmb.15.4.

[27] MIMURA N, FULCINTI M, GORGUN G, *et al*. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma[J]. Blood, 2012, 119(24): 5772-5781. DOI: 10.1182/blood-2011-07-366633.

[28] YAN H, PENG B, LIU Y, *et al*. Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide[J]. J Virol, 2014, 88(6): 3273-3284. DOI: 10.1128/JVI.03478-13.

(收稿:2023-04-11;修回:2023-09-14)
(编辑 邓强庭)