

# ABC 转运透性酶 DppC2 的缺失有利于鼠疫耶尔森氏菌在巨噬细胞内的生存

申雷鸣<sup>1</sup>, 魏雨萌<sup>1,2</sup>, 崔一鸣<sup>1,3</sup>, 赵彦婷<sup>1,4</sup>, 姚文武<sup>1</sup>, 刘瑾萍<sup>1,4</sup>, 郭阳云<sup>1,5</sup>, 李嘉敏<sup>1</sup>, 石佳丽<sup>1,2</sup>, 宋凯<sup>1\*</sup>, 宋亚军<sup>1\*</sup>

- 1 军事科学院军事医学研究院, 病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京
- 2 苏州大学 药学院, 江苏 苏州
- 3 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州
- 4 内蒙古农业大学 园艺与植物保护学院, 内蒙古 呼和浩特
- 5 牡丹江医科大学 基础医学院, 黑龙江 牡丹江

申雷鸣, 魏雨萌, 崔一鸣, 赵彦婷, 姚文武, 刘瑾萍, 郭阳云, 李嘉敏, 石佳丽, 宋凯, 宋亚军. ABC 转运透性酶 DppC2 的缺失有利于鼠疫耶尔森氏菌在巨噬细胞内的生存[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4060-4074.

SHEN Leiming, WEI Yumeng, CUI Yiming, ZHAO Yanting, YAO Wenwu, LIU Jinping, GUO Yangyun, LI Jiamin, SHI Jiali, SONG Kai, SONG Yajun. Deficiency of the ABC transporter permease-like protein DppC2 facilitates the survival of *Yersinia pestis* in macrophages[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 4060-4074.

**摘要:** 【目的】研究 *dppC2* 基因在鼠疫耶尔森氏菌(鼠疫菌)巨噬细胞内生存中的作用。【方法】采用自杀质粒同源重组法构建鼠疫菌 201 株的 *dppC2* 基因无痕敲除株(201- $\Delta dppC2$ )；通过巨噬细胞内生存实验、酸生存实验、过氧化氢生存实验、酶活测定、活性氧检测、细胞毒力测定和小鼠攻毒实验等，比较 201- $\Delta dppC2$  与野生株(201-WT)的表型差异；利用转录组学分析和实时定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)分析 201- $\Delta dppC2$  与 201-WT 的基因表达差异。【结果】与 201-WT 相比，201- $\Delta dppC2$  在小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 和人单核细胞白血病细胞 THP-1 中的胞内生存率显著升高，酸生存率及过氧化氢生存率升高，耐酸基因 *hdeD* 以及过氧化物酶相关基因 *katA* 和 *katG* 的转录水平上调，过氧化氢酶和过氧化物酶的活力升高，细菌及其感染的巨噬细胞 RAW264.7 胞内活性氧水平降低；对 HeLa 细胞的毒性降低，但对小鼠的毒力无差异。【结论】*dppC2* 基因缺失后，鼠疫菌对酸性和过氧化氢环境的适应性提高，有利于鼠疫菌在巨噬细胞内的生存和复制。

**关键词:** 鼠疫菌；巨噬细胞；*dppC2*；胁迫环境耐受性

资助项目：国家自然科学基金(U22A20526)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U22A20526).

\*Corresponding authors. E-mail: SONG Kai, ksongzy@126.com; SONG Yajun, songyj@bmi.ac.cn

Received: 2025-02-27; Accepted: 2025-04-10; Published online: 2025-05-09

## Deficiency of the ABC transporter permease-like protein DppC2 facilitates the survival of *Yersinia pestis* in macrophages

SHEN Leiming<sup>1</sup>, WEI Yumeng<sup>1,2</sup>, CUI Yiming<sup>1,3</sup>, ZHAO Yanting<sup>1,4</sup>, YAO Wenwu<sup>1</sup>, LIU Jinping<sup>1,4</sup>, GUO Yangyun<sup>1,5</sup>, LI Jiamin<sup>1</sup>, SHI Jiali<sup>1,2</sup>, SONG Kai<sup>1\*</sup>, SONG Yajun<sup>1\*</sup>

1 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, China

2 College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China

3 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

4 College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia, China

5 School of Basic Medical Sciences, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the role of *dppC2* in the survival of *Yersinia pestis* in macrophages. [Methods] The strain (201- $\Delta dppC2$ ) with traceless knockout of *dppC2* was constructed with a suicide plasmid *via* homologous recombination based on *Y. pestis* biovar Microtus strain 201. Phenotypes were compared between 201- $\Delta dppC2$  and the wild type (201-WT) by the acid survival assay, hydrogen peroxide survival assay, macrophage intracellular survival assay, reactive oxygen species (ROS) detection, and cytotoxicity and mouse challenge assays. The gene expression was compared between 201- $\Delta dppC2$  and 201-WT by transcriptomics analysis and RT-qPCR. [Results] Compared with 201-WT, 201- $\Delta dppC2$  exhibited multiple phenotypic alterations, including significantly increases in intracellular survival rates in RAW264.7 and THP-1 cells and under acidic and hydrogen peroxide conditions, upregulation of the acid resistance gene *hdeD* and the catalase-related genes *katA* and *katG*, enhancement of catalase and peroxidase activities, and declines in intracellular ROS levels in 201- $\Delta dppC2$  and RAW264.7 cells infected with the mutant. Furthermore, 201- $\Delta dppC2$  showed reduced cytotoxicity to HeLa cells but no change in the virulence in mice. [Conclusion] The deletion of *dppC2* has been demonstrated to enhance the fitness of *Y. pestis* to acidic and hydrogen peroxide environments, which promote the survival and replication of *Y. pestis* in macrophages.

**Keywords:** *Yersinia pestis*; macrophage; *dppC2*; environmental stress tolerance

鼠疫是一种自然疫源性疾病，主要在啮齿动物中流行，可通过跳蚤叮咬、直接接触或吸入污染气溶胶传播给人类，引发人间鼠疫<sup>[1-2]</sup>。人类感染后的主要形式包括腺鼠疫、肺鼠疫和败血性鼠疫等，若未及时治疗，致死风险极高<sup>[3-4]</sup>。历史上曾发生3次鼠疫全球大流行，致约2亿人死亡，严重危害人类社会，目前在全球不同疫源地仍有散在发生<sup>[5-6]</sup>。1894年，学者

Alexander Yersin 成功分离并鉴定出鼠疫的病原体——鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*，以下简称鼠疫菌)<sup>[7-8]</sup>。古DNA研究表明，鼠疫菌约7000年前由假结核耶尔森氏菌进化而来<sup>[5,9-10]</sup>。

鼠疫菌在感染哺乳动物宿主早期易被巨噬细胞和中性粒细胞吞噬<sup>[11]</sup>。巨噬细胞吞噬病原体后会产生NO<sup>3-</sup>、NO<sup>2-</sup>等活性氧杀伤病原体<sup>[12]</sup>。此外，巨噬细胞内溶酶体通过膜上质子

泵逆浓度梯度转运  $H^+$  以形成有效杀伤病原体的酸性环境<sup>[13]</sup>。巨噬细胞内的氧化环境<sup>[14]</sup>、酸性环境和溶菌酶等是清除侵入机体致病菌的重要手段<sup>[15]</sup>。鼠疫菌被吞噬细胞吞噬后不会被完全杀伤和清除, 反而表现出在单核细胞和巨噬细胞吞噬作用下生存和繁殖的能力<sup>[16]</sup>。体外研究表明, 这部分在巨噬细胞中存活下来的鼠疫菌可以分泌 *Yersinia outer protein J* (YopJ) 引发巨噬细胞的程序性死亡, 释放细胞内细菌进一步扩大感染范围, 进而导致败血症<sup>[17]</sup>。此外, 鼠疫菌 *phoPQ* 突变株在巨噬细胞内表现出生存缺陷, 且在体外低 pH 和氧化应激条件下的生存能力降低, 其对 BALB/c 小鼠的毒力同样显著减弱 (LD<sub>50</sub> 升高 75 倍), 这表明巨噬细胞杀伤和清除鼠疫菌的能力可能有助于宿主抵抗感染<sup>[18-19]</sup>。这些结果凸显了鼠疫菌在巨噬细胞内生存能力对其发病过程的重要性。然而, 鼠疫菌抵抗巨噬细胞杀伤作用的具体分子机制尚不完全清楚<sup>[8,20]</sup>。

前期研究发现鼠疫菌 201 菌株的巨噬细胞诱导株 (201-macrophage induced, 201-MI) 在巨噬细胞内的生存能力显著高于野生株。全基因组测序显示 201-MI 存在一些插入/缺失和单核苷酸突变 (包括 *dppC2* 基因), 这些突变可能提升了其胞内生存能力<sup>[21]</sup>。生物信息学分析表明鼠疫菌的 *dppC2* 基因 (YP\_RS06860) 可能编码一种 microcin C ATP-binding cassette (ABC) 转运透性酶, 目前鲜有关于 *dppC2* 基因的研究。在沙门氏菌中类似的 YejABEF 转运蛋白参与对抗抗菌肽, 并且有利于细菌在巨噬细胞内增殖和对小鼠的毒力<sup>[22]</sup>。这提示 *dppC2* 基因可能与鼠疫菌在巨噬细胞内生存能力相关。

本研究构建鼠疫菌 *dppC2* 基因敲除株和回补株, 通过表型实验和基因转录分析等方法初步探索 *dppC2* 基因缺失在鼠疫菌抵抗巨噬细胞杀伤中的作用机制, 以期有助于进一步探索鼠疫菌抵抗巨噬细胞杀伤的机制研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和细胞

布氏田鼠型鼠疫菌 201 株为本实验室保存<sup>[23-24]</sup>。自杀质粒 pDS132、质粒 pBAD24、宫颈癌细胞系 (HeLa)、小鼠单核巨噬细胞系 (RAW264.7) 和单核细胞白血病细胞系 (THP-1) 均为本实验室保存。鼠疫菌 201 株用 LB 培养基在 26 °C (模拟鼠疫菌在跳蚤内生存的温度) 或 37 °C (模拟宿主体内温度) 振荡培养。细胞均在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 北京维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.2 主要试剂和仪器

赫氏琼脂, Hopebiol 公司; RPMI 1640、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco 公司; 基因组 DNA 提取试剂盒, Qiagen 公司; RNA 小提试剂盒, 赛默飞世尔科技公司; 无缝克隆试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 逆转录试剂盒 (HiScript III RT SuperMix), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 过氧化氢酶活性检测试剂盒、过氧化物酶活性检测试剂盒、细胞毒性 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 细菌活性氧检测试剂盒、活性氧检测试剂盒, BestBio 公司; 2×PrimeSTAR Max Premix, TaKaRa 公司; *Sph* I-HF 和 *Sal* I-HF 限制性内切酶, New England Biolabs 公司。

精密细胞培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; PCR 仪、多功能酶标仪, Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 上海罗氏制药有限公司; 转录组学测序平台, 江苏宏微特斯医药科技有限公司; 实时无标记细胞分析 (real-time cell analysis, RTCA) 系统, 安捷伦科技有限公司。

### 1.3 引物

本研究所用引物序列见表 1, 根据序列 ASM788v1 (NCBI) 设计。

表1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
Up- <i>dppC2</i> -F	CTTCTTCTAGAGGTACCGCACGCTATTTTACTGGTAGTGC
Up- <i>dppC2</i> -R	ATAGTGGTGAGGTCGCCATACATTATTGGCGGCCCTCAAA
Down- <i>dppC2</i> -F	TATGGCGACCTCACCCTATTGGATATCCAAAACCTCAGT
Down- <i>dppC2</i> -R	TTGTGGAATTCCCGGGAGAGCAATCATCACTCGCTGGCGT
<i>dppC2</i> -F	GGGGATCCTCTAGAGTCGACATGATGAGACTAAGTGAAT
<i>dppC2</i> -R	AAACAGCCAAGCTTGCATGCTCAGTACACCTTACTTGGGT
Q- <i>rpoB</i> -F	GTTGATCTGAGCACCTTACC
Q- <i>rpoB</i> -R	CCTTGATTTCTTTCTCTGTCTG
Q- <i>katG</i> -F	GGTCTAAGGCTGGTGTGTT
Q- <i>katG</i> -R	TAAGTTTCCCTGTTTTCCG
Q- <i>katA</i> -F	ATGTTTGTCCGCTTCTCCA
Q- <i>katA</i> -R	AATCCCAGTTGCCTTCCTC
Q- <i>hdeD</i> -F	TAAGGATCTAAAAAGACCGG
Q- <i>hdeD</i> -R	TAGCAACCATAAAGCAACTG

#### 1.4 *dppC2* 敲除株和回补株的构建

采用自杀质粒同源重组法基于 201-WT 无痕敲除 *dppC2*。使用基因组 DNA 提取试剂盒提取 201-WT 的全基因组。使用引物对 Up-*dppC2*-F/R 和 Down-*dppC2*-F/R 以 201-WT 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 *dppC2* 的上游和下游同源臂。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.5  $\mu$ L, DNA 模板(10 ng/ $\mu$ L) 5  $\mu$ L, 双蒸水 17  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用无缝克隆试剂盒连接线性化质粒 pDS132 与上、下游同源臂。重组质粒电穿孔转化到大肠杆菌 S17 $\lambda$ pir 中, 与 201-WT 共孵育过夜后涂布于含氯霉素的耶尔森氏菌选择性琼脂(yersinia selective agar base, YSAB)平板。从 YSAB 平板挑取单菌落接种到 LB 培养基, 26  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 2 h, 将培养物涂布于含 7% 蔗糖的 LB 琼脂平板, 以筛选发生第 2 次同源重组的鼠疫菌。敲除株命名为 201- $\Delta$ *dppC2*。

基于质粒 pBAD24 构建回补株。采用 *Sal*I-HF 和 *Sph*I-HF 酶对质粒 pBAD24 进行双酶切。使

用引物对 *dppC2*-F/R, 以 201-WT 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 *dppC2* 片段。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.5  $\mu$ L, DNA 模板(10 ng/ $\mu$ L) 5  $\mu$ L, 双蒸水 17  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用无缝克隆试剂盒连接线性化 pBAD24 和 *dppC2* 片段。将重组质粒电穿孔转化到 201- $\Delta$ *dppC2*, 产生的转化子命名为 201- $\Delta$ *dppC2*::com。

#### 1.5 生长曲线测定

活化甘油保存的 201-WT 和 201- $\Delta$ *dppC2* 至生长平台期, 按 1:100 比例接种至 LB 培养基, 26  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至生长对数期( $OD_{620}=1.0$ )。将菌液按 1:100 的比例接种至含 60 mL LB 培养基的锥形瓶中。将锥形瓶置于精密细胞培养振荡器, 26  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, 每 2 min 自动测量细菌培养物的吸光度。每个菌株设置 3 个重复。鼠疫菌在 37  $^{\circ}$ C、LB 培养基中的生长曲线, 除培养温度外与前述相同。

## 1.6 胞内生存实验

巨噬细胞 RAW264.7 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养, 铺板至 12 孔细胞培养板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养过夜。201-WT、201- $\Delta$ dppC2 和 201- $\Delta$ dppC2::com 以 MOI=10 感染 RAW264.7 细胞 30 min 后, 更换为 200  $\mu$ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基杀死残留的细胞外细菌。使用快速吉姆萨染液对细胞进行染色后置于倒置显微镜观察。将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中分别培养 0.5、2、4 和 8 h。PBS 洗涤细胞后使用 0.3% Triton X-100 裂解感染的 RAW264.7 细胞 15 min, 5 倍倍比梯度稀释裂解液并将稀释液滴板至赫氏固体培养基培养计数。鼠疫菌在 THP-1 中的胞内生存实验按照上述方法进行, 但在感染前需将细胞在含有 100 ng/mL PMA 的 RPMI 1640 中诱导分化 48 h。

## 1.7 酸生存和过氧化氢生存实验

活化甘油保存的 201-WT、201- $\Delta$ dppC2 和 201- $\Delta$ dppC2::com 至生长平台期( $OD_{620}$  约为 1.8), 按 1:100 比例接种至 LB 培养基, 26 °C、200 r/min 培养至生长对数期( $OD_{620}$  约为 1.0)。分别用 100 mmol/L 和 200 mmol/L 过氧化氢刺激 10 min, 以及用 pH 3.5 的酸性溶液刺激 1.0 h 和 1.5 h。将刺激前后的细菌进行 5 倍倍比梯度稀释, 并将稀释液滴板至赫氏固体培养基培养计数, 计数活菌浓度并比较菌株间的生存率差异。

## 1.8 过氧化氢酶活力和过氧化物酶活力检测

按照过氧化氢酶活性检测试剂盒和过氧化物酶活性检测试剂盒的说明书测定 201-WT、201- $\Delta$ dppC2 和 201- $\Delta$ dppC2::com 的过氧化氢酶和过氧化物酶活性差异。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240 nm 有特征光吸收, 过氧化氢酶分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使溶液的吸光度随反应时间下降, 吸光度下降越快过氧化氢酶活力越高; 过氧化物酶可催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化特定底物, 生成的产物在 470 nm 有特征吸收峰, 吸光度越高过氧化物酶活力越高。

## 1.9 活性氧检测

使用细菌活性氧检测试剂盒检测 201-WT、201- $\Delta$ dppC2 和 201- $\Delta$ dppC2::com 的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 差异。按照活性氧检测试剂盒的说明书测定 RAW264.7 细胞感染 201-WT、201- $\Delta$ dppC2 和 201- $\Delta$ dppC2::com 后的细胞内活性氧变化。细菌活性氧检测试剂盒的荧光探针 O11 和活性氧检测试剂盒的荧光探针 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 可自由进入胞内被 ROS 氧化生成荧光物质, 荧光的强弱可反映 ROS 含量的高低。

## 1.10 细胞毒力检测

使用 MTT 试剂盒测定 201-WT、201- $\Delta$ dppC2 和 201- $\Delta$ dppC2::com 对 HeLa 和 RAW264.7 细胞的毒力差异。MTT 可被细胞中线粒体内的脱氢酶还原成深紫色产物, 在 490 nm 有特征吸收峰。细胞量越多吸光度越高, 说明细菌的细胞毒力越低。

## 1.11 RTCA 实验

E-Plate 16 孔板加入 50  $\mu$ L DMEM 校准基线后, 每孔加入  $5 \times 10^3$  个 HeLa 细胞, 待细胞贴壁后检测细胞增殖曲线。RTCA 系统每 15 min 测量 1 次细胞阻抗, 从而得到反映细胞增殖的细胞指数 (cell index, CI)<sup>[25]</sup>。201-WT、201- $\Delta$ dppC2 和 201- $\Delta$ dppC2::com 以 MOI=10 感染细胞后置于 RTCA 检测平台实时检测 CI。

## 1.12 动物实验

201-WT 和 201- $\Delta$ dppC2 生长至对数期后用 PBS 稀释至  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL。6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分为 6 个实验组 ( $n=10$ )。实验组分别通过腹股沟皮下和腹腔注射 100  $\mu$ L 稀释菌液, 对照组注射等量 PBS。连续监测各组小鼠的生存情况, 并绘制生存曲线。本研究所有动物实验经军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所实验动物福利伦理委员会批准, 编号为 IACUC-IME-2024-020。

### 1.13 转录组测序和分析

分别收集 26 °C 和 37 °C 培养的 201-WT 和 201- $\Delta dppC2$ , 使用 RNA 小提试剂盒提取细菌总 RNA, 经去除 rRNA、创建 cDNA 文库和 Qubit 定量后进行 Illumina 测序。201-WT 和 201- $\Delta dppC2$  在 26 °C 和 37 °C 培养的转录组原始数据存储在微生物科学数据中心(NMDC), 登录号分别为 NMDC40078468-40078473 和 NMDC40078432-40078437。以鼠疫菌 91001 株的序列(ASM788v1)作为测序结果注释的参考基因组。以  $P_{adj}<0.05$  且  $|\log_2 \text{fold change}|>1$  为阈值, 鉴定 201-WT 和 201- $\Delta dppC2$  的显著差异表达基因。

### 1.14 实时定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)

使用逆转录试剂盒将 201-WT 和 201- $\Delta dppC2$  的 RNA 逆转录为 cDNA。以单拷贝基因 *rpoB* 作为内参基因。RT-qPCR 反应体系: 2×Light Cycler® 480 SYBR Green Master 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.8  $\mu\text{L}$ , cDNA (5 ng/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 6.4  $\mu\text{L}$ , 设置 3 个生物学重复。RT-qPCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 53 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 40 个循环。通过溶解曲线验证引物扩增的特异性。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$

法计算基因相对表达量, 以 201-WT 的基因表达量为 1, 分析 201- $\Delta dppC2$  的基因表达水平。

### 1.15 统计学分析

每个菌株至少设置 3 个独立的生物学重复, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。满足正态分布和方差齐性的两组数据采用非配对 *t* 检验; 3 组数据间差异分析先进行单因素方差分析, 然后通过 Šidák 检验进行多重比较。小鼠攻毒生存曲线采用 Log-Rank (Mantel-Cox) 检验。所有检验均以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$ ; ns: 无统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长曲线测定结果

在 26 °C 和 37 °C 培养条件下, 201-WT 和 201- $\Delta dppC2$  在 LB 培养基的生长曲线下面积无显著差异(图 1), 表明 *dppC2* 的缺失不影响鼠疫菌在 LB 培养基中的生长。

### 2.2 胞内生存结果

通过吉姆萨染色法对吞噬鼠疫菌的巨噬细胞进行染色。图 2A 为对照组, 巨噬细胞核呈紫蓝色, 胞浆呈灰蓝色; 图 2B 为吞噬鼠疫菌的巨噬细胞, 胞内鼠疫菌呈杆状紫蓝色, 两极浓染,

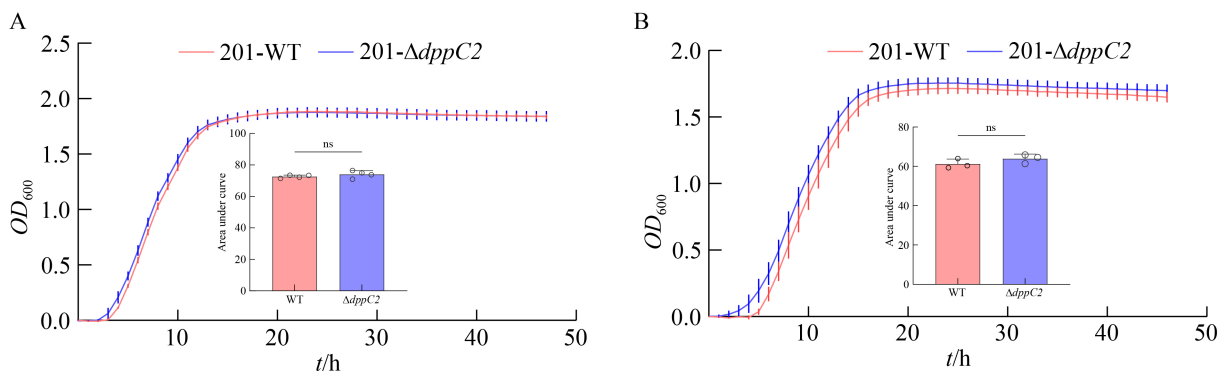
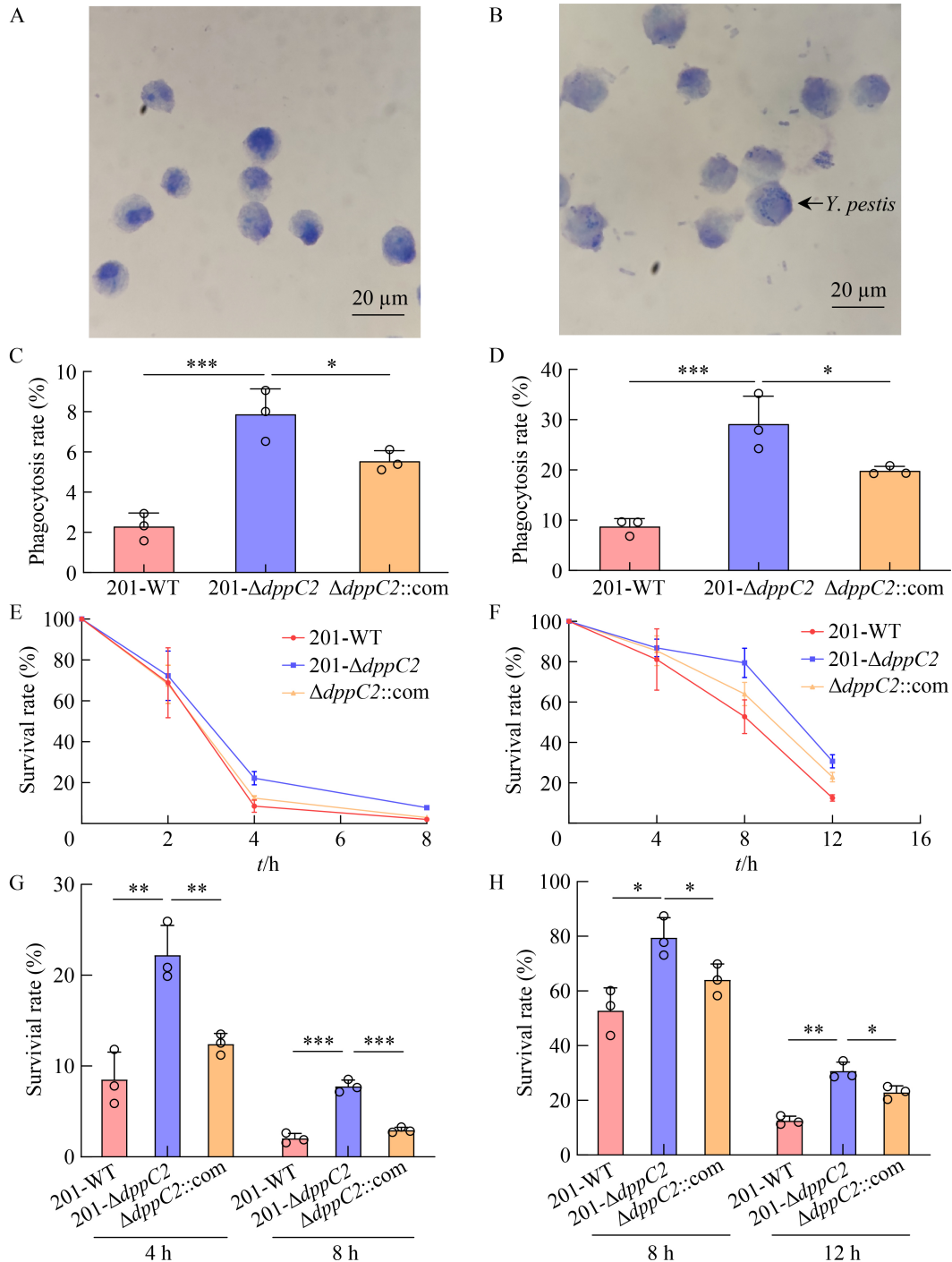


图1 201-WT和201- $\Delta dppC2$ 在不同培养温度下的生长曲线

Figure 1 Growth curves of 201-WT and 201- $\Delta dppC2$  strains at different culture temperatures. A: 26 °C; B: 37 °C. ns: No significant difference.



**图2** 201-WT、201- $\Delta$ dppC2和201- $\Delta$ dppC2::com在巨噬细胞RAW264.7和THP-1胞内生存能力

Figure 2 Intracellular viability of 201-WT, 201- $\Delta$ dppC2 and 201- $\Delta$ dppC2::com strains in macrophages RAW264.7 and THP-1. A: Giemsa staining of macrophages RAW264.7; B: Giemsa staining of macrophages RAW264.7 infected with *Y. pestis*; C, D: Phagocytosis of *Y. pestis* in macrophages RAW264.7 (C) and THP-1 (D); E, F: Intracellular survival curves of *Y. pestis* in macrophages RAW264.7 (E) and THP-1 (F); G, H: Intracellular survival of *Y. pestis* in macrophages RAW264.7 (G) and THP-1 (H). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

表明鼠疫苗可被巨噬细胞 RAW264.7 吞噬。在 RAW264.7 和 THP-1 细胞中, 201- $\Delta dppC2$  被巨噬细胞的吞噬率明显高于 201-WT, 且这种表型差异可被回补株部分恢复(图 2C、2D)。根据 201-WT、201- $\Delta dppC2$  和 201- $\Delta dppC2::com$  在巨噬细胞 RAW264.7 和 THP-1 细胞内 2、4、8 和 12 h 的生存率绘制的生存曲线(图 2E、2F)显示, 201- $\Delta dppC2$  在 2 种巨噬细胞中的生存率均高于 201-WT; 通过对 201-WT、201- $\Delta dppC2$  和 201- $\Delta dppC2::com$  的胞内生存率进行统计学分析发现, 与 201-WT 相比 201- $\Delta dppC2$  在 RAW264.7 细胞(4 h 和 8 h)和 THP-1 细胞(8 h 和 12 h)的生存率显著升高, 而回补株可部分恢复这种生存率差

异(图 2G、2H)。结果表明 *dppC2* 缺失使鼠疫苗更易被 RAW264.7 和 THP-1 细胞吞噬, 并增强了鼠疫苗在 RAW264.7 和 THP-1 细胞中的生存能力。

### 2.3 酸生存和过氧化氢生存实验结果

利用 37 °C 条件下酸性和过氧化氢环境在体外模拟巨噬细胞胞内环境, 26 °C 则模拟适宜鼠疫苗体外增殖的环境温度<sup>[26]</sup>。酸刺激 1.0 h 和 1.5 h 后, 201- $\Delta dppC2$  的生存率显著高于 201-WT(图 3A、3B), 回补株可以恢复酸刺激条件下的表型差异。在 100 mmol/L 和 200 mmol/L  $H_2O_2$  中分别处理 10 min 后, 201- $\Delta dppC2$  的生存率显著高于 201-WT, 且回补株能够恢复这种条件下的表型差异(图 3C、3D)。结果表明 *dppC2* 缺失增强了

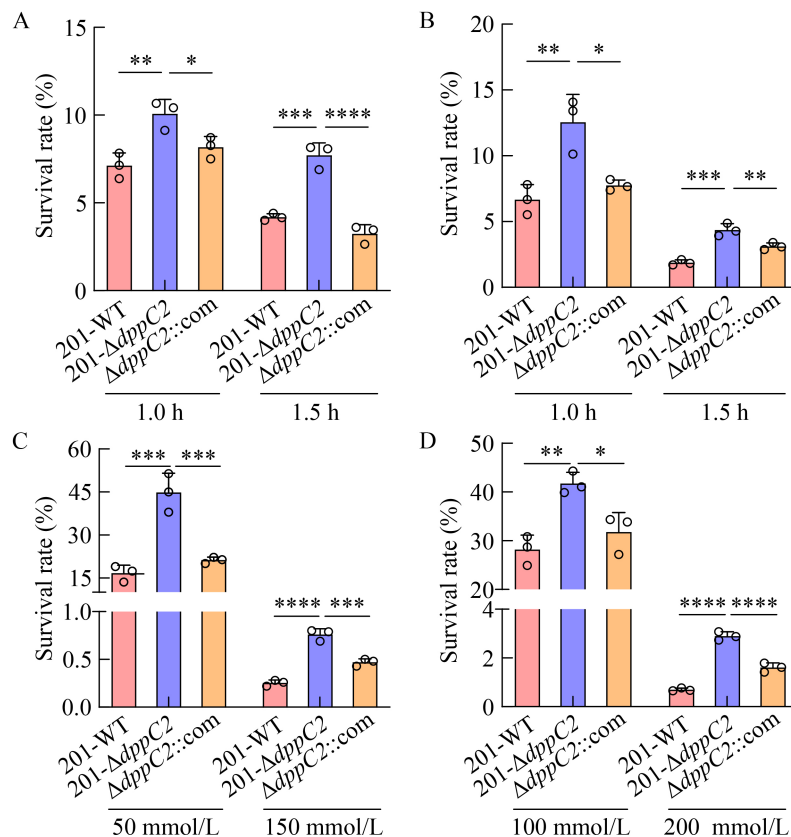


图3 201-WT、201- $\Delta dppC2$ 和201- $\Delta dppC2::com$ 的酸生存率和过氧化氢生存率

Figure 3 Survival rates of 201-WT, 201- $\Delta dppC2$  and 201- $\Delta dppC2::com$  strains after treatment with acid and  $H_2O_2$ . Survival rates of *Y. pestis* after 1 h and 1.5 h treatment with pH 3.5 at 26 °C (A) and 37 °C (B); C: Survival rates of *Y. pestis* after 10 min treatment with 50 mmol/L and 150 mmol/L at 26 °C; D: Survival rates of *Y. pestis* after 10 min treatment with 100 mmol/L and 200 mmol/L  $H_2O_2$  at 37 °C. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .



鼠疫菌对氧化应激和低 pH 环境的耐受性。

## 2.4 比较转录组结果

为了进一步探索 *dppC2* 基因缺失对鼠疫菌表达谱的影响, 比较分析在 26 °C 或 37 °C 培养的 201-WT 和 201- $\Delta$ *dppC2* 的转录组。相较于 201-WT, 在 26 °C 培养条件下 201- $\Delta$ *dppC2* 中仅有 *yejF* (YP\_RS06865, 与 *dppC2* 基因相邻) 表达下调; 在 37 °C 培养条件下 201- $\Delta$ *dppC2* 中 *yejF* 表达下调, *sRNA00014*、*cpxP*、*feoA*、*fruB*、*bssS*、YP\_RS07975、YP\_RS09590 和 YP\_RS13175 表达上调(表 2)。

## 2.5 RT-qPCR 结果

以单拷贝基因 *rpoB* 作为内参, 对 201-WT 和 201- $\Delta$ *dppC2* (26 °C 培养) 的 RNA 转录本进行 RT-qPCR 分析, 比较其耐酸相关基因(*hdeD*)、过氧化氢酶和过氧化物酶编码基因(*katA* 和 *katG*) 的转录水平差异。敲除株的耐酸基因 *hdeD* 转录水平高于野生株(图 4A)。此外, 敲除株的过氧化氢酶基因 *katA* 和 *katG* 的转录水平也高于野生株(图 4B、4C)。26 °C 转录组结果显示, 相较于 201-WT, 201- $\Delta$ *dppC2* 中 *hdeD* ( $\log_2$  fold change=0.156,  $P_{\text{adj}}=0.007$ )、*katA* ( $\log_2$  fold change=0.130,

$P_{\text{adj}}=0.028$ ) 和 *katG* ( $\log_2$  fold change=0.177,  $P_{\text{adj}}=3.213 \times 10^{-34}$ ) 的转录水平虽未达到筛选阈值, 但变化具有显著性( $P_{\text{adj}} < 0.05$ )。结果表明, *dppC2* 缺失会引起耐酸基因 *hdeD* 和过氧化氢酶基因 *katA/katG* 的转录水平略有升高。

## 2.6 酶活力检测结果

通过试剂盒检测 201-WT、201- $\Delta$ *dppC2* 和 201- $\Delta$ *dppC2*::com 的过氧化氢酶活力和过氧化物酶活力发现 201- $\Delta$ *dppC2* 的酶活力均高于 201-WT, 且回补株可恢复酶活力差异(图 5)。结果表明 *dppC2* 基因缺失后, 鼠疫菌表现出更高的过氧化氢酶和过氧化物酶活力。

## 2.7 胞内活性氧测定结果

为了研究 201- $\Delta$ *dppC2* 在巨噬细胞内生存率的升高是否与 ROS 有关, 检测鼠疫菌和巨噬细胞感染后的 ROS 水平。在 26 °C 和 37 °C 培养条件下, 201- $\Delta$ *dppC2* 的 ROS 水平均显著低于 201-WT, 且回补株可恢复表型差异(图 6A)。巨噬细胞感染鼠疫菌后, 随着感染时间的延长细胞内 ROS 水平与对照组(未感染细菌)相比明显升高。感染 201- $\Delta$ *dppC2* 的巨噬细胞的细胞内 ROS 水平明显低于感染 201-WT 的巨噬细胞, 回补株可恢复

表2 表达水平显著改变的基因

Table 2 Genes with significantly regulated expression levels

Gene ID*	Gene name	$\log_2$ fold change	$P_{\text{adj}}$	Function
26 °C				
YP_RS06865	<i>yejF</i>	-2.965	$2.802 \times 10^{-128}$	Microcin C ABC transporter ATP-binding protein YejF
37 °C				
YP_RS06865	<i>yejF</i>	-1.418	$2.217 \times 10^{-6}$	Microcin C ABC transporter ATP-binding protein YejF
sRNA00014	-	2.145	0.047	-
YP_RS00405	<i>cpxP</i>	1.705	0.035	Cell-envelope stress modulator CpxP
YP_RS00700	<i>feoA</i>	1.246	$2.851 \times 10^{-7}$	Ferrous iron transporter A
YP_RS06740	<i>fruB</i>	1.213	$2.564 \times 10^{-5}$	Fused PTS fructose transporter subunit IIA/HPr protein
YP_RS07975	-	1.007	$1.645 \times 10^{-3}$	tRNA-Gly
YP_RS09590	-	1.230	$1.913 \times 10^{-3}$	HEAT repeat domain-containing protein
YP_RS11765	<i>bssS</i>	1.118	$2.141 \times 10^{-3}$	Biofilm formation regulator BssS
YP_RS13175	-	1.790	$2.141 \times 10^{-3}$	Hypothetical protein

\*: NCBI reference sequence ASM788v1; -: No annotations.

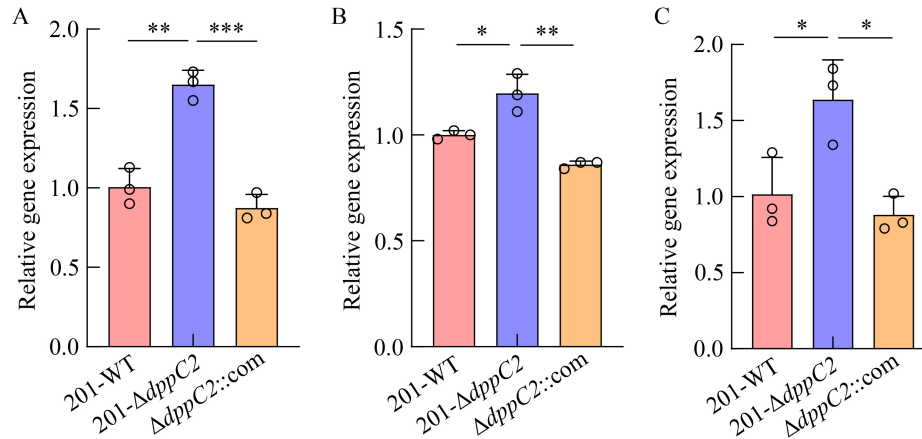


图4 201-WT、201-ΔdppC2和201-ΔdppC2::com的RT-qPCR分析

Figure 4 RT-qPCR of 201-WT, 201-ΔdppC2 and 201-ΔdppC2::com strains. A: Acid tolerance-related gene (*hdeD*); B: Catalase gene (*katA*); C: Peroxidase gene (*katG*). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

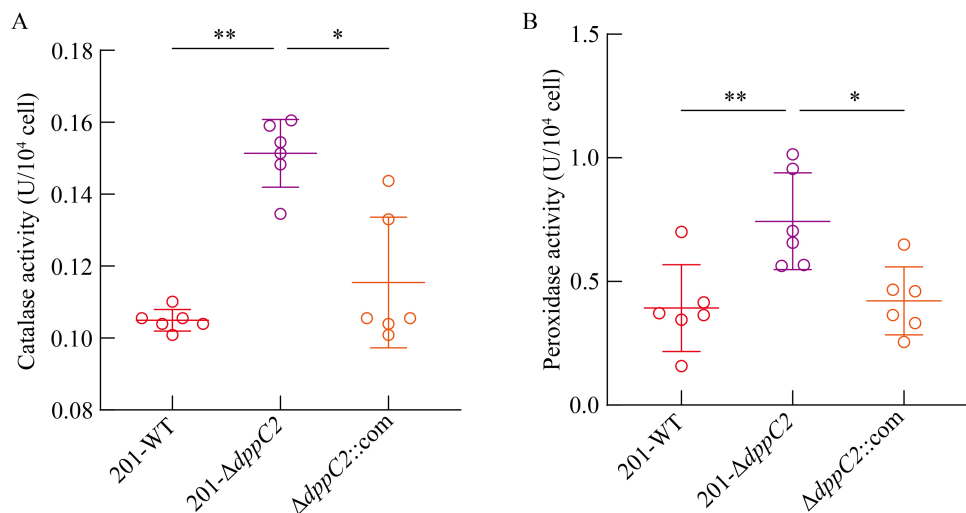


图5 201-WT、201-ΔdppC2和201-ΔdppC2::com的过氧化氢酶和过氧化物酶活力

Figure 5 Catalase and peroxidase activity of 201-WT, 201-ΔdppC2 and 201-ΔdppC2::com strains. A: Catalase activity; B: Peroxidase activity. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

ROS水平差异(图6B-6D)。

## 2.8 细胞毒力结果

为了研究 *dppC2* 缺失对鼠疫菌细胞毒力的影响, 比较分析了 201-WT 和 201-ΔdppC2 对 HeLa 和 RAW264.7 细胞的细胞毒性。MTT 实验结果显示, 感染 201-ΔdppC2 的细胞在  $OD_{490}$  的吸光度较高, 说明 201-ΔdppC2 对 HeLa 和 RAW264.7 细胞的细胞毒性降低(图 7A、7B)。通过 RTCA 检

测各菌株对 HeLa 细胞的毒力差异, 与 201-WT 相比感染 201-ΔdppC2 的细胞 CI 曲线下面积更高, 表明细胞毒力更低(图 7C、7D)。上述研究结果表明, *dppC2* 缺失降低了鼠疫菌对 HeLa 细胞的细胞毒力。

## 2.9 动物实验结果

通过腹股沟皮下注射和腹腔注射 2 种途径感染 BALB/c 小鼠( $n=10$ )研究 *dppC2* 对鼠疫菌毒

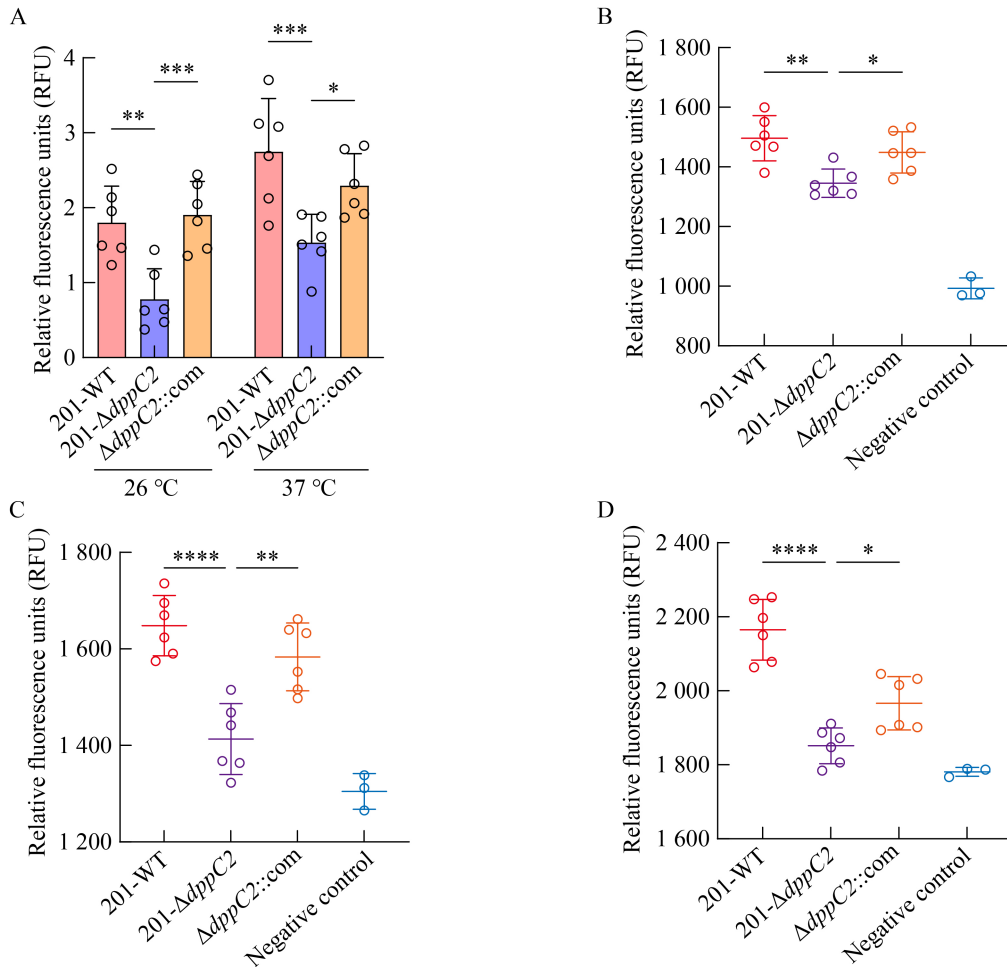


图6 201-WT、201- $\Delta dppC2$ 和201- $\Delta dppC2::com$ 及感染后巨噬细胞内的ROS

Figure 6 ROS within 201-WT, 201- $\Delta dppC2$  and 201- $\Delta dppC2::com$  strains and in post-infection macrophages. A: ROS of 201-WT, 201- $\Delta dppC2$ , and 201- $\Delta dppC2::com$  strains at 26 °C and 37 °C; B–D: Intracellular ROS in macrophages infected by *Y. pestis* for 4 h (B), 8 h (C), and 24 h (D). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

力的影响。不管是腹股沟皮下注射途径还是腹腔内注射，201-WT 和 201- $\Delta dppC2$  感染小鼠的生存曲线变化趋势一致(图 7E、7F)，无显著性差异。结果表明 *dppC2* 缺失不影响鼠疫菌对 BALB/c 小鼠的致病性。

### 3 讨论与结论

鼠疫菌在侵入宿主初期易受到吞噬细胞的攻击和吞噬，但能在巨噬细胞内生存和复制<sup>[11]</sup>。在吞噬细胞内“武装”后，鼠疫菌从细胞中“逃

逸”出来，并对中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬作用产生抵抗力<sup>[27]</sup>。这种胞内生存能力是鼠疫菌在感染早期存活和后期感染扩散的重要环节<sup>[11]</sup>。为研究 *dppC2* 在鼠疫菌巨噬细胞内生存中的作用，本研究构建了 *dppC2* 敲除株，并比较了 201- $\Delta dppC2$  和 201-WT 的表型差异。与 201-WT 相比，201- $\Delta dppC2$  在 RAW264.7 和 THP-1 细胞中都表现出更高的细胞内生存能力。研究表明巨噬细胞能依靠细胞内酸性和氧化环境有效清除入侵的病原体<sup>[28]</sup>。本研究在体外通过低 pH 环

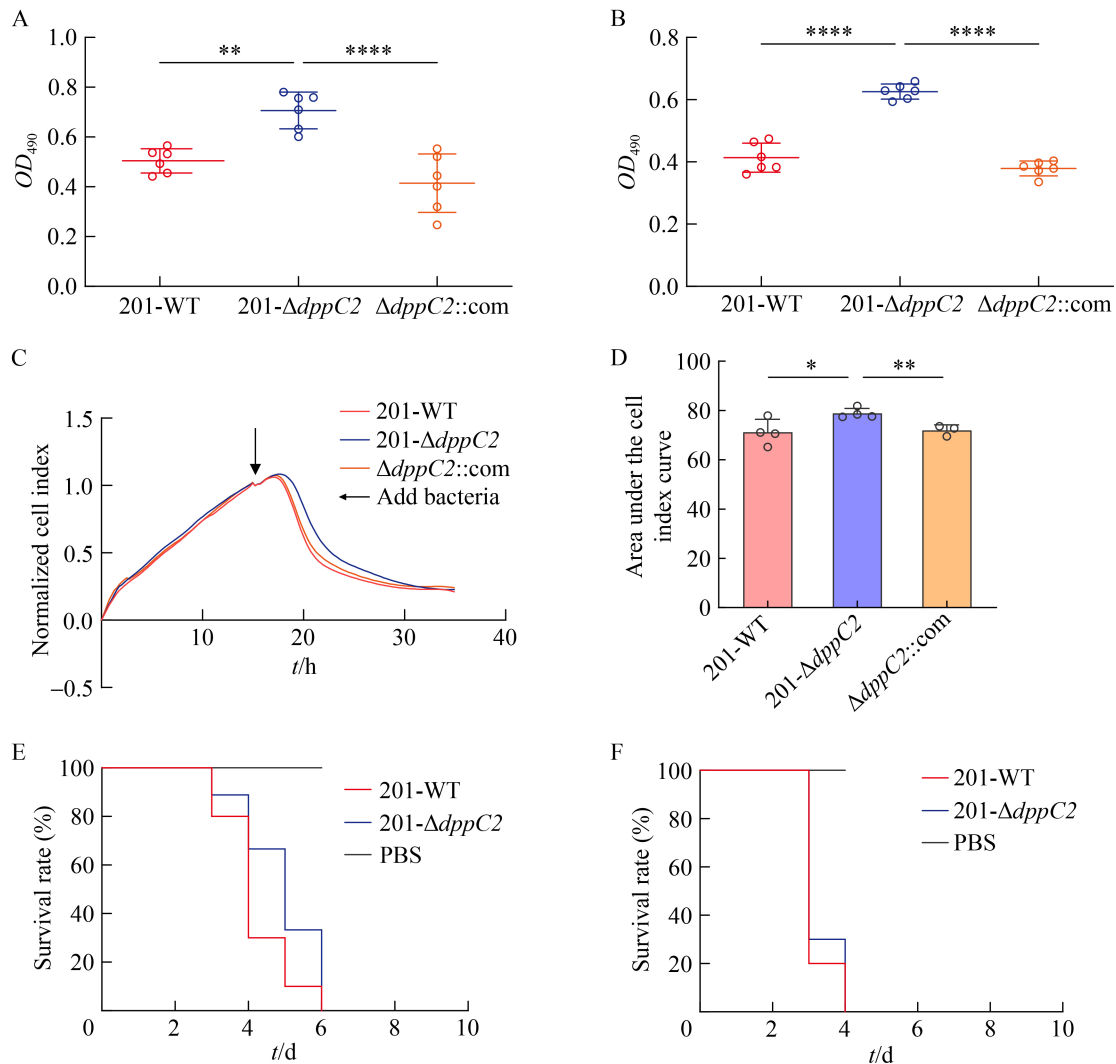


图7 201-WT、201- $\Delta dppC2$ 和201- $\Delta dppC2::com$ 的细胞毒力和感染后小鼠的生存曲线

Figure 7 Cytotoxicity of 201-WT, 201- $\Delta dppC2$  and 201- $\Delta dppC2::com$  strains and survival curves of infected mice. Cell activity assay (MTT assay) of HeLa (A) and RAW264.7 (B) cells infected by *Y. pestis*; C: RTCA assay to detect the virulence of *Y. pestis* on HeLa cells; D: The area under the cell index curve of RTCA; E: Survival curves of mice after subcutaneous injection of 201-WT and 201- $\Delta dppC2$  (Each mouse was injected with  $1.7 \times 10^3$  CFU of bacteria); F: Survival curves of mice after intraperitoneal injection of 201-WT and 201- $\Delta dppC2$  (Each mouse was injected with  $1.7 \times 10^3$  CFU of bacteria). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.0001$ .

境和氧化应激条件模拟巨噬细胞内的酸性和氧化环境, 发现 201- $\Delta dppC2$  在这 2 种条件下都表现出更强的生存率。这表明 *dppC2* 缺失增强鼠疫苗对酸性和氧化环境的耐受性和适应性, 从而促进其在巨噬细胞内的生存能力。

针对 *dppC2* 缺失增强鼠疫苗对酸性和氧化

环境的耐受性和适应性, 本研究进一步对相关基因的表达水平进行验证。耐酸蛋白 HdeABD 可以通过阻止酸诱导的蛋白质聚集和促进 pH 中和后的蛋白质重折叠来增强细菌的耐酸能力<sup>[29-30]</sup>; 而 *hdeD* 基因的下调与酸性条件下细菌耐受性的降低有关<sup>[31]</sup>。KatA 和 KatG 是鼠疫苗

中受转录调节剂 OxyR 调控的单功能过氧化物酶和双功能过氧化物酶<sup>[32]</sup>；Scheller 等<sup>[33]</sup>证明了 KatA 是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主要清除剂。*dppC2* 缺失后，转录组测序显示其对鼠疫菌基因的全局转录水平影响不大，前述几个相关基因的转录水平变化未达到筛选阈值(|log<sub>2</sub> fold change|>1)，但变化具有显著性( $P_{\text{adj}} < 0.05$ )，这提示对于转录组数据还需要更为精细的解读。基于基因的生物功能出发，进一步的 RT-qPCR 验证结果显示，在 201- $\Delta dppC2$  中 *hdeD*、*katA* 和 *katG* 的转录水平升高。鼠疫菌 *dppC2* 缺失导致的 *hdeD* 转录水平上调有利于其抵抗巨噬细胞及吞噬小体内的酸性环境；*katA* 和 *katG* 的转录水平升高，以及相应的 KatA 和 KatG 酶活性的升高，可能是 201- $\Delta dppC2$  抵抗巨噬细胞中氧化压力的关键因素。

在 26 °C 和 37 °C 转录组结果中，*dppC2* 敲除株的 *yejF* 基因表达水平均出现显著下调。鼠疫菌基因组中 *dppC2* 和 *yejF* 两个基因的位置相邻，存在共转录，因此上游基因的敲除很可能导致下游基因的转录下调。*yejF* 基因在大肠杆菌、鼠疫菌和沙门氏菌中的编码产物为 ABC 转运蛋白 YejABEF 中的 ATP 结合亚基<sup>[22,34]</sup>。ABC 转运蛋白通常由多个亚基组成，包括跨膜域和核苷酸结合域。这些亚基在操纵子中的协同表达有助于确保转运蛋白的组装和功能，提高物质转运的效率和底物特异性<sup>[35]</sup>。已知在沙门氏菌中，YejF 对于细菌抵抗抗菌肽(多黏菌素 B、人防御素等)的杀伤和对小鼠的毒力有重要作用<sup>[22]</sup>。关于 YejF 转录下调在鼠疫菌中的生物学意义仍需进一步探索。

活性氧 ROS 是由分子氧衍生出来的一组高活性含氧化合物，含病原体的吞噬体中产生的 ROS 在巨噬细胞介导的免疫防御中起着至关重要的作用<sup>[36]</sup>。本研究的结果表明，201- $\Delta dppC2$  及其感染的巨噬细胞中 ROS 水平都较低，进一步解释了其巨噬细胞内生存能力提高的原因。

本研究从 *hdeD*、*katA* 和 *katG* 的转录水平，KatA 和 KatG 的酶活水平以及 ROS 含量等多个

角度证明，201- $\Delta dppC2$  比 201-WT 更能适应巨噬细胞内的酸性和氧化环境，并能抑制受感染巨噬细胞内 ROS 的升高，从而促进鼠疫菌在巨噬细胞内的存活，使其更有效地抵御巨噬细胞介导的杀伤。此前关于巨噬细胞通过吞噬体酸化和过氧化氢酶活性介导杀伤细菌的有关研究也支持这一推断<sup>[37-38]</sup>。

值得注意的是，*dppC2* 敲除株在巨噬细胞中生存能力增强，对 HeLa 和 RAW264.7 细胞的细胞毒性都有所降低，但小鼠毒力与野生株无明显差异。鼠疫菌对小鼠的致病性是一个复杂的生物学过程，不仅与细胞毒性有关，还涉及细菌的侵袭力、免疫逃逸能力、定殖能力等多个因素<sup>[3,39-40]</sup>。在本研究中鼠疫菌 *dppC2* 缺失后，其巨噬细胞生存能力和细胞毒性与野生株存在显著差异，但这种变化只涉及其致病过程中的个别环节，可能不足以影响其动物毒力。

本研究初步揭示了 ABC 转运蛋白 DppC2 缺失后提高鼠疫菌胞内生存率的机制，为其在细胞存活机制的研究提供了新的视角，有利于深入了解鼠疫菌如何在宿主体内生存、繁殖并引发疾病。宿主细胞内的微环境与细菌原本的生活环境有很大差异，ABC 转运蛋白能够将宿主细胞内的金属离子、氨基酸、维生素等营养物质运输到细胞内，使其能够在宿主细胞内稳定生存<sup>[41-42]</sup>。相比之下，在鼠疫菌中 DppC2 的缺失却能够提高鼠疫菌在巨噬细胞内的生存率，推测 DppC2 在巨噬细胞内所转运的某种或某类物质可能不利于鼠疫菌的胞内生存。这也为我们提出一些问题。例如 DppC2 作为一种 ABC 转运透性酶，其转运的物质是什么？*dppC2* 的缺失为什么会导致 *hdeD*、*katA* 和 *katG* 的转录水平的变化？*dppC2* 的转录受什么机制的调控？这些问题为我们后续相关研究提供了新的思路。

## 作者贡献声明

申雷鸣：实验操作、数据分析、撰写初稿；魏雨萌：修改初稿；崔一鸣：执行调研；赵彦

婷: 技术支持; 姚文武: 参与论文讨论; 刘瑾萍: 背景调研; 郭阳云: 实验方法讨论; 李嘉敏: 论文修改; 石佳丽: 实验材料准备; 宋凯: 实验设计、论文审阅; 宋亚军: 研究指导、论文审阅、经费支持。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] WU YR, XIN YQ, YANG XY, SONG K, ZHANG QW, ZHAO HH, LI CX, JIN Y, GUO Y, TAN YF, SONG YJ, TIAN HY, QI ZZ, YANG RF, CUI YJ. Hotspots of genetic change in *Yersinia pestis*[J]. Nature Communications, 2025, 16: 388.
- [2] ZUO XJ, LIU F, HU YH, HUANG XZ, GUO Y, CUI MN, FAN H, ZHANG X, WU ZH, WANG WR, YANG RF, WU YR, LI JY, CUI YJ. Genomic diversity and transmission patterns of *Yersinia pestis* in Inner Mongolia Autonomous Region, China[J]. Communications Biology, 2024, 7: 1480.
- [3] DEMEURE C, DUSSURGET O, FIOLE GM, LE GUERNAS, SAVIN C, PIZARRO-CERDÁ J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination and diagnostics[J]. Microbes and Infection, 2019, 21(5/6): 202-212.
- [4] ANDRADES VALTUEÑA A, MITTNIK A, KEY FM, HAAK W, ALLMÄE R, BELINSKIJ A, DAUBARAS M, FELDMAN M, JANKAUSKAS R, JANKOVIĆ I, MASSY K, NOVAK M, PFRENGLE S, REINHOLD S, ŠLAUS M, SPYROU MA, SZÉCSÉNYI-NAGY A, TÖRV M, HANSEN S, BOS KL, et al. The stone age plague and its persistence in Eurasia[J]. Current Biology, 2017, 27(23): 3683-3691.e8.
- [5] RASMUSSEN S, ALLENTOF ME, NIELSEN K, ORLANDO L, SIKORA M, SJÖGREN KG, PEDERSEN AG, SCHUBERT M, van DAM A, KAPEL CMO, NIELSEN HB, BRUNAK S, AVETISYAN P, EPIMAKHOV A, KHALYAPIN MV, GNUNI A, KRIISKA A, LASAK I, METSPALU M, MOISEYEV V, et al. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5 000 years ago[J]. Cell, 2015, 163(3): 571-582.
- [6] 郭晓, 仝泽辉, 杜宗敏. 鼠疫减毒活疫苗研究现状与展望[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 567-581.
- [7] GUO X, TONG ZH, DU ZM. Live-attenuated *Yersinia pestis* vaccines[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 567-581 (in Chinese).
- [8] YANG RF, BUTLER T. Discovery of the plague pathogen: lessons learned[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016, 918: 27-33.
- [9] YANG RF, ATKINSON S, CHEN ZQ, CUI YJ, DU ZM, HAN YP, SEBBANE F, SLAVIN P, SONG YJ, YAN YF, WU YR, XU L, ZHANG CT, ZHANG Y, HINNEBUSCH BJ, STENSETH NC, MOTIN VL. *Yersinia pestis* and plague: some knowns and unknowns[J]. Zoonoses, 2023, 3(1): 5.
- [10] RASCOVAN N, SJÖGREN KG, KRISTIANSEN K, NIELSEN R, WILLERSLEV E, DESNUES C, RASMUSSEN S. Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the neolithic decline[J]. Cell, 2019, 176(1/2): 295-305.e10.
- [11] McNALLY A, THOMSON NR, REUTER S, WREN BW. 'Add, stir and reduce': *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(3): 177-190.
- [12] SPINNER JL, WINFREE S, STARR T, SHANNON JG, NAIR V, STEELE-MORTIMER O, HINNEBUSCH BJ. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2014, 95(3): 389-398.
- [13] CHRISTOPOULOS PF, GRIGALAVICIUS M, CORTHAY A, BERG K, THEODOSSIOU TA. Reactive species from two-signal activated macrophages interfere with their oxygen consumption measurements[J]. Antioxidants, 2021, 10(7): 1149.
- [14] HU M, CHEN J, LIU S, XU H. The acid gate in the lysosome[J]. Autophagy, 2023, 19(4): 1368-1370.
- [15] 倪斌, 张义全, 黄新祥, 杨瑞馥, 周冬生. 鼠疫菌 OxyR 调控子蛋白对 *dps* 的转录调控机制[J]. 微生物学报, 2013, 53(7): 685-690.
- [16] NI B, ZHANG YQ, HUANG XX, YANG RF, ZHOU DS. Transcriptional regulation of *dps* by OxyR protein in *Yersinia pestis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(7): 685-690 (in Chinese).
- [17] LESEIGNEUR C, LÊ-BURY P, PIZARRO-CERDÁ J, DUSSURGET O. Emerging evasion mechanisms of macrophage defenses by pathogenic bacteria[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 577559.
- [18] DUDTE SC, HINNEBUSCH BJ, SHANNON JG. Characterization of *Yersinia pestis* interactions with human neutrophils *in vitro*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 358.
- [19] PAQUETTE N, CONLON J, SWEET C, RUS F, WILSON L, PEREIRA A, ROSADINI CV, GOUTAGNY N, WEBER ANR, LANE WS, SHAFFER SA, MANIATIS S, FITZGERALD KA, STUART L, SILVERMAN N. Serine/threonine acetylation of TGF  $\beta$ -activated kinase (TAK1) by *Yersinia pestis* YopJ inhibits innate immune signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(31): 12710-12715.
- [20] OYSTON PC, DORRELL N, WILLIAMS K, LI SR, GREEN M, TITBALL RW, WREN BW. The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3419-3425.
- [21] MAO MQ, HE L, YAN QP. An updated overview on the bacterial PhoP/PhoQ two-component signal transduction

- system[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2025, 15: 1509037.
- [20] CONNOR MG, PULSIFER AR, PRICE CT, ABU KWAIK Y, LAWRENZ MB. *Yersinia pestis* requires host Rab1b for survival in macrophages[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(10): e1005241.
- [21] 陈欣, 宋凯, 武雅蓉, 肖丽婷, 金钧妍, 杜奕溥, 崔玉军, 余莉, 宋亚军. 巨噬细胞内连续传代诱导鼠疫耶尔森菌表型变化的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2022, 42(4): 251-257.
- CHEN X, SONG K, WU YR, XIAO LT, JIN JY, DU YP, CUI YJ, YU L, SONG YJ. Adaptive phenotypes of *Yersinia pestis* induced by successive passages in macrophages[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2022, 42(4): 251-257 (in Chinese).
- [22] ESWARAPPA SM, PANGULURI KK, HENSEL M, CHAKRAVORTTY D. The yejABEF operon of *Salmonella confers* resistance to antimicrobial peptides and contributes to its virulence[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 2): 666-678.
- [23] ZHANG QW, WANG Q, TIAN G, QI ZZ, ZHANG XC, WU XH, QIU YF, BI YJ, YANG XY, XIN YQ, HE J, ZHOU JY, ZENG L, YANG RF, WANG XY. *Yersinia pestis* biovar *Microtus* strain 201, an avirulent strain to humans, provides protection against bubonic plague in *Rhesus macaques*[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(2): 368-377.
- [24] SONG YJ, TONG ZZ, WANG J, WANG L, GUO ZB, HAN YP, ZHANG JG, PEI DC, ZHOU DS, QIN HO, PANG X, HAN YJ, ZHAI JH, LI M, CUI BZ, QI ZZ, JIN LX, DAI RX, CHEN F, LI ST, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans[J]. *DNA Research*, 2004, 11(3): 179-197.
- [25] ÇETIN İ, TOPÇUL MR. Evaluation of the cytotoxic effect of Ly2109761 on HeLa cells using the xCELLigence RTCA system[J]. *Oncology Letters*, 2019, 17(1): 683-687.
- [26] SCHOTTHOEFER AM, BEARDEN SW, HOLMES JL, VETTER SM, MONTENIERI JA, WILLIAMS SK, GRAHAM CB, WOODS ME, EISEN RJ, GAGE KL. Effects of temperature on the transmission of *Yersinia pestis* by the flea, *Xenopsylla cheopis*, in the late phase period[J]. *Parasites & Vectors*, 2011, 4: 191.
- [27] LI B, YANG RF. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(5): 1804-1811.
- [28] SWEET MJ, RAMNATH D, SINGHAL A, KAPETANOVIC R. Inducible antibacterial responses in macrophages[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2024, 25(2): 92-107.
- [29] WU D, QI WF, NIE W, LU ZY, YE YX, LI JH, SUN T, ZHU YF, CHENG HP, WANG XH. BacFlash signals acid-resistance gene expression in bacteria[J]. *Cell Research*, 2020, 31(6): 703-712.
- [30] HONG WZ, WU YE, FU XM, CHANG ZY. Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(7): 328-335.
- [31] GAO QQ, SU SY, LI X, WANG H, LIU JB, GAO S. Transcriptional analysis of RstA/RstB in avian pathogenic *Escherichia coli* identifies its role in the regulation of *hdeD*-mediated virulence and survival in chicken macrophages[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 241: 108555.
- [32] WAN F, FENG X, YIN JH, GAO HC. Distinct H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging system in *Yersinia pseudotuberculosis*: KatG and AhpC act together to scavenge endogenous hydrogen peroxide[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 626874.
- [33] SCHELLER D, BECKER F, WIMBERT A, MEGGERS D, PIENKOß S, TWITTENHOFF C, KNOKE LR, LEICHERT LI, NARBERHAUS F. The oxidative stress response, in particular the *katY* gene, is temperature-regulated in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *PLoS Genetics*, 2023, 19(7): e1010669.
- [34] WANG Z, BIE PF, CHENG J, LU L, CUI BY, WU QM. The ABC transporter YejABEF is required for resistance to antimicrobial peptides and the virulence of *Brucella melitensis*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31876.
- [35] LINTON KJ, HIGGINS CF. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control[J]. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2007, 453(5): 555-567.
- [36] WINTERBOURN CC, KETTLE AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(6): 642-660.
- [37] DAS D, BISHAYI B. Staphylococcal catalase protects intracellularly survived bacteria by destroying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the murine peritoneal macrophages[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2009, 47(2): 57-67.
- [38] WEISS G, SCHAIBLE UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria[J]. *Immunological Reviews*, 2015, 264(1): 182-203.
- [39] KE YH, CHEN ZL, YANG RF. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 106.
- [40] SONI J, SINHA S, PANDEY R. Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1370818.
- [41] HOW SS, NATHAN S, LAM SD, CHIENG S. ATP-binding cassette (ABC) transporters: structures and roles in bacterial pathogenesis[J]. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 2025, 26(1): 58-75.
- [42] AKHTAR AA, TURNER DP. The role of bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporters in pathogenesis and virulence: therapeutic and vaccine potential[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 171: 105734.