



# 毒力基因 *ompA* 在禽致病性大肠埃希菌外膜囊泡诱导鸡气管黏膜上皮细胞凋亡中的功能

程曦, 梅婷, 李哲, 牛露露, 傅丹丹, 宋祥军, 邵颖, 祁克宗, 涂健\*

安徽农业大学动物科技学院 兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036

程曦, 梅婷, 李哲, 牛露露, 傅丹丹, 宋祥军, 邵颖, 祁克宗, 涂健. 毒力基因 *ompA* 在禽致病性大肠埃希菌外膜囊泡诱导鸡气管黏膜上皮细胞凋亡中的功能[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 268-282.

CHENG Xi, MEI Ting, LI Zhe, NIU Lulu, FU Dandan, SONG Xiangjun, SHAO Ying, QI Kezong, TU Jian. Role of virulence gene *ompA* in apoptosis of chicken trachea epithelium cells induced by outer membrane vesicles of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 268-282.

**摘要:**【目的】探究毒力基因 *ompA* 在禽致病性大肠埃希菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)分泌外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)诱导鸡气管黏膜上皮细胞(chicken trachea epithelium cells, CTECs)凋亡中的功能, 为后期深入研究 APEC-OMV 的致病机制奠定基础。【方法】以 APEC 分离株 AE17 为野生株, 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *ompA* 基因缺失株, 利用表达载体 pET-28a 构建 *ompA* 基因过表达株, 并分别提取野生株、缺失株、pET-28a 空载株及过表达株的 OMV。通过透射电镜、纳米颗粒分析、annexin V-FITC/PI 双染检测及超微病理切片等实验探究毒力基因 *ompA* 在 APEC-OMV 诱导 CTECs 细胞凋亡中的功能。【结果】成功构建缺失株 AE17  $\Delta ompA$ 、空载株 AE17-pET-28a 及过表达株 AE17-pET-28a-OmpA。与 AE17 的 OMV (AE17-OMV)相比, AE17  $\Delta ompA$  的 OMV (AE17 $\Delta ompA$ -OMV)颗粒浓度显著减少且平均粒径显著降低( $P<0.05$ ), 而 AE17-pET-28a-OmpA 的 OMV (AE17-pET-28a-OmpA-OMV)颗粒浓度显著增加且平均粒径显著增大( $P<0.05$ )。与 AE17-OMV 处理组相比, AE17 $\Delta ompA$ -OMV 对 CTECs 损伤程度降低, 凋亡率下降, 仅有部分 CTECs 线粒体轻微肿胀; 而 AE17-pET-28a-OmpA-OMV 感染 CTECs 后细胞凋亡率升高且出现显著细胞病变, 如部分线粒体基质变淡、嵴消失甚至转化为空泡状结构等。【结论】*ompA* 基因对 APEC-OMV 的平均粒径和颗粒浓度具有正调控作用, 且促进 APEC-OMV 诱导 CTECs 细胞凋亡。

**关键词:** 禽致病性大肠埃希菌; 外膜囊泡; *ompA*; 鸡气管黏膜上皮细胞; 细胞凋亡

资助项目: 国家自然科学基金(31972644); 2020 年度高校优秀人才支持计划(gxyqZD2020009)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31972644) and the 2020 University Excellent Talents Support Program (gxyqZD2020009).

\*Corresponding author. E-mail: tujian1980@126.com

Received: 2022-04-25; Accepted: 2022-07-13; Published online: 2022-07-22

# Role of virulence gene *ompA* in apoptosis of chicken trachea epithelium cells induced by outer membrane vesicles of avian pathogenic *Escherichia coli*

CHENG Xi, MEI Ting, LI Zhe, NIU Lulu, FU Dandan, SONG Xiangjun, SHAO Ying, QI Kezong, TU Jian\*

Anhui Provincial Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

**Abstract:** [Objective] To explore the role of the virulence gene *ompA* in apoptosis of chicken trachea epithelium cells (CTECs) induced by outer membrane vesicles (OMV) of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), so as to lay a foundation for further research on the pathogenesis of APEC-OMV. [Methods] On the basis of the wild-type APEC strain AE17, the *ompA*-deleted strain was constructed via the CRISPR/Cas9 system and the *ompA*-overexpressing strain via the expression plasmid pET-28a. OMV was respectively extracted from the wild-type strain, the *ompA*-deleted strain, the empty plasmid-transformed strain, and the *ompA*-overexpressing strain. The role of *ompA* in the apoptosis of CTCs induced by APEC-OMV was explored by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, annexin V-FITC/PI double staining assay, and ultramicroscopic pathological sections. [Results] The *ompA*-deleted strain AE17 $\Delta$ *ompA*, the empty plasmid-transformed strain AE17-pET-28a, and the *ompA*-overexpressing strain AE17-pET-28a-OmpA were successfully constructed. Compared with those of AE17-OMV, the particle density and size of OMV decreased in AE17 $\Delta$ *ompA*-OMV ( $P < 0.05$ ) and increased in AE17-pET-28a-OmpA-OMV ( $P < 0.05$ ). Compared with the CTCs induced by AE17-OMV, those induced by AE17 $\Delta$ *ompA*-OMV showcased reduced apoptosis rate and damage degree, with slightly swelling of only some mitochondria. However, the CTCs infected by AE17-pET-28a-OmpA-OMV presented increased apoptosis rate and damage degree as manifested by the matrix fading of some mitochondrion and disappearance or even transformation into vacuolated structures of mitochondrial cristae. [Conclusion] The virulence gene *ompA* positively regulated the particle density and size of APEC-OMV and promoted the apoptosis of CTCs induced by APEC-OMV.

**Keywords:** avian pathogenic *Escherichia coli*; outer membrane vesicle; *ompA*; chicken trachea epithelium cells; apoptosis

禽致病性大肠埃希菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 属于肠道外致病性大肠埃希菌, 易与其他呼吸道疾病混合感染导致家禽高病死率, 从而造成养禽业每年数百万美元的经济损失<sup>[1]</sup>。研究表明,

APEC 因基因组与人尿道致病性大肠埃希菌 (uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) 相似, 而被认为是人类肠外致病性大肠埃希菌的贮藏库<sup>[2]</sup>。因此, 开展 APEC 致病机制的研究具有保障产业发展及公共卫生的重要意义。

外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)是一种由细菌分泌的胞外载体<sup>[3]</sup>,在其生命活动中发挥着重要作用,能够保护细菌免受有害物质侵害、调节细菌生物被膜的形成、介导细菌间的交流以及促进细菌毒性播散<sup>[4]</sup>。研究发现,在大肠埃希菌分泌的 OMV 感染宿主过程中,上皮细胞是损伤最严重、细胞效应最早出现的细胞之一<sup>[5]</sup>。大肠埃希菌 OMV 可通过多重致病机制侵染宿主上皮细胞,诱导细胞释放炎症介质,从而导致宿主发生炎症反应<sup>[6-8]</sup>。但禽致病性大肠埃希菌外膜囊泡(APEC-OMV)的致病机制尚不明确,APEC-OMV 诱导鸡气管黏膜上皮细胞(chicken trachea epithelium cells, CTECs)损伤的过程中起关键作用的毒力因子有待进一步明确。

外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA)作为一种细菌的热变性外膜蛋白,其 N-末端结构域是一个嵌入外膜的八链反平行  $\beta$  桶<sup>[9]</sup>,在不同致病菌中具有高度保守性;其 C-末端结构域以非共价形式锚定到肽聚糖上赋予孔蛋白活性<sup>[10-11]</sup>。因此,OmpA 具有支撑外膜结构和离子渗透性孔蛋白的作用。本课题组前期基于非标记定量(label-free)蛋白质组学分析 APEC-OMV 蛋白组分发现,OmpA 是其中丰度最高的蛋白组分,可诱导 CTECs 发生细胞早期和晚期凋亡,并且导致 CTECs 部分天然免疫基因表达水平发生显著变化<sup>[12]</sup>,因此假定 OmpA 是 APEC-OMV 的重要毒力因子。

本研究以毒力因子 OmpA 为切入点,建立 APEC-OMV 感染 CTECs 细胞模型,并构建 *ompA* 基因缺失株和过表达株,探究毒力基因 *ompA* 在 APEC-OMV 诱导 CTECs 凋亡中的功能作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和引物设计

APEC 临床分离株 AE17, CRISPR/Cas9

基因缺失技术所用质粒 pTargetF 和 pCas,原核表达载体 pET-28a 和 CTECs 等均由兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室保存。OptiPrep™密度梯度培养基购自 Sigma 公司。BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒购自 ApexBio 公司。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。

根据 GenBank 公布的 APEC O2-211 菌株中 *ompA* 基因序列(NZ\_CP006834.2)作为参照,使用软件 Primer Premier 5 设计本研究所需引物(表 1),由通用生物系统(安徽)有限公司合成。

### 1.2 *ompA* 基因缺失株的构建

利用 CRISPR/Cas9 基因缺失技术<sup>[13]</sup>构建含有目的基因 *ompA* 同源臂 donor 质粒 pTargetF,将其电转化到携带 pCas 质粒的 AE17 感受态细胞中替换目的基因。将筛选得到的阳性重组子接种于含有 Kan 抗性的 LB 液体培养基中,加入 0.5 mol/L IPTG 28 °C 恒温摇床培养 16 h 消除 pTargetF 质粒,再将菌液置于 42 °C 过夜培养消除 pCas 质粒,用表 1 中的引物 *ompA*-in-F/R 和 *ompA*-out-F/R 进行 PCR 验证,经测序验证后的缺失株命名为 AE17 $\Delta$ *ompA*。

### 1.3 *ompA* 基因过表达株的构建

用表 1 中的引物 *ompA*-F/R 以 AE17 基因组 DNA 为模板扩增完整的 *ompA* 基因,PCR 验证后进行切胶回收。以胶回收的 DNA 片段为模板、pET28a-OmpA-F/R 为引物,扩增 *ompA* 基因并回收电泳产物,采用 DNA 无缝克隆技术进行同源重组并将重组产物化转至克隆菌株 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,挑取阳性菌落进行 PCR 验证,质粒被命名为 pET-28a-OmpA。将 pET-28a 和 pET-28a-OmpA 分别电转化到 AE17 感受态细胞中,筛选阳性菌株,参照 Trizol 法<sup>[14]</sup>提取

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primer sequences used in the experiments

Primer	Sequence (5'→3')	Usage	Size (bp)
pTargetF-F	AGCGAGGAAGCGGAAGAGCG	Plasmid identification primers of pTargetF	800
pTargetF-R	CAAGATAGCCAGATCAATGT		
sgRNA-F	<u>CGGAATTC</u> GACACTAAATCCAACGTTTAGTTTAGAGCTAGAAATAG	Primers for CRISPR/Cas9 gene deletion system	105
sgRNA-R	CTTCACTGGCCTCAAAAAAAGCACCGACTCGG		
Up-F	TTTTTTTGGAGGCCAGTGAAGAAAAGAATCTCCATC	The upstream sequence of <i>ompA</i>	422
Up-R	TCTTGCCCTCCGAAACCTCATAGTGACCGCCCA		
Down-F	AGGTTTCCGGAGGGGCAAGATTAATTTATGTTTTTC	The downstream sequence of <i>ompA</i>	505
Down-R	<u>CCAAGCTTTT</u> CAAATCATCTGCCAACCAA		
<i>ompA</i> -in-F	GCTGGCGGTGTTGAGT	Endogenous identification primers of <i>ompA</i>	361
<i>ompA</i> -in-R	CGATGCGGTCGGTGTA		
<i>ompA</i> -out-F	TTATGCTGGCGAAGGC	Exogenous identification primers of <i>ompA</i>	1 193
<i>ompA</i> -out-R	CGTTGGTGACGGGAAA		
<i>ompA</i> -F	ATGACTGGTGCTAAACTGGGC	Used for constructing <i>ompA</i> overexpression plasmid	954
<i>ompA</i> -R	TTAAGCTTGC GGCTGAGTTAC		
pET28a-OmpA-F	CAGCAAATGGGTGCGGATCCATGACTGGTGCTAAACTGGGCT		954
pET28a-OmpA-R	GCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCTTAAGCTTGC GGCTGAGTTACA		
Rt- <i>dnaE</i> -F	GATTGAGCGTTATGTCCGAGGC	Used for validation of <i>ompA</i> gene expression levels by qRT-PCR	80
Rt- <i>dnaE</i> -R	GCCCCGCAGCCGTGAT		
Rt- <i>ompA</i> -F	CCGTATGTTGGCTTTGAAATGGGTTAC		
Rt- <i>ompA</i> -R	GTAGATGTCCAGGTCGTCA GTGATTG		

The gene of underline strands for restriction enzyme cutting site.

细菌总 RNA, 以 *dnaE* 为内部参考基因, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法<sup>[15]</sup>计算相对表达水平。过表达 AE17 株命名为 AE17-pET-28a-OmpA, 空载体菌株命名为 AE17-pET-28a。

#### 1.4 APEC-OMV 的提取

参照文献[16], 将 AE17 菌株转接于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 16 h。在 4 °C 条件下以 10 000×g 离心 20 min 后收集上清液。0.45 μm 真空过滤泵抽滤上清液后, 使用 100 kDa 超滤浓缩管在 4 °C 条件下以 2 000 r/min 将上清液浓缩至原体积的 1/10。将浓缩后的上清液转移至无菌超速离心管中, 4 °C、39 000×g 离心 3 h, 弃去上清液, 按照

1:1 000 比例用无菌 PBS 重悬黑色沉淀物质, 获得 OMV 粗提液。

#### 1.5 APEC-OMV 的纯化

参照文献[17], 将 OptiPrep™密度梯度培养基用 10 mmol/L HEPES-150 mmol/L NaCl 稀释至浓度为 25%和 40%, 按照浓度从高到低依次加入无菌超速离心管中, 最后在最上层加入 OMV 粗提液。4 °C、41 000 r/min 超高速离心 6 h 后, 从上往下依次收集梯度成分于 EP 管并做好标记后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 以 OmpA 多克隆抗体为一抗(1:500)、HRP 标记的 IgG 为二抗(1:5 000), 并利用 ECL 显色曝光。

根据免疫印记验证(Western blotting, WB)

结果收集 OMV 富集梯度层, 用 10 mmol/L Hepes-150 mmol/L NaCl 稀释到 30 mL, 装入无菌超速离心管, 4 °C、39 000×g 离心 3 h, 弃去上清, 保留灰黄色沉淀物质并按照 1:1 000 比例重悬, 此为 OMV 的高纯度提取液。配制相应 BCA 显色工作液, 在 96 孔板中 37 °C 孵育 30 min, 使用酶标仪测定  $OD_{620}$  数值。

### 1.6 纳米颗粒分析

通过统计散射颗粒的数量来计算纳米颗粒浓度, 即用粒子矩阵 ZetaView PMX 110 在 405 nm 发射光下将 4 株菌的 OMV 进行浓度测定, 用 PBS 稀释 OMV 至  $1 \times 10^7$ – $1 \times 10^9$  粒/mL, 并对 4 株菌的 OMV 大小及质量分别进行测定。

### 1.7 透射电镜观察

纯化后的 OMV 于碳膜铜网上室温静置约 1 min, 待样品处于半干状态时吸取 3 滴醋酸双氧铀染液在封口膜上, 将铜网在每滴染液滴珠上漂浮负染。室温干燥铜网后使用透射电镜观察。

### 1.8 CCK-8 法检测细胞存活率

参照文献[18], 待 CTECs 铺满 96 孔细胞培养板板底时, 弃去培养基, 用无菌的 PBS 洗涤 3 次, 加入 100  $\mu$ L 不含胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和抗生素的基础培养基, 另加入 10  $\mu$ L 5  $\mu$ g/mL 4 株菌的 OMV 感染细胞<sup>[19]</sup>, 设置仅有 100  $\mu$ L 基础培养基孔为空白对照组。每个样品 3 组平行对照, 作用时间选择 3、6、12 和 24 h 共 4 个时间段。当到达每个时间节点时, 弃去培养基, 每孔加入 100  $\mu$ L 基础培养基和 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 置于细胞培养箱避光孵育 1.5 h, 使用酶标仪测定  $OD_{450}$  数值。

### 1.9 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡情况

#### 1.9.1 流式细胞仪检测

按照 CCK-8 实验建立的毒力模型进行实验

操作。待模型建立结束后收集细胞, 用无菌 PBS 洗涤细胞 2 次后, 加入 100  $\mu$ L 1×Binding Buffer 重悬细胞, 再加入 5  $\mu$ L annexin V-FITC 和 10  $\mu$ L PI Staining Solution, 轻轻混匀。在避光条件下室温反应 15 min 后, 加入 400  $\mu$ L 1×Binding Buffer, 混匀后置于冰上。样品在 1 h 内用流式细胞仪检测。

在流式细胞术双染检测中, annexin V-FITC 与 PI 均不能标记活细胞, 这类细胞主要富集于 Q4 区域; annexin V-FITC 可标记凋亡细胞中的早期凋亡细胞而 PI 不可标记, 这类细胞主要富集于 Q3 区域; annexin V-FITC 与 PI 可同时标记晚期凋亡细胞, 这类细胞主要富集于 Q2 区域<sup>[20]</sup>。细胞凋亡评价包括早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞<sup>[21]</sup>, 即细胞凋亡数量为 Q2 和 Q3 数值之和。

#### 1.9.2 荧光显微镜观察

在 24 孔细胞培养板的每孔底部放置无菌细胞爬片。按照 CCK-8 实验建立的毒力模型进行实验操作。待模型建立结束后, 用无菌 PBS 洗涤 2 次, 取出细胞爬片置于洁净平皿上。加入 100  $\mu$ L 1×Binding Buffer、5  $\mu$ L annexin V-FITC 和 10  $\mu$ L PI Staining Solution, 轻轻混匀后避光、室温反应 15 min。混合液滴加于细胞爬片上, 置于荧光显微镜下观察细胞状态。

#### 1.10 光学显微镜观察

按照 CCK-8 实验建立的毒力模型进行前处理后利用光学显微镜观察 CTECs 形态变化。

#### 1.11 超薄切片和电镜观察

按照 CCK-8 实验建立的毒力模型进行实验操作后收集 CTECs。用无菌 PBS 洗涤 2 次后, 离心弃去上清并将细胞放置于 2.5%戊二醛溶液中至少 24 h, 随后在预冷的 1 四氧化锇水溶液中固定 2 h。通过 30–100 乙醇系列脱水, 细胞被浸透于纯环氧树脂中包埋。包

埋后, 用超薄切片机切成约 70 nm 的超薄切片。最后超薄切片用柠檬酸铅染色、透射电镜观察。

### 1.12 统计学分析

本研究所有实验数据利用 Graphpad prism 8.0.2 软件 Student's *t*-test 方法和单因素方差进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因缺失株 AE17 $\Delta$ *ompA* 的鉴定

将回收的 sgRNA、UP 和 DOWN 三组片段连接大肠埃希菌敲除质粒 pTargetF, 并转化至 DH5 $\alpha$ 。提取质粒, 利用 pTargetF 鉴定引物进行菌体 PCR 鉴定, 以 pTargetF 空载质粒为对照, 结果与预期相符, 构建 pTargetF-*OmpA* 重组载体扩增出 1 832 bp 条带, 空载质粒扩增出 800 bp 条带, 见图 1A。

将重组质粒 pTargetF-*OmpA* 电转入含有 pCas-AE17 感受态细胞中, 用内侧引物

*ompA*-in-F/R 和外侧引物 *ompA*-out-F/R 鉴定 AE17 $\Delta$ *ompA* 菌株, 内侧未扩增出片段, 外侧扩增出大小为 105 bp 的片段, 表明缺失株构建成功, 见图 1B。

### 2.2 基因过表达株 AE17-pET-28a-*OmpA* 的鉴定

以 AE17 基因组 DNA 为模板, 利用 *ompA*-F/R 引物进行 PCR 扩增, 在 954 bp 处有符合目的片段大小的扩增条带, 见图 2A。将 *ompA* 基因连接原核表达载体 pET-28a 并利用 pET-28a 通用引物进行菌体 PCR 鉴定, 以空载菌株为对照, 结果重组载体扩增出 1 209 bp 条带, 空载菌株扩增出 255 bp 条带, 见图 2B。将鉴定无误的重组载体进行测序, 结果表明重组表达载体 pET-28a-*OmpA* 构建成功。分别将空载质粒 pET-28a 和重组载体 pET-28a-*OmpA* 电转入 AE17 感受态细胞中, 提取细菌总 RNA, qRT-PCR 鉴定 *ompA* 过表达菌株构建成功, 见图 2C。

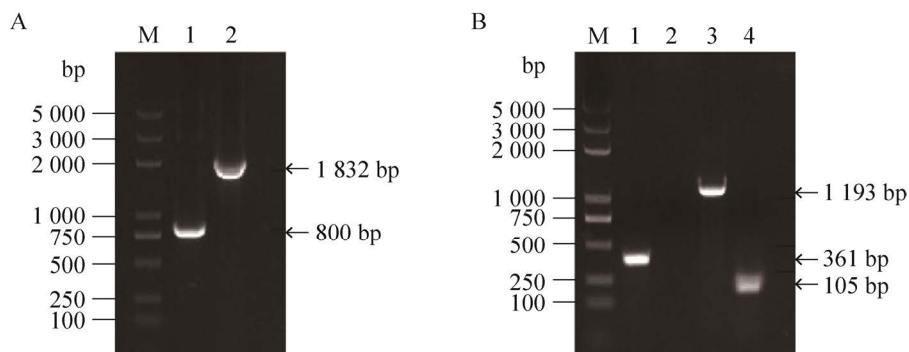


图 1 重组载体 pTargetF-*OmpA* (A)和 *ompA* 基因缺失株(B)的 PCR 鉴定

Figure 1 Identification of pTargetF-*OmpA* recombinant plasmid (A) and *ompA* gene deletion strain (B) by PCR. M: Trans 5k DNA Marker I. A, 1: Amplification of pTargetF empty plasmid; 2: Amplification of pTargetF-*OmpA* recombinant plasmid. B, 1: Using *ompA*-in-F/R as the identification primer, AE17 amplified the target fragment of 361 bp; 2: Using *ompA*-in-F/R as the identification primer, AE17 $\Delta$ *ompA* could not be amplified; 3: Using *ompA*-out-F/R as the identification primer, AE17 amplified the target fragment of 1 193 bp; 4: Using *ompA*-out-F/R as the identification primer, AE17 $\Delta$ *ompA* amplified the target fragment of 105 bp.

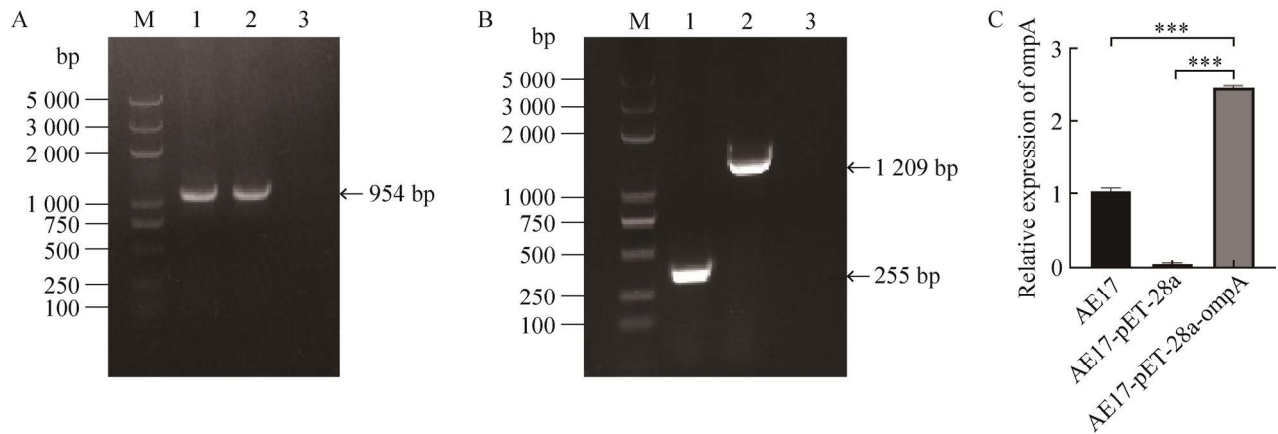


图2 *ompA* 基因(A)和重组载体 pET-28a-OmpA (B)的 PCR 鉴定、qRT-PCR 鉴定 *ompA* 基因的转录水平(C)

Figure 2 Identification of *ompA* gene (A) and pET-28a-OmpA (B) recombinant plasmid by PCR and validation of *ompA* gene expression levels by qRT-PCR (C). M: Trans 5k DNA marker I; A, 1, 2: Amplification of *ompA* gene; 3: Negative control. B, 1: Amplification of pET-28a empty plasmid; 2: Amplification of pET-28a-OmpA recombinant plasmid; 3: Negative control. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 2.3 密度梯度离心后 APEC-OMV 免疫印记检测

Western blotting 结果如图 3 所示, 外膜蛋白 OmpA 主要分布在第 2 层与第 3 层。这一结果表明粗提后的 APEC-OMV 在经过密度梯度离心后, 在 25%–40% Optiprep 分离液中主要分布在 2、3 层, 即密度为 28–31。

参照上述方法分别提取 AE17-OMV、AE17 $\Delta$ *ompA*-OMV、AE17-pET-28a-OMV 和 AE17-pET-28a-OmpA-OMV, 经由 BCA 蛋白浓度测量结果表明 AE17-OMV 蛋白浓度为 321.84 ng/ $\mu$ L, AE17 $\Delta$ *ompA*-OMV 蛋白浓度为 288.47 ng/ $\mu$ L,

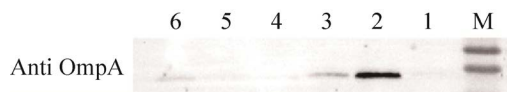


图3 不同 Optiprep 密度梯度下的 APEC-OMV 分布情况

Figure 3 Immunoblot analysis of APEC-OMV isolated by density gradient centrifugation. M: Protein marker; 1–6: 25%–40% optiprep separation solution.

AE17-pET-28a-OMV 浓度为 123.24 ng/ $\mu$ L, AE17-pET-28a-OmpA-OMV 浓度为 373.29 ng/ $\mu$ L。

### 2.4 四株菌的 OMV 纳米颗粒分析和透射电镜观察

如图 4 所示, 透射电镜下 OMV 形态、大小并不均一, 大多呈无色透明的双层球状小泡, 边缘光滑且整齐。纳米颗粒分析结果如图 5 所示, AE17-OMV 在 *ompA* 基因缺失后其平均粒径显著减小, 颗粒浓度显著下降, 而在 *ompA* 基因过表达时趋势相反。

### 2.5 四株菌的 OMV 对 CTECs 生长的抑制作用

CCK-8 法检测结果表明在感染时间为 24 h 时, 4 株菌的 OMV 对 CTECs 的抑制作用最为显著, 见图 6。

### 2.6 四株菌 OMV 诱导 CTECs 凋亡率的测定

流式细胞仪分析结果如表 2 和图 7 所示, 与 Blank 组相比, AE17-OMV、AE17 $\Delta$ *ompA*-OMV、AE17-pET-28a-OMV 和 AE17-pET-28a-OmpA-OMV 感染 CTECs 后在早期和晚期凋亡



数量均有所增加。与 AE17-OMV 组和 Blank 组相比, *ompA* 基因缺失后细胞凋亡率降低; 而 *ompA* 基因过表达后细胞凋亡率呈现明显提高的趋势, 特别是在早期凋亡方面影响较多。荧

光显微镜观察结果与流式细胞仪检测趋势保持一致, 如图 8 所示。上述实验结果表明, 4 株菌的 OMV 均可诱导 CTECs 发生早期和晚期凋亡, 且 *ompA* 基因对细胞凋亡具有促进作用。

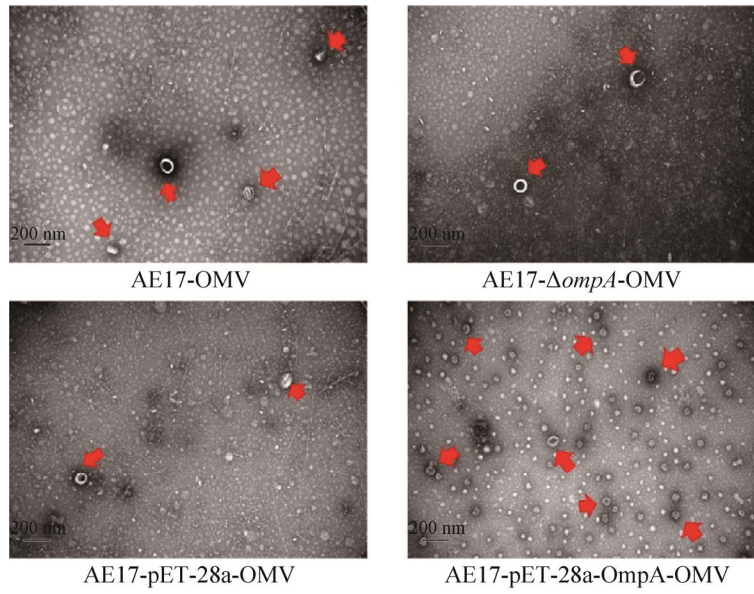


图 4 四株菌的 OMV 的透射电镜图(比例尺=200 nm)

Figure 4 Transmission electron microscopy of OMV from four kinds strains (scale=200 nm). The red arrow indicates the APEC-OMV under transmission electron microscopy.

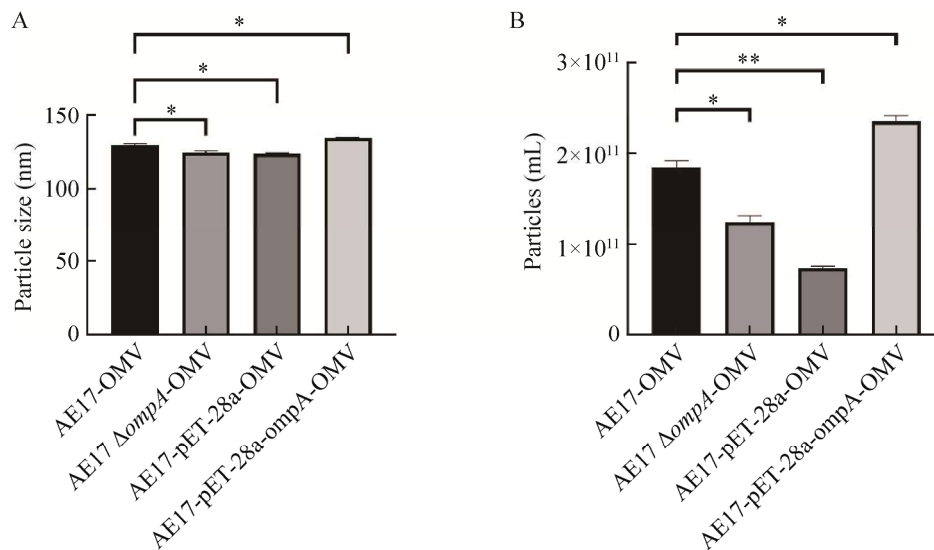


图 5 四株菌的 OMV 的纳米颗粒追踪分析结果

Figure 5 Results of nanoparticle tracking analysis of OMV from four kinds strains. A: Particle size of main. B: Particulate density. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



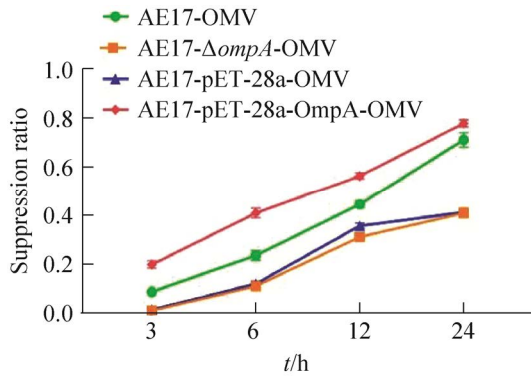


图 6 四株菌 OMV 对 CTECs 生长的抑制作用

Figure 6 Inhibition rate of OMV from four kinds strains on the growth of CTECs. Standard deviation stands for the probable error of positive and negative 5.

## 2.7 四株菌 OMV 诱导 CTECs 病变的光镜观察

光学显微镜观察结果如图 9 所示, CTECs 正常形态下多呈长梭形, 在视野范围内呈现平展伸张状态, 排列紧密; AE17-OMV 感染 CTECs 24 h 后, 单细胞内有空泡且空泡比较多, 出现部分细胞脱落, 视野内的细胞较为稀疏。可见 APEC-OMV 对 CTECs 的细胞形态存在一定影响。AE17 $\Delta$ ompA-OMV 感染 CTECs 后细胞内也出现少许空泡, 但细胞脱落数量较 AE17-OMV 组明显减少。AE17-pET-28a-OmpA-OMV 感染 CTECs 后细胞脱落数量明显增多, 未更换培养基中能肉眼观察到细胞碎片, 且视野内细胞贴壁数量锐减。相较而言 AE17-pET-28a-OMV 虽

然对 CTECs 细胞形态也有所改变, 如细胞内出现一些空泡等, 但是改变程度明显不及 AE17-pET-28a-OmpA-OMV 对 CTECs 的影响。

## 2.8 四株菌 OMV 诱导 CTECs 病变的超微观察

透射电镜观察结果如图 10 所示, 与 CTECs 的正常形态相比, AE17-OMV 感染 CTECs 24 h 后细胞膜部分破损, 细胞质外流; 内质网轻度肿胀, 部分断裂; 线粒体变大变圆, 嵴变短变少甚至消失; 部分嵴断裂, 形成大小不一的、不规则的空泡。相较之下, AE17 $\Delta$ ompA-OMV 感染后细胞病变减缓, 仅有部分线粒体轻微肿胀, 内质网外观形态大体正常。虽然 AE17-pET-28a-OMV 感染 CTECs 后也会对细胞造成轻微损伤, 如内质网轻微肿胀、线粒体稍肿胀等, 但 AE17-pET-28a-OmpA-OMV 感染后的细胞病变更为明显, 如细胞内部分内质网严重肿胀、断裂; 线粒体基质变淡、嵴消失甚至转化为小泡状结构; 自噬体显著增多。

## 3 讨论与结论

OMV 是一种由细菌自然分泌的、具有双层蛋白脂结构的球形囊泡, 其中含有细胞壁成分、膜蛋白、细胞质蛋白和细菌核酸等免疫活性分子<sup>[22-23]</sup>。作为病原菌极为重要的毒力载体, OMV 可携带毒力因子通过内吞作用进入感染宿主细胞内, 提高病原菌的致病力<sup>[24]</sup>。随着研

表 2 四株菌 OMV 感染 CTECs 后细胞凋亡率

Table 2 The apoptosis rate of CTECs infected by OMV from four kinds strains

Group	Early apoptosis (%)	Late apoptosis (%)	Apoptosis (%)
Blank	2.48±0.05	2.43±0.09	4.91±0.11
AE17-OMV	13.95±0.15***	13.31±0.34***	27.27±0.35***
AE17 $\Delta$ ompA-OMV	6.11±0.09***	8.44±0.23***	14.55±0.19***
AE17-pET-28a-OMV	6.27±0.10***	7.62±0.01***	13.87±0.10***
AE17-pET-28a-OmpA-OMV	23.62±0.88***	13.83±0.76***	37.45±0.81***

Mean±SD, n=3; \*\*\*: P<0.001.

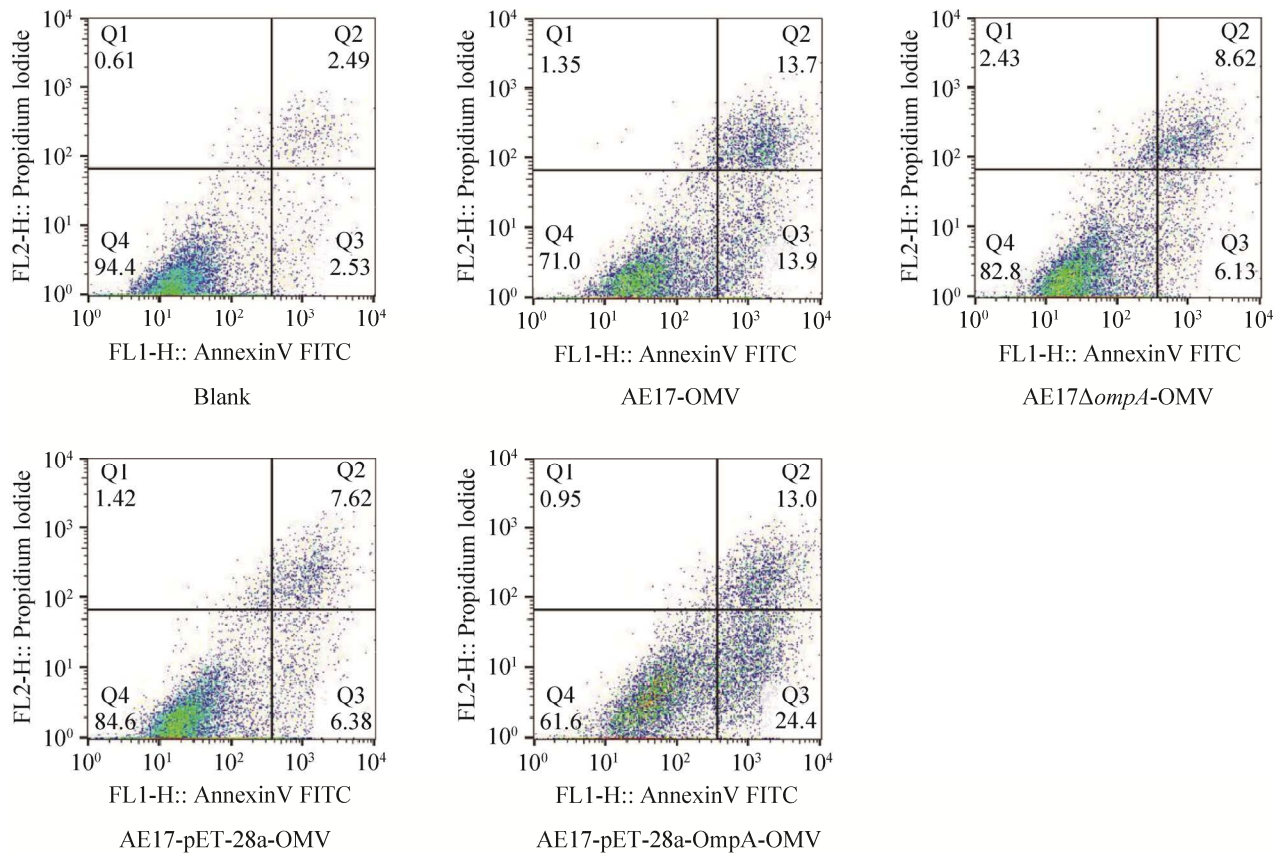


图7 流式细胞仪检测4株菌OMV感染CTECs后的细胞凋亡结果

Figure 7 The apoptosis of CTECs infected by OMV from four kinds strains detected by Fluorescence-Activated Cell Sorter.

究的深入, 针对揭示 APEC-OMV 分子致病机制的研究目标、明确 APEC-OMV 组分中起关键致病作用的毒力因子及其与感染宿主细胞互作机制均有助于进一步的研究。

OMV 的产生与基因的调控作用相关, 而并不是随机发生事件。目前 OMV 形成的生物学机制尚无定论, 包膜交联调节机制为其中一种假说。革兰氏阴性菌的包膜主要由外膜和细胞膜组成, 与周质空间之间含有一层肽聚糖 (peptidoglycan, PG)<sup>[25]</sup>。对于大多数革兰氏阴性菌来说, 包膜的稳定性来自于不同的包膜之间的相互交联作用<sup>[26-27]</sup>。Samsudin 等证明, OmpA、PG 和布劳恩脂蛋白 (Braun's lipoprotein, BLP 或 Lpp) 之间的相互作用对于维持细胞包膜的

完整性至关重要<sup>[28]</sup>。OmpA 作为一种外膜孔蛋白, 包含二氨基庚二酸 (diaminopimelate, DAP) 的周质结合位点, 而 DAP 是 PG 的组分<sup>[29]</sup>。由此推测, APEC 可能通过 *ompA* 基因调控 PG 的组分, 借以调节 Lpp-PG 交联的数量, 从而对 OMV 的产生造成影响。本研究以 APEC 临床分离株 AE17 为野生株, 构建 *ompA* 基因缺失株及过表达株, 分别提取上述菌株的 OMV 进行电镜观察和纳米颗粒分析。结果发现 APEC-OMV 在 *ompA* 基因缺失后其平均粒径显著减小且颗粒浓度显著下降, 而在 *ompA* 基因过表达后结果相反。由此推测 *ompA* 基因对 APEC-OMV 产生的平均粒径和颗粒浓度具有正调控作用。

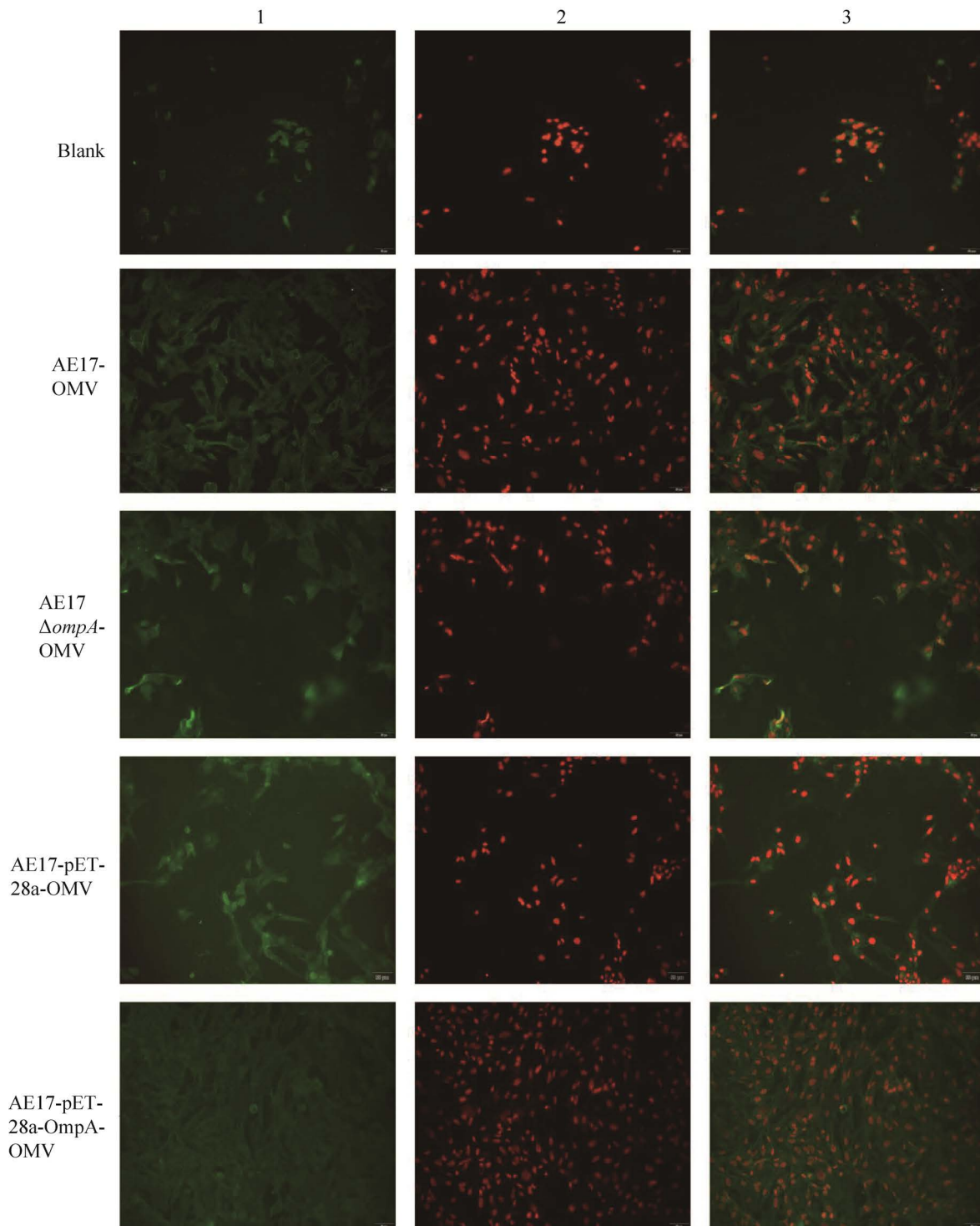


图 8 Annexin V-FITC/PI 染色后荧光显微镜观察 4 株菌 OMV 诱导 CTECs 凋亡结果(比例尺=50  $\mu\text{m}$ )

Figure 8 Apoptosis of CTECs infected by OMV from four kinds strains observed by fluorescence microscopy after Annexin V-FITC/PI staining (Scale=50  $\mu\text{m}$ ). 1: Viable apoptotic cell (green fluorescence); 2: Non-viable apoptotic cell (red fluorescence); 3: Combination image of viable and non-viable apoptotic cell.



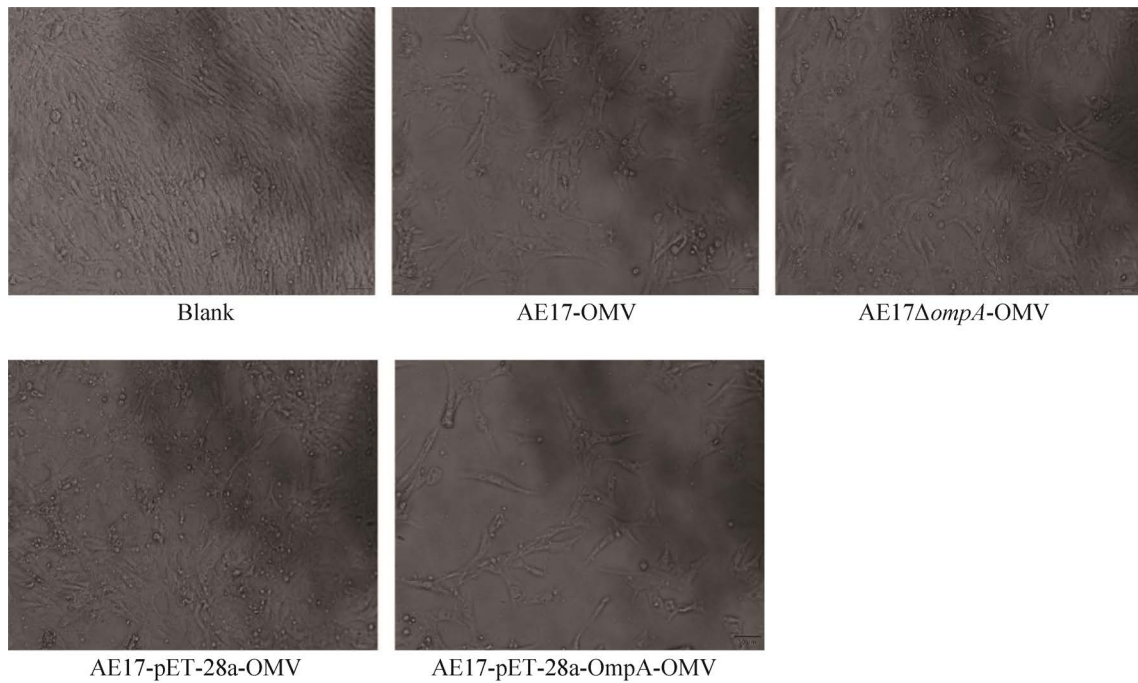


图 9 光学显微镜观察 4 株菌 OMV 诱导 CTECs 损伤情况(比例尺=50  $\mu\text{m}$ )

Figure 9 The damage of CTECs infected by OMV from four kinds strains by light microscopy (scale=50  $\mu\text{m}$ ).

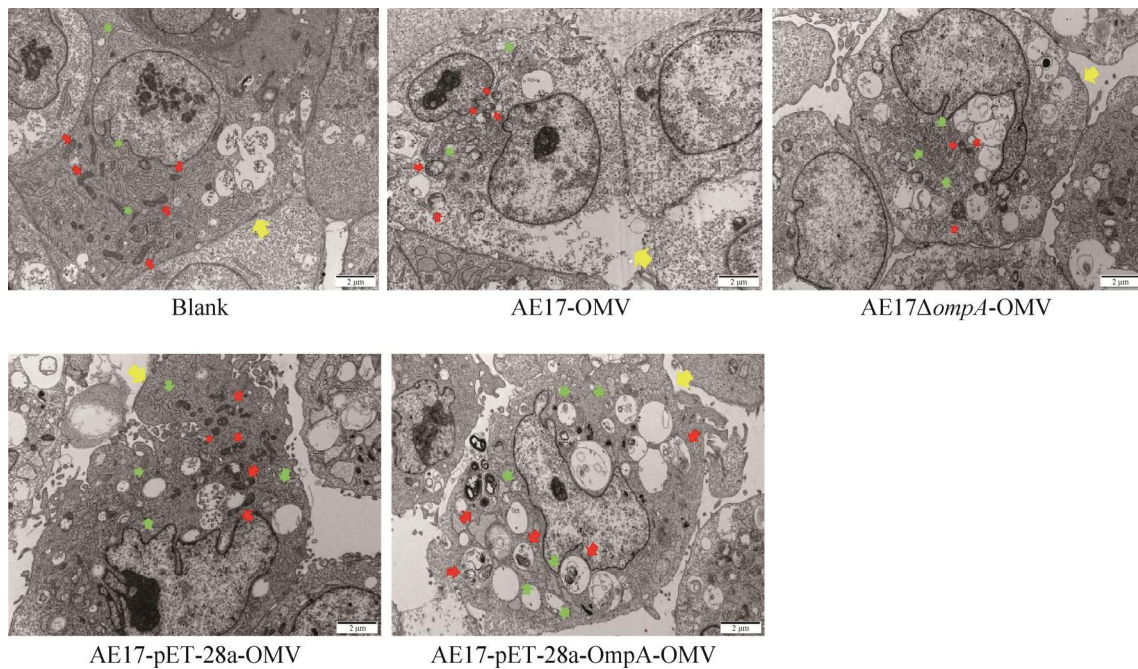


图 10 透射电镜观察 4 株菌 OMV 诱导 CTECs 损伤情况(比例尺=2  $\mu\text{m}$ )

Figure 10 The ultrathin changes of CTECs infected by OMV from four kinds strains by transmission electron microscope (scale=2  $\mu\text{m}$ ). Red arrows are mitochondria; Green arrows are endoplasmic reticulum; Yellow arrows are cell membranes.

为了进一步探究毒力因子 OmpA 对 APEC-OMV 毒力作用的影响,本研究利用 Annexin V-FITC/PI 双染法测定 4 株 APEC 菌 OMV 分别感染 CTECs 的凋亡情况,结果发现 APEC-OMV 可诱导 CTECs 发生早期和晚期凋亡,且 *ompA* 基因对细胞凋亡具有促进作用。前期有相关研究发现,OMV 能够诱导细胞发生凋亡的条件取决于其能够将蛋白质毒素传递至细胞内的细胞器,如线粒体<sup>[30]</sup>。致病性大肠埃希菌和淋病奈瑟氏菌的 OMV 可通过传递蛋白质毒素以破坏线粒体,释放细胞色素 C 诱导凋亡体的形成<sup>[31-32]</sup>,从而激活细胞凋亡起始者 Caspase-9 和下游执行者 Caspase-3、Caspase-7,导致发生细胞凋亡现象。淋球菌、UPEC 和铜绿假单胞菌的 OMV 能够导致线粒体功能障碍,从而抑制宿主蛋白质的合成<sup>[33]</sup>。而蛋白质合成的长期抑制作用可通过调节 BCL-2 家族成员激活线粒体的凋亡<sup>[34]</sup>。因此,OMV 激活促凋亡的 BCL-2 拮抗剂(BCL-2 antagonist/killer, BAK),从而随着时间的推移充分破坏线粒体并激活 Caspase-3<sup>[35]</sup>。Caspase 活性具有自我调节功能,而细胞凋亡通常维持质细胞膜的完整性,但可能导致继发性坏死<sup>[36]</sup>。这些过程是否会影响 OMV 诱导细胞凋亡的能力,以及微生物分子如内毒素和蛋白质毒素的相对浓度对实验结果是否存在影响,均有待于进一步的探究。

线粒体在细胞凋亡和焦亡等一系列主要细胞活动中起着关键作用。介导线粒体断裂的典型途径是由一个含有 GTPase 结构域的细胞质蛋白调控的,该蛋白属于动力蛋白(dynamin)家族,被称为 dynamin-related protein 1 或 Drp1<sup>[25]</sup>。有研究表明,鲍曼不动杆菌诱导的线粒体断裂和细胞毒作用需要 Drp1,而 OmpA 可以激活小鼠肺上皮细胞中由宿主 GTPase 蛋白 Drp1 驱动的典型线粒体断裂途径<sup>[37]</sup>。本研究通过光学显

微镜和透射电镜观察发现,APEC-OMV 中 *ompA* 过量表达会对 CTECs 的毒力作用增加,其中线粒体基质变淡、嵴消失甚至转化为小泡状结构,反之则损伤降低。目前尚不清楚携带 OmpA 的 OMV 是否在 APEC 感染中以宿主线粒体为目标,且 OmpA 在 OMV 中如何诱导线粒体损伤?根据现阶段的研究推测,其中一种可能是孔蛋白通道直接插入线粒体,导致细胞色素 C 释放到细胞质中,从而扰乱线粒体功能导致随后的细胞死亡。另一种可能是 OmpA 与线粒体蛋白的相互作用,激活了 Drp1 介导的线粒体分裂途径,导致线粒体网络断裂和细胞死亡。下一步的研究将确定哪些宿主细胞蛋白与 OmpA 相互作用,以及 OmpA 的哪些结构特征是表型所识别或所需的,这将为这一过程提供更好的机制解决方案。

## 参考文献

- [1] OLSÉN A, JONSSON A, NORMARK S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 1989, 338(6217): 652-655.
- [2] BÉLANGER L, GARENAUX A, HAREL J, BOULIANNE M, NADEAU E, DOZOIS CM. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2011, 62(1): 1-10.
- [3] 卞志标,李冰,勾红潮,杨君,臧莹安,李春玲.革兰阴性菌外膜囊泡的研究进展[J].*畜牧与兽医*, 2020(5): 136-142.  
BIAN ZB, LI B, GOU HC, YANG J, ZANG YA, CL. *Advances in research on outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020(5): 136-142 (in Chinese).
- [4] LEITNER DR, LICHTENEGGER S, TEMEL P, ZINGL FG, RATZBERGER D, ROIER S, SCHILD-PRÜFERT K, FEICHTER S, REIDL J, SCHILD S, SCHILD S. A combined vaccine approach against *Vibrio cholerae* and ETEC based on outer membrane vesicles[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 823.
- [5] CAÑAS MA, FÁBREGA MJ, GIMÉNEZ R, BADIA J, BALDOMÀ L. Outer membrane vesicles from probiotic

- and commensal *Escherichia coli* activate NOD1-mediated immune responses in intestinal epithelial cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 498.
- [6] MURASE K, MARTIN P, PORCHERON G, HOULE S, HELLOIN E, PÉNARY M, NOUGAYRÈDE JP, DOZOIS CM, HAYASHI T, OSWALD E. HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2016, 213(5): 856-865.
- [7] KIM JH, YOON YJ, LEE J, CHOI EJ, YI N, PARK KS, PARK J, LÖTVALL J, KIM YK, GHO YS. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules *in vitro* and *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59276.
- [8] LEE J, YOON YJ, KIM JH, DINH NTH, GO G, TAE S, PARK KS, PARK HT, LEE C, ROH TY, DI VIZIO D, GHO YS. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* regulate neutrophil migration by induction of endothelial IL-8[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2268.
- [9] BAGOS PG, LIAKOPOULOS TD, SPYROPOULOS IC, HAMODRAKAS SJ. PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(web server issue): W400-W404.
- [10] FINDLAY HE, MCCLAFFERTY H, ASHLEY RH. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein[J]. *BMC Microbiology*, 2005, 5: 5.
- [11] REUSCH RN. Biogenesis and functions of model integral outer membrane proteins: *Escherichia coli* OmpA and *Pseudomonas aeruginosa* OprF[J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279(6): 893.
- [12] 李芳果. APEC-OMV 关键毒力因子 OmpA 对鸡气管上皮细胞天然免疫的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2021.
- LI FG. Effect of OmpA, the key virulence factor of APEC-OMV, on the innate immunity of chicken tracheal epithelial cells[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [13] 富国文, 单春兰, 敖平星, 赵汝, 高丽波, 刘超英, 高洪. 应用 CRISPR/Cas9 系统构建大肠埃希氏菌 *irp2* 基因缺失株[J]. *动物医学进展*, 2021(1): 50-55.
- FU GW, SHAN CL, AO PX, ZHAO R, GAO LB, LIU CY, GAO H. Construction of *irp2* gene deletion *Escherichia coli* strain with CRISPR/Cas9 system[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021(1): 50-55 (in Chinese).
- [14] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Ecological Applications*, 1987, 162(1): 156-159.
- [15] XUE M, XIAO Y, FU D, RAHEEM MA, SHAO Y, SONG X, TU J, XUE T, QI K. Transcriptional regulator YqeI, locating at ETT2 locus, affects the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Animals: Basel*, 2020, 10(9): E1658.
- [16] KIM OY, PARK HT, DINH NTH, CHOI SJ, LEE J, KIM JH, LEE SW, GHO YS. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 626.
- [17] 程谦. 肠出血性大肠杆菌细菌外膜囊泡毒力因子的鉴定及功能初步探究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2019.
- CHENG Q. Identification of virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* bacterial outer membrane vesicles and preliminary study on their functions[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2019 (in Chinese).
- [18] 阮苑. RyhB/cysE 影响禽致病性大肠杆菌生物表型及致病性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2020.
- RUAN Y. Effects of RyhB/cysE on biological phenotype and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [19] 杨君. 副猪嗜血杆菌外膜囊泡蛋白质组分分析、致病作用及 *lpxM* 基因缺失株构建的研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2020.
- YANG J. Analysis of protein components of outer membrane vesicle of *Haemophilus parasuis*, its inflammatory effect and construction of *lpxM* gene deletion strain[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [20] 徐婵, 黄慧琪, 吕奕兵, 林亲雄, 宋萍, 杨新洲. 藏木香石油醚快速溶剂萃取物体外抑制肝癌细胞增殖活性研究[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2020(5): 833-840.
- XU C, HUANG HQ, LYU YB, LIN QX, SONG P, YANG XZ. Study on inhibiting hepatocarcinoma cells proliferation of petroleum ether extract from *Inula racemosa* by accelerated solvent extraction *in vitro*[J]. *Journal of Central China Normal University: Natural*

- Sciences, 2020(5): 833-840 (in Chinese).
- [21] MA Q, WANG J, REN Y, MENG F, ZENG L. Pathological mechanistic studies of osimertinib resistance in non-small-cell lung cancer cells using an integrative metabolomics-proteomics analysis[J]. *Journal of Oncology*, 2020, 2020: 6249829.
- [22] HÜTTENER M, DIETRICH M, PAYTUBI S, JUÁREZ A. HilA-like regulators in *Escherichia coli* pathotypes: the YgeH protein from the enteroaggregative strain 042[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 268.
- [23] WARTH A, MULEY T, MEISTER M, STENZINGER A, THOMAS M, SCHIRMACHER P, SCHNABEL PA, BUDCZIES J, HOFFMANN H, WEICHERT W. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, 30(13): 1438-1446.
- [24] 江志威. 杀鱼爱德华氏菌外膜囊泡转运型细菌毒力因子的筛选及初步功能研究[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2018.  
JIANG ZW. Screening and preliminary function study of virulence factors of *Edwardsiella ichtiocyti* outer membrane vesicle transport bacteria[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [25] SILHAVY TJ, KAHNE D, WALKER S. The bacterial cell envelope[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(5): a000414.
- [26] BRAUN V, WOLFF H. Attachment of lipoprotein to murein (peptidoglycan) of *Escherichia coli* in the presence and absence of penicillin FL 1060[J]. *Journal of Bacteriology*, 1975, 123(3): 888-897.
- [27] CASCALES E, BERNADAC A, GAVIOLI M, LAZZARONI JC, LLOUBES R. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(3): 754-759.
- [28] SAMSUDIN F, BOAGS A, PIGGOT TJ, KHALID S. Braun's lipoprotein facilitates OmpA interaction with the *Escherichia coli* cell wall[J]. *Biophysical Journal*, 2017, 113(7): 1496-1504.
- [29] PARK JS, LEE WC, YEO KJ, RYU KS, KUMARASIRI M, HESEK D, LEE M, MOBASHERY S, SONG JH, KIM SI, LEE JC, CHEONG C, JEON YH, KIM HY. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the Gram-negative bacterial outer membrane[J]. *FASEB Journal*, 2012, 26(1): 219-228.
- [30] DHITAL S, DEO P, STUART I, NADERER T. Bacterial outer membrane vesicles and host cell death signaling[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(12): 1106-1116.
- [31] DEO P, CHOW SH, HAY ID, KLEIFELD O, COSTIN A, ELGASS KD, JIANG JH, RAMM G, GABRIEL K, DOUGAN G, LITHGOW T, HEINZ E, NADERER T. Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(3): e1006945.
- [32] BIELASZEWSKA M, RÜTER C, BAUWENS A, GREUNE L, JAROSCH KA, STEIL D, ZHANG W, HE X, LLOUBES R, FRUTH A, KIM KS, SCHMIDT MA, DOBRINDT U, MELLMANN A, KARCH H. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(2): e1006159.
- [33] DEO P, CHOW SH, HAN ML, SPEIR M, HUANG C, SCHITTENHELM RB, DHITAL S, EMERY J, LI J, KILE BT, VINCE JE, LAWLOR KE, NADERER T. Mitochondrial dysfunction caused by outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria activates intrinsic apoptosis and inflammation[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(11): 1418-1427.
- [34] SPEIR M, LAWLOR KE, GLASER SP, ABRAHAM G, CHOW S, VOGRIN A, SCHULZE KE, SCHUELEIN R, O'REILLY LA, MASON K, HARTLAND EL, LITHGOW T, STRASSER A, LESSENE G, HUANG DC, VINCE JE, NADERER T. Eliminating *Legionella* by inhibiting BCL-XL to induce macrophage apoptosis[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 15034.
- [35] CZABOTAR PE, LESSENE G, STRASSER A, ADAMS JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(1): 49-63.
- [36] WANG Y, GAO W, SHI X, DING J, LIU W, HE H, WANG K, SHAO F. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 99-103.
- [37] TIKU V, KOFOED EM, YAN D, KANG J, XU M, REICHEL T, DIKIC I, TAN MW. Outer membrane vesicles containing OmpA induce mitochondrial fragmentation to promote pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 618.