

DOI:10.13350/j.cjpb.250103

• 论著 •

鼠伤寒沙门菌诱导巨噬细胞 RAW264.7 铜死亡机制研究*

李丽,袁西露,程龙云,谢荣现,祝姚姚,李冰清**,宋楠楠**

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系,山东济南 250000)

【摘要】 **目的** 讨论病原菌感染后诱导巨噬细胞发生铜死亡的现象并分析该细胞反应对细菌胞内生存影响,探索细胞铜死亡的机制及其对鼠伤寒沙门菌胞内生存和致病性的影响。 **方法** 鼠伤寒沙门菌入侵、加铜离子载体伊利司莫(Elesclomol,ES)和氯化铜 24 h后,收集细胞并设置未处理细胞对照组、ES对照组、WT感染组,用电感耦合等离子质谱检测细胞内铜离子浓度变化;细胞内铜染色后,使用共聚焦显微镜观察铜离子的分布情况;细胞入侵 48 h后,设置未处理细胞对照组、细胞中和感染的细胞中加入不同浓度铜离子(1 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$),采用乳酸脱氢酶法检测了添加铜离子前后感染细胞死亡率的差异;细胞入侵 24 h后,免疫荧光和 Western blot 方法检测铜死亡关键指标硫辛酰化修饰的 DLAT 蛋白寡聚体产生及分布情况。 **结果** 感染和加入药物干预的 RAW264.7 细胞内的铜元素的含量无差异,细胞内铜元素含量分别为 NC 组 0.06533 ± 0.008327 ,ES 组 0.1580 ± 0.002646 ,WT 组为 0.07367 ± 0.007572 ;共聚焦显微镜显示感染后细胞内铜离子分布形态发生变化,铜离子聚集成点状;细胞感染 48 h后,Cell 组细胞死亡率为 19.60 ± 9.758 ,Cell+1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 17.27 ± 7.130 ,Cell+2.5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 40.13 ± 5.650 ,Cell+5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 65.50 ± 1.241 ,WT+1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 65.44 ± 1.329 ,WT+2.5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 80.56 ± 4.543 ,WT+5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 76.42 ± 1.316 ,鼠伤寒沙门菌入侵后细胞死亡率随培养基添加铜离子浓度增加而增高;共聚焦显微镜和 Western blot 显示鼠伤寒沙门菌入侵后铜死亡关键蛋白丙酮酸脱氢酶 DLAT 亚基发生寡聚化形成多聚体。 **结论** 感染后 RAW264.7 细胞启动铜死亡,抑制鼠伤寒沙门菌胞内生存,为铜死亡的机制研究提供了理论研究基础。

【关键词】 鼠伤寒沙门菌;巨噬细胞 RAW264.7;铜死亡;铜离子;DLAT 蛋白

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)01-0014-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Jan.;20(01):14-18,24.]

Salmonella typhimurium invades macrophages RAW264.7 and induces Cuproptosis in cells

LI Li, YUAN Xilu, CHENG Longyun, XIE Rongxian, ZHU Yaoyao, LI Bingqing, SONG Nannan
(Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China)***

【Abstract】 **Objective** To discuss the phenomenon of Cuproptosis in macrophages induced by pathogen infection and analyze the effect of this cellular response on bacterial intracellular survival, and to explore the mechanism of Cuproptosis and its effect on the intracellular survival and pathogenicity of *Salmonella typhimurium*. **Methods** 24 hours after the invasion of *Salmonella Typhimurium* and the addition of copper ion carrier Elesclomol (ES) and copper chloride, the cells were collected and set up as untreated cell control group, ES control group and WT infection group, and the changes in intracellular copper ion concentration were detected by inductively coupled plasma mass spectrometry; after intracellular copper staining, the distribution of copper ions was observed using a confocal microscope; 48 hours after cell invasion, different concentrations of copper ions (1 $\mu\text{mol/L}$, 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$) were added to the untreated cell control group, cells and infected cells, and the difference in the mortality rate of infected cells before and after the addition of copper ions was detected by the lactate dehydrogenase method; 24 hours after cell invasion, immunofluorescence and Western blot methods were used to detect the production and distribution of lipoyl-modified DLAT protein oligomers, a key indicator of Cuproptosis. **Results** There was no difference in the content of copper in RAW264.7 cells infected and treated with drugs. The content of copper in cells was 0.06533 ± 0.008327 in NC group, 0.1580 ± 0.002646 in ES group, and 0.07367 ± 0.007572 in WT group. Confocal microscopy showed that the distribution of copper ions in cells changed after infection,

* **【基金项目】** 国家自然科学基金青年基金项目(No. 32000095,32170034)

** **【通讯作者】** 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com; 宋楠楠, E-mail: songnn05@sina.com

【作者简介】 李丽(1996-),女,青海西宁人,在读研究生,研究方向为病原菌生存适应机制, E-mail: liligx8@163.com

and copper ions aggregated into dots. After 48 hours of cell infection, the cell death rate in Cell group was 19.60 ± 9.758 , that in Cell+ $1 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 group was 17.27 ± 7.130 , that in Cell+ $2.5 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 group was 40.13 ± 5.650 , and that in Cell+ $5 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 group was 65.50 ± 1.241 . The cell death rate of the cells in the WT+ $1 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 group was 65.44 ± 1.329 , that in the WT+ $2.5 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 group was 80.56 ± 4.543 , that in the WT+ $5 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 group was 76.42 ± 1.316 . After the invasion of *Salmonella typhimurium*, the cell death rate increased with the increase of copper ion concentration added to the culture medium. Confocal microscopy and Western blot showed that the key protein of Cuproptosis, pyruvate dehydrogenase DLAT subunit, oligomerized to form polymers after the invasion of *Salmonella typhimurium*. **Conclusion** After infection, RAW264.7 cells initiated Cuproptosis and inhibited the intracellular survival of *Salmonella typhimurium*, providing a theoretical basis for the study of the mechanism of Cuproptosis.

【Keywords】 *Salmonella Typhimurium*; macrophage RAW264.7; Cuproptosis; copper ions; DLAT protein

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, STM)属革兰阴性菌,是一种兼性胞内菌。该菌是常见的食源性病原体,感染后在宿主肠道上皮细胞和巨噬细胞内生存和复制,可引起急性胃肠炎甚至伤寒等疾病^[1]。多年来鼠伤寒沙门菌感染相关疾病仍发病率较高,已经成为严重的公共卫生问题^[2-3]。

细胞微环境中金属离子浓度和分布的动态调节是细胞维持生理活性的基本调节手段,也是应对鼠伤寒沙门菌等病原菌感染的有效手段^[4-5]。铁、铜、锌、锰等微量元素对于维持细胞内外电解质平衡和生物酶促反应等具有关键作用^[6]。细胞在受到病原菌感染刺激时,还能通过调节金属离子浓度、分布和代谢等发挥抗感染作用^[7-9]。当鼠伤寒沙门菌入侵宿主肠道上皮细胞和巨噬细胞时,细胞迅速降低铁离子浓度使胞内处于铁匮乏环境进而限制细菌的胞内生存和增殖^[10]。铜是细胞内最重要的微量元素之一,以 Cu^+ (还原型)和 Cu^{2+} (氧化型)两种离子形式参与细胞生理功能,在线粒体呼吸、抗氧化反应和生物大分子合成等关键生命活动中发挥重要作用^[11];过量铜离子可通过降低线粒体相关蛋白水平导致活性氧水平升高,进而导致细胞损伤^[12];铜离子可辅助治疗肿瘤,其作用机制可能是通过介导核蛋白定位因子-4(NPI4)功能降低进而促进肿瘤细胞死亡^[13]。过量铜离子可引起一种新型细胞程序性死亡形式-铜死亡(Cuproptosis),其调控过程与线粒体代谢密切相关,铜与线粒体TCA循环中的硫辛酰化蛋白直接结合导致蛋白异常聚集及呼吸链复合体中铁硫簇蛋白的丢失,引起蛋白质毒性应激反应,最终导致细胞死亡^[14]。

鼠伤寒沙门菌入侵巨噬细胞后可在胞内生存,并随巨噬细胞进入血液循环或其他定植病灶,在此过程中,细胞抗感染免疫与细菌生存策略是决定病情转归的关键因素^[15]。鼠伤寒沙门菌感染后可导致巨噬细胞内铜离子发生明显聚集,并且使用铜螯合剂干预可提高细胞内鼠伤寒沙门菌的存活率。伴随着鼠伤寒沙门菌入侵,细胞可能启动了与铜相关的杀菌机制^[16-17]。目

前对铜离子异常聚集与鼠伤寒沙门菌感染的关系以及干预后细菌生存率下降的分子机制尚不清楚,因此展开铜离子在细胞抗感染免疫中的作用及机制的研究。为了解细胞内铜离子代谢异常与病原菌感染的关系,本研究使用鼠伤寒沙门菌入侵小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞,检测细胞内铜离子浓度、分布和细胞生存状态等,以期探讨感染诱导的细胞内铜离子代谢异常及其对细菌生存致病的影响提供理论依据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 细胞与细菌 单核巨噬细胞白血病细胞RAW264.7购自广州源井生物科技有限公司,野生型鼠伤寒沙门菌14028s(*Salmonella typhimurium*, STM),为本实验室保存菌种。

1.2 试剂与仪器 氯化铜($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;伊利司莫(Elesclomol, ES)、Coppersensor 1(CS1)荧光染料购自美国MedChemexpress生物科技有限公司;铜元素标准溶液购自国家有色金属及电子材料分析测试中心;CytoTox96非放射性细胞毒性检测试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;Anti-Pyruvate-dehydrogenase E2/E3bp抗体(ab110333),山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor 488)(ab150113)购自艾博抗(上海)贸易有限公司;微波消解仪购自上海屹尧仪器科技发展有限公司;电感耦合等离子体质谱仪购自赛默飞世尔科技公司;分光光度计购自上海精密仪器仪表有限公司。

2 方 法

2.1 细胞和细菌培养 RAW264.7细胞常规培养使用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,每日换液,1:3隔天传代。野生型鼠伤寒沙门菌14028s(WT)菌株采用LB培养基,37℃,200 r/min振荡培养。WT菌株用LB培养基37℃过夜培养。24 h后按照菌液:培养基=1:100的比例将细菌转接到含有0.3

mol/L NaCl 的高盐 LB 培养基中, 培养至 A_{600} 值为 0.5。

2.2 细菌入侵试验 RAW264.7 细胞按照 1×10^7 个/皿接种到 100 mm 细胞培养皿中, 静置过夜培养。WT 菌株以 DMEM 培养基稀释细菌, 按感染复数 (MOI) = 10 对细胞进行感染。感染 1 h 后, 换用含 100 mg/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基杀死残余的细胞外细菌。感染 2 h 后换用含 20 mg/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基保持细胞活力, 抑制细胞外细菌生长。设立细胞对照组 (NC) 和阳性药 (ES) 对照组, 细胞对照组操作除细菌感染外与实验组均相同; 阳性药物 ES 对照组细胞培养基实验中更换为含有 $1 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 和 10 nmol/L ES 的 DMEM 培养基。以上每个组别分别进行 3 次生物重复。

2.3 细胞内铜元素含量测定 将细菌入侵试验中的实验组和对照组细胞感染后培养 24 h, PBS 洗涤后收集并重悬计数, 称取相同质量样品至聚四氟乙烯消解罐中, 5 mL 硝酸微波消解 4 次, 消解条件: 100°C , 2 min; 120°C , 2 min; 150°C , 5 min; 180°C , 20 min。润洗后定容 25 mL, ICP-MS 仪器进行分析并计算铜元素浓度。每个组别分别进行 3 次生物重复。

2.4 细胞内铜离子分布共聚焦成像 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/皿接种 35 mm 共聚焦小皿, 过夜培养。细菌入侵后 24 h, 各组细胞 PBS 清洗后用 $400 \mu\text{L}$ 组织细胞固定液在室温下固定细胞 30 min, 弃置固定液, PBS 清洗细胞 2~3 次。向培养皿中加入 1 mL PBS 和 $5 \mu\text{L}$ 铜离子荧光染料 (CS1), 避光放入 37°C 培养箱培养 15~20 min 后, 激光共聚焦显微镜成像观察。

2.5 感染后细胞死亡率检测 RAW264.7 细胞以 4×10^5 个/孔接种到 96 孔细胞培养板板孔中, 过夜培养。试验设立培养基空白对照组 (孔板中只加培养基)、细胞对照组、裂解液阳性对照组 (细胞中加入试剂盒中裂解液)、添加铜离子细胞对照组 (共 3 组, 添加铜离子浓度分别 1、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$)、入侵实验组 (共 3 组, 添加铜离子浓度分别 1、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$)。按照细菌入侵试验操作步骤进行试验, 入侵后培养 48 h, 将孔板中的 $50 \mu\text{L}$ 细胞培养上清液转移到酶标板中, 按照细胞毒性试剂盒说明书操作检测并计算细胞死亡率。以上每个组别分别进行 3 次生物重复。

2.6 感染细胞内丙酮酸脱氢酶亚基 (DLAT) 分布形态共聚焦成像 RAW264.7 以 1×10^5 个/皿的密度将接种 35 mm 共聚焦小皿, 过夜培养。细菌入侵后 24 h, 各组细胞室温固定 30 min, $400 \mu\text{L}$ 0.2% Triton X-100 穿膜 15 min。随后以 $400 \mu\text{L}$ 2% BSA 置 4°C 孵育过夜。以 2% BSA 的 Anti-Pyruvate

dehydrogenase E2/E3bp 一抗 (1 : 1000) 4°C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次后加入荧光标记二抗 (1 : 500), 37°C 避光孵育 1 h, 加入 $400 \mu\text{L}$ DAPI 避光 8 min 染核, PBS 清洗 3 次, 激光共聚焦显微镜成像观察。

2.7 感染细胞内 DLAT 蛋白多聚体检测 RAW264.7 细胞进行细菌入侵试验 24 h 后弃置培养基并收集细胞。裂解细胞提取细胞全蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度, 调整各组蛋白浓度至一致。向各样品中加入适量的非变性蛋白上样缓冲液进行非变性蛋白电泳并转膜进行 Western blot 检测。

3 统计分析

本研究采用 Graphad Prism 8 (Mann Whitney test, GraphPad Software INC, San Diego, CA, USA) 统计作图软件对研究数据进行统计分析。数据资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据比较采用 t 检验分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 鼠伤寒沙门菌入侵 RAW264.7 细胞后胞内铜离子浓度未发生明显变化

WT 刺激和加入伊利司莫和 CuCl_2 24 h 后, 检测细胞铜元素含量, NC 组细胞内铜元素含量为 0.06533 ± 0.008327 ; WT 组细胞内铜元素含量为 0.07367 ± 0.007572 ; ES 组细胞内铜元素含量为 0.1580 ± 0.002646 。NC 组与 WT 组比较差异无统计学意义 ($t = 1.282, P < 0.05$), NC 组与 10 nmol/L ES + $1 \mu\text{mol/L}$ CuCl_2 比较差异有统计学意义 ($t = 18.37, P < 0.05$) (图 1), 鼠伤寒沙门菌入侵未导致细胞内铜离子发生明显浓度变化。

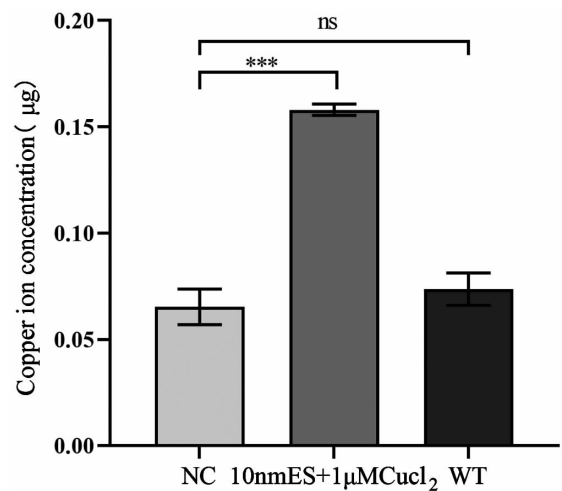
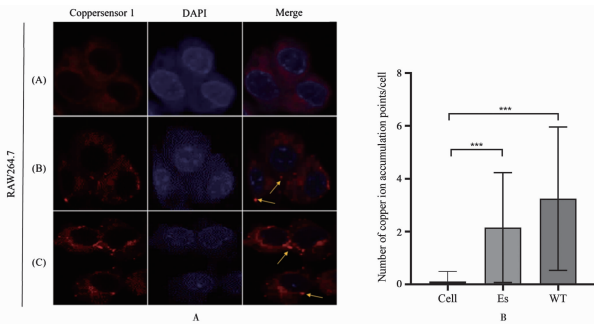


图 1 细胞内铜元素含量
Fig. 1 Intracellular copper content

2 鼠伤寒沙门菌入侵 RAW264.7 细胞导致细胞内铜离子聚集

每组分别选取 10 个细胞,对细胞中的铜聚点个数进行计数,细胞对照组每个细胞平均铜离子聚点个数为 0.1111 ± 0.3827 ;ES 对照组每个细胞平均铜离子聚点个数为 2.156 ± 2.078 ;WT 感染组每个细胞平均铜离子聚点个数为 3.244 ± 2.715 。添加 CuCl_2 及铜离子载体伊利司莫的对照组和 WT 组均观察到明显的点状聚集体,而细胞对照组细胞内铜离子呈均匀分布,细胞在受到鼠伤寒沙门菌刺激较 ES 处理形成的铜离子聚点个数更多(图 2)。



A 细胞对照组 B ES 对照组 C WT 感染组
图 2 鼠伤寒沙门菌入侵 RAW264.7 细胞引起细胞内铜离子聚集
A Untreated cell control group B ES treated group C WT infected group

Fig. 2 *S. typhimurium* infected RAW264.7 cells and causes intracellular copper ion accumulation

3 培养基中添加铜离子使感染鼠伤寒沙门菌的 RAW264.7 细胞死亡率增高

鼠伤寒沙门菌感染细胞 48 h 后检测各组细胞的死亡率,在培养基中分别加入不同浓度的铜离子(1、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$),对比发现随着入侵后培养基中添加铜离子的浓度升高,细胞的死亡率也随之增高。并且感染组细胞与只添加了不同浓度铜离子的细胞对照相比,死亡率升高的更为显著(图 3),入侵导致的细胞死亡部分与铜离子相关。Cell 组细胞死亡率为 19.60 ± 9.758 ;Cell+1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 17.27 ± 7.130 ;Cell+2.5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 40.13 ± 5.650 ;Cell+5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 65.50 ± 1.241 ;WT+1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 65.44 ± 1.329 ;WT+2.5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 80.56 ± 4.543 ;WT+5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组细胞死亡率为 76.42 ± 1.316 。WT+1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组与 WT+2.5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组比较差异有统计学意义($t=4.372, P<0.05$),WT+1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组与 WT+5 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 组比较差异有统计学意义($t=9.108, P<0.05$)。

4 鼠伤寒沙门菌入侵后 RAW264.7 细胞内形成丙酮酸脱氢酶 DLAT 亚基寡聚体

本研究在共聚焦显微镜成像下观察感染细胞内

DLAT 蛋白的聚集状态,ES 阳性对照组及 WT 入侵的细胞内均可见到 DLAT 蛋白点状聚集体,而细胞对照组细胞内 DLAT 蛋白在细胞内较为分散,未观察到明显聚集体(图 4)。细胞对照组胞内没有形成 DLAT 蛋白多聚体,而 ES 阳性对照组与 WT 感染组细胞内 DLAT 蛋白寡聚体明显增多(图 5)。

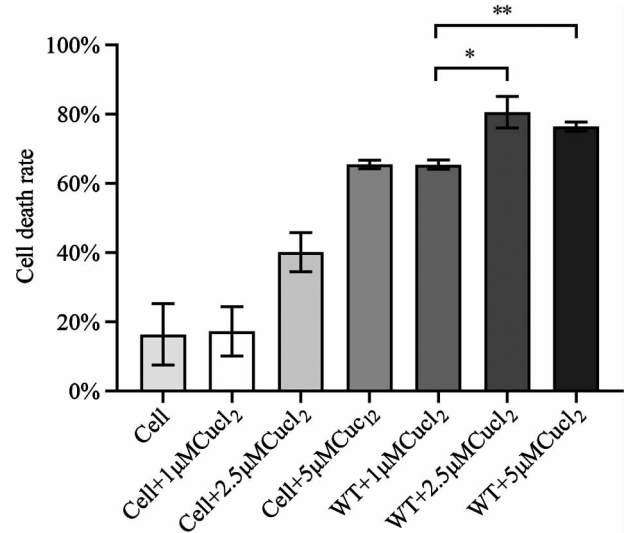
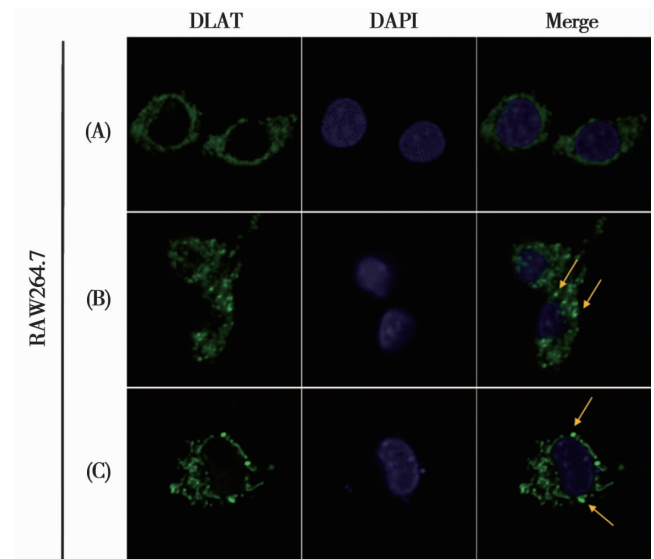


图 3 鼠伤寒沙门菌入侵后 RAW264.7 细胞死亡率变化
Fig. 3 Changes in the death rate of RAW264.7 cells after invasion by *S. typhimurium*



A 细胞对照组 B ES 对照组 C WT 感染组
图 4 鼠伤寒沙门菌入侵后 RAW264.7 细胞内形成 DLAT 聚点
A Untreated cell control group B ES treated group C WT infected group

Fig. 4 DLAT foci formed in RAW264.7 cells after invasion by *S. typhimurium*

讨论

为了应对鼠伤寒沙门菌入侵感染,宿主具有多重免疫杀菌机制^[18]。金属离子对鼠伤寒沙门菌的生存和致病都具有重要的作用,宿主可通过营养免疫策略

限制病原菌获得足够的金属离子^[19],例如,鼠伤寒沙门菌可通过UMP化修饰酶YdiU调节铁吸收关键蛋白Fur,进而在细胞内缺铁环境下提高生存率^[20],因此宿主的铁离子限制这一营养免疫策略对鼠伤寒沙门菌的生存影响甚微。2012年,Achard等^[16]研究发现了鼠伤寒沙门菌入侵引起巨噬细胞内铜聚集现象,且在加入铜螯合剂之后巨噬细胞内的鼠伤寒沙门菌的存活率得到提高,表明伴随着细菌入侵细胞启动了与铜相关的杀菌机制,但该研究未对具体分子机制进行更深入阐释。目前关于铜死亡分子机制的研究提示,铜离子异常增高或聚集会导致细胞死亡^[14],结合鼠伤寒沙门菌感染过程巨噬细胞内出现铜聚集,干预抑制铜聚集过程逆转鼠伤寒沙门菌死亡,本研究中鼠伤寒沙门菌感染可能通过诱导宿主细胞发生铜死亡,从而抑制鼠伤寒沙门菌生存致病。

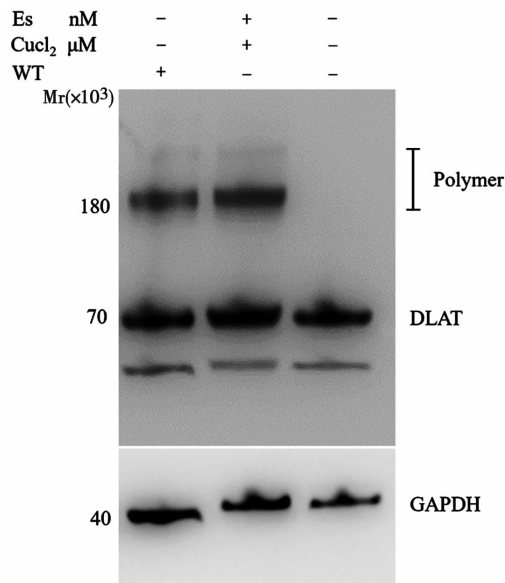


图5 鼠伤寒沙门菌入侵后细胞后DLAT蛋白多聚体
Fig. 5 DLAT forms multimers in cells after invasion by *S. typhimurium*

本研究应用铜离子化学染色、免疫荧光等技术结合共聚焦显微镜细胞成像技术,发现鼠伤寒沙门菌入侵RAW264.7细胞后胞内铜离子浓度不变但分布状态发生改变;胞内铜离子分异常聚集以及铜死亡过程中关键蛋白DLAT聚集现象,DLAT蛋白的聚集是细胞铜死亡的关键步骤和主要标志,本实验中共聚焦成像和Western blot实验中检测到明显的DLAT蛋白聚集及寡聚体形成,因此推断鼠伤寒沙门菌的入侵诱导巨噬细胞RAW264.7发生了铜死亡。鼠伤寒沙门菌入侵RAW264.7细胞后细胞死亡率增高并在加入铜离子之后检测到铜离子浓度依赖的死亡率升高,提示感染相关的细胞铜死亡是宿主细胞杀菌策略之一。细胞铜死亡发生时,Cu²⁺会与硫辛酰化的丙酮酸脱氢

酶复合体DLAT亚基结合并诱导DLAT亚基寡聚化,不溶性的DLAT寡聚体大量堆积将会产生细胞毒性并最终导致细胞死亡。鼠伤寒沙门菌入侵诱导的铜离子聚集,很可能通过此途径诱导细胞发生铜死亡进而限制鼠伤寒沙门菌生存致病。

本研究检测到铜离子和DLAT蛋白在感染细胞中均出现了明显的聚集现象,但在感染24h后采用共聚焦成像方法并未观察到两者的细胞内共定位,由于目前无法确定鼠伤寒沙门菌入侵后两者结合的时空顺序和具体模式机制,因此入侵后固定成像时间点以及固定穿膜等操作破坏蛋白-铜离子互作结合等因素均可能是影响检测观察结果的原因;鼠伤寒沙门菌属革兰阴性肠杆菌科,入侵巨噬细胞诱导铜死亡的过程是针对某些特定细菌还是应对细菌感染的一种普遍杀菌机制还有待验证;本研究检测到铜聚集及DLAT寡聚体,证明鼠伤寒沙门菌感染导致细胞发生了铜死亡,但是对于鼠伤寒沙门菌感染相关铜死亡的上游机制,即感染是如何启动铜死亡这一过程的分子机制还不清楚。

综上,本研究发现鼠伤寒沙门菌入侵巨噬细胞RAW264.7细胞诱导铜死亡,从而抑制鼠伤寒沙门菌的胞内生存。本研究为研究铜死亡的分子机制提供了新的研究基础;更重要的是本研究发现了宿主细胞启动铜死亡应对病原菌感染这一新型抗菌免疫机制,从宿主细胞的角度研究其对病原菌感染的调控机制将对鼠伤寒沙门菌特别是耐药株感染的临床治疗和药物研发提供新的思路和线索。

【参考文献】

[1] Janssen R, Van Der Straaten T, Van Diepen A, et al. Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella Typhimurium*[J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(6): 527-534.
[2] Larock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(4): 191-205.
[3] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(6): 882-889.
[4] Chong A, Cooper KG, Kari L, et al. Cytosolic replication in epithelial cells fuels intestinal expansion and chronic fecal shedding of *Salmonella typhimurium*[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(7): 1177-1185, e6.
[5] Cunrath O, Bumann D. Host resistance factor SLC11A1 restricts *Salmonella* growth through magnesium deprivation[J]. *Science*, 2019, 366(6468): 995-999.
[6] Permyakov EA. Metal binding proteins[J]. *Encyclopedia*, 2021, 1(1): 261-292.
[7] Nolan EM. A metal shuttle keeps pathogens well fed[J]. *Science*, 2016, 352(6289): 1055-1056. (下转 24 页)

- Faecalibacillus intestinalis* and formic acid as commonly altered in cancer patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(15):8026.
- [10] Zeng X, Liu Z, Dong Y, et al. Social hierarchy dictates intestinal radiation injury in a gut microbiota-dependent manner [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21):13189.
- [11] 王俊杰, 谈善军, 吴国豪. 肠道菌群在癌性恶病质营养代谢及治疗中的作用[J]. 肠外与肠内营养, 2021, 28(1):49-54.
- [12] Li Y, Dong J, Xiao H, et al. Gut commensal derived-valeric acid protects against radiation injuries [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(4):789-806.
- [13] Yue F, Zeng X, Wang Y, et al. Bifidobacterium longum SX-1326 ameliorates gastrointestinal toxicity after irinotecan chemotherapy via modulating the P53 signaling pathway and brain-gut axis [J]. *BMC Microbiol*, 2024, 24(1):8.
- [14] Badgeley A, Anwar H, Modi K, et al. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(1):188494.
- [15] Moron R, Galvez J, Colmenero M, et al. The importance of the microbiome in critically ill patients: Role of nutrition [J]. *Nutrients*, 2019, 11(12):3002.
- [16] Lin D, EL Alam MB, Jaoude JA, et al. Microbiome dynamics during chemoradiation therapy for anal cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2022, 113(5):974-984.
- [17] Zheng Y, Gao W, Spratt DE, et al. Management of gastrointestinal perforation related to radiation [J]. *Int J Clin Oncol*, 2020, 25(6):1010-1015.
- [18] Wexler HM. Bacteroides; the good, the bad, and the nitty-gritty [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(4):593-621.
- [19] Shuwen H, Kefeng D. Intestinal phages interact with bacteria and are involved in human diseases [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1):2113717.
- [20] 崔佳瞿, 田宏亮, 王序杰, 等. 围手术期肠道菌群移植联合营养支持治疗在放射性肠炎合并肠梗阻中的近期疗效[J]. 中华胃肠外科杂志, 2023, 26(10):955-962.
- [21] Zhang X, Zhao Y, Zhao X, et al. Anti-inflammatory, cardioprotective effect of gypenoside against isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats via alteration of inflammation and gut microbiota [J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(5):2731-2750.
- [22] Lu L, Li F, Gao Y, et al. Microbiome in radiotherapy: an emerging approach to enhance treatment efficacy and reduce tissue injury [J]. *Mol Med*, 2024, 30(1):105.
- [23] 薛志刚. 免疫营养干预影响肠道微生态及胃肠肿瘤结局基础与临床初探[D]. 北京协和医学院, 2020.
- 【收稿日期】 2024-07-02 【修回日期】 2024-09-28

~~~~~  
(上接 18 页)

- [8] Mayneris-Perxachs J, Moreno-Navarrete JM, Fernandez-Real J M. The role of iron in host microbiota crosstalk and its effects on systemic glucose metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(11):683-698.
- [9] Kuang H, Dou G, Cheng L, et al. Exosomes-based humoral regulation of iron metabolism is required for host antibacterial response [M]. Version 1. Preprint available at Research Square: *Nat. Metab*, 2022; 5(1):111-128.
- [10] Lim D, Kim KS, Jeong JH, et al. The hepcidin-ferroportin axis controls the iron content of *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2091.
- [11] Ge EJ, Bush AI, Casini A, et al. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(2):102-113.
- [12] Xue Q, Kang R, Klionsky DJ, et al. Copper metabolism in cell death and autophagy [J]. *Autophagy*, 2023, 19(8):2175-2195.
- [13] Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4 [J]. *Nature*, 2017, 552(7684):194-199.
- [14] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586):1254-1261.
- [15] Takaya A, Yamamoto T, Tokoyoda K. Humoral Immunity vs. *Salmonella* [J]. *Front Immunol*, 2020, 10:3155.
- [16] Achard MS, Stafford SL, Bokil NJ, et al. Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection [J]. *Biochem J*, 2012, 444(1):51-57.
- [17] Dupont CL, Grass G, Rensing C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications [J]. *Metallomics*, 2011, 3(11):1109-1118.
- [18] Mistry JJ, Marlein CR, Moore JA, et al. ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2019, 116(49):24610-24619.
- [19] Murdoch CC, Skaar EP. Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host-pathogen interface [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(11):657-670.
- [20] Jia H, Song N, Ma Y, et al. *Salmonella* facilitates iron acquisition through umpylation of ferric uptake regulator [J]. *mBio*, 2022, 13(3):e0020722.
- 【收稿日期】 2024-06-15 【修回日期】 2024-08-30