

# 尿路致病性大肠埃希菌乳酸脱氢酶促进巨噬细胞乳酸化增强致病性的机制

樊力铭, 陈也, 蒋委余, 郑欣怡, 谢子文, 叶乐元, 金意涵, 方佳琪\*

浙大城市学院 医学院临床医学系, 浙江 杭州

樊力铭, 陈也, 蒋委余, 郑欣怡, 谢子文, 叶乐元, 金意涵, 方佳琪. 尿路致病性大肠埃希菌乳酸脱氢酶促进巨噬细胞乳酸化增强致病性的机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1074-1087.

FAN Liming, CHEN Ye, JIANG Weiyu, ZHENG Xinyi, XIE Ziwen, YE Leyuan, JIN Yihan, FANG Jiaqi. Lactate dehydrogenase from uropathogenic *Escherichia coli* enhances pathogenicity via promoting macrophage lactylation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(3): 1074-1087.

**摘要:** 尿路致病性大肠埃希菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)是引发尿路感染(urinary tract infection, UTI)最常见的病原菌, 能够定植于尿路上皮细胞, 可引发严重的败血症、肾衰竭, 对人类健康构成威胁。乳酸化是巨噬细胞抗 UPEC 感染的一种重要蛋白质翻译后修饰方式。UPEC CFT073 菌株的 DNA 序列中包含具有催化乳酸生成功能的乳酸脱氢酶 *ldhA* 基因, 但其调控巨噬细胞乳酸化的具体机制尚未明确。【目的】探讨 *ldhA* 基因产物 LdhA 调控巨噬细胞乳酸化进而影响 UPEC 致病性的作用机制。【方法】利用生物信息学在线工具预测 *ldhA* 基因产物 LdhA 的功能结构域和跨膜区; 通过分子克隆技术体外表达重组蛋白 rLdhA; 使用乳酸脱氢酶活性检测试剂盒测定 rLdhA 的乳酸脱氢酶活性; 采用 Western blotting 检测 rLdhA 进入巨噬细胞的方式及其对巨噬细胞乳酸化的影响; 运用 ELISA 检测 rLdhA 对巨噬细胞炎症因子的影响; 利用全自动微生物分析系统检测 LdhA 对 UPEC CFT073 耐药性的影响; 分别用产生 LdhA 的野生型 UPEC CFT073 菌株(CFT073<sup>wt</sup>)、敲除 *ldhA* 基因的 CFT073 菌株(CFT073<sup>ΔldhA</sup>), 或经 rLdhA 及乳酸脱氢酶抑制剂预处理的 rLdhA 感染或尾静脉注射小鼠, 观察并测定 LdhA 对小鼠致病性的影响。【结果】LdhA 蛋白含有乳酸脱氢酶功能域且能够外分泌。成功构建了 *ldhA* 基因体外表达系统, 表达并提纯了重组蛋白 rLdhA。rLdhA 具有乳酸脱氢酶功能, 能通过网格蛋白介导的内吞作用进入巨噬细胞, 并剂量依赖性地促进巨噬细胞乳酸化水平。rLdhA 显著抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的巨噬细胞炎症因子生成。LdhA 能够显著影响 UPEC CFT073 的耐药性, 并促进 UPEC 对小鼠的致病性。【结论】LdhA 通过促进巨噬细胞的乳酸化水平抑制炎症因子的产生, 进而增强 UPEC 的致

资助项目: 国家级大学生创新创业训练计划(202513021034, 202513021033); 浙江省自然科学基金(LQ20H100001)

This work was supported by the National College Students Innovation Training Program (202513021034, 202513021033) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ20H100001).

\*Corresponding author. E-mail: fangjq@hzcu.edu.cn

Received: 2025-08-07; Accepted: 2025-12-15; Published online: 2025-12-19

病性, 其具体的分子调控机制尚需进一步研究。本研究为进一步阐明 UPEC 的致病性提供了新的科学依据。

**关键词:** 尿路致病性大肠埃希菌; 乳酸脱氢酶; 巨噬细胞; 乳酸化; 致病性

## Lactate dehydrogenase from uropathogenic *Escherichia coli* enhances pathogenicity *via* promoting macrophage lactylation

FAN Liming, CHEN Ye, JIANG Weiyu, ZHENG Xinyi, XIE Ziwen, YE Leyuan, JIN Yihan, FANG Jiaqi\*

Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Hangzhou City University, Hangzhou, Zhejiang, China

**Abstract:** Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the leading cause of urinary tract infections (UTIs). It can adhere to and colonize uroepithelial cells, disseminate systemically, and induce severe sepsis and subsequent renal failure, posing a substantial threat to global public health. Emerging evidence indicates that lactylation, a key post-translational modification (PTM) in macrophages, plays a crucial role in the host defense against UPEC infection. Notably, the UPEC CFT073 strain harbors *ldhA*, which encodes lactate dehydrogenase (LDH), an enzyme critical for lactate biosynthesis. However, the mechanism by which LdhA (the *ldhA*-encoded LDH) regulates macrophage lactylation during UPEC infection remains elusive. **[Objective]** To elucidate how LdhA modulates macrophage lactylation and thereby impacts UPEC pathogenicity. **[Methods]** Online bioinformatics tools were used to predict the functional domains and transmembrane regions of LdhA. The recombinant protein rLdhA was generated *via* molecular cloning, and its LDH activity was measured by a commercial LDH activity assay kit. Western blotting was performed to assess the cellular entry of rLdhA into macrophages and its regulatory effect on macrophage lactylation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the secretion of inflammatory cytokines in macrophages treated with rLdhA. The drug resistance profile of UPEC CFT073 (wild-type and *ldhA*-knockout strains) was analyzed *via* an automated microbial identification system. To evaluate the role of LdhA in UPEC pathogenicity, we treated mice with the wild-type UPEC CFT073 (CFT073<sup>wt</sup>), *ldhA*-deficient mutant (CFT073<sup>ΔldhA</sup>), or rLdhA (with or without pretreatment with an LDH inhibitor) through intraperitoneal injection or tail vein injection, and then observed and quantified pathogenic phenotypes. **[Results]** LdhA harbored a LDH domain and was secreted extracellularly. We successfully established an expression system for *ldhA* and achieved efficient expression and purification of rLdhA. Functional assays confirmed that rLdhA exhibited LDH activity and can enter macrophages *via* clathrin-mediated endocytosis, subsequently enhancing macrophage lactylation in a dose-dependent manner. Additionally, rLdhA significantly inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cytokine production in macrophages. Furthermore, LdhA was found to substantially modulate the drug resistance profile of UPEC CFT073. *In vivo* studies demonstrated that LdhA

promoted the pathogenicity of UPEC in a mouse infection model. **[Conclusion]** Collectively, our findings demonstrate that LdhA enhances UPEC pathogenicity by upregulating macrophage lactylation and suppressing the production of proinflammatory cytokines. However, the underlying molecular mechanisms mediating this regulatory cascade remain to be fully elucidated and warrant further exploration. This study offers a new theoretical basis for deciphering the pathogenic mechanisms of UPEC infections.

**Keywords:** uropathogenic *Escherichia coli*; lactate dehydrogenase; macrophage; lactylation; pathogenicity

尿路感染(urinary tract infection, UTI)是常见的泌尿系统疾病,也是仅次于呼吸道感染的第二大常见感染性疾病,且复发率较高<sup>[1]</sup>。尿路感染常可引发肾盂肾炎、膀胱炎,严重时甚至会导致败血症、肾衰竭等,进而危及生命<sup>[2]</sup>。肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌等可引起 UTI,而 80% 的 UTI 由尿路致病性大肠埃希菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)所致<sup>[3]</sup>。UPEC 通过 I 型纤毛、P 纤毛、T1 性毛等黏附因子定殖于尿路上皮细胞,进而在宿主细胞内自我聚集形成细菌囊泡,以逃避宿主的免疫监视,从而在细胞内长期存活并持续感染<sup>[4-5]</sup>。UTI 多采用抗生素治疗,然而 UPEC 对常用抗生素的耐药性日益增强,导致治疗难度增加<sup>[6]</sup>。因此深入研究 UPEC 的致病机制对尿路感染的控制和治理具有重大意义。

乳酸脱氢酶是一类重要的氧化还原酶,广泛存在于真核生物和原核生物体内,可催化丙酮酸与乳酸之间的相互转化<sup>[7]</sup>。乳酸化是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式,通过赖氨酸残基与乳酸形成共价结合改变蛋白质的功能,进而调节细胞的生理过程和信号传导途径<sup>[8-9]</sup>。研究发现,病原菌的乳酸脱氢酶表达水平与其在体内感染模型中的毒力可能存在关联。在葡萄球菌属、链球菌属及其他细菌中敲除或抑制乳酸脱氢酶基因通常会导致细菌的增殖能力下降和毒力减弱<sup>[10-11]</sup>。巨噬细胞作为机体固有免疫反应中的关键细胞,在抵抗 UPEC 引起的感染中发挥着非常重要的作用<sup>[12-14]</sup>。

UPEC CFT073 菌株的 DNA 序列中包含具有乳酸脱氢酶功能的 *ldhA* 基因。为探究其表达产物 LdhA 在 UPEC CFT073 感染时的作用以及对巨噬细胞乳酸化的影响,本研究分别向 C57BL/6 小鼠膀胱滴注  $10^9$  CFU/mL 产生 LdhA 的野生型 CFT073 菌株(CFT073<sup>wt</sup>)和敲除 *ldhA* 基因的 CFT073 菌株(CFT073<sup>ΔldhA</sup>),发现 CFT073<sup>wt</sup> 感染组肾和膀胱组织中炎性细胞浸润显著增多,表明 LdhA 能促进 UPEC CFT073 的致病性。然而,目前尚未见关于 LdhA 在 UPEC 逃逸巨噬细胞免疫及在所致尿路感染中致病作用的研究报道。本研究通过构建小鼠尿路感染模型,测定 LdhA 对 UPEC CFT073 耐药性及小鼠致病性的影响,进一步明确重组蛋白 rLdhA 进入巨噬细胞的机制,以及其对巨噬细胞乳酸化水平和促炎因子生成的调控作用。本研究旨在为阐明 UPEC 的致病机制提供新的实验依据,为尿路感染的防治提供潜在药物靶点,具有重要的科学价值与临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

UPEC CFT073<sup>wt</sup> 菌株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所徐建国院士惠赠; UPEC CFT073<sup>ΔldhA</sup> 由本实验室委托杭州丰海生物科技有限公司构建; *E. coli* ATCC 25922、*E. coli* ATCC 35218 和 *E. coli* ATCC 43895 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

### 1.1.2 细胞株

人巨噬细胞系 THP-1 和小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

### 1.1.3 实验动物

雌性 C57BL/6 小鼠(6-8 周龄, 18-20 g)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。本研究所有动物实验获得浙大城市学院实验动物福利伦理审查委员会批准, 编号为 22024。

### 1.1.4 主要试剂和仪器

LB 培养基, 北京索莱宝科技有限公司; 1640 培养基, 英潍捷基(上海)贸易有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、乳酸检测试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、*Ex-Taq* 酶 PCR 试剂盒、T-A 克隆载体 pMD19-T、T4 DNA 连接酶, 宝日医生物技术(北京)有限公司; YeaRed 核酸胶染料, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 乳酸脱氢酶活性检测试剂盒, 北京盒子生工科技有限公司; LdhA 抑制剂草氨酸钠、小窝蛋白介导的内吞作用抑制剂 dynasore、网格蛋白介导的内吞作用抑制剂 methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD), MCE 公司; 乳酸化抗体, 杭州景杰生物科技股份有限公司; GAPDH 抗体、荧光标记羊抗兔二抗, Abcam 公司; 抗 rLdhA 血清, 实验室自制; IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  细胞因子检测试剂盒, 上海钰博生物科技有限公司; CD14 微珠, Miltenyi 公司; CD14 和 F4/80 特异性单克隆抗体, eBioscience 公司。

离心机、水平摇床, 赛洛捷克公司; 酶标仪, 赛默飞世尔(中国)科技公司; 电热恒温水浴锅, 金坛市易晨仪器制造有限公司; 振荡培养箱, 太仓市科教器材厂; 全自动蛋白纯化仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 全自动微生物分析系统, 生物梅里埃公司; 荧光扫描成像系统, LI-COR 公司; 流式细胞仪, BD 公司。

## 1.2 菌株和细胞的培养

UPEC CFT073<sup>wt</sup> 和 UPEC CFT073 <sup>$\Delta$ ldhA</sup> 采用 LB 液体培养基于 37 °C、220 r/min 摇床振荡培养。采用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 THP-1 和 RAW264.7 细胞。

## 1.3 LdhA 蛋白功能结构域、跨膜区和三维结构预测

采用 NCBI CD-search server、TMHMM-2.0 和 AlphaFold 3 在线工具分析 LdhA 蛋白的功能结构域、跨膜区和三维结构。

## 1.4 重组蛋白 rLdhA 的表达纯化

### 1.4.1 目的基因片段扩增与测序

根据 UPEC CFT073 全基因组序列(GenBank 登录号为 NZ\_CP051263.1)中 *ldhA* 基因限制性核酸内切酶图谱分析结果, 结合 T-A 克隆载体 pMD19-T 和原核表达载体 pET-42a 多克隆位点中的限制性核酸内切酶位点, 设计含限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 位点(CATATG 和 CTCGAG)的引物, 用于扩增 *ldhA* (987 bp)基因片段。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。*ldhA* 基因片段扩增引物为 *ldhA1* (5'-CGCCATATGAAA CTCGCCGTTTATAGCAC-3') 和 *ldhA2* (5'-CGCGAGCTCAACCAGTTCGTTTCGGCAGGT-3')。采用 *Ex-Taq* 酶 PCR 试剂盒扩增 *ldhA* 基因片段, 用 YeaRed 核酸胶染料预染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。采用 T-A 克隆试剂盒将扩增片段克隆入 pMD19-T 中, 形成 pMD19-T<sup>*ldhA*</sup> 重组质粒, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.4.2 原核表达系统构建

pMD19-T<sup>*ldhA*</sup> 和原核表达载体 pET-42a 质粒分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳后回收酶切产物, 用紫外分光光度法检测其浓度。将 *ldhA* 基因片段分别与线性化的 pET-42a 按 1:5 的比例混合, 在 T4 DNA 连接酶作用下连接成 pET-42a<sup>*ldhA*</sup>, 委托生工生物工程(上海)股份有限公

司再次测序。将 pET-42a<sup>ldhA</sup> 转入感受态 *E. coli* BL21(DE3) 中, 形成 *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-42aldhA</sup> 工程菌株。

### 1.4.3 目的重组蛋白表达与提纯

将 *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-42aldhA</sup> 接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.8, 加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 后继续振荡培养 6 h, 诱导目的重组蛋白 rLdhA 表达。采用 SDS-PAGE 和全自动蛋白纯化仪分别检测 rLdhA 的表达和提纯情况, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。

### 1.5 rLdhA 乳酸脱氢酶活性的测定

按照乳酸脱氢酶活性检测试剂盒的操作步骤绘制标准曲线后, 将阳性对照组、rLdhA 组和 rLdhA 与乳酸脱氢酶抑制剂草氨酸钠预先处理组用酶标仪在 450 nm 波长处进行检测, 将得到的数值按照公式(1)计算。

$$\text{终乳酸脱氢酶活性值} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times 10^3}{V_{\text{样}} \times T} \quad (1)$$

式中:  $x$  为丙酮酸标准品浓度,  $V_{\text{样}}$  为反应体系中加入的待测样本体积,  $T$  为酶促反应时间。

### 1.6 rLdhA 进入巨噬细胞的测定

用 80 μmol/L 网格蛋白介导内吞作用抑制剂 dynasore、60 μmol/L 包膜蛋白介导内吞作用抑制剂 MCD 预处理 THP-1 和 RAW264.7 细胞 30 min 后, 用 rLdhA 孵育上述抑制剂处理及未处理的细胞 4 h, 然后温和裂解细胞。以 rLdhA-IgG (实验室自制) 为一抗、HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗, 采用 Western blotting 检测胞内的 rLdhA 情况, 用凝胶图像分析系统测定条带灰度值。

### 1.7 rLdhA 对巨噬细胞乳酸化水平影响的测定

用不同浓度 rLdhA (1、5、10 μmol/L) 处理巨噬细胞 THP-1 和 RAW264.7 24 h 后, 1 000×g 离心 10 min 收集细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 裂解

液裂解细胞后, 收集蛋白。进行蛋白电泳及电转至 PVDF 膜后, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次, 以免抗 D-KIa-IgG、鼠抗 GAPDH-IgG 为一抗, 羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG 为荧光二抗。采用红外成像系统检测巨噬细胞乳酸化水平。

### 1.8 rLdhA 对巨噬细胞炎症因子生成影响的测定

用 rLdhA (5 μmol/L) 处理巨噬细胞 THP-1 和 RAW264.7 24 h 后, 1 000×g 离心 10 min 取细胞培养上清。用 ELISA 试剂盒检测 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的表达水平。

### 1.9 尿路感染动物模型的构建

雌性 C57BL/6 小鼠(6–8 周, 18–20 g) 随机分为生理盐水组、CFT073<sup>wt</sup> 组和 CFT073<sup>ΔldhA</sup> 组 ( $n \geq 10$ ), 用静脉留置针从尿道向膀胱滴注 10<sup>9</sup> CFU/mL 的 CFT073<sup>wt</sup> 或 CFT073<sup>ΔldhA</sup> 构建尿路感染小鼠模型<sup>[15]</sup>。5 d 后处死小鼠, 取肾脏和膀胱观察大体病理变化, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 进行包埋、切片、HE 染色观察肾脏和膀胱组织病理改变情况。试验中设置注射生理盐水对照。模型小鼠肾脏巨噬细胞的制备: 将上述小鼠肾脏切成小块并放入试管中, 加入 1 mL 原酶溶液, 37 °C 培养 30 min, 用过滤器 (40 μmol/L) 过滤后, 将细胞重悬于 10 mL PBS 中, 室温 800×g 离心 10 min; 将细胞重悬于 5 mL 氯化铵钾液中, 室温放置 10 min 后, 加入 10 mL PBS 以停止反应, 室温 800×g 离心 10 min; 将细胞重悬于 RPMI-1640 培养基中, 37 °C 培养 2 h, 待巨噬细胞黏附在培养皿上, 轻轻摇动培养皿, 丢弃不黏附的细胞, 用 PBS 洗涤贴壁细胞 3 次; 胰蛋白酶消化后, 将细胞重悬于 PBS 中, 用过滤器 (40 μmol/L) 过滤细胞悬液。用 CD14 微珠分离 CD14<sup>+</sup> 细胞。用抗 CD14 和 F4/80 的特异性单克隆抗体标记细胞, 采用流式细胞仪鉴定分选的肾脏巨噬细胞纯度。

## 1.10 LdhA 对 UPEC CFT073 耐药性影响的测定

分别取对数生长期的 UPEC CFT073<sup>wt</sup>、UPEC CFT073<sup>ΔldhA</sup>、*E. coli* ATCC 25922、*E. coli* ATCC 35218 和 *E. coli* ATCC 43895, 制备成标准浊度的菌悬液。稀释后使用已经预先包被了梯度浓度的环丙沙星、左旋氧氟沙星、氨苄西林和培养基的药敏测试卡。由全自动微生物分析系统自动定量吸取菌液并注入测试卡中, 然后移入其内部恒温孵育箱, 在整个孵育期间(18–20 h)进行连续、实时监测, 最终得出最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值。

## 1.11 LdhA 在防治尿路感染中的潜在作用

用过量 LdhA 抑制剂草氨酸钠与 rLdhA 孵

育后, 将 rLdhA 和经抑制剂作用后的 rLdhA 尾静脉注射至 C57BL/6 小鼠体内, 5 d 后取小鼠肾脏和膀胱, HE 染色观察肾脏和膀胱组织病理改变情况。

## 1.12 统计学分析

采用 *t*-检验和 ANOVA 统计学方法分析数据, 所得到的数据以 mean±SD 表示,  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

# 2 结果与分析

## 2.1 LdhA 的结构与功能

生物信息学分析结果显示, LdhA(由 *ldhA* 基因编码)蛋白含有乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)功能域(图 1A)。TMHMM-2.0 软件预测结果显示, LdhA 能够外分泌(图 1B)。AlphaFold 3 成功预测了 LdhA 的三维结构(图 1C)。使用乳酸脱氢

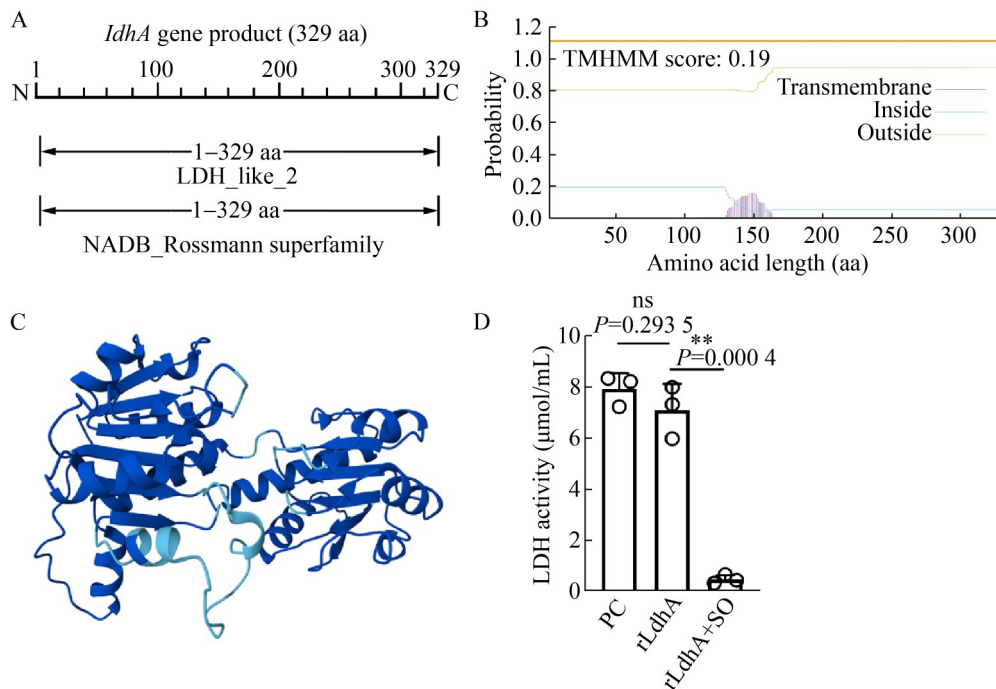


图1 LdhA蛋白的结构及功能。A: LdhA蛋白的功能域预测; B: LdhA蛋白的跨膜预测; C: LdhA蛋白的三维结构预测; D: LdhA具有乳酸脱氢酶活性。

Figure 1 The structure and function of LdhA. A: Functional domain prediction of LdhA; B: Transmembrane prediction of LdhA; C: Three-dimensional structure prediction of LdhA; D: LdhA exhibits lactate dehydrogenase activity. ns: No significance; \*\*:  $P < 0.01$ .

酶活性检测试剂盒检测发现, 相较于阳性(PC)对照组, rLdhA 具有同等水平的乳酸脱氢酶活性; 用过量 LdhA 抑制剂草氨酸钠(SO)处理 rLdhA 后, 其乳酸脱氢酶活性被显著抑制(图 1D)。

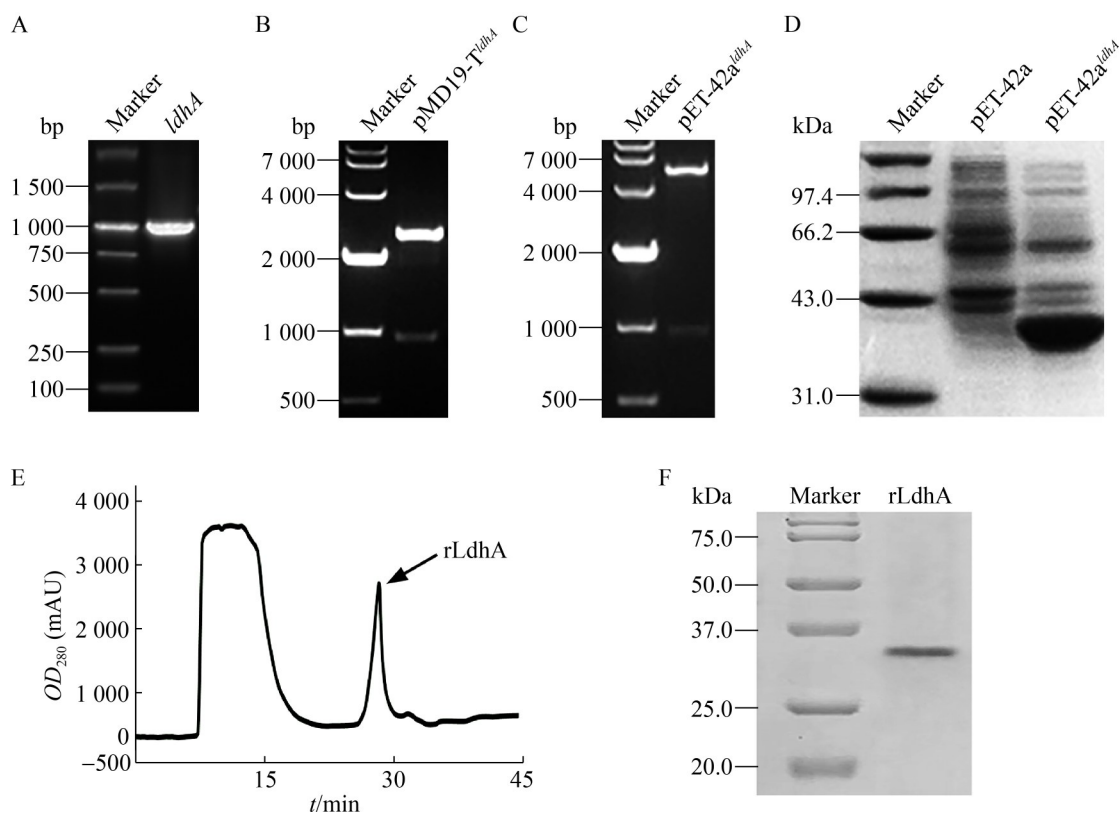
## 2.2 重组蛋白 rLdhA 的表达提纯

从 UPEC CFT073 菌株 DNA 中扩增出预期大小的 *ldhA* 基因片段(图 2A), 并成功构建了克隆和亚克隆重组质粒(图 2B、2C)。测序结果显示, 扩增片段与 GenBank 登录号为 NZ\_CP051263.1 中公布的相应序列完全相同, 测序数据已上传至 ScienceDB, DOI 号为 10.57760/sciencedb.29496。

所构建的原核表达系统能高效表达重组蛋白 rLdhA, 全自动蛋白纯化仪提纯的 rLdhA 显示为单一的蛋白条带(图 2D-2F)。

## 2.3 rLdhA 对巨噬细胞乳酸化的影响

用小窝蛋白介导的内吞作用抑制剂 dynasore 和网格蛋白介导的内吞作用抑制剂 methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) 处理 THP-1 和 RAW264.7 细胞后, Western blotting 结果表明, 能够进入巨噬细胞的 rLdhA 在 MCD 处理后的细胞中无法检测到, 表明 rLdhA 通过网格蛋白介导的内吞作用进入巨噬细胞(图 3A、3B)。用 rLdhA 处理 THP-1



**图2 重组蛋白rLdhA的表达提纯。** A: *ldhA*基因的PCR扩增条带; B: *ldhA*基因的克隆质粒双酶切条带; C: *ldhA*基因的亚克隆质粒双酶切条带; D: rLdhA的诱导表达; E: rLdhA的纯化曲线; F: 提纯的rLdhA电泳图。

Figure 2 The expression and purification of recombinant protein rLdhA. A: The PCR bands for the *ldhA* gene; B: The double-digestion bands of the *ldhA* gene-cloned plasmid; C: The double-digestion bands of the *ldhA* gene-subcloned plasmid; D: Induced expression of rLdhA; E: Purification curve of rLdhA; F: SDS-PAGE image of purified rLdhA.

和RAW264.7细胞后, Western blotting结果显示, 与对照组相比, 1  $\mu\text{mol/L}$ 的rLdhA显著促进了THP-1的乳酸化水平( $P<0.05$ ), 当剂量为5  $\mu\text{mol/L}$ 或10  $\mu\text{mol/L}$ 时促进水平更加显著( $P<0.01$ ) (图3C、3E); 而在RAW264.7细胞中, 与对照组相比, 1  $\mu\text{mol/L}$ 的rLdhA对RAW264.7的乳酸化水平无显著差异, 5  $\mu\text{mol/L}$ 或10  $\mu\text{mol/L}$ 的rLdhA显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )地促进了RAW264.7的乳酸化水平(图3D、3F)。

## 2.4 rLdhA对巨噬细胞炎症因子生成水平的影响

用rLdhA处理THP-1和RAW264.7细胞后

收集细胞上清, ELISA检测结果发现, 与对照组相比, rLdhA对THP-1细胞IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平无显著影响; 与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导组相比, rLdhA显著抑制了THP-1细胞IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平( $P<0.01$ ) (图4A); 在RAW264.7细胞中得到一致的结果(图4B)。

## 2.5 LdhA对小鼠致病性的影响

与CFT073 $\Delta\text{ldhA}$ 感染组相比, CFT073 $^{\text{wt}}$ 组小鼠肾脏和膀胱有明显的脓肿和肿大(图5A); HE染色结果表明, 肾、膀胱组织中有大量炎性细胞浸润(图5B); CFT073 $^{\text{wt}}$ 感染组小鼠的体重相较于CFT073 $\Delta\text{ldhA}$ 组显著减少( $P<0.05$ ) (图5C), 而CFT073 $^{\text{wt}}$ 感染组小鼠肾脏( $P<0.05$ )和膀胱( $P<0.01$ )

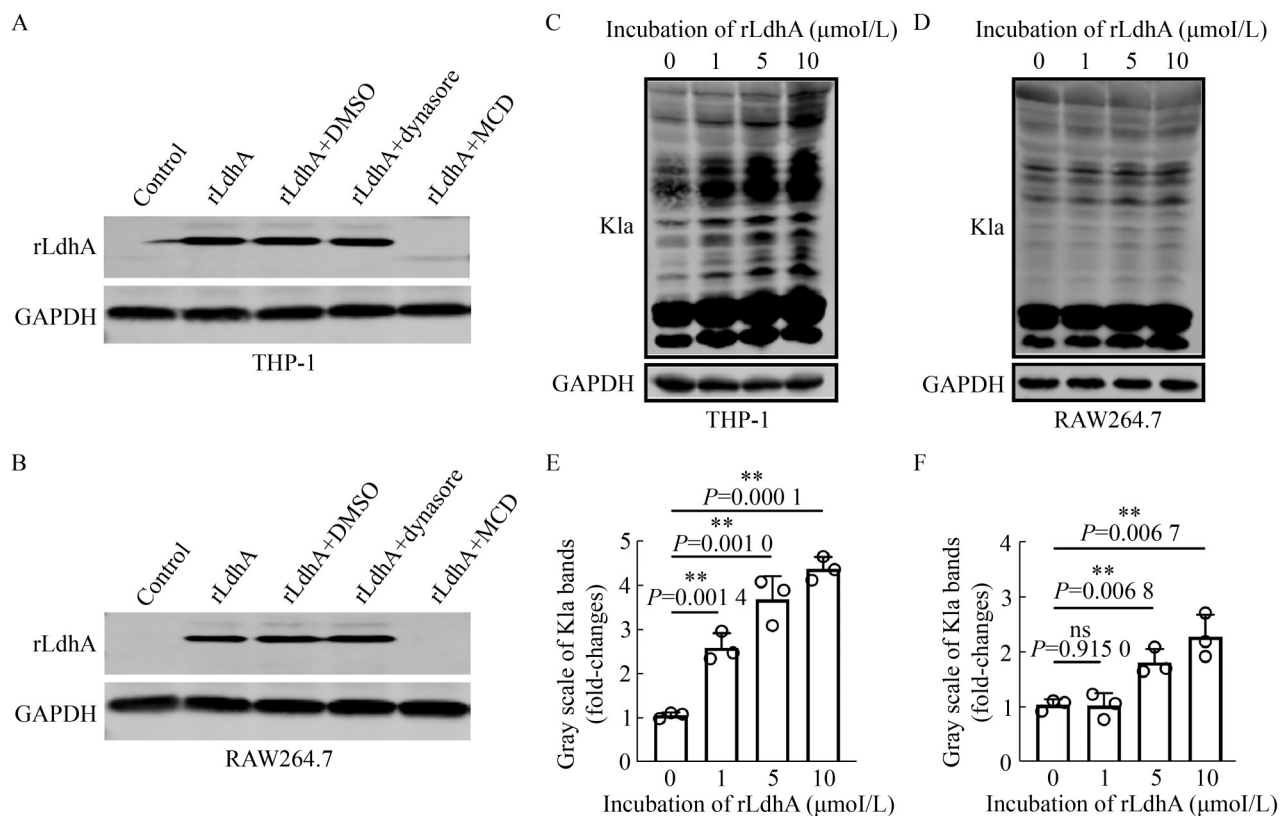
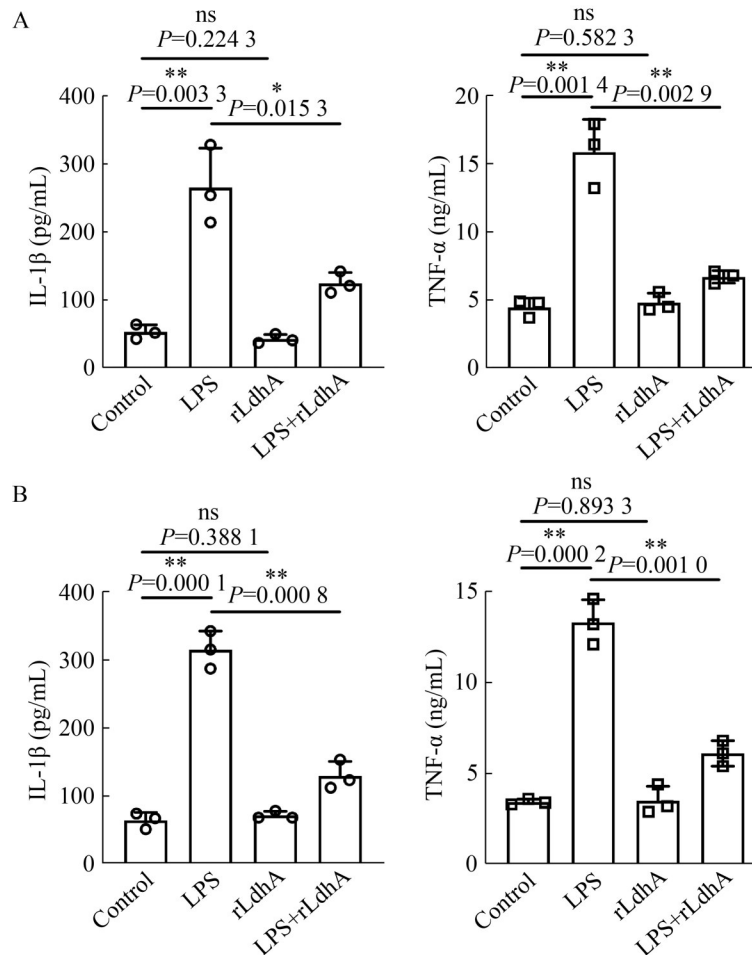


图3 rLdhA对巨噬细胞乳酸化的影响。A、B: rLdhA进入巨噬细胞情况; C、D: 不同浓度rLdhA对THP-1和RAW264.7乳酸化的影响; E、F: 对C和D中乳酸化条带的灰度分析。

Figure 3 The effect of rLdhA on macrophage lactylation. A, B: The entry of rLdhA into THP-1 and RAW264.7 cells; C, D: The effect of different concentrations of rLdhA on the lactylation of THP-1 and RAW264.7 cells; E, F: Gray scale analysis of the lactylation bands in C and D. ns: No significance; \*\*:  $P<0.01$ .



**图4** rLdhA对巨噬细胞炎症因子的影响。A: rLdhA对THP-1细胞IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的影响; B: rLdhA对RAW264.7细胞IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的影响。

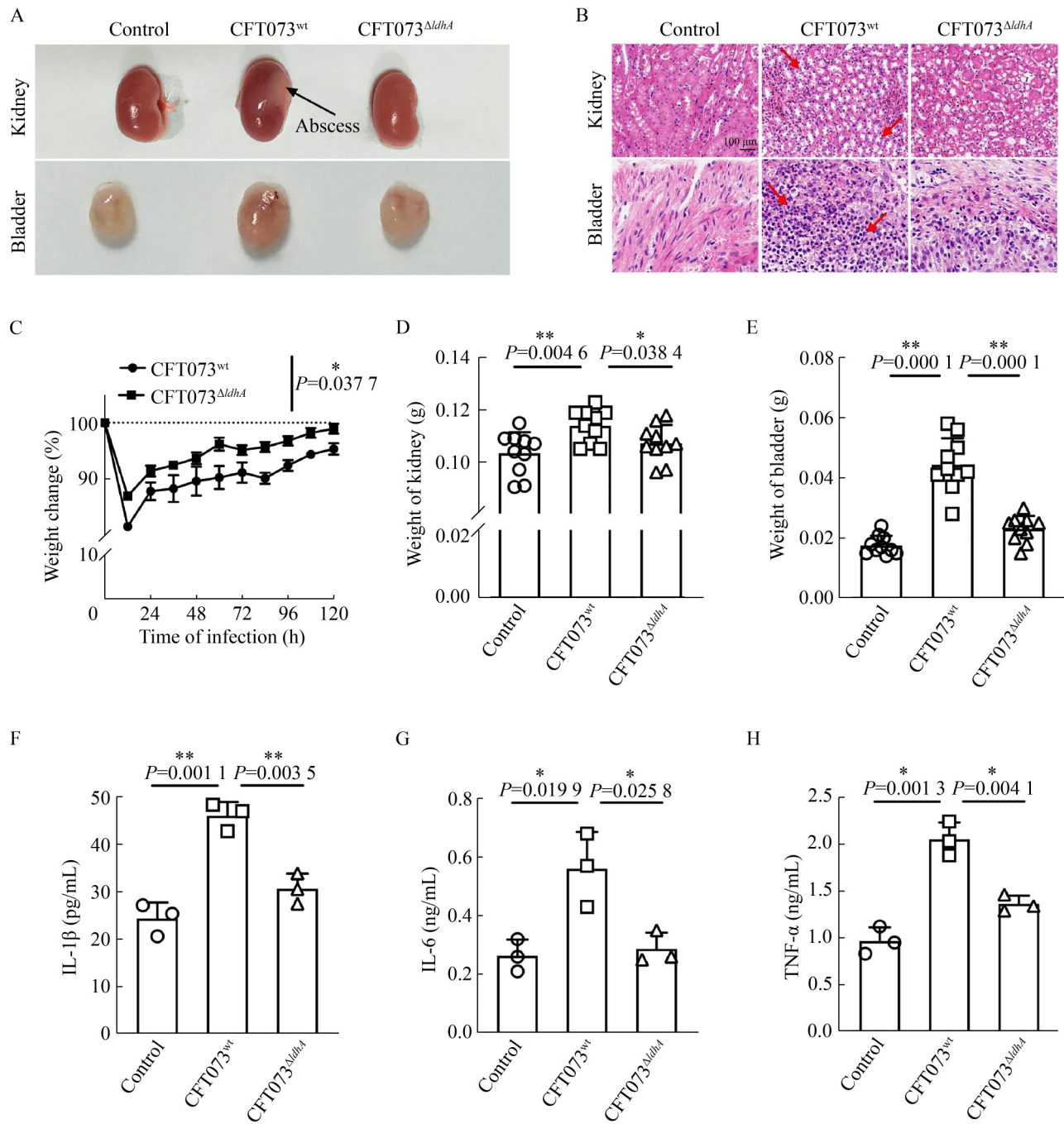
Figure 4 The effect of rLdhA on the macrophage inflammatory factors. A: The effect of rLdhA on the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in THP-1 cells; B: The effect of rLdhA on the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in RAW264.7 cells. ns: No significance; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

的质量显著大于 CFT073 <sup>$\Delta$ ldhA</sup> 组(图 5D、5E); 相较于 CFT073<sup>wt</sup> 感染组, CFT073 <sup>$\Delta$ ldhA</sup> 感染组小鼠肾脏巨噬细胞上清中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  显著减少(图 5F)。

## 2.6 LdhA 对 UPEC CFT073 耐药性的影响及在防治尿路感染中的潜在作用

CFT073<sup>wt</sup> 和 CFT073 <sup>$\Delta$ ldhA</sup> 感染 THP-1 细胞后, 对 THP-1 进行温和裂解, 以获取胞内定殖的细菌。药敏试验检测结果发现, 对比于药敏

敏感标准菌株 *E. coli* ATCC 25922 和耐药标准菌株 *E. coli* ATCC 35218 及 *E. coli* ATCC 43895, CFT073<sup>wt</sup> 对环丙沙星、左旋氧氟沙星和氨苄西林具有一定的耐药性, 而 CFT073 <sup>$\Delta$ ldhA</sup> 却对上述 3 种抗生素均敏感(图 6A)。用过量 LdhA 抑制剂草氨酸钠与 rLdhA 孵育后, 将 rLdhA 和抑制剂作用后的 rLdhA 尾静脉注射至小鼠体内, 5 d 后取小鼠肾脏和膀胱, HE 染色结果发现, rLdhA 能够引起小鼠炎性细胞的浸润, 而抑制剂处理组的炎性细胞显著减少(图 6B)。



**图5 LdhA对小鼠致病性的影响。** A: LdhA对小鼠肾和膀胱病变的影响; B: LdhA对小鼠肾和膀胱组织的病理学影响; C: LdhA对小鼠体重的影响; D、E: LdhA对小鼠肾和膀胱质量的影响; F: LdhA对小鼠炎症的影响。

Figure 5 The effect of LdhA on the pathogenicity in mice. A: The effect of LdhA on the pathological changes in the kidneys and bladders of mice; B: The pathological effects of LdhA on renal and bladder tissues of mice; C: The effect of LdhA on the body weight of mice; D, E: The effect of LdhA on the renal and bladder weights in mice; F: The effect of LdhA on the inflammation in mice. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

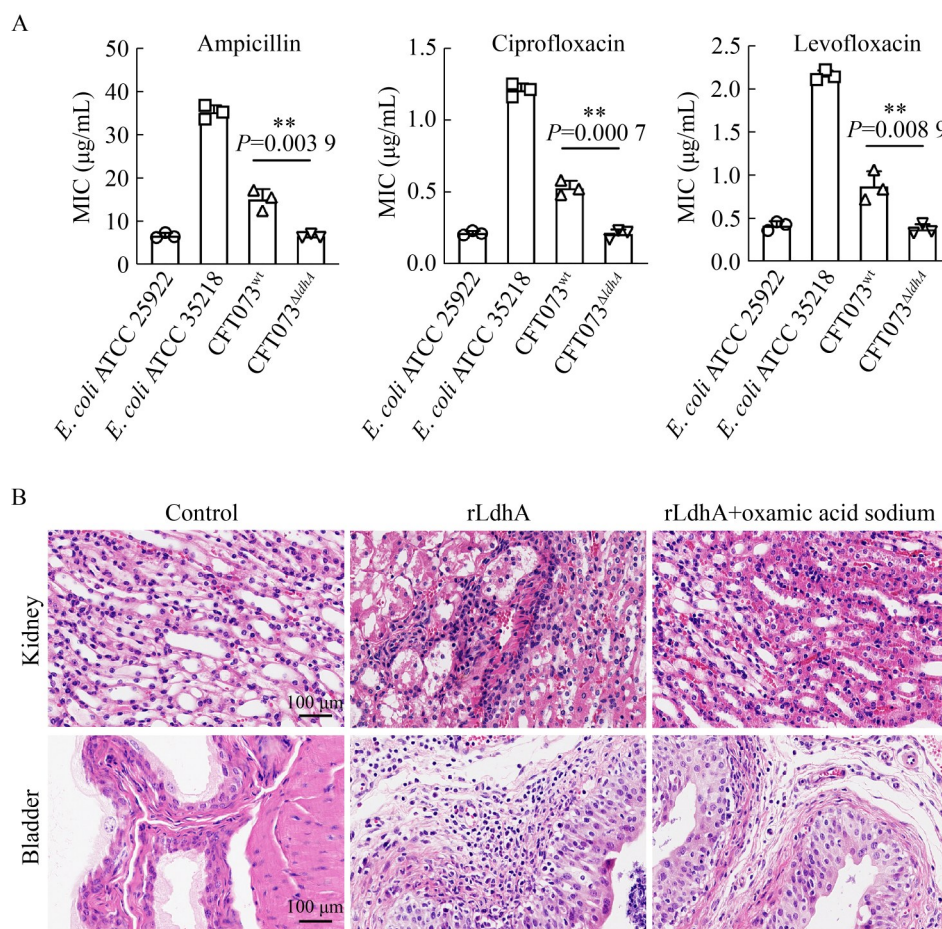


图6 LdhA对UPEC CFT073耐药性的影响及在防治尿路感染中的潜在作用。A: LdhA对UPEC耐药性的影响; B: LdhA在防治尿路感染中的作用。

Figure 6 The effect of LdhA on the antimicrobial resistance of UPEC CFT073 and its role in the prevention and treatment of urinary tract infections. A: The effect of LdhA on UPEC antimicrobial resistance; B: The potential role of LdhA in the prevention and treatment of urinary tract infections. \*\*:  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

#### 3.1 LdhA 的结构与功能

根据生物信息学预测, LdhA 蛋白具有乳酸脱氢酶功能域。乳酸脱氢酶是一种含锌离子的金属蛋白, 既是糖酵解及糖异生过程中的重要酶系之一, 也是关键的氧化还原酶, 可催化丙酮酸与乳酸之间的氧化还原反应以及相关  $\alpha$ -酮酸的反应<sup>[16]</sup>。本研究结果也证明 LdhA 确实可以增强巨噬细胞的乳酸化水平, 这与预测的功能相符。病原菌感染宿主时通常会分泌一些毒力

因子和侵袭性酶, 以此抵抗宿主的免疫反应或逃逸其攻击; 通过预测发现 LdhA 为外分泌蛋白, 且已证实其外分泌后可进入巨噬细胞, 其入胞机制正在进一步探究中。这些结果表明, 可外分泌的 LdhA 在 UPEC 的致病过程中发挥了重要作用。

#### 3.2 rLdhA 对巨噬细胞乳酸化的影响

乳酸化自 2019 年被报道以来, 已逐渐成为继乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等蛋白质翻译后修饰之后, 细胞代谢调控的重要新型途径<sup>[14]</sup>。乳酸化修饰是一种依赖代谢物乳酸的翻

译后修饰, 在细胞内分布广泛。其具体形成机制为: 乳酸分子通过酯键与蛋白质中赖氨酸残基的氨基发生反应, 形成赖氨酸的乳酸化修饰, 该修饰具有可逆性, 修饰的添加与移除可分别在乳酸转移酶及去乳酸化酶的催化下完成<sup>[17]</sup>。乳酸化修饰的检测主要通过质谱技术和免疫印迹技术, 前者主要用于对某一特定蛋白进行精准定性、鉴定修饰位点并定量分析; 后者主要用于细胞或组织中总体乳酸化的定性/半定量分析。乳酸作为细胞能量代谢的重要中间产物, 不仅在细胞内发挥关键的代谢调节作用, 还能通过乳酸化修饰直接影响蛋白质功能<sup>[18]</sup>。Zhu 等<sup>[19]</sup>发现, HMGB 蛋白的乳酸化能够驱动急性肾损伤中中性粒细胞 NETs 的形成, 表明蛋白的乳酸化能够促进小鼠肾损伤的发生。本研究发现, rLdhA 能够以剂量依赖的方式促进 THP-1 和 RAW264.7 细胞的乳酸化, 提示 LdhA 可能通过调控宿主细胞的乳酸化在 UPEC 引发的尿路感染过程中发挥作用。

### 3.3 rLdhA 对巨噬细胞炎症因子生成的影响

当乳酸化修饰水平异常升高时, 巨噬细胞会启动从促炎 M1 型向抑炎 M2 型的表型转化。乳酸通过增强特定分子的乳酸化修饰, 进而靶向抑制 M1 型 NF- $\kappa$ B 通路的活化, 使 NF- $\kappa$ B 与 DNA 的结合能力被竞争性抑制, 最终导致 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等促炎因子的转录表达受阻<sup>[14]</sup>。Li 等<sup>[20]</sup>报道, 在高乳酸环境中丙氨酰 tRNA 合成酶 2 感知到乳酸后, 对参与抗病毒固有免疫反应的 cGAS 发生乳酸化修饰, 导致其失活, 进而抑制抗病毒固有免疫反应。本研究证实, rLdhA 可抑制巨噬细胞 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的生成, 表明 LdhA 在 UPEC 感染过程中也能通过增强巨噬细胞的乳酸化水平抑制炎症因子生成, 进而逃逸固有免疫反应, 增强致病性。

### 3.4 LdhA 对小鼠致病性的影响

在病原体感染过程中组织细胞可分泌趋化

因子, 募集巨噬细胞浸润以清除病原体。此外, 浸润的巨噬细胞还能分泌趋化因子, 招募中性粒细胞等其他先天免疫细胞, 这些免疫细胞通过分泌炎症因子共同杀灭病原体<sup>[13]</sup>。多数尿路感染由 UPEC 引起, 该菌可导致严重的肾盂肾炎、膀胱炎, 并伴有明显的中性粒细胞浸润<sup>[21-24]</sup>。我们此前报道, UPEC 毒力因子 TcpC 可通过泛素化降解巨噬细胞和中性粒细胞的关键蛋白, 进而抑制炎症反应<sup>[15,25]</sup>, 从而逃逸固有免疫反应。然而, LdhA 在 UPEC 感染中的作用尚未见研究报道。动物实验结果显示, 与 CFT073 $\Delta$ ldhA 感染组相比, CFT073<sup>wt</sup> 组小鼠的肾脏和膀胱出现明显的脓肿与肿大, 肾、膀胱组织中存在大量炎性细胞浸润, 且 CFT073<sup>wt</sup> 组小鼠肾脏巨噬细胞炎症因子水平显著升高, 结合 LdhA 能够促进巨噬细胞乳酸化水平的研究结果, 提示 LdhA 很可能通过促进细胞内乳酸及乳酸化水平, 从而促进炎症因子的产生, 抑制巨噬细胞的杀菌活性, 介导 UPEC CFT073 的免疫逃逸。这一机制与毒力因子 TcpC 通过抑制巨噬细胞和中性粒细胞炎症反应截然不同。UPEC CFT073 两个介导免疫逃逸的机制, 可能是其适应宿主免疫压力的进化智慧——TcpC 通过静默躲防降低免疫关注度, LdhA 通过混乱破防消耗免疫资源, 利于细菌扩散, 两者具有协同作用, 最终均指向打破免疫平衡。这也提示我们, 未来研究需从单一因子机制走向网络协同调控, 并基于机制开发抗毒力治疗、精准疫苗等新型策略, 为解决细菌耐药性、慢性感染等临床难题提供新突破口。

### 3.5 LdhA 对 UPEC 耐药性的影响及在防治尿路感染中的作用

尿路感染主要由 UPEC 引起, 而 77% 的复发患者由最初引起感染的菌株所致。这表明 UPEC 对宿主免疫反应和抗生素治疗有抵抗力, 因此这些菌株可能作为复发性感染的主要来源<sup>[26]</sup>。Kerkez 等<sup>[27]</sup>用 UPEC CFT073 感染小鼠

巨噬细胞系 J774A.1 后, 测试了 UPEC CFT073 对治疗尿路感染常用抗生素(庆大霉素、氨苄西林、呋喃妥因、甲氧苄啶、磺胺甲恶唑和环丙沙星)的敏感性, 结果表明所有测试的抗生素对细胞内细菌的疗效远低于细胞外细菌。大多数抗生素在临床可达到的浓度下无法在细胞内达到有效杀菌效果。例如, 环丙沙星杀死 99.9% 的细胞外细菌浓度在最低抑菌浓度(MIC)附近, 而细胞内细菌的浓度需要超过 MIC 100 倍才能达到杀菌效果<sup>[27]</sup>。本研究的药敏实验结果也证实, CFT073<sup>wt</sup> 和 CFT073<sup>ΔldhA</sup> 感染巨噬细胞后, 胞外菌均对环丙沙星、左旋氧氟沙星和氨苄西林敏感, 胞内的 CFT073<sup>wt</sup> 对环丙沙星、左旋氧氟沙星和氨苄西林具有一定的耐药性, 而胞内的 CFT073<sup>ΔldhA</sup> 对环丙沙星、左旋氧氟沙星和氨苄西林的耐药性显著下降, 表明 LdhA 对 UPEC CFT073 的耐药性具有显著作用。结合乳酸脱氢酶抑制剂处理后的动物预疗效实验结果, 提示 LdhA 可以作为预防和治疗尿路感染, 特别是复发性尿路感染的潜在作用靶点。

## 4 结论

本研究表明, 具有乳酸脱氢酶活性的 LdhA 能够通过网格蛋白介导的内吞作用进入巨噬细胞, 并对巨噬细胞的乳酸化水平具有显著的剂量依赖性调控作用。在 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型中, LdhA 能显著抑制炎症因子的生成水平, 提示其可能通过调节乳酸化修饰参与炎症反应的调控。动物实验结果表明, LdhA 可增强 UPEC 对小鼠的致病性, 且 LdhA 对 UPEC CFT073 的耐药性具有重要作用, 可作为防治尿路感染的潜在靶点。然而, 其具体的分子调控机制仍有待进一步研究。

## 作者贡献声明

樊力铭: 实验设计、实验操作、结果分析、稿件的撰写和修改; 陈也: 实验操作、数据收集; 蒋委余: 实验设计、数据分析; 郑欣怡: 实验设计、验

证; 谢子文: 软件程序; 叶乐元: 协助实验操作; 金意涵: 参与数据讨论; 方佳琪: 基金获取、项目管理、实验设计、实验指导、结果分析、稿件的撰写和修改。

## 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] GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. *The Lancet*, 2022, 400(10369): 2221-2248.
- [2] TIMM MR, RUSSELL SK, HULTGREN SJ. Urinary tract infections: pathogenesis, host susceptibility and emerging therapeutics[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2024, 23(2): 72-86.
- [3] SCHWARTZ L, de DIOS RUIZ-ROSADO J, STONEBROOK E, BECKNELL B, SPENCER JD. Uropathogen and host responses in pyelonephritis[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2023, 19(10): 658-671.
- [4] FLORES C, ROHN JL. Bacterial adhesion strategies and countermeasures in urinary tract infection[J]. *Nature Microbiology*, 2025, 10(3): 627-645.
- [5] SPAULDING CN, KLEIN RD, RUER S, KAU AL, SCHREIBER HL, CUSUMANO ZT, DODSON KW, PINKNER JS, FREMONT DH, JANETKA JW, REMAUT H, GORDON JI, HULTGREN SJ. Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist[J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 528-532.
- [6] KLEIN RD, HULTGREN SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(4): 211-226.
- [7] ZHUO ZY, WANG Y, XU YF. Advancements in research on lactate dehydrogenase A in urinary system tumors[J]. *BMC Urology*, 2024, 24(1): 187.
- [8] WANG JY, WANG ZY, WANG QX, LI X, GUO YP. Ubiquitous protein lactylation in health and diseases[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2024, 29(1): 23.
- [9] CHEN J, HUANG ZY, CHEN Y, TIAN H, CHAI PW, SHEN YN, YAO YR, XU SQ, GE SF, JIA RB. Lactate and lactylation in cancer[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2025, 10: 38.
- [10] LYNCH A, PEARSON P, SAVINOV SN, LI AY, RICH SM. Lactate dehydrogenase inhibitors suppress *Borrelia burgdorferi* growth *in vitro*[J]. *Pathogens*, 2023, 12(7): 962.
- [11] WISE AD, TenBARGE EG, MENDONÇA JDC, MENNEN EC, McDANIEL SR, REBER CP, HOLDER BE, BUNCH ML, BELEVSKA E, MARSHALL MG,

- VACCARO NM, BLAKELY CR, WELLAWA DH, FERRIS J, SHELDON JR, BIEBER JD, JOHNSON JG, BURCHAM LR, MONTEITH AJ. Mitochondria sense bacterial lactate and drive release of neutrophil extracellular traps[J]. *Cell Host & Microbe*, 2025, 33(3): 341-357.e9.
- [12] WANG ZH, JIANG ZM, ZHANG Y, WANG CW, LIU ZY, JIA ZK, BHUSHAN S, YANG JJ, ZHANG ZG. Exosomes derived from bladder epithelial cells infected with uropathogenic *Escherichia coli* increase the severity of urinary tract infections (UTIs) by impairing macrophage function[J]. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(1): e1011926.
- [13] LI L, JIAO QC, YANG QQ, LU HS, ZHOU X, ZHANG Q, ZHANG FT, LI H, TIAN ZG, ZENG ZT. A bladder-blood immune barrier constituted by suburothelial perivascular macrophages restrains uropathogen dissemination[J]. *Immunity*, 2025, 58(3): 568-584.e6.
- [14] ZHANG D, TANG ZY, HUANG H, ZHOU GL, CUI C, WENG YJ, LIU WC, KIM S, LEE S, PEREZ-NEUT M, DING J, CZYZ D, HU R, YE Z, HE MM, ZHENG YG, SHUMAN HA, DAI LZ, REN B, ROEDER RG, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation[J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575-580.
- [15] FANG JQ, OU Q, PAN J, FANG J, ZHANG DY, QIU MQ, LI YQ, WANG XH, YANG XY, CHI Z, GAO W, GUO JP, MIETHKE T, PAN JP. TcpC inhibits Toll-like receptor signaling pathway by serving as an E3 ubiquitin ligase that promotes degradation of myeloid differentiation factor 88[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(3): e1009481.
- [16] CHEN XY, LIU LL, KANG SW, GNANAPRAKASAM JR, WANG RN. The lactate dehydrogenase (LDH) isoenzyme spectrum enables optimally controlling T cell glycolysis and differentiation[J]. *Science Advances*, 2023, 9(12): eadd9554.
- [17] HE XD, WANG QW, CHENG X, WANG WH, LI YT, NAN YB, WU J, XIU BQ, JIANG T, BERGHOLZ JS, GU H, CHEN FH, FAN GJ, SUN LH, XIE SZ, ZOU JJ, LIN S, WEI Y, LEE J, ASARA JM, et al. Lysine vitcylation is a vitamin C-derived protein modification that enhances STAT1-mediated immune response[J]. *Cell*, 2025, 188(7): 1858-1877.e21.
- [18] CAI HH, CHEN XY, LIU Y, CHEN YB, ZHONG GC, CHEN XY, RONG S, ZENG H, ZHANG L, LI ZL, LIAO AH, ZENG XT, XIONG W, GUO CH, ZHU YF, DENG KQ, REN H, YAN H, CAI Z, XU K, et al. Lactate activates trained immunity by fueling the tricarboxylic acid cycle and regulating histone lactylation[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 3230.
- [19] ZHU L, ZHENG Q, LIU XD, DING H, MA MQ, BAO JX, CAI YW, CAO CC. HMGB1 lactylation drives neutrophil extracellular trap formation in lactate-induced acute kidney injury[J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 15: 1475543.
- [20] LI HY, LIU C, LI R, ZHOU LL, RAN Y, YANG QQ, HUANG HZ, LU HS, SONG H, YANG B, RU H, LIN SX, ZHANG L. AARS1 and AARS2 sense L-lactate to regulate cGAS as global lysine lactyltransferases[J]. *Nature*, 2024, 634(8036): 1229-1237.
- [21] LI XP, ZHOU JR, LIU XM, JIN C, LIU L, SUN HM, WANG Q, WANG QS, LIU RY, ZHENG XY, LIU YT, PANG Y. Nucleoside-diphosphate kinase of uropathogenic *Escherichia coli* inhibits caspase-1-dependent pyroptosis facilitating urinary tract infection[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(4): 114051.
- [22] SÖDERSTRÖM B, PITTORINO MJ, DALEY DO, DUGGIN IG. Assembly dynamics of FtsZ and DamX during infection-related filamentation and division in uropathogenic *E. coli*[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3648.
- [23] NASKAR M, PAREKH VP, ABRAHAM MA, ALIBASIC Z, KIM MJ, SUK G, NOH JH, KO KY, LEE J, KIM C, YOON H, ABRAHAM SN, CHOI HW.  $\alpha$ -hemolysin promotes uropathogenic *E. coli* persistence in bladder epithelial cells *via* abrogating bacteria-harboring lysosome acidification[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(5): e1011388.
- [24] 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 X, MEI T, LI Z, NIU LL, FU DD, SONG XJ, SHAO Y, QI KZ, TU J. 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 (in Chinese).
- [25] OU Q, FANG JQ, ZHANG ZS, CHI Z, FANG J, XU DY, LU KZ, QIAN MQ, ZHANG DY, GUO JP, GAO W, ZHANG NR, PAN JP. TcpC inhibits neutrophil extracellular trap formation by enhancing ubiquitination mediated degradation of peptidylarginine deiminase 4[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3481.
- [26] MORRISON JJ, MADDEN EK, BANAS DA, DiBIASIO EC, HANSEN M, KROGFELT KA, ROWLEY DC, COHEN PS, CAMBERG JL. Metabolic flux regulates growth transitions and antibiotic tolerance in uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2024, 206(6): e0016224.
- [27] KERKEZ I, TULKENS PM, TENSON T, van BAMBEKE F, PUTRINŠ M. Uropathogenic *Escherichia coli* shows antibiotic tolerance and growth heterogeneity in an *in vitro* model of intracellular infection[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(12): e0146821.