2026, 66(2): 801-814
CSTR: 32112.14.j.AMS.20250672
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20250672

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

EvpP 对迟缓爱德华氏菌生物学特性及感染巨噬细胞的影响

杨子轩，康若茗，胡玉帅，高迎莉，王淑芳，秦蕾*

江苏海洋大学 海洋科学与水产学院，江苏 连云港

杨子轩, 康若茗, 胡玉帅, 高迎莉, 王淑芳, 秦蕾. EvpP 对迟缓爱德华氏菌生物学特性及感染巨噬细胞的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 801-814.

YANG Zixuan, KANG Ruoming, HU Yushuai, GAO Yingli, WANG Shufang, QIN Lei. Impacts of EvpP on the biological characteristics of *Edwardsiella tarda* and infection of macrophages[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(2): 801-814.

摘　要：VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)是迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的一种新型毒力因子。迟缓爱德华氏菌毒力蛋白 P (*E. tarda* virulence protein P, EvpP)是 T6SS 的效应蛋白，但目前对 EvpP 功能机制的研究仍十分有限。【目的】解析 EvpP 的生物学功能，深入探究 T6SS 在 *E. tarda* 致病过程中的作用。【方法】构建 *E. tarda* 的 *evpP* 基因缺失株(Δ*evpP*)和回补株(Δ*evpP*-C)，在此基础上开展 *evpP* 基因缺失对 *E. tarda* 生物学特性以及巨噬细胞感染影响的研究。【结果】*E. tarda* 野生株、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 在生长曲线和生理生化特性方面并无显著差异。相较于野生株，Δ*evpP* 的运动性、生物被膜生成能力以及感染 RAW264.7 巨噬细胞的黏附率、胞内增殖率和触发细胞自噬的能力均显著下降，但能诱发巨噬细胞分泌更多的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)。Δ*evpP*-C 的胞内增殖能力未完全恢复至野生株水平，但其他表型均得到完全恢复。【结论】EvpP 不影响 *E. tarda* 的生长和生理生化特性，但能不同程度地增强该菌的运动性、生物膜形成能力以及对巨噬细胞的黏附、胞内增殖能力和自噬活性，且能抑制 *E. tarda* 感染的巨噬细胞分泌更多 TNF-α。研究结果进一步证实 EvpP 参与 *E. tarda* 的致病过程，并在其中发挥重要作用。

关键词：迟缓爱德华氏菌；EvpP；巨噬细胞；生物学特性

资助项目：江苏省自然科学基金(BK20221396)
This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221396).
*Corresponding author. E-mail: 2006000034@jou.edu.cn
Received: 2025-09-03; Accepted: 2025-10-11; Published online: 2025-11-18

Impacts of EvpP on the biological characteristics of *Edwardsiella tarda* and infection of macrophages

YANG Zixuan, KANG Ruoming, HU Yushuai, GAO Yingli, WANG Shufang, QIN Lei*

School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] The type VI secretion system (T6SS) is a novel virulence factor of *Edwardsiella tarda*. *E. tarda* virulence protein P (EvpP) is an effector of the T6SS. To date, the functional mechanisms of EvpP are still poorly understood. This study aimed to comprehensively investigate the biological functions of EvpP and elucidate the roles of T6SS in the pathogenicity of *E. tarda*. **[Methods]** We constructed the *evpP*-deleted mutant (Δ*evpP*) and complemented strain (Δ*evpP*-C) to study the effects of *evpP* deletion on the biological characteristics of *E. tarda* and infection in macrophages. **[Results]** No significant differences were observed in the growth curves or physiological and biochemical properties among the wild-type (WT), Δ*evpP*, and Δ*evpP*-C. However, compared with WT, Δ*evpP* exhibited significantly reduced motility, biofilm formation, adhesion rate to RAW264.7 macrophages, intracellular proliferation capacity, and ability to induce host cell autophagy, while triggering increased secretion of tumor necrosis factor-α (TNF-α) by macrophages. The complementation of *evpP*-C did not fully restore the intracellular proliferation capability, but completely rescued the other phenotypic defects. **[Conclusion]** EvpP does not affect the growth or physiological and biochemical properties of *E. tarda*. However, it could enhance the bacterial motility, biofilm formation, adhesion to macrophages, intracellular proliferation, and autophagy, while suppressing TNF-α secretion in *E. tarda*-infected macrophages. These findings confirm that EvpP plays a critical role in the pathogenicity of *E. tarda*.

Keywords: *Edwardsiella tarda*; EvpP; macrophages; biological characteristics

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是一种重要的人兽共患病原体，其宿主范围广泛，可引起鱼类、两栖类、爬行类、哺乳类甚至人类的感染[1]，尤其对水产养殖业危害巨大[2]。*E. tarda* 属于胞内寄生菌，能够在宿主巨噬细胞内生存繁殖，进而促进自身感染[3-4]。目前，对 *E. tarda* 复杂的致病机理了解尚不充分，这在很大程度上限制了迟缓爱德华氏菌病的有效治疗与防控工作。

在众多毒力因子中，VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)被认为是 *E. tarda* 发挥毒力所必需的，在 *E. tarda* 的致病过程中发挥着重要作用[5-6]。T6SS 是新近确定的与细菌毒力和竞争生存密切相关的分泌系统，由结构蛋白、转位蛋白和分泌蛋白等组成[7-8]，其中分泌蛋白能够决定 T6SS 的杀伤功能[9]。作为 T6SS 的分泌蛋白，迟缓爱德华氏菌毒力蛋白 P (*E. tarda* virulence protein P, EvpP)已被证实参与 *E. tarda* 的致病过程[10]。EvpP 是 *E. tarda* 特有的分泌蛋白，其转录受到双组分系统 EsrA-EsrB 和铁摄取调节因子 Fur 的正向调控[11]；Zhang 等[12]通过体内实验表明，*evpP* 的转录可被调节因子 H-NS 抑制。阻断 EvpP 的表达会使 *E. tarda* 的毒性显著削弱，并影响菌株侵染上皮细胞、溶血活性、黏液穿透力以及抵抗血清杀伤和体内寄生的能力[6,11]。王鑫[13]研究发现，*E. tarda* 入侵鼠巨噬

细胞后 EvpP 的表达量显著上升，表明 EvpP 参与 *E. tarda* 与巨噬细胞的互作关系。进一步研究发现，EvpP 能够抑制细胞质内 Ca^{2+}的增加，阻断炎性小体接头蛋白 ASC 的寡聚化，通过 Ca^{2+}依赖性 MAPK-Jnk 途径阻止 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎性小体的激活，从而促进 *E. tarda* 在巨噬细胞内的定殖[14]。动物实验表明 EvpP 能够抑制 Jnk-caspy 炎性小体信号通路，并显著抑制中性粒细胞向感染部位的募集[15]。作为 *E. tarda* 非常重要的毒力因子，目前尚不清楚 T6SS 如何通过其分泌蛋白 EvpP 影响 *E. tarda* 的生物学特性，以及在与巨噬细胞的互作过程中具体参与哪些环节。

本研究基于同源重组技术构建了迟缓爱德华氏菌的 *evpP* 基因缺失株和回补株。在此基础上，对 *E. tarda* 野生株、缺失株和回补株在生长曲线、生理生化特性、运动性、生物膜形成以及与巨噬细胞相互作用(包括黏附、胞内增殖、炎性因子分泌和细胞自噬等方面)进行比较分析，探究 EvpP 在 *E. tarda* 生物学特性及与巨噬细胞互作中所扮演的角色。研究结果综合评估了 EvpP 的功能，为证实 EvpP 参与 *E. tarda* 致病过程并承担重要角色提供更多科学依据和参考，同时也为寻找防控迟缓爱德华氏菌病的有效措施提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与细胞系

E. tarda、*E. coli* β2163、*E. coli* DH5α λpir 菌株以及 pLP12、pBAD 质粒均由本实验室保存；RAW264.7 巨噬细胞系由中国科学院干细胞库提供。

1.2 主要试剂和仪器

TSB、TSA、LB 培养基以及细菌微量生化鉴定管均购自杭州微生物试剂有限公司；DMEM 培养基购自 HyClone 公司；胎牛血清购自 Gibco 公司；电泳预制胶购自南京金斯瑞生物科技有限公司；TNF-α 检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；姬姆萨染色液购自北京索莱宝科技有限公司；MDC 自噬检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司；兔抗鼠 LC3 多克隆抗体、兔抗鼠 Tubulin 内参抗体、羊抗兔二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司；PrimeSTAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶和 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司；ClonExpress® II One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

酶标仪，ThermoFisher Scientific 公司；CO_2 细胞培养箱，RS Biotech 公司；细菌浊度仪，杭州齐威仪器有限公司；荧光显微镜，Nikon 公司；电泳仪，北京六一生物科技有限公司；半干转印仪，Cytiva 公司。

1.3 *E. tarda* 的 *evpP* 缺失株(Δ*evpP*)和回补株(Δ*evpP*-C)的构建

1.3.1 引物的设计

根据 GenBank 中 *E. tarda evpP* 基因序列(Gene 编号 ID：8608773)，利用 Primer Premier 5.0 设计 *evpP* 缺失株和回补株构建所需引物(表 1)，由上海捷瑞生物工程有限公司进行引物合成。

1.3.2 *evpP* 缺失株(Δ*evpP*)的构建

使用试剂盒提取 *E. tarda* 菌株基因组 DNA 并作为模板，分别扩增 *evpP* 基因的上游和下游同源臂。通过交叠 PCR 获得融合片段后克隆至 pLP12 自杀质粒构建重组质粒(pLP12-*evpP*)。将重组质粒转化大肠杆菌 DH5α λpir 并涂布 LB 平板(20 μg/mL Cm, 0.3% D-glucose)进行筛选。将重组质粒转化 *E. coli* β2163，涂布 LB 平板(20 μg/mL Cm, 0.3 mmol/L DAP)筛选阳性克隆。利用 TSA 平板(0.3 mmol/L DAP, 0.3% D-glucose)开展接合试验，将重组质粒从供体菌 *E. coli*

表1 *evpP*缺失株和回补株构建所用引物

Table 1 Primers used in the construction of *evpP* deletion mutants and complemented strains

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5′→3′)	产物大小 Product size (bp)
P1	CATGACG<u>TCTAGA</u>CGCTGACGCATCCATTATCGCAAC	610
P2	GATATGCCCGACCGTCAGGTTTGGTCCAACATCGGACCATTCCAGCTC	
P3	GAGCTGGAATGGTCCGATGTTGGACCAAACCTGACGGTCGGGCATATC	587
P4	TAGTCGT<u>ACTAGT</u>TTGGCTGTCATCTCCGCTCAGGG	
P5	GACACAGTTGTAACTGGTCCA	1 220
P6	CAGGAACACTTAACGGCTGAC	
P7	CATGACG<u>TCTAGA</u>GCGTCGTGTCAGGAGGCGATGAA	970/1 663
P8	TAGTCGT<u>ACTAGT</u>TTGCGCTCTTTCAGCTTGGGAAGC	
P9	CGAATTGGGTACCAGCGCTT	273
P10	TACCGTCGACGCCGGCCAGC	
P11	TGGGCTAGCGAATTCGAGCTAGGAGGAATTCACCATGTTGACTTTGAATTCCGAGCTG	618
P12	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGCTATTTCAATATTGAAAATTGGTGGCTAC	
P13	CTAGAGTCGACCTGCAGGCA	5 529
P14	AGCTCGAATTCGCTAGCCCA	
P15	CCATAAGATTAGCGGATCCTACCT	722
P16	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAG	

下划线为酶切位点；P1/P2用于扩增上游同源臂；P3/P4用于扩增下游同源臂；P1/P4用于缺失株检测；P5/P6用于pLP12-*evpP*重组载体构建检测；P7/P8用于插入突变株检测；P9/P10用于pBAD33cm-rp4质粒检测；P11/P12用于扩增*evpP*；P13/P14用于扩增pBAD33cm-rp4载体片段；P15/P16用于*evpP*-pBAD33cm-rp4重组质粒和回补株的检测。

Restriction enzyme sites are underlined; P1/P2 used for amplifying the upstream homologous arm; P3/P4 used for amplifying downstream homologous arm; P1/P4 used to detect deletion mutants; P5/P6 used to detect recombinant vector; P7/P8 used to detect insertion mutants; P9/P10 used to detect pBAD33cm-rp4; P11/P12 used for amplifying *evpP*; P13/P14 used for amplifying pBAD33cm-rp4; P15/P16 used to detect *evpP*-pBAD33cm-rp4 and complemented strains.

β2163 转移至 *E. tarda* 中，继续涂布平板(20 μg/mL Cm, 0.3% D-glucose)筛选插入突变株并进行 PCR 检测。取一个插入突变克隆经 TSB (0.3% D-glucose)培养后涂布平板(0.4% L-arabinose)筛选阳性克隆，PCR 检测并进行测序验证。

1.3.3 回补株(Δ*evpP*-C)的构建

参照 1.3.2 节缺失株构建的方法，将质粒 pBAD33cm-rp4 转化于 *E. coli* β2163 感受态细胞，涂布 LB 平板筛选阳性克隆。将 Δ*evpP* 与 *E. coli* β2163 进行接合实验，确定质粒 pBAD33 cm-rp4 能够在 Δ*evpP* 中进行复制。以 *E. tarda* 菌株基因组 DNA 为模板，扩增纯化 *evpP* 基因，并与扩增的载体片段进行无缝克隆连接，PCR 检测筛选重组克隆，并进行测序验证。将阳性克隆质粒转化 *E. coli* β2163，然后通过接合试验将 *evpP*-pBAD33cm-rp4 重组质粒转入 Δ*evpP*。挑取若干重组克隆进行检测，阳性克隆纯化培养后测序验证。

1.4 菌株生长曲线的测定

分别挑取 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 菌落接种至 TSB 培养基，28 ℃、120 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.6)。使用细菌浊度仪将菌液调至统一浓度后，按 1% 接种量加入新鲜 TSB 培养基，28 ℃、120 r/min 振荡培养 24 h，在指定时间点取样测定 OD_{600} 值并绘制生长曲线。试验重复 3 次。

1.5 菌株生理生化检测

分别将 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 菌株接种于 TSA 培养基，28 ℃倒置培养 12 h，挑取菌落用生理盐水制成菌悬液，采用细菌浊度仪统一调至 0.5 个麦氏比浊单位，分别吸取适量菌液加入细菌生理生化测定管中，28 ℃培养箱培养 24 h，观察并根据鉴定管判读表记录结果。试验重复 3 次。

1.6 菌株运动性测定

将 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 菌株分别使用 TSB 培养基 28 ℃、120 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.6)，采用细菌浊度仪将菌液浓度调至一致，分别吸取 1 μL 菌液垂直点在 0.5% 琼脂半固体培养基上，28 ℃培养 12 h，拍照并测量细菌运动所得轨迹的直径，分析比较 3 组菌株的运动能力差异。试验重复 3 次。

1.7 菌株生物被膜形成能力测定

将 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 菌株于 28 ℃、120 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.6)，使用新鲜 TSB 培养基调整各菌液 OD_{600} 至 0.1，各取 200 μL 菌液至 96 孔板，每个实验组设 8 个平行孔，TSB 培养基作为空白对照。28 ℃静置培养 48 h 后弃除菌液，PBS 洗涤 3 次，自然风干，加入 200 μL 纯甲醇固定 10 min，吸净甲醇并晾干，1% 结晶紫染色 15 min，PBS 洗涤 3 次后晾干。完全干燥后加入 200 μL 无水乙醇作用 30 min，酶标仪测量光密度值(OD_{595})。试验重复 3 次。

1.8 巨噬细胞黏附试验

将状态良好的 RAW264.7 细胞平铺于 24 孔板，每孔 1×10^5 个细胞。37 ℃、5% CO_2 培养过夜后，按照感染复数 MOI (细菌:巨噬细胞)=100:1 的比例加入菌液进行感染实验。培养板 800 r/min 离心 5 min，孵育 1 h。吸弃培养基，无菌 PBS 轻柔润洗细胞 5–6 次，每孔加入 1 mL 1% Triton X-100 裂解细胞 15 min，裂解液梯度稀释后涂布于 TSA 平板，28 ℃倒置培养 24 h 进行 CFU 计数并计算黏附率，计算如公式(1)所示。

$$黏附率=(黏附细胞菌数/孔内感染菌数)\times100\% \quad (1)$$

在 24 孔板中放入细胞爬片进行 Giemsa 染色观察。侵染步骤同上，细胞孵育完成后，将孔中培养液吸出，PBS 洗 3 次后取出细胞爬片，甲醇固定 10 min，最后用姬姆萨工作液染色 10 min，冲洗脱色后镜检拍照。每个实验组设 3 个平行。试验重复 3 次。

1.9 胞内菌株增殖率检测

参照 Subashchandrabose 等[16]的方法并作适当修改。侵染步骤同 1.8 节黏附试验，孵育 30 min 后吸弃培养基，PBS 轻柔洗涤 3 次，换含有 100 μg/mL 庆大霉素的完全培养基进行处理。实验分两组(T_0 和 T_1)，每个实验组设 3 个平行。T_0 组在庆大霉素加入 15 min 后采用 PBS 洗涤 3 次，1% Triton X-100 裂解细胞，稀释涂布平板计数。T_1 组则在庆大霉素加入 2 h 后裂解并稀释涂布平板。细菌胞内增殖率计算如公式(2)所示。

$$增殖率=(T_1-T_0)/T_0\times100\% \quad (2)$$

细胞侵染及姬姆萨染色步骤同 1.8 节，试验重复 3 次。

1.10 巨噬细胞分泌 TNF-α 的测定

采用 ELISA 试验检测菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 感染 RAW264.7 细胞后肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)的分泌表达量。细胞侵染步骤同 1.8 节黏附试验，每株菌设 3 个平行，孵育 1 h 后用 100 μg/mL 庆大霉素培养基处理 1 h，轻柔洗涤后换新鲜培养基继续培养。分别在感染后 12 h 和 24 h 取细胞上清，按照 TNF-α ELISA Kit 说明书进行 TNF-α 的检测。试验重复 3 次。

1.11 免疫荧光监测巨噬细胞自噬

细胞侵染步骤同 1.8 节黏附试验，庆大霉素处理 1 h 后更换新鲜培养基，继续培养 6 h 后按

照 MDC 自噬检测试剂盒说明书进行细胞染色，倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.12 Western blotting 检测 LC3 蛋白的表达量

采用免疫印迹法检测菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 感染巨噬细胞后微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)分子的表达量。感染实验同 1.8 节黏附试验，分别在感染后 4 h 和 8 h 提取细胞总蛋白，使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组样品蛋白浓度。样品 95 ℃变性 15 min 后进行 SDS-PAGE 分离 LC3 目的蛋白。电泳完成后使用 14 V 恒压半干转膜 50 min。取出 PVDF 膜，甲醇浸泡 1 min，室温下水平摇床封闭 1 h。将膜分别置于兔抗鼠 LC3 一抗(1:2 500)、兔抗鼠 β-tubulin 一抗(1:7 500) 4 ℃孵育过夜，随后 TBST 清洗，羊抗兔二抗(1:7 500)孵育 1 h，TBST 漂洗。最后加入 ECL 发光液进行显色，成像系统曝光显影。使用 ImageJ 分析各条带灰度值。试验重复 3 次。

1.13 统计学分析

本研究数据使用 GraphPad Prism 9 进行统计学分析，且数据均以平均值±标准偏差(mean±SD)表示，两组之间差异的显著性使用独立的 *t* 检验进行评估，多组之间的比较则采用单因素方差分析。P<0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 迟缓爱德华氏菌 *evpP* 缺失株(Δ*evpP*)和回补株(Δ*evpP*-C)的鉴定

通过自杀质粒介导的同源重组方法，以氯霉素抗性标记和阿拉伯糖诱导的致死基因 *vmt* 进行正、反向双重筛选。对筛选后的克隆进行检测，以野生型为对照，缺失突变的克隆 PCR 扩增产物片段大小为 1 195 bp，而野生株的扩增片段大小为 1 663 bp (图 1A)，符合预期。克隆纯化后，再次扩增验证，PCR 产物测序结果证实 *evpP* 缺失突变株构建成功，命名为 Δ*evpP*。

扩增 *evpP* 基因与 pBAD33 载体序列，连接构建 *evpP*-pBAD33cm-rp4 重组质粒，转化 Δ*evpP*。以 Δ*evpP* 和 *E. coli* β2163 (*evpP*-pBAD33cm-rp4)为对照，PCR 检测筛选重组克隆。如图 1B 所示，阳性克隆扩增片段为 722 bp。纯化阳性克隆，并进行测序验证，测序结果表明回补菌株构建成功，命名为 Δ*evpP*-C。

2.2 *evpP* 缺失不影响 *E. tarda* 的生长能力

对 *E. tarda* 野生株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 进行生长能力测定并绘制生长曲线(图 2)。可见 3 株菌的生长特性并无明显差异，在相同培养条件下均于培养后 8 h 进入对数期，16 h 进入稳

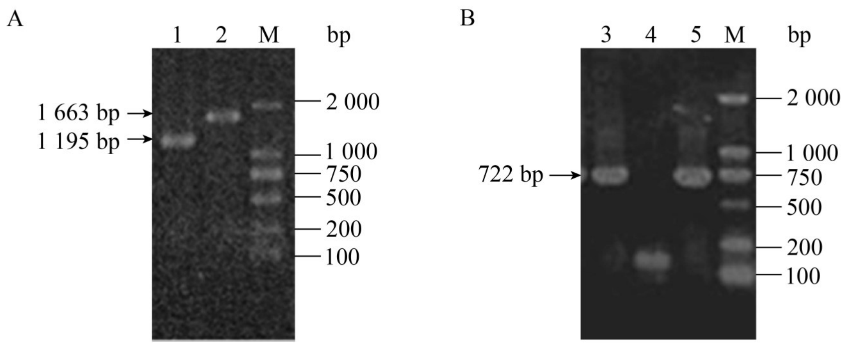

图1 迟缓爱德华氏菌*evpP*缺失株(A)和回补株(B)的检测。M：DL2000 DNA marker；1：*evpP*缺失株；2：野生株；3：回补株；4：*evpP*缺失株；5：大肠杆菌β2163 (*evpP*-pBAD33cm-rp4)。

Figure 1 Detection of *evpP* deletion mutants (A) and complemented strains (B). M: DL2000 DNA marker; 1: Δ*evpP*; 2: Wild type; 3: Δ*evpP*-C; 4: Δ*evpP*; 5: *E. coli* β2163 (*evpP*-pBAD33cm-rp4).

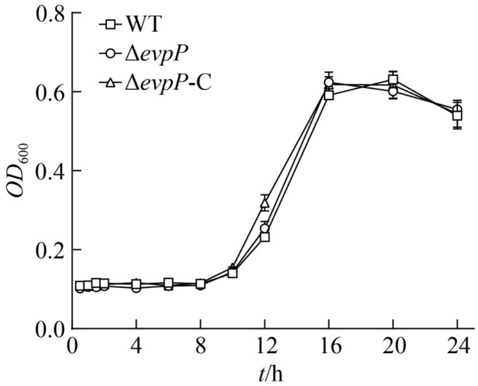

图2 野生株(WT)、缺失株(Δ*evpP*)和回补株(Δ*evpP*-C)的生长曲线

Figure 2 The growth curves of WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C.

定期。研究表明，*evpP* 基因的缺失不会影响 *E. tarda* 的生长能力。

2.3 *evpP* 缺失不影响 *E. tarda* 的生理生化特性

取对数生长期的 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 菌株进行生理生化特征测定，结果显示 3 株菌的生理生化特性完全一致，均能发酵葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖，具有赖氨酸脱羧酶活性、鸟氨酸脱羧酶活性、精氨酸双水解酶活性，能够生成吲哚和 H_2S (表 2)。提示 *evpP* 缺失不影响 *E. tarda* 的生理生化特性。

2.4 EvpP 影响 *E. tarda* 的运动能力

对菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 进行运动性检测，并根据菌株的运动直径评估各菌株运动能力的变化。结果显示各菌株均呈现明显的运动性，但 Δ*evpP* 的运动能力明显受损($P<0.01$)，而 Δ*evpP*-C 恢复野生株运动能力(图 3)，提示 EvpP 与 *E. tarda* 的运动性相关，能够增强菌株的运动能力。

2.5 EvpP 参与 *E. tarda* 生物被膜的形成

采用结晶紫染色法评估菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 产生生物膜的能力。如图 4 所示，*evpP* 缺失使得 Δ*evpP* 菌株生物膜形成能力显著下降($P<0.001$)，而回补株 Δ*evpP*-C 生物被膜形成能力与野生株相比无显著差异($P>0.05$)。提示

表2 菌株WT、Δ*evpP*和Δ*evpP*-C的生理生化特性

Table 2 Biochemical characteristics of WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C

项目 Items	WT	Δ*evpP*	Δ*evpP*-C	项目 Items	WT	Δ*evpP*	Δ*evpP*-C
V-P Voges-Proskauer	−	−	−	棉子糖 Raffinose	−	−	−
山梨醇 Sorbitol	−	−	−	麦芽糖 Maltose	+	+	+
侧金盏花醇 Adonitol	−	−	−	蜜二糖 Melibiose	−	−	−
甘露醇 Mannitol	−	−	−	硫化氢 Hydrogen sulfide	+	+	+
木糖醇 Xylitol	−	−	−	苯丙氨酸 Phenylalanine	−	−	−
葡萄糖 Glucose	+	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylas	+	+	+
果糖 Fructose	+	+	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylas	+	+	+
蔗糖 Sucrose	−	−	−	精氨酸双水解酶 Arginase dihydrolase	+	+	+
甘露糖 Mannose	+	+	+	脲酶 Urease	−	−	−
乳糖 Lactose	−	−	−	吲哚 Indole	+	+	+
木糖 Xylose	−	−	−	氧化酶 Oxidase	−	−	−

+：阳性；−：阴性。

+: Positive; −: Negative.

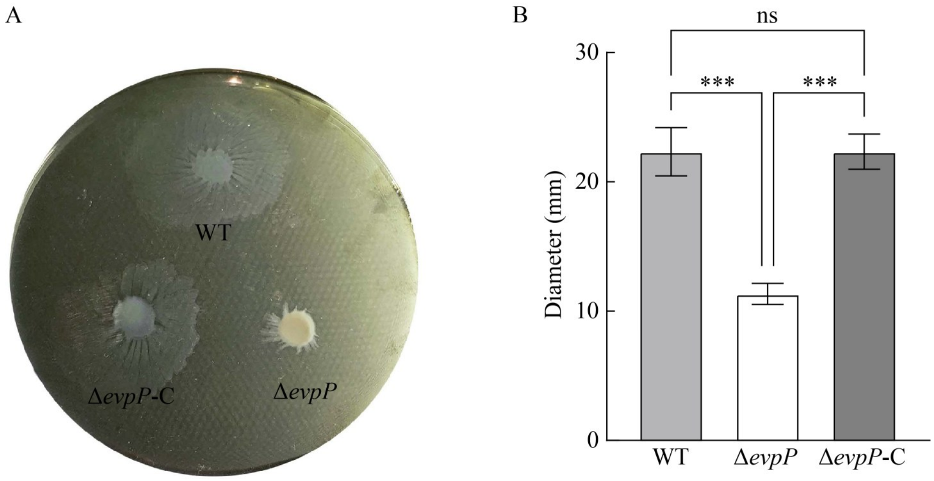

图3　菌株WT、Δ*evpP*和Δ*evpP*-C的运动性测定。A：三株菌株的运动轨迹；B：运动直径测定统计(***：*P*<0.001；ns：*P*>0.05)。

Figure 3　Motility determination of WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C strains. A: Swimming path of WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C; B: Motility zone diameter of WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C (***: *P*<0.001; ns: *P*>0.05).

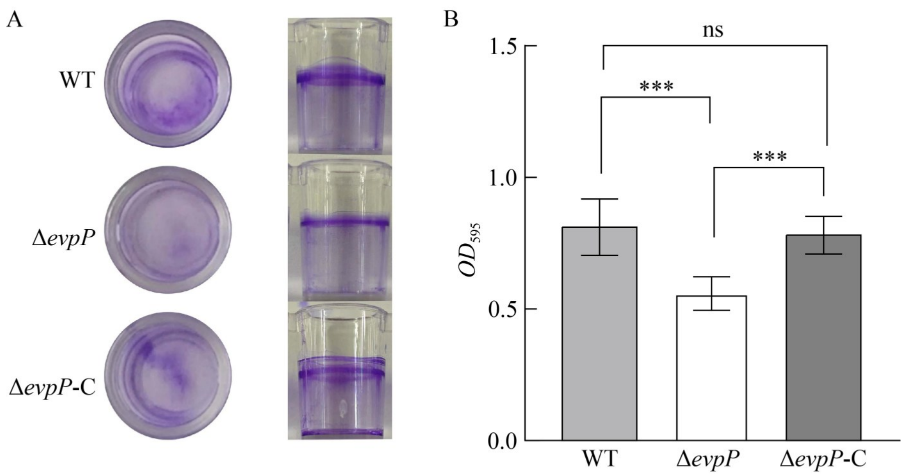

图4　菌株WT、Δ*evpP*和Δ*evpP*-C的生物被膜形成情况。A：菌株培养48 h后结晶紫染色；B：生物被膜的吸光度(OD_{595})测定(***：*P*<0.001；ns：*P*>0.05)。

Figure 4　The biofilm forming of WT, Δ*evpP*和Δ*evpP*-C. A: Biofilm formation of the strains by crystal violet staining at 48 h; B: Absorbance measurement of biofilm formation at 595 nm (***: *P*<0.001; ns: *P*>0.05).

EvpP 参与 *E. tarda* 的生物被膜的形成过程，二者呈正相关。

2.6　EvpP 促进 *E. tarda* 黏附巨噬细胞

通过测定菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 对 RAW264.7 巨噬细胞的黏附率并进行比较分析，探究 EvpP 对 *E. tarda* 侵染巨噬细胞的影响。研究结果显示：缺失株的细胞黏附率较野生株显著降低(*P*<0.001)，且回补株的黏附能力得到恢复(图 5)。这表明 EvpP 与 *E. tarda* 黏附巨噬细胞的过程相关，能够显著增强细菌侵染细胞的能力。

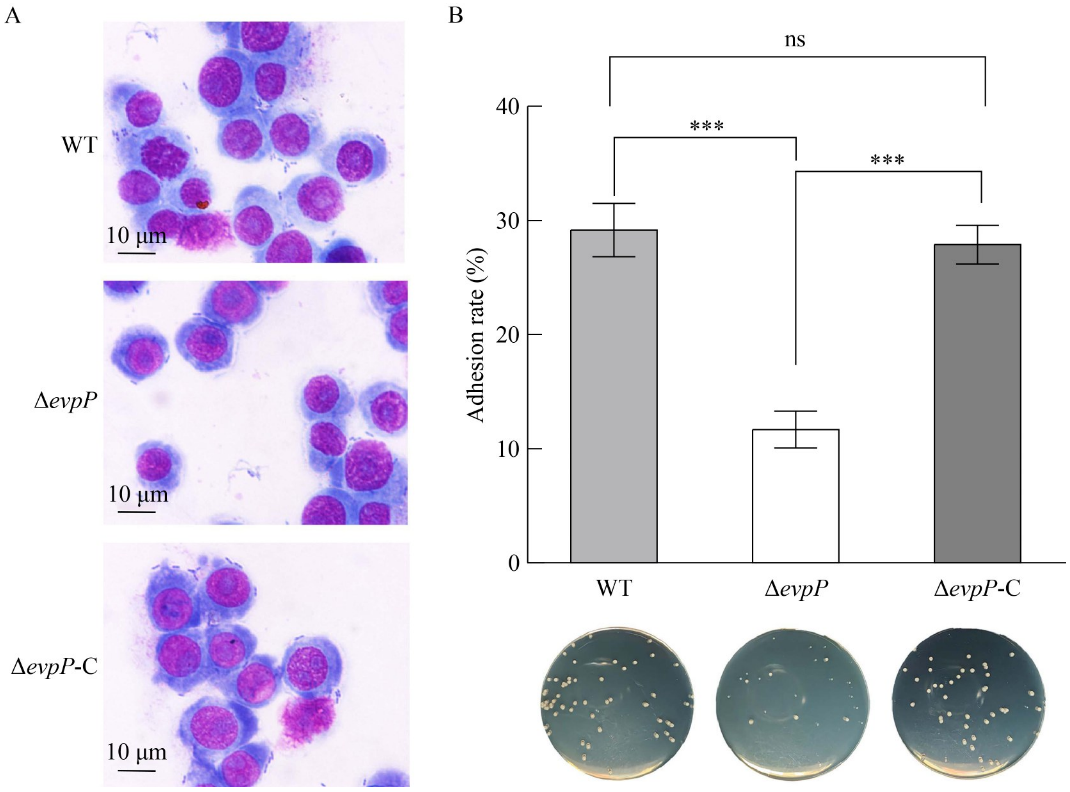

图5 *evpP*的缺失导致*Edwardsiella tarda*对RAW264.7细胞的黏附性降低。A：WT、Δ*evpP*和Δ*evpP*-C菌株感染RAW264.7细胞的姬姆萨染色；B：菌株的黏附率统计(***：*P*<0.001；ns：*P*>0.05)。

Figure 5 Loss of *evpP* results in reduced adherence of *Edwardsiella tarda* to RAW264.7 cells. A: Giemsa-stained RAW264.7 cells infected by WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C strains, respectively; B: Adhesion rate of three strains expressed as cell-associated CFU/initial CFU (***: *P*<0.001; ns: *P*>0.05).

2.7 EvpP 有助于 *E. tarda* 在巨噬细胞内的增殖

分别对菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 感染细胞后 15 min 组(T_0)和 2 h 组(T_1)进行计数，并按照公式(2)计算增殖率。如图 6 所示，缺失株的胞内增殖率较野生株显著降低(*P*<0.001)，说明 *E. tarda* 的胞内增殖能力明显受到 *evpP* 缺失的影响。Δ*evpP*-C 的胞内增殖能力未完全恢复至野生株水平，暗示 EvpP 可能通过与其他功能蛋白形成调控网络共同参与 *E. tarda* 的胞内寄生过程。

2.8 EvpP 抑制 *E. tarda* 感染的巨噬细胞分泌 TNF-α

采用 ELISA 检测菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 刺激 RAW264.7 细胞分泌产生 TNF-α 的水平，并进行分析比较。结果显示，感染 Δ*evpP* 的细胞在 12 h 及 24 h 时 TNF-α 分泌水与菌株 WT 相比平均显著上调(*P*<0.001)，而 Δ*evpP*-C 感染的细胞 TNF-α 分泌水平无明显差异(图 7)。这表明 EvpP 能够抑制 *E. tarda* 感染的巨噬细胞分泌产生 TNF-α。

2.9 EvpP 诱发 *E. tarda* 感染的巨噬细胞自噬

采用免疫荧光法检测自噬小体以评估细胞自噬活性。MDC 染色观察感染 8 h 后的 RAW264.7 细胞发现，Δ*evpP* 感染细胞激发的荧光强度弱于 WT 和 Δ*evpP*-C (图 8A)。每 1 个荧光斑点相当于 1 个自噬小体，说明 *evpP* 的缺失

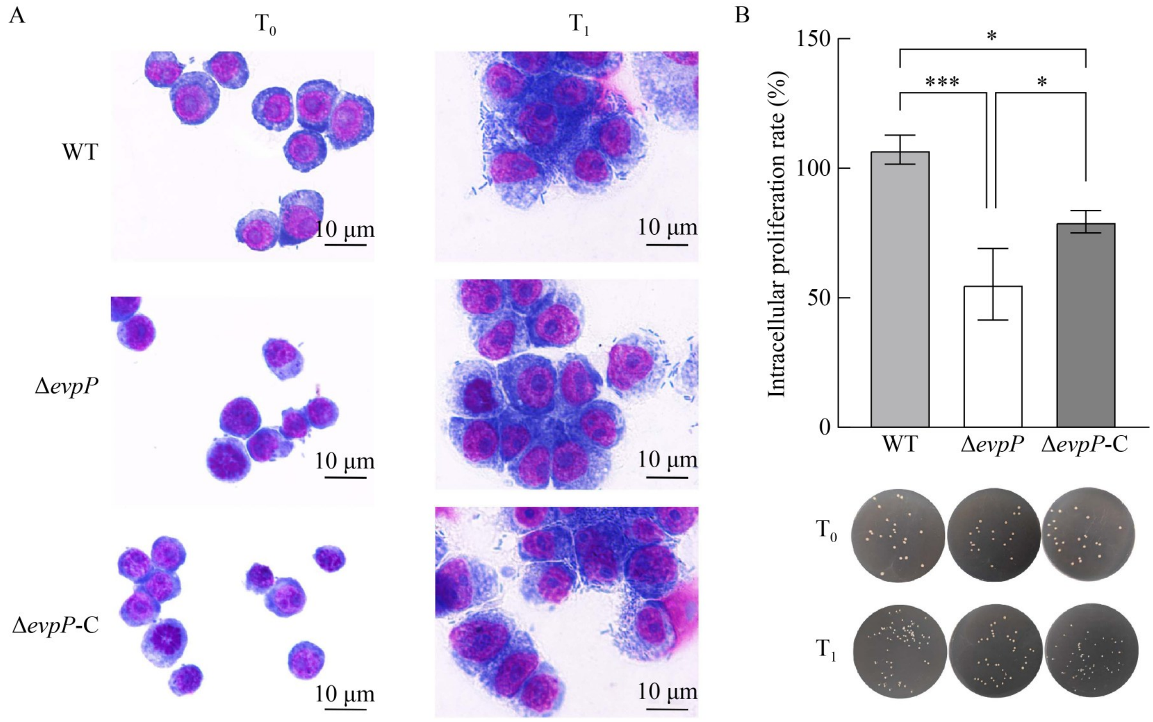

图6　*evpP*缺失削弱*Edwardsiella tarda*胞内增殖能力。A：WT、Δ*evpP*和Δ*evpP*-C菌株感染RAW264.7细胞的姬姆萨染色；B：各菌株的胞内增殖率(*：P<0.05；***：P<0.001)。

Figure 6　Loss of *evpP* results in reduced intracellular proliferation of *Edwardsiella tarda* in RAW264.7 cells. A: Giemsa-stained RAW264.7 cells infected by WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C strains, respectively; B: Intracellular proliferation rate of WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C (*: P<0.05; ***: P<0.001).

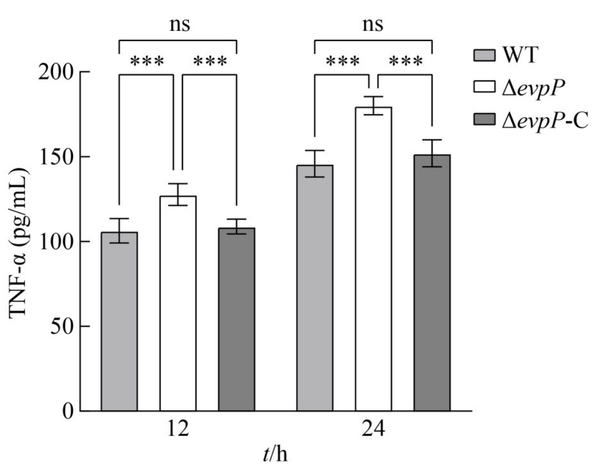

图7　菌株感染RAW264.7巨噬细胞分泌TNF-α的检测分析

Figure 7　Analysis of TNF-α secreted by RAW264.7 cells after exposure to WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C strains (***: P<0.001; ns: P>0.05).

导致 *E. tarda* 感染 RAW264.7 细胞的自噬水平下降。为进一步验证免疫荧光观察结果，以自噬关键标志性分子 LC3 表达水平为评价指标，采用免疫印迹法检测菌株 WT、Δ*evpP* 和 Δ*evpP*-C 在不同感染时间点诱发的 RAW264.7 细胞自噬活性。如图 8B 所示，在感染后 4 h 和 8 h，Δ*evpP* 感染细胞 LC3-Ⅱ转化水平均显著下调(P<0.001)，且 Δ*evpP*-C 诱发细胞自噬活性恢复至野生株水平。上述结果表明，EvpP 能够触发 *E. tarda* 感染的 RAW264.7 巨噬细胞发生自噬。

3　讨论与结论

本研究基于同源重组技术成功构建了迟缓爱德华氏菌的 *evpP* 基因缺失株和回补株，为后续深入探究 EvpP 的功能及其在 *E. tarda* 致病过

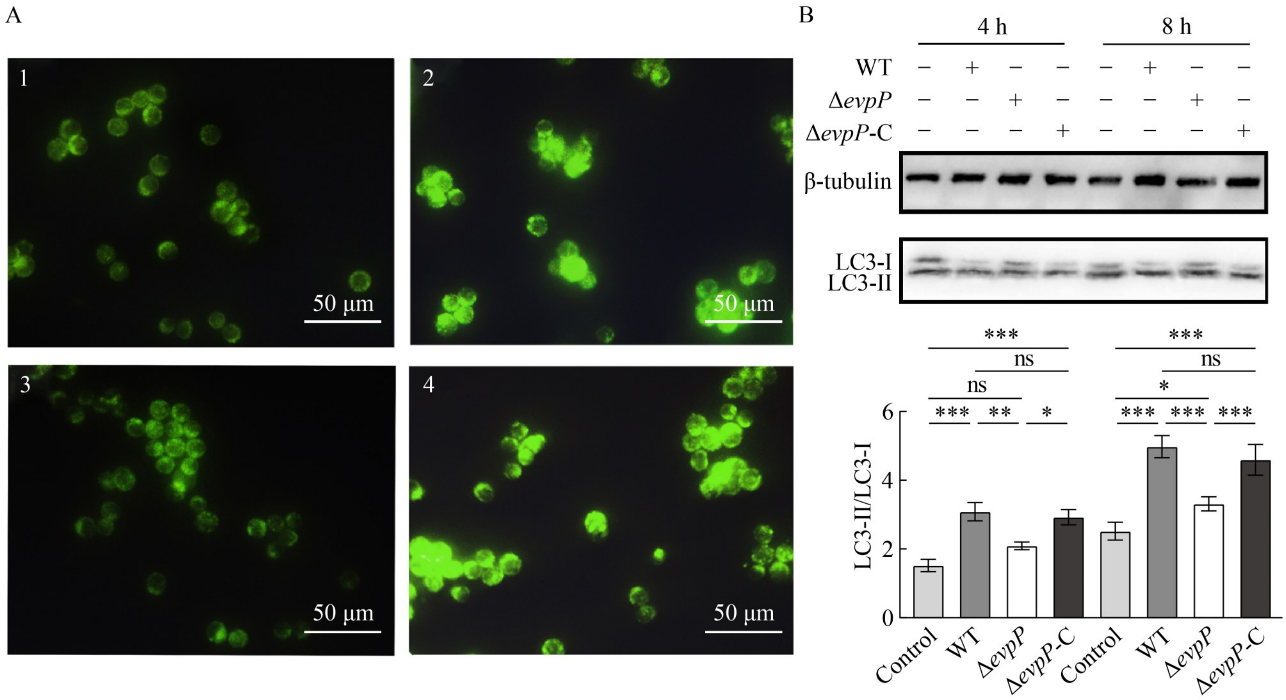

图8 菌株感染RAW264.7巨噬细胞诱发的自噬。A：MDC染色观察(1：空白对照；2：WT感染巨噬细胞；3：Δ*evpP*感染巨噬细胞；4：Δ*evpP*-C感染巨噬细胞)；B：Western blotting检测菌株感染RAW264.7细胞的LC3表达水平(+：有；−：无；*：P<0.05；**：P<0.01；***：P<0.001；ns：P>0.05)。

Figure 8 Autophagy induced by WT, Δ*evpP* and Δ*evpP*-C strains, respectively. A: Autophagy was confirmed by MDC staining (1: Control; 2: RAW264.7 cells infected with WT; 3: RAW264.7 cells infected with Δ*evpP*; 4: RAW264.7 cells infected with Δ*evpP*-C); B: LC3 was detected by Western blotting in cells infected with strains (+: Infected with this strain; −: Not infected with this strain; *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001; ns: P>0.05).

程中所扮演的角色奠定了基础，同时也为相关疫苗的开发提供了新的思路。将 *evpP* 基因缺失株与 *E. tarda* 野生株进行比较分析，证实 *evpP* 基因缺失对 *E. tarda* 的生长特性无影响，这表明 EvpP 并非 *E. tarda* 生长生存所必需，也为后续开展一系列相关实验研究提供了科学依据。已有研究发现，一些细菌的毒力与其生理生化特性相关，酶可通过不同代谢途径调控毒力因子的表达，间接或直接增强细菌的致病性[17-18]。本研究表明，*evpP* 基因的缺失并不影响 *E. tarda* 的生理生化特性，提示 EvpP 可能并非通过直接调控细菌生理生化特性的方式对 *E. tarda* 的毒力产生影响。

细菌 T6SS 分泌系统的多种相关蛋白能通过调控细菌运动和生物膜形成来影响细菌的致病性[19-20]。本研究结果显示，*evpP* 基因缺失后 *E. tarda* 的运动能力显著下降，表明 EvpP 与 *E. tarda* 的运动性密切相关。鞭毛运动是细菌最主要的运动方式，不仅有利于病原菌的传播，还与生物膜的形成和毒力因子的表达密切相关。研究发现 T6SS 相关基因 *hcp2* 的缺失能影响细菌鞭毛蛋白 FliC 的产生与分泌，并削弱细菌的运动能力[21-22]。由此推测，EvpP 也可能通过影响 *E. tarda* 鞭毛相关蛋白的表达和输出来影响细菌的运动能力，但其具体调控机制还有待解析。本研究结果进一步证实，EvpP 能够促进 *E. tarda* 生物膜的形成。生物膜被认为是致病菌毒力的一个重要因素，与细菌的运动性有关[23-24]。

He 等[25]的研究表明，鞭毛蛋白对于 *E. tarda* 生物膜的形成至关重要。Leung 等[26]研究表明，*E. tarda* 生物膜的形成受多个基因调控，因此 EvpP 是否通过介导 *E. tarda* 的运动性来影响生物膜的形成还是通过其他调控方式仍有待进一步明确。

巨噬细胞在宿主抵御 *E. tarda* 感染时扮演着非常重要的角色。*E. tarda* 是胞内寄生菌，被巨噬细胞吞噬后能够“劫持”利用巨噬细胞，促进其在细胞内的生存、增殖和细胞间的扩散，*E. tarda* 与巨噬细胞的互作结果将直接影响迟缓爱德华氏菌病的发展和转归[3-4]。鉴于巨噬细胞在宿主对 *E. tarda* 免疫反应中的重要性以及 EvpP 的致病性，推测 EvpP 可能直接或间接参与 *E. tarda* 与巨噬细胞的相互作用过程。细菌对细胞的黏附是其定殖过程中的重要环节，多种病原菌的 T6SS 相关基因已被证实参与细菌黏附的调控[20,27]。本研究表明，EvpP 能够增强 *E. tarda* 对 RAW264.7 细胞的黏附，促进 *E. tarda* 与巨噬细胞的相互作用，为细菌 T6SS 参与宿主细胞黏附提供了新证据。Wu 等[22]证实 T6SS 相关蛋白 Hcp2 能通过正向调控鞭毛系统介导溶藻弧菌的黏附性，但目前还不能确定 EvpP 促进 *E. tarda* 黏附的真正机制。EvpP 是通过调控鞭毛蛋白的表达，还是通过其他方式，如调控黏附素分泌，还需进一步的试验来证实。*E. tarda* 能够在巨噬细胞中存活和增殖是其致病的关键因素[3]。王鑫[13]研究发现 EvpP 的表达量在 *E. tarda* 感染的鼠巨噬细胞中显著上升，提示 EvpP 参与 *E. tarda* 与巨噬细胞的互作关系。本研究发现，与 WT 菌株相比，Δ*evpP* 菌株在巨噬细胞内的增殖能力显著减弱，进一步证实了 EvpP 在 *E. tarda* 与巨噬细胞互作关系中的重要性。然而，Δ*evpP*-C 菌株在本研究中并未完全恢复至野生型水平，暗示 EvpP 可能与其他毒力因子存在协同调控机制，共同形成某个调控网络对 *E. tarda* 的胞内命运产生影响。已有研究也发现，EvpP 能通过 Ca^{2+}依赖性 MAPK-Jnk 途径促进 *E. tarda* 在巨噬细胞内的定殖[14]。是否还存在其他 EvpP 参与的 *E. tarda* 胞内生存调控的路径？这些调控路径所参与的蛋白是否受到 *evpP* 基因敲除的影响，使得 Δ*evpP*-C 只是部分恢复野生型的胞内增殖水平？这些问题都有待进一步探索与研究。巨噬细胞一旦识别外来细菌感染会被激活并分泌炎症细胞因子[28]。TNF-α 是介导宿主炎症反应的关键细胞因子，是巨噬细胞控制外来入侵感染的重要动员信号[29-30]。TNF-α 也被发现在针对鱼类迟缓爱德华氏菌病的免疫反应中发挥着重要作用[31]。本研究显示，Δ*evpP* 菌株相较 *E. tarda* 野生株诱导巨噬细胞产生更多的 TNF-α，提示 *E. tarda* 能够在巨噬细胞内生存、增殖与 EvpP 调控 TNF-α 的表达分泌相关，EvpP 能够抑制巨噬细胞 TNF-α 的分泌进而达到 *E. tarda* 逃避免疫攻击的目的。

自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性的降解途径。巨噬细胞作为极其重要的免疫细胞，其自噬过程在病原体感染中的地位日益受到关注[32]。自噬体的形成是自噬过程的关键步骤之一，其数量反映了细胞自噬的活跃程度。自噬发生时 LC3-I 会转化为 LC3-II，附着在自噬体膜上。通过检测 LC3 蛋白的表达水平，可以评估细胞自噬的程度和活性[33]。在本研究中 *E. tarda* 缺失 *evpP* 后显著下调巨噬细胞自噬水平，表明 EvpP 能够诱发 RAW264.7 巨噬细胞发生自噬。类似报道也表明，副溶血弧菌 T6SS 的 VgrG2 蛋白能够诱发巨噬细胞自噬[34]。自噬在细菌感染中具有双重作用，既可帮助宿主细胞清除胞内细菌抵御感染，也可被一些病原菌利用加剧感染[35]。胡玉帅等[36]研究发现，*E. tarda* 刚感染巨噬细胞时自噬能促进对细菌的清除，但很快 *E. tarda* 开始利用自噬促进其在胞内的增殖。推测 *E. tarda* 可能利用 EvpP 去触发巨噬细胞自噬，从而有助于自身的胞内生存。研究结果也为揭示 *E. tarda* 触发自噬的机制奠定了基础。

综上所述，本研究表明 EvpP 对 *E. tarda* 的

生长和生理生化特性无显著影响，但参与 *E. tarda* 的运动和生物膜形成过程，并在 *E. tarda* 与巨噬细胞的互作环节，包括黏附、胞内增殖、炎症应答和自噬过程，都发挥了重要的作用。研究结果丰富了对 EvpP 的认知，为进一步研究 *E. tarda* 的感染机制及其对宿主免疫应答的影响奠定了基础。关于 *E. tarda* 与 T6SS 分泌系统致病性之间关系的解析，对开发研究新药和靶向治疗、制定迟缓爱德华氏菌有效防控措施具有重要意义。后续将进一步开展分子机制方面的研究，从分子层面深入探究 EvpP 对上述表型影响的具体机制，并对相关推测进行验证。

作者贡献声明

杨子轩：实验操作、数据分析和论文撰写；康若茗：实验操作和数据收集；胡玉帅：数据分析和验证；高迎莉：提供菌株构建技术支持；王淑芳：提供 Western blotting 技术支持；秦蕾：提供经费支持、实验指导、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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] BUJÁN N, MOHAMMED H, BALBOA S, ROMALDE JL, TORANZO AE, ARIAS CR, MAGARIÑOS B. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2018, 41(1): 30-37.

[2] XU TT, ZHANG XH. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture[J]. Aquaculture, 2014, 431: 129-135.

[3] LEUNG KY, SIAME BA, TENKINK BJ, NOORT RJ, MOK YK. *Edwardsiella tarda*-virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen[J]. Microbes and Infection, 2012, 14(1): 26-34.

[4] ZHANG LZ, NI CS, XU WT, DAI TC, YANG DH, WANG QY, ZHANG YX, LIU Q. Intramacrophage infection reinforces the virulence of *Edwardsiella tarda*[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(10): 1534-1542.

[5] SRINIVASA RAO PS, YAMADA Y, TAN YP, LEUNG KY. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(2): 573-586.

[6] ZHENG J, LEUNG KY. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(5): 1192-1206.

[7] RUSSELL AB, HOOD RD, BUI NK, LeROUX M, VOLLMER W, MOUGOUS JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells[J]. Nature, 2011, 475(7356): 343-347.

[8] 李俊, 俞盈, 王豪举. 细菌VI型分泌系统的研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(3): 291-296.
LI J, YU Y, WANG HJ. Advances in bacterial type VI secretion system: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(3): 291-296 (in Chinese).

[9] 梁小夜, 许平, 董涛. 从效应蛋白视角看革兰氏阴性细菌VI型蛋白分泌系统底物转运机理[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 339-344.
LIANG XY, XU P, DONG T. Effector recognition and translocation by type VI protein secretion system in Gram-negative bacteria[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 339-344 (in Chinese).

[10] HU WT, ANAND G, SIVARAMAN J, LEUNG KY, MOK YK. A disordered region in the EvpP protein from the type VI secretion system of *Edwardsiella tarda* is essential for EvpC binding[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e110810.

[11] WANG X, WANG QY, XIAO JF, LIU Q, WU HZ, XU LL, ZHANG YX. *Edwardsiella tarda* T6SS component evpP is regulated by *esrB* and iron, and plays essential roles in the invasion of fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(3): 469-477.

[12] ZHANG J, XIAO J, ZHANG Y, CUI S, LIU Q, WANG Q, WU H, ZHANG Y. A new target for the old regulator: H-NS suppress T6SS secretory protein EvpP, the major virulence factor in the fish pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(5): 557-564.

[13] 王鑫. 迟钝爱德华氏菌双组份系统 EsrA-EsrB 和 QseB-QseC 的毒力调控机制[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
WANG X. Pathogenic regulation mechanisms of two component systems EsrA-EsrB and QseB-QseC in *Edwardsiella tarda*[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).

[14] CHEN H, YANG DH, HAN FJ, TAN JC, ZHANG LZ, XIAO JF, ZHANG YX, LIU Q. The bacterial T6SS effector EvpP prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting the Ca^{2+}-dependent MAPK-Jnk pathway[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 21(1): 47-58.

[15] TAN JC, YANG DH, WANG Z, ZHENG X, ZHANG YX, LIU Q. EvpP inhibits neutrophils recruitment *via* Jnk-caspy inflammasome signaling *in vivo*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 851-860.

[16] SUBASHCHANDRABOSE S, SMITH SN, SPURBECK RR, KOLE MM, MOBLEY HLT. Genome-wide detection of fitness genes in uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(12): e1003788.

[17] RASHID MH, RUMBAUGH K, PASSADOR L,

DAVIES DG, HAMOOD AN, IGLEWSKI BH, KORNBERG A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9636-9641.
[18] YU M, XU Y, XU TT, WANG B, SHENG AB, ZHANG XH. WcaJ, the initiating enzyme for colanic acid synthesis, is required for lipopolysaccharide production, biofilm formation and virulence in *Edwardsiella tarda*[J]. Aquaculture, 2015, 437: 287-291.
[19] BAI XR, LIU PX, WANG WC, JIN YH, WANG Q, QI Y, ZHANG XY, SUN WD, FANG WH, HAN XG, JIANG W. TssL2 of T6SS2 is required for mobility, biofilm formation, wrinkly phenotype formation, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* SH112[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 537.
[20] CAI HY, YU JY, QIAO Y, MA Y, ZHENG J, LIN M, YAN QP, HUANG LX. Effect of the type VI secretion system secreted protein hcp on the virulence of *Aeromonas salmonicida*[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2307.
[21] LIU LY, HAO S, LAN RT, WANG GX, XIAO D, SUN H, XU JG. The type VI secretion system modulates flagellar gene expression and secretion in *Citrobacter freundii* and contributes to adhesion and cytotoxicity to host cells[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(7): 2596-2604.
[22] WU SL, TANG JF, WANG B, CAI J, JIAN JC. Roles of Hcp2, a hallmark of T6SS2 in motility, adhesive capacity, and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*[J]. Microorganisms, 2023, 11(12): 2893.
[23] HOFFMAN LR, D'ARGENIO DA, MacCOSS MJ, ZHANG ZY, JONES RA, MILLER SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation[J]. Nature, 2005, 436(7054): 1171-1175.
[24] 蒋富凤, 雷涛, 吴清平, 张菊梅, 庞锐. 副溶血性弧菌生物被膜形成及其调控机制研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(11): 2381-2390.
JIANG FF, LEI T, WU QP, ZHANG JM, PANG R. Biofilm formation and regulation mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*: progress and trends[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(11): 2381-2390 (in Chinese).
[25] HE Y, XU TT, FOSSHEIM LE, ZHANG XH. FliC, a flagellin protein, is essential for the growth and virulence of fish pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45070.
[26] LEUNG KY, WANG QY, ZHENG XC, ZHUANG M, YANG ZY, SHAO S, ACHMON Y, SIAME BA. Versatile lifestyles of *Edwardsiella*: free-living, pathogen, and core bacterium of the aquatic resistome[J]. Virulence, 2022, 13(1): 5-18.
[27] SORIA-BUSTOS J, ARES MA, GÓMEZ-ALDAPA CA, GONZÁLEZ-Y-MERCHAND JA, GIRÓN JA, de la CRUZ MA. Two type VI secretion systems of *Enterobacter cloacae* are required for bacterial competition, cell adherence, and intestinal colonization[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 560488.
[28] WYNN TA, CHAWLA A, POLLARD JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. Nature, 2013, 496(7446): 445-455.
[29] GOMES MC, BROKATZKY D, MOSTOWY S. *Shigella*-trained pro-inflammatory macrophages protect zebrafish from secondary infection[J]. Cell Reports, 2025, 44(5): 115601.
[30] ZELOVÁ H, HOŠEK J. TNF-α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances[J]. Inflammation Research, 2013, 62(7): 641-651.
[31] LI HL, SUN BG, JIANG S, SUN L. Cytokines induced by *Edwardsiella tarda*: profile and role in antibacterial immunity[J]. Biomolecules, 2021, 11(8): 1242.
[32] BAH A, VERGNE I. Macrophage autophagy and bacterial infections[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 1483.
[33] KLIONSKY DJ, ABDELAZIZ AK, ABDELFATAH S, ABDELLATIF M, ABDOLI A, ABEL S, ABELIOVICH H, ABILDGAARD MH, ABUDU YP, ACEVEDOAROZENAA. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2021, 17(1): 1-382.
[34] YU Y, FANG LH, ZHANG Y, SHENG HX, FANG WH. VgrG2 of type VI secretion system 2 of *Vibrio parahaemolyticus* induces autophagy in macrophages[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 168.
[35] GUO F, ZHANG H, CHEN CF, HU SW, WANG YZ, QIAO J, REN Y, ZHANG K, WANG Y, DU GQ. Autophagy favors *Brucella melitensis* survival in infected macrophages[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2012, 17(2): 249-257.
[36] 胡玉帅, 杨子轩, 许嘉妍, 高迎莉, 徐静, 秦蕾. 自噬参与迟缓爱德华菌与巨噬细胞的互作及对炎症应答的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(11):5226-5239.
HU YS, YANG ZX, XU JY, GAO YL, XU J, QIN L. Autophagy participates in the *Edwardsiella tarda*-macrophage interaction and influences on the inflammatory response[J]. Microbiology China, 2025, 52(11): 5226-5239 (in Chinese).