

DOI:10.13350/j.cjpb.231003

• 论著 •

O-GlcNAc 修饰对宿主细胞抵抗类鼻疽伯克霍尔德菌感染的影 响^{*}

许杏珍^{1,2}, 曾颖斐², 夏乾峰^{2**}, 李雪霞^{2**}

(1. 海南医学院公共卫生与全健康国际学院, 海南海口 571199; 2. 海南医学院热带转化医学教育部重点实验室, 海南医学院热带医学院)

【摘要】 目的 探讨在不同浓度葡萄糖培养下人肺癌上皮 A549 细胞对类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, Bp) 的抗感染能力的变化, 探究 O-GlcNAc 糖基化修饰对宿主细胞抗感染能力的影响。方法 分别用含 0、1、5、20 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 A549 细胞, 并在此条件下用类鼻疽伯克霍尔德菌感染 A549 细胞, 感染 24 h 后用 Giemsa 染色, 显微镜下观察细胞的空斑形成面积和多核巨细胞(MNGCs)数量; CCK-8 检测细胞存活率; Western blot 检测 O-GlcNAc 糖基化修饰水平的变化。结果 A549 细胞空斑形成面积、多核巨细胞数量随葡萄糖浓度的增高而减少(均 $P < 0.01$); 细胞存活率随葡萄糖浓度增高呈递增趋势($P < 0.01$); 细胞的 O-GlcNAc 修饰水平随葡萄糖浓度增高呈递增趋势($P < 0.05$)。结论 葡萄糖有助于增强 A549 细胞对类鼻疽伯克霍尔德菌的抗感染能力, 推测 O-GlcNAc 糖基化修饰在其中起调控作用, 但具体机制有待进一步研究。

【关键词】 类鼻疽伯克霍尔德菌; O-GlcNAc 糖基化修饰; 抗感染

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)10-1127-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Oct;18(10):1127-1131,1136.]

The O-GlcNAcylation enhances the anti-infective ability of host cells against *Burkholderia pseudomallei*

XU Xingzhen^{1,2}, ZENG Yingfei², XIA Qianfeng², LI Xuexia² (1. *International School of Public Health and one Health, Hainan Medical University, Haikou 571199, China*; 2. *Key Laboratory of Tropical Translational Medicine of Ministry of Education, School of Tropical Medicine, Hainan Medical University*)

【Abstract】 **Objective** To investigate the changes of the anti-infective ability of A549 cells against *Burkholderia pseudomallei* (Bp) under different concentrations of glucose and to explore the effect of O-GlcNAcylation on host's anti-infective ability. **Methods** A549 cells were cultured in DMEM medium containing 0, 1, 5, 5, 20 mmol/L glucose respectively, and infected with Bp under these conditions. After 24 hours of infection, the A549 cells were stained with Giemsa, the plaque area and the number of multinuclear giant cells(MNGCs) were observed under microscope. The cell viability was detected with CCK-8 kit, and O-GlcNAcylation was detected with Western blot. **Results** With the increase of glucose concentration, the plaque areas and the number of multinuclear giant cells of A549 cells decreased (all $P < 0.01$), while the cell survival rate and the level of O-GlcNAcylation increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Glucose can enhance the anti-infective ability of A549 cells against Bp and speculated that O-GlcNAcylation plays an important regulatory role, but the specific mechanism should be further explored.

【Key words】 *Burkholderia pseudomallei*; O-GlcNAcylation; anti-infection

^{***}类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, Bp)是一种革兰阴性杆菌, 侵犯宿主可导致严重的类鼻疽病, 危及生命, 病死率达 9%~70%^[1]。类鼻疽病是一种传染性极强的人兽共患病, 在我国南方沿海地区、东南亚、澳大利亚北部等地区高发^[2]。Bp 通过破损的皮肤、呼吸道、经口等途径感染人体, 可导致败血症、细菌性肺炎和肺脓肿等的发生, 出现的临床症状及其严重程度取决于细菌载量及菌株、宿主免疫力及感染途径等^[3]。目前针对类鼻疽病的临床诊断方法有限, 主要通过微生物学方法诊断。类鼻疽病无特征性临床症状, 易发生漏诊和误诊, 且目前尚无用于预防该

疾病的疫苗。研究发现, Bp 感染宿主细胞后可逃避机体的免疫攻击, 潜伏在机体内并复制, 但具体逃逸机制尚不完全清楚。因此, 探究 Bp 在宿主细胞内的作用

【基金项目】 海南省科协青年英才创新计划 (No. QXCM202015); 国家自然科学基金项目 (No. 82060001); 海南医学院大学生创新创业项目 (No. s202111810020)。

【通讯作者】 李雪霞, E-mail: xxiali@yeah.net

夏乾峰, E-mail: xiaqianfeng@sina.com

【作者简介】 许杏珍 (1999-), 女, 海南儋州人, 硕士研究生在读, 初级检验师。主要研究方向: 疾病预防与控制。E-mail: 690496467@qq.com

机制对类鼻疽病的诊断和治疗至关重要。

糖尿病患者因自身免疫功能低下无法进行有效的机体免疫防御,是感染类鼻疽病的高风险人群之一,特别在2型糖尿病(Type 2 diabetes, T2D)患者尤为多见,是类鼻疽病发生的重要危险因素。统计数据显示,在2017年全球大约有超过4.5亿人患有糖尿病,约500万人死亡^[4],其中部分糖尿病患者的死亡与感染类鼻疽病有关^[5]。但迄今为止,糖尿病患者患类鼻疽病的具体发生机制仍不十分清楚。

Cattaneo等^[6]的研究表明,蛋白质翻译后修饰有多种方式,O-GlcNAc糖基化修饰是一种结构简单的单糖翻译后修饰类型。葡萄糖、谷氨酰胺、氨基葡萄糖在细胞内经己糖胺生物合成途径(HBP)转化为UDP-GlcNAc,UDP-GlcNAc作为O-GlcNAc的供体,是O-GlcNAc糖基化的关键底物^[7],在糖基转移酶OGT的作用下将UDP-GlcNAc以共价键的形式连接到蛋白质丝氨酸或苏氨酸残基上,形成O-GlcNAc糖基化修饰,该修饰经糖基水解酶OGA水解去除^[8]。O-GlcNAc糖基化修饰动态调节蛋白质功能,在细胞代谢、基因转录、信号传导等方面起到重要的调控作用^[9]。感染性疾病、糖尿病、败血症、癌症等的发生均与O-GlcNAc糖基化修饰异常相关^[10]。因此推测O-GlcNAc糖基化修饰在病原体感染机体中可能同样起重要的调控作用,即通过动态调节蛋白质的功能而调控宿主细胞对病原体的抵抗能力。本研究以A549细胞为模型,初步探讨O-GlcNAc糖基化修饰的变化对宿主细胞抵抗Bp感染能力的影响,为Bp与宿主细胞之间的作用机制研究提供新的信息。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 菌株和细胞 Bp HNBp001菌株由本实验室分离自海南本土类鼻疽病患者血清。A549细胞购于美国ATCC公司。

1.2 主要试剂 胎牛血清,DMEM培养基和胰酶购于美国Gibco公司; β -Actin抗体购于武汉博士德生物工程公司;RL2抗体购于英国abcam公司;CCK-8试剂盒购于上海百赛生物技术公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG(H+L),BCA蛋白浓度检测试剂盒,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒,BeyoECL Star试剂,4%多聚甲醛及Gimesa染色液购于上海碧云天生物技术公司;Thiamet G和OSMI-4小分子抑制剂购于美国MedChemExpress公司;蛋白Marker购于美国Thermo Scientific公司;PVDF膜购于美国Millipore公司;BSA购于美国SIGMA公司;Tween 20购于德国Biofroxx公司。

2 方法

2.1 细菌及细胞的预培养 HNBp001用LB液体培养基于37℃、200 r/min摇床震荡培养约12 h。A549细胞培养用10%FBS的DMEM培养基于5%CO₂ 37℃细胞培养箱中培养。

2.2 Bp感染A549细胞模型的建立 取HNBp001以感染复数为50(MOI=50:1)分别感染A549细胞0、3、6、12、24 h,建立不同感染时间的HNBp001感染A549细胞模型,通过检测细胞存活率、空斑形成面积、多核巨细胞形成数量判定模型是否建立成功。

2.3 CCK-8检测细胞存活率 取构建的HNBp001感染A549细胞模型,按CCK-8试剂盒操作说明检测细胞存活率。

2.4 细胞空斑形成试验 取HNBp001感染A549细胞模型,PBS洗3次,4%多聚甲醛室温固定10 min,Giemsa染色1~2 min,流水缓慢冲洗染色液后自然干燥,显微镜下观察空斑形成情况。

2.5 多核巨细胞(MNGCs)形成数量检测 取HNBp001感染A549细胞模型,PBS洗3次,胰酶消化离心,取少量细胞用4%多聚甲醛重悬并于室温固定10 min。用巴氏吸管取固定后的细胞悬液滴于玻片上,自然晾干,Giemsa染色,95%酒精洗脱复染,静置晾干,显微镜下观察A549 MNGCs(细胞核在2个以上)形成情况,计算MNGCs形成率。MNGCs形成率(%)=(MNGCs内的细胞核数/细胞核总数)×100%。

2.6 Western blot检测O-GlcNAc糖基化水平 取蛋白样品20 μ g进行SDS-PAGE电泳并转膜,3%BSA室温封闭PVDF膜1 h,与一抗在4℃冰箱孵育过夜,TBST洗膜3次;加入二抗室温孵育1 h,TBST洗膜3次;加入BeyoECL Star发光液孵育30~60 s,使用化学发光成像仪(ChemiSCOPE 6100)显影成像。试验设未感染A549细胞对照(CK)。

2.7 不同浓度葡萄糖培养下细胞感染Bp情况 用含不同浓度葡萄糖(0、1、5.5、20 mmol/L)的DMEM培养基培养A549细胞,在此条件下以MOI=50:1的HNBp001感染A549细胞24 h,检测其存活率、空斑面积、MNGCs形成数量及O-GlcNAc糖基化水平。

2.8 OGA、OGT的表达调控 A549细胞感染HNBp001(MOI=50)12 h后,用OGT(OSMI-4)或OGA(Thiamet G)的小分子抑制剂处理细胞(终浓度为50 μ mol)并继续培养24 h,检测细胞存活率、空斑面积、MNGCs形成数量及O-GlcNAc糖基化水平。

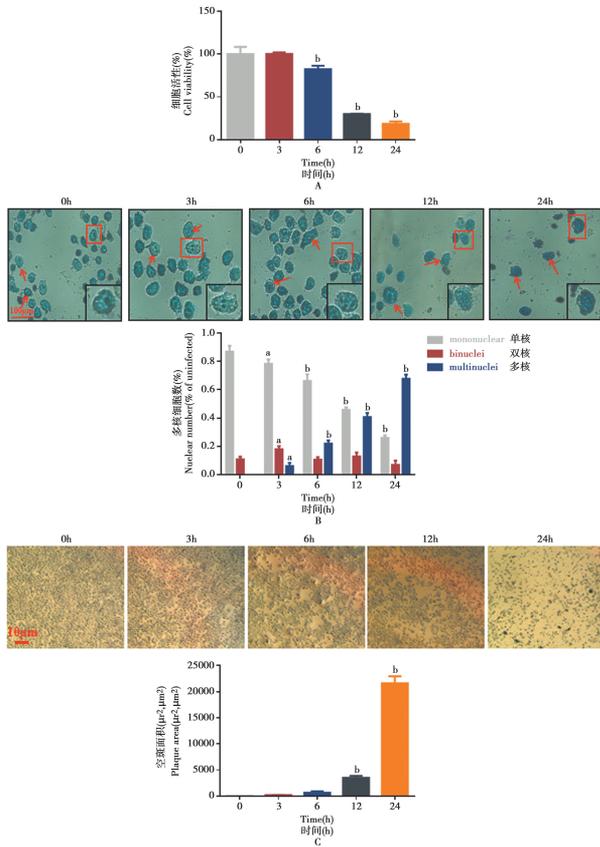
2.9 统计学分析 采用Graphpad Prism 6.0软件进行作图 and 数据分析,多组间计量资料的比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结果

1 HNBp001 感染 A549 细胞模型的建立

利用 BpHNBp001 体外感染 A549 细胞, 建立 HNBp001 感染细胞模型。细胞存活率、多核巨细胞(MNGCs)形成数量及空斑形成面积检测表明 HNBp001 感染 A549 细胞模型建立成功。

用 HNBp001(MOI:50) 分别感染 A549 细胞 0、3、6、12、24 h, 观察细胞存活率, 结果显示随着感染时间的增加, 宿主细胞的存活率逐渐下降、MNGCs 数量逐渐增多、空斑形成面积增大, 直至细胞死亡(图 1)。



A Bp 感染不同时间的 A549 细胞存活率 B Bp 感染不同时间 A549 细胞 MNGCs 形成率 C Bp 感染不同时间 A549 细胞的空斑面积。注: 与 0h 比较, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$ 。

图 1 HNBp001(MOI=50) 感染 A549 细胞模型的建立

A Survival rate of A549 cells at different time of Bp infection B MNGCs formation rate in A549 cells C Plaque area of A549 cells. Notes; Compare with 0h mm, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$.

Fig. 1 Establishment of A549 cell model infected with HNBp001

2 HNBp001 感染对细胞 O-GlcNAc 糖基化修饰的影响

Western blot 检测 O-GlcNAc 糖基化水平, 结果如图 2。与 CK 组比较, 感染 HNBp001 的 A549 细胞 O-GlcNAc 糖基化修饰水平下降, 表明 HNBp001 感染和宿主细胞内的 O-GlcNAc 糖基化修饰存在一定关联。

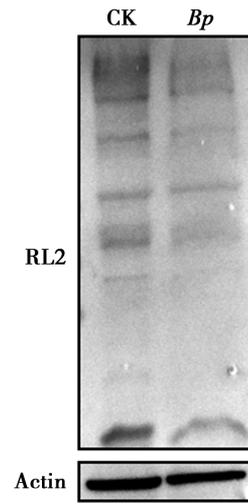
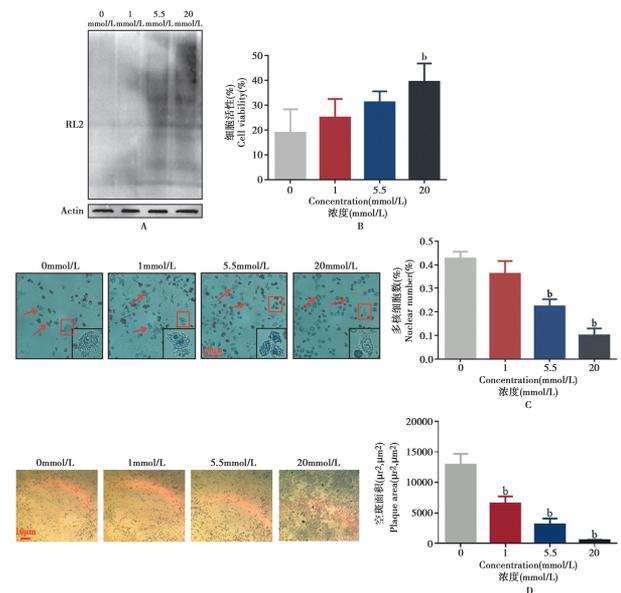


图 2 感染 Bp (MOI:50) 24 h 的 A549 细胞 O-GlcNAc 糖基化水平
Fig. 2 O-GlcNAcylation level of A549 cells CK group and Bp group (MOI:50mm, 24 h)

3 葡萄糖浓度对宿主细胞 O-GlcNAc 糖基化修饰及抵抗 HNBp001 感染的影响

葡萄糖作为 O-GlcNAc 糖基化修饰的底物来源, 随着培养基中葡萄糖浓度的增高(0、1、5.5、20 mmol/L), 细胞 O-GlcNAc 糖基化修饰水平增强(图 3A); 在此条件下用 HNBp001 感染 A549 细胞, 结果显示随着葡萄糖浓度的增加, 宿主细胞的存活率升高、MNGCs 形成数量减少、空斑形成面积减小(图 3)。表明葡萄糖可能增强宿主细胞对 HNBp001 的抗感染能力。



A HNBp001 感染 A549 细胞的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平变化 B A549 细胞存活率 C A549 细胞 MNGCs 形成率 D A549 细胞的空斑面积。注: 与 0mmol/L 葡萄糖组比较; b $P < 0.01$ 。

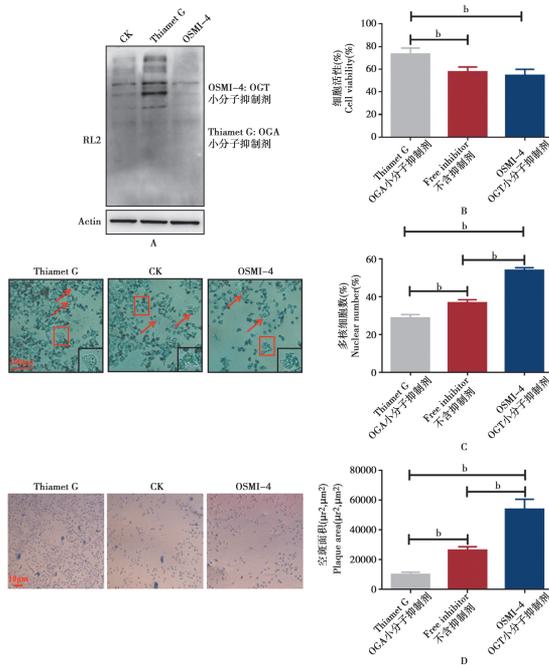
图 3 不同浓度葡萄糖培养下感染 Bp 的 A549 细胞相关指标检测

A Survival rate of A549 cells at different concentrations of glucose with Bp infection B MNGCs formation rate in A549 cells C Plaque area of A549 cells. Notes; Compare with 0mmol/L; b $P < 0.01$.

Fig. 3 Establishment of A549 cell model infected with HNBp001

4 O-GlcNAc糖基化修饰对宿主抵抗 HNBp001 感染的影响

葡萄糖作为 O-GlcNAc 糖基化修饰的底物来源,推测可能由于葡萄糖浓度的增加提升了宿主细胞内的 O-GlcNAc 修饰水平,进而提升了宿主细胞的抗感染能力。为此进一步利用催化 O-GlcNAc 糖基化修饰的两个关键酶(OGT 和 OGA)的小分子抑制剂作进一步验证,结果如图 4。HNBp001(MOI:50,12 h)感染宿主 A549 细胞,OGT 抑制剂(OSMI-4)在降低宿主细胞内 O-GlcNAc 修饰水平的同时,使宿主细胞的存活率下降、MNGCs 形成数量增加、空斑形成面积增加;OGA 抑制剂(Thiamet G)在提升宿主细胞内 O-GlcNAc 修饰水平的同时,宿主细胞的存活率较 OSMI-4 组显著升高,MNGCs 形成数量、空斑形成面积显著减少。表明适当浓度的葡萄糖可调控宿主细胞的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平,并调控宿主对 HNBp001 的抗感染能力。



A OSMI-4 及 Thiamet G 处理 A549 细胞的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平变化 B A549 细胞存活率 C A549 细胞 MNGCs 形成率 D A549 细胞的空斑面积。注:b 组间比较, $P < 0.01$ 。

图 4 OSMI-4 及 Thiamet G 处理对 OGA、OGT 调控 A549 细胞 O-GlcNAc 糖基化修饰的影响

A Changes in level of O-GlcNAc treated with OGT inhibitor (OSMI-4) or OGA inhibitor (Thiamet G) B Survival rate of A549 cells at different concentrations of glucose with *Bp* infection C MNGCs formation rate in A549 cells D Plaque area of A549 cells. Notes: b $P < 0.01$.

Fig. 4 Expression regulation of OGA and OGT

讨论

Bp 作为一种胞内生存的革兰阴性杆菌感染人体后可逃避机体的免疫攻击,潜伏在体内并复制,造成持续性感染和胞间扩散,从而导致严重的类鼻疽病^[11]。

Bp 进入机体内产生相应的毒力因子以利于其粘附在宿主细胞表面,例如 IV 型菌毛、鞭毛结构基因 *fliC*^[12-13]。经宿主细胞的吞噬作用,Bp 在胞内分泌相关毒力蛋白破坏宿主细胞的免疫功能,如 T3SS 系统将效应蛋白注入宿主细胞中发挥作用^[14];BipB 将效应蛋白在胞内大量复制,诱导宿主细胞凋亡^[15];BipC 促进肌动蛋白尾的形成,影响 Bp 在胞内传播和胞间扩散,因此造成细胞破裂,融合相邻细胞形成多核巨细胞^[16]。此外,Bp 通过上调嘌呤、组氨酸、脂肪酸和氨基酸的生物合成途径^[17],以及上调细胞因子信号 3 抑制因子(SOCS3)和 SH2 包含的细胞诱导型因子(CIS)两种负调控因子的表达来抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达^[18],从而造成对宿主的持续性感染。目前尚无高效疫苗和特效药物用于类鼻疽病的预防和治疗,深入探究 Bp 感染宿主的病理机制,可为 Bp 与宿主细胞之间的相互作用研究提供新的信息。

机体细胞处于复杂多变的内环境中,为维持内环境稳态,抵御细胞内外环境的刺激需要做出第一反应。细胞为维持稳态涉及众多繁杂的分子机制,蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰是参与维持细胞稳态的重要方式之一,其功能包括调节蛋白质功能、抑制炎症反应、增强免疫功能、参与信号传导、减少细胞凋亡等^[9]。O-GlcNAc 糖基化修饰由 OGT 糖基转移酶将供体底物转移到丝氨酸/苏氨酸残基的羟基上进行修饰,OGA 糖基水解酶则去除这种修饰,这是一种可逆的、动态调控的修饰方式^[19]。O-GlcNAc 糖基化修饰对细胞应激非常敏感,当细胞处于不利的环境和遭受有害刺激时,如缺氧、炎症因子、活性氧、外界刺激等,O-GlcNAc 糖基化迅速作出反应保护机体,因此 O-GlcNAc 糖基化被充当“细胞应激传感器”^[20]。

大多数(85%)Bp 感染者出现急性病症,并伴有肺炎、败血症、肺脓肿等症状^[21]。有研究表明氨基葡萄糖可改善败血症小鼠的存活率并减轻败血症引起的肺部损伤和炎症,其机制是促进 O-GlcNAc 糖基化修饰表达,抑制 MAPK 和 NF- κ B 两种炎症信号通路,从而改善肺部和全身炎症反应,揭示了 O-GlcNAc 糖基化通过抑制炎症信号通路的抗炎作用^[22],说明 O-GlcNAc 糖基化修饰与类鼻疽病引起的败血症存在某种联系。另外,氨基葡萄糖在细胞内经过己糖胺生物合成途径转化为 UDP-GlcNAc,作为 O-GlcNAc 糖基化修饰的供体影响 O-GlcNAc 糖基化修饰水平^[23]。

糖尿病患者感染类鼻疽病的风险显著高于非糖尿病患者。细胞中 O-GlcNAc 糖基化修饰水平高表达,摄取胰岛素信号通路受到抑制,造成体内利用胰岛素受阻,无法降低体内血糖浓度,最终引发糖尿病^[24]。但 O-GlcNAc 糖基化水平增加不是绝对引起胰岛素抵抗

而导致糖尿病的发生。Barrientos 等^[25]报道给小鼠模型注射特异性较强的 OGA 小分子抑制剂(NButGT)时,其组织 O-GlcNAc 糖基化修饰水平增加,但未发生胰岛素抵抗现象。

Li 等^[26]研究发现,病毒感染机体期间出现急性炎症,葡萄糖代谢增加,与己糖胺生物合成途径有关的 O-GlcNAc 糖基化能调节线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)功能的分子机制,因此推测 O-GlcNAc 糖基化在抗病毒先天免疫中发挥重要作用。Zou 等^[27]报道 NF- κ B 的表达及 NF- κ B DNA 的结合活性随着 O-GlcNAc 糖基化水平增高而降低,而 NF- κ B 在炎症、免疫和抗细胞凋亡反应中起重要调控作用^[28]。O-GlcNAc 糖基化能抑制核因子 NF- κ B 表达信号通路,进一步抑制炎症反应,同时减少小神经胶质细胞的活化,减轻脑组织的缺血与损伤,由此减少败血症大鼠模型脑组织损伤^[29]。因此,O-GlcNAc 糖基化对炎症的总体作用是减弱炎症反应,保护机体^[30]。本研究建立了 Bp 感染 A549 细胞模型,观察了宿主细胞蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰对 Bp 在胞内存活的影响。结果显示,在不同浓度葡萄糖中 O-GlcNAc 糖基化表达水平不同,随着葡萄糖浓度的增加,O-GlcNAc 糖基化表达水平上调,细胞存活率增高,空斑面积和多核巨细胞形成率相应减少,A549 细胞凋亡减少,表明葡萄糖可能参与调控宿主细胞的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平及宿主对 HNBp001 的抗感染能力。

综上所述,蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰影响 Bp 在体内的存活率,葡萄糖可促进 O-GlcNAc 糖基化表达,提升宿主细胞对 Bp 的抗感染能力,减少细胞凋亡,起到保护细胞的作用,但关于 O-GlcNAc 糖基化修饰抑制 Bp 感染的具体机制有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Gassiep I, Armstrong M, Norton R. Human melioidosis [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2): e00006-19.
[2] Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, et al. Melioidosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 17107.
[3] Kaewpan A, Duangurai T, Rungruengkitkun A, et al. *Burkholderia pseudomallei* pathogenesis in human skin fibroblasts: A Bsa type III secretion system is involved in the invasion, multinucleated giant cell formation, and cellular damage [J]. PLoS One, 2022, 17(2): e0261961.
[4] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138: 271-281.
[5] Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, et al. Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand [J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 82(6): 1113-1117.
[6] Cattaneo A, Chirichella M. Targeting the post-translational proteome with intrabodies [J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(6): 578-

591.
[7] Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(7): 448-462.
[8] Swamy M, Pathak S, Grzes KM, et al. Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy [J]. Nat Immunol, 2016, 17(6): 712-720.
[9] Chang YH, Weng CL, Lin KI. O-GlcNAcylation and its role in the immune system [J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 57.
[10] Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(7): 452-465.
[11] Vadivelu J, Vellasamy KM, Thimma J, et al. Survival and intranuclear trafficking of *Burkholderia pseudomallei*: Strategies of evasion from immune surveillance? [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(1): e0005241.
[12] Essex-Lopresti AE, Boddey JA, Thomas R, et al. A type IV pilin, pilA, contributes to adherence of *Burkholderia pseudomallei* and virulence *in vivo* [J]. Infect Immun, 2005, 73(2): 1260-1264.
[13] Inglis TJ, Robertson T, Woods DE, et al. Flagellum-mediated adhesion by *Burkholderia pseudomallei* precedes invasion of *Acanthamoeba astronyxis* [J]. Infect Immun, 2003, 71(4): 2280-2282.
[14] Vander Broek CW, Stevens JM. Type III Secretion in the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 255.
[15] Suparak S, Kespichayawattana W, Haque A, et al. Multinucleated giant cell formation and apoptosis in infected host cells is mediated by *Burkholderia pseudomallei* type III secretion protein BipB [J]. J Bacteriol, 2005, 187(18): 6556-6560.
[16] Kang WT, Vellasamy KM, Rajamani L, et al. *Burkholderia pseudomallei* type III secreted protein BipC: role in actin modulation and translocation activities required for the bacterial intracellular lifecycle [J]. Peer J, 2016, 4: e2532.
[17] Willcocks SJ, Denman CC, Atkins HS, et al. Intracellular replication of the well-armed pathogen *Burkholderia pseudomallei* [J]. Curr Opin Microbiol, 2016, 29: 94-103.
[18] Ekcharyawat P, Pudla S, Limposuwan K, et al. *Burkholderia pseudomallei*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 and cytokine-inducible src homology 2-containing protein in mouse macrophages: a possible mechanism for suppression of the response to gamma interferon stimulation [J]. Infect Immun, 2005, 73(11): 7332-7339.
[19] Lee BE, Suh PG, Kim JI. O-GlcNAcylation in health and neurodegenerative diseases [J]. Exp Mol Med, 2021, 53(11): 1674-1682.
[20] Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, et al. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease [J]. Annu Rev Biochem, 2011, 80: 825-858.
[21] Currie BJ, Ward L, Cheng AC. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(11): e900.

