



单核细胞增多性李斯特菌谷胱甘肽还原酶 GR 的生物学特性

吕洁婷[#], 孙静[#], 郑光辉, 韩月, 成炯泽, 宋厚辉^{*}, 程昌勇^{*}

浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室,
浙江 杭州 311300

摘要:【目的】本文旨在构建单核细胞增多性李斯特菌谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)基因 *lmo1433(gr)* 缺失株, 并研究 GR 在细菌生长和运动过程中发挥的作用及与谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx) 系统间的调控关系, 探究 GR 参与细菌抗氧化应激和致病力的生物学功能, 为阐明氧化还原蛋白介导细菌环境适应和宿主内感染的机制奠定分子基础。【方法】利用细菌遗传操作系统构建获得 *gr* 缺失株及回补株后, 通过分子生物学和感染生物学手段, 比较野生株和突变株的运动性、生长能力、抗氧化应激、细胞黏附、侵袭和增殖能力; 利用整合型质粒构建带 GR 启动子的荧光报告系统, 并结合荧光定量分析 GR 受 Grx 调控的情况。【结果】缺失 *gr* 后李斯特菌在体外培养基中的生长能力未受明显影响, 但在半固体培养基中的运动能力却显著增强; 缺失 *gr* 后细菌在铜离子、镉离子以及胍中抗氧化应激能力增强, 在 H₂O₂ 中无差异; 缺失 *gr* 后细胞黏附、侵袭和增殖能力均显著增强; 荧光报告系统定量分析发现 *grx* 缺失后 *gr* 的启动子活性显著增强, 表明 Grx 参与对 GR 的转录负调控。【结论】本研究首次证实了单增李斯特菌谷胱甘肽还原酶 GR 能调控细菌的运动能力, 并且缺失 GR 增强了李斯特菌的抗氧化应激和感染宿主能力; 首次证实了 GR 的自身转录受 Grx 负调控, 但具体分子机制有待于深入探究。本研究有助于深入理解单增李斯特菌氧化还原蛋白的调控关系以及通过参与诸多生物学过程介导细菌体外环境适应及宿主内感染的分子机制, 为防控胞内菌感染提供了新策略。

关键词: 单核细胞增多性李斯特菌, 谷胱甘肽还原酶, 运动性, 氧化应激耐受, 细菌感染

单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种人兽共患革兰氏阳性胞内菌^[1]。它能适应高盐、极寒、酸性等应激环境, 易感者为孕妇、老人、免疫力低

基金项目: 国家自然科学基金(31872620, 31770040, 31972648); 浙江省自然科学基金(LZ19C180001, LQ19C180002, LQ20C010001)
浙江农林大学本科科研训练项目(2020KX0160)

[#]共同第一作者。

^{*}通信作者。E-mail: 程昌勇, lamge@zafu.edu.cn; 宋厚辉, songhh@zafu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-20; 修回日期: 2020-08-29; 网络出版日期: 2021-03-01

下等人^[2]。李斯特菌主要在加工、储存、运输过程中污染肉、蛋、奶等产品。人感染李斯特菌后轻则腹泻、呕吐，重则流产、脑膜炎甚至致死。1964年至2010年间，中国28个省份分别报告了147例临床病例，479例李斯特菌分离株和82例与暴发相关的病例，而2011年至2017年中国报告了562名李斯特菌病患者，表明过去十年中患者人数急剧增加^[3]。2018年有报道称在中国因食品中污染单增李斯特菌的平均患病率约为4.4%，其中侵袭性李斯特菌病的致死率大于25%^[4]。在各种食品中，肉类和家禽产品的李斯特菌感染率最高，约为8.9%。因为目前中国是世界上最大的肉类生产国和肉类消费国，所以深入研究李斯特菌对于保障食品安全及控制食源性疾病具有重大意义^[5-6]。

单增李斯特菌内存在一种由*lmo1433*基因编码的谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)。GR属于谷氧还蛋白(Grx)系统成员，该系统由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、GR、谷胱甘肽(GSH)和Grx组成^[7-8]。单增李斯特菌通过细胞内的Trx和Grx这两套氧化还原稳态系统来应对宿主释放的超氧化物并修复被破坏的二硫键^[9]。Trx的主要功能是还原蛋白二硫键^[10-11]，Grx在结构和功能上与Trx相似，除二硫化物-二硫醇交换机制外，Grx还可通过一硫醇机制催化底物的还原。Grx可通过可逆性谷胱甘肽酰化来调节许多蛋白质的活性，例如Ras、Fas、ASK1、NF- κ B和procaspase-3，这些蛋白在控制细胞凋亡中都起到重要作用。Grx系统和Trx系统具有多种生物学活性，包括DNA合成的调控、抗氧化应激的防御、细胞周期和细胞凋亡的介导^[12]，抑制Trx系统或使GSH耗竭，均可引起ROS升高，诱导细胞死亡^[13]。GR能在NADPH作为唯一还原力和电子供

体时，将氧化性谷胱甘肽(G-S-S-G)转化为还原性谷胱甘肽(G-SH)，从而保持G-SH/G-S-S-G比例的平衡，起到维持细胞内G-SH含量的作用^[14-15]；GR通过催化谷胱甘肽还原，降低细胞内ROS水平来抵抗细胞内的氧化应激^[16-20]。细菌通过一系列毒力因子感染细胞，我们猜测，GR可能调控了细菌毒力因子而使细菌更不易被宿主感知并清除。本实验室先前通过转录组测序发现，缺失Grx后GR转录水平显著上调，并且缺失Grx能增强抗氧化应激和感染细胞能力^[21]。本研究为探究谷氧还蛋白系统应激作用机制奠定了基础，并为深入阐明李斯特菌Grx系统通过氧化还原作用介导细菌体外环境适应及宿主内感染的分子机制奠定了重要基础。

另外，本研究首次发现，缺失GR影响了李斯特菌的运动性。细菌运动性与鞭毛合成有关，李斯特菌在37℃以上环境中不合成鞭毛，而在30℃以下环境下才合成鞭毛^[22-23]。李斯特菌鞭毛合成的主要受调控因子MogR和GmaR的控制^[24-25]。MogR能够结合并占据鞭毛基因的启动子区使转录因子无法结合于此，从而导致鞭毛基因转录受到遏制^[26]。GmaR是一种糖基转移酶，在30℃下能与MogR形成稳定的复合物从而阻止MogR对鞭毛基因的遏制，促进鞭毛合成；而在37℃环境下GmaR不稳定易被降解从而无法阻止MogR对鞭毛转录的抑制^[27-28]。GmaR转录又受到DegU调控^[29]，DegU为双组分应答调节剂，具有受体域^[30]，该受体域可以不依赖磷酸化状态的方式来激活鞭毛运动性的表达^[31]。FlhB、FliM和FliY是鞭毛分泌系统(T3SS)成分蛋白，也参与调节鞭毛相关基因的转录，进而影响鞭毛合成和细菌运动^[32]。此外，本实验室前期研究发现，李斯特菌的另一重要氧化还原家族蛋白TrxA可以

通过氧化还原修饰与 MogR 相互作用, 使 MogR 分子内和分子间二硫键能正确折叠并维持其功能和活性, 进而参与鞭毛基因的转录调控及鞭毛的合成。本文首次发现, 李斯特菌 GR 同样参与调控李斯特菌的鞭毛合成及运动性, 完善了李斯特菌借助氧化还原酶系统参与细菌鞭毛合成和运动的相关系统研究, 但 GR 与鞭毛合成调控涉及的具体分子机制是否类似于 TrxA 或者还存在其他的未知机制仍有待深入研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物: 本研究用到的菌株及质粒均为本实验室保存, 主要包括: 单增李斯特菌 EGD-e、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21、温度敏感性载体 pKSV7、整合型穿梭载体 pIMK2 及游离复制型载体 pAM401。BHI 培养基(brain heart infusion, BHI)用于李斯特菌培养, LB 培养基用于大肠杆菌培养, 除特殊说明外, 菌培养条件均为 37 °C 振荡培养。试验涉及引物见表 1。

1.1.2 试剂: BHI 和 LB 培养基分别购于 Oxoid 公司、生工生物工程(上海)股份有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)和胰酶 (0.25% Trypsin-EDTA) 购自 Thermo Fisher Scientific; KOD plus Neo PCR 酶、限制性核酸内切酶、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PCR 产物纯化回收试剂盒以及质粒提取试剂盒分别购自 Toyobo、NEB、碧云天公司、上海慧凌生物科技有限公司、天根生化科技有限公司。本研究所用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 Δgr 重组缺失质粒构建

从 NCBI 数据库下载 *gr* 基因序列(基因序列号: 985502)及其上下游基因序列, 通过 Snapgene 软件在 *gr* 基因上下游各约 500 bp 处设计引物 (pSL2501-Fwd-a/pSL2501-b 和 pSL2501-c/pSL2501-Rev-d)扩增同源臂序列。利用重叠 PCR 方法将上下游同源臂扩增连接获得用于同源重组的重组片段, 克隆至 pKSV7 载体中, 获得重组质粒 pSL2501, 并经测序正确后转化至 DH5 α 中(图 1)。

表 1. 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study. The restriction enzyme sites are underlined

| Primers | Sequences (5'→3') | Products/bp |
|-----------------|---|-------------|
| pSL2501-a-front | CACCATCTCTTGAAACAATGATGGCG | |
| pSL2501-Fwd-a | CCG <u>GAAATTC</u> GAAATTTTAGAATATAAAAAATGATAAAATGACGGCCG | 527 |
| pSL2501-b | TTCACTAAGAAAATGAGCCTAAATCACTCCTTCTTAGCTTGTTTTCCC | |
| pSL2501-c | ATTTAGGCTCATTTTCTTAGTGAAGAAGCAGATTATATGATAAATTACA | 526 |
| pSL2501-Rev-d | AA <u>ACTGCAG</u> CACCGTTCACAGTAGTGATTTTTTTCT | |
| pSL2856-Fwd | GGCGAGCTCCGGCTTTGAATGGGCGAAATTA AAAC | 1555 |
| pSL2856-Rev | CGGGTACCCTAGTTCAAAGCAGTTAAGTCACTTGCT | |
| pSL2506-a | CGCGGATCCCGGCTTTGAATGGGCGAAATTA AAAC | 219 |
| pSL2506-b | GTTCTTCTCCTTACTCATCTAAATCACTCCTTCT | |
| pSL2506-c | CTAAGAAGGAGTGATTTAGATGAGTAAAGGAGAAGAAC | 736 |
| pSL2506-d | ACGCGTCCGACTTATTTGTATAGTTTCATCCATGCCATGTGTAATCC | |
| pKSV7-M13-Fwd | GCGATTAAGTTGGGTAACGCC | 1113 |
| pKSV7-M13-Rev | GCGGATAACAATTTACACAGGA | |

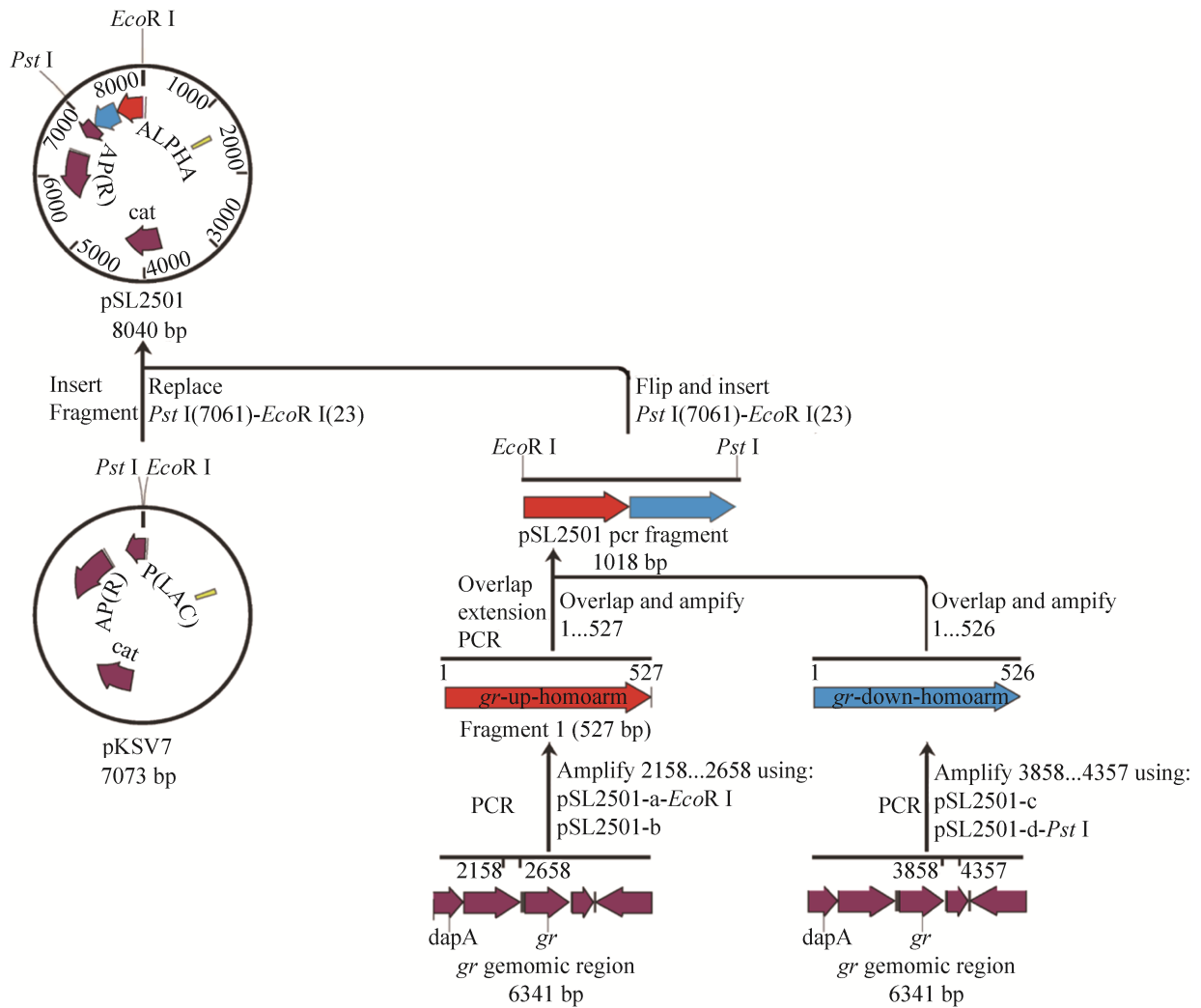


图 1. *gr* 缺失株重组质粒的构建策略

Figure 1. Construction strategy of the recombinant plasmid pSL2501 for *gr* gene deletion.

1.3 Δ*gr* 缺失株筛选和验证

将上述重组质粒 pSL2501 电转入 EGD-e 感受态中, 通过温度和氯霉素抗性双重选择压力进行同源重组克隆筛选, 利用引物(pSL2501-a-front/pSL2501-Rev-d)对筛选出的重组克隆进行 PCR 验证, 最终经测序验证, 所缺失的基因序列与预期设计相符后得到 Δ*gr* 缺失株。

1.4 CΔ*gr* 重组质粒的构建

从 Biocyc、Promoter3.0 网站分别查询到 *gr*

为单转录本且得到 *gr* 启动子后, 通过 Snapgene 在 *gr* 基因上游启动子区及下游设计引物 (pSL2856-Fwd/pSL2856-Rev) 并扩增序列, 克隆至 pIMK2 载体, 获得重组质粒 pSL2856, 并经测序正确后转化至大肠杆菌 DH5α 中(图 2)。

1.5 Δ*gr* 感受态的制备

Δ*gr* 过夜培养后, 1:100 转接至 100 mL (终浓度为 0.5 mol/L 蔗糖及 BHI)新鲜培养基中, 培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.2 后加入青霉素 G (终浓度为 20 μg/mL),

37 °C 振荡培养 2 h 后, 4 °C 离心(转速为 3750 r/min) 10 min 后用预冷的 1 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液洗 3 次后, 最后用缓冲液(含 1 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸及 0.5 mol/L 蔗糖)重悬, -80 °C 保 C Δ *gr* 回补株构建: 将 2 μ g pSL2856 质粒电转至 Δ *gr* 感受态中, 电转参数设置为 25 μ F、200 Ω 及 2500 V, 37 °C 静置培养, 通过挑取单菌落进行 PCR 验证获得阳性克隆后, 最终经测序验证基因序列与预期设计相符后得到 C Δ *gr* 回补株。

1.6 荧光素酶报告基因(GFP)质粒构建

通过 Snapgene 软件在 *gr* 基因上游启动子区及 pFL251 质粒分别设计引物(pSL2506-a/pSL2506-b 和 pSL2506-c/pSL2506-d)扩增序列, 利用重叠 PCR 方法将 *gr* 启动子和 GFP 连接获得用于同源重组片段, 插入游离型载体 pAM401 载体, 获得重组质粒 pSL2506, 并经测序正确后转化至大肠杆菌 DH5 α (图 3)。再将 pSL2506 电转入 EGD-e 和缺失株 Δ *grx*, 即得携带 GFP 报告基因的菌株。

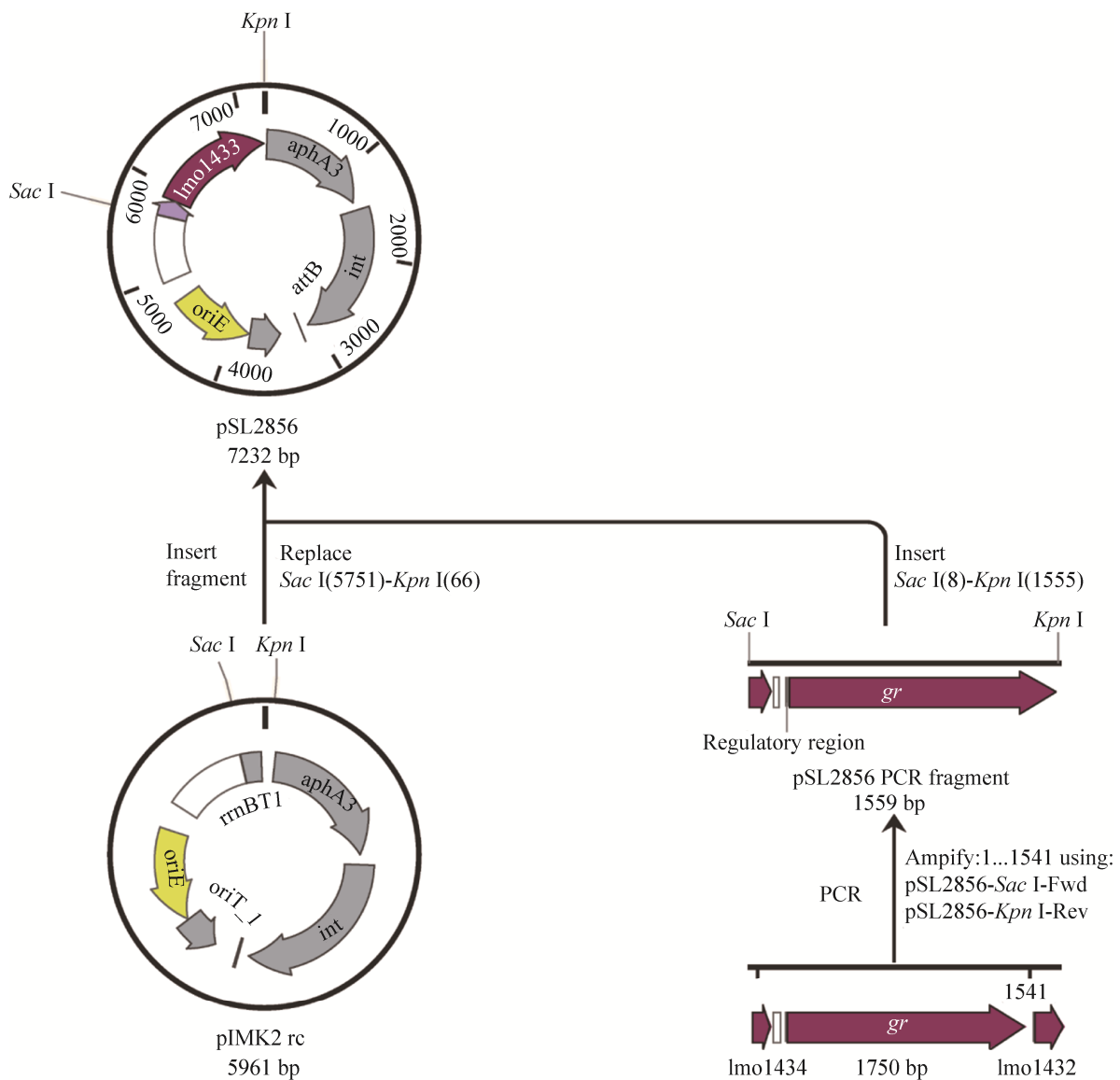


图 2. *gr* 回补株重组质粒的构建策略

Figure 2. Construction strategy of the recombinant plasmid pSL2856 for *gr* gene complementation.

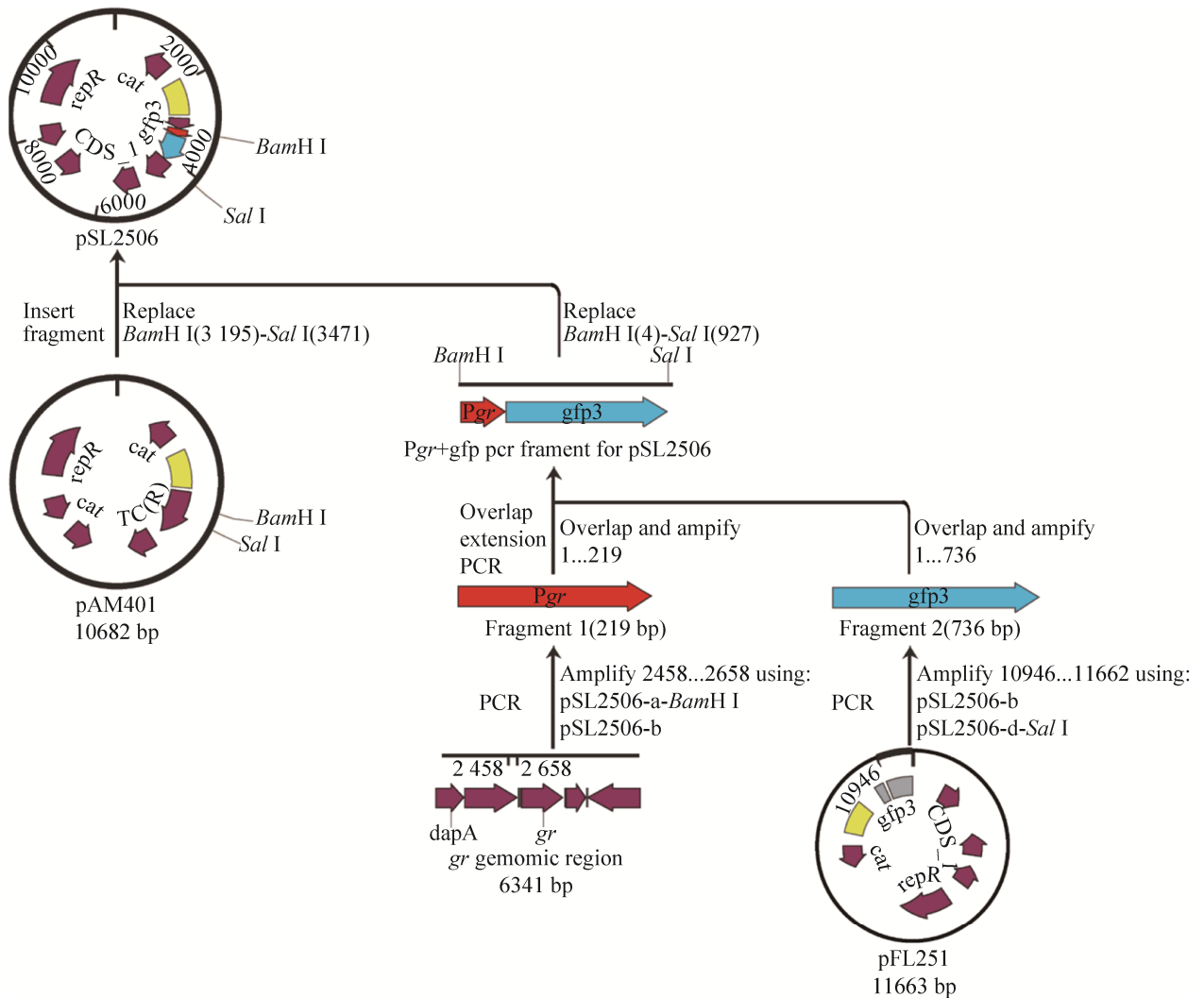


图 3. Grx 调控 gr 基因的荧光素酶报告基因构建策略

Figure 3. The strategy of the fluorescent reporter system for studying the regulation of gr by Grx.

1.7 荧光的定性与定量检测

将上述携带 GFP 报告基因的两个菌株培养过夜, 调 OD_{600} 至 0.6 后, 取等量菌液滴于载玻片固定并用荧光显微镜测荧光强度。取等量菌液加入 96 孔板中并用酶标仪测量荧光强度(条件为 $Em/Ex=535/485\text{ nm}$), 未含 GFP 报告基因的 EGD-e 和 Δgrx 的荧光强度作为阴性对照, 数据采用 GraphPad Prism 软件分析作图。

1.8 生长曲线的测定

将 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 振荡培养过夜, 调

OD_{600} 至 0.6, 起始菌液稀释 100 倍后, 加入 96 孔板中于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 静置培养, 每隔 1 h 测定 OD_{600} , 连续测定 12 h 并绘制生长曲线。

1.9 运动性试验

将 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ $37\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养过夜, 调 OD_{600} 至 0.6, 取灭菌牙签蘸取少量菌液, 穿刺接种于 TSA 半固体培养基(0.25%琼脂、2%氯化钠及 1.5%胰蛋白胨)中, 分别于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 静置培养, 12、24、36、48 h 后观察细菌运动圈。

1.10 氧化应激试验

将 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 37 °C 振荡培养过夜, 调 OD_{600} 至 0.6, 记为 10^{-0} , 用磷酸盐缓冲液稀释至 10^{-6} , 并依次点于含有氧化剂的 BHI 固体培养基上, 37 °C 静置培养过夜后观察并拍照。氧化应激以 H_2O_2 为直接氧化剂, 肼(Diamide) 为硫醇特异性氧化剂, 铜(Copper chloride, Cu)、镉(Cadmium chloride, Cd)等二价金属离子为氧化活性胁迫性氧化剂。 H_2O_2 、Diamide、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度分别为 5.00、1.50、0.75 和 0.50 mmol/L。

1.11 人肠上皮细胞(Caco-2)粘附和侵袭试验及鼠巨噬细胞(RAW264.7)增殖试验

将 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 37 °C 振荡培养过夜, Caco-2 和 RAW264.7 细胞铺板密度均为 10^6 , 细菌和细胞比例(MOI)分别为 10:1 和 1:5。将 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 按 MOI 加入 24 孔培养板后放置于细胞培养箱, 0.5 h 后拿出培养板用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗 3 遍, 并用 400 μ L 冰水及 100 μ L 胰酶吹打裂解, 稀释到合适梯度涂布至 BHI 培养基中。Caco-2 细胞的另一个 24 孔培养板在 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 加入 1.5 h 后用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 用 50 μ g/mL 庆大霉素杀菌 1.5 h 后(同 0.5 h 裂解操作), 稀释到合适梯度涂布至 BHI 培养基中; RAW264.7 细胞另 3 个 24 孔培养板在 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 加入 1 h 后用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 用 50 μ g/mL 庆大霉素杀菌 1 h 后, 记为 2 h, 在 2 h、5 h 和 8 h 后(同 0.5 h 裂解操作)稀释到合适梯度涂布至 BHI 培养基中, 在 37 °C 培养过夜后进行菌落计数, 用 Graphpad 软件进行作图并分析差异性。

2 结果和分析

2.1 Δgr 及 $C\Delta gr$ 重组菌的验证

根据 Δgr 重组质粒(图 1, 方法同 1.3)构建方法, 引物如表 1, Δgr 上游同源臂条带为 524 bp (图 4-A, 列 1), 下游同源臂为 523 bp (图 4-A, 列 2)。重叠 PCR 得 1012 bp 目的片段(图 4-A, 列 3)。用引物(pSL2501-a/pSL2501-d)扩增电转入 EGD-e 感受态的 pSL2501 菌落得到 1012 bp 的阳性克隆(图 4-B, 列 1)。42 °C 同源重组后, 用引物(pSL2501-a-front/pSL2501-d)扩增菌落得到 1212 bp 阳性克隆(图 4-B, 列 2)。在 30 °C 传代丢失 pKSV7 质粒后, 用引物(pKSV7-M13-Fwd/pKSV7-M13-Rev)验证菌落无条带(图 4-B, 列 3), 说明质粒已丢失。

根据 $C\Delta gr$ 重组质粒(图 2, 方法同 1.4)构建方法, 用引物(pSL2856-Fwd-Sac I/pSL2856-Rev-Kpn I)扩增菌落, 得到 $C\Delta gr$ 重组质粒目的片段 1555 bp (图 4-C, 列 1)。用引物(pSL2856-Fwd-Sac I/pSL2856-Rev-Kpn I)扩增电转入 Δgr 感受态的 pSL2856 单菌落, 得到阳性条带 1555 bp (图 4-C, 列 2), 因为电转后的模板中含框内敲除的 Δgr , 所以用引物(pSL2856-Fwd-Sac I/pSL2856-Rev-Kpn I)扩增还可得启动子区与 gr 下游片段共 340 bp (图 4-C, 列 2)。经测序验证 Δgr (图 4-D)、 $C\Delta gr$ (图 4-E)所构基因序列与预期设计相符后得到 Δgr 缺失株和 $C\Delta gr$ 回补株。

2.2 GR 生长曲线测定

图 5 为 EGD-e、 Δgr 、 $C\Delta gr$ 在 30 °C (图 5-A) 及 37 °C (图 5-B)培养时的生长曲线。结果显示, 突变株与 EGD-e 生长曲线无明显差异, 说明 GR 并不影响李斯特菌的正常生长。

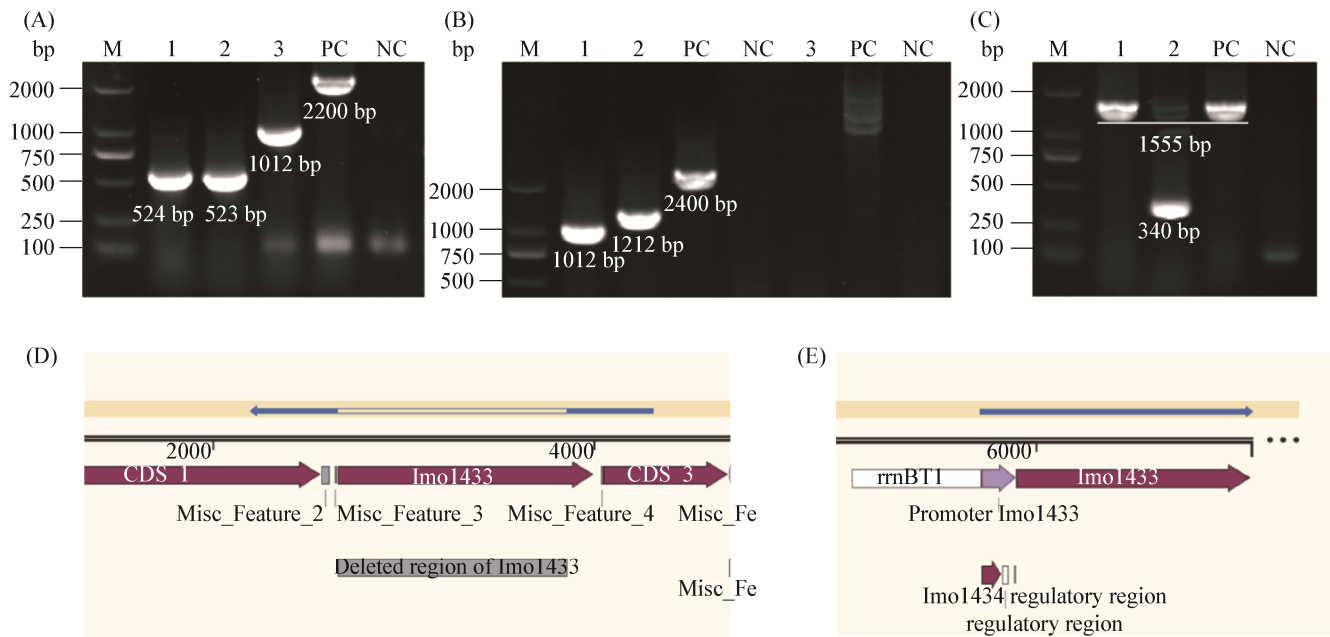


图 4. 缺失株构建重组质粒(A)、缺失株 Δgr (B)及回补株 $C\Delta gr$ (C)的 PCR 验证及测序结果(D-E)

Figure 4. Confirmation of *gr* deletion plasmid (A), and the deletion (B) and complementation (C) strains by PCR and sequencing analysis (D-E). A: lane 1-3: PCR fragments of homologous arms from EGD-e; B: lane 1-3: PCR screening for the *gr* deletion colonies; C: 1: PCR fragment from pSL2856; 2: electroporation of pSL2856. M: DL2000 DNA marker; PC: positive control; NC: negative control.

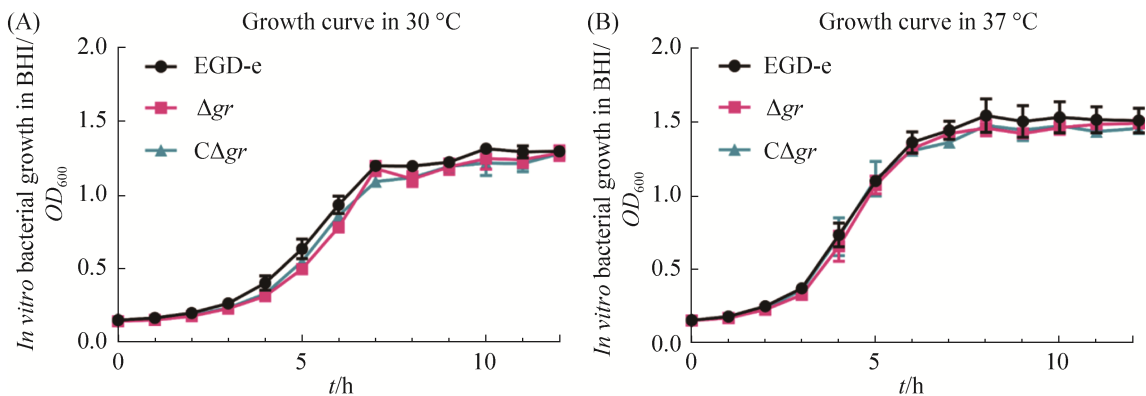


图 5. EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 在 30 °C(A)及 37 °C(B)环境中的生长曲线测定

Figure 5. *In vitro* growth of the wild-type EGD-e, Δgr , and $C\Delta gr$ in BHI broth at 30 °C (A) or 37 °C (B). Data are expressed as means \pm SE of three independent experiments.

2.3 GR 运动性试验分析

在 30 °C 条件下的各时间段, Δgr 与 EGD-e 和 $C\Delta gr$ 相比运动圈均明显增大(图 6-A), 在 37 °C 时 EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 均无明显运动圈(图 6-B),

李斯特菌在 30 °C 以上会失去鞭毛。利用 GraphPad Prism 软件分析 30 °C 各时间段 Δgr 与 EGD-e 和 $C\Delta gr$ (图 6-C)以及 37 °C (图 6-D)运动圈直径可得, 在 30 °C 下, Δgr 的运动圈直径显著大于 EGD-e 和

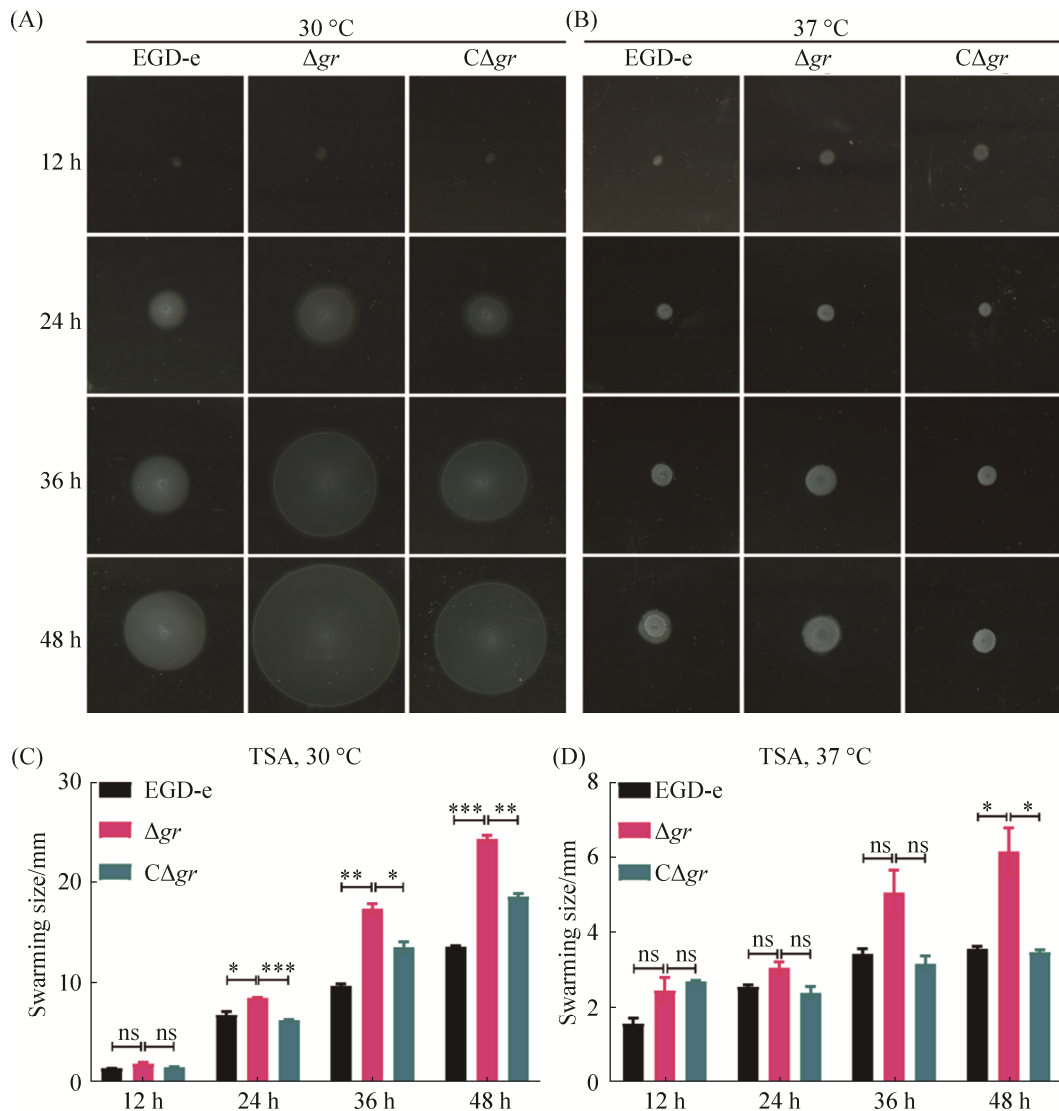


图 6. EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 在 30 °C(A 和 C)及 37 °C(B 和 D)环境中的运动能力分析

Figure 6. Motility assay of the wild-type EGD-e, Δgr , and $C\Delta gr$ at 30 °C (A) or 37 °C (B). A, B: swarming assay; C, D: quantification of swarming size. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

$C\Delta gr$, 说明李斯特菌缺失 GR 后鞭毛运动性增强, 推测缺失 GR 可能影响了鞭毛基因的转录水平并且在李斯特菌鞭毛系统中起到负调控的作用。

2.4 绿色荧光蛋白(GFP)荧光释放量定性及定量验证

本研究构建了含有 gr 启动子区的荧光报告子 (图 3, 方法同 1.6), 通过荧光释放强度判断 gr 转

录水平。定性结果显示, 在荧光显微镜下, 含 gr 启动子的荧光报告质粒的 Δgrx 与含 gr 启动子的荧光报告质粒的 EGD-e 相比, 荧光显著增强 (图 7-A)。荧光定量检测显示 Δgrx 荧光检测数值显著高于 EGD-e (图 7-B, $P < 0.01$)。定性与定量检测结果一致, 证实了 grx 缺失导致单增李斯特菌 gr 基因转录水平上调, 也证明了 grx 与 gr 启动子之间存在调控关系, 为进一步探究相关机制奠定基础。

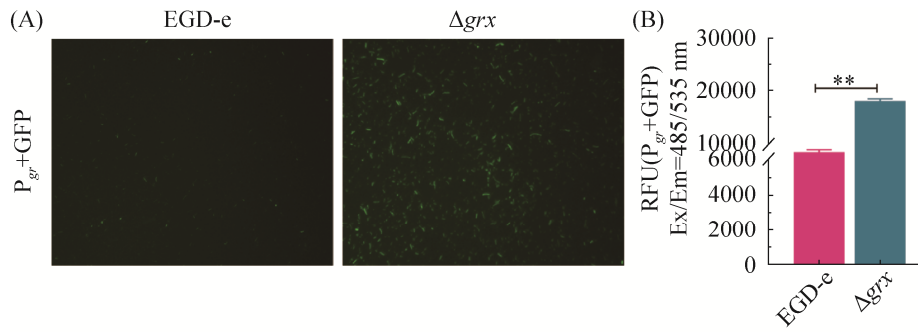


图 7. *gr* 荧光报告系统在 EGD-e 和缺失株 Δgrx 中的荧光强度(A)及基于酶标仪的定量分析(B)

Figure 7. Fluorescence analyzed by microscopy (A) and quantified by ELISA (B) of the *gr* promoter-based fluorescent reporter in EGD-e and Δgrx mutant. **: $P < 0.01$.

2.5 GR 抗氧化应激能力分析

已知谷氧还蛋白 Grx 具有抗氧化应激能力, 为进一步探究受 Grx 调控的 GR 是否也具有抗氧化应激能力, 我们采用氧化应激试验, 检测三种菌株在不同氧化应激条件下(H_2O_2 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Diamide)的生长能力, 结果显示, 在 5 mmol/L H_2O_2 培养条件下, 三种菌株的生长状况无差异

(图 8-A), 在含 0.5 mmol/L 的 Cu^{2+} 、0.75 mmol/L 的 Cd^{2+} 和 1.5 mmol/L 及以上浓度的 Diamide 培养条件下, Δgr 生长能力相较于 EGD-e 和 $C\Delta gr$ 均显著增强(图 8-B, 8-C, 8-D)。以上结果表明, GR 对金属离子氧化剂 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和巯基特异性氧化剂 Diamide 均敏感, GR 缺失后抗氧化能力显著增强, 这一结果与已知 Grx 系统抗氧化的结论^[9]相反, 2.4

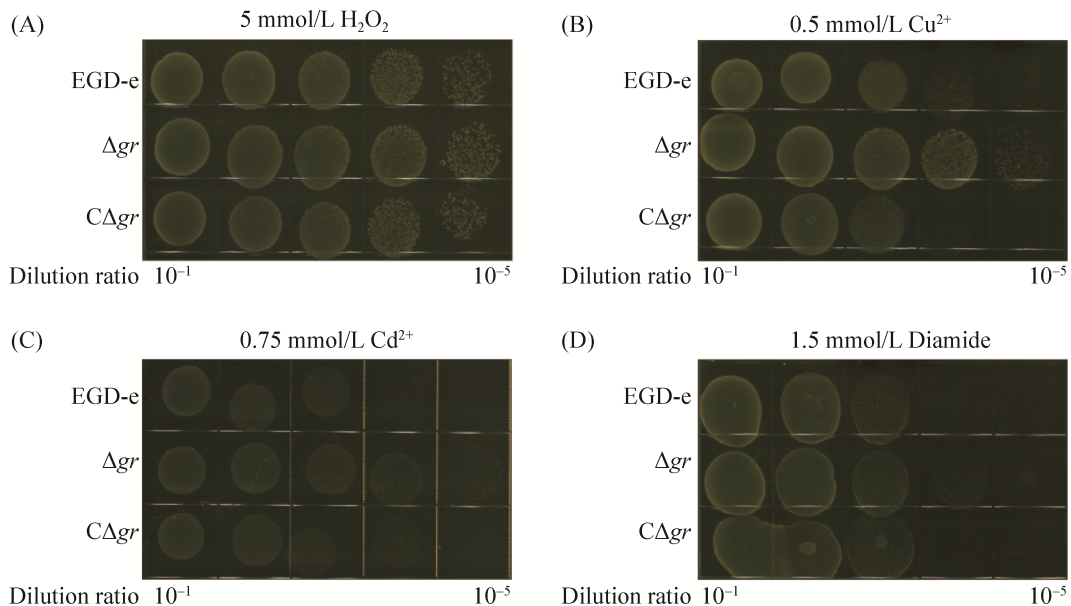


图 8. EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 在 H_2O_2 (A)、 Cu^{2+} (B)、 Cd^{2+} (C)和 Diamide (D)氧化应激条件下稀释点板

Figure 8. Oxidative tolerance of wild-type EGD-e and *gr* mutants exposed to different concentrations of H_2O_2 (A), Cu^{2+} (B), Cd^{2+} (C) or Diamide (D).

试验结果表明, GR 受 Grx 负调控, 而缺失 Grx 已被证实可以增加氧化应激的耐受性^[21], 我们猜测李斯特菌能通过缺失 GR 而代偿性地上调某些与氧化耐受性相关的氧化酶来增加其自身对于氧化耐受性的能力, 而 GR 能够负调控细菌氧化应激的耐受性。

2.6 上皮细胞 Caco-2 黏附和侵袭试验及巨噬细胞 RAW264.7 增殖试验分析

单增李斯特菌在进入消化道后, 首先入侵肠道上皮细胞, 上述试验结果表明, GR 缺失后细菌抗氧化能力显著增强, 为进一步探究 GR 对于细菌感染细胞生物学所起到的功能, 我们首先检测了 3 种菌株在 Caco-2 中的黏附、侵袭能力。试验结果显示在 Caco-2 细胞中, Δgr 的黏附率(图 9-A)及侵袭率(图 9-B)均显著多于 EGD-e 和 $C\Delta gr$ ($P < 0.05$)。细菌入侵巨噬细胞后, 细胞会立即释放大量 ROS 抵御细菌入侵, 可见细菌的抗氧化能力对于是否能成功感染宿主细胞极其重要^[33]。为进一步探究 GR 在细胞增殖中所发挥的作用, 我们检测了 3 种菌株在 RAW264.7 中的增殖能力, 试验结果显示, 在 RAW264.7 细胞内增殖 0.5 h、2 h、

5 h 和 8 h 后, Δgr 的增殖率均显著多于 EGD-e 和 $C\Delta gr$ (图 9-C), 细胞试验结果与氧化应激结果一致。上述结果证明, GR 能介导细菌毒力因子调控, 从而影响细菌细胞感染的能力。

3 讨论

本研究构建了 *gr* 基因的缺失株、回补株及荧光素酶报告基因, 并通过分子生物学、应激生物学、细胞生物学等手段, 比较单核细胞增多性李斯特菌和突变株间的运动性、体外生长能力、抗氧化应激能力、细胞黏附、侵袭、增殖能力及生物学特性, 结果显示, 缺失 GR 后细菌的运动性、抗氧化应激、细胞感染能力均能显著增强, 本研究为下一步深入研究鞭毛调控系统、谷氧还蛋白系统应激作用机制等奠定了扎实的基础。

本文证实了缺失 GR 不影响李斯特菌生长速率, 但在 30 °C 时能使细菌的运动性增强这一现象, 我们推测 GR 影响了鞭毛相关基因表达水平。细菌运动性受到温度以及鞭毛这两部分的控制, 单增李斯特菌在 37 °C 以上温度不形成鞭毛, 而在 30 °C 以下温度形成鞭毛^[23]。*degU* 基因能结合

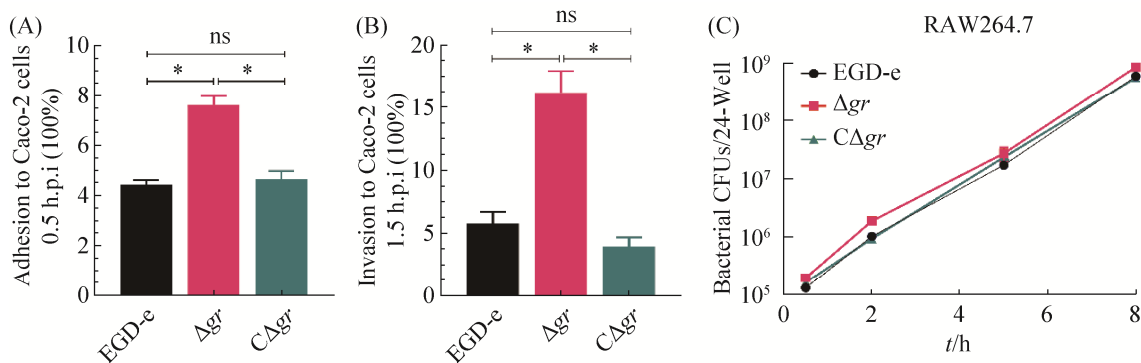


图 9. EGD-e、 Δgr 和 $C\Delta gr$ 在 Caco-2 的黏附率(A)和侵袭率(B)及 RAW264.7 增殖(C)分析

Figure 9. Analysis of adhesion (A) and invasion (B) in Caco-2 and infection of wild-type EGD-e and *gr* mutants in RAW264.7 macrophages (C).

gmaR 的启动子 *fliN-gmaR* 使下游基因转录, *gmaR* 能与 *mogR* 结合, *mogR* 在高温时通过结合鞭毛基因的启动子区可使鞭毛基因转录受到遏制。有报道称, TrxA 与鞭毛关键蛋白 MogR 之间存在互作, 参与鞭毛合成^[12]。谷胱甘肽合成酶负责铜绿假单胞菌中 GSH 的生物合成, 缺失谷胱甘肽合成酶后影响铜绿假单胞菌鞭毛的形成^[34]。谷胱甘肽合成酶和 GR 均与谷胱甘肽有关, 但从目前来看两者的调控方式以及发挥的功能均不同。GR 是谷氧还蛋白系统(Grx)中重要的一部分, 和谷氧还蛋白一同参与细菌的氧化还原修饰, 并且能将氧化型的谷胱甘肽还原为还原性的谷胱甘肽。而谷胱甘肽合成酶(GshF)不属于谷氧还蛋白系统, 主要参与细菌中谷胱甘肽的合成, 并且 GshF 会受到谷胱甘肽的反馈抑制。因而, 可以简单概括为: GshF 主要参与细菌中 GSH 的来源, 而 GR 以及 Grx 属于 GSH 发挥功能的“载体”。基于我们的研究初步证实, GR 和 GshF 调控李斯特菌鞭毛合成的作用方式完全相反。缺失 GshF 鞭毛运动性降低, 而本文缺失 GR 能使鞭毛运动性增强, 两者对于细菌运动性的贡献完全相反。缺失 *gshF* 后, 鞭毛合成促进基因 *gmaR* 以及鞭毛丝蛋白基因 *flaA* 的转录水平显著降低; 鞭毛抑制基因 *mogR* 以及鞭毛分泌系统蛋白基因 *fliI*、*fliP*、*fliQ* 等转录水平却上调, 从而综合引起鞭毛合成受阻, 运动能力下降。相反, 缺失 GR 导致运动能力增强, 且鞭毛基因转录水平升高, 我们推测 GR 可能也通过抑制 DegU 及 GmaR 的转录从而增强 MogR 对鞭毛合成抑制, 也可能通过调节 Grx 系统相关基因来控制鞭毛运动性, 比如 GR 催化 GSH 还原为鞭毛基因的氧化还原修饰提供环境。但具体的分子机制尚待进一步研究。因此, 我们后续将针对 GR、Grx 系统相关基因以及 GshF 在调控鞭毛基因合成及运动中

的差异机制进行深入探索, 为完善李斯特菌氧化还原蛋白家族调控修饰细菌在环境适应和宿主感染过程发挥的机理奠定基础。

此前本实验室将 EGD-e 和 Δgr 进行转录组分析得知, 缺失 *grx* 后, *gr* 转录水平差异显著^[21]。本研究通过构建 *gr* 的荧光报告子导入到 Δgrx 中, 通过荧光定性和定量试验证明了 GR 自身转录水平确实受 Grx 的负调控。Grx 系统由 NADPH、GR、谷胱甘肽(GSH)、Grx 组成^[7-8]。GR 和 Grx 的活性位点均包含保守的基序 Cys-XX-Cys, 蛋白质的巯基-二硫键氧化还原状态的变化对于控制蛋白质功能也很重要。细菌 Grx 系统在环境适应和宿主感染过程中具有功能多样性。Grx 能在 DTT 作为供体的情况下有效催化胰岛素的巯基-二硫键氧化还原, 缺失 Grx 可提高细菌耐受性和存活力, 促进细菌在细胞内的增殖能力。缺乏 *gshB* 会导致生长速率降低, 并对氧化应激敏感性更高。GSH 可以减少细胞二硫键, GR 可还原谷胱甘肽二硫化物^[35-36]。GR 不仅能通过催化 GSH 还原从而在氧化还原调节中起到重要作用, 还能促进中性粒细胞杀菌活性^[37-38]。本研究证实, GR 自身转录水平受 Grx 的负调控, 而 GR 与 Grx 在氧化应激、胞内侵袭、侵袭、增殖、运动性等功能上均表现出相似的特性。缺失 GR 后细菌毒力增强, 我们推测, GR 可能通过降低细菌的毒力而更好地减少宿主对它的抵抗, 增强隐蔽性, 有利于其长期定植于细胞中。基于此研究基础, 我们推测 GR 生物学特性与 Grx 相似, 且 Grx 已证实对细菌毒力因子内化素 A 和内化素 B 存在影响, 我们猜测 GR 也介导了细菌毒力因子的调控, 为了证实这一猜想, 下一步我们将深入探索 GR 与 Grx 系统调控关联机制并研究 GR 如何通过 Grx 系统调控细菌毒力因子、鞭毛系统、氧化应激的相关机制。本

研究有助于深入理解李斯特菌氧化还原系统重要蛋白的调控关系以及通过参与诸多生物学过程介导细菌在宿主内外环境中的适应机制，对于防控食源性胞内菌感染和保障人类公共卫生具有重要意义。

参考文献

- [1] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 32–46.
- [2] Roberts BN, Chakravarty D, Gardner III JC, Ricke SC, Donaldson JR. *Listeria monocytogenes* response to anaerobic environments. *Pathogens*, 2020, 9(3): 210.
- [3] Chen YT, Chen MT, Wang J, Wu QQ, Cheng JH, Zhang JM, Sun QF, Xue L, Zeng HY, Lei T, Pang R, Ye QH, Wu S, Zhang SH, Wu HM, Li WZ, Kou XY. Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods and pasteurized milk in China. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 642.
- [4] Yin YL, Doijad S, Wang WP, Lian K, Pan XZ, Koryciński I, Hu YC, Tan WJ, Ye SY, Wang ZG, Pan ZM, Chakraborty T, Jiao XA. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from invasive listeriosis in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2020, 17(3): 215–227.
- [5] Kühn S, Enninga J. The actin comet guides the way: how *Listeria* actin subversion has impacted cell biology, infection biology and structural biology. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(4): e13190.
- [6] Soni DK, Ahmad R, and Dubey SK, Biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*: emerging trends [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2018. 44(5): 590–608.
- [7] Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 95: 27–42.
- [8] Ji M, Barnwell CV, Grunden AM. Characterization of recombinant glutathione reductase from the psychrophilic Antarctic bacterium *Colwellia psychrerythraea*. *Extremophiles*, 2015, 19(4): 863–874.
- [9] Allen EMG, Mieyal JJ. Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 17(12): 1748–1763.
- [10] Ouyang Y, Peng Y, Li J, Holmgren A, Lu J. Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Metallomics*, 2018, 10(2): 218–228.
- [11] Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 17(12): 1738–1747.
- [12] Cheng CY, Dong ZM, Han X, Wang H, Jiang L, Sun J, Yang YC, Ma TT, Shao CY, Wang XD, Chen ZW, Fang WH, Freitag NE, Huang HR, Song HH. Thioredoxin is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [13] Gellert M, Richter E, Mostertz J, Kantz L, Masur K, Hanschmann EM, Ribback S, Kroeger N, Schaeffeler E, Winter S, Hochgräfe F, Schwab M, Lillig CH. The cytosolic isoform of glutaredoxin 2 promotes cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2020, 1864(7): 129599.
- [14] Aydemir D, Hashemkhani M, Durmusoglu EG, Acar HY, Ulusu NN. A new substrate for glutathione reductase: glutathione coated Ag₂S quantum dots. *Talanta*, 2019, 194: 501–506.
- [15] Plancarte A, Nava G, Munguia JA. A new thioredoxin reductase with additional glutathione reductase activity in *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 2017, 177: 82–92.
- [16] Michie KL, Dees JL, Fleming D, Moustafa DA, Goldberg JB, Rumbaugh KP, Whiteley M. Role of *Pseudomonas aeruginosa* glutathione biosynthesis in lung and soft tissue infection. *Infection and Immunity*, 2020, 88(6): e00116–20.
- [17] Malik WA, Wang XG, Wang XL, Shu N, Cui RF, Chen XG, Wang DL, Lu XK, Yin ZJ, Wang JJ, Ye WW. Genome-wide expression analysis suggests glutaredoxin genes response to various stresses in cotton. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 153: 470–491.
- [18] Baldissera MD, Souza CF, Parmeggiani B, Leipnitz G, Verdi CM, Santos RCV, Stefani LM, Baldisserotto B. The disturbance of antioxidant/oxidant balance in fish experimentally infected by *Aeromonas caviae*: relationship with disease pathophysiology. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 122: 53–57.
- [19] Liu HJ, Wang X, Yang ZL, Ren LL, Qian TT. Identification and biochemical characterization of the glutathione reductase family from *Populus trichocarpa*. *Plant Science*, 2020, 294: 110459.

- [20] Fan HJ, Tan ZB, Wu YT, Feng XR, Bi YM, Xie LP, Zhang WT, Ming Z, Liu B, Zhou YC. The role of ginsenoside Rb1, a potential natural glutathione reductase agonist, in preventing oxidative stress-induced apoptosis of H9C2 cells. *Journal of Ginseng Research*, 2020, 44(2): 258–266.
- [21] Sun J, Hang Y, Han Y, Zhang X, Gan L, Cai C, Chen ZW, Yang Y, Song QJ, Shao CY, Yang YC, Zhou YS, Wang XD, Cheng CY, Song HH. Deletion of glutaredoxin promotes oxidative tolerance and intracellular infection in *Listeria monocytogenes*. *Virulence*, 2019, 10(1): 910–924.
- [22] Eshwar AK, Guldimann C, Oevermann A, Tasara T. Cold-shock domain family proteins (Csps) are involved in regulation of virulence, cellular aggregation, and flagella-based motility in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 453.
- [23] Gründling A, Burrack LS, Bouwer HGA, Higgins DE. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(33): 12318–12323.
- [24] Kamp HD, Higgins DE. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002153.
- [25] Bigot A, Pagniez H, Botton E, Fréhel C, Dubail I, Jacquet C, Charbit A, Raynaud C. Role of FliF and FliI of *Listeria monocytogenes* in flagellar assembly and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5530–5539.
- [26] Shen A, Higgins DE, and Panne D. Recognition of AT-rich DNA binding sites by the MogR repressor [J]. *Structure*, 2009, 17(5): 769–77.
- [27] Kamp HD, Higgins DE. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the GmaR antirepressor governs temperature-dependent control of flagellar motility in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(2): 421–435.
- [28] Zhang T, Bae D, Wang C. *Listeria monocytogenes* DNA glycosylase AdIP affects flagellar motility, biofilm formation, virulence, and stress responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(17): 5144–5152.
- [29] Shen A, Higgins DE. The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(4): e30.
- [30] Gueriri I, Cyncynatus C, Dubrac S, Arana AT, Dussurget O, Msadek T. The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 8): 2251–2264.
- [31] Gueriri I, Bay S, Dubrac S, Cyncynatus C, Msadek T. The Pta-AckA pathway controlling acetyl phosphate levels and the phosphorylation state of the DegU orphan response regulator both play a role in regulating *Listeria monocytogenes* motility and chemotaxis. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(6): 1342–1357.
- [32] Cheng CY, Wang H, Ma TT, Han X, Yang YC, Sun J, Chen ZW, Yu HF, Hang Y, Liu FD, Fang WH, Jiang LL, Cai C, Song HH. Flagellar basal body structural proteins FlhB, FliM, and FliY are required for flagellar-associated protein expression in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 208.
- [33] Reniere ML. Reduce, induce, thrive: bacterial redox sensing during pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(17): e00128–18.
- [34] Zhang YN, Zhang C, Du X, Zhou Y, Kong WN, Lau GW, Chen GK, Kohli GS, Yang L, Wang TT, Liang HH. Glutathione activates type III secretion system through vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 164.
- [35] Wang J, Pan S, Berk BC. Glutaredoxin mediates akt and eNOS activation by flow in a glutathione reductase-dependent manner. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2007, 27(6): 1283–1288.
- [36] Li KY, Hein S, Zou WX, Klug G. The glutathione-glutaredoxin system in *Rhodobacter capsulatus*: part of a complex regulatory network controlling defense against oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(20): 6800–6808.
- [37] Kim VY, Batty A, Li JH, Kirk SG, Crowell SA, Jin Y, Tang J, Zhang J, Rogers LK, Deng HX, Nelin LD, Liu YS. Glutathione reductase promotes fungal clearance and suppresses inflammation during systemic *Candida albicans* infection in mice. *The Journal of Immunology*, 2019, 203(8): 2239–2251.
- [38] Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 17(8): 1124–1160.

Characterization of the glutathione reductase from *Listeria monocytogenes*

Jieting Lv[#], Jing Sun[#], Guanghui Zheng, Yue Han, Jiongze Cheng, Houhui Song^{*}, Changyong Cheng^{*}

Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang Province, China

Abstract: **[Objective]** The important foodborne bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* uses the glutaredoxin (Grx) system to defend the oxidative stress during environmental adaption. Here, we explore biological characteristics of the glutathione reductase (GR) during bacterial infection. **[Methods]** We constructed the *gr* deletion and complementation strains to compare the abilities in bacterial growth, motility, oxidative tolerance and cellular infection. Besides, the *gr* promoter-based fluorescent report system (FRS) was genetically obtained to further study regulation of *gr* by Grx. **[Results]** Our data show that deletion of *gr* did not affect bacterial growth but enhanced the capability of swarming. Additionally, lack of *gr* significantly increased oxidative tolerance of bacteria under Cu²⁺ and Cd²⁺ stress, as well as increased efficiencies of intracellular infection in Caco-2 and RAW264.7 cells. Importantly, transcription of *gr* was negatively regulated by Grx. **[Conclusion]** The glutathione reductase plays a critical role in bacterial flagella-based swarming motility and correlates a regulatory relationship with the Grx system. Also, GR plays a non-classical role in bacterial oxidative resistance and intracellular infection. This study will expand our understanding of the redox regulatory mechanisms exploited by intracellular bacteria during adaption outside the environment and inside the host, which provides novel strategies to prevent and control the foodborne diseases.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, glutathione reductase, swarming motility, oxidative tolerance, bacterial infection

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872620, 31770040, 31972648), by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ19C180001, LQ19C180002, LQ20C010001) and by the Scientific Research Training Program for Undergraduate of Zhejiang A&F University (2020KX0160)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: Changyong Cheng, lamge@zafu.edu.cn; Houhui Song, songhh@zafu.edu.cn

Received: 20 June 2020; Revised: 29 August 2020; Published online: 1 March 2021