



DegU 调控单核细胞增生李斯特菌感染宿主细胞及适应高温的机制研究

毛敏杰[#], 周思[#], 廖俊慧, 李豪杰, 徐加利, 金浩博, 金戈旋, 朱富鑫, 孙静, 宋厚辉, 邓思敏^{*}, 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 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心 浙江省动物医学与健康国际科技合作基地 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州 311300

毛敏杰, 周思, 廖俊慧, 李豪杰, 徐加利, 金浩博, 金戈旋, 朱富鑫, 孙静, 宋厚辉, 邓思敏, 程昌勇. DegU 调控单核细胞增生李斯特菌感染宿主细胞及适应高温的机制研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4726-4737.

MAO Minjie, ZHOU Si, LIAO Junhui, LI Haojie, XU Jiali, JIN Haobo, JIN Gexuan, ZHU Fuxin, SUN Jing, SONG Houhui, DENG Simin, CHENG Changyong. The orphan response regulator DegU regulates host cell infection and high-temperature adaptation of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4726-4737.

摘要: 【目的】本研究旨在探究孤儿调节因子 DegU 在介导单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)宿主感染和高温环境适应性方面的调控机制。【方法】本研究以单增李斯特菌参考菌株 EGD-e、*degU* 基因缺失菌株 $\Delta degU$ 和回补菌株 $C\Delta degU$ 为研究材料, 通过细胞模型、实时荧光定量聚合酶链式反应和凝胶阻滞试验等方法探究 DegU 对单增李斯特菌感染宿主细胞和适应高温的调控机制。【结果】研究结果表明: 缺失 *degU* 后, 单增李斯特菌在 Caco-2 上的黏附和侵袭能力显著降低, 在 RAW264.7 中的增殖能力显著降低, 在 L929 中的空斑形成能力也显著降低; 进一步通过实时荧光定量聚合酶链式反应检测 *degU* 基因缺失后引起的单增李斯特菌毒力因子转录水平变化, 发现多个重要毒力因子转录水平均显著下调; 该试验结果还发现与毒力相关的热应激基因 *clpE* (受 CtsR 抑制的 ATP 依赖蛋白水解酶编码基因)转录水平显著升高, 而在 43°C 高温条件下, *clpE* 转录水平显著降低; 进一步通过凝胶阻滞试验结果表明 DegU 能够与 *clpE* 的启动子直接结合。【结论】综合所

资助项目: 浙江省自然科学基金(LQ21C180001, LY23C180002); 国家自然科学基金(32002317, 32172849, 31972648); 全国大学生创新创业训练项目(202010341043); 浙江农林大学人才启动科研发展基金(2019FR035)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ21C180001, LY23C180002), the National Natural Science Foundation of China (32002317, 32172849, 31972648), the Scientific Research Training Program for National Undergraduate (202010341043), and the Zhejiang A&F University Talents Starting Program (2019FR035).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. CHENG Changyong, Tel: +86-571-63745865, E-mail: lamge@zafu.edu.cn;

DENG Simin, E-mail: dengsm@zafu.edu.cn

Received: 2023-04-29; Accepted: 2023-07-17; Published online: 2023-08-02

述, *degU* 基因缺失能够降低单增李斯特菌在宿主感染过程中的细胞黏附、侵袭、胞内增殖和胞间迁移能力; DegU 能够与 *clpE* 启动子结合, 直接调控 *clpE* 基因的转录水平来适应高温环境。该研究为进一步深入解析单增李斯特菌的宿主感染和环境适应性机制奠定了试验基础。

关键词: 单增李斯特菌; 孤儿调节因子 DegU; 宿主细胞感染; 毒力因子; 高温适应

The orphan response regulator DegU regulates host cell infection and high-temperature adaptation of *Listeria monocytogenes*

MAO Minjie[#], ZHOU Si[#], LIAO Junhui, LI Haojie, XU Jiali, JIN Haobo, JIN Gexuan, ZHU Fuxin, SUN Jing, SONG Houhui, DENG Simin^{*}, CHENG Changyong^{*}

Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Animal Science and Technology·College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Listeria monocytogenes* is a food-borne bacterial pathogen that is widely distributed in the environment. This study aims to investigate the regulatory role of the orphan response regulator DegU in the infection and high-temperature adaptation of *L. monocytogenes*. **[Methods]** The regulatory roles of DegU in three strains including wild-type EGD-e, $\Delta degU$, and $C\Delta degU$ of *L. monocytogenes* were studied. The infection models established with human epithelial cell line Caco-2, mouse RAW264.7 macrophages, and murine fibroblast L929, real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were employed to investigate the roles of DegU in the infection and high-temperature adaptation. **[Results]** Compared with wild-type EGD-e, $\Delta degU$ showed weakened abilities to adhere, invade, proliferate, and migrate between host cells. The RT-qPCR results revealed that the transcription levels of the multiple virulence factors were down-regulated while that of *clpE* was up-regulated in $\Delta degU$. However, the transcription level of *clpE* was down-regulated at 43 °C. Moreover, EMSA demonstrated that DegU bound directly with the promoter of *clpE*. **[Conclusion]** DegU plays a vital role in adhesion, invasion, proliferation, and migration of *L. monocytogenes*. Additionally, DegU directly binds with the promoter and regulates the transcriptional level of *clpE* to adapt to the high-temperature environment. The findings provide a basis for probing into the infection and environmental adaptation mechanisms of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; orphan response regulator DegU; infection in host cells; virulence factors; high-temperature adaptation

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*), 简称单增李斯特菌, 是一种重

要的革兰阳性食源性致病菌, 普遍存在于各种环境和动物宿主中^[1-2], 免疫功能低下者、孕妇

和新生儿对其易感^[3]。当摄入被污染的食物后,单增李斯特菌通过表达重要的毒力因子:内化素 A (internalin A, InlA)和 B (internalin B, InlB)、李斯特菌溶血素 O (listeriolysin O, LLO)、肌动蛋白 A (actin assembly-inducing protein, ActA)、磷酸酯酶 C [phospholipase A (PlcA)和 phospholipase B (PlcB)]和金属蛋白酶等介导靶细胞的黏附、内化、细胞内增殖和宿主细胞间的传播等环节^[4-5],突破肠道屏障后随淋巴和血液进入肝脏和脾脏,甚至穿越血脑屏障和胎盘屏障,从而引发脑膜炎、败血症和孕妇早产、流产或死产等一系列的症状^[6]。该菌已成为食源性微生物引起食物中毒的第三大死亡原因,具有感染率低、死亡率高等特征,其死亡率高达 20%–30%^[7]。

单增李斯特菌具有较强的环境适应能力,能耐受酸、活性氧、高渗透压、低温和高温等环境应激^[8],该菌对环境变化的感知和响应能力对其生存和致病性至关重要^[9]。细菌双组分调控系统(two-component regulatory system, TCS)是细菌中广泛存在的信号转导机制,通过感知外界环境刺激作出反馈并调控细菌中重要的生物学功能^[10]。组氨酸激酶(degradative enzyme synthesis, DegS)/同源反应调节子 DegU 是枯草芽孢杆菌中的一种多效双组分系统,参与控制趋化性、运动性、降解酶产生和环境适应性等生物学过程^[11]。在单增李斯特菌中缺乏组氨酸激酶传感器 DegS,因此 DegU 被认为是孤儿调节因子。尽管缺乏组氨酸激酶传感器 DegS,孤儿调节因子 DegU 在调控单增李斯特菌的生长、运动性、鞭毛形成、热应激耐受和毒力等方面发挥重要的作用^[12-15]。当细菌暴露在极端高温条件下时,高温可以改变蛋白质的空间结构使其变性,并导致细菌死亡;细菌也会立即诱导热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)合成增强其热应激耐受性,并在蛋白质折叠、组装、修复和防止导致细菌死亡的蛋白质聚集体

形成方面发挥重要的作用^[16]。

前期研究发现, *degU* 基因缺失使单增李斯特菌的热应激耐受能力显著减弱且半数致死量(lethal dose, LD_{50})上升 11 倍^[13,17], DegU 是如何调控宿主感染过程来影响毒力的呢?在单增李斯特菌中,受应激调节因子(class three stress gene repressor, CtsR)负调控的第 3 类热休克蛋白 ATP 依赖蛋白水解酶(caseinolytic protease, Clp),包括 ClpC、ClpP 和 ClpE,是逆境生存和胞内生长所必需的^[18-19]。因此,本研究以单增李斯特菌 EGD-e、*degU* 基因缺失株和回补菌株为研究材料,拟通过细胞模型、实时荧光定量聚合酶链式反应(real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)和凝胶迁移阻滞试验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)来探究 DegU 在单增李斯特菌感染宿主细胞和适应高温环境中的调控作用和机制。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞及培养条件

本研究所用的菌株单增李斯特菌参考菌株 EGD-e、*degU* 基因缺失菌株和回补菌株^[15],大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 *E. coli* BL21 均为本实验室保存。本研究涉及细胞:人肠上皮细胞 Caco-2、小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠成纤维细胞 L929 均为本实验室保存。单增李斯特菌使用牛脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)肉汤培养基在 37 °C 进行常规振荡培养。*E. coli* 使用肉汤培养基(Luria-Bertani, LB)进行 37 °C 振荡培养。Caco-2 细胞培养于添加 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 1640 培养基中;RAW264.7 细胞和 L929 细胞培养于添加 10% FBS 的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)培养基中,上述细胞均在含有 5% CO₂ 的 37 °C 细胞恒温培养箱中静置培养。

1.2 试剂

BHI 和 LB 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司和生工生物工程(上海)股份有限公司;

Trizol Reagent 试剂购自 Thermo Fisher 公司; 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; EMSA 探针生物素标记试剂盒、化学发光法 EMSA 试剂盒和正电荷尼龙膜购自上海碧云天生物技术有限公司; HiScript II Q RT SuperMix for qRT-PCR (+gDNA wiper)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 引物

本试验引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.4 单增李斯特菌在 Caco-2 细胞上的黏附和侵袭试验

取 1 mL 过夜培养的单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 菌液 1:100 转接到 BHI 新鲜培养

基中培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 然后用 10 mmol/L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次后用 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 细胞培养基倍比稀释菌液, 最终以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10:1 感染人肠上皮细胞 Caco-2 (细胞铺板密度约为 2×10^5 个/mL)。黏附: 37 °C, 5% CO_2 感染 30 min, 此时记作 0 h, 用 10 mmol/L PBS 洗涤 3 次细胞, 每孔加入预冷的胰蛋白酶消化液(trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid, trypsin-EDTA, 0.25%)裂解 10 min, 充分吹打混匀裂解细胞后进行稀释计数; 侵袭: 其余孔继续培养 1.5 h, 加入含终浓度 50 μ g/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 细胞培养基, 37 °C, 5% CO_2 作用 30 min 杀死胞外细菌后, 裂解细胞稀释计数, 处理方法同上。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
16S rRNA-RT-fwd	TGAAATGCGTAGATATGTGGAGG
16S rRNA-RT-rev	ATCGTTTACGGCGTGGACTA
<i>plcA</i> -RT-F	CGAGCAAAACAGCAACGATAG
<i>plcA</i> -RT-R	CGTGTCAGTTCTGGGAGTAGTGTA
<i>plcB</i> -RT-F	ATCATACCCTCCAGGCTACCA
<i>plcB</i> -RT-R	CGCCCTTTTCGCATTTTC
<i>inlA</i> -RT-F	GGTCTCACAAACAGATCTAGACCAAGT
<i>inlA</i> -RT-R	GTTGATTATTGCTGAAATTTATTTGTG
<i>inlB</i> -RT-F	GAGACTATCACCGTGCCAACG
<i>inlB</i> -RT-R	TTTGTGTCATCTGTGCACAC
<i>actA</i> -RT-F	CAGCAGATGAGTCTTACCACA
<i>actA</i> -RT-R	CCATTTCCCCGCATCTTTTA
<i>hly</i> -RT-F	TCACATCGTCCATCTATTTGCC
<i>hly</i> -RT-R	ATTACCGTTCTCCACCATTCC
<i>mpl</i> -RT-F	CAGCAAGGACAGCTTAGGATTAC
<i>mpl</i> -RT-R	CTTTCCTGTTTCCGACATA
<i>clpE</i> -RT-F	ACGGCAGTTTTACCAACACC
<i>clpE</i> -RT-R	AACCAAGCAAACCGTGAACA
<i>prfA</i> -RT-F	AGCTTGGCTCTATTTGCGGT
<i>prfA</i> -RT-R	GCTATGTGCGATGCCACTTG
<i>clpE</i> -QDZ-F	CTAGTCTAGAATATAATTCCTCCTTTTAAAAATG
<i>clpE</i> -QDZ-R	CGGGAATTCAAATAGCACAAAAACGTTCCCTTTAT

1.5 胞内增殖试验

取 1 mL 过夜培养的单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 菌液 1:100 转接到新鲜 BHI 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 然后用 10 mmol/L PBS 洗涤 2 次后用 DMEM 培养基倍比稀释菌液, 最终以 MOI=10:1 感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 (细胞铺板密度约为 2×10^5 个/mL)。在感染后 30 min 用添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基 37 °C 处理细胞 30 min 以杀灭胞外细菌。处理后用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 此时记为细菌内增殖 0 h, 随后用添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基(添加 10% FBS)继续培养 2、5 和 8 h。将培养各时间段后的细胞裂解后进行细胞计数。

1.6 细菌空斑试验

取 1 mL 过夜培养的单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 菌液 1:100 转接到新鲜 BHI 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 以 MOI=1:5 感染小鼠成纤维细胞 L929 (细胞铺板密度约为 1×10^6 个/mL), 感染上菌液后, 不同角度水平晃动培养板, 使分布均匀, 每 15 min 晃动 1 次, 37 °C, 5% CO_2 条件下培养 1 h; 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入含终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 细胞培养基, 37 °C, 5% CO_2 继续培养 1 h 杀灭胞外细菌; 覆盖琼脂:10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 3 mL 含终浓度为 0.7% 的低熔点琼脂糖和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的无酚红 DMEM (含 10% FBS) 细胞培养基, 琼脂凝固后, 将 6 孔板倒置于 37 °C (含 5% CO_2) 细胞培养箱中继续培养 3 d 直至看到空斑。固定与染色: 每孔加入 600 μL 40% 甲醛溶液置于 37 °C 培养箱固定 2 h, 倒扣拍掉琼脂, 每孔加入 600 μL 0.5% 的结晶紫溶液, 染色 10 min 后 ddH₂O 冲洗后拍照。

1.7 RT-qPCR

从美国国家生物技术信息中心 (National

Center of Biotechnology Information, NCBI) 基因数据库中下载单增李斯特菌毒力因子编码基因 *actA*、*hly*、*plcA*、*plcB*、*inlA*、*inlB*、*mpl*、*prfA*、热应激耐受相关基因 *clpE* 和内参基因 16S rRNA (*lmo01*) 的序列, 根据荧光定量 PCR 引物设计规则使用 Primer 3 Plus 网站设计实时荧光定量 PCR 引物(引物序列详见表 1)。挑取平板上新鲜的单增李斯特菌单菌落, 转接至 5 mL 新鲜的 BHI 液体培养基, 在 37 °C 或 43 °C 条件下, 200 r/min, 振荡培养 10 h。参照文献进行细菌 RNA 的提取以及反转录^[20], 并定量 EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 的各基因 mRNA 转录水平。

1.8 EMSA

通过 BioCyc 数据库查明 *clpE* 基因为单转录本。用 Snapgene 软件设计引物 *clpE*-QDZ-F/R, 以单增李斯特菌野生株 EGD-e 基因组 (GenBank ID: NC_003210.1) 为模板, 扩增基因 *clpE* (Gene ID: 986780) 的编码序列 (coding sequence, CDS) 区及其上游启动子区域。用 EMSA 探针生物素标记试剂盒标记 DNA 样品, 随后通过 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行分析, 再将凝胶转移到正电荷尼龙膜上, 然后进行紫外线交联, 最后使用化学发光法 EMSA 试剂盒检测迁移条带。

1.9 统计分析

上述结果均使用 CorelDRAW X8 进行图片处理和 GraphpadPrism 8.0 对数据进行显著性方差分析。其中 * 表示 $0.01 < P < 0.05$; ** 表示 $0.001 < P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$; ns 表示 $P > 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 单增李斯特菌缺失 *degU* 基因后黏附和侵袭能力减弱

单增李斯特菌在肠道上皮细胞黏附和侵袭的能力是表征病原菌毒力的一个重要指标^[21]。为模拟 *degU* 在黏附和入侵宿主细胞过程中发挥

的作用, 本试验探究 EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 在 Caco-2 上的黏附和侵袭能力。结果表明, 在单增李斯特菌感染 Caco-2 细胞 0.5 h 时, EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 的黏附率分别为 3.02%、2.03% 和 2.59%。 $degU$ 基因缺失后, $\Delta degU$ 较 EGD-e 相比黏附率下降 32.78% ($0.001 < P < 0.01$) (图 1A)。当感染 Caco-2 细胞 1.5 h 后,

与 EGD-e 和 $C\Delta degU$ 相比, $\Delta degU$ 的侵袭率分别下降 54.23% ($0.001 < P < 0.01$) 和 54.67% ($0.001 < P < 0.01$) (图 1B)。EGD-e 与 $C\Delta degU$ 的黏附率和侵袭率均没有显著性差异。综上所述, 缺失 $degU$ 基因使单增李斯特菌的黏附和侵袭显著减弱, 而回补 $degU$ 基因能够恢复 $\Delta degU$ 在 Caco-2 细胞中的黏附和侵袭能力。

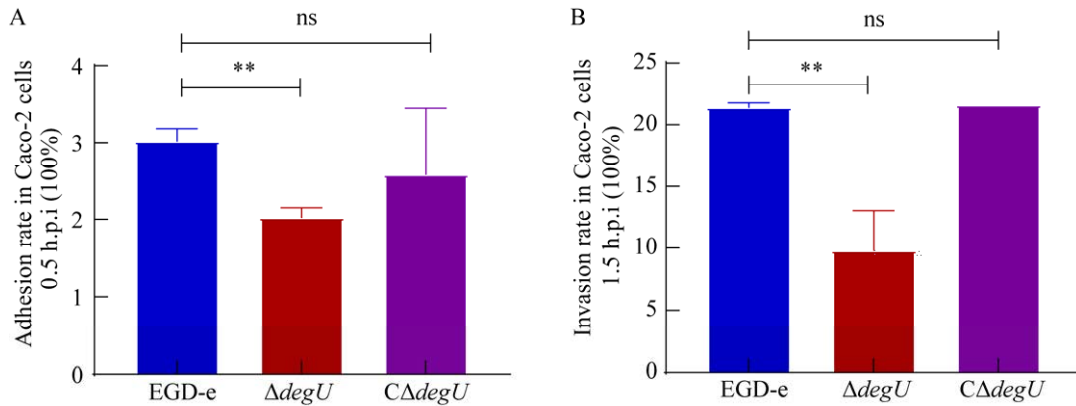


图 1 EGD-e、 $degU$ 缺失株和回补株感染 Caco-2 细胞后的黏附(A)和侵袭能力(B)比较

Figure 1 Comparison of adhesion (A) and invasion (B) ability among *Listeria monocytogenes* EGD-e, $degU$ gene deletion and complementary strains in Caco-2 cells. **: $0.001 < P < 0.01$; ns: $P > 0.05$.

2.2 单增李斯特菌缺失 $degU$ 基因后胞内增殖能力减弱

为进一步探索单增李斯特菌在宿主体内耐受免疫细胞清除从而增殖的过程, 感染 RAW264.7 探究 $degU$ 在细菌胞内增殖中的作用。结果表明, 单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 在感染细胞后 0.5–8 h, 胞内细菌量菌呈现明显的增长, 但增长趋势各不相同; 与 EGD-e 相比, $\Delta degU$ 的胞内细菌量在 0.5、2、5 和 8 h 分别下降 63.41% ($0.001 < P < 0.01$)、86.84% ($0.001 < P < 0.01$)、96.92% ($0.01 < P < 0.05$) 和 95.24% ($0.01 < P < 0.05$); EGD-e 和 $C\Delta degU$ 的细菌增殖量没有显著性差异(图 2)。综上所述, 结果表明, 缺失 $degU$ 基因导致单增李斯特菌在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的胞内增殖能力显著降低。

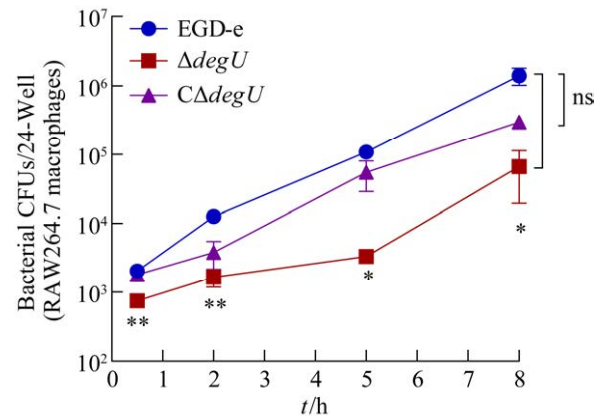


图 2 EGD-e、 $degU$ 缺失株和回补株感染 RAW264.7 细胞后的增殖能力比较

Figure 2 Comparison of proliferation ability of *Listeria monocytogenes* EGD-e, $degU$ gene deletion and complementary strains in RAW264.7 cells. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ns: $P > 0.05$.

2.3 单增李斯特菌缺失 *degU* 基因后胞间迁移能力减弱

单增李斯特菌作为一种胞内寄生菌，在感染过程中其细胞间迁移能力是至关重要的。通过细菌空斑试验进一步探究 DegU 对单增李斯特菌在细胞间传播的影响。结果表明， $\Delta degU$ 中细菌感染形成的空斑直径与 EGD-e 和 $C\Delta degU$ 相比分别缩小 30.67% ($P < 0.001$) 和 26.16% ($P < 0.001$)，而 EGD-e 和 $C\Delta degU$ 形成的空斑直径无显著性差异(图 3A、3B)；EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 感染形成的空斑数量无显著差异(图 3A、3C)。综上所述，单增李斯特菌缺失 *degU* 基因后在细胞间的迁移能力显著减弱。

2.4 *degU* 基因缺失的单增李斯特菌毒力相关因子转录水平降低

细胞模型明确了 DegU 在单增李斯特菌宿主感染的黏附、侵袭、胞内增殖和胞间迁移过程中的作用。在上述过程中，有重要的毒力因子 InlA、InlB、PlcA、PlcB、LLO、ActA、PrfA 和 Mpl 等参与。本研究利用 RT-qPCR 检测相应毒力基因的转录水平，结果表明，与单增李斯特菌 EGD-e 相比， $\Delta degU$ 的 *actA*、*plcA*、*plcB* 和 *inlA* 的基因转录水平均显著下调，分别下调 2.7、1.6、4.9 和 2.4 倍(图 4)。综上所述，单增李斯特菌缺失 *degU* 基因后重要毒力基因 *actA*、*plcA*、*plcB* 和 *inlA* 的转录水平显著降低。

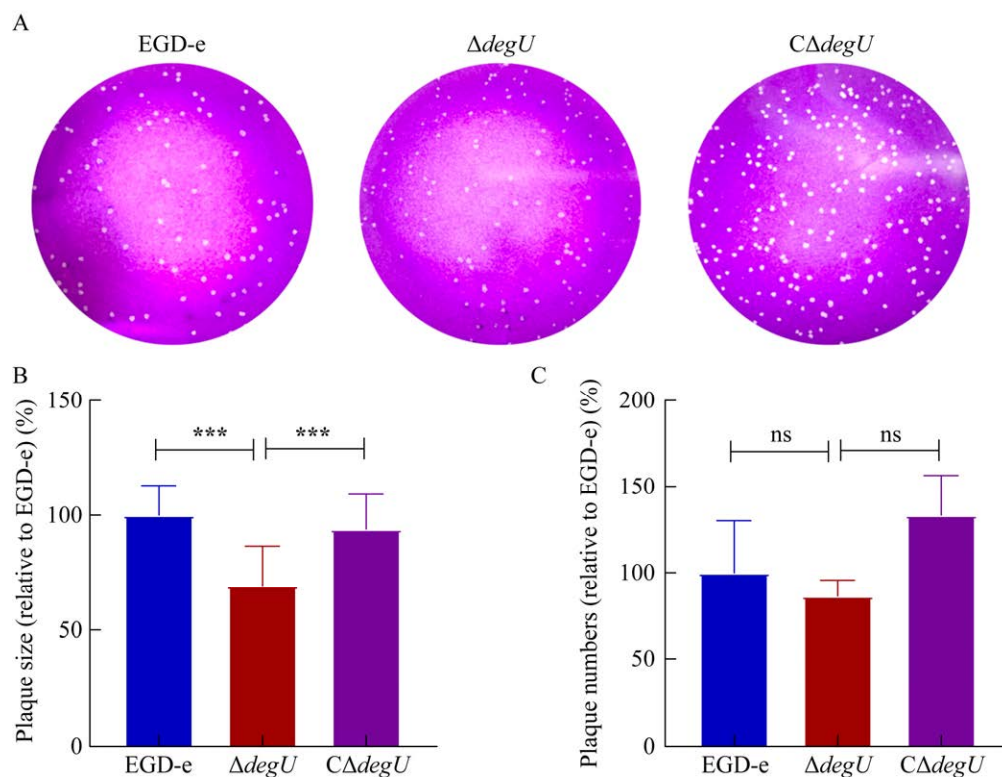


图 3 EGD-e、*degU* 缺失株和回补株感染 L929 细胞后的胞间迁移能力比较

Figure 3 Comparison of intercellular migration ability in L929 cells infected with *Listeria monocytogenes* EGD-e, *degU* gene deletion and complementary strains. A: Plaque formation in L929 cells after infected with *L. monocytogenes*. B: Plaque size. C: Plaque numbers. ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

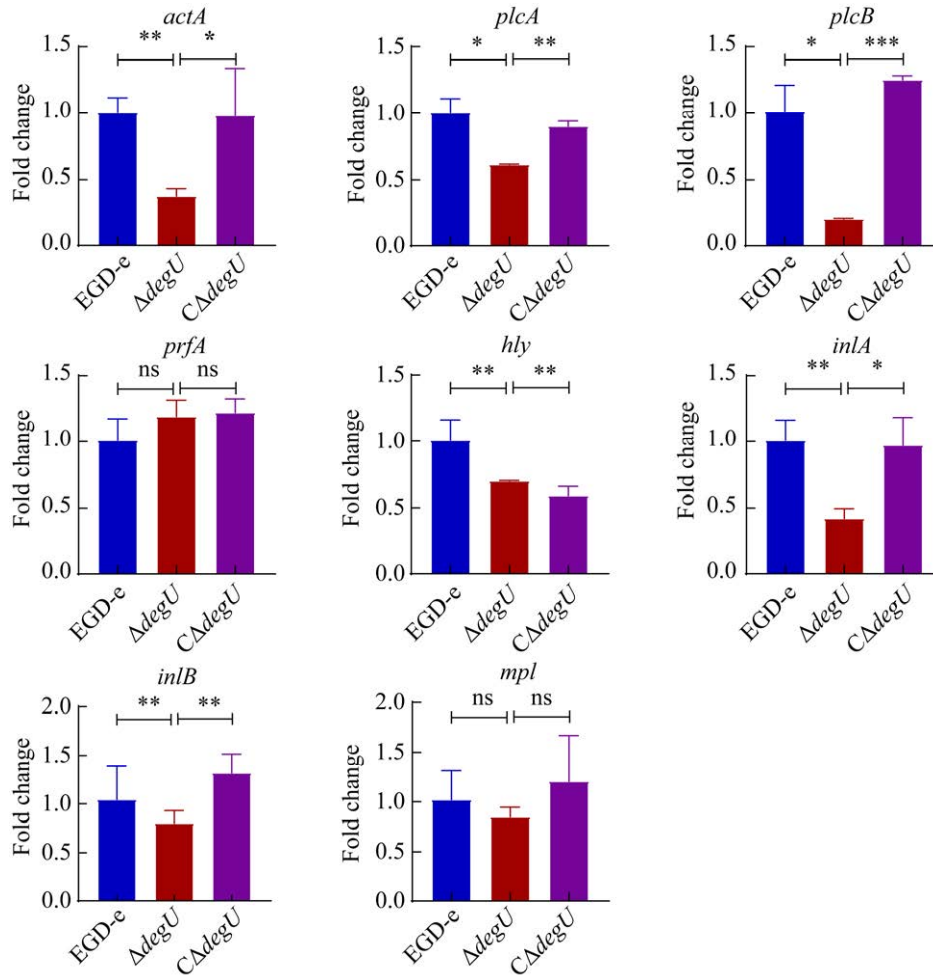


图 4 EGD-e、 $\Delta degU$ 和 $C\Delta degU$ 中毒力相关基因的转录水平差异

Figure 4 The transcription level of virulence factors in *Listeria monocytogenes* EGD-e, *degU* gene deletion and complementary strains. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

2.5 DegU 直接结合 *clpE* 调控单增李斯特菌的高温适应能力

前期研究发现, 在 $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温条件下, 缺失 *degU* 基因后单增李斯特菌的生长受到显著抑制; DegU 调控 *hrcA*、*grpE*、*dnaK*、*dnaJ*^[15] 和 *ctsR*^[22] 热应激相关基因, 从而调节单增李斯特菌在高温中的适应能力。为了探究 DegU 与受 CtsR 抑制的 *clpE* 基因之间的调控关系, 本研究采用 EMSA 方法检测 DegU 蛋白能否直接与 *clpE* 基因启动子区结合, 以 $0\text{--}16\text{ pmol/L}$ 设置 5 个梯度的 DegU 蛋白与生物素标记的 *clpE* 基因启动子区结合。结果

表明, 在 *clpE* 基因启动子区观察到明显的条带迁移, 且随着蛋白量的增加条带显著上移, 说明 DegU 量的增加促进了 *clpE* 基因启动子区结合(图 5A)。进一步利用 RT-qPCR 方法检测 *degU* 基因缺失对单增李斯特菌 *clpE* 基因在不同温度下转录水平的影响。结果发现, 在 $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热应激条件下, $\Delta degU$ 中 *clpE* 的转录水平较 EGD-e 和 $C\Delta degU$ 显著降低(图 5B); 而在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理条件下, *clpE* 在 $\Delta degU$ 中的转录水平与 EGD-e 相比上调 64.4 倍(图 5C)。综上所述, DegU 能够与基因 *clpE* 的启动子区结合, 从而直接调控 *clpE* 在不同温度下的转录水平。

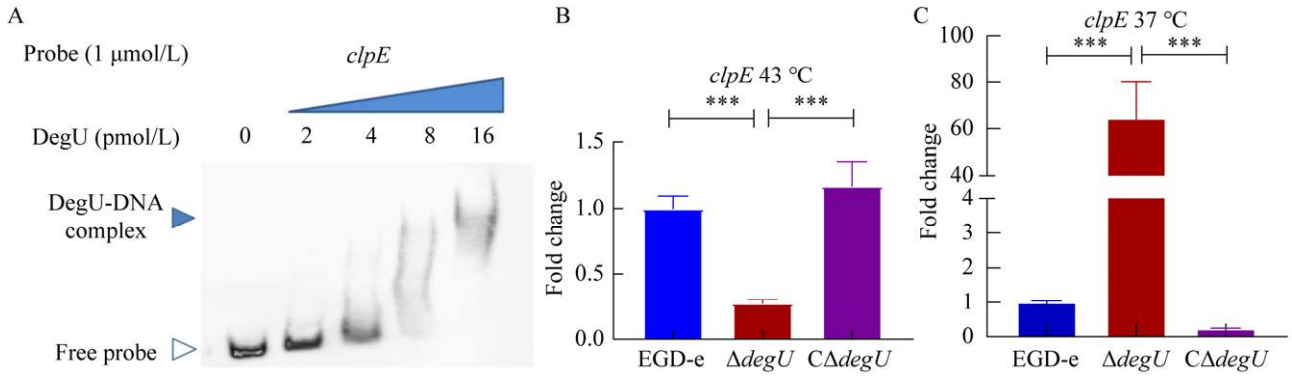


图 5 DegU 直接结合 *clpE* 调控单增李斯特菌的高温适应能力

Figure 5 DegU directly regulates the high-temperature adaption by binding with the promoter of *clpE*. A: The binding ability between DegU and promoter region of *clpE* analyzed by EMSA. B, C: The transcription level of *clpE* in *Listeria monocytogenes* EGD-e, *degU* gene deletion and complementary strains at 43 °C and 37 °C. ***: $P < 0.001$.

3 讨论与结论

单增李斯特菌孤儿调节因子 DegU 与枯草芽孢杆菌 DegU 高度同源，在细菌运动性、毒力、生物被膜形成和热应激耐受等方面发挥重要调控作用^[13,15]。当人或动物食用受污染的食物后，单增李斯特菌进入宿主消化道，并在肠道内定殖，随后通过 InlA 和 InlB 进入胞内^[23]，在 PlcA、PlcB 和 LLO^[24]的共同作用下将吞噬泡裂解从而进入宿主细胞的胞质环境，在宿主细胞胞质内完成增殖后通过 ActA 招募宿主细胞的骨架蛋白聚集成彗星样尾巴并带动细菌在胞质内运动^[25]，从而有效逃逸吞噬泡的吞噬，并扩散到邻近细胞进行周而复始的感染^[21]。

Gueriri 等通过小鼠模型确定单增李斯特菌 *degU* 基因缺失使 LD_{50} 较 EGD-e 增加 11 倍；小鼠存活试验显示感染缺失株 Δ*degU* 的小鼠存活率显著高于感染单增李斯特菌 EGD-e 的小鼠，表明 DegU 对单增李斯特菌的毒力有重要调控作用^[13]。本研究通过细胞模型进一步模拟多效调节因子 DegU 介导细菌感染宿主的过程。单增李斯特菌 *degU* 缺失后使其在 Caco-2 细胞中的

黏附和侵袭能力、在 RAW264.7 中的增殖能力和在 L929 中的迁移能力均显著降低(图 1-3)。进一步通过 RT-qPCR 发现 *degU* 缺失后单增李斯特菌毒力基因 *actA*、*plcA*、*plcB* 和 *inlA* 均显著下调，表明其可能是通过下调 PrfA 依赖的毒力基因的转录水平来降低细胞感染能力(图 4)。此外，在 37 °C 条件下，与细菌毒力相关的 ATP 依赖水解酶编码基因 *clpE* 在 Δ*degU* 中的转录水平显著升高($0.001 < P < 0.01$) (图 5C)。研究发现，表面毒力相关蛋白 SvpA 失活会导致细菌毒力下降，并且该毒力相关蛋白受 ATP 酶 ClpP 和 ClpC 负调控^[19,26]，说明非 PrfA 依赖的 SvpA 也在单增李斯特菌的毒力调控中起重要作用。单增李斯特菌 *ctsR*Δ*Gly* 突变菌株，在 ClpP 和 ClpC 表达增加的情况下表现出毒性降低的情况^[19]，说明单增李斯特菌可能通过 ClpP 和 ClpC 的表达量增加来降低毒力。然而，还有一些研究表明 Clp 的减少与毒力降低有关。Gaillot 等证明 *clpP* 基因的缺失会降低单增李斯特菌毒力，而与回补 *clpP* 基因则会恢复毒力^[27]；*clpC* 和 *clpE* 失活后，单增李斯特菌的毒力也减弱^[28-29]；*ctsR* 缺失菌株被认为过表达 Clp 蛋白，但具有与

野生型相同的毒力^[18]。有趣的是, 有证据表明 PrfA 与第 3 类热休克蛋白对毒力存在交叉调控, 如 PrfA 的过量产生会下调 ClpC 的产生^[30], ClpC 通过调节进入宿主细胞所需的毒力因子 InlA、InlB 和 ActA 的表达来影响黏附和侵袭^[31], 但交叉调控的机制尚不清楚。因此, *degU* 基因缺失的单增李斯特菌可能通过下调 PrfA 依赖的毒力基因 *actA*、*plcA*、*plcB* 和 *inlA* 的转录水平来降低细胞感染能力, 从而减弱其毒力。而 *degU* 基因缺失导致单增李斯特菌毒力降低与 *clpE* 转录水平上调之间是否存在调控关系以及调控的机制都值得进一步研究。

单增李斯特菌的热应激耐受与 3 类热休克蛋白 HSPs 有关: 受 HrcA 抑制的伴侣蛋白, 由 DnaK、DnaJ、GroES 和 GroEL 组成, 其主要辅助热变性多肽重新折叠成活性蛋白^[32-33]; 受 σ B 调控的一般应激反应蛋白^[34]; ATP 依赖蛋白水解酶 Clp, 参与错误折叠蛋白的蛋白分解^[35-36]。本研究发现, DegU 可以直接与 *clpE* 启动子结合介导高温适应(图 5A)。在 37 °C 下, ATP 依赖水解酶编码基因 *clpE* 在 $\Delta degU$ 中的转录水平显著升高(0.001 < P < 0.01) (图 5C); 在 43 °C 下, *clpE* 在 $\Delta degU$ 中的转录水平显著降低(0.001 < P < 0.01) (图 5B), 说明 DegU 通过直接调控 *clpE* 的转录水平来适应环境温度变化。据文献报道在低温(<30 °C)和 37 °C 条件下, CtsR 都会阻止非必须的应激蛋白的合成, 包括 ClpC、ClpP 和 ClpE, 直到环境变化(热、氧化和营养缺陷等)时才会强烈诱导应激相关基因的转录^[18,28]。因此, 在 43 °C 下, *degU* 缺失导致 *clpE* 转录水平显著降低, 从而降低其在高温环境中的生存能力。因此, 虽然 DegU 在低温、适温和高温条件下表达水平不发生改变^[12], 但 DegU 能够通过直接激活 *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* 操纵子^[15]、*ctsR*^[22]和 *clpE* 来调控单增李斯特菌在高温下的生存能力^[15]。

综上, 本研究通过细胞模型、RT-qPCR 和 EMSA 等技术深入解析了 DegU 调控单增李斯特菌的毒力的机制, 同时首次发现 DegU 通过直接调控 *clpE* 介导单增李斯特菌的高温适应能力。该研究结果为深入理解细菌环境适应性与其毒力之间的调节关系奠定了基础, 对于进一步完善李斯特菌防控策略具有深远意义。

参考文献

- [1] WANG Y, LU L, LAN RT, SALAZAR JK, LIU JL, XU JG, YE CY. Isolation and characterization of *Listeria* species from rodents in natural environments in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(6): e44.
- [2] ZHAO Q, HU P, LI QQ, ZHANG SS, LI HX, CHANG J, JIANG QJ, ZHENG Y, LI YS, LIU ZS, REN HL, LU SY. Prevalence and transmission characteristics of *Listeria* species from ruminants in farm and slaughtering environments in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 356-364.
- [3] WITTER AR, OKUNNU BM, BERG RE. The essential role of neutrophils during infection with the intracellular bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Immunology*, 2016, 197(5): 1557-1565.
- [4] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 32-46.
- [5] PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth[J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(6): GPP3-0013-2018.
- [6] TIENSUU T, GUERREIRO DN, OLIVEIRA AH, O'BYRNE C, JOHANSSON J. Flick of a switch: regulatory mechanisms allowing *Listeria monocytogenes* to transition from a saprophyte to a killer[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2019, 165(8): 819-833.
- [7] DISSON O, MOURA A, LECUIT M. Making sense of the biodiversity and virulence of *Listeria monocytogenes*[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(9): 811-822.
- [8] WALES AD, DAVIES RH. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its

- relevance to foodborne pathogens[J]. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 2015, 4(4): 567-604.
- [9] SIBANDA T, BUYS EM. *Listeria monocytogenes* pathogenesis: the role of stress adaptation[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(8): 1522.
- [10] KÜHN S, ENNINGA J. The actin comet guides the way: how *Listeria* actin subversion has impacted cell biology, infection biology and structural biology[J]. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(4): e13190.
- [11] GUPTA M, RAO KK. Phosphorylation of DegU is essential for activation of *amyE* expression in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biosciences*, 2014, 39(5): 747-752.
- [12] KNUDSEN GM, OLSEN JE, DONS L. Characterization of DegU, a response regulator in *Listeria monocytogenes*, involved in regulation of motility and contributes to virulence[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240(2): 171-179.
- [13] 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[J]. *Microbiology*, 2008, 154(8): 2251-2264.
- [14] 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[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(6): 1342-1357.
- [15] CHENG CY, LIU F, JIN HB, XU XF, XU JL, DENG SM, XIA J, HAN Y, LEI L, ZHANG X, SONG HH. The DegU orphan response regulator contributes to heat stress resistance in *Listeria monocytogenes*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 761335.
- [16] SCHUMANN W. Regulation of bacterial heat shock stimulons[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2016, 21(6): 959-968.
- [17] WILLIAMS T, JOSEPH B, BEIER D, GOEBEL W, KUHN M. Response regulator DegU of *Listeria monocytogenes* regulates the expression of flagella-specific genes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 252(2): 287-298.
- [18] NAIR S, DERRE I, MSADEK T, GAILLOT O, BERCHE P. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(4): 800-811.
- [19] KARATZAS KAG, WOUTERS JA, GAHAN CGM, HILL C, ABEE T, BENNIK MHJ. The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(5): 1227-1238.
- [20] CHENG CY, HAN X, XU JL, SUN J, LI K, HAN Y, CHEN MM, SONG HH. YjbH mediates the oxidative stress response and infection by regulating SpxA1 and the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) in *Listeria monocytogenes*[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-19.
- [21] JOHANSSON J, FREITAG NE. Regulation of *Listeria monocytogenes* virulence[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(4): GPP3-0064-2019.
- [22] 金浩博, 徐加利, 郑晨煦, 邓思敏, 程昌勇, 江玲丽, 宋厚辉. 单增李斯特菌 DegU 直接调控 CtsR 介导温度适应的研究[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(5): 986-992.
- JIN HB, XU JL, ZHENG CX, DENG SM, CHENG CY, JIANG LL, SONG HH. *Listeria monocytogenes* DegU directly regulates the CtsR to mediate temperature adaption[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(5): 986-992 (in Chinese).
- [23] BONAZZI M, LECUIT M, COSSART P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009, 1(4): a003087.
- [24] HAMON MA, RIBET D, STAVRU F, COSSART P. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(8): 360-368.
- [25] PILLICH H, PURI M, CHAKRABORTY T. ActA of *Listeria monocytogenes* and its manifold activities as an important listerial virulence factor[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 399: 113-132.
- [26] BOREZÉE E, PELLEGRINI E, BERETTI JL, BERCHE P. SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology*, 2001, 147(11): 2913-2923.
- [27] GAILLOT O, PELLEGRINI E, BREGENHOLT S, NAIR S, BERCHE P. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(6): 1286-1294.

- [28] ROUQUETTE C, RIPIO MT, PELLEGRINI E, BOLLA JM, TASCONE RI, VÁZQUEZ-BOLAND JA, BERCHE P. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(5): 977-987.
- [29] NAIR S, FREHEL C, NGUYEN L, ESCUYER V, BERCHE P. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 31(1): 185-196.
- [30] RIPIO MT, VÁZQUEZ-BOLAND JA, VEGA Y, NAIR S, BERCHE P. Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 158(1): 45-50.
- [31] NAIR S, MILOHANIC E, BERCHE P. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(12): 7061-7068.
- [32] GAHAN CG, O'MAHONY J, HILL C. Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating *in vivo* expression[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(6): 3924-3932.
- [33] van der VEEN S, ABEE T. HrcA and DnaK are important for static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance in *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(12): 3782-3790.
- [34] RONCARATI D, SCARLATO V. Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(4): 549-574.
- [35] BUCUR FI, GRIGORE-GURGU L, CRAUWELS P, RIEDEL CU, NICOLAU AI. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2700.
- [36] van der VEEN S, HAIN T, WOUTERS JA, HOSSAIN H, de VOS WM, ABEE T, CHAKRABORTY T, WELLS-BENNIK MHJ. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response[J]. *Microbiology*, 2007, 153(10): 3593-3607.