

单核增生李斯特氏菌信息素脂蛋白 PplA 介导的细菌感染机制

刘郁匆^{1#}, 杨立锋^{2#}, 任耿佳¹, 桑琴嘉¹, 宋厚辉¹, 孙静¹, 江玲丽²,
程昌勇^{1*}, 陈绵绵^{1*}

- 1 浙江农林大学 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, 同一健康和食品安全“一带一路”国际联合实验室, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州
- 2 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波

刘郁匆, 杨立锋, 任耿佳, 桑琴嘉, 宋厚辉, 孙静, 江玲丽, 程昌勇, 陈绵绵. 单核增生李斯特氏菌信息素脂蛋白 PplA 介导的细菌感染机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3540-3551.

LIU Yucong, YANG Lifeng, REN Gengjia, SANG Qinjia, SONG Houhui, SUN Jing, JIANG Lingli, CHENG Changyong, CHEN Mianmian. Mechanisms of bacterial infection mediated by the lipoprotein PplA of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3540-3551.

摘要: 【目的】利用单核增生李斯特氏菌野生株、脂蛋白基因 *pplA* 缺失株和回补株探究 PplA 在单核增生李斯特氏菌感染功能中的作用。【方法】比较野生株、缺失株和回补株在细胞溶血能力、细胞黏附和侵袭能力、胞内增殖能力、胞间迁移能力、小鼠脏器定殖能力、小鼠脏器内细菌毒力因子转录水平和群体感应相关基因转录水平等方面的差异, 从而解析 PplA 在单核增生李斯特氏菌感染宿主中的作用。【结果】缺失 *pplA* 基因后, 单核增生李斯特氏菌的胞内增殖能力和胞间迁移能力无显著差异, 但溶血能力、细胞黏附和侵袭能力、小鼠脏器定殖能力均显著降低, 且小鼠脏器内细菌毒力因子 *plcB*、*hly* 和 *prfA* 的转录水平显著下降。此外, 群体感应相关基因 *agrA*、*agrB*、*agrC* 和 *luxS* 的转录水平也发生了显著变化。【结论】研究表明单核增生李斯特氏菌脂蛋白 PplA 参与细菌毒力调控过程, 显著影响细菌的致病力。

关键词: 单核增生李斯特氏菌; 脂蛋白 PplA; 细胞感染; 毒力调控

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801800); 宁波市自然科学基金(2023J241); 浙江省自然科学基金(LY23C180002)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801800), the Ningbo Natural Science Foundation (2023J241), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY23C180002).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Mianmian, mmchen@zafu.edu.cn; CHENG changyong, lamge@zafu.edu.cn

Received: 2024-11-12; Accepted: 2025-04-30; Published online: 2025-06-11

Mechanisms of bacterial infection mediated by the lipoprotein PplA of *Listeria monocytogenes*

LIU Yucong^{1#}, YANG Lifeng^{2#}, REN Gengjia¹, SANG Qinjia¹, SONG Houhui¹, SUN Jing¹, JIANG Lingli², CHENG Changyong^{1*}, CHEN Mianmian^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Biotechnology on Animal Science & Veterinary Medicine of Zhejiang Province, Zhejiang Engineering Research Center for Veterinary Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, the Belt and Road International Joint Laboratory for One Health and Food Safety, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

² Ningbo College of Health Sciences, Ningbo, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] We employed the wild-type strain of *Listeria monocytogenes*, the lipoprotein gene *pplA*-deleted strain, and the complementary strain to investigate the role of PplA in the infection of *L. monocytogenes*. [Methods] We compared the hemolytic capacity, cell adhesion and invasion, intracellular proliferation, cell-to-cell migration, mouse organ colonization, transcription levels of virulence factors in mouse organs, and transcription levels of quorum sensing-related genes among wild-type, *pplA*-deleted, and complementary strains to explore the role of PplA in the infection of *L. monocytogenes*. [Results] After the deletion of *pplA*, *L. monocytogenes* showed no significant change in intracellular proliferation or cell-to-cell migration. However, its hemolytic capacity, cell adhesion and invasion, mouse organ colonization, and transcription levels of virulence factors such as *plcB*, *hly*, and *prfA* in mouse organs were significantly reduced. Moreover, the transcription levels of quorum sensing-related genes *agrA*, *agrB*, *agrC*, and *luxS* were altered in the *pplA*-deleted strain. [Conclusion] The lipoprotein PplA is involved in the virulence regulation and affects the pathogenicity of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; lipoprotein PplA; cell infection; virulence regulation

单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*), 是一种食源性人畜共患病原菌^[1]。作为一种胞内寄生菌^[2], 单核增生李斯特氏菌生存能力极强, 不仅可以从水和土壤中分离得到^[3], 还特别容易适应人体胃肠道环境, 并耐受酸性、胆汁、渗透压和抗菌肽等变化^[4]。该菌常在食物的储存和运输环节污染食品^[5], 抵抗力较弱的人群感染后很容易患上李斯特菌病^[6], 严重者还会并发败血症、胎儿流产和脑膜炎等疾病, 因此被称为第三大最有害的人畜共患病原体^[7-8]。目前, 单核增生李斯特氏菌在欧洲的感染人数逐年增加,

且具有较高的发病率和致死率^[9]。

单核增生李斯特氏菌主要通过 4 个阶段主动入侵宿主细胞并在细胞内定殖^[10]: 第 1 阶段是黏附与侵袭, 单核增生李斯特氏菌首先黏附并内化至细胞内; 第 2 阶段是在其分泌的毒力因子帮助下进入细胞质; 第 3 阶段是胞内增殖, 单核增生李斯特氏菌在宿主细胞胞质中大量增殖; 第 4 阶段是胞间迁移, 单核增生李斯特氏菌通过形成彗星状尾巴迁移至邻近细胞^[11]。单核增生李斯特氏菌在细胞内的生长和转移主要依赖于转录激活因子 positive regulatory factor A

(PrfA)的调节,在细菌进入宿主细胞后,PrfA能够激活和诱导单核增生李斯特氏菌的毒力基因表达,而 peptide pheromone-encoding lipoprotein A (PplA)是一种能够激活 PrfA 的小分子辅助因子^[12]。PplA 是一种信息素脂蛋白,其N端存在信号肽,可在蛋白酶 Eep 和信号肽酶 SPII 的切割作用下产生多肽信息素 peptide pheromone encoded by peptide pheromone-encoding lipoprotein A (pPplA),从而刺激有助于液泡逃逸的相关基因表达,帮助单核增生李斯特氏菌从宿主吞噬泡中逃逸,并促进 PrfA 的激活^[13]。在革兰阳性菌中,多肽信息素能够直接参与群体感应,改变微生物相互作用的细胞间通讯模式,调节生物膜的形成,影响细胞外酶、代谢物和细胞外多糖等公共物质的分泌以及抗菌物质的合成,从而直接或间接影响微生物群落对不断变化环境的适应性^[14]。然而,目前关于 PplA 如何调控单核增生李斯特氏菌感染机制的研究尚不明确。

本研究利用单核增生李斯特氏菌野生株 EGD-e、缺失株 $\Delta pplA$ 及其回补株,探究 PplA 对单核增生李斯特氏菌溶血能力、细胞黏附和侵袭能力、胞内增殖和胞间迁移能力、小鼠脏器定殖能力以及小鼠脏器内细菌毒力因子转录水平的影响,旨在揭示 PplA 在单核增生李斯特氏菌感染功能中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养条件

本研究所用菌株与细胞均来自本实验室。菌株均由本实验室前期构建,包括单核增生李斯特氏菌野生型菌株 EGD-e、脂蛋白 PplA 缺失株(利用 pKSV7 重组质粒构建,缺失 *pplA* 基因 900 bp 总长的第 13–882 bp)和回补株[携带有 *pplA* 基因及其启动子片段的 pIMK2 重组整合型质粒(卡那霉素抗性)整合至 *pplA* 缺失株基因组];细胞包括 Caco-2、RAW264.7 和 L929 细胞。

EGD-e 和 *pplA* 基因缺失株接种于无抗性脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基中, *pplA* 基因回补株接种于含有卡那霉素抗性的 BHI 培养基中, 37 °C、250 r/min 振荡培养, 人源结肠癌上皮细胞 Caco-2 使用 RPMI 1640 培养基(含 15% FBS)培养, 鼠源巨噬细胞 RAW264.7 和鼠源成纤维细胞系 L929 使用 DMEM 培养基(含 10% FBS)培养^[15], 以上细胞均于 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37 °C 恒温静置培养。

1.1.2 主要试剂和仪器

BHI 培养基购自 Oxoid 公司; 无菌脱纤维羊血购自南京森贝伽生物科技公司; DMEM 细胞培养基购自 Sigma-Aldrich 公司; RPMI 1640 细胞培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自赛默飞世尔科技公司; 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)和聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)均购自北京索莱宝科技有限公司; 低熔点琼脂糖购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad Laboratories 公司; 酶标仪购自伯腾(BioTek)仪器有限公司; 扫描仪购自爱普生(Epson)有限公司。

1.2 细胞的复苏与培养

将冻存的细胞于 37 °C 恒温水浴锅中加热至融化, 700 r/min 离心 3 min 后弃上清, 用 5 mL 细胞培养基重悬细胞并将其转移至 T25 细胞培养瓶中, 放置于含 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37 °C 恒温静置培养。细胞贴壁生长至铺满细胞瓶后, 弃掉培养基, 用 PBS 清洗 1 次, 再加入 2 mL EDTA 放置于培养箱中静置, 待细胞全部脱落后加入 3 mL 细胞培养基, 700 r/min 离心 3 min 弃上清, 加入适量细胞培养基重悬并计数, 根据细胞数量转移至 T75 细胞培养瓶继续培养。

1.3 血细胞溶血实验

将平板划线培养的 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 $C\Delta pplA$ 的单菌落分别接种于相应抗性的 BHI 液体培养

基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 然后取适量菌液于 4 °C、4 800 r/min 离心 10 min 后用无菌 PBS 清洗 2 次并将 OD_{600} 调至 0.6, 按照 1:100 接种于 BHI 中 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6 时, 将菌液 12 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液按照 1:1 的比例加入 PBS-DTT 形成混合液并在 96 孔板中梯度稀释。在阴性对照孔中加入 100 μ L PBS-DTT 混合液; 阳性对照孔在阴性对照孔的基础上每孔添加 2 μ L Triton X-100。取出 1 mL 新鲜绵羊血置于 2 mL 离心管中, 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min, 将上清和白细胞层弃掉; 加入生理盐水重悬红细胞, 再次离心, 弃上清, 重复洗涤步骤 1 次, 将红细胞与生理盐水以 1:20 混匀, 制成 5% 绵羊红细胞-生理盐水悬液。每孔加入 100 μ L 上述 5% 红细胞悬液, 37 °C 静置培养 30 min 以裂解红细胞。96 孔板 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min 后使用扫描仪扫描并检测 OD_{550} , 绘制溶解曲线并使用 GraphPad 软件对数据进行分析, 统计结果用 one-way ANOVA 比较差异(***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$)。

1.4 人源上皮细胞 Caco-2 的黏附与侵袭实验

使用 RPMI 1640 (含 15% FBS) 培养 Caco-2 细胞并计数, 按照每孔约 3×10^5 个细胞转移至 12 孔板中, 放入 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱静置培养; 将平板划线培养的 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 $C\Delta pplA$ 单菌落分别接种于相应抗性的 BHI 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 然后使用 10 mmol/L PBS 将菌液清洗 2 遍后调整 OD_{600} 值至 0.6; 将菌液以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 10 的比例感染细胞, 30 min 后弃去原有培养基, 使用 10 mmol/L PBS 将细胞清洗 2 遍, 加入 1 mL 细胞裂解液并进行稀释点板, 统计数目并根据公式(1)计算黏附率。

$$\text{黏附率} = \text{黏附菌量} / \text{感染菌量} \times 100\% \quad (1)$$

另取一块细胞培养板在感染 60 min 后, 用 PBS 洗涤 2 次后加入 1 mL 预热的 RPMI 1640 培

养基(添加庆大霉素, 终浓度 50 μ g/mL), 放入培养箱中继续培养 1 h, 弃去培养孔中废液, 使用 PBS 反复洗涤细胞后加入 1 mL 细胞裂解液进行稀释点板, 统计数目并根据公式(2)计算侵袭率, 使用 GraphPad 进行绘图并使用 t 检验分析差异(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)。

$$\text{侵袭率} = \text{侵袭菌量} / \text{感染菌量} \times 100\% \quad (2)$$

1.5 鼠源巨噬细胞 RAW264.7 胞内细菌增殖试验

使用 DMEM 培养基(含 10% FBS)培养并重悬细胞, 按照每孔 2×10^5 cell/mL 的密度铺板于 12 孔板。将 EGD-e、 $\Delta pplA$ 及 $C\Delta pplA$ 分别接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 并将菌液 OD_{600} 调整至 0.6。将菌液按 1:1 000 比例加入 DMEM 培养基中, 感染 1 h 后弃去上清, 并加入 DMEM 培养基(含庆大霉素, 终浓度 50 μ g/mL); 分别于感染后 2、5、8 h 取出一块细胞培养板, 清洗后加入 1 mL 4 °C 细胞裂解液使细胞破裂, 随后进行稀释点板计数。使用 GraphPad 软件分析数据, 并通过 t 检验比较差异(ns: $P > 0.05$)。

1.6 鼠源成纤维细胞 L929 内细菌胞间迁移实验

使用 DMEM 培养基(含 10% FBS)培养并重悬细胞, 按照每孔 2×10^5 cell/mL 的密度铺板于 12 孔板。将 EGD-e、 $\Delta pplA$ 及 $C\Delta pplA$ 分别接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 并将菌液 OD_{600} 调整至 0.6。将菌液按 1:1 000 比例加入 DMEM 培养基中, 感染 1 h 后弃去上清, 并加入 DMEM 培养基(含庆大霉素, 终浓度 50 μ g/mL)。感染 2 h 后, 弃去细胞培养液并用 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 3.6 mL 琼脂覆盖液, 冷却至琼脂凝固后, 置于在 37 °C 细胞培养箱中倒置培养, 约 48–60 h 后可见空斑出现。每孔加入 700 μ L 的 40% 甲醛溶液, 在 37 °C 培养箱中静置 70 min 以固定空斑。将琼脂凝块挑出, 向每孔中加入 0.5% 的结晶紫溶液染色

30 min, 使用 ddH₂O 冲洗未结合的结晶紫溶液, 拍摄空斑图像并统计空斑直径。使用 GraphPad 软件分析数据, 并通过 *t* 检验比较差异 (ns: $P > 0.05$)。

1.7 细菌的小鼠脏器定殖实验

选用 4 周龄 SPF 级雌性 ICR 小鼠为模型, 分成 3 组, 每组 7 只, 饲养 3–4 d。将 EGD-e、 Δ *pplA* 及 $C\Delta$ *pplA* 分别接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 并将菌液 OD_{600} 调整至 0.6。每只小鼠腹腔注射 100 μ L 菌液, 48 h 后处死小鼠, 取全部脾脏和部分肝脏称量并记录质量。将肝脏和脾脏研磨后点板计数, 使用 GraphPad 软件分析数据, 并通过 *t* 检验比较差异 (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$)。

本研究动物实验均已通过浙江农林大学实验动物伦理委员会审查, 批准号: ZAFUAC202485。

1.8 小鼠体内单核增生李斯特氏菌毒力基因转录水平检测

将 4 周龄 SPF 级雌性 ICR 小鼠分为 2 组, 每组 5 只。将 EGD-e 和 Δ *pplA* 分别接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 并将菌液 OD_{600} 调整至 0.6。腹腔注射菌液感染小鼠, 48 h 后取肝脏进行研磨。4 °C、4 800 r/min 离心 10 min 获取沉淀, 将胰酶与 ddH₂O 按照 1:2 的比例均匀加入匀浆沉淀静置 30 min 以裂解真核细胞; 4 °C、4 800 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 加入 DNA 酶(5 mg/mL)和 RNA 酶(5 mg/mL)各 100 μ L, 振荡混匀后于 37 °C 培养箱静置 30 min 以降解真核细胞的 DNA 和 RNA。4 °C、4 800 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入溶菌酶裂解菌体, 并使用 TRIzol 法提取细菌总 RNA 进行反转录。对表 1 所列的单核增生李斯特氏菌重要毒力基因(*prfA*、*inlA*、*inlB*、*plcA*、*plcB*、*actA*、*hly*)进行实时荧光定量 PCR 检测, 以 *rpoB* 作为内参基因。PCR 反应体系: 2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master 10 μ L, 上、下游引物(1 μ mol/L)各 4 μ L, cDNA 2 μ L。PCR 反应

表1 本研究所用引物

Table 1 Primer sequences used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>plcA</i> -f	CGAGCAAAACAGCAACGATAG
<i>plcA</i> -r	CGTGTCTAGTTCTGGGAGTAGTGATA
<i>plcB</i> -f	ATCATACCCCTCCAGGCTACCA
<i>plcB</i> -r	CGCCCTTTTCGCATTTTC
<i>hly</i> -f	TCACATCGTCCATCTATTTGCC
<i>hly</i> -r	ATTACCGTTCTCCACCATTCC
<i>inlA</i> -f	TAGCGATGGCGGTAGTTACACAGA
<i>inlA</i> -r	TTAAGTGGCTGCGTCACGGTTC
<i>inlB</i> -f	GCAGTCAACTTAACCCGCTATGTCA
<i>inlB</i> -r	GTGCGAGGCTAGAGTTCTTGTGTT
<i>actA</i> -f	CAGCAGATGAGTCTTCACCACA
<i>actA</i> -r	CCATTTCCCCGCATCTTTTA
<i>prfA</i> -f	ACAGCTGAGCTATGTGCGAT
<i>prfA</i> -r	AATGATTTTTTCGATTAACGGGAAGCT
<i>agrA</i> -f	GTTTGAGTTAGTATCACGAATGCC
<i>agrA</i> -r	CAAACCTCCGAATTCCTGAGC
<i>agrB</i> -f	GAAAGAATGGCGGATGTGTTG
<i>agrB</i> -r	CCTGTTACTAAGGCGATACCG
<i>agrC</i> -f	ACAAAAGGAGAAGGTCTGTTG
<i>agrC</i> -r	CGGTCACTTTTCGTATCTAAGGC
<i>agrD</i> -f	ACAATCCATGAAAGTTGCGGA
<i>agrD</i> -r	TCACAAATGGACTTTTTGGTTTCGT
<i>luxS</i> -f	CAATGGGATGTCAAACAGGC
<i>luxS</i> -r	CAACCGCATTGGACTTCATTG
<i>rpoB</i> -f	CTACACTTAGGTATGGCTGCTCG
<i>rpoB</i> -r	GGCTTCTTCCACTGTGCTCC

程序: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 算法分析数据并用 GraphPad 软件绘图, 当 log₂ fold change (FC) > 1 时说明基因转录水平显著上调, log₂FC < -1 时说明基因转录水平显著下调, 否则为基因转录水平无显著变化。

1.9 单核增生李斯特氏菌群体感应相关基因转录水平检测

将过夜培养的 EGD-e 和 Δ *pplA* 菌液分别转接入 BHI 培养基, 置于 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养。当菌液的 OD_{600} 值在 0.4–0.5 时, 取

1 mL 菌液 4 °C、4 800 r/min 离心 10 min 收集菌体。提取细菌总 RNA 进行反转录。采用荧光定量 PCR 方法研究 PplA 对单核增生李斯特氏菌 Agr 系统和 LuxS 系统群体感应相关基因(*agrA*、*agrB*、*agrC*、*agrD* 和 *luxS*, 见表 1)的转录调控。采用 1.8 节的反应体系、反应程序和数据统计分析算法进行研究。

2 结果与分析

2.1 *pplA* 缺失后细菌溶血能力显著降低

通过比较 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 $C\Delta pplA$ 培养上清对绵羊血细胞的破坏能力, 探究 PplA 对单核增生李斯特氏菌溶血能力的影响。如图 1A 所示, 缺失株 $\Delta pplA$ 的溶血能力较野生株 EGD-e 显著降低, 而回补株的溶血能力与野生株无显著差异。比较各菌株及阴性/阳性对照溶血后溶液的 OD_{550} 值, 绘制溶血曲线(图 1B)并进行显著性分析, 结果显示 *pplA* 缺失后的溶血能力显著低于野生株($P < 0.001$), 表明 PplA 能显著提高单核增生李斯特氏菌的溶血能力。

2.2 *pplA* 缺失后细菌对细胞的黏附侵袭能力显著降低

通过 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 $C\Delta pplA$ 感染 Caco-2 细胞, 进行稀释点板计数, 探究 PplA 在单核增

生李斯特氏菌黏附侵袭 Caco-2 细胞中的作用。如图 2A 所示, $\Delta pplA$ 感染后的细胞表面黏附细菌数较野生株显著减少($P < 0.05$), 而回补株与野生株差异不显著, 表明 PplA 显著提高了单核增生李斯特氏菌对 Caco-2 细胞的黏附能力。如图 2B 所示, $\Delta pplA$ 感染后侵袭至细胞内的细菌数量显著低于野生株和回补株($P < 0.01$), 即 PplA 能显著促进单核增生李斯特氏菌侵袭肠上皮细胞。

2.3 *pplA* 基因缺失后细菌的胞内增殖能力不变

使用 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 $C\Delta pplA$ 感染鼠源巨噬细胞 RAW264.7 后进行稀释点板计数, 探究 PplA 在单核增生李斯特氏菌胞内增殖中的作用。如图 3 所示, 在感染后 2、5 及 8 h 细胞中各菌株在细胞内的数量差异均不显著($P > 0.05$)。这表明 PplA 对单核增生李斯特氏菌在巨噬细胞 RAW264.7 中的增殖能力无显著影响。

2.4 *pplA* 缺失后细菌在细胞间的迁移能力不变

使用 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 $C\Delta pplA$ 感染 L929 细胞后, 通过检测其形成的空斑大小来探究 *pplA* 对细菌胞间迁移能力的影响。如图 4 所示, 各菌株形成的空斑大小和数量差异均不显著,

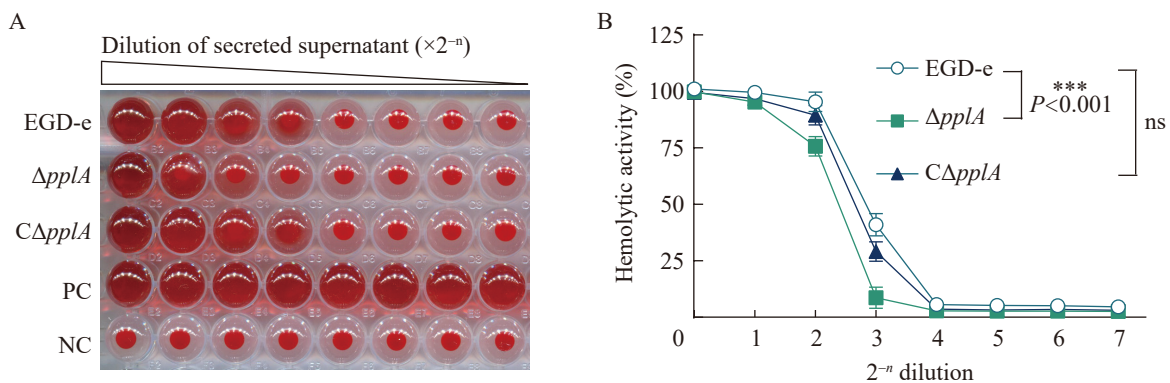


图1 *pplA*缺失株溶血能力检测(A)与分析(B)

Figure 1 Determination (A) and analysis (B) of hemolysis ability in *pplA* deletion strain. PC: Positive control; NC: Negative control; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

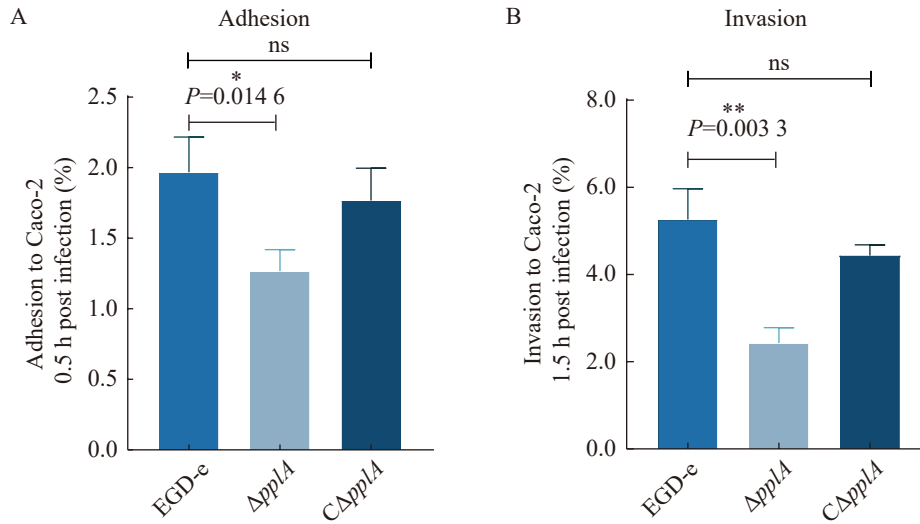


图2 *pplA*缺失株在Caco-2细胞中黏附侵袭能力检测

Figure 2 Determination of adhesion and invasion of *pplA* deletion strain in Caco-2 cells. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ns: $P>0.05$.

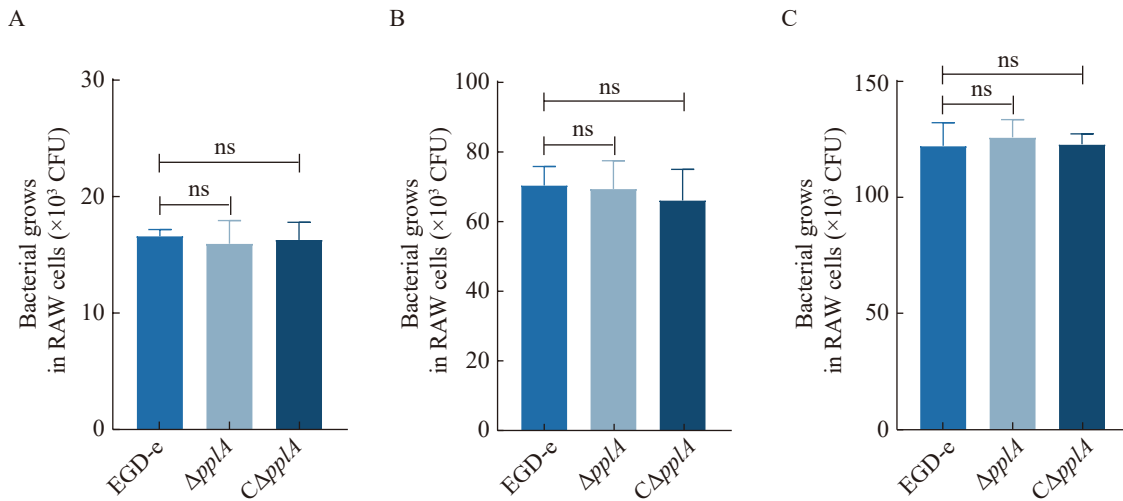


图3 *pplA*缺失株在RAW264.7细胞中2 h (A)、5 h (B)和8 h (C)的增殖能力检测

Figure 3 Determination of proliferation of *pplA* deletion strain in RAW264.7 cells during 2 h (A), 5 h (B), and 8 h (C). ns: $P>0.05$.

表明 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 C $\Delta pplA$ 的胞间迁移能力差异不显著,说明 PplA 对单核增生李斯特氏菌的胞间迁移能力无显著影响。

2.5 *pplA* 缺失后细菌在小鼠脏器中的定殖能力显著降低

为了探究 *pplA* 对细菌毒力的影响,通过使

用 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 C $\Delta pplA$ 感染小鼠,并对脾脏和肝脏细菌定殖数量进行统计。如图 5 所示,在感染 48 h 后, $\Delta pplA$ 感染小鼠脾脏与肝脏中分离的细菌数量显著少于 EGD-e 和 C $\Delta pplA$ 感染小鼠,表明 *pplA* 缺失后单核增生李斯特氏菌在小鼠脾脏与肝脏中的定殖能力显著减弱,即

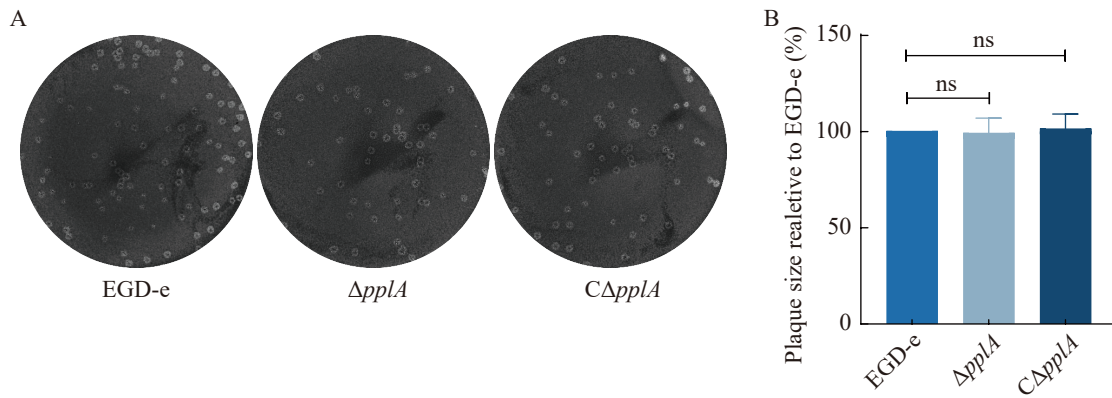


图4 *ppla*缺失株迁移能力检测(A)与分析(B)

Figure 4 Determination (A) and analysis (B) of bacteria cell-to-cell spread ability in *ppla* deletion strain. ns: $P > 0.05$.

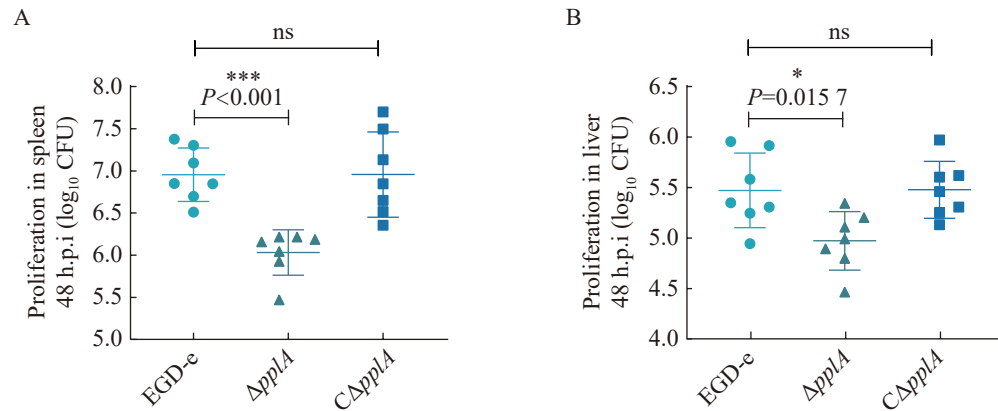


图5 *ppla*缺失株在小鼠脾脏(A)和肝脏(B)中的定殖能力分析

Figure 5 Determination of proliferation of *ppla* deletion strain in mouse spleen (A) and liver (B). *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

PplA 对单核增生李斯特氏菌在宿主器官中的定殖起促进作用。

2.6 *ppla* 缺失后单核增生李斯特氏菌毒力因子 *inlB*、*plcA*、*plcB*、*hly* 和 *prfA* 转录水平降低

通过感染小鼠后单核增生李斯特氏菌毒力因子的转录水平测定, 探究 *ppla* 对细菌在宿主细胞内的毒力因子转录水平的影响。如图 6 所示, 在 *ppla* 缺失后, *plcB*、*hly* 以及调控以上基因的单核增生李斯特氏菌重要毒力因子 *prfA* 的转录水平均显著下调, 其中, *prfA* 的变化最为

显著, 而 *inlA*、*actA*、*inlB* 和 *plcA* 则无显著变化。这表明在单核增生李斯特氏菌感染宿主时, PplA 可以通过改变细菌毒力基因的转录水平进而促进单核增生李斯特氏菌的毒力。

2.7 *ppla* 缺失影响细菌群体感应相关基因 *agrA*、*agrB*、*agrC* 和 *luxS* 的转录

单核增生李斯特氏菌群体感应系统包括 Agr 系统和 LuxS 系统^[16]。通过对 *ppla* 缺失的单核增生李斯特氏菌群体感应相关基因的转录水平研究, 探究 *ppla* 对细菌群体感应系统的调控。结果显示 *ppla* 缺失后, Agr 系统群体感应相关

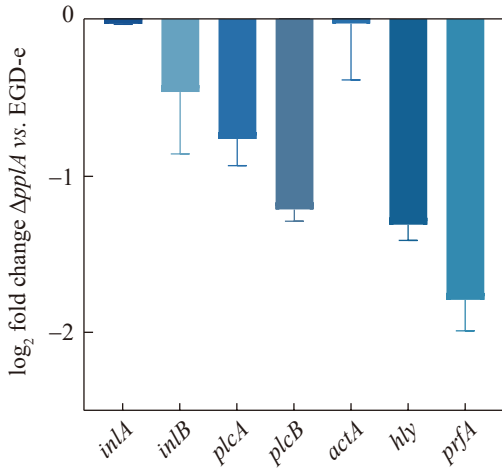


图6 *pplA*缺失株毒力基因*inlB*、*plcA*、*plcB*、*hly*和*prfA*转录水平检测

Figure 6 Determination of the transcriptional level of virulence genes *inlB*, *plcA*, *plcB*, *hly*, and *prfA* in *pplA* deletion strain.

基因 *agrD* 转录水平未发生显著变化，而 *agrA* 和 *agrB* 显著上调，*agrC* 显著下调；LuxS 系统群体感应相关基因 *luxS* 显著下调(图 7)。这表明单核增生李斯特氏菌中，PplA 可以调控 Agr 系统和 LuxS 系统群体感应相关基因的转录水平。

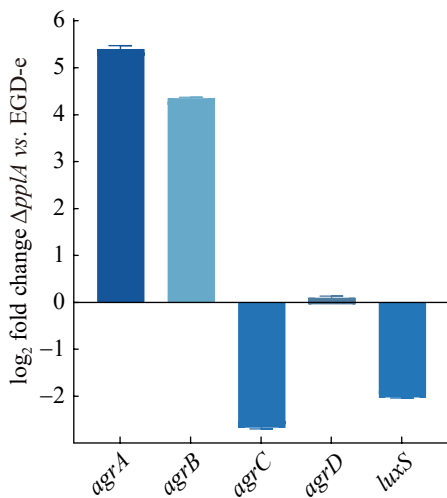


图7 *pplA*缺失株群体感应相关基因的转录分析

Figure 7 Determination of the transcriptional level of quorum sensing related genes *agrA*, *agrB*, *agrC*, and *luxS* in *pplA* deletion strain.

3 讨论与结论

本研究主要通过单核增生李斯特氏菌野生株 EGD-e、 $\Delta pplA$ 和 $C\Delta pplA$ 进行体内和体外感染实验，以探究 *pplA* 对单核增生李斯特氏菌致病力的影响。在体外研究中，使用绵羊血细胞、肠上皮细胞 Caco-2、巨噬细胞 RAW264.7 以及成纤维细胞 L929 作为感染模型，以探究 *pplA* 对单核增生李斯特氏菌溶血活性、细胞黏附侵袭能力、胞内增殖和胞间迁移能力的影响。结果表明，单核增生李斯特氏菌缺失 *pplA* 后，其溶血能力显著降低，表明 PplA 在细菌的膜裂解能力中起到了促进作用。膜裂解能力是单核增生李斯特氏菌逃逸宿主吞噬泡的重要机制之一，PplA 可能通过调控溶血素 LLO 的表达或活性来增强细菌的膜裂解能力。此外，*pplA* 缺失株在细胞黏附与侵袭能力方面也显著减弱，说明 PplA 在感染初级阶段细菌与宿主细胞的相互作用中起到了关键作用，可能通过影响细菌表面蛋白的表达或修饰，增强细菌与宿主细胞的黏附能力。在胞内增殖和胞间迁移能力方面，*pplA* 缺失株与野生株相比无显著性差异，表明 PplA 主要参与细菌的早期感染阶段。在体内试验中，以小鼠作为感染模型，结果显示 *pplA* 缺失后，单核增生李斯特氏菌在小鼠脏器中的定殖能力显著下降。为了进一步探究 *pplA* 是否影响单核增生李斯特氏菌感染宿主动物时毒力因子的表达水平，通过 RT-qPCR 检测了感染小鼠体内单核增生李斯特氏菌主要毒力因子的基因转录水平。结果表明，在缺失 *pplA* 后，其毒力因子 *plcB*、*hly* 和 *prfA* 基因转录水平显著下调，这与感染结果一致，说明 PplA 不仅在感染的初级阶段影响单核增生李斯特氏菌，还通过调控其毒力因子的表达来增强细菌在宿主体内的生存和增殖能力。这些结果进一步说明了 PplA 在调控单核增生李斯特氏菌毒力中的重要作用。

群体感应机制对细菌的致病力具有调控作用，当细菌密度达到一定水平时，群体感应使

细菌接收信号分子, 进而触发一系列级联反应和基因表达, 导致相关毒力因子的产生和分泌, 从而影响细菌的毒力^[14]。群体感应系统最初在海洋细菌中被报道, 当细胞群密度足以产生自诱导剂的积累时会触发生物发光^[17]。革兰氏阳性菌通常利用分泌的寡肽和双组分系统进行群体感应, 这些系统由膜结合的传感器激酶受体和能够调控基因表达的细胞质转录因子组成^[18]。群体感应在革兰氏阳性菌中的生物学作用包括协调群体行为, 如生物膜形成、毒力因子产生和抗生素抗性等^[18]。例如, 金黄色葡萄球菌中存在一种典型的双组分系统, 即所谓的辅助基因调节因子(auxiliary gene regulation, Agr)系统, 该系统以反应调节因子 AgrA 和调节 RNAIII 作为主要的细胞内效应子, 能够感应细菌密度, 调整细菌毒力因子表达的时机以响应应激以及代谢和环境方面的动态变化^[19]。芽孢杆菌属也存在群体感应系统, 可通过感受细菌密度调节相关基因表达, 其调控网络的一个重要参与者是信息素 ComX, 它在整个过程中起诱导剂的作用, 除此以外, 枯草芽孢杆菌还存在 ComQXPA 这一四蛋白群体感应系统^[20]。肺炎链球菌具有 TprA/PhrA 肽信号系统, 能够介导群体感应, 帮助其在鼻咽处定殖, 除此以外该系统还能控制抗微生物肽的基因簇表达, 从而影响肺炎链球菌在鼻咽定殖期间的竞争性适应性^[21]。革兰氏阳性菌的群体感应通常利用小的翻译后修饰的肽信号分子, 这些肽信号与组氨酸激酶双组分信号转导系统的传感器元件相互作用, 能够调节枯草芽孢杆菌和肺炎链球菌中细菌能力的发育、粪肠球菌中的结合以及金黄色葡萄球菌中的毒力^[22]。单核增生李斯特氏菌中也存在群体感应系统, 其中 Agr 群体感应系统是其重要组成部分^[23-24]。相关研究表明, Agr 系统中 *agrD* 基因的缺失会导致细菌对宿主的侵袭能力降低、在小鼠体内毒力衰减以及 *prfA* 依赖性基因表达水平的降低^[23], 而 *agrA* 基因的缺失则会使细菌在宿主内的脏器定殖能力降低^[24]。LuxS/AI-2 群

体感应系统中的 *luxS* 基因, 其缺失可减弱细菌的生物被膜形成能力, 但对细菌的溶血活性和磷脂酶活性并无影响^[25]。单核增生李斯特氏菌信息素脂蛋白 PplA 产生的多肽信息素 pPplA 可以介导细菌之间的信号传递, 有利于感染中吞噬体膜的破坏和细菌的逃逸^[13]。在本研究中, 首先探究了 PplA 是否调节 Agr 和 LuxS 群体感应系统。结果表明, 缺失 PplA 并不影响与细菌毒力相关的 Agr 系统中 *agrD* 基因的转录水平, 但会使 *agrA* 基因的转录水平上调。由于 *agrA* 基因能够促进单核增生李斯特氏菌的毒力, 且 PplA 本身也具有促进单核增生李斯特氏菌毒力的功能。由此可以推断, PplA 发挥其促进细菌毒力的功能并非通过调控 *agrA* 基因来实现的。相比之下, LuxS 群体感应系统在单核增生李斯特氏菌感染中的作用尚不明确, 因此 PplA 调控 LuxS 群体感应系统介导的致病机制也仍待探究。此外, 研究发现 PplA 可以提高感染小鼠体内单核增生李斯特氏菌重要毒力因子 *prfA*、*hly*、*plcA* 和 *plcB* 等的基因转录水平。因此, 推测 PplA 的功能发挥可能类似于枯草芽孢杆菌和肺炎链球菌, 即 PplA 产生的多肽信息素 pPplA 与双组分信号转导系统的传感器元件或转录调节因子等调控元件相互作用, 提高转录激活因子 PrfA 的表达, PrfA 进而提高毒力因子 LLO、PlcA 和 PlcB 等的表达, 从而提高单核增生李斯特氏菌在宿主内的存活能力(图 8)。然而, 该过程的具体机制仍需进一步探究。

本研究通过比较单核增生李斯特氏菌野生株、脂蛋白 PplA 缺失株和回补株在细胞溶血能力、细胞黏附和侵袭能力、胞内增殖能力、胞间迁移能力、小鼠脏器定殖能力、小鼠脏器内细菌毒力因子转录水平以及群体感应相关基因转录水平等方面的差异, 揭示了 PplA 在单核增生李斯特氏菌感染宿主过程中的作用, 为理解单核增生李斯特氏菌的感染机制提供了新的分子基础, 也为抗感染治疗提供了潜在靶点。

- vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104575.
- [5] SHAMLOO E, HOSSEINI H, MOGHADAM ZA, LARSEN MH, HASLBERGER A, ALEBOUYEH M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance[J]. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2019, 20(4): 241-254.
- [6] QUEREDA JJ, MORÓN-GARCÍA A, PALACIOS-GORBA C, DESSAUX C, PORTILLO FG, PUCCIARELLI MG, ORTEGA AD. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: a trip from environmental to medical microbiology[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 2509-2545.
- [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] RAVINDHIRAN R, SIVARAJAN K, SEKAR JN, MURUGESAN R, DHANDAPANI K. *Listeria monocytogenes* an emerging pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions[J]. *Microbial Ecology*, 2023, 86(4): 2231-2251.
- [9] VÁZQUEZ E, de GREGORIO-VICENTE O, SORIANO V, ÁLVAREZ-DOMÍNGUEZ C, CORRAL O, MORENO-TORRES V. Increased incidence and mortality from *Listeria monocytogenes* infection in Spain[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2024, 145: 107089.
- [10] McDOUGAL CE, SAUER JD. *Listeria monocytogenes*: the impact of cell death on infection and immunity[J]. *Pathogens*, 2018, 7(1): 8.
- [11] COSTA AC, PINHEIRO J, REIS SA, CABANES D, SOUSA S. *Listeria monocytogenes* interferes with host cell mitosis through its virulence factors InlC and ActA[J]. *Toxins*, 2020, 12(6): 411.
- [12] HALL M, GRUNDSTRÖM C, BEGUM A, LINDBERG MJ, SAUER UH, ALMQVIST F, JOHANSSON J, SAUER-ERIKSSON AE. Structural basis for glutathione-mediated activation of the virulence regulatory protein PrfA in *Listeria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016, 113(51): 14733-14738.
- [13] XAYARATH B, ALONZO F 3rd, FREITAG NE. Identification of a peptide-pheromone that enhances *Listeria monocytogenes* escape from host cell vacuoles[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(3): e1004707.
- [14] MEIRELES D, POMBINHO R, CABANES D. Signals behind *Listeria monocytogenes* virulence mechanisms[J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2369564.
- [15] 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.
- [16] WIKTORCZYK-KAPISCHKE N, SKOWRON K, WAŁECKA-ZACHARSKA E. Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*-overview of selected aspects[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2023, 10: 1161486.
- [17] KUWAHARA H, MORITA H. Bioluminescence of *Aliivibrio fischeri* in artificial seawater and its application in fungicide sensing[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2022, 2524: 183-195.
- [18] PAPPENFORTH K, BASSLER BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588.
- [19] BRONESKY D, WU ZF, MARZI S, WALTER P, GEISSMANN T, MOREAU K, VANDENESCH F, CALDELARI I, ROMBY P. *Staphylococcus aureus* RNAlII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2016, 70: 299-316.
- [20] TREINEN C, MAGOSCH O, HOFFMANN M, KLAUSMANN P, WÜRTZ B, PFANNSTIEL J, MORABBI HERAVI K, LILGE L, HAUSMANN R, HENKEL M. Modeling the time course of ComX: towards molecular process control for *Bacillus* wild-type cultivations[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 144.
- [21] MUELLER BROWN K, EUTSEY R, GAZIOGLU O, WANG D, VALLON A, ROSCH JW, YESILKAYA H, HILLER NL. Peptide maturation molecules act as molecular gatekeepers to coordinate cell-cell communication in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(7): 114432.
- [22] DE KIEVIT TR, IGLEWSKI BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(9): 4839-4849.
- [23] RIEDEL CU, MONK IR, CASEY PG, WAIDMANN MS, GAHAN CGM, HILL C. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(5): 1177-1189.
- [24] AUTRET N, RAYNAUD C, DUBAIL I, BERCHE P, CHARBIT A. Identification of the agr locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(8): 4463-4471.
- [25] SELA S, FRANK S, BELAUSOV E, PINTO R. A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5653-5658.