

单核增生李斯特氏菌通过调控线粒体 Ca^{2+} 摄取蛋白 2 (MICU2) 介导的致病机制

吴海虹^{1#}, 杨立锋^{2#}, 宋厚辉¹, 江玲丽², 张蕊³, 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管理国际科技合作基地, 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
- 3 中国农业大学 动物医学院, 北京

吴海虹, 杨立锋, 宋厚辉, 江玲丽, 张蕊, 程昌勇, 陈绵绵. 单核增生李斯特氏菌通过调控线粒体 Ca^{2+} 摄取蛋白 2 (MICU2) 介导的致病机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4537-4549.

WU Haihong, YANG Lifeng, SONG Houhui, JIANG Lingli, ZHANG Rui, CHENG Changyong, CHEN Mianmian. Mitochondrial calcium uptake 2 (MICU2)-mediated pathogenic mechanism of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4537-4549.

摘要: 【目的】探究单核增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 通过毒力因子溶血素 O (listeriolysin O, LLO) 调控线粒体 Ca^{2+} 摄取蛋白 2 (MICU2) 表达及其互作关系, 进而影响线粒体钙稳态和细菌胞内增殖的分子机制。【方法】采用 Western blotting 技术检测单核增生李斯特氏菌 EGD-e 和 Δhly 感染 HeLa 细胞后 MICU2 的表达变化。运用基因沉默技术和真核过表达技术探究 MICU2 蛋白水平变化对单核增生李斯特氏菌胞内增殖能力的影响。利用 AlphaFold3 预测 LLO 与 MICU2 的互作位点, 并通过免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 验证二者的相互作用。结合线粒体钙荧光探针 (Rhod-2 AM) 分析 MICU2 对钙稳态的调控作用。【结果】EGD-e 感染 4 h 和 6 h 后 MICU2 表达显著上调 ($P < 0.001$), 而 Δhly 感染后 MICU2 的表达量无显著变化 ($P > 0.05$)。沉默 MICU2 可增强细菌增殖能力 ($P < 0.01$) 并升高线粒体钙水平 ($P < 0.05$); 过表达 MICU2 则减弱细菌增殖能力 ($P < 0.01$) 并降低线粒体钙水平 ($P < 0.05$)。AlphaFold3 预测显示, LLO 第 462 位丙氨酸 (Ala) 与 MICU2 第 119 位谷氨酸 (Glu) 通过氢键结合, Co-IP 证实二者存在相互作用。【结论】本研究表明, 单核增生李斯特氏菌通过 LLO 上调 MICU2 表达, MICU2 通过减少线粒体钙抑制细菌胞内增殖, LLO 与 MICU2 的互作是此过程的关键分子基础。本研究为深入探究单核增生李斯特氏菌的致病

资助项目: 国家重点研发计划 (2023YFD1801800); 宁波市自然科学基金 (2023J241)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801800) and the Ningbo Natural Science Foundation (2023J241).

[#]These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2025-03-18; Accepted: 2025-05-09; Published online: 2025-06-25

机理提供了参考。

关键词：单核增生李斯特氏菌；线粒体 Ca^{2+} 摄取蛋白 2 (MICU2)；线粒体；钙稳态；感染

Mitochondrial calcium uptake 2 (MICU2)-mediated pathogenic mechanism of *Listeria monocytogenes*

WU Haihong^{1#}, YANG Lifeng^{2#}, SONG Houhui¹, JIANG Lingli², ZHANG Rui³, 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 of Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

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

3 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, China

Abstract: [Objective] To investigate the molecular mechanism by which *Listeria monocytogenes* regulates the expression of mitochondrial calcium uptake 2 (MICU2) through the virulence factor listeriolysin O (LLO) and their interaction, thereby affecting mitochondrial calcium homeostasis and bacterial intracellular proliferation. [Methods] Western blotting was employed to analyze MICU2 expression in HeLa cells infected with *L. monocytogenes* EGD-e or Δhly . Gene silencing and eukaryotic overexpression approaches were used to examine how MICU2 regulated the intracellular proliferation of *L. monocytogenes*. AlphaFold3 was used to predict the interaction sites between LLO and MICU2, and co-immunoprecipitation (Co-IP) was performed to verify their interaction. Mitochondrial calcium fluorescence probe (Rhod-2 AM) was used to analyze the regulatory role of MICU2 in calcium homeostasis. [Results] EGD-e infection upregulated MICU2 expression at 4 h and 6 h post-infection ($P < 0.001$), whereas Δhly showed no effect ($P > 0.05$). The silencing of MICU2 enhanced bacterial proliferation ($P < 0.01$) and elevated mitochondrial calcium levels ($P < 0.05$), whereas overexpression of MICU2 reduced bacterial proliferation ($P < 0.01$) and decreased mitochondrial calcium levels ($P < 0.05$). AlphaFold3 predicted that alanine (Ala) at position 462 of LLO interacted with glutamate (Glu) at position 119 of MICU2 via a hydrogen bond, and Co-IP confirmed their interaction. [Conclusion] *L. monocytogenes* upregulates MICU2 expression via LLO, and MICU2 inhibits bacterial intracellular proliferation by reducing mitochondrial calcium levels. The interaction between LLO and MICU2 is a key molecular basis for this process. These findings provide insights into the pathogenic mechanism of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; mitochondrial calcium uptake 2 (MICU2); mitochondria; calcium homeostasis; infection

单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是一种革兰染色阳性的胞内寄生菌^[1],可入侵巨噬细胞和非吞噬上皮细胞进行胞内增殖^[1-2]。在感染宿主过程中,单核增生李斯特氏菌会被吞噬体吞噬^[3],且在吞噬体内无法正常增殖,因此其会分泌一种穿孔毒素溶血素 O (listeriolysin O, LLO, 由 *hly* 基因编码),从而破坏细胞膜和吞噬体膜,是单核增生李斯特氏菌逃避宿主免疫防御的重要机制^[4-5]。单核增生李斯特氏菌感染细胞后, LLO 破坏细胞膜,导致胞外钙离子内流,使细胞内钙离子浓度升高^[6-9],通过线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)进入线粒体的 Ca^{2+} 水平增多,进而催化丙酮酸脱氢酶复合物产生乙酰辅酶 A^[10],抑制 LC3 相关吞噬作用(LC3-associated phagocytosis, LAP)的发生^[11]。缺失 MCU 会显著降低骨髓巨噬细胞中的线粒体 Ca^{2+} 水平,增强 LAP 和细菌杀伤作用,这证明单核增生李斯特氏菌通过上调线粒体 Ca^{2+} 信号来抑制 LAP,以此作为其生存策略^[10]。

线粒体钙离子单向转运复合物(MCU complex)是位于线粒体内膜的一种高选择性钙通道^[12]。在人体中,该复合物由多种亚基组成,至少包含 4 个核心组分: MCU、基本跨膜亚基(essential MCU regulator, EMRE),以及 2 个调控蛋白——线粒体钙离子摄取蛋白 1 (mitochondrial calcium uptake 1, MICU1)和线粒体钙离子摄取蛋白 2 (mitochondrial calcium uptake 2, MICU2)^[12]。这些组分协同作用确保 Ca^{2+} 顺利进入线粒体,并在维持细胞信号传导、能量代谢和钙稳态中发挥关键作用。MICU1 和 MICU2 可结合形成二聚体,并控制 MCU 通道的开放和闭合^[13]。当线粒体基质 Ca^{2+} 水平较低时, MICU1 和 MICU2 的二聚体关闭 MCU 通道,阻断线粒体 Ca^{2+} 的摄取;而当 Ca^{2+} 浓度较高时, MICU1 和 MICU2 上的 EF-hand (elongation factor-hand)结构域与 Ca^{2+} 结合,形成开放状态

二聚体,使 MCU 通道打开, Ca^{2+} 得以进入线粒体^[13-15]。MICU1 和 MICU2 表达水平的改变可调控线粒体 Ca^{2+} 的吸收。上调 MICU2 的表达可以降低线粒体 Ca^{2+} 浓度;沉默 MICU2 会促进线粒体吸收 Ca^{2+} ,表明 MICU2 是 MCU 的重要调节因子^[16-17]。

尽管已有研究显示线粒体 Ca^{2+} 在单核增生李斯特氏菌感染过程中发挥重要作用,但细菌对 MCU 复合物各亚基的调控机制尚不明确。因此,本研究分析了 MICU2 不同蛋白水平对单核增生李斯特氏菌胞内增殖能力的影响,预测并验证了 MICU2 和 LLO 的相互作用情况,为进一步揭示单核增生李斯特氏菌利用溶血素 LLO 调控 MICU2 以促进其胞内增殖提供了重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及细胞株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、单核增生李斯特氏菌参考菌株 EGD-e、缺失株 Δhly (通过同源重组方法敲除 LLO 的编码基因 *hly*, 且通过回补试验验证了敲除效果,该菌株已应用于 LLO 功能的多项研究^[5,18])、载体 N-HA-pCMV 和 N-Myc-pCMV、LLO 真核表达载体 Myc-LLO_{T515AL516A} (在载体 N-HA-pCMV 基础上构建, LLO 为 26-529 aa, 且第 515、516 位氨基酸突变,使 LLO 丧失膜裂解能力)、人宫颈癌细胞 (HeLa 细胞)和人胚肾细胞(HEK 293T)均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

BHI (brain and heart infusion broth)培养基, Oxoid 公司; jetPRIME[®] transfection reagent、INTERFERin[®] transfection reagent, Polyplus transfection[®]公司; Western blotting 及 IP 细胞裂解液、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,上海碧云天生物技术股份有限公司; MICU2 抗体, Abcam 公司; β -tubulin、GAPDH 抗体, 武

汉爱博泰克生物科技有限公司；Myc 和 HA 抗体，Cell Signaling Technology 公司；限制性核酸内切酶，New England Biolabs 公司；FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2、HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR、2×ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；质粒小提试剂盒、PCR 纯化/凝胶回收试剂盒，上海惠凌生物技术有限公司；DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、0.25% Trypsin-EDTA，ThermoFisher Scientific 公司。

1.3 真核细胞总 RNA 提取及 cDNA 的制备

使用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒提取真核细胞 RNA，经酶标仪检测 RNA 浓度后，使用 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。反转录体系(20 μ L)：5×All-in-one qRT SuperMix 4 μ L，Enzyme mix 1 μ L，RNA 1 μ g，RNase-free ddH₂O 补足至 20 μ L。反转录程序：37 °C 反转录 15 min，98 °C 灭活 5 min。

1.4 MICU2 真核表达载体的构建与鉴定

采用同源重组的方法构建 MICU2 真核表达载体。根据 NCBI 数据库检索下载人源 *MICU2* 基因序列，从 N-HA-pCMV 真核表达载体上选取 *Kpn* I 和 *Eco*R I 作为酶切位点，将 *MICU2* 的基因序列与 N-HA-pCMV 连接。通过 SnapGene 设计引物，上游引物 MICU2-F (5'-*TATGGCCA TGGAGGCCCGAATTCATATGGCGGGCTGC GGGTAG*-3') (斜体代表同源臂，长度为 17 bp，下划线代表酶切位点) 和下游引物 MICU2-R (5'-*ATCCCCGCGGCCGCGGTACCTTAAAAA GACCTTTTCCAGCTTGTTCAG*-3') (斜体代表同源臂，长度为 14 bp，下划线代表酶切位点) 均由杭州擎科生物技术有限公司合成。按照

1.3 节中的方法提取真核细胞 RNA 并反转录成 cDNA，以 cDNA 作为模板，用上述引物经 PCR 扩增出 *MICU2* 基因片段。PCR 反应体系(50 μ L)：2×TOROBlue® Flash KOD DyeMix 25 μ L，上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L，DNA 模板 1 μ L，ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件：95 °C 预变性 3 min；98 °C 变性 10 s，60 °C 退火 5 s，68 °C 延伸 1 min，35 个循环；68 °C 终延伸 10 min。PCR 产物经测序正确后，使用 2×ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 将片段连接至 N-HA-pCMV 载体中。将连接后的产物转化进大肠杆菌 DH5 α ，并涂布于 Amp 抗性平板上培养过夜。挑取单菌落进行 PCR 验证，并进行测序鉴定，将测序正确的 N-HA-pCMV-MICU2 重组质粒命名为 pSL3076。

1.5 Western blotting 检测单核增生李斯特氏菌感染后 HeLa 细胞内 MICU2 蛋白表达

由于 HeLa 细胞线粒体含量丰富，被广泛应用于探究单核增生李斯特氏菌与宿主线粒体相互作用的相关研究^[18-20]，因此本研究使用 HeLa 细胞进行试验。将 HeLa 细胞以 2×10^5 cells/mL 的密度均匀接种于 6 孔板内。提前一晚挑取 BHI 固体培养基上的野生株 EGD-e 和缺失株 Δhly 单菌落，分别接种于 BHI 液体培养基中，在 37 °C、200 r/min 的振荡条件下培养 12 h。之后，取 1 mL 菌液，以 5 000 r/min 离心 2 min，使用无菌的 10 mmol/L PBS 洗涤 2 次，将菌液浓度调整至 $OD_{600}=0.6$ 。取出细胞培养板，弃去孔内的培养基，用 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次。用不含胎牛血清的 DMEM 细胞培养基稀释菌液，按照 MOI=300:1 的比例加入细胞板中。将细胞放入 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中，培养 1 h 后用 PBS 轻轻润洗细胞 3 次，随后，将 50 mg/mL 的庆大霉素用 DMEM 细胞培养基按 1:1 000 的比例稀释，加入培养板，继续

培养 1 h 后换成含有终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 完全培养基。在不同时间点使用 RIPA 裂解液裂解细胞, 收取细胞样品, 用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量, 取一定量的蛋白加入 4 \times Loading buffer, 混匀后煮沸变性, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续 Western blotting 试验。由于 Tubulin 能在 HeLa 细胞中稳定表达且不受单核增生李斯特氏菌感染影响^[21-22], 且 MICU2 的表达量变化不会影响 Tubulin 的蛋白表达^[23], 因此本研究使用 Tubulin 作为内参蛋白。MICU2 抗体稀释度为 1:1 000; β -tubulin 抗体稀释度为 1:10 000; 二抗稀释度为 1:10 000。最后, 使用 ECL 化学发光试剂盒配制显影液, 曝光后使用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.6 MICU2 沉默或过表达后单核增生李斯特氏菌在 HeLa 细胞内的胞内增殖试验

在 HeLa 细胞中转染 siRNA (小干扰 RNA) 或真核表达载体, 对细胞进行 MICU2 蛋白的沉默或过表达处理。转染 24 h 后, 按照 1.5 节中的方法使用单核增生李斯特氏菌感染 HeLa 细胞, 并分别在感染后 2 h 和 6 h 后使用无菌 PBS 清洗细胞 3 遍。每孔加入 500 μL 预冷的裂解液 (0.25% Trypsin-EDTA: 无菌 ddH_2O =1:4), 冰上裂解 15 min, 将样品收集到 1.5 mL EP 管中, 振荡混匀后进行 10 倍倍比稀释, 混匀后取 10 μL 接种于 BHI 平板上, 每个样品做 3 个平行。最后将 BHI 平板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养过夜, 第 2 天对单菌落进行计数, 并使用 GraphPad Prism 9.0 统计每个实验组的细菌数并绘制成图。

1.7 AlphaFold3 预测 LLO 与 MICU2 互作

为预测 LLO 与 MICU2 之间的相互作用关系, 从 UniProt 数据库分别下载 LLO (ID: P13128) 与 MICU2 (ID: Q8IYU8) 的氨基酸序列, 之后使用 AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com>)

在线预测工具预测这 2 个蛋白之间的相互作用。根据预测结果选择评分最高的模型, 使用 ChimeraX 工具进行可视化分析, 并确定预测的互作位点。

1.8 免疫共沉淀试验 (Co-IP 试验) 分析 LLO 与 MICU2 互作

提前一晚将 HEK 293T 细胞按照 5×10^5 cells/mL 的密度接种于 6 孔板中, 待细胞密度达到 60%–80% 后进行转染。试验组转染 Myc-LLO 和 HA-CypD 真核表达质粒, 对照组转染 N-Myc-pCMV 空载质粒和 HA-CypD 真核表达质粒。转染 24 h 后, 使用 Western blotting 及 IP 细胞裂解液+蛋白酶抑制剂裂解细胞 10 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min 后取上清, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 用 10 mmol/L PBS 将蛋白浓度稀释至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 取 30 μL 蛋白样品于 1.5 mL EP 管中, 加入 10 μL 4 \times Loading buffer, 煮沸 6–8 min 后暂存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 作为 Input 样品。剩余的蛋白进行后续处理: 取出保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱的 Protein G 磁珠, 振荡均匀后吸取 5 μL 磁珠加入 1.5 mL EP 管中, 将 EP 管放置在磁力架上, 吸去上清, 用预冷的 PBS 清洗磁珠 3 遍, 最后弃去上清并加入 300 μL 蛋白, 放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋转仪上旋转低温孵育 1 h, 以排除非特异性结合。将 EP 管瞬离后放置于磁力架上, 待磁珠被吸附后, 将上清转移至另一 EP 管中, 将 1 μL Myc 抗体加入上清中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 翻转结合过夜。加入 10 μL Protein G 磁珠, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 翻转结合 3 h。用磁力架收集磁珠, 加入 200 μL 预冷的 PBS 清洗磁珠 7–8 遍, 最后吸去上清并加入 40 μL 1 \times Loading buffer 混匀, 最后煮沸 6–8 min, 作为 IP 样品。将 Input 样品和 IP 样品一起进行 Western blotting 试验。

1.9 流式细胞术检测线粒体钙离子水平

Rhod-2 AM 是一种可特异性进入线粒体并

与线粒体中的钙离子结合产生强烈荧光的探针，常用于监测线粒体内的钙离子浓度变化^[10,24-25]。本研究采用 Rhod-2 AM 作为荧光探针，借助流式细胞术对线粒体钙离子水平进行检测。在 HeLa 细胞中转染 siRNA 或真核表达载体，对细胞进行 MICU2 蛋白的沉默或过表达处理，转染 24 h 后按照 1.5 节的方法用单核增生李斯特氏菌感染 HeLa 细胞，在感染后 4 h 进行线粒体 Ca^{2+} 检测。提前使用不含血清的 DMEM 将 Rhod-2 AM 稀释至终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 的工作液，充分混匀。接着，弃去细胞中的培养基，用 37°C 预热的 PBS 洗涤细胞，然后加入 $200 \mu\text{L}$ 0.25% trypsin-EDTA 消化细胞，将细胞收集在 EP 管中，以 700 r/min 离心 3 min 。小心吸去上清，每管加入 $500 \mu\text{L}$ Rhod-2 AM 工作液，轻轻重悬细胞，将 EP 管置于 37°C 细胞培养箱中避光孵育 30 min 。弃去染液，用无菌 PBS 洗涤细胞 2 次。最后用无菌 PBS 重悬至单细胞悬液。取 $500 \mu\text{L}$ 样品上机检测，每个样品采集 $10\,000$ 个细胞，同时设置未染色对照组以检测细胞自发荧光。使用流式软件 FlowJo 分析荧光信号强度。

1.10 数据统计与分析

本研究所涉及的数据均用 GraphPad Prism 9.0 软件处理，采用 Student's *t*-test 和 one-way ANOVA 进行分析。所有试验均独立进行 3 次，

结果采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，ns 表示差异无统计学意义，*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 MICU2 真核表达载体的构建及验证结果

通过同源重组方法构建 MICU2 真核表达载体，并采用 PCR 及测序进行验证。提取 HEK 293T 细胞的总 RNA，反转录生成 cDNA，以此为模板，使用含同源臂的上游引物 MICU2-F 和下游引物 MICU2-R 扩增 MICU2 基因片段。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，以 DL2000 DNA marker 为参照，结果显示，在 $1\,000$ – $1\,500 \text{ bp}$ 之间可见条带(图 1A)，与预期的 MICU2 片段大小一致。随后将该扩增片段纯化并连接至 N-HA-pCMV 载体中，构建重组质粒 pSL3076。使用 N-HA-pCMV 载体引物进行菌落 PCR 验证，结果在 $1\,500$ – $2\,000 \text{ bp}$ 处检测到目标条带(图 1B)，测序结果进一步确认插入序列准确无误，表明重组质粒 pSL3076 构建成功。

2.2 单核增生李斯特氏菌感染 HeLa 细胞后 MICU2 的蛋白表达水平显著升高

分别使用 EGD-e 和 Δhly 感染 HeLa 细胞，

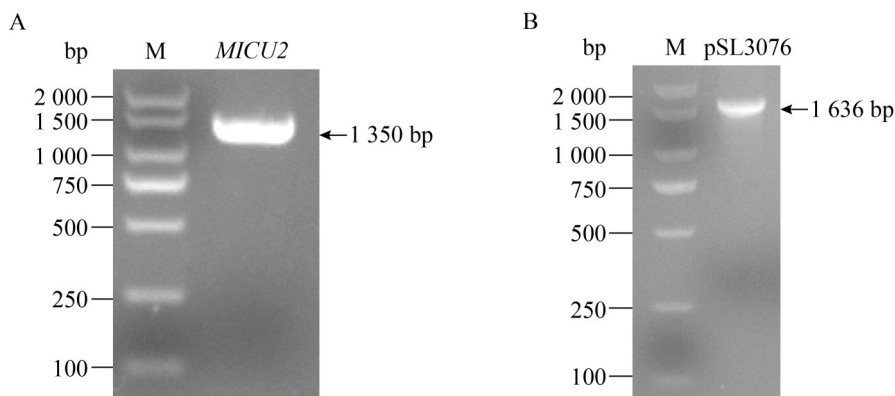


图1 MICU2基因片段的PCR扩增(A)及重组质粒pSL3076的PCR鉴定结果(B)

Figure 1 Amplification of MICU2 gene fragment (A) and identification of recombinant plasmid pSL3076 by PCR (B). M: DL2000 DNA marker.

并在感染后 2、4、6 h 收取细胞总蛋白，经 BCA 定量后进行 Western blotting 试验，检测 MICU2 的蛋白表达水平变化。如图 2 所示，与未感染的细胞相比，EGD-e 感染 4 h 和 6 h 后，MICU2 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$) (图 2A、2B)；而 Δhly 感染的细胞中，MICU2 的蛋白表达无显著变化 ($P > 0.05$) (图 2C、2D)，这与本研究通过 iTRAQ 蛋白质组学分析得出的结果一致。上述结果表明，单核增生李斯特氏菌感染细胞引起 MICU2 蛋白表达量显著上升，且这种变化与 LLO 有关。

2.3 MICU2 过表达后单核增生李斯特氏菌在 HeLa 细胞内的胞内增殖能力显著降低

将重组质粒 pSL3076 转染至 HeLa 细胞中，

24 h 后提取细胞总蛋白，并使用 BCA 法进行蛋白定量，随后通过 Western blotting 试验检测蛋白表达水平。结果显示，HeLa 细胞内 MICU2 的表达水平显著升高 (图 3A、3B)，进一步验证了 MICU2 真核表达载体构建成功。使用单核增生李斯特氏菌 EGD-e 感染过表达 MICU2 的 HeLa 细胞，分别在感染后 2、4、6 h 分析单核增生李斯特氏菌在胞内的增殖情况。结果显示，与转染 N-HA-pCMV 空载的对照组相比，过表达 MICU2 的 HeLa 细胞内单核增生李斯特氏菌数量显著减少 (图 3C)，表明 MICU2 在细胞中具有抵抗单核增生李斯特氏菌感染的功能。

2.4 MICU2 沉默后单核增生李斯特氏菌在 HeLa 细胞内的胞内增殖能力显著升高

委托苏州吉玛基因股份有限公司合成 3 对

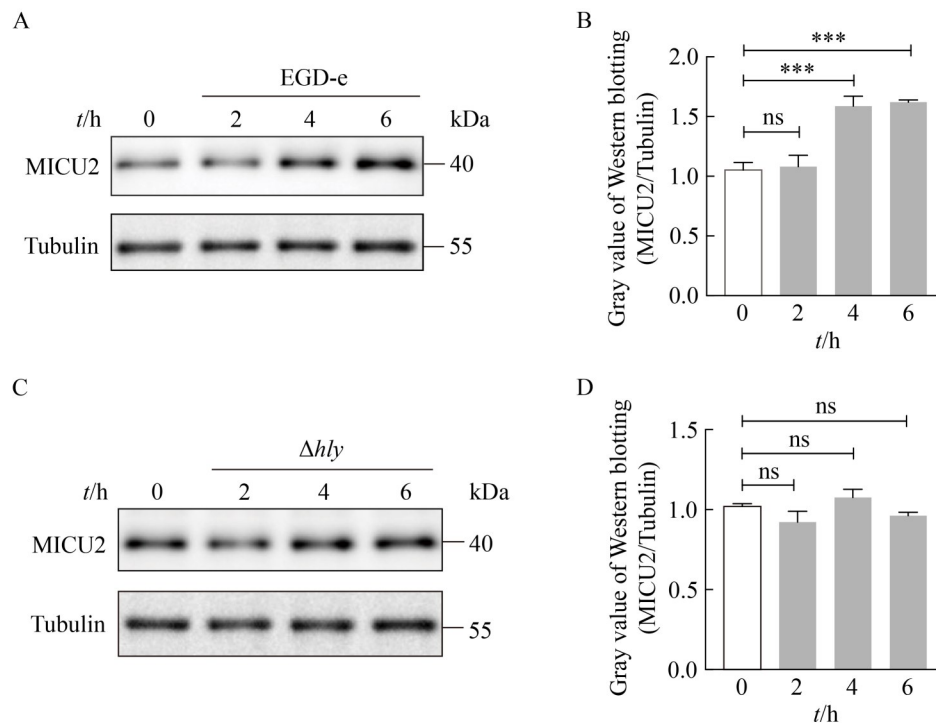


图2 EGD-e和 Δhly 感染后HeLa细胞内MICU2蛋白表达量的Western blotting验证(A、C)和灰度分析(B、D)

Figure 2 Western blotting validation (A, C) and grayscale value analysis (B, D) of MICU2 protein expression after infection of HeLa cells with EGD-e and Δhly strain. ns: No significance; ***: $P < 0.001$.

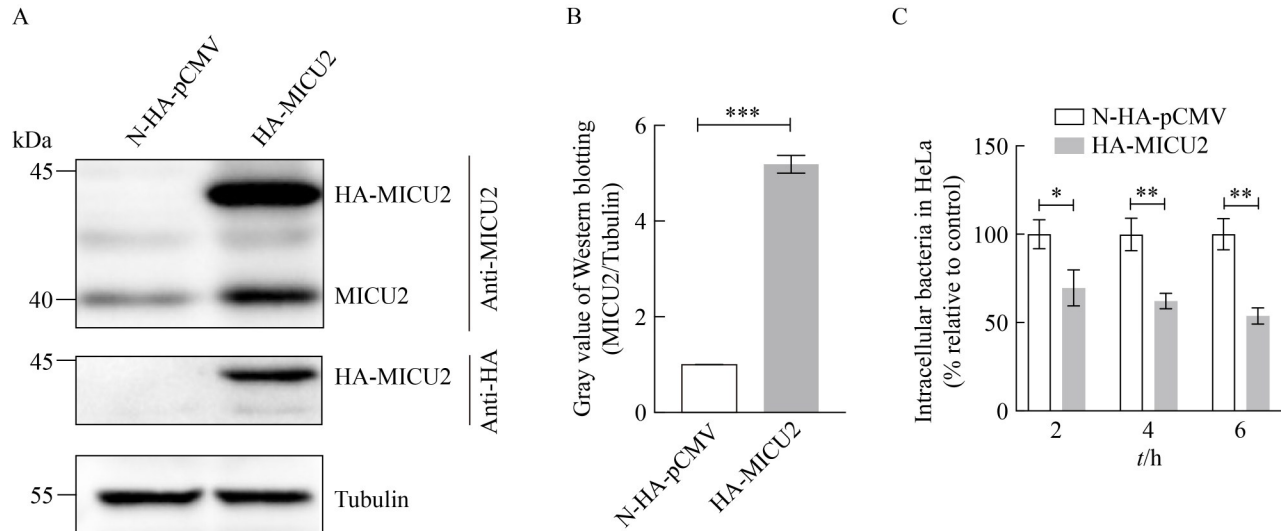


图3 MICU2过表达效果的Western blotting验证(A)、灰度分析(B)及单核增生李斯特氏菌在过表达MICU2的HeLa细胞中的胞内增殖能力检测(C)

Figure 3 Western blotting validation (A) and grayscale value analysis (B) of eukaryotic expression vector transfection-mediated MICU2 overexpression, and intracellular proliferation assay of *Listeria monocytogenes* in MICU2 overexpressing HeLa cells (C). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

针对MICU2的siRNA, 分别命名为si-MICU2-1、si-MICU2-2和si-MICU2-3, 并以si-Ctrl作为阴性对照。为检测siRNA的沉默效果, 将3对siRNA分别转染至HeLa细胞中, 24 h后提取细胞总蛋白, 并使用BCA法进行蛋白定量, 随后通过Western blotting试验检测蛋白表达水平。结果显示, 3对siRNA均有较好的沉默效果, 其中si-MICU2-3沉默效果最为显著(图4A、4B), 因此选用si-MICU2-3进行后续试验。接下来, 使用EGD-e感染MICU2沉默的HeLa细胞, 分别在感染后2、4和6 h分析单核增生李斯特氏菌在胞内的增殖情况。结果显示, 与转染si-Ctrl的对照组相比, 转染si-MICU2的HeLa细胞内单核增生李斯特氏菌数量显著增多(图4C), 表明沉默MICU2会显著增强单核增生李斯特氏菌在细胞中的增殖能力。

2.5 MICU2与LLO之间存在相互作用

利用AlphaFold3对LLO蛋白和MICU2的互作关系进行预测, 结果显示LLO蛋白的第

462位氨基酸ALA与MICU2的第119位氨基酸GLU可能通过氢键形成连接(图5A)。为验证该预测结果, 本研究采用Co-IP技术对LLO与MICU2的蛋白互作关系进行了试验。将带有HA标签的MICU2和带有Myc标签的LLO真核表达载体共转染进HEK 293T细胞中, 阴性对照组共转染Myc-pCMV空载质粒和HA-CypD真核表达质粒。转染24 h后用Western blotting及IP细胞裂解液+蛋白酶抑制剂裂解细胞, 收取蛋白样品。本研究选择带有Myc标签的蛋白作为诱饵蛋白, 按照1.8节的步骤进行后续试验。结果显示, LLO蛋白成功拉下MICU2蛋白(图5B), 表明MICU2与LLO之间存在相互作用, 说明LLO可能通过相互作用调控MICU2的表达。

2.6 单核增生李斯特氏菌感染MICU2沉默或过表达的HeLa细胞后线粒体钙离子水平检测

分别沉默和过表达HeLa细胞中的MICU2

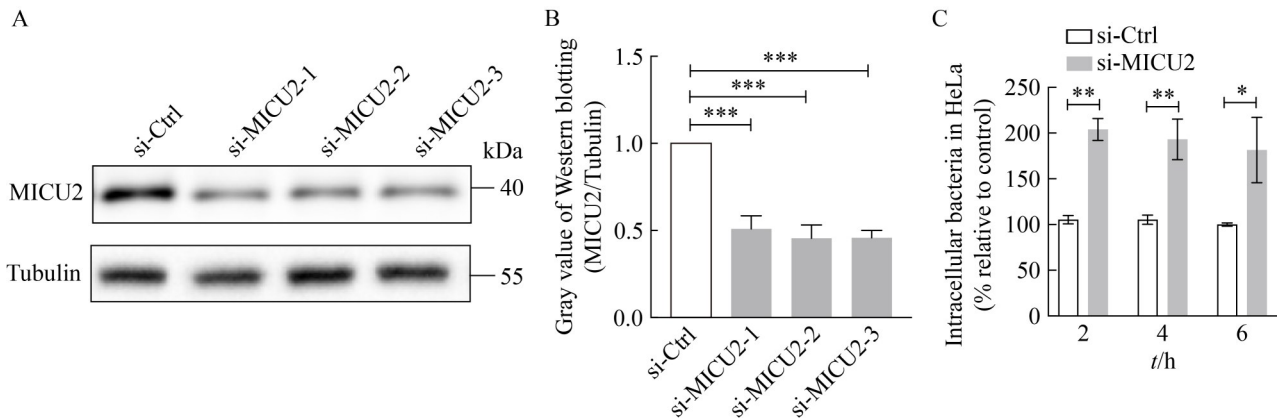


图4 MICU2的siRNA沉默效果的Western blotting验证(A)、灰度分析(B)及单核增生李斯特氏菌在MICU2沉默HeLa细胞中的胞内增殖能力检测(C)

Figure 4 Western blotting validation (A) and grayscale value analysis (B) of siRNA-mediated MICU2 silencing, and intracellular proliferation assay of *Listeria monocytogenes* in MICU2-silenced HeLa cells (C). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

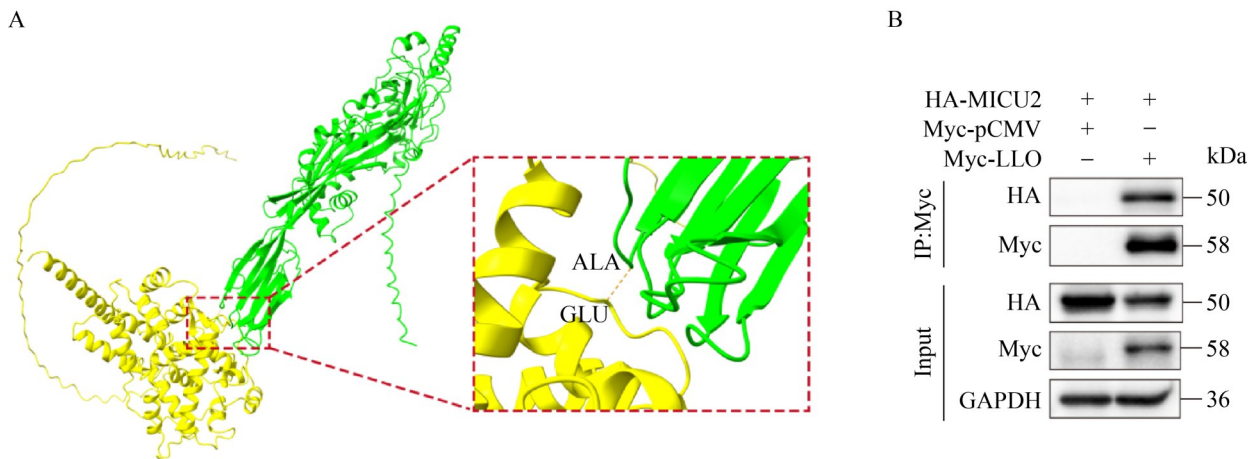


图5 AlphaFold3预测LLO与MICU2的互动(A)及Co-IP研究MICU2和LLO的互动关系(B)。黄色代表MICU2蛋白,绿色代表LLO蛋白,黄色虚线表示两蛋白之间的氢键。

Figure 5 The interaction model of LLO and MICU2 predicted by AlphaFold3 (A) and the Co-IP analysis of the interaction between MICU2 and LLO (B). The yellow protein represents MICU2, the green protein represents LLO, and the hydrogen bonds between the two proteins are indicated by yellow dashed lines.

蛋白,并使用EGD-e感染,在感染4h后使用线粒体钙离子荧光探针Rhod-2 AM检测线粒体Ca²⁺水平变化,并通过流式细胞术分析荧光强度变化。结果显示,与转染N-HA-pCMV空载的对照组相比,过表达MICU2的HeLa细胞内线

粒体Ca²⁺水平显著降低(图6A、6B)。与转染si-Ctrl的对照组相比,转染si-MICU2的HeLa细胞内线粒体Ca²⁺水平显著升高(图6C、6D)。这表明MICU2能够通过调控线粒体Ca²⁺来影响单核增生李斯特氏菌的感染。

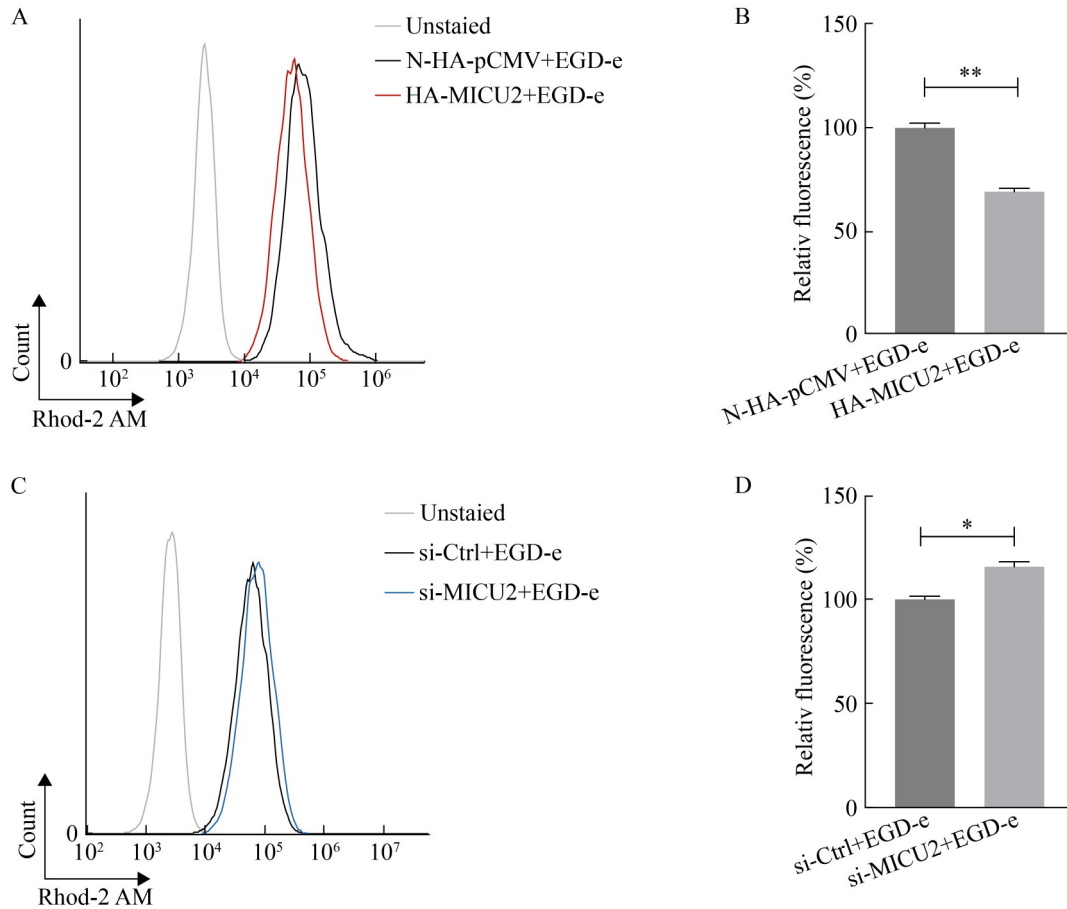


图6 单核增生李斯特氏菌感染过表达及沉默MICU2的HeLa细胞后线粒体Ca²⁺流式细胞仪分析图(A、C)及荧光强度分析(B、D)

Figure 6 Representative histogram (A, C) and fluorescence intensity analysis (B, D) of Rhod-2 AM fluorescence intensity in *Listeria monocytogenes*-infected HeLa cells with MICU2 overexpression or silencing. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

单核增生李斯特氏菌是一种重要的胞内寄生菌，其致病机制与宿主细胞内的钙离子信号密切相关^[1]。MICU2作为MCU复合物的调节亚基，在调控线粒体钙离子稳态中发挥关键作用^[13]。本研究发现，单核增生李斯特氏菌野生株EGD-e感染HeLa细胞后，MICU2的表达水平显著上升，而缺失LLO的 Δhly 菌株感染则不会导致MICU2表达量发生显著变化，说明LLO可能参与调控MICU2的蛋白表达。研究发

现，在单核增生李斯特氏菌感染宿主期间LLO可以与线粒体MICOS的核心成分Mic60相互作用，从而调控线粒体^[18]。本研究通过AlphaFold3对LLO蛋白和MICU2的互作关系进行预测，预测结果显示LLO蛋白的第462位氨基酸ALA与MICU2的第119位氨基酸GLU可能通过氢键形成连接，Co-IP试验结果显示LLO与MICU2之间存在相互作用，表明LLO可能通过蛋白之间的相互作用间接影响MICU2的功能。

Ca²⁺信号转导对细胞功能和细胞存活至关重要，线粒体Ca²⁺摄取是细胞命运的重要决定因

素, 控制呼吸、线粒体自噬和细胞凋亡的线粒体途径^[11-12]。线粒体 Ca^{2+} 的超载不仅会影响宿主的能量代谢, 还可能诱发氧化应激, 加重细胞损伤^[26]。许多病原微生物在感染宿主后都会调控线粒体 Ca^{2+} 稳态, 如金黄色葡萄球菌^[27] 和肺炎链球菌^[28], 感染后都会引起胞质 Ca^{2+} 升高, 随后诱导线粒体 Ca^{2+} 过载, 最终可能导致线粒体膜通透性转换 (mitochondrial permeability transition, MPT) 介导的坏死或线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 释放, 引发炎症反应等^[29]。在单核增生李斯特氏菌感染对细胞的调控机制中, Ca^{2+} 信号和线粒体功能也是 2 个关键要素^[9]。已有研究证实, 单核增生李斯特氏菌分泌的 LLO 诱导巨噬细胞发生线粒体自噬^[30], 此外, 单核增生李斯特氏菌利用 LLO 破坏宿主细胞膜, 促使胞外 Ca^{2+} 内流, 导致线粒体内 Ca^{2+} 水平升高^[14,21-22]。MCU 是 Ca^{2+} 进入线粒体的最主要通道, 除此之外, MICU2 等亚基也参与调控 MCU 复合物的活性, 与线粒体 Ca^{2+} 摄取密切相关^[15]。在 HeLa 和 HEK 293T 细胞中, MICU2 主要通过负向调控机制抑制线粒体 Ca^{2+} 摄取, 从而维持细胞内 Ca^{2+} 稳态^[13,15,31-32]。MICU2 对线粒体钙稳态的调控是通过改变 MCU 通道活性实现的, 分布在线粒体膜间隙中的 MICU1 和 MICU2 通过结合钙离子来改变其构象, 从而控制 MCU 通道的开放和关闭, 即 MICU2 对于钙稳态的调控需要依赖 MCU 这一 Ca^{2+} 进出的关键孔道^[15]。当缺失了 MCU 后, 单核增生李斯特氏菌就无法通过上调线粒体 Ca^{2+} 水平来抑制 LC3 相关吞噬作用^[10], 说明了 MCU 在单核增生李斯特氏菌逃逸宿主杀伤中的重要作用。然而, 单核增生李斯特氏菌是否通过调控宿主 MCU 及相关蛋白来控制线粒体 Ca^{2+} , 目前尚不明确。因此, 本研究探究了单核增生李斯特氏菌通过调控 MICU2 介导的致病机制。沉默 MICU2 后会导致单核增生李斯特氏菌在

HeLa 细胞内的增殖能力显著增强, 且线粒体 Ca^{2+} 水平升高; 而过表达 MICU2 则抑制细菌的胞内增殖, 降低线粒体 Ca^{2+} 水平。结合线粒体 Ca^{2+} 超载可能会激活细胞死亡途径^[33], 我们推测, 单核增生李斯特氏菌感染诱导的 MICU2 表达量上调可能是宿主细胞的保护性反应, 通过提高诱导 MCU 开放的阈值来控制 Ca^{2+} 的内流, 从而延缓细胞死亡。避免线粒体钙过载造成的细胞损伤。此外, 有研究报道, 在单核增生李斯特氏菌感染期间 MICU1 的表达水平会显著增加^[34], 说明 MICU2 与 MICU1 可能通过共同调控线粒体钙稳态影响宿主抗菌免疫, 其具体机制仍需进一步研究。

综上所述, 本研究揭示了单核增生李斯特氏菌通过毒力因子 LLO 调控 MICU2 蛋白表达, LLO 与 MICU2 之间存在相互作用, 反映了病原体与宿主之间复杂的相互作用, 为进一步探索线粒体 Ca^{2+} 与病原菌致病机制的关系提供了重要参考。上调 MICU2 可以抑制单核增生李斯特氏菌的增殖, 因此 MICU2 可作为一个潜在的治疗靶点, 对于人兽共患病的防控和保障公共卫生安全具有重要意义。

作者贡献声明

吴海虹: 实验操作、数据分析和论文撰写; 杨立锋: 数据分析、论文撰写和获取基金; 宋厚辉: 获取基金, 数据监管; 江玲丽: 提出概念, 提供技术支持; 张蕊: 提供技术支持; 程昌勇: 研究构思和设计, 获取基金, 论文修改; 陈绵绵: 研究构思和设计, 数据收集和处理, 论文撰写与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在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] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 16(1): 32-46.
- [2] COELHO C, BROWN L, MARYAM M, VIJ R, SMITH DFC, BURNET MC, KYLE JE, HEYMAN HM, RAMIREZ J, PRADOS-ROSALES R, LAUVAU G, NAKAYASU ES, BRADY NR, HAMACHER-BRADY A, COPPENS I, CASADEVALL A. *Listeria monocytogenes* virulence factors, including listeriolysin O, are secreted in biologically active extracellular vesicles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(4): 1202-1217.
- [3] CAIN RJ, SCORTTI M, MONZÓ HJ, VÁZQUEZ-BOLAND JA. *Listeria* InlB expedites vacuole escape and intracellular proliferation by promoting Rab7 recruitment via Vps34[J]. *mBio*, 2023, 14(1): e0322122.
- [4] AGBAVOR C, ZIMNICKA A, KUMAR A, GEORGE JL, TORRES M, PREHNA G, ALONZO F 3rd, DURRANT JD, FREITAG NE, CAHOON LA. The chaperone PrsA2 regulates the secretion, stability, and folding of listeriolysin O during *Listeria monocytogenes* infection[J]. *mBio*, 2024, 15(7): e0074324.
- [5] 冯昱超, 徐加利, 朱斌杰, 吴泽斌, 王雯静, 丁桢, 蔡孜萌, 陈绵绵, 孙静, 江玲丽, 宋厚辉, 夏菁, 程昌勇. 单增李斯特菌毒力因子溶血素关键氨基酸位点在感染过程中的作用研究[J]. *微生物学报*, 2024, 64(4): 1219-1232.
- FENG YC, XU JL, ZHU BJ, WU ZB, WANG WJ, DING A, CAI ZM, CHEN MM, SUN J, JIANG LL, SONG HH, XIA J, CHENG CY. Roles of key amino acid residues of the virulence factor listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* infection[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(4): 1219-1232 (in Chinese).
- [6] GEKARA NO, WESTPHAL K, MA B, ROHDE M, GROEBE L, WEISS S. The multiple mechanisms of Ca²⁺ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*[J]. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(8): 2008-2021.
- [7] VADIA S, SEVEAU S. Fluxes of Ca²⁺ and K⁺ are required for the listeriolysin O-dependent internalization pathway of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(3): 1084-1091.
- [8] HAMON M, BIERNE H, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(6): 423-434.
- [9] MARCHI S, MORRONI G, PINTON P, GALLUZZI L. Control of host mitochondria by bacterial pathogens[J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(5): 452-465.
- [10] LI TL, KONG LG, LI XH, WU SJ, ATTRI KS, LI Y, GONG WP, ZHAO B, LI LP, HERRING LE, ASARA JM, XU L, LUO XB, LEI YL, MA Q, SEVEAU S, GUNN JS, CHENG XL, SINGH PK, GREEN DR, WANG HB, WEN HT. *Listeria monocytogenes* upregulates mitochondrial calcium signalling to inhibit LC3-associated phagocytosis as a survival strategy[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(3): 366-379.
- [11] DATAN E, SALMAN S. Autophagic cell death in viral infection: Do TAM receptors play a role?[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2020, 357: 123-168.
- [12] GIORGI C, MARCHI S, PINTON P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(11): 713-730.
- [13] PATRON M, CHECCHETTO V, RAFFAELLO A, TEARDO E, VECELLIO REANE D, MANTOAN M, GRANATIERO V, SZABÓ I, de STEFANI D, RIZZUTO R. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity[J]. *Molecular Cell*, 2014, 53(5): 726-737.
- [14] FAN MR, ZHANG JR, TSAI CW, ORLANDO BJ, RODRIGUEZ M, XU Y, LIAO MF, TSAI MF, FENG L. Structure and mechanism of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter holo complex[J]. *Nature*, 2020, 582(7810): 129-133.
- [15] KAMER KJ, MOOTHA VK. MICU1 and MICU2 play nonredundant roles in the regulation of the mitochondrial calcium uniporter[J]. *EMBO Reports*, 2014, 15(3): 299-307.
- [16] PETRUNGARO C, ZIMMERMANN KM, KÜTTNER V, FISCHER M, DENGJEL J, BOGESKI I, RIEMER J. The Ca²⁺-dependent release of the Mia40-induced MICU1-MICU2 dimer from MCU regulates mitochondrial Ca²⁺ uptake[J]. *Cell Metabolism*, 2015, 22(4): 721-733.
- [17] PAYNE R, HOFF H, ROSKOWSKI A, FOSKETT JK. MICU2 restricts spatial crosstalk between InsP3R and MCU channels by regulating threshold and gain of MICU1-mediated inhibition and activation of MCU[J]. *Cell Reports*, 2017, 21(11): 3141-3154.
- [18] CHENG CY, CHEN MM, SUN J, XU JL, DENG SM, XIA J, HAN Y, ZHANG X, WANG J, LEI L, ZHAI RD, WU Q, FANG WH, SONG HH. The MICOS complex subunit Mic60 is hijacked by intracellular bacteria to manipulate mitochondrial dynamics and promote bacterial pathogenicity[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(46): 2406760.
- [19] LEVCHENKO SM, KUZMIN AN, PLISS A, QU JL, PRASAD PN. Macromolecular profiling of organelles in normal diploid and cancer cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(20): 10985-10990.
- [20] STAVRU F, BOUILLAUD F, SARTORI A, RICQUIER D, COSSART P. *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(9): 3612-3617.
- [21] ARCHAMBAUD C, SISMEIRO O, TOEDLING J, SOUBIGOU G, BÉCAVIN C, LECHAT P, LEBRETON A, CIAUDO C, COSSART P. The intestinal microbiota interferes with the microRNA response upon oral *Listeria* infection[J]. *mBio*, 2013, 4(6): e00707-13.
- [22] GAO Y, ZHOU M, ZHANG W, JIANG JX, OUYANG ZB, ZHU YF, LI N. NLRP3 mediates trophoblastic inflammasome activation and protects against *Listeria monocytogenes* infection during pregnancy[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(22): 1202.

- [23] GRANATIERO V, GIORGIO V, CALÌ T, PATRON M, BRINI M, BERNARDI P, TIRANTI V, ZEVIANI M, PALLAFACCHINA G, de STEFANI D, RIZZUTO R. Reduced mitochondrial Ca^{2+} transients stimulate autophagy in human fibroblasts carrying the 13514 A>G mutation of the ND5 subunit of NADH dehydrogenase[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2015, 23(2): 231-241.
- [24] TROLLINGER DR, CASCIO WE, LEMASTERS JJ. Selective loading of rhod 2 into mitochondria shows mitochondrial Ca^{2+} transients during the contractile cycle in adult rabbit cardiac myocytes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 236(3): 738-742.
- [25] ALVEAR TF, FARIAS-PASTEN A, VERGARA SA, PRIETO-VILLALOBOS J, SILVA-CONTRERAS A, FUENZALIDA FA, QUINTANILLA RA, ORELLANA JA. Hemichannels contribute to mitochondrial Ca^{2+} and morphology alterations evoked by ethanol in astrocytes[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2024, 12: 1434381.
- [26] GARBINCUS JF, ELROD JW. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease[J]. *Physiological Reviews*, 2022, 102(2): 893-992.
- [27] STELZNER K, WINKLER AC, LIANG CG, BOYNY A, ADE CP, DANDEKAR T, FRAUNHOLZ MJ, RUDEL T. Intracellular *Staphylococcus aureus* perturbs the host cell Ca^{2+} homeostasis to promote cell death[J]. *mBio*, 2020, 11(6): e02250-20.
- [28] NERLICH A, MIETH M, LETSIU E, FATYKHOVA D, ZSCHEPPANG K, IMAI-MATSUSHIMA A, MEYER TF, PAASCH L, MITCHELL TJ, TÖNNIES M, BAUER TT, SCHNEIDER P, NEUDECKER J, RÜCKERT JC, EGGELING S, SCHIMEK M, WITZENRATH M, SUTTORP N, HIPPENSTIEL S, HOCKE AC. Pneumolysin induced mitochondrial dysfunction leads to release of mitochondrial DNA[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 182.
- [29] YAMAZAKI T, KIRCHMAIR A, SATO A, BUQUÉ A, RYBSTEIN M, PETRONI G, BLOY N, FINOTELLO F, STAFFORD L, NAVARRO MANZANO E, AYALA deLa PEÑA F, GARCÍA-MARTÍNEZ E, FORMENTI SC, TRAJANOSKI Z, GALLUZZI L. Mitochondrial DNA drives abscopal responses to radiation that are inhibited by autophagy[J]. *Nature Immunology*, 2020, 21(10): 1160-1171.
- [30] ZHANG YF, YAO YK, QIU XX, WANG GD, HU Z, CHEN SY, WU ZX, YUAN N, GAO HC, WANG JR, SONG HH, GIRARDIN SE, QIAN YC. *Listeria hijacks* host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(4): 433-446.
- [31] XING YF, WANG MF, WANG J, NIE ZZ, WU GY, YANG X, SHEN YQ. Dimerization of MICU proteins controls Ca^{2+} influx through the mitochondrial Ca^{2+} uniporter[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(5): 1203-1212.e4.
- [32] MATESANZ-ISABEL J, ARIAS-DEL-VAL J, ALVAREZ-ILLERA P, FONTERIZ RI, MONTERO M, ALVAREZ J. Functional roles of MICU1 and MICU2 in mitochondrial Ca^{2+} uptake[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2016, 1858(6): 1110-1117.
- [33] ENDLICHER R, DRAHOTA Z, ŠTEFKOVÁ K, ČERVINKOVÁ Z, KUČERA O. The mitochondrial permeability transition pore: current knowledge of its structure, function, and regulation, and optimized methods for evaluating its functional state[J]. *Cells*, 2023, 12(9): 1273.
- [34] CARVALHO F, SPIER A, CHAZE T, MATONDO M, COSSART P, STAVRU F. *Listeria monocytogenes* exploits mitochondrial contact site and cristae organizing system complex subunit Mic10 to promote mitochondrial fragmentation and cellular infection[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e03171-19.