

芝吉, 曹青, 赵学慧, 等. 谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因缺失对单增李斯特菌致病性的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 93-100.

ZHI J, CAO Q, ZHAO X H, et al. Effect of deletion of glutamate decarboxylase *lmo2363* gene on pathogenicity of *Listeria monocytogenes* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 93-100.

谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因缺失对单增李斯特菌致病性的影响

芝吉, 曹青, 赵学慧, 张浩浩, 范子秋, 马永辉, 邓静, 何曾文,
马金锐, 张坤中, 崇倩, 薛惠文*, 苟惠天*

(甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 旨在探究谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因缺失对单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 致病性的影响。以 LM 参考株 ATCC 19111 为对照, 用荧光显微镜观察分离株 LM83-1、缺失株 LM83-1 Δ *lmo2363*、回补株 CLM83-1 Δ *lmo2363* 的生物被膜形成; 采用人结肠腺癌细胞 Caco-2 和小鼠巨噬细胞 RAW264.7 进行黏附侵袭和胞内增殖试验; 对 LM83-1 和 LM83-1 Δ *lmo2363* 转录组测序分析, 筛选两者之间的差异表达基因, 对差异表达基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 代谢通路富集分析。结果: 与 LM83-1 相比, 在培养 24、48 h 时, LM83-1 Δ *lmo2363* 的生物被膜结构疏松, 形成量下降, CLM83-1 Δ *lmo2363* 在各时间段生物被膜形成与 LM83-1 相同; LM83-1 Δ *lmo2363* 对 Caco-2 细胞的黏附率增强, 侵袭率下降, CLM83-1 Δ *lmo2363* 对 Caco-2 细胞的黏附率和侵袭率与 LM83-1 无显著差异; 在 4、8、12、24 h 时, LM83-1 Δ *lmo2363* 在巨噬细胞胞内增殖能力减弱, 在 4 h 时 CLM83-1 Δ *lmo2363* 在巨噬细胞胞内增殖能力减弱; 转录组测序显示, 与 LM83-1 相比, 缺失株 LM83-1 Δ *lmo2363* 中共有 136 个基因表达差异显著, 其中上调基因 36 个, 下调基因 100 个; GO 功能富集分析显示, 差异表达基因主要富集在乙醇胺解胺酶活性、细菌型鞭毛基体、乙醇胺分解代谢过程、铁离子稳态等 GO 条目中; KEGG 代谢通路富集分析显示, 差异表达基因主要富集在磷酸转移酶系统、淀粉和蔗糖代谢、鞭毛组装等通路中。本研究表明, 谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因可能通过参与铁稳态、鞭毛组装、磷酸转移酶系统等生物学过程在 LM 生物被膜形成和体外细胞感染中发挥重要作用, 研究结果为进一步探究谷氨酸脱羧酶的功能奠定基础。

关键词: 单增李斯特菌; 谷氨酸脱羧酶; 生物被膜; 体外细胞感染; 转录组测序

中图分类号: S852.612 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)04-0093-08

Effect of deletion of glutamate decarboxylase *lmo2363* gene on pathogenicity of *Listeria monocytogenes*

ZHI Ji, CAO Qing, ZHAO Xuehui, ZHANG Haohao, FAN Ziqiu, MA Yonghui, DENG Jing, HE Zengwen,
MA Jinrui, ZHANG Kunzhong, CHONG Qian, XUE Huiwen*, GOU Huitian*
(College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of the deletion of glutamate decarboxylase *lmo2363* gene on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. In here, the reference strain of *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 was used as the control. The biofilm formation of LM83-1, LM83-1 Δ *lmo2363* and CLM83-1 Δ *lmo2363* was observed by fluorescence microscopy. Caco-2 cells and RAW264.7 cells were used for adhesion, invasion and intracellular proliferation tests of the above bacterium. Transcriptome sequencing of LM83-1 and LM83-1 Δ *lmo2363* was performed to screen the differentially expressed genes between them, and GO functional enrichment analysis and KEGG metabolic pathway enrichment analysis were performed for differentially expressed genes. The results showed that, compared with LM83-1, the biofilm structure of LM83-1 Δ *lmo2363* decreased and the biofilm formation of CLM83-1 Δ *lmo2363* was the same as that of LM83-1 at 24 h and 48 h. The adhesion rate of LM83-1 Δ *lmo2363* to Caco-2 cells was enhanced, and the invasion rate was decreased. The adhesion rate and invasion rate of CLM83-1 Δ *lmo2363* to Caco-2 cells were not significantly different from those of LM83-1. The proliferation of LM83-1 Δ *lmo2363* in macrophages decreased at 4, 8, 12 and 24 h, and the proliferation of CLM83-1 Δ *lmo2363* in macrophages decreased at 4 h.

收稿日期: 2024-04-15; 修回日期: 2025-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960726, 32060822, 31560700); 国家重点研发计划项目 (2019YFC1605705); 甘肃农业大学青年导师扶持基金项目 (GAU-QDFC-2020-10); 甘肃省重点研发计划项目 (20YF8FA136); 张家川揭榜挂帅项目 (ZC-STK-2023A-030)

第一作者: 芝吉, 女, 藏族, 硕士研究生

* 通信作者: 薛惠文, 教授, 研究方向为兽医公共卫生与食源性病原菌监测, E-mail: xuehw@gsau.edu.cn; 苟惠天, 教授, 研究方向为食源性疾病预防安全控制与动物性食品安全检测, E-mail: gouht@gsau.edu.cn。

Transcriptome sequencing showed that 136 genes of the deletion strain LM83-1 Δ lmo2363 were significantly different from those of LM83-1, including 36 up-regulated genes and 100 down-regulated genes. The GO functional enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were mainly concentrated in GO items such as ethanolamine lysozyme activity, bacterial flagella substrate, ethanolamine catabolism, iron ion homeostasis, etc. The enrichment analysis of the KEGG metabolic pathways showed that the differentially expressed genes were mainly concentrated in the phosphotransferase system, starch and sucrose metabolism, and flagella assembly. These results suggested that the glutamate decarboxylase *lmo2363* gene may played an important role in the formation of LM biofilm and *in vitro* cell infection by participating in biological processes such as iron homeostasis, flagella assembly and phosphotransferase system; which laid a foundation for further exploration into the function of glutamate decarboxylase.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; glutamic acid decarboxylase; biofilm; *in vitro* cell infection; transcriptome sequencing

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 简称单增李斯特菌, 是一种胞内致病菌, 侵袭巨噬细胞和非吞噬细胞, 特别是胃肠道上皮细胞, 感染人和动物后引起李氏杆菌病^[1-3]。LM 可形成生物被膜 (biofilm, BF), 保护细菌免受极端环境胁迫, 具有抗菌和免疫防御作用, 为其生存和致病创造了有利条件^[4]。

lmo2363 基因编码的谷氨酸脱羧酶在 LM 中发挥抗酸作用, 当 LM 处于酸性环境时, 谷氨酸脱羧酶将胞内的谷氨酸脱羧分解成 γ -氨基丁酸 (GABA) 和 CO₂, 这一过程消耗氢离子, 从而提高细菌胞内 pH 值, 保护细菌免受酸损伤^[5-6]。目前对 LM 谷氨酸脱羧酶的研究主要集中在抗酸应激方面, 尚未见有关谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因对 LM 致病性影响的报道。前期研究发现, *lmo2363* 基因缺失株与分离株 LM83-1 相比, 在低温、高渗透压等胁迫条件下的生长能力减弱。基于此, 本研究以 LM 参考株 ATCC 19111、分离株 LM83-1、*lmo2363* 基因缺失株 LM83-1 Δ lmo2363、*lmo2363* 基因回补株 LM83-1 Δ lmo2363 为研究对象, 通过荧光显微镜观察各菌株生物被膜形成, 利用体外细胞感染试验评估各菌株的致病能力, 并对 LM83-1 和 LM83-1 Δ lmo2363 进行转录组测序分析, 为阐明 LM 谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和菌株

人结肠腺癌细胞 Caco-2、小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自武汉普诺赛生物科技有限公司。单增李斯特菌分离株 LM83-1 (1/2a 血清型)、缺失株 LM83-1 Δ lmo2363、回补株 CLM83-1 Δ lmo2363 由甘肃农业大学兽医公共卫生学实验室分离或构建; 单增李斯特菌参考株 ATCC 19111 购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.2 主要试剂

DMEM 和 RPMI 1640 细胞培养基购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公

司; 反转录试剂盒购自南京诺唯赞科技股份有限公司; SYBR Green Premix Pro HS qPCR Kit 购自江苏艾瑞克生物科技有限公司。

1.3 生物被膜荧光显微镜观察

参考文献 [7] 进行生物被膜荧光染色。将 LM 参考株 ATCC 19111、分离株 LM83-1、缺失株 LM83-1 Δ lmo2363、回补株 CLM83-1 Δ lmo2363 分别接种至放有细胞爬片的 12 孔细胞培养板中, 分别培养 24、28、72 h 后弃去培养液, 经 PBS 洗涤、2.5% 戊二醛固定、荧光染料染色后用抗荧光封片剂封片, 荧光显微镜观察。

1.4 细胞黏附试验

参考文献 [8] 进行体外细胞感染试验。调整 LM 参考株 ATCC 19111、分离株 LM83-1、缺失株 LM83-1 Δ lmo2363、回补株 CLM83-1 Δ lmo2363 菌液 OD₆₀₀ 至 0.2 (10⁸ CFU/mL), 并用无抗的 DMEM 细胞培养液稀释 100 倍 (10⁶ CFU/mL), 各取 1 mL 加入铺板生长的 Caco-2 细胞中, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 1 h; 无菌 PBS 洗涤未黏附细菌, 加 100 μ L 胰酶, 37 °C 消化 3 min, 再加入 900 μ L 的 ddH₂O, 充分吹打使细胞完全脱落。将全部液体转移至 1.5 mL 的离心管中, 涡旋震荡 3 min, 使细胞彻底裂解, 对裂解液进行 10 倍梯度稀释后涂板计数。

1.5 细胞侵袭试验

同 1.4 方法感染 Caco-2 细胞, 2 h 后弃去培养液, 无菌 PBS 洗涤, 加入 1 mL 含 150 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 细胞培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 1 h, 彻底杀灭胞外菌。弃去细胞培养基, 用无菌 PBS 洗涤, 裂解细胞, 稀释后涂布计数菌落。

1.6 胞内增殖试验

同 1.4 方法感染 RAW264.7 细胞, 1 h 后用 150 μ g/mL 庆大霉素杀灭未入侵细菌; 弃去培养液, 无菌 PBS 洗涤, 加入含 20 μ g/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 培养液于 37 °C、5% CO₂ 培养箱共培养 4、8、12、24 h 后弃去细胞培养液, 用无菌 PBS 洗涤, 裂解细胞, 稀释后涂布计数菌落。

1.7 转录组测序样品准备

将-80℃冻存的分离株 LM83-1 和缺失株 LM83-1 Δ lmo2363 划线复苏,挑取单菌落过夜培养,次日按 1:100 转接,继续培养至对数生长期,取 1 mL 菌液离心收集菌体。将收集的细菌沉淀快速置于液氮中冷冻 10 min,研成粉末。加入 TRIzol 充分混匀,使菌体溶解于 TRIzol 中,形成清亮不黏稠的液体,每个菌设置 3 个平行,委托苏州金唯智有限公司完成转录组测序。

1.8 差异表达基因筛选和富集分析

使用 DESeq2 (V1.26.0) 软件对分离株 LM83-1 和缺失株 LM83-1 Δ lmo2363 进行基因表达差异分析,按照差异显著性标准(差异基因表达变化 2 倍以上且 $P < 0.05$) 筛选差异表达基因,并对筛选的差异表

达基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 代谢通路富集分析。

1.9 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证转录组数据

从分离株 LM83-1 和缺失株 LM83-1 Δ lmo2363 的差异表达基因中筛选 15 个基因进行 RT-qPCR 验证。使用在线网站 Primer Quest-design qPCR assays 设计这 15 个基因的实时荧光定量 PCR 引物,送至擎科生物技术有限公司合成,引物基本信息见表 1。反应体系:2 \times SYBR Green Pro Taq HS Premix 10 μ L,模板 cDNA 1 μ L,上下游引物各 0.4 μ L, ddH₂O 7.8 μ L。反应条件:预变性 95℃ 5 min; 95℃ 5 s, 56℃ 30 s, 72℃ 15 s, 循环 40 次;溶解曲线 95℃ 10 s, 65℃ 1 min, 97℃ 10 s。

表 1 引物基本信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp	引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
lmo2799-F	CCGTTAGTGGGAGCAAATGA	127	lmo2185-F	GGGTTTGTTCACCAGGATTTAC	110
lmo2799-R	GGGATAATTGGAGCGGGATTAG		lmo2185-R	GGACAAGCAGACTTCCGTTAT	
lmo1960-F	TTGCGCGTGACGAATTTAAC	135	lmo0712-F	GCCAGCGTCTTACCTAAAGT	120
lmo1960-R	GGTAGTCGGCTCATCAAGAAATA		lmo0712-R	TTGCGCGTTTGATTGTGTATC	
lmo2105-F	GCTCGTCTTTGTTCCTCAAATC	105	lmo0128-F	AGCGAATGAGCTGATTTCTATCT	114
lmo2105-R	TCCATTACGCGGTCCATAAC		lmo0128-R	TCCTCATCTCTCCTGACTTT	
lmo2123-F	TGAAGGCAGAAGATGCAGTTA	113	lmo1186-F	CGTTGCTACTATTGGGCTAGTT	112
lmo2123-R	GAAAGATCAGCGGACAACAAAG		lmo1186-R	TGCGATTCCACCTACGATTTTC	
lmo2125-F	GTCAAGCGGAAGAGCTTCTAA	116	lmo1175-F	CGGCGTAGACCAAGTAACAA	105
lmo2125-R	CAGGCTACAAAGACTACGTGAA		lmo1175-R	AGATACTCAGGCCCAATAAATCC	
lmo2181-F	CGTCGTTTCATACACAGCAAAG	126	lmo1176-F	GACCATGCAGTAGCACAAGA	125
lmo2181-R	GGATCCATGTTTTCGGATTTTAC		lmo1176-R	AAGTCTGGGCGAGTTAAGTATTC	
lmo0367-F	AAGACCGGTTCCGGTGTAAAG	104	lmo1177-F	CAGGTCTAGTAACAGCTGAATCC	106
lmo0367-R	GCATAAATCGCCGTCAGAATAAG		lmo1177-R	CCGCCGCTATGAATGTTAGA	
lmo0690-F	CCAAGCGTCTGATAAAGCTAATG	134			
lmo0690-R	CAGCATCAGCAACGGATAATG				

1.10 统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件对细胞黏附、侵袭、胞内增殖试验数据进行统计分析,非配对 t 检验用于分析数据差异性。

2 结果

2.1 生物被膜荧光显微镜观察

ATCC19111、LM83-1、LM83-1 Δ lmo2363、CLM83-1 Δ lmo2363 生物被膜荧光显微镜观察结果显示(图 1),随着培养时间的推移,各菌株生物被膜形成量增加,在 24、48 h 时 LM83-1 Δ lmo2363 和 ATCC 19111 的生物被膜形成量比 LM83-1 少,形成

了单层生物被膜,结构疏松;CLM83-1 Δ lmo2363 的生物被膜形成量和结构与 LM83-1 无差异;在 72 h 时各菌株形成了致密、多层生物被膜。

2.2 Caco-2 细胞黏附试验和侵袭试验

黏附试验结果显示(图 2A),ATCC 19111、LM83-1、LM83-1 Δ lmo2363、CLM83-1 Δ lmo2363 的黏附率分别为 2.16%、1.57%、3.44%、1.5%。统计分析结果显示,LM83-1 Δ lmo2363 与 LM83-1 相比对 Caco-2 细胞的黏附率增强,差异极显著($P < 0.01$);LM83-1 与 ATCC 19111 相比对 Caco-2 细胞的黏附率下降,差异显著($P < 0.05$);CLM83-1 Δ lmo2363 与 LM83-1 相比无显著差异($P > 0.05$)。

侵袭试验结果显示 (图 2B), ATCC 19111、LM83-1、LM83-1 Δ lmo2363、CLM83-1 Δ lmo2363 的侵袭率分别为 4.29%、0.19%、0.1%、0.21%。统计学分析结果显示 LM83-1 Δ lmo2363 与 LM83-1 相比

对 Caco-2 细胞的侵袭率下降, 差异极显著 ($P < 0.01$); LM83-1 与 ATCC 19111 相比对 Caco-2 细胞的侵袭率下降, 差异极显著 ($P < 0.001$); CLM83-1 Δ lmo2363 与 LM83-1 相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

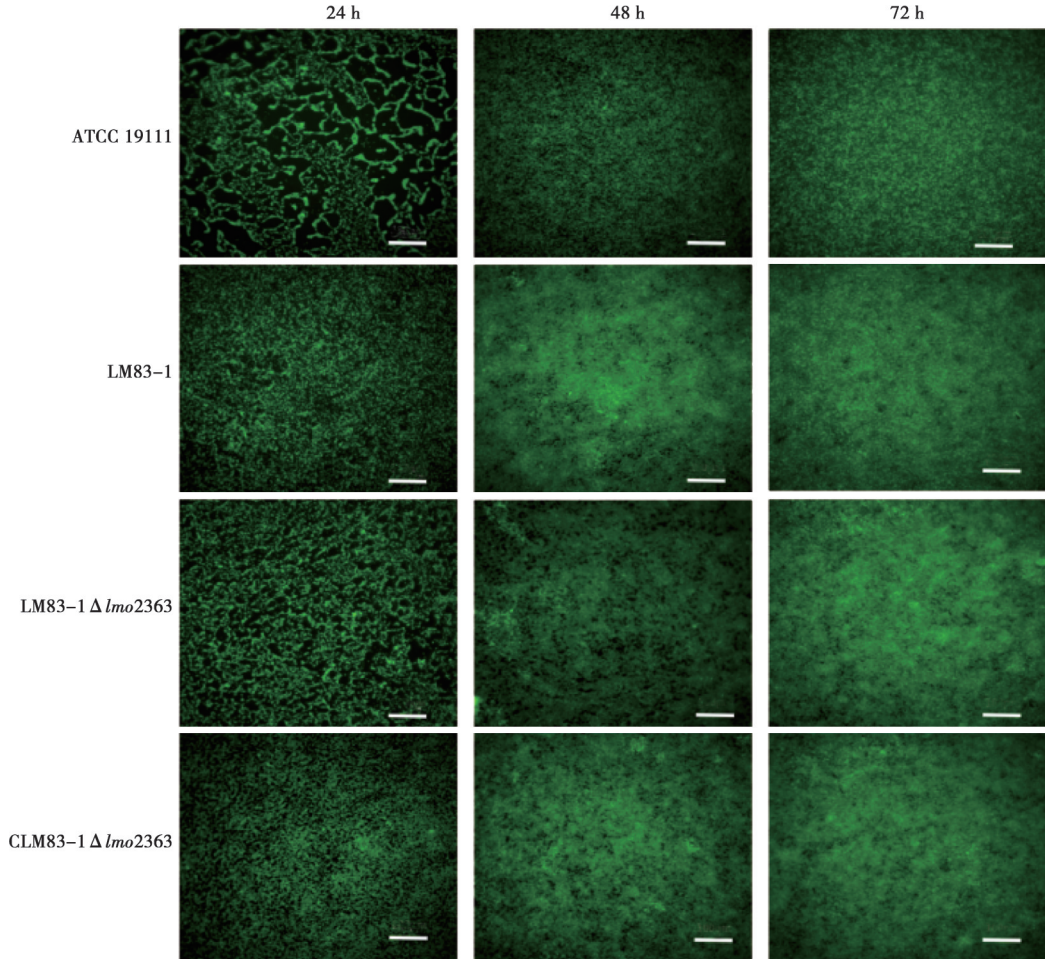
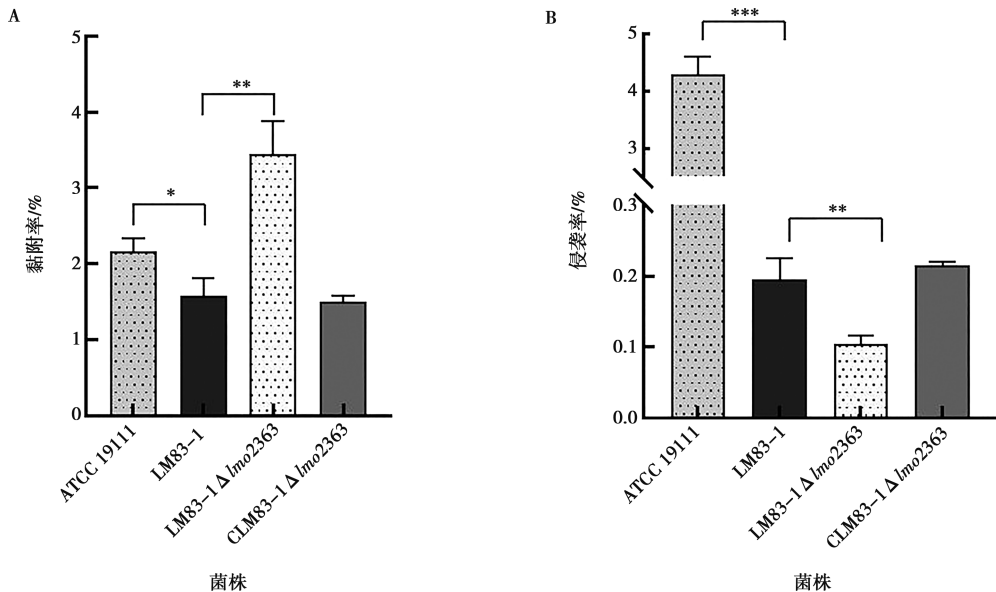


图 1 不同菌株生物被膜荧光显微镜观察结果 (比例尺 = 100 μ m)



注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$ 。下同。

图 2 Caco-2 细胞黏附率 (A) 和侵袭率 (B)

2.3 巨噬细胞胞内增殖试验

ATCC 19111、LM83-1、LM83-1 Δ lmo2363、CLM83-1 Δ lmo2363 胞内增殖能力测定结果见图 3。随着培养时间的延长，菌量呈增加趋势。其中 ATCC 19111 较 LM83-1 增长缓慢，在培养 0、4、8、12、

24 h 时均差异极显著 ($P < 0.01$)；LM83-1 Δ lmo2363 与 LM83-1 相比在巨噬细胞胞内增殖能力较弱，在 4、8、12、24 h 时差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；CLM83-1 Δ lmo2363 与 LM83-1 相比在 4 h 时差异极显著 ($P < 0.01$)，其余时间段无显著差异 ($P > 0.05$)。

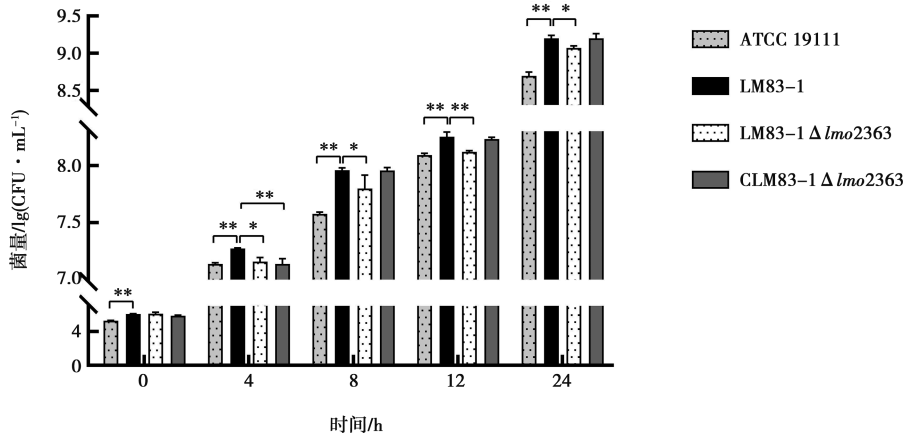


图 3 不同菌株在 RAW264.7 胞内增殖结果

2.4 差异表达基因筛选

LM83-1 与 LM83-1 Δ lmo2363 之间差异表达基因筛选结果显示，缺失株 LM83-1 Δ lmo2363 与 LM83-1

相比共有 136 个基因表达差异显著，其中上调基因 36 个，下调基因 100 个。根据差异表达基因绘制了火山图 (图 4)。

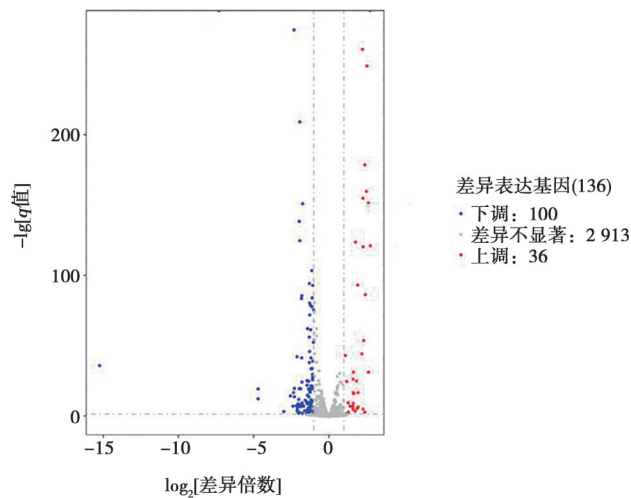


图 4 差异表达基因火山图

2.5 差异表达基因 GO 富集分析

LM83-1 和 LM83-1 Δ lmo2363 之间差异表达基因 GO 富集分析结果显示 (图 5)，差异表达基因显著富集的前 30 个 GO term 中有 9 个分子功能、7 个细胞组分、14 个生物过程。其中与 LM 致病相关的分子功能有结构分子活性、麦芽糖转运 ATP 酶活性、乙醇胺解氨酶活性、血红素结合部位、血红素加氧酶 (脱环) 活性；细胞组分有细菌型鞭毛基体、细胞膜、乙醇胺解氨酶复合物、ATP 结合盒 (ABC) 转运复合物 (含底物结合亚基)；生物过程有铁离子稳态、

细胞对铁离子的反应、铁同化、磷酸烯醇丙酮酸依赖的糖磷酸转移酶系统、血红素分解代谢过程、麦芽糖运输系统等。

2.6 KEGG 富集分析

LM83-1 和 LM83-1 Δ lmo2363 之间差异表达基因 KEGG 富集分析结果显示 (图 6)，共富集到 39 个代谢通路中，其中前 30 个显著富集的代谢通路中与 LM 致病相关的有磷酸转移酶系统 (PTS)、淀粉和蔗糖代谢、鞭毛组装等。

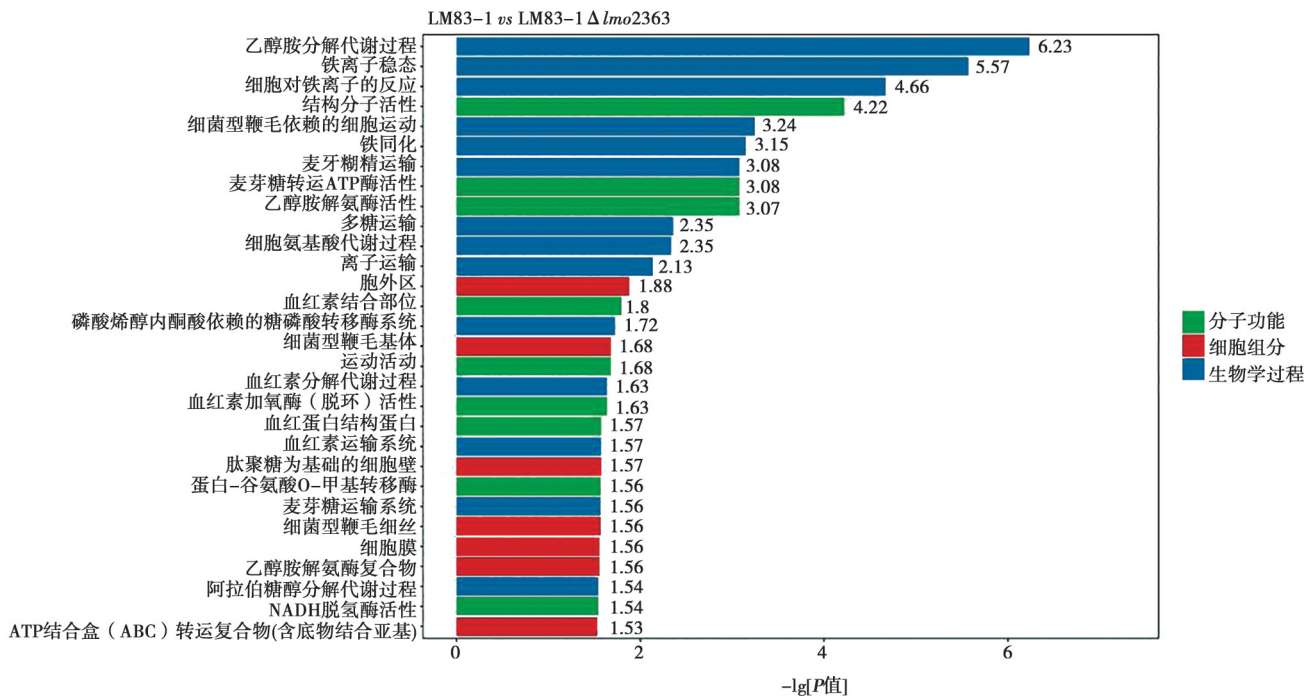


图5 差异表达基因 GO 富集

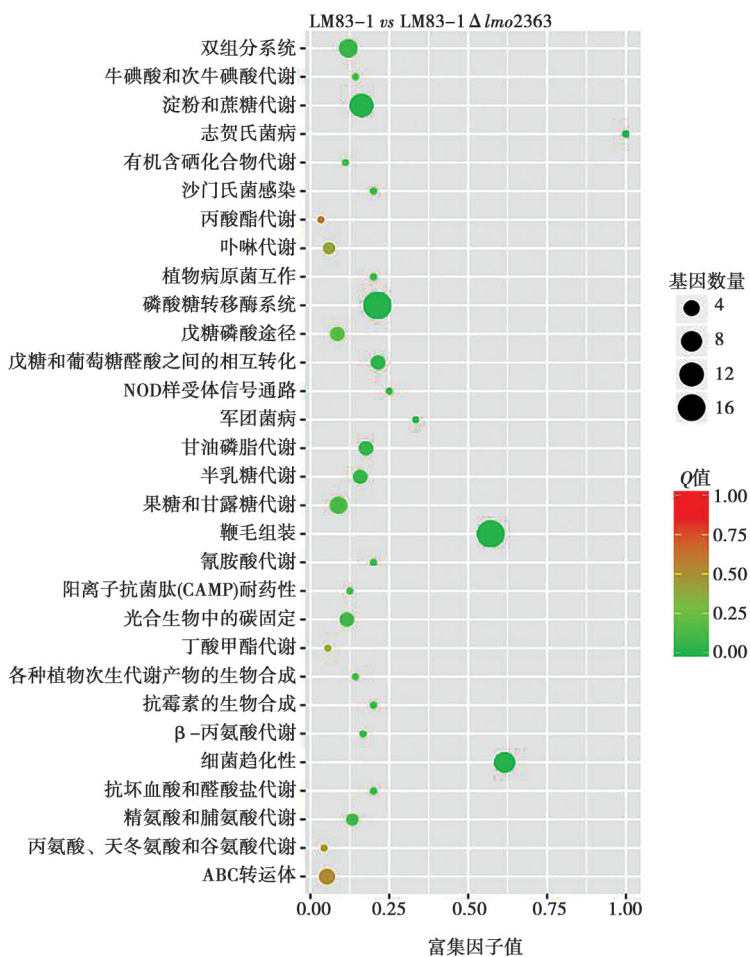


图6 差异表达基因 KEGG 富集散点图

2.7 RT-qPCR 验证

为了验证转录组测序结果可靠性, 筛选 15 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证, 结果显示 (图 7),

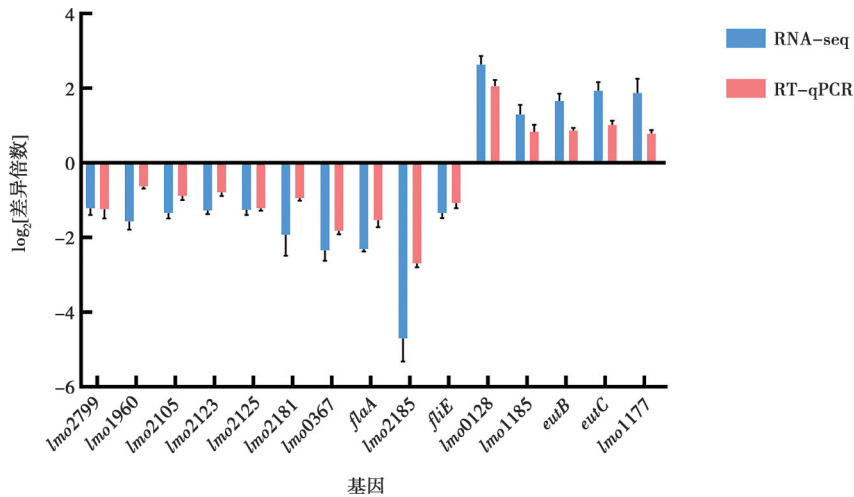


图 7 RT-qPCR 验证差异表达基因

3 讨论

LM 是一种重要的食源性病原菌, 可以引起李氏杆菌病, 威胁公众健康。LM 可以在不锈钢、聚丙烯等接触表面形成生物被膜来保护自身, 促进其在胁迫环境中存活, 增加了食品污染的风险^[9]。本研究观察 ATCC 19111、LM83 - 1、LM83 - 1 Δ *lmo2363*、CLM83-1 Δ *lmo2363* 这 4 菌株的生物被膜形成能力, 结果显示各菌株在 72 h 内随着培养时间的延长, 生物被膜的形成量逐渐增加。在 24 h 和 48 h 时 LM 缺失株的生物被膜形成量较分离株显著减少, 表明谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因在生物被膜形成过程中起重要作用。*lmo2363* 基因缺失后对 Caco-2 细胞的黏附率显著增强, 侵袭率显著降低, 在巨噬细胞内的存活能力下降, 表明 *lmo2363* 基因在细菌黏附侵袭及胞内存活过程中发挥作用, 这可能因为谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因缺失影响了 LM 的黏附侵袭和胞内存活相关的因子, 进而影响细菌的感染能力。

本研究转录组测序结果表明, 单增李斯特菌 *lmo2363* 基因的缺失影响一系列生物学过程和代谢通路, LM83-1 与 LM83-1 Δ *lmo2363* 间共筛选到 136 个差异表达基因, 其中上调基因 36 个, 下调基因 100 个。与 LM 致病相关上调差异表达基因有参与乙醇胺分解代谢过程的 *eutB*、*eutC*、*lmo1177*、*lmo1186* 基因。下调差异表达基因有参与铁离子稳态的 *fhuC*、*lmo2105* 等基因; 参与细菌鞭毛组装的 *flaA*、*fliE*、*motB*、*fliG* 等基因; 参与磷酸转移酶系统的 *lmo0298*、*lmo0915*、*lmo2685* 等基因。有研究表明 *eutB*、*eutC*

RT-qPCR 与 RNA-seq 测序差异基因上下调趋势一致, 表明测序结果可靠。

是分解乙醇胺最核心的 2 个基因, 将乙醇胺分解为乙醛和氨, 分别作为碳和氮的来源^[10]。有研究发现, 与 LM 野生株相比, *eutB* 缺失突变体在细胞内增殖存在缺陷, 菌数降低了一个对数级, 在感染 Caco-2 细胞中 *eut* 基因表达上调^[11]。本研究对 LM83-1 和 LM83-1 Δ *lmo2363* 转录组测序结果发现, *lmo2363* 基因缺失后 *eutB*、*eutC* 等基因表达上调, 这可能是引起 LM83-1 Δ *lmo2363* 对 Caco-2 黏附率增强的重要原因。

铁离子胞质内积累过多会对细菌细胞造成毒性, 因为它促进活性氧的产生, 破坏细菌细胞^[12]。此外, 铁离子稳态失衡会导致超氧化物歧化酶活性降低, 增加细菌对氧化应激的敏感性^[13]。研究发现, 在铁载体合成或摄取方面有缺陷的结核分枝杆菌突变体无法在巨噬细胞内存活^[14]。本研究对 LM83-1 和 LM83-1 Δ *lmo2363* 测序结果发现, 维持细胞内铁稳态的相关基因 *fhuC*、*lmo2105*、*lmo2185*、*lmo2186* 表达下调, *lmo2363* 基因缺失株在巨噬细胞内存活降低可能与这些基因表达下调有关。

细菌生物被膜的形成取决于极性鞭毛的运动, 研究发现, 与野生菌相比, 创伤弧菌 *flaE* 基因缺陷的突变株生物被膜形成显著减少^[15]。Moe 等^[16]报道空肠弯曲杆菌 *flaA* 突变株不能形成和野生型菌株一样的生物被膜。这些研究表明, 鞭毛以及鞭毛介导的运动是细菌生物被膜形成所必需的。Dons 等^[17]研究发现, 在 LM 中缺失 *flaA* 基因后, 与野生株相比, 对 Caco-2 细胞的侵袭率下降。本研究对 LM83-1 和 LM83-1 Δ *lmo2363* 菌株转录组测序分析发现, 编码鞭毛蛋白的 *flaA*、*fliE* 基因表达下调, 这可能导致

LM83-1 Δ lmo2363 生物被膜形成能力的下降和对 Caco-2 细胞侵袭率的降低。

LM 可以在不同环境中存活,这在很大程度上归因于其基因组中含有大量的碳水化合物 PTS 编码基因。碳水化合物可以作为能量来源被吸收,还可以作为 LM 基因表达的特异诱因,以应对预期的压力^[18-19]。大肠杆菌缺失 PTS 编码基因后,其生长能力和糖摄取能力严重下降^[20];克罗诺杆菌 PTS 编码麦芽糖转运体亚单位的 *malX* 基因缺失后,其生物被膜形成能力减弱,胞外多糖含量降低^[21]。此外,PTS 还能介导细菌应激反应,当 LM 缺失硫氧还蛋白家族氧化还原酶 *yjbH* 基因后,大多数 PTS 系统基因显著下调,细菌对金属离子氧化剂显著敏感^[22]。本研究发现,富集在 PTS 系统的基因表达下调,这可能与 LM83-1 Δ lmo2363 生物被膜形成能力下降和巨噬细胞内存活能力下降有关。

综上,本研究证实 *lmo2363* 基因在单增李斯特菌中可能通过参与铁稳态、鞭毛组装、PTS 等生物学过程在 LM 生物被膜形成和细胞感染中发挥重要作用。本研究结果为深入了解谷氨酸脱羧酶 *lmo2363* 基因功能奠定基础。

参考文献:

- [1] CHOWDHURY B, ANAND S. Environmental persistence of *Listeria monocytogenes* and its implications in dairy processing plants [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2023, 22 (6): 4573-4599.
- [2] 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.
- [3] FLIEGER A, FRISCHKNECHT F, HÄCKER G, et al. Pathways of host cell exit by intracellular pathogens [J]. *Microbial Cell*, 2018, 5 (12): 525-544.
- [4] QUENDERA A P, PINTO S N, POBRE V, et al. The ribonuclease PNPase is a key regulator of biofilm formation in *Listeria monocytogenes* and affects invasion of host cells [J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2023, 9 (1): 34.
- [5] KARATZAS K A, SUUR L, O'BYRNE C P. Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (10): 3571-3579.
- [6] DAMIANO M A, BASTIANELLI D, AL DAHOUK S, et al. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Brucella* spp.: distribution and contribution to fitness under extremely acidic conditions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81 (2): 578-586.
- [7] 莘似韵, 孙晓红, 徐忆宁, 等. 超高压对单增李斯特菌生物被膜形成的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26 (2): 294-300.
- [8] 方春. 单核细胞增生李斯特菌谱系 III 强毒株与弱毒菌株比较基因组及致病力差异机制 [D]. 杭州: 浙江大学. 2015.
- [9] BYUN K H, KIM H J. Survival strategies of *Listeria monocytogenes* to environmental hostile stress: biofilm formation and stress responses [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2023, 32 (12): 1631-1651.
- [10] KAVAL K G, GARSIN D A. Ethanolamine utilization in bacteria [J]. *mBio*, 2018, 9 (1): e00066-18.
- [11] JOSEPH B, PRZYBILLA K, STÜHLER C, et al. Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (2): 556-568.
- [12] LLAMAS M A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ A. Iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*: targeting iron acquisition and storage as an antimicrobial strategy [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2022, 1386: 29-68.
- [13] JAKUBOVICS N S. An ion for an iron: streptococcal metal homeostasis under oxidative stress [J]. *The Biochemical Journal*, 2019, 476 (4): 699-703.
- [14] SRITHARAN M. Iron homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic insights into siderophore-mediated iron uptake [J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198 (18): 2399-2409.
- [15] JUNG Y C, LEE M A, LEE K H. Role of flagellin-homologous proteins in biofilm formation by pathogenic *Vibrio* species [J]. *MBio*, 2019, 10 (4): 01793-19.
- [16] MOE K K, MIMURA J, OHNISHI T, et al. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni* [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72 (4): 411-416.
- [17] DONS L, ERIKSSON E, JIN Y, et al. Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence [J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (6): 3237-3244.
- [18] WU J, MCAULIFFE O, O'BYRNE C P. Trehalose transport occurs via TreB in *Listeria monocytogenes* and it influences biofilm development and acid resistance [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 394: 110165.
- [19] XU T, TAO X, HE H, et al. Functional and structural diversification of incomplete phosphotransferase system in cellulose-degrading clostridia [J]. *The ISME Journal*, 2023, 17 (6): 823-835.
- [20] KIM H J, JEONG H, LEE S J. Glucose transport through N-acetylgalactosamine phosphotransferase system in *Escherichia coli* C strain [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 32 (8): 1047-1053.
- [21] KONG X, LI C, SUN X, et al. The maltose transporter subunit IICB of the phosphotransferase system: an important factor for biofilm formation of *Cronobacter* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 370: 109517.
- [22] CHENG C, HAN X, XU J, et al. 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.