

ILO 与 LLO 协助李斯特菌黏附、侵袭细胞及胞内增殖的比较研究*

刘思静^{1,2}, 刘婷^{1,2}, 周玉真^{1,2}, 郭妮^{1,2}, 黄欢^{1,2}, 汪川^{1,2△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041);

2. 四川大学华西公共卫生学院 公共卫生与预防医学实验中心(成都 610041)

【摘要】目的 研究李斯特菌溶血素的主要功能,比较两种李斯特菌——绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*, LI)和单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)的溶血素对细菌黏附细胞等作用的强弱。**方法** 构建含有 LI *i-hly* 基因上、下游同源序列和 *lacZ* 基因或 *hly* 基因的打靶质粒,利用基因重组技术构建 LI 溶血素(ILO)缺陷的 LI 重组菌株 LI Δ *i-hly*::*lacZ* 和回补表达 LM 溶血素(LLO)的重组菌株 LI Δ *i-hly*::*hly*;比较 2 株重组菌与野生 LI 对人肝癌 HepG2 细胞的黏附、侵袭能力;比较 3 株菌在巨噬细胞 RAW264.7 内的增殖能力。**结果** 重组菌株 LI Δ *i-hly*::*lacZ* 和 LI Δ *i-hly*::*hly* 的基因序列与预期相符;LI Δ *i-hly*::*hly*、LI 和 LI Δ *i-hly*::*lacZ* 对 HepG2 细胞的黏附率分别为(3.43±0.82)%、(3.43±1.59)% 和(3.41±1.12)%,侵袭率分别为(1.74±0.46)%、(1.22±0.75)% 和(1.39±0.46)%,差异均无统计学意义;胞内增殖实验结果表明,与野生株相比,ILO 缺陷株 LI Δ *i-hly*::*lacZ* 在巨噬细胞内的增殖量降低,LI Δ *i-hly*::*hly* 的增殖量升高。**结论** LI 在细胞内的增殖水平与 ILO 有关,ILO 缺失抑制了 LI 在细胞内的增殖能力,LM 溶血素 LLO 协助细菌逃离吞噬泡进入宿主细胞质的能力强于 LI 溶血素 ILO。

【关键词】 绵羊李斯特菌 单增李斯特菌 LM 溶血素 LI 溶血素 胞内增殖

Comparison of the Effects of ILO and LLO in Helping *Listeria* Adhere, Invade Cell and Intracellularly Multiply LIU Si-jing^{1,2}, LIU Ting^{1,2}, ZHOU Yu-zhen^{1,2}, GUO Ni^{1,2}, HUANG Huan^{1,2}, WANG Chuan^{1,2△}. 1. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Research Center for Public Health and Preventive Medicine, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】Objective To study the primary function of ivanolysin O (ILO) and Listeriolysin O (LLO) and compare the effects of these two hemolysins in helping bacteria adhere, invade cell and intracellularly multiply. **Methods** The targeting plasmids carrying the upstream and downstream sequences of *i-hly* and *lacZ* gene sequence or *hly* gene sequence were constructed. Then two recombinant strains, the ILO deletion strain LI Δ *i-hly*::*lacZ* and LLO compensative expressing strain LI Δ *i-hly*::*hly*, were constructed by plasmid targeting recombinant technique. The adhesive and invasive ability of LI Δ *i-hly*::*hly*, LI and LI Δ *i-hly*::*lacZ* were evaluated in HepG2 cells, and their intracellular multiplication abilities were evaluated in RAW264.7 macrophages. **Results** Genome sequences of the recombinant strains were as expected. The adhesive rate of LI Δ *i-hly*::*hly*, LI and LI Δ *i-hly*::*lacZ* were (3.43±0.82)%, (3.43±1.59)% and (3.41±1.12)% respectively, and the invasive rate were (1.74±0.46)%, (1.22±0.75)% and (1.39±0.46)% respectively. Difference in adhesive and invasive rates showed no significance. Among three strains, LI Δ *i-hly*::*lacZ* showed the lowest intracellular proliferation rate, and LI Δ *i-hly*::*hly* possessed the highest intracellular proliferation rate in RAW264.7 macrophages. **Conclusion** The intracellular multiplication ability of LI is related to ILO. Deletion of ILO induces a distinct decrease in intracellular multiplication for LI. Compared with ILO, LLO shows a stronger ability in helping the bacteria escape from the phagosome into the host cell cytosol.

【Key words】 *Listeria ivanovii* *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O Ivanolysin O Intracellular multiplication

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)作为一种胞内寄生菌,能在宿主吞噬细胞内存活、增

殖,并直接感染邻近细胞,诱发宿主高效的特异性 T 细胞免疫反应,因此被用作疫苗载体广泛应用于肿瘤治疗和疫苗研究等方面^[1-2]。LM 独特的胞内寄生特性与其逃离宿主细胞吞噬泡的能力密切相关^[3],LM 溶血素(Listeriolysin O, LLO)在这个过

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31570924)和四川省科技厅国际合作项目(No. 2017HH0080)资助

△ 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

程中发挥重要作用^[4]。绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*, LI)是李斯特菌属中另一种细菌,具有与LM类似的基因组结构和胞内寄生性,且不对人类致病^[5]。本研究团队已构建了多株分别表达结核分枝杆菌 Ag85C 和 ESAT-6 蛋白的减毒 LI 重组菌株,免疫小鼠后可诱导特异的 IFN- γ 的分泌,初步证实了 LI 作为活菌疫苗载体的价值^[6]。但我们发现,LI 载体疫苗候选株在体内免疫器官中存在的时间比 LM 短,导致其免疫原性受限,这可能与 LI 溶血素(Ivanolysin O, ILO)的能力有关。ILO 与 LLO 的氨基酸序列呈现高度相似性(80%),但 ILO 协助细菌逃离吞噬泡进入宿主细胞质的能力可能弱于 LLO,但目前,相关研究资料还很匮乏。因此,本研究构建 ILO 缺陷的 LI 菌株与回补替换表达 LLO 的 ILO 缺陷型 LI 菌株,研究重组菌对 HepG2 细胞的黏附、侵袭能力以及在巨噬细胞内的增殖情况,分析溶血素的主要功能,并比较 LLO 与 ILO 协助细菌黏附、侵袭细胞及胞内增殖的作用的强弱,为进一步优化以 LI 为载体的疫苗体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 质粒 pCW107 含氨苄西林抗性基因(*Amp^r*)、红霉素抗性基因(*Ery^r*)、*Xba* I、*Not* I、*Spe* I 酶切位点各 1 个;绵羊李斯特菌野生株 LI PAM55;人肝癌细胞系 HepG2;鼠巨噬细胞系 RAW264.7。以上质粒、菌株和细胞均由本实验室保存,大肠杆菌 DH5 α 购自 TaKaKa。

1.1.2 PCR 引物 LI-ILO-up-f/r(f: 5'-GCAGATACACTTAAAAAGTTCTAGAGCAAGTTAA GGAAGTAGCGC-3'; r: 5'-TTTCCATATTTT TAGCGCCGCGGTTTCTACTCTCCTTCTAC-3')用于扩增*i-hly* 基因上游同源序列;LI-ILO-down-f/r(f: 5'-AGTGAAAACCGCGGCCGCTAAAAATATGGAAAACCC-3'; r: 5'-AATTCGCCCCGGGACTAGTTTATGGTTCAAATCAAACGTT-3')用于扩增*i-hly* 基因下游同源序列;So-lacZ-f/r(f: 5'-GTGAAAACCGCGGCCGCTAGCTTTAAGGCTAAATGCCGAAT-3'; r: 5'-TTTCCATATTTTAGCGGCCGCTAGAGTGACTTTTATGTTGAGG-3')用于扩增 *lacZ* 基因;So-LLO-f/r(f: 5'-CCGCGGCCGCATGAAAAAATAATGCTAGTTTATTACACTTATATT-3'; r: 5'-TTTTCATATTTTATAGCGGCCGCTTATTCGATTGGA

TTATCTACTTTA-3')用于扩增 *hly* 基因;lacZ-f/r(f: 5'-GTTTTTATTACACTTATATT-3'; r: 5'-TTATTCGATTGGATTATCTACTTTA-3')用于筛选 *lacZ* 基因;Ery-f/r(f: 5'-GTCGACGATTCACAAAAATAGGC-3'; r: 5'-ACTAGTCCGGGGCGAATTG-3')用于筛选 *Ery* 基因;LLO-f/r(f: 5'-ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTA-3'; r: 5'-TTATTCGATTGGATTATCTACT-3')用于筛选 *hly* 基因;ILO-f/r(f: 5'-ATGAAAAAATAATGCTACTTTTAA-3'; r: 5'-TTACTTAATTGGATTATCTACAG-3')用于筛选 *i-hly* 基因。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.1.3 主要仪器与试剂 高保真 DNA 聚合酶、无缝克隆试剂盒 TreliefTM SoSoo cloning kit(北京擎科新业生物技术有限公司);质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit (200)、胶回收试剂盒 E. Z. N. A. TM Gel(OMEGA bio-tek);限制性内切酶 *Xba* I、*Not* I、*Spe* I,去磷酸化酶 CIAP(NEB);PCR 仪、ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(BIO-RAD)。

1.2 方法

1.2.1 打靶质粒 pCW-up-lacZ-down 和 pCW-up-hly-down 的构建 分别采用引物 LI-ILO-up-f/r 和 LI-ILO-down-f/r,以 LI 基因组为模板扩增 *i-hly* 基因上、下游同源序列“up”和“down”片段;通过无缝克隆试剂盒将含有质粒 pCW107 重叠序列的 up 片段连接至经 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切的载体上,构建 pCW-up 克隆质粒。将 pCW-up 经 *Spe* I 和 *Not* I 双酶切后,通过无缝连接构建 pCW-up-down 克隆质粒。将 pCW-up-down 经 *Not* I 酶切后,分别连接带有载体骨架重叠序列的 *lacZ* 和 *hly* 基因,构建打靶质粒 pCW-up-lacZ-down 和 pCW-up-hly-down,PCR 筛选阳性克隆菌,经酶切验证后送测序鉴定。

1.2.2 重组菌 LI Δ *i-hly*::*lacZ* 和 LI Δ *i-hly*::*hly* 的构建与筛选 提取打靶质粒 pCW-up-lacZ-down,电转化 LI,将电转液涂布于含 Ery(3 μ g/mL)、X-gal 和 IPTG 的 BHI 琼脂平板,30 $^{\circ}$ C 培养 48 h,挑取蓝色菌落进行 PCR 验证和提质粒验证。将电转成功的菌落通过 42 $^{\circ}$ C 的温度和红霉素抗性压力(3 μ g/mL)实现第一次同源重组,随后挑取平板上的单个蓝色菌落转种 BHI 肉汤,30 $^{\circ}$ C 传代培养 6 代完成第二次同源重组获得重组菌,依次用 Ery-f/r、lacZ-f/r 和 ILO-f/r 进行 PCR 验证和测序鉴定,重组菌命名为 LI Δ *i-hly*::*lacZ*。

lacZ 在约 3 900 bp 处存在明显条带, $LI\Delta i-hly::hly$ 在 3 900 bp 处无明显条带; 以引物 ILO-f/r 行 PCR 筛选, $LI\Delta i-hly::lacZ$ 在约 1 600 bp 处无明显条带; 以引物 LLO-f/r 进行 PCR 筛选, $LI\Delta i-hly::hly$ 在约 1 600 bp 处存在明显条带; 以引物 Ery-f/r 进行 PCR 筛选, 在约 1 400 bp 处 $LI\Delta i-hly::lacZ$ 与 $LI\Delta i-hly::hly$ 均无明显条带, 测序结果也与预期相符。以上结果表明, 经同源重组后, *LI* 基因组中溶血素基因 *i-hly* 被分别替换为 *lacZ* 基因和 LM 溶血素基因 *hly*。

2.3 重组菌细胞黏附与侵袭能力的测定

黏附侵袭实验结果显示(图 3), $LI\Delta i-hly::hly$ 、*LI* 和 $LI\Delta i-hly::lacZ$ 对人肝癌细胞 HepG2 的黏附率分别为 $(3.43 \pm 0.82)\%$ 、 $(3.43 \pm 1.59)\%$ 和 $(3.41 \pm 1.12)\%$, 对 HepG2 细胞的侵袭率分别为 $(1.74 \pm 0.46)\%$ 、 $(1.22 \pm 0.75)\%$ 和 $(1.39 \pm 0.46)\%$, 差异均无统计学意义。结果表明 2 株重组菌与野生菌株相比, 对 HepG2 细胞的黏附侵袭能力无差异。

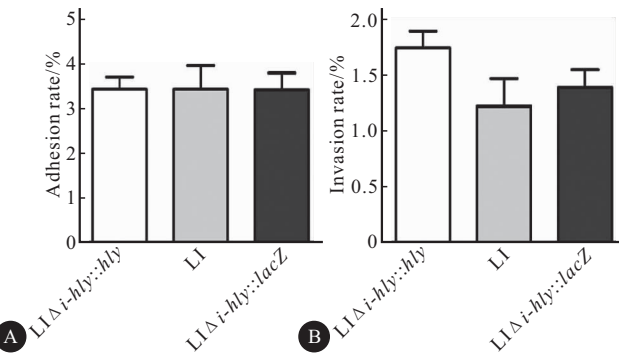


图 3 3 株绵羊李斯特菌对 HepG2 细胞的黏附(A)与侵袭(B)能力实验
Fig 3 Adhesion (A) and invasion (B) of 3 strains of *Listeria ivanovii* to HepG2 cells

2.4 重组菌在巨噬细胞内增殖能力的测定

由图 4 可见, *LI* 可在 RAW264.7 细胞内增殖, 但 ILO 缺陷型重组菌 $LI\Delta i-hly::lacZ$ 在 RAW264.7 内基本不增殖, 在感染后 4 h *LI* 与 $LI\Delta i-hly::lacZ$ 的增殖倍数的差异有统计学意义 ($P<0.05$), 这表明 ILO 与 *LI* 在巨噬细胞内的增殖能力有关。回补替代表达绵羊李斯特菌溶血素 LLO 的重组菌 $LI\Delta i-hly::hly$ 可在 RAW264.7 中增殖, 这表明 LLO 可恢复 ILO 缺陷株逃离吞噬泡的能力; 而且, $LI\Delta i-hly::hly$ 在 RAW264.7 中增殖量高于野生菌株 *LI*, 在感染后 6 h、7 h, $LI\Delta i-hly::$

hly 的增殖倍数与 *LI* 相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。以上结果表明, LM 的溶血素 LLO 协助细菌逃离吞噬泡进入宿主细胞质的能力强于 *LI* 的溶血素 ILO。

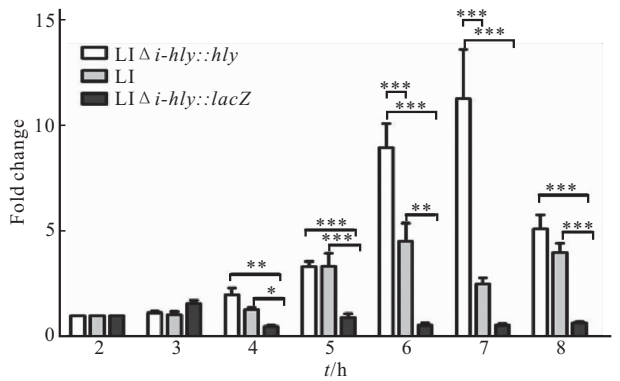


图 4 3 株绵羊李斯特菌在巨噬细胞 RAW264.7 中的增殖情况
Fig 4 Multiplication of 3 trains of *Listeria ivanovii* in RAW264.7 macrophages
* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.005$

3 讨论

LM 和 *LI* 可黏附、侵袭多种类型的细胞, 并能够在吞噬和非吞噬细胞内存活, 被吞噬细胞吞噬后又逃逸吞噬泡, 回到胞浆中增殖, 随后直接感染邻近细胞^[6]。这种逃逸吞噬泡, 在抗原递呈细胞内增殖的特点使得李斯特菌携带的抗原能有效递呈给原始淋巴细胞, 使宿主能够产生高效的抗原特异性的细胞免疫反应, 故是一种理想的外源抗原运送载体。本团队前期研究发现, LM 进入免疫器官呈现典型的增殖过程, 以较高的载量维持较长的时间, 随后被逐渐清除; 但是 *LI* 在免疫器官中难以观察到高水平、长时间的增殖, 表现为载量维持时间较短, 易被机体清除^[7]。李斯特菌胞内生活史中的重要过程都有不同的毒力因子参与, *LI* 具有与 LM 相似的毒力因子, 且这些毒力因子与 LM 相应的毒力因子在序列上和功能上存在一定的相似性, 这些相似性使得 *LI* 能够像 LM 一样建立胞内感染周期, 但这些毒力因子在 LM 和 *LI* 之间仍存在一定的差异^[8]。

LM 溶血素 LLO 是主要参与裂解细菌吞噬泡的李斯特菌致病因子, 同时也通过引起钙离子内流而参与细菌对上皮细胞的侵袭作用^[9]。LLO 与 *LI* 溶血素 ILO 的氨基酸序列具有高度相似性 (80%), FREHEL 等^[10] 在 LLO 缺失的 LM 变异菌株中表达 ILO, 能够恢复该基因缺失菌株逃离巨噬细胞和肝细胞中的吞噬体的能力, 提示 ILO 可能有与 LLO

相似的功能,但是该重组菌无法在小鼠脾脏内增殖,因此,LLO 与 ILO 在功能上的具体差异还有待深入研究。本研究敲除 LI 基因组中的 *ihly* 基因,构建溶血素缺失菌株 LI Δ *ihly*::*lacZ* 以及回补替换表达 LLO 的菌株 LI Δ *ihly*::*hly*,初步探究 LLO 基因在 LI 中的表达对菌株生物学特性的改变。实验结果表明,*ihly* 基因的敲除对于介导菌体的细胞黏附和侵袭能力无影响,上述结果表明 ILO 不是影响 LI 细胞黏附与侵袭的主要毒力因子。RAW264.7 细胞内的增殖实验结果表明 LI 可以在巨噬细胞内增殖,但缺失 ILO 的 LI 重组株 LI Δ *ihly*::*lacZ* 几乎无法在巨噬细胞内增殖,说明 LI 逃离吞噬体,在细胞质内增殖的能力与 ILO 密切相关;当回补替换表达 LLO 后,ILO 缺失株可恢复在巨噬细胞内增殖的能力,且生长趋势与 LI 相似,这表明 ILO 与 LLO 同样具有溶解吞噬体膜、促进细菌从吞噬体逃逸到细胞质中生长繁殖的功能;其次,表达 LLO 的 LI 重组菌 LI Δ *ihly*::*hly* 在巨噬细胞内的增殖量还高于表达 ILO 的 LI 野生株,说明 LLO 具有更强的促进细菌胞内生长的功能。因此有理由推测,与 LI 载体疫苗相比,以 LI Δ *ihly*::*hly* 为载体的重组菌在免疫器官中存活的时间更长,能以更高的载量维持更长的时间,可望具有更好的免疫效应。

值得注意的是,在 FREHEL 等^[10]的研究中,以 ILO 替代 LLO 会降低 LM 的毒性,这表明 LLO 的细胞毒性高于 ILO,因此在优化 LI 为载体的疫苗体系时,除了提高免疫原性,还需要考虑安全性。LLO 是一个由四个结构域(D1-D4)组成的杆状蛋白^[4-5],不同结构域的功能不同,D1 富含 MHC-II 类细胞表位,参与调节成孔过程;D2 富含 MHC-II 类细胞表位,参与调节成孔过程;D3 对于膜插入、孔形成和 LLO 变性至关重要;D4 与膜结合和细胞毒性有关^[11]。因此,在后续的实验,为进一步优化以 LI 为载体的疫苗体系,应对 ILO 和 ILO 不同功能域进行深入研究。

参 考 文 献

[1] WALLECHA A, CARROLL KD, MACIAG PC, *et al.*

Multiple effector mechanisms induced by recombinant *Listeria monocytogenes* anticancer immunotherapeutics. *Adv Appl Microbiol*, 2009, 66: 1-27 [2018-07-22]. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00801-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00801-0).

- [2] LE DT, DUBENKSY TW, BROCKSTEDT DG. Clinical development of *Listeria monocytogenes*-based immunotherapies. *Semin Oncol*, 2012, 39(3): 311-322.
- [3] FABRIZIA S, CRISTEL A, PASCALE C. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol Rev*, 2011, 240(1): 160-184.
- [4] 刘思静, 蒲启康, 蒋明娟. 李斯特菌溶血素在疫苗研制中的应用进展. *现代预防医学*, 2016, 43(9): 699-1701.
- [5] LIU D. Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic *Listeriae*. *Microbiol Insights*, 2013, 6(6): 59-69.
- [6] LIN Q, ZHOU M, XU Z, *et al.* Construction of two *Listeria ivanovii* attenuated strains expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigens for TB vaccine purposes. *J Biotechnol*, 2015, 196-197: 20-26 [2018-07-22]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165615000176?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.jbiotec. 2015. 01. 008.
- [7] ZHOU M, JIANG M, REN C, *et al.* *Listeria ivanovii* infection in mice: restricted to the liver and lung with limited replication in the spleen. *Front Microbiol*, 2016, 7: 790 [2018-07-22]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00790/full>. doi: 10.3389/fmicb.2016.00790.
- [8] 周梦莹, 蒲启康, 任晨艳, 等. 致病性李斯特菌毒力因子蛋白组学及基因组学研究进展. *现代预防医学*, 2015, 42(4): 694-697.
- [9] FABRIZIA S, FREDERIC B, ANNA S, *et al.* *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(9): 3612-3617.
- [10] FREHEL C, LETY M, AUTRET N, *ET AL.* Capacity of ivanolysin O to replace listeriolysin O in phagosomal escape and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 2003, 149(3): 611-620.
- [11] HERNÁNDEZFLORES KG, VIVANCOCID H. Biological effects of listeriolysin O: implications for vaccination. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 360741 [2018-07-22]. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/360741/>. doi: 10.1155/2015/360741.

(2018-08-17 收稿, 2018-11-26 修回)

编辑 吕 熙