

单增李斯特菌溶血素 O 的功能研究进展

王 政, 张闻桐, 吴美娇, 吴有雪, 刘 箐*

(上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘 要 单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm, 简称单增李斯特菌)是一种普遍存在的革兰阳性食源性病原体,可引起人类和一些动物的李斯特菌病。侵袭性李斯特菌病通常很严重,临床上表现为自然流产、败血症和脑膜脑炎,也可表现为发热性胃肠炎综合症。成孔蛋白单增李斯特菌溶血素 O (Listeriolysin O, LLO, 由 *hly* 基因编码)是一种重要的毒力因子,属于胆固醇依赖性细胞溶解素(cholesterol-dependent cytolysins, CDC)毒素,其通过膜穿孔机制介导 Lm 从吞噬体逃逸并引起李斯特菌病。最近的研究表明 LLO 除了主要的膜穿孔作用,还存在其他功能,在 Lm 感染过程中扮演了重要的角色。从 LLO 的功能和作用机制等方面综述了近年来对该毒素的研究进展,以便更好地理解单增李斯特菌的感染机制,为防治李斯特病的相关研究提供参考。

关键词 单核细胞增生李斯特菌;单增李斯特菌溶血素 O;功能;调节机制

中图分类号 Q939.93

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)04-0098-07

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.04.015

Advances in Function of *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O (LLO)

WANG Zheng, ZHANG Wen-tong, WU Mei-jiao, WU You-xue, LIU Qing

(Coll. of Med. Appl. & Foods, Shanghai Polytech. Uni., Shanghai 200093)

Abstract *Listeria monocytogenes* (Lm) is a ubiquitous Gram-positive food-borne pathogen that causes listeriosis both in humans and several animal species. Invasive listeriosis is usually severe and clinically manifested as spontaneous abortion, septicaemia, and meningoencephalitis, and also as a febrile gastroenteritis syndrome. The pore-forming protein listeriolysin O (LLO, encoded by *hly*), is a critical virulence factor, belongs to cholesterol dependent cells dissolved element (cholesterol-dependent cytolysins, CDC) toxin, that mediates Lm through membrane perforation mechanism and escape from phagosome, and causes listeriosis. However, recent studies have shown that beside major membrane perforation there are also other functions play a key role in the course of the infection of Lm. At this point, the research progress of LLO in recent years in terms of its function and mechanism of action and other aspects were summarized, so that a better understand of the infection mechanism of Lm, in order to provide reference for the prevention and treatment of listeriosis

Keywords *Listeria monocytogenes*; LLO; function; regulatory mechanisms

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)作为革兰阳性兼性厌氧菌,属于胞内寄生菌。Lm 广泛存在于自然界,能在低 pH 环境及较宽温度范围内(1~45℃)生存^[1]。其作为一种常见的人畜共患病原菌,可引起脑炎、脑膜炎、败

血症、脓肿及孕妇流产等一系列高死亡率的全身性疾病^[2]。Lm 的致病性依赖于细菌毒力因子的产生,其中最重要的毒力因子之一是单增李斯特菌溶血素 O (Listeriolysin O, LLO)。LLO 是一种由 *hly* 基因编码的蛋白,分子质量为 58.6~60 ku,属

基金项目:上海市科技创新行动计划项目(18495800400);上海理工大学微创励志创新基金项目

作者简介:王政 男,实习研究员,硕士。主要研究方向为食源性致病菌快速检测。E-mail: 172712240@st.usst.edu.cn

* 通讯作者。男,教授,博士,博士生导师。研究方向为食源性致病菌致病机理研究。Tel:021-65710369, E-mail: liuq@usst.edu.cn

收稿日期:2019-11-13

于胆固醇依赖性细胞溶解素 (Cholesterol-dependent cytolysins, CDC) 家族的一个成孔毒素,能够协助细菌破坏吞噬体,促进菌体进入胞液,是细菌得以在胞质增殖的先决条件,并且通过膜穿孔机制帮助 Lm 从内化的宿主细胞液泡逃逸。LLO 作为 Lm 的主要毒力因子,在 Lm 初级逃逸和次级吞噬体逃逸过程发挥了关键作用^[3-4]。本文总结了 LLO 的转录、翻译调节机制及其活性的影响因素,综述了 LLO 介导李斯特菌的逃逸机制,辅助李斯特菌的胞内复制以及作为毒力因子的致病机理,同时能够激活宿主的先天免疫反应及细胞免疫等功能。相对全面地综述了 Lm 在重要毒力因子 LLO 介导下与宿主细胞的相互作用,为预防和治疗李斯特病提供思路和指导。

1 LLO

LLO 所在的 CDC 家族包括不同菌种产生的链球菌素 O (Streptolysin O, SLO),肺炎球菌溶血素 (Pneumolysin, PLY),产气荚膜梭菌毒素 (Perfringolysin O, PFO) 等在内的 20 多种成孔毒素,也是细菌成孔毒素 (Pore-forming toxin, PFT) 里最大的组成家族^[5-6]。CDCs 的蛋白质分子量在 50 ~ 70 kDa 不等^[7]。其作用机制与其他 PFTs 成员相似,由细菌分泌出的水溶性毒素单体可被巯基活化,能够与宿主细胞膜结构的胆固醇相结合,并通过低聚化在膜表面形成直径为 25 ~ 40 nm 的膜穿孔^[8]。晶体学研究表明,LLO 单体结构与 CDCs 其他单体结构具有很强的相似性,由 4 个结构域 (Structure domain, D1 ~ D4) 组成,其中 D1、D2 和 D3 组成了单体的主要结构,D1 包含 25 个氨基酸的信号肽序列和脯氨酸 (proline, P)、谷氨酸 (Glutamate, E)、丝氨酸 (Serine, S) 和苏氨酸 (Threonine, T) (PEST) 组成的序列区域,该区域为 Lm 逃离吞噬体所必需的条件之一,D4 结构域包含一段高度保守序列 (ECTGLAWWWWR) 以及 3 个环状结构 (Loop structure, L1 ~ L3),这些正是 LLO 单体识别胆固醇以及膜结合所必须的条件。与带负电荷的 PFO 相比,LLO 单体的 L2 结构具有很多残基,并且带有更多的中性电荷。在膜穿孔形成过程中,每个单体都会形成两个 β -发卡结构,这类结构来自于 D3 的 α -螺旋^[9]。钠离子与钙离子通道的激活被证明与 LLO 引起的细菌内化相关^[10]。

LLO 能够被激活从而导致细菌内化主要依赖于宿主细胞的 γ -干扰素诱导的硫醇还原酶 (γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase, GILT), GILT 是唯一已知存在于吞噬体中的氧化还原酶^[11],在抗原递呈细胞被表达,并进入吞噬体后进行积累^[12]。

2 LLO 的调节机制

2.1 *hly* 的转录调节

LLO 蛋白由 *hly* 基因编码,其转录受到 *prfA* 基因的调控。实验证明,*hly* 的 5' 端非翻译区 (5' untranslated regions, 5' UTRs) 在调控 LLO 的表达中起着关键作用,在肉汤培养过程中,*hly* 5' UTR 的缺失在保留 *hly* 核糖体结合位点的同时,对 LLO 产生了一定的影响,但在胞内感染过程中,LLO 表达水平明显降低,这直接导致了细菌在细胞间传播的显著减弱,并且在小鼠体内其毒力降低了 10 倍。利用 *hly* 5' UTR 增强基因表达的能力,可以实现毒力基因的 *prfA* 独立互补和单克隆异源基因的高水平表达^[13]。江玲丽等^[14]拟研究单增李斯特菌分离株 M7 可能存在的低致病力机制,利用同源重组法构建 *hly* 及 *plcB* 单缺失 (M7- Δhly 和 M7- $\Delta plcB$) 及双缺失突变株 (M7- $\Delta hly/plcB$),比较它们之间的生物学特性差异,结果证明突变株 M7- Δhly 和 M7- $\Delta hly/plcB$ 因 *hly* 缺失而丧失溶血活性。单缺失突变株 M7- $\Delta plcB$ 、M7- Δhly 与 M7 具有相似的细胞黏附及增殖能力 ($P > 0.05$)。感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 1 000 时,双缺失突变株 M7- $\Delta hly/plcB$ 对 Caco-2 细胞毒性最低 (11.10%, M7- Δhly 次之 (23.53%) ($P < 0.05$)。 *hly* 及 *plcB* 缺失导致 Lm 对免疫抑制小鼠毒力降低。单增李斯特菌 M7 低致病力可能与其膜裂解相关基因 *hly* 及 *plcB* 的高水平表达有关,导致细胞毒性显著增强而从细胞内逃逸出,并被宿主免疫系统清除。此外,Lm 感染不同种类的宿主细胞时,LLO 的表达水平及活性也有所不同,感染巨噬细胞后,随着感染时间的增长,*hly* 转录活性稳步上升,最后趋于稳定,而当感染 Caco-2 细胞株后,2 h 后就达到了最高活性,随后呈下降趋势^[15-16]。因此,LLO 的活性表达及毒力大小受到 *hly* 基因的控制,当 *hly* 受损时,单增李斯特菌的毒力也随之降低,同时丧失溶血功能,这对减毒疫苗的研究

提供了一种新思路。

2.2 LLO 的翻译后调节

宿主细胞细胞质中 LLO 的稳定性受到蛋白降解机制的影响,从而影响 Lm 的感染能力。虽然 LLO 能介导 Lm 感染宿主细胞并促进其在细胞间的传播,但异常高水平的 LLO 能加速细胞毒性,促使宿主先天免疫机制清除胞外细菌。与其他 CDC 不同,LLO 的 N 端富含 PEST 残基。Lety 等^[17]为探究 PEST 序列在 LLO 生物活性中的作用,构建了两株 LLO 突变体:缺失 19 个残基组成的序列蛋白以及一个野生型重组蛋白,其中的 P、E、S、T 全部或部分被替换,结果表明,突变株所分泌的 LLO 量与阳性对照无显著差异,但这两种突变体在体内的毒力比 *hly* 阳性菌株要低很多;其次,体外实验证明 LLO 突变体菌株从吞噬体中逃逸的能力被严重削弱,随后在被感染细胞的胞浆中裂解。该研究也说明 LLO 蛋白的 N 端在 Lm 感染过程中起着重要作用。Schnupf 等^[18]研究发现,通过对 *hly* 基因的编码序列进行核苷酸替换,虽然没有改变蛋白序列,但却导致了 LLO 的过度产生、细胞毒性和毒力的丧失。总之,LLO 作为 Lm 主要的毒力因子之一,其翻译调控对 Lm 的发病机制至关重要。

2.3 LLO 活性的影响因素

LLO 与其他 CDCs 相比是唯一一种功能活性由 pH 调节的毒素,Schuerch 等^[19]实验证明当温度大于 30 °C 且 pH 为中性时,LLO 的结构会迅速发生不可逆的变性,这种变性通常会形成跨膜的 β 筒状结构。由于 LLO 跨膜结构域中存在酸性三联体,该结构起 pH 传感器的作用,阻断噬菌体的酸化已经被证明能够完全阻断 Lm 逃逸吞噬体。此外,结构研究显示 LLO 活性在中性 pH 下受到抑制,除了被确认为 pH 值传感器的酸性残留 E247、D208 和 D320 之外,LLO 的结构还揭示了多个 pH 敏感簇,它们通过结合钠离子和水分子直接或间接地相互作用^[20]。

当 Lm 入侵宿主细胞时,会分泌许多针对宿主细胞的毒力因子,促进感染。Burg-Golani T 证明了 *secDF* 突变株在巨噬细胞内生长受到抑制,但在体外培养时与阳性对照无显著差异,并且包括 LLO、PlcA、PlcB 等在内的细胞因子分泌均下降;当 Lm 野生株在巨噬细胞吞噬体中时,检测到

了 *secDF* 基因的上调,从而促进吞噬体逃逸^[21]。LLO 受 Sec 分泌系统调节能够穿越细胞膜结构,Sec 分泌系统分泌蛋白 SecD 和 SecF 以及翻译后的分泌产物 PrsA2 对于维持 LLO 的活性是必需的^[22]。此外,LLO 的分泌和功能的实施还依赖于信号肽酶 SipZ,SipZ 在吞噬体内的表达增加,在胞内也有低水平的表达。SipZ 的缺失降低了 LLO 的分泌,同时也降低了溶血性^[23]。

LLO 的氧化也可能限制其在吞噬体中的活性。活性氧 (Reactive oxygen species, ROS, 由 NOX2 NADPH 氧化酶产生) 和活性氮基团 (Reactive nitrogen species, RNS, 由 iNOS 产生) 已被证明能使 LLO 失活,从而限制 Lm 从吞噬体逃逸^[24]。研究表明,巨噬细胞 NOX2 NADPH 氧化酶产生 ROS 是一种成熟的抗菌防御系统。在 Δhly 菌株感染过程中能够观察到毒性衰减,但在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶敲除的宿主细胞毒性逐渐恢复,表明 LLO 在调节 ROS 分泌中起作用。 Δhly 菌株具有升高胞内 ROS 水平的功能,并将其定植于吞噬体^[25]。氯化物的存在能影响 LLO 低聚化的过程,虽然细胞的氯化物作用因细胞不同而产生差异,但吞噬体中的氯离子含量要比细胞质高,表明在胞内有形成高阶 LLO 寡聚体的趋势^[26]。在中性粒细胞中,发现有氯离子流入吞噬体内,使得浓度达到 70 mmol/L,而一般细胞质中氯离子浓度为 40 ~ 50 mmol/L。抑制氯转运体囊性纤维化跨膜电导调节因子 (Chloride transporter cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 能够降低 Lm 从液泡逃逸的概率^[27]。

3 LLO 的功能

LLO 最早被认为是一种细胞吞噬体溶解酶,因为它在逃离吞噬体的过程中起着关键作用,但有研究也揭示了 LLO 的胞外作用,这与 LLO 能够在营养肉汤 (Nutrient broth, NB) 培养的 LM 上清中被检测结果相一致^[28]。LLO 可以从很多部位影响宿主细胞,包括在细胞外介质、吞噬体内和细胞质等环境中,LLO 都可以发挥一些重要功能,从而促使 Lm 对宿主细胞的感染,在感染的过程中,LLO 在胞外及胞内都大量表达,正因为如此,针对

LLO 的抗体已经被用于诊断李斯特病菌。

3.1 LLO 介导 Lm 在吞噬体逃逸

作为胞内寄生菌,Lm 在感染过程中首先被哺乳动物细胞的吞噬体包裹,Lm 不能在吞噬体中复制^[29],但吞噬体弱酸性环境促进了 LLO 的合成与释放,协助 Lm 巧妙的逃离吞噬体进入胞浆,调整代谢策略以适应胞浆中的环境而存活下来,在这一逃避策略中 LLO 发挥了重要的作用。研究表明^[30]LLO 缺失或 LLO 特异性中和抗体处理的情况下,均可抑制 Lm 从吞噬体中逃离,无法进行复制和扩增。此外,在 LLO 存在的情况下,通常不能逃离吞噬体的病原菌(如大肠埃希菌)也能扰乱吞噬体进入胞浆^[31]。协助胞内病原菌逃逸吞噬体成为了 LLO 的主要功能,但后来通过研究发现,Lm 逃逸吞噬体是一个动态的过程,伴随着多个宿主细胞的反应,而且只有约 14% 的细菌发生内化^[32]。Lm 在细胞到细胞的传播过程中,LLO 在逃离相邻细胞的两层细胞膜过程也有一定作用。

之前的 LLO 功能模型基于其同源性以及其他 CDCs 的结构相似性,这些毒素都能产生 25 ~ 40 nm 的大孔^[33]。然而,Joel Swanson 用活细胞成像技术观察发现,LLO 在感染过程中可以在吞噬体膜诱导形成许多小的膜穿孔^[34]。研究表明,小的荧光分子在巨噬细胞吞噬过程中会被动内化。荧光分子从吞噬体转移到细胞质中主要与其分子量大小有关,分子量越小,越容易转移,在吞噬体形成后,荧光黄染料(Lucifer Yello,LY;522 Da)的转移要先于荧光红染料(Dextran texas red,DTR;10 000 Da)。另外,在小分子被保留在吞噬体中时检测到了钙离子的流出。由于吞噬体与溶酶体的融合需要钙的积累,Gaillard 提出了一种新的模型,即吞噬体小的膜穿孔具有与离子通道相似的功能,可以为其他细菌和宿主因子创造机会以促进吞噬物质的逃逸,而 LLO 在吞噬体膜诱导形成许多小的膜穿孔可能适用于这种模型^[29]。

3.2 LLO 辅助李斯特菌的胞内复制和毒力

Lm 被证明会引起慢性感染。Bhardwaj 等^[35]对严重联合免疫缺陷(Severe combined immunodeficiency,SCID)小鼠注射 1×10^4 cfu/mL 的 Lm,持续观察小鼠脾脏及肝脏的载菌量,结果发现 Lm 能够在肝脏和脾脏中生存,随着时间的延长,载菌

量也从 10^4 cfu/mL 增加到了 5.4×10^5 cfu/mL,28 d 后,一部分(10% ~ 20%)SCID 小鼠由于 Lm 感染发生死亡。之前 Lm 被认为是一种“细胞质适应性病原体”,在体内感染宿主细胞时,可以定植在细胞质。但在 Unanue 的研究中,利用 SCID 小鼠和体外培养的巨噬细胞对 Lm 在吞噬体空腔(Spacious listeria-containing phagosomes,SLAPs)中生长曲线进行监测,发现 Lm 在 SLAP 中的对数增长期为 8 h(Lm 在细胞质中仅为 40 min)。过量 LLO 的产生对于在感染期间形成 SLAP 是必要的,研究发现低 LLO 表达量(大约是正常溶血活性的三分之一)的突变菌株不能逃逸吞噬体,而是延缓了其生长时间^[36]。LLO 促进 SLAP 形成的机制还需要进一步研究。

3.3 LLO 作为一种信号分子和介导第二信使的产生

LLO 造成的膜穿孔形成后细胞质钙浓度的短暂升高会诱导宿主细胞中多种信号传导途径,包括激活丝裂原活化蛋白(Mitogen-activated protein,MAP)激酶通路,磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,PI)代谢,核因子 κ B(Nuclear factor kappa-B,NF- κ B)的核易位和白介素-6(Interleukin-6,IL-6)、白介素-8(Interleukin-8,IL-8)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)以及白介素-1a(Interleukin-1a,IL-1a)的分泌^[37-38]。Kayal 等通过体外 Lm 感染人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells,HUVEC),发现 Lm 诱导黏附因子(Adhesive factor)、趋化性细胞因子(Monocyte chemotactic protein-1)的表达以及 NF- κ B 的移位^[38]。此外,对转基因小鼠注射纯化的 LLO,发现 LLO 参与转基因小鼠 NF- κ B 的活化,从而诱导毛细血管内皮细胞 NF- κ B 的刺激,表明细菌分泌的 LLO 在感染过程中是诱导内皮细胞活化的一种强有力的炎症刺激因子。酪氨酸激酶的激活也会影响 LLO 表达,LLO 通过钙离子渗透孔的形成以及钙离子依赖信号和基因表达的调控参与 IL-6 的产生^[39]。LLO 介导的内质网(Endoplasmic reticulum,ER)损伤,被证明是由于感染期间钙离子浓度升高引起内质网应激(Endoplasmic reticulum stress,ER stress)并激活未折叠蛋白反应(Unfolded protein response,UPR),造成急性应激损伤,引起

细胞代谢紊乱和凋亡,这不利于 Lm 的生长^[40]。

3.4 LLO 作为促凋亡分子

此外,Lm 在感染过程中已被证明能诱导多种细胞凋亡。有研究表明,LLO 无论在体外或是体内都能诱导淋巴细胞的快速凋亡^[41]。实验证明亚纳摩尔级的 LLO 在没有 Lm 存在的情况下足以通过半胱氨酸和天冬氨酸依赖性和非依赖性途径诱导细胞凋亡。而且 LLO 介导的细胞凋亡会增加 Lm 的易感性,这是由白介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 上调所致^[42]。此外,Carrero 等^[43-44]通过单增李斯特菌感染不同品系小鼠的淋巴细胞,利用特异性抗体及细胞因子指示物等检测发现,几乎所有的细胞凋亡都与其先天免疫失效有关,例如中性粒细胞损伤、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)信号通路的阻断以及 TNF- α 受体的破坏、由于髓样分化因子-88 (Myeloid differentiation factor-88, MyD-88) 的缺失导致 toll 样受体(Toll-like receptor)的移位等,这些现象直接造成了大量淋巴细胞凋亡,同时细菌在脾脏和肝脏大量定植。

3.5 LLO 的其他功能

大部分与 LLO 有关的功能似乎都与 Lm 进入细胞质过程中膜穿孔的形成或进入后与胞内物质相互作用有关。除此之外,LLO 作为免疫原能够刺激特异性的 CD8 + T 细胞的产生,在 Lm 感染中具有显著的免疫保护作用^[45],为了验证这种反应不同于其在膜穿孔形成中的作用,使用关键位点缺失溶血性 LLO (非溶血性 LLO) 作为免疫原仍然在 Lm 感染模型中具有免疫保护作用。Wallecha 等^[46]研究表明非溶血性 LLO 在肿瘤免疫治疗中是有作用的,该研究展示了一种无毒的、非溶血性的 LLO 是一种有效的肿瘤免疫治疗佐剂,它可以作为毒力相关分子指示物 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 激活先天免疫反应和细胞免疫反应。同时对佐剂活性的研究表明,非溶血性 LLO 与人乳头瘤病毒 16 型 (Human papillomavirus-16, HPV-16) E7 重组蛋白融合或混合使用,均可增强抗肿瘤免疫反应,促进肿瘤的根除。Lm 感染引起的组蛋白 H3 去磷酸化和组蛋白 H4 去乙酰化,影响 146 个基因的表达,其作用依赖于 LLO 膜结合,而不依赖于孔的形成^[47]。此外,LLO 的存在能够诱导宿主发生自噬反应,这主要是由

于 LLO 将宿主细胞表面的微管相关蛋白轻链-3 (Microtubule associated protein light chain-3) 脂化,激活了细胞自噬途径,而阴性对照 LLO 缺失株没有这一反应^[48]。

3.6 LLO 功能总结

LLO 是致病性李斯特菌普遍存在的主要毒力因子之一。它是一种能结合胆固醇的孔形成素,可破坏吞噬体膜,使细菌进入胞浆并繁殖;能在感染细胞内诱导信号传导,在定向免疫应答中发挥重要作用。LLO 的许多生物功能源于 Lm 感染过程中通过在细胞膜上推动钙离子流入或从细胞内储存中释放钙的能力。随着细菌从一个细胞内转移到另一个细胞内,依赖于 LLO 的液泡逃离会引起免疫反应以及宿主信号通路的激活。此外,LLO 也有一些与膜穿孔形成活动无关的功能,比如能够诱导淋巴细胞的凋亡。重要的是,LLO 的活动并不是不受限制的,否则,宿主细胞将无法在数百种细菌的感染中存活下来。相反,LLO 的活动受到 Lm 的高度调节和宿主细胞的影响。

4 展望

LLO 在 Lm 感染宿主期间,在不同的环境中行使不同的功能。控制 LLO 活性的细菌和宿主因子被认为是 LLO 相关表型启动和宿主细胞在感染期间存活的关键因素。同时,LLO 的作用机制并不是一味地破坏宿主的结构,相反,LLO 现在被认为是一种精确的工具,它可以通过促进宿主细胞感染的方式调节宿主细胞的通路。LLO 的多功能性更像一把双刃剑,需要做的就是降低和避免其带来的危害,现阶段主要研究的方向有:①利用中草药提取物对 LLO 进行中和反应从而抑制 LLO 活性,例如黄芩提取物、积雪草酸、姜黄素等;②通过抑制 LLO 单体低聚化进而抑制 LLO 活性,例如叶黄素;还有一些天然化合物如肉豆蔻酸等经实验验证也能够抑制 LLO 的表达。同时,要善于利用 LLO 的多功能性,把它应用到生产生活中,有报道称将 LLO 与脂质体相结合为现代疫苗研究提供了可能性,同时经改造的 LLO 在肿瘤治疗中是一种有效的佐剂,能够激发宿主的免疫应答。

随着对 LLO 诸多的研究与认识,可以把它作为 Lm 用来促进信息传播的多功能工具。通过对

LLO 引起的 Lm 发病机理、作用机制、调控机制等方面的深入研究,对预防与控制 Lm 的传播来说尤为重要;同时,加强 LLO 的研究,对探究其他同源毒素相关性质与功能都具有一定的意义。

参考文献:

- [1] Stavru F, Archambaud C, Cossart P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights[J]. Immunological Reviews, 2015, 240(1):160-184.
- [2] Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49):19484-19491.
- [3] Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, et al. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation[J]. Infection & Immunity, 1989, 57(11):3629.
- [4] Vadia S, Arnett E, AnneCécile Haghight, et al. The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes[J]. Plos Pathogens, 2011, 7(11):1002356.
- [5] Polekhina G, Giddings KS, Tweten RK, et al. Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(3):600-605.
- [6] Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, et al. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins[J]. Cellular Microbiology, 2008, 10(9):1765-1774.
- [7] Michel E, Reich KA, Favier R, et al. Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O[J]. Molecular Microbiology, 2010, 4(12):2167-2178.
- [8] Hodel AW, Leung C, Dudkina NV, et al. Atomic force microscopy of membrane pore formation by cholesterol dependent cytolysins[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2016, 39:8-15.
- [9] Stefan Köster, Katharina van Pee, Martina Hudel, et al. Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation[J]. Nature Communications, 2014, 5(1): 286-301.
- [10] Vadia S, Seveau S. Fluxes of Ca²⁺ and K⁺ are required for the Listeriolysin O-Dependent internalization pathway of *Listeria monocytogenes* [J]. Infection & Immunity, 2014, 82(3):1084-1091.
- [11] Singh R, Jamieson A, Cresswell P. GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection [J]. NATURE, 2008, 455(7217):1244-1247.
- [12] Garin J, Diez R, Kieffer S, et al. The phagosome proteome: insight into phagosome functions[J]. The Journal of Cell Biology, 2001, 152(1):165-180.
- [13] Shen A, Higgins DE. The 5' untranslated region-mediated enhancement of intracellular listeriolysin O production is required for *Listeria monocytogenes* pathogenicity[J]. Molecular Microbiology, 2005, 57(5):1460-1473.
- [14] 江玲丽, 高有领, 周向阳, 等. 单增李斯特菌膜裂解相关基因缺失突变株的构建及生物学特性鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(4):779-788.
- [15] Sokolovic Z, Schüller S, Bohne J, et al. Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4 [J]. Infection & Immunity, 1996, 64(10):4008-4019.
- [16] Bohne J, Kestler H, Uebele C, et al. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA [J]. Molecular Microbiology, 1996, 20(6):1189-1198.
- [17] Lety, Marie-Annick, Frehel C, et al. Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes* [J]. Molecular Microbiology, 2010, 39(5):1124-1139.
- [18] Schnupf P, Hofmann J, Norseen J, et al. Regulated translation of listeriolysin O controls virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. Molecular Microbiology, 2010, 61(4):999-1012.
- [19] Schuerch DW, Wilson-Kubalek EM, Tweten RK. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(35):12537-12542.
- [20] Köster S, Van PK, Hudel M, et al. Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation[J]. Nature Communications, 2014, 5(4):3690.
- [21] Burg-Golani T, Pozniak Y, Rabinovich L, et al. Membrane chaperon SecDF plays a role in the secretion of *Listeria monocytogenes* major virulence factors [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(23):5262-5272.
- [22] Alonzo IiiF, Xayarath B, Whisstock J, et al. Functional analysis of the *Listeria monocytogenes* secretion chaperone PrsA2 and its multiple contributions to bacterial virulence[J]. Molecular Microbiology, 2011, 80(6):1530-1548.
- [23] Bonnemain C, Raynaud C, Hélène Réglier-Poupet, et al. Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(5):1251-1266.
- [24] Myers Jesse T, Tsang Albert W, Swanson Joel A. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages [J]. Journal of Immunology, 2003, 171(10):52-66.
- [25] Lam GY, Fattouh R, Muise A M, et al. Listeriolysin O suppresses phospholipase C-mediated activation of the microbicidal NADPH oxidase to promote *Listeria monocytogenes* infection [J]. Cell Host & Microbe, 2011, 10(6):627-634.
- [26] Aiken ML, Painter RG, Zhou Y, et al. Chloride transport in

- functionally active phagosomes isolated from Human neutrophils [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2012, 53(12):2308-2317.
- [27] Painter RG, Marrero L, Lombard GA, et al. CFTR-mediated halide transport in phagosomes of human neutrophils[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010, 87(5):933-942.
- [28] Moors MA, Levitt B, Youngman P, et al. Expression of Listeriolysin O and ActA by Intracellular and Extracellular *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection & Immunity*, 1999, 67(1):131-139.
- [29] Gaillard JL, Berche P, Sansonetti P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. *Infection & Immunity*, 1986, 52(1):50-55.
- [30] Junttila, Jaana RSI, Niemelä, et al. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1988, 65(4):321-327.
- [31] Bielecki J, Youngman P, Connelly P, et al. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells[J]. *Nature*. 1990, 345(6271):175-176.
- [32] Chastellier CD, Berche P. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria[J]. *Infection & Immunity*, 1994, 62(2):543.
- [33] Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJC, et al. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin [J]. *Cell*, 2005, 121(2):247-256.
- [34] Henry R, Shaughnessy L, Loessner MJ, et al. Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*[J]. *Cellular Microbiology*, 2010, 8(1):107-119.
- [35] Bhardwaj, Kanagawa, Swanson, et al. chronic listeria infection in scid mice: requirements for the carrier state and the dual role of t cells in transferring protection or suppression[J]. *Journal of Immunology*, 1998, 160(1):376-384.
- [36] Birmingham CL, Canadien V, Kaniuk NA, et al. Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles[J]. *Nature*, 2008, 451(7176):350-354.
- [37] Tang P, Sutherland CL, Gold MR, et al. *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 Mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Infection & Immunity*, 1998, 66(3):1106-1112.
- [38] Kayal S, Liliensbaum A, Poyart C, et al. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB and upregulation of adhesion molecules and chemokines[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 31(6):1709-1722.
- [39] Tsuchiya K, Kawamura I, Takahashi A, et al. Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent interleukin-6 production in caco-2 cells during *Listeria monocytogenes* infection *in vitro*[J]. *Infection & Immunity*, 2005, 73(7):3869-3877.
- [40] Gekara NO, Westphal K, Ma B, et al. The multiple mechanisms of Ca²⁺ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*[J]. *Cellular Microbiology*, 2010, 9(8):2008-2021.
- [41] Carrero JA, Unanue ER. Mechanisms and immunological effects of apoptosis caused by *Listeria monocytogenes* [J]. *Advances in Immunology*, 2012, 113(113):157-174.
- [42] Valenti P, Greco R, Pitari G, et al. Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes*: protective effect of lactoferrin[J]. *Experimental Cell Research*, 1999, 250(1):197-202.
- [43] Carrero JA. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2004, 200(4):535-540.
- [44] Carrero JA, Unanue ER. Lymphocyte apoptosis as an immune subversion strategy of microbial pathogens[J]. *Trends in Immunology*, 2006, 27(11):497-503.
- [45] Harty JT. CD8⁺ T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 175(6):1531-1538.
- [46] Wallecha A, Wood L, Pan ZK, et al. *Listeria monocytogenes*-derived listeriolysin O has pathogen-associated molecular pattern-like properties independent of its hemolytic ability [J]. *Clinical & Vaccine Immunology*, 2013, 20(1):77-84.
- [47] Mélanie Anne Hamon, Eric Batsché, Béatrice Régault, et al. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(33):13467-13472.
- [48] Meyer-Morse N, Robbins JR, Rae CS, et al. Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection[J]. *PLOS ONE*, 2010, 5(1):e8610.