

## 单核细胞增生李斯特菌抗酸应激机制

何珂<sup>1,2</sup> 程昌勇<sup>1</sup> 方春<sup>2</sup> 宋厚辉<sup>1</sup> 方维焕<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江农林大学动物科技学院 浙江 杭州 311300)

(2. 浙江大学动物预防医学研究所 浙江 杭州 310058)

**摘要:** 单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)是重要的人畜共患食源性病原,在青贮饲料、发酵食品、宿主胃内以及巨噬细胞吞噬体内都会遭遇酸应激。该菌有多种抗酸应激系统,如 $F_0F_1$ -ATPase、谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase system, GAD)、精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, ADI)、鲱氨酸脱亚胺酶(Agmatine deiminase, AgDI)系统等。在环境pH ( $pH_{ex}$ ) 4.5条件下可维持其细胞内pH ( $pH_i$ )稳态,在 $pH_{ex}$  3.5时仍能存活;用温和酸应激( $pH_{ex}$  4.5)预处理单增李斯特菌,可以通过酸耐受反应(Acid tolerance response)提高其在致死性酸性环境中的存活率,这一过程受 $\sigma^B$ 正调控,即 $\sigma^B$ 激活可以保护单增李斯特菌应对多种环境应激。因此, $\sigma^B$ 可以作为新型抗菌药物的靶标。更为重要的是,弱酸性发酵食品要严格控制李斯特菌的污染,以降低消费者的感染风险。

**关键词:** 单核细胞增生李斯特菌, 酸应激耐受, 调控机制

Acid tolerance of *Listeria monocytogenes*HE Ke<sup>1,2</sup> CHENG Chang-Yong<sup>1</sup> FANG Chun<sup>2</sup> SONG Hou-Hui<sup>1</sup> FANG Wei-Huan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science &amp; Technology, Zhejiang A&amp;F University, Hangzhou, Zhejiang 311300, China)

(2. Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

**Abstract:** *Listeria monocytogenes*, an important zoonotic foodborne pathogen, encounters acidic environments such as silage, fermented food, stomach and phagolysosomes. It contains a number of enzyme systems to deal with acid stress:  $F_0F_1$ -ATPase, glutamate decarboxylase, arginine deiminase and agmatine deiminase. The bacterium could maintain its intracellular pH ( $pH_i$ ) homeostasis when exposed to environmental pH ( $pH_{ex}$ ) 4.5, survives well in  $pH_{ex}$  3.5. Preexposure of *L. monocytogenes* cells to mild acid stress ( $pH_{ex}$  4.5) could induce acid tolerance response (ATR) that could render them more resistant to fatal acidic stress. SigB ( $\sigma^B$ ) is a positive regulator of ATR, enabling the bacterium to better cope with environmental stresses. Therefore,  $\sigma^B$  could be a target for development of novel antibacterial drugs. Stringent control of *L. monocytogenes* contamination in fermented food is of great importance to minimize the risk of listeria infections to consumers.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, Acid tolerance, Regulatory mechanisms

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31770040)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

**Received:** July 22, 2017; **Accepted:** October 27, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 02, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31770040)

**\*通讯作者:** Tel: 86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

**收稿日期:** 2017-07-22; **接受日期:** 2017-10-27; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-11-02

李斯特菌属(*Listeria* genus)是低 G+C%含量的革兰氏阳性无芽孢杆菌,目前发现有 17 个种<sup>[1]</sup>,其中以单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)、韦氏李斯特菌(*Listeria grayi*)、伊氏李斯特菌(*Listeria ivanovii*)、赛氏李斯特菌(*Listeria welshimeri*)和无害李斯特菌(*Listeria innocua*)较为常见。一般认为只有单增李斯特菌和伊氏李斯特菌为致病菌,而且仅有单增李斯特菌是该属中唯一的一种人兽共患病原<sup>[2-3]</sup>。单增李斯特菌广泛存在于环境(包括食品加工环境),人或动物一般通过摄入细菌污染的食物、水源等被感染<sup>[4]</sup>。

我国学者在 2000–2009 年间报道了新生儿单增李斯特菌感染 25 例,其中 56% (14 例)死亡<sup>[5]</sup>。2011 年,美国发生甜瓜污染单增李斯特菌引起的食源性感染,涉及 28 个州 147 人患病,其中 33 人死亡,是美国历史上最严重的一次食源性疾病暴发<sup>[6]</sup>。2014 年,27 个欧盟成员国报告 2 161 例人的单增李斯特菌感染,相当于每 10 万人 0.52 个病例,其中死亡 210 例,在确诊感染病例中的死亡率为 15%,2009–2014 年平均每年有 163 个死亡病例<sup>[7]</sup>。

## 1 单增李斯特菌与抗酸应激

酸应激是低 pH 和环境弱酸的综合生物学效应,单增李斯特菌在青贮饲料、发酵食品、宿主胃内以及巨噬细胞吞噬体内都会遭遇到酸应激。与其他食源性病原一样,单增李斯特菌的最适 pH 为 6.0–7.0<sup>[8-9]</sup>,但该菌具有很强的抗酸能力<sup>[10]</sup>。本实验室比较了参考菌株 10403S 和 EGDe、临床菌株 Lm850658 和食品分离株 M7 的抗酸能力,在 pH 2.5 的 BHI 中应激处理 1 h 后,菌株 10403S 的存活能力显著高于菌株 EGDe, Lm850658 显著高于 M7<sup>[11]</sup>,表明抗酸能力存在菌株间的差异。菌体细胞内 pH ( $pH_i$ )分析结果显示,即便在胞外 pH 4.5 条件下( $pH_{ex}$ , 盐酸调节)处理 1 h, 4 个菌株中有 3 个的  $pH_i$  仍可维持在 6.5–7.5 之间,并能缓慢生长。相对于无机酸,用乳酸、醋酸等有机酸处理(将  $pH_{ex}$  值调整到 4.5), 4 个受试菌株的  $pH_i$  均下降到 5.5 左右,

细菌不再生长,并且出现部分死亡。提示在同样  $pH_{ex}$  条件下,有机酸具有更强的抑菌作用。在  $pH_{ex}$  3.5 (无机酸或有机酸调  $pH_{ex}$ )条件下处理 1 h, 所有菌株的  $pH_i$  降低到 5.5 或以下,部分细胞出现死亡(不同菌株的存活率在 40%–85%之间)<sup>[12]</sup>。当  $pH_i$  高于  $pH_{ex}$  时,弱酸更容易以非离子化的形式扩散进入细胞内。进入胞内后解离释放质子,酸化细胞质。 $pH_{ex}$  越低,则弱酸性化合物越容易扩散进入细胞质,从而影响  $pH_i$ 。因此,抗酸应激能力(保持细胞内的 pH 稳态,使之接近中性状态)是单增李斯特菌等细菌在酸性环境下存活,并通过消化道建立感染的重要前提<sup>[13]</sup>。

## 2 单增李斯特菌的酸应激适应性

单增李斯特菌具有酸应激适应性,即酸耐受反应(Acid tolerance response, ATR)。ATR 是指细菌短时间暴露于温和酸应激,可显著增强其对更强酸应激(甚至是致死性酸应激)条件下的耐受能力。其机制是温和酸应激诱导了细菌抗酸作用相关蛋白的表达,这些蛋白的合成可被氯霉素抑制,进而阻止 ATR 的发生<sup>[14-15]</sup>。

将生长至对数早期的单增李斯特菌 LO28 菌株暴露于非致死性酸环境(pH 5.5 乳酸)中适应 1 h,然后置于致死性酸环境(pH 3.5 乳酸)中应激 1 h,发现经适应性酸应激的细菌比没有适应的细菌存活率高 25%<sup>[15]</sup>。

单增李斯特菌不同菌株间的 ATR 存在差异: Faleiro 等研究了 8 株来源于奶酪、肉和鱼的不同菌株在 pH 5.5 乳酸中应激诱导产生最高 ATR 所需时间: 6 株的 ATR 为 2 h, 在 pH 3.5 乳酸中处理 1 h 后细菌存活率介于 0.06%–49.60% 不等(平均 18.3%);另外 2 株需要诱导 4 h 才能获得最大 ATR, 经 pH 3.5 乳酸同样处理后存活率分别达 15.4% 和 85.7%<sup>[16]</sup>。

ATR 与细菌生长阶段有关: Ferreira 等研究了不同生长阶段(对数早期、中期以及稳定期)的 10403S 菌株在人工胃液(pH 2.5)中应激 60 min 后的

存活能力差异: 对数早期细菌于 pH 4.5 的 BHI 培养基中适应 1 h, 再转移至 pH 2.5 的人工胃液中, 其存活能力是未适应细菌的 2.5 倍; 对数中期的细菌用同样方法处理后, 存活力提高约 3 倍; 稳定期细菌, 无论是否经 pH 4.5 酸适应, 其在人工胃液中的存活率均为 100%<sup>[17]</sup>。以上研究结果表明处于稳定期的细菌具备“天然”的抗酸应激能力(可能是细菌生长过程中产生的代谢物对其自身的应激耐受), 无需酸适应就能耐受致死性酸环境<sup>[15]</sup>。

ATR 不仅能为后续酸应激提供保护, 还能交叉保护其他环境应激, 如不同类型的弱酸、低浓度酒精、过氧化氢等应激<sup>[18-20]</sup>。因此, 深入了解单增李斯特菌抗酸应激的分子机制, 有利于评估其在易污染食物中的生长和增殖能力及其对消费者感染的风险, 并为设计消除该菌污染的有效方

法提供依据。

### 3 单增李斯特菌的抗酸应激系统及其作用机制

单增李斯特菌有多种维持  $pH_i$  稳态的机制(图 1), 如  $F_0F_1$ -ATPase 系统<sup>[21]</sup>、谷氨酸脱羧酶系统(Glutamate decarboxylase system, GAD)<sup>[22]</sup>、精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, ADI)和鲱氨酸脱亚胺酶(Agmatine deiminase, AgDI)系统<sup>[23-24]</sup>。结合基因缺失, 综合比较单增李斯特菌 10403S 不同抗酸系统的作用, 我们发现抗酸作用最强的是 GadD2, 其次是 SigB (*sigB* 缺失), 再次是 ADI (*arcA* 缺失), AgDI (*augA1* 缺失)和 GadD3 抗酸作用相似(图 2) ( $F_0F_1$ -ATPase 系统疑为其缺失具有致死性, 无法获得相关组分的缺失菌株进行比较<sup>[25]</sup>)。

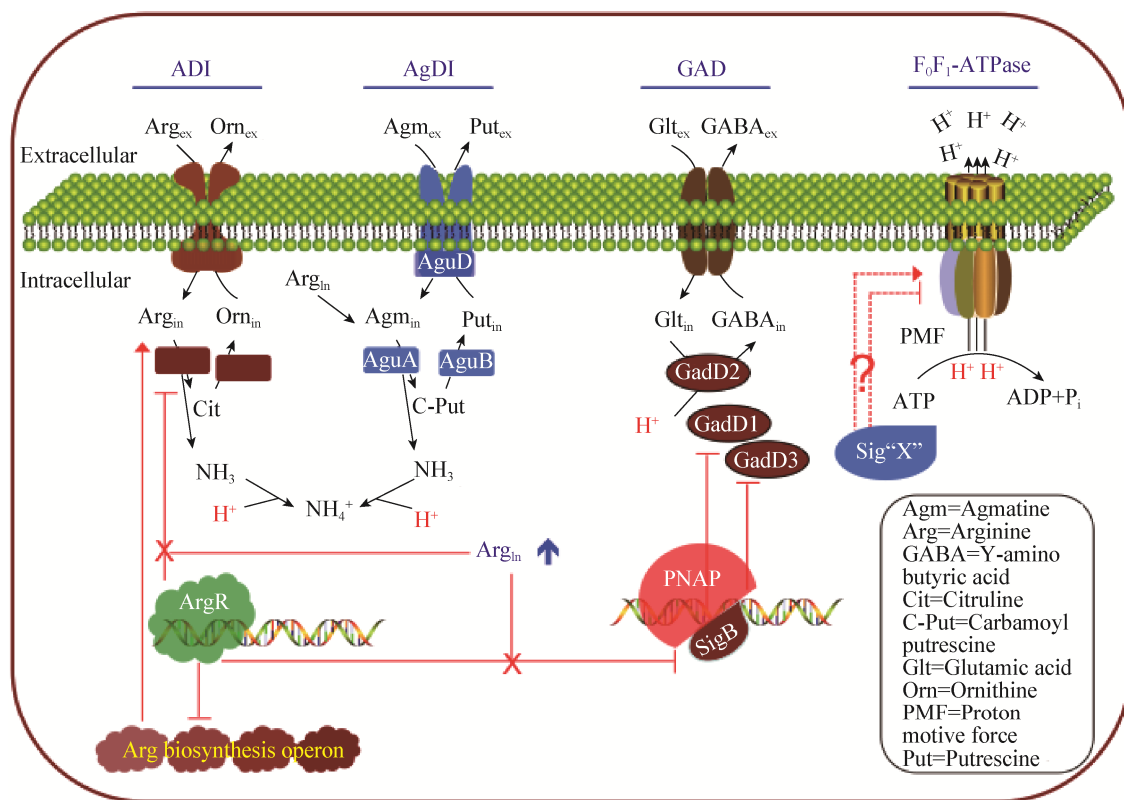


图 1 单核细胞增生李斯特菌的主要抗酸应激系统及其可能的调控机制

Figure 1 Main acid resistance systems of *Listeria monocytogenes* and the proposed regulatory mechanisms

注: 黑色箭头: 代谢途径; 红色箭头: 正调控; 红色“T”型: 负调控; 红色虚线: 疑似调控机制; 红色“X”: 抑制。

Note: Black arrows: Metabolic pathways; Red arrows: Positive regulation; Red “T-shaped” symbols: Negative regulation; Red “X”: Inhibition.

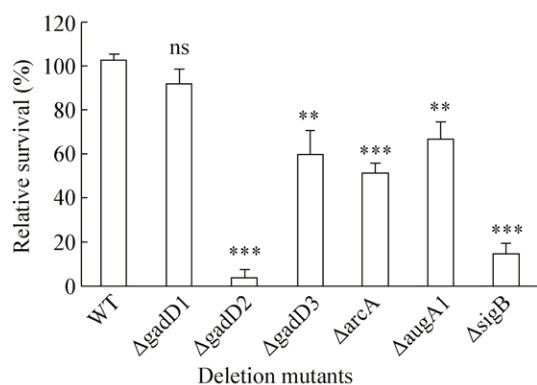


图 2 单核细胞增生李斯特菌的主要抗酸应激系统缺失株及其亲本菌株在 pH 2.5 BHI 中的存活能力比较

**Figure 2 Comparison of the deletion mutants involved in acid resistance of *Listeria monocytogenes* in pH 2.5 BHI medium expressed as survival relative to their parent strain**

注: WT: 亲本菌株, 其存活率设定为 100%; ns: 无显著差异 ( $P>0.05$ ); \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

Note: WT: Parent strain, its survival set as 100%; ns: Not significant ( $P>0.05$ ); \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

### 3.1 $F_0F_1$ -ATPase 系统

$F_0F_1$ -ATPase 由多个亚基组成, 偶联了质子跨膜转运的 ATP 合成/水解酶, 包括两个结构域(分别为催化结构域  $F_1$  以及跨膜结构域  $F_0$ )。  $F_1$  由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  亚基组成, 能够催化合成或水解 ATP;  $F_0$  包括 a、b 和 c 亚基, 嵌合在内膜上形成一个跨膜质子通道<sup>[21]</sup>。  $F_0F_1$ -ATPase 参与维持细胞  $pH_i$  稳态, 在质子顺电化学梯度流动时该酶可以催化 ADP 和  $P_i$  合成 ATP; 反过来当没有氢离子浓度梯度时,  $F_0F_1$ -ATPase 能够催化水解 ATP 并将质子泵出细胞外。在有氧条件下, ATPase 能够介导质子进入细胞而合成 ATP; 在无氧条件下  $F_0F_1$ -ATPase 水解 ATP 供能, 排出质子, 产生质子动力(PMF)。PMF 能够进一步促使细胞内质子排出, 从而使处于酸性环境中细菌胞内 pH 升高<sup>[26]</sup>。

利用二环己基碳二亚胺 (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide, DCCD) 作为  $F_0F_1$ -ATPase 抑制剂可以分析 ATPase 所起的作用。Datta 等的研究发现, DCCD 处理的对数期单增李斯特菌 LS2 菌株在 pH 3.0 (HCl) 中应激 1 h 后存活

率下降数倍, 但不影响其在 pH 7.3 条件下的存活, 提示细菌在抵抗酸应激过程中伴随质子的泵出<sup>[27]</sup>。Cotter 等发现, DCCD 处理处于对数期的单增李斯特菌 LO28 株, 先在 pH 5.5 乳酸中预处理 1 h, 后置于 pH 3.5 乳酸中继续应激 2 h, 存活的细菌数比没有 DCCD 处理的对照组细菌低 3 个 log。说明 DCCD 抑制  $F_0F_1$ -ATPase 可以显著降低细菌在致死性酸作用条件(pH 3.5)下的存活能力, 进一步证实  $F_0F_1$ -ATPase 作为质子泵在细菌抵抗酸应激过程中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。

### 3.2 谷氨酸脱羧酶系统

GAD 系统在包括单增李斯特菌在内的多种细菌中发挥重要的抗酸应激作用<sup>[22]</sup>, 其抗酸作用主要通过谷氨酸脱羧酶的脱羧反应来实现, 该反应通过消耗 1 mol 谷氨酸和 1 mol  $H^+$ , 产生 1 mol  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA), 进而提高  $pH_i$  以维持胞内稳态。生成的 GABA 通过跨细胞膜的谷氨酸逆向转运子 (Glutamate antiporter, GadT) 转运至胞外, 并交换等摩尔数的谷氨酸。由于谷氨酸常用作食品增鲜剂和防腐剂, 此类食品若有单增李斯特菌污染, 显然有助于细菌发挥抗酸作用<sup>[22]</sup>。

相比其他细菌, 单增李斯特菌 GAD 系统有多个组分, 包括 GadD1/GadD2/GadD3 和 GadT1/GadT2。但它们的抗酸作用并不完全相同: Karatzas 等将它们分为胞外 GAD 系统( $GAD_o$ , 由 GadT1/GadD1 和 GadT2/GadD2 组成)和胞内 GAD 系统( $GAD_i$ , 即 GadD3), 并且认为在菌株 LO28 中  $GAD_o$  发挥主要抗酸作用<sup>[28]</sup>。Feehily 等在菌株 10403S 中发现类似现象, 但菌株 EGDe 不能输出 GABA, 其抗酸作用主要依赖  $GAD_i$ 。提示 GAD 系统的抗酸作用存在菌株间差异<sup>[29-30]</sup>。

本实验室研究结果显示, 菌株 10403S 的 *gadD2* 基因缺失可显著降低其在 pH 2.5 条件下的存活率, *gadD3* 基因缺失后的存活率也显著下降, 但不如 *gadD2* 基因缺失株显著, 而 *gadD1* 基因缺失不影响细菌存活(图 2)。以上结果表明 GadD2 是该菌株的

主要抗酸因子。qPCR 结果显示: *gadT2/gadD2* 转录水平最高, *gadD3* 次之, *gadD1/gadT1* 最低<sup>[11]</sup>。不同菌株 GAD 系统转录水平的分析结果表明, 无论是在酸应激(pH 4.5)还是中性培养条件下, 10403S 的 *gadT2/gadD2* 转录水平显著高于 EGDe, *gadD3* 次之, *gadD1/gadT1* 转录水平最低; 生长稳定期, 菌株 M7 和 Lm850658 的 *gadD2* 转录水平与 10403S 相当。免疫印迹显示, 在 pH 4.5 或 pH 7.0 培养条件下, 菌株 EGDe 未检测到 GadD2 表达, M7 菌株仅有微量表达, 而菌株 10403S 和 Lm850658 的 GadD2 表达量相当, 且 GadD2 的表达量显著高于 GadD3。上述结果提示, GAD 系统中不同组分的抗酸作用与其表达水平紧密相关, 尤其是 GadT2/GadD2 的表达量是决定不同菌株间抗酸应激能力差异的主要因素。

### 3.3 精氨酸脱亚胺酶系统

单增李斯特菌有参与抗酸应激的 ADI 系统<sup>[23,31]</sup>, 该系统由精氨酸脱亚胺酶(ADI, 由 *arcA* 编码)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(Ornithine carbamoyltransferase, OCT, 由 *arcB* 编码)和氨甲酸激酶(Carbamate kinase, CK, 由 *arcC* 编码)3 个酶组成, 可将 1 mol 精氨酸转化为 2 mol 氨(NH<sub>3</sub>)和 1 mol 鸟氨酸(Ornithine), 并产生 1 mol ATP。1 mol 氨可结合 1 mol 质子形成 1 mol 铵离子(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), 进而升高 pH<sub>i</sub>, 发挥抗酸应激作用。鸟氨酸则由逆向转运子(Antiporter, 由 *arcD* 编码)输出至胞外, 交换等量精氨酸。本实验室研究发现, 单增李斯特菌谱系 I 和谱系 II 菌株中存在一个基因簇 *lmo0036-lmo0043*, 编码 ADI 系统相关基因及 AgDI 系统 2 个基因, 依次为 *arcB-arcD-aguA1-arcC-aguA2-aguR-lmo0042-arcA*, 而谱系 III 菌株缺失 *lmo0036-lmo0041* 基因簇<sup>[32-33]</sup>。ArcA 具有 ADI 活性, 在酸应激条件下 *acrA* 转录和表达水平显著上调, 缺失 *arcA* 导致 10403S 菌株在人工胃液和小鼠胃中的存活能力显著下降, 并降低其对小鼠的致病力<sup>[23]</sup>。

### 3.4 鲱精氨酸脱亚胺酶系统

AgDI 与 ADI 系统同处 *lmo0036-lmo0043* 基因

簇, 双拷贝的 *aguA* (*aguA1* 和 *aguA2*)分别编码鲱精氨酸脱亚胺酶 AguA1 和 AguA2。鲱精氨酸脱亚胺酶 AgDI 能够催化精氨酸的脱羧产物鲱精胺水解成氨甲酰腐胺(*N*-carbamoyl putrescine)和氨, 氨甲酰腐胺在腐胺氨甲酰转移酶(Putrescine carbamoyltransferase, PTC)的催化下转变成腐胺(Putrescine)和氨甲酰磷酸(Carbamoyl phosphate), 最后氨甲酰激酶(Carbamate kinase, CK)水解腐胺和 ADP 生成 ATP、氨和 CO<sub>2</sub>。整个通路中底物鲱精胺和终产物腐胺通过转运蛋白 AguD 进行等量交换。我们的研究发现, 尽管 *aguA1* 和 *aguA2* 在酸应激条件下的转录和表达水平都显著上调, 且 AguA1 和 AguA2 具有高度相似的模拟三级结构, 氨基酸相似性 67.7%, 但仅 AguA1 发挥抗酸应激作用, 并与小鼠的毒力密切相关; AguA2 没有抗酸能力<sup>[24]</sup>。定点突变 AguA1 和 AguA2 差异关键位点, 我们发现决定二者功能差异的位点为第 157 位甘氨酸(Gly), 将 AguA1 的 157 位由 Gly 突变为 Cys 后, AguA1 即失去活性; 而将 AguA2 的 157 位由 Cys 突变为 Gly 后 AguA2 便具有活性<sup>[24]</sup>。

## 4 单增李斯特菌抗酸应激的调控机制

### 4.1 应激调控因子 $\sigma^B$

单增李斯特菌除了含有上述抗酸应激相关系统外, 其酸耐受反应 ATR 还受 SigB ( $\sigma^B$ )调控。单增李斯特菌  $\sigma^B$  因子与革兰氏阴性菌的 RpoS 同属于 Sigma70 家族, 能够全局性调控细菌众多基因的表达, 并对胞外的环境信号产生应答, 从而成为细菌抵抗环境应激的调控枢纽<sup>[34]</sup>。 $\sigma^B$  因子作为 RNA 聚合酶全酶(RNAP)的一个蛋白亚单位, 主要负责特定启动子序列的识别和转录的启动。当细菌遇到应激时,  $\sigma^B$  激活产生调控级联反应, 感受并传递应激信号, 然后启动受  $\sigma^B$  调控基因( $\sigma^B$  调控子)的转录<sup>[34]</sup>。单增李斯特菌  $\sigma^B$  已被证实与酸、温度、渗透压、氧化等应激调控相关<sup>[35,17]</sup>。多达 150 个基因受到  $\sigma^B$  调控<sup>[36]</sup>。*Bacillus subtilis* 的 *sigB* 操纵子中各组分之间互作和  $\sigma^B$  激活机制的研究比较深入<sup>[37]</sup>, 单增李

斯特菌  $\sigma^B$  的激活网络同样由位于 *sigB* 操纵子内的 8 个蛋白(RsbR-RsbS-RsbT-RsbU-RsbV-RsbW-SigB-RsbX)组成,这些蛋白可能通过磷酸化与去磷酸化机制,以相关蛋白间的结合和解离来调控 *sigB* 的表达<sup>[38]</sup>。

Ferreira 等研究了处于不同生长阶段、酸预应激或未应激的 10403S *sigB* 基因缺失株和亲本株在 pH 2.5 的人工胃液或 BHI 中的存活率,他们发现:(1) *sigB* 基因缺失株的存活率显著低于亲本菌株:对数生长中期的存活率低 4 个 log,而稳定期则低 2 个 log。(2) 处于稳定期的 *sigB* 基因缺失株和亲本株比对数期细菌的存活率高 6 个 log。(3) pH 4.5 的 BHI 预应激处于对数生长期的细菌,可显著提高  $\Delta sigB$  株和亲本菌株的存活率(4 个 log 以上);而在稳定期,预应激对  $\Delta sigB$  株的存活率可提高 1 个 log,但对亲本菌株的存活率影响不显著。这些结果提示,  $\sigma^B$  不仅与单增李斯特菌的抗酸应激有关,而且还贡献其 ATR 反应<sup>[17]</sup>。后续研究也证实了  $\sigma^B$  参与调节对数期和稳定期细菌的抗酸能力<sup>[36]</sup>。

Chaturongakul 等研究了 10403S 菌株的调控蛋白 RsbT 和 RsbV 对  $\sigma^B$  依赖型抗酸应激能力的影响,发现对数中期的缺失株  $\Delta sigB$ 、 $\Delta rsbT$  和  $\Delta rsbV$  在 pH 2.5 人工胃液中应激 10 min 后的存活率较亲本株低 3 个 log,而亲本株只下降了 1.5 个 log。缺失株  $\Delta rsbT$  和  $\Delta rsbV$  在 pH 2.5 的人工胃液或 BHI 中的存活能力与 *sigB* 缺失株相当。说明细菌在受到酸应激时, RsbT 和 RsbV 参与激活  $\sigma^B$ <sup>[39]</sup>。本实验室研究了 RsbX 在单增李斯特菌抗应激中的作用,设计了应激-恢复生长-再应激试验方案,发现 *rsbX* 基因缺失株在恢复生长 0.5–1.5 h 后抵抗二次应激的能力显著高于亲本株。qPCR、启动子活性和免疫印迹试验证实, *rsbX* 基因缺失株在首次应激后恢复生长阶段  $\sigma^B$  的表达水平高于亲本株,表明 RsbX 在应激后恢复期负调控  $\sigma^B$ , 将其从高活力状态下调至正常水平。通过比较  $\Delta rsbX$  株和亲本株在对数生长期和平台期培养物对高盐应激的差异,我们发现 *rsbX* 基因

缺失不影响对数生长期细菌对 15% NaCl 应激的存活率,但其在平台期对高盐应激的存活率显著高于亲本株,平台期  $\Delta rsbX$  株的  $\sigma^B$  表达水平也显著高于亲本株。这些表明 RsbX 对  $\sigma^B$  的负调控作用不仅在应激后恢复期,也表现在细菌生长平台期<sup>[40]</sup>。

$\sigma^B$  的激活可以保护单增李斯特菌应对多种环境应激,而这些应激因素又常存在于食品生产过程。因此, van Schaik 等提出了以  $\sigma^B$  为靶标筛选抑制剂,阻止其激活,进而抑制该病原的抗应激能力,为减少单增李斯特菌在食品加工过程中的存活和传播提供一种新的策略<sup>[34]</sup>。Palmer 等通过高通量筛选,发现氟化苯乙烯磺胺(Fluoro-phenyl-styrene-sulfonamide, FPSS)可以有效下调受  $\sigma^B$  调控的大部分基因( $IC_{50}=3.5 \mu\text{mol/L}$ , 208 个下调基因中的 75% 受  $\sigma^B$  调控)<sup>[41]</sup>。他们的后续研究表明, FPSS 并不直接与  $\sigma^B$  结合抑制其活性,而是可能通过抑制  $\sigma^B$  与抗 SigmaB 因子 RsbW 的释放发挥作用<sup>[42]</sup>。

## 4.2 精氨酸抑制因子 ArgR

单增李斯特菌精氨酸抑制因子 ArgR 属于 ArgR/AhrC 转录调控因子家族,参与精氨酸的代谢调控。ArgR 与细菌的酸应激存活能力密切相关,10403S 的  $\Delta argR$  株在 pH 3.5 (乳酸调节)应激 2–3 h 后,其存活率显著高于亲本株。凝胶迁移试验证实 ArgR 能够与 *arcA*、*sigB*、*argC* 和 *argG* 启动子区的 Arg-box 发生不同程度的结合,但结合能力存在明显差异,即  $P_{argC} \geq P_{argG} > P_{sigB} > P_{arcA}$ 。氨基酸置换(S42A 和 R43A)后的 ArgR 与被调控基因启动子的结合能力明显降低或丧失,证实这两个位点为 ArgR 的关键氨基酸。在不外源添加精氨酸的应激条件下(pH 5.5), *argR* 缺失株的 *sigB* 和 *arcA* 转录及蛋白表达水平均显著上调,表明 ArgR 负调控  $\sigma^B$  和 ArcA。但外源添加精氨酸可以解除这种负调控作用<sup>[43]</sup>。这些结果提示, ArgR 不仅能够反馈负调控精氨酸合成代谢通路基因 *argC* 和 *argG*, 在酸应激条件下通过精氨酸依赖途径调控 *arcA* 和 *sigB* 的转录及表达,进而影响单增李斯特菌的抗酸应激作用(图 1)。由于



精氨酸和谷氨酸在合成和分解代谢途径紧密相关, ArgR 抑制或缺失是否影响细胞内的谷氨酸水平, 进而影响 GAD 系统的抗酸作用也有待研究。

#### 4.3 其他可能的调控机制

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 作为质子跨膜转运系统在抗酸应激中起着重要作用, 但这一系统在酸应激条件下是否存在调控机制研究甚少。Barriuso-Iglesias 等的研究表明, 谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的 SigH 因子可以通过与 *atpB* 的启动子区结合, 调控其在不同 pH 条件下的表达, 进而介导 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 系统对胞内 pH 的稳态<sup>[44]</sup>。单增李斯特菌除了 SigB, 还拥有 SigH、SigC 和 SigL, 这 3 个 Sigma 因子可能介导冷应激<sup>[45]</sup>。而这些因子是否介导抗酸应激、通过何种途径介导抗酸应激等问题也有待研究。

Bowman 等通过蛋白质组学分析, 发现在单增李斯特菌 Scott A 中 *gadD2* 并不响应酸应激调控, 认为 *GadD2* 为组成型表达<sup>[46]</sup>。我们的试验也发现, 酸应激(pH 4.5)也不显著影响 *gadD1*、*gadD2* 和 *gadD3* 的转录和表达, 也提示这些基因可能为组成型表达。五个预测的 GAD 系统疑似调控子 *gadR* 缺失也不影响 pH 2.5 酸应激条件下的存活, 表明这些因子并不介导抗酸应激<sup>[11]</sup>。Kazmierczak 等通过转录组学分析, 发现 *sigB* 缺失仅显著下调 *gadD3* 转录水平, 提示 SigB 可能参与调控 *gadD3*<sup>[47]</sup>。对于 *gadD1* 则因菌株而异, 可能部分受 SigB 调控<sup>[48]</sup>。由于 SigB 并不调控单增李斯特菌 GAD 中起主要作用的 *gadD2*, 其对 *gadD1* 和 *gadD3* 调控在抗酸中的作用可能并不重要(图 1)。

经典的双元调控系统由膜蛋白组氨酸激酶(K)和胞质应答调控子(R)组成, 组氨酸激酶感受特异性环境应激, 并通过磷酸化改变胞质应答调控子的构象, 从而激活或抑制受调控目标基因的表达<sup>[49]</sup>。Cotter 等发现单增李斯特菌 LO28 菌株的 *lisRK* 基因位点编码一个双元调控系统, 对数期的  $\Delta$ *lisRK* 菌株在 pH 3.5 中应激 45 min, 其抗酸能力显著低于缺失株<sup>[50]</sup>。但单增李斯特菌还拥有多种双元调控因子,

如 *liaSR* (*lmo1021/1022*)、*virSR* (*lmo1741/1745*)<sup>[51]</sup>, 这些双元调控因子是否调节该菌的抗酸应激也有待探索。20 世纪 80 年代以来, 已经发生了至少 4 起酸性即食食品引起的单增李斯特菌感染事件, 死亡 56 人<sup>[52]</sup>。因此, 酸性发酵食品生产过程中要严格控制单增李斯特菌的污染, 以降低消费者的感染风险。

#### 参考文献

- [1] Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12): 5273-5287
- [2] Vázquez-Boland JA, Domínguez-Bernal G, González-Zorn B, et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*[J]. Microbes and Infection, 2001, 3(7): 571-584
- [3] Liu DY. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(6): 645-659
- [4] Schlech III WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food[J]. New England Journal of Medicine, 1983, 308(4): 203-206
- [5] Feng YF, Ran L, Zhang LS. Listeriosis cases reported in medical literatures in China, 2000-2009[J]. Disease Surveillance, 2011, 26(8): 654-659 (in Chinese)  
冯延芳, 冉陆, 张立实. 2000-2009 年中国李斯特菌病文献报告病例分析[J]. 疾病监测, 2011, 26(8): 654-659
- [6] US Center for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado (Final update)[EB/OL]. 2012-08-27. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>
- [7] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014[J]. EFSA Journal, 2015, 13(12): 4329
- [8] Abee T, Wouters JA. Microbial stress response in minimal processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 50(1/2): 65-91
- [9] Hill C, O'Driscoll B, Booth I. Acid adaptation and food poisoning microorganisms[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 28(2): 245-254
- [10] Phan-Thanh L, Montagne A. Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1998, 44(3): 183-191
- [11] Fang C. Comparative genomics and pathogenicity difference mechanisms of *Listeria monocytogenes* lineage III virulent and low virulent strains[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2015 (in Chinese)  
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: 浙江大学博士学位

论文, 2015

- [12] Cheng CY, Yang YC, Dong ZM, et al. *Listeria monocytogenes* varies among strains to maintain intracellular pH homeostasis under stresses by different acids as analyzed by a high-throughput microplate-based fluorometry[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 15
- [13] Cotter PD, Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(3): 429-453
- [14] O'Driscoll B, Gahan C, Hill C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* LO28[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2679-2685
- [15] O'Driscoll B, Gahan CG, Hill C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(5): 1693-1698
- [16] Faleiro ML, Andrew PW, Power D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 84(2): 207-216
- [17] Ferreira A, Sue D, O'Byrne CP, et al. Role of *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2692-2698
- [18] Lou YQ, Yousef AE. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1252-1255
- [19] Skandamis PN, Yoon Y, Stopforth JD, et al. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses[J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(2): 294-303
- [20] Bonnet M, Rafi MM, Chikindas ML, et al. Bioenergetic mechanism for nisin resistance, induced by the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2556-2563
- [21] Sebald W, Friedl P, Schairer HU, et al. Structure and genetics of the  $H^+$ -conducting  $F_0$  portion of the ATP synthase[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982, 402: 28-44
- [22] Cotter PD, Gahan CG, Hill C. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(2): 465-475
- [23] Cheng CY, Chen JS, Shan Y, et al. *Listeria monocytogenes* ArcA contributes to acid tolerance[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, 62(6): 813-821
- [24] Cheng CY, Chen JS, Fang C, et al. *Listeria monocytogenes* *aguA1*, but not *aguA2*, encodes a functional agmatine deiminase: Biochemical characterization of its catalytic properties and roles in acid tolerance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(37): 26606-26615
- [25] Cotter PD, Gahan CGM, Hill C. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes*  $F_0F_1$ -ATPase operon in the acid tolerance response[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 60(2/3): 137-146
- [26] Krulwich TA, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(5): 330-343
- [27] Datta AR, Benjamin MM. Factors controlling acid tolerance of *Listeria monocytogenes*: effects of nisin and other ionophores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 4123-4126
- [28] Karatzas KAG, Suur L, O'Byrne CP. 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
- [29] Feehily C, Finnerty A, Casey PG, et al. Divergent evolution of the activity and regulation of the glutamate decarboxylase systems in *Listeria monocytogenes* EGD-e and 10403S: roles in virulence and acid tolerance[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112649
- [30] Karatzas KAG, Brennan O, Heavin S, et al. Intracellular accumulation of high levels of  $\gamma$ -aminobutyrate by *Listeria monocytogenes* 10403S in response to low pH: uncoupling of  $\gamma$ -aminobutyrate synthesis from efflux in a chemically defined medium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(11): 3529-3537
- [31] Ryan S, Begley M, Gahan CG, et al. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(2): 432-445
- [32] Chen JS, Jiang LL, Chen QM, et al. *Lmo0038* is involved in acid and heat stress responses and specific for *Listeria monocytogenes* lineages I and II, and *Listeria ivanovii*[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6(3): 365-376
- [33] Chen JS, Cheng CY, Xia Y, et al. *Lmo0036*, an ornithine and putrescine carbamoyltransferase in *Listeria monocytogenes*, participates in arginine deiminase and agmatine deiminase pathways and mediates acid tolerance[J]. *Microbiology*, 2011, 157(11): 3150-3161
- [34] van Schaik W, Abee T. The role of  $\sigma^B$  in the stress response of Gram-positive bacteria-targets for food preservation and safety[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(2): 218-224
- [35] Ferreira A, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of  $\sigma^B$  in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4454-4457
- [36] Raengpradub S, Wiedmann M, Boor KJ. Comparative analysis of the  $\sigma^B$ -dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(1): 158-171
- [37] Hecker M, Pané-Farré J, Uwe V. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 215-236
- [38] Shin JH, Brody MS, Pricet CW. Physical and antibiotic stresses require activation of the RsbU phosphatase to induce the general stress response in *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(9): 2660-2669
- [39] Chaturongakul S, Boor KJ. RsbT and RsbV contribute to  $\sigma^B$ -dependent survival under environmental, energy, and



- intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5349-5356
- [40] Xia Y, Xin YP, Li XL, et al. To modulate survival under secondary stress conditions, *Listeria monocytogenes* 10403S employs RsbX to down-regulate  $\sigma^B$  activity in the post-stress recovery stage or stationary phase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(4): 1126-1135
- [41] Palmer ME, Chaturongakul S, Wiedmann M, et al. The *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  regulon and its virulence-associated functions are inhibited by a small molecule[J]. mBio, 2011, 2(6): e00241-11
- [42] Ringus DL, Gaballa A, Helmann JD, et al. Fluoro-phenyl-styrene-sulfonamide, a novel inhibitor of  $\sigma^B$  activity, prevents the activation of  $\sigma^B$  by environmental and energy stresses in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(11): 2509-2517
- [43] Cheng CY, Dong ZM, Han X, et al. *Listeria monocytogenes* 10403S arginine repressor ArgR finely tunes arginine metabolism regulation under acidic conditions[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 145
- [44] Barriuso-Iglesias M, Barreiro C, Sola-Landa A, et al. Transcriptional control of the  $F_0F_1$ -ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values[J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(2): 178-188
- [45] Chan YC, Hu YW, Chaturongakul S, et al. Contributions of two-component regulatory systems, alternative  $\sigma$  factors, and negative regulators to *Listeria monocytogenes* cold adaptation and cold growth[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(2): 420-425
- [46] Bowman JP, Hages E, Nilsson RE, et al. Investigation of the *Listeria monocytogenes* Scott A acid tolerance response and associated physiological and phenotypic features via whole proteome analysis[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(4): 2409-2426
- [47] Kazmierczak MJ, Mithoe SC, Boor KJ, et al. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  regulates stress response and virulence functions[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(19): 5722-5734
- [48] Cotter PD, Ryan S, Gahan CGM, et al. Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 2832-2839
- [49] Gao R, Stock AM. Biological insights from structures of two-component proteins[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 133-154
- [50] Cotter PD, Emerson N, Gahan CGM, et al. Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(21): 6840-6843
- [51] Pöntinen A, Lindström M, Skurnik M, et al. Screening of the two-component-system histidine kinases of *Listeria monocytogenes* EGD-e. LiaS is needed for growth under heat, acid, alkali, osmotic, ethanol and oxidative stresses[J]. Food Microbiology, 2017, 65: 36-43
- [52] Paudyal R, Karatzas KAG. Stress adaptation of *Listeria monocytogenes* in acidic ready-to-eat products[A]//Kotzekidou P. Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods[M]. Amsterdam: Elsevier, 2016: 167-182