

单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因缺失对小鼠毒力和肠道菌群的影响

牛俊辉^{1,2,3}, 李琦^{1,3}, 毛福超^{1,3}, 钱满^{1,2,3}, 贾艳艳^{1,2,3},
丁轲^{1,2,3}, 张春杰^{1,2,3}, 程相朝^{1,2,3}, 廖成水^{1,2,3}

(1. 河南科技大学 动物科技学院 功能微生物与畜禽健康实验室, 河南 洛阳 471023; 2. 河南科技大学 洛阳市活载体生物材料与动物疫病防控重点实验室, 河南 洛阳 471023; 3. 河南科技大学 动物疫病与公共卫生重点实验室, 河南 洛阳 471023)

摘要: 【目的】探究单核细胞增生性李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes tatD* 基因缺失对小鼠 *Mus musculus* 毒力和肠道菌群的影响, 为 *tatD* 在单核细胞增生性李斯特氏菌与宿主相互作用中的作用及减毒疫苗研究提供参考。【方法】采用 Bliss 法将亲本菌株 (LM10403s)、缺失菌株 (LM10403s Δ *tatD*) 和互补菌株 (LM10403sC Δ *tatD*) 口服感染小鼠, 确定菌株对小鼠的半数致死量 (LD₅₀)。LM10403s Δ *tatD* 以 1.00 \times 10⁵ CFU 口服免疫小鼠观察其免疫保护效果。将 40 只 6 周龄雌鼠随机平均分为对照即磷酸缓冲盐溶液组 (PBS)、LM10403s 组、LM10403s Δ *tatD* 组和 LM10403sC Δ *tatD* 组, PBS 组小鼠灌胃 200 μ L 无菌 PBS, 实验组分别灌胃 200 μ L 含 1.00 \times 10⁶ CFU 的菌液。灌胃 24 h 后剖杀各组小鼠, 收集肠道内容物, 采用 Illumina HiSeq 测序技术测定各处理小鼠盲肠样品微生物 16S rRNA V3~V4 区序列, 并比较分析其微生物群落结构、多样性和信号通路富集。【结果】LM10403s Δ *tatD* 的 LD₅₀ 为 8.11 \times 10⁷ CFU, 毒力低于 LM10403s。同时 LM10403s Δ *tatD* 口服免疫小鼠后对单核细胞增生性李斯特氏菌亲本菌株的攻毒能提供 80% 保护率。Chao1 和 Observed species 指数显示: PBS 与 LM10403s Δ *tatD* 处理组差异不显著, 但 LM10403s 组和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组相比于 PBS 处理组显著下降 (P <0.05)。在门水平上, LM10403s Δ *tatD* 处理组的厚壁菌门 Firmicutes 相对丰度高于 LM10403s 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组, 而在属水平上, 乳杆菌属 *Lactobacillus* 相对丰度高于 LM10403s 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组。功能预测分析显示: LM10403s 处理组在细胞过程、环境信息处理和新陈代谢等信号通路的富集程度高于 LM10403s Δ *tatD* 处理组。【结论】*tatD* 基因缺失后单核细胞增生性李斯特氏菌的毒力降低, 并具有一定的免疫保护效果。*tatD* 基因缺失菌株感染小鼠对肠道菌群失调影响减小, 且有益菌增多。图 6 表 1 参 21

关键词: *tatD* 基因; 单核细胞增生性李斯特氏菌; 毒力; 16S rRNA; 肠道菌群

中图分类号: S811.6

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2024)01-0161-08

Effect of *tatD* gene deletion of *Listeria monocytogenes* on virulence and gut microflora in mice

NIU Junhui^{1,2,3}, LI Qi^{1,3}, MAO Fuchao^{1,3}, QIAN Man^{1,2,3}, JIA Yanyan^{1,2,3}, DING Ke^{1,2,3},
ZHANG Chunjie^{1,2,3}, CHENG Xiangzhao^{1,2,3}, LIAO Chengshui^{1,2,3}

(1. Laboratory of Functional Microbiology and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China; 2. Luoyang Key Laboratory of Live Carrier Biomaterial and Animal Disease Prevention and Control, Henan University of Science and Technology, Luoyang

收稿日期: 2022-12-10; 修回日期: 2023-09-30

基金项目: 河南省科技攻关项目 (182102110061); 河南科技大学研究生创新基金项目 (CXJJ-2021-KJ07); 河南科技大学青年骨干教师培养计划 (13450009)

作者简介: 牛俊辉 (ORCID: 0009-0009-3901-2387), 从事微生物感染与固有免疫细胞作用研究。E-mail: 1216110945@qq.com。通信作者: 廖成水 (ORCID: 0000-0002-8130-2056), 副教授, 博士, 从事微生物感染与固有免疫细胞作用研究。E-mail: liaochengshui33@163.com

471023, Henan, China; 3. The Key Lab of Animal Disease and Public Health, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China)

Abstract: [Objective] This study, with an investigation of the effects of *tatD* gene deletion in *Listeria monocytogenes* on virulence and gut microbiota in mice (*Mus musculus*), is aimed to provide reference for the role of *tatD* in the interaction between *L. monocytogenes* and the host, as well as for the study of attenuated vaccines. [Method] First, mice were orally infected with LM10403s, LM10403s Δ *tatD* and LM10403sC Δ *tatD* strains using the Bliss method to determine the strain's median lethal dose (LD₅₀) for mice before immunoprotective effect of LM10403s Δ *tatD* was observed in mice immunized with 1.00×10^5 CFU orally. Then, forty 6-week-old female mice were randomly and equally divided into PBS (ck), LM10403s, LM10403s Δ *tatD*, and LM10403sC Δ *tatD* groups, with those in the ck group gavaged with 200 μ L of sterile PBS and the ones in the experimental group gavaged with 200 μ L of bacterial solution containing 1.00×10^6 CFU, respectively. Next, after 24 h of gavage, the mice in each group were dissected and killed, with intestinal contents collected before Illumina Hiseq sequencing technology was used to determine the sequences of the microbial 16S rRNA V3–V4 regions of the cecum samples from each group so that a comparative analysis was conducted of the structure of microbial communities, diversity, and signaling pathway enrichment. [Result] The LD₅₀ of LM10403s Δ *tatD* was 8.11×10^7 CFU, which was less virulent than that of the parental strain. Oral immunization of mice with LM10403s Δ *tatD* provided 80% protection against *L. monocytogenes* parental strain infection. Chao1 and Observed species indices showed that the difference between ck and LM10403s Δ *tatD* group was not significant, but LM10403s and LM10403sC Δ *tatD* group were significantly lower compared to ck group ($P < 0.05$). At the phylum level, the relative abundance of the Firmicutes in LM10403s Δ *tatD* group was higher than that in LM10403s and LM10403sC Δ *tatD* group, and at the genus level, the relative abundance of the genus, *Lactobacillus* in LM10403s Δ *tatD* group was higher than that in LM10403s and LM10403sC Δ *tatD* group functional prediction analysis showed that LM10403s group in signaling pathways including cellular processes, environmental information processing, and metabolism was more enriched than the LM10403s Δ *tatD* group. [Conclusion] The deletion of *tatD* gene reduced the virulence of *L. monocytogenes* and had an immunoprotective effects while infection of the *tatD* gene deletion mutant strain in mice reduced the effect on intestinal flora dysbiosis and increased the beneficial bacteria. [Ch, 6 fig. 1 tab. 21 ref.]

Key words: *tatD* gene; *Listeria monocytogenes*; virulence; 16S rRNA; gut microbiota

单核细胞增生性李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes* 是一种重要食源性人畜共患致病菌^[1], 侵入机体后可穿过肠道屏障, 经淋巴和血液循环进入肝脏和脾脏, 随后到达大脑和胎盘^[2], 引起败血症、脑膜炎以及早产或流产等症状^[3]。单核细胞增生性李斯特氏菌广泛存在于牛奶、蔬菜和动物性食品等供应链中, 由其引发的食物中毒病例逐年增多, 虽然人类感染单核细胞增生李斯特氏菌发病率相对较低, 但一旦感染死亡率可达 30%~70%, 占食源性病原菌感染死亡的半数以上^[4]。单核细胞增生性李斯特氏菌分泌的胞外蛋白在细菌感染宿主中发挥着重要作用。细菌存在多种分泌系统将效应蛋白转运至胞外, 其中双精氨酸转运系统 (twinargininetranslocation, Tat) 是运输完全折叠蛋白质的一种分泌系统^[5]。

双精氨酸转运系统 D (twinargininetranslocation D, TatD) 是一种高度保守蛋白, 广泛存在于微生物中, 可作为一种重要的毒力因子参与修复 DNA、降解胞外诱捕网和诱发细胞程序性凋亡^[6]。伊氏锥虫 *Trypanosoma evansi* 和路氏锥虫 *Trypanosoma lewisi* 可分泌 TatD 蛋白, 降解巨噬细胞胞外诱捕网以对抗宿主的固有免疫反应^[7]。毛福超^[8] 研究发现: 单核细胞增生性李斯特氏菌 TatD 重组蛋白具有核酸酶活性, 同时通过重组自杀性质粒介导的等位基因交换技术获得了 *tatD* 基因缺失菌株 (LM10403s Δ *tatD*), 但关于单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因对动物的毒力和肠道菌群影响仍不清楚。因此, 本研究以小

鼠 *Mus musculus* 为试验动物, 将 LM10403s Δ *tatD* 口服感染小鼠, 观察 *tatD* 基因缺失后的单核细胞增生性李斯特氏菌对小鼠毒力和肠道菌群多样性的影响, 为进一步探究 *tatD* 基因在单核细胞增生性李斯特氏菌与宿主互作中的具体作用以及减毒疫苗研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

单核细胞增生性李斯特氏菌亲本菌株 (LM10403s)、缺失菌株 (LM10403s Δ *tatD*) 和互补菌株 (LM10403sC Δ *tatD*) 存于洛阳市活载体生物材料与动物疫病防控重点实验室, 6 周龄雌鼠购自郑州中原动物实验中心。琼脂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。卡那霉素购自金克隆 (北京) 生物技术有限公司。脑心膜浸出液 (BHI) 肉汤购自青岛海博生物技术有限公司。粪便基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; TksGflex DNA Polymerase 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; DNA 凝胶快速纯化试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 菌株的复苏与培养

将单核细胞增生性李斯特氏菌 LM10403s 和 LM10403s Δ *tatD* 接种于 BHI 固体培养基上复苏, 将 LM10403sC Δ *tatD* 接种于含卡那霉素的 BHI 固体培养基上复苏, 37 °C 恒温培养箱中培养 12~16 h。挑取 LM10403s 和 LM10403s Δ *tatD* 单个菌落接种于 BHI 肉汤中, 挑取 LM10403sC Δ *tatD* 单个菌落接种于含卡那霉素的 BHI 肉汤中, 37 °C 过夜振荡培养备用。

1.3 菌株对小鼠的毒力测定

用无菌生理盐水将新鲜培养的 LM10403s、LM10403s Δ *tatD* 和 LM10403sC Δ *tatD* 洗涤后进行连续 10 倍稀释, 选取 5 个稀释度的细菌分别给予小鼠口服灌胃, 每个稀释度 10 只小鼠, 每只 100 μ L, 灌胃前 12 h 禁食禁水, 接种 2 h 后正常饲喂。以给予生理盐水的小鼠作为对照, 持续观察各处理组小鼠症状直至无小鼠死亡。将死亡小鼠的肝脏无菌接种到 BHI 固体培养基上, 用单核细胞增生性李斯特氏菌引物进行 PCR 扩增鉴定。采用 Bliss 法得到菌株对小鼠的半数致死量 (LD₅₀)。

1.4 缺失菌株的免疫保护率测定

用无菌生理盐水将新鲜培养的 LM10403s Δ *tatD* 洗涤后调整细菌浓度, 以 1.00×10^5 CFU 的剂量给予小鼠口服灌胃, 灌胃前 12 h 禁食禁水, 接种 2 h 后正常饲喂。于首次免疫 7 d 后按相同剂量进行第 2 次免疫, 第 2 次免疫 7 d 后以给予 1.00×10^{10} CFU 的剂量对小鼠进行亲本菌株的攻毒。随后持续观察直至连续 7 d 无小鼠死亡, 记录各处理组小鼠症状及死亡情况。以未免疫强毒攻毒组和健康组为对照评价 *tatD* 基因缺失菌株的免疫保护效果。

1.5 菌株对小鼠肠道菌群的影响

1.5.1 动物分组与处理 将 40 只 6 周龄昆明雌鼠适应性饲养 7 d, 随机平分为磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、LM10403s、LM10403s Δ *tatD* 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组。分别灌胃 200 μ L 含 1.00×10^6 CFU 的菌液, 对照组小鼠灌胃 200 μ L 无菌 PBS, 灌胃前 12 h 断食, 并口服体积分数为 10% 的 Na₂HCO₃ 中和胃酸。灌胃 24 h 后采用颈椎脱臼剖杀小鼠, 立即收集肠道内容物。

1.5.2 小鼠肠道微生物基因组 DNA 提取与高通量测序 利用粪便基因组试剂盒提取基因组 DNA, 采用质量浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 测定 DNA 浓度。以基因组 DNA 为模板, 针对细菌 V3~V4 作为目标区域进行扩增。引物: 343F (5'-TACGGRAGGCAGCAG-3') 和 798R (5'-AGGGTATCTAATCCT-3')。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 磁珠法纯化 PCR 产物。送往上海欧易生物医学科技有限公司利用 Illumina Hiseq 2500 (PE250) 系统进行高通量测序。

1.5.3 生物信息学分析 高通量测序得到的 4 组小鼠原始图像数据文件经碱基识别, 分析转化为原始双端序列。利用 Trimmomatic (v 0.35)、FLASH (v 1.2.11)、split_libraries (v 1.8.0) 和 UCHIME (v 2.4.2) 等软件对原始序列进行质控, 得到优质序列。使用 Vsearch (v 2.4.2) 软件按照 97% 的相似度进行操作分类单元 (OTU) 分类^[9], 并进行 Alpha 和 Beta 多样性分析以及菌群构成分析。比较 4 个处理组小鼠肠道菌群在门和属水平的分布差异。采用 PICRUST 软件结合京都基因及基因组百科全书 (KEGG) 分析各组小鼠肠道菌群信号通路富集情况。

1.6 统计分析

采用 GraphPad Prism (v 8.0.1) 软件对数据进行差异性检验, 显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 缺失菌株对小鼠毒力的影响

从表 1 可见: 小鼠经口服接种不同稀释含量的 LM10403s、LM10403s Δ tatD 和 LM10403sC Δ tatD 后, 各组均有小鼠死亡, 而无菌生理盐水对照组的小鼠均未发生死亡。PCR 扩增鉴定死亡小鼠肝脏分离的细菌为单核细胞增生性李斯特氏菌。通过 Bliss 法计算得到 LM10403s Δ tatD 口服感染小鼠的 LD₅₀ 为 8.11×10^7 CFU, LM10403s 的 LD₅₀ 为 1.23×10^7 CFU, LM10403sC Δ tatD 的 LD₅₀ 为 1.94×10^7 CFU。表明单核细胞增生性李斯特氏菌敲除 *tatD* 基因后毒力下降。

2.2 LM10403s Δ tatD 的免疫保护率

LM10403s Δ tatD 经灌胃第 2 次免疫 7 d 后, 将 LM10403s 调整为 1.00×10^{10} CFU 对小鼠进行攻毒。结果显示: 未免疫的 LM10403s 攻毒组小鼠于攻毒后全部死亡, 无菌生理盐水对照组小鼠未发生死亡。而免疫 LM10403s Δ tatD 的接种组共 2 只小鼠死亡, 死亡时间分别为攻毒感染后的第 6 天和第 9 天, 其余存活小鼠的精神状态良好, 免疫保护率为 80%。表明单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因缺失菌株能够对亲本菌株感染小鼠产生较好的免疫效果。

2.3 *tatD* 基因缺失对单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠肠道微生物 OTU 分布的影响

对质控得到的优质序列, 按照 97% 的相似度进行 OTU 分类, 采用维恩图对 4 个处理组 OTU 分布情况进行分析。PBS、LM10403s、LM10403s Δ tatD 和 LM10403sC Δ tatD 4 个处理独有的 OTU 分别为 1 703、755、1 057 和 597 个, 4 组共有 1 781 个 OTU。肠道菌群多样性由高到低依次为 PBS、LM10403s Δ tatD、LM10403s、LM10403sC Δ tatD 处理组 (图 1)。表明 *tatD* 基因缺失后使得单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠后肠道菌群多样性增加。

2.4 *tatD* 基因缺失对单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠肠道微生物 Alpha 多样性的影响

从图 2 可见: 4 个处理样品的 Shannon 指数和 Simpson 指数差异不显著。Chao1 和 Observed species 指数显示: PBS 与 LM10403s Δ tatD 处理组差异不显著, 但 LM10403s 和 LM10403sC Δ tatD 处理组相比于 PBS 处理组显著下降 ($P < 0.05$)。表明各处理小鼠肠道菌群物种均匀度相差不大, 但亲本菌株感染小鼠时肠道菌群丰富度显著降低。

2.5 *tatD* 基因缺失对单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠肠道微生物 Beta 多样性的影响

Beta 多样性包括多种分析方法, 其中非度量多维尺度分析 (NMDS) 能更好地反映生态学数据的非线性结构, 相同颜色为相同分组, 同一组的样本距离越近, 并与其他组有明显距离, 说明分组效果好。图 3 显示: PBS 与各处理组样本距离较远, LM10403s Δ tatD 与 LM10403s、LM10403sC Δ tatD 处理组距离相对

表 1 不同菌株的毒力测定

处理	接种剂量/CFU	死亡数/只	半数致死量/CFU
LM10403s Δ tatD	4.61×10^9	8	8.11×10^7
	4.61×10^8	7	
	4.61×10^7	5	
	4.61×10^6	2	
	4.61×10^5	1	
LM10403sC Δ tatD	2.80×10^9	9	1.94×10^7
	2.80×10^8	6	
	2.80×10^7	5	
	2.80×10^6	3	
	2.80×10^5	3	
LM10403s	4.45×10^9	8	1.23×10^7
	4.45×10^8	6	
	4.45×10^7	6	
	4.45×10^6	5	
PBS	4.45×10^5	3	
		0	

说明: 每个稀释度 10 只小鼠。

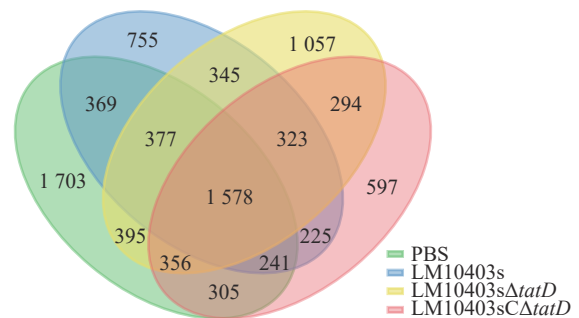
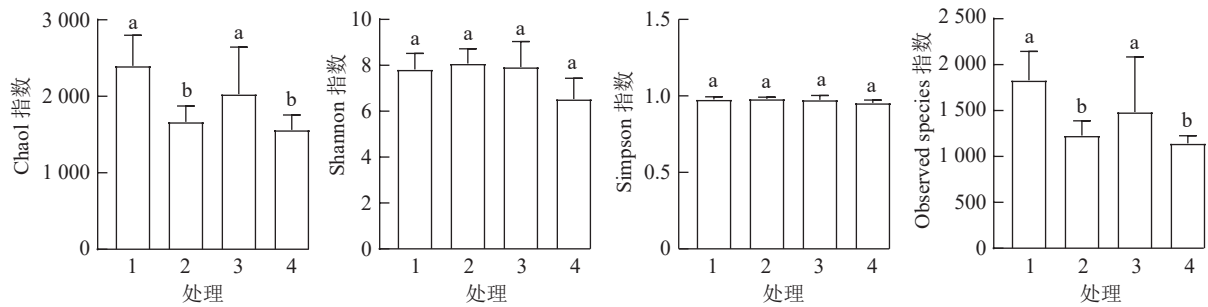


图 1 *tatD* 基因缺失对单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠肠道微生物的 OTUs 维恩图

Figure 1 OTUs venn diagram of *tatD* gene deletion on intestinal microorganisms of *L. monocytogenes* infected mice



不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。1、2、3、4 分别表示处理 PBS、LM10403s、LM10403s Δ *tatD*、LM10403sC Δ *tatD*。

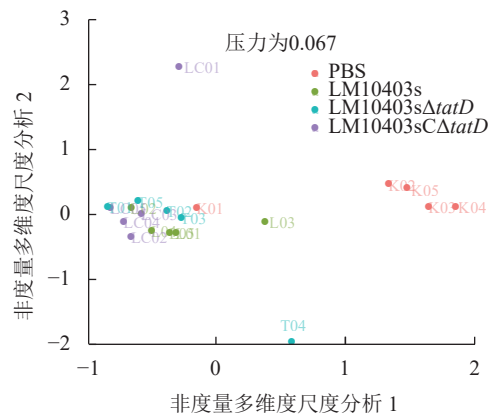
图 2 *tatD* 基因缺失对单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠的 Alpha 多样性分析

Figure 2 Alpha diversity index analysis of *L. monocytogenes* infected mice by deletion of the *tatD* gene

远，LM10403s 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组样本的聚集相近。表明 LM10403s Δ *tatD* 与 LM10403s、LM10403sC Δ *tatD* 处理组群落存在差异，但差异不大。

2.6 单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 缺失对小鼠肠道门水平微生物种群分布的影响

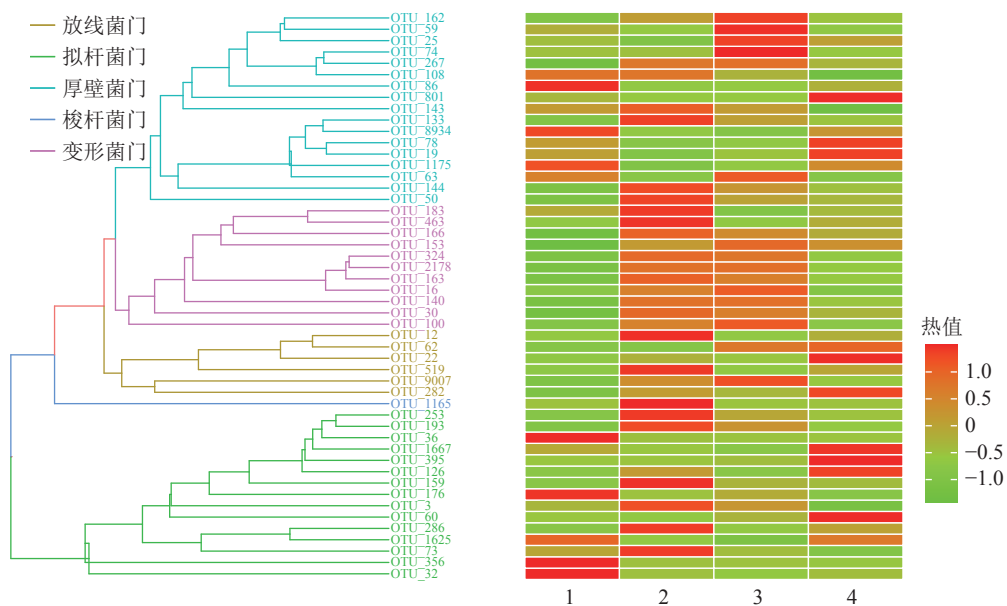
在门水平上，使用平均丰度前 50 位的门丰度数据绘制热图。结果显示：优势菌门为厚壁菌门 Firmicutes、变形菌门 Proteobacteria、放线菌门 Actinobacteria、梭杆菌门 Fusobacteria 和拟杆菌门 Bacteroidetes。LM10403s Δ *tatD* 处理组的厚壁菌门丰度明显高于 LM10403s 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组，拟杆菌门明显低于 LM10403s 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组 (图 4)。表明单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因缺失后，厚壁菌门明显增加，且与 PBS 处理组结果相似。



小圆点序号分别表示不同处理相应的 5 个重复样本。

图 3 *tatD* 基因缺失对单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠的 Beta 多样性分析

Figure 3 Beta diversity index analysis of *L. monocytogenes* infected mice by deletion of the *tatD* gene



1、2、3、4 分别表示处理 PBS、LM10403s、LM10403s Δ *tatD*、LM10403sC Δ *tatD*。

图 4 单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 缺失株感染小鼠肠道门水平微生物种群的热图分析

Figure 4 Heatmap graph of gut microbiota in mice after *tatD* mutant of *L. monocytogenes* infection at the phylum level

2.7 单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 缺失对小鼠肠道属水平微生物种群分布的影响

在属水平上, LM10403s、LM10403sΔ*tatD* 和 LM10403sCΔ*tatD* 处理组要由乳杆菌属 *Lactobacillus*、拟杆菌属 *Bacteroides* 和肠杆菌属 *Enterorhabdus* 组成。LM10403sΔ*tatD* 处理组的乳杆菌属相对丰度明显高于 LM10403s 和 LM10403sCΔ*tatD* 处理组 (图 5)。表明 *tatD* 基因缺失使单核细胞增生性李斯特氏菌感染的小鼠肠道菌群中乳杆菌属增加。

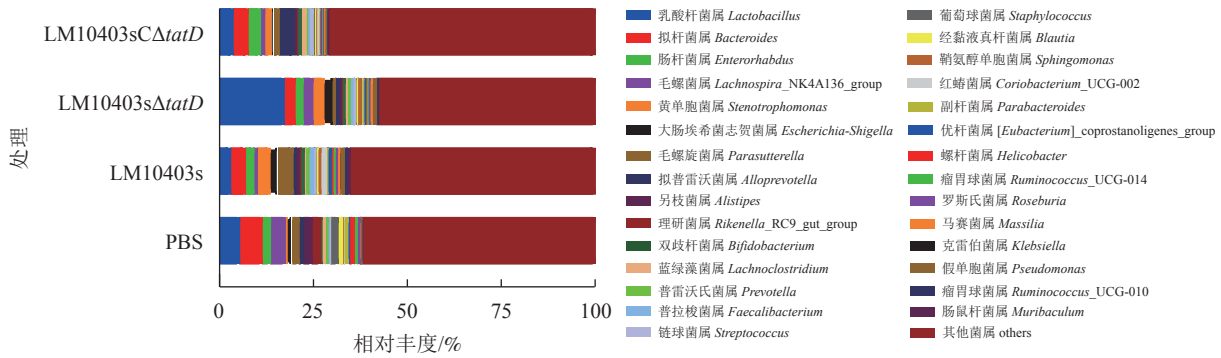


图 5 单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 缺失株感染小鼠肠道属水平微生物种群的分析

Figure 5 Analysis of gut microbiota in mice after *tatD* mutant of *L. monocytogenes* infection at the genus level

2.8 单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 对小鼠肠道微生物 KEGG 的功能预测

为进一步分析 *tatD* 基因缺失后小鼠肠道菌群改变引起的信号通路富集的差异, 采用 PICRUSt 软件结合 KEGG, 分析 4 组小鼠在遗传信息处理、生物体系统、新陈代谢、疾病、细胞过程和环境信息处理信号通路富集的差异。结果显示: LM10403sΔ*tatD* 和 PBS 处理组 6 类生物代谢通路相关性较低, 而 LM10403s 处理组具有较高的相关性 (图 6)。表明 *tatD* 基因缺失可能在单核细胞增生性李斯特氏菌感染小鼠肠道时, 影响其细胞过程、新陈代谢等方面。

3 讨论与结论

李斯特菌是一种强侵袭性胞内菌, 可穿透肠道、血脑和胎盘屏障。自单核细胞增生性李斯特氏菌基因组公布后, 大量毒力相关基因已被发掘, 并已深入探讨其在单核细胞增生性李斯特氏菌致病性方面的作用^[10]。作为重要的效应蛋白转运系统, Tat 系统在单核细胞增生性李斯特氏菌穿越宿主肠道屏障过程发挥何种作用仍不清楚。因此, 在本研究前期获得单核细胞增生性李斯特氏菌缺失菌株 LM10403sΔ*tatD* 的基础上进一步探究其口服感染小鼠的毒力, 同时采用高通量测序的方法观察其对小鼠肠道菌群的影响。

毒力是微生物对宿主造成损害的相对能力, 更是微生物得以在宿主体内传播的主要因素之一^[11]。单核细胞增生李斯特氏菌感染过程中, 包括 Tat 分泌系统在内的转运系统调控释放大量效应蛋白^[12]。ZHANG 等^[13] 将化脓隐秘杆菌 *Trueperella pyogenes* 菌株 *tatD* 基因敲除后, 缺失菌株在小鼠脾脏的细菌载量以及毒力明显较低。本研究也观察到了单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因缺失后, 口服感染小鼠的 LD₅₀ 由 1.23×10⁷ CFU 降为 8.11×10⁷ CFU。JHELMUM 等^[14] 也发现: *tatD* 基因缺失的肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* 在肺、血液和脾脏中负荷的细菌较少, 并且对脾脏的病理损伤也较小, 证实了 *tatD* 基因缺失后肺炎球菌毒性降低。NrfC 和 NapG 蛋白属于铁硫蛋白, 铁硫蛋白家族中的其他成员在促进细菌代谢中发挥了重要的作用, 并能促进细菌在更严酷的环境中得以生存^[15-16], 这 2 个蛋白在野生型菌株中迅速降解, 但 MATOS 等^[16] 将大肠埃希菌 *Escherichia coli* MC4100 菌株的 *tatD* 基因敲除后, 发

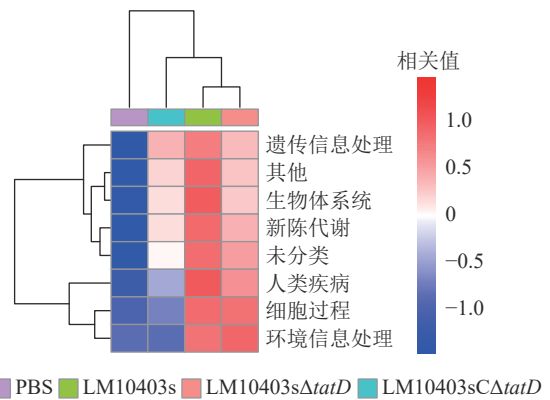


图 6 单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 缺失株感染小鼠肠道微生物 KEGG 通路差异

Figure 6 Differences of KEGG pathway in gut microbial in mice after *tatD* mutant of *L. monocytogenes* infection

现 NrfC 和 NapG 蛋白在 *tatD* 基因缺失菌株中高度稳定。因此, 这也有助于理解 *tatD* 基因缺失后, 单核细胞增生性李斯特氏菌的毒力下降不大, 但这种现象还需进一步研究证实。

尹诗恒等^[17]为探究松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 侵染下, 松干、松针与根系部位内生细菌菌群的影响, 选用高通量测序方法来进行研究。本研究同样采用高通量测序的方法探究单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因缺失对小鼠肠道菌群的影响。肠道菌群测序显示: 各处理组小鼠肠道菌群的物种均匀度相差不大, 但亲本菌株感染小鼠时肠道菌群的丰富度显著降低。动物肠道中的细菌门主要有厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门^[18]。厚壁菌门是肠道菌群中的一个优势菌门, 且其中包含许多有益菌, 例如: 芽孢杆菌属 *Bacillus*、肠球菌属 *Enterococcus*、乳杆菌属和乳球菌属 *Lactococcus* 等^[19]。在门水平上, LM10403s Δ *tatD* 处理组的厚壁菌门丰度明显高于 LM10403s 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组。乳酸菌是公认的安全食品级微生物, 在食物发酵和益生菌的应用中发挥着重要作用^[20]。服用乳酸菌制剂的人群与其他人群相比, 具有肠道屏障功能增强、肠道菌群平衡、炎症消散加快和免疫力增强等特征^[21], 表明乳酸菌具有治疗肠道功能紊乱、维持肠道菌群平衡和抵御肠道致病菌等多种作用。在门水平上, LM10403s Δ *tatD* 组与 PBS 处理组的厚壁菌门差异不大。但厚壁菌门包含许多菌属, 进一步属水平分析单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因缺失感染对小鼠肠道菌群的影响。LM10403s Δ *tatD* 处理乳杆菌属相对丰度为 20%, 显著高于 LM10403s 和 LM10403sC Δ *tatD* 处理组。因此, *tatD* 基因缺失使单核细胞增生性李斯特氏菌感染的小鼠肠道菌群中有益菌增加。KEGG 功能预测发现: LM10403s Δ *tatD* 和 PBS 处理组与 6 类生物代谢通路相关性较低, 而 LM10403s 处理组与 6 类生物代谢通路相关性较高。因此, *tatD* 基因可能直接或间接参与细胞过程和环境信息处理等信号通路。

综上所述, 本研究发现单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 缺失菌株感染小鼠毒力较亲本菌株明显下降, 并且有较好的免疫保护效力。单核细胞增生性李斯特氏菌 *tatD* 基因缺失感染小鼠后, 肠道菌群多样性高于亲本菌株, 且有益菌增加。同时, 发现 *tatD* 基因可能直接或间接参与细胞过程和环境信息处理等信号通路。

4 参考文献

- [1] FARBER J M, PETERKIN P I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen [J]. *Microbiological Reviews*, 1991, **55**(3): 476 – 511.
- [2] COSSART P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, **291**(6/7): 401 – 409.
- [3] 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.
- [4] MAURY M M, TSAI Y H, CHARLIER C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity [J]. *Nature Genetics*, 2016, **48**(3): 308 – 313.
- [5] YAN Xin, HU Sen, YANG Yan, et al. The twin-arginine translocation system is important for stress resistance and virulence of *Brucella melitensis* [J/OL]. *Infection and Immunity*, 2020, **88**(11): e00389-20[2022-12-01]. doi:10.1128/iai.00389-20.
- [6] CHEN Yichen, LI Chialung, HSIAO Yuyuan, et al. Structure and function of TatD exonuclease in DNA repair [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(16): 10776 – 10785.
- [7] ZHANG Kai, JIANG Ning, CHEN Hongyu, et al. TatD DNases of *African trypanosomes* confer resistance to host neutrophil extracellular traps [J]. *Science China Life Sciences*, 2021, **64**(4): 621 – 632.
- [8] 毛福超. 单增李斯特菌核酸酶TatD-like DNase的活性分析及缺失菌株的生物学特性[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2020. MAO Fuchao. *Activity Analysis of Listeria monocytogenes Nuclease TatD Like DNase and Biological Characteristics of the Deletion Strain* [D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2020.
- [9] 于国萍, 陈媛, 姚宇秀, 等. 利用Illumina MiSeq高通量测序技术分析原料乳的菌群分布[J]. *食品科学*, 2018, **39**(16): 186 – 191. YU Guoping, CHEN Yuan, YAO Yuxiu, et al. Application of Illumina MiSeq high-throughput sequencing technique to analyze bacterial distribution in raw milk [J]. *Food Science*, 2018, **39**(16): 186 – 191.
- [10] LOPES-LUZ L, MENDONCA M, FOGACA M B, et al. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence

- determinants-targeted immunological assays [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2021, **47**(1/6): 647 – 666.
- [11] DIARD M, HARDT W D. Evolution of bacterial virulence [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, **41**(5): 679 – 697.
- [12] MACHADO H, LOURENCO A, CARVALHO F, *et al.* The Tat pathway is prevalent in *Listeria monocytogenes* lineage II and is not required for infection and spread in host cells [J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2013, **23**(3): 209 – 218.
- [13] ZHANG Zehui, LIANG Yinfeng, YU Lihui, *et al.* TatD DNases contribute to biofilm formation and virulence in *Trueperella pyogenes* [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, **12**: 758465 [2022-12-01]. doi:10.3389/fmicb.2021.758465.
- [14] JHELMUM H, SORI H, SEHGAL D. A novel extracellular vesicle-associated endodeoxyribonuclease helps *Streptococcus pneumoniae* evade neutrophil extracellular traps and is required for full virulence [J/OL]. *Scientific Reports*, 2018, **8**(1): 7985 [2022-12-01]. doi: 10.1038/s41598-018-25865-z.
- [15] SAINI V, FARHANA A, STEYN A J. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3: a novel iron-sulfur cluster protein that regulates redox homeostasis and virulence [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, **16**(7): 687 – 697.
- [16] MATOS C F R O, DI COLA A D, ROBINSON C. TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli* [J]. *EMBO Report*, 2009, **10**(5): 474 – 479.
- [17] 尹诗恒, 张绍勇, 刘骥骥, 等. 松材线虫侵染对马尾松苗不同部位内生细菌菌群结构的影响 [J]. *浙江农林大学学报*, 2021, **38**(4): 846 – 853.
- YIN Shiheng, ZHANG Shaoyong, LIU Sushuang, *et al.* Effect of *Bursaphelenchus xylophilus* infection on the endophytic bacterial community structure in different parts of *Pinus massoniana* seedlings [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2021, **38**(4): 846 – 853.
- [18] SHAPIRA M. Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2016, **31**(7): 539 – 549.
- [19] BROWNE H P, ALMEIDA A, KUMAR N, *et al.* Host adaptation in gut *Firmicutes* is associated with sporulation loss and altered transmission cycle [J/OL]. *Genome Biology*, 2021, **22**(1): 204 [2022-12-01]. doi:10.1186/s13059-021-02428-6.
- [20] 何进, 徐思杨, 刘波, 等. 乳酸菌在农业和食品加工中的应用研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2022, **42**(4): 1 – 11.
- HE Jin, XU Siyang, LIU Bo, *et al.* Research progress in the application of lactic acid bacteria in agriculture and food processing [J]. *Journal of Microbiology*, 2022, **42**(4): 1 – 11.
- [21] HEENEY D D, GAREAU M G, MARCO M L. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, **49**: 140 – 147.