

双基因敲除减毒单增李斯特菌($\Delta actA/\Delta inlB$)的构建及其生物学初步鉴定

丁承超¹, 曾海娟¹, 钟菲菲², 陈国薇¹, 董庆利¹, 谢曼曼¹, 吴嫚¹, 刘武康¹, 刘箐¹

(1. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

(2. 湖南省长沙市食品质量监督检测中心, 湖南长沙 410013)

摘要: 减毒单增李斯特菌具有成为疫苗活载体的潜力, 可同时引起 MHC I 和 MHC II 类抗原递呈系统, 具有强烈激发 CD8⁺和 CD4⁺细胞免疫的能力。构建毒力基因缺失菌株进而评估其生物活性对于其作为疫苗活载体的开发尤为重要。本文采用同源重组技术构建单缺失菌株 *Lm- $\Delta actA$* 和双缺失菌株 *Lm- $\Delta actA/\Delta inlB$* , 从生长状态、毒力基因表达和对 HepG2 细胞侵袭能力方面探讨减毒菌株生物学特性。生长活性测定显示两种减毒菌株和野生型 *Lm (EGD-e)* 三者生长状况无差异; 实时定量 PCR 结果显示 *actA* 基因缺失后, *inlA* 基因表达水平上升两倍; *actA* 和 *inlB* 基因双缺失后, *plcB* 和 *hly* 基因的表达水平都有较大幅度的上升; 侵袭 HepG2 细胞结果显示 *actA* 基因缺失后侵袭能力增强、*actA* 和 *inlB* 基因共同缺失后侵袭能力减弱。因此, 减毒菌株的构建及其生物特性研究不仅对食源性致病菌 *Lm* 致病机理具有重要意义, 也为构建预防人类和动物疫病的疫苗载体奠定了基础。

关键词: 减毒单增李斯特菌; 疫苗载体; *actA*; *inlB*; 生物特性; 细胞侵袭

文章编号: 1673-9078(2016)07-66-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.011

Construction of Attenuated *Listeria monocytogenes* ($\Delta actA/\Delta inlB$) and Preliminary Identification of Biological Activity

DING Cheng-chao¹, ZENG Hai-juan¹, ZHONG Fei-fei², CHEN Guo-wei¹, DONG Qing-li¹, XIE Man-man¹, WU Man¹, LIU Wu-kang¹, LIU Qing¹

(1.School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China) (2.Supervision and Inspection Center of Food Quality and Safety in Changsha, Changsha 410013, China)

Abstract: Attenuated *Listeria monocytogenes* (*Lm*) has the potential to become a live vaccine vector. It can also produce major histocompatibility complex (MHC) I and MHC II antigen presentation systems, and significantly stimulate immunity in cluster of differentiation (CD)8⁺ and CD4⁺ cells. The construction of avirulent gene deletion strains and the subsequent evaluation of their biological activity are crucial for the development of live vaccine vectors. Homologous recombination technology was used to construct *Lm- $\Delta actA$* and *Lm- $\Delta actA/\Delta inlB$* strains, and the biological activities of attenuated strains were explored in terms of growth, virulence gene expression, and the capacity to invade HepG2 cells. The results showed that no difference in growth was found among the attenuated strains *Lm- $\Delta actA$* , *Lm- $\Delta actA/\Delta inlB$* , and wild type *Lm (EGD-e)*. Real time quantitative polymerase chain reaction (PCR) results showed that *inlA* expression was enhanced two-fold after the *actA* gene was deleted. The expression of *plcB* and *hly* genes was significantly elevated when *actA* and *inlB* genes were simultaneously deleted. The HepG2 cell invasion assay showed that the invasive capacity was enhanced after the *actA* gene was deleted and was weakened after deleting *actA* and *inlB* genes. Therefore, the construction of attenuated strains and study of their biological properties is not only important for understanding the pathogenesis of food-borne *Lm*, but also lays a foundation for the construction of vaccine vectors for the prevention of human and animal diseases.

Key words: attenuated *Listeria monocytogenes*; vaccine vector; *actA*; *inlB*; biological activity; cell invasion

收稿日期: 2015-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371776);上海市研究生教育创新计划

作者简介: 丁承超(1992-),男,硕士研究生,研究方向:病原微生物疫苗研究

通讯作者: 刘箐(1970-),男,博士,教授,研究方向:食源性致病菌致病机理及控制研究

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)是一种革兰氏阳性兼性厌氧胞内寄生条件致病菌。该菌可穿越肠道屏障、血脑屏障和胎盘屏障,引起人和动物的胃肠炎、脑膜炎、败血症^[1-2]。由于 *Lm* 对环境的耐受能力极强并可以形成菌膜,因此其广泛存在于自然界中,且容易通过生产和加工过程污染蔬菜、牛奶和肉制品等食品^[3]。其作为一种常见的食源性致病菌,所引起的食品安全问题已经引起全世界的广泛关注。然而,随着 *Lm* 全基因组测序工作的完成, *Lm* 逐渐成为国外学者在基因工程疫苗方面的研究热点,而国内在 *Lm* 作为疫苗载体的研究方面鲜有报道。以“*Listeria monocytogenes* +vaccine”为关键词在 PubMed 进行检索发现,截止 2015 年 09 月 01 日为止,共有 785 篇关于 *Lm* 作为疫苗载体的研究报道,其中近五年相关研究近 200 篇。迄今为止减毒 *Lm* 活载体疫苗已应用于人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类乳头瘤病毒(HPV)和转移性胰腺癌等^[4-6]人类复杂疾病的免疫治疗研究中。

Lm 作为疫苗载体能够同时引起 MHC I 和 MHC II 类抗原递呈系统,具有显著激发强烈的 CD8+ 和 CD4+ 细胞免疫的能力^[7-8]。然而野生型 *Lm* 对宿主毒性太强,因此在 *Lm* 作为疫苗载体之前需要进行减毒^[9]。目前研究发现 *Lm* 的毒力主要由六个毒力因子编码基(*prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*)组成。*plcA* 和 *plcB* 分别编码磷脂酰肌醇特异性磷脂酶(PI-PLC)和卵磷脂酶(PC-PLC),有助于 *Lm* 逃离吞噬小体;*actA* 与基于 *Lm* 肌动蛋白的运动性有关;*hly* 则与 *Lm* 的溶血素有关,参与单增李斯特菌一级和次级吞噬小体的逃离;*prfA* 主要调控 *Lm* 的侵袭相关毒力因子,如 *inlA* 和 *inlB* 等;*mpl* 是一个依赖锌的金属蛋白酶基因^[10-11]。目前, *actA/plcB*、*hly*、*prfA*、*actA* 等单个或者多个毒力基因敲除减毒的 *Lm* 已应用于肿瘤、病毒等 DNA 疫苗载体中,部分疫苗已经进入 I 期、II 期临床实验^[12]。

本文首先利用同源重组技术对单基因缺失菌株 *Lm-ΔinlB* 进行二次减毒,构建减毒李斯特菌 *Lm-ΔactA/ΔinlB*。然后从生长状态、毒力基因表达水平和对 HepG2 细胞侵袭能力方面比较减毒菌株与野生型菌株之间的生物活性。最后初步评估减毒 *Lm* 作为疫苗载体的可行性,并为食源性致病菌 *Lm* 致病机理研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

限制性内切酶 (*Sma*I、*Xba*I 和 *Sal*I)、*Taq* DNA

聚合酶、dNTPs、DNA Ladder Marker、T4 DNA 连接酶均购自 Takara 公司;实验引物均由上海生工生物有限公司合成;BHI 培养基(Brain Heart Infusion)购自北京陆桥技术有限责任公司;细胞培养基及胎牛血清购自上海赛齐生物工程有限公司;庆大霉素购自韩国 Biosharp 公司;PCR 仪、凝胶成像仪(香港 Gene Company Limited 基因有限公司);MicroPulser 电穿孔仪(美国 BIO-RAD 公司);SpectraMax M2 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 菌株、质粒及细胞

野生株 *Lm(EGD-e)* 和野生缺失株 *Lm-ΔinlB* 均为实验室保存,大肠杆菌感受态细胞 DH5α 购自 Takara 公司;pKSV7(温度敏感性穿梭载体,含有氯霉素抗生素标记)由华中师范大学副教授罗勤馈赠;人肝癌 HepG2 细胞株由本实验室保存。

1.3 双缺失减毒株(*Lm-ΔactA/ΔinlB*)的构建

1.3.1 引物

实验所用引物为表 1 所示

表 1 *Lm-ΔactA/ΔinlB* 构建及鉴定所需引物

Table 1 Construction of *Lm-ΔactA/ΔinlB* and primers used in

this study	
Primer	Sequence(5' → 3')
<i>inlB</i> -F	TGGGAGAGTAACCCAACCA
<i>inlB</i> -R	AGCTTTATTGGCGCTGACAT
<i>actA</i> -P1	ATTCCC GGG GATACGAAGGGCAATCAGGTG
<i>actA</i> -P2	ATT TCTAGAC ATCATCGCACGCATAAATC
<i>actA</i> -P3	ATT TCTAGAGA AAGGAAGAACCAGGGAACC
<i>actA</i> -P4	ATT CTGCAGT TATTGGCGTGCATAGGTTGA
<i>actA</i> -F	ATAGCGCAGCGAAATTAATA
<i>actA</i> -R	CCCGCATTTCTTGAGTGTTT

1.3.2 *Lm-ΔinlB* 菌株 *inlB* 基因缺失的验证

用引物 *inlB*-F/*inlB*-R(表 1)分别对 *Lm(EGD-e)*、*Lm-ΔinlB* 进行 *inlB* 片段的扩增,PCR 结果经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 重组质粒 pKSV7-actA(P1/P4)的构建

分别用引物 *actA*-P1/*actA*-P2 和 *actA*-P3/*actA*-P4(表 1)扩增 *actA* 基因的上游片段 P1/P2、下游片段 P3/P4; *Sma*I 和 *Xba*I、*Xba*I 和 *Sal*I 双酶切 *actA* 基因的上下游片段后使用 T₄ DNA 连接酶连接上下游片段,获得片段 P1/P4;使用 *Sma*I 和 *Sal*I 同时对 P1/P4 片段和穿梭质粒 pKSV7 进行双酶切;T₄ DNA 连接酶

连接双酶切后的产物，得到重组质粒；将获得的重组质粒导入 DH5 α 中，同时导入空载体 pKSV7 作对照，PCR 鉴定并使用 *Sma*I 和 *Sal*I 对扩增得到的重组质粒进行双酶切鉴定。鉴定为阳性的克隆由上海华大基因科技有限公司测序，将测序正确的阳性克隆命名为重组质粒 pKSV7-actA(P1/P4)。

1.3.4 减毒株 *Lm*- Δ actA/ Δ inlB 的构建

根据 Park 等^[13]方法制备 *Lm*- Δ inlB 感受态细胞，电转化法将重组质粒 pKSV7-actA(P1/P4) 导入 *Lm*- Δ inlB 感受态细胞。通过温度和氯霉素抗性压力进行同源重组。利用引物 *actA*-F/ *actA*-R、*actAP1*/*actAP4* (表 1) 及涂布无抗性平板对突变株进行鉴定，鉴定结果为阳性的菌株命名为 *Lm*- Δ actA/ Δ inlB。减毒株 *Lm*- Δ actA/ Δ inlB 的构建如图 1 所示。

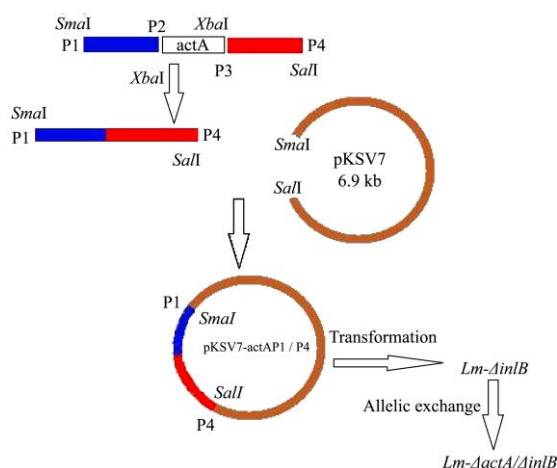


图 1 *Lm*- Δ actA/ Δ inlB 的构建原理

Fig.1 Schematic diagram for the construction of *Lm*- Δ actA/ Δ inlB

1.4 减毒株 *Lm*- Δ actA/ Δ inlB 生物特性研究

1.4.1 *Lm* (EGD-e)、*Lm*- Δ actA、*Lm*- Δ actA/ Δ inlB 的生长情况

使用酶标仪测定 *Lm* (EGD-e)、*Lm*- Δ actA、*Lm*- Δ actA/ Δ inlB 在 OD₆₀₀ 下的生长曲线，比较 *actA* 和 *inlB* 基因缺失后的菌株与 *Lm* (EGD-e) 的活力是否存在明显的不同。

1.4.2 RT-PCR 检测 *Lm*- Δ actA、*Lm*- Δ actA/ Δ inlB 主要毒力基因表达检测

为考察 *Lm* (EGD-e) 在缺失 *actA* 和 *inlB* 基因后其毒力基因的表达水平，提取 *Lm* (EGD-e)、*Lm*- Δ actA、*Lm*- Δ actA/ Δ inlB RNA 后反转录成 cDNA，以 *Lm* (EGD-e) 各毒力基因的表达水平作基准，RT-PCR 分别检测 *Lm*- Δ actA、*Lm*- Δ actA/ Δ inlB 中 *actA*、*inlA*、*inlB*、*plcB*、*hly* 基因的表达水平。

1.4.3 *Lm* (EGD-e)、*Lm*- Δ actA、*Lm*- Δ inlB、*Lm*- Δ actA/ Δ inlB 侵袭 HepG2 细胞

对细菌和细胞进行计数，调整浓度使得细菌和细胞分别为 10⁸ CFU/mL 和 10⁶ 个/mL，调整比例为细菌数/细胞数=100/1 后进行细菌侵袭细胞实验。侵袭之前将细胞培养板中换成不含血清的不完全培养基，排除血清对侵袭实验的干扰；放入细胞培养箱分别侵袭 5 h 后在显微镜下观察细胞形态；侵袭结束后加入 0.5 mL 700 μ g/mL 的庆大霉素，放置于细胞培养箱处理 30 min 充分灭活胞外细菌；使用 PBS 清洗庆大霉素后加入 0.5 mL 1% Triton-X-100，室温处理 30 min，充分破碎细胞后稀释涂布 BHI 平板，37 $^{\circ}$ C 培养进行平板计数。

1.5 数据分析方法

本实验数据经 Microsoft Excel 与 SPSS 处理。

2 结果与讨论

2.1 *Lm*- Δ inlB 菌株 *inlB* 基因缺失验证结果

用引物 *inlB*-F/*inlB*-R 对 *Lm*- Δ inlB 进行 *inlB* 片段的扩增，以 *Lm* (EGD-e) 作为阳性对照，经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 2 所示。由于 *Lm*- Δ inlB 中的 *inlB* 基因已经缺失，引物 *inlB*-F/*inlB*-R 与其没有结合位点，故泳道 3 PCR 结果无扩增条带，阳性对照 *Lm* (EGD-e) PCR 结果得到与预期大小 (600 bp) 一致的条带。结果表明用于构建 *Lm*- Δ actA/ Δ inlB 的菌株确为 *Lm*- Δ inlB。

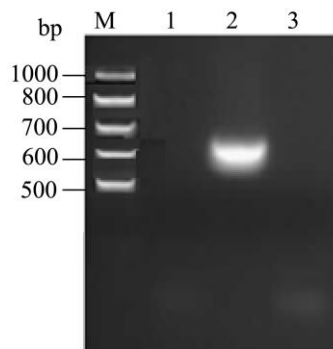


图 2 *inlB* 基因缺失验证结果

Fig.2 Identification of *inlB* gene deletion by PCR

注：M: DNA marker; 1: H₂O; 2: *Lm* (EGD-e); 3: *Lm*- Δ inlB。

2.2 重组质粒 pKSV7-actA(P1/P4) 的构建结果

将获得的重组质粒导入 DH5 α 中，使用 *actA*-P1/*actA*-P4 引物 PCR 鉴定。图 3a 显示，泳道 4、5 表明 *actA* 上下游连接片段 *actA*(P1/P4) 已经成功插入质粒 pKSV7 中。使用 *Sma*I 和 *Sal*I 对扩增得到的重组

质粒进行双酶切鉴定,如图 3b 所示,成功从重组质粒上酶切下和片段 *actA(P1/P4)* 一致大小(1500 bp)的片段。进一步的 DNA 测序结果表明插入的片段与 Genebank 序列相似度为 100%。

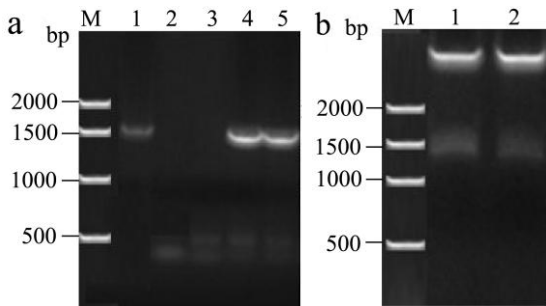


图 3 重组质粒 pKSV7-actA(P1/P4) 鉴定结果

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pKSV7-actA(P1/P4)

注: a: PCR analyses M: DNA marker; 1:*actA(P1/P4)*; 2:H₂O; 3:empty plasmid;4-5:pKSV7-actA(P1/P4); b:Enzyme-digested M: DNA marker;1-2: pKSV7-actA(P1/P4)。

2.3 减毒株 *Lm-ΔactA/ΔinlB* 的构建结果

电转化法将重组质粒 pKSV7-actA(P1/P4) 导入 *Lm-ΔinlB* 感受态细胞。通过温度和氯霉素抗性压力进行同源重组。利用引物 *actA-F/actA-R*、*actAP1/actAP4* 及涂布无抗性平板对突变株进行鉴定筛选,如图 4a 所示,使用引物 *actA-F/actA-R* 进行菌落鉴定时,预期突变株 2、3、6 泳道没有扩增条带,7 泳道 *Lm(EGD-e)* 作为对照扩增出与预期大小(750 bp)一致的条带;使用引物 *actAP1/actAP4* 对疑似突变株进行 PCR 鉴定,图 4b 表明突变株与 7 泳道 *Lm(EGD-e)* 相比,2、3、6 泳道有部分基因(750 bp)缺失。结合 4a、4b 两图,突变株 2、3、6 为 *actA* 基因缺失的阳性转化子,命名为 *Lm-ΔactA/ΔinlB*。

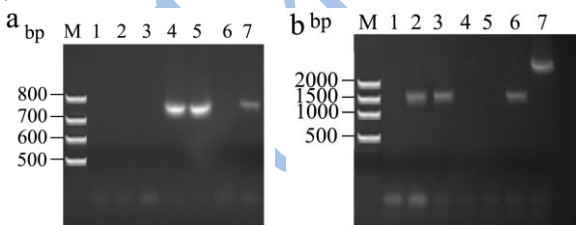


图 4 减毒株 *Lm-ΔactA/ΔinlB* 的鉴定结果

Fig.4 Identification of *Lm-ΔactA/ΔinlB* by PCR analyses. Fig.4A: PCR analyses using primer *actA-F/actA-R*;

注:b. PCR analyses using primer *actAP1/actAP4*. M:DNA marker; 1: H₂O; 4、5: negative result; 2、3、6: *Lm-ΔactA/ΔinlB*;7: *Lm(EGD-e)* .

2.4 *Lm(EGD-e)*、*Lm-ΔactA*、*Lm-ΔactA/ΔinlB*

生长曲线

使用酶标仪测定 12 h 内 *Lm(EGD-e)*、*Lm-ΔactA*、*Lm-ΔactA/ΔinlB* 在 OD₆₀₀ 下的生长曲线,比较 *actA* 和 *inlB* 基因缺失后的菌株与 *Lm(EGD-e)* 的活力是否存在明显的不同。图 5 表明 *Lm-ΔactA* 和 *Lm-ΔactA/ΔinlB* 在基因缺失后菌体生长趋势与野生株 *Lm(EGD-e)* 完全一致。

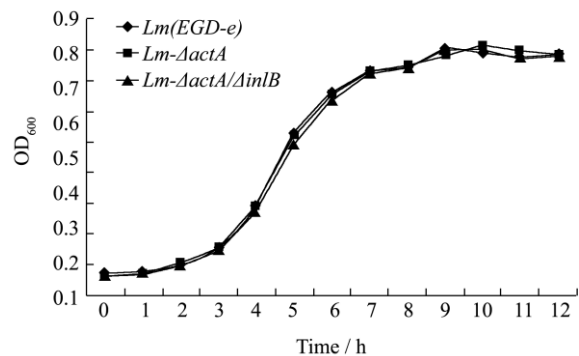


图 5 *Lm(EGD-e)*、*Lm-ΔactA*、*Lm-ΔactA/ΔinlB* 生长曲线

Fig.5 Growth curves of *Lm(EGD-e)*, *Lm-ΔactA*, and *Lm-ΔactA/ΔinlB* based on OD₆₀₀

2.5 *Lm-ΔactA*、*Lm-ΔactA/ΔinlB* 各毒力基因的表达水平

以 *Lm(EGD-e)* 各毒力基因的表达水平作基准,RT-PCR 分别检测 *Lm-ΔactA*、*Lm-ΔactA/ΔinlB* 中 *actA*、*inlA*、*inlB*、*plcB*、*hly* 基因的表达水平。结果如图 6 所示,*Lm(EGD-e)* 各毒力基因的表达水平为 1,则在 *actA* 基因缺失时,*inlA* 基因的表达水平上升至 2 倍左右,其他毒力表达水平无明显变化;当 *actA* 和 *inlB* 基因共同缺失时,*plcB* 和 *hly* 基因的表达水平分别上升至原来的 8 倍和 3 倍。

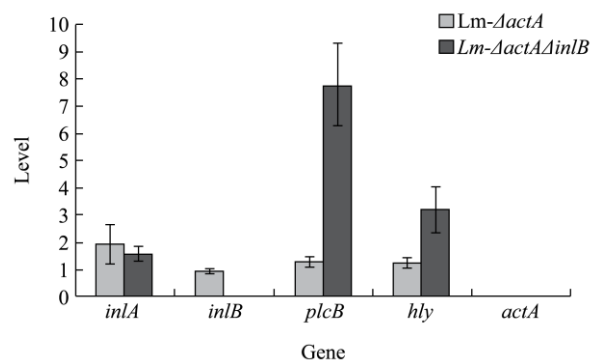


图 6 *Lm-ΔactA*、*Lm-ΔactA/ΔinlB* 各毒力基因的表达水平

Fig.6 Expression of virulence genes in *Lm-actA* and *Lm-ΔactA/ΔinlB* assessed by RT-PCR analyses

2.6 Lm (EGD-e)、Lm-ΔactA、Lm-ΔinlB、

Lm-ΔactA/ΔinlB 对 HepG2 细胞侵袭结果

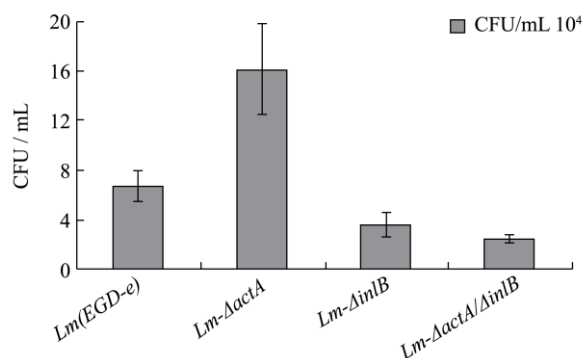


图7 各菌株的菌落总数

Fig.7 Viable colony counts of Lm (EGD-e), Lm-actA, Lm-ΔinlB, and Lm-ΔactA/ΔinlB

Lm (EGD-e) :6.60×10⁴CFU/mL; Lm-actA:1.60×10⁵CFU/mL; Lm-ΔinlB:3.50×10⁴CFU/mL; Lm-ΔactA/ΔinlB:2.42×10⁴CFU/mL.

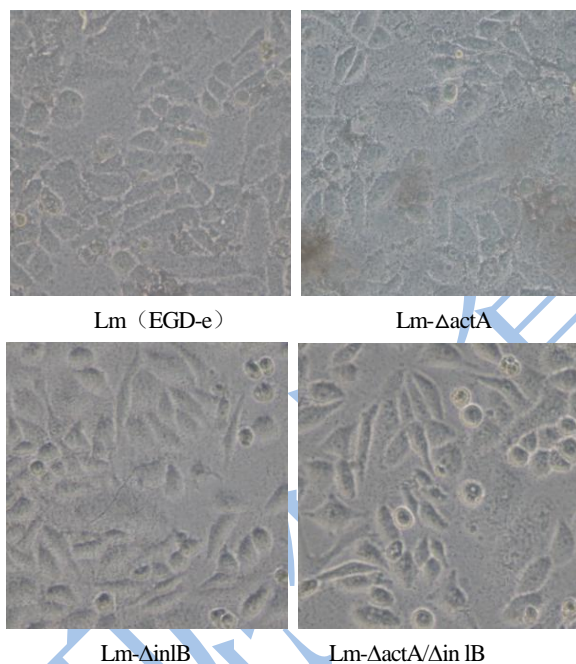


图8 侵袭后细胞形态

Fig.8 Cellular morphologies after invasion

分别用 Lm (EGD-e)、Lm-ΔactA、Lm-ΔinlB、Lm-ΔactA/ΔinlB 侵袭 HepG2 细胞 5 h, 破碎细胞后涂布 BHI 平板, 计算菌落总数。其结果如图 7 所示, 与 Lm (EGD-e) 入侵数 6.6×10⁴CFU/mL 相比, actA 基因在缺失后对 HepG2 细胞的入侵能力增强 2.5 倍左右, 为 1.6×10⁵CFU/mL。这主要是由于 actA 基因缺失后其 inlA 基因的表达水平上升 2 倍导致。根据 Dramsi 等^[14]的研究, Lm 入侵宿主细胞时首先是内化素基因起到内化作用; actA 和 inlB 基因共同缺失后, 由于主要毒

力基因缺失, 其侵袭能力下降为原来的 37%, 侵袭数目为 2.42×10⁴CFU/mL。侵袭结束后细胞形态如图 8 所示, HepG2 细胞经 Lm-ΔactA/ΔinlB 侵袭后细胞生长形态及贴壁性较好; 经 Lm-ΔactA 侵袭后, 由于侵入细胞较多, 细胞生长迟缓且形态变圆脱壁较多。细胞形态初步观察结果基本符合细胞侵袭后的涂布结果 (Fig.7)。

3 结论

3.1 为研制出安全且可以高效诱导免疫应答能力的活载体疫苗, 近年来科研工作者已成功构建出大量的减毒菌株, 包括 Lm-ΔactA、Lm-Δhly、Lm-ΔplcB 等。如何在毒力显著降低的前提下仍可以保证其能有较好的诱导免疫应答能力是该领域的研究重点。虽然 Lm 部分基因缺失后其毒力水平大幅度减毒, 但诱导免疫应答的能力也受到较大程度的影响。例如 Glomski I J 等^[15]研究发现在 hly 基因缺失后对小鼠的 LD₅₀ 明显上升, 但也致使其诱导免疫应答的能力减低。其原因是 hly 基因缺失的同时 Lm 的溶血活性也丧失了, 进而使 Lm 以 MHC I 类分子方式递呈抗原的能力减低^[16]。因此, 寻找新的减毒靶点同时考察其刺激免疫应答的能力显得尤为重要。

3.2 本实验室在前期已成功构建减毒菌株 Lm-ΔinlB, 本研究在 Lm-ΔinlB 基础上二次减毒构建双缺失菌株 Lm-ΔactA/ΔinlB。通过同源重组方法, 成功获得了减毒菌株 Lm-ΔactA 和 Lm-ΔactA/ΔinlB, 并且两者与野生型 Lm (EGD-e) 相比生长状况无明显变化, 说明 actA 和 inlB 基因的缺失对菌株的生长影响微乎其微 (Fig.5); 在 Lm 毒力缺失后对其它毒力基因影响的研究中发现, actA 基因的缺失后, inlA 基因的表达水平稳定上升为原来的 2 倍。研究首次发现 Lm 的 actA 和 inlA 基因存在某种关系, 这种关系可能受 Lm 自身的某种调控机制控制; 另外, 有趣的是在 actA 和 inlB 基因共同缺失时, hly 的表达水平上升为原来的 3 倍 (Fig.6)。在 Lm 作为疫苗载体时, 有 5-10% 的 Lm 可通过其特有的毒力蛋白 LLO 降解溶酶体膜后逃逸, 逃逸出来的细菌分泌的蛋白被蛋白酶降解加工后通过 MHC I 递呈给 CD8⁺T 细胞^[17-18]。hly 的表达水平上升意味着 Lm-ΔactA/ΔinlB 作为疫苗载体时可大大提升 MHC I 类分子方式递呈抗原的能力, 这充分发挥了 Lm 作为疫苗载体的优势; Lm-ΔactA/ΔinlB 对 HepG2 细胞的侵袭结果 (Fig.7; Fig.8) 显示, actA 基因在缺失后入侵能力反而增强, 这主要是由于 actA 基因缺失后其 inlA 基因的表达水平上升导致, 这符合 Lm 入侵宿主细胞时首先是内化素基因起到内化作用; 此外, 与 Lm

(EGD-e)相比, *Lm-ΔactA/ΔinlB* 对 HepG2 细胞的侵袭能力明显下降并且细胞状态较好 (Fig.7; Fig.8)。因此, 结合以上讨论 *Lm-ΔactA/ΔinlB* 满足作为一个疫苗载体的前提, 即减毒后毒力水平显著减低的同时保证其诱导免疫应答的能力。

3.3 本研究从另一角度证实 *Lm-ΔactA/ΔinlB* 具有作为载体的潜力, 减毒后菌株安全性明显增强也具有较强激发免疫应答的能力。此外, 该减毒菌株的构建及其生物活性研究不仅对食源性致病菌 *Lm* 引起的食品安全问题具有重大意义, 也为研究 *Lm* 毒力因子的致病机理及其调控机制提供了条件。

参考文献

- [1] Lecuit M, Cossart P. Genetically-modified-animal models for human infections: the *Listeria* paradigm [J]. Trends Mol. Med., 2002, 8(11): 537-542
- [2] Vazquez Boland J A, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clin. Microbiol. Rev., 2001, 14(3): 584-640
- [3] Takhistov P, George B. Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth [J]. Bioproc. Biosyst. Eng., 2004, 26 (4): 259-270
- [4] Miller EA, Spadaccia MR, Norton T, et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* vectors overcome suppressive plasma factors during HIV infection to stimulate myeloid dendritic cells to promote adaptive immunity and reactivation of latent virus [J]. AIDS Res. Hum. Retrov., 2015, 31(1): 127-136
- [5] Cory L, Chu C. ADXS-HPV: A therapeutic *Listeria* vaccination targeting cervical cancers expressing the HPV E7 antigen [J]. Hum Vacc Immunother, 2014, 10(11):3190-3195
- [6] Quispe-Tintaya W, Chandra D, Jahangir A, et al. Nontoxic radioactive *Listeria* is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer [J]. P. Natl. Acad. Sci., 2013, 110(21): 8668-8673
- [7] Calderon-Gonzalez R, Tobes R, Pareja E, et al. Identification and characterisation of T-cell epitopes for incorporation into dendritic cell-delivered *Listeria* vaccines [J]. J. Immunol. Methods, 2015, 424: 111-119
- [8] Wan X, Cheng C, Lin Z, et al. The attenuated hepatocellular carcinoma-specific *Listeria* Vaccine Lmdd-MPFG prevents tumor occurrence through immune regulation of dendritic cells [J]. Oncotarget, 2015, 6(11): 8822-8838
- [9] Miller EA, Spadaccia MR, Norton T, et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* vectors overcome suppressive plasma factors during HIV infection to stimulate myeloid dendritic cells to promote adaptive immunity and reactivation of latent virus [J]. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 2015, 31(1): 127-136
- [10] Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species [J]. Science, 2001, 294(5543): 849-852
- [11] Wilson RL, Tvinnereim AR, Jones BD, et al. Identification of *Listeria monocytogenes* in vivo-induced genes by fluorescence-activated cell sorting [J]. Infect. Immun., 2001, 69(8): 5016-5024
- [12] Dirk G Brockstedt, Dung T Le, Raffit Hassan, et al. Clinical experience with live-attenuated, double- deleted (LADD) *Listeria monocytogenes* targeting mesothelin-expressing tumors [J]. J. Imm. Ther. Can., 2013, 1(Suppl 1):P203
- [13] Park SF, Stewart GS. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells [J]. Gene, 1990, 94 (1): 129-132
- [14] Dramsi S, Biswas I, Maguin E, et al. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family [J]. Mol. Microbiol., 1995, 16(2): 251-261
- [15] Glomski I J, Decatur AL, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* mutants that fail to compartmentalize listerolysin O activity are cytotoxic, avirulent, and unable to evade host extracellular defenses [J]. Infect. Immun., 2003, 71(12): 6753-6765
- [16] Olier M, Pierre F, Rousseaux S, et al. Expression of truncated Internalin Ais involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* isolates carried asymptotically by humans [J]. Infect. Immun., 2003, 71(3): 1217-1224
- [17] Bertrand Toussaint, Xavier Chauchet, Yan Wang, et al. Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector [J]. Expert Rev. Vaccines, 2013, 12(10): 1139-1154
- [18] Bruhn KW, Craft N, Miller JF. *Listeria* as a vaccine vector [J]. Microbes Infect, 2007, 9(10): 1226-1235