

毒力因子InlA和InlB缺失影响单增李斯特菌侵袭宿主细胞和诱导凋亡的能力

刘武康, 陈国薇, 谢曼曼, 郭亮, 王淑娟, 董庆利, 刘箐*
(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种毒力较强、人畜共患的食源性致病菌, 其具有穿透宿主屏障、胞内寄生的特点, 因而致死率较高, 被其污染的食品容易引发严重的食品安全问题。本研究使用前期构建的LM重要的毒力因子内化素A (internalin A, InlA) 和InlB基因缺失菌株, 以人结肠癌细胞Caco-2和人肝癌上皮细胞HepG2为研究对象, 探究InlA和InlB缺失对LM侵袭宿主细胞和诱导细胞凋亡的影响。实验结果表明, InlA和InlB的缺失使LM侵袭宿主细胞的能力明显降低 ($P < 0.05$), 与野生株相比侵袭量下降超过50%, 同时也降低了其诱导宿主细胞凋亡的能力 ($P < 0.05$), 与野生株相比凋亡细胞的比例下降幅度达到30%~50%。本实验确定了InlA和InlB在LM侵袭宿主细胞和诱导细胞凋亡的过程中具有重要的作用, 有助于对LM的致病机理以及引起宿主相关免疫反应、诱导细胞凋亡相关分子机制的深入研究。

关键词: 单增李斯特菌; 毒力因子; 内化素蛋白; 细胞侵袭; 细胞凋亡

Effect of Deletion of Genes Encoding Virulence Factors InlA and InlB on the Ability of *Listeria monocytogenes* to Invade Host Cells and Induce Cell Apoptosis

LIU Wukang, CHEN Guowei, XIE Manman, GUO Liang, WANG Shujuan, DONG Qingli, LIU Qing*
(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: *Listeria monocytogenes* (LM) is a zoonotic food-borne pathogen with strong virulence. It has a high lethality due to the host barrier penetrability and intracellular parasitism. Hence, consumption of foods contaminated with LM causes food safety problems. In this study, LM strains with the deletion of the gene encoding the important virulence factors such as internalin A (InlA) and internalin B (InlB) and human colon Caco-2 and liver HepG2 cells were used to investigate the effect of *inlA* and *inlB* gene deletion on the ability of LM to invade host cells and induce cell apoptosis. The results showed that *inlA* and *inlB* deletion significantly reduced the ability of LM to invade host cells and induce cell apoptosis ($P < 0.05$) and resulted in a decrease of over 50% in invasion rate and a decrease of 30%–50% in the proportion of apoptotic cells compared with the wild-type strain. Therefore, *inlA* and *inlB* were confirmed to play an important role in host invasion and cell apoptosis induction by LM, which is helpful to intensively study the nosogenesis of LM and the molecular mechanisms by which LM causes host immunoreaction and induces cell apoptosis.

Key words: *Listeria monocytogenes*; virulence factors; internalins; host cell invasion; cell apoptosis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719009

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 19-0049-06

引文格式:

刘武康, 陈国薇, 谢曼曼, 等. 毒力因子InlA和InlB缺失影响单增李斯特菌侵袭宿主细胞和诱导凋亡的能力[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 49-54. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719009. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Wukang, CHEN Guowei, XIE Manman, et al. Effect of deletion of genes encoding virulence factors InlA and InlB on the ability of *Listeria monocytogenes* to invade host cells and induce cell apoptosis[J]. Food Science, 2017, 38(19): 49-54. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719009. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-07-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371776);

上海市科委“科技创新行动计划”长三角科技联合攻关领域项目 (15395810900)

作者简介: 刘武康 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食源性致病菌致病机理。E-mail: liu_wukang@126.com

*通信作者: 刘箐 (1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌致病机理及快速检测技术。E-mail: liuq@usst.edu.cn

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 又称单增李斯特菌, 是一种革兰氏阳性、人畜共患的食源性致病菌, 致病力较强, 感染者致死率可达20%~30%左右^[1]。LM抗逆性强, 可以在高盐、高温以及低温等多种不利环境中生存, 有较强的黏附能力, 易污染食品或食品加工器械而造成食品安全事故^[2]。LM可以穿透人体的肠道、胎盘以及血脑三大屏障, 常见症状为腹泻、呕吐, 严重感染甚至会引起婴幼儿脑膜炎、孕妇流产。LM感染宿主需要多个毒力基因共同作用, 其感染宿主大致可分为3个阶段, 即内化进入细胞、逃逸吞噬、胞质内移动和胞间传播^[4]。内化进入宿主细胞是LM感染宿主极为重要的过程, 成功进入宿主细胞将使其获得安全的环境, 体液免疫也将难以发挥作用, 通过药物治疗在胞内作用杀灭LM的难度也会增加^[3-4]。毒力因子内化素A (internalin A, InlA) 和InlB是最早被发现的介导LM入侵宿主细胞的内化素蛋白, 也是被广泛研究的毒力因子, 其主要作用机制是与宿主细胞上的特异性受体结合, 诱导非吞噬细胞将菌体内吞进入细胞内部寄生, 其中InlA的特异性受体是E-钙黏素 (epithelial cadherin, E-cad), 而InlB有3种受体, 分别是gC1qR、Met和GAGs, 许多研究表明InlA和InlB在穿透肠道屏障的过程中发挥重要作用, 但InlA和InlB在LM穿透胎盘和血脑屏障过程中的作用机制仍不明确^[5-7]。

近些年来, 食源性致病菌污染农产品、果蔬和畜产品引起的食品安全问题层出不穷^[8]。究其原因, 一方面是由于一线检测人员的专业知识不足、企业缺乏技术储备难以控制细菌污染问题, 另一方面长期以来抗生素的滥用, 导致强耐药性的菌株不断出现^[9-10]。因此, 应深入研究食源性致病菌寄生、增殖、传播以及感染宿主这些过程中的具体机理和相关分子机制, 并以此评估食源性致病菌的危害和风险, 制定有效的防治措施, 以及针对特异性的靶点开发抗菌药物, 避免大量使用广谱抗生素、防止强耐药性菌株出现。此外, 也有很多研究者致力于开发食源性致病菌疫苗, 希望从源头控制食源性致病菌的传播^[11]。由于LM可以激发强烈的细胞免疫, 所以经过减毒处理或毒力较弱的LM菌株不仅具有开发LM疫苗的条件, 还有作为高效递呈抗原的活载体的实用价值, 若用作口服疫苗载体LM还具有激活机体的黏膜免疫的功能^[12-13]。目前, 不仅有研究将其用作许多动物疫苗的载体, 如将减毒的LM菌株用作新城疫病毒 (new castle disease virus, NDV) 的载体用作鸡疫苗, 还有许多研究将LM用作如艾滋病、人类乳头瘤病毒甚至恶性肿瘤的疫苗载体, 较多的研究都以InlA、InlB或ActA等关键毒力因子为靶点进行减毒处理, 用来提高疫苗的安全性^[14-19]。

解决LM等食源性致病菌造成的食品安全问题或预防食源性疾病, 都必须对相关致病菌的致病机理和关键

毒力因子的作用机制进行深入研究。本研究使用LM的关键毒力因子InlA、InlB基因缺失的EGDe菌株, 以人结肠癌腺细胞Caco-2和人肝癌上皮细胞HepG2为对象, 初步探究InlA、InlB在LM侵袭宿主细胞、以及诱导宿主细胞凋亡过程中的作用, 以此作为后期深入研究相关毒力因子在LM的致病过程中具体作用机理和相关分子机制的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

单核细胞增生性李斯特菌的野生株EGDe、人结肠癌腺细胞Caco-2、人肝癌上皮细胞HepG2为上海理工大学系统生物医学研究中心保藏; *inlA*基因缺失的突变株 (EGDe Δ *inlA*)、*inlB*基因缺失的突变株 (EGDe Δ *inlB*)、*inlA*和*inlB*基因双缺失的突变株 (EGDe Δ *inlA/inlB*) 为上海理工大学系统生物医学研究中心前期自行构建并保藏。

脑心浸液 (brain heart infusion, BHI) 培养基 北京陆桥技术股份有限公司; 细胞培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、双抗 (青霉素、链霉素)、胰蛋白酶 美国Gibco公司; 细胞凋亡检测试剂盒 南京诺唯赞生物科技有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

生化培养箱 美国赛默飞世尔科技公司; FACSCalibur流式细胞仪及相关附件、分析软件 美国碧迪医疗器械有限公司; 酶标仪 美国分子仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞侵袭实验

将冻存的EGDe、EGDe Δ *inlA*、EGDe Δ *inlB*、EGDe Δ *inlA/inlB*菌液划线于BHI平板上, 挑取单菌落过夜培养至稳定期 (OD_{600nm}约为0.7左右), 取1 mL菌液转接至20 mL新鲜BHI液体培养基中于37 °C、200 r/min条件下培养至OD_{600nm}为0.3左右, Caco-2、HepG2细胞在实验前1 d计数并接入12孔细胞培养板并使其在含有体积分数10% FBS的DMEM培养基中贴壁生长^[20]。

侵袭实验时, 吸出培养液每孔加入2 mL不含FBS的DMEM培养基, 每孔加入适量菌液使感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为100:1 (细菌数量与细胞数量比) 左右^[21]; 将孔板置于37 °C、5% CO₂条件下培养适当时间 (Caco-2细胞侵袭时间为4 h, HepG2细胞侵袭时间为1.5 h) 后, 吸出上清液每孔加入500 μ L的700 μ g/mL庆大霉素于37 °C条件下作用0.5 h杀灭胞外细菌; 吸出上清液, 加入适量生理盐水清洗3次, 加入体积分数1%

Triton X-100, 于室温条件下放置0.5 h破碎细胞释放胞内细菌, 收集细胞裂解液进行适当倍数的稀释并涂布于BHI平板, 37 °C条件下静置培养过夜后统计菌落数^[22]。每次实验设置3个平行组, 实验重复3次。

1.3.2 细胞凋亡检测

细胞侵袭过程同1.3.1节所述, 在用700 μg/mL庆大霉素杀灭胞外细菌后, 用胰蛋白酶将贴附于孔板底部的细胞消化, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书所述的操作步骤对细胞进行收集、洗涤和染色, 染色完成后使用流式细胞仪检测并记录实验结果。

细胞凋亡检测试剂盒检测原理为: 细胞在凋亡早期时, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 由脂膜内侧翻向外侧, 使用与PS具有高度亲和力的绿色荧光标记的膜联蛋白 (Annexin V) 通过细胞外膜暴露的PS与凋亡早期细胞的细胞膜结合, 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 是一种核酸染料, PI能够透过凋亡中晚期或坏死细胞的细胞膜而使其具有红色荧光, 因此将Annexin V与PI匹配使用, 就可以区分凋亡细胞并将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。该方法是目前被广泛使用的细胞凋亡检测方法^[23-24]。

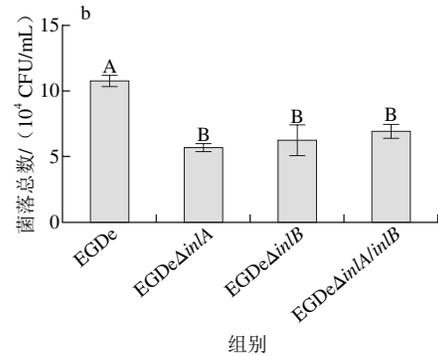
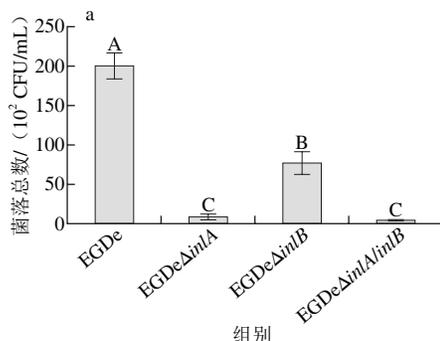
试剂盒使用时, 将细胞收集后用磷酸盐缓冲液洗涤2~3次, 用结合缓冲液重悬细胞并按说明书所述的方式加入适量荧光染液, 避光染色约10 min后即可上机检测。细胞凋亡检测时, 以未被细菌侵袭、正常生长的细胞为对照组, 同时根据试剂盒说明书要求设置未染色的阴性组用于调试仪器的相关参数并设置检测象限。每次实验设置3个平行组, 实验重复3次。

1.4 数据统计分析

本实验中流式细胞仪检测数据使用仪器配套软件统计分析并绘图, 实验结果的相关图片使用Adobe Photoshop CS6软件处理, 实验数据使用GraphPad Prism 5软件处理, 对数据进行方差分析并绘制图表。

2 结果与分析

2.1 细胞侵袭结果



大写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图4同。

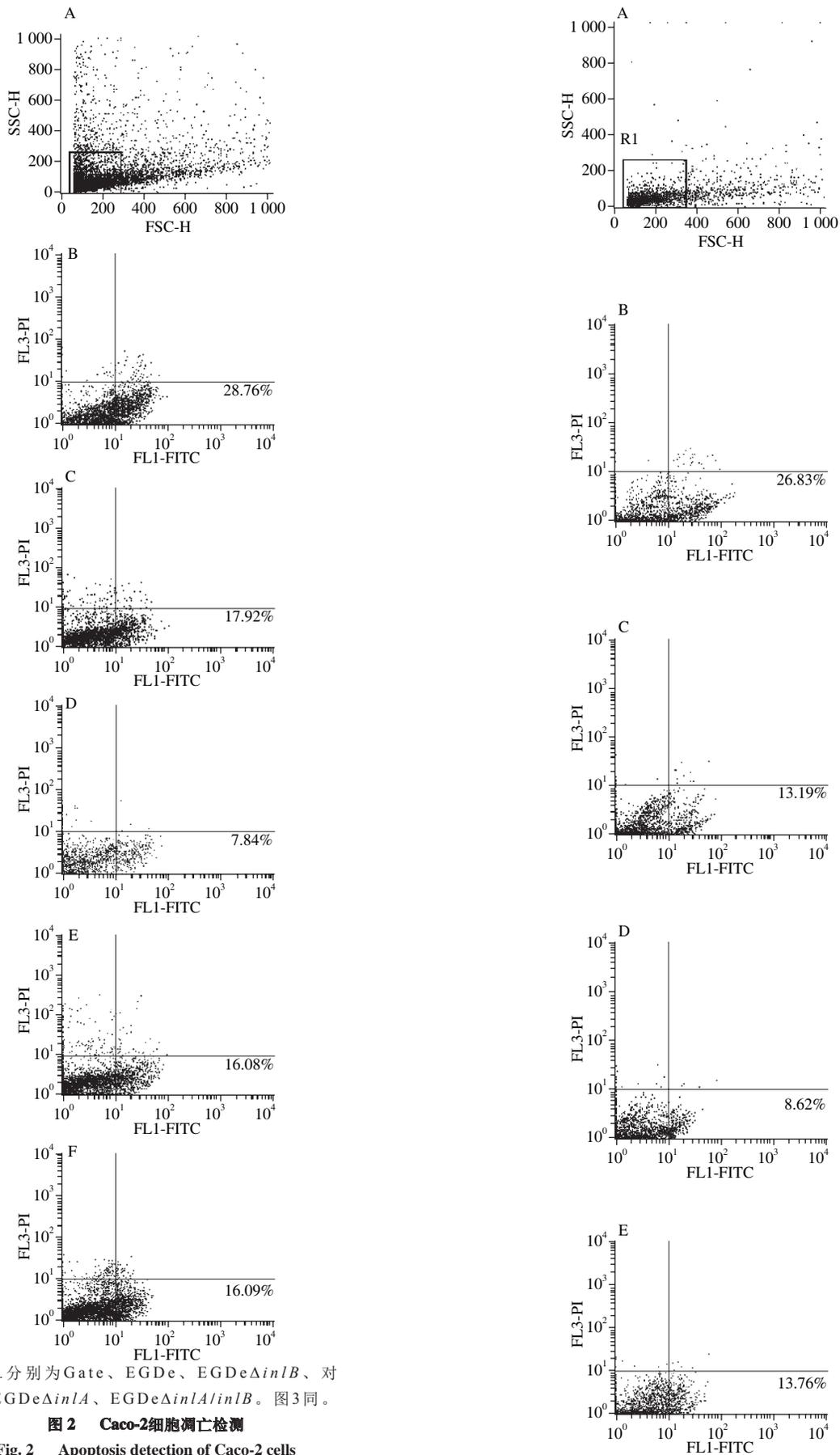
图1 菌株对Caco-2细胞 (a) 和HepG2细胞 (b) 的侵袭能力
Fig. 1 Invasion capacity of the gene deletion strains to human Caco-2 (a) and HepG2 (b) cells

实验结果见图1, 以细胞裂解液中的菌落数评估细菌侵袭细胞的能力。对实验数据的分析结果表明EGDeΔinlA、EGDeΔinlB、EGDeΔinlA/inlB 3株突变株侵袭Caco-2细胞的能力与野生株EGDe相比有显著的下降 ($P < 0.05$), EGDeΔinlB的侵袭量降至EGDe的30%左右 (约 7×10^3 CFU/mL), 同时EGDeΔinlA、EGDeΔinlA/inlB侵袭能力也弱于EGDeΔinlB ($P < 0.05$), 侵袭量仅有EGDe的5%和2.5%左右 (约 1×10^3 、 5×10^2 CFU/mL); EGDeΔinlA、EGDeΔinlB、EGDeΔinlA/inlB 3株突变株侵袭HepG2细胞的能力与LM野生株相比有显著的下降 ($P < 0.05$), 侵袭量约为EGDe的50%左右 (约 6×10^4 CFU/mL), 但3个突变株之间侵袭能力没有显著差异 ($P > 0.05$)。

由实验结果可知, Caco-2细胞抵御侵袭的能力强于HepG2细胞, 其处于侵袭状态下4 h最大侵袭量只能达到 2.0×10^4 CFU/mL左右, 突变株EGDeΔinlA和EGDeΔinlA/inlB的侵袭量只有 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ CFU/mL左右; EGDe对HepG2细胞侵袭1.5 h, 最大侵袭量就可以达到 1×10^5 CFU/mL左右, 即使是毒力因子InlA和InlB缺失的突变株, 侵袭量也在 5×10^4 CFU/mL左右。

2.2 细胞凋亡检测结果

细胞侵袭后使用流式细胞仪检测Caco-2细胞凋亡的结果见图2。门 (Gate) 表示选择的检测区域用于去除皱缩、粘黏的细胞和非细胞的颗粒物; 对照为未被侵袭的对照组细胞检测结果, 被检测细胞主要集中在左下象限, 少量细胞位于右下象限即处于凋亡早期的细胞, 处于左上、右上象限的细胞极少即没有明显的晚期凋亡和细胞坏死现象, 对照组的平均凋亡比例约为7.84%; 被EGDe侵袭的细胞处于右下象限的数量增多即出现明显的早期凋亡, 处于晚期凋亡和坏死阶段的细胞很少, 该组细胞的平均凋亡比例约为28.76%; 被EGDeΔinlA、EGDeΔinlB、EGDeΔinlA/inlB侵袭的细胞平均凋亡比例分别为16.08%、17.92%和16.09%, 同样基本处于早期凋亡阶段, 被突变株侵袭的细胞的凋亡比例低于被EGDe侵袭的细胞, 但高于对照组细胞。



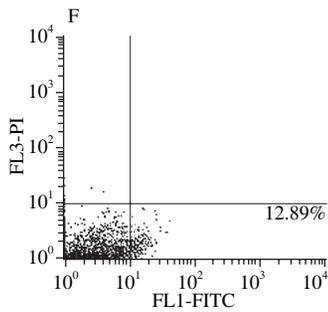


图3 HepG2细胞凋亡检测

Fig. 3 Apoptosis detection of HepG2 cells

HepG2细胞凋亡的检测结果见图3，其中门表示的意义同图2；对照为未被侵袭的对照组细胞检测结果，对照组的平均凋亡比例约为8.62%；被EGDe侵袭的细胞处于右下象限的数量明显增多即出现早期凋亡，而处于晚期凋亡和坏死阶段的细胞则较少，平均凋亡比例约为26.83%；被EGDe Δ inlA、EGDe Δ inlB、EGDe Δ inlA/inlB侵袭的细胞平均凋亡比例分别为13.76%、13.19%和12.89%，凋亡比例均低于被EGDe侵袭的细胞，但高于对照组细胞。

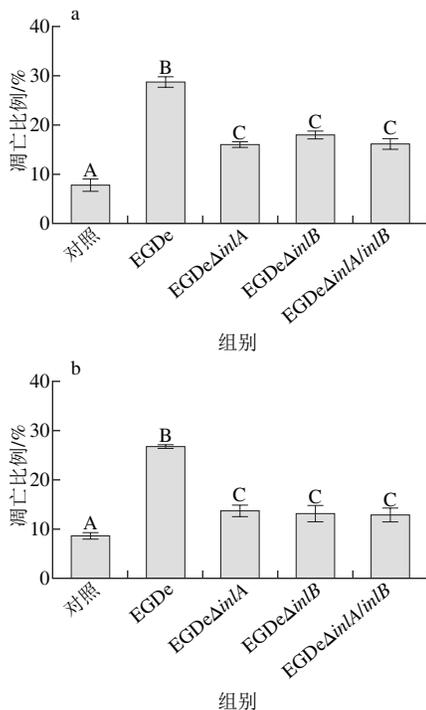


图4 Caco-2细胞 (a) 和HepG2细胞 (b) 凋亡比例

Fig. 4 Apoptosis percentages of Caco-2 (a) and HepG2 (b) cells

将3次重复实验的数据统计并进行方差分析。如图4所示，被EGDe侵袭的Caco-2、HepG2细胞的凋亡比例高于对照组，均超过25%，具有显著差异 ($P < 0.05$)；而与EGDe侵袭的细胞相比，被突变株EGDe Δ inlA、EGDe Δ inlB、EGDe Δ inlA/inlB侵袭的细胞凋亡比例有显著的下降 ($P < 0.05$)，下降幅度约30%~50%。

3 讨论

本实验使用LM重要毒力因子InlA和InlB缺失的突变菌株，侵袭Caco-2和HepG2细胞，探究InlA和InlB的缺失对LM侵袭宿主细胞和诱导细胞凋亡能力的影响，实验结果表明毒力因子InlA和InlB在LM侵袭宿主细胞及诱导凋亡的过程中起到了重要的作用。InlA和InlB的缺失使LM侵袭宿主细胞能力显著下降 ($P < 0.05$)，其中InlA在介导侵袭Caco-2细胞的过程中的作用大于InlB，而对于介导侵袭HepG2细胞，InlA和InlB的作用基本相同。出现上述实验结果的原因可能是：Caco-2是人结肠腺癌细胞，是研究肠道细胞功能的模式细胞，根据文献报道，LM在侵袭肠道细胞的过程中InlA发挥的作用大于InlB，并且InlA介导的内化是LM感染肠道细胞、穿透肠道屏障的重要途径，这应该是造成EGDe Δ inlA和EGDe Δ inlA/inlB对Caco-2细胞的侵袭量明显低于EGDe Δ inlB的主要原因^[25]；虽然也有文献指出InlB在介导LM侵袭肝脏细胞的过程中发挥重要作用，但实验结果却显示InlB在介导侵袭HepG2细胞的过程中的作用并不大于InlA，这可能是由于肝细胞是高度分化的非免疫细胞，并且不同于肠道起到的宿主屏障的作用，其本身具有的抵御细菌侵袭的机制就少于肠道细胞，而LM在侵袭肝细胞时却可以发挥多种毒力因子的协同作用，因此单个毒力因子的作用就不再是至关重要的^[26]。

InlA和InlB缺失也降低了LM诱导宿主细胞凋亡的能力，虽然突变株EGDe Δ inlA、EGDe Δ inlB、EGDe Δ inlA/inlB诱导细胞产生凋亡的比例大于对照组细胞，但相比于野生株EGDe，出现凋亡的细胞比例下降了约30%~50%。实验结果表明LM具有诱导宿主细胞凋亡的能力，而毒力因子InlA和InlB在LM诱导宿主细胞凋亡的过程中发挥重要作用，缺失该毒力因子的突变株诱导凋亡的能力明显下降。InlA和InlB在LM诱导宿主细胞凋亡的过程中发挥作用的机制可能有两种：InlA和InlB是一种细菌表面蛋白，介导LM内化进入宿主细胞的途径是与细胞表面的特异性受体结合，诱导非吞噬细胞将菌体内化使其进入细胞内部，在这一过程中当其受体结合介导内化时很可能造成细胞膜结构的损伤，导致PS由内侧外翻出现凋亡信号^[27]；另一种可能是LM诱导宿主细胞凋亡的毒力因子需要在细胞内部发挥作用，而InlA和InlB是重要的介导LM内化的毒力因子，缺少了InlA和InlB使其难以进入宿主细胞内部，其诱导宿主细胞凋亡的能力也会因此受到影响^[28-29]。同时，实验结果也表明，本实验中进行的细菌侵袭处理主要是造成细胞的早期凋亡，并未出现明显的中晚期凋亡或细胞坏死的情况，这可能是由于实验中对细胞的侵袭处理时间相对较短，只引起了细胞膜结构的变化，PS由脂膜内侧翻向外侧产生早期凋亡检测信号，但并未引起细胞膜通透性发生显著变化或者细胞膜结构

的严重破坏,因此PI不能透过细胞膜使细胞具有中晚期凋亡或坏死的检测信号。根据相关文献的报道,食源性致病菌引起的宿主细胞凋亡途径主要有激活死亡受体诱导细胞凋亡、线粒体途径诱导凋亡以及通过内质网途径诱导细胞凋亡,因此后续的研究将关注LM在诱导宿主细胞凋亡时的作用途径,解析LM诱导宿主细胞凋亡的具体作用机制^[30-31]。

此外,本实验只使用了Caco-2和HepG2两种细胞系作为研究对象,实验结果有一定的局限性,由于LM可以穿透3种宿主屏障并且可以引起人和多种动物的疾病,所以还应选择更多的模式细胞或模式动物进行研究,更加全面地解析InIA和InIB的作用机制。食源性致病菌的致病机理的研究目前还处于初期阶段,但是无论是控制食源性致病菌的污染,还是研制有效的抗菌物质或疫苗从源头预防食源性疾病,都需要深入研究食源性致病菌重要的毒力因子作用通路和分子机制。关于LM或者其他重要的食源性致病菌的具体毒力因子的作用、诱导宿主细胞凋亡以及引起宿主免疫反应的具体机理的研究还相对较少,随着分子生物学相关技术的不断发展,新兴的基因编辑技术、高通量的基因检测技术等方法将有助于研究食源性致病的致病机理,同时转基因实验动物的出现也使研究者可以选择更合适的模式动物,这些都有助于解决食源性致病菌引起的食源性疾病和食品安全问题。

参考文献:

- [1] KANKI M, NARUSE H, TAGUCHI M, et al. Characterization of specific alleles in InIA and PrfA of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 211: 18-22. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.023.
- [2] TRAVIER L, GUADAGNINI S, GOUIN E, et al. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(1): 430-445. DOI:10.1371/journal.ppat.1003131.
- [3] PILCHOVÁ T, HERNOULD M, PRÉVOST H, et al. Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2014, 35(1): 366-372. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.07.021.
- [4] RENIERE M L, WHITELEY A T, HAMILTON K L, et al. Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen[J]. Nature, 2015, 517: 170-173. DOI:10.1038/nature14029.
- [5] BIERNE H, SABET C, PERSONNIC N, et al. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*[J]. Microbes and Infection, 2007, 9(10): 1156-1166. DOI:10.1016/j.micinf.2007.05.003.
- [6] BONAZZI M, ESTEBAN V, PIZARRO-CERDÁ J, et al. Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InIA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*[J]. Cellular Microbiology, 2008, 10(11): 2208-2222. DOI:10.1111/j.1462-5822.2008.01200.x.
- [7] COSSART P, TOLEDO-ARANA A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview[J]. Microbes & Infection, 2008, 10(9): 1041-1050. DOI:10.1016/j.micinf.2008.07.043.
- [8] 赵静, 孙海娟, 冯叙桥. 食品中食源性致病菌污染状况及其监测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(5): 1353-1360.
- [9] 秦思, 沈赞, 马恺, 等. 2012年江苏省食源性致病菌耐药监测分析[J]. 江苏预防医学, 2014, 25(1): 28-30. DOI:10.3969/j.issn.1006-9070.2014.01.010.
- [10] 马婷, 李芳, 单大亚. 基于物联网技术的食品冷链物流跟踪及追溯问题研究[J]. 上海理工大学学报, 2013, 35(6): 557-562. DOI:10.3969/j.issn.1007-6735.2013.06.009.
- [11] 曾海娟, 宋春美, 吴淑燕, 等. 食源性致病菌疫苗研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(11): 1553-1556. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2015.11.025.
- [12] 丁承超, 陈国薇, 吴嫒, 等. 减毒单增李斯特菌疫苗递呈研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(6): 892-895. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2016.06.028.
- [13] 丁承超, 吴淑燕, 邱实, 等. 口服疫苗研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(17): 1512-1516. DOI:10.11669/cpj.2015.17.012.
- [14] 江玲丽. 单核细胞增生性李斯特菌的主要毒力基因分析及其重组菌构建与免疫原性[D]. 杭州: 浙江大学, 2006: 112-127.
- [15] MILLER E A, SPADACCIA M R, 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 Research & Human Retroviruses, 2015, 31(1): 127-136. DOI:10.1089/AID.2014.0138.
- [16] CORY L, CHU C. ADXS-HPV: a therapeutic *Listeria* vaccination targeting cervical cancers expressing the HPV E7 antigen[J]. Human Vaccines & Therapeutics, 2014, 10(11): 3190-3195. DOI:10.4161/hv.34378.
- [17] 张超, 陈国薇, 杨玉萍, 等. 食源性致病菌诱导细胞凋亡机理研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 234-238. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201405046.
- [18] 尹晓蛟, 白琳, 杨旭. 重组减毒单核细胞增生李斯特菌在肿瘤免疫治疗中的应用进展[J]. 农业灾害研究, 2016, 6(2): 17-20; 23.
- [19] 段斐斐. 表达密码子优化的HPV16 E7的重组李斯特菌的构建及其抗肿瘤特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014: 23-42.
- [20] 陈国薇, 吴嫒, 张超, 等. 活性氧影响单核细胞增生李斯特菌对7721肝癌上皮细胞的侵袭[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 117-122. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201521023.
- [21] VAN DER VEEN S, ABEE T. Contribution of *Listeria monocytogenes* RecA to acid and bile survival and invasion of human intestinal Caco-2 cells[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2011, 301(4): 334-340. DOI:10.1016/j.ijmm.2010.11.006.
- [22] WILBER Q T, DINESH C, ARTHEE J, et al. Nontoxic radioactive *Listeria* (at) is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(21): 8668-8673. DOI:10.1073/pnas.1211287110.
- [23] HIGGS B W, DILEO J, CHANG W E, et al. Modeling the effects of a Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) on the apoptosis pathway[J]. BMC Microbiology, 2005, 6(1): 1-12. DOI:10.1186/1471-2180-6-48.
- [24] WANG J H, ZHOU Y J, HE P. *Staphylococcus aureus* induces apoptosis of human monocytic U937 cells via NF-kappaB signaling pathways[J]. Microbial Pathogenesis, 2010, 49(5): 252-259. DOI:10.1016/j.micpath.2010.06.007.
- [25] VEIGA E, COSSART P. *Listeria* InIB takes a different route to met[J]. Cell, 2007, 130(2): 218-219. DOI:10.1016/j.cell.2007.07.005.
- [26] THOMAS W, HEINZ D W, WOLF-DIETER S. Thermodynamically reengineering the listerial invasion complex InIA/E-cadherin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(35): 13960-13965. DOI:10.1073/pnas.0702199104.
- [27] 冯莹颖, 张强, 黄兰红, 等. InIA和InIB介导单核细胞增生李斯特菌入侵宿主细胞分子机制的研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(12): 1894-1900. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2009.12.027.
- [28] TAMBURRO M, SAMMARCO M L, AMMENDOLIA M G, et al. Evaluation of transcription levels of *inIA*, *inIB*, *shly*, *bsh* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* strains using quantitative reverse-transcription PCR and ability of invasion into human CaCo-2 cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(6): 1-7. DOI:10.1093/femsle/fnv018.
- [29] LI S, LI Y X, CHEN G W, et al. Restraining reactive oxygen species in *Listeria monocytogenes* promotes the apoptosis of glial cells[J]. Redox Report Communications in Free Radical Research, 2016, 22(4): 190-196. DOI:10.1080/13510002.2016.1173327.
- [30] LAWEN A. Apoptosis: an introduction[J]. BioEssays, 2003, 25(9): 888-896. DOI:10.1002/bies.10329.
- [31] KOZJAK-PAVLOVIC V, ROSS K, RUDEL T. Import of bacterial pathogenicity factors into mitochondria[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(1): 9-14. DOI:10.1016/j.mib.2007.12.004.