单增李斯特菌感染 RAW264.7 细胞转录组差异表达分析

马红梅[1,2]，马臣杰[1,2]，岳 苑[1,2,3]，马玲玲[1,2]，马嘉琦[1,2]，曾 瑾[*1,2]

（1. 宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室，宁夏 银川 750021；2. 宁夏大学 生命科学学院，宁夏 银川 750021；3. 宁夏回族自治区食品检测研究院，宁夏 银川 750002）

摘要：为研究单核细胞增生李斯特菌（*Listeria monocytogenes*，LM）感染前后 RAW264.7 细胞基因表达谱变化，筛选关键功能基因和通路，探究其致病机制。作者以感染复数（MOI）10 的 LM 感染 RAW264.7 细胞 6 h，提取细胞 RNA 进行转录组测序，选取感染组与对照组相比差异倍数≥1.5 且 $P<0.05$ 的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析，并通过 RT-qPCR 验证部分差异基因。转录组结果显示，RAW264.7 细胞在感染 LM 前后有 1 782 个基因差异表达，其中上调为 989，下调为 793。GO 分析结果主要涉及免疫系统过程、免疫反应、细胞程序性死亡调控等。KEGG 分析结果显示，显著富集的通路有细胞因子-受体相互作用、肿瘤坏死因子信号通路、IL-17 信号通路等。RT-qPCR 验证试验结果显示，随机选择的 11 个显著差异基因表达倍数趋势与测序结果一致。该研究为进一步深入研究 LM 的致病机制奠定了基础。

关键词：单核细胞增生李斯特菌；RAW264.7 细胞；转录组；差异表达基因

中图分类号：Q 93　**文章编号：**1673-1689(2023)06-0038-11　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.006

Comparative Analysis of Transcriptome Differential Expression in RAW264.7 Cells Infected by *Listeria monocytogenes*

MA Hongmei[1,2]，*MA Chenjie*[1,2]，*YUE Yuan*[1,2,3]，*MA Lingling*[1,2]，*MA Jiaqi*[1,2]，*ZENG Jin*[*1,2]

（1. Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western, Ningxia University, Yinchuan 750021, China；2. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China；3. Ningxia Hui Autonomous Region Food Testing and Research Institute, Yinchuan 750002, China）

Abstract: The alterations of gene expression profile of RAW 264.7 cells before and after infection by *Listeria monocytogenes* (LM) were explored, and the key functional genes and pathways were screened to lay a foundation for investigating the pathogenic mechanism. The RAW264.7 cells were treated with LM at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 6 h, and RNA was extracted for transcriptome sequencing. Differentially expressed genes (DEGs) in the infection group compared to

收稿日期：2021-07-20

基金项目：国家自然科学基金项目（31660719）；宁夏自然科学基金项目（2020AAC03073，2021AAC03049）；宁夏回族自治区重点研发计划项目（东西部合作）（2017BN04）。

***通信作者：**曾 瑾（1973—），女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事病原微生物学方面的研究。E-mail：zengjin@nxu.edu.cn

the control group with a 1.5 fold change and a $P<0.05$ were screened and analyzed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. Some DEGs were validated by RT-qPCR. The transcriptome results showed that the expression of 1 782 genes in RAW264.7 cells changed significantly before and after infection with LM, including 989 up-regulated and 793 down-regulated genes. GO enrichment analysis mainly involved the immune system process, immune response, and regulation of programmed cell death and so on. KEGG analysis showed that the significantly enriched pathways included cytokine-receptor interaction, tumor necrosis factor, and IL-17 signaling pathway and so on. The RT-PCR verification experimental results showed that the trend of fold change of expression in the randomly selected 11 significantly DESs was consistent with the sequencing results. This study lays a foundation for further in-depth exploration of the pathogenic mechanism of LM.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, RAW264.7 cells, transcriptome, differentially expressed genes

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*,LM),简称单增李斯特菌,是一种常见的革兰氏阳性胞内寄生菌。该菌为短杆菌,大小约为 0.5 μm×(1.0~2.0) μm,兼性厌氧、嗜冷、不含芽孢,不形成荚膜,广泛存在于周围环境中[1-3]。LM 是一种人畜共患致病菌,主要由污染的食物传播,是世界卫生组织列举的四大食源性病原菌之一[4-7]。据国家卫健委报道,LM 导致的食源性疾病病例数在全国食源性病例数中占很大比例。LM 是李斯特菌众多类型中唯一能引起人类李斯特菌病(Listeriosis)的主要病原体[8],尤其容易感染孕妇、新生儿等免疫力低下的人群[9-11]。即使是低水平的食物污染(约 10^2~10^4 个细菌)也有可能导致局灶性感染、细菌性败血症和脑膜炎以及胎儿感染,导致流产或妊娠并发症[12-13],甚至引起危及生命的疾病[14-15]。据美国疾病预防控制中心报道,美国每年患有李斯特菌病的人数多达 2 000 人,死亡率高达 30%,其致死率甚至高过其他流行性致病菌,如沙门氏菌及肉毒杆菌[16]。据报道,恶性肿瘤或器官移植患者更易患侵袭性李斯特菌病,人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性患者侵袭性李斯特菌病的发病率是普通人群的 500~1 000 倍[17]。目前,由于其约 20%~70%的高病死率[18-19]以及高度的耐药性,李斯特菌病仍是许多国家关注的重大公共卫生问题和面临的主要挑战[20-24]。

目前关于 LM 的研究主要表现在 LM 的检测以及应用研究上,但关于 LM 对机体的致病机制研究尚不明确[25-26]。因此作者对 LM(ATCC 19115)感染前后的受体细胞 RAW264.7 进行了转录组测序分析[27],期望从 LM 感染前后的受体细胞中找到差异表达的基因和代表性的差异表达通路,从而为进一步研究 LM 的致病机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

小鼠单核巨噬白血病细胞(RAW264.7)和单核细胞增生李斯特菌(ATCC 19115):均为作者所在实验室保存。

1.2 单核细胞增生李斯特菌的培养

将保有 LM 的磁珠在脑心浸液(Brain Heart infusion,BHI)固体培养基上划线,37 ℃恒温培养 16~18 h 后挑单菌接至 10 mL BHI 液体培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 达 0.6~0.8。吸取细菌培养液至无菌的 1.5 mL 离心管,12 000 r/min 离心 30 s 收集细菌,无菌 PBS 洗涤 3 次,用 1 mL DMEM 完全培养基重悬混匀后,测定 OD_{600},根据需要调整菌液的浓度。

1.3 RAW264.7 细胞培养及感染

RAW264.7 细胞培养在由基础培养基和 10 % 新生小牛血清(Newborn Calf Serum,NBCS)组成的 DMEM 完全培养基中,取对数期 RAW264.7 细胞铺于 6 孔细胞培养板,每孔细胞数量为 1×10^6 个,在 37 ℃和体积分数为 5%的 CO_2 条件下过夜培养,细胞密度达到约 80%时进行处理。本实验主要分为 2 组,每组进行 3 次重复,LM 感染组(MOI=10)命名为 NL1、NL2 和 NL3,感染时间为 6 h;另外一组未处理的细胞作为对照组,命名为 NC1、NC2 和 NC3。

1.4 总 RNA 提取

使用 Trizol 试剂(TIANGEN)提取细胞总 RNA，Nanodrop8000 测定 RNA 浓度。OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.2 为合格样本。

1.5 文库构建及测序

RNA-seq 试验过程涉及样本检测、富集 mRNA、合成 cDNA 第一条链和第二条链、末端修复、加 A 尾和接头、筛选 cDNA、PCR 扩增、纯化 PCR 产物、建库。文库质检合格后测序，流程见图 1。

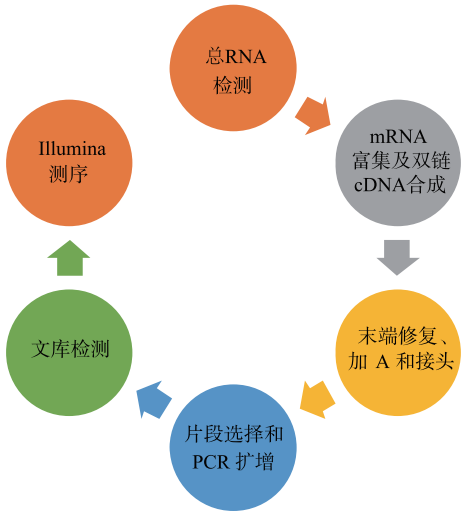


图 1 建库测序流程图

Fig. 1 Flow chart of library construction and sequencing

1.6 数据质控

测序原始数据经过一系列过滤、筛选以及错误率检查、GC 含量分布检查，最后获得 clean reads[28]。后续所有分析均为对 clean reads 数据进行分析所得[29]。

1.7 差异基因筛选

使用 DESeq2(Anders et al,2014)软件进行差异表达分析，分析方法基于负二项分布。以 P<0.05 以及$|\log_2 F|\geqslant 1.5$(其中 F 为 fold change)为标准筛选差异表达基因(differentially expressed genes，DEGs)[30]。

1.8 差异基因富集分析

对筛选后符合标准的 DEGs 进行 GO(Gene Ontology，GO) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG)富集分析[31]。利用 GO 对注释到的基因功能进行分析，利用 KEGG 根据参与的通路或功能对 DEGs 进行分类和统计。富集分析标准为 P<0.05。

1.9 RT-qPCR 验证

作者选取了 11 个 DEGs 对分析结果进行 RT-qPCR 验证。对各基因扩增结果计算相对表达量，并与 RNA-Seq 结果进行比较。

1.10 统计学分析

对计算结果进行统计学分析，作图软件为 GraphPad Prism 8，数据结果表示为 Mean±SD。(P<0.05 表示差异显著，P<0.01 表示差异极显著)。

2 结果与分析

2.1 数据质控分析

对 LM 感染组和对照组获得的 clean reads 进行汇总，见表 1。$Q$20 大于 95%，$Q$30 大于 90%，表明经 LM 感染后的 RAW264.7 细胞所提取的 RNA 质量良好，转录组测序结果可信。

表 1 样本测序数据质量汇总

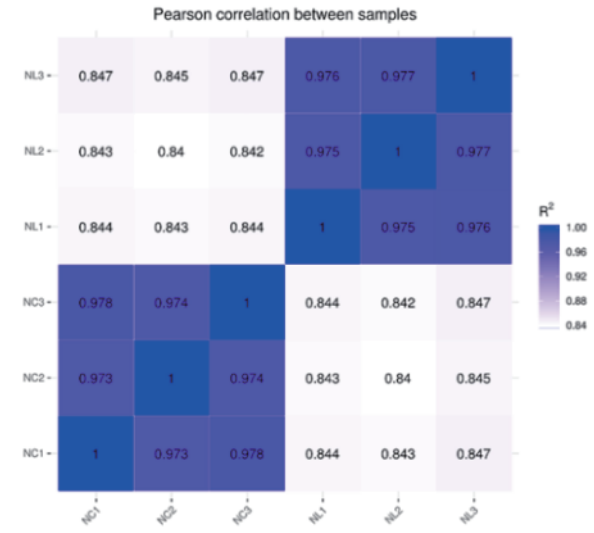
Table 1 Summary of sample sequencing data quality

样品	原始数据/组	有效数据/组	有效碱基数/G	错误率/%	$Q$20/%	$Q$30/%	GC 比例/%
对照组 1	44 854 838	42 983 174	6.45	3	97.54	93.1	50.41
对照组 2	46 137 472	44 820 176	6.72	2	98.22	94.68	50.47
对照组 3	45 967 140	44 164 130	6.62	3	97.31	92.53	50.52
感染组 1	45 882 976	43 597 732	6.54	3	97.16	92.28	49.99
感染组 2	47 629 240	45 341 064	6.8	3	97.44	92.86	49.86
感染组 3	52 366 302	50 112 388	7.52	3	97.44	92.86	49.83

注：$Q$20/30 为 Phred 数值大于 20/30 的碱基占总碱基的百分比；GC 比例为 G 与 C 占总碱基的百分比。

2.2 样本间相关性分析

相关性分析可用于检验实验可靠性和样本合理性，相关系数值越接近 1 代表样本的相似度越高。生物学重复样品间 R^2 一般要求大于 0.8。由图 2 可知，本研究中的 3 次独立重复实验所收获的细胞 RNA 样品经转录组测序后，样本间相关性系数均大于 0.8，证明 3 次重复实验的样本间差异不显著，因此后续的转录组测序结果差异分析可靠。



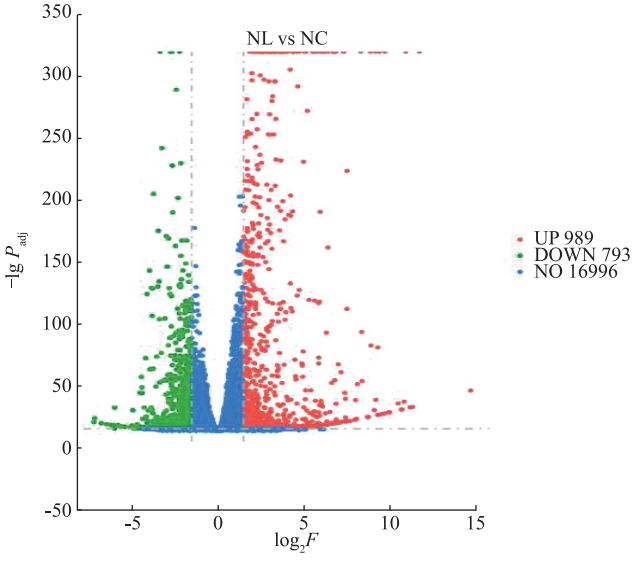
图中横纵坐标均表示样本间相关系数的平方(R^2)

图 2　样本间相关性分析热图

Fig. 2　Heat map of correlation between samples

2.3　差异基因筛选

edgeR 软件筛选出 P<0.05 以及$|\log_2 F|\geq 1.5$ 的 DEGs(其中 F 为基因表达倍数变化)。图 3 显示,LM 感染 RAW264.7 细胞后,DEGs 为 1 782 个,其中上调的 DEGs 为 989,下调的 DEGs 为 793,筛选结果见火山图。另外将 DEGs 取并集后进行分析[28],表达相似基因均可聚类在一起,见图 4。



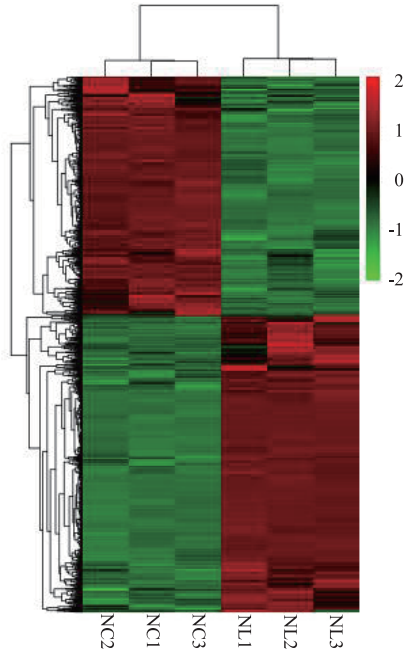
$\log_2 F$ 为基因表达倍数变化;$-\lg P_{adj}$ 为基因表达差异水平;上调为红色,下调为绿色[28]。

图 3　差异基因火山图

Fig. 3　Differential gene volcano map

2.4　差异基因 GO 功能富集分析

对聚类后的 DEGs 进行 GO 功能富集分析,共得到 617 条 GO 注释,其中 51.05%(315 条)涉及生物学过程(BP),36.79%(227 条)涉及分子功能(MF),12.16%(75 条)涉及细胞组分(CC)。图 5 为前 30 条注释结果,BP 中 DEGs 显著集中在免疫系统过程(immune system process)、免疫反应(immune response)、G 蛋白偶联受体信号通路(G-protein coupled receptor signaling pathway)、细胞内信号转导(intracellular signal transduction)、细胞程序性死亡的调控(regulation of programmed cell death)等;CC 中 DEGs 显著集中在胞外区(extracellular region)中;MF 中 DEGs 显著集中在细胞因子活性(cytokine activity)、细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、信号受体结合(signaling receptor binding)、分子功能调节(molecular function regulator)、受体调节活性(receptor regulator activity)和受体配体活性(receptor ligand activity)等。在所有注释中,细胞因子活性最显著。



样品名和差异基因 FPKM 归一化后的数值,红色代表高表达量,绿色为低表达量,越红越高,越绿越低。

图 4　差异表达基因聚类热图

Fig. 4　Clustering heat map of differentially expressed genes

2.5　差异基因 KEGG 富集分析

对 DEGs 进行 KEGG 分析,DEGs 富集到了 304 条信号通路中,显著性变化的有 44 条(P<0.05)。图

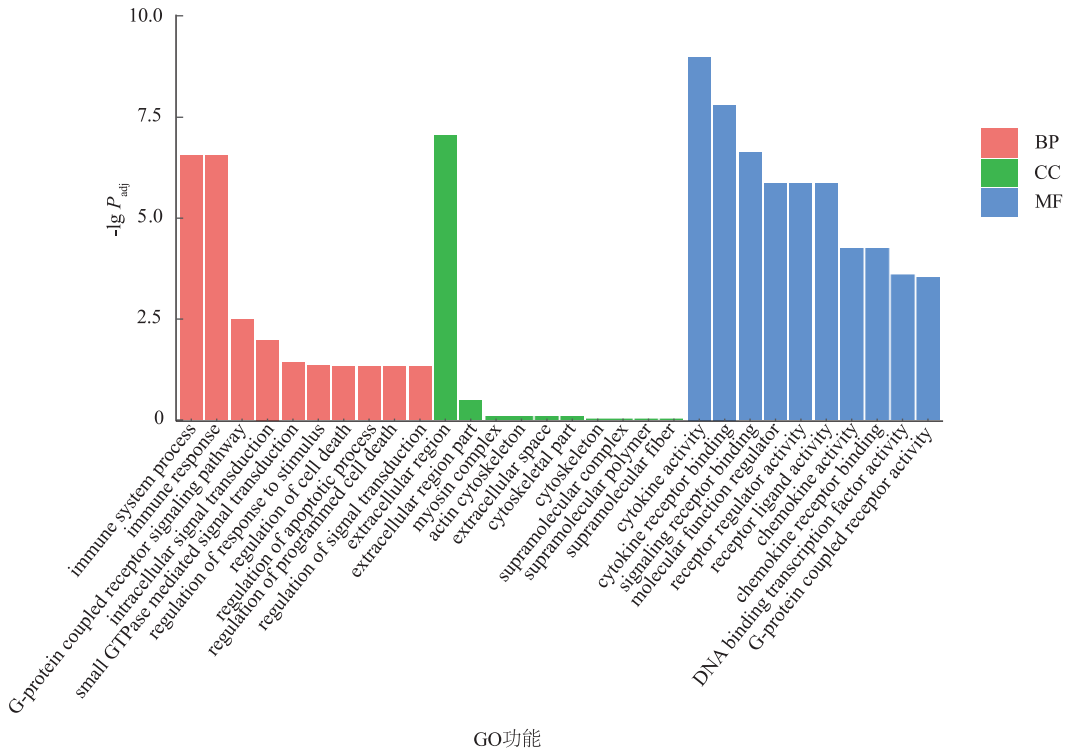


图 5　GO 富集分析柱状图

Fig. 5　Histogram of GO enrichment analysis

6 为富集的前 19 条 KEGG 通路[28],DEGs 在肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、甲型流感(Influenza A)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、NF-κB 信号通路 (NF-kappa B signaling pathway)等信号通路显著富集。对显著富集的前几条信号通路的差异基因进行统计，结果见表 2。KEGG 通路分析表明，上调的基因主要集中在促炎细胞因子、趋化因子等免疫调控方面的基因,例如白介素 IL-6、IL-1β、TNF、NLRP3、CC 基序趋化因子 CCL2 和 CCL22 等。

表 2　显著富集信号通路及其差异表达基因

Table 2　Significantly enriched signaling pathways and their differentially expressed genes

KEGG ID	基因功能描述	基因数/个	基因名称
mmu04060	细胞因子-细胞因子受体相互作用	57	*Ccl3/Tnf/Cxcl2/Cxcl10/ Tnfsf9/Osm/Cx3cr1/Cd40/Tnfrsf9/Ccl2/Il16/ Il27/Il1a/Il6/ Il1b/Il10/Tgfb3*…
mmu04668	肿瘤坏死因子信号通路	37	*Tnf/Cxcl2/Atf4/Tnfaip3/Tab1/Il6/Ifnb1/Il1b/Casp7/Casp3/Akt3/Ripk3/Mapk8/Tnfrsf1a/Bcl3*…
mmu05164	甲型流感	42	*Tnf/Rsad2/Cxcl10/Ifih1/Nfkb1/Ccl5/Nlrp3/Ddx58/Trim25/Nfkbib/Pik3r2/Irf7//Oas3/Irf9/Ccl2/Il6/Il1b* …
mmu04657	白介素-17 信号通路	25	*Tnf/Cxcl2/Cxcl10/Ptgs2/Nfkb1/Tnfaip3/Jun/Fosl1/Fos/Nfkbia/Ikbke/Jund/Mapk14/Fosb/Ccl2/Csf3/Il6/Il1b*…
mmu04064	核因子-κB 信号通路	27	*Tnf/Cxcl2/Plau/Cd14/Ccl4/Ptgs2/Nfkb1/Cflar/Tnfaip3/Traf1/Nfkbia/Lyn/Cd40/Ltb/Lta/Blnk/Lck/Il1b*…
mmu04620	Toll 样受体信号通路	23	*Ccl3/Tnf/Cd14/Cxcl10/Ccl4/Nfkb1/Ccl5/Jun/Cd86/Tlr2/Cd40/Mapk14/Pik3r2/Cd80/Il6/Ifnb1/Il1b*…
mmu05169	EB 病毒感染	45	*Tnf/Cxcl10/Nfkb1/Cdkn1a/Mdm2/Cd44/Tnfaip3/Jun/Tlr2/Ikbke/Lyn/Nfkbib/Cd40/Mapk14/Bcl2l11/Il6*…

2.6 RT-qPCR 验证

为了进一步验证结果准确性,从表 2 列出的通路中筛选出 11 个基因(5 个上调,6 个下调)进行验证,RT-qPCR 引物序列见表 3,对比结果见图 7。由图 7 可知,RT-qPCR 结果与转录组测序一致,表明数据可靠。

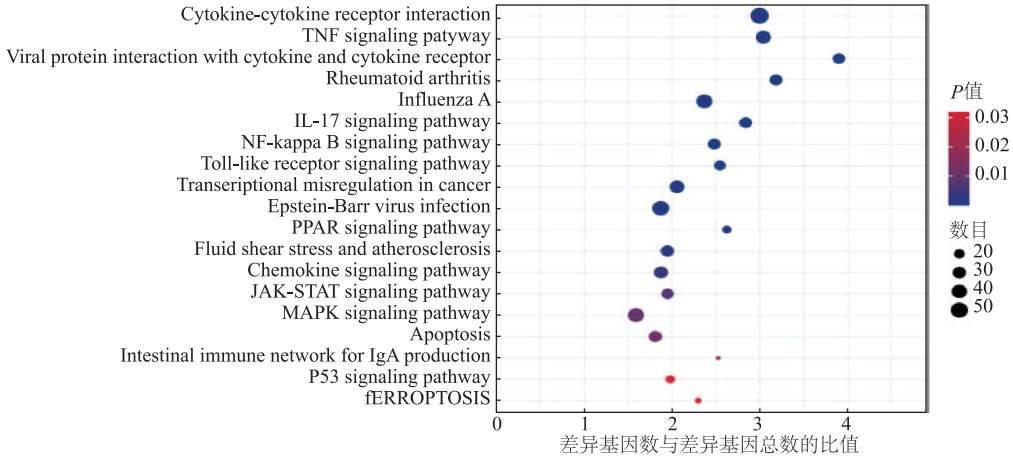


图 6 前 19 条富集的 KEGG 信号通路散点图

Fig. 6 Scatter diagram of the first 19 enriched KEGG signaling pathways

表 3 RT-qPCR 引物序列

Table 3 RT-qPCR primer sequence

基因	序列 5′→3′	T_m	片段长度/bp
GAPDH	F-TGTGAACGGATTTGGCCGTA	56.91	159
	R-ACTGTGCCGTTGAATTTGCC	56.75	
CD14	F-CAAGTTCCCGACCCCCAAG	61.8	135
	R-GCATCCCGCAGTGAATTGTG	57.5	
LCN2	F-GGCCAGTTCACTCTGGGAAA	57.7	91
	R-TGGCGAACTGGTTTGTAGTCC	57.6	
DUSP1	F-GCAGTGCCTATCACGCTTCT	57.9	130
	R-TCCTCCACAGGGATGCTCTT	58.3	
NOD2	F-GCTGGATTACACTCTGTGGGA	56.8	180
	R-GTGAGTTTGTTGTTGAAGAGAGC	54.0	
CXCL2	F-CACTCTCAAGGGCGGTCAA	57.8	97
	R-TCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTC	55.3	
SCD2	F-TACTCAGCCACCACCACAATC	57.3	89
	R-CCCCAGTGGTGAGAACTCTTT	57.0	
Blnk	F-ATGTATGTGATGCCTGCCGA	56.6	114
	R-TACATACTCGCCCCTCGTGA	57.9	
Irf1	F-AGGGGACATTGGGATAGGCA	58.5	121
	R-AATGGCCTGAATAGAGGGCG	57.7	
Jup	F-TCTCTCGGATGTAGCCACCA	57.9	130
	R-GTTGCAGGTCAGGTTGGAGA	57.6	
casp2	F-CTACATGACCAGACCGCACA	57.3	110
	R-ACACCATGTGAGAGGAGTGC	57.4	
casp7	F-GCCCACTTATCTGTACCGCA	57.5	114
	R-TCTTTGTCCGTCCCATTCCG	57.6	

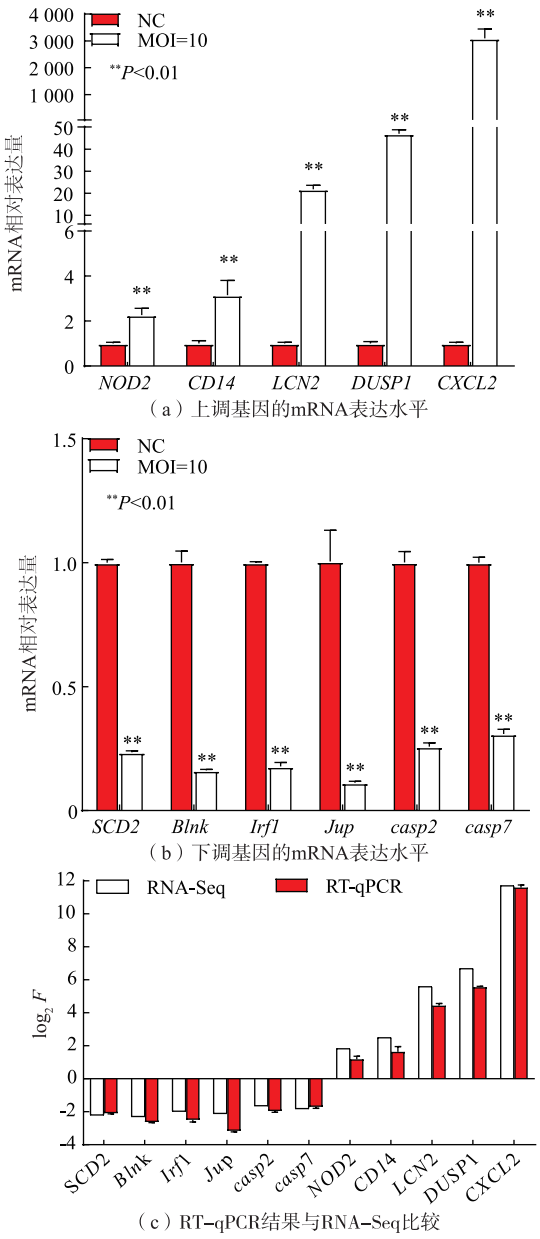


图 7　RT-qPCR 数据与 RNA-Seq 数据比较

Fig. 7　Comparison of RT-qPCR data and RNA-Seq data

3 讨　论

李斯特菌病是许多国家关注的重大公共卫生安全问题，在 2017 年 6 月中旬，南非曾出现李斯特菌病病例爆发的案例。据美国国家传染病研究所(NICD)报告，在 1 060 个实验室检测确认的李斯特菌病病例中死亡人数多达 216 人，通过流行病学调查发现，爆发的主要原因是食用了被 LM 污染的即食肉制品。通过对患者的不同分离株进行 MLST(Multilocus sequence typing，MLST)分析[32]，发现来自患者的分离株中很大一部分(91%)的序列类型为 6 型 (ST6)[33-35]。Zhang 等使用脉冲场凝胶电泳(PFGE)和全基因组测序(WGS)对上海市即食肉类加工厂中的单核细胞增生李斯特菌进行了研究，结果显示在 48 个送检样本中，有 12 个样本存在单核细胞增生李斯特菌分离株，其中 ST5(1/2b)分离株占主导地位(83.3%，10/12)[20]。另外，有研究团队对 2008~2019 年来自 29 个医疗机构的 144 例李斯特菌病病例进行了分析，其中包括 96 例母婴感染，33 例菌血症，13 例神经性李斯特菌病和 2 例皮肤性李斯特菌病。这些病例中，52 例感染孕妇有 31 例胎儿流产 (占 59.6%)，41 例新生儿患者中有 4 例死亡(占 9.8%)，通过 MLST 分析将 144 株临床分离菌株区分为 23 个单独的 ST 序列类型。分析结果显示，最流行的 ST 是 ST87(49 株，占 34.0%)。此外，该研究发现所有单核细胞增生李斯特氏菌分离株对青霉素、氨苄青霉素和美罗培南均敏感，这也说明，导致临床李斯特菌病的单核细胞增生李斯特菌菌株具有基因多态性，同时应该警惕 ST87 和 ST1 型所引起的高患病率[36]。

单增李斯特菌是一种胞内寄生菌，是动物和人类胃肠道的暂时性寄居者[37-38]。它能穿越包括胎盘屏障、血脑屏障、肠上皮紧密连接在内的多种生理性屏障，能广泛定植于各种组织器官。LM 细胞膜表面存在 2 种重要的毒力因子 InlA 和 InlB，在 LM 中通过肠上皮屏障和胎盘屏障发挥关键作用[39]。溶血素 O(ListeriolysinO，LLO)是 LM 分泌的成孔毒素，在LM 从囊泡逃逸进入胞浆内的过程中发挥重要作用[40-42]。ActA 也是 LM 的一种胞膜表面蛋白质，介导 LM 在细胞内的迁移以及在相邻细胞和组织间的传播[43-44]。

在胃肠道内，先天免疫受体起着抵抗侵入性病原体的直接防御机制作用，而细菌建立感染的第一步，也是最重要的一步，就是微生物病原体可能通过毒素、RNA、DNA 作用于宿主细胞，触发宿主细胞内的信号转导，引起细胞生理和生化变化，同时宿主细胞也通过分泌某些蛋白质进行免疫调控[45-46]。这种细菌与宿主的相互作用不仅决定了疾病的转归，而且对理解病原微生物的早期感染机制也具有重要意义[47-49]。

转录组分析在真菌及细菌的致病机理研究中应用广泛。唐光甫等人利用转录组分析，对红曲中

桔霉素导致毒性的内在机理进行了探究[50],发现桔霉素可能通过TP53、CASP3、MAPK3 和 ALB 等关键靶点导致肝肾毒性,揭示了桔霉素导致肝肾毒性的潜在作用靶点和信号通路,为进一步研究桔霉素致毒机理和健康防护提供理论参考。目前还未有 LM 感染RAW264.7 细胞后转录组表达谱差异分析的报道。RAW264.7 细胞是研究细菌感染的经典细胞系[51]。为了探讨 RAW264.7 细胞经 LM 处理后基因表达谱的变化,用 LM 感染 RAW264.7 细胞 6 h 后提取感染组和对照组细胞总 RNA 进行转录组测序。结果表明,与对照组相比,差异表达基因有 1 782 个,其中上调为 989,下调为 793。对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析,测序分析的结果表明 DEGs 大多富集在与炎症相关的信号通路中,如肿瘤坏死因子信号通路、NF-κB 信号通路、凋亡通路和 IL-17 信号通路等。对上述通路中高表达的基因进行研究,基因 NLRP3 在 LM 感染后显著上调。NLRP3 也称 NOD 样受体蛋白质 3(Nod-like receptor protein 3,NLRP3),它能结合凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)形成 NLRP3(NLR Family Pyrin Domain Containing 3,NLRP3)炎性小体。在已发现的炎性小体中,NLRP3 炎性小体是研究最为透彻的。研究表明,NLRP3 在心血管疾病(CVD)[52]、动脉粥样硬化[53-55]、败血症[56]、糖尿病肾病[57-58]、帕金森病[59]、缺血性肌肉损伤[60]等多种疾病中发挥重要作用。本课题组也对 NLRP3 进行了相关研究[61],NLRP3 炎性小体可由双信号模式激活,微生物或内源性细胞因子刺激细胞,导致核因子 κB(Nuclear factor-kappa B,NF-κB)的激活,NF-κB 激活后则会介导 IL-1β 和 IL-18 等重要的细胞炎性因子前体的产生,同时 NF-κB 激活 NLRP3 mRNA 的转录,再进行翻译及翻译后修饰等,此过程即称为 NLRP3 priming,也被认为是经典的 NLRP3 炎性小体活化中的第一信号[62-63]。第二信号可由 ATP、毒素、病毒、ROS 等识别位于细胞质内的模式识别受体 NLRs 激活[64-65]。2 种信号也会共同作用,导致一系列严重的炎症反应[66-67]。总之,结合转录组分析及以上研究数据表明,在 LM 感染 RAW264.7 细胞中,NLRP3 介导的炎症反应可能发挥了极其关键的作用。

4 结 语

通过转录组分析发现,RAW264.7 细胞在感染 LM 6 h 后差异表达基因有 1 782 个,其中上调为 989,下调为 793。通过对基因注释发现,DEGs 主要集中在免疫系统过程、免疫反应、细胞内信号转导、细胞程序性死亡的调控、细胞因子活性、细胞因子受体结合、信号受体结合、分子功能调节、受体调节活性和受体配体活性等生物学功能。除此之外,DEGs 大多富集在与炎症相关的信号通路中,如肿瘤坏死因子信号通路、NF-κB 信号通路、Toll 样受体信号通路、凋亡通路和 IL-17 信号通路等。通过对功能基因进行分析,发现 NLRP3 基因在 LM 感染后显著上调,这为单增李斯特菌感染 RAW264.7 细胞后介导的炎症反应提供了新思路,也为进一步研究 LM 的致病机理提供思路和研究基础。

参考文献:

[1] ZHAO Q,HU P,LI Q,et al. Prevalence and transmission characteristics of *Listeria* species from ruminants in farm and slaughtering environments in China[J]. **Emerging Microbes & Infections**,2021,10(1):356-364.

[2] NIGHTINGALE K K,SCHUKKEN Y H,NIGHTINGALE C R,et al. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2004,70(8):4458-4467.

[3] WALLAND J,LAUPER J,FREY J,et al. *Listeria monocytogenes* infection in ruminants:is there a link to the environment,food and human health? A review[J]. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**,2015,157(6):319-328.

[4] HASSAN R,ALLEY E,KINDLER H,et al. Clinical response of live-attenuated,*Listeria monocytogenes* expressing mesothelin (CRS-207) with chemotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma[J]. **Clinical Cancer Research**,2019,25(19):5787-5798.

[5] LINKE K,RUCKERL I,BRUGGER K,et al. Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2014,80(18):5583-5592.

[6] WEIS J,SEELIGER H P R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature[J]. **Applied Microbiology**,1975,30(1):29-32.

[7] HOSSAIN M I, KIM K, RAHAMAN MIZAN M F, et al. Comprehensive molecular, probiotic, and quorum-sensing characterization of anti-listerial lactic acid bacteria, and application as bioprotective in a food(milk) model[J]. **Journal of Dairy Science**, 2021, 104(6): 6516-6534.

[8] RIVAS L, DUPONT P Y, WILSON M, et al. An outbreak of multiple genotypes of *Listeria monocytogenes* in New Zealand linked to contaminated ready-to-eat meats-a retrospective analysis using whole-genome sequencing[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2019, 69(6): 392-398.

[9] 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.

[10] MERLA C, CORBELLA M, BATISTI BIFFIGNANDI G, et al. Epidemiological characterization of *Listeria monocytogenes* infections in pavia province in 2017 reveals the presence of multiple concurrently circulating strains[J]. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2021, 18(4): 267-275.

[11] LOPEZ-VALLADARES G, DANIELSSON-THAM M L, THAM W. Implicated food products for listeriosis and changes in serovars of *Listeria monocytogenes* affecting humans in recent decades[J]. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2018, 15(7): 387-397.

[12] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. **Nature Reviews Microbiology**, 2018, 16(1): 32-46.

[13] SUNWOO J S, SHIN H R, LEE H S, et al. A hospital-based study on etiology and prognosis of bacterial meningitis in adults[J]. **Scientific Reports**, 2021, 11(1): 6028.

[14] CHARLIER C, DISSON O, LECUIT M. Maternal-neonatal listeriosis[J]. **Virulence**, 2020, 11(1): 391-397.

[15] HUANG S L, ChOU Y T, HSIEH Y C, et al. Epidemiology and clinical characteristics of *Listeria monocytogenes* bacteremia in a Taiwanese medical center[J]. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, 2010, 43(6): 485-490.

[16] MEAD P S, SLUTSKER L, DIETZ V, MCCAIG L F, et al. Food- related illness and death in the United States[J]. **Emerging Infectious Diseases**, 1999, 5(5): 607-625.

[17] JURADO R L, FARLEY M M, PEREIRA E, et al. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection[J]. **Clinical Infectious Diseases**, 1993, 17(2): 224-227.

[18] JORDAN K, MCAULIFFE O. *Listeria monocytogenes* in Foods[J]. **Advances in Food and Nutrition Research**, 2018, 86: 181-213.

[19] NOWAK J, VISNOVSKY S B, PITMAN A R, et al. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* 15G01, a persistent isolate from a seafood-processing plant, is influenced by inactivation of multiple genes belonging to different functional groups[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2021, 87(10): e02349.

[20] ZHANG H, QUE F, XU B, et al. Identification of *Listeria monocytogenes* contamination in a ready-to-eat meat processing plant in China[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2021, 12: 628204.

[21] BROWN P, CHEN Y, PARSONS C, et al. Whole genome sequence analysis of phage-resistant *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strains from turkey processing plants[J]. **Pathogens**, 2021, 10(2): 199.

[22] GUIDI F, ORSINI M, CHIAVERINI A, et al. Hypo- and hyper-virulent *Listeria monocytogenes* clones persisting in two different food processing plants of central italy[J]. **Microorganisms**, 2021, 9(2): 376.

[23] ABA R P M, GELIDO E M L, YATCO K, et al. Microbial shelf life of coconut water subjected to various inoculation levels of *Listeria monocytogenes* and storage conditions[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2021, 344: 109108.

[24] RAMIRES T, KLEINUBING N R, IGLESIAS M A, et al. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi[J]. **Food Research International**, 2021, 140: 109871.

[25] LI F, YE Q, CHEN M, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2021, 179: 113073.

[26] LI F, YE Q, CHEN M, et al. Cas12aFDet: A CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2021, 1151: 338248.

[27] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. **Nature Reviews Genetics**, 2009, 10(1): 57-63.

[28] 成荣. 抗真菌肽 MAF-1A 抗近平滑念珠菌作用机制的研究[D]. 贵阳:贵州大学,2020.
[29] 曹政,居马别克·夏拉巴依,李春燕,等. 牛结节性皮肤病病毒感染 MDBK 细胞后转录组差异表达分析[J]. 畜牧兽医学报,2021,52(2):460-468.
[30] 唐霞,司俊卓,卢楠,等. 肠道病毒 D68 型感染前后转录组分析及差异表达基因的验证[J]. 第三军医大学学报,2021,43(4):275-282.
[31] 谢文娟,吕国栋,曹琦,等. cDNA 微阵列分析 BALB/c 小鼠肝脑组织中差异性表达基因的研究[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(3):180-183.
[32] SAWABE T,OGURA Y,MATSUMURA Y,et al. Updating the Vibrio clades defined by multilocus sequence phylogeny:proposal of eight new clades,and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov[J]. **Frontiers in Microbiology**,2013,4:414.
[33] SMITH A M,TAU N P,SMOUSE S L,et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in south africa,2017-2018:laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates[J]. **Foodborne Pathogens and Disease**,2019,16(7):524-530.
[34] KAPTCHOUANG T C D,FRI J,SANTIi M,et al. Listeriosis outbreak in south africa:a comparative analysis with previously reported cases worldwide[J]. **Microorganisms**,2020,8(1):135.
[35] THOMAS J,GOVENDER N,MCCARTHY K M,et al. Outbreak of listeriosis in south africa associated with processed meat[J]. **The New England Journal of Medicine**,2020,382(7):632-643.
[36] LU B,YANG J,GAO C,et al. Listeriosis cases and genetic diversity of their *L. monocytogenes* isolates in China,2008-2019[J]. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**,2021,11:608352.
[37] GRIF K,HEIN I,WAGNER M,et al. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in the feces of healthy Austrians[J]. **Wiener Klinische Wochenschrift**,2001,113(19):737-742.
[38] GAHAN C G,HILL C. *Listeria monocytogenes*:survival and adaptation in the gastrointestinal tract[J]. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**,2014,4:9.
[39] DELLAFIORA L,FILIPELLO V,DALL'ASTA C,et al. A structural study on the *Listeria Monocytogenes* internalin A-Human E-cadherin interaction:a molecular tool to investigate the effects of missense mutations[J]. **Toxins**,2020,12(1):60 .
[40] PETRISIC N,KOZOROG M,ADEN S,et al. The molecular mechanisms of listeriolysin O-induced lipid membrane damage[J]. **Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes**,2021,1863(7):183604.
[41] COELHO C,BROWN L,MARYAM M,et al. *Listeria monocytogenes* virulence factors,including listeriolysin O,are secreted in biologically active extracellular vesicles[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2019,294(4):1202-1217.
[42] PHELPS C C,VADIA S,ARNETT E,et al. Relative roles of Listeriolysin O,InlA,and InlB in *Listeria monocytogenes* uptake by host cells[J]. **Infection and Immunity**,2018,86(10):e00555.
[43] SEVEAU S. Multifaceted activity of listeriolysin O,the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*[J]. **Sub–Cellular Biochemistry**,2014,80:161-195.
[44] CZUCZMAN M A,FATTOUH R,VAN RIJN J M,et al. *Listeria monocytogenes* exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread[J]. **Nature**,2014,509(7499):230-234.
[45] DOWD G C,MORTUZA R,IRETON K. Molecular mechanisms of intercellular dissemination of bacterial pathogens[J]. **Trends in Microbiology**,2021,29(2):127-141.
[46] SAILA S,GYANWALI G C,HUSSAIN M,et al. The host GTPase Arf1 and its effectors AP1 and PICK1 stimulate actin polymerization and exocytosis to promote entry of *Listeria monocytogenes*[J]. **Infection and Immunity**,2020,88(2):e00578.
[47] JOSEPH P K,THOMAS H O,ANDREW O,JENNIFER M. Programmed cell death and inflammation:winter is coming[J]. **Trends in Immunology**,2017,38(10):705-718.
[48] BASTOUNIS E E,SERRANO-ALCALDE F,RADHAKRISHNAN P,et al. Mechanical competition triggered by innate immune signaling drives the collective extrusion of bacterially infected epithelial cells[J]. **Developmental Cell**,2021,56(4):443-460.
[49] DOWD G C,MORTUZA R,BHALLA M,et al. *Listeria monocytogenes* exploits host exocytosis to promote cell-to-cell spread[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2020,117(7):3789-3796.
[50] 唐光甫,桂艳玲,满海乔,等. 红曲桔霉素致毒机理的网络药理学分析[J]. 食品与生物技术学报. 2023,42(2):90-96.
[51] LIU W,ZHANG Y,ZHU W,et al. Sinomenine inhibits the progression of rheumatoid arthritis by regulating the secretion of

inflammatory cytokines and monocyte/macrophage subsets[J]. **Frontiers in Immunologyl**,2018,9:2228.

[52] SCHUNK S J,KLEBER M E,MARZ W,et al. Genetically determined NLRP3 inflammasome activation associates with systemic inflammation and cardiovascular mortality[J]. **European Heart Journal**,2021,42(18):1742-1756

[53] WESTERTERP M,FOTAKIS P,OUIMET M,et al. Cholesterol efflux pathways suppress inflammasome activation,NETosis, and atherogenesis[J]. **Circulation**,2018,138(9):898-912.

[54] 解静,程琦,刘昳佳,等. NLRP3 炎症小体在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. 天津中医药. 2020,37(4):469-474.

[55] 鞠建庆,王心意,徐浩. NLRP3 炎症小体 / 白介素 -1β 信号通路与动脉粥样硬化及活血解毒中药干预研究进展[J]. 中华中医药学刊,2021,39(8):54-57.

[56] ZHANG J,WANG C,WANG H,et al. Loganin alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating macrophage polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. **International Immunopharmacology**,2021,95:107529.

[57] DING H,LI J,LI Y,et al. MicroRNA-10 negatively regulates inflammation in diabetic kidney via targeting activation of NLRP3 inflammasome[J]. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**,2021,29(7):2308-2320.

[58] 毛海霞,欧三桃. NLRP3 炎性小体与糖尿病肾病的研究进展[J]. 西南军医. 2021,23(1):30-34.

[59] HUANG S,CHEN Z,FAN B,et al. A selective NLRP3 inflammasome inhibitor attenuates behavioral deficits and neuroinflammation in a mouse model of Parkinson's disease[J]. **Journal of Neuroimmunology**,2021,354:577543.

[60] WANG Y,XIE W,LIU B,et al. Stem cell-derived exosomes repair ischemic muscle injury by inhibiting the tumor suppressor Rb1-mediated NLRP3 inflammasome pathway[J]. **Signal Transduction and Targeted Therapy**,2021,6(1):121.

[61] 史客松. 产气荚膜梭菌β1 毒素诱导巨噬细胞焦亡机制的研究[D]. 银川:宁夏大学,2020.

[62] ZHANG Q,LENARDO M J,BALTIMORE D. 30 Years of NF-kappaB:a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. **Cell**,2017,168(1-2):37-57.

[63] OZAKI E,CAMPBELL M,DOYLE S L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases:current perspectives[J]. **Journal of Inflammation Research**,2015,8:15-27.

[64] KELLEY N,JELTEMA D,DUAN Y,et al. The NLRP3 inflammasome:an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2019,20(13):3328.

[65] TSUCHIYA K. Inflammasome-associated cell death:Pyroptosis,apoptosis,and physiological implications[J]. **Microbiology and Immunology**,2020,64(4):252-269.

[66] PARK J H,JEONG S Y,CHOI A J,et al. Lipopolysaccharide directly stimulates Th17 differentiation *in vitro* modulating phosphorylation of RelB and NF-kappaB1[J]. **Immunology Letters**,2015,165(1):10-19.

[67] KIM E H,PARK M J,PARK S,et al. Increased expression of the NLRP3 inflammasome components in patients with Behcet's disease[J]. **Journal of Inflammation**,2015,12:41.