

吴坤钟, 李荣松, 曹阳, 等. 英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后的转录组分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(5): 17-26.  
WU Kunzhong, LI Rongsong, CAO Yang, et al. Transcriptome analysis of *Drosophila* S2 cells infected by *Listeria innocua* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(5): 17-26.

# 英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后的转录组分析

吴坤钟, 李荣松, 曹阳, 黄志君, 田铃

(华南农业大学 动物科学学院/广东省农业动物功能基因组学与分子育种重点实验室/

广东省蚕桑工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】英诺克李斯特菌 *Listeria innocua* 为李斯特菌属 *Listeria* 的一种非致病菌, 与致病菌单增李斯特菌 *L. monocytogenes* 具有共同的毒力祖先, 本文旨在研究英诺克李斯特菌感染后宿主基因表达的变化情况, 为宿主调控、防御单增李斯特菌的危害提供参考。【方法】用英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞, 利用转录组测序检测该细菌感染后果蝇 S2 细胞的基因表达变化, 采用 qPCR 验证英诺克李斯特菌感染后果蝇 S2 细胞中差异表达的基因。【结果】英诺克李斯特菌感染 3 h 后, 宿主果蝇 S2 细胞中 Toll/Imd 信号通路发生显著上调, 吞噬体和霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 感染信号通路显著下调; 抗菌肽基因 *DmDef*(DmDefensin)、*DmDro*(DmDrosomycin)、*DmDpt A*(DmDptericin A)、*DmDpt B*(DmDptericin B)、*DmMtk*(DmMetchnikowin)、*DmCec A2*(DmCecropin A2)、*DmAtt A*(DmAttacin A)、*DmAtt B*(DmAttacin B)、*DmAtt D*(DmAttacin D)、*DmCec B*(DmCecropin B) 均被显著地诱导表达, 其中, 上调幅度最大的基因是 *DmDef*, 上调了 9.805 倍。qPCR 验证结果显示, *DmMtk*、*DmAtt A*、*DmDro* 和 *DmDef* 基因表达分别上调了 8.180、7.533、7.204 和 4.569 倍。【结论】英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后, 变化最显著的基因类群为抗菌肽。本研究全面调查了英诺克李斯特菌感染后宿主基因表达的变化情况, 为揭示非致病菌感染后宿主细胞的反应、细菌与宿主的互作规律提供了参考。

**关键词:** 英诺克李斯特菌; 果蝇 S2 细胞; 转录组测序; 免疫; 抗菌肽; 信号通路

中图分类号: S881

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2020)05-0017-10

## Transcriptome analysis of *Drosophila* S2 cells infected by *Listeria innocua*

WU Kunzhong, LI Rongsong, CAO Yang, HUANG Zhijun, TIAN Ling

(College of Animal Science, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key

Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/Guangdong Provincial

Sericulture and Mulberry Engineering Research Center, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】*Listeria innocua* is a non-pathogenic bacterium from the *Listeria* genus, which harbors the virulence factors evolved from the same ancestor with the pathogenic bacterium *L. monocytogenes*. This study aims to investigate the transcriptional variations of host cells after *L. innocua* infection, and provide a basis for host regulation and prevention of damage from *L. monocytogenes*. 【Method】We used *L. innocua* to infect *Drosophila melanogaster* S2 cells and analyzed the change of gene expression in *Drosophila* S2 cells by

收稿日期: 2020-01-13 网络首发时间: 2020-07-13 15:22:07

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200713.1448.004.html>

作者简介: 吴坤钟 (1995—), 男, 硕士研究生, E-mail: [wukunzhong@stu.scau.edu.cn](mailto:wukunzhong@stu.scau.edu.cn); 李荣松 (1997—), 男, 硕士研究生, E-mail: [lirongsong@stu.scau.edu.cn](mailto:lirongsong@stu.scau.edu.cn); †对本文贡献相同; 通信作者: 田铃 (1980—), 女, 教授, 博士, E-mail: [tianling@scau.edu.cn](mailto:tianling@scau.edu.cn)

基金项目: 广东省自然科学基金 (2017A030311024)

transcriptome sequencing. The differentially expressed genes in *Drosophila* S2 cells infected by *L. innocua* was verified by qPCR. 【Result】 The Toll/Imd signaling pathways were significantly upregulated in *Drosophila* S2 cells after *L. innocua* infection for three hours, while the phagosome and *Vibrio cholerae* infection signaling pathways were significantly downregulated. The antimicrobial peptide genes including *DmDef* (DmDefensin), *DmDro* (DmDrosomycin), *DmDpt A* (DmDptericin A), *DmDpt B* (DmDptericin B), *DmMtk* (DmMetchnikowin), *DmCec A2* (DmCecropin A2), *DmAtt A* (DmAttacin A), *DmAtt B* (DmAttacin B), *DmAtt D* (DmAttacin D), and *DmCec B* (DmCecropin B) were significantly induced after *L. innocua* infection. Among them, the most upregulated gene was *DmDef* with 9.805 fold change. The qPCR verification results showed that the expressions of *DmMtk*, *DmAtt A*, *DmDro* and *DmDef* genes were upregulated by 8.180, 7.533, 7.204 and 4.569 fold. 【Conclusion】 After *L. innocua* infection, the genes with the most significant change in *Drosophila* S2 cells are antimicrobial peptide genes. This study offers a comprehensive investigation of gene expression changes in *Drosophila* S2 cells after *L. innocua* infection, and provide a reference for revealing the response of host cells evoked by non-pathogenic bacteria as well as interaction studies between bacterial pathogens and hosts.

**Key words:** *Listeria innocua*; *Drosophila* S2 cell; transcriptome sequencing; immunity; antimicrobial peptide; signaling pathway

李斯特菌属 *Listeria* 是革兰阳性菌, 隶属厚壁菌门 Firmicutes 芽孢杆菌纲 Bacilli 芽孢杆菌目 Bacillales, 该属包括 17 个种。狭义上的李斯特菌属包括 6 个种, 即单增李斯特菌 *L. monocytogenes*、绵羊李斯特菌 *L. ivanovii*、威尔斯李斯特菌 *L. welshimeri*、默氏李斯特菌 *L. murrayi*、西尔李斯特菌 *L. seeligeri* 和英诺克李斯特菌 *L. innocua*, 公认的致病菌只有 2 种, 即单增李斯特菌和绵羊李斯特菌<sup>[1-2]</sup>。其中单增李斯特菌致病性最强, 可导致人与动物患李斯特菌病<sup>[3]</sup>。绵羊李斯特菌又称伊氏李斯特菌, 仅能引起动物李斯特菌病<sup>[4]</sup>, 但也有引起人患李斯特菌病的个别案例<sup>[2]</sup>。此外, 非常罕见英诺克李斯特菌和西尔李斯特菌引起人李斯特病的报道, 且二者不具有溶血活性, 因此它们一般被认为是非致病菌。其中, 英诺克李斯特菌常伴随单增李斯特菌出现, 并被视为后者的指示菌<sup>[5]</sup>。李斯特菌属成员的中间宿主范围较广, 常常生存于蔬菜、乳类和肉类制品中; 适应性强, 在 2~42 °C 均能正常生长<sup>[6-7]</sup>。李斯特菌病的潜伏期一般小于 24 h<sup>[8]</sup>, 临床表现为脑膜炎、菌血症、眼内炎、颈淋巴结炎、胆囊炎、骨髓炎及关节炎等, 易感人群为老人、孕妇、新生儿和免疫缺陷患者<sup>[9]</sup>。在动物中, 由绵羊李斯特菌引起的李斯特菌病可表现为流产、败血症等, 但不引起脑膜炎<sup>[10]</sup>。鉴于李斯特菌有危害性大、宿主谱广和适应性强的特点, 很多国家都已经采取相关措施防控食品中李斯特菌的污染, 一些发达国家如美国等已将李斯特菌病定为法定传染病, 但目前我国仅在部分省市对李斯特菌病开展相关检测工作<sup>[11]</sup>。

目前对李斯特菌的研究多集中在单增李斯特菌上, 对其他李斯特菌的研究较少。已知的单增李斯特菌毒力因子主要有溶血素基因 *hly* 编码的李斯特溶血素 O (Listeriolysin O, LLO)、*plcA* 编码的磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (Phospholipase C, PI-PLC)、*plcB* 基因编码的磷脂酰胆碱磷脂酶 (Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, PC-PLC)、*SmcL* 基因编码的神经磷脂酶 C (Nerve phospholipase C, NPI-PLC)、肌动蛋白 A (Actin A, Act A)、内化素 (Internalins, InI) 和细胞壁水解酶 (p60)<sup>[12]</sup>。其中 LLO 是重要的毒力因子, 相对分子质量为 60 000, 是一种孔成毒素, 与细胞膜表面分子结合后可以直接插入细胞膜上, 是李斯特菌逃逸初级吞噬和双层膜吞噬体所必须的毒力因子<sup>[13-14]</sup>。此外, LLO 还可以调节巨噬细胞的细胞因子表达, 从而诱导树突细胞凋亡。当李斯特菌借助细胞内吞侵入宿主细胞后被包裹在吞噬体中, 随后李斯特菌分泌 LLO 和 PI-PLC 裂解吞噬体膜, 从而逃逸进入宿主细胞浆中<sup>[15]</sup>。但此时, 李斯特菌仍存在被宿主细胞自噬所清除的危险, 而 Act A 在李斯特菌从宿主胞质中逃逸的过程中发挥着重要的作用<sup>[16]</sup>。Act A 是一种表面蛋白, 当李斯特菌逃出吞噬体进入细胞浆中时, Act A 可以模仿 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白 (Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP) 机制, 调用宿主细胞自身的肌动蛋白, 这些肌动蛋白在李斯特菌一端形成 1 条彗星状的尾巴, 赋予李斯特菌在胞质中运动的能力, 并向邻近的细胞迁移, 实现细胞间侵袭<sup>[17]</sup>。Act A 还可以与宿主细胞中的

Ena/VASP 和 Arp2/3 复合体相结合, 以此逃避宿主细胞的自噬识别系统<sup>[18]</sup>。

研究表明, 英诺克李斯特菌与单增李斯特菌的关系密切, 两者可能具有共同的毒力祖先, 在进化过程中英诺克李斯特菌丢失了编码主要毒力因子的基因<sup>[19]</sup>。英诺克李斯特菌在基因组上与单增李斯特菌非常相似, 例如两者都有 300 多个编码运输蛋白的基因, 包括 80 多个碳转运蛋白, 两者都含有糖酵解所必需的酶<sup>[20]</sup>。典型的英诺克李斯特菌已在进化过程中缺失了 LIPI-1 毒力岛, 但 Johnson 等<sup>[21]</sup>和 Moura 等<sup>[22]</sup>研究发现某些天然非典型英诺克李斯特菌株却含有完整的 LIPI-1 毒力岛, 这类菌株具有溶血活性, 可以主动穿过肠上皮, 传播到肝脏和脾脏, 但危害程度远低于单增李斯特菌。由于英诺克李斯特菌与单增李斯特菌的亲缘关系最为接近, 所以在一些食品的研究中, 英诺克李斯特菌常常作为单增李斯特菌的替代菌种<sup>[23]</sup>。例如, Sorrentino 等<sup>[24]</sup>发现在低 pH 条件下 3-苯基乳酸可以抑制英诺克李斯特菌的生长。另外 Tremonte 等<sup>[25]</sup>发现, 英诺克李斯特菌在面对酸胁迫时会显著上调普遍胁迫蛋白 (Universal stress protein, *USP*) 基因的表达, 表明在抵御酸胁迫时 *USP* 基因发挥着至关重要的作用。

目前, 李斯特菌引起的相关并发症尚无特效药, 也鲜有其感染后宿主基因组水平的详细反应情况的研究报道。由于典型的英诺克李斯特菌被认为是非致病菌<sup>[26]</sup>, 人们对宿主与其互作的机制关注较少。鉴于英诺克李斯特菌与单增李斯特菌的亲缘关系最近, 我们如果能够深入挖掘其感染后宿主基因表达的变化情况, 将为宿主调控、防御单增李斯特菌的危害提供对比与参考。利用英诺克李斯特菌可以感染果蝇 *Drosophila melanogaster* S2 细胞的特性, 我们在英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞 3 h 后, 对果蝇 S2 细胞进行了转录组测序。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与菌株的培养

英诺克李斯特菌 (ATCC, 33090, 由上海海洋大学提供) 用李斯特菌培养基 (HB4160, 海博生物技术有限公司) 活化和培养。果蝇 S2 细胞 (由中国科学院上海植物生理生态研究所提供) 在含有体积分数为 5% 胎牛血清 (FBS500-S, AusGeneX, 澳大利亚) 的 Insect SIM SF 培养基 (MSF1-1, 信和生物公司) 中培养。

### 1.2 英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞

果蝇 S2 细胞铺板培养 18 h 后, 用 50 nmol/L

水溶性胆固醇 (134428, BIOBERRY) 孵育 30 min。

试验组处理: 胆固醇孵育 30 min 后加入英诺克李斯特菌悬浮液 (约 20 个细菌) 在 28 °C 条件下孵育 1.5 h。然后用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤果蝇 S2 细胞, 在含 100 μmol/L CuSO<sub>4</sub> 和 10 μg/mL 庆大霉素的 Insect SIM SF 培养基中继续培养果蝇 S2 细胞 3 h。对照组处理: 不加英诺克李斯特菌悬浮液, 其他操作同试验组。培养结束后, 收集试验组和对照组果蝇 S2 细胞进行后续试验。

### 1.3 RNA 的抽提及转录组测序

用 TRIzol 试剂 (9108-1, Takara, 日本) 抽提感染英诺克李斯特菌后的果蝇 S2 细胞中的总 RNA。使用 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, 美国) 定量总 RNA 模板。通过凝胶电泳确定每个样品中总 RNA 的完整性。根据浓度和质量值, 分别选取试验组与对照组 3 个最好的 RNA 样品用于文库制备和 Illumina Novaseq 6000 测序。原始配对的末端读数修整后由 SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>) 和 Sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>) 使用默认参数进行质量控制。然后使用 TopHat 软件 (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>, 版本 2.1.1) 以定向模式将原始的读数与参考基因组比对。根据每百万条映射片段中每千个碱基的转录本所包含的片段 (Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped, FPKM) 计算每个转录本的表达水平。使用 RSEM 软件 (<http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/>) 定量基因丰度。R 统计软件包 EdgeR (<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/edgeR.html>) 用于基因差异表达分析。此外, 使用 Goatools (<https://github.com/tanghaibao/Goatools>) 和 KOBAS 2.1.1 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/download.php>) 进行 GO 和 KEGG 分析。对照组和试验组样品均设置 3 个生物学重复。

### 1.4 实时定量 PCR 检测

对差异基因进行 qPCR 验证: 用 TRIzol 试剂分别提取对照组与试验组果蝇 S2 细胞的总 RNA, 使用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT 试剂盒 (RR047A, Takara, 日本) 反转录生成 cDNA, 进行 qPCR 检测。以果蝇的 *rp49* 基因作为内参基因。对照组和试验组样品均设置 3 个生物学重复。

利用 qPCR 对英诺克李斯特菌的增殖情况进行检测: 英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞 3 h 后, 收集果蝇 S2 细胞, 用基因组提取试剂盒 (D3129-01, Magen) 提取总基因组, 以此为模板, 以果蝇 *rp49* 基因作为内参基因, 用英诺克李斯特菌的凋亡抑制蛋

白 (Inhibitor of apoptosis protein, *IAP*) 基因特异性引物进行 qPCR 检测英诺克李斯特菌的增殖情况<sup>[27]</sup>。

### 1.5 数据分析

采用 Microsoft Office Excel2010 软件绘图。试验组和对照组的差异显著性通过 *t* 检验进行统计分析。

按以下公式计算每个基因的差异表达倍数:

$$\text{差异倍数} = \frac{\text{试验组基因表达量}}{\text{对照组基因表达量}}$$

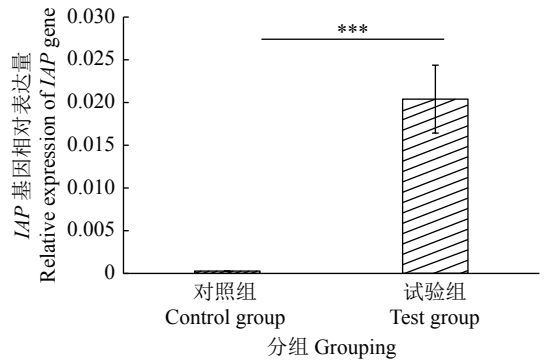
## 2 结果与分析

### 2.1 英诺克李斯特菌在果蝇 S2 细胞内的增殖情况

利用 qPCR 对英诺克李斯特菌的增殖情况进行检测, 结果表明, 英诺克李斯特菌的 *IAP* 基因拷贝数剧烈上升, 果蝇 S2 细胞中侵染了大量的英诺克李斯特菌 (图 1)。因此, 我们在英诺克李斯特菌侵染果蝇 S2 细胞 3 h 后收集果蝇 S2 细胞提取总 RNA 用于转录组测序以及后续的 qPCR 验证。

### 2.2 果蝇 S2 细胞转录组测序数据质控与评估

对照组和试验组分别平均产生了 59 125 670 和 60 779 885 条原始数据, 错误率均在 0.025 6% 以



图中数据为平均值±标准差; “\*\*\*”表示差异达到 0.001 的显著水平 (*t* 检验)

Datum in the figure is  $\bar{x} \pm SD$ ; “\*\*\*” indicates significant difference at the level of 0.001 (*t* test)

图 1 英诺克李斯特菌侵染果蝇 S2 细胞 3 h 后英诺克李斯特菌增殖情况

Fig. 1 Proliferation of *Listeria innocua* after its infection in *Drosophila* S2 cells for three hours

下 (表 1)。果蝇 S2 细胞被英诺克李斯特菌侵染前基因组的 GC 质量分数在 50% 左右, 被侵染 3 h 后基因组 GC 质量分数变化不大 (表 1)。对照组和试验组的 3 次生物学重复之间的相关性系数均在 0.994 9 以上, 表明各组之间重复性良好, 可进行下一步分析。

表 1 果蝇 S2 细胞转录组测序数据统计表

Table 1 Statistics of transcriptome sequencing data for *Drosophila* S2 cells

分组 Grouping	样本编号 Sample ID	原始序列读数 No. of raw reads	有效序列读数 No. of clean reads	错误率/% Error rate	GC质量分数/% GC content
对照组 Control group	1	59 639 278	59 073 172	0.025 6	51.16
	2	61 599 522	61 100 672	0.024 3	51.54
	3	56 138 212	55 717 464	0.024 2	51.67
试验组 Test group	4	64 092 782	63 648 024	0.024 0	51.43
	5	63 143 600	62 708 658	0.024 1	51.56
	6	55 103 274	54 732 148	0.024 3	51.40

### 2.3 果蝇 S2 细胞基因表达差异

英诺克李斯特菌侵染宿主果蝇 S2 细胞 3 h 后, 韦恩分析表明对照组与试验组共同表达的基因有 7 808 个, 仅在试验组表达的基因有 98 个, 仅在对照组表达的基因有 187 个。

与对照组相比, 试验组共有 54 个基因呈现显著性差异 (上/下调倍数  $\geq 2$ ), 其中 21 个基因上调, 33 个基因下调, 变化幅度最大的是 *DmCR46081*, 上调了 232 倍, 其次是 *DmDef*(*DmDefensin*)、*DmDro* (*DmDrosomycin*)、*DmDpt A*(*DmDptericin A*) 和

*DmDpt B*(*DmDptericin B*) 等抗菌肽基因。*DmCR46081* 基因编码 rRNA 前体加工蛋白, 提示果蝇 S2 细胞被英诺克李斯特菌侵染后某些基因的转录和翻译水平大幅度提升 (表 2)。

### 2.4 果蝇 S2 细胞差异表达基因的功能注释分析

GO 注释分析显示, 21 个上调的基因共涉及 10 个 GO 条目, 可分为生物进程、细胞组分和分子功能 3 大类, 其中富集基因数目最多的 GO 条目分别是胞外区 (9 个)、应激反应 (5 个)、代谢进程 (4 个)、免疫系统进程 (4 个)、多细胞生物进程

表 2 试验组与对照组果蝇 S2 细胞基因表达的差异倍数

Table 2 Fold change in gene expression of *Drosophila* S2 cells between test group and control group

基因 Gene	基因描述 Gene description	差异倍数 Fold change	基因 Gene	基因描述 Gene description	差异倍数 Fold change
<i>DmCR46081</i>	CR46081	232.000	<i>DmMuc30E</i>	Mucin 30E	0.473
<i>DmCG34330</i>	Uncharacterized protein, transcript variant A	14.649	<i>DmWhamy</i>	WHAMM and JMY related, transcript variant C	0.464
<i>DmDef</i>	Defensin	9.805	<i>DmGgt-1</i>	Gamma-glutamyl transpeptidase, transcript variant B	0.463
<i>DmDro</i>	Drosocin, transcript variant A	7.629	<i>DmCG15528</i>	Uncharacterized protein	0.454
<i>DmDpt A</i>	Diptericin A	7.447	<i>DmCG9279</i>	Uncharacterized protein, transcript variant C	0.447
<i>DmDpt B</i>	Diptericin B	5.825	<i>DmCG7848</i>	Uncharacterized protein	0.432
<i>DmEdin</i>	Elevated during infection	5.272	<i>DmMuc68Ca</i>	Mucin 68Ca	0.423
<i>DmMtk</i>	Metchnikowin	4.888	<i>DmCG8219</i>	Uncharacterized protein	0.414
<i>DmCec A2</i>	Cecropin A2	4.174	<i>DmCG1246</i>	Uncharacterized protein, transcript variant E	0.403
<i>DmAtt D</i>	Attacin D	3.878	<i>DmTsp42Ep</i>	Tetraspanin 42Ep, transcript variant A	0.390
<i>DmAtt A</i>	Attacin A	3.820	<i>DmAOX2</i>	Aldehyde oxidase 2	0.384
<i>DmAtt B</i>	Attacin B, transcript variant A	3.558	<i>DmCG4409</i>	Uncharacterized protein	0.384
<i>DmPGRP-SD</i>	Peptidoglycan recognition protein SD	3.380	<i>DmSmydA-7</i>	SET and MYND domain containing, arthropod-specific, member 7, transcript variant A	0.346
<i>DmPGRP-SA</i>	Peptidoglycan recognition protein SA, Transcript variant B	3.282	<i>DmCR32636</i>	CR32636	0.322
<i>DmCec B</i>	Cecropin B	3.209	<i>DmCd</i>	Cardinal	0.314
<i>DmCG31274</i>	Uncharacterized protein	3.131	<i>DmVha100-4</i>	Vacuolar H <sup>+</sup> ATPase 100 kD subunit 4	0.303
<i>DmTsf1</i>	Transferrin 1, transcript variant A	2.963	<i>DmCR45215</i>	CR45215	0.294
<i>DmPsf1</i>	Psf1	2.436	<i>DmCG17140</i>	Uncharacterized protein, transcript variant B	0.280
<i>DmCG43175</i>	Uncharacterized protein, transcript variant A	2.419	<i>DmGr59f</i>	Gustatory receptor 59f	0.278
<i>DmObp99a</i>	Odorant-binding protein 99a, transcript variant B	2.151	<i>DmCG34124</i>	Uncharacterized protein	0.276
<i>DmSp212</i>	Serine-peptidase 212	2.080	<i>DmCtr1B</i>	Copper transporter 1B	0.251
<i>DmNdl</i>	Nudel	0.495	<i>DmCG13992</i>	Uncharacterized protein, transcript variant C	0.250
<i>DmCep290</i>	Cep290, transcript variant A	0.483	<i>DmCG10514</i>	Uncharacterized protein	0.237
<i>DmCyp4d14</i>	Cyp4d14, transcript variant A	0.481	<i>DmVha68-3</i>	Vacuolar H <sup>+</sup> ATPase 68 kD subunit 3	0.235
<i>DmCc2d2a</i>	Coiled-coil and C2 domain containing 2A	0.478	<i>DmDhd</i>	Deadhead, transcript variant A	0.231
<i>DmCG34056</i>	Uncharacterized protein	0.475	<i>DmCG12105</i>	Uncharacterized protein, transcript variant B	0.230
<i>DmMtg</i>	Mind the gap, transcript variant G	0.473	<i>DmCG42326</i>	Uncharacterized protein, transcript variant D	0.149

(3 个)、催化活性 (3 个)、结合 (3 个)、细胞进程 (1 个)、细胞成分组织或生物合成 (1 个)、胞外区组件 (1 个)(表 3)。

下调的 33 个基因共涉及 22 个 GO 条目, 其中富集基因数最多的 GO 条目分别是催化活性 (11 个)、代谢进程 (10 个)、细胞膜 (10 个)、单组织进程 (8 个)、细胞膜组件 (8 个)、结合 (8 个)、细胞进程 (7 个)、定位 (6 个)、细胞 (6 个)、细胞组件 (6 个)、细

胞器 (4 个)、细胞器组件 (3 个)、大分子复合物 (3 个)、转录活性 (3 个)、排毒 (1 个)、生物进程调控 (1 个)、多细胞组织进程 (1 个)、生物调控 (1 个)、应激反应 (1 个)、胞外区 (1 个)、抗氧化活性 (1 个)、电子转运活性 (1 个)(表 4)。

结果显示, 上调基因多集中在胞外区, 下调基因多集中在代谢进程、细胞膜和催化活性, 说明被英诺克李斯特菌感染后果蝇 S2 细胞的某些代谢反

表 3 英诺克李斯特菌感染后果蝇 S2 细胞上调基因 GO 注释

Table 3 GO annotation of upregulated genes in *Drosophila* S2 cells after *Listeria innocua* infection

分类 Category	GO 条目 GO term	所含基因 Contained gene
生物进程 Biological process	应激反应 Response to stimulus	<i>DmDef</i> , <i>DmPGRP-SD</i> , <i>DmPGRP-SA</i> , <i>DmCec A2</i> , <i>DmCec B</i>
	细胞成分组织或生物合成 Cellular component organization or biogenesis	<i>DmCR46081</i>
	免疫系统进程 Immune system process	<i>DmPGRP-SD</i> , <i>DmPGRP-SA</i> , <i>DmCec A2</i> , <i>DmCec B</i>
	代谢进程 Metabolic process	<i>DmSp212</i> , <i>DmCR46081</i> , <i>DmPGRP-SD</i> , <i>DmPGRP-SA</i>
	细胞进程 Cellular process	<i>DmCR46081</i>
	多细胞生物进程 Multi-organism process	<i>DmPGRP-SD</i> , <i>DmCec A2</i> , <i>DmCec B</i>
细胞组分 Cellular component	胞外区 Extracellular region	<i>DmDpt B</i> , <i>DmDef</i> , <i>DmTsf1</i> , <i>DmAtt B</i> , <i>DmAtt A</i> , <i>DmPGRP-SD</i> , <i>DmAtt D</i> , <i>DmCec A2</i> , <i>DmCec B</i>
	胞外区组件 Extracellular region part	<i>DmDef</i>
分子功能 Molecular function	结合 Binding	<i>DmObp99a</i> , <i>DmPGRP-SD</i> , <i>DmPGRP-SA</i>
	催化活性 Catalytic activity	<i>DmSp212</i> , <i>DmPGRP-SD</i> , <i>DmPGRP-SA</i>

表 4 英诺克李斯特菌感染后果蝇 S2 细胞下调基因 GO 注释

Table 4 GO annotation of downregulated genes in *Drosophila* S2 cells after *Listeria innocua* infection

分类 Category	GO 条目 GO term	所含基因 Contained gene
生物进程 Biological process	多细胞组织进程 Multicellular organismal process	<i>DmGr59f</i>
	生物进程调控 Regulation of biological process	<i>DmDhd</i>
	排毒 Detoxification	<i>DmCd</i>
	应激反应 Response to stimulus	<i>DmCd</i>
	生物调控 Biological regulation	<i>DmDhd</i>
	定位 Localization	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmCG9279</i> , <i>DmCG17140</i> , <i>DmCG8219</i> , <i>DmCtr1B</i> , <i>DmVha100-4</i>
	单组织进程 Single-organism process	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmCG9279</i> , <i>DmCG7848</i> , <i>DmAOX2</i> , <i>DmCd</i> , <i>DmDhd</i> , <i>DmVha100-4</i> , <i>DmCyp4d14</i>
	代谢进程 Metabolic process	<i>DmCG15528</i> , <i>DmVha68-3</i> , <i>DmNdl</i> , <i>DmCG7848</i> , <i>DmAOX2</i> , <i>DmMtg</i> , <i>DmCd</i> , <i>DmDhd</i> , <i>DmGgt-1</i> , <i>DmCyp4d14</i>
	细胞进程 Cellular process	<i>DmCG15528</i> , <i>DmVha68-3</i> , <i>DmCG9279</i> , <i>DmCG7848</i> , <i>DmCd</i> , <i>DmDhd</i> , <i>DmGgt-1</i>
细胞组分 Cellular component	细胞 Cell	<i>DmCG9279</i> , <i>DmCG17140</i> , <i>DmCG8219</i> , <i>DmGr59f</i> , <i>DmDhd</i> , <i>DmVha100-4</i>
	细胞器 Organelle	<i>DmCG9279</i> , <i>DmCG17140</i> , <i>DmDhd</i> , <i>DmVha100-4</i>
	细胞器组件 Organelle part	<i>DmCG9279</i> , <i>DmCG17140</i> , <i>DmVha100-4</i>
	细胞组件 Cell part	<i>DmCG9279</i> , <i>DmCG17140</i> , <i>DmCG8219</i> , <i>DmGr59f</i> , <i>DmDhd</i> , <i>DmVha100-4</i>
	细胞膜 Membrane	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmNdl</i> , <i>DmCG34056</i> , <i>DmCG1246</i> , <i>DmCG17140</i> , <i>DmTsp42Ep</i> , <i>DmCd</i> , <i>DmGr59f</i> , <i>DmCtr1B</i> , <i>DmVha100-4</i>
	细胞膜组件 Membrane part	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmNdl</i> , <i>DmCG1246</i> , <i>DmTsp42Ep</i> , <i>DmCd</i> , <i>DmGr59f</i> , <i>DmCtr1B</i> , <i>DmVha100-4</i>
	胞外区 Extracellular region	<i>DmMtg</i>
	大分子复合物 Macromolecular complex	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmCG9279</i> , <i>DmVha100-4</i>
分子功能 Molecular function	电子转运活性 Electron carrier activity	<i>DmAOX2</i>
	转录活性 Transporter activity	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmCtr1B</i> , <i>DmVha100-4</i>
	结合 Binding	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmCG9279</i> , <i>DmCG7848</i> , <i>DmAOX2</i> , <i>DmMtg</i> , <i>DmCd</i> , <i>DmCG8219</i> , <i>DmCyp4d14</i>
	催化活性 Catalytic activity	<i>DmCG15528</i> , <i>DmVha68-3</i> , <i>DmNdl</i> , <i>DmCG7848</i> , <i>DmAOX2</i> , <i>DmCG34056</i> , <i>DmCd</i> , <i>DmDhd</i> , <i>DmGgt-1</i> , <i>DmCG10514</i> , <i>DmCyp4d14</i>
	抗氧化活性 Antioxidant activity	<i>DmCd</i>

应下降。

### 2.5 果蝇 S2 细胞差异表达基因的富集分析

2.5.1 上调基因 KEGG 富集 KEGG 富集分析表明, 显著上调的 21 个基因只注释到 1 个 KEGG 通路, 即 Toll/Imd 通路 ( $P < 0.001$ ), 包括 4 个果蝇抗菌

肽基因 *DmDpt A*、*DmDef*、*DmCec A2*(*Cecropin A2*) 和 *DmCec B*(*Cecropin B*)。

2.5.2 下调基因 KEGG 富集 KEGG 富集分析结果 (表 5) 表明, 下调的 33 个基因注释到 23 个 KEGG 通路。

表 5 英诺克李斯特菌感染后果蝇 S2 细胞下调基因 KEGG 富集表

Table 5 KEGG enrichment of downregulated genes in *Drosophila* S2 cells after *Listeria innocua* infection

通路 Pathway	P	所含基因 Contained gene
霍乱弧菌感染 <i>Vibrio cholerae</i> infection	0.033	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmVha100-4</i>
类风湿关节炎 Rheumatoid arthritis	0.034	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmVha100-4</i>
幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导 Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	0.036	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmVha100-4</i>
集合管酸分泌 Collecting duct acid secretion	0.037	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmVha100-4</i>
突触小泡循环 Synaptic vesicle cycle	0.042	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmVha100-4</i>
咖啡因代谢 Caffeine metabolism	0.043	<i>DmAOX2</i>
牛磺酸和牛磺酸的代谢 Taurine and hypotaurine metabolism	0.049	<i>DmGgt-1</i>
吞噬体 Phagosome	0.049	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmVha100-4</i>
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	0.072	<i>DmGgt-1</i>
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	0.078	<i>DmVha68-3</i> , <i>DmVha100-4</i>
矿物质吸收 Mineral absorption	0.082	<i>DmCtr1B</i>
粘蛋白型 O-聚糖的生物合成 Mucin type O-glycan biosynthesis	0.089	<i>DmCG34056</i>
药物代谢-其他酶 Drug metabolism - other enzymes	0.155	<i>DmAOX2</i>
NOD样受体信号通路 NOD-like receptor signaling pathway	0.158	<i>DmDhd</i>
丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	0.163	<i>DmCG7848</i>
铂耐药 Platinum drug resistance	0.182	<i>DmCtr1B</i>
过氧化物酶体 Peroxisome	0.197	<i>DmAOX2</i>
结核 Tuberculosis	0.198	<i>DmVha100-4</i>
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	0.204	<i>DmGgt-1</i>
流体剪切应力与动脉粥样硬化 Fluid shear stress and atherosclerosis	0.209	<i>DmDhd</i>
mTOR信号通路 mTOR signaling pathway	0.216	<i>DmVha68-3</i>
溶酶体 Lysosome	0.247	<i>DmVha100-4</i>
嘌呤代谢 Purine metabolism	0.262	<i>DmAOX2</i>

### 2.6 免疫相关通路中的基因分析

英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后的转录组测序数据经 GO 注释和 KEGG 富集分析显示, 显著上调的基因主要与免疫相关。从 24 个 KEGG 通路中筛选出 10 个与免疫相关的 KEGG 通路, 分别是 Toll/Imd 通路、类风湿关节炎、吞噬体、霍乱弧菌感染、幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导、NOD 样受体信号通路、铂耐药、结核、流体剪切应力与动脉粥样硬化、mTOR 信号通路, 共涉及到 8 个基因, 其中上调幅度最大的是 *DmDef*, 上调了 9.805 倍, 下调幅度最大的是 *DmDhd*, 下调了 4.329 倍。

### 2.7 果蝇 S2 细胞转录组中抗菌肽的 qPCR 验证

英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后, 变化最

为显著的基因类群为抗菌肽。转录组分析显示, 英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞 3 h 后共 10 个抗菌肽基因显著上调, 包括 *DmDef*、*DmDro*、*DmDpt A*、*DmDpt B*、*DmCec A2*、*DmCec B*、*DmMtk* (*DmMetchnikowin*)、*DmAtt D*(*DmAttacin D*)、*DmAtt A*(*DmAttacin A*)、*DmAtt B*(*DmAttacin B*), 其中上调幅度最大的是 *DmDef*(表 2)。

我们选取 9 个抗菌肽基因, 利用 qPCR 进行了验证, 其中上调幅度最大的是 *DmMtk*, 上调 8.180 倍, *DmAtt A* 上调 7.533 倍, *DmDro* 上调 7.204 倍, *DmDef* 上调 4.569 倍 (图 2), 与转录组测序结果的趋势基本一致, 说明英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后, 抗菌肽基因受到显著的诱导表达。

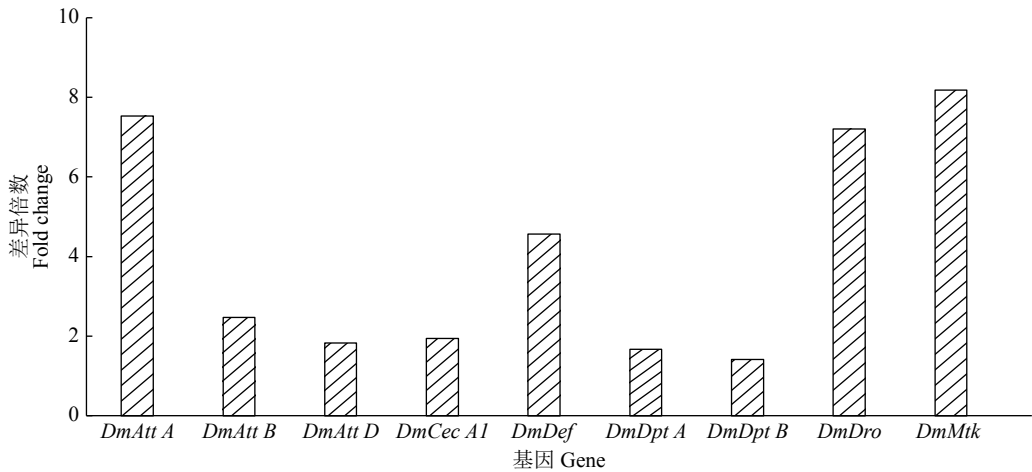


图 2 免疫相关基因表达的 qPCR 验证结果

Fig. 2 qPCR verification results for expression of immune related genes

### 3 讨论与结论

已知的果蝇免疫信号通路有 3 条, 分别是 Toll 通路、Imd 通路和 JAK/STAT 通路。果蝇虽然没有获得性免疫, 但是依然能对不同病原菌的入侵做出不同的先天免疫反应, 革兰阳性菌和真菌所引起的免疫反应主要由 Toll 通路介导, 而革兰阴性菌和细胞壁含 DAP 型肽聚糖的阳性菌引起的免疫反应主要由 Imd 通路介导<sup>[28-29]</sup>。Toll 通路或 Imd 通路被激活后可诱导下游抗菌肽的表达<sup>[30]</sup>。已知的果蝇抗菌肽主要有 7 种, 分别是 Attacin、Diptericin、Drosocin、Defensin、Cecropin、Metchnikowin 和 Drosomycin。抗菌肽的表达由 Toll 和 Imd 通路调控, 若 Toll 通路和 Imd 通路缺失, 将不能诱导抗菌肽的表达<sup>[31-33]</sup>。

英诺克李斯特菌属于革兰阳性菌, 其细胞壁肽聚糖成分主要为 DAP 型肽聚糖<sup>[34]</sup>, DAP 型肽聚糖可以激活果蝇的 Imd 通路。已有研究表明, 果蝇的 PGRP-SD 作为胞外受体不参与 Toll 通路, 而是参与 Imd 通路的激活<sup>[35]</sup>。本研究发现 *DmPGRP-SD* 出现显著上调, 提示英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后 Imd 通路可能被激活。抗菌肽 Attacin、Cecropin 和 Diptericin 的表达主要受 Imd 通路的调控<sup>[36-37]</sup>, 本研究结果显示果蝇的抗菌肽基因 *DmAtt A*、*DmAtt B*、*DmAtt D* 和 *DmCec A2* 和 *DmCec B* 均出现显著上调, 显示了 Imd 通路的激活。而抗菌肽 Drosomycin、Defensin 和 Metchnikowin 的表达主要受 Toll 通路调控<sup>[38]</sup>, 本研究结果中显示果蝇的抗菌肽基因 *DmDro*、*DmDef* 和 *DmMtk* 也出现了显著上调, 提示英诺克李斯特菌可能同时引起了 Imd 和 Toll 通路的激

活, 但具体是 Toll 通路还是 Imd 通路起主要作用, 则需要进一步的研究。抗菌肽被认为具有广谱性, 但 Hanson 等<sup>[39]</sup> 研究发现抗菌肽针对某些病原微生物具有特异性, Imd 通路调控的抗菌肽对单增李斯特菌并不起作用<sup>[34]</sup>。Hanson 等<sup>[39]</sup> 研究还发现果蝇的 *spz* 基因缺失后对英诺克李斯特菌表现出极高的敏感性, 提示在抵御英诺克李斯特菌的过程中, Toll 通路调控的抗菌肽起重要作用。鉴于上述研究结果和单增李斯特菌与英诺克李斯特菌相近的亲缘关系, 猜测宿主在抵御英诺克李斯特菌和单增李斯特菌侵染的过程中 Toll 通路调控的抗菌肽可能起到关键作用, 但 Toll 通路的激活机制需要进一步深入研究。

英诺克李斯特菌作为一种胞内寄生菌, 通过内吞作用侵入宿主细胞后会被包裹在吞噬体中, 英诺克李斯特菌在宿主细胞中的增殖需要它从宿主的吞噬体中逃逸至细胞质中, 我们注意到液泡型 H<sup>+</sup> 离子腺苷三磷酸酶 (Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, V-ATPase) 基因 *DmVha68-3* 和 *DmVha100-4* 均出现了显著下调, KEGG 富集结果显示它们富集到吞噬体等通路中。*DmVha68-3* 编码果蝇 V-ATPase-A 亚基, *DmVha100-4* 编码 V-ATPase-a 亚基, 为 V-ATPase 复合体形成的关键亚基<sup>[40]</sup>, V-ATPase 广泛存在于细胞器膜上, 如内体、溶酶体及吞噬体膜, 可以将 H<sup>+</sup> 泵入这些细胞器中以维持这些细胞器的相对酸性内环境, 促进细胞器对内吞或是细胞自噬包裹的底物或是入侵的微生物进行降解<sup>[41-42]</sup>。单增李斯特菌的毒力因子 LLO 正常发挥作用时需要酸性环境, 在 pH 5.6 时 LLO 的溶血活性最高, 当 pH 超过 7.0 时 LLO 的活性基本丧失<sup>[43]</sup>。典型的英诺李斯特菌缺失毒力岛, 而其感染果蝇 S2 细胞后上述



2 个 *DmV-ATPase* 基因的下调是否跟毒力岛缺失有关目前尚不清楚, 值得我们今后深入思考。此外, 是否可以通过调控宿主细胞的 V-ATPase 活性从而抑制单增李斯特菌毒力因子 LLO 的活性对其进行防控, 也是有益的思考。

#### 参考文献:

- [1] 李翠云. 单核细胞李斯特菌研究近况[J]. 中国热带医学, 2010, 10(1): 120-122.
- [2] 蔡雪薛. 单核细胞增生李斯特菌毒力相关基因的筛选鉴定及其功能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [3] VÁZQUEZ-BOLAND J A, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, GONZÁLEZ-ZORN B, et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*[J]. *Microbes Infect*, 2001, 3(7): 571-584.
- [4] GAILLARD J L, BERCHE P, SANSONETTI P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infect Immun*, 1986, 52(1): 50-55.
- [5] 陈健舜, 江玲丽, 方维焕. 李斯特菌毒力因子及其进化[J]. *微生物学报*, 2007(4): 738-742.
- [6] ORSI R H, WIEDMANN M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(12): 5273-5287.
- [7] JUNTILA J R, NIEMELÄ S I, HIRN J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*[J]. *J Appl Bacteriol*, 1988, 65(4): 321-327.
- [8] 王旭. 基于比较基因组学和转录组学技术揭示单增李斯特菌毒力因子的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- [9] 杜秀媛. 李斯特菌致病性的研究及部分基因的功能分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.
- [10] SCALLAN E, HOEKSTRA R M, ANGULO F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States: Major pathogens[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1): 7-15.
- [11] LI W, BAI L, FU P, et al. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 15(8): 459-466.
- [12] 郎需龙, 王兴龙. 李斯特菌毒力因子及其调控机制的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(3): 195-198.
- [13] ALVAREZ-DOMINGUEZ C, ROBERTS R, STAHL P D. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(Pt 6): 731-743.
- [14] MARQUIS H, GOLDFINE H, PORTNOY D A. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*[J]. *J Cell Biol*, 1997, 137(6): 1381-1392.
- [15] PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*[J]. *J Pathol*, 2006, 208(2): 215-223.
- [16] KOCKS C, GOUIN E, TABOURET M, et al. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein[J]. *Cell*, 1992, 68(3): 521-531.
- [17] COSSART P, TOLEDO-ARANA A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: An overview[J]. *Microbes Infect*, 2008, 10(9): 1041-1050.
- [18] CHONG R, SWISS R, BRIONES G, et al. Regulatory mimicry in *Listeria monocytogenes* actin-based motility[J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 6(3): 268-278.
- [19] DEN BAKKER H C, CUMMINGS C A, FERREIRA V, et al. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 688.
- [20] MILILLO S R, FRIEDLY E C, SALDIVAR J C, et al. A Review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52(8): 712-725.
- [21] JOHNSON J, JINNEMAN K, STELMA G, et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7): 4256-4266.
- [22] MOURA A, DISSON O, LAVINA M, et al. Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*[J]. *Infect Immun*, 2019, 87(4): e00758-18.
- [23] NYHAN L, JOHNSON N, BEGLEY M, et al. Comparison of predicted and impedance determined growth of *Listeria innocua* in complex food matrices[J]. *Food Microbiol*, 2020, 87: 103381.
- [24] SORRENTINO E, TREMONTE P, SUCCI M, et al. Detection of antilisterial activity of 3-phenyllactic acid using *Listeria innocua* as a model[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1373.
- [25] TREMONTE P, SUCCI M, COPPOLA R, et al. Homology-based modeling of universal stress protein from *Listeria innocua* up-regulated under acid stress conditions[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1998.
- [26] YILDIRIM Z, YERLIKAYA S, ÖNCÜL N, et al. Inhibitory effect of lactococcin BZ against *Listeria innocua* and indigenous microbiota of fresh beef[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2016, 54(3): 317-323.
- [27] LIU D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen[J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(6): 645-659.
- [28] 刘甜, 罗开珺. 果蝇 Toll 和 Imd 信号通路中的功能结构域[J]. *环境昆虫学报*, 2011, 33(3): 388-395.
- [29] STUART L M, EZEKOWITZ R A. Phagocytosis and comparative innate immunity: Learning on the fly[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(2): 131-141.
- [30] TANJI T, HU X, WEBER A N R, et al. Toll and Imd pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(12): 4578-4588.

- [31] VODOVAR N, VINALS M, LIEHL P, et al. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11414-11419.
- [32] TZOU P, REICHHART J M, LEMAITRE B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2152-2157.
- [33] GOTTAR M, GOBERT V, MICHEL T, et al. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein[J]. *Nature*, 2002, 416(6881): 640-644.
- [34] 陈康康, 吕志强. 昆虫肽聚糖识别蛋白研究进展[J]. *昆虫学报*, 2014, 57(8): 969-978.
- [35] IATSENKO I, KONDO S, MENGIN-LECREULX D, et al. PGRP-SD, an extracellular pattern-recognition receptor, enhances peptidoglycan-mediated activation of the *Drosophila* Imd pathway[J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 1013-1023.
- [36] LEMAITRE B, REICHHART J M, HOFFMANN J A. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(26): 14614-14619.
- [37] IMLER J, BULET P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: Structures, activities and gene regulation[J]. *Chem Immunol Allergy*, 2005, 86: 86648.
- [38] 程廷才, 王根洪, 李娟, 等. 昆虫抗菌肽基因表达调控机理[J]. *蚕学通讯*, 2004, 24(3): 20-26.
- [39] HANSON M A, DOSTÁLOVÁ A, CERONI C, et al. Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides *in vivo* using a systematic knockout approach[J]. *eLife*, 2019, 8: 44341.
- [40] ALLAN A K, DU J, DAVIES S A, et al. Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles[J]. *Physiol Genomics*, 2005, 22(2): 128-138.
- [41] 游海燕, 邓云, 覃文新. V-ATPases 的功能及其抑制剂研究进展[J]. *生命科学*, 2009, 21(4): 499-503.
- [42] HOLLIDAY L S. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: An essential multitasking enzyme in physiology and pathophysiology[J]. *New J Sci*, 2014, 2014: 1-21.
- [43] 谭炳乾, 何启盖, 肖军, 等. 单核细胞增多性李斯特菌 *hlyA* 基因序列及溶血素活性测定[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(2): 161-165.

【责任编辑 庄 延】