

# TLRs 和 NLRs 协同影响胸膜肺炎放线杆菌诱导的胸膜肺炎 IRFs 的表达



杨婷婷<sup>1</sup>, 刘鑫<sup>1</sup>, 张宇航<sup>1</sup>, 邵萌萌<sup>1</sup>, 王宇凤<sup>1</sup>, 黄复深<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128

<sup>2</sup>湖南农业大学湖南兽药工程技术研究中心, 湖南长沙 410128

**摘要:** 猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌感染而引起的一种猪的重要传染病, NLRs 和 TLRs 可能参与了猪传染性胸膜肺炎的发生。研究表明, IRFs 在调节感染过程中的炎症因子表达从而调节炎症的发生和机体的抗菌反应其重要作用, 为探讨它们在猪传染性胸膜肺炎肺部病变发生中的作用, 我们在 App 经滴鼻感染制造胸膜肺炎放线杆菌小鼠模型的基础上, 利用石蜡切片检测了小鼠的肺部病变, 同时利用 qPCR 和 western-blot 检测多个基因表达的变化。结果表明, 小鼠经滴鼻感染 App 48 h 后出现呼吸困难、厌食等症状。尸检发现急性出血性肺炎对肺造成严重损伤。组织病理变化以出血、嗜酸性粒细胞及淋巴细胞浸润为特征。与对照组比较, App 感染小鼠肺组织中白细胞介素-8 (IL-8)、IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-6、干扰素- $\alpha$  (INF- $\alpha$ )、toll 样受体-2 (TLR-2)、TLR-4、干扰素调节因子-1 (IRF-1)、IRF-5、IRF-7、NLRP-3 表达显著升高, 而 IRF-3、IRF-4 表达显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。本研究提示 TLR/NLRs 信号通路可能协同激活 App 诱导的小鼠胸膜肺炎模型中的 IRFs 的表达, 进而调节小鼠肺部的炎症反应和肺部炎症。

**关键词:** 小鼠; 胸膜肺炎放线杆菌; 致炎因子; IRF; NLRP-3 炎性小体

**DOI:** [10.57237/j.life.2022.01.001](https://doi.org/10.57237/j.life.2022.01.001)

## TLR and NLRs Signaling May Synergistically Affect Expression of IRFs in Mouse Pleuropneumonia Model Induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Yang Ting-ting<sup>1</sup>, Liu Xin<sup>1</sup>, Zhang Yu-hang<sup>1</sup>, Shao Meng-meng<sup>1</sup>, Wang Yu-feng<sup>1</sup>, Huang Fu-shen<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, China

<sup>2</sup>Hunan Engineering Research Center of Veterinary Drug, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, China

**Abstract:** Porcine contagious pleuropneumonia, caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), is a very important disease in pig industry. NLRs and TLRs may involve in the pathogenesis of this disease. It was reported that IRFs played an important role in regulating the expression of inflammatory factors during infectious diseases, thus regulating the occurrence of inflammation and the antibacterial reaction. In order to investigate their role in the pathogenesis of pulmonary lesions in porcine contagious pleuropneumonia, we employed a mouse model of intranasal infection by App,

基金项目: 湖南省教育厅重点项目资助 (No. 16A101).

\*通信作者: 黄复深, 15211071993@163.com

收稿日期: 2022-08-28; 接受日期: 2022-10-05; 在线出版日期: 2022-12-15

<http://www.lifescitech.org>

which resulted in lung inflammation. Mice showed dyspnea and anorexia after intranasal inoculation with App at post-inoculation 48 h. In the autopsy, the lungs were found to be severely damaged by acute hemorrhagic pneumonia. The histopathologic changes were characterized by hemorrhage, eosinophils and lymphocyte infiltration. Expression of interleukin-8 (IL-8), IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, interferon- $\alpha$ (INF- $\alpha$ ), toll-like receptor-2 (TLR-2), TLR-4, interferon regulatory factor-1(IRF-1), IRF-5, IRF-7, and NLRP-3 were increased significantly concomitantly with decreased expression of IRF-3 and IRF-4 in the lung of App infected mice compared with control ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The present results suggest that TLR/NLRs signaling may synergistically activate IRFs in mouse pleuropneumonia model induced by App and then regulate the inflammatory response and lung inflammation in mice.

**Keywords:** Mice; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Preinflammatory Cytokines; IRF; NLRP-3 Inflammasome

## 1 引言

研究表明,细胞因子在感染性疾病中起着重要作用,我们常称为细胞因子风暴[1, 2]。如各种趋化因子,包括白细胞介素-8(IL-8)、IL-6、IL-7、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和 IFN- $\alpha/\beta$  可参与诱导胃十二指肠黏膜炎症反应,以及幽门螺杆菌感染、流感病毒感染、HSV 感染、疱疹性角膜炎的疾病发生[1-8]。现在有关细胞因子在传染病发病中的作用越来越受到关注,其有关成果有利于传染病防治新方法的研究[1, 2, 8]。

猪传染性胸膜肺炎是一种由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App) 感染而引起的一种猪的重要传染病,表现为高传染性、纤维性渗出、出血性和坏死性肺炎。可使猪只因急性感染出现高死亡率,同时还可引起猪慢性感染的肺局部病变[9]。研究表明,细胞因子(IL-1 $\alpha$ 、IL-6、INF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-8) 直接或间接参与来自 App 脂多糖(LPS)引起的猪胸膜肺炎[9-11]。抗炎药物吲哚美辛 (Indomethacin) 可使降低小鼠 App 感染后肺组织病变和死亡率[9]。转录组研究提示,这些细胞因子表达的变化可能涉及包括 NOD 样受体 (nucleotidebinding oligomerization domain, NLRs)和 (Toll-like receptors, TLRs)的多个细胞信号传导通路[11, 12]。

机体微生物病原体的识别是由模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs)介导的[13]。宿主可以通过免疫细胞表达的多种 PRRs 识别微生物中存在的不同病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 从而产生进一步的细胞应答过程,如炎症反应[3, 4, 6]。PRRs 包括 NLRs 和 TLRs 等。NLRs 信号通路是与微生物识别和宿主防御相关的重要通路,可通过炎症小体 (NLR 组装的蛋白复合体) 诱导 caspase-1 激活[13], 进而产生应答反应, 在宿主

抵御微生物方面起着重要作用。研究表明,TLR 信号对 NLR 信号有促进作用,同时,有报道指出 NLRs 和 TLRs 之间的协同作用[13]。干扰素调节因子(interferon-regulatory factors, IRFs) 在调节感染过程中的炎症因子表达,从而调节炎症的发生和机体的抗菌反应其重要作用[14]。研究表明,TLR 和 NLRs 都可激活 IRFs 信号通路[13]。有证据表明,NLR 信号通路参与了肺部炎症的发生[11]。

本研究在滴鼻感染 App 建立的小鼠模型基础上,利用 qPCR 技术和免疫印迹技术在转录水平和蛋白表达水平对 PRRs (TLR、NLR 和 AIM)在小鼠胸膜肺炎炎症因子表达调节是否存在协同作用及 IRFs 等在疾病发生中的可能作用进行了探讨。

## 2 材料与方法

### 2.1 细菌菌株及培养条件

APP 血清 I 型菌株于含 15  $\mu\text{g/ml}$  NAD (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)和 10%新生小牛血清(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)的胰蛋白酶大豆肉汤培养基(TSB) (青岛日水生物技术有限公司)中, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%的二氧化碳培养箱培养。

### 2.2 感染动物模型的建立

选取 12 只 4 周龄 BALB/C 小鼠(湖南 SJA 实验动物), 随机分为对照组和实验组 (每组 6 只)。实验组小鼠经滴鼻接种 0.25mL  $1\times 10^8$  CFU/mL 菌液。对照组小鼠经滴鼻接种等体积生理盐水。接种 2 天后处死小鼠, 采集肺部组织用于提取总 RNA、蛋白质和组织病理学分析[12]。

## 2.3 病理学检查

常规石蜡切片进行组织病理学分析。即，采集肺部组织，10%福尔马林中固定 24 小时，常规处理并包埋在石蜡中。组织切片(3-4 μm)用苏木精-伊红(HE)染色。

## 2.4 实时荧光定量 PCR 分析

从 NCBI 获得小鼠有关基因的核苷酸序列，利用 Primer 5.0 设计引物后，送上海生物科技有限公司合成。本研究使用的引物序列见表（表 1）。

表 1 本实验中实时荧光定量 PCR 引物

Genes	Primers(5'→3')	Amplicon size(bp)
<i>β-action</i>	F: 5' TTCCTTCTTGGGTATGGAAT3'	178 bp
	R: 5' GAGCAATGATCTTGATCTTC3'	
<i>IRF-1</i>	F: 5' AAGTCCAGCCGAGATGCTAA3'	116 bp
	R: 5' TAGCTGCTGTGGTCATCAGG 3'	
<i>IRF-2</i>	F: 5' ATCTGCTGCCCAGCATGGCG 3'	189bp
	R: 5' TGACACTGGCCCGGGTCTCC 3'	
<i>IRF-3</i>	F: 5' TCTACCGAGGCCGCCAGGTC 3'	198bp
	R: 5' ACAGTGCCAGCCCATTGCCC 3'	
<i>IRF-4</i>	F: 5' CATGGGCCACCCCTACCCCA 3'	180bp
	R: 5' CCTTGCCAGTGGTGGCCTCG 3'	
<i>IRF-5</i>	F: 5' CCCGCCGTGTGAGGCTGAAG 3'	241bp
	R: 5' CAGCGCAGGTTGGCCTTCCA 3'	
<i>IRF-6</i>	F: 5' GCCCCGAATCAGTGTGGCCC 3'	236bp
	R: 5' GAGCTCCTCCTGGTCGGGCA 3'	
<i>IRF-7</i>	F: 5' AGACCCCGTCCCACCACAGG 3'	179bp
	R: 5' CCTGTAGCACTGTGCGGCCC 3'	
<i>IRF-8</i>	F: 5' GGTCCAGCAGCCCAGTGCAG 3'	230bp
	R: 5' TGTCGGCCGTCGGAAGCAC 3'	
<i>IRF-9</i>	F: 5'ATGGTGGCCGAGTGGTGGGT3'	176bp
	R: 5'ATTGCTGGCCACCAGGACGC3'	
<i>IL-1β</i>	F: 5' GCCTCGTGCTGTCGGACCCA 3'	199bp
	R: 5' TCCAGCTGCAGGGTGGGTGT 3'	
<i>IL-10</i>	F: 5' GCACCCACTTCCCAGTCGGC 3'	217bp
	R: 5' CCATGCTTCTCTGCCTGGGGC 3'	
<i>IL-6</i>	F: 5' GCTGGTGACAACCACGGCCT 3'	107bp
	R: 5' AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT 3'	
<i>NLRC-4</i>	F: 5' ACCTGAGAAGCGCCAGGGGG 3'	241bp
	R: 5' AGGCACTCCGTGGTGGTGGT 3'	
<i>NLRP-3</i>	F: 5' ATCTGCTGCCCAGCATGGCG 3'	168bp
	R: 5' GGTCTGGCCGACTGCTGCTG 3'	
<i>TNF-α</i>	F: 5' ATCCGCGACGTGGAAGTGGC 3'	159bp
	R: 5' TTGGGGACCGATCACCCCGA 3'	
<i>IFN-α</i>	F: 5' CCTGATGGTCTCTGGCGGTGC 3'	184bp
	R: 5' GGCATCCACCTTCTCCTGCGG3'	
<i>IFN-β</i>	F: 5' TCCACGCTGCGTTCCTGCTG3'	130bp
	R: 5' AGTCCGCCCTGTAGGTGAGGT3'	
<i>TLR-1</i>	F: 5' GGTGGAGGGCTGGCCTGACT3'	233bp
	R: 5' TGGCCCTGTGCCTGGTCTGT3'	
<i>TLR-2</i>	F: 5'CTGCACGGCCACAGGCTTCA 3'	172bp
	R: 5' CTGCACGGCCACAGGCTTCA3'	
<i>TLR-3</i>	F: 5'CTGGCCACCAGCGAGAGCAC 3'	171bp
	R: 5' AGAGCGAGGGGACAGACGCT3'	
<i>TLR-4</i>	F: 5' CTGAGCAAACAGCAGAGGAAGAAC 3'	124bp
	R: 5' ATAGCAGAGCCCCAGGTGAGC 3'	
<i>TLR-5</i>	F: 5' CTGAGCAAACAGCAGAGGAAGAAC 3'	139bp

Genes	Primers(5'→3')	Amplicon size(bp)
TLR-9	R: 5' ATAGCAGAGCCCCAGGTGAGC 3'	247bp
	R: 5' GCTGCGACCATGCCCCAAT 3'	
	R: 5' AGCTTGCGCAGGCGGGTTAG 3'	
AIM2	R: 5' ATAGCAGAGCCCCAGGTGAGC 3'	102bp
	R: 5' GTGGCAGAGGCAGCAGAGCA 3'	

总 RNA 的提取: 取肺组织, 液氮速冻。用 Trizol (宝生物工程(大连)有限公司)法按试剂盒说明提取 RNA。分光光度法测定总 RNA 浓度。

cDNA 的合成: 利用 5×TransScript<sup>®</sup>All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (AT341) (北京全式金生物技术股份有限公司)试剂从总 RNA 反转录 cDNA。反应总体积为 20 μl, 包括总 1 μg 总 RNA、4 μl 5×TransScript<sup>®</sup>All-in-One SuperMix、1 μl gDNA Remover, 加入 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 至 20 μl。样本在 42 ℃ 孵育 15 min, 然后 85 ℃ 孵育 5s, 加入 TransScriptRRT/TI 和 gDNA Remover。

实时荧光定量 PCR 扩增 (qPCR): 利用 2×TransStartR Tip Green qPCR Super Mix (AQ141) (北京全式金生物技术股份有限公司)进行实时荧光定量 PCR 扩增。反应总体积为 20 μl, 包括上述 cDNA 合成样品的模板 cDNA 1 μl, 正向引物 1 μl (10 μM), 反向引物 1 μl (10 μM), 10 μl 2×TransStartR Tip Green qPCR Super Mix, 加入 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μl。反应在 94 ℃ 初始预孵育 30 s, 随后进行 40 个扩增周期: 94 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s。熔化曲线分析在 65-95 ℃ 放大后立即进行, 连续荧光采集。

基因相对表达量的计算: 本研究的基因表达量采用“Delta-delta 法”进行相对定量分析。将所选基因的表达量按公式  $2^{[-\Delta Cq_{\text{sample}} - \Delta Cq_{\text{control}}]} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$  归一化至内参  $\beta$ -action 基因的表达量, 并转化为相对 mRNA 表达量[12]。

2.5 蛋白质印迹分析

从肺组织中提取总蛋白[14]。使用 Bradford 测定法 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)测定样品的蛋白浓度。每个样品取 20 ~ 30 μg 进行 Western blot 分析。样品经 10% 丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后, 电转移到硝化纤维素滤膜上。用含 5% (w/v)脱脂乳的 PBS 处理 2 小时, 然后与 IRF-1、IRF-3、IRF-5、IRF-7、NLPR-3 和  $\beta$ -actin(1:1000)一抗(艾美捷科技有限公司)在 4 ℃ 孵育过夜, 再与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1000) (艾美捷科技有限公司)孵育 1h, 显色。Western blotting 带用 BioRad 软件定量。

2.6 统计分析

采用单因素方差分析法(ANOVA)进行统计分析。误差用平均标准误差(SEM)表示。

3 结果

3.1 经鼻接种 App 后小鼠肺部组织的病理学变化

小鼠经鼻内接种 App 48 h 后出现呼吸困难、厌食等症状。剖检发现, 小鼠肺部有急性出血性肺炎。病理组织学改变以出血、嗜酸性粒细胞及淋巴细胞浸润为特征 (图 1B), 对照组肺部组织未见病变 (图 1A)。

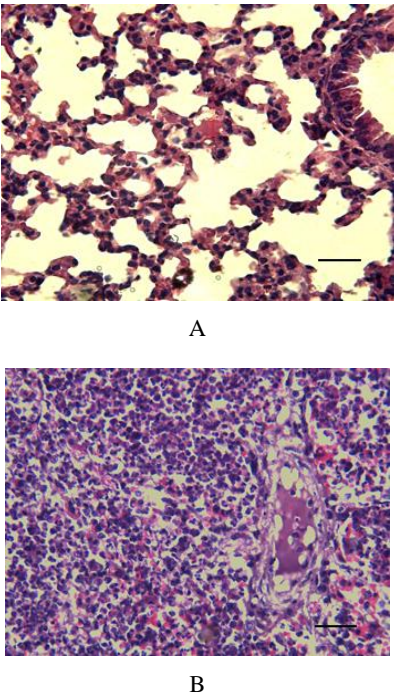


图 1 小鼠感染后 48 小时肺部的组织病理学观察  
A. 正常小鼠的肺部切片: 未见病灶; B. App 感染小鼠肺部切片, 可见肺部损伤, 有炎症细胞浸润 (400×)

### 3.2 小鼠肺组织中部分细胞因子 mRNA 的表达水平

采用实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, qPCR) 检测各组小鼠肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  mRNA 表达水平。如图 2 所示, 感染小鼠肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  mRNA 水平均显著高于未感染小鼠( $p < 0.01$ )。

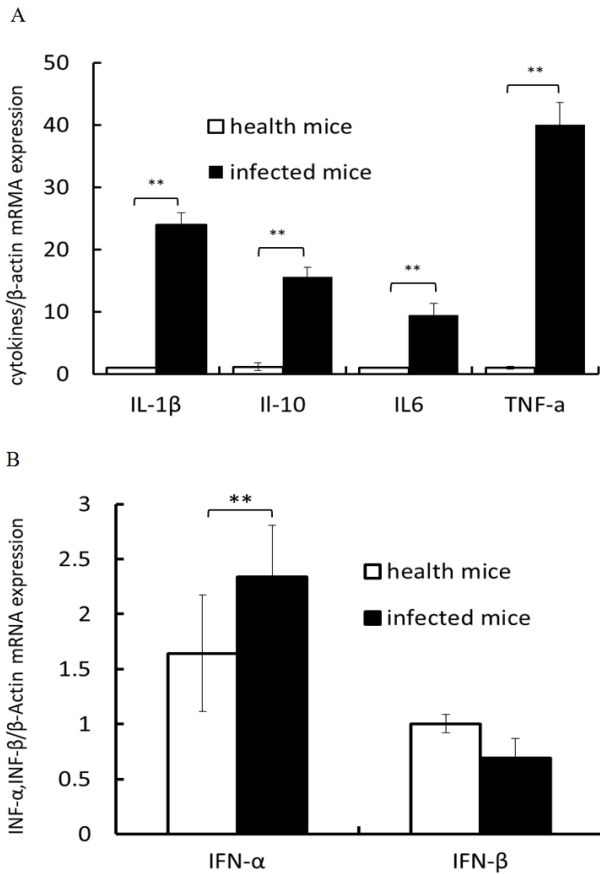
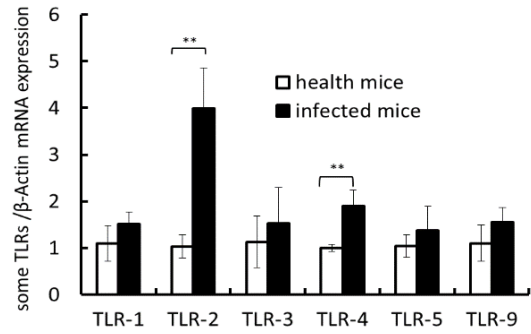


图 2 感染小鼠肺部细胞因子 mRNA 表达水平的变化

A. 致炎因子/ $\beta$ -Actin mRNA 的表达水平, B. IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ / $\beta$ -Actin mRNA 表达水平. (\*\*表示  $P < 0.01$ , 与正常小鼠有显著差异)

### 3.3 感染小鼠肺内 TLR mRNA 表达水平的变化

实时荧光定量 PCR 分别检测对照组和实验组小鼠肺组织中 TLR-1、2、3、4、5 和 9 mRNA 的表达水平, 发现感染小鼠肺部 TLR-2 和 4 mRNA 水平较未感染小鼠肺部明显上调( $p < 0.05$ ) (图 3)。



(\*\*表示  $P < 0.01$ , 与正常小鼠有显著性差异)

图 3 感染小鼠 TLRs mRNA 表达水平的变化

### 3.4 感染小鼠肺部 IFR mRNA 表达水平的变化

实时荧光定量 PCR 分别检测对照组和实验组小鼠肺组织中 IRF-1~9 mRNA 的表达水平。发现, 感染小鼠肺部的 IRF-1、-5 和 -7 mRNA 水平均显著高于未感染小鼠( $p < 0.05$ )。同时, 还发现感染小鼠肺组织中 IRF-3 和 -4 mRNA 水平均低于未感染小鼠( $p < 0.05$ ) (图 4A)。Western blot 结果显示 IRF-1、5、7 表达增加, IRF-3、4 表达减少 (图 4B)。

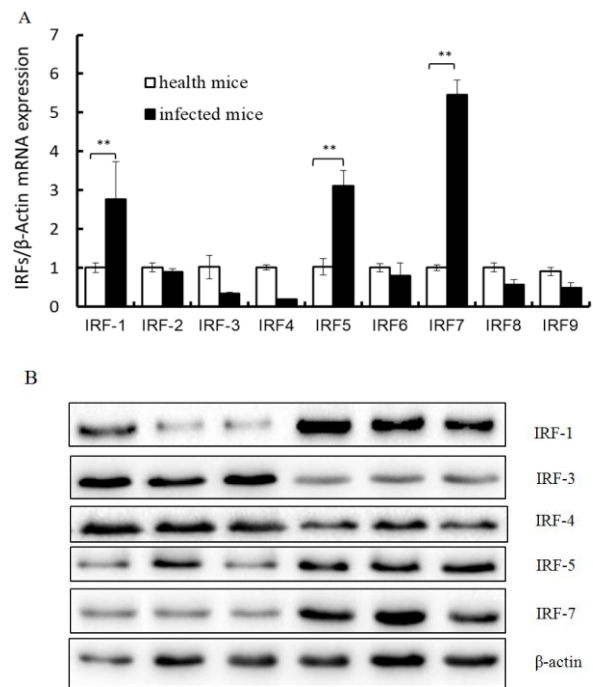


图 4 感染小鼠肺部 IRF 表达水平的变化

A. 小鼠肺部 IRF/ $\beta$ -Actin mRNA 表达水平 (\*\*表示  $P < 0.01$ , 与正常小鼠有显著性差异), B. 小鼠肺部 IRF 表达水平 western blot 的检测。

### 3.5 感染小鼠肺组织中 AIM2、NLRC4、NLRP3 mRNA 表达水平的变化

实时荧光定量 PCR 检测对照组和实验组肺部 AIM2、NLRC 和 NLRP-3 mRNA 的表达水平。发现感染小鼠肺部 NLRP3 mRNA 水平均显著高于未感染小鼠( $p < 0.05$ ) (图 5A)。Western blot 结果显示, 感染小鼠肺部 NLRP3 表达明显增高 (图 5B)。

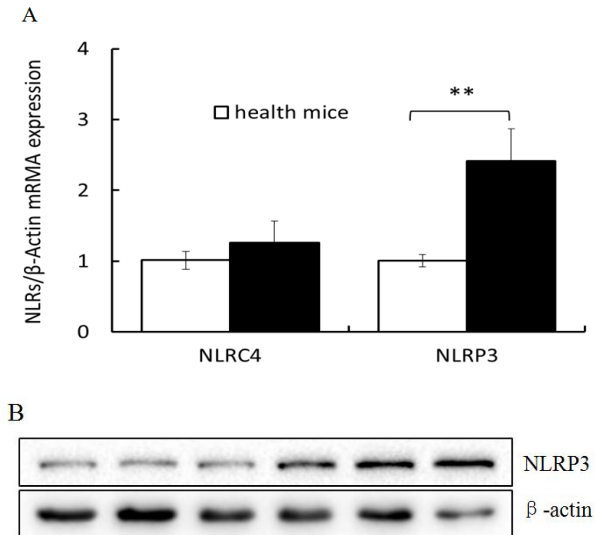


图 5 感染小鼠 NLRC 和 NLRP3 表达水平的变化

A. 小鼠肺部 NLRC 和 NLRP3/β-Actin mRNA 的表达水平 (\*\*表示  $P < 0.01$  与正常小鼠有显著性差异), B. 小鼠肺部 NLRP3 表达水平的 western blot 的检测结果。

## 4 讨论

猪胸膜肺炎是由 App 感染引起的一种严重猪传染性疾病。本研究发现, 小鼠经鼻接种 App 48 h 后出现呼吸困难和厌食症。剖检发现小鼠有急性出血性肺炎; 组织病理学检查发现, 肺部组织有出血、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润。感染小鼠肺组织中 IL-8、IL-10、INF-α、TNF-α、IL-1β、IL-6 表达明显升高, 与前人的研究结果一致[10, 11]。研究表明, TNF-α、IL-1 水平与急性疾病的严重程度呈正相关[9]。本研究发现, IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10 可直接或间接诱导 App 感染小鼠的炎症反应。这些结果支持 App 可引起 App 鼻内感染小鼠胸膜肺炎的假设。

研究表明, I 型干扰素 (IFN-α 和 IFN-β) 是先天性免疫和获得性免疫应答反应的主要贡献者。IFN-α 主要来源于白细胞和浆细胞样树突状细胞 (DC), IFN-β

主要来源于成纤维细胞和上皮细胞。IFN-α 和 IFN-β 信号通过共同受体 IFNAR 发挥作用。细胞因子与该受体结合导致 JAK-STAT 信号通路的激活, 从而导致 I 型 IFNs 的表达和抗病毒和抗菌作用的产生[3, 15]。研究表明, IFN-α 和 IFN-β 对对不同的病原体, 其抵抗作用不同[16, 17]。抗病毒如 HBV, IFN-α 比 IFN-β 更有效。IFN-α 可使肝脏干扰素刺激基因 (ISGs) 以及促炎细胞因子白细胞介素 6 (IL-6) 表达水平升高, 而 IFN-β 处理小鼠, 其肝脏中抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF-β 的表达水平增高[3-5, 16]。本研究我们首先检测到小鼠 App 感染后 INF-α 的显著升高, 而 INF-β 的表达无明显差异。至于这个表达差异的原因以及 INF-α 在 App 感染中的作用, 有待进一步研究。

IRFs 是调节 I 型 IFNs 和 IFNs 诱导基因表达的转录因子, 与抗病毒等病原体感染的天然免疫调节、细胞分化、凋亡以及抑制肿瘤发生有关[18, 19]。小鼠的 IRF 有 9 个家族成员: IRF-1、IRF-2、IRF-3、IRF-4、IRF-5、IRF-6、IRF-7、IRF-8 和 IRF-9。IRF-1、IRF-3、IRF-5 和 IRF-7 对 I 型 IFN 基因有正反馈调节作用。IRF-3、IRF-5 和 IRF-7 是病毒感染中信号转导的直接引导者, 在诱导 I 型 IFN 基因以及趋化因子基因的表达中起重要作用[18]。IFN-γ 可诱导 IRF-1 表达[14, 19]。有证据显示, IFN-γ 在猪感染肺组织中表达增加[11]。因此, 我们推断, App 感染后 IRF-1 表达的增加是由于 IFN-γ 表达增加所致。Puthia 等[20]发现, 大肠杆菌感染中先天免疫的自限作用依赖于 IRF-3 和 IRF-7 之间的紧密平衡, 它们在小鼠尿路致病性大肠杆菌感染中对细胞因子表达起相互拮抗的调节作用。IRF-7 驱动炎症反应并通过自我限制抑制小鼠对大肠杆菌感染的保护作用[20]。IRF-4 下调而 IRF-5 则上调 TLR 依赖的促炎因子如 TNF-α 和 IL-6[21]的表达[20]。本研究结果显示, App 感染引起的小鼠胸膜肺炎, IRF-1、IRF-5、IRF-7 的表达显著升高, 而 IRF-3、IRF-4 表达显著降低。因此, 我们认为 IRF-1、3、4、5、7 参与了 App 感染的发病过程。在 App 感染过程中, IRF-7 和 IRF-5 的表达通过自我限制降低小鼠的炎症反应, 而 IRF-3、IRF-4 及 IRF-5 对小鼠 App 感染后的炎症反应起促进作用。

机体对病原体的识别是启动先天免疫反应 (如炎症) 的一个重要因素。机体的 PRRs 识别病原体的 PAMPs 后, 启动一系列信号传导过程, 诱导清除病原体所需的防御反应。PRR 信号同时可诱导树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 成熟, 树突状细胞是诱导宿主第二道防线的免疫保护作用即适应性免疫反应的重要

细胞。TLRs 是最早发现的 PRRs, 它们可识别细菌产物 PAMPs, 如脂蛋白 (TLR-1、TLR-2 和 TLR-6 识别)、LPS (TLR-4 识别) 和鞭毛蛋白 (TLR-5 识别)。这些 TLR 在识别各自的 PAMPs 后, 招募特定的适配器分子如 MyD88 和 TRIF, 启动下游信号传导事件, 导致炎症细胞因子、I 型 IFN、趋化因子和抗菌肽的表达和分泌, 进而引起中性粒细胞的招募、巨噬细胞的激活和 PRRs 刺激基因的诱导表达, 从而直接清除病原体。同时, TLR 信号可刺激 DCs 成熟, 有助于诱导适应性免疫应答[15, 22-25]。本研究检测到 TLR-2、4 表达增加, 这意味着 TLR-2、4 可能参与 App 感染的发病机制。

越来越多的证据表明, TLR 信号对 NLR 信号起负调控作用[26, 27]。NLRs 由细胞内受体家族组成, 该家族包含 5 个结构不同的亚家族: NLRA、NLRB、NLRC、NLRP 和 NLRX。其中, NLRPs 包括 NLRP1、NLRP3、NLRP4、NLRP6、NLRP7、NLRP12 等, 有参与炎性小体形成的作用。NLRPs 可感知胞内细菌产物对多种刺激作出反应, 形成 NLRP-炎性小体[26, 27]。一些 NLRs 家族成员, 如 NLRP-3, 可识别一些特殊的微生物成分和危险因子, 在激活炎症小体的功能中发挥核心作用[28]。NLRP-3 炎症小体对维持体内平衡对抗病原感染中非常重要[28]。在本研究中, 我们发现 App 感染小鼠肺部 NLRP-3 表达增加。因此, 我们推测 NLRP-3 炎性小体可能参与了 App 感染小鼠的炎症反应, 这可能是 App 分泌的 Apx 等毒素引起的。

研究表明, TLR 和 IFN 信号通路之间有关联作用[29]。报道指出, TLR 可通过促进 IRF 家族诱导 I 型 IFN (IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ ) 的表达, 如 TLR-3 和 TLR-4 通过激活 IRF-3 诱导 IFN- $\beta$ , TLR-9 通过 IRF-7 诱导 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ [29]。此外, NLRs 和 TLRs 之间在功能上存在协同作用。两个受体都可激活 IRFs 信号通路[13]。我们的结果显示 App 感染小鼠肺部 IFN- $\alpha$ 、TLR-2、TLR-4、IRF-1、IRF-5、IRF-7 和 NLRP-3 的表达显著升高, 而 IRF-3、IRF-4 的表达降低。据此我们推测, 在 App 引起小鼠胸膜肺炎中, TLR/NLRs 信号通路可能协同影响 IRFs 的表达, 进而调节细胞因子表达变化, 成为肺部炎症发生的因素。

## 5 结论

本研究表明, 小鼠经滴鼻感染 App 而引起的胸膜肺炎, 其肺组织的白细胞介素-8 (IL-8)、IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-6、干扰素- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) 等炎症因子显著增高, 同时 toll

样受体-2 (TLR-2)、TLR-4、干扰素调节因子-1 (IRF-1)、IRF-5、IRF-7、NLRP-3 表达显著升高, 而 IRF-3、IRF-4 表达显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。因此, 我们推断 TLR/NLRs 信号通路可能协同影响 App 诱导的小鼠胸膜肺炎模型中的 IRFs 基因的表达, 进而调节细胞因子表达变化, 成为肺部炎症发生的因素。

## 参考文献

- [1] Högbom M, Ihalin R. Functional and structural characteristics of bacterial proteins that bind host cytokines. *Virulence*. 2017, 8 (8): 1592-1601.
- [2] Imanishi J. Expression of cytokines in bacterial and viral infections and their biochemical aspects [J]. *J Biochem*. 2000, 127 (4): 525-530.
- [3] Shaabani N, Vartabedian VF, Nguyen N, et al. IFN- $\beta$ , but not IFN- $\alpha$ , is responsible for the pro-Bacterial Effect of Type I interferon. *Cell Physiol Biochem*. 2021, 55 (3): 256-264.
- [4] Paludan SR. Innate antiviral defenses independent of inducible IFN $\alpha$ / $\beta$  production [J]. *Trends Immunol*. 2016, 37 (9): 588-596.
- [5] McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, et al. Type I interferons in infectious disease [J]. *Nat Rev Immunol*. 2015, 15 (2): 87-103.
- [6] Bajpai A, Prasad KN, Mishra P, et al. Distinct cytokine pattern in response to different bacterial pathogens in human brain abscess [J]. *J Neuroimmunol*. 2014, 273 (1-2): 96-102.
- [7] Wang X, Gu W, Qiu H, et al. Comparison of the cytokine immune response to pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 1B/O:8 and 2/O:9 in susceptible BALB/C and resistant C57BL/6 mice [J]. *Mol Immunol*. 2013, 55 (3-4): 365-371.
- [8] Islam D, Lombardini E, Ruamsap N, et al. Controlling the cytokine storm in severe bacterial diarrhoea with an oral Toll-like receptor 4 antagonist [J]. *Immunology*. 2016, 147 (2): 178-189.
- [9] 张宇航, 黄复深. 猪传染性胸膜肺炎研究进展. 黑龙江畜牧兽医. 2019, (13): 45-48.
- [10] Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection [J]. *Microbes Infect*. 2002, 4 (2): 225-235.
- [11] Zuo Z, Cui H, Li M, et al. Transcriptional profiling of swine lung tissue after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Int J Mol Sci*. 2013, 14 (5): 10626-10660.

- [12] 胡佩佩, 黄复深, 牛俊超, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌感染小鼠所致炎症中 TLR-4 信号通路涉及细胞焦亡 [J]. 微生物学报, 2015, 55 (05): 650-656.
- [13] Oviedo-Boyso J, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. Collaborative action of Toll-like and NOD-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria [J]. *Mediators Inflamm*. 2014, 2014: 432785.
- [14] Zhao J, Chen C, Xiao JR, et al. An Up-regulation of IRF-1 after a spinal cord injury: implications for neuronal apoptosis [J]. *J Mol Neurosci*. 2015, 57 (4): 595-604.
- [15] Monroe KM, McWhirter SM, Vance RE. Induction of type I interferons by bacteria [J]. *Cell Microbiol*. 2010, 12 (7): 881-890.
- [16] Zhou Y, Li S, Tang Z, et al. Different antiviral effects of IFN $\alpha$  and IFN $\beta$  in an HBV mouse model [J]. *Immunobiology*. 2017, 222 (3): 562-570.
- [17] Sheehan KC, Lazear HM, Diamond MS, et al. Selective blockade of interferon- $\alpha$  and - $\beta$  reveals their non-Redundant functions in a mouse model of West Nile Virus infection [J]. *PLoS One*. 2015, 10 (5): e0128636.
- [18] Chen W, Royer WE Jr. Structural insights into interferon regulatory factor activation [J]. *Cell Signal*. 2010, 22 (6): 883-887.
- [19] Dou L, Liang HF, Geller DA, et al. The regulation role of interferon regulatory factor-1 gene and clinical relevance [J]. *Hum Immunol*. 2014, 75 (11): 1110-1114.
- [20] Puthia M, Ambite I, Cafaro C, et al. IRF7 inhibition prevents destructive innate immunity-A target for nonantibiotic therapy of bacterial infections [J]. *Sci Transl Med*. 2016, 8 (336): 336ra59.
- [21] Savitsky D, Tamura T, Yanai H, et al. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family [J]. *Cancer Immunol Immunother*. 2010, 59 (4): 489-510.
- [22] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*. 2011, 34 (5): 637-650.
- [23] Coveney AP, Wang W, Kelly J, et al. Myeloid-related protein 8 induces self-tolerance and cross-tolerance to bacterial infection via TLR4- and TLR2-mediated signal pathways [J]. *Sci Rep*. 2015, 5:13694.
- [24] Ramstead AG, Robison A, Blackwell A, et al. Roles of Toll-Like receptor 2 (TLR2), TLR4, and MyD88 during pulmonary coxiella burnetii infection. *Infect Immun* [J]. 2016, 84 (4): 940-949.
- [25] Koch KN, Müller A. Helicobacter pylori activates the TLR2/NLRP3/caspase-1/IL-18 axis to induce regulatory T-cells, establish persistent infection and promote tolerance to allergens [J]. *Gut Microbes*. 2015, 6 (6): 382-387.
- [26] Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release [J]. *J Immunol*. 2005, 174 (10): 6518-6523.
- [27] Guzelj S, Jakopin Ž. Nucleotide-Binding oligomerization domain 1/Toll-Like Receptor 4 co-Engagement promotes non-specific immune response against K562 cancer cells. *Front Pharmacol*. 2022, 13: 920928.
- [28] Kim JJ, Jo EK. NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection [J]. *J Korean Med Sci*. 2013, 28 (10): 1415-1423.
- [29] Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own [J]. *Eur J Immunol*. 2007, 37 (2): 306-309.

## 作者简介

### 黄复深

1964 年生, 教授, 博士, 主要从事病原生物学研究.

E-mail: 15211071993@163.com