

# 猪肺炎支原体感染诱导的固有免疫应答研究进展

赖加翠, 何佳蔚, 丁红雷\*

西南大学动物医学院 动物支原体学实验室, 重庆 400715

赖加翠, 何佳蔚, 丁红雷. 猪肺炎支原体感染诱导的固有免疫应答研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4773-4783.

LAI Jiacui, HE Jiawei, DING Honglei. Advances in innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4773-4783.

**摘要:** 猪肺炎支原体是引起猪支原体肺炎的病原。由于缺乏成熟的猪肺炎支原体感染动物模型, 使得猪肺炎支原体相关的抗感染免疫研究进展较为缓慢。本文从猪肺炎支原体感染后的炎症反应、固有免疫系统对猪肺炎支原体的识别、固有免疫细胞的作用、补体系统、抗菌肽、自噬以及细胞凋亡 7 个方面进行综述, 旨在阐明固有免疫系统各组分在猪肺炎支原体感染中发挥的作用的研究进展, 并对今后猪肺炎支原体感染的固有免疫应答研究的重点方向进行展望。

**关键词:** 猪肺炎支原体; 固有免疫应答; 炎症反应

## Advances in innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* infection

LAI Jiacui, HE Jiawei, DING Honglei\*

Laboratory of Veterinary Mycoplasmology, College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** *Mycoplasma hyopneumoniae* is the pathogen causing swine mycoplasmal pneumonia. The lack of well-established animal models of *M. hyopneumoniae* infection has delayed the progress of *M. hyopneumoniae*-related anti-infection immunity studies. This paper reviews the inflammatory response, the recognition of *M. hyopneumoniae* by the innate immune system, and the role of innate immune cells, complement system, antimicrobial peptides, autophagy, and apoptosis in *M. hyopneumoniae* infection. The aim was to elucidate the important roles played by the components of the innate immune system in the control of *M. hyopneumoniae* infection,

资助项目: 国家自然科学基金(32172870); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金(SKLV2021KF003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172870) and the Opening Foundation of State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology (SKLV2021KF003).

\*Corresponding author. E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

Received: 2023-07-13; Accepted: 2023-09-20; Published online: 2023-10-12

and prospect key research directions of innate immune response of *M. hyopneumoniae* infection in the future.

**Keywords:** *Mycoplasma hyopneumoniae*; innate immune response; inflammation

猪支原体肺炎(swine mycoplasmal pneumonia), 又称猪气喘病, 是一种由猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)感染引起的猪的慢性消耗性呼吸系统传染病。猪支原体肺炎常诱发持续的炎症反应和免疫抑制, 导致仔猪生长迟缓、饲料转化效率低下、出栏时间延长; 且常因继发感染其他病原造成猪的死亡率升高, 给全球养猪业造成重大经济损失<sup>[1]</sup>。疫苗接种(灭活/减毒活疫苗)是控制该病的主要方法, 但由于商品化疫苗不能阻断病原对猪的感染, 猪肺炎支原体在猪场中仍广泛存在<sup>[2]</sup>。目前, 对猪肺炎支原体致病机制的认识仍是管中窥豹, 对猪肺炎支原体感染引起的免疫应答尚有许多不明之处, 但近年来也有诸多进展。本文就抗猪肺炎支原体感染诱导的固有免疫应答研究进展进行综述, 分析固有免疫系统在抵御猪肺炎支原体感染方面发挥的作用, 并对今后猪肺炎支原体感染诱导的固有免疫应答研究的重点方向进行展望。

## 1 固有免疫应答概述

在病原微生物感染早期, 固有免疫是机体免疫防御的第一道防线, 是在固有免疫各因素(屏障结构、固有免疫细胞和固有免疫分子等)共同参与下完成的, 起到杀灭、清除病原、诱导炎症反应, 以及启动适应性免疫应答的作用<sup>[3]</sup>。对于像猪肺炎支原体这类定殖在呼吸道上皮细胞的病原, 相关的免疫应答始于呼吸道黏膜表面, 包括黏液的物理保护, 局部生成调理性素、抗菌肽, 以及纤毛的清除作用, 还可能伴随多反应性免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)

的分泌<sup>[4]</sup>。固有免疫细胞是固有免疫应答的主要成分。当病原微生物侵入机体后, 由固有免疫细胞形成一个复杂的网络对猪肺炎支原体进行识别、结合, 激活免疫细胞发挥相应的生物学效应, 最终杀伤、清除侵入的病原, 并介导多种促炎性细胞因子、趋化因子和促炎介质的释放, 诱导机体的炎症反应。而炎症反应同样作为固有免疫应答过程的一部分, 能够增强机体的抗感染能力, 在控制细菌感染、促进对病原体的清除以及诱导适应性免疫应答方面都发挥重要作用。除此之外, 多种固有免疫分子也参与抗感染固有免疫应答, 如细胞因子发挥促进炎症反应作用、激活的补体发挥其对病原体的溶解和损伤作用、抗菌肽的抗菌作用等, 是固有免疫系统重要的效应分子。

## 2 猪肺炎支原体感染后的炎症反应

猪肺炎支原体在宿主下呼吸道定殖引起机体的抗感染免疫, 而过度激活的局部免疫应答将导致病理性的炎症反应。虽然目前猪肺炎支原体感染机体诱导的免疫反应和疾病相关炎症反应的发生机制尚不完全清楚, 但在免疫病理学上, 猪肺炎支原体感染通常表现为: 细支气管周围和血管周围有单核巨噬细胞和淋巴细胞浸润, 慢性感染可见支气管相关淋巴组织(bronchus-associated lymphoid tissue, BALT)显著增生。研究证实, 在感染猪肺炎支原体的猪 BALT、肺泡隔膜和支气管肺泡渗出物等部位, 白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2)、IL-4、IL-8、IL-10 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ,

TNF- $\alpha$ )等分泌增多<sup>[5]</sup>。此外,促炎性细胞因子如 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、TNF- $\alpha$  的基因表达与感染过程中肺组织病变评分表现出相关性<sup>[6]</sup>,说明这些细胞因子在猪肺部病变的形成和扩散中起到关键作用。用猪肺炎支原体脂质相关膜蛋白(lipid-associated membrane proteins, LAMPs)处理猪外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),培养细胞的上清液中细胞因子 IL-6、IL-1 $\beta$  表达上调<sup>[7]</sup>。此外,猪肺炎支原体能刺激猪骨髓来源树突状细胞(bone-marrow derived dendritic cells, BMDCs)产生多种促炎性细胞因子,如 IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 和 TNF- $\alpha$ <sup>[8]</sup>。

猪肺炎支原体能够刺激小鼠肺泡巨噬细胞系 MH-S 以剂量依赖性方式产生 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ;核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)通路和 3 种独立的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传导途径参与上述细胞因子产生的调控过程<sup>[9]</sup>。猪肺炎支原体感染猪肺泡巨噬细胞系 3D4/21 后,分子伴侣热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90)/Sec22 同源物 b (Sec22 homolog b, Sec22b)通过调节自噬载体促进成熟 IL-1 $\beta$  (mature IL-1 $\beta$ , m-IL-1 $\beta$ )的分泌<sup>[10]</sup>,该研究揭示了一种自噬介导细胞因子分泌的机制。此外,猪肺炎支原体还可通过多种黏附蛋白与宿主的胞外基质成分(如纤溶酶原)相互作用<sup>[11]</sup>;纤溶酶原活化为纤溶酶后可以提高猪肺炎支原体的黏附效率,并作为炎性细胞的激活剂刺激细胞因子释放,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6<sup>[12]</sup>;这一反应过程也是猪肺炎支原体感染期间引起炎症反应的一部分<sup>[13]</sup>。

总之,猪肺炎支原体能够通过多种方式诱导多种炎性细胞因子的产生,促进炎症反应;虽然炎症反应在控制病原微生物感染中具有重

要作用,但猪肺炎支原体感染引起的炎症反应似乎更易引起宿主组织细胞的损伤和疾病的发生。由于支原体通常缺乏像毒素那样的经典毒力因子,猪肺炎支原体感染宿主产生高水平炎症因子可能是导致肺部病变的主要因素。

### 3 固有免疫系统对猪肺炎支原体的识别

模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)与病原微生物表面的病原相关模式分子(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)的相互识别是机体启动固有免疫应答、抵抗病原体侵袭的关键步骤。PRR 是主要在固有免疫细胞表面表达的识别分子,根据其蛋白质结构域同源性可分为 5 种:Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)、核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样受体(NOD-like receptors, NLRs)、C 型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLR)s、视黄酸诱导基因-I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)样受体(RIG-like receptors, RLRs)和胞质 DNA 传感器(cytosolic DNA sensors)<sup>[14]</sup>。其中,TLRs 和 NLRs 是机体抗感染的固有免疫信号通路中极为重要的两种受体。

早期研究发现,TLR2 和 TLR6 均在猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophages, PAMs)中表达,并且在猪肺炎支原体的感应和识别过程中发挥重要作用<sup>[15]</sup>;脂肽成纤维细胞刺激配体 1 (fibroblast-stimulating ligand 1, FSL-1)是一种来源于细菌的 TLR2/TLR6 激动剂<sup>[16]</sup>。在猪肺炎支原体感染初期(12 h),PAMs 中的 TLR6 转录水平升高,而 TLR2 转录水平下降;这可能是猪肺炎支原体过早刺激 TLR2,导致 TLR2 在 12 h 前到达高峰后迅速下降所致;研究者据此推测,猪肺炎支原体与 PAMs 共同孵育后,

依次刺激 TLR2 和 TLR6,经刺激的 TLR2/TLR6 将信号传递到 PAMs 的细胞浆和细胞核,引起其他相关基因和细胞因子表达量的变化<sup>[17]</sup>。猪肺炎支原体的 Mhp597 蛋白可以黏附在 PAMs 的细胞膜上并与 TLR4 结合,导致 TLR4 被激活,进而启动下游髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)/NF- $\kappa$ B 信号通路,上调促炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的表达<sup>[18]</sup>。猪肺炎支原体蛋白 P97 是一种新型 TLR5 激动剂,能够刺激 TLR5 以剂量依赖的方式活化并刺激 HEK-Blue<sup>TM</sup> mTLR5 细胞产生 IL-8,是一种激活固有免疫系统的潜在佐剂<sup>[19]</sup>。在小鼠肺树突状细胞和 B 细胞共培养模型中加入猪肺炎支原体细胞裂解物后,IgA 的分泌显著增加,同时 TLR2 和 TLR4 的表达上调,而 TLR2 和 TLR4 受抑制时,IgA 水平不受影响<sup>[20]</sup>,这说明,TLR 感应猪肺炎支原体不仅可以启动固有免疫信号通路,还可以调控 IgA 的产生,而 IgA 在黏膜免疫中有着重要作用。

猪肺炎支原体脂蛋白 Mhp390 与宿主 NOD1 之间可能存在相互作用,结合 Mhp390 可以刺激 PAMs 产生高水平促炎性细胞因子(如 TNF- $\alpha$  等),推测这与 NOD1 激活介导下游蛋白激酶和转录因子的活化有关<sup>[21-22]</sup>。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain-associated protein 3, NLRP3)的单核苷酸多态性与支原体肺炎指数相关;在猪肺炎支原体感染严重的猪场,NLRP3-2906G 基因型的个体肺部病变评分相对较低,NLRP3-2906G 是一种已知增强炎症反应的等位基因<sup>[23]</sup>,这说明 NLRP3 在猪肺炎支原体的抗感染免疫中也可能发挥着重要作用。

## 4 固有免疫细胞的作用

巨噬细胞是机体固有免疫系统的主要组成

细胞,借助其表面的 PRR、调理性受体和细胞因子受体,介导对病原体的吞噬杀伤作用以及自身的活化等生物学效应<sup>[3]</sup>。大量研究表明,巨噬细胞参与猪肺炎支原体感染期间的炎症反应和免疫应答。早在 2004 年就有研究团队发现,猪感染猪肺炎支原体后,体内的淋巴细胞和巨噬细胞被激活,导致多种促炎性和免疫调节细胞因子的增加,如 IL-1、IL-2、IL-4、TNF- $\alpha$  和 IL-6,进而导致肺部病变和淋巴网状增生<sup>[24]</sup>。猪肺炎支原体同样可以在体外刺激巨噬细胞,诱导其通过激活信号分子(如 NF- $\kappa$ B)介导促炎性细胞因子的产生<sup>[17-18,21]</sup>。小鼠模型中肺炎支原体感染的固有免疫应答反应主要依赖巨噬细胞,而中性粒细胞参与较少<sup>[25]</sup>。但 PAMs 在体外对猪肺炎支原体的摄取吞噬似乎受到限制,猪肺炎支原体甚至可以抵抗巨噬细胞的摄取,即使添加具有调理作用的特异性抗血清也不能改善这种吞噬抵制现象<sup>[26]</sup>。在发生猪支原体肺炎的猪肺泡腔内同时存在大量的中性粒细胞和肺泡巨噬细胞以及少量淋巴细胞,这些浸润的巨噬细胞主要为 M2 型巨噬细胞;此外,刺激 Th2 型细胞免疫的抗炎细胞因子 IL-10 水平上调,IL-10 抑制巨噬细胞活化,下调免疫应答反应<sup>[27]</sup>。M2 型巨噬细胞以及 IL-10 在猪肺泡腔的大量存在可以部分解释猪肺炎支原体为什么不容易被清除。

中性粒细胞是血液中的主要吞噬细胞,具有高度的移动性和吞噬能力,通过吞噬病原、清除细胞外细菌和触发炎性细胞因子产生发挥免疫保护作用<sup>[3]</sup>。结合前文阐述的猪肺炎支原体能够逃避巨噬细胞的摄取吞噬,推测在猪肺炎支原体感染期间,中性粒细胞或许比巨噬细胞起着更为关键的清除病原的作用。除了在发生猪支原体肺炎的猪支气管和细支气管上皮细胞表面以及管腔的黏液渗出物中检测到猪肺炎

支原体外,在支气管和细支气管腔以及肺泡腔中的中性粒细胞和少数巨噬细胞中也能检测到猪肺炎支原体<sup>[27]</sup>,这说明,猪肺炎支原体感染期间中性粒细胞可能发挥了主要的吞噬清除作用。此外,中性粒细胞和单核细胞都可以通过释放促炎性细胞因子,如IL-1和TNF- $\alpha$ ,参与炎症的早期阶段;感染猪肺炎支原体的猪表现出卡他性支气管间质性肺炎,其特征是单核细胞明显浸润,淋巴滤泡形成,淋巴细胞、浆细胞和中性粒细胞在肺泡腔和肺泡隔积聚<sup>[24]</sup>。

巨噬细胞/中性粒细胞外诱捕网(macrophage extracellular traps, METs/neutrophil extracellular traps, NETs)是一种以DNA为骨架,被抗菌肽、组蛋白和细胞特异性蛋白酶包裹形成的细胞外基质,捕获和杀灭各种微生物。有研究显示,NETs并不参与猪肺炎支原体的抗感染免疫应答,因为在猪肺炎支原体表面存在能够降解胞外核酸的多功能核酸酶Mhp597, Mhp597通过破坏NETs的完整性帮助猪肺炎支原体逃避中性粒细胞的吞噬和杀灭<sup>[18]</sup>。另一项研究发现,猪肺炎支原体可以利用核酸酶从METs中获取核苷酸,并将这些宿主核苷酸整合到自身DNA中,并且这些宿主核苷酸的利用率高于从培养基摄取游离核苷酸;这表明,NETs不仅无法发挥抗猪肺炎支原体感染的天然免疫防御功能,反过来还为猪肺炎支原体的增殖提供核苷酸原料<sup>[28]</sup>。

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是最强大的抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)之一,激活效应CD4<sup>+</sup>T细胞,将抗原交叉提呈给CD8<sup>+</sup>T细胞,并刺激B细胞产生抗体,从而将固有免疫和适应性免疫有机联系起来<sup>[3]</sup>。猪肺炎支原体能够刺激经典树突状细胞2(conventional dendritic cell 2, cDC2)产生肿瘤坏死因子,参与天然免疫应答<sup>[29]</sup>,也可以刺激猪血液中cDC1、cDC2

和浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)上调CD40、CD25的表达,进而刺激B细胞的增殖和IgM的产生。然而在长期感染猪肺炎支原体的猪鼻腔内,包括DC、CD3<sup>+</sup>T细胞和表达分泌型IgA的B细胞在内的免疫细胞数量显著下降;进一步研究发现,CD1a作为猪肺炎支原体的首要抗原提呈分子,在DCs上的表达显著下调,导致DCs的抗原提呈能力被明显抑制,而DCs的抗原提呈能力又直接影响随后的T细胞免疫应答<sup>[30]</sup>。

## 5 补体系统

猪肺炎支原体感染猪气管上皮细胞后,部分基因表达发生变化,在上调基因中有几个与免疫反应和炎症相关的基因,如C3补体、血清淀粉样蛋白A3(serum amyloid A3, SAA3)、趋化因子CXCL2(C-X-C motif chemokine ligand 2)和CC趋化因子配体20(CC chemokine ligand 20, CCL20),以及半乳糖凝集素2(galectin 2, LGALS2)和半乳糖凝集素8(galectin 8, LGALS8)基因<sup>[31]</sup>。其中补体作为固有免疫的重要组成部分,活化后参与宿主对病原微生物感染的防御、细胞碎片的处理以及炎症反应等过程。早期研究表明,支原体在激活补体旁路途径方面效率相对较低,并且可能无法通过攻膜复合物杀死支原体<sup>[32]</sup>。近期研究发现,补体因子H(complement factor H, CFH)可能在保护猪肺炎支原体免受补体杀伤方面具有关键作用,猪肺炎支原体可以通过几种表面蛋白如热不稳定延伸因子(elongation factor thermo unstable, EF-Tu)与CFH结合,避免补体系统激活;此外,EF-Tu结合CFH后还减少了猪肺炎支原体表面补体成分C3,抑制了进一步的补体活化,避免了补体系统对猪肺炎支原体的细胞毒作用<sup>[33]</sup>。

## 6 抗菌肽

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是一类具有抗菌活性的小分子可溶性多肽的总称,一般小于 10 kDa,包括组织蛋白酶抑制素(cathelicidin)和防御素(defensin)两大类,在哺乳动物固有免疫反应中有着不可或缺的作用,被认为是具有替代抗生素潜力的抗击病毒或细菌等病原微生物的小分子<sup>[34]</sup>。猪 $\beta$ 防御素 2 (porcine beta-defensin 2, PBD-2)是一种由猪上皮细胞高效表达的具有广谱杀菌特性的抗菌肽,尤其在抵抗呼吸道致病菌感染中具有重要作用<sup>[35]</sup>。猪肺炎支原体感染原代猪气管上皮细胞(primary porcine tracheal epithelial cells, PTECs)后,可导致未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)的 3 条信号通路中 PKR (protein kinase RNA)样内质网激酶-真核细胞起始因子 2 $\alpha$  (PKR-like ER kinase-eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , PERK-eIF2 $\alpha$ )的磷酸化被抑制,有活性的激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)表达水平降低,核酸内切酶肌醇需求酶 1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ )选择性剪切 X-框结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) mRNA 的 26 个核苷酸片段的能力下降,这抑制了 UPR 靶分子葡萄糖调节蛋白 78 (78 kDa glucose-regulated protein, GRP78)和 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)的转录蛋白表达,进而抑制了 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[36]</sup>。猪肺炎支原体对 NF- $\kappa$ B 信号传导的抑制降低了 PBD-2 的产生水平。而 PBD-2 可以抑制黏附素 P97 和 P116 的转录水平。因此,猪肺炎支原体通过影响 NF- $\kappa$ B 信号通路降低 PBD-2 的产生,促进 P97 和 P116 的表达、对宿主细胞的黏附和感染。该团队的最新研究发现,猪肺炎支原体膜蛋白 Mhp271 的 R1-2 区可以通过和宿主

UPR 调节因子 GRP78 的核苷酸结合结构域(nucleotide-binding domain, NBD)结合后降解 GRP78,抑制宿主的 UPR 反应,并通过 NF- $\kappa$ B 信号通路影响 PBD-2 的合成与分泌,最终促进猪肺炎支原体对宿主细胞的黏附和持续感染<sup>[37]</sup>。

## 7 自噬

猪肺炎支原体作为一种传统认为的胞外菌也能进入宿主细胞。2018 年有研究报道猪肺炎支原体能进入猪肾细胞系 PK-15 并持续存在<sup>[38]</sup>,随后有研究认为,猪肺炎支原体也能进入 PAMs<sup>[26]</sup>。猪肺炎支原体通过网格蛋白(clathrin)和小窝(caveolae)介导的内吞作用进入细胞内部<sup>[26,28]</sup>。笔者实验室发现,猪肺炎支原体不仅能进入 PAMs,还存在于猪 I 型和 II 型肺泡细胞<sup>[39]</sup>。自噬 (autophagy)是内质网膜或高尔基体膜形成自噬囊泡(phagophore),自噬囊泡将胞内的蛋白聚集物、受损的细胞器等包裹,形成双层膜结构的自噬体 (autophagosome),再与溶酶体融合形成自噬溶酶体 (autolysosome),利用溶酶体的水解酶降解所包裹物质的过程。作为一种天然免疫防御机制,自噬同样可以降解侵入细胞的病原微生物,在机体抗感染免疫方面有着重要作用。笔者实验室发现猪肺炎支原体进入 PK-15 细胞后显著增加了 PK-15 中自噬体数量及自噬标志蛋白(LC3-II、ATG5、ATG12-ATG5 和 beclin 1)表达, P97 蛋白与 LC3 形成共定位,说明猪肺炎支原体诱导了自噬;但自噬底物 p62 随感染时间延长而不断积累,说明自噬体与溶酶体不能融合形成完整的自噬流<sup>[40]</sup>。进一步研究发现,猪肺炎支原体在新鲜收集的 PAMs 和猪肺泡巨噬细胞系 3D4/21 中同样能诱导不完全自噬;这种不完全自噬过程是通过激活 MAPK/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和磷

脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)信号通路实现的<sup>[41]</sup>;猪肺炎支原体则利用不完全自噬在胞内存活并大量增殖<sup>[40-41]</sup>。而猪肺炎支原体如何与宿主相关蛋白互作阻断自噬体与溶酶体的融合的相关研究正在开展。总之,以上结果说明,猪肺炎支原体可以进入包括免疫细胞在内的宿主细胞内部以逃避宿主的免疫攻击,通过在宿主细胞内诱导不完全自噬实现在胞内存活和增殖。

## 8 细胞凋亡

细胞凋亡是程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)的方式之一,对于维持多细胞生物的体内平衡有重要意义。细胞凋亡作为一种先天性防御机制,通过清除感染细胞来限制病原体入侵,在许多抗感染免疫过程中发挥着关键作用<sup>[42]</sup>。由病原感染诱导细胞凋亡作为联合因素能够进一步引发机体的炎症反应<sup>[43]</sup>。Li 等通过测定猪肺炎支原体感染 PAMs 细胞后的差异基因表达谱,鉴定出 34 个参与细胞凋亡的基因,如半胱天冬酶 10 (caspase-10)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma 2, BCL2)相关蛋白 A1 和佛波醇-12-肉豆蔻酸-13-乙酸酯诱导蛋白 1 (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, PMAIP1)基因,以及 7 个参与细胞凋亡信号通路的基因<sup>[44]</sup>。源自猪肺炎支原体的 LAMP 能够通过促进 NO 和超氧阴离子的产生以及 caspase 的活化,以内源线粒体依赖途径在体外诱导猪肺泡巨噬细胞系 3D4/21 细胞和猪外周血单核细胞的凋亡<sup>[7,45]</sup>。除 LAMP 外,近年发现猪肺炎支原体表面脂蛋白 Mhp390 (P68)也是促进炎症发展以及诱导猪免疫细胞凋亡的介质,其通过活化 caspase-3 诱导炎症反应,进而

导致 PBMCs 中单核细胞、淋巴细胞和 PAMs 的凋亡<sup>[21]</sup>。然而,免疫细胞的过度凋亡将会导致机体的免疫抑制,削弱先天性免疫应答,并且增加再感染的概率<sup>[46]</sup>。

## 9 总结与展望

猪肺炎支原体感染通常伴随着机体强烈的炎症反应。炎症反应在控制病原微生物感染过程中具有重要作用,但猪肺炎支原体感染引起的炎症反应似乎更易引起宿主组织细胞的损伤和疾病的发生。TLR2/TLR6、TLR4、TLR5、NOD1 和 NLRP3 都能感应猪肺炎支原体并将信号传递给下游分子,引起其他相关基因和细胞因子表达量的变化。猪肺炎支原体感染期间单核细胞、中性粒细胞和树突状细胞都可以通过释放炎症细胞因子参与炎症的早期阶段,其中中性粒细胞可能发挥着主要吞噬作用。另一方面,猪肺炎支原体通过抑制补体活化逃避补体的杀伤作用。此外,猪肺炎支原体感染引起了机体的防御素免疫应答,但随着时间延长,防御素的分泌也逐渐被抑制。猪肺炎支原体进入宿主细胞后诱导不完全自噬,避免了溶酶体水解酶的消化降解,有利于猪肺炎支原体在胞内存活和增殖,更为其逃逸宿主的免疫攻击提供了庇护所。猪肺炎支原体感染诱导宿主免疫细胞凋亡,降低宿主的免疫反应,这或许在猪肺炎支原体的免疫逃避中起重要作用。总之,在猪肺炎支原体感染诱导机体抗感染免疫应答过程中,涉及多个固有免疫信号通路,包括 Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、细胞因子-细胞因子受体的相互作用、NF- $\kappa$ B 信号通路、MAPK 信号通路、自噬信号通路以及细胞凋亡信号途径等。猪肺炎支原体感染诱导的固有免疫应答如图 1 所示。



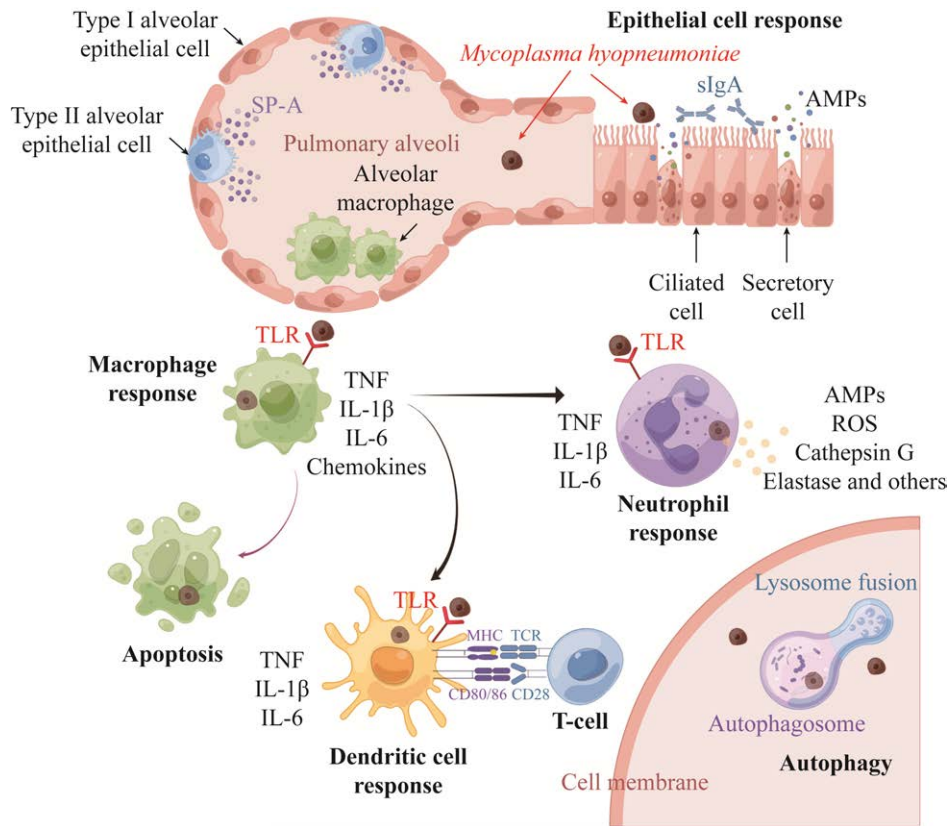


图 1 猪肺炎支原体感染诱导的固有免疫应答图示 本图用 Figdraw 2.0 软件绘制

Figure 1 Scheme of innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. This image was drawn by Figraw 2.0.

总体而言，尽管猪肺炎支原体诱导了机体强烈的炎症和免疫反应，但仍可在宿主体内持续感染数月，它对机体免疫应答的调节和逃逸是可以预见的，这也是猪肺炎支原体影响疾病进展的重要特征。但猪肺炎支原体诱导的免疫应答仍有许多未知，比如除了 TLR2/6，猪肺炎支原体是否识别其他 PRRs；部分经典固有免疫细胞如肥大细胞、滤泡 DC，固有淋巴样细胞 ILC1 亚群、ILC2 亚群、ILC3 亚群、自然杀伤细胞，以及固有淋巴细胞自然杀伤 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、B1 细胞等在猪肺炎支原体感染中的功能；固有免疫应答的作用时相和作用特点；猪肺炎支原体如何实现在肺泡巨噬细胞的增殖和逃逸等，均尚待阐明。在未来的研究中，应首

先重点关注猪肺炎支原体如何启动固有免疫应答以及如何逃逸固有免疫的杀灭；还应关注如何将猪肺炎支原体通过固有免疫细胞启动的以体液免疫为主的 Th2 型细胞免疫应答转变为以细胞免疫为主的 Th1 型细胞免疫应答，通过细胞免疫清除进入胞内的病原。

## REFERENCES

- [1] MAES D, SIBILA M, KUHNERT P, SEGALÉS J, HAESBROUCK F, PIETERS M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(suppl 1): 110-124.
- [2] TAO Y, SHU JH, CHEN J, WU YH, HE YL. A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*[J].



- Research in Veterinary Science, 2019, 123: 144-152.
- [3] KENNETH M, CASEY W, LESLIE B. Janeway's Immunobiology[M]. 10th ed. New York: W. W. Norton & Company, 2022: 3-7.
- [4] MAES D. Mycoplasmas in Swine[M]. Leuven Belgium: Acco Publishers, 2020: 111.
- [5] LORENZO H, QUESADA O, ASSUNÇÃO P, CASTRO A, RODRÍGUEZ F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 109(3/4): 199-207.
- [6] ALMEIDA HMS, MECHLER-DREIBI ML, SONÁLIO K, FERRAZ MES, STORINO GY, BARBOSA FO, MAES D, MONTASSIER HJ, de OLIVEIRA LG. Cytokine expression and *Mycoplasma hyopneumoniae* burden in the development of lung lesions in experimentally inoculated pigs[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 244: 108647.
- [7] BAI FF, NI B, LIU MJ, FENG ZX, XIONG QY, SHAO GQ. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 175(1): 58-67.
- [8] FOUROUR S, MAROIS-CRÉHAN C, MARTELET L, FABLET C, KEMPF I, GOTTSCHALK M, SEGURA M. Intra-species and inter-species differences in cytokine production by porcine antigen-presenting cells stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, and *M. flocculare*[J]. Pathogens, 2019, 8(1): 34.
- [9] DAMTE D, LEE SJ, HWANG MH, GEBRU E, CHOI MJ, LEE JS, CHENG H, PARK SC. Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines[J]. New Zealand Veterinary Journal, 2011, 59(4): 185-190.
- [10] ZHANG ZZ, WEI YN, LIU BB, WU YZ, WANG HY, XIE X, FENG ZX, SHAO GQ, XIONG QY. Hsp90/Sec22b promotes unconventional secretion of mature-IL-1 $\beta$  through an autophagosomal carrier in porcine alveolar macrophages during *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. Molecular Immunology, 2018, 101: 130-139.
- [11] SAADE G, DEBLANC C, BOUGON J, MAROIS-CRÉHAN C, FABLET C, AURAY G, BELLOC C, LEBLANC-MARIDOR M, GAGNON CA, ZHU JZ, GOTTSCHALK M, SUMMERFIELD A, SIMON G, BERTHO N, MEURENS F. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract[J]. Veterinary Research, 2020, 51(1): 80.
- [12] SYROVETS T, LUNOV O, SIMMET T. Plasmin as a proinflammatory cell activator[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2012, 92(3): 509-519.
- [13] WOOLLEY LK, FELL SA, DJORDJEVIC SP, EAMENS GJ, JENKINS C. Plasmin activity in the porcine airways is enhanced during experimental infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, is positively correlated with proinflammatory cytokine levels and is ameliorated by vaccination[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 164(1/2): 60-66.
- [14] LI DY, WU MH. Pattern recognition receptors in health and diseases[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6: 291.
- [15] MUNETA Y, UENISHI H, KIKUMA R, YOSHIHARA K, SHIMOJI Y, YAMAMOTO R, HAMASHIMA N, YOKOMIZO Y, MORI Y. Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2003, 23(10): 583-590.
- [16] ROSE WA, McGOWIN CL, PYLES RB. FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist, enhances resistance to experimental HSV-2 infection[J]. Virology Journal, 2009, 6(1): 1-11.
- [17] 王贵平, 李君佩, 罗广, 李晓云, 贾杏林. 猪肺炎支原体对猪肺泡巨噬细胞外源性抗原递呈加工功能相关因子 mRNA 表达量的影响[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(11): 2101-2107.
- WANG GP, LI JP, LUO G, LI XY, JIA XL. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* on mRNA expression of the some factors' related to presentation and processing of exogenous antigen in porcine alveolar macrophage[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2017, 37(11): 2101-2107 (in Chinese).
- [18] LI P, ZHANG YK, LI X, ZHOU WY, LI XN, JIANG F, WU WX. *Mycoplasma hyopneumoniae* Mhp597 is a cytotoxicity, inflammation and immunosuppression associated nuclease[J]. Veterinary Microbiology, 2019, 235: 53-62.
- [19] GAUTHIER L, BABYCH M, SEGURA M, BOURGAULT S, ARCHAMBAULT D. Identification of a novel TLR5 agonist derived from the P97 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Immunobiology, 2020, 225(4): 151962.
- [20] LI X, ZHANG YK, YIN B, LIANG JB, JIANG F, WU WX. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 mediate

- the IgA immune response induced by *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Infection and Immunity*, 2019, 88(1): e00697-e00619.
- [21] LIU W, ZHOU DN, YUAN FY, LIU ZW, DUAN ZY, YANG KL, GUO R, LI M, LI S, FANG LR, XIAO SB, TIAN YX. Surface proteins mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 126: 92-100.
- [22] LIU W, JIANG PC, YANG KL, SONG QQ, YUAN FY, LIU ZW, GAO T, ZHOU DN, GUO R, LI C, SUN P, TIAN YX. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection activates the NOD1 signaling pathway to modulate inflammation[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 927840.
- [23] SUZUKI K, SHINKAI H, YOSHIOKA G, MATSUMOTO T, TAKENOUCI T, TANAKA J, SHIMIZU M, KITAZAWA H, UENISHI H. Polymorphisms in pattern recognition receptor genes are associated with respiratory disease severity in pig farms[J]. *Animals*, 2022, 12(22): 3163.
- [24] RODRÍGUEZ F, RAMÍREZ GA, SARRADELL J, ANDRADA M, LORENZO H. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2004, 130(4): 306-312.
- [25] LAI JF, ZINDL CL, DUFFY LB, ATKINSON TP, JUNG YW, van ROOIJEN N, WAITES KB, KRAUSE DC, CHAPLIN DD. Critical role of macrophages and their activation via MyD88-NFκB signaling in lung innate immunity to *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14417.
- [26] DEENEY AS, MAGLENNON GA, CHAPAT L, CRUSSARD S, JOLIVET E, RYCROFT AN. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades phagocytic uptake by porcine alveolar macrophages *in vitro*[J]. *Veterinary Research*, 2019, 50(1): 1-15.
- [27] NUEANGPHUET P, SUWANRUENGSRM M, FUKU N, UEMURA R, HIRAI T, YAMAGUCHI R. Neutrophil and M2-polarized macrophage infiltration, expression of IL-8 and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia in swine[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2021, 189: 31-44.
- [28] HENTHORN CR, CHRIS MINION F, SAHIN O. Utilization of macrophage extracellular trap nucleotides by *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Microbiology (Reading)*, 2018, 164(11): 1394-1404.
- [29] TRUEEB BS, BRAUN RO, AURAY G, KUHNERT P, SUMMERFIELD A. Differential innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in various types of antigen presenting cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 240: 108541.
- [30] SHEN YM, HU WW, WEI YN, FENG ZX, YANG Q. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* on porcine nasal cavity dendritic cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 198: 1-8.
- [31] MUCHA SG, FERRARINI MG, MORAGA C, DI GENOVA A, GUYON L, TARDY F, ROME S, SAGOT MF, ZAHA A. *Mycoplasma hyopneumoniae* J elicits an antioxidant response and decreases the expression of ciliary genes in infected swine epithelial cells[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 13707.
- [32] HOWARD CJ. Variation in the susceptibility of bovine *Mycoplasmas* to killing by the alternative complement pathway in bovine serum[J]. *Immunology*, 1980, 41(3): 561-568.
- [33] YU YF, WANG J, HAN R, WANG L, ZHANG L, ZHANG AY, XIN JQ, LI SL, ZENG YH, SHAO GQ, FENG ZX, XIONG QY. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades complement activation by binding to factor H via elongation factor thermo unstable (EF-Tu)[J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 1059-1074.
- [34] AGEITOS JM, SÁNCHEZ-PÉREZ A, CALO-MATA P, VILLA TG. Antimicrobial peptides (amps): ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 133: 117-138.
- [35] YANG X, CHENG YT, TAN MF, ZHANG HW, LIU WQ, ZOU G, ZHANG LS, ZHANG CY, DENG SM, YU L, HU XY, LI L, ZHOU R. Overexpression of porcine beta-defensin 2 enhances resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(7): 2836-2843.
- [36] PAN Q, WANG XM, LIU T, YU Y, LI L, ZHOU R, LI GW, XIN JQ. *Mycoplasma hyopneumoniae* inhibits porcine beta-defensin 2 production by blocking the unfolded protein response to facilitate epithelial adhesion and infection[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(7): e00164-00120.
- [37] PAN Q, XU QY, LIU T, ZHANG YJ, XIN JQ. *Mycoplasma hyopneumoniae* membrane protein Mhp271 interacts with host UPR protein GRP78 to facilitate infection[J]. *Molecular Microbiology*, 2022, 118(3): 208-222.
- [38] RAYMOND BBA, TURNBULL L, JENKINS C,

- MADHKOOR R, SCHLEICHER I, UPHOFF CC, WHITCHURCH CB, ROHDE M, DJORDJEVIC SP. *Mycoplasma hyopneumoniae* resides intracellularly within porcine epithelial cells[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 17697.
- [39] 文玉康, 周冰倩, 陈政锬, 杨梅, 田亚琴, 丁红雷. 猪肺炎支原体 Mhp366-N 蛋白多克隆抗体的制备及应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2695-2703.  
WEN YK, ZHOU BQ, CHEN ZK, YANG M, TIAN YQ, DING HL. Preparation and application of polyclonal antibody against Mhp366-N protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2695-2703 (in Chinese).
- [40] WANG ZD, WEN YK, ZHOU BQ, TIAN YQ, NING YR, DING HL. Incomplete autophagy promotes the replication of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Journal of Microbiology, 2021, 59(8): 782-791.
- [41] WEN YK, CHEN ZK, TIAN YQ, YANG M, DONG QS, YANG YJ, DING HL. Incomplete autophagy promotes the proliferation of *Mycoplasma hyopneumoniae* through the JNK and Akt pathways in porcine alveolar macrophages[J]. Veterinary Research, 2022, 53(1): 62.
- [42] RUDIN CM, THOMPSON CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death[J]. Annual Review of Medicine, 1997, 48: 267-281.
- [43] TORCHINSKY MB, GARAUDE J, BLANDER JM. Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger[J]. Current Opinion in Immunology, 2010, 22(1): 55-62.
- [44] LI B, DU LP, SUN B, YU ZY, LIU MJ, FENG ZX, WEI YN, WANG HY, SHAO GQ, HE KW. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e101968.
- [45] BAI FF, NI B, LIU MJ, FENG ZX, XIONG QY, XIAO SB, SHAO GQ. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2013, 155(3): 155-161.
- [46] LEAL ZIMMER FMA, PAES JA, ZAHA A, FERREIRA HB. Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Virulence, 2020, 11(1): 1600-1622.

(本文责编 郝丽芳)