

研究报告

猪胸膜肺炎放线杆菌通过 Adh 诱导猪肺泡巨噬细胞氧化应激

尹小丽^{#1}, 文博^{#1}, 王瑞彪¹, 胡建和¹, 张鑫赫¹, 白跃宇², 丁轲^{1,3}, 朱春玲¹, 王艳辉⁴, 王磊^{*1}

1 河南科技学院 动物科技学院, 河南 新乡 453003

2 郑州大学 农学院, 河南 郑州 450001

3 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471023

4 南关区福祉街道办事处, 吉林 长春 130022

尹小丽, 文博, 王瑞彪, 胡建和, 张鑫赫, 白跃宇, 丁轲, 朱春玲, 王艳辉, 王磊. 猪胸膜肺炎放线杆菌通过 Adh 诱导猪肺泡巨噬细胞氧化应激[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 799-810.

YIN Xiaoli, WEN Bo, WANG Ruibiao, HU Jianhe, ZHANG Xinhe, BAI Yueyu, DING Ke, ZHU Chunling, WANG Yanhui, WANG Lei. *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces oxidative stress in porcine alveolar macrophages via Adh[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 799-810.

摘要: 【背景】猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)可导致严重的肺脏炎性损伤。细胞氧化应激与肺脏炎性损伤密切相关, 但是 APP 感染和细胞氧化应激之间的关系仍不清楚。【目的】明确 APP 感染和细胞氧化应激之间的关系并对其机制进行初步探索, 从而为进一步阐明 APP 致病机理奠定基础。【方法】APP 野生菌 5b (5b WT)和 Adh 基因缺失菌(5b Δ Adh)分别感染猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophage, PAM)后, 荧光显微镜观察细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, RT-qPCR 和 Western blotting 检测氧化应激相关分子的表达变化, 利用 NLRP3 炎性体抑制剂 MCC950 处理细胞, 分别感染 5b WT 和 5b Δ Adh 后, 生化反应法检测细胞内乳酸和丙酮酸含量, 流式细胞术检测细胞内 ROS 水平及线粒体膜电位变化情况; 采用 tandem mass tag (TMT)标记定量蛋白质组学测序分析细胞蛋白表达变化并检测线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)的释放情况。【结果】免疫荧光和流式细胞术检测结果均显示, 5b WT 组 ROS 水平明显高于 5b Δ Adh 组, 但经 MCC950 处理后可以逆转这一上升趋势; 生化指标检测结果表明, 相

资助项目: 国家自然科学基金(32172862); 国家重点研发计划 (2021YFD1301200); 河南省优秀青年科学基金(222300420043); 河南省高校科技创新团队(24IRTSTHN035); 河南省科技研发计划联合基金(225200810044)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172862), the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1301200), the Outstanding Youth Science Fund of Henan Province (222300420043), the Science and Technology Innovative Research Team in Higher Educational Institutions of Henan Province (24IRTSTHN035), and the Joint Fund of Science and Technology Research and Development Program in Henan Province (225200810044).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wlei_007@163.com

Received: 2024-08-30; Accepted: 2024-11-02; Published online: 2024-11-18

较于 5b Δ Adh 组, 5b WT 组的丙酮酸和乳酸的含量下降更显著, 而且经过 MCC950 抑制 NLRP3 活性后, 细菌感染组的丙酮酸和乳酸的含量均有显著回升, 与对照组无显著差异; 5b WT 和 5b Δ Adh 感染后, 猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophage, PAM)中氧化应激关键转录因子核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)和 GCLM 均呈现出下降的趋势; Western blotting 结果表明 5b WT 和 5b Δ Adh 组烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 (nicotinamide adenine dinucleotide oxidase 2, NOX2)含量增高, 并且 5b WT 组含量升高更明显; 蛋白质组学分析表明共有 15 个蛋白的表达出现显著变化, GO 分析发现这些差异蛋白主要参与 ATP 代谢、嘌呤代谢、炎症等重要生物学过程, KEGG 分析发现这些蛋白与炎症调节、能量转运和氧化磷酸化等相关的信号通路密切相关; 重要的是 5b WT 和 5b Δ Adh 感染 PAM 后, 线粒体受损细胞比例分别为 69.6%和 58.5%, 均高于对照组, mtDNA 也大量释放到细胞质中。【结论】APP 可以通过 Adh 引起 PAM 氧化应激, 并且 NLRP3 炎性体活化参与细胞氧化应激的形成。

关键词: 猪胸膜肺炎放线杆菌; 猪肺泡巨噬细胞; Adh; 活性氧; 线粒体损伤

Actinobacillus pleuropneumoniae induces oxidative stress in porcine alveolar macrophages via Adh

YIN Xiaoli^{#1}, WEN Bo^{#1}, WANG Ruibiao¹, HU Jianhe¹, ZHANG Xinhe¹, BAI Yueyu², DING Ke^{1,3}, ZHU Chunling¹, WANG Yanhui⁴, WANG Lei^{*1}

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China

2 School of Agricultural Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China

3 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

4 Nangan District Fufu Sub-district Office, Changchun 130022, Jilin, China

Abstract: [Background] *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) causes severe inflammatory damage to the lungs. Cellular oxidative stress is closely linked to lung inflammatory damage, while the relationship between APP infection and cellular oxidative stress remains unclear. **[Objective]** To clarify the relationship between APP infection and cellular oxidative stress and explore its mechanism, thereby laying a foundation for elucidating the pathogenic mechanism of APP. **[Methods]** After infecting porcine alveolar macrophages (PAMs) with APP wild-type strain 5b (5b WT) and Adh-deleted strain (5b Δ Adh), respectively, we observed the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) using fluorescence microscopy, and determined the expression of oxidative stress-related molecules by RT-qPCR and Western blotting. Cells were treated with the NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 and then infected with 5b WT and 5b Δ Adh, respectively. Biochemical methods were employed to measure the intracellular lactate and pyruvate levels. Flow cytometry was employed to determine the ROS levels and changes in mitochondrial membrane potential. Additionally, TMT-labeled quantitative proteomics sequencing was conducted to analyze changes in cellular protein expression and detect the release of mitochondrial DNA (mtDNA). **[Results]** Results from immunofluorescence and flow cytometry indicated that the 5b WT group had higher levels of ROS than the 5b Δ Adh group,

and this trend was reversed following MCC950 treatment. Biochemical analysis further revealed that the 5b WT group had significantly lower levels of pyruvate and lactate, which elevated again after NLRP3 was inhibited with MCC950. Additionally, the PAMs infected by 5b WT and 5b Δ Adh showcased notable declined levels of Nrf2 and *GCLM* and up-regulated expression of NOX2, with a more pronounced up-regulation observed in the 5b WT group. Proteomics analysis indicated significant changes in the expression of 15 proteins. GO analysis revealed that these differentially expressed proteins were mainly involved in key biological processes such as ATP metabolism, purine metabolism, and inflammation. KEGG analysis predicted that these proteins were involved in inflammation regulation, energy transport, and oxidative phosphorylation. Notably, 5b WT and 5b Δ Adh infections increased the proportions of PAMs with mitochondrial damage to 69.6% and 58.5%, respectively, with mtDNA release into the cytoplasm. **[Conclusion]** APP induced oxidative stress in PAMs *via* Adh, and the activation of NLRP3 inflammasome participated in the generation of cellular oxidative stress.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; porcine alveolar macrophage; Adh; reactive oxygen species; mitochondrial damage

猪胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 是一种革兰氏阴性菌、兼性厌氧、杆状细菌, 是猪胸膜肺炎的病原体^[1]。APP 感染可致使肺脏严重的不可逆损伤, 其引起的呼吸系统传染病一直是困扰我国养猪业的重要细菌性传染病之一。猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophage, PAM) 是 APP 感染过程中最早且主要的靶细胞。黏附是 APP 感染 PAM 的首要步骤, 其中三聚体自转运黏附素 (trimeric autotransporter adhesions, TAA) 在促进 APP 早期感染过程中发挥重要作用。我们前期研究发现 APP TAA 头部 124–612 aa 区域是其感染 PAM 的关键区域, 并将该结构区域命名为 Adh^[2]。

氧化应激是指细胞内氧化物质过多或者抗氧化物质过少, 倾向于氧化, 即细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮产生过多^[3]。ROS 的累积是细胞氧化应激的重要体现。研究表明, GAT107 通过减少巨噬细胞氧化应激, 从而减轻呼吸机相关肺炎小鼠模型中的炎症性肺损伤和死亡率^[4]。Carr 等^[5]发现社区获得性肺炎患者表现出维生素 C 耗尽和氧化应激升高状

态。Kuвано 等^[6]发现氧化应激可导致特发性间质性肺炎中的上皮细胞损伤, 其中线粒体质量的增加可能导致更多的 ROS 生成。但是 APP 感染和肺泡巨噬细胞氧化应激之间的关系仍不清楚。

APP 诱导可通过诱导 NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) 炎性体活化导致细胞焦亡^[7]。重要的是, 有研究报道细胞焦亡过程中产生效应分子打孔蛋白 Gasdermin D (GSDMD) 可定位至线粒体导致线粒体损伤, 从而加剧细胞氧化应激^[8]。因此, 本研究将探讨 APP 及 Adh 对 PAM 产生氧化应激的影响以及 NLRP3 炎性体抑制剂 MCC950 处理细胞后对氧化应激的作用, 以期为后续深入研究 APP 感染机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品

5b WT 由本实验室保存, 5b Δ Adh 由本实验室构建并保存。PAM 细胞系 (CRL2845) 由哈尔滨兽医研究所谢芳研究员惠赠。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基, BD公司; RPMI-1640 培养基, 翌圣生物科技股份有限公司。SYBR Green 荧光定量 PCR 检测试剂盒, 翌圣生物科技股份有限公司; cDNA 合成试剂盒, 湖南爱科瑞生物工程有限公司; JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒、活性氧检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 丙酮酸和乳酸含量检测试剂盒、细胞线粒体分离试剂盒及 BCA 总蛋白定量试剂盒, 碧云天生物有限公司; NLRP3 特异性抑制剂 MCC950, 爱必信生物科技股份有限公司; DNeasy 血液和组织试剂盒, Qiagen 公司; Goat Anti-Rabbit IgG/HRP, 笛医生物科技股份有限公司; 荧光显微镜, Leica 公司; AKTA Purifier 100 纯化仪(用于 SCX 色谱), GE Healthcare 公司; Rabbit Anti-NOX2、TMT 标记试剂盒、Q Exactive HF-X 质谱仪、荧光定量 PCR 仪、金属浴和酶标仪, Thermo 公司; 全自动化学发光图像分析系统、流式分析仪和分光光度计, Beckman 公司。

1.3 细菌培养条件

5b WT 和 5b Δ Adh 菌株在 -80°C 冷冻保藏。菌株于 BHI 培养基(含 5%的营养液)中 37°C 、180 r/min 振荡培养过夜, 随后取 10 μL 菌液加到 5 mL BHI 培养基(含 5%的营养液), 37°C 振荡培养直至对数生长期($OD_{600}=0.6$)。吸取 100 μL 菌液 6 000 r/min 离心 2 min, 弃掉上清并用 PBS 洗涤 3 次, 最后加入 1 mL RPMI-1640 培养基将其重悬备用。

1.4 细胞培养条件及处理

PAM 保存在 RPMI-1640 完全培养基中(含有 10%胎牛血清和 100 U/mL 的青霉素和链霉素), 细胞在 37°C 、5% CO_2 的培养箱内孵育。当细胞密度达到 80%–90%时, PBS 清洗 3 次, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 铺板于 6 孔细胞培养板待用。

观察细胞达到 70%密度后, 加入 MCC950, 1 h 后加入 5b Δ Adh 和 5b WT, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 或 0.4 mmol/L ATP 作为阳性对照, 作用 12 h 之后用 PBS 洗涤细胞 3 次备用。

1.5 Tandem mass tag (TMT)标记定量蛋白质组学分析

从细胞中提取蛋白后, 通过 BCA 对其浓度进行测定。用胰蛋白酶将蛋白进行酶解以形成肽段, 再使用 TMT 试剂标记肽段, 并将不同样本中标记的肽段混合到一起。利用 SCX 色谱对混合的肽段进行分级。然后使用质谱仪进行肽段的质谱分析, 并通过数据分析软件处理下机数据, 从而鉴定肽段和蛋白质以进行定量分析。最后通过 GO、KEGG 等生物信息学分析方式分析蛋白质的表达差异、生物学功能注释、通路及网络分析等。

1.6 活性氧的测定

细胞经细菌和 MCC950 处理约 10 h 后加入活性氧检测试剂盒中, Rosup 作为阳性对照, 放入培养箱中继续孵育, 1.5 h 之后, 弃掉细胞培养液, 加入 1 mL 稀释 1:1 000 的活性氧探针, 于细胞培养箱内孵育 30 min (注意避光)。弃上清后用 PBS 洗涤细胞 3 次, 在荧光显微镜下观察。

1.7 RT-qPCR

细胞经处理后通过 Trizol 法提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA。按 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书进行 PCR, 反应体系: $2\times\text{qPCR SYBR Green Master Mix}$ 10 μL , 各引物(0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.4 μL , 待测样品 cDNA 溶液 2 μL , RNase Free H_2O 补齐 20 μL 。反应条件: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环。引物序列见表 1, 引物由湖南爱科瑞生物工程有限公司合成。

1.8 Western blotting

细胞处理后收取总蛋白, 经 BCA 蛋白浓度

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primer pairs in RT-qPCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
<i>Nrf2</i> 基因上游引物 <i>Nrf2</i> Forward primer	ATTCAATGATTCTGACTCTG
<i>Nrf2</i> 基因下游引物 <i>Nrf2</i> Reverse primer	CGTATCCCCAGAAGAATGTA
GCLM 基因上游引物 GCLM Forward primer	TCAGTGGGCACAGGTAAAA
GCLM 基因下游引物 GCLM Reverse primer	TTGTTTAGCAAATGCAGTCA
<i>cytb</i> 基因上游引物 <i>cytb</i> Forward primer	ATCCTGCCATTCATCATTAC CG
<i>cytb</i> 基因下游引物 <i>cytb</i> Reverse primer	TGATGAGATTCCGGTAGGGT
COX1 基因上游引物 COX1 Forward primer	TCACCCGCAATACTATGAGCT CTG
COX1 基因下游引物 COX1 Reverse primer	GCCCCCTATAATGGCGAAC AC
D-loop 基因上游引物 D-loop Forward primer	CACACCCTATAACGCCTTG CC
D-loop 基因下游引物 D-loop Reverse primer	GGGTAAGTGCCTGCTTTCGT AG
NOX1 基因上游引物 NOX1 Forward primer	CCGTAGCATTCCCTACCCTA GT
NOX1 基因下游引物 NOX1 Reverse primer	ATGGGTTGGAGTAGCCCGT AG
GAPDH 基因上游引物 GAPDH Forward primer	GCCTGGAGAAACCTGCAAA AT
GAPDH 基因下游引物 GAPDH Reverse primer	GACGAAGTGGTCGTTGAGGG

测定后加入蛋白上样缓冲液，金属浴仪器 100 °C 煮样 10 min。取蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳，采用电转印法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上，用 5% 的脱脂奶粉封闭纤维素膜 1.5 h。PBST 洗涤后，加 Rabbit Anti-NOX2 (1:1 000 稀释)，4 °C 孵育过夜。洗涤后加入二抗 (1:5 000 稀释)，室温孵育 2 h，洗涤后曝光。同时检测 β -actin 蛋白表达水平。

1.9 JC-1 的测定

将 JC-1 线粒体荧光探针以 1:100 比例稀释浓度为 10 μ g/mL，加入 RPMI-1640 培养基中并

剧烈振荡混匀，12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清 4 °C 保存。将细胞处理后用胰酶消化，经完全培养基中和后，1 000 r/min 离心 5 min，再用 PBS 洗涤 2 次。用含有 JC-1 荧光探针的培养基重悬细胞，放入 37 °C 培养箱中孵育 30 min，1 000 r/min 离心 10 min 弃掉上清，再用 PBS 洗涤 2 次，将其重悬避光备用。

1.10 线粒体分离及总 DNA 提取

细菌感染细胞后，PBS 洗涤 3 次，再用胰酶消化，900 r/min 离心 6 min 收集细胞。根据细胞线粒体分离试剂盒说明书进行操作，分离细胞线粒体后收集上清。再按照 DNeasy 血液和组织试剂盒说明书提取上清液中的总 DNA，最后经 RT-qPCR (详见 1.7) 检测线粒体相关基因表达水平。

1.11 丙酮酸和乳酸含量检测

细胞经细菌和 MCC950 处理约 10 h 后，取培养液用于后续检测。按照丙酮酸和乳酸含量检测试剂盒说明书分别配制反应工作液，将培养液与反应工作液混匀，37 °C 避光反应 30 min。检测吸光度后建立标准曲线，最后计算丙酮酸和乳酸的浓度。

1.12 统计学分析

所有试验共进行 3 次以上，使用 ImageJ 软件进行灰度分析，用 GraphPad Prism 8.02 数据处理软件进行统计学分析，并应用 one-way ANOVA 对不同组间的差异进行了统计， $P < 0.05$ 为差异具有显著性，有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 APP 感染促进 PAM ROS 累积

氧化应激的主要检测指标之一就是 ROS 的产生，并且有研究报道 NLRP3 的活化会影响 ROS 水平^[9]。在 ROS 检测中，虽然 5b WT 组和 5b Δ Adh 组 ROS 含量均有提高，但 5b WT 组 ROS

水平明显高于 $5b\Delta Adh$ 组(图 1)。流式细胞术检测结果显示, $5b\Delta Adh$ 感染 PAM 后 ROS 生成显著增加(52.9%), 而 MCC950 处理可使 ROS 降低至 21%。相比之下, $5b$ WT 感染诱导的 ROS 生成更高(66%), MCC950 处理后降至 56.4% (图 2)。这些数据与荧光显微镜观察一致, 均表明 APP 感染能引发 PAM 氧化应激反应, 并且抑制 NLRP3 炎性体活化后可以降低细胞氧化应激水平。

2.2 APP 感染调控 PAM 内乳酸和丙酮酸含量

乳酸和丙酮酸在细胞发生氧化应激时发挥着重要作用。结果表明, 相较于阴性对照组, $5b$ WT 和 $5b\Delta Adh$ 感染 PAM 细胞后丙酮酸和乳酸的含量都呈现出下降的趋势; 而经过 MCC950 处理之后, 丙酮酸和乳酸的含量又恢复为与阴性对照组接近的水平, 表明抑制 NLRP3 炎性体活化后可以降低细胞氧化应激水平。 $5b$ WT 组与 $5b\Delta Adh$ 组相比, 丙酮酸和乳酸的含量降低得更显著, 即 $5b$ WT 比 $5b\Delta Adh$ 刺激 PAM 细胞后产

生的氧化应激反应更强, 结果如图 3A、3B 所示。

2.3 APP 感染调控氧化应激相关基因表达

核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 作为调控抗氧化应激的一种关键转录因子, 在诱导机体的抗氧化应答中起着重要作用。为了证明 APP 感染是否会引起氧化应激, 采用荧光定量的方法检测氧化应激的关键转录因子 Nrf2 和下游 *GCLM* 基因, 结果表明 *Nrf2* 基因被 APP 感染之后呈现出下降的趋势, 抗氧化能力降低, 而其下游基因 *GCLM* 在受到 Nrf2 的调控之后呈现出同样的趋势(图 4A、4B)。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 (nicotinamide adenine dinucleotide oxidase 2, NOX2) 和 ROS 的产生有关, 研究结果显示, $5b$ WT 和 $5b\Delta Adh$ 都能引起 NOX2 的表达水平增加, 但是 $5b$ WT 作用更加显著(图 4C)。由此我们得出 APP 感染 PAM 细胞后会致 ROS 含量增多并且降低抗氧化

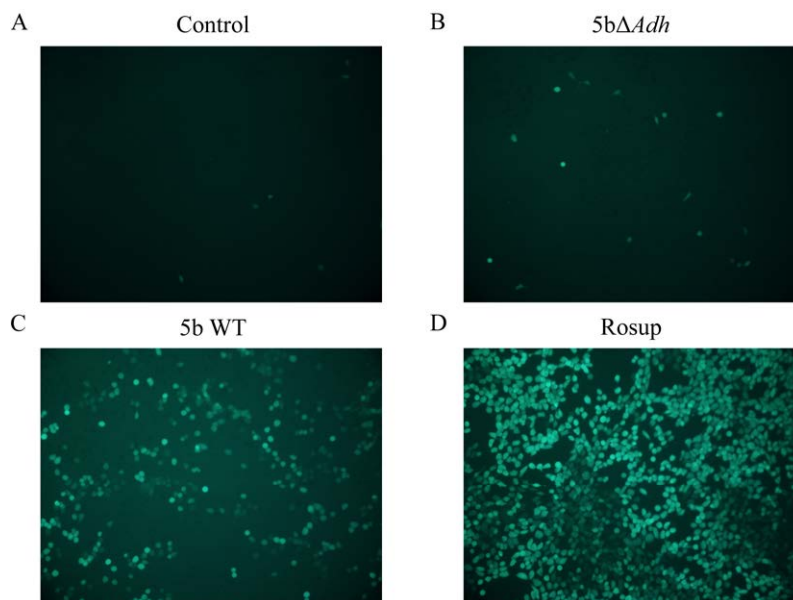


图 1 荧光显微镜观察 APP 感染 PAM 细胞后活性氧的产生

Figure 1 The amount of reactive oxygen species observed by fluorescence microscopy after APP infection of PAM cells.

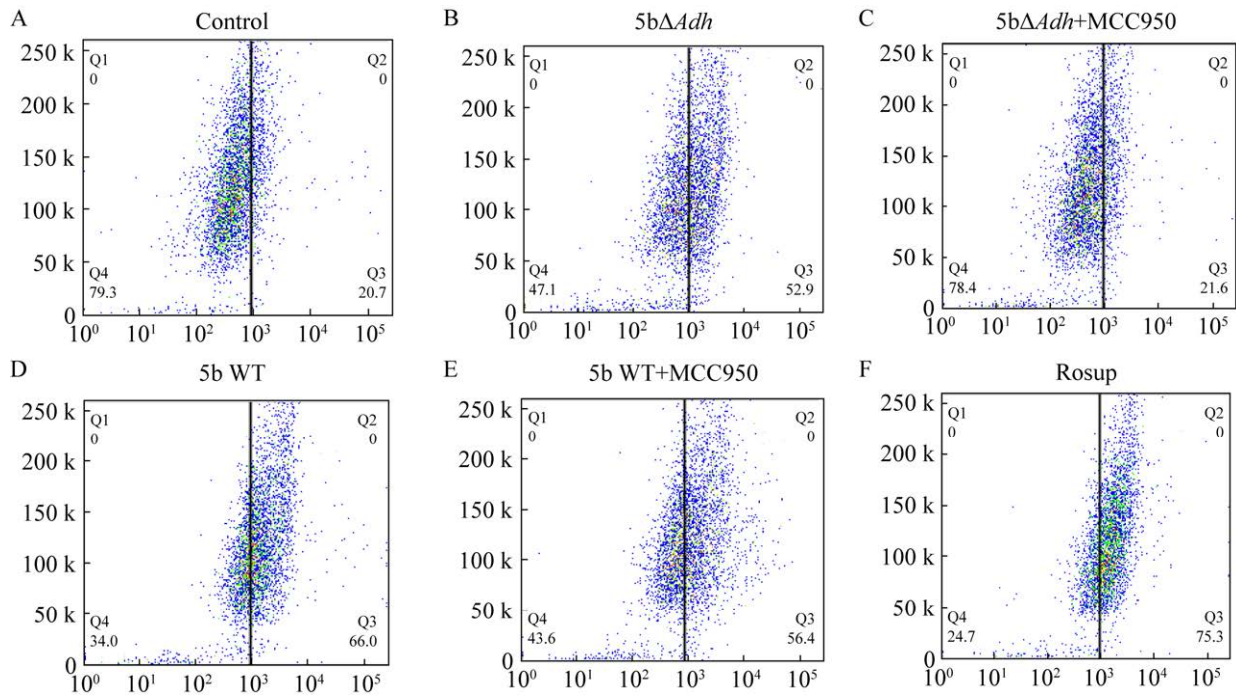


图 2 5b WT 和 5bΔAdh 感染对 PAM 细胞活性氧的影响

Figure 2 Effects of 5b WT and 5bΔAdh infections on ROS in PAM cells.

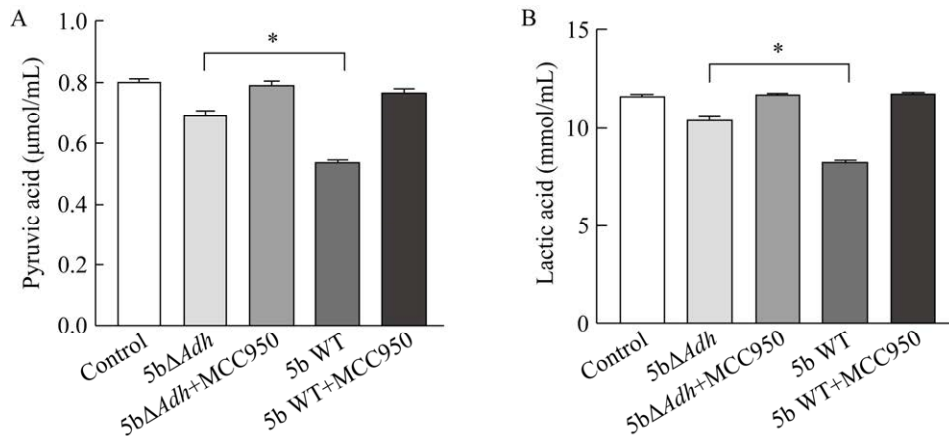


图 3 MCC950 对 APP 感染 PAM 细胞中丙酮酸(A)和乳酸(B)含量的影响

Figure 3 Effect of APP infection on pyruvate (A) and lactate (B) in PAM with MCC950. *: $P < 0.05$.

能力，进而促进细胞氧化应激，且 Adh 发挥了重要作用。

2.4 5b WT 和 5bΔAdh 感染 PAM 的蛋白质组定量分析

采用 TMT 标记定量蛋白质组学技术共鉴

定到 4 910 个蛋白质。按照表达倍数变化 1.5 倍以上(上调大于 1.5 倍或者下调小于 0.667 倍)且 $P < 0.05$ 的标准筛选差异表达蛋白质。火山图显示共有 15 个差异表达蛋白质，其中上调蛋白质有 6 个，下调蛋白质有 9 个(图 5A)。采用层次聚

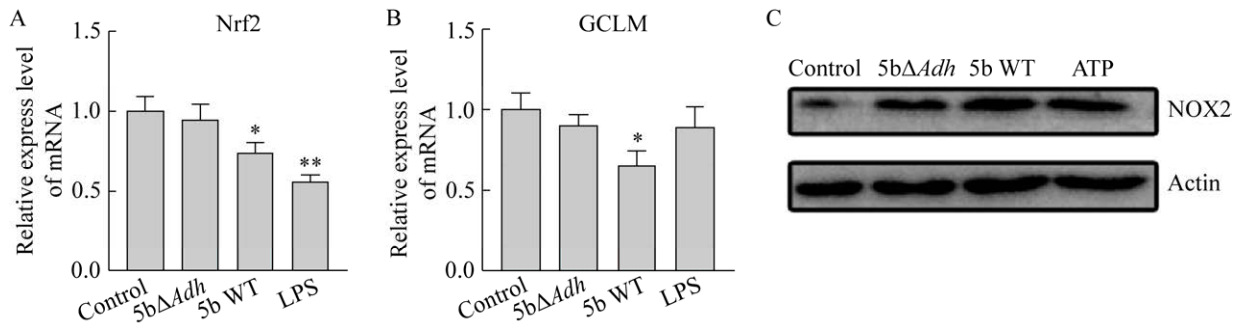


图4 5b WT 和 5bΔAdh 感染 PAM 细胞后 *Nrf2* (A)、*GCLM* (B) 的基因表达和 NOX2 蛋白(C)表达分析
Figure 4 Gene expression of *Nrf2* (A) and *GCLM* (B) and protein expression of NOX2 (C) after infection of PAM cells with 5b and 5bΔAdh. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

类算法(hierarchical cluster)对差异表达蛋白质分别进行聚类分析。结果显示,差异表达蛋白 Ig-like domain-containing protein、xylulokinase、SAP domain-containing protein、probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase 和 mitochondrial 等含量相对较高, Gamma-interferon-inducible-lysosomal thiol reductase、keratin 1、myosin-1 和 amino acid transporter 等含量相对较低(图 5B)。GO 富集分析发现,这些差异表达蛋白质主要参与 ATP 代谢、嘌呤代谢及炎症等重要生物学过程。KEGG 通路富集发现这些差异蛋白主要参与炎症调节、能量转运、氧化磷酸化、核糖体活化等相关的信号通路,其中 ATP 代谢过程、嘌呤核糖核苷三磷酸代谢过程和三磷酸核糖核苷代谢过程较为显著(图 5C),进一步研究发现 A0A077EVQ4、A1XQV6、A0A287AWH6、A0A076E9W7、B5KN59 均与线粒体呼吸链和线粒体 NADH 脱氢酶有关,并且 APP 感染 PAM 后都出现下调。NADH 脱氢酶的异位表达,可以分别补充线粒体复合物 I 或 III 的功能缺失而不产生 ROS,在没有内源性线粒体复合物 I 或复合物 III 功能的情况下挽救 NLRP3 炎症小体的激活。因此,线粒体电子传递链是 NLRP3 炎症小体激活所必需的;比较组

PAM vs. 5bΔAdh+PAM 中也有少量和 ATP 产生相关的蛋白降低,比较组 5b WT+PAM vs. 5bΔAdh+PAM 中则没有,提示 APP 感染 PAM 后引起细胞氧化应激的机制和能量代谢有关。

2.5 APP 感染引起线粒体膜电位改变

氧化应激可以导致线粒体损伤和功能障碍,而线粒体膜电位是反映线粒体损伤情况的一个标准。从结果可以看出无论是 5bΔAdh 还是 5b WT 感染 PAM 后,线粒体损伤都较为严重,受损细胞的比例在 58.5%和 69.6%,远高于阴性对照组的 18.8%(图 6),而加入 MCC950 之后,两组受损细胞的比例均有一定程度的降低,这表明 APP 感染 PAM 细胞后能导致细胞线粒体损伤,但抑制 NLRP3 炎症小体活化可以缓解线粒体损伤。

2.6 APP 感染 PAM 促进线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)释放

线粒体损伤引起线粒体孔道异常开放。因此,mtDNA 的异常释放是线粒体损伤的重要标志。为了研究 APP 是否会影响 mtDNA 的释放,我们分别使用 5b WT 和 5bΔAdh 感染 PAM,结果发现,相较于对照组,5b WT 比 5bΔAdh 更能引起 mtDNA 异常释放到细胞质中(图 7),从而确证 APP 能通过 Adh 引起线粒体损伤。

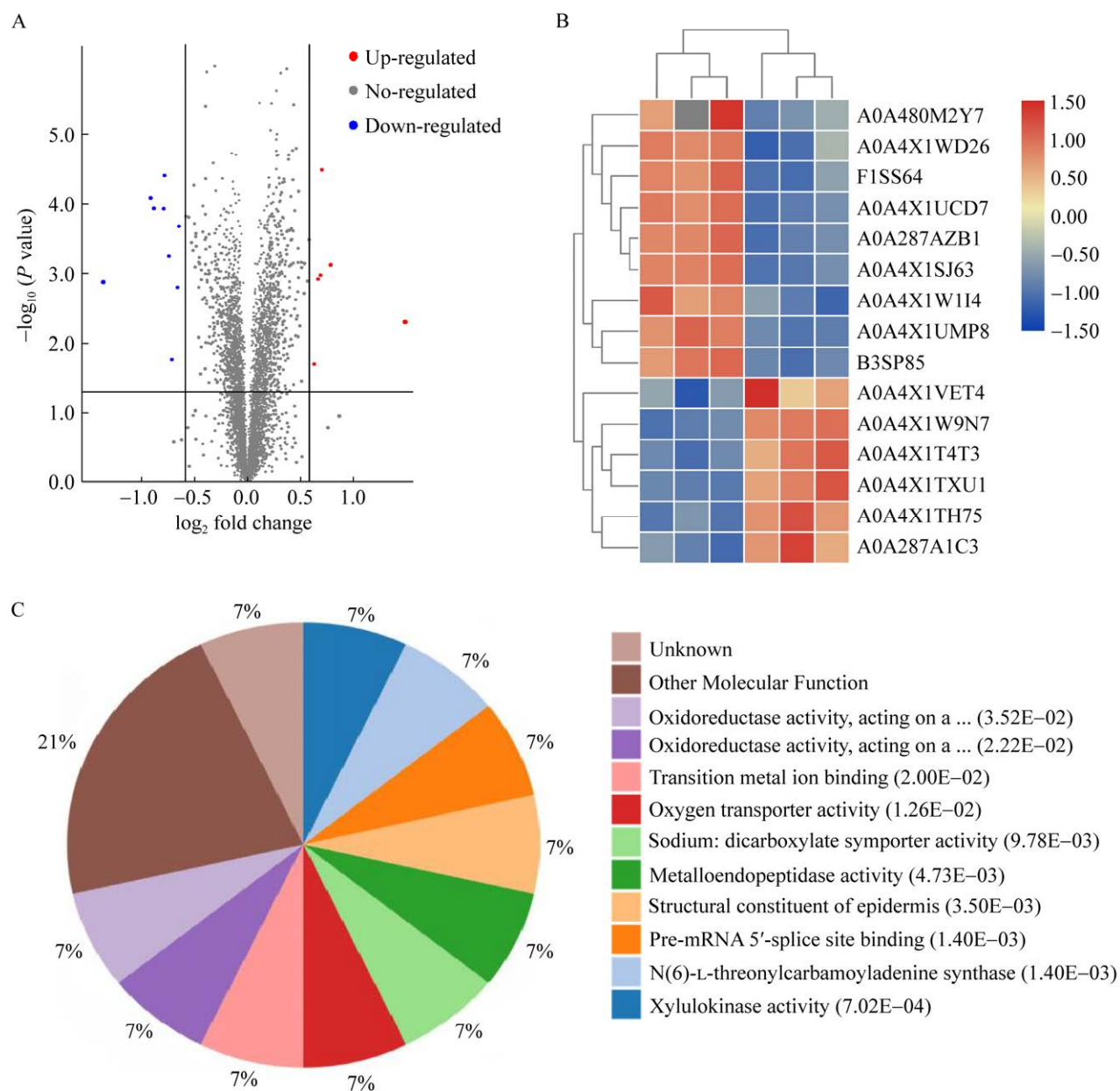


图 5 5b WT 和 5b Δ Adh 感染 PAM 细胞后蛋白组学分析 A: PAM+5b WT vs. PAM+5b Δ Adh 火山图, 横坐标为差异倍数(以 2 为底的对数变换), 纵坐标为差异的显著性 P value (以 10 为底的对数变换); B: PAM+5b WT vs. PAM+5b Δ Adh 的差异表达蛋白质聚类分析结果; C: PAM+5b WT vs. PAM+5b Δ Adh 主要参与 KEGG 信号通路。

Figure 5 Proteomic analysis of APP wild strain 5b and *Adh* gene deletion strain after infection of PAM cells. A: PAM+5b WT vs. PAM+5b Δ Adh volcano map. The horizontal coordinate is the multiple of the difference (logarithmic transformation with base 2), and the vertical coordinate is the significance P value of the difference (logarithmic transformation with base 10). B: Cluster analysis results of differentially expressed proteins of PAM+5b WT vs. PAM+5b Δ Adh. C: PAM+5b WT vs. PAM+5b Δ Adh is mainly involved in the KEGG signaling pathway.

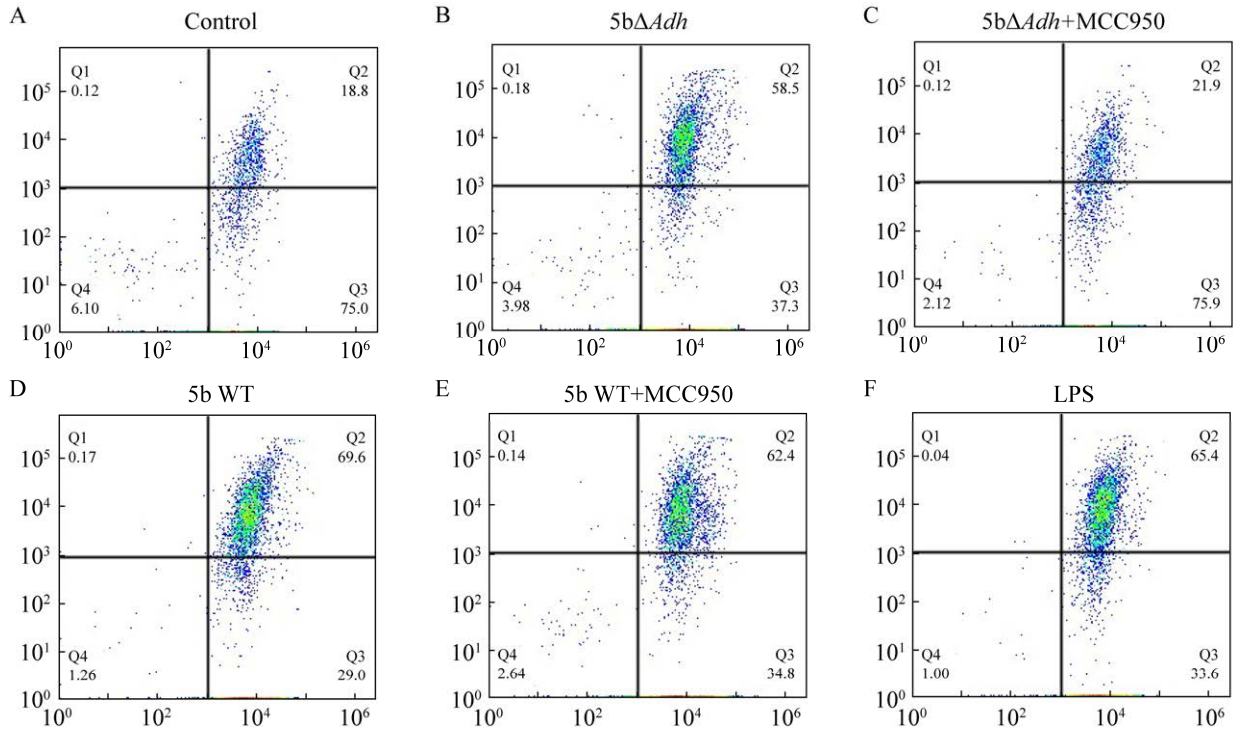


图 6 5b WT 和 5bΔAdh 感染 PAM 后用 JC-1 检测对线粒体损伤情况的影响

Figure 6 The effect of APP on mitochondrial damage after PAM infection was measured with JC-1.

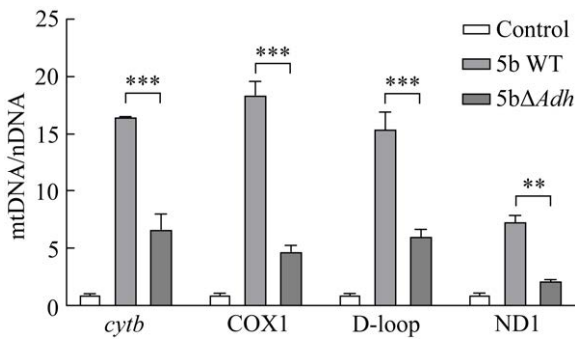


图 7 5b WT 和 5bΔAdh 感染 PAM 后检测线粒体 DNA 释放情况

Figure 7 mtDNA release was detected after 5b WT and 5bΔAdh infection with PAM. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论

氧化应激在各种生理和病理过程中起着至关重要的作用,包括内皮功能障碍、炎症反应和细胞死亡。而乳酸可促进哺乳动物细胞和秀

丽隐杆线虫对氧化应激的抵抗力,其中丙酮酸可重现乳酸介导的保护作用^[10]。同时, Ma 等^[11]发现乳酸转运稳态的破坏扰乱了心肌细胞内的乳酸-丙酮酸平衡,导致氧化应激和炎症反应,加剧心肌损伤。另一方面,有研究报道 NLRP3 炎性体激活通过裂解 GSDMD 诱导一种称为细胞焦亡的细胞死亡机制^[12]。随后 Huang 等^[13]发现 LPS 刺激 GSDMD 裂解促使线粒体成孔,导致 mtDNA 释放到内皮细胞的细胞质中从而抑制内皮细胞增殖。并且,有研究探讨了 MCC950 的作用, Jiao 等^[14]发现 MCC950 通过阻断 NLRP3 炎性体的组装和促炎细胞因子的释放,在脊髓损伤小鼠模型中减轻了炎症反应并改善了神经功能。因此,引入 NLRP3 炎性体的特异性抑制剂 MCC950,研究 NLRP3 炎性体对 ROS 产生的影响。实验结果显示,通过检测 ROS 的释放以及丙酮酸和乳酸的含量, 5b WT 比 5bΔAdh

刺激 PAM 细胞后产生的氧化应激反应更强, 并且经 MCC950 处理后反应程度降低, 从侧面证实 Adh 在 APP 感染 PAM 发生氧化应激过程中起到重要作用, 并且 NLRP3 炎性体在该过程发挥一定作用。

NADPH 氧化酶(NOX)家族, 尤其是 NOX2, 已被确定为不同细胞环境中 ROS 的重要来源。Ortega 等^[15]发现 NOX2、NOX1 和 iNOS, 在与妊娠相关静脉功能不全相关的胎盘损伤中过表达, 表明 NOX2 在全身氧化应激中的潜在作用。水苏碱可以通过减少 NOX2 胞质亚基 p47phox 的表达水平, 抑制 p47phox 在质膜间的移位, 从而阻止 NOX2 复合物的完全组装, 进而抑制 NOX2 活性发挥抗氧化作用, 保护神经细胞^[16]。这些研究强调了 NOX2 在氧化应激相关病理中的意义, 并为以 NOX2 为靶点减轻氧化损伤和相关并发症的潜在治疗策略提供了见解。

Nrf2 是一种重要的抗氧化转录因子, 可以调节多种细胞保护因子以减少氧化应激^[17]。在新生儿缺氧缺血性脑病中, ROS 产生水平增加和抗氧化水平降低导致氧化应激, Nrf2 的激活可能是防治新生儿缺氧缺血性脑病的一种新策略^[18]。Li 等^[19]研究了 Nrf2 对脓毒症诱导的肝损伤的保护作用, 强调了 Nrf2 在抵抗氧化应激和炎症中的作用。同时 GCLM 在氧化应激中的作用一直是各种研究中感兴趣的课题。Chigusa 等^[20]探索了在滋养层细胞中激活 Nrf2 信号以抑制氧化应激, 突出了在氧化应激条件下 GCLM 表达的重要性。这些研究都强调了 NOX2、Nrf2 和 GCLM 在调节氧化应激及其在各种病理条件下的意义。因此, 在本研究中通过分子表达水平确证了 5b WT 刺激 PAM 后比 5bΔAdh 更容易产生氧化应激, 揭示了 Adh 在 APP 感染 PAM 后调控氧化应激过程的关键作用, 为探索 APP 感染机制及其病理效应提供了理论依据。

TMT 技术是由 Thermo Scientific 公司研发的一种多肽体外标记技术。该技术采用 2 种、6 种或 10 种同位素的标签, 通过特异性标记多肽的氨基基团, 然后进行串联质谱分析, 可同时比较 2 组、6 组或 10 组不同样品中蛋白质的相对含量。本研究通过此项技术确证了 APP 感染 PAM 的过程与线粒体紧密相关, 实验结果为深入研究 APP 感染 PAM 产生氧化应激的分子机制奠定了理论基础。

当细胞氧化应激过程中线粒体损伤时, mtDNA 主要位于线粒体基质内。然而, 在各种应激条件下 mtDNA 可以从线粒体释放到细胞质中^[21]。Li 等^[22]报道猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 感染促进线粒体功能障碍, 从而诱导细胞质 mtDNA 应激和 ROS 积累。以上研究显示线粒体损伤与氧化应激的释放密切相关, 本研究检测了线粒体膜电位变化和细胞质 mtDNA 释放水平。结果显示 APP 通过 Adh 感染 PAM 后能导致细胞线粒体损伤并且释放更多胞质 mtDNA, 推测这一过程与 NLRP3 炎性体的活化亦有关联。

4 结论

本研究发现 APP 通过 Adh 诱导猪肺泡巨噬细胞氧化应激, 此发现不仅为 APP 感染的分子机制研究提供新思路, 也为猪胸膜肺炎的防控增添了理论基础。

REFERENCES

- [1] LOERA-MURO A, ANGULO C. New trends in innovative vaccine development against *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 217: 66-75.
- [2] WANG L, QIN WH, ZHAI RD, LIU ST, ZHANG H, SUN CJ, FENG X, GU JM, DU CT, HAN WY, LANGFORD PR, LEI LC. Differential gene expression profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during induction of primary alveolar macrophage apoptosis in piglets[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 78: 74-86.

- [3] VALERIO V, MYASOEDOVA VA, MOSCHETTA D, PORRO B, PERRUCCI GL, CAVALCA V, CAVALLOTTI L, SONGIA P, POGGIO P. Impact of oxidative stress and protein S-glutathionylation in aortic valve sclerosis patients with overt atherosclerosis[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(4): 552.
- [4] GAUTHIER AG, LIN MS, ZEFI S, KULKARNI A, THAKUR GA, ASHBY CR, MANTELL LL. GAT107-mediated $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor signaling attenuates inflammatory lung injury and mortality in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by alleviating macrophage mitochondrial oxidative stress *via* reducing MnSOD-S-glutathionylation[J]. *Redox Biology*, 2023, 60: 102614.
- [5] CARR AC, SPENCER E, DIXON L, CHAMBERS ST. Patients with community acquired pneumonia exhibit depleted vitamin C status and elevated oxidative stress[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1318.
- [6] KUWANO K, NAKASHIMA N, INOSHIMA I, HAGIMOTO N, FUJITA M, YOSHIMI M, MAEYAMA T, HAMADA N, WATANABE K, HARA N. Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias[J]. *The European Respiratory Journal*, 2003, 21(2): 232-240.
- [7] HERNANDEZ-CUELLAR E, GUERRERO-BARRERA AL, AVELAR-GONZALEZ FJ, DÍAZ JM, CHÁVEZ-REYES J, SALAZAR de SANTIAGO A. An *in vitro* study of ApxI from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 and induction of NLRP3 inflammasome-dependent cell death[J]. *Veterinary Record Open*, 2021, 8(1): e20.
- [8] MIAO R, JIANG C, CHANG WY, ZHANG HW, AN JS, HO F, CHEN PC, ZHANG H, JUNQUEIRA C, AMGALAN D, LIANG FG, ZHANG JB, EVAVOLD CL, HAFNER-BRATKOVIČ I, ZHANG ZB, FONTANA P, XIA SY, WALDECK-WEIERMAIR M, PAN YD, MICHEL T, et al. Gasdermin D permeabilization of mitochondrial inner and outer membranes accelerates and enhances pyroptosis[J]. *Immunity*, 2023, 56(11): 2523-2541.e8.
- [9] DAI WR, ZHOU S, ZHONG GQ, JIANG ZY. MicroRNA-223-3p attenuates angiotensin II-dependent ROS effect on cell viability by targeting NLRP3 in H9c2 cells[J]. *Archives of Medical Science*, 2021.
- [10] TAUFFENBERGER A, FIUMELLI H, ALMUSTAFA S, MAGISTRETTI PJ. Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(9): 653.
- [11] MA XM, GENG K, WANG P, JIANG ZZ, LAW BYK, XU Y. MCT4-dependent lactate transport: a novel mechanism for cardiac energy metabolism injury and inflammation in type 2 diabetes mellitus[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2024, 23(1): 96.
- [12] SWANSON KV, DENG M, TING JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, 19(8): 477-489.
- [13] HUANG LS, HONG ZG, WU W, XIONG SQ, ZHONG M, GAO XP, REHMAN J, MALIK AB. mtDNA activates cGAS signaling and suppresses the YAP-mediated endothelial cell proliferation program to promote inflammatory injury[J]. *Immunity*, 2020, 52(3): 475-486.e5.
- [14] JIAO JH, ZHAO GJ, WANG Y, REN PF, WU MF. MCC950, a selective inhibitor of NLRP3 inflammasome, reduces the inflammatory response and improves neurological outcomes in mice model of spinal cord injury[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 7: 37.
- [15] ORTEGA MA, ROMERO B, ASÚNSOLO Á, MARTÍNEZ-VIVERO C, SAINZ F, BRAVO C, de LEÓN-LUIS J, ÁLVAREZ-MON M, BUJÁN J, GARCÍA-HONDUVILLA N. Pregnancy-associated venous insufficiency course with placental and systemic oxidative stress[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(7): 4157-4170.
- [16] 单旭. 水苏碱抗阿尔茨海默症神经细胞氧化应激损伤的机制研究[D]. 沈阳: 辽宁大学硕士学位论文, 2023.
- SHAN X. Studies on the mechanism of stachydrine Anti-oxidative stress damage in neuronal cells of Alzheimer's disease[D]. Shenyang: Master's Thesis of Liaoning University, 2023 (in Chinese).
- [17] HU Y, LUO YM, ZHENG YM. Nrf2 pathway and autophagy crosstalk: new insights into therapeutic strategies for ischemic cerebral vascular diseases[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1747.
- [18] LIU JX, ZHENG D, CHEN L, CHEN S, MIN JW. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 as a potential therapeutic target in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Journal of Integrative Neuroscience*, 2024, 23(5): 103.
- [19] LI LP, ZHANG QW, ZHANG X, XU XT, WANG XZ, HUANG X, WANG T, JIANG ZZ, XIAO L, ZHANG LY, SUN LX. Protective effects of Nrf2 against sepsis-induced hepatic injury[J]. *Life Sciences*, 2021, 282: 119807.
- [20] CHIGUSA Y, KAWASAKI K, KONDOH E, MOGAMI H, UJITA M, FUJITA K, TATSUMI K, TAKEDA S, KONISHI I. Simvastatin inhibits oxidative stress *via* the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in trophoblast cells[J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2016, 42(1): 36-43.
- [21] YAN CH, LIU X, XU HD, WANG LM. Cytoplasmic mtDNA clearance suppresses inflammatory immune responses[J]. *Trends in Cell Biology*, 2024, 34(11): 897-900.
- [22] LI HW, YANG XT, SONG YZ, ZHU QG, LIAO ZQ, LIANG YX, GUO JH, WAN B, BAO DK. PRRSV infection activates NLRP3 inflammasome through inducing cytosolic mitochondrial DNA stress[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 279: 109673.