

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (5) :650 - 656; 4 May 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140431

## 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

胡佩佩, 黄复深\*, 牛俊超, 唐昭山

湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128

**摘要:**【目的】探讨革兰氏阴性菌胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus Pleuropneumoniae*, APP) 感染小鼠致肺病变的分子细胞机制, 以改善猪传染性胸膜肺炎的防治。【方法】滴鼻法感染小鼠, 观察肺部眼观病变, 石蜡切片 HE 染色观察肺组织病变。RT-PCR 和 qPCR 方法检测小鼠肺部的 Caspase-1、Caspase-3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TLR-4 表达量的变化。【结果】小鼠在感染后 48h 内死亡, 解剖后观察小鼠肺部有严重出血和炎症。实验组小鼠肺组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 和 TNF- $\alpha$  的表达水平显著增加; TLR-4 的表达量显著上调; 肺部组织 Caspase-1 的表达水平明显升高, 而 Caspase-3 的表达水平未见明显变化。【结论】TLR-4 信号通路可能参与 APP 感染引起的肺部炎症的发生, APP 感染后激活 TLR-4 信号通路使有关细胞释放炎症因子, 引起的肺部炎症。炎症可能涉及 Caspase-1 参与的细胞焦亡。

**关键词:**猪传染性胸膜肺炎, 小鼠, 病理学, 分子和细胞机制, TLR-4 信号通路, 细胞焦亡

**中图分类号:**S852      **文章编号:**0001-6209(2015)05-0650-07

猪传染性胸膜肺炎 (Porcine contagious pleuropneumoniae, PCP) 是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 感染引起的猪的呼吸道疾病, 其典型特征是肺出血、坏死以及纤维素性粘连<sup>[1]</sup>。急性经过表现为纤维素性肺炎和出血性肺炎为特征的急性肺损伤炎症经过, 死亡率高; 慢性经过表现为生长缓慢的肺损伤并终身带菌<sup>[2]</sup>。该病的爆发对养猪业造成的经济损失严重。该病自然感染一般为 1 - 2d, 最急性型常在出现症状后 24 - 36h 死亡, 急性型病程长短不定, 通常于发病后 2 - 4d 死亡, 能耐过 4d 以上者, 症状逐渐减轻, 常能自行康复或转为慢性。亚急性型和慢性型多由

急性转化而来, 全身症状不明显<sup>[3]</sup>。可见, 猪感染猪胸膜肺炎放线杆菌后的早期反应对该病的发生和发展起非常重要的作用, 研究该过程的分子细胞机制对于猪传染性胸膜肺炎的防治是一个有益的工作。

Toll 样受体家族是一类天然免疫受体, 通过识别病原相关分子模式, 引发一系列的信号传导, 进而导致炎症介质包括细胞因子的释放, 从而引起一系列的免疫和病理反应, 使机体产生免疫保护和病理过程<sup>[4]</sup>。Toll 样受体家族是生物致炎因素的主要受体, 如 Toll 样受体 4 (TLR-4)。TLR-4 是转导内毒素/脂多糖 (LPS) 信号的主要跨膜受体<sup>[5]</sup>。对于

基金项目: 湖南农业大学校研究生创新课题 (12254-YCX201302); 教育部留学回国科研启动基金 (GT0096)

\* 通信作者。E-mail: 15211071993@163.com

作者简介: 胡佩佩 (1989 -), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 从事病原生物学研究。E-mail: hu\_pei\_pei@163.com

收稿日期: 2014-09-11; 修回日期: 2014-12-04

TLR-4 信号途径在猪感染猪胸膜肺炎放线杆菌后的致病作用报道较少。对于细胞因子在猪传染性胸膜肺炎中的作用, 李润生等<sup>[6]</sup>通过原位杂交和 Northern 杂交技术, 对感染猪肺部组织和肺泡灌洗液细胞不同时间点肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白介素-6 (IL-6) 和白介素-18 (IL-18) 的表达和分泌水平进行了研究, 发现 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IL-8 与肺部病变程度有显著的相关性, 而 TNF- $\alpha$  水平未见变化。但 Morrison 等利用 ELISA 方法在感染猪肺泡灌洗液中检测到 TNF- $\alpha$  的变化。Jakob 等<sup>[7]</sup>利用基因芯片检测了参与猪感染猪胸膜肺炎放线杆菌后早期反应的基因表达变化, 发现肺组织有 357 个基因的表达发生变化, 其中与免疫激活的相关蛋白和天然免疫中致炎因子基因的表达上调。本文着重研究猪 TLR-4 在猪感染胸膜肺炎放线杆菌的早期反应中的作用和可能的致病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源:** 猪胸膜肺炎放线杆菌血清 3 型由湖南农业大学动物医学院余兴龙教授惠赠。

**1.1.2 培养基:** 胰蛋白大豆肉汤培养基 (TSB) 购自青岛日水生物技术有限公司。无支原体超级新生

牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。NAD 氧化型辅酶 I 购自北京鼎国生物技术有限公司。

**1.1.3 主要试剂:** TRNzol 总 RNA 提取试剂、PCR 反应试剂 ( $2 \times Taq$  PCR Master Mix)、DNA 标准分子量 (D2000 Maker) 购自北京天根生化科技有限公司, 反转录试剂盒、荧光定量 qPCR 用 SYBR<sup>®</sup> Green I 试剂购自 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司。

### 1.2 动物感染模型的建立和组织病理学观察

实验用昆明小鼠, 4 周龄, 重 18 - 22g, 清洁级, 共 12 只, 雌雄各半, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。小鼠随机分为两组, 每组 6 只。实验组用致死剂量菌液 ( $1 \times 10^{11}$  CFU) 滴鼻感染小鼠, 对照组生理盐水滴鼻。感染后随时观察小鼠临床症状的变化和死亡情况。感染后 48h (致死剂量半数致死时间) 宰杀存活小鼠, 取肺, 一部分用于总 RNA 提取, 一部分采用 10% 的福尔马林固定, 用于组织病理学观察。组织病理学观察以常规石蜡切片 H-E 染色进行。

### 1.3 引物

根据文献和 GenBank 已发表的小鼠的 Caspase-1、Caspase-3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TLR-4 基因序列设计特异性引物 (表 1)。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1. 目的基因的引物序列和扩增片段长度

Table 1. PCR primer sequences and length of target genes in this study

Genes	Primers (5'→3') for PCR (length)	Primers (5'→3') for real-time PCR (length)
$\beta$ -actin	F: CTGTCCCTGTATGCCTCTG R: TGATGTACGCACGATTT (219bp)	F: TTCCTTCTTGGGTATGGAAT R: GAGCAATGATCTTGATCTTC (203bp)
Caspase-1	F: CCCCAGGCAAGCCAAATC R: TTGAGGCTCCCAGTCACTCC (201bp)	F: CCCCAGGCAAGCCAAATC R: TTGAGGCTCCCAGTCACTCC (201bp)
Caspase-3	F: AGCTTCTCAGAGGCGACTA R: GGACACAATACACGGGATCT (381bp)	F: TTCAGCTATCAGTATTCGAAGC R: GTCCGACACGGGTATCCACATC (88bp)
IL-1 $\beta$	F: ATGTGGCTGTGGAGAAG R: TTGTGAGGTGCTGATGTA (531bp)	F: GAGCACCTCTTTTCTTTCATCTT R: TCACACACCAGCAGGTTATCATC (84bp)
IL-6	F: ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGAC R: CTAGGTTTCCGAGTAGATCTCAA (636bp)	F: CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA R: GCAAGTGCATCGTTGTTTCATAC (111bp)
IL-18	F: GCCATGTCAGAAGACTCTTGCGCTC R: GTACAGTGAAGTCGGCCAAAGTTGTC (579bp)	F: ATATCGACCGAACAGCC R: TAGGGTCACAGCCAGTC (89bp)
TNF- $\alpha$	F: GGCAGGTCTACTTYGGAGTCATYGC R: ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG (443bp)	F: ATCCGCGACGTGGAAGCTG R: ACCGCCTGGAGTTCTGGAA (70bp)
TLR-4	F: AGTGGGTCAAGGAACAGAAGCA R: CTTTACCAGCTCATTTCTCACC (311bp)	F: CTGAGCAAACAGCAGAGGAAGAAC R: ATAGCAGAGCCCCAGGTGAGC (124bp)

## 1.4 半定量 RT-PCR

按 TRNzol 总 RNA 提取试剂说明书从组织中提取总 RNA。按反转录试剂盒的说明书合成 cDNA 第一链。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 变性 30 s, IL-18、TLR-4 的退火温度为 56℃, Caspase-1 的退火温度为 58℃, Caspase-3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 及 IL-6 的退火温度为 55℃, 退火时间均为 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 26 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。扩增完成后, 分别取 5  $\mu$ L 的 PCR 产物, 于 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照后利用 Quantity One 软件进行条带峰面积灰度扫描, 计算所测基因和  $\beta$ -actin 扩增条带峰面积灰度之比以评定所测基因的表达水平。

## 1.5 荧光实时定量 PCR

荧光实时定量 PCR (qPCR) 采用 CFX96 系统荧光定量 PCR 仪分析。按 SYBR<sup>®</sup> Green I 试剂说明进行操作。qPCR 条件: 95℃ 30s 1 个循环; 95℃ 15s, 60℃ 30s, 40 个循环。记录并分析荧光信号, 与内参  $\beta$ -actin 比较, 根据比值分析所测基因的表达水平。

## 1.6 数据的处理

数据以平均值  $\pm$  标准差 (SD) ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析判断差异显著性。

## 2 结果和分析

### 2.1 眼观和组织病理学观察

小鼠攻毒感染后, 48h 内未见死亡。但实验小鼠表现为挤堆, 双眼微闭, 被毛粗乱, 精神沉郁, 不采食, 呼吸急促等症状。剖检可见肺部呈鲜红色, 有弥漫性出血, 同时可见有坏死灶, 有些有纤维素性增生, 包心包肝。组织病理学观察发现 (图 1), 感染小鼠肺泡结构消失, 细末支气管附近有广泛的细胞损伤, 气管的柱状上皮细胞结构破坏, 气管内有炎细胞浸润; 肺静脉血管扩张, 肺泡间质有红细胞浸润; 肺上皮细胞损伤, 肺泡壁细胞坏死脱落, 肺泡内有浆液。炎症灶周围有大量炎细胞聚集, 包括: 巨噬细胞, 淋巴细胞, 和中性粒细胞, 其中以中性粒细胞浸润为主。

### 2.2 感染后肺组织 TLR-4 表达水平的变化

由图 2 可见, 相较对照组, 实验组 TLR-4 的表达量显著上调 ( $P < 0.05$ )。

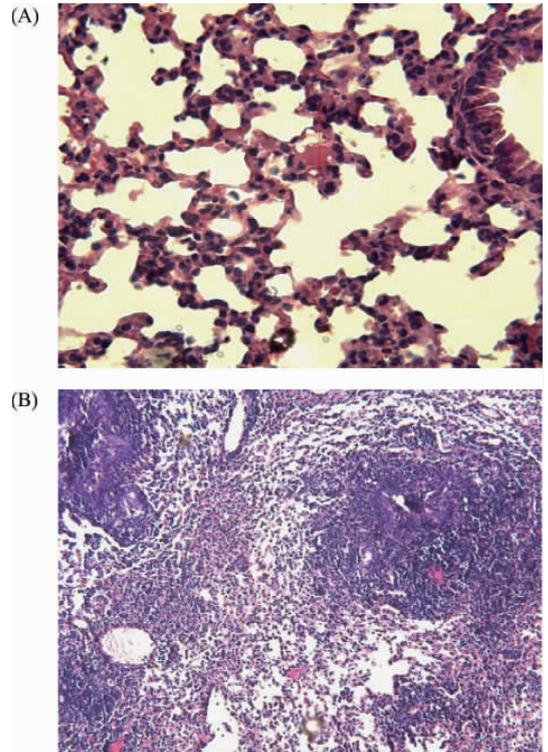


图 1. 小鼠感染后 48 h 肺部的组织病理变化 (10  $\times$ , H-E 染色)

Figure 1. Pulmonary histological pathology of infected mice 48hr postinfection. A: Pulmonary histology of control group mice; B: Pulmonary histological pathology of infected mice 48hr postinfection indicating inflammation.

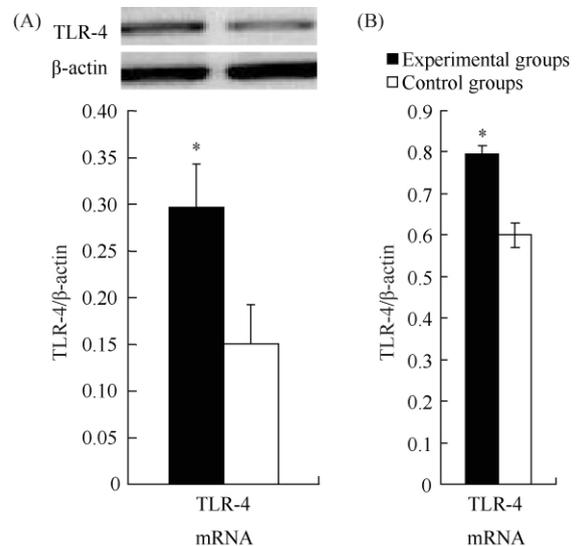


图 2. 猪胸膜肺炎放线杆菌感染后肺组织 TLR-4 的表达水平变化

Figure 2. Expression level of TLR-4 in lungs of mice ( $* P < 0.05$  vs control). A: Expression level of TLR-4 by RT-PCR; B: Expression level of TLR-4 by qPCR.

### 2.3 小鼠感染后肺组织炎症相关细胞因子表达水平的变化

从图 3 可见, 实验组小鼠肺组织内 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  的表达水平与对照组相比增加显著 ( $P < 0.05$ )。IL-6 的表达水平增加更显著 ( $P < 0.01$ )

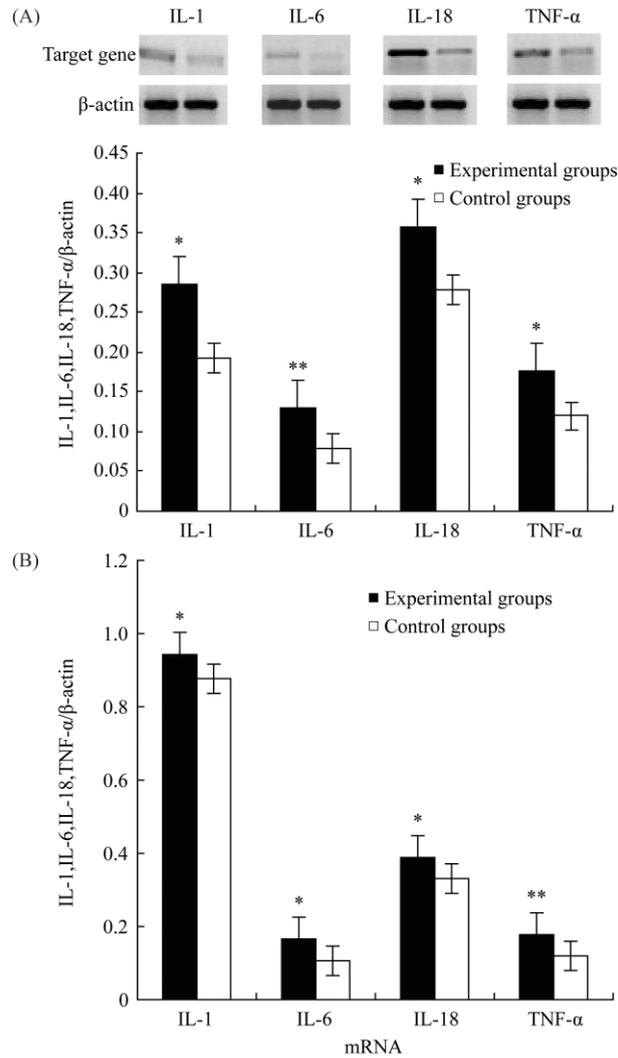


图 3. 猪胸膜肺炎放线杆菌感染后肺组织 IL-1, IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  表达水平的变化

Figure 3. Expression level of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  in lungs of mice. A: Expression level of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  by RT-PCR; B: Expression level of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  qPCR. (\*\* $P < 0.01$  vs control; \*  $P < 0.05$  vs control)

### 2.4 小鼠感染后肺组织 Caspase-1 表达水平的变化

从图 4 可见, 小鼠在滴鼻感染 APP 后, 肺部组织 Caspase-1 的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 Caspase-3 的表达水平未见明显变化 ( $P > 0.05$ )。

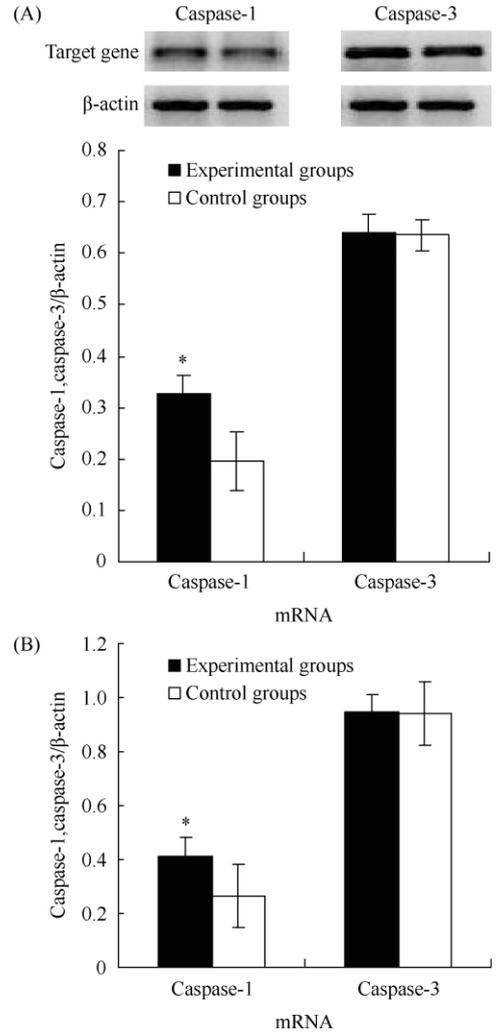


图 4. 猪胸膜肺炎放线杆菌感染后肺组织 Caspase-1 和 caspase-3 的表达水平变化

Figure 4. Expression level of Caspase-1 and Caspase-3 in lungs of mice. A: Expression level of Caspase-1/Caspase-3 by RT-PCR; B: Expression level of Caspase-1/Caspase-3 by qPCR. (\*  $P < 0.05$  vs control)

## 3 讨论

本实验结果表明小鼠滴鼻攻毒感染后可表现一定的临床症状。剖检可见肺部呈鲜红色, 有弥漫性出血, 同时可见有坏死灶, 后期纤维素性增生。组织病理学观察发现, 感染小鼠肺泡结构消失, 细末支气管附近有广泛的细胞损伤, 气管的柱状上皮细胞结构破坏, 气管内也是炎细胞浸润; 肺静脉血管扩张, 肺泡间质有红细胞浸润; 肺上皮细胞损伤, 肺泡壁坏死脱落有浆液。炎症灶周围有大量炎细胞聚集, 包括: 巨噬细胞, 淋巴细胞, 和中性粒细胞, 且以中性粒

细胞浸润为主。小鼠在 APP 感染引起的猪传染性胸膜肺炎的研究领域中已广泛应用,但多采用腹腔注射法造模,本实验采用滴鼻攻毒感染的方法,基本再现了 APP 感染引起的猪传染性胸膜肺炎早期的疾病过程。至于 APP 感染 48h 后的疾病发展有待进一步观察。

TLR 是一类天然免疫受体,通过识别病原相关分子模式,引发一系列的信号传导,进而导致炎症介质包括细胞因子的释放,从而引起一系列的免疫和病理反应,使机体产生免疫保护和病理过程<sup>[8]</sup>。TLR-4 是机体对革兰氏阴性菌表达的 LPS 等应答的主要受体<sup>[9]</sup>,LPS 触发巨噬细胞和其他炎细胞如中性粒细胞分泌细胞因子和炎症介质从而引起一系列的免疫和病理反应,使机体产生免疫保护和病理过程,甚至诱导有关细胞死亡<sup>[4-5,10-13]</sup>。刘筱等研究表明 TLR-4 在肺感染中起着重要的作用<sup>[14]</sup>。本研究发现,小鼠感染 APP 后,肺部组织 TLR-4 的表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ),从而推测 APP 感染鼠的肺脏的炎症可能跟 TLR-4 的激活有关系。

小鼠 APP 感染的一个重要病变过程就是肺部的炎症。本实验发现,小鼠感染后肺组织内 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  的表达水平与对照组相比增加显著 ( $P < 0.05$ ),IL-6 的表达水平增加更显著 ( $P < 0.01$ ),与前人<sup>[15-16]</sup>用猪所做的研究结果一致。研究表明 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 具有明显的致炎作用。IL-1 $\beta$  是炎症放大的启动因子,在炎症反应中发挥重要作用。IL-18 是趋化性细胞因子,吸引白细胞定向移动。由于受到 Caspase-1 表达量升高的激活,趋化性细胞因子 IL-18 前体被激活,IL-18 分泌增多,吸引白细胞的定向向肺部病灶聚集<sup>[17]</sup>。TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  同属炎症放大的启动因子,主要由活化的单核巨噬细胞、PMN、内皮细胞等产生。许多实验研究表明,肿瘤坏死因子可作为肺部感染的炎症标志物。许燕萍等<sup>[18]</sup>的实验结果显示肺内 TNF- $\alpha$  水平升高与肺炎克雷伯菌在体内引起小气道上皮细胞损伤程度平行,TNF- $\alpha$  蛋白表达上调加重上皮细胞损伤。陈业民等<sup>[19]</sup>研究 SD 大鼠细菌性重症肺炎模型中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等含量变化的实验表明,肺部感染时机体释放大量的 TNF- $\alpha$ ,其水平反应肺部感染及病变程度。可见,小鼠感染 APP 后,IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 和 TNF- $\alpha$  参与致病过程。研究表明 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 和 TNF- $\alpha$  主要参与猪感染 APP 的早期应答<sup>[20]</sup>。但 Myers 等<sup>[21]</sup>实验发现猪胸膜肺炎放线杆

菌感染后 72h 血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10 水平未见升高。李润生也获得了类似的结果<sup>[6]</sup>。

本研究发现,感染小鼠肺泡结构消失,细末支气管附近有广泛的细胞损伤和炎细胞浸润;肺上皮细胞损伤,肺泡壁坏死脱落有浆液;炎症灶周围有大量炎细胞聚集。研究表明细胞死亡存在多种方式,有些存在 Caspase 依赖性<sup>[22]</sup>。Caspase-1 和 Caspase-3 是调节细胞死亡和凋亡的重要分子。Caspase-3 是细胞凋亡的重要执行分子,Caspase-1 主要与炎症引起的细胞死亡有关<sup>[23]</sup>。Caspase-1 调节细胞死亡可能是通过直接作用于与细胞生存相关的重要蛋白,或激活引起炎症因子的释放,制造了一个炎性环境,并反馈给相关细胞从而促进死亡<sup>[24]</sup>。Bergsbaken 等<sup>[25]</sup>报道称,宿主细胞在受到病原微生物的侵染或内源性危险信号刺激时,宿主细胞会发生 caspase-1 依赖性的不同于细胞凋亡的死亡,称为细胞焦亡,与细胞凋亡一样,细胞焦亡表现为核固缩、染色质 DNA 断裂、TUNEL 染色阳性;细胞膜完整性丧失,并释放促炎性细胞内容物,诱发炎症反应,是其不同于细胞凋亡的特征。研究表明细胞焦亡是由 Caspase-1 介导的细胞死亡过程。细胞焦亡在感染等多中疾病的发生中起作用<sup>[26]</sup>。本研究发现肺部组织 Caspase-1 的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ),而 Caspase-3 的表达水平未见明显变化 ( $P > 0.05$ )。说明小鼠感染后 Caspase-1 的激活对肺组织病变的发生起非常重要的作用,可能涉及细胞焦亡。

可见,TLR-4 信号通路可能参与 APP 感染引起的肺部炎症的发生。APP 感染后激活 TLR-4 信号通路使有关细胞释放炎症因子,引起的肺部炎症;Caspase-1 参与了肺部细胞死亡的分子过程,为进一步研究 APP 感染病理学和临床用药提供新的参考依据。

## 参考文献

- [1] Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Veterinary Research*, 2010, 41 (5) : 65-80.
  - [2] Lv S, Guo G, Tang N, Wei F, Shen Z. Advancement of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in molecular biological research. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27 (6) : 574-577. (in Chinese)
- 吕素芳,郭广君,唐娜,魏凤,沈志强.猪胸膜肺炎放线杆菌分子生物学研究进展.中国人兽共患病学报,

- 2011, 27 (6) : 574-577.
- [3] Xiao L, Zhou L, Sun C, Feng X, Du C, Gao Y, Ji Q, Yang S, Wang Y, Han W, Langford PR, Lei L. Apa is a trimeric autotransporter adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* responsible for autoagglutination and host cell adherence. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52 (5) : 598-607.
- [4] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4 : 499-511.
- [5] Li W, Jiang D, Zhu F, Qi X. Progress of molecular mechanism of endotoxin tolerance. *Chinese Journal of Immunology*, 2010, 26 : 764-768. (in Chinese)  
李维朝, 蒋电明, 朱凤臣, 祁晓桐. 内毒素耐受的分子机制研究进展. 中国免疫学杂志, 2010, 26 : 764-768.
- [6] Li R, Wang Q, Cai W, Yang C, Zhang H, Wu L. Construction and evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* models. *Modern Animal Husbandry*, 2009, 2 : 5-10. (in Chinese)  
李润生, 王全胜, 蔡文礼, 杨昌祥, 张宏, 吴龙. 猪放线杆菌胸膜肺炎模型的构建及其评价. 当代畜禽养殖业, 2009, 2 : 5-10.
- [7] Hedegaard J, Skovgaard K, Mortensen S, Sørensen P, Jensen TK, Hornshøj H, Bendixen C, Heegaard PM. Molecular characterisation of the early response in pigs to experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using cDNA microarrays. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2007, 49 : 1-11.
- [8] Chen J, Jiang H. TLR-4 signaling pathway and inflammatory reaction. *Medical Recapitulate*, 2009, 10, 15 (19) : 2902-2904. (in Chinese)  
陈洁, 姜虹. TLR-4 信号通路与炎症反应. 医学综述, 2009, 10, 15 (19) : 2902-2904.
- [9] Chen W, Shi Z. Interaction of extracellular molecules in TLR4 signal transduction pathway. *Medical Recapitulate*, 2006, 12 (9) : 522-524. (in Chinese)  
陈伟, 史忠. TLR4 信号转导通路中胞外分子之间的相互作用. 医学综述, 2006, 12 (9) : 522-524.
- [10] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, 406 (6797) : 782-786.
- [11] Li Y, MA Li, Mao B, Qian G. TLR4-MD2 signaling pathway induced by endotoxin. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2002, 18 (2) : 121-125. (in Chinese)  
李永旺, 麻莉. 内毒素诱导的 TLR4-MD2 信号传导通路. 中国药理学通报, 2002, 8, 18 (2) : 121-125.
- [12] Zhao B, Huo H, Jiang T. Research status of Toll like receptor-4. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2007, 12 (1) : 19-22. (in Chinese)  
赵保胜, 霍海如, 姜廷良. Toll 样受体 4 的研究及现状. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12 (1) : 19-22.
- [13] Poltork AL, Smimova X. Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Molecules and eases*, 1998, 15 : 340-355.
- [14] Liu X, Fang X, Zhou X, Meng C, Ren S. Alteration of toll-like receptors TLR2 and TLR4 and gene expression of proinflammatory factors TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in lungs of swine after *Mycoplasma pneumoniae* injection. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 27 (6) : 1305-1309. (in Chinese)  
刘筱, 方晓敏, 邹晓龙, 孟翠, 任守文. 猪感染肺炎支原体后肺组织 TLR2、TLR4 及促炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  基因表达的变化. 江苏农业学报, 2011, 27 (6) : 1305-1309.
- [15] Qiu C, Hou G, Hang D. Molecular Mechanism of TNF- $\alpha$  Signal Transduction. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23 (6) : 430-435. (in Chinese)  
丘创华, 侯敢, 皇帝南. TNF- $\alpha$  信号传导通路的分子机理. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23 (6) : 430-435.
- [16] Fossum C, Watrangan E, Fuxler L, Jensen KT, Wallgren P. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) as markers for acute bacterial infection in swine—a possible role for serum interleukin-6. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998, 64 (2) : 161-172.
- [17] Hu Y, Shen G, Bai H. Research progress of interleukin-18 and its relevant disease. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2005, 11 : 44-46. (in Chinese)  
胡迎东, 沈国顺, 白红光. 白细胞介素 18 与有关疾病的研究进展. 现代畜牧兽医, 2005, 11 : 44-46.
- [18] Xu Y, Xu H. Study on rat small airway epithelium injury induced by *Klebsiella pneumoniae* and relation with TNF- $\alpha$  in the lung. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2005, 1 : 12-14. (in Chinese)  
许燕萍, 许浒. 肺炎克雷伯菌引起大鼠小气道上皮细胞损伤及与肺内  $\alpha$  肿瘤坏死因子关系的探讨. 中国生化药物杂志, 2005, 1 : 12-14.
- [19] Chen Y, Huang W, Li S, Liang K. Changes of INF- $\gamma$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in rats with severe pneumonia. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2007, 23 (3) : 492-494. (in Chinese)  
陈业民, 黄文杰, 李胜利, 梁坤. 重症肺炎大鼠干扰素- $\gamma$ 、白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  含量变化. 中国病理生理杂志, 2007, 23 (3) : 492-494.
- [20] Wang Q, Li R, Cai W, Yang C. Model of *Porcine contagious pleuropneumoniae* and study on biological evaluation of progress. *Modern Animal Husbandry*, 2008,

12:8-10. (in Chinese)

王全胜,李润生,蔡文礼,杨昌祥.猪放线杆菌胸膜肺炎模型的建立及生物学评价指标的研究进展.当代畜禽养殖业,2008,12:8-10.

- [21] Myers MJ, Farrell DE, Snider TG 3rd, Post LO. Inflammatory cytokines, pleuropneumonia infection and the effect of dexamethasone. *Pathobiology*, 2004, 71 (1) : 35-42.
- [22] Zhang L, Zhang T, Tan N. Programmed cell death independent of caspases. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9 (19) ,3760-3763 (in Chinese)  
张琳刚,张天禹,谭宁.细胞程序性死亡的非 Caspase 依赖型途径.现代生物医学进展,2009,9(19):3760-3763.
- [23] Chen M. Research Advance on programmed cell death pathway. *Chemical Engineering & Equipment*, 2012, 6: 154-158. (in Chinese)

陈默.细胞程序性死亡研究进展.化学工程与装备,2012,6:154-158.

- [24] Wu H, Chen Y, Xu Y, Shen P. The role of caspase-1 played in the process of inflammation and programmed cell death. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, 33 (2) : 182-189. (in Chinese)  
郭皓晨,陈勇军,徐易尘,沈萍萍. Caspase-1 在炎症及程序性细胞死亡过程中的作用.中国细胞生物学学报,2011,33(2):182-189.
- [25] Bergsbaken T, Fink SL, Coombs BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation pyroptosis. *Nature Review Microbiology*, 2009, 7:99-109.
- [26] Lin J, Li D. Pyroptosis: a caspase-1-dependent cell death. *International Journal of Immunology*, 2011, 05, 34 (3) : 213-218. (in Chinese)  
林静,李大主.细胞焦亡:一种新的细胞死亡方式.国际免疫学杂志,2011,05,34(3):213-218.

## TLR-4 involvement in pyroptosis of mice with pulmonary inflammation infected by *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Peipei Hu, Fushen Huang<sup>\*</sup>, Junchao Niu, Zhaoshan Tang

Veterinary Faculty, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China

**Abstract:** [Objective] Pyroptosis is a caspase-1 dependent programmed cell death and involves pathogenesis of infectious diseases by releasing many pro-inflammatory cytokines to induced inflammation. TLR-4 plays an important role in mediating pathogenesis of some infectious diseases. In this study, we detected the expression of TLR-4 and some molecules (e. g caspase-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18) related with pyroptosis to determine its involvement and mechanisms of pulmonary inflammation in mice infected by *A. pleuropneumoniae*. [Methods] Mice were intranasally infected by *A. pleuropneumoniae* and killed 48 hours post infection. Pulmonary gross lesion and histological pathology by H-E were observed. Expression levels of caspase-1, caspase-3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, and TLR-4 in lung of mice were detected by RT-PCR and qPCR. [Results] Serious pulmonary hemorrhage and inflammation in infected mice were observed. Expression levels of caspase-1, caspase-3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 and TLR-4 increased, and expression levels of caspase-3 were not changed in lung of infected mice. [Conclusion] TLR-4 might be involved in pulmonary inflammation of mice infected by *A. pleuropneumoniae*. After induced by activated TLR-4 some cells in this lesion expressed pro-inflammatory cytokines. These cytokines would induce pulmonary inflammation. This lesion might involve pyroptosis with caspase-1 expression.

**Keywords:** porcine contagious pleuropneumonia, mice, pathology, molecular and cellular mechanism, TLR-4 signaling, pyroptosis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Graduate Innovation Fund of Hunan Agricultural University (12254-YCX201302) and by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of State Education Ministry (GT0096)

<sup>\*</sup> Corresponding author. E-mail: 15211071993@163.com

Received: 11 September 2014 / Revised: 4 December 2014