

研究报告

猪源 ISG15 蛋白通过促进炎症因子释放和巨噬细胞死亡加剧胸膜肺炎放线杆菌感染

甘林, 文字, 田岩岩, 张开心, 李丰阳, 雷连成, 李娜*

吉林大学 动物医学学院 人兽共患病研究教育部重点实验室, 吉林 长春 130062

甘林, 文字, 田岩岩, 张开心, 李丰阳, 雷连成, 李娜. 猪源 ISG15 蛋白通过促进炎症因子释放和巨噬细胞死亡加剧胸膜肺炎放线杆菌感染[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 713-724.

GAN Lin, WEN Yu, TIAN Yanyan, ZHANG Kaixin, LI Fengyang, LEI Liancheng, LI Na. Porcine ISG15 exacerbates *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by promoting inflammatory cytokine release and macrophage death[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 713-724.

摘要: 【背景】猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)感染引起的一种呼吸道疾病,该病死亡率可达 80%–100%。干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated genes 15, ISG15)蛋白可抑制病毒的复制,但其在 APP 方面的研究尚不清楚。【目的】构建猪源 ISG15 原核表达载体,纯化 ISG15 蛋白并研究其对 APP 感染的影响。【方法】构建 pET-28a-ISG15 原核表达载体,纯化获得 ISG15 蛋白。采用流式细胞术和实时荧光定量 PCR 法检测 ISG15 蛋白处理后肺泡巨噬细胞死亡情况和炎症因子表达水平。建立 APP 感染小鼠模型,鼻内给药 ISG15 后,检测小鼠体重、临床症状及存活情况,分析 ISG15 对 APP 致病性的影响。【结果】获得了 ISG15 蛋白。相较于单独攻菌组,ISG15 添加组的肺泡巨噬细胞死亡率、炎症因子 IL-6 和 IFN- γ 表达水平均显著升高($P<0.05$)。在小鼠试验中,相较于单独攻菌组,中剂量和高剂量 ISG15 组小鼠的临床症状及死亡率显著上升,肺组织 IL-6、IFN- γ 和 IL-1 β 表达水平显著增加。【结论】ISG15 通过促进肺泡巨噬细胞死亡和炎症因子的释放加剧 APP 的感染,为 APP 防治技术的研发提供了理论基础。

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌; ISG15; 炎症因子; 巨噬细胞

资助项目: 国家自然科学基金(32273006)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32273006).

*Corresponding author. E-mail: vetlina2013@126.com

Received: 2024-11-09; Accepted: 2025-01-15; Published online: 2025-01-21

Porcine ISG15 exacerbates *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by promoting inflammatory cytokine release and macrophage death

GAN Lin, WEN Yu, TIAN Yanyan, ZHANG Kaixin, LI Fengyang, LEI Liancheng, LI Na*

Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] Porcine transmissible pleuropneumonia is a respiratory disease caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection, and the mortality rate of the disease can reach 80%–100%. The ISG15 protein inhibits viral replication, but its study in *Actinobacillus pleuropneumoniae* is unknown. [Objective] To build a prokaryotic expression vector for porcine ISG15, purify the protein, and study its effect on *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) infection. [Methods] A prokaryotic expression vector pET-28a-ISG15 was constructed for the expression of ISG15. Flow cytometry and fluorescence quantitative PCR were used to detect the death of alveolar macrophages and the expression of inflammatory cytokines after ISG15 treatment. A mouse model of APP infection was established. After intranasal administration of ISG15, the body weight, clinical symptoms, and survival of the mice were measured to analyze the influence of ISG15 on the pathogenicity of APP. [Results] ISG15 was obtained successfully after prokaryotic expression and purification. The death of alveolar macrophages and the expression levels of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and interferon-gamma (IFN- γ) were increased after ISG15 treatment ($P < 0.05$). Compared with the APP challenge group, the mice treated with medium- and high-dose ISG15 post-infection showed severe clinical symptoms, increased mortality, and up-regulated expression levels of IL-6, IFN- γ , and IL-1 β in the lung tissue. [Conclusion] ISG15 aggravates the APP infection by promoting the death of alveolar macrophages and the expression of inflammatory cytokines. The findings provide a theoretical basis for developing methods for the prevention and treatment of APP.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; ISG15; inflammatory cytokine; macrophage

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)感染引起的一种呼吸道疾病,该病死亡率高达 80%–100%,给养猪业造成了严重的经济损失^[1]。临床上,该菌常与猪链球菌(*Streptococcus suis*)、猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus)、副猪格拉瑟氏菌(*Glaesserella parasuis*)等其他病原体混合感染,加剧了该病的危害。APP 血清型众多,灭活疫

苗对不同血清型的交叉保护效果不理想,加之细菌耐药性的增加,致使该病的防治更加困难。

干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated genes 15, ISG15)是一种 I 型干扰素(interferon)诱导基因,主要以细胞内游离形式、与靶标蛋白偶联的细胞内形式和细胞外分泌形式这 3 种形式存在。细胞内 ISG15 主要功能为病毒和细胞蛋白的翻译后修饰,类似于泛素化。在这个

过程中,该蛋白通过与 150 多种蛋白质靶标偶联,介导经典免疫信号通路,如 NF- κ B、JNK 和 IRF-3 通路^[2]。胞外分泌的 ISG15 也可以作为一种细胞因子或趋化因子发挥调节免疫细胞的作用^[3]。当前,多个研究表明 ISG15 可以通过与宿主蛋白的非共价结合来破坏病毒复制,例如,与甲型流感病毒(influenza a virus, IAV)中的非结构蛋白 1 (non structural protein 1, NS1)结合^[4-5],进而抑制病毒复制,诸如此类病毒还包括呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)^[6]、人乳头瘤病毒 16 型(human papillomavirus type 16, HPV16)^[7]及辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SINV)^[8]等。除此之外,在癌症中,ISG15 可根据肿瘤类型表现出抑制或促进肿瘤作用^[9],例如 ISG15 参与调节胰腺癌干细胞代谢中关键蛋白的活性,从而破坏其代谢可塑性,促进其凋亡^[10]。总的来说,目前对 ISG15 的研究主要集中于病毒、癌症等,而对于细菌类疾病的研究甚少。

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)是肺部感染的第一道防线,是抵挡病原微生物感染的关键一环。此前研究表明,APP 感染后会诱导肺泡巨噬细胞死亡并产生过量的促炎细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等,加剧肺损伤^[11]。在牛痘病毒(Vaccinia virus, VACV)感染中,ISG15 可通过调节线粒体功能和稳定性,促进巨噬细胞极化为促炎表型,从而降低病毒滴度^[12]。此外,ISG15 缺失加重小鼠结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的感染^[13]。王俊^[14]发现 APP 感染猪肺支气管上皮细胞能够诱导细胞分泌含有大量 ISG15 的外泌体囊泡,该外泌体可通过递送内容物至巨噬细胞,激活巨噬细胞,但是 ISG15 对细菌感染引发的炎症应答有何作用尚不清楚。

因此,本研究克隆了猪源 ISG15 基因,对

其进行原核表达,并利用纯化的 ISG15 蛋白初步探究了其对 APP 感染的影响,为 APP 防治技术的研发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和重组蛋白表达受体菌 BL21(DE3), TaKaRa 公司。pET-28a(+)原核表达载体由本实验室保存。APP 血清 5 型菌株 L20 保存于本实验室。猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophage, PAM)由本实验室保存。6-8 周龄(20 \pm 2) g 的 ICR 小鼠,辽宁长生生物技术股份有限公司。动物实验方案获得吉林大学实验动物福利伦理委员会批准(JLUA-1309)。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

LB 溶菌肉汤培养基(卡那霉素 50 μ g/mL) (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; 脑心浸液(brain-heart infusion, BHI)培养基(g/L): 葡萄糖 11.0, 酵母提取物 25.0, 脑心浸液 15.0, 使用前需添加 5%马血清、20 μ g/mL 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD); 固体培养基则需要以上条件基础上额外添加 15 g/L 琼脂。

高糖 DMEM 细胞培养基, 宝生物工程(大连)有限公司; PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶(*Eco*R I 和 *Xho* I)、T4 DNA 连接酶及反转录预混型试剂盒(含去除 gDNA 试剂), TaKaRa 公司; TRIzol 试剂、RNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒及质粒小量提取试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 青霉素-链霉素双抗, Gibco 公司; 7-AAD Viability Staining Solution, BioLegend 公司; 胎牛血清, Clark 公司; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, Sigma 公司。

细菌振荡培养箱, 哈尔滨东联电子有限公司; 细菌恒温培养箱, 上海一恒公司; NanoDrop

微量分光光度计, 荧光定量 PCR 仪, Thermo fisher 公司; 流式细胞分析仪, Bio-Rad 公司。

1.3 培养条件

APP 的培养参照文献[11]。APP 菌株培养于 37 °C 恒温培养箱的 BHI 培养基。

PAM 培养于含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 IU/mL) 及链霉素 (100 IU/mL) 成分的高糖 DMEM 培养基中, 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养, 经 3 次以上传代后可使用。

1.4 引物设计与目的基因的扩增

按照 TRIzol 试剂说明提取 PAM 细胞的总 RNA, 并用 NanoDrop 微量分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 使用反转录预混型试剂盒 (含去除 gDNA 试剂) 将总 RNA 逆转录为 cDNA 后待用。

根据猪 ISG15 基因序列 (NM_001128469.2) 设计 1 对引物, 并在上、下游引物末端分别添加 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 该引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物为 ISG15-F (5'-CGGAATTCATGGGTAGGGAAGTGAAGG T-3') 和 ISG15-R (5'-CCGCTCGAGGCACATAG GCTTGAGGTCAT-3')。PCR 反应体系 (25 μL): 2×PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶预混剂 12.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL, cDNA (1 μg/mL) 1 μL。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后确定其扩增产物的特异性及大小。通过胶回收试剂盒、纯化试剂盒回收纯化目的条带。

1.5 重组质粒 pET-28a-ISG15 的构建

将 pET-28a(+) 载体与 PCR 回收产物分别经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 酶切产物分别经 0.8%、2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 切胶回收目的基因及线性化载体片段, 经 DNA ligation kit 连

接后, 将连接产物转化至 DH5α 感受态细胞。在转化后的卡那霉素抗性平板挑取单个菌落至 5 mL 含卡那霉素的溶菌 LB 肉汤培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养 16 h 后用质粒小提试剂盒提取质粒, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定大小正确的阳性克隆重组质粒, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.6 pET-28a-ISG15 重组蛋白诱导表达条件的优化

将鉴定正确的 pET-28a-ISG15 转化至感受态 *E. coil* BL21(DE3) 中, 通过菌落 PCR 挑取阳性克隆单菌落至含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中制备种子液, 37 °C 培养过夜; 将种子液按照 1% 接种量转接至含卡那霉素的 LB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养, 待 OD₆₀₀ 达到 0.6–0.8 时, 将菌液分装至 6 个 50 mL 灭菌离心管中, 分为 3 组, 第一组 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L, 第二组 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 第三组终浓度为 1 mmol/L, 诱导条件分别为: 16 °C 24 h, 37 °C 12 h。8 000 r/min 离心 6 min 收集诱导菌体, 冰浴条件下超声波裂解, 超声条件: 功率 200 W, 开 3 s 停 3 s, 30 min; 4 °C、10 800×g 离心 6 min 后, 分离上清与沉淀, 制样后通过 12% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 确定最佳诱导条件。

1.7 ISG15 蛋白的纯化

以 1.6 的最佳诱导条件大量诱导表达蛋白 pET-28a-ISG15, 参照文献[15]纯化 ISG15 蛋白。取不同时间段的菌液制样用于凝胶电泳、考马斯亮蓝染色鉴定, 分别为: 诱导前全菌、诱导后全菌、诱导后上清、诱导后沉淀、不同浓度 (25、50 和 500 mmol/L) 咪唑洗脱液。

1.8 CCK-8 法检测 ISG15 蛋白的细胞毒性

将 PAM 细胞按照 5×10⁶ cells/mL 的密度接种至 96 孔无菌细胞培养板, 培养 24 h 细胞铺满孔

板后弃去上清，用 PBS 清洗 3 次后，加入 100 μ L 不含双抗和血清的 DMEM 培养基，向 PAM 细胞中加入不同质量浓度的 ISG15 蛋白溶液(终质量浓度 5、50 和 500 ng/mL)，空白对照组细胞中添加 100 μ L 空白培养基。分别于 6、12、24 h 利用 CCK-8 法检测 PAM 细胞活力状况，以评价不同浓度 ISG15 蛋白对 PAM 的细胞毒性。

1.9 流式细胞术检测细胞的活力

将细胞分为 4 组，蛋白添加组是在 PAM 细胞中分别加入含 5 ng/mL 和 50 ng/mL ISG15 蛋白溶液的 DMEM 基础培养基，其余 PAM 细胞分为空白对照组、攻菌组，仅添加 DMEM 基础培养基；继续培养 12 h，孵育结束后用 PBS 清洗 3 次去除双抗，添加 500 μ L 不含血清和双抗的 DMEM 培养基。除空白对照组外的试验组将 APP 与 PAM 细胞以 MOI=20 (APP:PAM=20:1) 共培养。培养 3 h 后收集细胞。1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液，使用 5 μ g 7-AAD 工作液重悬细胞并置于冰中，应用流式细胞仪的 PI 通道检测细胞死亡情况。

1.10 RT-qPCR 法检测细胞的炎症因子水平

将 PAM 细胞中加入 50 ng/mL ISG15 溶液的 DMEM 基础培养基，攻菌步骤同 1.9。培养 3 h 后收集细胞，按照 1.4 的步骤提取 cDNA，参照文献[16]用实时荧光定量 PCR 法进行检测，以 β -actin 为管家基因，使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)表达水平，具体分组如下：PAM, PAM+APP, PAM+APP+ISG15 (50 ng/mL)，实验进行 3 次生物学重复。引物序列参考文献[14]，详见表 1。

1.11 动物实验

SPF 级 ICR 小鼠用于建立 APP 感染模型。将 30 只 6-8 周龄的 ICR 小鼠随机分为 5 组，每组 6 只，分别为空白对照组，ISG15 低剂量(50 μ g/只)、中剂量(100 μ g/只)、高剂量(200 μ g/只)试验组和攻菌对照组，将每组的小鼠进行标号。攻菌前分别记录各组的体重和临床症状，其中临床症状评分相关细则见参考文献[17]。根据分组对每组小鼠

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primer pairs in real-time PCR

| Gene name | Prime | Sequence (5'→3') |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Pig-IL-6</i> | Pig-IL-6-F | GGAGACCTGCTTGATGAGAATC |
| | Pig-IL-6-R | GGCCTCGACATTTCCCTTATT |
| <i>Pig-IFN-γ</i> | Pig-IFN- γ -F | GTAGCTCTGGGAAACTGAATGA |
| | Pig-IFN- γ -R | GATGAGTTCACTGATGGCTTTG |
| <i>Pig-β-actin</i> | Pig- β -actin-F | CATCACCATCGGCAACGA |
| | Pig- β -actin-R | GCGTAGAGGTCCTTCCTGA |
| <i>Mouse-GAPDH</i> | Mouse-GAPDH-F | GCAAATTCAACGGCACAGTCAAG |
| | Mouse-GAPDH-R | TCGCTCCTGGAAGATGGTGATG |
| <i>Mouse-IL-6</i> | Mouse-IL-6-F | CGGTCTTGTGGAGTTTCAGATA |
| | Mouse-IL-6-R | CTGGATCAGTGCTTTGGTACT |
| <i>Mouse-IFN-γ</i> | Mouse-IFN- γ -F | CTCTCCTCATGGCTGTTTCT |
| | Mouse-IFN- γ -R | TTCTTCCACATCTATGCCACTT |
| <i>Mouse-IL-1β</i> | Mouse-IL-1 β -F | TCCAGGACAAAGACCACAAATC |
| | Mouse-IL-1 β -R | GCAGAACACCACTTCTCTTTC |

通过滴鼻进行攻菌, 攻菌浓度为 3×10^7 CFU/只, 攻菌后按照分组分别对小鼠通过滴鼻给予不同浓度的 ISG15 蛋白, 攻菌对照组滴入等量的 PBS 溶液。将攻菌的时间点记为 0 h, 分别于 6、12、24 h 三个时间点记录各组的死亡情况、体重及临床症状变化。于攻菌 24 h 后将剩余小鼠麻醉, 进行灌注后取其肺脏置于 -80°C 保存。取小鼠同一部位的肺脏, 并按照 1.10 步骤提取该肺组织的总 RNA, 测定 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 基因表达情况, 引物序列见表 1。

1.12 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10 软件作图并进行显著性差异分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建与鉴定结果

2.1.1 猪源 ISG15 基因克隆及重组表达载体构建

提取 PAM 细胞总 RNA, 用特异性引物通过 PCR 扩增出 ISG15, 电泳结果显示大小为 513 bp, 与预期条带大小一致(图 1A)。重组质粒 pET-28a-ISG15 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 得到大小约为 5 369 bp 和 513 bp 的 2 个基因片段, 与预期相符(图 1B)。将鉴定成功的重组质粒测序, 并与 GenBank 中猪 ISG15 原序列进行比对, 比对结果表明 ISG15 序列成功插入 pET-28a 载体且并无突变, 表明质粒构建成功。

2.1.2 重组质粒 pET-28a-ISG15 最佳诱导条件及蛋白纯化

设置不同条件摸索重组质粒 pET-28a-ISG15 的最佳诱导条件, 结果显示, 该重组蛋白多在沉淀中表达, 选择温度 37°C , IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L , 诱导条件为 12 h, 其在上清中表

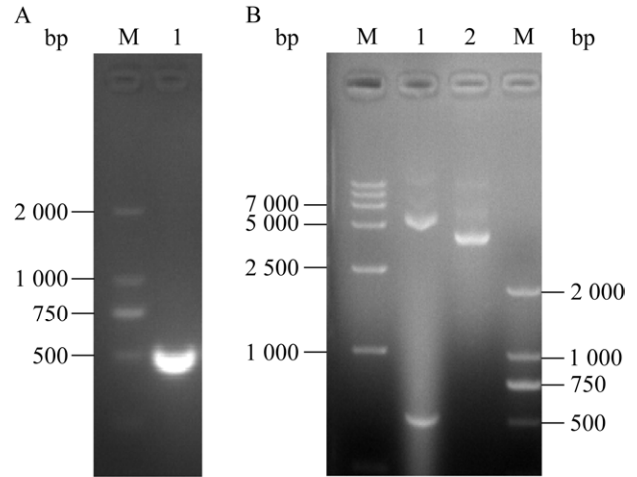


图 1 ISG15 的 PCR 扩增结果(A)和 pET-28a-ISG15 双酶切鉴定(B) A 中 M: DNA 分子量表征; 1: ISG15 的扩增片段。B 中 M: DNA 分子量表征; 1: 酶切后 pET-28a-ISG15 质粒; 2: pET-28a-ISG15 质粒。

Figure 1 PCR amplification of ISG15 (A) and dual-enzyme digestion of pET-28a-ISG15 (B). A: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1: Amplified fragment of ISG15. B: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1: pET-28a-ISG15 plasmid after enzyme digestion; 2: pET-28a-ISG15 plasmid.

达较多(图 2A)。以该最佳条件进行蛋白纯化, 通过不同浓度的咪唑对镍柱进行洗脱, 可见 ISG15 蛋白在 500 mmol/L 咪唑洗脱液中沉淀最多(图 2B)。通过镍柱亲和层析实现了对 ISG15 蛋白的分离纯化, 纯化后的 ISG15 蛋白最终浓度为 2 mg/mL 。

2.2 ISG15 蛋白对 PAM 的细胞毒性

CCK-8 结果证明, 相较于空白对照组, ISG15 各浓度组细胞活力无显著差异(图 3), 提示 500 ng/mL 以下的 ISG15 蛋白对细胞均无显著毒性。

2.3 ISG15 蛋白促进 APP 感染的 PAM 死亡

7-AAD 染色流式细胞术结果显示, 相较于攻菌对照组, 5 ng/mL ISG15 蛋白组细胞死亡率显著增加($P < 0.05$), 50 ng/mL ISG15 蛋白组 PAM

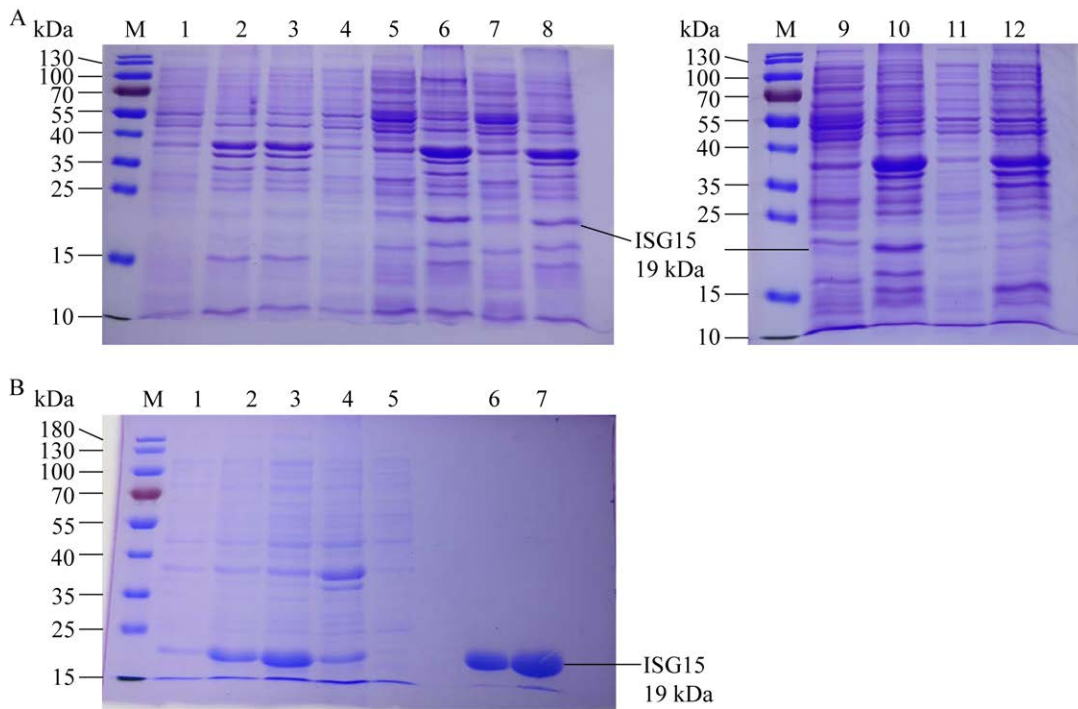


图 2 重组蛋白 pET-28a-ISG15 诱导表达的 SDS-PAGE 分析(A)和镍柱层析纯化(B) A 中 M: 蛋白 marker; 1-4 分别为 1 mmol/L IPTG 诱导后上清、沉淀、0.5 mmol/L IPTG 诱导后沉淀、上清(均为 16 °C 诱导); 5-8 分别为 1 mmol/L IPTG 诱导后上清、沉淀、0.5 mmol/L IPTG 诱导后上清、沉淀(均为 37 °C 诱导); 9-10 分别为 0.1 mmol/L IPTG 诱导后上清、沉淀(37 °C 诱导); 11-12 为 0.1 mmol/L IPTG 诱导后上清、沉淀(16 °C 诱导)。B 中 M: 蛋白 marker; 1: 诱导前全菌; 2: 诱导后全菌; 3: IPTG 诱导后上清; 4: IPTG 诱导后沉淀; 5: 25 mmol/L 咪唑洗脱液; 6: 50 mmol/L 咪唑洗脱液; 7: 500 mmol/L 咪唑洗脱液。
 Figure 2 SDS-PAGE analysis (A) and nickel column chromatography purification (B) of recombinant protein pET-28a-ISG15 induced expression. A: M: Protein marker; 1-4 were supernatant and precipitation after 1 mmol/L IPTG induction, and after 0.5 mmol/L IPTG induction (both induced at 16 °C), respectively; 5-8 were supernatant and precipitation after 1 mmol/L IPTG induction, and after 0.5 mmol/L IPTG induction (both induced at 37 °C) respectively; 9-10 were supernatant induced by 0.1 mmol/L IPTG and precipitated (induced at 37 °C), respectively; 11-12 was supernatant induced by 0.1 mmol/L IPTG and precipitated (induced at 16 °C). B: M: Protein marker; 1: Whole bacteria before induction; 2: Whole bacteria after induction; 3: Supernatant of the recombinant bacteria induced with IPTG; 4: Precipitate of the recombinant bacteria induced with IPTG; 5: 25 mmol/L imidazole purified protein; 6: 50 mmol/L imidazole purified protein; 7: 500 mmol/L imidazole purified protein.

死亡率极显著增加($P<0.01$) (图 4), 该结果表明 ISG15 蛋白的添加加剧了 APP 感染下的 PAM 死亡。

2.4 ISG15 蛋白促进 APP 感染的 PAM IL-6 和 IFN- γ 表达

由图 5 结果可知, 相较于 APP 感染组, 50 ng/mL ISG15 蛋白组的 PAM 细胞的 IL-6 表达水平极显

著增加($P<0.01$), IFN- γ 表达水平显著增加 ($P<0.05$)。表明 ISG15 蛋白促进 APP 感染下的 PAM 炎症因子的表达。

2.5 ISG15 增加 APP 对小鼠的致病性

相较于攻菌对照组, 不同浓度的 ISG15 组 体重差异无统计学意义($P>0.05$), 但在 6、12 和

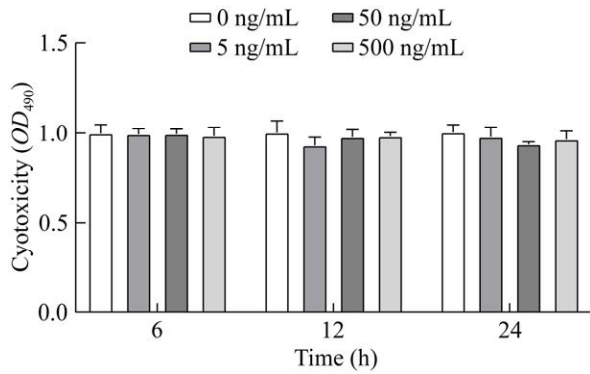


图3 ISG15蛋白对PAM的细胞毒性
Figure 3 Cytotoxicity of ISG15 protein on PAM.

24 h时,小鼠的临床症状评分中200 μ g ISG15组小鼠的临床评分均显著升高,12 h中,100 μ g ISG15组小鼠临床评分显著升高($P < 0.05$) (图6)。24 h后,相较于攻菌对照组,100 μ g和200 μ g组小鼠存活率均显著下降(图6)。此外,相较于攻菌对照组,100 μ g和200 μ g组中ISG15处理组小鼠肺组织的炎症因子IL-6、IL-1 β 及IFN- γ 均显著上升(图6)。以上结果表明,ISG15会加剧APP感染,增加对小鼠的致病性,并且随着ISG15浓度的增加而增加。

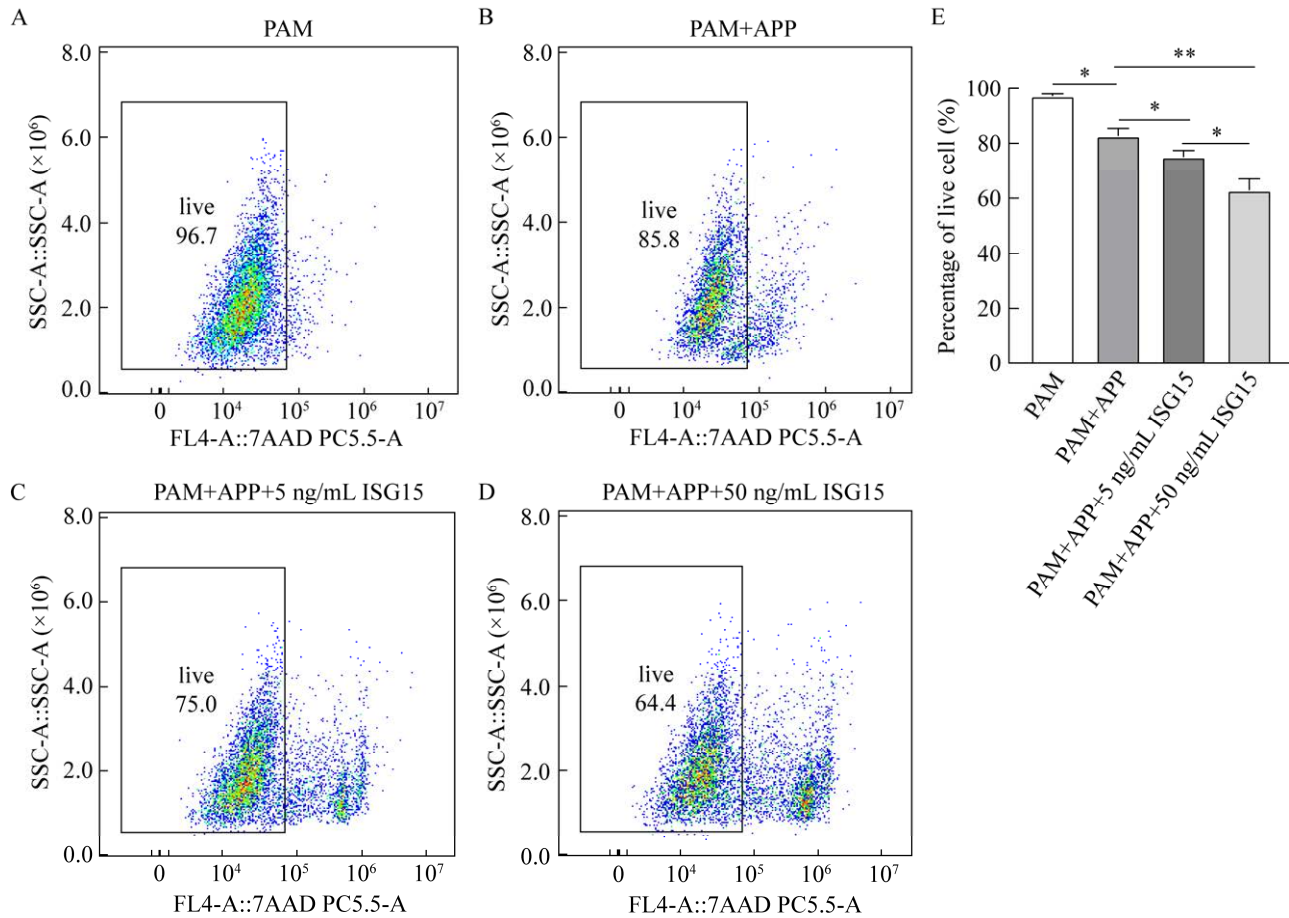


图4 7-AAD检测APP感染后的PAM死亡情况 A:空白对照组;B:攻菌组;C:攻菌+5 ng/mL ISG15组;D:攻菌+50 ng/mL ISG15组;E:各组数据分析图。

Figure 4 7-AAD detection of PAM death after APP infection. A: Blank control group; B: Attacked group; C: Attacked+5 ng/mL ISG15 group; D: Attacked+50 ng/mL ISG15 group; E: Data analysis graphs of each group. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

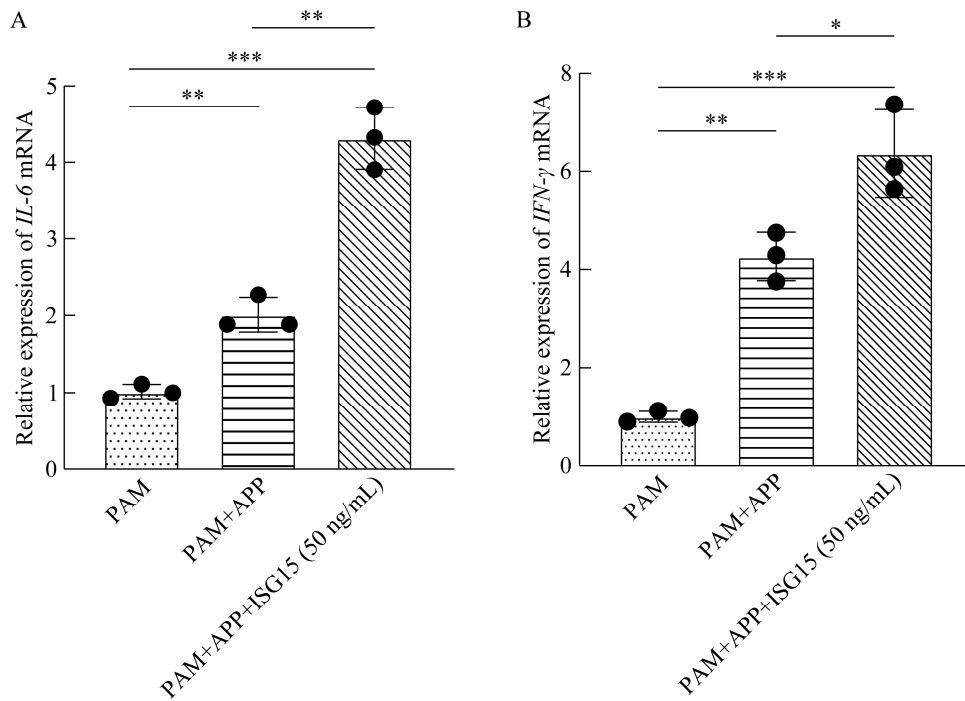


图5 RT-qPCR检测APP感染后炎症因子表达 A: IL-6表达水平; B: IFN- γ 表达水平。

Figure 5 The expression of inflammatory factor after APP infection was detected by RT-qPCR. A: IL-6 expression level; B: IFN- γ expression level. ns: Not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论

APP是一种革兰氏阴性荚膜球杆菌,可引发猪传染性胸膜肺炎,从而诱发严重的肺组织损伤,导致临床症状和死亡,造成养殖户巨大的经济损失。因此,研究APP的致病机制对该病原的防治具有重要意义。

ISG15通过多种机制发挥作用:(1)共价蛋白修饰(ISGylation);(2)非共价细胞内作用;(3)发挥细胞外细胞因子活性。通过这些机制,ISG15控制多个细胞途径并参与多种疾病过程,包括DNA损伤反应、自噬、抗病毒反应和癌症相关过程等^[18]。通常认为,ISG15一方面可通过直接与病毒靶蛋白结合抑制病毒复制,另一方面可通过其细胞外信号传导促进先天免疫反应。但与公认的抗病毒性不一样,ISG15根据

肿瘤情况促进或抑制肿瘤发生。在细菌方面,ISG15的作用也呈现“双刃剑”性质,例如在感染了结核分枝杆菌后,ISG15缺失小鼠比正常小鼠更易感,但感染后期,ISG15介导的IFN- γ 反而会增加小鼠死亡率。在临床中,APP在猪群中依靠猪只口鼻的直接接触或者是气溶胶的方式感染呼吸道,感染猪只表现呼吸困难、精神沉郁、体重下降等症状,剖检可见肺部有出血性和坏死性区域等。Bao等^[19]发现,APP感染ICR小鼠后,其症状、死后剖检结果与临床上感染猪只相似。此外,仔猪APP感染后肺组织巨噬细胞大量死亡,IFN- γ 等炎症因子过度释放,损伤严重^[20]。

本研究发现ISG15蛋白可以促进肺泡巨噬细胞死亡和IFN- γ 等炎症因子的释放,同时促

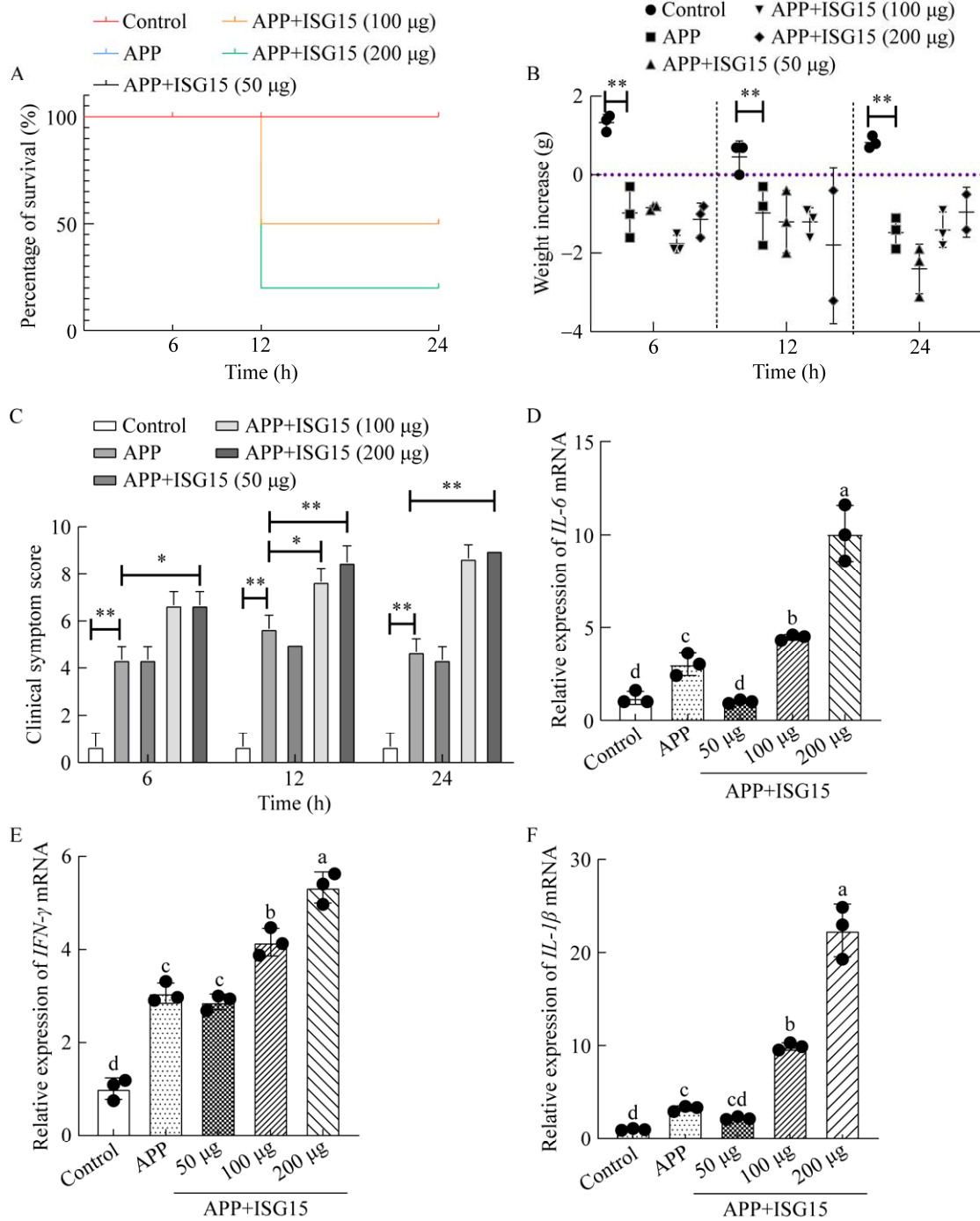


图 6 APP 感染后小鼠各指标变化 A: 小鼠存活率; B: 体重变化; C: 临床症状; D: IL-6 表达水平; E: IFN- γ 表达水平; F: IL-1 β 表达水平。

Figure 6 Changes of various indexes in mice after APP infection. A: Mice survival rate; B: Weight change; C: Clinical symptoms; D: IL-6 expression level; E: IFN- γ expression level; F: IL-1 β expression level. ns: Not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

进 APP 感染肺组织炎症因子释放, 加剧 APP 对小鼠的致病性。此前研究^[21]表明, IFN- γ 缺失会促进肺组织中 IL-18 的分泌, 并最终提高 APP 感染小鼠的存活率。而细胞外的 ISG15 可通过与白细胞功能相关抗原-1 (leukocyte function-associated antigen, LFA-1) 结合, 刺激细胞分泌 IFN- γ ^[22]。Swaim 等^[23]认为当 IL-12 驱动细胞因子(如 IL-10)表达时, ISG15 与 LFA-1 的结合会增强细胞因子的分泌。而 APP 刺激气管上皮细胞产生 IL-8、IL-6 及 TNF- α , 这些炎症因子可促使 APP 打破上皮屏障, 从而随着其他呼吸道病原体进行迁移^[24], 同时, 过量的炎症因子也会导致猪肺部发生病变。因此, 有必要进一步研究 ISG15 加剧 APP 感染作用机制。

4 结论

本研究成功构建了 pET-28a-ISG15 原核表达载体并纯化获得 ISG15 蛋白, 发现 ISG15 蛋白会加剧 APP 的感染, 促进 APP 感染的 PAM 死亡、炎性因子表达增多。该研究为 ISG15 加剧细菌感染方面提供了新佐证, 同时为有效控制 APP 感染提供了靶标。

REFERENCES

- [1] SASSU EL, BOSSÉ JT, TOBIAS TJ, GOTTSCHALK M, LANGFORD PR, HENNIG-PAUKA I. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(Suppl 1): 72-90.
- [2] JEON YJ, YOO HM, CHUNG CH. ISG15 and immune diseases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802(5): 485-496.
- [3] EBSTEIN F, LANGE N, URBAN S, SEIFERT U, KRÜGER E, KLOETZEL PM. Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009, 41(5): 1205-1215.
- [4] TANG YJ, ZHONG GX, ZHU LH, LIU X, SHAN YF, FENG HP, BU ZG, CHEN HL, WANG C. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 184(10): 5777-5790.
- [5] ZHAO C, HSIANG TY, KUO RL, KRUG RM. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5): 2253-2258.
- [6] GONZÁLEZ-SANZ R, MATA M, BERMEJO-MARTÍN J, ÁLVAREZ A, CORTIJO J, MELERO JA, MARTÍNEZ I. ISG15 is upregulated in respiratory syncytial virus infection and reduces virus growth through protein ISGylation[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(7): 3428-3438.
- [7] DURFEE LA, LYON N, SEO K, HUIBREGTSE JM. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15[J]. *Molecular Cell*, 2010, 38(5): 722-732.
- [8] LENSCHOW DJ, GIANNAKOPOULOS NV, GUNN LJ, JOHNSTON C, O'GUIN AK, SCHMIDT RE, LEVINE B, VIRGIN HW 4th. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection *in vivo*[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(22): 13974-13983.
- [9] YUAN Y, QIN H, LI HL, SHI WJ, BAO LC, XU ST, YIN J, ZHENG LF. The functional roles of ISG15/ISGylation in cancer[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1337.
- [10] ALCALÁ S, SANCHO P, MARTINELLI P, NAVARRO D, PEDRERO C, MARTÍN-HIJANO L, VALLE S, EARL J, RODRÍGUEZ-SERRANO M, RUIZ-CAÑAS L, ROJAS K, CARRATO A, GARCÍA-BERMEJO L, FERNÁNDEZ-MORENO MÁ, HERMANN PC, SAINZ B Jr. ISG15 and ISGylation is required for pancreatic cancer stem cell mitophagy and metabolic plasticity[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2682.
- [11] QIN WH, WANG L, ZHAI RD, MA QY, LIU JF, BAO CT, SUN DG, ZHANG H, SUN CJ, FENG X, GU JM, DU CT, HAN WY, LANGFORD PR, LEI LC. Apa2H1, the first head domain of Apa2 trimeric autotransporter adhesin, activates mouse bone marrow-derived dendritic cells and immunization with Apa2H1 protects against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 81: 108-117.
- [12] BALDANTA S, FERNÁNDEZ-ESCOBAR M, ACÍN-PÉREZ R, ALBERT M, CAMAFEITA E, JORGE I, VÁZQUEZ J, ENRÍQUEZ JA, GUERRA S. ISG15 governs mitochondrial function in macrophages following vaccinia virus infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(10): e1006651.
- [13] KIMMEY JM, CAMPBELL JA, WEISS LA, MONTE KJ, LENSCHOW DJ, STALLINGS CL. The impact of ISGylation during *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice[J]. *Microbes and Infection*, 2017, 19(4/5): 249-258.
- [14] 王俊. 猪气管上皮细胞外泌体抑制胸膜肺炎放线杆菌诱导肺泡巨噬细胞死亡的机制[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2024.
WANG J. Mechanism of porcine trachea epithelial cell exosome inhibiting death of alveolar macrophage induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2024 (in Chinese).

- [15] 伍军, 何文文, 普浩, 金敏, 石文玉, 马爱军, 罗亭祥, 杨德鹏, 巴音查汗, 呼尔查. 边缘革蜱 AQP 重组蛋白的表达及抗蜱效果[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(7): 1466-1472, 1506.
WU J, HE WW, PU H, JIN M, SHI WY, MA AJ, LUO TX, YANG DP, YANG DP, HU EC. Conditional screening of recombinant proteins of *Dermacentor marginatus* AQPs and anti-tick effect[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2024, 44(7): 1466-1472, 1506 (in Chinese).
- [16] QI W, ZHU R, BAO C, XIAO J, LIU B, SUN M, FENG X, GU J, LI Y, LEI L. Porcine circovirus type 2 promotes *Actinobacillus pleuropneumoniae* survival during coinfection of porcine alveolar macrophages by inhibiting ROS production[J]. Veterinary Microbiology, 2019, 233: 93-101.
- [17] CHEN PR, BAO CT, ZHU RN, WANG J, ZHU JH, LI ZH, LI FY, GU JM, FENG X, LI N, LEI LC. IL-5 enhances the resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in mice through maintaining appropriate levels of lung M2, PMN-II and highly effective neutrophil extracellular traps[J]. Veterinary Microbiology, 2022, 269: 109438.
- [18] ÁLVAREZ E, FALQUI M, SIN L, McGRIL JP, PERDIGUERO B, COLOMA R, MARCOS-VILLAR L, TÁRREGA C, ESTEBAN M, GÓMEZ CE, GUERRA S. Unveiling the multifaceted roles of ISG15: from immunomodulation to therapeutic frontiers[J]. Vaccines, 2024, 12(2): 153.
- [19] BAO CT, XIAO JM, LIU BJ, LIU JF, ZHU RN, JIANG P, LI L, LANGFORD PR, LEI LC. Establishment and comparison of *Actinobacillus pleuropneumoniae* experimental infection model in mice and piglets[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 128: 381-389.
- [20] 鲍春彤. 胸膜肺炎放线杆菌诱导的肺脏细胞因子应答特征和 IL-21 作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2022.
BAO CT. Characteristics of pulmonary cytokine response and immunologic mechanism of IL-21 as *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2022 (in Chinese).
- [21] BAO C, LIU B, ZHU R, XIAO J, LI Z, JIANG H, WANG B, LANGFORD PR, FEI R, LI N, LEI L. IFN- γ Mice resist *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by promoting early lung IL-18 release and PMN-I accumulation[J]. Infection and Immunity, 2021, 89(6): e00069-21.
- [22] GAO N, ME R, DAI CY, YU FX. ISG15 acts as a mediator of innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in C57BL/6J mouse corneas[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2020, 61(5): 26.
- [23] SWAIM CD, SCOTT AF, CANADEO LA, HUIBREGTSE JM. Extracellular ISG15 signals cytokine secretion through the LFA-1 integrin receptor[J]. Molecular Cell, 2017, 68(3): 581-590.e5.
- [24] BERCIER P, GOTTSCHALK M, GRENIER D. Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on barrier function and inflammatory response of pig tracheal epithelial cells[J]. Pathogens and Disease, 2019, 77(1): fty07.