

研究报告

副猪嗜血杆菌外膜囊泡激活 caspase-11 和 NLRP3 炎性体诱导炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 分泌

李艳^{#1,2,3,4}, 杨君^{#1,2,3,4}, 翟少伦^{1,2,3,4}, 楚品品^{1,2,3,4}, 卞志标^{1,2,3,4}, 张昆丽^{1,2,3,4}, 李春玲^{*1,2,3,4}

1 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东 广州 510640

2 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广东 广州 510640

3 农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640

4 岭南现代农业科学与技术广东省实验室茂名分中心, 广东 茂名 525000

李艳, 杨君, 翟少伦, 楚品品, 卞志标, 张昆丽, 李春玲. 副猪嗜血杆菌外膜囊泡激活 caspase-11 和 NLRP3 炎性体诱导炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 分泌[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5171-5183

Li Yan, Yang Jun, Zhai Shaolun, Chu Pinpin, Bian Zhibiao, Zhang Kunli, Li Chunling. Outer membrane vesicles from *Haemophilus parasuis* activate caspase-11 and NLRP3 inflammasome to induce the secretion of IL-1 β and IL-18[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5171-5183

摘要:【背景】副猪嗜血杆菌可引起多种炎症反应和较高死亡率, 其致炎机制目前尚不清楚。

【目的】探究副猪嗜血杆菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)诱导 RAW264.7 细胞 caspase-11 及 NLRP3 炎性体活化的功能, 以及 caspase-11 在 OMVs 活化炎性体诱导炎性因子表达过程中的关键作用。【方法】副猪嗜血杆菌 OMVs 感染 RAW264.7 细胞, 收集 6、12 和 24 h 细胞, RT-PCR 检测 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 的表达; 收集感染后 48 h 细胞, Western blotting 检测 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白表达。收集感染后 6、12、24、48 和 72 h 细胞上清, ELISA 检测 interleukin (IL)-1 β 和 IL-18 表达水平; 不同浓度 OMVs (0、2.5、10、25、50 和 100 μ g/mL)感染 RAW264.7 细胞 24 h, ELISA 检测上清中 IL-1 β 和 IL-18 水平。构建 caspase-11

基金项目: 国家自然科学基金(31772776); 广东省自然科学基金(2020A1515010475); 广东省科技专项资金(江科[2021]183号); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2021KJ119); 广东省农业科学院学科团队建设计划(XTXM202202, XT202208); 国家重点研发计划(2016YFD0500709)

#对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31772776); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515010475); Special Funds for Science and Technology of Guangdong Province ([2021]183); Innovation Team Project of Modern Agricultural Industrial Technology System of Guangdong Province (2021KJ119); Disciplinary Team Construction Program from Guangdong Academy of Agricultural Sciences (XTXM202202, XT202208); National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500709)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: lichunling@gdaas.cn

Received: 2022-07-13; Accepted: 2022-09-21; Published online: 2022-10-13

沉默 RAW264.7 细胞株, 收集 OMVs 感染后 12、24 和 48 h 细胞培养上清检测 IL-1 β 和 IL-18 水平。

【结果】 Caspase-11 mRNA 转录水平在 OMVs 感染 6、12 和 24 h 均极显著高于对照组($P<0.01$); NLRP3 mRNA 转录水平在感染后 6、24 h 极显著高于对照组($P<0.01$); ASC mRNA 转录水平在感染后 12、24 h 显著低于对照组($P<0.05$); caspase-1 mRNA 转录水平在感染后 6、12 和 24 h 显著高于对照组($P<0.05$)。Western blotting 结果显示, 与空白对照组相比, OMVs 组 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白表达均明显升高。OMVs 感染 RAW264.7 细胞后 12、24、48 和 72 h, IL-1 β 表达量极显著高于对照组($P<0.01$), 而且呈现时间依赖性升高, IL-18 表达水平在感染后 6、12、24、48 和 72 h 显著高于对照组($P<0.05$); 不同浓度 OMVs 感染细胞时, OMVs 对细胞的致炎作用呈现剂量依赖性增强。Caspase-11 沉默后, IL-1 β 水平在感染后 12、24 和 48 h 显著低于未沉默组; Caspase-11 沉默组 IL-18 表达量在感染后 24、48 h 均显著低于未沉默组($P<0.05$)。**【结论】** 副猪嗜血杆菌 OMVs 在副猪嗜血杆菌诱导的炎症反应中发挥重要作用, OMVs 可诱导 RAW264.7 细胞 caspase-11 介导的非经典 NLRP3 炎性体信号通路活化。

关键词: 副猪嗜血杆菌; 外膜囊泡; caspase-11; NLRP3 炎性体; IL-1 β ; IL-18

Outer membrane vesicles from *Haemophilus parasuis* activate caspase-11 and NLRP3 inflammasome to induce the secretion of IL-1 β and IL-18

LI Yan^{#1,2,3,4}, YANG Jun^{#1,2,3,4}, ZHAI Shaolun^{1,2,3,4}, CHU Pinpin^{1,2,3,4}, BIAN Zhibiao^{1,2,3,4}, ZHANG Kunli^{1,2,3,4}, LI Chunling^{*1,2,3,4}

1 Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

2 Key Laboratory of Livestock Disease Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510640, Guangdong, China

3 Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510640, Guangdong, China

4 Maoming Branch Center of Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agricultural Science and Technology, Maoming 525000, Guangdong, China

Abstract: [Background] *Haemophilus parasuis* can cause a variety of inflammatory reactions and high mortality, while the inflammatory mechanism remains unclear. **[Objective]** To study the activation of caspase-11 and NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) inflammasome in RAW264.7 cells by *H. parasuis* outer membrane vesicles (OMVs) and the key role of caspase-11 in the OMVs-induced expression of inflammatory cytokines. **[Methods]** The RAW264.7 cells were infected with *H. parasuis* OMVs and collected 6, 12, and 24 h post infection. RT-PCR was employed to determine the mRNA levels of caspase-11, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC), and caspase-1. Western blotting was employed to determine the protein levels of caspase-11, NLRP3, ASC, and caspase-1 48 h post infection. Enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) was employed to determine the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 in the cell supernatants 6, 12, 24, 48, and 72 h post infection. After the RAW264.7 cells were stimulated with different concentrations of OMVs (0, 2.5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h, the cell supernatants were collected for the measurement of IL-1 β and IL-18 levels by ELISA. The RAW264.7 cells with the silencing of caspase-11 were established and then infected with OMVs, and the supernatants were collected for the measurement of IL-1 β and IL-18 levels 12, 24 and 48 h post infection. **[Results]** The mRNA level of caspase-11 was up-regulated in the RAW264.7 cells 6, 12 and 24 h post infection with OMVs ($P<0.01$). The mRNA level of NLRP3 was higher than that in the control group 6 and 24 h post infection ($P<0.01$). The mRNA level of ASC was significantly lower than that in the control group 12 and 24 h post infection ($P<0.05$). The mRNA level of caspase-1 was significantly higher than that in the control group 6, 12, and 24 h post infection ($P<0.05$). Western blotting showed that the expression levels of caspase-11, NLRP3, ASC, and caspase-1 were up-regulated after infection with OMVs. The level of IL-1 β elevated in a time-dependent manner after the cells were stimulated with OMVs for 12, 24, 48 and 72 h and was higher than that in the control group ($P<0.01$), and the level of IL-18 was higher than that in the control group at the time points of 6, 12, 24, 48 and 72 h ($P<0.05$). When the cells were stimulated with different concentrations of OMVs, the inflammatory effect increased in a dose-dependent manner. The level of IL-1 β in the caspase-11-silenced cells stimulated with OMVs was lower than that in the non-silenced group at the time points of 12, 24 and 48 h ($P<0.05$), and the level of IL-18 showed the same trend as that of IL-1 β at the time points of 24 and 48 h ($P<0.05$). **[Conclusion]** The OMVs of *H. parasuis* play an important role in the inflammatory response induced by *H. parasuis*. OMVs can induce the activation of non-canonical NLRP3 inflammasome signaling pathway mediated by caspase-11 in RAW264.7 cells.

Keywords: *Haemophilus parasuis*; outer membrane vesicles; caspase-11; NLRP3 inflammasome; IL-1 β ; IL-18

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)是一种革兰氏阴性细小杆菌,是猪上呼吸道的一种条件性致病菌,继发感染可引起全身性疾病。副猪嗜血杆菌感染可引起猪的多种炎症反应,包括多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎等,其高发病率和死亡率给养猪业造成严重经济损失^[1]。副猪嗜血杆菌分为 15 个血清型,1、5、10、12、13 和 14 型是强毒血清型,2、4、8 和 15 型是弱毒血清型,3、6、7、9 和 11 型是无毒血清型,我国流行的主要血清型为 4、5 和 13 型^[2-3]。

炎症是由感知病原体相关的分子模式引起

的^[4]。NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain containing protein 3, NLRP3)是细胞质内重要的模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs),参与炎性小体组装,激活炎症信号通路,介导炎症反应的发生和发展^[5]。NLRP3 参与多种微生物(包括细菌)对感染的感知^[6],毒素、晶体、ATP、组织蛋白酶和活性氧(reactive oxygen species, ROS)已被证明可活化典型的 NLRP3 炎性体。此外, NLRP3 还可通过小鼠半胱天冬酶-11 (caspase-11)激活, caspase-11 识别细胞质中的细

菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)并诱导 NLRP3 炎性体的非规范激活^[7-8]。

外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是细菌在生长过程中由细胞膜分泌的一种球形、纳米级蛋白质脂质体囊泡,直径大约为 10–300 nm^[9]。OMVs 的组成成分主要包括:脂多糖(LPS),外膜、周浆间隙的蛋白质和脂质,以及肽聚糖、核酸、酶和毒力因子等^[10]。LPS 是革兰氏阴性菌外膜囊泡 OMVs 最丰富、最有效的免疫刺激成分。OMVs 作为 LPS 的载体,在介导细菌与宿主相互作用,诱导炎症反应引起宿主组织损伤过程中发挥重要作用^[11]。OMVs 携带的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)可与宿主细胞的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)结合,通过信号级联放大及炎症通路激活,导致炎症介质合成增多、炎症细胞募集,促发炎症反应^[12]。

副猪嗜血杆菌 OMVs 在副猪嗜血杆菌致炎过程中的机制尚不清楚。本研究以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为模型,研究了副猪嗜血杆菌 OMVs 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子的分泌、NLRP3 炎性体活化及 caspase-11 沉默对细胞因子表达水平的影响,探究副猪嗜血杆菌 OMVs 的致炎作用及 caspase-11 在 OMVs 致炎过程中的关键作用,以期揭示副猪嗜血杆菌的致炎机制。

1 材料与方法

1.1 材料

副猪嗜血杆菌致病性菌株 H45 由本实验室分离保存,RAW264.7 细胞购自中国昆明细胞库。胰蛋白胨大豆琼脂培养基/胰蛋白胨大豆肉汤培养基,广东环凯生物科技有限公司;胎牛血清, Gibco 公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

(NAD), Sigma 公司;小鼠白介素 18 (IL-18) ELISA 试剂盒,武汉 Cusabio 公司;小鼠白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒,R&D System 公司;caspase-11 抗体,Abcam 公司;NLRP3、caspase-1 和 ASC 抗体, Cell Signaling Technology 公司;BCA 检测试剂盒, Thermo Scientific Pierce 公司;caspase-11 shRNA 慢病毒颗粒和对照 shRNA 慢病毒颗粒-A, Santa Cruz Biotechnology 公司;CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega 公司;HiScript[®] II Reverse Transcriptase 和 ChamQ[™] Universal SYBR[®] qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。PCR 仪, Eppendorf 公司;凝胶成像分析系统, Bio-Rad 公司;微孔板分光光度计, BioTek 公司;超高速离心机, Beckman 公司。

1.2 OMVs 提取、纯化及鉴定

收集 37 °C、220 r/min 培养至对数生长期 ($OD_{600}=1.0$)的副猪嗜血杆菌(H45 株)菌液,于 4 °C、7 500 \times g 离心 15 min,弃沉淀,收集上清;使用 100 kDa 截流超滤膜浓缩过滤上清液,收集滤液;4 °C、150 000 \times g 超速离心 40 min,弃上清,收集沉淀;5 mL PBS 重悬,得到粗提 OMVs;用不连续的蔗糖密度梯度超高速离心 12 h,收集各层离心液后,4 °C、150 000 \times g 超速离心去除溶液中的蔗糖成分,PBS 重悬,得到纯化的 OMVs,置于 4 °C 保存。将纯化后的囊泡涂在微型铜网格上,滴加 2%醋酸双氧轴染色,室温干燥,在透射电镜下观察纯化好的 OMVs 形态。纯化的 OMVs 经 15% SDS-PAGE 分析蛋白浓度及大小,通过动态光散射进一步确定 OMVs 的粒径分布。

1.3 细胞毒性试验

将 RAW264.7 细胞接种 96 孔板,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。待细胞贴壁后分别用 OMVs (2.5 μ g/mL)和副猪嗜血杆菌(MOI=10)感

染细胞, 于感染后 3、6、12 和 24 h 收取细胞培养上清液, 按照 CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 说明书进行乳酸盐脱氢酶检测。

1.4 Real-time PCR 检测 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 表达

副猪嗜血杆菌 OMVs 感染 RAW264.7 细胞, 分别收取 6、12 和 24 h 细胞, 提取细胞总 RNA, 使用反转录试剂盒将细胞总 RNA 逆转录获得 cDNA。Real-time PCR 检测各组细胞中 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 水平。反应条件: 95 °C 30 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 次循环; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.5 Western blotting 检测细胞中 caspase-11、NLRP3、caspase-1 及 ASC 的蛋白表达

收集 OMVs 感染 48 h 的细胞, 使用蛋白裂解液裂解细胞并提取细胞总蛋白, 蛋白样品经 15% SDS-PAGE 电泳后转移至 0.22 μ m 的 PVDF 膜, 室温孵育封闭 1h, 加入一抗(1:1 000), 4 °C 孵育过夜; HRP 标记二抗(1:5 000), 室温孵育 1 h。滴加 ECL 发光液避光静置 1–2 min 后应用化学发光成像系统进行图像采集, 运用 Image J

图像分析软件分析条带灰度值。

1.6 Caspase-11 基因沉默细胞构建

将 RAW264.7 细胞接种到 12 孔板中 37 °C 静置培养过夜, 待细胞达 80% 融合度时加入含有 caspase-11 序列的 shRNA 慢病毒(MOI=50) 和空白慢病毒(MOI=50), 混匀并连续培养 2 d, 然后加入适量嘌呤霉素(2.0 μ g/ μ L) 筛选具有嘌呤霉素抗性的慢病毒感染细胞株。通过 Western blotting 验证慢病毒感染细胞 caspase-11 蛋白表达水平的变化。

1.7 ELISA 检测 IL-1 β 和 IL-18 的表达

副猪嗜血杆菌及其 OMVs 分别接种 RAW264.7 细胞, 于感染后 6、12、24、48 和 72 h 收集细胞培养上清; 不同浓度(0、2.5、10、25、50 和 100 μ g/mL) OMVs 感染 RAW264.7 细胞 24 h, 收集细胞培养上清; OMVs 同时刺激 RAW264.7 细胞及其 caspase-11 沉默细胞, 12、24、48 h 收集细胞培养上清, 使用 ELISA 试剂盒检测上清液中细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 水平。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行实验数据统计分析。数据以均数 \pm 标准差表示; 进行 Student's *t*-test 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各目的基因引物序列信息

Table 1 Primer sequence information of each target gene

基因名称 Gene name	序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
Caspase-11	F: ACAATGCTGAACGCAGTGAC	150
	R: CTGGTTCCTCCATTCCAGA	
NLRP3	F: ATTACCCGCCCGAGAAAGG	141
	R: TCGCAGCAAAGATCCACACAG	
ASC	F: CTTGTCAGGGGATGAACTCAAAA	154
	R: GCCATACGACTCCAGATAGTAGC	
Caspase-1	F: ACAAGGCACGGGACCTATG	237
	R: TCCCAGTCAGTCCTGGAAATG	
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123
	R: TG TAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

2 结果与分析

2.1 OMVs 的鉴定及检测

电镜观察结果显示, 纯化的副猪嗜血杆菌 OMVs 为双层囊泡状结构(图 1A)。动态光色散法测定 OMVs 的粒径主要分布在 60–70 nm 之间, 其粒径平均值为 63.32 nm (图 1B)。

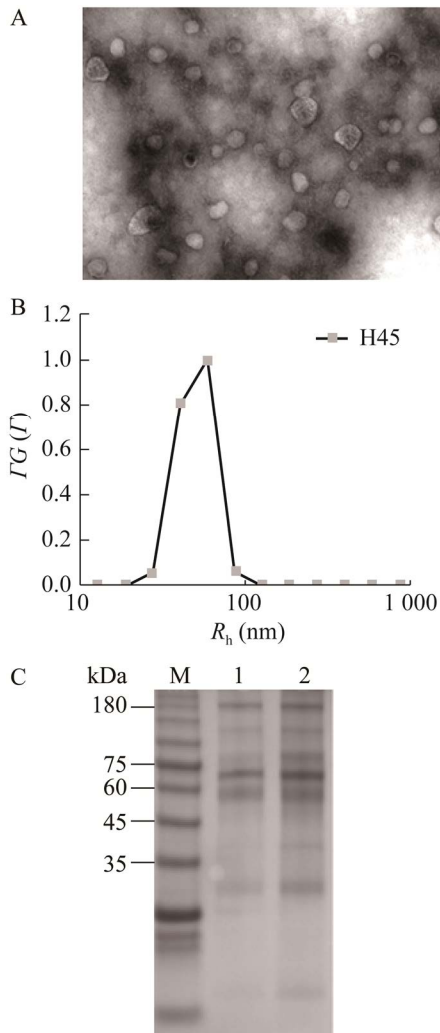


图 1 副猪嗜血杆菌 OMVs 的鉴定 A: 透射电镜观察 OMVs 结构; B: OMVs 的粒径分布; C: OMVs 的 SDS-PAGE 检测

Figure 1 Identification of *Haemophilus parasuis* OMVs. A: Structure of OMVs observed by transmission electron microscope; B: Particle size distribution of OMVs; C: SDS-PAGE detection of OMVs.

纯化的 OMVs 进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示, OMVs 蛋白质主要集中在 60–75 kDa 和 180 kDa 左右(图 1C)。

2.2 副猪嗜血杆菌及其 OMVs 对细胞的毒性

毒性检测结果显示, 副猪嗜血杆菌及其 OMVs 均可以引起细胞死亡, 随着作用时间的延长, 对细胞的毒性作用越来越明显, 呈现时间依赖性。副猪嗜血杆菌引起的细胞死亡率可以达到 30%, OMVs 引起的细胞死亡率为 20%。感染 12 h 之前, OMVs 对细胞的毒性作用大于副猪嗜血杆菌; 但 24 h 时, 副猪嗜血杆菌对细胞的毒性大于 OMVs (图 2)。

2.3 副猪嗜血杆菌及其 OMVs 对 IL-1 β 和 IL-18 表达的影响

在副猪嗜血杆菌感染 RAW264.7 细胞后 6、12、24、48 和 72 h, IL-1 β 表达水平均显著高于对照组($P < 0.01$); 而且在感染后 48 h 内, IL-1 β 表达量呈现时间依赖性升高($P < 0.01$) (图 3A)。副猪嗜血杆菌感染 RAW264.7 细胞后 12、24、48 和 72 h, IL-18 表达量均显著高于对照组($P < 0.05$); 而且在感染后 24 h 内, IL-18 表达量呈现时间依赖性升高($P < 0.05$) (图 3B)。与对照组相比, OMVs 感染 RAW264.7 细胞后 12、24、

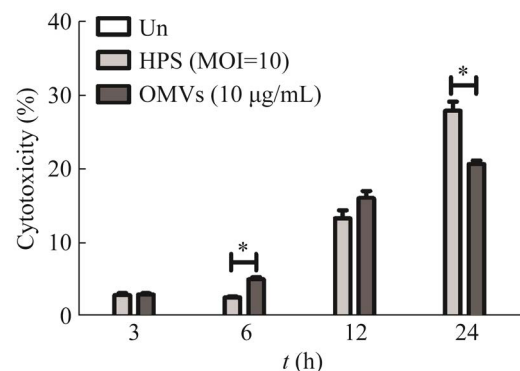


图 2 副猪嗜血杆菌及其 OMVs 对细胞的毒性 *表示差异显著($P < 0.05$)

Figure 2 Cytotoxicity of HPS and OMVs to cells. *: Significant difference ($P < 0.05$).

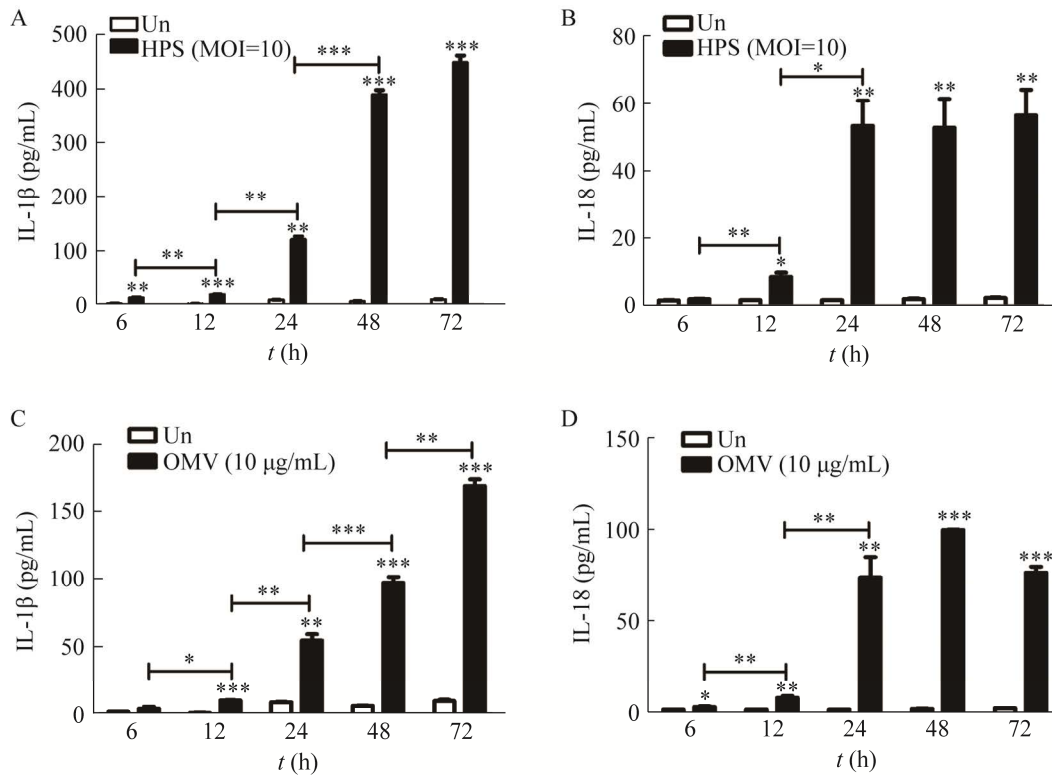


图 3 炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的表达

Figure 3 Expression of inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

48 和 72 h, IL-1 β 表达量均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而且感染后 IL-1 β 的表达随着取样时间点的推移均显著升高 ($P < 0.05$) (图 3C), 呈现明显的时间依赖性。在感染后 6、12、24、48 和 72 h, IL-18 表达水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), IL-18 表达量也呈现总体升高趋势, 在感染后 12、24 h 均极显著高于前一个取样点 ($P < 0.01$) (图 3D)。

当 OMVs 的浓度为 0、2.5、10 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, OMVs 对细胞的致炎作用呈现剂量依赖性增强; 随着 OMVs 浓度的提高, IL-1 β 和 IL-18 表达水平越来越高(图 4)。其中, 10、25 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组 IL-1 β 表达与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$) (图 4A), 2.5、10 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组 IL-18 表达水平极显著高于对照组 ($P < 0.01$)

(图 4B); 当 OMVs 浓度达到 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其对细胞的致炎作用无显著提高。

不同浓度 OMVs 感染细胞后, 随着 OMVs 浓度的增加, 细胞的病变死亡情况越来越明显(图 5)。

2.4 OMVs 对 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 转录水平的影响

OMVs 感染能够提高 caspase-11 mRNA 转录水平, OMVs 感染后 6、12 和 24 h, caspase-11 mRNA 转录水平均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), OMVs 感染后 12 h, caspase-11 转录水平极显著高于感染后 6 h ($P < 0.01$) (图 6A)。

NLRP3 mRNA 转录水平在 OMVs 感染后也呈现上升趋势, 在感染后 6、24 h 均极显著高于对照组 ($P < 0.01$) (图 6B)。

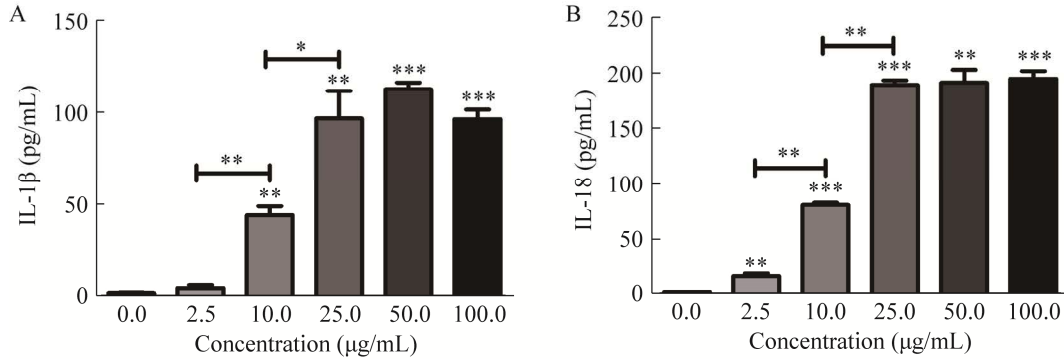


图4 不同浓度 OMVs 刺激细胞炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的表达

Figure 4 Expression of inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 with different concentrations of OMVs stimulated. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

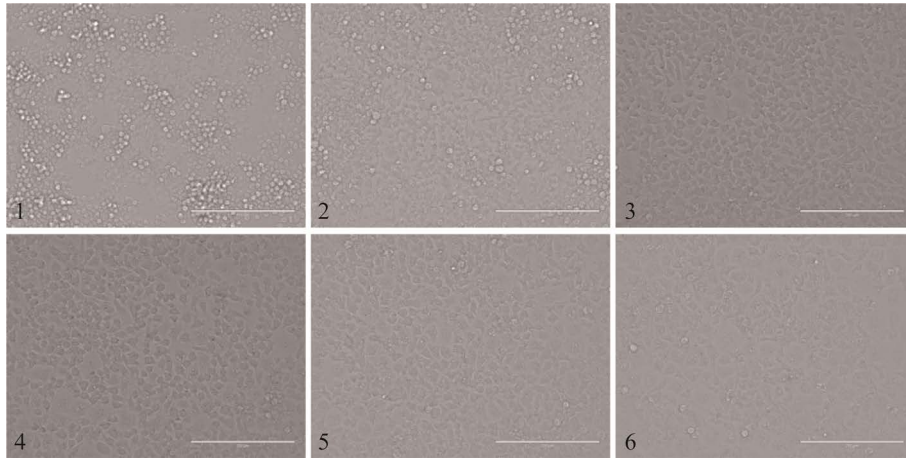


图5 不同浓度 OMVs 对细胞状态的影响

Figure 5 Effect of different concentrations of OMVs on the cell state. 1-6: 0, 2.5, 10.0, 25.0, 50.0 and 100.0 $\mu\text{g/mL}$.

ASC mRNA 转录水平在 OMVs 刺激后未升高反而呈下降趋势, 在感染后 12、24 h 均显著低于对照组($P < 0.05$) (图 6C)。

Caspase-1 mRNA 转录水平在 OMVs 感染后呈现升高趋势, 与对照组相比, caspase-1 转录水平在感染后 6、12 和 24 h 均显著升高($P < 0.05$) (图 6D)。

2.5 OMVs 对 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白水平的影响

与对照组相比, OMVs 感染组细胞中

caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白表达均明显升高, 与 LPS 刺激组细胞中各蛋白的表达趋势一致(图 7)。

2.6 Caspase-11 沉默效果检测

通过 Western blotting 检测基因沉默后 RAW264.7 细胞中 caspase-11 蛋白表达。结果如图 8 所示, 与空载体处理细胞相比, 含有干扰 shRNA 序列的重组慢病毒处理过的 RAW264.7 细胞中 caspase-11 表达水平显著降低(图 8)。

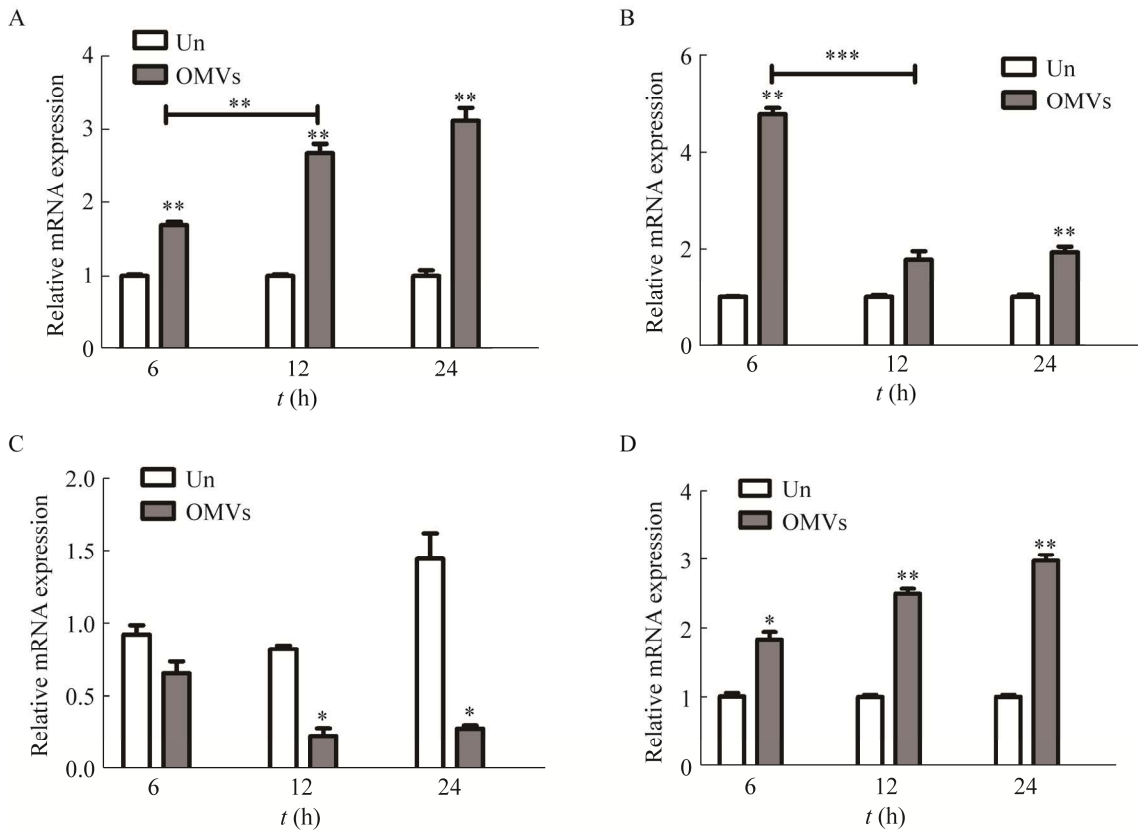


图 6 OMVs 刺激细胞 caspase-11 (A)、NLRP3 (B)、ASC (C)和 caspase-1 mRNA (D)

Figure 6 The mRNA expression of caspase-11 (A), NLRP3 (B), ASC (C) and caspase-1 (D) induced by OMVs. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

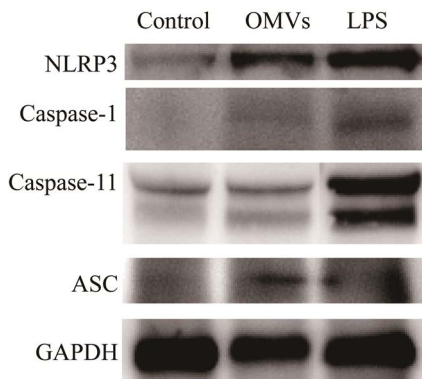


图 7 Western blotting 检测 NLRP3、caspase-1、caspase-11 及 ASC 的蛋白表达

Figure 7 The protein expression of NLRP3, caspase-1, caspase-11 and ASC detected by Western blotting.

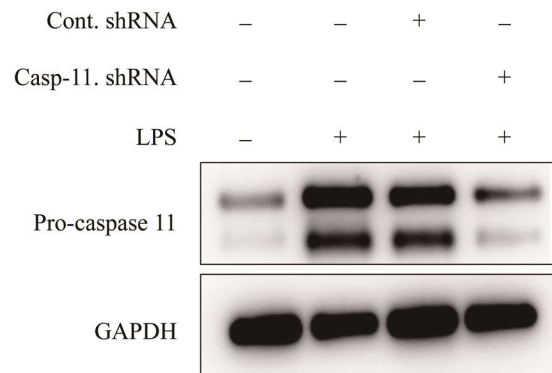


图 8 Western blotting 验证慢病毒沉默 caspase-11 效果 +: 加入组分; -: 不加入组分

Figure 8 The verification of the effect of lentivirus silencing caspase-11 by Western blotting. +: Add components; -: No component.

2.7 Caspase-11 沉默对 OMVs 诱导炎性细胞因子表达的影响

OMVs 同时刺激 RAW264.7 细胞及其 caspase-11 沉默细胞, 炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 表达检测结果显示, caspase-11 沉默后 IL-1 β 表达在感染后 12、24 和 48 h 显著低于未沉默组 ($P < 0.05$) (图 9A); caspase-11 沉默组 IL-18 表达量在感染后 24、48 h 均显著低于未沉默组 ($P < 0.05$) (图 9B)。

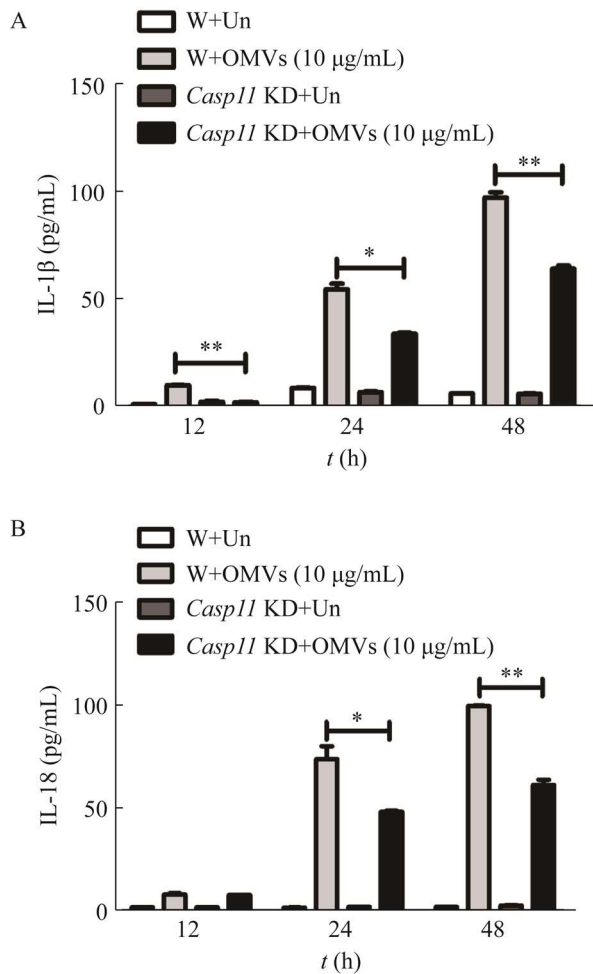


图 9 Caspase-11 沉默对 IL-1 β 和 IL-18 表达的影响

Figure 9 Effect of the caspase-11 silencing on the expression of IL-1 β and IL-18. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

副猪嗜血杆菌感染可诱导宿主炎性反应, 有研究报道显示, 副猪嗜血杆菌可黏附并侵袭猪脑微血管内皮细胞 (porcine brain microvascular endothelial cells, PBMEC), 诱导 PBMEC 凋亡和促炎细胞因子产生^[13]。副猪嗜血杆菌通过激活多种信号通路诱导炎性反应。副猪嗜血杆菌感染仔猪单核吞噬细胞 (piglet mononuclear phagocytes, PMNP) 后激活 NF- κ B 信号通路促进细胞凋亡, 活化 NLRP3 炎性体启动炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的转录表达^[14]。副猪嗜血杆菌还可激活 PK-15 细胞 NOD1/2-RIP2-NF- κ B 信号通路, 诱导炎性因子 CCL4、RANTES 和 IL-8 的表达^[15]。

外膜囊泡的产生一直被广泛关注, 自 1965 年首次观察到 OMVs 以来^[16], 对革兰氏阴性菌 OMVs 的研究已有 50 多年^[17-18]。OMVs 凭借其纳米颗粒大小、黏附性和蛋白水解特性等优势能够通过宿主组织迁移, 破坏上皮紧密连接, 将细菌毒力因子传递给底层组织中的免疫细胞^[19]。研究表明, 细菌 OMVs 可诱发炎症反应, 促进炎性细胞因子分泌, 并与细菌的致炎机制相关^[20]。铜绿假单胞菌 OMVs 能够诱导巨噬细胞 RAW264.7 细胞分泌炎性因子 IL-8^[21]; 自然分泌的铜绿假单胞菌 OMVs 可通过激活 TLR4 信号通路触发显著的炎症反应^[22]。牙龈卟啉单胞菌 OMVs 可有效激活巨噬细胞中促炎性细胞因子的产生^[23], 在其引起的炎症中起着至关重要的作用^[24]。此外, 连翘木霉、脑膜炎奈瑟菌、幽门螺旋杆菌分泌的 OMVs 均可诱导炎性细胞因子的分泌^[25-27]。副猪嗜血杆菌能够分泌 OMVs, 本课题组前期已开展副猪嗜血杆菌 OMVs 分泌及蛋白组分研究^[28]。目前, 副猪嗜血杆菌 OMVs 诱导的炎性反应机制尚不

清楚。本研究中,我们以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为模型,分析了副猪嗜血杆菌及其 OMVs 诱导炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的表达。结果发现,副猪嗜血杆菌及其 OMVs 均可诱导 RAW264.7 细胞炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 表达的显著升高,OMVs 显示出与副猪嗜血杆菌相同或更强的诱导能力。为了深入了解副猪嗜血杆菌 OMVs 诱导的炎性反应,我们评价了不同浓度 OMVs 对炎性细胞因子表达的影响。结果发现,OMVs 诱导 IL-1 β 和 IL-18 的分泌在一定范围内($\leq 25 \mu\text{g/mL}$)呈现剂量依赖性增加,但当浓度高于 $50 \mu\text{g/mL}$ 时无显著变化。本研究结果证实,副猪嗜血杆菌 OMVs 感染 RAW264.7 细胞促进了炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的表达升高,而且这种升高呈显著的时间依赖性和剂量依赖性。

炎性体通过调控炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放在宿主细胞炎症反应的发生与发展中发挥重要作用^[29],是协调宿主免疫稳态的关键先天免疫成分^[30-31],NLRP3 的激活可导致炎症组织损伤^[32]。NLRP3 遇到刺激后,招募适配器凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)及效应器半胱氨酸天冬蛋白酶前体(pro-caspase-1),形成一个大的细胞溶质复合体 NLRP3 炎性体。炎性体组装触发 caspase-1 的自切割和激活,活化的 caspase-1 进一步切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 转化为其成熟形式的 IL-1 β 和 IL-18^[33]。随着 NLRP3 炎性体激活机制研究的深入,caspase-11 介导的非经典 NLRP3 炎性体信号途径被发现,该途径可由细胞质中的脂多糖直接激活 caspase-4/5 (人)或 caspase-11 (鼠),从而触发 NLRP3 炎性体的组装及一系列细胞因子的成熟和释放^[34]。研究显示,革兰氏阴性菌 OMVs 可活化 caspase-11,并在诱导炎性因子表达中发挥重要作用^[35]。百日咳杆菌 OMVs 能够活化小鼠

和人巨噬细胞的 NLRP3 炎性体,继而产生 IL-1 β ,诱导了小鼠巨噬细胞 caspase-11 依赖性的非经典炎性体通路激活^[36]。本研究对副猪嗜血杆菌 OMVs 感染 RAW264.7 细胞后 caspase-11 和 NLRP3 炎性体表达水平进行了检测,发现 caspase-11、NLRP3、ASC 和 caspase-1 的蛋白表达量在 OMVs 刺激后均显示升高,提示 OMVs 诱导 RAW264.7 细胞 caspase-11 及 NLRP3 炎性体活化,参与了副猪嗜血杆菌诱导的炎性反应。

为了进一步验证 caspase-11 在 OMVs 活化 NLRP3 炎性体诱导炎性细胞因子产生过程中的作用,我们首先沉默了 RAW264.7 细胞 caspase-11 基因,分析比较了基因沉默前后细胞因子分泌水平的变化。Caspase-11 基因沉默后,OMVs 诱导的 IL-1 β 和 IL-18 水平显著低于未沉默组,说明 caspase-11 基因沉默影响了 OMVs 诱导细胞分泌炎性因子的能力,证实 caspase-11 在 OMVs 活化 NLRP3 炎性体、促进炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 分泌过程中发挥关键作用。

本研究证实,副猪嗜血杆菌 OMVs 通过激活 caspase-11 介导的非经典 NLRP3 炎性体通路诱导 RAW264.7 细胞炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 的表达分泌。

REFERENCES

- [1] Macedo N, Rovira A, Torremorell M. *Haemophilus parasuis*: infection, immunity and enrofloxacin[J]. Veterinary Research, 2015, 46: 128
- [2] Rafiee M, Blackall PJ. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*[J]. Australian Veterinary Journal, 2000, 78(3): 172-174
- [3] Del Río ML, Gutiérrez CB, Rodríguez Ferri EF. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(2): 880-882
- [4] Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation,

- and disease susceptibility[J]. *Cell*, 2015, 160(5): 816-827
- [5] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(8): 588-606
- [6] Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(7): 407-420
- [7] Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock[J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1250-1253
- [8] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszyński A, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4[J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1246-1249
- [9] O'Donoghue EJ, Krachler AM. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2016, 18(11): 1508-1517
- [10] Bitto NJ, Kaparakis-Liaskos M. The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(6): 1287
- [11] Ünal CM, Schaar V, Riesbeck K. Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2011, 33(5): 395-408
- [12] Pathirana RD, Kaparakis-Liaskos M. Bacterial membrane vesicles: biogenesis, immune regulation and pathogenesis[J]. *Cellular Microbiology*, 2016, 18(11): 1518-1524
- [13] Bouchet B, Vanier G, Jacques M, Gottschalk M. Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells[J]. *Veterinary Research*, 2008, 39(5): 42
- [14] Fu SL, Xu L, Li SL, Qiu YS, Liu Y, Wu ZY, Ye C, Hou YQ, Hu CAA. Baicalin suppresses NLRP3 inflammasome and nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling during *Haemophilus parasuis* infection[J]. *Veterinary Research*, 2016, 47(1): 80
- [15] Ma B, Hua KX, Zhou SS, Zhou HF, Chen YS, Luo R, Bi DR, Zhou R, He QG, Jin H. *Haemophilus parasuis* infection activates NOD1/2-RIP₂ signaling pathway in PK-15 cells[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 79: 158-165
- [16] Bishop DG, Work E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions[J]. *The Biochemical Journal*, 1965, 96(2): 567-576
- [17] Jan AT. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1053
- [18] Sartorio MG, Pardue EJ, Feldman MF, Haurat MF. Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2021, 75: 609-630
- [19] Cecil JD, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden JA, Singleton W, Perez-Gonzalez A, Mansell A, Reynolds EC. Outer membrane vesicles prime and activate macrophage inflammasomes and cytokine secretion *in vitro* and *in vivo*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1017
- [20] Yu YJ, Wang XH, Fan GC. Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 39(4): 514-533
- [21] 朱宏亮, 陈帆, 吴豫, 易伟, 杨志刚. 铜绿假单胞菌外膜囊泡经 TLR4/NF-κB 通路诱导巨噬细胞炎症反应[J]. *国际免疫学杂志*, 2020, 43(3): 257-262
- Zhu HL, Chen F, Wu Y, Yi W, Yang ZG. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles induces the inflammatory response in macrophages via the TLR4/NF-κB pathways[J]. *International Journal of Immunology*, 2020, 43(3): 257-262 (in Chinese)
- [22] Zhao KL, Deng X, He C, Yue BS, Wu M. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles modulate host immune responses by targeting the toll-like receptor 4 signaling pathway[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(12): 4509-4518
- [23] Fleetwood AJ, Lee MKS, Singleton W, Achuthan A, Lee MC, O'Brien-Simpson NM, Cook AD, Murphy AJ, Dashper SG, Reynolds EC, et al. Metabolic remodeling, inflammasome activation, and pyroptosis in macrophages stimulated by *Porphyromonas gingivalis* and its outer membrane vesicles[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 351
- [24] Yang WW, Guo B, Jia WY, Jia Y. *Porphyromonas gingivalis*-derived outer membrane vesicles promote calcification of vascular smooth muscle cells through ERK1/2-RUNX2[J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(12): 1310-1319
- [25] Friedrich V, Gruber C, Nimeth I, Pabinger S, Sekot G, Posch G, Altmann F, Messner P, Andrukhov O, Schäffer C. Outer membrane vesicles of *Tannerella forsythia*:

- biogenesis, composition, and virulence[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2015, 30(6): 451-473
- [26] Mirlashari MR, Høiby EA, Holst J, Lyberg T. Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*: effects on cytokine production in human whole blood[J]. *Cytokine*, 2001, 13(2): 91-97
- [27] Chmiela M, Walczak N, Rudnicka K. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles involvement in the infection development and *Helicobacter pylori*-related diseases[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2018, 25(1): 78
- [28] Zhang KL, Chu PP, Song S, Yang DX, Bian ZB, Li Y, Gou HC, Jiang ZY, Cai RJ, Li CL. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a highly virulent strain of *Haemophilus parasuis*[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 756764
- [29] Broz P. Inflammasome assembly: the wheels are turning[J]. *Cell Research*, 2015, 25(12): 1277-1278
- [30] Palazon-Riquelme P, Lopez-Castejon G. The inflammasomes, immune guardians at defence barriers[J]. *Immunology*, 2018, 155(3): 320-330
- [31] Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1013-1022
- [32] Qiao JL, Huang YJ, Xia Y, Chu PP, Yao HN, Xu LY, Qi KM, Liu Y, Xu KL, Zeng LY. Busulfan and cyclophosphamide induce liver inflammation through NLRP3 activation in mice after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Scientific Reports*, 2016, 5: 17828
- [33] Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, 19(8): 477-489
- [34] Matikainen S, Nyman TA, Cypryk W. Function and regulation of noncanonical caspase-4/5/11 inflammasome[J]. *Journal of Immunology: Baltimore, Md: 1950*, 2020, 204(12): 3063-3069
- [35] Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, Rathinam VAK. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1106-1119
- [36] Elizagaray ML, Gomes MTR, Guimaraes ES, Rumbo M, Hozbor DF, Oliveira SC, Moreno G. Canonical and non-canonical inflammasome activation by outer membrane vesicles derived from *Bordetella pertussis*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1879