

## 猪肺炎支原体与宿主相互作用研究进展

宁雅茹, 丁红雷

西南大学 动物科技学院 兽医传染病学实验室, 重庆 400715

宁雅茹, 丁红雷. 猪肺炎支原体与宿主相互作用研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1741-1753.

Ning YR, Ding HL. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and host—a review. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1741-1753.

**摘要:** 猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 是猪支原体肺炎 (Porcine enzootic pneumonia, PEP) 的病原体。由于难以建立基因操作平台, 也没有成熟的动物模型, 这为 Mhp 致病机制研究增加了极大的困难。但支原体学家仍然在 Mhp 与宿主互作方面取得了一定进展。文中从 Mhp 对宿主细胞的黏附、损伤、刺激宿主产生的炎症反应和免疫反应 4 个方面进行了综述, 并对今后 Mhp 致病机理研究方向进行了展望, 以期为后续的 Mhp 与宿主互作研究提供借鉴, 为有效疫苗和药物开发提供理论依据。

**关键词:** 猪肺炎支原体, 黏附, 炎症, 免疫反应

## Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and host—a review

Yaru Ning, and Honglei Ding

Laboratory of Veterinary Infectious Diseases, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** *Mycoplasma hyopneumoniae* is the pathogen of porcine enzootic pneumonia (PEP). Due to difficulties in studying the pathogenesis of *M. hyopneumoniae* for blockage on the establishment of gene operation platform and immature animal model, mycoplasmologists still make progress in understanding the interaction between *M. hyopneumoniae* and host. In this paper, we review the adhesion and damage of *M. hyopneumoniae* to host cells, the inflammatory response and immune response of host stimulated by *M. hyopneumoniae*. Meanwhile, we propose research directions of the pathogenesis of *M. hyopneumoniae* in the future. This review can provide references for the follow-up study on the interaction between *M. hyopneumoniae* and host, and provide theoretical basis for effective vaccine and drug development.

**Keywords:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, adhesion, inflammation, immune response

**Received:** February 3, 2020; **Accepted:** April 29, 2020

**Supported by:** Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2020B012), Chongqing Technology Innovation and Application Development Project (No. cstc2019jscx-msxmX0402), State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology Foundation (No. SKLVBF201905).

**Corresponding author:** Honglei Ding. Tel/Fax: +86-23-68251196; E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项资金 (No. XDJK2020B012), 重庆市技术创新与应用发展专项 (No. cstc2019jscx-msxmX0402), 兽医生物技术国家重点实验室开放课题基金 (No. SKLVBF201905) 资助。

网络出版时间: 2020-05-09

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200508.1431.001.html>

猪支原体肺炎 (Porcine enzootic pneumonia, PEP) 又名猪喘气病、猪气喘病或猪地方性流行性肺炎, 是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 感染引起的猪的一种慢性呼吸道传染病。患病猪主要表现为咳嗽、喘气、生长迟缓, 病理剖检以肺的尖叶、心叶、中间叶和膈叶前缘出现肉样或虾肉样实变为特征<sup>[1]</sup>。

猪支原体肺炎广泛存在于世界各地, 我国超过 99% 的猪场存在 Mhp 感染。对该病的防控主要采取生物安全控制、疫苗免疫和投喂抗菌药物 3 种措施<sup>[2]</sup>, 但现有的商品化疫苗免疫保护效果较差, 停止使用抗菌药物后临床症状又会再次出现, 生物安全措施难以奏效。对该病的致病机理了解较少是阻碍切断病原传播途径和研发有效疫苗和药物的瓶颈。现阶段科学家难以建立支原体的基因操作平台、基因组中色氨酸由终止密码子 TGA 编码等特性, 给 Mhp 致病机制研究增加了极大的困难。虽然存在上述种种难题, 支原体学家仍然在 Mhp 与宿主细胞互作方面取得了一定进展。本文结合笔者实验室相关工作, 对 Mhp 致病机制研究进行了综述, 并对今后 Mhp 致病机理研究方向进行了展望, 以期为后续的 Mhp-宿主互作研究提供借鉴, 为有效疫苗和药物开发提供理论依据。

## 1 猪肺炎支原体对宿主细胞的黏附

黏附是病原菌与宿主相互作用的第一步。Mhp 进入呼吸道后, 黏附于气管、支气管和细支气管纤毛上皮细胞, 从而完成在呼吸道的定殖, 进一步导致纤毛脱落、上皮细胞死亡<sup>[3]</sup>。参与黏附的主要是膜蛋白, 目前已经鉴定的 Mhp 膜蛋白超过 60 个<sup>[4-6]</sup>。其中, 如 Mhp107、Mhp108 (P116)、Mhp182 (P102)、Mhp183 (P97)、Mhp271、Mhp384、Mhp390 (P68)、Mhp493 (P216)、Mhp494 (P159)、Mhp540 (EF-Tu)、Mhp683、Mhp684 (P146) 等参与了 Mhp 对宿主细胞的黏附。各黏附蛋白及其已经鉴定的黏附细胞及细胞外基质蛋白见表 1。

### 1.1 P97 蛋白家族蛋白

P97 蛋白家族蛋白是最早发现的与黏附相关的 Mhp 蛋白。该家族共包括 7 个蛋白, 分别为 Mhp107、Mhp183、Mhp271、Mhp280、Mhp385、Mhp483、Mhp684<sup>[7]</sup>。最早发现 Mhp183 蛋白一个分子量为 97 kDa 的片段与黏附相关, 后来发现其家族的大部分成员也参与 Mhp 对宿主细胞的黏附。

#### 1.1.1 P97

P97 蛋白是最早发现的 Mhp 黏附素, 它于 1995 年在 Zhang 等鉴定一株单抗 F2G5 时被发现<sup>[8]</sup>。F2G5 能识别一个 97 kDa 的 Mhp 蛋白, 该蛋白根据其分子量被命名为 P97。当 P97 蛋白与纤毛结合后, 抑制了 Mhp 与纤毛的结合; 但这种抑制不是 100%, 所以他们认为应该还有其他的黏附素在 Mhp 与纤毛的结合中发挥作用<sup>[8]</sup>。Hus 等<sup>[9]</sup>克隆了 P97 蛋白的核苷酸序列, 发现 P97 蛋白由一个 124.9 kDa 的蛋白在其第 195 位氨基酸切割下来后形成。在大肠杆菌中表达的重组 P97 蛋白也能与猪的呼吸道纤毛结合, 且被肝素 (Heparin) 和褐藻多糖 (Fucoidan) 阻断; 结合部位位于 P97 蛋白羧基端, 该区域有两个重复区, 分别命名为 R1 区和 R2 区。该研究小组进一步发现纤毛结合部位位于 R1 区, 该区域包含“AAKPV(E)”重复序列; R1 区至少要有 7 个“AAKPV(E)”重复才能完成与纤毛的结合<sup>[10]</sup>。单独的 R1 区也能与纤毛结合, 但需要包含 8 个“AAKPV(E)”重复<sup>[11]</sup>。这说明 R1 区的“AAKPV(E)”重复及其数量对 P97 与纤毛的结合至关重要。在不同的菌株中 P97 蛋白的分子量不同, 在 J 菌株中, 其分子量为 94 kDa。原蛋白前体的前 195 个氨基酸则形成一个 22 kDa 的蛋白; P97 的氨基端和羧基端可被进一步切割成 66 kDa 和 28 kDa 的两个蛋白<sup>[12]</sup>。后来发现 P97 和 22 kDa 的蛋白是由 *mhp183* 基因编码的一个 126 kDa 的前体蛋白裂解而成<sup>[7,13]</sup>。

病原菌与宿主细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 成分的结合在启动致病过程时具有

表 1 Mhp 蛋白对细胞及细胞外基质的黏附

Table 1 Adhesion of Mhp protein to cell and extracellular matrix

No.	Gene name in 232 strain	Gene name in 168 strain	Gene name in J strain	Protein name	Adhesion to cilia	Adhesion to fibronectin	Adhesion to heparan	Adhesion to plasminogen	Adhesion to actin	Adhesion to cell
1	<i>mhp107</i>	MHP168_293	MHJ_0264	Mhp107	F1 <sub>Mhp107</sub> <sup>[15]</sup> , F2 <sub>Mhp107</sub> , F3 <sub>Mhp107</sub> <sup>[15]</sup>	F3 <sub>Mhp107</sub> <sup>[15]</sup>	F1 <sub>Mhp107</sub> <sup>[15]</sup>	F1 <sub>Mhp107</sub> <sup>[15]</sup>	F1 <sub>Mhp107</sub> <sup>[15]</sup>	F3 <sub>Mhp107</sub> adheres to PK15 <sup>[15]</sup>
2	<i>mhp183</i>	MHP168_110	MHJ_0194	P97	F3 <sub>Mhp107</sub> <sup>[15]</sup> , P97 <sup>[8-11]</sup>	P97, 28 kDa protein <sup>[14]</sup>	P97 <sup>[13]</sup> , 28 kDa protein <sup>[14]</sup>	P97, 28 kDa protein <sup>[14]</sup>	P97, 28 kDa protein <sup>[14]</sup>	
3	<i>mhp271</i>	MHP168_195	MHJ_0105	Mhp271	R2 <sub>271-R1B</sub> <sup>[16]</sup>	R2 <sub>271-R1B</sub> <sup>[16]</sup>	R2 <sub>271-R1B</sub> <sup>[16]</sup>			
4	<i>mhp385</i>	MHP168_413	MHJ_0269	Mhp385	P88 <sub>385</sub> <sup>[17]</sup>	P88 <sub>385</sub> <sup>[17]</sup>	P88 <sub>385</sub> <sup>[17]</sup>			
5	<i>mhp493</i>	MHP168_503	MHJ_0493	P216	P120, P85, F2 <sub>P216</sub> , F3 <sub>P216</sub> <sup>[19]</sup>	P120, P85 <sup>[19]</sup>	P120, P85 <sup>[19]</sup>			F1 <sub>P216</sub> , F2 <sub>P216</sub> , F3 <sub>P216</sub> adhere to PK15 <sup>[19]</sup>
6	<i>mhp684</i>	MHP168_676	MHJ_0663	P146	P50 <sub>P146</sub> , P40 <sub>P146</sub> , P85 <sub>P146</sub> <sup>[20]</sup>	P50 <sub>P146</sub> , P40 <sub>P146</sub> , P85 <sub>P146</sub> <sup>[20]</sup>	P50 <sub>P146</sub> , P40 <sub>P146</sub> , P85 <sub>P146</sub> <sup>[20]</sup>			
7	<i>mhp108</i>	MHP168_292	MHJ_0263	P116	F1 <sub>P116</sub> , F2 <sub>P116</sub> , F3 <sub>P116</sub> , F4 <sub>P116</sub> <sup>[22]</sup>	P116 <sup>[22]</sup>	P116 <sup>[22]</sup>			F1 <sub>P116</sub> and F3 <sub>P116</sub> adhere to PK15 <sup>[22]</sup>
8	<i>mhp182</i>	MHP168_198	MHJ_0195	P102	P102, P42 <sup>[21]</sup>	P102, P42 <sup>[21]</sup>	P60, P42 <sup>[21]</sup>			P102 adheres to PK15 <sup>[21]</sup>
9	<i>mhp384</i>	MHP168_424	MHJ_0268	Mhp384	P60 <sub>384</sub> , P50 <sub>384</sub> <sup>[17]</sup>	P60 <sub>384</sub> , P50 <sub>384</sub> <sup>[17]</sup>	P60 <sub>384</sub> , P50 <sub>384</sub> <sup>[17]</sup>			
10	<i>mhp683</i>	MHP168_675	MHJ_0662	Mhp683	P45 <sub>683</sub> , P48 <sub>683</sub> , P50 <sub>683</sub> <sup>[23]</sup>	P45 <sub>683</sub> , P48 <sub>683</sub> , P50 <sub>683</sub> <sup>[23]</sup>	P45 <sub>683</sub> , P48 <sub>683</sub> , P50 <sub>683</sub> <sup>[23]</sup>			
11	<i>mhp014</i>	MHP168_014	MHJ_0014	Fba	Fba <sup>[24]</sup>					Fba adheres to STEC <sup>[24]</sup>
12	<i>mhp036</i>	MHP168_032	MHJ_0031	GAPDH	GAPDH <sup>[25]</sup>	GAPDH <sup>[25]</sup>	GAPDH <sup>[25]</sup>	GAPDH <sup>[25]</sup>	GAPDH <sup>[25]</sup>	
13	<i>mhp129</i>	MHP168_271	MHJ_0242	Eno	Eno <sup>[26]</sup>			Eno <sup>[26]</sup>		Eno adheres to STEC <sup>[26]</sup>
14	<i>mhp252</i>	MHP168_174	MHJ_0125	MHJ_0125	MHJ_0125 <sup>[27]</sup>	MHJ_0125 <sup>[27]</sup>	MHJ_0125 <sup>[27]</sup>	MHJ_0125 <sup>[27]</sup>		
15	<i>mhp390</i>	MHP168_418	MHJ_0274	P68	P68 <sup>[28]</sup>					
16	<i>mhp462</i>	MHP168_474	MHJ_0461	MHJ_461	MHJ_461 <sup>[29]</sup>	MHJ_461 <sup>[29]</sup>	MHJ_461 <sup>[29]</sup>	MHJ_461 <sup>[29]</sup>		P54 and P58 adhere to STEC <sup>[30]</sup>
17	<i>mhp494</i>	MHP168_504	MHJ_0494	P159/P110	F2 <sub>P159</sub> , F4 <sub>P159</sub> <sup>[32]</sup>					P27, P110, P52 adhere to PK15 <sup>[31-32]</sup>
18	<i>mhp540</i>	MHP168_533	MHJ_0524	EF-Tu	EF-Tu <sup>[33-34]</sup>	EF-Tu <sup>[33-34]</sup>	EF-Tu <sup>[33-34]</sup>	EF-Tu <sup>[33-34]</sup>	EF-Tu <sup>[33-34]</sup>	EF-Tu adheres to STEC <sup>[34]</sup>

重要作用。这些 ECM 包括纤连蛋白 (Fibronectin)、玻连蛋白 (Vitronectin)、层黏连蛋白 (Laminin) 和胶原蛋白 (Collagen) 等。ECM 蛋白是葡萄糖胺聚糖 (Exogenous glycosaminoglycan), 如肝素、硫酸乙酰肝素 (Heparan sulfate) 和硫酸软骨素 B (Chondroitin sulfate B) 的连接蛋白。一些病原菌也能够通过招募外源性葡萄糖胺聚糖到其表面, 以方便病原与宿主 ECM 成分的相互作用。Jenkins 等<sup>[13]</sup>研究发现, P97 蛋白的 N 端 (653 个氨基酸) 和 C 端 (301 个氨基酸) 都能与肝素以剂量依赖性的方式连接, 且 R1 区和 R2 区在 C 端与肝素的连接中都是必不可少的。进一步研究发现 P97 蛋白除了能与肝素连接, 还能与纤连蛋白和纤溶酶原 (Plasminogen) 连接; 其羧基端裂解形成的 28 kDa 蛋白也能单独直接与这 3 个蛋白结合<sup>[14]</sup>。

### 1.1.2 Mhp107

Mhp107 蛋白是一个含 1 032 个氨基酸的 104 kDa 的 P97 蛋白家族成员。可以分为大小为 42.7 kDa、42.1 kDa 和 44.8 kDa 的 N 端片段 (F1<sub>Mhp107</sub>)、中间片段 (F2<sub>Mhp107</sub>) 和 C 端片段 (F3<sub>Mhp107</sub>)。这 3 个片段都能和猪呼吸道上的纤毛结合。F1<sub>Mhp107</sub> 片段还能和肝素及纤溶酶原结合; F3<sub>Mhp107</sub> 片段除了能与纤连蛋白结合, 还负责与猪肾传代细胞系 PK15 的黏附<sup>[15]</sup>。

### 1.1.3 Mhp271

Mhp271 是另一个含重复序列的 P97 家族蛋白, 在其羧基端有 3 个重复序列, 分别为 R1A<sub>271</sub>、R1B<sub>271</sub> 和 R2<sub>271</sub>。该蛋白在不同菌株间序列同源性超过 99%, 主要变化在其重复序列, 特别是 R1B<sub>271</sub> 和 R2<sub>271</sub> 区域。在 R1A<sub>271</sub> 区只有很少的序列变化, R1B<sub>271</sub> 区的重复序列数从 3–8 个不等。以 232 菌株基因组为模板克隆的 R2<sub>271</sub>–R1B<sub>271</sub> 片段含 9 个 R1 重复和 5 个 R2 重复, 能够结合肝素、纤连蛋白和猪呼吸道纤毛, R1A<sub>271</sub> 由于重复序列太少不能与这些成分结合<sup>[16]</sup>。

### 1.1.4 Mhp385

Mhp385 有 988 个氨基酸, 分子量为 115 kDa。

在其 “<sup>761</sup>L-N-V↓A-V-S<sup>766</sup>” 位点可被半胰肽 (Semitryptic peptide) 切割成大小为 88 kDa (P88<sub>385</sub>) 和 27 kDa (P27<sub>385</sub>) 的两个蛋白。P88<sub>385</sub> 能被肝素和纤毛结合位点识别, 与之结合; P27<sub>385</sub> 虽然有 4 个 R1 重复, 但不能与肝素和纤毛结合<sup>[17]</sup>。

### 1.1.5 P216

Mhp493 蛋白分子量为 216 kDa, 因此也称 P216 蛋白, 它可以分解为 120 kDa (P120, N 端) 和 85 kDa (P85, C 端) 的两个蛋白, 切割位点为 “<sup>1072</sup>T-N-F↓Q-E<sup>1076</sup>”<sup>[18]</sup>, 这两个蛋白均能和肝素与猪呼吸道纤毛结合<sup>[19]</sup>。在大肠杆菌表达的 P216 的 3 个片段 F1<sub>P216</sub> (35–491 位氨基酸)、F2<sub>P216</sub> (464–908 位氨基酸)、F3<sub>P216</sub> (903–1 444 位氨基酸) 能够与 PK15 细胞结合, 而 F2<sub>P216</sub> 和 F3<sub>P216</sub> 则能和纤毛结合<sup>[19]</sup>。

### 1.1.6 P146

Mhp683 蛋白分子量为 147 kDa, 因此也称 P146 蛋白。该蛋白在两个 “S/T-X-F↓X-D/E” 样位点被切割为 3 个片段, 分别是 50 kDa、40 kDa 和 85 kDa 的 P50<sub>P146</sub> (N 端片段)、P40<sub>P146</sub> (中间片段) 和 P85<sub>P146</sub> (C 端片段), 这 3 个蛋白均位于 Mhp 表面, 特异性地与猪呼吸道纤毛和肝素结合; 此外, P85 蛋白还能与纤溶酶原结合<sup>[20]</sup>。

## 1.2 P102 蛋白家族蛋白

P102 蛋白家族也包括 7 个成员, 分别为 Mhp108、Mhp182、Mhp272、Mhp274、Mhp275、Mhp384、Mhp683, 已经证明 Mhp182、Mhp108、Mhp384、Mhp683 参与了黏附过程, 且 Mhp182 和 Mhp108 与黏附密切相关。

### 1.2.1 P102

Mhp182 蛋白是一个含 904 个氨基酸的 102 kDa 的蛋白, 因此也称 P102。该蛋白基因与 *mhp183* 位于同一个操纵子, 在 *mhp183* 基因下游<sup>[7]</sup>。P102 可自身水解为 60 kDa 和 42 kDa 的两个蛋白, 称为 P60 和 P42。这 3 个蛋白均位于细菌表面, 且能与纤溶酶原结合。P102 可使纤溶酶原被组织特异性

的纤溶酶原激活剂 (Tissue-specific plasminogen activator, tPA) 激活, 使其获得降解纤维蛋白原 (Fibrinogen) 的能力。此外, P102 和 P42 还能与纤连蛋白结合; P102 具有黏附于 PK15 细胞的能力<sup>[21]</sup>。

### 1.2.2 P116

P116 蛋白由 *mhp108* 基因编码。该蛋白羧基端的含 311 个氨基酸的 39.6 kDa 片段 (F4<sub>P116</sub>) 在与 Mhp 表面分子结合过程中发挥重要作用, 可与纤连蛋白、纤溶酶原以剂量依赖性方式结合, 其羧基端的赖氨酸残基在与纤溶酶原结合过程中发挥重要作用。其 37–295 位的 33.5 kDa (F1<sub>P116</sub>) 和 542–699 位的 21.8 kDa (F3<sub>P116</sub>) 片段能与 PK15 细胞结合; 所有 4 个片段 (F2<sub>P116</sub>: 296–541 位氨基酸, 32.5 kDa; F4<sub>P116</sub>: 700–1 010 位氨基酸, 39.6 kDa) 均能与猪呼吸道纤毛结合, 但与其他 3 个片段相比, F3<sub>P116</sub> 的结合能力稍弱<sup>[22]</sup>。因此, P116 通过多种途径与宿主细胞黏附。

### 1.2.3 Mhp384

Mhp384 含 957 个氨基酸, 理论分子量为 109.2 kDa。在 Mhp 内找不到完整的 Mhp384 蛋白, 其在“S/T-X-F↓X-D/E”样位点被切割成大小为 60 kDa (P60<sub>384</sub>) 和 50 kDa (P50<sub>384</sub>) 的两个蛋白。P60<sub>384</sub> 和 P50<sub>384</sub> 均能被肝素和纤毛结合位点识别并结合<sup>[17]</sup>。

### 1.2.4 Mhp683

Mhp683 蛋白大小为 135 kDa, 可自身水解为 P45<sub>683</sub> (N 端片段)、P48<sub>683</sub> (中间片段) 和 P50<sub>683</sub> (C 端片段) 3 个蛋白, 均位于 Mhp 表面。这 3 个蛋白之间的切割位点为“TTKF↓QE”。将 Mhp683 分段表达, 分为 F1<sub>683</sub> (42–308 位氨基酸, 37.3 kDa)、F2<sub>683</sub> (306–597 位氨基酸, 41.1 kDa)、F3<sub>683</sub> (595–803 位氨基酸, 30.5 kDa)、F4<sub>683</sub> (801–1 017 位氨基酸, 31.2 kDa)、F5<sub>683</sub> (1 017–1 194 位氨基酸, 27.3 kDa) 5 段, 这 5 个片段均能与肝素和猪呼吸道纤毛结合, 说明 Mhp683 的 3 个自身水解片段也能与肝素和猪呼吸道纤毛结合<sup>[23]</sup>。

## 1.3 其他黏附蛋白

### 1.3.1 Fba

在 232 菌株中, 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, Fba) 由 *mhp014* 基因编码; 在 168 菌株中, 其编码基因为 *MHP168\_014*。该蛋白位于 Mhp 表面, 能黏附于猪气管上皮细胞 (Swine tracheal epithelial cells, STEC)。Fba 重组蛋白制备的抗体可特异性阻断 Mhp 对 STEC 的黏附; 经表面等离子共振研究发现其也能与纤连蛋白结合<sup>[24]</sup>。

### 1.3.2 Mhp036

Berry 等发现, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 也能位于 Mhp 表面, 该蛋白由 232 菌株的 *mhp036* 基因编码。亲和层析结合试验结果表明, Mhp 的 GAPDH 蛋白能与肌动蛋白、纤连蛋白、肝素和纤溶酶原结合<sup>[25]</sup>。

### 1.3.3 Eno

Mhp 烯醇化酶 (Enolase, Eno) 由 232 菌株 *mhp129* 基因编码, 在 168 菌株和 J 菌株中分别由 *MHP168\_271* 和 *MHJ\_0242* 编码。类似于 Fba, Eno 也是一种菌体表面蛋白, 可以黏附在 STEC 上, Eno 抗体可特异性阻断 Mhp 对 STEC 的黏附。免疫印迹和表面等离子共振证明, Eno 还能与纤溶酶原以剂量依赖性方式结合<sup>[26]</sup>。

### 1.3.4 MHJ\_0125

MHJ\_0125 蛋白由 J 菌株的 *MHJ\_0125* 基因编码, 在 232 菌株中对应 Mhp252 蛋白, 分子量为 440 kDa, 是一种氨肽酶, 能形成十二聚体聚合物结构。MHJ\_0125 也是一个菌体表面的多功能黏附素, 能与肝素和纤溶酶原结合。其与纤溶酶原的结合是剂量依赖性的, 结合之后能促进 tPA 对纤溶酶原的激活<sup>[27]</sup>。

### 1.3.5 P68

P68 蛋白在 232 菌株和 168 菌株中分别由 *mhp390* 和 *MHP168\_418* 编码。Liu 等研究发现, P68 位于 Mhp 菌体表面, 以剂量依赖性方式与猪气管纤毛结合, 最佳结合浓度为 0.1 μg/L<sup>[28]</sup>。

### 1.3.6 MHJ\_461

MHJ\_461 是一种亮氨酸氨基肽酶, 在 232 菌株和 J 菌株中分别由 *mhp462* 和 *MHJ\_462* 编码, 单体分子量为 51.4 kDa。在菌体表面形成由超过 10 个单体聚集而成的分子量分别为 500 kDa 和 800 kDa 的多聚蛋白。MHJ\_461 能与肝素结合, 也能结合纤溶酶原, 且在 tPA 存在时, 帮助纤溶酶原转化为纤维蛋白酶<sup>[29]</sup>。

### 1.3.7 P110

P110 是一种糖蛋白, 能与猪气管上皮细胞结合。P110 能水解为 1 个 P54 蛋白和 2 个 P28 蛋白, 这两个蛋白也分别能与 STEC 结合<sup>[30]</sup>。后续研究发现, P110 蛋白由 159 kDa 的 Mhp494 蛋白 (也称为 P159 蛋白) 水解而来, 该蛋白也能与肝素结合<sup>[31]</sup>。

### 1.3.8 P159

P159 蛋白能被内源性蛋白酶分别在“<sup>233</sup>F↓Q<sup>234</sup>”和“<sup>981</sup>F↓Q<sup>982</sup>”位点切割, 形成 P27、P110 和 P52 三个蛋白<sup>[32]</sup>。这 3 个蛋白均能与 PK15 细胞结合<sup>[31-32]</sup>, 也能与肝素以剂量依赖性方式结合<sup>[31-32]</sup>; P159 的分段重组蛋白 F<sub>2P159</sub> (31-264 位氨基酸) 和 F<sub>4P159</sub> (958-1 405 位氨基酸) 能与纤毛结合, 这 2 个区段分别包含在 P110 和 P52 蛋白中<sup>[32]</sup>。

### 1.3.9 EF-Tu

热不稳定延伸因子 (Elongation factor thermo unstable, EF-Tu) 在 232 菌株、168 菌株和 J 菌株分别由 *mhp540*、*MHP168\_533* 和 *MHJ\_0524* 基因编码, 位于 Mhp 表面。研究发现该蛋白在 Mhp 中也可以作为一种黏附因子与细胞表面的纤连蛋白、肌动蛋白和纤溶酶原结合<sup>[33-34]</sup>, 用 EF-Tu 抗体阻断 EF-Tu 的功能后, Mhp 与 STEC 的结合能力减弱<sup>[34]</sup>。

虽然已经发现了近 20 种黏附相关蛋白, 且估计将来还会有新的黏附蛋白被发现, 但哪个黏附蛋白及宿主细胞表面的哪种 ECM 在 Mhp 对宿主细胞的黏附中发挥主要作用? 此外, 哪个黏附蛋白可作为下一代 Mhp 疫苗的保护性抗原? 这是今

后黏附蛋白研究中需重点解决的问题。

## 2 猪肺炎支原体对宿主细胞的损伤

不同毒力的 Mhp 菌株对宿主细胞的损伤程度不一。强毒菌株和中等毒力菌株感染 STEC, 能造成纤毛变粗、破损和脱落, 而弱毒菌株对纤毛影响较小; 与弱毒菌株相比, 强毒菌株和中等毒力菌株感染细胞后能显著降低细胞活性, 促进 STEC 分泌 MUC5B 黏蛋白、一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 和内源性活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 引起细胞的氧化应激反应, 且 STEC 的损伤程度与菌株的毒力呈正相关<sup>[35]</sup>。

细胞凋亡是细胞为维持内环境稳定, 由基因控制的有序性的细胞死亡过程。细胞凋亡可被细胞内 NO、ROS、促炎细胞因子、激素等激活<sup>[36-37]</sup>。在许多动物细胞中, 过量的 NO、ROS 和 Caspase-3 是细胞凋亡的关键介质。过量的 NO 与超氧阴离子自由基反应形成过氧亚硝酸盐; 线粒体产生的过量的 ROS 能突破细胞抗氧化防御系统发生氧化应激, 激活细胞凋亡级联反应; Caspase-3 是膜受体调节和线粒体调节的凋亡通路中 Caspase 级联反应的下游效应因子。脂相关膜蛋白 (Lipid-associated membrane proteins, LAMP) 是 Mhp 的重要致病因子, 它能引起猪肺泡巨噬细胞 (Porcine alveolar macrophage, PAM) 系 3D4/21 的凋亡, 这种凋亡是通过产生 NO、超氧阴离子和激活 Caspase-3 实现的<sup>[38]</sup>。LAMP 也能通过 p38 MAPK 和 Bax/Bcl-2 信号通路造成猪外周血淋巴细胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)<sup>[39]</sup> 和 St. Jude 猪肺上皮细胞系 (St. Jude porcine lung epithelial cell line, SJPL)<sup>[40]</sup> 的凋亡。已经鉴定出多个与凋亡相关的 LAMP 蛋白, 这些蛋白可以作为毒力因子促进细胞凋亡的发生。Mhp 的 Fba 蛋白能刺激 STEC 产生丙酮酸, 导致细胞凋亡<sup>[41]</sup>。

I 型信号肽酶 (Type I signal peptidase, SPase I) 则通过 Caspase-3 级联信号途径促进 Mhp 诱导的

细胞凋亡<sup>[42]</sup>。Mhp390 蛋白除了与猪气管纤毛结合,还能刺激 PBMCs 中单核细胞和淋巴细胞及 PAMs 凋亡<sup>[28]</sup>,从而降低宿主的免疫反应。最近,Mhp597 蛋白也被证明能导致 PK15 细胞凋亡<sup>[43]</sup>。

除了 LAMP 蛋白,胆固醇在 Mhp 导致的宿主细胞凋亡和损伤中也发挥重要作用。胆固醇含量高的猪肺组织,Mhp 的感染也更加严重。其原因是胆固醇能加快 Mhp 的生长,并促进 Mhp 对 PAMs 的黏附,进而促进了 Mhp 导致的细胞凋亡<sup>[44]</sup>,这种凋亡也是通过增加过氧化氢 (Hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) 和产生 NO,上调肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 表达水平和激活 Caspase-3 级联信号途径实现的。

Mhp 在代谢过程中产生的代谢产物有时也能成为 Mhp 的重要致病因子。 $H_2O_2$  属于 ROS 的一种,易穿透细胞膜,与细胞内的还原型铁离子通过芬顿反应生成高毒性的羟自由基,对多种细胞造成毒性。高毒力 Mhp 菌株能利用甘油生成  $H_2O_2$ ,从而造成对细胞的毒性<sup>[45]</sup>。开始认为该过程是甘油-3-磷酸氧化酶 (Glycerol-3-phosphate oxidase, GlpO) 将甘油-3-磷酸 (Glycerol-3-phosphate) 转化为磷酸二氢丙酮 (Dihydroxyacetone-phosphate, DHAP), DHAP 产生有细胞毒性的  $H_2O_2$ <sup>[46]</sup>; 后来发现不同毒力菌株之间 *glpO* 基因转录水平没有差异<sup>[45]</sup>。因此,在 Mhp 中,甘油通过何种途径最终生成  $H_2O_2$  还需进一步研究。

除了对宿主细胞的直接损伤,Mhp 的两个表面蛋白酶,Xaa 促氨肽酶 PepP (232 菌株中由 *mhp680* 基因编码,J 菌株中由 *MHJ\_0659* 基因编码) 和寡内肽酶 F-PepF (232 菌株中由 *mhp520* 基因编码,J 菌株中由 *MHJ\_0522* 基因编码) 能降解促炎肽,其中 PepP 能降解缓激肽 (Bradykinin, BK)、P 物质 (Substance P) 和神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY), PepF 能降解 BK、P 物质和神经激肽 (Neurokinin A, NKA)。BK 能促进支气管收缩,是一种促炎肽; NPY 是一种炎症介质, P 物质和

NKA 有抗菌肽功能,能促进气管支气管内黏液分泌和增加纤毛摆动频率。破坏这 4 种蛋白就降低了纤毛摆动频率和黏液纤毛清除效率,降低呼吸道纤毛对 Mhp 的清除,从而有利于 Mhp 在呼吸道纤毛的定殖<sup>[47]</sup>。

### 3 猪肺炎支原体刺激机体导致的炎症反应

Mhp 感染猪只后,能刺激机体的 PBMCs 产生一系列炎症因子,如白细胞介素- $1\beta$  (Interleukin- $1\beta$ , IL- $1\beta$ )、IL-8、IL-18 和 TNF- $\alpha$ , 这些炎症因子也存在于支气管肺泡灌洗液 (Broncho-alveolar lavage fluids, BALF)<sup>[48]</sup>。Mhp 刺激猪的骨髓来源树突状细胞 (Bone-marrow-derived dendritic cells, BM-DCs) 产生 IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 和 TNF- $\alpha$ <sup>[49]</sup>。此外,Mhp 能刺激鼠 PAMs 细胞产生 IL- $1\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B 在调控这些细胞因子的产生中具有重要作用<sup>[50]</sup>。Mhp 刺激机体产生高水平炎症因子可能是 Mhp 造成肺部病理损伤的重要原因。进一步研究发现,Mhp390 蛋白在 Mhp 刺激机体产生 IL- $1\beta$  和 TNF- $\alpha$  中具有重要作用<sup>[28]</sup>。此外,Mhp597 在 Mhp 感染细胞导致的炎症反应中也能上调炎症因子 IL- $1\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  基因的表达。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在 Mhp597 诱导的炎症反应中发挥重要作用,将 TLR4 沉默,能显著降低 Mhp597 诱导的上述炎症因子的表达; 该反应通过 TLR4 下游的 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路实现<sup>[43]</sup>。

### 4 宿主的免疫反应

Mhp 感染机体引起的免疫反应包括体液免疫、黏膜免疫、细胞免疫和天然免疫。Mhp 感染机体后通常要 8-24 周才能检测到血清 IgG 抗体<sup>[51-52]</sup>,也有研究报道 Mhp 感染后 21 d 有不超过 10% 的猪只能检测到血清 IgG<sup>[53]</sup>; 全菌抗原制备的灭活疫苗免疫后 6 周<sup>[54]</sup>甚至到 14 周<sup>[55]</sup>才能检测到 IgG,这与经典免疫学理论中病原感染或疫苗免疫

后 1 周左右即可检测到 IgG 相比大大延迟。其主要原因应是血清抗体产生时间较晚；通过改变 ELISA 试剂盒的包被抗原，也可能会使 IgG 的检测时间点提前。Garcia-Morante 等<sup>[53]</sup>研究发现，在 Mhp 感染后 21 d，超过 90% 的猪只在肺部均能产生 IgG，说明 IgG 在呼吸系统产生较早。此外，IgG 水平，特别是 IgG2 水平与肺部病理损伤呈正相关，抗体水平高则肺部病变严重<sup>[53]</sup>，这说明血清抗体不能提供免疫保护。Mhp 灭活疫苗主要刺激机体产生体液免疫，但灭活疫苗既不能阻止 Mhp 在呼吸道的定殖，也不能阻断 Mhp 在猪群内和猪群之间传播，有试验证实已免疫 Mhp 灭活疫苗的猪群和未免疫猪群之间 Mhp 的感染率无显著性差异<sup>[56-59]</sup>，这些研究进一步说明血清抗体在免疫保护中几乎没有作用。

吃初乳仔猪的断奶体重显著高于不吃初乳仔猪的断奶体重，且与初乳摄入量呈正相关<sup>[60]</sup>。那 Mhp 初乳抗体是否能发挥免疫保护作用，降低或避免 Mhp 对仔猪的感染？通过文献分析发现，在 Mhp 流行严重的猪群中，获得 Mhp 母源抗体（主要为 IgM）的仔猪不出现猪支原体肺炎临床症状，当母源抗体消失后，断奶仔猪的临床症状就会出现<sup>[61]</sup>。虽然免疫 Mhp 灭活疫苗不能阻止 Mhp 在母猪呼吸道的定殖，但其哺乳仔猪呼吸道中 Mhp 的定殖率远远低于未经 Mhp 疫苗免疫母猪所产仔猪哺乳期内呼吸道中 Mhp 的定殖率，且哺乳仔猪 Mhp 的感染率和母源抗体水平呈负相关<sup>[55,63]</sup>。这表明 Mhp 灭活疫苗产生的母源抗体在对仔猪的免疫保护中发挥了作用。因此，初乳抗体在免疫保护中的作用应是今后 Mhp 抗感染免疫的一个重要研究方向。

Mhp 感染后刺激机体产生的 IgA 存在于外周血血清、支气管肺泡灌洗液、鼻黏膜、气管、肺门淋巴结和肺部<sup>[63]</sup>。黏膜抗体 IgA 产生时间要远远早于 IgG 的产生时间，以 P97 蛋白为抗原制备 ELISA 试剂盒，在 Mhp 感染后 4 d 即可检测到鼻

腔分泌物中的 IgA<sup>[64]</sup>。因此，可以把 IgA 作为 Mhp 感染的早期检测抗体。SIgA 可能在 Mhp 感染中发挥免疫保护功能，当 SIgA 水平升高后，Mhp 导致的临床症状减轻，肺部病理损伤程度和气管纤毛损伤程度降低，Mhp 的负载量显著下降<sup>[65]</sup>。Mhp 弱毒疫苗经鼻腔和胸腔免疫能产生高水平 SIgA<sup>[66]</sup>，经气雾免疫也能产生相同的效果<sup>[67]</sup>。因此弱毒疫苗的免疫效果可能优于灭活疫苗。IgA 的产生受 TLR2 和 TLR4 的调控，Mhp 感染后，TLR2 和 TLR4 的表达量升高；抑制 TLR2 和 TLR4 的表达，IgA 的分泌明显降低<sup>[63]</sup>。因此，增强 IgA 的分泌应是下一代 Mhp 疫苗研发应考虑的问题。

早期研究认为，细胞免疫在 Mhp 的免疫保护中可能发挥主要作用<sup>[68]</sup>，但通过对 Mhp 感染后猪血清及肺泡灌洗液中 IgG1 和 IgG2 的检测，Garcia-Morante 等认为 Th1 细胞调节的免疫反应在 Mhp 感染中占主导地位，且 Th1 细胞产生 IgG2 的水平与肺部病理损伤严重程度呈正相关<sup>[53]</sup>。由于缺少合适的动物模型及相应的商品化试剂，关于细胞免疫在 Mhp 感染中的作用研究较少。考虑到现在普遍使用的灭活疫苗免疫效果不佳且其主要刺激机体产生体液免疫，因此，应尽快建立合适的 Mhp 感染动物模型，加快相应试剂开发，加强对细胞免疫的研究，并评价其在免疫保护中的地位。

Trueeb 等报道，Mhp 能诱导不同类型的细胞产生天然免疫反应，如能刺激 PMBCs 和传统树突状细胞 2 (Conventional dendritic cells 2, cDC2) 产生 TNF，也能诱导猪血液中单核细胞、cDC1、cDC2 和浆细胞样树突状细胞 (Plasmacytoid dendritic cells, pDC) 上调 CD40、CD25 的表达，刺激了 B 细胞的增殖和 IgM 的产生<sup>[69]</sup>。自噬 (Autophagy) 也是一种天然免疫反应，是细胞质中非特异性蛋白质被具有双层膜结构的自噬体 (Autophagosome) 包裹，与溶酶体融合形成自噬溶酶体 (Autolysosome)，最终将自噬溶酶体中包



裹的物质降解的过程。近年来有研究发现, Mhp 能进入猪的传代细胞系, 如 Che<sup>[70]</sup>和 Raymond<sup>[71]</sup>等分别在 2014 年和 2018 年报道 Mhp 能进入 PK15 细胞; 另一项研究证明 Mhp 也能进入猪肺泡巨噬细胞<sup>[72]</sup>。笔者实验室从采集的猪肺泡巨噬细胞中检测到了 Mhp, 进一步说明 Mhp 能进入细胞内。我们还发现 Mhp 感染猪肺组织的临床样本中, 与 Mhp 阴性样品相比, 自噬标志蛋白 LC3-II 的表达量明显升高, 且与 Mhp 形成共定位; Mhp 感染 PK-15 细胞能显著增加自噬标志蛋白的表达, 说明 Mhp 感染 PK-15 细胞也能导致自噬发生。此外还发现自噬体与溶酶体不能融合形成完整的自噬流, 这造成 Mhp 在细胞内随着感染时间延长大量增殖, 表明自噬促进了 Mhp 在细胞内的增殖, 但这种自噬反应是通过哪条信号通路介导还需进一步明确。自噬体与溶酶体的融合需要可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子黏附蛋白受体 (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, SNARE) 复合物 (包括 syntaxin 17、SNAP29、VAMP8 等蛋白) 和 Rab7、LAMP2 的参与, SNAP47、ATG14 也参与了这一融合过程。Mhp 如何与这些蛋白相互作用阻断自噬体与溶酶体的融合是本实验室下一步要开展的工作。

## 5 总结与展望

Mhp 感染宿主细胞的首要步骤是对宿主细胞的黏附, 已经有十几个与黏附相关蛋白被鉴定出来, 其黏附机制大部分也已经被阐明。Mhp 黏附之后对宿主细胞的直接损伤包括对纤毛的破坏、细胞毒性作用、宿主细胞的凋亡与死亡等, 这些直接损伤是由哪些毒力因子导致的, 如何实现与宿主细胞的互作及互作机制是什么, 仍需进一步明确。由于难以对 Mhp 开展基因操作, 这给毒力基因的鉴定及其功能研究造成了很大的困难。建立 Mhp 基因操作系统应是今后 Mhp 致病机制研究需要攻克的重要技术平台。

由于尚未建立 Mhp 感染的动物模型, 使得

Mhp 相关的免疫学研究较为滞后, 特别是其引起的初乳体液免疫、细胞免疫及天然免疫研究; 另一方面就是 Mhp 如何逃避免疫系统攻击, 实现其在宿主细胞内的增殖。此外, 哪些蛋白, 特别是哪些膜蛋白和分泌蛋白在免疫保护中扮演重要角色需要明确。笔者实验室已经鉴定了 36 个血清体液免疫显性蛋白和 8 个只在体内表达而体外无细胞培养不表达的血清体液免疫显性蛋白<sup>[73]</sup> (部分研究结果相关论文尚在审稿中), 这些蛋白的免疫学功能及免疫保护作用仍需要细胞学和动物试验来证明。

加强 Mhp 与宿主互作及免疫机制研究将是今后 Mhp 基础研究的重要方向, 这有助于 Mhp 致病机制的阐明, 同时对预防性生物制品和小分子靶向抗菌药物的开发具有重要的理论指导意义。

## REFERENCES

- [1] Chen PY. Veterinary Lemology. 6 th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 259-262 (in Chinese).  
陈溥言. 兽医传染病学. 6 版. 北京: 中国农业出版社, 2015: 259-262.
- [2] Maes D, Sibila M, Kuhnert P, et al. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(S1): 110-124.
- [3] Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, et al. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*, 1992, 30(4): 329-341.
- [4] Reolon LA, Martello CL, Schrank IS, et al. Survey of surface proteins from the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 using a biotin cell surface labeling approach. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): e112596.
- [5] Tacchi JL, Raymond BBA, Haynes PA, et al. Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol*, 2016, 6(2): 150210.
- [6] Paes JA, Lorenzatto KR, De Moraes SN, et al. Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and

- Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis. *J Proteomics*, 2017, 154: 69–77.
- [7] Minion FC, Lefkowitz EJ, Madsen ML, et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol*, 2004, 186(21): 7123–7133.
- [8] Zhang Q, Young TF, Ross RF. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun*, 1995, 63(3): 1013–1019.
- [9] Hsu T, Artiushin S, Minion FC. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol*, 1997, 179(4): 1317–1323.
- [10] Hsu T, Minion FC. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun*, 1998, 66(10): 4762–4766.
- [11] Minion FC, Adams C, Hsu T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun*, 2000, 68(5): 3056–3060.
- [12] Djordjevic SP, Cordwell SJ, Djordjevic MA, et al. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun*, 2004, 72(5): 2791–2802.
- [13] Jenkins C, Wilton JL, Minion FC, et al. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun*, 2006, 74(1): 481–487.
- [14] Raymond BBA, Jenkins C, Seymour LM, et al. Proteolytic processing of the cilium adhesin MHJ\_0194 (P123J) in *Mycoplasma hyopneumoniae* generates a functionally diverse array of cleavage fragments that bind multiple host molecules. *Cell Microbiol*, 2015, 17(3): 425–444.
- [15] Seymour LM, Falconer L, Deutscher AT, et al. Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem*, 2011, 286(12): 10097–10104.
- [16] Deutscher AT, Jenkins C, Minion FC, et al. Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Mol Microbiol*, 2010, 78(2): 444–458.
- [17] Deutscher AT, Tacchi JL, Minion FC, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs. *J Proteome Res*, 2012, 11(3): 1924–1936.
- [18] Tacchi JL, Raymond BBA, Jarocki VM, et al. Cilium adhesin P216 (MHJ\_0493) is a target of ectodomain shedding and aminopeptidase activity on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Proteome Res*, 2014, 13(6): 2920–2930.
- [19] Wilton J, Jenkins C, Cordwell SJ, et al. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2009, 71(3): 566–582.
- [20] Bogema DR, Deutscher AT, Woolley LK, et al. Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography. *mBio*, 2012, 3(2): e00282–11.
- [21] Seymour LM, Jenkins C, Deutscher AT, et al. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol*, 2012, 14(1): 81–94.
- [22] Seymour LM, Deutscher AT, Jenkins C, et al. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J Biol Chem*, 2010, 285(44): 33971–33978.
- [23] Bogema DR, Scott NE, Padula MP, et al. Sequence TTKF↓QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem*, 2011, 286(48): 41217–41229.
- [24] Yu YF, Liu MJ, Hua LZ, et al. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase encoded by a core gene of *Mycoplasma hyopneumoniae* contributes to host cell adhesion. *Vet Res*, 2018, 49: 114.
- [25] Berry IJ, Jarocki VM, Tacchi JL, et al. N-terminomics identifies widespread endoproteolysis and novel methionine excision in a genome-reduced bacterial pathogen. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11063.
- [26] Chen R, Yu YF, Feng ZX, et al. Featured

- species-specific loops are found in the crystal structure of Mhp Eno, a cell surface adhesin from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 209.
- [27] Robinson MW, Buchtman KA, Jenkins C, et al. MHJ\_0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol*, 2013, 3(4): 130017.
- [28] Liu W, Zhou DN, Yuan FY, et al. Surface proteins Mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microb Pathog*, 2019, 126: 92–100.
- [29] Jarocki VM, Santos J, Tacchi JL, et al. MHJ\_0461 is a multifunctional leucine aminopeptidase on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol*, 2015, 5(1): 140175.
- [30] Chen JR, Lin JH, Weng CN, et al. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*, 1998, 62(2): 97–110.
- [31] Burnett TA, Dinkla K, Rohde M, et al. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol*, 2006, 60(3): 669–686.
- [32] Raymond BBA, Tacchi JL, Jarocki VM, et al. P159 from *Mycoplasma hyopneumoniae* binds porcine cilia and heparin and is cleaved in a manner akin to ectodomain shedding. *J Proteome Res*, 2013, 12(12): 5891–5903.
- [33] Widjaja M, Harvey KL, Hagemann L, et al. Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. *Sci Rep*, 2017, 7: 11227.
- [34] Yu YF, Wang HG, Wang J, et al. Elongation factor thermo unstable (EF-Tu) moonlights as an adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae* by binding to fibronectin. *Front Microbiol*, 2018, 9: 974.
- [35] Feng YY, Wang HY, Liu BB, et al. The pathogenic mechanism of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains with different virulence on 3D cultured swine tracheal epithelial cell. *Acta Veterin Zootechn Sin*, 2018, 49(2): 378–387 (in Chinese).
- 冯艳艳, 王海燕, 刘蓓蓓, 等. 猪肺炎支原体不同毒力菌株对猪气管上皮 3D 细胞的损伤差异与机制分析. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(2): 378–387.
- [36] D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582–592.
- [37] Kleih M, Böpple K, Dong M, et al. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 851.
- [38] Bai FF, Ni B, Liu MJ, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 155(3): 155–161.
- [39] Bai FF, Ni B, Liu MJ, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Vet Microbiol*, 2015, 175(1): 58–67.
- [40] Ni B, Bai FF, Wei Y, et al. Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 11429–11443.
- [41] Hua LZ, Wang SJ, Ma DF, et al. Prokaryotic expression of aldolase of *Mycoplasma hyopneumoniae* and induced apoptosis in porcine tracheal epithelial cells *in vitro*. *Progr Vet Med*, 2019, 40(6): 17–22 (in Chinese).
- 华利忠, 王世杰, 马丹夫, 等. 猪肺炎支原体醛缩酶原核表达及致猪气管上皮细胞凋亡的研究. *动物医学进展*, 2019, 40(6): 17–22.
- [42] Paes JA, Virginio VG, Cancela M, et al. Pro-apoptotic effect of a *Mycoplasma hyopneumoniae* putative type I signal peptidase on PK(15) swine cells. *Vet Microbiol*, 2017, 201: 170–176.
- [43] Li P, Zhang YK, Li X, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* Mhp597 is a cytotoxicity, inflammation and immunosuppression associated nuclease. *Vet Microbiol*, 2019, 235: 53–62.
- [44] Liu MJ, Du GM, Liu BB, et al. Cholesterol exacerbates *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced

- apoptosis via stimulating proliferation and adhesion to porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol*, 2017, 211: 112–118.
- [45] Ferrarini MG, Mucha SG, Parrot D, et al. Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2018, 108(6): 683–696.
- [46] Ferrarini MG, Siqueira FM, Mucha SG, et al. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. *BMC Genomics*, 2016, 17: 353.
- [47] Jarocki VM, Raymond BBA, Tacchi JL, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* surface-associated proteases cleave bradykinin, substance P, neurokinin A and neuropeptide Y. *Sci Rep*, 2019, 9: 14585.
- [48] Muneta Y, Minagawa Y, Shimoji Y, et al. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(10): 1065–1070.
- [49] Fourour S, Marois-Créhan C, Martelet L, et al. Intra-species and inter-species differences in cytokine production by porcine antigen-presenting cells stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, and *M. flocculare*. *Pathogens*, 2019, 8(1): 34.
- [50] Damte D, Lee SJ, Hwang MH, et al. Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines. *N Zeal Vet J*, 2011, 59(4): 185–190.
- [51] Djordjevic SP, Eamens GJ, Romalis LF, et al. An improved enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of porcine serum antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*, 1994, 39(3/4): 261–273.
- [52] Leon EA, Madec F, Taylor NM, et al. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Vet Microbiol*, 2001, 78(4): 331–341.
- [53] Garcia-Morante B, Segalés J, Fraile L, et al. Potential use of local and systemic humoral immune response parameters to forecast *Mycoplasma hyopneumoniae* associated lung lesions. *PLoS ONE*, 2017, 12(4): e0175034.
- [54] Sibila M, Nofrarías M, López-Soria S, et al. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet Microbiol*, 2007, 122(1/2): 97–107.
- [55] Martelli P, Terreni M, Guazzetti S, et al. Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *J Vet Med*, 2006, 53(5): 229–233.
- [56] Arsenakis I, Michiels A, Schagemann G, et al. Effects of pre-farrowing sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on offspring colonisation and lung lesions. *Vet Rec*, 2019, 184(7): 222.
- [57] Villarreal I, Maes D, Vranckx K, et al. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine*, 2011, 29(9): 1731–1735.
- [58] Villarreal I, Meyns T, Dewulf J, et al. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *Vet J*, 2011, 188 (1): 48–52.
- [59] Meyns T, Dewulf J, De Kruif A, et al. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine*, 2006, 24(49/50): 7081–7086.
- [60] Declerck I, Dewulf J, Sarrazin S, et al. Long-term effects of colostrum intake in piglet mortality and performance. *J Anim Sci*, 2016, 94(4): 1633–1643.
- [61] Djordjevic SP, Eamens GJ, Romalis LF, et al. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Aust Vet J*, 1997, 75(7): 504–511.
- [62] Ruiz AR, Utrera V, Pijoan C. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* sow vaccination on piglet colonization at weaning. *J Swine Health Prod*, 2003, 11(3): 131–135.
- [63] Li X, Zhang YK, Yin B, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 mediate the IgA immune response induced by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun*, 2019, 88(1): e00697–19.
- [64] Feng ZX, Bai Y, Yao JT, et al. Use of serological and mucosal immune responses to *Mycoplasma*

- hyopneumoniae* antigens P97R1, P46 and P36 in the diagnosis of infection. *Vet J*, 2014, 202(1): 128–133.
- [65] Zhang N, Gao P, Yin B, et al. Cathepsin L promotes secretory IgA response by participating in antigen presentation pathways during *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *PLoS ONE*, 2019, 14(4): e0215408.
- [66] Li PC, Li YF, Shao GQ, et al. Comparison of immune responses to intranasal and intrapulmonary vaccinations with the attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 strain in pigs. *J Vet Med Sci*, 2015, 77(5): 519–525.
- [67] Hua LZ, Bai Y, Wu YZ, et al. Kinetics of siga secretion and bacterin proliferation in respiratory tracts after aerosol vaccination of attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine (168 strain). *Chin J Vet Parasitol*, 2019, 27(4): 69–74 (in Chinese).  
华利忠, 白昀, 武昱孜, 等. 猪支原体肺炎活疫苗 (168 株) 气溶胶免疫后呼吸道 sIgA 分泌及抗原存留规律. *中国动物传染病学报*, 2019, 27(4): 69–74.
- [68] Maes D, Segales J, Meyns T, et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*, 2008, 126(4): 297–309.
- [69] Trueeb BS, Braun RO, Auray G, et al. Differential innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in various types of antigen presenting cells. *Vet Microbiol*, 2020, 240: 108541.
- [70] Che QL, Liu BB, Liu MJ, et al. Invasion of host cells by different virulent *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Acta Veterin Zootechn Sin*, 2014, 45(6): 981–988 (in Chinese).  
车巧林, 刘蓓蓓, 刘茂军, 等. 不同毒力猪肺炎支原体侵入宿主细胞的观察. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(6): 981–988.
- [71] Raymond BBA, Turnbull L, Jenkins C, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* resides intracellularly within porcine epithelial cells. *Sci Rep*, 2018, 8: 17697.
- [72] Deeney AS, Maglennon GA, Chapat L, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades phagocytic uptake by porcine alveolar macrophages *in vitro*. *Vet Res*, 2019, 50: 51.
- [73] Ning YR, Zhou YQ, Wang ZD, et al. Elevated Mhp462 antibody induced by natural infection but not *in vitro* culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Heliyon*, 2020, 6(8): e04832.

(本文责编 郝丽芳)