

MyD88 抑制剂 ST2825 对丝状支原体山羊亚种 感染宿主细胞的影响

张俊波¹, 印双红^{2*}, 张 红², 陆安法³

(1. 铜仁学院农林工程与规划学院 (铜仁市文化科技产业创新研究中心), 铜仁 554300;

2. 铜仁学院大健康学院, 铜仁 554300; 3. 铜仁市动物疫病预防控制中心, 铜仁 554300)

摘 要: 为分析 MyD88 在丝状支原体山羊亚种 (Mmc) 感染肺泡上皮细胞中的分子机制。以山羊肺泡上皮细胞为材料, 用不同浓度的 MyD88 抑制剂 (ST2825) 与细胞孵育, MTT 法检测细胞活性, 试剂盒检测 caspase-3 的活性, 以及实时定量 PCR 检测 *MyD88* 和 *TNF- α* mRNA 的表达水平, 试剂盒检测 H₂O₂ 浓度和 NO 浓度。当 ST2825 浓度为 5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不影响细胞活性, 而浓度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞活性显著降低; 感染比例 (MOI) 为 10, 感染时间为 8、12 和 24 h, Mmc 可以显著提高 *MyD88* mRNA 的表达水平 ($P<0.01$); 可显著提高 caspase-3 的活性, 而 ST2825 能够显著降低 caspase-3 ($P<0.05$); 感染时间为 24 h, Mmc 可显著提高 *TNF- α* mRNA 的表达水平、H₂O₂ 浓度和 NO 浓度 ($P<0.05$), 而 ST2825 在 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度时, 可显著降低 Mmc 介导的 caspase-3 活性、H₂O₂ 浓度以及 LDH 水平 ($P<0.05$), ST2825 在 5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时可显著降低 *TNF- α* mRNA 的表达水平和 NO 浓度 ($P<0.05$)。

关键词: 丝状支原体山羊亚种; MyD88 抑制剂; 致病机制

中图分类号: S855

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0611-06

Effect of MyD88 inhibitor ST2825 on host cells infected with mycoplasma mycoides subspecies capri

ZHANG Junbo¹, YIN Shuanghong², ZHANG Hong², LU Anfa³

(1. College of Agroforestry Engineering and Planning (Institute of Cultural and Technological Industry Innovation of Tongren), Tongren University, Tongren 554300; 2. College of One Health, Tongren University, Tongren 554300; 3. Animal Disease Prevention and Control Center of Tongren City, Tongren 554300)

Abstract: To study the molecular mechanism of MyD88 in alveolar epithelial cells infected by filamentous mycoplasma goat subspecies, the goat alveolar epithelial cells were treated with different concentrations of inhibitor ST2825. The cell activity was detected by MTT Assay Kit and the caspase-3 activity was measured using Caspase-3 Colorimetric Assay Kit from APExBIO Company. Expression levels of *TNF- α* mRNA were analyzed by real-time quantitative PCR, H₂O₂ concentration was measured using H₂O₂ Assay Kit, and NO concentration was measured using NO Assay Kit. The cell activity was not affected by ST2825 at the concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, but it was significantly decreased on the concentration of 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. When the infection ratio (MOI) was 10, the expression of *MyD88* mRNA was increased at 8 h, 12 h and 24 h post-infection, and the activity of caspase-3 was also significantly increased by the subspecies of mycelial carcinoma ($P<0.01$), while the expression of caspase-3 was significantly decreased by ST2825 ($P<0.05$). Expression levels of *TNF- α* mRNA and the concentrations of H₂O₂ and NO were significantly enhanced by Mycoplasma at 24 h post-infection

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502067), 中国博士后科学基金项目 (2017M613003), 铜仁学院博士科研启动基金项目 (trxyDH1504), 贵州省教育厅自然科学研究重点项目 (黔教合 KY 字 (2015) 411 号), 贵州省科技合作计划项目 (黔科合 LH 字[2015]7238; 黔科合 LH 字[2015]7236 号) 和贵州省教育厅青年科技人才成长项目[黔教合 KY 字[2017]312]共同资助。

作者简介: 张俊波, 博士, 副教授。E-mail: zhangjunbo666@126.com

* 通信作者: 印双红, 讲师。E-mail: ysh_hong2006@163.com

($P < 0.05$), however, mycoplasma-dependent caspase-3 activity, H_2O_2 and LDH levels were significantly decreased by ST2825 at the concentrations of 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and mycoplasma-dependent *TNF- α* mRNA and NO levels were also significantly decreased by ST2825 at the concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$).

Key words: mycoplasma mycoides subspecies capri; MyD88 inhibitor; pathogenesis

山羊传染性胸膜肺炎是山羊的一种急性或慢性呼吸道传染病, 主要症状为纤维素性胸膜肺炎, 此病可感染各种年龄的公母羊群, 有很高的发病率和死亡率, 被世界动物卫生组织列入通报疫病名录, 我国将此病列为二类传染病^[1-4]。此病的临床特征为: 高热、卡他性鼻液、眼结膜炎、纤维素性胸膜炎、母羊流产和消瘦等等。该病在世界范围内普遍流行, 严重危害养羊业发展, 给养羊业带来巨大的经济损失。山羊传染性胸膜肺炎在我国流行时间较长, 最早在甘肃发现有此病发生, 随后, 在多个省份报道此病发生, 例如在内蒙古、四川、云南和江苏等地^[5]。在贵州的流行情况, 2001年在首次获得丝状支原体山羊亚种分离株^[6], 2011年首次获得绵羊肺炎支原体分离株^[7]。贵州白山羊的原产地和主产区位于铜仁沿河县, 在山羊疾病中传染性胸膜肺炎发病率和死亡率高, 年龄在2岁内的山羊较易感染, 发病率为37.7%, 病死率为36.4%^[8]。此病已严重危害贵州养羊业的健康发展。

TLRs 是一类天然免疫受体, 是高度保守的 I 型跨膜蛋白, 为模式识别受体, 是关键天然免疫分子^[9], 主要在免疫细胞和上皮细胞上表达。它通过识别病原微生物的保守结构发挥着重要作用, 激活天然免疫细胞, 导致一系列的机体炎症反应, 在机体抵御病原微生物侵袭上发挥重要作用。TLR 样受体信号通路介导多种生物学效应, 如诱导炎症因子释放, 诱导杀菌活性, 促凋亡与抗凋亡作用等。MyD88 是 TLR 信号通路中的关键接头蛋白, 在传递上游信息和感染疾病发生中至关重要。MyD88 与心血管疾病、炎症性肠病、肿瘤等疾病密切相关。

目前, 由于 Mmc 对山羊肺泡上皮细胞的作用机理尚不是很清楚, 本实验的目的是探讨 MyD88 在 Mmc 感染山羊肺泡上皮细胞中作用机制, 为 Mmc 的致病机理提供理论基础和参考意见。

1 材料与方法

1.1 材料

丝状支原体山羊亚种与山羊肺泡上皮细胞为梵净山特色动植物资源重点实验室保存。胎牛血清和 DMEM 细胞培养液购自 GIBCO 公司; 酵母提取物、蛋白胨购自上海生工公司; Triton X-100 细胞裂解液、MTT 试剂盒和 DMSO 购自北京索莱宝科技有

限公司; Trizol Reagent Kit 购自 Invitrogen 公司; Caspase-3 活性检测试剂盒和 ST2825 抑制剂购自 Apexbio 公司; LDH 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; SYBR 染料购于罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 实验 收集对数期的山羊肺泡上皮细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔总体积为 200 μL , 边缘孔用无菌的 PBS 填充。弃去上清, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值, 具体操作见说明书。

1.2.2 引物设计与合成 从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站 GenBank 上查找公布相关基因设计引物。采用 Primer5.0 软件设计对特异性引物, 引物序列见表 1, 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>MyD88</i>	F: TGGTGGTGGTTGTCTCTGAC
	R: GGAACCTTTCTTCATTGGCTTG
<i>TNF-α</i>	F: GCCAACTCCCTCTGTTTATGT
	R: GGACACCTTGACCTCCTGAAT
<i>β-actin</i>	F: GCTCTCTCCAGCCTTCCT
	R: AGGTCCTTTCGGATGTCG

1.2.3 RNA 提取和 cDNA 的合成 抑制剂 ST2825 与细胞孵育 1 h。Mmc 感染细胞, 细菌:细胞数比例按 10:1 的进行感染细胞, 并将感染的细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中放置 4、8、12 和 24 h, 总 RNA 提取按 Trizol Reagent Kit 提供的方法进行, 在无核酸酶的离心管中加入如下混合物: 5 μL 的总 RNA; Oligo(dT)152 μL RNase-Free ddH₂O 5.5 μL ; Super Pure dNTP 2 μL ; 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅上加热 5 min 后迅速在冰上冷却 2 min。瞬时离心后加入以下组分试剂: RNasin 0.5 μL ; 5 \times First-Strand Buffer 4 μL 加 TIANScript M-MLV 1 μL , 轻轻用移液器混匀, 25

℃温浴 10 min。42℃温浴 50 min; 95℃加热 5 min 后终止反应, 置于冰上; RNase-Free ddH₂O 加入 30 μL, -20℃冰箱放入备用。

1.2.4 实时定量 PCR 以纯化的 cDNA 为模板, 内参 β-actin 为对照, 在罗氏 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪上进行相对定量的 PCR 反应, 反应体系为 2×SYBR Green Master Mix 10 μL, cDNA 模板 2 μL, 上、下游引物各 1 μL, 双蒸水 6 μL。PCR 反应条件: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 15 s, 59℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 40 个循环, 每组细胞每个时间点的细胞做 3 个重复, 实验完成后用 2^{-ΔΔC_T} 法对实验数据进行分析。

1.2.5 caspase-3 活性检测 抑制剂 ST2825 与细胞作用 1 h, Mmc 感染细胞, 细菌:细胞按 10:1 的个数比进行感染细胞, 并将感染的细胞继续置于 5% CO₂、37℃的培养箱中培养 24 h, 4℃、1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集细胞, 同前吸尽上清后, 按照每 200 万细胞加入 100 μL 裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解 15 min。用 Bradford 法检测待测样品中的蛋白浓度。这样就可以计算出一个样品单位重量蛋白中所含的 caspase-3 的酶活力单位, 具体操作见说明书。

1.2.6 H₂O₂ 浓度的测定 抑制剂 ST2825 与细胞作用 1 h。Mmc 感染细胞, 细菌:细胞按 10:1 的个数比进行感染细胞, 并将感染的细胞继续置于 5%、37℃的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。弃上清, 加入 H₂O₂ 检测裂解液, 充分匀浆, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清, 按照说明书进行操作。

1.2.7 NO 浓度的测定 抑制剂 ST2825 与细胞作用 1 h。Mmc 感染细胞, 细菌:细胞按 10:1 的个数比进行感染细胞, 并将感染的细胞继续置于 5%、37℃的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。取细胞上清液, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 7 min, 按照说明书检测 NO 浓度。

1.2.8 LDH 实验 抑制剂 ST2825 与细胞作用 1 h。Mmc 感染细胞, 于 24 h 取 50 μL 细胞上清液测 LDH 的 OD₄₅₀, 按照说明书进行操作。

1.2.9 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 多组样本间均数用方差分析, 两组间比较采用 2 样本均数的 *t* 参数检验或 *q* 检验。

2 结果与分析

2.1 MyD88 抑制剂 ST2825 对肺泡上皮细胞活性的影响

不同浓度抑制剂 ST2825 (0、5、10、20 和 40

μmol·L⁻¹) 与细胞作用 24 h 后, 收集细胞, 利用 MTT 方法检测细胞活性, 结果表明, 当抑制剂 ST2825 浓度为 5、10 和 20 μmol·L⁻¹ 不影响细胞活性, 而在 40 μmol·L⁻¹ 时细胞活性显著降低 ($P < 0.05$) (表 2)。结果表明, 本研究发现 ST2825 对细胞活性影响具浓度依赖性。

表 2 ST2825 对细胞活性影响
Table 2 Effects of ST2825 on cell viability

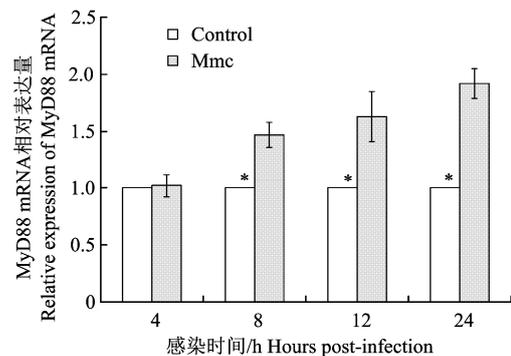
ST2825 处理浓度 /μmol·L ⁻¹ Treatment concentration	与对照组细胞活性比值/% Cell activity ratio of treatment group to control group ($\bar{x} \pm s$)
0	92.23±4.01
5	91.96±2.28
10	91.76±2.88
20	91.19±3.07
40	83.41±2.36*

注: “*”表示与对照组 (0 μmol·L⁻¹) 相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: “*”indicate significant difference compared with control (0 μmol·L⁻¹) at $P < 0.05$.

2.2 对不同时间下 Mmc 感染肺泡上皮细胞的分析

Mmc 山羊亚种感染肺泡上皮细胞后, 提取细胞的总 RNA, 用实时定量 PCR 检测 MyD88 的 mRNA 水平。在支原体 MOI 为 10 情况下, 感染时间为 4、8、12 和 24 h, 结果发现, 在所观察的时间点可以显著提高 MyD88 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$) (图 1)。



“*”表示 Mmc 感染组与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)
“*”indicate significant differences between Mmc infection group and the control group at the 0.01 level

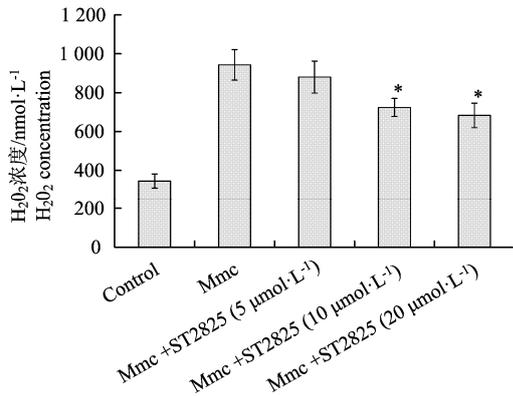
图 1 MyD88 mRNA 表达水平

Figure 1 The expression changes of MyD88 mRNA

2.3 抑制剂 ST2825 对 Mmc 介导的 H₂O₂ 分泌影响

将抑制剂不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育 1 h, 然后, 用 Mmc 感染细胞, 在 24 h 检测胞内 Mmc 对细胞引起的损伤情况。结果显示, 抑制剂

ST2825 在 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下可以显著降低 Mmc 导致的 H_2O_2 分泌 ($P<0.05$) (图 2), 可见抑制剂 ST2825 可以降低 Mmc 引起的细胞损伤。



“*”表示 Mmc+ST2825 感染组与 Mmc 组相比差异显著 ($P<0.05$)。下同

“*”indicate significant differences between Mmc-ST2825 group and the Mmc infection group at the 0.05 level. The same below

图 2 H₂O₂ 浓度变化

Figure 2 The secretion changes in H₂O₂

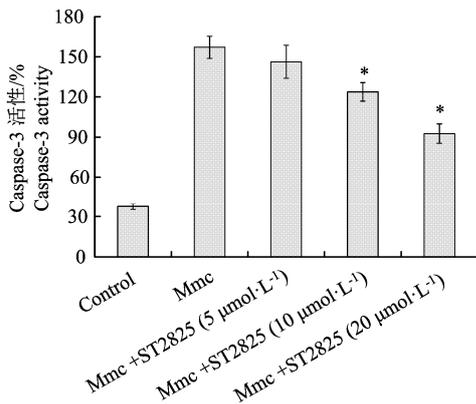


图 3 Caspase-3 活性变化

Figure 3 The activity changes of caspase-3

2.4 ST2825 对 Mmc 介导的 caspase-3 活性的影响

本研究又进一步检测了抑制剂 ST2825 对 Mmc 介导的 caspase-3 活性的影响, 本研究将 ST2825 (5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的抑制剂与细胞提前孵育 1 h, 再用 Mmc 感染细胞 24 h, 检测 caspase-3 的活性。结果显示, Mmc 可显著提高 caspase-3 的活性, 而 ST2825 在浓度 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够显著降低 caspase-3 的活性 ($P<0.05$) (图 3), 削弱 Mmc 对 caspase-3 活性的促进作用。

2.5 ST2825 对 Mmc 介导的 TNF- α mRNA 表达的影响

在感染时间 24 h 发现, Mmc 提高基因 TNF- α mRNA 表达水平, MyD88 抑制剂 ST2825 在 5、10

和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下可显著降低 Mmc 介导的 TNF- α mRNA 表达水平 ($P<0.05$) (图 4), 结果表明, 抑制剂 ST2825 可以降低 Mmc 引起的凋亡相关基因 TNF- α mRNA 的表达。

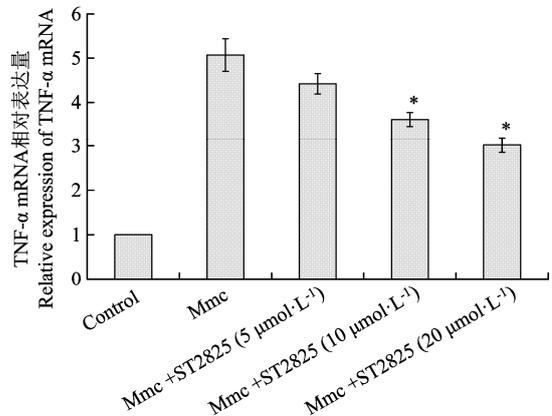


图 4 TNF- α mRNA 表达水平

Figure 4 The expression changes of TNF- α mRNA

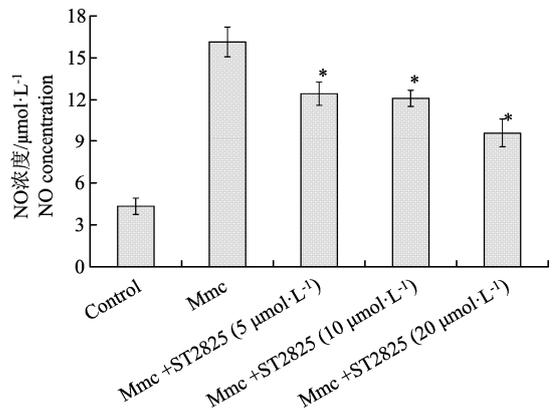


图 5 NO 浓度变化

Figure 5 The secretion changes in NO

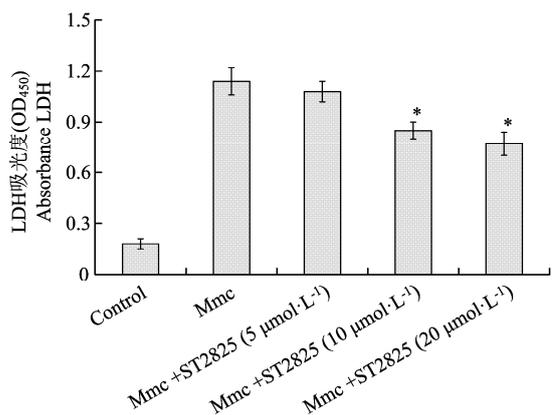


图 6 LDH 水平变化

Figure 6 The secretion changes in LDH

2.6 ST2825 对 Mmc 介导的 NO 的影响

将抑制剂不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育

1 h, 然后, 用 Mmc 感染细胞, 在 24 h 检测胞内 Mmc 对细胞引起的损伤情况。结果显示, Mmc 引起 NO 水平显著高于对照组, 而抑制剂 ST2825 在 5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下可以显著降低 Mmc 导致的 NO 分泌 ($P<0.05$) (图 5), 可见 NO 是一个非常关键的信号分子, 在细胞凋亡过程中起着重要作用。结果表明抑制剂 ST2825 可以降低 Mmc 引起的凋亡相关基因 NO 的表达。

2.7 ST2825 对 Mmc 介导的 LDH 的影响

将抑制剂不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育 1 h, 然后, 用 Mmc 感染细胞, 在 24 h 检测培养液上清液中 LDH 水平。结果显示, Mmc 感染细胞的 LDH 水平显著高于对照组, 而抑制剂 ST2825 在 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下可以显著降低 Mmc 导致的 LDH ($P<0.05$) (图 6)。结果表明 Mmc 可引起肺上皮细胞崩解, 抑制剂 ST2825 可以降低 Mmc 引起的细胞崩解度。

3 讨论与结论

MyD88 与 TLRs 相互作用后, 募集 IRAK 家族蛋白。但在外源刺激下由配体激活后, IRAK-4 发挥致 IRAK-1 磷酸化的激酶作用, 磷酸化的 IRAK-1 继而与 MyD88 作用。此时, MyD88 的 TIR 结构域与受体发生结合, N 端的 DD 结构域与 TRAF6、IRAK-1 和 IRAK-4 复合体共同结合至受体上, 而 IRAK-1 和 TRAF-6 发生磷酸化反应活化后与 MyD88 发生解离反应^[10]。TRAF-6 和 Ubc13/Uev1A 共同催化 TRAF6 自身第 63 位的赖氨酸发生泛素化, 在 TAB-1 和 TAB-2 的介导下, 与 MAP3K 家族成员 TAK1 结合并激活 TAK-1。活化的 TAK-1 分别使 MAPK 和 IKK 复合物磷酸化, 引起两条不同途径的信号转导。TAK-1 活化的另一条途径为 MAPK 通路, 通过 ERK、JUK 和 p38 3 条级联反应, 激活转录因子 c-Jun 和 c-fos, cJun 和 c-fos 转入细胞核, 形成转录因子 AP-1, 调节 IL-1、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的分泌^[11-12]。

MyD88 对细胞因子具有调节作用。促炎症细胞因子 IL-6 可以激活淋巴细胞及加速炎症反应蛋白的合成。MyD88 通路可以调控 IL-6 的水平。ST2825 可以阻碍 MyD88 发生二聚化, 使其不能募集 IRAK1 和 IRAK4, 从而干扰 MyD88 信号通路。热灭活的牛布鲁氏菌是很强的 Th1 佐剂, 热灭活的牛布鲁氏菌诱导 TNF 产生需要 MyD88 的参与^[13]。Kaisho 等^[14]用 LPS 刺激野生型和 MyD88 缺陷型树突状细胞并分别与 CD4⁺T 细胞共同培育, LPS 刺激后, 野

生型树突状细胞可提高 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 和 IL-12 的分泌, 并抑制 IL-4 的分泌。然而, MyD88 缺陷型树突状细胞则不能诱导 CD4⁺T 细胞产生 IFN- γ 和 IL-12, 但可以显著提高 IL-4 分泌。

支原体不仅介导宿主发生免疫反应, 同时也可引起单核细胞和巨噬细胞坏死或凋亡发生^[15]。细胞凋亡是通过级联反应与细胞因子变化致细胞死亡的过程。Caspase-3 与 Caspase-8 在 Caspase 级联反应中作用至关重要, 是导致细胞凋亡的关键途径和所有凋亡信号传导的共同通路^[16-17]。Caspase-8 是细胞凋亡步骤中的起始因子, 可以直接活化下游效应分子 Caspase-3, 而 Caspase-3 位于细胞凋亡级联反应的下游, 也是细胞程序性死亡的关键因子^[18]。此外, 多种支原体能够通过分泌过量 NO 来诱导细胞凋亡^[19-20]。而 NO 的表达是由低剂量抑制因子一氧化氮合酶 (NOS) 所控制的^[21], 过量的 NO 与超氧阴离子自由基形成过氧亚硝酸盐, 从而活化细胞凋亡的级联反应^[22]。

MyD88 抑制剂 ST2825 可降低 Mmc 介导的 caspase-3 活性、H₂O₂ 浓度、LDH 水平和 TNF- α mRNA 表达水平及 NO 浓度, 因此, ST2825 在 Mmc 引起山羊肺泡上皮细胞氧化损伤中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] KUSILUKA L J, OJENIYI B, FRIIS N F, et al. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of cattle and goats in Tanzania[J]. Acta Vet Scand, 2000, 41(3): 299-309.
- [2] 倪莉, 徐强, 赵俊, 等. 山羊传染性胸膜肺炎病原的分离鉴定和生物学特性[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(3): 26-27.
- [3] 曹玉璞, 叶元康. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 151-162.
- [4] HERNANDEZ L, LOPEZ J, ST-JACQUES M, et al. Mycoplasma mycoides subsp. capri associated with goat respiratory disease and high flock mortality[J]. Can Vet J, 2006, 47(4): 366-369.
- [5] 汪代华, 徐刚毅. 山羊传染性胸膜肺炎的流行现状和防治技术[J]. 四川畜牧兽医, 2005, 32(10): 48-49.
- [6] 万一元, 龙鳌, 万晴姣, 等. 贵州山羊传染性胸膜肺炎病原的分离鉴定[J]. 中国草食动物, 2001, 21(4): 44-46.
- [7] 张双翔, 周碧君, 姜汉雯, 等. 山羊传染性胸膜肺炎继发大肠埃希氏菌感染的诊断[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(6): 144-146.
- [8] 杨光, 李忠全, 崔玉林, 等. 贵州白山羊传染性胸膜肺炎流行病学调查报告[J]. 草业与畜牧, 2012 (11): 46-49.
- [9] O'NEILL L A J, GOLENBOCK D, BOWIE A G. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(6): 453-460.

- [10] 吴燕燕, 王 易. Toll 样受体信号通路中 MyD88 的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2012,28(3): 262-265.
- [11] MQTSHWENE P G, MONCRIEFFE M C, GROSSMANN J G, et al. An oligomeric signaling platform formed by the toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4[J]. J Biol Chem, 2009, 284(37): 25404-25411.
- [12] KONNO H, YAMAMOTO T, YAMAZAKI K, et al. TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF- κ B and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA[J]. PLoS One, 2009, 4(5):e5674.
- [13] HUANG L Y, ALIBERTI J, LEIFER C A, et al. Heat-killed brucella abortus induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is toll-like receptor 2 dependent[J]. J Immunol, 2003, 171(3): 1441-1446.
- [14] KAISHO T, HOSHINO K, IWABE T, et al. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support Th2 cell differentiation[J]. Int Immunol, 2002, 14(7):695-700.
- [15] WELDEAREGAY Y B, PICH A, SCHIECK E, et al. Proteomic characterization of pleural effusion, a specific host niche of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle with contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) [J]. J Proteomics, 2016, 131: 93-103.
- [16] MARANI M, TENEV T, HANCOCK D, et al. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein bim which directly activate bax to trigger apoptosis [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (11): 3577-3589.
- [17] 毛德文, 陈月桥, 王丽, 等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 148-150.
- [18] 曾明, 丁媛媛, 王金萍, 等. 可舒胶囊对酒精性肝损伤小鼠肝组织 Caspase-3 与 Caspase-8 活性的影响[J]. 中国医药导报, 2013, 10(27): 22-24.
- [19] LI B, DU L P, SUN B, et al. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e101968.
- [20] XU X, ZHANG H, SONG Y L, et al. Strain-dependent induction of neutrophil histamine production and cell death by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Leukoc Biol, 2011, 91(2):275-284.
- [21] MITSUNARI M, YOSHIDA S, SHOJI T, et al. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells[J]. J Reprod Immunol, 2006, 72(1/2): 46-59.
- [22] BAI F F, NI B, LIU M J, et al. Mycoplasma hyopneumoniae-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro[J]. Vet Microbiol, 2015, 175(1): 58-67.