

牛 A 型巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 激活 RAW264.7 细胞 TLR4 信号通路的比较分析

李艳红, 刘洁, 李伟平, 崔雨婷, 彭远义, 吴正理*

(西南大学动物科技学院, 重庆 400715)

摘要: 本研究旨在比较牛 A 型多杀性巴氏杆菌高毒力株(PmCQ2)和低毒力株(PmCQ6)脂多糖(LPS)对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 内 TLR4 信号通路的影响。选用体外培养 RAW264.7 细胞,经 LPS 刺激后检测细胞内 TLR4 信号激活及对 TNF- α 和 IL-12p40 表达的影响;并利用 Western blot 检测 LPS 对 I κ B α 磷酸化及 NF- κ Bp65 活化的影响。结果显示,高毒力株 LPS_{PmCQ2} 和低毒力株 LPS_{PmCQ6} 分别刺激 RAW264.7 细胞后,均能显著提高 TLR4 的表达,并诱导细胞因子 TNF- α 和 IL-12p40 的分泌表达;LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6} 均能诱导 I κ B α 磷酸化,促进 NF- κ Bp65 核转位,但二者没有显著差异($P>0.05$)。本研究表明牛 A 型多杀性巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 均能参与 TLR4 介导的小鼠巨噬细胞免疫应答,且二者对 TLR4 介导的 I κ B α -NF- κ B 信号通路的作用无显著差异,暗示牛 A 型多杀性巴氏杆菌对小鼠巨噬细胞的毒力与 LPS 无明显相关性,可能由其他毒力因子决定。

关键词: 牛 A 型多杀性巴氏杆菌;脂多糖;Toll 样受体 4;核因子 κ B;肿瘤坏死因子 α

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)03-0620-07

Comparative Analysis of TLR4 Signaling Pathway in RAW264.7 Cells Activated by LPS from High- and Low-virulence Strains of Bovine *Pasteurella multocida* Serotype A

LI Yanhong, LIU Jie, LI Weiping, CUI Yuting, PENG Yuanyi, WU Zhengli*

(College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: This study was designed to investigate the effects of TLR4 signaling pathway in RAW264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS) in two different virulent *Pasteurella multocida* serotype A isolates (high-virulent PmCQ2 and low-virulent PmCQ6) respectively. The activation of TLR4 pathway, expression of TNF- α and IL-12p40, phosphorylation of I κ B α , and nuclear translocation of NF- κ B, were identified in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Results showed that the expression of TLR4, TNF- α and IL-12p40 was significantly increased in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Furthermore, both LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6} up-regulated I κ B α phosphorylation, and activated TLR4-triggered nuclear translocation of NF- κ Bp65, but there was no significant difference between the two treatments. The LPS of bovine *Pasteurella multocida* Serotype A high- and low-virulent strains can induce the TLR4-mediated immune response, and there is no difference in TLR4-mediated I κ B α -NF- κ B signaling pathway, indicating that there may be no significant difference in virulence between LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6} on RAW264.7 cells. These results suggested that for RAW264.7 cells, the virulence of *Pasteurella multocida* is dependent on oth-

收稿日期: 2018-08-20

基金项目: 国家自然科学基金(31770965;31600716);重庆市基础科学与前沿技术研究专项(cstc2017jcyjAX0420);中央高校基本科研业务费专项资金(SWU114011;SWU114015);国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项基金(CARS-37)

作者简介: 李艳红(1980-),女,讲师,博士,主要从事病原微生物与免疫研究, Tel: 023-68251070, E-mail: lyhong08@126.com

* 通信作者: 吴正理,主要从事病原微生物与免疫研究, E-mail: zh20140202@swu.edu.cn

ers virulence factors, not LPS.

Key words: bovine *Pasteurella multocida* serotype A; lipopolysaccharide; Toll-like receptors 4; NF- κ B; TNF- α

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)是各种动物和人的共患性病原菌,是重点防控的疫病病原之一^[1]。根据该菌荚膜抗原和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的不同,可以将其划分为 A、B、D、E 和 F 5 个血清型,不同的血清型常与特定的疾病相关^[2-3],其中感染牛的多杀性巴氏杆菌以 B 型为主, A 和 E 型次之^[2]。为了深入了解多杀性巴氏杆菌的致病机制,研究者们分别从免疫保护^[4-5]、致病基因^[6-8]乃至全基因组分析^[9-10]等方向进行了研究。目前报道的 Pm 毒力因子包括荚膜、外膜蛋白、脂多糖、多杀性巴氏杆菌毒素、胞外酶、质粒以及一些毒力相关基因(如 *tbpA*、*ptfA* 等)^[6-8],但多杀性巴氏杆菌的毒力因子与致病性之间的关系尚不完全清楚。

细胞毒力因子脂多糖是一种血清型特异免疫原,能够激发宿主细胞的免疫应答和炎症反应^[11]。LPS 的免疫应答和炎症反应主要由巨噬细胞、树突细胞等免疫细胞表面受体——Toll 样受体 4(Toll-like receptors 4, TLR4)介导,TLR4 可激活、引发一系列趋化因子和促炎性细胞因子的转录、表达和分泌,如提高白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-12(IL-12)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等细胞因子的表达水平,调动炎症反应所需的炎性细胞和炎性分子,发挥机体天然免疫的重要防御作用^[12-13]。目前,有少量研究报道巴氏杆菌 LPS 可以诱导激发 TLR4 依赖性的信号通路^[14-15]。然而,评估多杀性巴氏杆菌不同毒力株的 LPS 成分对 TLR4 信号刺激的影响,尚未见报道^[16]。在笔者实验室的前期研究中,从肉牛场分离到 6 株 A 型多杀性巴氏杆菌,并经感染小鼠的半致死量确定其毒力,分别确定了高毒力株 PmCQ2(LD₅₀ 2.2 × 10⁵ cfu)和低毒力株 PmCQ6(LD₅₀ 1.14 × 10⁸ cfu)^[17]。本试验用 PmCQ2 和 PmCQ6 的 LPS 分别刺激小鼠巨噬细胞,观察 TLR4 的表达及炎症因子 TNF- α 和 IL-12p40 的分泌情况,分析牛 A 型多杀性巴氏杆菌不同毒力株 LPS 对小鼠巨噬细胞 TLR4-NF- κ B 信号通路的作用,为阐述不同毒株 LPS 刺激细胞信号调节及其作用机制,以及了解巴氏杆菌 LPS 的致病机制提供重要的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及菌株

小鼠巨噬细胞(RAW264.7,购自中国科学院昆明动物研究所);牛 A 型多杀性巴氏杆菌(高毒力株 PmCQ2、低毒力株 PmCQ6),由本实验室分离保存,并经感染小鼠半致死量确定其毒力^[17]。

1.2 药品与试剂

新生胎牛血清(FBS)和 DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司,大肠杆菌脂多糖购自 Sigma,鼠抗 I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65 和 β -actin 抗体、HRP 标记的羊抗鼠二抗购自美国 Cell Signaling,鼠抗 TLR4 购自北京博奥森,小鼠 TNF- α 和 IL-12p40 ELISA 试剂盒购自 MultiSciences,快速银染试剂盒、ECL 发光试剂盒购自碧云天,脂多糖抽提试剂盒购自 iNtRON。

1.3 牛 A 型多杀性巴氏杆菌脂多糖的提取与鉴定

将 PmCQ2 和 PmCQ6 分别接种于马丁肉汤培养基,于 37 °C、180 r · min⁻¹ 培养 16~18 h。利用脂多糖提取试剂盒分别提取高毒力株脂多糖(LPS_{PmCQ2})和低毒力株脂多糖(LPS_{PmCQ6})。对纯化的 LPS 用 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,之后进行银染分析。

1.4 小鼠巨噬细胞培养和分组

RAW264.7 细胞培养在含有 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中,5% CO₂、37 °C 中培养 1~2 d 传代,在细胞对数生长期时进行试验。试验分组如下:对照组(no treatment, NT,下同),正常培养的 RAW264.7 细胞,以不同培养时间取样;LPS 组,细胞添加终浓度 1.0 μ g · mL⁻¹ 的 LPS^[9,18],分别培养 20 min、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 后取样,收集细胞沉淀,分别用于提取总蛋白、核蛋白和总 RNA。每组设 3 次重复。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 LPS 刺激下 RAW264.7 细胞内 TLR4 mRNA 的表达

RAW264.7 细胞培养至对数生长期,取经终浓度 1.0 μ g · mL⁻¹ LPS 刺激不同时间的样品及未处理对照,离心收集细胞,采用 Trizol 法抽提 RNA,并反转录成 cDNA。TLR4 和内参 GAPDH 的引物由上海

Invitrogen 公司合成, *TLR4* (上游: 5'-GCTTTCAC-CTCTGCCTTCAC-3'; 下游: 5'-CGAGGCTTTTC-CATCCAATA -3'), *GAPDH* (上游: 5'-GGGTGGTC-CAGGGTTTCTTACT-3'; 下游: 5'-AGGTT-GTCTCCTGCGACTTCA-3')。定量 PCR 反应体系: 2×SYBR Green real-time PCR 混合液 10 μL, 模板 cDNA 2 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, 加水至 20 μL。扩增条件: 94 °C 3 min, 40 个循环 (94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 延伸 5 min, 利用 Bio-Rad CFX Manager 实时荧光定量 PCR 仪进行检测。结果使用比较阈值法进行定量分析, 其计算方法是: 目的基因相对表达倍数 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [19]。

1.6 ELISA 法测定 LPS 介导的 RAW264.7 细胞因子释放

取对数生长期 RAW264.7 细胞, 加入终浓度 1.0 μg · mL⁻¹ 的 LPS^[9, 18] 刺激 RAW264.7 细胞, 于 37 °C 分别孵育 1、3、6、12、24 h 后, 以及未刺激对照细胞, 离心取适量细胞上清液, 按 ELISA 试剂盒操作说明分别测定 TNF-α 和 IL-12p40 的浓度。

1.7 免疫印迹

参照以前的试验方法^[10, 20], 收集细胞进行裂解以获取蛋白, BCA 方法测定蛋白质浓度。每个泳道加样 30 μg 总蛋白, 经 10% SDS-PAGE 胶 200 V、45 min 电泳分离, 然后经 200 V、60 min 转移至 PVDF 膜上; 含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 缓冲液 (200 mmol · L⁻¹ Tris, 1.5 mol · L⁻¹ NaCl, 0.1% Tween-20, pH7.5) 孵育封闭 2 h, 分别加入相应的稀释抗体 4 °C 过夜杂交; TTBS 缓冲液洗膜后加入 HRP 标记的二抗杂交, 37 °C 孵育 1 h。洗膜后加 ECL 发光试剂, 利用 Gel Doc 进行图像采集。

1.8 统计学分析

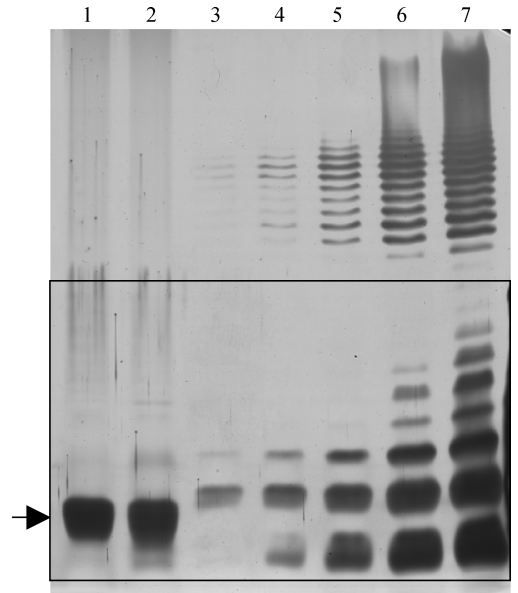
试验数据以 " $\bar{x} \pm s_x$ " 形式表示, 试验重复 3 次。试验数据采用配对 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛 A 型多杀性巴氏杆菌脂多糖的提取及鉴定

采用脂多糖抽提试剂盒方法分别提取牛 A 型多杀性巴氏杆菌高毒力株脂多糖 (LPS_{PmCQ2}) 和低毒力株脂多糖 (LPS_{PmCQ6}), 经银染后用 ImageJ 软件进行灰度分析, 结果如图 1 所示, 以大肠杆菌 LPS 标准品为参照, 获得纯度较高的 LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6},

其浓度分别为 1.94 和 2.14 μg · μL⁻¹。



1. LPS_{PmCQ6} 提取物; 2. LPS_{PmCQ2} 提取物; 3~7. 大肠杆菌 LPS 标准品, 其上样量分别是 0.625、1.25、2.5、5、10 μg。箭头所示为 LPS, 黑色方框为灰度分析选取范围

1. LPS of PmCQ6; 2. LPS of PmCQ2; 3-7. Contained 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 μg of *E. coli* LPS, respectively, for plotting a standard curve to quantitate LPS in the 2a-protein preparation. The arrow is shown as LPS, and the black box is the selection range for grayscale analysis

图 1 牛 A 型多杀性巴氏杆菌 PmCQ2 和 PmCQ6 脂多糖的鉴定

Fig. 1 Characterization of LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6} by SDS-PAGE and silver stain

2.2 Real-time PCR 检测经 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞内 *TLR4* mRNA 的表达

用终浓度为 1.0 μg · mL⁻¹ LPS_{PmCQ2} 或 LPS_{PmCQ6} 分别刺激 RAW264.7 细胞, 在不同时间点 (NT、20、60、180、360、720 min) 分别收集细胞并提取细胞 RNA。以 *GAPDH* 为内参, 经 Real-time PCR 检测 (图 2) 显示: 当 LPS_{PmCQ2}、LPS_{PmCQ6} 分别处理细胞后, 细胞内 *TLR4* mRNA 的表达均增多, 与未处理组比较, 差异均不显著, 且 LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6} 处理组间细胞内 *TLR4* mRNA 表达的变化趋势基本一致。

2.3 牛 A 型巴氏杆菌 LPS 诱导 RAW264.7 细胞膜受体 *TLR4* 的表达

Western blot 结果显示, LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6} 均能诱导细胞膜受体 *TLR4* 的表达, 二者的表达趋势基本一致, 虽在处理 60 min 后两个处理组间存在显著差异 ($P < 0.05$), 但差异量较小。当 LPS_{PmCQ2} 和

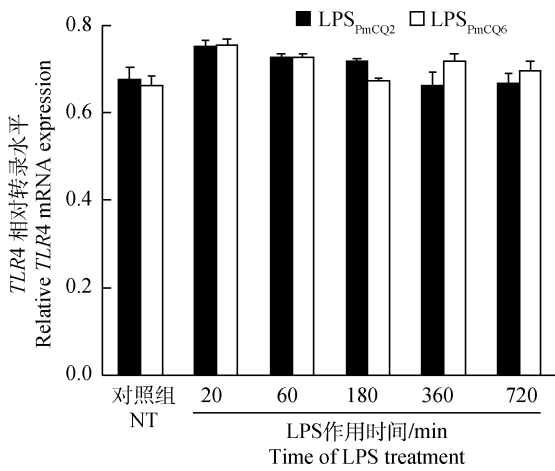


图 2 LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6} 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 基因 *TLR4* mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of *TLR4* mRNA in RAW264.7 cells induced by LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6}

LPS_{PmCQ6} 分别刺激细胞 60 min 后,其表达量均达到最高,其中高毒力株 LPS_{PmCQ2} 处理组,其表达量是对照组的 2.6 倍,低毒力株 LPS_{PmCQ2} 处理组是对照组表达量的 2 倍,之后 TLR4 表达量均略有下降,见图 3。试验结果表明 LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6} 均能直接诱导 TLR4 的表达进而作用 TLR4 下游信号通路。

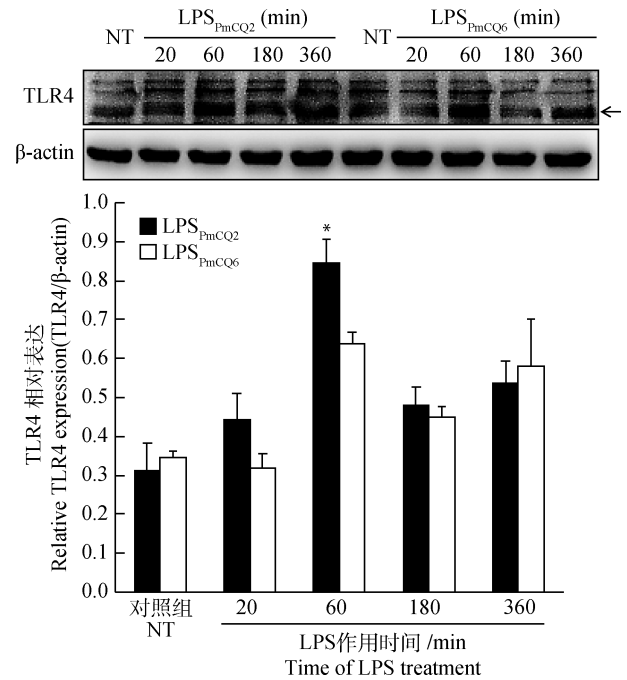
2.4 ELISA 检测细胞因子 TNF- α 和 IL-12p40 的表达

分别收集 LPS_{PmCQ2}、LPS_{PmCQ6} 处理的细胞培养上清液,采用 ELISA 试剂盒检测经 LPS 刺激 0 (NT)、20 min、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 后小鼠巨噬细胞分泌的 TNF- α 和 IL-12p40 的表达情况。结果显示,经 LPS 激活后,细胞内 TNF- α 在 0~12 h 内分泌量逐渐上升,1~3 h 内上升幅度显著,后上升幅度逐渐减小,12~24 h 期间 TNF- α 表达量趋于平稳(图 4A);IL-12p40 在 0~6 h 内分泌量较为稳定,6~24 h 内分泌量大幅上升(图 4B);高、低毒力株 LPS 对小鼠巨噬细胞内 TNF- α 和 IL-12p40 的表达影响基本一致,这表明高、低毒力株 LPS 对小鼠巨噬细胞炎症因子分泌的影响无显著差异 ($P > 0.05$),暗示高、低毒力株 LPS 的毒力可能无差异。

2.5 牛 A 型巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 诱导 TLR4 介导的 I κ B α -NF- κ B 信号通路

用 LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6} 分别处理 RAW264.7 细胞 0、20、60、180、360 min 后,发现两组处理中的 I κ B α 磷酸化水平均随着时间的推移,逐渐升高,但无显著差异 ($P > 0.05$),见图 5。同时,对核转录因

子 NF- κ Bp65 的核转位检测中发现(图 6),LPS_{PmCQ2} 处理组,在刺激细胞 60 min 后,NF- κ Bp65 在核内表达量最高;而 LPS_{PmCQ6} 处理组在处理 180 min 时,核内 NF- κ Bp65 表达量最高。此外,仅在处理 180 min 时,LPS_{PmCQ6} 处理组与 LPS_{PmCQ2} 处理组有显著性差异 ($P < 0.05$),其他作用时间点二者均无显著差异。以上结果表明,牛 A 型巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 对 TLR4 介导的 I κ B α -NF- κ B 信号通路的作用未见显著差异,暗示高、低毒力株 LPS 的毒力可能无差别。



* 表示差异显著 ($P < 0.05$), 下图同; 箭头所示为目标蛋白 TLR4, 大小约 90 ku

The star means significant difference between the treatments ($P < 0.05$). The same as blow. The arrow shows the TLR4 protein, which is about 90 kD in size

图 3 牛 A 型多杀性巴氏杆菌 LPS_{PmCQ2} 和 LPS_{PmCQ6} 对 RAW264.7 细胞膜受体蛋白 TLR4 表达的影响

Fig. 3 Expression of TLR4 in RAW264.7 cells induced by LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6} at different time points

3 讨论

LPS 在细菌致病过程扮演重要的角色,可以刺激动物机体发生体液免疫,同时因其独特的作用,被当作毒力因子和血清型特异免疫原^[16,21]。LPS 的识别是通过与细胞膜受体 TLR4 发生结合,这种结合是因类脂 A 能够识别结合到 TLR4 的胞外富含亮氨酸重复结构域,从而导致特异性配体信号的感

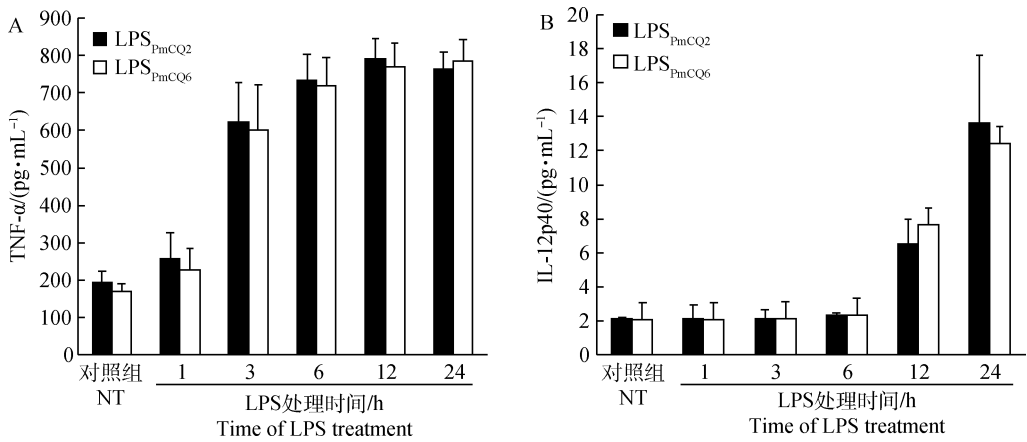


图 4 牛 A 型多杀性巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 和 IL-12p40 的影响

Fig. 4 Expression of TNF- α and IL-12p40 in RAW264.7 cells induced by LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6} at different time points

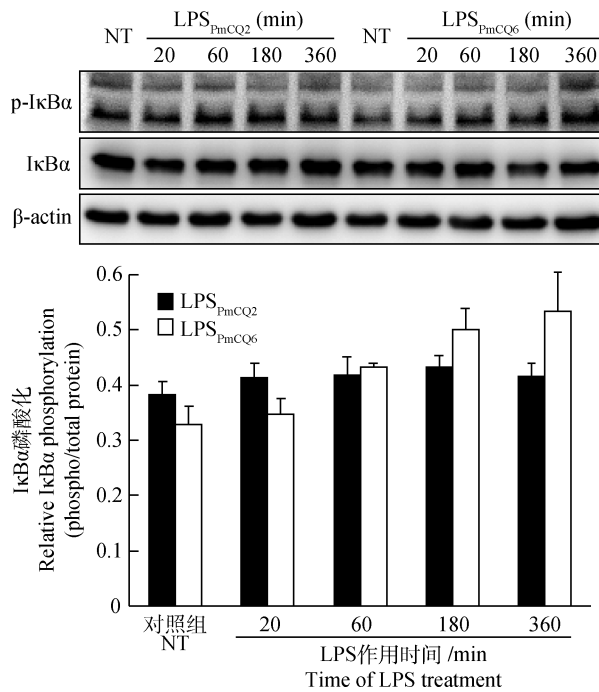


图 5 牛 A 型多杀性巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 对 RAW264.7 细胞内 I κ B α 磷酸化的影响

Fig. 5 Phosphorylation of I κ B α in RAW264.7 cells induced by LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6} at different time points

知传导,胞内信号级联的始发和先天免疫反应的激活,最终导致 NF- κ B 诱导的炎性细胞因子的释放和黏附分子的表达,以及黏附分子吸引白细胞到感染部位^[22]。Galdiero 等^[14]研究表明,多杀性巴氏杆菌菌体和从多杀性巴氏杆菌中抽提的 LPS 均能够使嗜中性粒细胞有效黏附到分离的牛内皮细胞上,并在 LPS 刺激 2~4 h 后,嗜中性粒细胞转移到内皮细胞层上。巴氏杆菌 LPS 也能够刺激小鼠脾细胞,激活 TLR4-NF- κ B 通路^[23],诱导表达、释放各种促炎症的和免疫调节的细胞因子,如 IL-1 α 、TNF- α 、

IFN- γ 和 IL-12p40^[18]。然而,直接比较多杀性巴氏杆菌 LPS 与市售的 LPS 制剂对 TLR4 信号通路的影响,或评估不同的多杀性巴氏杆菌 LPS 成分对 TLR4 信号刺激的效果,目前没有可获得的数据和相关报道^[16]。前期研究中,本实验室分离到 6 株 A 型多杀性巴氏杆菌,并确定了高毒力株 PmCQ2 和低毒力株 PmCQ6^[17]。在本试验中,笔者分别以 PmCQ2 和 PmCQ6 的 LPS 分别刺激 RAW264.7 细胞,发现两组 LPS 均能够显著提高细胞因子 TNF- α 和 IL-12p40 的分泌表达,提示两组 LPS 均能够激

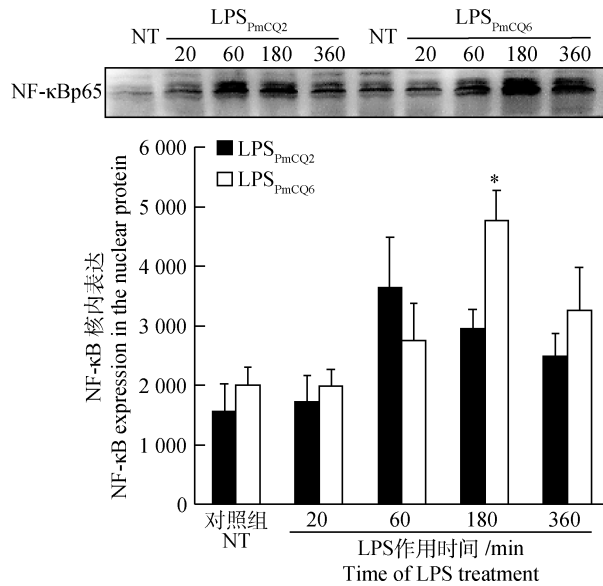


图 6 牛 A 型多杀性巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 对 RAW264.7 内 NF- κ Bp65 活化的影响

Fig. 6 Effect of NF- κ B activation in RAW264.7 cells induced by LPS_{PmCQ2} and LPS_{PmCQ6} at different time points

活经典的 TLR4 信号。

针对革兰阴性细菌细胞壁的主要成分 LPS 的免疫应答和炎症反应主要由 TLR4 介导。LPS 激活 TLR4 受体后能够招募特异接头蛋白,在一系列受体相关酶和激酶的作用下,激活下游 IKK,促使 I κ B α 磷酸化并随后泛素化降解,NF- κ B 复合体解体,NF- κ B 转位入核,进而引起包括炎症细胞因子等目的基因的转录^[24]。本试验结果显示牛 A 型巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 均能够提高 I κ B α 磷酸化,激活 NF- κ B;且两组 LPS 对小鼠巨噬细胞 TLR4-NF- κ B 信号途径的影响无差别,这暗示牛 A 型巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 对小鼠巨噬细胞的毒性水平可能无差异,推测不同毒力的牛 A 型巴氏杆菌对小鼠巨噬细胞毒力的高低是由其他毒力因子决定,与 LPS 无明显相关性。

目前报道的杆菌的毒力因子包括荚膜、外膜蛋白、脂多糖、多杀性巴氏杆菌毒素、胞外酶、质粒以及一些毒力相关基因(如 *tbpA*、*ptfA* 等)^[6-8];而且笔者课题组前期通过比较 PmCQ2 和 PmCQ6 的基因组发现,PmCQ2 有 5 个编码基因和 2 个插入片段是 PmCQ6 中所没有的;进一步分析 A 型多杀性巴氏杆菌基因组,基因 PmCQ2_5g0025、PmCQ2_7g0006 和 PmCQ2_5g0013 存在于高毒力株 PmCQ2 和 Pm36950 中,而在低毒力株 PmCQ6 中缺失^[9]。笔者认为这些基因和插入片段将是后期研究多杀性巴氏杆菌毒力因子的重要靶标。总之,本研究初步排除

了 LPS 与多杀性巴氏杆菌对小鼠巨噬细胞的毒力之间的相关性,对进一步探究多杀性巴氏杆菌的致病机制提供了理论基础,为巴氏杆菌引起的感染性疾病防治及基因工程疫苗的研究提供基础与思路。

4 结论

利用牛 A 型多杀性巴氏杆菌高毒力株 LPS_{PmCQ2} 和低毒力株 LPS_{PmCQ6} 分别刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7,经检测分析发现:高、低毒力株均能显著提高 TLR4 的表达,并诱导细胞因子 TNF- α 和 IL-12p40 的分泌表达;同时,均能诱导 I κ B α 磷酸化,促进 NF- κ Bp65 核转位,但二者没有显著差异。牛 A 型多杀性巴氏杆菌高、低毒力株 LPS 均能参与 TLR4 介导的小鼠巨噬细胞免疫应答,且二者对 TLR4 介导的 I κ B α -NF- κ B 信号通路的作用无显著差异。

参考文献 (References):

- [1] WILSON B A, HO M F. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26(3):631-655.
- [2] DABO S M, TAYLOR J D, CONFER A W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease[J]. *Anim Health Res Rev*, 2007, 8(2):129-150.
- [3] HATFALUDI T, AL-HASANI K, BOYCE J D, et al. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144(1-2):1-17.
- [4] 李能章,刘舒萍,程蓉,等.牛 A 型多杀性巴氏杆

- 菌新型保护性抗原的筛选及鉴定[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(11):1438-1443.
- LI N Z, LIU S P, CHENG R, et al. Screening and identification of new protective antigens of bovine *Pasteurella multocida* serotype A[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(11):1438-1443. (in Chinese)
- [5] BOYCE J D, SEEMANN T, ADLER B, et al. Pathogenomics of *Pasteurella multocida* [M]//AKTORIES K, ORTH J H C, ADLER B. *Pasteurella Multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012, 361:23-38.
- [6] EWERS C, LÜBKE-BECKER A, BETHE A, et al. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 114(3-4):304-317.
- [7] HARPER M, BOYCE J D, ADLER B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 265(1):1-10.
- [8] KATOCH S, SHARMA M, PATIL R D, et al. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*[J]. *Vet Res Commun*, 2014, 38(3):183-191.
- [9] DU H H, FANG R D, PAN T T, et al. Comparative genomics analysis of two different virulent bovine *Pasteurella multocida* isolates[J]. *Int J Genomics*, 2016, 2016:4512493.
- [10] MAY B J, ZHANG Q, LI L L, et al. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(6):3460-3465.
- [11] RAETZ C R H, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 635-700.
- [12] HILDEBRAND D, SAHR A, WÖLFLE S J, et al. Regulation of Toll-like receptor 4-mediated immune responses through *Pasteurella multocida* toxin-induced G protein signalling[J]. *Cell Commun Signal*, 2012, 10(1):22.
- [13] KUBATZKY K F, KLOOS B, HILDEBRAND D. Signaling cascades of *Pasteurella multocida* toxin in immune evasion[J]. *Toxins*, 2013, 5(9):1664-1681.
- [14] GALDIERO M, FOLGORE A, NUZZO I, et al. Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells *in vitro* by protein H and LPS of *Pasteurella multocida* [J]. *Immunobiology*, 2000, 202(3):226-238.
- [15] TAPPING R I, AKASHI S, MIYAKE K, et al. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides[J]. *J Immunol*, 2000, 165(10): 5780-5787.
- [16] KUBATZKY K F. *Pasteurella multocida* and immune cells[M]//AKTORIES K, ORTH J H C, ADLER B. *Pasteurella Multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012, 361:53-72.
- [17] 杨宝凤, 李能章, 邹灵秀, 等. 6株牛源A型多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(6):487-489.
- YANG B F, LI N Z, ZOU L X, et al. Identification and partial biological characteristics of six serotype A *Pasteurella multocida* from beef cattle[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(6):487-489. (in Chinese)
- [18] IOVANE G, PAGNINI P, GALDIERO M, et al. Role of *Pasteurella multocida* porin on cytokine expression and release by murine splenocytes[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 66(3-4):391-404.
- [19] MACNEIL A J, JIAO S C, MCEACHERN L A, et al. MAPK kinase 3 is a tumor suppressor with reduced copy number in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(1):162-172.
- [20] WU Z L, LI Y J, MACNEIL A J, et al. Calcineurin-Rcan1 interaction contributes to stem cell factor-mediated mast cell activation[J]. *J Immunol*, 2013, 191(12):5885-5894.
- [21] 华瑞其, 赵新新, 程安春. 多杀性巴氏杆菌脂多糖的结构与功能研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(10): 1961-1968.
- HUA R Q, ZHAO X X, CHENG A C. Research progress in the lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(10): 1961-1968. (in Chinese)
- [22] HARPER M, BOYCE J D, COX A D, et al. *Pasteurella multocida* expresses two lipopolysaccharide glycoforms simultaneously, but only a single form is required for virulence: Identification of two acceptor-specific heptosyl I transferases[J]. *Infect Immun*, 2007, 75(8):3885-3893.
- [23] PRIYA G B, NAGALEEKAR V K, MILTON A A P, et al. Genome wide host gene expression analysis in mice experimentally infected with *Pasteurella multocida* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7):e0179420.
- [24] SKAUG B, JIANG X M, CHEN Z J. The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways[J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78:769-796.