

卢冰霞, 周颖, 许心婷, 等. 猪肺炎支原体感染 3D4/21 细胞的基因表达谱分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (8): 85-94.

LU B X, ZHOU Y, XU X T, et al. Gene expression profile of 3D4/21 cells infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (8): 85-94.

猪肺炎支原体感染 3D4/21 细胞的基因表达谱分析

卢冰霞^{1#}, 周颖^{1,2#}, 许心婷¹, 杨讯业¹, 林昌华^{2,3}, 赵硕^{1,2}, 程珂^{2,4}, 张胜斌^{2,3}, 覃国喜⁴, 秦毅斌^{1,2}, 段群棚^{1,2}, 许艺兰¹, 全琛宇¹, 陈婷婷¹, 徐悦^{1,2}, 吴先华^{2,5*}, 陈忠伟^{1*}

(1. 广西壮族自治区兽医研究所/广西兽医生物技术重点实验室/农业农村部中国(广西)-东盟跨境动物

疫病防控重点实验室, 广西南宁 530001;

2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530004; 3. 广西农垦永新畜牧集团西江有限公司, 广西贵港 537100;

4. 广西农垦永新畜牧集团金光有限公司, 广西南宁 530042; 5. 广西农垦永新畜牧集团新兴有限公司, 广西柳州 545100)

摘要: 旨在探讨猪肺炎支原体 (Mhp) 感染 3D4/21 细胞后引起的活性氧 (ROS) 分泌变化及其相关的基因表达情况, 并通过时间点的选择来分析表达发生改变基因的功能和潜在的感染机制。采用高通量测序技术, 分析了 Mhp 感染细胞后的基因表达情况, 并对差异表达基因 (DEGs) 进行了基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 功能富集分析。结果: Mhp 感染细胞和未感染细胞之间共有 1 940 个 DEGs, 其中 1 070 个上调, 871 个下调; GO 功能分析发现 Mhp 对 3D4/21 细胞的影响主要集中在细胞进程、代谢进程、生物调节等方面; KEGG 富集分析发现差异基因主要富集在癌症的发生发展、氧化还原、化学致癌、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 等相关信号通路。本研究在分子水平上为 Mhp 感染机制的理解提供新的视角, 并为后期防治猪支原体肺炎的靶向药物研发提供了初步研究基础。

关键词: 猪肺炎支原体; 转录组测序; 基因差异表达谱

中图分类号: S828 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)08-0085-10

Gene expression profile of 3D4/21 cells infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*

LU Bingxia^{1#}, ZHOU Ying^{1,2#}, XU Xinting¹, YANG Xunye¹, LIN Changhua^{2,3}, ZHAO Shuo^{1,2}, CHENG Ke^{2,4}, ZHANG Shengbin^{2,3}, QIN Guoxi⁴, QIN Yibin^{1,2}, DUAN Qunpeng^{1,2}, XU Yilan¹, QUAN Chenyu¹, CHEN Tingting¹, XU Yue^{1,2}, WU Xianhua^{2,5*}, CHEN Zhongwei^{1*}

(1. Guangxi Veterinary Research Institute/Key Laboratory of Veterinary Biotechnology of Guangxi/Key Laboratory of China (Guangxi) -ASEAN Cross-border Animal Disease Prevention and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanning 530001, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. Guangxi Nongken Yongxin Animal Husbandry Group Xijiang Co., Ltd., Guigang 537100, China;

4. Guangxi Nongken Yongxin Animal Husbandry Group Jinguang Co., Ltd., Nanning 530042, China;

5. Guangxi Nongken Yongxin Animal Husbandry Group Xinxing Co., Ltd., Liuzhou 545100, China)

Abstract: The study was to investigate the changes in ROS secretion and related gene differential expression following *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) infection of 3D4/21 cells, and to analyze the functions and potential infection mechanisms of these differentially expressed genes by selecting appropriate time points. High-throughput sequencing technology was used to analyze gene expression in Mhp-infected cells, and functional enrichment analysis was performed on the differentially expressed genes (DEGs) using GO and KEGG. The

收稿日期: 2024-09-23; 修回日期: 2025-06-17

基金项目: 国家现代农业产业技术体系广西创新团队建设专项 (nycytxgxcxtld-2023-15-02); 南宁市科学研究与技术开发计划项目 (20232039); 广西基本科研业务费专项 (桂科专项 23-4); 广西畜牧产业科技先锋队项目 (桂农科盟 202409-01-3); 广西农业科技自筹经费项目 (Z2023033, Z202222); 广西创新驱动发展专项资金项目 (桂科 AA17204057-1)

第一作者: 卢冰霞, 女, 硕士; 周颖, 女, 硕士。[#]共同第一作者

* 通信作者: 吴先华, 硕士, 高级畜牧师, 研究方向为病毒学, E-mail: 15177775660@163.com; 陈忠伟, 本科, 正高级兽医师, 研究方向为猪传染病病原与分子生物学, E-mail: chen_zhong-wei@163.com。

results showed that there were 1 940 differentially expressed genes between Mhp-infected cells and blank control cells, with 1 070 upregulated and 871 downregulated. The GO functional analysis revealed that the impact of Mhp on 3D4/21 cells primarily focused on cellular processes, metabolic processes, and biological regulation. The KEGG enrichment analysis indicated that the differentially expressed genes were mainly enriched in pathways related to cancer development, redox reactions, chemical carcinogenesis, MAPK signaling, and PI3K-Akt signaling. This study provided new insights into the molecular mechanisms of Mhp infection and laid a foundation for the development of targeted drugs for the prevention and treatment of Mycoplasmal pneumonia in swine.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*; transcriptome sequencing; gene differential expression profiling

猪支原体肺炎 (mycoplasmal pneumonia of swine) 是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 引起的一种全球性地方性慢性呼吸道疾病, 对生猪养殖业构成了严重的经济负担。Mhp 感染导致猪只生长性能下降, 且由于其引发的免疫抑制作用, 增加了其他病原体的感染风险, 进而形成混合感染的情况^[1-2]。Mhp 主要通过吸附于气管、支气管上皮细胞的表面纤毛, 阻碍纤毛的正常运动, 导致纤毛的断裂和脱落, 最终导致上皮细胞死亡^[3]; 此外, Mhp 的感染不仅造成机体呼吸道的机械损伤, 还通过调节免疫反应或产生相关炎症因子导致机体损伤。

近年来, 随着组学技术的发展, 特别是二代测序技术的应用, 为全面理解复杂的生物过程提供了可能性^[4]。这种技术因其高通量、高准确性、高灵敏度、高自动化程度、低成本以及适用于未知物种和未知基因检测的优点, 被广泛应用于全基因组测序、单核苷酸多态性研究、转录表达谱分析、相关 RNA 研究及转录调控等领域^[5-9]。蒋立人等^[10]利用转录组学分析了鸡胚免疫新城疫病毒感染后, 宿主法氏囊内免疫关键基因及相关信号通路分子的转录差异; 张洪亮^[11]通过转录组学分析了伪狂犬病毒感染 PK-15 细胞后的差异基因表达情况, 为深入探究病毒的致病机制提供了理论支持。

猪肺泡巨噬细胞在宿主防御中起着重要作用, 而 Mhp 感染正是通过影响这些细胞的功能来实现其致病效应。前期研究发现, Mhp 感染猪肺泡巨噬细胞系 (3D4/21) 后, 引发了细胞内活性氧 (ROS) 分泌的变化, 进而可能影响到宿主细胞的防御机制^[12]。为了揭示这一过程中基因表达的变化模式, 本研究拟选择多个时间点进行采样, 以确定 ROS 分泌的最佳时间窗口。通过高通量测序技术, 分析 Mhp 感染细胞后的基因表达情况, 并对差异表达基因 (DEGs) 进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 功能富集分析。此外, 国内外已有研究表明, 转录组学分析在揭示病原微生物感染机制方面具有显著优势^[8-10]。因此, 通过转录组学测定, 可以系统地了解 Mhp 感染后细胞内基因表达的整体变化, 进而揭示 Mhp 感染的分子机制。本研究旨在从分子

水平上揭示 Mhp 感染 3D4/21 细胞后引起表达显著变化的基因, 预测这些 DEGs 在细胞进程、代谢进程、生物调节等方面的功能, 以及 Mhp 感染后, 细胞内的 ROS 分泌与 DEGs 之间是否存在相关性, 从而为揭示 Mhp 感染机制提供新的视角, 并为后期防治猪支原体肺炎的靶向药物研发奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞及试剂

猪肺泡巨噬细胞系 (3D4/21) 由广西大学兽药药理实验室保存。猪肺炎支原体 J 株 (Mhp J) 由江苏农科院邵国青老师团队提供。RNAiso Plus、RT reagent Kit 和 FAST qPCR (荧光定量 PCR) 酶均购自 TaKaRa 生物。KM2 培养基购自江苏农科院; 总 RNA 提取试剂盒购自简石生物。

1.2 细胞培养

细胞复苏后, 待细胞长至 80% ~ 90%, 用 1× PBS 洗 3 次后, 加入适量 0.05% 胰蛋白酶消化液, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 3 min, 在显微镜下观察细胞消化情况。加入 1 mL 10% 胎牛血清 (FBS) DMEM 终止消化, 并用移液枪将细胞轻轻吹打下来, 收集到 10 mL 离心管中, 800 r/min 离心 5 min, 弃去液体, 加入 4 mL 含有 10% FBS 的 DMEM 培养基并将细胞吹打均匀, 再将该细胞悬液均匀分布到含有 10% FBS DMEM 的 T25 细胞瓶中, 并轻轻吹打至细胞分散均匀, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养待用。

1.3 Mhp 培养

将装有 Mhp 培养液的冻存管从 -80 °C 冰箱中取出, 待其融化, 按照 1 : 10 比例进行 Mhp 接种 (500 μL Mhp 培养液加入 4.5 mL KM2 中), 随后置于 37 °C 培养箱中培养。

1.4 Mhp 生长滴度的测定

在 12 个试管中加入 0.9 mL KM2 培养基, 在第 1 个试管中加入 0.1 mL 待测 Mhp 培养液, 充分混匀之后从中取 0.1 mL 到第 2 个试管中, 再混匀, 再取 0.1 mL 到下一个试管, 直至到第 12 个试管, 做好标记, 置于 37 °C 培养箱中培养; 另取一个只含有 1 mL

KM2 培养基作为阴性对照，同样放入 37 °C 培养基中培养。每天观察培养基的颜色变化，20 d 之后，以培养基颜色改变的最后一个试管作为 Mhp 的菌液滴度，用颜色变化单位 (color change unit, CCU) 表示，例如第 10 个试管是最后一个出现颜色改变的，则相对滴度就是 10¹⁰ CCU/mL。

1.5 试验分组及处理

试验分为 5 个组，对照组 (无血清 DMEM) 及 4 个不同浓度的 Mhp J 感染组 (5×10⁶、1×10⁷、2×10⁷ 和 5×10⁷ CCU)，感染细胞 6、12、18、24 和 36 h。

1.6 Mhp 感染 3D4/21 细胞核酸扩增及鉴定

按照简石生物 DNA 提取试剂盒提取 Mhp 感染 3D4/21 细胞 18 h 时细胞中 DNA，进行 Mhp 183 基因的 qPCR 扩增，观察扩增曲线和 Ct 值。引物序列：Mhp183-F: 5'-CAAAGCGAGTATGAAGAACAAGAAA-3'，Mhp183-R: 5'-GTCATCATTGGGTGGCTAAGT-3'，Mhp183-P: 5'-ROX-TCCAGGAAGTCAAGGTA-ACTAGTGACCA-BHQ-3'。扩增体系 (20 μL): 2×TaqMan Fast qPCR 预混液 10 μL, Mhp-183-F (10 μmol/L) 0.4 μL, Mhp-183-R (10 μmol/L) 0.4 μL, Mhp-183-P (10 μmol/L) 0.3 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 扩增程序设定为：94 °C 3 min; 94 °C 15 s, 57 °C 30 s, 40 个循环。Ct 值小于 30 的样本被判定为阳性。

1.7 时间和病原量确定

为了确定 Mhp 感染后 ROS 分泌的变化规律，本研究选择多个时间点进行采样，包括感染后的 6、12、18、24 和 36 h。Mhp 的感染剂量分别为 5×10⁶、1×10⁷、2×10⁷ 和 5×10⁷ CCU/mL 分别感染作用上述时间后，弃去感染液，用 PBS 对细胞进行清洗 3 次，再每孔加入 1 mL DCFH-DA 探针工作液 (探针和 DMEM 比例为 1 : 1 000)，放入 37 °C 培养箱中避光培养 30 min。弃去上清液，用 PBS 洗 3 次，将六孔板放置倒置荧光显微镜上观察荧光强度。选择最佳浓度和感染时间组合，进行样品制备。

1.8 测序样品收集

在确定了 Mhp 感染 3D4/21 细胞的最佳感染浓度和最佳感染时间后，用 PBS 洗 3 次，每孔加入 RNAiso Plus 1 mL，冰上裂解，连续吹打细胞直至细胞全部裂解，随后将细胞裂解悬液收集到无酶离心管中，用封口膜封口，放入液氮中速冻，置 -80 °C 保存。干冰运送至广州基迪奥公司运用二代技术进行转录组测序。在测序过程中，将 RNA 反转录为 cDNA，然后将 cDNA 片段化并连接上接头，制备成测序文库，再通过高通量测序仪对文库中的 DNA 片段进行大规模并行测序，从而获得大量的短序列测序读长

(reads)，质控处理后获得有效数据 (valid data) 与猪参考基因组进行比对，并获取在参考基因组或基因上的位置信息，以及测序样本特有的序列特征信息。

1.9 DEGs RT-qPCR 验证

为了验证测序结果是否准确，从 DEGs 中随机挑选 9 个基因进行验证。引物序列详见表 1。

表 1 DEGs 引物序列

基因名称	引物序列 (5'→3')
谷胱甘肽 S-转移酶 α4 (GSTA4)	F: GGAATGGCACTGACCCAGAC R: GTTTGAAGGCAGCCAATGCC
谷胱甘肽 S-转移酶 α1 (GSTA1)	F: ACACCCAGGACCAATCTTCT R: ATTGCGTGCGAACAAAACAAA
过氧化氢酶 (CAT)	F: GCTGAGTCCGAAGTGGTCTA R: TTCATCTGGTCACTGGCTGG
细胞色素 P450 1A1 (CYP1A1)	F: GGGTCTCCTTCTTTACGCCA R: GTGGCTTCCCTCACGATTCA
溶质载体家族 26 成员 1 (SLC26A1)	F: GATCCCTTTGTGGTCAGTTGC R: CCCACTGTAAACCCGTCCG
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NOX4)	F: GGGGCTAGGATTGTGCCTAA R: CGGAGAAGTTGAGGGCGTT
超氧化物歧化酶 2 (SOD2)	F: TTGTAGGAGCGCCGAATACC R: CCTCTGGCTCTTCCACTC
细胞色素 C 氧化酶 7A2 样蛋白 (COX7A2L)	F: CCGGCTTGAGGACTTTTGAT R: GGCAATCAGGCAGTAGATGTT
醛酮还原酶 1C1 (AKR1C1)	F: GCACCTGAAGAGGTTCCCAA R: TCTGGTCAAGGAAAGTGGC
β-肌动蛋白 (β-actin)	F: CTCGATCATGAAGTGGCAG T R: GTGATCTCCTTCTGCATCCTTGT C

2 结果

2.1 Mhp 感染 3D4/21 细胞核酸扩增和鉴定

如图 1 所示，不同浓度 Mhp 感染细胞 18 h 后，对 Mhp 进行核酸检测均出现扩增曲线，且 Ct 值均低于 28；细胞对照组则不出现扩增曲线。

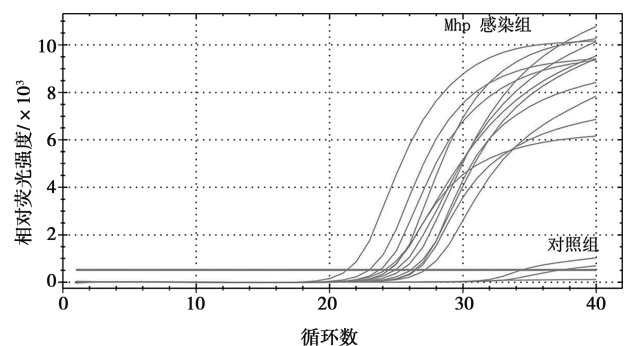


图 1 Mhp 感染细胞 qPCR 扩增结果

2.2 不同浓度 Mhp 感染 3D4/21 细胞产生 ROS 水平情况

由图 2 所示，与细胞对照组相比，不同浓度的 Mhp 感染 3D4/21 细胞后均可使细胞产生一定的

ROS，其中 2×10^7 和 5×10^7 CCU Mhp 感染 3D4/21 细胞 18 和 24 h 后 ROS 荧光最显著。因此选择 2×10^7 CCU Mhp 感染 3D4/21 细胞 18 h 进行转录组测序。

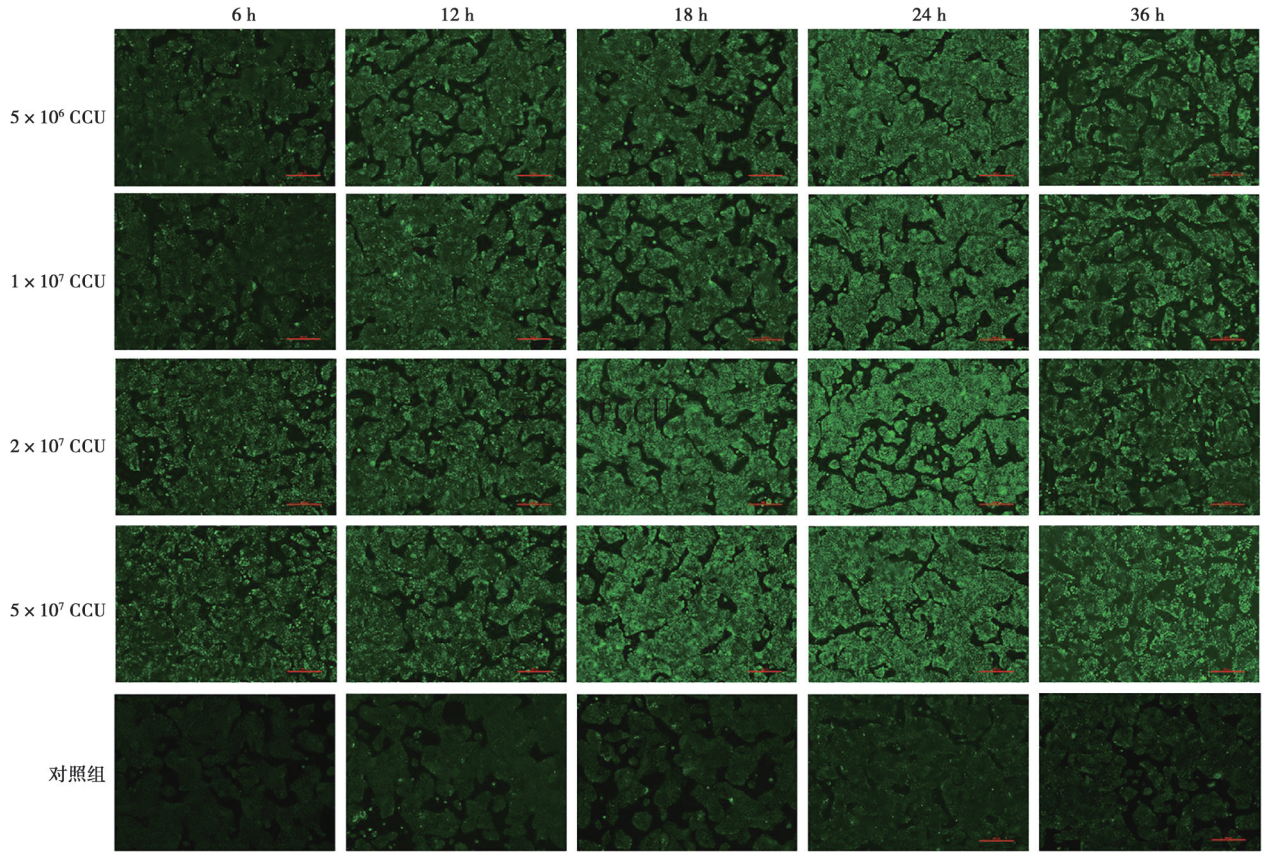


图 2 Mhp 感染细胞后 ROS 分泌情况 (标尺=100 μm)

2.3 样本关系分析

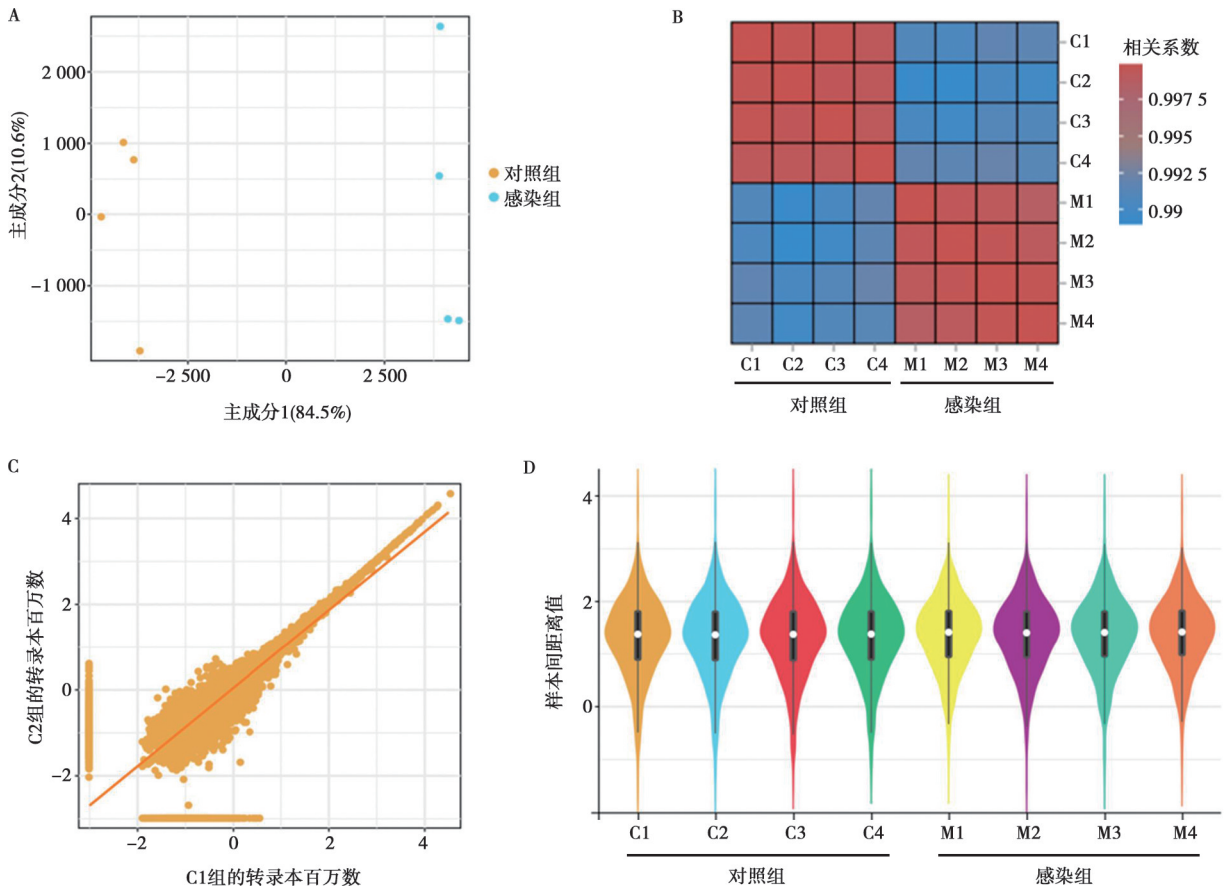
如图 3 所示，通过散点图 (图 3A)、Pearson 相关系数图 (图 3B)、重复性散点图 (图 3C) 和小提琴图 (图 3D) 完整展现转录组测序中每个组的样品重复性较好，2 组差异较大，组内样本具有较高的相关性，基因分布集中且均匀。

2.4 DEGs 分析

通过对转录组测序结果进行差异基因分析，按 $P < 0.05$ 且差异倍数 (FC) > 1.2 ，筛选出细胞对照组和 Mhp 感染组之间的 DEGs，发现共有 1 941 个 DEGs (1 070 个上调，871 个下调) (图 4A、B)。对 DEGs 进行分层聚类分析结果发现，组内 DEGs 表达量集中，样本具有较好重复性 (图 4C)。筛选两者任意重复样品 FPKM 值均大于 1 的基因，并挑选上调和下调倍数最大的前 10 个基因。

结果发现，与细胞对照组比较，Mhp 感染组上

调的基因包括组氨酸脱羧酶 (HDC)、酰辅酶 A 合成酶 (ACSM2B)、碘甲腺原氨酸脱碘酶 1 (DIO1)、4-氨基丁酸氨基转移酶 (ABAT)、甘露糖基转移酶 4C (MGAT4C)、缝隙连接蛋白 $\beta 1$ (GJB1)、D-氨基酸氧化酶 (DAO)、PDZ 结构域结合蛋白 1 (PDZK1)、溶质载体家族 5 成员 1 (SLC5A1)、谷胱甘肽 S-转移酶 $\alpha 1$ (GSTA1) (表 2)；而下调的基因包括富含亮氨酸重复序列蛋白 37A2 (LRRC37A2)、B 细胞淋巴瘤 2 样蛋白 15 (BCL2L15)、3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸合成酶 2 (PAPSS2)、核受体亚家族 1D 组成员 1 (NR1D1)、白细胞介素 2 受体 γ 链 (IL2RG)、LIM 结构域蛋白 2 (LMO2)、趋化因子 (C-C 基序) 配体 5 (CCL5)、 α -1 抗胰糜蛋白酶 2 (SERPINA3-2)、染色体 20 开放阅读框 204 (C20orf204)、补体衰变加速因子 (CD55) (表 3)。



A. 散点图; B. Pearson 相关系数图; C. 重复性散点图; D. 小提琴图。

图3 样本关系分析结果

表2 Mhp 组相对对照组差异上调基因表达量 (前 10 个上调基因)

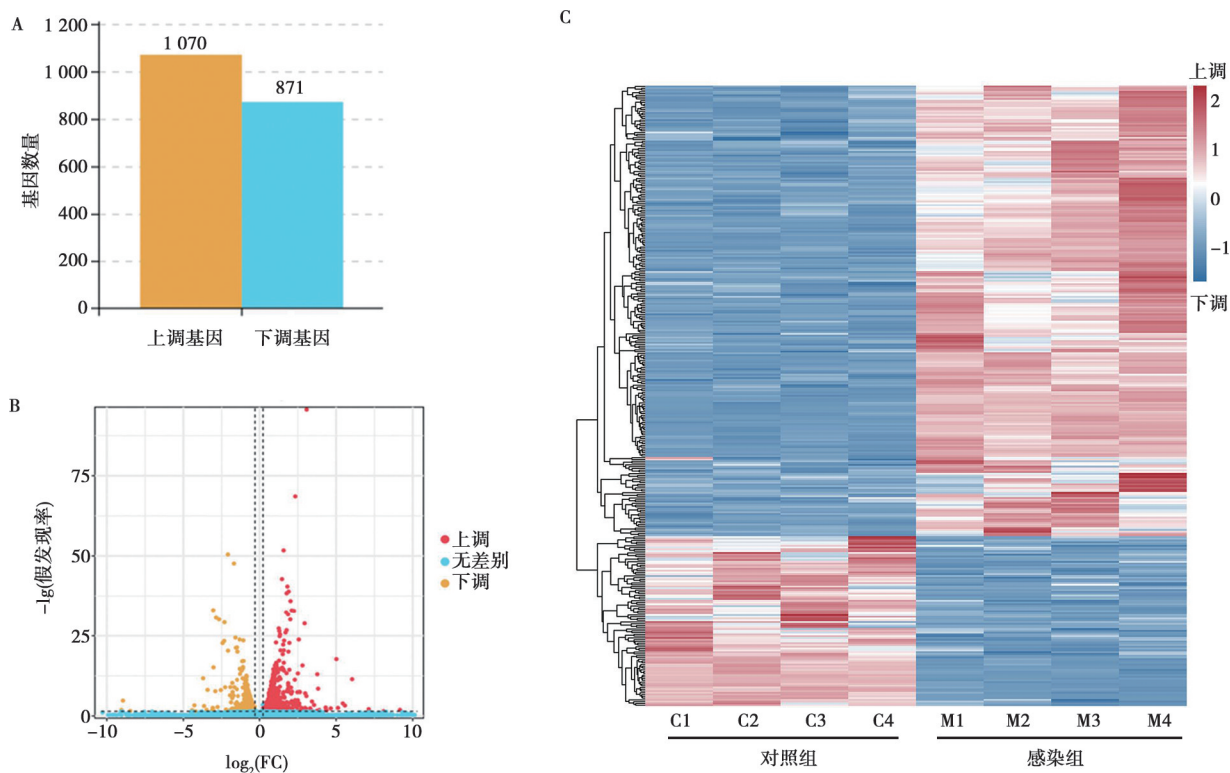
标识符	基因名称	细胞组均值	感染组均值	log ₂ (FC)	P 值
ENSSSCG00000004644	HDC	0.131	4.345 25	5.051 800 467	7.38×10 ⁻²¹
ENSSSCG00000007858	ACSM2B	3.662 5	31.627	3.110 256 050	1.99×10 ⁻¹⁰⁰
ENSSSCG00000028896	DIO1	0.338	2.735 25	3.016 577 549	1.44×10 ⁻⁰⁹
ENSSSCG00000007909	ABAT	0.779 25	6.145 5	2.979 372 239	2.10×10 ⁻³²
ENSSSCG00000032321	MGAT4C	0.308 75	2.256 75	2.869 735 566	1.44×10 ⁻³
ENSSSCG00000012394	GJB1	0.903 5	6.465	2.839 053 864	8.07×10 ⁻¹⁹
ENSSSCG00000009942	DAO	1.196	7.239 25	2.59 762 285	3.46×10 ⁻²⁷
ENSSSCG00000006693	PDZK1	19.792 25	102.238 5	2.368 931 041	4.51×10 ⁻⁷³
ENSSSCG00000010036	SLC5A1	2.18	10.592 25	2.280 609 038	1.63×10 ⁻³⁶
ENSSSCG00000058308	GSTA1	9.149 75	40.216 75	2.135 992 269	1.08×10 ⁻³⁶

表3 Mhp 组相对对照组差异下调基因表达量 (前 10 个下调基因)

标识符	基因名称	细胞组均值	感染组均值	log ₂ (FC)	P 值
ENSSSCG00000017324	LRR37A2	10.652 5	2.011 75	-2.404 669 114	5.46×10 ⁻²⁶
ENSSSCG00000038970	BCL2L15	62.389 25	12.633 25	-2.304 071 635	1.04×10 ⁻²⁶
ENSSSCG00000010437	PAPSS2	73.272 25	17.604	-2.057 363 641	1.15×10 ⁻⁵⁴
ENSSSCG00000036933	NR1D1	10.202 25	2.463 25	-2.050 252 396	1.50×10 ⁻²³

续表3

标识符	基因名称	细胞组均值	感染组均值	\log_2 (FC)	P 值
ENSSSCG00000012397	IL2RG	7.65875	2.023 75	-1.920 077 866	7.01×10^{-09}
ENSSSCG00000013307	LMO2	7.292 25	1.956 25	-1.89 827 327	1.08×10^{-11}
ENSSSCG00000017705	CCL5	11.837	3.461 25	-1.773 938 433	6.77×10^{-08}
ENSSSCG00000060202	SERPINA3-2	8.674 5	2.693 75	-1.687 164 639	8.68×10^{-09}
ENSSSCG00000055892	C20orf204	1.404 25	0.437	-1.684 094 618	3.75×10^{-2}
ENSSSCG00000015664	CD55	182.039	57.561 75	-1.661 065 207	9.45×10^{-52}



A. DEGs 柱状图 (对照组 vs 感染组); B. DEGs 火山图; C. DEGs 热图。

图 4 差异基本分析

2.5 DEGs GO 功能分析

通过差异 GO 富集分析 (图 5), DEGs 在生物进程 (biological process) 中主要富集于细胞进程 (cellular process), 代谢进程 (metabolic process), 生物调节 (biological regulation), 生物过程的调控 (regulation of biological process), 对刺激的反应 (response to stimulus), 定殖 (localization), 多细胞生物进程 (multicellular organismal process), 生物的正向/反向调节进程 (positive/negative regulation of biological process), 信号 (signaling), 免疫系统进程 (immune system process), 生物黏附 (biological adhesion), 生物体间种间相互作用的生物学进程 (biological process involved in interspecies interaction between organism), 生殖 (reproduction), 生殖过程 (reproductive process), 增长 (growth), 行为 (be-

havior), 多有机体过程 (multi-organism process), 病毒进程 (viral process), 间歇式增长过程 (rhythmic process), 生物矿化 (biomineralization), 解毒作用 (detoxification); 在分子功能 (molecular function) 中主要富集于结合 (binding), 催化活性 (catalytic activity), 分子功能调节 (molecular function regulator), 转运体活性 (transporter activity), 转录调节体活性 (transcription regulator activity), ATP 依赖活性 (ATP-dependent activity), 分析转换器活性 (molecular transducer activity), 结构分子活性 (structural molecule activity), 抗氧化活性 (antioxidant activity); 在细胞组分 (cellular component) 中主要富集在细胞解剖实体 (cellular anatomical entity) 和含蛋白质复合物 (protein-containing complex)。

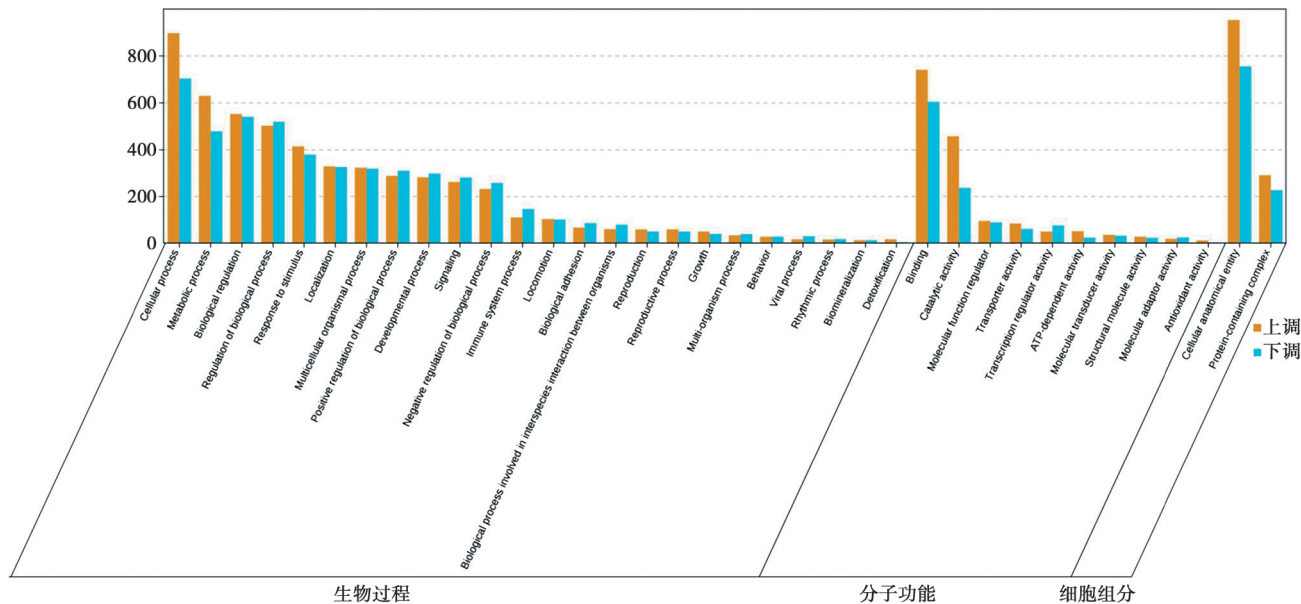


图5 DEGs 的 GO 富集分析

2.6 DEGs KEGG 功能分析

分析，结果如图6所示。

对 Mhp 感染 3D4/21 细胞 DEGs 进行 KEGG 富集



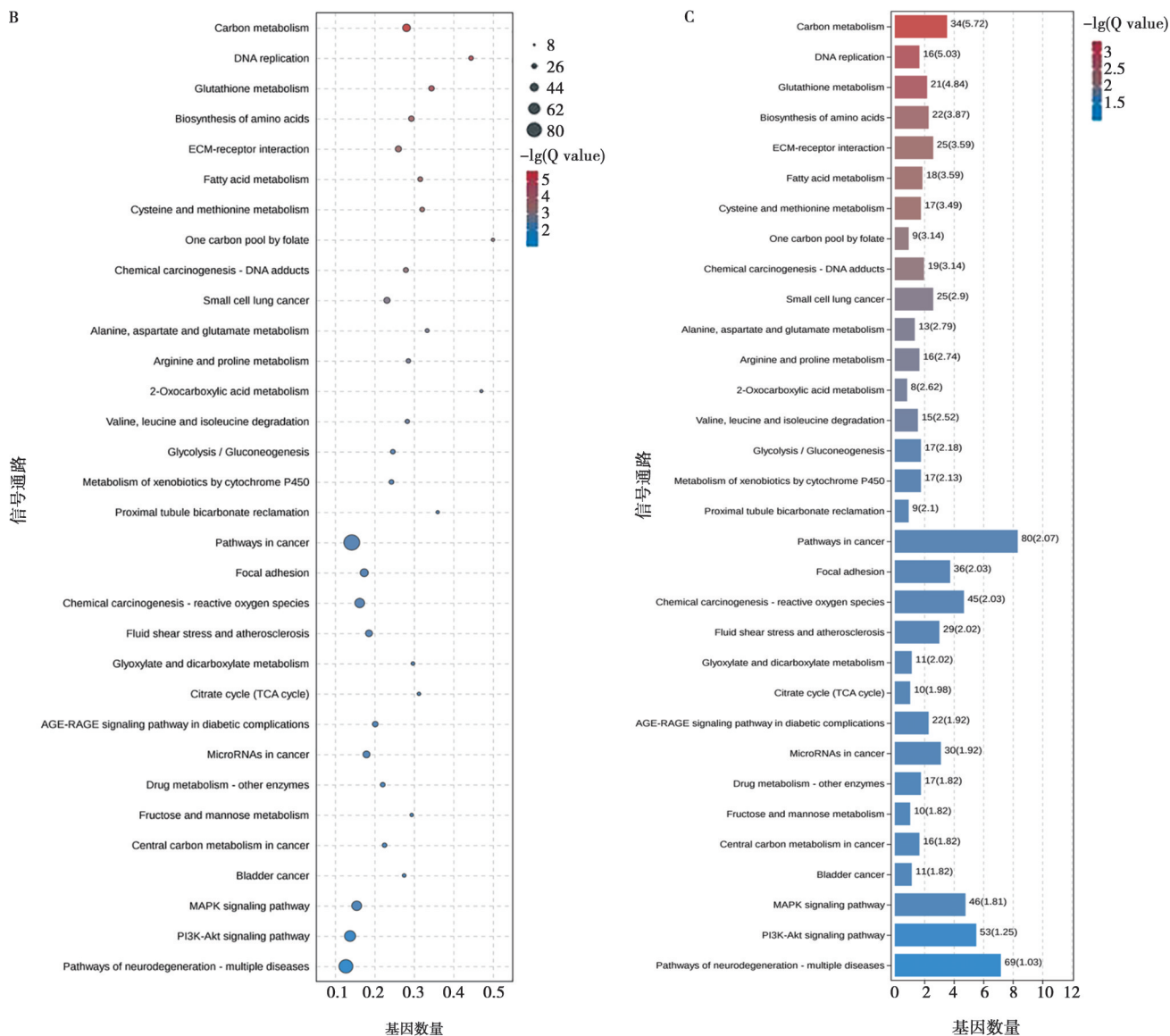


图 6 DEGs KEGG 富集分析

Mhp 感染 3D4/21 细胞 18 h 后主要富集到的通路有癌症信号通路 (pathways in cancer), 黏附斑激酶 (focal adhesion kinase), 化学致癌作用-活性氧 (chemical carcinogenesis-reactive oxygen species), 神经退行性疾病的途径 (pathways of neurodegeneration-multiple diseases), PI3K/Akt 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway), MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway), 碳代谢 (carbon metabolism), 脂肪酸代谢 (fatty acid metabolism), 小细胞肺癌 (small cell lung cancer), 细胞色素酶 CYP450 代谢

(metabolism of xenobiotics by cytochrome P450), 流体剪切应力和动脉粥样硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis), 与肿瘤相关信号转导通路的 MicroRNA (micrnas in cancer), 药物代谢-其他酶 (drug metabolism-other enzymes) 等。

2.7 DEGs RT-qPCR 验证

随机选取 9 个 DEGs, 通过 RT-qPCR 进行验证其表达量。结果如图 7 所示, 这 9 个 DEGs RT-qPCR 结果与转录组测序结果相一致, 进一步证实 Mhp 感染 3D4/21 细胞后诱导细胞产生氧化应激。

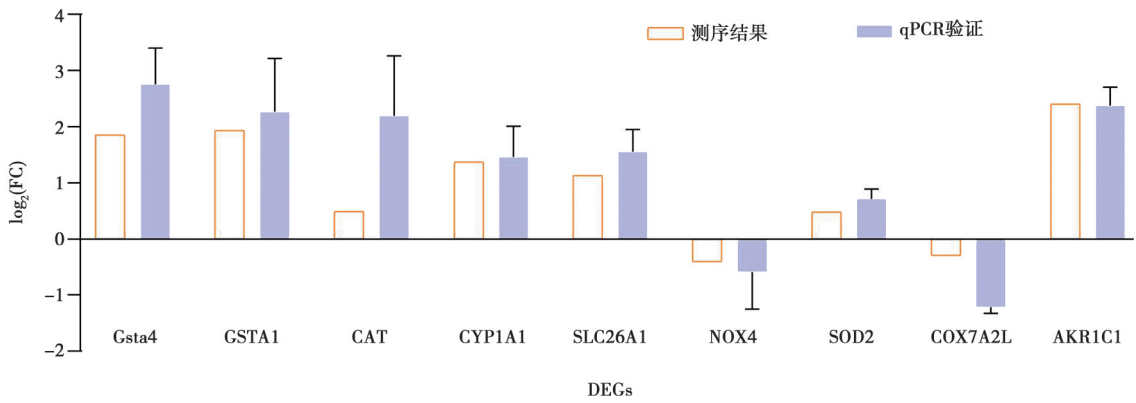


图7 RT-qPCR验证测序中氧化应激相关 mRNA 表达

3 讨论

研究结果显示, Mhp 感染 3D4/21 细胞后, 与细胞对照组相比, 导致了 1 940 个基因的差异表达, 其中 1 070 个基因上调, 871 个基因下调。在差异表达上调的前 10 个基因中, 包括 PDZK1 和 GSTA1。

PDZK1 编码一种蛋白质, 它参与了细胞膜上的信号转导、膜蛋白质的定位和稳定等功能。在 Pan 等^[13]的研究中, PDZK1 的表达在 PCV2 感染期间增强, 并且 PDZK1 的过表达抑制 PCV2 Cap 蛋白的表达并降低 PCV2 在细胞中的复制。在 Guo 等^[14]的研究中, 也发现 PDZK1 可以通过 STAT3/C-myc 途径影响肝细胞癌的增殖、迁移和凋亡。因此, Mhp 感染 3D4/21 细胞后 PDZK1 转录水平的上调, 提示 Mhp 感染可能通过干扰 PDZK1 的正常调控, 影响细胞内凋亡程序的平衡。

GSTA1 编码一种谷胱甘肽 S-转移酶, 这种酶参与了体内的抗氧化防御系统, 催化谷胱甘肽与各类亲电化合物的结合, 从而保护细胞免受氧化应激的损害。Pan 等^[15]发现, A549 癌细胞中 GSTA1 的 mRNA 和蛋白表达量均高于 MRC-5 正常细胞; 抑制 A549 癌细胞中 GSTA1 的表达可以显著抑制细胞的活力, 表明 GSTA1 的表达可能是肺癌早期诊断和治疗的目标分子。Romero 等^[16]发现, GSTA1 通过抑制促炎细胞因子和减轻氧化应激来阻碍 JNK 信号通路的激活, 并且 GSTA1-1 在 JNK 介导的细胞凋亡中具有保护作用。因此, Mhp 感染 3D4/21 细胞后 GSTA1 转录水平的上调, 进一步支持了 Mhp 感染可能通过增强抗氧化反应来影响细胞生存机制。

研究发现, 差异表达下调的基因包括 BCL2L15、IL2RG、LMO2 和 CCL5 等。BCL2L15 编码的蛋白质可能参与细胞凋亡的调节, 尤其是在 B 细胞的生物学过程中可能发挥重要作用。Zhang 等^[17]发现

BCL2L15 的过表达抑制了视网膜母细胞瘤的增殖并增加了细胞凋亡。IL2RG 编码白细胞介素 2 (IL-2) 受体的 γ 亚单位, 是多种细胞因子受体的一部分, 参与细胞免疫反应的调节, 尤其是对于 T 细胞和自然杀伤细胞的功能发挥重要作用。IL2RG 基因与人源化癌症息息相关, Ren 等^[18]和 Zhou 等^[19]均通过敲除 IL2RG 基因成功建立异种人源癌症模型。LMO2 编码的蛋白质作为致癌蛋白的功能已得到证实^[20]。CCL5 可以驱使巨噬细胞和免疫细胞向病灶部位移动和浸润, 本研究发现 Mhp 感染 3D4/21 细胞后引起 CCL5 表达趋势与王贵平^[21]的发现相反, 可能与 Mhp 感染的时间段不同有关。这些发现共同揭示了细胞信号传导、凋亡调控及免疫应答在疾病发展中的复杂作用。推测 Mhp 的感染可能通过干扰这些关键信号通路, 如细胞凋亡调控机制、促进细胞增殖及调节免疫细胞的极化状态, 从而在宿主细胞中引发一系列反应。

GO 分析显示, 这些 DEGs 广泛分布在细胞中, 调节着细胞表面受体活性, 这可能增加了 Mhp 在细胞表面的定殖能力, 并参与各种信号传导, 调控细胞的抗炎抗氧化反应和免疫能力。KEGG 分析发现, 与细胞对照组相比, Mhp 感染组的信号通路富集主要涉及肿瘤信号通路、黏附斑激酶、化学致癌作用-活性氧、神经退行性疾病的途径、PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、小细胞肺癌、细胞色素酶 CYP450 代谢、与肿瘤相关信号转导通路的 MicroRNA 等。PI3K/Akt 信号通路和 MAPK 信号通路与氧化应激和炎症反应进程相关; 化学致癌作用-活性氧、小细胞肺癌、与肿瘤相关信号转导通路的 MicroRNA 等与肿瘤发生发展相关。PDZK1、GSTA1、BCL2L15、IL2RG 和 LMO2 基因均参与细胞凋亡的调控。

为了验证测序结果的准确性, 随机选取了 DEGs 进行 RT-qPCR 验证, 发现 GSTA4、GSTA1、CAT、CYP1A1 等因子与氧化应激相关。GSTA4 和 GSTA1

在氧化应激条件下表达通常会发生变化，它们是细胞应对氧化应激的重要分子机制之一。通过与谷胱甘肽结合，这些基因能够清除 ROS 等氧化应激产物，减轻氧化损伤对细胞的伤害。CAT 是一种广泛存在于生物体内的酶，通过迅速分解过氧化氢，维持细胞内氧化还原平衡，保护细胞免受氧化应激的伤害。CYP1A1 是一种主要存在于肝脏及肠道中的代谢酶，能够参与代谢多种内外源性有害异物，并生成细胞毒性物质，可能导致 DNA 损伤而诱发肿瘤。作为单加氧酶，CYP1A1 同时具有羟化酶活性及环氧化酶活性，并可参与调控免疫反应。这些结果表明，Mhp 的感染诱导了 3D4/21 细胞的抗氧化反应。

综上所述，本研究证实 Mhp 感染 3D4/21 细胞后，通过干扰细胞凋亡途径、促进相关基因异常表达，影响细胞生命周期调控，同时诱导细胞产生抗氧化、抗炎反应。尽管目前尚未建立与癌症发生发展的直接关联，但该发现为解析 Mhp 影响宿主细胞生存机制提供了关键线索，指明了后续机制研究的新方向。研究成果不仅有助于开发针对 Mhp 感染的靶向干预措施，也对降低生猪养殖业经济损失具有重要实践意义，后续需进一步深入探究其具体作用机制。

参考文献：

- [1] 熊炜, 王艳, 魏晓锋, 等. 可视化猪肺炎支原体 LAMP 检测方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25 (4): 29-33.
- [2] THACKER E L, HALBUR P G, ROSS R F, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37 (3): 620-627.
- [3] BLANCHARD B, VENA M M, CAVALIER A, et al. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Vet Microbiol, 1992, 30 (4): 329-341.
- [4] 叶建伟, 张勇, 徐苓, 等. 医学发展的未来: 从基因组学到整合医学 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87 (27): 1873-1875.
- [5] 林燕敏, 门振华, 陈业强, 等. 基因测序技术发展及生物医学应用 [J]. 齐鲁工业大学学报 (自然科学版), 2016, 30 (5): 24-28.
- [6] HUANG S, LI R, ZHANG Z, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. Nat Genet, 2009, 41 (12): 1275-1281.
- [7] MOROZOVA O, HIRST M, MARRA M A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009, 10 (1): 135-151.
- [8] MORIN R D, O'CONNOR M D, GRIFFITH M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells [J]. Genome Res, 2008, 18 (4): 610-621.
- [9] OUYANG Z, ZHOU Q, WONG W H. ChIP-Seq of transcription factors predicts absolute and differential gene expression in embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106 (51): 21521-21526.
- [10] 蒋立人, 冯贺龙, 姜鑫瑞, 等. 鸡胚免疫新城疫疫苗后宿主法氏囊转录组学分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (4): 1632-1641.
- [11] 张洪亮. 伪狂犬病病毒的基因工程疫苗构建及其感染 PK-15 细胞的转录组和蛋白质组学分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [12] 周颖, 陈忠伟, 段群棚, 等. 猪肺炎支原体感染猪肺泡巨噬细胞诱导氧化应激反应机制的初步研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2025 (4): 1-7.
- [13] PAN H, HUAN C, ZHANG W, et al. PDZK1 upregulates nitric oxide production through the PI3K/ERK2 pathway to inhibit porcine circovirus type 2 replication [J]. Vet Microbiol, 2022, 272: 109514.
- [14] GUO L, JIANG W, QUAN L, et al. Mechanism of PDZK1 in hepatocellular carcinoma complicated with hyperuricemia [J]. J Oncol, 2022, 2022: 1403454.
- [15] PAN X D, YANG Z P, TANG Q L, et al. Expression and function of GSTA1 in lung cancer cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (20): 8631-8635.
- [16] ROMERO L, ANDREWS K, NG L, et al. Human GSTA1 - 1 reduces c-Jun N-terminal kinase signalling and apoptosis in Caco-2 cells [J]. Biochem J, 2006, 400 (1): 135-141.
- [17] ZHANG J X, YAN X J, WU S, et al. KLF16 overexpression deleteriously affects the proliferation and migration of retinoblastoma by transcriptionally repressing BCL2L15 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529 (4): 977-983.
- [18] REN J, YU D, FU R, et al. *IL2RG*-deficient minipigs generated via CRISPR/Cas9 technology support the growth of human melanoma-derived tumours [J]. Cell Prolif, 2020, 53 (10): e12863.
- [19] ZHOU Q, FACCIPONTE J, JIN M, et al. Humanized NOD-SCID *IL2rg* ^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies [J]. Cancer Lett, 2014, 344 (1): 13-19.
- [20] CHAMBERS J, RABBITS T H. LMO2 at 25 years: a paradigm of chromosomal translocation proteins [J]. Open Biol, 2015, 5 (6): 150062.
- [21] 王贵平. 猪肺炎支原体诱导猪肺泡巨噬细胞基因差异表达谱研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.