吉林农业大学学报
Journal of Jilin Agricultural University
ISSN 1000-5684,CN 22-1100/S

《吉林农业大学学报》网络首发论文

题目： 半胱氨酰tRNA合成酶2在金黄色葡萄球菌感染的奶牛乳腺上皮细胞中的作用
作者： 萨其拉， 梁巧， 李娜， 李丰阳，雷连成
收稿日期： 2024-02-06
网络首发日期： 2024-04-22
引用格式： 萨其拉，梁巧，李娜， 李丰阳， 雷连成．半胱氨酰 tRNA 合成酶 2 在金黄色葡萄球菌感染的奶牛乳腺上皮细胞中的作用[J/OL]．吉林农业大学学报．https://link.cnki.net/urlid/22.1100.s.20240418.1651.002

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性， 录用定稿一经发布， 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版， 以单篇或整期出版形式， 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

网络首发时间： 2024-04-22 09:41:21
网络首发地址： https://link.cnki.net/urlid/22.1100.s.20240418.1651.002

半胱氨酰 tRNA 合成酶 2 在金黄色葡萄球菌感染的奶牛乳腺上皮细胞中的作用*

萨其拉[1]，梁　巧[2]，李　娜[1]，李丰阳[1]，雷连成[1**]
1.吉林大学动物医学学院，长春 130062；2.吉林大学白求恩第一医院，长春 130061

摘　要： 为探讨半胱氨酰 tRNA 合成酶 2（Cysteinyl-tRNA synthetase 2, CARS2）在金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*）感染奶牛乳腺上皮细胞（MAC-T）中的作用，采用 shRNA 敲降 CARS2，通过平板菌落计数法检测 *S. aureus* 对 MAC-T 细胞的黏附、侵袭和其在胞内的存活能力；流式细胞术检测 *S. aureus* 感染 MAC-T 后活性氧（ROS）的释放水平；qRT-PCR 和 ELISA 技术检测 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 和蛋白表达水平；Western blotting 检测 *S. aureus* 感染后对 MAC-T 细胞自噬的影响。结果显示：敲降 CARS2 不影响 *S. aureus* 向 MAC-T 细胞的黏附和侵袭（$p > 0.05$），但却显著提高了其胞内存活能力（$p < 0.01$），同时下调 ROS 的释放（$p < 0.05$）；另外，敲降 CARS2 显著降低了 *S. aureus* 感染后炎性细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的表达（$p < 0.05$），下调细胞自噬（$p < 0.05$）。结果表明：CARS2 可能通过调控 ROS 和细胞自噬水平，抑制 *S. aureus* 在 MAC-T 细胞内的存活，CARS2 可能是奶牛乳腺炎潜在的调控靶点。

关键词： 半胱氨酰-tRNA 合成酶 2；金黄色葡萄球菌；活性氧；细胞自噬；奶牛乳腺上皮细胞
文献标识码： A

Investigation of the role of cysteinyl-tRNA synthetase 2 in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* infection

SAQila[1]，LIANG Qiao[2]，LI Na[1]，LI Fengyang[1]，LEI Liancheng[1**]
1. *College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun* 130062*, China;* 2. *The First Hospital of Jilin University, Changchun* 130061, *China*

Abstract: This study aims to explore the role of cysteinyl-tRNA synthetase 2 (CARS2) on the regulation of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infection in bovine mammary epithelial cells (MAC-T). CARS2 expression was knocked down using a shRNA. Bacterial adhesion, invasion, and intracellular survival of *S. aureus* in MAC-T cells was assessed using the plate colony counting method. Flow cytometry was used to measure reactive oxygen species (ROS) level following *S. aureus* infection in MAC-T cells. The mRNA and protein levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α MAC-T cells were quantified using qRT-PCR and ELISA, respectively. Additionally, Western blotting analysis was conducted to evaluate the expression levels of autophagy-related proteins ATG5, SQSTM1/p62, LC3A/B in MAC-T cells. The resulted show that knock-down of CARS2 did not alter the adhesion and invasion capabilities ($P > 0.05$), but markedly enhanced intracellular survival of *S. aureus* in MAC-T cells ($P < 0.01$). Knock-down of CARS2 also reduced the levels of ROS and pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, and TNF-α upon *S. aureus* infection ($P < 0.05$). Furthermore, the expressions of autophagy-related proteins ATG5, SQSTM1/p62, LC3A/B were also inhibited by knock-down of CARS2 upon *S. aureus* infection ($P < 0.05$). Overall, these findings suggest that CARS2 increases survival of *S. aureus* in MAC-T cells via down-regulation of ROS production and autophagy signaling. CARS2 maybe a potential therapeutic target for bovine mastitis.

Keywords: Cysteinyl-tRNA synthetase2; *Staphylococcus aureus*; ROS; autophagy; bovine mammary epithelial cells

乳腺炎是一种常见疾病，严重影响奶牛的健康和乳品产量[1]。这种疾病的发生与多种因素相关，致病

* 基金项目：国家自然科学基金面上项目（31772715）
** 通信作者
作者简介：萨其拉，女，在读硕士，研究方向：预防兽医学。
收稿日期：2024-02-06

菌感染被认为是最主要的原因，尤其是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*），它是引起奶牛乳腺炎最主要的病原体之一[2-3]。研究显示， *S. aureus* 感染 能够激活宿主细胞的 自噬过程[4]，通过 激活 PPAR 信号通路来增强过氧化物酶体活性和活性氧（Reactive oxygen species, ROS）生成，从而帮助清除 *S. aureus*，作为宿主细胞抵抗感染的防御机制[5]。然而，*S. aureus* 也能够通过抑制自噬过程，从而逃避宿主的清除， 维持其在细胞内的存活[6]。

在哺乳动物中，半胱氨酰-tRNA 合成酶 2（Cysteinyl-tRNA synthetase 2, CARS2）发挥着重要作用，它作为关键的半胱氨酸过硫化物合酶， 负责生成内源性过硫化物[7]，这种过硫化物在抵御病毒性气道感染和缓解慢性肺损伤方面具有保护作用[8]。还有研究发现，人类 CARS2 中具有内源性 TLR2/6 激活结构域，这种结构使其能够参与免疫防御[9]。此外，CARS2 表达的增加与阿尔茨海默病相关的神经炎症加剧有关[10]。CARS2 还能够调控精氨酸代谢，进而促进奶牛乳腺上皮细胞发生自噬[11]。但 CARS2 在奶牛乳腺炎中的具体作用尚未见报道。

本课题组前期研究表明，长期受到炎性细胞因子 IFN-γ 刺激的奶牛乳腺上皮细胞会出现精氨酸耗竭现象，增加了对 *S. aureus* 的易感性，促进乳腺炎的发生[12]。进一步研究证明，CARS2 是IFN-γ 调控精氨酸耗竭的关键分子[13]，基于此我们推测 CARS2 可能在 *S. aureus* 感染中发挥了一定的作用。本研究使用平板菌落计数法、流式细胞术、qRT-PCR、ELISA 和 Western blot 等技术，旨在评价 CARS2 于体外培养的奶牛乳腺上皮 MAC-T 细胞系对 *S. aureus* 易感性和 *S. aureus* 感染下细胞自噬方面的影响， 为防治 *S. aureus* 引起的奶牛乳腺炎提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 供试材料

奶牛乳腺上皮细胞系（MAC-T），由扬州大学朱国强教授惠赠；金黄色葡萄球菌（ATCC 49525）为本实验室保存。

1.2 试剂与仪器

5% CO_2 细胞培养箱（Thermo 美国），震荡培养箱（莱玻特瑞 中国），化学发光/凝胶成像系统（天能 中国），酶标仪（Tecan sunrise 瑞士），DMEM/F12 培养基（Biological Industry 以色列），青霉素/链霉素双抗（Biological Industry 以色列），胎牛血清（Clark 美国），新生牛血清（Clark 美国），胰酶 EDTA 消化液（Biochannel 中国），TritonX-100（Sigma 美国），硫酸庆大霉素（Sigma 美国），组织/细胞高效RIPA 裂解液（索莱宝 中国），PMSF 蛋白酶抑制剂（索莱宝 中国），5×Loading Buffer 缓冲液（索莱宝 中国），蛋白 Marker（Thermo 美国），BCA 蛋白定量分析试剂盒（Thermo 美国），PVDF 膜（Millipore 美国），ECL 发光试剂盒（Millipore 美国），X-tremeGENE™ HP DNA 转染试剂（Roche 瑞士），PrimeScript™ RT reagent Kit（TaKaRa 日本），RNAiso Plus（TaKaRa 日本），TB Green（TaKaRa 日本），GAPDH 抗体（ABclonal 中国），HRP 标记的山羊抗兔二抗（ABclonal 中国），CARS2 抗体（Aviva 中国），LC3A/B 抗体（Proteintech 中国），SQSTM1/p62 抗体（Abmart 中国），ATG5 抗体（Novus 美国），sh-CARS2 慢病毒干扰质粒（购于长春赛信生物有限公司），活性氧检测试剂盒（碧云天 中国），牛白细胞介素 6（IL-6）ELISA 试剂盒、牛白细胞介素 1β（IL-1β）ELISA 试剂盒、牛肿瘤坏死因子 α（TNF-α）ELISA 试剂盒，均购于南京博研生物公司。

1.3 细胞感染试验

1.3.1 细胞培养 将 MAC-T 细胞培养于含有 10%胎牛血清、 1%青霉素/链霉素双抗的 DMEM/F12 培养基中，待细胞进入对数生长期后，按照每孔 5×10^4 的细胞量接种于 12 孔细胞板，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。

1.3.2 细菌培养 从-80 ℃冰箱中取出冻存的金黄色葡萄球菌菌种（ATCC 49525）融化，采用三区划线法将菌液接种到 LB 固体平板上，将其在 37 ℃的细菌培养箱中倒置，进行过夜培养。从平板上挑取单个菌落至含有 5 mL LB 液体培养基的试管中，置于 37 ℃， 180 r/min 摇床振荡培养至 OD_{600}=1.0，取 1 mL 菌液， 6000 r/min，离心 5 min 收集菌体后，弃去上清，使用无菌 PBS 洗涤 3 次，加入 1 mL 完全培养基重悬菌体，用于后续试验。

1.3.3 质粒转染 待 MAC-T 细胞培养至 80%汇合度后，使用无菌 PBS 洗涤细胞，随后更换 DMEM/F12 基础培养基备用。根据 X-tremeGENE™ HP DNA 转染试剂说明书配制转染体系，取 100 μL 基础培养基于 1.5 mL 的无菌 EP 管中， 根据相应的质粒浓度，分别向 EP 管中添加 1 μg 的 sh-Control 和 sh-CARS2 质粒并轻轻混匀，将转染试剂按照 3 μL:1 μg 的比例添加到质粒 DNA 混合溶液中，轻轻混匀，室温下静置孵育 15 min 后，将转染复合物逐滴添加到细胞培养液中，轻轻摇晃均匀，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养， 12 h 后更换为完全培养基，培养 24 h 以完成质粒的转染过程。

1.4 MAC-T 细胞对 *S. aureus* 易感性的检测

1.4.1 *S. aureus* 对 MAC-T 细胞黏附能力的检测将 sh-Control 和 sh-CARS2 质粒分别转染至 MAC-T 细胞中，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后，使用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次，以备后续实验使用；将 *S. aureus* 培养至对数生长期（OD_{600}=1.0），随后，使用无菌 PBS 洗涤 *S. aureus* 3 次，后用基础培养基 DMEM/F12 重悬菌体。在感染复数（MOI）为 30 的条件下，将 *S. aureus* 接种至 MAC-T 细胞中，并在 37 ℃下孵育 30 min。孵育完成后，弃去培养基，使用无菌 PBS 洗涤 5 次，以去除未能黏附的细菌，之后使用 0.25%胰蛋白酶对细胞进行消化处理，1000 r/min，离心 5 min，弃去上清，并用 1 mL 无菌 PBS 重悬细胞，将所得细胞悬液进行 10^4、10^5、10^6 倍稀释，均匀涂布于 LB 琼脂平板上，37 ℃过夜培养，分别计算 sh-Control 组和 sh-CARS2 组的菌落数量。

1.4.2 *S. aureus* 对 MAC-T 细胞侵袭能力的检测 同样在感染复数（MOI）为 30 的条件下，将 *S. aureus* 接种至 MAC-T 细胞中，于 37 ℃下孵育 1 h。孵育结束后，弃去培养基并使用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次，后加入含有硫酸庆大霉素（100 μg/mL）的细胞培养基于 37 ℃下处理细胞 1 h，以杀死细胞外细菌。用 PBS 洗涤细胞 3 次后，使用 0.25%胰蛋白酶对细胞进行消化处理，1000 r/min，离心 5 min。弃去上清后，加入 1 mL 0.5% TritonX-100 于 37 ℃下裂解细胞 15 min，将所得裂解液进行 10^3、10^4、10^5 倍稀释后均匀涂布到 LB 琼脂平板上，37 ℃过夜培养，分别计算侵入 sh-Control 组和侵入 sh-CARS2 组的细胞内菌落数量。

1.4.3 *S. aureus* 在 MAC-T 细胞内存活能力的检测 以感染复数（MOI）为 30 的条件，将 *S. aureus* 接种至 MAC-T 细胞中并在 37 ℃下孵育 1 h。孵育完成后，弃去培养基并使用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次，随后用含有硫酸庆大霉素（100 μg/mL）的培养基于 37 ℃下处理细胞 1 h，目的是杀死细胞外细菌。弃去含有庆大霉素的培养基，再次使用无菌 PBS 洗涤 3 次后，加入 1 mL 基础培养基，此时标记为感染后 0 h。继续在 37 ℃下培养至感染后 1 h，用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次，使用 0.25%胰蛋白酶对细胞进行消化处理，1000 r/min，离心 5 min，弃去上清后，加入 1 mL 0.5% TritonX-100 于 37 ℃下裂解 15 min，将所得裂解液进行 10^3、10^4、10^5 倍稀释涂布到 LB 琼脂平板上，37 ℃过夜培养，分别计算 sh-Control 组和 sh-CARS2 组中细胞内的 *S. aureus* 菌落数量。

1.5 *S. aureus* 感染后 MAC-T 细胞 ROS 释放的检测

实验设置包括四个分组：对照组、对照+感染组、干扰组和干扰+感染组，按照相应分组完成 sh-Control 和 sh-CARS2 质粒的转染及细菌胞内感染 1 h 处理。随后使用 PBS 洗涤细胞 3 次，并使用 0.25%胰蛋白酶对细胞进行消化处理，1000 r/min，离心 5 min。期间将ROS 检测试剂盒中的DCFH-DA 探针用DMEM/F12 无血清培养基稀释至 10 μmol/L 的工作浓度备用。离心后，弃去上清，取 500 μL DCFH-DA 工作液重悬细胞并充分混匀，之后在 37 ℃避光孵育 15 min，期间每隔 5 min 颠倒混匀一次，确保 DCFH-DA 探针和细胞充分接触。孵育完成后，使用 DMEM/F12 基础细胞培养基洗涤细胞三次，以充分去除未能进入细胞内的DCFH-DA，最后，使用流式细胞仪于FITC 通道检测细胞的平均荧光强度，并利用 FlowJo 软件进行数据分析。

1.6 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后炎性细胞因子释放的检测

1.6.1 实时荧光定量PCR 试验设置包括4 个分组：对照组、对照+感染组、干扰组、以及干扰+感染组。使用 TriZol 法分别提取四组细胞的总 RNA，随后使用 PrimeScript™ RT 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，并将其储存于-20 ℃备用。根据 GenBank 上公布的目的基因序列，设计特异性引物，由长春库美生物公司合成。使用 TB GREEN 进行 qPCR 反应，反应混合物总体系为 20 μL：包括 cDNA 模板 1 μL，上下游引物各 0.8 μL，TB GREEN 10 μL，ddH_2O 7.4 μL。qPCR 反应程序设置为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 10 s；60 ℃退火 60 s；共进行 40 个循环。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1.qPCR primer sequence

基因	序列（5'→ 3'）
IL-1β-F	CTCCGACGAGTTTCTGTGTGACG
IL-1β-R	GAGAGGAGGTGGAGAGCCTTCAG
IL-6-F	GCCTTCACTCCATTCGCTGTCTC
IL-6-R	AAGTAGTCTGCCTGGGGTGGTG
TNF-α-F	GCTGACGGGCTTTACCTCATCTAC
TNF-α-R	GGCTCTTGATGGCAGACAGGATG
β-actin-F	TCCTGCGGCATTCACGAAACTAC
β-actin-R	GTGTTGGCGTAGAGGTCCTTGC

1.6.2 ELISA 试验设置包括对照组、对照+感染组、干扰组和干扰+感染组，按照相应分组完成 sh-Control 和 sh-CARS2 质粒转染及细菌胞内感染 1 h 处理后，收集细胞培养上清液，在 2000×*g* 条件下离心 20 min，随后吸取上清。按照南京博研生物公司生产的 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的蛋白分泌水平，操作步骤按照试剂说明书进行。

1.7 *S. aureus* 感染后 MAC-T 细胞中自噬相关蛋白的检测

试验设置包括对照组、对照+感染组、干扰组和干扰+感染组，根据分组对细胞进行 sh-Control 和 sh-CARS2 质粒转染，并进行细菌胞内感染 1 h 处理。处理完成后，弃去培养基，每孔加入 1 mL 预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次，后加入 60 μL RIPA 裂解液（含有 1% PMSF），置于冰上裂解 15 min 后，使用细胞刮刀收集细胞，并转移到 1.5 mL EP 管中，4 ℃，12000 g/min，离心 15 min，随后吸取上清到新的 1.5 mL EP 管中，加入 1/4 体积的 5×蛋白Loading buffer 缓冲液，混匀后 100 ℃煮沸 8 min，将蛋白样品置于-20 ℃保存备用。

配制相应浓度的蛋白胶后，以 90 V 电压进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后，依据蛋白Marker 确定并切取含有目的蛋白的凝胶片段，将其浸泡在转膜液中。同时，根据目的蛋白条带大小裁剪相应大小的 PVDF 膜，于甲醇中激活 2 min 后，浸泡在转膜液中。根据目的蛋白大小使用 90 V 恒压转膜。转膜完成后，使用 5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h，以 1:1000 比例用 PBST 稀释相应一抗，并在 4 ℃条件下过夜孵育。孵育结束后，置于摇床使用 PBST 洗涤，每次 8 min，共洗涤 4 次。随后，按照 1:4 000 的比例使用 PBST 稀释二抗，室温条件下孵育 50 min 后，置于摇床使用 PBST 洗涤，每次 8 min，重复 4 次。最后，使用 ECL 发光液均匀滴加到 PVDF 膜，于天化学发光/凝胶成像系统进行显影，使用 Image J 图像分析软件进行灰度值分析，定量蛋白表达水平。

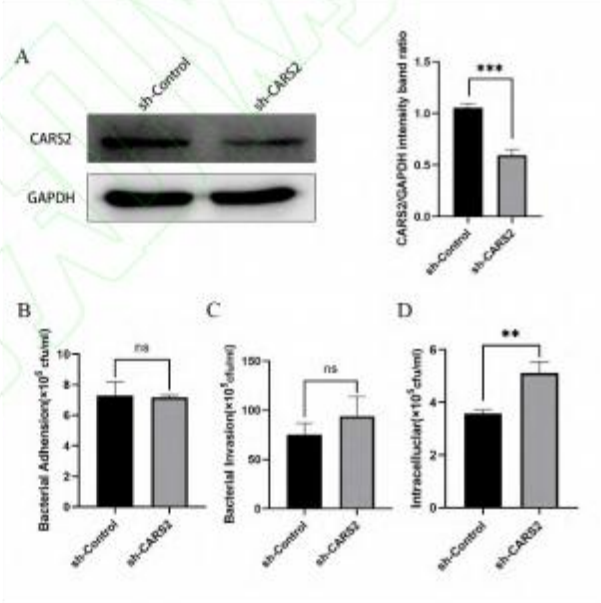
1.8 统计方法

每组试验均设置 3~5 次重复，利用 GraphPad Prism 8 对试验 1.4 的数据进行 *t* 检验分析，对其余实验数据进行单因素方差分析(ANOVA)。实验结果以平均值±标准误差(Mean±SEM)表示。统计学差异的标准如下：当 $0.01 < P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义，用“*”表示；$0.001 < P < 0.01$ 则代表差异非常显著，用“**”表示；$P < 0.001$ 则代表差异极其显著，用“***”表示。

2 结果与分析

2.1 敲降 CARS2 后 MAC-T 细胞对 *S. aureus* 易感性的变化

本研究通过Western blot 方法评估了 sh-CARS2 质粒的敲降效率，并利用 LB 平板菌落计数法分析了 *S. aureus* 对 MAC-T 细胞的黏附、侵袭及其在细胞内的存活情况。结果显示，相较于 sh-Control，sh-CARS2 处理显著抑制了蛋白水平上的 CARS2 表达（$P < 0.001$），证实敲降成功（图 1A）；sh-CARS2 处理组的黏附和侵袭菌落数均无明显变化（$P > 0.05$）（图 1B-C），但是 *S. aureus* 在胞内的菌载量显著增加（$P < 0.01$）（图 1D）。这些结果表明，敲降 CARS2 不影响 *S. aureus* 向 MAC-T 细胞的黏附和侵袭，但增加了 *S. aureus* 在黏附和侵袭之后的胞内存活能力。



A：sh-CARS2 质粒敲降效果； B：*S. aureus* 对 MAC-T 细胞的黏附能力；C：*S. aureus* 对 MAC-T 细胞的侵袭能力；D：*S. aureus* 在 MAC-T 细胞内的存活能力。

图 1 敲降 CARS2 后 MAC-T 细胞对 *S. aureus* 易感性的变化

Fig. 1. Changes in susceptibility of MAC-T cells to *S. aureus* after knocking down CARS2

2.2 敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后 ROS 释放的影响

ROS 是细胞对抗细菌感染的关键指标。为了探究 CARS2 如何影响 *S. aureus* 在 MAC-T 细胞内的存活，通过流式细胞术测定了感染 *S. aureus* 前后的 MAC-T 细胞释放ROS 的水平。结果显示，相较于 sh-Control，sh-CARS2 处理虽然降低了MAC-T 细胞ROS 释放水平，但差异并不显著（$P > 0.05$）；与未感染相比，*S.aureus* 感染显著增加了 ROS 释放（$P < 0.001$），而敲降 CARS2 则显著下调了 *S. aureus* 感染

引起的 ROS 释放（$P < 0.05$）（图 2）。结果表明，当受到 *S. aureus* 感染后， 敲降 CARS2 抑制了 MAC-T 细胞的 ROS 释放水平。

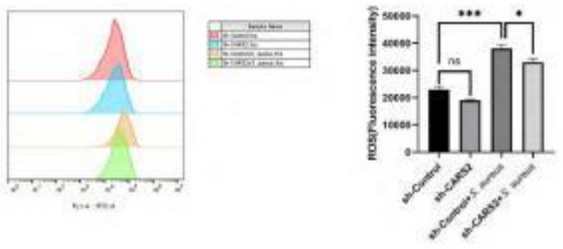


图 2 敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后 ROS 释放的影响

Fig. 2. Effects of knocking down CARS2 on ROS release after *S. aureus* infection of MAC-T cells

2.3 敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后炎性细胞因子释放的影响

为了检测 CARS2 是否会对 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后炎性细胞因子的释放产生影响，通过 qRT-PCR 和 ELISA 技术检测 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 和蛋白水平。结果显示， 相较于 sh-Control，sh-CARS2 处理未显著改变 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 和蛋白水平（$P > 0.05$）；*S. aureus* 感染显著上调了 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA（$p < 0.01$）和蛋白水平（$P < 0.05$），而敲降 CARS2 显著降低了 *S. aureus* 感染引起的这三种炎性细胞因子的 mRNA 表达水平（$P < 0.05$）（图 3A-C）和蛋白表达水平（$p < 0.05$）（图 3D-F）。结果表明，当受到 *S. aureus* 感染后，敲降 CARS2 抑制 MAC-T 细胞释放炎性细胞因子。

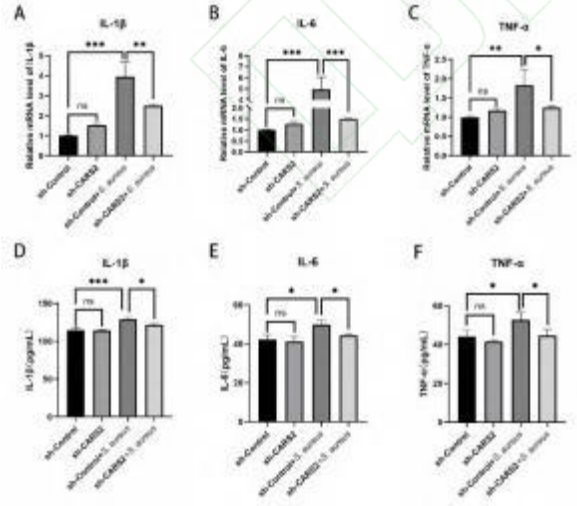


图 3 敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后炎性细胞因子释放的影响

A-C：qRT-PCR 检测敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染的 MAC-T 细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达水平的影响；D-F：ELISA 检测敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染的 MAC-T 细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α 的蛋白水平的影响。

Fig. 3. Effects of knocking down CARS2 on the release of inflammatory cytokines after *S. aureus* infection of MAC-T cells

2.4 敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染后 MAC-T 细胞自噬的影响

细胞产生的 ROS 可以抵抗细菌感染，同时也可以通过调控自噬来清除被感染的细胞。 为了检测 CARS2 是否会对感染 *S. aureus* 的 MAC-T 细胞的自噬水平产生影响，采用 Western blot 技术检测自噬标志蛋白 ATG5、SQSTM1/p62、LC3A/B 的表达水平。结果显示， 相较于 sh-Control，sh-CARS2 处理显著增加了 ATG5、LC3A/B 蛋白的表达（$P < 0.05$），下调了 SQSTM1/p62 蛋白的表达（$P < 0.05$）；*S. aureus* 感染显著增加了 ATG5、LC3A/B 蛋白的表达（$P < 0.01$），而敲降 CARS2 可以显著下调 *S. aureus* 感染引起的 ATG5、SQSTM1/p62、LC3A/B 的蛋白表达水平（$P < 0.05$）（图 4）。结果表明，敲降 CARS2 在未感染 *S. aureus* 的 MAC-T 细胞中促进自噬过程维持细胞稳定，而在 *S. aureus* 感染条件下，敲降 CARS2 抑制自噬过程从而帮助细胞抵抗细菌感染。

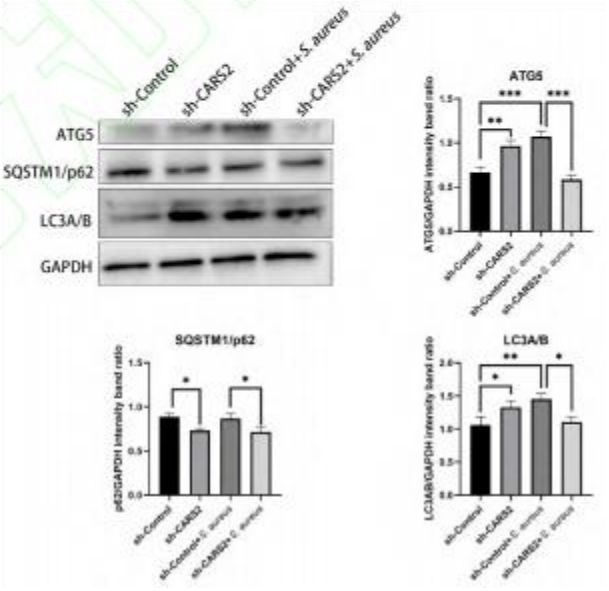


图 4 敲降 CARS2 对 *S. aureus* 感染后 MAC-T 细胞自噬的影响

Fig. 4. Effects of knocking down CARS2 on autophagy of MAC-T cells after *S. aureus* infection

3 讨 论

由金黄色葡萄球菌诱发的慢性亚临床乳腺炎对乳品行业造成了巨大的经济损失。CARS2 作为一种半胱氨酸过硫化物合酶， 主要负责在体内生成过硫化物[14, 15]。半胱氨酸过硫化物及其参与的蛋白质多硫化过程对氧化还原信号的转导具有调节作用[16]。目前，

关于 CARS2 在调控奶牛乳腺炎发生方面的作用尚未见相关报道。本研究证实，在 *S. aureus* 感染情况下，CARS2 能够调节 ROS 和炎性细胞因子的产生， 以及调控细胞自噬，增加宿主细胞的防御功能， 因此，CARS2 可能是一个治疗奶牛乳腺炎的潜在靶点。

ROS 是细胞正常氧代谢中的副产物，通过调控细胞增殖和存活，在细胞信号传导中发挥着重要作用[17]。外源性刺激，如炎性细胞因子和微生物感染，可引起细胞内 ROS 水平的变化，从而改变病理过程的严重程度[18]。例如， 有研究表明线粒体产生的 ROS 通过 GSDMD 介导的坏死性凋亡，促进感染的易感性[19]。作为病原体感染过程中氧化应激的主要参与者之一，ROS 的水平可以调节促炎因子的产生水平，是衡量炎症损伤程度的重要指标。乙型肝炎病毒可以通过抑制 NF-κB 通路和减少 ROS 的产生，来抑制脂多糖诱导的NLRP3 炎症小体活化和 IL-1β 的产生[20]。本研究发现，在 *S. aureus* 感染状态下，干扰 CARS2 在降低 ROS 水平的同时， 也下调了促炎性细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 和蛋白水平的表达。因此我们推测 CARS2 可能通过增加 ROS 和促炎细胞因子的释放，诱发宿主天然免疫，从而促进 MAC-T 细胞对 *S. aureus* 的清除。

自噬是一种进化上保守的过程，涉及蛋白质和细胞器的分解代谢过程， 对于维持细胞和生物体的稳态至关重要。自噬可分为巨自噬、分子伴侣介导的自噬和微自噬这三种类型[21]。自噬体的形成主要由一系列自噬相关的 ATG 基因执行，这些基因的激活和组装受信号转导等因素的调节，如营养缺乏、能量下降或受损底物的积累。ATG5 是是自噬相关基因中的一个重要成员， 能与 ATG12 等其他 ATG 蛋白偶联形成复合物，参与自噬体的形成过程。 SQSTM1/p62 是选择性自噬的标志性蛋白，可以作为自噬底物与自噬体膜蛋白 LC3-II结合。自噬过程与细胞死亡和 ROS 生成密切相关，ROS 诱导的细胞死亡可以通过 caspase 依赖性的细胞凋亡、炎性小体驱动的细胞焦亡，以及 caspase 非依赖性的细胞死亡途径（包括坏死性凋亡、铁死亡和自噬）进行[22]。研究初步证实 CARS2 与 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后的细胞内菌载量相关，且与感染后释放的 ROS 呈正相关。推测 CARS2 可能调节 *S. aureus* 感染后细胞自噬的发生。本研究通过 Western blotting 试验， 表明 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞时， CARS2 可以促进 MAC-T 细胞发生自噬。*S. aureus* 感染奶牛乳腺分为以下阶段： 黏附乳房皮肤和皮下基质；侵入乳腺组织和细胞；逃避宿主免疫系统并大量繁殖。 *S. aureus* 可以通过内化作用进入非吞噬细胞。有研究表明，*S. aureus* 内化进入巨噬细胞可引起 LC3 和 SQSTM1/p62 蛋白表达增加，自噬体形成；但是由于自噬体与溶酶体的融合被阻断， 自噬体不断积累，使得*S. aureus* 在细胞内持续存活[23]。本研究发现 *S. aureus* 感染 MAC-T 细胞后， 下调 CARS2 减少 ATG5、p62、LC3A/B 蛋白的表达， 证实在 *S. aureus* 感染状态下， 下调 CARS2 可以抑制细胞自噬的发生，但其具体机制还有待进一步研究。

本研究证实 CARS2 在奶牛乳腺上皮感染 *S. aureus* 起一定作用，提示其为预防奶牛乳腺炎以及乳制品行业的发展提供新的研究靶点。

参考文献:

[1] A G A, T G V, Barros-Velázquez J, et al. Staphylococcus aureus Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis [J]. Toxins (Basel), 2020, 12(9): 537.

[2] Cobirka M, Tancin V, Slama P. Epidemiology and Classification of Mastitis [J]. Animals (Basel), 2020, 10(12): 2212.

[3] Anderson K L, Lyman R, Moury K, et al. Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus mastitis in dairy heifers [J]. J Dairy Sci, 2012, 95(9): 4921-30.

[4] Wang M, Fan Z, Han H. Autophagy in Staphylococcus aureus Infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 750222.

[5] Wang X, SuF, Yu X, et al. RNA-Seq Whole Transcriptome Analysis of Bovine Mammary Epithelial Cells in Response to Intracellular Staphylococcus aureus [J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 642.

[6] Arroyo D S, Soria JA, Gaviglio EA, et al. Toll-like receptor 2 ligands promote microglial cell death by inducing autophagy [J]. Fasebj, 2013, 27(1): 299-312.

[7] Akaike T, Ida T, Wei F Y, et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1177.

[8] Matsunaga T, Sano H, Takita K, et al. Supersulphides provide airway protection in viral and chronic lung diseases [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4476.

[9] Cho S, Kim S B, Lee Y, et al. Endogenous TLR2 ligand embedded in the catalytic region of human cysteinyl-tRNA synthetase 1 [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000277.

[10] Qi X H, Chen P, Wang Y J, et al. Increased cysteinyl-tRNA synthetase drives neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Transl Neurodegener, 2024, 13(1): 3.

[11] 苗婧, 李丰阳, 王婷婷, 等. 半胱氨酰 tRNA 合成酶 2 对奶牛乳腺上皮细胞精氨酸代谢及细胞自噬的影响 [J]. 吉林农业大学学报: 1-7.

[12] Liu B, Che Y, Zhang M, et al. IFN-γ Activates the TLR4-CCL5 Signaling Through Reducing Arginine Level, Leading to Enhanced Susceptibility of

Bovine Mammary Epithelial Cells to Staphylococcus aureus [J]. Inflammation, 2020, 43(6): 2209-21.

[13] 苗婧. CARS2 介导 IFN-γ诱导奶牛乳腺上皮细胞精氨酸耗竭的机制研究 [D]: 吉林大学, 2023.

[14] Zainol Abidin Q H, Ida T, Morita M, et al. Synthesis of Sulfides and Persulfides Is Not Impeded by Disruption of Three Canonical Enzymes in Sulfur Metabolism [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(4): 868.

[15] Fujii S, Sawa T, Motohashi H, et al. Persulfide synthases that are functionally coupled with translation mediate sulfur respiration in mammalian cells [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(4): 607-15.

[16] Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, et al. Redox Signaling Regulated by Cysteine Persulfide and Protein Polysulfidation [J]. Molecules, 2016, 21(12): 1721.

[17] Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation [J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 351-69.

[18] Li Y, Boehning D F, Qian T, et al. Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca2+ uniporter activity [J]. Faseb J, 2007, 21(10): 2474-85.

[19] Weindel C G, Martinez E L, Zhao X, et al. Mitochondrial ROS promotes susceptibility to infection via gasdermin D-mediated necroptosis [J]. Cell, 2022, 185(17): 3214-31.e23.

[20] Yu X, Lan P, Hou X, et al. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL- 1β production via suppressing the NF-κBpathway andROS production [J]. J Hepatol, 2017, 66(4): 693-702.

[21] Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism [J]. Immunity, 2021, 54(3): 437-53.

[22] Radogna F, Cerella C, Gaigneaux A, et al. Cell type-dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma [J]. Oncogene, 2016, 35(29): 3839-53.

[23] Cai J, Li J, Zhou Y, et al. Staphylococcus aureus facilitates its survival in bovine macrophages by blocking autophagic flux [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(6): 3460-8.