



克柔念珠菌诱导奶牛乳腺上皮细胞 microRNA 差异表达分析

苗宇航^{1,2}, 丁涛^{1,2}, 辛杰^{1,2}, 马文妍^{1,2}, 杜军^{1,2*}

(1. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; 2. 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘要: 非编码小RNA(microRNA)可参与奶牛乳腺固有免疫应答,可作为病原菌感染宿主细胞和奶牛乳腺炎的潜在生物标志物之一,但克柔念珠菌(*Candida krusei*)感染奶牛乳腺上皮细胞(MAC-T)后 microRNA 的表达模式尚不清晰。本研究旨在分析 *Candida krusei* 诱导 MAC-T 中的差异表达 microRNA(DEmicroRNA)及其功能,为揭示 *Candida krusei* 感染 MAC-T 的标志 microRNA 和后续研究 microRNA 调控宿主细胞免疫应答的调控机制提供基础。利用转录组(RNA-Seq)测序技术和生物信息学方法对克柔念珠菌感染(感染复数=1)后的 MAC-T 进行 microRNA 测序、DEmicroRNA 分析及 GO 和 KEGG 功能富集分析。结果表明,在正常组和感染组 MAC-T 中共检测出 1 465 个 microRNA,相比于正常组,感染组筛选出 16 个表达显著上调和 7 个表达量显著下调的 microRNA。应用 TargetScan 和 miRanda 软件对 11 个极显著性差异表达 microRNA 进行靶基因预测,共预测到 6 739 个靶基因。GO 和 KEGG 功能富集分析结果表明,上述 11 个极显著性差异表达 microRNA 可通过免疫相关信号通路而调节奶牛乳腺炎症,进一步分析发现,显著下调的 bta-miR-2377,显著上调的 bta-miR-2285i 可能通过潜在靶基因参与 MAPK、NF- κ B、Toll 样受体信号通路进而调控宿主细胞炎症的发生与发展过程。在 *Candida krusei* 诱导的奶牛乳腺上皮细胞中获得了 23 个 DEmicroRNA,可能通过潜在靶基因调控奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的发生与发展过程,为揭示 microRNA 调控克柔念珠菌诱导奶牛乳腺炎的致病机制提供了科学基础。

关键词: 克柔念珠菌;奶牛乳腺上皮细胞;microRNA;生物信息学分析;差异表达 microRNA

中图分类号: S857.26

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0486-14

Differential Expression Analysis of microRNA in Bovine Mammary Epithelial Cells Induced by *Candida krusei*

MIAO Yuhang^{1,2}, DING Tao^{1,2}, XIN Jie^{1,2}, MA Wenyan^{1,2}, DU Jun^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources with Western Characteristics, Ministry of Education, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Non-coding small RNAs (microRNAs) can be involved in the innate immune response of bovine mammary glands and can serve as potential biomarkers for pathogen infection of host cells and bovine mastitis. However, the expression pattern of microRNAs in bovine mammary epithelial cells (MAC-T) after *Candida krusei* infection remains unclear. This study aims to analyze the differentially expressed microRNAs (DEmicroRNAs) in MAC-T induced by *Candida krusei* and their functions, providing a basis for revealing the marker microRNAs of *Candida krusei* infection in MAC-T and for

收稿日期: 2025-02-24

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目(2024AAC03118); 国家自然科学基金项目(32160044)

作者简介: 苗宇航, 硕士生, 主要从事动物病原生物学研究, E-mail: myh6943@126.com

* 通信作者: 杜军, 主要从事动物病原生物学研究, E-mail: dujun@nxu.edu.cn

subsequent research on the regulatory mechanism of microRNAs in regulating the immune response of host cells. Utilizing RNA-Seq sequencing technology and bioinformatics methods, microRNA sequencing, DE microRNA analysis, and GO and KEGG functional enrichment analysis were conducted on MAC-T cells after infection with *Candida krusei* (infection multiplicity=1). A total of 1 465 microRNAs were detected in MAC-T cells of both the normal group and the infection group. Compared with the normal group, 16 microRNAs were significantly upregulated and 7 were significantly downregulated in the infection group. TargetScan and miRanda software were used to predict the target genes of the 11 microRNAs with extremely significant differential expression, and a total of 6 739 target genes were predicted. The results of GO and KEGG functional enrichment analysis indicated that the 11 microRNAs with extremely significant differential expression could regulate bovine mammary gland inflammation through immune-related signaling pathways. Further analysis revealed that the significantly downregulated bta-miR-2377 and the significantly upregulated bta-miR-2285i might participate in the MAPK, NF- κ B, and Toll-like receptor signaling pathways through potential target genes, thereby regulating the occurrence and development of host cell inflammation. Twenty-three DE microRNA are obtained in *Candida krusei* induced bovine mammary epithelial cells, which may regulate the occurrence and development of inflammatory response in bovine mammary epithelial cells through potential target genes, and provide a scientific basis for revealing the pathogenic mechanism of microRNA regulating *Candida krusei* induced bovine mastitis.

Keywords: *Candida krusei*; bovine mammary epithelial cells; microRNA; bioinformatics analysis; differentially expressed microRNAs

* **Corresponding author:** DU Jun, E-mail: dujun@nxu.edu.cn

奶牛乳腺炎是奶牛养殖业中常见疾病之一,严重影响奶牛生产性能。引起奶牛乳腺炎的因素复杂多样,包括饲养环境、病原微生物感染和遗传等因素,其中病原菌是主要的致病原因^[1],包括细菌、真菌,真菌中克柔念珠菌是引起奶牛真菌性乳腺炎的主要致病菌之一,其可以通过菌丝相、酵母相以及毒力因子 14-3-3 蛋白诱导 MAC-T 发生炎症反应,激活 MAPK、NF- κ B、Toll 样受体信号通路^[2-3]。大量研究发现奶牛乳腺炎的发生和发展过程受多基因表达调控^[4-5]、信号转导和网络调节的影响。近年来,研究发现 microRNA 在建康奶牛和患乳腺炎奶牛之间会出现差异性表达,这表明 microRNA 可以作为新的调控因素参与奶牛乳腺炎的调控过程^[6]。

microRNA 是一类重要的非编码小 RNA,是基因表达过程中进化保守的转录后调控因子,在高等真核生物中普遍表达^[7]。microRNA 长约 22 个核苷酸,主要机制是成熟的 microRNA 与 RNA 诱导沉默复合体(RISC)结合,AGO 蛋白引导 RISC 通过剪切、转录抑制或脱腺苷化等方法对靶基因 mRNA 进行沉默,介导靶基因 mRNA 降解或翻译抑制,在基

因调控过程中发挥重要作用^[6]。近期研究发现 microRNA 的调控已成为哺乳动物免疫系统中重要的调控方法^[8],Ryan 等^[9]研究发现,免疫细胞中可表达 100 多个 microRNA,其通过调节细胞信号转导通路中关键蛋白的表达水平来控制先天性和适应性免疫应答。此外,microRNA 还可以作为诊断生物标志物在奶牛乳房炎的早期诊断方面发挥重要作用^[10-11],学者们已经筛选了大量与奶牛乳腺炎相关的差异表达 microRNA,不同致病菌感染的乳腺炎奶牛组织、细胞或体液样本中的 microRNA 有着不同的表达模式,在乳腺炎调节过程中发挥不同的作用^[12-16],如 Luoreng 等^[14]在 *E. coli* 和 *S. aureus* 诱导的牛乳腺组织中分别鉴定出 279 个和 305 个差异表达 microRNA,其中外周血中 miR-1301、miR-2284r 可作为血液标志物用于诊断 *S. aureus* 诱导的奶牛乳腺炎。Bagnicka 等^[17]在 *Coagulase-positive* 和 *Coagulase-negative* 诱导的牛乳腺组织中分别鉴定出 32 个和 12 个差异表达 microRNA,进一步分析发现 miR-99 和 miR-182 在表观遗传调控中发挥重要作用,可以作为 *Coagulase-positive* 和 *Coagulase-negative* 诱导奶

牛乳腺炎的潜在的分子标志物。Pu等^[18]在 *S. agalactiae* 诱导的牛乳腺组织中鉴定出 35 个与奶牛乳腺炎相关的 DEmicroRNA。Ma等^[19]在 *S. aureus* 诱导的牛乳汁中鉴定出 37 个与奶牛乳腺炎相关的 DEmicroRNA, 对 bta-miR-378 和 bta-miR-185 进行功能验证分析发现两者均富集于炎症相关基因, 揭示可作为潜在生物标志物。以上研究所获得的 DEmicroRNA 功能富集结果显示, 不论是哪一类型的乳腺炎或样本类型, DEmicroRNA 均不同程度地参与了 Toll 样受体信号通路、NF- κ B 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、转化生长因子- β (TGF- β)信号通路、趋化因子信号转导等多个免疫学相关的信号通路, 可见 DEmicroRNA 在调节奶牛乳腺炎的发生发展具有重要作用, 而目前对于克柔念珠菌感染奶牛乳腺细胞和组织的 DEmicroRNA 尚未明晰。基于此, 本研究利用高通量测序技术对 *Candida krusei* 诱导发生炎症反应的奶牛乳腺上皮细胞进行了 microRNA 测序、DEmicroRNA 的筛选及功能注释, 阐明克柔念珠菌诱导奶牛乳腺上皮细胞发生炎症反应的 microRNA 表达模式和潜在生物标志物, 以期今后进一步探究 microRNA 在克柔念珠菌感染奶牛乳腺细胞和组织中的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和菌株 奶牛乳腺上皮细胞(MAC-T)为本实验室早期鉴定及冻存、克柔念珠菌(*Candida krusei*) ATCC 6258 购自美国 ATCC 菌种保藏中心。

1.1.2 试剂 DMEM-High Glucose 培养液、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶 ED-TA ($2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶, $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 酚红)均购自以色列 BI 公司; YPD 液体培养基、改良沙堡弱琼脂糖培养基均购自青岛海博生物有限公司; TruSeq Small RNA Sample Prep Kits (Illumina, San Diego, USA); qPCR 试剂盒、逆转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; ELISA 试剂盒购自武汉默沙克生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 克柔念珠菌的复苏与培养 将低温冻存的克柔念珠菌 ATCC 6258 用 YPD 液体培养基重新悬浮于 50 mL 的无菌锥形瓶中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇

床过夜培养。将菌悬液划线接种于改良沙堡弱琼脂糖培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续培养获得单菌落, 挑取单菌落接种至 YPD 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床过夜培养获得菌悬液, 计数备用。

1.2.2 奶牛乳腺上皮细胞复苏、培养以及细胞分组 将冻存的 MAC-T 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 无菌水浴锅轻轻晃动使其融化。待细胞完全融化后置于 10 mL 离心管内离心 ($1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min), 弃上清, 用 1 mL 完全培养基重悬后接种于细胞培养皿中, 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱内培养。待细胞生长至 90% 后, 进行传代, 将传代后的奶牛乳腺上皮细胞用 2 mL 胰酶消化, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 用不含双抗的完全培养基重悬, 用细胞计数仪计数。按 $7\times 10^6\text{ cell}\cdot\text{皿}^{-1}$ 接种于 10 cm 细胞培养皿中, 过夜培养后, 将细胞分为正常 MAC-T 组、ATCC 6258 感染组 (MOI=1), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱内继续培养 4 h。每组设置 3 个生物学重复。

1.2.3 ELISA 法检测 MAC-T 细胞因子的分泌水平 收集各处理组细胞上清液, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清为待测样本, 根据 ELISA 检测试剂盒说明书操作步骤进行检测, 依据标准曲线计算各处理组中 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IL-4 的相对表达量。

1.2.4 RNA 提取及测序文库构建 使用 TRIzolTM 法提取正常 MAC-T 组、ATCC 6258 感染组 MAC-T 的总 RNA (Total RNA), 将两组样本进行 RNA 混池, 分别使用 Nanodrop 仪测定 Total RNA 的纯度及浓度、Agilent 2100 生物分析仪检测 RIN 值 (RNA integrity number) 评估 Total RNA 的完整性, 琼脂糖核酸凝胶电泳验证 Total RNA 是否被基因组 DNA 污染。确定 RNA 质量合格以后, 利用 Oligo(dT) 磁珠富集 mRNA; 以此为模板, 利用 TruSeq Small RNA Sample Prep Kits (Illumina, San Diego, USA) 试剂盒进行逆转录合成 cDNA, 进行末端修复、加 A 并连接测序接头后通过 PCR 富集 cDNA 文库。库检合格后在 Illumina HiSeq 2000 高通量测序平台进行测序。

1.2.5 测序数据质量控制与 microRNA 的鉴定 将测序得到的原始数据 (Raw Reads) 去除 3' 接头序列、质量较低序列后获得高质量数据 (Clean Reads)。利用 ACGT101-miR (V4.2) 软件对 microRNA 进行分析鉴定, 筛选 18~26 nt 序列, 对筛选后的数据通过与多个数据进行比对、过滤, 得到有效数据 (Valid

Reads),进一步将有效数据与 miRBase 21.0 数据库进行前体及基因组比对,将有效数据分为已知 microRNA 和新的 microRNA。以两组校正后的 $P < 0.05$ 为筛选条件,获得差异表达的 microRNA 并进行聚类分析。

1.2.6 差异表达 microRNA 的 RT-qPCR 验证
为验证测序结果及 DE microRNA 的可靠性,随机选取 8 个 DE microRNA (包括 7 个表达上调和 1 个

表达量下调的 microRNA),使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒分别进行 8 个 DE microRNA 的 cDNA 合成。以正常 MAC-T 组和 ATCC 6258 感染组的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 试验,每个样本重复三次。RT-qPCR 反应体系:2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix: 10 μL,上、下游引物各 0.4 μL (引物信息见表 1),cDNA 模板 1 μL,加无菌无酶的 ddH₂O 至

表 1 用于 microRNA 表达量检测的 RT-qPCR 引物

Table 1 RT-qPCR primers for microRNA expression detection

非编码小 RNA microRNA	引物序列 (5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product length
Bta-miR-2377	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACAGAGC	50
	上游引物 Forward primer: GCGTGTCCTACTGCACACACTA	21
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
Bta-miR-2285i	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACCCAAAA	50
	上游引物 Forward primer: ACGAGAACAAAACCGGAACGAAC	23
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
Bta-miR-215	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACTGTCTG	50
	上游引物 Forward primer: GCGGCCTGATGACCTATGAATTG	23
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
Bta-miR-362-5p	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACACTCAC	50
	上游引物 Forward primer: GAACTGACAATCCTTGGAACCTAGG	25
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
Bta-miR-219b-3p	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACACTGAT	50
	上游引物 Forward primer: AGAAGGCAGAATTGCGTTTGGAC	23
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
Bta-miR-146b	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACACAGCC	50
	上游引物 Forward primer: CCACCATGTGAGAACTGAATTCCAT	25
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
Bta-miR-20b_R+3_1ss10CT	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACAACTAC	50
	上游引物 Forward primer: AGCTGGACCAAAGTGCTTACAGT	23
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
Bta-miR-19b_R+2	茎环引物 stem-loop primer: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACACTCTC	50
	上游引物 Forward primer: AACCTCCTAATCCTTGCTACCTGG	24
	下游引物 Reverse primer: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	20
β -Actin	上游引物 Forward primer: AGATCAAGATCATCGCGCCC	20
	下游引物 Reverse primer: CATTTGCGGTGGACGATGGA	20
U6 snRNA	上游引物 Forward primer: CTCGCTTCGGCAGCACA	17
	下游引物 Reverse primer: AACGCTTCACGAATTTGCGT	20

20 μL 。RT-qPCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法,以 $\beta\text{-Actin}$ 和 $U6$ snRNA 为双内参基因计算 microRNA 的相对表达量,后取基因表达量的 $\log_2$ 对数值,表明基因表达量的变化倍数。

1.2.7 差异表达 microRNA 靶基因预测 采用 TargetScan(v5.0)、miRanda(v3.3a)两款软件对极显著性差异表达的 microRNA 分别进行靶基因预测,其中 TargetScan 算法中去除 context score percentile 小于 50 的靶基因,miRanda 算法中去除最大自由能(Max Energy)大于 -10 的靶基因,最后取这两款软件的交集作为差异表达 microRNA 的最终靶基因(即筛选靶基因阈值为 TargetScan_score ≥ 50 & miranda_Energy < -10)。

1.2.8 差异 microRNA 靶基因的功能富集分析 利用 Gene Ontology 数据库(<https://www.geneontology.org/>)和 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)对靶基因 GO 和 KEGG 通路进行富集分析。

1.2.9 数据分析 ELISA、RT-qPCR 试验结果采用 GraphPad Prism 9.4.1 统计软件进行数据分析,计量数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间比较采用 LSD- t 检验。microRNA 测序结果采用 ACGT101-miR(V4.2) 分析软件进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

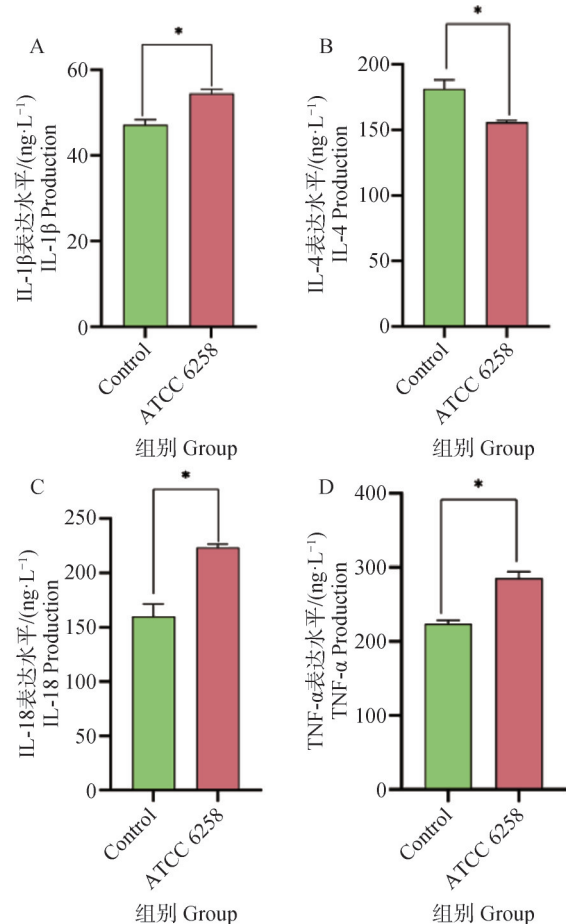
2 结果

2.1 奶牛乳腺上皮细胞炎症因子表达水平检测炎症模型的验证

采用 ELISA 检测试剂盒检测正常 MAC-T 组、ATCC 6258 感染组中细胞炎症因子表达水平,结果如图 1 所示,与正常 MAC-T 组相比,ATCC 6258 感染组中 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 的表达水平显著升高($P < 0.05$),IL-4 表达水平显著降低($P < 0.05$)。表明 *Candida Krusei* 诱导奶牛乳腺上皮细胞发生炎症反应。

2.2 microRNA 测序概况

在 Illumina HiSeq 2000 高通量测序平台上对正常 MAC-T 组和 ATCC 6258 感染组共同构建的 6 个 cDNA 文库分别进行测序。对原始数据进行质量控制后,每个样本平均获得 10 065 309 个 Clean Reads,两组 microRNA 的 GC 含量均大于 49.97%,Q20 均大于 94.18%,Q30 均大于 88.93%,与 mRNA、RFam(包含 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 等)以及 Repbase 数据库进行比对过滤,最



*, $P < 0.05$, $n = 3$

图1 细胞炎症因子表达水平的变化

Fig.1 Changes in the expression levels of inflammatory factors in cells

终获得 9 611 271 个 Valid Reads(表 2)。以上各项数据表明测序数据可靠,可用于后续的 microRNA 分类注释和表达量分析。

2.3 microRNA 的鉴定和注释

使用 ACGT101-miR 软件进行 microRNA 的鉴定以及表达量的统计,评估组内及组间样品 microRNA 表达特征的相关性及差异表达的 microRNA。通过与哺乳动物成熟 microRNA 序列(microRNA 数据库)、microRNA 前体、牛基因组序列的比对分析。共鉴定出 1 330 条 microRNA,分为 known microRNA(本物种 gp1a)、conservative microRNA(近源物种 gp1b、2a、2b、3a)、novel microRNA(gp4)。对鉴定到的 microRNA 进行长度统计,microRNA 的长度集中分布于 18~26 nt,其中长度为 22 nt 的 microRNA 所占比例最大,占 43%(图 2)。

表 2 测序文库质量统计

Table 2 Quality statistics of sequencing library

样品 Sample	质控后序列(/%) Clean reads	有效序列(/%) Valid reads	GC 含量/% GC	Q20 值/% Q20	Q30 值/% Q30
空白对照组 1 Control 1	8 550 695 (76.42)	7 853 099 (91.84)	55.21	94.18	88.93
空白对照组 2 Control 2	8 642 738 (86.55)	8 252 043 (95.48)	50.74	97.74	94.60
空白对照组 3 Control 3	11 450 128 (88.86)	10 954 421 (95.67)	50.78	97.82	94.87
ATCC 6258 感染组 1 ATCC 6258 1	10 111 972 (90)	9 783 952 (96.76)	50.13	97.83	95.08
ATCC 6258 感染组 2 ATCC 6258 2	10 710 185 (91.32)	10 278 510 (95.97)	50.35	97.82	94.80
ATCC 6258 感染组 3 ATCC 6258 3	10 926 138 (91.58)	10 545 598 (96.52)	49.97	97.97	95.29

Q20 为质量值 ≥ 20 的碱基所占百分比, Q30 为质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比

Q20 is the percentage of bases with mass value ≥ 20 , and Q30 is the percentage of bases with mass value ≥ 30

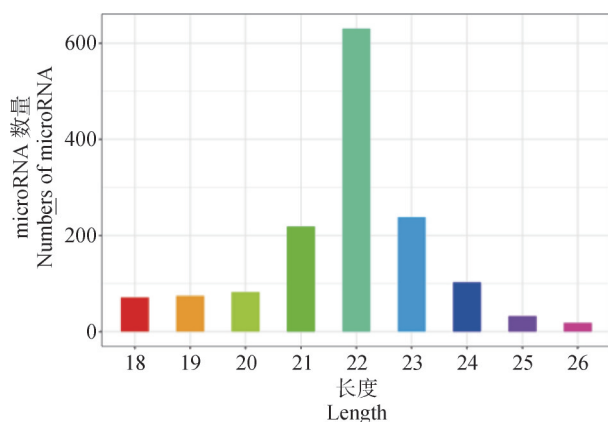


图 2 已鉴定的 microRNA 长度分布

Fig. 2 The length distribution of identified microRNAs

2.4 microRNA 的差异表达分析

差异表达分析结果显示,与正常 MAC-T 组相比,ATCC 6258 感染组中有 23 个 DEmicroRNA,其中 16 个 microRNA 的表达量显著上调,7 个 microRNA 的表达量显著下调(表 3、图 3)。其中 bta-miR-2377 表达量显著下调,差异倍数为 0.61;bta-miR-2285i、bta-miR-20b_R+3_1ss10CT、bta-miR-215、bta-miR-362-5p、bta-miR-500_R+2、bta-miR-219b-3p、bta-miR-146b 表达量显著上调,差异倍数分别为 1.65、5.31、1.5、1.29、2.66、1.66。

2.5 RT-qPCR 验证

对随机选取的 8 个 DEmicroRNA 进行 RT-qPCR 基因表达量验证,结果表明,RT-qPCR 的检测结果与 RNA-Seq 测序数据分析得到的基因表达

量变化趋势是一致的(图 4),说明本研究中的 RNA-Seq 测序及其差异表达分析结果是可靠的。

2.6 差异 microRNA 靶基因预测与功能富集分析

在 23 个差异 microRNA 中,对 11 个极显著性差异 microRNA(见表 4)进行靶基因预测,共发现 6 739 个潜在靶基因。GO 注释表明,microRNA 潜在的靶基因共富集到 9 095 个 GO 条目,包含细胞过程、生物调节、转录调控、细胞迁移以及炎症有关的免疫系统 6 231 个生物学过程,蛋白质同源二聚化活性、跨膜受体蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、转录共激活因子活性等 1 846 个分子功能和 1 021 个细胞组分。潜在靶基因的 KEGG 富集分析,结果发现,DEmicroRNA 的潜在靶基因可能涉及 109 条信号通路,其中最显著富集的通路为代谢相关途径(metabolic pathways),同时也富集到了与炎症有关的 NF- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路、MAPK(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、p53 信号通路、PI3K-AKT 信号通路及 mTOR(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路和 Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)信号通路、Janus 酪氨酸蛋白激酶(janus tyrosine protein kinase, JAK)-信号转导及转录激活因子(signal transduction and transcription activating factor, STAT)信号通路等(图 5)。通过深入分析,发现表达上调的 bta-miR-2285i 的靶基因 MAPK8 富集在 MAPK 信号通路上,表达下调的 bta-miR-2377 的靶基因

表 3 空白对照组与 ATCC 6258 感染组差异性表达 microRNA

Table 3 Differential expression of microRNA between blank control group and ATCC 6258 infection group

microRNA 名称 microRNA name	差异倍数 Log ₂ FC	P 值 P value	上调/下调 Up/Down
mdo-miR-196a-5p_R+2	2.891 907 300	0.001 073 447	Up
PC-3p-17914_31	1.948 567 463	0.001 313 257	Up
PC-3p-23460_18	2.569 135 000	0.001 540 719	Up
chi-miR-191-3p	-0.807 459 348	0.003 157 484	Down
bta-miR-2377	-0.723 000 000	0.005 163 673	Down
oan-miR-16b-5p_L+1	2.369 133 16	0.006 208 570	Up
bta-miR-2285i	0.356 148 451	0.009 318 871	Up
PC-5p-8555_99	-1.033 720 831	0.010 246 079	Down
PC-3p-20561_24	-2.301 896 470	0.010 361 880	Down
chi-miR-18a-3p_R+1	-0.403 969 492	0.010 398 300	Down
pal-miR-9993a-3p	-0.330 814 089	0.010 453 945	Down
bta-miR-20b_R+3_1ss10CT	0.719 604 509	0.020 103 455	Up
bta-miR-215	2.408 603 805	0.030 145 620	Up
mmu-miR-378d_R+2_1ss6CA	1.752 421 816	0.035 169 227	Up
bta-miR-362-5p	0.584 875 060	0.038 184 233	Up
eca-miR-1839_L-1R+3	2.094 428 940	0.042 436 847	Up
PC-3p-13080_52	-0.486 472 783	0.049 297 031	Down
PC-3p-19898_25	2.022 363 047	0.050 328 524	Up
bta-miR-500_R+2	0.370 279 491	0.050 354 398	Up
bta-miR-219b-3p	1.410 831 312	0.050 380 862	Up
lca-miR-19b_R+2	1.588 370 285	0.050 393 992	Up
bta-miR-146b	0.729 240 479	0.050 461 322	Up
PC-3p-17661_32	1.303 327 519	0.050 485 736	Up

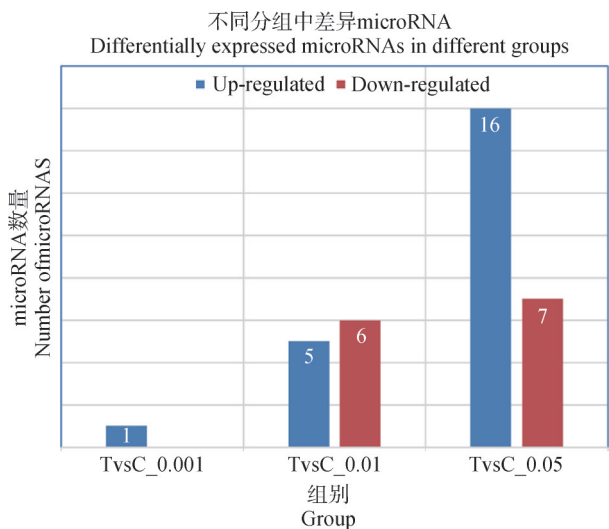


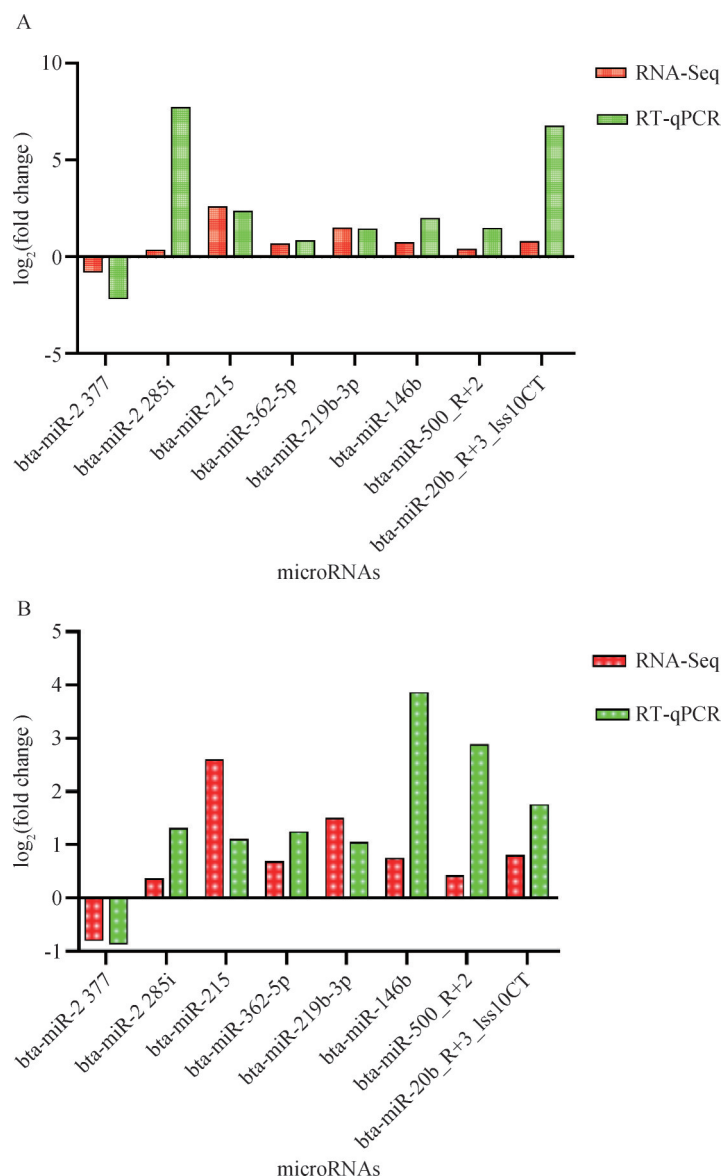
图 3 microRNA 的差异表达分析

Fig. 3 Differential expression analysis of microRNAs

IRF5/MAP2K3/TLR4 富集在 Toll 样受体信号通路上, STAT5A/5B 富集在 JAK-STAT 信号通路上。上述结果表明, 这些 DE microRNA 通过对应的信号通路参与调节了 ATCC 6258 诱导的奶牛乳腺炎过程。

3 讨 论

奶牛乳腺炎是奶牛养殖过程中发病率较高且最为常见的疾病之一, 受养殖环境、管理水平等多重影响, 克柔念珠菌是引起宁夏银川地区真菌性奶牛乳腺炎的主要致病真菌之一, 能够促使奶牛乳腺上皮细胞分泌多种细胞炎性因子如 IL-18、IL-1 β 和 TNF- α , 启动细胞炎症反应以及免疫调控作用^[3]。乳腺上皮细胞是乳腺组织识别病原体微生物入侵



A. 以 β -Actin 作内参; B. 以 U6 snRNA 作内参

A. β -Actin was used as internal reference ; B. U6 was used as internal reference

图4 microRNA 的 RT-qPCR 结果与 RNA-Seq 测序结果比较

Fig. 4 Comparison of RT-qPCR results of microRNAs with RNA-Seq sequencing results

的第一道防线,是奶牛乳腺免疫系统的重要组成部分,常被用作体外奶牛乳腺炎的研究模型。近年来,大量研究发现,非编码 RNA(ncRNA)在奶牛乳腺炎的发生发展过程中具有重要作用^[20-22],其中 microRNA 主要是通过其种子序列(2—8 位核苷酸)与炎症相关靶基因 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)完全或不完全互补,转录调控炎症相关靶基因的表达及翻译,在奶牛乳腺炎中发挥重要作用,为探讨 microRNA 在 *Candida krusei* 诱导 MAC-T 炎症反应中的表达模式,本研究通过建立 *Candida krusei* 诱导 MAC-T 炎症模型,利用转录组测序和生物信

息学分析筛选出 23 个差异表达 DE microRNA,提示这些 DE microRNA 可能参与了克柔念珠菌诱导奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的发生与发展过程。潘晓乐^[23]在 *S. aureus* 诱导奶牛乳腺上皮细胞中鉴定出 174 个 DE microRNA,并且推测 miR-29b 的靶基因主要富集于趋化因子(TGF)信号通路、白介素 17 信号通路参与奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的发生过程。Wang 等^[15]在 *S. aureus* 诱导奶牛乳腺组织中鉴定出 27 个 DE microRNA,并且 GO 和 KEGG 富集分析发现潜在靶基因参与 RAS 信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-AKT/mTOR 信号通路参与奶牛

表 4 差异表达 microRNA 的 GO 功能注释

Table 4 GO functional annotation of differentially expressed microRNA

功能组 Functional group	分类 Class	GO 编号 GO ID	显著基因数 Significant genes	总基因数 Annotated genes
生物学过程 Biological process	蛋白磷酸化 Protein phosphorylation	GO:0006468	172	3 590
	RNA 聚合酶 II 转录正调控 Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	GO:0045944	223	3 590
	细胞增殖负调控 Negative regulation of cell population proliferation	GO:0008285	78	3 590
	子宫胚胎发育 In utero embryonic development	GO:0001701	62	3 590
	囊泡运输 Vesicle-mediated transport	GO:0016192	48	3 590
	转化生长因子 β 受体信号通路 Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	GO:0007179	28	3 590
	RNA 聚合酶 II 转录负调控 Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	GO:0000122	150	3 590
	中心体定位 Centrosome localization	GO:0051642	11	3 590
	磷脂酰肌醇去磷酸化 Phosphatidylinositol dephosphorylation	GO:0046856	14	3 590
	转录正调控 Positive regulation of transcription	GO:0045893	123	3 590
	凋亡正调控 Positive regulation of apoptotic process	GO:0043065	58	3 590
	血生成 Hemopoiesis	GO:0030097	22	3 590
	细胞生长的负调控 Negative regulation of cell growth	GO:0030308	31	3 590
	BMP 信号通路 BMP signaling pathway	GO:0030509	26	3 590
	蛋白质转运 Protein transport	GO:0015031	45	3 590
细胞组分 Cellular component	细胞溶质 Cytosol	GO:0005829	657	3 590
	核质 Nucleoplasm	GO:0005654	624	3 590
	细胞质 Cytoplasm	GO:0005737	700	3 590
	细胞核 Nucleus	GO:0005634	725	3 590
	质膜 Plasma membrane	GO:0005886	505	3 590
	内质网 Endoplasmic reticulum	GO:0005783	200	3 590
	高尔基体 Golgi apparatus	GO:0005794	187	3 590
	胞内膜结合细胞器 Intracellular membrane-bounded organelle	GO:0043231	177	3 590
	内质网膜 Endoplasmic reticulum membrane	GO:0005789	93	3 590
	膜 Membrane	GO:0016020	481	3 590
分子功能 Molecular function	相同蛋白结合 Identical protein binding	GO:0042802	302	3 590
	蛋白结合 Protein binding	GO:0005515	639	3 590
	蛋白激酶活性 Protein kinase activity	GO:0004672	142	3 590
	蛋白激酶结合 Protein kinase binding	GO:0019901	98	3 590
	泛素蛋白连接酶结合 Ubiquitin protein ligase binding	GO:0031625	73	3 590
	ATP 结合 ATP binding	GO:0005524	264	3 590
	序列特异性 DNA 结合 Sequence-specific DNA binding	GO:0043565	102	3 590

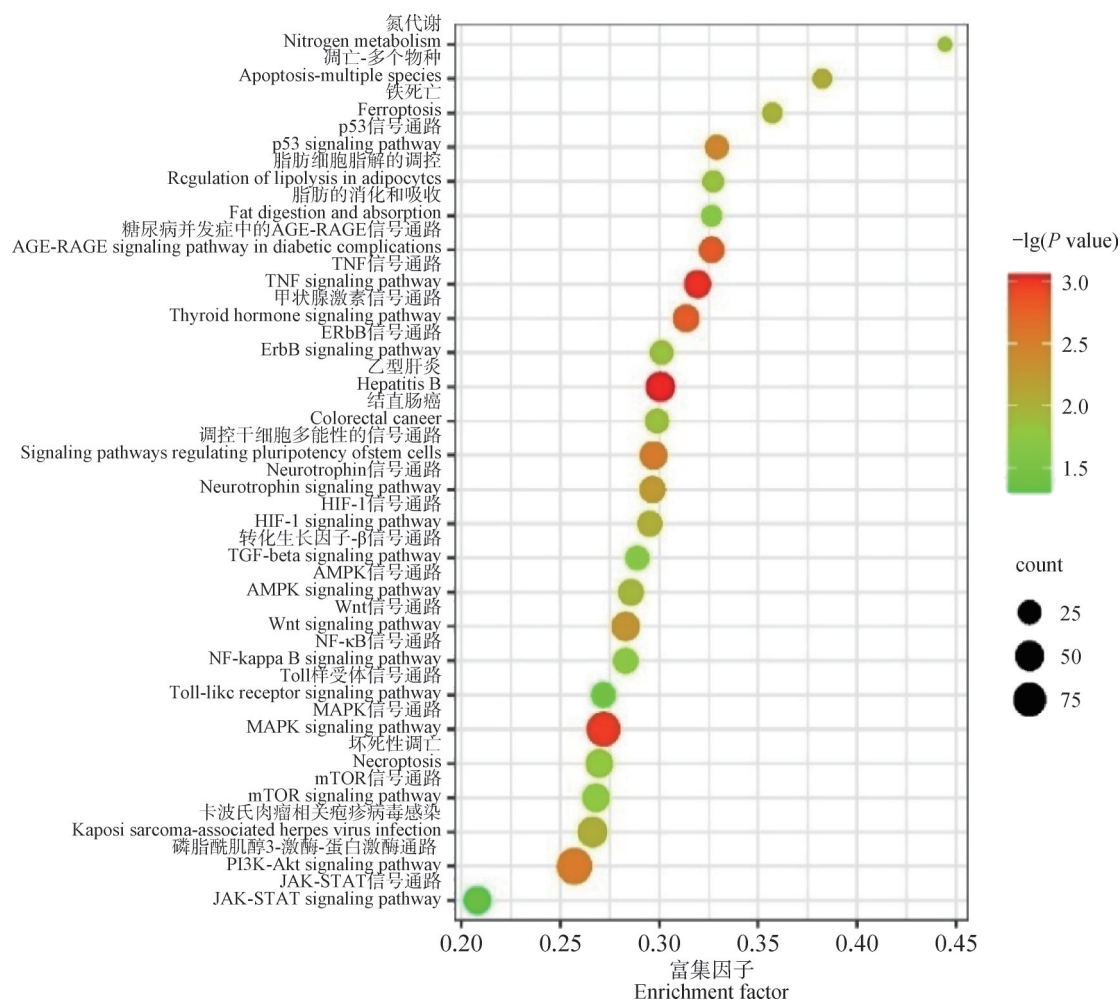


图5 DEMicroRNA 靶基因 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of DEMicroRNA target genes

乳腺组织的炎症反应。此外,在不同病原菌处理的奶牛乳腺组织、乳汁以及血液中也检测到参与奶牛乳腺炎免疫调控的 DEMicroRNA。上述研究与本研究检测到的 DEMicroRNA 的种类以及表达水平不一致,提示不同病原菌、组织、细胞状态中 microRNA 的表达模式不同,表明 microRNA 在奶牛乳腺炎中的作用机制非常复杂。因此,为进一步解析 microRNA 对克柔念珠菌性奶牛乳腺炎的免疫调控网络,本研究对 *Candida krusei* 诱导的奶牛乳腺上皮细胞进行 microRNA 差异表达分析,结果发现 DEMicroRNA 可能通过调控靶基因介导炎症相关信号通路来调节 *Candida krusei* 诱导的 MAC-T 炎症反应。

GO 和 KEGG 富集分析是 DEMicroRNA 功能分析的主要方法,本研究通过 GO 富集分析发现 11 个极显著差异 microRNA 可能参与炎症相关免疫调

节、细胞迁移、转录调控、蛋白激酶活性、转录共激活因子活性的过程,KEGG 功能富集分析发现 DEMicroRNA 对应的靶基因可能涉及 NF-κB、MAPK、JAK-STAT、TLR、p53、PI3K-AKT/mTOR 等信号通路的调控,进而参与奶牛乳腺炎症反应的调控。现已有研究表明,上述 5 个信号通路在人与动物免疫应答及炎症反应过程中具有重要调控作用^[24-27]。

TLRs 是一类在先天性免疫中发挥重要作用的模式识别受体 (PRRs),主要负责识别病原体相关分子模式 (PAMPs) 以及损伤相关分子模式 (DAMPs),激活先天性免疫和适应性免疫^[28];核因子-κB (NF-κB) 是一组在调控免疫反应、炎症反应、细胞生长与死亡等多种生理过程中起关键作用的转录因子,负责调节免疫细胞的活化、增殖和分化^[29]。蔡明玉等^[2]研究发现克柔念珠菌毒力因子

14-3-3蛋白通过激活TLR/NF- κ B信号通路使奶牛乳腺上皮细胞发生炎症反应。王凡^[30]研究发现miR-148a通过靶向TLR4,减少MyD88表达和p65磷酸化,抑制NF- κ B信号通路,有效缓解奶牛乳腺上皮细胞炎症反应,表明存在microRNA可以下调TLR/NF- κ B信号通路抑制奶牛乳腺上皮细胞炎症反应。NF- κ B家族成员具有五个不同的亚单位:p50/p105(NF- κ B1)、p52/p100(NF- κ B2)、c-Rel、RelA(p65)和RelB^[31]。其中RelB包含1~300个残基的区域,主要参与NF- κ B信号通路的非经典途径,作为调控因子来调节NF- κ B信号通路,参与机体的先天性免疫和适应性免疫^[32]。在炎症条件下,免疫细胞(T细胞、B细胞、单核细胞和星形胶质细胞)中RelB表达量显著升高^[33]。吴钟伟等^[34]研究发现,miR-146a-3p通过靶向RelB的3'UTR的367-377区域抑制动脉粥样硬化小鼠血管内皮细胞的细胞因子分泌,表明microRNA可以通过靶向RelB基因抑制NF- κ B信号通路,减缓细胞炎症反应。本研究中bta-miR-2377、bta-miR-2285i的潜在靶基因分别为TLR4、RelB,与上述研究结果一致,因此推测bta-miR-2377、bta-miR-2285i可能通过靶基因介导TLR/NF- κ B信号通路调节*Candida krusei*诱导的MAC-T炎症反应的发展过程,其分子机制有待于进一步验证。

MAPK(mitogen-activated protein kinase signaling pathway)信号通路是一类重要的细胞信号传导通路,通过级联磷酸化反应,参与多种信号转导通路,传递细胞外信号至细胞核,调控基因表达、细胞增殖、分化、存活和凋亡等多种生物过程^[35]。级联反应包括三层顺序激活激酶:MAPK激酶激酶(MAP3K)、MAPK激酶(MAP2K)和MAPK^[36]。Wang等^[37]研究发现,金黄色葡萄球菌在感染奶牛乳腺上皮细胞时,致病性毒力因子与TLR2的结合导致NF- κ B和MAPK等信号通路激活,进一步促进促炎细胞因子IL-6和TNF- α 的表达,这表明MAPK信号通路在奶牛乳腺上皮细胞炎症反应中具有重要的作用。MAPK8作为MAPK家族的一员,磷酸化并激活一系列下游基因的表达,在细胞增殖、细胞分化、细胞存活、细胞死亡、炎症和其他病理进展中发挥关键调节作用^[38]。Gu等^[39]研究发现在内皮细胞中,miR-130a-3p通过靶向MAPK8,调控MAPK信号通路,抑制内皮细胞炎症反应,降低促炎因子的表达。本研究中bta-miR-2285i的潜

在靶基因MAPK8富集到了MAPK信号通路上,与上述研究结果一致,表明bta-miR-2285i可能通过靶向MAPK8介导MAPK信号通路从而实现对*Candida krusei*诱导的MAC-T炎症反应的调控作用,但具体的分子机制仍需进一步验证。

JAK-STAT信号通路是一种细胞内信号传导机制,它在多种生物学过程中发挥重要作用,包括基因表达、免疫反应、细胞分化、代谢和细胞生长等^[40-41]。近年来,大量试验数据表明,JAK-STAT信号通路与免疫系统功能的各个方面有关,例如抵抗感染、维持免疫耐受、增强屏障功能和预防癌症等^[42]。蒲俊华^[43]研究发现,miR-122通过靶向EPOR基因,参与JAK-STAT信号通路,调控JAK蛋白、STAT蛋白基因表达水平,调节链球菌引起的奶牛乳腺组织的炎症损伤,表明JAK-STAT信号通路在奶牛乳腺炎中具有重要调控作用。JAK-STAT信号通路有三个部分:细胞受体、JAK蛋白、STAT蛋白^[44]。哺乳动物中有7个STAT家族成员:STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B和STAT6^[45]。STAT家族的每个成员都可以被多种细胞因子和相关JAK激活,其中STAT5A和STAT5B是具有多效性作用的广谱细胞因子的关键作用靶点,在T细胞增殖、分化、存活和衰老等过程中发挥重要作用^[46]。本研究中bta-miR-2377潜在的靶基因为STAT5A、STAT5B,推测bta-miR-2377可能通过靶向STAT5A、STAT5B参与JAK-STAT信号通路,在奶牛乳腺上皮细胞免疫反应中发挥重要作用。在对STAT家族成员功能研究中发现,STAT5A、STAT5B是人类和小鼠自然杀伤(NK)细胞活化、增殖以及成熟的重要转录调控因子^[47]。其中NK细胞是先天免疫系统中抵抗多种病毒感染和消除肿瘤细胞的效应器,这表明bta-miR-2377可能在先天性免疫调控中也发挥具有重要作用,其分子机制有待于进一步验证。

4 结 论

在*Candida krusei*诱导炎症的奶牛乳腺上皮细胞模型中获得了16个表达上调和7个表达下调的DEmicroRNA。其中显著性下调的bta-miR-2377,显著性上调的bta-miR-2285i通过潜在靶基因介导MAPK、JAK-STAT、NF- κ B和Toll样受体等炎症相关信号通路,从而调控*Candida krusei*诱导的MAC-T炎症反应的发生与发展过程,为下一步揭

示特异性 microRNA 在克柔念珠菌致病机制方面奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] RUEGG P L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(12):10381-10397.
- [2] 蔡明玉, 张海龙, 海珍珍, 等. 重组克柔念珠菌 14-3-3 蛋白诱导奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的分子机制 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54:1679-1689.
CAI M, ZHANG H L, HAI Z Z, et al. The inflamed mechanism induced by recombinant 14-3-3 protein of *Candida krusei* on bovine mammary epithelial cells [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54: 1679-1689. (in Chinese)
- [3] 杜 军. 克柔念珠菌两相损伤奶牛乳腺上皮细胞机制研究[D]. 银川:宁夏大学, 2021.
DU J. Study on the mechanism of two-phase injury of bovine mammary epithelial cells by *Candida krusei* [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021. (in Chinese)
- [4] GORJI A E, ROUDBARI Z, SADEGHI B, et al. Transcriptomic analysis on the promoter regions discover gene networks involving mastitis in cattle [J]. *Microbial Pathog*, 2019, 137:103801.
- [5] JU Z H, JIANG Q, LIU G, et al. Solexa sequencing and custom microRNA chip reveal repertoire of microRNAs in mammary gland of bovine suffering from natural infectious mastitis [J]. *Anim Genet*, 2018, 9(1):3-18.
- [6] 杨 箭, 王兴平, 罗仍卓么, 等. miRNA 在奶牛乳房炎中的表达模式和分子调控机制 [J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28:2069-2079.
YANG J, WANG X P, LUORENG Z M, et al. The expression pattern and molecular regulatory mechanism of miRNA in mastitis of dairy cows (*Bos taurus*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28: 2069-2079. (in Chinese)
- [7] SUN K, LAI E C. Adult-specific functions of animal microRNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14 (8) : 535-548.
- [8] NORMA S, ISABELLE D R, ISABELLE T, et al. MicroRNAs in inflammasomopathies [J]. *Immunol Lett*, 2023, 256-257:48-54.
- [9] RYAN M O, DINESH S R, C, AADEL A, et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10 (2):111-122.
- [10] SATOSHI N, YA C, MASAYUKI S, et al. Transcriptomic profiling identifies an exosomal microRNA signature for predicting recurrence following surgery in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg*, 2022, 276(6):e876-e885.
- [11] DAMIEN F, RONAN G S, LOUISE B, et al. The identification of circulating miRNA in bovine serum and their potential as novel biomarkers of early *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis infection [J]. *PloS One*, 2015. 10(7):e0134310.
- [12] LI R, ZHANG C L, LIAO X, et al. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (3):4997-5013.
- [13] LAI Y C, TAKURO F, TADASHI M, et al. Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis [J]. *PloS One*, 2017, 12(5):e0177182.
- [14] LUORENG Z M, WANG X P, MEI C G, et al. Expression profiling of peripheral blood miRNA using RNAseq technology in dairy cows with *Escherichia coli*-induced mastitis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):12693.
- [15] WANG X Z, SU F, YU X H, 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.
- [16] LUORENG Z M, WEI D W, WANG X P. MiR-125b regulates inflammation in bovine mammary epithelial cells by targeting the NKIRAS2 gene [J]. *Vet Res*, 2021, 52(1):122.
- [17] BAGNICKA E, KAWECKA-GROCHOCKA E, PAWLINA-TYSZKO K, et al. MicroRNA expression profile in bovine mammary gland parenchyma infected by coagulase-positive or coagulase-negative staphylococci [J]. *Vet Res*, 2021, 52(1):41.
- [18] PU J H, LI R, ZHANG C L, et al. Expression profiles of miRNAs from bovine mammary glands in response to *Streptococcus agalactiae*-induced mastitis [J]. *J Dairy Res*, 2017, 84(3):300-308.
- [19] MA S Y, TONG C, EVELINE M I A, et al. Identification and characterization of differentially

- expressed exosomal microRNAs in bovine milk infected with *Staphylococcus aureus* [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1):934.
- [20] MAN Z, HERMAN W B, JIAN G, et al. MicroRNA miR-223 modulates NLRP3 and Keap1, mitigating lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in bovine mammary epithelial cells and murine mammary glands [J]. *Vet Res*, 2023, 54(1):78.
- [21] CHEN Z, LIANG Y, LU Q, et al. Cadmium promotes apoptosis and inflammation via the circ08409/miR-133a/TGFB2 axis in bovine mammary epithelial cells and mouse mammary gland [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 222:112477.
- [22] YU C, JING Y, ZHI H, et al. Exosomal lnc-AFTR as a novel translation regulator of FAS ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis [J]. *BioFactors (Oxford, England)*, 2022, 48(1):148-163.
- [23] 潘晓乐. 奶牛金黄色葡萄球菌性乳腺炎免疫相关 microRNA 的筛选及其生物学功能 [D]. 银川:宁夏大学, 2022.
- PAN X L. Screening og microRNAs in immune response to *S. aureus* isolated from bovine mastitis and their biological functions [D]. Yinchuan : Ningxia University, 2022. (in Chinese)
- [24] ZHANG Y P, XU Y Q, CHEN B W, et al. Selenium deficiency promotes oxidative stress-induced mastitis via activating the NF- κ B and MAPK pathways in dairy cow [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(6):2716-2726.
- [25] LI J D, YIN P, GONG P, et al. 8-methoxypsoralen protects bovine mammary epithelial cells against lipopolysaccharide-induced inflammatory injury via suppressing JAK/STAT and NF- κ B pathway [J]. *Microbiol Immunol*, 2019, 63(10):427-437.
- [26] MARVALIM C, DATTA A, LEE S C. Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy [J]. *Theranostics*, 2023, 13(4):1421-1442.
- [27] XU F, NA L X, LI Y F, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10(1):54.
- [28] SEYED H A, KHALIL K, MEHRAN G. Toll-like receptors (TLRs) and their potential therapeutic applications in diabetic neuropathy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 102:108398.
- [29] MOSTAFIZAR M, CORTES-PÉREZ C, SNOW W, et al. Challenges with methods for detecting and studying the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the central nervous system [J]. *Cells*, 2021, 10(6):1335.
- [30] 王凡. miR-148a 靶向 TLR4/NF- κ B 调控奶牛乳腺上皮细胞炎性损伤的研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2024.
- WANG F. MiR-148a targets TLR4/NF- κ B pathway to attenuate inflammatory injury in bovine mammary epithelial cells [D]. Yangling : Northwest A & F University, 2024 (in Chinese)
- [31] MOCKENHAUPT K, GONSIEWSKI A, KORDULA T. RelB and neuroinflammation [J]. *Cells*, 2021, 10(7):1609.
- [32] CILDIR G, LOW K C, TERGAONKAR V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease [J]. *Trend Mol Med*, 2016, 22(5):414-429.
- [33] MILLET P, MCCALL C, YOZA B. RelB: an outlier in leukocyte biology [J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 94(5):941-951.
- [34] 吴钟伟, 赵圣吉, 李春富, 等. miR-146a-3p 靶向 RELB 调控动脉粥样硬化小鼠内皮细胞的细胞因子分泌 [J]. 海南医学院学报, 2020, 26:742-748.
- WU Z W, ZHAO S J, LI C F, et al. miR-146a-3p targets RELB regulates cytokine secretion in endothelial cells of atherosclerotic mice [J]. *Journa of Hainan Medical Colleage*, 2020, 26:742-748. (in Chinese)
- [35] MA Y, JADE N. Specificity models in MAPK cascade signaling [J]. *FEBS Open Bio*, 2023, 13(7):1177-1192.
- [36] AIWEN S, LIU L, LI S, et al. Natural products targeting the MAPK-signaling pathway in cancer: overview [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2024, 150(1):6.
- [37] WANG H, BI C L, WANG Y J, et al. Selenium ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells by inhibiting activation of TLR2, NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1):197.
- [38] XU P, ZHANG G F, HOU S X, et al. MAPK8 mediates resistance to temozolomide and apoptosis of glioblastoma cells through MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106:1419-1427.

- [39] GU M, LIU K, XIONG H, et al. MiR-130a-3p inhibits endothelial inflammation by regulating the expression of MAPK8 in endothelial cells[J]. *Heliyon*, 2024, 10(2):e24541.
- [40] HU Q, BIAN Q H, RONG D C, et al. JAK/STAT pathway: Extracellular signals, diseases, immunity, and therapeutic regimens [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11:1110765.
- [41] NITISH K, NIDHI S, SIDHARTH M. Connection between JAK/STAT and PPAR γ signaling during the progression of multiple sclerosis: Insights into the modulation of T-cells and immune responses in the brain[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2021, 14(5):823-837.
- [42] HUANG W, LI Y Y, ZHANG C, et al. IGF2BP3 facilitates cell proliferation and tumorigenesis via modulation of JAK/STAT signalling pathway in human bladder cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23):13949-13960.
- [43] 蒲俊华. 奶牛链球菌型乳腺炎乳腺组织基因表达与 microRNA 分析及 miR-122 对 EPO 和 JAK-STAT 通路靶向调控 [D]. 扬州:扬州大学, 2017.
- PU J H. Expression profiles of genes and microRNAs from bovine mammary glands in response to *Streptococcus agalactiae*-induced mastitis and regulation of miR-122 on EPO and JAK-STAT pathway [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017. (in Chinese)
- [44] RUCHI P A, SCOTT M L, RAZELLE K. JAK: Not just another kinase [J]. *Mol Cancer Therap*, 2022, 21(12):1757-1764.
- [45] AWASTHI N, LIONGUE C, C, WARD A. STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1):198.
- [46] MAURER B, KOLLMANN S, PICKEM J, et al. STAT5A and STAT5B-twins with different personalities in hematopoiesis and leukemia [J]. *Cancers*, 2019, 11(11):1726.
- [47] GOTTHARDT D, TRIFINOPOULOS J, SEXL V, et al. JAK/STAT cytokine signaling at the crossroad of NK cell development and maturation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2590.

(编辑 白永平)