网络出版时间:2026-01-09 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.07.002

金黄色葡萄球菌外囊泡对奶牛乳腺上皮细胞炎症的诱导作用

黄倩[1],杨江流[1],乔亚蕊[1],李军[1,2],周学章[1]

(1 宁夏大学 生命科学学院 西部特色资源保护与利用教育部重点实验室,宁夏 银川 750021;
2 宁夏职业技术大学 宁夏中药材开发与利用工程技术研究中心,宁夏 银川 750021)

[摘 要] 【目的】探究金黄色葡萄球菌外囊泡(EVs)对奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)炎症的影响,为系统阐述金黄色葡萄球菌EVs诱导BMECs炎性损伤的分子机制奠定基础。【方法】通过差速+超速离心法分离纯化金黄色葡萄球菌的EVs,利用透射电镜和纳米颗粒跟踪分析对EVs进行鉴定;用DIO荧光染料示踪金黄色葡萄球菌EVs,观察BMECs对金黄色葡萄球菌EVs的内化情况;用0,5,10,20,25 μg/mL EVs处理BMECs,测定EVs对BMECs增殖活力的影响;将20 μg/mL EVs与BMECs共孵育0,1,3 h,通过Western Blot、RT-qPCR测定NLRP3信号通路炎性因子表达量;用NLRP3抑制剂MCC950预处理BMECs 3 h后,用20 μg/mL EVs与BMECs共孵育1 h,Western Blot测定NLRP3信号通路炎性因子表达量。【结果】成功从金黄色葡萄球菌培养上清液中获得纯化的EVs,其具有双层膜和典型的杯盘状结构,粒径大小为80~320 nm,符合革兰氏阳性菌EVs特征。EVs可被BMECs内化至胞内。0~25 μg/mL EVs对BMECs的活性无显著影响。经20 μg/mL EVs处理后,BMECs *IL*-18、*IL*-1*β*、*IL*-6、*TNF*-*α*基因mRNA相对表达量在1 h时均较对照极显著上升($P<0.01$),*IL*-18、*IL*-1*β*基因mRNA相对表达量在3 h时也较对照分别极显著和显著升高;Western Blot结果显示,与0 h处理组相比,EVs处理1,3 h BMECs NLRP3信号通路中NLRP3、GSDMD、N-GSDMD、caspase1、IL-18、IL-1β等炎性因子蛋白表达量大多显著或极显著上升;与EVs处理组相比,MCC950+EVs处理组BMECs NLRP3信号通路中NLRP3、GSDMD、N-GSDMD、c-caspase1、IL-18、IL-1β等炎性因子蛋白表达量均显著或极显著下调。【结论】金黄色葡萄球菌在正常增殖过程中能分泌EVs,可被BMECs内化。EVs通过NLRP3信号通路诱导BMECs发生炎症反应,表明EVs在金黄色葡萄球菌感染BMECs的过程中有重要作用。

[关键词] 金黄色葡萄球菌;外囊泡;奶牛乳腺上皮细胞;NLRP3信号通路

[中图分类号] S858.237.2+6 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)07-0011-09

Induction of inflammation in mammary epithelial cells of dairy cows by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles

HUANG Qian[1], YANG Jiangliu[1], QIAO Yarui[1], LI Jun[1,2], ZHOU Xuezhang[1]

(1 *Key Laboratory of Conservation and Utilization of Western Characteristic Resources, Ministry of Education, School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*; 2 *Ningxia Traditional Chinese Medicine Development and Utilization Engineering Technology Research Center, Ningxia Polytechnic University, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*)

Abstract: 【Objective】 The present study investigates the effects of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles (EVs) on the inflammation of bovine mammary epithelial cells (BMECs) and aims to lay a foundation for the systematic elucidation of the molecular mechanisms by which *S. aureus* EVs induce inflammatory damage

[收稿日期] 2025-04-25 [修回日期] 2026-06-10
[基金项目] 宁夏回族自治区自然科学基金项目(2023AAC03322);2023年宁夏回族自治区青年拔尖人才培养项目(宁人社函〔2024〕106号);宁夏回族自治区科技创新领军人才项目(2021GKLRLX10)
[作者简介] 黄倩(1999—),女,宁夏海原人,在读硕士,主要从事病原生物学与宿主免疫研究。E-mail:hq2943@126.com
[通信作者] 周学章(1969—),男,宁夏银川人,教授,博士,博士生导师,主要从事兽医药理学研究。E-mail:zhouxuezhang@nxu.edu.cn
李军(1982—),男,山西大同人,教授,博士,主要从事中药开发及病原生物学研究。E-mail:lijunamy@126.com

in BMECs.【Method】The EVs of *Staphylococcus aureus* were isolated and purified by differential and ultracentrifugation, and identified using transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis. The internalisation of *S. aureus* EVs was observed by tracking them with DIO fluorescent dye. BMECs were exposed to 0, 5, 10, 20, and 25 μg/mL EVs, determine the effect of EVs on the enhancing vitality of BMECs. BMECs were incubated with 20 μg/mL EVs for 0, 1, and 3 hours to assess the expression of NLRP3 signaling pathway-related inflammatory factors by Western blot and RT-qPCR. BMECs were subjected to a 3-hour pre-treatment with the NLRP3 inhibitor MCC950 before being incubated with 20 μg/mL EVs for 1 hour. The expression levels of inflammatory factors in the NLRP3 signalling pathway were determined by Western Blot analysis.【Result】Purified EVs were successfully isolated from the culture medium of *S. aureus*. These EVs exhibited a double-layered membrane and a typical cup-shaped structure. The particle sizes of the purified EVs ranged from 80 to 320 nm, and these characteristics are consistent with those of Gram-positive bacterial EVs. The EVs were effectively internalized by BMECs. In the concentration range of 0—25 μg/mL, EVs exerted no significant effect on BMECs viability. Following treatment with 20 μg/mL EVs, the relative mRNA expression levels of *IL-18*, *IL-1β*, *IL-6*, and *TNF-α* genes of BMECs were extremely significantly higher than those in the control group at 1 h ($P<0.01$). Furthermore, the relative mRNA expression levels of *IL-18* and *IL-1β* genes were also extremely significantly and significantly higher than those in the control group at 3 h, respectively. The Western Blot results demonstrated that compared with the 0 h treatment group, the protein expression levels of NLRP3, GSDMD, N-GSDMD, caspase1, IL-18, IL-1β inflammatory factors in the NLRP3 signalling pathway of BMECs in the EVs-treated group were mostly significantly or extremely significantly increased at 1 and 3 hours. Compared with the EVs-treated group, the MCC950+EVs-treated group exhibited a significant or extremely significant decrease in the protein expression levels of NLRP3, GSDMD, N-GSDMD, c-caspase1, IL-18, IL-1β inflammatory factors in the NLRP3 signalling pathway of BMECs.【Conclusion】*Staphylococcus aureus* can secrete EVs during normal proliferation. These EVs can be internalised by BMECs and induce an inflammatory response in BMECs via the NLRP3 signalling pathway. This suggests that EVs have an important role in the process of *S. aureus* infection of BMECs.

Key words: *Staphylococcus aureus*; extracellular vesicles; bovine mammary epithelial cells; NLRP3 signalling pathway

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌之一,在中国、印度和巴西等发展中国家,10%～40%的奶牛乳腺炎病例由该菌引起[1],其表达的许多外毒素参与细菌逃避宿主的防御,促进金黄色葡萄球菌在奶牛乳腺的定殖,引起奶牛的慢性乳房内感染,从而导致牛奶产量和质量大幅下降,给乳业造成了严重的经济损失[2]。近年来,研究发现一种名为零型分泌系统的外囊泡(extracellular vesicles,EVs)代表了革兰氏阳性菌特有的分泌机制[3]。EVs是正常生长细菌的一部分,携带多种毒力因子、磷脂、多糖、核酸和脂蛋白,在调节宿主免疫和细菌致病中发挥重要作用。EVs作为一种广义的分泌途径,可将细菌中的毒力因子、蛋白质等转移到其他细菌以及真核细胞中,从而保护细菌免受有害物质的侵害、调节细菌生物膜的形成、介导细菌间的交流以及促进细菌毒素传递。XU等[4]研究发现,马红球菌EVs能通过TLR2-NF-κB/MAPK通路诱导巨噬细胞产生炎症反应,细菌EVs在宿主细胞的炎症发生过程中起重要作用。金黄色葡萄球菌EVs能通过质膜融合及网格蛋白/发动蛋白依赖性内吞作用进入宿主细胞,其携带的活性毒力因子及RNA等大分子,在宿主细胞免疫应答过程中发挥重要作用,而这一内化过程的效率与EVs结构的完整性密切相关[5]。GURUNG等[6]发现,完整的金黄色葡萄球菌EVs可诱导人喉癌细胞(HEp-2)凋亡,而裂解的EVs则不能,这表明金黄色葡萄球菌EVs可作为毒力相关成分的运输系统,导致宿主细胞损伤。另外,RODRIGUEZ等[7]研究表明,金黄色葡萄球菌EVs携带RNA和DNA,并通过Toll样受体信号通路将其运输到相应靶点,从而引发干扰素β表达,加剧炎症反应。

核苷酸结合寡聚化结构域样受体3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3，NLRP3）炎症小体是一种重要的细胞内多聚体[8]，可增强宿主对病原体和内源性激活剂的炎症反应。其是由NLRP3蛋白、凋亡Speck样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD，ASC）和半胱天冬酶-1（cysteine-aspartic protease 1，caspase-1）组成的复合体[9]。NLRP3炎症小体在多种疾病的发生中发挥作用[10-12]，可被多种物质或因素激活，使NLRP3蛋白构象发生改变，ASC蛋白发生寡聚，从而形成ASC斑点，随后招募caspase-1，使其聚集并发生自我剪切激活成有活性的半胱天冬酶-1（c-caspase1），c-caspase1能够特异性地将促炎细胞因子白介素1β前体（pro-Interleukin-1 beta，pro-IL-1β）和白介素18前体（pro-Interleukin 18，pro-IL-18）切割成成熟的IL-1β和IL-18。同时，Gasdermin蛋白家族的GSDMD被炎症型c-caspase1切割成N-GSDMD，N-GSDMD会在细胞膜上形成孔洞，导致细胞膜通透性增加，细胞发生肿胀直至破裂，释放出细胞内容物，包括IL-1β、IL-18和乳酸脱氢酶等，引发细胞凋亡，从而引起炎症反应[13]。WANG等[14]研究表明，金黄色葡萄球菌EVs可被巨噬细胞内化，并激活NLRP3，促进IL-1β、IL-18的释放。奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells，BMECs）是乳腺的首道物理屏障，当病原体依赖黏附因子黏附在BMECs上时，可与细胞表面的受体特异性结合，进而侵入细胞内部，引发乳腺炎的发生。而关于金黄色葡萄球菌EVs是否会通过NLRP3信号通路诱导BMECs发生炎症反应尚未见报道。因此，本研究对金黄色葡萄球菌EVs进行提取和表征，并探究其对BMECs炎症的诱导作用及其作用机制，以期为将EVs作为治疗奶牛乳腺炎的新靶点提供依据。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　菌株与细胞　金黄色葡萄球菌（ATCC-49775），购自美国典型菌种保存中心；奶牛乳腺上皮细胞系，由山东农业大学生命科学学院提供。

1.1.2　主要试剂　胰蛋白胨大豆琼脂（TSA）和胰蛋白胨大豆肉汤（TSB），购自青岛海博生物公司；DMEM-High Glucose培养液、胰蛋白酶EDTA溶液，均购自美国BI公司；胎牛血清，购自以色列BI公司；去基因组DNA反转录试剂盒、RT-qPCR试剂盒，均购自北京全式金生物公司；引物由生工生物工程（上海）有限公司合成；DIO染料，购自UE；BCA蛋白含量检测试剂盒、CCK-8细胞增殖毒性检测试剂盒、全蛋白提取试剂盒、蛋白Marker（14～120 ku）、6×Loading Buffer，均购自南京凯基生物公司；Western Blot试剂盒电泳液、转膜液，均购自上海雅酶生物公司；PVDF膜，购自美国Millipore公司；NLRP3、GSDMD、N-GSDMD、caspase1、c-caspase1、IL-18一抗，均购自美国Affinity Biosciences公司；IL-1β一抗，购自武汉三鹰生物技术有限公司；HRP标记二抗，购自美国Proteintech公司。

1.2　方　法

1.2.1　金黄色葡萄球菌EVs提取　将金黄色葡萄球菌划线接种于TSA平板培养基后，37 ℃恒温培养箱中培养过夜，挑取单菌落接种于TSB液体培养基中，37 ℃、120 r/min恒温摇床中培养至600 nm处吸光度（OD_{600}）达到1.0，10 000 *g*离心20 min除去菌泥，上清液用0.45 μm过滤器过滤，去除残留菌体或细菌碎片。滤液利用浓缩装置（100 ku）超滤浓缩，浓缩液再用0.22 μm过滤器过滤，去除残留杂质后，转移至超速离心管中，4 ℃下150 000 *g*离心3 h，弃上清，PBS重悬获得EVs，用BCA试剂盒测定EVs的蛋白质浓度。

1.2.2　金黄色葡萄球菌EVs透射电镜观察　吸取10 μL EVs悬液滴加到载物铜网上，用40 g/L多聚甲醛固定，室温静置15 min，用吸水纸从铜网边缘吸取多余液体，加入10 μL 10 g/L磷钨酸负染5 min，常温干燥后进行透射电镜成像，并对图像进行分析。

1.2.3　金黄色葡萄球菌EVs粒径分析　将1.2.1节得到的EVs用300 μL PBS稀释，再加入10 mL PBS进行2次稀释。将3 mL无菌PBS加入样品池中进行调零后，吸取3 mL稀释后的EVs溶液添加至样品池中，将样品池放入纳米粒度分析仪中测定EVs的粒径分布范围。

1.2.4　BMECs培养　将冻存的BMECs置于37 ℃无菌水浴锅中快速融化（时间不超过2 min）后转移至离心管中离心（1 000 r/min离心5 min），弃去上清，用1 mL培养基重悬后接种于含体积分数10% FBS的DMEM中，37 ℃下体积分数5% CO_2以及完全湿度的培养箱中培养，细胞生长至80%～90%融合时进行消化传代2次，用2.5 g/L胰酶消化

BMECs,将BMECs悬浮液1 000 r/min离心5 min,收集沉淀,用培养基重悬后,用细胞计数仪计数,备用。

1.2.5 BMECs对金黄色葡萄球菌EVs摄入的检测 按照DIO荧光标记试剂盒说明书对EVs进行荧光标记。取纯化金黄色葡萄球菌EVs样品和PBS(对照),加入DIO溶液,使DIO终浓度为10 μmol/L,混匀,室温条件下避光孵育20 min,然后4 ℃条件下150 000 *g*离心3 h,PBS重悬,4 ℃保存备用。将BMECs以1×10^4个/孔接种于放置盖玻片的6孔板中,37 ℃、体积分数5% CO_2培养过夜。向BMECs中分别加入DIO标记的EVs和同法处理的PBS共孵育1 h后,40 g/L多聚甲醛固定细胞10 min,PBS洗涤3次,5 g/L TritonX-100孵育10 min,将细胞一侧的盖玻片放置在滴加含DAPI的防荧光淬灭剂的载玻片上,使用荧光显微镜成像,分析BMECs对EVs的摄取情况。

1.2.6 EVs对BMECs增殖活力的影响 将BMECs以1×10^4个/孔接种于96孔板中,过夜贴壁培养至细胞融合度为80%左右时,分别加入0,5,10,15,20和25 μg/mL的EVs,设置空白对照组(DMEM)、阴性对照组(正常培养细胞),处理24 h后,每孔加入10 μL CCK-8试剂,37 ℃继续孵育3 h。使用酶标仪于450 nm处测定吸光度(OD_{450}),根据下式计算细胞存活率:细胞存活率=(试验组OD_{450}−空白对照组OD_{450})/(阴性对照组OD_{450}−空白对照组OD_{450})×100%。

1.2.7 EVs对BMECs炎性因子基因表达的影响 根据NCBI GenBank中*IL*-18、*IL*-1*β*、*IL*-6、*TNF*-*α*及*β*-*actin*内参基因序列,用Primer Premier 3.0软件设计实时荧光定量PCR引物,引物序列见表1。将BMECs以4×10^5个/孔接种于6孔板中,过夜贴壁培养至细胞融合度为80%左右,加入含20 μg/mL EVs的DMEM分别共孵育BMECs 0,1和3 h,弃去6孔板中培养液,PBS清洗2次,用Trizol试剂反复吹打细胞,提取总RNA,用Nanodrop 2000测定RNA浓度。使用HiScript Ⅱ Q RT SuperMix for qPCR反转录试剂盒制备cDNA,再使用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)。RT-qPCR反应体系20 μL:cDNA 2 μL,SYBR Mix 10 μL,上、下游引物各0.5 μL,ddH_2O 7 μL。PCR反应程序:95 ℃预变性2 min;95 ℃变性15 s,60 ℃退火20 s,72 ℃延伸20 s,40个循环。以*β*-*actin*为内参基因,根据每个样品的循环阈(*Ct*),用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对目的基因进行相对定量分析。

表1 本研究所用引物序列

Table1 Primer sequences use in the study

基因名称Gene name	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)
IL-6	F:CTGCAAGAGACTTCCATCCAG,R:AGTGGTATAGACAGGTCTCTGTTGG
TNF-*α*	F:CTGAACTTCGGGGTGATCGG,R:GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGC
IL-18	F:CACTTTGGCAAACTTGAACCTAAGC,R:TGAACAGTCAGAATCAGGCATATCC
IL-1*β*	F:GGCTGATGACCCTAAACAGATGAAG,R:ACGATGACCGACACCACCTG
β-*actin*	F:CGTCCGTGACATCAAGGAGAAGC,R:GGAACCGCTCATTGCCGATGG

1.2.8 EVs诱导BMECs炎性反应机制分析 (1)EVs对BMECs NLRP3信号通路相关蛋白表达量的影响。用EVs处理BMECs,处理方法同1.2.7节。弃去处理组细胞6孔板中培养液,用1 mL预冷PBS洗涤细胞2次,向6孔板中滴加100 μL含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液后置于冰上,摇床振荡30 min裂解细胞。收集细胞裂解液,4 ℃下12 000 r/min离心15 min,将上清转移至新的EP管,用BCA试剂盒检测蛋白浓度后100 ℃变性10 min。

(2)NLRP3抑制剂MCC950对EVs诱导BMECs炎症反应的影响。将BMECs以4×10^5个/孔接种于6孔板中,过夜贴壁培养至细胞融合度为80%左右时,加入10 μmol/L MCC950处理3 h,弃去培养液,加入含20 μg/mL EVs的DMEM继续处理1 h。以正常BMECs为空白对照组(CK)。同(1)中方法提取蛋白并检测浓度。

(3)Western Blot检测。分别对上述Evs、MCC950处理的BMECs蛋白样品进行Western Blot检测。配制12.5% SDS-PAGE分离凝胶进行蛋白质电泳,蛋白加样量10 μL/孔,电泳后转印PVDF膜,用含50 g/L脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h后。将PVDF膜与NLRP3信号通路相关蛋白一抗在4 ℃孵育过夜,然后将膜与HRP标记的山羊抗兔、山羊抗鼠二抗(1∶10 000倍稀释)室温孵育1 h。最后用ECL发光液对膜上蛋白进行可视化,以GAPDH为内参蛋白,使用Image J软件对蛋白条带灰度值进行分析。

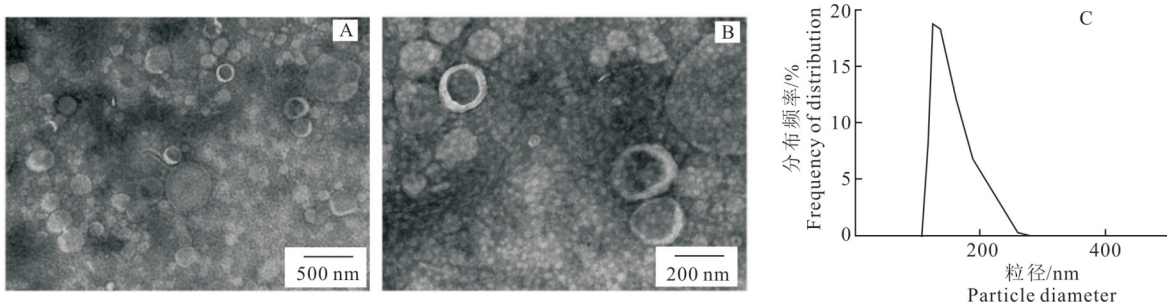
1.3　数据统计分析

采用GraphPad Prism 9软件进行数据处理和统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析法，符合正态分布且两组方差齐时，比较*t*检验。

2　结果与分析

2.1　金黄色葡萄球菌EVs的提取及鉴定

使用差速、超速离心法分离金黄色葡萄球菌EVs后，通过透射电镜（TEM）观察，结果（图1-A，B）显示，金黄色葡萄球菌EVs呈圆形或椭圆形，具有双层膜结构，中间凹陷而边缘清晰，呈典型的杯盘状形态。粒径检测结果（图1-C）显示，EVs粒径为80～320 nm，多集中在100 nm左右，符合革兰氏阳性菌EVs典型的粒径大小。表明本试验成功获得了金黄色葡萄球菌EVs。



A，B. EVs透射电镜观察图像；C. EVs粒径检测。

A，B. EVs transmission electron microscope observation images；C. EVs particle size detection.

图1　金黄色葡萄球菌EVs的鉴定

Fig. 1　Identification of *S. aureus* EVs

2.2　BMECs对金黄色葡萄球菌EVs的内化作用

结果（图2）显示，金黄色葡萄球菌EVs可进入BMECs内，分布在细胞质中，绿色激光下EVs呈绿色荧光，蓝色激光下BMECs核呈蓝色荧光。结果表明，EVs 1 h内即可进入BMECs。

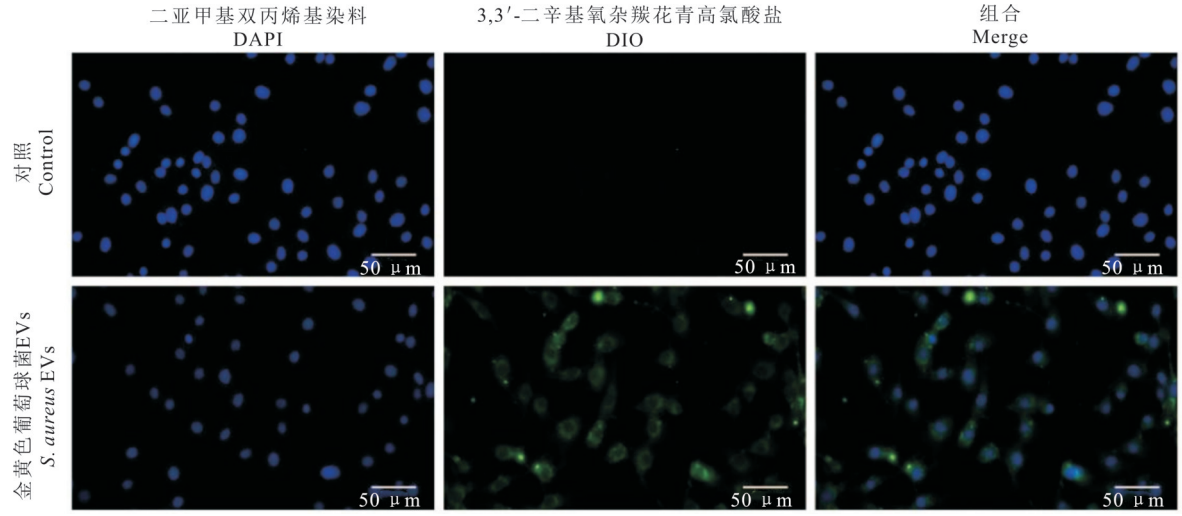


图2　BMECs对金黄色葡萄球菌EVs的内化作用

Fig. 2　Internalisation of *S. aureus* EVs by BMECs

2.3　金黄色葡萄球菌EVs对BMECs增殖活力的影响

用0～25 μg/mL EVs处理BMECs 24 h后，通过CCK-8法检测BMECs的存活率，结果（图3）显示，不同质量浓度的金黄色葡萄球菌EVs对BMECs存活率的影响均无显著差异（$P>0.0.5$）。

2.4　EVs对BMECs炎性因子基因表达的影响

用金黄色葡萄球菌EVs作用BMECs 0，1和3 h后，通过RT-qPCR分析炎性细胞因子（IL-6、TNF-α、IL-18和IL-1β）的基因表达量。结果（图4）显示，*IL-18*、*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*基因mRNA相对表达量在1 h时均较作用前（0 h）极显著上升（$P<0.01$），*IL-18*、*IL-1β*基因mRNA相对表达量在3 h时也较作用前（0 h）分别极显著和显著升高，这表明金黄色葡萄球菌EVs可诱导BMECs发生炎性反应。

2.5 EVs对BMECs NLRP3信号通路相关蛋白表达量的影响

用金黄色葡萄球菌EVs处理BMECs 0,1,3 h后,通过Western Blot分析NLRP3信号通路相关蛋白(NLRP3、caspase1、GSDMD、N-GSDMD、IL-18和IL-1β)的表达量,结果见图5。图5显示,与0 h相比,EVs处理1,3 h BMECs NLRP3信号通路中NLRP3、GSDMD、N-GSDMD、caspase1、IL-18、IL-1β等炎性因子蛋白表达量大多显著或极显著上升,表明金黄色葡萄球菌EVs能通过NLRP3信号通路引起BMECs发生炎性反应。

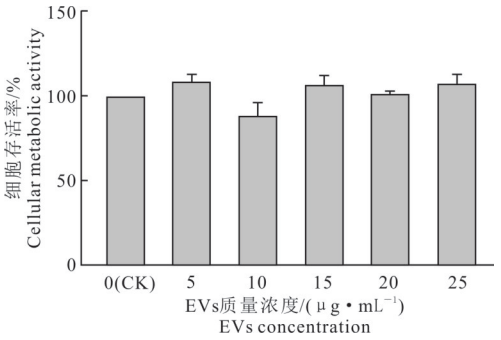
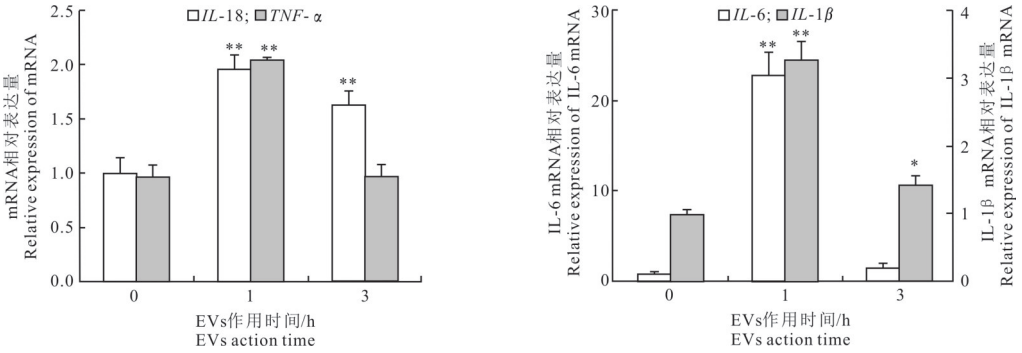


图3 不同质量浓度EVs对BMECs增殖能力的影响

Fig. 3 Effects of different mass concentrations of EVs on the proliferative capacity of BMECs



与0 h组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。图5同。

Compared with the 0 h,* indicates significant difference ($P<0.05$),and ** indicates highly significant difference ($P<0.01$). The same as in Fig. 5.

图4 金黄色葡萄球菌EVs对BMECs炎性因子基因表达量的影响

Fig. 4 Effects of *S. aureus* on the expression of inflammatory factor genes in BMECs

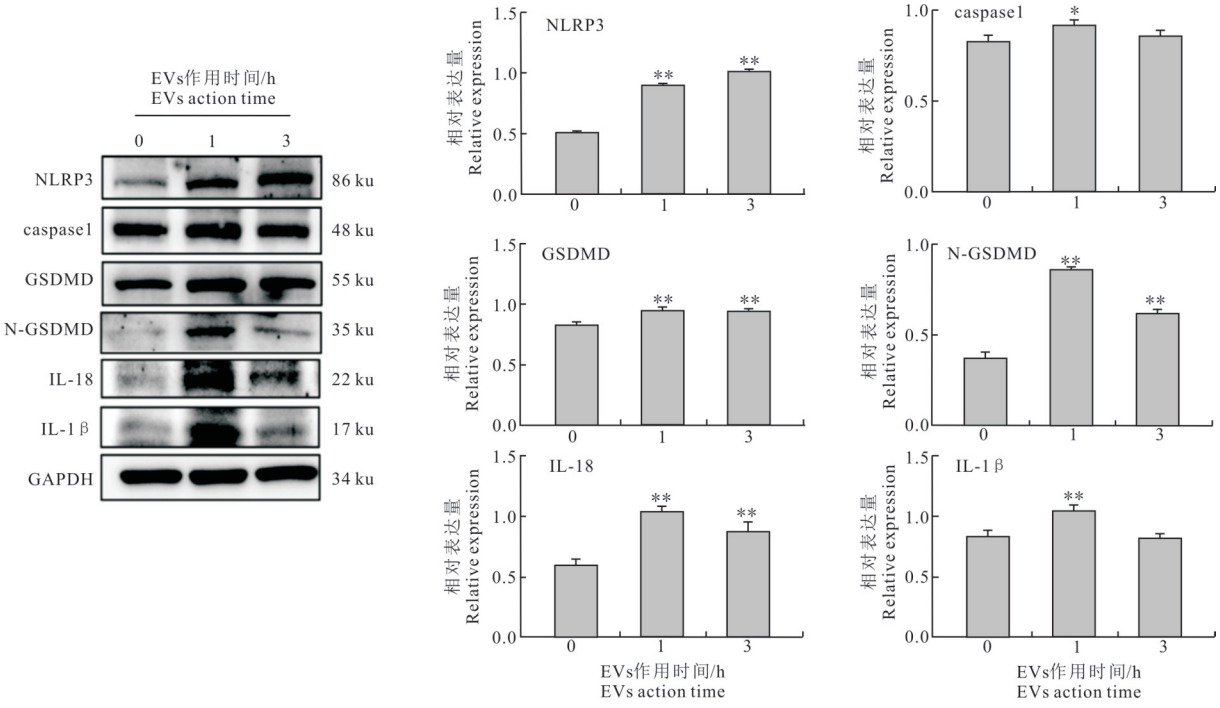
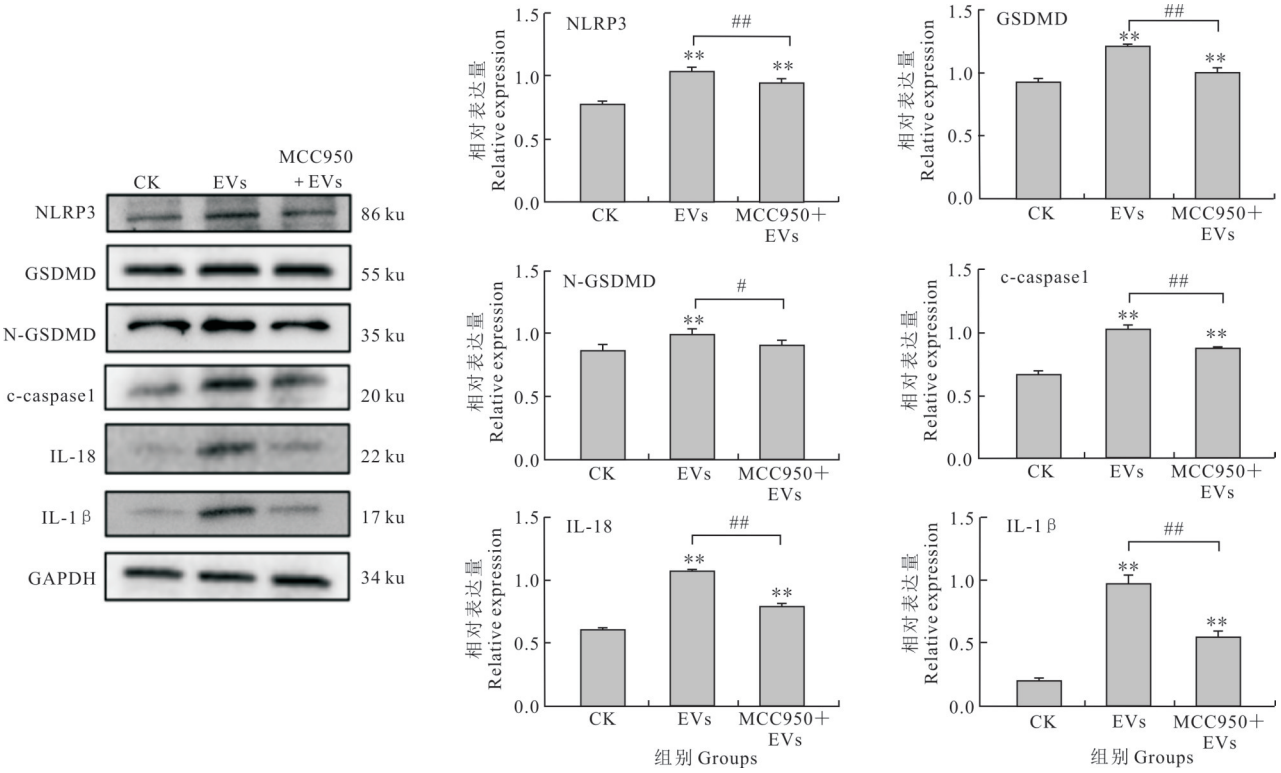


图5 金黄色葡萄球菌EVs对BMECs NLRP3信号通路炎性因子蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effects of *S. aureus* EVs on the expression of inflammatory factor proteins of the NLRP3 signalling pathway in BMECs

2.6　NLRP3 抑制剂对 EVs 诱导 BMECs 炎症反应的影响

采用 Western Blot 试验探究 NLRP3 信号通路蛋白表达情况，结果见图 6。图 6 显示，与对照组相比，EVs 处理组中 NLRP3、GSDMD、N-GSDMD、c-caspase1、IL-18、IL-1β 炎性因子蛋白表达量均极显著上升；与 EVs 处理组相比，MCC950＋EVs 组 BMECs NLRP3 信号通路中 NLRP3、GSDMD、N-GSDMD、c-caspase1、IL-18、IL-1β 炎性因子的蛋白表达量均显著或极显著下降。这表明抑制 NLRP3 炎症小体的激活，会抑制 NLRP3 信号通路相关蛋白的表达水平。该结果进一步证实金黄色葡萄球菌 EVs 是通过 NLRP3 信号通路诱导 BMECs 发生炎性反应的。



与 CK 组相比，*表示差异显著（$P<0.05$），**表示差异极显著（$P<0.01$）；#表示差异显著（$P<0.05$），##表示差异极显著（$P<0.01$）。

Compared with the CK group, * indicates significant difference ($P<0.05$) and ** indicates highly significant difference ($P<0.01$); # indicates significant difference ($P<0.05$), and ## indicates highly significant difference ($P<0.01$).

图 6　NLRP3 抑制剂对 EVs 诱导 BMECs 炎性因子蛋白表达量的影响

Fig. 6　Effects of inhibitor of the NLRP3 signalling pathway on the expression of inflammatory factor proteins induced in BMECs by EVs

3　讨　论

金黄色葡萄球菌是一种兼性胞内寄生菌，可入侵 BMECs 并产生毒力因子，诱导 BMECs 发生炎症反应，是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌之一[15]。而 EVs 是菌体与宿主细胞进行物质交流的重要介质。研究发现，金黄色葡萄球菌 EVs 大小为 20～400 nm，形态为典型的杯状或球形[16]。EVs 能通过外层磷脂双分子层与宿主细胞的质膜进行相互作用，通过内吞作用或膜融合被宿主细胞内化，将其内容物释放到宿主细胞中。RODRIGUEZ 等[7]的研究证明，金黄色葡萄球菌 EVs 可以被 HEp-2 细胞内化，且 EVs 是通过富含胆固醇的膜微域进入宿主细胞，从而将细菌成分运送进去。本研究结果表明，金黄色葡萄球菌在正常增殖过程中会产生膜源性囊泡结构，并且透射电镜和纳米颗粒跟踪分析显示，其形态和纳米尺寸符合革兰氏阳性菌 EVs 的基本特征。EVs 作用 BMECs 1 h 后，即被内化至胞内。

据报道，金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等多种革兰氏阳性菌分泌的 EVs 可诱导巨噬细胞活化并释放炎性细胞因子。THAY 等[17]发现，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 EVs 可将 α-毒素递送至人单核巨噬细胞，导致细胞死亡；另有研究证实，金黄色葡萄球菌 EVs 能诱导宿主细胞产生 IL-6、胸腺基质淋巴

生成素、巨噬细胞炎症蛋白-1α等促炎介质,进而引发特异性皮炎样皮肤炎症反应[18]。本研究发现0~25 μg/mL的EVs对BMECs活性无显著影响,这与TARTAGLIA等[19]的研究结果一致。EVs虽然富含菌体中的脂多糖、脂蛋白以及一些毒力因子,但并非所有的EVs都具有细胞毒性[19-20],这说明EVs的细胞毒性可能与金黄色葡萄球菌本身毒力及其EVs之间的蛋白质组差异相关[21]。

NLRP3炎症小体是天然免疫系统的重要信号通路之一,在机体防御细菌感染的过程中发挥着重要作用。细菌入侵宿主,可激活NLRP3炎症小体,导致细胞膜破裂,释放大量细胞因子,使炎性细胞聚集,从而引发机体的炎症反应。SAENZ-DE-JUANO等[22]研究证实,分离的金黄色葡萄球菌EVs能在体外侵袭原代BMECs,并诱导BMECs中IL-1β、IL-8、TNF-α和防御素β1的转录上调,且蛋白表达量随EVs剂量的增加呈增长趋势,同时能观察到轻微的炎症现象。本研究在此基础上进一步证实,使用金黄色葡萄球菌EVs处理BMECs后,IL-6、TNF-α等炎性因子的基因表达量显著上调,且金黄色葡萄球菌EVs可激活NLRP3信号通路,促进IL-18、IL-1β分泌;而使用NLRP3信号通路抑制剂MCC950预处理后,不仅显著抑制了NLRP3的激活,同时还减少了该信号通路下游炎性因子的分泌。另外,WANG等[13]发现,金黄色葡萄球菌EVs感染能诱导人-单核巨噬细胞中NLRP3信号通路的激活,并上调该信号通路中炎性因子的表达量。上述结果表明,金黄色葡萄球菌EVs可通过NLRP3信号通路引发BMECs的炎症反应。

尽管本研究揭示了金黄色葡萄球菌EVs通过NLRP3通路诱导BMECs炎症的新机制,但仍存在一定局限性,需在未来研究中进一步完善。本试验使用BMECs作为研究对象,虽能模拟细胞层面的炎症反应,但与体内乳腺组织存在差异,后续研究可结合动物模型(如乳腺炎小鼠模型)验证EVs在生理环境下的作用,以明确EVs在介导乳腺炎发生中的作用。此外,EVs中具体激活NLRP3的分子(如核酸、毒素蛋白)尚未明确,未来可通过EVs成分分析(如RNA测序、质谱)和功能缺失试验(如敲低特定分子)进一步解析其致病机制。

4 结 论

金黄色葡萄球菌在正常增殖过程中能够产生并释放EVs,且能在体外被BMECs内化至胞内,但不会对BMECs活性造成炎性损伤。金黄色葡萄球菌EVs能够诱导BMECs释放炎性因子,并通过NLRP3信号通路诱导奶牛乳腺上皮细胞发生炎症。本研究为金黄色葡萄球菌外囊泡在奶牛乳腺炎发生中的作用机制研究提供了思路,同时也为寻找新的奶牛乳腺炎治疗靶点及临床药物开发奠定了基础。

[参考文献]

[1] WANG W, LIN X H, JIANG T, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1123.

[2] MACION A, WYSZYŃSKA A, GODLEWSKA R. Delivery of toxins and effectors by bacterial membrane vesicles[J]. Toxins, 2021, 13(12): 845.

[3] BRIAUD P, CARROLL R K. Extracellular vesicle biogenesis and functions in gram-positive bacteria[J]. Infection and Immunity, 2020, 88(12): e00433-20.

[4] XU Z K, HAO X J, LI M, et al. *Rhodococcus equi*-derived extracellular vesicles promoting inflammatory response in macrophage through TLR2-NF-κB/MAPK pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 9742.

[5] Da Silva D, Gonzalez C, Lorca G. Internalization of extracellular vesicles from *Lactobacillus johnsonii* N6.2 elicit an RNA sensory response in human pancreatic cell lines[J]. Journal of Extracellular Biology, 2023, 2(7): e101.

[6] GURUNG M, MOON D C, CHOI C W, et al. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27958.

[7] RODRIGUEZ B V, KUEHN M J. *Staphylococcus aureus* secretes immunomodulatory RNA and DNA *via* membrane vesicles[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 18293.

[8] FU J N, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Annual Review of Immunology, 2023, 41: 301-316.

[9] ELLIOTT E I, SUTTERWALA F S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly[J]. Immunological Reviews, 2015, 265(1): 35-52.

[10] 熊诗强,周其全. NLRP3炎性小体在缺氧性肠道应激致肺损伤中的作用及机制[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(11): 912-917.
XIONG S Q, ZHOU Q Q. Role of NLRP3 inflammasomes in lung injury induced by gut hypoxic stress and its mechanism[J]. Medical Journal of Chinese PLA, 2014, 39(11): 912-917.

[11] 黄晨恺,甘达凯,张望,等. 熊果酸对肝纤维化大鼠NOX2/ROS/NLRP3炎性小体活化的影响[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4): 485-491.
HUANG C K, GAN D K, ZHANG W, et al. Effects of ursolic

acid on activation of NOX2/ROS/NLRP3 inflammasome in liver fibrosis rats[J]. Basic & Clinical Medicine, 2018, 38(4): 485-491.

[12] 葛鑫，陈潇菲. β-胡萝卜素调节NLRP3炎症小体抑制金黄色葡萄球菌性乳腺炎的实验研究[J]. 新疆医科大学学报，2022，45(6)：623-628.
GE X, CHEN X F. Inhibitory effect on β-carotene of *Staphylococcus aureus* mastitis by regulating NLRP3 inflammasome [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2022, 45(6): 623-628.

[13] WANG X Z, LIU M C, GENG N, et al. *Staphylococcus aureus* mediates pyroptosis in bovine mammary epithelial cell *via* activation of NLRP3 inflammasome[J]. Veterinary Research, 2022, 53(1): 10.

[14] WANG X G, EAGEN W J, LEE J C. Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(6): 3174-3184.

[15] ALEKSEEVA L, RAULT L, ALMEIDA S, et al. *Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63279.

[16] RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. The Journal of Cell Biology, 2013, 200(4): 373-383.

[17] THAY B, WAI S N, OSCARSSON J. *Staphylococcus aureus* α-toxin-dependent induction of host cell death by membrane-derived vesicles[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54661.

[18] HONG S W, KIM M R, LEE E Y, et al. Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation[J]. Allergy, 2011, 66(3): 351-359.

[19] TARTAGLIA N R, BREYNE K, MEYER E, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles elicit an immunostimulatory response *in vivo* on the murine mammary gland[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 277

[20] JUN S H, LEE J H, KIM S I, et al. *Staphylococcus aureus*—derived membrane vesicles exacerbate skin inflammation in atopic dermatitis [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2017, 47(1): 85-96.

[21] JEON H, OH M H, JUN S H, et al. Variation among *Staphylococcus aureus* membrane vesicle proteomes affects cytotoxicity of host cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 93: 185-193.

[22] SAENZ-DE-JUANO M D, SILVESTRELLI G, WEBER A, et al. Inflammatory response of primary cultured bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles[J]. Biology, 2022, 11(3): 415.

（责任编辑：马秋明）

（上接第 10 页）

[25] THUCHAPOL K, AISAWAN R, PATTAREEYA P. The optimum dose and period of 17α-methyltestosterone immersion on masculinization of red tilapia (*Oreochromis* spp.)[J]. Aquaculture and Fisheries, 2023, 8(2): 174-179.

[26] ZHOU Q, WANG Y, GUO Y W, et al. A comparative transcriptome analysis reveals the effects of letrozole and 17α-methyltestosterone on the expression of reproductive-related genes in Golden Pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Fishes, 2025, 10(1): 21.

[27] CHI M L, JIA Y Y, CHENG S, et al. Effects of 17α-methyltestosterone on the growth performance, development, and reproduction of gynogenetic topmouth culter (*Culter alburnus* Basilewsky)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2019, 35: 444-456.

[28] CHEN Q Q, YANG D Y, CHEN M Q, et al. Smad4 and FoxH1 potentially interact to regulate *cyp19a1a* promoter in the ovary of ricefield eel (*Monopterus albus*)[J]. Biology of Sex Differences, 2024, 15: 60.

[29] POGODA H M, SOLNICA K L, DRIEVER W, et al. The zebrafish forkhead transcription factor FoxH1/Fast1 is a modulator of Nodal signaling required for organizer formation[J]. Current Biology, 2000, 10(17): 1041-1049.

[30] SIROTKIN H I, GATES M A, KELLY P D, et al. *fast*1 is required for the development of dorsal axial structures in zebrafish[J]. Current Biology, 2000, 10(17): 1051-1054.

（责任编辑：马秋明）