网络出版时间:2026-02-04 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.08.002

*METTL3*基因在奶牛乳腺上皮细胞炎症反应中的表达及功能分析

王正兴[1,2],李彦龙[1,2],邢明旭[1,2],秦铭[1,2],王玉梅[1,2],王兴平[1,2],罗仍卓么[1,2]
(1 宁夏大学 动物科技学院,宁夏 银川 750021;2 宁夏回族自治区反刍动物分子细胞育种重点实验室,宁夏 银川 750021)

[摘 要] 【目的】探讨甲基转移酶样蛋白3(methyltransferase-like 3,METTL3)基因在奶牛乳腺上皮细胞(bovin mammary epithelial cells, bMECs)炎症反应中的表达及功能,为解析奶牛乳房炎分子调控机制奠定基础。【方法】采用生物信息学方法分析奶牛METTL3蛋白质的结构特征;采用50 μg/mL的脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)构建bMECs炎症模型,在此基础上通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测LPS诱导不同时间点(0,3,6,12和24 h)炎症因子基因(*IL*-6和*IL*-8)及*METTL3*基因的表达水平,并利用CCK-8和RT-qPCR检测干扰*METTL3*基因后bMECs的细胞活力、炎症因子、细胞增殖及凋亡相关基因表达的变化。【结果】生物信息学分析结果表明,*METTL3*基因的开放阅读框(ORF)长度为1 743 bp,编码一个由580个氨基酸组成的蛋白质,该蛋白存在59个潜在的翻译后修饰位点,可能通过表观转录调控机制参与细胞炎症进程。在LPS诱导bMECs的不同时间点,*IL*-6和*IL*-8表达量随诱导时间延长而升高,于24 h达到表达峰值($P<0.01$),表明成功建立了bMECs炎症模型。与0 h相比,*METTL3*在LPS刺激3,6,12和24 h的表达水平均极显著上调($P<0.01$),其中6 h表达量最高,呈现炎症早期响应特征。在干扰*METTL3*表达后,bMECs内促炎因子*IL*-6的表达水平极显著下调($P<0.01$),*IL*-8显著下调($P<0.05$),*IL*-1β亦呈现下降趋势,细胞增殖基因*CDK2*、*CDK4*和*PCNA*的表达水平均极显著升高($P<0.01$),而细胞凋亡基因*CASP3*、*CASP9*和*BAX*的表达水平均极显著降低($P<0.01$)。干扰*METTL3*后,bMECs细胞活力显著升高($P<0.05$)。【结论】*METTL3*通过加剧炎症反应、促进细胞凋亡并抑制细胞增殖而加重LPS诱导的bMECs炎症损伤,提示*METTL3*是调控奶牛乳腺炎进程的关键分子。

[关键词] 奶牛;奶牛乳腺上皮细胞;炎症反应;*METTL3*
[中图分类号] S858.23 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)08-0010-08

Analysis on the expression and function of *METTL3* gene in the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells

WANG Zhengxing[1,2], LI Yanlong[1,2], XING Mingxu[1,2], QIN Ming[1,2], WANG Yumei[1,2], WANG Xingping[1,2], Luoreng Zhuoma[1,2]
(1 *School of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*; 2 *Key Laboratory of Molecular Cell Breeding of Ruminants, Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the expression and function of methyltransferase-like 3 (*METTL3*) in the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells (bMECs), so as to lay a foundation for elucidating the molecular regulatory mechanisms of bovine mastitis. 【Method】 The structure characteristics of the bovine METTL3 protein were analyzed by using bioinformatics methods. An inflammatory

[收稿日期] 2025-06-21 [修回日期] 2025-09-28
[基金项目] 国家自然科学基金项目(32460826);国家现代农业产业技术体系项目(CARS-36);宁夏自然科学基金项目(2024AAC03116)
[作者简介] 王正兴(2001—),男,宁夏吴忠人,在读硕士,主要从事奶牛乳房炎分子抗性育种研究。E-mail:wangzhengxing0707@163.com
[通信作者] 罗仍卓么(1978—),女(藏族),青海西宁人,副教授,博士生导师,主要从事奶牛基因表达调控与分子育种研究。E-mail:luorenzhuoma@nxu.edu.cn

model of bMECs was established based on 50 μg/mL LPS treatment. On this basis, RT-qPCR was used to detect the expression levels of inflammatory factors (*IL*-6 and *IL*-8) and the *METTL3* gene at different time points (0, 3, 6, 12, and 24 h) after LPS induction. CCK-8 assay and RT-qPCR were employed to examine cell viability, the expression of inflammatory factors, and the expression of cell proliferation and apoptosis-related genes after *METTL3* knockdown.【Result】Bioinformatics analysis results indicated that the open reading frame (ORF) of the *METTL3* gene was 1 743 bp in length, encoding a protein of 580 amino acids. This protein contained 59 potential post-translational modification sites and might be involved in cellular inflammatory processes through epitranscriptional regulatory mechanisms. At different time points after LPS induction, the expression levels of *IL*-6 and *IL*-8 continued to increase over time, peaking at 24 h ($P<0.01$), indicating the successful establishment of an inflammatory model of bMECs. The expression level of *METTL3* was highly significantly upregulated at 3, 6, 12, and 24 h after LPS stimulation ($P<0.01$) compared with that at 0 h, with the highest expression level observed at 6 h, demonstrating the characteristic of early inflammatory response. After *METTL3* knockdown, the expression level of the pro-inflammatory factor *IL*-6 was highly significantly downregulated ($P<0.01$), *IL*-8 was significantly downregulated ($P<0.05$), and *IL*-1β also showed a downward trend. The expression levels of cell proliferation-related genes *CDK2*, *CDK4*, and *PCNA* were highly significantly increased ($P<0.01$), while the expression levels of apoptosis-related genes *CASP3*, *CASP9*, and *BAX* were highly significantly decreased ($P<0.01$). In addition, cell viability was significantly increased after *METTL3* knockdown ($P<0.05$).【Conclusion】*METTL3* aggravates LPS-induced inflammatory injury in bMECs by exacerbating the inflammatory response, promoting cellular apoptosis, and inhibiting cell proliferation. This finding identifies *METTL3* as a key regulator in the progression of bovine mastitis.

Key words: dairy cows; bovin mammary epithelial cells; inflammatory response; *METTL3*

奶牛乳房炎是全球乳业面临的最具破坏性的疾病之一，其发病机制涉及病原-宿主-环境的复杂互作网络。流行病学数据显示，我国规模化牧场乳房炎发病率为46%～70%，夏季高发期可导致单产下降10%～15%，并伴随20%的奶牛被淘汰[1-2]。值得注意的是，奶牛乳房炎约60%的病例为亚临床型，其特征性的体细胞数（somatic cell count，SCC）升高与乳汁成分改变不仅严重影响乳的加工特性，更可能通过携带耐药菌株威胁食品安全[3-5]。奶牛乳房炎的发生主要是由病原体入侵乳房所导致[6-7]。在病原学维度，以大肠杆菌（*Escherichia coli*）为代表的革兰氏阴性菌是奶牛乳房炎的核心病原[8-9]。这些病原体通过机械挤奶造成的乳头导管微损伤或环境污染物侵入乳腺组织后，其特异性毒力因子启动级联致病机制，大肠杆菌释放的脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）可与奶牛乳腺上皮细胞表面Toll样受体4（toll-like receptor 4，TLR4）结合，触发髓样分化初级反应蛋白88（myeloid differentiation primary response 88，MyD88）依赖的核因子κB（nuclear factor kappa B，NF-κB）信号通路活化，诱导白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-alpha，TNF-α）等促炎因子释放[10-12]。值得注意的是，病原体间存在协同致病现象，如停乳链球菌（*Streptococcus dysgalactiae*）分泌的透明质酸酶可降解细胞外基质，促进其他病原菌的深层组织定植[13]。

近年来，RNA表观遗传学调控在炎症性疾病防控中的作用逐渐为人们所重视，其中N6-甲基腺苷（m6A）修饰作为最丰富的转录后修饰形式，通过动态调控RNA代谢参与炎症信号网络的重编程[14]。甲基转移酶样蛋白3（methyltransferase-like 3，METTL3）作为m6A修饰系统的核心催化元件，其功能已在人类疾病模型中取得突破性发现。例如，*METTL3*通过介导m6A修饰调控细胞自噬，促进成纤维细胞样滑膜细胞的衰老与骨关节炎进展，这为理解其在关节炎症中的分子作用提供了直接证据[15]。这一发现提示，*METTL3*可能通过类似的表观遗传学途径参与炎症相关信号通路的调控。此外，临床研究显示，*METTL3*在肺腺癌组织中的高表达与肿瘤细胞的糖代谢活性（18F-FDG最大标准摄取值）呈正相关[16]，表明*METTL3*可能通过调控细胞能量代谢影响炎症微环境。这些发现提示，*METTL3*可能是连接表观遗传调控与炎症代谢重编程的关键节点，可能在奶牛乳房炎中具有潜在的

调控作用。

目前,*METTL3*基因的表达及功能在奶牛或其他反刍动物中尚鲜见研究报道。因此,本研究拟通过生物信息学分析、炎症模型构建及功能验证试验,探究*METTL3*在奶牛乳腺上皮细胞炎症反应中的表达变化及其对细胞增殖和凋亡的调控作用,为解析奶牛乳房炎的分子调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

奶牛乳腺上皮细胞(bovin mammary epithelial cells, bMECs),由宁夏回族自治区反刍动物分子细胞育种重点实验室保存,细胞已经过形态与纯度鉴定[17]。DMEM/F-12培养基(货号LA1320)购自Hyclone公司;胎牛血清(FBS,货号S9029)购自BI公司;2×M5 HiPer SYBR Premix EsTaq(货号06366546001)购自北京聚合美生物科技有限公司;PrimeScript RT逆转录试剂盒(货号RR047Q)和TRIzol试剂(货号9109)均购自Takara公司;X-tremeGENE HP DNA转染试剂(货号06366546001)购自Sigma-Aldrich公司;CCK-8检测试剂盒(货号C0038)购自上海碧云天生物科技有限公司;*METTL3*基因siRNA干扰片段由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。多功能酶标仪、普通PCR仪和CFX96 Touch RT-qPCR仪均购自Bio-Rad公司。

1.2 *METTL3*基因的生物信息学分析

根据GenBank数据库中的*METTL3*基因序列(GenBank登录号:NM 001102238.2),利用ORF Finder(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)在线软件预测基因的开放阅读框,并推导其所编码的氨基酸序列;利用在线工具String(https://cn.string-db.org/)进行METTL3蛋白的分子互作网络分析。

1.3 bMECs炎症模型构建

将液氮中冻存的bMECs取出,立即放入37 ℃水浴锅中轻轻晃动解冻。将解冻后的bMECs无菌操作接种至含有体积分数10%胎牛血清(FBS)的DMEM/F-12细胞培养基中,置于37 ℃,体积分数5% CO_2和100%饱和湿度的培养箱中培养。在单层细胞融合达70%时,利用LPS(终质量浓度为50 μg/mL)诱导bMECs,使其产生炎症反应,构建炎症细胞模型。在LPS诱导的第0,3,6,12和24 h时分别收集细胞,用于RNA提取。

1.4 *METTL3*干扰片段的合成及转染bMECs细胞

合成奶牛*METTL3*基因的特异性干扰片段(正义链:5′-AGGAGUUGAUCGAAGUAAATT-3′;反义链:5′-UUUACUUCGAUCAACUCCUTT-3′)。细胞转染方法:将生长状态良好且无污染的bMECs接种至6孔细胞培养板中,当单层细胞融合达70%时,配制甲液[si-干扰组(si-METTL3):5 μL干扰片段+100 μL OPTI;NC组(si-NC):5 μL si-NC+100 μL OPTI]和乙液[3 μL X-tremeGENE HP转染试剂+100 μL OPTI];甲液和乙液均静置5 min后等体积混合,混合液静置20 min后加入到bMECs中,每组进行3次重复。转染42 h后,加入LPS诱导bMECs发生炎症反应,转染48 h时收集细胞进行RNA提取。

1.5 RNA提取及逆转录

收集经过处理的bMECs,加入Trizol裂解后经氯仿分层、异丙醇沉淀及体积分数75%乙醇洗涤,最终用RNase-free水溶解。使用多功能酶标仪测定RNA浓度及纯度(OD_{260}/OD_{280}为1.8~2.0),1%琼脂糖凝胶电泳验证其完整性。取1 μg RNA,采用PrimeScript RT试剂盒反转录为cDNA。

1.6 相关基因表达水平的实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测

以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因作为内参基因,采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测*METTL3*、炎症相关基因(*IL*-6、*IL*-8、*IL*-1β)、细胞增殖标志基因(*CDK2*、*CDK4*、*PCNA*)和细胞凋亡标志基因(*CASP3*、*CASP9*、*BAX*)mRNA表达水平,试验所用引物序列见表1。以逆转录得到的cDNA为模版,利用SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ qPCR试剂盒检测相关基因的表达量。每个样本均进行3个生物学和3个技术重复,利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达量。

1.7 细胞活力CCK-8法检测

采用CCK-8法(cell counting kit-8)检测细胞增殖活性。当bMECs细胞融合度达90%时,以1×10^4个/孔的密度接种于96孔板,细胞贴壁后按试验设计进行转染处理。转染48 h后,每孔加入10 μL CCK-8反应液,继续于37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱孵育1 h。利用多功能酶标仪测定450 nm波长的吸光度(OD_{450})。每组设3个生物学重复,结果取平均值。

表 1　试验所用的引物序列

Table 1　Primers used in the study

基因名称 Gene name	引物序列（5'→3'） Primer sequence（5'→3'）	产物长度/bp Product length
METTL3	F：CCACTCTTGTGACCTATGC，R：GCAATAGTCCCTGTACCTC	98
IL-6	F：CACTCCATTCGCTGTCT，R：GTGTCTCCTTGCTGCTT	227
IL-8	F：ACACATTCCACACCTTTCCAC，R：ACCTTCTGCACCCACTTTTC	149
IL-1β	F：CAACCGTACCTGAACCC，R：GACACCACCTGCCTGAA	193
CASP3	F：AAGATTTAGTGCCGATGC，R：GACCACCAAGTTCTAGGATA	175
CASP9	F：CCTGCCTTACCATTCACC，R：GCATTCTGCTCCTCCTCC	205
CDK2	F：GATGGACGGAGCTTGTTATCG，R：ATCACACTCACACTGGAGAAGA	182
CDK4	F：CCTTCATGCCAACTGCATCG，R：CCTTCATGCCAACTGCATCG	148
PCNA	F：GAACCTCACCAGCATGTCCA，R：ACGTGTCCGCGTTATCTTCA	86
BAX	F：GCAAACTGGTGCTCAAGG，R：GCACTCCAGCCACAAAG	189
GAPDH	F：GGCATCGTGGAGGGACTTATG，R：GCCAGTGAGCTTCCCGTTGAG	186

1.8　数据统计分析

试验数据分析采用标准化流程。所有试验均独立重复 3 次，数据以“平均值±标准差（Mean±SD）”表示。使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件对所得数据进行独立样本 *t* 检验，$P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异极显著。

2　结果与分析

2.1　METTL3 蛋白质的理化性质、亲疏水性和磷酸化位点分析

通过生物信息学分析发现，*METTL3* 基因的开放阅读框（ORF）长度为 1 743 bp，编码一个由 580 个氨基酸组成的蛋白质，该蛋白包含一个甲基转移酶结构域（图 1）。NetPhos 3.0 磷酸化修饰预测结果表明，METTL3 蛋白存在 59 个潜在的翻译后修饰位点，其中包括 32 个丝氨酸（Ser）、5 个苏氨酸（Thr）和 22 个酪氨酸（Tyr）残基，这些修饰位点主要富集于 N 端结构域（1～200 氨基酸）和甲基转移酶催化核心区（300～400 氨基酸），提示磷酸化修饰可能通过构象调节影响 METTL3 的酶活性和底物的识别能力。上述参数为深入解析 METTL3 的结构稳定性及生物学功能提供了重要理论依据。

2.2　METTL3 蛋白质分子互作网络分析

利用 STRING 数据库（v11.5，置信度＞0.7）构建 METTL3 蛋白质的互作网络，结果显示，METTL3 作为核心节点，可能与 m6A 甲基化复合体组分 METTL14、去甲基化酶 ALKBH5 及 m6A 阅读蛋白 YTHDF1 等蛋白质形成功能模块（图 2）。值得注意的是，该网络还包含锌指 CCCH 型结构域蛋白 13（ZC3H13），该蛋白可调控 m6A 甲基转移酶复合物的核定位，影响 RNA 修饰，可能在炎症反应和免疫调控中起重要作用。以上结果提示，METTL3 可能通过表观转录调控参与细胞炎症反应进程。

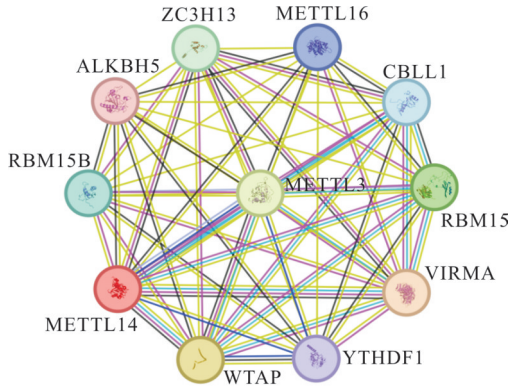


红线所标记区域为 METTL3 蛋白的甲基转移酶结构域；●. 终止密码子。

The region marked by the red line indicates the methyltransferase domain of the METTL3 protein; ●. Termination codon.

图 1　*METTL3* 开放阅读框分析

Fig. 1　Open reading frame analysis of *METTL3*



METTL3. 甲基转移酶样蛋白3;METTL14. 甲基转移酶样蛋白14;WTAP. Wilms肿瘤1关联蛋白;VIRMA. 病毒样m6A甲基转移酶相关蛋白;RBM15B. RNA结合基序蛋白15;ZC3H13. 锌指CCCH型结构域蛋白13;CBLL1. Cbl原癌基因样蛋白1;YTHDF1. YTH N6-甲基腺苷RNA结合蛋白1;ALKBH5. AlkB同源物5;METTL16. 甲基转移酶样蛋白16。

METTL3. Methyltransferase-like 3;METTL14. Methyltransferase-like 14;WTAP. Wilms tumor 1-associated protein;VIRMA. Vir-like m6A methyltransferase-associated protein;RBM15B. RNA binding motif protein 15;ZC3H13. Zinc finger CCCH-type containing 13;CBLL1. Cbl proto-oncogene like 1;YTHDF1. YTH N6-methyladenosine RNA binding protein 1;ALKBH5. AlkB homolog 5;METTL16. Methyltransferase-like 16 .

图2 METTL3蛋白质互作网络

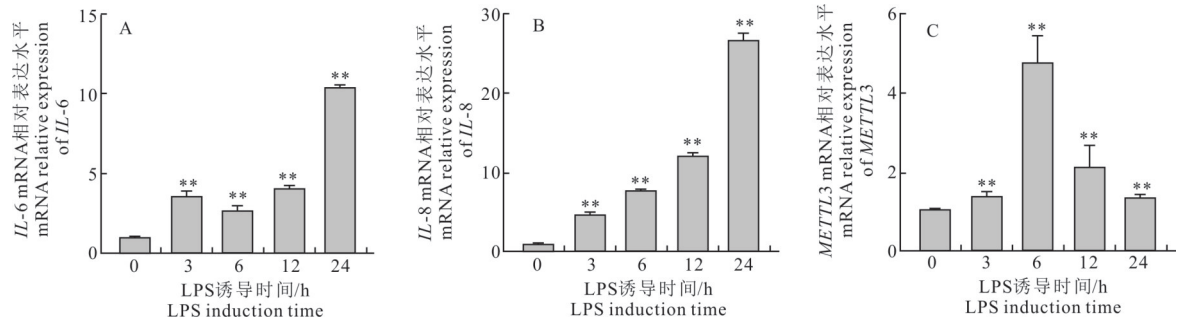
Fig. 2 METTL3 protein interaction network

2.3 炎症模型的建立以及*METTL3*在炎症模型中的表达模式

为了验证LPS诱导的bMECs炎症模型的可靠性,采用RT-qPCR技术检测LPS诱导不同时间bMECs的炎症因子*IL*-6和*IL*-8的mRNA表达水平。结果显示,与0 h相比,炎症因子*IL*-6和*IL*-8在LPS诱导后3,6,12和24 h的表达量均极显著上调($P<0.01$)(图3-A,B),表明成功构建了bMECs炎症模型。通过RT-qPCR检测*METTL3*在炎症细胞模型中的时序表达,结果显示,与对照组(0 h)相比,*METTL3*在LPS诱导3,6,12和24 h时的mRNA表达量均极显著上调($P<0.01$),其中6 h表达量最高,为对照组的4.85倍(图3-C),呈现炎症早期响应特征。由于*METTL3*在LPS诱导6 h时的表达量最高,后续试验LPS诱导时间定为6 h。上述结果表明,*METTL3*可能在bMECs炎症反应中具有潜在的调控作用。

2.4 干扰*METTL3*对LPS诱导bMECs炎症因子表达的影响

干扰*METTL3*对LPS诱导bMECs炎症因子表达的影响结果见图4。



图柱上标*表示差异显著($P<0.05$),标**表示差异极显著($P<0.01$)。

* indicates significant difference ($P<0.05$), and ** indicates highly significant difference ($P<0.01$).

图3 bMECs炎症模型建立以及*METTL3*在细胞炎症中的表达模式

Fig. 3 Construction of bMECs inflammation model and expression pattern of *METTL3* in the inflammatory cells

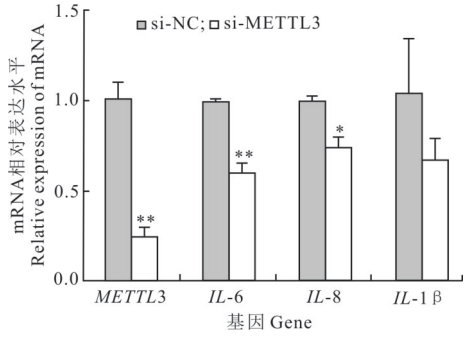


图4 干扰*METTL3*对LPS诱导bMECs中炎症因子表达的影响

Fig. 4 Effects of *METTL3* knockdown on the expression of inflammatory factors in LPS-induced bMECs

由图4可知,si-METTL3干扰组bMECs中*METTL3*的表达量较si-NC对照组极显著降低($P<0.01$),为对照组的26%,表明通过瞬时转染si-METTL3可使bMECs内的*METTL3*受到抑制,基因干扰效率良好,说明该细胞转染体系和条件可用于后续的试验。通过qPCR检测干扰*METTL3*后炎症因子*IL*-6、*IL*-8和*IL*-1β mRNA的表达水平。结果显示,si-METTL3干扰组中炎症因子*IL*-6和*IL*-8 mRNA的表达量较si-NC对照组分别极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)下降,为对照组的56%和77%;*IL*-1β mRNA有下降趋势,但差异不显著

（$P>0.05$）（图 4）。上述结果表明，干扰 *METTL3* 可抑制 bMECs 中炎症因子的表达，从而缓解 bMECs 炎症反应，提示 *METTL3* 可促进 LPS 诱导的 bMECs 炎症反应。

2.5　干扰 *METTL3* 对 LPS 诱导的 bMECs 细胞增殖和活力的影响

为探究干扰 *METTL3* 对 LPS 诱导的 bMECs 的细胞增殖和活力的影响，本研究通过 RT-qPCR 检测干扰 *METTL3* 后细胞增殖标志基因 *CDK2*、*CDK4* 和 *PCNA* mRNA 的表达水平，并采用 CCK-8 试验检测细胞活力。结果（图 5）表明，干扰组 si-METTL3 中细胞增殖标志基因 *CDK2*、*CDK4* 和 *PCNA* mRNA 的表达量较 si-NC 对照组极显著升高，分别为对照的 2.39 倍、1.51 倍和 1.88 倍（$P<0.01$）。干扰组 si-METTL3 中细胞活力（OD_{450} 为 0.657）较对照组（OD_{450} 为 0.566）显著增加，是对照的 1.16 倍（$P<0.05$）。上述试验结果表明，干扰 *METTL3* 可促进 bMECs 的增殖，提高 bMECs 细胞活力。

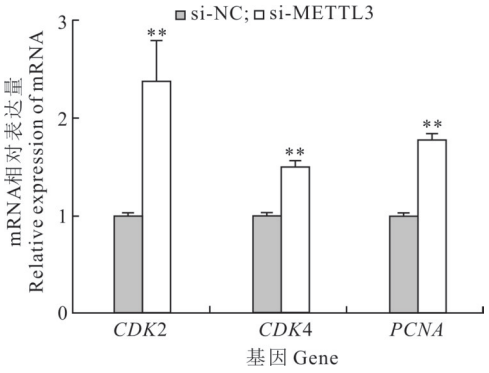


图 5　干扰 *METTL3* 对 LPS 诱导的 bMECs 细胞增殖标志基因表达的影响

Fig. 5　Effects of *METTL3* knockdown on proliferation marker gene expression in LPS-induced bMECs

2.6　干扰 *METTL3* 对 LPS 诱导的 bMECs 凋亡的影响

为探究干扰 *METTL3* 对 LPS 诱导的 bMECs 细胞凋亡的影响，本研究利用 RT-qPCR 技术检测了干扰 *METTL3* 后细胞凋亡标志基因 *CASP3*、*CASP9* 和 *BAX* mRNA 的表达水平，结果显示，干扰组 si-METTL3 中细胞凋亡标志基因 *CASP3*、*CASP9* 和 *BAX* mRNA 的表达量较 si-NC 对照组均极显著下调（$P<0.01$），分别为对照组的 51%，60% 和 38%（图 6）。结果表明，干扰 *METTL3* 可抑制 LPS 诱导炎症的 bMECs 细胞凋亡，从而缓解 bMECs 的炎症反应。

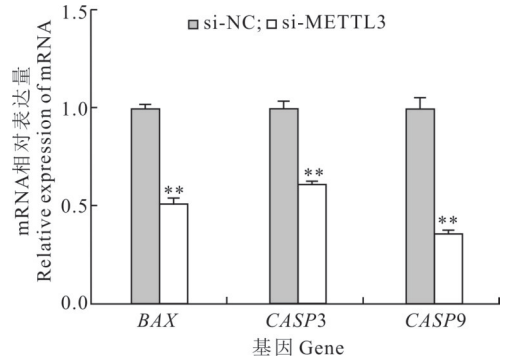


图 6　干扰 *METTL3* 对 LPS 诱导的 bMECs 细胞凋亡标志基因 mRNA 表达的影响

Fig. 6　Effects of *METTL3* knockdown on apoptosis marker gene expression in LPS-induced bMECs

3　讨　论

奶牛乳房炎是奶牛乳腺组织受物理损伤、细菌感染和化学刺激后产生的炎症性疾病，是奶产业中最为流行和常见的炎症性疾病，是制约奶业发展的主要原因之一[18-19]。奶牛乳房炎病理机制不仅涉及病原体侵袭，更与宿主免疫调控网络的多层次交互作用密切相关[20-22]。在病原体侵入奶牛乳腺组织后，乳腺上皮细胞和免疫细胞通过模式识别受体（如 Toll 样受体）感知外来病原，并迅速激活相关信号通路，启动宿主防御机制[23-25]。然而，这种防御机制在早期有助于控制感染，但若失控或过度活化，则会导致炎症反应过度，进而加剧奶牛乳腺组织损伤和功能障碍[9,26]。因此，挖掘和阐明基因在奶牛乳腺炎症中的调控作用，对于奶牛乳房炎抗病分子育种尤为重要。

本研究结果表明，*METTL3* 是 LPS 诱导炎症的早期响应因子（表达峰值为 6 h，早于炎症因子峰值 24 h 以上），其通过影响炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡这 3 个关键过程，深度参与乳腺炎病理进程。生物信息学分析提示，*METTL3* 可能通过磷酸化修饰发挥动态调控功能，其 59 个潜在磷酸化位点（Ser 32/Thr 5）的发现提示，当 TLR4 识别 LPS 激活下游激酶级联时，METTL3 可能通过磷酸化修饰实现酶活性的动态调节，这种翻译后修饰机制使其成为连接病原识别与表观转录调控的关键分子节点。在分子作用方面，本研究通过 RNAi 试验发现，*METTL3* 是一个促炎因子，可通过促进 *IL*-6、*IL*-8 及 IL-1β 等主要炎症因子的表达加剧炎症反应，这与 HAN 等[27]的研究结果相似。值得注意的是，这种调控可能具有双重机制：一方面 *METTL3* 通过

m6A修饰直接增强炎症因子mRNA稳定性[28],另一方面通过修饰炎症通路关键分子(如TRAF6/MyD88)的mRNA间接放大NF-κB信号[29]。IL-6作为急性期炎症反应的核心介质[30],其受*METTL3*调控的机制为理解乳腺菌群失调与炎症持续化提供了新的表观遗传视角,提示致病菌可能通过激活*METTL3*而促进炎性反应。

在细胞增殖调控方面,本研究发现干扰*METTL3*可使*CDK2*、*CDK4*和*PCNA*的表达量显著上调,表明*METTL3*具有抑制细胞周期进程的作用。*CDK2*作为DNA损伤修复的关键启动因子[31-32],其表达升高暗示*METTL3*敲低可能通过维持基因组稳定性增强组织修复能力。在凋亡调控方面,本试验发现干扰*METTL3*可使*BAX*、*CASP3*和*CASP9*的表达下调,表明*METTL3*在线粒体凋亡通路中发挥重要作用。有文献报道,*METTL3*通过调控促凋亡基因表达诱导线粒体膜电位崩溃,而干扰该基因则可有效阻断Caspase激活级联反应,该机制对炎症压力下上皮屏障完整性的维持具有重要的生理意义[33-34]。这种既调控免疫应答又决定细胞存活的特性,使*METTL3*成为乳腺炎进程中连接组织损伤与修复的分子节点。

综上,*METTL3*通过调控LPS诱导的bMECs炎症反应,在奶牛乳腺炎发生发展中发挥着重要作用。本研究表明,*METTL3*是奶牛乳房炎中潜在的干预靶点,这为深入理解奶牛乳腺炎的分子调控机制提供了新的依据,并为奶牛抗乳房炎的分子育种提供了理论基础。但是,*METTL3*的分子调控机制还有待于进一步研究,

4 结 论

*METTL3*表达在LPS诱导的bMECs炎症中显著上调,干扰*METTL3*可以抑制促炎因子*IL-6*、*IL-8*和*IL-1β*表达,同时下调凋亡基因*BAX*、*CASP3*和*CASP9*的表达,并促进增殖基因*CDK2*、*CDK4*和*PCNA*表达及细胞活力,最终实现对bMECs炎症损伤的缓解,结果提示*METTL3*可能是缓解奶牛乳房炎的分子靶点。本研究结果为解析奶牛乳房炎的分子调控网络奠定了基础。

[参考文献]

[1] 叶雯,麻柱,俞英,等. 我国奶牛乳房炎发病现状及防治措施[J]. 中国畜牧杂志,2023,59(9):343-348.
YE W MA Z,YU Y,et al. Current situation of the incidence of mastitis in dairy cows in China and preventive measures[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry,2023,59(9):343-348.

[2] 张哲,李新圃,杨峰,等. 奶牛隐性乳房炎综合防制措施的研究与应用[J]. 中国兽医学报,2018,38(3):598-601.
ZHANG E,LI X P,YANG F,et al. Research and application of comprehensive preventive measures for cryptic mastitis in dairy cows[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2018,38(3):598-601.

[3] CHENG W N,HAN S G. Bovine mastitis:risk factors,therapeutic strategies,and alternative treatments:a review[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2020,33(11):1699-1713.

[4] TOMMASONI C,FIORE E,LISUZZO A,et al. Mastitis in dairy cattle:on-farm diagnostics and future perspectives[J]. Animals(Basel),2023,13(15):2538.

[5] 乔亚蕊,杨江流,高登军,等. 宁夏地区牛乳肠球菌耐药性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2024,52(8):1-10.
QIAO Y R,YANG J L,GAO D J,et al. Analysis of drug resistance of enterococcus faecalis in Ningxia[J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition),2024,52(8):1-10.

[6] GELGIE A E,GELALCHA B D,FREEMAN T,et al. Whole transcriptome analysis of mycoplasma bovis-host interactions under in vitro and in vivo conditions[J]. Veterinary Microbiology,2025,303:110426.

[7] 谢玉杰,高瑞,缪西鹏,等. 奶牛乳房炎6种主要致病菌多重PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 农业科学研究,2022,43(1):43-48.
XIE Y J,GAO R,MIAO X P,et al. Establishment and preliminary application of a multiplex PCR detection method for 6 major pathogenic bacteria causing bovine mastitis[J]. Journal of Agricultural Science Research,2022,43(1):43-48.

[8] IBRAHIM N,REGASSA F,YILMA T,et al. Impact of subclinical mastitis on uterine health, reproductive performances and hormonal profile of Zebu x Friesian crossbred dairy cows in and around Jimma town dairy farms, Ethiopia[J]. Heliyon,2023,9(6):e16793.

[9] MENG M,HUO R,WANG Y,et al. Lentinan inhibits oxidative stress and alleviates LPS-induced inflammation and apoptosis of BMECs by activating the Nrf2 signaling pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2022,222(Pt B):2375-2391.

[10] CHEN L,HAN Y,CHEN Y,et al. Eight SNVs in NF-kappaB pathway genes and their different performances between subclinical mastitis and mixed Chinese Holstein cows[J]. Gene,2015,555(2):242-249.

[11] LAN X,QI D,REN H,et al. Chicoric acid ameliorates LPS-induced inflammatory injury in bovine lamellar keratinocytes by modulating the TLR4/MAPK/NF-kappaB signaling pathway[J]. Scientific Reports,2023,13(1):21963.

[12] WANG J,HU Q,YANG J,et al. Differential expression pro-

files of lncRNA following LPS-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells[J]. Frontiers in Veterinary Science，2021，8：758488.

[13] FURFARO L L，CHANG B J，PAYNE M S. Perinatal streptococcus agalactiae epidemiology and surveillance targets[J]. Clinical Microbiology Reviews，2018，31(4)：e00049-18.

[14] WANG M，BISSONNETTE N，LATERRIERE M，et al. Methylome and transcriptome data integration reveals potential roles of DNA methylation and candidate biomarkers of cow streptococcus uberis subclinical mastitis[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology，2022，13(1)：136.

[15] CHEN X，GONG W，SHAO X，et al. METTL3-mediated mA modification of ATG7 regulates autophagy-GATA4 axis to promote cellular senescence and osteoarthritis progression[J]. Annals of the Rheumatic Diseases，2022；81(1)：87-99.

[16] 廖勇胜，赵志宏，左志刚，等. 肺腺癌组织中METTL3蛋白表达水平及其与^{18}F-FDG最大标准摄取值的相关性[J]. 检验医学与临床，2024，21(15)：2221-2225.
LIAO Y S，ZHAO Z H，ZUO Z G，et al. METTL3 protein expression in lung adenocarcinoma tissues and its correlation with the maximum standardised uptake value of ^{18}F-FDG[J]. Laboratory Medicine and Clinics，2024，21(15)：2221-2225.

[17] WANG J，WANG X，FENG F，et al. LncRNA HULIB promotes LPS induced inflammatory response in bovine mammary epithelial cells via PP2AB[J]. International Immunopharmacology，2024，143(Pt 3)：113496.

[18] 王正兴，罗仍卓么，王晋鹏，等. 奶牛乳房炎相关IFNE基因的克隆、表达及功能研究[J]. 西南农业学报，2024，37(2)：420-428.
WANG Z X，LUO R Z M，WANG J P，et al. Cloning，expression and function of mastitis-associated IFNE gene in dairy cows[J]. Southwest Journal of Agriculture，2024，37(2)：420-428.

[19] ASHRAF A，IMRAN M. Causes，types，etiological agents，prevalence，diagnosis，treatment，prevention，effects on human health and future aspects of bovine mastitis[J]. Animal Health Research Reviews，2020，21(1)：36-49.

[20] GORJI A E，ROUDBARI Z，SADEGHI B，et al. Transcriptomic analysis on the promoter regions discover gene networks involving mastitis in cattle[J]. Microbial Pathogenesis，2019，137：103801.

[21] LI Y，REN Q，WANG X，et al. Bta-miR-199a-3p Inhibits LPS-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells via the PI3K/AKT/NF-kappaB signaling pathway[J]. Cells，2022，11(21)：3518.

[22] CHO H，KIM D，JEON H，et al. Bactericidal activities and biochemical features of 16 antimicrobial peptides against bovine-mastitis causative pathogens[J]. Veterinary Research，2024，55(1)：150.

[23] DE SCHEPPER S，DE KETELAERE A，BANNERMAN D D，et al. The toll-like receptor-4（TLR-4）pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle[J]. Veterinary Research，2008，39(1)：5.

[24] XU T，LIU R，LU X，et al. Lycium barbarum polysaccharides alleviate LPS-induced inflammatory responses through PPAR-gamma/MAPK/NF-kappaB pathway in bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of Animal Science，2022，100(1)：345.

[25] NAJAFI M，GUO Y，ANDERSSON G，et al. Gene networks and pathways involved in LPS-induced proliferative response of bovine endometrial epithelial cells[J]. Genes（Basel），2022，13(12)：2342.

[26] TSUGAMI Y，WAKASA H，KAWAHARA M，et al. Adverse effects of LPS on membrane proteins in lactating bovine mammary epithelial cells[J]. Cell and Tissue Research，2021，384(2)：435-448.

[27] HAN L，TIELIWAERDI N，LI X. METTL3-deficiency m6A-dependently degrades MALAT1 to suppress NLRP3-mediated pyroptotic cell death and inflammation in mycobacterium tuberculosis（H37Ra strain）-infected mouse macrophages[J]. Tuberculosis（Edinb），2024，146：102502.

[28] LUO S，LIAO C，ZHANG L，et al. METTL3-mediated m6A mRNA methylation regulates neutrophil activation through targeting TLR4 signaling[J]. Cell Reports，2023，42(3)：112259.

[29] XU S，XING J，ZHENG L，et al. Azithromycin regulates METTL3-mediated NF-kappaB pathway to enhance M2 polarization of RAW264.7 macrophages and attenuate LPS-triggered cytotoxicity of MLE-12 alveolar cells[J]. International Immunopharmacology，2024，137：112426

[30] ABDULLAH N R，ABDULLAH F A. Non-tuberculous mycobacteria hsp65 in relation to bovine subclinical mastitis and IL6 concentration in cow's milk[J]. Archives of Razi Institute，2022，77(5)：1683-1691.

[31] CHEN Y，CAI Q，PAN C，et al. CDK2 inhibition enhances antitumor immunity by increasing IFN response to endogenous retroviruses[J]. Cancer Immunology Research，2022，10(4)：525-539.

[32] FREEMAN-COOK K，HOFFMAN R L，MILLER N，et al. Expanding control of the tumor cell cycle with a CDK2/4/6 inhibitor[J]. Cancer Cell，2021，39(10)：1404-1421.

[33] ZHANG G，ZENG X，ZHANG R，et al. Dioscin suppresses hepatocellular carcinoma tumor growth by inducing apoptosis and regulation of TP53，BAX，BCL2 and cleaved CASP3[J]. Phytomedicine，2016，23(12)：1329-1336.

[34] GUO W，ZHANG Y，LING Z，et al. Caspase-3 feedback loop enhances bid-induced AIF/endoG and bak activation in Bax and p53-independent manner[J]. Cell Death & Disease，2015，6(10)：e1919.

（责任编辑：马秋明）