

王淑君,张丁,李一鸣,等. 半乳糖凝集素-3 基因敲除对 MRSA 感染小鼠皮肤模型中脓肿发展的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(8): 992-1000.

WANG S J, ZHANG D, LI Y M, et al. Effect of galectin-3 gene knockout on abscess development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected mouse skin model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(8): 992-1000.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.08.005

半乳糖凝集素-3 基因敲除对 MRSA 感染小鼠皮肤模型中脓肿发展的影响

王淑君,张丁,李一鸣,张思怡,周静,陈紫涵,程美琦,韩珊珊,王德成*,晁金*

(三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室,三峡大学基础医学院,宜昌市感染与炎症损伤重点实验室,湖北 宜昌 443002)

【摘要】 目的 探讨半乳糖凝集素-3 (galectin-3, Gal3) 在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染小鼠皮肤模型中对皮肤脓肿发展以及肥大细胞 (mast cell, MC) 激活的影响。**方法** 将 6 ~ 8 周龄的野生型小鼠和 Gal3 基因敲除 (Gal3^{-/-}) 小鼠分为 4 组:野生型小鼠 + PBS 组、野生型小鼠 + MRSA 组、Gal3^{-/-}小鼠 + PBS 组、Gal3^{-/-}小鼠 + MRSA 组,分别皮下注射 MRSA 或 PBS,每组 5 只。观察记录小鼠皮肤脓肿发展和病理学变化,比较皮肤组织中的载菌量,并分析相关炎性细胞因子、MC 脱颗粒及活化标志物 5-羟色胺 (5-hydroxy tryptamine, 5-HT) 的差异。**结果** 感染 MRSA 后,野生型小鼠皮肤出现渐进性脓肿,而 Gal3^{-/-}小鼠脓肿体积较小。与野生型小鼠 + MRSA 组相比, Gal3^{-/-}小鼠 + MRSA 组皮肤载菌量显著降低 ($P < 0.01$),且组织病理学观察显示较少的炎症细胞浸润。Gal3^{-/-}小鼠皮肤中的细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-33、TGF- β 和 IL-10 均显著低于野生型小鼠 ($P < 0.05$)。甲苯胺蓝染色显示,野生型小鼠 + MRSA 组皮肤组织中大量 MC 释放颗粒物质,而 Gal3^{-/-}小鼠 + MRSA 组仅发现少量脱颗粒的 MC。免疫组化染色进一步发现, Gal3^{-/-}小鼠 + MRSA 组中 5-HT 的表达显著低于野生型小鼠 + MRSA 组。**结论** Gal3 缺失降低 MRSA 感染导致的小鼠皮肤中 MC 的活化与脱颗粒,改变炎症反应,减轻了皮肤组织的脓肿发生。

【关键词】 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;半乳糖凝集素-3;基因敲除;肥大细胞;活化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 08-0992-09

Effect of galectin-3 gene knockout on abscess development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected mouse skin model

WANG Shujun, ZHANG Ding, LI Yiming, ZHANG Siyi, ZHOU Jing, CHEN Zihan, CHENG Meiqi,
HAN Shanshan, WANG Decheng*, CHAO Jin*

(Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, College of Basic Medical Sciences, China
Three Gorges University, Yichang Key Laboratory of Infection and Inflammation, Yichang 443002, China)

Corresponding author: CHAO Jin. E-mail: chaojin028@163.com; WANG Decheng. E-mail: dcwang99@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of galectin-3 (Gal3) on skin abscess development and activation of mast cells (MC) in mice infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** Wild type mice

【基金项目】湖北省自然科学基金 (2023AFB736), 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室开放课题 (2023KZL027)。

Funded by the Natural Science Foundation of Hubei Province (2023AFB736), Open Foundation of Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy (2023KZL027).

【作者简介】王淑君,女,在读硕士研究生,研究方向:感染免疫与慢性炎症。Email:wsj1998777@163.com

【通信作者】晁金,女,讲师,博士,研究方向:感染与免疫。Email: chaojin028@163.com;

王德成,男,教授,博士,研究方向:感染与免疫。Email: dcwang99@163.com。

* 共同通信作者

and Gal3-knockout (*Gal3*^{-/-}) mice, at 6 ~ 8 weeks of age, were divided into four groups: Wild type mice + PBS group, Wild type mice + MRSA group, *Gal3*^{-/-} mice + PBS group, *Gal3*^{-/-} mice + MRSA group, were subcutaneously injected with MRSA or the same volume of phosphate buffer saline, with five mice per group. The development and pathological changes of skin abscess were monitored and recorded. The bacterial load in skin tissues was compared, and the expression of associated cytokines, degranulation of MC, and the distribution of MC activation marker 5-hydroxytryptamine (5-HT) were detected. **Results** The skin of Wild type mice showed progressive abscesses after subcutaneous infection with MRSA, but the *Gal3*^{-/-} mice showed smaller abscess areas. Compared to the Wild type mice + MRSA group, the *Gal3*^{-/-} mice + MRSA group showed lower bacterial loading in the skin tissues (*P* < 0.01) and fewer infiltrating inflammatory cells with histopathological observation. The expression of cytokines, including IL-1β, TNF-α, IL-33, TGF-β, and IL-10, were significantly lower in *Gal3*^{-/-} mice than Wild type mice (*P* < 0.05). The toluidine blue staining showed a large number of degranulated MCs in the skin tissues of the wild type mice + MRSA group, whereas only a few degranulated MCs were observed in the *Gal3*^{-/-} mice + MRSA group. It was further found that the expression of 5-HT in *Gal3*^{-/-} mice + MRSA group was significantly lower than that in wild-type mice + MRSA group with immunohistochemical staining. **Conclusion** Gal3 deficiency reduced the activation and degranulation of mouse skin MC after MRSA infection, resulting in changes to inflammatory responses and alleviating the severity of skin tissue abscesses.

[Keywords] methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; galectin-3; gene knockout; mast cell; activation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

由于外科移植手术增多、免疫抑制剂大量使用及细菌耐药性不断增加等原因,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的感染率逐年升高。皮肤及软组织是 MRSA 在临床最常见的感染部位^[1]。特应性皮炎患者、糖尿病足患者创面或压疮创面易被 MRSA 定植造成感染,导致患者病情加重,延长临床治疗时间^[2-4],表明 MRSA 的定植可能与宿主的免疫状态有关。然而,会造成 MRSA 感染或加重的与宿主相关的因素并不明确,这些因素的作用机制也不清楚。

MC 是皮肤组织中重要的固有免疫细胞,在抵御病原感染的免疫反应中发挥重要作用。同时,MC 还可介导变态反应,是引发许多类型皮炎的重要媒介^[5]。有研究发现,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是肥大细胞(mast cell, MC)脱颗粒的有效诱导剂^[2],表明 MRSA 定植与皮肤病之间可能存在机制联系,但其相关机制有待进一步探索。

半乳糖凝集素-3(galectin, Gal3)是凝集素蛋白质家族成员之一,通过碳水化合物识别域(carbohydrate recognition domain, CRD)与 β-半乳糖苷结合从而与其他蛋白相互作用,进而参与广泛的细胞功能。已知 Gal3 在免疫细胞活化和炎症因子分泌中发挥重要作用,可参与多种器官(肝、肺、肾、神经等)的炎症和纤维化,成为这些疾病的重要药物靶点^[6]。Gal3 还参与多种病原体的感染过程。研究表明, Gal3 敲除小鼠对一些细菌如布鲁氏菌、奈瑟球菌、马红球菌等更具抵抗力^[7-9]。多项病毒

感染实验表明, Gal3 促进感染的多个进程,包括病毒进入、复制和免疫反应调节等^[6],并增强细胞因子的产生^[10-12]。近期研究表明, Gal3 是 COVID-19 感染患者肺损伤预后不良的指征之一,可作为潜在的治疗靶标^[10,13-14]。然而, Gal3 敲除小鼠感染克氏锥虫后明显加重心脏损伤和纤维化^[15]。有研究报道, Gal3 敲除小鼠感染 SA 后皮肤损伤减弱^[16]。体外实验还发现, Gal3 通过降低 ROS 产生,抑制中性粒细胞的呼吸爆发^[16-17]。然而,尚不明确 Gal3 对 MRSA 感染后皮肤组织脓肿发生发展、免疫反应及对 MC 的影响。

为此,本研究团队构建了 *Gal3*^{-/-} 小鼠的 MRSA 皮肤脓肿模型,比较 Gal3 敲除后对小鼠皮肤脓肿发生发展过程的影响,并评价了皮肤脓肿过程中炎性细胞因子、MC 及其活化标志物的变化,以期深入研究 Gal3 在调控 MRSA 皮肤组织损伤的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 SPF 级 C57BL/6 品系的 *Gal3*^{-/-} 小鼠,委托苏州赛业生物科技有限公司【SCXK(苏)2020-0006】采用 CRISPR/Cas9 技术构建,6 ~ 8 周龄,体重约 20 g,每组 5 只(雌鼠 2 只、雄鼠 3 只)。10 只 6 ~ 8 周龄及体重约 20 g 的 SPF 级野生型小鼠 C57BL/6 小鼠购自三峡大学实验动物中心【SCXK

(鄂)2022-0012】，每组 5 只(雌鼠 2 只,雄鼠 3 只)。所有小鼠饲养于三峡大学实验动物中心【SYXK(鄂)2022-0061】屏障环境,自由饮水和摄食,温度 20 ~ 26 ℃,相对湿度 60% ± 5%,12 h 明暗交替。本研究所有动物实验均经三峡大学动物伦理委员会批准(2022010Q1)。

1. 1. 2 菌株

本研究中所用 MRSA 菌株(ST-239)由上海仁济医院李敏教授赠送^[18]。

1. 1. 3 主要试剂与仪器

TSA、TSB(广东环凯微生物科技有限公司);甲苯胺蓝染色液(索莱宝科技有限公司);TRIzol 抽提剂、Green Taq Mix、SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞生物科技股份有限公司);DNA ladder 100 bp(天根生化科技有限公司);RIPA 裂解液(索莱宝科技有限公司);Anti-Galectin 3 一抗(abcam 公司, ab76245);5-HT 一抗(云克隆科技有限公司, PAA808Ge01)。奥林巴斯显微镜及 Cellsens 图像分析系统(OLYMPUS, 日本);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪器、全波长酶标仪(Thermo Scientific 公司, 美国);引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1. 2 方法

菌株的培养制备和动物感染实验均在生物安全二级实验室进行。

1. 2. 1 感染用菌株的培养与制备

MRSA 菌种保种于-80 ℃冰箱。解冻后,取 MRSA 菌液在 TSA 细菌固体培养基上画线,置 37 ℃ 过夜培养。18 ~ 24 h 后,取单个菌落转接于 TSB 液体培养基中,待细菌长至对数生长期时离心、加入 PBS 快速洗涤 2 次,之后用 PBS 将细菌重悬至 1 × 10⁸ CFU/50 μL。

1. 2. 2 感染实验

用异氟烷将小鼠进行吸入式麻醉,之后用宠物剃毛器联合温和脱毛膏将小鼠腹部皮肤毛发脱去。分别将 2 种小鼠随机分为 4 组,分别为野生型小鼠 + PBS 组、野生型小鼠 + MRSA 组、Gal3^{-/-}小鼠 + PBS 组、Gal3^{-/-}小鼠 + MRSA 组,每组 5 只。将野生型小鼠 + MRSA 组和 Gal3^{-/-}小鼠 + MRSA 组右侧腹部皮下注射含 1 × 10⁸ CFU MRSA 的菌液,野生型小鼠 + PBS 组和 Gal3^{-/-}小鼠 + PBS 组注射等体积 PBS,注射前小鼠称重,注射后 10 d 内每天观察记录

脓肿部位的皮肤变化、溃疡和结痂等状况。

1. 2. 3 脓肿体积的测定

注射后每天测量脓肿的长径与宽径,直至实验结束。脓肿体积的计算参考文献^[19]中方法。

1. 2. 4 皮肤载菌量测定

取直径约 0.5 cm 皮肤病变组织,经无菌 PBS 冲洗后置于含 0.1% Triton-X 的 PBS 溶液中匀浆。将组织匀浆液使用无菌 PBS 连续倍比稀释,取 100 μL 稀释液涂布于 TSA 固体培养基上,置于 37 ℃ 培养 18 ~ 24 h。计数单个菌落数,小鼠皮肤组织载菌量表示为 log₁₀ CFU/g。

1. 2. 5 实时荧光定量 PCR

收集组织使用 TRIzol 试剂提取组织总 RNA,使用逆转录试剂将 RNA 逆转合成 cDNA。采用 SYBR qPCR Master Mix 试剂检测小鼠皮肤组织 IL-1β、TNF-α、IL-33、TGF-β 和 IL-10 mRNA 的表达。取其 CT 平均值进行实验数据分析,以 GAPDH 作为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算各基因 mRNA 的相对表达。相应引物序列见表 1。利用 Stepone Software v2.3 进行分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of qRT-PCR	
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
GAPDH	F:TCTCTGCGACTTCAACA
	R:TGTAGCCGTATTCATTGTCA
IL-1β	F:TCTGAAGAAGAGACGGCTGAGTTTC
	R:CTGGTAGGTGTAAGGTGCTGATCTG
TNF-α	F:GGACTAGCCAGGAGGGAGAACAG
	R:GCCAGTGAGTGAAAGGGACAGAAC
IL-33	F:GTGCTACTACGCTACTATGA
	R:TTGTGAAGGACGAAGAAGG
TGF-β	F:TCTGAAGAAGAGACGGCTGAGTTTC
	R:CTGGTAGGTGTAAGGTGCTGATCTG
IL-10	F:TGGAGCAGGTGAAGAATG
	R:TCATTGTCATGTAGGCTTCT

1. 2. 6 苏木素-伊红(HE)染色

4%多聚甲醛固定液浸没处理后的组织,之后制成组织蜡块,切片后进行 HE 染色,风干后树脂封片。

1. 2. 7 甲苯胺蓝染色

将石蜡切片置于二甲苯中 20 min,再分别放入不同浓度乙醇中 5 min,流水冲洗。之后,将切片置于甲苯胺蓝染料中染色 20 min,流水冲洗。95%乙醇镜下观察分色效果,无水乙醇脱水 1 min,二甲苯透明 2 min,重复此步骤 1 次,风干后中性树脂封片。

1.2.8 免疫组织化学染色

将切片脱蜡后置于柠檬酸盐缓冲液中煮沸 20 min,冷却至室温后用 PBS 冲洗;加入 3% 过氧化氢覆盖组织切片,15 min 后 PBS 冲洗,在 37 ℃ 使用 5% BSA 封闭 1 h。加入 5-HT 一抗,4 ℃ 过夜;次日,二抗室温孵育 1 h,DAB 显色液显色,蒸馏水冲洗后对组织切片进行苏木素染色,使用梯度乙醇将切片脱水至透明,风干后中性树脂封片。

1.3 统计学分析

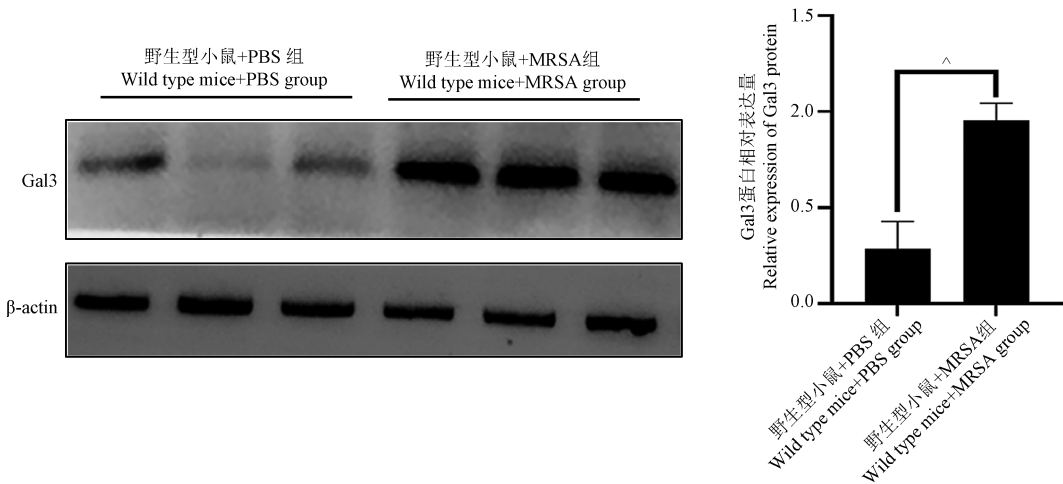
应用 GraphPad Prism 7.0 作图,用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示结果,采用独立样本 *t* 检验分析对

比两组间数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。每组实验至少独立重复 3 次。

2 结果

2.1 MRSA 感染后皮肤中 Gal3 的表达上升

将 C57BL/6 小鼠腹部皮下分别注射 MRSA 和等体积的 PBS,10 d 后处死小鼠,Western Blot 检测皮肤组织中的 Gal3 表达,见图 1。结果发现,与野生型小鼠 + PBS 组相比,小鼠注射 MRSA 之后,皮肤组织中的 Gal3 显著增加($P < 0.05$)。可见,MRSA 感染后促进皮肤组织中 Gal3 的表达。



注:与野生型小鼠 + PBS 组相比, $^{\wedge}P < 0.05$ 。

图 1 小鼠感染 MRSA 后皮肤组织中 Gal3 的表达比较($n = 5$)

Note. Compared with wild type mice + PBS group, $^{\wedge}P < 0.05$.

Figure 1 Expression of Gal3 in the mice skin tissue after MRSA infection($n = 5$)

2.2 Gal3 缺失减轻 MRSA 感染造成的皮肤脓肿

野生型小鼠和 $Gal3^{-/-}$ 小鼠腹部注射等量 MRSA,观察记录小鼠皮肤组织大体病变如脓肿形成,分泌脓液等情况。结果发现,野生型小鼠 + PBS 组皮肤没有任何异常,而野生型小鼠在接种 MRSA 后出现肉眼可见的皮肤破损,且随着实验周期的延长,组织病变呈进行性进展,脓肿体积逐渐增大。与野生型小鼠 + MRSA 组相比, $Gal3^{-/-}$ 小鼠 + MRSA 组皮肤脓肿体积较小,脓肿程度明显较轻(见图 2A, 2B)。对感染组皮肤组织进行载菌量计数发现,野生型小鼠 + MRSA 组皮肤组织中的细菌数量显著高于 $Gal3^{-/-}$ 小鼠 + MRSA 组小鼠(图 2C, $P < 0.01$)。

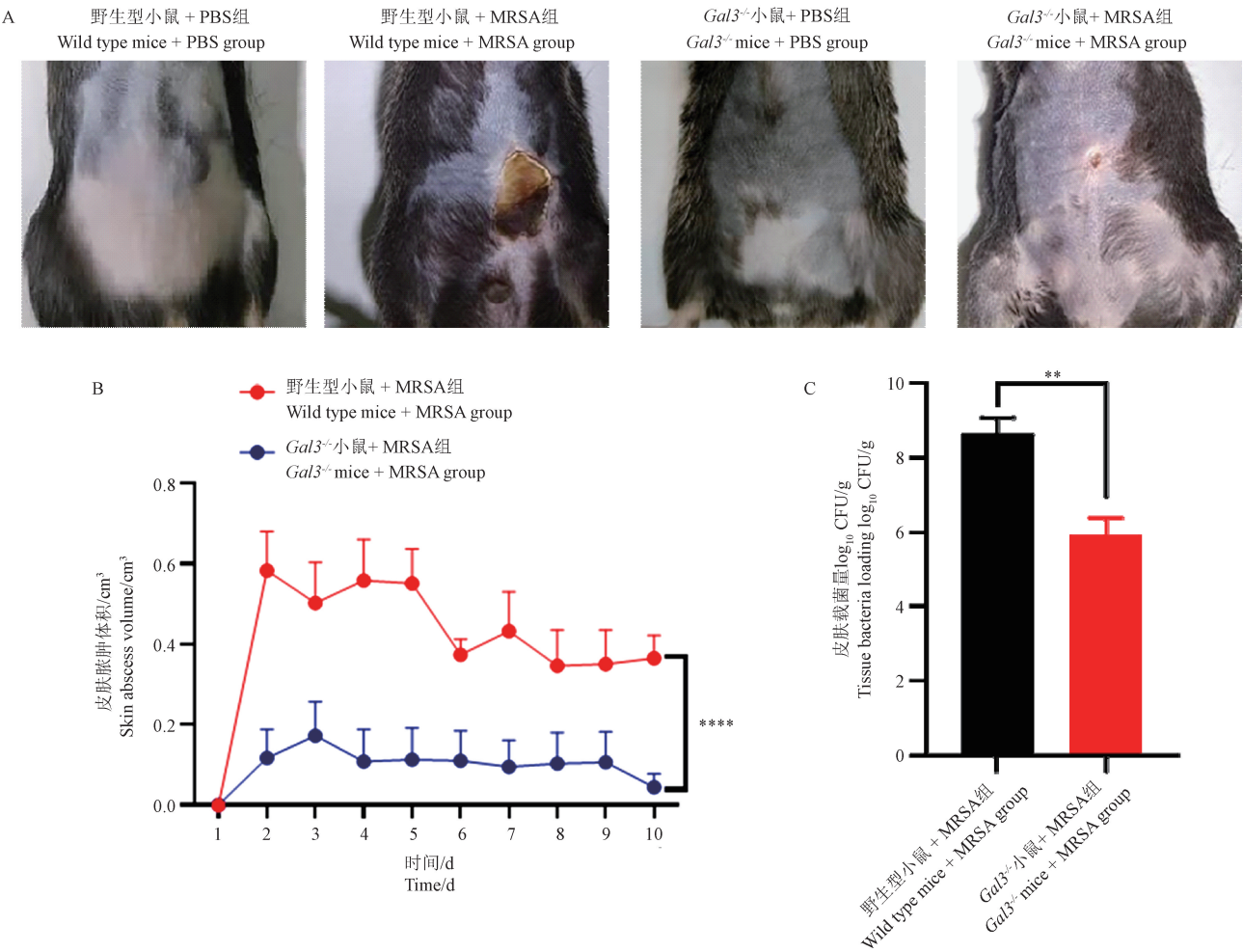
2.3 感染 MRSA 后皮肤组织病理学观察

小鼠腹部注射 MRSA 10 d 后处死小鼠,收集损伤皮肤组织,观察比较小鼠皮肤病理学差异,见图

3。结果发现,野生型小鼠 + PBS 组和 $Gal3^{-/-}$ 小鼠 + PBS 组皮肤组织结构清楚,表皮细胞排列紧密,层次分明;真皮层中胶原纤维排列有序,毛囊和皮脂腺等结构完整。与野生型小鼠 + PBS 组相比,野生型小鼠 + MRSA 组皮肤表皮明显增厚,真皮中胶原纤维断裂,其中大量炎性细胞浸润;乳头层内的皮脂腺结构遭到破坏,皮脂腺缩小,毛囊消退。而 $Gal3^{-/-}$ 小鼠皮肤各层结构依然较为清晰,表皮层细胞层次较为分明,仅有少量炎性细胞浸润;毛囊和皮脂腺结构均较为完整。以上结果表明 Gal3 缺失可减轻 MRSA 皮肤脓肿模型小鼠的皮肤损伤和炎症反应。

2.4 感染 MRSA 后皮肤组织中炎性细胞因子表达差异

提取小鼠皮肤组织 RNA,qRT-PCR 检测相关炎



注:与野生型小鼠 + MRSA 组相比, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。(下图同)

图 2 小鼠感染 MRSA 后皮肤组织病变情况、脓肿面积及载菌量($n = 5$)

Note. Compared with wild type mice + MRSA group, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Skin tissue lesions, abscess development, and bacteria loading in mice infected with MRSA($n = 5$)

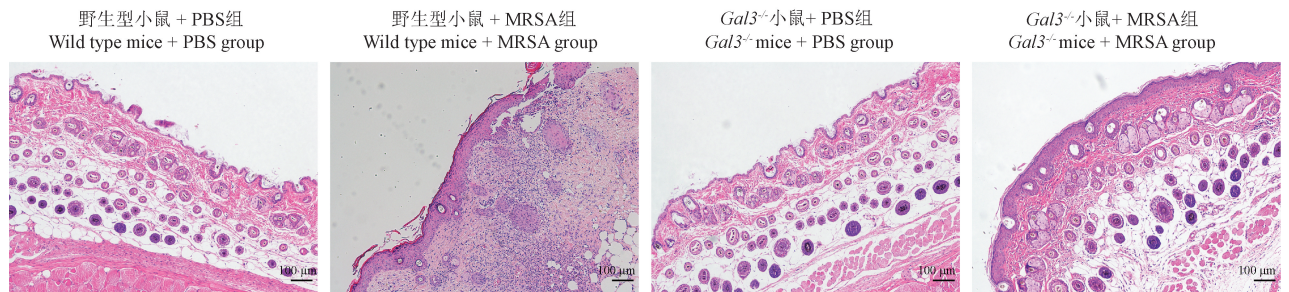


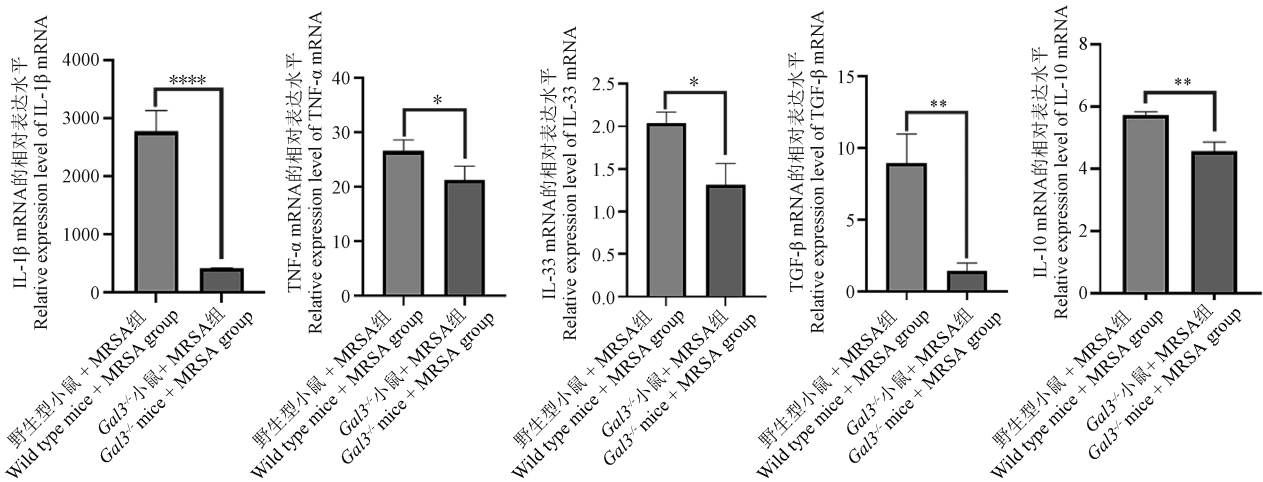
图 3 小鼠感染 MRSA 后皮肤组织的 HE 观察

Figure 3 Histopathology examination in skin tissue of mice after MRSA infection

性细胞因子 mRNA 表达。结果如图 4 所示, *Gal3*^{-/-} 小鼠 + MRSA 组皮肤组织中促炎性细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-33 显著下调($P < 0.05$), 抑炎性细胞因子 TGF- β 和 IL-10 也显著下调($P < 0.01$), 说明 *Gal3* 影响 MRSA 感染后皮肤组织中的炎症反应。

2.5 MRSA 感染后皮肤损伤处 MC 的分布和形态差异

甲苯胺蓝染色发现, 野生型小鼠 + MRSA 组皮肤损伤部位可见大量肥大细胞, 且 MC 大多形状不规则, 胞体和胞核体积和密度均明显增加, 细胞脱



注：与野生型小鼠 + MRSA 组相比，* $P < 0.05$ 。（下图同）

图 4 小鼠感染 MRSA 后皮肤组织中细胞因子的变化 ($n = 5$)

Note. Compared with wild type mice + MRSA group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

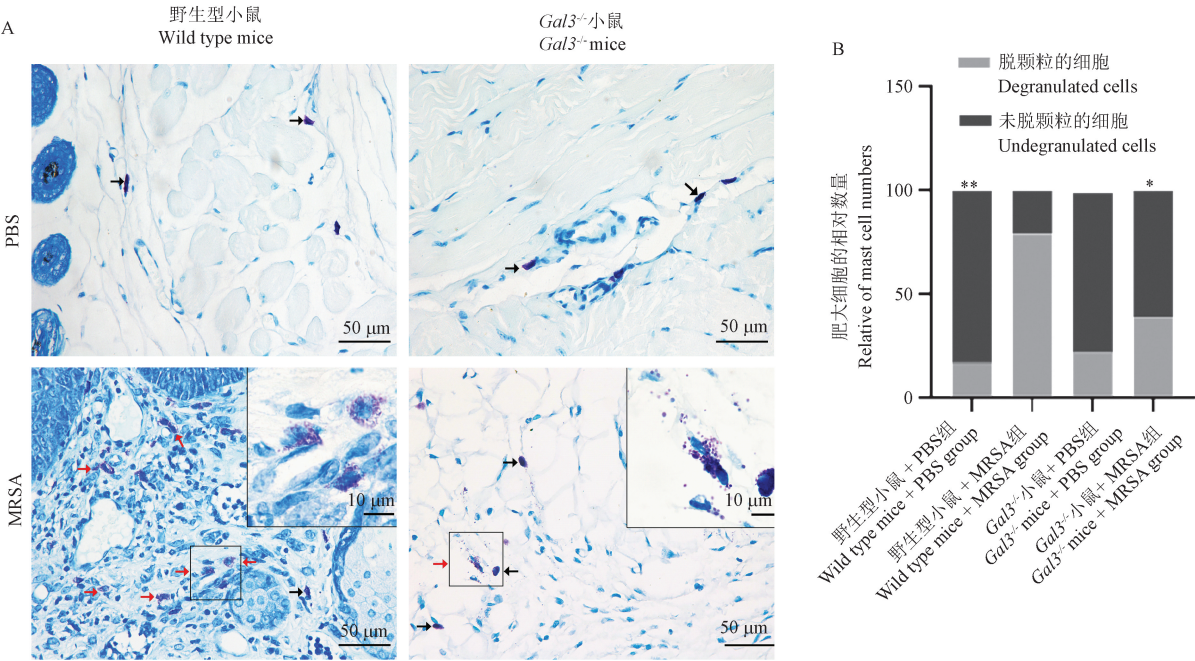
Figure 4 Change of cytokines in skin tissue of mice after MRSA infection ($n = 5$)

颗粒现象增多；反之， $Gal3^{-/-}$ 小鼠 + MRSA 组皮肤组织中 MC 胞体胞核在体积和密度均无显著性差异，多呈规则的圆形或卵圆形，且脱颗粒现象较少（图 5）。观察 MC 的脱颗粒现象发现，野生型小鼠 + MRSA 组 MC 的脱颗粒现象更活跃，少见未活化的 MC； $Gal3^{-/-}$ 小鼠 + MRSA 组脱颗粒 MC 明显少于野生型小鼠 + MRSA 组（图 5）。提示 MRSA 感染可能

导致 MC 过度活化，促使 MC 脱颗粒， $Gal3$ 缺失减轻了 MRSA 感染造成的 MC 激活与脱颗粒。

2.6 皮损处肥大细胞活化标志物 5-HT 的免疫组化染色

肥大细胞脱颗粒会导致 5-HT 分泌增加，因此 5-HT 是 MC 活化的重要标志物^[20]。镜下观察发现（见图 6A），两感染组小鼠皮肤组织中的 5-HT 表达



注：黑色箭头指示为未脱颗粒的肥大细胞；红色箭头指示脱颗粒的肥大细胞。

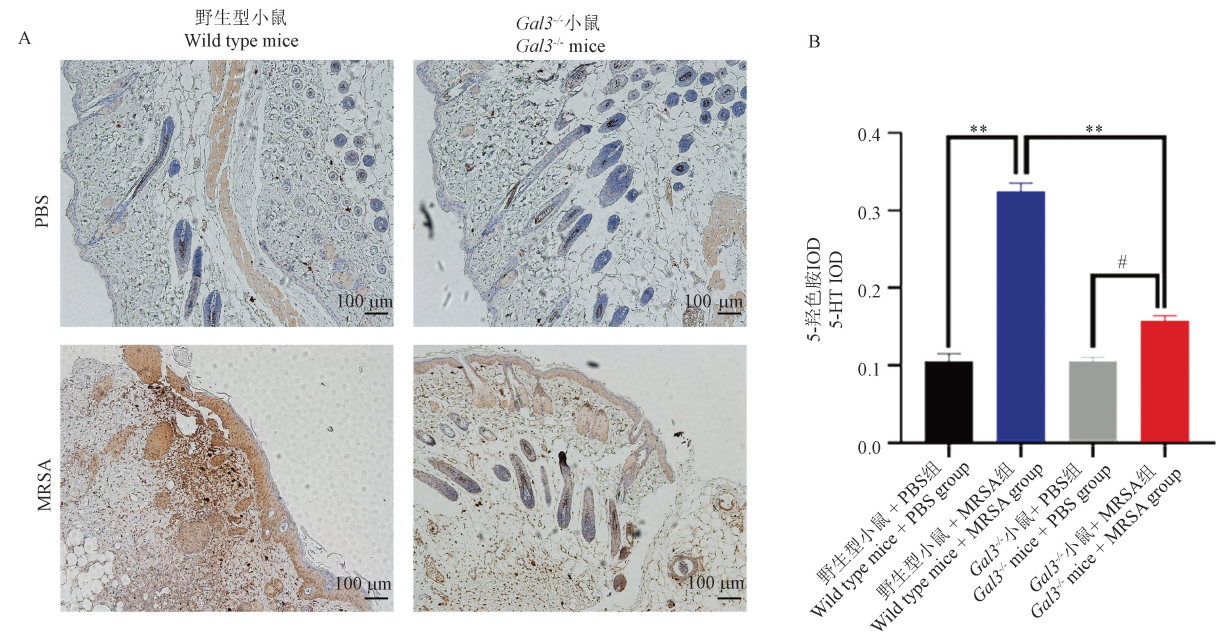
图 5 小鼠感染 MRSA 后皮肤组织中肥大细胞分布与脱颗粒观察

Note. Black arrows indicate the undegranulated MC. Red arrows indicate the degranulated MC.

Figure 5 Distribution and degranulation of mast cells in the skin tissue in mice after MRSA infection

均增加,但野生型小鼠 + MRSA 组表皮信号明显强于 $Gal3^{-/-}$ 小鼠 + MRSA 组。与镜下观察结果一致,统计比较 5-HT 表达结果也显示:感染 MRSA 后,野生型小鼠皮损处 5-HT 信号显著增加 ($P <$

0.01,见图 6B),而 $Gal3$ 缺失后表皮损伤处虽然也有所增加,但显著低于野生型小鼠 ($P < 0.01$)。这些结果进一步表明,MRSA 感染可能导致小鼠皮肤 MC 过度活化,这种活化可能与 $Gal3$ 相关。



注:与 $Gal3^{-/-}$ 小鼠 + PBS 组相比, # $P < 0.05$ 。
图 6 小鼠感染 MRSA 后皮肤组织中 5-HT 免疫组织化学染色观察及统计 ($n = 5$)
Note. Compared with $Gal3^{-/-}$ mice + PBS group, # $P < 0.05$.

Figure 6 Immunohistochemistry staining of 5-HT in skin tissue of mice after MRSA infection ($n = 5$)

3 讨论

皮肤感染是 MRSA 最常见的疾病之一,如特应性皮炎、牛皮癣、糖尿病足感染等。一项关于阿尔茨海默病患者的研究报道,SA 感染导致 MC 数量增加,在 MC 内增殖并介导 Th1 细胞发育以及慢性炎症的发展,导致 Th1 细胞因子和 IFN 持续释放,表现为固有层内水肿^[21-22]。SA 的肽聚糖可依赖 TLR 刺激 MC,分泌 TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-13 等多种细胞因子^[23]。与此一致,本研究表明 MRSA 感染后,小鼠皮肤组织的 MC 无论在数量还是体积均增加,脱颗粒现象增加,MC 活化标志物 5-HT 也增加,表明 MRSA 促进了皮肤中 MC 的激活。

如前所述, $Gal3$ 在各种病原感染中的作用机制不同。体外实验表明, $Gal3$ 在抗原刺激下可激活 MC^[7],并促进 MC 的粘附运动^[24]。本研究通过 MRSA 感染实验在小鼠体内证实了这一发现。从目前的报道来看,在 SA 感染过程中, $Gal3$ 可能发挥了双重或多重作用。与本研究结果类似,ELMWALL

等^[16]也发现 $Gal3^{-/-}$ 小鼠感染 SA 之后皮肤损伤减轻,其 MC 的体外反应存在缺陷,JNK/IL-4 表达降低,表明 $Gal3$ 在肥大细胞引起的炎症反应中可能发挥作用。因此,仍需进一步探讨 $Gal3$ 在 MRSA 诱导的 MC 激活中的作用机制。

微生物可通过肥大细胞的表面受体如 TLR2/TLR6 等激活核因子 κB (NF- κB) 途径激活肥大细胞。一方面,肥大细胞可诱导 Th1 和 Th2 细胞分化,并作为皮肤炎症的主要效应细胞^[25],分泌多种细胞因子,招募其他免疫细胞;另一方面,这些炎症介质和因子影响皮肤炎症的进展与愈合,并可能带来严重后果。本研究发现, $Gal3^{-/-}$ 小鼠感染 MRSA 后,肥大细胞脱颗粒现象减少,多种细胞因子的表达降低。这表明, $Gal3$ 促进肥大细胞和免疫细胞表达多种细胞因子,进而加速了皮肤损伤,对损伤的愈合不利。可以推测,在过敏性皮肤炎症中 $Gal3$ 的存在可能加剧了皮肤炎症损伤。先前研究报道, $Gal3$ 可促进多种炎性细胞因子的分泌^[6,12],还通过增加 TGF- β mRNA 的表达加重小鼠心肌细胞的炎症和纤

维化^[26],这些报道与本研究的结果一致。然而,本研究中 *Gal3*^{-/-} + MRSA 组的 IL-10 表达也低于野生型小鼠 + MRSA 组,推测其原因可能是 *Gal3* 缺失后 MRSA 难以广泛激活皮肤组织中的 MC,导致组织中整体的细胞因子表达较低。

已有研究发现,完整、非脱颗粒的 MC 是伤口正常愈合所必需的,而 MC 的脱颗粒减缓了糖尿病患者的伤口愈合进程^[5]。脱颗粒状态的 MC 会释放 5-HT,促进局部血管参与过敏反应^[27]。本研究中发现 *Gal3* 缺失小鼠感染 MRSA 后,皮肤损伤部位 5-HT 表达回落,推测在 MRSA 感染中,*Gal3* 促进 MC 的活化及对 5-HT 的分泌,进而参与皮肤炎症反应。这一机制也许能解释临床中 MRSA 感染延长特应性皮炎损伤的现象^[2]。

综上所述,本研究通过构建 *Gal3* 基因敲除小鼠感染 MRSA 皮肤脓肿模型,发现 *Gal3* 缺失可减轻因 MRSA 感染造成的皮肤损伤和炎性反应,减少皮肤组织中肥大细胞的激活和脱颗粒。

参 考 文 献(References)

[1] SUAYA J A, MERA R M, CASSIDY A, et al. Incidence and cost of hospitalizations associated with *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in the United States from 2001 through 2009 [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 296.

[2] NAKAMURA Y, OSCHERWITZ J, CEASE K B, et al. *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells [J]. Nature, 2013, 503(7476): 397-401.

[3] HUITEMA L, PHILLIPS T, ALEXEEV V, et al. Intracellular escape strategies of *Staphylococcus aureus* in persistent cutaneous infections [J]. Exp Dermatol, 2021, 30(10): 1428-1439.

[4] 丁群,王鹏华,褚月颌,等. 糖尿病足感染中耐甲氧西林表皮葡萄球菌 SCCmec 分型临床研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(1): 51-54.

DING Q, WANG P H, CHU Y J, et al. SCCmec genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in diabetic foot infections [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2011, 31(1): 51-54.

[5] DONG J, CHEN L, ZHANG Y, et al. Mast cells in diabetes and diabetic wound healing [J]. Adv Ther, 2020, 37(11): 4519-4537.

[6] BOUFFETTE S, BOTEZ I, CEUNINCK F D. Targeting galectin-3 in inflammatory and fibrotic diseases [J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(8): 519-531.

[7] FERRAZ L C, BERNARDES E S, OLIVEIRA A F, et al. Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection [J]. Eur J Immunol, 2008, 38(10): 2762-2775.

[8] QUATTRONI P, LI Y, LUCCHESI D, et al. Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic

cells [J]. Cell Microbiol, 2012, 14(11): 1657-1675.

[9] TANA F L, GUIMARÃES E S, CERQUEIRA D M, et al. Galectin-3 regulates proinflammatory cytokine function and favours *Brucella abortus* chronic replication in macrophages and mice [J]. Cell Microbiol, 2021, 23(10): e13375.

[10] CANIGLIA J L, GUDA M R, ASUTHKAR S, et al. A potential role for Galectin-3 inhibitors in the treatment of COVID-19 [J]. PeerJ, 2020, 8: e9392.

[11] MACHALA E A, MCSHARRY B P, ROUSE B T, et al. Gal power: the diverse roles of galectins in regulating viral infections [J]. J Gen Virol, 2019, 100(3): 333-349.

[12] GARCIA-REVILLA J, DEIERBORG T, VENERO J L, et al. Hyperinflammation and fibrosis in severe COVID-19 patients: galectin-3, a target molecule to consider [J]. Front Immunol, 2020, 11: 2069.

[13] GAJOVIC N, MARKOVIC S S, JURISEVIC M, et al. Galectin-3 as an important prognostic marker for COVID-19 severity [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 1460.

[14] AHMED R, ANAM K, AHMED H. Development of galectin-3 targeting drugs for therapeutic applications in various diseases [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 8116.

[15] DA SILVA A A, TEIXEIRA T L, TEIXEIRA S C, et al. Galectin-3: a friend but not a foe during *Trypanosoma cruzi* experimental infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 463.

[16] ELMWALL J, KWIECINSKI J, NA M, et al. Galectin-3 is a target for proteases involved in the virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Immun, 2017, 85(7): e00177-e00117.

[17] VENKATAKRISHNAN V, ELMWALL J, LAHIRI T, et al. Novel inhibitory effect of galectin-3 on the respiratory burst induced by *Staphylococcus aureus* in human neutrophils [J]. Glycobiology, 2023, 33(6): 503-511.

[18] LI M, WANG X, GAO Q, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China [J]. J Med Microbiol, 2009, 58(4): 456-461.

[19] 王德成,王星,周文江,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌皮肤脓肿小鼠感染模型的建立与评估 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 221-224, 286.

WANG D C, WANG X, ZHOU W J, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of skin abscess by infection with an isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(3): 221-224, 286.

[20] VERA M E, MARIANI M L, AGUILERA C, et al. Effect of a cytoprotective dose of dehydroleucodine, xanthatin, and 3-benzoyloxymethyl-5H-furan-2-one on gastric mucosal lesions induced by mast cell activation [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5983.

[21] MATSUI K, KANAI S, IKUTA M, et al. Mast cells stimulated with peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* augment the development of Th1 cells [J]. J Pharm Pharm Sci, 2018, 21

- (1): 296–304.
- [22] HAYES S M, BIGGS T C, GOLDIE S P, et al. *Staphylococcus aureus* internalization in mast cells in nasal polyps: Characterization of interactions and potential mechanisms [J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 145(1): 147–159.
- [23] CHEN H, ZHANG J, HE Y, et al. Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases [J]. Toxins, 2022, 14(7): 464.
- [24] BAMBOUSKOVA M, POLAKOVICOVA I, HALOVA I, et al. New regulatory roles of galectin-3 in high-affinity IgE receptor signaling [J]. Mol Cell Biol, 2016, 36(9): 1366–1382.
- [25] GARCIA-RODRIGUEZ K M, BAHRI R, SATTENTAU C, et al. Human mast cells exhibit an individualized pattern of antimicrobial responses [J]. Immun Inflamm Dis, 2020, 8(2): 198–210.
- [26] SONKAWADE S D, POKHAREL S, KARTHIKEYAN B, et al. Small endogeneous peptide mitigates myocardial remodeling in a mouse model of cardioselective galectin-3 overexpression [J]. Circ Heart Fail, 2021, 14(9): e008510.
- [27] KARLSSON A, FOLLIN P, LEFFLER H, et al. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils [J]. Blood, 1998, 91(9): 3430–3438.
- [收稿日期] 2023–12–08

阿尔茨海默病中 β 淀粉样蛋白神经毒性机制及其在新药研发中的意义

随着人类医疗卫生事业的发展,人们的平均寿命不断延长。然而,寿命的延长使人更多时间处在衰老阶段,这就会增加罹患各种疾病的风险。科学研究表明,高龄是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的最大危险因素。AD 是一种典型的神经系统退行性疾病。流行病学调查表明,从 65 岁开始,也就是到了我国大多数人退休的年龄,AD 发病率就开始呈现指数型增长,几乎是每五年增加一倍。因此,科学认识和有效控制 AD 对于提高老年人生活质量至关重要。本综述讨论了以 $A\beta$ 为中心的 AD 致病机制方面的一些最新进展,并对未来有望成为药物靶点的抗 $A\beta$ 药物研发策略进行了展望。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(1):3-9. doi: 10.1002/ame2.12313)。