

张思怡,姜生涛,王淑君,等.去甲基化酶Tet2缺失对MRSA诱导的小鼠皮肤自噬功能及炎症反应的影响[J].华中农业大学学报,2025,44(6):314-322.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.031

## 去甲基化酶Tet2缺失对MRSA诱导的小鼠皮肤自噬功能及炎症反应的影响

张思怡<sup>1</sup>,姜生涛<sup>2</sup>,王淑君<sup>1</sup>,黄素洁<sup>1</sup>,韩珊珊<sup>1</sup>,  
金柱<sup>2</sup>,王德成<sup>1</sup>,朱银城<sup>3</sup>,余波<sup>3</sup>,晁金<sup>1</sup>

1.三峡大学基础医学院/三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室/宜昌市感染与炎症损伤重点实验室,宜昌 443002; 2.宜昌市第三人民医院,宜昌 443003; 3.宜昌市夷陵区动物疫病预防控制中心,宜昌 443110

**摘要** 为探讨10-11易位双加氧酶2(ten-eleven translocation 2, Tet2)在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)感染中对皮肤炎症反应和自噬功能的影响,在C57BL/6J野生型(*Tet2*<sup>+/+</sup>)和*Tet2*基因敲除型(*Tet2*<sup>-/-</sup>)小鼠皮下接种MRSA以建立小鼠皮肤脓肿模型,观察记录小鼠皮肤损伤变化和测定组织菌载量,并检测炎性因子及自噬相关基因的表达。结果发现,与*Tet2*<sup>+/+</sup>小鼠相比,*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠感染MRSA后表现出更严重的皮肤损伤和更高的组织菌载量( $P<0.01$ )。组织病理学观察显示,*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠感染部位表现为表皮和真皮明显增厚、胶原纤维断裂、皮脂腺萎缩、毛囊消失及大量炎性细胞浸润;透射电镜观察显示,*Tet2*<sup>+/+</sup>小鼠感染部位出现明显的自噬体结构,而在*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠感染部位未发现自噬相关结构。实时荧光定量PCR检测结果显示,*Tet2*缺失后小鼠促炎因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的mRNA表达水平极显著上调( $P<0.01$ ),抑炎性因子IL-10( $P<0.05$ )和TGF- $\beta$ 的mRNA表达显著下调( $P<0.001$ ),自噬标志物Sqstm1表达增加( $P<0.01$ ),而Map1lc3b表达降低( $P<0.01$ )。免疫组化结果进一步证实,*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠感染MRSA后p62蛋白表达升高,而LC3b表达降低。试验结果表明,*Tet2*通过调控自噬过程参与MRSA感染的免疫防御,*Tet2*缺失后导致自噬受阻和炎症反应失调,从而加重感染小鼠的皮肤组织损伤。

**关键词** 10-11易位双加氧酶2;基因敲除;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;皮肤损伤;自噬;炎症反应

**中图分类号** R751; R378    **文献标识码** A    **文章编号** 1000-2421(2025)06-0314-09

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)感染已成为全球公共卫生领域的重大挑战。自1961年首次分离出MRSA菌株以来,MRSA在医院感染以及社区获得性感染中的检出率持续上升<sup>[1]</sup>。MRSA是引起皮肤及软组织感染(skin and soft tissue infections, SSTIs)的主要病原菌之一,SSTIs又称皮肤及皮肤结构感染,可表现为单纯性感染或进展为复杂性感染,严重者可并发坏死性筋膜炎和菌血症等危及生命的并发症<sup>[2]</sup>。尽管抗生素治疗方案不断更新,但对MRSA感染的临床防治仍面临严峻挑战,深入阐明MRSA致病机制和宿主免疫防御机制具有重要意义。

表观遗传调控在宿主-病原体相互作用中发挥

关键作用。研究表明,病原体可通过影响DNA甲基化、组蛋白修饰等表观遗传机制调节宿主免疫应答<sup>[3]</sup>。10-11易位双加氧酶2(ten-eleven translocation 2, Tet2)是哺乳动物体内的一种 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)和Fe $^{2+}$ 依赖的DNA去甲基化酶,通过催化5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)转化为5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)参与基因表观遗传调控<sup>[4]</sup>。有研究发现,病原体可直接或间接提高DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)的表达,导致宿主细胞DNA过度甲基化和持续性炎症反应<sup>[5-6]</sup>。Tet2通过调节DNA甲基化水平影响IL-1 $\beta$ 、IL-6等炎症因子的表达,从而精细调控炎症反应的强度和持续时间<sup>[7-8]</sup>。此外,Tet2还参与自噬过

收稿日期:2025-04-11

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

张思怡,E-mail:xyzzz0217@163.com

通信作者:晁金,E-mail:chaojin028@163.com;余波,E-mail:917735922@qq.com

程的调控,在骨质疏松、脂质代谢紊乱等多种病理过程中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。

自噬是细胞应对各种应激条件的重要防御机制,在维持细胞稳态和更新再生中发挥核心作用。皮肤作为机体抵御外界有害因素的首要屏障,常暴露于多种可激活自噬的刺激因素,如病原体、紫外线、辐射和化学毒素等。自噬不仅可降解细胞内受损或衰老的细胞器及有害蛋白<sup>[11]</sup>,还能促进细胞内病原体的清除<sup>[12]</sup>,在皮肤创伤修复过程中,自噬参与炎症反应、上皮再生和血管新生等关键环节<sup>[13-14]</sup>。然而,Tet2在MRSA感染诱导的皮肤损伤中的作用及Tet2与自噬的关系尚未阐明。本研究通过Tet2基因敲除小鼠建立皮肤感染模型,分析Tet2对炎症反应及自噬的调控作用,以揭示Tet2在宿主抗MRSA免疫防御中的关键机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1)实验动物与菌株。SPF级野生型C57BL/6J小鼠(*Tet2*<sup>+/+</sup>)购自三峡大学实验动物中心,SPF级*Tet2*基因敲除(*Tet2*<sup>-/-</sup>)的C57BL/6J小鼠由笔者所在课题组委托苏州赛业生物科技有限公司采用CRISPR/Cas9技术构建,并通过PCR和引物测序进行基因鉴定,确认基因型后再进行杂合子互配扩增繁殖,获得*Tet2*基因全身敲除(*Tet2*<sup>-/-</sup>)小鼠。所有小鼠饲养环境温度为22~25℃,湿度55%~65%,光照时长为12 h。每日检查小鼠的全价营养颗粒饲料和饮用水是否充足,保证小鼠自由饮水和充分摄食,每周至少更换2次垫料。动物试验经三峡大学实验室动物福利与伦理委员会批准后进行(审批号:2024010W)。本研究中所用MRSA菌株(ST-239)由上海仁济医院李敏教授馈赠,由笔者所在课题组进行保种传代<sup>[15]</sup>。

2)主要试剂与仪器。胰酪大豆胨固体培养基(tryptose soya agar, TSA)及对应液体培养基(trypticase soy broth, TSB)购自广东环凯微生物科技有限公司,总RNA提取试剂、Taq酶预混液购自诺唯赞生物科技股份有限公司,cDNA一链合成预混液购自爱博泰克生物科技有限公司,Lc3b抗体(14600-1-AP)购于武汉三鹰生物技术有限公司,sqstm1/p62抗体(T55546)购自艾比玛特医药科技有限公司;OLYMPUS光学显微镜(日本)和Cellsens软件用于切片观察和图像采集, Thermo Scientific(美国)实时荧光定

量PCR仪用于mRNA水平检测,所用引物由笔者设计,委托北京擎科生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

1)感染用菌液制备。菌株培养、菌液制备和动物感染试验均在符合生物安全二级标准的实验环境中进行。从-80℃低温冰箱中取出MRSA菌株,解冻后涡旋混匀,取适量菌液划线接种于TSA平板,将培养平板倒置于细菌培养箱过夜孵育,18~24 h后选取单菌落转接至装有适量TSB培养基的试管中,在37℃条件下以200 r/min振荡培养至对数生长期,离心收集MRSA菌体,用无菌生理盐水重悬并调整菌液质量浓度至1×10<sup>9</sup> CFU/mL。

2)感染试验。随机选取6~8周龄、体质量18~22 g的SPF级雄性*Tet2*<sup>+/+</sup>小鼠和*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠各10只作为实验动物。小鼠麻醉后,先将小鼠腹部毛发剃短,再使用温和脱毛膏将小鼠腹部毛发彻底脱去以暴露皮肤;于小鼠左侧腹部皮下注射100 μL MRSA菌液,注射菌量为1×10<sup>8</sup> CFU,对照组注射等体积生理盐水(normal saline, NS);在接种后3周内对小鼠皮肤脓肿情况进行观察,记录感染部位脓肿体积及创面大小变化。试验分组:对照组接种生理盐水,分别为*Tet2*<sup>+/+</sup>小鼠未感染组(*Tet2*<sup>+/+</sup>+NS)和*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠未感染组(*Tet2*<sup>-/-</sup>+NS);试验组接种MRSA,分别为*Tet2*<sup>+/+</sup>小鼠感染组(*Tet2*<sup>+/+</sup>+MRSA)和*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠感染组(*Tet2*<sup>-/-</sup>+MRSA)。

3)脓肿体积的测定。接种后每隔1 d测量小鼠皮肤脓肿的长径(length, L)与宽径(width, W),脓肿体积(V)通过公式 $V=(\pi/6)L \cdot W^2$ 进行计算,直至试验结束<sup>[16]</sup>。

4)皮肤菌载量测定。取小鼠创面处直径约0.5 cm皮肤组织称质量后,加入含0.1%曲拉通X-100的组织裂解液进行匀浆处理;随后,将所得组织匀浆液按10倍梯度进行递增稀释,分别吸取100 μL不同质量浓度的组织匀浆稀释液,均匀涂布于TSA固体培养基表面,在37℃恒温培养箱中孵育18~24 h;统计各稀释梯度平板上的单菌落数,计算每克组织对应的CFU值,小鼠皮肤组织的菌载量表示为CFU/g。

5)实时荧光定量PCR(qPCR)。小鼠创面处皮肤组织研磨裂解后,经氯仿分层、异丙醇沉淀、乙醇洗涤获得RNA;使用分光光度计检测RNA浓度及纯度,取1 μg RNA进行逆转录(反应程序:37℃ 2 min, 55℃ 15 min, 85℃ 5 min),所得cDNA用于qPCR检测;qPCR反应体系含cDNA一链合成预混液和特异

性引物,反应程序为95℃预变性3 min,随后进行40个循环反应(95℃5 s,60℃30 s);检测结束后取CT平均值进行试验数据分析,以GAPDH作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各基因mRNA的相对表达,所有组别均设复孔并检测溶解曲线以确保数据可靠性。相应引物见表1。

表1 qPCR引物序列  
Table 1 Primer sequence of qPCR

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequence(5'-3')                        |
|---------------------|--|
| GAPDH               | F: TCTCCTCGCAGCTCAACA<br>R: TGTAGCCGTATTCTATTGTCA            |
| IL-1                | F: TCTGAAGAAGAGACGGCTGAGTTTC<br>R: CTGGTAGGTGTAAGGTGCTGATCTG |
| TNF- $\alpha$       | F: GGAATAGCCAGGAGGGAGAACAG<br>R: GCCAGTGAAGTGAAGGGACAGAAC    |
| TGF- $\beta$        | F: TCTGAAGAAGAGACGGCTGAGTTTC<br>R: CTGGTAGGTGTAAGGTGCTGATCTG |
| IL-10               | F: TGGAGCAGGTGAAAGATG<br>R: TCATTGTCATGTAGGCTTCT             |
| Map1lc3b            | F: GTGATTATAGAGCGATACAAGG<br>R: TCACCAGGAGGAAGAAGG           |
| Sqstm1              | F: CACAGGCACAGAAAGACAA<br>R: CCGACTCCAAGGCTATCT              |
| MMP-9               | F: TTGAAGTCTCAGAAGGTGGAT<br>R: ACTCACACGCCAGAAGAAT           |
| MMP-2               | F: CCACACCAACTACGATGATG<br>R: AACACAGCCTCTCCTCCT             |

6)H&E染色。将采集的小鼠皮肤组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,通过乙醇梯度脱水以去除组织中的水分;脱水完成后,依次置于二甲苯I 30 min、二甲苯II 30 min进行透明处理;将完成脱水的组织块通过石蜡包埋制成蜡块,切片机切取4  $\mu$ m厚度切片,于37℃环境烘干4~6 h;切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇复水后进行H&E染色:苏木精染5 min、1%盐酸乙醇分化1 min、伊红复染2 min,自然风干并用树脂进行封片。

7)免疫组织化学染色。在完成与H&E染色相同的脱蜡复水步骤后,切片经柠檬酸盐缓冲液沸水浴20 min进行抗原修复,自然冷却后PBS冲洗;随后滴加3%双氧水溶液,在室温条件下静置15 min;采用5%牛血清白蛋白在37℃环境下封闭处理15 min;加入稀释后的p62(1:300)和LC3b(1:100)一抗,在4℃环境下过夜孵育;次日滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:100),于室温下孵育1 h;应用二氨基联苯胺(DAB)完成显色反应,经蒸馏水冲洗后,采用梯度乙醇脱水至透明状态,待自然风干后使用中

性树脂进行封片处理。显微镜下镜检进行图片的采集和分析,使用软件Image-J对p62与LC3B的表达进行量化,通过积分光密度值与阳性染色面积比值得出平均光密度后作统计学分析。

8)透射电镜超微结构切片及染色。取小鼠创面皮肤组织,剔除皮下脂肪成分后浸没于2.5%戊二醛溶液固定液中,充分固定后使用切片机制备超薄切片。染色程序包括2个步骤:将切片置于载物铜网后倒扣于醋酸铀染液,染色30~45 min,用双蒸水清洗3次,滤纸吸附去除残留液滴;随后将载网放入柠檬酸铅染液,染色10~15 min,重复清洗步骤,用滤纸吸干残余水分后,载网置于干燥避光环境中保存。电镜下观察组织超微结构。

9)统计学处理。应用GraphPad Prism 8.0作图,数据采用“平均数±标准差”表示,使用独立样本t检验对2组数据进行统计学分析,以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 表示差异极显著。每组试验至少独立重复3次。

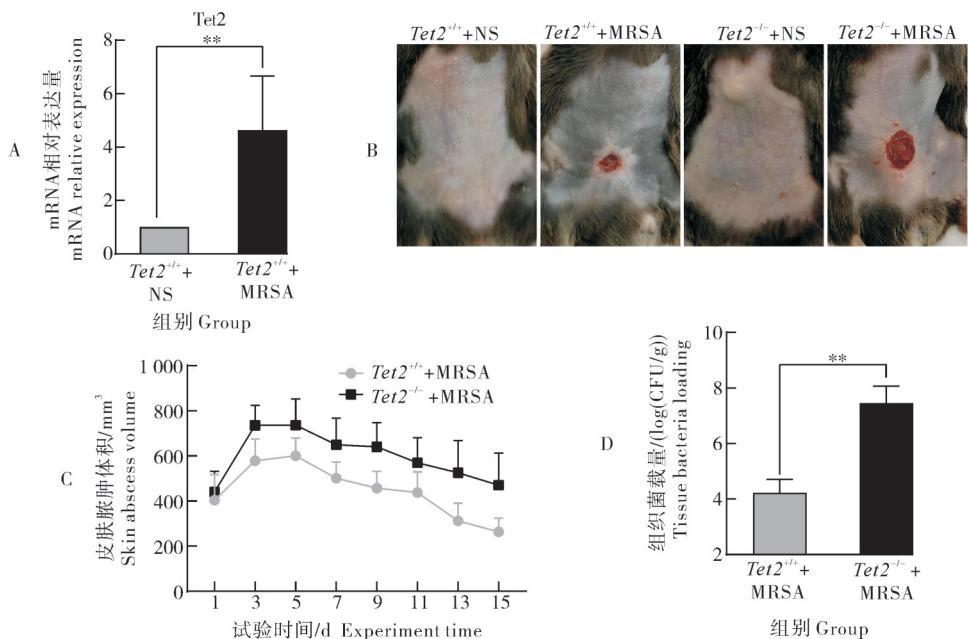
## 2 结果与分析

### 2.1 Tet2缺失对MRSA感染小鼠皮肤损伤及菌载量的影响

如图1A所示,与对照组相比,MRSA感染后,Tet2<sup>+/+</sup>小鼠皮肤组织中Tet2 mRNA水平极显著增加( $P<0.01$ ),提示Tet2可能参与MRSA感染的宿主应答。随后在Tet2<sup>+/+</sup>和Tet2<sup>-/-</sup>小鼠腹部皮下接种MRSA,观察皮肤感染部位的病理变化。结果显示,Tet2<sup>+/+</sup>+MRSA组小鼠接种部位出现局限性肿胀,皮肤肿胀范围较小且逐渐愈合。相比之下,Tet2<sup>-/-</sup>小鼠表现出进行性组织损伤,特征为肿胀体积持续增大、皮肤溃烂和伤口愈合延迟(图1B、图1C)。为进一步评估Tet2缺失对宿主清除细菌能力的影响,对感染后皮肤组织进行菌载量检测。结果显示,Tet2<sup>-/-</sup>小鼠皮肤组织中的菌载量极显著高于Tet2<sup>+/+</sup>小鼠( $P<0.01$ ,图1D),提示Tet2缺失损害了宿主对MRSA的清除能力。

### 2.2 MRSA感染诱导的小鼠皮肤组织病理损伤观察和炎症因子表达差异

H&E染色结果显示,与对照组相比,Tet2<sup>+/+</sup>小鼠感染MRSA后皮损部位表皮略微增厚,但皮肤各层结构依然较为完整清晰,可见散在炎性细胞浸润。Tet2<sup>-/-</sup>小鼠感染MRSA后皮损部位出现显著的组织病理改变,主要表现为皮肤表皮和真皮明显增厚;真皮胶原纤维排列紊乱、断裂,其中有大量炎性细胞



“\*”( $P<0.05$ )表示对照组与试验组之间差异显著，“\*\*”( $P<0.01$ )、“\*\*\*”( $P<0.001$ )表示差异极显著。下同。“\*”( $P<0.05$ ) showed significant difference between control group and experimental group, “\*\*”( $P<0.01$ )、“\*\*\*”( $P<0.001$ ) showed extremely significant difference. The same as below.

图1 小鼠接种MRSA后Tet2基因表达差异(A)、皮肤脓肿(B)、脓肿体积(C)及菌载量(D)变化  
Fig.1 Comparison of *Tet2* gene expression (A), skin lesions (B), abscess volume (C), and bacterial load (D) in mice inoculated with MRSA

浸润；皮脂腺萎缩，毛囊结构消失(图2A)。qPCR结果显示，*Tet2<sup>-/-</sup> + MRSA*小鼠皮肤组织中促炎细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的mRNA水平极显著上调( $P<0.001$ )，抑炎细胞因子TGF- $\beta$ ( $P<0.001$ )和IL-10( $P<0.05$ )的表达显著降低(图2B)。说明*Tet2*缺失可加重MRSA感染诱导的皮肤病理损伤和炎症反应。

### 2.3 MRSA感染后小鼠皮肤自噬结构观察及自噬基因表达检测

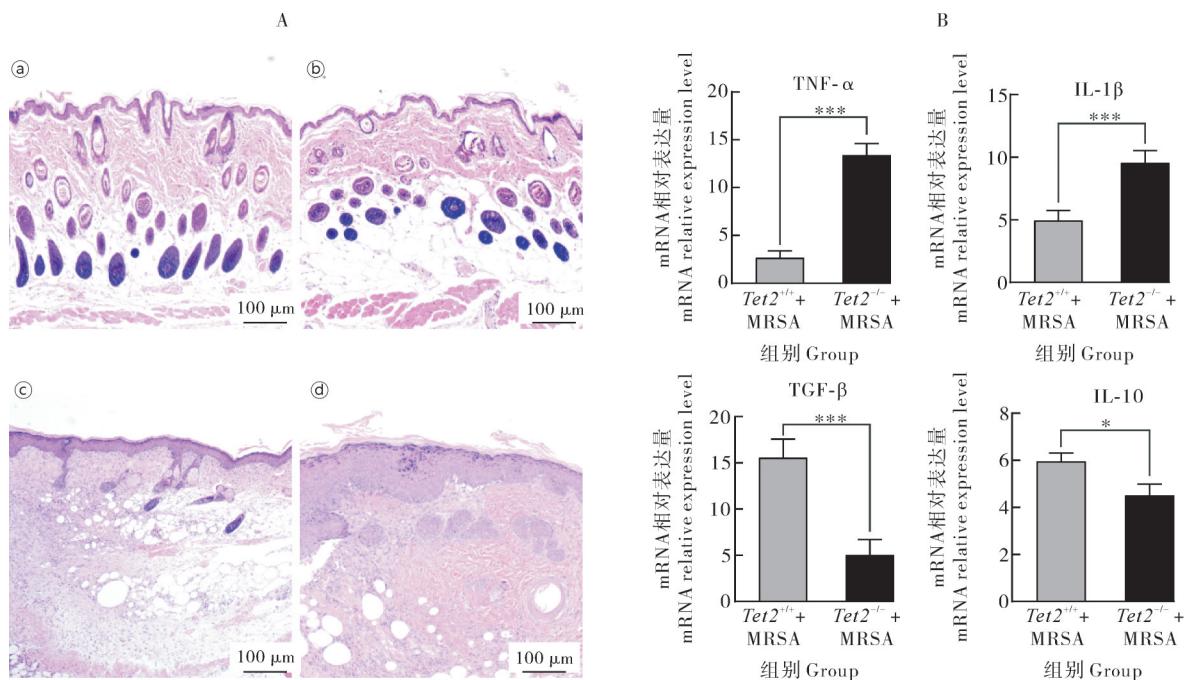
通过透射电镜观察小鼠感染MRSA后的皮肤组织超微病理结构发现，*Tet2<sup>+/+</sup>*小鼠可见完整的细胞结构和大量特征性的自噬相关结构(图3A-Ⓐ，白色箭头)。需要注意的是，部分自噬体内可见被包裹的细菌成分(图3A-Ⓑ，红色箭头)。相比之下，*Tet2<sup>-/-</sup>*小鼠细胞结构紊乱，且在多个视野下均未观察到典型的自噬相关结构(图3A-Ⓒ、图3A-Ⓓ)。为验证形态学观察结果，进一步检测组织中自噬标志物的表达水平。RT-qPCR结果显示，与*Tet2<sup>+/+</sup>*组相比，*Tet2<sup>-/-</sup> + MRSA*小鼠皮肤组织中自噬相关基因*Map1lc3b*(编码LC3b蛋白)表达极显著下调( $P<0.01$ )，而自噬底物*Sqstm1*(编码p62蛋白)的表达极显著上调( $P<0.01$ ) (图3B)，提示自噬流受到抑制。此外，*Tet2*缺失后，与组织损伤修复相关的基质金属蛋白

酶MMP-2和MMP-9的表达水平均极显著上调( $P<0.01$ )。这些结果提示，*Tet2*缺失抑制小鼠皮肤细胞自噬水平，影响机体对病原体的清除，这可能与感染部位持续性炎症反应和组织损伤有关。

### 2.4 MRSA感染后小鼠皮肤自噬相关蛋白分布及表达丰度差异

为进一步验证*Tet2*缺失对皮肤细胞自噬的影响，利用免疫组化法检测自噬标志物LC3b和p62在小鼠皮损部位组织的表达。如图4A所示，*Tet2<sup>+/+</sup>*小鼠皮肤组织中LC3b在表皮中的颗粒层和棘层以及真皮层均有较高表达，而p62阳性信号相对较弱。相反，在*Tet2<sup>-/-</sup>*小鼠皮肤组织中LC3b阳性信号在各部位均显著降低，而p62呈广泛且强阳性表达，真皮层阳性信号增加最为明显，表明p62蛋白的积累可能与自噬流的受阻有关。

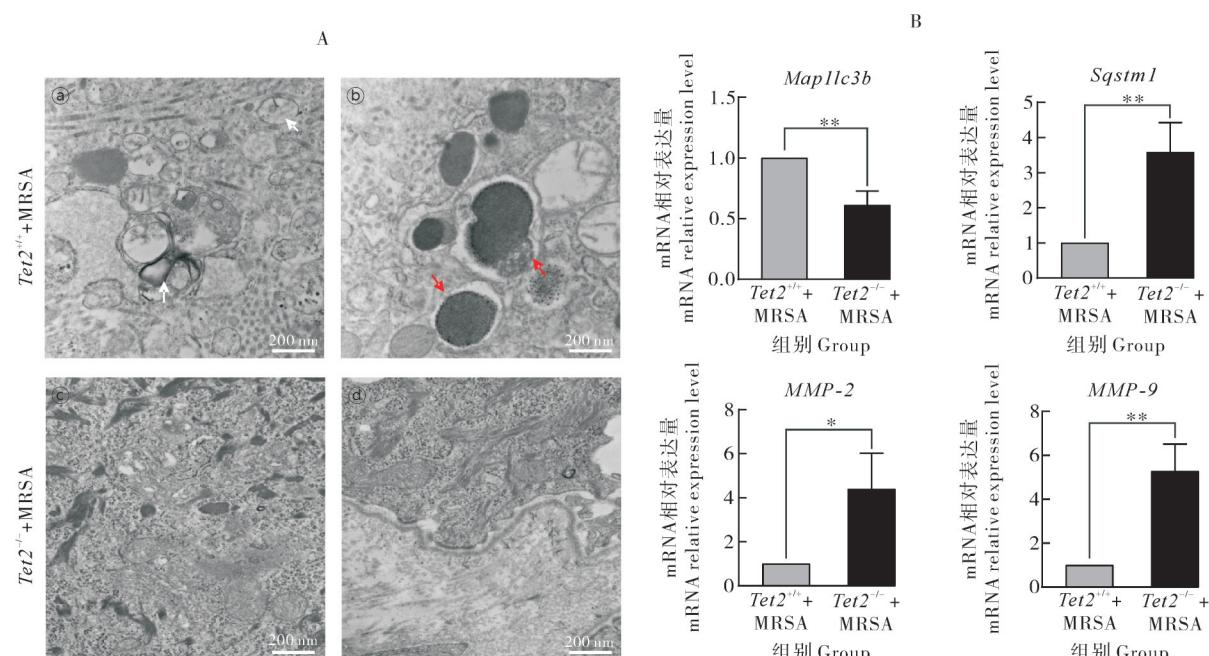
对免疫组化染色结果进行半定量分析，结果见图4B。与*Tet2<sup>+/+</sup> + MRSA*小鼠相比，*Tet2<sup>-/-</sup> + MRSA*小鼠皮肤组织中LC3b的平均光密度值(average optical density, AOD)极显著降低( $P<0.001$ )，而p62的AOD值极显著升高( $P<0.01$ )。这种LC3b下调和p62蓄积的表达模式进一步支持了*Tet2*缺失抑制自噬流的推论。



A: ①为  $Tet2^{+/+}$  小鼠未感染组, ②为  $Tet2^{-/-}$  小鼠未感染组, ③为  $Tet2^{-/-}$  小鼠感染组, ④为  $Tet2^{-/-}$  小鼠感染组。标尺=100  $\mu$ m。  
A: ① refers to  $Tet2^{+/+}$  uninfected mice group, ② refers to  $Tet2^{-/-}$  uninfected mice group, ③ refers to  $Tet2^{-/-}$  infected mice group, ④ refers to  $Tet2^{-/-}$  infected mice group. Scale bar=100  $\mu$ m.

图2 小鼠接种MRSA后皮肤组织病理学观察(A)及细胞因子表达变化(B)

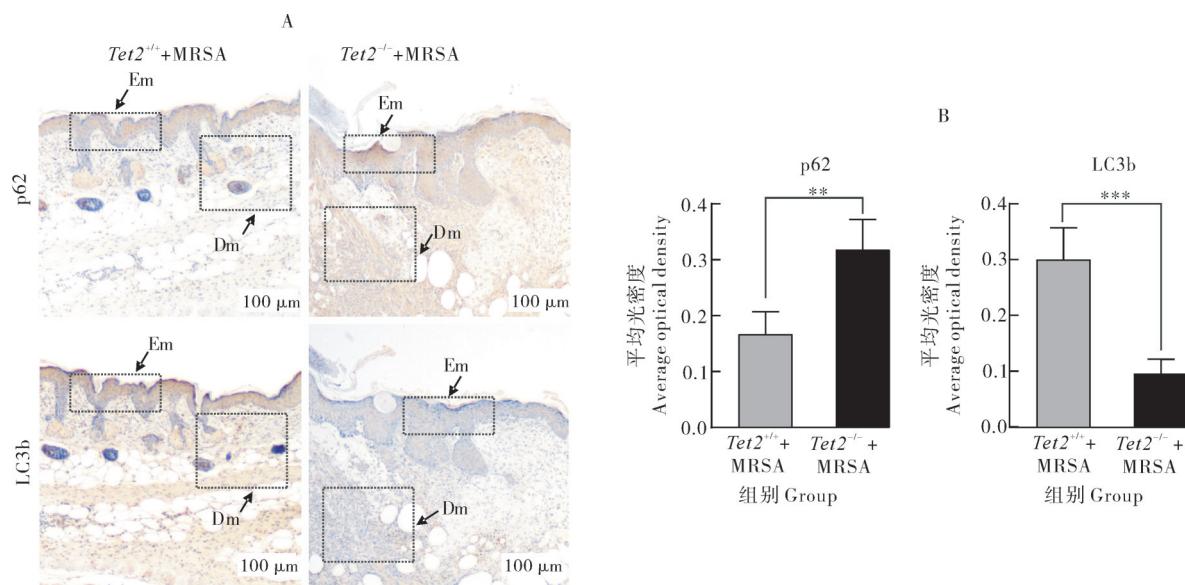
Fig. 2 Histopathology examination (A) and the change of cytokines (B) in lesional skin of mice after MRSA infection



A: ①、②为  $Tet2^{+/+}$  小鼠感染组, ③、④为  $Tet2^{-/-}$  小鼠感染组。标尺=200 nm。A: ① and ② refers to  $Tet2^{+/+}$  infected mice group, ③ and ④ refers to  $Tet2^{-/-}$  infected mice group. Scale bar=200 nm.

图3 小鼠接种MRSA后皮肤组织超微结构观察(A)及自噬相关基因(B)变化

Fig. 3 Ultrastructural observation of skin tissue (A) and changes of autophagy-related genes (B) in mice inoculated with MRSA



Em:表皮;Dm:真皮。标尺=100 μm。Em: Epidermis; Dm: Dermis. Scale bar=100 μm.

图4 小鼠接种MRSA后皮肤组织中自噬相关蛋白的分布(A)及表达量化分析(B)

Fig. 4 Distribution (A) and quantitation (B) of autophagy-related proteins in skin tissues of mice inoculated with MRSA

### 3 讨 论

自噬作为细胞的保守降解途径,在维持皮肤组织稳态和抵御病原体入侵中发挥重要作用<sup>[17-18]</sup>。本研究透射电镜结果显示,*Tet2*<sup>+/+</sup>小鼠皮肤在MRSA感染后出现大量自噬小体及自噬溶酶体,而在*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠受感染皮肤组织中未观察到相关自噬结构;同时,免疫组织化学染色结果表明在*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠中自噬受到抑制,提示正常细胞自噬在宿主抗菌免疫中具有重要作用。宿主通过自噬选择性清除胞内病原体的方式又称为异种自噬<sup>[19-20]</sup>,研究表明多数细菌感染机体后,细菌脂多糖或肽聚糖成分被相应受体识别,诱导自噬起始复合物的产生从而激活自噬,以抵御侵入宿主细胞内的病原体<sup>[21-22]</sup>。

细菌与宿主自噬系统的相互作用十分复杂。一方面,自噬可通过降解途径清除病原体;另一方面,某些病原体已进化出逃避或抑制自噬的策略<sup>[23]</sup>。如小鼠缺乏自噬相关蛋白ATG5后,结核分枝杆菌感染加剧肺部感染,死亡率更高<sup>[24]</sup>。肠炎沙门氏菌通过效应蛋白AvrA干扰宿主细胞自噬,使细菌在宿主体内持续存活和增殖<sup>[25]</sup>。针对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA),有研究报道SA膜囊泡可激活固有免疫并诱导自噬<sup>[26]</sup>,自噬的激活可抑制过度的炎症反应<sup>[27]</sup>。然而,SA也能通过自身毒力因子IsaB抑制细胞自噬水平来增强细菌的生存能

力<sup>[28]</sup>,可见自噬在宿主抗SA感染中起着重要作用,但是SA感染过程中自噬发挥的作用和机制尚未得到进一步研究。本研究发现,*Tet2*<sup>+/+</sup>小鼠感染MRSA后,皮肤组织*Tet2*表达上调,而*Tet2*缺失导致自噬受损、细菌清除能力下降,推测*Tet2*可能通过调控自噬参与了宿主抵抗MRSA感染的过程。

作为表观遗传调控因子,*Tet2*在免疫应答中发挥多重功能<sup>[29]</sup>。研究表明,*Tet2*缺失加重内毒素休克和结肠炎的炎症反应<sup>[7]</sup>。在肺炎链球菌感染的研究中,*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠出现更严重的肺部坏死和出血,肺泡中存在广泛的炎症细胞浸润且小鼠死亡率明显升高<sup>[30]</sup>。上述报道与本研究观察到的MRSA感染表型一致。值得注意的是,*Tet2*还能通过调控自噬参与破骨细胞生成、肝脏脂肪变性和动脉粥样硬化等多种相关疾病<sup>[9-10,31]</sup>。虽然已知*Tet2*可通过调控细胞因子表达影响机体的抗菌免疫<sup>[32-33]</sup>,但*Tet2*是否通过自噬途径发挥作用尚未阐明。有研究发现,军团菌感染中自噬相关基因异常甲基化会导致自噬受损,而使用甲基化抑制剂能够恢复这些自噬相关基因的表达水平并限制细菌复制<sup>[34]</sup>。Muhammad等<sup>[35]</sup>研究报道,幽门螺杆菌感染导致相关基因的过度甲基化,自噬水平受损从而促进胃癌的发生发展。这为*Tet2*通过DNA去甲基化调控自噬水平参与抗菌免疫提供了理论基础。本研究发现,*Tet2*<sup>-/-</sup>小鼠感染MRSA后皮损组织中细菌载量增加,同时伴随

着炎症病理损伤的加重以及自噬水平的降低。这些结果表明, *Tet2* 在抵抗 MRSA 引起的皮肤感染中发挥重要作用, 潜在机制可能涉及到细胞通过异种自噬途径促进细菌的清除。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 通过降解和重塑细胞外基质, 参与组织修复、炎症反应、血管生成等过程<sup>[36]</sup>。皮肤受损后 MMP-9 表达水平上升, 随着创面愈合表达逐渐降低; 而持续的 MMP-9 激活会导致细胞外基质过度降解和炎症反应失调<sup>[37]</sup>。本研究发现, *Tet2* 缺失后 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达显著增加, 而在糖尿病足溃疡的研究中, *Tet2* 通过 DNA 去甲基化激活 MMP-9 表达导致皮肤溃疡难以愈合<sup>[38]</sup>。这种差异可能反映了不同病理条件下 *Tet2* 调控 MMPs 表达的特异性, 具体作用机制有待进一步研究。

本研究通过建立 MRSA 感染所致的小鼠皮肤肿瘤模型, 发现感染后小鼠皮肤组织中 *Tet2* 表达显著上调。而在 *Tet2*<sup>-/-</sup> 小鼠中, 感染后表现出更严重的皮肤组织病理损伤, 并伴随自噬活性降低。这些结果表明, 在 MRSA 感染过程中, *Tet2* 可能通过促进小鼠自噬水平参与宿主抗细菌感染的免疫应答; 同时, *Tet2* 还通过调控炎症相关基因的表达, 参与炎症反应的起始与消退过程。综上所述, 本研究揭示了 *Tet2* 与自噬在 MRSA 皮肤感染中的保护作用, 可为探究表观遗传调控在抗感染免疫中的作用提供新的理论依据。然而, *Tet2* 调控自噬参与宿主抗菌免疫的具体机制仍需深入探索。

## 参考文献 References

- [1] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2021 年 CHINET 中国细菌耐药监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2022, 22(5): 521-530. HU F P, GUO Y, ZHU D M, et al. CHINET surveillance of antimicrobial resistance among the bacterial isolates in 2021 [J]. Chinese journal of infection and chemotherapy, 2022, 22(5): 521-530 (in Chinese with English abstract).
- [2] SARTELLI M, COCCOLINI F, KLUGER Y, et al. WSES/GAIS/WSIS/SIS-E/AAST global clinical pathways for patients with skin and soft tissue infections [J/OL]. World journal of emergency surgery, 2022, 17 (1) : 3 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1186/s13017-022-00406-2>.
- [3] GRABIEC A M, POTEMPA J. Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases [J]. Critical reviews in microbiology, 2018, 44(3): 336-350.
- [4] ITO S, D'ALESSIO A C, TARANOVA O V, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification [J]. Nature, 2010, 466 (7310): 1129-1133.
- [5] TOLG C, SABHA N, CORTESE R, et al. Uropathogenic *E. coli* infection provokes epigenetic downregulation of CDKN2A (p16INK4A) in uroepithelial cells [J]. Laboratory investigation, 2011, 91(6): 825-836.
- [6] BARADARAN E, MOHARRAMIPOUR S, ASGARI S, et al. Induction of DNA methyltransferase genes in *Helicoverpa armigera* following injection of pathogenic bacteria modulates expression of antimicrobial peptides and affects bacterial proliferation [J/OL]. J Insect Physiol, 2019, 118: 103939 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103939>.
- [7] ZHANG Q, ZHAO K, SHEN Q C, et al. *Tet2* is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6 [J]. Nature, 2015, 525(7569): 389-393.
- [8] FUSTER J J, MACLAUCHLAN S, ZURIAGA M A, et al. Clonal hematopoiesis associated with *TET2* deficiency accelerates atherosclerosis development in mice [J]. Science, 2017, 355(6327): 842-847.
- [9] YANG C, TAO H Q, ZHANG H F, et al. *TET2* regulates osteoclastogenesis by modulating autophagy in OVX-induced bone loss [J]. Autophagy, 2022, 18(12): 2817-2829.
- [10] LI T, FANG T, XU L X, et al. Empagliflozin alleviates hepatic steatosis by activating the AMPK-TET2-autophagy pathway *in vivo* and *in vitro* [J/OL]. Frontiers in pharmacology, 2020, 11: 622153 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.622153>.
- [11] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.
- [12] VOZZA E G, MULCAHY M E, MCLOUGHLIN R M. Making the most of the host: targeting the autophagy pathway facilitates *staphylococcus aureus* intracellular survival in neutrophils [J/OL]. Frontiers in immunology, 2021, 12: 667387 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667387>.
- [13] JEONG I, BAE W, CHOI J, et al. Ischemia induces autophagy of endothelial cells and stimulates angiogenic effects in a hindlimb ischemia mouse model [J/OL]. Cell death & disease, 2020, 11 (8) : 624 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02849-4>.
- [14] KAWANO A, ARIYOSHI W, YOSHIOKA Y, et al. Docosahexaenoic acid enhances M2 macrophage polarization *via* the p38 signaling pathway and autophagy [J]. Journal of cellular biochemistry, 2019, 120(8): 12604-12617.
- [15] LEI Z Q, ZHANG D, LU B Y, et al. Activation of mast cells in skin abscess induced by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infection in mice [J]. Research in veterinary science, 2018, 118: 66-71.
- [16] 王德成, 王星, 周文江, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌皮肤肿瘤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. 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 laboratorium animalis scientia sinica*, 2010, 18 (3) : 221-224 (in Chinese with English abstract).
- [17] XIE Z P, KLIONSKY D J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations [J]. *Nature cell biology*, 2007, 9 (10):1102-1109.
- [18] 梁佳,彭辉,宗尤佳,等. Nrf2与自噬在皮肤损伤中的调控作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2023, 38(9) : 1047-1052. LI-ANG J, PENG H, ZONG Y J, et al. Regulatory role of Nrf2 and autophagy in skin damage [J]. *The Chinese journal of dermatovenereology*, 2023, 38(9) : 1047-1052 (in Chinese with English abstract).
- [19] KWON D H, SONG H K. A structural view of xenophagy, a battle between host and microbes [J]. *Molecules and cells*, 2018, 41(1):27-34.
- [20] COATES M, BLANCHARD S, MACLEOD A S, et al. Innate antimicrobial immunity in the skin: a protective barrier against bacteria, viruses, and fungi [J/OL]. *PLoS pathogens*, 2018, 14 (12) : e1007353 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007353>.
- [21] WANG Z H, LI C H. Xenophagy in innate immunity: a battle between host and pathogen [J/OL]. *Dev Comp Immunol*, 2020, 109: 103693 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103693>.
- [22] 邓亦宁,张云科,焦晓宇,等. 细菌感染诱发细胞自噬的研究进展[J]. 热带生物学报, 2023, 14(3):279-287. DENG Y N, ZHANG Y K, JIAO X Y, et al. Advances in autophagy induced by bacterial infection [J]. *Journal of tropical biology*, 2023, 14(3):279-287 (in Chinese with English abstract).
- [23] 王招弟,丁红雷. 细菌与自噬的抗争:死亡或重生[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8) : 1471-1483. WANG Z D, DING H L. Fighting between bacteria and autophagy : death or rebirth[J]. *Chinese journal of biotechnology*, 2020, 36(8) : 1471-1483 (in Chinese with English abstract).
- [24] GOLOVKINE G R, ROBERTS A W, MORRISON H M, et al. Autophagy restricts *Mycobacterium tuberculosis* during acute infection in mice [J]. *Nature microbiology*, 2023, 8(5) : 819-832.
- [25] JIAO Y, ZHANG Y G, LIN Z J, et al. *Salmonella enteritidis* effector AvrA suppresses autophagy by reducing beclin-1 protein [J/OL]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 686 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00686>.
- [26] BITTO N J, CHENG L, JOHNSTON E L, et al. *Staphylococcus aureus* membrane vesicles contain immunostimulatory DNA, RNA and peptidoglycan that activate innate immune receptors and induce autophagy [J/OL]. *Journal of extracellular vesicles*, 2021, 10(6) : e12080 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1002/jev2.12080>.
- [27] ZHANG S F, HUANG X F, XIU H Q, et al. The attenuation of Th1 and Th17 responses *via* autophagy protects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced sepsis [J/OL]. *Microbes infect*, 2021, 23 (8) : 104833 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104833>.
- [28] LIU P F, CHENG J S, SY C L, et al. IsaB inhibits autophagic flux to promote host transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of investigative dermatology*, 2015, 135(11):2714-2722.
- [29] CONG B Y, ZHANG Q, CAO X T. The function and regulation of TET2 in innate immunity and inflammation [J]. *Protein & cell*, 2021, 12(3):165-173.
- [30] QUIN C, DEJONG E N, COOK E K, et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to bacterial pneumonia is dependent on Tet2 function [J/OL]. *Journal of clinical investigation*, 2024, 134 (11) : e171002 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1172/JCI171002>.
- [31] PENG J, YANG Q, LI A F, et al. Tet methylcytosine dioxygenase 2 inhibits atherosclerosis *via* upregulation of autophagy in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47):76423-76436.
- [32] ZHU C Z, CAI Y, MO S W, et al. NF- $\kappa$ B-mediated TET2-dependent TNF promoter demethylation drives Mtb-upregulation TNF expression in macrophages [J/OL]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2021, 129:102108 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102108>.
- [33] QIN W H, BRANDS X, MATSUMOTO H, et al. Role of myeloid Tet methylcytosine dioxygenase 2 in pulmonary and peritoneal inflammation induced by lipopolysaccharide and peritonitis induced by *Escherichia coli* [J/OL]. *Cells*, 2021, 11 (1) : 82 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.3390/cells11010082>.
- [34] ABD EL MAKSoud A I, ELEBEEDY D, ABASS N H, et al. Methylomic changes of autophagy-related genes by legionella effector Lpg2936 in infected macrophages [J/OL]. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020, 7: 390 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00390>.
- [35] MUHAMMAD J S, NANJO S, ANDO T, et al. Autophagy impairment by *Helicobacter pylori*-induced methylation silencing of MAP1LC3Av1 promotes gastric carcinogenesis [J]. *International journal of cancer*, 2017, 140(10) : 2272-2283.
- [36] NAGASE H, VISSE R, MURPHY G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [J]. *Cardiovascular research*, 2006, 69(3):562-573.
- [37] 陈端凯,冯时,唐乾利,等. 湿润暴露疗法/湿润烧伤膏对慢性创面组织中MMP-2和MMP-9表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(2):288-294. CHEN D K, FENG S, TANG Q L, et al. Effect of MEBT/MEBO on expression of MMP-2 and MMP-9 in chronic refractory wounds [J]. *Chinese pharmacological bulletin*, 2020, 36 (2) : 288-294 (in Chinese with English abstract).

- lish abstract).
- [38] ZHOU L Y, REN M, ZENG T T, et al. TET2-interacting long noncoding RNA promotes active DNA demethylation of the MMP-9 promoter in diabetic wound healing [J/OL]. *Cell death disease*, 2019; 10(11): 813 [2025-04-11]. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2047-6>.

## Effects of Tet2 demethylase deletion on MRSA-induced autophagy and inflammatory response in mouse skin

ZHANG Siyi<sup>1</sup>, JIANG Shengtao<sup>2</sup>, WANG Shujun<sup>1</sup>, HUANG Sujie<sup>1</sup>, HAN Shanshan<sup>1</sup>, JIN Zhu<sup>2</sup>, WANG Decheng<sup>1</sup>, ZHU Yincheng<sup>3</sup>, YU Bo<sup>3</sup>, CHAO Jin<sup>1</sup>

1. College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University/  
Hubei Provincial Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy/  
Yichang City Key Laboratory of Infection and Inflammation, Yichang 443002, China;

2. The Third People's Hospital of Yichang, Yichang 443003, China;

3. Yichang City Yiling District Animal Disease Prevent and Control Center, Yichang 443110, China

**Abstract** The role of ten-eleven translocation 2 (Tet2) in host defense against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and its potential effects on the inflammatory response and autophagy in mouse skin were studied. Subcutaneous inoculation of MRSA was performed in C57BL/6J Wild-type (*Tet2*<sup>+/+</sup>) and Tet2 knockout (*Tet2*<sup>-/-</sup>) mice to establish a murine skin abscess model. The changes in lesions of mouse skin were monitored, the tissue bacterial loads were measured. The expression of inflammatory factors and autophagy related genes were detected. The result showed that *Tet2*<sup>-/-</sup> mice infected with MRSA had more severe damage in skin and higher tissue bacterial loads ( $P < 0.01$ ) compared with *Tet2*<sup>+/+</sup> mice. Changes in severe histopathology including the thickened epidermis, the dermis with broken collagen fibers, sebaceous gland atrophy and numerous infiltrated extensive inflammatory cells were observed in MRSA-infected *Tet2*<sup>-/-</sup> mice. A large number of autophagosomal architectures were formed in MRSA-infected *Tet2*<sup>+/+</sup> mice under examination with transmission electron microscopy, whereas they are rarely found in *Tet2*<sup>-/-</sup> mice. The result of Real-time quantitative PCR detection showed that Tet2 deficiency resulted in extremely significant up-regulation of pro-inflammatory mediators including IL-1 and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), alongside down-regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 ( $P < 0.05$ ) and TGF- $\beta$  ( $P < 0.001$ ). Sqstm1 (p62) and Map1lc3b (LC3b) as two classical indicators for autophagy in *Tet2*<sup>-/-</sup> mice were elevated and decreased compared to that in *Tet2*<sup>+/+</sup> mice ( $P < 0.01$ ) during MRSA-infection. The result of immunohistochemistry staining showed that there was extensive expression of p62 and decreased expression of LC3b in Tet2-deficient mice, indicating that Tet2 plays a protective role in MRSA-mediated skin injury by promoting autophagy, and its absence results in impaired autophagy and dysregulated inflammatory responses, ultimately leading to the exacerbated pathology of skin tissue in infected mice.

**Keywords** ten-eleven translocation 2 (Tet2); gene knockout; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); skin injury; autophagy; inflammatory response

(责任编辑:胡 敏)