



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: IL-17A 在高耐药且高毒力金黄色葡萄球菌急性吸入性肺炎中的作用  
作者: 匡琪, 朱小雨, 李璐, 王雪燕, 闫培杰, 张丽丽, 吕蒙, 胡凌飞, 周冬生, 杨文慧  
网络首发日期: 2026-03-02  
引用格式: 匡琪, 朱小雨, 李璐, 王雪燕, 闫培杰, 张丽丽, 吕蒙, 胡凌飞, 周冬生, 杨文慧. IL-17A 在高耐药且高毒力金黄色葡萄球菌急性吸入性肺炎中的作用 [J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260302.1429.002>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## IL-17A 在高耐药且高毒力金黄色葡萄球菌急性吸入性肺炎中的作用

匡琪<sup>1,2</sup>,朱小雨<sup>2</sup>,李璐<sup>2</sup>,王雪燕<sup>1,2</sup>,闫培杰<sup>2</sup>,张丽丽<sup>2</sup>,吕蒙<sup>2</sup>,胡凌飞<sup>2</sup>,周冬生<sup>2</sup>,杨文慧

1,2

(<sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院,合肥 230032;<sup>2</sup>军事科学院军事医学研究院,北京 100071)

**摘要** **目的** 探究白细胞介素 (IL)-17A 在高耐药且高毒力金黄色葡萄球菌 USA300-R 所致小鼠急性吸入性肺炎中的作用。**方法** 利用气溶胶肺递送技术构建 USA300-R 小鼠急性吸入性肺炎模型,通过转录组测序 (RNA-seq)、酶联免疫吸附实验 (ELISA) 分别检测感染小鼠肺部 *Il17a* 基因、IL-17A 蛋白表达趋势;利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *Il17a* 基因敲除 (*Il17a*<sup>-/-</sup>) 小鼠,比较 *Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠和野生型小鼠吸入感染 USA300-R 后的生存情况、体质量、肺部菌载量和肺组织病理变化趋势。**结果** USA300-R 感染后,小鼠肺组织 *Il17a* 基因表达水平、肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-17A 蛋白表达水平在感染后 12 h 较感染前分别提升 50 倍 ( $P < 0.01$ )、6 倍 ( $P < 0.001$ );相比于野生型小鼠,*Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠肺组织菌载量在感染后 12 h 和 24 h 均提高约 10 倍 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ),但肺组织病理损伤程度显著减弱,肺泡壁增厚程度减轻,中性粒细胞浸润程度显著下降,存活率提高约 50% ( $P < 0.05$ )。**结论** IL-17A 在金黄色葡萄球菌 USA300-R 急性吸入性肺炎中通过招募中性粒细胞参与杀菌,但过度浸润的中性粒细胞加剧小鼠肺部炎症损伤,降低存活率,是潜在的治疗靶点。

**关键词** IL-17A;金黄色葡萄球菌;肺炎;促炎;中性粒细胞;基因敲除

**中图分类号** R378.1;R563.1

**文献标识码** A

### Role of IL-17A in acute inhalational pneumonia caused by highly virulent and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

Kuang Qi<sup>1,2</sup>, Zhu Xiaoyu<sup>2</sup>, Li Lu<sup>2</sup>, Wang Xueyan<sup>1,2</sup>, Yan Peijie<sup>2</sup>, Zhang Lili<sup>2</sup>, Lü Meng<sup>2</sup>, Hu Lingfei<sup>2</sup>, Zhou Dongsheng<sup>2</sup>, Yang Wenhui<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071)

**Abstract** **Objective** To investigate the role of Interleukin (IL)-17A in acute inhalational pneumonia induced by the highly drug-resistant and hypervirulent *Staphylococcus aureus* strain

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2024YFC2309302)

作者简介:匡琪,女,硕士研究生;

杨文慧,女,博士,副研究员,硕士生导师,通信作者, E-mail: fionyoung@163.com

USA300-R in mice. **Methods** An acute inhalational pneumonia model was established in mice using an aerosolized pulmonary delivery technique. RNA sequencing (RNA-seq) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were employed to examine the expression dynamics of *Il17a* mRNA and IL-17A protein, respectively, in the lungs of infected mice. *Il17a* knockout (*Il17a*<sup>-/-</sup>) mice were generated using CRISPR/Cas9 gene editing technology. The survival rate, body weight, bacterial load in lung tissue, and histopathological changes were compared between *Il17a*<sup>-/-</sup> and wild-type (WT) mice following inhalational infection with USA300-R. **Results** 12 hours after USA300-R infection, compared to pre-infection, the expression level of *Il17a* mRNA in lung tissue and the level of IL-17A protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) increased by approximately 50-fold ( $P < 0.01$ ) and 6-fold ( $P < 0.001$ ), respectively. Compared to WT mice, *Il17a*<sup>-/-</sup> mice exhibited approximately 10-fold higher bacterial loads in lung tissue at both 12 and 24 hours post-infection ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ). However, they showed significantly attenuated lung histopathological injury, reduced alveolar wall thickening, markedly decreased neutrophil infiltration, and an approximately 50% improvement in survival rate ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In acute *Staphylococcus aureus* USA300-R inhalational pneumonia, IL-17A contributes to bacterial clearance by recruiting neutrophils; however, excessive neutrophil infiltration exacerbates pulmonary inflammation and injury, reduces survival rates, and represents a potential therapeutic target.

**Keywords** IL-17A; *Staphylococcus aureus*; pneumonia; pro-inflammatory effect; neutrophil; gene knockout

**Fund program** National Key Research and Development Program of China (No. 2024YFC2309302)

**Corresponding author** Yang Wenhui, E-mail: fionyoung@163.com

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是一种重要耐药致病菌<sup>[1]</sup>, 被世界卫生组织列为“高度优先”病原体。MRSA 可导致皮肤感染、肺炎等多种疾病, 致死率约为 63.1%<sup>[2]</sup>, 其中肺炎致死高达 16%<sup>[3-4]</sup>。目前, 万古霉素是治疗 MRSA 的首选药物<sup>[4]</sup>, 但其副作用显著<sup>[1, 5]</sup>, 并存在诱导耐药风险<sup>[6]</sup>, 因此亟需寻找新干预靶点。

白细胞介素 (interleukin, IL) -17A 是 IL-17 家族调控中性粒细胞招募的关键炎症因子<sup>[2-4, 7]</sup>, 其功能可能具有模型依赖性: 在铜绿假单胞菌所致慢性阻塞性肺病中, IL-17A 驱动晚期中性粒细胞浸润, 加剧肺损伤<sup>[8]</sup>; 而在脓毒症<sup>[9]</sup>或 MRSA 皮肤感染<sup>[10]</sup>中, IL-17A 对中性粒

细胞的招募则有利于控制感染。然而, IL-17A 在 MRSA 急性肺炎的具体作用尚未明确。该研究通过构建 *Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠, 比较其与野生型小鼠感染后的生存体质量、肺部菌载量及病理损伤, 以阐明 IL-17A 在 MRSA 急性肺炎中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 金黄色葡萄球菌 USA300-R 菌株 (ATCC BAA-1566), 属于 ST8 分型、MRSA 菌株, 对甲氧西林和四环素等多种抗生素耐药, 由第三军医大学饶贤才教授馈赠。

**1.1.2 实验动物** 以 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄, 雌性) 作为野生型小鼠 (wild type, WT), 购自北京斯贝福实验动物技术有限公司。SPF 级 *Il17a*<sup>-/-</sup> C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄, 雌性), 购自江苏集萃药康生物科技有限公司。本实验已通过军事医学研究院微生物流行病学研究所动物实验伦理审查委员会批准, (批号: IACUC-IME-2025-A013)。动物饲养及感染均在军事医学研究院动物中心完成, 按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

**1.1.3 主要试剂和仪器** 脑心浸润液培养基 (brain heart infusion broth, BHI, 英国 Oxoid 生物公司); 琼脂糖 (翌圣生物科技股份有限公司); 血琼脂平板 (北京陆桥技术有限责任公司); 泊洛沙姆 (美国 Sigma-Aldrich 生物公司); 3%过氧化氢、75%乙醇 (山东安捷高科消毒科技有限公司); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS, 天津灏洋生物制品科技有限责任公司); 0.9%氯化钠注射液 (山东华鲁制药有限公司); 鼠尾鉴定试剂盒 (上海碧云天生物科技股份有限公司); 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 酶预混液 (北京博迈德基因技术有限公司); PCR 引物 (北京天一辉远生物科技有限公司); 核酸凝胶染料 (北京擎科生物科技股份有限公司); 50× TAE 电泳缓冲液 (江苏康润生物科技有限公司); Mouse IL-17A ELISA KIT (北京索莱宝科技有限公司); RNA 快速提取试剂盒 (上海奕杉生物科技有限公司); HiScript II One Step qRT-PCR SYBR Green Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。生物安全柜 (美国 Nuaire 公司, 型号: NU-440-44E); 细菌震荡培养箱 (上海精宏实验设备有限公司, 型号: HZQ-F160); 高通量水平电泳槽 (上海翌圣生物科技股份有限公司, 型号: MiniPro™ EpBasic); 紫外分光光度计 (上海元析仪器有限公司, 型号: UV-8000A); 液体气溶胶肺递送装置 (北京慧荣和科技有限公司, 型号: MKC22524); 立式低温高速离心机 (日本 Hitachi Koki 有限公司, 型号: CR22N); 电子天平 (苏州培科实验室仪器科技有限公司, 型号: WTC 2000); 微量分光光度计 (型号: NanoDrop2000)、PCR 仪 (型号: ABIProFlex)、成像系统 (型号: iBright CL750)、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 系统 (型号: Applied Biosystems 7300)

(美国赛默飞世尔科技公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌培养及菌液制备** 将-80 °C保存的甘油菌种以 1:1 000 的比例接种于 20 mL 的 BHI 肉汤中, 置于 37 °C振荡 (220 r/min) 培养 14 h, 直至细菌生长至平台期, 600 nm 处吸光度 (absorbance,  $A$ )  $A_{600\text{ nm}} > 2.6$ , 作为第 1 代菌。随后, 取第 1 代菌以 1:200 的比例接种于 20 mL BHI 肉汤中, 继续在 37 °C振荡 (220 r/min) 培养 3.5 h, 此时菌液  $A_{600\text{ nm}} \approx 1.5$ , 作为第 2 代菌。接着, 将第 2 代菌以 1:200 的比例接种于 BHI 肉汤中, 继续在 37 °C振荡 (220 r/min) 培养 3.5~4 h, 直至菌液  $A_{600\text{ nm}} = (1.8\sim 2.0)$ 值, 此为第 3 代菌。收集第 3 代菌液至无菌 1.5 mL 离心管, 4 000 r/min, 离心 10 min, 弃去上清液, 用适量含 0.05%泊洛沙姆生理盐水重悬, 调整菌液  $A_{600\text{ nm}} = 1.8$ 。最后将  $A_{600\text{ nm}} \approx 1.8$  的菌液浓缩至 3 倍, 此时菌落计数约为  $1 \times 10^8$  菌落形成单位 (colony forming unit, CFU), 作为后续感染小鼠的剂量<sup>[11]</sup>。

**1.2.2 RNA-seq 分析 IL-17 家族基因表达水平** 基于基因表达综合库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中高耐药且高毒力金黄色葡萄球菌 USA300-R 小鼠急性吸入性肺炎模型的肺组织 RNA-seq 数据集 GSE220943<sup>[12]</sup>, 采用基因表达量标准化指标 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM 值) 评估模型中 IL-17 家族关键基因的表达水平。肺炎模型由 USA300-R 菌株以  $1 \times 10^8$  CFU (亚致死剂量) 经液体气溶胶肺递送途径攻毒<sup>[13]</sup> WT 小鼠而得, 感染 0~24 h 为急性炎症期, 24~48 h 为炎症恢复期, 48~96 h 为损伤修复期。RNA-seq 数据集包括感染后 0、12、24、48、96 h 共 5 个时间点的肺组织样本测序结果, 每个时间点含 3 份肺组织样本。

**1.2.3 RT-qPCR 检测 *Il17a* 基因表达水平** USA300-R 菌株以  $1 \times 10^8$  CFU 剂量 (50  $\mu$ L) 经液体气溶胶肺递送途径攻毒<sup>[13]</sup> 9 只 WT 小鼠, 分别在感染后 0、12、24 h 取 3 只小鼠的肺组织, 使用 RNA 快速提取试剂盒获得该小鼠肺组织总 RNA, 根据 RT-qPCR 试剂盒说明书进行相关 RT-qPCR 操作, 每只小鼠设置 3 个复孔。鉴定 *Il17a* 基因所用 RT-qPCR 引物为: 正向引物, 5'-GTCCTTCCATTCTCTGATGCAC-3'; 反向引物, 5'-GGATGCTTCCTCTACCAGCC-3'。  $\beta$ -actin 内参所用引物为: 正向引物, 5'-GGCTGTATCCCTCCATCG-3'; 反向引物, 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。 RT-qPCR 体系为: 5  $\mu$ L 2 $\times$  One Step SYBR Green Mix、0.5  $\mu$ L One Step SYBR Green Enzyme Mix、Primer F 和 Primer R 各 0.5  $\mu$ L、0.2  $\mu$ L Dye II、1  $\mu$ L RNA template, 最后 ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 10  $\mu$ L。 RT-qPCR 反应条件: 50 °C 逆转录 180 s, 95 °C 预变性 30 s, 40 次循环反应 (95 °C 变性 10 s, 60 °C 延伸 30 s), 熔解曲线解析 (95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s, 熔解: 从 60 °C

缓慢、连续升温至 95 °C，并在此过程中持续采集荧光信号）。

**1.2.4 ELISA 检测 IL-17A 蛋白表达水平** USA300-R 菌株以  $1 \times 10^8$  CFU 剂量（50  $\mu$ L）经液体气溶胶肺递送途径攻毒<sup>[13]</sup>30 只 WT 小鼠，分别在感染后 0、12、24 h 各取 10 只小鼠，对小鼠进行肺泡灌洗操作，使用小鼠 IL-17A ELISA 试剂盒检测 BALF 中 IL-17A 蛋白表达水平。

**1.2.5 PCR 鉴定 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠基因型** 对 *Il17a*<sup>-/-</sup>基因敲除小鼠进行鉴定，并设置 WT 小鼠作为对照。根据鼠尾鉴定试剂盒说明书配制消化液，剪取约 2 mm 鼠尾浸泡在消化液中，使用 PCR 仪，将消化液在 55 °C 下孵育 15 min、95 °C 下孵育 5 min 后，加入终止液，吸取上清即为提取的小鼠基因组 DNA。使用微量分光光度计测定 DNA 浓度后，对两种小鼠鼠尾提取基因组样本进行 PCR 扩增，同时设置空白对照，以鉴定 *Il17a* 基因是否敲除成功。体系①：鉴定 *Il17a* 基因所用第 1 对 PCR 引物（F1R1）：正向引物，5'-TGCTCTGCACTCGTATTCTCATG-3'；反向引物，5'-ACATATCCAGCAGGATGCTTCC-3'；体系②：鉴定 *Il17a* 基因所用第 2 对 PCR 引物（F2R2）：正向引物，5'-AGCTCAGCGTGCCAAACAC-3'；反向引物，5'-CCCTGCTCTATCCAAGAACTCTG-3'。 *$\beta$ -actin* 内参：正向引物，5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'；反向引物，5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。PCR 体系为：15  $\mu$ L 2 $\times$ Taq pre-mix、Primer F 和 Primer R 各 0.5  $\mu$ L、0.2  $\mu$ L Dye II、3  $\mu$ L DNA template，最后 ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 30  $\mu$ L。PCR 反应条件：94 °C 预变性 180 s，95 °C 变性 30 s，72 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，72 °C 最终延伸 10 min。PCR 结束后，对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，上样量为 5  $\mu$ L，110 V 电泳 30 min。

**1.2.6 小鼠肺组织菌载量检测** USA300-R 菌株以  $1 \times 10^8$  CFU 剂量（50  $\mu$ L）经液体气溶胶肺递送途径攻毒<sup>[13]</sup>WT 小鼠和 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠各 12 只，感染后 0、12、24 h 每组处死 4 只，制备肺组织匀浆，取 10  $\mu$ L 梯度稀释后的溶液滴血琼脂平板，37 °C 培养箱中培养 16~24 h 后进行菌落计数。

**1.2.7 小鼠肺组织病理检测** 攻毒和分组方法同上，感染后 0、12、24 h 每组处死 4 只，取整肺浸泡在 4% 组织固定液 48 h 后，由武汉赛维尔生物科技有限公司完成样本包埋、石蜡切片及苏木精-伊红（hematoxylin-eosin staining, HE）染色。在光学显微镜下观察肺组织病理变化，进行病理损伤评分。采用 Smith 评分方法<sup>[14]</sup>对肺水肿、肺泡以及间质炎症、肺泡及间质出血、肺不张和透明膜形成，分别进行 0~4 分半定量分析：无损伤，0 分；病变范围 <25%，1 分；病变范围占 25%~50%，2 分；病变范围占 >50%~75%，3 分；病变满视野，4 分；总肺

损伤评分为上述各项之和。每只动物观察 10 个高倍镜视野，取其平均值。

**1.2.8 小鼠生存曲线测定及体质量变化检测** USA300-R 菌株以  $2 \times 10^8$  CFU 剂量（半数致死剂量，50  $\mu$ L）经液体气溶胶肺递送途径攻毒 WT 小鼠和 *Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠各 10 只，观察并记录感染后 7 d 内小鼠的生存情况和体质量变化趋势。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件绘图，并进行统计学分析。*Il17a* 基因表达水平比较采用单因素方差分析，小鼠 BALF 中 IL-17A 蛋白表达水平比较采用双因素方差分析，小鼠存活率估计采用 Kaplan-Meier 法，比较采用 Log-rank 检验，肺组织病理评分比较采用双因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 USA300-R 感染后 WT 小鼠肺部 *Il17a* 基因表达情况** 对肺组织的 RNA-seq 数据集进行差异基因表达分析，结果显示，与 0 h 相比，IL-17A 家族基因中 IL-17A 和 IL-17F 在 USA300-R 感染后 12 h 上调（ $P < 0.001$ ， $P < 0.01$ ），均较感染前提升约 10 倍（图 1A）。随后通过 RT-qPCR 进一步验证 *Il17a* 基因在感染后 12 h 显著上调，较感染前提升约 50 倍（ $P < 0.01$ ）（图 1B）。

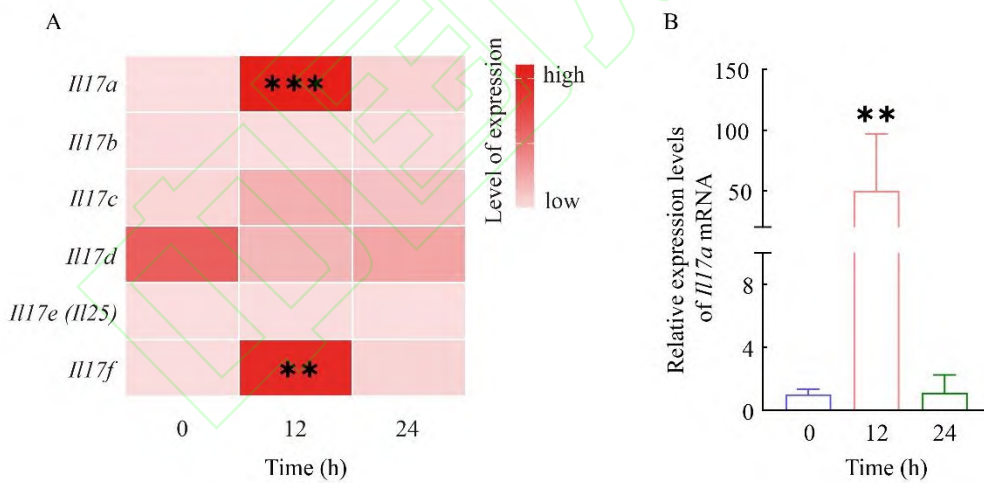


图 1 USA300-R 感染后 WT 小鼠肺部 *Il17a* 基因水平变化 ( $n = 3$ )

Fig.1 Changes in *Il17a* gene level in the lungs of WT mice after USA300-R infection ( $n = 3$ )

A: USA300-R 感染后 WT 小鼠肺组织 *Il17* 家族基因表达变化；B: USA300-R 感染后 WT 小鼠肺组织 *Il17a* mRNA 相对表达水平变化；与 0 h 相比较，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。

A: Changes in the expression of *Il17a* family genes in WT mice lung tissue after USA300-R infection; B: Changes in relative *Il17a* mRNA expression levels in lung tissue of WT mice after

USA300-R infection; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0 h.

**2.2 USA300-R 感染后 WT 小鼠肺部 IL-17A 蛋白水平升高** 构建 WT 小鼠急性吸入性肺炎模型, 对感染后 0、12、24 h 的小鼠 BALF 进行 ELISA 检测, 发现感染 12 h 后小鼠肺部 IL-17A 的表达水平急速升高, 较感染前提升约 6 倍 ( $P < 0.001$ ); 感染后 24 h, IL-17A 的表达水平较 12 h 略有降低, 但仍较感染前提升约 5 倍 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。IL-17A 蛋白与 *Il17a* 基因表达水平在感染后 12 h 均保持升高趋势, 提示 IL-17A 在急性吸入性肺炎的急性炎症期 (感染后 0~24 h 之前) 发挥重要作用。

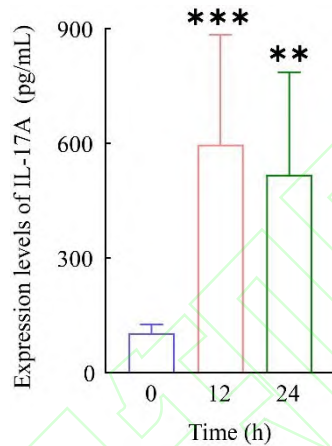


图 2 USA300-R 感染后 WT 小鼠 BALF 中 IL-17A 表达水平变化 ( $n = 10$ )

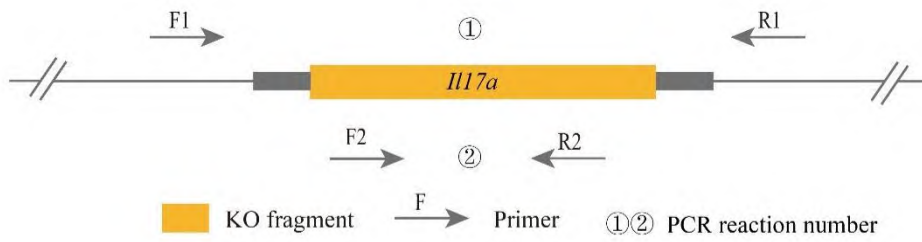
Fig.2 Changes in IL-17A expression level in BALF of WT mice after USA300-R infection ( $n = 10$ )

与 0 h 相比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0 h group .

**2.3 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠的构建与鉴定** 使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 敲除 C57BL/6J 小鼠体内的 *Il17a* 基因, 构建 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠, 体系①鉴定引物为 F1R1, 体系②鉴定引物为 F2R2(图 3A), *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠仅在体系①中出现单条带, 体系②中无条带; WT 小鼠在体系①的 1 248 bp 和体系②的 314 bp 分别出现单条带。通过 PCR 鉴定小鼠基因型, 1~18 泳道, 仅在体系①中 356 bp 左右出现单条带、体系②中无条带, 为纯合 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠; 19~20 泳道在体系①的 1 248 bp、体系②的 314 bp 分别出现条带, 为 WT 小鼠 (图 3B); 表明纯合 *Il17a* 基因敲除小鼠构建成功。同时, 动物饲养情况表明, *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠生长发育稳定, 能正常繁育后代, 可以开展后续实验。

A



B

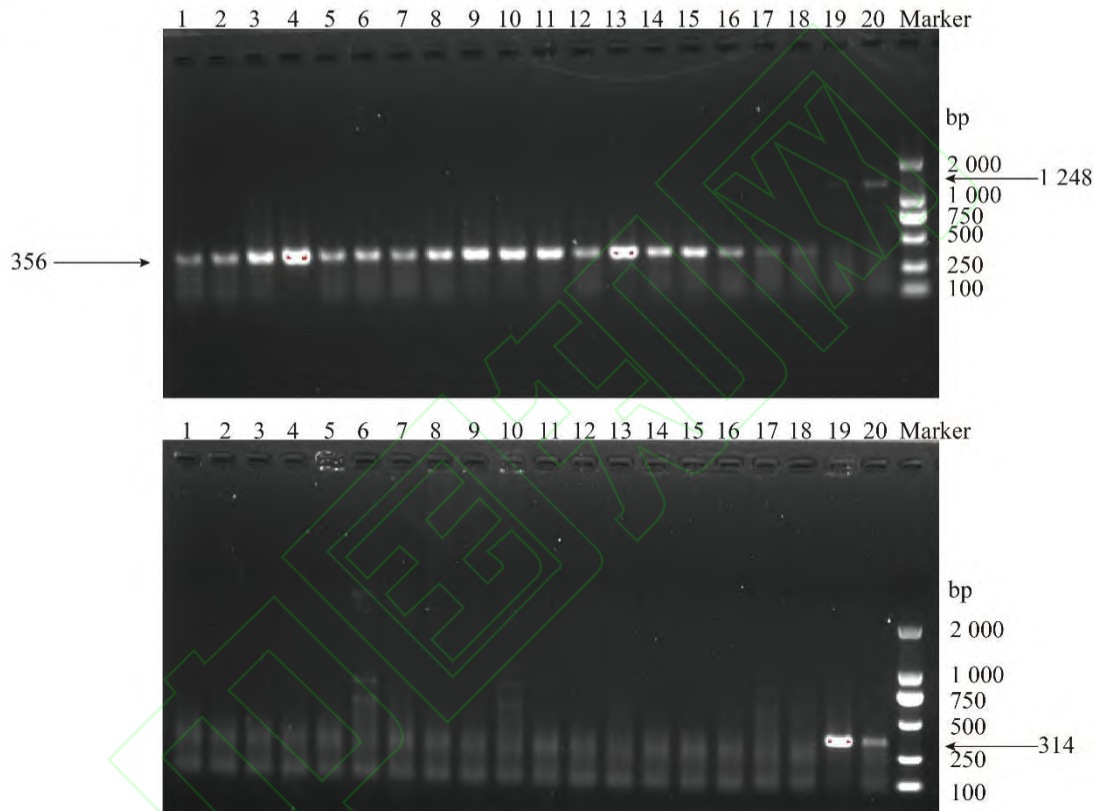


图3  $Il17a^{-/-}$ 小鼠敲除策略及基因型鉴定

Fig.3 The knockout strategy and genotyping identification of  $Il17a^{-/-}$  mice

A: C57BL/6J 小鼠  $Il17a$  基因敲除方案模式图; B:  $Il17a^{-/-}$  小鼠基因型鉴定结果, 上图为体系①扩增产生的 PCR 产物; 下图为体系②扩增产生的 PCR 产物; 1-18 为  $Il17a^{-/-}$  小鼠; 19、20 为 WT 小鼠。

A: Schematic diagram of the  $Il17a$  gene knockout protocol in C57BL/6J mice; B: Genotyping results of  $Il17a^{-/-}$  mice. The upper panel shows the PCR product amplified in reaction ①; the lower panel shows the product amplified in reaction ②. Lanes 1-18:  $Il17a^{-/-}$  mice; lanes 19, 20: WT mice.

2.4 USA300-R 感染后  $Il17a^{-/-}$  小鼠与 WT 小鼠肺组织细菌载量变化 对感染后 0、12、24 h

的两组小鼠肺组织匀浆样本进行菌落培养,相比于WT小鼠,*Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠细菌清除速度减缓,在12、24 h时,敲除小鼠的细菌载量提升约10倍( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ),表明IL-17A能够促进小鼠肺部细菌清除。见图4。

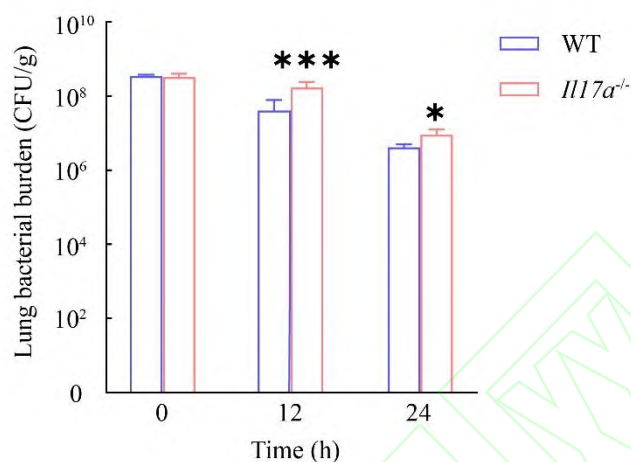


图4 USA300-R 感染小鼠细菌载量变化 ( $n = 4$ )

Fig.4 Changes in bacterial load in mice infected with USA300-R ( $n = 4$ )

与对照组相比较,  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ 。

$*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  vs WT group.

**2.5 USA300-R 感染后 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠与 WT 小鼠肺组织病理学分析** 针对 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠和 WT 小鼠急性吸入性肺炎模型,取感染后0、12、24 h的两组小鼠肺组织进行H&E染色与观察。结果显示,0 h时WT小鼠与 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠均未见明显异常;12 h时WT小鼠比 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠肺部损伤更严重、肺泡壁更厚、肺泡间隔更宽,并伴有大量中性粒细胞浸润现象,但病理评分无差异;24 h时,WT小鼠明显比 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠出现更多的粒细胞浸润,小范围肺泡实质化,较多的细胞碎片(图5A),病理评分显示 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠肺组织病理评分低于WT小鼠( $P < 0.05$ ) (图5B)。

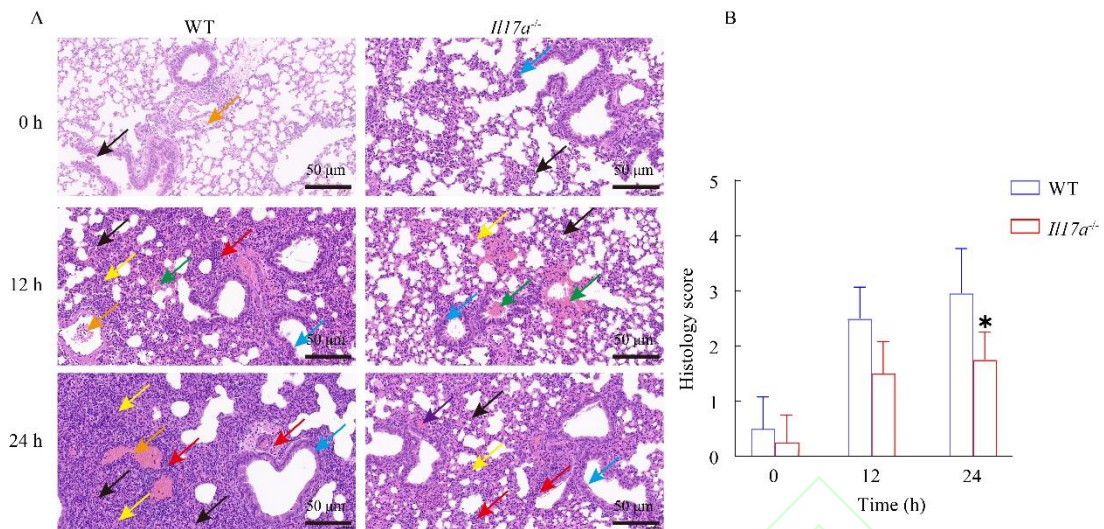


图 5 USA300-R 感染小鼠后肺组织病理变化 (A) 及评分 (B) ( $n = 4$ )  $\times 20$

Fig.5 Histopathological changes in lung tissue of mice after USA300-R infection (A) and corresponding scoring (B) ( $n = 4$ )  $\times 20$

黑色箭头表示粒细胞浸润；蓝色箭头表示细支气管上皮细胞排列不规则；黄色箭头表示坏死细胞碎片；橙色箭头表示少量周围水肿；绿色箭头表示局部出血；红色箭头表示血管周围粒细胞小灶性浸润。与 WT 组比较，\* $P < 0.05$ 。

Black arrows indicate granulocyte infiltration; blue arrows indicate irregular arrangement of bronchiolar epithelial cells; yellow arrows indicate necrotic cellular debris; orange arrows indicate minimal peripheral edema; green arrows indicate focal hemorrhage; red arrows indicate perivascular focal infiltration of granulocytes. \* $P < 0.05$  vs the WT group.

**2.6 USA300-R 感染后 *Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠与 WT 小鼠生存曲线与体质量变化** 对攻毒后的两组小鼠进行临床观察，发现 *Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠相较 WT 小鼠存活率提升约 50% ( $P < 0.05$ ) (图 6A)，在急性炎症期 (0~2 d) 体质量下降具有变慢的趋势 (图 6B)，在损伤修复期 (2~7 d)，体质量恢复也存在同样趋势。上述结果表明 IL-17A 在 USA300-R 感染后的急性炎症期 (0~2 d) 发挥促炎作用，能够导致小鼠病死率增加。

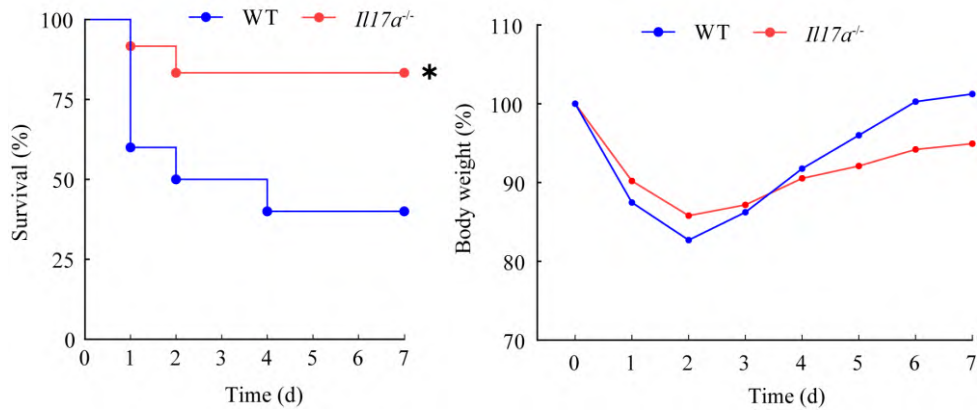


图 6 USA300-R 感染小鼠生存和体质量变化 ( $n = 10$ )

Fig.6 Survival and body weight changes of mice infected with USA300-R ( $n = 10$ )

A: USA300-R 感染 WT 小鼠与 *Il17a*<sup>-/-</sup> 敲除小鼠生存曲线; B: USA300-R 感染 WT 小鼠与 *Il17a*<sup>-/-</sup> 敲除小鼠体质量变化; 与 WT 组相比较,  $*P < 0.05$ 。

A: Survival curves of wild-type mice and *Il17a*<sup>-/-</sup> mice infected with USA300-R; B: Body weight changes of wild-type mice and *Il17a*<sup>-/-</sup> mice infected with USA300-R;  $*P < 0.05$  vs the WT group.

### 3 讨论

MRSA 所致急性吸入性肺炎因病情进展迅速、治疗难度大, 成为临床棘手问题<sup>[15]</sup>。常规抗生素治疗不仅存在副作用, 还易加速耐药性进化<sup>[16]</sup>。因此, 深入探究 MRSA 与宿主免疫应答的相互作用, 对于疾病预防和临床用药具有重要意义。

本研究以高耐药且高毒力 MRSA 菌株 USA300-R 为对象, 采用液体气溶胶肺递送技术构建小鼠急性肺炎模型<sup>[11]</sup>, 此方法将细菌精准递送至下呼吸道, 更好地模拟细菌在肺部的自然定植与感染<sup>[13]</sup>。本研究中 MRSA 感染后小鼠肺组织及 BALF 中 IL-17A 表达水平显著升高, 提示其可能参与宿主抗感染免疫应答。为明确 IL-17A 的具体作用, 本研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Il17a* 基因敲除小鼠, 比较其与 WT 小鼠的感染表型。结果显示, 亚致死剂量 MRSA 感染后, 两组小鼠肺组织细菌载量均随时间降低, 但 *Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠细菌载量显著高于 WT 小鼠, 表明 IL-17A 可促进肺部细菌清除。肺组织病理观察进一步证实, 与 *Il17a*<sup>-/-</sup> 相比, WT 小鼠感染后中性粒细胞浸润显著增加, 这与 IL-17A 通过招募中性粒细胞参与抗菌防御的已知功能一致<sup>[17-18]</sup>。

然而, 与菌载量结果相反的是, *Il17a*<sup>-/-</sup> 小鼠肺组织病理损伤程度显著减轻, 粒细胞浸润减少, 肺泡壁增厚、细胞碎片堆积等改变明显缓解。Ellson et al<sup>[18]</sup> 研究表明, 中性粒细胞通

过吞噬、脱颗粒及释放胞外陷阱直接清除细菌,但过度激活的中性粒细胞释放的活性氧(ROS)和炎症因子,会破坏肺泡结构,加剧肺部损伤,最终导致宿主死亡<sup>[18]</sup>。同样在本研究中,半数致死剂量 MRSA 感染后, *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠存活率显著高于 WT 小鼠,可能是 IL-17A 虽通过招募中性粒细胞清除细菌,但大量中性粒细胞激活后释放的炎症因子和活性氧会加剧肺泡结构破坏,导致严重肺损伤。而 *Il17a*<sup>-/-</sup>小鼠因缺乏 IL-17A 的趋化信号,中性粒细胞浸润减少,炎症损伤减轻,生存结局得以改善。

综上所述, IL-17A 在 MRSA 急性吸入性肺炎中具有双重作用:既通过招募中性粒细胞促进细菌清除,又因过度炎症反应加剧肺损伤、降低存活率。这一发现为理解 MRSA 肺炎免疫病理机制提供了实验依据,对优化临床抗炎治疗策略具有参考价值。

#### 参考文献

- [1] Masuta K, Oba Y, Iwata K. Linezolid versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: controversy continues[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(1): 161. doi:10.1093/cid/cis331.
- [2] Ikuta K S, Swetschinski L R, Robles Aguilar G, et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet, 2023, 400(10369): 2221-48. doi:10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- [3] 刘周, 杨凯, 姚杰, 等. 金黄色葡萄球菌临床流行趋势及耐药性分析[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(4): 409-12. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2013.04.021.
- [3] Liu Z, Yang K, Yao J, et al. Antimicrobial resistance and clinical epidemic trend of *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Univ Med Anhui, 2013, 48(4): 409-12. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2013.04.021.
- [4] Ota C, Ng-Blichfeldt J P, Korfei M, et al. Dynamic expression of HOPX in alveolar epithelial cells reflects injury and repair during the progression of pulmonary fibrosis[J]. Sci Rep, 2018, 8: 12983. doi:10.1038/s41598-018-31214-x.
- [5] An M M, Shen H, Zhang J D, et al. Linezolid versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: a meta-analysis of randomised controlled trials[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 41(5): 426-33. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.12.012.
- [6] Naghavi M, Vollset S E, Ikuta K S, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050[J]. Lancet, 2024, 404(10459): 1199-

226. doi:10.1016/s0140-6736(24)01867-1.

- [7] Sun L, Wang L, Moore B B, et al. IL-17: balancing protective immunity and pathogenesis[J]. *J Immunol Res*, 2023, 2023: 3360310. doi:10.1155/2023/3360310.
- [8] Ding F, Han L, Fu Q, et al. IL-17 aggravates *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 811803. doi:10.3389/fimmu.2021.811803.
- [9] Cho J S, Pietras E M, Garcia N C, et al. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(5): 1762-73. doi:10.1172/jci40891.
- [10] Marchitto M C, Dillen C A, Liu H, et al. Clonal V $\gamma$ 6<sup>+</sup>V $\delta$ 4<sup>+</sup>T cells promote IL-17-mediated immunity against *Staphylococcus aureus* skin infection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(22): 10917-26. doi:10.1073/pnas.1818256116.
- [11] Zhao Y, Zhou D S, Yang W H, et al. Model construction and characteristic analysis of pneumonia induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice[J]. *Chin J Zoonoses*, 2023, 39(5): 447-54. doi:10.3969/j.issn.1002-2694.2023.00.042.
- [12] Zhao Y, Zhai L, Qin T, et al. Time-course transcriptome analysis of the lungs of mice challenged with aerosols of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone reveals inflammatory balance[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(2): 347. doi:10.3390/biom13020347.
- [13] Wang J, Hu L, Zhang Z, et al. Mice fatal pneumonia model induced by less - virulent *Streptococcus pneumoniae* via intratracheal aerosolization[J]. *Future Microbiol*, 2024, 19(12): 1055-1070. doi: 10.1080/17460913.2024.2355738.
- [14] Eltzschig H K, Bratton D L, Colgan S P. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(11): 852-69. doi:10.1038/nrd4422.
- [15] Lodise T P Jr, McKinnon P S. Burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: focus on clinical and economic outcomes[J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(7): 1001-12. doi:10.1592/phco.27.7.1001.
- [16] Howden B P, Giulieri S G, Wong Fok Lung T, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(6): 380-95. doi:10.1038/s41579-023-00852-y.

- [17] Gurczynski S J, Moore B B. IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(1): L6-L16. doi:10.1152/ajplung.00344.2017.
- [18] Ellson C D, Riça I G, Kim J S, et al. An integrated pharmacological, structural, and genetic analysis of extracellular versus intracellular ROS production in neutrophils[J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(9): 167533. doi:10.1016/j.jmb.2022.167533.

