

• 论 著 •

# 自噬真核细胞在不动杆菌清除中的机制及诱导巨噬细胞凋亡的蛋白质组织学研究

李 伟,郭连峰,刘兆玮,姚新洁,李 平,李庆禄  
(河北省衡水市人民医院检验科,河北衡水 053000)

**摘 要:**目的 观察自噬真核细胞在不动杆菌清除中的机制及对诱导巨噬细胞凋亡蛋白质组织学的影响。方法 取 OCR 雌性小鼠 24 只,建立小鼠不动杆菌感染模型,随机分为对照组( $n=12$ )和观察组( $n=12$ )。对照组注射生理盐水,观察组注射自噬真核细胞,测定两组小鼠不动杆菌清除情况及诱导巨噬细胞凋亡的蛋白质组织学情况。结果 两组小鼠植入后即刻病灶组织细菌定量比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );观察组植入后 24、48 h 病灶组织细菌定量,显著低于对照组( $P<0.05$ );观察组小鼠注射自噬真核细胞后肺部组织基本正常,肺泡腔开放,未见异常物质,肺泡壁无明显增厚,且壁内未见炎性细胞浸润。对照组小鼠由于注射生理盐水缺乏不动杆菌清除能力导致肺部可见大量炎性细胞浸润,血管扩张,部分小鼠存在充血现象。结论 不动杆菌小鼠体内注射自噬真核细胞能提高机体清除率,诱导巨噬细胞凋亡。

**关键词:**自噬真核细胞; 不动杆菌; 巨噬细胞; 蛋白组织学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)19-2720-03

## Mechanisms of autophagic eukaryotic cells in *Acinetobacter microvilli* removal and protein histological study on apoptosis induced by macrophages

LI Wei, GUO Lianfeng, LIU Zhaowei, YAO Xinjie, LI Ping, LI Qinglu

(Department of Clinical Laboratory, Hengshui People's Hospital of Hebei Province, Hengshui, Hebei 053000, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the mechanisms of autophagic eukaryotic cells in *Acinetobacter microvilli* removal and protein histological study on apoptosis induced by macrophages. **Methods** A model of *Acinetobacter baumannii* infection was established in 24 female OCR mice. The mice were randomly divided into control group ( $n=12$ ) and observation group ( $n=12$ ). The control group was injected with normal saline, and the observation group was injected with autophagy eukaryotic cells, the histopathological changes of *Acinetobacter* and the induction of macrophage apoptosis were observed. **Results** There was no significant difference in the bacterial counts between the two groups of mice immediately after implantation ( $P>0.05$ ), the bacterial counts in the 24 and 48 h in the observation group was significantly lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). The lung tissue of mice in the observation group injected after autophagy was normal, the alveolar cavity was open, no abnormal substances were found, the alveolar wall was not obviously thickened, and no inflammatory cell infiltration was found in the wall. The mice in the control group were injected with normal saline and lacked the ability to remove *Acinetobacter*, resulting in a large number of inflammatory cell infiltration, vasodilatation, and congestion in some mice. **Conclusion** Autophagic eukaryotic cells injected with *Acinetobacter baumannii* can increase the clearance rate, induce apoptosis of macrophages and improve the quality of *Acinetobacter baumannii*.

**Key words:** autophagic eukaryotic cells; *Acinetobacter*; macrophages; protein histology

鲍曼不动杆菌是临床上常见的致病菌,是革兰阴性菌的一种,能导致多种感染性疾病,尤其是在免疫缺陷、昏迷、创伤及慢性病患者中<sup>[1]</sup>。有研究报道显示,鲍曼不动杆菌感染引起的病死率为 19.0%~54.0%,且具有较高的耐药性<sup>[2]</sup>。近年来相关研究表明,鲍曼不动杆菌能黏附、侵入多种哺乳动物体内,并且能在宿主细胞中得以生存<sup>[3]</sup>,但是其具体机制尚不完全知晓。自噬是细胞程序化凋亡的过程,也是真核生物进化保守对细胞内物质进行相应周转的重要过程,细胞在饥饿状态下更加容易发生,自噬细胞能清除一些多余或老化的细胞器,维持机体代谢平衡及器官的功能更新<sup>[4]</sup>。但是,对于自噬真核细胞在不动杆菌清除中的机制及对诱导巨噬细胞凋亡蛋白质组织学的影响少有报道<sup>[5]</sup>。为探讨自噬真核细胞在不动杆菌清除中的机制及对诱导巨噬细胞凋亡的蛋白质组织学的影响,本研究选取 2015 年 5 月至 2016 年 8 月本院提供的 OCR 雌性小鼠 24 只进行研究,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 取 OCR 雌性小鼠 24 只,随机分为对照组( $n=12$ )和观察组( $n=12$ ),体质量为 23~45 g,平均(32.9±3.0)g,所选动物均由本院动物实验中心提供。实验过程中对裸鼠的饲养、处理均符合《关于善待实验动物的指导意见》相关规则<sup>[6]</sup>。所有实验均通过医院动物委员会批准同意。

**1.2 材料与试剂** 为保证实验的顺利完成,采用的主要材料与试剂有鲍曼不动杆菌 HS-1511、环磷酰胺、麻醉剂 2,2,2-三溴乙醇、LB Agar 培养基、甲醛组织固定剂、白细胞稀释液等,相关试剂和仪器厂家见表 1。

## 1.3 方法

**1.3.1 小鼠不动杆菌感染模型建立** (1)术前处理。根据相关文献,实验术前 4 d、术前 1 d 分别采用腹腔注射 200 mg/kg 和 150 mg/kg 环磷酰胺,使得小鼠体内中性粒细胞计数下降为 90.0%左右<sup>[7]</sup>。(2)菌液准备。取 LB 平皿上生长的单个鲍曼

不动杆菌菌落,放置在 10 mL 的 LB 液体中进行培养,以 150 r/min 震荡进行 2 h 培养,使得吸光度(A)值菌粒直径为 600 nm,取 5 mL 细菌液 10 min 离心,速度为 4 000 r/min,去除上层清液后采用生理盐水洗涤后制备菌液,取 100  $\mu$ L 菌液经过稀释后接种到 LB 培养基上进行 16 h 培养,控制不动杆菌菌液水平为  $2.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$  CCFU/mL。利用耳窥镜直视下进行小鼠气管插管,待插管成功后沿着气管插管注射 10  $\mu$ L 鲍曼不动杆菌菌液,连续吹打 3 次,确保菌液全部进入小鼠肺部,在啮齿动物操作台上进行 1 min 竖立,然后将小鼠缓慢放平在操作台上<sup>[8]</sup>,将小鼠放回饲养笼中,见图 1。

**1.3.2 处理方法** 对照组注射生理盐水方法:小鼠模型建立后静脉注射 5 mL 生理盐水,每天 1 次,共注射 1 次。观察组注射自噬真核细胞方法:小鼠模型建立后静脉注射  $1 \times$

$10^6$  个/毫升自噬真核细胞,每天 1 次,共注射 1 次<sup>[9]</sup>。

表 1 主要材料和试剂

主要材料和试剂	厂家/批号
鲍曼不动杆菌 HS-1511	临床分离菌
环磷酸腺	Sigma 公司/批号 SLBC0666V
麻醉剂 2,2,2-三溴乙醇	Sigma 公司
LB Agar 培养基	上海生工公司/批号 14012950
甲醛组织固定剂	中山市康乃馨生物医疗科技有限公司
白细胞稀释液	南京建成生物工程研究所



图 1 小鼠不动杆菌感染模型建立

**1.4 观察指标** (1)病灶组织细菌定量。两组小鼠全部苏醒后,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌操作下取出两组小鼠肺,称重后每 0.1 g 肺中加入 0.9 mL 生理盐水,采用匀浆机研磨,取 100  $\mu$ L 颗粒稀释后接种到 LB 培养基中进行 16 h 培养,完成菌落计数,从而计算出每克肺部组织的细菌水平<sup>[10]</sup>。(2)小鼠巨噬细胞凋亡的蛋白质组织学表达。手术后第 14 天处死两组小鼠,取出病灶肺部组织,采用水平为 4% 甲醛溶液进行固定,石蜡包埋后制备 4  $\mu$ m 病理切片,采用 HE 染色,在倒置显微镜下观察两组小鼠蛋白质组织学表达情况,相关操作步骤必须严格遵循仪器、试剂盒操作说明进行<sup>[11]</sup>。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理,正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

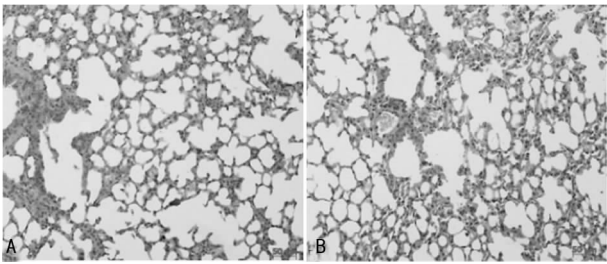
2 结 果

**2.1 两组小鼠植入后不同时间点病灶组织细菌定量比较** 两组小鼠植入后即刻病灶组织细菌定量比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );观察组植入后 24、48 h 病灶组织细菌定量,显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 两组小鼠植入后不同时间点病灶组织细菌定量比较( $\bar{x} \pm s$ , CFU)

组别	<i>n</i>	植入即刻	植入后 24 h	植入后 48 h
观察组	12	5.63 $\pm$ 0.21	4.12 $\pm$ 0.14	1.21 $\pm$ 0.08
对照组	12	5.61 $\pm$ 0.19	5.87 $\pm$ 0.43	2.12 $\pm$ 0.35
<i>t</i>		1.205	19.281	20.442
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05

**2.2 两组小鼠巨噬细胞凋亡的蛋白质组织学比较** 观察组小鼠注射自噬真核细胞后肺部组织基本正常,肺泡腔开放,未见异常物质,肺泡壁无明显增厚,且壁内未见炎性细胞浸润。对照组小鼠由于注射生理盐水缺乏不动杆菌清除能力导致肺部可见大量炎性细胞浸润,血管扩张,部分小鼠存在充血现象,见图 2。



注:A 为观察组;B 为对照组

图 2 两组小鼠巨噬细胞凋亡的蛋白质组织学比较( $\times 200$ )

3 讨 论

不动杆菌属于革兰阴性菌的一种,该病菌能诱导多种感染性疾病,且多发生在免疫缺陷、昏迷、创伤人群中。随着临床抗菌药物的大量及不合理滥用,导致不动杆菌耐药率呈上升趋势<sup>[12]</sup>。同时,不动杆菌又属于一种胞外菌,能黏附、侵入多种哺乳动物细胞内,并且在宿主细胞中生存。因此,采取有效的措施提高不动杆菌的清除率对提高治疗效果具有重要的意义<sup>[13]</sup>。

文献[14]报道显示,自噬属于细胞死亡的一种过程,能清除机体内的一些多余或老化的细胞器,从而维持机体平衡。目

前,临床上对于自噬的机制尚不完全知晓,多与机体控制多种细胞内生物感染有关。本研究以小鼠作为研究对象,建立小鼠不动杆菌模型,并且分别植入生理盐水和自噬真核细胞,结果显示,两组小鼠植入后即刻病灶组织细菌定量比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );观察组植入后 24、48 h 病灶组织细菌定量,显著低于对照组( $P<0.05$ )。提示自噬细胞的注入能有效提高机体内不动杆菌的清除率,从而能维持机体内环境平衡,避免病原菌对机体产生的影响。由于自噬细胞植入机体后能提高细胞的自我吞噬能力,有效抑制炎症反应的发生和增殖,导致病原菌不会对机体产生明显的影响,从而能诱导巨噬细胞凋亡,减缓机体症状,帮助其早期清除病原菌。本研究中,观察组小鼠注射自噬真核细胞后肺部组织基本正常,肺泡腔开放,未见异常物质,肺泡壁无明显增厚,且壁内未见炎症细胞浸润。对照组小鼠由于注射生理盐水缺乏不动杆菌清除能力,导致肺部可见大量炎症细胞浸润,血管扩张,部分小鼠存在充血现象。可见,不动杆菌小鼠体内注射自噬真核细胞能诱导巨噬细胞凋亡,调节机体免疫,提高病原菌的清除能力<sup>[15]</sup>。

综上所述,不动杆菌小鼠体内注射自噬真核细胞能提高机体清除率,诱导巨噬细胞凋亡,为临床不动杆菌感染清除提供依据和参考。

参考文献

[1] 解晓双,赵玉军,张德显,等. PBP<sub>s</sub> 介导革兰阴性菌对 β-内酰胺类抗菌药物的耐药机制[J]. 中国预防兽医学报, 2013,35(2):169-172.

[2] 陈菲菲,狄红霞,蓝乐夫. 金黄色葡萄球菌重要毒力因子的功能及其抑制剂研究进展[J]. 中国科学, 2013, 58(36):3743-3752.

[3] 崔艳艳,高洪,严玉霖,等. 大肠埃希菌外膜蛋白 F 与细菌耐药性研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(6):164-166.

[4] 许婕灵,张振辉,江慧琳,等. 微小 RNA-101 和微小 RNA-125a-5p 在脂多糖诱导人 THP-1 巨噬细胞自噬中的调控作用[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(4):334-338.

[5] 林超,刘兆国,钱星,等. 自噬在心血管疾病中的作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10):1347-1349.

[6] 杨翠,王猛,武超,等. 保护性自噬对顺铂诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的抑制作用探讨[J]. 安徽医药, 2015, 19

(1):152-155.

[7] 于红红,吴玛莉,冷冷,等. 自噬与动脉粥样硬化的关系及中药的干预作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(7):736-740.

[8] Ding L, Wang X, Schnackenberg L, et al. Regulation of autophagy and apoptosis in response to ox-LDL in vascular smooth muscle cells, and the modulatory effects of the microRNA hsa-let-7 g[J]. Int J Cardio, 2013, 168(2):1378-1385.

[9] Salabei JK, Cummins TD, Singh M, et al. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress[J]. Biochem J, 2013, 451(3):375-388.

[10] 杨亭,倪振洪,龚薇,等. 盐酸青藤碱诱导 EA. hy926 细胞自噬及其在抗炎中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11):1084-1087.

[11] 张晓钰,徐丽慧,赵高翔,等. 葫芦素 E 抑制 HeLa 细胞 mTORC1 的活性并诱导细胞自噬[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(6):807-811.

[12] Choi CH, Lee BH, Ahn SG, et al. Proteasome inhibition-induced p38 MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3β[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(4):759-764.

[13] Huo L, Zhang J, Qu Z, et al. Vasorelaxant effects of Shunaoxin pill are mediated by NO/cGMP pathway, HO/CO pathway and Calcium Channel blockade in isolated rat thoracic aorta[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 173(31):352-360.

[14] 邱炳辉,漆松涛,曾浩,等. 神经外科 ICU 耐药鲍曼不动杆菌颅内感染的治疗[J]. 中华神经外科杂志, 2014, 30(6):586-588.

[15] 徐艳春,赵莹,王丽,等. 某三级综合医院 05R(份标本细菌分布及耐药情况分析[J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(6):83-85.

(收稿日期:2017-04-09 修回日期:2017-05-27)

(上接第 2719 页)

[5] Momotani K, Tanaka T, Iwai E, et al. Ovarian clear cell adenofibromatous tumor of borderline malignancy associated with high levels of carbohydrate antigen 199[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2011, 37(5):472-477.

[6] 杨丽萍,李会影,任淑敏. 血清 HE4 联合 CA125 检测在卵巢癌诊断、治疗中的价值[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(24):7083-7084.

[7] 王琰,杨聪莉,程百茹,等. 尿液 HE4 联合 CA125 检测对卵巢癌的价值初探[J]. 实用妇产科杂志, 2014, 30(3):220-223.

[8] 刘连红,罗建祥,徐月君,等. CA125 和 HE4 蛋白在卵巢癌组织及血清中的表达及其临床意义探讨[J]. 重庆医学, 2014, 43(28):3722-3723.

[9] 尚陈宇,刘冬冬,徐建华,等. HE4 和 CA125 联合检测在卵巢癌诊断及预后评估中的价值研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(33):5492-5494.

[10] 蒋显勇,袁才佳,易艳军,等. 血清 CEA、CA125 及端粒酶活性联合检测在卵巢癌早期诊断中的价值[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(21):37-40.

[11] 杨广水. CA125、CA199 与 CEA 联合检测在卵巢癌早期诊断中的价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(3):699-701.

[12] 董素民,李文澎,张秀玲,等. 血清 CA125、CA199、VEGF-C 联合检测对卵巢癌淋巴结转移的诊断价值[J]. 山东医药, 2016, 56(10):86-87.

(收稿日期:2017-02-13 修回日期:2017-05-07)