

DOI:10.13350/j.cjpb.220920

• 临床研究 •

慢阻肺患者鲍曼不动杆菌感染肺泡巨噬细胞 凋亡机制的研究*

张阳, 焦雨佼**, 巩翠珂, 张树森, 段玉玲

(邢台市人民医院呼吸与危重症医学科, 河北邢台 054000)

【摘要】 **目的** 研究鲍曼不动杆菌参与慢性阻塞性肺疾病(COPD)肺部感染的肺泡巨噬细胞凋亡的机制。 **方法** 选取2018年5月-2021年5月收治的3 026例慢阻肺患者,痰液培养检测病原菌分布情况。将人肺泡巨噬细胞分为对照组以及肺泡巨噬细胞感染组,培养24 h后,采用CCK-8法检测细胞增殖情况,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,采用Western bolt法检测Janus激酶1/信号转导子和转录激活子1(JAK1/STAT1)信号通路相关蛋白表达水平。 **结果** 3 026例慢阻肺患者中肺部感染862例(28.49%),共检出病原菌1 012株,其中革兰阴性菌665株(65.71%),革兰阳性菌241株(23.81%),真菌106株(10.47%);主要感染病原菌为鲍曼不动杆菌212株、肺炎克雷伯菌150株、大肠埃希菌122株。鲍曼不动杆菌感染组的肺泡巨噬细胞活力明显低于对照组,而肺泡巨噬细胞凋亡明显高于对照组($P < 0.05$)。JAK1/STAT1信号通路相关蛋白(p-JAK1、p-STAT1、NF- κ B、TNF- α)表达水平均明显高于对照组($P < 0.05$)。 **结论** 慢阻肺肺部感染病原菌主要为鲍曼不动杆菌,鲍曼不动杆菌可能通过激活肺泡巨噬细胞的JAK1/STAT1信号通路而上调炎症反应,诱导细胞凋亡。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;鲍曼不动杆菌;肺泡巨噬细胞;细胞凋亡;Janus激酶1/信号转导子和转录激活子1

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)09-1082-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.;17(9): 1082-1085.]

Study on apoptosis mechanism of alveolar macrophages infected with *Acinetobacter baumannii* in patients with chronic obstructive pulmonary disease

ZHANG Yang, JIAO Yu-jiao, GONG Cui-ke, ZHANG Shu-sen, DUAN Yu-ling (Respiratory and Critical Care Medicine Department, Xingtai Municipal People's Hospital, Xingtai, Hebei 054000, China)***

【Abstract】 **Objective** To study the mechanism of *Acinetobacter baumannii* involved in the apoptosis of alveolar macrophages in pulmonary infection of chronic obstructive pulmonary disease. **Methods** 3 026 patients with chronic obstructive pulmonary disease treated in our hospital from May 2018 to May 2021 were selected. Sputum culture was used to detect the distribution of pathogens. Human alveolar macrophages were divided into control group and alveolar macrophage infection group. After 24 hours of culture, cell proliferation was detected by CCK-8 method, apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression levels of Janus kinase 1 / signal transducer and activator of transcription 1 (Jak1/STAT1) signaling pathway related proteins were detected by western bolt method. **Results** There were 862 cases (28.49%) of pulmonary infection in 3 026 patients with COPD. 1 012 strains of pathogens, 665 strains of Gram-negative bacteria (65.71%), 241 strains of Gram-positive bacteria (23.81%) and 106 strains of fungi (10.47%) were detected. The main pathogens were 212 strains of *A. baumannii*, 150 strains of *Klebsiella pneumoniae* and 122 strains of *Escherichia coli*. The cell viability of the *A. baumannii* infection group was significantly lower than that of the control group, and the cell apoptosis was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The expression level of JAK1/STAT1 signaling pathway related proteins (p-JAK1, p-STAT1, NF- κ B, TNF- α) was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The main pathogen of COPD pulmonary infection is *A. baumannii*. *A. baumannii* may up regulate inflammatory response and induce apoptosis by activating Jak1/STAT1 signaling pathway of alveolar macrophages.

【Key words】 chronic obstructive pulmonary disease; *Acinetobacter baumannii*; alveolar macrophages; apoptosis; Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 1

* **【基金项目】** 邢台市重点研发计划自筹项目(No. 2020ZC295)。

** **【通讯作者】** 焦雨佼, E-mail: 2723187878@qq.com

【作者简介】 张阳(1989-),女,河北邢台人,研究生,主治医师。研究方向:慢性阻塞性肺疾病与肺癌。E-mail: zdztye@163.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary, COPD)简称慢阻肺,是常见的呼吸系统疾病,以不完全可逆性的气流受限以及持续气道炎症为主要特征,具有较高的致残率和致死率^[1-2]。导致 COPD 发生、发展的因素包括病原菌侵袭、空气污染、吸烟等, COPD 也容易引发肺部感染,进而累及呼吸系统,影响 COPD 的治疗效果,不利于临床预后并降低患者的生活质量^[3]。研究发现,鲍曼不动杆菌是常见的医源性感染病原菌,特别是在重症监护室患者中具有较高的感染率,容易导致呼吸机相关性肺炎^[4]。Janus 激酶 1/信号转导子和转录激活子 1 (Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 1, JAK1/STAT1)信号通路具有调控机体炎症反应、氧化应激反应的作用,且研究已证实 JAK1/STAT1 信号通路的活化可诱导肺泡巨噬细胞的凋亡,是影响 COPD 发生发展的重要信号通路^[5-6]。鲍曼不动杆菌可促进慢阻肺的发生发展,但具体调控机制尚不明确。基于此,本研究通过探讨鲍曼不动杆菌在慢阻肺患者中的感染情况以及对肺泡巨噬细胞的增殖、凋亡的影响,从而为理解鲍曼不动杆菌引起肺损伤的机制提供理论依据。

对象与方法

1 基本资料

选取我院 2018 年 5 月-2021 年 5 月收治的 3 026 例慢阻肺患者,根据肺部感染情况分为感染组和非感染组,年龄 34~64 岁,病程 4~12 年。

纳入标准:(1)符合 2013 年版《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》中关于慢阻肺的诊断标准^[7],肺功能、影像学检测(CT 和 X 线)确诊;(2)肺部感染患者符合《美国急性病医院预防医院感染策略纲要》中的诊断标准^[8];(3)动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)≥50 mmHg;动脉血氧分压(PaO₂)≥60 mmHg;(4)病历资料完整。

排除标准:(1)心、肝、肾等重要脏器功能障碍;(2)合并肺结核、肺部肿瘤,患有自身免疫疾病;(3)合并其他感染性疾病,肺外细菌感染,呼吸道畸形。

该研究已获医院伦理委员会批准,患者均自愿签署知情同意书。

2 方法

2.1 痰液病原检测 收集受试者痰标本,采用全自动微生物鉴定系统(型号: BACTEC FX 200, Becton Dickinson 公司)检测病原菌。

2.2 人肺泡巨噬细胞分离、纯化和培养 取健康志愿者的肺泡灌洗液,2 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min,弃上清;PBS 缓冲液洗涤后离心弃上清;PBS 缓冲液重悬细胞,加入 PBS 缓冲液,800 r/min(离心半

径 10 cm)离心 5 min,弃上清;加入 1640 培养基 2 ml(批号:1803719)重悬细胞、计数,以 1.5×10^6 个接种于 T25 培养瓶(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号: TG18YQ23)中;于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号: Forma)。

2.3 人肺泡巨噬细胞感染 取肺泡巨噬细胞, 2×10^5 个/孔细胞接种于 6 孔板,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号: Forma)培养过夜。设对照组和感染组,其中感染组加入 1×10^5 CFU/ml 的鲍曼不动杆菌,对照组加入空白溶媒,培养 24 h,检测鲍曼不动杆菌对肺泡巨噬细胞的影响。

2.4 细胞增殖情况检测 CCK-8 法进行检测。培养 24 h 后收集以上各组细胞(每组 3 个复孔),并设置空白对照,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,37 °C 孵育 2 h,使用酶标仪(北京普朗新技术有限公司,型号: DNM-9602G)测定 450 nm 各孔的吸光度(A)值。细胞活力 = (A 感染组 - A 空白对照组) / (A 对照组 - A 空白对照组) × 100%。

2.4 细胞凋亡情况检测 采用流式细胞仪(贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司,型号: CytoFLEX LX)进行检查。收集各组细胞, 3×10^6 个/组,按照 Annexin V-FITC/PI 染色试剂盒(批号: 18Y03172W, 美国 BD 公司)说明书操作步骤进行处理, PBS 清洗细胞 1 次,于每孔加入胰蛋白酶(不含 EDTA)(批号: YTG8230914)消化细胞, 1 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min 后分离获取下层细胞,然后加入 2 ml 结合缓冲液,依次加入 100 μl 的 Annexin V-FITC、PI,避光孵育 15~20 min。最后向流式管中加入 400 μl 缓冲液,混匀后上机检验,平行 3 次。

2.5 JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白表达水平检测 采用 Western bolt 法检测 JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白(p-JAK1、p-STAT1、NF-κB、TNF-α)表达水平。采用 RIPA 裂解液(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号: 20180372SMF)提取细胞的蛋白,BCA 法定量蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,电转至 PVDF 膜上,脱脂奶粉(5%)室温封闭 2 h,依次使用对应的兔抗人(一抗)(1:2 000)、山羊抗兔多克隆 IgG(二抗)(1:10 000)进行孵育, TBST 洗膜,于凝胶系统中曝光,采用 Image J 软件分析条带灰度,并以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,以目的蛋白与内参灰度值比值为 p-JAK1、p-STAT1、NF-κB、TNF-α 的表达量,平行实验 6 次。

3 统计学分析

采取 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。计数资料以例(%)表示,比较采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 基线资料以及血清指标比较

3 026 例慢阻肺患者中肺部感染 862 例

表 1 基线资料比较
Table 1 Comparison of baseline data

组别 Group	n	性别 (男/女) Gender (male/female)	年龄(年) Age (years)	体质指数 Body mass index(kg/m ²)	病程(年) Course of disease(years)	吸烟(例) Smoking (cases)	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)
感染组	862	486/376	47.64±4.45	23.54±2.32	8.35±2.17	235	76.24±6.82	66.65±5.45
未感染组	2164	1167/997	47.39±4.57	23.39±2.14	8.49±2.06	621	75.82±7.12	67.02±5.61
χ^2/t		1.496	1.368	1.641	1.662	0.625	1.482	1.651
P		0.221	0.171	0.101	0.097	0.429	0.138	0.099

2 肺部感染病原菌分布特征

862 例肺部感染患者共检测出病原菌 1 012 株,其中革兰阴性菌 665 株(65.71%),革兰阳性菌 241 株(23.81%),真菌 106 株(10.47%)。主要感染病原菌为鲍曼不动杆菌 212 株、肺炎克雷伯菌 150 株、大肠埃希菌 122 株(表 2)。

表 2 肺部感染病原菌分布特征
Table 2 Distribution characteristics of pathogenic bacteria in lung infection

病原菌 Pathogen	株数(株) No. of strain	构成比(%) Composition ratio
革兰阴性菌	665	65.71
鲍曼不动杆菌	212	20.95
肺炎克雷伯菌	150	14.82
大肠埃希菌	122	12.06
铜绿假单胞菌	98	9.68
流感嗜血杆菌	36	3.56
阴沟肠杆菌	20	1.98
产气肠杆菌	15	1.48
其他	12	1.19
革兰阳性菌	241	23.81
金黄色葡萄球菌	95	9.39
肺炎链球菌	62	6.13
表皮葡萄球菌	36	3.56
溶血链球菌	23	2.27
溶血葡萄球菌	12	1.19
尿肠球菌	8	0.79
其他	5	0.49
真菌	106	10.47
白假丝酵母	64	6.32
白色念珠菌	32	3.16
其他	10	0.99

3 细胞增殖情况

与对照组细胞相比,感染组的细胞活力明显下降 [(100.00±5.42)% vs (65.38±7.71)%], ($t=8.998, P<0.05$) (图 1)。

4 细胞凋亡情况

Q2 区域即 PI 阴性而 Annexin V-FITC 阳性,代表凋亡细胞。与对照组细胞相比,感染组的 Q2 区域细胞

(28.49%),两组患者的性别、年龄等基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$) (表 1)。

群明显增加,表明细胞凋亡明显增加($P<0.05$) (图 1)。

5 JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白表达水平情况

感染组 JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白(p-JAK1、p-STAT1、NF- κ B、TNF- α)表达水平均明显高于对照组(均 $P<0.05$) (表 3)。

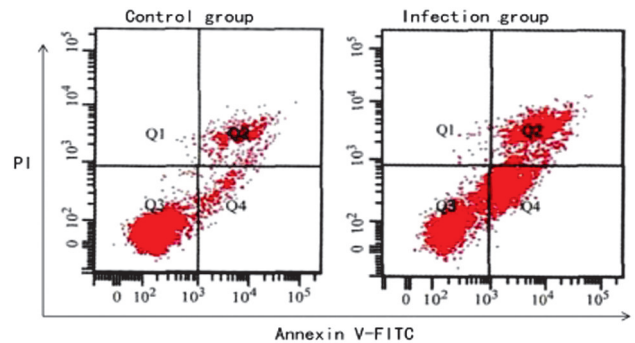


图 1 对照组、感染组细胞凋亡比较
Fig. 1 Comparison of apoptosis between control group and infection group

表 3 JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白表达水平
Table 3 JAK1/STAT1 signal pathway related protein expression levels

组别 Group	n	p-JAK1	p-STAT1	NF- κ B	TNF- α
感染组	6	1.04±0.25	1.04±0.28	1.36±0.26	1.33±0.37
对照组	6	0.39±0.11	0.58±0.13	0.69±0.15	0.72±0.18
t		5.829	3.650	5.467	3.631
P		<0.001	0.004	<0.001	0.005

讨论

COPD 的主要临床表现为慢性咳嗽、咯痰、喘息、消瘦等,且随着病情的进展,可出现进行性呼吸困难、早老化等^[9]。COPD 进展慢,容易出现肺部感染,且病情迁延难治愈,容易导致患者心肺功能短时间内衰竭,从而增加死亡风险。因此,研究 COPD 患者肺部感染病原菌分布特点以及加重肺损伤相关机制对于疾病诊治具有重要指导意义。本研究回顾性分析了本院 3 026 例慢阻肺患者中肺部感染情况,肺部感染共 862 例(28.49%),其中革兰阴性菌 665 株(65.71%),革兰阳性菌 241 株(23.81%),真菌 106 株(10.47%),表明

肺部感染以革兰阴性菌为主。邓翔等^[10]通过检测 COPD 患者的痰液,共检出 129 株病原菌,其中革兰阴性菌占比可达 67.4%。本次研究发现,主要感染病原菌为鲍曼不动杆菌 212 株、肺炎克雷伯菌 150 株、大肠埃希菌 122 株,表明鲍曼不动杆菌是引起 COPD 肺部感染的重要病原菌,与郎燕芳等^[11]研究结果相近。另外,研究认为^[10,12],COPD 为消耗性疾病,随着病程的迁移,患者营养状态下下降,且以中老年患者为主,自身抵抗能力较差,导致机体免疫功能进一步降低,从而容易发生病原菌感染。同时,长期使用抗菌素治疗,增加了耐药风险,以及辅助使用机械通气也增加了病原菌入侵肺部的机会。因此,临床上需加强病原菌的检测了解 COPD 患者肺部感染病原菌的分布特征,并以抗生素用药经验结合药敏试验为依据,合理使用抗菌治疗,同时配合营养调控、呼吸功能训练以及心肺康复等,增加患者免疫抵抗力以及增强肺组织的修复能力。

COPD 的主要病理表现为呼吸道的慢性炎症损伤、气道重构,其中鲍曼不动杆菌可通过其细胞壁脂多糖而激活固有免疫细胞表面的模式识别受体,从而活化固有免疫细胞,诱导炎症因子、趋化因子的释放,导致肺组织损伤,加重疾病进展^[13]。肺泡巨噬细胞是肺组织重要的免疫细胞之一,其在参与细胞免疫应答、杀伤病原菌以及清除细胞碎片等方面起着关键作用^[14]。本研究通过检测肺泡巨噬细胞增殖和凋亡情况,结果显示鲍曼不动杆菌可降低肺泡巨噬细胞活力,诱导肺泡巨噬细胞凋亡。结合 Rumbo 等^[15]研究表明,鲍曼不动杆菌可通过内吞途径侵入肺组织肺泡巨噬细胞内部,从而导致肺泡巨噬细胞的应激反应和凋亡,进而造成肺组织细胞损伤。同时,本研究显示,鲍曼不动杆菌感染后,肺泡巨噬细胞的 JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白(p-JAK1、p-STAT1、NF- κ B、TNF- α)表达水平均明显高于对照组,表明可通过上调 JAK1/STAT1 信号通路而刺激细胞炎症反应,从而诱导肺泡巨噬细胞凋亡,从而加重 COPD 疾病进展。当鲍曼不动杆菌入侵免疫系统后,刺激免疫细胞大量分泌促炎因子,从而激活和招募其他免疫细胞,并分泌更多的炎症因子,继而形成正反馈,导致炎症风暴的形成^[16]。其中 JAK1/STAT1 信号通路是串联炎症反应过程的重要信号通路,其通过调节肺泡巨噬细胞分泌 NF- κ B、TNF- α 等促炎因子,加剧炎症反应,从而诱导肺泡巨噬细胞的凋亡,以及加重肺组织炎性损伤^[17]。张怡敏等^[18]研究也证实,鲍曼不动杆菌感染肺泡巨噬细胞后,可活化血小板激活因子受体,以及激活 JAK1/STAT1 信号通路,从而诱导肺泡巨噬细胞的氧化应激状态,促进丙二醛表达,降低超氧化物歧化酶活性,导致丙二醛蓄积,使得核酸、蛋白质等大分子交联,诱发

细胞和组织损伤。研究表明,可针对 JAK1/STAT1 信号通路进行深入研究,从而筛选出防治鲍曼不动杆菌感染以及减轻 COPD 患者肺损伤的治疗靶点。

综上所述,慢阻肺肺部感染病原菌主要为鲍曼不动杆菌,该菌可能通过激活肺泡巨噬细胞的 JAK1/STAT1 信号通路而上调炎症反应,诱导细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] 张小娥,张彩莲. 慢性阻塞性肺疾病流行病学及疾病经济负担研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制,2017,25(6):472-476.
- [2] Yoon YS, Jin M, Sin DD. Accelerated lung aging and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Expert Rev Respir Med, 2019, 13(4):369-380.
- [3] Agusti A, Hogg JC. Update on the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2019, 381(13):1248-1256.
- [4] 杨淳,刘冬冬,席寅,等. ICU 肺部泛耐药鲍曼不动杆菌感染预后危险因素分析[J]. 广东医学,2019,040(009):1255-1258.
- [5] Ma Y, Tang T, Sheng L, et al. Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting JAK1-STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4):1925-1934.
- [6] 杨非柯,金岚,陈伟,等. 二氢杨梅素通过 Janus 激酶 3/信号转导与转录激活子 5 信号通路抑制氧化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞 M1 型极化[J]. 中华老年医学杂志,2019,38(9):1053-1057.
- [7] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(4):255-264.
- [8] 刘思娣(译),吴安华(校). 美国急性病医院预防医院感染策略纲要(2014 更新版)[J]. 中国感染控制杂志,2014(11):702-704.
- [9] 成玮,李晓云,段佳熙,等. 慢性阻塞性肺病患者疼痛的研究进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2020,19(1):96-99.
- [10] 邓翔,胡芬,蒋在慧,等. 慢阻肺患者肺部感染的病原学、危险因素及炎症因子水平分析[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(3):324-326,331.
- [11] 郎燕芳,俞志红,陆晓玲,等. 慢阻肺合并睡眠呼吸暂停综合征老年患者肺感染的病原学及相关因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(23):5329-5332,5356.
- [12] O'Donnell DE, Milne KM, James MD, et al. Dyspnea in COPD: New mechanistic insights and management implications[J]. Adv Ther, 2020, 37(1):41-60.
- [13] Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease[J]. Autophagy, 2018, 14(2):221-232.
- [14] 刘学雷,杨宁爱,康宇婷,等. 弓形虫 RH 株调节 JAK1-STAT6 信号通路诱导人原代肺泡巨噬细胞极化的研究[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(9):1005-1009.
- [15] Rumbo C, Tomas M, Fernandez Moreira E, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells[J]. Infect Immun, 2014, 82(11):4666-4680.
- [16] 安志远,丁文一. 鲍曼不动杆菌外膜蛋白 A 慢病毒载体的构建及其对 RAW264.7 细胞 NLRP3 炎症小体的激活[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(2):146-150.
- [17] Liang YB, Tang H, Chen ZB, et al. Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5):6405-6411.
- [18] 张怡敏,张宏方,周雪宁,等. 鲍曼不动杆菌通过活化血小板激活因子受体引起感染人支气管上皮细胞的氧化应激和细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2018,34(5):421-426.

【收稿日期】 2022-05-15 【修回日期】 2022-07-27