

DOI:10.13350/j.cjpb.221120

• 临床研究 •

NF- κ B/JNK/PI3K 信号表达在糖尿病足多重耐药金黄色葡萄球菌感染中的作用

张娟¹, 张根生^{2*}, 黄雪¹, 赵晓宏¹

(1. 三二〇一医院内分泌科, 陕西汉中 723000; 2. 三二〇一医院骨科)

【摘要】 目的 研究核因子- κ B(NF- κ B)/c-Jun N-末端激酶(JNK)/磷酸酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号表达在糖尿病足多重耐药金黄色葡萄球菌(SA)感染中的作用。方法 前瞻性选取 2019 年 7 月-2021 年 7 月本院收治的 69 例 SA 感染的糖尿病足患者作为研究组, 同期选取于本院就诊的 40 例足部烧伤患者作为对照组。对患者进行 SA 分离鉴定并做药敏试验, 根据耐药结果将研究组分为多重耐药组与非多重耐药组; 采用蛋白质印迹法(Western blot)检测 NF- κ B p65、JNK、PI3K 信号通路分子表达强度, 使用实时定量 PCR 检测其 mRNA 表达量。结果 对照组与研究组中性粒细胞比率、血肌酐、C 反应蛋白、降钙素原、白介素-6 水平差异无统计学意义($P>0.05$); 研究组糖化血红蛋白、白细胞计数、红细胞沉降率高于对照组($P<0.05$)。药敏试验显示, 研究组检出 33 例多重耐药 SA, 对照组检出 2 例, 研究组多重耐药 SA 检出率高于对照组($P<0.05$)。多重耐药组白细胞计数、中性粒细胞比率、C 反应蛋白、降钙素原、白介素-6 水平高于非多重耐药组($P<0.05$); 两组的糖化血红蛋白、红细胞沉降率、血肌酐水平差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组标本中 NF- κ B、JNK、PI3K 蛋白表达微弱, 研究组标本中 NF- κ B、JNK、PI3K 蛋白表达强烈; 多重耐药组标本中的 NF- κ B、JNK、PI3K 光密度值高于非多重耐药组。研究组 NF- κ B、JNK、PI3K 表达量高于对照组($P<0.05$), 且多重耐药组表达量高于非多重耐药组($P<0.05$)。结论 SA 感染的糖尿病足患者创面肉芽组织中 NF- κ B/JNK/PI3K 信号表达增强, 且多重耐药 SA 感染患者增强更显著; SA 多重耐药发生可能与炎症反应增强有关。

【关键词】 NF- κ B/JNK/PI3K 信号; 糖尿病足; 多重耐药; 金黄色葡萄球菌; 感染

【中图分类号】 R378.11

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2021)12-1337-04

[Journal of Pathogen Biology. 2021 Dec;16(12):1337-1340.]

Role of NF- κ B/JNK/PI3K signaling pathway related molecules in multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* infection in diabetic foot

ZHANG Juan¹, ZHANG Gen-sheng², HUANG Xue¹, ZHAO Xiao-hong¹ (1. Department of Endocrinology, 3201 Hospital, Hanzhong, Shanxi 723000, China; 2. Department of Orthopedics, 3201 Hospital)*

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) / c-Jun N-terminal kinase (JNK) / phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway related molecules in multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* (SA) infection in diabetic foot. **Methods** Sixty-nine SA-infected diabetic foot patients admitted to our hospital from July 2019 to July 2021 were prospectively selected as study group, and another 40 patients with foot burns were selected as control group. SA strains were isolated and identified from the patients and drug sensitivity test was conducted. According to the drug resistance results, study group was divided into multiple drug resistance group and non-multiple drug resistance group. The protein expression intensity and mRNA expression levels of NF- κ B P65, JNK and PI3K signaling pathway molecules were detected by Western blot and real-time quantitative PCR. **Results** The neutrophil-lymphocyte ratio, serum creatinine, C-reactive protein, procalcitonin and interleukin-6 levels demonstrated no significant difference between the two groups ($P>0.05$). The glycosylated haemoglobin, white blood cell count and erythrocyte sedimentation rate were $(5.34 \pm 0.61)\%$, $(7.86 \pm 1.49) \times 10^9/L$ and $(34.48 \pm 7.59) mm/h$ in control group, which had significant difference with $(7.89 \pm 1.17)\%$, $(9.42 \pm 1.66) \times 10^9/L$ and $(37.52 \pm 9.86) mm/h$ in study group ($P<0.05$). Drug sensitivity test showed that 33 cases of multidrug-resistant SA infections were detected in study group and 2 cases in control group, and the overall detection rate of multidrug-resistant SA infection was 47.83% in study group, which was higher than 5.00% in control group ($P<0.05$). The white blood cell count, neutrophil-lymphocyte ratio and C-reactive protein, procalcitonin and interleukin-6 level in multi-drug resistance group were higher than those in non-multi-drug resistance group ($P<0.05$), while the glycosylated haemoglobin, erythrocyte sedimentation rate and serum creatinine yielded no statistical difference

* **【通讯作者】** 张根生, E-mail: zhangensn@163.com

【作者简介】 张娟(1985-), 女, 陕西汉中, 人, 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事内分泌与代谢性疾病研究。E-mail: zhangjiao@163.com

between the two groups ($P>0.05$). The expression of NF- κ B, JNK, PI3K protein was weak in control group, while was relatively strong in study group. The optical density values of NF- κ B, JNK and PI3K in multi-drug resistant group were higher than those in non-multi-drug resistant group. The expression levels of NF- κ B, JNK and PI3K were (137.48 ± 16.71), (2.04 ± 0.27) and (2.17 ± 0.29) in study group, which were significantly higher than (93.52 ± 11.36), (0.89 ± 0.06) and (1.38 ± 0.20) in control group ($P<0.05$). The expression levels of NF- κ B, JNK and PI3K were (139.52 ± 17.12), (2.21 ± 0.35) and (2.36 ± 0.41) in multi-drug resistant group, which were significantly higher than (128.37 ± 14.08), (1.76 ± 0.18) and (1.84 ± 0.26) in non-multi-drug resistant group ($P<0.05$). **Conclusion** NF- κ B/JNK/PI3K signaling expression in granulation tissue of SA infected diabetic foot is enhanced, especially in patients with multidrug resistant SA infection, moreover, the occurrence of multidrug resistance SA infection may be related to the enhancement of inflammatory response.

【Key words】 NF- κ B/JNK/PI3K signaling pathway; diabetic foot; multidrug resistance; *Staphylococcus aureus*; infection

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)属于条件致病菌,在糖尿病足溃疡中为常见感染致病菌,且在耐药菌中占比较高^[1-2],治疗难度大。由于糖尿病患者自身免疫力低下,SA易引发感染,且较难控制^[3-4]。近年来随着抗生素的广泛使用,多重耐药SA检出率逐渐增多,增加了治疗难度^[5-6]。糖尿病足溃疡愈合过程中炎症反应使各细胞因子协调发生紊乱,研究显示,溃疡能刺激促炎因子而影响基因蛋白信号表达。核因子- κ B(NF- κ B)为体内调节多种反应的转录因子,被上游信号通路激活后以调控细胞、生长、趋化等因子表达,参与细胞增殖、凋亡等过程。c-Jun N-末端激酶(JNK)为丝裂原活化蛋白激酶家族,又称应激活化蛋白激酶,其信号转导通路在细胞周期、凋亡、应激等病理生理过程中发挥重要作用。磷酸酰肌醇3-激酶(PI3K)为胞内磷脂酰肌醇激酶,本身具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性,常见PI3K/Akt信号通路,能抑制细胞增殖并促进凋亡^[7-8]。本研究通过检测多重耐药SA感染糖尿病足患者创面肉芽组织中的NF- κ B/JNK/PI3K信号表达情况,探讨糖尿病患者多重耐药SA感染与其炎症反应的关系。

对象与方法

1 一般资料

前瞻性选取2019年7月-2021年7月本院收治的69例SA感染的糖尿病足患者作为研究组,其中男37例,女32例。纳入标准:符合《中国糖尿病足防治指南(2019版)中足溃疡感染诊疗部分解读》标准^[9]确诊为糖尿病足溃疡合并感染;患肢踝肱指数超过0.9,且无缺血情况;签署知情同意书。排除标准:免疫系统障碍患者;合并恶性肿瘤患者;甲状腺功能严重障碍患者;合并危重症患者;其他类型感染患者;临床资料不完整患者。同期选取于本院就诊的40例足部烧伤患者作为对照组,其中男22例,女18例。两组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)(表1)。

表1 两组一般资料比较
Table 1 Comparison of general data between the two groups

指标 Index	对照组 Control group (n=40)	研究组 Research group (n=69)	χ^2/t	P	
性别	男	22	37	0.019	0.889
	女	18	32		
年龄(岁)	57.63±6.28	58.12±7.41	0.351	0.726	
病程(年)	1.65±0.78	1.83±0.59	1.361	0.176	
溃疡面积(cm ²)	6.62±1.84	7.26±2.15	1.577	0.118	
溃疡深度(cm)	1.07±0.33	1.17±0.46	1.206	0.231	
溃疡部位	足背	12	23	0.159	0.924
	足趾	17	27		
	足底	11	19		
感染类型	急性	16	31	0.251	0.617
	慢性	24	38		

本研究经医院医学伦理委员会批准,患者知情同意。

2 方法

2.1 SA分离鉴定与药敏试验 患者入院后第一次换药,对周围皮肤消毒并清洗创面病灶,取创面基底部组织,按《金黄色葡萄球菌小菌落突变株的分离与鉴定》标准^[10]将菌株分离,使用全自动细菌鉴定系统(Phoenix-100,美国BD公司产品)进行菌株鉴定。

采用K-B纸片琼脂扩散法对明确的SA进行药敏试验,根据结果将患者分为多重耐药组与非多重耐药组。

2.2 NF- κ B p65、JNK、PI3K信号通路分子表达强度

使用Western blot进行检测。取患者创面基底部的肉芽组织,经固定、包埋处理,连续切片,烤片脱蜡至水,用双氧水将内源性过氧化物酶去除,于RIPA缓冲液中裂解创面组织总蛋白;使用Pierce BCA测定法对蛋白质浓度进行测定,通过6%~10%SDS-PAGE分离裂解物并转移至硝酸纤维素膜。将转移膜、封闭液于TBST孵育,后与第一抗体孵育过夜。将膜和二抗于室温下孵育;用ECL试剂盒(艾美捷科技有限公司产品)放入X光片夹中,压片,加入显色液,通过凝胶图像分析系统拍照,使用ImageJ软件分析免疫反应性

条带光密度。

2.3 NF-κB、JNK、PI3K 基因 mRNA 表达量 按照荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Biosharp 公司产品)说明书方法在创面组织中将总 RNA 分离出来,通过 life technologies 合成第一链 cDNA,以此为模板,磷酸甘油醛脱氢酶为参照;采用实时定量 PCR 系统中的 SYBR Green 作实时 PCR 的指标;PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环;Dissociation Stage:95 °C 15 s,60 °C 30 s,90 °C 15 s。于 Taq DNA 聚合酶作用下,使引物链沿着模板延伸。反应结束后由软件自动记录荧光曲线,分级计算 Ct 值,检测被测样品 RNA 完整与可靠性,使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算相对定量。 $\Delta\Delta Ct = \text{样品与内参照 Ct 均值之差} - \text{对照样品与对照组内参照 Ct 均值之差}$;后取 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作为被检样品初始 mRNA 含量。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 21.0 进行统计学分析。计数资料用百分比表示,采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1 两组患者临床资料比较

两组患者中性粒细胞比率、血肌酐、C 反应蛋白、降钙素原、白介素-6 水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);研究组糖化血红蛋白、白细胞计数、红细胞沉降率高于对照组(均 $P < 0.05$ (表 2))。

表 2 两组患者血清指标比较
Table 2 Comparison of serum indexes between the two groups

指标 Index	对照组 Control group (n=40)	研究组 Research group (n=69)	t	P
糖化血红蛋白(%)	5.34±0.61	7.89±1.17	12.796	<0.001
白细胞计数($\times 10^9/L$)	7.86±1.49	9.42±1.66	4.906	<0.001
中性粒细胞比率(%)	68.70±6.14	69.55±9.38	0.513	0.609
红细胞沉降率(mm/h)	34.48±7.59	37.52±9.86	1.681	0.096
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	80.76±11.83	81.92±18.62	0.354	0.724
C 反应蛋白(mg/L)	11.54±2.83	11.88±2.32	0.680	0.498
降钙素原(ng/ml)	1.07±0.25	1.18±0.31	1.912	0.059
白介素-6(pg/ml)	16.74±3.35	16.88±3.26	0.214	0.831

2 多重耐药 SA 检出结果

药敏试验结果显示,研究组检出 33 例多重耐药 SA,对照组检出 2 例,研究组多重耐药 SA 检出率高于对照组($P < 0.05$ (表 3))。

3 两组多重耐药患者资料比较

两组患者一般资料与糖化血红蛋白、红细胞沉降率、血肌酐水平差异无统计学意义($P > 0.05$);多重耐药组白细胞计数、中性粒细胞比率与 C 反应蛋白、降钙素原、白介素-6 水平高于非多重耐药组($P < 0.05$) (表 4)。

表 3 两组患者多重耐药 SA 检出结果比较
Table 3 Comparison of detection results of multidrug resistance SA between the two groups

组别 Group	例数 No. of cases	多重耐药 SA Multidrug resistant SA	检出率 Detection rate (%)
对照组	40	2	5.00
研究组	69	33	47.83
χ^2			21.304
P			<0.00

表 4 多重耐药与非多重耐药组临床资料与血清指标比较
Table 4 Comparison of clinical data and serum indexes between multidrug resistance and non multidrug resistance groups

指标 Index	非多重耐药组 Non multidrug resistance group (n=36)	多重耐药组 Multidrug resistance group (n=33)	χ^2/t	P
性别	男	20	0.113	0.737
	女	16		
年龄(岁)	57.82±5.84	58.37±4.36	0.440	0.661
病程(年)	1.81±0.52	1.88±0.65	0.496	0.622
溃疡面积(cm^2)	6.94±1.81	7.53±1.16	1.596	0.115
溃疡深度(cm)	1.14±0.28	1.22±0.36	1.035	0.304
溃疡部位	足背	14	1.048	0.592
	足趾	13		
	足底	9		
感染类型	急性	19	1.875	0.171
	慢性	17		
糖化血红蛋白(%)	7.62±1.19	7.96±1.38	1.099	0.276
白细胞计数($\times 10^9/L$)	8.74±1.38	12.95±2.18	9.668	<0.001
中性粒细胞比率(%)	66.41±5.36	79.62±5.87	9.772	<0.001
红细胞沉降率(mm/h)	36.42±7.31	37.86±10.58	0.662	0.510
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	80.15±15.27	82.10±16.17	0.515	0.608
C 反应蛋白(mg/L)	10.20±1.68	15.59±1.94	12.364	<0.001
降钙素原(ng/ml)	2.28±0.83	3.62±1.03	5.973	<0.001
白介素-6(pg/ml)	17.08±3.51	19.67±3.74	2.967	0.004

4 各组创面肉芽组织 NF-κB、JNK、PI3K 信号表达

对照组标本中 NF-κB、JNK、PI3K 蛋白表达微弱,研究组标本中 NF-κB、JNK、PI3K 蛋白表达强烈,其光密度值差异显著;多重耐药组标本中的 NF-κB、JNK、PI3K 光密度值高于非多重耐药组。对照组 NF-κB、JNK、PI3K 表达量低于研究组($P < 0.05$),且多重耐药组表达量高于非多重耐药组($P < 0.05$ (表 5))。

讨 论

糖尿病足为糖尿病主要并发症,发病机理涉及机体高血糖、氧化应激、缺血缺氧导致下肢血管病变等因素^[11]。糖尿病足为下肢远端神经异常、周围血管不同程度病变导致的足部溃疡、感染、深层组织破坏,轻症表现为足部畸形、皮肤干燥发凉,重症患者表现为足部溃疡、坏疽等,是患者截肢的主要原因^[12-13]。糖尿病足溃疡易发生细菌感染,进而延长溃疡愈合时间,SA 为重要致病菌,可感染呼吸、泌尿、血液循环等系统及皮肤与软组织等,溃疡久治不愈导致糖尿病足患者的截

肢率增加,可超过 15%^[14]。感染为糖尿病足进展主要表现,当患者发生深部感染后,治疗效果不佳。临床在糖尿病足感染部位中分离出多种致病菌,其中 SA 检出率较高。近年来由于滥用抗生素而导致多重耐药 SA 检出率逐年增加^[15],多重耐药 SA 多出现于久治不愈的感染创面中,其治疗难度大,患者截肢率较高,对其生活质量有严重影响。

表 5 各组患者 NF-κB、JNK、PI3K 蛋白表达量比较
Table 5 Comparison of NF-κB、JNK and PI3K protein expression in each group

组别 Group	例数 No. of cases	NF-κB	JNK	PI3K
对照组	40	93.52±11.36	0.89±0.06	1.38±0.20
研究组	69	137.48±16.71	2.04±0.27	2.17±0.29
<i>t</i>		14.764	26.512	15.242
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001
非多重耐药组	36	128.37±14.08	1.76±0.18	1.84±0.26
多重耐药组	33	139.52±17.12	2.21±0.35	2.36±0.41
<i>t</i>		8.427	7.562	7.217
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

本研究结果表明,研究组糖化血红蛋白、白细胞计数与红细胞沉降率高于对照组,且多重耐药组白细胞计数、中性粒细胞比率、C 反应蛋白水平高于非多重耐药组,证明糖尿病足患者机体免疫炎症反应明显,且发生多重耐药 SA 感染后情况更为严重。自噬可满足细胞自身代谢需要,可参与细胞生长分化^[16-17]。研究显示^[18],自噬能有效缓解糖尿病足发生慢性并发症,但感染患者的自噬特点尚不明确。本结果显示,糖尿病足患者感染创面肉芽组织中 NF-κB、JNK、PI3K 蛋白表达较为强烈,且多重耐药 SA 患者组织中表达强于非多重耐药患者。原因为创面愈合炎症期间,NF-κB 信号被激活与 JNK 磷酸化发挥重要作用;PI3K 信号为参与细胞增殖分化、凋亡与葡萄糖转运等溃疡愈合重要通路;说明患者创面 NF-κB/JNK/PI3K 信号通路介导的血管新生被激活,炎症反应较严重^[19-20]。为进一步明确 NF-κB/JNK/PI3K 的高表达对糖尿病足患者多重耐药 SA 感染有促进作用,本研究对比了糖尿病足与足部烧伤间的 NF-κB、JNK、PI3K 蛋白表达,SA 多重耐药与非耐药患者间的 NF-κB、JNK、PI3K 表达量,结果证实了糖尿病足患者多重耐药 SA 感染的组织中 NF-κB/JNK/PI3K 信号分子通路被激活。

综上所述,糖尿病足患者多发多重耐药 SA 感染,其创面肉芽组织中 NF-κB/JNK/PI3K 信号表达增强,发病机制可能与机体炎症反应有一定关联。

【参考文献】

[1] 万东芳,万永山,朱红军,等. 皮肤软组织感染患者金黄色葡萄球

菌感染状况研究[J]. 中华医院感染学杂志,2019,29(1):32-35.

[2] Xia H, Gao J, Xiu M, et al. Community-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Chinese adult: A case report[J]. *Medicine*,2020,99(26):e20914.

[3] 于学斌,彭跃进,史帅涛,等. 糖尿病足患者金黄色葡萄球菌感染的临床特点与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2015,(16):3664-3666.

[4] 宁丽萍,王占科,王勋松,等. 糖尿病足患者金黄色葡萄球菌感染率和耐药性分析[J]. 东南国防医药,2019,21(1):71-74.

[5] 曾海莲. 糖尿病足患者发生多重耐药菌感染的危险因素相关分析[J]. 检验医学与临床,2016,13(z2):51-53.

[6] Silva V, Almeida F, Carvalho JA, et al. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* EMRSA-15 clone as the predominant cause of diabetic foot ulcer infections in Portugal[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,2020,39(1):179-186.

[7] 徐亚青,郑建娣,周玉琴,等. 糖尿病血培养阳性患者菌群分布特点及耐药结果分析[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(13):1616-1618.

[8] 韩强,柳国斌,秦亮,等. 紫朱软膏对金黄色葡萄球菌感染糖尿病足溃疡炎症反应及 NF-κB/JNK/PI3K 信号表达的影响[J]. 天津中医药大学学报,2021,40(2):226-234.

[9] 汤正义. 中国糖尿病足防治指南(2019 版)中足溃疡感染诊疗部分解读[J]. 世界临床药物,2019,40(9):599-602.

[10] 熊元,王波,李皓宇,等. 金黄色葡萄球菌小菌落突变株的分离与鉴定[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(5):968-971.

[11] 宋薇,解嘉慧,肖宇. 糖尿病足溃疡的危险因素与治疗研究进展[J]. 山东医药,2019,59(4):88-91.

[12] 黄仁燕,韩强,胡啸明,等. 巨噬细胞在糖尿病足溃疡愈合过程中调控机制研究进展[J]. 海南医学院学报,2019,25(4):315-320.

[13] Chang CW, Lin MH. Optimization of PMA-qPCR for *Staphylococcus aureus* and determination of viable bacteria in indoor air[J]. *Indoor Air*,2018,28(1):64-72.

[14] 王夏妃,龚维坤,孙英芬,等. 糖尿病足患者感染多重耐药菌的病原学分布特点与危险因素分析[J]. 浙江临床医学,2018,20(4):725-727.

[15] 钟金焕,史旻,李燕美. 糖尿病足患者金黄色葡萄球菌感染的临床特点与耐药性分析[J]. 吉林医学,2019,40(11):2510-2512.

[16] 龚艺,陈丹,陈小琴,等. NF-κB 和 JNK 通路调节肺炎链球菌 PspA 蛋白诱导人类单核细胞分泌炎症细胞因子[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(4):464-467.

[17] 孙瑶瑶. PI3K-Akt 和 JNK 信号通路与 AfMNPV 诱导斜纹夜蛾 SL-1 细胞凋亡[D]. 华中师范大学,2014.

[18] 黄晓菁,郑霄,葛乔波. 自噬相关分子 Beclin1 和 LC3 在糖尿病足多重耐药金黄色葡萄球菌感染中的作用[J]. 中国医师杂志,2021,23(6):836-841.

[19] 卫东,杜丽萍,张家建. 封闭负压引流联合生物敷料对糖尿病足溃疡创面植皮后血管新生、炎症反应的影响[J]. 海南医学院学报,2017,23(15):2071-2074.

[20] 池莉莎. NF-κB/JNK 参与调控 bFGF 促人真皮成纤维细胞迁移作用的研究[D]. 温州医科大学,2015.

【收稿日期】 2022-07-19 【修回日期】 2022-09-26