

# 鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠中性粒细胞中抗氧化蛋白 6、丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1 和翻译控制肿瘤蛋白表达变化

邹琪<sup>1</sup>, 颜培娥<sup>2</sup>, 陈振东<sup>2</sup>, 汪华学<sup>1</sup>, 何先弟<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**通过蛋白印迹技术验证鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠中性粒细胞中抗氧化蛋白 6 (PRDX6)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1 (SERPIN B1) 和翻译控制肿瘤蛋白 (TCTP) 在不同时间点的表达情况。**方法:**将 18 只清洁级雄性成年 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 (N 组)、脓毒症 6 h 组 (6 h 组) 和 12 h 组, 每组 6 只。利用鲍曼不动杆菌腹腔注射制作鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠模型, 提取 N 组、6 h 组和 12 h 组大鼠的中性粒细胞总蛋白, 用免疫印迹实验检测 PRDX6、SERPIN B1 和 TCTP 的表达变化, 并与前期双向凝胶电泳结果做对比分析。**结果:**6 h 组和 12 h 组中性粒细胞中 PRDX6 表达量均明显低于 N 组 ( $P < 0.01$ ), 12 h 组较 6 h 组下降更明显 ( $P < 0.01$ ); 6 h 组和 12 h 组 SERPIN B1 的表达量均高于 N 组 ( $P < 0.01$ ), 6 h 组和 12 h 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 6 h 组和 12 h 组 TCTP 的表达量均显著高于 N 组 ( $P < 0.01$ ), 而 6 h 组和 12 h 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 3 种蛋白的表达与前期蛋白质组学实验结果基本一致。**结论:**鲍曼不动杆菌脓毒症组大鼠中性粒细胞中 PRDX6、SERPIN B1 和 TCTP 表达与正常组之间存在明显差异, PRDX6、SERPIN B1 和 TCTP 可能会成为鲍曼不动杆菌脓毒症早期诊断和治疗的分子靶点。

**[关键词]** 脓毒症; 鲍曼不动杆菌; 氧化蛋白 6; 丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1; 翻译控制肿瘤蛋白

**[中国图书资料分类法分类号]** R 631      **[文献标志码]** A

## The expressions of Peroxiredoxin 6, serine protease inhibitor B1 and translationally controlled tumor protein protein in neutrophils of *Acinetobacter baumannii* sepsis rats

ZOU Qi<sup>1</sup>, YAN Pei-e<sup>2</sup>, CHEN Zhen-dong<sup>2</sup>, WANG Hua-xue<sup>1</sup>, HE Xian-di<sup>1</sup>

(1. Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Graduate, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the expressions of the Peroxiredoxin 6 (PRDX6), serine protease inhibitor B1 (SERPIN B1) and translation control tumor protein translationally controlled tumor protein (TCTP) in neutrophils of *Acinetobacter baumannii* sepsis rats using Western blot technology at different points time. **Methods:** The *Acinetobacter baumannii* rat model was established by intraperitoneal injection with *Acinetobacter baumannii*. The total proteins of neutrophils in normal rats and rats after 6 and 12 h of sepsis were harvested. The protein levels of PRDX6 SERPIN B1 and TCTP in normal and sepsis rats were detected by western blot, and compared with the results of two-dimensional gel electrophoresis. **Results:** The PRDX6 expression levels in neutrophils of *Acinetobacter baumannii* rats after 6 and 12 h of sepsis were significantly lower than that of normal rats ( $P < 0.01$ ), the increasing degree of which in rats after 6 h of sepsis was more significantly than that in rats after 12 h of sepsis ( $P < 0.01$ ). The SERPIN B1 and TCTP expression levels in neutrophils of *Acinetobacter baumannii* rats after 6 and 12 h of sepsis were significantly higher than those of normal rats ( $P < 0.01$ ), the differences of which between sepsis rats after 6 and 12 h of sepsis were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The expression levels of PRDX6 SERPIN B1 and TCTP were in accordance with the results of proteomics. **Conclusions:** The expressions of PRDX6, SERPIN B1 and TCTP in neutrophils of *Acinetobacter baumannii* sepsis rats are different from the normal rats, which can used as the target molecules in the early diagnosis and treatment of *Acinetobacter baumannii*.

**[Key words]** sepsis; *acinetobacter baumannii*; peroxiredoxin 6; serine protease inhibitor B1; translationally controlled tumor protein

**[收稿日期]** 2014-01-30

**[基金项目]** 1. 安徽省高校省级自然科学研究重点资助项目 (KJ2013A186); 2. 安徽省“十二五”临床重点培育专科建设项目 (01P44)

**[作者单位]** 1. 蚌埠医学院第一附属医院 重症医学科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院 研究生部, 安徽 蚌埠 233030

**[作者简介]** 邹琪 (1983 -), 男, 硕士, 住院医师。

**[通信作者]** 何先弟, 硕士研究生导师, 主任医师, 教授。E-mail: panzersas@163.com

重症监护室 (ICU) 收治患者中由感染引发的危重病日益增多, 甚至发展为脓毒症。脓毒症一直是临床上较为棘手的问题, 不仅治疗困难, 来势凶猛, 而且病死率也较高<sup>[1]</sup>, 尤其是抗生素使用不当而导致的鲍曼不动杆菌脓毒症的发病率也日益增多<sup>[2]</sup>, 在 ICU 中由鲍曼不动杆菌所致的脓毒症治疗更加困难。本实验延续前期蛋白质组学实验<sup>[3]</sup>, 验证鲍曼不动杆菌中性粒细胞中抗氧化蛋白 6

(PRDX6)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1 (SERPIN B1) 和翻译控制肿瘤蛋白 (TCTP) 在不同时间点的表达情况, 为后续研究提供分子生物学参考依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料 鲍曼不动杆菌菌株 (ATCC19606)、淋巴细胞分离液 (TBD)、红细胞裂解液、DMEM 细胞培养液、Tris base、SDS、丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、TEMED、甘油、3% 右旋糖酐、甲醛、 $\alpha$ -HCCA (Sigma)、脱脂奶粉 (伊利)、蛋白 Marker (Fermentas)、TCTP 抗体 (AnBo 公司)、Peroxiredoxin6 抗体 (博奥森)、leukocyte elastase inhibitor A 抗体 (SANTA CRUZ)、 $\beta$ -actin (Santa)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (中杉)、Wistar 大鼠 (扬州大学医学院实验动物中心)。

1.2 主要仪器 水平转子离心机 (Eppendor)、分光光度计 (Eppendor)、ChemiDocXRS 成像系统 (Bio-Rad)、Western-blot 电泳和转膜设备 (Bio-Rad)、Labscan 扫描控制和分析前处理软件 (Amersham Biosciences)、ImageMaster™ 2D Platinum 软件 (Version 5.10 GE)、quantity one 软件 (Version 4.62 Bio-Rad)。

1.3 鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠模型制备 鲍曼不动杆菌菌株 (ATCC19606) 配置活菌液, 使用 0.9% 氯化钠注射液将菌液浓度调配至  $7 \times 10^8$  cfu/m<sup>3</sup>。选取 18 只清洁级雄性成年 Wistar 大鼠, 质量 220 ~ 240 g, 随机分为 3 组 (每组 6 只): 正常对照组 (N 组)、鲍曼不动杆菌脓毒症 6 h 组 (6 h 组)、鲍曼不动杆菌脓毒症 12 h 组 (12 h 组)。鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠模型参照文献<sup>[4]</sup>制作, 6 h 组和 12 h 组腹腔内注射鲍曼不动杆菌悬液 10 ml/kg, 对照组腹腔内注射 0.9% 氯化钠注射液 10 ml/kg。

### 1.4 中性粒细胞及总蛋白提取

1.4.1 中性粒细胞提取 N 组、6 h 组和 12 h 组分别于 12 h、6 h 和 12 h 后分离右侧颈动脉, 插管采血, 以肝素抗凝管收集, 使用大鼠淋巴细胞分离液对血液进行梯度离心, 收集底部沉淀的红细胞和中性粒细胞, 弃去上清液后, 以 DMEM 细胞培养液和沉淀细胞 1:1 混匀, 再和 3% 右旋糖酐混匀后在 37 °C 水浴箱中孵育 1 h, 弃去底部沉淀的红细胞, 收集上清液, 用 MDEM 洗涤 2 次后, 使用双蒸水涨破剩余红细胞, 再加入等量 1.8% 氯化钠注射液恢复等渗, 并再次加入 DMEM 洗涤 2 次, 如还有未涨破红细胞, 适当加用红细胞裂解液去除, 再使用 EP 管收集

中性粒细胞进行细胞总蛋白提取, 中性粒细胞姬姆萨染色后测纯度  $\geq 95\%$ , 台盼蓝染色测存活率  $\geq 98\%$ 。

1.4.2 中性粒细胞总蛋白提取 在 EP 管中的中性粒细胞中加入裂解液 (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% IPG buffer, 1% cocktail), 振荡混匀后 4 °C 下静置 1 h (每隔 15 min, 振荡混匀 1 次)。4 °C 40 000 r/min 离心 1 h。取上清液行 Bradford 蛋白定量, 分装于 EP 管中, -80 °C 保存备用。

1.5 Western blot 分析 中性粒总蛋白用 5 倍上样缓冲液稀释, 100 °C 5 min 煮沸变性, 上样量为 45  $\mu$ g, SDS-PAGE 电泳使用 5% 积成层胶 (80 V, 15 min) 和 12% 分离胶 (110 V, 60 min) 进行电泳, 在冰浴中使用硝酸纤维素膜 (NC) 膜进行转膜 (80 V, 120 min), 转膜完成后浸泡在 TBST 稀释的 5% 脱脂奶粉中, 置于摇床上室温封闭 1 h, 使用 1:300 TBST 稀释的一抗在 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 后加入 1:8 000 TBST 稀释的二抗, 37 °C 孵育 1 h, 使用 TBST 洗膜 3 次, 15 min/次, 最后进行显色, 使用 ECL 发光液暗室浸透膜后使用 Bio-Rad 凝胶成像系统成像, 拍摄目的条带后使用 quantity one 软件进行分析。

1.6 统计学方法 采用方差分析和  $q$  检验及  $t$  检验。

## 2 结果

3 组大鼠中性粒细胞中 PRDX6、SERPIN B1 和 TCTP 表达比较显示, 6 h 组和 12 h 组中性粒细胞 PRDX6 表达量均明显低于 N 组 ( $P < 0.01$ ), 12 h 组较 6 h 组下降 ( $P < 0.01$ ); SERPIN B1 在 6 h 组和 12 h 组的表达量均明显高于 N 组 ( $P < 0.01$ ), 6 h 组和 12 h 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); TCTP 在 6 h 组和 12 h 组的表达量均明显高于 N 组 ( $P < 0.01$ ), 而 6 h 组和 12 h 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。3 种蛋白的表达和前期蛋白质组学结果<sup>[3]</sup>基本相同 (见表 1~2、图 1~6)。

## 3 讨论

PRDX6、SERPIN B1 和 SERPIN B1 分别属于抗氧化蛋白、信号转导和免疫调控蛋白类。PRDX6 蛋白是 Peroxiredoxins 家族 6 种抗氧化酶中的一种, PRDX6 是对抗氧化应激的重要酶, 细胞的抗氧化能力是通过促炎和抗炎细胞因子对它的调节实现的<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明, PRDX6 可由  $\gamma$  干扰素和肿瘤坏

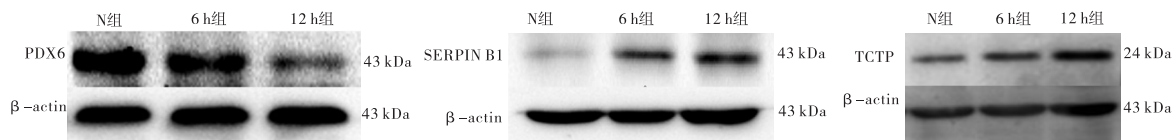


图1 PRDX6 Western blot图

图2 SERPIN B1 Western blot图

图3 TCTP Western blot图

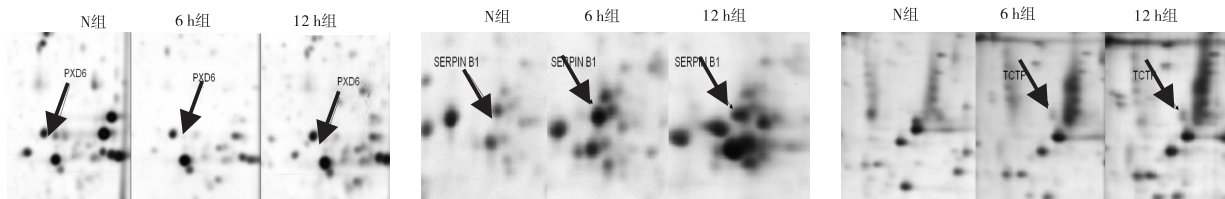


图4 双向凝胶电泳图

图5 SERPIN B1 双向凝胶电泳图

图6 TCTP 双向凝胶电泳图

表1 3组大鼠 PRDX6、SERPIN B1 和 TCTP 的不同时间点 western blot 吸光度比值比较 ( $n_i = 6; \bar{x} \pm s$ )

分组	PRDX6/ $\beta$ -actin 吸光度比值	SERPIN B1/ $\beta$ -actin 吸光度比值	TCTP/ $\beta$ -actin 吸光度比值
N 组	0.099 $\pm$ 0.027	0.159 $\pm$ 0.016	0.049 $\pm$ 0.016
6 h 组	0.065 $\pm$ 0.020 **	0.320 $\pm$ 0.083 **	0.077 $\pm$ 0.016 **
12 h 组	0.017 $\pm$ 0.006 ** $_{\Delta\Delta}$	0.357 $\pm$ 0.089 **	0.079 $\pm$ 0.012 **
F	26.22	13.24	7.72
P	<0.01	<0.01	<0.01
MS <sub>组内</sub>	0.000 4	0.005 0	0.000 2

q 检验:与 N 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 6 h 组比较  $\Delta\Delta P < 0.01$

表2 3组大鼠 PRDX6、SERPIN B1 和 TCTP 的不同时间点双向凝胶电泳蛋白白值比较 ( $n_i = 6; \bar{x} \pm s$ )

分组	PRDX6	SERPIN B1	TCTP
N 组	0.149 $\pm$ 0.008	0.107 $\pm$ 0.009	0
6 h 组	0.034 $\pm$ 0.018 **	0.293 $\pm$ 0.050 **	0.045 $\pm$ 0.014
12 h 组	0.052 $\pm$ 0.010 ** $_{\Delta}$	0.265 $\pm$ 0.035 **	0.062 $\pm$ 0.012
F	141.14	47.56	2.26 <sup>#</sup>
P	<0.01	<0.01	<0.01
MS <sub>组内</sub>	0.000 2	0.001 3	0.000 1

q 检验:与 N 组比较 \*\*  $P < 0.01$ ; 与 6 h 组比较  $\Delta P < 0.05$ ; # 示 t 值

死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 调节。PRDX6 也可以通过控制活性氧的功能调节基因的表达,保护上皮细胞免受氧化。PRDX6 有过氧化酶和磷脂酶 A<sub>2</sub> 的活性,并提高氧化酶活性 SDS 的活化,中性粒细胞用佛波醇脂刺激,免疫印迹和共聚焦显微镜检测到 PRDX6 易位到质膜,增强了中性粒细胞的活性,使中性粒细胞释放的还原型辅酶 II 能够发挥氧化酶功能,从而达到杀灭病原微生物的目的<sup>[7]</sup>。本实验脓毒症大鼠 PRDX6 表达下调,由此我们推断 PRDX6 减少,中性粒细胞的活性下降导致了鲍曼不动杆菌脓毒症的发展。

SERPIN B1 表达定位不仅在炎症浸润的细胞,如中性粒细胞等,在上皮细胞同样表达,并且在炎症性肠疾病的发病机制中发挥重要作用。Uchiyama 等<sup>[8]</sup> 研究表明,细胞内的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员 SERPIN B1,可通过抑制结肠上皮细胞氧化应激反应,起到保护结肠上皮细胞的作用。Chai 等<sup>[9]</sup> 研究表明,通过抑制丝氨酸蛋白酶活性,可以降低肺血管通透性,使中性粒细胞的活化降低,从而减少 TNF- $\alpha$  和白细胞介素-8 的产生,在烧伤所致的急性肺损伤 (ARDS) 中起到对肺组织的保护作用。Ahn 等<sup>[10]</sup> 研究发现肺组织中的透明质酸减少在 ARDS 肺水肿的发生中起着重要作用,ARDS 使中性粒细胞活化所产生的弹性蛋白酶可导致透明质酸的减少,而 SERPIN 可以抑制弹性蛋白酶降解透明质酸,减轻 ARDS 的肺水肿。

TCTP 是在免疫应答、细胞增殖、致癌和细胞凋亡中起重要作用的多功能蛋白质,已被作为癌症治疗的靶点<sup>[11]</sup>。Gu 等<sup>[12]</sup> 研究显示,与低级别肿瘤以及正常组织相比 TCTP 蛋白水平在高级别肿瘤均显著升高。TCTP 的异位表达增强了肿瘤细胞在体外和在体内的增殖,而 TCTP 基因的敲除则抑制了这种效应。Gnanasekar 等<sup>[13]</sup> 通过 siRNA 技术干扰 TCTP 蛋白在前列腺癌细胞中的表达,抑制前列腺癌细胞的生长并促使其凋亡增加,证明了 TCTP 的抗凋亡作用,他们的研究也表明了 TCTP 是在线粒体水平通过插入线粒体膜防止 Bax 蛋白二聚化的产生来起到抗凋亡作用。本实验中 TCTP 的表达呈逐步上升趋势,表明 TCTP 在鲍曼不动杆菌脓毒症抗中性粒细胞凋亡方面可能起着某些作用。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Kong X, Thimmulappa R, Craciun F, et al. Enhancing Nrf2 Pathway by Disruption of Keap1 in Myeloid Leukocytes Protects

- Against Sepsis[J]. Crit Care Med, 2011, 184(8): 928-938.
- [2] Aguirre-Avalos G, Mijangos-Méndez JC, Zavala-Silva ML, et al. Bacteremia caused by *Acinetobacter baumannii* among patients in critical care[J]. Gac Med Mex, 2009, 145(1): 21-25.
- [3] 何先弟, 邹琪, 陈振东, 等. 鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠中性粒细胞的蛋白质组学研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(5): 385-394.
- [4] Cirioni O, Silvestri C, Ghiselli R, et al. Therapeutic efficacy of buforin II and rifampin in a rat model of *Acinetobacter baumannii* sepsis[J]. Crit Care Med, 2009, 37(4): 1403-1407.
- [5] Paula FM, Ferreira SM, Boschero AC, et al. Modulation of the peroxiredoxin system by cytokines in insulin-producing RINm5F cells; down-regulation of PRDX6 increases susceptibility of  $\beta$  cells to oxidative stress[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 374(1/2): 56-64.
- [6] Hasanova N, Kubo E, Kumamoto Y, et al. Age-related cataracts and Prdx6; correlation between severity of lens opacity, age and the level of Prdx 6 expression[J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93(8): 1081-1084.
- [7] Ambruso DR, Ellison MA, Thurman GW, et al. Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(2): 306-315.
- [8] Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, et al. Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302(10): 1163-1170.
- [9] Chai JK, Cai JH, Deng HP, et al. Role of neutrophil elastase in lung injury induced by burn-blast combined injury in rats[J]. Burns, 2013, 39(4): 745-753.
- [10] Ahn CM, Sandler H, Saldeen T. Decreased lung hyaluronan in a model of ARDS in the rat; effect of an inhibitor of leukocyte elastase[J]. Ups J Med Sci, 2012, 117(1): 1-9.
- [11] Nayariseri A, Yadav M, Wishard R. Computational evaluation of new homologous down regulators of Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) targeted for tumor reversion [J]. Interdiscip Sci, 2013, 5(4): 274-279.
- [12] Gu X, Yao L, Ma G, et al. TCTP promotes glioma cell proliferation *in vitro* and *in vivo* via enhanced  $\beta$ -catenin/TCF4 transcription [J]. Neuro Oncol, 2014, 16(2): 217-222.
- [13] Gnanasekar M, Thirugnanam S, Zheng G, et al. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells [J]. Int J Oncol, 2009, 34(5): 1241-1246.

(本文编辑 刘畅)

## (上接第 1599 页)

- [4] 李玉斌, 冯继, 周益明, 等. 立体定向引导微创手术切除脑功能区病变[J]. 中国临床神经外科杂志, 2010, 15(8): 492-494.
- [5] 孙良先, 伍国锋, 任思颖, 等. 脑立体定向植入海马电极监测颞叶内侧癫痫的临床研究[J]. 中华神经科杂志, 2012, 45(4): 233-237.
- [6] 黄旅黔, 龚明, 王忠安, 等. 立体定向联合显微手术治疗丘脑高血压脑出血的临床预后分析[J]. 中华神经医学杂志, 2012, 11(8): 815-818.
- [7] Talairach J, Tournoux P. Co-planar stereotactic atlas of the human brain[M]. New York: Georg Thieme Verlag, 1988: 40.
- [8] 陈晓光, 朱敏伟, 林志国, 等. 脑前连合和后连合立体定向 MRI 研究及其临床意义[J]. 中华神经医学杂志, 2008, 7(8): 838-840.
- [9] Yasargil MG, Krisht AF, Ture U, et al. Microsurgery of insular gliomas: Part I, II, IV [J]. Contemporary Neurosurgery, 2002, 24(11): 1-8.
- [10] Park J, Lee SH, Kang DH, et al. Olfactory dysfunction after ipsilateral and contralateral pterional approaches for cerebral aneurysms[J]. Neurosurgery, 2009, 65(4): 727-732.
- [11] Hong T, Wang Y. Unilateral approach to clip bilateral multiple intracranial aneurysms [J]. Surg Neurol, 2009, 72 (Suppl 1): 23-28.
- [12] 李成, 隋东莉, 曹承亮, 等. 大脑外侧裂影响解剖学研究及其临床意义[J]. 蚌埠医学院学报, 2014, 39(2): 151-154.
- [13] Lightstone AW, Benedict SH, Bova FJ, et al. Intracranial stereotactic positioning systems: Report of the American Association of Physicists in Medicine Radiation Therapy Committee Task Group no. 68 [J]. Med Phys, 2005, 32(7): 2380-2398.

(本文编辑 刘璐)