

泛素-蛋白酶体途径与烧伤骨骼肌蛋白降解研究进展

段红杰 柴家科

严重烧伤后物质与能量代谢的显著特点之一是高分解代谢,可使机体迅速陷入负氮平衡状态。约占机体细胞总质量 50% 的骨骼肌作为人体最大的氮库,其分解消耗对机体无疑会产生巨大影响^[1]。骨骼肌蛋白过度分解不仅影响患者的运动和康复,而且容易引发肺部并发症或下肢深静脉血栓等。肌蛋白丢失的原因可以是合成减少,也可以是分解增加,或者兼而有之。本文主要综述烧伤后骨骼肌蛋白降解的研究进展。

1 泛素-蛋白酶体途径及其作用

泛素-蛋白酶体途径作为骨骼肌蛋白降解的重要途径已经受到广泛关注。它通过降解错误折叠的、氧化的、突变的或受损的蛋白质而构成细胞蛋白质质量控制的第二道防线,同时也降解部分正常蛋白质以调节蛋白活性^[2]。泛素-蛋白酶体介导的蛋白降解包括 2 个主要步骤:一是泛素化,即多泛素链通过异构肽键与靶蛋白分子结合;二是泛素化的蛋白被 26S 蛋白酶体降解。两者都是高度调节的细胞进程。见图 1。

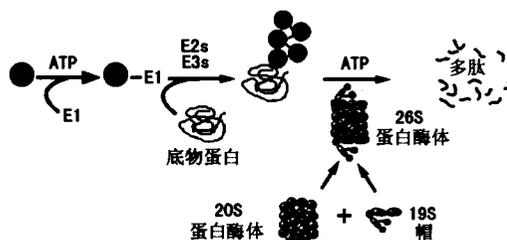


图 1 泛素-蛋白酶体途径降解蛋白质示意图。ATP 为腺苷三磷酸,E1 为泛素活化酶,E2 为泛素耦联酶,E3 为泛素蛋白连接酶

泛素化由系列酶促反应完成,包括 3 类酶:泛素活化酶(E1);泛素耦联酶(E2),骨骼肌中主要为 E214K;泛素蛋白连接酶(E3),骨骼肌中主要为

E3 α 、MAFbx 和 MuRF1。多泛素链装配因子(E4)也有重要的作用,至今已有 2 个 E4s 在哺乳动物细胞中得以鉴定^[3]。泛素化作用的高效和高度特异性,主要依赖于 E3。目前主要有 3 种类型的 E3s,即含有 HECT 结构域的 E3s、含有环指状结构域的 E3s 和含有 U2box 结构域的 E3s^[4]。正是由于这些复杂多变的 E3s 家族成员可以对不同底物进行特异性识别,才呈现出蛋白降解的高度选择性。

靶蛋白进入蛋白酶体需要底物传送蛋白的辅助,这些蛋白含有泛素样结构域(UBL)与 E2,或 UBX 和 UBA 结构域,包括 Rad23、Dsk2、Ddi1 和 Shp1/p47。Rad23、Dsk2 和 Ddi1 的 UBL 能够直接与 26S 蛋白酶体相互作用,Shp1/p47 的 UBX 结构域能够与 Cdc48/p97 相互作用,通过 Cdc48/p97 与蛋白酶体联系在一起。多数泛素化底物通过与 RPN1/S2 结合进入蛋白酶体,泛素化的靶蛋白能够直接与 RPN10/S5a 和腺苷三磷酸酶 5(ATPase-5)/S6' 或 S6a 结合。RPT5/S6' 或 S6a ATPase 也能够与 E3s 中的 VHL 结合,因此底物与蛋白酶体的结合有许多直接和间接途径,为多种蛋白在蛋白酶体中提供了选择性降解过程^[5]。

虽然泛素与细胞内快速降解的蛋白连接在一起,但是其本身却是长寿命蛋白,这是由于泛素蛋白耦联物在水解之前,泛素解离酶(DUB)已将泛素从底物上解离下来。DUB 属于蛋白酶超家族,根据其催化机制可以分为 5 类:天门冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶。生物信息学研究显示,大约有 79 个有功能的 DUB^[6],其中大部分为半胱氨酸蛋白酶。DUB 能够识别最接近的泛素基序,特异性地从泛素和与其 C 末端最后一个残基 Gly76 相连的分子之间断开。

2 泛素-蛋白酶体途径与烧伤骨骼肌蛋白降解

研究表明,严重烧伤后骨骼肌蛋白降解显著增强,以肌纤维蛋白为著。通常骨骼肌有 3 种蛋白降解通路:(1)溶酶体蛋白酶途径,包括组织蛋白酶和其他水解酶类,主要降解细胞外蛋白以及细胞表面

基金项目:国家自然科学基金(30571919);北京市自然科学基金(7072077)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所

通讯作者:柴家科,Email:cjk304@126.com,电话:010-66867972

受体;(2)钙依赖的蛋白酶途径,主要在组织损伤坏死和自溶过程中起作用;(3)泛素-蛋白酶体途径,主要降解细胞内蛋白。尽管烧伤后骨骼肌内溶酶体酶表达增加,蛋白的降解也有钙依赖的蛋白酶参与,但泛素-蛋白酶体途径在烧伤引起的蛋白降解中仍起主要作用^[7]。有学者观察到,烧伤后大鼠趾长伸肌(快白肌)质量减轻,泛素、E214K mRNA 及蛋白表达水平显著增加,而比目鱼肌(慢红肌)则增加不明显,趾长伸肌内泛素结合蛋白含量增加^[8,9]。

烧伤后大鼠骨骼肌蛋白降解增加和泛素及 E214K 表达增加,同时 20S 蛋白酶体最大的亚基 RC2 基因表达也明显增加,泛素、E214K、RC2 的表达水平与蛋白降解率呈显著正相关^[10]。烧伤后大鼠趾长伸肌 20S 蛋白酶体 RC3、RC7 亚基 mRNA 和蛋白表达显著升高,20S 蛋白酶体活性明显增强。从烫伤后第 2 天开始,大鼠骨骼肌中 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体的蛋白酶活性和 ATPase 活性均明显增加^[11],提示烧伤可激活 26S 蛋白酶复合体系统,参与骨骼肌蛋白质的降解过程。

严重烧伤脓毒症患者 24 h 尿内三甲基组氨酸(3-MH)排出量显著增加,股四头肌泛素-蛋白酶体成分 mRNA 表达显著增加,说明重症烧伤脓毒症患者泛素-蛋白酶体途径被激活,导致骨骼肌蛋白降解增强^[12]。

3 烧伤后骨骼肌蛋白降解的调节

3.1 促进骨骼肌蛋白降解的因素

3.1.1 糖皮质激素 有报道,大鼠烧伤后血浆糖皮质激素水平显著增加,与 RC2 mRNA 表达和肌纤维蛋白降解率之间呈显著正相关;而糖皮质激素拮抗剂能有效降低肌纤维蛋白降解率,说明糖皮质激素在调节骨骼肌蛋白降解中具有重要作用^[13-14]。

3.1.2 细胞因子 静脉注射大剂量重组肿瘤坏死因子 α ,能增强大鼠骨骼肌泛素-蛋白酶体途径的活性,导致总蛋白特别是肌纤维蛋白降解率升高^[15]。烫伤后大鼠血浆白细胞介素 1(IL-1)和 IL-6 水平升高也与蛋白质降解率呈正相关。

3.1.3 脓毒症 脓毒症或内毒素攻击时骨骼肌蛋白降解率增加,泛素-蛋白酶体途径活性增强。当烧伤合并脓毒症时,大鼠骨骼肌蛋白降解率进一步增加,泛素及蛋白酶体等多种成分表达和蛋白酶体活性也随之增高^[14,16-18]。说明脓毒症可通过激活泛素-蛋白酶体活性加速骨骼肌蛋白降解。

3.1.4 核因子 κ B(NF- κ B) 研究表明,NF- κ B

在烧伤脓毒症大鼠的骨骼肌中明显活化,NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫基甲酸盐,能够明显降低脓毒症时骨骼肌代谢率,提示 NF- κ B 可能参与调控烧伤脓毒症时骨骼肌的异常代谢^[18]。

3.2 抑制骨骼肌蛋白降解的因素

3.2.1 胰岛素样生长因子 I(IGF-I) IGF-I 能够抑制烧伤大鼠骨骼肌泛素-蛋白酶体活性达 90%,但对钙依赖的蛋白降解途径没有影响。其机制与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 即 PI3K/Akt 介导的 GSK-3 β 和 FOXO 转录因子失活有关^[19]。

3.2.2 雄激素 雄激素能够显著减少大鼠骨骼肌蛋白的降解,促进蛋白质合成。

3.2.3 早期切痂 烧伤大鼠早期切痂组在伤后 2、4、5 d 蛋白降解率显著降低,泛素转录表达在伤后呈持续下降趋势^[20]。烧伤后早期切痂可降低骨骼肌蛋白的高分解代谢反应,与泛素-蛋白酶体途径活性下降有关。

3.2.4 肠道喂养 与肠外营养相比,肠道喂养能明显降低烫伤大鼠骨骼肌中 19S 调节复合体活性和表达水平,减少骨骼肌蛋白质分解^[21]。

3.2.5 胰岛素 单纯烫伤大鼠伸趾长肌中 3-MH 含量、泛素基因转录水平和 E2 与内源性蛋白质结合率明显升高,给予胰岛素后其水平明显下降。说明胰岛素强化治疗能通过基因水平抑制细胞内泛素-蛋白酶体途径活性,有效减轻烫伤脓毒症时骨骼肌蛋白的高分解^[22-23]。

4 存在的问题及展望

目前对烧伤后骨骼肌蛋白降解的研究主要集中在动物模型上,鲜有关于烧伤患者骨骼肌蛋白降解的报道。尽管人和大鼠泛素-蛋白酶体途径对骨骼肌蛋白降解的作用相似,但并非完全一致。例如大鼠受糖皮质激素作用后,骨骼肌蛋白降解和泛素-蛋白酶体途径成分的表达均增强,而 Cushing 综合征患者泛素、E214K 和几种蛋白酶体亚基的 mRNA 水平并没有增加^[24-25]。所以,有待于对烧伤患者骨骼肌蛋白降解机制进行深入研究。

尽管泛素-蛋白酶体途径是烧伤后骨骼肌降解的主要途径,但它并不能直接降解正常的骨骼肌蛋白。在大鼠后肢悬吊模型中,有赖于钙蛋白酶 3 介导的肌动蛋白和肌球蛋白从 Z 盘分解、从肌丝释放,暴露出失稳的 N 末端残基,使其成为适合 N 末端法则通路的底物^[26]。有研究表明,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶能将肌动球蛋白复合物降解成相对分子

质量为 14×10^3 的小片段,为泛素-蛋白酶体途径提供底物^[27]。在烧伤专业的研究中,尚未见到相关报道。

以往认为,N 末端法则通路中的 E214k 和 E3 α 在骨骼肌蛋白降解中起重要作用。但最近研究表明, Atrogin-1/MAFbx 和 MURF-1 这两种泛素连接酶在骨骼肌蛋白降解中至关重要。似乎骨骼肌蛋白降解过程中针对不同的蛋白质有多种泛素连接途径被激活^[28]。确定特异的蛋白连接酶并选择有针对性的抑制剂控制骨骼肌蛋白过度降解,而不影响泛素-蛋白酶体系统的其他功能,其应用前景广阔。

参考文献

[1] 柴家科,盛志勇. 应重视严重烧伤脓毒症患者骨骼肌蛋白高分解代谢的研究. 中华医学杂志, 2005, 85(41):2883-2885.

[2] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 2002, 82(4):373-428.

[3] Kaneko-Oshikawa C, Nakagawa T, Yamada M, et al. Mammalian E4 is required for cardiac development and maintenance of the nervous system. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(24):10953-10964.

[4] Robinson PA, Ardley HC. Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci*, 2004, 117(22): 5191-5194.

[5] Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(8): 599-609.

[6] Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 2005, 123(2): 773-786.

[7] Fang CH, Wang JJ, Hobler S, et al. Proteasome blockers inhibit protein breakdown in skeletal muscle after burn injury in rats. *Clin Sci*, 1998, 95(2): 225-233.

[8] Fang CH, Sun X, Li BG, et al. Burn injuries in rats upregulate the gene expression of the ubiquitin-conjugating enzyme E2 (14k) in skeletal muscle. *J Burn Care Rehabil*, 2000, 21(6): 528-534.

[9] Duan X, Berthiaume F, Yarmush D, et al. Proteomic analysis of altered protein expression in skeletal muscle of rats in a hypermetabolic state induced by burn sepsis. *Biochem J*, 2006, 397(1): 149-158.

[10] Chai J, Wu Y, Sheng Z. The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin- proteasome proteolytic pathway in burned rats. *Burns*, 2002, 28(6): 527-533.

[11] 谭银玲,汪仕良,董燕麟. 严重烫伤大鼠骨骼肌 26S 蛋白酶复合体和 19S 调节复合体活性的变化. 解放军医学杂志, 2002, 27(3): 241-243.

[12] 柴家科,申传安,盛志勇. 严重烧伤脓毒症患者骨骼肌蛋白分解代谢的临床研究. 中华医学杂志, 2005, 85(2): 2895-2898.

[13] 吴焱秋,柴家科,盛志勇. 糖皮质激素在烧伤大鼠骨骼肌蛋白降解中的作用及其与蛋白酶体亚基表达的关系. 中华实验外科杂志, 2003, 20(3): 211-213.

[14] 柴家科,申传安,盛志勇. 糖皮质激素在烧伤脓毒症骨骼肌蛋白代谢中作用的研究. 中华外科杂志, 2002, 40(9):705-708.

[15] 柴家科,申传安. 静脉注射肿瘤坏死因子 α 对大鼠骨骼肌蛋白降解的影响及机制初探. 中华烧伤杂志, 2003, 19(2): 100-103.

[16] 申传安,柴家科,姚咏明,等. 脓毒症呼吸肌蛋白降解代谢的变化. 中华急诊医学杂志, 2005, 14(12): 985-988.

[17] 吴焱秋,柴家科,杨红明,等. 不同因素刺激对大鼠骨骼肌组织蛋白代谢影响的比较与分析. 解放军医学杂志, 2003, 28(11): 952-953.

[18] 尹会男,柴家科,申传安,等. 核因子- κ B 在烧伤脓毒症大鼠骨骼肌蛋白分解代谢中的作用研究. 解放军医学杂志, 2003, 28(11): 960-962.

[19] Fang CH, Li BG, Haword J, et al. Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor I and glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Endocrinology*, 2005, 146(7): 3141-3149.

[20] 吴焱秋,柴家科,杨红明,等. 严重烧伤大鼠早期切痂植皮后骨骼肌泛素转录的变化. 解放军医学杂志, 2003, 28(11): 954-955.

[21] 谭银玲,汪仕良,董燕麟. 肠道喂养和肠外营养对烫伤大鼠骨骼肌 19S 调节复合体作用的影响. 中国普通外科杂志, 2003, 12(12): 910-913.

[22] Vered S, Sundararajan M, Martin Y, et al. Insulin suppresses the increased activities of lysosomal cathepsins and ubiquitin conjugation system in burn-injured rats. *J Surg Res*, 2000, 93(1):120-126.

[23] 申传安,柴家科,姚咏明,等. 胰岛素强化治疗对烫伤脓毒症兔骨骼肌蛋白高降解的调节及其机制. 中国危重病急救医学, 2006, 18(3): 139-142.

[24] Tiao G, Fagan J, Roegner V, et al. Energy-ubiquitin-dependent muscle proteolysis during sepsis in rats is regulated by glucocorticoids. *J Clin Invest*, 1996, 97(2):339-348.

[25] Balliere C, Tauveron I, Taillandier D, et al. Glucocorticoids do not regulate the expression of proteolytic genes in skeletal muscle from Cushing's syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(9):3161-3164.

[26] Irina K, Elena K, Gayathri V, et al. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(15):2125-2134.

[27] Jie D, Xiaonan W, Christiane M, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*, 2004, 113(11):115-123.

[28] Pei RC, Hannah JK, Stewart HL. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *IJBCB*, 2005, 37(2):2088-2097.

(收稿日期:2007-06-04)

(本文编辑:王旭)

中华烧伤杂志在 2007 年重庆市期刊编校质量考核中评为
合格期刊