

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

柴家科 申传安

【摘要】 目的 观察静脉注射重组大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF α) 对大鼠骨骼肌蛋白降解的影响,初步探讨其与糖皮质激素的关系。**方法** Wistar 大鼠随机分为 3 组: A 组为对照组; B 组一次性静脉注射重组大鼠 TNF α 1×10^6 U/kg; C 组预先使用糖皮质激素受体拮抗剂 RU38486 灌胃, 2 h 后注射重组大鼠 TNF α (条件同 B 组)。用药后 12 h, 测量各组大鼠体温, 分离伸趾长肌, 称重后进行有氧孵育。采用高效液相色谱法测定总蛋白和肌纤维蛋白的降解率, 以 RNA 印迹法检测泛素 mRNA (2.4 kb) 和 C2 亚基 mRNA 的表达变化。**结果** 用药后 12 h, 体温: B、C 组大鼠均明显高于 A 组 ($P < 0.01$); 伸趾长肌重量: B、C 组均明显轻于 A 组 ($P < 0.01$), 但 C 组重于 B 组 ($P < 0.05$); 总蛋白和肌纤维蛋白降解率: B 组较 A 组分别升高 43% 和 112% ($P < 0.01$); C 组较 B 组分别降低 16% 和 28% ($P < 0.01$); 泛素 mRNA 和 C2 亚基 mRNA 的表达: B 组较 A 组分别升高约 4.3、3.6 倍, C 组较 B 组均明显降低。**结论** 静脉注射大剂量重组大鼠 TNF 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, 糖皮质激素是该效应的介导因素之一。

【关键词】 蛋白; 肿瘤坏死因子; 受体, 糖皮质激素; 泛素

Study on the mechanism of the effects of recombinant rat tumor necrosis factor α on the degradation of rat skeletal muscle proteins CHAI Jia-ke, SHEN Chuan-an. Burns Institute, The 304th Hospital of PLA, Beijing, 100037. P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism and the effects of intravenously injected tumor necrosis factor α (TNF α) on skeletal muscle protein degradation in rats and its relationship with glucocorticoid. **Methods** Forty-five male Wistar rats were randomly divided into 3 groups as A (control), B (TNF α injection) and C (TNF α and glucocorticoid receptor antagonist injection) groups. TNF α in dose of 1×10^6 units/kg was given to rats in B group intravenously. RU38486, a glucocorticoid receptor antagonist, was given by gavage in C group 2 hours before intravenous injection of TNF α in the same dose as in B group. The rat temperature was monitored 12 hours after the administration of the drugs. At the same time, the rat extensor digitorum longus muscles (EDL) were isolated, weighed and cultured under aerobic condition, and then the degradation rates of total and the myofibrillar proteins were determined with HPLC (high performance liquid chromatography), and the expression changes in C2 subunit mRNA and ubiquitin mRNA were detected by Northern blot. **Results** Twelve hours after the injection, the temperature of the rats in B and C group was much higher than that in A group ($P < 0.01$), while the weight of the extensor digitorum longus muscle in B and C groups was evidently lower than that in A group ($P < 0.01$) whereas that in C was higher than that in B groups ($P < 0.05$). The degradation rates of total and the myofibrillar proteins in B group were increased by 43% and 112%, respectively, when compared with those in A group ($P < 0.01$), while the rates in C group was decreased by 16% and 28%, respectively, when compared with those in B group ($P < 0.01$). In addition, the expressions of ubiquitin mRNA (2.4 kb) and C2 subunit mRNA in B group were increased 4.3 and 3.6 fold compared with those in A group, whereas those in C group were much lower than those in B group. **Conclusion** Intravenous injection of recombinant TNF α in large dose might enhance the activity of rat skeletal muscle ubiquitin-proteasome system pathway, which led to an increase in the degradation rate of rat total protein, especially the myofibrillar protein. Glucocorticoid was one of the mediating factors of that effect.

【Key words】 Protein; Tumor necrosis factor; Receptor, Glucocorticoid; Ubiquitin

在严重烧创伤、重症感染、恶病质等病理状态下, 机体内多种组织 (特别是占机体干重约 50% 的骨骼肌组织) 蛋白发生高分解代谢, 导致或加重负

氮平衡, 严重影响患者的康复和预后^[1,2]。研究证实, 糖皮质激素、胰岛素、肿瘤坏死因子 α (TNF α) 以及白细胞介素 6 (IL-6) 等炎症介质与骨骼肌蛋白的高分解代谢关系密切^[3,4]; 烧伤脓毒症大鼠骨骼肌蛋白降解与血浆内糖皮质激素和 TNF α 的含量呈正相关^[1]。本研究以实验大鼠为对象, 通过静脉注射

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970716, 30271339); 军队医药卫生科研基金“十五”重点课题 (01Z095)
作者单位: 100037 北京, 解放军第三〇四医院全军烧伤研究所

重组大鼠 TNF α , 结合使用糖皮质激素受体拮抗剂, 利用离体有氧孵育体系, 观察了 TNF α 对大鼠骨骼肌蛋白降解的调节效应及其与糖皮质激素的关系, 并对其作用机制作了初步探讨。

材 料 与 方 法

1. 主要试剂与仪器: 重组大鼠 TNF α (内毒素含量 $< 1 \text{ EU}/\mu\text{g}$) 购自英国 Peptotech 公司; 糖皮质激素受体拮抗剂 RU38486、羧甲基纤维素、聚山梨酯、放线菌酮、3-甲基组氨酸(3-MH)、酪氨酸(Tyr)均购自美国 Sigma 公司; 荧光胺由美国 ICN 公司提供; 总 RNA 提取试剂盒(Trizol)购自美国 Life Technology 公司; 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒、Taq 酶、PCR 产物纯化试剂盒、cDNA 探针标记试剂盒购自美国 Promega 公司。引物由北京赛百盛生物工程技术有限公司合成; PCR 产物测序由中国科学院基因组信息学中心完成。Gel work 2000 图像扫描系统为美国 Bio-rad 公司产品; 紫外交联仪购自美国 UVP 公司; 1339-DNA 固液相分子杂交仪为北京高新技术研究所研制。

2. 实验动物及分组: 雄性 Wistar 大鼠(解放军军事医学科学院提供), 体重 50~60 g, 随机分为 A、B、C 3 组, 每组 15 只(9 只用以测定蛋白代谢率, 6 只用以测定泛素系统基因表达)。B 组静脉注射重组大鼠 TNF α ($1 \times 10^6 \text{ U}/\text{kg}$); C 组预先使用 RU38486 ($10 \text{ mg}/\text{kg}$) 灌胃, 2 h 后注射重组大鼠 TNF α , 条件同 B 组; A 组为对照组。

3. 骨骼肌组织的离体孵育和蛋白降解率的测定: 详见参考文献[5]。用药后 12 h, 测量各组大鼠体温(直肠温度)。随后用质量浓度 30 g/L 的戊巴比妥 ($45 \text{ mg}/\text{kg}$) 腹腔注射麻醉大鼠, 分离双侧伸趾长肌, 称重, 进行离体有氧孵育。采用高效液相色谱法检测肌组织 Tyr 和 3-MH 的净增量, 分别用以反映总蛋白和肌纤维蛋白的降解率。3-MH(或 Tyr) 的净增量 = 孵育 3 h 后孵育液内 3-MH(或 Tyr) 量 + 孵育 3 h 后肌组织内 3-MH(或 Tyr) 量 - 孵育前肌组织内 3-MH(或 Tyr) 量。

4. 骨骼肌内泛素系统基因表达的分析: (1) RNA 的提取和探针制备: 采用总 RNA 提取试剂盒, 以一步法提取各组大鼠伸趾长肌肌管总 RNA; 采用 RT-PCR 试剂盒, 对转录产物进行扩增, 均按说明书操作。引物序列见参考文献[6]。纯化扩增产物, 经测序证实其与各扩增基因目的片段一致。(2) RNA 印迹: 取各样本 RNA 30 μg , 常规进行变性、电

泳、转膜, 以紫外交联仪内固定。在膜上标记出 28 SrRNA 和 18 SrRNA 条带的位置后, 将膜置入预杂交液内 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 h。将含有 ^{32}P -dCTP 的 cDNA 探针加入杂交 A 液内, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性, -20 $^{\circ}\text{C}$ 乙醇快速冷却, 随后一起加入杂交 B 液 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热。弃杂交管内的预杂交液, 加入杂交液, 置杂交仪内过夜。室温洗膜 2 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 洗膜 2 次。用滤纸吸干水分, 将膜置 -65 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影 24 h。使用 Gel work 2000 图像扫描系统进行分析。

5. 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 t 检验。

结 果

1. 体温变化: 用药后 12 h, B、C 组大鼠直肠温度各为 $38.3 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 和 $38.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, 两者差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。但两组与 A 组 $37.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 比较, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。

2. 伸趾长肌重量的变化: 用药后 12 h, B、C 组大鼠伸趾长肌重量分别为 32.4 ± 1.6 、 $33.6 \pm 1.1 \text{ mg}$ 肌组织湿重/100 g 体重, C 组明显高于 B 组 ($P < 0.05$)。B、C 组与 A 组 $35.1 \pm 1.7 \text{ mg}$ 肌组织湿重/100 g 体重相比, 均明显降低 ($P < 0.01$)。

3. 伸趾长肌总蛋白和肌纤维蛋白降解率的变化: B 组较 A 组分别升高 43% 和 112% ($P < 0.01$), C 组较 B 组分别降低 16% 和 28% ($P < 0.01$), 见表 1、2。

表 1 静脉注射重组大鼠 TNF α 后大鼠伸趾长肌总蛋白降解率的变化 ($\text{nmol} \cdot \text{g}$ 肌组织湿重 $^{-1} \cdot 3 \text{ h}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The comparison in total proteolytic rate in EDL among different groups ($\text{nmol} \cdot \text{gww}^{-1} \cdot 3 \text{ h}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肌组织内		孵育液内	净增量
		孵育前	孵育后 3 h		
A	9	93.7 \pm 9.4	100.8 \pm 7.0	350.2 \pm 14.3	358.3 \pm 10.5
B	9	109.2 \pm 6.1	162.5 \pm 8.2	459.1 \pm 10.3	512.4 \pm 9.1*
C	9	102.2 \pm 5.4	144.3 \pm 9.1	388.3 \pm 11.6	430.4 \pm 9.3**

注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, # $P < 0.01$

表 2 静脉注射重组大鼠 TNF α 后大鼠伸趾长肌肌纤维蛋白降解率的变化 ($\text{nmol} \cdot \text{g}$ 肌组织湿重 $^{-1} \cdot 3 \text{ h}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

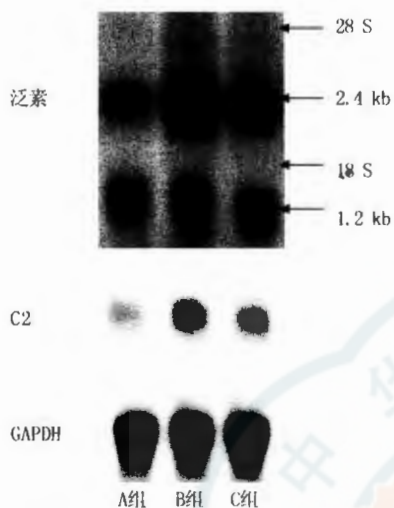
Tab 2 The comparison in myofibrillar proteolytic rate in EDL among different groups ($\text{nmol} \cdot \text{gww}^{-1} \cdot 3 \text{ h}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肌组织内		孵育液内	净增量
		孵育前	孵育后 3 h		
A	9	4.35 \pm 0.60	3.05 \pm 0.39	2.54 \pm 0.79	1.24 \pm 0.47
B	9	4.81 \pm 0.43	3.96 \pm 0.27	3.48 \pm 0.48	2.63 \pm 0.44*
C	9	4.66 \pm 0.34	3.39 \pm 0.29	3.16 \pm 0.37	1.89 \pm 0.36**

注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, # $P < 0.01$

4. 伸趾长肌内泛素系统 mRNA 表达的变化: B 组大鼠伸趾长肌内泛素 mRNA 2.4 kb 条带的表达较 A 组升高 3.6 倍, C 2 亚基 mRNA 的表达较 A 组升

高 4.3 倍; C 组泛素 mRNA 2.4 kb 条带的表达较 B 组下降 42%, C2 亚基 mRNA 的表达较 B 组下降 63%。3 组间三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)mRNA 的表达无明显差异, 见图 1。



注:以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照,条带分子量以标记的 28 S、18 S rRNA 的位置并结合文献确定

图 1 静脉注射重组大鼠 TNFα 后大鼠伸趾长肌内泛素系统 mRNA 水平的变化

Fig 1 Northern blot analysis for ubiquitin mRNA and C2 subunit mRNA from EDL muscle

讨 论

正常机体血液内 TNFα 含量极低 (pg/ml), 主要参与免疫调控, 激活 B 细胞促进抗体产生, 增强白细胞吞噬及杀伤能力, 并有抗病毒、抗肿瘤作用。但在炎症性、消耗性疾病状态下, 血液内 TNFα 可增加上千倍 (ng/ml), 通过过度激活巨噬细胞, 产生大量的致炎性细胞因子, 促进剧烈的急性炎症反应, 在脓毒症和多器官功能不全综合征的发生发展中起重要作用。

既往研究表明, 在烧伤脓毒症、癌症等病理条件下, 骨骼肌蛋白降解的增强与 TNFα 密切相关。为深入了解其机制, 笔者利用离体有氧孵育系统, 观察了静脉注射重组大鼠 TNFα 对大鼠骨骼肌总蛋白以及肌纤维蛋白降解率的影响。Tyr 广泛存在于各种蛋白质内, 能反映总蛋白降解率。3-MH 是一种微量氨基酸, 主要存在于骨骼肌的肌动蛋白和肌凝蛋白内 (约占 91.1%), 是组氨酸形成组氨酰-tRNA 之后发生甲基化的产物, 而且蛋白质分解代谢释放的 3-MH 不能作为 tRNA 的底物用以合成肽链, 其释放量可间接反映肌纤维蛋白的降解率^[7]。本研究结果表明, 静脉注射大剂量重组大鼠 TNFα 后, 大鼠骨骼肌总蛋白和肌纤维蛋白降解率均明显增强, 而后

者的增强幅度大大高于前者, 提示 TNFα 含量升高所诱导的骨骼肌蛋白降解增强具有明显的选择性。该特点与烧伤脓毒症、癌症时大鼠骨骼肌蛋白降解增强的特点相一致, 进一步提示了 TNFα 在炎症性、消耗性疾病时的骨骼肌蛋白降解增强过程中, 可能发挥了重要的诱导作用。

TNFα 的促骨骼肌蛋白降解作用是直接效应还是由某些因子介导的间接效应呢? TNFα 是一种由单核-巨噬细胞、T 细胞以及内皮细胞分泌的细胞因子, 属多肽类激素, 在骨骼肌细胞膜上有其特异性受体, 理论上, TNF 能直接与该受体结合并产生一定效应。但既往研究表明, TNFα 能刺激垂体-肾上腺, 增加机体内糖皮质激素的分泌, 以及通过激活巨噬细胞内核因子 κB(NF-κB) 信号途径, 启动 IL-1、IL-6 等多种致炎性细胞因子的基因转录^[8]。本研究结果表明, 对于 TNFα 的促骨骼肌蛋白降解及促骨骼肌泛素系统基因表达效应, 糖皮质激素受体拮抗剂均可起不完全抑制作用, 这一方面说明糖皮质激素参与介导了 TNFα 的促骨骼肌蛋白降解作用; 另一方面, 因其属“不完全抑制”, 尚不能排除 TNFα 直接作用于骨骼肌导致蛋白降解增强的可能性, 因此需要进一步研究。

骨骼肌细胞内含有多种蛋白降解途径, TNFα 是通过何种途径增强骨骼肌蛋白降解的呢? 泛素蛋白酶体途径是新近获知的细胞内蛋白降解途径, 主要由 3 部分组成: 蛋白降解的信号分子—泛素、激活并促进泛素与靶蛋白结合的泛素相关酶、蛋白降解场所—蛋白酶体。本研究结果显示, 静脉注射重组大鼠 TNFα 后, 大鼠骨骼肌内泛素 mRNA (2.4 kb) 以及 C2 亚基 mRNA 的表达明显增强。而既往研究表明, 泛素系统的基因表达与该系统的活性呈正相关, 如抑制 C2 亚基的基因表达, 能显著减少细胞内蛋白酶体的含量和活性^[9]。说明静脉注射 TNFα 能通过上调基因表达, 显著增强骨骼肌内泛素蛋白酶体途径的活性, 这可能是骨骼肌蛋白产生高分解代谢的重要原因。泛素由 1 个多基因家族编码, 不同长度的 mRNA 可编码含有不同数目泛素分子的蛋白质。目前证明, 编码泛素的 mRNA 分为 3.2、2.4 和 1.2 kb 3 种条带, 一般采用 Northern 杂交技术可以检测出 2.4 kb 和 1.2 kb 条带。本研究结果显示, 静脉注射 TNFα 后, 大鼠骨骼肌内泛素的 mRNA 2.4 kb 表达明显增强, 而 1.2 kb 条带增强并不明显, 提示不同泛素基因条带的表达可能具有不同意义, 尚需深入研究。

参 考 文 献

1 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, 9: 705 - 708.

2 Jiak Chai, Yanqiu Wu, Zhiyong Sheng. The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in burned rats. Burns, 2002, 28: 527 - 533.

3 Mitch WE, Bailey JL, Wang XN, et al. Evaluation of signals activating ubiquitin-proteasome proteolysis in a model of muscle wasting. Am J Physiol, 1999, 276: C1132 - C1138.

4 Llovera M, Carbo N, Soriano JL, et al. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. Cancer Letters, 1998, 133: 83 - 87.

5 柴家科, 刁力, 盛志勇, 等. 脓毒症大鼠骨骼肌有氧糖酵解过程与细胞内钠离子浓度改变的关系. 中华医学杂志, 1999, 79: 546 - 548.

6 申传安, 柴家科, 姚咏明, 等. 肿瘤坏死因子在烧伤脓毒症大鼠骨骼肌蛋白高分解代谢中的作用及其机制. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 340 - 343.

7 Ballard FJ, Tomas FM. 3-methylhistidine as a measure of skeletal muscle protein breakdown in human subjects; the case for its continued use. Clin Sci, 1983, 65: 209 - 215.

8 Han Y, Weinman S, Boldogh I, et al. Tumor necrosis factor- α -inducible I κ B α proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. J Biol Chem, 1999, 274: 787 - 794.

9 Grune T, Blasig IE, Sitte N, et al. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. J Biol Chem, 1998, 273: 10857.

(收稿日期: 2002 - 03 - 25)

(本文编辑: 罗 勤)

· 经验交流 ·

用于瘢痕注射的注射器助力件

杨岑山 周德 孙建忠

增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织致密、坚硬, 注射时需要用很大的力。应用玻璃注射器及一次性塑料注射器进行瘢痕注射时, 因没有着力点, 操作十分困难。据此, 笔者设计了一个简单的附加于一次性塑料注射器的助力件, 称注射器助力件, 临床应用效果良好。

应用材料: 6 mm 厚的环氧树脂板。助力件由分离的 A 和 B 两部分构成。A 部分应用于注射器筒, 作为固定用。B 部分应用于注射器芯, 以施加推力。设计如图示 1、2 所示, 实物及操作照片见图 3、4。本助力件根据上海米瓦沙医药工业有限公司生产的 20 ml 注射器设计 [标准号为 GB - 15810、15811

(95)], 读者可依据自己常用的注射器大小, 作相应调整。

本助力件特点为:

1. 增加了注射的着力点, 注射时可以双手用力, 使手部的力更有效地施加于注射器上, 操作更有效率。
2. 取材方便, 材料轻, 制作工艺简单, 易于清洗。
3. 与一次性注射器结合应用, 操作简单, 携带方便。
4. 助力件不需要消毒。

目前, 笔者利用此助力件治疗增生性瘢痕及瘢痕疙瘩 46 例, 应用效果良好。希望广大同行提出改进意见, 以便完善。

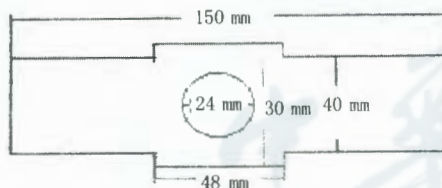


图 1 助力件 A

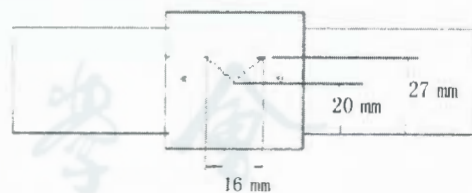


图 2 助力件 B



图 3 助力件实物



图 4 助力件操作

(收稿日期: 2001 - 10 - 15)

(本文编辑: 赵 云)

作者单位: 350025 福州, 南京军区福州总医院烧伤整形科