DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.011
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0305-04

论著

TNFα对烫伤大鼠骨骼肌26S蛋白酶复合体及19S调节复合体的作用

谭银玲[1],汪仕良[1],董燕麟[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038;[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 为阐明及防治烧伤后负氮平衡提供理论依据。方法 在接近体内环境下于体外分别用免疫沉淀扣除法和间接ELISA法检测TNFα对30%体表皮肤全层烫伤大鼠烧伤后第1、2、3、5、7天内骨骼肌中26S蛋白酶复合体及19S调节复合体的活性和蛋白水平的影响。结果 TNFα可以刺激烧伤后大鼠骨骼肌中26S蛋白酶复合体及19S调节复合体的活性和蛋白表达水平明显升高。结论 TNFα对烧伤后大鼠骨骼肌中26S蛋白酶复合体系统的激活具有重要作用,从而加强蛋白质的分解代谢,这可能与烧伤后负氮平衡的发生密切相关。

关键词:烧伤;肿瘤坏死因子α;26S蛋白酶复合体;19S调节复合体
中图法分类号:R322.74;R392.11;R644 文献标识码:A

Effects of TNFα on 26S proteasome and 19S regulator in skeletal muscle of the severely scalded rats

TAN Yin-ling, WANG Shi-liang, DONG Yan-ling (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of negative nitrogen balance in the treatment after burns. Methods The means of immuno-precipitation-deduction and ELISA were used to test the activities and contents of 26S proteasome and 19S regulator in skeletal muscle of rats inflicted with 30%TBSA III burns. Results TNFα markedly raised the activities and contents of 26S proteasome and 19S regulator in skeletal muscle after scalding. Conclusion TNFα activates the 26S proteasome system in skeletal muscle, thus it enhances the degradation of protein, which is associated with the development of negative nitrogen balance following scalding.

Key words: burns; TNFα; 26S proteasome; 19S regulator

创伤可使炎症细胞产生TNFα、IL-1、IL-6等细胞因子,这些细胞因子能作用于多种组织和器官,刺激糖皮激素和胰高血糖素等物质的产生,并与它们协同作用,出现一系列全身反应,其中包括对骨骼肌蛋白质代谢的影响。而现在认为,真核细胞内蛋白质的降解主要是通过泛素-26S蛋白酶复合体系统进行的[1]。我们以前的研究也已证明烧伤可激活骨骼肌中依赖泛素的26S蛋白酶复合体系统[2];国外学者报道TNFα可促进泛素基因表达及泛素结合物水平升高[3];但对于烧伤后以上因素对26S蛋白酶复合体系统的作用尚缺乏直接证据。因此本实验选择TNFα这种引起蛋白质分解代谢的主要细胞因子,考察它对烧伤后的26S蛋白酶复合体及19S调节复合体是否具有激活及调控作用,以进一步探讨烧伤后大鼠肌肉蛋白质降解的主要机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

重组人TNFα(第三军医大学外研所),TNFα单抗(军事医学科学院),抗26S蛋白酶复合体IgG及抗19S调节复合体IgG(自制),20S多功能蛋白酶(第三军医大学生物化学与分子生物学教研室惠赠),Cowan I金黄色葡萄球菌菌株(第三军医大学微生物学教研室惠赠),^{125}I-lysozyme(上海生工),^{125}I-lysozyme-ub(自制),羊抗兔碱性磷酸酶标二抗(Boehringer Mannein)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及烧伤模型 健康成年Wistar雄性大鼠,共120只,体重(250±30) g,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。烫伤模型制作见文献[2]。

1.2.2 实验动物分组 每组动物8只。分为正常TNFα注射组:将正常未烧伤大鼠,由尾静脉注射TNFα(300 μg/kg),分别于注射后6、12、24、48、72 h处死;烫伤TNFα注射组:大鼠烫伤后2 h,由尾静脉注射TNFα(300 μg/kg),分别于注射后6、12、24、48、72 h处死;烫伤TNFα单抗注射组:大鼠烫伤后2 h,由尾静脉分两次注射TNFα单抗(3 mg/kg),时间间隔6 h,分别于注射后24、

作者简介:谭银玲(1970-),女,重庆市人,博士,讲师,主要从事烧伤后蛋白质代谢方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752239

收稿日期:2002-01-04;修回日期:2002-06-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

48、72 h 处死；烫伤对照组：烫伤后大鼠尾部静脉注射相同体积生理盐水，其余处理同正常对照组；正常对照组：除不予致伤及注射细胞因子外，其余处理同烫伤组。

1.2.3 大鼠骨骼肌中 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体的活性测定

1.2.3.1 金黄色葡萄球菌的制备、骨骼肌粗提物的预处理及靶蛋白的免疫沉淀：参见倪兵等[4]的方法，但于测定管中加入相应的抗 26S 蛋白酶复合体抗体/19S 调节复合体抗体。

1.2.3.2 26S 蛋白酶复合体的蛋白酶活性测定 26S 蛋白酶复合体的靶蛋白免疫沉淀后的上清中，加入反应缓冲液至 200 μl，于 37℃温育 1 h 后，各加 8×10^7 Bq 的 ^{125}I-lysozyme-ub（^{125}I-lysozyme-ub 的制备另文发表），37℃温育 2 h 后，加 30 μl 的 3% BSA 和 500 μl 的 15% 三氯醋酸，于 0℃搅拌，静置 10 min，10 000 × *g* 离心 10 min，弃上清，沉淀进行 γ 计数。根据对照管与测定管的差值确定 26S 蛋白酶复合体的蛋白酶活性。

1.2.3.3 19S 调节复合体的蛋白酶活性测定 19S 调节复合体的靶蛋白免疫沉淀后的上清液中，加入适量的 20S 多功能蛋白酶，反应缓冲液 A 加至 200 μl，37℃温育 2 h。其余操作同上。

1.2.4 大鼠骨骼肌中 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体的含量测定 用 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体标准或骨骼肌匀浆上清的稀释液包被 40 孔 ELISA 微孔反应板，洗涤后加适当 1/128 稀释度的抗 26S 蛋白酶复合体或抗 19S 调节复合体抗血清，37℃水浴 30 min，洗涤后再加羊抗兔碱性磷酸酶标二抗，37℃水浴显色 15 min，2 mol/L 硫酸终止反应，测 490 nm 处的 *A* 值。以纯化的 26S 蛋白酶复合体/19S 调节复合体（26S 蛋白酶复合体/19S 调节复合体的提纯另文发表）作为标准进行定量分析。

1.3 统计处理

采用 SPSS 统计软件包对所有数据进行单因素方差分析和 *t* 检验，计量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体活性的变化，见表 1。

正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 19S 调节复合体活性的变化，见表 2。

正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体含量的变化，见表 3。

正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 19S 调节复合体含量的变化，见表 4。

表 1 正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体的活性[$n=8$, cpm·(100 μg)$^{-1}$·(2h)$^{-1}$]

Tab 1 Activities of 26S proteasome after injection of TNFα and its monoantibody in normal and scalded rats[$n=8$, cpm·(100 μg)$^{-1}$·(2h)$^{-1}$]

Normal control group	Time after scald or injection (h)	Scald control group	Normal group with injection of TNFα	Scald group with injection of TNFα	Scald group with injection of antibodies of TNFα
248±36.7	6	240±20.2	260±13.9	291±20.3	
	12	261±25.4	281±14.6	373±24.6*	
	24	273±40.2	317±27.2△	409±22.5*	316±22.9
	48	1215±70.9△	788±44.5△	1508±68.9*	684±35.4*
	72	1549±83.5△	914±33.0△	1795±97.2*	927±53.6*

△: $P<0.01$ *vs* Normal control group; *: $P<0.01$ *vs* Scald control group

表 2 正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 19S 调节复合体的活性[$n=8$, cpm·(100 μg)$^{-1}$·(2 h)$^{-1}$]

Tab 2 Activities of 19S regulator after injection of TNFα and its monoantibody in normal and scalded rats[$n=8$, cpm·(100 μg)$^{-1}$·(2 h)$^{-1}$]

Normal control group	Time after scald or injection (h)	Scald control group	Normal group with injection of TNFα	Scald group with injection of TNFα	Scald group with injection of antibodies of TNFα
173±19.4	6	166±17.5	178±15.2	189±7.5	
	12	186±16.4	194±17.3	210±18.3	
	24	201±18.5	284±22.5△	446±20.3*	317±22.3*
	48	870±48.4△	704±30.6△	1274±76.6*	525±31.4*
	72	1126±58.7△	853±34.9△	1506±81.3*	873±46.5*

△: $P<0.01$ *vs* Normal control group; *: $P<0.01$ *vs* Scald control group

表 3 正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体的含量（$n=8$ μg/g）

Tab 3 Contents of 26S proteasome after injection of TNFα and its monoantibody in normal and scalded rats（$n=8$ μg/g）

Normal Control group	Time after scald or injection (h)	Scald Control group	Normal group with injection of TNFα	Scald group with injection of TNFα	Scald group with injection of antibodies of TNFα
30.47±5.34	6	31.52±4.40	28.23±4.96	32.54±5.12	
	12	34.06±3.99	31.66±5.02	35.30±5.60	
	24	36.86±5.89	36.73±5.84	39.49±6.14	33.24±4.37
	48	50.27±7.23△	47.29±6.47△	67.16±7.93*	35.92±5.61*
	72	54.61±7.90△	51.23±6.80△	77.92±7.16*	39.31±5.25*

△: $P<0.01$ *vs* Normal control group; *: $P<0.01$ *vs* Scald control group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 4　正常大鼠与烫伤大鼠注射 TNFα 及其单抗后 19S 调节复合体的含量（$n=8$，μg/g）

Tab 4　Contents of 19S regulator after injection of TNFα and its monoantibody in normal and scalded rats（$n=8$，μg/g）

Normal control group	Time after scald or injection (h)	Scald control group	Normal group with injection of TNFα	Scald group with injection of TNFα	Scald group with injection of antibodies of TNFα
19.63±4.21	6	22.60±4.27	18.92±4.77	24.52±4.30	
	12	23.81±4.55	20.07±4.05	27.29±4.26	
	24	26.38±4.76	26.87±4.62	38.33±5.51 *	22.54±3.16
	48	41.27±5.90△	38.14±5.13△	65.84±7.29 *	26.36±3.73 *
	72	48.39±6.14△	42.52±4.80△	72.57±6.36 *	30.95±5.84 *

△：$P<0.01$ *vs* Normal control group；　*：$P<0.01$ *vs* Scald control group

3　讨论

26S 蛋白酶复合体系统在真核细胞中广泛存在，是胞质的主要成份之一，占胞内可溶性蛋白的 0.5%～1.0%。该系统对细胞内蛋白质的降解分为两步：首先由一种小分子肽-泛素与底物蛋白质结合，形成泛素-蛋白复合物，然后该复合物再提呈给 26S 蛋白酶复合体降解。该 26S 蛋白酶复合体系统负责胞内能量依赖的、非溶酶体蛋白降解途径，主要降解细胞内的短周期及异常蛋白质，现已确定它是细胞内蛋白降解的主要途径之一。26S 蛋白酶复合体由催化中心 20S 多功能蛋白酶和 19S 调节复合体组成。20S 多功能蛋白酶只能降解小分子肽，不能降解泛素化的蛋白质底物，也不需要 ATP；但当 20S 多功能蛋白酶与 19S 调节复合体结合后，便可赋予其能量依赖性、泛素化底物识别及降解活性。可见 19S 调节复合体是 26S 蛋白酶复合体的蛋白酶活性的重要激活因子，对细胞内蛋白质的降解速率起着重要的调节作用。

本实验所采用的是免疫沉淀扣除法测定 26S 蛋白酶复合体/19S 调节复合体的活性，即用抗 26S 蛋白酶复合体抗体/抗 19S 调节复合体抗体与抗原（26S 蛋白酶复合体/19S 调节复合体）结合，用金黄色葡萄球菌去除抗原-抗体复合物，然后测其上清与放射性底物作用后的三氯乙酸沉淀放射活性，与对照组相比，用扣除法得出该酶的特异活性。26S 蛋白酶复合体具有多种水解活性。^{125}I-lysozyme 底物对 26S 蛋白酶复合体的特异性也较高，免疫沉淀后的上清中酶活性很低[10]。在本实验中利用 ^{125}I-lysozyme-ub 作为底物测定 26S 蛋白酶复合体活性，是为了正确反应 26S 蛋白酶复合体对大分子蛋白质（如溶菌酶）的降解活性；而如上所述，19S 调节复合体的活性测定实际上是一种促蛋白酶活性，因此应将 26S 蛋白酶复合体和 19S 调节复合体的活性分别进行测定。

本实验结果表明，正常大鼠注射 TNFα 后，骨骼肌中 26S 蛋白酶复合体与 19S 调节复合体的活性和含量均有显著升高，提示 TNFα 与 26S 蛋白酶复合体系统密切相关；进一步观察发现，烫伤后 26S 蛋白酶复合体与 19S 调节复合体的活性和含量也有显著升高，但注射 TNFα 单抗可明显它们的活性与含量，提示 TNFα 可激活或介导骨骼肌中的 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体的作用，增强蛋白质分解代谢，因注射 TNFα 单抗可明显抑制这种作用。

国外学者报道，用 TNFα 急性处理正常大鼠 8 h 后，发现其骨骼肌 3-甲组氨酸和酪氨酸释放量均明显增加[5]；把 Leu 掺入大鼠蛋白质后，再用 TNFα 处理大鼠，也发现 TNFα 增强了骨骼肌蛋白质的水解[6]。另有报道，给予 pentoxifylline（抑制巨噬细胞释放 TNF）可以抑制因脓毒症引起的肌肉蛋白分解[7]，并可阻断泛素依赖性降解途径，抑制肿瘤大鼠肌肉中泛素、泛素结合酶 E2 及 26S 蛋白酶复合体的中心酶 20S 多功能蛋白酶的亚基 C2 和 19S 调节复合体的亚基 Psmc2 的表达[8]；注射 TNF 抗体可抑制因注射肿瘤细胞或内毒素而导致的肌肉蛋白的分解[9]。

这一结果与本室唐新国[10]报道在给予 TNFα 的大鼠骨骼肌中可以见到多聚泛素含量及基因表达增加的结果相吻合。因泛素-26S 蛋白酶复合体是一个大系统，多聚泛素需先在连接酶系统作用下与底物结合，再由泛素载体蛋白将底物运至 19S 调节复合体的非 ATPase 亚基上，蛋白底物被 19S 调节复合体解链后，转入管状的 20S 多功能蛋白酶入口，随后在内腔中被消化、释放[2]。因此如 TNFα 注射后大鼠骨骼肌中多聚泛素含量和基因表达升高，且蛋白质降解速率也明显增强，则 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体的含量及活性理应升高。本实验支持这种观点。

从实验结果还可看出，TNFα 单抗未能完全抑制烫伤对 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体的刺激作用，可能原因有二个：一是 TNFα 单抗剂量不够，未能完全中和组织产生的 TNFα；二是由于创伤后炎症细胞能同时产生多种细胞因子，它们互相诱生、协同作用，而 TNFα 单抗只能抑制 TNFα 作用，其它细胞因子仍在发挥作用。因此我们不能认为烫伤后 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体的激活是 TNFα 一种细胞因子所致，可能还有其它细胞因子参与其间。但就实验结果而言，我们认为，TNFα 在其中起重要作用。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Bochtler M, Ditzel L, Groll M, *et al*. The proteasome[J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1999, 28(1): 295—317.

[2] 谭银玲, 董燕麟. 严重烫伤大鼠骨骼肌蛋白质降解途径及泛素作用的研究[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(6): 384—386.

[3] Garcia C, Agell N, Llovera M, *et al*. TNF-α increases the ubiquitinazation of rat skeletal muslce proteins[J]. FEBS, 1998, 323(3): 211—214.

[4] 倪 兵, 周建新, 董燕麟. 严重烫伤大鼠骨骼肌20S蛋白酶含量及活性的变化[J]. 中华创伤杂志, 1999, 15(Supp): 18-20.

[5] Starnes HF, Warren RS. Redistribution of amino acids in rat liver and muscle induced by tumor necrosis factor requires the adrenal response[J]. Aurg Forum, 1987, 18(1): 41—45.

[6] Flores E A, Bistrian B R. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat[J]. J Clin Invest, 1989, 83(5): 1614—1642.

[7] Combaret L, Ralliere C, Taillandier D, *et al*. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats[J]. Mol Biol Rep, 1999, 26(1—2): 95—101.

[8] Combaret L, Cecile R. Manipulation of the ubiquitin-proteasome in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats[J]. Mol Biol Rep, 1999, 26(1): 95—101.

[9] Llovera M, Garcia M C, Lopez S J, *et al*. Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1[J]. Cancer Lett, 1998, 130(1—2): 19—27.

[10] 唐新国, 董燕麟. TNFα在严重烫伤大鼠骨骼肌泛素依赖的蛋白质降解途径中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4): 341—344.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)04-0308-01

结肠黑病变28例分析

Analysis of 28 cases of *Melanosis coli*

何天勤，彭贵勇 （第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心内镜室，重庆 400038）

随着便秘发病率的增加和肠镜技术的广泛应用，结肠黑变病（Melanosis coli, MC）的发病率呈明显上升趋势。我院1995年9月至2002年3月行大肠镜检查8 195例，诊断MC28例，现分析如下。

1 临床资料

MC28例（0.34%），男5例，女23例，年龄20～84岁，平均49.4岁，≤35岁8例，36～59岁13例，≥60岁7例。临床表现便秘18例，病程3个月～20年，均有服用牛黄解毒丸，番泻叶，果导，排毒养颜胶囊等泻药史，腹胀4例，腹痛2例，便血2例，腹泻1例，右下腹包块1例。

2 结果

肠镜下的特征是粘膜光滑，完整，可见浅棕色，棕褐色或黑色的色素沉着，呈虎皮斑，网格状间断或连续分布。本组病例呈浅棕色8例，黑色20例。分布全大肠23例，升结肠及横结肠2例，回盲部及直肠1例，直肠2例。均符合MC的组织学表现：结肠粘膜上皮形态结构正常，固有膜有数目不等的含色素颗粒巨噬细胞，铁染色阳性，黑色素染色阳性。

3 讨论

MC是一种以结肠粘膜色素沉着为特征的非炎症性疾病。本组检出率0.34%，与国内报道的0.06%～5.9%相符合，女性明显多于男性，占82%。

MC病因不明，便秘和长期口服泻药是目前多数学者公认的主要原因，本组占64.3%。以蒽醌为主的泻药进入大肠后，可致短暂的剂量相关的结肠粘膜上皮细胞的凋亡，产生的凋亡小体被单核巨噬细胞所吞噬，并通过基底膜小孔移行致粘膜的固有层，在巨噬细胞的溶酶体内，凋亡小体转化为典型的脂褐素或其它色素，泻药的长期应用，含色素的巨噬细胞不断聚集，最终成典型的MC。其次，慢性炎症性肠病和慢性腹泻也可致MC[1,2]，本组资料支持此观点。

MC是否更常伴结肠癌和结肠息肉尚无定论，本院8 195例大肠镜检查发现结直肠癌613例（7.48%），息肉1 064例（12.87%），而28例MC无1例合并结直肠癌和息肉，因此MC与结肠癌和息肉的关系尚需进一步的研究。

MC是一种可逆病变，停用或不用含色素的泻药而改用油性的缓泻剂及加强胃肠动力的药物治疗便秘，可减少MC的发病率及逆转已经产生的病变。

关键词：黑变病；大肠

中图法分类号：R574.62 文献标识码：B

参考文献：

[1] Pardi D S, Tremaine W J, Rothenberg H J, *et al*. *Melanosis coli* in inflammatory bowel disease[J]. J Clin Gastroenterol, 1998, 26(3): 167-170.

[2] Byers B J, Marsh P, Parkinson D, *et al*. *Melanosis coli* is associated with an increase insolonic epithelial apoptosis and not with laxative use[J]. Histopathology, 1997, 30(2): 160-164.

（编辑 陈聪连）

作者简介：何天勤（1966－），男，四川省攀枝花市人，主治医师，主要从事消化系统疾病的诊断及治疗方面的研究，现在攀煤集团总医院消化内科工作，攀枝花 617000。电话：(0812)5996126

收稿日期：2002-04-23；修回日期：2002-09-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net