DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.017

文章编号:1000-5404(2000)04-0341-04

论著

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

唐新国, 董燕麟 (第三军医大学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 探讨大鼠烫伤后骨骼肌蛋白质降解增强的机制和TNFα作用的关系。方法 以30%和37%TBSA全层烫伤大鼠为模型,观察局部和远隔部位比目鱼肌泛素(Ub)含量、酪氧酸(Tyr)释放量、血清TNFα水平及TNFα作用下比目鱼肌Ub和Ub mRNA表达水平。结果 TNFα注射后24 h内比目鱼肌Ub、Ub mRNA、Tyr释放量均显著增加。烫伤后伤肢Ub含量、Tyr释放量皆显著增加,变化趋势一致;未伤肢Ub增加而Tyr释放量增加不明显;血清TNFα水平显著升高。TNFα处理后烫伤大鼠伤肢、未伤肢比目鱼肌Ub含量、Tyr释放量皆显著升高,且伤肢变化更显著。烫伤、TNFα的交互效应显著。结论 烫伤可能借烫伤局部产生的TNFα作用于Ub依赖系统促进烫伤局部骨骼肌蛋白质降解。

关键词:TNFα;烫伤;Ub;蛋白质降解
中图法分类号:R392.1;R644 文献标识码:A

Effects of TNFα on ubiquitin-dependent skeletal muscle proteolysis in severe scalding rats

TANG Xin-guo, DONG Yan-lin (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of intensified proteolysis of skeletal muscles after severe scalding in rats and its relation with TNFα. **Methods** Rats with 30% and 37% TBSA full thickness scalding served as the animal model. The content of ubiquitin (Ub) and the amount of tyrosine released in the soleus muscle and in the scalded and remote regions were determined. The serum level of TNFα was measured. In addition, the expression of Ub protein and mRNA in the soleus after the injection of TNFα was observed. **Results** 24 hours after TNFα injection, the expression of Ub protein and mRNA and the amount of tyrosine release in the soleus were significantly increased. The Ub content and the amount of tyrosine release were significantly increased in a similar tendency in the scalded limb; in the unscalded limb, the increase of Ub content was observed but no significant increase of tyrosine was found. After the treatment of TNFα, Ub content and the amount of tyrosine release in the soleus were markedly increased in both the scalded and unscalded limbs but the changes were more marked in the scalded one. The cross effects of scalding and TNFα were clearly observed. **Conclusion** After scalding, the production of certain amount of TNFα induced by scalding itself can act on the Ub-dependent system to promote proteolysis of skeletal muscles in scalded region.

Key words: TNFα; scalding; ubiquitin; proteolysis; rat

哺乳动物细胞内有多种不同的蛋白质降解途径承担着蛋白质的分解。其中泛素(Ubiquitin, Ub)依赖的26S蛋白酶体途径由多个酶参与共同完成[1]。我室早期研究提示Ub依赖的蛋白质降解途径是烫伤后骨骼肌蛋白质降解增强的主要原因[2]。在烫伤早期主要限于烫伤局部骨骼肌蛋白质分解代谢增强,无法用激素的作用得到圆满的解释。肿瘤坏死因子-α(Tumour necrosis factor-α, TNFα)、IL-1、IL-6均参与增强创伤机体蛋白质分解代谢,但机理不清楚。为此建立大鼠烫伤模型,以进一步探讨烫伤后大鼠骨骼肌蛋白质降解增强和TNFα的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar雄性大鼠,体重70~80 g,由第三军医大学动物所提供。

1.2 主要材料与试剂

1.2.1 泛素 Sigma。

基金项目:全军"九五"指令性攻关项目(96L043)
作者简介:唐新国(1966—),男,安徽人,硕士,讲师,现在南京军医学院生化教研室工作,南京 210099。
收稿日期:1999-09-30;修回日期:1999-12-22

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

1.2.2 泛素抗血清（兔抗鼠） 美国 Dr. Steve Nœcker 赠予本室。

1.2.3 菌种 为 JM101，携含多聚泛素基因的质粒 pRB130 由澳大利亚 Dr. Rohan Baker 惠赠本室。

1.2.4 Dig 标记、检测试剂 Boehinger Mannheim。

1.2.5 TNF 试剂盒、rHu-TNFα 北京邦定生物医学试剂公司。

1.2.6 DNA 预杂交缓冲液（高 SDS 缓冲液） 7% SDS，50 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液（pH 7.0），50%甲酰胺，2%封阻试剂，5×SSC，0.1×月桂酰肌氨酸。

1.2.7 Krebs-Ringers 缓冲液 碳酸盐缘冲液（pH 7.4），5 mmol/L 葡萄糖，0.13% BSA，0.5 mmol/L 放线菌酮，除酪氨酸外的其它 19 种大鼠血浆浓度的编码氨基酸。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物的处理 30%与 37%TBSA 烫伤模型按我室建立的方法进行[3]。TNFα 处理动物为 rHu-TNFα 经尾静脉注入，剂量为 670×10^3 U/kg 体重，共注射 3 次，间隔 30 min。剪毛或心脏穿刺采集血液标本，断头活杀取比目鱼肌。

1.3.2 实验动物分组 大鼠随机分组，每组 6 只。

1.3.2.1 烫伤与对照组 分正常对照组和伤后第 3 天（3PBD）、第 5 天（5PBD）、第 7 天（7PBD）共 4 组。

1.3.2.2 rHu-TNFα 处理组 分正常对照组和最后一次注射后 6、12、24 h 3 个时相共 4 组。

1.3.2.3 烫伤与注射 rHu-TNFα 双因素处理组 伤后第 3 天（3PBD）分为未烫伤、烫伤大鼠的未伤肢与伤肢 3 组，注射 rHu-TNFα 处理则是伤后第 2 天（2PBD）注射 rHu-TNFα，于第 3 天（3PBD）分为未烫伤注射与烫伤注射的未伤肢与伤肢 3 组。

1.3.3 比目鱼肌蛋白质降解速率测定[酸（Tyrosine，Tyr）体外总释放量] 按本室已建立的方法测定每克比目鱼肌每 2 h 的 Tyr 释放量[6]。Tyr 含量测定用改良荧光分光光度法测定。

1.3.4 血清 TNFα 水平测定 用邦定医学试剂公司的试剂盒测定。

1.3.5 组织中泛素的测定 用标准泛素或待测比目鱼肌匀浆上清液包被微孔板，用泛素抗血清与酶标二抗建立间接 ELISA 法测定每克比目鱼肌的泛素蛋白含量。

1.3.6 组织总 RNA 的提取 肌肉于 D 溶液中匀浆，酚、氯仿：异丙醇抽提，无水乙醇沉淀，DEPC 处理的 ddH2O 溶解。

1.3.7 泛素 DNA 探针的制备[4] 碱裂解法提取并初步纯化质粒，酶切后低熔点琼脂糖凝胶电泳分离目的片段，Dig 随机引物法标记泛素 cDNA。

1.3.8 泛素 mRNA 水平测定 建立 Slot blot 法测定泛素 mRNA。

1.4 数据统计学处理

用第三军医大学的统计程序处理，分别用一元线性回归、单因素方差分析、有重复固定型双因素方差分析。

2 结果

2.1 烫伤和 rHu-TNFα 对在体大鼠比目鱼肌 Tyr 释放量的影响

在体 rHu-TNFα 处理后 24 h 大鼠比目鱼肌 Tyr 释放量比未经 TNFα 处理的对应组有显著增加（$P<0.05$）；烫伤大鼠未伤肢在 3PBD 与未烫伤大鼠相应组没有显著差异（$P>0.05$）；烫伤大鼠伤肢较未伤肢和未烫伤大鼠的相应组，Tyr 释放量皆有显著增加（$P<0.05$）；烫伤、TNFα 的单独效应皆有非常显著差异（$P<0.01$），见表 1。

表 1 在体烫伤和 rHu-TNFα 处理组比目鱼肌 Tyr 释放量（nmol·g^{-1}·2 h^{-1}）

Tab 1 Tyrosine release of the soleus muscle of scalded and rHu-TNFα treated groups（nmol·g^{-1}·2 h^{-1}）

	Unscalded group	Scalded group	
		Unscalded leg	scaled leg
No TNFα	211±4.9	213±5.5	240±12.5*△
TNFα injection	258±10.7★	264±20.0★	303±13.3★*△

★：$P<0.05$ *vs* no TNFα；*：$P<0.05$ vs unscalded group；△：$P<0.05$ vs unscalded leg

2.2 大鼠烫伤后血清 TNFα 水平的变化

大鼠烫伤后的 3PBD、5PBD、7PBD 血清中 TNFα 水平较对照组升高非常显著（$P<0.01$），3PBD 时最高，5PBD 时有所下降，7PBD 时又升高，见表 2。

表 2 烫伤后血清 TNFα 浓度

Tab 2 Serum TNFα levels after scalding

	Control	Scalded group(d)		
		3	5	7
TNFα（ρ_B/ng·ml^{-1}）	0.9±0.16	12.88±3.47**	4.97±2.07**	7.14±1.58**
Times		14.2	5.5	7.8

**：$P<0.01$ *vs* control

2.3 rHu-TNFα 对在体大鼠比目鱼肌 Tyr 释放量的影响

在体 rHu-TNFα 注射后 6、12、24 h 比目鱼肌 Tyr 释放量与对照组比较，增高非常显著（$P<0.01$），24 h 虽有所下降，但仍显著地高于对照组（$P<0.05$）。在测定时段随时间的推移变化趋于减小，见表 3。

表 3 在体 rHu-TNFα 处理组比目鱼肌 Tyr 释放量

Tab 3 The effects of Tyrosine release of soleus after TNFα injection *in vivo*

	Control	TNFα injection group (h)		
		6	12	24
Tyr release(nmol·g^{-1}·2 h^{-1})	211±4.9	393±46.0**	312±37.7**	258±10.7*
Percentage(%)	100	186	148	122

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.4 严重体表烫伤后比目鱼肌泛素蛋白含量变化

烫伤后 3PBD、7PBD 比目鱼肌泛素蛋白含量比对照组有显著增加（$P<0.01$ 和 $P<0.05$），而在 3PBD 与对照组无显著差异，见表 4。

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

表 4　烫伤组比目鱼肌泛素蛋白含量

Tab 4　Contents of Ubiquitin of soleus in scalded group

	Control	Scalded group (d)		
		3	5	7
Ubiquitin content (μg/g)	36.4±3.6	62.8±6.0**	40.4±5.0	46.4±7.0*
Percentage (%)	100	173	111	127

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.5　rHu-TNFα 对在体比目鱼肌泛素 mRNA 和泛素蛋白水平的影响

注射 rHu-TNFα 后的 6、12 h 比目鱼肌泛素 mRNA 水平比正常对照组显著增高（$P<0.01$），24 h 后虽含量有所降低，但仍显著高于对照（$P<0.05$）。3 个时相泛素蛋白含量比对照组增高皆非常显著（$P<0.01$），见表 5。

表 5　在体 rHu-TNFα 处理组比目鱼肌泛素 mRNA 表达与泛素蛋白含量的变化

Tab 5　Changes of ubiquitin contents and of ubiquitin mRNA expression after rHu-TNFα injection *in vivo*

	Control	rHu-TNFα injection(h)		
		6	12	24
Ubiquitin mRNA	100±20	342±83**	278±47**	170±47*
Ubiquitin (μg/g)	39.6±2.5	155.4±10.5**	124.4±19.3**	73.7±13.8**
Ubiquitin(%)	100	392	314	186

The unit of ubiquitin mRNA: Arbitrary unit · control mean^{-1};

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.6　烫伤和 rHu-TNFα 对在体比目鱼肌泛素蛋白含量的影响

在体 rHu-TNFα 处理后，正常大鼠，烫伤大鼠未伤肢、伤肢比目鱼肌泛素蛋白含量显著增加（$P<0.05$）；烫伤组未伤肢、伤肢皆显著高于未烫伤组（$P<0.05$）；烫伤组中伤肢泛素含量显著高于未伤肢（$P<0.05$）；rHu-TNFα、烫伤对比目鱼肌泛素含量的单独和交互效应非常显著（$P<0.01$），见表 6。

表 6　在体烫伤和 rHu-TNFα 处理组比目鱼肌泛素蛋白含量(μg/g)

Tab 6　Contents of Ubiquitin of soleus after scalding and in rHu-TNFα treated group *in vivo*(μg/g)

	Unscalded group	Scalded group	
		Unscalded leg	Scalded leg
No TNFα	36.9±2.5	65.5±4.9*	86.2±7.9*△
TNFα injection	73.7±13.8★	81.5±5.3★*	132.4±13.9★*△

★：$P<0.05$ *vs* no TNFα；*：$P<0.05$ *vs* unscalded group；△：$P<0.05$ *vs* unscalded leg

3　讨论

3.1　严重烫伤诱导 TNFα 的产生

李林等[5]观察到烫伤大鼠血清，未伤肢。伤肢骨骼肌 TNFα 水平持续升高，伤肢显著高于未伤肢和血清。本文烫伤后的 3PBD、5PBD、7PBD 血清 TNFα 水平显著高于正常对照。结果与 Liu 等[6]的相似。TNFα 由多种介质刺激下的网状内皮细胞系统产生。创伤早期 TNFα 的产生是机体对组织损伤产生的应激反应，本试验观测 3 个时相点血清 TNFα 水平升高可能为晚期刺激因素 LPS、TSST-1、补体等的刺激所致。7PBD 时血清 TNFα 高于 3PBD 可能与烫伤后感染的发生有关，感染与局部产生的 LPS 刺激局部巨噬细胞等释放 TNFα，从而引起血中 TNFα 的升高。

3.2　rHu-TNFα 对烫伤大鼠骨肌蛋白质分解代谢速率的影响

正常大鼠经 rHu-TNFα 处理后 6、12、24 h 比未处理组，烫伤大鼠的伤肢、未伤肢经 rHu-TNFα 处理后比未处理组 Tyr 释放量皆有显著增加，提示 TNFα 能对在体正常和烫伤大鼠的伤肢、未伤肢的骨骼肌蛋白质降解皆有促进作用，即 TNFα 具有全身效应，能通过血路促进骨骼肌蛋白质降解。Goodman[7]也发现 TNFα 能增强骨骼肌蛋白质降解。

烫伤后血清 TNFα 水平显著升高，但未能引起未伤肢 Tyr 释放量显著增加。Sternes 等[8]研究认为低剂量 TNFα 不能促进骨骼肌蛋白质降解。推测血清 TNFα 主要来自烫伤局部，随血流运输达未伤肢，其浓度会有所下降。TNFα 在哺乳动物血流中的半寿期仅为 6～20 min。循环因子 TNFα-BP 能在急性期下向调节 TNFα 生物活性，但其免疫活性并未减弱。李林等[5]发现烫伤大鼠伤肢比目鱼肌中 TNFα 含量显著高于未伤肢。提示烫伤局部产生 TNFα 的增多成为血中 TNFα 水平升高的主要原因，同时引起烫伤局部骨骼肌蛋白质分解代谢增强。

3.3　烫伤后比目鱼肌泛素水平

泛素是一种热休克蛋白，在 3PBD、5PBD、7PBD 骨骼肌中泛素含量皆有增加，伤肢泛素的增加与蛋白质降解显著相关。谭银玲等[2]曾发现大鼠于 1PBD、2PBD、3PBD 伤　、未伤肢泛素皆显著增加，伤肢变化更显著，且烫伤局部蛋白质分解的主要原因是依赖泛素系统 26S 蛋白酶体活性的增强。Lowell 等[9]发现溶酶体与骨骼肌中肌原纤维蛋白质降解无关。大鼠饥饿去神经导致的肌萎缩中泛素表达增加，26S 蛋白酶复合体的某些亚基的 mRNA 增加，同时骨骼肌蛋白质分解代谢增强[10]。故本研究认为泛素表达水平的提高有利于待分解蛋白质的泛素化，从而引起烫伤局部比目鱼肌蛋白质分解增强。未伤肢中二者不相关，机制尚需进一步研究。

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

3.4　TNFα 对泛素 mRNA、泛素蛋白水平的影响

rHu-TNFα 处理后大鼠骨骼肌泛素 mRNA、泛素水平皆显著提高，这与 Martinez 等[11] 的报道相似，且与 Tyr 释放量的增加显著相关。提示在体 TNFα 急性处理可激活泛素依赖的系统从而促进骨骼肌蛋白质降解。TNFα 对该系统的激活是否需要糖皮质激素的参与还有待探讨。

TNFα 对正常大鼠、烫伤大鼠骨骼肌泛素表达皆有显著促进作用，同时 Tyr 释放显著提高。烫伤能刺激受损局部 TNFα 的产生，从而引起局部泛素依赖的蛋白质降解途径活性增强。

烫伤与 rHu-TNFα 对比目鱼肌泛素表达的交互效应显著，提示烫伤使受损局部对 TNFα 的作用变得敏感，再遇外源 TNFα 刺激时，可能局部释放更多 TNFα 等介质，从而使局部骨骼肌泛素表达水平提高。

参考文献：

[1] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway [J]. Cell, 1994, 79(1): 13—21.
[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—387.
[3] 黄涛生，董燕麟. 离体骨骼肌蛋白质代谢速率的测定[J]. 生物化学与生物物理学进展，1988, 15(1): 64—67.
[4] 丁·萨姆布鲁克，EF·费里奇，T·曼尼阿蒂斯 著. 金冬雁 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 16—395.
[5] 李　林，董燕麟，杨　春. 严重体表烫伤早期 TNF 对骨骼肌蛋白质分解代谢影响的实验研究[J]. 第三军医大学学报，1995, 17(5): 382—386.
[6] Liu X S, Luo Z H, Yang Z C, et al. The significance of changes in serum tumour necrosis factor (TNF) activity in severely burned patients[J]. Burn, 1994, 20(1): 40—44.
[7] Goodman M N. Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats[J]. Am J Physiol, 1991, 260 (Endocrinol Metab 23): E727—E730.
[8] Stemes H F, Warren R S, Conti P S, et al. Redistribution of amino acids in rat liver and muscle induced by tumor necrosis factor requires the adrenal response[J], Surg Forum, 1987, 18: 41—42.
[9] Lowell B B, Ruderman N B, Goodman M N. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle[J]. Biochem J, 1986, 234(1): 237—240.
[10] Medina R, Wing S S, Goldberg A L. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy[J]. Biochem J, 1995, 307 (3): 631—637.
[11] Martinez C G, Llovera M, Agell N, et al. Ubiquitin gene expression in skeletal musscle is increased by tumour necrosis factor-α[J], Biochem Biophysi Res Comm, 1994, 201(2): 682—686.

（编辑　陈聪连）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)04-0344-01

1 例胰-十二脂肠-肾同期联合移植术病人的护理

Nursing of a case of simultaneous pancreas-duodenum-kidney transplantation

王安静，方　丽　（第三军医大学附属新桥医院肾移植科，重庆　400037）

我院 1998 年 11 月 15 日成功地为 1 例糖尿病并发尿毒症病人施行了胰-十二脂肠-肾同期移植术，术后胰肾功能恢复良好，生活基本自理。现将护理重点报告如下。

1　病例介绍

病人女，51 岁，患Ⅰ型糖尿病 20 年，双眼视力光感 5 年，肾功能衰竭 2 年，术前依靠腹膜透析、注射胰岛素维持生命，在经严格 ABO、HLA 配型及淋巴细胞毒试验，淋巴细胞转化率测定后接受了该手术。手术在持续硬膜外麻醉下采用膀胱引流术式进行，历时 8 h。术后应用环孢素 A、强的松、骁悉及抗胸腺细胞球蛋白四联免疫抑制治疗，同时，静脉滴注复方丹参液，腹壁皮下注射速避凝针以预防血栓形成、静脉推注泰能针以预防感染。术后第 3 天胰肾功能恢复正常，12 d 下床活动，无不适，40 d 出院。

2　术后护理

2.1 严密观察病情

2.1.1　生命征的观察　病人术后采用多功能监护仪连续监

（下转 348 页）

作者简介：王安静（1965—），女，重庆市人，主管护师，主要从事器官移植术后护理方面的研究。电话：（023）65200281

收稿日期：1999-05-12；修回日期：1999-12-24

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