

• 论著 •

蛋白酶体-C2 亚基基因在烫伤脓毒症大鼠心肌内的表达及意义

申传安 柴家科 姚咏明 盛志勇 蒋金珩

【摘要】 目的 探讨烧伤脓毒症时动物心肌内蛋白酶体核心亚基-C2 亚基 mRNA 表达及蛋白降解的变化及意义。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 45 只,随机分为烫伤组、脓毒症组及对照组。烫伤组大鼠使用沸水致背部 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤;脓毒症组大鼠用同样方法烫伤后,立即腹腔注射内毒素(6 mg/kg)制成烫伤脓毒症大鼠模型。通过高效液相-荧光法检测心肌内三甲基组氨酸(3-MH)的含量,用核糖核酸印迹杂交(Northern 杂交)检测心肌内蛋白酶体-C2 亚基 mRNA 表达的变化。**结果** 脓毒症大鼠烫伤后 2 h 和 6 h,单位心肌内 3-MH 含量较对照组和烫伤组均显著升高(P 均 <0.01);烫伤组大鼠伤后 2 h 与对照组比较差异无显著性($P>0.05$),而伤后 6 h 较对照组显著升高($P<0.01$)。脓毒症大鼠伤后 2 h 和 6 h 心肌内蛋白酶体-C2 亚基 mRNA 表达较对照组和烫伤组均显著升高(P 均 <0.01),烫伤组大鼠伤后 2 h 和 6 h 较对照组也均显著升高(P 均 <0.01)。**结论** 严重烫伤特别是合并内毒素攻击后,早期动物心肌细胞内泛素蛋白酶体途径活性呈持续增强现象,蛋白降解率显著增加。这可能是烧伤脓毒症时心功能异常的蛋白代谢机制。

【关键词】 烧伤; 脓毒症; 心肌; 三甲基组氨酸; 基因表达; 蛋白酶体

Gene expression of C2 subunit of proteasome in cardiac muscle in burned rats with sepsis SHEN Chuan-an*, CHAI Jia-ke, YAO Yong-ming, SHENG Zhi-yong, JIANG Jin-heng. * Burns Institute, 304th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To study the gene expression of C2 subunit of proteasome and proteolysis in cardiac muscle in burned animals with sepsis. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into burn group, burn sepsis group and control group. The extent of burn injury was 30% total body surface area (TBSA)Ⅲ degree burn, and the model of burn sepsis was replicated by administration of endotoxin (6 mg/kg) into the peritoneal cavity immediately after burn injury. The contents of 3-methylhistidine (3-MH) in cardiac muscle were determined with high performance liquid chromatography. The expression of C2 subunit mRNA in the cardiac muscle was assessed with Northern blot analysis. **Results** The contents of 3-MH in cardiac muscle of burned rats with sepsis increased significantly at 2 hours and 6 hours, as compared with burned rats and normal control (all $P<0.01$). There was no marked difference of contents of 3-MH in cardiac muscle between burned rats at 2 hours and control group, however, the contents of 3-MH in cardiac muscle of burned rats at 6 hours increased significantly compared with control group. The gene expression of C2 subunit in cardiac muscle of burned rats with sepsis increased significantly at 2 hours and 6 hours compared with burned rats and normal control (all $P<0.01$). There were significant differences in the intensity of gene expression of C2 subunit in cardiac muscle between burned rats at 2 hours and 6 hours and normal control (all $P<0.01$). **Conclusion** The data suggest that the activity of ubiquitin system, one of important protein degradation pathways, and the proteolysis in cardiac muscle is continuously enhanced after burn injury, especially when sepsis set in, probably contributes to abnormal protein metabolism with malfunction of the heart during burn sepsis.

【Key words】 burn; sepsis; cardiac muscle; 3-methylhistidine; gene expression; proteasome

心功能下降是严重烧伤脓毒症患者常见而致命的并发症,因此,维持正常的心功能是成功救治严重烧伤患者的关键之一^[1]。然而,关于严重烧伤后血循环动力泵——心肌组织结构和功能变化机制尚不清楚。本研究从组织蛋白代谢的角度,分析了烫伤及脓

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271339);军队医药卫生“十五”重点课题(012095);首都医学科研发展基金(2004-3024)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第三〇四临床部烧伤研究所(申传安,柴家科,姚咏明,盛志勇);321000 浙江省金华市中心医院(蒋金珩)

作者简介:申传安(1974-),男(汉族),山东省人,博士研究生,主治医师。

毒症模型大鼠心肌内蛋白酶体核心亚基-C2 亚基的基因表达及蛋白降解的变化,以期为进一步探讨严重烧伤脓毒症时心肌结构变化及其对心功能的影响提供分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组 雄性 Wistar 大鼠(军事医学科学院提供)45 只,体重 50~60 g,随机分为烫伤组、脓毒症组及对照组。烫伤组大鼠在戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔注射麻醉、背部去毛,100℃、12 s 造成背部 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤。脓毒症组大鼠用同样方法烫伤后,立即腹腔注射内毒素(O55:B5,

美国 Sigma 公司) 6 mg/kg 模拟烧伤脓毒症, 生理盐水 100 ml/kg 抗休克治疗, 单笼饲养。对照组大鼠不烫伤, 并使用等量生理盐水替代内毒素。通过高效液相-荧光法检测心肌内三甲基组氨酸(3-MH)的含量, 用核糖核酸印迹杂交(Northern 杂交)检测心肌内蛋白酶体-C2 亚基 mRNA 表达的变化。伤后 2 h 和 6 h 分离大鼠心肌, 立即于液氮内冻存。

1.2 心肌内 3-MH 含量测定按文献[2]方法。

1.2.1 标本处理:用体积分数为 3% 的高氯酸高速匀浆大鼠心肌, 14 000 g (4 °C) 离心 25 min。

1.2.2 柱前衍生:吸取 50 μ l 上清液, 加入 125 μ l 的 0.2 mol/L 硼酸钠, 旋涡振荡, 缓慢加入 125 μ l 乙腈(含荧光胺 1.6 g/L)混匀, 静置 5 min 后, 加入 70% 高氯酸 18 μ l, 置于 80 °C 的水浴 1 h。冷却至室温, 加入 3 mol/L 含 0.5 mol/L 3-N-吗啉代丙磺酸(MOPS)50 μ l 的 NaOH, 使标本液终点 pH 为 6.0, 即可上机进行分离、检测。

1.2.3 色谱条件:流动相采用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(含体积分数为 30% 的乙腈, pH 7.50), 等度洗脱, 流速 1.0 ml/min; 进样量 100 μ l; 柱温为室温; 荧光检测波长为激发 365 nm, 发射 460 nm。

1.3 心肌内蛋白酶体-C2 亚基基因表达测定按文献[3]方法。

1.3.1 RNA 提取和探针制备:一步法提取心肌内总 RNA(Trizol, 美国 Life Technology 公司), 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR), 对转录产物扩增, 试剂盒为美国 Promega 公司产品。引物序列: ①蛋白酶体-C2 亚基: 扩增片段为 305 bp, 5'-TCC-AAACCTGCCCATCTGCTAACT-3' (正义链), 5'-AGGCTGTGCTTTTCTCTGTGGTCT-3' (反义链); ②三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH): 扩增片段为 309 bp, 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (正义链), 5'-AGATCCACAACGGA-TACATT-3' (反义链); 北京赛百盛生物工程技术公司合成。产物测序结果与各扩增基因目的片段一致, 由中国科学院基因组信息学中心测序。

1.3.2 Northern 杂交:对每份 RNA 样品取 30 μ g, 经变性、电泳后, 用毛细管法将 RNA 转至尼龙膜, 在紫外交联仪内固定, 在膜上标记 28SrRNA 和 18SrRNA 条带的位置后, 将膜置入预杂交液中, 65 °C 5 h。将含有 32 P-dCTP 的探针加入 6.2 ml 的杂交 A 液内[十二烷基硫酸钠(SDS)和 ssDNA], 100 °C 变性(-20 °C 乙醇快速冷却); 加入 5.24 ml 杂交 B 液(二硫苏糖醇、Denhardt's 试剂及 SSCP),

65 °C 预热; 弃杂交管内的预杂交液加入杂交液, 杂交仪内过夜; 室温洗膜 2 min, 60 °C 15 min 洗膜 2 遍; 滤纸吸干后, 将膜置-65 °C 放射自显影 24 h。使用美国 Gel Work 2000 图像扫描系统分析。

1.4 统计学分析:所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 应用 Stata 软件进行数据描述、*t* 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

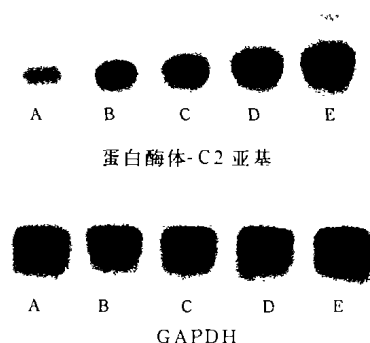
2.1 心肌内 3-MH 含量的变化(表 1):脓毒症大鼠致伤后 2 h 3-MH 含量为(3.32 ± 0.18) μ mol/g, 6 h 为(3.64 ± 0.41) μ mol/g, 较烫伤组 2 h(2.80 ± 0.13) μ mol/g 和 6 h(3.23 ± 0.26) μ mol/g 以及对照组(2.72 ± 0.32) μ mol/g 均显著升高(P 均 <0.05); 烫伤组大鼠伤后 2 h 与对照组差异无显著性, 而伤后 6 h 较对照组显著升高($P<0.01$)。

表 1 烫伤脓毒症大鼠心肌内 3-MH 含量($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	3-MH 含量	组别	3-MH 含量
对照组	2.72 ± 0.32	脓毒症 2 h 组	$3.32\pm 0.18^{* \#}$
烫伤 2 h 组	2.80 ± 0.13	脓毒症 6 h 组	$3.64\pm 0.41^{* \Delta}$
烫伤 6 h 组	$3.23\pm 0.26^{*}$		

注:与对照组比较: * $P<0.01$, 与烫伤 2 h 组比较: # $P<0.01$, 与烫伤 6 h 组比较: $\Delta P<0.05$

2.2 心肌蛋白酶体-C2 亚基 mRNA 表达(图 1):大鼠烫伤后 2 h 心肌内蛋白酶体-C2 亚基 mRNA 表达较对照组即显著增强了 12.6% ($P<0.01$), 伤后 6 h 增强了 57.7% ($P<0.01$)。烫伤后复合内毒素攻击对心肌内蛋白酶体-C2 亚基 mRNA 增强更显著, 伤后 2 h 较对照组增强了 106.0% ($P<0.01$), 伤后 6 h 增强了 148.4% ($P<0.01$)。



注: A 为对照组, B 为烫伤 2 h 组, C 为烫伤 6 h 组, D 为脓毒症 2 h 组, E 为脓毒症 6 h 组; 以 GAPDH 为内参

图 1 烫伤及脓毒症大鼠心肌内蛋白酶体-C2 亚基 mRNA 表达变化 ($n=9$)

Figure 1 Expressions of C2 subunit of proteasome mRNA in cardiac muscle in burned rats with sepsis ($n=9$)

3 讨论

危重烧伤特别是合并严重感染的脓毒症患者早期即可出现心律失常及心肌收缩能力下降等心功能障碍,其严重程度与患者的预后密切相关。新近研究发现,脓毒症时血中内毒素和炎性介质(如肿瘤坏死因子等)含量增加是心肌收缩力下降的重要原因之一^[4,5]。病理学研究也显示烧伤脓毒症时心肌内影响收缩功能的细胞器有形态学的改变,如肌浆膜完整性破坏,细胞内游离钙增多,原肌球蛋白、肌浆球蛋白和肌动蛋白减少等,但是引起这些变化的原因尚不清楚。研究发现,烧伤脓毒症时由于血中糖皮质激素和炎性介质的含量升高等原因,使骨骼肌蛋白特别是肌纤维蛋白降解显著增强,导致肌组织萎缩,收缩力下降,负氮平衡及机体免疫力下降,严重影响患者的康复^[6,7]。那么烧伤脓毒症时心肌的蛋白降解代谢是如何变化,心肌收缩功能下降是否与蛋白降解代谢的变化有关,目前尚未见相关报道。

本研究结果显示,严重烫伤特别是合并内毒素攻击时,心肌内 3-MH 含量显著升高。3-MH 主要存在于骨骼肌的肌动蛋白和肌凝蛋白内(大约占 91.1%),是组氨酸形成组氨酰-tRNA 后发生甲基化的产物,蛋白质分解代谢释放的 3-MH 不能作为 tRNA 的底物合成新肽链。因此,测定 3-MH 的释放量可反映肌组织蛋白的分解代谢。本研究结果显示,烫伤早期特别是心肌内 3-MH 的含量呈持续升高现象,提示心肌组织蛋白降解明显增强。一般认为,疼痛、创伤、发热、烧伤等各种原因导致机体发生应激反应时,机体内蛋白代谢表现为分解代谢显著增强,出现负氮平衡。伤后早期的这种蛋白高分解代谢可向重要器官提供游离氨基酸,有利于机体保护性调节反应,如供肝脏合成急性期蛋白及糖异生,供给免疫系统细胞和肠上皮细胞大量的谷氨酸以适应其需要量的明显增加等。但是,持续的蛋白高分解必将导致患者抵抗力下降、并发症增加,特别是如果发生在呼吸肌或心肌等特殊功能肌群,使其收缩功能下降,势必其弊远大于利,严重影响患者的康复。此外,研究结果也提示烫伤合并内毒素攻击时心肌蛋白分解代谢较单纯烫伤更显著。感染是严重烧烫伤后常见的并发症,感染严重时病原微生物经创面或血流进入机体,释放大量内毒素,启动炎性反应引发脓毒症。许多研究表明,内毒素可损害心肌线粒体、肌浆网、肌膜等结构,在严重感染早期即可导致

心功能异常,因此,及早识别和防止心功能障碍的发生与发展,对脓毒症的救治有重要的价值。细胞内结构蛋白的完整性是维持心肌细胞功能的基础,本研究揭示合并内毒素可以显著增强烫伤后心肌结构蛋白的降解率,且使降解发生的时机更早,这对从代谢角度研究脓毒症时心功能障碍发生的机制及改进防治措施有一定参考意义。

弄清蛋白高分解代谢的机制是有效防治脓毒症时心肌蛋白高降解的前提。人体细胞内有多种蛋白降解途径,其中泛素-蛋白酶体途径是新近发现的一种细胞内能量依赖性-选择性蛋白降解途径,该途径在癌症和脓毒症等多种严重消耗性疾病的高代谢中有重要作用。该途径主要由泛素、泛素相关酶和蛋白酶体三部分组成。泛素是标记靶蛋白降解的信号分子,蛋白酶体是靶蛋白降解的场所,是 C2 亚基蛋白酶体的核心功能亚基。有研究表明,C2 亚基的基因表达与该系统的活性呈正相关^[8]。本研究结果发现,严重烫伤后早期心肌细胞内蛋白酶体途径的活性呈持续增强,其增强的时机早于蛋白降解率的增加,合并内毒素攻击可使其表达进一步明显增强,提示泛素-蛋白酶体途径活性增强可能是严重烫伤及脓毒症早期心肌蛋白降解增强的重要原因之一。

参考文献:

- 1 White J, Thomas J, Maass D L, et al. Cardiac effects of burn injury complicated by aspiration pneumonia-induced sepsis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285: H47-H58.
- 2 申传安, 柴家科, 姚咏明. 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[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 340-343.
- 3 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[J]. 中华外科杂志, 2002, 9: 705-708.
- 4 Maass D L, Hybki D P, White J, et al. The time course of cardiac NF- κ B activation and TNF- α secretion by cardiac myocytes after burn injury; contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction[J]. Shock, 2002, 17: 293-299.
- 5 White D J, Maass D L, Sanders B, et al. Cardiomyocyte intracellular calcium and cardiac dysfunction after burn trauma[J]. Crit Care Med, 2002, 30: 14-22.
- 6 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 321-324.
- 7 Chai Jiake, Wu Yanqiu, Sheng Zhiyong. The role of ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia[J]. Crit Care Med, 2003, 31: 1082-1087.
- 8 申传安, 柴家科, 姚咏明, 等. 烧伤脓毒症早期膈肌内泛素基因和蛋白的表达变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 655-657.

(收稿日期: 2004-12-21 修回日期: 2005-03-21)

(本文编辑: 李银平)