

- endorphin and cortisol in graded sepsis. *Hum Metab Res.* 1998 , 30(9) 570-574.
- [8] DeRiu PL , Petruzzi V , Caria MA , et al. β -endorphin and cortisol levels in plasma and CSF following acute experimental spinal traumas. *Physiol Behav* , 1997 62(1) :1-5.
- [9] 洪新如 , 王成海. 下丘脑室旁核 β -内啡肽在大鼠烫伤休克中的作用. *生理学报* , 1995 47(1) :19-24.
- [10] Hamilton AJ , Carr DB , Larovere JM. et al. Endotoxic shock elicits greater endorphin secretion than hemorrhage. *Circ Shock* , 1986 , 19(1) :47-54.
- [11] Ramabadran K , Bansinath M. Endogenous opioid system modulation a new addition to the therapeutic armamentarium in the treatment of shock and spinal cord injury. *Asia Pac J Pharmacol* , 1988 3(1) :111-124.
- [12] 胡德耀 , 潘学坤 , 刘良明 , 等. δ 和 κ 阿片受体拮抗剂在治疗创伤低血容量性休克中的意义. *中国危重病急救医学* 2000 , 12(2) :101-104.

(收稿日期 2001-12-24)

【作者简介】

洪新如 (1965 -) 男(汉族) , 福建省福州市人 , 上海第二军医大学毕业 , 1992 年获第二军医大学神经内分泌学博士学位.

王成海 (1937 -) 男(汉族) , 福建省福州市人 , 上海第二军医大学教授、硕士生导师.

林葆城 (1925 -) 男(汉族) , 福建省福州市人 , 上海第二军医大学教授、硕士生导师.

IL-1 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

【摘要】目的 : 为阐明及防治烧伤后负氮平衡提供理论依据。方法 : 在接近机体内环境下 , 于体外分别用免疫沉淀扣除法和间接 ELISA 法检测 IL-1 对 30% 体表皮全层烫伤大鼠烧伤后骨骼肌中 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 : IL-1 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 : IL-1 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 , 这可能与烧伤后平衡负氮的发生密切相关。

【关键词】 烧伤 ; 白细胞介素-1 ; 26S 蛋白酶复合体 ; 19S 调节复合体

【中图分类号】R644 【文献标识码】A 【文章编号】1001-0726(2002)02-0081-04

The Effects of IL-1 on the 26S Proteasome and 19S Regulator in Skeletal Muscle of the Severely Scalding Rats *Tan yin-ling¹ Wang shi-liang¹ Dong yan-ling² Institute for Burns , Southwestern Hospital , The 3rd Military Medical University , Chongqing 400038*

【abstract】 **Objective** : Try to clarify the mechanism of negative nitrogen balance after burns. **Methods** : The means of immuno-precipitation-deduction and ELISA were used to test the change of activities and contents of 26S proteasome and 19S regulator in skeletal muscle of rats inflicted with 30% TBSA III° burns. **Results** : IL-1 can markedly raised the activities and contents of 26S proteasome and 19S regulator in rats skeletal muscle after scalded. **Conclusions** : IL-1 can activate the 26S proteasome system in skeletal muscle , thus enhance the degradation of protein , which is associated with the development of negative nitrogen balance following scald.

【Key word】 burns IL-1 26S proteasome 19S regulator

【CLC number】R 644 【Document code】A 【Article ID】1001-0726(2002)02-0081-04

创伤可使炎症细胞产生 IL-1、TNF α 、IL-6 等细胞因子,这些细胞因子能作用于多种组织和器官,刺激糖皮质激素和胰高血糖素等物质的产生,并与它们协同而产生一系列全身反应,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]。我室曾报道烫伤后 IL-1、TNF α 及 IL-6 等水平升高,且均可加强骨骼肌蛋白质降解^[2],我室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^[3],但对于烧伤后以上因素对 26S 系统的作用尚缺乏直接证据。因此本实验选择 IL-1 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。

一、材料与方法

1. 主要材料与试剂:重组人 IL-1 及 IL-1 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(第三军医大学生化教研室惠赠),Cowan I 金黄色葡萄球菌菌株(第三军医大学微生物教研室惠赠),¹²⁵I-Lysozyme(上海生工),羊抗兔碱性磷酸酶标二抗(Boehringer Mannheim)。

2. 实验动物及烧伤模型制作:实验动物为健康成年 Wistar 雄性大鼠,体重 250 ± 30g,雌雄不拘,由第三军医大学动物所提供。随机分为烫伤组和对照组,每组 8 ~ 10 只。烫伤模型制作见文献^[3]。

3. 实验动物分组:每组动物 8 只。① 正常 IL-1 单抗注射组:将正常未烧伤大鼠,由尾静脉注射 TNF α (300 μ g/kg),分别于注射后第 6h、12h、24h、48h 及 72h 处死;② 烫伤 IL-1 注射组:大鼠烫伤后 2h,由尾静脉注射 TNF α (300 μ g/kg),分别于注射后第 6h、12h、24h、48h 及 72h 处死;③ 烫伤 IL-1 单抗注射组:大鼠烫伤后 2h,由尾静脉分两次注射 TNF α 单抗(3mg/kg),时间间隔 6h,分别于注射后第 24h、48h 及

72h 处死;④ 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;⑤ 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。

4. 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 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:参见倪兵等的方法^[4],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;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 μ l,于 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后,各加 100000cpm 的¹²⁵I-lysozyme-ul(¹²⁵I-lysozyme-ub 的制备另文发表),37 $^{\circ}$ C 温育 2h 后,加 30 μ l 的 3% BSA 和 500 μ l 的 15% 三氯醋酸,于 0 $^{\circ}$ C 搅拌,静置 10min,10000 × g 离心 10min,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。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 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育 2h。(余操作同上);

5. 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 $^{\circ}$ C 水浴 30min,洗涤后再加羊抗兔碱性磷酸酶标二抗,37 $^{\circ}$ C 水浴显色 15min,2M 硫酸终止反应,测 490nm 处的 OD 值。

6. 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, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。计量结果以均数 ± 标准差表示。

二、结果

1. 注射 IL-1 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体活性的变化(见表 1):

表 1 注射 IL-1 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体活性的变化(cpm/100 μ g 蛋白)

正常对照	注射后 时间(h)	正常注射 IL-1	烫伤后时 间(h)	烫伤对照组	烫伤注射 IL-1	烫伤注射 IL-1 单抗
248 ± 36.7	6	245 ± 21.9	6	240 ± 20.2	269 ± 31.6	
	12	259 ± 20.6	12	261 ± 25.4	280 ± 27.4	
	24	284 ± 34.4	24	273 ± 40.2	416 ± 37.5*	325 ± 22.3
	48	655 ± 52.3 [△]	48	1215 ± 70.9 [△]	1482 ± 80.6*	833 ± 46.4*
	72	832 ± 65.70 [△]	72	1549 ± 83.5 [△]	1714 ± 89.4*	1056 ± 52.3*

[△]p < 0.01 与正常对照组比较; * 与相应的烫伤对照组比较, n = 8

2. 注射 IL-1 及其单抗后 19S 调节复合体活性的变化(见表 2):

表 2 注射 IL-1 及其单抗后 19S 调节复合体活性的变化(cpm/100μg 蛋白)

正常对照	注射后 时间(h)	正常注射 IL-1	烫伤后时 间(h)	烫伤对照组	烫伤注射 IL-1	烫伤注射 TIL-1 单抗
173 ± 19.4	6	170 ± 16.8	6	166 ± 17.8	185 ± 13.7	
	12	188 ± 15.2	12	186 ± 16.4	223 ± 15.0	
	24	300 ± 17.4 [△]	24	201 ± 18.5	397 ± 22.1*	258 ± 20.3
	48	669 ± 28.5 [△]	48	870 ± 48.4 [△]	1229 ± 66.5*	613 ± 40.5*
	72	814 ± 31.3 [△]	72	1126 ± 58.7 [△]	1470 ± 71.3*	766 ± 53.9*

△p < 0.01 与正常对照组比较 ; * 与相应的烫伤对照组比较 ; n = 8

3. 注射 IL-1 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体含量的变化(见表 3):

表 3 注射 IL-1 及其单抗后 26S 蛋白酶复合体含量的变化(ug/g 蛋白)

正常对照	注射后 时间(h)	正常注射 IL-1	烫伤后时 间(h)	烫伤对照组	烫伤注射 IL-1	烫伤注射 IL-1 单抗
30.47 ± 5.34	6	29.40 ± 5.15	6	31.52 ± 4.40	33.17 ± 5.08	
	12	33.65 ± 4.94	12	34.06 ± 3.99	35.92 ± 4.76	
	24	37.18 ± 5.26	24	36.86 ± 5.89	40.34 ± 5.19	32.70 ± 4.88
	48	45.96 ± 5.70 [△]	48	50.27 ± 7.23 _△	71.69 ± 6.33*	34.63 ± 5.81*
	72	49.33 ± 5.22 [△]	72	54.61 ± 7.90 _△	78.4 ± 5.48*	40.19 ± 6.24*

△p < 0.05 与正常对照组比较 ; * p < 0.05 与相应的烫伤对照组相比较 ; n = 8

4. 注射 IL-1 及其单抗后 19S 调节复合体含量的变化(见表 4):

表 4 注射 IL-1 及其单抗后 19S 调节复合体含量的变化(ug/g 蛋白)

正常对照	注射后 时间(h)	正常注射 IL-1	烫伤后 时间(h)	烫伤对照组	烫伤注射 IL-1	烫伤注射 IL-1 单抗
19.63 ± 4.21	6	19.14 ± 3.92	6	22.60 ± 4.27	23.46 ± 4.09	
	12	21.36 ± 4.15	12	23.81 ± 4.55	27.95 ± 4.43	
	24	25.80 ± 3.76	24	26.38 ± 4.76	34.33 ± 5.71*	23.64 ± 3.50
	48	38.92 ± 4.79 [△]	48	41.27 ± 5.90 [△]	62.28 ± 7.81*	25.50 ± 3.07*
	72	42.35 ± 5.13 [△]	72	48.39 ± 6.14 [△]	66.43 ± 8.04*	26.92 ± 3.56*

△p < 0.05 与正常对照组比较 ; * p < 0.05 与相应的烫伤对照组相比较 ; n = 8

三、讨论

26S 蛋白酶复合体系统在真核细胞中广泛存在,是胞浆的主要成份之一,占胞内可溶性蛋白的 0.5%—1%。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^[5]。

IL-1 是一种较复杂的多功能细胞因子,可介导创伤炎症、感染的急性期代谢变化,促进肌肉蛋白质分解及急性期蛋白在肝脏的合成^[6,7]。本实验结果说明 IL-1 可激活骨骼肌中的 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体系统,并提示严重烫伤可诱导 IL-1 的释放并激活骨骼肌中的 26S 蛋白酶复合体及 19S 调节复合体系统,增强蛋白质分解代谢,注射 IL-1 单抗可明显抑制这种作用。

从实验结果还可看出,IL-1 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,可能原因有二:一是 IL-1 单抗剂量不足,未能完全中和组织产生的 IL-1;二是由于创伤后炎症细胞能同时产生多种细胞因子,它们具有互相诱生、协同作用,而 IL-1 单抗只能抑制 IL-1 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 IL-1 一种细胞因子所致,它们可能协同作用,也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,IL-1 在其中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1999, 28: 295-317
- [2] 聂梅,董燕麟. 烫伤早期 TNF 与 IL-1 增强骨骼肌蛋白质分解代谢作用机制的研究. *第三军医大学学报* 2001, 23(2): 172-175
- [3] 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. *中华创伤杂志*, 1998, 14(6): 384-386
- [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. *中华创伤杂志*, 1999, 15(Sup):

18-20

- [5] Ferrell-K; Wilkinson-CR; Dubiel-W, et al. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome a complex problem. *Trends-Biochem-Sci*. 2000 Feb 25(2): 83-8
- [6] Zamir-O; Hasselgren-PO; O'Brien-W, et al. Muscle protein breakdown during endotoxemia in rats and after treatment with interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra). *Ann-Surg*. 1992 Sep 21(3): 381-5; discussion 386-7
- [7] Cannon-JG; Meydani-SN; Fielding-RA, et al. Acute phase response in exercise. II. Associations between vitamin E, cytokines and muscle proteolysis. *Am-J-Physiol*. 1991 Jun 26(6 Pt 2): R1235-40

(收稿日期 2002-01-15)

[作者简介]

谭银玲 女(1970—),女(汉族),重庆人,华西医科大学毕业,现从事生物化学专业,讲师。

汪仕良(1935—),男(汉族),上海人,第二军医大学毕业,现从事烧伤学外科专业,主任医师,教授。

董燕麟(1928—),男(汉族),北京人,华西大学医学院毕业,现从事生物化学专业,教授。

MEBO 治疗重度冻伤疗效的实验研究

郭金龙,严泉剑,金晓明,张天杰

【摘要】目的:研究湿润烧伤膏(MEBO)对重度冻伤的治疗效果,为临床应用提供参考。方法:将兔足制成重度冻伤模型,然后将动物随机分为三组进行治疗:对照组、妥布霉素组和 MEBO 组,并对其疗效进行对比观察。结果:MEBO 对兔足重度冻伤的治疗效果即优于妥布霉素组($P < 0.05$),更优于对照组($P < 0.01$)。结论:MEBO 对严重冻伤具有明显的治疗作用,可在临床放心使用。

【关键词】 重度冻伤;MEBO;妥布霉素;实验研究

【中图分类号】R645 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1001-0726(2002)02-0084-03

Experimental Research on the Efficacy of MEBO in Treating Severe Chilblain Guo Jin-long, Yan Quan-jian, Jin Xiao-ming, et al. No. 148 Hospital, Zhou Cun District, Zibo City, Shandong Province 255300

【Abstract】Objective: To evaluate the efficacy of MEBO in treating severe chilblain. **Method:** Rabbit foot chilblain model was used in this experiment. The animals were divided randomly into 3 groups, Animals in group 1 served as a control, in group 2, rabbits were treated with tobramycin and in group 3, treated with MEBO. **Results:** MEBO was more efficacious than tobramycin in treating rabbit foot chilblain ($P < 0.05$) and the result was also better than that of the control ($P < 0.01$). **Conclusion:** MEBO has very marked efficacy in treating severe chilblain.