维普资讯 http://www.cqvip.com

· 论著 ·

地塞米松对骨骼肌细胞蛋白降解的调节及其机制研究

申传安 柴家科 姚咏明 盛志勇

【摘要】 **目的** 研究地塞米松对体外培养的骨骼肌肌管内长寿命蛋白降解的影响及其可能的作用机制。**方法** 无菌分离(2 日龄)Wistar 大鼠双下肢肌肉，组织块法培养、增殖、传代纯化成肌细胞，融合形成肌管，使用 L -[3,5 -^{3}H]-酪氨酸标记肌管长寿命蛋白后，随机分成两组。A 组：分别用不含地塞米松(对照组)或含地塞米松 10 nmol/L(A1 组)、100 nmol/L(A2 组)、1 000 nmol/L(A3 组)的培养液培养肌管，12、24、36 和48 h 后使用液体闪烁计数仪测定培养液和细胞内 L -[3,5 -^{3}H] -酪氨酸的含量，计算肌管长寿命蛋白的降解率。B 组：分别用含蛋白酶体抑制剂 MG132(50 μmol/L，B1 组)或含 MG132(50 μmol/L)和地塞米松 100 nmol/L (B2 组)的培养液培养肌管 24 h，相同方法测定肌管长寿命蛋白降解率。**结果** A1、A2 和 A3 组长寿命蛋白降解率均较对照组显著增加，差异有显著性(P 均<0.01)。A2 组和 A3 组长寿命蛋白降解率均较 A1 组显著增加，差异有显著性(P 均<0.01)。A2 组和 A3 组比较，长寿命蛋白降解率差异无显著性($P>0.05$)。B1 组长寿命蛋白降解率较对照组(24 h)降低明显，B2 组长寿命蛋白降解率较 A2 组(24 h)显著降低，差异均有显著性(P 均<0.01)。**结论** 泛素-蛋白酶体途径是骨骼肌肌管长寿命蛋白的重要降解途径之一。地塞米松能通过激活肌管内泛素-蛋白酶体途径而增强长寿命蛋白的降解，此效应在一定范围内呈量-效依赖关系。

【关键词】 蛋白降解； 肌管； 骨骼肌； 地塞米松； 蛋白酶体抑制剂； MG132

Effect of dexamethasone on degradation of cultured myotube protein and its mechanism *SHEN Chuan - an, CHAI Jia - ke, YAO Yong - ming, SHENG Zhi - yong. Burns Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA (Formerly 304 th Hospital of PLA), Beijing 100037, China*

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of dexamethasone on degradation of long - lived protein in myotubes and to elucidate its possible mechanism. **Methods** After isolating skeletal muscles of rat's hind limb under sterile condition, the myoblasts were proliferated in tissue - block culture. After being passaged and purified, the myoblasts fused into myotubes. The protein in myotubes was radiolabelled with L -[3,5 -^{3}H]- tyrosine, and then the myotubes were divided into two groups. In group A, the myotubes were cultured in Dubbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mmol/L tyrosine without dexamethasone (control group), with dexamethasone 10 nmol/L (group A1), dexamethasone 100 nmol/L (group A2), and dexamethasone 1 000 nmol/L (group A3), respectively. The amounts of L -[3,5 -^{3}H]- tyrosine in culture medium and cells were determined and the degradation rates of long - lived protein were calculated at 12, 24, 36, 48 hours of culture. In group B, the myotubes were cultured in DMEM containing 10% FBS and 2 mmol/L tyrosine with 50 μmol/L proteasome inhibitor MG132 (group B1), or 50 μmol/L MG132 and 100 nmol/L dexamethasone (group B2). Proteolytic rates of protein were calculated with the same way as group A at 24 hours. **Results** The proteolytic rate of long - lived protein in group A1, group A2 and group A3 was all increased significantly compared with that in control group (all $P<0.01$), and that in group A2 and A3 rose markedly compared with that in group A1 (both $P<0.01$), respectively. There was no statistically significant difference between group A2 and group A3 ($P>0.05$). Proteolytic rate of long - lived protein in group B1 was significantly lower than that in control group ($P<0.01$). The degradation rate of long - lived protein in group B2 was markedly lower than that in group A2 ($P<0.01$). **Conclusion** The results suggest that the ubiquitin - proteasome system is one of the important pathways of degradation of long - lived protein in cultured myotubes, and dexamethasone could enhance the degradation of long - lived protein in cultured myotubes by activating ubiquitin proteasome pathway in dose - dependent manner.

【**Key words**】 degradation of protein; myotube; skeletal muscle; dexamethasone; proteasome inhibitor; MG132

以骨骼肌蛋白高降解为主要原因的负氮平衡是重症烧伤、创伤代谢变化的特征之一，严重影响患者的康复。近期研究认为，体内糖皮质激素和肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素 -6(IL -6)等炎性介质含量增加与上述消耗性疾病时骨骼肌蛋白高代谢有密切的关系，并发现选择性蛋白降解途径泛素-蛋白酶

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30571744, 30271339)；军队医药卫生"十五"重点课题(01Z095)；首都医学发展科研基金项目(2003 - 3024)

作者单位：100037 北京，解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军烧伤研究所

作者简介：申传安(1974 -)，男(汉族)，山东人，医学博士，主治医师。

维普资讯 http://www.cqvip.com

体在此过程中有重要作用[1-3]。本研究拟采用作用因素单一的体外细胞培养方法，结合使用蛋白酶体抑制剂 MG132(一种人工合成的能抑制蛋白酶体活性的肽醛，具有细胞穿透性)，探讨地塞米松对骨骼肌蛋白降解率的调节及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养：无菌分离 Wistar 大鼠(2 日龄，中国军事医学科学院提供)双下肢肌肉，组织块法培养 2～3 d 后骨骼肌细胞将近铺满瓶底时，以质量分数为 1%的胰蛋白酶消化传代(去除组织块)，接种于 6 孔板($1\times10^5/cm^2$)，加入 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM，含体积分数 10%的胎牛血清)，继续培养至细胞近铺满孔底，将培养液更换为 DMEM(含体积分数为 4%的马血清和 2%的胎牛血清，Hyclone 公司)，促进细胞融合形成肌管，培养 36～48 h 后，将培养液更换为 DMEM(含 4%马血清和 10 μmol/L 阿糖胞苷，Sigma 公司)以进一步促进细胞融合并清除未融合的成肌细胞，培养 12 h 后再将培养液更换为 DMEM(含 10%的胎牛血清)继续培养，待用。

1.2 同位素标记的肌管内长寿命蛋白测定：将含 3.7×10^7 Bq/L 的 L-[3,5-^{3}H]-酪氨酸(中国原子能物理研究所)的培养液培养肌管 48 h 后，用 2 ml 冰冷的 Hank 平衡盐溶液(含 2 mmol/L 非同位素标记酪氨酸)快速漂洗细胞 2 遍，随后使用 DMEM(含 10%胎牛血清和 2 mmol/L 非同位素标记酪氨酸)培养肌管 2 h，降解短寿命蛋白。再用 2 ml 冰冷的 Hank 平衡盐溶液(含 2 mmol/L 非同位素标记酪氨酸)漂洗 2 遍，待用。

1.3 实验分组：将已标记的肌管随机分成两组。A 组：分别应用不含地塞米松(对照组)和含有地塞米松 10 nmol/L(A1 组)、100 nmol/L(A2 组)和 1 000 nmol/L(A3 组)DMEM 培养肌管 12、24、36 和 48 h。B 组：分别应用含蛋白酶体抑制剂 MG132(50 μmol/L，B1 组)或含有 MG132(50 μmol/L)和地塞米松 100 nmol/L(B2 组)的 DMEM 培养肌管 24 h。收集培养液和细胞。

1.4 长寿命蛋白降解率的测定：使用液体闪烁计数仪测定培养液与细胞内的 L-[3,5-^{3}H]-酪氨酸含量。长寿命蛋白降解率＝培养液内 L-[3,5-^{3}H]-酪氨酸含量/(培养液＋细胞内的 L-[3,5-^{3}H]-酪氨酸含量)。

1.5 统计学处理：所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用 Stata 软件进行数据描述和单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 地塞米松对肌管内长寿命蛋白降解率的影响(表 1)：伤后各时间点，A1、A2 和 A3 组肌管内长寿命蛋白降解率均较对照组显著增加(P 均<0.01)；A2 和 A3 组肌管长寿命蛋白降解率均较 A1 组显著增加(P 均<0.01)；A2 和 A3 组肌管长寿命蛋白降解率比较，差异均无显著性(P 均>0.05)。

表 1 地塞米松对伤后不同时间肌管长寿命蛋白降解率的影响($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

Table 1 Effects of dexamethasone on degradation in cultured myotubes long-lived protein at different time after injury($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	长寿命蛋白降解率			
	伤后 12 h	伤后 24 h	伤后 36 h	伤后 48 h
对照组	0.17±0.02	0.38±0.01	0.56±0.03	0.75±0.02
A1 组	0.20±0.01*	0.41±0.02*	0.62±0.02*	0.82±0.03*
A2 组	0.24±0.04*$	0.48±0.03*$	0.72±0.04*$	0.96±0.02*$
A3 组	0.23±0.03*$	0.49±0.05*$	0.73±0.03*$	0.97±0.06*$

注：与对照组比较：*$P<0.01$；与 A1 组比较：$$P<0.01$

2.2 蛋白酶体抑制剂 MG132 对地塞米松增强肌管内长寿命蛋白降解率的抑制作用(表 2)：B1 组长寿命蛋白降解率较对照组显著降低($P<0.01$)；B2 组长寿命蛋白降解率较 A2 组(24 h)亦显著降低($P<0.01$)。

表 2 MG132 对地塞米松增强肌管内长寿命蛋白降解率的抑制作用($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

Table 2 Inhibition of MG132 on enhanced degradation of cultured myotubes long-lived protein by dexamethasone($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	长寿命蛋白降解率	组别	长寿命蛋白降解率
对照组	0.38±0.01	B1 组	0.27±0.10*
A2 组	0.48±0.03	B2 组	0.29±0.03△

注：与对照组比较：*$P<0.01$；与 A2 组比较：△$P<0.01$

3 讨 论

烧伤、创伤患者，特别是在合并感染后，革兰阴性菌产生的内毒素等致热源刺激机体，使机体长期处于应激状态，体内糖皮质激素分泌明显增加。糖皮质激素是体内主要应激激素和促分解代谢激素之一，具有调节糖、脂肪和蛋白质的生物合成和代谢作用，还具有抗炎作用，称其为“糖皮质激素”是因为其调节糖类代谢的活性最早为人们所认识[4]。新近研究发现，糖皮质激素可能与重症烧伤、创伤、脓毒症等炎症性疾病时负氮平衡主要原因之一的骨骼肌蛋白高降解密切相关。

3.1 糖皮质激素与骨骼肌蛋白代谢：既往动物实验

维普资讯 http://www.cqvip.com

研究中发现，重症烧伤、创伤、脓毒症等炎症性疾病时外周血内糖皮质激素含量与骨骼肌蛋白降解率呈正相关，静脉注射糖皮质激素能增强大鼠骨骼肌蛋白降解，由此认为，糖皮质激素可能是上述炎症性疾病时负氮平衡、骨骼肌蛋白高代谢的介导因素之一。

为进一步探讨糖皮质激素与骨骼肌蛋白降解的关系，本实验中选用了成分单一的离体培养骨骼肌肌管作为研究对象。骨骼肌肌管内蛋白按照降解快慢可分为短寿命蛋白和长寿命蛋白，其中绝大部分为长寿命蛋白，如肌凝蛋白、肌动蛋白等。各种长寿命蛋白的半寿期也有差异，肌型肌酸激酶同工酶为 75 h，肌凝蛋白轻链为 29 h，肌凝蛋白重链为 20～200 h，肌动蛋白为 142 h，平均半寿期在 40 h 左右。由于骨骼肌细胞既不合成、也不分解酪氨酸[5]，因此采用 L -[3,5 -^{3}H]-酪氨酸标记肌管蛋白能较准确地反映蛋白分解代谢率。既往研究认为，高浓度的酪氨酸能够使细胞内酪氨酸含量迅速升高，加快细胞内外酪氨酸浓度的动态平衡，从而尽量减少蛋白分解释放的 L -[3,5 -^{3}H]-酪氨酸被细胞重新利用，提高蛋白降解率测定的准确性。本实验中所用浓度 2 mmol/L 是酪氨酸在 DMEM 中的最大溶解度，此浓度下细胞内氨基酸池在 20 min 内即能达到稳定的动态平衡，且能显著减少细胞对 L -[3,5 -^{3}H]-酪氨酸的重新利用。

本实验结果发现，使用地塞米松培养骨骼肌肌管，能显著增强其长寿命蛋白降解，而且此效应在一定范围内呈量-效依赖关系，但在超过一定浓度后（100 nmol/L 与 1 000 nmol/L 作用差异无显著性），蛋白降解率不再随浓度增加而增加，这可能与地塞米松与肌管糖皮质激素受体已达饱和有关。

3.2 糖皮质激素调节骨骼肌蛋白代谢的机制：糖皮质激素是如何调节肌管内蛋白降解的呢？肌细胞内有多种蛋白降解途径，分为溶酶体途径和非溶酶体途径两大类，后者又分为能量依赖性途径和非能量依赖性途径。泛素-蛋白酶体途径属于能量依赖性途径，是新近发现的一种细胞内选择性蛋白降解途径，目前研究认为该途径与骨骼肌蛋白降解关系密切。该系统主要由泛素、泛素相关酶和蛋白酶体 3 个部分组成，其中蛋白酶体是靶蛋白降解的场所[1,2,6]。本实验结果显示，使用含有蛋白酶体抑制剂 MG132 的培养液培养肌管，抑制蛋白酶体活性后，肌管内长寿命蛋白的降解率明显下降，这说明在生理状态下，泛素-蛋白酶体途径在骨骼肌细胞内蛋白的降解中起重要作用。同时也提示，使用 MG132 抑制蛋白酶体活性能显著抑制地塞米松对肌管长寿命蛋白降解的增强作用，说明糖皮质激素可能是通过增强泛素-蛋白酶体途径的活性来增强骨骼肌肌管内长寿命蛋白降解的。

糖皮质激素属甾类激素，呈脂溶性，可经简单扩散进入细胞内，其效应是通过与胞浆受体结合形成激素-胞浆受体复合物后进入核内，与核内受体结合形成受体二聚体，然后该二聚体与激素调节元件结合，调节特异性靶基因的转录。本实验室既往的研究结果发现，糖皮质激素调节元件位于含有泛素耦联酶 E2 - 14 ku 和泛素基因的启动子内，提示糖皮质激素可能与泛素-蛋白酶体途径基因表达的调节有关；脓毒症大鼠在骨骼肌蛋白降解增高的同时，外周血糖皮质激素含量显著上升，且伴有骨骼肌组织内泛素-蛋白酶体途径多种成分的基因表达显著增强。而使用糖皮质激素受体拮抗剂 RU38486 能显著抑制烧伤脓毒症大鼠骨骼肌蛋白降解率和泛素-蛋白酶体途径基因表达的增强[7]。结合本实验所得出“使用蛋白酶体抑制剂能够显著抑制地塞米松对肌管长寿命蛋白降解的增强作用”的结果，提示糖皮质激素可能是在基因水平增强泛素-蛋白酶体途径的活性而导致骨骼肌蛋白降解增强。

参考文献：

1 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.

2 Wolf D H, Hilt W, Sommer T. Death gives birth to life: the essential role of the ubiquitin - proteasome system in biology [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1695: 1 - 2.

3 Roos - Mattjus P, Sistonen L. The ubiquitin - proteasome pathway[J]. Ann Med, 2004, 36: 285 - 295.

4 申传安，柴家科，姚咏明，等. 糖皮质激素对大鼠骨骼肌蛋白分解代谢的影响及其机制探讨[J]. 中国危重病急救医学，2002，14：428 - 431.

5 Gulve E A, Dice J F. Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes [J]. Biochem J, 1989, 260: 377 - 387.

6 Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1695: 55 - 72.

7 姚咏明，柴家科，林洪远，主编. 现代脓毒症理论与实践[M]. 北京：科学出版社，2005：466 - 474.

（收稿日期：2005 - 12 - 10 修回日期：2006 - 01 - 25）

（本文编辑：李银平）

· 广告目次 ·

①珠海丽珠：丽珠血液灌流器 …… （封二）

②深圳迈瑞：监护仪 …… （插页）

③天津红日：血必净 …… （封三）

④索诺声有限公司：便携式彩超 …… （封底）