

• 论著 •

胰岛素强化治疗对烫伤脓毒症兔骨骼肌蛋白高降解的调节及其机制

申传安 柴家科 姚咏明 杜晓辉 盛志勇

【摘要】 目的 探讨胰岛素强化治疗对烫伤脓毒症骨骼肌蛋白高降解的调节及机制。**方法** 雄性日本大耳白兔 30 只,按随机数字表法将动物分为烫伤组(S 组)、烫伤脓毒症组(SS 组)、烫伤治疗组(SI 组)、烫伤脓毒症治疗组(SSI 组)以及对照组(C 组),每组 6 只动物。S 组使用沸水致背部 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤;SS 组同样条件致伤后,立即腹腔注射内毒素(2 mg/kg)模拟烫伤脓毒症。SI 组和 SSI 组从伤后 2 h 开始经静脉泵入胰岛素,使血糖值始终波动在 4.4~6.1 mmol/L。通过高效液相-荧光法检测伸趾长肌和尿内三甲基组氨酸(3-MH)的含量;采用核糖核酸印迹法(Northern blot)检测伸趾长肌内泛素基因的表达式变化。**结果** S 组和 SS 组伸趾长肌和尿内 3-MH 含量较 C 组均显著升高(P 均 <0.01);SI 组和 SSI 组伸趾长肌和尿内 3-MH 含量分别较 S 组和 SS 组显著降低(P 均 <0.01)。S 组和 SS 组伸趾长肌内编码泛素的基因转录水平则较 C 组显著增强(P 均 <0.01);SI 组和 SSI 组伸趾长肌内编码泛素的基因转录水平分别较 S 组和 SS 组显著降低(P 均 <0.01)。**结论** 严重烫伤特别是合并内毒素攻击后早期伸趾长肌细胞内泛素-蛋白酶体途径活性即显著增强,蛋白降解率显著增加。胰岛素强化治疗能通过基因水平抑制细胞内泛素-蛋白酶体途径的活性,有效降低烫伤脓毒症时骨骼肌蛋白高降解。

【关键词】 烫伤; 脓毒症; 胰岛素; 肌,骨骼; 蛋白代谢; 泛素; 兔

Effect of insulin intensive treatment on hyperproteolysis of skeletal muscle in scalded rabbit with sepsis

SHEN Chuan-an*, CHAI Jia-ke, YAO Yong-ming, DU Xiao-hui, SHENG Zhi-yong. * Burns Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA (Formerly 304th Hospital of PLA), Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To study the effect of insulin intensive treatment on hyperproteolysis of skeletal muscle in scalded rabbit with sepsis. **Methods** Male white rabbits were randomly divided into scald group (S group), scald sepsis group (SS group), scald with insulin treatment group (SI group), scald sepsis with insulin treatment group (SSI group), and control group (C group), with 6 animals in each group. The extent of scald injury was 30% total body surface area (TBSA)Ⅲ degree in depth, and the model of scald sepsis was replicated by administration of endotoxin (2 mg/kg) into the peritoneal cavity immediately after scald injury. Insulin intensive treatment was given with injection of insulin to keep the plasma glucose level in physiologic range (4.4~6.1 mmol/L) for SI group and SSI group. The contents of 3-methylhistidine (3-MH) in extensor digitorum longus (EDL) muscles and urine were determined with high performance liquid chromatography. The expressions of ubiquitin mRNA in the EDL muscle were assessed with Northern blot analysis. **Results** The contents of 3-MH in EDL muscles and urine of S group and SS group were increased significantly as compared with C group (all $P<0.01$), and that of SI group and SSI group were decreased markedly compared with S group and SS group (all $P<0.01$), respectively. The mRNA expression of ubiquitin of S group and SS group was enhanced significantly compared with C group (all $P<0.01$), and that of SI group and SSI group was down-regulated notably compared with S group and SS group (all $P<0.01$), respectively. **Conclusion** The activity of ubiquitin system, one of important protein degradation pathways, and the proteolysis in skeletal muscle are enhanced after scald injury, especially so sepsis sets in, and insulin intensive treatment can effectively alleviate hyperproteolysis of skeletal muscle through inhibiting the activity of ubiquitin system at gene level.

【Key words】 scald; sepsis; insulin; muscle skeletal; protein metabolism; ubiquitin; rabbit

基金项目:国家自然科学基金项目(30271339);军队医药卫生“十五”重点课题(01Z095);首都医学科发展基金(2004-3024)

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(申传安,柴家科,姚咏明,盛志勇);100853 北京,解放军总医院普外科(杜晓辉)

作者简介:申传安(1974-),男(汉族),山东人,医学博士,主治医师。

烧伤脓毒症时骨骼肌蛋白降解具有“自噬性”特点,单纯通过补充蛋白质或氨基酸并不能有效抑制骨骼肌蛋白高降解。胰岛素是体内主要的合成激素,是肌氮平衡的重要调节者。烧伤脓毒症时糖皮质激素和炎性介质分泌增多等因素可导致胰岛素的生物效应降低^[1],但烧伤脓毒症时胰岛素抵抗(insulin

resistance, IR) 与骨骼肌蛋白高降解之间的关系及其机制尚有待阐明。本研究拟通过兔烫伤脓毒症动物模型, 初步探讨胰岛素强化治疗对烧伤脓毒症早期骨骼肌蛋白高分解代谢的影响及作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备及分组方法: 清洁级健康雄性日本大耳白兔 30 只, 体重 (2.2 ± 0.2) kg, 购自北京科宇动物养殖中心。动物购进后在动物实验室适应性饲养(饲养条件达到恒温、恒湿、万级) 1 周后, 进行实验。按随机数字表法将动物分为烫伤组(S 组)、烫伤脓毒症组(SS 组)、烫伤治疗组(SI 组)、烫伤脓毒症治疗组(SSI 组) 以及对照组(C 组), 每组 6 只动物。实验前 12 h 禁食, 自由饮水。

烫伤脓毒症模型制备: 使用质量分数为 3% 的戊巴比妥钠溶液经耳缘静脉缓慢注射麻醉动物, 于右侧耳缘静脉留置针穿刺建立静脉输液通道, 肝素钠溶液(125 kU/L) 封管备用。行右侧颈静脉插管, 肝素钠溶液封管, 并留置尿管(排净残余尿液)。刮去背部毛发, 按照公式计算兔总体表面积(TBSA)^[2]: $A = K \cdot M^{0.67}$; 式中 A 为 TBSA (cm^2), K 为 Meeh's 系数 9.75, M 为兔体重(g)。体重为 2.2 kg 的白兔, 其 TBSA 约为 $1\,690\text{ cm}^2$, 烫伤面积约为 500 cm^2 ($25\text{ cm} \times 20\text{ cm}$)。将刮毛后的背部皮肤(烫伤区周围皮肤使用隔热材料保护) 浸入沸水中 10 s, 造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤(病理证实), 并立即向腹腔内注射内毒素(O55:B5, Sigma 公司) 2 mg/kg , 以模拟烫伤脓毒症模型。伤后将兔固定于固定笼内, 无菌纱布覆盖保护创面、保温, 并立即静脉滴注生理盐水 20 ml/kg (2 h 内匀速滴完) 复苏, 尿管接尿袋间断开放收集尿液。

1.2 胰岛素强化治疗: 伤后 2~4 h 内 15 min 测血糖 1 次, 随后 30 min 测 1 次。SI 组和 SSI 组从伤后 2 h 开始静脉泵入短效人胰岛素(丹麦诺和诺德公司) 使血糖值始终波动在 $4.4 \sim 6.1\text{ mmol/L}$ 。

1.3 标本采集及初步处理

1.3.1 尿标本: 伤后 12 h 用尿袋收集尿液, 分装后置液氮内冻存。

1.3.2 组织标本: 伤后 12 h 用 3% 戊巴比妥钠溶液, 经耳缘静脉缓慢注射麻醉动物, 无菌手术分离双侧伸趾长肌, 生理盐水冲洗, 无菌纱布拭干, 立即放入冻存管内置液氮内保存。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 骨骼肌和尿内三甲基组氨酸(3-MH) 含量测定^[3]: 用体积分数为 3% 的高氯酸将伸趾长肌各

肌标本高速匀浆, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $14\,000 \times g$ 离心 25 min, 沉淀蛋白, 留上清。尿标本经酸沉淀蛋白后, 保存上清。按文献[3]方法测定。

柱前衍生: 吸取 $50\text{ }\mu\text{l}$ 上清液, 加入 0.2 mol/L 硼酸钠 $125\text{ }\mu\text{l}$, 旋涡振荡, 缓慢加入 $125\text{ }\mu\text{l}$ 乙腈(含荧光胺 1.6 g/L) 混匀, 静置 5 min 后, 加入 70% 的高氯酸 $18\text{ }\mu\text{l}$, 置 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 1 h。冷却至室温, 加入含 0.5 mol/L 3-[N-吗啉代]丙磺酸(MOPS) 的 3 mol/L NaOH $50\text{ }\mu\text{l}$, 使标本液终 pH 为 6.0, 即可上机分离检测。

色谱条件: 流动相采用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(含体积分数为 30% 的乙腈, pH 7.5), 等度洗脱, 流速 1.0 ml/min ; 进样量 $100\text{ }\mu\text{l}$ 。柱温为室温, 荧光检测波长为激发 365 nm /发射 460 nm 。

1.4.2 骨骼肌内泛素系基因表达测定: 按文献[4]方法测定。

1.4.2.1 RNA 提取和探针制备: 一步法提取伸趾长肌内总 RNA (Trizol, 美国 Life Technology 公司), 采用逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR, 试剂盒由美国 Promega 公司提供) 对转录产物进行扩增。引物序列: ①三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH): 扩增片段为 309 bp, 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3' (正义链); 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3' (反义链)。②泛素(ubiquitin, Ub): 扩增片段为 156 bp, 5'-TAA GAC CAT CAC CCT CGA TT-3' (正义链); 5'-TGG ATG TTG TAG TCA GAC AGG G-3' (反义链)。引物由北京赛百盛生物工程技术有限公司合成, 产物测序结果与各扩增基因目的片段一致。

1.4.2.2 核糖核酸印迹法(Northern blot): 按文献介绍的方法行 Northern blot。对每份 RNA 样品取 $30\text{ }\mu\text{g}$, 经变性、电泳后, 用毛细管法将 RNA 转至尼龙膜, 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 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 下预杂交液中 5 h; 将含有 ^{32}P -dCTP 的探针加入 6.2 ml 杂交 A 液内 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 变性后 ($-20\text{ }^\circ\text{C}$ 乙醇快速冷却), 加入 5.24 ml 杂交 B 液 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 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, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下 15 min 洗膜 2 遍; 滤纸吸干, 膜置 $-65\text{ }^\circ\text{C}$ 下放射自显影 24 h。用 AlphaImager 2200 软件分析灰度值, 取其与相应的内参比值进行统计分析。

1.5 统计学分析: 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 Stata 7.0 软件进行数据描述, 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿内 3-MH 排出量(表 1): S 组伤后 12 h 尿内 3-MH 排出量为 $(18.3 \pm 3.1) \mu\text{mol}$, 较 C 组 $(13.6 \pm 2.7) \mu\text{mol}$ 显著升高 ($P < 0.01$); SS 组伤后 12 h 尿内 3-MH 排出量为 $(29.7 \pm 4.0) \mu\text{mol}$, 均显著高于 C 组和 S 组 (P 均 < 0.01)。SI 组 $[(15.3 \pm 2.4) \mu\text{mol}]$ 和 SSI 组 $[(22.7 \pm 3.3) \mu\text{mol}]$ 伤后 12 h 尿内 3-MH 排出量分别较 S 组和 SS 组显著降低 (P 均 < 0.01)。

表 1 伤后 12 h 伸趾长肌和尿内 3-MH 含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Changes of contents of 3-MH in extensor digitorum longus muscle and urine 12 hours post injury ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	尿内 3-MH 排出量 (μmol)	伸趾长肌内 3-MH 含量 ($\mu\text{mol/g}$)
C 组	13.6 ± 2.7	2.10 ± 0.22
S 组	$18.3 \pm 3.1^*$	$2.68 \pm 0.21^*$
SS 组	$29.7 \pm 4.0^{**}$	$3.32 \pm 0.24^{**}$
SI 组	$15.3 \pm 2.4^{\#}$	$2.31 \pm 0.19^{\#}$
SSI 组	$22.7 \pm 3.3^{\Delta}$	$2.55 \pm 0.23^{\Delta}$

注:与 C 组比较: * $P < 0.01$; 与 S 组比较: $^{\#} P < 0.01$; 与 SS 组比较: $^{\Delta} P < 0.01$

2.2 伸趾长肌内 3-MH 含量的变化(表 1): S 组伤后 12 h 伸趾长肌内 3-MH 含量为 $(2.68 \pm 0.21) \mu\text{mol/g}$ 较 C 组 $(2.10 \pm 0.22) \mu\text{mol/g}$ 显著升高 ($P < 0.01$); SS 组伤后 12 h 伸趾长肌内 3-MH 含量为 $(3.32 \pm 0.24) \mu\text{mol/g}$, 显著高于 C 组和 S 组 (P 均 < 0.01)。SI 组 $[(2.31 \pm 0.19) \mu\text{mol/g}]$ 和 SSI 组 $[(2.55 \pm 0.23) \mu\text{mol/g}]$ 伤后 12 h 伸趾长肌内 3-MH 含量分别较 C 组和 SS 组均显著降低 (P 均 < 0.01)。

2.3 伸趾长肌 Ub 系统相关成分的基因表达(图 1): Ub 有一个多基因家族编码,不同长度的 mRNA 编码含有不同数目 Ub 分子的蛋白质,翻译后经修饰、酶切形成 Ub 单体发挥作用^[5]。Northern blot 结果显示, S 组伤后 12 h 伸趾长肌内 Ub mRNA 表达水平较 C 组显著增强,其中以 2.4 kb 条带增强更显著 ($P < 0.01$)。SS 组伤后 12 h 伸趾长肌内 Ub mRNA 表达水平显著强于 C 组和 S 组 (P 均 < 0.01)。SI 组和 SSI 组伤后 12 h 伸趾长肌内 Ub mRNA 表达水平分别较 S 组和 SS 组显著降低 (P 均 < 0.01),其中 1.2 kb 条带降低更显著。

3 讨论

严重烫伤/脓毒症等危重病时常伴有 IR 现象,又称为“外科糖尿病”^[6,7]。所谓 IR 是指机体对一定

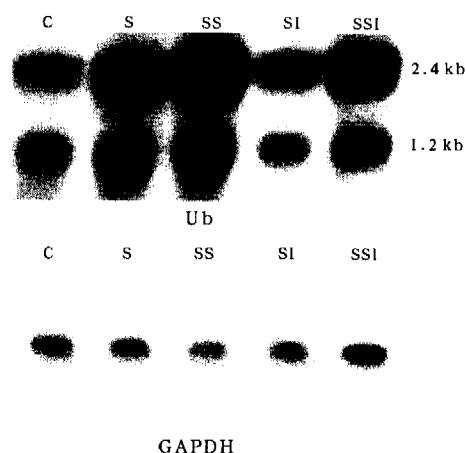


图 1 伸趾长肌内 Ub mRNA 表达变化
Figure 1 Expressions of ubiquitin mRNA in extensor digitorum longus muscle

浓度胰岛素的生物反应低于正常,即对胰岛素的敏感性和反应性下降。相对于糖尿病患者发生的慢性 IR 而言,由创伤、感染、手术、情绪激动等引起的胰岛素作用相对不足称为急性 IR。目前研究认为,急性 IR 时血中胰岛素浓度正常或稍高,而血糖浓度却高于生理水平这一直观表现,主要是与胰岛素刺激糖转运蛋白摄取葡萄糖的能力减弱有关。高血糖症能导致机体对感染的易感性增加,促进炎症反应(增强多核淋巴细胞和单核细胞产生炎症介质,抑制中性粒细胞和淋巴细胞功能),影响微循环(减少内皮细胞、一氧化氮水平)等一系列危害,影响危重病患者的预后^[8,9]。

但是,IR 潜在的危害远不止此。实质上,组织对胰岛素敏感性降低是对脂肪、蛋白质和糖以及水、电解质平衡及交感神经等所有生物效应的抵抗,因此高血糖仅仅是糖代谢障碍的一个表征。危重病时 IR 与蛋白高代谢的关系早已受到很多学者的重视,但受限于胰岛素受体后作用机制和蛋白降解生物学机制研究的滞后,一直未能取得突破。最近有大样本临床试验报道,严格控制外科危重病患者的血糖水平能够减少严重感染的发病率和脓毒症的病死率^[10]。也有基础研究表明,胰岛素受体后作用机制与泛素-蛋白酶体途径有着密切的关系。正是基于此,本实验中分析了胰岛素强化治疗对严重烫伤/脓毒症骨骼肌蛋白高降解的影响与机制。

3.1 适合胰岛素强化治疗研究的严重烫伤和脓毒症动物模型的建立: 由于使用胰岛素强化治疗,容易导致低血糖反应,需要反复抽血检测血糖值,及时调整胰岛素的用量,因此选用体重较大的动物——兔

作为实验对象,较为理想。在本实验中,我们成功地建立了兔严重烫伤和脓毒症代谢模型。家兔胆小易于受惊,因此在管理中应注意适应性饲养时操作尽可能轻、稳、静,保持安静的环境,尽可能地减少对兔的惊吓,减少对实验的干扰因素。虽然日本大耳白兔的两耳长大高举、血管清晰,易于采血和注射,但在实验中发现,严重烫伤后即使给予及时的液体复苏,兔外周动、静脉血管仍会处于严重的收缩状态,血流量锐减,很难采到理想的血标本,建立恰当的静脉采血通道成为进行胰岛素强化治疗的关键问题之一。本实验中采用经耳缘静脉输液,颈静脉插管作为采血通道(导管向近心端插入 4.5~5.0 cm,达中心静脉),较好地解决了这一问题。此外我们采用 Meeh's 计算公式,利用模具保护的方法保证了相对统一的烫伤严重程度。

3.2 胰岛素强化治疗的理论基础:如上所述严重烫伤/脓毒症等危重病时,多种因素可导致组织对胰岛素敏感性下降,所谓敏感性下降是指胰岛素的剂量反应曲线右移。研究表明,增强胰岛素浓度可达到正常的最大效应。此外,严重烫伤/脓毒症等危重病时血糖显著升高,但血胰岛素含量仅维持在生理水平,这提示存在胰岛 B 细胞分泌胰岛素功能相对不足,这与体内糖皮质激素和儿茶酚胺作用增强有关。据此,在有效补给营养的前提下,补充外源性胰岛素在理论上应该是对严重烫伤/脓毒症等危重病时体内胰岛素作用相对不足的一种替代治疗。

3.3 胰岛素强化治疗对严重烫伤/脓毒症时骨骼肌蛋白高降解的影响:本实验中首次采用有确定指标(控制血糖在生理水平)的全身使用胰岛素治疗严重烫伤/脓毒症模型动物,观察其对骨骼肌蛋白降解的影响与机制。在实验中,我们采用伤后 2 h 才开始给予胰岛素强化治疗,以尽可能地模拟临床严重烫伤患者伤后救治的实际情况。实验结果证实,严重烫伤特别是复合内毒素攻击后动物体内存在严重的胰岛素相对作用不足现象,伤后 12 h 骨骼肌蛋白降解率显著升高,而使用胰岛素强化治疗能显著减轻严重烫伤/脓毒症后骨骼肌蛋白高降解。本实验中既测定了尿内 3-MH 的排出量,也测定了骨骼肌内 3-MH 的含量。这是因为,虽然尿内 3-MH 主要来源于肌肉蛋白的代谢,但是难免会受到其他组织源性(如皮肤等)3-MH 的干扰,所以,严格意义上讲,尿内 3-MH 的排出量反映的是全身代谢,而骨骼肌组织内 3-MH 含量更直接地反映了骨骼肌的蛋白降解。本实验结果表明,尿内 3-MH 的排出量与伸

趾长肌内 3-MH 含量二者之间的变化有高度相关性,进一步客观地反映了机体内骨骼肌蛋白降解的变化。遗憾的是,由于胰岛素强化治疗容易导致低血糖反应,需要严密的监护,本实验仅就胰岛素强化治疗对伤后早期(12 h)严重烫伤/脓毒症动物的骨骼肌蛋白高降解的影响进行了探讨,远期效果尚需进一步观察。

3.4 胰岛素强化治疗调节严重烫伤/脓毒症时骨骼肌蛋白高降解的机制:研究表明胰岛素能够与细胞核内多种 DNA 转录启动子结合,调节数百种基因的转录与表达^[11]。本研究结果显示,严重烫伤特别是复合内毒素攻击后,动物伸趾长肌内 Ub 基因表达显著增强,而使用胰岛素强化治疗能显著降低基因表达。既往研究发现,严重烫伤/脓毒症时骨骼肌细胞内泛素-蛋白酶体途径活性增强是蛋白高降解的重要原因,这提示胰岛素强化治疗可能是通过在基因水平抑制泛素-蛋白酶体途径的活性,而降低严重烫伤/脓毒症时骨骼肌蛋白高降解。

参考文献:

- Long W, Barrett E J, Wei L P, et al. Adrenalectomy enhances the insulin sensitivity of muscle protein synthesis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 284: E102-E109.
- Hu R H, Yu Y M, Costa D, et al. A rabbit model for metabolic studies after burn injury[J]. J Surg Res, 1998, 75: 153-160.
- 申传安, 柴家科, 姚咏明, 等. 肿瘤坏死因子在烧伤脓毒症大鼠骨骼肌蛋白高降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.
- 申传安, 柴家科, 姚咏明, 等. 蛋白酶体-C2 亚基基因在烧伤脓毒症大鼠心肌内的表达及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 200-202.
- Hayashi T M N, Matsuda M. Nucleotide sequence and expression of rat polyubiquitin mRNA[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1218: 232-234.
- Thorell A, Nygren J, Hirshman M F, et al. Surgery-induced insulin resistance in human patients: relation to glucose transport and utilization[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 1999, 276: E754-E761.
- Ljungqvist O, Nygren J, Thorell A, et al. Insulin resistance and elective surgery[J]. Surgery, 2000, 127: 757-760.
- Marik P E, Raghavan M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis[J]. Intensive Care Med, 2004, 30: 748-756.
- Baird T A, Parsons M W, Phan T, et al. Persistent poststroke hyperglycemia is independently associated with infarct expansion and worse clinical outcome[J]. Stroke, 2003, 34: 2208-2214.
- Berghe G V, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients[J]. N Engl J Med, 2001, 345: 1359-1367.
- Rome S, Clément K, Rabasa-Lhoret R, et al. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates ~800 genes during a hyperinsulinemic clamp[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 18063-18068.

(收稿日期: 2005-07-26 修回日期: 2006-02-14)

(本文编辑: 李银平)