

• 论著 •

胰岛素强化治疗拮抗烫伤大鼠
心肌细胞凋亡的机制研究

吕根法 石宏伟 樊磊 冯志明 王光远

【摘要】 目的 探讨大鼠重度烫伤后胰岛素强化治疗拮抗心肌细胞凋亡的作用及机制。**方法** 将 18 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假伤组、烫伤组和胰岛素强化治疗组(强化治疗组),每组 6 只。制作 30% 总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤模型及胰岛素强化治疗模型。伤后 6 h 取大鼠左室心肌组织,采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡,用免疫组化和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)分别观察 3 种凋亡相关基因天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达。**结果** 与假伤组比较,烫伤后心肌凋亡细胞明显增多[(13.1±3.4)%比(0.6±0.4)%, $P<0.01$];caspase-3、Bax 的蛋白表达明显增高(免疫组化 caspase-3:13.72±4.13 比 1.36±0.95, Bax:29.64±5.42 比 2.24±1.04; Western blotting caspase-3:5.72±2.13 比 1, Bax:4.64±1.42 比 1),而 Bcl-2 表达水平显著降低(免疫组化:3.39±1.52 比 8.01±2.56; Western blotting:0.69±0.42 比 1,均 $P<0.01$)。经胰岛素强化治疗后,心肌细胞的凋亡率较烫伤组明显降低[(6.7±1.8)%比(13.1±3.4)%, $P<0.01$],3 种凋亡相关基因的蛋白表达水平正好与烫伤组的变化相反(免疫组化 caspase-3:8.88±3.36 比 13.72±4.13, Bax:14.43±3.69 比 29.64±5.42, Bcl-2:8.61±3.72 比 3.39±1.52; Western blotting caspase-3:2.18±0.86 比 5.72±2.13, Bax:2.87±1.35 比 4.64±1.42, Bcl-2:3.57±1.70 比 0.69±0.42, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 胰岛素强化治疗可能通过调节 caspase-3、Bax 和 Bcl-2 3 种细胞凋亡相关基因的表达,对烫伤后心肌细胞发挥抗凋亡作用。

【关键词】 烫伤; 胰岛素强化治疗; 心肌细胞; 凋亡

Intensive insulin treatment protected the cardiac myocytes against apoptosis in severely scalded rats LU Gen-fa, SHI Hong-wei, FAN Lei, FENG Zhong-ming, WANG Guang-yuan. Department of Burns and Plastic Surgery, Hospital 534 of PLA, Luoyang 471003, Henan, China

Corresponding author: LU Gen-fa, Email: genfalu@yahoo.com.cn ;

【Abstract】 Objective To investigate the effect of intensive insulin treatment, in the protection of myocytes against apoptosis in severely scalded rats and its underlying mechanism. **Methods** Eighteen Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups (6/each) to receive: sham surgery, burn damage (on the back of the animals, degree Ⅲ, to 30% of total body surface area), and burn damage + intensive insulin treatment. Tissue samples were collected from the left ventricle 6 hours after infliction of the burn damage for the examination of myocardial cell apoptosis [by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) staining] and the expression of apoptosis-related molecules caspase-3, Bax, and Bcl-2 (by immuno-histochemistry and Western blotting). **Results** In comparison with the animals in sham treated group, the myocyte apoptosis rate in animals in burn damage only group increased significantly [(13.1±3.4)% vs. (0.6±0.4)%, $P<0.01$]. The expression of caspase-3 and Bax both significantly increased while the level of Bcl-2 expression significantly decreased (immuno-histochemistry caspase-3: 13.72±4.13 vs. 1.36±0.95, Bax: 29.64±5.42 vs. 2.24±1.04, Bcl-2: 3.39±1.52 vs. 8.01±2.56; Western blotting caspase-3: 5.72±2.13 vs. 1, Bax: 4.64±1.42 vs. 1, Bcl-2: 0.69±0.42 vs. 1, all $P<0.01$). The animals received intensive insulin treatment showed significantly less myocyte apoptosis [(6.7±1.8)% vs. (13.1±3.4)%, $P<0.01$], significantly lower expression in caspase-3, Bax, and significantly higher level of Bcl-2 expression as compared to the animals in burn damage only group (immuno-histochemistry caspase-3: 8.88±3.36 vs. 13.72±4.13, Bax: 14.43±3.69 vs. 29.64±5.42, Bcl-2: 8.61±3.72 vs. 3.39±1.52; Western blotting caspase-3: 2.18±0.86 vs. 5.72±2.13, Bax: 2.87±1.35 vs. 4.64±1.42, Bcl-2: 3.57±1.70 vs. 0.69±0.42, $P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Intensive insulin therapy may protect myocytes against apoptosis in severely burned animals through the regulation of the expression of apoptosis-related molecules caspase-3, Bax and Bcl-2.

【Key words】 Burn; Intensive insulin treatment; Myocardium; Apoptosis

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.12.003

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30772250),河南省洛阳市应用技术与开发项目(1101051A)

作者单位:471003 河南洛阳,解放军第五三四医院烧伤整形科

通信作者:吕根法,Email:genfalu@yahoo.com.cn

胰岛素强化治疗能够有效改善危重患者重要器官功能,明显降低多器官功能障碍综合征(MODS)的发病率及病死率。严重烧伤早期由于心肌缺血、缺氧可造成心肌细胞损害和心功能不全,近年来的研

究显示,心脏在缺血、缺氧时,胰岛素具有显著的心肌细胞保护作用。凋亡作为细胞损害的一种最终结果,在烧伤早期心功能不全的发生中起到重要作用^[1-2]。本研究中通过建立 30% 总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤大鼠模型及胰岛素强化治疗模型,观察心肌细胞凋亡的变化,旨在探讨胰岛素强化治疗的抗凋亡作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器:凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程公司);天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、Bax、Bcl-2 抗体(美国 Cell Signal 公司);HPIAS-1000 病理图文管理系统(武汉千屏影像技术有限责任公司),Alphamager™2200 凝胶图像分析系统(美国安莱公司)。

1.2 动物模型及分组:健康雄性 SD 大鼠 18 只,体重 200~250 g,由第四军医大学动物中心提供,动物合格证号:SCXK(军 2005-009)。按随机数字表法均分为假伤、烫伤和强化治疗 3 组,模型的制作参照文献^[3]方法。伤后 6 h 处死大鼠,取左心室组织标本用于蛋白检测。本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 原位末端缺刻标记法(TUNEL)定量检测凋亡细胞:石蜡切片常规脱蜡,按试剂盒程序说明检测凋亡细胞,用单盲法进行观察、计数,每张切片随机选取 10 个视野($\times 40$),计数至少 200 个细胞核,计算凋亡指数(AI=凋亡阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)。

1.4 免疫组化检测 3 种凋亡相关基因的蛋白表达:石蜡切片脱蜡,按常规进行免疫组化染色,一抗浓度 caspase-3 为 1:200、Bax 为 1:100、Bcl-2 为 1:200,二抗所用浓度均为 1:400。HPIAS-1000 病理图文管理系统吸光度(A)值扫描,每张切片取 5 个视野的平均值。

1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 3 种凋亡相关基因的蛋白表达:取左心室组织,加组织细胞裂解液匀浆,提取蛋白,二喹啉甲酸法(BCA

法)定量,12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),每个泳道上样量 40 μ g,半干转膜,5%脱脂牛奶封闭,分别加 caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的一抗(浓度均为 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:4 000),化学发光、显影、压片,Alphamager™2200 凝胶图像分析系统灰度扫描并以与假伤组灰度值比值表示。

1.6 统计学处理:数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞凋亡变化(图 1;表 1):正常心肌细胞核呈淡蓝色,凋亡后表现为黄色固缩核。假伤组大鼠心肌几乎无明显的凋亡细胞。烫伤组可见黄色颗粒数目明显增加,表明凋亡细胞较假伤组明显增多,AI 明显升高($P<0.01$)。强化治疗组 AI 较烫伤组明显下降,表现出明显的抗凋亡作用($P<0.01$)。

图 1 假伤组(a)、烫伤组(b)、胰岛素强化治疗组(c)大鼠心肌细胞凋亡变化 TUNEL $\times 200$

2.2 心肌细胞凋亡相关基因表达的变化(表 1;图 2~5):免疫组化染色显示,烫伤后 caspase-3 和 Bax 蛋白表达明显高于假伤组,Bcl-2 蛋白表达则显著低于假伤组(均 $P<0.01$)。经过胰岛素强化治疗后,caspase-3 和 Bax 蛋白表达明显低于烫伤组,Bcl-2 蛋白表达显著高于烫伤组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。进一步通过 Western blotting 测定显示,强化治疗组与烫伤组 3 种凋亡相关基因蛋白表达水平变化与免疫组化的结果基本相同。

表 1 胰岛素强化治疗对烫伤大鼠心肌细胞 AI 及 3 种凋亡相关基因蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	AI (%)	免疫组化法检测蛋白表达			Western blotting 法检测蛋白表达		
			caspase-3	Bax	Bcl-2	caspase-3	Bax	Bcl-2
假伤组	6	0.6 $\pm$ 0.4	1.36 $\pm$ 0.95	2.24 $\pm$ 1.04	8.01 $\pm$ 2.56	1	1	1
烫伤组	6	13.1 $\pm$ 3.4 ^a	13.72 $\pm$ 4.13 ^a	29.64 $\pm$ 5.42 ^a	3.39 $\pm$ 1.52 ^a	5.72 $\pm$ 2.13 ^a	4.64 $\pm$ 1.42 ^a	0.69 $\pm$ 0.42 ^a
强化治疗组	6	6.7 $\pm$ 1.8 ^c	8.88 $\pm$ 3.36 ^b	14.43 $\pm$ 3.69 ^c	8.61 $\pm$ 3.72 ^b	2.18 $\pm$ 0.86 ^b	2.87 $\pm$ 1.35 ^c	3.57 $\pm$ 1.70 ^b

注:AI,凋亡指数;Western blotting,蛋白质免疫印迹法;caspase-3,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3;与假伤组比较,^a $P<0.01$;与烫伤组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$

图 2 假伤组(a)、烫伤组(b)、胰岛素强化治疗组(c)大鼠心肌细胞天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 蛋白表达免疫组化 ×200

图 3 假伤组(a)、烫伤组(b)、胰岛素强化治疗组(c)大鼠心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达 免疫组化 ×200

图 4 假伤组(a)、烫伤组(b)、胰岛素强化治疗组(c)大鼠心肌细胞 Bax 蛋白表达 免疫组化 ×200

注, caspase-3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β -actin, β -肌动蛋白

图 5 蛋白质免疫印迹法检测 3 组大鼠心肌细胞

caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白表达

3 讨论

心肌细胞的损害在严重烧伤后心功能不全中具有重要的作用, 胰岛素强化治疗能够明显减轻脓毒症心肌细胞的损伤和改善心功能, 但具体的机制尚不清楚^[8]。缺血、缺氧是引起烧伤后心肌细胞损害的病理生理基础, 凋亡与坏死是其主要两种表现形式。在缺血、缺氧引起的心肌细胞损害中, 凋亡先于细胞坏死出现, 是早期(2~6 h)心肌细胞死亡的主要形式^[4], 因此, 如何有效抑制心肌细胞凋亡, 是防治烧伤后心功能不全的重要措施。近年来大量研究显示, 胰岛素除具有代谢调节作用外, 还具有显著的抗凋亡及促细胞生存的作用^[5]。

研究表明, 线粒体依赖的 caspases 激活是一条重要的心肌细胞凋亡途径^[6], 这一途径的激活触发了 caspases 的级联效应, 首先激活 caspase-9, 进而激活下游效应分子 caspase-3、6、7。Bcl-2/Bax 比例的变化是调控这一途径的关键, 上调 Bcl-2 基因表达能够拮抗此途径引起的细胞凋亡。胰岛素与受体结合后激活磷脂酰肌醇-3-肌酶(PI3K)/Akt 通路, 在细胞损伤修复和抗凋亡中发挥了重要作用。PI3K/Akt 可通过多种途径抑制凋亡, 促进细胞生存^[5]: ①直接磷酸化核转录因子, 抑制促凋亡基因和(或)增强抗凋亡基因的表达。正调控环磷酸腺苷(cAMP)应答元件结合蛋白(CREB)以及核转录因子- κ B(NF- κ B), 促进 Bcl-2 等转录因子表达。②直接磷酸化促凋亡基因。Akt 通过磷酸化 BAD, 下调 Bax 等表达, 失去在线粒体膜上与 Bcl-2 或 Bcl-xL 的拮抗作用。③磷酸化 caspase, 抑制其对抗凋亡分子的降解作用。由此可见, PI3K/Akt 通路的活化对细胞的生存至关重要。

张家平等^[1]研究发现, 心肌凋亡细胞增加在烧伤后心功能受损中占有重要地位。本研究中通过对心肌细胞 TUNEL 染色检测发现, 烫伤后左心室的心肌凋亡细胞显著增多, 经胰岛素强化治疗后, 心肌细胞凋亡率明显降低, 提示烧伤后早期使用胰岛素可能通过减少细胞凋亡, 从而抑制有效收缩单位的丢失, 可发挥其对心肌细胞的保护作用。本研究中进一步通过对线粒体依赖的 caspases 激活途径的观察, 探讨胰岛素拮抗心肌细胞凋亡的分子机制。Caspase-3、Bax、Bcl-2 分别是 caspases 途径的重要分子。免疫组化和 Western blotting 检测结果均显示烫伤后促凋亡基因 caspase-3、Bax 表达显著增高, 而抗凋亡基因 Bcl-2 表达明显降低; 经胰岛素强化治疗后, caspase-3、Bax 表达明显降低, Bcl-2 表达

则显著增高。

本课题组前期的研究已得出严重烫伤后胰岛素强化治疗能明显激活 PI3K/Akt 通路的结论^[7]。结合本研究结果可以认为:胰岛素通过激活 PI3K/Akt 通路,调控线粒体依赖的 caspases 途径,抑制促凋亡基因和增强抗凋亡基因的表达,可能是其发挥抗心肌细胞凋亡、保护心功能的作用机制之一。

参考文献

- [1] 张家平,黄跃生,周新,等.严重烫伤大鼠心肌细胞凋亡与心功能损害的关系.中华烧伤杂志,2002,18:272-275.
- [2] Carlson DL, Lightfoot E Jr, Bryant DD, et al. Burn plasma mediates cardiac myocyte apoptosis via endotoxin. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282, H1907-1914.
- [3] 张震,董士民,刘涛.胰岛素强化治疗对严重脓毒症患者心功能

的影响.中国危重病急救医学,2011,23:104-105.

- [4] Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. Cardiovasc Res, 2003, 59, 132-142.
- [5] Martelli AM, Faenza I, Billi AM, et al. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling, new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? Cell Signal, 2006, 18, 1101-1107.
- [6] Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature, 2001, 410, 549-554.
- [7] 吕根法,侯宏义,陈璧,等.胰岛素强化治疗对烫伤大鼠心肌细胞作用的初步研究.中国危重病急救医学,2008,20:724-726.

(收稿日期,2011-07-24)

(本文编辑,李根平)

• 消息 •

中国科技论文统计结果:2010 年国际论文被引用篇数较多的前 20 位医院排名

单位	被引用 被引用 2010 年论文数增长趋势				排	单位	被引用 被引用 2010 年论文数增长趋势				排
	篇数	次数	SCI	MEDLINE			篇数	次数	SCI	MEDLINE	
四川大学华西医院	307	727	23.8	-19.6	1	南京医科大学第一附属医院	152	350	23.9	11.2	11
第四军医大学西京医院	280	707	24.2	18.3	2	中山大学第一附属医院	145	348	10.5	-15.7	12
北京大学第一医院	243	613	-3.5	-21.3	3	北京大学第三医院	134	278	42.0	5.1	13
上海交通大学医学院附属瑞金医院	210	627	10.5	13.1	4	复旦大学附属中山医院	132	389	-20.7	8.2	14
中国医学科学院阜外心血管病医院	198	477	-11.4	-26.2	5	浙江大学医学院第二附属医院	131	303	17.8	-8.9	15
解放军总医院	167	339	60.5	-3.3	6	北京协和医院	130	281	55.3	-21.7	16
浙江大学医学院第一附属医院	162	451	17.2	19.5	7	华中科技大学附属协和医院	128	275	24.9	-63.6	17
南京军区南京总医院	160	370	-12.9	-20.7	8	北京大学人民医院	127	248	0.9	-29.9	18
华中科技大学同济医院	158	335	26.3	9.7	9	第三军医大学西南医院	117	264	56.7	-12.9	19
山东大学齐鲁医院	153	338	-1.7	1.0	10	中南大学湘雅二医院	116	303	54.9	-32.5	20

中国科技论文统计结果:2010 年国内论文被引用次数较多的前 20 位医院排名

单位	被引用次数 排名			单位	被引用次数 排名		
	次数	排名	排名		次数	排名	排名
解放军总医院	12 603	1	1	上海交通大学医学院附属瑞金医院	4 058	11	11
北京协和医院	7 617	2	2	第三军医大学西南医院	3 915	12	12
四川大学华西医院	6 191	3	3	第四军医大学西京医院	3 894	13	13
北京大学第一医院	5 594	4	4	北京大学人民医院	3 771	14	14
华中科技大学同济医院	5 492	5	5	南京医科大学第一附属医院	3 549	15	15
中山大学第一附属医院	4 494	6	6	复旦大学附属华山医院	3 437	16	16
南京军区南京总医院	4 404	7	7	中南大学湘雅医院	3 412	17	17
第二军医大学长海医院	4 375	8	8	中南大学湘雅二医院	3 379	18	18
华中科技大学附属协和医院	4 203	9	9	北京大学第三医院	3 366	19	19
南方医科大学南方医院	4 153	10	10	第二军医大学长征医院	3 359	20	20

中国科技论文统计结果:2010 年表现不俗论文较多的前 20 位医院排名

机构名称	表现不 全部 表现不俗 排				机构名称	表现不 全部 表现不俗 排			
	俗论文	论文	论文比例	名		俗论文	论文	论文比例	名
四川大学华西医院	100	634	15.77	1	第二军医大学长征医院	29	192	15.10	16
第四军医大学西京医院	57	313	18.21	2	第三军医大学西南医院	29	188	15.43	16
上海交通大学医学院瑞金医院	57	262	21.76	2	四川大学华西口腔医院	29	168	17.26	16
南京医科大学第一附属医院	48	218	22.02	4	第二军医大学长海医院	28	182	15.38	19
山东大学齐鲁医院	38	173	21.97	5	复旦大学华山医院	28	200	14.00	19
解放军总医院	36	305	11.80	6	上海交通大学医学院第九人民医院	23	192	11.98	21
上海交通大学医学院仁济医院	36	127	28.35	6	第三军医大学大坪医院	23	115	20.00	21
浙江大学第一附属医院	36	286	12.59	6	第四军医大学口腔医院	22	109	20.18	23
华中科技大学同济医学院协和医院	35	281	12.46	9	哈尔滨医科大学第一附属医院	22	117	18.80	23
上海交通大学医学院第六人民医院	35	203	17.24	9	北京大学第一附属医院	21	137	15.33	25
华中科技大学同济医学院同济医院	33	226	14.60	11	第二军医大学东方肝胆外科医院	21	67	31.34	25
中山大学第一附属医院	33	190	17.37	11	浙江大学第二附属医院	21	172	12.21	25
北京协和医院	31	205	15.12	13	中南大学湘雅二医院	20	141	14.18	28
中国医科大学第一附属医院	31	213	14.55	13	北京大学第三附属医院	18	169	10.65	29
复旦大学肿瘤医院	30	95	31.58	15	北京大学人民医院	18	114	15.79	29