DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.001

烫伤小鼠早期 IL-6在骨骼肌蛋白质降解中作用的研究*

论著

李书武** 董燕麟 (第三军医大学基础医学部生物化学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨严重烫伤早期 IL-6的动态变化及对骨骼肌蛋白质分解代谢的影响。方法: 以含一侧后肢在内的 18%~ 20% TBSA Ⅲ度烫伤 Balb/c小鼠为模型,观察伤后 7 d内血清与比目鱼肌 IL-6含量及比目鱼肌酪氨酸释放量(TNR);正常小鼠注射 IL-6及烫伤小鼠注射 IL-6抗血清对 TNR的影响。结果: 伤肢比目鱼肌 IL-6含量明显升高,持续 3 d左右。未伤肢变化趋势与伤肢基本一致,但明显低于伤肢。烫伤后两侧比目鱼肌 TNR变化不同,伤肢在第 3日达到峰值,然后呈下降趋势,未伤肢除第 2日高于正常组外,与正常组差别均不明显。正常小鼠注射 IL-6后 TNR明显升高,而烫伤小鼠在注射 IL-6抗血清后则伤肢 TNR显著降低。结论: 烫伤早期机体 IL-6升高与烫伤局部炎症反应有关,高水平 IL-6能促进机体外周蛋白质分解。

关键词 白细胞介素-6;酪氨酸释放量;烫伤;比目鱼肌

中图法分类号 Q512; R644

创伤后骨骼肌蛋白质分解加强,以往认为主要是胰高血糖素、糖皮质激素在创伤后升高所致[1]。近年来的研究认为细胞因子等炎症介质在介导创伤后早期高代谢状态中也起重要作用。研究证实 TNFα, IL-1在创伤后组织中升高并参与外周蛋白质代谢[2,3]。IL-6在创伤后也显著升高[4],并受 TNFα, IL-1的诱导[5]。创伤后 IL-6在机体内的动态变化以及对外周蛋白质的分解代谢的影响,还不清楚。本研究以烫伤小鼠为模型探讨烫伤后 IL-6的动态变化与骨骼肌蛋白质分解代谢之间的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

氨基酸(味之素株式会社 日本),亚硝基萘酚(Fluka德国),rIL-6(1× 10^5 u/mg)及 IL-6单抗(1∶500)(军事医学科学院)。

1.2 动物模型

Balb/c小鼠,鼠龄 7~ 10周,体重 18~ 22 g(第三军医大学实验动物中心供应),浸于 89℃水浴中 3 s造成背部 2 cm× 3 cm和一后肢在内的 18%~ 20% 体表面积Ⅲ度烫伤。

1.3 实验方法

Balb/c小鼠,雌雄各半,随机分为五组,每组分别设对照组和烫伤组。第一组和第二组小鼠烫伤后 1, 2, 3, 5, 7 d(PBD)断头处死,测定血清 IL-6(sIL-6),比目鱼肌(sm)的酪氨酸净释放量(TNR)和 IL-6含量。第三组以 IL-6(125μg/kg体重)尾静脉注射正常小鼠,每 3 h注射一次,第一次注射后 6 h测定 sIL-6, smIL-6和 TNR。第四组正常小鼠 sm体外加 IL-6(750 ng/ml)孵育 6 h后测定 TNR,第五组对烫伤小鼠每隔 12 h腹腔注射 IL-6单抗(0.01 ml)一次,在伤后 1, 2, 3 d断头处死,测定 TNR。TNR测定参照黄涛生[6]和蔡祝辉[7]等的方法。

2 结果

烫伤后,比目鱼肌蛋白质分解情况动态变化结果见表 1

表 1 烫伤肢、未烫伤肢比目鱼肌 TNR及动态变化(Try nmol/2h· g湿组织)

Tab 1 TNR changes of soleus muscle in scalded leg and unscalded leg (Try nmol/2h· g wet tissue)

	Control	Leg-Scalded					Leg-Unscalded				
	PBD0	PBD1	PBD2	PBD3	PBD5	PBD7	PBD1	PBD2	PBD3	PBD5	PBD7
$\bar{x}$	214.3	165.1*	201.3	314.3*	291.3*	250.3*	214.6	260.2*	216.1	209.8	209.8
s	10.2	8.8	14.8	10.4	14.9	9.1	15.3	10.1	7.2	11.1	14.2
n	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

*: $P < 0.05$ *vs* control PBD: postburn days

烫伤后小鼠血清、比目鱼肌中 IL-6含量动态变化结果见 表 2, 3

* 全军"八五"攻关课题

** 李书武,男,29岁,住院医师,硕士 现在附属西南医院输血科 重庆, 400038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 烫伤肢、未烫伤肢比目鱼肌中 IL-6含量变化 (W_B /ng·100 mg^{-1}湿组织)

Tab 2 Changes of IL-6 in soleus muscle of scalded leg and unscalded leg ((W_B /ng·100 mg^{-1} wet tissue)

	Control	Leg-Scalded					Leg-Unscalded				
	PBD0	PBD1	PBD2	PBD3	PBD5	PBD7	PBD1	PBD2	PBD3	PBD5	PBD7
$\bar{x}$	0.17	6.18*	5.66*	4.96*	4.69*	3.94*	4.33*	4.14*	4.20*	3.63*	2.90*
s	0.01	1.07	0.37	0.69	0.64	0.43	0.41	0.27	0.98	0.35	0.63
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

* : P < 0.01 *vs* control

表 3 烫伤后小鼠血清中 IL-6的动态变化 (ρ_B /ng·ml^{-1})

Tab 3 Dynamic changes of sIL-6 of scalded mice (ρ_B /ng·ml^{-1})

	Control	PBD1	PBD2	PBD3	PBD5	PBD7
$\bar{x}$	< 0.07	6.84*	6.67*	6.46*	4.97*	3.66*
s		0.83	1.07	0.53	0.67	0.61
n	14	10	10	10	10	10

* : P < 0.01 *vs* control

正常小鼠尾静脉注射 IL-6后机体 IL-6含量及 Tyr净释放量结果见表 4

表 4 小鼠尾静脉注射 rIL-6后血清 IL-6含量,比目鱼肌的 IL-6含量,与酪氨酸净释放量 [W_B(IL-6) /ng·100 mg^{-1}湿组织](Tyr nmol/2h·g湿组织)

Tab 4 The contents of IL-6, smIL-6 and TNR of soleus muscle after iv IL-6 in mice [W_B(IL-6) /ng·100 mg^{-1} wet tissue] (Tyr nmol/2h·g wet tissue)

	Control			iv IL-6 group		
	sIL-6	smIL-6	TNR	sIL-6	smIL-6	TNR
$\bar{x}$	< 0.07	0.17	214.3	12.3	8.34	384.6
s		0.01	10.2	0.9	1.1	16.6
n	14	28	20	10	20	20

* : P < 0.01 *vs* control

正常小鼠比目鱼肌加 IL-6孵育后蛋白质分解情况结果见表 5

表 5 比目鱼肌体外加 rIL-6温育后酪氨酸净释放量 (Tyr nmol/2h·g湿组织) ($\bar{x}$±s)

Tab 5 TNR of soleus muscle after cultivated with IL-6 (Tyr nmol/2h·g wet tissue) ($\bar{x}$±s)

	n	TNR
Control	20	224.3± 16.1
IL-6 group	20	294.1± 15.3*

* : P < 0.01 *vs* control

小鼠烫伤后,用 IL-6单抗腹腔注射,比目鱼肌蛋白质分解情况见表 6

表 6 腹腔注射 IL-6单抗烫伤小鼠后比目鱼肌 TNR含量的变化 (Tyr nmol/2h·g湿组织)

Tab 6 Change of TNR in soleus muscle of scalded mice after IL-6 McAb intraperitoneal injection (Tyr nmol/2h·g wet tissue)

	Control	Leg-Scalded			Leg-Unscalded		
	PBD0	PBD1	PBD2	PBD3	PBD1	PBD2	PBD3
$\bar{x}$	214.3	167.8	200.8	281.5	214.3	226.3	202.6
s	10.2	14.9	16.1	8	10.7	2.9	13.8
n	10	5	5	5	5	5	5

* : P < 0.05 *vs* control

3 讨论

烫伤小鼠无论肌组织还是血清中 IL-6水平都显著升高. 血清中的动态变化与烧伤病人血清中 IL-6含量变化趋势相一致[4,5],肌肉组织内 IL-6变化未见其他报道. 本研究中观察到的结果提示 IL-6参与了创伤的早期反应. 创伤后机体合成分泌 IL-6增多的机理还不清楚,目前一般认为创伤后肠源性感染引起体内内毒素增加激活了单核巨噬细胞产生大量 IL-6[8]. 梁华平等[9]报道淋巴细胞也是由内毒素激活并参与创伤后 IL-6的生成.

小鼠在严重烫伤后的第 1天血清及肌组织中 IL-6含量就显著升高,持续 3 d左右,第 5天开始下降,第 7天时明显低于前 3天. 在伤肢, IL-6含量在前 3天明显高于未伤肢相同时相点. 这种差异提示,创伤早期 IL-6的合成主要来自创伤局部,并影响血液及未伤肢的 IL-6含量. 创伤局部炎症细胞浸润可能是局部 IL-6合成增多的主要原因. 在第 5天、第 7天伤肢、未伤肢比目鱼肌 IL-6含量相比较差异不明显,可能这时烫伤引起的全身反应起主要作用. 烫伤前 3天,局部反应强烈, IL-6主要以创伤局部产生为主,第 5天以后,局部反应减弱,创伤引起全身反应使创伤局部和整体之

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

间相互缓冲,IL-6含量在全身渐趋平衡。有报道指出创(烧)伤后其他部位的细胞如淋巴细胞,肠系膜细胞产生 IL-6的能力也显著增强,当受到 LPS、Con A等外界因素刺激时产生 IL-6的能力更强[9,10],这些因素也可能参与调节 IL-6在全身的分布。

rIL-6尾静脉注射正常小鼠,作用 6 h后,其比目鱼肌蛋白质分解增强,提示 IL-6对正常小鼠骨骼肌的分解代谢确有增强作用,同时本研究在正常小鼠比目鱼肌温育液中加入 rIL-6后,也能引起蛋白质分解速率的加快,证实 IL-6参与了骨骼肌蛋白质的分解代谢。烫伤小鼠腹腔注射 IL-6单抗能够减弱比目鱼肌的蛋白质分解,进一步说明 IL-6在创伤后比目鱼肌的蛋白质分解增强中起一定作用。本研究结果显示出烫伤小鼠比目鱼肌酪氨酸释放量不高于未烫伤小鼠比目鱼肌酪氨酸释放量时,IL-6单抗对酪氨酸释放量的抑制作用不明显。IL-6单抗起抑制作用仅在酪氨酸释放量大于正常对照时出现,抑制效率超过 10%,提示促使创伤后骨骼肌蛋白质分解受多种因素制约。烫伤后机体 IL-6水平变化与外周蛋白质分解时相上的差异,表现在伤后前 3天 IL-6持续高水平而蛋白质分解由低水平持续升高至峰值,以后伤肢 IL-6水平与 TNF显著相关(r = 0.98),可能是严重烫伤后的休克与应激引起的一种自我保护,使影响蛋白质分解的因素延迟并受多种因素制约的结果之一。

创伤后 IL-6升高并促进骨骼肌蛋白质分解的详细机理还不清楚。一些学者从不同方面进行了探讨,De Bant等[2]测定了烧伤病人尿中 3 MH肌酐值发现和血清 IL-6呈明显正相关,认为 IL-6在机体蛋白质更新和肌纤维蛋白质分解中起重要作用。Mateo等[11]用大鼠做实验,测定其血清和伤口渗出液中 IL-6水平,同时分离伤口处多形核细胞、巨噬细胞和纤维母细胞进行培养,发现伤后血清、伤口渗出液、细胞培养的上清液 IL-6都显著升高。Bank等[12]人观察到烧伤病人的渗出液中 IL-6和弹性蛋白酶活性之间存在相关关系,他们分离中性粒细胞,发现病理性高浓度 IL-6能显著诱导其脱颗粒释放溶酶体组织蛋白酶 G和弹性蛋白酶,并表现出浓度依赖性。Tsujinaka等[13]观察到 IL-6转基因小鼠的骨骼肌进行性萎缩,用免疫组化和原位杂交技术发现骨骼肌中蛋白水解酶 B、L和其 mRNA显著增多。IL-6通过中枢系统引起外周蛋白质分解增强作用也不容忽视,IL-6能够刺激下丘脑-垂体-肾上腺轴促使糖皮质激素释放,影响骨骼肌蛋白质的分解[14]。

参考文献

1 Bessey P Q. Early hormonal changes effect the catabolic response to trauma. Ann Surg, 1993, 218(4): 476

2 De Bant J P, Chollet-Martin S, Hernvann A. Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism. J Trauma, 1994, 36(5): 624

3 李　林,董燕麟. TNF对抗骨骼蛋白质分解代谢的影响.第三军医大学学报, 1995, 17(5): 382

4 Ueyama M, Maruyama Z, Osame M. Marked increase in plasma interleukin-6 in burn patients. J Lab Clin Med, 1992, 120(5): 693

5 Shalaby M R, Waage A, Aardenr L. Endotoxin, tumor necrosis factor and interleukin-1 induce interleukin-6 production *in vivo*. Clin Imnmunol Immunopathol, 1989, 53(3): 488

6 Huang T S, Dong Y L. Changes in protein metabolism of soleus muscle in scalded rats of the therapeutic effects of leucine and insulin. J Med Coll P L A, 1987, 2(3): 254

7 蔡祝辉.人血清中游离色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸的微量测定。生物化学及生物物理学进展, 1979, 11(1): 49

8 Bootha A J, Moore F A, Moore E E *et al*. Effects of accidental trauma on cytokine endotoxin production. Crit Care Med, 1994, 22(5): 894

9 梁华平,张　艳,耿　波.创伤小鼠 IL-6的变化。第三军医大学学报, 1994, 16(3): 161

10 Ogle C K, Mao J X, Wu J Z *et al*. The production of TNF, IL-1, IL-6 and PGE_2 by isolated enterocytes and gut macrophages: effect of LPS and thermal injury. J Burn Care Rehabil, 1994, 15: 470

11 Mateo Romto B, Jonathan S R, Jorge E A *et al*. Interleukin-6 activity in wounds. Am J Physiol, 1994, 266: R1844

12 Bank V, Deinhlod D, Kunz D. Effects of interleukin-6 and transforming growth factor-β on neutrophil elastase release inflammation, 1995, 19(1): 83

13 Tsujinaka J, Ebisuic, Fjita J. Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. Biochem Biophy Res Comm, 1995, 207(1): 168

14 Spath-Schwalbe E. IL-6 stimulates the hypothalamus-pituifary-adrenal axis in man. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79(4): 1212

(收稿: 1997-01-16,修回: 1997-08-11)

(编辑　冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Role of interleukin-6 in catabolism of skeletal muscle protein in the early stage after scalding in mice

Li Shuwu, Dong Yanlin (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the dynamic changes of interleukin-6 (IL-6) and its effects on catabolism of the skeletal muscle protein in the early stage after scalding. Methods: After a model of Balb/C mice inflicted with 18% ~ 20% TBSA full-thickness skin scald on the back and one hindleg was established, the protein catabolic rate (TNR) and the level of IL-6 in soleus muscle and serum were determined and the effects of IL-6 on TNR of normal mice and those of IL-6 antiserum on TNR of the scalded mice were observed during the first week after scalding. Results: The level of IL-6 was significantly increased and maintained during the first three days. TNR of the scalded leg was elevated to the peak on the 3rd day and then decreased gradually while that of the unscalded leg was increased only on the 2nd day after scalding. TNR was significantly increased when IL-6 was injected to the normal mice and IL-6 antiserum could significantly inhibit the increased TNR of the scalded mice when it was injected intraperitoneally. Conclusion: The increase of IL-6 is related with local inflammatory response in the early stage after scalding and the high level of IL-6 can increase the catabolic rate of muscle protein.

Key words interleukin-6; tyrosine net release; scalding; soleus muscle; mouse

科研简报

庚型肝炎病毒感染者肝组织中庚型肝炎病毒相关抗原的表达

The expression of hepatitis G virus-related antigens in the liver tissues of patients with HGV/GBV-C infection

聂青和* 谢 青** 胡大荣 李梦东 李 玲 (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆, 400038

庚型肝炎病毒(HGV)、GB病毒C型(GBV-C)是新近发现的一种正链RNA病毒,属黄病毒家族成员之一,现认为HGV、GBV-C为同一病毒的不同分离株。由于对此病毒的基因克隆成功,研究进展迅速,但均限于血清学抗体及病毒核酸的检测,对其感染者肝组织中病毒相关抗原表达的研究,尚未见报道。我们对12例非甲~戊型肝炎患者经血清学证实(抗HGV阳性、HGV RNA阳性)为HGV/GBV-C感染,经肝穿获取肝组织,应用免疫组化方法,以鼠抗HGV NS5单克隆抗体(由解放军三〇二医院免疫研究室程云主任惠赠)进行检测。单抗工作效价1:200。对照实验包括:① 省略一抗和二抗;② 以免疫前鼠IgG替代特异性抗体;③ 特异性抗体预先经抗原吸收;④ 以2例肝血管瘤患者及2例正常人肝组织作为对照。

结果:8例(66.67%)患者肝组织中检出HGV抗原,阳性信号位于胞浆中,阳性细胞可成散在、簇状或弥散性分布。阳性细胞周围可无明显炎性浸润及坏死,阳性表达的肝细胞也可位于坏死灶中或灶旁,碎屑坏死处可见HGV抗原表达。对照实验结果表明省略一抗和二抗后阳性信号消失,正常鼠IgG替代单抗结果呈阴性,特异性抗体经抗原吸收后再用于检测肝组织抗原,阳性信号明显受到抑制,2例肝血管瘤及2例正常人肝组织检测均阴性。

目前有关文献报道大多数HGV/GBV-C感染体内常有两种或两种以上肝炎病毒重叠感染,并认为HGV/GBV-C感染对原有HBV或HCV感染的基础病变无明显影响,而且HGV感染的动物模型肝组织病变也不明显。因此,对HGV/GBV-C的致病性产生怀疑,或认为HGV/GBV-C慢性感染的临床意义不大。本组病人均为单一HGV感染,不仅检测阳性率较高,而且对HGV感染的免疫病理可进行探讨。我们的初步研究结果表明HGV可在急、慢性肝炎患者肝组织中表达而且表达部位可见炎性坏死,提示HGV在肝炎肝损伤过程中可能有一定作用,其确切致病机理有待进一步研究。有关其它肝病患者肝组织中HGV/GBV-C抗原表达的研究尚在进行中。

关键词 庚型肝炎病毒; GB病毒C型; 单克隆抗体; 免疫组织化学

中图法分类号 R512.63

(收稿: 1997-07-15; 修回: 1997-09-22)

(编辑 王 红)

* 聂青和,男,36岁,主治医师,博士研究生

** 附属新桥医院病理科 重庆,400037

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net