DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.006

TNF-α 与烧伤后胰岛素抵抗相关性的研究

王占科* 许霖水 (第三军医大学基础医学部生物化学教研室) 重庆, 630038

提 要 目的: 确证 TNF-α 在烧伤后胰岛素抵抗发生中的作用。方法: 利用 30% TBSAIII°烫伤小鼠模型,检测伤后不同时相点血浆 TNF-α,血糖,胰岛素,乳酸和胰高血糖素的动态变化并进行相关性分析。同时用重组人 TNF-α(rh-TNF-α)注射正常小鼠和单克隆抗体(TNF-McAb)注射烫伤小鼠,观察上述相关指标的变化。结果: 严重烫伤小鼠 3 h 后出现胰岛素抵抗指标增高并可被 TNF-McAb 减轻。结论: 烧伤后机体 TNF-α 产生增多在胰岛素抵抗中起重要作用。

关键词 烧伤; TNF-α; 胰岛素抵抗
中图法分类号 R458.5

烧伤后出现胰岛素抵抗是烧伤重要的并发症之一,其详细机理不完全清楚。近来文献[1]报道,肥胖的大鼠脂肪细胞 TNF-α 超表达并与胰岛素抵抗程度呈正相关。烧(创)伤后多种组织的 TNF mRNA 表达增强,血中 TNF-α 水平升高并与烧(创)伤后高代谢的发生以及内脏多器官功能障碍密切相关[2,3]。但对于烧伤后机体 TNF-α 升高在胰岛素抵抗发病中的作用及其特点如何,国内外文献报道不多。为此,我们利用 30% TBSAIII°烫伤小鼠为模型,系统测定血浆 TNF-α 水平和胰岛素抵抗的相关指标的改变并进行相关系数(r)显著性(p)检验。与此同时分别给正常和烫伤小鼠注射重组人 TNF-α(rh-TNF-α)和 TNF-McAb,研究 TNF-α 在烧伤胰岛素抵抗中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

TNF-α、TNF-McAb、TNF-α 检测药盒(北京军事医学科学院);血糖试剂盒(保定生物制品所);胰岛素试剂盒(华西糖尿病研究所);胰高血糖素试剂盒(中国原子能研究所);乳酸脱氢酶(Sigma);其余试剂为分析纯。TNF-α 及 TNF-McAb 用 5% BSA 溶液配制。

1.2 动物模型

昆明小鼠(18 g~20 g)由本校动物中心提供,雌雄不拘。小鼠背部按 30% 体表面积剪毛,(89℃±1℃)热水中浸烫 3 s 制成III°烫伤模型。腹腔注射生理盐水 2.0 ml,随机分成: 伤后 3、6、12 h 和 1、2、3、5 d 7个组和 TNF-McAb 治疗组。每组动物数见表中所示。另外设正常小鼠注射 TNF-α 组(各 26只分别以低、高剂量连续或一次注射),低、高剂量连续注射组分别于伤后 2、6、8 h 取血测定相关指标。动物分笼喂养、自由摄食。

1.3 样品制备及测定指标

动物断头迅速取血,以 EDTA+抑肽酶抗凝。3000 r/min 离心 10 min,收集血浆,必要时重复离心 10 min 以完全去除血细胞。收集血浆 -70℃保存,用于 TNF-α,血糖,胰岛素,胰高血糖素和乳酸测定。结果经 IBM 微机作相关系数显著性检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 烫伤小鼠血浆 TNF-α 及其它相关指标动态变化

30% TBSAIII°烫伤小鼠各时相点的血浆 TNF-α 和胰岛素抵抗相关指标: 血糖(Gs)、胰岛素(Ins)、乳酸(LA)、胰高血糖素(Glc)含量变化见表 1。

表 1 严重烫伤小鼠血浆 TNF-α 及其相关指标的动态变化 (n= 15, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Dynamic changes of TNF-α and relative index in plasma after scalding mice (n= 15, $\bar{x}\pm s$)

	Control	3PBH	6PBH	12PBH	1PBD	2PBD	3PBD	5PBD
Gs(mmol/L)	5.18± 0.28	10.57± 3.61**	13.15± 3.22**	13.21± 2.11	10.28± 3.63**	10.46± 1.96**	10.75± 1.39**	8.47± 0.67**
Ins(mU/L)	13.3± 1.71	14.58± 2.95	12.57± 2.90	13.75± 2.19	17.01± 4.32	24.44± 3.33**	25.87± 3.28**	22.19± 4.34**
TNF-α(μg/L)	0.92± 0.08	1.55± 0.68**	3.56± 0.57**	3.72± 0.49**	2.87± 0.61**	3.67± 0.58**	3.7± 0.65**	2.40± 0.74**
Ins×Gs	67.75± 8.64	145.70± 20.76**	156.70± 19.65**	178.16± 15.49**	162.92± 24.69**	250.54± 20.90**	274.70± 20.22**	186.25± 29.26**
LA(mmol/L)	2.43± 0.17	2.50± 2.10*	6.74± 1.92**	7.50± 1.54**	5.25± 2.28**	6.39± 1.86**	6.90± 1.19**	4.36± 0.33**
Glc(pmol/L)	25.95± 10.61	40.42± 15.99*	47.22± 17.93**	48.28± 18.34**	53.03± 19.79**	57.65± 22.91**	59.32± 22.83**	44.46± 23.33**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs control

* 王占科,男,28岁,硕士,现在南昌 94医院检验科 南昌, 330002

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

从表 1中看出,TNF-α在伤后 3 h就开始明显升高,一直到第 5天保持高水平状态。血糖亦于伤后 3 h升高,第 5天有所下降,但仍高于对照水平。胰岛素 1 d后升高,第 5天有所降低,但仍高于对照组。乳酸从 3 h开始升高,第 5天稍下降,但高于对照组。胰高血糖素亦是 3 h开始升高一直持续到 5 d后。

2.2 烫伤小鼠血浆 TNF-α与胰岛素抵抗相关指标相关分析

将表 1中各个体小鼠的不同时相点测定结果通过微机程序作相关系数(r)显著性检验,可清楚看到,TNF-α与 Ins×Gs (r= 0.745),LA和 Glc(r分别为 0.685和 0.762)存在明显正相关,而 TNF-α与 Gs和 Ins相关不显著。说明严重烫伤后血浆 TNF-α升高与胰岛素抵抗发生有密切关系。此外乳酸和胰高血糖素的变化亦是烧伤后胰岛素抵抗的重要指标。

2.3 注射 TNF-McAb改善烧伤胰岛素抵抗

每次用 3 mg/kg体重剂量的 TNF-McAb伤后每间隔 8 h连续注射烫伤小鼠,对照组注射生理盐水。第 3天取血检测胰岛素抵抗的相关指标,其结果见表 2

表 2　严重烫伤小鼠注射 TNF-McAb后血浆相关指标的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of relative index in plasma after constant injecting TNF-McAb to scalding mice($\bar{x}\pm s$)

	n	Ins	Gs	Ins×Gs	LA	Glc
Control	15	24.46± 1.99	10.01± 0.90	241.56± 17.06	6.36± 0.87	53.6 ± 20.88
Treated	15	16.63± 1.73*	7.25± 0.72**	120.63± 18.80*	3.40± 0.46*	35.72± 19.97

*: P < 0.05,**: P < 0.01 *vs* Control

表中显示,未经 TNF-McAb治疗的小鼠血浆各指标与表 1第 2至 3天(2PBD~3PBD)组相应指标接近,经过 TNF-McAb治疗后各指标明显降低。表明抗 TNF单克隆抗体通过中和血中 TNF-α从而改善烫伤小鼠胰岛素抵抗状态,尽管不能完全消除烫伤后胰岛素抵抗。进一步证实烧伤后 TNFα升高在胰岛素抵抗发病中起重要作用。

2.4 正常小鼠注射 TNF-α出现胰岛素抵抗

为了进一步确定 TNF-α分泌增多(血中 TNF-α水平升高)可诱发胰岛素抵抗发生,我们用低剂量($1\mu g\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$)和高剂量($100\mu g\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$ TNF-α经尾静脉连续注射给正常小鼠,造成慢性 TNF血症。分别于 2、6、8 h采血,观察关指标的变化。结果显示,低剂量 TNF-α连续注射组,2 h后血浆 Ins×Gs升高(103.59± 21.74 *vs* 70.09± 14.16)并随注射时间延续增加幅度越大(6 h, 144.29± 25.86 *vs* 69.36± 18.23; 8 h, 192.73± 18.95 *vs* 71.88± 15.21);其它 Gs, Ins, LA, Glc结果略。高剂量 TNF-α连续注射组除了 Glc增加更明显外,其它指标变化与低剂量组接近。但由于高剂量 TNF-α可促进非胰岛素依赖(如肝脏)葡萄糖摄取,结果血糖升高幅度不大,所以 Ins×Gs值升高不如低剂量注射组明显。另外用更大剂量($200\mu g\cdot kg^{-1}$) TNF-α一次性注射时,其结果只见 LA水平升高比较明显外,其它指标改变不显著。以上结果说明 TNF-α诱导胰岛素抵抗是一种时间和剂量依赖的连续刺激的过程。

3 讨论

无论是烧伤或其它类型的创伤(包括大手术、感染休克)均可出现血糖和胰岛素浓度升高。虽然血中胰岛素的绝对浓度不低于正常,甚至往往较正常为高,但它与增高的血糖浓度相比却表现胰岛素的相对不足。同时由于烧(创)伤后机体组织对胰岛素刺激的最大的反应性降低,致使胰岛素不能发挥正常的促进细胞对葡萄糖的摄取和有效利用,而出现创伤性胰岛素抵抗。胰岛素抵抗的原因非常复杂,其中 TNF-α可能起着十分关键的作用[4~6]。我们的实验中看到严重烫伤小鼠 3 h后血中 TNF-α水平就明显升高,并从休克期一直持续到高代谢期。其它相关的胰岛素抵抗指标亦相应变化,特别是 Ins×Gs, LA和 Glc与 TNF-α升高呈明显的正相关。表明烧伤后由于迅速出现烧伤毒血症,尤其是内毒素(LPS)的作用可使 TNF-α很快就升高,可能是胰岛素抵抗发生的重要因素。烧伤后虽然 Gs和 Ins亦可在 3 h出现升高,但血糖和胰岛素的升高与 TNF-α的相关并不显著。相反如果以血糖与胰岛素浓度的乘积(Ins×Gs)表示,结果 Ins×Gs值升高从休克期一直持续到高代谢期并与 TNF-α升高明显正相关。提示烧伤后仅以血糖或胰岛素单个水平的升降似乎不能完全反映胰岛素抵抗的程度,而用 Ins×Gs值作为胰岛素抵抗的指标则更灵敏和特异,这与文献[7]看法相一致。烧伤后由于组织产生胰岛素抵抗,糖的有氧氧化能力下降(丙酮酸脱氢酶受抑制),结果血中乳酸堆积。因此血中乳酸水平亦是烧伤后胰岛素抵抗的一种较可靠的指标。另外,胰高血糖素作为升糖激素之一,对胰岛

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

素表现拮抗作用,同时由于 TNF-α 能够促进胰高血糖素的产生,在烧伤后胰岛素抵抗发生中的意义受到人们的重视。

烧伤后由于应激,细菌移位和内毒素(LPS)等的作用,单核/巨噬细胞被激活而产生大量 TNF-α 和其它促进炎症的细胞因子(如 IL-6)。它们不仅可对机体免疫功能产生影响[8],同时对物质代谢亦产生调节作用[9]。有关 TNF-α 引起胰岛素抵抗的事实已在肥胖性大(小)鼠模型中得到证实[1,5]。本研究利用重组人 TNF-α 注射正常小鼠同样显示胰岛素抵抗相关指标的改变。相反,用抗 TNF-α 单克隆抗体注射烧伤小鼠可以看到胰岛素抵抗的各相关指标得到明显改善。另外当用更大剂量 TNF-α 一次注射,由于不能维持有效浓度,而且大剂量 TNF-α 通过刺激非胰岛素依赖的急性葡萄糖摄取,所以其胰岛素抵抗指标改变不如持续注射明显。结果表明,TNF-α 诱导胰岛素抵抗是一种时间和剂量依赖的连续刺激的结果。有关 TNF-α 引起烧伤后胰岛素抵抗发病的机理,可能涉及胰岛素受体信号传递水平的缺陷[5],其详细机理有待继续研究。

参考文献

1 Hotamishgil G S, Shargill N S, Spiegelman B M *et al*. Adipose expression of TNF-α direct role in obesity-Linked insulin resistance. Science, 1993, 259(5091): 87

2 袁建成,肖光夏,秦孝建等.严重烫伤大鼠早期肺组织 TNF mRNA表达及其细胞定位.中华创伤杂志, 1995, 11(2): 107

3 Liu X S, Luo Z H, Yang Z C *et al*. The significance of changes in serum tumor necrosis factor (TNF) activity in severely burned patients. Burns, 1994, 20(1): 40

4 Poll T V, Romijn J A, Endert E *et al*. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. Amer J Physiol, 1991, 261(4): E457

5 Homamisligil G S, Murray D L, Choy L N *et al*. Tumor necrosis factor a inhibits signaling from the insulin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(11): 4854

6 Petit F, Bagby G J, Lang G H. Tumor necrosis factor mediates zymosan-induced increase in glucose flux and insulin resistance. Amer J Physiol, 1995, 268(2): E21

7 李光伟,潘孝红, Stephen. L *et al*. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数.中华内科杂志, 1993, 32(10): 656

8 苏 波,薛建中,陈玉林等.静脉注射小剂量 rhTNF-α 对烫伤大鼠 T淋巴细胞功能的影响.中华整形烧伤科杂志, 1995, 11(1): 36

9 邵 洪,汪仕良.严重烧伤后高代谢反应机理的研究.中华外科杂志, 1994, 32(7): 438

(收稿: 1997-02-24;修回: 1997-05-30)

(编辑 汪勤俭)

Correlations of TNF-α with insulin resistance after severe scalding in mice

Wang Zhanke, Xu Linshui (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: To explore the role of TNF-α in insulin resistance after severe scalding. **Methods**: After the mice were inflicted with 30% TBSA full-thickness scalding, the dynamic changes of TNF-α, glucose, insulin, lactic acid and pancreatic glucagon in the plasma were observed and the relativity among them were also analyzed. In addition, the above-mentioned indices in normal mice injected with recombined human TNF-α (rh-TNF-α) and scalded mice injected with monoclonal antibody against TNF-α (TNF-McAb) were determined. **Results**: In the scalded mice, the increment of TNF-α was significantly correlated to those of multiply glucose, lactic acid and pancreatic glucagon but not significantly correlated with the changes of glucose and insulin at the 3rd hour after scalding. Continuous injection of low-dose TNF-α into the normal mice induced insulin resistance which could be alleviated by injection of TNF-McAb. **Conclusion**: After severe thermal injury, the increment in production of TNF-α plays an important role in insulin resistance.

Key words scalding; TNF-α; insulin resistance; mouse

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