DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.004

严重体表烫伤早期TNF对骨骼肌蛋白质分解代谢影响的实验研究

李 林* 董燕麟 杨 春 陈 敏 (第三军医大学基础部生物化学教研室)重庆,630038

提 要 为探讨烧伤后骨骼肌蛋白质解分解代谢的变化规律及其可能机理,以37%体表面积Ⅱ度烫伤大鼠为模型,于伤后1周内动态观察了创伤局部与远隔部位骨骼肌蛋白质分解代谢速率与TNF含量的动态变化。结果提示:①创伤局部及远隔部位骨骼肌蛋白质分解速率的进行性增强是严重烧伤后负氮平衡的重要原因,尤以创伤局部蛋白质的分解更为重要。②创伤局部骨骼肌中TNF含量明显高于远隔部位,但二者间存在显著相关关系,以近似的浓度时间曲线逐步增高,且与相应肌组织蛋白质分解代谢速率呈正相关。提示远隔部位骨骼肌中TNF含量受创伤局部TNF含量的影响,局部高浓度的TNF可能是导致蛋白质分解的重要原因。③外源性TNF-McAb可阻断内源性TNF的作用,提示细胞因子拮抗剂的应用可望开辟一种新的治疗途径。④严重烫伤后TNF的产生既受局部炎症刺激的影响,又随创面感染的发生而明显增加。

关键词 烧伤;蛋白质分解代谢;肿瘤坏死因子(TNF)

中图法分类号 Q51;R644

严重烧伤所诱发的以蛋白质分解加速、负氮平衡为主要特征的烧伤后超高代谢状态,势必造成蛋白质的过度消耗,进而损伤重要生命器官,使机体免疫功能进行性降低,甚至造成不可逆的多器官衰(MOF),导致死亡率增高。所以对严重烧伤后高分解代谢机理的研究,一直为人们所关注。

有大量实验发现,在创伤或炎症刺激下,主要由激活的巨噬细胞分泌的一大类细胞因子,在机体高分解代谢、组织细胞损伤以后MOF的发生发展中起着重要的作用[1,2]。但是细胞因子对于高代谢反应的确切调节机理尚未完全阐明。

本文以包括背部及一侧后肢的37%体表皮肤全层烫伤大鼠为模型,于伤后1周内动态观察了烫伤局部及远隔部位比目鱼肌蛋白质分解速率及TNF含量的变化,同时观察伤后各时相点血浆TNF水平的变化,以及外源性TNF单克隆抗体(TNF-McAb)对烫伤大鼠骨骼肌蛋白质分解代谢的影响,以伤后骨骼肌蛋白质分解代谢的规律并探讨TNF的可能作用机理及其意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性Wistar大鼠,由第三军医大学动物中心所提供。体重180±20 g。

1.2 主要试剂

1.2.1 各种L-氨基酸 日本味之素公司

1.2.2 骨骼肌温育液 Krebs-Ringers碳酸缓冲液pH 7.4,含5 mmol/L葡萄糖,0.13%牛血清白蛋白及除酪氨酸外其他19种大鼠血浆浓度氨基酸。

1.2.3 TNF酶联免疫检测试剂盒 军事医学科学院邦定生物医学公司。

1.2.4 TNF单克隆抗体 军事医学科学院邦定生物医学公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制作 以93~95℃热水致背部及一侧后肢Ⅱ°烫伤(37%体表面积),伤后立即腹腔注射生理盐水30ml/kg以抗休克,分笼喂养,自由摄食饮水,天气寒冷时给予室内加温。

1.3.2 动物分组及处理 动物随机分为正常对照组、烫伤组、正常TNF注射组(7×10^6u/kg体重)及烫伤TNF-McAb注射组(3.0mg/kg体重)后者于伤后24、48h分别由尾静脉注射TNF-McAb,于伤后72h处死,以同时烫伤之大鼠为对照组。

1.3.3 标本采取 动物用乙醚吸入麻醉后仰卧固定,打开腹腔,由下腔静脉抽血,及时分离血清。抽血后剪断腹部血管放血致死。立即摘取肝脏及两侧后肢比目鱼肌,剔净筋膜,准确称量。

1.3.4 血清、肝脏、伤肢与未伤肢比目鱼肌蛋白质含量测定以牛血清白蛋白为标准,用Lowry法测定蛋白质含量。

1.3.5 比目鱼肌酪氨酸(Tyr)体外净释放量测定 按照蔡祝辉等建立的荧光分光光度法[3]。

1.3.6 TNF标准曲线制作 用TNF检测试验剂盒,按其建立的ELISA双抗夹心法复管测定各稀释浓度标准TNF酶标值。绘制标准曲线,求得相关指数$R^2=0.9997$。按公式计算

* 北京军区高等医学专科学校生物化学教研室 石家庄,200000

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

出各测定标本的TNF含量，以0.096ng/mg为检测出下限，此值以下定为"0"。

1.3.7 血清TNF测定　取血清0.3ml，加入苯甲基氟磺酸(PMSF)，使终浓度为1mmol/L。取标本100μl，测TNF含量。

1.3.8 比目鱼肌TNF含量测定　在冰浴中制备匀浆，用于TNF测定。

1.3.9 数据统计　采用SPLM软件，由第三军医大学统计教研室处理。

2 实验结果

2.1 烫伤后伤肢与未伤肢比目鱼肌酪氨酸净释放量的动态变化(表1)

2.1.1 伤肢Tyr净释放量除伤后第1天外，其余各时相点均明显高于正常($P<0.01$)，且高于相应的未伤肢($P<0.01$)呈持续上升趋势，至第7天已达正常的1.6倍。

2.1.2 未伤肢Tyr净释放量在伤后呈持续上升趋势，至伤后第5天，则显著高于正常($P<0.01$)，至第7天为正常值的1.3倍($P<0.01$)(表1)。

2.2 烫伤大鼠组织中TNF水平的动态变化(表2)

2.2.1 血清TNF含量的变化　在本实验中采用的ELISA检测法在正常组大鼠血清中无一例检出TNF。伤后各时相点的TNF检出率按时间顺序而依次增加，伤后第7日的检出率为100%，TNF含量增至0.410 ng/L。

2.2.2 比目鱼肌TNF的变化　正常大鼠比目鱼肌TNF均未检出。在伤后各时相点，伤肢TNF检出率为100%，其含量随时间而渐次增高，伤后第7日陡升至12.536 ng/g组织，为伤后第2日的6.64倍。未伤肢TNF含量亦逐渐增加，虽均低于相应的伤肢($P<0.01$)，但其变化波型相似于伤肢，二者TNF含量呈显著正相关，$r=0.89$，$P<0.01$。

2.2.3 比目鱼肌TNF含量与Tyr释放量的关系　伤后未伤肢及伤肢Tyr释放量的变化趋势与TNF含量变化呈显著正相关，相关系数分别为$r=0.74$，$P<0.01$；$r=0.81$，$P<0.01$。

2.3 重组人TNF(rHu－TNF)对正常大鼠比目鱼肌Tyr净放量的影响(表3)

尾静脉注射rHu－RNF 18h后，比目鱼肌Tyr净释放量较注射生理盐水对照料明显增加($P<0.01$)。

2.4 TNF－McAb对烫伤大鼠比目鱼肌Tyr净释放量的影响(表4)

注射TNF－McAb与未注射TNF－McAb的动物，同时在烫伤后72 h处死。以未烫伤大鼠为正常对照组。未注射TNF－McAb组大鼠伤肢比目鱼肌Tyr释放量显著增高，既高于正常对照组($P<0.01$)，又高于未伤肢($P<0.01$)。而注射TNF－McAb组伤肢比目鱼肌Tyr释放量显著低于未注射TNF－McAb组之伤肢，虽仍高于未伤肢，但此差别未达到显著水平(见表4)。

表1 烫伤后伤肢与未伤肢比目鱼Tyr净释放量的动态变化(Tyr:nmol/g湿组织/2 h $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Dynamic changes of the amount of tyrosine released by the soleus muscle of the injued and uninjured limbs after scalding(tyrosine nmol/g wet tissue/2 h,$\bar{x}\pm s$)

Postinjury day	No. of rats	Uninjured limb	Injured Limb
Normal	8	287.26±19.00	
1st day	8	295.05±29.00	305.18±29.73
2nd day	8	299.05±18.31	342.44±20.41*#
3rd day	8	312.64±44.04	360.34±29.75*#
5th day	8	329.21±15.13*	381.98±10.06*#
7th day	8	374.69±15.36*	463.67±21.39*#

*：$P<0.01$ *vs* control，**：$P<0.01$ *vs* the corresponding value of the uninjured limb

表2 烫伤大鼠组织中TNF含量的动态变化

Tab 2 Dynamic changes of TNF content in the serum and the soleus after scalding($\bar{x}\pm s$)

Postinjury day	N	Serum TNF content		Muscuar, TNF content (ng/g)			
		n	ng/ml	n	Uninjured limb	n	Injured limb
Normal	6	0	0				
2nd day	6	2	0.078±0.125	1	0.131±0.320	6	1.889±0.796*
3rd day	6	3	0.094±0.118	4	1.511±1.2684	6	5.496±0.900*
5th day	6	5	0.157±0.113	6	1.136±0.403	6	5.516±1.366*
7th day	6	6	0.410±0.278	6	4.364±1.768	6	12.536±4.056*

N: means the number of rats examined and n the number of rats positive for TNF，*：$P<0.01$ *vs* nuinjured limb

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

表 3 rHu－TNF 对 Tyr 净释放量的影响

Tab 3 rHu－TNF injection and tyrosine release in the soleus (tyrosine nmol/g wet tissue/2 h, $\bar{x}\pm s$)

Group	No. of rats	Released amount of tyrosine
Control	6	287.94±24.18
TNF－injected	6	347.49±15.53*

*: $P<0.01$ *vs* control value

2.5 烫伤后大鼠组织蛋白质含量的动态变化(表5)

伤后血清蛋白质含量呈下降趋势，但未达到显著差异水平。肝脏蛋白质含量变化不明显，仅在0.271～0.290g/g 范围内波动。

伤后各时相点比目鱼肌蛋白质含量上下波动，第3日后呈进行性下降。各时相点伤肢蛋白质含量均低于未伤肢，但均未达到显著差异水平。伤后第7天伤肢蛋白质含量明显低于正常($P<0.05$)。

表 4 TNF－McAb 对烫伤大鼠比目鱼肌 Tyr 净释放量的影响(Tyr：nmol/g 湿组织/2 h)

Tab 4 Effects of TNF－McAbs on released tyrosine amount by boleus muscle after scalding (tyrosine nmol/g wet tissue/2 h)

	Normal control	Scalded group	
		Uninjured limb	Injured limb
No TNF-McAb	287.26±19.00(8)	312.64±44.04(8)	360.34±29.75(8)*#
TNF-McAb injection		298.18±15.06(8)	313.02±22.64(8)@

*: $P<0.01$, #: $P<0.01$ *vs* value of uninjured limb, @: $P<0.01$ *vs* TNF－McAb injection

表 5 烫伤后组织蛋白质含量的动态变化

Tab 5 Dynamic changes of protein level in the serum liver and soleus muscle after scalding

Postinjury (day)	Serum level	Hepatic Level	Muscular level	
			Uninjured limb	Injured limb
Control	8.00±0.57	0.290±0.023	0.222±0.034	
1st day	7.57±0.54	0.273±0.017	0.238±0.034	0.228±0.32
2nd day	7.60±0.58	0.271±0.024	0.208±0.073	0.201±0.017
3rd day	7.92±0.80	0.272±0.017	0.221±0.023	0.220±0.025
5th day	7.30±0.89	0.284±0.028	0.200±0.026	0.193±0.038
7th day	7.25±0.97	0.271±0.022	0.190±0.017	0.174±0.021*

The number of rats examined was 8, *: $P<0.05$ *vs* control value

3 讨论

3.1 严重体表烫伤后大鼠比目鱼肌蛋白质分解代谢的动态变化和意义

骨骼肌是机体最重要的蛋白质贮库。严重烧伤是骨骼肌蛋白质分解的强烈刺激因素，由其诱发的机体应激反应，改变了机体的激素环境，导致超高代谢的发生，出现严重的负氮平衡。以往对烧伤早期(72 h，即烧伤后休克期进入高代谢期之始)蛋白质分解代谢的研究揭示了受伤局部(伤肢)蛋白质分解增强是早期负氮平衡的主要原因，而远隔部位(未伤肢)的肌肉蛋白质分解并不增强[4,5]。关于伤后1周内骨骼肌蛋白质分解代谢的动态变化尚未见报道。本实验以比目鱼肌酪氨酸(Tyr)释放量反映蛋白质分解代谢速率。结果如表1所表明，在烫伤后1、2、3、5、7 d 各时相点双侧比目鱼肌 Tyr 释放量均高于正常，呈渐进型上升趋势。未伤肢 Tyr 释放量至伤后第5天开始明显高于正常。伤肢 Tyr 释放量均高于相应的未伤肢，此差异在伤后第2天即达非常显著水平。上述结果表明，烫伤后创伤局部及远隔部位骨骼肌蛋白质分解代谢的进行性加剧可能是负氮平衡的重要原因，而其中以创伤局部(伤肢)骨骼肌蛋白质的分解更为重要。

经典的分解代谢激素被认为是介导烧伤后超高代谢的重要因素[6,7]，但这些激素单独或联合作用虽可诱发正常人出现类似烧伤的特征。说明除了全身性因素外，尚可能有局部炎性细胞因子的作用[6]。在众多细胞因子中，TNF、IL-1被认为具有重要的代谢调节作用[8]。

3.2 TNF 对肌肉蛋白质分解代谢的作用

TNF 主要是由激活的巨噬细胞分泌的具有广泛生物学活性的细胞因子，与其它细胞因子相互协同相互制约共同组成了复杂的细胞信息网络，是机体免疫反应，炎症反症和代谢调控的重要介质。关于 TNF 对感染和脓毒性休克的病理机理已有了很多研究，但关于创伤后 TNF 变化的报道还不很多，观点各异[9,10]，

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

本实验结果表明，在伤后各时相点血清及比目鱼肌TNF含量呈进行性增高，伤肢TNF含量均显著高于未伤肢，二者变化趋势一致，呈显著正相关。双侧比目鱼肌TNF含量与相应肌肉的Tyr释放量也呈相关关系。结果提示，未伤肢TNF含量受伤肢TNF含量的影响，说明局部产生的TNF可随血循环到达远隔部位引起损害。局部高浓度的TNF可能是导致蛋白质分解代谢的重要因素。

在临床上，当rTNF作为抗肿瘤药物用于肿瘤患者时，可诱发病人出现烧伤后的高代谢状态，连续注射rHu-TNF 3～4周体重下降3%～5%。以TNF 200 μg/m²剂量体内注射，检测病人前臂血流量增加65%，而氨基酸流量却增加250%，同时病人O_2消耗量增加30%，说明TNF可促进高代谢及蛋白质分解[11]。

本实验中给正常大鼠注射rHu-TNF后，比目鱼肌Tyr净释放量增加20.67%，表明肌肉蛋白质分解代谢确实受到TNF的影响。

3.3　TNF单克隆抗体(TNF-McAb)对烫伤后骨骼肌蛋白质分解代谢的影响及其意义

Fletcher等在动物实验中已观察到TNF注射组动物在24h死亡率达100%，而TNF＋TNF-MAb组动物则72h尚无一例死亡[12]。我们将同时烫伤大鼠分为两组，其中一组给予注解TNF-McAb(中和活性为每毫克中和10^6U TNF)，可观察到该组大鼠伤肢Tyr净释放量虽仍高于未伤肢，但较烫伤对照组伤肢的Tyr释入量明显降低($P<0.05$)。由此不仅进一步证实了TNF在蛋白质分解代谢中的重要作用，同时也提示以TNF-McAb可以阻断内源性TNF的损害作用，对于改善烧伤后的高代谢状态，不失为一值得探索的有效手段。如果细胞因子确实是许多疾病病理改变的重要介质，那么抑制特定的细胞因子合成或阻断其活性将有治疗作用。

3.4　烫伤后TNF变化规律和意义

在本实验中，正常大鼠血清及肌肉组织中TNF检出率为0，伤后各时相点TNF水平渐次增高，但在前5 d内其浓度时间曲线较为平缓，伤后第7天则陡然增高数倍。这种变化规律可能与创面的感染有关。在烫伤初期无明显感染时，TNF的产生主要是对局部非感染性炎症刺激的生物反应，而随着创面感染的发生，TNF的生成则可能主要由革兰氏阴性-细菌产生的内毒素所诱发。本实验中，曾观察到1只伤后7 d处死的大鼠，伤肢创面感染并有多发性肝脓肿(病理切片证实)，此鼠血清TNF含量高达0.821 ng/ml，伤肢TNF 20.024 ng/g。此外亦有报道称热损伤后，LPS刺激TNF生成的反应增强[13]，使TNF产生增多，二者相互影响，可能对疾病预后产生不良影响。

3.5　烫伤后组织蛋白质含量的变化规律及其机理

伤后第7天伤肢比目鱼肌蛋白质含量明显低于正常，仅为正常值的78%。肝脏蛋白质含量虽略有波动，但始终未出现明显变化。血浆蛋白质缓慢降低，但未达到显著差异水平。上述蛋白质量的变化是符合烧伤后蛋白质代谢特征的，即蛋白质从骨骼肌转向肝脏，刺激肝内糖异生及蛋白质合成。这种代谢特征是神经-激素-细胞因子相互影响共同作用的结果。

严重烫伤的强烈刺激，激活机体单核巨噬细胞系统，产生TNF等细胞因子，同时诱发下丘脑-垂体-肾上腺轴使分解代谢激素分泌增加。在糖皮质激素存在条件下，TNF可促进骨骼肌蛋白质大量分解[14]，释出的大量氨基酸是肝脏合成急性期反应蛋白质的主要原料[15]。由TNF诱生的IL-6是这一过程最强有力的刺激因子。给动物连续注射TNF数天后可见肝脏重量及蛋白质含量增加[16]。

血浆蛋白含量变化既取决于肝脏蛋白质的合成速度，又受外周蛋白质分解代谢的影响。是营养代谢变化的慢指标，由其衡量机体氮水平的急性变化是缺乏特异性的。伤后炎症刺激所导致的血管通透性增加可使血浆白蛋白外渗，表现出血浆蛋白含量下降。

参考文献

1 Cerra FB. The systemic septic response: concepts of pathogenesis. J Trauma, 1990; 12(suppl): S 169

2 Busam R. IL-6 in septic state. J Hepatol, 1989; 8: 672

3 蔡祝辉，金月仙，赵琼蕊等. 人血清中游离氨基酸荧光微量测定法. 生物化学与生物物理学进展，1979; 11(1): 49

4 Huang TS, Dong YL. Changes in protein metabolism of soleus muscle in scalded rats and the therapeutic effects of leucine and insulin. J Med Coll PLA, 1987; 2(3): 254

5 Yang Q, Dong YL. Effects of exogenous Na-DL-3-hydroxybutyrate and insulin on skeletal muscle protein metabolism in rats after early severe buun injury. J Med Coll PLA, 1989; 4(1): 29

6 Edward E. The metabolic effects of thermal injury. World J Surg, 1992; 16: 68

7 Woolf PD. Hormonal response to trauma. Crit Care Med, 1992; 20(2): 216

8 Tredget EE, Yu YM, Zhong S et al. Role of IL-1 and TNF on energy metabolism in rabbits. Am J Physiol, 1988; 255: E760

9 Liu XS, Luo ZH, Yang ZC. The significance of changes of

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

serum tumor necrosis factor activity in sevrely burned patients. Burns,1994;20(1):40
10 Hohami E, Novikov M, Bass R et al. Closed head injury triggers early production of TNF alpha and IL-6 by brain tissue. J Cerebral Blood Flow Metabolism,1994;14(4):615
11 Botha AJ, Moore FA, Moore EE. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. Crit Care Med,1994;22(5):894
12 Flectcher JE, Colling JH, Graves ED et al. Tumor necrosis factor-induced mortality is reversed with cyclooxygenase inhibition. Ann Surg,1993;21(3):660
13 Minei JP, Williams JG, Hill SJ et al. Augmented tumor necrosis factor response to lipopolysaccharide after thermal injury is regulated post-transcriptionally. Arch Surg,1994;129(11):1198
14 Zamir O, Hasselgrem PO, James H et al. Effects of TNF or IL-1 on muscular uptake of amino acids and functions of glucorticoids. Surg Gyn Obs,1993;117(1):27
15 Hiyama DT, Allmen D, Rosenblum L et al. The synthesis of albumin and acute phase-protein in burned rats. J Burn Care Rahabil,1991;12(1):1
16 Mealy K. Tumor necrosis factor increases hepatic parencyhma. Br J Surg,1991;78(3):331

(收稿:1995-07-20;修回:1995-09-18)

Dynamic study of TNF effects on skeletal muscle proteolysis in early stage of severe scalding in rats

Li Lin, Dong Yanlin, Yang Chun, Chenmin (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract In order to invesigate the pattern of protein catabolic changes of the skeletal muscles after severe burns and the possible mechanism, the protein catabolic rate and tumor necrosis factor (TNF) contnet of the skeletal muscles of the scalded region and remote region were dynamically observed in the first week after the rats were inflicted with 37% TBSA full thickness scalding. It was found that 1. the progressive aggravation of protein catabolism of the skeletal muscles of both the scalded and remote regions especially that of the scalded region was the main cause of negative nitrogen balance after burn injury; 2. the TNF content of skeletal muscles was far higher in the scalded region than in the remote region but the TNF increase of the 2 regions was significantly correlated and increased gradually in a similar content-time cruve. TNF increase was also significantly correlated to the protein catabolic rate of the skeletal muscles. These facts imply that the TNF increase of the muscles of the remote region is affected by that of the scalded region and local high TNF content may be an important cause to result in increased protein catabolism; 3. Exogenous TNF monoclonal antibodies could block the effects of endogenous TNF, which suggests that cytokine antagonists may open a new route of treatment; and 4. TNF production after severe scalding was stimulated by local inflammation and subsequent wound infection and the latter played a more impormtant role.

Key words burns; protein catabolism; tumor necrosis factor (TNF)

新书信息

《人体颅底部薄层断面与MRI、CT对照图谱》已出版

临床使用的MRI和CT已能作出薄到1.5～2mm的断层图像,但现有的解剖图谱断层厚度多在10mm以上,不能适应影像诊断的要求。临床上急需与现代影像诊断相适应的薄层断面图谱以作为正常对照。作者采用生物塑化新技术,率先制作出了颅底部间距为1.5～2mm的断面标本并与相应的MRI、CT相对照,这对于提高MRI、CT诊断的准确率及对相应临床科室的诊断和治疗均具有重要价值。国内外尚无同类图谱出版。本书包括颅底冠矢横三方位的连续断面图,并配以相应的MRI、CT图、简图及中英对照。

本书由四川省科学技术出版社出版,16开(精装),估价185元/册。ISBN－5364－3104－X/R·680。欲订者,请由邮局汇款给第三军医大学学报编辑部张大春教授,款到后,发票随书一并寄出。地址:重庆市高滩岩 邮编:630038

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