DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.03.002

大鼠严重体表烫伤后骨骼肌蛋白酶作用研究

文耕云 董燕麟（第三军医大学训练部 生化教研室）630038

提 要 为探讨严重烧伤早期负氮平衡发生机制，利用包括一侧后肢的37%大鼠体表面积全皮层烫伤模型，观察受伤肢体与未伤肢体比目鱼肌蛋白分解率的变化及相应肌肉几种蛋白水解酶可溶性部分活性改变。同时观察了胰岛素和β-羟基丁酸钠（β-HOBNa）对这些蛋白酶的效应。

烧伤后第3天结果表明，烫伤肢体比目鱼肌蛋白分解率及蛋白酶可溶性部份活性显著升高；胰岛素有降低组织蛋白酶活性的作用；β-HOBNa无此效应。

上述结果提示：严重体表烧伤早期受伤部位肌肉蛋白分解加快乃局部组织蛋白酶活性上升所为。胰岛素的节氮作用可能与抑制了这类蛋白酶的活性有关。

关键词 组织蛋白酶类；烧伤；肌肉；大鼠；代谢；蛋白水解；溶酶体

创伤后的负氮平衡，被认为是蛋白质合成的增加及更强烈的蛋白质分解增加所致[1]。蛋白酶类，尤其是组织蛋白酶的作用，通常被视为机体蛋白质分解的直接原因[2]，但它们在重度创伤中的作用不太清楚。胰岛素和酮体常用来纠正烧伤后的负氮平衡，但对它们节氮作用机理的认识尚存在分歧。本文以包括一侧后肢在内的37%体表全皮层烫伤大鼠为模型，观察伤后第3天比目鱼肌组织蛋白酶及胞浆中中性蛋白酶可溶性部份活性的变化以及相应部位蛋白质分解代谢情况，同时观察在体补充胰岛素和β-HOBNa对以上几种蛋白酶的作用。

1 材 料 与 方 法

1.1 材料

L-氨基酸、DL-βHOBNa为上海生化试剂厂出品；OPA为FLuka产品，瑞士；MPF-4型日立荧光分光光度计，日本；HSC-18R冷冻高速离心机，吉林图门。Wistar大鼠由本校动物所提供。

1.2 方法

实验动物的处理：体重170g～230g雄性大鼠随机分为烫伤组与对照组。烫伤组乙醚吸入麻醉后，剪去欲伤背部（30%BSA）及一侧后肢（7%BSA）的毛，踝下用胶泥包裹，使其伤后能正常行走。脱毛部分置于93℃水浴烫伤3s，造成Ⅲ度全皮层烫伤。伤后除腹腔注射5ml生理盐水外，不予其他处理，然后分笼喂养，自由饮水、摄食，光照随自然昼夜。对照组除不予致伤外，其余处理完全同烫伤组。

比目鱼肌蛋白分解速率的测定：断头处死大鼠后，从双肢分离比目鱼肌，按黄涛生[3]等建立的方法进行测定。

蛋白酶可溶性部分酶活性的测定：分离比目鱼肌后，仔细去除结缔组织，称重，然后进行测定。参考Odessey[4]建立的方法。在测定时以酪氨酸作标准，原文的MES为PBS取代，底物改用牛血红蛋白。荧光法[5]测定上清液中游离氨基酸含量。

外源性酮体及胰岛素的补给：参考杨青[6]的方法。

蛋白质测定方法：Lowry法[7]。

2 结 果

比目鱼肌蛋白质分解速率的测定：比目鱼肌蛋白质分解速率包括酪氨酸净释放量和掺入比目鱼肌蛋白质中的酪氨酸量两部分。结果表明，烫伤组大鼠伤肢比目鱼肌蛋白分解速率较未伤肢和正常对照动物增加约25%（$\bar{x}\pm s$），相差非常显著（$P<0.01$）；烫伤组未伤肢与正常对照组比较无明显改变（$P>0.05$）。如表1：

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

表1 比目鱼肌酪氨酸释放
(蛋白质分解率)

Tab.1 Tyrosine Release in Soleus Muscle (Protein degradation rate)
(nmol/g·wet weight/2h $\bar{x}\pm s$)

Control	Scalded	
	uninjured	injured
273.4±13.6 ($n=10$)	264.7±11.8 ($n=11$)	314.2±11.3* ($n=11$)

* means $P<0.01$, as compared with control and uninjured

蛋白酶的测定：实验中所测定的酶活性分别为组织蛋白酶B，H，L和D可溶性部分及胞浆中中性蛋白酶。伤后第3天结果表明，烫伤大鼠伤肢比目鱼肌组织蛋白酶B，H，L和D及中性蛋白酶活性均显著高于烫伤大鼠健肢及对照组（$P<0.01$），而后两组相比较无显著差异（$P>0.05$）。组织蛋白酶D活性上升幅度不如组织蛋白酶B，H，L，中性蛋白酶活性上升最少。β-HOBNa对这些蛋白酶活性没有影响（$P>0.05$）。胰岛素降低了组织蛋白酶B，H，L活性（$P<0.01$），其中烫伤组伤肢、健肢及对照组分别降低了7.9%，9.5%和18.3%。胰岛素对组织蛋白酶D也产生了明显的抑制功效（$P<0.01$），其中烫伤组伤肢、健肢及对照分别降低了6.4%，8.8%和14.4%。但对中性蛋白酶无明显效应（$P>0.05$）。表2、3、4。

表2 烧伤后比目鱼肌组织蛋白酶B、H、L活性

Tab.2 Activities of Cathepsins B, H, L in Soleus Muscle postburn
(tyr mmol/mg·pr/h $\bar{x}\pm s$)

	Control	Scalded	
		uninjured	injured
No agent infusion	27.3±2.58 ($n=11$)	27.4±2.66 ($n=12$)	44.3±4.42* ($n=12$)
β-HOBNa infusion	28.1±2.62 ($n=12$)	27.6±2.54 ($n=12$)	43.2±4.33* ($n=12$)
Insulin infusion	22.4±2.12△ ($n=12$)	24.8±2.13△ ($n=12$)	38.02±2.43*△ ($n=12$)

* means $P<0.01$, as compared with control and uninjured

△ means $P<0.05$, as compared with no agent infusion

表3 烧伤后比目鱼肌组织蛋白酶D活性

Tab.3 Activities of Cathepsin D in Soleus Muscle postburn
(Try nmol/mg·pr/h $\bar{x}\pm s$)

	Control	Scalded	
		uninjured	injured
No agent infusion	31.4±2.80 ($n=11$)	31.7±2.66 ($n=12$)	40.4±3.28* ($n=12$)
β-HOBNa infusion	30.7±2.61 ($n=12$)	31.3±2.64 ($n=12$)	41.2±3.02* ($n=12$)
Insulin infusion	26.3±2.16△ ($n=12$)	28.2±2.08△ ($n=12$)	36.2±3.12*△ ($n=12$)

* means $P<0.01$, as compared with control and uninjured

△ means $P<0.05$, as compared with no agent infusion

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

表 4　烧伤后比目鱼肌中性蛋白酶活性

Tab.4　Activities of Neutral Proteases in Soleus Muscle postburn

(Tyr nmol/mg·pr/h $\bar{x} \pm s$)

	n	Control	Scalded	
			uninjured	injured
No agent infusion	12	29.4±2.78	28.9±3.43	34.5±4.42*
β-HOBNa infusion	12	29.3±3.02	29.6±3.123	3.8±34.8*
Insulin infusion	12	28.9±2.86	29.1±2.68	34.1±3.66*

* means $P<0.01$, as compared with control and uninjured

3　讨　论

体表烫伤早期大鼠比目鱼肌蛋白质分解率的变化：实验结果表明，烫伤后大鼠致伤肢与非致伤肢比目鱼肌蛋白分解代谢有差异（$P<0.01$），致伤部位比目鱼肌酪氨酸释放显著高于非致伤肢，而健肢比目鱼肌酪氨酸释放与正常对照无显著差异（$P>0.05$）。该结果与轻度烫伤导致的仅伤肢肌肉蛋白分解加强，而健肢肌肉无明显改变的结论一致[8]，也与本室以前在重度烫伤下研究蛋白质分解代谢结果相同[6][9]。说明创伤对局部的刺激，是早期受伤局部蛋白分解加快的主要原因，受伤局部蛋白分解加快可能是烫伤早期负氮平衡的原因之一。

但是，饥饿和人工运用胰高血糖素、肾上腺素和肾上腺糖皮质激素，可分别导致组织蛋白分解增强，产生负氮平衡[10]，它们与创伤有类似的全身效应，而没有创伤刺激及部位存在。这就使重度烫伤早期远隔部位肌肉不出现蛋白分解显著增强难以解释。其中的差异还有待于深入探讨。

单纯体表烫伤后早期组织蛋白酶B，H，L及组织蛋白酶D以及中性蛋白酶的变化：对于增强的蛋白分解速率，通常认为是溶酶体中组织蛋白酶活性上升所致[2]。轻度创伤早期，受伤局部组织蛋白酶活性增高已普遍得到证实[11]。我们的重度烫伤模型结果表明，伤肢比目鱼肌的几种蛋白酶活性均较健肢及正常对照有明显上升（$P<0.01$），健肢与正常对照无显著差异（$P>0.05$）。其中以组织蛋白酶B，H，L上升幅度最大，组织蛋白酶D次之，中性蛋白酶最次。

有作者认为中性蛋白酶活性在轻度创伤中的上升，并不是肌肉本身的酶活性升高所为，而是由于浸润肌肉的肥大细胞脱颗粒造成，对于肌肉蛋白分解率没有显著影响。本文未进行类似研究，尚不能确定中性蛋白酶对蛋白分解率的贡献。

外源性β-HOBNa、胰岛素对烫伤早期比目鱼肌组织蛋白酶B，H，L和组织蛋白酶D及中性蛋白酶的影响：从实验结果可以看出，1）胰岛素有降低组织蛋白酶活性的作用；2）烫伤大鼠有胰岛素抵抗的存在。

胰岛素降低组织蛋白酶活性的作用已十分肯定，一种可能的解释是降低了蛋白水解酶的合成或利用。创伤情况下胰岛素在节氮方面的研究，本室在体[6]与离体[7]实验结果不同。离体实验表明，超生理剂量胰岛素降低了创伤导致的高蛋白分解率，但其原因有待于进一步研究；在体补充超生理剂量胰岛素，未能导致受伤肢体肌肉蛋白分解率的下降。本次实验亦采用在体补充胰岛素，总剂量大于前次一倍，且分2次注射，使其血中浓度波动较小。结果表

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

明，各组组织蛋白酶活性显著下降（$P<0.01$），受伤组下降程度不如正常对照组，说明受伤动物产生了胰岛素抵抗，但仍然不能解释前面所述蛋白分解率未发生明显变化的结果。

本次实验结果提示，尽管受伤动物产生了胰岛素抵抗，但超生理剂量的胰岛素，仍会产生一定作用；胰岛素抵抗的产生有一过程，而补充胰岛素是伤后立即进行的。所以推测，在抵抗发生以前，可能就有组织蛋白酶受抑发生。

外源性 β-HOBNa 的节氮作用已为不少作者证实。尽管如此，其节氮作用的机制却存在意见分歧。有些作者认为β-HOBNa根本没有节氮作用。本室在体补充β-HOBNa降低了蛋白分解率已获得证实，而本次实验结果未能表明它对各组的组织蛋白酶及中性蛋白酶有明显影响。有人认为β-HOBNa的节氮作用的原因，可能是在整体调节上抑制了氨基酸释放，也可能与谷丙转氨酶活性有关。

参 考 文 献

1. Bilmazes C, Craig L Kien, Dennis K Rohrbaugh, et al. Titrative contribution by skeletal muscle to elevated rate of whole body protein breakdown in burned children as measured by n-methlhistdine output. Metabolism 1978; 27(6):671
2. Neely AN, Mortimore GE, et al. Localization of products of endogenous proteolysis in lysosomes of perfused rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1974;59(4):680
3. 黄涛生 董燕麟。离体骨骼肌蛋白质代谢速率的测定方法。生物化学与生物物理学进展 1988;15(1):64
4. Odessey R. Burn-induced stimulation of lysosomal enzyme activity in skeletal muscle. Metabolism 1986;35(8):750
5. 蔡祝辉 金月仙 赵琼蕊，等。人血清中游离氨基酸的荧光微量测定法。生物化学与生物物理学进展 1979;11(1):51
6. Yang Qing, Dong Yanling. Effects of exogenous Na-DL-3-Hydroxybutyrate and insulin on skeletal muscle protein metabolism in rats after early severe burn injury. J Med Coll PLA 1989;4(1):29
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with Folin Phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265
8. Shangraw RH, Turinsky J. Effects of disuse and thermal injury on protein turnover in skeletal muscle. J Surg Res 1982; 33(4):345
9. Huang Taosheng, Dong Yanling. Changes in Protein metabolism of soleus muscle in scalded rats and therapeutic effects of leucine and insulin. J Med Coll PLA 1987;2(3):254
10. Bessey PQ, Watters JM, Aoki TT, et al. Combined hormonal infusion stimulates the metabolic response to injury. Ann Surg 1984;200(3):264
11. Salminen A, Hongisto K, Vihko V. Lysosomal changes related to exercise injuries and training-induced protection in mouse skeletal muscles. Acta Physical Scan 1984;120(1):15

（收稿：1989.12.25；修回：1991.01.21）

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

A Study of Protease Activity in Skeletal Muscle after Severe Burn Injury in Rats

Wen Gengyun, Dong Yanlin (Department of Biochemistry, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

Abstract In order to clarify the mechanisms of the occurrence of negative nitrogen balance in the early period after severe burns, full thickness burns of 37% TBSA was inflicted on the back and one hind leg of the rats by scalding and then protein degradation rate and the activities of cathepsins B, H, and L, cathepsin D, and neutral protease were studied in the soleus muscle of the scalded and healthy legs. The effects of a large dose of intraperitoneal insulin and Na-DL-3-hydroxybutyrate on these proteases were also observed respectively.

It was found that on the 3rd day after injury, the protein degradation rate and the activities of cathepsins B, H, and L, cathepsin D, and neutral protease increased significantly in the soleus of the scalded limb, but no similar changes could be seen in those of the healthy limd and in the control. An intraperitoneal injection of insulin significantly inhibited the activities of cathepsins B, H, L and D.

These findings suggest that cathepsins play an important role in the protein degradation of the injured skeletal muscle in the early stage of severe burns and are one of the causes of negative nitrogen balance. Insulin can be protein-sparing because of its inhibition on cathepsins although there may be insulin resistance in scalded rats.

Key words cathepsins; burns; muscle; rat; metabolism; proteolysis; lysosome

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