DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.02.004



# 烫伤大鼠比目鱼肌氧化还原状态变化与蛋白质分解代谢的关系

王远程 董燕麟 （第三军医大学训练部 生化教研室）630038

**提 要** 本文以一侧后肢（7%体表面积）全层烫伤大鼠为模型观察伤后比目鱼肌蛋白质分解速率与氧化还原状态的关系。结果指出伤后72h大鼠烫伤肢离体保温及在体比目鱼肌细胞内乳酸/丙酮酸比值、苹果酸/丙酮酸比值明显低于未伤肢，蛋白质分解速率升高。胰岛素（0.01u/ml介质）能显著升高比目鱼肌细胞内乳酸/丙酮酸与苹果酸/丙酮酸比值，同时降低蛋白质分解速率。从而提示，烫伤后大鼠比目鱼肌蛋白质分解速率的变化与胞液中氧化还原状态密切相关。

**关键词** 氧化还原；蛋白质/代谢；肌；灼伤；大鼠

机体蛋白质分解加强、负氮平衡是烧伤后代谢变化特征之一，烧伤局部骨骼肌蛋白质分解增强是伤后早期负氮平衡的主要原因[1]。有关烧伤后蛋白质分解代谢增强的机理仍未弄清楚，近年来研究表明[2][3]，肌肉蛋白质分解代谢的调节可能与胞液中氧化还原状态变化有关，饥饿、创伤时，蛋白质分解加强，NAD（P）H/NAD（P）比值降低，以甲烯蓝作为电子接受体改变氧化还原状态时，骨骼肌蛋白质分解亦可增强。烧伤后蛋白质代谢改变是否由氧化还原状态改变参与调节，目前尚未见报道。本文以一侧后肢7%体表面积全层烫伤大鼠为模型，从离体与在体两方面观察比目鱼肌蛋白质分解速率与氧化还原状态的变化，为探讨烧伤后蛋白质分解代谢增强的调节机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

雄性Wistar系大鼠，体重190～230g。校动物所提供。

乳酸脱氢酶（Ⅱ型）、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶系Sigma公司产品；L(+)-乳酸锂为B.D.H.产品；NAD、DL-苹果酸为进口分装；NADH、丙酮酸钠和1，4-哌嗪二乙磺酸（PIPES）均为上海生化所产品；放线菌酮为Fluka公司产品；胰岛素系国家标准品（1mg≈27单位），北京药品生物制品检定所

### 1.2 方法

1.2.1 实验动物随机分为烫伤组和对照组

烫伤组吸入乙醚麻醉后，剪去一侧后肢的毛（7%体表面积），足部以胶泥包裹，使其伤后能正常行走，脱毛部分浸入90℃水浴致伤3s。伤后不予任何处理，分笼喂养，自由饮水、摄食。对照组除不予致伤外其余处理同烫伤组。

1.2.2 肌肉束的制备

参照Tischler[2]方法并作改进。大鼠于伤后72h断头处死，迅速分离烫伤肢与未伤肢比目鱼肌，制成40～60mg肌束。取新鲜组织350～400mg，置于3.0ml含5mmol/L葡萄糖、0.5mmol/L放线菌酮和正常大鼠血浆浓度氨基酸（除去酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸与谷氨酰胺）的Krebs-Ringer碳酸氢钠缓冲液中，用95%$O_2$：5%$CO_2$混合气体连续通气，37℃水浴预温振摇40min之后，将肌肉束转入新鲜同种介质中保温2h。取出肌肉，介质在沸水浴中加热3min终止保温。

NADH提取：保温后部分肌肉束用滤纸吸干，于2.0ml冰冷介质（0.25mol/L KOH溶于50%乙醇中）剪碎，匀浆2min，0～4℃离心10min，4000×g。取上清液1.2ml置于加盖硬质玻管中，55℃水浴60s，取出后速冷却至4℃，以1.5mol/L $HClO_4$-0.25mol/L Tris缓冲液调至pH8.1～8.5，离心去沉淀。

NAD、苹果酸、乳酸及丙酮酸的提取：保温后取部分肌肉束吸干，于2.0ml的0.6mol/L $HClO_4$冰冷介质中剪碎，匀浆1min，0～4℃离心10min，

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

2000×g，取上清液1.8ml，以2.5mol/L KOH-0.1 mol/L PIPES缓冲液调节pH至5.5～6.5，离心去沉淀。

1.2.3 测定方法

介质中酪氨酸测定，参照蔡祝辉[4]建立的方法。NAD用荧光法测定，参考Estabrook等[5]法。介质中丙酮酸用紫外光度法测定，NADH、苹果酸及组织中丙酮酸用荧光法测定，参照Tischler等[2]法并作适当改进。

1.2.4 在体实验比目鱼肌的处理

大鼠于伤后72h处死，肌组织立即置液氮保存。测定代谢产物时肌肉处理同保温后肌组织。

1.2.5 肌肉组织菊糖间隙

采用黄涛生等[6]测得的数据，为0.54ml/g新鲜肌肉。

1.2.6 计算

细胞内乳酸、丙酮酸、苹果酸含量(nmol/g)＝组织内含量（nmol/g）－菊糖间隙（ml/g）×介质中含量（nmol/ml）。

1.2.7 数据处理

采用本校编制的程序作线性回归和单因素方差分析。

## 2 结 果

在保温介质中加入放线菌酮抑制骨骼肌蛋白质合成，以释放入介质中酪氨酸总量计算蛋白质分解速率。同时以细胞内乳酸/丙酮酸（L/P）、苹果酸/丙酮酸（M/P）和NADH/NAD比值反映细胞内氧化还原状态的变化。结果见表1。伤后大鼠离体比目鱼肌保温后细胞内L/P与M/P比值烫伤肢较未伤肢及正常组显著降低，$P<0.01$，而烫伤肢比目鱼肌NAD含量显著高于未伤肢与正常组，$P<0.01$，未伤肢与正常组无明显变化。烫伤肢酪氨酸释放量较未伤肢和正常组显著增高，$P<0.01$。

表1 伤后72h离体比目鱼肌氧化还原状态与蛋白质分解速率的变化

| | $n$ | 细胞内L/P | 细胞内M/P | 细胞内含量（nmol/g） | | 酪氨酸释放(nmol/g/2h) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | NADH | NAD | |
| 正常组 | 12 | 31.3±3.1 | 4.0±0.3 | 97.4±8.6 | 194.6±17.3 | 386.2±18.5 |
| 伤 肢 | 12 | 27.3±1.9* | 3.4±0.3* | 99.1±7.0 | 219.0±12.5* | 463.1±21.2* |
| 健 肢 | 12 | 32.6±1.5 | 4.2±0.4 | 98.6±7.6 | 198.4±14.4 | 387.2±15.7 |

*与正常组比较 $P<0.01$

保温介质中加入胰岛素，剂量为0.01u/ml。结果见表2。给予胰岛素后各组细胞内L/P与M/P比值均增高，蛋白质分解速率则降低。

表2 胰岛素对比目鱼肌氧化还原状态与蛋白质分解速率的影响

| | 正常组 | | 伤肢 | | 健肢 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 胰(I) | 对照 | 胰(I) | 对照 | 胰(I) | 对照 |
| 细胞内L/P | 40.8±2.8* (12) | 31.3±3.1 (12) | 36.3±2.1* (8) | 26.1±2.0 (8) | 41.9±2.4* (8) | 31.1±2.4 (8) |
| 细胞内M/P | 5.1±0.3* (12) | 4.0±0.2 (12) | 4.5±0.2* (8) | 3.4±0.3 (8) | 5.3±0.2* (8) | 4.1±0.3 (8) |
| 蛋白分解抑制率 | 12.2% | 0 | 11.4% | 0 | 11.8% | 0 |

注：胰（I）：胰岛素剂量为0.01u/ml；各组与其对照比较*$P<0.01$

在体比目鱼肌实验结果见表3。在体比目鱼肌烫伤肢L/P、M/P比值亦显著低于未伤肢和正常组，未伤肢和正常组则无显著差异；在体酪氨酸释放量，烫伤肢比目鱼肌亦明显高于未伤肢和正常组，后二者无明显差异。

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

表3 伤后72h在体比目鱼肌氧化还原状态与蛋白质分解速率的变化

| | n | 细胞内L/P | 细胞内M/P | 酪氨酸释放nmol/g/2h |
|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 11 | 88.3±9.1 | 3.6±0.2 | 385.0±24.5 |
| 伤 肢 | 11 | 73.8±6.4* | 3.0±0.3* | 455.3±21.4* |
| 健 肢 | 11 | 85.1±5.6 | 3.7±0.3 | 391.1±21.9 |

*与正常组比较$P<0.01$

## 3 讨 论

普遍认为，蛋白质分解速率的快慢与其结构密切相关。辅酶或某些效应剂可能具有稳定蛋白质结构的作用而降低蛋白质分解速率[7]。谷胱甘肽与蛋白质形成蛋白质-SSG复合物是启动蛋白质分解的标志[8]。近来研究表明，骨骼肌氧化还原状态变化与其蛋白质分解速率密切相关，细胞内L/P和M/P比值升高时，蛋白质分解速率降低。当给予胰岛素、肾上腺素与异丙基肾上腺素可降低蛋白质的分解，同时升高胞液NADH/NAD比值[2][9]。Tischler[10]提出，激素、某些代谢产物对蛋白质分解的调节是通过氧化还原状态改变介导完成的。当NAD (P) H/NAD (P) 比值处于氧化状态［即NAD (P) 含量升高、NAD (P) H含量下降］时，即形成蛋白质-SSG复合体，改变蛋白质构象，从而启动蛋白质分解。这一理论得到实验证实。Brown等[11]测定了幼年大鼠断奶后肝脏蛋白质分解速率、蛋白质-SSG、游离GSSG及GSH含量变化，结果发现，与进食时比较，蛋白质分解速率增加3～5倍，蛋白质-SSG含量增加4倍，谷胱甘肽总量降低40%，而GSSG增高3倍。类似的结果亦在骨骼肌组织发现。Tischler等[10]测定了大鼠伸趾长肌谷胱甘肽含量变化，与进食时比较，蛋白质分解速率显著升高，GSH/GSSG比值降低20%。本实验结果表明，烫伤肢较未伤肢和正常组蛋白质分解速率显著升高，与此同时，烫伤肢骨骼肌细胞内L/P、M/P比值较未伤肢和正常组显著降低。此外，烫伤肢NAD总量显著升高，但NADH含量各组变化不明显。在体实验亦与离体实验结果一致，表明烧伤后骨骼肌氧化还原状态与蛋白质分解速率的相关关系具有生理意义。生理剂量胰岛素可使介质中酪氨酸释放量降低，各组细胞内L/P、M/P比值显著升高。这一结果与文献[2]报道的结果一致。因此可以推测，氧化还原状态的变化可能参与胰岛素对烧伤后骨骼肌蛋白质分解代谢的调节。

迄今为止，有关烧伤后骨骼肌蛋白质分解代谢的调节机理尚未明了。烧伤后骨骼肌细胞内GSH/GSSH比值以及蛋白质-SSG变化如何，本文尚未涉及。因此，氧化还原状态变化对烧伤后骨骼肌蛋白质分解代谢的调节作用有待进一步研究。

## 参 考 文 献


1. Huang Taosheng, Dong Yanlin. Changes in protein metabolism of soleus muscle in scalded rats and therapeutic effects of leucine and insulin. J Med College PLA(China) 1987; 2 (3) :254
2. Tischler ME, Fagan JM. Relationship of the reduction-oxidation state to protein degradation in skeletal and atrial muscle. Arch Biochem Biophy 1982; 217:191
3. Buse MG, Weigand DA, Peeler D, et al. The effect of diabetes and the redox potential on amino acid content and release by isolated rat hemidiaphragms. Metabolism 1980; 29 (7) :605


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

4. 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报 1979; 11(1):51
5. Estabrook RW, Williamson JR, Frankel R, et al. The fluorometric determination of mitochondrial adenine nucleotides. Methods in Enzymology 1967; 10:474
6. 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
7. Beynon RJ, Bond JS. Catabolism of intracellular protein degradation: Molecular aspects. Am J Physiol 1986; 251:141
8. Bond JS, Offermann MK. Initial events in the degradation of soluble cellular enzymes: Factors affecting the stability and proteolytic susceptibility of fructose-1, 6-biphosphate aldolase. Acta Biol Germ 1981; 40:1365
9. Fagan JM, Satarug S, Cook PH, et al. Rat muscle protein turnover and redox state in progressive diabetes. Life Sci 1987; 40:783
10. Tischler ME, et al. Muscle protein degradation and its regulation. Nutrition Rev 1987; 45:135
11. Brown PA, Khairallah EA. Coordinate regulation of protein-bound glutathione with intracellular proteolysis in livers of meal fed rats. Fed Proc 1982; 41:868

(收稿: 1991-02-21; 修回: 1992-02-11)

## Relationship between the state of oxidation-reduction and protein degradation in the scalded soleus muscle of rats

Wang Yuancheng, Dong Yanlin (Department of Biochemistry, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

**Abstract** One hind leg(7%TBSA)of the rat was scalded and the changes of the reduction-oxidation state and protein degradation in the soleus muscle were observed 72 hours postinjury both in vitro and in vivo. It was found that the lactate/pyruvate (L/P) and malate/pyruvate(M/P)ratios of the soleus muscle were significantly lower and the protein degradation rate much higher in the scalded leg than in the unscalded legs and the control. After the addition of insulin to the medium significant elevation of L/P and M/P ratios and reduction of the protein degradation rate in the soleus muscle could be observed. There findings suggest that there is a good correlation between the changes of the reduction-oxidation state and the protein degradation rate in the cytosol of the soleus muscle after scalding in the rat.

**Key words** reduction-oxidation; protein /ME; muscle; burns; rats

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