DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.s1.001

烫伤大鼠肝脏蛋白质合成变化及胰岛素的影响

黄涛生 董燕麟（生物化学教研室）

提 要 本文观察了37%体表面积皮肤全层烫伤大鼠伤后第三天离体肝脏蛋白质代谢变化及胰岛素的影响。结果表明，烫伤大鼠肝脏蛋白质及DNA含量都无明显的变化，但RNA含量增加24%，离体肝片亮氨酸掺入率增加31%；加入胰岛素后，对照组和烫伤组亮氨酸掺入分别增加23.5%和25.7%。提示烫伤大鼠肝脏蛋白质合成速率加快，并可能与RNA含量增加有关；但对胰岛素仍具有很高的敏感性。

关键词 烫伤；蛋白质代谢；肝脏；胰岛素

肝脏是多种蛋白质的合成部位。其蛋白质代谢变化将直接影响多种血浆蛋白含量。烧伤后多种血浆蛋白含量发生明显变化[1]，但关于其肝脏蛋白质代谢变化的研究，现仅见于整体水平[2]。由于伤后氨基酸的体内代谢、稀释和分布发生变化，其结果可能都有一定误差。

本文利用亮氨酸不能直接在肝脏代谢的特点[3]，用^{3}H亮氨酸作示踪剂，观察37%体表面积皮肤全层烫伤后第三天离体肝片亮氨酸掺入速率及胰岛素对其影响，以探讨严重体表烫伤后肝脏蛋白质代谢变化及对胰岛素的敏感性。

材料与方法

一、材 料

1. 实验动物：Wistar 、雄性大白鼠，体重150～200g，由本校动物所供给。

2. 主要试剂：菲啶溴红，中国科学院生物物理所产品；^{3}H-亮氨酸，中国原子核研究所产品；核糖核酸酶，Boeheinger Mennheim 厂产品；氨基酸，日本味之素公司产品，西南制药三厂杨德华馈赠；胰岛素，四川医学院药厂产品。

二、动物模型的制备与饲养

实验前动物在本实验室用本校动物所配制的混合饲料喂养三天以上，按体重配对分成烫伤组与对照组，烫伤组用乙醚吸入麻醉后，将占体表面积30%的背部置于90～93℃水浴致伤7秒，一侧后肢（占体表面积7%）以同样水温致伤3秒，造成37%体表皮肤全层烫伤（病理切片证实），伤后腹腔注射生理盐水5.0ml，分笼喂养，自由饮水、摄食，对照组除不致外伤，处理同烫伤组，摄食量与烫伤组进行严格对照。

三、肝脏薄片亮氨酸体外掺入[4]

于伤后第三天，将动物断头处死，迅速剖腹取其肝脏，切成约0.5mm薄片，取鲜组织400～500mg，置于3.0ml含五倍大鼠血浆浓度亮氨酸和其余19种正常大鼠血浆浓度氨基酸[5,6]、10mM葡萄糖的Krebs-Ringer氏碳酸氢钠缓冲液中[7]，以O_2:CO_2为95:5的混合气体连续通气，37℃水浴振荡保温40分钟后，将肝脏薄片转至3.0ml新鲜介质中，其中每毫升含^{3}H-亮氨酸1.0μCi，以相同的保温条件保温2小时，取出肝脏薄片，吸干、剪碎，在2.0ml含0.1mM EDTA的10%三氯醋酸介质中，用内切式组织匀浆器匀浆，3000rpm离心10分钟，弃去上清，沉淀部分用相同的介质洗涤二次后，用乙醇：乙醚（1:1）萃取20分钟，去除乙醇、乙醚后，加入70%过氯酸0.7ml，30%H_2O_2 1.3ml，70℃水浴消化2小时，取消化液200μl，以8N NaOH中和其酸性后，加闪烁液（1000ml含：ppo 4g，popop 200mg，甲苯700ml，乙二醇乙醚300ml）12ml，在LKB-Rack-Beta-1217液体闪烁计算仪上，以外标准作粹灭校正，测定其放射性（计数效率约为30%）。胰岛素组即每毫升介质加入0.1u胰岛素，其余步骤相同，每次实验同时测定介质中的放射性。

$$\text{亮氨酸掺入率（nmol/g肝脏/2h）} = \frac{\text{掺入蛋白质中}^3\text{H-亮氨酸放射性(DPM/g肝脏/2h)}}{\text{介质中}^3\text{H-亮氨酸比放射性（DPM/nmol）}}$$

四、肝脏核酸含量测定

把肝组织用生理盐水制成1:400的匀浆，参照

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

陈逸诗[8]菲啶溴红微量核酸测定法稍加改良，将菲啶溴红用量减少至7μg/ml，增加核糖核酸酶用量至1.0μg/ml，延长保温时间至一小时，以达到RNA的完全消化，分别以小牛胸腺DNA和酵母RNA为标准，在日立MPF-4荧光分光光度计上测定其DNA和RNA含量。

五、肝脏蛋白质含量的测定

将肝匀浆稀释后，以小牛血清白蛋白为标准，以简化Lowry法[9]测定其蛋白质含量。

结　果

一、核酸含量的荧光分光法测定

图1和图2分别为EthBr-RNA的激发光谱与发射光谱。EthBr-DNA的激发光谱和EthBr-RNA的激发光谱极为相似，都是由两个激发峰组成，一个在紫外区，一个在可见光区。EthBr-RNA或EthBr-DNA荧光强度与其浓度之间线性关系较好的激发光波长是330～350nm和520～550nm(发射光波长为600nm处)，与陈逸诗的结果基本一致，考虑到样品中含有蛋白质，故本实验选用激发光波长为520nm。EthBr-RNA和EthBr-DNA的发射光谱也极为相似，其荧光强度与核酸浓度之间线性关系较好的区域为570～600nm (激发光波长在520nm处)，本实验选用600nm。图3为激发光为520nm，发射光波长为600nm处，荧光强度和核酸浓度之间的关系曲线。

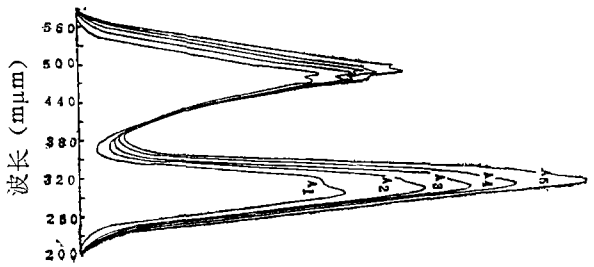


图1　EthBr－RNA激发光谱
λex＝200－590mμm，λem＝600mμm
RNA浓度：A_1-A_5，1，2，3，4，5μg/ml
EthBr浓度：7μg/ml

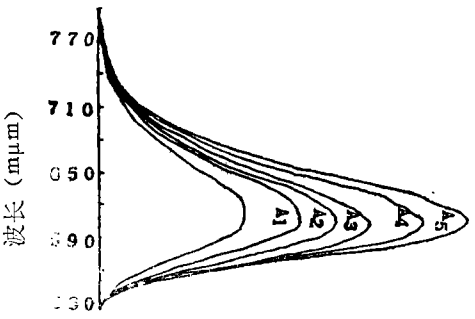


图2　EthBr－RNA发射光谱
λex＝520mμm，λem＝530－800mμm
RNA浓度：A_1-A_5，1，2，3，4，5μg/ml
EthBr浓度，7μg/ml

二、保温时间对亮氨酸掺入的影响（图4）

离体肝薄片，在2小时的保温时间内，其亮氨酸掺入速率基本恒定，超过2小时后，亮氨酸的掺入速率开始下降。图4为掺入蛋白质中亮氨酸量与保温时间的关系曲线。

三、烫伤大鼠肝脏核酸含量和蛋白质含量的变化

用菲啶溴红法测定肝脏核酸含量，所得结果与文献报道相近[10]，37%体表面积皮肤全层烫伤后第三天，其DNA和蛋白质含量无明显变化(表1)，但RNA含量增加24%，与对组照有非常显著的差异（$P<0.01$）。

表1 肝脏核酸和蛋白含量
(mg/g肝脏，$\bar{X}\pm SE$)

	对照组	烫伤组
DNA	2.76±0.15 (24)*	3.00±0.15 (21)
RNA	10.35±0.30 (24)	12.82±0.33** (21)
蛋白质	228.1±4.76 (19)	240.1±11.3 (14)

* 括号内数据为动物数，下同。**和对照组比 $P<0.01$

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

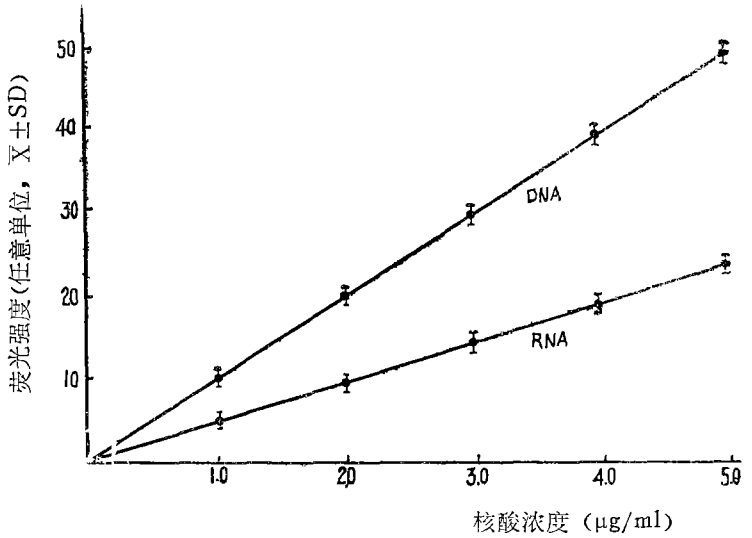


图3　核酸标准曲线（n=7）　　λex=520mμm，λem=600mμm

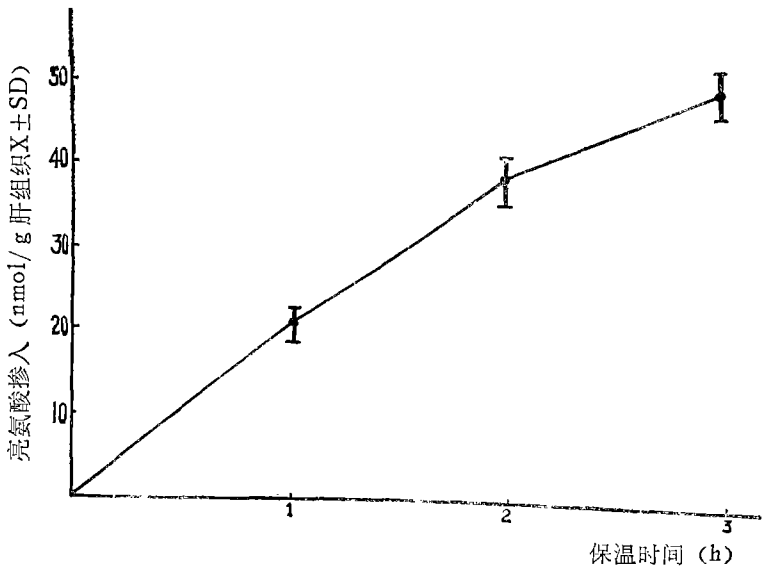


图4　离体肝脏薄片亮氨酸掺入活性（n=6）

四、烫伤大鼠肝片亮氨酸体外掺入变化及胰岛素的影响（表2）

表2 体表烫伤对肝脏亮氨酸体外掺入的影响及胰岛素的作用(nmol/g肝脏/2h，$\bar{X}\pm SE$)

	对照组	烫伤组
胰岛素（－）	28.20±1.55 (15)	36.84±1.65** (15)
胰岛素（＋）	34.82±1.09++ (15)	46.30±1.76**++ (15)

**和对照组比较P＜0.01，++和胰岛素（－）组比较P＜0.01

如表2所示，37%体表面积皮肤全层烫伤后，大鼠肝片亮氨酸掺入率增加37%（P＜0.01），每毫升介质加入0.1u胰岛素后，烫伤组和对照组亮氨酸掺入率分别增加25.7%和23.5%，均有非常显著差异，但两者增加程度基本一致。

讨　论

整体水平肝脏蛋白质代谢研究中，单纯以掺入肝脏蛋白质中放射性同位素标记的氨基酸含量作为其肝脏蛋白质合成速率的指标[2]，可由于氨基酸的体内代谢、稀释和分布等体内过程发生改变而造成误差。因此，本

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

实验利用肝脏缺乏分解支链氨基酸的转氨酶，亮氨酸必须经肝外组织转氨，生成α-酮基异戊酸后才能在肝脏代谢的特点[3]，选用^{3}H-亮氨酸作为示踪剂，在离体的情况下，直接观察了亮氨酸掺入肝脏蛋白质的速率，以了解肝脏蛋白质合成速度。由于目前还缺乏简单、方便的亮氨酸测定方法，因此，本实验把介质中亮氨酸的浓度提高到5倍大鼠血浆浓度，使肝细胞内、外亮氨酸达到平衡，以介质中^{3}H-亮氨酸的比放射性代替细胞内^{3}H-亮氨酸比放射性，结果表明，在40分钟预温后的2小时保温时间内，亮氨酸掺入率基本不变，因此，该方法不仅可减少同位素用量，排除体内某些因素的干扰，而且简单、方便。

本实验采用上述方法观察了37%体表面积皮肤全层烫伤后大鼠肝脏蛋白质合成的变化，结果发现，伤后第三天，肝脏薄片亮氨酸掺入率增加31%（$P<0.01$）（表2），而蛋白质含量不变，这一结果与Shangraw[2]在整体水平所得结果基本一致，该氏发现单一侧后肢烫伤后第三天，肝脏蛋白质合成速率增加56%，其分解速率也有相应的增加，结果其蛋白质含量无明显变化。我们认为，其蛋白质含量不变，除了与其分解速率增加外，还可能由于肝脏合成的蛋白质80%是分泌蛋白，因而不易在蛋白质的定量测定中反应出来。

肝脏蛋白质合成受多种因素的调节，在氨基酸和能量不足时，肝脏蛋白质合成减少。各种氨基酸中，色氨酸的含量可能对肝脏蛋白质合成的调节最为重要。在色氨酸缺乏时，肝脏蛋白质合成受阻，这时增加色氨酸的含量可能有助于肝脏蛋白质合成[11]，因此动物的摄食量可能影响实验结果，本实验对两组动物的摄食量进行严格的对照，以排除食物对实验结果的影响。

关于烧伤后肝脏蛋白质合成增加的机制还不太清楚，多种激素都可对肝脏蛋白质合成进行调节。烧伤后甲状腺激素、糖皮质激素[12]、胰岛素[13]和生长激素[14]含量升高，其中糖皮质激素可作用于转录和翻译水平，因此，可能对烧伤后肝脏蛋白质的合成起了重要调节作用。

本实验在观察肝脏薄片亮氨酸掺入的同时，测定了其核酸含量，结果发现，DNA的含量无明显改变，但RNA含量增加24%（$P<0.01$），提示烫伤后肝脏蛋白质合成增加与RNA含量增加有关。Sevaljevic[15]分离亚致死性体表烫伤大鼠肝细胞核发现，伤后核内蛋白质、RNA含量增加。电镜下可见染色质结构松散[16]，提示伤后肝脏细胞核的结构发生改变。茆象千[17]等观察30%体表面积烫伤大鼠肝细胞核转录活性发现，伤后^{3}H-UTP掺入明显增加，提示伤后肝细胞RNA合成增加。因此，烫伤后RNA含量增加，至少部分是RNA合成增加的结果。

在创伤情况下，多种代谢途径产生胰岛素抵抗，包括烧伤后胰岛素对肝糖异生的抑制作用降低[18]。但关于伤后肝脏蛋白质代谢对胰岛素的敏感性未见报道。本实验在介质中加入超生理剂量的胰岛素，结果发现，烫伤组和对照组亮氨酸掺入都有明显增加，而且增加程度基本一致，提示伤后肝脏蛋白质合成对胰岛素仍具有高度的敏感性，可以排除肝脏蛋白质合成对胰岛素的抵抗。

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

参 考 文 献

1. Fleck A, et al. British Medical Bulletin 1985; 41(3):256
2. Shangraw RE & Turinsky J. Biochem J 1984; 223:747
3. Odessey R & Goldberg AL. Am J Physiol 1972; 223:1376
4. Hasselgren PO, et al. J Trauma 1984; 24 (3):224
5. 顾景范，等。营养学报。1984；6(1)：3
6. 施新猷，等。医用动物实验方法。北京：人民卫生出版社，1979：424
7. Umbreit WW. Manometric and Biochemical Techniques. 5 th ed, Burgress Publishing Co. 1972: 147
8. 陈逸诗，等。 生物化学与生物物理进展 1979；11(1)：55
9. Schacterle GR & Pollack RL. Anal Biochem 1973; 51:654
10. Ananda SP, et al. J Lab & Clin Med 1972; 80:4
11. Gerok W. in Liver in Metabolism Diseases ed Bianchi L, 1983; 108
12. Botstone GR, et al. Burns 1976; 2:207
13. Turinsky J, et al. J Trauma 1977; 17:344
14. Frayn KN, et al. Clin Endocrinol(Oxf) 1984; 20:179
15. Selvajevic L, et al. Int J Biochem 1983; 15(2):225
16. Selvajevic L, et al. J Cell Sci 1984; 71:75
17. 苗象千等。待发表
18. Walf RR, et al. Metabolism 1979; 289(10): 1031

Changes of Protein Metabolism in Rat Liver after Scalding and Effects of Insulin

Huang Taosheng and Dong Yanling

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

Full thickness scalding of 37% TBSA was inflicted to rats. Three days later, the liver of the animals was isolated and the changes of the protein metabolism in the liver and the effects of insulin on the changes were evaluated.

It was found that the protein and DNA levels of the liver showed no obvious changes after scalding, but the RNA content increased by 24% and the rate of leucine incorporation by 31%. After the addition of insulin, the leucine content increased by 23.% and 25.8% in the controls and the injured animals respectively. The results indicate that the rate of protein synthesis in the liver of the scalded animals increases, which is likely to be related to the increase of RNA content, and the liver protein synthesis remains to be sensitive to insulin.

Key words: Scalding; Protein metabolism; Liver; Insulin

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