DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.01.005

烫伤后大鼠比目鱼肌蛋白质代谢的变化及亮氨酸、胰岛素的作用

黄涛生 董燕麟（生物化学教研室）

提 要 本文离体观察了包括一侧后肢的37%体表皮肤全层烫伤大鼠比目鱼肌蛋白质代谢的变化及亮氨酸、胰岛素的作用。结果表明，伤后第三天伤肢比目鱼肌蛋白含量明显降低，酪氨酸掺入、酪氨酸释放与净释放速率均明显升高，但健肢比目鱼肌上述指标与对照组无明显差异；增加介质中亮氨酸含量对比目鱼肌蛋白质代谢无明显作用，但0.1u/ml胰岛素除对伤肢比目鱼肌蛋白质代谢无明显作用外，使烫伤动物健肢和对照动物比目鱼肌酪氨酸掺入明显增加，酪氨酸净释放明显减少。结果提示（1）体表烫伤后，烫伤局部骨骼肌蛋白分解加强可能是伤后负氮平衡的主要原因。（2）单独施加亮氨酸并不能改善骨骼肌蛋白质代谢。（3）烫伤局部骨骼肌蛋白质代谢对胰岛素的敏感性降低。

关键词 烫伤；比目鱼肌；蛋白代谢；亮氨酸；胰岛素

烧伤对骨骼肌蛋白质代谢的作用可分为局部作用和全身作用，在轻度烧伤时，局部肌肉组织蛋白质的消耗可能是伤后负氮平衡的主要原因[1][2][3]，随着烧伤严重程度的增加，可能涉及远隔部位，但关于严重烧伤情况下，烧伤局部和远隔部位骨骼肌蛋白质代谢变化的比较尚未见报道。

本文以包括一侧后肢的37%体表皮肤全层烫伤大鼠为模型，离体观察了伤后第三天伤肢和健肢比目鱼肌蛋白质代谢的变化及亮氨酸、胰岛素的作用；以探讨烧伤后负氮平衡的机制及可能的影响因素。

材 料 与 方 法

一、实验动物 Wistar雄性大鼠，体重150～200g，由本校动物所供给。

二、主要试剂 ^{3}H-菊糖，27ci/mmol（中国原子能研究院，北京）；^{3}H-酪氨酸，27ci/mmol（中国原子核研究所，上海）；氨基酸（味之素公司，日本）；胰岛素，40u/ml（四川医学院药厂）。

三、实验方法

1. 动物的处理与饲养：将实验所用动物按体重配对分成烫伤组和对照组。烫伤组用乙醚吸入麻醉后，剪去欲伤的背部和一侧后肢的毛，将背部（占体表面积30%）置于大小适宜的模具中，90～93℃水浴烫伤7秒，一侧后肢（7%体表面积）以同样水温烫伤3秒。病理切片证实皮肤全层凝固性坏死，肌肉组织结构上未见损伤。伤后腹腔注射生理盐水5.0ml，分笼喂养，自由饮水，摄食，记录每天摄食量，并将对照组摄食量与烫伤组进行严格对照。

2. 比目鱼肌蛋白质代谢速率的测定[4]：于伤后第三天，将动物断头处死，分别分离烫伤动物双侧比目鱼肌和对照组比目鱼肌，称重后，按肌纤维方向，从肌腱部位，迅速把比目鱼肌制成50～80mg/块的肌束，取鲜组织400～500mg，置于3.0ml含除酪氨酸外其余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]用O_2:CO_2为95:5的混合气体连续通气，37℃水浴振荡40分钟后，转至含3.0ml新鲜介质中，其中每毫升含^{3}H-酪氨酸0.5μCi，在相同的保温条件下，保温2小时，取出肌肉组织吸干、剪碎，在2.0ml含0.1mM EDTA的三氯醋酸（10%）介质中匀浆，3,000转/分离心10分钟，沉淀部分用2.0ml的上述介质洗涤两次，将所有的上清液混合，用微量酪氨酸荧光分光法[8]在日立MPF-4荧光分光光度计上测定其酪氨酸含量。取一定量上清液，加入闪烁液（1000ml含：PPO 4g、POPOP200mg、甲苯700ml、乙二醇乙醚300ml）在LKB-Rack-Beta-1217液体闪烁计数仪上，以外标准源作猝灭校正，测定其放射性（DPM）；沉淀部分用乙醇：乙醚（1:1）萃取20分钟，去除乙醇、乙醚后，加入70%

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

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，以上述方法测定其放射性；取保温后介质，去蛋白后，测定其酪氨酸含量与放射性。亮氨酸和胰岛素组即分别把介质中亮氨酸浓度升高到5倍大鼠血浆浓度和每毫升介质加入0.1μ的胰岛素，其余过程相同。

3．菊糖间隙的测定：取一定量比目鱼肌按上述过程进行保温，但以0.5μCi/ml的^{3}H-菊糖代替0.5μCi/ml的^{3}H-酪氨酸，保温完毕，取出肌肉组织，吸干、剪碎，直接用过氯酸和H_2O_2消化，用8N NaOH中和其酸性后，以上述方法测定其放射性。

4．计算：

菊糖间隙（ml/克肌肉）

$$= \frac{\text{保温后肌肉组织}^3\text{H-菊糖放射性（DPM/克肌肉）}}{\text{介质中}^3\text{H-菊糖放射性（DPM/ml）}}$$

比目鱼肌细胞内^{3}H－酪氨酸比放射性（DPM/nmol）

$$= \frac{\text{上清液中放射性（DPM/克肌肉）} - \text{菊糖间隙（ml/克肌肉）} \times \text{介质中放射性（DPM/ml）}}{\text{上清液中酪氨酸含量(nmol/克肌肉)} - \text{菊糖间隙(ml/克肌肉)} \times \text{介质中酪氨酸含量(nmol/ml)}}$$

掺入比目鱼肌酪氨酸含量（nmol/克组织/2 h）

$$= \frac{\text{掺入蛋白质}^3\text{H-酪氨酸放射性（DPM/克组织/2h）}}{\text{肌肉细胞内}^3\text{H-酪氨酸比放射性（DPM/nmol）}}$$

酪氨酸净释放量（nmol/克组织/2h）

＝释入介质酪氨酸总量（nmol/2h）÷肌肉组织重量（克）

酪氨酸释放量（nmol/克组织/2h）

＝掺入蛋白质酪氨酸含量（nmol/克组织/2h）＋酪氨酸净释放量（nmol/克组织/2h）

5．比目鱼肌蛋白质含量：用简化Lowry法[9]测定。

实验结果

一、烫伤大鼠比目鱼肌蛋白质含量的变化

于伤后第三天测定其比目鱼肌蛋白质含量发现，伤肢比目鱼肌蛋白质含量明显降低（$P<0.05$），但健肢与对照组无明显差异。

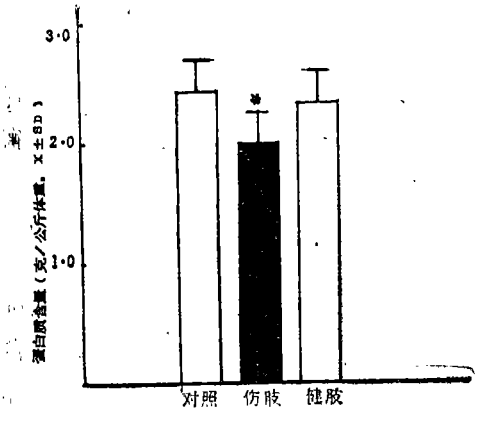


图1　烫伤对大鼠比目鱼肌蛋白质含量的影响

二、烫伤大鼠比目鱼肌蛋白质合成速率的变化及亮氨酸、胰岛素的作用（表1）

伤后第三天，伤肢比目鱼肌酪氨酸掺入率增加33%（$P<0.01$），健肢比目鱼肌酪氨酸的掺入率与对照组无明显差异；增加介质中亮氨酸的含量到5倍大鼠血浆浓度，各组动物比目鱼肌酪氨酸掺入率都无明显改变，但每毫升介质加入0.1u胰岛素后，除伤肢比目鱼肌酪氨酸掺入无显著改变外，对照组比目鱼肌和烫伤组健肢比目鱼肌酪氨酸掺入率分别增加25%（$P<0.05$）和53%（$P<0.05$）

三、烫伤后大鼠比目鱼肌酪氨酸净释放的变化及亮氨酸、胰岛素的作用

伤后第三天，伤肢比目鱼肌释放到介质中酪氨酸含量增加17%（$P<0.01$），但健肢和对照组无明显差异，增加介质中亮氨酸含量并不能使比目鱼肌酪氨酸净释放减少，但每毫升介质加入0.1u胰岛素后，除伤肢比目鱼肌外，健肢和对照组酪氨酸净释放量都有明显减少（表2）

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

表1 比目鱼肌酪氨酸体外掺入及亮氨酸、胰岛素对其影响
(nmol/克湿组织/2h, $\bar{X}\pm SE$)

A→ / B↓	对照组	烫伤组		P值
		健肢	伤肢	
基础介质	76.7±4.7 (20)	63.3±3.7 (20)	105.8±6.1**△△ (20)	A<0.001
+亮氨酸	77.1±3.9 (10)	73.1±7.1 (10)	108.2±9.7*△ (10)	B<0.001
+胰岛素	96.0±4.7+ (10)	96.7±10.3+ (10)	120.1±8.3 (10)	A*B<0.001

*和对照组比较P<0.05　　++和基础介质比较P<0.01
**和对照组比较P<0.01　　△ 和伤肢比较P<0.05
+和基础介质组比较P<0.05　　△△ 和伤肢比较P<0.01
括号内数为实验动物数

表2 比目鱼肌酪氨酸净释放量及亮氨酸、胰岛素的影响
(nmol/克湿组织, $\bar{X}\pm SE$)

A→ / B↓	对照组	烫伤组		P值
		健肢	伤肢	
基础介质	185.1±6.1 (20)	188.6±5.2 (20)	217.7±6.2**△△ (20)	A<0.001
+亮氨酸	165.5±7.3 (10)	178.3±10.6 (10)	234.5±14.7**△△ (10)	B<0.001
+胰岛素	148.9±7.2++ (10)	143.9±6.5++ (10)	203.0±10.7**△△ (10)	A*B<0.001

符号表示同表1

四、烫伤大鼠比目鱼肌蛋白质分解速率的变化及亮氨酸、胰岛素的作用

烫伤大鼠伤后第三天伤肢比目鱼肌蛋白质分解速率增加24% (P<0.01)，但健肢蛋白质分解速率与对照组无明显差异，增加介质中亮氨酸含量和每毫升介质加入0.1u胰岛素，对这一过程都无明显作用（表3）。

讨　论

一、体表烫伤后骨骼肌蛋白质代谢变化及可能机制　本实验结果表明，体表烫伤后，烫伤局部和远隔部位骨骼肌蛋白质代谢变化不同，伤肢蛋白质含量降低（图1）。在离体酪氨酸掺入实验中，蛋白质合成与蛋白质分解速率明显加快，酪氨酸净释放量明显高于对照组。由于蛋白质合成速率增加部分抵销了蛋白质分解加强引起的消耗。健肢比目鱼肌蛋白质含量、酪氨酸掺入和释放与对照组无明显差异，提示在严重烧伤的情况下，与轻度烧伤时一样[2][3][10]，其负氮平衡的主要原因在于烧伤局部骨骼肌分解加强。

烧伤局部骨骼肌蛋白质合成和分解增加的机制还不太清楚。其局部血流增加和蛋白质分解增加后的氨基酸释出增加对其蛋白质合成增加可能有一定的作用。烧伤局部蛋白质分解增加的原因可能与溶酶体和非溶酶体蛋白水解酶有关。Odessey[11][12]先后用蛋

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

表3 比目鱼肌酪氨酸释放及亮氨酸，胰岛素对其影响
(nmol/克湿组织/2h，$\bar{X}\pm SE$)

A← / B ←	对照组	烫伤组		P 值
		健肢	伤肢	
基础介质	264.9±8.3 (20)	254.2±6.2 (20)	327.9±7.6$^{*}_{\Delta}$ $^{*}_{\Delta}$ (20)	A<0.001
+亮氨酸	241.1±13.0 (10)	250.7±5.2 (10)	342.5±12.9$^{*}_{\Delta}$ $^{*}_{\Delta}$ (10)	B = 0.08
+胰岛素	250.0±12.7 (10)	240.5±8.1 (10)	315.4±11.6$^{*}_{\Delta}$ $^{*}_{\Delta}$ (10)	A*B = 0.20

符号表示同表1

白水解酶抑制剂和直接测定烫伤局部骨骼肌溶酶体蛋白水解酶的方法，发现，烫伤局部骨骼肌多种溶酶体蛋白水解酶活性升高。但就其溶酶体蛋白水解酶活性升高的机制尚未见报道，我们推测，可能与局部炎症反应中，巨噬细胞释放的白细胞介素1有关，后者可使骨骼肌蛋白质分解加强[13]。

二、亮氨酸对骨骼肌蛋白质代谢的调节作用　支链氨基酸主要在骨骼肌组织分解，是肌肉组织的重要能源之一，在创伤的情况下，各种氨基酸的氧化分解不一，其中亮氨酸的分解明显增加[14]。因此，亮氨酸的含量可能对骨骼肌蛋白质代谢具有调节作用。本实验在正常大鼠血浆浓度氨基酸的基础上，单独增加亮氨酸浓度，以探讨给烧伤患者单独增加亮氨酸的作用，结果表明单独增加亮氨酸的含量并无明显改变比目鱼肌蛋白质代谢速率的作用。提示这种情况下，单独增加亮氨酸并不能改善机体的氮平衡，这一结果和整体实验[15]和部分离体实验[16]结果一致。然而，支链氨基酸尤其是亮氨酸具有促使饥饿大鼠离体骨骼肌和心肌蛋白质合成，抑制其分解的作用已有不少的报道[17][18]。

产生以上种种分歧的主要原因可能是，在饥饿的情况下，骨骼肌组织参与支链氨基酸氧化分解有关的酶活性升高，亮氨酸的氧化加强，使之容易造成亮氨酸的相对缺乏，这时亮氨酸的补充可为蛋白质合成提供底物，通过亮氨酸的氧化供能，抑制蛋白质的分解。在正常情况下，可能不易引起亮氨酸的缺乏。在烧伤的情况下，尽管亮氨酸的氧化增加，但由于蛋白质分解加强，细胞内氨基酸含量可能高于正常水平[19]，因此，在这种情况下，补充亮氨酸可能不具有饥饿时的效应。

三、胰岛素对烧伤后骨骼肌蛋白质代谢的调节　超生理剂量胰岛素(0.1u/ml)可使烫伤大鼠健肢和对照组动物比目鱼肌酪氨酸掺入明显增加，释入介质中酪氨酸含量明显减少。由于酪氨酸总释放量无明显改变，因此，胰岛素主要是通过增加蛋白质的合成而减少骨骼肌蛋白质消耗的。由于伤肢比目鱼肌蛋白质合成与分解对胰岛素的敏感性降低，提示可能存在胰岛素抵抗，或由于伤肢骨骼肌蛋白质合成速率已经达到较大的限度，此时，胰岛素并不能进一步刺激其蛋白质的合成。这一结果与单一侧后肢烫伤大鼠葡萄糖代谢极为相似[20]。

胰岛素对骨骼肌蛋白质代谢的调节是多环节的，近来有人[21]认为$PGF_2\alpha$参与这一过程，胰岛素在促使骨骼肌蛋白质合成的同时，也使其$PGF_2\alpha$的含量增加，消炎痛在抑制$PGF_2\alpha$的同时，也抑制了胰岛素的这一作用。烫伤局部骨骼肌蛋白质代谢对胰岛素敏

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

感性降低是否与此有关，有待进一步阐明。

参 考 文 献

1. Hassett J & Border JB. World J Surg 1981; 7:707
2. Odessey R & Parr B. Metabolism 1982; 31(1):82
3. Shangraw RE & Turinsky J. J Surg Res 1982; 33:345
4. Tischer ME, et al. J Biol Chem 1982; 257: 1613
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. Manometic and Biochemical Techniques. 5th ed, Burgess Publishing Co, 1972:146
8. 蔡祝辉，等。生物化学与生物物理进展 1979;11(1):49
9. Schacterle GR & Pollack RL. Anal Biochem 1973; 51:654
10. Shangraw RE & Turinsky J. Biochem J 1984; 223:747
11. Odessey R, et al. Proc Clin Biol Res 1985; 180:747
12. Odessey R. Metabolism 1986; 35(8):750
13. Loda M, et al. Surgery 1984; 96:204
14. Birkhahn RH & Mashiro O. J Trauma 1985; 25(5):516
15. Smith JAR & Simms JS. JPEN 1980; 4:433
16. Shangraw RE & Turinsky J. Physiologist 1980; 23:94
17. Buse MG, et al. Horm & Metab Res 1979; 11:289
18. Chua B, et al. J Biol Chem 1978; 252(17): 8358
19. Askanaz J, et al. Ann Surg 1978; 188:797
20. Nelson KM & Turinsky J. J Surg Res 1983; 31:288
21. Reed PJ, et al. Biochem J 1985; 227:255

（上接15页）

增加主要与肺微血管壁通透性增高有关。Meyrick等[6]观察到给绵羊输入ZAP，当肺淋巴流量增加时，可见肺血管内皮细胞受损，随着肺淋巴中蛋白含量增加，可见水肿液在肺内聚集，血管周围有细胞渗出。因此ZAP对肺血管内皮细胞的损伤，可能是导致肺微血管壁通透性增加的直接原因。

在我们的实验中，输入ZAP后外周血白细胞计数减少，这可能是白细胞在肺中淤积的结果。输入ZAP后1小时末，中性粒细胞释放超氧阴离子的能力显著增强。两个半小时末，L/P值显著增大，似可认为白细胞参与了激活的补体对肺的损伤作用。输入ZAP可直接激活中性粒细胞，使之释放超氧阴离子的能力增强。中性粒细胞释放超氧阴离子增多，可能与肺微血管壁通透性增加有关。

中性粒细胞释放超氧阴离子能力增强时，肺动脉压已降至对照水平。Havill先给绵羊使用超氧歧化酶，在输入ZAP时，未出现明显的肺血管壁通透性增高，而早期的肺动脉压升高不受影响。表明中性粒细胞释放超氧阴离子的能力增强，不会导致肺动脉压升高。

上述结果提示ZAP激活中性粒细胞，使之释放超氧阴离子增多，可能是激活的补体损伤肺微血管壁的原因之一。

参 考 文 献

1. Goldstein IM. Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J Clin Invest 1975; 56: 1155～1163
2. Sacks T. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes; An in vitro model of immune vascular damage. J Clin Invest 1978; 61:1161～1167
3. Till GO. Intravascular activation of complement and acute lung injury : Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. J Clin Invest 1982; 69:1126～1135
4. Stothert JC. Modified chronic lung lymph fistula in goats via thoracic duct. J Appl Physiol 1981; 51:226～228
5. Shigeoka AO. Defective oxidative metabolic responses of neutrophils from stressed neonates. J Pediatr 1981; 98:392～398
6. Meyrick BO. The effect of a single infusion of zymosan-activated plasma on the pulmonary microcirculation of sheep: Structure-function relationships. Am J Pathol 1984; 114:32～45

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

ter the infusion of ZAP. Consequently, there was an increase in the amount of lung lymph flow and the protein concentration in the lung lymph. The results indicate that the superoxide anion released by the activated granulocytes may be one of the causes through which the activated complement can induce lung injury.

Key words: Complement; Lymph; Pulmonary circulation; Superoxide anion

(p.14)

Changes of protein Metabolism in Rat Soleus Muscle after Burus and Effects of Leucine and Insulin

Huang Taosheng, Dong Yanling (Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

This paper is to report the changes of the protein metabolism in the rat soleus muscle in vitro after 37% TBSA full-thickness burns covering one hindlimb and the effects of leucine and insulin on the burned muscle.

It was found that there werea significant decreases of the protein content and marked exaggeration of the rates of tyrosine incorporation, tyrosine release and tyrosine net release in the burned muscle. No changes of the above-mentioned parameters could be revealed in the muscle of the unburned limb and the controls. Elevation of leucine concentration in the medium could not improve the protein metabolism of the burned muscle. 0.1 u/ml of insulin could significantly stimulate the tyrosine incorporation in the muscle of the unburned limb and the controls, but no similar effect was observed on the burned muscle.

The results indicate that increased protein degradation of the local burned muscle is responsible for the postburn negative nitrogen balance; administration of leucine alone cannot improve the protein metabolism in the local burned muscle; and the sensivity of the burned muscle to insulin is suppressed.

Key words: Burns; Soleus muscle; Protein metabolism; Leucine; Insulin

(p.16)

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