DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.04.003

重度烫伤大鼠肝、肌细胞核转录的动态变化

茆象千 石成德 董燕麟

（生化教研室）

提 要 本实验研究30%体表面积Ⅲ度烫伤大鼠的肝与骨骼肌细胞核体外转录活性，分别观察了伤后6、12、24、48和72小时转录活性的动态变化。

实验结果表明，烫伤后6小时大鼠肝细胞核〔^{3}H〕-UTP掺入达峰值，与对照组比较差异非常显著（$P<0.001$），24小时后迅速降低至对照组水平。而骨骼肌细胞核〔^{3}H〕-UTP掺入，在伤后12小时达峰值（$P<0.001$），是对照组水平的172%，并一直持续到72小时，转录活性仍在很高的水平上。

上述结果提示，创伤后肝与骨骼肌组织中蛋白质生物合成速度增加，可能与这些组织中细胞核转录活性升高有关。

关键词：烫伤；肝、肌细胞核；核转录活性

创伤引起机体蛋白质的大量丢失是创伤后代谢变化的重要特征之一。蛋白质的丢失对患者的预后与伤口愈合均有明显的影响，因此，对创伤后蛋白质的代谢变化有许多研究报导。但关于蛋白质的合成代谢报导结果不一。Frayn等[1]与Newman等[2]则证明大鼠烫伤后肌肉蛋白质的合成受到抑制；Shangraw等[3]与Birkhahn等[4]则证明受伤后的大鼠与人的蛋白质合成增强。肝脏与骨骼肌是创伤后蛋白质代谢改变最显著的组织，而RNA又是蛋白质生物合成的关键因素，RNA含量愈多，蛋白质合成愈旺盛。Millward等[5]指出，骨骼肌中蛋白质与RNA的含量呈正相关。本实验采用细胞核体外转录系统，观察严重烫伤后的大鼠在72小时内肝细胞核与骨骼肌细胞核转录活性的动态变化，为进一步认识创伤后蛋白质合成代谢变化机理提供资料。

材料与方法

一、材料和仪器

雄性大鼠，体重150～180g，由校动物所提供。四种核苷三磷酸盐，上海东风试剂厂产品。〔^{3}H〕-UTP，20Ci/mmol，上海原子核研究所产品。

MSE-75型超速离心机。LKB 1217型液体闪烁计数器。SP8-100型紫外分光光度计。ZS83-1型内切式组织匀浆器。

二、烫伤大鼠模型制备[6]

大鼠用乙醚麻醉，剪去背部致伤部位的毛，浸于83℃热水中30秒钟，造成30%体表面积Ⅲ度烫伤。动物随机分组，分别于伤后6、12、24、48与72小时快速断头活杀取材。对照组与实验组同样处理，但不致伤。

三、肝细胞核的制备

活杀大鼠后立即取肝组织1g，按Tata[7]介绍的方法制备肝细胞核，先用适量的介质A（含2mM $MgCl_2$、0.32M蔗糖、0.05% Tritonx-100的pH 7.0 10mM Tris-HCl缓冲液）漂洗、剪碎，再用24ml同样介质将肝组织碎块制成匀浆，用200目尼龙布过滤除去残渣。滤液以800×g离心10分钟，制得粗核。将粗核混悬于20ml介质B（含1mM $MgCl_2$、2.2M蔗糖的pH7.0 Tris-HCl缓冲液）中，并在超速离心管内以5ml介质B铺垫，将粗核悬液加在其上，于68000×g离心60分钟，沉淀即为提纯的肝细胞核。将肝纯核混悬于少量保存液（含3mM $Mg(Ac)_2$、0.1mM EDTA、10mM DTP的25%甘油水溶液）中备用。

四、肌细胞核的制备

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

参照Kuehl法[8]加以改良。取大鼠后腿部骨骼肌4 g，用适量A液（含2 mM $MgCl_2$、0.32M蔗糖、0.05% Tritonx-100的pH7.0 10mM Tris-HCl缓冲液）漂洗后，于10ml B液（含1 mM $MgCl_2$、0.5%Tritonx-100的0.25M蔗糖液）中剪碎，先用内切式组织匀浆器绞切2分钟，再用玻璃匀浆器制成匀浆。用200目尼龙布过滤，残渣再用玻璃匀浆器匀浆一次，合并两次滤液。于800×g离心5分钟，沉淀用适量B液再洗一次，得到粗核。将粗核混悬于15ml C液（含1%小牛血清、5 mM $MgCl_2$的2.3M蔗糖液）中。用8 ml D液（含1%小牛血清、5 mM $MgCl_2$的2.4M蔗糖液）铺垫于超速离心管中，将粗核悬液加在垫子上，65000×g离心75分钟，制得纯肌细胞核。

上述制备肝、肌细胞核的操作均在0～4 ℃下进行。

五、细胞核悬液中DNA含量的测定

按张龙翔等[9]紫外吸收法测定。将核悬液以0.1N NaOH稀释，于紫外分光光度计上测定260 nm吸收值，按下列公式计算DNA浓度。

$$\text{DNA浓度}\ (\mu g/ml) = \frac{O.D260}{0.020 \times L} \times \text{稀释倍数}$$

0.020为每毫升溶液含1微克DNA的光密度

L为比色杯厚度（厘米），一般为1

六、细胞核转录活性测定

参照Marzluff等[10]方法进行。在100μl总反应体系中含细胞核悬液50μl，最终各离子浓度为25 mM pH8.0Tris-HCl缓冲液；25mMα-巯基乙醇；0.05mM EDTA；ATP、GTP、CTP均为1 mM，UTP为0.2mM；[^{3}H]-UTP为2 μCi。反应体系于30℃保温30分钟，加2 ml冰冷10%TCA-20mM焦磷酸钠液终止反应，并沉淀转录生成的RNA。将溶液经“4-9”型玻璃纤维空气滤纸（上海红光造纸厂）吸滤，再分别用10%TCA、5%TCA和95%乙醇5ml各冲洗三次。滤膜置80℃烘干30分钟，浸于含0.03%POPOP-0.3%PPO的5 ml二甲苯闪烁液中，于液体闪烁计数器计数，结果以每50μg DNA的cpm表示。

结　果

烫伤组在伤后6、12、24、48和72小时肝、骨骼肌细胞核转录活性，以及对照组上述两种细胞核转录活性结果见表1、2。

表1　肝细胞核转录活性（$\bar{X} \pm S \cdot D$）

	对照组	烫伤组（小时）				
		6	12	24	48	72
转录活性	7408	10175 **	10000 **	8002	7463	8156 *
	±690	±1227	±1216	±651	±656	±408
cpm/50μgDNA	(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=9)	(n=9)
%	100	137.4	134.9	108.0	100.7	110.0

括号内数字为动物数　　与对照组比较 ** $P<0.001$　　* $P<0.05$

表2　骨骼肌细胞核转录活性（$\bar{X} \pm S \cdot D$）

	对照组	烫伤组（小时）				
		6	12	24	48	72
转录活性	2024	3356 **	3493 **	3486 **	3399 **	3027 **
	±129	±541	±628	±477	±351	±266
cpm/50μgDNA	(n=12)	(n=12)	(n=11)	(n=12)	(n=12)	(n=12)
%	100	165.8	172.6	172.2	167.9	149.5

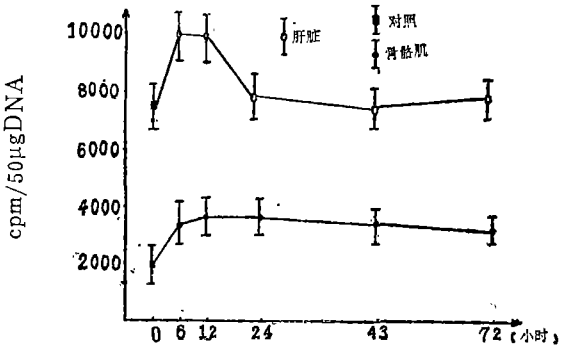
括号内数字为动物数　与对照组比较 ** $P<0.001$

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

从表1可知烫伤后6小时肝细胞核在体外转录系统中[^{3}H]-UTP的掺入由对照组的7408±690cpm/50μg DNA增高至10175±1227cpm/50μg DNA，差异非常显著（$P<0.001$），12小时开始下降，48小时恢复对照组水平，72小时又稍有增高。

从表2说明烫伤后6小时肌细胞核[^{3}H]-UTP的掺入升高同样显著（$P<0.001$），由对照组的2024±129cpm/50μg DNA增至3356±541cpm/50μgDNA，12小时达最大值，平均达到对照组水平的172.6%，并且一直持续到伤后72小时转录活性仍在很高的水平上。

上述结果从下图可见，烫伤后大鼠的肝和骨骼肌细胞核转录活性动态变化曲线是极不相同的。



烫伤后肝和骨骼肌细胞核转录活性动态变化曲线比较图

讨　论

本文参照Tata与Kuehl等介绍的方法制备的肝细胞核和骨骼肌细胞核经高倍显微镜与电镜检查形态完整，纯度较高。从体外转录活性测定的结果看，能满足实验要求，并且肝细胞核的转录活性显著高于肌细胞核。

大鼠烫伤后6小时肝细胞核转录活性达峰值，然后逐渐趋向恢复对照组水平。此变化情况基本上与文献报导结果一致。Liu等[11]利用^{14}C-乳清酸掺入实验观察受伤后大鼠肝脏RNA的合成，结果指出在伤后8小时达到峰值，并且特别指出主要是mRNA合成增快。Hurley等[12]利用20～30%体表面积全层皮肤烫伤大鼠作实验观察肝多核糖体的活性，指出伤后24小时肝多核糖体的翻译活性比对照组增高150～260%，5天后恢复至对照组水平。这些结果均提示，在伤后肝细胞核转录活性明显增高。

肝脏是血浆蛋白质合成的主要器官，创伤后血浆中急性时相反应蛋白大都来自肝脏。Sevalievic等[13]观察20%体表面积烫伤大鼠血浆蛋白在伤后虽有轻度下降，但[^{3}H]-亮氨酸的掺入率却显著增高，而且这种增高早在伤后4小时即可出现。其后他们[6]又进一步证实烫伤后虽然白蛋白与球蛋白的掺入率都增高，但最明显的是α-与β-球蛋白部分，这正是血浆急性时相反应蛋白在电泳中分布的位置。因此，我们认为本实验指出烫伤后大鼠肝细胞核转录活性增高，可能是合成肝脏分泌的血浆蛋白，特别是急性时相反应蛋白的mRNA部分。

关于创伤后骨骼肌RNA的合成情况，从查阅到的文献中未见报导。Millward等[5]用改变喂养大鼠条件观察骨骼肌RNA含量与蛋白质含量的关系，结果指出，饥饿或无蛋白饲料均可以降低大鼠骨骼肌中RNA含量，同时蛋白质合成速率亦相应下降，蛋白质的合成量与RNA含量呈正相关。Stein等[14]观察营养补充适当的骨折大鼠全身各器官蛋白质合成情况，结果指出，除肺脏外，其他器官与组织，包括骨骼肌的蛋白质合成均明显增高。Shangraw等[3]对单后肢烫伤的大鼠骨骼肌蛋白质合成代谢进行观察结果也指出蛋白质合成增高。根据本实验的结果，伤后骨骼肌细胞核转录活性增高，说明骨骼肌RNA合成加快，也间接的证明蛋白质合成代谢是活跃的。

但由于骨骼肌蛋白质合成易受外界因素的影响，例如氨基酸和能量补充不足、肢体活

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

动受限、激素的不平衡等均可影响蛋白质的合成，因此，过去文献中关于创伤后蛋白质合成代谢有些不同的结果，可能与这些因素有关。

参 考 文 献

1. Frayn KN, et al. Regulation of protein metabolism by a physiological concentration of insulin in muscle soleus and extensor digitorum longus muscles. Effects of storvation and scald injury. Biochem J 1979; 184:323

2. Newman JJ, et al. Altered protein metabolism in diaphragms from thermally injured rats. J Surg Res 1984; 36:177

3. Shangraw RE, et al. Altered protein kinetice in vivo after single-limb burn injury. Biochem J 1984; 223:747

4. Birkhahn RH, et al. Effects of major skeletal trauma on whole body protein turnover in man measured by L-^{14}C-Leucine. Surgery 1980; 88:294

5. Millward DJ, et al. Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle. Nature 1983; 241:204

6. Sevaljevic L, et al. The effects of repeated thermal injury on rat liver and serum protein synthesis rates. Comp Biochem Physiol 1982; 73B:379

7. Tata JR. Isolation of nuclei from liver and other tissues. Methods in Enzymology 1974; 31A:253

8. Kuehl L. Isolation of skeletal muscle nuclei. Methods in cell Biology 1977; 15: 79

9. 张龙翔，等。生化实验方法和技术。 人民教育出版社，1981: 218

10. Marzluff WF, et al. Transcription ribonucleic acid in isolated muscle myeloma nuclei. Biochemistry 1973; 12:3440

11. Liu AL, et al. Injury and plasma protein biosynthesis II. Hepatic microsomal activity and polysomal organization. Biochem Biophys Acta 1968; 166:195

12. Hurley PM, et al. Selective increases in the activities of rat liver polysomes following burn trauma. Proc Soc Exp Biol Med 1980; 164:121

13. Sevaljevic L, et al. Thermal Trauma-induced changes in the synthesis of rat serum proteins. Comp Biochem Physiol 1983; 76B:227

14. Stein JP, et al. Changes in protein synthesis after trauma: Importance of nutrition. Am J Physiol 1977; 233:E348

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

Dynamic Changes of Transcriptional Activities of Nuclei of Rat Liver and Skeletal Muscle Cells in vitro after Severe Burns

Mao Xiangqian, et al

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

The dynamic changes of the transcriptional activities of the nuclei of the rat liver and skeletal muscle cells were observed in the 6th, 12th, 24th, 48th, and 72nd hours after the animals were inflicted with 30% TBSA third degree burns.

It was found that the incorporation of [^{3}H]-UTP into the liver cell nuclei in vitro increased significantly in the 6th and 12th postburn hours. The peak of elevation occurred in the 6th hour postburn (from 7408±690 cpm/50 μg DNA of normal to 10175±1227 cpm/50 μg DNA, $P<0.001$). Then the incorporation reduced rapidly and retuened to normal in level in the 24th hour postburn.

The transcriptional activities of rat skeletal muscle cell nuclei was also significantly elevated in the 6th and 12th postburn hours ($P<0.001$). The peak occurred in the 12th hour postburn (from 2024±129 cpm/50 μg DNA of normal to 3493±628 cpm/50 μg DNA). The incorporation was maintained at the high level until 72nd hour postburn.

It is suggested that the elevation of the transcriptional activities might be responsible for the increment of protein synthesis in rat liver and skeletal muscles after burns.

Key words: Transcriptional activity; Liver cells; Skeletal muscle cells; Severe burns

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