

## 褪黑激素对严重烧伤早期肾功能损害的保护作用

韩晓华 温冠清 徐珞

**【摘要】 目的** 观察褪黑激素(MLT)对严重烧伤大鼠肾组织氧化应激损伤和肾功能不全的保护作用及机制。**方法** 将 70 只 SD 大鼠随机分为假手术组(10 只)、烫伤组(用背部浸入沸水中 30 s 造成 30% 总体表面积 III 度烫伤模型, 30 只)和 MLT 治疗组(伤后立即腹腔注射 MLT 10 mg/kg, 每 12 h 补充注射 1 次, 30 只)。检测各组伤后 6、24 和 72 h 肾组织丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量、血浆肌酐(BCr)及尿素氮(BUN)水平, 以及伤后 6 h 肾组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和髓过氧化物酶(MPO)活性。**结果** 烫伤后各时间点肾组织 MDA 水平明显升高, 而 GSH 含量则显著下降, 二者变化均以伤后 6 h 最明显( $P$  均  $< 0.01$ )。BCr 及 BUN 水平在烧伤后 6 h 达高峰( $P$  均  $< 0.01$ ), 然后呈进行性下降。单次 MLT 治疗使伤后 6 h 肾组织 MDA 水平降低 27.8% ( $P < 0.01$ ), 使 GSH 含量提高 44.4% ( $P < 0.05$ ), 并抑制 BCr 及 BUN 水平 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。连续注射 MLT 对以上各指标均无明显影响。此外, MLT 使烧伤后 6 h 肾组织 MPO 水平降低 30.2% ( $P < 0.05$ ), 但对 GSH-Px 活性无明显影响。**结论** 30% III 度烫伤可导致大鼠肾脏发生明显的氧化应激损伤(伤后 72 h 内)及急性肾功能不全(伤后 24 h 内), 单次 MLT 治疗对二者均具有一定的保护作用, 可能与 MLT 具有强大的自由基清除能力及抑制中性粒细胞聚集有关。

**【关键词】** 烧伤; 褪黑激素; 氧化应激; 肾功能; 大鼠

**Protective effect of melatonin against renal dysfunction following severe burn in rats** HAN Xiao-hua, WEN Guan-qing, XU Luo. Department of Physiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong, China

**【Abstract】 Objective** To explore the protective effect of melatonin (MLT) against renal dysfunction in the early stage of burn in rats. **Methods** Seventy SD rats were randomly assigned to three groups: sham control ( $n=10$ ), burn control ( $n=30$ ) and MLT group ( $n=30$ ). The 30% total body surface area (TBSA) full-thickness burn was induced by immersing the dorsal skin into boiling water for 30 seconds, while MLT (10 mg/kg, i. p.) was given immediately postburn, and the same dose was repeated once after 12 hours. The contents of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) in renal tissue, as well as plasma creatinine (BCr) and urea nitrogen (BUN) levels were measured at 6, 24 and 72 hours postburn, while the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and myeloperoxidase (MPO) of renal tissue were measured only at 6 hours postburn. **Results** MDA content was significantly increased and GSH content was decreased in renal tissue after a 30% TBSA full-thickness burn at all time points. Plasma BCr and BUN levels were elevated within 24 hours postburn. All these changes peaked at 6 hours postburn (all  $P < 0.01$ ). Single injection of MLT decreased MDA by 27.8% ( $P < 0.01$ ) but increased GSH by 44.4% ( $P < 0.05$ ). It also inhibited the rise in plasma BCr and BUN levels ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). However, repeated MLT injection did not show additional effect on these parameters as single injection of MLT. In addition, single dose of MLT also lowered the MPO level by 30.2% ( $P < 0.05$ ), but did not improve the GSH-Px activity at 6 hours postburn. **Conclusions** Severe burn may result in obvious oxidative stress (within 72 hours postburn) in the kidney with acute renal dysfunction (within 24 hours postburn). Single injection of MLT partially counteracted these changes, due to its high free radical scavenging capacity as well as its inhibitory effect on neutrophil-mediated tissue injury.

**【Key words】** burn; melatonin; oxidative stress; renal function; rat

严重烧伤后, 由于有效循环血量锐减及微循环淤滞, 各脏器均呈现不同程度的缺血、缺氧性损害, 肾脏是最主要的靶器官之一, 严重时可发展为急性肾功能衰竭, 病死率极高<sup>[1-3]</sup>。组织缺血可通过激活黄嘌呤氧化酶途径和中性粒细胞(PMN)的呼吸爆

发产生大量氧自由基(OFR), 后者常导致细胞膜脂质过氧化、蛋白氧化及 DNA 损伤, 是烧伤早期肾脏损害的重要发病机制之一<sup>[2,4-5]</sup>。褪黑激素(MLT)是一种主要由松果体分泌的神经内分泌激素。近年来大量的研究表明, MLT 具有广泛而强大的自由基清除作用, 且无明显的毒副作用<sup>[6]</sup>。因此, 本实验将 MLT 应用于 30% 总体表面积 III 度烫伤大鼠, 观察它对严重烧伤后肾脏氧化应激损伤和肾功能的保护作用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470642)

作者单位: 266021 青岛大学医学院生理学教研室

作者简介: 韩晓华(1968-), 女(汉族), 山东省人, 博士, 讲师 (Email: xiaohua.han@163.com)。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和仪器:**MLT、硫代巴比妥酸、1,1,3,3-四乙氧基丙烷、还原型辅酶 I (NADPH)、二硫硝基苯、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽还原酶、过氧化氢酶(CAT)等购由美国 Sigma 公司,其余试剂为国产分析纯。仪器主要包括 Genesys 2 型分光光度计(美国 Thermo 公司)及 Cobas Fara II 型全自动生化分析仪(瑞士 Roche 公司)。

**1.2 动物分组及烫伤模型制备:**健康、雄性 SD 大鼠 70 只(青岛市药检所动物中心提供),体重 200~250 g,按随机数字表法分为假手术组(10 只)、烫伤组(30 只)及 MLT 治疗组(30 只),后两组又分为 6、24 和 72 h 3 个时间点。所有动物于戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉后背部剃毛;假手术组行假烫伤,背部浸入 37 °C 水中 15 s,伤后 6 h 处死;烫伤组及 MLT 组背部浸入沸水中 15 s,造成 30% 总体表面积 III 度烫伤,伤后立即腹腔注射体积分数为 1% 的乙醇生理盐水或 MLT(10 mg/kg),此后每 12 h 补充注射 1 次至伤后 72 h。两组动物均于烫伤后 1 h 腹腔注射 15 ml 生理盐水复苏。伤后各时间点取血分离血浆,-20 °C 保存备用,同时取双肾及心脏制备组织标本。

**1.3 观察指标及测定:**①丙二醛(MDA)含量:取肾组织 200 mg,冰浴下剪碎匀浆,3 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 20 min,取上清,用硫代巴比妥酸比色法<sup>[9]</sup>测定。②GSH 含量:参考 Griffith 法<sup>[8]</sup>测定。③血浆肌酐(BCr)及尿素氮(BUN):用全自动生化分析仪测定。④谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性:按 Flohe 法<sup>[9]</sup>测定。⑤髓过氧化物酶(MPO)活性:按 Grisham 法<sup>[10]</sup>测定。

**1.4 统计学分析:**所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 Prism 4.0 统计软件对数据进行单因素方差分析及 Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组肾组织 MDA 和 GSH 含量变化(表 1):**烫伤后肾组织 MDA 水平明显升高,而 GSH 含量则显著下降,二者变化均以伤后 6 h 最明显,其中 MDA 增加约 2 倍( $P < 0.01$ ),而 GSH 下降 46.4% ( $P < 0.01$ ),随后逐渐恢复,但伤后 72 h 两指标与对照组比较差异仍有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。与烫伤组比较,单次注射 MLT 使 MDA 降低 27.8% ( $P < 0.01$ ),而 GSH 升高 44.4% ( $P < 0.05$ );但与假手术组比较差异仍具有统计学意义( $P < 0.01$  和

$P < 0.05$ );连续应用 MLT 对烫伤后 24 h 和 72 h 肾脏氧化应激损伤无明显的保护作用。

表 1 MLT 对大鼠肾组织 MDA 和 GSH 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of MLT on MDA and GSH contents

		in renal tissue( $\bar{x} \pm s$ )		nmol/mg
组别	动物数(只)	MDA	GSH	
假手术组	10	2.24±0.55	15.1±2.0	
烫伤组	6 h	4.54±0.70**	8.1±1.1**	
	24 h	3.68±0.71**	10.3±2.4**	
	72 h	2.94±0.35*	11.6±1.8*	
MLT 组	6 h	3.28±0.31***	11.7±0.9**	
	24 h	3.81±0.74**	12.0±4.1*	
	72 h	2.44±0.88	14.1±3.3	

注:与假手术组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与烫伤组比较:\*\*\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

**2.2 各组肾功能变化(表 2):**烫伤后 BCr 及 BUN 均明显升高( $P$  均  $< 0.01$ ),伤后 6 h 即达高峰并呈进行性下降,至 72 h 时基本恢复到假手术组水平( $P$  均  $> 0.05$ )。MLT 干预可抑制伤后 6 h BCr 和 BUN 水平,抑制率分别为 15.3% 和 21.5% ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ),连续注射 MLT 无明显保护作用。

表 2 MLT 对大鼠 BCr 及 BUN 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of MLT on BCr and BUN levels( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	BCr( $\mu\text{mol/L}$ )	BUN( $\text{mmol/L}$ )
假手术组	10	47.2±6.3	7.9±2.0
烫伤组	6 h	75.0±17.6**	19.5±1.5**
	24 h	60.7±12.3*	13.1±3.4**
	72 h	52.0±6.9	7.9±0.9
MLT 组	6 h	63.6±6.6**	15.3±1.1***
	24 h	58.2±6.9	12.4±2.5**
	72 h	58.1±7.4	7.3±0.7

注:与假手术组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与烫伤组比较:\*\*\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

**2.3 MLT 对烫伤后 6 h 肾组织 GSH-Px 及 MPO 活性的影响(表 3):**与假手术组比较,烫伤后 6 h 肾组织 GSH-Px 活性明显降低( $P < 0.01$ ),而 MPO 水平则升高 3.9 倍( $P < 0.01$ )。单次 MLT 注射对烫伤后 GSH-Px 无明显影响,但使 MPO 水平降低 30.2% ( $P < 0.05$ )。

表 3 MLT 对大鼠烫伤后 6 h 肾组织 GSH-Px 及 MPO 活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of MLT on GSH-Px and MPO activities of renal tissue at 6 hours postburn( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	GSH-Px( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	MPO(U/g)
假手术组	10	103.1±18.3	3.2±1.0
烫伤组	10	71.8±9.4**	12.6±4.4**
MLT 组	10	77.0±6.8**	8.8±3.1***

注:与假手术组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与烫伤组比较:\*\*\* $P < 0.05$

### 3 讨论

MDA 是脂质过氧化终产物之一,而 SOD 和 GSH 是体内最重要的内源性抗氧化物,可在清除 OFR 时被消耗,检测它们的变化可以评估机体的氧化应激状态<sup>[4,11]</sup>。本研究表明,30% 总体表面积 III 度烫伤可导致肾脏出现严重的氧化应激损伤,并持续至烫伤后 72 h。

烧伤时造成肾脏氧化应激产生的机制至少包括:①烧伤后由于体液大量渗出和血液重新分布,肾脏处于严重的缺血、缺氧状态。虽然动物在伤后 1 h 进行液体复苏,但由于烧伤早期液体的渗出非常迅速而腹腔内液体吸收相对缓慢,实际上形成了一种非典型缺血/再灌注损伤模型。肾组织细胞内的黄嘌呤氧化酶,在 O<sub>2</sub> 存在下,以次黄嘌呤或黄嘌呤为底物产生超氧阴离子和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,后两种产物互相作用产生毒性更强的羟自由基,诱发多不饱和脂肪酸脂质过氧化<sup>[12]</sup>。②烧伤后大量化学介质释放,促使 PMN 在肾内聚集活化,后者可通过释放各种蛋白水解酶和 OFR 引起肾组织损伤。MPO 是 PMN 特异性标志酶,本实验观察到烫伤 6 h 后 MPO 显著升高,证明 PMN 是肾脏内 OFR 的重要来源。此外,内源性抗氧化物如维生素 E 和 GSH 的减少,以及各种抗氧化酶如 GSH-Px、SOD 和过氧化氢酶(CAT)活性的抑制,使机体抗氧化能力明显受损,从而加重 OFR 介导的组织损伤<sup>[13]</sup>。除肾脏严重的氧化应激损伤外,烧伤 24 h 内也出现肾功能异常,二者变化趋势非常相似,均以伤后 6 h 的变化最为明显,提示烧伤后肾功能不全可能与肾脏缺血及肾内氧化应激反应密切相关。

MLT 是近年发现的强效抗氧化剂,在侧链 N-乙酰基的协作下,利用 5 位上的甲氧基直接清除机体内各种自由基,如羟自由基、脂质过氧化物、超氧阴离子及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等<sup>[6]</sup>,尤其是 MLT 对体内毒性最强的羟自由基的清除能力非常强大,为内源性抗氧化剂 GSH 的 4 倍和维生素 E 的 2 倍<sup>[14]</sup>。此外,MLT 还可增加细胞内多种抗氧化酶(如 GSH-Px、SOD)活性,提高机体的抗氧化水平<sup>[6]</sup>。

目前,对于 MLT 在烧伤中的抗氧化作用报道极少。Sener 等<sup>[11]</sup>曾报道,MLT 干预(10 mg/kg,伤后立即注射,每 8 h 补充 1 次)能明显抑制烧伤后 8 h 和 24 h 肾组织 MDA、GSH 及氧化蛋白水平。而本实验也证实了 MLT 在烫伤早期有抗氧化作用及对肾功能的保护作用,但 MLT 连续注射时效果不明显。该现象可能是因为 MLT 半衰期很短(0.5~

1 h)<sup>[6]</sup>,采用较长给药间隔(每 12 h 1 次)时,MLT 在靶器官达不到有效的药物浓度。因此,还需要对 MLT 治疗的剂量及时间间隔等做进一步研究。

为探讨 MLT 对烧伤后 6 h 肾脏氧化应激和肾功能保护作用的机制,我们还测定了该时间点的 GSH-Px 及 MPO 活性。结果表明,MLT 对烫伤后明显受抑的 GSH-Px 无显著影响,但可部分抑制 MPO 水平。据此推测,MLT 的抗氧化作用可能主要与其强大的自由基清除能力密切相关。此外,还可通过抑制 PMN 聚集和活化,减少 PMN 介导的组织损伤来实现。

综上所述,MLT 能抑制严重烧伤早期肾脏氧化应激损伤,并对肾功能具有一定的保护作用。由于该药物无明显的不良反应<sup>[6]</sup>,可作为烧伤抗氧化治疗中很有前途的候选药物之一。

### 参考文献:

- 1 杨宗城. 烧伤后多器官功能衰竭发病机理临床研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志,1992,8(1):8.
- 2 杨红明,柴家科,盛志勇,等. 严重烧伤延迟复苏后多器官功能障碍综合征的早期防治[J]. 中国危重病急救医学,2000,12(10):610-612.
- 3 徐盈斌,祁少海,谢举临,等. 乌司他丁对严重烧伤患者脏器功能的保护作用[J]. 中国危重病急救医学,2006,18(1):39-41.
- 4 李亚洁,王影,翟惠敏,等. 复合营养素干预对湿热复合创伤应激大鼠脂质过氧化反应的影响[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(1):52-53.
- 5 陈旭,覃凤均,程时,等. 锌-金属硫蛋白对严重烫伤大鼠氧自由基损伤的保护作用[J]. 中华烧伤杂志,2001,17(1):46-48.
- 6 Vijayalaxmi T, Thomas C R Jr, Reiter R J, et al. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(10):2575-2601.
- 7 Zhang C, Sheng Z Y, Hu S, et al. The role of oxygen-free radical in the apoptosis of enterocytes in scalded rats after delayed resuscitation[J]. J Trauma, 2004, 56(3):611-617.
- 8 Griffith O W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine[J]. Anal Biochem, 1980, 106(1):207-212.
- 9 Flohé L, Günzler W A. Assays of glutathione peroxidase[J]. Methods Enzymol, 1984, 105:114-121.
- 10 Grisham M B, Benoit J N, Granger D N. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine[J]. Methods Enzymol, 1990, 186:729-742.
- 11 Sener G, Sehirli A O, Satiroğlu H, et al. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury[J]. Burns 2002, 28(5):419-425.
- 12 史英钦,张文杰,王青,等. 谷氨酰胺二肽对烧伤大鼠血清谷胱甘肽浓度及抗氧化作用的影响[J]. 中华实用医学,2002,4(1):16-17.
- 13 卫伟,夏照帆. 烧伤后的氧化应激研究进展[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(3):192-194.
- 14 Tan D X, Chen L D, Poeggeler B, et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger[J]. Endocr J, 1993, (1): 57-60.

(收稿日期:2007-03-04 修回日期:2007-10-02)

(本文编辑:李银平)