

• 论著 •

胰岛素强化治疗对烫伤大鼠心肌细胞作用的初步研究

吕根法 侯宏义 陈璧 张万福 朱雄翔 董茂龙 胡大海

【摘要】目的 探讨胰岛素强化治疗对严重烫伤大鼠心肌的保护作用。方法 将 18 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 6 只。行右颈静脉插管以备液体复苏及药物输入。假伤组大鼠在 37 ℃ 水中假烫伤后给予生理量液体复苏; 烫伤组造成总体表面积(TBSA)30% II 度烫伤后, 常规予以生理盐水复苏; 强化组于烫伤后给予胰岛素强化治疗, 液体总量同烫伤组。于烫伤前后不同时间点经尾静脉采血测定血糖。伤后 6 h 处死动物, 心脏取血测定心肌酶谱; 取左心室组织, 观察组织病理学变化; 用蛋白质免疫印迹法检测活化的 Akt(p-Akt)表达。结果 与假伤组比较, 烫伤组伤后血糖及心肌酶谱水平均明显升高, 伤后各时间点之间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。强化组经胰岛素强化治疗后, 伤后各时间点血糖水平均显著低于烫伤组($4.5 \sim 5.2 \text{ mmol/L}$ 比 $7.6 \sim 8.4 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 心肌酶水平也显著降低[乳酸脱氢酶(LDH): $(2369.3 \pm 178.9) \text{ U/L}$ 比 $(2684.1 \pm 335.0) \text{ U/L}$, $P < 0.05$; α -羟丁酸脱氢酶(α -HBD): $(576.7 \pm 219.2) \text{ U/L}$ 比 $(1002.0 \pm 347.1) \text{ U/L}$, $P < 0.01$; 心肌激酶(CK): $(1041.9 \pm 623.2) \text{ U/L}$ 比 $(2447.1 \pm 1183.7) \text{ U/L}$, $P < 0.01$]。镜下组织病理学观察均显示, 强化组心肌细胞损伤和结构的改变明显减轻, 并能显著上调 p-Akt 表达(1.18 ± 0.43 比 0.24 ± 0.11 , $P < 0.01$)。结论 胰岛素强化治疗对严重烫伤大鼠心肌具有明显的保护作用, 此作用可能与增强 Akt 活化、抑制心肌细胞损伤有关。

【关键词】 烧伤; 胰岛素强化治疗; 心肌细胞; 大鼠

Effect of intensive insulin treatment on cardiac myocytes of severely scalded rats LÜ Gen-fa, HOU Hong-
yi, CHEN Bi, ZHANG Wan-fu, ZHU Xiong-xiang, DONG Mao-long, HU Da-hai. Center of Burn
Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

Corresponding author: HU Da-hai (Email: burns@fmmu.edu.cn)

【Abstract】Objective To study the protective effect of intensive insulin treatment on cardiac myocytes of severely scalded rats. **Methods** Eighteen model Sprague-Dawley (SD) rats were subjected to 30% total body surface area (TBSA) full thickness injury, and they were divided into three groups with 6 rats in each group. The right jugular vein was cannulated for fluid resuscitation and administration of drugs. The rats in burn group were injected with normal saline, the intensive insulin group with injection of insulin to maintain plasma glucose content in normal range, and the sham burn group received physiologic dose of saline without burn injury. Plasma glucose was monitored after burn injury. Rats were sacrificed at 6 hours postburn to examine plasma myocardial enzymes spectrum as well as histological and ultrastructure changes in cardiac tissue. The expression of p-Akt was detected by western blotting. **Results** Plasma glucose level was significantly elevated in burn group within postburn 6 hours as compared with the sham burn group, and lowered in intensive insulin group ($4.5 \sim 5.2 \text{ mmol/L}$ vs. $7.6 \sim 8.4 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). And the intensive insulin therapy could effectively inhibit the release of cardiac enzymes [lactate dehydrogenase (LDH): $(2369.3 \pm 178.9) \text{ U/L}$ vs. $(2684.1 \pm 335.0) \text{ U/L}$, $P < 0.05$; α -hydroxybutyrate dehydrogenase (α -HBD): $(576.7 \pm 219.2) \text{ U/L}$ vs. $(1002.0 \pm 347.1) \text{ U/L}$, $P < 0.01$; creatine kinase (CK): $(1041.9 \pm 623.2) \text{ U/L}$ vs. $(2447.1 \pm 1183.7) \text{ U/L}$, $P < 0.01$]. The expression of p-Akt was significantly strengthened in the intensive insulin group (1.18 ± 0.43 vs. 0.24 ± 0.11 , $P < 0.01$). Light microscopic and electron microscopic examinations showed that intensive insulin therapy could alleviate the injury to myocardial cells and structural changes. **Conclusion** Intensive insulin treatment possesses protective effect on cardiocytes after a severe burn, and it is related to its up-regulation of phosphorylation level of Akt in cardiocyte, thus inhibiting the damage to myocytes.

【Key words】 burn; intensive insulin treatment; cardiac myocyte; rat

严重烧伤早期“休克心”形成是诱发和加重休

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772250)

作者单位: 710032 陕西西安, 第四军医大学西京医院全军烧伤外科中心

通信作者: 胡大海, 博士生导师, Email: burns@fmmu.edu.cn

作者简介: 吕根法(1970-), 男(汉族), 河南省人, 医学博士, 主治医师, 主要从事烧伤后脏器保护研究。

克、导致烧伤早期组织缺血、缺氧的启动因素之一^[1]。加强烧伤早期心肌损害的研究, 保护心肌细胞, 增强心功能, 对减轻组织损害、降低并发症有重要意义。近年研究显示, 胰岛素在心肌细胞缺血、缺氧时具有显著的细胞保护作用^[2]; 而且临幊上也观察到, 胰岛素强化治疗能显著降低重症加强治疗病

房(ICU)患者的病死率,有明显的器官保护作用^[3]。但严重烧伤后胰岛素强化治疗对心肌细胞的保护作用及可能机制尚不十分清楚。因此,本研究中通过建立烫伤后胰岛素强化治疗大鼠模型,观察胰岛素强化治疗对严重烧伤后心肌细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组:18只健康雄性SD大鼠(由第四军医大学动物中心提供),体重200~250g。右颈外静脉插管接三腔管,用于液体复苏和药物输入。按随机数字表法将大鼠分为3组,每组6只。强化组及烫伤组大鼠背部剃毛、脱毛后置于95℃热水中18s,造成总体表面积(TBSA)30%Ⅱ度烫伤模型;强化组伤后立即输注胰岛素等渗盐水(胰岛素120U/L),适当补充质量分数为10%的葡萄糖,使大鼠血糖控制在4.0~6.6mmol/L,补液总量为2ml·kg⁻¹·TBSA%⁻¹·8h⁻¹;烫伤组伤后仅给予等量生理盐水。假伤组置于37℃水中18s模拟烫伤,伤后给予生理量液体(10ml·kg⁻¹·8h⁻¹),其余处理同烫伤组。伤后6h处死各组大鼠,取血并留取左心室组织标本待测。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血糖及心肌酶谱测定:尾静脉采血;用血糖仪测血糖,用全自动生化分析仪测心肌酶谱。

1.2.2 病理检查:腹主动脉放血处死大鼠,3组取相应部位的左心室组织,进行病理学检查。

1.2.3 蛋白质免疫印迹法检测:将左心室组织在液氮内研碎,加入组织细胞裂解液,匀浆提取蛋白,二喹啉甲酸法(BCA法)定量。用质量分数为12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),每泳道上样50μg,半干转膜,脱脂牛奶封闭,加入Akt、活化Akt(p-Akt)抗体(1:1000)4℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:4000),化学发光,显影,压片,灰度扫描,以与假伤组灰度值比值表示。

1.3 统计学处理:数据以均数±标准差(±s)表示,采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析、t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖(表1):伤后1h内大鼠即出现高血糖反应,并持续6h,至实验结束与假伤组比较差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。强化组血糖基本控制在4.5~5.2mmol/L,伤后各时间点血糖值均明显低于烫伤组(P<0.05或P<0.01)。

2.2 心肌酶谱(表1):伤后6h烫伤组乳酸脱氢酶(LDH)、α-羟丁酸脱氢酶(α-HBD)和心肌激酶(CK)均明显高于假伤组(P<0.05或P<0.01),表明心肌细胞损害严重。强化组心肌酶谱水平均明显低于烫伤组(P<0.05或P<0.01)。

2.3 心肌细胞常规及超微病理变化(彩色插页图1~2):常规病理显示:假伤组心肌细胞排列整齐,结构清晰;伤后6h出现心肌细胞肿胀、肌丝排列紊乱,细胞界限不清,心肌毛细血管充血、红细胞渗出等炎症表现;强化组心肌组织细胞结构基本正常,部分心肌细胞肿胀、毛细血管内稍有充血。超微病理结果显示:假伤组心肌细胞肌原纤维完整,横纹清晰无空泡变,线粒体和细胞核结构正常;烫伤组心肌细胞肌原纤维水肿明显,少部分溶解断裂,线粒体肿胀、空泡变及嵴突破坏;强化组心肌纤维结构基本完整,横纹清晰、大部分线粒体结构正常,少部分线粒体肿胀、空泡变,大多数嵴突清晰可见。

2.4 蛋白质免疫印迹结果(图3):伤后6h烫伤组p-Akt表达明显低于假伤组(0.24±0.11比1.0±0.14,P<0.01),胰岛素治疗后,p-Akt的表达明显增高(1.18±0.43比0.24±0.11,P<0.01);而3组间Akt蛋白表达差异无统计学意义。

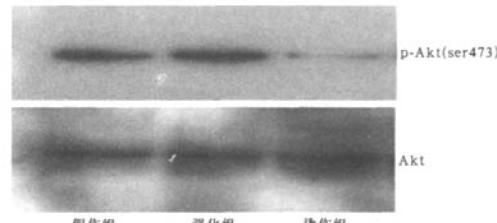


图3 蛋白质免疫印迹法检测各组大鼠心肌组织p-Akt的表达

表1 各组大鼠烫伤后血糖及心肌酶谱的变化比较(±s)

组别	动物数	血糖(mmol/L)							心肌酶谱(U/L)		
		伤前	伤后1h	伤后2h	伤后3h	伤后4h	伤后5h	伤后6h	LDH	α-HBD	CK
假伤组	6	6.4±0.5	6.3±1.4	6.9±0.7	6.7±0.9	6.0±0.5	5.9±0.8	6.1±0.8	738.6±87.3	300.0±82.1	266.6±119.1
烫伤组	6	6.2±1.8	7.6±1.7 ^a	8.3±2.6 ^a	8.5±3.0 ^b	7.7±0.9 ^b	7.9±1.2 ^b	8.4±4.7 ^b	2 684.1±335.0 ^a	1 002.0±347.1 ^b	2 447.1±1 183.7 ^b
强化组	6	6.2±2.0	5.1±0.8 ^{bc}	4.5±0.9 ^{bc}	4.8±1.9 ^{bd}	5.1±1.1 ^{bd}	4.6±1.3 ^{bd}	5.2±1.0 ^{bd}	2 369.3±178.9 ^{ac}	576.7±219.2 ^{bd}	1 041.9±623.2 ^{bd}

注:与假伤组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与烫伤组比较,^cP<0.05,^dP<0.01

3 讨论

严重烧伤后心肌细胞的损害是引起烧伤后心功能不全的主要原因。心肌细胞损伤程度、心功能是否及时恢复,可直接影响休克期的平稳渡过,并最终决定预后。近年研究发现胰岛素通过激活PI3K/Akt途径,启动“生存信号”活化心肌细胞,发挥抗损伤、促修复、促细胞生存的作用,Akt活化是该通路的关键环节^[4]。常规胰岛素(控制血糖水平在10.0~11.1 mmol/L)并不能有效抑制严重创伤的高血糖、胰岛素抵抗等代谢紊乱。高血糖反应可引起机体释放大量过氧化物、肿瘤坏死因子等,导致心肌细胞的过氧化损伤、炎性损伤,而且高血糖可诱导一些基因的异常表达而产生心肌细胞损害^[5~6]。胰岛素强化治疗通过稳定血糖在正常水平(4.6~6.1 mmol/L),能够明显改善重度烧伤后的心功能不全^[3]。但其如何发挥心肌细胞保护作用尚不十分清楚。

本研究中用TBSA 30%Ⅲ度烫伤动物模型,通过微量泵输入胰岛素,并根据血糖水平给予10%葡萄糖输入,基本调控血糖水平在正常状态,建立胰岛素强化治疗严重烫伤的动物模型。在此基础上通过心肌酶谱及病理学变化,观察胰岛素强化治疗对严重烫伤后心肌细胞的保护作用,并进一步通过研究胰岛素信号通路关键的活化分子Akt,初步探明胰岛素强化治疗对心肌细胞保护作用的机制。

心肌细胞的结构完整性是提供心脏泵功能的基础。在重度烫伤后,左心室心肌细胞的病理变化显示心肌细胞肿胀,肌小节结构破坏,肌丝溶解,线粒体空泡变性等严重损害。心肌细胞损伤后,大量的心肌酶释放入血,心肌酶谱的变化反映了心肌细胞的损伤程度。本结果显示在重度烫伤后,外周血心肌酶谱明显高于假伤组,提示心肌细胞损伤严重;而胰岛素强化治疗组能明显减轻心肌细胞的病理损害程度,降低心肌酶的释放,提示其对心肌细胞结构及功能

的具有保护作用。

严重烫伤后,心肌细胞的损害与缺血、缺氧、高血糖反应关系密切^[7]。研究显示胰岛素能够通过活化Akt途径发挥抗炎、抗凋亡及促修复作用,Akt激活在胰岛素介导的细胞存活中起核心作用。本实验结果表明,在重度烫伤时,Akt途径处于抑制状态,表现为p-Akt明显低于正常心肌细胞;胰岛素强化治疗能很好控制血糖水平在正常范围,且能明显上调Akt的活化。提示严重烫伤时,心肌细胞结构破坏、肌丝溶解及胰岛素强化治疗对心肌细胞的保护作用可能与此有关。

综上所述,在严重烫伤早期给予胰岛素强化治疗能明显减轻心肌细胞的损害程度,上调被抑制的Akt活性,而上调被抑制Akt可能在其心肌保护作用中至关重要,在伤后抗体克治疗中具有重要的意义,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 黄跃生.烧伤后早期心肌损害的分子机制及防治研究进展[J].中华烧伤杂志,2004,20(5):257~259.
- [2] Devos P, Chiolero R, Van den Berghe G, et al. Glucose, insulin and myocardial ischemia[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(2):131~139.
- [3] van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients[J]. N Engl J Med, 2001, 345(19):1359~1367.
- [4] Andreelli F, Jacquier D, Troy S. Molecular aspects of insulin therapy in critically ill patients[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(2):124~130.
- [5] 姚咏明,孟海东.脓毒症高血糖与胰岛素强化治疗策略[J].中国危重病急救医学,2006,18(2):68~70.
- [6] 罗小星,靳利利,薛军,等.开心胶囊对糖尿病大鼠心肌p53 mRNA表达的调节[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10(2):114~115.
- [7] Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. Cell, 1997, 91(2):231~241.

(收稿日期:2008-07-21 修回日期:2008-11-01)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

复苏脓毒性休克大鼠超氧化物歧化酶-1超表达对心肌功能的影响

近期德国科研人员为了证实复苏大鼠脓毒性休克中超氧化物歧化酶-1(SOD-1)基因超表达是否可以预防该过程中的心肌功能损伤和去甲肾上腺素反应,使用正常大鼠和杂合与纯合SOD-1超表达大鼠进行盲肠结扎穿孔术(CLPS)15 h制备脓毒症模型,通过中心静脉压和左心室压测量CLP和假手术18、21、24 h心功能指标。注射羟乙基淀粉和去甲肾上腺素(CLPS组)来维持动物血压。结果显示液体复苏和去甲肾上腺素需求在不同大鼠中无差异。然而,在杂合与纯合的SOD-1超表达动物中心腔SOD活性分别升高5倍和9倍;组织过氧化氢酶活性无差异。麻醉液体复苏使得左心室扩张,左心室收缩期末压和最大收缩压升高,每搏量和心排血量增加。CLP大鼠由于注入去甲肾上腺素,心率、收缩期末压力显著升高并且松弛时间显著缩短,不同大鼠间无差异。因此研究者认为,无论杂合或是纯合大鼠SOD-1超表达对脓毒症诱导的心肌去甲肾上腺素反应引起的损伤起持续的改善作用,可能与静脉注射去甲肾上腺素一样,是由于缺乏组织过氧化氢酶和线粒体SOD活性引起的。

李响,周国勇,编译自《Intensive Care Med》,2008-10-15(电子版);胡森,审校

吗啡胸段硬膜外给药对急性心肌缺血诱发大鼠肺组织肿瘤坏死因子- α 表达的影响

(正文见707页)

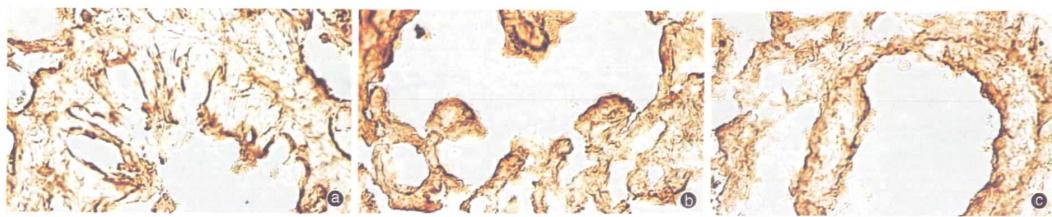


图1 光镜下观察CAO组大鼠肺组织中TNF- α 的表达(DAB, $\times 40$)

胰岛素强化治疗对烫伤大鼠心肌细胞作用的初步研究

(正文见724页)

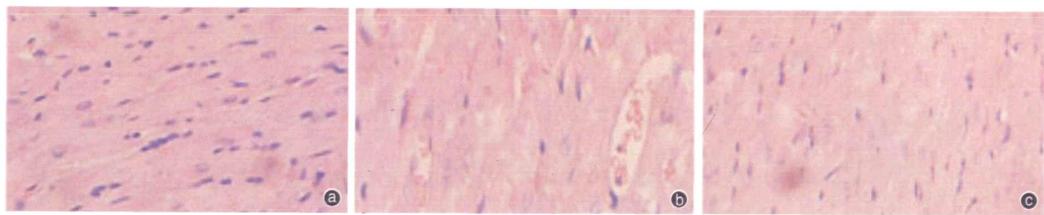


图1 光镜下观察各组大鼠左心室组织常规病理学改变(HE, $\times 200$)



图2 光镜下观察各组大鼠左心室组织超微病理学改变($\times 20000$)

乌司他丁对大鼠心肺复苏后心肌损伤的保护作用

(正文见730页)

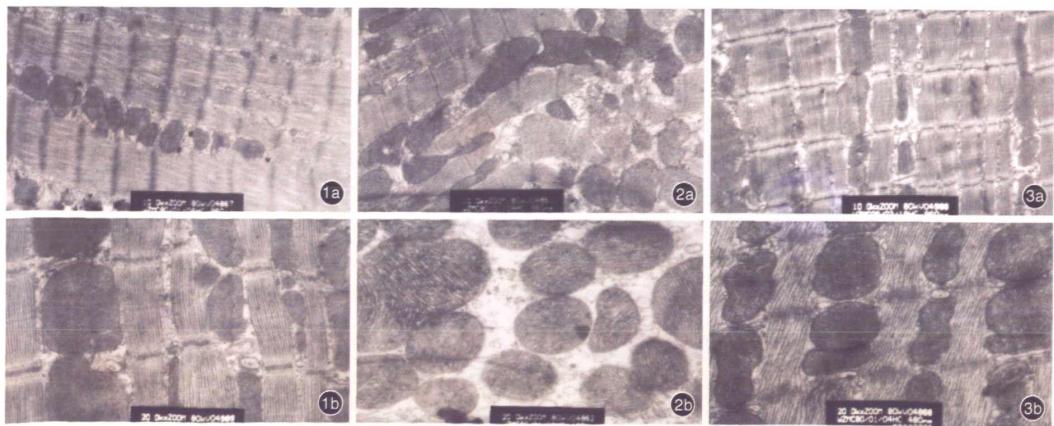


图1 透射电镜下观察各组大鼠CPR后心肌组织病理学改变