

# 胰岛素干预对严重烧伤后早期大鼠血管内皮细胞的保护效应

张万福 高峰 王耘川 朱雄翔 汤朝武 王跃民 胡大海

**【摘要】** 目的 了解胰岛素对严重烧伤后早期大鼠血管内皮细胞的保护效应,并分析相关机制。方法 将SD大鼠分成假伤组(7只)、烧伤组(7只)和处理组(7只)。后2组制成30%TBSAⅢ度烧伤(用94℃水浴烫伤)模型,假伤组37℃水浴模拟致伤过程。伤后即刻,各组经腹腔注射等渗盐水(40 ml/kg)抗休克,同时处理组皮下注射胰岛素3 U/kg、另2组同法注射等体积等渗盐水。伤后24 h透射电镜下观察各组大鼠主动脉内皮细胞形态及结构,检测其血糖、血清一氧化氮(NO)及各型一氧化氮合酶(NOS)水平。结果 镜下可见,处理组较烧伤组主动脉内皮细胞受损程度明显减轻。伤后24 h,假伤组、烧伤组、处理组大鼠血糖分别为(4.9±0.8)、(8.2±1.0)、(7.1±0.7) mmol/L,后2组均显著高于假伤组( $P < 0.01$ ),但处理组明显低于烧伤组( $P < 0.05$ )。处理组血清NO、总NOS和结构型NOS(cNOS)水平均明显高于烧伤组( $P < 0.01$ ),但2组血清诱导型NOS水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 胰岛素干预可保护严重烧伤后早期大鼠的血管内皮细胞,其机制可能与促cNOS水平升高从而使生理态NO合成增加有关。

**【关键词】** 烧伤; 胰岛素; 内皮细胞; 一氧化氮

The protective effect of early insulin treatment on vascular endothelial cells in severely scalded rats  
ZHANG Wan-fu, GAO Feng, WANG Yun-chuan, ZHU Xiong-xiang, TANG Chao-wu, WANG Yue-min,  
HU Da-hai. Burn Center, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P. R. China

Corresponding author: HU Da-hai, Email: burns@fmmu.edu.cn, Tel: 029-84775298

**【Abstract】** Objective To investigate the protective effect of insulin on vascular endothelial cells of rats at early post-burn stage, and its mechanism. Methods Adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: i. e., sham scald group (n=7), scald group (n=7) and treatment group (n=7). The rats in the latter 2 groups were subjected to 30% TBSA full-thickness burns with 94℃ water, and the sham scald rats were treated with 37℃ water. Intra-peritoneal injection of 40 ml/kg isotonic saline solution and subcutaneous injection of 3 units/kg insulin were given to the rats in treatment group after being subjected to 30% TBSA full-thickness burns. Subcutaneous injection of equal amount of isotonic saline was given to the sham and burn groups. The changes in vascular endothelial cell structure were observed with electron microscopy at 24 post-scald hours (PSH). Meanwhile, the blood glucose contents, the serum levels of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthetase (NOS) were determined with oxidase method and colorimetric method, respectively. Results The injury of arterial endothelial cells in the treatment group was obviously alleviated compared with that in burn group. The blood glucose content in the treatment group (7.1±0.7 mmol/L) was significantly lower than that in scald group (8.2±1.0 mmol/L,  $P < 0.05$ ), though it was much higher in both groups than that in sham scald group (4.9±0.8 mmol/L,  $P < 0.01$ ) at 24 PBH. The serum content of NO, total NOS and cNOS in treatment group were obviously higher than those in scald group ( $P < 0.01$ ), but there was no obvious difference in iNOS content between the two groups ( $P > 0.05$ ). Conclusion Insulin exhibits protective effect on vascular endothelial cells in severely scalded rats at the early post-burn stage, and it is attributed to its promotion of cNOS level leading to NO production.

**【Key words】** Burns; Insulin; Endothelial cells; Nitric oxide

胰岛素除调节机体代谢之外,还具有细胞保护作用,但具体机制尚不清楚<sup>[1,2]</sup>。本实验中笔者对严

重烧伤大鼠模型应用胰岛素进行早期干预,观察大鼠血管内皮细胞的变化,并就一氧化氮(NO)在其中发挥的作用进行初步研究和探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器来源

胰岛素购自丹麦诺华诺德公司,NO、一氧化氮

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院全军烧伤中心(张万福、王耘川、朱雄翔、汤朝武、胡大海);第四军医大学基础部生理学教研室(高峰、王跃民)

通讯作者:胡大海,Email: burns@fmmu.edu.cn,电话:029-84775298

合酶(NOS)检测试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司;稳步倍加型血糖仪、JEM-2000EX 型透射电子显微镜和 Model-680 型酶标仪分别为美国强生公司、日本电子公司和美国 Bio-Rad 公司产品。

### 1.2 动物分组及标本采集

清洁级雄性 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心)21 只,体质量(200 ± 20)g。将大鼠分成假伤组、烧伤组和处理组,每组 7 只。各组大鼠适应性喂养 1 周后,经腹腔注射 30 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,背部用 100 g/L 硫化钠脱毛。后 2 组大鼠脱毛区置入 94 °C 水浴锅 20 s,制成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤)模型<sup>[3]</sup>;假伤组水浴温度为 37 °C,模拟致伤过程。伤后即刻各组大鼠经腹腔注射等渗盐水(40 ml/kg)抗休克,同时处理组皮下注射胰岛素(3 U/kg),假伤组和烧伤组同法注射等体积等渗盐水。各组大鼠单笼饲养,自由饮水及进食。

伤后 24 h 将各组大鼠再次以戊巴比妥钠麻醉,固定肢体后单侧分离颈动脉,插管抽血并将其处死。从主动脉根部至髂总动脉分叉处取出动脉,剥离外层结缔组织,用等渗盐水清洗动脉,将其切成 4 段,每段长约 3 mm,用体积分数 2.5% 戊二醛固定,4 °C 保存。取少量所抽取颈动脉血检测血糖水平,剩余全血以 1000 × g 离心 15 min,取上清液于 -80 °C 冻存、待测。

### 1.3 检测指标

**1.3.1 主动脉内皮细胞形态及结构** 将保存的大鼠颈动脉组织常规处理后制成厚度 60 nm 的超薄切片,于透射电镜下观察。

**1.3.2 血糖水平** 应用血糖仪直接检测各组大鼠血糖水平。

**1.3.3 血清 NO 水平** 将冻存血清于 37 °C 水浴复温 5 min,按试剂盒说明书进行操作。每样本设 2 个复孔,在波长 570 nm 下用酶标仪测定其吸光度(A)值。以亚硝酸钠为标准品,计算各样本 NO 水平。

**1.3.4 血清各型 NOS 水平** (1)总 NOS 水平测定按试剂盒说明书进行操作。每样本设 2 个复孔,在波长 530 nm 下用酶标仪测定其 A 值,并计算出总 NOS 水平。(2)参照试剂盒说明书,预先向样本中加入钙抑制剂,其后操作步骤同总 NOS 水平的测定,所得结果为诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平。结构型一氧化氮合酶(cNOS)水平 = 总 NOS 水平 - iNOS 水平。

### 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 主动脉血管内皮细胞的形态结构

镜下见假伤组大鼠血管内皮细胞结构完整、层次清楚,管腔内膜光滑、连续。烧伤组内皮细胞层多处中断,大量细胞变性、坏死或部分脱落于管腔中,细胞间隙明显增宽,细胞结构被破坏。处理组内皮细胞层完整,细胞间隙增宽但程度轻于烧伤组,细胞超微结构较清晰,肿胀不明显。见图 1。

### 2.2 血糖水平

假伤组、烧伤组和处理组大鼠的血糖水平分别为(4.9 ± 0.8)、(8.2 ± 1.0)、(7.1 ± 0.7) mmol/L,

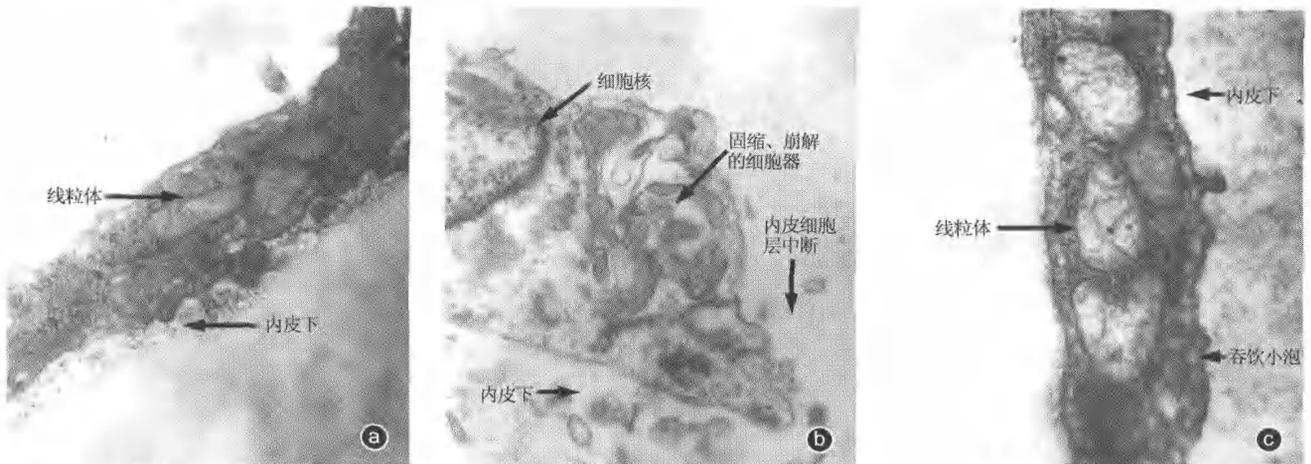


图 1 各组大鼠伤后 24 h 主动脉血管内皮细胞的形态结构 透射电镜 ×30 000。a. 假伤组大鼠血管内皮细胞核、线粒体清晰,管腔内膜光滑、连续;b. 烧伤组大鼠血管内皮细胞超微结构模糊,细胞肿胀,细胞器固缩、崩解明显,少数胞膜破裂,胞核异染质增多、边集;c. 处理组大鼠血管内皮细胞未见明显脱落及坏死,细胞连接周围出现大量吞饮小泡,胞膜完整,线粒体内少量空泡形成,胞核略增大,异染质轻微边集

后 2 组均显著高于假伤组 ( $P < 0.01$ ), 处理组比烧伤组有所降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 血清 NO 水平

假伤组、烧伤组和处理组大鼠的血清 NO 水平分别为  $(12.8 \pm 2.0)$ 、 $(21.1 \pm 5.0)$ 、 $(34.4 \pm 8.8)$  mmol/L, 后 2 组均显著高于假伤组 ( $P < 0.01$ ), 且处理组高于烧伤组 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 血清各型 NOS 水平

假伤组、烧伤组和处理组大鼠的血清总 NOS 水平分别为  $(25.0 \pm 1.4)$ 、 $(24.1 \pm 2.1)$ 、 $(28.2 \pm 1.7)$  U/ml, 处理组明显高于烧伤组和假伤组 ( $P < 0.01$ ), 烧伤组与假伤组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。假伤组、烧伤组和处理组大鼠的血清 iNOS 水平分别为  $(8.3 \pm 1.7)$ 、 $(10.9 \pm 2.8)$ 、 $(11.2 \pm 4.2)$  U/ml, 后 2 组均明显高于假伤组 ( $P < 0.05$ ), 但 2 组间比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。假伤组、烧伤组和处理组大鼠的血清 cNOS 水平分别为  $(16.7 \pm 1.5)$ 、 $(13.2 \pm 2.6)$ 、 $(17.0 \pm 3.6)$  U/ml, 处理组明显高于烧伤组 ( $P < 0.01$ ), 烧伤组明显低于假伤组 ( $P < 0.01$ ), 但处理组与假伤组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

传统认为胰岛素主要具有调节糖、蛋白质、脂肪三大营养物质代谢和贮存的作用。在危重疾病时, 由于胰岛素不足或产生胰岛素抵抗, 机体通常出现高血糖反应, 有学者提出此时胰岛素治疗主要通过降低高血糖的蓄积而对机体产生保护作用<sup>[4]</sup>; 但也有学者提出胰岛素抵抗使胰岛素治疗的降血糖作用受限, 对危重病患者产生的保护作用并非源于降血糖<sup>[5]</sup>。本实验观察到, 伤后 24 h 烧伤组大鼠血糖水平明显升高, 处理组血糖水平有所降低但程度有限, 这与第 2 种观点基本相符。预实验中笔者观察到, 大鼠烧伤后即刻皮下注射胰岛素剂量为 3 U/kg 时, 对机体的保护作用最佳。

血管内皮细胞是影响血管通透性的主要屏障, 且能够表达黏附分子, 合成调节凝血-纤维蛋白溶解系统的物质以及多种细胞因子, 它不仅是炎症反应中被动的靶细胞, 也是一种效应细胞, 通过其屏障和分泌功能, 成为严重创伤、休克等多种疾病发生发展的病理基础, 有效地保护内皮细胞的完整性, 可改善微循环并减轻组织、细胞缺氧状态, 避免发生多器官功能衰竭并降低病死率<sup>[3]</sup>。近年来, 人们在对胰岛素的深入研究中得知, 胰岛素除调节机体物质与能

量代谢外, 还广泛参与了组织细胞的保护过程<sup>[1,2]</sup>。鉴于上述胰岛素研究取得的进展及内皮细胞的重要性, 本实验对严重烧伤大鼠早期行胰岛素干预后, 观察其主动脉血管内皮细胞超微结构, 证实胰岛素保护血管内皮细胞的作用较明显, 这与胰岛素应用于危重患者观察到的结果<sup>[6]</sup>一致。

NO 具有保护细胞和损伤细胞的双重作用, 何种作用占上风很大程度上依赖于机体生理态 NO 的绝对量及它与病理态 NO 的相对含量。促 NO 生成的酶包括内皮型一氧化氮合酶、神经型一氧化氮合酶及 iNOS, 前 2 型统称为 cNOS, 主要存在于内皮细胞、神经细胞等。通常认为来源于具有组织活性的 cNOS 可短暂地催化合成少量生理态 NO, 在许多生理性自稳态过程中对组织细胞产生保护作用; 而病理状态下产生的 iNOS 则持续地催化合成大量的病理态 NO, 它具有细胞毒性损伤作用, 可加速细胞死亡, 参与机体的许多病理过程<sup>[7]</sup>。有研究报道, 在严重烧伤后早期, 生理态 NO 含量不足或相对不足, 某些有效的干预措施可促使生理态 NO 合成, 这种增加的 NO 能够舒张动脉、静脉、微血管, 从而减轻缺血再灌注对机体的损伤, 同时抑制血小板及白细胞聚集、黏附, 抵制血栓形成, 清除自由基, 使炎症介质及细胞因子不至于反应过度, 以维持微血管屏障的完整性并对组织细胞发挥有效的保护作用<sup>[8]</sup>。在胰岛素保护机制的研究中, 人们逐渐意识到 NO 可能在其中发挥极为重要的作用<sup>[1,6]</sup>。

本实验结果显示, 烧伤组 cNOS 水平相对假伤组明显降低, 而 iNOS 水平升高, 因此总 NOS 水平相对变化不大, 但由于 iNOS 可持续促 NO 生成, 故伤后血清 NO 水平有所升高; 给予胰岛素干预的处理组, 相对于烧伤组 cNOS 水平明显升高, 而 iNOS 水平未见明显变化, 故总 NOS 水平也相应升高, 血清 NO 水平在原水平 iNOS 及增多的 cNOS 的作用下进一步升高。笔者推测, NO 对机体的作用主要决定于 cNOS 和 iNOS 的相对水平。严重烧伤后早期生理态 NO 不足或相对不足, 胰岛素干预主要上调了 cNOS 水平使之与假伤组差异不大, 促使生理态 NO 含量增加, 可能对内皮细胞的完整性起到有效的保护作用。受到保护的內皮细胞又进一步促进 cNOS 和生理态 NO 的产生。两者互为因果、相互促进, 共同维护机体内环境的相对稳定。

以往鲜见应用烧伤动物模型观察胰岛素干预后机体 cNOS 及 NO 水平变化的报道。本实验中笔者对严重烧伤后早期大鼠给予适量胰岛素, 其 cNOS

及 NO 水平上调,血管内皮细胞正常的形态结构得以维护,提示胰岛素干预措施及其具体分子调控机制值得深入研究,这对严重烧伤后早期并发症的防治具有一定意义。

参考文献

[1] Gao F, Gao E, Yue TL, et al. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of P13-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*, 2002, 105(12): 1497 - 1502.

[2] Jeschke MG, Klein D, Herndon DN. Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction to severe trauma. *Ann Surg*, 2004, 239(4): 553 - 560.

[3] Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*, 2001, 29(7 Suppl): S 21 - 27.

[4] Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med*, 2003, 31(2): 359 - 366.

[5] Jeschke MG, Klein D, Bolder U, et al. Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. *Endocrinology*, 2004, 145(9): 4084 - 4093.

[6] Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, et al. Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J Clin Invest*, 2005, 115(8): 2277 - 2286.

[7] Nicotera P, Brune B, Bagetta G. Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends Pharmacol Sci*, 1997, 18(6): 189 - 190.

[8] 高建川, 吴雄飞, 杨宗城, 等. 一氧化氮在烧伤大鼠心脏损害中作用的研究. *中国危重病急救医学*, 1998, 10(7): 400 - 403.

(收稿日期: 2006 - 08 - 24)

(本文编辑: 赵敏)

· 病例报告 ·

特重度烧伤合并硝基氯苯中毒一例

郭志谦 刘敏 杨新蕾

患者男, 26 岁, 面部、躯干及四肢因化学物品爆炸致伤(爆炸产物为氰化亚铁及硝基氯苯), 伤后 1 h 收入笔者单位。入院时患者意识清楚、痛苦面容、烦躁口渴, 皮肤湿冷, 双侧瞳孔对光反射灵敏, 心率 110 次/min, 呼吸 21 次/min。伤后 18 h, 患者出现精神恍惚、嗜睡、持续酱油色尿、呼吸浅快、血氧饱和度下降。血常规检查: WBC  $23.8 \times 10^9/L$ 、血红蛋白 108 g/L、血细胞比容 0.32、血小板计数  $81 \times 10^9/L$ 。生化检查提示低蛋白血症(白蛋白 26.8 g/L)、肝功能受损(直接胆红素 290  $\mu\text{mol/L}$ 、间接胆红素 95.7  $\mu\text{mol/L}$ 、天冬氨酸转氨酶 169 U/L)、电解质紊乱(血钠 132.8 mmol/L、血钙 1.77 mmol/L、血钾 5.85 mmol/L), 血气分析提示低氧血症[二氧化碳总量 25 mmol/L、氧分压为 77 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)]、呼吸性碱中毒(pH 7.41、碳酸氢根离子 24 mmol/L)。诊断:(1)全身多处烧伤, 总面积 75%, 其中深 II 度 45%、III 度 30% TBSA。(2)低血容量性休克。(3)溶血性贫血。(4)硝基氯苯中毒。(5)氰化亚铁中毒。

患者入院后即用悬浮床治疗。根据其精神状态、生命体征、尿量及中心静脉压随时调整补液速度, 尿量维持在 100 ml/h 左右。应用广谱抗生素预防感染, 并根据创面、血液细菌培养结果及时调整。给予大剂量维生素 C 清除氧自由基, 还原型谷胱甘肽解毒、纠正低氧血症, 三磷酸腺苷辅酶胰岛素改善心、脑功能。静脉滴注亚甲蓝注射液 1 ~ 2 次/d、6 ml/次, 控制高铁血红蛋白血症。应用激素保护细胞膜功

能、抑制溶血反应。输血浆、全血及人血白蛋白, 持续给予肠道营养。妥善清创行暴露治疗, 定期外用碘伏及重组人表皮生长因子。于烧伤后第 4 天在全身麻醉下行四肢创面削痂及双手网状皮片、双上肢自体邮票皮、双下肢大张开洞异体皮移植术。术后患者精神状态迅速好转, 尿色淡黄, 溶血性贫血得以控制, 血生化指标恢复正常。患者入院后共行 3 次植皮术, 术后创面完全修复, 住院 60 d 痊愈出院。

讨论 特重度烧伤合并氰化亚铁、硝基氯苯中毒及溶血性贫血, 救治困难, 病死率极高。本例患者抢救成功的因素包括:(1)患者自我救护意识强, 伤后立即用自来水冲洗 15 min, 既稀释了毒物又降低了创面温度。(2)早期有效的休克复苏综合措施, 为后期治疗奠定基础。(3)入院早期医师对爆炸物资料及时了解、明确诊断, 并针对性应用亚甲蓝解毒治疗。硝基氯苯进入人体后可立即生成具有强烈亲电子作用的羟胺, 将血红蛋白氧化成高铁血红蛋白, 使氧无法向组织输送而导致组织缺氧, 出现中毒症状; 而亚甲蓝可使高铁血红蛋白还原成血红蛋白, 从而阻断高铁血红蛋白血症的形成或发展, 避免全身重要脏器进一步损伤。(4)早期静脉给予高价营养及保护重要脏器功能和机体免疫功能等综合措施, 使病情得到有效控制。(5)积极有效的创面处理。患者因全身情况差, 伤后第 3 天病情加重, 尿量减少、色浓。于伤后第 4 天行削痂手术, 及时清除感染源, 避免毒素持续吸收。

作者单位: 361003 厦门, 解放军第一七四医院烧伤整形科

通讯作者: 郭志谦, Email: guozhqlin@163.com, 电话: 0592 - 2664055

(收稿日期: 2006 - 09 - 11)

(本文编辑: 赵敏)