DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.027
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1059-03

论著

Giα介导的胰岛素信号转导在烫伤大鼠胰岛素抵抗中的作用

乔 飞,李晓辉,陆邦超 (第三军医大学基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨Giα介导的胰岛素信号转导在烫伤大鼠胰岛素抵抗中的作用,初步阐明烫伤后发生胰岛素抵抗的信号转导分子机理。方法 ①Western杂交检测严重烫伤大鼠肝脏细胞Giα含量的变化规律,并检测烫伤3 d大鼠肝脏细胞IRS-1的酪氨酸磷酸化。②血糖仪和放射免疫法检测烫伤大鼠血糖及胰岛素水平,并统计分析与Giα表达水平的关系。结果 ①烫伤后1~6 d肝细胞Giα明显降低,以伤后第3天最为明显。同步检测IRS-1的酪氨酸磷酸化,发现在胰岛素刺激下IRS-1不能发生酪氨酸磷酸化。②烫伤大鼠血糖和胰岛素水平均明显升高。对烫伤3 d的血糖和Giα进行相关分析,发现Giα的表达水平和血糖呈明显的负相关。结论 Giα表达减少可能是烫伤大鼠IRS酪氨酸磷酸化障碍及产生胰岛素抵抗的一个重要机制。

关键词:胰岛素受体底物1;抑制性G蛋白α亚单位;酪氨酸磷酸化;信号转导
中图法分类号:R35;R458.5;R644 文献标识码:A

Role of Giα mediated insulin signal transduction in insulin resistance of burned rat

QIAO Fei, LI Xiao-hui, LU Bang-chao (Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of the Giα-mediated insulin signal transduction in the burn rats insulin resistance for the mechanism of the resistance. Methods The content of Giα in rat liver cells after severe scald was detected with the Western blot. Blood sugar and insulin were determined with the use of glycometry and radio-immunity assay. Results Expression of Giα was decreased obviously in the liver cells from the first to sixth day after scalding, and reached lowest in the third day. Meanwhile, the level of tyrosine phosphorylation of IRS-1 was not increased under insulin stimulation. The level of blood glucose and serum insulin was obviously increased on the third day after scalding. Moreover, there was a significant negative correlation between the concentration of blood glucose and the level of Giα expression. Conclusion Reduction of Giα expression in liver cells in rats after scalding is one of the most important mechanisms by which the impairment of tyrosine phosphorlation of IRS-1 and posttraumatic insulin resistance happen.

Key words: IRS-1; α subunit of inhibitory G-proteins; tyrosine phophorylation; signal transduction

严重创伤(烫伤)后机体代谢出现紊乱,发生创伤后胰岛素抵抗可出现创伤后糖尿病。胰岛素受体底物(Insulin receptor substrate, IRS)是多种受体酪氨酸蛋白激酶的专一性内源底物。在酪氨酸蛋白激酶的作用下,可以使IRS的多个酪氨酸磷酸残基发生磷酸化,其发生酪氨酸磷酸化障碍时将引起葡萄糖转运障碍,以及其下游的信号中断。因此IRS在胰岛素信号系统中占据中心地位。1996年Moxham CM等使用可诱导表达反义RNA封闭$Gi\alpha_2$的基因编码的转基因小鼠研究Gi蛋白和胰岛素作用的关系时发现,肝脏和脂肪组织不能表达$Gi\alpha_2$的转基因小鼠,同时表现出高胰岛素血症、葡萄糖耐量下降和胰岛素抵抗;并且出现在胰岛素刺激下IRS-1的酪氨酸磷酸化减少的现象[1],因而推测Giα蛋白(α subunit of inhibitory G-proteins)可能参与了胰岛素信号转导。近年来,一些其他研究也发现胰岛素信号系统和Giα蛋白参与的信号系统之间存在交叉对话。本研究以大鼠背部30%体表面积Ⅲ度烫伤为模型,采用Western杂交方法检测正常及严重烫伤大鼠肝脏内Giα含量的变化,同时应用免疫沉淀和免疫杂交技术检测胰岛素刺激后IRS-1的酪氨酸磷酸化。旨在探索Giα介导的胰岛素信号转导在烫伤后胰岛素抵抗中的作用。

1 材料与方法

1.1 烫伤大鼠肝脏细胞中Giα蛋白含量及血糖和血浆胰岛素的检测

1.1.1 实验动物分组与动物模型 正常雄性Wistar大鼠(160~200 g)48只,由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为正常对照组、烫伤1 d组、烫伤2 d组、烫伤3 d组、烫伤4 d组、烫伤5 d组、烫伤6 d组、烫伤7 d组,共8组。每组6只。大鼠背部剪毛,用乙醚麻醉后将背部在95 ℃水中烫10 s,复制30%体表面积Ⅲ度烫伤模型。伤后水食自取。

1.2 样品制备

大鼠分别于烫伤后1、2、3、4、5、6、7 d断头处死。取不同时相点的烫伤组和正常对照组大鼠肝组织约0.1 g,分别加入匀浆缓冲液[Chilled buffer:(pH 7.4)20 mmol/L Tris/HCl/150 mmol/L NaCl/10%(v/v) glycerol/2 mmol/L EDTA/1 mmol/L Na_3VO_4/50 mmol/L $Na_4P_2O_7$/10mmol/L NaF/10 mmol/L glycerol-3-phosphate/0.2 mmol/L PMSF/20 μg/ml leupeptin/10 μg/ml pepstatin/25 μg/ml aprotinin(溶于0.01 mol/L的HEPES)]1 ml剪碎,组织在内切式匀浆机中匀浆(4 000 r/min,10s×2)。匀浆液在1 500×g,4 ℃下离心3 min,取上清,上清再在13 000×g 4 ℃下离心10 min,

作者简介:乔 飞(1974-),男,江苏省扬州市人,硕士,医师.主要从事G蛋白的信号转导方面的研究,现在南京八一医院。电话:13057531975

收稿日期:2001-12-20;修回日期:2002-03-31

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

取上清,上清在17 000× g 4 ℃下离心50 min,取沉淀。沉淀用100 μl PBS溶解,使用Lowry法测定蛋白含量。

1.3 Giα蛋白的检测

使用Westem印迹和DAB显色方法检测Giα蛋白。转印后的膜使用TTBS封闭1 h。然后加入抗Giα抗体(1∶1000)(Sigma)在室温摇床上共同孵浴1 h,倾去液体使用TTBS洗脱3次,每次30 min,再加入辣根标记的二抗(1∶1 000)(Sigma)在室温下孵浴1 h,倾去液体使用TTBS洗脱3次,DAB显色。显色后的膜用双蒸水漂洗3次。待其晾干时,在Bio-rad图像分析系统上对目的带进行扫描,以对照组的Odu/mm^{2}值为100%,根据各样品的Odu/mm^{2}值计算相对值,进行半定量分析。

1.4 血糖和胰岛素水平的检测

动物烫伤后第3天经尾取血测定血糖浓度(使用强生公司的快速测血糖仪),测定前禁食8 h。经下腔静脉取血2 ml测定胰岛素水平(按试剂盒说明书进行)。

1.5 经胰岛素刺激烫伤大鼠的肝脏细胞中IRS-1及IRS-1酪氨酸磷酸化检测

1.5.1 实验动物分组 正常雄性Wistar大鼠(160~200 g)24只,由第三军医大学实验动物中心提供。使用烫伤大鼠模型(同上),动物分为正常加胰岛素刺激组、正常无胰岛素刺激组、烫伤加胰岛素刺激组、烫伤无胰岛素刺激组,共4组。每组6只。

1.5.2 实验方法 使用烫伤大鼠模型(同上),在烫伤后3 d进行实验。先将大鼠用乙醚麻醉,剪开腹部,(胰岛素刺激组)经肠系膜下静脉注射胰岛素(5 mU/g),90 s后取肝脏[2]。

1.5.3 样品蛋白制备 分别取不同组大鼠的肝脏组织0.1 g,加入chilled buffer:(pH 7.4)20 mmol/L Tris/HCl/150 mmol/L NaCl/10%(v/v) glycerol/2 mmol/L EDTA/1 mmol/L Na_3VO_4/50 mmol/L Na4P_2O_7/10 mmol/L NaF/10 mmol/L glycerol-3-phosphate/0.2 mmol/L PMSF/20 μg/ml leupeptin/10 μg/ml pepstatin/25 μg/ml aprotinin(溶于0.01 mol/L的HEPES)1 ml在冰浴中匀浆。匀浆液在1 500× g,4 ℃下离心3 min,取上清。上清再在13 000× g 4 ℃下离心10 min,取上清。上清加入IRS-1抗体(1∶200)在4 ℃下孵浴4 h免疫沉淀,然后加入protein A/G-Sepharose 5 mg在4 ℃下孵浴过夜。上清在17 000× g 4 ℃下离心50 min,取沉淀,沉淀经过沉淀清洗buffer1、2、3[1、PBS(pH 7.5)含1% non-idet P-40,2、10 mmol/L Tris/HCl(pH 7.5)含0.5 M $LiCl_2$/100 μmol/L Na_3VO_4 3、10 mmol/L Tris/HCl(pH7.5)含100 mmol/L Nacl/1 mmol/L EDTA]清洗后(每种buffer清洗30 min)使用沉淀复悬buffer液[50 μl of 10 mmol/L Tris/HCl(pH 7.5)含100 mmol/L NaCl/1 mmol/L EDTA]复悬。

1.5.4 IRS-1及IRS-1酪氨酸磷酸化检测 使用Western印迹和DAB显色方法对IRS-1及IRS-1酪氨酸磷酸化进行检测[1]。方法如下:①抗IRS-1二抗(1∶1 000)(Simga)和转印后的PVDF膜在TTBS缓冲液一起在室温下共同孵浴封闭1 h。倾去液体使用TTBS洗脱3次,每次30 min,再加入辣根标记的二抗(1∶1 000)(Sigma)在室温下孵浴1 h,倾去液体使用TTBS洗脱3次,DAB显色。然后使用DAB显色。以可见明显显色条带为阳性(+)。②沉淀复悬液经过电泳,转印。转印后的PVDF膜和加入抗酪氨酸磷酸化抗体(1∶600)(Sigma)的TTBS缓冲液一起在室温下共同孵浴封闭1 h。倾去液体使用TTBS洗脱3次,每次30 min,再加入辣根标记的二抗(1∶1 000)(Sigma)在室温下孵浴1 h,倾去液体使用TTBS洗脱3次,DAB显色。然后使用DAB显色。以可见明显显色条带为阳性(+)。

1.6 统计学处理

使用SPSS8.0统计分析软件,结果用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。血糖、血浆胰岛素水平及Giα蛋白含量等数据显著性检验使用双样本t检验分析,并使用泊松相关分析对血糖和Giα蛋白的变化进行成对数据比较。对IRS-1及IRS-1酪氨酸磷酸化的记数结果采用χ^2检验。

2 结果

2.1 烫伤大鼠肝细胞Gi蛋白表达水平的动态变化及烫伤后第3天血糖和血浆胰岛素水平

使用Western印迹检测烫伤大鼠肝脏细胞不同时相点的Giα,显示烫伤后1~6 d肝脏细胞内Giα蛋白含量明显降低。在第3天时降到最低水平,以后又逐渐升高。到第7天基本恢复正常,见图1。

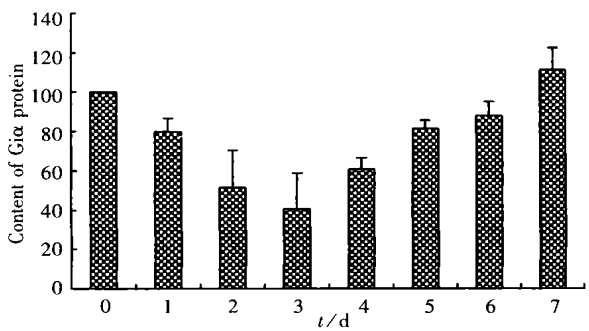


图1 烫伤大鼠1~7 d肝脏细胞Giα蛋白含量

Fig 1 Content of Giα protein in the hepatocytes of rats 1~7 d after scalding

烫伤后第3天取血测定血糖浓度,测定前禁食8 h。经下腔静脉取血2ml测定胰岛素水平同时取肝脏检测Giα蛋白含量的变化(见2.1)。结果显示,烫伤组血糖水平明显升高,血浆胰岛素水平也明显升高,见表1。对烫伤3 dGiα含量和烫伤3天的血糖值进行成对数据相关分析,结果显示两组数据呈明显负相关($\gamma=-0.74$, $P<0.01$)。

表1 烫伤3 d大鼠血糖、血浆胰岛素及Giα蛋白($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Plasma concentration of sugar, insulin and Giα protein in rats 3 d after scalding($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Normal	Scalded
Insulin(mU/L)	17.1±3.2	20.5±1.5 *
Glucose(mmol/L)	2.58±0.08	3.13±0.21 **
Giα protein	100	40.75±18.18 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Normal

2.2 烫伤大鼠肝细胞IRS-1及IRS-1酪氨酸磷酸化的变化

预实验显示烫伤后大鼠肝脏细胞出现IRS-1酪氨酸磷酸化障碍,以第3天最为明显。本实验使用烫伤后第3天大鼠,在胰岛素刺激下检测肝脏细胞IRS-1及IRS-1酪氨酸磷酸化,结果显示在烫伤后第3天,肝脏IRS-1发生明显的酪氨酸磷酸化障碍(表现为不能发生酪氨酸磷酸化),但细胞内IRS-1的总量没

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

有明显变化($P>0.05$), 见图 2, 3。

表 2　胰岛素刺激下烫伤大鼠肝脏细胞内 **IRS-1** 的酪氨酸磷酸化

Tab 2　Phosphorylation of IRS-1in the hepatocytes of scalded rats under insulin stimulation

	Normal-insulin	Normal+insulin	Scald-insulin	Scald+insulin
Phosphoryla-tion of IRS-1	−	+	−	−
IRS-1	+	+	+	+

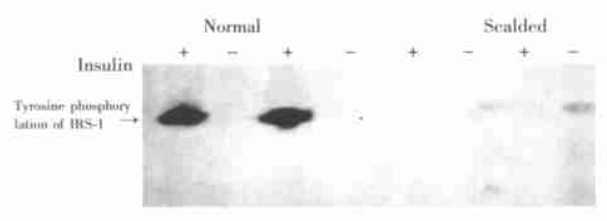


图 2　烫伤大鼠在胰岛素刺激下肝脏细胞 **IRS-1** 的酪氨酸磷酸化

Fig 2　Phosphorylation of IRS-1 in the hepatocytes of scalded rats under insulin stimulation

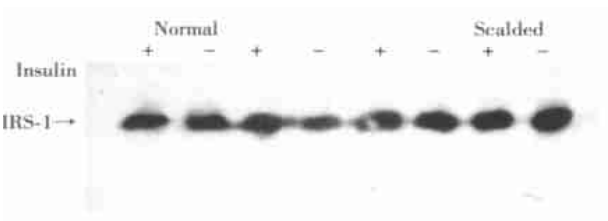


图 3　烫伤大鼠肝脏细胞 **IRS-1**

Fig 3　IRS-1 in in the hepatocytes of scalded rats

3　讨论

严重创伤(烫伤)后机体代谢出现紊乱, 可出现创伤后糖尿病。目前认为创伤后胰岛素抵抗是以肝脏葡萄糖生成和输出增加(肝糖原分解和糖异生增强)而外周组织(肌肉和脂肪)胰岛素依赖的葡萄糖摄取减少, 以及对葡萄糖彻底氧化障碍为主要特征的糖代谢紊乱。唐仲进用真实血糖固定术研究烧伤大鼠葡萄糖代谢, 证明烧伤后葡萄糖置换率明显降低与胰岛素受体后缺陷有关。目前研究认为胰岛素受体的酪氨酸激酶激活, 引起受体自身磷酸化后, 首先引起 IRS-1 磷酸化再由后者对下游的含 SH2 区蛋白结合而偶联信号传递。本实验观察到, 在大鼠严重烫伤后 3 d, 从肠系膜下静脉注射胰岛素 90 s 后检测肝细胞内 IRS-1 的酪氨酸磷酸化, 结果 IRS-1 不能发生酪氨酸磷酸化。而总的IRS-1 含量并没有明显变化。有研究报道, 在严重烫伤情况下肌肉的胰岛素受体出现自身磷酸化和 IR-TPK 活性降低[3], 在胰岛素刺激下肌细胞内 IRS-1 的酪氨酸不能发生磷酸化。与本实验结果相一致。IRS-1 作为胰岛素信号转导中关键的一步, 其不能酪氨酸磷酸化必然发生胰岛素信号传导障碍而引起胰岛素抵抗[4~5], 因此在严重烫伤的情况下 IRS-1 出现酪氨酸磷酸化障碍可能是烫伤后发生胰岛素抵抗的一个重要原因。1996 年 Moxham 等[11] 使用诱导表达反义 RNA 封闭 $Gi_{\alpha 2}$的基因编码的转基因小鼠研究 Giα 蛋白和胰岛素作用之间的关系时发现, 小鼠表现出高胰岛素血症、葡萄糖耐量下降和胰岛素抵抗, 以及在胰岛素刺激下 IRS-1 的酪氨酸磷酸化减少等现象, 推测 Giα 可能参与胰岛素信号转导。2000 年 Matsuda N 等报道糖尿病大鼠心肌 Gi-2α 和 Gi-3α 的含量与正常动物比较分别下降了 22%±2%和 57%±2%, 其 mRNA 水平分别下降 22%和 53%, 但 G_{i-1}和 Gs 在对照组和实验组其 mRNA 的表达却没有明显的变化。Tao J 发现 $G_{\alpha i2}$表达增加可以增强胰岛素的信号转导。

本实验应用烫伤复制胰岛素抵抗模型, 检测烫伤后 1~7 d Giα 在肝脏中表达的变化。结果显示, 烫伤后 1~6 d Giα 表达水平明显降低, 尤以第 3 天最为显著。结合烫伤后 3 d 大鼠肝脏 IRS-1 酪氨酸磷酸化障碍最为明显的结果, 表明 Giα 表达减少可能是烫伤后大鼠出现 IRS-1 酪氨酸磷酸化障碍的主要原因。本实验还观察到烫伤 3 d 大鼠血糖水平和血浆胰岛素均明显升高, 表明大鼠存在明显的胰岛素抵抗现象, 并与本实验发现 IRS-1 酪氨酸磷酸化障碍的结果一致。对烫伤 3 d Giα 含量和血糖值进行成对数据相关性分析, 结果显示两组数据呈明显的负相关($P<0.01$, $r=-0.74$)。这提示 Giα 含量的下降与烫伤后发生的胰岛素抵抗有密切关系。结合烫伤 48 h 后大鼠出现明显的胰岛素抵抗及肌细胞酪氨酸磷酸化障碍的文献报道[8]。我们认为烫伤后肝脏细胞内 Giα 表达减少及其进而导致的 IRS 酪氨酸磷酸化下降是烫伤动物发生胰岛素抵抗的重要分子机制。

参考文献:

[1] Moxham C M, Malbon C C. Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit Gia_2[J]. Nature, 1996, 379(6 568): 840−844.

[2] Ikezu T, Okamoto T, Yonezawa K, *et al*. Analysis of thermal injury-induced insulin resistance in rodents. Implication of postreceptor mechanism [J]. J Biol Chem, 1997, 272(40): 25 289−25 295.

[3] 张　波, 许霖水, 吴喜贵. 烧伤后胰岛素信号传导缺陷机理的研究[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(1): 4−6.

[4] Yoshikawa T, Noguchi Y, Satoh S. Inhibition of IRS-1 phosphorylation and the alterations of GLUT4 in isolated adipocytes from cachectic tumor-bearing rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 256(3): 676−681.

[5] Friedman J E, Ishizuka T, Shao J, *et al*. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes[J]. Diabetes, 1999, 48(9): 1 807−1 814.

[6] Matsuda N, Hattori Y, Gando S, *et al*. Differential gene transcriptional regulation of Gi isoforms and Gs protein expression in diabetic rat hearts [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000, 361(1): 53−60.

[7] Tao J, Malbon C C, Wang H Y. Galpha(i2) enhances insulin signaling via suppression of protein-tyrosine phosphatase 1B[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (43): 39 705−39 712.

[8] Carter E A. Insulin resistance in burns and trauma[J]. Nutr Rev, 1998, 56 (1 Pt2): S170−S176.

(编辑　薛国文)

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