内毒素在烧伤大鼠胰岛素受体信号传导障碍中作用机制的研究

俞志海* 许霖水** (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所检验科) 重庆, 400042

提 要 目的: 探讨内毒素在烧伤胰岛素抵抗发病中的作用机制。方法: 以 20% TBSAIII度烧伤合并腹腔注射内毒素(1 mg/kg)大鼠为模型,研究血清 TNF-α和 NO动态变化及肌肉细胞质膜胰岛素受体结合能力和酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性的改变,同时观察外源 NO供体 SNP对正常大鼠离体骨骼肌细胞膜胰岛素受体 TPK活性的影响。结果: 烧伤合并内毒素血症大鼠血清 TNF-α、NO水平早期即升高,比单纯烧伤及单纯内毒素血症大鼠升高更明显,峰值提前,且其肌肉细胞膜 IR TPK活性降低亦更明显。外源 NO抑制离体正常肌肉细胞膜 IR TPK活性。结论: 烧伤内毒素血症时,内毒素刺激多种细胞合成并分泌 TNF-α和 NO等一系列致炎症介质,抑制胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶活性,干扰胰岛素受体信号传导而导致糖代谢紊乱和胰岛素抵抗。

关键词 内毒素;胰岛素受体;胰岛素抵抗;酪氨酸蛋白激酶;肿瘤坏死因子 α;一氧化氮
中图法分类号 R644; R392.11

临床资料表明,烧伤以及其它类型创伤病人常合并内毒素血症,病人多器官功能衰竭的发生率明显高于单纯创伤患者[1]。创伤并发内毒素血症时机体通常出现胰岛素抵抗和糖代谢紊乱,其详细机制尚未完全清楚。最近研究证实,内毒素激活多种细胞合成并释放肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和一氧化氮(NO)等一系列致炎症介质,引起胰岛素受体(Insulin receptor, IR)信号传导多环节的改变。本研究以大鼠 20% 体表面积III度烧伤复合小剂量内毒素(1 mg/kg)腹腔注射形成烧伤合并内毒素血症为模型,观察血中 TNF-α、NO动态变化和肌肉细胞膜胰岛素受体及受体 TPK活性变化,从胰岛素受体信号传导水平阐明内毒素在烧伤内毒素血症大鼠胰岛素抵抗发生中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

[γ-^{32}P]ATP(亚辉公司,北京), HistoneII B 内毒素(*E. Coli*. 血清型 0127: B8)(Sigma公司), TNF-α、NO测定试剂盒(邦定公司,北京),其余试剂均为 A.R级。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 Wistar大鼠,由本校实验动物中心提供,体重(200±20) g,雌雄不拘,随机分成烧注组(BE组)、单烧组(B组)、单注组(E组)和正常对照组(N组),每组每时相点 6只,另以 6只作正常对照。分笼喂养,自由摄食。B组按文献[1]制作 20% TBSAIII度烧伤模型。BE组以 1 mg/kg内毒素(预先溶于 2 ml无菌生理盐水中)腹腔注射,余同 B组。E组除不造成烧伤外,余同 BE组。N组除不注射内毒素外,余同 E组。以上各组动物于不同时相点,检测血清 TNF-α、NO浓度,取第 3天动物大腿肌肉,制备胰岛素受体增溶液。

1.2.2 血清 TNF-α、NO测定 分别用 ELISA和化学法按试剂盒说明书测定。

1.2.3 胰岛素受体增溶和受体结合测定 按本室建立方法操作[2]。

1.2.4 胰岛素受体 TPK活性测定 按本室建立方法测定[3]。

1.2.5 硝普钠(Sodium nitroprusside, SNP)与正常大鼠比目鱼肌孵育及其 IR TPK活性测定 参考 Leighton等[4]方法。

2 结果

2.1 血清 TNF-α动态变化

BE组在 1 h TNF-α明显升高($P < 0.01$), 3 h达峰值, B组 3 h开始升高($P < 0.01$), 12 h达高峰, E组 1 h也明显升高($P < 0.01$),峰值在 12 h, BE组与 B组比较,表明内毒素使伤后 TNF-α峰值升高且提前。结果见表 1。

2.2 血清 NO动态变化

各组血清 NO水平于 0.5 h即开始升高($P < 0.01$), 72 h仍高于正常水平($P < 0.01$)。BE组峰值较 B组和 E组提前,结果见表 2。

2.3 肌肉细胞膜胰岛素受体变化

肌细胞膜 IR结合经 Scatchard作图分析受体最大结合率和最大结合容量,见表 3。BE组、B组、E组分别与 N组比较,受体最大结合率均差异不显著($P > 0.05$)。BE组、E组的受体最大结合容量明显下降($P < 0.01$),而 E组与 N组、BE组与 B组比较,差异均不显著($P > 0.05$)。因此,烧伤及烧伤合并内毒素血症大鼠肌细胞膜 IR最大结合率不变,最大结合容量显著降低,而内毒素对正常及烧伤大鼠肌细胞膜 IR最大结合率和最大结合容量均无明显影响。

* 俞志海,男,28岁,住院医师,硕士
** 基础医学部生物化学教研室 重庆, 400038

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

表 1 血清 TNF-α 的动态变化 (ρ_B/μg·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Dynamic changes of TNF-α in serum (ρ_B/μg·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Groups	0 h	0.5 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
N	0.4± 0.03								
BE		0.45± 0.06	3.33± 0.50*	5.87± 0.65*	5.14± 0.61*	4.17± 0.38*	2.11± 0.29*	1.26± 0.25*	0.86± 0.08*
B		0.44± 0.05	0.64± 0.06*△△	1.62± 0.16*△△	2.73± 0.37*△△	4.39± 0.50*	2.55± 0.33*△	1.36± 0.21*	1.00± 0.12*△
E		0.42± 0.04	0.86± 0.16*△△	2.62± 0.26*△△	4.28± 0.50*△	5.27± 0.50△△	4.21± 0.34*△△	3.00± 0.49*△△	1.61± 0.23*△△

*: $P<0.01$ *vs* N; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* BE

表 2 血清 NO的动态变化 (ρ_B/μg·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Dynamic changes of NO in serum (ρ_B/μg·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Groups	0 h	0.5 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
N	7.00± 0.66								
BE		33.97± 1.52*	30.06± 2.66*	25.97± 1.35*	22.23± 2.14*	18.17± 1.55*	17.45± 1.96*	17.40± 2.12*	16.45± 2.06*
B		20.07± 2.07*△	22.11± 2.48*△	25.65± 2.08*	20.93± 2.31*	19.35± 3.04*	17.16± 2.18*	15.63± 2.03*	13.49± 1.62*△
E		17.83± 1.87*△	21.31± 2.20*△	25.85± 2.18*	20.68± 2.83*	16.92± 2.14*	15.85± 1.86*	13.89± 1.47*△	11.83± 1.33*△

*: $P<0.01$ *vs* N; △: $P<0.01$ *vs* BE

表 3 肌细胞膜胰岛素受体结合能力的改变 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Muscle cell membrane IR binding capacity ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Maximum binding rate (%)	Maximum binding capacity (pmol/mg)
N	12.40± 0.97	1.03± 0.16
BE	11.49± 1.03	0.44± 0.05*
B	11.90± 0.93	0.45± 0.06*
E	12.04± 1.08	0.99± 0.14

*: $P<0.01$ *vs* N

2.4 肌肉细胞膜 IR TPK活性改变

用 Histone Ⅱ B为外源底物,以^{32}P掺入量作单位测定 TPK活性,见表 4。在基础状态(无胰岛素刺激)BE组、B组 TPK活性明显低于 N组($P<0.01$),而 E组与 N组差异不显著($P>0.05$)。在 10^{-5} mol/L胰岛素刺激时,BE组、B组和 E组的 TPK活性明显低于 N组($P<0.01$),而 BE组又明显低于 B组或 E组($P<0.01$)。用胰岛素刺激时^{32}P掺入量减去基础^{32}P掺入量作为胰岛素刺激的 IR TPK活性,E组明显低于 N组($P<0.01$),BE组明显低于 E组($P<0.01$)。结果提示,烧伤合并内毒素血症大鼠肌细胞膜 IR的基础和胰岛素刺激时 TPK活性均明显降低,对胰岛素刺激的反应能力亦明显减退,内毒素使正常及烧伤大鼠的肌细胞膜 IR TPK活性对胰岛素的反应性均明显降低。

表 4 肌细胞膜胰岛素受体 TPK活性的改变 (fmol/min·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 TPK activity of muscle cell membrane IR (fmol/min·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

	N	BE	B	E
- Ins	1.62± 0.21	0.79± 0.08*	0.85± 0.09*	1.60± 0.17
+ Ins	4.39± 0.51△	0.96± 0.12*▲	1.42± 0.15*△▲	2.86± 0.13*△▲
Ins stimulated TPK	2.78± 0.43	0.17± 0.05*	0.57± 0.11*#	1.26± 0.06*#

Ins stimulated TPK= TPK(+ Ins)- TPK(- Ins); △: $P<0.01$ *vs* - Ins; *: $P<0.01$ *vs* N; #: $P<0.1$ *vs* BE

2.5 离体 NO对正常大鼠肌肉细胞膜 IR TPK活性的影响

当孵育液中加入 1.0 mmol/L或 10 mmol/L SNP时,肌细胞膜 IR基础 TPK活性与对照组无显著差异($P>0.05$),而胰岛素刺激时 TPK活性显著降低($P<0.01$),且 10 mmol/L SNP组降低非常显著($P<0.01$)。当 1.0 mmol/L SNP和 200 μmol/L血红蛋白同时与比目鱼肌孵育时,胰岛素刺激时 TPK活性明显高于单独 1.0 mmol/L SNP组($P<0.01$),且与对照组无显著差异($P>0.05$)。用胰岛素刺激的 IR催化的^{32}P掺入量作比较,也得到同样的结果。见表 5。表明 SNP明显抑制肌肉细胞膜 IR TPK活性对胰岛素的反应性,且呈剂量依赖关系,NO清除剂血红蛋白对此有逆转作用。

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

表 5　NO对正常肌细胞膜胰岛素受体 TPK活性的影响(fmol/min· mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 5　The effect of NO on normal muscle cell membrane IR TPK activity (fmol/min· mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

	Control	SNP (1.0 mmol/L)	SNP (10 mmol/L)	SNP+ Hemoglobin (1.0 mmol/L) (200μmol/L)
- Ins	1.54± 0.14	1.60± 0.07	1.47± 0.13	1.54± 0.17
+ Ins	4.22± 0.56	3.00± 0.42*	2.15± 0.06*△	4.16± 0.46△
Ins stimulated TPK	2.68± 0.48	1.42± 0.43*	0.69± 0.11*△	2.60± 0.59△

Ins stimulated TPK= TPK(+ Ins)- TPK(- Ins);* : $P<0.01$ *vs* control;△: $P<0.01$ *vs* SNP

3　讨论

内毒素血症引起的糖代谢紊乱和胰岛素抵抗在创伤、外科感染等疾病中已有不少的研究.但内毒素血症时发生的胰岛素抵抗涉及 IR信号传导的改变,未见研究报道.

目前普遍认为烧伤后,机体的高血糖高胰岛素血症而引起的受体下向调节导致 IR数目减少,不是胰岛素抵抗的直接原因, Fan等[5]报道用内毒素直接注射造成内毒素血症后骨骼肌细胞膜 IR数目及亲和力均无显著改变,与我们的结果相一致.

我们的实验证实,烧伤和内毒素血症大鼠肌肉细胞膜 IR的 TPK活性对胰岛素的反应性明显降低,且内毒素能加重烧伤大鼠的这一改变,这就有可能影响到胰岛素生物学效应的最终发挥而导致胰岛素抵抗.烧伤时,儿茶酚胺、胰高血糖素和糖皮质激素水平升高,激活细胞内蛋白激酶 A蛋白激酶 C而引起 IR的 Ser/Thr残基磷酸化,由此抑制β-亚基 Tyr残基磷酸化,导致 TPK活性降低.而且,烧伤后由于创面感染、肠源性细菌移位等机体极易发生内毒素血症.大量研究证明,内毒素通过受体介导刺激单核巨噬细胞等合成分泌 TNF-α等致炎症介质而进一步发挥生物学效应.本研究结果表明,烧伤和内毒素血症大鼠血清 TNF-α、NO水平早期即升高,并持续 72 h以后,烧伤合并内毒素血症大鼠升高更明显,峰值提前.而 TNF-α可引起 IR自身磷酸化及 TPK激活、IRS-1磷酸化等 IR受体信号传导多个环节的缺陷.

NO在体内半衰期只有几秒,却具有复杂的病理和生理功能,其在糖代谢中的作用近几年已被注意[6,7].在骨骼肌细胞中已检测到多种一氧化氮合酶的表达.NO参与了骨骼肌细胞正常的糖代谢,但其过度产生却抑制胰岛素刺激的葡萄糖转运和糖原合成.本实验提示,烧伤内毒素血症时,NO通过抑制 IR TPK活性而参与糖代谢紊乱和胰岛素抵抗的发生,这是烧伤内毒素血症时胰岛素抵抗发生的主要环节和机制.

参考文献

1 刘友生,晏良遂.烧伤复合内毒素血症对肝脏的损害及其意义的研究.中华整形外科杂志, 1994, 10(2): 142

2 张　波,许霖水.严重烫伤大鼠胰岛素受体自身磷酸化改变在胰岛素抵抗中的研究.第三军医大学学报, 1997, 19(1): 4

3 毛旭虎,许霖水.胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶在严重烫伤大鼠胰岛素抵抗中作用的研究.第三军医大学学报, 1996, 18(1): 1

4 Leighton B, Kowalchuk J M, Challiss R A J, *et al*. Circadian rhythm in sensitivity of glucose metabolism to insulin in rat soleus muscle. Am J Physiol, 1988, 255(1, ptl): 41

5 Fan J, Li Y H, Wojnar M M, *et al*. Endotoxin-induced alterations in insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor, IRS-1, and MAP kinase in skeletal muscle. Shock, 1996, 6(3): 164

6 Young M E, Radda G K, Leighton B. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle *in vitro*. Biochem J, 1997, 322(ptl): 223

7 Bedard S, Marcotte B, Marette A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. Biochem J, 1997, 325(pt2): 487

(收稿: 1998-12-30;修回: 1999-04-05)

(编辑　汪勤俭)

Mechanism of role of endotoxin in defects of insulin receptor signal transduction after burns in rats

Yu Zhihai, Xu Linshui (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To explore the mechanism of the role of endotoxin in occurrence of insulin resis-

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