DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.015

钒酸钠改善严重烫伤大鼠肌细胞胰岛素受体 TPK活性的研究

陈 彬* 许霖水 吴喜贵 (第三军医大学基础医学部生物化学教研室) 重庆,400038

提 要 目的: 探讨钒酸钠改善创伤后胰岛素抵抗和糖代谢紊乱的机制。方法: 用钒酸钠胃饲 30% TBSAIII度烫伤大鼠,观察血糖、胰岛素、肌细胞膜胰岛素受体结合特性和胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶(IR-TPK)活性的改变。结果: 钒酸钠降低严重烫伤大鼠空腹血糖水平,不改变胰岛素水平,也不改变肌细胞膜胰岛素受体最大结合率和结合容量,但可显著增加胰岛素刺激的 IR-TPK活性。结论: 钒酸钠可不通过胰岛素受体介导而直接刺激 IR-TPK活性,改善靶组织对胰岛素的敏感性。

关键词 烧伤;钒酸钠;胰岛素受体;酪氨酸蛋白激酶

中图法分类号 Q578

钒酸钠具有广泛的类胰岛素作用,能稳定地控制血糖而不增加血浆胰岛素水平。在胰岛素依赖性糖尿病和非胰岛素依赖性糖尿病动物模型中发现钒酸钠能有效地缓解胰岛抵抗。本研究以 30% 体表面积背部皮肤全层烫伤(30% TBSA)大鼠为模型,观察钒酸钠对严重烫伤大鼠糖代谢和肌肉胰岛素受体结合特性、受体酪氨酸蛋白激酶(Tyrosine protein kinase, TPK)活性的影响,旨在了解其对创伤后胰岛素的改善效果及作用机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia), WGA(第二军医大学,上海), N-乙酰氨基葡萄糖(Aldrich), [r-^{32}P]ATP(福瑞公司,北京), HistoneII B(Sigma),正钒酸盐(北京化工厂), ^{125}I-胰岛素及 RIA试剂盒(华西糖尿病研究所),血糖试剂盒(保定长城临床检验试剂公司),其余试剂均为 AR级。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 Wistar雄性大鼠,体重(200±20) g,本校实验动物中心提供。按本室建立的方法[1]制作 30% TBSAIII度烫伤模型。对照组除不烫伤外,其余同烫伤组。上述大鼠随机分成 4组: 烫伤组(D),烫伤灌药组(DV),正常对照组(C),正常灌药组(CV),每组动物 7只。灌药组按每日 20 mg/kg体重胃饲 0.4% 正钒酸钠盐生理盐水稀释液,连续 3 d,对照组给予等剂量的生理盐水。

1.2.2 标本收集 动物第 3天禁食过夜,麻醉后尾静脉取血,肝素抗凝分离血浆,-30℃保存,用于空腹血糖及胰岛素测定。此后断头处死大鼠,从后肢取出肌肉组织制备和纯化胰岛素受体。

1.2.3 空腹血糖及胰岛素测定 血糖测定用葡萄糖氧化酶法,胰岛素测定用放射免疫分析法,按说明书操作。

1.2.4 胰岛素受体增溶及纯化 WGA-Sepharose 4B亲和层析柱(Φ 5 cm)按文献[2]制作,肌肉细胞膜胰岛素受体增溶及纯化参考 Madhur等[3]方法,蛋白质定量用 Lowry法。

1.2.5 肌细胞胰岛素受体测定 按文献[1]的方法。

1.2.6 胰岛素受体 TPK活性测定 参考 Grunberger[4]的方法并加以修改。TPK活性以每 mg蛋白每分钟 HistoneII B转移的^{32}P fmol数扣除空白管(未加外源底物) fmol数的差值表示,胰岛素刺激的受体 TPK活性以胰岛素刺激值减去基础值的 fmol·mg^{-1}·min^{-1}表示。

1.2.7 统计分析 胰岛素受体结合分析按双位点受体计算机软件程序处理,其它数据选用第三军医大学数学教研室编制的《医用统计程序包 SPMR》相应程序处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 钒酸钠对空腹血糖水平的影响

大鼠严重烫伤 3 d后其血糖与正常对照组比较升高 44.4% ($P<0.01$),经钒酸钠胃饲 3 d后,CV组与 C组相比,变化不显著; DV组与 D组相比,血糖明显降低,接近正常对照水平。表明钒酸钠对严重烫伤大鼠高血糖有明显改善作用。

2.2 钒酸钠对空腹血浆胰岛素的影响

严重烫伤后大鼠血浆胰岛素显著升高,钒酸钠胃饲后, CV组与 C组相比血浆胰岛素水平降低, DV组与 D组相比改变不显著,见表 1。

2.3 钒酸纳对肌肉细胞膜胰岛受体结合特性的影响

4组大鼠肌细胞膜胰岛素受体最大结合率差别均不显著。严重烫伤后受体最大结合容量较正常对照显著降低。钒酸钠灌服后, CV组与 C组, DV组与 D组相比,差异均不显著。见表 1。

* 陈 彬,男,30岁,讲师,硕士

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

表 1　钒酸钠对大鼠血糖、胰岛素及肌细胞胰岛素受体的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of vanadate on plasma glucose, insulin level and insulin receptor on the cell membrane of skeletal muscle in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Glucose (C_B/mmol·L^{-1})	Insulin (mu/L)	Insulin receptor	
				Maxium binding rate	Maxium binding capacity
Control					
Untreated(C)	7	5.77± 0.74	17.01± 3.95	13.84± 0.86	1.19± 0.50
Vanadate treated(CV)	7	5.09± 0.86	9.24± 4.53▲	13.50± 0.65	1.14± 0.12
Scalded					
Untreated(D)	7	8.33± 1.86▲	29.66± 7.76▲	12.40± 1.79	0.60± 0.06
Vanadate treated(DV)	7	5.47± 1.20△	27.96± 5.02	12.86± 0.69	0.58± 0.10

▲: $P<0.01$ *vs* C;△: $P<0.01$ *vs* D

2.4　钒酸钠对大鼠肌细胞膜胰岛素受体 TPK活性的影响

在基础状态下,除 D组 TPK活性略降低外,其余三组大鼠 TPK活性均无显著差异。在 10^{-7} mol/L胰岛素刺激下,D组 TPK活性比 C组显著降低,经钒酸钠胃饲后,CV 组与 C组相比,其 TPK活性无显著变化;DV 组 TPK活性明显升高,接近正常对照水平。当用胰岛素刺激的 ^{32}P掺入量减去基础 ^{32}P掺入量的值表示 IR-TPK活性时,结果显示烫伤后肌肉胰岛素刺激的 IR-TPK活性显著降低,钒酸钠胃饲不改变正常大鼠胰岛素刺激的 IR-TPK活性,但可恢复烫伤大鼠胰岛素刺激的 IR-TPK活性,见表 2

表 2　钒酸钠对骨骼肌细胞胰岛素受体 TPK活性的影响

Tab 2　Effect of vanadate on the activity of skeletal muscle-derived insulin receptor TPK

Group	n	Basic	Insulin stimulation (10^{-7}mol/L)	△TPK
Control				
Untreated(C)	16	1.43± 0.26	2.36± 0.25	0.95± 0.17
Vanadate treated(CV)	16	1.38± 0.30	2.38± 0.21	1.00± 0.21
Scalded				
Untreated(D)	16	1.25± 0.12	1.60± 0.23*	0.35± 0.17*
Vanadate treated(DV)	16	1.41± 0.28	2.18± 0.48△	0.77± 0.32△

unit: fmol^{32}P·mg^{-1}·min^{-1};

*: $P<0.01$ *vs* C;△: $P<0.01$ *vs* D

3　讨论

钒酸钠具有类胰岛素样作用,能迅速而持久地降低血糖。给链脲佐菌素 (Streptozotocine, STZ)糖尿病大鼠胃饲钒酸钠 2~ 3 d可使大鼠升高的血糖降至正常[7]。本实验结果显示:严重烫伤大鼠胃饲钒酸钠 3 d,可使血糖恢复正常,而对血浆胰岛素水平无明显影响,与文献 [5,6]相一致。表明钒酸钠降血糖作用与磺脲类药物不同,它不改变大鼠血浆胰岛素水平,而发挥广泛改善胰岛素抵抗的作用。一般认为钒酸钠可通过改变糖代谢一些关键酶活性,如增加外周组织对胰岛素的敏感性,而使血糖恢复[8]。有人认为钒酸钠降血糖的机制是通过对靶组织胰岛素受体途径来实现的[9]。本结果显示,钒酸钠不改变大鼠肌细胞胰岛素受体活性,而是直接激活受体 TPK活性,这与 Challiss和 Venkatesan等[10,11]的研究结果相一致。表明钒酸钠降血糖效应的发挥可以不通过肌肉组织胰岛素受体水平,而直接涉及受体 TPK信号耦联传递环节。提示钒酸钠可能通过不同作用方式改善糖代谢和胰岛素抵抗,其中包括增加骨骼肌对葡萄糖的摄取;增加糖原合成酶对血糖敏感性,增加糖原合成;提高组织对胰岛素的敏感性,促进糖的氧化作用。本资料表明,TPK活性的降低与烫伤大鼠血糖升高密切相关 ($r=0.9169$, $P<0.01$),而钒酸钠胃饲后,肌细胞膜 TPK活性的恢复与大鼠血糖的降低也显著相关 ($r=0.9632$, $P<0.01$)。进一步说明,钒酸钠提高胰岛素受体 TPK受体信号耦联途径是改善烫伤后糖代谢紊乱和胰岛素抵抗的关键步骤。

参考文献

1　徐爱民,许霖水,董燕麟.严重烫伤大鼠胰岛素受体信号传导缺陷的研究.中华创伤杂志, 1994, 10(5): 211

2　Zhang S M, Li J X, Wei M, *et al*. A simplified method for the preparation of WGA-Sepharose 4B and its use in the purification of M N blood group antigens. Biomedical Chromatography, 1989, 3(3): 110

3　Madhur K, Sinha M, Jenquin M, *et al*. Subunit structure autophosphorylation and tyrosine-specific protein kinase activity of hepatic insulin receptor in fetal neonat and adult rats. Diabetes, 1987, 36(10): 1161

4　Grunberger G, Zick Y, Roth J, *et al*. Protein kinase activity of the insulin receptor in human circulation and cultured mononuclear cells. Biochem Biophys Res Commun, 1983, 115(2): 560

5　Madsen K, Proter V M, Fedorak R N. Oral vanadate re-

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

duces Na^+-dependent glucose transport in rat small intestine. Diabetes, 1993, 42(8): 11226
6 Malabau U H, Dryden S, Mccarthy H D, *et al*. Effect of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rat. Diabetes, 1994, 43(1): 9
7 Meyerovitch J, Rothenberg P, Shechter Y, *et al*. Impaired insulin action but normalizes blood glucose level in streptozoticin-treated rats. J Biol Chem, 1987, 262(14): 6658
8 Bloodel O, Simon J, Chevalier B, *et al*. Impaired insulin action but normal insulin receptor activity in diabetic rat liver: effect of vanadate. Am J Physiol, 1990, 258(3): E459
9 Tamura S, Brown T A, Whipple J H, *et al*. A novel mechanism for the insulin like effect of vanadate on glycogen synthesis in rats adipocytes. J Biol Chem, 1984, 259(10): 6650
10 Challiss R A, Leighton B, Lozeman F J, *et al*. Effects of chronic administration of vanadate to the rat on the sensitivity of glycolysis and glycogen sythesis in skeletal muscle to insulin. Biochem Pharmacol, 1987, 36(3): 357
11 Venkatesan N, Avidan A, Davidson M B. Anti-diabetic action of vanadyl in rats in dependent of *in vivo* insulin-receptor kinase activity. Diabetes, 1991, 40(4): 492

(收稿: 1998-01-21;修回: 1998-09-28)
(编辑 冯崇英)

Effects of Vanadate on TPK activity of insulin receptor on cell membrane of the skeletal muscle after severe scalding in rats

Chen Bin, Xu Linshui, Wu Xigui (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the mechanism of vanadate in improving the insulin resistance and glucose metabolism disorder after severe scalding in rats. Methods: To observe the changes in plasma glucose level, plasma insulin level, insulin receptor (IR) binding property and its tyrosine protein kinase (IR-TPK) activity. After the rats with 30% TBSA full-thickness skin burns were fed with vanadate. Results: Vanadate significantly decreased the plasma glucose level. There were no changes in plasma insulin level and the maximum binding capacity and rate of insulin receptor on the cell membrane of the skeletal muscle. However, the IR-TPK activity was significantly enhanced. Conclusion: Vanadate can promote the sensitivity of target tissue to insulin by increasing IR-TPK activity without induction of IR.

Key words scalding; Vanadate; insulin receptor; tyrosine protein kinase

脑电监测在急性海洛因中毒患者救治中的应用

Application of EEG monitored in patients with acute toxicity of herroin

王惠玉* 方勇飞 (第三军医大学附属西南医院神经内科) 重庆, 400038

例 1男, 24岁于 1996年 5月 1日 22时自行 im 0.2 g海洛因,约 10 min后诉头昏即进入深睡状。 5月 2日清晨其家人发现脉搏几乎摸不到才送我院就诊。体检:心率 70~ 80次 /min,呼吸 8~ 10次 /min,血压测不出。脑电监测:基本节律为 4~ 6 Hz 40~ 100μV波,其中散在少量 8~ 9 Hz 30~ 50μV a波,结论:中度异常。经对症治疗 2 d后复查脑电监测:基本节律为 9~ 10 Hzα波,各区较多散在 5~ 7 Hzθ中幅θ波。结论:轻至中度异常。较首次监测有好转,继续治疗 3 d后出院。

例 2女, 21岁。于 196年 5月 9日 20时自行 im海洛因 0.2 g,约 15 min后出现头痛即进入深睡状。第 2天 18时家人发现其尿失禁即送当地医院治疗 4 d,病情无好转于 5月 18日入我院。体检:深昏迷状,潮式呼吸 26次 /min,心率 120次 /min。脑电监测:各区为弥漫 1~ 3 Hz 30~ 100μVδ波,其间稍多 4~ 7 Hz 20~ 70μVθ波。结论:重度异常。经对症治疗 4 d后病情无好转,脑电监测亦无改善。继续治疗 10 d无好转死亡,家人提供其有吸食海洛因 2年史。

例 3女, 24岁。 1996年 8月 27日晚 23时自行 im海洛因 0.2 g后 10 min感头痛即入睡。第 2日晨 9时家人因对其呼之不应而送入我院。体检:心率 100次 /min,呼吸血压正常。脑电监测:基本节律为低幅快波,各区散在较多 3 Hz中幅δ波及 4~ 6 Hz 150μVθ波。结论:轻至中度异常。继续治疗 10 d后出院。

(下转 33页)

* 王惠玉,女, 43岁,副主任技师

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