DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.035

3 讨论

既往研究表明,动物梭曼中毒后,心脏功能会受到严重抑制,其机制与梭曼的胆碱能作用有关[3,4],但梭曼对心脏的直接作用也不容忽视。

本研究以大鼠离体灌流工作心脏为模型,探讨梭曼对动物心脏功能的直接影响。初步结果表明,急性梭曼中毒后,大鼠心功能在早期出现暂时兴奋后转入进行性抑制,表现为反应大鼠心脏收缩性能的指标如左心室压力(LVP)、左室压最大上升速率(+ dp/dt$_{max}$)、左心室收缩成份的缩短速率(Vce-50)等在梭曼中毒后10 min升高,30 min下降直至实验结束;而与心脏舒张性能有关的指标如左心室舒张末压(LVEDP)和左室压下降最大速率(- dp/dt$_{max}$)等在中毒早期变化不明显,中毒后 60 min开始下降。以上结果提示,梭曼对心脏功能直接作用的关键环节在于对心肌收缩性能的影响,而中毒晚期心脏舒张功能的下降可能与心脏整体功能的降低有关。

梭曼中毒对心肌收缩性能的影响机制可能是:① 梭曼中毒对心肌胆碱能神经系统的影响,导致心肌系统的神经介质紊乱,影响心肌正常功能的发挥[5];② 心肌收缩需要充足的能量供给,梭曼中毒可以导致心肌能量代谢紊乱,引起心功能失常[6];③ 梭曼对细胞微环境离子状态的影响,可能诱发心肌细胞异常电活动,导致心肌收缩性能的改变[7]。总之,梭曼中毒引起心功能变化的机制十分复杂,有些推测尚待进一步证实。

关键词 梭曼中毒;心脏功能;大鼠
中图法分类号 R827.172

参考文献

1 Worek F, Kirchner T, Szinicz L. Treatment of tabun poisoned guinea-pigs with atropine, Hlo7 or H16; effect on respiratory and circulatory function. Arch Toxicol, 1994, 68(4): 231
2 Poizat C, Grably S, Cuchet P, *et al*. Relationship beween heart function and energy production: A study on isolated rat heart. Arch Physiol Biochem, 1996, 104(1): 71
3 Worek F, Kleine A, Falke K, *et al*. Arrhythmias in organophosphate poisoning: effect of atropine and bispyridinium oximes. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1995, 329(3): 418
4 Tryphonas L, Clement J G. Histomorphogenesis of soman-induced encephalocardiomyopathy in Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol, 1995, 23(3): 393
5 McKenzie J E, Scanding D M, Ahle N W, *et al*. Effects of soman(pinacolyl methyl phosphono fluoridate) on coronary blood flow and cardiac function in swine. Fundam Appl Toxicol, 1996, 29(1): 140
6 Vanneste Y, Lispn D. Biochemical changes associated with muscle fibre necrosis after experimental organophosphate poisoning. Hum Exp Toxicol, 1993, 12(5): 365
7 Karlsson B, Fredriksson S A, Sellstrom A, *et al*. The protective effect of nimodipine, a calcium antagonist and its influence on soman clearnce in the anaesthetized rabbit. J Pharm Pharmacol, 1994, 46(2): 123

(收稿: 1997-11-15;修回: 1998-06-25)
(编辑 冷怀明)

大鼠骨骼肌胰岛素受体的部分纯化及其特征

Purification and characterization of insulin receptor from skeletal muscle of the rat

毛琼国* 张 波** (第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室)重庆,400038

提 要 目的:对大鼠骨骼肌胰岛素受体的结构和特征进行分析。方法:采用麦胚凝集素琼脂糖凝胶(WGA-Sepharose 4B)部分纯化骨骼肌胰岛素受体;通过 SDS-PAGE 胰岛素结合实验以及受体自身磷酸化和外源性底物磷酸化实验,分析受体的结构,并研究其特征。结果:SDS-PAGE证明骨骼肌胰岛素受体由两处分子量分别为 135×10^{3}u和 95×10^{3}u亚基组成;受体结合实验经 Scatchard作图分析表明受体与胰岛素结合呈负协同效应,最大结合容量为(0.96± 0.34) pmol/mg,受体β亚基能自身磷酸化,且能激活受体内在

* 毛琼国,女,26岁,助理实验师
** 西南医院检验科

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

酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性,并呈胰岛素剂量依赖关系。结论: WGA-Sepharose 4B纯化的骨骼肌胰岛素受体纯度和活性较好,其结构和特征与其他组织胰岛素受体相同。

胰岛素是通过其靶细胞质膜的特异性受体介导对细胞代谢和生长的调节。现已证明,胰岛素受体是由两个α亚基和两个β亚基组成的四聚体。胰岛素与靶细胞质膜上受体的α亚基结合,导致胰岛素受体空间构象发生改变,诱导受体β亚基自身磷酸化后激发受体TPK活性,这是胰岛素信号跨膜传导的早期事件[1]。由于许多病毒癌基因的蛋白产物也具有TPK活性。已有许多证据表明生长因子受体酪氨酸蛋白激酶与细胞增殖及癌变有着密切的关系。因此研究胰岛素受体作用机制对于揭示细胞代谢调节、细胞生长和肿瘤病因都十分重要。

有关骨骼肌中胰岛素受体纯化和性质的研究在国内还未见报道。本研究通过对大鼠骨骼肌胰岛素受体的部分纯化,并对其结构和特征进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

Sepharose 4B(Pharmacia公司), WGA(第二军医大学), N-乙酰氨基葡萄糖(Merk公司), Histone Ⅱ B(H_2B, Sigama公司), [γ-^{32}P]ATP(比活度> 5000 Ci/mmol,北京福瑞公司),其他试剂均为分析纯。雄性Wistar大鼠由本校实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 WGA-Sepharose 4B亲和层析柱的制备　参考张世民等方法[2],略有修改。Sepharose 4B凝胶在pH11的强碱性条件下,用溴化氰活化后,迅速转移到溶解有WGA的0.01 mol/L $NaHCO_3$、0.15 mol/L NaCl的溶液中,4℃缓慢搅拌过夜。交联后的Sepharose 4B凝胶用乙醇胺封闭残余活化基团。红细胞凝聚法检查活性后装填于1× 15 cm玻璃层析柱中,用缓冲液平衡后备用。

1.2.2 胰岛素受体增溶与纯化　参考文献[3]进行,取大鼠肌肉组织去其脂肪和结缔组织制备胰岛素受体增溶液。增溶后的胰岛素受体上样于平衡后的WGA-Sepharose 4B亲和柱,洗脱杂蛋白直到OD_{280} < 0.02后,改用N-乙酰葡萄糖胺洗脱胰岛素受体,收集洗脱峰流出液,浓缩后-70℃保存。

1.2.3 胰岛素受体SDS聚丙酰胺凝胶电泳　纯化的胰岛素受体用DTT变性后进行SDS-PAGE,银染色后观察结果。

1.2.4 胰岛素结合实验及Scatchard分析　按Talor等方法进行。

1.2.5 胰岛素受体β-亚基自身磷酸化和TPK活性检测　胰岛素受体自身磷酸化实验参照文献[4]方法进行。受体TPK活性观察H_2B作外源性底物,用10^{-7} mol/L的胰岛素刺激。磷酸化蛋白质进行SDS-PAGE,干胶后作放射自显影,观察受体β-亚基自身磷酸化和H_2B磷酸化的结果。

2 结果

2.1 骨骼肌胰岛素受体的部分纯化

在本实验中WGA-Sepharose 4B交联率达90%左右。红细胞凝聚法检查表明制备的WGA-Sepharose 4B活性较高。增溶的骨骼肌细胞膜上样于WGA-Sepharose 4B亲和层析柱,用N-乙酰葡萄糖洗脱可行一洗脱峰,收集洗脱峰流出液经SDS-PAGE电泳即为纯化的胰岛素受体。

2.2 受体纯度及亚基组成

纯化的胰岛素受体经DTT变性后,作SDS-PAGE银染后显示两条带,分子量分别为135× 10^3u和95× 10^3u。这与其它组织中胰岛素受体α-亚基和β亚基的分子量是一致的。特别是95× 10^3u带染色更深,证明用WGA-Sepharose 4B亲和层析能得到较纯的胰岛素受体。另外,可见170× 10^3u和66× 10^3u两条蛋白带,但染色较浅。

2.3 受体的胰岛素结合活性

利用放射配基(^{125}I-胰岛素)竞争结合实验,结果经Scatchard作图分析为一条凹面向上的曲线,表明骨骼肌胰岛素受体对胰岛素的结合同样呈负协同效应,纯化受体对胰岛素的最大结合容量为(0.96± 0.34) pmol/mg蛋白。

2.4 受体的自身磷酸化和酪氨酸蛋白激酶活性

用[γ-^{32}P]ATP进行掺入实验,磷酸化蛋白质作SDS-PAGE放射自显影观察受体的自身磷酸化程度。在胰岛素作用下可见相当于β亚基的95× 10^3u的蛋白质磷酸化,其受体自身磷酸化程度呈胰岛素剂量依赖关系。另外我们对受体的TPK使外源性底物H_2B磷酸化进行了研究。放射自显影显示有14× 10^3u(H_2B)和95× 10^3u对应的两条自显影带。证明胰岛素受体在胰岛素刺激下不仅能发生自身磷酸化,而且能激活受体TPK活性,使外源性底物也发生磷酸化。

3 讨论

肌肉组织是胰岛素主要靶器官,研究胰岛素受体的信号传导机制,需要获得纯度较高的胰岛素受体。我们采用WGA-Sepharose 4B亲和层析纯化的胰岛素受体经还原后(DTT)进行SDS-PAGE显示骨骼肌胰岛受体由α和β两种亚基组成,与其他组织中的受体性质相同。银染后电泳凝胶上见到的170× 10^3u和66× 10^3u的蛋白质,可能是胰岛素受体亚基的降解产物。胰岛素结合实验表明骨骼肌中纯化的胰岛素受与其它组织的一样能与胰岛素特异性结合并呈负协同效应。磷酸化实验证明大鼠骨骼肌胰岛素受体β亚基(95×

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

10^3 u)同样具有自身磷酸化能力,能激活受体内在TPK催化外源性底物磷酸化。因此采用本实验方法纯化骨骼肌胰岛素受体具有其它组织胰岛素受体的结构和特性,并且能够排除质膜上其它蛋白质对胰岛素结合行为和磷酸化分析的干扰,能较好的满足胰岛素受体功能的研究以及糖尿病、创伤等病理条件下骨骼肌胰岛素受体信号缺陷的研究。

关键词 受体,胰岛素;酪氨酸蛋白激酶

中图法分类号 Q51

参考文献

1 Charles F, Raphael A, David B. Phosphorylation of insulin receptors solubiliced from rat skeletal muscle. Diabetes, 1994, 33(5): 704

2 Zhang S M, Li J X, Wei Y, *et al*. A simplified method for the preparation of WGA-Sepharose 4B and its use in the purification of MN blood group antigens. Biomedical chromatography, 1989, 3(3): 10

3 Masanori L, Masashi K. Effect of piolitazone on insulin receptor of skeletal muscles from high-fat-fed rats. Metabolism, 1993, 42(8): 1017

4 张 波,许霖水,吴喜贵.烧伤后胰岛素受体信号传导缺陷机理的研究.第三军医大学学报, 1997, 19(1): 4

(收稿: 1997-11-10;修回: 1998-03-24)

(编辑 刘 鹏)

高效液相色谱法测定人尿乳果糖及甘露醇

Determination of lactulose and mannitol in urine by HPLC

潘 峰* 王一健 孙 玮 李才安 (第三军医大学基础医学部中心实验室)重庆, 400038

提 要 目的:建立一项快速、灵敏测定人尿乳果糖(L)及甘露醇(M)的实验方法。方法:烧伤病人口服给药:乳果糖 10 g,甘露醇 5 g,高效液相色谱示差(HPLC-RI)检测法测定各时段 L、M 的排出量。结果:L、M 的线性范围为 4~500 mg/L,平均回收率为 96.39%~98.37%,精密度(CV%)为 2.68~3.74,最低检测限 0.05 mg/L。结论:L/M 的值增大,可示肠通透性增高。

双糖试验[1]的方法有多种:薄层色谱法是一种耗时、半定量的方法[2];气-液色谱法,需要复杂的柱前衍生[3];液相色谱法,省时、稳定性好、可靠性高,仪器较普及,易于推广[4,5]。本实验采用高效液相色谱示差(HPLC-RI)检测法测定烧伤病人尿中乳果糖、甘露醇的含量,对烧伤病人肠通透性变化的评价,探索出一种有效、可靠、灵敏、快捷的实验方法。

1 材料和方法

1.1 仪器

美国 Waters 公司高效液相色谱仪(810系列),配备 510 泵, U_{6K}进样器, 410示差检测器。

1.2 试剂

乳果糖、甘露醇均为 Sigma 公司产品,乙腈为色谱纯,实验用水为超纯水。

1.3 色谱条件

色谱柱, Beckman Ultrasil NH_2柱, 10 μm(4.6 mm×250 mm)。流动相:乙腈-水(72∶28, v/v),流速 1 ml/min,柱温 32℃,示差检测器内加热温度定为 37℃,灵敏度设定值的 32,时间常数为 1.0。

1.4 标准液的配制

精确制备 1 g/L的乳果糖、甘露醇标准储备液,用时再均量稀释。

1.5 尿样收集

烧伤病人伤后 1、4、8、14 d天早晨,排尿后口服给药:乳果糖 10 g、甘露醇 5 g,连续 6 h收集尿液,并计总量,混匀,各时段取 1 ml,加 0.2 mg 硫柳汞作防腐剂,-20℃保存,待测。

2 结果

2.1 标准曲线

取正常尿液,与样品同样处理,加入标准储备液,配成浓度为:4、10、25、50、100、200、500 mg/L,每种浓度进样 3次,峰面积 R与相应的浓度 C进行线性回归,其回归方程为: $C_{乳}$ = 7.73 × 10^{-5} R + 1.066, r = 0.9993, $C_{甘}$ = 8.42 × 10^{-5} R + 0.624, r = 0.9996。统计结果表明:乳果糖和甘露醇在 4~500 mg/L的范围内,有良好的线性关系。色谱图见图 1。

* 潘 峰,男,34岁,实验师

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