DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.022

严重烫伤小鼠 TNF-α 表达及其在胰岛素抵抗中作用的研究

王占科* 许霖水 (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: 阐明 TNF-α 超表达在烧伤胰岛素抵抗中的作用机制。方法: 观察全层体表面积 30% (30% TBSA)烫伤小鼠肝脏 TNF-α mRNA表达的动态变化和肝脏及肌肉部分纯化的胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶(Insulin receptor tyrosine protein kinase, InsR-TPK)活性变化以及注射 TNF-McAb后 InsR-TPK活性恢复情况。结果:① 严重烫伤小鼠肝脏 TNF-α-mRNA表达,伤后 3 h开始升高,24 h略有下降,随后又升高,一直持续到第 5天。② 严重烫伤小鼠肝脏和肌肉 InsR-TPK活性降低。注射 TNF-McAb,烫伤小鼠肌肉 InsR-TPK活性恢复而肝脏 InsR-TPK活性变化不明显。结论: 严重烫伤后 TNF-α mRNA表达增强,血中 TNF-α水平升高,抑制 InsR-TPK活性,引起 InsR信号传递障碍是烧(创)伤胰岛素抵抗主要环节和分子基础。

关键词 烧伤; TNF-α mRNA;酪氨酸蛋白激酶
中图法分类号 R644

烧伤,包括其它类型的创伤和感染,出现胰岛素抵抗而影响临床对病人的营养调理和治疗工作。我们前期研究证实,严重烫伤大鼠出现胰岛素抵抗与胰岛素受体(Insulin receptor, InsR)自身磷酸化及胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶(Insulin receptor tyrosine protein kinase, InsR-TPK)活性降低有关[1,2],但详细机制不清楚。本研究利用 30% TBSAIII度烫伤小鼠为模型,研究肝脏 TNF-α mRNA表达和肝脏及肌肉 InsR-TPK活性变化以及注射 TNF-McAb后 InsR-TPK活性恢复情况,探讨 TNF-α超表达在烧伤胰岛素抵抗发生中的作用。其结果总结如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 TNF-McAb(北京邦定试剂公司); [α-^{32}P]dCTP和 [γ-^{32}P]ATP(北京福瑞公司); PolyGLu·Tyr(4:1)(Sigma); TNF cDNA质粒 PBV220(重庆第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所刘韧博士惠赠); 限制性内切酶 EcoRI和 SptI(Sigma);随机探针标记试剂盒(Pharmacia);其余试剂均为分析纯。

1.1.2 动物模型 昆明株小鼠体重 22 g~25 g,雌雄不拘,由本校实验动物中心提供。按本室方法[2]制作烫伤模型。动物分笼喂养,自由摄食。对照组除不烫伤外,其余同烫伤组处理。TNF-McAb注射组按 3 mg/kg总剂量于伤后经尾静脉每天 3次连续注射 3 d 依各时相点断头活杀动物,进行检测。

1.2 方法

1.2.1 肝脏 TNF-α mRNA表达检测 采用 Northern杂交方法,按文献[3,4]操作。

1.2.2 肝脏和肌肉 InsR-TPK活性测定 参照本室建立的方法[2],制备 WGA-Sepharose 4B亲和层析柱,增溶和纯化肝脏和肌肉细胞膜 InsR,作 InsR-TPK活性测定。以^{32}P掺入 fmol/mg蛋白·min^{-1}表示 TPK活力。按下式计算 InsR-TPK活性:

$$InsR\text{-}TPK = [^{32}P_{(R+I+S)} - {}^{32}P_{(R+I)}] - [^{32}P_{(R+S)} - {}^{32}P_{(R)}]$$

R I S分别代表受体蛋白、胰岛素和外源底物

1.2.3 数据处理 用本校数学教研室编制的医用统计程序包 SPMR进行单因数方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 烫伤后肝脏 TNF-α mRNA超表达

通过 Northern blot杂交技术,检测正常和烫伤小鼠肝细胞 TNF-α mRNA表达水平。结果显示,正常小鼠肝脏可检测出 TNF-α mRNA,严重烫伤后 3 h(3PBH,其余类推)肝脏 TNF-α mRNA明显升高,12 h达峰值,24 h~48 h有所下降,随后又迅速升高,并一直持续到第 5天,见附图。TNF-α mRNA的 Northern blot杂交斑点经岛津 930双波长薄层扫描仪分析,以正常小鼠的吸光度值为 1.00烫伤小鼠肝脏各时相点 TNF mRNA,相对含量变化: 1.80(3PBH), 2.64(6PBH), 3.47(12PBH), 2.54(严重烫伤后 1 d, 1PBD), 2.66(2PBD), 2.88(3PBD), 3.17(5PBD)。表明严重烫伤小鼠肝脏 TNF-α mRNA超表达,并与血中 TNF-α正相关。

附图 肝脏 TNF-α mRNA Northern blot杂交
Fig. Northern blot of TNF-α mRNA in liver

* 王占科,男,30岁,主治医师,硕士,现在 94医院检验科 南昌市,330000

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

2.2 严重烫伤 InsR-TPK活性改变

2.2.1 严重烫伤后肌肉 InsR-TPK活性变化　严重烫伤后 3 d,小鼠肌肉部分纯化 InsR-TPK活性无论是基础或加胰岛素(100μmol/L)刺激的 InsR-TPK活性均低于正常对照。当用 TNF-McAb注射后,InsR-TPK活性明显得到恢复,见表 1

表 1　严重烫伤小鼠肌肉 InsR-TPK活性变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of muscle InsR-TPK activity after scalding in mice($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Control	3PBD	TNF-McAb
- Ins	10	3.66± 0.56	2.56± 0.44#	3.11± 0.57#
+ Ins	10	8.78± 0.80	3.30± 0.50**	4.98± 0.84#
ΔTPK	10	5.12± 0.80	0.74± 0.50**	1.89± 0.84#

ΔTPK: TPK(+ Ins) - TPK(- Ins); * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$ *vs* control; # : $P<0.05$ *vs* 3PBD;

上述结果进一步证明,烫伤后 TNFα引起胰岛素抵抗是与 TNFα抑制 InsR-TPK活性这一胰岛素受体信号系统偶联的中心环节密切相关。

2.2.2 烫伤后肝脏 InsR-TPK活性变化　肝脏部分纯化的 InsR-TPK活性检测发现,烫伤后无论是基础状态或是胰岛素刺激,肝脏 InsR-TPK活性均降低。用 TNF-McAb注射烫伤小鼠,未能得到 InsR-TPK活性的恢复,见表 2

表 2　严重烫伤小鼠肝脏 InsR-TPK活性变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of liver InsR-TPK activity after scalding in mice ($\bar{x}\pm s$)

Group	Control	3PBD	TNF-McAb
- Ins	2.94± 0.63	2.15± 0.45	2.19± 0.45
+ Ins	7.01± 0.80	2.74± 0.50**	2.82± 0.70
ΔTPK	4.07± 0.80	0.55± 0.50**	0.63± 0.70

ΔTPK: TPK(+ Ins) - TPK(- Ins); ** : $P<0.01$ *vs* control

提示严重烧伤后 TNFα通过抑制肝脏 InsR-TPK信号偶联途径,造成胰岛素抵抗,不可能用中和外周 TNFα而得到恢复。

3 讨论

胰岛素抵抗是烧伤或其它类型创伤、感染休克时常见的代谢紊乱的症候群,一直是临床和基础研究关心的问题。我们前期研究证明[1,2],严重烫伤大鼠胰岛素抵抗与胰岛素受体信号传导缺陷有关,特别发现肝脏和骨骼肌(胰岛素主要靶组织)细胞膜及其部分纯化的 InsR-TPK活性降低,InsRβ-亚基自身磷酸化和对胰岛素刺激的反应性减退,可能由此引起胰岛素受体信号偶联途径障碍是烧伤后胰岛素抵抗发病的中心环节,但其发病的机制尚未完全清楚。近年来已有报道,肥胖小鼠脂肪细胞 TNFα超表达,抑制机体胰岛素受体信号传导,是引起肥胖和 NIDDM胰岛素抵抗的主要原因[5]。我们还注意到烧伤大鼠肝脏和肺 TNFα mRNA超表达的报道[6]。然而 TNFα mRNA超表达和血中 TNFα水平升高对烧伤后胰岛素受体信号传递有何影响?国内外未见有文献报道。

我们的研究结果证明,严重烫伤小鼠早期肝脏 TNFα mRNA表达与血中 TNFα水平同步增加[9],而且从伤后 3 h开始明显升高并一直持续到第 5天。血浆 TNFα水平升高与血浆葡萄糖胰岛素乘积(GS× Ins)明显正相关,而与单独的血糖和胰岛素升高相关不显著。首次引用 GS× Ins指标定量描述烧伤胰岛素抵抗[9]。发现烧伤后 TNFα与胰岛素抵抗从休克期一直持续到高代谢期。为了进一步证实 TNFα在烧伤胰岛素抵抗的作用,我们使用抗 TNF单克隆抗体(TNF-McAb)注射烧伤小鼠,结果发现中和外周血 TNFα可以有效改善胰岛素抵抗,同时亦能改善肌肉 InsR-TPK活性和对胰岛素刺激的反应性,但不能改善肝脏 InsR-TPK活性和对胰岛素刺激的反应性。其原因不完全清楚,可能由于肝脏巨噬细胞系统是 TNFα产生的主要场所,产生大量 TNFα,通过自分泌、旁分泌等方式作用于肝脏实质细胞,或者因为本研究所用 TNF-McAb剂量不足以中和肝脏的 TNFα,或不能到达肝细胞以有效改善其功能,从而提示纠正肝脏和外周组织胰岛素抵抗的途径可能不一样。

TNFα引起烧伤胰岛素受体信号传递障碍的详细机制尚未明确,我们的实验和其它报道[7~9],证明 TNFα可能直接引起胰高血糖素等应激(升糖)激素升高,拮抗组织对胰岛素的敏感性。另一方面 TNFα通过靶细胞膜上 TNFR介导的神经酰胺作第二信使,激活蛋白激酶 A蛋白激酶 C和 Ser/Thr蛋白激酶,刺激胰岛素受体 Ser/Thr残基磷酸化,抑制胰岛素刺激的β-亚基自身磷酸化或胰岛素受体底物 1(IRS-1)磷酸化,从而阻断胰岛素受体信号传递,导致胰岛素抵抗。

参考文献

1 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

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

3 J萨姆希鲁克,E F弗里奇,T曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指

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

南.北京:科学出版社, 1992: 16~55, 322~323, 974~975
4 谭 骏 主编.基因工程学原理及实验操作技术.北京:科学技术文献出版社, 1994: 98~101
5 Hotamisligil G S, Murray D, Choy L *et al*. Tumor necrosis factor-α inhibits signaling from the insulin receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91(11): 4854
6 袁建成,肖光夏. TNF-α mRNA在严重烫伤大鼠肝脏中的表达及细胞定位.中华外科杂志, 1995; 33(10): 636
7 王占科,许霖水. TNF-α烧伤后胰岛素抵抗相关性的研究.第三军医大学学报, 1997; 19(4): 310
8 Feinstein R, Kanety H, Papa M Z *et al*. TNF suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. J Biol Chem, 1993; 268(3,4): 26055
9 Peraldi P, Hotamisligil G S, Buurman W A *et al*. Tumor necrosis factor inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase, J Biol Chem, 1996; 271(22): 13018

(收稿: 1997-09-29;修回: 1998-01-05)
(编辑 冯崇英)

Expression of TNF-α and its role in insulin resistance after severe scalding in mice

Wang Zhanke, Xu Linshui (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To clarify the mechanism of the role of overexpression of TNF-α mRNA in insulin resistance after severe scalding. **Methods**: In the mice inflicted with 30% TBSA full-thickness skin scalding, the dynamic changes of TNF-α mRNA expression in the liver and the activity of insulin receptor tyrosine protein kinase (InsR-TPK) were determined. Then the reinstatement of InsR-TPK activity by injecting TNF-McAb for 3 days was also observed. **Results**: The expression of TNF-α mRNA in the liver was markedly increased in the first 3h post-scalding and remained high for 5 days. The activity of InsR-TPK in both the liver and skeletal muscle with or without insulin stimulation was greatly reduced as compared with the control. In addition, these disorders of InsR-TPK activity of muscle can be ameliorated through neutralization of the circulatory TNF-α by administration of TNF-McAb. **Conclusion**: The suppression of insulin receptor signal transmission due to the overecpression of TNF-α mRNA and elevated circulatory TNF-α level may be the molecular mechanism and central stage of insulin resistance after thermal injury.

Key words scalding; TNF-α mRNA; tyrosine protein kinase; mouse

头颈部肿瘤患者血清 sIL-2R及 TNF含量的观察

Observation on serum levels of sIL-2R and TNF in patients with head-neck malignant tumors

刘碾记* 黄晋生** 范文汉 赵洪进 (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科)重庆, 400038

近年来发现,头颈部肿瘤患者血清中可溶性白细胞介素-2受体(Soluble interleukin 2 receptor, sIL-2R)、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis fector, TNF)可升高,血清 sIL-2R和 TNF含量在一定程度上反应体内 T细胞的活化及肿瘤活动情况[1]。但国内关于正常人及头颈部肿瘤患者血清中 sIL-2R TNF含量的报道较少。我们用酶联免疫吸附法检测了头颈部肿瘤患者及健康献血员 sIL-2R和 TNF含量,现将结果报道如下。

1 材料与方法

研究对象:健康献血员 20例,男女各 10例,为我院输血科提供。喉癌 10例,鼻咽癌 5例,均为我院住院病人,经手术、病理证实。

sIL-2R酶联检测试剂盒:德国 Bochringer Mannbeim Biochemica公司产品,按试剂盒说明书操作,Beckman 700型生化

(下转 254页)

* 刘碾记,男, 45岁,副主任医师,副教授
** 现在海军总医院中心实验室 北京, 100037

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