DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.002

烧伤后胰岛素受体信号传导缺陷机理的研究*

张 波** 许霖水 吴喜贵 (第三军医大学基础部生物化学教研室) 重庆,630038

提 要 目的: 为了探索烧伤后胰岛素受体信号传递缺陷的机理,以阐明烧伤胰岛素抵抗的分子基础。方法: 采用 WGA-Sepharose 4B亲和层杆纯化大鼠肝脏和肌肉细胞膜胰岛素受体,通过胰岛素受体蛋白 γ-^{32}P磷酸化的 SDS-PAGE放射自显影和外源底物磷酸化,观察烫伤大鼠早期胰岛素受体β亚基自身磷酸化和受体酪氨酸蛋白激酶(IR-TPK)活性变化。结果: 30% TBSAIII°烫伤3 d大鼠肝和肌肉胰岛素受体β亚基自身磷酸化能力明显下降;胰岛素受体 TPK活性亦明显降低并对胰岛素刺激的反应性明显减退。结论: 胰岛素受体信号偶联障碍可能是烧(创)伤后胰岛素抵抗发生的分子基础。

关键词 灼伤;受体,胰岛素;酪氨酸蛋白激酶
中图法分类号 R644

创伤后(包括烧伤,败血症休克等)机体出现胰岛素抵抗,其详细机理仍不清楚。1982年 Black等[1]用葡萄糖钳夹技术研究烧伤病人胰岛素-葡萄糖消耗之间的动态变化,发现外周组织对胰岛素刺激的反应性明显降低,从而提出创伤后胰岛素抵抗的机理可能涉及胰岛素受体后缺陷。许多动物实验结果[2,3]亦证明严重烧伤大鼠比目鱼肌对2-脱氧葡萄糖摄取其基础值改变不明显,但它们对胰岛素刺激葡萄糖摄取的反应性明显降低。表明烧伤后组织对胰岛素刺激的受体信号传导发生障碍。现知胰岛素受体 TPK活性是胰岛素受体信号系统偶联的中心环节。本文采用 WGA-Sepharose 4B亲和层析技术纯化大鼠肝和肌肉细胞质膜的胰岛素受体,研究 30% 体表面积皮肤全层烫伤大鼠胰岛素受体β亚基自身磷酸化能力和受体 TPK活性的变化,探讨烧伤后胰岛素受体信号传递缺陷的机理,其结果总结如下:

1 材料与方法

1.1 材料

CNBr-Sepharose 4B(Phamacia公司), WGA(第二军医大学,上海), N-乙酰氨基葡萄糖(Aldrich公司), [γ-^{32}P]ATP(福瑞公司,北京), Poly Glu· Tyr(4∶1)(Sigma), X线片(乐凯胶片公司,中国),其余试剂均为 A· R级。Wistar大鼠由本校实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 Wistar大鼠,体重(200±20) g,雌雄不拘,随机分成烫伤组和对照组。按文献[2]制作 30% TBSA烫伤模型,分笼喂养,自由摄食。对照组除不烫伤外,其余同烫伤组处理。伤后第3天断头活杀动物,立即取出肝脏和大腿肌肉,制备和纯化胰岛素受体。

1.2.2 胰岛素受体增溶与纯化 取大鼠肝脏和肌肉组织,以 Buffer A 1∶10体积(W/V)进行匀浆。200目尼龙布过滤,滤液4℃ 10 000× g离心10 min上清液转至100 000× g,4℃离心90 min。沉淀溶于适量 Buffer B(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4,含1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na_3VO_4和1% Triton-100)在磁力搅拌下4℃增溶1 h,再4℃,100 000× g离心90 min,上清为质膜增溶组分。

参考文献[4]制备 WGA-Sepharose 4B亲和层析柱(1× 5 cm)。按 Madhru等[5]方法略加改动,纯化肝和肌肉细胞质膜胰岛素受体。用 Lowry法作蛋白质定量。

1.2.3 胰岛素受体β亚基磷酸化放射自显影 参考 Masanori等[6]方法,略加修改进行受体蛋白磷酸化。冰浴终止反应后加入预冷的4× Laemmli上样 Buffer(含100 mmol/L DTT), 95℃~100℃水中加热3 min~5 min,冷却后样品作 SDS-PAGE电泳后,固定、银染色、干胶。用乐凯胶片于-70℃曝光48 h,作放射自显影。

1.2.4 胰岛素受体 TPK活性测定 参考 Grunberger等[7]方法略作修改,通过外源底物 poly Glu· Tyr(4∶1)磷酸化程度(^{32}P掺入量)作胰岛素受体 TPK活性测定。每点平行三管。TPK活性以每 mg蛋白每分钟转移^{32}P的 fmol数扣除空白管(未加外源底物) fmol数的差值表示。胰岛素受体 TPK活性以胰岛素刺激值减去基础值的 fmol/mg蛋白 min^{-1}表示。

2 结果

2.1 胰岛素受体β-亚基自身磷酸化

经过 WGA-Sepharose 4B亲和层析部分纯化的大鼠肝和肌肉细胞膜胰岛素受体蛋白经 DTT还原后在 SDS-PAGE凝胶上可清楚看到两条分子量相应为135× 10^3 u和94× 10^3 u的蛋白带(电泳图未给出)。部分纯化的肝脏和肌肉细胞胰岛素受体分别进行[γ-^{32}P]ATP磷酸化和 SDS-PAGE放射自显影均可以看到相当于94× 10^3 u蛋白带出现放射性斑点,如图1所示。表明胰岛素受体β亚基自身磷酸化并呈胰岛素刺激的剂量依赖关系。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 3907879
** 现在附属西南医院检验科 重庆,630038

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



图 1　正常大鼠部分纯化胰岛素受体自身磷酸化放射自显影

Fig 1　Autoradiograph of partially purified insulin receptor autophosphorylation in normal rats

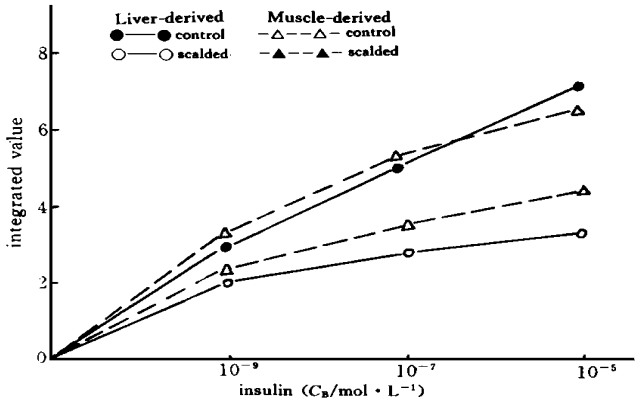


图 2　烫伤大鼠胰岛素受体β-亚基自身磷酸化改变

Fig 2　Changes of insulin receptor β-subunit autophosphorylation in scalded rats

2.2　严重烫伤后胰岛素受体β-亚基自身磷酸化的变化

正常和烫伤后 3 d大鼠肝和肌肉部分纯化的胰岛素受体β-亚基自身磷酸化 SDS-PAGE放射自显影胶片用 CS-910双波长薄层扫描仪(日本岛津)测定,以空白(无胰岛素刺激)管斑点为零,用积分值(Integrated value)表示自显影斑点密度为纵座标,以胰岛素剂量为横座标作图,观察烫伤大鼠胰岛素受体β-亚基自身磷酸化的变化,结果如图 2所示。从图 2中看出,无论是正常或烫伤大鼠肝和肌肉胰岛素受体β-亚基磷酸化均呈胰岛素刺激剂量依赖关系。但烫伤后无论是肝脏或肌肉的胰岛素受体β-亚基自身磷酸化的能力明显下降而且对胰岛素刺激的反应能力亦明显降低。

2.3　严重烫伤后胰岛素受体 TPK活性变化

用 polyGlu· Tyr(4∶1)为外源性底物进行磷酸化,以^{32}P掺入量(fmol^{32}P/mg pro· min^{-1})作单位,测定正常和烫伤大鼠肝脏和肌肉 TPK活性。其结果如附表所示。在基础状态(无胰岛素刺激)烫伤组肝脏 TPK活性为(3.94± 0.84) fmol ^{32}P/mg pro· min^{-1}比对照组(4.40± 0.88) fmol/mg pro· min^{-1}略降低。烫伤后肌肉 TPK活性为(3.04± 0.56) fmol /mg pro· min^{-1},比对照组低(3.29± 0.49) fmol /mg pro· min^{-1},但两组之间差异均不显著($P > 0.05$)。在不同浓度的胰岛素刺激下,肝脏和肌肉 TPK活性均呈剂量依赖关系。但烫伤组的 TPK活性明显低于对照组,而且对胰岛素刺激的反应性亦明显降低。当用胰岛素刺激的^{32}P掺入量减去基础^{32}P掺入量的值表示胰岛素受体 TPK(IR-TPK)活性时,烫伤后大鼠肝和肌肉的 IR-TPK活性变化如附表所示。从表中看出,烧伤后无论是肝或肌肉的 IR-TPK活性均显著降低,对胰岛素刺激的反应性亦明显减退。

附表　烫伤大鼠肝和肌肉 IR-TPK活性变化($\bar{x}$± s)

Table　Changes of IR-TPK in scalded rats ($\bar{x}$± s)

Insulin	n	IR-TPK of liver			IR-TPK of muscle		
		10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}
Control	20	1.25± 0.52△	5.08± 0.82	5.25± 0.77	0.75± 0.53	3.48± 0.68	3.74± 0.74
Scalded	20	0.4± 0.24*	0.99± 0.49**	1.09± 0.33**	0.49± 0.25*	0.96± 0.32**	1.35± 0.41**

△: unit fmol ^{32}P/mg pro· min^{-1}; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* control

3　讨论

胰岛素受体信号偶联系统是胰岛素发挥生物学功能的基础。胰岛素受体β亚基自身磷酸化激发受体内在性 TPK活性,由此启动诸如骨骼肌及脂肪细胞对葡萄糖转运体 4(GluT$_4$)由细胞内向质膜转移和肝脏糖原合成等的信号传递。大量研究证明糖尿病出现高血糖症主要原因与胰岛素受体自身磷化和受体 TPK活性降低有关。对于创伤后出现高血糖高胰岛素反应是否亦与胰岛素受体信号系统偶联障碍有关,国内外未见有报道。为了弄清创伤后胰岛受体信号传递缺陷及其机理,我们首先用 WGA-Sepharose 4B亲和层析

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

方法纯化大鼠肝脏和肌肉细胞膜胰岛素受体,直接用于受体信号传递变化的研究。通过蛋白磷酸化和放射自显影方法,证明凝胶相应于94× 10^3 u位置出现自显影斑点,并呈胰岛素刺激剂量依赖关系,表明为胰岛素受体β-亚基自身磷酸化。有关受体磷酸化放射自显影,大多数作者使用特异性的抗受体抗体或抗磷酸酪氨酸抗体以提高灵敏度和特异性。然而上述两种抗体价格比较昂贵,而且不易得到。我们在实验中采取适当加大受体蛋白用量和延长爆光时间,同样得到比较满意的实验结果,为受体放射自显影研究提供了有益的经验,在国内未见有报道。

创伤后胰岛素抵抗是以肝脏葡萄糖生成和输出增多(肝糖分解和糖异生增强)而外周组织(肌肉和脂肪)胰岛素依赖的葡萄糖摄取减少,以及组织对葡萄糖彻底氧化障碍为主要特征的糖代谢紊乱。本研究结果表明,严重烧伤后由于肝和肌肉胰岛素受体β-亚基自身磷酸化能力下降由此影响受体 TPK活性,其结果可引起由 TPK到肝糖原合成以及肌肉等葡萄糖跨膜转运体(GluT)由细胞内向质膜转移的胰岛素刺激效应障碍相吻合[3]。

严重烫伤后胰岛素受体自身磷酸化和 IR-TPK活性降低的机理目前尚不清楚。然而创(烧)伤后机体应激反应,儿茶酚胺,胰高血糖素和糖皮质激素水平升高,细胞内蛋白激酶 A 蛋白激酶 C都可受到激活而引起胰岛素受体的 Ser/Thr残基磷酸化,由此抑制β-亚基酸 Tyr残基磷酸化,导致 TPK活性降低[7],从而干扰胰岛素受体信号系统偶联[8]。最近大量报道肥胖机体脂肪细胞 TNFα超表达,引起胰岛素受体自身磷酸化障碍和 TPK活性下降是胰岛素抵抗的重要原因[9]。创伤后特别是内毒素血症,TNFα水平明显升高,可能对创伤性胰岛素受体信号传导缺陷起着重要的作用,值得深入研究。

参考文献

1 Black P R, David M, Brooks C *et al*. Mechanism of insulin resistance following injury. Ann Surg, 1982; 196(4): 420

2 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

3 许霖水,吴喜贵.严重烫伤肌肉葡萄糖摄取障碍机理的研究.第三军医大学学报, 1995; 17(6): 467

4 Zhang S M, Li J X, Wei Y M *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

5 Madhru 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

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

7 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

8 Roth R A. Biochemical mechanism of insulin resistance. Horm Res, 1994; 41(suppl 2): 51

9 Hotamiligil 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

(收稿: 1996-09-13;修回: 1997-01-04)

(编辑 刘 鹏)

Study of the mechanism of insulin resistance after severe scalding in rats

Zhang Bo, Xu Linshui, Wu Xigui (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To clarify the mechanism and molecular basis of insulin resistance after severe scalding. Methods: In the rats inflicted with 30% TBSA scalding, the insulin receptors on the cell membrane of the liver and skeletal muscle were partially purified with WGA-Sepharose 4B affinity chromatography and then the changes of autophosphorylation of insulin receptor β-subunit and the activity of tyrosine protein kinase insulin receptors (TR-TPR) were observed with SDS-PAGE autoradiography of phsophorylation of insulin receptors and phosphorylation of exogenous substrate. Results: The degree of autophospholation of insulin receptor β-subunit and the activity of IR-TPR and its sensitivity to insulin stimulation in the liver and skeletal muscle were markedly decreased as compared with the control. Conclusion: The defect of insulin receptor signal transduction may be the molecular mechanism of insulin resistance after thermal injury.

Key words burns; receptor; insulin; tyrosine protein kinase

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