DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.001

论著

胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶在重度烫伤大鼠胰岛素抵抗中作用的研究*

毛旭虎** 许森水 (第三军医大学基础部生物化学教研室)重庆,630038

提 要 以30%体表面积背部皮肤全层烫伤大鼠为模型,通过建立肝细胞膜和骨骼肌细胞膜外源性底物磷酸化的分析方法,观察烫伤后3d胰岛素刺激的胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶活性的改变,探讨创伤后胰岛素抵抗的分子机理。结果表明:烫伤早期大鼠表现胰岛素抵抗,肝细胞和骨骼肌细胞膜刺激外源性底物磷酸化的基础值增高而胰岛素刺激胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶的反应能力则明显减退。提示烫伤后胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶对胰岛素刺激的反应性的降低,可能影响了胰岛素受体信号的传导,从而引起由酪氨酸蛋白激酶介导的胰岛素刺激的葡萄糖跨膜转运和糖原合成等信号偶联通路发生障碍导致胰岛素抵抗。

关键词 灼伤;受体,胰岛素;酪氨酸蛋白激酶;胰岛素抵抗
中图法分类号 R644;Q578

胰岛素对靶细胞的作用首先是与细胞膜上专一性的胰岛素受体结合。胰岛素受体是由α和β两种亚基组成的四聚体糖蛋白,其中α亚基能与胰岛素结合,β亚基具有特异的酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase,TPK)活性[1]。当胰岛素与其受体的α亚基结合后可引起β亚基的自身磷酸化,并使β亚基内在的TPK活性激活。现已证实,胰岛素受体内在TPK活性的激活是胰岛素受体跨膜信号传导的重要环节[2]。激活的胰岛素受体TPK能通过磷酸化细胞内一些内源性生理底物,介导糖代谢等多向生物学效应。动物模型和临床资料证明,创伤后机体表现胰岛素抵抗,胰岛素刺激肌肉组织摄取和处理葡萄糖的能力下降,可能涉及胰岛素受体TPK活性的改变。本研究以30%TBSAⅢ度烫伤大鼠为模型,通过建立肝细胞膜和肌肉细胞膜保温系统对外源性底物磷酸化的分析方法,观察伤后胰岛素刺激的胰岛素受体TPK活性的变化,以阐明酪氨酸蛋白激酶在严重烫伤引起胰岛素抵抗中的作用,为临床创伤性糖尿病的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

[γ-^{32}P]-ATP(比活度>5000 ci/mmol)(北京福瑞公司)。Histone Ⅱ B、poly Glu·Tyr(4∶1)、单组份胰岛素(Sigma)。血糖测定试剂盒(保定长城临床检验试剂公司)。胰岛素测定试剂盒(华西糖尿病研究所)。其它试剂均为分析纯。

1.2 动物模型

Wistar雄性大鼠,体重180~250 g,随机分为烫伤3d组和正常对照组,烫伤模型按本室建立方法[3]制作。

1.3 细胞膜的制备

肝细胞的分离采取不连续蔗糖密度梯度离心法进行,骨骼肌细胞膜的制备参阅Bonen等方法略加修改后进行。细胞膜的鉴定包括膜结构的电镜观察和5'-核苷酸酶活性的测定。膜蛋白的定量采用Lowry法。

1.4 外源性底物磷酸化试验及胰岛素刺激的TPK活性测定

外源性底物磷酸化分析方法参考Harald等[4]结合本室条件略加修改。反应体系含终浓度为50 mmol/L Tris-HCl,pH7.4,50 mmol/L $MgCl_2$,5 mmol/L $MnCl_2$,1 mg/ml Histone Ⅱ B,加入膜酶后以50 μmol/L[γ-^{32}P]-ATP(0.2 μci/nmol)启动反应,反应总体积为50 μl,25℃保温15 min,置冰浴并加入终浓度为50 mmol/L未标记ATP终止反应(对照管终止反应后加入膜酶)。取定量反应液点于双层滤膜,10%三氯醋酸(TCA)抽洗,80℃干燥,加入闪烁液后计数。TPK活性以每毫克膜酶每分钟催化^{32}P转移到Histone Ⅱ B上的fmol数表示。

胰岛素刺激的TPK活性测定:先将膜酶与不同浓度(0、10^{-9}、10^{-7}、10^{-5} mol/L)的胰岛素于25℃保温40 min,然后按外源性底物磷酸化的分析方法进行反应,测定磷酸化反应量。胰岛素刺激的胰岛素受体TPK活性以胰岛素刺激的细胞膜TPK活性减去基础状态下细胞膜TPK活性的差值表示。

1.5 其它方法

血糖测定采用葡萄糖氧化酶法,胰岛素测定采用放射免疫法,数据处理采用标准t检验进行分析。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39070819
** 现在医学检验系临床生物化学教研室 重庆,630038

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

2 结果

2.1 烫伤后血糖和血浆胰岛素水平的变化(见表1)

表1 烫伤后大鼠血糖和血浆胰岛素水平变化

Tab 1 Changes of plasma level of glucose and insulin after scalding

Group	Blood glucose (mmol/L)	Plasma insulin (mU/L)
Control	4.91±0.80 (n=6)	15.76±4.37 (n=7)
Scalding	6.64±0.48 (n=5)△	25.65±6.60 (n=5)△

△: $P<0.05$ *vs* control

2.2 烫伤后细胞膜基础TPK活性的改变

采用肝细胞和肌肉细胞膜与外源性底物温育,刺激Histone Ⅱ B磷酸化,结果表明在未加胰岛素刺激的基础状态下,烫伤后肝细胞膜和肌肉细胞膜TPK活性增强($P<0.05$)(见表2)。

表2 基础状态下TPK活性的变化

Tab 2 Changes of TPK activity in the basal condition ($\bar{x}\pm s$)

Group	Hepatocyte membrane	Skeletal muscle membrane
Control	3.24±1.10	1.41±0.46
Scalding	6.02±3.05*	2.35±0.35*

1. The data are expressed as the amount of P^{32} incorporated Histone Ⅱ B per minute per mg membrane protein, values are means ± $s_{\bar{x}}$ of five individual experiments; 2. *: $P<0.05$ *vs* control

2.3 伤后胰岛素受体TPK对胰岛素刺激反应性的变化

从图1和图2可以看出,胰岛素对正常大鼠胰岛素受体TPK活性有明显的刺激作用,而烫伤后胰岛素受体TPK活性对胰岛素刺激的反应能力显著降低。

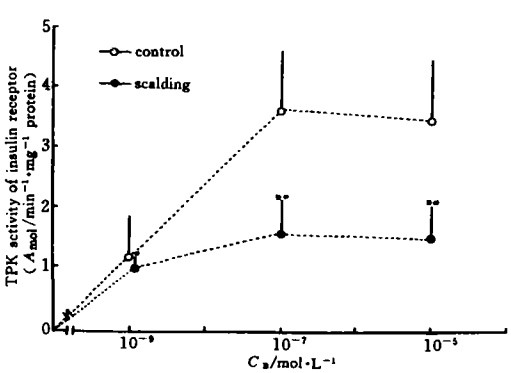


图1 肝细胞膜胰岛素受体TPK对胰岛素的反应

Fig 1 Effect of insulin on TPK activity of insulin receptor in hepatocyte membrane

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

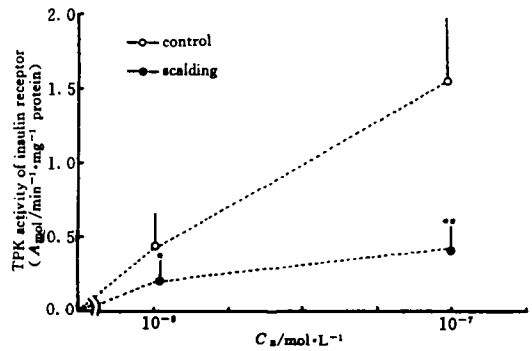


图2 骨骼肌细胞膜胰岛素受体TPK对胰岛素的反应

Fig 2 Effect of insulin on TPK activity of insulin receptor in skeletal muscle membrane

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

对创伤胰岛素耐受的机理已有不少研究。一般认为由于创伤后细胞膜上胰岛素受体数目(结合容量)的减少以及受体后的缺陷所致。胰岛素受体数目的减少可能与创伤后高血糖和高胰岛素血症引起的受体下向调节有关。由于细胞膜上存在有"闲置"受体(spare receptor),胰岛素受体数目的减少并不是引起胰岛素抵抗的直接原因。烫伤后胰岛素抵抗主要原因可能涉及受体信号传导缺陷所致。近来大量实验证明,胰岛素受体β亚基内在的酪氨酸蛋白激酶活性在胰岛素受体的信号传递与表现中发挥着重要作用,许多胰岛素的信号传递途径及生物学效应的发挥依赖于受体的酪氨酸蛋白激酶活性,激活的受体酪氨酸蛋白激酶可通过磷酸化其它细胞内的生理性底物如胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1,IRS-1),PP15等介导包括葡萄糖转运、糖原合成等信号传递途径[5]。胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶跨膜信号的改变,是肥胖和NIDDM出现胰岛素抵抗的直接原因[6]。烫伤后大鼠表现高血糖和高胰岛素血症反应,而靶细胞对升高的胰岛素反应性降低,是否亦与调节葡萄糖代谢的胰岛素受体TPK活性的跨膜信号改变有关?未见有文献报道。为此我们通过观察胰岛素受体TPK活性以及对外源性底物(主要是酪蛋白、组蛋白)某些Tyr残基磷酸化刺激的跨膜信号途径作用的变化,来探讨创伤后胰岛素抵抗可能涉及的受体信号传递的分子基础。

本实验证明在未加胰岛素刺激的基础状态下,烫伤后肝细胞和肌肉细胞膜TPK活性增强。这可能是由于烫伤应激反应,儿茶酚胺、胰高血糖素和糖皮质激

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

素作用加强，可引起细胞内 cAMP 增加，通过蛋白激酶 A 系统，刺激外源性底物磷酸化加强；另一方面，烫伤后可引起某些细胞因子（如 TNFα，IL－1 等）刺激蛋白激酶 C，促使外源性底物磷酸化增强；或者是烫伤后胰岛素受体 TPK 本身被激活而引起外源性底物磷酸化增加。由于烫伤后胰岛素受体 TPK 活性增强，有可能对烫伤基础葡萄糖摄取增强起重要作用[7]。然而，关于烫伤后基础胰岛素受体 TPK 活性是否增强及其意义有待进一步研究。胰岛素受体 TPK 活性是在胰岛素受体与胰岛素结合后受体的自身磷酸化而被激活的，而丝/苏氨酸的磷酸化对 TPK 活性亦有调节作用。胰岛素对正常大鼠胰岛素受体 TPK 活性有明显的刺激作用，而烫伤后胰岛素受体 TPK 活性对胰岛素刺激的反应能力显著降低，与在肥胖、糖尿病等表现胰岛素抵抗的大鼠中观察到的结果一致。导致这一现象的原因还不清楚，可能与胰岛素受体在伤后的磷酸化状态改变有关。烫伤后蛋白激酶 C 活性增加以及胰岛素对腺苷酸环化酶抑制作用的降低引起的细胞内 cAMP 浓度升高[8]，均可能抑制了胰岛素受体 Tyr 残基的自身磷酸化，使胰岛素受体 TPK 表现出对胰岛素的反应性降低。近来有作者观察到肿瘤坏死因子 α（TNFα）也能够通过降低胰岛素受体的自身磷酸化抑制胰岛素刺激受体 TPK 活性的能力[9]。伤后 TNFα 水平的增加是否也参与作用，有待进一步证实。

对比目鱼肌整体和离体的实验中都证实烫伤后胰岛素刺激的葡萄糖摄取能力明显减退[3,7]、唐仲进等利用葡萄糖固定技术也证实烫伤后胰岛素刺激的葡萄糖处置显著低于正常[10]。这些结果提示伤后胰岛素刺激的葡萄糖转运以及糖的利用等信号传导通路的偶联环节可发生障碍，伤后胰岛素刺激 TPK 活性能力的下降可能会影响胰岛素受体信号的向下传递，使由受体 TPK 介导的葡萄糖转运、糖原合成等信号途径发生障碍，胰岛素调节的细胞葡萄糖代谢、利用能力下降，机体出现高血糖、高胰岛素血症反应为特征的胰岛素抵抗。本研究结果表明胰岛素刺激胰岛素受体 TPK 活性能力的下降，可能是引起烫伤后胰岛素抵抗的重要原因。

参考文献

1 Kasuga M, Zick Y, Blith DL *et al*. Insulin stimulation of phosphorylation of the β－subunit of insulin receptor. J Biol Chem, 1982; 257: 9891

2 Having HU. The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistant. Diabetologia, 1991; 34: 846

3 许霖水，吴喜贵，董燕麟. 严重烫伤大鼠胰岛素抵抗的研究. 中华实验外科杂志，1988；5：17

4 Harald HK, Gary RF, Jerrold MO. Substrate specifities of insulin and epidermal growth factore receptor kinase. Biochem Biophys Res Com, 1985; 127: 254

5 White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. J Biol Chem, 1994; 269: 1

6 Le－Marchand －Brustel Y, Gremeauxt T, Ballotti R *et al*. Insulin receptor tyrosine kinase activity is defective in skeletal musele of insulin resistant obese mice. Nature, 1985; 315: 676

7 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

8 Takaycema S, White MF, Kahn CR. Phorbol ester－induced serine phosporylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. J Biol Chem, 1988; 263: 3440

9 Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor－2: direct role in obesity－linked insulin resistance. Science, 1993; 259: 87

10 唐仲进，廖锡麟. 烫伤大鼠胰岛素耐受机理. 中华创伤杂志，1992；8(3)：144

（收稿：1995-09-17；修回：1996-01-05）

（编辑　刘　鹏）

Effects of insulin receptor tyrosine protein kinase on insulin resistance after scalding in rats

Mao Xuhu, Xu Linshui (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract After the rats were inflicted with 30% TBSA full thickness scalding on the back, the changes of insulin receptor tyrosine protein kinase (IRTPK) were studied on the 3rd day postscalding with the phosphorylation of external substrates stimulated with hepatic and muscular cytomembranes to determine the possible molecular mechanism of insulin resistance after scalding. It was found that insulin resistance appeared in the early stage postscalding while the basic value of the phosphorylation of external substrates stimulated

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

with hepatic and muscular cytomembrane was increased and the activity of IRTPK to insulin was greatly suppressed as compared with the control. These facts indicate that the imparied responses of IRTPK to the stimulation of insulin may affect down-stream signal transmission of the insulin receptors and then the signal coupling pathway for the glucose transmembranous transportation and glycogen synthesis mediated with IRTPK and stimulated with insulin is obstructed. Consequently, insulin resistance occurs.

Key words scalding; insulin receptor; tyrosine protein kinase; insulin resistance; rat

论文摘要

肿瘤标志物在胰腺癌组织中表达的实验研究*

Experimental study of expression of tumor markers in pancreatic carcinomatous tissue

赵晓晏 刘为纹** 于世远 (第三军医大学附属新桥医院医院消化内科) 重庆,630037

胰腺癌是消化道较为常见的恶性肿瘤之一,其发病率有逐年上升的趋势,其诊断问题是目前研究的焦点。本研究用大鼠胰腺癌及人胰导管腺癌组织标本应用 Southern blot、PCR-ASO 探针技术及免疫组织化学等方法,初步探讨肿瘤标志物与胰腺癌的关系,主要结果如下:(1)本研究在国内首次利用重氮丝氨酸成功地诱发出同代纯系 Wistar 大鼠原发性胰腺癌动物模型,总发生率为13.3%,组织学均为中分化腺泡细胞癌,对致癌过程诸多因素动态观察,发现对大鼠胰腺具有相对特异性的致癌剂重氮丝氨酸是动物模型成功的必要条件,生大豆粉和高不饱和脂肪酸饮食是动物模型的促发因素,能促进胰腺嗜酸性腺泡细胞结节(aAACN)的形成和转化,并发现动物模型中伴有大量肿瘤血管的生成,其增生程度与 aAACN 的增生程度相一致。提出胰腺 aAACN 是重氮丝氨酸诱发大鼠原发性胰腺癌的癌前病变。致癌剂加促癌因素刺激大鼠胰腺 aAACN 的形成与增生、并伴新生血管的形成,最后形成实体胰腺癌为本动物模型的癌变过程。(2)利用 PCR-ASO 探针技术及免疫组织化学方法观察了大鼠胰腺癌及人胰导管腺癌 c-Ki-ras 癌基因第12位密码子点突变及其基因产物 p21蛋白的变化规律,发现重氮丝氨酸诱发 Wistar 大鼠原发性胰腺癌不具备 c-Ki-ras 癌基因及产物的变化。c-Ki-ras 癌基因第12位密码子及其产物 p21蛋白的阳性表达是国人胰导管腺癌的主要表达形式,点突变率及 p21蛋白的阳性表达率分别为97%和83%,两者阳性吻合率达93%,提示两项指标检测存在显著的正相关性。其点突变谱变化规律示 G→T 突变率为63%,G→A 变突率为34%,G→C 突变率为8.6%,提出 c-Ki-ras 癌基因及其产物 p21蛋白在胰腺癌组织的高表达率可望成为今后胰腺癌主要的基因诊断形式。本研究应用 Southern blot 及免疫组织化学的方法对比研究癌基因及产物 p53蛋白的及以癌基因产物 nm23,c-myc 蛋白、及 c-erbB-2蛋白的表达,除 c-erbB-2在正常胰腺及大鼠腺泡细胞增生结节中有低频率的表达外,其余均在肿瘤组织中表达,表达率20%～63%,提示这些基因产物不能单独作为胰腺癌基因诊断形式。(3)应用免疫组织化学的方法对比研究了大鼠原发性胰腺癌及人胰导管腺癌组织中细胞周期监控指标(PCNA),碳水化合物抗原(CA19-9)及粘蛋白抗原(Tn,sTn、CEA,Span-1)的变化。结果表明 PCNA 标记指数在大鼠胰腺癌变过程中有显著性变化,伴随着癌变的进程,其 PCNA 标记指数逐步增加。人胰导管腺癌 PCNA 标记指数为0.48±0.20,而正常胰腺呈阴性反应,提示 PCNA 是反映细胞增生及恶性转化的良好指标。Tn 及 sTn 在胰腺癌组织呈同步表达的特点,与正常胰腺组织的差异有显著性,是反映恶性疾病的良好指标之一。CEA、CA19-9及 Span-1是目前研究较多的胰腺癌肿瘤标志物,本研究结果示胰腺癌阳性率为77%～89%。并与肿瘤的病理分期抑或临床分期有一定关系,但都不是癌前病变的指标,仅能作为病理诊断的辅助指标之一。(4)本研究还应用显微分光光度计进行了大鼠癌变过程及人胰导管腺癌组织中 DNA 含量及其倍体变化,结果表明癌变过程中 DNA 含量与 aAACN 的增生及恶性转化是呈一致性关系,其倍性变化由正常向非整倍体过渡,间接说明 aAACN 是重氮丝氨酸诱发 Wistar 大鼠原发性胰腺腺泡细胞癌的癌前病变。人胰导管腺癌的 DNA 变异与多数肿瘤变化规律一致,并与其病理分期有明确的关系。

关键词 胰腺肿瘤;基因;抗原;碳水化合物

中图法分类号 R735.9

(收稿:1995-12-29;修回:1996-01-23)

(编辑 沈锡庚、王 红)

* 全军"八五"攻关项目

** 第三军医大学附属西南医院消化内科 重庆,630038

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