DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.001

严重烫伤肌肉葡萄糖摄取障碍机理的研究*

论著

许森水 吴喜贵 (第三军医大学基础部生物化学教研室)重庆,630038

提 要 观察30%体表皮肤全层烫伤大鼠骨骼肌细胞膜葡萄糖转运体位点的动态变化以阐明严重烫伤后肌肉葡萄糖摄取障碍的原因。结果显示,严重烫伤后肌肉总葡萄糖转运体结合位点变化不明显($P>0.05$),但细胞内膜葡萄糖糖转运体位点向质膜转移的胰岛素刺激效应比对照组明显降低($P<0.05$)。提示严重烫伤后葡萄糖转运体向细胞质膜转移减少是肌肉葡萄糖摄取障碍的直接原因,可能亦是胰岛素抵抗的重要环节。

关键词 灼伤;葡萄糖转运体;胰岛素抵抗
中图法分类号 Q532.3;R644

创伤性糖尿病和胰岛素抵抗是创伤后代谢改变的重要指征,其详细机理一直不清楚。越来越多的证据表明,糖尿病尤其是Ⅰ型(NIDDM)前期肌肉对胰岛素刺激葡萄糖摄取反应障碍的胰岛素抵抗是代谢性内分泌紊乱和NIDDM发病的重要原因,可能与胰岛素受体酪氨酸激酶(TK)信号途径偶联异常引起葡萄糖转运体-4(glucose transporter-4,GluT-4)转移和活性改变有关[1,2]。我们在对严重烫伤大鼠肌肉葡葡糖摄取研究时同样证明烫伤大鼠无论是整体或离体比目鱼肌对胰岛素刺激葡萄糖摄取的反应性均明显降低[3,4]。其原因是否与细胞质膜GluT-4减少有关未见有文献报道。

笔者利用D-[U-^{14}C]葡萄糖结合试验并通过Scatchard公式计算细胞膜葡萄糖转运体结合位点。观察细胞亚组分葡萄糖转运体动态变化,探讨严重烫伤大鼠葡萄糖摄取障碍与葡萄糖转运体转移变化之间的关系,以阐明严重烫伤后胰岛素抵抗发生机理。结果总结如下:

1 材料与方法

1.1 材料

猪胰岛素注射液(40 U/ml,上海生化制药厂),D-[U-^{14}C]葡萄糖(248 mCi/mmol,中科院放射医学研究所,天津)。其余试剂为A·R级。Wistar大鼠由本校动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 体重180±20 g雄性大鼠按前法[3]制作30%体表皮肤全层烫伤模型,自由摄食。伤后3 d注射胰岛素(4 U/kg体重,腹腔),对照动物注射生理盐水。1h后断头活杀。

1.2.2 细胞膜及亚组分制备 大鼠断头放血后取后腿肌肉在冰浴上去脂肪与结缔组织。称重后按Klip A等法[5]结合本室条件操作:肌肉剪碎用高速分散器4×10 s捣碎,20目筛过滤。用玻璃匀浆低速匀浆,200目尼龙布过滤。滤液1∶10(W/V)稀释,搅拌5 min,4℃,7000×g离心10 min,上清液再100000×g 4℃离心10 min。沉淀(粗膜)作蔗糖梯度,同样条件离心90 min。收集25%和35%蔗糖的膜组分,分别用10 mmol/L $NaHCO_3$稀释并离心得沉淀为细胞质膜和细胞内膜(microsome)[5]。膜组分悬浮于Krebs-Ringer磷酸盐缓冲液(KRPB),pH7.4,并作成600 μg蛋白/ml,用于^{14}C葡萄糖结合试验。

1.2.3 D-[U-^{14}C]葡萄糖结合试验 参照Ludvigsen C等方法[6],适当修改:取不同量(见图1、2)D-[U-^{14}C]葡萄糖与粗膜(100 μg/50 μl)或亚组分膜(30 μg/50 μl)在1 mmol/L D-葡萄糖存在下,总体积200 μl,30℃振摇10 min,立即加入等体积的10%三氯醋酸终止反应。充分混匀,静置5 min,于1700×g离心10 min。去净液体部分,沉淀用100 μl热水(80℃)溶解,2.0 ml无水乙醇助溶,用popop/甲苯进行液闪测定。以加热变性膜放射性作非特异性结合(NSB),各浓度点平行3管,取扣除NSB后的平均值计算特异性结合率(B)以B/F对^{14}C-葡萄糖结合量进行Scatchard作图分析,求出肌肉细胞膜葡萄糖转运体结合位点。以nmol ^{14}C葡萄糖/mg蛋白膜表示。

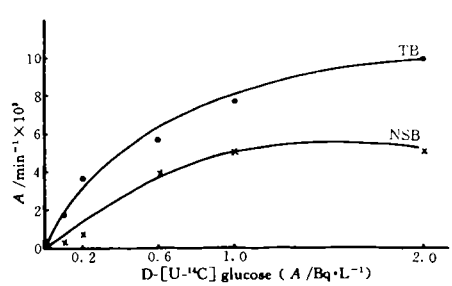


图1 D-[U-^{14}C]葡萄糖与肌肉细胞膜结合
Fig 1 Binding of D-[U-^{14}C] glucose on celll membrane of muscle
TB: Total binding of ^{14}C-glucose;
NSB: nonspecific binding of ^{14}C-glucose

* 国家自然科学基金资助项目,No.39070819

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

3 讨论

细胞对血循环中葡萄糖摄取的速率是糖在细胞内代谢的限速步骤。而肌肉是胰岛素刺激的葡萄糖消耗的主要器官。肌肉对葡萄糖摄取是由葡萄糖转运体4(GluT-4)易化扩散介导的,后者对胰岛素敏感,严格受其调节。基础状态GluT-4合成后主要停留在沿肌原纤维排列的膜性小泡,质膜上的GluT-4含量明显低于细胞内库[9]。胰岛素刺激肌肉组织对葡萄糖摄取的信号是通过胰岛素底物-1信号系统(IRS-1 Signaling System)直接促进细胞内GluT-4由细胞内库向质膜转移,增加细胞质膜上GluT-4的数量与活性[10]。因此测定细胞膜GluT-4的动态变化,特别是对胰岛素刺激的反应性变化对研究肌肉葡萄糖摄取障碍的机制可以提供有用的信息。目前对细胞膜GluT-4性质的研究方法有三:①用放射性标记葡萄糖(及其衍生物)作Vmax和Km动力学测定[6];②用[^{3}H]-松弛素B作D-葡萄糖proteble结合位点测定[3];③用高效的GluT-4单克隆抗体放射自显影测定。后两种方法虽然精度和特异性高,但亦存在不同程度的试剂来源和价格昂贵而限制应用和开展的问题。

本文作者的实验应用D-[U-^{14}C]葡萄糖结合试验确定葡萄糖转运体(GluT-4),其饱和曲线性质和胰岛素刺激效应与[^{3}H]-松弛素B的结合结果一样[5,7],并采取Scatchard公式作图,直接计算葡萄糖转运体结合位点。结果表明,严重烫伤大鼠肌肉细胞葡萄糖转运体转移的胰岛素刺激效应与正常大鼠比较明显降低,这一改变与肌肉葡萄糖摄取障碍直接相关,可能是创伤后血糖升高和胰岛素抵抗的重要原因。关于创伤后肌肉葡萄糖摄取障碍的信号传递及其意义有待进一步研究。

参考文献

1 Nolam JJ, Freidenberg G, Henry R. Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes melllitus and obesity. J Clin Endocrinol Metab,1994;78:471

2 Kanety H, Moshe S, Shafrir E et al. Hyperinsuliemia induces a reversible impairment in insulin receptor function leading to dibetes in the sand rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA,1994;91:1853

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

4 许霖水,吴喜贵,董燕麟.严重烫伤大鼠骨骼肌胰胰岛素抵抗的研究.创伤杂志,1990;6:87

5 Klip A, Ramlal T, Young DA et al. Insulin-induced traslocation of glucose transporter in rat hindlimb muscles. FEBS Lett,1987;(1):224

6 Ludvigsen C, Jarett L. A comparison of basal and insulin-stimulated glucose transport in rat dipocyte plasma membranes. Diabetes,1980;29:373

7 Klip A, Walker D. The glucose transport system of muscle plasma membranes: characterization by means of [^{3}H]-cytochalasin B binding. Arch Biochem Biophys,1983;221:175

8 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;10:211

9 Thordis G, Kotliao N, Piloh PF. Immunological analysis of GluT4-enriched vesices. J Biol Chem,1993;268:1691

10 Myer MG, JR, Sun XJ. IRS-1 signaling system. TIBS, 1994;19:289

(收稿:1995-03-15;修回:1995-09-22)

Study of the mechanism of glucose uptake impairment in skeletal muscles after severe scalding in rats

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

Abstract In order to investigate the mechanism of the impaired glucose uptake of the skeletal muscles after severe scalding, the changes of the binding sites of glucose transporter in the fraction of skeletal muscle membrane were observed in rats after they were inflicted with 30% TBSA full thickness scalding. It was found that the total binding sites of glucose transporter of the scalded rats were not significantly different from those of the the normal ($P>0.05$) but the effect of insulin-stimulation on the translocation of glucose transporter to plasma membrane from intracellular pool was significantly decreased ($P<0.05$). These findings suggest that the reduction of the translocation of glucose transporter to plasma membrane after scalding can result in abnormal glucose uptake and consequently insulin resistance.

Key words burns; glucose transporter; insulin resistance

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