DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.05.003

严重烫伤大鼠肝细胞跨膜信号传导的研究*

徐爱民 许森水 董燕麟 (第三军医大学基础部生物化学教研室) 630038

提 要 本文研究30%体表皮肤全层烫伤大鼠的肝细胞膜胰岛素受体结合性质变化和对肝细胞膜腺苷酸环化酶活性调节,探讨跨膜信号传导在烫伤后胰岛素抵抗中的作用。结果证明烫伤后肝细胞膜胰岛素受体结合容量降低,胰岛素对腺苷酸环化酶抑制的敏感性下降。提示烫伤后肝膜信号传递障碍可能影响糖代谢异常和引起胰岛素抵抗。

关键词 灼伤;受体,胰岛素;腺苷酸环化酶类;胰岛素抗药性
中图法分类号 R644;Q578

肝脏是糖代谢的重要器官又是胰岛素作用的敏感靶组织。胰岛素通过特异的膜受体将信号传到细胞内影响胞内cAMP含量而调节糖代谢某些关键酶,控制血糖恒定。烧伤存在葡萄糖代谢障碍[1,2],可能涉及某些信号跨膜传导异常。本文以30%背部皮肤全层烫伤大鼠为模型观察胰岛素对特异膜受体结合和对腺苷酸环化酶(AC)活性调节,从信号跨胰传递水平探讨伤后胰岛素抵抗发生机制。总结如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

葡萄糖氧化酶、胰高血糖素、ATP为Sigma产品。^{3}H-cAMP药盒,^{125}I-Na为中国原子能研究院产品。其它试剂为BR级。

1.2 实验动物

按文献[3]建立30% BSA烫伤模型,分笼喂养。

1.3 肝细胞膜制备

按华西医科大学生化教研室介绍方法,采用不连续蔗糖梯度离心。收集37%~41%蔗糖界面膜组分,-20℃保存备用。膜蛋白及标志酶测定按前法[3]。

1.4 肝细胞膜胰岛素受体结合

参考严孝强方法,膜蛋白80 μg/管,^{125}I-胰岛素0.15 ng/管。总体积250 μl,4℃育温24 h,聚乙二醇-6000作沉淀剂。测定系列浓度胰岛素最大结合容量。

1.5 胰岛素对腺苷酸环化酶的调节

参考Gawler等方法[4]测定肝膜AC活性。酶促底物混合液(含ATP 1.5 mmol/L,NaF 10 mmol/L,GTP 0.1 mmol/L,$MgSO_4$ 5 mmol/L,茶碱10 mmol/L,磷酸肌酸7.4 mg/ml,肌酸激酶1 mg/ml)与20~40 μg膜蛋白(酶)在终浓度为5 μm高血糖素刺激后再用不同浓度(10^{-11},10^{-10},10^{-9},10^{-8},10^{-7} mol/L)胰岛素抑制。总体积为100 μl,30℃反应10 min。煮沸、冷却用氧化铝吸附,离心。取40 μl上清液用蛋白激酶竞争法测定cAMP生成量。以pmol cAMP/mg蛋白·min表示酶活性。

1.6 血糖及血浆胰岛素含量测定

按文献[3]方法进行。

2 实验结果

2.1 血糖及血浆胰岛素水平的变化

正常及烫伤大鼠血糖和血浆胰岛素水平的变化见表1。烫伤后3 d和5 d血糖分别升高47.5%和30.1%。血浆胰岛素水平分别升高105%和84%。

表1 烫伤大鼠血糖与血浆胰岛素水平的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of plasma level of glucose and insulin in scalded rats ($\bar{x}\pm s$)

Groups	3rd day postscalding		5th day postscalding	
	Glucose (mmol/L)	Insulin (mU/L)	Glucose (mmol/L)	Insulin (mU/L)
Control	7.02±0.25 ($n=7$)	13.5±3.5 ($n=7$)	7.20±0.64 ($n=7$)	13.2±2.9 ($n=7$)
Scalded	10.34±1.58※ ($n=8$)	27.7±7.6※※ ($n=7$)	9.42±1.32※ ($n=6$)	24.3±5.8※※ ($n=7$)

※: stands for $P<0.05$ and ※※ $P<0.001$ as compared with that of the control

* 国家自然科学基金资助课题,No. 39070819

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

2.2 肝细胞膜胰岛素受体的改变

肝细胞膜胰岛素受体结合的 Scatchard 作图得一凹面向上曲线，见图1。曲线向右延伸与横轴交点（截距）为最大结合容量（Bmax）。正常大鼠肝膜胰岛素受体最大结合容量为1.39±0.15 pmol/mg 蛋白。与文献报道结果相似。烫伤后3 d 和5 d 组分别为0.77±0.12 pmol/mg 蛋白和0.73±0.07 pmol/mg 蛋白，与正常组比较差异非常显著（$P<0.001$）。烫伤后受体亲和力（曲线斜率）升高，但最大结合率差异不显著（$P>0.05$）。

2.3 胰岛素对肝细胞膜 AC 活性调节的变化

结果见表2。从表2中看出，用5 μmol/L 胰高血糖素刺激时，烫伤大鼠 AC 活性升高程度明显低于正常鼠。在所给剂量范围（10^{-11}～10^{-7} mol/L）为24%左右。与 Gawler[4] 结果相似。但在低剂量胰岛素作用下（10^{-9}～10^{-11} mol/L）烫伤组 AC 抑制效应明显低于正常组（图2所示）。抑制曲线右移，ED_{50}增大。

表2 胰岛素对肝细胞膜 AC 调节的改变

Tab 2 Changes of adenylate cyclase activity in hepatocyte membrane （$\bar{x}\pm s$）

Groups	No.	Insulin concentration (mol/L)					
		0	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
Control	9	318.25±53.17	281.75±28.25	246.51±18.50	246.25±18.24	241.37±21.53	234.27±15.57
			(7.47±1.15)%	(15.9±1.10)%	(20.62±1.53)%	(24.27±2.20)%	(24.8±1.72)%
3rd day	7	251.08±32.19※	245.69±26.97	233.00±13.32	223.07±14.83	195.69±15.87	190.32±13.61
			(2.09±0.23)%※※	(7.17±0.41)%※※	(11.51±0.74)%※	(22.01±1.77)%	(24.20±1.71)%
5th day	6	187.50±20.67※	183.29±23.12	174.38±24.13	168.52±23.99	141.04±21.29	142.23±11.83
			(2.27±0.28)%※※	(6.93±0.75)%※※	(10.13±1.28)%※	(24.53±3.38)%	(24.13±3.02)%

Note: The percentages denote the rate of insulin inhibition on adenylate cyclase;
The unit of the activity of adenylate cyclase: pmol cAMP/mg protein/min;
※: stands for $P<0.05$ and ※※: $P<0.001$ as compared with that of the control.

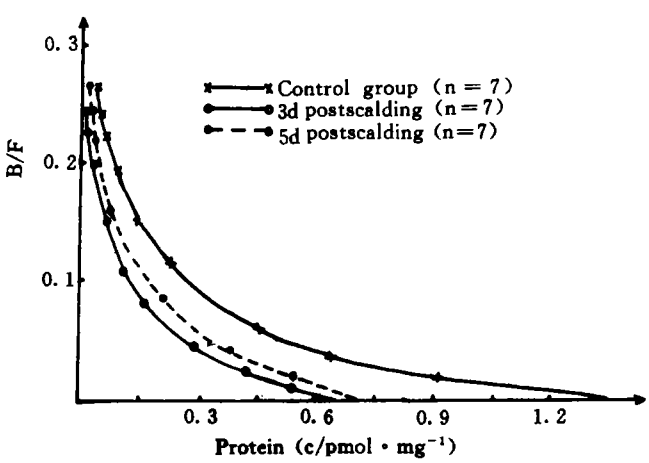


图1 大鼠肝细胞膜胰岛素受体 Scatchard 作图

Fig 1 Binding capacity of insulin recpetors in hepatocyte membrane

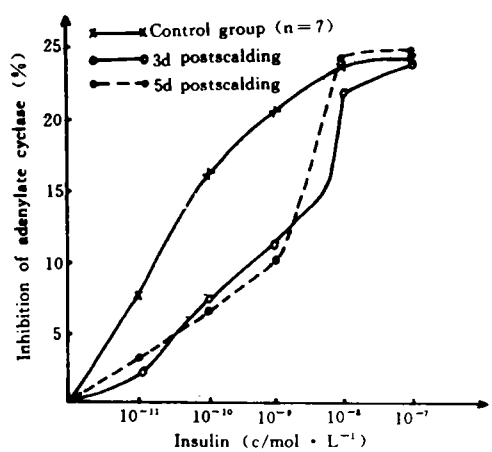


图2 胰岛素对肝细胞膜 AC 抑制曲线

Fig 2 Insulin inhibition on glucagon-stimulated adenylate cyclase

3 讨论

已知烧伤、感染和包括大手术的不同创伤条件下机体往往出现高血糖和高胰岛素反应。我们的实验结果也证实这一现象，但对于创伤后高血糖的原因仍不清楚。最近的临床研究和动物实验均证明创伤后糖代谢障碍。James 等[1]和 Jeevanandam 等[2]利用同位素标记的葡萄糖对不同部位严重创伤病人示踪研究证明创伤高代谢期机体耗 O_2 量增加，血中葡萄糖氧化速率下降，被摄取的葡萄糖氧化百分比明显降低而葡萄糖生成则明显增加。来自葡萄糖的 CO_2 生成量低于正常对照，但血中乳酸水平没有差别。认为创伤后高血糖的主要原因是糖异生（Cori 氏循环）作用加强。唐仲进[5]用真实血糖固定术研究烧伤大鼠葡萄糖代谢，证明烧伤后葡萄糖置换率明显降低，认为与胰岛素受体后缺陷（代谢障碍）有关。

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

本研究企图观察烫伤对肝细胞胰岛素受体结合行为的影响及对腺苷酸环化酶调节的改变从受体信号传导水平上了解创伤条件下糖代谢障碍和产生胰岛素抵抗的基础。结果证明严重烫伤早期肝细胞胰岛素受体结合容量减少，亲和力升高。最大结合率正常。这些改变可能是烫伤后应急激素（高血糖素等）增加，促进糖原分解或/和糖异生使血糖升高而出现高胰岛素反应。后者诱发胰岛素受体内吞的下向调节使膜上受体减少。这一改变与 Desbquois 等[6]用放射配基（^{125}I-胰岛素）诱导大鼠肝细胞表面受体内吞的结果相一致。细胞膜上受体内吞后，密度稀疏，结果负协同效应减弱使受体亲和力升高。由于受体数目的下向调节和应激激素升高，可能通过对胰岛素受体的异种失敏[7]，因此当生理剂量（10^{-11}～10^{-9} mol/L）胰岛素作用时腺苷酸环化酶对胰岛素抑制的反应其敏感性降低。但是由于"闲置"受体的存在，当有超生理剂量胰岛素存在时（10^{-8}～10^{-7} mol/L）腺苷酸环化酶的最大反应效应仍可正常。表明创伤后肝膜胰岛素受体信号传导敏感性降低，加之应激激素（胰高血糖素和肾上腺素等）的作用，肝细胞内 cAMP 水平升高[8～10]，通过影响糖代谢某些关键酶活性，使糖原分解加强，糖原合成减少，及糖异生增强或糖有氧氧化障碍[1,2]。这可能是创伤后高血糖和胰岛素抵抗的重要原因。

参考文献

1 James HF, Shaw DM, Frame CS, et al. An integrated analysis of glucose, fat, and protein metabolism in severely traumatized patients. Ann Surg, 1989, 209: 63～72

2 Jeevanandam M, David H. Glucosa turnover, oxidation, and indices of recycling in severely traumatized patients. J Trauma, 1990, 30: 582～589

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，1988，5：17～20

4 Gawler D, Milligan G, Houslay MD. Treatment of STZ－diabetic rats with metformin restores the ability of insulin to inhibit adenylate cyelase activity. Biochem J, 1988, 249: 537～543

5 唐仲进，疗锡麟. 烫伤大鼠胰岛素耐受. 中华创伤杂志，1992，8：144～147

6 Desbuqueis B, Lopez S, Burlet H, et al. Ligand-induced translocation of insulin receptors in intact rat liver. J Biol Chem, 1982, 275: 10852～10859

7 Heyworth CM, Whetton AD, Wong S, et al. Insulin inhibits the cholera-toxin catalysed ribosylation of a MT－25000 protein in rat liver plasma membranes. Biochem J, 1985, 228: 593～599

8 Jettery EP, Gitomer W, Cka Y, et al. β-Adrenergic regulation of insulin and epidermal growth factor receptors in rat adipocytes. J Biol Chem, 1983, 258: 7386～7391

9 Houslay MD. Insulin, Glucagon and the receptor mediated control of cyclic AMP concentrations in liver. Biochem Soc Trans, 1986, 14: 183～188

10 Clarc M. Change of hepatocytes by glucagon triggers a rapid modulation of adenylate cyclase activity in isolated membrane. Biochem J, 1983, 214: 93～101

（收稿：1993-10-30；修回：1994-09-16）

Changes of the binding capacity of insulin recpetors and activities of adenylate cyclase in hepatocytes after scalding in rats

Xu Aimin, Xu Linshui, Dong Yanlin (Department of Biochemistry, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract In order to investigate the effects of transmembranous conduction of signals on insulin resistance after scalding, the changes of the binding capacity of insulin recpetors in the cell membrane of hepatocytes and the activities of adenylate cyclase were observed in rats after they were inflicted with 30% TBSA full thickness scalding. It was found that the maximum binding capacity of insulin receptors was significantly decreased after scalding but the average affinity increased. The sensitivity of insulin inhibition on the activity of adenylate cyclase was significantly reduced but there was no apparent difference of the maximum inhibition activity. These findings suggest that the impairment of transmembranous conduction of insulin signals across the cell membrane of hepatocytes after scalding can result in abnormal metabolism of glucose and consequently insulin resistance.

Key words burns; receptor insulin; adenyle cyclase; insulin resistance

※ The Project Supported by the National Natural Science Foundation of China

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