DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.02.005

胰岛素介体对烫伤大鼠cAMP磷酸二酯酶的调节*

许森水 吴喜贵 (第三军医大学基础部生物化学教研室)630038

提 要 由经胰岛素诱导的大鼠肝细胞质膜分离出一种分子量为3～3.5 kD的胰岛素化学介体,可以刺激大鼠脂肪细胞的cAMP依赖的磷酸二酯酶(cAMP-PDE)。刺激作用呈剂量依赖关系。这种胰岛素介体刺激正常大鼠cAMP-PDE活性升高6倍,但对烫伤大鼠cAMP-PDE活性只增加1.24倍,两者差异明显。表明烫伤大鼠cAMP-PDE对胰岛素介体刺激的反应性降低可能涉及胰岛素抵抗的受体后信号传递缺陷。

关键词 灼伤;胰岛素介体*;磷酸二酯酶类;胰岛素抗药性

中图法分类号 Q578;R644

1979年Larner首次报道[1]从大鼠肌肉分离一种经胰岛素诱导的小分子糖肽可模仿胰岛素刺激糖原合成酶的能力,称之为"胰岛素化学介体"(Insulin chemical mediator)。随后Saltiel等[2]从大鼠肝、脂肪细胞膜分离出经胰岛素/或磷脂酶C诱导的肌醇磷酸糖脂也能刺激大鼠丙酮酸脱氢酶和磷酸二酯酶活性。国内也有报道[3,4],胰岛素介体能抑制大鼠腺苷酸环化酶,调节细胞内cAMP和脂肪合成。经证明在糖尿病中起作用。关于"胰岛素介体"对创伤性糖尿病的影响未见有报道。

本文利用正常大鼠肝细胞质膜经胰岛素诱导产生的胰岛素介体对烫伤(4 d)大鼠脂肪细胞cAMP-PDE活性调节的研究,旨在探讨创伤后胰岛素抵抗的受体后缺陷可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:按本室[5]建立的大鼠烫伤模型方法,制作30%体表面积皮肤全层烫伤。

1.1.2 试剂:猪结晶胰岛素(国家标准品,27 U/mg),8-^{3}H-cAMP(>22 Ci/mmol,上海原子核开发公司)。胶原酶(type Ⅰ,Sigma),Dowex 1×8Cl$^-$(200～400 mesh,Serva),其余试剂为AR级。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞粗质膜制备:参考Saltiel方法[6],大鼠肝脏用适量1 mmol/L $NaHCO_3$(pH7.5)捣碎,过滤,10倍(W/V)稀释,30 000×g 4℃离心25 min。沉淀溶于少量上述的$NaHCO_3$,用玻璃匀浆器匀浆,10倍(V/V)稀释再1 100×g离心10 min。上清液再(30 000×g 25 min)离心得沉淀用10 mmol/L磷酸盐(钾)pH7.4)悬浮,最后作成10 mg/ml的粗膜蛋白悬浮液备用。

1.2.2 胰岛素介体分离、纯化:参考张世荣方法[3],取肝粗膜悬浮液置于小瓶中加(或不加)终浓度为2 nmol/L的胰岛素37℃水浴振摇15 min,立即离心(30 000×g,4℃,25 min)得上清液于Sephadex G25柱(1×35 cm)层析,以10 mmol/L磷酸盐(PB)pH7.4洗脱,流速1 ml/10 min。在230 nm波长监测下收集各组分。冻干后残渣用2.0 ml PB溶解作cAMP-PDE激活试验。

1.2.3 cAMP-PDE制备及活性测定

1.2.3.1 按Robinson[7]方法,大鼠附睾脂肪垫去血管后剪碎,置于含2% BSA/Krebs-Ringer Bicarbonat缓冲液pH7.4的小瓶中加终浓度为1 mg/ml胶原酶制备脂肪细胞。分离的脂肪细胞用0.25 mol/L蔗糖/50 mmol/L Tris－HCl pH7.5,洗涤2次。以5倍(V/V)体积稀释并匀浆(20℃),离心(20 000×g,4℃,10 min),取油层下液体再离心(48 000×g,30 min)得沉淀(P_2)为PDE。用10 mmol/L Tris－HCl pH7.4溶解并作成600 μg蛋白/ml的酶悬浮液,－20℃备用。

1.2.3.2 cAMP-PDE活性测定:参考张林华方法[8],取不同稀释浓度(1,1:10,1:100,1:1 000)的胰岛素介体各50 μl与50 μl(30 μg酶蛋白)PDE悬浮液和0.1 μmol/L(含^{3}H－cAMP 10～15×10^4 cpm)的cAMP 100 μl在5 mmol/L $MgSO_4$存在下30℃温育10 min。经两步测定^{3}H－腺苷cpm。以pmol cAMP水解/mg蛋白·min^{-1}表示酶活力。

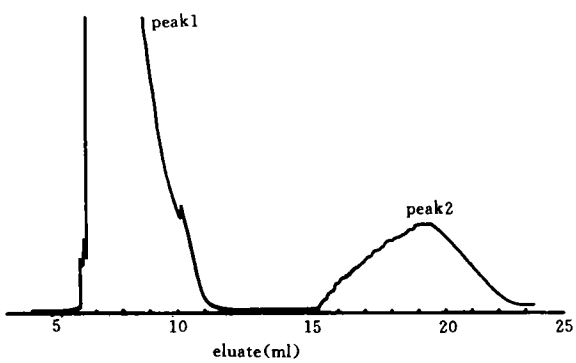
* 国家自然科学基金资助题目

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

2 结果

2.1 胰岛素介体的分离与鉴定

用2 nmol/L(300 μU/ml)胰岛素与10 mg/ml 大鼠肝粗膜37℃温育15 min 后经 Sephadex G25柱层析,在230 nm 监测下得到两个洗脱峰(peak1和 peak2)(见附图)。第一个峰(peak1)洗脱体积约11 ml,文献报道[3,9]证明为一些大分子膜蛋白和胰岛素的洗脱峰。(我们用标准胰岛素校正证明胰岛素单独洗脱为8ml 左右)。第二个峰(peak2)经用胰岛素和溶菌酶等校正初步确定分子量为3～3.5 kD,与文献[2,10]结果相符。确定为经胰岛素诱导产生的化学介体。收集第一和第二峰对脂肪细胞 cAMP-PDE 激活试验,结果第二峰可使 cAMP-PDE 活性提高5.2倍,而第一峰只提高0.67倍。未加胰岛素温育的肝质膜也可得到2个相应的峰(未画出),但第二峰只提高 PDE 活性1.2倍左右。表明肝粗质膜经胰岛素刺激后可诱导模仿胰岛素作用的化学介体生成。



附图 大鼠肝细胞质膜胰岛素介体洗脱曲线

Fig Sephadex G25 chromatography of insulin chemical mediator from hepatic plasma membrane of rats

peak1: fraction of hepatic plasma membrane and insulin; peak2: fraction of insulin chemical mediator

2.2 胰岛素介体对正常和烫伤大鼠cAMP-PDE的刺激

由正常大鼠肝质膜产生的胰岛素介体分别对正常和烫伤大鼠脂肪细胞 cAMP-PDE 活性刺激结果见附图。在不同量(不同稀释倍数)胰岛素介体刺激下 cAMP-PDE 活性呈剂量依赖升高。但烫伤组升高远远低于正常组。正常组最大刺激效应增加6倍,而烫伤组只增加1.24倍。表明烫伤后脂肪细胞 cAMP-PDE 对胰岛素介体刺激的反应性明显障碍。

3 讨论

胰岛素的生理作用十分复杂,其信号传递也可能包括多种途径。其确切机理虽不完全清楚。近10多年来有许多报道证明胰岛素与靶细胞或靶细胞质膜育温可诱导产生称为"介体"的第二信使物质。甚至用高纯化的磷脂酶 C 与靶细胞质膜温育可释放具有胰岛素样作用的化学活性物质。我们用2 nmol/L(生理剂量范围)胰岛素诱导大鼠肝质膜产生的"介体"刺激脂肪细胞 cAMP-PDE 活性使之提高6倍左右。与前文[5]用2 nmol/L 胰岛素直接刺激 cAMP-PDE 活性提高1.6倍相比较,胰岛素经过它的化学介体(第二信使)的介导可使生理作用放大近150倍。

目前对胰岛素化学介体的本质虽然尚未定论,但比较一致的看法认为它是一种含磷酸肌醇的聚糖(不是 IP_3)[10]。其分子量大小,文献报道不一致,可能与各实验室的操作条件不同,所得不同糖脂(肽)片段有关[6]。我们采用张世荣等方法[9]得到的介体在3～3.5 kD 之间结果相符。所能刺激脂肪细胞 cAMP-PDE 活性又与 Saltiel 的结果相同[2]。

目前对胰岛素化学介体研究报道虽多,但主要在于其性质和生理作用的研究,而对其病理条件的意义报道则少[4]。特别是对创伤条件下的意义更未见有报道。本研究观察肝细胞膜胰岛素化学介体刺激烫伤大鼠脂肪细胞 cAMP-PDE 活性,这是对创伤胰岛素抵抗发病机理探讨的有益尝试。结果证明烫伤早期脂肪细胞 cAMP-PDE 对胰岛素化学介体刺激的反应性明显降低。提示,严重烫伤引起"创伤性糖尿病"类似内分泌失常引起的糖尿病,不仅涉及胰岛素受体水平降低[5],同时涉及受体信号偶联等胰岛素介体释放和生物效应降低[4,9,11]的受体后事件缺陷。

参考文献

1 Larner J, Galasko G, Cheng K, et al. Generation by insulin of a chemical mediator that controls protein phosphorylation & dephosphorylation. Science, 1979, 206: 1408

2 Saltiel AR, Cuatrecasas P. Insulin Stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modutators derived from an inositol glycolipid. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 5793

3 张世荣,幸兴球,薛庆富,等. 胰岛素和胰岛素介体对细胞 cAMP 和脂解的调节. 生物化学与生物物理学报,1987,19: 79

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

4 康有厚，刘亚兵，陈援朝，等. 链脲佐菌素糖尿病大鼠的胰岛素受体结合，胰岛素介体释放和葡萄糖氧化. 中华内分泌代谢杂志，1991，7：96

5 许霖水，吴喜贵. 严重烫伤大鼠脂肪组织胰岛素抵抗机制的研究. 第三军医大学学报，1993，15：305

6 Saltiel AR, Siegel MI, Jacobs S, et al. Putative mediator of insulin action: Regulation of pyruvate dehydrogenase & adenylate cyclase activities. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79:3513

7 Robinson FW, Smith CJ, Flanagan EF. cGMP-dependent stimulation of the hembrane-bound insulin-sensitive cAMP phosphodiesterase from rat adipocytes. J Biol Chem, 1989, 264:16458

8 张林华，吴兆峰，刘秉文，等. 一种快速可靠的3′，5-cAMP磷酸二酯酶活力测定法. 生物化学与生物物理进展，1986，3：58

9 张世荣，魏铁拳，幸兴球，等. 胰岛素介体的功能——调节细胞cAMP和脂肪合成及糖尿病的影响. 中国科学(B辑)，1987，3：265

10 Joe Espind. Mechanism of insulin action. Nature, 1987, 328:574

11 Amatruda JM, Chang CL. Insulin resistance in the liver fasting and diabetes mellitus. Biochem Biophys Res Commum, 1983, 112:35

(收稿：1993-10-04；修回：1993-12-04)

Effect of insulin mediator on phosphodiesterase after scalding in rats

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

Abstract An insulin chemical mediator with a molecular weight of 3000～3500 Da was prepared from hepatic plasma membrane of rats and it can stimulate the activity of cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) of the adipocytes of both normal and scalded rats in a dosage-dependent manner. It was found that the activity of cAMP-PDE was increased by 6 times in the control but only 1.24 times in the scalded rats; the difference between the 2 groups was statistically significant ($P<0.001$). The findings suggest that the response after of cAMP-PDE to the stimulation of the insulin mediator is greatly decreased scalding, which may involve the defects of postreceptor events in insulin resistance.

Key words burns; insulin mediator ; phosphodiesterases; insulin resistance

(上接88页)

讨论

绿脓杆菌性角膜溃疡是配戴角膜接触镜最严重的并发症。起病急，发展快，常致角膜穿孔及视功能毁坏。以往治愈后也常留角膜大白斑严重影响视力。近年研究表明，自由基及其代谢产物是角膜溃疡病理损害因素之一，抗氧化剂治疗可减轻角膜损害[1]。本例患者经大剂量抗生素及抗氧化剂(vit.C、E、肝素)治疗，很快控制炎症并短期内溃疡修复。并见痊愈后角膜仅留薄云衣，保存了一定的有用视力。通过本例患者治疗，我们认为：(1)配戴角膜接触镜要严格卫生条件，不要延时配戴，有不适要暂停戴镜，点抗生素眼液或及早就医防止严重并发症发生。(2)对于角膜溃疡的治疗除抗生素外，辅以抗氧化剂可减轻溃疡损害，加速溃疡修复。

关键词 角膜溃疡，角膜接触镜

中图法分类号 R772.21

参考文献

1 王　一，张汉承，魏明竟. 自由基与细菌性角膜溃疡. 眼科研究，1992，3(10)：161～163

(收稿：1993-06-16；修回：1993-12-05)

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