DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.04.004

严重烫伤大鼠脂肪组织胰岛素抵抗机制的研究*

许森水 吴喜贵 (第三军医大学基础部生化教研室) 630038

提 要 30% TBSA Ⅲ°烫伤大鼠,伤后第 4 天,脂肪组织胰岛素受体最大结合容量明显减少。胰岛素敏感的低 Km 值 cAMP-磷酸二酯酶(PDE)对胰岛素激活的敏感性降低;最大反应性正常,但反应剂量曲线右移,ED_{50}增大。脂肪细胞 FFA 和 cAMP 含量变化不明显,超生理剂量(30nM)胰岛素抗脂解效应存在。

关键词 灼伤;胰岛素抗药性;受体,胰岛素;磷酸二酯酶类

已知肥胖和链脲佐菌素(STZ)致糖尿病大(小)鼠脂肪组织存在胰岛素抵抗,其对胰岛素敏感性的变化与胰岛素受体结合的改变相平衡[1,2]。严重创伤的"创伤性糖尿病"可罹及这一胰岛素敏感的靶组织。本文以 30%体表皮肤全层(30% BSA Ⅲ°)烫伤大鼠为模型,观察伤后第 4 天脂肪组织胰岛素受体和胰岛素敏感的磷酸二酯酶(低 Km 值 cAMP-PDE)活性,脂肪细胞的 cAMP 和游离脂酸(FFA)含量变化。了解烫伤对脂肪代谢影响以探讨胰岛素抵抗发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型:体重 180～200g 雄性 Wistar 大鼠按文献[3]方法致 30% BSA Ⅲ°烫伤,自由摄食,伤后第 4 天检测。

1.1.2 试剂:^{125}I-Na,^{3}H-cAMP 放免药盒(中国原子能研究院),^{3}H-cAMP,比活性≥20 居里/毫克分子(上海原子核技术开发公司),胶原酶Ⅱ型(Sigma),Dowex1×8 Cl^-型,200～400 目(Serva),其余试剂为 AR 级。

1.2 方法*

1.2.1 脂肪组织胰岛素敏感磷酸二酯酶测定

1.2.1.1 脂肪组织育温及低 Km cAMP-PDE 制备[4,5]:取大鼠附睾脂肪垫,去血管后剪碎(小米粒大小)用含2%牛血清白蛋白(BSA)的克雷布一林格碳酸盐缓冲液(Krebs-Ringer Bicarbonat Buffer, KRBB),pH 7.4洗涤组织(100×g 离心2min)。称取脂肪组织0.5～1.0g 盛于有5.0ml(含2% BSA, 5mmol/L GS)KRBB 的小瓶中,供氧,振摇(30次/min)预温 30 min,于相应瓶内加终浓度为:0、0.1、0.3、1.0、3.0、10、30 nmol/L 胰岛素,继续温育 15 min。用长针头吸弃下层保温介质。用 Buffer A(含 0.25mol/L 蔗糖的50mmol/L Tris-HCl,pH 7.5)洗涤2次。以5倍体积(W/V)Buffer A 匀浆,2 000×g 4℃离心10min, 取出油层下液体于另外离心管,48 000×g 离心30min,得沉淀(P_2)溶于10mmol/L Tris-HCl pH 7.5,Lowry 法定蛋白(BSA 作标准),稀释成300μg 蛋白/ml 悬浮液,进行酶活性测定。

1.2.1.2 低 Km 值 cAMP-PDE 活性测定[6,7]:取 P_2 部分的膜制剂 100μl(30μg 蛋白)与 0.1μmol/L(含^{3}H-cAMP 10 ～ 15 × 10^4cpm)的 cAMP 在 4mmol/L $MgSO_4$ 存在的 50mmol/L Tris-HCl,pH 7.5,总体积200μl,30℃准确保温10min。煮沸90s,冷却后加入50μl(1mg/ml 蒸馏水)蛇毒。混匀后37℃继续保温15min,再煮沸。冷却后加入 0.3ml (1:3) Dowex1×8/3 mmol/L HAC 的悬浮液, 加 50μl (10mmol/L)腺苷作载体,充分混匀5min 并于2000rpm 离心5min。取200μl 上清液作液闪测定放射性。以 pmol cAMP 水解/mg 蛋白·min^{-1}表示酶活性。

1.2.2 脂肪组织胰岛素受体结合试验

按文献[3]制备^{125}I-胰岛素及受体结合试验。取大鼠附睾脂肪垫,去血管并剪碎。用含2% BSA 的 KRBB,pH 7.4洗涤组织。制成 1 g 组织/ml 的悬浮液。每管 0.2 g 组织, 0.3 ng ^{125}I-胰岛素,总体积 0.5 ml 23℃振摇30min,吸出保温介质并用0.5ml×2的2% BSA KRBB 洗2次以去除未结合的胰岛素。组织吸干后进行 γ-计数。

1.2.3 脂肪组织 cAMP 和 FFA 含量测定

* 国家自然科学基金资助课题

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

1.2.3.1 脂肪组织 cAMP 测定[7]：中国原子能研究院 cAMP 放免药盒，蛋白激酶结合法，煮沸变性直接测定组织 cAMP 含量。以 pmol/mg 组织表示。

1.2.3.2 脂肪细胞 FFA 测定：大鼠附睾脂肪垫经胶原酶（Ⅰ型，1～2mg/ml）消化制备脂肪细胞。移取 100mg 细胞于 2.5ml 含 1% BSA 的 KRPB，pH 7.4 小瓶中加/或不加肾上腺素（10μmol/L）、胰岛素（30nmol/L）37℃振摇 30min。于育温后样品中加入 2.5ml Dole 氏液抽提 FFA。用一次提取法[8]和二苯卡巴腙/二苯卡巴肼作显色剂测定 FFA。以 μmol FFA/g 细胞/30min 表示。

2 结果

2.1 烫伤后脂肪组织 cAMP-PDE 对胰岛素反应的变化

文献证明[1,2,4,5]脂肪细胞存在胞浆和膜结合两种形式的 cAMP-PDE。其中膜结合的 PDE 为低 Km 值 cAMP-PDE 对胰岛素敏感。用 0.25mol/L 蔗糖（等渗）制备时 90% 以上活性停留于微粒体粗膜（P_2 部分）。正常和烫伤大鼠脂肪组织与不同浓度胰岛素保温，该酶由胰岛素激活结果见图1。

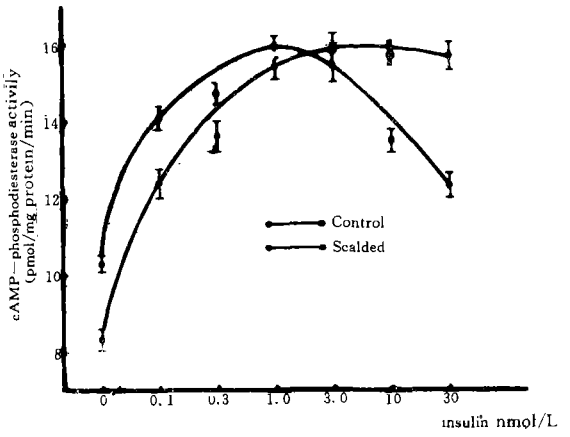


图1 烫伤大鼠脂肪组织低 Km 值 cAMP-PDE 对胰岛素反应曲线

Fig 1 Response curve of stimulation of insulin in adipose tissue of scalded rats

从图1结果看出，烫伤后大鼠脂肪组织低 Km 值 cAMP-PDE 活性低于正常对照组。这一结果与肥胖性糖尿病大鼠情况相似[1,2]，胰岛素能激活正常和烫伤脂肪组织此酶活性。但是它们对胰岛素刺激的反应剂量曲线不同，正常大鼠最大反应剂量为 1.0 nmol/L，烫伤大鼠为 3.0nmol/L。当以最大反应百分数作图（见图2），烫伤大鼠低 Km 值 cAMP-PDE 的剂量曲线明显右移，ED_{50} 增大。

表明烫伤后大鼠脂肪组织低 Km 值 cAMP-PDE 对胰岛素刺激的敏感性降低，但最大效应（反应性）没有变化。这与肥胖性和遗传性糖尿病大鼠胰岛素抵抗特征一样[1,2,5]。

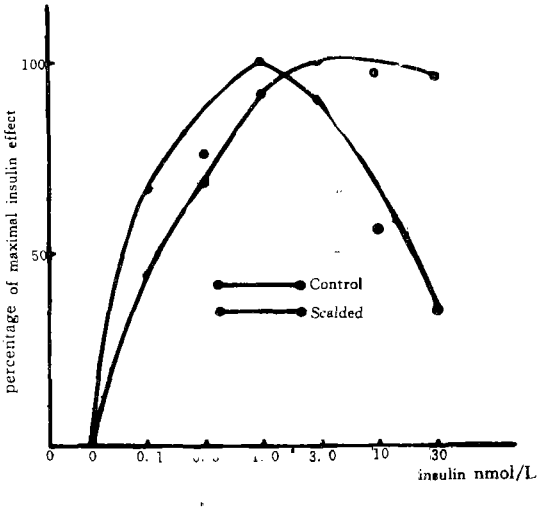


图2 烫伤大鼠脂肪组织低 Km 值 cAMP-PDE 对胰岛素反应最大效应百分数

Fig 2 Percentage of maximal insulin effect of low cAMP-PDE in adipose tissue of scalded rats

2.2 烫伤后脂肪组织胰岛素受体变化

大鼠脂肪组织胰岛素受体结合试验经 Scatchard 作图得一条凹面向上的曲线。见图3。这与其它组织受体结合性质一样[3]。正常组脂肪组织胰岛素受体最大结合容量（$Bmax$ 为 143.35±46pmol/

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

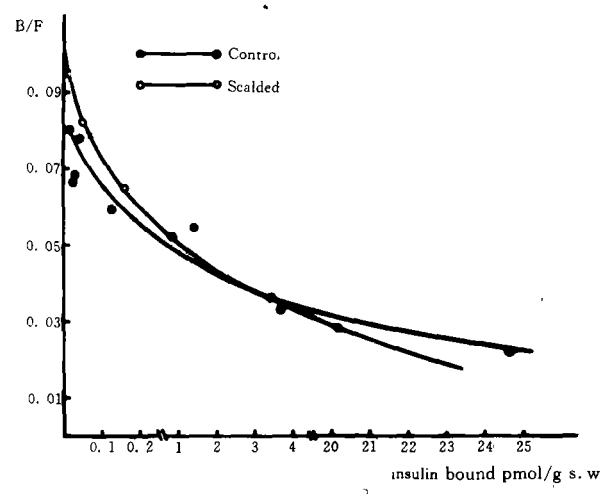


图3 烫伤大鼠脂肪组织胰岛素受体结合 Scatchard 作图

Fig 3 Scatchard plot of insulin receptor in adipose tissue of scalded rats

g 湿重组织，亲和力为0.71±0.11pmol/L^{-1}。烫伤组为 71.29 ± 33 pmol/g 湿重组织， 亲和力 0.79 ± 0.07 pmol/L^{-1}。结果表明，烫伤后大鼠脂肪组织胰岛素受体数目明显减少（$P<0.001$）。

2.3 烫伤后 cAMP 和 FFA 含量变化

本实验用蛋白激酶结合法和热变性直接测定组织中 cAMP 含量处于标准曲线敏感区，且线性良好，同时操作简单，避免干扰因素。

脂肪细胞 FFA 含量测定选用二苯卡巴腙/二苯卡巴肼为显色剂，提高灵敏度。其结果见附表。烫伤后大鼠脂肪组织 cAMP 含量变化不明显。正常与烫伤大鼠脂肪细胞内基础 FFA 含量也基本一样。肾上腺素（10μmol/L）能够升高正常和烫伤大鼠脂肪细胞中 FFA 含量（促脂解作用），大剂量（30nmol/L）胰岛素可对抗肾上腺素的作用（抗脂解作用）。这种效应与文献[9]报道一致。大剂量胰岛素的抗脂解作用与正常大鼠比较差别不明显，这与 cAMP 水平变化相一致。

附表 大鼠脂肪组织 cAMP 和 FFA 含量

Tab Changes of both cAMP and FFA in adipose tissue of scalded rats

	FFA(μmol/g tissue, S.W)			cAMP
	Basal△	Epinephrine(10μmol/L	Epinephrine(10μmol/L)+Insulin(30nmol/L)	(pmol/mg tissue)
Control(16)	4.07±1.11	15.29±4.19*	8.33±3.12**	0.39±0.11
Scalded(9)	4.61±1.14	16.06±5.50*	9.19±2.78**	0.40±0.17

△ no added hormone; * $P<0.001$ *vs* Basis; ** $P<0.01$ *vs* Epinephrine.

3 讨论

脂肪组织是能源物质主要贮藏场所，代谢十分活跃。严重创伤后机体高代谢期脂肪代谢变化直接影响能量代谢而受到关注。Richard 等[10](1982)对25名烧伤面积35%～95%患者脂动员研究证明，患者血中 FFA，甘油和甘油三酯明显升高，酮体保持正常。他们认为 FFA 主要用于再脂化。最近杨青等[11]和 Chiolero 等[12]分别报道严重烫伤大鼠和头颅合并伤的人体血浆 FFA 保持正常或稍降低。对于创伤后脂肪组织代谢有何改变及其机理有待进一步研究。早期对遗传和肥胖鼠胰岛素抵抗研究[13]证明脂肪组织对激素敏感性降低，胰岛素受体结合，葡萄糖转运和氧化存在障碍。胰岛素对脂肪组织代谢调节主要是抗脂解作用。本文通过观察30% BSA Ⅲ°烫伤大鼠脂肪组织胰岛素敏感的磷酸二酯酶活性变化和胰岛素受体，了解到伤后脂肪组织对胰岛素的反应性。结果表明严重烫伤后脂肪组织低 Km 值 cAMP-PDE 对胰岛素敏感性降低，最大反应能力不变，但最大反应剂量曲线右移。这种敏感性降低与同一模型肝细胞膜和骨骼肌细胞膜腺苷酸环化

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

酶系统的抑制特征相一致(待发表)。这种以敏感性降低的胰岛素抵抗现象与受体减少有关[1,2]。由于"闲置"受体存在,烫伤后大剂量胰岛素作用最大反应性正常,所以胰岛素抗脂解效应(FFA 水平)与正常对照组无明显差别。

对于严重创伤应激状况(脂解激素升高)下血浆 FFA 不升高有三种解释:①烧伤后机体 FFA 氧化加强。②创伤时血浆白蛋白降低故 FFA 运出减少。③创伤高代谢期"底物循环"加强,FFA 用于再酯化。我们的研究结果直接证明严重烫伤时脂肪细胞内 FFA 基础水平不升高。说明此时由胰岛素对磷酸二酯酶和腺苷酸环化酶的最大反应性正常。两者保持动态平衡,cAMP 水平恒定,脂解与抗脂解(脂肪合成)达到平衡,但底物循环加强,机体大量能量则被消耗。

参考文献

1. Makino H, Kanatsuka A, Suzuki T, et al. Insulin resistance of fat cell from spontaneously diabetes KK mice. Diabetes, 1985;34:844
2. Suzuki T, Maino H, Kanatsuka A, et al. Effects of diet restriction on insulin-sensitive phosphodiesterase in rat fat cells. Metabolism, 1987;36:43
3. 许霖水 吴喜贵 董燕麟。重度烫伤大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的研究。中华创伤杂志,1990;2:87
4. Saltiel AR, Seigerwat RW. Purification of putative insulin-sensitive cAMP phosphodiesterase or its catalytic domin from rat adipocytes. Diabetes, 1986;35:698
5. Robinson FW, Smith CJ, Flanagan EF. cGMP-dependent stimulation of the membrane-bound insulin-sensitive cAMP phosphodiesterase from rat adipocytes. J Biol Chen, 1989;264:16458
6. Kono T, Robinson FW, Sarver JA. Insulin-sensitive phosphodiesterase. J Biol Chem, 1975;250:7826
7. 陈海鑫 李振甲。组织中 cAMP、cGMP 放免分析法的改进。生物化学与生物物理进展,1986;5:78
8. 上海医学化验所。血清游离脂肪测定。临床生化检验(上册):上海:上海科学技术出版社,1982:169
9. 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;19:70
10. Richard L, Harris MD, Rene A, et al. Lipid mobilization and metabolism after thermal trauma. J Trauma, 1982;22:194
11. 杨 青 董燕麟。严重烧伤早期外源性 β-羟丁酸钠、胰岛素对大鼠骨骼肌蛋白质代谢的影响。第三军医大学学报,1989;11:5
12. Chiolero R, Schutz Y, Lemarchand TH. Hormonal and metabolic changes following severe head injury or noncraniol injury. JPEN, 1989;13:5
13. Olefsky JM. The effects of spontaneous obesity on insulin binding glucose transport and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. J Clin Invest, 1976;57:842

(收稿:1992-09-07;修回:1993-06-23)

A study on the mechanism of insulin resistance of adipose tissue after scalding in rats

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

Abstract The possible mechanism of insulin resistance of the adipose tissue after burn injury was studied. The binding activity of the insulin receptors, the insulin effects on insulin-sensitive phosphodiesterase (PDE) and the level of free fatty acid (FFA) and cAMP were observed for 4 d in the adipose tissue of the rats inflicted with 30% TBSA full thickness scalding.

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

It was found that the maximal binding capacity of the insulin receptors was greatly decreased ($P<0.01$) while the affinity especially the low affinity was increased ($P<0.05$); the dose-response curve, the expression of maximal insulin effect in percentage, was shifted to the right; the maximal activation of insulin of the activity of low Km cAMP-PDE was decreased; and the level of FFA and cAMP were not significantly altered.

These findings suggest that the insulin receptors might be damaged by severe scalding to result in desensitization to insulin actions such as the decreased activation of low Km cAMP-PDE.

Key words burns; insulin resistance; receptors, insulin; phosphodiesterases

大剂量冲击化疗引起消化道反应的防治

个案与短篇

岳旭丽 刘素琴 (第三军医大学西南医院肿瘤科) 630038

消化道反应是抗肿瘤化疗常见的副反应之一，常影响病人继续治疗。自1991年初起，我们采用大剂量冲击化疗综合治疗恶性肿瘤病人，收到了明显疗效，报道如下：

1 临床资料与治疗方法

74例恶性肿瘤住院患者，男44例、女30例；年龄为7～60岁，平均47岁。其中食道癌2例，肺癌20例，恶性淋巴瘤6例，乳腺癌14例，胃窦癌14例，结肠癌17例和肾癌1例。随机分为综合治疗组40例和对照组34例。手术后半月至半年内开始化疗，均采用大剂量冲击化疗，如第1天 JM-8 400mg、CTX 600mg，第1天和第8天 5-Fu 750mg，1～2个月为一个疗程；JM-8 400mg，MMC 20mg，5-Fu 750mg 四周一疗程，均为静脉给药。综合治疗组在化疗前交待可能出现的副反应。化疗当天禁食早餐和午餐。根据病人具体病情，营养状况等分别给予输入脂肪乳氨基酸、葡萄糖或全血、血浆等。液体输完后继续卧床休息2 h 以上，晚餐可进少量清淡饮食。综合治疗第2天起逐渐增加食品的种类和数量。对照组为大剂量化疗后给予胃复安20mg 肌注，同时不限制病人进食。

2 结果与分析

本组病人大剂量化疗后消化道反应的程度按 WHO 规定的标准进行判定。0级：无恶心呕吐；Ⅰ级：恶心；Ⅱ级：呕吐可控制；Ⅲ级：呕吐需要治疗；Ⅳ级：呕吐难以控制。

综合治疗组病人消化道副反应显著低于对照组（$P<0.05$），综合治疗组0级反应为65%，对照组为29%；两组病人食欲恢复情况相差非常显著（$P<0.01$），综合治疗组平均为3.6d，对照组为7.35 d，综合治疗组明显优于对照组。

化疗病人的恶心呕吐是化疗药物对胃肠道粘膜上皮细胞的生长抑制及直接刺激引起的[1]。化疗药物还可以刺激传入神经至植物神经系统兴奋第四脑室底部的化学感受区，引起不同程度的胃肠道反应，对病人在禁食前提下辅以静脉营养，在血药浓度高峰期使胃肠道处于休息状态，减少消化道受化疗药物，食物及消化液的刺激从而减轻胃肠道副反应，促进病人食欲早日恢复，该方法使用简单，止吐效果达到并超过大剂量胃复安及联合止吐用药[2]，同时也消除了反复用药及药物的副作用给病人带来的痛苦，病人愿意接受，尤其适用于经过多疗程化疗，消化道反应较重的病人。

关键词 恶心；呕吐；抗肿瘤药/副作用

参考文献

1. 韩芍亭 刘 奇。抗癌药物手册。青岛：山东大学出版社，1991：58
2. 徐午辰。化疗引起的恶心呕吐的处理。实用肿瘤杂志，1988；3(3)：187

(收稿：1992-10-23；修回：1993-05-15)

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