

· 论著 ·

c-Jun 氨基末端激酶抑制剂减轻烫伤后胰岛素抵抗的实验研究



陈新龙 夏照帆 韦多 贲道锋 唐洪泰 葛绳德

【摘要】 目的 探讨 c-Jun 氨基末端激酶(JNK) 抑制剂 SP600125 对烫伤后胰岛素抵抗的作用及机制。方法 24 只 SD 大鼠以表格随机法分为假伤组、烫伤对照组和烫伤 + SP600125 组。将大鼠制成 30% TBSA Ⅲ度烫伤模型(其中假伤组以常温模拟烫伤过程)。伤后第 4 天进行葡萄糖钳夹实验(烫伤 + SP600125 组在实验开始前 2 h 给予拮抗剂 SP600125),检测肌肉组织胰岛素受体底物(IRS)1 磷酸化丝氨酸 307(Ser³⁰⁷)和酪氨酸的活性变化,并比较各组磷酸化 JNK 表达水平。结果 (1)葡萄糖钳夹实验:假伤组、烫伤对照组和烫伤 + SP600125 组 100 g/L 葡萄糖输注率分别为(12.33 ± 0.42)、(6.61 ± 0.27)、(11.11 ± 0.68) mg · kg⁻¹ · min⁻¹,各组间比较,差异有统计学意义(P < 0.01)。(2)烫伤对照组与假伤组比较,肌肉组织 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷ 和磷酸化 JNK 活性明显升高,IRS-1 磷酸化酪氨酸活性明显降低(P < 0.05)。烫伤 + SP600125 组与烫伤对照组比较,肌肉组织中 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷ 和磷酸化 JNK 活性降低而 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性增加。结论 SP600125 通过抑制 JNK 磷酸化而降低 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷ 活性,可部分减轻烫伤后胰岛素抵抗发生。

【关键词】 烧伤; 高胰岛素血症; 受体,胰岛素; 丝氨酸; JNK 丝裂原活化蛋白激酶类

Amelioration of insulin resistance after scald by c-Jun N-terminal kinase inhibitor in rat CHEN Xin-long*, XIA Zhao-fan, WEI Duo, BEN Dao-feng, TANG Hong-tai, GE Sheng-de. *Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital to Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, P. R. China

Corresponding author: XIA Zhao-fan, 200433, Burn center, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Email: XiaZhaoFan@hotmail.com, Tel: 021-25070599

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanism of c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor (SP600125) in amelioration of insulin resistance after scald. Methods Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomized into sham (the process of scald was mimicked by water at room temperature), scald, scald and SP600125 groups. The rats were inflicted with 30% TBSA full-thickness scald in the latter two groups. Euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp experiment was carried out 4 days after scald. SP600125 was administered to the rats in scald and SP600125 2 hrs before Euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp was performed. Changes in the phospho-Serine³⁰⁷ and phospho-tyrosine of IRS-1 activity, as well as expression of phospho-JNK in muscles were determined. Results Euglycemic-Hyperinsulinemic Glucose Clamps experiment showed that the infusion rate of 100 g/L glucose in sham, scald, scald and SP600125 groups were (12.33 ± 0.42), (6.61 ± 0.27), (11.11 ± 0.68) mg · kg⁻¹ · min⁻¹, respectively (P < 0.01). The level of IRS-1 Serine³⁰⁷ phosphorylation and JNK activity in muscles were significantly increased, while insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 decreased markedly after scald. Compared with scald group, the level of IRS-1 Serine³⁰⁷ phosphorylation and JNK activity in scald and SP600125 group were decreased but tyrosine phosphorylation was elevated. Conclusion SP600125 can partially ameliorate insulin resistance after scald by inhibition of JNK activation, and decrease the level of IRS-1 phospho-serine³⁰⁷.

【Key words】 Burns; Hyperinsulinemia; Receptor, insulin; Serine; JNK mitogen activated protein kinase

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571921);上海市医学重点学科建设资助项目(05Ⅲ007);上海市科学技术委员会科研计划资助项目(05JC14046)

作者单位:300162 天津,武装警察部队医学院附属医院烧伤整形科(陈新龙);第二军医大学长海医院全军烧伤中心(夏照帆、韦多、贲道锋、唐洪泰、葛绳德)

通信(讯)作者:夏照帆,200433,第二军医大学长海医院全军烧伤中心,Email: xiazhaoan@hotmail.com, 电话: 021-25070599

如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族中的成员 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)参与磷酸化级联反应,在细胞应激信号传递过程中可使细胞核和非细胞核蛋白质磷酸化^[1]。近年的研究显示,JNK 依赖的胰岛素受体底物(IRS)1 丝氨酸(Ser)磷酸化的作用具有负性调节胰岛素受体的功能。严重烧伤后肿瘤坏死

因子(TNF) α 等炎性介质水平明显升高,可令 IRS-1 丝氨酸 307(Ser³⁰⁷)磷酸化作用显著增强^[2]。

IRS-1 Ser³⁰⁷磷酸化阻止 IRS-1 酪氨酸结合域与胰岛素受体 β 亚基相连接,从而阻止了 IRS-1 与胰岛素受体结合,继而影响 1-磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)的活化^[3]。与 JNK-1^{+/+}小鼠相比,JNK-1^{-/-}小鼠不仅 IRS-1 Ser³⁰⁷磷酸化水平较低,且血液循环中胰岛素水平和葡萄糖浓度也明显降低^[4]。

笔者在上述研究基础上开展本实验,目的是通过观察 JNK 抑制剂 SP600125 对于烧伤后 IRS-1 Ser³⁰⁷磷酸化作用和胰岛素抵抗的影响,探讨 JNK 在烧伤后胰岛素信号转导途径障碍中所起的调控作用,为临床上纠正烧伤后葡萄糖代谢异常和胰岛素抵抗寻找新的途径。

材料与方 法

1. 材料来源:抗 IRS-1 磷酸化酪氨酸、磷酸化 Ser³⁰⁷、JNK 和磷酸化 JNK 抗体及 10 倍细胞裂解液(厦门世德行实业有限公司);SP600125 和辣根过氧化物酶标记的二抗(美国 Calbiochem 公司);强化化学发光(ECL)试剂盒(美国 Upstate 公司);4,4'-二羧酸-2,2'-二喹啉(BCA)蛋白质定量试剂盒(美国 Pierce 公司);其他化学试剂(美国 Sigma 公司);匀浆器(上海弗鲁克流体机械制造有限公司),图像仪(美国国立卫生研究院),GL-20G-II 高速冷冻离心机(上海精密仪器仪表有限公司)。

2. 动物分组及处理:SD 大鼠(本校实验动物中心)24 只,体重 160~170 g,雌雄不拘,按表格随机化方法分为假伤组(8 只)、烫伤对照组(8 只)和烫伤+SP600125 组(8 只),自由进食、饮水。(1)大鼠腹腔注射 20 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后背部剃毛,将烫伤对照组和烫伤+SP600125 组大鼠背部置于 100℃沸水中浸烫 12 s,制成 30% TBSA III 度烫伤模型(经病理切片证实),伤后立即腹腔注射乳酸钠林格液 5 ml 复苏。假伤组大鼠背部置于 28~30℃温水中模拟烫伤 12 s。烫伤+SP600125 组大鼠于进行正常血糖高胰岛素钳制实验前 2 h 静脉注射含 SP600125 (5 mg/kg)的二甲亚砷(DMSO)250 μ l,其余两组同时静脉注射 DMSO 250 μ l。(2)正常血糖高胰岛素钳制实验:各组大鼠烫伤后第 4 天,均禁食 5 h,之后同法麻醉按文献^[5]方法操作。

3. 标本采集:正常血糖高胰岛素钳制实验结束后,将各组大鼠经颈动脉放血处死,即刻分离腓肠肌组织并放置于液氮中保存。取出肌肉标本,加于

100 g/L 细胞裂解液中,冰浴、匀浆,4℃、25 480 \times g 离心 20 min,取上清液于 -20℃保存备用。

4. 检测 IRS-1 磷酸化酪氨酸、磷酸化 Ser³⁰⁷、JNK 和磷酸化 JNK 水平:烫伤后第 4 天,采用免疫沉淀和免疫印迹技术检测,结果采用图像仪进行分析,并用吸光度(A)值表示。

5. 免疫组织化学检测:从液氮中再取部分肌肉标本放置于体积分数 10% 甲醛中固定,按相关试剂盒说明书操作,并以二氨基联苯胺(DAB)显色,检测 JNK 和磷酸化 JNK 表达水平。

6. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

结 果

1. 正常血糖高胰岛素钳制实验:假伤组、烫伤对照组和烫伤+SP600125 组大鼠 100 g/L 葡萄糖输注率分别为(12.33 \pm 0.42)、(6.61 \pm 0.27)、(11.11 \pm 0.68) mg \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹,假伤组与烫伤对照组、烫伤对照组与烫伤+SP600125 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2. 各组肌肉组织中 IRS-1 磷酸化酪氨酸表达水平:假伤组、烫伤对照组和烫伤+SP600125 组大鼠检测结果为:1.00 \pm 0.35、0.53 \pm 0.21 和 0.89 \pm 0.13,假伤组与烫伤对照组、烫伤对照组与烫伤+SP600125 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3. 各组肌肉组织中 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷表达水平:烫伤后第 4 天,假伤组、烫伤对照组和烫伤+SP600125 组大鼠检测结果为:1.00 \pm 0.24、3.10 \pm 1.90 和 1.11 \pm 0.54,假伤组与烫伤对照组、烫伤对照组与烫伤+SP600125 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

4. 各组肌肉组织中 JNK 和磷酸化 JNK 表达水平:假伤组、烫伤对照组和烫伤+SP600125 组 JNK 水平分别为:1.0 \pm 0.4、0.9 \pm 0.4 和 0.9 \pm 0.4,各组之间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。此时相点下,假伤组、烫伤对照组和烫伤+SP600125 组磷酸化 JNK 水平为:1.00 \pm 0.29、1.61 \pm 0.32 和 1.04 \pm 0.30,假伤组与烫伤对照组、烫伤对照组与烫伤+SP600125 组之间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

5. 经免疫组织化学检测,烫伤对照组大鼠肌肉组织中磷酸化 JNK 表达水平较假伤组明显升高,烫伤+SP600125 组的升高趋势不明显(图 1)。



图 1 各组大鼠肌肉组织中磷酸化 JNK 的表达水平。a. 假伤组 DAB $\times 200$; b. 烧伤对照组 DAB $\times 200$; c. 烧伤 + SP600125 组 DAB $\times 200$; 图中箭头指示阳性表达较强的细胞

讨 论

严重烧伤后机体出现葡萄糖代谢异常和胰岛素抵抗。烧伤后胰岛素抵抗的发生机制在于胰岛素受体后信号传导受损^[6]。调控 IRS-1 功能有 2 种方式,一是通过 IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用,其二是通过 IRS-1 蛋白质降解途径。胰岛素刺激后,IRS-1 Ser/苏氨酸磷酸化是一种敏感性的下调胰岛素信号传导的机制。IRS-1 蛋白质 Ser/苏氨酸磷酸化作用在胰岛素和胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 信号传导早期步骤中作为双向敏感调控机制;基础状况下,IRS-1 Ser/苏氨酸适当的磷酸化作用对于胰岛素和 IGF-I 受体酶最佳磷酸化作用是必需的;然而 IRS-1 蛋白质 Ser/苏氨酸过度的磷酸化作用对于 IRS-1 酪氨酸磷酸化作用起着负性调控作用^[7]。正性 IRS-1 酪氨酸磷酸化作用与负性 IRS-1 蛋白质 Ser 的磷酸化作用之间的精确平衡可能是调节 IRS-1 功能的重要机制,它依赖于激活的胰岛素受体数量的多少。确定 IRS-1 蛋白质 Ser 残基位点对于充分理解胰岛素的作用和胰岛素抵抗可能至关重要,因为这些位点的 Ser 参与了基础和过度的 IRS-1 磷酸化作用,它们的磷酸化作用对于 IRS-1 构型及其与胰岛素受体和其他蛋白质的相互作用起着重要的作用。IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用对于 IRS-1 的负性调节作用是胰岛素信号传导过程中普遍存在的负反馈调控机制。我们以往的研究结果显示,严重烧伤后 IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用显著地增强,而且 IRS-1 酪氨酸磷酸化作用明显降低。MAPK 家族中的成员 JNK 与 IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用有关或者直接参与 IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用^[3];JNK 抑制剂或者 IRS-1 蛋白质 JNK 结合区的突变将降低 IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用。与 JNK1^{-/-} 比较,JNK1 剔除的小鼠循环中胰岛素和葡萄糖浓度明显地下降,且 IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用也显著性降低^[3]。本研究结果显示,严重烧伤后第 4 天肌肉组织磷酸化 JNK 活性显著地增加;JNK 抑制剂 SP600125 不仅抑制了 JNK 的磷酸化,同时也降低了 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷ 活

性,增加了 IRS-1 酪氨酸磷酸化作用,明显改善了严重烧伤后葡萄糖代谢异常和胰岛素抵抗的程度。本研究的结果与 Gao 等^[8]的研究结果相一致,他们观察到 TNF- α 只需要 5 min 即可引起 3T3 细胞 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷ 升高 3~10 倍,随后逐渐下降。SP600125 可明显降低 TNF- α 引起的 IRS-1 Ser³⁰⁷ 磷酸化作用并减轻了胰岛素抵抗的程度。

综上所述,严重烧伤后早期 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷ 活性增强,磷酸化酪氨酸活性下降导致胰岛素抵抗;烧伤后 IRS-1 Ser³⁰⁷ 过度磷酸化及胰岛素抵抗与 JNK 的活化密切相关,是严重烧伤后胰岛素抵抗发生的调控机制之一。

其他应激激化的激酶如核因子抑制蛋白激酶、细胞外的信号调节激酶等是否参与烧伤后葡萄糖代谢异常和胰岛素抵抗的发生,值得进一步探讨。

参 考 文 献

- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Sci*, 2002, 298: 1911-1912.
- 陈新龙,夏照帆,韦多,等. 胰岛素受体底物 1 在烧伤后胰岛素抵抗中的作用. 第二军医大学学报, 2004, 25: 1052-1054.
- Aguirre ED, Giraud YH, Shoelson SE, et al. Phosphorylation of Ser³⁰⁷ in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*, 2002, 277: 1531-1537.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 2002, 420: 333-336.
- Fisher SJ, Kahn CR. Insulin signaling is required for insulins direct and indirect action on hepatic glucose production. *J Clin Invest*, 2003, 111: 463-468.
- Ikezu T, Okamoto T, Yonezawa K, et al. Analysis of thermal injury-induced insulin resistance in rodents. Implication of postreceptor mechanisms. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25289-25295.
- Greene MW, Garofalo RS. Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation. *Biochemistry*, 2002, 41: 7082-7091.
- Gao ZG, Zulcher A, Quon MJ, et al. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem*, 2003, 278: 24944-24950.

(收稿日期: 2005-10-19)

(本文编辑: 赵敏)