

## 胰岛素受体底物 1 在烧伤后胰岛素抵抗中的作用

陈新龙, 夏照帆\*, 韦 多, 田建广, 郇京宁, 路 卫, 唐洪泰, 朱世辉  
(第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433)

**[摘要]** 目的: 观察烧伤后胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 及其丝氨酸<sup>307</sup>和酪氨酸磷酸化的变化, 探讨烧伤后胰岛素抵抗的分子机制。方法: 6 周龄 SD 大鼠(体质量 160~ 170 g) 随机分为假烫伤组( $n=8$ ) 和烫伤组( $n=8$ ), 烫伤组大鼠制成烧伤面积为 30% 的 III 度烫伤模型, 伤后第 4 天, 禁食 5 h 后的大鼠, 进行正常血糖高胰岛素钳夹技术实验, 实验后颈动脉放血处死, 立即采集肌肉和脂肪标本, 采用免疫沉淀和免疫印迹方法分析 IRS-1 及其丝氨酸<sup>307</sup>和酪氨酸磷酸化的变化情况。结果: 烫伤后肌肉和脂肪组织中 IRS-1 上丝氨酸<sup>307</sup>磷酸化水平显著升高[假烫伤组光密度值设定为 1, 进行对照比较; 骨骼肌:  $(3.78 \pm 1.58) \text{ vs } (1.00 \pm 0.16)$ ,  $P < 0.01$ ; 脂肪组织:  $(2.09 \pm 0.44) \text{ vs } (1.00 \pm 0.18)$ ,  $P < 0.05$ ], 而 IRS-1 上酪氨酸磷酸化水平显著降低[骨骼肌:  $(0.66 \pm 0.32) \text{ vs } (1.00 \pm 0.34)$ ,  $P < 0.05$ ; 脂肪组织:  $(0.62 \pm 0.27) \text{ vs } (1.00 \pm 0.24)$ ,  $P < 0.05$ ]。烫伤后 IRS-1 含量无显著性改变[肌肉组织:  $(0.87 \pm 0.05) \text{ vs } (1.00 \pm 0.17)$ ,  $P > 0.05$ ; 脂肪组织:  $(0.93 \pm 0.01) \text{ vs } (1.00 \pm 0.16)$ ,  $P > 0.05$ ]。结论: 烧伤后 IRS-1 丝氨酸<sup>307</sup>磷酸化升高和酪氨酸磷酸化降低可能是烧伤后胰岛素抵抗发生的重要分子机制之一。

**[关键词]** 烧伤; 胰岛素抵抗; 胰岛素受体底物 1; 丝氨酸<sup>307</sup>; 酪氨酸; 磷酸化

**[中图分类号]** R 644 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004) 10-1052-03

### Role of insulin receptor substrate 1 in insulin resistance after burn

CHEN Xin-Long, XIA Zhao-Fan\*, WEI Duo, TIAN Jian-Guang, HUAN Jing-Ning, LU Wei, TANG Hong-Tai, ZHU Shi-Hui  
(Department of Burns, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the changes of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), Serine<sup>307</sup> and tyrosine phosphorylation of IRS-1 after burn, providing information for the molecular mechanism of insulin resistance after burn. **Methods:** Sprague-Dawley rats were randomized into burn group ( $n=8$ ): 30% TBSA full thickness burn injury and control group ( $n=8$ ): sham burn trauma. IRS-1, phospho-Serine<sup>307</sup> and phospho-tyrosine of IRS-1 in skeletal muscles and fat tissues after Euglycemic-Hyperinsulinemic glucose clamps *in vivo* were determined by immunoprecipitation and Western blot analysis. **Results:** The level of IRS-1 Serine<sup>307</sup> phosphorylation in both skeletal muscles and fat tissues increased significantly in burn group compared with that in control group (Skeletal muscle:  $3.78 \pm 1.58 \text{ vs } 1.00 \pm 0.16$ ,  $P < 0.01$ ; Fat tissue:  $2.09 \pm 0.44 \text{ vs } 1.00 \pm 0.18$ ,  $P < 0.05$ ), while insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 decreased significantly in burn group compared with that in control group (Skeletal muscle:  $0.66 \pm 0.32 \text{ vs } 1.00 \pm 0.34$ ,  $P < 0.05$ ; Fat tissue:  $0.62 \pm 0.27 \text{ vs } 1.00 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$ ). But quantities of IRS-1 were not significantly different between 2 groups (Skeletal muscle:  $0.87 \pm 0.05 \text{ vs } 1.00 \pm 0.17$ ,  $P > 0.05$ ; Fat tissue:  $0.93 \pm 0.01 \text{ vs } 1.00 \pm 0.16$ ,  $P > 0.05$ ). **Conclusion:** This study indicates that Serine<sup>307</sup> hyperphosphorylation and tyrosine hypophosphorylation of IRS-1 *in vivo* may be an important molecular mechanism of insulin resistance after burn.

**[KEY WORDS]** burn; insulin resistance; insulin receptor substrate 1; serine<sup>307</sup>; tyrosine; phosphorylation

[A cad J Sec M il M ed U niv, 2004, 25(10): 1052-1054]

\* 严重烧伤引起糖代谢异常和胰岛素抵抗<sup>[1]</sup>。Ikezu 等<sup>[2]</sup>发现胰岛素受体后信号转导机制的改变导致烧伤后胰岛素抵抗的发生。但烧伤后胰岛素抵抗的分子机制仍未阐明。胰岛素受体底物蛋白 (IRS) 是介导胰岛素代谢作用的关键信号分子<sup>[3]</sup>。A guirre 等<sup>[4]</sup>采用培养和杂交的多种类型细胞证实, 丝氨酸<sup>307</sup>磷酸化不仅干涉 IRS-1 与胰岛素受体的相互作用, 而且阻碍 IRS-1 酪氨酸磷酸化作用, 从而影响胰岛素信号向下游传导。IRS-1 上丝氨酸<sup>307</sup>邻近磷酸化酪氨酸结合区段 (PTB), 磷酸化丝氨酸<sup>307</sup>在

介导胰岛素负反馈调节方面起重要作用<sup>[4]</sup>。本研究采用分子生物学技术观察烧伤后第 4 天肌肉和脂肪组织中 IRS-1、IRS-1 上磷酸化酪氨酸和磷酸化丝氨酸<sup>307</sup>含量变化, 探讨烧伤后胰岛素抵抗的分子机制, 为进一步纠正烧伤后胰岛素抵抗提供分子靶

\* [基金项目] 国家自然科学基金 (30271340); 国家重点基础研究规划 ("973" 计划) 课题 (G1999054309); 国家高新技术发展规划 ("863" 计划) 课题 (2001AA 21604)。

[作者简介] 陈新龙 (1966-), 男 (汉族), 博士, 主治医师

\* Corresponding author. E-mail: xiazhaofan@hotmail.com

点。

## 1 材料和方法

1.1 材料和试剂 抗 IRS-1, IRS-1 磷酸化酪氨酸和磷酸化丝氨酸<sup>307</sup>抗体及 10 × 细胞裂解液 (Cell Signaling Technology Inc.); 辣根过氧化物酶标记的二抗 (Calbiochem); ECL (Upstate Cell Signaling Solutions); BCA 蛋白质定量试剂盒 (Pierce Chemical Co.); 其他化学试剂 (Sigma); 匀浆器 (Fluko Equipment of Shanghai Co.)。

1.2 烫伤动物模型的制备 16 只 SD 大鼠 (本校实验动物中心提供), 6 周龄, 体质量 160~170 g, 雌雄不拘, 随机分为烫伤组 ( $n=8$ ) 和假烫伤组 ( $n=8$ ), 自由进食水。采用 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 背部剔毛; 烫伤组大鼠背部置于 100 ℃ 沸水中烫 12 s, 制成烫伤面积为 30% 的 III 度烫伤模型 (病理证实), 伤后腹腔立即注射乳酸钠林格注射液 5 ml 进行液体复苏; 假烫伤组置于 28~30 ℃ 温水中假烫 12 s。

1.3 肌肉和脂肪标本的采集 采用 Fisher 等<sup>[5]</sup>的方法进行正常血糖高胰岛素钳夹实验。烧伤后第 4 天, 禁食 5 h 后的大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 沿颈部正中切口, 分离出颈静脉, 采用一次性使用静脉留置针穿刺、插管、固定。一次性使用静脉留置针预先注入少量稀释的肝素钠溶液, 接通静脉输液装置, 然后连接微量输液泵。沿大鼠大腿前内上方行纵形切口, 分离出股静脉, 采用同样方法留置静脉插管, 连接到同一微量输液泵上。由静脉留置针注入少量稀释的肝素钠溶液, 预防血栓形成。稳定 80 min 后, 尾静脉采血测定基础血糖值。采用微量输液泵通过股静脉插管恒速输注生理盐水稀释的胰岛素溶液 [20 mU/(kg·min)]; 通过颈静脉插管输注 10% 葡萄糖溶液。通过尾静脉采血, 用手握型

电子血糖仪测定血糖浓度, 根据血糖浓度调整葡萄糖总输注率 (GIR), 以维持血糖浓度稳定在 5.5~6.0 mmol/L。血糖浓度持续稳定 30 min 后, 间隔 10 min 测定血糖值, 计算 5~6 次平均 GIR。实验结束后, 将大鼠颈动脉放血处死, 即刻分离腓肠肌和腹部脂肪组织, 并放置于液氮中保存备用。取出肌肉和脂肪标本, 加于 1 × 细胞裂解液 (1:10, w/v) 在冰上, 采用匀浆器匀浆, 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 20 min, 将上清液 -20 ℃ 保存备用。样本中蛋白质的定量采用 BCA 法, 用小牛血清作为标准品, 调整样本中蛋白质的浓度。

1.4 IRS-1, IRS-1 磷酸化酪氨酸和磷酸化丝氨酸<sup>307</sup>检测 采用免疫沉淀与免疫印迹方法<sup>[2]</sup>, 应用 8% 分离胶, 蛋白质的上样量均为 60 μg。图像分析采用 NIH 图像仪 (National Institutes of Health, Bethesda), 将假烫伤组光密度值设定为 1, 进行对照比较。

1.5 统计学处理 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 烧伤后第 4 天正常血糖高胰岛素钳夹检测结果 烫伤后第 4 天, 烫伤组 10% 葡萄糖总输注率 (GIR) 显著低于假烫伤组 ( $6.74 \pm 0.20$  vs  $12.14 \pm 0.30$ ,  $P < 0.01$ )。

2.2 肌肉和脂肪组织中 IRS-1, IRS-1 上磷酸化酪氨酸和磷酸化丝氨酸<sup>307</sup>含量变化 结果见表 1。烫伤组肌肉和脂肪组织中 IRS-1 上磷酸化酪氨酸含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而肌肉和脂肪组织中 IRS-1 上磷酸化丝氨酸<sup>307</sup>含量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但肌肉和脂肪组织中 IRS-1 含量两组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 大鼠烫伤后肌肉和脂肪组织中 IRS-1, IRS-1 上磷酸化酪氨酸和磷酸化丝氨酸<sup>307</sup>含量

Tab 1 IRS-1, IRS-1 phospho-tyrosine and phospho-Ser<sup>307</sup> in skeletal muscles and fat tissues in burned rats

( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Index	Muscle		Fat	
	Control	Burn	Control	Burn
IRS-1	1.00 ± 0.17	0.87 ± 0.05	1.00 ± 0.16	0.93 ± 0.01
Phospho-tyrosine	1.00 ± 0.34	0.66 ± 0.32*	1.00 ± 0.24	0.62 ± 0.27*
Phospho-Ser <sup>307</sup>	1.00 ± 0.16	3.78 ± 1.58*	1.00 ± 0.18	2.09 ± 0.44*

\*  $P < 0.05$  vs control group

### 3 讨论

IRS-1 在传递胰岛素信号中起中心作用<sup>[6,7]</sup>。在胰岛素刺激下, IRS 蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸化在下调胰岛素信号上是一种敏感性调控机制, IRS 蛋白质丝氨酸/苏氨酸基础水平的磷酸化在胰岛素和 IGF-I 受体激酶刺激引起继发的酪氨酸磷酸化作用中起重要的正性调节作用<sup>[8]</sup>。但 IRS 蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸化作用的增加将削弱 IRS 与胰岛素受体的相互作用<sup>[9]</sup>。IRS 丝氨酸/苏氨酸磷酸化作用在调节胰岛素和 IGF-I 起始阶段信号转导过程中起双向调控作用, IRS 蛋白质丝氨酸/苏氨酸基础水平的磷酸化是胰岛素和 IGF-I 信号转导过程所必需的, 而 IRS 蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸化升高对于 IRS 酪氨酸磷酸化作用起负反馈调节作用<sup>[8]</sup>。但是并非所有的 IRS 丝氨酸/苏氨酸起相同的作用, IRS-1 Ser<sup>307</sup> 紧紧靠近磷酸化酪氨酸结合区段 (PTB), Ser<sup>307</sup> 磷酸化升高将阻碍 IRS 与胰岛素受体的相互作用并且削弱 IRS 酪氨酸磷酸化作用<sup>[4]</sup>。包括胰岛素、葡萄糖、TNF- $\alpha$  等多种物质均可刺激 IRS-1 Ser<sup>307</sup> 磷酸化<sup>[10,11]</sup>。严重烧伤可引起 TNF- $\alpha$  胰岛素、葡萄糖、促炎症细胞因子等不同程度升高, 严重烧伤早期可通过这些物质诱导 IRS-1 Ser<sup>307</sup> 磷酸化升高而引起胰岛素抵抗的发生。目前认为 Ser<sup>307</sup> 对 IRS-1 负性调节作用是胰岛素信号转导途径中普遍存在的一种负反馈调控机制, 是多种刺激所致的应激反应诱导的胰岛素抵抗的重要机制之一。

本研究的结果显示烧伤后 IRS-1 Ser<sup>307</sup> 磷酸化作用显著升高而酪氨酸磷酸化作用显著降低, 但 IRS-1 含量却无显著性变化, 说明严重烧伤后早期 IRS-1 出现了功能变化而非含量改变。本研究显示严重烧伤后 IRS-1 Ser<sup>307</sup> 磷酸化增强并伴随 IRS 酪氨酸磷酸化作用的减弱, 至少部分揭示了严重烧伤后胰岛素抵抗的分子基础, 为烧伤后胰岛素抵抗的发病机制找到一个合理的解释。然而 IRS-1 Ser<sup>307</sup> 磷酸化作用可以通过不同的应激激化的激酶途径包括 JNK、mTOR 等激活<sup>[11]</sup>。在体外实验中发现 JNK、mTOR 等可被 TNF- $\alpha$  等激活<sup>[12]</sup>。烧伤后胰岛素抵抗的发生是否通过 TNF- $\alpha$  等激活 JNK、mTOR 而引起 IRS-1 Ser<sup>307</sup> 磷酸化升高值得进一步探讨。

### [参考文献]

- [1] 陈新龙, 夏照帆, 韦多, 等. 烧伤后胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(10): 1049-1051.  
Chen XL, Xia ZF, Wei D, et al. Insulin resistance following thermal injury: an animal study [J]. *Dier Jun Yi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2004, 25(10): 1049-1051.
- [2] Ikezu T, Okamoto T, Yonezawa K, et al. A analysis of thermal injury-induced insulin resistance in rodents. Implication of postreceptor mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(40): 25289-25295.
- [3] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 799-806.
- [4] Aguirre V, Werner ED, Giraud J, et al. Phosphorylation of Ser<sup>307</sup> in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(2): 1531-1537.
- [5] Fisher SJ, Kahn CR. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(4): 463-468.
- [6] Ogawa W, Matozaki T, Kasuga M. Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 182(1-2): 13-22.
- [7] White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 182(1-2): 3-11.
- [8] Greene MW, Garofalo RS. Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(22): 7082-7091.
- [9] Paz K, Hemi R, LeRoith D, et al. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(47): 29911-29918.
- [10] Aguirre V, Uchida T, Yenush L, et al. The c-Jun N-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser<sup>307</sup> [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(12): 9047-9054.
- [11] Rui L, Aguirre V, Kim JK, et al. Insulin/IGF-1 and TNF- $\alpha$  stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser<sup>307</sup> via distinct pathways [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(2): 181-189.
- [12] Gao Z, Zuberi 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]. *J Biol Chem*, 2003, 278(27): 24944-24950.

[收稿日期] 2004-05-09

[修回日期] 2004-07-19

[本文编辑] 尹茶