

· 论 著 ·

西罗莫司对大鼠烧伤后 IRS-1 Ser³⁰⁷磷酸化和胰岛素抵抗的作用

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: 探讨西罗莫司对大鼠烧伤后胰岛素受体底物 1 丝氨酸³⁰⁷ (IRS-1 Ser³⁰⁷) 磷酸化和胰岛素抵抗的作用。方法: 6 周龄 SD 大鼠(体质量 160~170 g) 随机分为假烫伤组($n=8$)、烫伤组($n=8$) 和烫伤+西罗莫司组($n=8$)。烫伤组和烫伤+西罗莫司组大鼠制成烫伤面积为 30% 的 III 度烫伤模型, 伤后第 4 天禁食 5 h 后的大鼠腹腔注射西罗莫司(0.4 mg/kg) 2 h 后, 进行正常血糖高胰岛素葡萄糖钳夹技术实验, 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 及其磷酸化丝氨酸³⁰⁷和酪氨酸活性的变化, 通过免疫组化观察各组肌肉组织中磷酸化哺乳类西罗莫司靶点激酶(mTOR) 表达的差异。结果: 正常血糖高胰岛素葡萄糖钳夹技术实验中假烫伤组、烫伤组和烫伤+西罗莫司组 10% 葡萄糖输注率分别为(12.33±0.42)、(6.61±0.27) 和(10.35±0.63) mg/(kg·min), 烫伤组和其他 2 组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。烫伤大鼠肌肉和脂肪组织中 IRS-1 Ser³⁰⁷活性较假烫伤组明显升高($P<0.05$), 而 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性较假烫伤组明显降低($P<0.05$)。西罗莫司明显降低烫伤大鼠 IRS-1 Ser³⁰⁷活性而明显增加 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性($P<0.05$)。免疫组化显示烫伤后磷酸化 mTOR 活性升高, 西罗莫司显著抑制了 mTOR 活化。结论: 西罗莫司通过抑制 mTOR 磷酸化作用从而降低了 IRS-1 磷酸化丝氨酸³⁰⁷活性, 至少部分减轻烧伤后胰岛素抵抗的发生。

[关键词] 烧伤; 胰岛素抵抗; 胰岛素受体底物 1; 丝氨酸³⁰⁷; 磷酸化

[中图分类号] R 644

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)10-1055-03

Effects of sirolimus on IRS-1 phosphoSer³⁰⁷ and insulin resistance in burned rats

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 effects of sirolimus on IRS-1 phospho-Ser³⁰⁷ and insulin resistance after burn in rats. **Methods:** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomized into control (sham burn trauma), burn (30% TBSA full thickness burn injury) and burn+sirolimus groups ($n=8$). Euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp was performed 4 d after burn. Sirolimus (0.4 mg/kg) was injected intraperitoneally 2 h before euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamps. Phosphoserine³⁰⁷, phosphotyrosine of IRS-1 and phospho-mTOR in muscles and fat tissues were determined by immunoprecipitation and Western blot analysis or immunohistochemistry. **Results:** The infused rates of total 10% glucose (GIR, mg/kg·min) in control, burn and burn+sirolimus groups were 12.33±0.42, 6.61±0.27 and 10.35±0.63, respectively ($P<0.01$). The level of IRS-1 Serine³⁰⁷ phosphorylation in both muscle and fat tissues *in vivo* increased significantly, while insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 decreased markedly after burn. Sirolimus inhibited the activation of mTOR, reduced Serine³⁰⁷ phosphorylation, elevated tyrosine phosphorylation and partly prevented the decrease of GIR after burn. **Conclusion:** Sirolimus inhibits the activation of mTOR, decreases the level of IRS-1 phosphoserine³⁰⁷, and, at least partly, ameliorates insulin resistance after burn.

[KEY WORDS] burn; insulin resistance; insulin receptor substrate1; serine³⁰⁷; phosphorylation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1055-1057]

* 严重烧伤引起糖代谢异常和胰岛素抵抗^[1]。Ikezu 等^[2]发现烧伤后胰岛素受体后信号传导机制的改变导致胰岛素抵抗的发生。胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 丝氨酸³⁰⁷ (IRS-1 Ser³⁰⁷) 磷酸化在介导胰岛素负反馈调节方面起重要作用^[3]。我们以往的实验^[4,5]已经发现烧伤后 IRS-1 Ser³⁰⁷磷酸化活性显著性升高, 同时伴随 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性显著性降低。应激活化的激酶之一哺乳类西罗莫司靶点激酶(mTOR) 在体内外实验中已发现可介导丝氨酸³⁰⁷

磷酸化作用^[6]。本研究通过 mTOR 抑制剂西罗莫司, 探讨降低 IRS-1 Ser³⁰⁷磷酸化作用对大鼠烧伤后胰岛素抵抗的作用。

* [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: ziazhaoan@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 抗 IRS-1 磷酸化酪氨酸, 磷酸化丝氨酸³⁰⁷和磷酸化 mTOR 抗体及 10 × 细胞裂解液 (Cell Signaling Technology Inc.); 西罗莫司和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 24 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, 随机分为假烫伤组、烫伤组和烫伤+西罗莫司组, 每组 8 只, 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; 烫伤组和烫伤+西罗莫司组大鼠背部置于 100 °C 沸水中烫 12 s, 制成烧伤面积为 30% 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 °C 温水中假烫 12 s, 烫伤+西罗莫司组大鼠正常血糖高胰岛素钳夹技术前 2 h 腹腔注射西罗莫司 (0.4 mg/kg, 溶解于 250 μl 二甲基亚砷), 其余 2 组腹腔注射 250 μl 二甲基亚砷。

1.3 肌肉和脂肪标本的采集 采用 Fisher 等^[7]的方法进行正常血糖高胰岛素葡萄糖钳夹实验。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 °C 下 15 000 r/min 离心 20 min, 将上清液 -20 °C 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。采集部分肌肉标本放置于 10% 甲醛固定进行免疫组化检测。

1.4 IRS-1 磷酸化酪氨酸和磷酸化丝氨酸³⁰⁷检测 采用免疫沉淀与免疫印迹方法^[21], 应用 8% 分离胶, 蛋白质的上样量均为 60 μg。

1.5 免疫组化检测 肌肉组织磷酸化 mTOR 免疫组化检测按照抗体说明书进行, 结果采用双盲法由 2 位病理医生评估。

1.6 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 烫伤后第 4 天正常血糖高胰岛素葡萄糖钳夹技术检测 烫伤组 10% 葡萄糖总输注率 (GIR) 为 (6.61 ± 0.27) mg/(kg·min), 显著低于假烫伤组 [(12.33 ± 0.42) mg/(kg·min), $P < 0.01$] 和烫伤+西罗莫司组 [(10.35 ± 0.63) mg/(kg·min), $P < 0.05$]。

2.2 肌肉和脂肪组织中 IRS-1 上磷酸化酪氨酸和磷酸化丝氨酸³⁰⁷活性的变化 结果见表 1。烧伤后第 4 天, 烫伤组 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性较假烫伤组明显降低 ($P < 0.05$), 而烫伤+西罗莫司组 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性较烫伤组明显升高 ($P < 0.05$)。烫伤组 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷活性较假烫伤组显著升高 ($P < 0.05$), 而烫伤+西罗莫司组 IRS-1 磷酸化 Ser³⁰⁷活性较烫伤组显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 磷酸化 mTOR 在肌肉组织的表达 结果见图 1。烧伤后第 4 天, 烫伤组肌肉组织磷酸化 mTOR 活性较假烫伤组明显升高, 西罗莫司明显地抑制这种升高。

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

Tab 1 IRS-1 phospho-tyrosine and phospho-Ser³⁰⁷ in skeletal muscles and fat tissues in burned rats

Index	Muscle			Fat		
	Control	Burn	Burn+ sirolimus	Control	Burn	Burn+ sirolimus
Phospho-tyrosine	1.00 ± 0.35	0.51 ± 0.21*	0.76 ± 0.18	1.00 ± 0.29	0.58 ± 0.20*	0.78 ± 0.22
Phospho-Ser ³⁰⁷	1.00 ± 0.24	3.10 ± 1.90*	1.20 ± 0.41	1.00 ± 0.20	2.01 ± 0.36*	1.26 ± 0.36

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

* $P < 0.05$ vs control group; $P < 0.05$ vs burn group

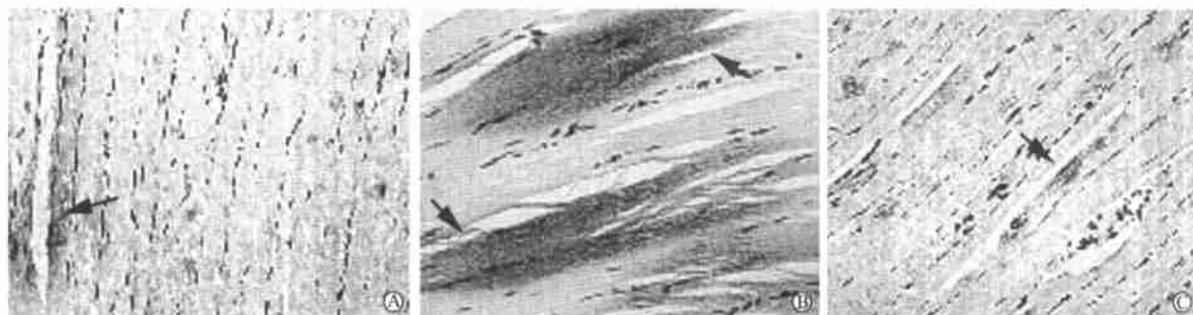


图 1 大鼠烫伤后第 4 天磷酸化 mTOR 在肌肉组织的表达

Fig 1 Phospho-mTOR in skeletal muscle of rats determined by immunohistochemistry 4 d after burn ($\times 20$)

A: Control group; B: Burn group; C: Burn+ sirolimus group; Arrows showing expression of phospho-mTOR in skeletal muscle

3 讨论

我们研究发现严重烧伤后葡萄糖代谢异常呈现动态变化的规律(结果待发表), 烧伤后第 3 和 4 天胰岛素抵抗表现明显。本研究在前面的实验基础上, 采用烧伤后第 4 天作为研究时间点, 探讨西罗莫司对烧伤后 IRS-1 Ser³⁰⁷磷酸化和胰岛素抵抗的作用。本研究中发现烧伤后第 4 天肌肉和脂肪组织 IRS-1 磷酸化丝氨酸³⁰⁷活性显著地升高, 而 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性明显降低, 与以往的研究^[4, 5]结果一致; 同时还发现烧伤后磷酸化 mTOR 表达增强。Gual 等^[8]采用培养的 3T3 脂肪细胞证实, 胰岛素刺激的丝氨酸³⁰⁷磷酸化作用直接通过应激激活的激酶 mTOR 途径介导实现; 西罗莫司抑制了 mTOR 活化, 从而明显降低磷酸化丝氨酸³⁰⁷活性, 揭示 mTOR 参与了细胞糖代谢和胰岛素抵抗的发生。我们研究发现西罗莫司明显抑制烧伤后肌肉组织磷酸化 mTOR 的表达, 同时明显降低烧伤后肌肉和脂肪组织 IRS-1 磷酸化丝氨酸³⁰⁷活性, 而显著地增加 IRS-1 磷酸化酪氨酸活性。正常血糖高胰岛素葡萄糖钳夹技术是目前世界公认的测定机体胰岛素抵抗的“金标准”, 使胰岛素抵抗可以进行定量测定, 除此以外的任何胰岛素敏感性评估方法都不能与之相比拟^[9]。我们发现烫伤+ 西罗莫司组大鼠正常血糖高胰岛素葡萄糖钳夹技术检测 GIR 较烫伤组显著性升高, 显示 mTOR 参与了介导烧伤后 IRS-1 丝氨酸³⁰⁷磷酸化作用, 至少部分参与了烧伤后胰岛素抵抗的发生。

胰岛素可以通过 mTOR 介导 IRS-1 丝氨酸³⁰⁷磷酸化作用^[8]。本研究发现西罗莫司抑制了 mTOR 活化, 部分降低了 IRS-1 丝氨酸³⁰⁷磷酸化作用, 提示烧伤后胰岛素抵抗的发生存在着其他机制, 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]. *Dierjunyidaxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2004, 25(10): 1049-1051.
- [2] Ikezu T, Okamoto T, Yonezawa K, et al. Analysis of thermal injury-induced insulin resistance in rodents. Implication of postreceptor mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(40): 25289-25295.
- [3] Aguirre V, Werner ED, Giraud J, et al. Phosphorylation of Ser³⁰⁷ in insulin receptor substrate 1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(2): 1531-1537.
- [4] 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[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(10): 1052-1054.
Chen XL, Xia ZF, Wei D, et al. Role of insulin receptor substrate 1 on insulin resistance after burn[J]. *Dierjunyidaxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2004, 25(10): 1052-1054.
- [5] Chen XL, Xia ZF, Ben DF, et al. Molecular mechanism of insulin resistance after burn: an animal study[J]. *Diabetologia*, 2004, 11(1): 1-5.
- [6] Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, et al. MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate 1 on serine residues 307, 612 and 632[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(11): 1532-1542.
- [7] 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.
- [8] Gual P, Gonzalez T, Gremeaux T, et al. Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate 1 function by distinct mechanisms in 3T3L1 adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 26550-26557.
- [9] 李光伟. 胰岛素敏感性评估及其应用[A]. 见: 李秀钧主编. 胰岛素抵抗综合征[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 44-54.

[收稿日期] 2004-05-09

[修回日期] 2004-07-19

[本文编辑] 尹茶