

## 糖尿病和硝化条件下胰岛素受体及底物酪氨酸磷酸化的研究

葛伊莉<sup>1,2</sup> 彭 红<sup>1</sup> 周 军<sup>1</sup> 黄开勋<sup>\*,1</sup>

(<sup>1</sup> 华中科技大学化学系, 武汉 430074)

(<sup>2</sup> 湖北大学化学化工学院, 武汉 430062)

**摘要:** 利用新颖的定量核磁共振(<sup>31</sup>P NMR)法和免疫印迹法研究了四氧嘧啶诱导的糖尿病状态下以及酪氨酸经过氧亚硝酸根供体 SIN-1 硝化条件下大鼠肝脏胰岛素受体(IR)的自磷酸化和受体底物 1(IRS1)的磷酸化。结果表明, 四氧嘧啶诱导的糖尿病大鼠肝脏中 IR 自磷酸化水平削弱了, 硝化对大鼠肝脏中 IR 自磷酸化的影响依赖于 SIN-1 浓度, 根据 IRS1 磷酸化位点基序设计的多肽的硝化完全抑制了其磷酸化, 提示酪氨酸硝化可能干扰胰岛素磷酸化信号通路。

**关键词:** 酪氨酸磷酸化; <sup>31</sup>P NMR; 免疫印迹法; 糖尿病

中图分类号: O611.5; O613.62; O657.61

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2008)07-1040-06

## Protein Tyrosine Phosphorylation of the Insulin Receptor and Its Substrate under Diabetes Mellitus and Nitration Conditions

GE Yi-Li<sup>1,2</sup> PENG Hong<sup>1</sup> ZHOU Jun<sup>1</sup> HUANG Kai-Xun<sup>\*,1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

(<sup>2</sup>Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei University, Wuhan 430062)

**Abstract:** Insulin receptor (IR) autophosphorylation and phosphorylation of the IR substrate-1 (IRS1) was investigated under the conditions of alloxan-induced diabetes and nitration of tyrosine residues after treatment with the peroxynitrite donor SIN-1 *in vitro*. A novel quantitative <sup>31</sup>P NMR method based on our previously developed qualitative protocol and western-blotting analysis was used in present research. The results illustrated that IR autophosphorylation levels were decreased in rat livers rendered diabetic by alloxan. After the addition of SIN-1 to purified IR aliquots, a dose-dependent alteration of autophosphorylation levels occurred. This suggested that the effects of the nitration of IR on the autophosphorylation depended on the peroxynitrite concentration. The study on phosphorylation of synthetic peptides with the phosphorylation motif of IRS1 showed that the nitration of tyrosine inhibited the phosphorylation, suggesting that tyrosine nitration might interfere with the phosphorylation in insulin signaling pathways.

**Key words:** tyrosine phosphorylation; <sup>31</sup>P NMR; western-blotting analysis; diabetes mellitus

胰岛素信号传导可以通过蛋白质的磷酸化来实现。当胰岛素结合到胰岛素受体(IR)上, IR 在多个酪氨酸残基上进行自磷酸化<sup>[1]</sup>, 导致胰岛素受体激酶的激活, 该激活的激酶作用于胰岛素受体底物 1

(IRS1)等蛋白质家族, 使得这些蛋白质酪氨酸磷酸化, 进而向下游传递信号。因此, 胰岛素受体及底物酪氨酸磷酸化在胰岛素信号传导中起着关键的作用。

收稿日期: 2008-01-04。收修改稿日期: 2008-04-11。

国家自然科学基金(No.20671037, 20371018)和华中科技大学理科基金(No.0101013180)资助项目。

\*通讯联系人。E-mail: hxxzrf@mail.hust.edu.cn

第一作者: 葛伊莉, 女, 44 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 生物无机化学。

四氧嘧啶被广泛地用来建立糖尿病实验动物模型,以便研究糖尿病的病理和治疗药物。四氧嘧啶诱导动物患 I 型糖尿病,尽管对正常大鼠肝脏胰岛素信号传导体系的蛋白质磷酸化已有研究,但是,胰岛素信号体系中,四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠肝脏的蛋白质磷酸化的研究还鲜有报道<sup>[2]</sup>。

在人的组织中,已证明硝化酪氨酸(加硝基于酚羟基的邻位)存在于正常的生理条件下,并且在糖尿病病人体内含量显著增加<sup>[3]</sup>。尽管人们已知多种生化通路导致酪氨酸硝化<sup>[3]</sup>,迄今为止,发现最有活性的硝化剂是过氧亚硝酸根离子,过氧亚硝酸根离子对蛋白质的主要影响是导致酪氨酸残基硝化<sup>[4]</sup>,并且硝化蛋白质的存在被认为是过氧亚硝酸根离子在组织中形成的标志物,SIN-1(3-morpholiniosydnonimine)是过氧亚硝酸根离子的供体<sup>[5]</sup>,在简单的缓冲液中,SIN-1 分解产生等摩尔的超氧阴离子和一氧化氮,超氧阴离子和一氧化氮又定量地形成过氧亚硝酸根离子( $\text{NO}^\cdot + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{ONOO}^-$ )。酪氨酸磷酸化是细胞信号传导中重要的调节者,过氧亚硝酸根离子或者硝基酪氨酸的形成可能干扰正常的信号传导通路<sup>[6]</sup>。以前的研究表明在不同的体系中,过氧亚硝酸根离子对酪氨酸磷酸化的影响导致磷酸酪氨酸依赖的信号上调或下调,但是各种研究无统一结论<sup>[6]</sup>。因此,鉴于糖尿病和过氧亚硝酸根离子的密切关系,过氧亚硝酸根离子对磷酸化酪氨酸依赖的胰岛素信号的影响有待阐明。

分析磷酸化位点的传统方法主要是通过放射性标记 ATP,将  $^{32}\text{P}$  掺入到细胞蛋白质中<sup>[7]</sup>。我们已经建立了一种非放射性的测定蛋白质磷酸化的定性  $^{31}\text{P}$  NMR 波谱法,并且用此方法研究了正常大鼠肝脏组织 IR 的体外自磷酸化<sup>[8]</sup>。本工作将已经建立的定性方法改进为定量  $^{31}\text{P}$  NMR,并用此定量的  $^{31}\text{P}$  NMR 方法和免疫印迹法研究在四氧嘧啶诱导糖尿病和酪氨酸硝化的病理条件下,大鼠肝脏胰岛素信号系统中的胰岛素受体及底物合成肽酪氨酸磷酸化的变化,旨在对磷酸酪氨酸依赖的胰岛素信号传导和糖尿病的研究提供一些有价值的信息。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

$^{31}\text{P}$  NMR 用美国瓦里安 (Varian) 公司生产的 INOVA-600 核磁共振仪测定,蛋白质浓度测定在 Spectra MAX 型(美国 Molecular Device 公司)全光谱

自动酶标仪上进行,血糖测试在 Advantage 血糖仪(美国 Roche 公司)上进行。免疫印迹法在 Hoefer miniVE 垂直电泳系统(Pharmacia 公司)和半干电转槽(北京六一仪器厂)进行测定。多肽由西安华辰生物科技有限公司合成,磷酸肌酸(PCr)购自美国 Amresco 公司,小鼠—抗 P—Tyr(PY99)(一抗),辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(II+L)(二抗)和增强化学发光试剂(ECL 试剂)购自美国 Pierce 公司;SIN-1(3—吗啉—斯得酮亚胺),购自美国 Sigma 公司;麦胚凝集素—琼脂糖沉积的微球购自瑞典 Pharmacia 公司,所用其他试剂均为市售分析纯试剂。12 只雄性 Wistar 大鼠(体重:180±15 g),购于湖北省预防医学科学院实验动物中心。

### 1.2 糖尿病大鼠造模

12 只雄性 Wistar 大鼠,被放在安装有空调的动物房中,正常的日夜循环喂养大鼠饲料和自来水,饲料来源于湖北省预防医学科学院实验动物中心。购买回来适应环境 4 d 后,这些大鼠被随意分成两组:糖尿病组和正常控制组,每组各 6 只。实验前,2 组大鼠都禁食 12 h,6 只糖尿病组大鼠按体重腹腔注射  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 10% 四氧嘧啶溶液(四氧嘧啶溶液是用 pH=3.0 的柠檬酸缓冲液配制并过滤,临用前配制),然后,6 只糖尿病组的大鼠随意进食。这组大鼠连续 3 d 3 次注射四氧嘧啶溶液。同时,6 只正常控制组的大鼠注射 0.15 mL 柠檬酸缓冲液代替四氧嘧啶溶液。并且监测 2 组 Wistar 大鼠的体重。2 周后,糖尿病组的大鼠用血糖测试仪测定大鼠尾静脉全血血糖,那些体重明显降低且进食后血糖浓度高于  $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的大鼠确定为糖尿病模型。

### 1.3 肝脏细胞胰岛素受体提取

从正常的和糖尿病的大鼠肝脏(大约各 25 g)提取胰岛素受体,具体操作步骤参见文献<sup>[9]</sup>。提取的受体蛋白浓度采用 Bradford 检测法测定,调整正常的和糖尿病的大鼠肝脏受体浓度均为  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  左右,分装于小 EP 管,保存于  $-80^\circ\text{C}$  备用。提取胰岛素受体并通过麦胚凝集素—琼脂糖亲和层析柱纯化,纯化的受体蛋白浓度采用 Bradford 检测法测定,调整正常的和糖尿病的大鼠肝脏受体浓度均为  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 1.4 多肽合成

2 条含有胰岛素受体底物 1 磷酸化基序 YMXM 的模拟 IRS1 多肽由西安华辰生物科技有限公司合成,1 条具有修饰的 3-硝基酪氨酸,1 条具有未修饰的酪氨酸。(a) Arg-Arg-Ala-Tyr( $\text{NO}_2$ )-Met-Asn-

Met-Ala-Arg-Ala, (b) Arg-Arg-Ala-Tyr-Met-Asn-Met-Ala-Arg-Ala。

### 1.5 $^{31}\text{P}$ NMR 样品制备及测定条件

在 EP 管中加入 250  $\mu\text{L}$  上述纯化的受体,加入 1  $\mu\text{L}$  600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  抑酶肽,自磷酸化缓冲液 44  $\mu\text{L}$ , 0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  猪胰岛素 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP 和 5  $\mu\text{L}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 所有反应物均溶解于 Hepes 缓冲液 ( $\text{pH}=7.4$ )<sup>[9]</sup>, 加入 50  $\mu\text{L}$  重水<sup>[10]</sup>, 将 EP 管中 500  $\mu\text{L}$  的溶液混匀后转移进入 5 mm 直径的 NMR 管中测定  $^{31}\text{P}$  NMR 谱, 在毛细管中装入 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PCr 溶液, 将此毛细管插入到装有溶液的 NMR 管中用作外标 (零参比化学位移)<sup>[8]</sup>, 然后就可以在核磁共振仪上, 相对于 PCr 的  $^{31}\text{P}$  NMR 信号峰面积对待测样品进行面积积分, 最后定量计算出相对峰面积。定性测定的方法是将 PCr 的  $^{31}\text{P}$  NMR 信号先单独测定, PCr 的化学位移设置为 0 ppm<sup>[11-13]</sup>, 然后, 样品溶液在无 PCr 的条件下测定其核磁共振图谱。所有的  $^{31}\text{P}$  NMR 谱测定用 Varian INOVA-600 核磁共振仪, 在 25  $^{\circ}\text{C}$  及频率为 242.794 MHz 条件下进行, 其他参数设置为: 扫描宽度 7 290 Hz, 弛豫延迟 1 s, 45 $^{\circ}$  脉冲宽度, 1 500 次扫描<sup>[8]</sup>。

### 1.6 糖尿病大鼠肝脏和用 ONOO $^{-}$ 处理后 IR 自磷酸化反应的免疫印迹法测定

我们制备了 2 种相同浓度的胰岛素受体蛋白质样品, 1 份来自于正常大鼠肝脏, 1 份来自于糖尿病大鼠, 用抗磷酸酪氨酸抗体进行胰岛素刺激的 IR 酪氨酸磷酸化的检测, 免疫印迹的具体操作方法参见文献<sup>[8]</sup>。

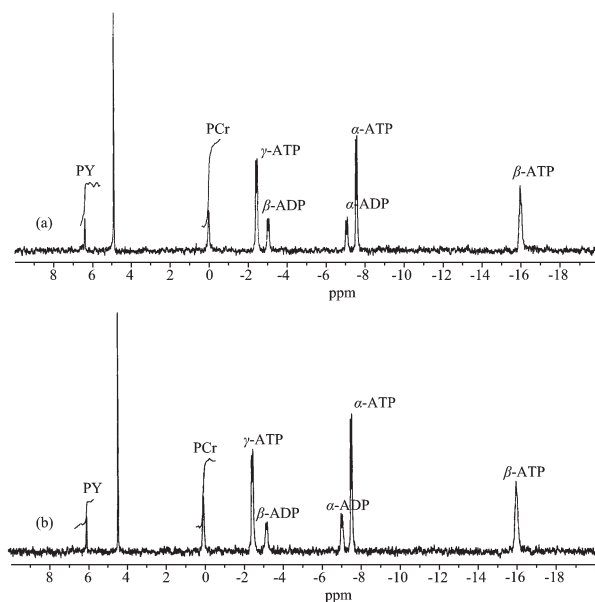
在室温下, 取 6 等份正常大鼠肝脏 IR 溶液用不同浓度的 SIN-1 孵育 10 min 后, 用抗磷酸酪氨酸抗体进行胰岛素刺激的 IR 酪氨酸磷酸化的检测, 免疫印迹的方法同上。

## 2 结果与讨论

### 2.1 用 $^{31}\text{P}$ NMR 谱法检测四氧嘧啶诱导的糖尿病对胰岛素激活 IR 自磷酸化的影响

IR 在胰岛素的刺激下能使自身  $\beta$  亚基磷酸化而具有酪氨酸激酶活性, 随后使得其下游的蛋白质磷酸化。为了测试在四氧嘧啶诱导的 I 型糖尿病中胰岛素信号传导是否改变, 本文采用所建立的  $^{31}\text{P}$  NMR 方法来定量测定大鼠肝脏 IR 体外自磷酸化程度。图 1a 和图 1b 分别为正常大鼠和糖尿病大鼠肝脏细胞膜 IR 用胰岛素刺激后, 采用  $^{31}\text{P}$  NMR

定量法测定的自磷酸化信号。从图 1a 和图 1b 可以看到相对于 PCr 峰面积, 正常大鼠肝脏细胞膜磷酸化酪氨酸 (PY, 6.0~6.4 ppm) 的峰面积是 47.54% $\pm$ 0.97% (平均值 $\pm$ 标准偏差,  $n=3$ ), 而糖尿病大鼠肝脏 PY 的峰面积是 41.66% $\pm$ 0.91% (平均值 $\pm$ 标准偏差,  $n=3$ )。通过比较这 2 种图谱, 可以推算出糖尿病大鼠肝脏 IR 体外自磷酸化水平比正常大鼠受体降低了 12.37%。



(a) in normal rat livers; (b) in diabetic rat livers after incubation in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  (25  $^{\circ}\text{C}$ ); PY: insulin receptor phosphorylated at tyrosine residues

图 1 在 25  $^{\circ}\text{C}$  温度和  $\text{Mg}^{2+}$  存在的条件下, 用胰岛素刺激的 IR 自磷酸化  $^{31}\text{P}$  NMR 图谱

Fig.1  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of insulin receptor autophosphorylation with insulin stimulation

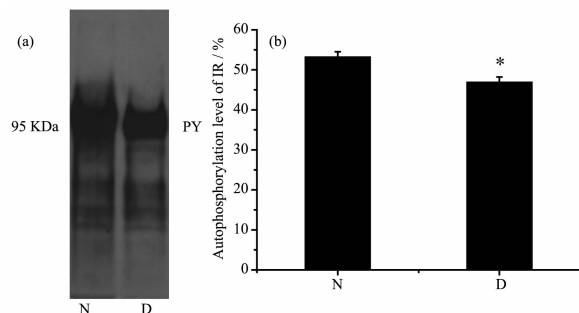
图 1a 和图 1b 表明相对于 PCr 峰面积, 糖尿病大鼠肝脏 IR 磷酸化酪氨酸残基的峰面积明显高于正常大鼠肝脏磷酸化酪氨酸 (PY) 的峰面积, 同时, 与纯的 ATP 的共振峰比较, 上述 ATP 的共振峰降低而 ADP 的共振峰增加<sup>[8]</sup>, 意味着磷酸根可能传递到酪氨酸的酚羟基上。这个结果说明四氧嘧啶诱导的糖尿病大鼠肝脏的 IR 的自磷酸化水平比正常大鼠的自磷酸化水平明显下调, 因此, 其活性可能降低。这可能与以前研究所揭示的在四氧嘧啶诱导的糖尿病大鼠肝脏中 IR 的蛋白质表达和基因表达均明显下降 (数据未列出) 有关。因此, 说明在四氧嘧啶诱导的 I 型糖尿病鼠肝脏中, 胰岛素信号通路上游的磷酸化信号明显削弱。

众所周知,  $^{31}\text{P}$  NMR 的 IUPAC 标准是 85% 的

$\text{H}_3\text{PO}_4$ ,然而,用 PCr 作为内标更适合生物体系,PCr 总是存在于生物体内(例如,在能量代谢中),这使得 PCr 成为方便的内标而不需要加 85%的  $\text{H}_3\text{PO}_4$  作为外标,因此,PCr 是在生物体内和体外测定  $^{31}\text{P}$  NMR 谱时常常使用的化学位移参考 (0 ppm)。由于这个原因,我们选择 PCr 作为体外测定胰岛素受体  $^{31}\text{P}$  NMR 谱的外标以便与体内测定相一致。而且,在本研究中,设计 PCr 被装入到毛细管中再插入到待测溶液中,这种在我们以前设计方案基础上改进的设计具有以下优点,即 PCr 不干扰样品的测定(因为 PCr 没直接与样品接触),可得到  $^{31}\text{P}$  NMR 样品的信号峰面积相对于 PCr 的信号峰面积积分,这使得定量分析成为可能。

## 2.2 用免疫印迹法体外测定胰岛素受体自磷酸化

为了验证所建立的  $^{31}\text{P}$  NMR 定量方法的可行性,我们进一步用单克隆的抗磷酸化酪氨酸抗体进行免疫印迹实验,以测定在四氧嘧啶诱导的糖尿病的病理状态下,大鼠肝脏 IR 经过胰岛素刺激后的酪氨酸自磷酸化程度。如图 2,免疫印迹测定表明与正常大鼠相比,在四氧嘧啶诱导糖尿病的病理状态下的自磷酸化降低了 15.10%。此结果与  $^{31}\text{P}$  NMR 法的结果相近,说明我们所建立的  $^{31}\text{P}$  NMR 定量方法用于蛋白质磷酸化的测定是可行的。



N and D meant normal and diabetic rat livers, respectively; PY: insulin receptor phosphorylated at tyrosine residues; Data were expressed as means  $\pm$  SD (standard deviation,  $n=3$ ); \* $p<0.05$  versus normal one

图 2 在胰岛素存在条件下 IR 自磷酸化免疫印迹测定:(a) IR 自磷酸化免疫印迹分析,(b) IR 自磷酸化免疫印迹分析的数据统计分析

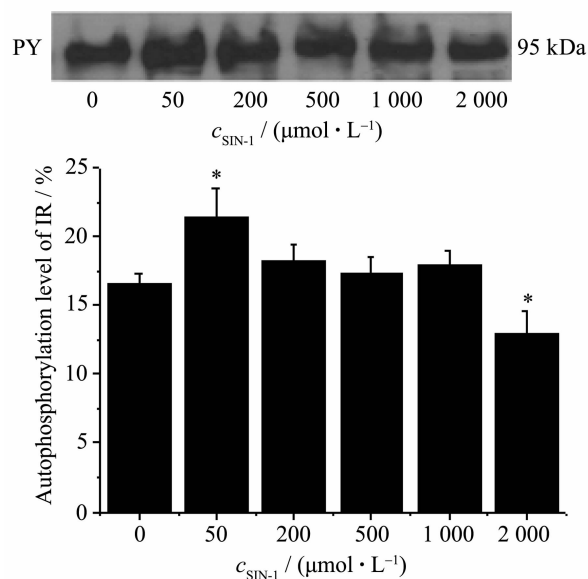
Fig.2 Western-blotting of insulin receptor autophosphorylation in the presence of insulin

图 2 中的自磷酸化下调的结果(15.10%)与图 1 的  $^{31}\text{P}$  NMR 测定的结果相接近,这些结果证明在 I 型糖尿病状态下,大鼠肝脏中胰岛素信号的早期步骤被削弱,一些研究者认为 IR 活性的降低以及

IRS1 蛋白质磷酸化的降低已证实出现在胰岛素抵抗的不同动物模型中,并且认为胰岛素信号早期步骤的改变是导致胰岛素抵抗的重要因素<sup>[14]</sup>。但是,造成这种胰岛素抵抗的分子机制还不清楚。

## 2.3 硝化对 IR 自磷酸化的影响

医学研究证明硝基酪氨酸存在于糖尿病人的血液中,并且硝基酪氨酸水平在高血糖时增加<sup>[15]</sup>。很多因素都对胰岛素磷酸化信号传导有影响,由于糖尿病和硝基酪氨酸的密切相关性,因此,我们进一步研究了硝化对 IR 自磷酸化的影响。过氧亚硝酸根离子是潜在的硝化剂,它能使酪氨酸残基硝化,因此酪氨酸是过氧亚硝酸根离子的关键靶点之一。在本研究中,用过氧亚硝酸根离子的供体 SIN-1 作用于大鼠肝脏 IR,然后用免疫印迹法检测 IR 酪氨酸自磷酸化水平,以观察硝基酪氨酸的形成是否对 IR 酪氨酸自磷酸化产生影响。如图 3 所示,酪氨酸残基的硝化对 IR 自磷酸化的影响与 SIN-1 浓度相关。有趣的是在低浓度 ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )SIN-1 的作用下,IR 自磷酸化的程度增加,而较高浓度( $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 SIN-1 对 IR 自磷酸化产生抑制作用。



PY: insulin receptor phosphorylated at tyrosine residues; Data were expressed as means  $\pm$  SD (standard deviation,  $n=3$ ); \* $p<0.05$  versus the sample untreated by SIN-1

图 3 用 SIN-1 处理之后的 IR 自磷酸化的免疫印迹分析  
Fig.3 Western-Blotting of insulin receptor autophosphorylation after the treatment with SIN-1

如图 3 所示, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SIN-1 处理时酪氨酸磷酸化水平最高,随着 SIN-1 浓度增加酪氨酸磷酸化水平下降, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的 SIN-1 处理后,受

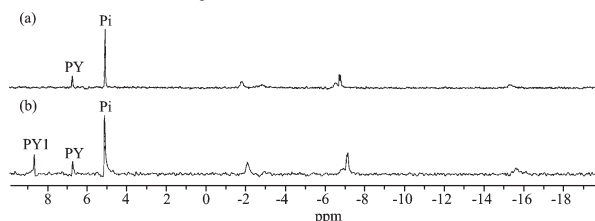
酪氨酸磷酸化的水平与没有 SIN-1 处理的水平相近,当 SIN-1 的浓度为  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,与没有 SIN-1 处理的受体酪氨酸磷酸化水平相比,其酪氨酸磷酸化水平下降。Di Stasi 等人<sup>[6]</sup>的实验证明在突触小体蛋白质中,当用  $50 \sim 500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 SIN-1 处理时,其磷酸化水平上升,当用  $1 \sim 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 SIN-1 处理时,其磷酸化水平下降,提示激酶可能的激活和失活,提示着 SIN-1 这种硝化剂对酪氨酸激酶的双向影响。我们的实验结果与 Di Stasi 等人的观察相似,Di Stasi 等人认为硝化酪氨酸广泛地存在于一些慢性的和多发性的炎症疾病中。此外,蛋白质中酪氨酸残基的硝化可能改变蛋白质功能,因此,酪氨酸残基的硝化既具有生理意义,又具有病理意义,而且我们的实验结果说明硝化剂浓度不同可能导致酪氨酸残基的硝化对磷酸化酪氨酸依赖的胰岛素信号传导的影响不同。

## 2.4 模拟 IRS1 多肽硝化对磷酸化影响的

### $^{31}\text{P}$ NMR 测定

尽管有重要的证据证明硝基酪氨酸的形成对于糖尿病和相关疾病的病理有重要意义,但是,硝基酪氨酸的形成对胰岛素功能的影响以及在这些病理状态下硝基酪氨酸的形成的作用目前尚不清楚<sup>[15]</sup>。与正常人相比,糖尿病人的硝基酪氨酸的免疫反应性(活性氮的标志,例如,过氧亚硝酸根离子的形成)也更高<sup>[18]</sup>,在胰岛素信号级联中,IRS1 肯定是最重要的上游分子之一,也是过氧亚硝酸根离子作用的最重要的靶点<sup>[16]</sup>,因此,我们在体外研究了酪氨酸硝化是否会影响其胰岛素受体底物的磷酸化。早先的研究表明在胰岛素刺激的 IRS1 酪氨酸磷酸化中,IRS1 至少有 8 个酪氨酸可被激活的 IR 磷酸化,它们都处于 YMXM 基序中(其中 X 是任意种类的氨基酸)。因此,我们设计了 2 条具有 YMXM 基序的多肽作为激活的 IR 的底物,这 2 条多肽 1 条是具有硝化酪氨酸的多肽 Arg-Arg-Ala-Tyr( $\text{NO}_2$ )-Met-Asn-Met-Ala-Arg-Ala,而另一条为未硝化酪氨酸的多肽 Arg-Arg-Ala-Tyr-Met-Asn-Met-Ala-Arg-Ala。我们用这 2 条多肽来研究 IRS1 的酪氨酸硝化和未硝化对其磷酸化的影响。在相同的实验条件下,在大鼠肝脏提取的 IR 中加入胰岛素刺激使之自磷酸化激活其激酶活性后,再分别加入到 2 条肽中使底物肽体外磷酸化<sup>[17]</sup>。因为 IR 激酶能催化 ATP 上的  $\gamma$  磷酸根转移到底物蛋白质或肽的酪氨酸残基的酚羟基上,用  $^{31}\text{P}$  NMR 谱检测多肽的磷酸化信号,发现未硝化

酪氨酸的多肽体系中,在大约 8.6 ppm 的位置出现了酪氨酸磷酸化的  $^{31}\text{P}$  NMR 的新共振峰(如图 4b),而含有硝基酪氨酸的多肽磷酸化的 NMR 图谱中未见此峰(如图 4a),说明含未硝化酪氨酸的多肽被磷酸化了,而含硝化酪氨酸的多肽没有被磷酸化。大约 8.6 ppm 的化学位移可归属于未修饰多肽上磷酸化的酪氨酸,这来自于 P-O 键核磁共振信号<sup>[11]</sup>,这个结果证明酪氨酸残基的硝化几乎完全抑制了它的磷酸化,提示酪氨酸硝化可能干扰磷酸化酪氨酸的胰岛素信号传导。



PY1: the peptide phosphorylated at tyrosine residues; PY: insulin receptor phosphorylated at tyrosine residues

图 4 在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  存在的条件下,用胰岛素刺激孵育了 40 min 之后,IR 底物的磷酸化  $^{31}\text{P}$  NMR 谱图:(a)具有硝化酪氨酸的多肽;(b)具有未硝化酪氨酸的多肽

Fig.4  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of the phosphorylation of IR substrates: (a) peptide with nitrated tyrosine (b) peptide with un-nitrated tyrosine after forty minute incubation with insulin stimulation in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

酪氨酸硝化常常是过氧亚硝酸根离子修饰的蛋白质酪氨酸残基的标志,一些研究者认为由于硝化羟基的  $\text{pK}_a$  值从游离态的 10 降低到 7.2,这种修饰增加了蛋白质的负电荷,因此,他们假设硝化在某种程度上可以模拟磷酸化,如果这种假设是正确的,硝化可能有重要的病理意义<sup>[19]</sup>。与酪氨酸比较,硝基酪氨酸中硝基形成分子内氢键决定了 ATP 作用方式的不同,分子内的氢键造成的空间位阻效应可能是影响磷酸根结合到羟基上的主要原因。Gow 等人<sup>[6]</sup>认为硝基酪氨酸是差的 IR 酪氨酸激酶的底物。的确,我们发现酪氨酸残基上酪氨酸邻位的硝化阻止其磷酸化,因此 IRS1 上酪氨酸硝化对磷酸化的抑制也许可以作为糖尿病的一个潜在的治疗靶点。

## 3 结 论

本文研究了糖尿病和硝化对 IR 和模拟 IRS1 多肽的酪氨酸磷酸化的影响,运用所建立的定量

$^{31}\text{P}$  NMR 法测定糖尿病条件下 IR 自磷酸化,发现 IR 自磷酸化水平明显下降。研究证实酪氨酸残基的硝化对 IR 自磷酸化的影响在体外是依赖过氧亚硝酸根离子浓度的。检测了模拟 IRS1 磷酸化基序合成多肽的酪氨酸磷酸化信号,实验证明模拟 IRS1 的硝化多肽中酪氨酸硝化完全抑制了酪氨酸磷酸化,上述糖尿病和硝化对酪氨酸磷酸化水平的影响最终可能会导致胰岛素信号传导变化,因此,本研究结果可以对磷酸化酪氨酸依赖的胰岛素信号传导和糖尿病的研究提供一些有价值的信息。

#### 参考文献:

- [1] Virkamäki A, Ueki K, Kahn C R. *J. Clin. Invest.*, **1999**,**103**: 931~943
- [2] White M F. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2002**,**283**: E413~E422
- [3] Mallozzi C, Di Stasi A M M, Minetti M. *FEBS Lett.*, **2001**, **503**:189~195
- [4] Mondoro T H, Shafer B C, Vostal J G. *Free Radical Bio. Med.*, **1997**,**22**:1055~1063
- [5] Low S Y, Sabetkar M, Bruckdofer K R, et al. *FEBS Lett.*, **2002**,**511**:59~64
- [6] Gow A J, Duran D, Malcolm S, et al. *FEBS Lett.*, **1996**,**385**: 63~66
- [7] Yan J X, Packer N H, Gooley A A, et al. *Journal of Chromatogr. A*, **1998**,**808**:23~41
- [8] Ge Y, Peng H, Huang K. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**,**385**: 834~839
- [9] Marshak D R, Kadonaga J T, Burgess R R, et al. *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1996**.
- [10] Luo X C, Zhao N M, Zhang R Q. *Tsinghua Sci. Technol.*, **2000**,**5**:443~445
- [11] Hirokazu H, Keitaro Y, Kazuhiro Y. *Brain Res. Protoc.*, **2000**,**5**:182~189
- [12] Wiedermann D, Schneider J, Fromme A, et al. *Magn. Reson. Mater. Phys.*, **2001**,**3**:118~126
- [13] ZHANG Zhen-Zhong(张振中), DU Ze-Han(杜泽涵). *Magnetic Resonance in Biological Medicine*(生物医学中的磁共振). Beijing: Science Press, **2003**.
- [14] Rojas F A, Hirata A E, Saad M J A. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2001**,**183**:63~69
- [15] Chi Q, Wang T L, Huang K X. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **2005**,**330**:791~796
- [16] Di Stasi A M M, Mallozzi C, Macchia G, et al. *J. Neurochem.*, **1999**,**73**:727~735
- [17] Ablooglu A J, Till J H, Kim K, et al. *J. Biol. Chem.*, **2000**, **275**:30394~30398
- [18] Kiss L, Szabó C. Mem I. *Oswaldo Cruz*, **2005**,**100**(Suppl.I): 29~37
- [19] Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi A M M. *Free Radical Bio. Med.*, **2002**,**33**:744~754