

- [8] Michael MZ, Sm OC, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(12): 882-891.
- [9] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNA-143 and -145 in colon cancer[J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(5): 311-320.
- [10] Ng EK, Tsang WP, Ng SS, et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2009, 101(4): 699-706.
- [11] Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microRNA processing by p53[J]. Nature, 2009, 460(7254): 529-533.
- [12] La Rocca G, Badin M, Shi B, et al. Mechanism of growth inhibition

by microRNA 145; the role of the IGF-I receptor signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2009, 20(2): 485-491.

- [13] Gregersen LH, Jacobsen AB, Frankel LB, et al. MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8836.
- [14] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(5): 903-906.
- [15] 童登武, 罗涛, 陈笃顺, 等. 58 例老年结直肠癌患者的围手术期处理分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(19): 1968-1970.

(收稿日期: 2010-05-05)

• 综 述 •

谷氨酸信号转导与胰岛素慢分泌调节机制研究进展

陈立强 综述, 李 涛, 周克元 审校
(广东医学院, 广东东莞 523808)

关键词: 糖尿病; 谷氨酸; 胰岛素; 体内分泌物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0357-03

糖尿病发病率高居各类慢性疾病之首, 死亡率继肿瘤和心脑血管疾病之后, 位列第 3。全世界糖尿病患者共有 1.6 亿, 中国就有 5 000 万, 已超过欧洲与美国的糖尿病患者总数。糖尿病的发病是由多因素相互作用形成的, 对糖尿病发病机制的不明确给临床治疗带来很大的困难^[1]。研究胰岛素分泌调节的精确机制有利于进一步了解糖尿病的发生过程。现主要对谷氨酸信号和胰岛素分泌调节的分子机制方面的最新研究进展进行综述。

1 胰岛素分泌的快分泌机制

高等哺乳动物体内响应于不同的血糖浓度变化而分泌胰岛素的机制主要有 2 个: 胰岛素快分泌主要是由 ATP 依赖性钾通道(KATP)产生激发信号的, KATP 关闭抑制了质膜的去极化; 随后, Ca^{2+} 电压门控通道开放, 大量 Ca^{2+} 内流导致胞质 Ca^{2+} 浓度升高, Ca^{2+} 浓度升高激发了胰岛素的分泌, 其作用时间较快(2~5 s), 快分泌使机体对血糖的升高及时并迅速作出反应。

2 胰岛素分泌的慢分泌机制

胰岛素快分泌的 Ca^{2+} 信号的产生不足以维持胰岛素的持续分泌, 故一定有 1 种存在于线粒体但不同于 ATP 的信号分子存在。有研究证明这种信号分子是谷氨酸, 葡萄糖进入胰岛 β 细胞后经过三羧酸循环生成谷氨酸, 谷氨酸激发了胰岛素的慢分泌。谷氨酸信号激发慢分泌作用较 KATP 晚 5~10 min, 但其作用时间较长, 可持续激发胰岛素释放。因此, 慢分泌在维持体内血糖的稳定发挥着更为重要的作用。

2.1 谷氨酸在胰岛素慢分泌中的作用 葡萄糖在胞质通过糖酵解作用生成丙酮酸, 丙酮酸进入线粒体参与三羧酸循环并生成 α -酮戊二酸, 在谷氨酸脱氢酶(glutamic acid dehydrogenase, GDH)的催化下, α -酮戊二酸生成谷氨酸, 谷氨酸为胰岛 β 细胞内信号分子, 通过谷氨酸转运体包裹转运, 谷氨酸信号分子与相应受体结合产生信号激发胰岛素的慢分泌。

谷氨酸通过信号的输出、输入和停止来调节胰岛素分泌^[2]。葡萄糖浓度提高使胰岛 β 细胞线粒体代谢加快, 代谢产

物谷氨酸含量提高, 谷氨酸利用囊泡膜谷氨酸转运体包裹转移并释放, 与谷氨酸受体结合产生激发信号, 引起胰岛素的慢分泌反应。在细胞膜通透性增加大鼠胰岛素瘤 INS-1 细胞中, 在保持胞质 Ca^{2+} 浓度一定的情况下, 谷氨酸可直接激发胰岛素的分泌, 而未经过线粒体的代谢调节; 也有研究表明, 谷氨酸在胞质高 Ca^{2+} 和 ATP 浓度的情况下增加了胰岛素的分泌; 而利用 H^{+} -ATP 酶或囊泡膜谷氨酸转运体(vesicular glutamate transporters, VGLUTs)的抑制剂对谷氨酸转运进行干扰时, 发现胰岛素的分泌被抑制^[3]。

谷氨酸在胰岛 β 细胞中作为信号分子的角色已经被证实, 但它在细胞内如何发挥作用目前还不明确。利用膜片钳技术对小鼠胰腺 β 细胞瘤细胞株 MIN6 进行研究, 发现谷氨酸通过抑制 KATP 引起胰岛素的释放^[4]; β 细胞具有丝/苏氨酸蛋白磷酸酶(protein serine/threonine phosphatases, PPase)活性, 蛋白磷酸酶是具有催化已经磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化反应的一类酶分子, 与蛋白激酶相对应存在, 共同构成了磷酸化和去磷酸化这一重要的蛋白质活性的开关系统, 在 β 细胞中主要是 PPase-1 和 PPase-2A; 利用福斯高林(血小板凝集抑制剂)或佛波酯等药物可直接激活蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 产生蛋白磷酸化作用引起胰岛素的分泌; 利用 PPase 抑制剂冈田酸可引起 Ca^{2+} 内流和胰岛素分泌; Lehtihel 等^[5]研究表明在糖代谢中生成的谷氨酸信号分子是通过抑制 PPase 的活性, 从而抑制了 PPase 的去磷酸化作用激发胰岛素的分泌, 所以谷氨酸的信号转导在胰岛维持机体血糖平衡中发挥了重要作用^[6]。

2.2 GDH 在胰岛素慢分泌中的作用 谷氨酸是由 GDH 催化生成的, GDH 由 GLUD1 基因编码, 在线粒体中以六聚体形式存在。GDH 在脑组织星形胶质细胞中高表达, 用于清除和代谢神经组织释放的谷氨酸, 肝脏和肾脏的 GDH 在氨代谢和解毒作用中也发挥了重要作用; 在胰岛 β 细胞中, GDH 是引起胰岛素分泌的关键酶, 其作用是催化生成信号分子谷氨酸, 从而激发胰岛素的分泌^[7]。

GDH 在糖酵解、谷氨酸和谷氨酰胺代谢以及氨基酸诱导

胰岛素分泌中都起着关键作用。在胰岛 β 细胞线粒体代谢过程中, GDH 催化产生谷氨酸, 谷氨酸作为细胞内的信号分子通过相应的通路激发胰岛素的分泌, 故 GDH 催化能力的强弱决定了谷氨酸生成的多少, 从而影响了胰岛素分泌; 通过抑制胰岛 β 细胞 GDH 的活性或利用敲除了 β 细胞特异 GDH 的转基因小鼠 $\beta\text{Glut1}^{-/-}$ 作为动物模型进行研究^[8], 结果发现 GDH 被抑制或缺失都会导致胰岛素的分泌减少^[9-10]。

GDH 催化活性是由变构激活剂和变构抑制剂的相互作用决定的, 亮氨酸和 ADP 等对 GDH 产生变构激活作用而三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 是变构抑制剂, 这些因素都可以通过调节 GDH 的催化活性调节胰岛素分泌, 从而维持机体血糖平衡^[11]。在高胰岛素血症/高血氨症的形成机制研究中发现, 患者体内胰岛素分泌过多以致造成高胰岛素血症, 主要是由于 GTP 对 GDH 的变构抑制作用缺失, GDH 在变构激活剂的作用下活性大大增强, 胰岛素分泌不断增加从而形成机体高胰岛素状态^[12]。进一步研究表明, GTP 的变构抑制作用是在 GDH 的催化反应过程中, 通过增加 GDH 和生成产物的亲和力而减慢酶的催化作用, 生成产物谷氨酸的减少导致胰岛素分泌下降, GDH 在生成谷氨酸信号分子激发胰岛素慢分泌过程和维持机体血糖平衡中都发挥着很重要的作用; 因此, 研究 GDH 对深入了解低糖血症、高胰岛素血症/高血氨症和糖尿病的发病机制都很有帮助, 而且对临床糖尿病的治疗有很好的指导作用。

2.3 谷氨酸转运体在胰岛素慢分泌中的作用 葡萄糖进入胰岛 β 细胞后经过线粒体的三羧酸循环生成谷氨酸, 谷氨酸激发了胰岛素的慢分泌; 然而, 谷氨酸要产生激发信号就必须完成细胞内信号转导或与谷氨酸受体结合。在 β 细胞内谷氨酸的转运主要由 2 种谷氨酸转运系统完成, 分别是天冬氨酸-谷氨酸交换系统和谷氨酸转运系统。这 2 种转运系统属于线粒体溶质转运蛋白家族 (SLC25), 该蛋白家族属于膜镶嵌蛋白, 主要负责线粒体溶质分子的跨膜转运; 人类基因组 SLC25 家族包括 48 个成员, 但只对其中的 30 种有所了解, 因此, 对 SLC25 的深入研究有利于了解线粒体溶质分子的转运过程或信号产生的生理机制。天冬氨酸-谷氨酸交换系统和谷氨酸转运系统都属于线粒体的谷氨酸转运系统, 胰岛 β 细胞线粒体谷氨酸转运系统是谷氨酸信号体系的 1 个很重要的组成部分, 谷氨酸转运到胞质激发胰岛素的慢分泌作用, 故对谷氨酸转运系统的研究有利于了解谷氨酸的信号转导过程^[13]。

最近研究发现线粒体谷氨酸转运体 1 (glutamate carrier 1, GC1) 在葡萄糖诱导胰岛素分泌中发挥了重要作用。在 β 细胞线粒体中存在 2 种谷氨酸转运体 (GC1 和 GC2), 分别由 SLC25A22 和 SLC25A18 基因编码, 促进线粒体内膜谷氨酸的转运。实验证明 GC1 在 INS-1E β 细胞和大鼠胰岛细胞内 mRNA 和蛋白水平均有表达; 而且由腺病毒介导的短发夹 RNA 对 GC1 干扰, 发现 INS-1E 分泌胰岛素的能力大大降低, 故表明 GC1 在葡萄糖诱导胰岛素分泌和维持 β 细胞对葡萄糖的最大反应性方面都发挥着重要作用^[14]。

2.4 VGLUTs 在胰岛素慢分泌中的作用 谷氨酸释放前储存在囊泡内, 当细胞受到刺激信号时, 谷氨酸会以 ATP 依赖的方式包装入 VGLUTs 进行转运。VGLUTs 分为 VGLUT1~3 3 种^[2]; 而在胰岛 β 细胞中主要表达 VGLUT2, Li 等^[15] 在研究克隆 VGLUT2 在胰岛 β 细胞表达中找到 VGLUT2 的启动子, 深入研究表明, 谷氨酸积累产生的势能是胰岛素分泌囊泡向细胞膜移动和释放的主要能量来源, VGLUTs 转运谷氨酸是胰

岛素转移和释放的限速步骤, 故 VGLUTs 的表达对胰岛素分泌有很重要的影响。在谷氨酸转运和细胞信号发生的过程中, VGLUTs 都发挥了很重要的作用。

2.5 线粒体在胰岛素慢分泌中的作用 线粒体是胰岛素分泌调节的指挥中心, 胰岛素的快分泌和慢分泌都是由线粒体的代谢分子信号操控的。葡萄糖、核苷酸和营养物质等在胰岛 β 细胞线粒体中经过三羧酸循环产生相应的代谢分子 (例如 ATP、亮氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺等) 与细胞内 KATP、胞质 Ca^{2+} 通道、谷氨酸信号系统等协同完成胰岛素分泌过程; 因此, 线粒体对胰岛素分泌的调节是通过多种调节因子和多种代谢通路的综合作用完成的, 这也是糖尿病发病机制复杂的原因之一^[7]。

胰岛素慢分泌主要是由线粒体代谢产物谷氨酸激发的, 谷氨酸作为细胞内的信号分子激发胰岛素的持续分泌, 在维持机体正常血糖水平过程中发挥更重要的作用; 线粒体缺陷会使细胞内能量代谢失衡, 代谢产物减少而严重影响胰岛素分泌, 故临床上已将线粒体作为治疗靶点, 为糖尿病对症治疗提供有力的证据; 线粒体代谢因子的生成和转导通路的深入研究也有利于探讨胰岛素分泌机制以及糖尿病的发病机制^[16]。

3 展望

胰岛 β 细胞分泌胰岛素是维持机体血糖平衡的重要因素, 研究胰岛素分泌调节有利于进一步了解糖尿病的发病机制和过程, 对临床上糖尿病的治疗也有很大的帮助。在胰岛 β 细胞分泌胰岛素机制中谷氨酸都产生了重要的信号转导和调节作用, 谷氨酸的调节作用可能与糖尿病和胰岛素的分泌有着很重要的关系; 故对谷氨酸信号转导机制的研究可能有利于深入了解糖尿病的发病机制和提高临床治疗效果。总之, 目前对谷氨酸在胰岛素慢分泌的信号作用有一定的认识, 然而还没有对其复杂的调节机制有更为深入的了解; 还需要进一步深入研究和阐述谷氨酸在胰岛素慢分泌中的分子机制。这些研究将提供更多的有关谷氨酸作用于胰岛素慢分泌的认识, 为发现新的治疗糖尿病的方法提供依据。

参考文献

- [1] 李颖, 刘东方. 早相胰岛素分泌缺陷在 2 型糖尿病发病机制中的作用[J]. 重庆医学, 2007, 36(3): 280-282.
- [2] Li T, Ghishan FK, Bai L, et al. Molecular physiology of vesicular glutamate transporters in the digestive system[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(12): 1731-1736.
- [3] Eto K, Yamashita T, Hirose K, et al. Glucose metabolism and glutamate analog acutely alkalinize pH of insulin secretory vesicles of pancreatic beta-cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(2): E262-271.
- [4] Katsuta H, Ozawa S, Ninomiya T, et al. Insulinotropic action of glutamate is dependent on the inhibition of ATP-sensitive potassium channel activities in MIN 6 beta cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(3): 660-664.
- [5] Lehtihet M, Honkanen RE, Sjöholm A, et al. Glutamate inhibits protein phosphatases and promotes insulin exocytosis in pancreatic beta-cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(2): 601-607.
- [6] Moriyama Y, Hayashi M. Glutamate-mediated signaling in the islets of Langerhans: a thread entangled[J]. Trends Pharmacol Sci, 2003, 24(10): 511-517.
- [7] Maechler P, Carobbio S, Rubi B, et al. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(5/6): 696-709.

- [8] Carobbio S, Frigerio F, Rubi B, et al. Deletion of glutamate dehydrogenase in beta-cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(2):921-929.
- [9] Yang SJ, Huh JW, Kim MJ, et al. Regulatory effects of 5'-deoxy-pyridoxal on glutamate dehydrogenase activity and insulin secretion in pancreatic islets[J]. Biochimie, 2003, 85(6):581-586.
- [10] Frigerio F, Casimir M, Carobbio S, et al. Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 2008, 1777(7-8):965-972.
- [11] Smith TJ, Stanley CA. Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare[J]. Trends Biochem Sci, 2008, 33(11):557-564.
- [12] Li M, Smith CJ, Walker MT, et al. Novel inhibitors complexed with glutamate dehydrogenase: allosteric regulation by control of protein dynamics[J]. J Biol Chem, 2009, 284(34):22988-23000.
- [13] Frigerio F, Casimir M, Carobbio S, et al. Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis[J]. Biochimica Biophysica Acta (BBA), 2008, 1777(7/8):965-972.
- [14] Casimir M, Lasorsa FM, Rubi B, et al. Mitochondrial glutamate carrier GC1 as a newly identified player in the control of glucose-stimulated insulin secretion[J]. J Biol Chem, 2009, 284(37):25004-25014.
- [15] Li T, Bai L, Li J, et al. Spl is required for glucose-induced transcriptional regulation of mouse vesicular glutamate transporter 2 gene[J]. Gastroenterology, 2008, 34(7):1994-2003.
- [16] Liu S, Okada T, Assmann A, et al. Insulin signaling regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells[J]. PLoS One, 2009, 4(11):7983.

(收稿日期:2010-03-05)

• 综 述 •

结直肠癌的实验室诊断:从筛查到预后

陈慧娟 综述, 李洪波 审校

(广东省广州市金域医学检验中心 510330)

关键词:结直肠肿瘤; 筛查; 诊断; 鉴别; 治疗结果; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0359-03

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是较常见的恶性肿瘤之一,位居中国常见恶性肿瘤的第4位^[1]。约有75%的CRC患者为散发性CRC,主要是由环境、饮食和年龄等因素所引起,另外25%为家族或遗传性CRC,其致病原因尚未完全清楚。遗传性CRC包括遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)和家族性结直肠息肉综合征(familial adenomatous polyposis, FAP)、MYH基因相关肿瘤、家族性黏膜皮肤色素沉着胃肠道息肉病(Peutz-Jeghers综合征)和幼年性息肉病(juvenile polyposis Syndrome, JPS),该类CRC的遗传学特征较清晰。确定CRC的类型对患者及其家族成员的筛查和后续跟踪具有很大的指示作用。本文介绍了从CRC筛查、诊断、治疗到预后实验室所能提供的检测,现综述如下。

1 结直肠癌的筛查

美国癌症协会推荐具有平均发病危险的个体从50岁起应根据自身状况定期进行1个或几个筛查,同时美国胃肠病学协会推荐具有高发危险的个体应更早进行筛查并增加筛查的频率。在所有的筛查项目中,粪便隐血试验(fecal occult blood test, FOBT)和粪便免疫化学试验(fecal immunochemical test, FIT)是没有侵入性的检测。FOBT可以确诊癌前息肉,通过手术切除可降低CRC的发病率和其相关的致死率,可屈性乙状结肠镜检查也可降低CRC的致死率,两者相结合可极大地提高筛查效率。双重对比钡剂灌肠法较少使用,可检查整个结肠的状态但对息肉确诊的敏感性较差。目前临检实验室所提供的筛查项目主要为FIT和FOBT,早在2003年美国癌症协会的CRC便血检测项目指南已包括了FIT, FIT检测较FOBT检测具有一些优势。传统的以愈创木脂为试剂的FOBTs会因患者食用红肉、一些天然水果、未烹饪的蔬菜、非甾体类抗炎药

和阿司匹林等而呈假阳性,因患者维生素C摄入量大于250 mg/d而呈假阴性,因此FOBT在采样前需要对患者进行饮食和用药的限制,而FITs如InSure[®]因其具有较高的特异性而不需要在采样前对患者进行饮食和用药的限制。InSure[®]对结肠和直肠的隐出血具有较高的特异性,一项比较InSure[®]和以愈创木脂为试剂的FOBT的临床研究发现^[2], InSure[®]较FOBT具有较高真阳性率,早期CRC(92.3% vs 30.8%, $n=13$),所有分期CRC(87.5% vs 54.2%, $n=24$),腺癌(42.6% vs 23%, $n=61$)。FOBT或FIT的阳性结果一般反映了粪便中存在出血且该出血或许与CRC有关,若FOBT或FIT结果阳性应进行结肠镜检查。粪便中血液分布不均或间歇性的出血可能导致假阴性结果,因此阴性结果不能排除CRC可能。

2 结直肠癌的鉴别诊断

CRC患者没有特异的发病特征(如体质量减轻、腹部疼痛、排出黏液或结肠出血)甚至没有症状,因此CRC的诊断主要为结肠镜检查和怀疑病变组织的病理检查。一旦CRC被确诊,确定其是否为遗传性将显得至关重要。若诊断为HNPCC或家族成员中有与HNPCC相关的突变,将需要加强监控。

2.1 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)

HNPCC的诊断应从MSI检测开始进行,符合任一Bethesda标准的CRC患者均应进行MSI检测。一项基于1222例CRC患者的研究显示, Bethesda标准与MSI相结合能极大地提高确定患者进行MMR突变检测的准确率,两者相结合确定患者进行MLH1或MSH2突变检测的灵敏度为81.8%,特异性为98%,精确度为97.9%,两者结合能降低患者的检测费用^[3]。MSI检测的结果报告为高频率微卫星不稳定性(MSI-H),低频率微卫星不稳定性(MSI-L)和微卫星稳定(MSS),若在美国国家癌症研究所推荐的5个稳定标记物中有大于2个标记物显