

situ labeling, PRINS) 技术同时检测 FNRBC 的 X 和 Y 染色体, 发现能可靠和有效地检测胎儿性别, 且特异性与荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术相似。

2.2 胎儿血型的检测 胎儿 Rh 血型检测对于预防因 Rh 血型不合而引起的新生儿溶血病非常有意义, 当 Rh 血型阴性的孕妇血液中存在 Rh 血型抗体时, 通过检测胎儿的 Rh 血型, 可以预知其是否会发生因 Rh 血型不合而引起的新生儿溶血病, 从而可以采取相应的防治措施。Simone 等^[8]直接利用流式细胞仪检测 FNRBC 的 RhD 血型, 其同时利用 CD71、GPA 和 RhD 血型 3 种单克隆抗体标记 FNRBC, 发现此方法与逆转录 PCR 法有很好的相关性, 并且有可能作为未来临床应用的一个发展方向。此外, ABO 血型基因变异时有发生, 已逐步引起重视, 利用 FNRBC 也可用于该方面的研究。

2.3 单基因遗传病的诊断 单基因遗传病种类很多, 常见的有珠蛋白生成障碍性贫血、甲型血友病等, 他们都是由某一对 (或个) 等位基因存在异常而引起。利用从孕妇外周血中分离的 FNRBC, 可用于诊断此类疾病。D'Souza 等^[3]利用 FNRBC 检测 β -珠蛋白生成障碍性贫血, 并以绒毛膜取样或脐血穿刺结果为参照, 此法的准确率为 80%。

2.4 胎儿染色体异常的诊断 利用 FNRBC 检测染色体异常, 目前主要利用 FISH 技术, Mavrou 等^[9]通过计数分离得到的 FNRBC 数量来作为检测胎儿染色体异常的一个补充指标。

2.5 病理产科相关的检测 有关胎儿有核细胞与产科病理过程的相关性研究是近年来的一大研究热点, FNRBC 及其成分在数量上的改变可用来预测产科的病理过程, 目前常用于先兆子痫、胎儿生长受限、囊性纤维病等方面的研究。Aali 等^[10]通过分析孕妇外周血和脐带血中分离的 FNRBC 数量来研究其与先兆子痫的关系, 发现母血和脐带血中的 FNRBC 数量与先兆子痫具有明显相关性, 并且其数量的增高可能与胎盘供血不足有关。

3 展 望

综上所述, 从孕妇外周血中分离胎儿有核细胞的方法众多, 且取得了一定的进展, 但这些方法尚存在, 操作相对复杂、费时费力等不足, 有些方法虽然相对简便, 但分离效率却不高。因此, 在今后的研究中, 特别是在分离方法上, 尚需寻找一些操作简便、快捷且分离效率相对较高的方法。相信随着分子生物学、免疫化学等技术的不断进步和更多胎儿细胞特异性抗原的发现, 将能够从孕妇外周血中有效地分离出胎儿细胞用于临床

• 综 述 •

产前诊断, 真正实现产前诊断的无创性。

参考文献

- [1] Huang R, Barber TA, Schmidt MA, et al. A microfluidics approach for the isolation of nucleated red blood cells (NRBCs) from the peripheral blood of pregnant women[J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28(28):892-899.
- [2] Daniel L, Ponnusamy S, Aniza M, et al. Separation of model mixtures of epsilon-globin positive fetal nucleated red blood cells and anucleate erythrocytes using a microfluidic device[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 64(71):1862-1866.
- [3] D'Souza E, Sawant PM, Nadkarni AH, et al. Evaluation of the use of monoclonal antibodies and nested PCR for noninvasive prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in India[J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 130(86):202-209.
- [4] Kwon KH, Jeon YJ, Hwang HS, et al. A high yield of fetal nucleated red blood cells isolated using optimal osmolality and a double-density gradient system[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(19):1245-1250.
- [5] Babochkina T, Mergenthaler S, Lapaire O, et al. Evaluation of a soybean lectin-based method for the enrichment of erythroblasts[J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(22):329-330.
- [6] Nagy GR, Bán Z, Sipos F, et al. Isolation of epsilon-haemoglobin-chain positive fetal cells with micromanipulation for prenatal diagnosis[J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25(14):398-402.
- [7] Krabchi K, Gadjji M, Yan J, et al. Dual-color PRINS for in situ detection of fetal cells in maternal blood[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 334(14):141-149.
- [8] Simone N, Lai M, Rumi C, et al. Non-invasive detection of fetal rhesus D status: a comparison between polymerase chain reaction and flow cytometry[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2006, 21(12):404-409.
- [9] Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis A, et al. Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: a second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(8):150-153.
- [10] Aali BS, Malekpour R, Sedig F, et al. Comparison of maternal and cord blood nucleated red blood cell count between pre-eclamptic and healthy women[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2007, 33(11):274-278.

(收稿日期: 2011-01-04)

CKS2 蛋白及其在恶性肿瘤中的研究进展

王佳佳 综述, 张忠英[△] 审校

(福建医科大学教学医院/厦门大学附属中山医院临床检验中心 361004)

关键词: 细胞周期; 肿瘤; 研究; CKS2 蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)06-0670-04

周期蛋白依赖性激酶亚基 CKS(cyclin-dependent kinase subunit)家族广泛存在于真核生物, 它由一组相对分子质量为 $(9 \sim 18) \times 10^3$ 的小蛋白构成, 对细胞分裂周期的调节起重要

作用。人类细胞中存在两种 CKS(又称 CKSHS)蛋白, 分别为 CKS1(cyclin-dependent kinase subunit 1)和 CKS2(cyclin-dependent kinase subunit 2)。其中 CKS2 已被观察到在多种恶

[△] 通讯作者, E-mail: zhangzy1121@yahoo.com.cn.

性肿瘤中异常表达,与肿瘤的发生、发展关系密切,因此对 CKS2 进行深入的研究具有十分重要的意义。现就 CKS2 的生物学特征及其与恶性肿瘤关系的研究进展综述如下。

1 cks2 的分子生物学特征和功能

1.1 cks2 的基因定位与蛋白结构特点 编码 cks2 的 cks2 基因位于人类染色体 9q22 上。Richardson 等^[1]首次在人类细胞中克隆得到 cks 基因。他们发现最大的 cks2 克隆片段含有一个 612 bp 的插入序列和开放性读码框(ORF),在 poly(A)段之前还包括一个 280 bp 的 3'-非翻译区。DNA 序列分析显示人类 CKS2 与 CKS1 非常相似,他们所编码的蛋白质具有 81% 的氨基酸同源性,但是他们执行不同的功能。

CKS2 蛋白由 79 个氨基酸残基组成,相对分子质量较小,约为 9×10^3 。和人类 CKS1 蛋白的单体结构不同的是,CKS2 是由 3 个连锁二聚体均匀组成的六聚物。它所包含的 12 链 β 折叠是该蛋白结构的显著特点。在 CKS2 六聚物中,各二聚体亚基之间形成了罕见的 β 链交换。这些 β 链交换区域位于羧基端,可能是 CKS2 发挥其生物学功能的结构基础。

1.2 CKS2 是生殖细胞减数分裂中后期转换的必需条件

CKS2 在细胞减数分裂过程中具有非常重要的作用,是生殖细胞从减数第一次分裂中期进入减数第一次分裂后期的必要条件。Demetrick 等^[2]通过靶向敲除技术造成小鼠 cks2 基因缺失。结果发现在 CKS2^{-/-} 雄性小鼠中,生精上皮的一系列活动消失,初级精母细胞在减数第一次分裂中期停止发育。与同种野生型小鼠相比较,成年雄性 CKS2^{-/-} 小鼠的睾丸出现高度的细胞凋亡,这提示初级精母细胞不能发育成熟而丧失活力,最后通过细胞凋亡途径被清除。类似的结果在 CKS2^{-/-} 雌性小鼠中也被观察到,其卵母细胞的发育也同样停止在减数第一次分裂中期阶段。而在 CKS1^{-/-} 的小鼠中,cks2 可以补偿由于 cks1 敲除而缺失的部分功能。

研究还发现,在 CKS2^{-/-} 小鼠的精母/卵母细胞中所有的减数分裂前期事件均为正常。所以发生于 CKS2^{-/-} 小鼠精母/卵母细胞的减数第一次分裂中期发育活动停止,更可能的原因是缺乏进入减数第一次分裂后期的能力。此外,因生殖细胞发育失败而造成 CKS2^{-/-} 小鼠的不育、不孕,可能是由于 CKS1 和 CKS2 蛋白表达同时缺失而引起的。

1.3 CKS2 在体细胞增殖、分化和胚胎发育中的作用 为了分析人类 CKS 蛋白与细胞增殖、分化间的关系,Arvai 等^[3]对 CKS1 和 CKS2 在人类正常及恶性淋巴细胞中的表达进行研究,观察到健康者外周血淋巴细胞受到 PHA 刺激后,CKS2 mRNA 和蛋白表达均增加。同时他们还对急性淋巴细胞白血病患者的恶性淋巴细胞进行检测,发现他们的 CKS1 和 CKS2 mRNA 在细胞周期中表达水平的改变相似,且与细胞增殖情况有着显著的关联。

此外,Parse 等^[4]的一项研究显示,同时敲除 cks1 和 cks2 基因可以造成胚胎细胞在仅经历 2~4 个分裂周期之后的桑葚胚期或更早死亡。在小鼠胚胎的成纤维细胞(MEFs)和 HeLa 细胞中,RNAi 介导的 cks1/2 基因沉默能够促使细胞增殖活动的停止。这种现象可能是因为分别破坏了编码细胞周期蛋白 B1、细胞周期蛋白 A2 和 CDK1 的 ccnb1、ccna2 和 cdk1 基因的转录,从而使细胞周期停滞在 G₂ 期。因此提示 CKS2 在早期胚胎的发育和体细胞分裂过程中具有极其重要的作用。

2 CKS2 的影响因子

2.1 CKS2 与 CDK 的相互作用关系 CDK(cyclin-dependent kinase)是一种存在于真核生物的蛋白激酶,它需要与另外一些相关蛋白结合,以此来执行对细胞周期的调控。CKS1/2 是这些相关蛋白中非常重要的一类。Richardson 等^[1]的研究结果已经证明,人类 CKS1 和 CKS2 蛋白在体外均可与 CDC2/CDC28 蛋白激酶(酵母 CDK)结合。随着 CKS2 晶体结构的发现,他们认为 CKS2 与 CDK 的结合是其发挥生物学功能的必要条件,并预测 CKS2 可能在体内 CDK 多聚化的活动中扮演了一个核心角色而参与对细胞周期的调控。有学者在对恶性淋巴瘤的体外实验研究中观察到,磷酸化的 CDK1 和 CDK2 更易于与人类 CKS1/2 蛋白结合。

2.2 Glu63 和 Gln63 的重要意义 Glu63 是位于 CKS2 蛋白羧基端 β 链交换区域的氨基酸。Spruck 等^[5]利用定向诱变技术,使人类 CKS2 蛋白 β 链上的 Glu63 发生氨基酸置换,成为 Gln63 代替 Glu63 的突变体(E63Q)。该突变的发生没有影响 CKS2 的蛋白结构,它的空间构象和多聚化组成并没有因此而发生改变,而是表现为 CKS2 蛋白的基本生物学功能的丧失。在体外实验中 E63Q 与人类 Cdk1 和 Cdk2 的结合能力显著降低,分别仅为野生型 CKS2 蛋白的 4% 和 8%。因此,E63Q 的生物学功能丧失可能与它和 Cdk 的结合能力降低有关。

2.3 p53 对 Cks2 的调节 Urbanowicz-kachnowicz 等^[6]研究发现 cks2 作为肿瘤抑制基因 p53 的下调靶点,cks2 的表达受 p53 抑制,这种抑制作用不仅表现在 mRNA 水平,还表现在蛋白质水平。他们的研究观察到增加 p53 的表达量之后 cks2 mRNA 的表达即被下调。p53 下调转录是通过 cks2 启动子发挥调节作用的,增加野生型 p53 可导致 cks2 启动子的下调;相反,突变型 p53 的表达对 cks2 启动子几乎没有影响。此外,在不同的细胞系中都能得出相似的实验结果。类似的结果在 CKS2 蛋白水平也被证实。作为 p53 的同系物,p63 和 p73 则不具有抑制 cks2 转录的效应。研究结果提示,p53 很有可能通过下调 cks2 的表达水平来影响哺乳动物生殖细胞减数第一次分裂中期到后期的转换。

3 CKS2 蛋白与恶性肿瘤

3.1 CKS2 在前列腺癌中的表达及其可能的致癌机制 Martinsson-Ahleén 等^[7]对非雄性激素依赖型前列腺癌的研究表明,CKS2 在肿瘤中出现过度表达,实验已经观察到 CKS2 的过度表达与前列腺癌的增殖与侵袭力密切相关。Watson 等^[8]的研究也发现 CKS2 在前列腺癌中具有过高的表达水平。他们还通过转染等技术,使良性的前列腺上皮瘤细胞表达 CKS1 和 CKS2,发现其细胞增长活动得到促进。减少 CKS1 在恶性前列腺癌中的表达,可以抑制其肿瘤细胞的增殖、生长、转移等;而减少 CKS2 的表达,则能诱发其细胞程序性死亡以抑制肿瘤细胞的恶性增殖。他们的研究结果揭示了 CKS1 和 CKS2 可能的不同致癌机制,即 CKS1 是通过促进细胞增长的方式来实现其致癌性;CKS2 则是通过抑制细胞的凋亡途径来实现。

3.2 CKS2 在原发性肝细胞癌中的表达和临床意义 Rother 等^[9]采用 RT-PCR、免疫组化和蛋白印迹分析等技术检测 CKS1 和 CKS2 在 mRNA 和蛋白水平的表达。研究结果表明在原发性肝细胞癌中 CKS1 和 CKS2 在 mRNA 和蛋白表达水平均比配对癌旁组织(肝炎组织和肝硬化组织)和正常肝脏组织高,且与肿瘤的病理分级、淋巴结转移及结节个数等临床病理指标相关。原发性肝细胞癌中 CKS1 和 CKS2 的过度表达

均与 P27kip1 在蛋白水平呈负相关,他们认为异常的 CKS1 和 CKS2 表达可能通过 P27kip1 蛋白参与原发性肝癌的发生、发展,他们可作为原发性肝细胞癌恶性程度判断的潜在指标,也有望为原发性肝细胞癌治疗新的靶点。

3.3 CKS2 表达上调可增加胃癌中的细胞增殖率 Stanbro-ugh 等^[10]采用基因芯片技术分析在配对的患者癌组织和癌旁组织中的 CKS2 mRNA 转录水平,发现 CKS2 在癌组织中大约是正常组织的两倍;采用 RT-PCR 方法分析来自胃癌患者的 10 对组织样本,发现在癌组织中 CKS2 mRNA 是正常组织中的 6 倍,且在癌组织中 CKS2 的增高强于 CKS1。同时他们运用免疫组化、临床病理学方法分析胃癌组织中 CKS2 蛋白的表达,观察到高水平的 CKS2 表达约占 53%,CKS2 蛋白主要分布在细胞核区,部分分布在细胞质中。且 CKS2 蛋白表达的强弱与肿瘤的组织学类型、肿瘤的大小、淋巴结转移和 TNM 分期存在关联性。并发现在 CKS2 过度表达的细胞中,肿瘤抑制基因 p53 和 p21cip1 的表达下调、细胞的增殖率提高;而通过 CKS2-siRNA 转染的细胞则表现为肿瘤抑制基因 p53 表达增加,细胞增殖迟缓。

3.4 CKS2 对子宫颈肿瘤细胞生物学行为的调节 Lan 等^[11]采用基因芯片技术对 29 例香港地区女性子宫颈鳞状细胞癌的研究发现,cks2 基因在肿瘤细胞中与正常细胞中存在差异表达。Shen 等^[12]对晚期局部型的子宫颈癌识别与转移的相关基因进行研究,观察这些基因表达的增加或降低对转录调控的影响作用。实验观察到 CKS2 的表达与肿瘤细胞的增殖速度、氧化磷酸化水平、侵袭能力、肿瘤的大小联系紧密。他们认为 CKS2 的表达水平可能影响子宫颈癌的发生和发展。

3.5 CKS2 在膀胱癌中的显著上调 kang 等^[13]在采用微阵列和 RT-PCR 技术对 21 例膀胱癌组织(其中 10 例浅表型、11 例浸润型)和 4 例正常膀胱组织的研究中发现,cks2 是其中一个显著上调的基因。这个差异不仅表现在膀胱癌与正常膀胱组织之间,同时也表现在浸润型膀胱癌和浅表型膀胱癌的比较中。cks2 在浸润型膀胱癌中的上调水平明显高于后者。此结果提示 cks2 的表达与膀胱癌的进展过程密切相关。他们认为,cks2 很可能成为膀胱癌诊断、分期的生物标志。

3.6 CKS2 在结直肠肿瘤中的高表达 Wong 等^[14]采用微阵列分析方法,对浸润性结直肠肿瘤细胞的基因标记进行研究鉴定,发现 cks2 在浸润性结直肠肿瘤的肿瘤细胞中具有较高的表达水平。Lyng 等^[15]也通过对结直肠肿瘤肝转移的研究发现,cks2 基因的表达上调与肿瘤转移关系密切。

除此之外,CKS2 蛋白在乳腺癌、脑膜瘤等恶性肿瘤组织中的异常表达均有报道,但暂无深入的研究结果^[16-17]。

4 展 望

CKS2 蛋白作为一种新型的肿瘤标志物正引起越来越多研究者的兴趣,在多种恶性肿瘤组织中发现的 CKS2 异常表达,提示 CKS2 与肿瘤的发生、生长、转移等生物学行为关系密切^[18-20]。一些学者已经对 CKS2 与肿瘤的关系作出了较为深入的研究,这些研究旨在探明 CKS2 在肿瘤中所扮演的具体角色,希望以此为突破,从而找出攻克肿瘤的新途径。但有关其生物学功能研究还不够充分,特别是它在细胞分裂周期中的具体功能和调控机制至今仍不明确。研究 CKS2 与肿瘤的关系,还有赖于 CKS2 生物学功能的不断明晰,相信随着相关实验研究的深入,CKS2 蛋白能为肿瘤的临床诊断治疗带来新的

前景。

参考文献

- [1] Richardson HE, Stueland CS, Thomas J, et al. Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Genes Dev*, 1990, 4(8):1332-1344.
- [2] Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the human genes CKS1 to 8q21 and CKS2 to 9q22 [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 73(3):250-254.
- [3] Arvai AS, Bourne Y, Hickey MJ, et al. Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain [J]. *J Mol Biol*, 1995, 249(5):835-842.
- [4] Parge HE, Arvai AS, Murtari DJ, et al. Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control [J]. *Science*, 1993, 262(5132):387-395.
- [5] Spruck CH, de Miguel MP, Smith AP, et al. Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis [J]. *Science*, 2003, 300(5619):647-650.
- [6] Urbanowicz-Kachnowicz I, Baghdassarian N, Nakache C, et al. CksHs expression is linked to cell proliferation in normal and malignant human lymphoid cells [J]. *Int J Cancer*, 1999, 82(1):98-104.
- [7] Martinsson-Ahlzén HS, Liberal V, Grünfelder B, et al. Cyclin-dependent kinase associated proteins Cks1 and Cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(18):5698-5709.
- [8] Watson MH, Bourne Y, Arvai AS, et al. A mutation in the human cyclin-dependent kinase interacting protein, CksHs2, interferes with cyclin-dependent kinase binding and biological function, but preserves protein structure and assembly [J]. *J Mol Biol*, 1996, 261(5):646-657.
- [9] Rother K, Dengl M, Lorenz J, et al. Gene expression of cyclin-dependent kinase subunit Cks2 is repressed by the tumor suppressor p53 but not by the related proteins p63 or p73 [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(6):1166-1172.
- [10] Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, et al. Increased expressions of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5):2815-2825.
- [11] Lan Y, Zhang Y, Wang J, et al. Aberrant expression of Cks1 and Cks2 contributes to prostate tumorigenesis by promoting proliferation and inhibiting programmed cell death [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(3):543-551.
- [12] Shen DY, Fang ZX, You P, et al. Clinical significance and expression of cyclin kinase subunits 1 and 2 in hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2010, 30(1):119-125.
- [13] Kang MA, Kim JT, Kim JH, et al. Upregulation of the cyclin kinase subunit CKS2 increases cell proliferation rate in gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(6):761-9.
- [14] Wong YF, Cheung TH, Tsao GS, et al. Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(10):2461-2469.
- [15] Lyng H, Brvig RS, Svendsrud DH, et al. Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7:268.
- [16] Kawakami K, Enokida H, Tachiwada T, et al. Identification of dif-

- ferentially expressed genes in human bladder cancer though genome-wide gene expression profiling[J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(3): 521-531.
- [17] Wiese AH, Auer J, Lassmann S, et al. Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells[J]. *Cancer Detect Prev*, 2007, 31(4): 282-295.
- [18] Lin HM, Chatterjee A, Lin YH, et al. Genome wide expression profiling identifies genes associated with colorectal liver metastasis[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(6): 1541-1549.
- [19] Miller WR. Clinical, pathological, proliferative and molecular responses associated with neoadjuvant aromatase inhibitor treatment in breast cancer[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 118(4-5): 273-276.

- [20] Fèvre-Montange M, Champier J, Durand A, et al. Microarray gene expression profiling in meningiomas: differential expression according to grade or histopathological subtype[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(6): 1395-1407.
- [21] Chow LS, Lam CW, Chan SY, et al. Identification of RASSF1A modulated genes in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncogene*, 2006, 25(2): 310-316.
- [22] de Wit NJ, Rijntjes J, Diepstra JH, et al. Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(12): 2249-2261.

(收稿日期: 2011-02-01)

• 综 述 •

糖基化终末产物与糖尿病慢性并发症的研究

邢晓光¹综述, 王金良²审校

(1. 天津港口医院 300456; 2. 天津市公安医院 300000)

关键词: 糖尿病; 糖尿病并发症; 研究

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 06. 027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)06-0673-03

糖尿病慢性并发症几乎累及全身各器官组织, 起病隐匿, 早期不易被发现, 呈渐进性发展, 当发展到一定阶段后治疗效果不佳, 是造成患者致残、致死的重要原因。近年来的大量研究证据表明, 持续高血糖引起体内多种蛋白质非酶糖基化及由此形成的晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)在糖尿病慢性并发症的发病机制中起重要作用^[1]。糖基化终末产物是体内蛋白质与葡萄糖或其他还原单糖反应生成的稳定的共价化合物, 它可通过损伤血管内皮、促进白细胞黏附、增加血小板聚集和刺激血管平滑肌增殖等机制, 促进动脉粥样硬化、糖尿病血管并发症、尿毒症等糖尿病慢性并发症的发生和发展。

1 糖基化终末产物(AGEs)概述

AGEs 是指糖的醛基与蛋白质的氨基端在非酶催化的化学反应下生成的一类物质。研究者最初认为 AGEs 只是蛋白质老化的标志, 以便体内识别降解、清除老化的蛋白质^[2]。近年来, 随着对糖尿病慢性并发症发病机制及病理改变的深入研究, 对 AGEs 有了更全面的认识。现在越来越多的事实表明, AGEs 不仅与被修饰的大分子的降解有关, AGEs 与其受体相互作用, 能够激活多个信号转导通路, 促进多种细胞因子的合成与释放, 促使糖尿病并发症的发生和发展。

1.1 AGEs 的产生 AGEs 是非酶糖基化反应的终末产物, 在无酶的条件下, 开链的葡萄糖分子游离醛基或酮基和蛋白质氨基酸残基侧链 ϵ -氨基或氨基末端的 α -氨基通过亲和结合, 迅速生成醛亚胺(alimine), 即 Schiff 碱, 这是一个不稳定的中间产物, 可以返回到原来的反应物状态。不稳定的 Schiff 碱基在体内很快达到平衡, 随后, Schiff 碱基可缓慢发生分子结构化学重排, 形成较稳定的但仍为可逆的糖-蛋白质酮胺结合物, 此种碱性产物比较稳定, 反应的可逆性大大减低, 经重新排列, 形成性质更为稳定的 1-氨基-1-去氧-D-酮糖(1-amino-1-deoxy-D-ketose), 即 Amadori 产物, 此为糖基化反应的早期阶段。Amadori 产物或 Amadori 产物经过多步脱水和分子重排产生

的多种高度反应性羰基化合物, 如 3-脱氧葡萄糖醛酮、乙二醛、甲基乙二醛等, 进一步与其他游离氨基反应, 最后形成不可逆性的 AGEs, 这是糖基化反应的晚期阶段。最近有研究发现, 果糖胺-3-激酶可磷酸化 Amadori 产物而阻断糖基化反应^[3]。葡萄糖的自身氧化产物乙二醛与蛋白质氨基反应或由糖酵解产物甘油醛-3-磷酸转变成甲基乙二醛, 后者再与蛋白质反应形成 AGEs, 这两条途径主要发生在细胞内。其中, 甲基乙二醛可通过乙二醛酶-I 和乙二醛酶-II 被还原成 D-乳酸盐而被解毒。另外, AGEs 也可由脂质过氧化形成, 也可来源于烟草或食物, 称为外源性 AGEs。AGEs 一经形成便不可逆转, 主要通过巨噬细胞的吞噬作用清除, 降解为可溶性的小分子多肽(低相对分子质量 AGE-肽), 在正常情况下可被肾脏及时清除。

1.2 AGEs 的结构 AGEs 具有高度异质性, 在体内有多种不同的存在形式, 如羧甲基赖氨酸(CML)、羧乙基赖氨酸(CEL)、羧甲基缬氨酸(carboxymethylvaline, CMV)、戊糖苷素(pentosidine)等^[4]。从这些化合物断裂的结构看, 糖化反应中掺杂着氧化过程, 糖化过程伴随着氧化, 形成的产物就是糖化氧化产物, Pentosidine 和 CML 就是这样的产物。在体外实验中, 运用抗氧化剂能够使 CML 的生成减少, 则可证实这一点。在蛋白质存在的条件下, 金属催化的多聚不饱和脂肪酸的氧化也能形成 CML, 这表明脂质氧化在 AGEs 的形成中起一定的作用。因此, CML 可以作为碳水化合物和脂质氧化反应产生氧化应激的一个生物标志物。

1.3 AGEs 的生化特点 AGEs 呈棕色; 一部分 AGEs 具有特有的荧光特性; 具有交联性, 即使去除了糖, 他们之间仍能通过侧链交联, 形成相对分子质量极大的物质; 对酶稳定, 不易被降解; 许多细胞(如巨噬细胞、系膜细胞、内皮细胞)表面均有其受体, AGEs 通过这些受体可以影响细胞的功能^[1]。

1.4 AGEs 的代谢^[5] 细胞间质中存在的 AGEs 由巨噬细胞进行识别和清除, 巨噬细胞对 AGE 修饰的组织和细胞的降解主要是通过巨噬细胞上特异的 AGE 受体介导。血液中游离