

- 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

的 AGEs 由肝窦状细胞(如枯否氏细胞和内皮细胞)上的清道夫受体进行作用。降解后小而可溶的 AGE 肽释放出来,随后经肾脏清除。因此,肾功能的好坏对 AGEs 的清除起决定作用。任何肾脏功能的破坏均会导致 AGEs 的积聚,从而引起内皮功能紊乱和血管疾病。

1.5 AGEs 及其特异性受体的相互作用 现已发现,AGEs 与细胞表面特异性受体的相互作用是其致病的关键途径^[6]。AGEs 与细胞表面 AGEs 受体结合后,可引起多种蛋白质基因表达水平的改变。这些细胞有单核-巨噬细胞、淋巴样细胞、肾小球系膜细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等。一些存在于内皮细胞、单核-巨噬细胞和肾小球膜细胞上的 AGEs 受体已被命名和克隆出来了^[7]。目前,已从鼠肝中提取出两种 AGEs 受体: P60 和 P90,均分布于单核-巨噬细胞系统和外周 T 淋巴细胞;在内皮细胞表面分离到相对分子质量为 35×10^3 和 46×10^3 两种蛋白,都镶嵌在细胞膜上,分别与 AGEs 不同位点结合,共同完成受体的功能。

2 AGEs 与糖尿病慢性并发症

2.1 AGEs 与糖尿病神经病变 糖尿病神经病变的主要病理特点是神经纤维缺失、轴索变性、脱髓鞘及微血管的改变。既往已经认识到糖尿病神经组织内非酶糖基化反应增强可引起神经结构蛋白、基质蛋白的广泛交联,从而直接破坏神经结构,影响神经再生与修复。近期许多研究表明,氧化应激在介导 AGEs 产生细胞毒性作用方面起着关键的作用。AGEs-AGEs 受体(RAGE)相互作用导致神经功能紊乱也日益受到关注。

2.1.1 AGEs 直接损伤神经组织 高血糖状态可引起半衰期长的蛋白质普遍糖基化,神经轴索细胞骨架蛋白(如微管蛋白、肌动蛋白及神经丝蛋白)半衰期均较长,且富含赖氨酸,因此易发生糖基化反应。对 2 型糖尿病患者腓肠及股神经进行活检发现,其轴突及髓鞘 AGEs 沉积显著增多^[8]。神经组织内 AGEs 沉积增多可导致细胞骨架蛋白交联增强,从而损害轴浆运输,影响细胞内信号转导及蛋白质磷酸化或去磷酸化,导致轴索变性,神经再生能力下降。

2.1.2 氧化应激介导 AGEs 的细胞毒性作用 氧化应激在生理或病理条件下可通过糖氧化、自身氧化作用参与 AGEs 的形成。Brownlee^[9]提出了糖尿病并发症发病的统一机制学说,认为高血糖诱导细胞产生过量的活性氧簇(ROS)是多元醇途径、AGEs 途径、PKC 途径及己糖胺途径激活的一个共同上游事件。体外实验表明高血糖引起的 ROS 升高可以使甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)活性下降 66%^[10],导致糖酵解中间产物甘油醛-3-磷酸显著增多,过多的磷酸丙糖转化为 AGEs 的前体甲基乙二醛,使得 AGEs 生成增加。正常情况下周围神经抗氧化能力显著低于大脑及肝脏,在糖尿病时,过氧化氢酶、谷胱甘肽酶及超氧化物歧化酶被糖基化后活性明显下降,使 ROS 清除减少。

2.2 AGEs 与动脉粥样硬化 糖基化反应在正常机体即可缓慢进行,因此 AGEs 水平随着年龄的增长而缓慢增加。大量动物实验表明^[11],体内 AGEs 慢性蓄积与动脉粥样硬化之间有密切关系,AGEs 启动可加速动脉粥样硬化的发生和发展。国外学者应用免疫组织化学方法检测血糖正常的低密度脂蛋白受体缺陷家兔,首次发现家兔动脉粥样硬化斑块组织中存在大量的 AGEs,而血管正常部位却无 AGEs 表达,提示糖基化终末产物可能是动脉粥样硬化斑块形成的始动因素。这些研究都表明糖基化终末产物是促动脉粥样硬化形成的重要因素。

2.3 AGEs 与糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)

DR 是常见的糖尿病并发症。它的特征是异常血管形成导致的出血、缺血和梗死。特异的形态和功能改变包括基底膜增厚、外膜细胞缺损和通透性增加。AGEs 的形成抑制 NO 产生,由于 NO 是血管舒张因子,有抗血管平滑肌增殖的作用,因此 AGEs 的积聚导致血管增厚、弹性减低、内皮功能不良,影响组织重构,使血管通透性增加^[12]。体外实验表明,视网膜基底膜经 AGEs 修饰后,视网膜外膜细胞增殖减少而视网膜内细胞增殖增加。这与 AGEs 引起的 NO 减少、活性氧物质的产生及血管弹性的改变一起,能够解释 AGEs 对微血管结构和功能的影响。

2.4 AGEs 与糖尿病肾病 Jurgen 等^[13]报道,糖基化终末产物与肾内皮细胞表面特异性受体结合,可导致肾结构和功能异常,主要表现为细胞外基质成分(如 IV 型胶原)、层粘连蛋白及纤维连接蛋白含量增多。给正常大鼠尾静脉注射外源性 AGEs 后,血清 AGEs 水平显著增高;肾小球容积增大、基膜增宽、系膜细胞外基质增多,这与临床慢性肾功能不全的病理变化相似,静脉给予糖基化终末产物抑制剂氨基胍治疗则可明显抑制上述结构及功能的改变。以上结果揭示,体内积聚的 AGEs 可造成肾脏结构破坏和功能丧失。

3 AGEs 的检测

3.1 高效液相色谱法 目前用于检测 AGEs 的色谱技术主要是高效液相色谱法(HPLC)。HPLC 具有高效、高灵敏度、高分辨率的特点,这在分析 AGEs 的结构方面有其独到之处,但其操作过程繁杂、耗费昂贵,不利于应用到临床检验。

3.2 免疫组织化学法 免疫组织化学法是利用抗 AGEs 单抗或多抗对组织中 AGEs 的分布进行定位检查。目前免疫组织化学法主要用于 AGEs 相关疾病发病机制的研究。该法检测 AGEs 首先要获得组织标本,操作过程繁杂,而且只能做定性检测,这些缺点限制了其在临床工作中的应用。

3.3 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA 具有敏感度高、特异性强、操作简单、观察结果容易的特点,是一种颇为理想的微量测定技术,目前以竞争法最为常用。ELISA 法在检测 AGEs 的应用中存在的主要问题是缺乏统一的标准方案。这有多方面的原因:AGEs 的化学结构复杂多样、没有制备抗体的标准方法、没有统一的计量单位等。为使不同实验室或不同批次所测得的 AGEs 具有可比性,Misuhashi 等^[14]首先提出用正常人血清(NHS)来标准化 AGEs 检测。因正常人血清中可测到 AGEs 而且其水平处在狭窄范围,所以可用正常人群血清平均 AGEs 值作为测定 AGEs 的通用标准。NHS 法所定义的 AGEs 单位为在竞争性 ELISA 中 1 U AGEs 等于 1:5 稀释的 NHS 所抑制的 AGEs 的量,即 NHS 中 AGEs 量定为 5 U/mL。该法所定义的 AGEs 值还可以应用于 AGE 修饰蛋白质,表达为 AGE U/ μ g 蛋白,因此不同实验室、不同检测方法所制备的 AGE 修饰蛋白就可以标准化。

3.4 荧光分析法 AGEs 具有发射荧光的特性,因而可以用荧光分光光度计测定其荧光值从而反映 AGEs 在循环或组织中的水平。用于测定 AGEs 的激发光谱(Ex)为 350~390 nm,发射光谱(Em)为 440~470 nm,化学结构不同的 AGEs,其荧光光谱特征不同,荧光强度随 AGEs 浓度的增加而升高。Gopalkrishnapillai 等^[15]测得糖基化血红蛋白(Hb-AGE)的特征性荧光光谱为 Ex 308/Em 345 nm,可以由此来测定其血清中的浓度,实验证明,该法测得的 Hb-AGE 值比 ELISA 法所获得的结果更为合理。当然,荧光光谱分析也有其局限性,一些 AGEs 没有荧光特性,如羧甲基赖氨酸(CML),体内还存在其他荧光物质以及引起荧光淬灭的物质,这些都影响了分子荧光

分析的应用范围。

3.5 放射免疫分析法(RIA) 通过与同位素标记抗原竞争结合特异抗体而达到检测样品中某种特殊 AGEs 含量的放免法的特异性和灵敏度均较高,但标记抗原的同位素放射强度随时间衰减,造成检测结果的批间差异较大,重复性不够好。

3.6 放射受体分析法 AGEs 特异结合受体存在于许多细胞(如单核-巨噬细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等)表面,故可通过放射受体分析法来检测 AGEs 水平。该法敏感性、特异性均较高,但目前应用报道并不多见,主要因为其操作需培养细胞,耗时费力,而且结果受同位素衰变影响大,稳定性和重复性差,故很难推广应用。

3.7 质谱法 Kislinger 等^[16]用 MALDI-TOF-MS 检测 A-madori 产物、CML 和咪唑酮 A(imidazolone A),将 AGE-Lysozyme 通过蛋白内切酶 Glu-C 酶切用 Binex III MALDI-TOF-MS 检测,获得了质量指纹谱,与蛋白数据库比较后,可以获知蛋白质的糖基化位点。MALDI-TOF-MS 不能作绝对定量分析,仅能作相对量化分析,但在分析相对分子质量方面有独特的优势,又具有可以同时分析多个不同 AGEs 的优点。

3.8 流动注射分析技术 张林和孙子林^[17]采用流动注射分析技术检测了 78 例糖尿病患者的 AGEs 含量,结果尚可,但目前文献报道较少,有待于进一步深入研究其检测效果。

4 结 语

总之,越来越多的证据表明,AGEs 在糖尿病及其并发症中有重要作用,影响细胞内信号转导、转录因子活化及基因表达。然而,AGEs 的作用,尤其是在糖尿病微血管和大血管并发症病因学的作用机制仍有待于进一步确证,检测方法仍需进一步完善及标准化^[18]。尽管如此,关于 AGEs 在糖尿病并发症中机制的研究为有效地控制与治疗并发症提供了一条新的研究途径。相信随着研究的拓展和深入,将更加丰富糖尿病并发症发病机制的理论基础,同时对糖尿病并发症防治提供了新的思路 and 对策。

参考文献

[1] Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis[J]. Curr Diab Rep, 2004, 4(1): 31-36.

[2] Singh R, Barden A, Mori T, et al. Advanced glycation end products: a review[J]. Diabetologia, 2001, 10(19): 129-146.

[3] Veiga da-cunda M, Jacquemin P, Delpierre G, et al. Increased protein glycation in fructosamine-3-kinase-deficient mice[J]. Biochem J, 2006, 399(2): 257-264.

[4] 林炜栋, 陈向芳, 陆树良, 等. 晚期糖基化终末产物与糖尿病皮肤微血管病变相关性研究[J]. 上海医学, 2004, 27(11): 832-835.

[5] Takuhito S, Hidenori K, Tomoaki M, et al. Receptor for advanced glycation end products is involved in impaired angiogenic response in diabetes[J]. Diabetes, 2006, 55(8): 2245-2255.

[6] Ilaria C, Patrizia M, Michele Z, et al. Expression of receptor for advanced glycation end products in sarcoid granulomas[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(5): 498-506.

[7] Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins[J]. J Biol Chem, 1992, 267(11): 14998-15013.

[8] Misur I, Zarkovic K, Barada A, et al. Advanced glycation end products in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy[J]. Acta Diabetol, 2004, 41(1): 158-166.

[9] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(8): 1615-1625.

[10] Alikhani M, Maclellan C, Raptis M, et al. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases and FOXO1 transcription factor[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 291(6): 1293-1302.

[11] Huali ZH, Kathryn CB, Sammy WM, et al. Increased serum advanced glycation end products are associated with impairment in HDL antioxidative capacity in diabetic nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(3): 927-933.

[12] 阳光. 血糖变异与老年 2 型糖尿病慢性血管并发症相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(7): 647-649.

[13] Jurgen MB, Sybille F, Gunter S, et al. Advanced glycation end products and the kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 289(4): 645-659.

[14] Misuhashi T, Vlassara H, Found HM, et al. Standardizing the immunological measurement of advanced glycation end products using normal human serum[J]. Immunol Methods, 1997, 207(1): 79-88.

[15] Gopalkrishnapillai B, Nadanathangam V, Karmakar N, et al. Evaluation of autofluorescent property of hemoglobin-advanced glycation end product as a long-term glycemic index of diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52(4): 1041-1046.

[16] Kislinger T, Humeny A, Peich CC, et al. Relative quantification of N(epsilon)-(Carboxymethyl)lysine, imidazolone A, and the A-madori product in glycated lysozyme by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(1): 51-57.

[17] 张林, 孙子林. 糖基化终产物与 2 型糖尿病慢性并发症的关系调查[J]. 实用预防医学, 2006, 13(5): 1140-1141.

[18] 李明. 糖基化蛋白的检测及其在临床中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(11): 1018-1020.

(收稿日期: 2011-02-12)

• 个案与短篇 •

糖尿病患者血糖和尿微量清蛋白联合检测对早期肾损伤的临床价值

刘晓峰, 涂 艳, 邓 蕾

(江西省九江市第一人民医院检验科 332000)

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 06. 028

文献标识码: C

文章编号: 1673-4130(2011)06-0675-01

糖尿病是一种可引起多器官病变的内分泌疾病, 监测患者 血糖和尿蛋白分泌对于纠正治疗、病情控制非常重(下转插 III)