

• 综 述 •

# 醛糖还原酶与氧化应激对糖尿病外周神经病变影响研究进展

李庆蓉 综述, 杨红英 审校

(昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南昆明 650101)

**关键词:** 糖尿病; 高血糖; 醛氧化还原酶类; 糖尿病神经病变; 氧化应激**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.032**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)01-0071-03

糖尿病外周神经病变(DPN)是糖尿病常见并发症,也是导致糖尿病患者致残、生命质量下降的常见原因,可累及体神经和自主神经,患者临床症状以感觉缺失为主<sup>[1]</sup>。DPN 病因错综复杂,发病机制尚未完全阐明,多认为与神经内膜新陈代谢异常、神经营养缺失及神经血流量减少有关<sup>[2-3]</sup>。氧化应激也是 DPN 重要发病机制之一,可导致神经内膜损伤及神经血流量减少,涉及糖基化终末产物形成、多元醇代谢途径、蛋白激酶 C 激活及微血管损伤等。氧化应激的参与及多元代谢旁路增强被普遍认为是 DPN 发病的最主要原因,其中多元醇通路中的第 1 个限速酶,即醛糖还原酶(AR),十分重要。目前中国与部分欧洲国家采用醛糖还原酶抑制剂(ARI)治疗 DPN,取得了一定的临床治疗效果<sup>[4]</sup>。本文就氧化应激及 AR 在 DPN 中的作用进行综述。

## 1 氧化应激的产生及其与 DPN 的关系

氧化应激是指在遭受各种有害刺激时,机体内高活性分子,如活性氧自由基(ROS)和活性氮自由基(RNS)产生过多,氧化物生成速度超出其清除速度,从而导致组织损伤。自由基具有奇数(即不成对)的电子、原子或原子团,由于电子不配对,性质很不稳定,可从周围分子中夺取电子而使回复至稳态。周围分子失去电子,即被氧化,进入不稳定状态,又可夺取其他分子的电子,如此依次传递下去,形成连锁反应。已有研究表明糖尿病患者体内存在明显的氧化应激,尤其是自由基产生增加,是继发糖尿病慢性并发症的重要因素<sup>[5]</sup>。氧化应激是 ROS(如超氧化物阴离子、羟基自由基、过氧亚硝基、过氧化氢)与抗氧化剂[如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶、谷胱甘肽,维生素 C 或维生素 E]失衡的结果。高血糖可导致氧化应激增加,超氧阴离子、过氧化氢、氧化亚氮(NO)等 ROS 生成增多。因此 ROS 的过量产生与 ROS 清除能力下降都会导致氧化应激<sup>[6]</sup>。氧化应激的主要后果是多余的 ROS 引起蛋白质、脂肪、核酸等生物大分子的氧化损伤<sup>[7]</sup>。高血糖患者体内存在氧化与抗氧化的失衡,导致 ROS 介导的氧化损伤。Brownlee 等<sup>[8]</sup>提出的统一机制学说认为,高糖环境下线粒体呼吸链中 ROS 生成过多是大部分因素启动的根源。氧化应激可引起蛋白质生物学活性降低,并导致细胞能量代谢、信号转导异常,最终导致细胞死亡<sup>[9]</sup>。细胞培养、动物实验和抗氧化剂临床应用研究均证实高血糖引起的氧化应激在 DPN 发生、发展中起着极其重要的作用。大量 ROS 的产生可直接损伤细胞膜和具有膜结构的内质网、溶酶体和线粒体<sup>[10]</sup>。因此,一旦内源和外源性氧化产物超过了机体的抗氧化能力,便形成氧化应激状态。

有研究显示,糖尿病患者体内的氧化应激增强,神经内膜氧化应激产生的 ROS 对神经组织有直接毒性作用<sup>[11]</sup>。ROS 对神经元的损伤主要表现为细胞膜发生脂质过氧化反应,膜磷

脂被破坏降解;细胞膜对钠、钙及大分子物质通透性增加,神经元发生细胞毒性水肿;线粒体破坏,功能丧失<sup>[12]</sup>。此外,氧化应激还可使神经营养因子水平减少 64%<sup>[13]</sup>,并可产生 8-羟基鸟嘌呤,使 DNA 受损,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性下降,导致神经功能及结构异常<sup>[14]</sup>。同时,ROS 可介导 PARP 激活,通过快速消耗 NAD<sup>+</sup> 而抑制 3-磷酸甘油醛脱氢酶活性,使磷酸丙糖浓度增高,进而增加丙酮醛的形成和葡萄糖代谢终产物的生成,激活 PKC。上述过程共同作用引起神经组织损伤,进而导致 DPN 的发生<sup>[15]</sup>。

## 2 抗氧化剂的作用

机体存在两类抗氧化系统,一类是酶抗氧化系统,包括 SOD、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等,另一类是非酶抗氧化系统,包括维生素 C、维生素 E、GSH、褪黑素、 $\alpha$ -硫辛酸、类胡萝卜素、铜(Cu)、锌(Zn)、硒等。

许多研究都发现高血糖小鼠体内抗氧化剂活性降低。Low 等<sup>[16]</sup>发现注射硫脲佐菌素(STZ) 4 周后的糖尿病小鼠 Cu/Zn SOD 活性显著下降,且这种下降反应可通过使用胰岛素来预防。Nickander 等<sup>[17]</sup>发现 GSH 活性在给小鼠注射 STZ 1 月后下降,但不会持续超过 3 个月,说明抗氧化剂在避免神经损伤方面具有重要作用。然而,抗氧化剂能否预防及治疗人 DPN 尚无定论。有研究提示抗氧化治疗只能在短时间内减轻 ROS 对神经细胞的损伤,且临床疗效存在争议<sup>[18]</sup>。临床常用抗氧化剂对治疗 DPN 具有一定的效果,但可使用的抗氧化种类有限且疗效不确定。因此,尚缺乏特效药物,且现有的抗氧化药物并不能满足治疗需要,需进一步研究。

## 3 氧化应激与多元醇代谢途径

多年研究表明,葡萄糖在神经组织中的代谢主要有以下两条通路:一是在己糖激酶作用下,转化为 6-磷酸葡萄糖,并进入糖酵解途径,正常情况下,这是葡萄糖代谢的主要通路;另一条是葡萄糖代谢的多元醇通路由 AR 和山梨醇脱氢酶(SDR)共同构成。在血糖正常的情况下,细胞内的葡萄糖仅约 5% 进入多元醇通路。糖尿病状态下,该通路异常激活,约 30% 的葡萄糖进入此通路<sup>[19]</sup>。AR 是多元醇途径的关键酶,是含巯基的单链多肽,属于 NADPH 依赖性醛-酮还原酶族,主要分布于神经、肾脏、脑、肌肉、精囊、胎盘等,可催化多种醛(包括醛形式的葡萄糖)还原为相应的醇。AR 在神经组织中施万细胞内含量最高。ROS 可抑制糖酵解关键酶从而激活多元醇通路,其活力增强将造成山梨醇等代谢产物的蓄积,从而改变细胞的渗透压和增加氧化应激,通过激活死亡信号转导通路诱导细胞凋亡<sup>[20]</sup>。山梨醇被山梨醇脱氢酶氧化为果糖,由于神经组织内无果糖激酶,不能分解果糖,使山梨醇和果糖聚集造成神经细胞、神经和神经纤维内渗透压增高。有研究提示,在多元醇

途径造成组织细胞损伤的过程中氧化应激可能占有更重要的地位。因为体外试验表明,细胞渗透压得到控制后,由多元醇途径诱发的氧化应激仍可导致内皮细胞凋亡<sup>[21]</sup>。可见 AR 是造成外周神经组织氧化应激和功能损伤的主要因素之一。

#### 4 ARI 在糖尿病神经病变中的应用

ARI 可分为以下几类:羧酸类,如托瑞司他和依帕司他;海因类,如 Sorbinil(因引起严重的过敏反应而终止 I 期临床试验)和 SNK-860;酚类,如槲皮素;苯磺酰硝基甲烷类。目前多数 ARI 属于羧酸类,是一种羧酸衍生物,可特异地作用于多元醇代谢通路<sup>[22]</sup>。ARI 可通过抑制 AR 活性而抑制 DPN 患者红细胞中山梨醇的生成,减少山梨醇和果糖在外周神经组织的沉积,还可通过抑制蛋白激酶信号通路,增加内皮细胞 NO 的生成,抑制高糖介导的中性粒细胞内皮细胞黏附因子及内皮黏附因子的表达,可以有效改善外周神经病变<sup>[23]</sup>。

依帕司他是第一个被批准使用的 ARI,在日本已广泛用于治疗 DPN,但尚未获得美国食品药物协会的承认<sup>[24]</sup>。依帕司他在提高外周神经传导速度的作用方面起效较慢,按每日餐前服用,每次 50 mg 用药 3 个月后外周神经病变症状可有明显好转<sup>[25]</sup>。动物试验则证实,只有以足量的 ARI 处理 STZ (65 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) 诱导的糖尿病小鼠才可有效控制多元醇通路的活性从而达到治疗效果。Hotta 等<sup>[26]</sup>在 2006 年进行了多中心、长期随访、随机对照研究评估依帕司他对 DPN 的长期疗效,试验持续 3 年,给予 289 例 DPN 患者依帕司他治疗,结果显示依帕司他对临床症状、正中神经 MNCV、MFWL、VPT 的改善均明显优于安慰剂,且对血糖控制较好、没有或仅有轻微血管病变的患者疗效更好。Ohmura 等<sup>[27]</sup>研究发现,口服依帕司他 3 个月可明显降低 2 型糖尿病患者红细胞内脂质氢过氧化物,表明依帕司他可能具有抗氧化作用。张美彪等<sup>[28]</sup>的研究表明,DPN 患者在有效控制血糖、血脂、血压的基础上,应用依帕司他治疗 3 个月后,神经症状明显改善,尤其是减轻麻木和疼痛症状。

综上所述,多元醇通路的激活及氧化应激在 DPN 发生、发展中起着重要作用,但 DPN 发病机制十分复杂,还有待进一步深入研究,且 ARI 对 DPN 患者的治疗效果报道不一致。进行 DPN 发生机制的研究,对于早期诊断和治疗 DPN 并发症有重要价值。

#### 参考文献

- [1] Obrosova IG. Diabetes and the peripheral nerve[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(10): 931-940.
- [2] Vinik AI. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy[J]. *Am J Med*, 1999, 107(2B): 17-26.
- [3] Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, et al. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy[J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 375(1/3): 217-223.
- [4] Kuzumoto Y, Kusunoki S, Kato N, et al. Effect of the aldose reductase inhibitor fidarestat on experimental diabetic neuropathy in the rat[J]. *Diabetologia*, 2006, 49(12): 3085-3093.
- [5] 徐敏, 杨红英. 氧化应激与糖尿病脑病[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(8): 729-730.
- [6] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine [M]. 2nd ed. Oxford, England: Clarendon Press, 1989: 100-102.
- [7] Russell JW, Berent-Spillon A, Vincent AM, et al. Oxidative injury and neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance[J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 30(3): 420-429.

- [8] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [9] Obrosova IG. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2002, 50(1): 3-35.
- [10] Julius U, Drel VR, Grässler J, et al. Nitrosylated proteins in monocytes as a new marker of oxidative-nitrosative stress in diabetic subjects with macroangiopathy[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009, 117(2): 72-77.
- [11] Spillson AB, Russell JW. Metabotropic glutamate receptor regulation of neuronal cell death[J]. *Exp Neurol*, 2003, 184(Suppl 1): 97-105.
- [12] Lelkes E, Unsworth BR, Lelkes PI. Reactive oxygen species, apoptosis and altered NGF-induced signaling in PC12 pheochromocytoma cells cultured in elevated glucose: an in vitro cellular model for diabetic neuropathy[J]. *Neurotox Res*, 2001, 3(2): 189-203.
- [13] Houson L, Corder R, Patel J, et al. Oxidative stress participates in the breakdown of neuronal phenotype in experimental diabetic neuropathy[J]. *Diabetologia*, 2001, 44(4): 424-428.
- [14] Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N, et al. Effects of OPB-9195, anti-glycation agent, on experimental diabetic neuropathy[J]. *Eur J Clin Invest*, 2001, 31(6): 513-520.
- [15] Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 959(1): 368-383.
- [16] Low PA, Nickander KK. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes[J]. *Diabetes*, 1991, 40(7): 873-877.
- [17] Nickander KK, Schmelzer JD, Rohwer DA, et al. Effect of alpha-tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve[J]. *J Neuro Sci*, 1994, 126(1): 6-14.
- [18] Vincent AM, McLean LL, Backus C, et al. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons[J]. *FASEB J*, 2005, 19(6): 638-640.
- [19] Misawa S, Sakurai K, Shibuya K, et al. Neuropathic pain is associated with increased nodal persistent Na(+) currents in human diabetic neuropathy[J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2009, 14(4): 279-284.
- [20] Kubo E, Urakami T, Fatma N, et al. Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: role of AOP2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(4): 1050-1056.
- [21] Oyama T, Miyasita Y, Watanabe H, et al. The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages[J]. *Diabet Res Clin Pract*, 2006, 73(3): 227-234.
- [22] Ramirez MA, Borja NL. Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy[J]. *Pharmacotherapy*, 2008, 28(5): 646-655.
- [23] 郑琪蓉, 苏青. 依帕司他的药理作用及临床应用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2006, 25(11): 876-884.
- [24] Ramirez MA, Borja NL. Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy[J]. *Pharmacotherapy*, 2008, 28(5): 646-655.
- [25] Wisner D. Martindale: The Complete Drug Reference; 37th ed[J]. *J Med Libr Assoc*, 2012, 100(1): 75-76.
- [26] Hotta N, Akanuma Y, Kawamori R, et al. Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy: the 3-year, multicenter, comparative Aldose

Reductase Inhibitor-Diabetes Complications Trial[J]. Diabetes Care, 2006, 29(7): 1538-1544.

[27] Ohmura C, Watade H, Azuma K, et al. Aldose reductase inhibitor, epalrestat, reduces lipid hydroperoxides in type 2 diabetes[J]. Endocr J, 2009, 56(1): 149.

[28] 张美彪, 黄云湘, 匡甸亚, 等. 依帕司他与甲钴胺改善糖尿病周围神经传导速度的比较[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(5): 79-84.

(收稿日期: 2012-10-08)

• 综 述 •

## 金属离子和化合物对血清清蛋白影响的研究进展

陈墨龙<sup>1</sup>, 夏 敏<sup>1</sup>, 陈仁政<sup>1</sup>, 刘毅敏<sup>2</sup>综述, 赵先英<sup>2</sup>审校

(第三军医大学: 1. 学员旅 2 队; 2. 药学院化学教研室, 重庆 400038)

关键词: 血清白蛋白; 离子; 化合物; 荧光猝灭

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)01-0073-03

血清清蛋白(SA)是脊椎动物血浆中含量最为丰富并且极易纯化的蛋白质, 由于它这一特有的地位, 在过去 30 年间, 使他成为了物理学家、化学家、生物学家研究的一种典型理想蛋白质。它是血浆中研究最早也是最为清楚的蛋白质, 1982 年得到人血清清蛋白(HSA)的 cDNA 全序列, 随后对其他脊椎动物 SA 的研究也相继展开。到目前为止, 已经对它所表现出的理化特性, 如光谱性质、吸附平衡、电化学性质、热化学性质等一些方面进行了研究, 对其特性、功能有了一定的认识。同时, 由于牛血清清蛋白(BSA)具有非专一性结合的特点, 现已用于免疫诊断治疗法的过程研究、临床化学试剂、细胞培养基等。笔者就近些年关于多种离子及化合物对 HSA 的研究做一简要综述。

### 1 HSA

HSA 是由约 18 种共 585 个氨基酸残基组成的单链无糖基蛋白质, 整个蛋白质分子共含有 17 个二硫键, Cys34 上有惟一游离的巯基, 在蛋白质修饰中有重要应用。HSA 具有独特的分子结构, 能与代谢产物、调节物、金属离子等物质相结合, 在血液循环过程中作为内源物质与外源物质的存储和运输分子, 对于物质在靶点的运输与释放有重要意义; 同时, HSA 还能可逆地结合许多药物, 影响药物的运转、代谢和清除, 甚至改变药物在血液中的溶解性, 降低毒副作用。另一方面, HAS 相对分子质量较小, 但数目多, 约占总蛋白质分子数的 3/4, 因而可以维持 4/5 左右的血浆胶体渗透压, 而血浆胶体渗透压的改变也影响 HSA 的合成, 因而构成相互影响关系。在自由基清除方面, HSA 氨基序列 34 位上存在半胱氨酸残基, 可转变成巯基, 即硫醇, 作为活性氧和活性氮的清除剂, 硫醇起到自由基清除的作用。由于其特殊的结构与基团, HSA 还具有抗凝、酶活性、酶抑制剂活性等生理活性。

HSA 在血浆中最为丰富, 临床主要作为血浆容量扩充剂, 可用于治疗出血性休克、脑缺血、烧伤等疾病, 通常每次使用剂量都超过 10 g。由于 HSA 主要通过从血浆中提取而获得, 具有来源有限、价格昂贵等缺点, 因此, 很多学者积极探索基因工程、细胞工程等制备方法。关于 HSA 的非治疗作用, 如用作药剂、辅料、诊断试剂、手性物质分离剂、培养基添加剂等的报道也越来越多, 又由于 BSA 与 HSA 的结构相似<sup>[1]</sup>, 分子量相近, 二者的氨基酸序列高度相似, 而 BSA 又价廉易得, 因此人们常常通过研究离子、化合物与 BSA 的结合, 作为药物对

HSA 结合情况的参考。

### 2 金属离子与化合物对 HSA 的影响

#### 2.1 金属离子对 HSA 的影响

2.1.1  $Pb^{2+}$  铅是一种具有神经毒性的重金属元素, 对人体无任何生理功能, 理想血铅浓度为零。铅一旦进入人体, 90% 存在于骨骼, 10% 随血液分布到全身各器官和组织。铅对人体的影响是剂量效应, 并具有持续累积的过程, 随血铅水平的提高, 可对全身血液、神经、肾脏、内分泌和免疫等各系统产生毒性作用, 临床表现复杂, 缺乏特异性。传统认为, 铅侵入人体后, 主要以  $Pb^{2+}$  形式与红细胞内血红蛋白结合<sup>[2]</sup>, 关于  $Pb^{2+}$  与 HSA 相互作用的文献报道较少, 并且文献结果差别较大。因此研究  $Pb^{2+}$  与 HSA 的相互作用十分必要。有学者采用荧光法研究了  $Pb^{2+}$  与 BSA 的相互作用<sup>[3]</sup>, 测定了不同条件下  $Pb^{2+}$  与 BSA 作用的荧光光谱, 并通过热力学计算探讨了二者的作用方式、BSA 荧光的猝灭机制<sup>[4]</sup>、 $Pb^{2+}$  与 BSA 之间的结合常数及结合位点。结果表明,  $Pb^{2+}$  对 BSA 的荧光猝灭属于静态猝灭,  $Pb^{2+}$  通过疏水作用进入 BSA 的疏水腔与之发生相互作用, 反应的  $A_G = 4.15 \times 10^4$  J/mol,  $A_S = 136$  J/(mol · K), 结合数  $n = 1.366$ , 结合常数  $K_A = 2.07 \times 10^7$  J/mol。以此模拟了  $Pb^{2+}$  对人体的影响机制。通过以上一系列实验得出结论,  $Pb^{2+}$  可与 BSA 中的氨基酸残基结合。因此,  $Pb^{2+}$  对于蛋白质的二级结构具有较强的破坏作用, 说明  $Pb^{2+}$  具有较大的急性毒性。

2.1.2  $Cr^{6+}$  铬是环境中常见的重金属污染物, 主要来源于电镀、制革、采矿、铬盐化工等工业废水, 是一种毒性较大的致畸、致突变剂, 被国际癌症研究机构归为人类职业致癌物。 $Cr^{6+}$  对生物机体具有重要的毒性作用, 可导致细胞凋亡及肿瘤发生, 引起 DNA 氧化损伤及蛋白交联的机制还不十分清楚, 近几年研究人员多采用分析光谱的方法, 如荧光光谱、EPR 光谱、散射光谱等方法分析二者的作用机制。有学者采用荧光光谱法、紫外光谱法研究  $K_2Cr_2O_7$  与 BSA 的相互作用<sup>[5]</sup>。实验结果表明,  $Cr^{6+}$  使 BSA 的紫外吸收降低, 峰位红移, 表明  $Cr^{6+}$  与 BSA 发生较强的相互作用,  $Cr_2O_7^{2-}$  与 BSA 形成基态复合物导致 BSA 内源荧光猝灭, 猝灭机制主要为静态猝灭。实验结果表明, 上述过程是一个熵增加、自由能降低的自发分子间作用过程<sup>[5]</sup>。由此可见,  $Cr^{6+}$  在血清蛋白中能够相对稳定地存在, 并且  $Cr^{6+}$  与 BSA 相互良好结合, 二者发生较强的相互作用