

晚期糖化终产物在糖尿病血管并发症中的致病机制

郑超 综述, 文格波 审校

(衡阳医学院附属第一医院临床学研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 糖基化; 动脉粥样硬化; 糖尿病

[摘要] 长期的高糖环境下形成的晚期糖化终产物是糖尿病慢性并发症的发病机制之一。它主要通过直接和间接途径作用于人体, 本文就晚期糖化终产物与糖尿病血管并发症的关系作一综述。

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

晚期糖化终产物(advanced glycosylation endproduct, AGE)是非酶糖化反应的终末期产物, 体内还原性单糖, 如葡萄糖、果糖及葡萄糖-6-磷酸的醛基或酮基与氨基酸或核苷酸的游离氨基之间发生非酶糖化反应, 生成不稳定的 Schiff 碱, 再经缓慢重排, 生成可逆性的 Amadori 产物, 此后经复杂的重排, 最后生成不可逆的 AGE。近年来的研究发现, AGE 与糖尿病慢性并发症有密切关系^[1]。AGE 主要通过直接和间接途径作用于人体。本文即从以上两种途径综述 AGE 在糖尿病血管并发症中的作用。

1 晚期糖化终产物的直接作用

AGE 的直接作用主要包括引起细胞外基质的分子结构、功能改变和胞内 AGE 的形成。

AGE 可以在蛋白质、脂和核酸中形成。晶体蛋白是一种更新缓慢的蛋白, 随着时间的增长, 经 AGE 修饰的晶体蛋白进行性增加, 这种反应在糖尿病患者体内尤为突出。用核糖核酸酶的实验证实, AGE 在自由糖缺如的情况下引起交联。用核糖核酸酶和糖一起孵育, 有共价交联的核糖核酸二聚体、三聚体形成, 去除糖化的核糖核酸仍继续多聚化, 说明糖尿病组织交联的发展过程中即使严格地控制血糖仍不能阻止交联的发展。AGE 诱使胶原发生交联后, 溶解性下降, 不易被酶消化, 从而使血管基底膜增厚, 组织硬度增加。

AGE 与血浆蛋白如低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、IgG 等共价偶联, 沉积在血管壁, 引起管腔进行性狭窄^[2]。糖化的 LDL 可将其其它的 LDL 颗粒固定于糖化了的管壁蛋白上, 促进纤维脂质斑块的形成, 同时抑制它从管壁内扩散, 间接促进脂蛋白 AGE 的形成。实验显示, 糖尿病患者的 LDL 样品中, LDL 的载脂蛋白和脂质连接的 AGE 水平都较正常人群高, 而循环中的 AGE 蛋白断裂物-AGE 肽比葡萄糖更能有效地与 LDL 反应, 促进 LDL 的氧化, 从而产生大量自由基, 引发组织损伤。

近年来的研究显示, 在血管基质形成的 AGE 可能干扰了一氧化氮(nitric oxide, NO)的生化活性^[3]。在体外, 连接

AGE 的胶原基质对 NO 的生物活性有直接减弱作用。NO 是一种内皮细胞源性血管舒张因子, 它的主要效应包括舒张血管, 抑制血小板聚集等。糖尿病动物中, AGE 堆积与抑制 NO 血管舒张作用成正比, 并且可以通过阻断 AGE 的形成而提高 NO 血管舒张作用。

DNA 和核酸蛋白也是 AGE 损伤的目标, 它们的非酶糖化可影响基因的转录和表达。将质粒 PBR322 非酶糖化后再转染大肠杆菌, 可使质粒 PBR322 的抗四环素基因失活。血管细胞内 AGE 的形成参与了糖尿病血管并发症的发病, 但其具体影响过程仍有待进一步研究。

2 晚期糖化终产物的间接作用

2.1 受体的概况^[4]

AGE 的结合位点在多种细胞如内皮细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞、单核巨噬细胞及类成骨细胞均有发现。AGE 是一群结构多样的物质, 能与细胞表面的许多分子发生相互作用。因肺组织的内皮细胞和单核巨噬细胞成分含量丰富, 故最先用肺来研究 AGE 受体, Nepper 等^[5]从肺组织分离出两种细胞表面相关性多肽, 一种为 35 kDa 的 RAGE, 另一种为 80 kDa 的乳铁蛋白样多肽, 经氨基酸端蛋白测序和胰蛋白酶消化片段分析后, 从肺组织文库中克隆出 cDNA。根据推测的氨基酸序列, RAGE 是一种新的免疫球蛋白超家族成员。RAGE 细胞外区域具有 V 型片段紧接两个 C 型片段的类免疫球蛋白结构。在细胞外区域之后是一个跨膜区和一条高度电荷的胞质尾巴, 细胞内段 RAGE 与 B 细胞激活标记 CD20 最具有同源性, 该段很可能在配体占领受体后结合胞浆内信号传导分子, 产生细胞效应。在内皮细胞和单核细胞表面, RAGE 和 LF-L 以复合物的形式出现^[6]。RAGE 和 LF-L 的抗体之间无交叉反应, 但均能阻断 AGE 与其位点的结合, 以上提示 RAGE 可能参与了宿主对环境干扰的反应, 与之一致的是 RAGE 基因在 6 号染色体短臂人类主要组织相容性抗原 ③和 ④之间。

A 型巨噬细胞清除受体和其他在细胞表面呈现的多肽(p60、p90、galectin-2)也被认为可能是 RAGE 的结合点, 这些结合点在 AGE 介导的细胞激活中的作用尚未明确。清除受

体可能主要通过内吞、清除 AGE 而发挥作用, p60、p90、galectin- 2 有可能与 RAGE 识别不同结构的 AGE 有关。

2.2 经 RAGE 的信号传导^[7]

RAGE 做为信号传导受体介导 AGE 和其配体结合在细胞表面, 激活细胞内部各种信号传导机制^[8]。最近有实验证明, 用一种突变的缺乏胞内尾巴的负性 RAGE 可以阻断 AGE 引发的细胞激活。AGE 的主要成份之一羧甲基赖氨酸(carboxymethyl lysine, CML) 在缺乏受体时生物活性丧失, 不产生活性氧碎片, 不发荧光, 也不形成交联。目前发现 RAGE 的信号途径之一是 p21ras 的激活引起丝裂素活化蛋白激酶和转录因子 NF- κ B 的核转位, 最终导致靶基因的转录。丝裂素活化蛋白激酶细胞外信号调节激酶 1 和 2 是激活的 p21ras 的靶物。在细胞暴露于 AGE 15~ 20 min 内, 细胞外信号调节激酶 1 和 2 即达到激活顶峰。当 p21ras 第 118 位半胱氨酸被丝氨酸取代时, AGE 和 RAGE 相互作用引起的细胞外信号调节激酶 1 和 2 的激活则被阻断。

NF- κ B 是多种“损伤反应基因”的多效转录调节因子, 它的激活可引起靶细胞中这类基因的表达。如在糖尿病组织中, 血管细胞粘附分子和亚铁血红素氧合酶- iv 表达均升高。这些细胞应激标记物均与 NF- κ B 激活密切相关^[9]。用抗 RAGE- IgG 或过量的可溶性 RAGE 阻断 AGE 与 RAGE 的结合同时也阻止了由此引起的 NF- κ B 的激活。

2.3 RAGE 介导的生物学效应

2.3.1 晚期糖化终产物对单核细胞的作用 体内和体外实验均证实, AGE 对单核细胞具有选择性趋化作用^[10]。体内实验可见 AGE 引起单核细胞穿过正常的内皮层到达 AGE 注射点。体外实验发现, 在完整的内皮细胞层或平滑肌细胞层一侧孵育 AGE 后可引起另侧单核细胞跨膜转移明显增加, 这种 AGE 引起的单核细胞在内皮下游走和沉积, 可能与动脉粥样硬化的早期变化有关。

单核细胞被激活后产生一系列细胞因子, 如血小板源性生长因子(platelet- derived growth factor, PDGF)、胰岛素样生长因子^[11](insulin- like growth factor, IGF)、白介素- 1(interleukin- 1, IL- 1) 及肿瘤坏死因子- 2(tumor necrosis factor- 2, TNF- 2) 等。另外, 还刺激粒细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage- colony stimulating factor, GM- CSF) 释放, 以旁分泌或自分泌方式刺激粒细胞生长, 从而将 AGE 对单核巨噬细胞的作用放大。

2.3.2 晚期糖化终产物与血管内皮细胞受体的作用 正常血管内皮仅少量表达 RAGE 抗原及 mRNA, 而在糖尿病或其他原因引起的闭塞性血管病变中 RAGE 抗原及 mRNA 的表达明显增强^[12, 13]。

RAGE 介导了内皮细胞对 AGE 的清除, 同时沟通了 AGE 从血管到内皮下层的联系, 间接促进了 AGE 与细胞外基质成分发生交联, 引起基底膜增厚, 通透性异常。

内皮细胞上 RAGE 与 AGE 结合后, 产生氧化应激, 包括产生硫代巴比妥酸反应性物质(TBARS) 和激活 NF- κ B。这些过程可被抗 RAGE- IgG 或抗氧化剂阻断, 内皮细胞产生氧化应激后可诱导白介素- 6 mRNA 的表达增加。白介素-

6 是一种与纤维蛋白原合成有关的细胞因子。

内皮细胞在处理 AGE 过程中, 一方面增加组织因子促凝活性, 另一方面抑制抗凝血栓调理素活性, 引起内皮细胞单层通透性增加。这种通透性改变可被事先应用可溶性 RAGE 阻断。

观察发现, 糖尿病兔体内血管细胞粘附分子- 1 表达增加。血管细胞粘附分子- 1 是一种粘附受体, 增强单核细胞对内皮细胞的粘附, 使单核细胞靶向性地粘附在血管壁, 促进动脉粥样硬化的发展。同时还发现, 糖尿病患者体内的可溶性血管细胞粘附分子- 1 较正常人群高。尽管目前对血管细胞粘附分子- 1 的功能尚不清楚, 但可作为糖尿病患者血管受损的标志物。

此外, AGE 与内皮细胞受体结合后诱导血管收缩多肽, 即内皮素- 1 的生成。

2.3.3 晚期糖化终产物对其它细胞受体的作用 成纤维细胞、平滑肌细胞上的 RAGE 主要介导靶细胞的增殖效应, 其中成纤维细胞的效应由表皮生长因子(EGF) 介导, 平滑肌细胞至少能产生三种促细胞分裂因子, 其中 PDGF、纤维细胞生长因子和肝素结合表皮生长因子样生长因子是大血管病变中最重要的生长因子。

系膜细胞上的 RAGE 可诱导许多基质成分产生^[14], 如 IV 型胶原、昆布氨酸和硫酸肝素糖化蛋白, 这些是构成基底膜的主要成份。糖尿病时, 系膜细胞上的 RAGE 介导, 与肾小球系膜中巨噬细胞上 RAGE 相互作用, 释放一些生长因子, 主要有 PDGF 和转移生长因子(transfer growth factor, TGF- β)。TGF- β 是一种多功能的细胞因子, 它能刺激细胞外基质合成, 抑制细胞外基质的蛋白裂解活性, 增加胶原及层粘连蛋白 mRNA 水平, 使平滑肌细胞转移到内层发生增殖^[15]。

另外, RAGE 可作为细胞粘附分子介导红细胞对内皮细胞的粘附, 表面有 AGE 形成的红细胞能被内皮细胞上的 RAGE 识别而结合, 引起内皮细胞氧化损伤, 这种反应同样能被抗 RAGE 抗体阻断。

3 晚期糖化终产物与氧化应激

氧化作用和非酶糖化关系密切。首先, 氧化作用参与了非酶糖化。非酶糖化产物如羧甲基赖氨酸和戊糖醛是还原糖和游离氨基在有氧条件下经过金属离子催化形成, 同时还产生氧自由基。无氧环境、络合剂、还原剂以及氧自由基捕获剂对 AGE 的形成均有抑制作用。其次, 非酶糖化与氧化作用, 特别是脂质过氧化有相互促进作用。糖化胶原蛋白能催化脂质过氧化反应^[16], 而脂质过氧化物对糖化胶原蛋白的交联有促进作用。单核吞噬细胞通过特异性受体识别和摄取 AGE, 也可通过清道夫受体识别和摄取 AGE 和氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox- LDL), 提示 AGE 和 ox- LDL 可能有共同的结构。脂质过氧化物如 ox- LDL, 难以通过正常代谢途径转运和清除, 在体内聚集, 有利于非酶糖化的发生。

另外, AGE 发挥生物效应时也产生氧化应激, 使用抗氧

化剂能减轻 AGE 的生物效应,说明 AGE 发挥生物效应时也有氧化应激的参与^[17],但是非酶糖化和氧化作用的关系仍有待进一步研究。

4 晚期糖化终产物与临床

实验发现,糖尿病患者肾脏及视网膜组织中 AGE 水平在微血管病变的早期即已显著升高,且胶原-AGE 与尿蛋白排泄率高度相关。故监测尿蛋白排泄率可反映体内胶原-AGE 的水平。在治疗方面,抑制 AGE 合成和阻断 AGE 与 RAGE 之间作用的药物将是今后研究的方向^[18]。大量的实验证实,盐酸氨基胍能够抑制 AGE 合成,改善糖尿病的慢性并发症的许多症状^[19,20]。阻断 AGE 与 RAGE 之间相互作用的抗 RAGE 抗体和可溶性 RAGE^[18]也是非常具有前途的药物。另外,抗氧化剂可能对糖尿病慢性并发症起到一定疗效。

参考文献

- [1] Bonnardel-Phu E, Wautier JL, Vicaute E, et al. Advanced glycation endproducts are involved in microvascular permeability changes observed in microcirculation of diabetic rats in vivo [J]. *J Mal Vasc*, 2000, **25** (2): 122-127
- [2] Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S, et al. In vivo and in vitro evidence for the glycoxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **150** (2): 343-355
- [3] 严金川, 陈日新. 糖基化终产物对人脐静脉内皮细胞一氧化氮含量影响及意义 [J]. *中国糖尿病杂志*, 1998, **6**: 239
- [4] Helen Vlassara. Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: role of advanced glycation endproducts receptors [J]. *Diabetes*, 1996, **45** (suppl 3): S 65-66
- [5] Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylated endproducts of protein [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 14 998-15 004
- [6] Ann Marie Schmidt. The endothelial cell binding site for advanced glycation endproducts consists of a complex: An integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 9 882-889
- [7] Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, et al. Activation of receptor for advanced glycation endproducts: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 1999, **34**: 479-489
- [8] Kislinger T, Fu C, Huber B, et al. N (epsilon)-(carboxymethyl) lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation endproducts that activate cell signaling pathways and modulate gene expression [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (44): 31 740-749
- [9] Ann Marie Schmidt. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 1 395-403
- [10] Schmidt AM, Yan SD, Brett J, et al. Regulation of human Mononuclear phagocyte migration by cell surface binding proteins for advanced glycation endproducts [J]. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 2 155-168
- [11] Kirseim M, Aston CS, Hintz R, et al. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation endproduct modified proteins [J]. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 439-446
- [12] Rittthaler U, Deng Y, Zheng Y, et al. Expression of receptors for advanced glycation endproducts in peripheral occlusive vascular disease [J]. *Am J Pathol*, 1995, **146**: 688-694
- [13] Sun M, Muinehiro Yokoyama, Toshiyuki Ishiwata, et al. Deposition of advanced glycation endproducts (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat [J]. *Int J Exp Pathol*, 1998, **79**: 207-222
- [14] Noriyuki Iebara, Hiroya Takeoka, Yoshihiko Yamada, et al. Advanced glycation endproducts modulate transcriptional regulation in mesangial cells [J]. *Kidney International*, 1996, **50**: 1 166-172
- [15] Takayuki Higashi, Hiroyuki Sano, Tetsushi Saishoji, et al. The receptor for advanced glycation endproducts mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells [J]. *Diabetes*, 1997, **46**: 463
- [16] Richard Bucala. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 6 434-438
- [17] Sobal G, Menzel J. The role of antioxidants in the long-term glycation of low density lipoprotein and its Cu²⁺-catalyzed oxidation [J]. *Free Radic Res*, 2000, **32** (5): 439-449
- [18] Rahbar S, Kumar, Yemini K, et al. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **262** (3): 651-656
- [19] Ronald G Tilton. Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines: inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation endproducts formation [J]. *Diabetes*, 1993, **42**: 221-232
- [20] 黄宇峰, 林善铤, 程梅芬, 等. 氨基胍对糖尿病大鼠肾组织中糖化终产物受体 mRNA 表达的调节 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1999, **15** (1): 27-30
- [21] Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble receptor for advanced glycation endproducts blocks hyperpermeability in diabetic rats [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 238-243

(此文 1999-11-12 收到, 2000-08-10 修回)

(此文编辑 文玉珊)