

糖尿病微血管病变机制的研究进展

王 慧 娄晋宁

糖尿病已成为世界上发病率最高、对人类健康威胁最严重的疾病之一。胰岛素抵抗、胰岛素功能缺陷导致胰岛功能衰竭是 2 型糖尿病发病的重要机制之一。糖尿病所引起的糖代谢紊乱,导致微血管病变,继而引起一系列并发症,包括视网膜病变、糖尿病肾病和糖尿病足。糖尿病微血管病变的机制尚不完全明确,目前认为非酶性糖基化终末产物形成、蛋白激酶 C 信号通路的激活、氧化应激反应、多元醇通路激活和己糖胺通路活性增高等具有重要的作用。本文就此方面的研究进展进行综述。

一、糖尿病微血管病变的病理特征

内皮细胞在糖尿病微血管病变中具有关键作用,其结构和功能均表现出显著的异质性。来自不同部位的血管内皮在正常和疾病状态下的表型特征并不相同。研究表明,不仅来自大血管和小血管的内皮细胞的基因表达谱存在差异,而且来自不同组织器官的微血管内皮细胞的基因表达谱也不相同,这些差异基因对于内皮细胞的迁移、血管生成、细胞外基质形成和脂质代谢等一些生物效应具有重要意义。除内皮细胞外,其他类型的细胞如周细胞和足细胞在糖尿病微血管病变的发生和发展过程中也发挥了重要的作用。视网膜周细胞可调节视网膜毛细血管局部的血流量和血管通透性,对内皮细胞起支持作用,还可通过接触抑制对内皮细胞的增生起抑制作用^[1]。内皮细胞之间以紧密连接的方式相互连接,构成了血-视网膜屏障中最为重要的结构基础。周细胞和内皮细胞结构和功能的完整性对维持视网膜毛细血管的稳定性具有十分重要的作用。周细胞选择性的丢失被认为是糖尿病视网膜病变最早的病理形态学改变,它导致通透性增加、内皮细胞增生、基膜增厚和微血管瘤形成,进一步引起血-视网膜屏障破坏,视网膜毛细血管出血、渗出,乃至新生血管的形成和纤维增生,最终

导致视网膜脱离,造成失明^[1]。足细胞和内皮细胞形成了肾小球毛细血管网,并与基膜一起构成了肾小球的滤过屏障。足细胞损伤和丢失是糖尿病肾病的主要病理特征之一^[2]。

此外,糖尿病肾病早期出现肾小球肥大、基膜增厚以及系膜区细胞外基质的进行性积聚,尿蛋白排泄量增加,后期表现为肾小球和肾小管间质的纤维化,大量蛋白尿生成,发生终末期肾衰竭。糖尿病的微血管改变不仅发生在肾脏和视网膜,也可累及肢体末端微血管,表现为微血管内皮损伤,基膜增厚,管壁通透性增加,毛细血管出血、渗出,管腔狭窄甚至完全闭塞,引起组织的血液灌流减少,出现缺血性坏死。糖尿病足是糖尿病患者下肢血管病变、神经病变合并溃疡、坏疽、感染引起组织破坏的一种病理状态,具有很强的致残性,最终可导致截肢甚至死亡。糖尿病微血管病变表现出一定的器官特异性,主要发生在肾脏、视网膜及外周血管,而在脑和肺等其他器官这种病理改变并不明显。深入研究微血管病变的器官特异性的相关机制可以从一个新的角度寻找预防和治疗糖尿病微血管病变的靶点。

二、糖尿病微血管病变的机制

1. 多元醇通路的激活:多元醇通路由一系列酶系统构成,其中醛糖还原酶是多元醇通路的关键酶。正常情况下葡萄糖很少经多元醇通路代谢,当糖尿病血糖水平升高时,己糖激酶呈饱和状态,过剩的葡萄糖不能通过正常的氧化或酵解途径代谢,于是,醛糖还原酶活性增加,多元醇代谢通路激活。多元醇代谢通路激活后使细胞内山梨醇和果糖过度堆积,继而引起细胞渗透性损伤,同时细胞内肌醇和谷胱甘肽(GSH)水平下降,还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH/NAD⁺)比值增高,Na⁺-K⁺-ATP 酶活性下降,细胞和组织缺氧,内皮细胞受损。一般认为,多元醇通路激活发生于糖尿病微血管病变信号通路中的上游,因此醛糖还原酶抑制剂可以阻断多元醇通路代谢,延缓糖尿病微血管病变的进展。

2. 糖基化终末产物及其受体:糖基化终末产物

基金项目:国家“973”基金项目(2006CB503906)

作者单位:100073 北京协和医学院研究生院(王慧);100029

北京,中日友好临床医学研究所(王慧、娄晋宁)

通讯作者:娄晋宁,电子信箱:Lou.j@mail.com

(advanced glycation end products, AGEs)是在非酶促条件下蛋白质、氨基酸、脂质或核酸等的游离氨基与还原糖的羰基经过缩合、重排、裂解、氧化修饰后所产生的一组稳定的终末产物。在长期高血糖过程中,糖尿病患者体内的糖基化终末产物生成增多,通过与内皮细胞表面的糖基化终末产物受体结合,干扰活性氧的作用,导致血管内皮细胞功能紊乱,影响血管的结构和功能,使血管舒张功能受损,可能是引起糖尿病微血管病变发生发展的始动因素之一。正常情况下 RAGE 在血管内皮细胞、周细胞、足细胞和神经胶质细胞中都有低水平表达。糖尿病发生后细胞 RAGE 表达水平随着其配体浓度的增加而上调^[3]。AGEs - RAGE 对于糖尿病肾小球病变发生发展的作用已经通过转基因动物模型所证实。Yamamoto 等将胰岛细胞过度表达 iNOS 的转基因小鼠与血管内皮细胞特异性过表达 RAGE 的转基因小鼠进行杂交。结果杂交小鼠的 RAGE 过表达增加了内皮细胞对糖基化终末产物的敏感性。这种双重转基因鼠的肾脏病变呈加速发生,蛋白尿加重,肾脏增生肥大,出现肾小球系膜增生和肾小球硬化^[4]。而阻断 db/db 小鼠的 RAGE 或敲除链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病小鼠 RAGE 基因,则可减轻糖尿病小鼠的蛋白尿和肾小球硬化。肾小球微血管内皮细胞的损伤可能是引起糖尿病肾病的具体机制尚不完全清楚。除肾小球内皮细胞外,系膜细胞和足细胞亦表达 RAGE 受体。AGEs 通过 RAGE 与这些细胞结合,可产生过多的基质蛋白,并能改变基质蛋白金属酶和金属蛋白酶抑制物表达^[3]。

3. 蛋白激酶 C 信号通路激活:目前认为,蛋白激酶 C(PKC)激活可能是糖尿病微血管损伤的共同通路。糖尿病情况下多种途径可激活 PKC:高血糖可使细胞内二酯酰甘油(DAG)增多,激活 PKC;多元醇通路活跃使 NADH/NAD⁺ 比值升高,有利于 DAG 形成,从而激活 PKC;AGE 和 RAGE 相互作用也可激活 PKC^[5];氧化应激反应和游离脂肪酸增加均可导致 PKC 激活^[6]。PKC 激活进一步影响一系列血管功能,包括血管的舒缩反应、通透性、内皮细胞增生、新生血管形成以及血液流变学的改变。PKC 可抑制内皮细胞的 eNOS 活性,降低一氧化氮(NO)的产生,并且增加血管的内皮素(endothelin-1, ET-1)的释放,导致血管舒缩功能障碍^[7];PKC 也可促使血管内皮生长因子(VEGF)表达,从而促进新生血管形成,增加血管通透性;PKC 还可上调肾小球的 TGF- β_1 表

达水平,增加纤维连接蛋白和 IV 型胶原的表达,导致细胞外基质增生。在糖尿病状态下,视网膜、肾小球和主动脉等多种组织中 PKC 活性均增强,而脑组织的 PKC 活性保持不变,提示了组织特异性的 PKC 激活可能部分解释了为什么糖尿病微血管病变主要发生于视网膜和肾小球,表现出一定的器官特异性^[8]。PKC 在血管组织中的分布呈亚型特异性,其中 PKC- β 主要在视网膜、肾脏、心脏、脑和胰岛等组织中表达,被认为是与糖尿病微血管病变密切相关的一种主要的亚型^[9]。由于 PKC 对组织或细胞的生理活动非常重要,非特异性的全 PKC 抑制剂很可能引起一些毒性反应,甚至导致机体死亡,因此人们针对 PKC- β 亚型设计了特异性 PKC- β 抑制剂(LY333531)。研究表明,LY333531 可使糖尿病早期的肾小球高滤过状态恢复正常,降低蛋白尿排泄率,下调肾小球内 TGF- β_1 表达,肾小球内细胞外基质沉积减少,因而缓解了肾小球硬化及肾间质纤维化的程度,有阻止或延缓糖尿病肾病发生和发展的作用^[9]。

4. 蛋白激酶 A 活性降低:近年来,越来越多的研究提示蛋白激酶 A(PKA)在糖尿病血管病变过程中可能有一定的作用。在血管组织中,cAMP 可调节血管张力和维持平滑肌细胞的收缩功能,它与 PKA 结合可使底物磷酸化,进而调节细胞的生长、分化和凋亡,影响下游信号通路的基因表达以及维持血管张力。PKA 不仅可通过上调血管内皮细胞 eNOS 的表达和活性改善血管内皮功能障碍,还可下调血管 NADPH 氧化酶的 p22phox 亚基表达,从而抑制氧化应激反应中活性氧簇(ROS)的大量生成^[10]。高糖状态下,脂联素可以通过激活 PKA 抑制内皮细胞生成大量的 ROS^[11]。此外,PKA 激活可抑制内皮细胞凋亡,降低血管内皮的通透性以及改善血管内皮的屏障功能^[12,13]。许多研究表明,PKA 与 PKC 的激活对细胞的功能具有相反的作用,因此,PKA 激活可能对糖尿病状态下的微血管有保护作用,可延缓糖尿病微血管病变的进展。

5. 氧化应激反应:在 2004 年的 ADA 和 EASD 大会上美国学者提出:引起糖尿病并发症的 4 条通路活性增加,实质上都是高糖诱导的超氧化物过表达的结果。持续高糖状态下葡萄糖诱导的线粒体过氧化物生成过多是糖尿病各种并发症发生的中心环节和共同的病理生理学机制。目前发现,氧化应激反应可以激活几乎所有与糖尿病微血管并发症发生发展有关的信号传导通路,包括 PKC 通路、多元醇通路、己糖

胺通路以及 AGEs 形成^[6]。氧化应激的结果是导致 ROS 的产生。糖尿病血管病变过程中产生的 ROS 主要来源于以下几种途径:葡萄糖自身氧化、蛋白质非酶糖基化、多元醇通路激活、线粒体电子传递链、NADPH 氧化酶和解偶联的 eNOS^[14]。Brownlee 等认为糖尿病状态下线粒体电子传递链生成 ROS 可能是氧化应激的一个重要原因。他们进一步提出,来源于线粒体的 ROS 通过下调 eNOS 的表达和抑制其活性导致内皮细胞功能障碍^[15]。因此,阻断线粒体产生过量的活性氧可抑制高血糖引起的蛋白激酶 C 激活、AGEs 生成、山梨醇蓄积以及转录因子 NF- κ B 的活化。ROS 介导的微血管内皮细胞损伤可能表现为记忆性的病理改变,当血糖降至正常后,这种改变仍然存在,从而影响血糖水平的恢复,称之为高血糖的“代谢记忆”^[16]。过量生成的 ROS 可以与 DNA 和蛋白相互作用,引起细胞损伤,其中线粒体 DNA 可能是 ROS 损伤的一个特殊靶点^[16]。近期研究发现,NADPH 氧化酶在氧化应激过程中有重要作用^[17]。AGEs 和 RAGE 相互作用激活下游通路的 PKC- α ,介导糖尿病大鼠肾脏的 NADPH 氧化酶生成 ROS^[12]。糖尿病小鼠的 PKC- β 基因被敲除后其 NADPH 氧化酶不再被激活,表明 NADPH 氧化酶激活可能通过 PKC 途径^[18]。在氧化应激反应中,NADPH 氧化酶如同一把“双刃剑”:一方面,在糖尿病早期,短暂激活 NADPH 氧化酶可通过 ROS 激活细胞内氧化还原信号通路,继而诱导抗氧化酶表达上调,包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶;另一方面,长期激活 NADPH 氧化酶产生过量的 ROS 可引起 eNOS 解偶联、线粒体功能障碍以及细胞内 NADPH 水平下降所致的抗氧化基因表达减弱^[19]。Satoh 等发现,糖尿病大鼠肾小球 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达增强,而肾小球 eNOS 的二聚体形式减少,eNOS 处于解偶联状态可导致 ROS 生成增多。因此,认为 NADPH 氧化酶和解偶联的 eNOS 很可能是糖尿病大鼠肾小球 ROS 生成的主要来源^[20]。

6. 细胞因子:糖尿病患者视网膜新生血管形成与 VEGF 表达水平上调密切相关。VEGF 可促进血管生成,增强血管通透性,增加黏附分子及细胞外基质的产生。色素上皮细胞衍生因子(PEDF)为丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员,具有潜在的抑制血管生成的作用,PEDF 可减弱 VEGF 对糖尿病微血管病变的影响。PEDF 不仅抑制 NADPH 氧化酶的活性,具有抗氧化特性,而且可抑制 AGEs 诱导的 RAGE 过表达^[21]。

在糖尿病视网膜病变的增生期,VEGF 表达水平上升而 PEDF 水平下降。此外,糖尿病状态下内皮细胞黏附分子表达水平显著升高,包括细胞间黏附因子(ICAM-1)、血管细胞黏附因子(VCAM-1)和 E-选择素,导致白细胞与血管内皮细胞间的黏附增加,聚集形成小栓子阻塞血管,同时白细胞活化所产生的细胞因子可促进内皮细胞的损伤,加重微血管病变。

三、C-肽在防治微血管病变中的作用

既往认为 C 肽没有生物学活性,C 肽与胰岛素一同从胰岛 β 细胞分泌,仅用于评估 β 细胞的功能。1 型糖尿病患者胰岛素绝对分泌不足,其 C 肽水平明显低于正常。2 型糖尿病早期为胰岛素抵抗,临床上以高胰岛素血症为主,C 肽水平有所上升,而后期胰岛 β 细胞功能衰竭,胰岛素与 C 肽水平均下降。近 10 余年来越来越多的证据表明 C 肽在防止和逆转早期糖尿病微血管病变的发生和发展中可能有重要的作用。首先,胰岛素可以延缓糖尿病微血管病变的进展,但不能防止和逆转糖尿病微血管病变。新诊断的早期 1 型糖尿病患者在接受胰岛素治疗后其肾小球的高滤过并不能恢复正常,而给予生理剂量的 C 肽可以明显改善糖尿病患者的肾功能。其次,成功的胰岛移植可以使糖尿病患者的尿蛋白及尿微量白蛋白明显降低,提示胰岛移植可以防止甚至逆转糖尿病患者的肾脏病变^[22]。Thompson 等发现,与药物治疗组相比,胰岛移植成功的患者在移植 3 年后视网膜病变程度明显减轻,表明胰岛移植在防止糖尿病视网膜病变方面也有重要作用^[23]。胰岛移植后,内源性胰岛素重新分泌,C 肽分泌也随之恢复。因此,认为重新分泌的 C 肽可有效地防止和延缓糖尿病微血管病变。C 肽在防止和逆转糖尿病微血管病变中的作用,还有待更长期的临床研究予以证实。目前对 C 肽作用机制的认识主要有 3 个方面:①激活肾小管细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,增强肾小管对水和盐的重吸收;此外,在人肾小管细胞中 C 肽参与磷脂酶 C、蛋白激酶 PKC- δ 、PKC- ϵ 和 RhoA 的激活,导致 ERK1/2 和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)磷酸化,同时激活蛋白激酶 B^[24];②与细胞膜上 G 蛋白偶联的受体特异性结合引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[25];③结合到包括内皮细胞在内的细胞的细胞膜上,激活内皮型一氧化氮合酶,刺激一氧化氮合成,维持血管稳态^[25]。

四、结论与展望

综上所述,糖尿病微血管病变的发生和发展过程受多种因素影响。长期高血糖导致糖基化终末产物

水平上升,糖基化终末产物与其特异性受体结合后激活细胞内的蛋白激酶 C,引发氧化应激反应,导致细胞内一系列生理生化改变和血管功能障碍,从而产生糖尿病微血管病变。虽然这些因素在糖尿病微血管病变中的作用已经被人们所认识,但许多新的因素还有待进一步的研究去阐明。

参考文献

- Ejaz S, Chekarova I, Ejaz A, *et al.* Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. *Diabetes Obes Metab*,2008,10(1):53-63
- Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*,2005,54(6):1626-1634
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*,2008,4(5):285-293
- Yamamoto Y, Kato I, Doi T, *et al.* Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE overexpressing mice. *J Clin Invest*,2001,108(2):261-268
- Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, *et al.* Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetes*,2008,57(2):460-469
- Tuttle KR, Anderberg RJ, Cooney SK, *et al.* Oxidative Stress Mediates Protein Kinase C Activation and Advanced Glycation End Product Formation in a Mesangial Cell Model of Diabetes and High Protein Diet. *Am J Nephrol*,2008,29(3):171-180
- Yokota T, Ma RC, Park JY, *et al.* Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes. *Diabetes*,2003,52(3):829-837
- Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein Kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*,2001,44(6):659-673
- Tuttle KR, Bakris GL, Toto RD, *et al.* The effect of ruboxistaurin on nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*,2005,28(11):2686-2690
- Shah DI, Singh M. Activation of protein kinase A improves vascular endothelial dysfunction. *Endothelium*,2006,13(4):267-277
- Ouedraogo R, Wu X, Xu SQ, *et al.* Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes*,2006,55(6):1840-1846
- Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, *et al.* Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRX*,2004,1(1):17

- 25

- Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, *et al.* Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvascular Research*,2004,67(1):64-77
- Basta G, Lazzerini G, Del Turco S, *et al.* At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2005,25(7):1401-1407
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*,2005,54(6):1615-1625
- Xie L, Zhu X, Hu Y, *et al.* Mitochondrial DNA oxidative damage triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in high glucose-induced HRECs. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,2008,49(9):4203-4209
- Gorin Y, Block K, Hernandez J, *et al.* Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem*,2005,280(47):39616-39626
- Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, *et al.* Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C β -null mice. *Diabetes*,2006,55(11):3112-3120
- Gao L, Mann GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signaling. *Cardiovasc Res*,2009,82(1):9-20
- Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, *et al.* NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*,2005,288(6):F1144-1152
- Yamagishi S, Ueda S, Matsui T, *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents advanced glycation end products (AGEs)-elicited endothelial nitric oxide synthase (eNOS) reduction through its anti-oxidative properties. *Protein Pept Lett*,2007,14(8):832-835
- Fiorina P, Folli F, Zerbini G, *et al.* Islet transplantation is associated with improvement of renal function among uremic patients with type 1 diabetes mellitus and kidney transplants. *J Am Soc Nephrol*,2003,14(8):2150-2158
- Thompson DM, Begg IS, Harris C, *et al.* Reduced progression of diabetic retinopathy after islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation*,2008,27;85(10):1400-1405
- Zhong Z, Davidescu A, Ehrén I, *et al.* C-peptide stimulates ERK1/2 and JNK MAP-kinases via activation of PKC in human renal tubular cells. *Diabetologia*,2005,48(1):187-197
- Rebsomen L, Khammar A, Raccach D, *et al.* C-peptide effects on renal physiology and diabetes. *Exp Diabetes Res*,2008,2008:281536

(收稿:2010-04-22)

欢迎订阅

欢迎赐稿