

NADPH 氧化酶在糖尿病慢性并发症中的作用及中西药干预研究进展

李伯武 梁晓春

近年来全球糖尿病患者人数急剧上升,糖尿病及其并发症给人类健康带来巨大的危害。糖尿病慢性并发症的发病机制尚未完全阐明,存在多个假说,目前业内已公认氧化应激是糖尿病慢性并发症的主要发病机制之一^[1]。NADPH 氧化酶作为一种过氧化物酶,催化产生活性氧(ROS),参与介导体内的氧化应激损伤,有足够的实验和观测数据表明其与糖尿病慢性并发症的氧化应激机制密切相关。现就 NADPH 氧化酶与糖尿病慢性并发症的关系及中西药干预现状进行综述。

一、NADPH 氧化酶与糖尿病慢性并发症的发生

糖尿病慢性并发症的发生机制非常复杂,涉及到细胞代谢障碍、信号传导受阻、营养支持缺乏、细胞凋亡及再生修复等诸多方面。但是没有一种学说能够揭示糖尿病慢性并发症的全貌,它们之间内在联系如何,能否用一种全新的机制将它们统一起来成为当今研究的热点。2001 年 Brownlee^[2]提出了糖尿病并发症的统一机制学说,认为高糖引起线粒体中超氧阴离子生成过多,继而引发组织细胞中发生氧化应激,最终导致糖尿病的各种并发症。其中 NADPH 氧化酶作为催化产生超氧阴离子的关键酶,在被多种途径激活后,可迅速启动 ROS 的“生产线”,参与 PKC 调节、多元醇途径、AGEs 通路、己糖胺途径、细胞凋亡等进程,介导体内氧化应激反应,造成血管内皮损伤、血流供应减少及神经组织破坏等,最终引起糖尿病慢性并发症的发生。

1. NADPH 氧化酶与 PKC 调节:PKC 处于细胞内诸多信号通路中心,是具有重要生理功能的一类丝/苏氨酸蛋白激酶。相关实验表明,不论是在体外还是在体内激活的 PKC 信号传导途径,都可以通过上调

NADPH 氧化酶的表达,激发组织细胞的氧化应激反应,产生更多的氧自由基,刺激细胞的凋亡,造成血管内皮细胞的损伤^[3,4]。与此同时,氧化应激及硝基反应会增加 ONOO⁻的产生,并通过 PKC 途径进一步损伤血管内皮细胞,增加血管通透性,造成微循环障碍^[5]。PKC 为 NADPH 氧化酶的激动剂,能够在高糖等条件下激活。Inoguchi 等^[6]研究证实高浓度葡萄糖和高游离脂肪酸能够通过 PKC 依赖的 NADPH 氧化酶的激活来刺激 ROS 的生成,且这一过程能够被 PKC 的特异性抑制剂 GF109203 和钙感光蛋白 C 以及 NADPH 氧化酶的抑制剂二联苯碘所阻断。Babior 等学者^[7]更深一步研究发现,高血糖引起 ROS 增高也是通过依赖于 PKC 的 NADPH 氧化酶激活这一途径。当 PKC 调控启动后,NADPH 氧化酶被激活,随之 ROS 产生增加,促进了生长因子- β 、内皮细胞间黏附分子的生成,导致细胞外基质增生、基膜增厚,并影响内皮素-1、一氧化氮合酶等的表达,导致血流改变及血管舒缩功能紊乱,使血管通透性增加,并促进新生血管的生成。在上述血管内皮细胞的损伤过程中,NADPH 氧化酶扮演了重要角色。

2. NADPH 氧化酶与多元醇途径:葡萄糖是醛糖还原酶(AR)的底物,正常情况下经此途径代谢水平很低。糖尿病时,持续的高血糖使 AR 活性增加,引起细胞多元醇代谢途径的活化,将大量葡萄糖转换为山梨醇,山梨醇在山梨醇脱氢酶(SDH)的作用下被进一步转化成果糖。此过程中,AR 依靠 NADPH 作为辅助因子,而谷胱甘肽还原酶(GSR)在催化氧化性谷胱甘肽(GSSG)还原成还原性谷胱甘肽(GSH)时,亦需要 NADPH 作为辅助因子。因此当多元醇通路被激活后,NADPH 消耗过多,抑制了 GSH 这一细胞内主要的抗氧化剂的生成,导致自由基生成过多,并对组织细胞造成损伤。同时代谢产物山梨醇的聚集可导致细胞渗透压升高,引起细胞水肿,阻碍信号传导,增加氧化应激反应,并最终导致神经细胞变性、坏死^[8]。此外,多元醇通路的激活可以使 ROS 产生增

基金项目:北京市自然科学基金(7082077)

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院中医科

通讯作者:梁晓春,电子信箱:xcliang@vip.sina.com

加及脂质过氧化,导致 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性降低,阻滞神经节去极化,从而减慢神经传导速度。国外研究者在利用转基因糖尿病大鼠过度表达 AR 时,发现大鼠神经组织内山梨醇含量升高,GSH 下降,且与大鼠神经传导速度相关^[9]。另外,山梨醇在生成果糖的过程中, NAD^+ 被还原成 NADH, NADH/NAD^+ 比例增加,NADH 的增加促使二羟基丙酮还原为二酰基甘油的前体——三硝酸甘油,并最终激活 PKC 途径^[10]。增多的 NADH 作为底物又会引起 NADPH 氧化酶再度激活,并与 PKC 途径一起协同产生更多的活性氧。

3. NADPH 氧化酶与 AGEs 通路:长期的高血糖可使蛋白质发生非酶促糖化,并通过一系列反应,转变为稳定的晚期糖基化终末产物(AGEs)。而 AGEs 在体内大量的堆积可以通过氧自由基团对组织产生损伤作用^[11]。其机制可能为 AGEs 通过与其特异性受体 RAGE 的结合活化 NADPH 氧化酶,产生 ROS,并经过细胞内的信号传导通路 Ras/Raf/MEK/ERK,增加核转录因子 NF- κ B 的表达,启动炎症反应,引起神经微血管系统结构与功能的改变。另一种观点认为,过多的 ROS 可再次诱导 AGEs 的产生,并促进转化生长因子(TGF)- β 的生成,而 TGF- β 可上调小鼠系膜细胞 p22-phox、p47-phox、p67-phox 和 gp91-phox 的表达以及小管上皮细胞 p22-phox mRNA 的表达,从而形成正反馈放大效应^[12]。相关实验发现,从野生型小鼠分离得到的巨噬细胞可以增加经 AGEs 刺激诱导的组织因子水平,但从 NADPH 氧化酶中心亚基 gp91-phox 缺失型小鼠中分离得到的巨噬细胞却缺乏这种能力。这些发现提示,NADPH 氧化酶在 AGE-RAGE 介导的氧自由基产生以及触发这条轴线改变神经传导及功能中起到关键作用。

4. NADPH 氧化酶与己糖胺途径:己糖胺合成通路(HBP)是机体正常的糖代谢途径之一,在全身各种组织中广泛存在。当持续高血糖或细胞糖负荷过量时,此通路迅速开放,在相关酶的催化下,葡萄糖经过一系列反应,最终生成二磷酸尿嘧啶-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc)。而 UDP-GlcNAc 作为己糖胺合成通路的最终产物,可对蛋白和脂质进行一系列糖基化修饰,并上调细胞因子 TNF- α 、TGF- β_1 、PAI-1 等的表达,产生微血管病变和大量的 ROS,最终造成线粒体氧自由基产生过多以及 NADPH 氧化酶活性的增加,加重氧化应激^[13-15]。相关研究证实,己糖胺通路的激活,可引发体内氧化应激损伤,进行

性促发细胞功能障碍,导致神经功能受损和神经营养支持的丧失^[16]。

5. NADPH 氧化酶与细胞凋亡:由 ROS 介导的氧化应激反应是诱导细胞凋亡信号转导的重要原因。相关研究显示,高糖情况下,线粒体 DNA 受到自身 ROS 的攻击,引起线粒体突变^[17]。突变的线粒体可通过降低电子传递链中关键蛋白的表达而进一步放大氧化应激的效应,使线粒体膜电位丢失、ATP 合成下降、细胞内钙稳态失调,并激活凋亡相关信号如细胞色素 C、凋亡诱导因子等而触发细胞凋亡。此外,ROS 的产生可对核酸造成损伤,导致碱基被修饰或丢失以及单、双链 DNA 的断裂、交联,从而激活 DNA 损伤的分子感受器——聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP),活化的 PARP 可消耗大量的 NAD^+ 和 ATP,这些变化导致细胞氧化损伤、 Ca^{2+} 内流增加及能量耗竭,最终激活细胞凋亡途径。以上由 ROS 介导的细胞凋亡途径,NADPH 氧化酶都起到了关键作用。Susztak 等^[18] 在研究 DN 肾小球病变时发现,由 NADPH 氧化酶和线粒体共同作用产生的 ROS,可直接激活促凋亡的 p38 MAPK 和 caspase-3 途径,进而引起足细胞凋亡。而 Vincent^[19] 则证实,高糖特别是餐后血糖的升高能够减少 GSH 的含量,增加 NADPH 氧化酶的活性,促进 ROS 的生成,进一步诱导 caspase-3 的表达,使神经细胞 DNA 裂解为碎片,并启动脊髓背根神经元细胞的凋亡程序。国内学者在这方面亦做了相关研究,其中以丁莉、黎健为代表,他们在用高葡萄糖刺激血管内皮细胞时,发现高糖可以促进人脐静脉内皮细胞 NADPH 氧化酶 4 表达上调,并引起细胞内活性氧生成和凋亡增加^[20]。

二、西药对于糖尿病 NADPH 氧化酶水平调节的研究

NADPH 氧化酶在糖尿病慢性并发症的发生中具有重要作用,目前已证实多种药物可在一定程度上抑制其活性,减轻氧化应激对组织的损伤,并逐渐应用于临床。甲福明二甲双胍是一种双胍类降糖药,体外实验证明其具有清除氧自由基的能力。Ouslimani 等^[21] 进一步研究证实,甲福明二甲双胍通过减少 NADPH 氧化酶和(或)线粒体呼吸链的活性,能显著降低正常牛主动脉内皮细胞胞内 ROS 的含量。吡格列酮属噻唑烷二酮(TZD)类药物,是一类新型胰岛素增敏剂,动物试验已经证实噻唑烷二酮类有抗氧化作用。Bagi 等^[22] 发现吡格列酮可降低糖尿病大鼠 NADPH 氧化酶诱导的 ROS 水平,同时升高过氧化氢

酶活性。维生素 E 是一种重要的抗氧化药物,动物实验证实其能清除多余的 ROS,抑制 PKC - NADPH 氧化酶正反馈激活环,改善氧化应激状态^[23,24]。此外,NADPH 氧化酶抑制剂日益成为大家研究的焦点。研究发现夹竹桃麻素 apocynin,PKC 抑制剂 calphostin C 和 LY333531 以及 NADPH 氧化酶亚基 Rac - 1 阻断剂等都在不同程度上抑制了 NADPH 氧化酶的表达和上调,减少 ROS 的产生,延缓或减轻了糖尿病慢性并发症的发生。

三、中医药对于糖尿病 NADPH 氧化酶水平调节的研究

中医中药在抗氧化应激方面的研究也有很多报道,近年研究发现多种中药单味药、提取物及中药复方对糖尿病 NADPH 氧化酶水平有调节作用。

1. 单味药及提取物:黄芩素属黄酮类化合物,是中药黄芩的 4 种主要有效成分之一,其分子环中含有 3 位羟基,因此抗氧化效能最强。吴泽成等^[25]将 40 只由链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠随机分为对照组、模型组、黄芩素低、高剂量组,治疗 12 周后,发现模型组的 p22 - phox mRNA 及 p47 - phox mRNA 的含量明显高于对照组,两治疗组的 p22 - phox mRNA 及 p47 - phox mRNA 含量较模型组显著降低。提示黄芩素对 2 型糖尿病大鼠肾组织具有明显的保护作用,其机制可能是通过下调 p22 - phox mRNA 及 p47 - phox mRNA 的表达,减轻自由基对肾组织的氧化损伤。中药红花具有抗凝、降压、抗炎、抗氧化等作用,广泛用于治疗心脑血管疾病和糖尿病慢性并发症。刘慎微等^[26]将 40 只大鼠随机分为正常对照组、模型组和红花低、高剂量组,连续给药 12 周后,发现与模型组比较,红花各剂量组血肌酐、尿素氮、UAER、MDA 水平显著下降;SOD、GSH - PX 活性显著上升;p22 - phox mRNA、p47 - phox mRNA 表达水平显著降低。认为红花可能是通过抑制 p22 - phox mRNA、p47 - phox mRNA 的转录及胞质成分 p47 - phox 和膜成分 p22 - phox 的结合,从而降低 NADPH 氧化酶的活性,减少肾脏氧化应激反应和 ROS 产生。

2. 中药复方:通络方剂是中药复方制剂,由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、土鳖虫、赤芍等药物组成,具有活血通络、改善和调整血管内皮细胞功能的作用。张春阳等^[27]将糖尿病大鼠随机分为模型对照组、通络方剂超微粉组、通络方剂微粉组和正常对照组。干预 4 周后发现:与正常组相比,糖尿病大鼠肾皮质 MDA 和 GSH - Px 含量升高,TSOD 活性降低,NADPH 氧化酶

亚基 p47 - phox mRNA 表达增强;与模型组相比,两干预组糖尿病大鼠肾皮质 MDA 含量明显降低,TSOD 和 GSH - Px 活性增强,p47 - phox mRNA 表达降低。提示通络方剂能增强糖尿病大鼠肾脏 TSOD 和 GSH - Px 活性,降低 NADPH 氧化酶 p47 - phox mRNA 的表达,降低氧化应激水平,减少 ROS 的产生和对组织的损伤。

四、小结与展望

NADPH 氧化酶与糖尿病慢性并发症的氧化应激途径密切相关,并被证实广泛渗透于 PKC 途径、多元醇途径、AGEs 通路、己糖胺途径、细胞凋亡等有关发病机制假说中。越来越多的临床和实验研究支持抑制 NADPH 氧化酶活性的药物有助于糖尿病慢性并发症的防治,但相关西药的治疗效果不确定,且不良反应较大,需要进一步探索。中医学以整体观为核心,通过辨证论治的法则,灵活应用中医药,多靶点、多途径的防治糖尿病慢性并发症。大量的实验报道显示,中医药在降低糖尿病大鼠 NADPH 氧化酶的表达及减轻氧化应激损伤上具有独特的优势。然而研究当中也存在不少问题,评价标准不统一,设计欠规范,且多数实验仅停留在对某些指标的观察上,缺乏深入的探讨。此外,学者们对 NADPH 氧化酶的研究多聚集在糖尿病肾病方面,DPN 方面关注较少,目前还尚未检索到单味中药或复方影响糖尿病大鼠坐骨神经组织 NADPH 氧化酶的文献。因此,如何改进研究方法,寻求科学依据,并积极探索新的研究切入点,来阐明中药作用机制,让中医药在治疗糖尿病慢性并发症上发挥更大的优势,将成为今后关注的焦点。

参考文献

- 1 Stadler K, Jenei V, von Bolcschazy G, *et al.* Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitus in rats [J]. *Orv Hetil*, 2004, 145 (21): 1135 - 1140
- 2 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001; 414 (6865): 813 - 820
- 3 Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, *et al.* Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells; the role of protein kinase C and NAD(P)H - oxidase activation [J]. *Diabetes*, 2003, 52 (11): 2795 - 2804
- 4 Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, *et al.* Evaluation of oxidative stress in diabetic animals by in vivo electron spin resonance measurement role of protein kinase C [J]. *Diab Res Clin Pract*, 2004, 66 (Suppl 1): S109 - 113
- 5 Pricci F, Leto G, Amadio L, *et al.* Oxidative stress in diabetes - induced endothelial dysfunction involvement of nitric oxide and protein kinase C [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35 (6): 683 - 694
- 6 Inoguchi T, Li P, Umeda F, *et al.* High glucose level and free fatty acid

- stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C – dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells[J]. *Diabetes*, 2000, 49(11): 1939 – 1945
- 7 Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16: 42 – 47
- 8 Stevens MJ, Lattimer SA, Kamijo M, *et al.* Osmotically – induced nerve Taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat [J]. *Diabetologia*, 1993, 36(7): 608 – 614
- 9 Song Z, Fu DT, Chan YS, *et al.* Transgenic mice overexpressing aldose reductase in Schwann cells show more severe nerve conduction velocity deficit and oxidative stress under hyperglycemic stress. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 23: 638 – 647
- 10 Michael B, *et al.* Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813 – 820
- 11 Wauter MP, Chappey O, Corda S, *et al.* Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(5): E685 – E694
- 12 Yoo CW, Song CY, Kim BC, *et al.* Glycated albumin induces superoxide generation in mesangial cells. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14(426): 361 – 368
- 13 McClain DA, Paterson AJ, Roos MD, *et al.* Glucose and glucosamine regulate growth factor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8150
- 14 Daniels MC, Crook ED. Regulation of TGF – β by the hexosamine biosynthesis pathway in rat proximal tubule cells (Abstract). *Am J Soc Nephrol*, 1995, 6: 1040
- 15 Daniels MC, McClain DA, Crook ED. Transcriptional regulation of transforming growth factor β_1 by glucose: investigation into the role of the hexosamine biosynthesis pathway. *Am J Med Sci*, 2000, 319: 138
- 16 Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy[J]. *Diabetes*, 2003, 52(1): 165 – 171
- 17 Houten BV, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2006, 5(2): 145 – 152
- 18 Susztak K, Raft AC, Schiffer M, *et al.* Glucose – induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2006, 55(1): 225 – 233
- 19 Vincent AM, McLean LL, Backus C, *et al.* Short – term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons[J]. *FASEB*, 2005, 19(6): 638 – 640
- 20 丁莉, 屈顺林, 王蕾, 等. 高葡萄糖刺激血管内皮细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达上调、活性氧增加及细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(6): 405 – 409
- 21 Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont – Rousselot D, *et al.* Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells[J]. *Metabolism*, 2005, 54: 829 – 834
- 22 Bagi Z, Koffer A, Kaley G. PPAR gamma activation by reducing oxidative stress increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with type 2 diabetes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(2): H742 – 748
- 23 Gavrila D, Li WG, McCormick ML, *et al.* Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II – infused apolipoprotein E – deficient mice. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2005, 25: 1671 – 1677
- 24 Calvisi OF, Ladu S, Hironaka K, *et al.* Vitamin E down – modulates iNOS and NADPH oxidase in c – Myc/TGF – α transgenic mouse model of liver cancer[J]. *Hepatology*, 2004, 41: 815 – 822
- 25 吴泽成, 刘慎微, 尹超, 等. 黄芩素对 2 型糖尿病大鼠肾脏组织氧化应激的影响及其作用机制[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(10): 1566 – 1570
- 26 刘慎微, 尹超, 吴泽成, 等. 红花对 2 型糖尿病大鼠肾脏氧化应激反应的影响[J]. *中国药房*, 2009, 20(6): 409 – 411
- 27 张春阳, 邹俊杰, 石勇铨, 等. 通络方剂对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29(8): 940 – 943

(收稿: 2010 – 05 – 08)

关注糖尿病神经病变的脂质代谢异常途径

吴群励 梁晓春

糖尿病神经病变(diabetic neuropathy, DN)是糖尿病最常见的慢性并发症,患病率高达 50% ~ 90%^[1]。其临床表现复杂多样,是糖尿病患者致残和致死的重要原因之一,给家庭和社会带来沉重的负

担。因 DN 的发病机制迄今尚未完全阐明,故缺乏特异性的有效治疗方法及药物。越来越多的证据表明,脂质代谢紊乱与 DN 的发生发展密切相关,降脂治疗是 DN 治疗的新靶点,本文就此做一综述。

一、脂质代谢异常是 DN 发生发展的重要独立危险因素

高血糖是 DN 发生的始动因素,严格控制血糖可有效降低 DN 的发病率,这已得到循证医学的支持,

作者单位: 100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院中医科

通讯作者: 梁晓春, 电子信箱: xliang@vip.sina.com