糖基化终末产物对胰岛β细胞的损伤及作用机制研究进展

游　嘉　张文健　娄晋宁

摘　要　胰岛β细胞的功能障碍和凋亡是糖尿病病程中持续高糖的主要原因。糖基化终末产物(AGEs)作为糖毒性的重要作用机制与胰岛β细胞的损伤关系密切。今年来研究指出AGEs通过氧化应激反应可引起胰岛β细胞胰岛素合成功能障碍,胰岛素释放功能障碍,并促使胰岛β细胞凋亡;除此之外,AGEs还可抑制胰岛β细胞发生自噬作用从而促胰岛β细胞凋亡。因此,明确AGEs对胰岛β细胞损伤机制对于糖尿病发病机制的研究起着重要作用,并将对糖尿病的治疗提供新的方向。

关键词　糖基化终末产物　胰岛β细胞　功能障碍　凋亡

中图分类号　R3　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.050

逐渐加剧的胰岛β细胞衰竭和数量减少是2型糖尿病进展过程中的主要病理特征。明确胰岛β细胞损伤的机制对于阐明糖尿病的发病机制和开发有效治疗手段是非常重要的。糖代谢紊乱导致长期高血糖,继而引起的糖毒性,脂毒性及糖脂毒性是胰岛β细胞损伤的主要原因。糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)引起各种细胞功能障碍是糖毒性的重要机制。AGEs不仅与糖尿病血管并发症密切相关,而且对胰岛β细胞的损伤可能是糖尿病进展的重要因素之一。本文就AGEs对胰岛β细胞功能的影响及其作用机制进行综述。

一、AGEs的来源及细胞内作用机制

AGEs是由还原糖与蛋白质、脂类及核酸等的氨基发生非酶促糖的Maillard反应,产生稳定的、具棕色荧光的共价化合物。体内的AGEs沉积,一种是经过食物摄取的AGEs在体内累积,另一种是在体内通过一个缓慢而复杂的过程形成。正常人体内AGEs水平随年龄增长而缓慢增加,而糖尿病患者由于长期处于高血糖状态,导致糖基化反应及AGEs生成加速[1]。

目前的研究证明,AGEs引起的病理变化主要通过两种方式:(1)AGEs与特异受体结合(RAGE等),引起的一系列复杂细胞生物反应包括氧化应激和炎性反应等。AGEs与RAGE结合促进活性氧产生,激活PKC、MAPK、NF-κB等信号转导通路,进而引起各类细胞因子的改变。如AGEs-RAGE可诱导人肾小球系膜细胞内超氧阴离子形成,下调二氢叶酸还原酶的表达,从而加重2型糖尿病肾病的氧化应激反应[2]。(2)AGEs可通过直接与蛋白质发生交联,改变蛋白质结构、影响脂质代谢及修饰核酸从而影响细胞和组织功能引起的生理、生化的特性的变化。如AGEs若与血浆蛋白共价偶联,沉积在血管壁,将会降低管壁弹性,增加脆性,使管腔进行性狭窄,引发高血压。目前研究证明AGEs对胰岛β细胞的损伤主要包括胰岛素分泌功能障碍和增加胰岛β细胞凋亡两个方面。

二、AGEs通过氧化应激引起胰岛β细胞功能的障碍

当机体受到有害刺激时,体内产生的自由基和抗氧化防御之间出现失平衡,该现象即为氧化应激。氧化应激可导致细胞和组织受到损伤,在糖尿病及并发症的发生、发展中起着重要的作用。由于胰岛β细胞内抗氧化酶水平较低,对ROS较为敏感,因此胰岛β细胞是氧化应激的重要靶点。ROS可通过影响胰岛素信号转导通路间接抑制胰岛β细胞分泌功能;还可直接损伤胰岛β细胞,促其凋亡。

ROS产生的一个非常重要的途径就是AGEs。AGEs的形成过程中发生一系列的氧化反应,会产生大量ROS,当与胰岛β细胞上的受体RAGE结合发生又可诱导胰岛β细胞产生更多的氧化应激产物ROS。在ROS介导下,高糖环境又可促使AGEs的形成,形成一个恶性循环。由此推断AGEs对胰岛β细胞的损伤机制途径之一就是诱发胰岛β细胞的氧化

作者单位:100069　北京,中日友好医院

通讯作者:娄晋宁,教授,博士生导师,电子信箱:Lou.j@mail.com

应激反应。氧化应激引起的胰岛功能障碍表现在两个方面:胰岛素合成障碍和胰岛素分泌过程受损。

1. AGEs 影响胰岛素的合成:胰腺十二指肠同源盒子(pancreatic - duodenal homeo box,PDX - 1)是胰岛 β 细胞胰岛素基因的特异性转录因子,促进胰岛 β 细胞增殖,抑制凋亡,参与葡萄糖诱导的胰岛素合成,调节胰岛素基因及胰岛素分泌相关基因的表达。Foxo1 是胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路中关键的分子,与 2 型糖尿病的胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞功能障碍等有着密切的关系。Foxo1 蛋白通过磷酸化、乙酰化和泛素化 3 种修饰形式调节 Foxo1 分子转录活性,在信号转导过程中发挥作用。Foxo1 可与 PDX - 1 启动子结合,抑制 PDX - 1 的转录活性,对 PDX - 1 起负性调节的作用。研究发现 ROS 不但使 PDX - 1 的 mRNA 减少,导致 PDX - 1 合成下降,而且 ROS 还能使 PDX - 1 与胰岛素 DNA 的结合活性减弱,降低 PDX - 1 启动胰岛素基因的转录活性,使胰岛素的合成减少。使用外源性制备的 AGEs 孵育胰岛素细胞(INS - 1 和 HIT - T15),发现 AGEs 通过影响胰岛表达特异性转录因子 PDX - 1 和 Foxo1 导致胞内胰岛素的含量减少[3,4]。Del Guerra 等[5]发现在 2 型糖尿病中,胰岛素表达的下降与 Foxo1 表达增加相关。而在糖尿病动物的体内发现了 PDX - 1 含量降低的现象,且持续的高糖刺激可引起大鼠胰岛 β 细胞 Foxo1 表达增强[6,7]。当胰岛素细胞持续暴露于外源性的 AGEs,发现 Foxo1 表达增强,乙酰化程度增加可阻断其泛素化降解,同时 Foxo1 去磷酸化从细胞质移位至细胞核内,相应地互为转位竞争的 PDX - 1 被迫移除细胞核外,这一系列反应最终降低了胰岛素的合成[3,4]。

2. AGEs 影响胰岛素分泌途径:当细胞外血糖浓度升高时,葡萄糖通过细胞膜局部的葡萄糖转运子(GLUT2)进入胰岛 β 细胞。细胞内的葡萄糖很快被代谢,使胞质的 ATP/ ADP 比率增加,导致 ATP 敏感钾通道(K_{ATP})关闭,膜去极化,电压依赖性钙通道开放,胞内游离钙离子度升高,刺激胰岛素释放。

AGEs 引起 INS - 1 和大鼠胰岛的线粒体功能异常,出现超氧化物产量过高,ATP 含量降低,MnSOD 活性下降,改变细胞的钙通量,增加葡萄糖的摄取现象,导致氧化应激反应。这一系列的反应中影响到葡萄糖刺激引起的胰岛素的分泌的多个关键环节,最终导致胰岛素分泌功能障碍[8]。

Zhao 等[9]发现 AGEs 是通过与受体 RAGE 结合可激活 NF - κB 信号通路,引起 iNOS 的表达上调,从而增加 NO 的释放量,快速可逆的抑制线粒体呼吸链细胞色素 c 氧化酶的活性从而阻断 ATP 的产生,使得 K_{ATP}通道不能够闭合,进而导致胰岛 β 细胞的功能障碍,葡萄糖刺激胰岛素释放减少。

三、AGEs 诱导胰岛 β 细胞凋亡

2 型糖尿病 β 细胞数量减少的主要原因是细胞凋亡。正常情况下胰岛 β 细胞的凋亡虽然也存在,但糖尿病发生后细胞凋亡增加,打破细胞数量的平衡,导致糖尿病进展期胰岛 β 细胞数量减少,最终导致胰岛素分泌绝对不足。目前研究表明 AGEs 引起胰岛 β 细胞凋亡途径主要通过氧化应激和抑制自噬。

1. 氧化应激反应导致胰岛 β 细胞凋亡增加:胰岛 β 细胞是一种很易受氧化应激损伤并易凋亡的细胞。当外源性的 AGEs 干预 INS - 1 细胞,ROS 产物增多,诱导胰岛 β 胞细发生氧化应激,β 细胞凋亡增加[10]。炎性反应是一种常见的病理过程,在致炎因子作用于机体后,可引发组织细胞的损坏,使局部组织细胞显现变性、坏死。炎性反应和氧化应激是相互影响,相辅相成的,共同参与胰岛 β 细胞损伤的过程。当 AGEs 引起胰岛 β 细胞发生氧化应激反应,炎性转录因子 NF - κB 被激活,引发炎性因子分泌和炎性相关基因表达增多,促胰岛 β 细胞凋亡。

在细胞凋亡过程中,Bcl - 2 家族成员扮演重要的角色,在许多细胞受到刺激时起到保护细胞抗凋亡的作用。另一个重要的角色 caspase 可选择性地切割某些蛋白质,造成细胞凋亡。Zhu 等[11]报道当 AGEs 和 RAGE 结合后,会引起胰岛 β 细胞的 Bcl - 2 基因表达降低,激活 caspase,并引起线粒体肿胀,导致细胞凋亡增加。使用 RAGE 抗体中和 RAGE 可以有效抑制 AGEs 引起的胰岛 β 细胞凋亡。在对氧化应激引起细胞损伤的研究中已证明,氧化应激可引起多种信号通路发生错综复杂的反应,诱导细胞内各种酶活性改变,最终导致细胞凋亡。由于相关通路的复杂多样,AGEs 诱发的氧化应激导致的胰岛 β 细胞凋亡分子机制还不十分清楚。

2. AGEs 可抑制胰岛 β 细胞的自噬引起细胞凋亡:自噬是将错误修饰的细胞质蛋白及受损细胞器吞噬并使其包被入囊泡,后与溶酶体融合形成自噬溶酶体,再降解其所包裹的内容物的过程,借此实现细胞本身的代谢需要及细胞器的更新。已有研究表明,自噬对于维持胰岛 β 细胞数量、结构、基础及应激状态

下胰岛 β 细胞功能皆具有重要意义。LC3 是自噬标志蛋白,与其结合蛋白 SQSTM1/p62(SQSTM1 与泛素化蛋白连接)共同作用可将泛素化蛋白转运至自噬体降解,然而当胞内 SQSTM1/p62 积聚时说明自噬功能损伤。胰岛 β 细胞自噬缺陷的小鼠模型(胰岛 β 细胞上 Atg7 基因被特异性敲除)的胰岛 β 细胞内出现泛素化蛋白及 P62 蛋白积聚,且胰岛 β 细胞增殖减少,凋亡增加,胰岛素分泌显著降低,最终胰岛退化[12~15]。Song 等[16]研究证明使用糖蛋白(GA,AGEs 的前体产物)与 INS-1 细胞及大鼠胰岛共同孵育后均显示自噬标志蛋白 LC3-11 明显减少而 SQSTM1/p62 增加,这说明 GA 引起可胰岛 β 细胞自噬功能缺陷。SQSTM1/p62 持续表达激活 NF-κB-iNOS-caspase-3 信号通路,继而诱发 β 细胞凋亡。虽然 GA 不与 AGEs 的受体 RAGE 结合,不能完全代表 AGEs 对 β 细胞产生的细胞毒性机制,但作为 AGEs 的前体产物仍为 AGEs 诱发 β 细胞功能障碍的研究提出有意义的证据,另一方面也说明 AGEs 对 β 细胞产生的毒性不仅是通过与受体 RAGE 途径,其他机制尚待研究。

四、针对 AGEs 引起的胰岛 β 细胞衰竭的治疗方法的探讨

2 型糖尿的病程就是胰岛 β 细胞功能的逐渐衰退的过程。因此,如何减缓胰岛 β 细胞衰竭,促进其功能恢复就成为 2 型糖尿病治疗研究的重要方向。AGEs 对胰岛 β 细胞的损伤在糖尿病的发展过程中是一个重要的因素,减轻 AGEs 引起的细胞损伤对糖尿病可能具有治疗作用。

GLP-1 是一种肠促胰素,可促进 β 细胞生长分化、减少 β 细胞凋亡、刺激胰岛素分泌,有效降低血糖以减少 β 细胞的糖毒性。GLP-1 类似物及其受体激动剂已经广泛临床应用。Puddu 等通过 AGEs 和 GLP-1 同时作用于 HIT-T5 细胞发现,GLP-1 可以有效地保护 AGEs 引起的 β 细胞凋亡和坏死,并可减轻氧化应激,恢复氧化反应的平衡,降低 AGEs 受体 RAGE 的表达。虽然有实验表明 GLP-1 对 AGEs 抑制胰岛素分泌的恢复作用不明显或仅能部分恢复胰岛 β 细胞对糖刺激时胰岛素的应答分泌,但 GLP-1 对胰岛 β 细胞的保护作用是得到广泛证明的[17,18]。

磺酰脲类衍生物可通过关闭 ATP 依赖的钾离子通道,抑制钾离子的流出,使细胞膜内外的电位差逐渐变正。去极化作用开启钙离子通道,细胞内的钙离子浓度上升会增加胰岛素的释放,从而达到对 AGEs 造成的胰岛素分泌减弱的改善[10,17]。另外,由 AGEs 引起的胰岛 β 细胞分泌功能障碍还可以通过 iNOS 的抑制剂-氨基胍治疗得以改善[10]。随着对 AGEs 导致胰岛 β 细胞损伤在糖尿病进展过程中的重要性逐渐被认识,相信干预 AGEs 作用的药物有望被研发。

英国前瞻性糖尿病研究(UKPDS)指出 2 型糖尿病的本质是胰岛 β 细胞逐渐衰竭,而不是胰岛素敏感度的改变。如何保护和防止胰岛 β 细胞衰竭和细胞凋亡是目前 2 型糖尿病的防治的关键之一。虽然 AGEs 在糖尿病领域的研究目前还处于初步阶段,但 AGEs 与胰岛 β 细胞功能和凋亡都密切相关,深入探寻 AGEs 对胰岛 β 细胞作用的机制可能为预防或治疗 β 细胞损伤提供新的线索。

参考文献

1 Bansal S, Chawla D, Banerjee BD, *et al*. Association of RAGE gene polymorphism with circulating AGEs level and paraoxonase activity in relation to macro-vascular complications in Indian type 2 diabetes mellitus patients[J]. Gene, 2013, 526(2): 325-330

2 曾信幸, 李竞, 高凌, 等. AGEs 培养的人肾小球系膜细胞中二氢叶酸还原酶及 O2-水平[J]. 微循环学杂志, 2012, 22(3): 27-29

3 Shu T, Zhu Y, Wang H, *et al*. Ages decrease insulin synthesis in pancreatic β-cell by repressing PDX-1 protein expression at the post-translational level [J]. PLoS One, 2011, 6(4) e18782

4 Puddu A, Storace D, Odetti P, *et al*. Advanced glycation end-products affect transcription factors regulating insulin gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 395(1): 122-125

5 Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, *et al*. Functional and molecular defects of pancreatic islets inhuman type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2005, 54(3): 727-735

6 Robertson RP, Harmon J, Tran PO, *et al*. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection [J]. Diabetes, 2003, 52(3): 81-587

7 Kawamori D, Kaneto H, Nakatani Y, *et al*. The fork head transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(2): 1091-1098

8 Coughlan MT, Yap FY, Tong DC, *et al*. Advanced glycation end products are direct modulators of β-cell function [J]. Diabetes, 2011, 60 (10): 2523-2532

9 Zhao Z, Zhao C, Zhang XH, *et al*. Advanced glycation end products inhibit glucose-stimulated insulin secretion through nitric oxide dependent inhibition of cytochrome c oxidase and adenosine triphosphate synthesis [J]. Endocrinology, 2009, 150(6): 2569-2576

10 Lim M, Park L, Shin G, *et al*. Induction of apoptosis of Beta cells of the pancreas by advanced glycation end products, important mediators of chronic complications of diabetes mellitus [J]. Ann NY Acad Sci, 2008, 1150: 311-315

(下转第 179 页)

高诊断、判断预后,同时减少假阳性率、提高特异性。目前,国际上未形成统一操作模式,如光敏剂浓度、荧光剂持续时间、光源强度等,有待于形成统一操作标准,使 FC 更有效应用于临床。

参考文献

1 Sapre N, Herle P, Anderson PD, *et al*. Molecular biomarkers for predicting outcomes in urothelial carcinoma of the bladder[J]. Pathology, 2014, 46(4): 274 – 282

2 Hasser W, Droller MJ. Current concepts in assessment and treatment of bladder cancer[J]. Curr Opin Urol, 2000, 10(4): 291 – 299

3 邱永丰,张永瑞. 应用于膀胱肿瘤灌注治疗的化学药物研究进展[J]. 中华全科医学, 2014, 12(9): 1674 – 4152

4 Nilsson S, Ragnhammar P, Glimelius B, *et al*. A systematic overview of chemotherapy effects in urothelial bladdercancer[J]. Acta Oncol, 2011, 40(2 – 3): 371 – 390

5 Ohsugi H, Kitamura Y, Manabe Y, *et al*. Efficacy of prophylactic intravesical mitomycin C in patients with non – muscle – invasive bladder cancer[J]. Hinyokika Kiyo, 2014, 60(8): 375 – 379

6 汪蒴,余家琦,夏丹,等. 表阿霉素单次膀胱灌注预防浅表性膀胱肿瘤术后复发的前瞻性随机对照研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(4): 454 – 456

7 吴忠标,林国兵,陈柏君,等. 不同剂量表柔比星膀胱灌注预防浅表性膀胱肿瘤复发的疗效与安全性[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(8): 507 – 508

8 白云金,李金洪,魏强. 吉西他滨膀胱灌注治疗的研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2014, 10(26): 1001 – 1420

9 Gontero P, Frea B. Aetual experience and future development of gemcitabine superficial bladder cancer[J]. Ann Oncol, 2006, 17(5): 123 – 128

10 Dilorenzo G, PerdonàS, Damiano R, *et al*. Gemcitabine versus Bacille Calmette – Guérin after initial Bacille Calmette – Guérin failure in non – muscle – invasivebladder cancer: a multicenter prospective randomized trial[J]. Cancer, 2010, 116(8): 1893 – 1900

11 Luftnegger W, Ackermann DK, Futterlieb A, *et al*. Intravesical versus intravesical plus intradermal bacillus Calmette – Guérin: a prospective randomized study in patients with recurrent superficial bladder tumors[J]. J Urol, 2012, 155(7): 483 – 487

12 Byrne RR, Shariat SF, Brown R, *et al*. E – Cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, in situ and lymph node metastases with long – term follow up[J]. J Urol, 2001, 165(3): 1473 – 1479

13 Nativ O, Dalal E, Hidas G, *et al*. EDTA – induced urothelial cell shedding for the treatment of superficial bladder cancer in the mouse[J]. Int J Urol, 2006, 13(10): 1344 – 1346

14 Böhle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette – Guérin versus mitomycin C in superfi cial bladder cancer: formal meta – analysis of comparative studies on tumor progression[J]. Urology, 2004, 63(4): 682 – 686

15 Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, *et al*. Bacillus Calmette – Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine[J]. Cancer Sci, 2013, 104(1): 22 – 27

16 Colombel M, Saint F, Chopin D, *et al*. The effect of ofloxacin on bacillus calmette – guerin induced toxicity in patients with superficial bladder cancer: results of a randomized, prospective, double – blind, placebo controlled, multicenter study[J]. J Urol, 2006, 176(3): 935 – 939

17 孙忠全,钱伟庆,宋建达. α – 干扰素加丝裂霉素 C 膀胱灌注防治浅表性膀胱肿瘤复发的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2010, 22(10): 224 – 248

18 Berger AP, Steiner H, Stenzl A, *et al*. Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5 – aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single – center study[J]. Urology, 2003, 61(2): 338 – 341

19 Gándara L, Sandes E, Di Venosa G, *et al*. The natural flavonoid silybin improves the response to Photodynamic Therapy of bladder cancer cells[J]. J Photochem Photobiol B, 2014, 133(5): 55 – 64

20 French AJ, Datta SN, Allman R, *et al*. Investigation of sequential mitomycin C and photodynamic therapy in a mitomycin – resistant bladder cancer cel – l line model[J]. BJU Int, 2014, 93(4): 156 – 161

21 Richmond A, Owusu, Michael R. Hyperthermia as Adjunct to Intravesical Chemotherapy for Bladder Cancer[J]. Biomed Res Int, 2013, 10(26): 7 – 11

22 Straub M, Russ D, Hom T, *et al*. A phase IIA dose – finging study of PVP – hypericin fluorescence cystoscopy for detection of nonmuscle – invasive bladder cancer[J]. J Endourol, 2014, 11(5): 141 – 187

(收稿日期:2014 – 11 – 06)
(修回日期:2014 – 12 – 05)

(上接第 176 页)

11 Zhu Y, Shu T, Lin Y, *et al*. Inhibition of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) protects pancreatic β – cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 404(1): 159 – 165

12 Mazza S, Maffucci T. Autophagy and pancreaticβ – cells [J]. Vitamins Hormones, 2014, 95(2): 145 – 164

13 Jung HS, Lee MS. Role of autophagy in diabetes and mitochondria [J]. Ann New York Acad Sci, 2010, 1201 (7): 79 – 83

14 Hur KY, Jung HS, Lee MS. Role of autophagy in β – cells function and mass [J]. Diabetes Obesity Metab, 2010, 12 (10): 20 – 26

15 Jung HS, Chung KW, Won KJ, *et al*. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia [J]. Cell Metab, 2008, 8(4): 318 – 324

16 Song YM, Song SO, You YH, *et al*. Glycated albumin causes pancreatic beta – cells dysfunction through autophagy dysfunction [J]. Endocrinology, 2013, 154(8): 2626 – 2639

17 Hachiya H, Miura Y, Inoue K, *et al*. Advanced glycation end products impair glucose – induced insulin secretion from rat pancreatic β – cells [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2014, 21(2): 134 – 141

18 Puddu A, Storace D, Durante A, *et al*. Glucagon – like peptide – 1 counteracts the detrimental effects of advanced glycation end products in the pancreatic β – cells line HIT – T 15[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 398(3): 462 – 466

(收稿日期:2015 – 01 – 05)
(修回日期:2015 – 01 – 29)