

·综述·

高度糖基化终产物与骨质疏松

陈宏 蔡德鸿

机体长期高血糖状态是导致糖尿病慢性并发症的主要危险因素。高血糖状态通过在体内的糖基化作用引起一系列病理生理改变、形成糖尿病肾病、视网膜病变、神经病变、心脑血管病变、骨质疏松症等。高度糖基化终产物(Advanced Glycosylate End Products, AGE)是这一系列病理生理改变的重要环节,其作用机理在于 AGE 改变了部分生物大分子的结构和功能^[1]。令人关注的是,AGE 也被认为是一种衰老分子,在健康人群中随着年龄的增加而在组织中积累,参与衰老过程^[1,2]。由于糖尿病和衰老均可以导致骨质疏松,而 AGE 又能同时参与这两种疾病的病理过程,据此推测 AGE 有可能是老年性骨质疏松和糖尿病骨质疏松的共同致病因素。

一、AGE 的合成及代谢

AGE 是在无酶催化的情况下,葡萄糖、果糖及 6-磷酸葡萄糖等与生物大分子,尤其是长寿命蛋白,如胶原蛋白、基质蛋白等发生糖基化作用形成的终末产物^[1]。首先,糖与生物大分子的氨基基团结合形成不稳定的 Schiff 碱,然后经过一个缓慢的长达数周的重排形成更稳定的(但仍为化学可逆的)中间产物,即 Amadori 产物。Amadori 产物经过大约 28 d 的去氢、氧化和重排形成复杂的具有荧光性的 AGE。Schiff 碱和 Amadori 产物的堆积能改变被修饰的生物大分子的功能,但这种作用是可逆的。AGE 一旦形成,即为不可逆,且对蛋白质的消化酶高度抵抗。在糖尿病患者组织中即使血糖恢复正常,AGE 也不会回复正常,而是在组织中持续累积。AGE 可以通过改变这些生物大分子的结构和生物活性,广泛参与体内的各种病理变化。近来发现,短寿命的蛋白以及脂类和核酸也能发生糖基化形成 AGE 产物^[1]。由于 Amadori 产物理论上可有多重重排方式,AGE 的化学结构无特异性,但具有共同的抗原决定簇。几乎所有具有还原性的糖均能发生非酶促的糖基化作用。

AGE 在体内的代谢途径目前仍不明确。初步的研究认为,组织和细胞的 AGE 通过与巨噬细胞 AGE 受体结合,降解形成可溶性的 AGE-肽,这种小分子肽可以和细胞外基质的蛋白酶解成分相结合形成一类可进入循环的低分子量的 AGE 修饰物,即“第二代”AGE。推测这些 AGE 修饰蛋白的降解产物进入循环后多数被肾脏清除。但循环中未清除的 AGE 则包含具有高度反应性的中间产物以攻击靶组织,如肾脏,血管壁以及血浆蛋白成分等,进而加速相应的病变^[1,4]。

AGE 降解产物潜在的毒性作用在体内和体外实验中已得到证实。人血清中分离出来的 AGE-肽可以稳定地与靶蛋白,如胶原和血浆 LDL 共价结合产生 AGE-胶原和 AGE-LDL³。糖尿病肾病患者循环中的 AGE 降解产物通过加速粥样硬化形成,增加了罹患心血管并发症的危险性。

二、AGE 受体

AGE 在组织中沉积后可对组织产生直接的损害,也可以通过与 AGE 受体结合而引起一系列病理改变。多种细胞表面存在特异性识别和降解 AGE 的受体蛋白。AGE 受体蛋白最初发现于单核巨噬细胞,后在其他组织和细胞中也鉴定和克隆出一些 AGE 结合蛋白,如 35 kD 的 R-AGE、32 kD 的 Galectin-3 和 1 个与乳铁素有同源性的 80 kD 蛋白等⁶。各种 AGE 结合多肽的蛋白序列、配体特异性和功能均有差异,推测可能存在许多具有或不具有“受体”特征的 AGE 结合蛋白。这些蛋白参与了多种细胞功能如趋化、粘附、激活、细胞生长和分化、凝血或细胞屏障功能。例如通过 AGE 受体激活的 T 细胞可以与巨噬细胞协同在组织损害中发挥作用^[7]。这一点与在粥样硬化斑块中所发现的激活淋巴细胞活跃地参与了粥样硬化过程相一致。血管组织内累积的 AGE 是这类病变组织中巨噬细胞和 T 细胞激活的刺激物。

三、AGE 在骨质疏松症中的作用及机理

糖尿病骨质疏松症是糖尿病的慢性并发症之一,尤其在 1 型糖尿病中广泛存在。1976 年以来,Levin 等先后报道约 50% 的糖尿病患者可发生骨质疏松。在 1 型糖尿病中,长期的高血糖状态与骨量丢失有密切关系^[8],而且病变严重的青少年病人常出现骨骼生长发育迟缓^[9]。新近的研究表明 AGE 蛋白及其受体可能参与了糖尿病骨质疏松症的发生。将大鼠骨髓粒与葡萄糖孵育形成 AGE 后注入大鼠皮下结果发现骨吸收较对照组明显增强^[10]。在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠中也可以检测到骨胶原 AGE 的形成^[11]。Miyata 等人的研究则发现老年人骨组织中 AGE 的形成明显增加,且证实骨基质成分 I 型胶原在体外可以经过非酶促糖基化作用形成 AGE^[12]。提示糖尿病骨质疏松与老年性骨质疏松有共同的发病基础。而高血糖状态则加速了 AGE 形成过程,增加了 AGE 的形成量,因此糖尿病患者组织内呈 AGE 累积状态,易较早出现骨质疏松等各种病理变化。

骨质疏松的主要表现是低骨量和骨组织微结构退变,其发生的本质在于骨重建过程紊乱即骨吸收超过骨形成。骨吸收与骨形成分别与破骨细胞和成骨细胞直接相关。有研究发现 AGE 蛋白可以抑制小鼠成骨样细胞的活性,表现为

碱性磷酸酶活性下降,骨钙素分泌受到抑制,提示 AGE 蛋白可能抑制了骨生成^[11,14],也有研究认为 AGE 蛋白是通过加速骨吸收而参与骨质疏松的发病。AGE 可以促进单核/巨噬细胞产生 IL-1、TNF- β 、IL-6 等细胞因子,而这些细胞因子已经被证明可以提高破骨细胞的活性,加速骨吸收^[13,15,16]。我们近期的研究显示,AGE 可以引起体外培养的破骨细胞酸性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶活性增加并促进骨吸收陷窝的形成。

AGE 在组织中形成和沉积后,可通过不同的机理引起各种病理改变。(1)AGE 的直接化学作用:蛋白质 AGE 化以后,结构发生改变,可直接影响蛋白质通过正常信号传递途径发挥生理效应,而且由于 AGE 的不可逆性,使蛋白质在体内的更新周期延长。脂类、核酸也可经过非酶糖基化作用形成 AGE,导致结构和功能的改变。AGE 对组织可产生直接的损害,引起组织的老化和功能衰退,其中 1 个重要方式就是引起细胞外基质的分子结构及组成改变,从而导致基质功能的改变^[11,14]。骨组织为富含胶原的组织,Ⅰ型胶原的糖基化,可以直接导致骨髓脆性的增加。破骨细胞向骨质附着的能力与其胞膜表面丰富的玻连蛋白受体有关。值得注意的是玻连蛋白的 AGE 化可以显著影响内皮细胞的分布和粘附功能^[14]。(2)细胞内糖基化作用^[10]:在细胞外,蛋白质的糖基化主要由葡萄糖引起。在细胞内,则由果糖、6-磷酸葡萄糖、3-磷酸葡萄糖引起,糖基化速率更为迅速。若 DNA 发生糖基化,基因突变的发生频率明显增加,并引起基因的异常表达,影响细胞的结构和功能^[2]。(3)AGE 发挥作用的另一条重要途径是通过与细胞表面特异性受体结合而引起细胞因子、激素、氧自由基^[22]以及一氧化氮^[23]等可溶性信号物质含量改变,导致多种蛋白质基因表达水平的变化^[24,25]。最早确认的对 AGE 有高度亲和力的受体分布在内皮细胞和单核巨噬细胞膜上。AGE 与单核巨噬细胞、血管平滑肌细胞的 AGE 受体结合后,可诱导 IL-1、ICF-1、TGF- α 、TGF- β 、TNF- β 等基因水平的表达增多,这些细胞因子含量的增加进而引起细胞增生、血管壁增厚以及弹性下降^[1]。由于破骨细胞可能起源于单核巨噬细胞,而且,IL-1、IL-6、TNF 都是强有力的骨吸收因子,同时也是骨形成的抑制剂^[13,16]。据此推测,AGE 对破骨细胞功能产生的影响有可能也是通过 AGE 受体所形成的,有研究报道,小鼠成骨样细胞 MC3T3 E1 上有 AGE 受体的存在,提示了 AGE 受体作为作用中介的可能^[12]。(4)“第 2 代”AGE 的作用:“第 2 代”AGE 潜在的毒性效应在体内外试验中均已得到证实。但在糖尿病骨质疏松发病机理中的作用还有待进一步研究。

四、AGE 抑制剂

最经典的 AGE 抑制剂是氨基胍(Aminoguanidine),它是 1 种亲核胍类化合物,主要与糖基化反应终产物 3-脱氧葡萄糖酮醛反应,抑制 AGE 的形成^[26]。阿司匹林、二甲双胍、中药葛根、柴胡等也可能对蛋白质非酶糖基化有抑制作用。新近又逐渐开发了数种新型的 AGE 抑制剂,在防治糖尿病和衰老引起的并发症方面显示了良好的前景^[27,28]。运用 AGE 的

抑制剂干预其作用,有望为糖尿病性和老年性骨质疏松的防治提供新的手段。

AGE 在骨质疏松发生和发展中的作用及其机理目前仍远未阐明,尚有大量的研究有待进一步深入展开。探讨 AGE 对骨细胞生物学特性和骨微结构的影响为骨质疏松症发病机理的研究提供了新的方向。

参 考 文 献

- 1 Vlassara H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*, 1997, 46(Suppl 2):s19-25.
- 2 Chellan P, Nagaraj RH. Protein crosslinking by the maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 368:98-104.
- 3 Bucala R, Makita Z, Vega G, et al. Modification of LDL by advanced glycosylation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:9441-9445.
- 4 Chiarelli F, de Martino M, Mezzetti A, et al. Advanced glycation end products in children and adolescents with diabetes: relation to glycemic control and early microvascular complications. *J Pediatr*, 1999, 134:486-491.
- 5 Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, et al. Reactive glycosylation end products in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet*, 1994, 343:1519-1522.
- 6 Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissue. *Am J Pathol*, 1993, 143:1699-1712.
- 7 Libby P, Hase G. Involvement of the immune system in human atherosclerosis: current knowledge and unanswered questions. *J Lab Invest*, 1991, 64:5-15.
- 8 Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*, 1995, 44:775-782.
- 9 Rosenbloom AL, Lezotte DC, Weber FT, et al. Diminution of bone mass in childhood diabetes. *Diabetes*, 1977, 26:1052-1053.
- 10 Miyata T, Notoya K, Yoshida K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8:260-270.
- 11 Tomasek JJ, Meyers SW, Basinger JB, et al. Diabetic and age-related enhancement of collagen-linked fluorescence in cortical bones of rats. *Life Sci*, 1994, 55:855-861.
- 12 Miyata T, Kawai R, Taketomi S, et al. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, 11(Suppl 5):54-57.
- 13 Katayama Y, Akatsu T, Yamamoto M, et al. Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res*, 1996, 11:931-937.
- 14 Antonio D. Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem*, 1997, 170:43-45.
- 15 Takai M, Kasayama S, Yamamoto T, et al. Advanced glycation end products stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells. *J*

- Bone Miner Res, 1997, 12: 439-446.
- 16 Vlassara H, Brownlee M, Manogub K, et al. Cachetin TNF and IL-1 induced by glucose-modified protein: role in normal tissues remodeling. Science, 1998, 240: 1546-1548.
- 17 Paul RG, Bailey AJ. The effect of advanced glycation end-product formation upon cell matrix interactions. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31: 653-650.
- 18 Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G. Advanced glycation end products induced crosslinking of collagen *in vitro*. Biochem Biophys Acta, 1998, 1407: 215-224.
- 19 Bobbink WGC, de Boer HC, Winnie LH, et al. Effect of extracellular matrix glycation on endothelial cell adhesion and spreading: involvement of vitronectin. Diabetes, 1997, 46: 87-93.
- 20 Ling X, Sakashita N, Takeya M, et al. Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end-products in human tissues. Lab Invest, 1998, 78: 1591-1606.
- 21 Sedal W, Fischelstieder M. Immunohistochemical detection of N2-[1-(1-carboxy)ethyl] guanosine, an advanced glycation end product formed by the reaction of DNA and reducing sugars or L-ascorbic acid *in vitro*. Biochem Biophys Acta, 1998, 1425: 478-484.
- 22 Ceriello A. Hyperglycaemia, the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. Diabetes Nutr Metab, 1999, 12: 42-46.
- 23 Sugimoto H, Shukata K, Wata J, et al. Advanced glycation end products-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. Diabetologia, 1999, 42: 878-886.
- 24 Still AW, He C, Vlassara H. Characterization of the advanced glycation end-products receptor complex in human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 256: 549-556.
- 25 Kislinger T, Fu C, Huber B, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. J Biol Chem, 1999, 274: 31740-31749.
- 26 Taguchi T, Sugiura M, Hamada A, et al. Inhibition of advanced protein glycation by a Schiff base between aminoguanidine and pyridoxal. Eur J Pharmacol, 1999, 3789: 283-289.
- 27 Ruggiero-Lopez D, Leconte M, Monnet G, et al. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds: possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. Biochem-Pharmacol, 1999, 58: 1765-1773.
- 28 Rahbar S, Kumar-Yemini K, Scott S, et al. Novel inhibitors of advanced glycation end products. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 262: 651-656.