

糖基化终末产物与动脉粥样硬化的关系

王中群¹, 李丽华², 严金川¹, 徐绥宁¹

(江苏大学附属医院 1. 心内科, 2. 病理科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 糖基化终末产物; 动脉粥样硬化; 细胞凋亡; 钙化

[摘要] 糖基化终末产物(AGE)的形成是糖尿病患者代谢记忆的一个关键因素。系列研究及国内外相关研究显示 AGE 促进了动脉粥样硬化病变区的炎症、氧化应激、凋亡、微钙化灶的形成, 促使斑块由稳定向易损方向发展, 最终趋于破裂、血栓形成, 导致急性冠状动脉综合征等急性心脑血管事件的发生。文章从 AGE 的形成、来源、代谢、理化特性及其在炎症、脂质蓄积、凋亡、钙化中的作用机制等几个方面进行简要阐述, 希冀为动脉粥样硬化斑块的形成发展机制及治疗策略提供一些新的观念。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Relationship Between Advanced Glycation End-products and Atherosclerosis

WANG Zhong-Qun¹, LI Li-Hua², YAN Jin-Chuan¹, and XU Sui-Ning¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End-products; Atherosclerosis; Cell Apoptosis; Calcification

[ABSTRACT] The formation of advanced glycation end-products (AGE) is a key factor of metabolic memory in diabetic patients. The series of studies from ours and others indicated that AGE could promote inflammatory response, oxidative stress, apoptosis and micro-calcification formation in atherosclerotic lesions and accelerate the transition from stable plaque to vulnerable plaque, followed by plaque rupture, thrombogenesis and finally the occurrence of acute coronary syndrome. This paper elaborates the formation, source, metabolism, characterization of AGE and the mechanisms of AGE in inflammation response, lipid accumulation, apoptosis and calcification. We hope it can provide some new ideas for the mechanisms of atherosclerosis and therapeutic strategy.

糖基化终末产物(advanced glycation end-products, AGE)的形成是糖尿病患者代谢记忆的重要原因,也是糖尿病合并冠心病患者粥样硬化斑块形成的关键因素^[1,2]。我们的系列研究^[3-5]及国内外相关研究显示 AGE 促进了动脉粥样硬化病变区的炎症、氧化应激、凋亡、微钙化灶的形成,促使斑块的形成并使其由稳定向易损方向发展,最终趋于破裂、血栓形成,导致急性冠状动脉综合征等急性心脑血管事件的发生。鉴于动脉粥样硬化斑块的重要临床意义和糖尿病患病率迅猛增加所带来的社

会负担,深入探讨 AGE 在易损斑块形成并恶性演进中的作用就显得尤为迫切。为此,笔者整合了本课题组及相关学者的系列研究,从 AGE 的形成、来源、代谢、理化特性及其在炎症、脂质蓄积、凋亡、钙化中的作用机制等几个方面进行如下阐述,希冀为奋斗在该领域的研究者提供一些新的观念。

1 糖基化终末产物的形成

AGE 是一类异质性生物大分子,是还原糖(葡

[收稿日期] 2014-05-20

[修回日期] 2014-07-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81370408,81370409);江苏省自然科学基金(BK20131246,BK2011486);江苏省卫生厅项目(Q201308);江苏省创新团队基金(LJ201116);镇江市社会发展项目(SH2013024,SH2010012);镇江市心血管病学重点实验室基金(SS2012002)

[作者简介] 王中群,博士,主治医师,讲师,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床,E-mail 为 wangtsmc@aliyun.com。李丽华,硕士,主治医师,研究方向为动脉粥样硬化病理学。严金川,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为急性冠状动脉综合征的基础与临床研究,E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。

葡萄糖)与蛋白、脂质甚至核酸经过一系列非酶糖基化反应(即 Maillard 反应)形成的结构多样性褐色产物^[6-8]。AGE 一旦形成就不可逆转,这些沉积的蛋白也不易被蛋白酶分解。AGE 结构有进一步产生活性氧并与细胞表面特异性结构发生反应的能力。目前研究者已经阐明包括羧甲基赖氨酸(Nε-carboxymethyl-Lysine, CML)在内的 20 余种 AGE,其中非交联非荧光性 CML 是在食品 AGE 分析、动物相关研究中应用最为广泛的一个标志物^[9,10]。而且多中心流行病学调查显示随着老年人血清 CML 的升高,其全因死亡和心血管死亡的风险增加^[11]。

2 糖基化终末产物的来源及代谢

机体内 AGE 池主要有内源性和外源性两大来源^[12,13]。外源性 AGE 来自日常饮食,尤其是经过高温处理的食物(例如煎、炸、烘、烤等)。内源性 AGE 主要来自体内脂质、蛋白、核酸的非酶性糖基化,尤其是在糖尿病的高血糖状态下更易形成内源性的 AGE。有研究显示,糖尿病动物模型摄入高 AGE 饮食后更易形成动脉粥样硬化、糖尿病肾病等血管并发症。

AGE 的代谢是通过与巨噬细胞的特异性受体结合,被巨噬细胞降解为小的可溶性多肽后被释放,经肾脏清除^[5]。因此,AGE 的有效清除依赖正常的肾功能,肾功能的降低将导致 AGE 在体内的堆积。生理条件下 AGE 含量很低,但机体衰老或糖尿病的高血糖状态会促使糖化进程加快,导致机体不断自发生成 AGE。尽管绝大部分多肽都可发生转氨后糖化/氧化修饰,但 AGE 的形成主要依赖于三个因素,即高血糖的程度、糖化氧化底物的更新速率及组织微环境的氧化性质。在这三种因素作用下的糖尿病患者 AGE 形成加速,对心血管系统的危害剧增。

3 糖基化终末产物的理化特性

大部分 AGE 具有独特的理化特性:①棕色;②具有特有的荧光特性;③具有交联性,即使去除了糖,它们之间仍能通过侧链交联形成分子量极大的物质;④对酶稳定,不易被降解。但并非所有的 AGE 均有如此属性,例如 AGE 的主要活性成分与抗原决定簇 CML,在具有酶稳定性即不易被酶降解属性的同时,具有无色、无荧光、无交联属性^[14]。生理相关性 CML 修饰蛋白与细胞 AGE 受体(receptor

of AGE, RAGE, 一种膜蛋白,属免疫球蛋白超家族的多配体成员,存在于多种细胞上)相互作用后激活关键的细胞信号通路介导内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核巨噬细胞功能,激发血管和血管炎性并发症的加速发展。

目前研究证实 AGE 主要通过三个方面发挥生物学效应^[15]:一是通过对蛋白质、脂质、核酸等的直接修饰改变其结构功能;二是通过与特异受体结合改变可溶性信号分子如细胞因子、激素和自由基的水平导致机体的病理改变;三是由葡萄糖、果糖等在细胞内形成的 AGE 和高活性的中间产物能直接改变靶组织蛋白能。通过以上三个过程以受体和非受体介导的途径,AGE 改变血管的结构和功能导致疾病的发生。

4 糖基化终末产物与动脉粥样硬化

4.1 糖基化终末产物与动脉粥样硬化性疾病的流行病学关系

人群流行病学研究显示 AGE 与易损斑块关系密切。Fukushima 等^[2]对 208 名日本 ACS 患者非罪犯血管和罪犯血管斑块体积、血清 AGE 和可溶性 AGE 受体(soluble receptor of AGE, sRAGE)进行检测,结果发现在校准糖尿病多变量逻辑回归分析模型中,高水平的基线 AGE 与 ACS 斑块进展显著相关。贺桦等^[16]采用抗威廉蛋白 AGE 抗体竞争酶联免疫吸附测定法测定 32 例青年人急性心肌梗死、47 例中老年人急性心肌梗死和 38 例健康年轻自愿者血清中 CML 含量,结果发现,机体内 AGE 的产生增多部分参与了青年人冠状动脉粥样硬化的形成和急性心肌梗死的发病。Tahara 等^[17]对 Kurume 大学 275 例门诊病人进行 18F-FDG PET 分析发现,循环 AGE 值可能是反应动脉粥样硬化病灶内血管炎症的一个生物标志物。此外,几项研究证实限制糖尿病患者饮食 AGE 摄入可为健康带来有益影响,主要是降低循环中炎症标志物,避免发生血管功能紊乱。Uribarri 等^[18]报道膳食中 AGE 减少 50% 就可以观察到显著的临床获益。Luévano-Contreras 等^[19]观察标准饮食及低 AGE 饮食对糖尿病患者肿瘤坏死因子 α 、丙二醛、C 反应蛋白、胰岛素抵抗的影响,发现限制膳食 AGE 可抑制糖尿病患者炎症标志物及氧化应激水平。

另外,除了临床流行病学方面的证据外,AGE 与动脉粥样硬化斑块相关的病理学证据(凋亡、钙化、脂质蓄积、炎症因子、内皮损伤等)也取得了较

多进展。

4.2 糖基化终末产物促进动脉粥样硬化斑块形成及恶性演进的机制

AGE 的形成是一个重要的生化异常,在血管壁炎症、氧化应激、信号调控及易损斑块的形成与进展中发挥了重要作用^[20-23]。流行病学调查显示在合并冠心病的 2 型糖尿病患者,AGE 与 CML 均升高。免疫组化分析证实 AGE 弥漫的分布在动脉粥样硬化病灶细胞外基质中,同时在巨噬细胞与平滑肌细胞内也有浓密的蓄积。组织 AGE 浓度与动脉粥样硬化病灶的严重程度、血管壁血浆蛋白、脂蛋白、脂质的蓄积均有关系。越来越多的研究证实 AGE 主要通过如下两种途径来促进易损斑块的形成及恶性演进。

4.2.1 非受体途径

(1) AGE 对细胞外基质的影响。AGE 形成改变了细胞外基质分子的基本功能。血管壁胶原有相对较长的生物半衰期,随着时间推移会发生显著的非酶糖基化,对动脉粥样硬化形成发生显著影响。可溶性血浆蛋白例如低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、免疫球蛋白 IgG 也被捕获,在胶原上发生 AGE 的共价交联。在基底膜 IV 型胶原基础上形成的 AGE 可抑制这些分子横向联系形成正常的网状结构。在层粘连蛋白基础上形成的 AGE 可减少聚合物自我组装,抑制 IV 型胶原、肝素蛋白聚糖的结合。这些 AGE 诱导的细胞外基质功能的异常改变了完整血管壁的结构与功能^[24]。(2) AGE 对脂质的影响。发生在 LDL 磷脂成分及 ApoB 基础上的糖基化进程,可使 LDL 清除功能发生改变,并增加对氧化修饰的易感性。事实上,糖尿病 LDL 样品已经证实其 ApoB/脂质交联的 AGE 显著增加,这与氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 水平的增加有关。已有研究显示,诸如乙二醛、羟乙醛、羟醛或者其他含羰基基团的化合物等中间体能在糖类与多不饱和脂肪酸氧化时形成。这些常见中间体反过来能与蛋白质 (例如 LDL、ApoB) 的游离氨基基团反应形成 AGE 产物,包括咪唑酮、CML 等^[8]。而且,人单核细胞源性巨噬细胞对糖基化 LDL 的摄取是通过低亲和力非特异性受体 (清道夫受体) 介导的,这种摄取导致泡沫细胞形成——动脉粥样硬化早期特征。

4.2.2 受体途径

(1) AGE 细胞摄取。细胞表面 RAGE 介导 AGE-修饰分子的内吞及降解,作为 AGE 代谢与周转的一个重要功能。对 AGE 清除机制的研究已经发现几种可结合这种不可逆转修饰

性大分子的受体。在体内分离及体外合成的 AGE 均可被巨噬细胞 RAGE 所识别,这种识别不同于已经明确的巨噬细胞清道夫受体。随后的几项研究证实、克隆、分析了 RAGE, RAGE 是目前为止特征最为明确的介导 AGE 细胞效应的蛋白受体,现在越来越被认为是细胞内信号转导肽,而非一个单纯参与 AGE 内吞及周转的受体^[21]。

(2) AGE 与单核巨噬细胞的相互作用。AGE 与单核巨噬细胞的相互作用可通过诱导血小板源生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子 (IGF-1) 以及促炎细胞因子 (例如 IL-1 β 和 TNF- α) 诱导巨噬细胞活化表型的出现^[25]。可溶性 RAGE 配体 (在体外合成或糖尿病患者血浆分离的 AGE, AGE- β 2-微球蛋白或 CML-加合物) 与 RAGE 相互作用可促进细胞迁移 (趋化), 而固化的 AGE (例如那些在基底膜发现的) 则可以减缓单核巨噬细胞的迁徙 (此即 apoptosis-趋化抑制)。趋化或趋化抑制可通过 anti-RAGE 或 sRAGE 来阻断。

(3) AGE 与血管平滑肌细胞的相互作用。培养的平滑肌细胞在有 AGE 存在情况下增殖活性及纤连蛋白产生能力均增加^[26]。在体研究显示这一促进平滑肌细胞增殖的影响可能 (至少部分) 间接受到单核巨噬细胞因 AGE 诱导释放的细胞因子或生长因子的调节。TGF- β 可能是 AGE-诱导平滑肌细胞产生纤连蛋白的中间因子。在这样的情况下,受扰平滑肌细胞内配体-RAGE 相互作用对于再狭窄生物学具有重要意义。

(4) AGE 与血管内皮细胞的相互作用。内皮细胞表面有 AGE 受体,可介导 AGE 的摄取、胞转作用,同时也介导内部信号转导作用^[27]。AGE-RAGE 相互作用可改变内皮屏障作用,增加内皮细胞的通透性,进而增加大分子通过单层内皮的能力。这种通透性的增加常常伴随着内皮层物理结构完整性的改变。这一点已经为肌动蛋白结构破坏以及细胞形态改变所证实。AGE 在体外可改变内皮抗凝血功能,如减少血栓调节蛋白表达,伴随的诱导组织因子表达。这种对组织因子的诱导和对血栓调节蛋白活性的下调改变了内皮层的动态属性,尤其是在从抗凝到促凝这一动态过程中。AGE 结合在内皮 RAGE 上也会导致细胞抗氧化防御机制的破坏和活性氧 (ROS) 的产生。随着细胞氧化应激的增加,核因子 κ B (NF- κ B) 被激活,进而 NF- κ B-调控基因 [包括促凝的组织因子以及黏附分子例如 E-选择素、细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1)] 的表达也受到上调。这种变化使

得糖尿病血管更易于与循环中的单核细胞相互作用。

(5) 改变内皮依赖性血管舒张。耦联在血管基质上的 AGE 可改变一氧化氮(NO)的生物利用度,而 NO 则是调节血管舒张的一个重要调控子。在体外,将 AGE 加入 NO,可以浓度依赖性的方式阻断 NO 活性。实验诱导糖尿病动物模型的研究证实从糖尿病形成的 2 周内内皮依赖性的血管舒张就会迅速发生改变。根据相关研究可知,晚期糖基化反应过程中产生的其他游离自由基很可能与 NO 发生了直接反应,进而造成 NO 的快速灭活。同时,AGE 诱导强效血管收缩剂内皮素 1 的表达,改变内皮功能使血管收缩^[27]。

由此可见,AGE 通过上述两种主要途径从力学、非力学等多个方面对血管壁的完整性及功能造成强烈的损害,扰乱血管壁细胞的正常功能,诱发易损斑块的形成和促进其恶性演进^[12]。

4.3 糖基化终末产物与钙化的关系

斑块表浅部位及坏死灶周边的微钙化形成是使斑块应力改变并易于破裂的重要原因。为探索糖尿病动脉粥样硬化形成及发展过程中具有重要地位的 AGE 是否也发挥了关键作用,本课题组采用 ApoE^{-/-}小鼠腹腔注射链脲佐菌素(streptozocin, STZ)辅以饲喂半合成高脂饮食(high-fat diet, HFD)并连续尾静脉注射外源性 CML 成功诱导出糖尿病动脉粥样硬化钙化。而且血管壁斑块内 CML 的蓄积随着血管钙化的发展而增加^[3,4,23]。

鉴于在进展性动脉粥样硬化病变内,出现凋亡与高脂共存环境。凋亡的细胞主要是巨噬细胞^[28,29],而血管平滑肌细胞不是终末分化细胞,具有能应对局部环境变化发生表型转化的能力^[30]。已有的离体钙化模型通常都是将细胞置于含有 β-甘油磷酸盐的钙化培养基中培养,不能模拟在体动脉粥样硬化的钙化环境^[31]。我们的动物实验也不能准确地判断 CML 与钙化之间是因果关系还是伴随关系^[3]。故此我们又进行了系列的体外细胞学实验,结果证实高脂凋亡共存环境下 10 μmol/L CML 可有效地诱导 A7r5 钙化——增加细胞间的钙沉积,上调钙化标志物骨形成蛋白 2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、核心结合因子(core binding factor α1, Cbfa1)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的表达,下调平滑肌细胞固有表型 SM22α 的表达。这提示平滑肌细胞从收缩表型向成骨表型转向分化可被 10 μmol/L CML 所启动。综合相关资料可知晚期 CML 可促进糖尿病动脉粥

样硬化钙化的进展^[3,23]。

随后的在体、离体研究证实,随着糖尿病动脉粥样硬化病程的演进 AGE 的特异性受体 RAGE 表达上调,而且 CML 可显著促进 RAW264.7 巨噬细胞和 A7r5 主动脉平滑肌细胞的 RAGE 表达^[3]。既有的其他研究证实利用腺病毒表达载体转染 RAGE 后可显著诱导主动脉平滑肌细胞的成骨分化,而敲除 RAGE 则抑制动脉粥样硬化斑块的进展和钙化的形成^[32]。与这些研究相一致,我们的实验发现在高脂凋亡共存环境下 CML 诱导的 A7r5 平滑肌细胞钙盐沉积增加、Cbfa1 和 ALP 的表达上调均可被 anti-RAGE 中和性抗体所抑制^[3]。由上可见, RAGE 在 CML 信号传递中发挥了重要作用。随后基于相关研究假说,我们又分别进行了 RAGE、NADPH 氧化酶、p38MAPK、Cbfa1 等的阻断或抑制,形态学及分子生物学研究证实 CML/RAGE 轴可能首先启动了动脉粥样硬化病变区巨噬细胞的凋亡,进而诱导了高脂凋亡共存环境下 CML/RAGE → ROS → p38MAPK → Cbfa1 → ALP 钙化级联信号的传递^[3,13]。

4.4 糖基化终末产物与脂质蓄积和凋亡的关系

泡沫细胞形成是动脉粥样硬化发生的早期事件和关键环节,胆固醇等中性脂质在巨噬细胞中大量蓄积是泡沫细胞形成的重要原因^[33,34]。清道夫受体、酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1(acyl-coenzyme A: cholesterolcyl transferase-1, ACAT-1)和三磷酸腺苷结合盒转运体(ATP-binding cassette transporter, ABC)共同调节着巨噬细胞内胆固醇的摄取、酯化以及外排^[35,36]。在糖尿病患者糖脂代谢紊乱的情况下,大量 LDL 经通透性增强的内皮进入皮下间隙发生氧化形成 ox-LDL^[24,37]。由于巨噬细胞清道夫受体对 ox-LDL 的吞噬存在着正反馈机制且糖尿病状态下胆固醇逆向转运机制[外周细胞内多余胆固醇经 ABCA1/ABCG1 等胆固醇外排调控子流出到 ApoA I 形成高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL),进而经 HDL 将外周细胞多余的胆固醇输送到肝脏,经肝胆系统最终排出到体外]受损,因此导致巨噬细胞内脂质大量蓄积最终形成泡沫细胞^[38]。我们的动物实验发现 STZ-CML-HFD 联合处理 4 个月后血浆 LDL 显著升高而 HDL 显著下降,动脉粥样硬化斑块内清道夫受体 CD36 上调而胆固醇外排调控子 ABCA1 下调,斑块内脂质蓄积也明显增强^[3,4]。综合分析显示 STZ-CML-HFD 联合处理 4 个月显著损伤了 ApoE^{-/-}小鼠主动脉壁的胆固醇逆向转运能力,使得斑块内内皮下间隙蓄积的脂质增加。随后的细胞学实验证实,在模拟斑块发生的高

脂环境下 CML 可呈剂量依赖性的方式上调 RAW264.7 巨噬细胞内的游离胆固醇、胆固醇酯和总胆固醇的含量,且各剂量组均诱发泡沫细胞形成。分子生物学实验显示 CML 处理后细胞 ABCA1 下调而 CD36 上调,再次印证了 CML 处理可抑制胆固醇逆向转运而促进细胞内脂质蓄积^[3,4]。

粥样硬化斑块的深层为脂质池或称脂质核心,一般认为是由泡沫细胞死亡后其胞浆内的脂质释放出来形成的^[39]。巨噬细胞源性泡沫细胞死亡会急剧增加脂质池内脂质的含量,同时其形成的凋亡小体和细胞碎片还可为钙盐沉积和血管钙化提供成核微环境,促进斑块不稳定的发生和动脉硬化的进一步演化^[40]。我们的在体研究运用 TUNEL 技术对寡核小体进行原位标记,结果表明粥样硬化斑块内的细胞死亡以凋亡为主^[3,4]。凋亡的细胞要经历一系列有序的分子水平和形态学上的改变,例如 Caspase 活化、染色质缩聚和破坏、核膜的破坏和细胞膜泡化等。通过对 Cleaved Capase-3 的免疫组织化学/免疫细胞化学分析和 Annexin V-FITC/PI 双染荧光显微镜定性流式细胞术定量分析证实 CML 可显著诱导 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞的早期凋亡和晚期凋亡,并以剂量依赖性的方式促进高脂环境下巨噬细胞的总凋亡率^[3,4]。结合相关资料可知,CML/RAGE 信号很可能是通过促进荷脂巨噬细胞清道夫受体表达而抑制其胆固醇逆向转运导致细胞内糖脂代谢紊乱、脂质大量蓄积而外排受抑,最终使得泡沫细胞发生凋亡。

细胞凋亡的主要信号通路除了死亡受体活化介导凋亡(外源性途径)与线粒体损伤介导凋亡(内源性途径)外,近年发现的内质网应激启动凋亡通路在糖尿病及其血管并发症中发挥着越来越大的作用,甚至有学者认为糖尿病本身就是一个内质网应激性疾病^[41]。我们的动物实验显示,内质网应激伴侣分子葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 主要分布在动脉粥样硬化病变区的脂质池内,而且随着糖尿病动脉粥样硬化病程的延长内质网应激相关指标 GRP78、磷酸化 PERK (PKR-like ER kinase)、磷酸化 eIF2 α 、活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 和 CHOP 的表达均呈上调趋势^[4]。此外,在细胞水平的研究也证实 CML 可显著促进 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞上述内质网应激指标的上调^[4]。这提示糖尿病动脉粥样硬化的发生与演进确实伴随了内质网应激的发生,或者说 AGE 诱导的内质网应激很可

能参与了糖尿病小鼠动脉粥样硬化的发生发展。

内质网在细胞内分布广泛,其膜面积占细胞所有膜结构的 50%,不仅是蛋白质折叠、运输以及细胞内 Ca²⁺ 储存的主要场所,同时也是胆固醇及其他许多脂质合成的场所^[42]。Kim 等^[43] 研究显示高血糖可能通过内质网应激活化糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 调控脂代谢关键基因的表达,导致脂代谢紊乱,进而促进动脉粥样硬化发生发展。Duan 等^[44] 研究显示内质网应激介导的凋亡可能参与了血管钙化的形成。由此可见,内质网应激在血管壁损伤过程中发挥了举足轻重的作用。内质网应激级联反应表现为蛋白质合成暂停、内质网应激蛋白表达和细胞凋亡等,并依次包括在未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)、整合应激反应和内质网相关性死亡三个相互关联的动态过程中。作为细胞保护性应对机制的内质网应激体系一旦遭到破坏,细胞将不能合成应有的蛋白质,亦不能发挥正常的生理功能,直至出现细胞凋亡^[45]。

UPR 是由一个内质网分子伴侣 GRP78 和 3 个内质网应激感受蛋白所介导的,分别是 PERK、ATF6 (activating transcription factor 6) 和 IRE-1 (inositol-requiring enzyme 1) ^[46]。内质网应激存在时,未折叠蛋白在内质网内堆积使 GRP78 从 3 种内质网应激感受蛋白上解离,转而去结合未折叠蛋白。解离后的感受蛋白磷酸化并启动 UPR (包括三条主要通路:PERK-eIF2 α -ATF4 通路、ATF6 通路和 IRE-1 通路)。如果内质网应激诱因持续存在或比较严重时,这三条 UPR 通路就会启动相应的 CHOP、JNK 和 Caspase-12 等所介导的凋亡通路诱导细胞发生凋亡^[47,48]。那么,由 CML 所诱发的泡沫细胞凋亡究竟是这三条通路中的哪一条在发挥主要作用呢?随后的细胞学水平实验分别应用 anti-RAGE 中和性抗体阻断 RAGE、anti-CHOP 中和性抗体封闭 CHOP、Z-ATAD-FMK 抑制 Caspase-12、SP600125 抑制 JNK 后,结果发现 CML 所诱导的内质网应激凋亡通路主要是通过 CML/RAGE \rightarrow Lipid 蓄积 \rightarrow PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP \rightarrow Caspase-3 \rightarrow Apoptosis 通路来发生效应的,Caspase-12 也介导了部分 CML 所诱导的凋亡,但这部分凋亡很可能没有经过 RAGE 传递^[4]。

5 结 语

综上所述,AGE 通过受体与非受体途径从内皮

屏障破坏、泡沫细胞形成、凋亡、钙盐沉积等多个方面扰乱血流动力学稳态、破坏血管壁完整性、诱发斑块形成并启动氧化应激、炎症应答等级联反应,最终使得动脉壁病变向易损斑块恶性演进,直至破裂形成血栓导致急性冠状动脉综合征的发生。针对 AGE/RAGE 信号级联反应上的相关信号进行靶向阻断,设计优化的干预策略将会给糖尿病易损斑块的临床治疗提供新的契机。

[参考文献]

- [1] Raposeiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, et al. Fluorescent advanced glycation end products and their soluble receptor: the birth of new plasmatic biomarkers for risk stratification of acute coronary syndrome [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74 302.
- [2] Fukushima Y, Daida H, Morimoto T, et al. Relationship between advanced glycation end products and plaque progression in patients with acute coronary syndrome: the JAPAN-ACS sub-study[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 5.
- [3] Wang Z, Jiang Y, Liu N, et al. Advanced glycation end-product N-epsilon-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 387-396.
- [4] Wang Z, Yan J, Li L, et al. Effects of Nε-carboxymethyl-lysine on ERS-mediated apoptosis in diabetic atherosclerosis[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 172(3): e478-483.
- [5] Xu H, Wang Z, Wang Y, et al. Biodistribution and elimination study of fluorine-18 labeled Nε-carboxymethyl-lysine following intragastric and intravenous administration [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57 897(1-10).
- [6] Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, et al. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation[J]. *Free Radic Res*, 2013, 47 Suppl 1: 3-27.
- [7] Shen C, Li Q, Zhang YC, et al. Advanced glycation end products increase EPC apoptosis and decrease nitric oxide release via MAPK pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64: 35-43.
- [8] Yamagishi S. Glycation [J]. *Nippon Rinsho*, 2010, 68(5): 809-813.
- [9] Semba RD, Arab L, Sun K, et al. Fat mass is inversely associated with serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, in adults[J]. *J Nutr*, 2011, 141: 1 726-730.
- [10] Kasper M, Schieberle P. Labeling studies on the formation pathway of Nε-carboxymethyllysine in maillard-type reactions[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1 043: 59-62.
- [11] Semba RD, Bandinelli S, Sun K, et al. Plasma carboxymethyl-lysine, and advanced glycation end product, and all-cause and cardiovascular disease mortality in older community-dwelling adults[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2009, 57: 1 874-880.
- [12] Uribarri J, Cai W, Sandu O, et al. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1043: 461-466.
- [13] Sun Z, Liu J, Zeng X, et al. Protective actions of microalgae against endogenous and exogenous advanced glycation endproducts (AGEs) in human retinal pigment epithelial cells[J]. *Food Funct*, 2011, 2: 251-258.
- [14] Prasad A, Bekker P, Tsimikas S. Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease [J]. *Cardiol Rev*, 2012, 20(4): 177-183.
- [15] Nedić O, Rattan SI, Grune T, et al. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(Suppl 1): 28-38.
- [16] 贺桦, 许顶立, 谭家余, 等. 青年人急性心肌梗死血清晚期糖基化终末产物 Nε-羧甲基赖氨酸含量的变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(2): 221-222.
- [17] Tahara N, Yamagishi S, Takeuchi M, et al. Positive association between serum level of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products and vascular inflammation evaluated by [(18)F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(12): 2 618-625.
- [18] Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet [J]. *J Am Diet Assoc*, 2010, 110(6): 911-916.
- [19] Luévano-Contreras C, Garay-Sevilla ME, Wrobel K, et al. Dietary advanced glycation end products restriction diminishes inflammation markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2013, 52(1): 22-26.
- [20] Singh VP, Bali A, Singh N, et al. Advanced glycation end products and diabetic complications [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(1): 1-14.
- [21] Ott C, Jacobs K, Haucke E, et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 411-429.
- [22] Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(4): 582-592.
- [23] 王中群. AGEs/RAGE 信号启动糖尿病粥样斑块钙化的机制 [D]. 东南大学, 2012.

- [24] Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury [J]. *Circulation*, 2006, 114 (6): 597-605.
- [25] Nam MH, Lee HS, Seomun Y, et al. Monocyte-endothelium-smooth muscle cell interaction in co-culture: proliferation and cytokine productions in response to advanced glycation end products [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(9): 907-912.
- [26] Yamagishi S, Matsui T. Smooth muscle cell pathophysiology and advanced glycation end products (AGEs) [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(7): 875-881.
- [27] Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: a cause and therapeutic target of diabetic complications [J]. *J Diabetes Investig*, 2010, 1(3): 90-96.
- [28] Tabas I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11: 2 333-339.
- [29] Hegyi L, Hardwick SJ, Siow RC, et al. Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10: 27-42.
- [30] Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, et al. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification [J]. *J Intern Med*, 2006, 260: 192-210.
- [31] Suga T, Iso T, Shimizu T, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18: 670-683.
- [32] Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 2 461-469.
- [33] Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis [J]. *Med Res Rev*, 2008, 28(4): 483-544.
- [34] Oh J, Riek AE, Weng S, et al. Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (15): 11 629-641.
- [35] Rubic T, Lorenz RL. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10 [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(2): 527-535.
- [36] Rubic T, Trottmann M, Lorenz RL. Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(3): 411-419.
- [37] Hirose A, Tanikawa T, Mori H, et al. Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(1): 61-66.
- [38] Tan KCB. Reverse cholesterol transport in type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2009, 11 (6): 534-543.
- [39] Farmer JA, Gotto AM. Dyslipidemia and the vulnerable plaque [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2002, 44(6): 415-428.
- [40] Bevilacqua M, Dominguez LJ, Rosini S, et al. Bisphosphonates and atherosclerosis: why [J]? *Lupus*, 2005, 14 (9): 773-779.
- [41] Thomas SE, Dalton LE, Daly ML, et al. Diabetes as a disease of endoplasmic reticulum stress [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010, 26(8): 611-621.
- [42] Scull CM, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2 792-797.
- [43] Kim AJ, Shi Y, Austin RC, et al. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3 [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 1): 89-99.
- [44] Duan X, Zhou Y, Teng X, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387: 694-699.
- [45] 付明欢, 郭佳, 肖传实, 等. 脂联素依赖 p38-MAPK 途径抑制衣霉素诱导的内质网应激致心肌细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(7): 577-582.
- [46] Jeschke MG, Finnerty CC, Herndon DN, et al. Severe injury is associated with insulin resistance, endoplasmic reticulum stress response, and unfolded protein response [J]. *Ann Surg*, 2012, 255(2): 370-378.
- [47] 陆薇薇, 齐永芬. 内质网应激和血管损伤性疾病 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(10): 939-944.
- [48] Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2010, 107 (7): 839-850.

(此文编辑 许雪梅)