

2 型糖尿病葡萄糖应激与抗氧化代偿的变化

谢飞舟^{1,2} 施冬云² 肖玲² 刘精东¹ 刘珊林^{2Δ}

(¹南昌大学医学院江西省人民医院内分泌科 江西 南昌 330006; ²复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系-
复旦大学自由基调控与应用研究中心 上海 200032)

【摘要】 目的 利用 2 型糖尿病不同病程人群空腹及葡萄糖口服应激模型,研究葡萄糖应激对人体自由基代谢指标变化的影响,探讨血糖波动与氧化应激水平和机体抗氧化代偿能力的关系,以探明自由基对糖尿病不同病程的介导规律。**方法** 分为健康对照组(CO)、糖尿病前期组(DP)、糖尿病组(DM)和糖尿病并发症组(DC),每组选 30 例。氧化应激指标的测定:各组取空腹及口服葡萄糖液(GS)后 2 h 的肘静脉血各 5 mL,检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢(H₂O₂)、维生素 C(V_C)和总抗氧化能力(T-AOC)。**结果** 空腹氧化水平各组依次:DC>DM>DP>CO;还原水平除 DP 组 SOD 活力高于 CO 组,各组总体随糖代谢异常程度加剧呈下降趋势。葡萄糖应激 2 h 后各组自由氧化还原水平排列类同空腹。GS 干预前后比较,干预后各组 H₂O₂ 水平都有不同程度提高,但还原水平各组有不同,CO 与 DP 组在 GS 干预后,T-AOC 水平比干预前都升高。随糖代谢异常程度加剧,氧化应激水平逐步增高,抗氧化能力逐趋下降,氧化损伤产物 MDA 增多。GS 应激后,CO、DP 组的总体抗氧化能力 T-AOC 显示代偿性增高,而 DM、DC 组无此效应。**结论** 氧化应激在 2 型糖尿病的病理发展过程中起重要作用;CO 与 DP 组所具的抗氧化代偿能力,提示对糖尿病的早期诊断和早期有效干预具有重要意义。

【关键词】 2 型糖尿病; 氧化应激; 代偿效应; 活性氧

【中图分类号】 R 587.1 **【文献标志码】** A

Compensatory changes of antioxidant capacity in response to glucose stress in type 2 diabetes mellitus

XIE Fei-zhou^{1,2}, SHI Dong-yun², XIAO Ling², LIU Jing-dong¹, LIU Shan-lin^{2Δ}

(¹Department of Endocrinology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College-Free Radical Regulation and Application Research Center, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To detect the free radical metabolic changes in response to fast and glucose stress in different degree of type 2 diabetes mellitus, and to explore the relationship between blood sugar and oxidative stress/compensatory antioxidant capacity, thus to understand the role of free radicals in mediating diabetes mellitus. **Methods** Thirty prediabetic patients (DP group), 30 diabetic mellitus patients (DM group), 30 diabetes complications patients (DC group), and 30 healthy persons (CO group) were selected. Five mL vein blood sample was taken in diabetes mellitus patients after a fast or after 2 hours of oral administration with glucose. The oxidative stress parameters including SOD, MDA, H₂O₂, V_C, VE and total antioxidant capability (T-AOC) were detected. **Results** In fasting serum, the oxidative level in each group was DC>DM>DP>CO. The reductive level in each group decreased upon the degree of diabetes, except that SOD in DP group was higher than CO group. After administrating glucose, the H₂O₂ level was increased in all groups with different degree. However, the changes of reductive level were different in 4 groups, T-AOC was increased in CO and

DP groups after administrating GS. Upon the aggravation of the diabetes, the level of oxidative stress increased, the anti-oxidative ability decreased, and the oxidative product MDA increased. In response to glucose stress, the total antioxidant capacity (T-AOC) compensatory increased in CO and DP group, while in DM and DC group, T-AOC was not changed. **Conclusions** Oxidative stress plays an important role in the development of type 2 diabetes mellitus. The results that the anti-oxidative ability increased in control group (CO) and pre-diabetes (DP) group implies that early diagnose and interference are important in the treatment of diabetes mellitus.

【Key words】 type 2 diabetes; oxidative stress; compensatory effects; reactive oxygen species

实验已证明,糖尿病患者体内的氧化应激水平一般都增高^[1]。氧化应激是指机体因遭受各种有害刺激时,体内氧自由基产生过多;当氧化系统和抗氧化系统失衡,就会导致机体组织和功能损伤^[2-3]。生物体内具生物活性作用的自由基大部分是活性氧(reactive oxygen species ROS),主要包括有超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基($\cdot OH$)等。当血糖水平升高时,葡萄糖以非胰岛素依赖性方式在内皮细胞膜上葡萄糖转运体-1(GLUT-1)的帮助下进入细胞,并造成细胞内也呈高糖状态。胞内过多的葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸,后者通过三羧酸循环可提供过多的供氢体(NADH 和 $FADH_2$)进入线粒体呼吸链,并在电子传递过程中因电子泄漏过多而使 O_2^- 生成增加,并通过自由基反应产生更多 ROS。也有证据表明高血糖诱导的己糖胺生物合成通路的激活也可增加 ROS 的生成^[4]。当细胞内葡萄糖水平升高,醛糖还原酶活性增加并可催化山梨醇的形成^[5]。山梨醇可导致细胞损害并激活应激敏感信号通路,如 JNK/SAPK 和 P38/MAPK 通路。

为抗衡 ROS 过剩导致氧化应激水平的升高,机体内存在两类具有清除 ROS 自由基损伤作用的抗氧化系统,一类是抗氧化酶系统,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等;另一类是非酶抗氧化系统,包括维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽、 α -硫辛酸等。机体通过这些抗氧化系统使自由基体系的产生与清除保持动态平衡状态。正常情况下,自由基反应对于机体防御机制也是必要的,可增强机体的抗炎和免疫能力,但当自由基过剩且抗氧化水平下降时则会打破原有的平衡从而启动氧化应激的损伤机制。

目前研究认为,ROS 也介导了胰岛素抵抗和 β 细胞损伤,并导致葡萄糖调节受损和糖尿病的发生^[6];ROS 还参与了糖尿病慢性并发症的形成过程,导致糖尿病大血管及微血管、糖尿病神经病变、糖尿病足等并发症的发生。现研究发现,血糖波动幅度大易造成氧化应激状态,也有研究表明机体在

一定的氧化应激条件下,会诱导体内抗氧化酶的代偿升高,使之抗衡自由基对机体的损伤^[7]。本文利用餐后血糖波动模型,了解 2 型糖尿病不同病程在口服葡萄糖应激条件下氧化还原水平的变化,探讨糖尿病病程发展与氧化应激及抗氧化代偿能力之间的关系。

材料和方法

研究对象 所有病例均来自医院内分泌科住院及门诊就诊 2 型糖尿病患者,依据 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准进行诊断分组。对照组来自医院体检科的健康体检者,其肝肾功能、血糖(空腹及 OGTT 2 h)、血脂等生化指标及心电图、腹部超声、胸片、甲胎蛋白、癌胚抗原等检查均正常。所有入选者均无高血压、高血脂家族史;近 1 个月未患急性感染性疾病。

入选标准 空腹血糖(FPG) <6.1 mmol/L, OGTT 2 h 葡萄糖(2hPG) <7.8 mmol/L 为正常; 6.1 mmol/L \leq FPG <7.0 mmol/L 和/或 $7.8 \leq 2hPG < 11.1$ mmol/L 为糖尿病前期;FPG ≥ 7.0 mmol/L 和/或 $2hPG \geq 11.1$ mmol/L 为糖尿病。糖尿病并发症的诊断标准:对每一例糖尿病患者详细询问病史并进行体格检查,了解糖尿病病程长短,饮食控制情况;用眼底镜检查了解患者的视网膜病变情况,彩超检查患者颈动脉内膜中层厚度和有无斑块形成以了解动脉粥样硬化情况。如果患者有糖尿病视网膜病变、微量白蛋白尿、动脉粥样硬化、排除其他原因的肢端感觉异常或下肢疼痛、间歇性跛行、皮肤深溃疡、肢端坏疽等表现中的一项或几项,即诊断糖尿病并发症。

将入选人群分对照组(CO)、糖尿病前期组(DP)、糖尿病组(DM)、糖尿病并发症组(DC),各组的一般情况见表 1。

测定方法 于空腹 10~12 h 后早晨 8:00 抽取肘静脉血 5 mL,采血后进食 75 g 无水葡萄糖 + 300 mL 蒸馏水(GS),2 h 后再次抽取肘静脉血 5 mL。

所有血样收集后立即离心 10 min(3 500 r/min)取分离血清。空腹血清用全自动生化仪检测 FPG、血脂、肝功能、肾功能等;GS 应激处理后的血清测 2hPG。所有剩余血清立即置于 - 20 ℃ 冰箱冷冻保存,标本收集完全之后统一测定各项生化指标。采用黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤系统检测 SOD 酶活水平^[8];DCFH 荧光方法测 ROS 的 H₂O₂ 含量^[9];硫代巴比妥酸方法检测脂质过氧化产物丙二醛(MDA)浓度^[10];邻苯二胺荧光法测定抗坏血酸含量^[11];总抗氧化能力(T-AOC)采用 Fe²⁺/菲啉类系统比色法试剂盒测定(南京建成生物工程研究所

提供)。
统计方法 所有计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.0 软件进行统计分析。用单因素方差分析比较不同糖尿病病程空腹(或餐后 2 h)氧化应激水平的变化;用配对 *t* 检验比较同一组患者餐前与餐后氧化应激水平的变化。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

各组血糖水平的变化 各组血糖(包括 FPG 及 2hPG)随病程均有明显差异($P < 0.01$,表 1)。

表 1 各组研究对象的空腹及餐后血糖						
Tab 1 The FBG and 2hPG level in each group						
($\bar{x} \pm s$)						
Group	<i>n</i>	Procedure(Y)	Sex(M/F)	Age(year)	FPG(mmol/L)	2hPG(mmol/L)
CO	30	—	16/14	50.1 ± 10.7	4.54 ± 0.42	6.05 ± 0.72
DP	30	1.1 ± 0.8	17/13	51.2 ± 9.6	5.92 ± 0.55	9.01 ± 1.89
DM	30	2.3 ± 0.7	14/16	52.3 ± 10.1	7.72 ± 2.31	11.68 ± 2.72
DC	30	5.3 ± 2.1	17/13	54.3 ± 10.7	9.27 ± 3.01	15.69 ± 4.56

The blood sugar levels in different groups and that in the same group between fast and OGTT 2 h are all obviously different ($P < 0.05$).
H₂O₂ 随病程发展的变化 不论空腹还是 GS 剧呈逐渐升高趋势,依次 DC>DM>DP>CO,且各组餐前 H₂O₂ 均高于空腹时 H₂O₂(表 2)。

表 2 空腹及口服 GS 2h 后氧化应激指标的变化						
Tab 2 The changes of oxidative stress level after fast or OGTT 2 h						
($\bar{x} \pm s$)						
Group	H ₂ O ₂ (mmol/L)		MDA(nmol/mL)			
	fast	OGTT 2 h	fast	OGTT 2 h		
CO	73.62 ± 18.27	86.76 ± 19.36 ⁽⁴⁾	6.11 ± 1.54	6.37 ± 1.61		
DP	78.98 ± 19.23	88.69 ± 19.01 ⁽⁴⁾	7.81 ± 1.32 ⁽¹⁾	7.76 ± 1.52 ⁽¹⁾		
DM	89.53 ± 19.73 ⁽¹⁾⁽²⁾	109.77 ± 21.21 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾	8.32 ± 1.61 ⁽¹⁾⁽²⁾	8.93 ± 1.79 ⁽¹⁾⁽²⁾		
DC	98.73 ± 20.51 ⁽¹⁾⁽²⁾	125.72 ± 23.52 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾	8.92 ± 1.75 ⁽¹⁾⁽²⁾	9.17 ± 1.91 ⁽¹⁾⁽²⁾		

Group	V _C (μg/mL)		SOD(U/mL)		T-AOC(U/mL)	
	fast	OGTT 2 h	fast	OGTT 2 h	fast	OGTT 2 h
CO	52.76 ± 13.5	55.25 ± 13.7	127 ± 28	131 ± 27	6.01 ± 1.62	7.11 ± 1.89 ⁽⁴⁾
DP	51.28 ± 13.5	50.21 ± 13.1	139 ± 37 ⁽¹⁾	135 ± 36	6.07 ± 1.72	6.98 ± 1.97
DM	47.56 ± 12.9	44.37 ± 11.7 ⁽¹⁾	102 ± 29 ⁽¹⁾⁽²⁾	97 ± 27 ⁽¹⁾⁽²⁾	4.23 ± 1.15 ⁽¹⁾⁽²⁾	4.05 ± 1.07 ⁽¹⁾⁽²⁾
DC	29.37 ± 9.12 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	28.35 ± 8.7 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	89 ± 23 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	81 ± 22 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	3.76 ± 1.23 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.63 ± 0.89 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

⁽¹⁾ Compared with CO group, $P < 0.05$; ⁽²⁾ Compared with DP group, $P < 0.05$; ⁽³⁾ Compared with DM group, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾ Compared with fast, $P < 0.05$

MDA 与 V_C 的负相关变化 DC、DM、DP 组的 MDA 在空腹及 GS 口服 2h 后均明显高于 CO 组;与 H₂O₂ 变化趋势相同,随糖代谢异常程度加剧,MDA 含量逐渐升高,即 DC>DM>DP>CO。同组内餐后与空腹时比较,MDA 变化不大(图 1A)。
随糖代谢异常程度加剧,V_C 与 MDA 的变化趋势相反,即 V_C 的浓度 DC<DM<DP<CO。GS 口服 2h 后与空腹时 V_C 相比,对照组餐后较空腹时升高,表现出健康人群的 V_C 水平对葡萄糖应激有良

好的代偿性增高能力(图 1B)。
SOD 抗氧化酶活性的变化 DM 和 DC 组在空腹、GS 口服 2 h 后 SOD 均明显低于 CO 组,且 DC 组 SOD 相对最低;表明与 V_C 类似,随糖代谢异常程度加剧,SOD 呈下降趋势。但 DP 组空腹 SOD 水平明显高于 CO 组,口服 GS 后,DP 组 SOD 虽略有下降,但仍高于 CO 组空腹时及各组口服葡萄糖 2 h 后的 SOD 水平,这表明 DP 组在因糖代谢异常程度加剧的 ROS 刺激下,具有使 SOD 抗氧化酶活性代

偿性升高的能力(表 2),这与本课题组早先报道的自由基诱导 SOD 代偿性升高的效应相一致^[8]。

总体抗氧化水平 T-AOC 的变化 DM、DC 组的 T-AOC 不论空腹或餐后都明显低于 CO 和 DP 组。GS 口服应激后,CO 与 DP 组的 T-AOC 较空

腹明显升高($P<0.05$);而 DC 组则明显降低(图 2)。表明 CO 和 DP 组的总体抗氧化水平较高,并具有很强的抗氧化代偿能力,以抗衡氧化应激的损伤。

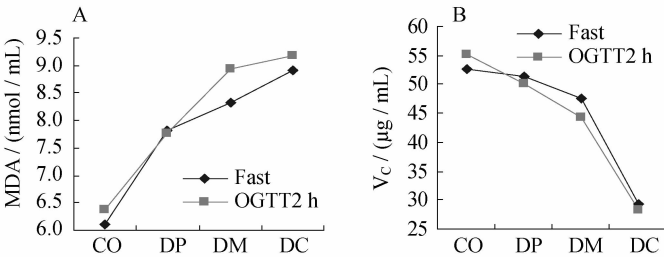


图 1 随病程发展的 MDA 与 Vc 的变化

Fig 1 The changes of MDA and Vc level following the course of diabetes

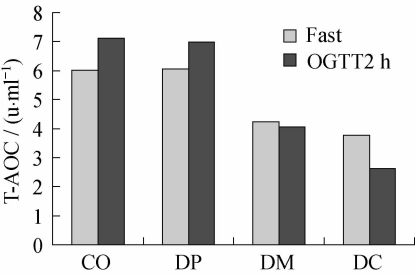


图 2 空腹及口服 GS 2h 后 T-AOC 的变化

Fig 2 The changes of T-AOC after fast or OGTT 2 h

讨 论

研究显示,随着糖尿病病程进展,机体抗氧化防御水平降低,清除自由基能力减弱。在糖尿病前期,机体的抗氧化能力可维持正常,甚至通过代偿能力可高于正常水平,以维持机体氧化还原状态的动态平衡。而糖尿病和糖尿病并发症期机体抗氧化能力均明显减弱,氧化与抗氧化系统失衡,导致氧化应激的不可逆损伤。

H₂O₂ 属活性氧族,其含量变化可部分反映体内氧化应激水平。本实验中各组血清 H₂O₂ 含量按病程 DC>DM>DP>CO,提示随糖代谢异常程度加剧,体内活性氧自由基的生成呈增多趋势。脂质过氧化是自由基过剩导致过氧化反应的结果,并可通过链式反应,放大氧化应激的损伤作用。因此,脂质过氧化产物 MDA 的含量变化可以反映机体脂质过氧化的程度,并间接反映了机体受自由基损伤的程度^[12]。本实验中,血清 MDA 值随糖代谢异常程度加剧而明显增高,提示机体受损伤程度随病程发展逐渐加重。

糖尿病的各种并发症,实验证明都与自由基介

导的脂质过氧化有关,Brownlee^[13] 认为,无论糖尿病大血管(如心血管、脑血管及下肢血管)还是微血管(如肾、神经和视网膜血管)并发症,都有一个共同的发病机制——氧化应激。Ceriello^[14] 提出了“共同土壤”学说,即氧化应激是胰岛素抵抗、糖尿病和心血管疾病共同发病机制。本文通过葡萄糖应激实验结果,也进一步说明氧化应激损伤在 2 型糖尿病的发生发展过程中起了重要作用。

本文实验证明,在糖尿病前期,产生的氧自由基及氧化应激产物虽呈增加趋势,但机体尚具有抗氧化应激的代偿能力,使机体氧化和抗氧化水平基本维持平衡状态。而糖尿病患者的抗氧化代偿能力明显下降,抗氧化体系无法阻抑自由基的损伤进程,使氧自由基及氧化应激产物在体内积累过剩;糖尿病并发症患者与糖尿病患者相比,抗氧化水平进一步下降,进一步导致患者体内氧化和抗氧化系统处于失衡状态。

在健康人群,餐后的血糖变化幅度不大,氧化水平升高也不明显,但糖尿病及糖尿病并发症患者餐后血糖波动幅度大,氧化应激水平也较空腹时明显升高,表明改善血糖水平的调节能力,应有利于减轻氧化损伤。

本文研究发现 CO 健康组和糖尿病前期 DP 组表现出对葡萄糖应激具有抗氧化代偿性增高的能力,提示尽早对血糖升高患者进行抗氧化干预并设法提高机体的抗氧化代偿能力对预防和延缓糖尿病的发生发展具有重要意义。

本课题组早先研究表明,摄取一定剂量的抗氧化剂对保持血糖水平及减轻氧化应激对机体的损伤有一定保护作用。Bottino 等^[15] 通过分离纯化胰岛细胞,在体外早期应用抗氧化剂干预胰岛细胞,也发现阻断氧化应激的反应过程可明显降低胰岛细胞的

损伤,并可促进胰岛细胞的增殖。本文揭示糖尿病前期的抗氧化代偿效应对葡萄糖应激损伤的保护性反应,为 2 型糖尿病的早期诊断和干预提供了一种新的思路。

参 考 文 献

- [1] Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(11): 1 491 - 1 499.
- [2] Mircescu G. Oxidative stress: an accomplice to uremic toxicity? [J]. *Ren Nutr*, 2006, 16(3): 194 - 198.
- [3] Lushchak VI. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms[J]. *Biol Chem (Mosc)*, 2007, 72(8): 809 - 827.
- [4] Kanwar YS, Akagi S, Sun L, et al. Cell biology of diabetic kidney disease[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2005, 101(3): 100 - 107.
- [5] Thomas TP, Porcellati F, Kato K, et al. Effects of glucose on sorbitol pathway activation, cellular redox, and metabolism of myo-inositol, phosphoinositide, and diacylglycerol in cultured human retinal pigment epithelial cells [J]. *Clin Invest*, 1994, 93(6): 2 718 - 2 724.
- [6] Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(41): 42 351 - 42 354.
- [7] Minamiyama Y, Bito Y, Takemura S, et al. Calorie restriction improves cardiovascular risk factors via reduction of mitochondrial reactive oxygen species in type II diabetic rats [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320(2): 535 - 543.
- [8] Liu SL, Shi DY, Pan Jh, et al. Observations on the compensatory effects of superoxide dismutase under hypoxic or ischaemic stress in rats and rabbits[J]. *Med Sci Res*, 1998, 26(11): 741 - 743.
- [9] 黄勇超, 施冬云, 刘珊林, 等. α -硫辛酸对缺氧应激肝癌细胞线粒体呼吸率和产能代谢的影响[J]. *生物物理学报*, 2007, 23(6): 436 - 442.
- [10] Li XY, Chow CK. An improved method for the measurement of malondialdehyde in biological samples[J]. *Lipids*, 1994, 29(1): 73 - 75.
- [11] 庞战军, 周玫, 陈瑗. 自由基医学研究方法[M]. 人民卫生出版社, 2000: 283.
- [12] 徐贵森, 刘合年, 杨淑霞, 等. 缺血再灌注脊髓丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性的变化[J]. *西南军医*, 2006, 8(2): 10 - 11.
- [13] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. *Diabetes*, 2005, 54: 1 615 - 1 625.
- [14] Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(5): 816 - 823.
- [15] Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment[J]. *Diabetes*, 2004, 53: 2 559 - 2 568.

(收稿日期: 2008 - 08 - 25; 编辑: 沈玲)