

波动性高糖对糖尿病视网膜病变的作用研究进展

董天慧¹,孙建梅²,姚舜¹,邹斌倩²,蒲泽南²,何雷¹

作者单位:¹南方医科大学珠江医院内分泌科,广东 广州 510280;

²南方医科大学检验与生物技术学院,广东 广州 510280

通信作者:何雷,女,副主任医师,研究方向为糖尿病视网膜病变及糖尿病足,E-mail:765139701@qq.com

摘要:糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病微血管严重并发症之一,其发生发展不仅与长期的高血糖水平有关,而且与血糖波动幅度呈现明显正相关。波动性高糖通过启动细胞自噬和细胞凋亡,激活氧化应激,损伤视网膜组织 DNA,促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的释放等多种途径参与 DR 的发生进展。

关键词:糖尿病视网膜病变; 血管内皮生长因子类; 细胞凋亡; 自噬; 氧化性应激; DNA 损伤; 波动性高糖; 综述

Research progress on the effect of high glucose fluctuations on the pathogenesis of diabetic retinopathy

DONG Tianhui¹, SUN Jianmei², YAO Shun¹, ZOU Binqian², PU Zenan², HE Lei¹

Author Affiliations: ¹Endocrinology Department, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China; ²School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China

Abstract: Diabetic retinopathy (DR) is one of the most serious diabetic microvascular complications. Its development and progression is not only related to long-term hyperglycemia, but also positively correlated with blood glucose fluctuations. High glucose fluctuations contribute to diabetic retinopathy through the following ways: inducing autophagy and apoptosis, activating oxidative stress, damaging DNA in retinal tissue cells, promoting the release of vascular endothelial growth factor (VEGF). This article is a brief review of contribution of high glucose fluctuations to DR.

Key words: Diabetic retinopathy; Vascular endothelial growth factors; Apoptosis; Autophagy; Oxidative stress; DNA damage; High glucose fluctuations; Review

近年来,随着糖尿病病人人数逐年上升,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)已成为全球主要致盲原因之一。23.0%的糖尿病病人出现DR^[1],其中非增生性DR及增生性DR发病率分别为19.1%和2.8%^[2]。DR的特征性病理改变表现为周细胞丧失和新生血管形成,临床根据有无视网膜新生血管的出现将DR分为非增殖期DR(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)和增殖期DR(proliferative diabetic retinopathy, PDR)。目前,已被证实的DR发病危险因素包括糖尿病病程,高血糖,高血压及血脂紊乱。糖化血红蛋白(HbA1c)反映糖尿病病人近2~3个月血糖平均水平,是反映血糖长期控制的指标,美国糖尿病协会将HbA1c作为糖尿病及其并发症预防监控“金标准”^[3],但在长期血糖水平与HbA1c相近的人群中,DR的发生与病程缺乏完全的一致性^[4],且与日内平均血糖漂移

幅度有显著关联性,说明波动性高糖所引起的生物效应对DR的危险性的作用可能超过血糖绝对水平的作用。近年来多项研究指出,波动性高糖能通过细胞自噬,细胞凋亡,氧化应激及视网膜组织DNA损伤,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的释放加速糖尿病进程参与DR的发生和进展。笔者就波动性高糖与DR之间的关系进行如下综述。

1 波动性高糖对DR的影响

2013年中国2型糖尿病防治指南中推荐2型糖尿病病人控制目标为HbA1c<7%^[5]。但目前很多研究表明,仅仅用HbA1c不足以评估糖尿病病人的血糖控制情况,糖尿病并发症的发生及严重程度还与血糖波动有关。波动性高糖,又称血糖漂移,是糖尿病病人的血糖在较高水平基础上围绕均值上行、下行双向的急性波动,被认为是监测短期血

糖变化的主要指标,并可通过自测血糖系统(self-monitored blood glucose, SMBG)或动态血糖监测系统(continuous glucose monitoring system, CGMS)获取血糖波动水平^[6]。王程琳^[7]采用 CGMS 监测 60 例 HbA1c 值无明显差异的 2 型糖尿病病人的连续 72 h 血糖,发现 DR 病人的平均血糖水平,平均血糖波动幅度和日间血糖平均绝对差均高于眼底正常的 2 型糖尿病病人,提示血糖波动是 DR 发生的重要因素之一,且较 HbA1c 的预测更为准确。另有研究表明,NPDR 病人血糖波动系数及糖尿病病程明显小于 PDR 病人,但两组 HbA1c 及空腹血糖差异无统计学意义,提示血糖波动也是预测 DR 病程进展的独立危险因素之一^[8]。有学者认为,在慢性高糖状态下,细胞可通过反馈调节部分拮抗高糖毒性作用,而当细胞处于葡萄糖浓度强烈波动状态时,该适应性调节作用减弱,导致高糖毒性增强。因此在糖尿病病程较长的 DR 病人中,应重视病人的血糖波动幅度,争取平稳降糖,以免加重 DR 病情进展。

2 波动性高糖引发 DR 的发病机制

2.1 波动性高糖与细胞凋亡 细胞凋亡又被称为 I 型程序性细胞死亡,其典型的形态学特点是 DNA 碎片化、染色质凝聚、核固缩、胞质皱缩、胞膜空泡化、凋亡小体形成。覆盖视网膜毛细血管的周细胞减少是 DR 中首先出现的病理改变及显著特征,已有研究证实糖尿病视网膜毛细血管周细胞丢失与细胞凋亡密切相关^[9]。周细胞最重要的功能是调节血管形成并稳定其功能。对人视网膜细胞体外培养^[10]显示,缺乏周细胞的毛细血管仍可有完整的内皮细胞,但微动脉瘤和新生血管通常缺乏周细胞,提示周细胞的缺失使内皮细胞的增生失去控制,发生非 VEGF 诱导的新生血管形成。周细胞凋亡还可导致毛细血管通透性改变,视网膜微血管渗漏,继而导致微血管基底膜增厚,管腔窄缩和血流改变,促使 DR 后期发生视网膜缺血缺氧及新生血管形成,最终发生牵拉性视网膜脱离。Beltramo 等^[11]的实验显示,离体培养 24 h 后,波动高糖组周细胞出现明显凋亡现象,恒定高糖组周细胞未发生凋亡,而恒定高糖组在转入波动高糖环境下后在 24 h 内出现细胞凋亡,且凋亡相关分子 Bax 含量与 DNA 断裂程度呈正相关。另外一项周细胞体外培养显示,波动性高糖环境下五种凋亡相关分子包括 Fas 配体(Fas ligand, FasL),激活的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(caspase-8),细胞凋亡调控蛋白 tBid,转录因子 p53 蛋白和凋亡前体蛋白 Bax 含量较恒定高糖条件明显增加,其中 FasL 增加最为显著,而

tBid, p53 和 Bax 增加幅度较小,但恒定高糖培养下的周细胞只有 FasL 含量明显增加,提示波动性高糖最有可能通过 caspase-8 激活途径诱发周细胞凋亡进程^[12]。并且有文献表明,大幅波动的血糖也可通过激活细胞内 Ca^{2+} 依赖的蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 介导周细胞凋亡^[13], Wu 等^[14]的体外实验也证实波动高糖较稳定高糖可更强烈地激活 PKC,诱导周细胞凋亡。此外,另有研究发现波动性高糖可下调抗凋亡因子 Bcl-2 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 前体水平,并上调凋亡前体蛋白 Bax 的线粒体转位和 caspase-3 p17 蛋白表达水平,促进微血管内皮细胞的凋亡,并加重视网膜缺血缺氧状态和微血栓形成^[15]。

2.2 波动性高糖与细胞自噬 自噬以自噬体形成特征,其激发的细胞死亡不依赖于 caspase 的加入,自噬体及其内的成分通过自身的溶酶体系统,在酸性环境和溶酶体酶的作用下被清除。自噬引发的细胞死亡有别于凋亡引发的 I 型程序性细胞死亡,因而称之为 II 型程序性细胞死亡。其中人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)自噬又与 DR 的发生进展密切相关^[16]。RPE 位于脉络膜和视网膜神经上皮层之间,是通过紧密连接互相交织的单层细胞,参与加强血-视网膜屏障功能,因此 RPE 细胞层损伤后,血-视网膜屏障功能障碍,引起视网膜渗出、出血及水肿(糖尿病性黄斑水肿),血管内大分子物质如纤维蛋白进入细胞外基质中形成纤维蛋白凝胶,允许和支持新生血管和基质细胞的向内生长,诱发 DR 的发生进展^[17]。另有研究表明,细胞自噬失控是糖尿病血管内皮细胞发生失稳态的关键因素,并且参与了糖尿病视网膜新生血管形成,通过抑制自噬可在一定程度上抑制新生血管形成,延缓 DR 进程^[18]。宋建^[19]发现对比波动性高糖培养环境下 RPE 细胞 ARPE-19 的自噬体数量明显多于恒定高糖组,且前者自噬相关蛋白 LC3 含量明显增高而自噬中间媒介 p62 蛋白明显降低,提示波动性高糖条件下 RPE 细胞自噬行为更为活跃。此外,该研究还发现波动性高糖条件下, RPE 细胞内可见大量高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) 从细胞核释放到细胞质内,并较恒定高糖组有明显增多,而使用丙酮酸乙酯阻断 HMGB1 的释放后, ARPE-19 细胞内的自噬水平显著降低。而另有研究表明胞质内 HMGB1 主要通过抗凋亡蛋白 Bcl-2 竞争自噬基因 Beclin-1 上的结合位点,形成 HMGB1-Beclin-1 复合物,诱导自噬

启动^[20]。因此这也间接证明血糖波动条件下,ARPE-19 细胞的自噬启动,是由 HMGB1 介导的,并最终诱发了 DR 的发生进展。

2.3 波动性高糖与氧化应激及视网膜组织 DNA 损伤 氧化应激被认为是糖尿病微血管并发症的重要发病机制之一。视网膜在糖尿病缺血缺氧条件下,线粒体内呼吸链电子传递受抑制,活性氧(reactive oxygen species,ROS)大量产生^[21]。此外,高血糖及波动又可作为刺激因素进一步引发 ROS 水平上升^[22],胞内 ROS 最主要的攻击目标是 DNA,其中 DNA 的断裂最为常见。此外,ROS 又可通过下游多元醇通路激活、氨基己糖途径、PKC 通路、糖基化终末产物增加导致 DR 的发生进展^[23]。谭芳^[24]发现血清丙二醛与餐后血糖波动幅度(postprandial glucose excursion,PPGE)成正相关,提示餐后血糖波动可加剧氧化应激的发生,且 DR 病人 PPGE 显著高于未合并糖尿病微血管病变的糖尿病病人,因此推测血糖波动可能通过增强氧化应激诱发 DR 的发生。而李立琴^[25]在对 ARPE 细胞离体培养发现与恒定性高糖相比,波动性高糖环境下不仅血清丙二醛生成增加,且抗氧化指标超氧化物歧化酶活性及谷胱甘肽含量下降,炎症因子细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1,ICAM-1)表达量增加,提示波动性高糖可能通过加剧氧化-抗氧化机制的不均衡以及氧化应激下炎症反应导致 DR 的发生。盖春柳等^[26]报告糖尿病大鼠视网膜组织存在 DNA 损伤,血糖波动可加重该损伤,并认为血糖波动具有独立于持续高血糖以外的损伤作用。此外,在波动性高糖刺激下,Müller 细胞合成诱导型一氧化氮合酶增加^[27],并生成过量的一氧化氮,一氧化氮作为自由基,参与氧化应激,诱导细胞凋亡、引起组织细胞损伤。

2.4 波动性高糖与 VEGF VEGF 是一种分子量约 48 kDa 的同型二聚体糖蛋白,其分子家族包括胎盘生长因子、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C 和 VEGF-D,其中 VEGF-A 又称血管通透因子,Klettner 等^[28]认为其是 DR 发生发展的关键因素。人 VEGF-A 基因可通过选择性剪切产生至少 6 种主要异构体,其中 VEGF165 是诱导血管生成、增加通透性和激发炎症反应的主要活化因子^[29]。VEGF 与受体结合后通过诱导视网膜毛细血管炎症反应,上调视网膜局部 ICAM-1 并增加白细胞黏附造成视网膜白细胞瘀滞,破坏血-视网膜屏障,增加视网膜局部血管通透性,促进血管内皮细胞穿越基底膜后迁移和增殖,刺激视网膜新生血管形成诱发 DR 的发生进展^[30]。

研究发现血清 VEGF 和血小板源性生长因子-BB 含量与平均血糖波动幅度,日内最大血糖波动幅度成正相关。徐丽丽^[31]在不同条件下培养 RPE72 h 后,间断高糖组较恒定高糖组细胞胞体薄,形态不规则,且前者较后者 VEGF 含量明显增高。Sun 等^[32]发现在间歇性高糖环境下培养的人视网膜血管内皮细胞(human retinal endothelial cells,HRECs) VEGF 基因转录和表达水平及线粒体产生的 ROS 水平较恒定高糖环境下有明显上升,并且通过使用抗氧化剂锰卟啉或 2-噻吩甲酰三氟丙酮阻断 ROS 的作用,可使 VEGF 表达下调,推测间歇性高糖可能通过某种机制诱发线粒体产生过量 ROS,并进一步通过氧化应激通路激活核因子- κ B,最终导致 HRECs 内 VEGF 表达上调。此外,人视网膜周细胞也是分泌 VEGF 的主要细胞之一,而其表达的 miR-126 分子可通过抑制周细胞表达 VEGF 负向调控视网膜血管内皮细胞和周细胞的增殖和侵袭能力,从而抑制 DR 的发生进展^[33]。Mazzeo 等^[34]发现间歇性高糖培养下周细胞表达 miR-126 较恒定高糖培养环境有明显下调,并导致间歇性高糖培养下周细胞分泌 VEGF 明显增加,但该研究并未发现两种环境下血小板衍生因子和 Ang-2 通路发生激活,提示间歇性高糖可能只是通过抑制 miR-126,上调 VEGF 表达诱发 DR 发生。

3 总结

综上所述,理想的血糖控制不仅要争取血糖水平 and HbA1c 达标,同时要注意减轻糖尿病病人的血糖波动。波动性高糖可通过启动细胞自噬和细胞凋亡,激活氧化应激,损伤视网膜组织 DNA,促进 VEGF 的释放等多种途径参与 DR 的发生进展,确切完整的机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] SONG SJ,HAN K,CHOI K S,et al. Trends in diabetic retinopathy and related medical practices among type 2 diabetes patients: Results from the National Insurance Service Survey 2006-2013[J]. J Diabetes Investig,2018,9(1):173-178.
- [2] STITT AW,CURTIS TM,CHEN M,et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy[J]. Prog Retin Eye Res,2016,51:156-186.
- [3] CHAMBERLAIN JJ,RHINEHART AS,SHAEFER CF,et al. Diagnosis and management of diabetes:synopsis of the 2016 American diabetes association standards of medical care in diabetes[J]. Ann Intern Med,2016,164(8):542-552.
- [4] 戴武,曹永红,叶军,等. 血糖漂移与 2 型糖尿病视网膜病变发生的相关性[J]. 安徽医科大学学报,2012,47(7):839-841.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年

- 版)[J]. 中华内分泌代谢杂志,2014,30(10):893-942.
- [6] ABDELZAHER LA, IMAIZUMI T, SUZUKI T, et al. Astaxanthin alleviates oxidative stress insults-related derangements in human vascular endothelial cells exposed to glucose fluctuations[J]. Life Sci, 2016, 150:24-31.
- [7] 王程琳. 血糖波动与2型糖尿病视网膜病变的关系[J]. 山西医药杂志, 2017, 46(15):1868-1869.
- [8] 奚宇. 2型糖尿病患者血糖波动与视网膜病变的关系[D]. 芜湖:皖南医学院, 2016.
- [9] DURHAM JT, DULMOVITS BM, CRONK SM, et al. Pericyte chemomechanics and the angiogenic switch: insights into the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy? [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(6):3441-3459.
- [10] DOMINGUEZ E, RAOUL W, CALIPPE B, et al. Experimental branch retinal vein occlusion Induces upstream pericyte loss and vascular destabilization[J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0132644. DOI:10.1371/journal.pone.0132644.
- [11] BELTRAMO E, BERRONE E, TARALLO S, et al. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2009, 25(6):566-576.
- [12] BELTRAMO E, ARROBA AI, MAZZEO A, et al. Imbalance between pro-apoptotic and pro-survival factors in human retinal pericytes in diabetic-like conditions[J]. Acta Ophthalmol, 2018, 96(1):e19-e26. DOI:10.1111/aos.13377.
- [13] QUAGLIARO L, PICONI L, ASSALONI R, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production[J]. Atherosclerosis, 2005, 183(2):259-267.
- [14] WU N, SHEN H, WANG Y, et al. Role of the PKC β II/JNK signaling pathway in acute glucose fluctuation-induced apoptosis of rat vascular endothelial cells [J]. Acta Diabetol, 2017, 54(8):727-736.
- [15] WU N, SHEN H, LIU H, et al. Acute blood glucose fluctuation enhances rat aorta endothelial cell apoptosis, oxidative stress and pro-inflammatory cytokine expression in vivo[J]. Cardiovasc Diabetol, 2016, 15(1):109.
- [16] SHI H, ZHANG Z, WANG X, et al. Inhibition of autophagy induces IL-1 β release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463(4):1071-1076.
- [17] 李倩, 郑志, 许迅. 细胞因子信号抑制因子3与糖尿病视网膜病变[J]. 眼科新进展, 2010, 30(8):785-788.
- [18] LENOIR O, JASIEK M, HENIQUE C, et al. Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis[J]. Autophagy, 2015, 11(7):1130-1145.
- [19] 宋建. 血糖波动所致氧化应激对ARPE-19细胞自噬功能的影响及其机制研究[D]. 天津:天津医科大学, 2016.
- [20] ZHU X, MESSER JS, WANG Y, et al. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(3):1098-1110.
- [21] CHAKRABARTI S K, GHOSH S, BANERJEE S, et al. Oxidative stress in hypothyroid patients and the role of antioxidant supplementation[J]. Indian J Endocrinol Metab, 2016, 20(5):674-678.
- [22] MENG X, GONG C, CAO B, et al. Glucose fluctuations in association with oxidative stress among children with T1DM: comparison of different phases [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(5):1828-1836.
- [23] AHSAN H. Diabetic retinopathy--biomolecules and multiple pathophysiology[J]. Diabetes Metab Syndr, 2015, 9(1):51-54.
- [24] 谭芳. 血糖波动对2型糖尿病患者氧化应激及炎症反应的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2011.
- [25] 李立琴. 血糖波动对HRPE细胞氧化应激以及表达ICAM-1的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2011.
- [26] 盖春柳, 赵静如, 陈晓隆. 血糖波动对糖尿病大鼠视网膜组织DNA损伤的影响[J]. 国际眼科杂志, 2014(6):992-995.
- [27] 石瑜珍. 葡萄糖浓度波动对兔视网膜Müller细胞的作用及可能机制[D]. 福州:福建医科大学, 2012.
- [28] KLETTNER A, KAYA L, FLACH J, et al. Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growth factor in the RPE/choroid and primary RPE[J]. Mol Vis, 2015, 21:736-748.
- [29] SENTHILKUMARI S, SHARMILA R, CHIDAMBARANATHAN G, et al. Epalrestat, an aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced toxicity in human retinal pigment epithelial cells *in vitro* [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2017, 33(1):34-41.
- [30] CAMPOCHIARO P A. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases[J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 49:67-81.
- [31] 徐丽丽. 间断高糖对人视网膜色素上皮细胞分泌VEGF的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2011.
- [32] SUN J, XU Y, SUN S, et al. Intermittent high glucose enhances cell proliferation and VEGF expression in retinal endothelial cells: the role of mitochondrial reactive oxygen species [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 343(1/2):27-35.
- [33] GIURDANELLA G, ANFUSO CD, OLIVIERI M, et al. Aflibercept, bevacizumab and ranibizumab prevent glucose-induced damage in human retinal pericytes *in vitro*, through a PLA2/COX-2/VEGF-A pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 96(3):278-287.
- [34] MAZZEO A, BELTRAMO E, IAVELLO A, et al. Molecular mechanisms of extracellular vesicle-induced vessel destabilization in diabetic retinopathy[J]. Acta Diabetol, 2015, 52(6):1113-1119.

(收稿日期:2018-02-09,修回日期:2018-03-16)