

文章编号:1672-3392(2009)06-0081-04

## 晚期糖基化终末产物的特性及其研究现状分析\*

许良元<sup>1,2</sup> 刘勇<sup>1</sup> 张弓<sup>3</sup> 翟玉峰<sup>1</sup> 朱灵<sup>1</sup> 吴路生<sup>1</sup>

(1 中国科学院安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031;

2 安徽农业大学工学院, 安徽 合肥 230036; 3 加拿大温尼伯大学, 马尼托巴 R3T6A5)

**摘要** 分析了晚期糖基化终末产物的生化特性和主要结构形式,介绍了目前检测晚期糖基化终末产物的主要方法和各自的优缺点,讨论了荧光光谱检测方法。用检测系统测试了晚期糖基化终末产物的激发光谱,同时采用 370 nm 的单色光作为激发光源,分别对正常人和糖尿病患者的皮肤进行了荧光光谱检测,通过获得的发射荧光光谱分析可以发现两者在 450 nm 附近的荧光存在明显的差异。结果表明该荧光光谱测量系统快速、无创、简单,可应用于对糖尿病、人体衰老、氧化应激等病情进行早期预测和诊断。

**关键词** 晚期糖基化终末产物; 无创检测; 方法; 荧光光谱

**中图分类号** R318.51 **文献标识码** A

### 1 引言

晚期糖基化终末产物(Advanced Glycation Endproducts, AGE)是在非酶条件下,蛋白质、氨基酸、脂类或核酸等大分子物质的游离氨基与还原糖的醛基经过缩合、重排、裂解、氧化修饰后产生一组稳定的终末产物<sup>[1,2]</sup>。许多细胞表面均有其受体,AGE 通过这些受体可以影响细胞的功能。大量研究证明,AGE 在糖尿病及其并发症、尿毒症、Alzheimer(阿尔茨海默)病、白内障、脊髓侧索硬化症等疾病和衰老的发生发展过程中具有重要作用<sup>[3-7]</sup>,起病隐匿,早期不易被诊断和发现,呈渐进性发展,当发展到一定阶段后治疗效果不佳,是造成患者致残致死的重要原因。因此检测血清和组织中 AGE 的浓度对多种疾病的预测、诊断及治疗具有重要的意义。由于 AGE 结构复杂多样,至今尚缺乏有效而方便快捷的检测方法以供临床应用<sup>[8]</sup>。本文在分析 AGE 的结构和目前常用的检测方法的基础上,重点讨论 AGE 无创荧光光谱检测法,并对该检测系统进行了实验验证。

### 2 晚期糖基化终末产物的生化特性及其致病机理

AGE 具有独特的生化特性:1) 它呈棕色;2)

一部分 AGE 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;5) 许多细胞,如:巨噬细胞、系膜细胞、内皮细胞表面均有其受体,AGE 通过这些受体可以影响细胞的功能。

AGE 通过改变蛋白质的结构、影响脂质代谢、修饰核酸、通过 AGE 受体等途径使人致病。体内过量 AGE 引起的病理改变主要通过以下三个过程:1) AGE 改变了细胞外基质蛋白的性质及细胞外诱发的信号传导途径;2) 通过 AGE 与其特异的细胞受体相互作用,改变了可溶性信号分子如细胞因子、激素和自由基的水平;3) 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,AGE 改变了血管的结构和功能,导致疾病的发生。

AGES 具有高度异质性,在体内有多种不同的存在形式。AGE 是一种结构多样性的化合物,分子量约在 2 200~6 000 ku,AGE 肽分子量为 1 500~2 000 ku。尽管人们已经对其进行了广泛的研究,但对于体内 AGE 的确切化学结构仍未完全明了,目前,人们已知的结构形式主要有以下几

收稿日期 2009-01-13; 收到修改稿日期 2009-03-28

作者简介 许良元(1973-),男,副教授,主要从事数控技术、光纤、光电子等方面的研究工作。E-mail: xlyjwh@126.com

\* 中国科学院知识创新工程青年人才领域专项前沿项目资助

种<sup>[9,10]</sup>：

- 1) 呋喃-糠酰-氢-咪唑 (FFI: 4-furanyl-2-furoyl-1H-imidazole);
- 2) 戊糖苷素 (Pentosidine)<sup>[11-14]</sup>;
- 3) 吡咯素 (Pyrraline)<sup>[15,16]</sup>;
- 4) 羧甲基赖氨酸 (CML)<sup>[17,18]</sup>;
- 5) 交联 (Crossline)<sup>[19-21]</sup>。

### 3 晚期糖基化终末产物的检测现状及方法

由于 AGE 化学结构尚不完全确定和呈多样性,而且无商品试剂盒可供临床使用,因此对其在体内蓄积程度的检测有较大困难而且目前尚无通用的测量单位,也没有能够被普遍接受和使用的检测方法,所以造成研究人员之间无法比较其实验结果,严重阻碍了对 AGE 及其相关疾病的研究进展。目前常用于检测 AGE 的主要方法有色谱分析技术、酶免疫吸附试验法、免疫组织化学法、放射免疫分析、放射受体分析、流动注射分析法、荧光光谱法等<sup>[19-24]</sup>。

### 4 荧光光谱法用于晚期糖基化终末产物的检测

组织荧光光谱诊断技术以其极高的灵敏度、精确度以及无损、安全、快速等优点而成为了目前光活检中的一个重要研究领域。AGE 紫外荧光无创光谱检测技术也是今后人体健康诊断技术、预测的重要发展方向之一。我们经过大量的调研和实验,逐步开展了对 AGE 的无创荧光光谱检测研究。

#### 4.1 测量原理

当用一种波长的光(如紫外光)照射某种物质时,这种物质的基态分子吸收能量被激发至激发态后,再返回基态时会在极短的时间内发射出较激发光波长的光(如可见光),这种光就称为荧光。入射到皮肤组织表面的光束,一部分进入皮肤,被皮肤组织散射与吸收,其散射、吸收的情况由皮肤组织内各种色素,如血红蛋白、胆红素和黑色素等决定,未被吸收的散射光最后会重新返回皮肤表面而进入空气中,这一部分散射光称为漫反射光,在皮肤表面可探测到各波长相应的漫射光强度,组成反射光谱。入射到皮肤组织内的一部分光,被荧光团吸收后激发出荧光。

#### 4.2 实验装置

测量系统的总体方案如图 1 所示。在进行 AGE 荧光光谱测量时,扫描激发单色仪,使不同波长的入射光激发皮肤组织里 AGE 的荧光物质,产生的荧光通过固定的发射单色仪照射到检测器上,检测相应的荧光强度,记录荧光强度与激发光波长的关系曲线,即为激发光谱。它反映了不同波长激发光引起物质发射某一波长荧光的相对效率,可用来鉴别荧光物质;保持激发光的波长和强度不变,AGE 荧光物质所产生的荧光通过发射单色仪照射到探测器上,扫描发射单色仪并检测各波长下相应的荧光强度,记录荧光强度与荧光发射波长的关系曲线,即为荧光发射光谱。它表示荧光物质所发射的荧光在各种波长下的相对强度,可用来鉴别荧光物质,并可作为荧光测定时选择测定波长或滤光片参数的根据。荧光信号经过去噪,归一化处理,放大了微弱光谱信号,突出了光谱的形状差异,减弱外界因素对采集荧光的影响,再通过计算机对采集的不同荧光信号进行归类分析,建立正常人和糖尿病患者的 AGE 荧光光谱数据库。

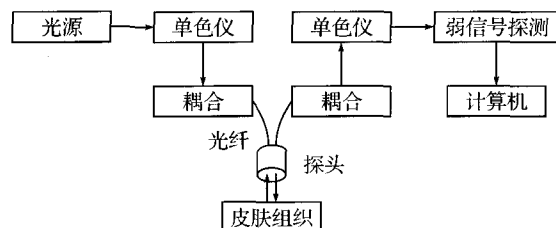


图 1 晚期糖基化终末产物测量系统

Fig. 1 AGE detecting system

#### 4.3 测试结果与分析

根据本文设计的荧光光谱检测系统,我们对 AGE 进行了激发波长扫描,得到的 AGE 激发光谱如图 2 所示。由图可以发现 AGE 最佳激发波长  $\lambda_e$  约为 370 nm。采用  $\lambda_e = 370$  nm 作为激发波长,以糖尿病检测为例,分别对没有患糖尿病的人体皮肤和患有糖尿病的患者皮肤取了几例测试对象进行了发射光谱测试,测试结果如图 3 所示。从图中可以看出患者皮肤 AGE 荧光强度明显高于正常人,发射波长约 450 nm 左右;同时由于影响 AGE 测试结果的因素很多,例如性别、年龄、皮肤颜色等,所以从图中还可以看出健康人群之间的测试结果也会有所差异,这些实验结果与本文引用的相关文献上介绍的结论几乎一致。

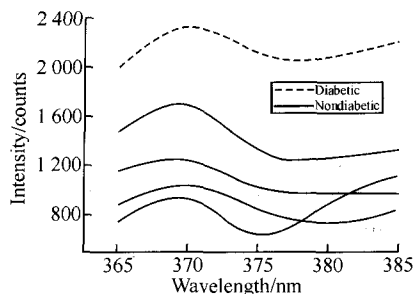


图2 激发光谱

Fig. 2 Excitation spectrum

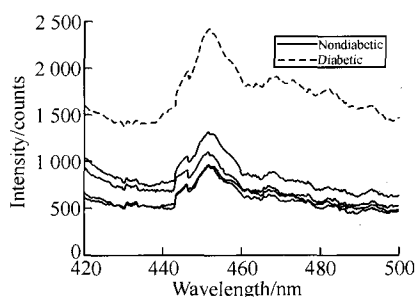


图3 发射光谱

Fig. 3 Emission spectrum

## 5 结论

目前 AGE 的检测方法比较多,但是 AGE 荧光光谱检测方法采用的是一种无创光谱检测技术,利用人的皮肤中糖基化终末产物受激产生的荧光强度的不同,通过对接收到的荧光强度进行分析研究,得到被检测人的健康状况等信息。该检测方法不需要采集血样,避免抽血进行生化实验给患者可能带来的疼痛、感染等且重复性好,患者更容易接受此方法,被测者可以根据测试数据对自己的身体状况(包括是否可能患有糖尿病、身体衰老情况等)进行早期预测和诊断,是今后快速和无创检测的重要研究方向之一。

### 参考文献

[1] 蔡德鸿,韩钧凌.高级糖基化终末产物的检测及其临床意义[J].辽宁实用糖尿病杂志,2004,12(1):57-60.  
 [2] 孙缙恩,杜冠华.晚期糖基化终末产物的病理意义及其机制[J].中国药理学通报,2002,18(3):246-249.  
 [3] Brownlee M. Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications[J]. *Annu. Rev. Med.*, 1991, 42(3): 159-66.  
 [4] Miyata T, Van Ypersele de Strihou C, Kurokawa H, *et al.* Alterations in Nonenzymatic biochemistry in uraemia-an origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications[J]. *Kidney*

*Int.*, 1999, 55(4): 389-399.

- [5] Dukic-Stefanovic S, Schinzel R, Reiderer P, *et al.* AGEs in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs[J]. *Biogerontology*, 2001, (2): 19-34.  
 [6] Lyons U, Silvestri G, Dunn J A, *et al.* Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts[J]. *Diabetes*, 1991, 40(13): 1010-1015.  
 [7] Kikuchi S, Shinpo K, Ogata A, *et al.* Detection of N epsilon-(carboxymethyl) lysine (CML) and non-CML advanced glycation end-products: in the anterior horn of amyotrophic lateral sclerosis spinal cord [J]. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2002, 3(2): 63-68.  
 [8] 孙子林.糖基化终产物(AGEs)的结构及其检测研究进展[D].南京:南京铁道医学院,1999:87-99.  
 [9] Brownlee M Lilly. Glycation and diabetic complications[J]. *Diabetes*, 1994, 43(2): 836-841.  
 [10] Koenig RJ, Blobstein SH, Cerami A. Structure of carbohydrate of hemoglobinal[J]. *J. Bioi. Chem.*, 1977, 252(5): 2992-2997.  
 [11] Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process [J]. *J. Bioi. Chem.*, 1989, 64(4): 21597-21602.  
 [12] Odetti P, Fogarty J, Sell DR, *et al.* Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects[J]. *Diabetes*, 1992, 41(3): 153-159.  
 [13] Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, *et al.* Accumulation of albumin-linked and freeform pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: Renal implications in the pathophysiology of pentosidine [J]. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1996, (7): 1198-1206.  
 [14] Miyata T, Ueda Y, Yoshida A, *et al.* Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product, by different modalities of renal replacement therapy [J]. *Kidney Int.*, 1997, 51(3): 880-887.  
 [15] Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, *et al.* Immunological Detection of a glucose derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo [J]. *J. Bioi. Chem.*, 1989, 263(2): 3758-3764.  
 [16] Miyata S, Monnier VM. Immunohistochemical Detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrrole [J]. *J. Clin. Invest.*, 1992, 82(3): 1102-1112.  
 [17] Meng J, Sakata N, Takebayashi S, *et al.* Glycoxidation in aortic collagen from STZ induced diabetic rats and its relevance to vascular damage[J]. *Atherosclerosis*, 1998, 136(3): 355-365.  
 [18] Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, *et al.* Nε-(Carboxymethyl) lysine is a dominant advanced glycation end products (AGE) antigen in tissue pro-

- teins[J] *Biochemistry*, 1995, 34(2): 10872-10878.
- [19] Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, *et al.* Formation of Crossline as a fluorescent advanced glycation end products in vitro and in vivo[J]. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 1996, 226(2): 37-41.
- [20] Yamaguchi M, Nakamura N, Nakano K, *et al.* Immunochemical quantification of crossline as a fluorescent advanced glycation endproduct in erythrocyte membraneproteins from diabetic patients with or without retinopathy[J]. *Diabet Med.*, 1998, 15(8): 458-462.
- [21] Abmed N, Argirov OK, Minbas HS, *et al.* Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application Nepsilon-carboxymethyl-lysine and Nepsilon-(1-carboxyethyl) lysine-modified albumin[J]. *Biochem J*, 2002, 364(1): 1-14.
- [22] Odetti P, Forgary J, Sell DR, *et al.* Chromatographic quantitative of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subject[J]. *Diabetes*, 1992, 41(3): 153-159.
- [23] Wiler SC, Chellan P, Arnold BM, *et al.* Chromatographic quantification of argprimidine, a methylglyoxal-derived product in Tissue proteins; comparison with pentosidine[J]. *AnalBiochem*, 2001, 290(2): 3583-3588.
- [24] Turk Z, Ljubic S, Turk N, *et al.* Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus[J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 303(2): 105-115.
- [25] Wrobel K, Wrobel K, Garay-Sevilla ME, *et al.* Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system[J]. *Clin. Chern.*, 1997, 43(9): 1563-1569.

## Property of Advanced Glycation Endproducts

XU Liang-yuan<sup>1,2</sup> LIU Yong<sup>1</sup> ZHANG Gong<sup>3</sup> ZHAI Yu-feng<sup>1</sup>  
ZHU Ling<sup>1</sup> WU Lu-sheng<sup>1</sup>

( 1 Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2 Engineering College, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3 University of Winnipeg, Manitoba R3T6A5, Canada )

**Abstract** The necessity to detect advanced glycation endproducts(AGE) and its biochemic property and main structure were analyzed in the paper. The main methods to detect AGE at present and their advantages and disadvantages were introduced. At the same time, the emission spectrum was detected on the skin of nondiabetic people and diabetes respectively. The result of the experiment indicates that there are differences distinctly about 450 nm between them. It proves the feasibility of the system. The process of the detection is very rapid and convenient. The patient can benefit from it to forecast and diagnose the state of illness such as diabetes, decrepitude, oxidative stress etc conveniently.

**Key words** AGE; noninvasive; method; fluorescence spectrum