

2型糖尿病患者尿核糖浓度显著高于正常*

苏涛^{1,2)} 辛亮¹⁾ 赫英舸¹⁾ 魏艳¹⁾ 宋宜祥³⁾ 黎巍威³⁾ 王学美³⁾ 赫荣乔^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (²⁾中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049; (³⁾北京大学第一医院, 北京 100034)

摘要 自从 Chevreul ME 发现糖尿病患者尿液中的糖是葡萄糖, 近 200 年的时间, 糖尿病被视为一组以葡萄糖慢性增高为特征的代谢性疾病, 而体内广泛存在的核糖与糖尿病之间的关系却被忽略. 研究发现核糖可以降低血葡萄糖浓度, 曾报道糖尿病患者可以口服核糖. 本实验室前期工作表明, 核糖能够迅速与蛋白质发生非酶促糖基化, 形成具有强烈细胞毒性的糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs), 引起细胞(包括神经细胞)死亡. 进一步的实验证明, 虽然在给小鼠注射核糖时, 血葡萄糖浓度有所降低, 但是糖基化血清蛋白和 AGEs 均显著升高, 说明核糖浓度的升高更容易使机体发生非酶促糖基化反应, 产生 AGEs, 从而造成危害. 本文采用 1-(4-羧基苯基)-3-甲基-5-吡啶酮(MOPBA)结合高效液相色谱, 对明确诊断的 2 型糖尿病患者($n = 30$)和同龄健康人($n = 30$)尿核糖进行了定量分析, 结果显示, MOPBA-核糖衍生物与尿核糖浓度之间呈线性相关($r^2=0.999$), 回收率达 99%. 经质谱分析显示, HPLC 分离的糖尿病患者尿样品中含 569.19 u MOPBA 衍生物峰(核糖, $C_{27}H_{29}N_4O_{10}$)和 599.20 u MOPBA 衍生物峰(葡萄糖, $C_{28}H_{31}N_4O_{11}$). 2 型糖尿病组尿核糖浓度(男性: $(134.28 \pm 35.09) \mu\text{mol/L}$; 女性: $(97.33 \pm 23.68) \mu\text{mol/L}$)显著高于正常对照组(男性: $(35.99 \pm 5.64) \mu\text{mol/L}$; 女性: $(33.72 \pm 6.27) \mu\text{mol/L}$) ($P < 0.001$), 同时, 其尿葡萄糖浓度也显著高于正常对照($P < 0.001$). 糖尿病患者尿核糖显著高于正常人的现象提示, 2 型糖尿病不但葡萄糖代谢异常, 同时核糖代谢也发生了异常.

关键词 2 型糖尿病, 核糖, 葡萄糖, 非酶促糖基化, 并发症, 代谢性疾病

学科分类号 Q5, R58

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00341

糖尿病(diabetes mellitus)是一组由于胰岛素分泌缺陷和/或胰岛素作用障碍所致的以高血糖为特征的代谢性疾病, 由患者的血糖过高、单糖从尿中排出使尿呈甜味而得名. 近 30 年来, 我国糖尿病患病率显著增加. 1980 年我国 14 省市 30 万人的流行病学资料显示, 糖尿病的患病率为 0.7%. 2007~2008 年, 全国 14 个省市进行的糖尿病流行病学调查显示, 我国 20 岁以上的成年人, 糖尿病患病率为 9.7%^[1]. 糖尿病严重危害我国人口健康, 造成巨大的经济和精神负担. 因此, 研究糖尿病新的发病机制, 不但对糖尿病的理解具有重要的理论意义, 同时对于探索新的生物标记物以及防治具有潜在的应用价值.

自从 1815 年, 法国化学家 Chevreul ME 发现糖尿病患者尿液的甜味是由葡萄糖所致, 历时 198 年, 糖尿病被认为是一组以慢性血葡萄糖(简称血糖)水平增高为特征的代谢病群, 即葡萄糖代谢失调是糖尿病发生发展的最主要原因^[2]. 由于葡萄糖

对蛋白质的非酶促糖基化(glycation), 导致体内蛋白质结构改变与功能丧失^[3]. 非酶促糖基化产生的糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)具有较强的细胞毒性, 在体内蓄积, 使细胞代谢发生紊乱甚至死亡, 是糖尿病并发症发生发展的主要原因^[4]. 国内外同行从基因、蛋白质、细胞、组织、临床以及流行病学调查等不同层次, 广泛研究了糖尿病的发病机制及其防治方法, 在相关基础和临床研究领域获得了重要的进展. 然而, 核糖(D-ribose, 广泛存在于机体内的还原糖)代谢失调与糖尿病及其并发症的关系却未见报道.

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB911000, 2010CB912303), 国家自然科学基金(31270868, 31200601, 81100610)和北京市自然科学基金(5112024)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: rongqiaoh@163.com

收稿日期: 2013-07-18, 接受日期: 2013-08-21

核糖是五碳还原糖, 属于呋喃糖。由于五碳环的不稳性, 使得核糖较葡萄糖具有更为活泼的醛基 (aldehyde group)。核糖广泛存在于细胞内外, 是 RNA、ATP、GTP、DNA、辅酶以及维生素的组成部分, 在生物体系中具有不可替代的重要作用^[5]。目前, 核糖被广泛用于能量补充剂, Steinberg 等^[6]曾提出糖尿病患者口服核糖。这是由于口服核糖是 ATP 合成的原料, 同时还可以降低血葡萄糖浓度的缘故^[7]。

本实验室比较了核糖与葡萄糖在牛血清白蛋白 (BSA) 非酶促糖基化过程中的动力学性质^[8], 结果显示, 核糖使蛋白质糖基化速度显著快于葡萄糖, 快速形成具有细胞毒性的 AGEs。然而, 在相同条件下, 葡萄糖的糖基化产物却没有表现出细胞毒性。采用神经 Tau 和 α 突触核蛋白 (α -synuclein) 作为研究对象, 也证明了核糖在非酶促糖基化过程中的活泼性质^[9-10]。韩婵帅等^[11]通过腹腔注射核糖, 观察到小鼠在注射核糖一个月后, 在水迷宫实验中的空间认知功能出现损伤, 在相同条件下葡萄糖则没有表现出对其认知功能的损伤。核糖可以自由通过血脑屏障^[12], 与脑内蛋白质进行非酶促糖基化反应, 形成 AGEs, 从而导致神经细胞代谢失调, 甚至死亡^[13]。

由于人血核糖的含量约为 20~100 $\mu\text{mol/L}$, 其浓度低于血葡萄糖, 因此, 测定体内的核糖, 需要分辨率较高的定量分析技术。本实验室在 Castells 等^[14]提出的分析还原糖方法的基础上, 针对核糖的定量分析进行技术改良, 解决了尿核糖的测定问题, 并对 30 名 2 型糖尿病临床患者和 30 名同龄正常人的尿核糖和葡萄糖进行了分析。结果表明, 2 型糖尿病患者尿中的核糖浓度显著高于正常对照, 提示 2 型糖尿病不但存在葡萄糖代谢失调, 而且存在核糖代谢失调。

1 材料与方法

1.1 材料

核糖 (分析纯, 美国 Amresco 公司); 葡萄糖 (分析纯, 美国 Amresco 公司); 1-(4-羧基苯基)-3-甲基-5-吡唑酮 (MOPBA) (纯度 $\geq 98\%$, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙腈 (液相色谱纯, Thermo Fisher Scientific 公司); 甲醇 (液相色谱纯, Thermo Fisher Scientific 公司); 1-己烷磺酸钠一水合物 (液相色谱纯, 百灵威科技公司); 磷酸 (分析纯, 北京益利精细化学品有限公司)。所有实验用纯水由

Milli-Q 系统制备 (美国 Millipore 公司)。MOPBA 试剂 (0.15 mol/L): 称取 1-(4-羧基苯基)-3-甲基-5-吡唑酮 3.273 g, 溶于 0.25 mol/L NaOH 的甲醇水溶液 (50:50) 100 ml。HCl 试剂 (2 mol/L): 16.95 ml 浓盐酸 (11.8 mol/L) 定容至 100 ml。

1.2 病例与对照

从北京大学第一医院门诊确诊的 2 型糖尿病病人 30 例, 年龄 50~85 岁 (男性 12 人, 女性 18 人) 糖耐量试验阳性, 空腹血糖浓度 (9.08 ± 3.01) mmol/L, 糖化血红蛋白为 (7.61 ± 1.17)%, 从未服用核糖作为能量补充, 无肾脏疾病等。同龄对照组 30 人, 年龄 50~85 岁 (男性 15 人, 女性 15 人), 无糖尿病史, 糖耐量试验阴性, 空腹血糖浓度正常, 经过体检未见肾脏及其他系统疾病。在研究过程中, 严格遵照中国科学院生物物理研究所伦理道德委员会的规定 (批准号: 2013-HRQ-1)。

1.3 核糖的测定

1.3.1 尿样采集。取晨尿中段, 检测前尿样置于冻存管中, -80°C 保存。采样前 12 h 未饮酒、未食用刺激性食物。

1.3.2 样品制备。取 400 μl 尿样置于 Eppendorff 管中, 加入 600 μl MOPBA 试剂。混匀后, 70°C 水浴 1.5 h。水浴完冷却到室温, 加入 150 μl 2 mol/L HCl, vortex 涡旋振荡, 离心 (13 000 r/min, 室温, 10 min), 取上清用 0.22 μm 的尼龙膜过滤后, 用于 HPLC 分析。

1.3.3 高效液相色谱条件。LC-20A 高效液相色谱仪 UV-HPLC, SPD-M20A 二极管阵列检测器 (日本岛津公司)。色谱柱: LiChrospher 100 RP-18 (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm , 德国 Merck 公司); 采用二元梯度洗脱的方法, 流动相 A: 10 mmol/L 己烷磺酸钠水溶液, 用磷酸调 pH=2.5; 流动相 B: 50% 乙腈, 配制后超声脱气 30 min。时间程序: 42%~60% 流动相 B, 15 min; 100% 流动相 B, 5 min; 42% 流动相 B, 5 min。流速: 1 ml/min。进样量: 20 μl 。检测波长: 271 nm。柱温: 45°C 。

1.3.4 标准曲线的建立。标准品制备: 分别称取核糖和葡萄糖固体, 配制成 0.1 mol/L 母液。将核糖与葡萄糖母液分别按照浓度比为 1:5 进行混合, 用纯水稀释混合母液, 稀释后核糖浓度和葡萄糖浓度见表 1。以峰面积 (y), 样品浓度 (x) 作为核糖标准曲线外标方程: $y = 6752x + 1005$ 。葡萄糖标准曲线外标方程: $y = 7114x + 27591$ 。

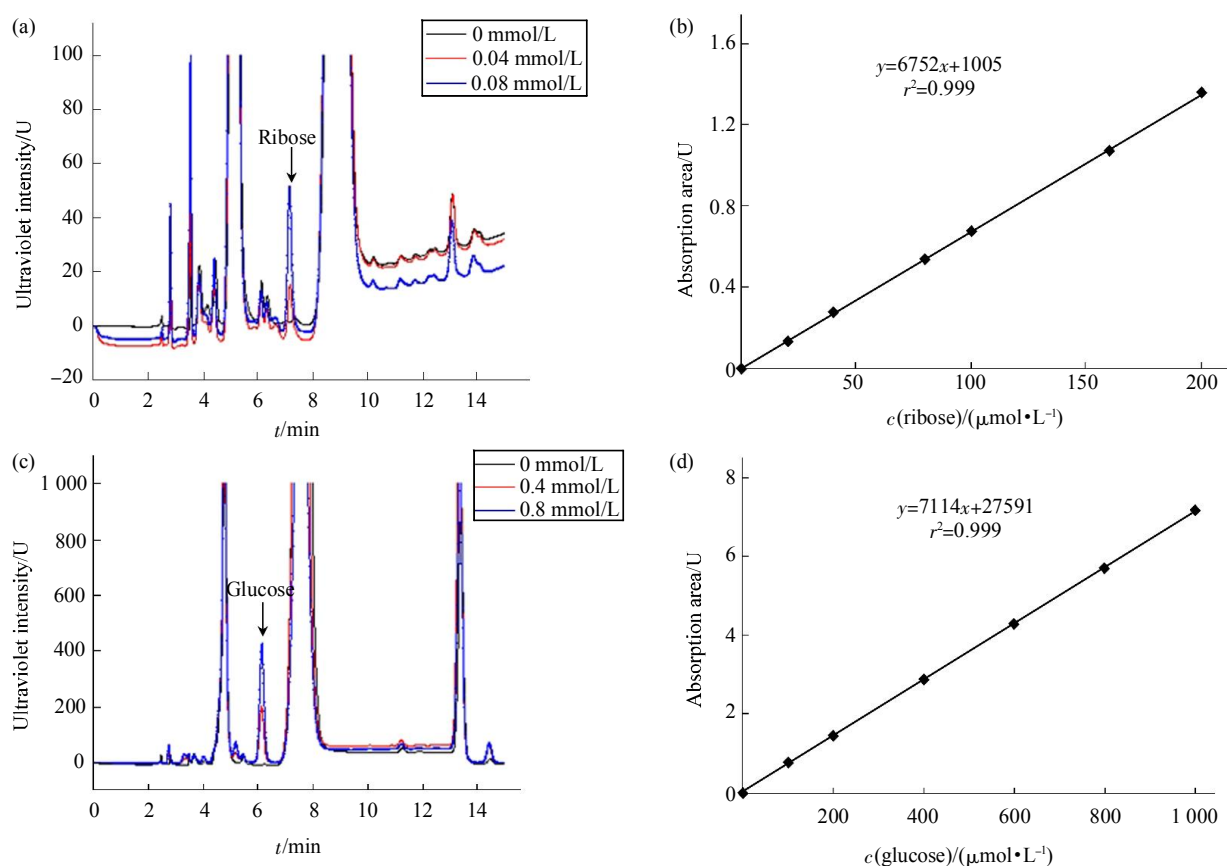
Table 1 Final concentration of D-glucose and D-ribose in standard curve

	1 ^{b)}	2	3	4	5	6	7
D-Ribose	0	20	40	80	100	160	200
D-Glucose	0	100	200	400	600	800	1 000

^{b)} The mean value of duplicate results for each concentration of standard substance, which unit is expressed in $\mu\text{mol/L}$.

1.3.5 吸收峰和保留时间的确定. 按照以上样品制备方法和色谱条件, 通过核糖或葡萄糖标准品与 MOPBA 反应, 确定反应产生的核糖 -MOPBA 类衍生物在 HPLC 洗脱过程中的保留时间, 随着标准品浓度的变化, 糖类衍生物洗脱峰的峰面积也呈正比例的变化, 从而判别样品中葡萄糖衍生物的保留时间, 如图 1a, 保留时间约为 $(6 \pm 1)\text{min}$, 葡萄糖

衍生物吸收峰可以有效分离. 核糖衍生物的保留时间约为 $(5 \pm 1)\text{min}$, 但是此条件下核糖衍生物吸收峰被其他杂峰干扰, 没有有效分离开. 调整色谱条件, 当二元梯度洗脱时间程序设为 38%~60% 流动相 B, 15 min; 100% 流动相 B, 5 min; 38% 流动相 B, 5 min. 流速: 1 ml/min. 核糖吸收峰得到有效分离, 如图 1a, 保留时间约为 $(7.2 \pm 1)\text{min}$.

**Fig. 1** Assays of uric D-ribose and D-glucose with (MOPBA) through HPLC

Aliquots of urine ($400\ \mu\text{l}$) were taken and incubated in Eppendorff tubes with $600\ \mu\text{l}$ 4-(3-Methyl-5-oxo-2-pyrazolin-1-yl) benzoic acid (MOPBA) reagent for 1 h at 70°C . After cooling to room temperature, the reaction mixture was acidified by adding $150\ \mu\text{l}$ aqueous HCl ($2\ \text{mol/L}$). The mixtures were vigorously shaken and centrifuged ($13\ 000\ \text{r/min}$, 4°C , 10 min). The supernatants were finally filtered through $0.22\ \mu\text{m}$ Nylon membranes and the resultant solutions ($20\ \mu\text{l}$ each) were injected into the C18-column on a UV-HPLC. The ordinate represents the absorbance area of labeled carbohydrates (arbitrary unit). Maximal absorbance of D-ribose and D-glucose was as indicated with arrows (panels a, c). The standard curves for D-ribose and D-glucose were shown in panel (b) and panel (d).

1.4 质谱分析

收集 HPLC 核糖和葡萄糖相对应保留时间的流出峰样品, 用傅立叶变换高分辨率质谱 (fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) APEX IV (美国 Bruker 公司) 对峰内化合物样品分子质量进行分析. 确定 HPLC 过程中糖类衍生产物的分子质量, 并且确定分子式.

1.5 统计分析

化学分析结果与临床数据的获得采取“双盲法”. 在结果出来之后, 才得到临床数据进行综合分析. 统计方法运用 SPSS 软件 (版本 13.0, 美国 International Business Machines Corporation 公司) 单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行统计.

2 结 果

2.1 MOPBA 的吸收峰与核糖浓度之间的关系

采用改良 Castells' 法^[4], 以纯水(或尿液)为溶

剂, 分别加入不同浓度核糖或葡萄糖(图 1)进行定量分析. 所形成的 MOPBA- 核糖衍生物吸收峰面积随核糖浓度升高而增加, 两者之间呈现线性相关 ($r^2=0.999$) (图 1a, b). 相同条件下, MOPBA- 葡萄糖衍生物的吸收峰面积与葡萄糖浓度也呈线性相关 ($r^2=0.999$) (图 1c, d). 在此条件下, UV-HPLC 不但能够有效分离尿液中的 MOPBA- 核糖和 MOPBA- 葡萄糖, 而且 MOPBA- 还原糖衍生物的吸收峰面积与这两种还原糖的浓度呈较好的线性相关.

2.2 实验的重复性

2.2.1 日内差. 在室温下, 取相同的尿样进行 HPLC 检测, 每隔 1 h, 重复检测一次, 共进行 5 次平行实验. 不同时间点的平均值见表 2. 结果显示, MOPBA 法在 8 h 内检测尿中核糖衍生物的含量基本稳定, 即该方法至少可以用于 8 h 内, 室温下放置样品的检测.

Table 2 Concentrations of uric D-ribose at different time points

0	1	2	3	4	5	6	7	Mean ¹⁾	RSD/%
114.81	115.47	115.25	114.60	114.01	113.53	113.14	112.81	114.20	0.86

¹⁾ Uric ribose concentration is in $\mu\text{mol/L}$ in the subject of control group. Data in means assayed at each time point ($n=5$). No significant difference among the values at room temperature at different hours ($P > 0.05$).

2.2.2 日间差. 按照图 1 所描述的条件与方法, 制备尿样, 每隔 1 天检测. 检测期间样品置于 4°C , 共进行 5 次平行实验. 结果表明, 尿样放置时间延

长, 测定的 MOPBA- 还原糖衍生物平均值有所降低(表 3), 所以, 样品制备后产生的 MOPBA- 还原糖衍生物, 24 h 内为最佳检测时间.

Table 3 Changes in the concentrations of uric D-ribose at different days

Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Mean ¹⁾	RSD/%
119.40	114.72	108.91	106.29	112.32	5.26

¹⁾ Data in means ($n=5$). No significant difference among the values on different days ($P > 0.05$). The samples were kept at 4°C before injection into HPLC.

2.2.3 回收率. 取对照组的尿样, 分别加入 40、80、100 μmol 核糖标准品, 经行 HPLC 检

测. 按照公式: 回收率 = (测出量 - 本底) / 标准加入量(表 4)进行计算, 核糖的回收率约 99%.

Table 4 Recoveries in the assay of uric D-ribose with HPLC

Input	Mean ¹⁾	Recoveries/%	RSD/%
40	39.92	99.80	2.23
80	79.11	98.89	3.23
100	100.70	100.70	2.55

¹⁾Data in means ($n=5$).

2.3 糖类衍生物分子式的确定

分别用标准品核糖、标准品葡萄糖以及正常对照组和糖尿病患者组的尿液与 MOPBA 反应, 分别进行 HPLC 分析(图 2). 收集 HPLC 保留时间为 6.5 min 葡萄糖吸收峰和 7.5 min 核糖吸收峰, 用傅立叶变换高分辨率质谱(FTICR-MS)对 MOPBA- 糖

衍生物进行分析. 标准品、尿核糖衍生物、尿葡萄糖衍生物收集样品的质谱分析结果见表 5. 分子质量的误差均小于 5 mu, 可以确定 HPLC 分离的标准品以及尿样品相同保留时间流出的化合物为 MOPBA- 核糖衍生物和 MOPBA- 葡萄糖衍生物.

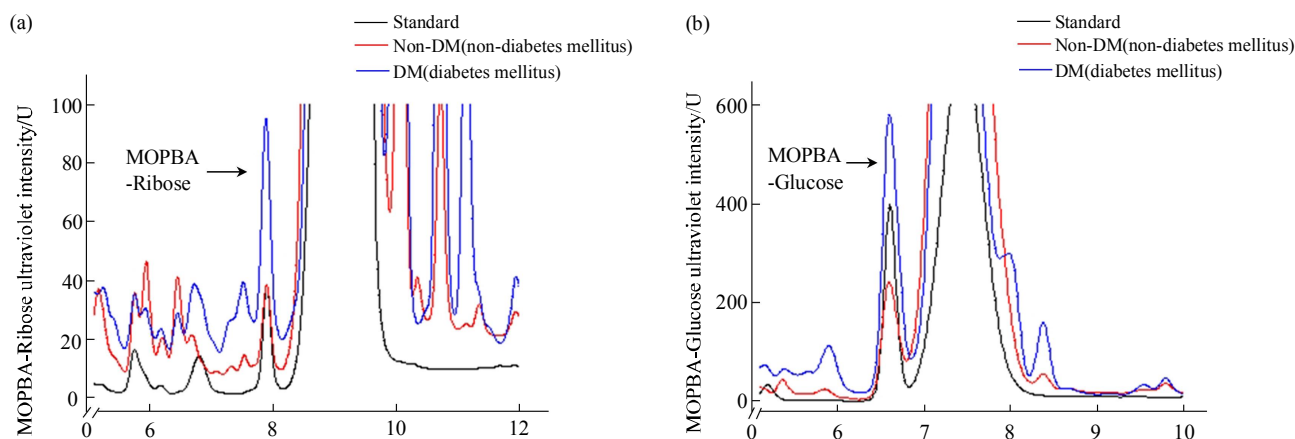


Fig. 2 Isolation of urine D-ribose and D-glucose with MOPBA through HPLC

Urine samples were reacted with MOPBA and then isolated through HPLC under the conditions indicated in Figure 1. The maximal absorbance of D-ribose (a) and D-glucose (b) in urine obtained from non-DM patients, DM patients and standard D-ribose solution as control.

Table 5 Molecular mass of MOPBA-ribose and MOPBA-glucose adduct with FTICR-MS

Sample	<i>m/z</i>	Means. <i>m/z</i>	Formula	Error/ μ ¹⁾
Ribose of standards	569.18782	569.18849	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ O ₁₀	-0.7
Glucose of standards	599.19838	599.19822	C ₂₈ H ₃₁ N ₄ O ₁₁	0.2
Uric ribose of control group	569.18782	569.18419	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ O ₁₀	3.6
Uric glucose of control group	599.19838	599.19996	C ₂₈ H ₃₁ N ₄ O ₁₁	-1.6
Uric ribose of diabetes group	569.18782	569.18557	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ O ₁₀	2.3
Uric glucose of diabetes group	599.19838	599.19887	C ₂₈ H ₃₁ N ₄ O ₁₁	-0.5

¹⁾ Error less than 5 mu were confident.

2.4 糖尿病患者尿核糖和尿葡萄糖与正常人的比较

对确诊为 2 型糖尿病患者(n=30)的尿样以及同龄对照组健康人(n=30)尿样的测定表明(表 6), 2 型糖尿病患者尿核糖浓度极显著($P < 0.001$)高于健康对照组(图 3a). 同时, 被试糖尿病患者尿葡萄糖水平也极显著($P < 0.001$)高于健康对照组(图 3b). 按照性别将被试分组后, 糖尿病患者尿核糖和尿葡萄

糖水平依然分别极显著($P < 0.001$)高于健康对照组. 但是, 男性与女性之间的尿核糖和尿葡萄糖水平未见明显差别(图 3c, 3d). 糖尿病组尿核糖, 男性: (134.28±35.09) μ mol/L, 女性: (97.33±23.68) μ mol/L; 正常组尿核糖, 男性: (35.99±5.64) μ mol/L, 女性: (33.72±6.27) μ mol/L.

Table 6 The demographic characteristics and uric sugar level of T2DM patients and control group

Control group						T2DM patients group					
Name	Gender	Age	FBG	Rib	Glc	Name	Gender	Age	FBG	Rib	Glc
Nxx	M	73	4.50	37.38	194.98	Dxx	M	65	10.00	12.92	76.57
Cxx	M	73	4.81	52.21	744.63	Hxx	M	56	15.20	144.91	2007.19
Wx	M	77	4.82	18.37	276.54	Lxx	M	50	9.02	40.51	346.76
Wxx	M	76	4.90	55.36	506.40	Wxx	M	59	7.76	29.74	225.38
Zxx	M	76	4.95	16.40	476.44	Wxx	M	64	6.68	227.17	3784.28
Qxx	M	64	5.00	43.10	620.74	Wxx	M	50	8.51	6.96	2256.12
Dxx	M	72	5.06	22.67	368.35	Zxx	M	51	9.62	19.67	309.80
Mxx	M	70	5.07	10.94	278.52	Dxx	M	64	19.68	498.21	34556.11
Jxx	M	73	5.07	30.65	232.45	Cxx	M	79	6.40	95.87	1743.03
Sxx	M	74	5.33	84.90	426.04	Sxx	M	79	7.90	40.33	16326.77
Hxx	M	58	5.40	68.16	248.26	Kxx	M	56	6.58	192.06	30247.77
Cxx	M	81	5.57	6.94	143.28	Kxx	M	62	7.43	302.98	1696.24
Cxx	M	62	6.17	38.85	248.07	Cxx	F	53	9.79	28.32	210.27
Lxx	M	78	6.42	29.74	305.26	Gxx	F	63	5.12	7.25	129.14
Lxx	M	73	6.50	24.10	203.83	Hxx	F	52	10.10	4.29	101.82
Lxx	F	59	4.69	13.05	223.87	Hx	F	67	7.82	91.58	1514.29
Mxx	F	63	4.69	88.60	676.27	Lxx	F	62	12.98	28.18	8387.59
Lxx	F	71	4.80	5.51	114.50	Lxx	F	81	10.02	141.91	22291.75
Jxx	F	67	4.84	30.23	238.50	Lxx	F	58	9.60	87.43	1323.10
Fxx	F	62	4.89	76.06	249.32	Lxx	F	61	7.42	9.27	141.28
Fx	F	72	4.90	24.40	190.46	Sxx	F	58	6.82	73.96	778.43
Sxx	F	93	4.91	23.68	128.04	Wxx	F	58	8.64	294.52	17623.54
Zxx	F	75	4.99	21.14	138.70	Yx	F	61	10.28	55.44	451.00
Zxx	F	76	5.02	38.06	190.87	Lx	F	52	6.10	50.05	396.60
Zxx	F	58	5.09	58.17	232.28	Lx	F	53	11.00	241.68	5960.42
Zxx	F	68	5.29	22.13	212.13	Zxx	F	58	13.00	26.82	18125.28
Zxx	F	70	5.45	32.47	284.31	Wx	F	53	7.74	87.40	681.44
Cxx	F	68	5.50	10.13	272.11	Lxx	F	63	7.10	340.69	1424.40
Wxx	F	77	5.59	28.39	463.18	Lxx	F	60	7.20	149.95	5309.84
Pxx	F	75	5.66	8.83	83.59	Hxx	F	55	6.90	33.14	871.47

The capital letter is the abbreviation for the last name. FBG, Rib, Glc and T2DM represent fasting blood glucose, D-ribose, D-glucose and type 2 diabetes mellitus, respectively. The fasting blood glucose concentration is in mmol/L and uric sugar concentrations are in $\mu\text{mol/L}$.

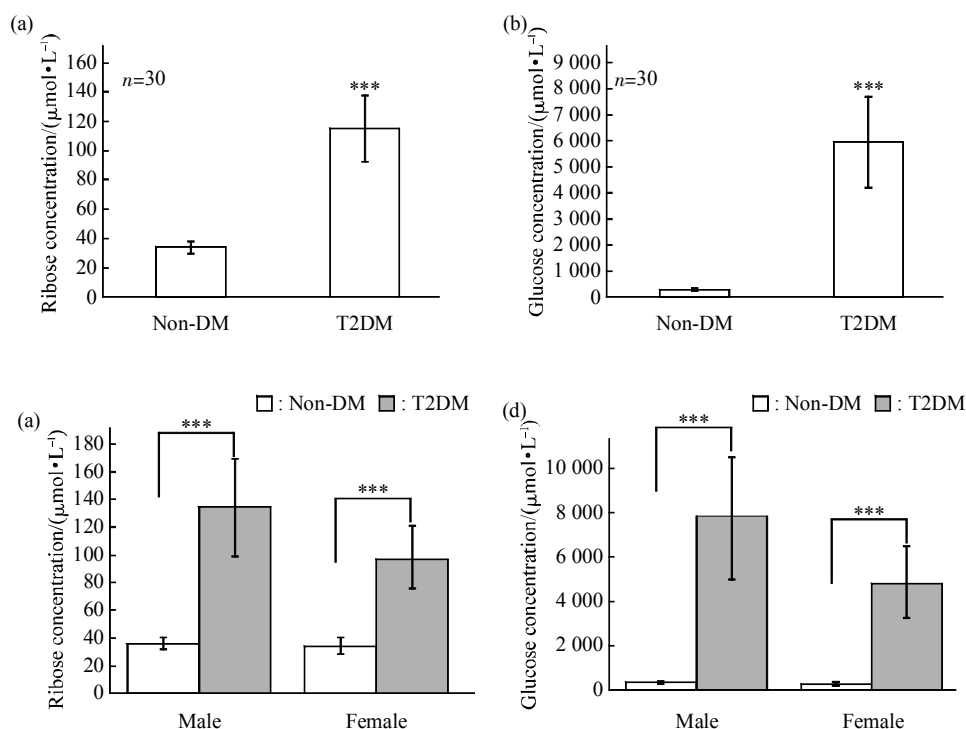


Fig. 3 Type 2 diabetics with a significant high level of uric D-ribose

Concentrations of uric D-ribose and D-glucose of Type 2 diabetic patients were determined with the MOPBA method as described in Figure 1. The concentration of uric D-ribose (a) and D-glucose (b) from diabetics is significantly ($n=30$, $*** P < 0.001$) higher than that from control group ($n=30$); and that of uric D-glucose (b) from diabetics is also significantly ($n=30$, $*** P < 0.001$) higher than that from control group ($n=30$). Furthermore, the concentrations of uric D-ribose and D-glucose from diabetics were also significantly higher after the subjects were divided into male and female, as shown in panel (c) and (d). However, no significant changes were detected between the genders. T2DM: Type 2 diabetes mellitus. Non-DM: Non-diabetes mellitus.

3 讨 论

3.1 糖尿病患者尿核糖代谢失调的可能性

采用改良 Castells' 分析法^[4], 可以通过 HPLC, 将 MOPBA-核糖与 MOPBA-葡萄糖吸收峰明显地分开, 并且核糖与葡萄糖的标准曲线的相关系数分别达到了 0.999, 回收率接近 99%, 这些数据表明, 改良 Castells' 法可以用于尿核糖的定量分析。

虽然核糖具有非常活泼的化学性质, 容易和蛋白质侧链氨基发生反应, 形成非酶促糖基化产物, 但在生理条件下, 尿中残留的蛋白质极少, 基本不影响核糖的定量分析。因此, 改良 Castells' 法用于尿核糖的测定, 其结果可靠。

3.2 体内核糖的来源

D-核糖可以从食物中来, 经肠道吸收, 随血液

被心肌细胞和骨骼肌细胞摄取, 在核糖激酶作用下, 加上 ATP 分解后产生的磷酸基团直接生成 5-磷酸核糖, 继而快速生成 ATP^[15-16]。D-核糖形成 5-磷酸核糖这一途径弥补了心肌细胞和骨骼肌细胞 ATP 补充缓慢的缺陷, 在机体经历缺氧、缺血或高强度运动时, 其作用更为突出。另一方面, 核糖也可以通过葡萄糖合成途径, 形成 5-磷酸核糖, 但其过程复杂、速度慢。然而, 2 型糖尿病患者体内核糖的异常升高, 其病理学机制目前尚不清楚, 需要进一步研究阐明。

尿核糖来自于血液, 2 型糖尿病患者尿核糖的显著升高, 说明血核糖的水平也异常升高。从本文的结果来看, 在尿核糖浓度升高时, 尿葡萄糖浓度也升高, 暗示 2 型糖尿病在葡萄糖代谢失调的同时, 也可能发生核糖代谢失调。否则, 2 型糖尿病患者的尿核糖就不会比正常对照组高 3 倍以上, 出

现极显著的差异. 这些结果显示, 糖尿病不但葡萄糖代谢失调, 而且还存在核糖代谢失调.

3.3 核糖与糖尿病并发症之间的关系

糖尿病引起的持续高血糖与长期代谢紊乱等, 可导致全身组织器官, 特别是中枢神经系统、肾、心血管等损害及其功能障碍. 严重者可引起失水, 电解质紊乱和酸碱平衡失调等急性并发症, 如酮症酸中毒和高渗昏迷. 糖尿病的危害主要来自于并发症, 因此, 核糖是否在 2 型糖尿病并发症中起的作用, 值得高度重视, 其理由是: a. 2 型糖尿病患者尿核糖显著高于正常对照, 提示其血中的核糖水平也相对较高; b. 核糖与葡萄糖一样, 广泛存在与机体内的各个组织器官^[17]; c. 核糖能够迅速导致蛋白质糖基化, 生成 AGEs, 相比之下, 葡萄糖则明显较慢^[8]; d. 相同条件下, 蛋白质核糖糖基化产物的细胞毒性远较葡萄糖的产物强^[9-10]; e. 核糖容易透过血脑屏障^[12], 引起中枢神经系统蛋白质糖基化和 AGEs 的累积^[13]. 这些结果提示, 核糖与 2 型糖尿病并发症的发生发展关系, 非常值得进一步阐明.

3.4 关于血核糖浓度

改良 Castells' 法能够准确测定尿中的核糖, 却不能够测定血清中的核糖. 其原因有三: 首先, 血液中含有许多蛋白质, 核糖具有非常活泼的醛基, 能够迅速与蛋白质上的侧链氨基反应, 形成糖基化产物. 因此, 血液的游离核糖难以准确进行微量定量分析, 其误差较大. 其次, 当血液中核糖升高时, 葡萄糖水平相应下降^[7, 18], 但是糖化血清蛋白的水平出现上升, 也就是说, 当核糖浓度在血中增加时, 非酶促糖基化的速度将显著加快. 所以, 本研究观察和比较了 2 型糖尿病患者与同龄健康人的尿核糖水平, 而尿核糖来源于血核糖. 在肾功能正常的情况下, 尿核糖浓度的增加, 间接说明了血核糖浓度的升高.

3.5 关于胰岛素抵抗

20 世纪 50 年代, Yalow 等^[19]应用放射免疫分析技术测定血浆胰岛素浓度, 发现血浆胰岛素水平较低的病人胰岛素敏感性较高, 而血浆胰岛素较高的人对胰岛素不敏感, 由此提出了胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 的概念. 胰岛素抵抗意味着机体细胞在胰岛素存在时, 对其不能做出适当的反应. 2 型糖尿病的胰岛素抵抗原因为“受体后”, 即问题出在对胰岛素做出反应的细胞本身的功能状态, 而非机体胰岛素产生的环节. 核糖不受胰岛素

的调节. 如果 2 型糖尿病患者存在核糖代谢失调, 则给予胰岛素就不能控制核糖导致的并发症的发展与恶化, 也会从另一个方面表现出“胰岛素抵抗”的症状. 也就是说, 给病人注射胰岛素, 不能够调节和纠正核糖在体内的代谢, 所以表现出了“胰岛素抵抗”. 当然, 核糖代谢失调与胰岛素抵抗之间的关系, 值得深入研究.

3.6 糖尿病患者长期口服核糖的潜在危险

尿核糖在 2 型糖尿病患者中异常升高的结果显示, 糖尿病患者口服核糖可能存在健康安全问题. 韩婵帅等^[14]在小鼠核糖实验中观察到, 尽管腹腔注射核糖可以降低小鼠血葡萄糖的浓度, 但其血清糖化蛋白却明显升高. 核糖与蛋白质反应所形成的 AGEs 可能在脑内慢性积累, 造成中枢神经系统的损伤^[13]. 也就是说, 如果给患者补充核糖, 但不利于糖尿病患者的健康, 反而增加了蛋白质的糖化, 造成进一步危害. 核糖能够降低血葡萄糖浓度, 仅仅是一种假象, 而严重的是, 核糖与蛋白质反应形成的 AGEs 及其慢性细胞毒性, 值得同行与广大糖尿病患者注意.

长期服用核糖, 可能会造成慢性积累性的细胞毒性效应. 尽管血红蛋白以及血清蛋白的半衰期分别为 120 天和 21 天, 但是, 脑神经元在发育过程中一旦形成, 不会再分裂增殖, 并与人相伴一生. 核糖能够穿过血脑屏障, 迅速与蛋白质发生反应, 形成 AGEs. 长期服用核糖, 核糖与蛋白质的反应物将在脑内慢性蓄积, 将可能造成慢性损害. 有报道表明, 老年斑 (senile plaque) 以及神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles) 都含有非酶糖基化产物^[20-21]. 因此, 对于非糖尿病人而言, 长期服用核糖应该谨慎, 而对于糖尿病患者, 长期口服核糖的潜在危险性更大.

致谢 由衷感谢中国科学院生物物理研究所王孔江博士在核糖分析方法的建立方面的鼎力支持! 感谢中国科学院生物物理研究所党委书记汪洪岩、离退休办公室主任王柳叶, 在同期对照组尿样和体检资料采样中给予的帮助! 感谢中国科学院蛋白质科学平台质谱技术组吴鹏、杨福全博士在核糖化学成分分析方面的支持!

参 考 文 献

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, *et al.* China national diabetes and metabolic disorders study group, prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med*, 2010, **362**(12): 1090-1101

- [2] Kumar, Vinay, Fausto, *et al.* Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th. Philadelphia, Pa: Saunders, 2005: 1194–1195
- [3] Vlassara H. Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1043**(1): 452–460
- [4] Melpomeni P, Jaime U, Helen V, *et al.* Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clinical Diabetes*, 2003, **21**(4): 186
- [5] Nelson D L, Lehninger M M Cox. Principle of Biochemistry. 3rd. New York: Worth Publishers, 2004, 297–324
- [6] Steinberg T, Poucher R L, Sarin R K, *et al.* Oral administration of D-Ribose in diabetes mellitus. *Diabetes*, 1970, **19**(1): 11–16
- [7] Bierman E L, Baker E M, Plough I C, *et al.* Metabolism of D-Ribose in diabetes mellitus. *Diabetes*, 1959, **8**(6): 455–458
- [8] Wei Y, Chen L, Chen J, *et al.* Rapid glycation with D-Ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SY5Y cells. *BMC Cell Biology*, 2009: **10**:10
- [9] Chen L, Wei Y, Wang X Q, *et al.* Ribosylation rapidly induces α -synuclein protein into advanced glycation end products in molten globules with high cytotoxicity. *PLoS ONE*, 2010, **5**(2): e9052
- [10] Chen L, Wei Y, Wang X Q, *et al.* D-Ribosylated Tau forms globular aggregates with high cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(15): 2559–2571
- [11] Han C H, Lu Y, Wei Y, *et al.* D-Ribose induces protein glycation and AGE formation and impairs spatial cognition. *PLoS ONE*, 2011, **6**(9): e24623
- [12] Agnew W F. Christian crone permeability of brain capillaries to hexoses and pentoses in the rabbit. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1967, **70**(20): 168–175
- [13] Wei Y, Han C H, Zhou J, *et al.* D-Ribose in glycation and protein aggregation. *Biochim Biophys Acta, General Subjects*, 2012, **1820**(4): 488–494
- [14] Castells C B, Arias V C, Castells R C. Precolumn derivatization of reducing carbohydrates with 4-(3-Methyl-5-oxo-2-pyrazolin-1-yl) Benzoic acid. study of reaction, high-performance liquid chromatographic separation and quantitative performance of method. *Chromatographia*, 2002, **56**(3/4): 153–160
- [15] Baumann P, Baumann L. Catabolism of D-fructose and D-ribose by *Pseudomonas douderoffii*. *Arch Microbiol*, 1975, **105**(3): 225–248
- [16] Segal S, Foley J. The metabolism of D-Ribose in man. *J Clin Invest*, 1958, **37**(5): 719–735
- [17] Weast, Robert C. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 62nd. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981, p.C-506
- [18] Steinberg T, Ortman P, Poucher R, *et al.* The effect of D-ribose infusion on serum immuno reactive insulin and glucose concentration. *Metabolism*, 1967, **16**(1): 40–46
- [19] Berson S A, Yalow R S. Insulin antagonists, insulin antibodies and insulin resistance. *Am J Med*, 1958, **25**(2): 155–159
- [20] Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K, *et al.* Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am J Pathol*, 1998, **153**(4): 1149–1155
- [21] Zou C L, Wang J Y, Wang S Y, *et al.* Characterizing the induction of diabetes in juvenile cynomolgus monkeys with different doses of streptozotocin. *Sci China Life Sci*, 2012, **55**(3): 210–218

The Abnormally High Level of Uric D-Ribose for Type-2 Diabetics*

SU Tao^{1,2}, XIN Liang¹, HE Ying-Ge¹, WEI Yan¹, SONG Yi-Xiang³, LI Wei-Wei³,
WANG Xue-Mei³, HE Rong-Qiao¹**

¹ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² The Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract In 1815, the French chemist Michel Eugène Chevreul (1786–1889) discovered that the sweetness in the urine of diabetics comes from grape sugar or D-glucose. Diabetes mellitus (DM) is considered as a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia (high concentration of blood D-glucose) resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. On the other hand, D-ribose as an energetic enhancer was found to decrease the concentration of blood D-glucose, and thus "Oral administration of D-ribose in diabetes mellitus" was ever described by Steinberg and colleagues (1970). As described previously in this laboratory, D-ribose rapidly glycosylates proteins, such as BSA, neuronal Tau and α -synuclein, producing advanced glycation end products (AGEs) with severe cytotoxicity, leading to dysfunction and cell death, *in vitro* and *in vivo*. Intraperitoneal injection of D-ribose into mice significantly increases their glycosylated serum protein and blood AGEs though the concentration of D-glucose became slightly decreased, suggesting that D-ribose is much easier to produce AGEs than D-glucose *in vivo*. Here, using 4-(3-Methyl-5-oxo-2-pyrazolin-1-yl) benzoic acid (MOPBA) coupled with HPLC, we determined the concentration of uric D-ribose of type 2 diabetic patients ($n=30$) and the age-matched healthy controls ($n=30$). The results show that the yield of the derivative of MOPBA-ribose is linearly correlated with the concentration of D-ribose ($r^2=0.999$) with a recovery of 99%. The isolated fractions of D-ribose and D-glucose from urine of type 2 diabetic patients through HPLC were analyzed by mass spectrometry, and the results showed that the fractions contained 569.19 u compound ($C_{27}H_{29}N_4O_{10}$, D-ribose), and 599.20 u compound ($C_{28}H_{31}N_4O_{11}$, D-glucose) respectively. The concentration of uric D-ribose of Type 2 diabetics (male (134.28 ± 35.09) $\mu\text{mol/L}$, female (97.33 ± 23.68) $\mu\text{mol/L}$) was significantly ($P < 0.001$) higher than that of the age-matched healthy control (male (35.99 ± 5.64) $\mu\text{mol/L}$, female (33.72 ± 6.27) $\mu\text{mol/L}$). Under the experimental conditions, the uric D-glucose level of the patients was also markedly ($P < 0.001$) higher than the control. Further analyses showed a marked increase in the level of uric D-ribose from either male ($P < 0.001$) or female ($P < 0.001$), but a significant difference of the uric levels between male and female could not be observed ($P > 0.05$). The high levels of uric D-ribose and D-glucose of the patients suggest that type 2 diabetic patients are not only suffered from D-glucose metabolism disorders, but also from D-ribose metabolism disorders.

Key words D-ribose, D-glucose, glycation, type 2 diabetes mellitus, complications, metabolism disorders

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00341

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2012CB911000, 2010CB912303), The National Natural Science Foundation of China (31270868, 31200601, 81100610) and Beijing Municipal Natural Science Foundation (5112024).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: rongqiaohe@163.com

Received: July 18, 2013 Accepted: August 21, 2013