

· 论        著 ·

# 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠二肽基肽酶 4 活性变化

税迎春<sup>1</sup>,夏欣一<sup>2</sup>,章  琮<sup>1</sup>,张  承<sup>1</sup>,吴元赭<sup>1</sup>

[摘要]  目的  观察四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠体内二肽基肽酶 4(DPP4)酶活性变化。方法  建立四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠模型,检测大鼠血浆及部分组织中 DPP4 酶活性变化,同时检测血浆总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、胰岛素和活性胰高血糖素样肽-1(GLP-1)水平变化。结果  四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠糖耐量和胰岛素耐量显著异常。血浆、肺、肝和回肠 DPP4 活性显著升高,其吸光度值分别由(0.10±0.01)、(0.16±0.02)、(0.15±0.01)和(0.17±0.01)升高到(0.20±0.04)、(0.18±0.03)、(0.19±0.02)和(0.19±0.02)。血浆胰岛素和活性 GLP-1 水平显著降低,分别由(1.22±0.41)ng/L 和(3.11±1.20)pmol/L 下降到(0.71±0.31)ng/L( $P<0.01$ )和(2.03±0.93)pmol/L( $P<0.05$ ),而血浆 TC 和 TG 水平显著升高,分别由(3.23±0.62)mmol/L 和(1.01±0.10)mmol/L 升高到(5.32±1.41)mmol/L( $P<0.01$ )和(1.83±0.41)mmol/L( $P<0.01$ )。结论  四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠糖耐量和胰岛素耐量显著异常,血脂升高,胰岛素降低,血浆及部分组织 DPP4 酶活性升高,从而导致血浆活性 GLP-1 水平下降。

[关键词]  四氧嘧啶;糖尿病妊娠大鼠;二肽基肽酶 4;活性 GLP-1;胰岛素

[中图分类号]  R587.1    [文献标志码]  A    doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.06.003

## Changes of DPP4 enzyme activity in alloxan-induced diabetic pregnant rat

SHUI Ying-chun<sup>1</sup>, XIA Xin-yi<sup>2</sup>, ZHANG Qiong<sup>1</sup>, ZHANG Cheng<sup>1</sup>, WU Yuan-zhe<sup>1</sup>. 1. Department of Gynaecology, 2. The People's Liberation Army Inspection Institute for Medical Research Nanjing, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract]  Objective  To study changes of DPP4 enzyme activity in alloxan induced diabetic pregnant rat. Methods  Diabetic rat were induced by alloxan, DPP4 enzyme activities of plasma and some tissues were determined. At the same time, the plasma insulin, TG, TC and active GLP-1 levels were also determined. Results  There were obvious impaired glucose tolerance and insulin tolerance in alloxan induced diabetic pregnant rat. In alloxan induced diabetic pregnant rat, DPP4 enzyme activities of the plasma, lung, liver and ileum increased from (0.10±0.01), (0.16±0.02), (0.15±0.01) and (0.17±0.01) to (0.20±0.04), (0.18±0.03), (0.19±0.02) and (0.19±0.02), respectively. At the same time, plasma insulin and active GLP-1 levels declined from (1.22±0.41) ng/L and (3.11±1.20) pmol/L to (0.71±0.31,  $P<0.01$ ) ng/L and (2.03±0.93,  $P<0.05$ ) pmol/L respectively, but plasma TC and TG increased from (3.23±0.62) mmol/L and (1.01±0.10) mmol/L to (5.32±1.41,  $P<0.01$ ) mmol/L and (1.83±0.41,  $P<0.01$ ) mmol/L respectively. Conclusion  In alloxan induced diabetic pregnant rat, glucose tolerance and insulin tolerance were abnormal significantly, accompanied with hyperlipidemia and hypoinsulinemia. DPP4 enzyme activities of the plasma and some tissues increased, then caused plasma active GLP-1 level decreased significantly. The results of the study can provide the experimental basis for the pathogenic mechanism of gestational diabetes mellitus research.

[Key words]  alloxan; diabetic pregnant rat; DPP4; active GLP-1; insulin

二肽基肽酶 4(dipeptidyl peptidase 4,DPP4)是目前糖尿病药物开发中最热门的靶点之一,目前已有多个 DPP4 抑制剂上市,用于糖尿病的治疗,效果十分显著。四氧嘧啶(alloxan,ALX)糖尿病大鼠模型是目前糖尿病研究中广泛应用的动物模型之一,对此模型的特征及其发病机制也已有许多研究报道。目前国内尚未见有关于四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠体内

DPP4 酶活性的研究报道。本研究观察四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠体内 DPP4 酶活性变化情况,以进一步了解四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠的生物学特征。

### 1 材料与方法

1.1 试剂  四氧嘧啶、甘氨酸对硝基苯胺(gly-Pro-p-nitroanilide)和 Hepes 缓冲液购自 Sigma 公司。血糖、三酰甘油(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和糖化血红蛋白(haemoglobin A1C, HbA1c)检测试剂盒购自南京建

基金项目:江苏省科技厅省级条件建设与民生科技专项基金(BM2013058)  
作者单位:210002 江苏南京,南京军区南京总医院,1.妇产科,2.全军检验医学研究所  
通讯作者:吴元赭,E-mail:Wuzhe860103@sina.com

成生物工程研究所。大鼠超敏胰岛素 ELISA 试剂盒为 ALPCO 公司产品。活性 GLP-1 (glucagon like peptide-1) ELISA 试剂盒购自 Millipore 公司。葡萄糖等其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器  $\mu$ -Quant 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司产品,3-18k 离心机为德国 Sigma 公司产品。

1.3 实验动物 SPF 级 WISTAR 大鼠,体重 250g 左右,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号为 SCXK (京)2002-0003。所有动物均饲养于 SPF 级动物房。

1.4 实验方法

1.4.1 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠模型建立 WISTAR 大鼠 28 只,禁食 (不禁水) 12 h 后,按 70 mg/kg 体重尾静脉注射四氧嘧啶,6 d 后测空腹血糖,以血糖值 14~26 mmol/L 为糖尿病大鼠。

1.4.2 口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 动物禁食 4 h 后,进行口服葡萄糖耐量试验<sup>[1]</sup>。测定空腹血糖 (0 min) 及葡萄糖 (2.0 g/kg) 负荷后 30、60 和 120 min 时的血糖值,并计算血糖曲线下面积 (AUC)。

1.4.3 胰岛素耐量试验 (insulin tolerance test, ITT) 进行 OGTT 1 周后,动物禁食 4 h,皮下注射常规胰岛素溶液 (0.4 U/kg)<sup>[1]</sup>。于注射前 (0 min) 和注射后 40、90 min 采血样,测定各时间点的血糖值,并计算血糖曲线下面积 (AUC)。

1.4.4 血浆 DPP4 活性测定 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠禁食 4 h,尾尖采血样,室温放置 30 min 后,6000×g 离心 1 min。反应底物甘氨酸对硝基苯胺工作液用 Hepes 缓冲液 (pH 7.05) 配制,浓度为 0.30 mmol/L。取 10  $\mu$ L 血浆,加入 40  $\mu$ L 底物工作液和 50  $\mu$ L Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.0)。在 37  $^{\circ}$ C 条件下,检测反应 60 min 内波长 405 nm 吸光度值的变化<sup>[2]</sup>。

1.4.5 组织 DPP4 酶活性测定 -80  $^{\circ}$ C 保存的组织样品于冰上融化。称取 0.1 g 组织,加于 500  $\mu$ L Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中剪碎,200 w,10 s/次,2 次,超声粉碎。然后于 4  $^{\circ}$ C,12 000 ×g 离心 10 min。取上清,再于 12 000 ×g 离心 20 min。获取上清用于测定。采用考马斯亮蓝法测定其蛋白浓度。选择 Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.0) 稀释上清,使各样品蛋白浓度一致。取 10  $\mu$ L 稀释上清,加入 40  $\mu$ L 底物工作液 (浓度为 0.30 mmol/L) 和 50  $\mu$ L Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.0)。在 37  $^{\circ}$ C 条件下检测反应 60 min 内 405 nm 处吸光度的变化<sup>[2]</sup>。

1.4.6 血浆 TC、TG、胰岛素和活性 GLP-1 水平测定 按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,组间差异比较采用 *t* 检验,所有数据经正态性和方差齐性检验,采用多因素方差分析方法分析,以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠 OGTT 变化 与正常对照大鼠相比,四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠空腹血糖值 (0 min) 显著升高,升高达 283.4% (*P*<0.01)。口服葡萄糖负荷后,30、60 和 120 min 血糖值也显著升高 (*P*<0.01),且 OGTT 曲线下面积 (AUC) 也显著升高 (*P*<0.01)。表明四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠糖耐量显著异常。

2.2 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠 ITT 变化 正常大鼠皮下注射胰岛素后,血糖下降十分显著,并且血糖恢复也比较迅速,而四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠皮下注射胰岛素后,血糖变化并不显著,提示四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠胰岛素耐量显著异常。

表 1 四氧嘧啶 (ALX) 糖尿病妊娠大鼠 OGTT 结果

| 组别    | <i>n</i> | OGTT 血糖值 (mmol/L) |              |              |              | AUC (mmol · h/L) |
|-------|----------|-------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
|       |          | 0 min             | 30 min       | 60 min       | 120 min      |                  |
| 对照组   | 12       | 5.01±0.80         | 8.50±1.21    | 6.52±1.09    | 5.53±0.91    | 25.59±2.61       |
| ALX 组 | 12       | 19.21±3.38 *      | 38.39±5.23 * | 27.74±4.71 * | 25.85±4.83 * | 57.73±9.21 *     |

注:与对照组比较,\**P*<0.01

表 2 四氧嘧啶 (ALX) 糖尿病妊娠大鼠 ITT 结果

| 组别    | <i>n</i> | ITT 血糖值 (mmol/L) |               |               | AUC (mmol · h/L) |
|-------|----------|------------------|---------------|---------------|------------------|
|       |          | 0 min            | 40 min        | 90 min        |                  |
| 对照组   | 12       | 4.81±0.72        | 2.89±0.90     | 4.01±1.09     | 5.42±1.12        |
| ALX 组 | 12       | 23.42±4.23 **    | 19.74±4.05 ** | 21.58±3.87 ** | 31.62±5.92 **    |

注:与对照组比较,\**P*<0.01

**2.3 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠血浆及部分组织 DPP4 活性变化** 与正常大鼠相比,四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠血浆 DPP4 活性显著升高,升高达 100.0% ( $P<0.01$ ),同时四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠肺、肝和回肠组织中 DPP4 活性也显著升高,分别升高了 12.5% ( $P<0.05$ )、26.7% ( $P<0.01$ ) 和 11.7% ( $P<0.05$ )。

表 3 四氧嘧啶 (ALX) 糖尿病妊娠大鼠血浆及部分组织 DPP4 活性变化 (吸光度值)

| 组织 | 对照组       | ALX 组       |
|----|-----------|-------------|
| 血浆 | 0.10±0.01 | 0.20±0.04** |
| 心  | 0.20±0.03 | 0.19±0.04   |
| 肺  | 0.16±0.02 | 0.18±0.03*  |
| 肾  | 0.22±0.02 | 0.22±0.03   |
| 脾  | 0.17±0.02 | 0.17±0.02   |
| 肝  | 0.15±0.01 | 0.19±0.02** |
| 回肠 | 0.17±0.01 | 0.19±0.02*  |
| 肌肉 | 0.15±0.02 | 0.15±0.03   |

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

**2.4 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠血浆胰岛素、活性 GLP-1、TC 和 TG 水平变化** 与正常大鼠相比,四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠血浆胰岛素和活性 GLP-1 水平显著降低,分别下降了 41.8% ( $P<0.01$ ) 和 34.7% ( $P<0.05$ ),而 TC 和 TG 水平显著升高,分别升高了 64.7% ( $P<0.01$ ) 和 81.2% ( $P<0.01$ )。但 HDL-C、LDL-C 和 HbA1c 水平无明显变化。

表 4 四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠血浆胰岛素、活性 GLP-1、TC 和 TG 水平变化

| 组别    | <i>n</i> | 胰岛素<br>(ng/L) | 活性 GLP-1<br>(pmol/L) | TC<br>(mmol/L) | TG<br>(mmol/L) |
|-------|----------|---------------|----------------------|----------------|----------------|
| 对照组   | 12       | 1.22±0.41     | 3.11±1.20            | 3.23±0.62      | 1.01±0.10      |
| ALX 组 | 12       | 0.71±0.31**   | 2.03±0.93*           | 5.32±1.41**    | 1.83±0.41**    |

注:与对照组比较\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

3 讨 论

四氧嘧啶是胰岛 β 细胞毒剂,通过产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等超氧自由基,选择性不可逆地破坏胰岛 β 细胞,作用迅速而强烈,使胰岛分泌功能丧失,造成内分泌功能紊乱,糖、脂肪、蛋白质等的代谢失调,从而导致负氮平衡,使机体消瘦而体重下降,甚至引起动物死亡<sup>[3]</sup>。由四氧嘧啶诱导的动物糖尿病模型与人类 1 型即胰岛素依赖性糖尿病类似。四氧嘧啶价格低廉,造模成功率高,死亡率低,模型稳定,因此四氧嘧啶诱导的动物糖尿病模型在抗糖尿病及降血脂药

物研发中应用十分广泛。

DPP4 是多功能的以同源二聚体形式存在的高特异性丝氨酸蛋白酶,广泛分布于肝、肾、肠、脾脏、肾上腺等组织中,存在于许多类型细胞表面,包括淋巴细胞、上皮细胞和内皮细胞等。DPP4 可以以膜结合型和可溶型 2 种形式存在,膜结合型 DPP4 被酶切后,即变为可溶型形式进入循环系统。DPP4 可以剪切 N 端的第二位为丙氨酸或脯氨酸的多肽,体内很多活性多肽,如神经肽、趋化因子、细胞因子等都是 DPP4 的底物<sup>[4]</sup>。

肠促胰岛素在糖尿病发生发展中起重要作用。GLP-1 为 20 世纪 80 年代发现的肠促胰岛素,摄食后由肠道 L 细胞分泌。GLP-1 的主要作用包括刺激胰岛素生物合成和葡萄糖诱发的胰岛素分泌,抑制胰高血糖素分泌,提高 β 细胞对血糖的反应,促进 β 细胞增殖并抑制其凋亡,延缓胃排空和减少肝糖输出等。研究表明 GLP-1 对妊娠期糖尿病患者的血糖和胰岛功能有改善作用<sup>[5-6]</sup>,但 GLP-1 极易被 DPP4 降解而失活,体内半衰期仅有 2 min 左右<sup>[7-8]</sup>。因此研究者试图直接补充或通过抑制 DPP4 活性来间接提高血液中 GLP-1 的量来治疗糖尿病<sup>[7-8]</sup>。

有关动物模型中 DPP4 活性的研究并不多。链脲菌素 (Streptozotocin, STZ) 诱导的 C57 糖尿病大鼠、高脂加 STZ 共同诱导的 Wistar 糖尿病大鼠、高脂或高果糖喂养的 F334/Jcl 大鼠的血浆 DPP4 活性均显著升高<sup>[9-11]</sup>。高脂和 STZ 联合诱导的 SD 糖尿病大鼠以及长期高脂喂养的 SD 大鼠的肠、肝脏和肾脏组织 DPP4 活性和表达均显著升高<sup>[12]</sup>。谷氨酸诱导的胰岛素抵抗大鼠的空腹血糖正常,但血清、肝脏和回肠 DPP4 酶活性及含量均显著升高。有研究表明 2 型糖尿病患者体内 DPP4 活性显著升高<sup>[13]</sup>,但是也有研究显示 2 型糖尿病患者体内 DPP4 活性是降低的<sup>[14-15]</sup>。有研究指出高血糖并不是引起 DPP4 活性升高的诱发因素,糖耐量异常和胰岛素抵抗才可能对 DPP4 酶活性升高起重要作用<sup>[16-19]</sup>。

本研究发现,和正常大鼠相比,四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠脂质代谢、糖耐量和胰岛素耐量显著异常,空腹血糖显著升高,表现出显著的 1 型糖尿病特征。四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠血浆 DPP4 活性显著升高,同时肺脏、肝脏和回肠中 DPP4 活性也显著升高。由于四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠 DPP4 活性升高,导致血浆中活性 GLP-1 降解加速,血浆中活性 GLP-1 浓度下降,进一步导致胰岛素分泌减少,血浆中胰岛素浓度下降,更进一步加重了大鼠糖尿病症

状。本研究结果提示,四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠血浆及部分组织 DPP4 活性显著升高,血浆活性 GLP-1 及胰岛素水平显著下降。该结果为探讨妊娠糖尿病的致病机制提供了试验依据。下一步我们将对四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠 DPP4 活性显著升高的可能机制进行研究与探讨,以丰富四氧嘧啶糖尿病妊娠大鼠的生物学特征。

# 【参考文献】

- [1] 刘率男,刘 泉,孙素娟,等.二甲双胍对 2 型糖尿病 KKAy 小鼠胰岛  $\beta$  细胞功能的影响及初步作用机制探讨[J].药学报,2014,49(11):1554-1562.
- [2] 程俊霖,刘江慧,胡云芳,等.DPP4 抑制剂对 2 型糖尿病的 I 期临床研究[J].东南国防医药,2014,16(6):592-596.
- [3] 徐淑云,卞如濂,陈 修.药理实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2002:1006-1007.
- [4] De MI, Korom S, Van DJ, et al. CD26, let it cut or cut it down [J]. Immunol Today, 1999, 20(8): 367-375.
- [5] 杨 露,成 玮,丁长花,等.谷氨酰胺降低 2 型糖尿病患者血糖的机制探讨[J].东南国防医药,2015,17(2):127-129.
- [6] 师俊梅.妊娠期糖尿病患者的血糖控制效果对妊娠结局的影响[J].东南国防医药,2015,17(1):40-42.
- [7] Abd A, Tahrani MK, Piya AH, et al. Saxagliptin: a new DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. Adv Ther, 2009, 26(3): 249-262.
- [8] Argyrakopoulou G, Doupis J. DPP4 inhibitors: from Sitagliptin monotherapy to the new Alogliptin-Pioglitazone combination therapy [J]. Adv Ther, 2009, 26(3): 272-280.
- [9] Kim SJ, Nian C, Doudet DJ, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with sitagliptin (MK0431) prolongs islet graft survival in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1331-1339.
- [10] Furuta Y, Horiguchi M, Sugaru E, et al. Chronic administration of

DSP-7238, a novel, potent, specific and substrate-selective DPP IV inhibitor, improves glycaemic control and beta-cell damage in diabetic mice[J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 12(5): 421-430.

- [11] Yasushi K, Takayuki K, Youichi S. et al. Increased plasma dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) activity and decreased DPP IV activity of visceral but not subcutaneous adipose tissue in impaired glucose tolerance rats induced by high-Fat or high-sucrose diet [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(3): 463-467.
- [12] Jian Y, Campitelli J, Gang H, et al. Increase in DPP-IV in the intestine, liver and kidney of the rat treated with high fat diet and streptozotocin [J]. Life Sci, 2007, 81(4): 272-279.
- [13] Mannucci E, Pala L, Ciani S, et al. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 2005, 48(6): 1168-1172.
- [14] McKillop AM, Duffy NA, Lindsay JR, et al. Decreased dipeptidyl peptidase-IV activity and glucagon-like peptide-1 (7-36) amide degradation in type 2 diabetic subjects [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 79(1): 79-85.
- [15] Meneilly GS, Demuth HU, McIntosh CS, et al. Effect of ageing and diabetes on glucose-dependent insulintropic polypeptide and dipeptidyl peptidase IV responses to oral glucose [J]. Diabet Med, 2000, 17(5): 346-350.
- [16] Stefanovic V, Antic S, Mitic-Zlatkovic M, et al. Reversal of increased lymphocyte PC-1 activity in patients with type 2 diabetes treated with metformin [J]. Diabetes Metab Res Rev, 1999, 15(6): 400-404.
- [17] Marguet D, Baggio I, Kobayashi T, et al. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26 [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(12): 6874-6879.
- [18] 李益明.DPP-4 抑制剂的独特作用机制:胰岛  $\alpha$ 、 $\beta$  细胞双调节作用[J].临床与药物,2014,11(7):21-23.
- [19] 郭 衍,王 翼,龙兆丰.口服降糖药二肽基肽酶 IV (DPP-4) 抑制剂的多器官保护作用[J].药学与临床研究,2014,22(6): 524-526.

(收稿日期:2015-08-19;修回日期:2015-08-27)

(本文编辑:齐 名; 英文编辑:王建东)