论著

文章编号:1000-5404(2011)16-1722-04

阿格列汀治疗三硝基苯磺酸诱导的溃疡性结肠炎小鼠的实验研究

靳迺诗[1],董 志[1],傅洁民[2],曾凡新[2],娄伦美[1] (400016 重庆,重庆医科大学药学院生化与分子药理实验室[1];400061 重庆,重庆医药工业研究院[2])

[摘要] **目的** 观察 DPP-4 抑制剂 Alogliptin 对三硝基苯磺酸诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠结肠的 MPO 值,血清 IL-8、TNF-α 和 GLP-2 水平的影响,并探讨 Alogliptin 对炎症性肠病(IBD)的治疗机制。**方法** 雄性 BALB/c 小鼠 48 只,分为 6 组,每组 8 只,分别为正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶治疗组(520 mg/kg),Alogliptin 高、中、低剂量组(1、0.3、0.1 mg/kg)。模型组采用三硝基苯磺酸(TNBS)对 BALB/c 小鼠进行灌肠,制作溃疡性结肠炎小鼠模型,经灌胃给予药物治疗后,观察 DPP-4 酶抑制剂 Alogliptin 对肠炎小鼠腹泻,组织形态损伤,结肠组织 MPO 酶活力,血清 IL-8、TNF-α 和 GLP-2 含量的影响。**结果** 与模型组相比,Alogliptin 高、中剂量组能够改善肠炎小鼠临床症状,减轻结肠黏膜损伤,显著降低 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的 DAI 评分($P<0.01$),并且治疗组小鼠结肠组织 MPO 酶活性、血清 IL-8 和 TNF-α 的浓度较模型组显著降低($P<0.05$);而 Alogliptin 治疗组小鼠血清 GLP-2 的含量较模型组和正常组都有显著升高($P<0.05$)。**结论** DPP-4 酶抑制剂 Alogliptin 能够有效抑制小鼠肠道炎性细胞的浸润,减轻肠黏膜的病理性损伤,对 TNBS 诱导的肠炎小鼠具有显著的治疗作用。

[关键词] Alogliptin;DPP-4 抑制剂;溃疡性结肠炎;三硝基苯磺酸

[中图法分类号] R574.62;R969;R977.15 [文献标志码] A

Therapeutic effect of alogliptin on mice with ulcerative colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid

Jin Naishi[1], Dong Zhi[1], Fu Jiemin[2], Zeng Fanxin[2], Lou Lunmei[1] ([1] Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2] Chongqing Pharmaceutical Research Institute, Chongqing, 400061, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the therapeutic mechanism of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor alogliptin on inflammatory bowel disease (IBD) by observing its effects on serum IL-8, TNF-α and GLP-2 levels as well as colonic myeloperoxidase (MPO) activity in mice with ulcerative colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). **Methods** Totally 48 male BALB/c mice were equally divided into 6 groups: a normal control group, a model group of IBD, a positive control group with sulfasalazine (520 mg/kg), and 3 therapeutic groups with high, medium and low alogliptin doses (1, 0.3 and 0.1 mg/kg, respectively). The mice in the model group were treated by rectal instillation with TNBS to establish IBD models and given drugs through intragastric administration to observe the effects of alogliptin on diarrhea, colonic mucosa lesion and colonic MPO activity, as well as serum IL-8, TNF-a and GLP-2 levels in the mice with ulcerative colitis. **Results** Compared with those of the model group, the clinical symptoms and lesion of colonic mucosa in the therapeutic groups with high and medium alogliptin doses were remarkably improved. In the two groups, the DAI score ($P<0.01$), colonic MPO activity ($P<0.05$) and serum IL-8 and TNF-α levels ($P<0.05$) decreased significantly. The serum GLP-2 level, however, increased significantly ($P<0.05$) as compared with that of the normal control group or the model group. **Conclusion** DPP-4 inhibitor alogliptin can effectively inhibit the infiltration of colonic inflammatory cells and alleviate the pathological damage of colonic mucosa, and thus has a significant therapeutic effect on mice with ulcerative colitis induced by TNBS.

[**Key words**] alogliptin; DPP-4 inhibitor; inflammatory bowel disease; trinitrobenzenesulfonic acid; ulcerative colitis

Corresponding author: Dong Zhi, Tel:86-23-68486678, E-mail:zhidong073@hotmail.com

[通信作者] 董 志,电话:(023)68486678,E-mail:zhidong073@hotmail.com

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),UC以局限于结肠的弥漫性黏膜炎症为特征,克罗恩病以斑片状、透壁性炎症为特征,并可累及消化系的任何部位。炎症性肠病在发病机制上属自身免疫疾病,临床表现为反复发作的慢性炎症性肠道疾病。近年来有研究发现,胰高血糖素样肽-2(glucagon-like peptide-2, GLP-2)具有促进肠黏膜增长,抑制炎性介质表达的作用,二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP-4)抑制剂能够通过抑制DPP-4酶而达到降低GLP-2降解失活的作用[1],这为炎症性肠病的治疗开辟新的途径。Alogliptin为日本武田公司开发的一种用于治疗2型糖尿病的DPP-4高选择性抑制剂,而对于其治疗炎症性肠病的作用还少见报道。本研究通过TNBS灌肠诱导小鼠产生溃疡性结肠炎模型,观察Alogliptin对模型小鼠MPO值,血清IL-8、TNF-α和GLP-2的影响,探讨其治疗炎症性肠病的治疗机制。

1 材料与方法

1.1 药物及其配置

Alogliptin由重庆医药工业研究院提供,通过成分鉴定和含量分析,临用时以0.5%羧甲基纤维素钠配成相应质量浓度的混悬液备用。柳氮磺吡啶(SASP,250 mg/片,上海三维制药有限公司生产,批号:200903C18)用刀片刮去包衣,呈现黄褐色,研碎后加0.5% CMC-Na配成26 g/L的混悬液备用。

1.2 实验动物和主要试剂

成年雄性清洁级BALB/c小鼠48只,体质量(25±3)g,由重庆医科大学实验动物中心提供;50 g/L 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-TNBS)购自美国Sigma公司,髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品,IL-8检测试剂盒胰高血糖素肽酶2检测试剂盒(glucagon-like peptide 2, GLP-2)购于重庆升博试剂公司,肿瘤坏死因子α(TNF-α)试剂盒购于上海亿欣生物试剂公司,低温冷冻离心机购于Thermo公司,酶标仪购于Perkin Elmer公司。

1.3 模型建立和分组

将BALB/c小鼠分成A、B、C、D、E、F组,每组8只,A、B、C组分别为Alogliptin 1、0.3、0.1 mg/kg剂量组,D组为SASP治疗阳性对照组(SASP 520 mg/kg),E组为模型对照组,F组为空白组。将BALB/c小鼠禁食不禁水16 h后,用乙醚轻度麻醉,用直径约为2 mm的导管经肛门插入结肠约4 cm,A、B、C、D、E组每只小鼠注入70 mg/kg的TNBS,F组每只小鼠注入等体积的生理盐水,将小鼠肛门捏住倒提5 min,待药物完全吸收后放入笼中继续饲养。灌肠结束后6 h,分别灌胃给予Aloglitpin、柳氮磺吡啶,连续治疗7 d后眼球取血测定血清IL-8、TNF-α和GLP-2值,处死小鼠,取结肠组织测定MPO值。

1.4 标本采集和DAI评分

每日观察和记录小鼠的体质量和大便情况,疾病活动度指数(DAI)=(体质量减轻率分数+粪便性状分数+隐血程度分数)/3,DAI评分标准[2-3]见表1;药物治疗7 d后摘眼球取血,静置30 min后,4 ℃ 3 000 r/min离心20 min。处死小鼠,取结肠组织分为2份,一份做HE染色,观察结肠损伤状况,另一份冻存于液氮中备用于MPO值检测。大便隐血检测采用联苯胺法。

表1 DAI评分标准

记分	体质量下降(%)	粪便性状	便血情况
0	无	正常	阴性
1	1~5		+
2	6~10	半稀便	+ +
3	11~15		+ + +
4	>15	稀便	+ + + +

正常大便:成形颗粒样便;半稀便:糊状或半成形不黏肛便;稀便:水样黏肛便

1.5 结肠组织MPO值,血清IL-8、TNF-α、GLP-2测定

结肠组织MPO值检测,血清IL-8、TNF-α、GLP-2检测参照检测试剂盒说明书。

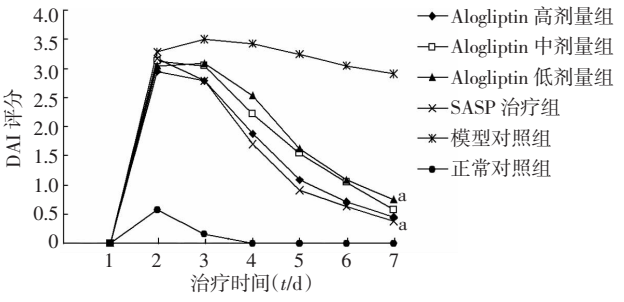
1.6 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 Alogliptin对肠炎小鼠DAI评分的影响

TNBS模型组小鼠出现体质量下降、稀便、便血、懒动、毛发散乱等,而Alogliptin治疗组和SASP治疗组小鼠稀便及便血情况明显减轻,DAI评分较模型组有显著降低($P<0.01$),而Alogliptin高剂量治疗组和柳氮磺吡啶治疗组无显著性差异($P>0.05$)。见图1。

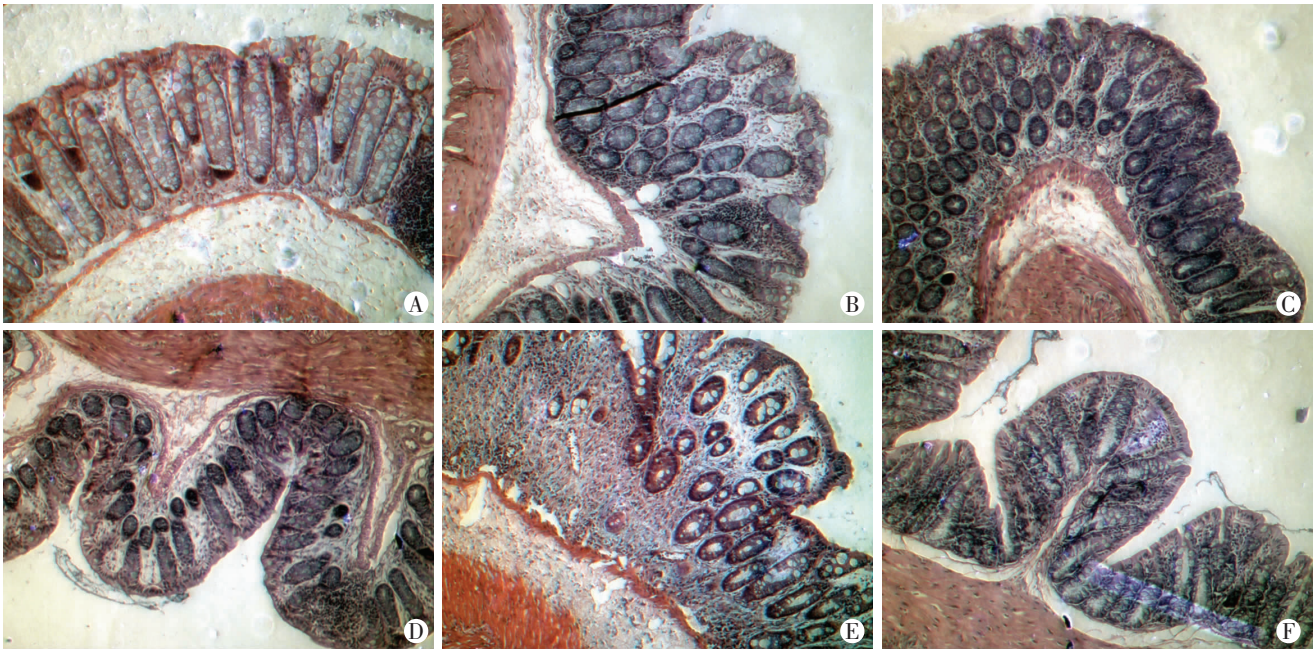


a:$P<0.01$,与模型组比较

图1 Alogliptin对肠炎小鼠疾病活动指数的影响

2.2 Alogliptin对肠炎小鼠组织病理学影响

正常组小鼠结肠黏膜上皮完整、连续,细胞与腺体排列规则,黏膜、固有层内血管和纤维间质正常,肌层无异常;模型组小鼠结肠黏膜充血水肿,大量炎性细胞浸润,肠壁增厚,腺体中杯状细胞明显减少;Alogliptin高、中、低治疗组和柳氮磺吡啶治疗组与模型组比均有不同程度的减轻,特别是Alogliptin高剂量组和SASP治疗组,除局部伴有少量炎性细胞浸润外基本接近正常组织。见图2。



A:Alogliptin 高剂量组;B:Alogliptin 中剂量组;C:Alogliptin 低剂量组;D:SASP 治疗组;E:模型组;F:正常组

图2 小鼠结肠组织病理学改变 (HE ×400)

2.3 Alogliptin 对小鼠 MPO 值,血清 IL-8、TNF-α 和 GLP-2 的影响

与正常对照组比较,TNBS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型 MPO 值、IL-8、TNF-α 的含量显著增高($P<0.01$)。与模型组比较,Alogliptin 高、中剂量组和 SASP 治疗组 MPO 值、IL-8、TNF-α 含量明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),对剂量有一定的依赖性;而 Alogliptin 高剂量治疗组血清 GLP-2 的浓度明显高于模型组小鼠($P<0.05$)。见表2。

表2 Alogliptin 对 TNBS 诱导的小鼠结肠组织 MPO 值,血清 IL-8、TNF-α 和 GLP-2 活性的影响 ($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	MPO(U/g)	IL-8(μg/L)	TNF-α(ng/L)	GLP-2(pmol/L)
正常组	0.55±0.12	0.18±0.05	36.27±3.40	1.06±0.05
模型组	2.28±0.40[a]	0.40±0.03[a]	148.75±36.87[a]	1.12±0.04[a]
SASP 治疗组	1.10±0.19[c]	0.26±0.03[c]	48.37±11.82[c]	1.05±0.05
Alogliptin 治疗组				
高剂量	1.00±0.23[c]	0.27±0.02[c]	47.79±8.82[c]	1.24±0.06[b]
中剂量	1.42±0.34[c]	0.31±0.04[c]	60.19±16.76[c]	1.18±0.03[b]
低剂量	1.77±0.32[b]	0.35±0.04[b]	72.70±17.48[c]	1.07±0.05

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与模型组比较

3 讨论

UC 以腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重为主要临床表现,病变主要累及直肠和远端结肠的黏膜层及黏膜下层,且病程迁延不愈。近年来对炎症性肠病的研究很多,虽然炎症性肠病的特异性致病因素至今尚不明确,但大量临床研究和动物实验表明,在遗传易感性的个体中,免疫系统异常是造成炎症和组织损伤的内在因素[4-5]。而目前治疗常用的3类药物:水杨酸类、类固醇激素和免疫抑制剂,只能缓解症状,且存在停药后易复发和长期用药不良反应多等缺点,因此开发治疗炎症性肠病的新药具有重要的意义。

2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)是一种半抗原物质,当乙醇灼伤结肠黏膜后与组织蛋白的赖氨酸 ε-氨基团结合,成为抗原,使 T 淋巴细胞致敏,使与半抗原结合的动物自身细胞遭到破坏,从而导致肠道炎症的发生。TNBS 代谢产生的 O_2^-、$H_2O_2^-$ 等活性氧及过氧化物的毒性物质损伤肠壁组织和上皮细胞[6],其病理表现为结肠水肿、充血,肠壁增厚,黏膜糜烂,溃疡形成。该模型动物存活率高,制作简单,是现在常用的 UC 动物模型之一。

Alogliptin 为日本武田公司近年来研发的一种用于治疗糖尿病的 DPP-4 高选择性抑制剂,其主要作用机制是抑制体内 GLP-1 的浓度,从而提高胰岛 β 细胞功能达到控制血糖的目的,具有良好的口服生物利用度,并且剂量安全范围很大,在临床的应用中几乎没有严重的不良反应[7]。但对于 Alogliptin 在治疗炎症性肠病方面的研究却很少,而且作用机制也尚不明确。Bank 等[8]的研究发现,DPP-4 抑制剂能够治疗 DSS 诱导的 BALB/c 小鼠肠炎。有研究发现,DPP-4 抑制剂能够治疗 DSS 诱导的小鼠肠炎,且小鼠体内 GLP-2 的浓度也显著升高[9],而在 DPP-4 基因敲除小鼠体内,

GLP-2的浓度较普通小鼠高,此外,在经DPP-4抑制剂治疗后,GLP-2的活性增加,处在恢复阶段的小鼠隐窝细胞增殖明显[10]。本实验研究表明,Alogliptin作为一种DPP-4高选择性抑制剂,能够显著升高肠炎小鼠体内GLP-2的水平($P<0.05$),对TNBS诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型具有良好的治疗作用,其治疗机制可能是通过抑制DPP-4酶而达到降低GLP-2降解失活,而GLP-2与大肠和小肠细胞的生长密切相关,一方面GLP-2可直接促进肠上皮细胞增殖,另一方面作用肠内神经元,肠内分泌细胞的GLP-2R,使二者产生神经递质和激素(一氧化氮、血管活性肽、5-羟色胺等)而促进肠隐窝细胞增殖;GLP-2还作用肠黏膜下的肌纤维母细胞GLP-2R,促进其生长因子IGF-1、IGF-2和KGF等的产生,改善肠上皮增殖和功能,从而减轻炎性反应。本实验研究发现,Alogliptin治疗组和模型组小鼠血清GLP-2的含量较正常对照组有显著升高($P<0.05$),而且呈剂量依赖性,而SASP治疗组与正常对照组无明显差异。该研究结果提示,Alogliptin对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用,可能是通过降低肠道内GLP-2的降解,相对增加体内GLP-2的浓度,而发挥的治疗作用,而模型组小鼠GLP-2的比例升高可能是由于其在肠道损伤后,通过某些反应来维持GLP-2的水平,以尽可能的修复肠道上皮。

MPO是评价炎症程度的指标,其活性反映了中性粒细胞的浸润数目和活性。IL-8是一种促炎细胞因子,主要由单核细胞、内皮细胞、表皮细胞以及T淋巴细胞在IL-1、TNF-α和外源性因子脂多糖的刺激下产生,许多研究发现IL-8在IBD的发病及治疗中起着十分重要的作用。TNF-α可诱导主要组织相容性复合抗原Ⅱ在结肠黏膜上皮细胞表面表达,增强基质主要金属蛋白酶活性,促进胃肠细胞组织损伤,改变肠上皮细胞形态结构和屏障特性,刺激或抑制肠上皮细胞的增殖,上调T细胞、嗜酸性和嗜碱性细胞功能[11]。本实验研究发现,Alogliptin能够降低小鼠结肠MPO值、血清IL-8、TNF-α水平,使小鼠肠炎症状减轻,并能够明显降低小鼠的DAI评分,高剂量与阳性对照药SASP的治疗作用相似。SASP为磺胺类抗菌药,是目前临床上使用较为广泛的治疗溃疡性结肠炎的药物,其疗效确切,然而在临床使用过程中不良反应较多,而且比较严重,作为DPP-4的高选择性抑制剂,Alogliptin的不良反应较柳氮磺吡啶少,在临床观察中,每日运用12.5~25 mg剂量时,仅有10.8%~15.2%的患者发生皮肤干燥,皮疹等较轻微的不良反应[12],可能为治疗溃疡性结肠炎的治疗提供新的治疗途径。

在本实验中,测定肠炎小鼠结肠组织的MPO值,血清IL-8、TNF-α、GLP-2以及DAI评分,以了解TNBS诱导的肠炎小鼠炎症的损伤程度以及Alogliptin对其的调节作用。研究结果显示:与模型组比较,Alogliptin高剂量治疗组小鼠稀便及便血情况明显减轻,DAI评分显著降低,MPO值,血清IL-8、TNF-α也显著降低,而血清内GLP-2的浓度却显著升高,这可能与Alogliptin能够抑制DPP-4酶,增加肠道内GLP-2的浓度,从而修复肠炎受损肠道有关,因此Alogliptin可能作为治疗炎症性肠病的潜在药物。

参考文献:

[1] 靳迺诗, 董志, 傅洁民, 等. DPP-4抑制剂与炎症性肠病[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(30): 3215-3219.

[2] Murthy S, Cooper H S, Yoshitake H, *et al*. Combination therapy of pentoxifylline and TNFalpha monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis[J]. Aliment Pharmacal Ther, 1999, 13(2): 251-260.

[3] Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, *et al*. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-249.

[4] Shih D Q, Targan S R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3): 390-400.

[5] Yamamoto-Furusho J K. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(42): 5594-5597.

[6] Arseneau K O, Pizarro T T, Cominelli F. Discovering the cause of inflammatory bowel disease: lessons from animal models[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2000, 16(4): 310-317.

[7] Triplitt C, Cersosimo E, DeFronzo R A. Pioglitazone and alogliptin combination therapy in type 2 diabetes: a pathophysiologically sound treatment[J]. Vasc Health Risk Manag, 2010, 6: 671-690.

[8] Bank U, Bohr U R, Reinhold D, *et al*. Inflammatory bowel diseases: multiple benefits from therapy with dipeptidyl- and alanyl-aminopeptidase inhibitors[J]. Front Biosci, 2008, 13: 3699-3713.

[9] Yazbeck R, Sulda M L, Howarth G S, *et al*. Dipeptidyl peptidase expression during experimental colitis in mice[J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(8): 1340-1351.

[10] Yazbeck R, Howarth G S, Geier M S, *et al*. Inhibiting dipeptidyl peptidase activity partially ameliorates colitis in mice[J]. Front Biosci, 2008, 13: 6850-6858.

[11] Szlosarek P W, Balkwill F R. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours[J]. Lancet Oncol, 2003, 4(9): 565-573.

[12] White J. Efficacy and safety of incretin based therapies: clinical trial data[J]. J Am Pharm Assoc (2003), 2009, 49 Suppl 1: S30-S40.

(**收稿**:2011-03-10;**修回**:2011-05-06)

(编辑 张 维)