doi:10.11659/jjssx.05E017026

·基础研究·

西格列汀对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化病变的影响

王 敏,魏芳晶,阴淑莹,于赛华,吴春立 (内蒙古医科大学附属医院心血管内科,内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘 要] **目的** 探讨二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂西格列汀对动脉粥样硬化的影响及其机制。**方法** 将30只雄性载脂蛋白E基因敲除(ApoE$^{-/-}$)小鼠随机分为对照组($n=15$)和实验组($n=15$),对照组给予高脂饮食,实验组小鼠进行高脂饮食并予以沙格列汀灌胃。16周后,眼球取血,分析血清中血脂和血糖水平,ELISA方法检测血清中一氧化氮合酶(eNOS)、血管黏附分子-1(VCAM-1)水平,并取主动脉组织进行动脉粥样硬化斑块分析。**结果** 2组小鼠空腹血糖、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)比较,差异无统计学意义($P>0.05$);实验组高密度脂蛋白(HDC-C)高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。实验组动脉粥样硬化的斑块面积(7.55±1.87)%,较对照组(11.67±1.32)%明显减小,血清VCAM-1低于对照组,eNOS高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** DPP-4抑制剂西格列汀增加HDL水平,增加血清中eNOS含量,抑制VCAM-1的表达,进而抑制ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化进展。

[关键词] 西格列汀;动脉粥样硬化;动脉粥样斑块;血脂;一氧化氮合酶;血管黏附分子-1
[中图分类号] R972+.6 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-05-16

Effect of sitagliptin on atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice

WANG Min, WEI Fang-jing, YIN Shu-ying, YU Sai-hua, WU Chun-li (Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia Hohhot 010050, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of DPP-4 inhibitor sitagliptin on atherosclerosis and its mechanism. **Methods** Thirty male ApoE$^{-/-}$ mice were randomly divided into two groups: experimental group ($n=15$) and control group ($n=15$). The mice in the experimental group were fed with high-fat mixture of sitagliptin and the control group was fed with high fat. Collected blood in the eyeballs in order to analyze serum levels of blood lipids and blood glucose after 16 weeks of feeding, and detected serum nitric oxide synthase (eNOS), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) with ELISA method. Collected aortic tissue in order to analyze atherosclerotic plaque. **Results** There was no significant difference in blood glucose, triglyceride and total cholesterol level between the two groups ($P>0.05$). The serum high density lipoprotein in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The atherosclerotic plaque in the experimental group (7.55±1.87)%, which was significantly smaller than that in the control group (11.67±1.32)%. The serum VCAM-1 in the experimental group was lower and the eNOS was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** DPP-4 sitagliptin can increase the expression of HDL and eNOS and inhibit the expression of VCAM-1, thereby inhibiting the progression of atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice.

Keywords: sitagliptin; atherosclerosis; atherosclerotic plaque; blood lipids; eNOS; VCAM-1

据国际糖尿病联盟2011年最新统计数据显示,全世界已有3.66亿人患有糖尿病,较2010年的2.85亿增加近30%,其中糖尿病前期的比例更高达15.5%[1]。糖尿病已成为严重威胁人类健康的世界性基础卫生问题。糖尿病更会使人体心、脑、周围血管疾病风险增加2~7倍,其中心血管疾病是糖尿病患者致死致残的主

[基金项目] 内蒙古医科大学青年创新基金课题(YKD2016QNCX041)
[通信作者] 魏芳晶,E-mail:weifangjing1071@163.com

感染诊断价值[J]. 齐鲁医学杂志,2015,30(6):681-685. doi:10.13362/j.qlyx.201506018.
[22] Reikeras O, Borgen P, Reseland JE, et al. Changes in serum cytokines in response to musculoskeletal surgical trauma[J]. BMC Research Notes, 2014, 7(1): 1-5. doi: 10.1186/1756-0500-7-128.
[23] 王百盛,刘欣伟,韩文锋,等. 白细胞介素-6对初次膝关节置换术后早期假体周围感染筛查作用研究[J]. 临床军医杂志,2016,44(8):812-814. doi:10.16680/j.1671-3826.2016.08.14.
[24] Heide HJLVD, Kraan PMVD, Rijnberg WJ, et al. Elevated levels of numerous cytokines in drainage fluid after primary total hip arthroplasty[J]. Int Orthop, 2010, 34(8): 1099-1102. doi: 10.1007/s00264-009-0852-8.
[25] Reikeras O, Borgen P, Reseland JE, et al. Changes in serum cytokines in response to musculoskeletal surgical trauma[J]. BMC Research Notes, 2014, 7(1): 1-5. doi: 10.1186/1756-0500-7-128.

(编辑:杨 颖)

要因素。动脉粥样硬化是2型糖尿病患者常见的心血管类并发症,而2型糖尿病也是影响动脉粥样硬化的危险因素,会促进动脉粥样硬化的发展[2]。2012年美国糖尿病学会和欧洲糖尿病研究协会声明强调需关注糖尿病患者的心血管风险,糖尿病主要的治疗核心是降低综合心血管事件风险[3]。2型糖尿病患者胰岛素含量低,β细胞功能衰退,GLP-1水平也会明显降低,因此及时补充GLOP-1能够有效降低血糖,但是人体中的GLP-1能够被DPP-4溶解并且失活,因此临床出现了DPP-4抑制剂,并以西格列汀为代表,主要用于2型糖尿病患者的治疗。DPP-4抑制剂作为新型降糖药物,除通过降低血糖降低动脉粥样硬化风险外,是否还具有潜在的心血管保护功能,目前鲜有研究,有少量研究认为其具有直接的保护心血管的作用[4],但是结论尚不确切,机制尚不明确。本课题旨在研究DPP-4抑制剂是否具有独立降糖作用外的心血管保护作用。

1 资料与方法

1.1 材料

选取8周龄 $ApoE^{-/-}$ 雄性小鼠30只作为研究对象,将小鼠按随机数字法分为2组,实验组15只,对照组15只。2组小鼠的年龄都在8周左右,实验组小鼠进行高脂混合西格列汀溶液的投食,对照组小鼠进行高脂投食。

1.2 方法

实验组小鼠进行高脂投食及西格列汀溶液灌胃,对照组小鼠进行高脂投食,高脂包括21%的脂肪和1.2%的胆固醇,西格列汀溶液50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$。每周对2组实验鼠的体质量和进食量进行记录,喂食至14周龄后禁食16 h,然后腹腔注射20%的葡萄糖溶液1 g/kg,分别于注射后0 min、15 min、30 min、60 min、120 min记录不同时间点实验鼠尾静脉的血糖情况。在喂食至16周龄后,禁食8 h。注射戊巴比妥钠5 μL/g将2组小鼠麻醉后,在眼球部取血,静置30 min,离心处理取血清冻存,然后分析血清中血脂谱水平等信息。通过ELISA方法检测血清中一氧化氮合酶(eNOS)、血管黏附分子-1(VCAM-1)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDC-C)、高密度脂蛋白(HDC-C),记录实验组对照组所得数值,分析西格列汀能否影响细胞内皮因子及血脂代谢。取血后的小鼠通过脊椎脱臼的方法处死,向小鼠的左心室注射0.9%生理盐水,用于清洗小鼠的主动脉,然后用解剖显微镜观察,用浓度为4%的福尔马林固定液进行固定,36 h后,用苏丹Ⅳ染色液进行染色,10 min后放到浓度为70%的酒精溶液中分化,过10 min用清水清洗20 min以上,观察实验鼠主动脉弓粥样斑块。

1.3 统计学方法

应用SPSS 16.0统计软件包进行统计学分析,体质量、血糖、血脂、斑块大小等计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量及血糖对比

喂养及药物干预6周后,对照组及实验组鼠体质量均有所增加,但各组体质量之间差异无统计学意义($P = 0.319$);对比2组小鼠腹腔注射20%葡萄糖(1 g/kg)后0 min、15 min、30 min、60 min和120 min这几个时间点血糖水平,实验组注射后不同时间点的血糖水平为4.2 mmol/L、6.7 mmol/L、7.9 mmol/L、10.3 mmol/L、6.8 mmol/L,对照组不同时间点血糖水平为4.8 mmol/L、6.9 mmol/L、7.6 mmol/L、10.4 mmol/L、5.9 mmol/L,2组鼠血糖水平比较差异无统计学意义($P = 0.830$),见表1。

表1 小鼠喂养6周后体质量及血糖比较($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	体质量(g)	血糖(mmol/L)
对照组	11.36±2.75	7.2±0.59
实验组	12.32±2.43	7.1±1.69
P	0.319	0.830

2.2 血脂对比

喂养8周后,2组甘油三酯(TG)比较差异无统计学意义($P = 0.346$);2组总胆固醇(TC)比较差异无统计学意义($P = 0.070$);实验组小鼠血清中的低密度脂蛋白(LDC-C)明显低于对照组,2组比较差异有统计学意义($P = 0.015$);实验组小鼠血清中高密度脂蛋白(HDC-C)明显高于对照组,2组比较差异有统计学意义($P = 0.001$),见表2。

表2 2组小鼠喂养8周后血脂比较($\bar{x} \pm s$, $n = 15$, mmol/L)

组别	TG	TC	LDC-C	HDC-C
实验组	2.03±0.65	6.74±1.45	4.27±0.84	3.01±0.33
对照组	2.27±0.72	8.29±2.93	5.02±1.87	2.37±0.42
P	0.346	0.070	0.015	0.001

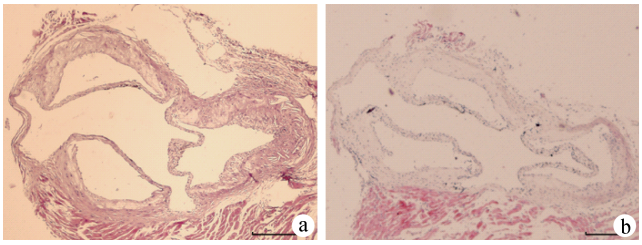
2.3 动脉粥样硬化斑块面积对比

对照组主动脉窦苏丹Ⅳ染色可见明显动脉粥样硬化斑块形成,并可见较多炎细胞浸润;实验组斑块面积较对照组明显减小,炎症反应较轻(图1)。实验组动脉粥样硬化的斑块大小为(0.142±0.016) mm^2。对照组动脉粥样硬化的斑块大小为(0.198±0.021) mm^2,实验

组动脉粥样硬化的斑块明显小于对照组,2 组比较,差异有统计学意义($P=0.001$),见图 2。

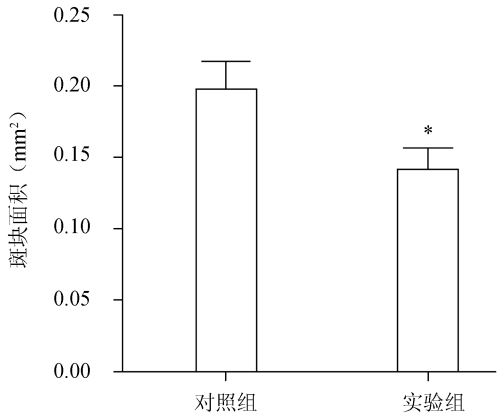
2.4 细胞因子 VCAM-1 及 eNOS 比较

实验组小鼠血清 VCAM-1 明显低于对照组,2 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);实验组 eNOS 明显高于对照组,2 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。



a:实验组;b:对照组

图 1 16 周 2 组主动脉窦苏丹 IV 染色(× 100)



*:与对照组比较,$P<0.05$

图 2 动脉粥样硬化斑块面积对比

表 4 细胞因子 VCAM-1 及 eNOS 比较($\bar{x}\pm s$,$n=15$)

组别	VCAM-1	eNOS
实验组	0.85 ±0.21	2.16 ±0.57
对照组	2.23 ±0.79	0.76 ±0.40
P	0.001	0.001

3 讨论

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)的发病机制有多种学说,目前多数学者支持“内皮损伤反应学说”,认为动脉粥样硬化的各种主要危险因素最终都损伤动脉内膜,粥样硬化病变的形成是动脉对内皮、内膜损伤做出的炎症-纤维增生性反应的结果。本实验直接观察 $ApoE^{-/-}$模型小鼠主动脉弓斑块面积,并检测西格列汀对 $ApoE^{-/-}$ 模型小鼠内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)、血管黏附分子-1(VCAM-1)表达的影响,探讨西格列汀对动脉粥样硬化发病机制的影响。

实验中所用的 $ApoE^{-/-}$模型小鼠是 AS 的经典模型,可以自发产生动脉粥样硬化,并且病理特征与人体动脉粥样硬化相似。$ApoE^{-/-}$小鼠在 5 ~ 6 周龄时,受损的血管内皮细胞出现单核细胞黏附,8 ~ 12 周龄时指纹形成,15 ~ 20 周龄开始出现纤维板块,粥样斑块等病变[5]。本实验选取 8 周龄 $ApoE^{-/-}$模型小鼠,以高脂饮食作为对照组,以高脂 + 西格列汀饮食作为实验组,实施西格列汀药物干预,探讨药物作用。在喂养 6 周后,实验组及对照组鼠体质量均有所增加,但各组体质量之间差异无统计学意义,说明西格列汀对小鼠体质量无明显影响,同时西格列汀对 AS 的影响并不依赖体质量的降低。此前也有报道西格列汀对体质量无明显影响[6]。西格列汀治疗除了不增加低血糖和体质量作用之外,还可能在心血管疾病方面存在保护作用[7-9]。高血糖已明确为动脉粥样硬化的危险因素,喂养 6 周后行腹腔糖耐量实验发现,实验组及对照组鼠血糖水平无明显变化,证明模型鼠并非糖尿病小鼠,排除血糖对模型鼠动脉粥样硬化的影响,也说明西格列汀对 $ApoE^{-/-}$模型小鼠 AS 的影响并不是在降低血糖方面。目前动脉粥样硬化已明确的诱因中,高血糖占主要地位,西格列汀作为新生一代的降糖药物,从有效平稳控制血糖方面讲,可以起到降低动脉粥样硬化的风险,本课题在排除血糖因素的干扰下,研究西格列汀是否具有降糖外的血管保护作用。在喂养 8 周达到 16 周龄时处死小鼠,实验组动脉粥样硬化的斑块明显小于对照组,直接说明西格列汀能够改善模型鼠动脉粥样硬化,机制需要进一步探讨。

本研究中,实验组小鼠血清中的低密度脂蛋白明显低于对照组,而高密度脂蛋白明显高于对照组,但 2 组甘油三酯及总胆固醇比较无明显差异。低密度脂蛋白是致 AS 的主要危险因素,近年来发现氧化 LDL 及小、密 LDL(sLDL)具有强烈的致动脉粥样硬化作用,但 DPP-4 抑制剂通过何种方式及途径降低低密度脂蛋白,增高高密度脂蛋白,尚不明确。目前此项研究并不多,分歧较大,Matsubara 等[10]的研究认为西格列汀对 AS 模型小鼠血脂无影响。Matikainen 等[11]认为维格列汀能降低 2 型糖尿病患者餐后甘油三酯水平。在一项为期 12 周的前瞻性、非盲、多中心试验中,248 例伴有血脂异常的 2 型糖尿病患者服用 50mg/d 西格列汀,结果发现总胆固醇、低密度脂蛋白、非高密度脂蛋白胆固醇明显降低[12]。

糖尿病患者心血管并发症的早期表现为内皮功能异常,同时内皮功能异常也是糖尿病患者远期心血管疾病死亡率增加的关键因素[13]。NO 是血管内皮释放的重要物质,经一氧化氮合酶途径合成,具有扩张血

管,抑制血小板黏附,抑制血管平滑肌细胞增生的作用[14-15]。本研究中实验组 eNOS 明显大于对照组,表明西格列汀可以增加小鼠血液中具有血管保护作用的 NO 含量,促进细胞内皮增生,抑制高血糖诱导的内皮细胞凋亡,从而改善内皮动能,抵抗动脉粥样硬化。VCAM-1 为细胞黏附因子,在炎性刺激时表达增加,启动免疫反应,介导淋巴细胞等与血管内皮细胞黏附,损伤血管内皮,导致血管功能障碍,诱发动脉粥样硬化[16]。实验组 VCAM-1 明显低于对照组,表明西格列汀可以减少小鼠血液中具有损伤内皮细胞的 VCAM-1 含量,抵抗动脉粥样硬化。相似性研究报道,西格列汀具有抑制血清中黏附分子、炎性因子的表达及激活磷酸化蛋白信号通路的作用,可用于预防糖尿病动脉粥样硬化的形成[17]。西格列汀显示出了与脂联素相关的抗动脉粥样硬化作用[18]。

综上所述,动脉粥样硬化就是 2 型糖尿病患者常见的心血管类并发症[19-20],本研究发现,DPP-4 抑制剂西格列汀通过增加血清中 eNOS 含量,抑制 VCAM-1 的表达,以及抑制炎性反应延缓动脉粥样硬化发展趋势,同时还能够有效降低低密度脂蛋白,增加高密度脂蛋白调节血脂异常,减少动脉粥样硬化。这也为进一步研究 DPP-4 抑制剂心血管保护作用的机制提供新的实验依据。

[参考文献]

[1] Marathe PH, Gao HX, Close KL. American diabetes association standards of medical care in diabetes 2017[J]. Diabetes, 2017, 9(4): 320 - 324. doi: 10.1111/1753 - 0407.12524.

[2] 王喜梅,杨跃进,吴永健. 二肽基肽酶 4 抑制剂心血管保护作用的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2012, 33(5): 593 - 596.

[3] Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Managemengt of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centerd approach[J]. Diabetes Care, 2012, 19(35): 1364 - 1379. doi: 10.1007/s00125 - 014 - 3460 - 0.

[4] Zhong J, Rao X, Rajagopalan S. et al. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: Potential implications in cardiovascular[J]. Atherosclerosis, 2013, 226(2): 1 - 10. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.012.

[5] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword[J]. Nat Rev Immnol, 2006, 6(7): 508 - 519. doi: 10.1038/nri1882.

[6] Erlick H, Stimmler L, Hlad CJ Jr, et al. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1964, 24: 107 - 1082. doi: 10.1210/jcem - 24 - 10 - 1076.

[7] Katsuno T, Ikeda H, Ida K, et al. Add-on therapy with the DPP-4inhibitor sitagliptin improves glycemic control in insulin-treated Japanese patients with type 2diabetes mellitus[J]. Endocr J, 2013, 60: 733 - 742.

[8] Shimoda S, Iwashita S, Ichimori S, et al. Efficacy and safety of sitagliptin as add-on therapy on glycemic control and blood glucose fluctuation in Japanese type 2 diabetes subjects ongoing with multiple daily insulin injections therapy[J]. Endocr J, 2013, 60(10): 1207 - 1214.

[9] Ervinna N, Mita T, Yasunari E, et al. Anagliptin a DPP-4 inhibitor, suppresses proliferation of vascular smooth muscles and monocyte inflammatory reaction and attenuates atherosclerosis in male apo E-deficient mice[J]. Endocrinology, 2013, 154(3): 1260 - 1270. doi: 10.1210/en.2012 - 1855.

[10] Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, et al. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, Des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-Deficient mice[J]. Am Coll Cardiol, 2012, 59(2): 65 - 76. doi: 10.1016/j.jacc.2011.07.053.

[11] Matikainen N, Manttari S, Schweizer A, et al. Vildagliptin therapy reduces posprandial intestinal triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with Type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2016, 49(9): 2049 - 2057. doi: 10.1007/s00125 - 006 - 0340 - 2.

[12] Shigematsu E, Yamakawa T, Kadonoso K, et al. Effect of sitagliptin on Lipid profile in patients with Type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Med Research, 2014, 6(5): 327 - 329. doi: 10.14740/jocmr1889w.

[13] Nagamine A, Hasegawa H, Hashimoto N, et al. The effects of DPP-4 inhibitor on hypoxia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J]. J Pharmacol Sci, 2017, 133(1): 42 - 48. doi: 10.1016/j.jphs.2016.12.003.

[14] Oyama J, Murohara T, Kitakaze M, et al. The effect of sitagliptin on carotid artery atherosclerosis in type 2 diabetes: The PROLOGUE randomized controlled trial[J]. PLoS Med, 2016, 13(6): e1002051. doi: 10.1371/journal.pmed.1002051.

[15] Hirano T, Yamashita S, Takahashi M, et al. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases macrophage infiltration and suppresses atherosclerosis in aortic and coronary arteries in cholesterol-fed rabbits[J]. Metabolism, 2016, 65(6): 893 - 903. doi: 10.1016/j.metabol.2016.03.010.

[16] Mita T, Katakami N, Yoshii H, et al. Alogliptin, a Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor, prevents the progression of carotid atherosclerosis in patients with Type 2 Diabetes: the study of preventive effects of alogliptin on diabetic atherosclerosis (SPEAD-A)[J]. Diabetes Care, 2016, 39(1): 139 - 148. doi: 10.2337/dc15 - 0781.

[17] 冯亚敏,鲁一兵,缪 珩,等. 西格列汀对二型糖尿病合并颈动脉硬化患者氧化应激指标和内皮素的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2014, 6(12): 499 - 500. doi: 10.13312/j.issn.1671 - 7783.y140184.

[18] Omoto S, Taniura T, Nishizawa T, et al. Anti-atherosclerotic effects of sitagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targrts and therapy, 2015, 27(8): 339 - 345. doi: 10.2147/DMSO.S84545. eCollection 2015.

[19] Ervinna N, Mita T, Yasunari E, et al. Anagliptin a DPP-4 inhibitor, suppresses proliferation of vascular smooth muscles and monocyte inflammatory reaction and attenuates atherosclerosis in male apoe-deficientmice[J]. Endocrinology, 2013, 154(3): 1260 - 1270. doi: 10.1210/en.2012 - 1855. Epub 2013 Jan 21.

[20] Yang CJ, Fan ZX, Yang J, et al. DPP-4 inhibitors: A potential promising therapeutic target in prevention of atherosclerosis[J]. Int J Cardiol, 2016, 202: 797 - 798. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.056.

(编辑:左艳芳)