

构建二肽基肽酶-IV 抑制剂体外筛选模型 及相关化合物抑制活性的测定

江慧贤¹, 罗超², 卢钧雄¹, 曹莹¹, 庞建新^{1*}

(1. 南方医科大学药学院抗肿瘤药理学与新药评价, 广州 510515;

2. 广州医学院第四附属医院药剂科, 广州 511400)

[摘要] **目的:**建立二肽基肽酶-IV(DPP-IV)抑制剂体外筛选模型,并测定相关化合物的抑制率。**方法:**提取 Caco-2 细胞中 DPP-IV,测定酶不同活力单位的吸光度(A),绘制活性-吸光度相关性曲线评价酶的活性与 A 的相关性;以 sitagliptin 为阳性对照测定其半抑制浓度(IC₅₀)验证本实验模型;以该模型测定 sitagliptin 衍生物及对 DPP-IV 有抑制作用化合物的抑制活性。**结果:**酶的活性在一定范围内与 A 成直线相关;以本模型测定的 sitagliptin IC₅₀为 18.354 nmol·L⁻¹;JD-1,JD-2 IC₅₀分别为 3.4, 2.6 μmol·L⁻¹,相关化合物的抑制率在 21.45%~27.77%之间。**结论:**使用本 DPP-IV 抑制剂筛选模型测定的 sitagliptin IC₅₀与文献报道的相近,证明本模型的有效性,所测化合物有一定抑制活性。

[关键词] 二肽基肽酶-IV 抑制剂模型;半抑制浓度;抑制率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0210-05

Construction of Screening Model for Dipeptidyl Peptidase IV *in vitro* and Active Inhibitory Estimation of Related Compounds

JIANG Hui-xian¹, LUO Chao², LU Jun-xiong¹, CAO Ying¹, PANG Jian-xin^{1*}

(1. Center of Anti-tumor Pharmacology and Drug Evaluation, Southern Medical University,

Guangzhou 510515, China; 2. The Fourth Affiliated Hospital of Guangzhou

Medical University, Guangzhou 511400, China)

[Abstract] **Objective:**We aimed to establish a model to select dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), and to test the inhibitory rate of the seven compounds. **Method:** DPP-IV was extracted from cultured Caco-2 cells and the values of absorbance (A) were tested in different activity units which were to evaluate the relation between the activity of DPP-IV and the value of A by the curve of activity-A. Sitagliptin as a positive control was used to evaluate the selected model. The derivatives from sitagliptin and the compounds were estimated inhibitory activity by the model. **Result:** The activity of DPP-IV was correlated to the value of A in a certain range. The IC₅₀ values of sitagliptin, JD-1 and JD-2 were 18.354 nmol·L⁻¹, 3.4 μmol·L⁻¹ and 2.6 μmol·L⁻¹, respectively; the range of inhibitory activity for the compounds was between 21.45% and 27.77%. **Conclusion:** The IC₅₀ of sitagliptin tested by this selected model is close to the value reported, which proves availability of the model. and meanwhile, the compounds estimated in this study contain inhibitory effect.

[Key words] model of dipeptidyl peptidase IV inhibitor; IC₅₀; inhibitory rate

[收稿日期] 20110923(009)

[第一作者] 江慧贤, 硕士研究生, 从事新药评价研究, Tel: 020-61648672, E-mail: jianghuixian@21cn.com

[通讯作者] *庞建新, 教授, 从事新药评价研究, Tel: 020-61648671, E-mail: pjx@fimmu.com

二肽基肽酶-IV/CD26 (DPP-IV/CD26; EC3.4.14.5)属于脯氨酰寡肽酶家族中的丝氨酸蛋白酶,当氮末端第二位为脯氨酸或者丙氨酸时, DPP-IV 可以在该部位劈开蛋白或多肽。同时, DPP-IV 也是 CD26T 细胞表面活化抗原,几乎能在人体所有器官组织中找到^[1]。目前,已报道了 DPP-IV

在内皮细胞,上皮细胞以及造血系统等不同细胞类型表面有表达^[2]。

20世纪以来,随着肠促胰岛素(incretin)概念的提出^[3]和研究的深入,该领域的研究越来越受到人们的重视;因其具有保护和促进胰岛 β 细胞增殖,促进胰岛素分泌同时抑制胰高血糖素分泌等作用而备受研究者青睐。但肠促胰岛素主要成分胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)和葡萄糖依赖性促胰岛素肽(glucose-dependent insulinotropic peptide, GIP)在体内易受DPP-IV降解而半衰期很短,无法起到生理活性作用^[4]。对DPP-IV抑制剂的研究成为糖尿病治疗研究的一个新热点,并且取得了显著的成效,以磷酸西他列汀(sitagliptin phosphate, Januvia)^[5]为代表的不同类型的小分子DPP-IV抑制剂不断涌现,成为极具前景的2型糖尿病新治疗策略。

目前,国外对DPP-IV抑制剂的研究较为深入,主要通过Caco-2细胞或动物肝肾组织细胞提取液获取DPP-IV,与特异性底物甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺(Gly-Pro-pNA)反应的方式来构建抑制剂筛选模型^[6-7]。而国内对DPP-IV抑制剂体外筛选模型的研究匮乏。本研究旨在建立一个简便,快捷,高效的DPP-IV抑制剂的体外筛选模型,并通过模型快速寻找该类抑制药物。

1 材料

1.1 细胞与受试化合物 Caco-2细胞:由南方医科大学药学院药剂学系刘中秋教授惠赠;sitagliptin(批号20090301,规格:1g,台州市盛欣医药化工有限公司);受试化合物(JD-1, JD-2, 2H-PPT, 2H-Rh1, 4H-Rh1, 2H-Rg2, 4H-Rg2)由香港浸会大学姜志宏教授惠赠。

1.2 试剂 DMEM高糖培养基,胎牛血清:购于Gibco公司;青霉素链霉素双抗溶液,胰酶-EDTA:购于吉诺生物医药技术有限公司;L-丙氨酸, L-天门冬酰胺, L-天门冬氨酸, L-谷氨酸, L-甘氨酸, L-脯氨酸, L-丝氨酸, 谷氨酰胺:购于Sigma-Aldrich公司;EDTA-2Na, Tris:购于北京鼎国生物技术公司;甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺(Gly-Pro-pNA, 批号028K1272, 规格25mg, Sigma-Aldrich公司)。

1.3 仪器 赛多利斯BS124S型电子天平(德国Sartorius), eppendorf单道微量可调移液器, eppendorf八道可调移液器(德国eppendorf公司), SW-CJ-II型净化工作台(苏州净化设备厂), 恒温CO₂培养箱(美国Thermo公司), Nikon ECLIPSE

TS100型生物倒置显微镜(日本Nikon公司), Sigma 3K30台式高速低温冷冻离心机(Sigma公司), eppendorf Centrifuge 5702型离心机(德国eppendorf公司), Benchmark Plus型酶标仪(美国BIO-RAD公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与DPP-IV提取 Caco-2细胞于含10%胎牛血清, 1%非必需氨基酸, 1%谷氨酰胺的DMEM高糖培养基, 37℃, 5% CO₂培养箱中培养, 每2d换1次液^[8]。待细胞汇合后, 再继续培养4d, 每天换液。4d后刮取、收集细胞, 反复冻融方法^[9]破碎细胞, 将收集的细胞置于液氮中15min, 取出后迅速投入37℃水浴中解冻5min, 反复3次, 10000×g, 4℃离心10min, 取上清, -20℃保存。以温度37℃, pH 8.3时, 1min内产生1μmol·L⁻¹pNA的DPP-IV的量定义为1个酶活力单位(1U)。检测每批细胞破碎液的酶活力单位, 调整酶活性为1U·L⁻¹。

2.2 pH对DPP-IV活性的影响 将细胞提取液加入96孔板中, 每孔100μL, 同时加入0.5mmol·L⁻¹的底物溶液(Gly-Pro-pNA)。100μL底物分别用pH为6, 6.5, 7.4, 8, 8.3, 8.5, 9^[10]的(50mmol·L⁻¹ Tris-HCl 1mmol·L⁻¹ EDTA)溶解, 37℃孵育30min, 每组设4个复孔, 以酶与底物溶剂反应组为空白, 405nm处测吸光度(A)。以A为纵坐标, pH为横坐标作图。

2.3 DPP-IV抑制剂体外快速筛选模型的建立与验证

2.3.1 酶活力单位与A相关性评价 DPP-IV配成1.0, 0.9, 0.7, 0.50, 0.25, 0.20, 0.10U·L⁻¹等梯度, 加入96孔板中, 每孔100μL, 同时加入0.5mmol·L⁻¹的底物Gly-Pro-pNA(50mmol·L⁻¹ Tris-HCl 1mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.3)100μL, 37℃孵育30min, 每组设4个复孔, 以酶与底物溶剂反应组为空白, 405nm处测A。以A为纵坐标, 以酶活力单位为横坐标, 绘制相关性曲线。

2.3.2 模型的建立与验证 参照文献[6]的方法, 并做改进。将不同浓度的sitagliptin溶液加入酶活力单位为1U·L⁻¹的DPP-IV溶液中, 使药物终浓度依次为1, 10, 20, 100, 500nmol·L⁻¹, 并以纯水代替sitagliptin为阴性对照, 冰浴孵育30min, 加于96孔板中, 每孔100μL; 加入100μL底物溶液, 以50mmol·L⁻¹ Tris-HCl 1mol·L⁻¹ EDTA, pH 8.3代替底物溶液为空白对照, 每组设4个复孔, 37℃孵

育 1 h 后, 405 nm 处测 A, 并根据以下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = [(A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{阴性对照组空白}}) - (A_{\text{抑制药物}} - A_{\text{抑制药物组空白}})] / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{阴性对照组空白}}) \times 100\%$$

2.4 DPP-IV 抑制剂体外快速筛选模型的应用

2.4.1 sitagliptin 衍生物 JD-1, JD-2 抑制活性测定

参照 2.3.2 方法, 在各不同浓度的 JD-1, JD-2 溶液加入 DPP-IV 溶液, 使药物终浓度依次为 2.5, 2.8, 30, 32, 35, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并以纯水代替受试药物为阴性对照, 冰浴孵育 30 min, 加于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 然后加入 100 μL 底物溶液, 以底物溶剂代替底物溶液为空白对照, 每组设 4 个复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 405 nm 处测 A, 并计算抑制率。

2.4.2 相关化合物抑制活性的筛选

基于已建立的 DPP-IV 抑制剂体外筛选模型, 对 2H-PPT, 2H-Rh1, 4H-Rh1, 2H-Rg2, 4H-Rg2 5 个预计有 DPP-IV 抑制作用的化合物进行了测定。按 2.3.2 方法操作, 使受试化合物 2H-PPT, 2H-Rh1, 4H-Rh1, 2H-Rg2, 4H-Rg2 反应终浓度分别达到 10, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并以纯水代替受试药物为阴性对照, 计算抑制率。

2.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Microsoft office (Excel) 2003 统计软件对抑制率进行回归分析。

3 结果

3.1 酶活力单位与 A 相关性评价 DPP-IV 在实验浓度范围内活性与 A 之间呈直线相关, $R^2 = 0.9992$ 。表明酶活性改变可引起 A 的改变, 两者的改变呈线性相关。见图 1。

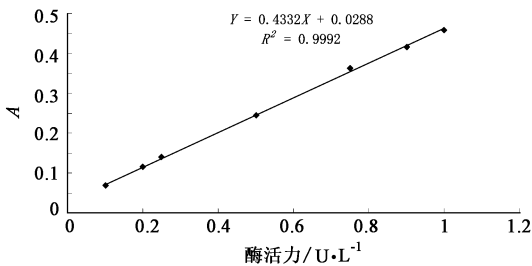


图 1 DPP-IV 活性-吸光度相关性曲线

3.2 pH 对 DPP-IV 活性的影响 DPP-IV 适宜 pH 在 8.0 附近, 低于 6.5 或高于 8.5 活性减弱^[11], 并且, 在酸性条件下 DPP-IV 基本无活性, 最适 pH 在 8.0 ~ 8.5^[12]。本实验在 pH 6 ~ 9 对 DPP-IV 活性的影响进行验证。结果显示 (图 2), pH 8.0 ~ 8.5 时, DPP-IV 活性比其他 pH 高, 且相关文献对 DPP-IV

抑制剂筛选时常用的 pH 为 8.3, 因此, 本筛选模型实验 pH 选取 8.3。

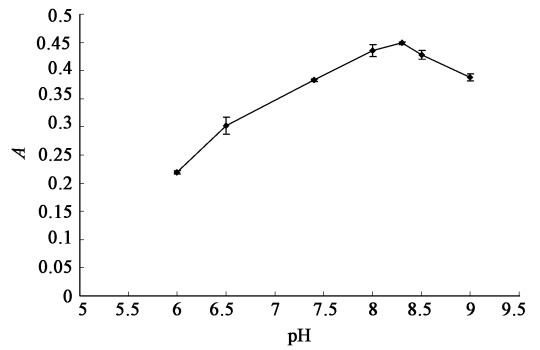


图 2 DPP-IV 活性-pH 相关性曲线

3.3 模型的验证 阴性对照及 sitagliptin 各剂量组 A 如表 1 所示, 根据 2.3.2 抑制率公式计算各组浓度下 sitagliptin 对酶活性的抑制率, 以抑制率为纵坐标, 药物浓度为横坐标, 作回归曲线, 并拟合得到回归方程, 根据回归方程计算 sitagliptin IC_{50} 值。为 18.354 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与文献^[13]报道相近。

表 1 sitagliptin 对 DPP-IV 的抑制活性

浓度/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
0	0.459 ± 0.028	-
1	0.404 ± 0.008	11.88
10	0.29 ± 0.011	36.37
20	0.216 ± 0.006	52.86
100	0.111 ± 0.003	75.82
500	0.027 ± 0.003	94.12

3.4 sitagliptin 衍生物 JD-1, JD-2 抑制活性测定 根据本模型设计的方法, 通过对 JD-1, JD-2 各剂量组抑制率的计算, 以抑制率为纵坐标, 受试化合物浓度为横坐标, 作回归曲线, 如图 3, 图 4 所示, 并拟合得到回归方程, 根据回归方程计算 JD-1, JD-2 IC_{50} 值, 结果如表 2 所示。

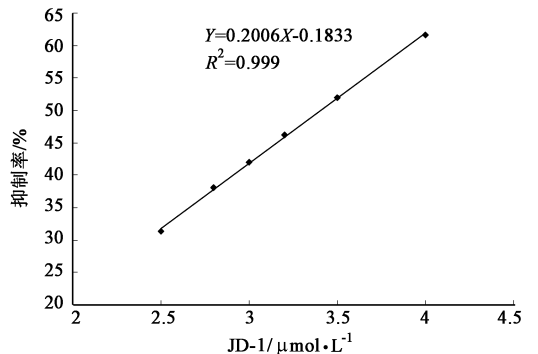


图 3 JD-1 浓度-抑制率曲线

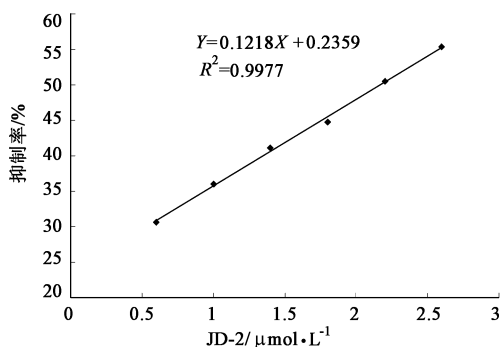


图4 JD-2 浓度-抑制率曲线

表2 sitagliptin 衍生物结构及 IC_{50}

化合物	结构	IC_{50} / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
JD-1		3.4
JD-2		2.6

3.5 相关化合物对 DPP-IV 酶的抑制活性 根据本模型设计的方法,通过对各化合物不同剂量组抑制率的计算,得到 2H-PPT, 2H-Rh1, 4H-Rh1, 2H-Rg2, 4H-Rg2 各组对 DPP-IV 抑制活性,结果如表 3 所示。

4 讨论

肠促胰岛素是由肠道细胞分泌的一类多肽,具有葡萄糖依赖的促进胰岛素分泌,同时抑制胰高血糖素分泌,保护和促进胰岛 β 细胞增生的作用,此外还能抑制消化液分泌,减缓消化道排空,影响中枢,增加饱腹感。其中以胰高血糖素样肽-1 (GLP-1), 葡萄糖依赖性促胰岛素肽 (GIP) 为最主要。但肠促胰岛素在体内半衰期极短,只有 2~7 min,在体内主要被 DPP-IV 分解破坏^[14-16]。随着研究的深入,现已成功开发了长效肠促胰岛素类似物艾塞那肽、利拉鲁肽。目前,DPP-IV 抑制剂的研究也已经引起世界各大制药公司的关注,不同类型的小分子 DPP-IV 抑制剂不断涌现。最具有代表性的是已上市的默克公司的 Januvia (磷酸西他列汀, sitagliptin phosphate), 诺华公司的 Galvus (维格列汀, vildagliptin,) 和百时美施贵宝公司的 Onglyza (沙克列汀, saxagliptin,)。此外武田制药公司的 NESINA (阿洛列汀, alogliptin,) 也于 2010 年 6 月在日本上

表3 相关化合物对 DPP-IV 的抑制率

化合物	结构	药物浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率 / %
2H-PPT		100	22.85
		50	6.33
		10	2.64
2H-Rh1		100	25.54
		50	8.83
		10	4.83
4H-Rh1		100	21.45
		50	6.08
		10	4.93
2H-Rg2		100	22.50
		50	7.73
		10	3.70
4H-Rg2		100	27.77
		50	9.67
		10	4.22

市;葛兰素史克公司的地那列汀 (denagliptin) 处于 II 期临床试验阶段;恒瑞医药的瑞格列汀已获准 FDA 批准进入 I 期临床。

本研究通过从 Caco-2 细胞内液提取得到 DPP-IV, 与特异性底物甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺 (Gly-Pro-pNA) 反应, 利用酶标仪测定反应产物对硝基苯胺含量, 评价 DPP-IV 活性, 从而推导 DPP-IV 抑制

剂的抑制率。

本实验通过设置若干 pH,对反应体系最适条件摸索,成功构建了 DPP-IV 抑制剂体外筛选模型。另外,将酶进行“酶活力单位”定义后,每批次采用固定单位的酶进行筛选,能保证批次间的质量,不因每批细胞提取液中 DPP-IV 绝对含量的差异而影响加入筛选模型中活性酶的量,影响抑制剂筛选的结果。而且,笔者应用已建立的模型对一系列预计有活性的化合物进行了对 DPP-IV 抑制研究,得到相关化合物有一定的抑制率,sitagliptin 衍生物 JD-1, JD-2 有较好的抑制活性。

本模型通过细胞培养方式提取 DPP-IV,具有经济、简便等优点。同时,本模型通过多孔板、酶标仪测定并分析结果,能同时对多个样品,多个浓度进行活性筛选,且所用设备简单,筛选效率高。而一个稳定、高效的 DPP-IV 抑制剂筛选模型,将有助于该类化合物的发现。

中药治疗具有疗效稳定,副作用小,多靶点同时作用的特点,适宜糖尿病及其并发症的治疗。随着中药应用于糖尿病的实验研究和临床实践日益增多,其作用机制也逐步明确。目前中药中具有降糖作用的活性成分主要集中在苷、多糖、生物碱和黄酮 4 大类中^[17]。如中药黄芪的活性成分黄芪多糖,能改善高胰岛素血症,调节血脂^[18];菟丝子中提取的菟丝子多糖具有明显的降糖作用,能升高 STZ 致糖尿病大鼠的胰岛素水平^[19];鬼箭羽的化学成分,以香橙素为代表的黄酮类化合物有较好的降糖活性^[20]。而利用本模型可进一步探寻具有 DPP-IV 抑制活性的降糖尿病中药成分,阐明作用机制,为开发新药开辟新途径。

[参考文献]

[1] Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides[J]. Regul Pept, 1999,85(1):9.
[2] Lambeir A M, Durinx C, Scharpe' S, et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside; an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV[J]. Crit Rev Clin Lab Sci,2003,40(3):209.
[3] Unger R H, Eisentraut A M. Entero-insular axis[J]. Arch Intern Med,1969,123(3):261.
[4] Green B D, Flatt P R, Bailey C J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors; a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes [J]. Diabetes Vasc

Dis Res,2006,3(3):159.
[5] Avraham Karasik, Pablo Aschner, harvey Katzeff, et al. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials [J]. Curr Med Res Opin,2008,24(2):489.
[6] Inger Brandt, Jurgen Joossens, Xin Chen, et al. Inhibition of dipeptidyl-peptidase IV catalyzed peptide truncation by Vildagliptin ((2S)-1-[(3-hydroxyadamantan-1-yl) amino] acetyl)-pyrrolidine-2-carbonitrile) [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(1):134.
[7] I Lin Lu, Keng Chang Tsai. A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors[J]. Eur J Med Chem,2008,43(8):1603.
[8] 张美玲,王新春,黄志巧,等. 异甘草素在 Caco-2 细胞的摄取特性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):134.
[9] 杨吉成,宋礼华,周建华,等. 医用细胞工程 [M]. 2 版. 上海:上海交通大学出版社,2003:146.
[10] Young B Kim, Lisa M Kopcho, Mark S Kirby, et al. Marcinkeviciene mechanism of Gly-Pro-pNA cleavage catalyzed by dipeptidyl peptidase-IV and its inhibition by saxagliptin (BMS-477118) [J]. Arch Biochem Biophys,2006,445:9.
[11] Agnieszka Banbula, Marcin Bugno, Jason Goldstein, et al. Emerging family of proline-specific peptidases of *porphyromonas gingivalis*: Purification and characterization of serine dipeptidyl peptidase, a structural and functional homologue of mammalian prolyl dipeptidyl peptidase IV [J]. Infect Immun, 2000, 68(3):1176.
[12] Barbara Leiting, Kelly Ann D Pryor, Joseph K Wu, et al. Thornberry. Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII [J]. Biochem J,2003,371:525.
[13] Kim D, Wang L, Beconi M, et al. (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl) butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes[J]. J Med Chem,2005,48(1):141.
[14] Gautier J F, Choukem S P, Girard J. Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes [J]. Diabetes Metabolism, 2008, 34 (Suppl 2):S65.
[15] Matthew Potenza, Elliot J Rayfield M D. Targeting the incretin systems in type 2 diabetes mellitus[J]. Mount Sinai J Medicine,2009,76(3):244.