

• 基础论著 •

# DPP4/CD26 抑制剂对脂多糖致胰岛 $\beta$ 细胞炎症反应的影响

胡星云 李焱 刘珊英 刘晓丹 蒋清凌

**【摘要】** 目的 探讨 DPP4 抑制剂 Sitagliptin 对脂多糖 (LPS) 诱导胰岛  $\beta$  细胞炎症反应的影响及可能机制。方法 Sitagliptin 与 LPS 同时或分别处理 RINm 细胞一定时间, 采用 RT-PCR 法检测 IL-6 mRNA 水平, Western blot 法检测细胞内 IL-6 水平及 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白磷酸化水平。结果 RT-PCR 结果显示, LPS+Sitagliptin 组与 LPS 组相比 IL-6 mRNA 水平明显下降 ( $P<0.01$ )。Western blot 结果显示, LPS+Sitagliptin 组较 LPS 组 IL-6 蛋白水平稍有下降, 但无统计学意义 ( $P>0.05$ ); LPS+Sitagliptin 组细胞内 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白磷酸化水平较 LPS 组明显降低 ( $P<0.01$ )。结论 DPP4/CD26 抑制剂在一定程度上能够抑制 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 表达及 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白磷酸化, 其作用机制可能与 DPP4/CD26 抑制剂干扰 NF- $\kappa$ B 炎症通路有关。

**【关键词】** 脂多糖类; 炎症; DPP4/CD26 抑制剂; 胰岛  $\beta$  细胞

**Effect of DPP4/CD26 inhibitor on LPS-induced inflammation in islet  $\beta$  cells** Hu Xingyun\*, Li Yan, Liu Shanying, Liu Xiaodan, Jiang Qingling. \*Department of Endocrinology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510120, China  
Corresponding author: Li Yan, Email: liyan19642002@yahoo.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of DPP4/CD26 inhibitor on LPS-induced inflammation in islet  $\beta$  cells, and to explore the possible mechanism. **Methods** RINm cells were cultured with LPS alone or combined with sitagliptin in a time, using RT-PCR to detect the level of IL-6 mRNA, and the expression of IL-6 and the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  protein were detected by western blot. **Results** The level of IL-6 mRNA in LPS+Sitagliptin group obviously declined compared with LPS group ( $P<0.01$ ); the expression of IL-6 protein in LPS+Sitagliptin group slightly declined compared with LPS group, but with no statistical difference ( $P>0.05$ ); the phosphorylation level of I $\kappa$ B $\alpha$  protein in LPS+Sitagliptin group significantly decreased compared with LPS group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** DPP4/CD26 inhibitor can effectively inhibit the expression of IL-6 mRNA and the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  protein which were induced by LPS. The mechanism may be related to DPP4/CD26 involved in LPS-activated NF- $\kappa$ B inflammatory pathway.

**【Key words】** Lipopolysaccharides; Inflammation; DPP4/CD26 inhibitor; Islet  $\beta$  cells

近年来,随着社会经济的飞速发展,人们生活质量的提高,生活方式的改变及人口老龄化速度的加快,2型糖尿病的患病率急速上升,发病年龄也逐年年轻化。糖尿病程逐步进展可引起心脏、肾脏、视网膜、神经血管系统等多个器官系统的慢性

并发症,导致器官功能障碍或衰竭,甚至致残或致死。目前,大量研究提示糖尿病是一种自然免疫和低度炎症疾病。其中,细菌产物脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可能参与了2型糖尿病慢性炎症的激活,从而影响胰岛  $\beta$  细胞功能。近年新开发的糖尿病新药 DPP4 抑制剂通过抑制 GLP-1 降解,在控制血糖,尤其是降餐后血糖方面效果显著。而多项研究提示 DPP-4 抑制剂在控制血糖同时可能存在独立于 GLP-1 之外的抗炎作用<sup>[1-2]</sup>。这可能与 DPP4/CD26 对免疫细胞活化、炎症因子释放的免疫炎症调节作用密切相关。因此,本研究以大

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.18.022

基金项目:国家自然科学基金(81070598)

作者单位:510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院内分泌科(胡星云、李焱、刘晓丹、蒋清凌);中山大学孙逸仙纪念医院林百欣医学研究中心(刘珊英)

通讯作者:李焱, Email: liyan19642002@yahoo.com

鼠β细胞 RINm 细胞株为媒介,初步探讨 DPP4 抑制剂 Sitagliptin 对 LPS 诱导胰岛β细胞炎症反应的影响及可能机制。

### 材料与amp;方法

#### 一、细胞株及试剂

大鼠胰岛β细胞 RINm 细胞株(中山大学孙逸仙纪念医院林百欣医研中心刘珊英老师惠赠); DPP4 抑制剂 Sitagliptin (Santa Cruz 公司); LPS (Sigma 公司); 兔抗大鼠 IL-6 抗体(Abcam 公司); 兔抗大鼠 IκBα 抗体、兔抗大鼠 pIκBα 抗体 (Cell Signalling Technology 公司); 兔抗大鼠 β-tubulin 抗体 (Epitomics 公司); RNA 逆转录试剂盒、PCR 反应试剂盒 (TaKaRa 公司)。

#### 二、实验分组及细胞培养

实验分组: 对照组; LPS(5 ng/ml)组; Sitagliptin (0.1 mol/L)组; LPS(5 ng/ml)+Sitagliptin(0.1 mol/L)组。

RINm 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下生长。取对数生长期的 RINm 细胞消化、计数,按每孔 3×10<sup>6</sup> cells 铺于 6 孔板中,待细胞完全贴壁改为无血清 PRIM-1640 培养基同步化 24 h,吸弃培养基,按实验分组干预细胞 120 min 后检测 IκBα 磷酸化水平,干预细胞 24 h 后检测 IL-6 及其 mRNA 水平。

#### 三、RT-PCR

提取细胞总RNA。酶标仪检测浓度后按试剂盒说明操作逆转录合成cDNA。选用管家基因GAPDH 作为对照。建立20 μl PCR反应体系,反应条件如下: 94℃预变性4 min, 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s, IL-6共35个循环, GAPDH共24个循环,最后4℃冷却。引物序列见表1。

表1 引物序列

引物	序列
IL-6	上游引物 5'-CTGCTCTGGTCTCTCGGAGT-3'
	下游引物 5'-TGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
GAPDH	上游引物 5'-GAGACAGCCGCATCTTCTTG-3'
	下游引物 5'-TGACTGTGCCGTTGAACCTTG-3'

扩增IL-6及GAPDH后,于2%琼脂糖凝胶中电泳,而后于紫外透视仪中观察电泳条带并拍照。应用ImageJ软件分析条带光密度,以IL-6与GAPDH条带的光密度比值表示IL-6 mRNA水平。

#### 四、Western blot

提取细胞总蛋白,4℃、15 000 r/min 离心 30 min,取上清,-80℃保存备用。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每孔上样量 25 μl 进行 SDS-PAGE 电泳,220 mA 恒流冰浴电转至 PVDF 膜上,5% BSA 封闭液封闭 2 h,一抗孵育 4℃过夜 (β-tubulin 1:1 000; IL-6 1:500; pIκBα 1:1 000; IκBα 1:1 000),山羊抗兔红外荧光标记二抗(1:2 000)室温下孵育 2 h, Syngene 化学发光/荧光检测数字成像系统进行检测并拍照,应用 ImageJ 软件分析条带光密度,IL-6 蛋白的表达以其与 β-tubulin 光密度的比值表示;IκBα 磷酸化水平以 pIκBα/IκBα 表示, pIκBα 及 IκBα 光密度均以 β-tubulin 光密度校正。

#### 五、统计学分析

本实验结果均应用 SPSS 16.0 统计软件处理。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用 LSD-t 检验。实验均至少重复 3 次。以 α=0.05 为检验水准, P<0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

#### 一、IL-6 水平的变化情况

1. RT-PCR 检测 IL-6 mRNA 结果显示: LPS 组细胞内 IL-6 mRNA 表达水平高于空白对照组(对照组 0.04±0.02, LPS 组 1.30±0.41, P=0.000); Sitagliptin 组明显低于 LPS 组(Sitagliptin 组 0.04±0.02, P=0.000),与对照组相比无明显差异(P=0.990); LPS+Sitagliptin 组较对照组 IL-6 mRNA 表达水平仍升高,差异具有统计学意义(LPS+Sitagliptin 组 0.77±0.33, P=0.001),但与 LPS 组相比明显下降(P=0.006)(图1)。

2. Western blot 检测细胞内 IL-6 结果显示: LPS 组细胞内 IL-6 水平高于空白对照组(对照组 100±0, LPS 组 237.35±91.01, P=0.000); Sitagliptin 组明显低于 LPS 组(Sitagliptin 组 123.03±45.17, P=0.002),与对照组相比无明显差异(P=0.497); LPS+Sitagliptin 组与对照组相比 IL-6 水平升高(LPS+Sitagliptin 组 190.32±72.91, P=0.012),较 LPS 组稍有下降,但无统计学意义(P=0.172)(图2)。

#### 二、IκBα 蛋白磷酸化水平变化情况

Western blot 检测结果显示: LPS 组 IκBα 蛋白

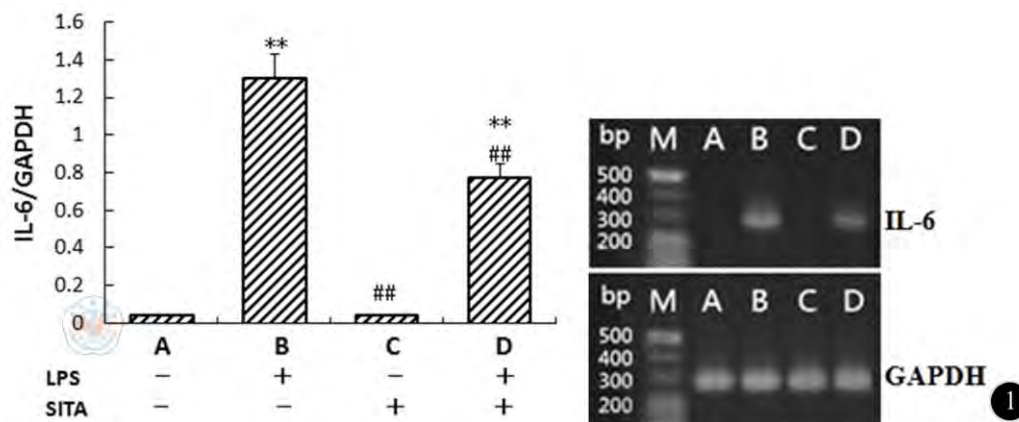


图1 Sitagliptin与LPS对细胞内IL-6 mRNA表达的影响。\* $P<0.01$  vs. control; ## $P<0.01$  vs. LPS; SITA: sitagliptin, A: 对照组, B: LPS组, C: Sitagliptin组, D: LPS+Sitagliptin组

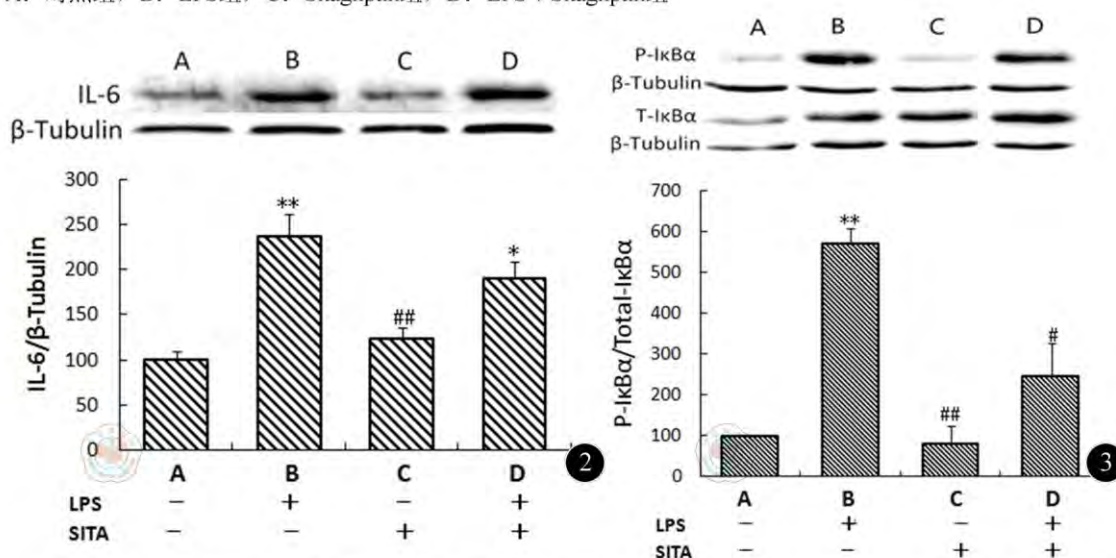


图2 Sitagliptin与LPS对细胞内IL-6水平的影响。\* $P<0.05$  vs. control; \*\* $P<0.01$  vs. control; ## $P<0.01$  vs. LPS; SITA: sitagliptin 图3 Sitagliptin与LPS对细胞内IkBa蛋白磷酸化的影响。\* $P<0.01$  vs. control; # $P<0.05$  vs. LPS; ## $P<0.01$  vs. LPS; SITA: sitagliptin

磷酸化水平明显高于空白对照组(对照组  $100 \pm 0$ , LPS组  $570.74 \pm 37.25$ ,  $P=0.005$ ); Sitagliptin组与LPS组相比明显下降(Sitagliptin组  $81.34 \pm 42.35$ ,  $P=0.004$ ), 较对照组无统计学差异( $P=0.893$ ); LPS+Sitagliptin组较LPS组IkBa蛋白磷酸化水平明显降低(LPS+Sitagliptin组  $247.88 \pm 78.30$ ,  $P=0.034$ ), 与对照组相比无统计学差异( $P=0.296$ ) (图3)。

## 讨 论

IL-6是一种广泛存在于体内的细胞因子,可以由淋巴细胞、单核/巨噬细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和心肌细胞等多类细胞产生。同时,IL-6作为一种促炎症因子,

是机体早相反应的主要物质,能够促进肝脏、血管、脂肪组织等合成和释放多种活性炎症因子。多项研究发现,在胰岛素抵抗和糖尿病人群中,血浆IL-6水平较正常人群明显升高<sup>[3-4]</sup>。而通过手术治疗肥胖和改善胰岛素抵抗之后,血浆IL-6水平可相应下降<sup>[1]</sup>。糖耐量异常的患者常常伴有轻度的高LPS血症。肠源性LPS可通过细胞表面相关受体激活TLR4信号传导通路,进而激活NF- $\kappa$ B致炎途径,启动下游IL-6等炎症因子的表达。这可能是糖尿病人群中IL-6水平升高的分子机制之一。本研究中亦证实,LPS在体外环境中可诱导大鼠胰岛 $\beta$ 细胞上调IL-6的转录及表达。国外有研究显示,在糖尿病小鼠模型中,DPP4抑制剂Alogliptin可以抑制LPS诱导IL-6在动脉粥样硬化斑块中的表达。同样,在体外培养的

U937 细胞为媒介的研究中亦得到类似的结果<sup>[2,5]</sup>。这提示 DPP4 抑制剂可能能够干扰 LPS 的致炎效应,而这一作用独立于 GLP-1 之外。在本课题对大鼠胰岛  $\beta$  细胞株的研究中发现, Sitagliptin 可以在转录水平抑制 LPS 对 IL-6 表达的上调效应。然而,在蛋白翻译水平,这一抑制作用较弱,并未表现出统计学差异。考虑这一方面可能与 IL-6 蛋白翻译过程中受到其他信号传导通路的共同调节有关,另一方面也不排除实验方法敏感性等因素造成的影响。IL-6 作为最早被列入与胰岛素抵抗相关的细胞因子之一,究竟如何是影响血糖控制至今毁誉参半<sup>[6]</sup>。IL-6 作为一种细胞炎症因子,可引起胰岛固有免疫系统的激活,且 IL-6 水平升高使肝脏等胰岛素靶器官处于应激状态,分泌大量急性反应蛋白,增加靶器官对胰岛素的敏感性。已有研究报道小剂量 IL-6 可以对抗 IL-1 $\beta$  对胰岛  $\beta$  细胞的细胞毒作用,并呈剂量依赖关系,且 IL-6 能刺激胰岛  $\beta$  细胞株 HIT-T15 细胞产生和分泌胰岛素,而高浓度的 IL-6 可使  $\beta$  细胞发生功能和形态变化<sup>[7]</sup>。胰岛  $\beta$  细胞分泌适量的 IL-6, 可以对抗其他细胞因子对胰岛  $\beta$  细胞的细胞毒作用,但另一方面如果胰岛过量的产生 IL-6, 则可激活固有免疫系统,进而发展为一个永久的自身破坏过程。由此推测,胰岛 IL-6 适量升高可能是维持胰岛  $\beta$  细胞功能的生理需要,是抵抗其他炎症因子损伤胰岛  $\beta$  细胞的一种保护机制。如果 IL-6 高过正常阈值则可协同其他炎症因子产生细胞毒作用。故维持机体 IL-6 处于适当水平是改善胰岛素抵抗的潜在有效手段,而 DPP4/CD26 在 IL-6 的表达过程中可能发挥至关重要的作用。

有研究发现, LPS 可以通过激活 NF- $\kappa$ B 致炎信号通路上调 IL-6 的表达<sup>[8]</sup>, 而 IL-6 作为一种促炎症因子又可通过细胞信号转导激活 NF- $\kappa$ B, 促进下游其他炎症介质和细胞因子转录释放, 进一步放大炎症反应<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为一种多效核转录因子, 是细胞信号传导途径中的枢纽, 在机体炎症反应发生和发展的过程中起着关键性作用。正常状态下 NF- $\kappa$ B 主要以 P50-P65 二聚体形式与其抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合存在于胞浆中处于失活状态<sup>[10]</sup>。当受到如 LPS 等炎症刺激因素时可通过刺激 IKK 活化, 诱导 I $\kappa$ B 磷酸化, 激活 NF- $\kappa$ B, 进而调控多种基因的转录与表达, 其中包括炎症反应、免疫应答、细胞增殖与凋亡等。在本研究中, 发现 DPP4 抑制剂可以下调 LPS 诱导

的磷酸化 I $\kappa$ B, 同时与炎症因子 IL-6 的表达呈同步化趋势。既往已有研究证明 CD26/DPP4 可通过诱导 caveolin-1 磷酸化, 利用 IRAK-1 依赖机制激活下游的 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[11]</sup>。由此推测, DPP4/CD26 抑制剂可能通过干扰 LPS 激活 NF- $\kappa$ B 通路而实现对胰岛  $\beta$  细胞的抗炎保护作用。

综上所述, DPP4/CD26 抑制剂在一定程度上能够抑制 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 表达及 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白磷酸化, 其作用机制可能与 DPP4/CD26 抑制剂干扰 NF- $\kappa$ B 炎症通路有关。这提示 DPP4/CD26 可能参与了 LPS 通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路介导的胰岛  $\beta$  细胞炎症反应。本研究结论为进一步开发以调节或抑制 2 型糖尿病的慢性炎症过程的治疗措施奠定前期基础, 为糖尿病的防治提供新的思路和科学依据。

#### 参 考 文 献

- [1] Ta NN, Li Y, Schuyler CA, et al. DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits TLR4-mediated ERK activation and ERK-dependent MMP-1 expression by U937 histiocytes[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(2): 429-435.
- [2] Ta NN, Schuyler CA, Li Y, et al. DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 58(2): 157-166.
- [3] Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, et al. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 166(2): 387-394.
- [4] De Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance[J]. *Febs Letters*, 2008, 582(1): 97-105.
- [5] Kopp HP, Kopp CW, Festa A, et al. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003(23): 1042-1047.
- [6] Wieser V, Moschen AR, Tilg H. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2013, 61(2): 119-125.
- [7] Buschard K, Kaen K, Horn T, et al. Interleukin 6: a functional and structural in vitro modulator of beta-cells from islets of Langerhans[J]. *Autoimmunity*, 1990, 5(3): 185-194.
- [8] Pesarini G, Amoroso A, Ferrero V, et al. Cytokines release inhibition from activated monocytes, and reduction of in-stent neointimal growth in humans[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(1): 242-248.
- [9] Tang CH, Chen CF, Chen WM, et al. IL-6 increases MMP-13 expression and motility in human chondrosarcoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 11056-11066.
- [10] Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF- $\kappa$ B: structure- function relationship of its protein subunits[J]. *Biochem J*, 1993, 290: 297-308.
- [11] Ohnuma K, Yamochi T, Uchiyama M, et al. CD26 mediates dissociation of Tollip and IRAK-1 from caveolin-1 and induces upregulation of CD86 on antigen-presenting cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(17): 7743-7757.

(收稿日期: 2014-07-08)

(本文编辑: 戚红丹)