

胰高血糖素样肽-2 和二肽基肽酶 IV 抑制剂联合使用对断奶仔猪肠上皮细胞的影响

贾刚^{#*}, 邓秋红[#], 蒋荣川, 赵华, 陈小玲, 刘光芒, 王康宁

(四川农业大学动物营养研究所, 成都 611130)

摘要: 本试验旨在研究不同浓度的胰高血糖素样肽-2 (Glucagon-like peptide 2, GLP-2) 和二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV) 抑制剂联合使用对体外原代培养的 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞增殖、代谢及相关酶活力的影响, 初步探讨提高 GLP-2 作用效果的方法。试验首先采用单因子试验设计探讨不同浓度 DPP-IV 抑制剂 (KR62436) 对断奶仔猪肠黏膜上皮细胞增殖及代谢的影响; 然后采用 2×3 因子设计, 考察添加不同浓度的 GLP-2 (1×10^{-10} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} mol·L⁻¹) 和 KR62436 (0 和 1×10^{-11} mol·L⁻¹) 对细胞增殖、代谢及凋亡的影响。结果发现, 培养液中单独添加 1×10^{-11} mol·L⁻¹ KR62436, 细胞数量、MTT OD 值、细胞沉积蛋白量、细胞总蛋白量、胞外 LDH、CK 和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活均无显著变化 ($P > 0.05$); 当 KR62436 浓度升高到 1×10^{-10} mol·L⁻¹, 细胞 MTT OD 值显著低于对照组 ($P < 0.05$), 胞外 LDH 和 CK 活力显著高于对照组 ($P < 0.05$)。培养液中同时添加 GLP-2 和低剂量的 KR62436, 随着培养液中 GLP-2 浓度的增加, 细胞数量、MTT OD 值、细胞蛋白沉积量、细胞总蛋白含量和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力显著增加 ($P < 0.05$), 胞外 LDH、CK 活力显著降低 ($P < 0.05$)。KR62436 显著提高了 GLP-2 的作用效果。结果表明, 低剂量 KR62436 对细胞生长的影响不显著, 高剂量的 KR62436 对细胞的代谢和完整性有负面效应; 但低剂量的 KR62436 能够促进 GLP-2 对细胞增殖、代谢和细胞完整性的作用效果。

关键词: 胰高血糖素样肽-2; DPP-IV 抑制剂; 肠上皮细胞; 增殖; 完整性

中图分类号: S828; S811.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)01-0099-09

Effects of the Combination of Glucagon-like Peptide-2 and Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors on Intestinal Epithelial Cells of Weaned Piglets *in vitro*

JIA Gang^{#*}, DENG Qiu-hong[#], JIANG Rong-chuan, ZHAO Hua,

CHEN Xiao-ling, LIU Guang-mang, WANG Kang-ning

(Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of the combination of Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitors with different concentrations on cell proliferation, metabolism and enzyme activity of primarily intestinal epithelial cells cultured *in vitro* from 28-day-old weaned piglets, and aimed to explore the method of promoting GLP-2 effects. The experiment, taking 28-day-old weaned piglets' intestinal epithelial cells as a model, studied the effects of DPP-IV inhibitors (KR62436) with different concentrations on the cell proliferation and metabolism. The 2×3 factorial design was adopted to study the effects of combination of GLP-2 (1×10^{-10} , 1×10^{-9} and 1×10^{-8} mol·L⁻¹) and KR62436 (0 and 1×10^{-11} mol·L⁻¹) on cell proliferation, metabolism and apoptosis. The results were as follows: there

收稿日期: 2016-06-16

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(博导类)(20125103110011); 四川省科技支撑计划(2013NZ0054)

作者简介: 贾刚(1970-), 男, 四川汉源人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事畜禽肠黏膜发育规律及营养调控研究; 邓秋红(1985-), 女, 四川德阳人, 博士生, 主要从事畜禽肠黏膜发育规律及营养调控研究, E-mail: dqh1985@163.com。二者并列为第一作者

* 通信作者: 贾刚, E-mail: jiagang700510@163.com

was no significant effect of DPP-IV with 1×10^{-11} mol · L⁻¹ on cell number, MTT OD, cell protein retention, total cell protein level, LDH activity, CK activity and Na⁺, K⁺-ATPase activity ($P > 0.05$). Compared with the control group, the DPP-IV group with 1×10^{-10} mol · L⁻¹ showed lower MTT OD value ($P < 0.05$), and higher LDH and CK activity ($P < 0.05$). In the groups that treated with different concentrations of GLP-2 and low concentrations of KR62436, with the GLP-2 doses increasing, cell number, MTT OD value, cell protein retention, total cell protein level and Na⁺, K⁺-ATPase activity increased significantly ($P < 0.05$), and LDH and CK activity decreased significantly ($P < 0.05$). KR62436 could significantly promote GLP-2 effects. The results indicate that the low concentration DPP-IV inhibitors have no significant effect on cell growth, while the high concentration DPP-IV inhibitor have a negative effect on cell metabolism and integrity. Combination of GLP-2 and low concentrations DPP-IV inhibitors may have favorable effects on intestinal epithelial cell proliferation, metabolism and integrity than GLP-2 alone.

Key words: glucagon-like peptide-2; dipeptidyl peptidase-IV inhibitors; intestinal epithelial cell; proliferation; integrity

胰高血糖素样肽-2 (Glucagon-like peptide-2, GLP-2) 是由回肠 L 细胞分泌的一种特异性肠营养因子, 具有促进肠上皮细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肠道发育和肠屏障功能的肠营养效应^[1]。在断奶仔猪上研究发现, 由于采食量和饲料性质的变化, 仔猪断奶后^[2-3]和遭受 LPS 免疫应激^[4]时内源 GLP-2 的分泌和活性出现了急剧降低, 并伴随肠道在形态和功能上的适应性变化^[5]。在体外试验, G. Jia 等^[6]在原代培养的 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞上研究发现, 外源添加 GLP-2 可以促进肠上皮细胞增殖, 并抑制肠上皮细胞的凋亡。余长松等^[7]研究发现, GLP-2 可保护 LPS 应激的仔猪空肠上皮细胞系 IPEC-J2 的细胞形态, 促进紧密连接蛋白的表达, 缓解肠上皮通透性的增加。在体内试验, Q. H. Deng 等^[2]研究发现, 外源注射 GLP-2 可以促进断奶仔猪的消化吸收功能和肠道发育, 并提高断奶仔猪的生产性能。但是, 动物体内完整的 GLP-2₁₋₃₃ 能被二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV) 降解生成无活性的 GLP-2₃₋₃₃, 且降解产物能与 GLP-2 受体 (GLP-2 receptor, GLP-2R) 竞争结合, 拮抗完整 GLP-2 生物学功能的发挥^[8-10]。因此, DPP-IV 活性的高低可能成为影响 GLP-2 生物活性发挥的重要决定因素之一。目前, 提高 GLP-2 水平的方式主要是外源添加人工合成 GLP-2 类似物来抵抗 DPP-IV 的酶解。那么, 能否通过抑制体内 DPP-IV 的活性提高内源 GLP-2 的作用效果呢? 研究发现, DPP-IV 可快速钝化参与膳食诱导胰岛素分泌降血糖的胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 和

葡萄糖依赖的胰岛素营养多肽 (Glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) 的活性, 而抑制 DPP-IV 的活性已经成为了一种治疗糖尿病的新策略^[11]。由于 GLP-2 也受到膳食调控, 并与 GLP-1 一起由回肠 L 细胞分泌^[12], 且活性也受到 DPP-IV 的调节, 那么, 抑制 DPP-IV 对 GLP-2 的生物学功能包括对肠上皮细胞的增殖和代谢有无影响, 目前尚无相关研究。

本研究拟在细胞模型上考察单独使用 DPP-IV 抑制剂 (KR62436) 以及与 GLP-2 联用对 GLP-2 调节断奶仔猪肠上皮细胞增殖、代谢及相关酶活力的影响。通过理清这些问题, 可帮助人们在临床或生产中运用 DPP-IV 治疗糖尿病或调节断奶仔猪肠道健康提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

1.1.1 试验 1 不同浓度 DPP-IV 抑制剂对体外培养的断奶仔猪肠上皮细胞的影响: 采用单因子试验设计, 培养液中 DPP-IV 抑制剂 (KR62436) 的水平分别设为 0、 1×10^{-11} 和 1×10^{-10} mol · L⁻¹, 共 3 个处理, 每个处理 4 个重复, 每个重复 1 个培养孔。

1.1.2 试验 2 不同浓度 GLP-2 与 DPP-IV 抑制剂联合使用对体外培养的断奶仔猪肠上皮细胞的影响: 采用 2 × 3 因子设计, DPP-IV 抑制剂 (KR62436) 的水平为 0、 1×10^{-11} mol · L⁻¹ (根据试验 1 结果决定), 而 GLP-2 的添加水平为 1×10^{-10} 、 1×10^{-9} 和 1×10^{-8} mol · L⁻¹, 试验共 6 个处理, 每个处理 4 个

重复,每个重复 1 个培养孔。

表 1 试验 2 设计方案

Table 1 The design proposal of test 2

组别 Group	KR62436/ (mol · L ⁻¹)	GLP-2/ (mol · L ⁻¹)	重复数 <i>n</i>
组 1 Group 1	0	1 × 10 ⁻¹⁰	4
		1 × 10 ⁻⁹	4
		1 × 10 ⁻⁸	4
组 2 Group 2	1 × 10 ⁻¹¹	1 × 10 ⁻¹⁰	4
		1 × 10 ⁻⁹	4
		1 × 10 ⁻⁸	4

1.2 试验对象

试验动物采用 28 日龄断奶的大白 × 太湖健康仔猪,体重分别为 6.85 kg(试验 1)和 6.96 kg(试验 2),屠宰后立即在无菌条件下取回肠,放入预冷的 4 °C 清洗液中,肠上皮细胞的消化分离参考 G. S. Evans 等^[13]和姜俊^[14]的方法。分离得到的肠上皮细胞用适量培养液悬浮,并吹打混合均匀。

1.3 试验材料

1.3.1 主要仪器设备 BB5060UV 型 CO₂ 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),A200 型倒置相差多功能生物显微镜(德国 Carl Zeiss Microimaging GmbH 公司),普通光学显微镜(日本 Olympus 公司),Wellscan MK III 型酶联免疫分析仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),DV-800 核酸蛋白分析仪(美国 Beckman Coulter 公司),高速冷冻离心机、微量加样器等。

1.3.2 主要试剂 胰高血糖素样肽-2(美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司,纯度 ≥ 95% (HPLC))、DPP-IV 抑制剂(美国 Sigma 公司,货号 KR62436,分子式为 C₁₄H₁₅N₇O,分子量为 297.32,纯度 ≥ 98% (HPLC))、胰岛素、胶原酶 XI 型、中性蛋白酶 I 型、四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司);山梨醇、DMEM 高糖培养液、胎牛血清、转铁蛋白(美国 Gibco 公司);Na⁺,K⁺-ATP 酶、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒,考马斯亮蓝总蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 试验方法

1.4.1 DPP-IV 抑制剂和 GLP-2 溶液的配制

DPP-IV 抑制剂的配制:用电子天平精确称量 100 μg

KR62436,加入 34 mL 超纯水,配成 1 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 的 DPP-IV 抑制剂储备液,分装后 -20 °C 储存备用,试验时取储备液倍比稀释为 1 × 10⁻¹⁰ mol · L⁻¹ 和 1 × 10⁻¹¹ mol · L⁻¹ 的 KR62436 溶液;GLP-2 溶液的配制:将 200 μg GLP-2 溶于 50 mL 超纯水中,配成 1 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ 的 GLP-2 储备液,分装后 -20 °C 储存备用,试验时按照需要分别倍比稀释为 1 × 10⁻⁸ mol · L⁻¹、1 × 10⁻⁹ mol · L⁻¹ 和 1 × 10⁻¹⁰ mol · L⁻¹ 的 GLP-2 培养液。

1.4.2 细胞接种及原代培养 将分离后已用培养液悬浮的细胞按 1 × 10⁶ 个 · mL⁻¹ 接种于已用胶原蛋白涂抹的 4 块 24 孔细胞培养板中,于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 静止培养 48 h,待细胞贴壁后,弃去原培养液,试验 1 各处理组分别加入含不同浓度 DPP-IV 抑制剂的培养液,继续培养 96 h 后,收集样品进行测定,试验 2 则在培养细胞贴壁后分别添加不同浓度的 GLP-2 和 DPP-IV 抑制剂,继续培养 96 h 后,收集样品进行测定。

1.4.3 样品收集及测定指标 细胞培养过程中,每隔 24 h,利用 A200 型倒置相差多功能生物显微镜的透射明场相差相衬法(PH)直接观察细胞形态,初步判断细胞的增殖情况;加入 DPP-IV 抑制剂和 GLP-2 培养细胞 96 h 后,各处理分别取 4 孔进行细胞计数:弃去培养液,用细胞清洗液清洗细胞 2~3 次,每孔加入 500 μL 混合酶消化液(300 U · mL⁻¹ XI 型胶原酶和 0.1 mg · mL⁻¹ I 型中性蛋白酶)消化细胞 30 min,制成细胞悬液,吹打均匀,用移液器吸取 20 μL 细胞悬液,加入血细胞计数板,在显微镜下进行细胞计数。

加入 DPP-IV 抑制剂和 GLP-2 培养细胞 96 h 后,各处理组分别取 4 孔进行 MTT 染色,并测定 540 nm 处的吸光值(MTT OD 值),其值反映活细胞的数量及细胞代谢的活跃程度;细胞原代培养结束后,收集各处理组的培养上清液和裂解液,分别测定细胞蛋白沉积量、细胞总蛋白含量,反映细胞的蛋白质代谢情况;测定培养液中的乳酸脱氢酶(LDH)及肌酸激酶(CK)活性,反映细胞形态的完整性及能量代谢状况^[15-17];测定裂解液中的 Na⁺,K⁺-ATP 酶活力,反映细胞的凋亡情况^[18]。

1.5 试验数据处理

试验 1 采用 SPSS 17.0 对试验数据进行 one-way ANOVA 方差分析,结合 Duncan 氏新复极差法对各处理组间的差异进行多重比较,以 $P < 0.05$

作为差异显著性标志,结果以“平均值±标准差”表示。试验2采用SPSS17.0统计软件的GLM模型进行二因素方差分析,检验DPP-IV、GLP-2及二者交互效应的显著性,结合Duncan氏新复极差法进行各试验组的多重比较,以 $P<0.05$ 作为差异显著性标志,试验结果以“平均数±pooled SEM”表示。

2 结果

2.1 DPP-IV抑制剂对断奶仔猪小肠上皮细胞的影响

2.1.1 DPP-IV抑制剂对断奶仔猪小肠上皮细胞增殖的影响

表2 DPP-IV抑制剂对细胞增殖的影响

Table 2 Effects of DPP-IV inhibitor on cell proliferation

项目 Item	KR62436 浓度/(mol·L ⁻¹) KR62436 concentration		
	0	1×10 ⁻¹¹	1×10 ⁻¹⁰
细胞数量/(10 ⁶ 个·mL ⁻¹) Cell number	1.54±0.099	1.59±0.078	1.61±0.071
MTT OD值 MTT OD value	0.042±0.004 ^a	0.047±0.005 ^a	0.030±0.006 ^b
细胞蛋白质沉积量/(mg·mL ⁻¹) Cell protein retention	1.011±0.262	1.052±0.178	0.911±0.104
细胞总蛋白含量/(mg·mL ⁻¹) Total cell protein level	1.212±0.116	1.234±0.091	1.107±0.049

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$)。下表同

Different letters in the same row means significant difference between the treatments ($P<0.05$), same or no letter in the same row means not significant difference between the treatments ($P>0.05$). The same as below

2.1.2 DPP-IV抑制剂对断奶仔猪小肠上皮细胞能量代谢和完整性的影响

由表3可知,当培养液中添加 1×10^{-11} mol·L⁻¹的KR62436时,Na⁺,K⁺-ATP酶活力、胞外LDH和CK活力均与对照组差异不显著($P>0.05$);然而,当培养液中添加 1×10^{-10}

由表2可知,当培养液中添加 1×10^{-11} mol·L⁻¹的KR62436时,细胞数量、MTT OD值、细胞蛋白沉积量和细胞总蛋白含量与对照组差异不显著($P>0.05$);然而,培养液中添加 1×10^{-10} mol·L⁻¹的KR62436时,尽管细胞数量、细胞蛋白沉积量和细胞总蛋白含量与对照组相比差异不显著($P>0.05$),但MTT OD值显著低于对照组($P<0.05$)。上述结果表明,低浓度DPP-IV抑制剂对细胞增殖和蛋白质代谢影响不显著,但高浓度DPP-IV抑制剂会影响细胞的蛋白质代谢。

mol·L⁻¹的KR62436时,Na⁺,K⁺-ATP酶活力出现下降的趋势($P>0.05$),并且胞外CK、LDH活力显著高于对照组($P<0.05$)。结果表明,低浓度KR62436对细胞结构造成的损害不显著,但高浓度KR62436可能引起细胞结构受损和能量代谢障碍。

表3 DPP-IV抑制剂对细胞代谢和完整性的影响

Table 3 Effects of DPP-IV inhibitor levels on cell metabolism and integrity

项目 Item	KR62436 浓度/(mol·L ⁻¹) KR62436 concentration		
	0	1×10 ⁻¹¹	1×10 ⁻¹⁰
Na ⁺ ,K ⁺ -ATP酶活力/(U·mg ⁻¹ protein) Na ⁺ , K ⁺ -ATPase activity	0.158±0.022	0.170±0.012	0.148±0.020
胞外LDH活力/(U·L ⁻¹) Extracellular LDH activity	161.475±9.722 ^a	153.176±1.487 ^a	177.375±4.812 ^b
胞外CK活力/(U·mL ⁻¹) Extracellular CK activity	1.143±0.031 ^a	1.194±0.031 ^a	1.271±0.015 ^b

2.2 GLP-2 与 DPP-IV 抑制剂联合使用对断奶仔猪小肠上皮细胞的影响

2.2.1 DPP-IV 抑制剂和 GLP-2 联合使用对断奶仔猪小肠上皮细胞增殖的影响 由表 4 可知,在 GLP-2 存在条件下, KR62436 显著提高了细胞数量、MTT OD 值、细胞蛋白沉积量和总蛋白含量

($P < 0.05$)。随着 GLP-2 添加剂量的提高,各项指标均显著增加($P < 0.05$)。除细胞数量和细胞总蛋白含量外, KR62436 与 GLP-2 在促进细胞增殖及蛋白质代谢上的交互效应显著,即 DPP-IV 抑制剂提高了 GLP-2 的作用效果($P < 0.05$)。

表 4 KR62436 和 GLP-2 对细胞增殖的影响

Table 4 Effects of combination of KR62436 and GLP-2 on cell proliferation

项目 Item	KR62436 浓度/ (mol · L ⁻¹) KR62436 concentration	GLP-2 浓度/(mol · L ⁻¹) GLP-2 concentration			Pooled SEM	P 值 P value		
		1 × 10 ⁻¹⁰	1 × 10 ⁻⁹	1 × 10 ⁻⁸		KR62436	GLP-2	KR62436 × GLP-2
细胞数量/(10 ⁶ 个 · mL ⁻¹) Cell number	0 1 × 10 ⁻¹¹	1.72 ^a 1.96 ^b	2.16 ^b 2.33 ^c	2.56 ^c 2.78 ^d	0.186 0.152	0.000	0.000	0.751
MTT OD 值 MTT OD value	0 1 × 10 ⁻¹¹	0.115 ^a 0.146 ^{ab}	0.175 ^{bc} 0.196 ^c	0.213 ^c 0.252 ^d	0.061 0.092	0.006	0.021	0.001
细胞蛋白质沉积量/(mg · mL ⁻¹) Cell protein retention	0 1 × 10 ⁻¹¹	1.298 ^a 1.555 ^{ab}	1.613 ^{bc} 2.146 ^d	1.879 ^{cd} 2.715 ^e	0.222 0.299	0.015	0.000	0.030
细胞总蛋白含量/(mg · mL ⁻¹) Total cell protein level	0 1 × 10 ⁻¹¹	1.629 ^a 1.910 ^b	2.038 ^c 2.430 ^d	2.619 ^e 2.937 ^f	0.186 0.165	0.000	0.000	0.299

2.2.2 KR62436 和 GLP-2 联合使用对断奶仔猪小肠上皮细胞代谢和完整性的影响 由表 5 可知, GLP-2 联合使用存在条件下,低剂量 DPP-IV 抑制剂显著提高了 Na⁺, K⁺-ATP 酶活($P < 0.05$),并显著降低了胞外 LDH 酶活力($P < 0.05$),对胞外 CK 酶活作用不显著($P > 0.05$);不同剂量的 GLP-2 对 Na⁺, K⁺-ATP、胞外 LDH 和 CK 酶活力作用效果显著($P < 0.05$),即:随着剂量的增加, Na⁺, K⁺-

ATP 酶活显著提高,而胞外 LDH 和 CK 酶活显著降低; KR62436 和 GLP-2 对细胞代谢酶活的交互效应显著($P < 0.05$)。KR62436 和 GLP-2 联合使用后胞外 LDH 和 CK 活性的降低,这提示细胞受到的损伤减少,细胞结构和功能的完整性加强,而 Na⁺, K⁺-ATP 活力提高,提示细胞凋亡的减少;但从 CK 活性变化分析,细胞能量代谢被 GLP-2 加强,而 KR62436 对细胞能量代谢的影响效果不明显。

表 5 KR62436 和 GLP-2 对细胞代谢和完整性的影响

Table 5 Effects of combination of KR62436 and GLP-2 on cell metabolism and integrity

项目 Item	KR62436 浓度/ (mol · L ⁻¹) KR62436 concentration	GLP-2 浓度/(mol · L ⁻¹) GLP-2 concentration			Pooled SEM	P 值 P value		
		1 × 10 ⁻¹⁰	1 × 10 ⁻⁹	1 × 10 ⁻⁸		KR62436	GLP-2	KR62436 × GLP-2
Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶活力/ (U · mg ⁻¹ protein) Na ⁺ , K ⁺ -ATPase activity	0 1 × 10 ⁻¹¹	0.231 ^a 0.391 ^b	0.517 ^b 0.748 ^c	0.845 ^c 1.391 ^d	0.122 0.169	0.000	0.000	0.005
胞外 LDH 活力/(U · L ⁻¹) Extracellular LDH activity	0 1 × 10 ⁻¹¹	163.225 ^c 128.810 ^b	130.777 ^b 119.961 ^{ab}	126.844 ^b 107.178 ^a	1.519 1.503	0.000	0.000	0.025
胞外 CK 活力/(U · mL ⁻¹) Extracellular CK activity	0 1 × 10 ⁻¹¹	0.295 ^b 0.270 ^b	0.193 ^a 0.206 ^a	0.174 ^a 0.167 ^a	0.081 0.117	0.922	0.000	0.000

3 讨论

3.1 DPP-IV 抑制剂 (KR62436) 对断奶仔猪肠黏膜上皮细胞的影响

DPP-IV 广泛存在于动物各种组织的上皮层,其中以空肠、回肠组织中含量较高^[19],其主要作用是通过切除 N-末端的二肽来钝化生物活性肽(如 GLP-2);D. J. Drucker 等^[20]发现,对大鼠给予可增加小鼠肠重和肠绒毛高度的 GLP-2 剂量则只能增加大鼠的小肠绒毛高度,但对小肠重量没有影响,分析原因发现这是由于大鼠有较高活性的 DPP-IV,这导致 GLP-2 被体内 DPP-IV 降解;随后的研究又发现,同样剂量的 GLP-2 在 DPP-IV 基因缺失的大鼠上表现出了与小鼠同样的效应,这提示我们 DPP-IV 介导的 GLP-2 的降解效率成为决定 GLP-2 功效的重要决定参数。B. Hartmann 等^[10]发现,单独使用 DPP-IV 抑制剂对大鼠肠道发育及生长的影响不显著,这提示我们对于内源分泌的 GLP-2, DPP-IV 抑制剂的作用效果并不明显,分析其原因可能与添加的剂量不足有关。但是却提出了一个新的问题,高剂量的添加是否会对肠上皮细胞有不好的影响。本研究的试验 1 发现,低浓度的 DPP-IV 抑制剂对细胞增殖、代谢、凋亡的影响不显著,这与 B. Hartmann 等^[10]的报道一致;然而,高剂量的 DPP-IV 抑制剂虽然一定程度上可能促进细胞增殖,但却可能造成细胞蛋白质代谢受阻及细胞结构的损伤。本试验的结果与 DPP-IV 抑制剂在啮齿动物和犬类模型上发现的毒性反应导致动物脱毛、血小板减少、脾肿大、多个器官病理学改变、胃肠毒性,甚至死亡的结果一致^[21]。因此,高剂量应用 KR62436 可能会对细胞或动物造成一些损害。

此外, K. Masur 等^[22]研究了给予 GLP-2 后再加 DPP-IV 抑制剂对人的结肠癌细胞系 (SW480, HT29) 的增殖和迁移的影响,结果表明 100 nmol·L⁻¹ 的 GLP-2 可使癌细胞的迁移活性从 20% 上升到 45%,用 DPP-IV 转染细胞后,添加 DPP-IV 抑制剂可以剂量依赖性地延续 GLP-2 的细胞迁移功效,并使细胞倍增时间从 2.4 d 降为 1.5 d,这虽然说明 DPP-IV 抑制剂可以延续并提升 GLP-2 的功效,但也存在较大的促进癌细胞转移的风险,这和传统认为 GLP-2 不会促进癌细胞增殖的结论存在差异,因此,生产实践中应用 DPP-IV 抑制剂需谨慎。

3.2 GLP-2 和 DPP-IV 抑制剂对 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞的影响

B. Hartmann 等^[10]发现,皮下注射 GLP-2 的同时给予 DPP-IV 抑制剂 (Valine-pyr-rolidide, VP),在最初 60 min 内完整 GLP-2 的浓度是对照组的 2 倍;对于小鼠而言,5 μg 的 GLP-2 再添加 VP 可产生相当于 25 μg GLP-2 的效应,而大鼠给予 GLP-2 和 VP 后也显著增加了肠重;L. Hansen 等^[23]报道,对于生长猪 ((35.1±0.7)kg),静脉滴注 GLP-2 后,有 30.9% 的 GLP-2 被降解为 GLP-2₃₋₃₃,而给予 DPP-IV 抑制剂 (VP) 后,显著降低了肾对完整 GLP-2 的清除率,并通过提高在血中的半衰期 (从 6.8 min 到 9.9 min) 而使完整 GLP-2 在肠道的量大幅上升;这种变化会带来什么样的效应呢? 作者并没有就这个问题作后续研究。本研究的试验 2 结果表明,对于原代培养的 28 日龄断奶仔猪的肠上皮细胞,不同浓度的 GLP-2 与 DPP-IV 抑制剂联合使用可以协同促进原代培养的肠上皮细胞的增殖,增强细胞蛋白质代谢和能量代谢,保障细胞的完整性。也就是说, DPP-IV 抑制剂提高了 GLP-2 对细胞增殖、代谢和细胞完整性的作用效果,这个结果与 J. A. Pospisilik 等^[24]在大鼠和 K. Masur 等^[22]在人的结肠癌细胞系的研究结果一致,但与 L. Simonsen 等^[25]在患 2 型糖尿病的不肥胖大鼠上的研究结果存在差异。L. Simonsen 等^[20]认为 DPP-IV 抑制剂主要通过调节 GLP-1、GIP 的活性而影响肠道发育,通过 GLP-2 的途径调节肠道生长的效应相对较弱。实际上, DPP-IV 作为共同刺激分子 (Costimulatory molecule) 并触发级联反应来调节免疫细胞增殖、细胞因子产生,活化信号表达的作用特点决定了其在机体内能与许多生物活性肽相互协同或拮抗^[26],这也为生产实践中应用抑制剂来调控 DPP-IV 的活性带来了新问题。

3.3 GLP-2 与 DPP-IV 抑制剂联合使用影响断奶仔猪肠上皮细胞发育的可能机理

3.3.1 影响细胞蛋白质代谢和能量代谢 从本试验结果可知,不同浓度的 GLP-2 与 DPP-IV 抑制剂联合使用可以提高细胞总数量,而细胞 MTT OD 值的升高也表明活细胞数增多,细胞总蛋白含量的提高及细胞沉积蛋白的提高则表明细胞蛋白质代谢增强,由于单独应用 DPP-IV 抑制剂没有取得上述效应,而外源添加不同浓度的 GLP-2 后, DPP-IV 抑制剂显著提高了 GLP-2 的作用效果,结合前人的研究

结果推测, DPP-IV 抑制剂可能通过影响 GLP-2 存在方式而加强了 GLP-2 的促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡的效果, 并可能导致了断奶仔猪肠黏膜上皮细胞的变化。这与 C. Tsai 等^[27] 报道对大鼠给予 GLP-2 则只能增加小肠绒毛高度, 但对小肠重量没有影响, 但 D. J. Drucker 等^[20] 报道同样剂量的 GLP-2 在 DPP-IV 基因缺失大鼠上增加肠绒毛高度和肠重(蛋白质代谢改变), P. T. Sangild 等^[28] 报道, 接受 TPN 处理的仔猪, 其 DPP-IV 活性降低会影响肠道对氨基酸摄取的试验结果相同。上述这些结论及本研究的试验结果初步提示, 抑制 DPP-IV 的同时添加 GLP-2 可改善肠细胞蛋白质代谢。J. A. Pospisilik 等^[24] 报道也与此相同。

A. San Gabriel 等^[29]、X. Wu 等^[30] 和 S. R. van der Schoor 等^[31] 的研究结果表明, 细胞能量代谢正常是维持细胞正常功能的基础, 而影响细胞能量代谢的肌酸激酶的穿梭机制障碍(导致胞外 CK 活性升高)会导致细胞线粒体 PCr 和 ATP 之间的能量传输发生障碍, 是细胞内能量代谢障碍的原因之一^[32]。本研究发现, 高剂量 KR62436 引起了细胞培养液中 CK 活性的增高, 这提示了 CK 外漏的发生, 表明细胞能量代谢出现障碍及细胞损伤的发生, 而添加 GLP-2 后 CK 活性下降, 表明 CK 外漏可能得到了缓解, 细胞损伤减小, 能量代谢障碍减轻或消失。因此, KR62436 与 GLP-2 联用可能会调节细胞能量代谢, 避免或减轻细胞能量代谢障碍的发生。

3.3.2 保护细胞结构完整, 降低细胞损伤及凋亡

LDH 是一种胞质酶, 当细胞膜的通透性增高或完整性丧失时, 其扩散进入胞外介质, 因此通过测定 LDH 活性变化可以衡量细胞损伤^[15-16], 本试验发现, 高剂量 KR62436 引起了胞外 LDH 升高, 添加 GLP-2 显著降低了胞外 LDH, 表明 KR62436 可能会引起细胞结构损伤、通透性增高或细胞完整性丧失, 这和细胞外 CK 的升高一致, 而添加 GLP-2 可以抑制细胞的这种变化, 保护细胞结构完整, 但这种变化的机理尚不清楚。

研究发现, 细胞应激反应或凋亡信号能引起细胞膜的超极化或去极化, 造成线粒体肿胀, ATP 缺乏, Na^+ , K^+ -ATP 酶抑制, 细胞色素 C 释放, 细胞色素 C 能与 Apaf-1、caspase-9 前体、ATP/dATP 形成凋亡体, 然后激活 caspase-3(半胱天冬蛋白酶), 进而引发 caspases 级联反应, 导致细胞凋亡^[18]。本试验发现, KR62436 虽然没有引起细胞 Na^+ , K^+ -

ATP 酶活性的显著变化, 但添加 GLP-2 后, 细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性显著上升, 这提示细胞凋亡受到抑制, 因此, 活细胞数量显著上升, 显微镜下可见细胞边缘清晰, 不规则细胞减少, 死(凋)亡细胞减少, 这可能也是 KR62436 提高 GLP-2 作用效果, 促进细胞增殖的原因之一。

4 结 论

4.1 高剂量添加 DPP-IV 抑制剂(KR62436)可能影响 28 日龄断奶仔猪肠黏膜上皮细胞的蛋白质代谢和能量代谢, 可能会对细胞造成一定的损害。

4.2 联合使用低剂量的 DPP-IV 抑制剂(KR62436)和 GLP-2 会提升 GLP-2 促进肠上皮细胞增殖、维持正常的蛋白质和能量代谢、保障细胞结构和功能的完整性, 抑制细胞凋亡的作用效果, 且两者具有明显的协同效应。

本研究从细胞层面说明了应用 DPP-IV 可以提高 GLP-2 作用效果的潜力, 但应用于生产实际的时机、剂量、作用效果等还需要动物试验进一步验证。

参考文献(References):

- [1] DRUCKER D J. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis [J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(2):161-171.
- [2] DENG Q H, JIA G, ZHAO H, et al. The prolonged effect of glucagon-like peptide 2 pretreatment on growth performance and intestinal development of weaned piglets[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2016, 7: 28.
- [3] PETERSEN Y M, HARTMANN B, HOLST J J, et al. Introduction of enteral food increases plasma GLP-2 and decreases GLP-2 receptor mRNA abundance during pig development[J]. *J Nutr*, 2003, 133(6):1781-1786.
- [4] 车炼强, 张克英, 丁雪梅, 等. 免疫应激对仔猪肠道发育及胰高血糖素样肽-2 分泌的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(5):676-682.
CHE L Q, ZHANG K Y, DING X M, et al. Effect of immune challenge on gut development and GLP-2 secretion of piglets[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(5):676-682. (in Chinese)
- [5] BOUDRY G, PÉ-RON V, LE HUË-ROU-LURON I, et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine[J]. *J Nutr*,

- 2004,134(9):2256-2262.
- [6] JIA G, JIANG R C, WANG K N. Effects of glucagon-like peptide-2 on morphology, proliferation and enzyme activity of intestinal enterocyte cells of weaned piglets *in vitro*[J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2009,22(8):1160-1166.
- [7] 余长松, 贾 刚, 邓秋红, 等. 胰高血糖素样肽-2 对脂多糖应激的 IPEC-J2 细胞形态和紧密连接相关基因表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2015,46(4):592-599.
- YU C S, JIA G, DENG Q H, et al. The effect of GLP-2 on cell morphology and the gene expression of tight junction in LPS stressed IPEC-J2 cells[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015,46(4):592-599 (in Chinese)
- [8] DRUCKER D J, CRIVICI A E, SUMNER-SMITH M. Glucagon-like peptide-2 analogs. Google Patents, U S,2015.
- [9] PIZZIMENTI V, GIANDALIA A, CUCINOTTA D, et al. Incretin - based therapy and acute cholecystitis: a review of case reports and EudraVigilance spontaneous adverse drug reaction reporting database [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2016,41(2):116-118.
- [10] HARTMANN B, HARR M B, JEPPESEN P B, et al. *In vivo* and *in vitro* degradation of glucagon-like peptide-2 in humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000,85(8):2884-2888.
- [11] MCCORMICK L M, KYDD A C, EAD P A, et al. Chronic dipeptidyl peptidase-4 inhibition with sitagliptin is associated with sustained protection against ischemic left ventricular dysfunction in a pilot study of patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2014,7(2):274-281.
- [12] ORSKOV C, HOLST J J, KNUHTSEN S, et al. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancrea[J]. *Endocrinology*, 1986,119(4):1467-1475.
- [13] EVANS G S, FLINT N, SOMERS A S, et al. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures [J]. *J Cell Sci*, 1992,101(Pt 1):219-231.
- [14] 姜 俊. 谷氨酰胺对鲤鱼肠上皮细胞生长和代谢的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- JIANG J. Effects of glutamine on the growth and metabolism of carp intestinal epithelial cells in primary culture[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [15] KOH J Y, CHOI D W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay [J]. *J Neurosci Methods*, 1987,20(1):83-90.
- [16] 陈 璐, 赵 鑫, 郭 政. 降钙素基因相关肽对高糖下新生大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2014, 34(10):1185-1188.
- CHEN L, ZHAO X, GUO Z. Effect of calcitonin gene-related peptide on anoxia-reoxygenation induced injury to neonatal rat cardiomyocytes incubated in high glucose medium[J]. *Chinese Journal of Anesthesiology*, 2014, 34(10):1185-1188. (in Chinese)
- [17] 卢新华, 黄 煌, 谭 斌, 等. 马齿苋总黄酮对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2013,32(5):371-374.
- LU X H, HUANG H, TAN B, et al. Protective effects of portulaca total flavone on hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 myocytes[J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, 2013, 32(5):371-374. (in Chinese)
- [18] VOSS O H, BATRA S, KOLATTUKUDY S J, et al. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation[J]. *J Biol Chem*, 2007,282(34):25088-25099.
- [19] MENTZEL S, DIJKMAN H B, VAN SON J P, et al. Organ distribution of aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV in normal mice[J]. *J Histochem Cytochem*, 1996,44(5):445-461.
- [20] DRUCKER D J, SHI Q, CRIVICI A, et al. Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV[J]. *Nat Biotechnol*, 1997,15(7):673-677.
- [21] KUSHNER P, GORRELL M. DPP-4 inhibitors in type 2 diabetes: Importance of selective enzyme inhibition and implications for clinical use [J]. *J Fam Pract*, 2010,59(2):1-5.
- [22] MASUR K, SCHWARTZ F, ENTSCHLADEN F, et al. DPP-4 inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells [J]. *Regul Pept*, 2006,137(3):147-155.
- [23] HANSEN L, HARE K J, HARTMANN B, et al. Metabolism of glucagon-like peptide-2 in pigs: role of dipeptidyl peptidase IV [J]. *Regul Pept*, 2007,138(2-3):126-132.

- [24] POSPISILIK J A, MARTIN J, DOTY T, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates β -cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetes*, 2003,52(3):741-750.
- [25] SIMONSEN L, PILGAARD S, ORSKOV C, et al. Exendin-4, but not dipeptidyl peptidase IV inhibition, increases small intestinal mass in GK rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007,293(1):288-295.
- [26] SUN A L, DENG J T, GUAN G J, et al. Dipeptidyl peptidase-IV is a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2012,9(4):301-308.
- [27] TSAI C, HILL M, DRUCKER D J. Biological determinants of intestinotrophic properties of GLP-2 *in vivo*[J]. *Am J Physiol*, 1997,272(3 Pt 1):662-668.
- [28] SANGILD P T, PETERSEN Y M, SCHMIDT M, et al. Preterm birth affects the intestinal response to parenteral and enteral nutrition in newborn pigs[J]. *J Nutr*, 2002,132(12):3786-3794.
- [29] SAN GABRIEL A, UNEYAMA H. Amino acid sensing in the gastrointestinal tract [J]. *Amino Acids*, 2013,45(3):451-461.
- [30] WU X, ZHANG Y, LIU Z, et al. Effects of oral supplementation with glutamate or combination of glutamate and N-carbamylglutamate on intestinal mucosa morphology and epithelium cell proliferation in weanling piglets[J]. *J Anim Sci*, 2012,90(Suppl 4):337-339.
- [31] VAN DER SCHOOR S R, SCHIERBEEK H, BET P M, et al. Majority of dietary glutamine is utilized in first pass in preterm infants[J]. *Pediatr Res*, 2010,67(2):194-199.
- [32] 孔庆辉, 晁 燕, 夏明哲, 等. 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶 M-CK cDNA 的克隆及组织表达分析[J]. *动物学杂志*, 2016,51(1):84-94.
- KONG Q H, CHAO Y, XIA M Z, et al. cDNA cloning and tissue expression of creatine kinase gene from Huanghe schizothoracin (*Schizopygopsis pylzovi*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016,51(1):84-94. (in Chinese)

(编辑 郭云雁)