

# 利格列汀对 2 型糖尿病大鼠代谢性内毒素血症的影响

潘道延 沈洁 朱筱 赵德福 陈志 韩亚娟 李文婷 陈远程

**【摘要】 目的** 探讨利格列汀对高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)诱导的 2 型糖尿病大鼠代谢性内毒素血症的影响。**方法** 30 只健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠按随机数字法选择 10 只作为正常对照组,以正常饲料喂养,其余 20 只以高脂饲料饲喂 8 周后,予一次性腹腔注射 STZ(35 mg/kg)制备 2 型糖尿病模型。将造模成功大鼠共 16 只按随机数字法分为利格列汀干预组( $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃,  $n=8$ )和糖尿病对照组(等量生理盐水灌胃,  $n=8$ ),干预 4 周后测定大鼠空腹血糖、空腹胰岛素(FINS)、甘油三酯、总胆固醇、门静脉血浆脂多糖、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、二胺氧化酶(DAO)的水平,计算稳态模型评估-胰岛素敏感指数(HOMA-ISI)及稳态模型评估-胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。**结果** 与正常对照组相比,糖尿病对照组空腹血糖、FINS、HOMA-IR、甘油三酯、总胆固醇及体重等指标明显升高,ln(HOMA-ISI)明显降低,而利格列汀干预组上述指标除体重外较糖尿病对照组均有改善( $F=39.18 \sim 136.74$ ,  $P$  均 $<0.01$ )。糖尿病对照组门静脉血浆脂多糖、TNF- $\alpha$ 、IL-6、血浆 DAO 水平明显高于正常对照组,而利格列汀干预组上述指标较糖尿病对照组有所下降( $F=18.13 \sim 51.43$ ,  $P$  均 $<0.05$ )。**结论** 利格列汀可以改善高脂饮食联合 STZ 诱导的 2 型糖尿病大鼠代谢性内毒素血症,并减轻全身系统性炎症反应。

**【关键词】** 利格列汀;2 型糖尿病;代谢性内毒素血症;炎症

**Effects of linagliptin on metabolic endotoxemia in type 2 diabetic rats** Pan Daoyan, Shen Jie, Zhu Xiao, Zhao Defu, Chen Zhi, Han Yajuan, Li Wenting, Chen Yuancheng. Department of Endocrinology and Metabolism, The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, China  
Corresponding author: Shen Jie, Email: shenjiedr@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of linagliptin on metabolic endotoxemia in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM) induced by high fat feeding and low dose streptozotocin (STZ). **Methods** Ten of the 30 healthy male Sprague-Dawley rats were selected as normal control group according to random number and received basic diet, whereas the other 20 rats were fed with high-fat diet for 8 weeks and then treated with STZ intraperitoneal injection (35 mg/kg) once to induce T2DM. Diabetes was successfully induced in 16 rats which were then randomly divided into linagliptin treatment group ( $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  gavage,  $n=8$ ) and T2DM control group (equivalent normal saline,  $n=8$ ) according to random number. Four weeks later, fasting blood glucose, fasting blood insulin (FINS), triglyceride, total cholesterol, portal blood plasma lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and diamine oxidase (DAO) were measured. Homeostasis model assessment-insulin sensitive index (HOMA-ISI) and homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated. **Results** Compared with normal control group, the levels of fasting blood glucose, FINS, HOMA-IR, triglyceride, total cholesterol and body weight were all significantly increased in T2DM control group, whereas the ln(HOMA-ISI) was significantly reduced; compared with T2DM group, indexes mentioned above except body weight were all improved in linagliptin treatment group ( $F=39.18 \sim 136.74$ , all  $P < 0.01$ ); compared with normal control group, the levels of portal blood plasma LPS, TNF- $\alpha$ , IL-6 and plasma DAO increased in T2DM control group, but indexes mentioned above were all decreased in linagliptin treatment group ( $F=18.13 \sim 51.43$ , all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Linagliptin can improve the metabolic endotoxemia in rats with T2DM induced by high fat feeding and STZ, and attenuate systemic inflammation response.

**【Key words】** Linagliptin; Type 2 diabetes mellitus; Metabolic endotoxemia; Inflammation

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35: 230-233)

代谢性内毒素血症是指血循环中脂多糖水平较正常高 2~3 倍的一种低度炎症反应状态<sup>[1]</sup>。近年越来越多的研究表明,由高脂饮食介导的代谢性内毒素血症参与了胰岛素抵抗、肥胖及 2 型糖尿病等的发生、发展,降低血浆脂多糖含量可以明显减轻全身系统性的炎症反应并改善胰岛素抵抗状态<sup>[2,3]</sup>。二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂作为一种新型降糖药物,因其可以抑制 DPP-4 对胰高血糖素样肽-1 的水解,增加其在体内的作用时间,从而产生降糖作用,但随着研究的深入,逐渐发现其除了降糖之外还有其他广泛的作用,如降血脂、改善炎症反应、促进伤口愈合等<sup>[4,5]</sup>。本研究拟观察新型 DPP-4 抑制剂利格列汀对高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)诱导的 2 型糖尿病大鼠代谢性内毒素血症的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及 2 型糖尿病模型的建立** 30 只 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 180~200 g,购自南方医科大学实验动物中心[批号为 SCXK(粤)2011-0015]。大鼠自由进食进水,交替照明 12 h,垫料每天更换。适应性饲养 1 周后,按照随机数字法选择 10 只作为正常对照组,予普通饲料喂养。其余 20 只准备造模,予高脂饲料喂养。高脂饲料由标准大鼠饲料中添加 10% 的蔗糖,20% 的熟猪油,2% 的胆固醇,0.5% 的猪胆盐组成,高脂饲料每天更换。第 8 周末准备造模大鼠禁食 12 h,腹腔注射小剂量 STZ (35 mg/kg) 进行 2 型糖尿病造模,正常对照组仅腹腔注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。72 h 后,所有大鼠禁食 12 h 后断尾取血 0.5 ml,测空腹血糖、空腹胰岛素(FINS),以随机血糖  $\geq 11.1$  mmol/L 作为 2 型糖尿病的诊断标准<sup>[6]</sup>。

**1.2 实验分组及干预** 第 8 周末造模后,72 h 内有 4 只动物死亡,剩余 16 只动物存活且随机血糖均大于 11.1 mmol/L,提示造模成功。将成功造模的大鼠按照随机数字法分为糖尿病对照组( $n=8$ )及利格列汀干预组( $n=8$ )。正常对照组给予标准饲料 +0.9% 生理盐水  $3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃,糖尿病对照组给予高脂饲料 +0.9% 生理盐水  $3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃,利格列汀干预组给予高脂饲料 +1 mg/ml 利格列汀溶液  $3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃,共干预 4 周<sup>[7]</sup>。观察各组大鼠食欲、毛发、大小便、行为及整体状态情况,根据大鼠体重调整给药剂量。灌胃药液均每天配制。

**1.3 主要试剂** STZ、二胺氧化酶(DAO)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒均购于美国 Sigma 公司,柠檬酸、柠檬酸钠、生理盐水等均由实验室提

供。利格列汀片(5 mg/片)由勃林格殷格翰公司馈赠。显色基质试剂盒购于厦门鲎实验厂有限公司,大鼠胰岛素、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6 采用美国 Linco 公司的 ELISA 试剂盒检测。

**1.4 样本采集** 12 周末,末次给药后,所有大鼠空腹过夜,称量体重。以 10% 水合氯醛,0.35 ml/100 g 腹腔注射进行麻醉,经门静脉取血分别置于 EDTA-K2 抗凝管及无热原的肝素抗凝管中,4℃ 离心(3 500 r/min,  $r = 8.6 \text{ cm}$ ) 15 min,取上清, -20℃ 保存,用于各项指标的测定。

**1.5 指标检测** 空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇采用日立 7600 全自动生化仪检测;ELISA 法检测血浆胰岛素,计算稳态模型评估-胰岛素敏感指数(HOMA-ISI)、稳态模型评估-胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。公式计算:  $\text{HOMA-ISI} = 1 / (\text{空腹血糖} \times \text{FINS})$ ;  $\text{HOMA-IR} = (\text{空腹血糖} \times \text{FINS}) / 22.5$  (空腹血糖单位为 mmol/L; FINS 单位为 mIU/L)。利用鲎试剂采用基质显色偶氮法严格执行无热原操作检测血浆脂多糖含量;ELISA 检测血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 DAO 水平。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据, GraphPad Prism 6 作图,数据以均数  $\pm$  标准差表示,进行正态性、方差齐性检验,若资料符合正态性、方差齐,多样本均数比较采用完全随机设计的方差分析,组间比较采用 LSD 检验;方差不齐时多样本均数比较采用近似  $F$  检验的 Welch 法;组间比较采用非参数检验的 Tamhane's  $T^2$  法;HOMA-ISI 取自然对数纳入统计分析;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般情况比较** 造模及药物干预过程中,正常对照组活动正常,毛发整齐。糖尿病对照组活动减少,精神萎靡,多尿且毛发暗淡凌乱,利格列汀干预组与糖尿病对照组相比,尿量减少,毛发相对整齐。

**2.2 各组体重、血糖及胰岛素等指标比较** 与正常对照组相比,糖尿病对照组及利格列汀干预组体重、空腹血糖、FINS、HOMA-IR 均明显升高( $P$  均  $< 0.05$ ),而  $\ln(\text{HOMA-ISI})$  明显降低( $P < 0.01$ );与糖尿病对照组相比,利格列汀干预组空腹血糖、FINS、HOMA-IR 显著降低( $P$  均  $< 0.01$ ),而  $\ln(\text{HOMA-ISI})$  明显升高( $P < 0.01$ ),体重无明显变化,见表 1。

**2.3 各组血脂变化情况** 与正常对照组相比,糖尿病对照组及利格列汀干预组血浆甘油三酯及总胆固醇水平均明显升高( $P$  均  $< 0.05$ );与糖尿病对照组相比,利格列汀干预组甘油三酯及总胆固醇水平均明显改善( $P$  均  $< 0.01$ ),见表 2。

表 1 3 组大鼠体重、血糖、胰岛素及胰岛素抵抗情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	体重(g)	FPG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	HOMA-IR	ln (HOMA-ISI)
正常对照组	10	310.90 ± 11.29	5.29 ± 0.89	12.19 ± 1.43	2.92 ± 0.81	-4.15 ± 0.28
糖尿病对照组	8	367.13 ± 40.79 <sup>a</sup>	17.24 ± 2.39 <sup>a</sup>	27.35 ± 2.54 <sup>a</sup>	21.18 ± 4.98 <sup>a</sup>	-6.14 ± 0.22 <sup>a</sup>
利格列汀干预组	8	352.88 ± 30.76 <sup>a</sup>	8.07 ± 1.15 <sup>ac</sup>	17.93 ± 4.31 <sup>ac</sup>	6.54 ± 1.83 <sup>bc</sup>	-4.95 ± 0.28 <sup>ac</sup>
F 值		14.13	136.74	107.85	90.43	127.77
P 值		0.004	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与糖尿病对照组相比,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;FPG:空腹血糖;FINS:空腹胰岛素;HOMA-IR:稳态模型评估-胰岛素抵抗指数;ln (HOMA-ISI):稳态模型评估-胰岛素敏感指数的自然对数

表 2 3 组大鼠血脂变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
正常对照组	10	0.80 ± 0.15	1.73 ± 0.31
糖尿病对照组	8	2.23 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.49 ± 1.15 <sup>a</sup>
利格列汀干预组	8	1.32 ± 0.10 <sup>ab</sup>	2.50 ± 0.17 <sup>bc</sup>
F 值		82.08	39.18
P 值		0.000	0.000

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与糖尿病对照组相比,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;TG:甘油三酯;TC:总胆固醇

2.4 各组血浆脂多糖、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 DAO 的含量变化 与正常对照组相比,糖尿病对照组及利格列汀干预组大鼠门静脉血浆脂多糖、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 DAO 水平均明显升高( $P$ 均 $< 0.05$ );与糖尿病对照组相比,利格列汀干预后,大鼠门静脉血浆脂多糖、TNF- $\alpha$  及 IL-6、DAO 水平均有所下降( $P$ 均 $< 0.05$ ),见表 3。

### 3 讨论

本研究提示,通过高脂饮食联合小剂量 STZ 进行 2 型糖尿病造模,可以观察到糖尿病对照组和利格列汀干预组空腹血糖、胰岛素、甘油三酯及总胆固醇水平均较正常对照组有不同程度的上升,HOMA-IR 明显上升,HOMA-ISI 有所下降,提示胰岛素抵抗明显增加。同时,两组血浆脂多糖水平也较正常对照组明显升高,即发生了“代谢性内毒素血症”。随着研究的深入,肠道菌群目前被认为是人体的“内分泌”器官,与胰岛素抵抗、肥胖及 2 型糖

尿病等代谢性疾病均有着密切的联系。而脂多糖作为革兰阴性菌的细胞壁成分,也被认为是肠道菌群和机体发挥相互作用的一项极其重要的环节。脂多糖在引起肠道局部炎症反应的同时,进入血循环,与巨噬细胞、嗜中性粒细胞表面的 Toll 样受体 4 及白细胞分化抗原 14 结合,释放大炎症因子。本研究中,高脂饮食干预后大鼠血循环中炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平明显上升,造成全身系统性炎症反应,而这一类代谢性低度炎症反应也被证实是胰岛素抵抗、肥胖及 2 型糖尿病等代谢性疾病发生、发展中的一项重要因素<sup>[2,8-9]</sup>。

但目前关于高脂饮食介导代谢性内毒素血症的机制尚存在争议,主要包括以下几个方面:有研究表明,脂多糖可以混入乳糜微粒中,随着乳糜微粒一起被吸收入血循环;高脂饮食可以导致乳糜微粒在肠上皮细胞间堆积,造成肠道紧密连接损伤;另外,高脂饮食介导的局部肠道炎症反应也可以损伤肠道机械屏障,使细菌代谢产物如脂多糖的通透性增加<sup>[10-11]</sup>。同样,高脂饮食介导的肠道菌群改变也被认为是导致代谢性内毒素血症的发病机制之一,通过使用抗生素或益生元来调节肠道菌群后,血清脂多糖水平也有所下降<sup>[12]</sup>。

研究观察到高脂饮食干预后,糖尿病对照组和利格列汀干预组血浆 DAO 水平较正常对照组明显上升,而 DAO 主要存在于哺乳动物小肠黏膜或绒毛上层,在其他组织中则较少。当小肠黏膜屏障功

表 3 3 组大鼠血浆脂多糖、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 DAO 含量变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	LPS(EU/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-6(ng/L)	DAO(U/L)
正常对照组	10	100.11 ± 33.02	898.83 ± 99.71	58.54 ± 7.20	836.87 ± 156.05
糖尿病对照组	8	250.89 ± 63.89 <sup>a</sup>	1 493.46 ± 241.21 <sup>a</sup>	141.11 ± 27.96 <sup>a</sup>	1 340.82 ± 259.70 <sup>a</sup>
利格列汀干预组	8	163.12 ± 13.35 <sup>bc</sup>	1 162.04 ± 295.28 <sup>cd</sup>	95.67 ± 10.93 <sup>ac</sup>	1 086.98 ± 259.26 <sup>bc</sup>
F 值		29.34	29.72	51.43	18.13
P 值		0.000	0.000	0.000	0.001

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与糖尿病对照组相比,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;LPS:脂多糖;TNF- $\alpha$ :肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;IL-6:白细胞介素-6;DAO:二胺氧化酶

能受损时,细胞释放 DAO 增加,DAO 进入肠细胞间隙、淋巴管和血流,使血浆 DAO 升高,血浆 DAO 水平可以作为探讨肠道机械屏障功能损伤和修复的理想指标<sup>[13]</sup>。提示可能通过损伤肠道黏膜屏障使肠道通透性增加。

本研究使用利格列汀干预 2 型糖尿病大鼠,观察到利格列汀干预组对比糖尿病对照组,不仅血糖、胰岛素、血脂水平有所降低,HOMA-ISI 及 HOMA-IR 等指标也均有所改善。同时,利格列汀还可以明显降低 2 型糖尿病大鼠血浆脂多糖水平,明显改善“代谢性内毒素血症”,并可以降低血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子的表达,减轻全身系统性炎症反应,也可以降低血浆 DAO 水平,显示利格列汀可以减轻高脂饮食介导的肠道损伤。利格列汀作为新型 DPP-4 抑制剂,较其他同类药物具有作用时间长、抑制 DPP-4 效果强等特点。研究逐渐发现 DPP-4 抑制剂除了抑制体内 DPP-4 对胰高血糖素样肽-1 的水解,还可以抑制 DPP-4 对葡萄糖依赖性促胰岛素多肽、基质细胞衍生因子-1 等的降解,降低肠道来源的血清中富含甘油三酯的脂蛋白水平,发挥更多降糖之外的作用<sup>[14-15]</sup>。因此,本研究观察到的利格列汀可以缓解高脂饮食介导的肠道损伤,减少肠道脂多糖进入血循环,可能与其发挥降糖之外的作用相关,但具体作用机制有待进一步研究证实。

综上所述,利格列汀对 2 型糖尿病大鼠代谢性内毒素血症有一定的改善作用,可减轻全身系统性炎症反应,这可能与其可以减轻肠道损伤有关。

### 参 考 文 献

- [1] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56 (7): 1761-1772.
- [2] Cani PD, Osto M, Geurts L, et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity [J]. *Gut Microbes*, 2012, 3 (4): 279-288.
- [3] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice [J]. *Diabetes*, 2008, 57 (6): 1470-1481.
- [4] Kern M, Klöting N, Niessen HG, et al. Linagliptin improves insulin sensitivity and hepatic steatosis in diet-induced obesity [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (6): e38744.
- [5] Schürmann C, Linke A, Engelmann-Pilger K, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates inflammation and accelerates epithelialization in wounds of diabetic ob/ob mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 342 (1): 71-80.
- [6] Davidson EP, Coppey LJ, Holmes A, et al. Effect of inhibition of angiotensin converting enzyme and/or neutral endopeptidase on vascular and neural complications in high fat fed/low dose streptozotocin-diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 677 (1-3): 180-187.
- [7] Thomas L, Eckhardt M, Langkopf E, et al. (R)-8-(3-amino-piperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydro-purine-2,6-dione (BI 1356), a novel xanthine-based dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, has a superior potency and longer duration of action compared with other dipeptidyl peptidase-4 inhibitors [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 325 (1): 175-182.
- [8] Cani PD. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome [J]. *Brief Funct Genomics*, 2013, 12 (4): 381-387.
- [9] McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, immunity, and metabolic disease [J]. *Immunity*, 2014, 41 (1): 36-48.
- [10] Ghoshal S, Witta J, Zhong J, et al. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50 (1): 90-97.
- [11] Shen W, Gaskins HR, McIntosh MK. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25 (3): 270-280.
- [12] Wang JH, Bose S, Kim GC, et al. Flos Lonicera ameliorates obesity and associated endotoxemia in rats through modulation of gut permeability and intestinal microbiota [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (1): e86117.
- [13] Luk GD, Bayless TM, Baylin SB. Plasma postheparin diamine oxidase. Sensitive provocative test for quantitating length of acute intestinal mucosal injury in the rat [J]. *J Clin Invest*, 1983, 71 (5): 1308-1315.
- [14] Matikainen N, Mänttari S, Schweizer A, et al. Vildagliptin therapy reduces postprandial intestinal triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2006, 49 (9): 2049-2057.
- [15] Zhao Y, Yang L, Zhou Z. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: multitarget drugs, not only antidiabetes drugs [J]. *J Diabetes*, 2014, 6 (1): 21-29.

(收稿日期: 2015-02-13)