

【临床研究】

中图分类号: R543.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2021)06-0520-06

通信作者:孟哲(1983-),男,河南郑州人,博士,副主任医师,研究方向:心血管疾病诊断与治疗;E-mail:mengzhenihao@163.com。

Hospital of Zhengzhou University from September 2018 to September 2019 were selected as study subjects. All subjects were divided into control group ($n=42$), DM group ($n=41$), CAHD group ($n=43$) and DM + CAHD group ($n=38$) according to medical history and coronary angiography results. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured at admission, and the levels of fasting blood glucose (FBG), 2-hours postprandial blood glucose (2 h-PBG), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were measured by fully automated biochemistry analyzer. Serum DPP4 and advanced glycosylation end products (AGEs) levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay. The human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in logarithmic phase were collected and randomly divided into control group, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 treatment group and $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 treatment group, and the cells were treated with serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 and $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 for 24 hours, respectively. The level of nitric oxide (NO) in supernatant of HUVECs was detected by nitrate reductase assay and the relative expression of phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser1177 (peNOS^{Ser1177}) in HUVECs were detected by Western blot.

Results The levels of SBP, FBG, 2 h-PBG and TC of patients in the DM group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$); the levels of SBP, LDL and TC of patients in the CAHD group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$); the levels of SBP, FBG, 2 h-PBG, LDL, TC and TG of patients in the DM + CAHD group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$); the level of SBP of patients in the CAHD group was significantly higher than that in the DM group ($P<0.05$), the level of 2 h-PBG of patients in the CAHD group was significantly lower than that in the DM group ($P<0.05$); the levels of FBG, 2 h-PBG and TG of patients in the DM + CAHD group were significantly higher than those in the DM group and CAHD group ($P<0.05$). The levels of serum DPP4 and AGEs of patients in the DM group, CAHD group and DM + CAHD group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), the levels of serum DPP4 and AGEs of patients in the DM + CAHD group were significantly higher than those in the DM group and CAHD group ($P<0.05$), there was no significant difference in the levels of serum DPP4 and AGEs of patients between the DM group and CAHD group ($P>0.05$). The level of serum DPP4 was positively correlated with AGEs in the four groups ($P<0.05$). The level of serum DPP4 of patients in the control group was not correlated with LDL, HDL, TC, TG, FBG, 2h-PBG, SBP, DBP ($P>0.05$); the level of serum DPP4 was positively correlated with the levels of LDL, TC, FBG, 2 h-PBG and SBP of patients in the DM group, CAHD group and DM + CAHD group ($P<0.05$). The level of NO and relative expression of peNOS^{Ser1177} in HUVECs in the $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 treatment group and $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 treatment group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$), the level of NO and relative expression of peNOS^{Ser1177} in HUVECs in the $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 treatment group were significantly lower than those in the $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP4 treatment group ($P<0.05$).

Conclusion DPP4 can cause vascular injury by inducing the endothelial dysfunction, which participates in the occurrence and development of DM combined with CAHD.

Key words: diabetes mellitus; coronary atherosclerotic heart disease; dipeptidyl peptidase 4; endothelial dysfunction

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的血管并发症尤其冠状动脉性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CAHD) 是 DM 致死和致残的主要原因, 严重危害人类健康^[1]。二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4) 作为机体内一种酶类物质, 在 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 中发挥重要的血糖调节作用。研究发现, DPP4 抑制剂可使动脉粥样硬化血管斑块面积减小, 延缓 DM 和冠状动脉疾病患者颈动脉内膜中层厚度的进展^[2-5], 而颈动脉内膜中层厚度是动脉粥样硬化的标志, 提示 DPP4 可能直接参与 DM 血管并发症的发生、发展。体内蛋白质、核酸、脂质等大分子物质的氨基基团可与葡萄糖的醛基发生一系列反应生成晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs), AGEs 通过直接作用或与糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 结合, 介导一

系列复杂的分子信号转导及调控机制, 参与 DM 血管并发症的发病过程^[6]。基于此, 本研究通过检测 DM 并发 CAHD 患者血清 DPP4 水平, 分析 DPP4 与 AGEs 以及心血管重要危险因素的相关性, 探讨 DPP4 在 DM 并发 CAHD 中的作用; 并通过体外实验, 观察外源性 DPP4 对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和内皮型一氧化氮合酶 Ser1177 位点的磷酸化 (phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser1177, peNOS^{Ser1177}) 水平的影响, 分析 DPP4 在内皮细胞损伤中的作用, 为探讨 DM 并发 CAHD 的分子机制提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 9 月至 2019 年 9 月郑州大学第一附属医院心血管内科收治的疑似 DM

或(和)CAHD 164 例患者为研究对象,其中男 84 例,女 80 例;年龄 $28 \sim 78(59.43 \pm 9.01)$ 岁。病例纳入标准:(1)根据临床症状、体征初步诊断 DM 或(和)CAHD;(2)年龄 $18 \sim 80(60.12 \pm 8.69)$ 岁;(3)患者或家属知情同意并签订知情同意书者。排除标准:(1)病史资料不完整患者;(2)存在严重的肝肾功能不全患者;(3)心功能Ⅳ级及急性肺水肿患者;(4)存在恶性肿瘤、急性感染性疾病、严重的造影剂过敏患者;(5)孕妇、哺乳期妇女;(6)无法合作及存在精神疾病患者等。根据确诊情况将患者分为 DM 组、CAHD 组、DM + CAHD 组和对照组,DM 的诊断符合 2017 年版《中国 2 型糖尿病防治指南》^[7] 诊断标准,CAHD 的诊断符合《中国慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南》^[8] 2007 年版 CAHD 诊断标准,DM + CAHD 组患者为同时符合 DM 和 CAHD 诊断标准,对照组患者为根据糖尿病诊断标准排除 DM 且根据冠状动脉造影排除 CAHD 的其他疾病患者。DM 组 41 例,男 21 例,女 20 例;年龄 $23 \sim 79(56.90 \pm 11.12)$ 岁。CAHD 组 43 例,男 22 例,女 21 例;年龄 $25 \sim 77(61.71 \pm 9.25)$ 岁。DM + CAHD 组 38 例,男 21 例,女 17 例;年龄 $22 \sim 80(62.67 \pm 7.16)$ 岁。对照组 42 例,男 20 例,女 22 例;年龄 $18 \sim 78(59.63 \pm 8.43)$ 岁。4 组患者年龄、性别比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 细胞、试剂及仪器 HUVECs 购自美国 ATCC 细胞库,人重组 DPP4 购自美国 R&D 公司,达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)购自美国 Gibco 公司,peNOS^{Ser1177} 抗体(9570S)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)抗体(9586S)购自美国 Cell Signaling 公司,山羊抗兔二抗购自中国爱博泰克生物有限公司,NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,AGEs 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测试剂盒购自美国 CELL BIOLABS 公司,DPP4 ELISA 检测试剂盒购自美国 Ebioscience 公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;全自动生物化学分析仪购自瑞士罗氏公司,生物安全柜购自香港力康公司,高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 4 组患者血压、血糖及血脂的检测 (1)入院时测量患者收缩压(systolic blood pressure,SBP)、舒张压(diastolic blood pressure,DBP)。(2)于入院第 2 天凌晨,抽取患者空腹肘静脉血 5 mL,采用全自动生物化学分析仪检测患者空腹血糖(fasting blood-glucose,FBG)、餐后 2 小时血糖(2-hours post-prandial blood glucose,2 h-PBG)及低密度脂蛋白(low-density lipoprotein,LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein,HDL)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、三酰甘油(triglyceride,TG)等指标。

1.3.2 4 组患者血清 AGEs 及 DPP4 水平的测定

血清采集参考文献[9]:所有研究对象均于清晨抽取空腹静脉血 5 mL,静置 1 h, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上层血清,置于 -80°C 冰箱保存。采用 ELISA 检测血清中 AGEs 及 DPP4 水平,严格按试剂盒说明书步骤进行操作。

1.3.3 HUVECs 细胞培养及分组 取冻存的 HUVECs,恒温水浴锅中解冻后, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 混匀,转移细胞悬液至 25 mL 细胞培养瓶,置于 37°C 、含体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的恒温培养箱中培养,隔天换液 1 次,至细胞融合至 80% ~ 90% 时,使用胰蛋白酶消化并收集细胞,按 1 : 2 进行分瓶、传代。传代后,待细胞融合率达到 70% ~ 80% 时,取对数生长期细胞随机分为对照组、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组,对照组细胞给予无血清的 DMEM 干预, $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组细胞分别给予 100、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预,干预 24 h 后收集细胞用于后续实验。

1.3.4 硝酸还原酶法检测 HUVECs 上清液中 NO 水平 取干预 24 h 的各组 HUVECs 细胞, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,采用硝酸还原酶法分别测定标准品(试剂盒中提供)及各组样品波长 550 nm 处吸光度值,计算 NO 水平, $\text{NO} = (\text{样品吸光度值} - \text{空白吸光度值}) / (\text{标准吸光度值} - \text{空白吸光度值}) \times \text{标准品浓度} \times \text{样品测定前稀释倍数}$ 。实验重复 3 次,取均值。

1.3.5 Western blot 检测 HUVECs 中 peNOS^{Ser1177} 相对表达量 参考文献[10-11]报道的 Western blot 法检测 HUVECs 中 peNOS^{Ser1177} 相对表达量。具体方法:取干预 24 h 的各组 HUVECs 细胞,加入细胞裂解液冰上裂解,蛋白提取试剂盒提取总蛋白,BCA

法测定各组蛋白浓度,配制 SDS-PAGE 凝胶后,取 25 μ L 细胞蛋白加至样品孔中,80 V 电泳30 min后,120 V 电泳至蛋白 Marker 充分分离,290 mA 恒流下转膜 90 min;脱脂奶粉封闭,滴加 peNOS^{Ser1177} 一抗(稀释度 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBS 洗涤 10 min \times 3 次,滴加山羊抗兔二抗(稀释度 1:2 000),避光室温孵育 1 h;TBS 洗涤 10 min \times 3 次,增强化学发光液滴加至聚偏二氟乙烯膜上,暗室中曝光、显影,化学发光凝胶成像系统拍照,Image J 图像处理系统分析条带灰度值,peNOS^{Ser1177} 相对表达量以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示。实验重复 3 次,取均值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21.0 统计软件进行数据统计与分析。计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法 *t* 检验;变量线性相关性应用

表 1 4 组患者血压、血糖及血脂水平比较

Tab.1 Comparison of blood pressure,blood glucose and blood lipid levels of patients among the four groups ($\bar{x} \pm s$)									
组别	<i>n</i>	SBP/ (mm Hg)	DBP/ (mm Hg)	FBG/ (mmol \cdot L ⁻¹)	2 h-PBG/ (mmol \cdot L ⁻¹)	LDL/ (mmol \cdot L ⁻¹)	HDL/ (mmol \cdot L ⁻¹)	TC/ (mmol \cdot L ⁻¹)	TG/ (mmol \cdot L ⁻¹)
对照组	42	125.68 \pm 15.64	78.89 \pm 9.66	5.13 \pm 0.45	6.07 \pm 0.91	2.21 \pm 0.74	1.25 \pm 0.23	4.13 \pm 0.72	1.35 \pm 0.48
DM 组	41	143.14 \pm 18.87 ^a	82.38 \pm 11.02	7.15 \pm 2.44 ^a	11.28 \pm 4.01 ^a	2.57 \pm 0.82	1.23 \pm 0.27	4.88 \pm 1.28 ^a	1.63 \pm 0.90
CAHD 组	43	148.33 \pm 18.11 ^{ab}	85.90 \pm 11.16	5.20 \pm 0.80	7.02 \pm 1.65 ^b	2.81 \pm 0.68 ^a	1.12 \pm 0.28	4.95 \pm 1.95 ^a	1.56 \pm 1.06
DM + CAHD 组	38	150.67 \pm 16.88 ^a	84.72 \pm 15.79	8.17 \pm 3.16 ^{abc}	14.66 \pm 4.37 ^{abc}	2.97 \pm 0.86 ^a	1.10 \pm 0.26	5.15 \pm 0.97 ^a	2.39 \pm 0.85 ^{abc}

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与 DM 组比较^b*P* < 0.05;与 CAHD 组比较^c*P* < 0.05;1 mm Hg = 0.133 kPa。

2.2 4 组患者血清中 DPP4、AGEs 水平比较及 DPP4 与 AGEs 相关性分析 结果见表 2。DM 组、CAHD 组、DM + CAHD 组患者血清 DPP4、AGEs 水平高于对照组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);DM + CAHD 组患者血清 DPP4、AGEs 水平高于 DM 组和 CAHD 组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);DM 组与 CAHD 组患者血清 DPP4、AGEs 水平比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。Person 相关分析显示,4 组患者血清 DPP4 水平均与 AGEs 呈正相关 (*r* = 0.459、0.768、0.731、0.541, *P* < 0.05)。

表 2 4 组患者血清 DPP4、AGEs 水平比较

Tab.2 Comparison of serum DPP4 and AGEs levels of patients among the four groups ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	DPP4/(μ g \cdot L ⁻¹)	AGEs/(mg \cdot L ⁻¹)
对照组	42	690.00 \pm 110.97	26.68 \pm 10.96
DM 组	41	1 002.86 \pm 103.97 ^a	71.27 \pm 13.41 ^a
CAHD 组	43	958.93 \pm 137.31 ^a	67.78 \pm 15.01 ^a
DM + CAHD 组	38	1 498.46 \pm 140.40 ^{abc}	113.06 \pm 11.22 ^{abc}

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与 DM 组比较^b*P* < 0.05;与 CAHD 组比较^c*P* < 0.05。

2.3 4 组患者 DPP4 与血压、血糖及血脂水平相关性分析 Person 相关分析显示,对照组患者血清 DPP4 水平与 LDL、HDL、TC、TG、FBG、2 h-PBG、SBP、DBP 均无相关性 (*P* > 0.05);DM 组患者血清

Pearson 相关分析;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组患者血压、血糖及血脂水平比较 结果见表 1。DM 组患者 SBP、FBG、2 h-PBG、TC 显著高于对照组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);CAHD 组患者 SBP、LDL、TC 显著高于对照组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);DM + CAHD 组患者 SBP、FBG、2 h-PBG、LDL、TC、TG 水平高于对照组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);CAHD 组患者 SBP 水平高于 DM 组,2 h-PBG 水平低于 DM 组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);DM + CAHD 组患者 FBG、2 h-PBG、TG 水平高于 DM 组和 CAHD 组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);其余组间相关指标比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。

DPP4 水平与 LDL、TC、FBG、2 h-PBG、SBP 水平呈正相关 (*r* = 0.68、0.77、0.86、0.78、0.80, *P* < 0.05);CAHD 组患者血清 DPP4 水平与 LDL、TC、FBG、2 h-PBG、SBP 水平呈正相关 (*r* = 0.78、0.60、0.91、0.50、0.79, *P* < 0.05);DM + CAHD 组患者血清 DPP4 水平与 LDL、TC、FBG、2 h-PBG、SBP 水平呈正相关 (*r* = 0.52、0.51、0.83、0.70、0.83, *P* < 0.05)。

2.4 3 组 HUVECs 中 NO 水平和 peNOS^{Ser1177} 相对表达量比较 对照组、100 μ g \cdot L⁻¹ DPP4 干预组、500 μ g \cdot L⁻¹ DPP4 干预组 HUVECs 中 NO 水平分别为 (12.64 \pm 1.11)、(10.65 \pm 1.05)、(7.98 \pm 1.00) mmol \cdot L⁻¹,HUVECs 中 peNOS^{Ser1177} 相对表达量分别为 0.99 \pm 0.12、0.64 \pm 0.05、0.44 \pm 0.07;100 μ g \cdot L⁻¹ DPP4 干预组和 500 μ g \cdot L⁻¹ DPP4 干预组 HUVECs 中 NO 水平和 peNOS^{Ser1177} 相对表达量低于对照组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);500 μ g \cdot L⁻¹ DPP4 干预组 HUVECs 中 NO 水平和 peNOS^{Ser1177} 相对表达量低于 100 μ g \cdot L⁻¹ DPP4 干预组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。

3 讨论

DM 是 21 世纪全球面临的严重而危急的公共

健康问题之一,世界卫生组织估计,未来在全球范围内高血糖将是导致过早死亡的第三大危险因素,仅次于高血压和吸烟。中华医学会糖尿病学分会指出,随着我国经济增长、人们生活方式的变化及人口老龄化,DM 患病率显著增加,已成为严重威胁我国人民生命健康的重大卫生问题。在 DM 所有并发症中,血管并发症包括大血管病变和微血管病变是最常见的并发症,也是 DM 致死和致残的主要原因,其中与动脉粥样硬化相关的心血管疾病比例高达 75%。有研究报道,DM 是 CAHD 的独立危险因素,与非 DM 患者相比,DM 患者发生 CAHD 的风险增加了 2~4 倍,而 CAHD 也是 DM 患者的常见死亡原因,说明 DM 合并 CAHD 更加严重地威胁着我国人民的生命健康^[12]。因此,深入探讨 DM 并发 CAHD 的发生机制十分必要。

本研究结果显示,与对照组相比,DM 患者 SBP、FBG、2 h-PBG 及 TC 水平显著升高;与单纯 DM 或者 CAHD 组患者相比,DM 并发 CAHD 患者 FBG、2 h-PBG、TG 水平显著升高;说明 DM 患者往往合并其他代谢异常,而高血压、高脂血症、高血糖是 DM 患者并发 CAHD 的重要危险因素。AGEs 既是高血糖的结果,又是心血管损伤的起始,其可通过直接或间接与其受体 RAGE 结合,介导一系列复杂的分子信号转导及调控机制,通过胰岛素抵抗、慢性炎症、氧化应激等机制参与 DM 血管并发症的发病过程^[13]。本研究结果显示,DM 组、CAHD 组、DM + CAHD 组患者血清 AGEs 水平高于对照组,DM + CAHD 组血清 AGEs 水平高于 DM 组和 CAHD 组,DM 组与 CAHD 组患者血清 AGEs 水平无明显差异,这与既往研究结果一致^[14-15],证实 AGEs 可促进 DM 患者血管病变的发生、发展,导致 CAHD 的发生,是 DM 并发 CAHD 的一个重要因素。

血管内皮细胞作为高糖损伤的重要靶点,其功能失常是 DM 患者血管病变的早期标志,也是 DM 患者合并心血管疾病的独立危险因素。高血糖状态下,血管舒张和收缩因子如内皮素-1、血管紧张素 II、前列环素等分泌失衡,特别是 NO 生物活性降低,可导致内皮细胞功能障碍。既往研究证实,DPP4 抑制剂作为一种广泛应用于临床的降糖药,可通过改善内皮细胞功能来抑制动脉粥样硬化的发生、发展^[12,16]。推测其机制可能是 DPP4 抑制剂通过抑制 DPP4 发挥酶促作用,使其底物胰高血糖素

样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1)/葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (glucose-dependent insulinitropic polypeptide, GIP) 水平升高,进一步通过激活环磷酸腺苷/一氧化氮合酶系统促进 NO 释放,抑制环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 信号转导减轻炎症反应,从而发挥血管保护作用^[1,17]。有研究报道,DM 并发 CAHD 患者血清 DPP4 水平升高与循环 DPP4 酶活性增加相关^[18-19]。SCHLATTER 等^[19] 和 ISHIBASHI 等^[20] 研究报道,AGEs 可使血清中 DPP4 水平升高,在近端肾小管内皮细胞中,AGEs 不仅上调了 DPP4 的表达,而且增加了可溶性 DPP4 的释放;ISHIBASHI 等^[20] 在 HUVECs 模型中发现,AGEs 与其受体结合诱导了活性氧水平的增加,通过促进基质金属蛋白酶切割 DPP4 胞外区域增加可溶性 DPP4 的生成。因此,推测 DPP4 酶活性增加可促进其底物如 GLP-1 和 GIP 的降解,发挥降糖作用,同时削弱 GLP-1/GLP-1R 信号通路对血管内皮的保护作用;循环中 DPP4 水平升高可能直接参与内皮功能损害,促进 DM 并发 CAHD 的发生发展。本研究结果显示,DM 组、CAHD 组、DM + CAHD 组患者血清 DPP4 水平高于对照组;DM + CAHD 组患者血清 DPP4 水平高于 DM 组和 CAHD 组;DM 组与 CAHD 组患者血清 DPP4 水平比较无明显差异。进一步对 DPP4 与 AGEs 及血压、血糖、血脂等传统 CAHD 危险因素^[21] 进行相关性分析显示,4 组患者血清 DPP4 均与 AGEs 呈正相关,DM 组、CAHD 组及 DM + CAHD 组患者血清 DPP4 水平与 LDL、TC、FBG、2 h-PBG、SBP 水平呈正相关,对照组患者血清 DPP4 水平与 LDL、TC、FBG、2 h-PBG、SBP 水平无相关性。以上研究结果提示,血清 DPP4 在 DM 并发 CAHD 中发挥了血管损伤作用,并且与其他危险因素一起,共同促进血管损伤的发展。

随着对 DPP4 研究的深入,DPP4 的非酶促作用被逐渐关注。研究表明,循环中的 DPP4 作为配体可以不依赖 GLP-1/GIP 的非酶促作用通过内皮细胞和平滑肌表面的蛋白酶激活受体 2 导致细胞增殖和炎症反应^[18,22],而炎症反应和平滑肌细胞增殖是 CAHD 发生、发展的重要过程。内皮细胞功能失常是 CAHD 的起始事件,NO 是内皮细胞的重要活性因子,而内皮细胞 peNOS^{Ser1177} 是合成 NO 的关键酶。目前,关于 DPP4 是否可以直接导致 NO 活性降低以及机制如何尚不清楚。因此,本研究选择 HUVECs

进行体外 DPP4 干预,检测干预后 HUVECs 中 NO 水平和 peNOS^{Ser1177} 相对表达量变化,结果显示,100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组 HUVECs 中 NO 水平和 peNOS^{Ser1177} 相对表达量显著低于对照组,500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组 HUVECs 中 NO 水平和 peNOS^{Ser1177} 相对表达量显著低于 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPP4 干预组。这一结果证实 DPP4 可通过非酶促作用直接导致内皮细胞功能障碍,其机制可能是 DPP4 通过抑制内皮细胞 peNOS^{Ser1177} 的表达降低 NO 的表达水平,导致内皮细胞发生炎症反应和损伤,且这种作用呈剂量依赖性。

综上所述,DM 患者并发 CAHD 患者血清中 DPP4 和 AGEs 水平明显升高,二者呈正相关性,DPP4 与 DM、高脂血症、高血压等 CAHD 发生的重要危险因素相关,外源性 DPP4 直接导致内皮细胞功能失常,说明血清 DPP4 是 DM 患者并发 CAHD 的危险因素,这也为 DPP4 抑制剂血管保护作用的研究提供了新的理论支持。但本研究临床部分主要是横断面数据,无法提供因果关系的确切证据,因此,DPP4 与 DM 患者 CAHD 发生、发展的关系仍需进一步研究。

参考文献:

[1] LIU H, GUO L, XING J, *et al.* The protective role of DPP4 inhibitors in atherosclerosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 875(5): 1-5.

[2] XIE W, SONG X, LIU Z. Impact of dipeptidyl-peptidase 4 inhibitors on cardiovascular diseases[J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 109: 17-26.

[3] LIU H, XIANG H, ZHAO S, *et al.* Vildagliptin improves high glucose-induced endothelial mitochondrial dysfunction via inhibiting mitochondrial fission[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 798-810.

[4] AKOUMIANAKIS I, BADI I, DOUGLAS G, *et al.* Insulin-induced vascular redox dysregulation in human atherosclerosis is ameliorated by dipeptidyl peptidase 4 inhibition[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(541): eaav8824.

[5] GAO P, LI L, WEI X, *et al.* Activation of transient receptor potential channel vanilloid 4 by DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) inhibitor vildagliptin protects against diabetic endothelial dysfunction[J]. *Hypertension*, 2020, 75(1): 150-162.

[6] 丁珊珊, 刘星玥, 马浩. 晚期糖基化终末产物介导糖尿病慢性并发症的分子机制研究进展[J]. *江苏医药*, 2020, 46(2): 202-206.

[7] 贾伟平, 陆菊明, 纪立农, 等. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2018, 10(1): 4-67.

[8] 马长生, 马虹, 高润霖, 等. 慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(3): 195-206.

[9] 陈云玲, 吕风华, 陈玉磊, 等. 血清脂联素、C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9 与冠状动脉病变程度的关系[J]. *新乡医学院学报*, 2019, 36(10): 967-970.

[10] 侯继院, 单国用, 王海霞, 等. 色瑞替尼对肺癌细胞 H3122 增殖及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2020, 37(7): 601-605.

[11] LIU H, PENG H, XIANG H, *et al.* TWEAK/Fn14 promotes oxidative stress through AMPK/PGC1 α /MnSOD signaling pathway in endothelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1998-2004.

[12] CHOXI R, ROY S, STAMATOULI A, *et al.* Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease: focus on the effect of antihyperglycemic treatments on cardiovascular outcomes[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2020, 18(4): 187-199.

[13] JUD P, SOURIJ H. Therapeutic options to reduce advanced glycation end products in patients with diabetes mellitus; a review[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 148: 54-63.

[14] BASMAN C, FISHMAN S L, AVTANSKI D, *et al.* Glycosylated hemoglobin, but not advanced glycation end products, predicts severity of coronary artery disease in patients with or without diabetes[J]. *Metabol Open*, 2020, 16(7): 100050.

[15] NINIC A, BOJANIN D, SOPIC M, *et al.* Transforming growth factor-beta1 and receptor for advanced glycation end products gene expression and protein levels in adolescents with type 1 diabetes mellitus[J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2021, 13(1): 61-71.

[16] AINI K, FUKUDA D, TANAKA K, *et al.* Vildagliptin, a DPP-4 inhibitor, attenuates endothelial dysfunction and atherogenesis in nondiabetic apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Int Heart J*, 2019, 60(6): 1421-1429.

[17] WICINSKI M, GORSKI K, WODKIEWICZ E, *et al.* Vasculoprotective effects of vildagliptin. Focus on atherogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2275.

[18] BAGGIO L L, VARIN E M, KOEHLER J A, *et al.* Plasma levels of DPP4 activity and sDPP4 are dissociated from inflammation in mice and humans[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3766.

[19] SCHLATTER P, BEGLINGER C, DREWE J, *et al.* Glucagon-like peptide 1 receptor expression in primary porcine proximal tubular cells[J]. *Regul Pept*, 2007, 141(1/3): 120-128.

[20] ISHIBASHI Y, MATSUI T, MAEDA S, *et al.* Advanced glycation end products evoke endothelial cell damage by stimulating soluble dipeptidyl peptidase-4 production and its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 125.

[21] 陈瀚珠, 钟南山, 陆再英, 等. 内科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 213-214.

[22] ROMACHO T, VALLEJO S, VILLALOBOS L A, *et al.* Soluble dipeptidyl peptidase-4 induces microvascular endothelial dysfunction through proteinase-activated receptor-2 and thromboxane A2 release[J]. *J Hypertens*, 2016, 34(5): 869-876.