

高分子化学材料负载短效胰岛素对糖尿病大鼠的降血糖作用

李宝新¹, 张鑫¹, 吕娟², 郭淑芹¹, 张玛丽¹, 李杰¹, 王嵩¹, 张云良^{1*} (1.保定市第一中心医院内分泌科, 河北 保定 071000; 2.南开大学高分子化学研究所, 天津 300071)

摘要: 目的 研究高分子化学材料制备水凝胶负载短效胰岛素对糖尿病大鼠的降糖作用。方法 大鼠以 $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病大鼠模型, 随机分为模型组、常规组(常规胰岛素注射)、水凝胶组(水凝胶负载短效胰岛素注射), 另设正常对照组, 每组 10 只。监测各组大鼠药物干预后 24 h 内血糖的变化; 高糖灌胃后血糖的变化; 观察药物干预后肝肾功能水平变化。结果 24 h 内模型组大鼠血糖无明显变化, 常规组与水凝胶组的血糖均于 3 h 时显著下降至最低点后上升, 但水凝胶组的血糖上升至 12 h 后再次下降, 并于 24 h 内维持在原水平的 49.3%~55.6%, 显著低于同时段常规组的血糖($P<0.05$)。高糖灌胃后常规组大鼠血糖于 0.5 h 下降, 于 1.5~2.5 h 维持于原水平的 59.8%~66.4%, 显著低于同时段模型组血糖($P<0.05$), 水凝胶组血糖值自 0.5 h 持续显著下降($P<0.05$), 2.5~3.5 h 时血糖值均较同时段常规组血糖值明显降低($P<0.05$), 实验过程中无明显低血糖。同时, 水凝胶组大鼠的谷丙转氨酶及谷草转氨酶显著低于模型组, 其中谷草转氨酶明显低于常规组, 但高于正常对照组($P<0.05$)。结论 高分子化学材料水凝胶负载短效胰岛素后使其不仅降糖效果优于常规胰岛素, 并且作用时间明显延长, 可进一步应用于胰岛素新剂型的开发。

关键词: 高分子化学材料; 胰岛素; 糖尿病; 降糖

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)02-0134-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.02.002

引用本文: 李宝新, 张鑫, 吕娟, 等. 高分子化学材料负载短效胰岛素对糖尿病大鼠的降血糖作用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 134-137.

Hypoglycemic Effects of Polymer Chemical Materials Loaded Short-acting Insulin in Diabetic Rats

LI Baoxin¹, ZHANG Xin¹, LYU Juan², GUO Shuqin¹, ZHANG Mali¹, LI Jie¹, WANG He¹, ZHANG Yunliang^{1*} (1.Department of Endocrinology, Baoding No.1 Central Hospital, Baoding 071000, China; 2.Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the hypoglycemic effect of polymer chemical materials loaded short-acting insulin in diabetic rats. **METHODS** The diabetic rat model was prepared by intraperitoneal injection of streptozotocin at $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dose, and divided randomly into model group, regular group (insulin injection), hydrogel group (loaded short-acting insulin injection), and normal control group, 10 in each group. The diversification of blood glucose of rats in each group after intervention in 24 h, the variety of blood glucose after gavage administration of high glucose, and the transformation level of liver function and renal function were observed after intervention. **RESULTS** Within 24 h, there was no difference of blood glucose in model group; the blood glucose in regular group and hydrogel group dropped to the lowest level at 3 h, but the ascendant blood glucose declined at 12 h hydrogel group. The blood glucose in hydrogel group kept the level of 49.3%~55.6% of initial content, which was remarkably deeper than that in regular group($P<0.05$). After gavage administration of high glucose, the blood glucose in regular group descended at 0.5 h, and maintained the level of 59.8%~66.4% of initial content from 1.5~2.5 h, which was noticeably lower than that in model group($P<0.05$). The blood glucose in hydrogel group came down from 0.5 h, which declined significantly from 2.5~3.5 h, compared with that in regular group($P<0.05$). The most important was that there was no occurrence of hypoglycemia. At the same time, the ALT and AST in hydrogel group descend distinctly, compared with that in model group, and AST in hydrogel group was lower than that in regular group, but higher than normal control group($P<0.05$). **CONCLUSION** The hypoglycemic effect of polymer chemical material loaded short-acting insulin is superior to that of regular fast-acting insulin with a prong long duration which can be further applied to the development of new insulin dosage forms.

KEYWORDS: polymer chemical materials; insulin; diabetes mellitus; hypoglycemic effect

随着糖尿病的患病率大幅上升, 糖尿病的治疗成为人们日益关注的重点。对于 1 型糖尿病及

胰岛功能差的 2 型糖尿病患者而言, 外源性胰岛素是主要的治疗方法^[1]。目前短效胰岛素以其较快

基金项目: 国家自然科学基金项目(81500644)

作者简介: 李宝新, 男, 博士, 副主任医师 Tel: (0312)25975007

E-mail: lbxlcx@163.com

*通信作者: 张云良, 男, 硕士, 主任

医师 Tel: (0312)5975007 E-mail: nfmzyl@163.com

及显著的降糖作用,在临床中应用最为广泛。但短效胰岛素的降糖作用持续时间较短,以致反复多次皮下注射及低血糖反应,是目前临床应用中较为棘手的问题。为了弥补短效胰岛素应用中的不足,有研究发现通过氨基苯硼酸(APBA)与氨基葡萄糖(AGA)之间的苯硼酸酯化作用制备一种可注射型高分子化学材料,以此作为胰岛素载体制备成水凝胶负载短效胰岛素,通过体外实验发现,在生理 pH 环境下,载药胶束中的糖响应部分通过感应葡萄糖的浓度,从而调节胰岛素的释放,进而将血糖水平控制在一定范围内^[2-3]。基于这种高分子化学材料水凝胶负载短效胰岛素在体外的研究结果,本实验通过不同的给药模式干预糖尿病大鼠模型,观察其降糖作用。

1 材料与方法

1.1 动物

40 只 SD 大鼠,♂,体质量 280~320 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号:11400700218632;饲养于河北大学医学院实验动物中心,室内通风良好,室温保持在 18~23 ℃,相对湿度 55%~66%,光线明暗各 12 h,基础饲料喂养,自由饮食饮水。适应性喂养 1 周后,禁食 24 h,不禁水。

1.2 仪器与材料

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司);罗康全型血糖仪(德国罗氏公司);生物合成人胰岛素(诺和灵 R, 诺和诺德公司,规格:400 IU/40 mL);APBA 和 AGA 均来自南开大学高分子化学研究所;全自动 7600 生化分析仪(日立);

1.3 模型制备

按 65 mg·kg⁻¹ 单次腹腔注射 1%STZ 诱导 3 d 后尾静脉取血,利用罗氏血糖仪检测大鼠血糖水平,随机血糖或空腹血糖≥16.7 mmol·L⁻¹ 判定为糖尿病大鼠^[4]。在整个过程中,2 只大鼠死亡(模型组 1 只,常规组 1 只),1 只大鼠因血糖未达标造模失败而被淘汰(模型组)。

1.4 大鼠分组及给药方法

随机将所有大鼠分组为正常对照组、模型组、常规组、水凝胶组,每组 10 只。按“1.3”项下方法制备糖尿病大鼠模型。随后按照下述给药方法进行给药:模型组大鼠皮下注射生理盐水(每次 25 μL·kg⁻¹,每天 2 次);常规组大鼠皮下注射常规胰岛素(生物合成人胰岛素,每次 1 IU·kg⁻¹,每天

2 次);水凝胶组大鼠皮下注射载药水凝胶(每次 0.15 IU·kg⁻¹,每天 21 时注射 1 次)。

1.5 水凝胶负载胰岛素的制备

利用 APBA 与 AGA 之间的苯硼酸环酯化作用,在生理 pH 条件下使 2 种水溶性聚合物 P(Asp-co-AspAPBA)和 P(Asp-co-AspAGA)发生交联,得到葡萄糖响应性高分子水凝胶,并在成胶过程将胰岛素负载到其中。分别配制 pH 7.4 的一定浓度的 2 种聚合物水溶液和胰岛素溶液,将 2 种聚合物溶液搅拌混合,并继续加入胰岛素溶液,经搅拌混合、静置后得到载药高分子水凝胶。通过改变 2 种聚合物溶液的比例或浓度,得到具有合适凝固时间和强度的载药水凝胶^[5](该步骤由南开大学高分子化学研究所完成)。

1.6 血清检测肝功能及肾功能

给药治疗 14 d 后,尾静脉取血收集所有糖尿病大鼠晨起的空腹静脉血(1 mL),4 000 r·min⁻¹ 离心 7 min,取上层血清并应用生化分析仪测定肝功能[谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)]及肾功能[血肌酐(CREA)、尿素氮(UREA)]。

1.7 血糖检测

1.7.1 观察药物干预后 24 h 内各组大鼠的血糖变化 实验前所有大鼠 10 h 禁食不禁水,根据“1.4”项下方法分组给药,给药时记为 0 h,应用罗氏血糖仪检测 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 h 的血糖值。

1.7.2 观察高糖灌胃后各组大鼠的血糖变化 实验前所有大鼠 10 h 禁食不禁水,根据“1.4”项下方法给药,给药时记为 0 h,0.5 h 后应用 20%葡萄糖溶液 10 mL 高糖灌胃模拟进食,自由饮水情况下,观察各组大鼠模拟进食后血糖的变化,连续测定记录 3.5 h。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,实验所得数据均呈正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析(ANOVA),进一步组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠用药干预后 24 h 的血糖变化

模型组大鼠血糖在 24 h 内无明显变化;常规组大鼠血糖值于 3 h 时显著下降 73.4%,后迅速上升,8 h 时上升至 0 h 血糖值的 90.1%,后维持于

原水平的 85.1%~90.5%。水凝胶组大鼠血糖于 3 h 显著降低 73.6%，后缓慢上升，于 12 h 上升至 0 h 血糖值的 74.0%，后显著下降，维持在原水平的 49.3%~55.6%。除 12 h 外水凝胶组血糖值均显著低于常规组同时段的血糖值($P<0.05$)，未见明显低血糖。结果见图 1。

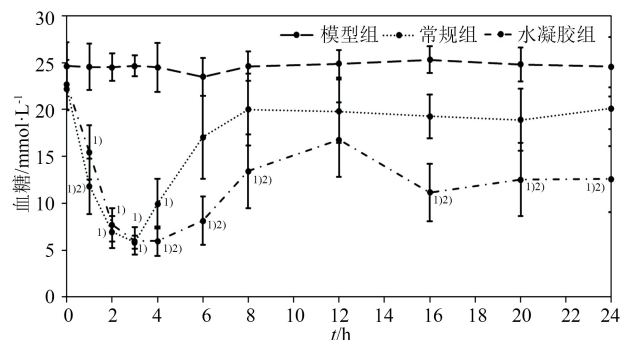


图 1 用药干预后 24 h 内各组大鼠血糖的变化($\bar{x} \pm s$)
与 0 h 比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与常规组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 Diversification of blood glucose of rats in each group in 24 h after intervention($\bar{x} \pm s$)

Compared with 0 h, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the regular group, ²⁾ $P<0.05$.

2.2 各组大鼠高糖灌胃后血糖的变化

正常对照组大鼠血糖自 0.5 h 升高，于 2 h 时达峰值后逐渐下降。模型组大鼠血糖自 0.5 h 迅速上升，于 1.5 h 达峰值。常规组大鼠血糖于 0.5 h 开始下降，于 1.5~2.5 h 维持于 0 h 血糖值的 59.8%~66.4%，较模型组同时时间段血糖值显著降低($P<0.05$)，并于 3.5 h 再次上升至原水平的 79.9%。水凝胶组大鼠血糖值自 0.5 h 显著持续下降至低于模型组血糖水平，于 3.5 h 降至 0 h 血糖的 27.0%($P<0.05$)，并且 2.5~3.5 h 时血糖值均较同时时间常规组的血糖值明显下降($P<0.05$)，未见明显低血糖。结果见图 2。

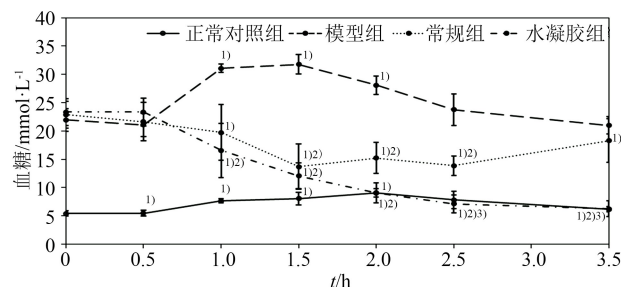


图 2 高糖灌胃后各组大鼠血糖变化($\bar{x} \pm s$)

与 0 h 比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与常规组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Variety of blood glucose of rats in each group after gavage administration of high glucose($\bar{x} \pm s$)

Compared with 0 h, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group ²⁾ $P<0.05$; compared with the regular group, ³⁾ $P<0.05$.

2.3 各组大鼠血清检测肾功能比较

与正常对照组相比，模型组 UREA 显著升高，其他组无明显上升。各组中的 CREA 无明显差异。水凝胶组 ALT 及 AST 显著低于模型组，并且 AST 较常规组显著降低，但较正常对照组显著升高($P<0.05$)，而 ALT 较常规组与正常对照组无明显差异。结果见表 1。

表 1 各组大鼠肾功能比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the liver and kidney function in each group of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT/ U·L ⁻¹	AST/ U·L ⁻¹	CREA/ μmol·L ⁻¹	UREA/ μmol·L ⁻¹
正常对照组	38.40±8.73	78.60±14.36	71.00±6.04	7.36±1.63
模型组	154.5±62.09 ¹⁾	320.17±21.67 ¹⁾	78.20±7.36	11.15±2.25 ¹⁾
常规组	86.89±18.60 ¹⁾²⁾	223.11±34.51 ¹⁾²⁾	75.80±5.17	9.90±2.72
水凝胶组	66.67±12.94 ²⁾	141.67±31.25 ¹⁾²⁾³⁾	70.83±6.59	9.40±1.05

注：与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与常规组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the regular group, ³⁾ $P<0.05$.

3 讨论

目前有研究发现通过自由聚合法组合而成的 pH 敏感水凝胶负载胰岛素(INS-TPM950)，应用 INS-TPM950 治疗糖尿病大鼠的血糖于 2.5 h 下降到最低点(47.5±5.5%)，然后于 8 h 上升至原水平的 (93.7±9.0%)^[6]。Li 等^[7]发现一种包裹 3D 透明质酸的胰岛素负载的糖响应水凝胶装置(INSs-HA)，通过口服的方法治疗糖尿病大鼠发现其血糖显著下降至原水平的 57.1%，并于 10 h 内维持在 38.4%，表明 HA 水凝胶具有延长降糖作用时间的效果。上述研究均应用不同载体负载短效胰岛素治疗糖尿病大鼠，但其降糖作用时间较短，并且实验中大鼠的血糖下降程度为 47.5%~57.1%。基于近年来研究发现含有苯硼酸的高分子材料具有良好的稳定性及低免疫原性。利用 APBA 和 AGA 分别部分修饰聚天冬氨酸，得到 2 种聚合物 P(Asp-co-AspAPBA)和 P(Asp-co-AspAGA)；利用苯硼酸与葡萄糖之间的苯硼酸酯化作用构建新型葡萄糖响应性高分子纳米药物载体，并负载短效胰岛素后制备形成水凝胶负载短效胰岛素^[8]。通过进行体外实验研究发现在生理 pH 7.4 下水凝胶纳米凝胶的组合能控制胰岛素的释放，以响应葡萄糖水平的变化^[9]。在上述研究结果基础上，本研究利用南开大学高分子化学研究所提供的材料进行体内实

验,结果常规胰岛素注射组大鼠的血糖值于 8 h 内显著降低,但其降糖作用只能维持 8 h。而水凝胶负载短效胰岛素注射组大鼠的血糖显著下降 73.6%,并于 24 h 内维持在较低的水平。说明与常规短效胰岛素相比,水凝胶负载短效胰岛素不仅具有显著的降糖效果,并且其降糖作用时间延长,相比常规短效胰岛素的降糖作用时间长 16 h。更有研究发现一种胰岛素的吸收促进剂——穿膜肽,通过口服的方法治疗糖尿病小鼠发现,餐后血糖于 3 h 时下降至原水平的 70%左右,后逐渐上升,于 6 h 上升至原水平的 80%^[10]。本研究更进一步探究水凝胶负载短效胰岛素注射组大鼠高糖灌胃后血糖水平的变化过程,此研究过程类似于口服糖耐量试验过程。结果发现水凝胶组大鼠的血糖值于餐后持续缓慢平稳下降,于 3.5 h 达原水平的 27.0%,并在 2.5 h 后维持在显著低于常规组大鼠血糖值的水平,并无明显低血糖。说明水凝胶负载短效胰岛素具有显著及平稳的降餐后血糖的作用,使血糖处于平缓变化的水平,无大幅度变化过程及低血糖。因此高分子化学材料水凝胶负载短效胰岛素后,其降糖作用显著并持久,至少维持 24 h,并且对于餐后血糖具有更好的降糖效果,无明显低血糖。本研究通过检测注射水凝胶负载短效胰岛素大鼠干预 14 d 后血清肝肾功指标的水平发现,模型组 ALT 及 AST 的含量较其他组明显升高,虽然水凝胶组大鼠的肝肾功能水平虽较正常对照组增加,但明显低于模型组大鼠,UREA 及 CREA 水平较其他组无明显差异。说明水凝胶组大鼠的肝脏损伤程度较模型组及常规组大鼠肝脏损伤程度较轻,肾功能无明显差异。水凝胶负载短效胰岛素对于肝功能影响较小。

综上所述,由 APBA 及 AGA 的酯化作用形成的水凝胶纳米复合物载体负载短效胰岛素后使其

降糖作用显著与持久,至少维持 24 h,并且与常规短效胰岛素相比,对于餐后血糖具有更好的降糖效果,无明显低血糖。同时水凝胶复合物载体负载短效胰岛素治疗对肝功能影响更小。因此上述 2 种高分子化学材料制备形成的水凝胶纳米复合物是短效胰岛素载体的理想选择。

REFERENCES

- [1] ZIMMET P Z. Diabetes and its drivers: the largest epidemic in human history? [J]. Clin Diabetes Endocrinol, 2017(3): 1.
- [2] YANG H, ZHANG C, LI C, et al. Glucose-responsive polymer vesicles templated by α -CD/PEG inclusion complex [J]. Biomacromolecules, 2015, 16(4): 1372-1381.
- [3] MA R, YANG H, LI Z, et al. Phenylboronic acid-based complex micelles with enhanced glucose-responsiveness at physiological pH by complexation with glycopolymer [J]. Biomacromolecules, 2012, 13(10): 3409-3417.
- [4] LI C D, ZHOU W L. Protective effects of paroxetine on neuropathic pain in diabetic rats and the possible mechanism [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(4): 488-491.
- [5] YANG H, MA R, LIU G, et al. Glucose-sensitive complex micelles based on phenylboronic acid complexation with glycopolymer [J]. J Control Release, 2013, 172(1): e103.
- [6] SHI Y, WANG X, DENG X, et al. Release profile of insulin from pH-sensitive hydrogel and its hypoglycemic effect by oral administration [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2016, 27(1): 86-96.
- [7] LI L, JIANG G, YU W, et al. A composite hydrogel system containing glucose-responsive nanocarriers for oral delivery of insulin [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016(69): 37-45.
- [8] YANG H, MA R, YUE J, et al. A facile strategy to fabricate glucose-responsive vesicles via a template of thermo-sensitive micelles [J]. Polym Chem, 2015, 6(20): 3837-3846.
- [9] LIU G, MA R, REN J, et al. A glucose-responsive complex polymeric micelle enabling repeated on-off release and insulin protection [J]. Soft Matter, 2013, 9(5): 1636-1644.
- [10] KAMEI N, SHIGEI C, HASEGAWA R, et al. Exploration of the key factors for optimizing the *in vivo* oral delivery of insulin by using a noncovalent strategy with cell-penetrating peptides [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(2): 239-246.

收稿日期: 2019-02-26

(本文责编: 曹粤锋)