

胰岛素自微乳剂肠道给药的降血糖效果考察^Δ

黄惠燕^{1*}, 梁丽梅^{1#}, 余芬¹, 吴美琴¹, 张晓娟¹, 黄小琼² (1.广东省人民医院/广东省医学科学院, 广州 510120; 2.广东医学实验动物中心, 广东佛山 528248)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2638-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.14

摘要 目的:研究胰岛素自微乳剂肠道给药在1型糖尿病模型大鼠体内的降血糖效果。方法:取大鼠ip给予链脲佐菌素(50 mg/kg)复制1型糖尿病模型,将模型大鼠随机分为模型(生理盐水)组、阳性对照(胰岛素注射液2.25 u/kg)组和微乳剂低、中、高剂量组(胰岛素自微乳剂4.5、9、18 u/kg);另取正常大鼠10只为假手术(生理盐水)组。均麻醉手术,除阳性对照组大鼠ip给药外,其余大鼠肠道给药,于给药前和给药后15~600 min检测各组大鼠血糖水平。另分别对正常对照组、模型未给糖组、模型给糖组和微乳剂(胰岛素自微乳剂9 u/kg)组大鼠进行糖耐量实验(除模型未给糖组大鼠不给糖外其余大鼠均给糖)。结果:与假手术组比较,模型组大鼠给药后0~240 min内的血糖值均增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组大鼠给药15 min后有降血糖趋势,给药后30~480 min内的血糖值均减小,其中降血糖峰值为36%、峰值时间为30 min;微乳剂低、中、高剂量组大鼠给药30 min后有降血糖趋势,给药后45~360 min内的血糖值均减小,其中降血糖峰值为18%~21%、峰值时间为90~120 min,以上差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。糖耐量实验中除模型未给糖组外其余各组大鼠均有血糖吸收峰,且微乳剂组大鼠血糖达峰值后迅速降低。结论:胰岛素自微乳剂能明显降低1型糖尿病模型大鼠的血糖。

关键词 胰岛素;自微乳剂;糖尿病;大鼠;药效学

Study on the Hypoglycemic Effect of Insulin Self-microemulsion for Parenteral Administration

HUANG Hui-yan¹, LIANG Li-mei¹, YU Fen¹, WU Mei-qin¹, ZHANG Xiao-juan¹, HUANG Xiao-qiong² (1.Guangdong General Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China; 2.Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan 528248, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the hypoglycemic effects of Insulin self-microemulsion for parenteral administration on model rats with type 1 diabetes *in vivo*. METHODS: Rats were treated with streptozotocin (50 mg/kg) to reproduce model with type 1 diabetes, ip. The model rats were randomly divided into model group (normal saline), positive control group (Insulin injection 2.25 u/kg) and self-microemulsion low, medium and high dose groups (Insulin self-microemulsion 4.5, 9 and 18 u/kg); and 10 normal rats were involved in sham-operation group (normal saline). Anesthesia and operation were conducted for all rats. Positive control group was administrated, ip; other rats were parenterally administrated. The blood glucose levels in groups were detected before and after 15-600 min administration. Glucose tolerance test was conducted for the rats in normal control group, model group without glucose, model group with glucose and microemulsion group (Insulin self-microemulsion 9 u/kg). All group were given glucose except model group without glucose. RESULTS: Compared with sham-operation group, the blood glucose levels in model group within 0-240 min were increased, with significant difference ($P<0.05$). Compared with model group, there was hypoglycemic trend in positive control group after 15 min, the blood glucose levels within 30-480 min were decreased, the hypoglycemic peak was 36%, and the peak time was 30 min; there was also hypoglycemic trend in microemulsion low, medium and high dose groups after 30 min, the blood glucose levels within 45-360 min were decreased, hypoglycemic peak was 18%-21%, and the peak time was 90-120 min, with significant differences ($P<0.01$ or $P<0.05$). All rats had glucose absorption peak except for model group without glucose in glucose tolerance test, and glucose of rats in microemulsion group reached its peak and then quickly decreased. CONCLUSIONS: Insulin self-microemulsion can obviously reduce the blood glucose of model rats with type 1 diabetes.

KEYWORDS Insulin; Self-microemulsion; Diabetes; Rat; Pharmacodynamics

胰岛素(Insulin)是胰岛B细胞分泌的一种多肽类激素,生理效应强,是治疗糖尿病的重要药物。但由于胰岛素的分子质量较大,在消化道难于吸收,且极易被蛋白酶降解,直接口服后生物利用度一般小于0.5%,没有临床意义。因此,至今胰岛素依然是以注射给药方式给药。长期每日多次注射给药给患者带来了巨大的痛苦和不便,并易引起脂肪萎缩等多种不

良反应。为改善胰岛素注射带来的上述问题,医药工作者一直致力于胰岛素口服给药途径的研究。为避免胰岛素在胃肠道被降解、促进其胃肠吸收,常采用其他材料作为药物载体,例如以高分子材料为载体的胰岛素乳剂^[1]、脂质体^[2]、微球^[3]、纳米粒^[4]、油性制剂^[5]、胶囊^[6]等相关研究已有报道。但目前这些口服制剂仍然存在生物利用度低、制剂不稳定等问题,故目前仍未有产品成功上市。为解决这些制剂的上述问题,本课题组对胰岛素自微乳剂口服给药系统进行了研究。为了解本课题组研制的胰岛素自微乳剂是否能经胃肠吸收入血循环而发挥降血糖的作用及其降血糖的疗效,本研究以1型糖尿病模型

^Δ 基金项目:广东省科技计划基金(No.2011B031800010)

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:020-81884713

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:药物制剂。电话:020-81884713

大鼠为实验动物,通过考察胰岛素自微乳剂在模型大鼠体内的降血糖效果,以检验胰岛素自微乳剂肠道给药的有效性及适宜性,为胰岛素口服肠道靶向制剂的进一步研究及自微乳剂化药物给药系统的研究提供实验数据。

1 材料

1.1 仪器

AL204型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);FA1204B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);强生稳豪稳型血糖仪[强生(上海)医疗器材有限公司]。

1.2 药品与试剂

胰岛素自微乳剂(广东省心血管病研究所,批号:20140322,规格:15 u/ml);胰岛素注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号:1403208,规格:400 u:10 ml);戊巴比妥钠(批号:120505,纯度:>99%)、链脲佐菌素(STZ,批号:130402,纯度:98%)均购自美国Sigma公司;50%葡萄糖注射液(50% GS,湖南科伦制药有限公司,批号:E13121806);其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,♂,体质量为(200±20)g,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物生产合格证号:44007200009290。

2 方法与结果

2.1 复制模型

选用大鼠,80只,称质量,ip给予STZ 50 mg/kg,自由饮

食。第8天剪尾取血,测定随机血糖值;第9天测定空腹血糖值。随机血糖值≥16 mmol/L、空腹血糖值≥11 mmol/L者即确定为1型糖尿病模型大鼠。

2.2 分组与给药

取复制模型成功的大鼠50只,禁食12 h,不禁水,随机分成5组,分别为模型(生理盐水)组、阳性对照(胰岛素注射液2.25 u/kg)组和微乳剂低、中、高剂量(胰岛素自微乳剂4.5、9、18 u/kg)组,每组10只。另取正常大鼠10只为假手术(生理盐水)组。大鼠ip给予戊巴比妥钠40 mg/kg进行麻醉,然后上腹部中线切口,分离十二指肠^[1],用注射器直接将药物注射进十二指肠,接着注射37℃的超纯水4 ml,然后放回十二指肠,缝合腹部切口。微乳剂低、中、高剂量组大鼠肠道注射给药,假手术组、模型组和阳性对照组大鼠均肠道注射给予等体积生理盐水,阳性对照组大鼠缝合切口后ip给予胰岛素注射液。

2.3 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件对数据进行统计分析。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.4 血糖值检测

分别于给药前和给药后15、30、45、60、90、120、150、180、240、360、480、600 min时取各组大鼠尾静脉血,测定各时间点的血糖值。各组大鼠的血糖值见表1,血糖-时间曲线见图1。

表1 各组大鼠的血糖值($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$)

Tab 1 Blood glucose concentration of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$)

组别	不同时间点												
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	240 min	360 min	480 min	600 min
假手术组	6.0±0.6	6.4±0.5	6.7±0.7	6.8±0.5	6.6±0.5	6.6±0.7	6.2±0.7	6.2±0.5	5.6±0.6	6.1±0.6	5.4±0.5	5.2±0.5	5.0±0.5
模型组	16.4±2.8*	16.4±2.7*	16.8±5.1*	16.4±6.0*	14.3±3.9*	13.0±3.9*	11.7±3.5*	10.3±4.1*	9.1±3.3*	7.2±3.1*	5.2±1.5	3.4±0.6	3.5±0.4
阳性对照组	15.3±6.4	15.2±8.5	9.7±6.3 [#]	6.5±5.8 ^{##}	4.3±4.5 ^{###}	3.1±3.5 ^{###}	2.5±3.2 ^{###}	2.2±3.2 ^{###}	2.2±2.8 ^{###}	1.6±2.8 ^{###}	1.3±2.2 ^{###}	1.1±1.5 [#]	2.0±1.3
微乳剂低剂量组	16.3±3.2	16.6±6.5	15.2±3.5	14.0±4.3*	12.8±4.4*	10.0±4.5*	7.7±4.4 ^{##}	6.2±2.6 ^{##}	5.6±2.4*	5.2±1.9*	4.9±2.4*	3.6±0.8	3.4±0.8
微乳剂中剂量组	17.5±2.2	18.2±5.2	17.0±2.2	15.3±2.9*	13.6±1.7*	11.6±3.8*	8.3±2.3 ^{##}	5.8±2.1 ^{##}	3.8±1.8 ^{##}	3.3±2.2 ^{##}	3.5±1.6*	3.4±1.1	3.3±0.9
微乳剂高剂量组	17.1±6.6	17.5±4.8	16.4±4.5	15.0±4.3*	13.5±3.5*	10.0±3.4*	7.2±3.8 ^{##}	5.0±2.9 ^{##}	3.9±2.2 ^{##}	3.0±1.8 ^{##}	3.3±1.4*	3.2±1.9	3.2±0.9

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

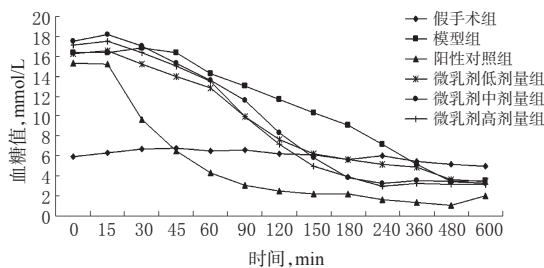


图1 各组大鼠血糖-时间曲线

Fig 1 Blood glucose concentration-time curve of rats in each group

由表1和图1结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠给药后0~240 min内的血糖值均增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);由于没有进食,模型组大鼠从给药后60 min开始血糖值逐渐平稳下降。与模型组比较,阳性对照组大鼠给药后30~480 min内的血糖值均减小,微乳剂低、中、高剂量组大鼠给药后45~360 min内的血糖值均减小,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。用梯形面积法计算各组大鼠的

AUC_{0-600 min},假手术组、模型组、阳性对照组和微乳剂低、中、高剂量组的结果依次为(3 435 ± 214)、(4 538 ± 475)、(1 568 ± 243)、(3 758 ± 513)、(3 459 ± 337)、(3 249 ± 322) mmol·min/L。与模型组比较,阳性对照组和微乳剂低、中、高剂量组大鼠的AUC_{0-600 min}均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.5 血糖水平评价

以给药前的血糖值为100%,各时间点的血糖值与给药前血糖值的比值乘以100%为该时间点的血糖水平。血糖水平>100%,表示血糖升高;血糖水平=100%,表示血糖不变;血糖水平<100%,表示血糖下降。比较不同时间点的血糖水平,2个相邻时间点的血糖值差值的绝对值越大,表示降血糖作用越强;并以其评价受试药的起效时间、降血糖的峰值及峰值时间。各组大鼠的血糖水平见表2。

由表2结果显示,与模型组比较,阳性对照组大鼠给药15 min后有降血糖趋势,降血糖峰值为36%,峰值时间为30 min;微乳剂低、中、高剂量组大鼠给药30 min后有降血糖趋势,降血糖峰值依次为18%、19%、21%,峰值时间为90~120 min。

表2 各组大鼠的血糖水平(%)

Tab 2 Blood glucose levels of rats in each group(%)

组别	不同时间点												
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	240 min	360 min	480 min	600 min
假手术组	100	107	112	113	110	110	103	100	93	102	90	87	83
模型组	100	100	102	100	87	79	71	63	55	44	32	21	21
阳性对照组	100	99	63	42	28	20	16	14	14	10	8.5	7.2	13
微乳剂低剂量组	100	102	93	86	79	61	47	38	34	32	30	22	21
微乳剂中剂量组	100	104	97	87	78	66	47	33	22	19	20	19	19
微乳剂高剂量组	100	102	96	88	79	58	42	29	23	18	19	19	19

2.6 糖耐量实验

取复制模型成功的大鼠,随机分成模型未给糖组、模型给糖组和微乳剂组,每组6只;另取6只正常大鼠作为正常对照组。按“2.2”项下方法给药,除微乳剂组大鼠给予胰岛素自微乳剂9 u/kg外,其余各组大鼠给予生理盐水。给药15 min后,除模型未给糖组外,其余各组大鼠均ip给予50%GS(2 g/kg)。分别于给药前和给药后15、30、45、60、90、120、150、180、240 min测定各组大鼠的血糖值。糖耐量实验各组大鼠的血糖-时间曲线见图2。

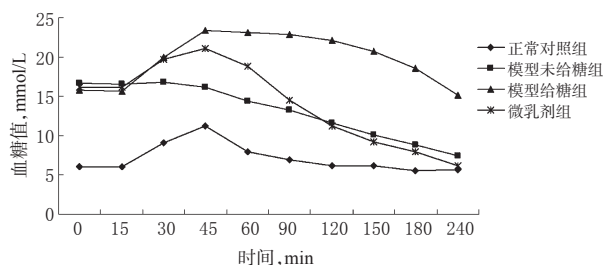


图2 糖耐量实验各组大鼠的血糖-时间曲线

Fig 2 Blood glucose concentration-time curve of rats in each group in glucose tolerance test

由图2结果显示,正常对照组大鼠ip给予5%GS后血糖快速升高,然后迅速下降,60 min后逐渐恢复正常;模型未给糖组大鼠血糖值缓慢下降,没有出现明显的血糖吸收峰;模型给糖组大鼠给药后45 min时达到最高的血糖值,并且维持较高血糖值一直到给药后180 min;微乳剂组大鼠给药后45 min时达到最高的血糖值,然后血糖值迅速降低,给药后240 min时血糖值已基本恢复正常。这说明胰岛素自微乳剂能明显降低1型糖尿病模型大鼠的血糖。

3 讨论

3.1 自微乳化药物给药系统的特点

自微乳化药物给药系统是由油相、乳化剂、助乳化剂按适宜的比例和处方量的药物混合液。该混合液进入胃肠道,在胃肠道的蠕动下,与体液自发形成微乳。当形成微乳后,一方面将蛋白质多肽类药物包裹于乳滴中,保护该类物质避免被消化道中的蛋白酶降解;另一方面,微乳巨大的比表面积提高了药物的溶解度,从而提高了难溶性蛋白质多肽类药物的生物利用度。微乳的粒径及乳化速率,是提高该类物质生物利用度的关键,而系统中的油相、乳化剂、助乳化剂的种类与比例的适宜性,对微乳的形成以及制剂的粒径和乳化速率起着决定性的作用,是制剂有效性的基础。

3.2 糖尿病大鼠模型的选用

糖尿病大鼠模型有1型模型和2型模型;2型模型大鼠的胰岛只部分被破坏,体内尚能分泌一定量的胰岛素;1型模型大鼠的胰岛完全破坏,体内不能分泌胰岛素。为避免内源性胰岛素的干扰,本实验选用1型糖尿病模型大鼠为实验对象。

3.3 胰岛素的吸收与血糖水平的关系

体内胰岛素的量与血糖水平呈负性关系、与降血糖幅度呈正性关系,故血糖水平的高低、降血糖作用的强弱直接反映了大鼠体内胰岛素量的多少。血糖水平越低,降血糖作用越强,大鼠体内胰岛素的量也越多,说明本制剂中胰岛素经肠道吸收的量越多。从实验结果可以看到,胰岛素自微乳剂给药后45 min开始有降血糖作用,达峰时间为90~120 min,降血糖作用维持了约300 min。

本实验表明,在1型糖尿病模型大鼠体内,本制剂经十二指肠给药后,能吸收入血循环,有效地降血糖。这对胰岛素口服肠道靶向制剂的进一步研究及自微乳化药物给药系统的开发有重要意义。

参考文献

- [1] Watnasirichaikul S, Rades T, Tucker IG, et al. In-vitro release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2002, doi: 10.1211/0022357021778736.
- [2] 吴正红, 平其能, 宋赟梅, 等. 壳聚糖和壳聚糖EDTA接合物双层包覆胰岛素口服纳米脂质体的研究[J]. *药学学报*, 2004, 39(11): 933.
- [3] 祁荣, 平其能, 徐瑞阳, 等. 酪蛋白和鱼精蛋白对胰岛素酶降解和口服降血糖作用的影响[J]. *药学学报*, 2004, 39(10): 844.
- [4] Mesiha MS, Sidhom MB, Fasipe B. Oral and subcutaneous absorption of insulin poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2005, 288(2): 289.
- [5] Li CL, Deng YJ. Oil-based formulations for oral delivery of insulin[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(9): 1101.
- [6] Hosny EA, Al-shora HI, Elmazar MM. Oral delivery of insulin from enteric-coated capsules containing sodium salicylate: effect on relative hypoglycemia of diabetic beagle dogs[J]. *Int J Pharm*, 2002, 237(1/2): 71.
- [7] 金方. 胰岛素口服自微乳化给药系统的研究[D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2004.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-05-20)

(编辑:邹丽娟)