

新型国产重组甘精胰岛素对1型糖尿病模型大鼠的降糖作用研究

魏滋鸿¹, 李薇¹, 武卫党¹, 李亚卓¹, 曾勇¹, 高晶¹, 司端运¹, 朱虹², 路江杰², 伊秀林^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300301

2. 合肥天麦生物科技发展有限公司, 安徽 合肥 230601

摘要: **目的** 探讨新型国产重组甘精胰岛素注射液对1型糖尿病模型大鼠的降糖作用。**方法** 选择健康SD大鼠和链脲佐菌素诱导的1型糖尿病大鼠, 甘精胰岛素注射液(来得时)为阳性对照药, 健康SD大鼠单次sc 2、4 IU/kg剂量的重组甘精胰岛素注射液, 大鼠尾静脉采血, 分别测定0 h(给药前)及给药后1、2、4、6、8 h空腹血糖; 1型糖尿病模型大鼠连续5 d sc 4、8 IU/kg剂量的重组甘精胰岛素注射液, 每天分别测定给药前(0 h)和给药后(4 h)空腹血糖, 给药第1、5天测定给药后1、2、4、6、8 h空腹血糖。**结果** 健康大鼠sc重组甘精胰岛素注射液2、4 IU/kg后, 血糖值在2 h下降到最低, 与对照组比较差异显著($P < 0.01$); 模型大鼠连续5 d sc 4、8 IU/kg重组甘精胰岛素注射液, 血糖于给药后4~6 h下降至最低点, 与模型组比较差异显著($P < 0.01$); 每天给药4 h后血糖均呈平稳下降趋势, 与模型组比较差异显著($P < 0.01$), 8 IU/kg血糖值与对照组接近。**结论** 国产重组甘精胰岛素注射液对1型糖尿病模型大鼠有较好的降糖效果, 与同剂量阳性药降糖效果相当。

关键词: 1型糖尿病; 重组甘精胰岛素注射液; 链脲佐菌素; 血糖

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)08-1446-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.015

Study on hypoglycemic effect of novel domestic recombinant insulin glargine injection on diabetic model rats

WEI Zihong¹, LI Wei¹, WU Weidang¹, LI Yazhuo¹, ZENG Yong¹, GAO Jing¹, SI Duanyun¹, ZHU Hong², LU Jiangjie², YI Xiulin¹

1. State Key Laboratory of Drug Release Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Research Co. Ltd., Tianjin 300301, China

2. Tianmai Biological Technology Development Co., Ltd., Hefei 230601, China

Abstract: **Objective** To explore the hypoglycemic effect of novel domestic recombinant insulin glargine injection on type 1 diabetic model rats. **Methods** Healthy SD rats and type I diabetic model rats induced by streptozotocin were used as model animals. The insulin glargine injection (Lantus) were used as the positive control drug. Healthy SD rats were sc injected with recombinant insulin glargine injection at two doses of 2 and 4 IU/kg for one time. Blood samples were taken from the tail vein of rats, the blood glucose values of 0 h and 1, 2, 4, 6, and 8 h were determined after administration. Type 1 diabetic model rats were sc injected with recombinant insulin glargine injection at two doses of 4 and 8 IU/kg for 5 d. Fasting blood glucose was measured daily before and after administration (4 h). Fasting blood glucose was measured at 1, 2, 4, 6, and 8 h after administration for days 1 and 5. **Results** After injected with 2 and 4 IU/kg, the blood glucose level was the lowest level in 2 h, which was significantly different compared with control group ($P < 0.01$). After sc injection of recombinant insulin glargine injection at two dose of 4 and 8 IU/kg in the model rats, the blood sugar decreased to the lowest point after 4 — 6 h, which was significantly different compared with model group ($P < 0.01$), and the blood glucose decreased steadily 4 h after administration per day, and was significantly different from the model group ($P < 0.01$), and the blood sugar of 8 IU/kg group was close to control group. **Conclusion** The domestic recombinant insulin glargine injection have good effect on hypoglycemic in rats with type 1 diabetes.

Keywords: type 1 diabetes; recombinant insulin glargine injection; streptozotocin; blood glucose

收稿日期: 2018-04-18

第一作者: 魏滋鸿(1988—), 研究实习生。Tel: (022)84845243 E-mail: weizh@tjipr.com

*通信作者: 伊秀林, 研究员。Tel: (022)84845242 E-mail: yixl@tjipr.com

随着人口老龄化及肥胖的增加,糖尿病的发病率也在逐年升高,据预测到2030年,糖尿病患者将增至4.39亿^[1]。全社会在糖尿病的研究上投入了巨大的人力和财力,特别是1型糖尿病患者,有研究表明,1型糖尿病患者血糖控制不佳相关死亡风险会增加8~10倍^[2]。胰岛素是机体内最主要的降血糖激素,可以促进糖原、脂肪、蛋白质等的合成,作为糖尿病首选治疗药物的外源性胰岛素不仅疗效显著,而且可以有效地避免患者出现药物依赖等不良反应^[3]。重组甘精胰岛素是利用现代生物学DNA重组技术,通过生物发酵人工合成的一种与人胰岛素具有相似降糖活性的长效胰岛素类似物^[4]。本研究采用链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠1型糖尿病模型,探讨新型国产甘精胰岛素注射液的降血糖药效,并与上市药品甘精胰岛素注射液(来得时)进行比较,为国产甘精胰岛素注射液的进一步临床前研究提供参考。

1 材料

1.1 主要试剂

重组甘精胰岛素注射液,无色澄明液体,规格300 IU: 3mL/支,批号E201508001,2~8℃保存;重组甘精胰岛素注射液溶媒对照,规格3 mL/支,批号TE1Y150505,2~8℃保存,合肥天麦生物科技发展有限公司生产。来得时甘精胰岛素注射液,规格300 IU/3mL,分装批号5B037A, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Germany生产,赛诺菲(北京)制药有限公司分装。STZ,批号S8050; 0.1 mol/L柠檬酸钠缓冲液,批号20150520,均为Solarbio公司产品。

1.2 实验动物及饲养

SD大鼠120只,SPF级,体质量180~200 g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2012-0001。屏障环境饲养:温度为20~26℃,相对湿度为40%~70%,昼夜明暗交替,动物自由饮水。

1.3 主要仪器

ACCU-CHEK Performa血糖仪,ACCU-CHEK Performa血糖试条,批号473428,均为德国罗氏公司产品;葡萄糖/乳酸分析仪及配套诊断试剂(型号Biosen C-Line Clinic/GP+),德国EKF诊断公司;电子天平,BS124S,北京赛多利斯仪器系统有限公司产品。

2 方法

2.1 对健康大鼠血糖影响

选用健康SD大鼠40只,根据体质量随机分为4组,分别为对照组、甘精胰岛素注射液(阳性对照,2 IU/kg)组,重组甘精胰岛素注射液2、4 IU/kg(剂量设定参照阳性对照药的临床用药剂量,选择不出现动物死亡的剂量为最高剂量)组,每组10只。大鼠禁食6 h后测定各组给药前(0 h)血糖,给药组按上述剂量单次sc相应药物,对照组sc等体积的溶媒对照液,体积均为1 μL/g。分别于给药后1、2、4、6、8 h尾静脉采血测定空腹血糖。

2.2 对1型糖尿病模型大鼠血糖影响

2.2.1 1型糖尿病大鼠模型的建立 选用健康SD大鼠80只,过夜禁食后以65 mg/kg剂量ip STZ造模,分别于造模后3、7 d尾静脉采血测定空腹血糖值,观察造模状况。血糖水平>16.8 mmol/L且持续5 d以上的大鼠即认为1型糖尿病模型建立成功。

2.2.2 分组及给药 注射STZ造模后,连续2次尾尖部静脉针刺采血测定空腹血糖值,选择2次血糖平均值在18.0~30.0 mmol/L的模型大鼠40只。模型大鼠根据血糖随机分成4组,分别为模型组、甘精胰岛素注射液(4 IU/kg)组、重组甘精胰岛素注射液4、8 IU/kg组,另选取10只健康大鼠为对照组。

大鼠禁食6 h后,给药组按上述剂量sc相应药物,对照组sc等体积的溶媒对照液,连续5 d。每天分别测定给药前(0 h)和给药后(4 h)空腹血糖。给药第1、5天测定给药后1、2、4、6、8 h空腹血糖,计算相对血糖值。

相对血糖值=给药后血糖/给药前血糖

2.3 统计学分析

数据均采用SPSS 17.0进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异分析采用 t 检验。

3 结果

3.1 对健康大鼠血糖的影响

如表1所示,健康大鼠sc给药后,各组均在给药后2 h血糖下降至最低点,与对照组比较均差异显著($P < 0.01$);重组甘精胰岛素注射液2 IU/kg剂量给药2 h后与同等剂量的阳性对照组血糖值基本相当,4 IU/kg剂量于给药后4和6 h血糖值明显低于阳性对照组($P < 0.05$),2、4 IU/kg剂量给药后的血糖分别下降了75.11%和80.43%。

表1 健康大鼠单次 sc 重组甘精胰岛素注射液后的血糖变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Changes of blood glucose after a single sc injection of recombinant insulin glargine injection in healthy rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (IU·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)					
		0 h	给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 4 h	给药后 6 h	给药后 8 h
对照	—	5.67±0.65	5.59±0.70	5.75±0.89	5.53±0.83	5.62±0.79	5.88±0.68
甘精胰岛素注射液	2	5.99±1.16	2.03±0.47**	1.53±0.23**	2.59±1.63**	5.02±2.39	6.38±1.33
重组甘精胰岛素注射液	2	5.53±0.63	2.97±0.75**	1.38±0.29**	3.04±1.44**	4.58±1.06	6.48±1.39
	4	5.37±0.78	2.34±0.67**	1.05±0.44**	1.27±0.23***	2.59±1.55***	5.29±1.93

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与甘精胰岛素注射液组比较: # $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs glargine injection group

3.2 对 I 型糖尿病模型大鼠血糖的影响

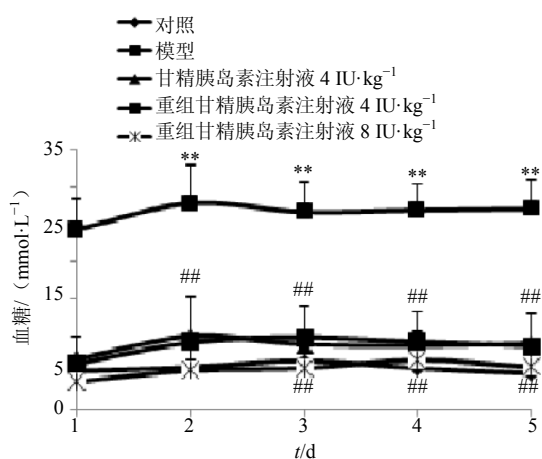
如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组血糖值显著升高 ($P<0.01$); 各给药组每天给药 4 h 后血糖

均呈平稳下降趋势, 与模型组比较差异显著 ($P<0.01$), 重组甘精胰岛素注射液 8 IU/kg 血糖值与对照组接近。

如表 2、3 所示, 给药第 1、5 天, 随着禁食时间的延长, 各组大鼠血糖均呈降低趋势, I 型糖尿病模型大鼠 sc 重组甘精胰岛素注射液 4、8 IU/kg 后, 于 4~6 h 血糖下降至最低点, 相对血糖值与模型组比较差异显著 ($P<0.01$); 阳性对照药 4 IU/kg 剂量组在给药的第 1、5 天均显示出良好的降糖效果, 分别下降至 20.60%、21.97%, 同剂量的重组甘精胰岛素注射液各时间点降血糖效果与阳性对照药基本相当, 没有统计学差异。

4 讨论

现如今非传染性慢性疾病已成为全球死亡和疾病负担的主要病因, 而糖尿病作为主要的疾病之一, 患病率呈现快速增长的趋势^[5]。糖尿病是一种以持续性高血糖为特征的内分泌障碍疾病^[6], I 型糖尿病又被称作胰岛素依赖型糖尿病, 表现为胰岛细胞破坏导致胰岛素绝对缺乏, 有些会同时表现出胰岛素抵抗^[7]。

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ### $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group; *** $P<0.01$ vs model group图1 模型大鼠连续 5 d sc 重组甘精胰岛素注射液血糖的变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 1 Changes of blood glucose in model rats after 5 d of sc recombinant insulin glargine injection ($\bar{x} \pm s, n=10$)表2 给药第 1 天大鼠相对血糖值 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Relative blood glucose on day 1 of administration of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (IU·kg ⁻¹)	相对血糖值/%					
		给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 4 h	给药后 6 h	给药后 8 h	
对照	—	95.51±24.08	85.09±6.59	78.30±17.15	57.43±31.59	46.13±29.15	
模型	—	94.05±17.07	86.56±21.46	71.60±27.53	59.10±14.63	58.39±12.46	
阳性对照	4	65.97±19.72	34.63±26.98*	25.21±15.91*	24.39±19.31*	20.60±8.62*	
重组甘精胰	4	61.15±18.03	24.58±6.24*	22.59±10.64**	18.81±7.79**	19.62±7.58**	
岛素注射液	8	58.42±20.00	30.25±14.24*	13.89±7.22**	16.07±4.69**	17.42±5.72**	

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

表3 给药第5天大鼠相对血糖值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Relative blood glucose on day 5 of administration of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (IU·kg ⁻¹)	相对血糖值/%				
		给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 4 h	给药后 6 h	给药后 8 h
对照	—	99.38±23.75	92.38±26.52	85.25±15.95	86.88±5.99	51.74±7.61
模型	—	97.08±19.69	91.25±18.75	76.14±16.73	77.33±11.76	61.24±10.31
阳性对照	4	72.37±16.24	42.63±15.12*	23.25±19.59*	38.83±21.30*	21.97±23.36*
重组甘精胰	4	66.30±21.87	35.27±15.65*	18.74±5.70**	17.38±6.86**	21.83±11.31**
胰岛素注射液	8	52.35±16.66	31.25±17.26*	17.35±8.80**	15.13±5.72**	16.24±7.01**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

STZ 的纯品为结晶粉状物,其溶液制剂不稳定^[8],因此本实验在造模前,先将枸橼酸三钠-枸橼酸缓冲液置冰箱预冷后在临用前配制,配制好后立即使用,保证 STZ 的稳定性^[9]。

胰岛素是机体内唯一可以降低血糖浓度的激素,因此对于糖尿病患者补充外源性的胰岛素是最有效的控制血糖的方法,在糖尿病的治疗中处于不可取代的地位。外源性的胰岛素主要应用于 1 型糖尿病患者和用饮食、药物治疗无效的 2 型糖尿病患者。重组甘精胰岛素注射液为国内生产的第三代长效胰岛素,属于生物技术药物^[9]。此类药物注射到皮下组织后,可形成微沉淀物^[10]。

重组甘精胰岛素注射液作为一种新型长效胰岛素制剂,可与短效胰岛素或速效胰岛素联合达到长时间控制血糖的目的。本实验针对一种新型国产重组甘精胰岛素注射液研究其对健康 SD 大鼠和 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠的降血糖作用。选用健康 SD 大鼠,给予 2、4 IU/kg 两个剂量的重组甘精胰岛素注射液,结果显示,两个剂量组的血糖均在 2 h 下降到最低点,分别为 (1.38±0.29) mmol/L 和 (1.05±0.44) mmol/L; 4 IU/kg 剂量组在 4~6 h 期间的血糖值仅为 1.27~2.59 mmol/L,表现出来良好的降血糖效果。选用 1 型糖尿病模型大鼠,分别给予 4、8 IU/kg 两个剂量的重组甘精胰岛素注射液,甘精胰岛素注射液作为阳性对照,结果显示,两剂量组血糖维持稳定,且呈剂量相关性,8 IU/kg 组血糖接近对照组,作用较显著; 4 IU/kg 组与给药前血糖值比较下降到 20%,与 4 IU/kg 阳性对照药效相当。

本研究 sc 给予大鼠重组甘精胰岛素注射液后,考察血糖值的变化,国产重组甘精胰岛素注射液和上市药品来得时甘精胰岛素注射液比较具有相似的

治疗效果,能够较长时间维持血糖平稳,为国产重组甘精胰岛素注射液的进一步开发提供了依据。

参考文献

- [1] 徐 华,何 毅,张鸣号,等. 1 型糖尿病大鼠模型的建立及糖尿病并发症相关指标的测定 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(1): 90-92.
- [2] 黄 琛,顾志峰,曹晓蕾,等. 1 型糖尿病大鼠模型建立及稳定性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(3): 49-51.
- [3] 黎克江,雷永红,刘新华. 甘精胰岛素联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病的疗效 [J]. 江苏医药, 2014, 40(2): 183-185.
- [4] 李 岩,秦 超,武 鑫,等. 甘精胰岛素注射液对大鼠的免疫原性/毒性研究 [J]. 毒理学杂志, 2016, (2): 127-131.
- [5] 苏力担卡扎·仇曼,何铁英,林 海,等. 链脲佐菌素建立 1 型糖尿病大鼠模型的最优剂量研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2016, (1): 84-85.
- [6] Ji E S, Ko I G, Cho J W, et al. Treadmill exercise inhibits apoptotic neuronal cell death with suppressed vascular endothelial growth factor expression in the retinas of the diabetic rats [J]. J Exerc Rehabil, 2013, 9(3): 348.
- [7] 于海英,孙中华,崔俊生,等. 胰岛新生实验研究中 1 型糖尿病大鼠模型的构建 [J]. 医学信息: 中旬刊, 2011, 24(7): 3118.
- [8] Khathi A, Serumula M R, Myburg R B, et al. Effects of syzygium aromaticum-derived triterpenes on postprandial blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats following carbohydrate challenge [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81632.
- [9] 张巨彪,苏秀兰,欧阳晓晖,等. 1 型糖尿病大鼠模型的建立及观察 [J]. 医学综述, 2013, 19(2): 41-46.
- [10] 曾敏莉. 重组甘精胰岛素药效学和药代动力学研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2005.