

新型糖苷类衍生物降糖作用筛选和研究

王小彦^{1,2}, 王玉丽¹, 陈 娇³, 赵桂龙¹, 徐为人^{1*}, 汤立达¹

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193

3. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070

摘要: 目的 针对钠-葡萄糖协同转运蛋白抑制剂(SGLT)靶点, 通过尿糖检测方法筛选和评价糖苷类衍生物的降糖作用。方法 SD大鼠分别单次ig给予8个新型糖苷类衍生物30 mg/kg, 在不同时段收集大鼠的尿液, 己糖激酶法测定葡萄糖的量; 尾静脉取血, 血糖仪测血糖水平; 同时对活性化合物进行大鼠糖耐量实验。结果 新型糖苷类衍生物中N-糖苷类化合物TY702-1N和S-糖苷类化合物TY702-1S对大鼠ig葡萄糖水溶液后的排糖作用较弱, C-糖苷类化合物TY702-4C的排糖作用较强, 且显示剂量相关性。结论 就开发和研制作用强、药动学性质好的降糖药物而言, 新型糖苷类衍生物TY702-4C是一个具有较好前景的先导化合物。

关键词: 糖苷类衍生物; 降糖作用; 钠-葡萄糖协同转运蛋白抑制剂; 尿糖; 血糖; 糖耐量

中图分类号: R965.1; R977.15 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)04-0454-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.016

Screening and research on hypoglycemic effects of novel glycoside derivatives

WANG Xiao-yan^{1,2}, WANG Yu-li¹, CHEN Jiao³, ZHAO Gui-long¹, XU Wei-ren¹, TANG Li-da¹

1. Tianjin Key Laboratory of Drug Design and Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Graduate College, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Department of Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective Aiming at the target point of sodium-glucose transport protein (SGLT) inhibitors, to screen and estimate the hypoglycemic effects of novel glycoside derivatives by urine glucose testing methods. **Methods** SD rats were ig administered with eight novel glycoside derivatives (30 mg/kg); The urine of rats was collected and the content of glucose was measured by hexokinase method in various periods. Also, the blood samples were obtained from tail vein of rats, the blood glucose was measured using blood glucose meter, and the glucose tolerance test of the active compounds was carried out. **Results** In novel glycoside derivatives, N-glycoside TY702-1N and S-glycoside TY702-1S had less hypoglycemic effect, C-glycoside TY702-4C had more obvious effect of excreting glucose, and it has a dose-dependent manner in blood glucose and urine glucose. **Conclusion** TY702-4C is a lead compound with good prospect in the research and development of new drug with more efficient and better pharmacokinetic characteristics.

Key words: glycosidic derivative; hypoglycemic effect; sodium-glucose transport protein inhibitor; urine glucose; blood glucose; glucose tolerance

根皮苷(phlorizin)是从苹果 *Malus pumila* Mill. 根皮中分离出来的糖苷, 在动物实验中显示明显的降血糖作用, 分子生物学研究表明其是钠-葡萄糖协同转运蛋白(SGLT)抑制剂^[1-2]。根皮苷的发现和 研究带动了一个新的降血糖机制发展^[3-6], 目前已有

一批糖苷类衍生物(如 dapagliflozin)作为 SGLT2 靶点的抑制剂处于临床研究中。本实验参考根皮苷和其他先导化合物合成出一批糖苷类衍生物, 以尿排糖法进行筛选降血糖作用^[7], 得到了活性较好的化合物, 为糖苷类衍生物的进一步研发奠定基础。

收稿日期: 2012-04-15

基金项目: 国家重大新药创制专项(2011ZX09401-009); 国家重大创制专项(2011ZX9401-009); 天津市科技支撑计划重点项目(10ZCKFSH01300)

作者简介: 王小彦, 硕士研究生。Tel: (022)23006862 E-mail: wxy054321@163.com

王玉丽, 助理研究员。Tel: (022)23006815 E-mail: wangyl8@tjipr.com

*通信作者 徐为人, 研究员。Tel: (022)23006862 E-mail: xuwr@tjipr.com

1 材料

1.1 试药与试剂

C-糖苷类化合物 TY702-1C (质量分数 98.5%, 批号 20100220)、TY702-2C (质量分数 99.3%, 批号 20100315)、TY702-3C (质量分数 98.7%, 批号 20100506)、TY702-4C (质量分数 99.1%, 批号 20100305)、TY702-5C (质量分数 99.0%, 批号 20100108)、TY702-6C (质量分数 99.2%, 批号 20100415), N-糖苷类化合物 TY702-1N (质量分数 98.9%, 批号 20100226), S-糖苷类化合物 TY702-1S (质量分数 98.6%, 批号 20100119), 阳性对照药 dapagliflozin (质量分数 98.9%, 批号 20091230), 均由天津药物研究院药物创新研究中心合成, 结构见图 1。葡萄糖, 天津市化学试剂一厂; 己糖激酶(KH) 法葡萄糖试剂盒, 中生生物科技股份有限公司。

1.2 仪器

ET-1 型易立测血糖/尿酸双功能测试仪, 聿新生物科技股份有限公司; SpectraMax M5/M5e 型微

孔板检测系统 (酶标仪)。

1.3 动物

SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 180~200 g, 天津市山川红实验动物科技有限公司提供, 许可证号: SCXK (津) 2010-0001。

2 方法

2.1 降糖活性化合物筛选

2.1.1 分组与给药 化合物分两次进行筛选, 每次实验均设对照组, 糖负荷模型组 (简称模型组), 化合物 TY702-1C、TY702-2C、TY702-3C、TY702-4C、TY702-5C、TY702-6C、TY702-1N、TY702-1S 8 个给药组, dapagliflozin 阳性对照组, 每组 8 只。各组大鼠分别 ig 给予相应化合物 30 mg/kg (均用 1% 羧甲基纤维素钠配制) 1 次, 给药体积为 10 mL/kg, 模型组给予相同体积的溶剂, 对照组不做任何处理。

2.1.2 血糖与尿糖检测 除对照组外, 其余各组大鼠于给药后 0.5 h ig 葡萄糖 (3 g/kg) 水溶液 10 mL/kg, 于给药前和给糖后 0.5、1、2、5 h 尾静脉

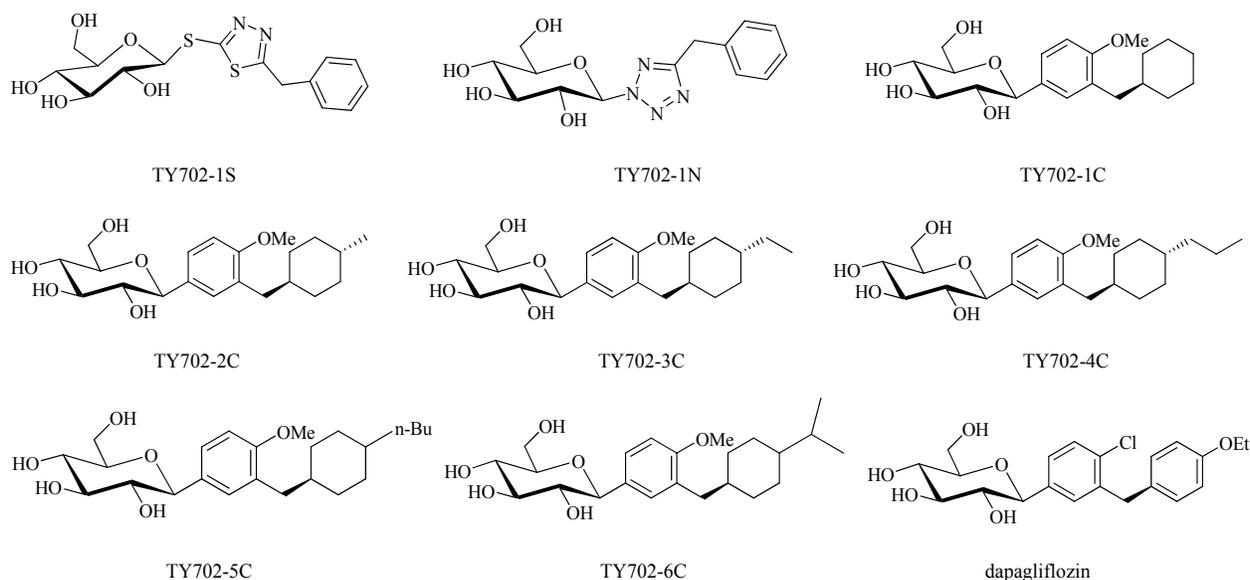


图 1 新型糖苷类衍生物的结构

Fig. 1 Structures of novel glycoside derivatives

取血, 血糖仪测定血糖水平; 以糖负荷后各时间点的血糖值减去糖负荷前血糖值得血糖增加值, 计算血糖增加值-时间的曲线下面积 (AUC); 于给药后 0~4、4~8 h 收集尿液 (并于 4 h 每只大鼠 ig 5 mL 水), 测尿样体积并稀释到适当浓度, 按 KH 试剂盒说明测定尿中葡萄糖的量, 计算尿排糖量^[8]。

2.2 降糖活性评价

2.2.1 分组与给药 对筛选出的使尿糖排泄量最高的化合物 TY702-4C 进行降糖活性评价。实验设糖负荷组 (简称模型组), dapagliflozin (30 mg/kg) 阳性对照组, TY702-4C 高、中、低剂量 (90、30、10 mg/kg) 组, 各组大鼠于 ig 给药 1 次后 0.5 h ig 葡萄糖 (3 g/kg) 水溶液 10 mL/kg。

2.2.2 血糖与尿糖检测 在给药前和给糖后 0.5、1、2、5 h 尾静脉取血，血糖仪测定血糖水平；同时收集 0~4、4~8、8~24 h 时间段尿液（4、8 h 收集尿量后每只大鼠 ig 5 mL 水），测定尿量和尿排糖量。

2.3 统计方法

采用 SPSS 11.5 统计软件包对数据进行处理，数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，血糖和尿排糖量用方差分析方法统计，尿量为非正态分布数据用非参数方法。

3 结果

3.1 降糖活性化合物筛选

模型组大鼠在糖负荷后 0~4、4~8 h 时间段的尿排糖量分别约 17.5、22.0 mg/kg，而 dapagliflozin 组在这 2 个时间段的排糖量均约给糖量的 25%，与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)，表明实验方法可行。不同糖苷类结构的筛选结果对比发现：大鼠糖负荷后尿排糖量由大到小依次为 TY702-1C 组 > TY702-1S 组 > TY702-1N 组，而 TY702-1C 经结构修饰后药效活性均有所提高，活性强度由弱渐强依次为 TY702-1C < TY702-2C < TY702-6C < TY702-3C < TY702-5C < TY702-4C，其中 TY702-4C 使大鼠的尿排糖量最多，2 个时间段的排糖量分别为给糖量的 11.5%、13.3%，但约为 dapagliflozin 组大鼠排糖量的 50%。而从尿量来看，dapagliflozin 组大鼠的尿量显著增加，在 2 个时间段的尿量均超过模型组大鼠的 1 倍以上；TY702-4C、TY702-5C、

TY702-3C、TY702-6C、TY702-2C 等衍生物组大鼠尿量增加均较少。由图 2 可见，糖负荷后，对照组大鼠血糖几乎没有变化，而模型组血糖增加的 AUC 平均升至 7.45 mmol·h·L⁻¹；dapagliflozin 可抑制大鼠血糖升高，使 AUC 降低至 2 mmol·h·L⁻¹；其他的 C-糖苷类化合物使 AUC 升高 3~5 mmol·h·L⁻¹，TY702-4C、TY702-5C、TY702-3C、TY702-6C 等化合物对血糖升高的抑制率分别为 81.2%、53.1%、49.0%、43.6%，显示较强的降血糖作用，降血糖趋势与尿糖排泄量趋势相一致。结果见表 1。

3.2 TY702-4C 降糖作用

根据尿排糖量和血糖增加曲线，选取降糖活性强的 TY702-4C 进一步评价其体内降糖作用。模型组大鼠 ig 葡萄糖后，血糖升高明显，至 0.5 h 血糖

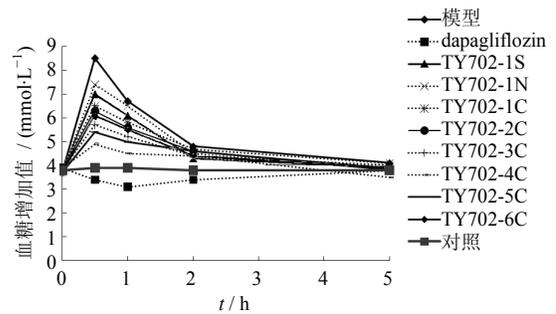


图 2 糖苷类衍生物对大鼠糖耐量的影响
Fig. 2 Effects of glycoside derivatives on glucose tolerance of rats

表 1 糖苷类衍生物对糖负荷大鼠尿排糖量、尿量及血糖增加值 AUC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 1 Effects of glycoside derivatives on AUC values of urinary sugar, urine volume, and blood glucose increase ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	尿排糖量 / (mg·kg ⁻¹)		尿量 / (mL·kg ⁻¹)		血糖增加值 AUC 0~5 h / (mmol·h·L ⁻¹)
		0~4 h	4~8 h	0~4 h	4~8 h	
对照	—	12.0 ± 1.6	20.0 ± 2.3	5.0 ± 0.3	15.0 ± 0.4	0.1 ± 0.0
模型	—	17.5 ± 2.1	22.0 ± 2.6	5.5 ± 0.4	14.0 ± 0.6	7.5 ± 3.6
dapagliflozin	30	778.0 ± 48.6**	765.0 ± 40.8**	13.0 ± 0.9*	31.0 ± 1.1*	-2.0 ± 2.8**
TY702-1S	30	129.5 ± 9.8*	218.0 ± 11.6**	13.5 ± 0.6*	15.0 ± 0.9	4.5 ± 6.7
TY702-1N	30	39.0 ± 4.2	204.5 ± 3.9**	8.0 ± 0.2	15.5 ± 0.9	5.8 ± 5.5
TY702-1C	30	193.0 ± 12.8**	233.5 ± 13.6**	11.0 ± 0.5*	17.5 ± 0.8	4.6 ± 3.2
TY702-2C	30	208.0 ± 15.4**	274.5 ± 15.1**	8.5 ± 0.4	16.0 ± 0.5	4.4 ± 3.9
TY702-3C	30	276.0 ± 12.9**	313.0 ± 24.4**	9.5 ± 0.3	19.0 ± 0.6*	3.5 ± 1.0*
TY702-4C	30	364.0 ± 13.9**	421.5 ± 23.7**	10.0 ± 0.4	20.5 ± 0.8*	1.4 ± 1.4**
TY702-5C	30	303.0 ± 14.4**	344.0 ± 21.4**	10.5 ± 0.3	20.0 ± 0.7*	3.8 ± 3.1*
TY702-6C	30	252.5 ± 22.7*	335.5 ± 31.7*	10.0 ± 0.6*	17.0 ± 0.5	4.2 ± 2.7*

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

升高了 4.5 mmol/L, 5 h 后恢复至正常水平; dapagliflozin 组大鼠糖负荷后各个监测时间点的血糖几乎无变化, 表明其能快速控制血糖的升高, 降血糖作用明显。TY702-4C 组的降血糖作用随着剂量增加而增强, 呈明显的剂量相关性, 在糖负荷 0.5~1 h 时, 血糖增加值与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 3。

尿排糖量实验结果显示, 模型组大鼠在糖负荷后尿排糖量很小, dapagliflozin 组在 0~4、4~8、8~24 h 尿排糖量分别是给糖量的 22.4%、21.6%、49.4%, 总排糖量约为给糖量的 93%, 与模型组相比差异显著 ($P < 0.01$)。TY702-4C 剂量相关地增加尿排糖量, 排糖主要集中在 0~8 h, 8~24 h 时段排糖量较少, 各剂量在 0~4 h 与 4~8 h 排糖量相差不大, 降尿糖作用比较缓和, 且与其降血糖作用趋势相应, 排糖速率几乎无变化。结果见表 2。

与模型组相比, dapagliflozin 组大鼠在 0~8 h 尿量明显增加, 8~24 h 尿量增加多于 0~8 h, 与该组

尿糖排出量相应。对 0~8 h 尿量影响: TY702-4C 剂量为 10、30 mg/kg 时作用较小, 而在 90 mg/kg 时作用明显 ($P < 0.05$); 对 8~24 h 尿量影响: TY702-4C 剂量为 10、30、90 mg/kg, 使尿量增加 ≥ 1 倍 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

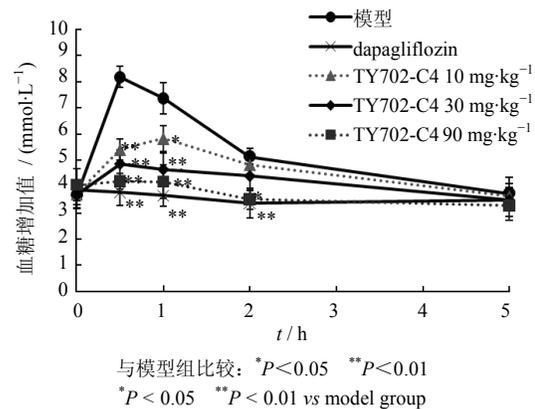


图 3 TY702-4C 对大鼠糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effects of TY702-4C on glucose tolerance of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 2 TY702-4C 对糖负荷大鼠尿排糖量和尿量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of TY702-4C on excretion of urine glucose and urine volume in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	尿排糖量 / (mg·kg ⁻¹)			尿量 / (mL·kg ⁻¹)		
		0~4 h	4~8 h	8~24 h	0~4 h	4~8 h	8~24 h
模型	—	20.5 ± 2.0	16.0 ± 2.2	1.4 ± 1.3	9.0 ± 1.1	19.0 ± 1.0	29.0 ± 1.2
dapagliflozin	30	673.0 ± 40.6**	647.5 ± 46.3**	1 482.0 ± 51.9**	19.0 ± 0.9**	28.0 ± 1.1**	102.0 ± 7.2**
TY702-4C	10	269.0 ± 17.6**	217.0 ± 22.2**	81.0 ± 3.3	9.0 ± 0.7	19.5 ± 0.9	58.0 ± 3.4**
	30	351.5 ± 13.4**	403.0 ± 30.0**	126.0 ± 9.3**	12.5 ± 0.6	21.5 ± 1.7	89.5 ± 5.3**
	90	551.5 ± 30.8**	593.5 ± 34.0**	706.5 ± 67.9**	17.5 ± 1.0*	23.0 ± 0.7*	89.0 ± 7.3**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

与补充和诱导胰岛素分泌、改善胰岛素抵抗、促进葡萄糖利用等的传统治疗糖尿病药物的机制不同, SGLT2 抑制剂是通过抑制葡萄糖在肾脏近曲小管的重吸收而排出体内多余葡萄糖, 从而达到控制血糖的目的。SGLT2 是治疗糖尿病的一个新靶点, 其独特的降糖机制决定了尿排糖量更能客观、直接地反映药效, 有些研究即采用尿排糖量作为筛选 SGLT2 抑制剂类降糖药的指标^[9-10]。本实验采用大鼠糖负荷后的血糖和尿糖 2 个指标评价新型糖苷类化合物的降糖活性, 以 dapagliflozin (30 mg/kg, 约为最大尿排糖量的效应剂量^[9, 11]) 为阳性对照药。大鼠在给予 dapagliflozin 5 h 后, 血糖完全恢复正

常, 且在 5 h 内血糖增加 AUC 与尿排糖量完全相关, 但在血糖恢复正常后其尿排糖作用还将维持一段时间, 因此阳性药排糖持续到 24 h。

TY702-4C 的降糖活性评价实验结果显示, 该化合物在 10、30 mg/kg 时, 使大鼠尿糖排泄主要集中在 0~8 h, 在 8~24 h 排出量约为糖负荷的 3%, 作用微弱; 剂量为 90 mg/kg 时, 在 0~4、4~8、8~24 h 时的排糖速度分别为 138.0、148.5、44.0 mg·h⁻¹·kg⁻¹, dapagliflozin 在 30 mg/kg 时, 大鼠 0~4、4~8、8~24 h 的排糖速度分别为 173.0、162.0、92.5 mg·h⁻¹·kg⁻¹。鉴于 SGLT2 是调节葡萄糖从原尿中回收的主要靶点, 因此抑制 SGLT2 可以降低肾排糖阈, 这不仅降低高血糖时相的排糖量, 对正常血

糖时相亦具有排糖作用,提示作用时间太长的药物可能存在低血糖风险、引起尿道感染等不良反应。根据 TY702-4C 的药效作用缓和,时间较短的特点,可以将其开发为针对餐后高血糖时相的药物。

本研究主要考察了 C-芳基、S-糖苷和 N-糖苷 3 类结构衍生物的降糖作用,3 个基本结构化合物降糖作用的强度为 TY702-1C > TY702-1N > TY702-1S。进一步对化合物 TY702-1C 进行结构修饰发现,结构中环己烷对位基团随着直链烷烃的增长,药效逐步增强,到 4 个碳的正丁基时,药效开始有所下降,构效关系明显;当用异丙基修饰时,药效较正丙基弱,表明直链 3 碳类在该位置最佳。目前 C-糖苷类化合物研究较多,发展较快,其主要有处于新药审批阶段的 dapagliflozin、处于 III 期临床的 Canagliflozin、ASP-1941 和 BI-10773,以及处于 II 期临床的 TS-071、CSG-452 和 LX-4211 等^[11-14]。本实验选择 TY702-1C 进行末端取代研究,得到了另外 5 个衍生物,根据其增加排尿糖作用,筛选到 TY702-4C 为最佳化合物,量效研究提示其具有明显的降血糖作用和剂量关系。目前 SGLT2 靶点较新颖,还没有上市的药物, dapagliflozin 作用较强,但因具有致癌风险暂被搁置(发现癌症与尿道感染具有很大的关系)。而 TY702-4C 作用比较肯定、强度稍弱于 dapagliflozin,作用时间较短,可能具有较少的低血糖、尿糖感染等不良反应,是一个具有较好前景的降糖药先导化合物。

参考文献

- [1] 张富东,李玲. 新型抗 2 型糖尿病药物钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(5): 375-379.
- [2] William N W. Development of the renal glucose reabsorption inhibitors: A new mechanism for the pharmacotherapy of diabetes mellitus type 2 [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(7): 1785-1794.
- [3] 邵华,高云龙,楼袁媛,等. 含反式环己烷结构的 C-葡萄糖苷类 SGLT2 抑制剂的设计、合成与降血糖活性研究 [J]. 有机化学, 2011, 31(6): 836-842.
- [4] 王致峰,赵桂龙,刘巍,等. 含噻二唑的硫代糖苷类 SGLT2 抑制剂的设计、合成与降血糖活性研究 [J]. 有机化学, 2010, 30(6): 849-859.
- [5] 邵华,赵桂龙,刘巍,等. SGLT2 抑制剂二甲基 dapagliflozin 的全合成 [J]. 合成化学, 2010, 18(3): 389-392.
- [6] 王致峰,赵桂龙,王玉丽,等. 苯萘基糖苷类化合物的合成及其治疗糖尿病的活性 [J]. 合成化学, 2009, 17(5): 570-573.
- [7] 熊娟,黄四爽. 尿糖、血糖和糖化血红蛋白在糖尿病诊断中的临床应用 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(21): 26-27.
- [8] Suk Y K, Min J K, Jinhwa L. 1, 2, 4-Triazinylmethylphenyl glucoside as novel C-aryl glucoside SGLT2 inhibitors [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2011, 32(8): 2938-2940.
- [9] Han S P, Hagan D L, Taylor J R, et al. Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1723-1729.
- [10] Zhang W B, Welihinda A, Mechanic J, et al. EGT1442, a potent and selective SGLT2 inhibitor, attenuates blood glucose and HbA1c levels in db/db mice and prolongs the survival of stroke-prone rats [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63(4): 284-293.
- [11] Cole P, Vicente M, Castaner R, et al. Dapagliflozin [J]. *Drugs Future*, 2008, 33(9): 745-751.
- [12] Boldys A, Okopien B. Inhibitors of type 2 sodium glucose cotransporters—a new strategy for diabetes treatment [J]. *Pharmacol Rep*, 2009, 61(5): 778-784.
- [13] Timothy C H, Simon W D. Development and potential role of type-2 sodium-glucose transporter inhibitors for management of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Ther*, 2011, 2(3): 133-145.
- [14] Mark S K. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in the treatment of Type 2 diabetes: A review of Phase II and III trials [J]. *Clin Invest*, 2011, 1(1): 145-156.