

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.008

## 糖尿病大鼠口服载胰岛素纳米粒的降血糖实验\*

白录军<sup>1</sup> 周 天<sup>1</sup> 冯旭阳<sup>2</sup> 郑鹏飞<sup>2</sup> 徐瑞芬<sup>3△</sup>

(1 兰州军区临潼疗养院第二疗养区 陕西 临潼 710600; 2 第四军医大学西京医院心脏内科 陕西 西安 710032;

3 陕西省人民医院麻醉科 陕西 西安 710068)

**摘要 目的:**利用糖尿病大鼠模型,研究载有胰岛素纳米粒的降血糖作用。**方法:**雄性SD大鼠18只,禁食12h后,尾静脉一次性注射5%四氧嘧啶40mg/kg制备大鼠糖尿病模型。超声条件下,制备含胰岛素纳米粒,纳米悬液的胰岛素浓度为2U/ml,于4℃冷藏保存。大鼠随机分为三组,口服胰岛素组(A组)、载胰岛素纳米粒组(B组)、皮下注射胰岛素组(C组)。分别于灌胃前、灌胃后0.5,1,2,4,8,12h取血测定血糖。**结果:**口服载胰岛素纳米粒后能显著降低大鼠的血糖水平,起效时间晚于皮下注射胰岛素,但作用时间长;而口服等量普通胰岛素血糖无明显变化。表明HTCC-ALG/OREC纳米粒在体内对胰岛素具有保护作用。**结论:**载胰岛素纳米粒具有一定的降血糖作用和缓释效果,是具有很好应用前景的口服蛋白质给药载体。

**关键词:**胰岛素;纳米粒;口服

中图分类号:Q95-3,R587.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)13-2430-03

## Study On Hypoglycemic Effects of Nanoparticles Loaded With Insulin In Diabetes Rats After Oral Given\*

BAI Lu-jun<sup>1</sup>, ZHOU Tian<sup>1</sup>, FENG Xu-yang<sup>2</sup>, ZHENG Peng-fei<sup>2</sup>, XU Rui-fen<sup>3△</sup>

(1 Second Convalescent Area of Lintong Sanatorium Lanzhou Military Command, Lintong, Shaanxi, 710600, China;

2 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of anesthesia, Shaanxi People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate hypoglycemic effects of nanoparticles loaded with insulin in diabetes rats after oral given.

**Methods:** 18 male SD rats were fasted for 12 hours, and diabetic rat model were prepared by tail vein injection with alloxan of 5% 40 mg/kg. Nanoparticles loaded with insulin were prepared by ultrasonic. Nanosuspension with the concentration of 2 U/ml, were conserved in the refrigerator at 4℃. Then randomly divided into three groups: oral given insulin (group A), oral given nanoparticles loaded with insulin group (group B) and subcutaneous injection insulin (group C). Glucose level were monitored respectively before and by gastric lavage after 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h. **Results:** The blood glucose level in rats significantly reduced after oral given for the nanoparticles loaded with insulin, and the onset time was later than the subcutaneous insulin injections, but the effect time was longer. No obvious change was found in blood glucose after oral given for the insulin. It is proved that nanoparticles played a protective role in the body. **Conclusion:** The nanoparticles loaded with insulin can reduced the glucose level, and the sustained release effect was realized, they have been used as drug carrier for protein.

**Key words:** Insulin; Nanoparticles; Oral given**Chinese Library Classification(CLC):** Q819 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)13-2430-03

### 前言

越来越多的活性多肽和特殊蛋白质用于治疗疾病,目前口服治疗仍被认为是最为便捷的一种方式,尤其是针对糖尿病这种需要经常给药的疾病<sup>[1-3]</sup>。但是,当多肽和蛋白质药物暴露在胃肠道的酸碱环境时很容易发生降解而失去药效。在使用药物载体时提高安全性和药物的吸收率也是必须要考虑的问题<sup>[4-6]</sup>。生物大分子基药物载体的使用可以帮助我们解决上述两个问题。首先,载体为多肽和蛋白质药物提供了一个免受外界影响的微环境;其次,当选用生物大分子作为载体材料时还能使得药物运输体系具有生物相容性、生物可降解性、无毒性、黏膜粘附性等优良性能<sup>[7-10]</sup>。本实验拟制备载胰岛素壳聚糖季铵盐-OREC纳米微粒,研究其对糖尿病大鼠的降血糖作用,为临床应用提供新的思路和方法。

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(8100597;81070248)

作者简介:白录军(1968-),男,硕士研究生,副主任医师。研究方向:纳米材料的医学应用, Tel: 13359295319, Email: bailujun@yeah.net

△通讯作者:徐瑞芬,副教授,博士, Email: xuruifen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-21 接受日期:2013-12-20)

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选用健康成年雄性 SD 大鼠 18 只, 体重 200~250 g, 由第四军医大学动物实验中心提供。

### 1.2 大鼠糖尿病模型的制备

所有大鼠禁食 12 h 后, 尾静脉一次性注射 5% 四氧嘧啶 (批号: A7413, Sigma 公司, 美国) 40 mg/kg。3 d 后测定空腹血糖, 若空腹血糖  $> 11.1 \text{ mmol/L}$ , 并出现多饮、多食、多尿即为 1 型糖尿病模型制备成功。

### 1.3 含胰岛素纳米粒子的制备

取 0.5 mg/mL 的氯化钙溶液 2.0 mL, 在 100W 超声条件下, 逐滴滴加到 6.0 mL 的含 40U 短效胰岛素的海藻酸钠溶液中, 超声 30s 后, 在磁力搅拌器上慢速搅拌。加入 1 mL 的 1.0 mg/mL 的壳聚糖 - 海藻酸钠 / 有机累托石 (HTCC-ALG/OREC) (12:1) 溶液, 搅拌 30min, 形成乳液。乳液静置过夜, 形成均一的纳米粒子悬液。纳米悬液的胰岛素浓度为 2 U/mL, 于 4 °C 冷藏保存。透射电镜观察形态学特征, 利用日本 Rigaku Co 公司 D/max-rA 型衍射计获得小角 X 射线衍射图谱, 连续记谱扫描,  $\text{CuK}\alpha$  辐射 ( $\lambda=0.154 \text{ nm}$ ), 管电压 40kV, 电流 50mA, 扫描范围分别为  $1^\circ \sim 10^\circ$ , 扫描速度  $1^\circ/\text{min}$ 。

### 1.4 大鼠灌胃降血糖实验

将糖尿病大鼠 18 只随机分成 3 组, 每组 6 只, A 组为口服普通短效胰岛素溶液对照组, 服药量为 40U/kg; B 组为胰岛素纳米粒子, 服药量为 40U/kg; C 组皮下注射普通短效胰岛素组, 剂量为 2U/kg。实验前禁食 12 小时, 采用 20% 乌拉坦  $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射麻醉后固定于手术台灌胃, 灌胃后禁食物未禁水。分别于灌胃前、灌胃后 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h 取血测定血糖, 所有血糖均使用 Medisense Optium 血糖仪测定。切掉大鼠尾部 1-2mm, 每次采血时用丙酮擦鼠尾使血管扩张, 挤血测定血糖值。

### 1.5 统计学分析

实验结果用均数  $\pm$  标准差表示, n 表示实验的次数。反复测量数据采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间比较采用 t-检验,  $P < 0.05$  为有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 电镜结果

图 1 为所制备的载胰岛素纳米粒子的 TEM 照片, 显示呈圆球形, 表面有绒毛状突起; 大小均匀, 分散性好, 平均粒径约为 30nm。

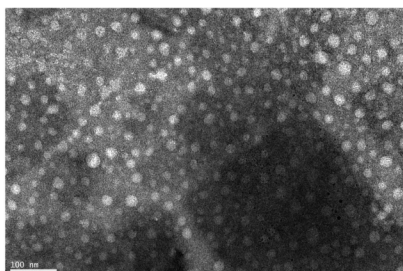


图 1 纳米粒子的 TEM

Fig. 1 TEM morphology of nanoparticles

### 2.2 纳米粒子的 XPS 能谱分析

各种元素都有它的特征电子结合能, 因此在能谱图中就出现特征谱线。X 光电子能谱法是一种表面分析方法, 提供的是样品表面的元素含量与形态, 而不是样品整体的成分, 其信息深度约为 3-5nm。图 2 为纳米粒子的 XPS 窄扫描分析图谱, 图 a 显示了 N 1s 的特征吸收峰, 在 379.8eV 附近, 被分配给 Si-N 结构的结合能, 表明了壳聚糖季铵盐与 OREC 之间存在相互作用。图 b 显示了 Si 2p 的特征吸收峰在 99.8eV 附近, 与 Si-Si 的结合能一致, 证明了 Si 出现在 NP31 中, 证实 OREC 存在于纳米粒子中。

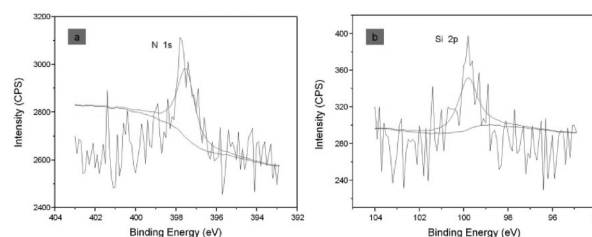


图 2 纳米粒子的 XPS 能谱分析图

Fig. 2 XPS narrow scans with the curve fit of QC-OREC/ALG nanoparticles: (a) N 1s and (b) Si 2p.

### 2.3 载胰岛素纳米粒的降血糖作用

图 3 为各组糖尿病大鼠口服胰岛素溶液或载胰岛素纳米粒子, 皮下注射胰岛素后血糖的变化情况。一般认为大鼠正常血糖的值为  $4.90 \sim 6.74 \text{ mmol/L}$  ( $91 \sim 125 \text{ mg/ml}$ )。实验结果表明, 皮下注射胰岛素给药的特点是降血糖作用迅速, 但是回升也较快。注射短效胰岛素 4h 后, 血糖降到最低, 平均  $7.9 \text{ mmol/L}$ , 然后很快回升到给药前的水平。给大鼠灌胃载胰岛素的 HTCC-OREC 纳米粒后, 空腹血糖即开始下降, 2h 血糖下降到  $12.8 \text{ mmol/L}$ , 4h 降到最低  $8.5 \text{ mmol/L}$ , 低血糖水平可以维持 12 h, 且血糖水平较为稳定, 说明口服含胰岛素的 HTCC-OREC 纳米粒后能显著降低大鼠的血糖水平, 起效时间晚于皮下注射, 但作用时间长。而口服等量普通胰岛素血糖无明显变化, 说明包裹入 HTCC-OREC 纳米粒的胰岛素给糖尿病大鼠口服后, 能够减少胃肠道蛋白酶的分解破坏, 在肠道吸收, 从而发挥降血糖作用。

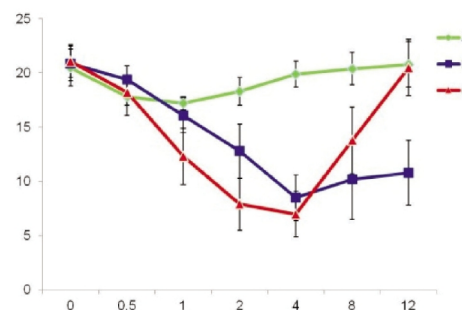


图 3 糖尿病大鼠降血糖实验: A: 口服普通短效胰岛素溶液对照组; B: 胰岛素纳米粒子组; C: 皮下注射普通短效胰岛素组。

Fig. 3 Study on the hypoglycemic effects of nanoparticle in diabetic rats: oral given insulin (group A), oral given nanoparticles loaded with insulin group (group B) and subcutaneous injection insulin (group C)

### 3 讨论

口服给药研究较多,但存在很多困难,主要表现在:1)多肽、蛋白类药物分子量较大,且常以多聚物的形式存在,不易透过胃肠粘膜;2)蛋白质在胃肠道中容易被酶和胃酸降解以致破坏,导致生物利用率低下,一般都小于2%<sup>[11-14]</sup>。纳米技术可以提高蛋白质药物口服吸收,将药物包载在纳米粒子中,可以防护蛋白质在胃肠道中的降解和破坏,同时可以提高药物的吸收利用<sup>[15-17]</sup>。蛋白质在水溶液中一般来讲是一种弱的两性聚电解质,其所带电荷情况与溶液的pH值有关,在蛋白质的等电点处其静电荷为零,根据这一特性可以使带相反电荷的两种蛋白质或者蛋白质与多糖分子之间通过静电作用形成聚积体<sup>[18,21]</sup>。

糖尿病大鼠降血糖实验表明,HTCC-ALG/OREC胰岛素纳米粒灌胃后具有明显的降血糖作用,壳聚糖季铵盐和有机蒙托石在胃肠道中对胰岛素具有一定的保护作用,可以减少胃酸和蛋白酶的降解;同时也说明HTCC-ALG/OREC纳米粒可促进胰岛素在肠道有效的吸收。与直接皮下注射短效胰岛素相比,HTCC-ALG/OREC胰岛素纳米粒维持降血糖作用的时间相对长一些,表明HTCC-ALG/OREC纳米粒在体内对胰岛素具有缓释作用。

综上所述,HTCC-ALG/OREC胰岛素纳米粒具有一定的降血糖作用和缓释效果,是具有很好应用前景的口服蛋白质给药载体。

#### 参考文献(References)

- [1] Kübler B, Jaboyedoff M. Illite crystallinity [J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science, 2000, 331:75-89
- [2] Zhang F, Qi CX, Wang S, et al. A study on preparation of cordierite gradient pores porous ceramics from rectorite[J]. Solid State Sciences, 2011,13:929-933
- [3] Bird MI, Cali JA. A revised high-resolution oxygen-isotope chronology for ODP-668B: implications for Quaternary biomass burning in Africa [J]. Global and Planetary Change, 2002, 33:73-76
- [4] Li X, Li X, Ke B, et al. Cooperative performance of chitin whisker and rectorite fillers on chitosan films [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85:747-752
- [5] Deng H, Li X, Ding B, et al. Fabrication of polymer/layered silicate intercalated nanofibrous mats and their bacterial inhibition activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83:973-978
- [6] Rumpel C, Ba A, Darboux F, et al. Erosion budget and process selectivity of black carbon at meter scale [J]. Geoderma, 2009, 154: 131-137
- [7] Wang X, Strand SP, Du Y, et al. Chitosan-DNA-rectorite nanocomposites: Effect of chitosan chain length and glycosylation [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79:590-596
- [8] Vidal O, Dubacq B. Thermodynamic modelling of clay dehydration, stability and compositional evolution with temperature, pressure and H<sub>2</sub>O activity [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009, 73: 6544-6564
- [9] Temur S, Kansun G. Geology and petrography of the Masatdagi diasporic bauxites, Alanya, Antalya, Turkey [J]. Journal of Asian Earth Sciences, 2006, 27:512-522
- [10] Rumpel C, González JA, Bardoux G, et al. Composition and reactivity of morphologically distinct charred materials left after slash-and-burn practices in agricultural tropical soils [J]. Organic Geochemistry, 2007, 38:911-920
- [11] Bu XZ, Zhang GK, Gao YY, et al. Preparation and photocatalytic properties of visible light responsive N-doped TiO<sub>2</sub>/rectorite composites [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2010, 136: 132-137
- [12] Ma HL, Xu YF, Qi XR, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 354:217-226
- [13] Sang L, Wang X, Chen Z, et al. Assembly of collagen fibrillar networks in the presence of alginate [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82:1264-1270
- [14] Maruyama Y, Ochiai A, Mikami B, et al. Crystal structure of bacterial cell-surface alginate-binding protein with an M75 peptidase motif [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 405: 411-416
- [15] Tam SK, Bilodeau S, Dusseault J, et al. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate polycation microcapsules [J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7:1683-1692
- [16] Peña C, Peter CP, Büchs J, et al. Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 36:73-80
- [17] Chuah AM, Kuroiwa T, Kobayashi I, et al. Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2009, 351: 9-17
- [18] Li XY, Chen XG, Sun ZW, et al. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393 [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 1479-1485
- [19] Arzate VI, Chanona PJ, Calderón DG, et al. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87:289-299
- [20] Chang JJ, Lee YH, Wu MH, et al. Preparation of electrospun alginate fibers with chitosan sheath [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87: 2357-2361
- [21] Yu W, Lin J, Liu X, et al. Quantitative characterization of membrane formation process of alginate-chitosan microcapsules by GPC [J]. Journal of Membrane Science, 2010, 346:296-301