

胰岛素肺部给药对大鼠的降血糖作用

沈赞聪, 张 强*, 魏树礼

(北京医科大学药学院药剂研究室, 北京 100083)

摘要 目的: 研究胰岛素溶液(INS-SOL)经正常大鼠肺部给药后的降血糖作用。方法: 以血糖水平为指标, 考察各种吸收促进剂以及酶抑制剂经正常大鼠肺部给药后对 INS-SOL 降血糖作用的影响。同时比较了 INS-SOL 在两种 pH 条件下的降血糖作用, 并以皮下注射为对照, 计算不同条件下 INS-SOL 的药理生物利用度 (pharmacological bioavailability, PBA)。结果: $0.5 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 INS-SOL 经肺部给药后即有明显的降血糖作用, 在不加吸收促进剂的条件下的 PA 为 26.0%。辛酸钠、胆酸钠、苜泽 35、苜泽 78 和酶抑制剂杆菌肽均显著地增加 INS-SOL 的降血糖作用。INS-SOL 在 pH 3 时的降血糖效果比 pH 7 时有显著的提高。结论: INS-SOL 经肺部给药后有显著的降血糖效果。

关键词 胰岛素; 肺部给药; 吸收促进剂; 降血糖作用

肺部给药途径作为多肽蛋白质的非注射给药途径之一, 近年来逐渐引起了人们的重视。其中以胰岛素 (insulin, INS) 的肺部给药研究发展较快^[1]。由于肺部有吸收表面积大, 肽类水解酶活性低, 药物易穿透等特点, 为 INS 的吸收提供了良好的生理环境, 因而 INS 能达到较高的生物利用度。目前国镶 INS 肺部给药制剂如气雾剂^[2]、喷雾剂^[3]及粉末吸入剂^[4]等的研究已进入了临床试验阶段, 很有希望在今后几年内上市, 而国内在此方面的研究仍处于滞后状态。本文建立了正常大鼠肺部给药的动物模型, 考察了 INS 溶液 (INS-SOL) 经肺部给药后对体内血糖水平的影响, 并比较了不同吸收促进剂和酶抑制剂对 INS 吸收的促进作用, 为今后进一步开发成 INS 肺部给药制剂打下基础。

材 料 和 方 法

1 实验材料

INS 原料 ($26 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$, 徐州生化厂), 依地酸二钠 (EDTA, 北京化工厂), 油酸 (OA, 北京金龙化学试剂有限公司), 辛酸钠 (SCa, 上海试剂二厂), 苜泽 35 (Brij35, Sigma 公司), 苜泽 78 (Brij78, Sigma 公司), 胆酸钠 (SCh, Sigma 公司), 2-羟丙基- β -环糊精 (2-HP- β -CD, 中国农业大学食品学院提供), 杆菌肽

(bacitracin, Server 公司), 戊巴比妥钠 (中国医药公司北京采购供应站), 其他试剂均为分析纯。

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, δ , $250 \pm 50 \text{ g}$, 北京医科大学实验动物中心。

2 实验方法

INS-SOL 制备及肺部给药 配制 pH 7 和 pH 3 的 INS-SOL。除 OA 需与 INS-SOL 超声混合均匀外, 其它促进剂或酶抑制剂均直接溶解到 INS-SOL 中。以 pH 7 的磷酸缓冲溶液为空白对照。将正常大鼠随机分组, 每组 5~6 只, 实验前禁食 12 h。动物经腹腔注射戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉, 麻醉后将动物仰卧固定, 手术暴露气管, 给药时先使动物与水平垂直, 用微量注射器自甲状软骨下第 5 至第 6 气管环间, 往气管内伸入 2 cm 左右注入药液 $100 \mu\text{L} / 200 \text{ g}^{-1}$ 体重, 使药液能被导入到肺部深处^[5]。给药后维持 30 s, 再与水平成 30° 放置, 动物能维持自主呼吸。在不同时间间隔于大鼠尾尖取血 0.2 mL, 离心取血清 20 μL , 按血糖测定项下测定血糖。

血糖的测定 用葡萄糖氧化酶法。酶试剂的配制及标准曲线的建立按文献^[6]方法进行。建立的标准曲线方程为: $A = 0.003X + 0.0023$ ($\gamma = 0.9999$), 其中 X 为血糖水平 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), A 为 505 nm 处吸收度测定值。测定时待血样凝固后离心 ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 精密吸取血清 20 μL , 加酶试剂 2.0 mL, 按标准曲线制作方法操作, 用上述标准曲线计算血糖值。经测定葡萄糖在血清中的高、中和低 3 种浓度的平均回收率分别为 $(101.8 \pm 2.4)\%$, $(101.2 \pm 0.9)\%$ 和 $(95.8 \pm 2.2)\%$ ($n = 5$)。

统计方法 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$

收稿日期: 1998-11-20

* 联系人 Tel: (010) 62091717, Fax: (010) 62015584,

E-mail: zqdodo@mail.bjmu.edu.cn

沈赞聪 男, 26 岁, 博士研究生

张 强 男, 41 岁, 教授, 博士生导师

魏树礼 男, 65 岁, 教授, 博士生导师

被认为有显著性差异, $P < 0.01$ 有极显著性差异。

结 果

1 不同剂量的 INS-SOL 对大鼠的降血糖作用

分别给与 $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1.0 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $5.0 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 INS-SOL (pH 7), 于不同时间测定血糖值, 结果表明, $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量即可引起血糖的下降。随着剂量的增加, 大鼠体内血糖下降幅度随之增大。 $5.0 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量降血糖最低可降至 26.7% (表 1)。

2 两种 pH 值条件下 INS-SOL 对大鼠的降血糖作用

分别给与 pH 7 和 pH 3 的 $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL, 于不同时间测定血糖值, 结果见表 2。pH 3 下的 INS-SOL 降血糖幅度大于 pH 7 下的 INS-SOL, 表明酸性环境更有利于 INS-SOL 在肺部的吸收。

3 酶抑制剂及不同吸收促进剂对 INS-SOL 肺部给药后降糖作用的影响

在 $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 INS-SOL 中加入 1% 的 EDTA, OA, Sca, Brij35, Brij78; 1% 和 5% 的 2-HP- β -CD 以及 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SCh。在 $1.0 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 INS-SOL 中加入 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的酶抑制剂杆菌肽。以上溶液经肺部给药后, 在 4 h 内的血糖水平见表 3。

Tab 1 Effect of different doses of INS-SOL given intrapulmonarily on blood glucose levels in normal rats

Doses / $\text{u}\cdot\text{kg}^{-1}$	Change of blood glucose level / %					
	0 h	0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	4.0 h
Control	100	98.7 \pm 5.7	110.1 \pm 24.7	109.1 \pm 18.9	112.6 \pm 17.1	113.7 \pm 19.1
0.5	100	92.6 \pm 5.7	81.9 \pm 7.7*	86.3 \pm 6.2*	86.2 \pm 6.3**	95.3 \pm 8.2*
1.0	100	76.5 \pm 8.4**	65.5 \pm 7.1**	63.1 \pm 7.4**	65.2 \pm 12.4**	71.7 \pm 18.5**
5.0	100	71.9 \pm 11.0**	52.5 \pm 8.8**	33.6 \pm 19.0**	26.7 \pm 16.3**	35.6 \pm 10.9**

Control: phosphate buffer solution (pH 7). Blood glucose level at 0 h was taken as 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, $n = 5 \sim 6$.

Tab 2 Effect of INS-SOL at different pH conditions given intrapulmonarily on blood glucose levels in normal rats

Doses / $\text{u}\cdot\text{kg}^{-1}$	Change of blood glucose level / %					
	0 h	0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	4.0 h
Control	100	98.7 \pm 5.7	110.1 \pm 24.7	109.1 \pm 18.9	112.6 \pm 17.1	113.7 \pm 19.1
0.5 (pH 7)	100	92.6 \pm 5.7	81.9 \pm 7.7	86.3 \pm 6.2	86.2 \pm 6.3	95.3 \pm 8.2
0.5 (pH 3)	100	71.1 \pm 5.9**	58.8 \pm 6.3**	73.7 \pm 8.5*	86.1 \pm 6.8	99.9 \pm 10.8

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ (pH 7) INS-SOL, $n = 5 \sim 6$.

Tab 3 Effect of INS-SOL given intrapulmonarily with co-administered enzyme inhibitor or various absorption enhancers on blood glucose levels in normal rats

Condition	Change of blood glucose level / %					
	0 h	0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	4.0 h
$0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL sc	100	45.4 \pm 7.3**	33.3 \pm 7.8**	53.3 \pm 6.2**	58.3 \pm 6.0**	68.2 \pm 5.9**
$0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL it	100	92.6 \pm 5.7	81.9 \pm 7.7	86.3 \pm 6.2	86.2 \pm 6.3	95.3 \pm 8.2
+ 1% EDTA	100	90.9 \pm 5.0	92.6 \pm 2.2	87.8 \pm 9.7	91.7 \pm 13.5	95.2 \pm 8.9
+ 1% OA	100	84.9 \pm 4.8*	90.0 \pm 4.6	84.3 \pm 3.0	96.8 \pm 8.9	98.2 \pm 6.9
+ 1% Sca	100	84.8 \pm 7.9*	79.2 \pm 6.3	75.6 \pm 7.2*	83.1 \pm 9.7	82.7 \pm 4.8**
+ 1% Brij35	100	81.2 \pm 5.2**	65.0 \pm 7.3**	76.6 \pm 9.8	83.0 \pm 7.6	83.0 \pm 8.8*
+ 1% Brij78	100	72.5 \pm 6.1**	66.7 \pm 6.9**	71.4 \pm 9.5*	80.0 \pm 9.8	80.1 \pm 11.5*
+ $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SCh	100	77.7 \pm 11.1*	59.1 \pm 16.2**	58.4 \pm 20.7**	70.4 \pm 23.8	76.7 \pm 20.7*
+ 1% 2-HP- β -CD	100	86.1 \pm 9.5	77.5 \pm 9.5	74.5 \pm 7.9*	88.1 \pm 13.7	106.9 \pm 21.8
+ 5% 2-HP- β -CD	100	78.4 \pm 4.4*	82.9 \pm 3.4	77.7 \pm 11.2	96.1 \pm 6.2	105.6 \pm 12.5
$1.0 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL it						
+ $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ bacitracin	100	61.4 \pm 7.6##	42.2 \pm 5.8##	52.9 \pm 16.2#	60.6 \pm 15.7	76.2 \pm 9.7

sc: Subcutaneous; it: Intratracheal; OA: Oleic acid; Sca: Sodium caprilate; SCh: Sodium cholate; 2-HP- β -CD: 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs $1.0 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL, $n = 5 \sim 6$.

4 药理生物利用度的计算

用梯形法计算血糖曲线上面积 (area above the curve, AAC) 来评价 INS-SOL 在各种不同条件下的药理生物利用度 (pharmacological bioavailability PBA)^[7], 以皮下注射 $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 INS-SOL 的 AAC 作为对照, 其他条件下给药的 AAC 与其相比得到相应的 PA 值(表 4)。PA 值越大, INS-SOL 经肺吸收的生物利用度则越高。结果表明, 与相同剂量的皮下注射途径相比, pH 7 时的 $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 INS-SOL 的 PA 值能达到 26.0%, 在酸性环境下 PA 达到 53.8%, 增加了一倍。EDTA, OA 和 2-HP- β -CD 均没有增加 INS-SOL 的降糖效果 ($P > 0.05$), SCa, SCh, Brij35, Brij78 及酶抑制剂 bacitracin 均能显著地提高 INS-SOL 的降糖作用 ($P < 0.05$), 其中 SCh 最为明显, 使 INS-SOL 的 PA 值能达到 69.0%。

Tab 4 Pharmacological bioavailability (PBA) of INS-SOL after intrapulmonary delivery to normal rats under different conditions

Condition	AAC / % · h		PA / %
	Mean	±S. D.	
$0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL sc	181.68	14.79	100.0
$0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL it (pH 7)	47.26	11.69	26.01
$0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL i. t (pH 3)	97.80	27.20	53.83* *
+ 1% EDTA	34.64	26.34	19.07
+ 1% OA	37.69	6.08	20.75
+ 1% SCa	73.14	24.44	40.26*
+ 1% Brij35	84.62	24.37	46.58*
+ 1% Brij78	97.36	21.91	53.59* *
+ 20 mmol·L ⁻¹ SCh	125.42	68.69	69.02*
+ 1% 2-HP- β -CD	62.97	30.30	34.66
+ 5% 2-HP- β -CD	51.81	18.55	28.52
20 mmol·L ⁻¹ bacitracin	165.75	35.87	45.62* *

sc: Subcutaneous; it: Intratracheal; OA: Oleic acid; SCa: Sodium caprilate; SCh: Sodium cholate; 2-HP- β -CD: 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin; AAC: Area above the curve. * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, vs $0.5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ INS-SOL, n = 5 ~ 6.

讨 论

在不加吸收促进剂的情况下, 本文研究的 INS-SOL 经大鼠肺部给药后药理生物利用度达到 26.0%, 国外报道在 13% ~ 37% 之间^[5, 8], 均远高于生物利用度仅为 1% 左右的口服给药途径^[9]。这是由于肺部吸收表面积很大, 血液循环丰富, 肽类水解酶活性低下, 能提高 INS 等大分子蛋白多肽药物的吸收。

在酸性环境下 INS-SOL 的吸收比中性环境下要好, 这可能是因为酸对肺泡膜的破坏而导致了细胞的通透性增加。EDTA 是一种金属螯合剂, 在胃肠道中可以干扰离子维持细胞内容物的能力, 增加紧密连接(tight junction)的通透性, 使本来不能进行细胞间转运的药物易于转运, 在 INS 口服给药研究中起到吸收促进剂的作用, 但在口腔粘膜给药和鼻腔给药中均无促进吸收作用^[10]。本实验中没有发现 EDTA 对 INS 的肺部给药有促进吸收的能力, 反而降低了吸收。OA 和 SCa 是脂肪酸及脂肪酸盐类吸收促进剂, 可增加生物膜的流动性, 使药物易于吸收。实验中发现 SCa 促进作用很显著, 但 OA 并未产生预想的结果, 可能是 OA 不能很好地与 INS-SOL 混溶所致。SCh 是胆酸盐类的吸收促进剂, 由于其能保护药物不被水解, 在本实验中促进吸收作用最为显著。Brij35 与 Brij78 均为合成醚类表面活性剂, 其促进作用很明显, 此类表面活性剂的作用也是改变细胞膜上的磷脂排列, 增加膜的流动性从而使药物易于通透。近来发现 β -CD 衍生物能增加粘膜的通透性, 促进鼻粘膜对 INS 的吸收。本文选用 2-HP- β -CD, 以 1% 和 5% 的浓度给药, 未见其对 INS 有显著的吸收促进作用。文献报道^[11] 同类 β -CD 衍生物中以二甲基- β -环糊精(DM- β -CD) 的吸收作用最为显著。

肺部肽类水解酶较少, 主要存在某种氨基肽酶对 INS 进行水解, 但活性较低^[12]。Bacitracin 是一种广谱的酶抑制剂, 可抑制各种蛋白水解酶的活性, 本文研究表明 bacitracin 在肺部能很好地起到保护 INS 不被酶水解的作用, 这与文献报道^[13] 一致。

本文研究了不同条件下的 INS-SOL 经大鼠肺部给药后对体内血糖的影响, 考察了一种酶抑制剂和数种吸收促进剂的吸收促进作用, 为进一步研究 INS 气雾剂、喷雾剂及粉末吸入剂奠定基础。

References

- 1 Robert F. Service. Drug delivery takes a deep breath. *Science*, 1997, **277**: 1199
- 2 Beth LL, Angeliki G, Adams GK. Preliminary study of the insulin aerosol delivered by oral inhalation in diabetic patients. *J Am Med Assoc*, 1993, **269**: 2106
- 3 Jenkle JH, Karlberg BE. Intrapulmonary administration of insulin to healthy volunteers. *J Int Med*, 1996, **240**: 93
- 4 Robert AG, Sherwyn LS, Michael H, et al. Pharmacological reproducibility of inhaled human insulin premeal dosing in patients with type 2 diabetes mellitus

- (NIDDM). *Diabetes*, 1998, **47**(Suppl): A99
- 5 Okumura K, Iwakawa S, Yoshida T, *et al.* Intratracheal delivery of insulin absorption from solution and aerosol by rat lung. *Int J Pharm*, 1992, **88**: 63
 - 6 Xu SY (徐叔云), Bian RL (卞如濂), Chen X (陈修). *Methodology of Pharmacological Experiments*. 2nd ed. (药理实验方法学), 第2版. Beijing: See chapter 54. Experimental methods for hypoglycemic drugs. (by Lin. Zb, Cong. Z). People's Health Publishing House, 1991. 1272~ 1274
 - 7 Zhang Q (张强), Ding JJ (丁继军), Wei SL (魏树礼). Properties and hypoglycemic effect of the insulin-loaded nanopartides for oral administration. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1998, **30**: 239
 - 8 Colthorpe P, Farr SJ, Taylor G, *et al.* The pharmacokinetics of pulmonary-delivered insulin: a comparison of intratracheal and aerosol administration to the rabbit. *Pharm Res*, 1992, **9**: 764
 - 9 Lowe PJ, Temple CS. Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J Pharm Pharmacol*, 1994, **46**: 547
 - 10 Aungst BJ, Rogers NJ. Site dependence of absorption-promoting actions of laureth-9, Na salicylate, Na₂-EDTA, and aprotinin on rectal, nasal, and buccal insulin delivery. *Pharm Res*, 1988, **5**: 305
 - 11 Merkus FWHM, Verhoef JC, Romeijn SG, *et al.* Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats. *Pharm Res*, 1991, **8**: 588
 - 12 Liu FY, Kildsig DO, Mitra AK. Pulmonary biotransformation in rat and rabbit. *Life Sci*, 1992, **51**: 1683
 - 13 Yamamoto A, Umemori S, Muranishi S. Absorption enhancement of intrapulmonarily administered insulin by various absorption enhancers and protease inhibitors in rats. *J Pharm Pharmacol*, 1994, **46**: 14

HYPOGLYCAEMIC EFFECT OF PULMONARILY DELIVERED INSULIN IN NORMAL RATS

Shen Zancong (Shen ZC), Zhang Qiang (Zhang Q) and Wei Shuli (Wei SL)

(School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT AIM: To investigate the hypoglycaemic effect of pulmonary-delivered insulin solution (INS-SOL) on normal rats. **METHODS:** INS-SOL was administered to the exposed trachea of anesthetized normal rats. Blood samples were collected at specified intervals and blood glucose levels were determined by glucose oxidase method. The hypoglycaemic response was examined after intrapulmonary delivery of INS-SOL in three doses (0.5, 1.0 and 5.0 u•kg⁻¹) and under two pH conditions (pH 3 and pH 7), as well as co-administration of protease inhibitor (bacitracin) or absorption enhancers. The pharmacological bioavailability (PBA), calculated from area above the curve (AAC) was used to evaluate the absorption enhancement of INS-SOL from the lung under various conditions. **RESULTS:** In the absence of additives, a low dose of insulin solution (0.5 u•kg⁻¹) produced significant hypoglycaemic effect following intrapulmonary administration, which showed a PBA of 26.0%. The concomitant administration of sodium caprylate, sodium cholate, Brij35, Brij78 as well as bacitracin appeared to be more effective for enhancing the pulmonary absorption of insulin than the other adjuvants like oleic acid, EDTA and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. Absorption of INS-SOL under pH 3 condition was significantly increased compared with that under pH 7 condition. **CONCLUSION:** Pulmonary delivery of INS-SOL produced significant hypoglycaemic effect on normal rats, the pulmonary route may be useful for the delivery of insulin.

KEY WORDS insulin; pulmonary delivery; absorption enhancer; hypoglycaemic effect