

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910177710.0

[51] Int. Cl.

C08B 37/04 (2006.01)

C07H 7/033 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

A61K 31/734 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 17 日

[11] 公开号 CN 101649004A

[22] 申请日 2009.9.18

[21] 申请号 200910177710.0

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛崂山区松岭路 238 号

[72] 发明人 赵 峡 于广利 管华诗 李广生
郝 翠

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

一种具有抗 II 型糖尿病活性的海洋寡糖化合物

[57] 摘要

本发明涉及一种具有抗 II 型糖尿病活性的海洋寡糖化合物，它是以来源于海洋并在每个糖环上中均含有羧基的 D - 聚甘露糖醛酸寡糖为原料，与稀碱和铬盐溶液反应，将与糖尿病发生和发展密切相关的三价铬离子引入寡糖分子形成的配合物。经药理学实验证实，本发明产品具有明显的促胰岛素分泌作用，且不受胰淀素的影响；对 II 型糖尿病大鼠和小鼠均具有减轻糖负荷，改善血脂代谢，提高胰岛素敏感性和一定的肾脏保护和减轻胰腺损伤作用。本发明产品来源于海洋天然生物，具有安全性好，结构独特、分子量低，铬结合率高，口服吸收好等特点，并可在多个环节发挥降糖作用，在 II 型糖尿病的防治方面具有良好的市场应用前景。

1. 一种海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物，其特征是它的糖残基由 D-甘露糖醛酸组成，并以 β -1,4-糖苷键连接，与三价铬离子进行配位络合制备，铬的质量百分含量为 0.1-15%，重均分子量 $\leq 10\text{kD}$ ，其分子式可表述为 $[\text{C}_6\text{H}_8\text{-}_m\text{O}_6\cdot\text{Cr}_m]_n$ ，其中 $m=0.1-1$ ， $n=1-50$ 。
2. 一种海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物的制备方法，其特征是将聚甘露糖醛酸溶液在 $\text{pH}=5-12$ 和温度 $45-75^\circ\text{C}$ 条件下，逐滴加入适量稀碱和铬盐溶液，保温反应 1h，过滤，用 2-4 倍体积的有机溶剂沉淀，静置，收集沉淀，用有机溶剂洗涤、脱水，减压干燥即得。
3. 权利要求 2 所述的铬盐是指氯化铬、醋酸铬和硝酸铬。
4. 权利要求 2 所述的稀碱是稀氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠、碳酸氢钾。
5. 一种海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物，其特征是用于 II 型糖尿病的预防和治疗。

一种具有抗 II 型糖尿病活性的海洋寡糖化合物

技术领域

本发明涉及一种具有抗糖尿病活性的化合物。具体地说，是涉及一种来源于海洋褐藻的聚甘露糖醛酸铬配合物及其制备方法和在抗 II 型糖尿病中的应用。

背景技术

糖尿病是一种多病因的常见内分泌代谢性疾病。据 2007 年国际糖尿病联盟统计，全球糖尿病患者总人数已达 2.46 亿，其中 II 型糖尿病占总糖尿病患者的 90% 以上。据估计，全球每分钟约有 6 人死于糖尿病，因糖尿病及其并发症而死亡的人数仅次于癌症和心脑血管疾病，已经成为影响人类生命健康的第三大杀手。目前，临床上应用的抗糖尿病药物主要有双胍类、磺脲类、 α -糖苷酶抑制剂和噻唑烷二酮类药物。这些药物的作用机理各不相同：双胍类药物主要是通过抑制肝糖元的分解和增加外周组织对葡萄糖的利用而发挥降糖作用；磺脲类药物具有促胰岛素分泌的作用，但存在增加体重和易发生低血糖等副作用； α -糖苷酶抑制剂是通过竞争性抑制小肠上皮绒毛膜上的淀粉和二糖水解酶的活性来延缓葡萄糖的吸收，易引起胃肠道的不良反应；噻唑烷二酮类药物具有增加胰岛素敏感性的作用，但对于胰岛素功能缺陷的病人难以发挥理想的疗效。总体来看，上述抗糖尿病药物虽具有较明显的降糖效果，但它们大多具有不同程度的毒副作用和不良反应，或存在作用方式较为单一的缺点。因此，研究和开发具有良好降糖活性的新型药物仍是临床上的迫切需要。

大量研究表明，铬具有明显改善糖代谢的作用，三价铬是构成葡萄糖耐量因子（GIF）的重要成分，也是胰岛素正常发挥生理功能必要的辅助因子。铬通过与烟酸或氨基酸结合形成 GTF 而协同胰岛素发挥作用，并可作用于葡萄糖代谢中的磷酸变位酶和琥珀酸脱氢酶来增加糖的利用。血清中铬的含量与胰岛素的活性呈正相关，当铬缺乏时会造成糖耐量受损，胰岛素的活性及组织对胰岛素的敏感性下降，严重时可导致糖代谢紊乱，引发或加重糖尿病。另外，铬还参与了脂肪代谢、蛋白代谢和核酸代谢的调节作用，铬缺乏时还会导致高脂血症、动脉粥样硬化病变和生长发育迟缓等。因此，三价铬对于糖尿病，尤其是由胰岛素抵抗等引起的 II 型糖尿病的预防和治疗具有重要的意义。铬的吸收与其化学结合形式密切相关，无机铬不仅毒性大，而且吸收率极低（ $<0.5\%$ ），但有机铬如吡啶甲酸铬、烟酸铬等的吸收率可达 10-25%。毒理学研究结果表明，三价铬不能透过红细胞膜，其毒性远低于六价铬，三价铬的中毒剂量比推荐的每日安全摄入量至少大 1000 倍，因而是人体必需微量元素中最为安全的元素之一。

糖类药物的研究与开发是本世纪生化药物研究领域的热点之一。目前已有较多的糖类化合物在糖尿病的防治方面显示出了良好的应用前景，如研究发现植物来源的南瓜多糖和苦瓜多糖，真菌来源的银耳多糖、灵芝多糖和虫草多糖，海洋动植物来源的壳聚糖、褐藻多糖和螺旋藻多糖等均有不同程度的降血糖作用，但目前由于这些多糖的作用靶点不明确，且存在口服吸收差、生物利用度低等缺点从而限制了其在临床上的应用。如对多糖类化合物，特别

是来源于海洋的多糖类化合物,进行适当的降解得到结构明确、口服吸收好的低聚糖或寡糖化合物,并根据糖尿病的发病作用机理进行合理的分子修饰,将会大大提高糖类化合物的降糖效果,有望成为一类新型的抗糖尿病药物。

发明内容

本发明的目的是以来源于海洋褐藻的聚甘露糖醛酸寡糖为分子骨架,将其与三价铬进行配位络合,以提供一种具有良好降糖活性的海洋寡糖铬配合物,满足临床上预防和治疗糖尿病的需要。

一种海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物,其特征是它的糖残基由 D-甘露糖醛酸组成,并以 β -1,4-糖苷键连接,与三价铬离子进行配位络合制备,铬的质量百分含量为 0.1-15%,重均分子量为 $\leq 10\text{kD}$,其分子式可表述为 $[\text{C}_6\text{H}_8\text{-}_m\text{O}_6\cdot\text{Cr}_m]_n$,其中 $m=0.1-1$, $n=1-50$ 。

一种海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物的制备方法,其特征是将聚甘露糖醛酸溶液在 $\text{pH}=5-12$ 和温度 $45-75^\circ\text{C}$ 条件下,逐滴加入适量稀碱和铬盐溶液,保温反应 1h,过滤,用 2-4 倍体积的有机溶剂沉淀,静置,收集沉淀,用有机溶剂洗涤、脱水,减压干燥即得。

一种海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物,其特征是用于 II 型糖尿病的预防和治疗。

本发明所述的铬盐是指氯化铬、醋酸铬和硝酸铬;所述的稀碱是指稀氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠、碳酸氢钾。

本发明以聚甘露糖醛酸这种在每个糖环上中均含有羧基的海洋生物寡糖为原料,将其与糖尿病发生和发展过程中密切相关的三价铬离子进行配位络合,得到了一种具有良好抗 II 型糖尿病活性的海洋寡糖化合物。与同类产品相比,本发明产品来源于海洋天然生物,具有安全性好,结构独特、分子量低,铬结合率高,口服吸收好等特点,并可在多个环节发挥降糖作用,在 II 型糖尿病的防治方面具有良好的市场应用前景。

具体实施方式

下面通过一些具体的实施例来对本发明做进一步的说明。

实施例 1

称取 10g 聚甘露糖醛酸(重均分子量为 7350 道尔顿)溶于 500ml 纯水中,用氢氧化钠溶液调节 $\text{pH}=10$,在 45°C 水浴中逐滴加入 2mol/L 氢氧化钠和 2mol/L 氯化铬溶液,当溶液中刚出现绿色絮状沉淀时,停止加入氢氧化钠和氯化铬,继续保温 1h。取出反应液,过滤,将滤液浓缩至 200mL 后加入 3 倍体积的 95%乙醇,沉淀,静置,收集沉淀,用无水乙醇脱水,在 45°C 下减压干燥,得到含铬量约为 15%的聚甘露糖醛酸铬配合物。

实施例 2

称取 10g 聚甘露糖醛酸(重均分子量为 5200 道尔顿)溶于 500ml 纯水中,用碳酸钠溶液调节 $\text{pH}=8$,在 70°C 水浴中逐滴加入 2mol/L 碳酸钠和 2mol/L 醋酸铬溶液 1mL,保温反应 1h。取出反应液,过滤,将滤液浓缩至 200mL 后加入 3 倍体积的丙酮,沉淀,静置,收集沉淀,用丙酮脱水,在 45°C 下减压干燥,得到含铬量约为 1%的聚甘露糖醛酸铬配合物。

实施例 3

称取 10g 聚甘露糖醛酸(重均分子量为 1500 道尔顿)溶于 500ml 纯水中,调节 $\text{pH}=5$,

在 60℃水浴中逐滴加入 2mol/L 氢氧化钠和 2mol/L 硝酸铬溶液 5mL，保温反应 1h。取出反应液，过滤，将滤液浓缩至 200mL 后加入 4 倍体积的丙酮，沉淀，静置，收集沉淀，用丙酮脱水，在 45℃下减压干燥，得到含铬量约为 5%的聚甘露糖醛酸铬配合物。

实施例 4

称取 10g 聚甘露糖醛酸（重均分子量为 3000 道尔顿）溶于 500ml 纯水中，用碳酸钾溶液调节 pH=9，在 55℃水浴中逐滴加入 2mol/L 碳酸钾和 2mol/L 氯化铬溶液 10mL，保温反应 1h。取出反应液，过滤，将滤液浓缩至 200mL 后加入 4 倍体积的 95%乙醇，沉淀，静置，收集沉淀，用无水乙醇脱水，在 45℃下减压干燥，得到含铬量约为 10%的聚甘露糖醛酸铬配合物。

实施例 5

称取 10g 聚甘露糖醛酸（重均分子量为 9500 道尔顿）溶于 500ml 纯水中，用氢氧化钾溶液调节 pH=11，在 50℃水浴中逐滴加入 2mol/L 氢氧化钾和 2mol/L 醋酸铬溶液 3mL，保温反应 1h。取出反应液，过滤，将滤液浓缩至 200mL 后加入 2 倍体积的丙酮，沉淀，静置，收集沉淀，用丙酮脱水，在 45℃下减压干燥，得到含铬量约为 3%的聚甘露糖醛酸铬配合物。

实施例 6

称取 10g 聚甘露糖醛酸（重均分子量为 2400 道尔顿）溶于 500ml 纯水中，用碳酸氢钠溶液调节 pH=7，在 65℃水浴中逐滴加入 2mol/L 碳酸氢钠和 2mol/L 硝酸铬溶液 0.5mL，保温反应 1h。取出反应液，过滤，将滤液浓缩至 200mL 后加入 4 倍体积的丙酮，沉淀，静置，收集沉淀，用丙酮脱水，在 45℃下减压干燥，得到含铬量约为 0.5%的聚甘露糖醛酸铬配合物。

本发明制备的海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物为浅绿色至深绿色无定形粉末或晶体，溶于水，不溶于乙醇、丙酮、乙醚和氯仿等有机溶剂，铬的质量百分含量为 0.1-15%，重均分子量≤10kD。

海洋聚甘露糖醛酸寡糖铬配合物（PMC）抗 II 型糖尿病的药效学实验

1 PMC 对胰岛细胞的促胰岛素分泌作用研究

下面是重均分子量为 3000Da 的 PMC 在不同浓度下，对 RIN-5F 胰岛细胞胰岛素分泌作用的影响以及胰淀素存在下对 PMC 促胰岛素分泌作用的影响研究结果。

实验方法：将胰岛细胞 RIN-5F 置入 96 孔板中，每孔约 2×10^5 个细胞，在温度 37℃和 5%的 CO₂ 培养箱中培养 72h。更换 RPMI 1640 培养液再培养 24 h，移去培养液，将细胞用新鲜培养液洗涤后，加入高浓度葡萄糖溶液，再加不同浓度经 0.22μm 滤膜过滤灭菌的 PMC 样品溶液。以纯水为空白组，以 1mmol/L 的格列苯脲为阳性对照组，在温度 37℃和 5%的 CO₂ 培养箱中培养 3h。取各孔培养液 300μL，离心除去细胞，将上清液用培养液稀释 100 倍，采用 ELISA 试剂盒测定胰岛素的浓度，考察 PMC 对胰岛细胞的促胰岛素分泌作用。

另取 RIN-5F 胰岛细胞用新鲜培养液洗涤后，各加入 100μmol/L 的胰淀素孵育 30min。除纯水空白组外，各组加入高浓度葡萄糖溶液和 100μmol/L 的 PMC 溶液，以 100μmol/L 的格列苯脲为阳性对照组，在温度 37℃和 5%的 CO₂ 培养箱中培养 3h。取各孔培养液 300μL，离心除去细胞，将上清液用培养液稀释 100 倍，采用 ELISA 试剂盒测定胰岛素的浓度，考察高

浓度胰淀素存在下对 PMC 促胰岛素分泌作用的影响。

实验结果：(1) 与空白对照组相比，高糖组胰岛素的分泌量显著增加，阳性对照组胰岛素的分泌量有非常显著的增加，表明实验模型可信。PMC 在 $30\mu\text{mol/L}$ 浓度下即具有显著刺激胰岛细胞分泌胰岛素的作用，且随着 PMC 浓度的增加，其刺激 RIN-5F 胰岛细胞分泌胰岛素的作用增强，呈剂量依赖关系。

(2) 在格列苯脲为阳性对照组中，经胰淀素孵育过的 RIN-5F 胰岛细胞，其胰岛素的分泌量明显降低。但在 PMC 实验组中，在胰淀素孵育 RIN-5F 胰岛细胞前后，胰岛素的分泌量无明显差异。

实验结论：PMC 和格列苯脲均具有明显的刺激胰岛细胞分泌胰岛素的作用。高浓度胰淀素的存在，可明显降低格列苯脲的促胰岛素分泌作用，但对 PMC 的促胰岛素分泌作用无明显影响。

胰淀素是由胰岛细胞分泌的一种正常激素，在病理条件下其分泌和代谢出现异常，可聚集形成纤维参与胰岛淀粉样蛋白沉积的形成。胰淀素在胰岛中的沉积，使 β -细胞发生凋亡进而导致胰岛素的分泌减少是 II 型糖尿病的典型发病机制，胰淀素在 II 型糖尿病的发生和发展过程中发挥着重要的作用。胰淀素通过在细胞表面的沉积，使格列苯脲的促胰岛素分泌作用明显降低，这是磺脲类药物继发性失效的原因之一。本实验发现，高浓度胰淀素的存在对 PMC 的促胰岛素分泌作用无明显影响，这表明 PMC 可通过与胰淀素的相互作用干扰其在细胞表面的沉积，抵抗胰淀素对胰岛细胞产生的毒性，从而在 II 型糖尿病的预防和治疗中显示出了良好的应用前景。

2 PMC 对 Wistar II 型糖尿病模型大鼠的治疗作用

实验方法：取 Wistar 大鼠 112 只，雌雄各半，体重 $200\sim 250\text{ g}$ 。动物预饲养 7 天后用于试验。随机选取 12 只作为正常对照组，雌雄各半，喂以基础饲料，自由进食，其余 100 只大鼠喂以高糖高脂饲料（基础饲料中加蔗糖 10%、猪油 10%、胆固醇 5%）饲养 4 周，同时自由饮水。4 周后，喂高糖高脂饲料大鼠均注射小剂量链脲佐菌素（STZ）诱导糖尿病，按 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 一次腹腔注射 1%STZ 溶液，临用前用枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液配制。72 h 后鼠尾取血测定各组大鼠空腹血糖，血糖 $\geq 11.1\text{ mmol/L}$ 者可认为造模成功。对造模成功的大鼠按体重随机分成 5 组，分别为模型对照组、阳性对照组、PMC 低、中、高剂量组。以上各组动物分别给药，正常对照组和模型对照组大鼠给予蒸馏水 $10\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ，阳性对照组给予盐酸二甲双胍肠溶片 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ，PMC 低、中、高剂量组分别给予 PMC 溶液，给药剂量分别为 $17\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $70\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ，给药体积 $10\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，1 次/d，连续给药 30 天。给药第 1 天 药后 2 h 测定血糖，观察是否具有急性降糖作用，给药开始后每周固定时间测定体重和摄食量，给药第 15 天 和第 30 天测定空腹血糖和空腹胰岛素，进行口服葡萄糖耐量试验，计算糖耐量曲线下面积（AUC）和胰岛素敏感指数（ISI）。末次药后 1 h，用 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠，腹主动脉取血，离心取血清，测定大鼠血清中游离脂肪酸（FFA）、甘油三酯（TG）、白蛋白（ALB）、总蛋白（TP）、总胆固醇（CHOL）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）的含量。处死动物，分离肝脏、肾脏、胰、脾脏、心脏，称

重,并计算脏器系数,将动物肾脏、胰腺,用4%甲醛溶液固定,石蜡包埋后切片,H-E染色,进行病理组织学检查。

实验结果:(1) 试验期间动物一般状态和体重变化情况:模型对照组动物出现毛色无光泽,尿量增多,少动,蜷卧等症状。阳性对照组、PMC低、中、高剂量组动物也有类似表现,但其症状较模型对照组有明显改善;各组动物体重变化无显著性差异($P>0.05$)。

(2) 摄食量变化:试验期间,各组动物在不同时期内,摄食量无显著性差异($P>0.05$)。给药3和4wk,PMC低、中、高剂量组平均摄食量较阳性对照组和模型对照组低。

(3) 急性降糖作用试验:药前阳性对照组、PMC低、中、高各组与模型对照组比较未见显著性差异($P>0.05$),药后各组血糖随给药剂量增加有一定的降低趋势。

(4) 口服葡萄糖耐量试验:给药第15天,模型对照组动物空腹血糖较高,给予葡萄糖后,血糖升高明显,AUC较空白对照组明显增加;阳性对照组动物空腹血糖较模型对照组低,给予葡萄糖后血糖亦有升高,但各时间点血糖值和AUC明显低于模型对照组,且30和60min血糖及AUC与模型对照组比较具有显著性差异($P<0.05$);PMC低剂量组动物空腹血糖和血糖升高趋势与阳性对照组一致,较模型对照组低,但其数值略高于阳性对照组,与模型对照组比较无统计学差异;随给药剂量增加,PMC中、高剂量组血糖降低效果减弱,高剂量组各时间点血糖值和AUC与模型对照组基本一致。模型对照组动物较空白对照组空腹胰岛素含量升高,胰岛素敏感指数降低;阳性对照组动物较模型对照组空腹胰岛素含量降低,胰岛素敏感指数升高,胰岛素敏感指数统计学分析有显著性差异($P<0.05$);PMC低剂量组动物与阳性对照组相似,与模型对照组比较有明显的降低空腹胰岛素含量、升高胰岛素敏感指数作用,有显著性差异($P<0.05$);随给药剂量增加,PMC中、高剂量降低空腹胰岛素含量、升高胰岛素敏感指数作用减弱。给药第30天,与给药第15天结果一致;阳性对照组和PMC低剂量组动物空腹血糖值和给予葡萄糖造成的血糖升高明显低于模型对照组;PMC随给药剂量增加抑制血糖升高作用明显减弱。阳性对照组和PMC低、高剂量组胰岛素敏感指数较模型对照组高,统计学分析有显著性差异($P<0.05$)。高剂量组胰岛素敏感指数相对高于低剂量组和中剂量组,但低、中、高剂量组未出现剂量依赖性增加趋势。

(5) PMC对大鼠血脂的影响:给药第30d,模型对照组、阳性对照组、PMC低、中、高剂量组FFA和TG均较空白组增加,说明胰岛素抵抗在模型对照组、阳性对照组、PMC低、中、高剂量组均存在。模型对照组、阳性对照组、PMC低、中、高剂量组、空白对照组各组之间TP无显著性差异,而模型对照组、PMC中、高剂量组ALB较空白对照组降低,提示肾脏功能可能有一定程度损伤。模型对照组、阳性对照组、PMC低、中、高剂量组CHOL、LDL-C均较空白对照组增加,且随着PMC剂量的增加,CHOL、LDL-C有增加趋势。HDL-C各组之间无显著性差异。

(6) PMC对大鼠脏器系数的影响:给药结束后模型对照组、阳性对照组、PMC低、中、高剂量组肝脏系数较空白组增加,PMC低剂量组肝脏系数相对较低,与模型对照组有显著性差异($P<0.05$)。心脏系数、脾脏系数、胰腺系数各组无显著性差异。肾脏系数模型对照组、阳性对照组、PMC低、中、高剂量组较空白组增高,空白组左右肾脏系数与模型对照组比较

有显著性差异 ($P<0.05$)。随 PMC 剂量的增加, 肝脏系数、胰腺系数、左右肾脏系数有增加趋势。

(7) 病理学检查结果: ①空白对照组大鼠肾脏皮、髓质分界清楚, 肾小管各段结构清晰, 间质纤维组织少, 肾小球分布均匀, 体积正常, 肾小球囊无粘连狭窄; 胰岛多为圆形或椭圆形的细胞团, 分散于胰腺腺泡之间, 数量较多, 胰岛的界限清, 无包膜, 细胞团的大小不一, 胰岛细胞的胞质丰富, 胞浆淡染呈浅粉红色, 核多为圆形深染; ②模型对照组大鼠, 与空白组大鼠比较, 肾脏肾小管上皮细胞空泡变性, 个别伴有蛋白管型, 肾皮质内肾小球毛细血管袢减少, 基质增多, 肾小囊囊腔增大; 胰腺内胰岛体积减小, 数量减少, 界限不清, 胰岛细胞数量也减少, 细胞肿胀, 胞质浅染, 细胞核固缩; ③阳性对照组大鼠, 亦存在肾脏肾小管上皮空泡变性, 肾小球毛细血管袢减少, 基质增多, 肾小囊囊腔增大, 但与模型对照组大鼠比较程度减轻; 胰腺内胰岛数量减少, 胰岛细胞数量减少, 细胞肿胀, 胞质浅染, 细胞核固缩, 与模型对照组大鼠比较未见明显差异; ④低剂量组大鼠, 肾脏肾小管上皮空泡变性, 皮质内肾小球毛细血管袢减少, 基质增多, 肾小囊囊腔增大, 但与模型对照组大鼠比较程度减轻, 未见肾小管内蛋白管型; 胰腺内胰岛数量减少, 胰岛细胞数量减少, 细胞肿胀, 胞质浅染, 细胞核固缩, 与模型对照组大鼠比较未见明显差异; ⑤中剂量组大鼠, 肾脏未见明显异常, 与空白组大鼠比较未见明显差异; 胰腺内胰岛数量比模型对照组有所增加, 但胰岛细胞数量仍然较少, 细胞肿胀, 胞质浅染, 细胞核固缩; ⑥高剂量组大鼠, 肾脏未见明显异常, 与空白组大鼠比较未见明显差异; 胰腺内胰岛数量增加, 胰岛细胞数量增加, 细胞肿胀程度减轻, 与模型对照组大鼠比较, 胰腺损伤减轻。

实验结论: 本试验条件下, PMC 对 II 型糖尿病大鼠体重和摄食量无明显影响, 无急性降糖作用, 不存在一过性血糖降低的危险, PMC 能够减轻糖负荷, 改善血脂代谢, 通过降低 FFA 提高 II 型糖尿病大鼠胰岛素敏感指数, 且具有一定的肾脏保护和减轻胰腺损伤作用。

3 PMC 对 KM II 型糖尿病模型小鼠的治疗作用

实验方法: 取 KM 小鼠 112 只, 雄性, 体重 18~22 g。随机选取 12 只小鼠作为正常对照组, 喂以基础饲料, 自由饮水, 其余 100 只小鼠喂以高糖高脂饲料 (含蔗糖 10%、猪油 10%、胆固醇 5%) 饲养 6 周, 同时自由饮水。6 周后, 喂高糖高脂饲料小鼠腹腔注射 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的 STZ, 分 5 次给予, 并继续给予高糖高脂饲料 1 周后, 测定各组小鼠空腹血糖, 浓度 $\geq 11.1 \text{ mmol/L}$ 者作为 II 型糖尿病小鼠模型。对造模成功的小鼠按体重随机分成 5 组, 分别为模型对照组、阳性对照组、PMC 低、中、高剂量组, 未做模型 12 只小鼠为正常对照组。正常对照组和模型对照组小鼠给予蒸馏水 $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 阳性对照组给予盐酸二甲双胍肠溶片 $225 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, PMC 低、中、高剂量组分别给予 PMC 溶液, 给药剂量分别为 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 给药体积 $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 连续给药 30 天。给药第 1 天 药后 2 h 测定血糖, 观察是否具有急性降糖作用。末次药后 1 h, 尾静脉针刺取血测定空腹血糖, 再摘除小鼠眼球取血, 离心取血清, 测定小鼠血清中胰岛素、游离脂肪酸 (FFA)、甘油三酯 (TG)、白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP)、总胆固醇 (CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的含量。将动物肾脏、胰腺, 用 4% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋

后切片, H-E 染色, 进行病理组织学检查。

实验结果: (1) 急性降糖作用试验结果: 空白对照组药前和药后 2 h 血糖与模型对照组比较具有显著性差异 ($P<0.05$); 阳性对照组、PMC 低、中、高剂量组动物药后 2 h 血糖与模型对照组比较有一定的降低趋势, 但与模型对照组比较无显著性差异, 各组给药前后自身对照比较, 二甲双胍组较药前降低 0.72 mmol/L 具有显著性差异 ($P<0.05$)、低剂量组较药前降低 0.46 mmol/L 具有显著性差异 ($P<0.05$)、中剂量组较药前降低 0.59 mmol/L、高剂量组较药前降低 0.37 mmol/L。

(2) 末次药后空腹血糖和空腹胰岛素: PMC 各剂量组动物空腹血糖值剂量依赖性升高; 阳性对照组、PMC 低、中剂量组空腹血糖值与模型对照组相比均降低, 具有显著性差异 ($P<0.05$), 但仍高于空白对照组, 高剂量组与模型对照组比较未见显著性差异 ($P>0.05$)。

阳性对照组、PMC 低、中、高剂量组空腹胰岛素水平均低于空白对照组, 与空白对照组比较均具有显著性差异 ($P<0.05$), 阳性对照组、PMC 低、中、高剂量组空腹胰岛素与模型对照组比较未见显著性差异 ($P>0.05$)。

阳性对照组、PMC 低、中剂量组动物胰岛素敏感指数较模型对照组升高, 具有显著性差异 ($P<0.05$)。阳性对照组胰岛素敏感指数与空白对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 模型对照组、PMC 低、中、高剂量组均较空白对照组低, 具有显著性差异 ($P<0.05$)。

(3) PMC 对 KM 小鼠血脂的影响: 模型对照组 FFA、TG、LDL-C、CHOL 显著升高, HDL-C 显著降低, 与空白对照组比较具有显著性差异 ($P<0.05$), 提示模型对照组存在高脂血症和胰岛素抵抗。模型对照组 TP 与空白对照组比较无显著性差异, 但 ALB 较空白对照组显著性降低, 提示肾功能可能存在一定的损伤。与模型对照组比较, 阳性对照组、低剂量组 FFA 降低, 具有显著性差异 ($P<0.05$), 提示胰岛素抵抗作用降低。PMC 低、中、高各剂量组 TG 均较模型对照组显著性降低 ($P<0.05$), PMC 低、中剂量组 CHOL 较模型对照组显著性降低 ($P<0.05$), 此外, PMC 低剂量组 HDL-C 较模型对照组显著性升高, 提示 PMC 具有一定的改善血脂代谢的作用。

(4) 病理学检查结果: ①空白对照组, 肾脏皮、髓质分界清楚, 肾小管各段结构清晰, 间质纤维组织少, 肾小球分布均匀, 体积正常, 肾小球囊无粘连狭窄。胰岛多为圆形或椭圆形的细胞团, 分散于胰腺腺泡之间, 数量较多, 胰岛的界限清, 无包膜, 细胞团的大小不一, 胰岛细胞的胞质丰富, 胞浆淡染呈浅粉红色, 核多为圆形深染; ②模型对照组, 与空白组比较, 肾脏肾小管上皮细胞空泡变性; 胰岛体积减小, 数量减少, 分布稀疏, 胰岛细胞肿胀, 胞质着色浅, 空泡增多, 细胞核固缩; ③阳性对照组, 肾脏未见明显异常; 胰岛与模型对照组比较体积增大, 数量增多, 胰岛细胞肿胀减轻; ④低剂量组, 肾脏未见明显异常; 胰岛与模型对照组比较体积增大, 数量增多, 胰岛细胞肿胀减轻; ⑤中剂量组和高剂量组, 肾脏未见明显异常; 胰岛体积增大, 数量增多, 与模型对照组大鼠比较, 胰腺损伤有所恢复。

实验结论: 在本试验条件下, PMC 对 II 型糖尿病小鼠无急性降糖作用, 不存在一过性血糖降低的危险, PMC 能够改善 II 型糖尿病小鼠血脂代谢, 降低 II 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗, 具有一定的增强胰岛素敏感性的作用, 且具有一定的肾脏保护和减轻胰腺损伤作用。