

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510094275.7

[51] Int. Cl.

**A61K 31/415 (2006.01)**

**A61K 9/08 (2006.01)**

**A61K 9/10 (2006.01)**

**A61K 9/16 (2006.01)**

**A61K 9/20 (2006.01)**

**A61K 9/48 (2006.01)**

[43] 公开日 2006 年 3 月 1 日

[11] 公开号 CN 1739502A

[51] Int. Cl. (续)

**A61P 3/10 (2006.01)**

**A61P 25/02 (2006.01)**

[22] 申请日 2005.9.8

[21] 申请号 200510094275.7

[71] 申请人 南京医科大学

地址 210029 江苏省南京市汉中路 140 号

共同申请人 浙江平湖莎普爱思制药有限公司

[72] 发明人 张银娣 余俊先 沈建平 吴建伟

金 弟 陈德康 丁虹彬 邱 俊

[74] 专利代理机构 南京苏高专利事务所

代理人 阙如生

权利要求书 1 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

苄达赖氨酸在制备治疗糖尿病周围神经病变  
药物中的应用

[57] 摘要

本发明公开了苄达赖氨酸的新用途,即在制药  
中的新应用。实际上是涉及苄达赖氨酸在制备治疗  
糖尿病周围神经病变药物中的应用。经药效学实验  
研究证明苄达赖氨酸具有非常显著的降低血糖和糖  
化血红蛋白以及促胰岛素分泌的作用,能增加坐骨  
神经 GSH - PX 的活力,抑制 COX - 2 的活力,显示  
BDL 对 DPN 大鼠有抗氧化和抗炎作用;具有显著降  
低神经和血清中 AGES 的含量,还具有显著降低醛  
糖还原酶(AR)的活性,能提高痛阈,提高糖尿病大  
鼠外周神经内  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性,增加运动神  
经传导速度等功能;在苄达赖氨酸中加入适当辅  
料,可以制成口服制剂,用它作为预防和治疗糖尿  
病周围神经病变。

- 
1. 苕达赖氨酸制剂在制备治疗糖尿病周围神经病变的药物中的应用。
  2. 根据权利要求 2 所述的苕达赖氨酸制剂，其特征是在苕达赖氨酸中加入适当的辅料，用常规的制备方法，可以制成片剂、颗粒剂、胶囊剂、口服液。

## 苄达赖氨酸在制备治疗糖尿病周围神经病变药物中的应用

### 一、技术领域

本发明涉及苄达赖氨酸制剂的新用途，尤其是涉及苄达赖氨酸在制备治疗糖尿病周围神经病变的药物中的应用。

### 二、背景技术

糖尿病神经病变是糖尿病最常见的并发症之一，病变可累及中枢神经和周围神经，尤以后者多见。目前我国有 5 000 万人以上正面临着糖尿病的威胁，据统计，糖尿病患者 5 年、10 年和 20 年后周围神经病变的发病率分别达到 30%、60% 和 90%。糖尿病神经病变可累及中枢神经和周围神经（diabetes peripheral neuropathy, DPN）等，其中以后者最为常见，且严重影响患者的生活质量。临床上糖尿病患者并发周围神经病变时，早期出现肢端感觉异常和痛觉过敏，随后有痛觉迟钝等感觉神经病变的症状，晚期可表现为肌张力下降，肌力减弱，甚至肌萎缩和瘫痪等运动神经病变的症状。DPN 的发病机理是多因素共同作用的结果，诸如代谢紊乱，血管损害，神经营养因子缺乏，氧化应激和免疫损伤因素等。可以预见，随着我国人民生活水平的迅速提高和人均寿命的延长，21 世纪我国糖尿病的患病率将不断上升，由 DPN 发展而发生比例也将显著提高。因此如何防治 DPN 正在成为本世纪全世界医药界的重要研究课题之一。

苄达赖氨酸（bendazac lysine, BDL）是由 Angelini 制药集团于 1983 年在意大利首先上市的抗白内障新药，其作用机制为抑制醛糖还原酶（aldose reductase, AR）的活性，不仅对糖性白内障有效，还对多种类型的早期老年性白内障有预防和治疗作用，而且不良反应轻微。

但至今未见到苄达赖氨酸能治疗糖尿病周围神经病变的有关报导。

### 三、发明内容

#### 1. 发明目的

本发明的目的在于提供苄达赖氨酸制剂的新用途，即在制备治疗糖尿病周围神经病变药物中的新应用。

#### 2. 技术方案

本发明涉及苄达赖氨酸制剂在制备治疗糖尿病周围神经病变的药物中的应用。

在苄达赖氨酸中加入适当的辅料，用常规的制备方法，可以制成片剂、颗粒剂、胶囊剂、口服液等口服制剂。

DPN 的发病机理是多因素共同作用的结果，诸如代谢紊乱，血管损害，神经营养因子缺乏，氧化应激和免疫损伤因素等。代谢紊乱因素主要有：

##### （1）、多元醇通路激活

神经细胞能量的获得主要依赖葡萄糖糖，高血糖引起的代谢紊乱直接影响神经细胞的代谢，是诱发 DPN 发病机制的主要因素。正常生理条件下，多元醇通路的代谢极低，糖尿病时非胰岛素依赖性组织（如晶体、神经、肾脏、视网膜等）的葡萄糖摄取大大增加，细胞内高糖激活醛糖还原酶（AR, aldose reductase），多元醇通

路有两个关键酶,即AR和山梨醇脱氢酶,葡萄糖经前者催化生成山梨醇,山梨醇再经山梨醇脱氢酶催化生成果糖。由于神经组织内不含果糖激酶,因此不能利用果糖,结果周围神经细胞内大量的山梨醇和果糖积聚,由于自身的极性。不易透过细胞膜,在胞内形成很高的渗透压,致神经纤维节段性脱髓鞘,不同程度的轴突损害;生理功能导致神经传导速度减慢,以远端感觉神经病变为主。多元醇聚积可竞争性地抑制神经组织摄取肌醇和干扰肌醇的正常代谢,致神经细胞内肌醇耗竭。肌醇减少,引起二酯酰甘油下降, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性降低,使神经细胞内外 $\text{Na}^+$ 浓度梯度下降,和 $\text{Ca}^{2+}$ 内流增加,出现神经传导功能降低和胶质细胞轴突分离结构变化。此外,AR的激活可以消耗大量的还原型辅酶II(NADPH),使还原型谷胱甘肽的含量下降致一些含巯基的酶或蛋白质易受氧化剂特别是过氧化物的损伤;一氧化氮合成酶(NOS)也需NADPH为辅酶,NADPH含量减少,NOS活性下降致一氧化氮合成减少,导致内皮依赖性血管舒张功能下降,局部血流灌注不足,神经内膜血流降低引起神经缺血,造成神经组织的结构或功能损伤。

## (2). 非酶促蛋白糖基化

正常情况下AGEs的生成极其缓慢,糖尿病时持续的高血糖可导致神经组织中蛋白质的非酶促化反应异常增高,大量的糖基化终末产物(AGEs, advanced glycation end products),导致血管壁增厚,管腔狭窄,使神经缺血,缺氧,后者,可增强氧化应激反应,自由基生成过多,使AGEs形成过多又可进一步加重氧化应激反应,造成恶性循环。AGEs与AGEs受体(RAGE)结合,可破坏髓鞘的完整性,影响神经组织的微管蛋白,影响具有神经分泌及轴索传导的微管系统的结构和功能,使细胞内基质蛋白对周围神经纤维的营养作用受到损害。

此外,糖尿病时,神经微血管低灌注引起的血管损害和血液粘滞度增高,血小板功能异常,红细胞变形能力下降,组织纤溶酶激活物减少及组织纤溶酶原抑制物(PAI-I)增多致血液流变学异常;神经生长因子(NGF)等缺乏,周围神经的雪旺细胞与神经元轴突之间的联系异常致神经营养和联系障碍,和氧化应激损伤及自身免疫损伤等因素均与DPN发病机制有关。

本课题组实验研究还发现,BDL能有效防治糖尿病肾病,而DPN与糖尿病肾病的发病机理有诸多共同之处。基于DPN的发病机制和已有的工作基础,本实验采用STZ腹腔注射造成糖尿病大鼠模型,研究BDL对糖尿病外周神经病变大鼠的整体生理状况、血糖和胰岛功能的影响、坐骨神经AGEs和AR活性的抑制作用、抗氧化作用、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响、神经纤维的形态学变化,多角度观察BDL对DPN的防治作用并阐明其机理。来说明其在制药领域中的新用途,从而进一步理解本发明的实质。

实验结果证明:

(1)、BDL 中高剂量治疗组(100、200 mg/kg)血糖和 HbA<sub>1c</sub> 与 DPN 模型组比较,表现出明显的降血糖作用 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。而且血浆胰岛素的含量比 DPN 模型组明显增多 ( $P<0.05$ , 或  $P<0.01$ )。

(2)、BDL 中高剂量治疗组坐骨神经 GSH-Px 的活力比 DPN 组显著增加 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。示 BDL 对 DPN 大鼠神经组织有抗氧化作用。

(3)、糖尿病状态下 COX-2/COX-1 活性大幅增加。BDL 低中高剂量组的 PGE<sub>2</sub> 尿排泄率较 DPN 组明显减少 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 说明 BDL 能抑制 COX-2 的活性;但 BDL 高剂量组的 TXB<sub>2</sub> 减少,表明对 COX-1 也有抑制作用。

(4)、BDL 低剂量治疗组(50 mg/kg)的神经和血清中 AGEs 含量较 DPN 组下降不明显, BDL 中高剂量治疗组降低神经和血清中 AGEs 含量的作用非常显著 ( $P<0.01$ , 或  $P<0.05$ )。

(5)、BDL 低中高剂量治疗组 AR 活性较 DPN 组低 ( $P<0.01$ ), 表明 BDL 对 AR 有明显的抑制作用。

(6)、BDL 三个剂量治疗组甩尾温度均比 DPN 组低,有非常显著性差异 ( $P<0.01$ )。运动神经传导速度(MNCV)测定结果表明, DPN 组的传导速度较正常组大鼠显著降低 ( $P<0.01$ ), 而 BDL 中高剂量组对 DPN 的传导速度下降有显著的改善作用 ( $P<0.01$ )。

(7)、BDL 低中高剂量治疗组均能显著地提高糖尿病大鼠 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性 ( $P<0.05$ , 或  $P<0.01$ )。

(8)、BDL 对 DPN 大鼠神经组织光镜下形态学显示,与正常大鼠相比,DPN 组大鼠坐骨神经神经外膜有大量的伊红色无结构的沉积物(糖基化蛋白),并伴有纤维化形成。BDL 低剂量组大鼠的以上形态学病变仅见轻微改变,而 BDL 中高剂量组改善则更为明显。

(9)、BDL 对 DPN 大鼠神经组织电镜下形态学显示 BDL 中高剂量组大鼠有髓神经纤维髓鞘厚度,电子密度,轴突节段性脱髓鞘现象有明显的减轻。BDL 低中高剂量组的有髓纤维面积比 DPN 组显著增加 ( $P<0.05$ , 或  $P<0.01$ );BDL 低中高剂量组的有髓纤维密度也降低。

### 3. 有益效果

从以上药理试验结果,可以得出本发明具有以下优点:

- (1) 本发明对已知苳达赖氨酸发现了新的医疗用途,开拓了一个新的应用领域,
- (2) 本发明的苳达赖氨酸药理效果好,作用强,预示着有良好的药用前景,
- (3) 本发明的苳达赖氨酸具有非常显著的降低血糖和糖化血红蛋白以及促胰岛素分泌的作用,且呈明显的剂量相关性。

(4) 苳达赖氨酸中高剂量治疗组增加坐骨神经 GSH-Px 的活力,抑制 COX-2 的活性,显示 BDL 对 DPN 大鼠有抗氧化和抗炎作用。

苄达赖氨酸具有显著降低神经和血清中 AGEs 的含量, 且呈明显的剂量相关性。

(5) 苄达赖氨酸具有非常显著的降低醛糖还原酶 (AR) 的活性, 呈明显的剂量相关。

(6) 苄达赖氨酸三个剂量治疗组均能提高痛阈, 提高糖尿病大鼠外周神经内  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性, 增加运动神经传导速度。

(7) 光镜或电镜下形态学显示苄达赖氨酸有明显的减轻 DPN 大鼠神经组织的病理改变

因此 BDL 作为 AR 的抑制剂对 DPN 有很好的治疗效果。

#### 四、具体实施方式

实施例 1: BDL 对 DPN 大鼠一般生理状况的影响

##### (一). 材 料 和 方 法

##### 1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley 品系大鼠, 体重 180~210g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物合格证号: SCXK (沪) 2003-0003。

##### 2 药品、试剂和仪器

苄达赖氨酸 (bendazac lysine, BDL) 为白色粉末, 分子量 428, 分子式  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ , 化学名: L-赖氨酸 (1-苄基-1H-吡啶-3-氧基) 乙酸盐, 由浙江平湖莎普爱斯制药有限公司提供, 批号 Lot030507, 其余试剂同第一部分。链脲霉素 (Streptozotocin, STZ) 购自 Calbiochem 公司, 批号 Lot. B51229。血糖检测药盒购自浙江东瓯生物工程有限公司, 批号 Lot2004030266。胰岛素放免检测药盒购自北京中国原子能科学研究院, 批号 Lot20040701。依帕司他 (epalrestat, EPS) 由江苏扬子江药业集团惠赠。大鼠尿白蛋白放免分析药盒购自北京福瑞生物工程公司, 批号 Lot20050301。PGE<sub>2</sub> 放免分析药盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 批号 Lot20040625。TXB<sub>2</sub> 放免分析药盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 批号 Lot20040625。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶测试盒购自南京建成生物工程研究所, 批号 Lot20040702。羟脯氨酸测试盒购自南京建成生物工程研究所, 批号 Lot20040702。 $\beta$ -NADPH 购自 Sigma 公司 (Sigma Co. St, Louis, USA) 批号 123K7012。DL-甘油醛购自 Sigma 公司 (Sigma Co. St, Louis, USA), 批号 Lot023K2512。其余化学试剂皆为分析纯级。

3 糖尿病造模和药物治疗 雄性 SD 大鼠, 禁食 12h 后, 腹腔一次性注射 STZ75mg. kg<sup>-1</sup> (临用前溶于 0.1mmol. L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠缓冲液, pH4.3), 72h 后尾静脉取血, 测定空腹血糖 >13.9mmol. L<sup>-1</sup> 者为造模成功。75 只糖尿病大鼠按照血糖

平行分组分为病理模型组(DPN),BDL低剂量治疗组(BL),BDL中剂量治疗组(BM),BDL高剂量治疗组(BH),依帕司他治疗组(EPS),每组15只,另设10只正常大鼠为对照组(NS),南京医科大学实验动物中心SPF级动物房饲养。糖尿病成模当日作为实验第一天,BDL治疗组的低中高剂量分别为50,100,200mg.kg<sup>-1</sup>,早晚各灌胃给药一次,EPS治疗组50mg.kg<sup>-1</sup>每天给药一次,BDL和EPS均用1%羧甲基纤维素(1%CMC)配成混悬液,按5.0ml.kg<sup>-1</sup>体重灌胃给药。实验中观察各组大鼠的体重、进食水量、尿量、毛发等一般状态,每周称体重1次。实验12周末测定各组大鼠的摆尾温度阈值,收集24小时尿液,20%乌拉坦5ml.kg<sup>-1</sup>麻醉,八道生理记录仪PowerLab/8SP测定大鼠坐骨神经传导速度,处死大鼠,腹主动脉收集血液,剥取两侧坐骨神经,进行各指标测定。

#### 4 指标测定

用大鼠摆尾温度值(Tailflick threshold temperature,TTT)测定痛阈。<sup>痛</sup>八道生理记录仪(Powerlab/8SP,澳大利亚ADInstruments公司),以单脉冲方波刺激进行坐骨神经传导速度(MNCV)测定。用葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖。HbA<sub>1c</sub>以亲和层析法测定;BUN用化学比色法测定,血浆胰岛素、尿白蛋白、尿PGE<sub>2</sub>和TXB<sub>2</sub>由南京医科大学同位素室采用放免法测定。血清和神经组织中AGEs的含量用荧光分光光度法测定。红细胞和坐骨神经AR活性用荧光分光光度计测定。

红细胞和坐骨神经Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性测试盒按南京建成生物工程研究所试剂盒说明进行。坐骨神经谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力的测定用紫外分光光度法。

腓肠神经纤维形态学采用光镜,电镜观察和图像分析

5 统计学处理 所有测定结果用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析ANOVA,药物治疗组与DPN组比较采用Dunnett's检验,P<0.05认为有统计学意义。

### (二) 结果

#### (1). BDL对DPN大鼠一般生理状况的影响

正常对照组大鼠精神振奋,毛发纯白光泽,活动频繁;进食量和饮水量正常,尿量尿量正常,垫料干燥,体重增长快。DPN病理模型组大鼠毛发枯黄、无光泽,精神萎靡,下腹部鼓胀,活动少,耳廓、眼球苍白,尾巴苍白湿冷,竖毛弓背,摄食量多,饮水量较正常组明显增多,尿量较正常组明显增多且粘性,垫料极易潮湿,体重增长缓慢,与DPN模型组相比,BDL高剂量治疗组大鼠在以上各方面皆有明显改善,接近于正常对照组

大鼠。BDL 低剂量治疗组的精神、活动、外观、摄食量和尿量则接近于 DN 模型组。BDL 中剂量治疗组和 EPS 阳性治疗组的整体表现则介于 BDL 低剂量治疗组和高剂量治疗组之间。每组均有若干只大鼠因相互撕咬或其他原因受伤感染致死。

至第 7~8 周开始同时并发白内障，并且随着时间的延长，发病率和病情呈明显剂量相关。明显加重。与 DPN 病理模型组相比，BDL 高剂量治疗组大鼠在各方面皆有很明显的改善，白内障发病率很低且病情明显减轻；BDL 中剂量治疗组外观、精神、活动接近高剂量治疗组，但摄食量、饮水量和尿量较之略多，白内障发病率较之略多；BDL 低剂量治疗组毛发偏黄、无光泽，精神不振，摄食量、饮水量和尿量较中剂量组多，白内障发病率较高，但比 DPN 模型组明显少。EPS 阳性治疗组的整体表现则介于 BDL 中剂量治疗组和高剂量治疗组之间。

(2) . BDL 对 DPN 大鼠肾功能的影响

DPN 组大鼠的肾指数、尿蛋白排泄率和血肌酐比正常组均明显增高，表明糖尿病大鼠的肾功能损害比较严重。BDL 高剂量组的三个指标均比 DPN 组降低( $P<0.05$ ) (见表 1)。

表 1. BDL 对 DPN 大鼠肾指数，尿蛋白排泄率和血清肌酐的作用( $\bar{x} \pm s$ )

组	n	肾指数( $\times 1000$ )	尿蛋白排泄率( $\mu\text{g}/\text{min}$ )	血清肌酐( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
NS	10	5.99 $\pm$ 0.33	0.35 $\pm$ 0.27	140.25 $\pm$ 14.31
DPN	10	15.69 $\pm$ 4.68 <sup>***</sup>	1.98 $\pm$ 1.21 <sup>***</sup>	204.28 $\pm$ 67.71 <sup>***</sup>
BL	10	12.31 $\pm$ 3.25	2.05 $\pm$ 0.84	175.1 $\pm$ 39.49
BM	11	12.23 $\pm$ 2.15	1.42 $\pm$ 0.68	175.83 $\pm$ 47.68
BH	11	11.31 $\pm$ 3.38*	0.95 $\pm$ 0.49*	149.11 $\pm$ 27.39*
EPS	10	13.65 $\pm$ 1.17	1.53 $\pm$ 0.59	189.13 $\pm$ 60.11

注：NS 组与 DPN 组比，<sup>\*\*\*</sup> $P<0.01$ ；BDL 组与 DPN 组比，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$

实施例 2 BDL 对 DPN 大鼠血糖和糖化血红蛋白的影响

1. 材料和方法 (同实施例 1)

2 结果

DPN 组大鼠的血糖和糖化血红蛋白 ( $\text{HbA}_{1\text{C}}$ ) 明显高于正常对照组，有非常显著性差异 ( $P<0.01$ )，表明造模是成功的。BDL 低剂量治疗组大鼠的血糖和  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  与 DPN 组相比，降血糖不明显；而 BDL 中高剂量治疗组血糖和  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  与 DPN 组比较，表现出明显的降血糖作用 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。阳性药 EPS 治疗组则没有降血糖的作用(见表 2)。



表 2. BDL 对 DPN 大鼠血糖和糖化蛋白的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	血糖 (mmol. L <sup>-1</sup> )		糖化蛋白 (%)
		给药前	给药后	
NS	10 (起始)	3.14±0.45	3.69±0.47	7.56±1.43
DPN	10	15.15±1.45	22.24±6.02 <sup>##</sup>	14.30±1.06 <sup>##</sup>
BL	10	15.44±0.98	17.89±3.31	10.59±2.36
BM	11	14.73±0.93	15.72±3.81 <sup>**</sup>	9.66±5.00 <sup>*</sup>
BH	11	15.34±1.24	12.37±2.36 <sup>**</sup>	9.16±4.30 <sup>*</sup>
EPS	10	14.81±1.69	19.29±4.19	13.02±1.73

注: NS 组与 DPN 组相比, <sup>##</sup>P<0.01; 药物治疗组与 DPN 组比, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01

3 BDL 对 DPN 大鼠的促胰岛素分泌作用

正常组大鼠血浆胰岛素的含量比 DPN 组显著增多 ( $P<0.01$ ), BDL 低剂量治疗组胰岛素含量仅轻微增加, BDL 中高剂量组血浆胰岛素的含量比 DPN 组明显增多 ( $P<0.05$ , 或  $P<0.01$ )。阳性药 EPS 治疗组血浆胰岛素的含量较 DPN 组没有增加 (见表 3)。

表 3. BDL 对 DPN 大鼠血浆胰岛素的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	血浆胰岛素 (mIU. L <sup>-1</sup> )
NS	10	32.66±15.85
DPN	10	6.34±2.56 <sup>##</sup>
BL	10	7.82±5.76
BM	11	16.24±11.05 <sup>*</sup>
BH	11	19.64±7.21 <sup>**</sup>
EPS	10	7.41±3.23

注: NS 组与 DPN 组相比, <sup>##</sup>P<0.01; 药物治疗组与 DPN 组相比, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01

实施例 3 BDL 对 DPN 大鼠神经组织 AR 和红细胞 AR 的抑制作用

1 材料和方法 (同实施例 1)

2 结果

DPN 组大鼠坐骨神经和红细胞中 AR 活性较正常组显著升高 ( $P<0.01$ ), 表明高血糖时组织细胞中 AR 活性被激活。BDL 低中高剂量治疗组 AR 活性较 DPN 组低 ( $P<0.01$ ), 表明 BDL 对 AR 有抑制作用。EPS 治疗组 AR 活性与 BDL 中高剂量组接近, 显著低于 DPN 组 ( $P<0.01$ ), 对 AR 表现出较强的抑制作用 (见表 4)

表 4. BDL 对 DPN 大鼠神经组织和红细胞醛糖还原酶的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AR in nerves(U/mgprot)	AR in erythrocyte(U/gHb)
NS	10	8.07±4.74	9.45±1.67
DPN	10	27.63±7.56 <sup>##</sup>	26.9±7.31 <sup>##</sup>
BL	10	17.78±5.88*	19.96±3.16*
BM	11	14.64±7.23**	15.46±4.71**
BH	11	13.39±6.44**	13.04±4.45**
EPS	10	12.58±9.44**	14.89±5.58**

注: NS 组与 DPN 组相比, <sup>##</sup>P<0.01; 药物治疗组与 DPN 组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01

实施例 4 BDL 对糖尿病肾病大鼠的抗氧化作用及对 DPN 大鼠尿中 COX-2 的影响

## 1 材料和方法 (同实施例 1)

## 2 结果

### (1). BDL 对 DPN 大鼠神经组织的抗氧化作用

DPN 组大鼠与正常大鼠相比, 坐骨神经谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活力明显降低 (P<0.01)。BDL 中高剂量治疗组坐骨神经 GSH-Px 的活力比 DPN 组显著增加 (P<0.05, P<0.01)。EPS 组 GSH-Px 的活力未见明显增加 (见表 5)。

表 5. BDL 对 DPN 大鼠神经组织谷胱甘肽-过氧化物酶的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	神经组织谷胱甘肽-过氧化物酶活性(U/mgprot)
NS	10	41.37±10.14
DPN	10	20.07±11.14 <sup>##</sup>
BL	10	29.58±15.34
BM	11	38.67±11.52*
BH	11	42.65±12.34**
EPS	10	29.05±14.72

注: NS 组与 DPN 组相比, <sup>##</sup>P<0.01; 药物治疗组与 DPN 组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01

### (2). BDL 对 DPN 大鼠尿中 COX-2 的影响

正常组大鼠尿 PGE<sub>2</sub> 和 TXB<sub>2</sub> 排泄率极低, DPN 组大鼠 PGE<sub>2</sub> 的排泄率是正常组的 9 倍, TXB<sub>2</sub> 的排泄率是正常组的 7 倍, 表明糖尿病状态下 COX-2/COX-1 活性大幅增加。BDL 低中高剂量组的 PGE<sub>2</sub> 排泄率较 DPN 组明显减少 (P<0.05 或 P<0.01), 说明 BDL 能抑制 COX-2 的活性; 但 BDL 高剂量组的 TXB<sub>2</sub> 减少, 表明对 COX-1 也有抑制作用。EPS 组 PGE<sub>2</sub> 和 TXB<sub>2</sub> 排泄率超过或接近 DPN 组, 对 COX-2/COX-1 没有

抑制作用（见表6）。

表 6. BDL 对 DPN 大鼠尿 PGE<sub>2</sub> 和 TXB<sub>2</sub>排泄率的作用 ( $\bar{x} \pm s$ ) ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	尿 PGE <sub>2</sub> 排泄率 (pg/min)	尿 TXB <sub>2</sub> 排泄率 (pg/min)
NS	10	30.5±17.57	8.35±2.60
DPN	10	277.22±212.39 <sup>***</sup>	55.32±24.65 <sup>***</sup>
BL	10	83.94±36.25 <sup>**</sup>	45.55±28.47
BM	11	88.01±36.44 <sup>**</sup>	40.94±10.01
BH	11	132.83±54.36 <sup>*</sup>	33.89±10.8 <sup>*</sup>
EPS	10	327.0±128.44	35.02±5.34

注：NS 组与 DPN 组相比，<sup>\*\*\*</sup>*P*<0.01；药物治疗组与 DPN 组相比，<sup>\*</sup>*P*<0.05，<sup>\*\*</sup>*P*<0.01  
实施例 5 BDL 对 DPN 大鼠神经组织 AGEs 和血清 AGEs 的影响

1 材料和方法（同实施例 1）

2 结果

DPN 组大鼠神经组织中的 AGEs 相对含量和血清中的 AGEs 相对含量与正常对照组相比明显升高，有非常显著性差异（*P*<0.01）。BDL 低剂量治疗组的神经和血清中 AGEs 含量较 DPN 组下降不明显，BDL 中高剂量治疗组降低神经和血清中 AGEs 含量的作用非常显著（*P*<0.01，或 *P*<0.05）。EPS 治疗组神经和血清中 AGEs 含量也都有显著性降低（*P*<0.01），说明 BDL 和 EPS 有降低 AGEs 的作用，且 BDL 的作用呈剂量依赖性（见表 7）。

表 7. BDL 对 DPN 大鼠神经组织 AGEs 和血清 AGEs 的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	神经组织 AGEs (AUF/mgHYP)	血清 AGEs (AUF/mgprot)
NS	10	12.32±4.17	6.13±1.40
DPN	10	47.95±14.49 <sup>***</sup>	20.29±7.51 <sup>***</sup>
BL	10	40.07±6.38	19.16±5.54
BM	11	33.02±7.87 <sup>**</sup>	13.45±2.93 <sup>*</sup>
BH	11	24.45±3.61 <sup>**</sup>	11.43±5.44 <sup>*</sup>
EPS	10	26.99±7.52 <sup>**</sup>	12.02±2.27 <sup>**</sup>

注：NS 组与 DPN 组相比，<sup>\*\*\*</sup>*P*<0.01；药物治疗组与 DPN 组相比，<sup>\*</sup>*P*<0.05，<sup>\*\*</sup>*P*<0.01  
实施例 6 BDL 对 DPN 大鼠摆尾温度和运动神经传导速度的影响

1 材料和方法（同实施例 1）

2 结果

DPN 病理模型组大鼠的摆尾温度值与正常组大鼠相比，显著增高，表明饲养 12 周的糖尿病大鼠并发外周神经病变，感觉神经受累。BDL 三个剂量治疗组甩尾温度均比 DPN 组低，有非常显著性差异（*P*<0.01）。运动神经传导速度测定结

果表明，正常组大鼠 MNCV 均值 54.42m/s, 为生理情况下的神经传导速度，DPN 组的传导速度较正常组大鼠显著降低 ( $P<0.01$ )，而 BDL 中高剂量组对 DPN 的传导速度下降有显著的改善作用 ( $P<0.01$ )。EPS 对 DPN 大鼠的摆尾温度和 MNCV 均有显著的改善作用 ( $P<0.01$ ) (见表 8)。

表 8. BDL 对 DPN 大鼠摆尾温度值和运动神经传导速度的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 n		摆尾温度值 (TTT, °C)	运动神经传导速度 (MNCV, m/s)
NS	10	43.20±0.71	54.42±5.18
DPN	10	48.25±0.92 <sup>##</sup>	38.79±5.09 <sup>##</sup>
BL	10	47.25±1.18	45.13±3.49
BM	11	46.05±1.04 <sup>**</sup>	48.02±4.28 <sup>**</sup>
BH	11	44.86±0.84 <sup>**</sup>	50.83±7.86 <sup>**</sup>
EPS	10	44.75±0.79 <sup>**</sup>	51.27±7.90 <sup>**</sup>

注：正常对照组与 DPN 组相比，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；药物治疗组与 DPN 组相比，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$

实施例 7 BDL 对 DPN 大鼠坐骨神经组织和红细胞 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响

1 材料和方法 (同实施例 1)

2 结果

DPN 组大鼠神经组织和红细胞 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性较正常组显著降低 ( $P<0.01$ )，表明糖尿病状态下组织细胞上 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活力下降。与 DPN 组相比，BDL 低中高剂量治疗组均能显著地提高糖尿病大鼠 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性 ( $P<0.05$ ，或  $P<0.01$ )。阳性药 EPS 治疗组也能显著提高 DPN 组大鼠神经组织和红细胞 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性 ( $P<0.05$ ，或  $P<0.01$ ) (见表 9)。

表 9. BDL 对 DPN 大鼠坐骨神经组织和红细胞 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

Group		Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶活性 (μmolPi/mgprot/hour)	
		N	坐骨神经 红细胞
NS	10	5.45±0.81	0.353±0.138
DPN	10	3.20±0.54 <sup>##</sup>	0.225±0.096 <sup>##</sup>
BL	10	4.95±1.30 <sup>*</sup>	0.318±0.083 <sup>*</sup>
BM	11	5.24±1.60 <sup>**</sup>	0.330±0.055 <sup>*</sup>
BH	11	4.82±1.77 <sup>*</sup>	0.364±0.101 <sup>**</sup>
EPS	10	5.08±1.12 <sup>**</sup>	0.342±0.066 <sup>*</sup>

注：NS 组与 DPN 组相比，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；药物治疗组与 DPN 组相比，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$

实施例 8 BDL 对 DPN 大鼠神经组织形态学的影响

1 材料和方法 （同实施例 1）

2 结果

(1) BDL 对 DPN 大鼠神经组织光镜下形态学的影响

光镜显示，与正常大鼠相比，DPN 组大鼠坐骨神经神经外膜有大量的伊红色无结构的沉积物（糖基化蛋白），并伴有纤维化形成。BDL 低剂量组大鼠的以上形态学病变仅见轻微改变，而 BDL 中高剂量组和 EPS 组的形态学改善则较为明显（见表 10）。

表 10. BDL 对 DPN 大鼠神经外膜糖基化蛋白的作用

Group	n	神经外膜糖基化蛋白沉积	
		粉染无结构物沉积（+/-）	粉染无结构物比例（%）
NS	10	0/10	0%
DPN	10	7/3	70%
BL	10	3/7	30%
BM	11	4/7	36%
BH	11	2/9	19%
EPS	10	3/7	30%

(2) BDL 对 DPN 大鼠神经组织电镜下形态学的影响

NS 组大鼠有髓神经纤维表面 Schwann 细胞膜完整，髓鞘结构清晰，电子密度一致，轴突内轴丝结构清晰；DPN 组大鼠有髓神经纤维髓鞘厚度不一，电子密度不等，轴突有明显的节段性脱髓鞘现象，且 Ranvier 结分布不均。BDL 低剂量组有髓神经纤维髓鞘厚度不一，轴突有比较明显的脱髓鞘改变；BDL 中高剂量和 EPS 组病理改变则明显减轻。

DPN 组大鼠的有髓纤维面积比正常组显著减少，而有髓纤维密度反而增加。BDL 低中高剂量组和 EPS 组的有髓纤维面积比正常组显著减少，但比 DPN 组显著增加（ $P<0.05$ , 或  $P<0.01$ ）；BDL 低中高剂量组的有髓纤维密度也比 DPN 组减少，但 BDL 中剂量组减少显著（ $P<0.05$ ）。各组的轴突/髓鞘比值无显著变化（见表 11）。

Tab11. Morphometric data of myelinate nerve fibres in the sural nerve of DPN rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	有髓纤维面积 ( $\mu m^2$ )	有髓纤维密度 ( $n \times 10^3/mm^2$ )	轴突/髓鞘比
NS	10	55.77 $\pm$ 3.10	11.05 $\pm$ 1.67	0.5376 $\pm$ 0.0600
DPN	10	34.24 $\pm$ 7.25 <sup>***</sup>	17.57 $\pm$ 1.73 <sup>***</sup>	0.4941 $\pm$ 0.0617
BL	10	45.16 $\pm$ 4.27 <sup>**</sup>	15.09 $\pm$ 2.08	0.5028 $\pm$ 0.0428
BM	11	50.90 $\pm$ 6.70 <sup>**</sup>	13.06 $\pm$ 2.26 <sup>*</sup>	0.5354 $\pm$ 0.0711
BH	11	44.01 $\pm$ 5.77 <sup>*</sup>	15.66 $\pm$ 2.32	0.5253 $\pm$ 0.0613
EPS	10	48.72 $\pm$ 7.78 <sup>**</sup>	15.52 $\pm$ 1.46	0.5251 $\pm$ 0.0646

注: NS 组与 DPN 组相比, <sup>\*\*\*</sup>P<0.01; 药物治疗组与 DPN 组相比, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01

### 实施例 9 苄达赖氨酸胶囊剂的制备

#### 1、苄达赖氨酸的口服胶囊制剂

##### 1.1、口服胶囊的原料配比

苄达赖氨酸	200g
硬脂酸镁	3.5g
50%乙醇	适量
制成	1000 粒

1.2、制粒灌装: 取 200g 苄达赖氨酸粉通过 80 目筛后与 32g 淀粉混匀, 加入适量的 50%乙醇作为湿润剂, 搅拌成适度的软材, 过 18 目筛, 制成松紧适度的颗粒, 在 60-70℃下干燥, 干粒经 16 目筛整, 加入 3.5g 硬脂酸镁混匀后制成 1000 粒, 测定含量, 按颗粒含量计算后灌胶囊。

### 实施例 10 苄达赖氨酸片剂组分的含量配比及制备方法

#### 1、片剂的原料配比

苄达赖氨酸	200g
淀粉	32g
硬脂酸镁	3.5g
95%乙醇	适量

制成 1000 片

2、制粒压片: 取 200g 通过 80 目筛的苄达赖氨酸(BDC)粉与 32g 淀粉混匀, 加入适量的 95%乙醇作湿润剂, 搅拌成适度之软材, 过 18 目筛, 制成松紧适度的颗粒, 经 50-60℃干燥, 干粒称重后, 加入 3.5g 硬脂酸镁, 经 18 目筛整粒混匀后, 测定含量与水分, 供压片用, 压片按照颗粒含量计算片重, 用  $\Phi 10mm$  片凹冲压片, 检查合格后分装。