

格列本脲在糖尿病大鼠体内药动学评价

李育卿^{1,2}, 魏玉辉¹, 周燕¹, 王丹^{1,2}, 张帆^{1,2}, 武新安¹

(1. 兰州大学第一医院药剂科, 兰州 730000; 2. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

【摘要】 目的 从格列本脲的药动学考察链脲佐菌素诱导糖尿病模型大鼠的适宜性。方法 腹腔注射链脲佐菌素 60 mg/kg 诱发糖尿病大鼠模型, 与正常大鼠灌胃给予 10 mg/kg 格列本脲, 采用高效液相色谱法分析其血药浓度。用 DAS 2.0 软件处理数据, 计算药动学参数。结果 格列本脲在正常大鼠和模型大鼠体内的药动学参数为: T_{max} 分别是 84.784 min, 255.427 min; C_{max} 分别是 0.259 mg/L, 0.910 mg/L; CL 分别是 0.092 L/min/kg, 0.019 L/min/kg; $AUC_{(0-720min)}$ 分别是 509.523 mg/L·min, 1528.280 mg/L·min。结论 格列本脲在正常大鼠与糖尿病大鼠体内的药动学过程有显著性差异, 但此结果与文献不一致, 此模型可能不适合考察药物在 II 型糖尿病病态下的药动学研究。

【关键词】 格列本脲; 链脲佐菌素; 模型; 糖尿病大鼠; 药动学

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0015-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.004

Evaluation of the Pharmacokinetics of Glibenclamide in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Models

LI Yu-qing^{1,2}, WEI Yu-hui¹, ZHOU Yan¹, ZHANG Fan^{1,2}, Wang DAN^{1,2}, WU Xin-an¹

(1. Department of Pharmacy, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. College of Pharmaceutical Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Objective To explore whether streptozotocin-induced diabetic rat models are suitable to evaluate the pharmacokinetic processes of glibenclamide in the diabetic state. **Methods** Diabetic rats induced by intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin and normal rats were administered glibenclamide at a dose of 10 mg/kg. The concentration of glibenclamide was determined by high performance liquid chromatography. Pharmacokinetic parameters were calculated using DAS 2.0 software. **Results** The pharmacokinetic parameters of glibenclamide in normal rats were as following: T_{max} was 84.784 min, C_{max} was 0.259 mg/L, CL/F was 0.092 L/min/kg and $AUC_{(0-720min)}$ was 509.523 mg/L·min. The same parameters in diabetic rats: T_{max} was 255.427 min, C_{max} was 0.910 mg/L, CL was 0.092 L/min/kg and $AUC_{(0-720min)}$ 1528.280 was mg/L·min. **Conclusions** There were significant differences between pharmacokinetic values of normal and diabetic rats. The results were different from that reported in the literature. Therefore, streptozotocin-induced diabetic rat models might not be suitable for pharmacokinetic evaluation of drugs in type II diabetic conditions.

【Key words】 Glibenclamide; Streptozotocin; Rat model, type II diabetes mellitus; pharmacokinetics

链脲佐菌素能够快速而稳定地选择性破坏胰岛 β 细胞功能, 诱发大鼠实验性糖尿病模型的常用

[作者简介] 李育卿(1987-), 女, 硕士, 从事药物代谢动力学研究。电话: 15009426240; E-mail: 0544023@163.com。

[通讯作者] 武新安(1962-), 男, 主任药师, 博士, 从事药物代谢动力学及药物转运体研究。电话: (0931) 8616392; Email: xinanwu6511@163.com。

药物。空腹一次性腹腔注射大剂量(50 ~ 70 mg/kg)^[1-4]的链脲佐菌素制备的糖尿病大鼠模型是常常被用来评价评价降糖药物药效的手段。考察糖尿病动物成模的指标一般以空腹血糖值为依据,然而该模型对药物的吸收、分布、代谢和排泄过程是否和糖尿病病人一致少有报道。我们通过比较 Niopas 等^[5]报道的健康受试者与 Coppack 等^[6]报道的 II 型糖尿病患者口服格列本脲药动学参数后发现,健康受试者和糖尿病人格列本脲的药动学参数无明显变化,这意味着格列本脲在健康受试者与 II 型糖尿病病人(无肾病)的体内过程无差异。本实验试图比较格列本脲在正常大鼠和一次性腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素诱发糖尿病大鼠模型的药动学是否存在差异,并与文献健康受试者和糖尿病人药动学相比,研究此模型与 II 型糖尿病病人的药动学是否一致,从而为确定链脲佐菌素诱发糖尿病大鼠模型是否适合作为药物的评价模型提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 二元梯度泵,SPD-M20A 二级阵列检测器,DGU-20A 在线脱气系统,SL-20A 自动进样系统,CTO-20A 柱温箱,LC Solution 色谱工作站(岛津,日本);SHZ-III 型循环真空水泵(上海亚荣生化仪器厂),高速离心机(深圳国华仪器厂),XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂),LT-224S 电子天平(北京赛多利斯)。

1.2 药品与试剂

链脲佐菌素(Sigma 公司,批号:18883-66-4),格列本脲对照品(中国药品生物制品检定所,批号:10135-0103),地西洋对照品(中国药品生物制品检定所,批号:1230-960),格列本脲片(山西云鹏制药有限公司,批号:A081001),甲醇(色谱纯,德国默克公司),乙腈(色谱纯,山东禹王实业公司禹城化工厂),其他试剂均为国产分析纯。去离子水(兰州大学第一医院自制)。

1.3 动物

健康雄性 Wistar 大鼠,体重 200 ~ 250 g,购于甘肃省中医学院实验动物中心,合格证号 SCXK(甘)2004-0006。所有大鼠使用代谢笼单只喂养,自由饮水及给予标准化饲料。

1.4 方法

1.4.1 色谱条件:色谱柱:伊利特 Hypersil ODS2

(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相:甲醇 - 0.2% 乙酸溶液(57:43, v/v),流速:1 mL/min,柱温:40℃,流检测波长:229 nm,进样量:20 μL。

1.4.2 储备液的配制:

1.4.2.1 内标溶液:精密称取地西洋对照品适量置于 100 mL 的容量瓶中,用乙腈定容至 100 mL,使地西洋浓度为 0.205 μg/mL,作为内标溶液。

1.4.2.2 格列本脲储备液:精密称取格列本脲对照品适量置于 50 mL 的容量瓶中,用内标溶液配制成 0.0852 mg/mL 的储备液,置于 4℃ 冰箱中保存,使用时用内标溶液稀释至所需浓度。

1.4.3 血浆样品处理:取血浆样品 100 μL,加内标溶液 200 μL,漩涡振荡 2 min,3 500 r/min 离心 10 min,将除蛋白后的溶液转移至装有 30 mg ~ 50 mg 氯化钠的 1.5 mL 离心管中,漩涡振荡 1 min,静置吸取上层有机层,40℃ 水浴氮气吹至少许,用乙腈溶解至 50 μL,超声、混匀后取 20 μL 进样分析。

1.4.4 色谱行为:在上述色谱条件下,格列本脲的保留时间为 12.55 min,内标的保留时间为 8.57 min。内源性杂质不干扰格列本脲与内标的分离测定。图 1 为空白血样、加样血浆及含内标的血浆样品色谱图。

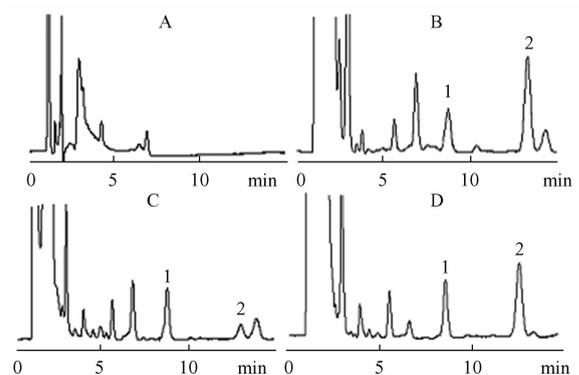


图 1 HPLC 色谱图

A-空白血浆;B-空白血浆 + 格列本脲标准品 + 内标;C-正常大鼠灌胃给予 10 mg/kg 后 120 min 的血浆样品;D-糖尿病大鼠灌胃给予 10 mg/kg 后 120 min 的血浆样品;(1 为内标,2 为格列本脲)

Fig. 1 HPLC chromatograms of blood plasma of the rats

Note: A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with glibenclamide and internal standard; C: Nomal rat plasma collected at two hours after intragastrically administration of glibenclamide 10 mg/kg; D: Diabetic rat plasma taken at two hours after intragastrically administration of glibenclamide 10 mg/kg; (1: internal standard; 2: glibenclamide)

1.4.5 标准曲线制备和最低检测浓度:精密吸取格列本脲对照品储备液适量,用内标溶液稀释至 15.62、31.25、62.50、125.00、500.00、1 000.00、1

500.00 $\mu\text{g/L}$ 的系列对照品溶液。取上述对照品溶液 200 μL 与 100 μL 空白大鼠血浆混合按血浆样品处理 1.4.3 项下操作,进样分析。记录格列本脲和内标峰面积。以格列本脲与内标的峰面积比为纵坐标(Y),格列本脲的浓度为横坐标(X)进行线性回归,回归得方程为: $Y = 3.8771X + 0.0378, r^2 = 0.9993$ 。表明格列本脲在 15.62 $\mu\text{g/L}$ ~ 1 500.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内,浓度与峰面积的线性关系良好。检测限($S/N \geq 3$)为 3 $\mu\text{g/L}$,血浆中格列本脲定量限($S/N \geq 10$)为 8 $\mu\text{g/L}$ 。

1.4.6 精密度:配制高、中、低 3 种浓度(1000.00、125.00、31.25 $\mu\text{g/L}$)三个不同浓度的格列本脲标准质控样品,按血浆样品处理 1.4.3 项下操作,进行色谱分析,代入标准曲线方程计算格列本脲浓度。一日内测定 5 次及每日测定 1 次,连续 5 d,计算日内日间精密度。日内精密度分别为 3.72%, 3.31%, 4.58%。日间精密度分别为 5.47%, 9.12%, 8.48%。

1.4.7 回收率:配制高、中、低(1000.00、125.00、31.25 $\mu\text{g/L}$)三个不同浓度的格列本脲标准质控样品,按血浆样品处理 1.4.3 项下操作,进行色谱分析,代入标准曲线方程计算格列本脲浓度。将实测值与理论值相比得到相对回收率,高、中、低浓度的格列本脲在大鼠血浆中的平均回收率分别为(95.73 \pm 6.17)%、(102.58 \pm 4.55)%、(93.23 \pm 3.07)%。

1.5 药动学研究

1.5.1 造模及采集血样:健康雄性 Wistar 大鼠 13 只,(200 ~ 250) g,随机分为两组,即正常组 5 只和糖尿病组 8 只。糖尿病组大鼠禁食 16 h 后腹腔注射链脲佐菌素 60 mg/kg。72 h 后断尾取空腹血,葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖。将空腹血糖高于 16.7 mmol/L 的大鼠视为造模成功,取 5 只纳入实验。给药前禁食 12 h,自由饮水,灌胃给予格列本脲混悬液 10 mg/kg。于给药前及给药后 15、30、60、90、120、150、180、240、360、540、720 min,经股动脉插管采血 0.25 mL,同时补充等量含 40 IU/mL 肝素钠的生理盐水,血样立刻转入涂过肝素钠的 1.5 mL 离心管中,在 3 500 r/min 离心 5 min 得血浆,取血浆 100 μL 在血浆样品处理 1.4.3 项下操作,测定血药浓度。

1.5.2 数据处理

血药浓度测定结果用 Drug and Statistics of Windows 2.0 (DAS 2.0)统计软件进行处理,计算药

动学参数。正常组与模型组比较采取 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 药时曲线及与药动学参数

图 2 为格列本脲在正常组和模型组的药-时曲线图。由图可以看出,糖尿病大鼠组格列本脲的血药浓度高于正常大鼠组,且达峰时间延长。

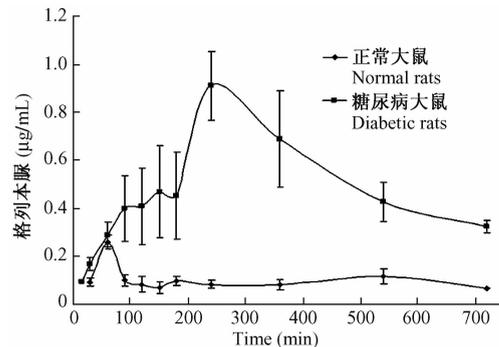


图 2 灌胃给予格列本脲 10 mg/kg 正常大鼠和糖尿病大鼠血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of glibenclamide after intragastrically administration in a dose of 10 mg/kg in normal rats and diabetic rats($\bar{x} \pm s, n = 5$)

对药时曲线中的数据用 DAS 2.0 统计软件进行处理,拟合后符合权重因子为 1/CC 的一室模型,主要的药动学参数见表 1。

3 讨论

一次性大剂量注射链脲佐菌素制备的糖尿病大鼠模型常被用来研究药物在糖尿病状态下的药动学和药效学^[1,4,7-9]。武开明^[7]采用一次性腹腔

表 1 正常大鼠组和糖尿病大鼠组格列本脲主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.1 Pharmacokinetic parameters of glibenclamide in the normal and diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数 Parameters	正常大鼠组 Normal rats	糖尿病大鼠组 Diabetic rats
T_{max} (min)	84.784 \pm 15.961	255.427 \pm 23.795 *
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.259 \pm 0.031	0.910 \pm 0.142 *
CL(L/min/kg)	0.092 \pm 0.012	0.019 \pm 0.008 *
$AUC_{(0-720\text{min})}$ (mg/L·min)	57.752 \pm 18.932	321.24 \pm 130.374 *

注: C_{max} , 达峰血药浓度; T_{max} , 血药浓度达峰时间; CL, 清除率; $AUC_{(0-720\text{min})}$, 药时曲线下面积。与正常组相比,* $P < 0.05$
Note: C_{max} : peak plasma concentration; T_{max} : time to reach C_{max} ; CL: total body clearance; $AUC_{(0-720\text{min})}$, area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 720 min. Compared with the normal rats, * $P < 0.05$

注射 65 mg/kg 链脲佐菌素制备糖尿病大鼠模型,并比较了小檗碱在正常和糖尿病大鼠的药动学,其结果表明,在糖尿病大鼠体内,小檗碱的 C_{max} 和 $AUC_{(0-24h)}$ 与正常大鼠相比分别提高了 1.3 倍 ($P < 0.05$) 和 1.5 倍 ($P < 0.05$)。刘晓等^[8] 采用相同方法制备糖尿病大鼠模型,经研究发现芦丁在糖尿病肾病大鼠体内的 $AUC_{(0-1)}$ 与正常大鼠相比显著增大 ($P < 0.01$),血浆清除率显著减小 ($P < 0.05$)。为了考察糖尿病对二甲双胍药动学的影响,本实验室秦红岩等人^[10] 采用空腹一次性腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素制备糖尿病大鼠模型,结果表明盐酸二甲双胍在糖尿病大鼠体内的 C_{max} 、 T_{max} 、 $t_{1/2}$ 及 AUC 均显著高于正常大鼠 ($P < 0.01$),其 CL/F 显著低于正常大鼠 ($P < 0.01$)。本课题结果表明格列本脲在正常大鼠和链脲佐菌素制备的糖尿病模型体内的药动学存在显著性差异。可见链脲佐菌素制得的糖尿病大鼠模型对药物的药动学有较为显著的影响。

但是,Sambol 等^[11] 比较了盐酸二甲双胍在健康受试者与 II 型糖尿病患者(无肾病)体内的药动学,结果显示健康受试者与糖尿病患者的所有药动学参数无显著差异。Niopas 等^[5] 报道了健康受试者口服 5 mg/kg 格列本脲的部分药动学参数,如下: T_{max} 为 3.6 ± 2.3 h, C_{max} 为 167 ± 63.4 ng/mL, $AUC_{(0-24 h)}$ 为 808.6 ± 279.4 ng·h/mL。Coppack 等^[6] 报道了 II 型糖尿病病人(无肾病无肝病)口服 5 mg/kg 格列本脲的部分药动学参数: T_{max} 为 2.71 ± 0.44 h, C_{max} 为 152 ± 26 ng/mL, $AUC_{(0-24 h)}$ 为 1154 ± 351 ng·h/mL。通过比较两组数据,格列本脲在健康受试者和 II 型糖尿病病人体内药的药动学参数也无显著性差异。因此,药物在一次性大剂量注射链脲佐菌素制得的糖尿病大鼠模型体内的药动学变化和糖尿病患者体内药动学的变化存在差异。

造成降糖药物在糖尿病模型大鼠与正常大鼠体内药动学参数存在差异而在 II 型糖尿病病人和健康受试者体内药动学参数无差异的原因,可能是由于一次性大剂量注射链脲佐菌素制备的糖尿病大鼠模型的病理机制与 II 型糖尿病患者病理机制不同。链脲佐菌素能直接破坏胰岛 β 细胞,引发糖尿病症状,同时引起脏器损害,但其作用机制尚不明确^[12]。研究发现糖尿病大鼠胃排空减慢^[13] 可以导致格列本脲的吸收增加,从而使其 AUC 显著增加。链脲佐菌素及高血糖环境能造成肝脏病变以

及引起肝脏代谢酶的变化^[14-15]。此外链脲佐菌素具有肾毒性,可抑制肾脏细胞的增殖和凋亡,引起细胞肥大,最终导致糖尿病肾病^[16-17],引起体内药物蓄积。体内肝脏及肾脏的损伤使格列本脲在糖尿病大鼠体内的总清除率下降。

因此,链脲佐菌素制得的糖尿病大鼠模型可能不完全符合 II 型糖尿病的病理状态。由本实验室及他人的研究数据表明,链脲佐菌素制备的糖尿病大鼠模型导致药物的体内过程与正常大鼠明显不同,与临床实际情况出入较大,从而可能不适用于考察药物在 II 型糖尿病病态下的药动学研究。

参考文献:

- [1] Eidi A, Eidi M, Esmaili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(9-10):624-629
- [2] Akbarzadeh A, Norouzi D, Mehrabi MR, et al. Induction of diabetes by streptozotocin in rats [J]. *Ind J Clin Biochem*, 2007, 22(2):60-64.
- [3] Adikwu MU, Yoshikawa Y, Takada K. Pharmacodynamic-pharmacokinetic profiles of metformin hydrochloride from a mucoadhesive formulation of a polysaccharide with antidiabetic property in streptozotocin-induced diabetic rat models [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(15):3041-3048.
- [4] Nazaroğlu NK, Sepici-Dincel A, Altan N. The effects of sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in the brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rat [J]. *J Diabetes Complications*, 2009, 23(3):209-213.
- [5] Niopas I, Daftsios AC. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 28(3-4):653-657.
- [6] Coppack SW, Lant AF, McIntosh CS, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of glibenclamide in non-insulin dependent diabetes mellitus [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1990, 29(6):673-684.
- [7] 武开明. 葛根芩连汤中小檗碱在正常和糖尿病大鼠的药动学比较 [J]. *中国药师*, 2010, 13(4):467-468.
- [8] 刘晓, 汤道权, 印晓星, 等. 芦丁在正常及糖尿病肾病大鼠体内药代动力学研究 [J]. *徐州医学院学报*, 2009, 29(11):708-712.
- [9] Kalaiarasi P, Kaviarasan K, Pugalendi KV. Hypolipidemic activity of 18 β -glycyrrhetic acid on streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 612(1-3):93-97.
- [10] 秦红岩, 段好刚, 魏玉辉, 等. 盐酸二甲双胍在正常大鼠与糖尿病大鼠体内的药动学比较 [J]. *中国现代应用药学杂志*, 2009, 26(6):433-436.

表 2 列出了中国地鼠山医群体近交系 E 繁殖性状的方差组分、遗传力和随机永久环境效应。由表可见,产仔数、离乳数、胎间隔 2-1 和胎间隔 3-2 的遗传力均较低,分别为 0.05、0.096、0.182 和 0.116。

3 讨论

中国地鼠山医群体于 1992 年建系并定名为 SYBI^[5],近年来,宋国华等^[6]在分子遗传标记方面,郭民等^[7]在繁殖生理方面,陈朝阳等^[8,9]对其血液学和生物学指标进行了研究,本文则在遗传力估计方面对其进行一定的研究。

本文原始数据来自最近 10 年的生产记录,不同年份、不同代次、不同胎次之间均有一定的差异,从表 1 可以看出,各性状之间的变异系数均较大。离乳数的母体共同效应方差为 0,表明共同效应很小,即离乳数的高低与个体本身关系不大。各性状的遗传力均小于 0.2,属于低遗传力。说明这些性状容易因环境的变化而产生非遗传的变异,对环境变化敏感。产仔数主要受排卵数、胎儿存活率及配种的影响。是一个复合性状。离乳数和母鼠母性、营养条件、环境条件均有一定关系。胎间隔则主要受雌鼠雄鼠的发情状态的影响。而发情与否和环境营养均有一定关系。所以进一步使营养和环境标

准化,可能会使这些性状趋于一致。

参考文献:

- [1] 盛志廉,陈瑶生,编著. 数量遗传学 [M]. 北京:科学出版社, 1999, 75.
- [2] 李宁,主编. 动物遗传学 [M]. 北京:中国农业出版社. 2003; 185-191.
- [3] Meyer, K. WOMBAT - A tool for mixed model analyses in quantitative genetics by REML [J]. J. Zhejiang Uni. Science B, 2007, 8(11): 815-821.
- [4] 刘恩岐,主编,医学实验动物学 [M]. 北京:人民卫生出版社. 2004, 43.
- [5] 刘田福. 中国地鼠山医群体近交系的培育 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(增刊):22-24.
- [6] 宋国华,刘田福,赵嘉慧,等. 近交系中国地鼠山医群体遗传结构的随机扩增多态分析 [J]. 山西医科大学学报, 2005, 36(3):270-274.
- [7] 郭民,张锐虎,李曙芳,等. 山医群体近交系中国地鼠动情周期的观察及染色法比较 [J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(8): 682-684.
- [8] 陈朝阳,张锐虎,景志杰,等. 群体近交系中国地鼠主要生物学指标的建立 [J]. 山西医科大学学报, 2009, 40(5):388-390.
- [9] 陈朝阳,张锐虎,景志杰,等. 山医群体近交系中国地鼠血液生理生化指标的测定分析 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 262-264.

[修回日期]2012-02-06

(上接第 18 页)

- [11] Sambol NC, Chiang J, O'Conner M, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of methormin in healthy subjects and patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus [J]. J Clin Pharmacol, 1996, 36 (11):1012-1021.
- [12] 夏旋. 链脲佐菌素在糖尿病模型中的应用研究 [J]. 国际内科学杂志, 2009, 36(9):540-543.
- [13] Ishiguchi T, Tada H, Nakagawa K, et al. Hyperglycemia impairs antro-pyloric coordination and delays gastric emptying in conscious rats [J]. Auton Neurosci, 2002, 95 (1-2): 112-120.
- [14] Baig NA, Herrine SK, Rubin R. Liver disease and diabetes

mellitus [J]. Clin Lab Med, 2001, 21 (1):193-207.

- [15] Shimojo N, Ishizaki T, Imaoka S, et al. Changes in amounts of cytochrome P450 isozymes and levels of catalytic activities in hepatic and renal microsomes of rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 46(4):621-627.
- [16] Cruzado JM, Lloberas N, Torras J, et al. Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats [J]. Diabetes, 2004, 53(4):1119-1127.
- [17] 原军英. 链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾病模型研究进展 [J]. 山西医药杂志, 2009, 38:66-68.

[修回日期]2012-02-08