

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.07.0798

• 短篇论著 •

负极性驻极体对胰岛素介电特性及降糖效果的影响

梁媛媛, 苑旺, 黄平, 郭鑫, 许佳捷, 江键*

海军军医大学(第二军医大学)基础医学院数理教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究负极性驻极体外静电场对胰岛素介电特性和结构的影响, 观察经电场作用的胰岛素的降糖效果。**方法** 采用栅压电晕充电系统将聚丙烯膜制备成 -500 、 $-1\ 000$ 、 $-1\ 500$ V 的负极性驻极体, 分别作用于胰岛素, 使用补偿法测量实验各驻极体在 48 h 内的等效表面电位, 通过介电常数 d_{33} 测量胰岛素的极化规律与外静电场的关系, 采用核磁共振和凝胶电泳检测外静电场对胰岛素分子结构的影响。将经不同表面电位负极性驻极体作用 12 h 的胰岛素溶液注入糖尿病大鼠体内, 观察驻极体作用后胰岛素的降糖效果。**结果** 不同表面电位负极性驻极体作用胰岛素溶液 48 h 时, 0~4 h 内胰岛素溶液两侧的电位差均随时间延长呈指数规律上升, 4 h 后逐渐趋于恒定。 -500 、 $-1\ 000$ 和 $-1\ 500$ V 驻极体作用胰岛素贴剂 12 h 时 d_{33} 值相比无驻极体静电场作用分别提高了 14.7 倍、26.7 倍和 45.0 倍, 12 h 后趋于稳定。经外电场作用后胰岛素的空间结构没有发生明显变化, 而大部分基团的氢键含量减少; 胰岛素结构中单聚体的比例提高, 主要以单聚体和二聚体的形式存在。 -500 V 和 $-1\ 000$ V 驻极体作用胰岛素治疗组处理 8 h 时大鼠的血糖含量与无驻极体作用胰岛素组相比分别下降了 50.9% 和 22.1% ($P<0.05$), 具有良好的降糖效果。**结论** 负极性驻极体可进一步改善胰岛素的降糖效果。

[关键词] 驻极体; 胰岛素; 电场; 生物分子核磁共振; 降糖效果**[中图分类号]** R 977.15 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)07-0798-05

Effect of negative polarity electret on dielectric properties and hypoglycemic effects of insulin

LIANG Yuan-yuan, YUAN Wang, HUANG Ping, GUO Xin, XU Jia-jie, JIANG Jian*

Department of Physics and Mathematics, College of Basic Medical Sciences, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of negative polarity electret on the dielectric properties and structure of insulin, and to observe the influence of electrostatic field on the hypoglycemic effect of insulin. **Methods** Negative polarity electrets of -500 , $-1\ 000$ and $-1\ 500$ V were prepared using polypropylene film by a gate voltage corona charging system, and were used to treat insulin, respectively. The equivalent surface potential of each electret within 48 h was measured by compensation method. The relationship between the polarization of insulin and the electrostatic field was measured by the dielectric constant d_{33} . The influence of the electrostatic field on the molecular structure of insulin was examined by nuclear magnetic resonance and gel electrophoresis. Insulin exposed to -500 , $-1\ 000$ and $-1\ 500$ V negative polarity electret for 12 h was injected into the diabetic rats, and then the hypoglycemic effect of insulin were observed. **Results** The potential differences between the two sides of insulin solution effected by negative polarity electrets with different surface potentials were exponentially increased within 0-4 h and gradually became constant at 4-48 h. Compared with the insulin patch treated by non-electret electrostatic field, the d_{33} values of insulin patch effected by -500 , $-1\ 000$ and $-1\ 500$ V electret for 12 h were increased by 14.7 times, 26.7 times and 45.0 times, respectively, and all tended to be stable after 12 h. The spatial structure of insulin exposed to electrostatic field did not change, but the hydrogen bond content of most persad was decreased; the proportion of monomers of the insulin was increased, and the main structures of the insulin were monomers and dimers. Compared with the electret-free insulin treatment group, the blood glucose content of diabetic rats treated with the -500 V and $-1\ 000$ V negative polarity electrets insulin for 8 h were decreased by 50.9% and 22.1%, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Negative polarity electret can further improve the hypoglycemic effect of insulin.

[收稿日期] 2018-04-25 **[接受日期]** 2018-06-06**[基金项目]** 国家自然科学基金(50977089). Supported by National Natural Science Foundation of China (50977089).**[作者简介]** 梁媛媛, 硕士生. E-mail: liangyy_208@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870921, E-mail: jjiang@smmu.edu.cn

[Key words] electrets; insulin; electric fields; biomolecular nuclear magnetic resonance; hypoglycemic effect

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(7): 798-802]

自 1922 年利用胰岛素治疗糖尿病以来, 胰岛素已成为各类糖尿病患者控制血糖和缓解病程的首选用药。由于胰岛素口服给药易受胃肠道 pH 和酶的影响而降解, 同时因其相对分子质量较大很难通过小肠上皮细胞被吸收进入人体循环^[1], 导致胰岛素口服给药的生物利用度较低, 因此临床上通常采取注射方式给药。鉴于胰岛素注射给药方式存在诸多不良反应^[2-3], 目前生物医学工程科学家们致力于使用物理技术促进胰岛素的透皮吸收, 其中大部分研究主要集中于利用外电场促进胰岛素的作用效果^[4-7]。但外电场作用对胰岛素结构等方面的影响少有报道, 而后者直接影响胰岛素透皮给药系统的部分机制和疗效。为了更直观探索外电场对胰岛素降糖效果的影响及其相关机制, 本研究通过介电常数 d_{33} 系数、核磁共振和凝胶电泳等方法研究经外电场处理后胰岛素的极化规律, 并将携带不同表面电位的驻极体作用后的胰岛素注入糖尿病模型大鼠以观察其降糖效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料与设备 聚丙烯膜 (PP 膜, 膜厚 13 μm ; 日本东丽株式会社)。猪胰岛素 (江苏万邦生化医药股份有限公司), 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ; 美国 Sigma 公司), 丙烯酸树脂 (Eudragit E100, 德国 Röhm 公司), 标准蛋白 (聚丙烯酰胺凝胶电泳低相对分子量标准蛋白, 检测的相对分子质量范围为 14 400~97 400; 上海升正生物技术有限公司)。磷酸二氢钾、氢氧化钠、柠檬酸、柠檬酸钠、氯化钠、柠檬酸丁三酯、乙醇等均购自国药集团化学试剂有限公司, pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 按《中华人民共和国药典》配制。栅控恒压电晕充电系统 (大连理工大学静电与特种电源研究所), ESR102A 型振动电容静电计 (北京华晶汇科技有限公司), ZJ-3A 型准静态 d_{33} 测量仪 (中国科学院声学研究所), AC-300P 型核磁共振谱仪 (德国 Bruker 公司), OneTouch® UltraEasy™ 血糖仪 (美国 Johnson 公司), DYCZ-30C 型凝胶电泳仪、垂直板电泳槽及

其附件等 (北京六一生物科技有限公司)。

1.2 驻极体制备及等效表面电位的测量 采用栅控恒压电晕充电系统对 PP 膜进行充电, 电晕电压为 -15 kV, 充电时间为 5 min, 制备成 -500、-1 000、-1 500 V 的负极性驻极体。使用振动电容静电计通过补偿法测量实验各驻极体在 48 h 内的等效表面电位。

1.3 经驻极体处理的胰岛素溶液的表面电位测定 将封装有 1 mL 胰岛素溶液的 PP 小袋分别置于 -500、-1 000 和 -1 500 V 驻极体充电面上 12 h, 使用振动电容静电计通过补偿法进行表面电位测定。

1.4 d_{33} 系数测量 丙烯酸树脂用乙醇溶解后放置过夜, 加入柠檬酸丁三酯, 边搅拌边加入胰岛素溶液 (pH 7.4), 混合均匀后铺于 PP 膜 (背衬层) 上, 自然干燥 12 h, 制备得胰岛素贴剂。将胰岛素贴剂的背衬层分别放置在 -500、-1 000、-1 500 V 驻极体的充电面上 24 h, 利用准静态 d_{33} 测量仪测量 0~24 h 内胰岛素的极化规律与外电场的关系。

1.5 核磁共振测量与凝胶电泳 分别取 pH 7.4 的胰岛素溶液和经 -1 000 V 驻极体作用 12 h 的胰岛素溶液 30 μL , 经制胶、电泳、染色和脱色等过程行凝胶电泳实验^[8], 研究外电场对胰岛素分子聚合的影响。用氘代试剂配制胰岛素溶液, 并取 1 mL 胰岛素溶液封装于 PP 小袋中经 -1 000 V 驻极体作用 12 h, 运用核磁共振谱仪测定未经驻极体作用和经驻极体作用后胰岛素的氢核磁共振谱, 研究外电场对胰岛素分子结构的影响。

1.6 实验动物与降糖实验 清洁级成年雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 \pm 20) g, 由海军军医大学 (第二军医大学) 实验动物中心提供 [动物生产许可证号: SCXK (沪) 2013-0016]。参考文献 [9] 构建糖尿病模型大鼠, 并按体质量将大鼠随机配对分组, 设无驻极体作用胰岛素组、-500 V 驻极体作用胰岛素组、-1 000 V 驻极体作用胰岛素组和 -1 500 V 驻极体作用胰岛素组, 以正常 SD 大鼠作为对照组。对照组大鼠皮下注射 0.9% 生理盐水溶液 1 mL/kg。取胰岛素配制成浓度为

0.1 mg/mL (2.8 IU/kg, pH 7.4) 的注射液, 给予无驻极体作用胰岛素组糖尿病大鼠皮下注射无驻极体作用的胰岛素溶液 (1 mL/kg), 3 个驻极体作用胰岛素组糖尿病大鼠分别皮下注射 -500、-1 000 和 -1 500 V 驻极体作用的胰岛素 (1 mL/kg)。0、0.5、1.5、3、4.5、6、8 h 后测定各组大鼠的血糖含量。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件行数据处理。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 胰岛素溶液两侧静电场随时间的变化规律 研究测量胰岛素溶液的驻极体外静电场和作用于胰岛素溶液两侧静电场的变化规律 (胰岛素溶液两侧静电场可依据驻极体等效表面电位和透过胰岛素溶液的驻极体等效表面电位的差值来确定), 结果如图 1 所示。-500、-1 000、-1 500 V 驻极体在 12 h 内分别有约 290、480、920 V 的电位差作用于胰岛素溶液, 表明驻极体的等效表面电位越高, 作用于胰岛素溶液的外静电场强度越强。不同表面电位负极性驻极体的等效表面电位随时间延长具有相似的变化规律: 0~4 h 内呈近似指数规律上升, 4~48 h 内基本保持不变。考虑到 PP 驻极体的表面电位在 12 h 内衰减很少, 实验结果表明透过胰岛素溶液的负极性驻极体的等效表面电位具有良好的稳定性, 胰岛素在驻极体外静电场作用下可被极化。

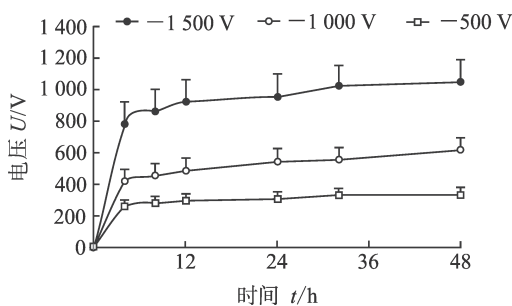


图1 不同表面电位负极性驻极体作用时胰岛素溶液两侧静电场的变化规律
 $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 外静电场引起胰岛素的极化 为进一步探究不同表面电位负极性驻极体引起胰岛素的极化规律以及胰岛素的极化程度与驻极体外静电场的关系, 本研究利用准静态 d_{33} 测量仪测量无驻极体

作用及经 -500、-1 000、-1 500 V 驻极体作用 24 h 4 组胰岛素贴剂的 d_{33} 值。结果 (图 2) 显示, 不同表面电位负极性驻极体作用胰岛素贴剂的 d_{33} 值在 0~8 h 内无明显变化, 8 h 后均随时间延长呈指数规律上升。与无驻极体作用胰岛素组相比, -500、-1 000、-1 500 V 驻极体作用 12 h 时胰岛素贴剂的 d_{33} 值分别提高了 14.7 倍、26.7 倍和 45.0 倍。胰岛素受外静电场作用而极化, 其极化程度与驻极体表面电位的绝对值成正比。外电场作用 12~24 h 后, 不同表面电位负极性驻极体作用胰岛素贴剂的 d_{33} 值略有增加, 但差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 表明此时间段内胰岛素的极化基本趋于饱和。

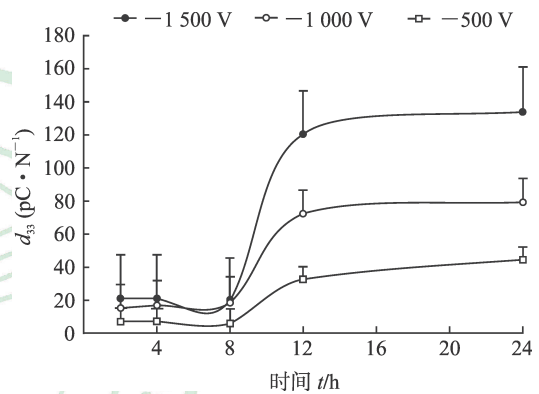


图2 不同表面电位负极性驻极体作用胰岛素贴剂的 d_{33} 值随时间的变化
 $n=6, \bar{x} \pm s$

2.3 外静电场对胰岛素结构的影响 通过核磁共振谱比较未经驻极体作用和经 -1 000 V 驻极体作用 12 h 后胰岛素的核磁共振氢谱, 探讨外静电场引起胰岛素极化的形成机制。结果 (图 3) 显示, -1 000 V 驻极体作用 12 h 后胰岛素各峰群的化学位移值较未经驻极体作用胰岛素组没有发生明显偏移, 表明 -1 000 V 驻极体处理不改变胰岛素的化学环境, 胰岛素的空间结构也未发生明显变化。除峰位位于 2.41 和 2.50 的峰值略有增加外, 其他峰及其峰群的峰值和峰面积均有不同程度的减少, 其中化学位移为 0.73 的峰面积明显减少, 提示经电场作用后胰岛素中大部分基团的氢键含量有所减少, 如胰岛素分子氢键网络中色氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 的甲基减少以及赖氨酸、精氨酸、酪氨酸和组氨酸等的 β -、 γ -、 δ -CH₂ 减少, 但谷氨酸的 β -、 γ -CH₂ 增加, 整体减少的氢键改变了胰岛素的极化状态和胰岛素分子间的静电相互作用

用, 提高了胰岛素结构中单聚体的比例。

为深入研究静电场对胰岛素结构的影响, 利用蛋白凝胶电泳研究经 -500 、 $-1\ 000$ 、 $-1\ 500$ V 驻极体作用 12 h 后胰岛素相对分子质量的改变。结果显示, 未经驻极体作用的胰岛素多以单聚和二聚体形式存在 (猪胰岛素单聚体的相对分子质量约为 $5\ 800$, 二聚体约为 $11\ 600$), 经不同驻极体电场作用后胰岛素的相对分子质量及其存在形式与未经驻极体作用的胰岛素相比无明显差异, 表明驻极体外静电场不改变胰岛素的一、二级结构及其聚集状态, 经电场作用的胰岛素主要以单聚体和二聚体的形式存在。

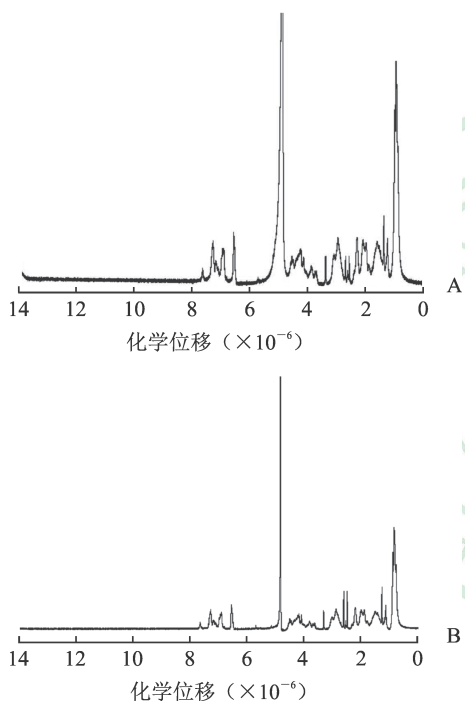


图 3 未经驻极体作用(A)和经 $-1\ 000$ V 驻极体作用(B)胰岛素的核磁共振氢谱

2.4 经外静电场作用后胰岛素的降糖效果 各组糖尿病大鼠血糖含量随时间的变化规律如图 4 所示。经不同表面电位负性驻极体作用的胰岛素的降糖规律与未经驻极体作用胰岛素相似。0~3 h 内 $-1\ 000$ V 驻极体作用胰岛素的降糖效果最佳, 8 h 时 -500 V 和 $-1\ 000$ V 驻极体作用胰岛素组大鼠的血糖含量分别为 (5.96 ± 1.60) mmol/L 和 (7.88 ± 2.99) mmol/L, 与无驻极体作用胰岛素组 $[(10.11 \pm 6.66)$ mmol/L] 相比分别下降了 50.9% 和 22.1% ($P < 0.05$), 表明 -500 V 和 $-1\ 000$ V 驻极体作用后的胰岛素均具有良好的降

糖效果。 $-1\ 500$ V 驻极体作用后胰岛素的降糖效果劣于无驻极体作用胰岛素组, 提示电场对胰岛素的降糖效果存在窗口范围, 并不是驻极体携带电压越高降糖效果越好。

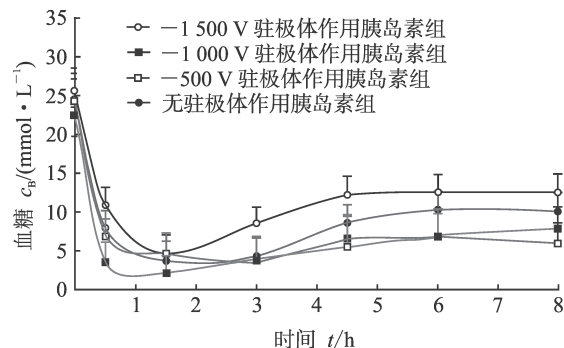


图 4 不同表面电位负性驻极体作用胰岛素的降糖规律

* $P < 0.05$ 与无驻极体作用胰岛素组相比. $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究将 PP 膜制备成不同电压的负性驻极体, 并以其产生的稳定外静电场作为电场源作用于胰岛素溶液。实验结果显示, 不同表面电位负性驻极体作用胰岛素溶液 48 h 时, 胰岛素溶液两侧的电位差均随时间延长呈指数规律上升, 4 h 后逐渐趋于恒定。这说明在外电场作用下胰岛素分子被极化, 极化的胰岛素分子沿外电场方向取向, 宏观上呈现出胰岛素两侧电位差呈指数规律上升, 且胰岛素分子的极化程度与驻极体的表面电位呈正相关; d_{33} 值的测量结果也进一步显示了胰岛素的极化规律。

核磁共振氢谱显示经外静电场作用的胰岛素的空间结构没有发生明显变化, 但部分基团氢键含量发生了变化, 改变了胰岛素结构中氢键网络和胰岛素的极化状态, 进一步影响胰岛素二聚体的结构稳定性, 从而提高了胰岛素结构中单聚体的比例, 有效提高了胰岛素的降糖效果。凝胶电泳实验也证实了驻极体外电场作用并未增加胰岛素的聚集性, 电场作用后胰岛素仍以单聚体和二聚体形式存在。

动物实验进一步说明经 -500 、 $-1\ 000$ V 驻极体处理的胰岛素的空间结构没有发生改变。胰岛素可能在外静电场作用下被极化, 导致胰岛素单体和单体接触界面上的静电电势分布及其静电作用力产生变化, 进而出现大量胰岛素单体^[10-11]。此外, $-1\ 500$ V 驻极体作用胰岛素的降糖效果劣于未经

驻极体作用的胰岛素,说明电场作用提高胰岛素的降糖效果具有电压窗口效应,但相关机制需进一步研究。

综上所述,负极性驻极体产生的静电场可引起胰岛素的弱极化,改变胰岛素的带电特性,增加胰岛素单体间的静电排斥力,从而减弱胰岛素单体间的凝聚力和聚合程度,有利于胰岛素单体的形成,促进胰岛素的降糖作用。合理选择不同表面电位驻极体可有效提高胰岛素的降糖效果。

[参 考 文 献]

- [1] SHAH R B, PATEL M, MAAHS D M, SHAH V N. Insulin delivery methods: past, present and future[J]. *Int J Pharm Investig*, 2016, 6: 1-9.
- [2] MARWAH H, GARG T, RATH G, GOYAL A K. Development of transferosomal gel for transdermal delivery of insulin using iodine complex[J]. *Drug Deliv*, 2016, 23: 1636-1644.
- [3] FEISZTHUBER H, BHATNAGAR S, GYÖNGY M, COUSSIOS C C. Cavitation-enhanced delivery of insulin in agar and porcine models of human skin[J]. *Phys Med Biol*, 2015, 60: 2421-2434.
- [4] MOHAMMAD E A, ELSHEMEY W M, ELSAYED A A, ABD-ELGHANY A A. Electroporation parameters for successful transdermal delivery of insulin[J/OL]. *Am J Ther*, 2016, 23: e1560-e1567. doi: 10.1097/MJT.0000000000000198.
- [5] HERMANN S, LILLY L C, MADER J K, ABERER F, RIBITSCH A, KOJZAR H, et al. Novel simple insulin delivery device reduces barriers to insulin therapy in type 2 diabetes: results from a pilot study[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2015, 9: 581-587.
- [6] HADEBE S I, NGUBANE P S, SERUMULA M R, MUSABAYANE C T. Transdermal delivery of insulin by amidated pectin hydrogel matrix patch in streptozotocin-induced diabetic rats: effects on some selected metabolic parameters[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9: e101461. doi: 10.1371/journal.pone.0101461.
- [7] DONNELLY R F, GARLAND M J, ALKILANI A Z. Microneedle-iontophoresis combinations for enhanced transdermal drug delivery[J]. *Methods Drug Deliv*, 2014, 1141: 121-132.
- [8] 孟庆石,张光祥,潘映红. 蛋白质复合体非变性凝胶电泳技术及其应用新进展[J]. *生物技术通报*, 2010, 6: 57-64.
- [9] 王美玲,黄平,梁媛媛,苑旺,郭鑫,江键. 正极性驻极体对胰岛素降糖效果影响的动物实验研究[J]. *高电压技术*, 2014, 40: 3816-3821.
- [10] CISZAK E, BEALS J M, FRANK B H, BAKER J C, CARTER N D, SMITH G D. Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin[J]. *Structure*, 1995, 3: 615-622.
- [11] BRANGE J, RIBEL U, HANSEN J F, DODSON G, HANSEN M T, HAVELUND S, et al. Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications[J]. *Nature*, 1988, 333: 679-682.

[本文编辑] 曾奇峰