

# 贵州百灵企业集团制药股份有限公司 关于糖宁通络研发项目的进展公告

本公司及董事会全体成员保证信息披露的内容真实、准确和完整，没有虚假记载、误导性陈述或重大遗漏。

## 风险提示：

鉴于糖宁通络胶囊研发项目的复杂性、风险性和不确定性，糖宁通络胶囊项目研制具有周期长、投入较大的情况，各阶段研究均具有风险性，公司将及时履行信息披露义务，请投资者注意投资风险。

公司本次公告的研究报告为糖宁通络胶囊不同给药干预方式对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响的试验报告，实验的目的是采用国际公认的 db/db 自发性糖尿病小鼠模型，研究糖宁通络胶囊长期给药、停药和治疗给药对胰岛素抵抗的作用机理，为糖宁通络胶囊的临床应用提供科学依据。本报告的结论存在与临床应用情况出现差异的可能性风险。

本公告为研发项目进展公告，不会对公司目前经营产生重大影响。

贵州百灵企业集团制药股份有限公司（以下简称：“公司”或“贵州百灵”）2016年1月22日收到中国医学科学院药用植物研究所编制的《糖宁通络胶囊不同给药干预方式对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响报告》，现对该项目研发进展情况作如下信息披露。

试验基本情况:

- 1、试验药物名称: 糖宁通络胶囊
- 2、试验单位: 中国医学科学院药用植物研究所
- 3、试验内容: 糖宁通络胶囊不同给药干预方式对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响
- 4、研究目的: 采用国际公认的 db/db 自发性糖尿病小鼠模型, 研究糖宁通络胶囊长期给药、停药和治疗给药对胰岛素抵抗的作用机理, 为糖宁通络胶囊的临床应用提供科学依据。

试验报告内容详见附件:《糖宁通络胶囊不同给药干预方式对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响报告》。

敬请广大投资者谨慎决策, 注意投资风险。

特此公告。

贵州百灵企业集团制药股份有限公司

董 事 会

2016 年 1 月 22 日

附件：

# 实 验 报 告

研究专题的名称：**糖宁通络胶囊不同给药干预方式对  
db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响**

试验报告的审查、批准

专 题 负 责 人 孙晓波 签名

2015 年 12 月 10 日 撰写

试验室负责人 孙晓波 签名

2016 年 1 月 20 日 批准

试验单位：中国医学科学院药用植物研究所

试验地点：北京市海淀区马连洼北路 151 号

试验时间：2015.5.10-2015.12.10

## 目 录

目录	2
摘要	3
1.研究专题名称及研究目的	5
2.药效学评价研究机构和委托单位的名称及地址	6
3.研究起止日期	7
4.供试品和对照品的名称、缩写名、代号、批号、稳定性、含量、 浓度、纯度、组分及其它特性	7
5.试验材料	8
6.试验方法	8
7.试验结果	11
8.小结	22
9.讨论	22
10.影响研究可靠性和造成研究工作偏离试验方案的异常情况	25
11.专题负责人与所有参加工作的人员姓名和承担的工作内容	25
12.试验资料的保存项目、地点及时间	25

## 摘 要

**目的：**采用国际公认的 db/db 小鼠自发性糖尿病动物模型，考察糖宁通络胶囊长期给药，停药和治疗给药对 db/db 小鼠胰岛素抵抗的影响，探索糖宁通络胶囊防治糖尿病的可能药效机制。

**方法：**

### 1. 糖宁通络胶囊长期给药对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响

60 只雌性 db/db 自发性糖尿病小鼠（6~8 周龄），随机分为 5 组，每组 10 只，分别为模型组、盐酸二甲双胍组、糖宁通络胶囊高剂量组（1.8g/kg）、糖宁通络胶囊中剂量组（0.9g/kg）、糖宁通络胶囊低剂量组（0.45g/kg），10 只同周龄雌性 C57/BL 小鼠为正常对照组。各组灌胃给药，每日 1 次，灌胃体积 0.1ml/10g，连续给药处理 38 周，其中空白对照组和模型组每天灌胃 0.1ml/10g 的饮用水。

### 2. 糖宁通络胶囊停药对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响

60 只雌性 db/db 小鼠随机分为 5 组，分别为模型组、盐酸二甲双胍(0.14g/kg)组、胰岛素(10U/kg)组、糖宁通络胶囊高剂量(0.9g/kg)组和糖宁通络胶囊低剂量（0.45g/kg）组，每组 12 只。12 只同周龄雌性 C57/BL 小鼠为空白对照组。糖宁通络胶囊给药 16 周后，停药 12 周，然后继续给药 7 周。

### 3. 糖宁通络胶囊治疗给药对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响

40 只雄性 db/db 小鼠随机分为 5 组，分别为模型组、盐酸二甲双

胍（0.14g/kg）组、糖宁通络胶囊高剂量（1.8g/kg）组、糖宁通络胶囊中剂量（0.9g/kg）组和糖宁通络胶囊低剂量（0.45g/kg）组，每组8只。8只同周龄雄性 C57/BL 小鼠为空白对照组。在 db/db 小鼠出现糖尿病视网膜并发症时开始给予糖宁通络胶囊后给药 19 周。

#### 4. 胰岛素抵抗信号通路相关蛋白检测方法

取 db/db 小鼠腓肠肌组织，提取组织蛋白，Western blotting 法测定胰岛素抵抗信号通路相关蛋白胰岛素受体底物-1（IRS-1）和磷酸化胰岛素受体底物-1（p-IRS-1）的表达水平。

**结果：**糖宁通络胶囊长期给药、停药和治疗给药均能增加 db/db 小鼠骨骼肌 p-IRS-1 水平，具有剂量依赖性，糖宁通络胶囊可能通过上调骨骼肌中的 p-IRS-1 水平，改善骨骼肌的胰岛素抵抗，发挥防治糖尿病作用。

**结论：**糖宁通络胶囊长期给药、停药和治疗给药对 db/db 小鼠骨骼肌的胰岛素抵抗信号通路具有影响，可能是糖宁通络胶囊防治糖尿病的药效作用机制。

## 1 研究专题的名称及研究目的

### 1.1 研究专题名称：

糖宁通络胶囊不同给药方法对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响

### 1.2 研究背景和目的：

糖尿病是一种以慢性、高血糖为特征的糖、脂类和蛋白质代谢异常相关疾病，已成为严重威胁人类健康的一大杀手。糖尿病作为慢性病，需要长期服用药物，因此其长期用药的安全性和有效性值得重点关注。糖尿病虽然以慢性高血糖为特征，但其最大的危害在于其微血管并发症和大血管并发症。

糖尿病是一种因胰岛素绝对或相对不足，或者靶细胞对胰岛素敏感性降低引起的以糖代谢紊乱为主的慢性综合性疾病，其中 2 型糖尿病的发生是外周胰岛素抵抗和  $\beta$  细胞功能缺陷共同作用的结果。研究表明：糖尿病的发生发展是进行性胰岛  $\beta$  细胞的衰竭过程，胰岛素抵抗加速了胰岛  $\beta$  细胞衰竭过程。2 型糖尿病患者的血糖和血脂代谢异常由胰岛素抵抗和  $\beta$  细胞功能衰竭两因素促成，其中胰岛素抵抗更为重要。胰岛素抵抗导致的持续性高血糖（即所谓糖毒性）和脂质紊乱造成的高 FFA、TG（即所谓脂毒性）对  $\beta$ -细胞功能进一步损害。可见，保护  $\beta$ -细胞功能的关键在于持续有效地改善糖和脂质代谢，根本在于有效改善胰岛素抵抗。

通过生活方式改变和药物干预，可以有效地减少和延缓糖尿病的发生发展。理想的新型降糖药物应该是可以有效治疗肥胖、有效

改善胰岛素抵抗、保护胰岛  $\beta$  细胞功能、减少和改善糖尿病并发症、提高生活质量并且药品可及价格合理。

如何有效防控 2 型糖尿病，开发理想的新型降糖药物是临床医生和制药企业面临的共同难题。中药及复方由于具有多成分、多靶点的作用特点，在治疗慢性非传染性疾病方面具有一定的优势，从中药复方中筛选有效组方是新药开发的途径之一。由于小鼠和人类功能基因的同源性高达 90% 以上，并且 db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天性 2 型糖尿病小鼠，具有高血糖、胰岛素抵抗、糖代谢异常，合并糖尿病视网膜和肾脏病变等多种疾病，与人类 2 型糖尿病发病机制和临床症状极为相似是一种良好的糖尿病药物研究动物模型。因此，本研究选择这种自发性糖尿病小鼠作为研究工具，考察降糖的同时，更多关注胰岛素抵抗，胰岛  $\beta$  细胞功能和糖尿病并发症的改善。

### 1.3 研究目的：

采用国际公认的 db/db 自发性糖尿病小鼠模型，研究糖宁通络胶囊长期给药、停药和治疗给药对胰岛素抵抗的作用机理，为糖宁通络胶囊的临床应用提供科学依据。

## 2 药效学评价研究机构和委托单位的名称及地址

### 2.1 药效学评价研究机构

名称：中国医学科学院药用植物研究所

地址：北京市海淀区马连洼北路 151 号

邮编：100193



电话：010-57833013

2.2 委托单位：贵州百灵企业集团制药股份有限公司

地址：贵州省安顺市经济技术开发区西航大道

电话：（0851）33418777

### 3 研究起止日期

试验起始日期：2015 年 4 月 10 日

试验结束日期：2015 年 10 月 10 日

### 4 供试品及对照品的名称、缩写名、代号、批号、稳定性、含量、浓度、纯度、组分及其它特性

#### 4.1 供试品

名称：糖宁通络胶囊

批号：20130401

提供者：贵州百灵企业集团制药股份有限公司

接收时间：2015 年 4 月 1 日

性状：胶囊，内容为黑褐色粉末

溶解性：可溶于水

稳定性：稳定

保存条件：密封

保存场所：中国医学科学院药用植物研究所样品室

剩余供试品处理方法：留样

#### 4.2 对照品（溶剂）

名称：蒸馏水

### 4.3 供试品配制

4.3.1 配制方法：用蒸馏水配制成所需浓度。

4.3.2 配制频率：试验现用现配。

## 5 试验材料

### 5.1 试验动物

SPF 级自发性糖尿病小鼠模型 C57/KsJ-db/db 小鼠（简称 db/db 小鼠），6~8 周龄，体重 45~55g；由中国科学院上海试验动物中心/上海斯莱克试验动物有限责任公司提供。

### 5.2 试验药物

糖宁通络胶囊（批号：20130401，规格：0.3g/粒，相当于 1.1g 生药/粒，人用量每次 3 粒，每日三次）由贵州百灵企业集团制药股份有限公司提供。

盐酸二甲双胍片由中美上海施贵宝制药有限公司生产（批号：1406155）。适应症：高胰岛素血症，2 型糖尿病。用法用量：通常本品（盐酸二甲双胍片）的起始剂量为 0.5 克，每日二次。日用药量为 1g。

### 5.3 仪器

稳豪型血糖试纸（批号：3623898）和稳豪型血糖仪购自强生（上海）医疗器材有限公司。酶标仪购自帝肯（上海）公司。日立 7080 全自动生化仪购自日本日立株式会社。电子天平购自梅特勒托利多仪器（上海）有限公司。

## 6 试验方法

## 6.1 试验分组与给药方法

### 6.1.1 糖宁通络胶囊长期给药对 db/db 小鼠胰岛素抵抗的影响

60 只雌性 db/db 自发性糖尿病小鼠（6~8 周龄），随机分为 5 组，每组 10 只，分别为模型组、盐酸二甲双胍组、糖宁通络胶囊高剂量组（1.8g/kg）、糖宁通络胶囊中剂量组（0.9g/kg）、糖宁通络胶囊低剂量组（0.45g/kg），二甲双胍联合糖宁通络胶囊中剂量组（0.9g/kg），10 只同周龄雌性 C57/BL 小鼠为正常对照组。各组灌胃给药，每日 1 次，灌胃体积 0.1ml/10g，连续给药处理 38 周，其中空白对照组和模型组每天灌胃 0.1ml/10g 的饮用水。

### 6.1.2 糖宁通络胶囊停药对 db/db 小鼠胰岛素抵抗的影响

60 只雌性 db/db 小鼠随机分为 5 组，分别为模型组、盐酸二甲双胍(0.14g/kg)组、胰岛素(10U/kg)组、糖宁通络胶囊高剂量(0.9g/kg)组和糖宁通络胶囊低剂量（0.45g/kg）组，每组 12 只。12 只同周龄雌性 C57/BL 小鼠为空白对照组。糖宁通络胶囊给药 16 周后，停药 12 周，然后继续给药 7 周。

### 6.1.3 糖宁通络胶囊治疗给药对 db/db 小鼠胰岛素抵抗的影响

40 只雄性 db/db 小鼠随机分为 5 组，分别为模型组、盐酸二甲双胍（0.14g/kg）组、糖宁通络胶囊高剂量（1.8g/kg）组、糖宁通络胶囊中剂量（0.9g/kg）组和糖宁通络胶囊低剂量（0.45g/kg）组，每组 8 只。8 只同周龄雄性 C57/BL 小鼠为空白对照组。db/db 小鼠出现糖尿病视网膜并发症后，给药 19 周。

## 6.2 Western blotting 法测定胰岛素抵抗信号通路相关蛋白表达

## (1) 蛋白提取

取骨骼肌，称重，加入添加了蛋白酶抑制剂，磷酸酶抑制剂和 PMSF 的组织蛋白抽提试剂，冰上裂解 30min。放入预冷的离心机离心，12000rpm 离心 15min。吸取上清液至预冷的 EP 管中，-80° C 保存待用。

## (2) 蛋白定量

2.1 将 BCA 试剂盒中的 BSA 标准品用 PBS 依次稀释为 2000，1000，500，250，125 $\mu$  g/mL 共 5 个浓度。将样品用 PBS 稀释 10 倍。将标准品和样品分别加入 96 孔板中，50 $\mu$  L/孔。

2.2 将 BCA 试剂盒中 A 液和 B 液以 50: 1 的比例混合，加入 96 孔板中，200 L/孔。

2.3 37° C 孵育 1h，酶标仪 562nm 处检测各孔的 OD 值

2.4 以 OD 值为纵坐标，标准品浓度为横坐标，绘制标准曲线。

2.5 根据标准曲线计算样品的浓度。将 SDS-PAGE 上样缓冲液与蛋白样品按 1: 4 混匀。

2.6 煮沸 5min，使蛋白充分变性，-80° C 保存待用。

## (3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

3.1 将 30% Acry-Bis、分离胶缓冲液，10% APS，TEMED 和双蒸水混匀，配制 10% 的分离胶，缓慢注入凝胶模具，用蒸馏水水封闭，凝聚 30min。

3.2 待分离胶和蒸馏水之间出现清晰的界面后，倒去蒸馏水，将 30% Acry-Bis、浓缩胶缓冲液，10% APS，TEMED 和双蒸水混

匀，配制 6% 的浓缩胶，缓慢注入凝胶模具并插上梳子，凝聚 30min.

3.3 将凝胶板装入电泳槽，在电泳槽中加入 1× 电泳液。小心的拔出梳子，用微量移液器将 20 μL 样品缓缓加至凝胶孔中。80V 电泳至溴酚蓝到达分离胶底部。

3.4 将胶安装至转膜装置，100 V，300mA 转膜 1h。

3.5 取 NC 膜置于 5% 脱脂牛奶（TBST 配制）摇床封闭 2h。

3.6 一抗 4° C 孵育过夜。

3.7 TBST 洗膜 3 次，每次 15min，HRP 标记的二抗孵育 2h

3.8 TBST 洗膜 3 次，每次 15min，用增强型 ECL 显色液避光孵育 5 min，用凝胶成像系统进行显影拍照。

## 7 试验结果

### 7.1 糖宁通络胶囊长期给药对 db/db 小鼠骨骼肌 IRS-1 磷酸化水平的影响

如图 1 所示，与 C57/BL 小鼠比较，db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1 磷酸化水平显著降低；与 db/db 小鼠比较，二甲双胍和糖宁通络胶囊高、中、低剂量长期给药能增加 db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1 磷酸化水平，且具有剂量依赖性。

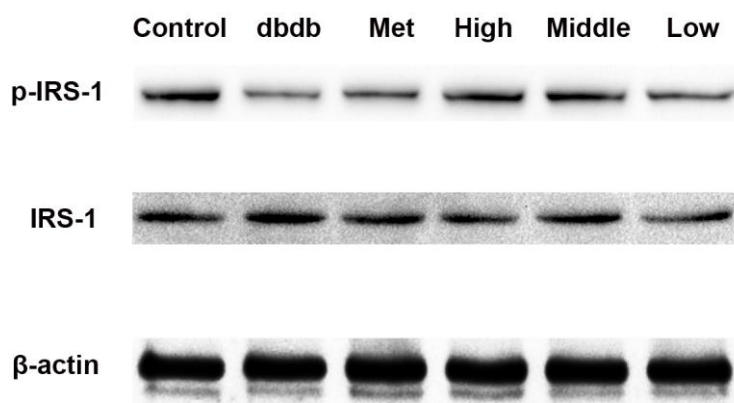


图 1 糖宁通络胶囊长期给药能够增加 IRS-1 的磷酸化水平

### 7.2 糖宁通络胶囊停药对 db/db 小鼠骨骼肌 IRS-1 磷酸化水平的影响

如图 2 所示，与 C57/BL 小鼠比较，db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1 磷酸化水平显著降低；二甲双胍和胰岛素停药能够增加 db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1 磷酸化水平。糖宁通络胶囊停药高、低剂量也显著上调 db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1 磷酸化水平。

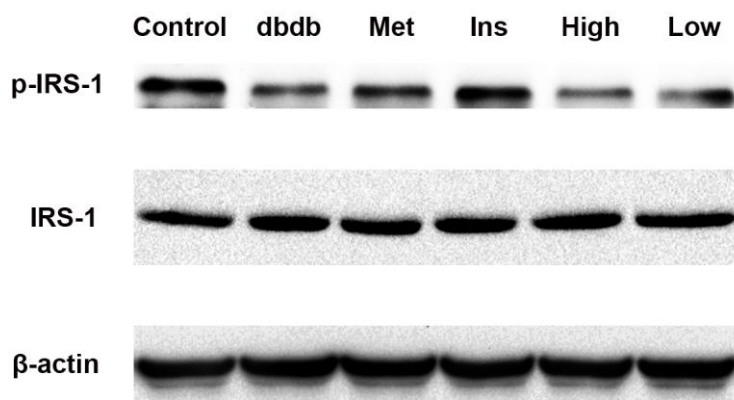


图 2 糖宁通络胶囊停药能够增加 IRS-1 的磷酸化水平

### 7.3 糖宁通络胶囊治疗给药对 db/db 小鼠骨骼肌 IRS-1 磷酸化水平的影响

如图 3 所示，与 C57/BL 小鼠比较，db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1

磷酸化水平显著降低，二甲双胍治疗给药能够增加 db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1 磷酸化水平。高、中、低剂量糖宁通络胶囊停药能够增加 db/db 小鼠骨骼肌的 IRS-1 磷酸化水平，且具有剂量依赖性。

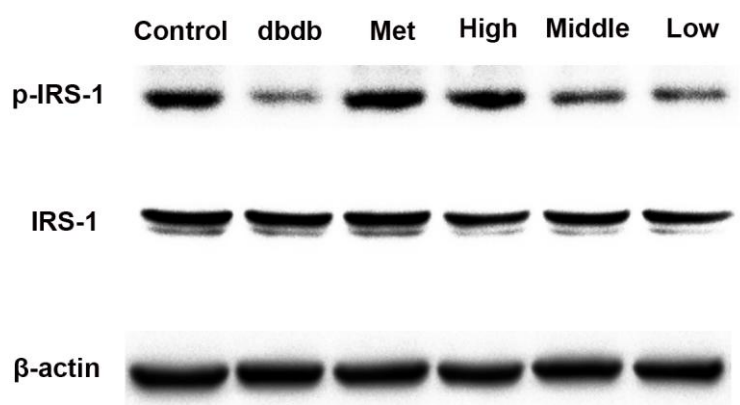


图 3 糖宁通络胶囊治疗给药能够增加 IRS-1 的磷酸化水平

**结论：**糖宁通络胶囊采用多种干预方式干预（长期给药 38 周、给药 16 周停药 12 在给药 7 周，26~28 周龄再进行给药治疗 19 周）均能增加 db/db 小鼠骨骼肌 IRS-1 的磷酸化水平，具有剂量依赖性，提示糖宁通络胶囊能够改善 db/db 小鼠的骨骼肌胰岛素抵抗。

### 讨论：

UKPDS研究的长期随访结果显示：虽然强化治疗病人血糖控制的效果明显较好，但所有治疗组（磺脲类药物、二甲双胍、胰岛素）病人的高血糖在6年中均进行性加重，并伴有β细胞功能进行性减退。UKPDS研究的一个重要结论是：无论使用何种药物（磺酰脲，二甲双胍或胰岛素），血糖控制恶化不可避免；也就是说糖尿病进展中伴随着胰岛β-细胞功能进行性减退，常用的治疗方法无一能够延缓疾病进程。

2型糖尿病患的血糖和血脂代谢异常由胰岛素抵抗和 $\beta$ 细胞功能衰竭两因素促成，其中胰岛素抵抗更为关键。胰岛素抵抗导致的持续性高血糖（即所谓糖毒性）和脂质紊乱造成的高FFA、TG（即所谓脂毒性）对 $\beta$ -细胞功能进一步损害。可见，保护 $\beta$ -细胞功能的关键在于持续有效地改善糖和脂质代谢，根本在于有效改善胰岛素抵抗。

胰岛素抵抗是指胰岛素执行其正常生物作用的效应不足，表现为外周组织尤其是肌肉，脂肪组织对葡萄糖的利用障碍，早期胰岛 $\beta$ 细胞尚能代偿性地增加胰岛素分泌弥补效应不足，但久而久之，胰岛 $\beta$ 细胞的功能就会逐步衰弱，导致糖耐量异常和糖尿病发生。

在众多心血管疾病的危险因素中胰岛素抵抗处于核心地位，或者说胰岛素抵抗是多种疾病，特别是糖尿病及心血管共同的危险因素，是滋生多种代谢相关疾病的共同土壤。流行病学资料显示，胰岛素抵抗在糖尿病及心血管疾病发病之前多年就可存在，常常与肥胖、年龄的增长、高血压、高脂血症相伴随。因此，胰岛素抵抗是促使糖尿病、高血压、高血脂等疾病发展发生的重要原因。

血糖的调节主要受“胰岛素受体/IRS-1/PI3K/磷酸肌醇依赖的蛋白激酶/蛋白激酶B/葡萄糖转移因子4”信号途径的影响。胰岛素受体底物（IRS）是胰岛素信号传递的重要介质，其中IRS-1在胰岛素信号转导通路中的作用尤为重要。IRS-1在体内多个组织中均有表达，其中在胰岛 $\beta$ 细胞、肝脏、骨骼肌和脂肪组织中表达最为丰富。

研究显示，2型糖尿病患者及其亲属不管其是否伴有糖耐量损害，均存在胰岛素抵抗IR。文献和本试验研究均表明：自发性2型糖尿病



大鼠肌肉组织IRS-1蛋白表达及磷酸化水平均有下降，而与IR相关。

本研究表明：糖宁通络胶囊长期给药和治疗给药均能增加db/db小鼠骨骼肌IRS-1的磷酸化水平，具有剂量依赖性；前期研究结果：糖宁通络显著降低糖尿病小鼠HOMA-IR指数，提示糖宁通络胶囊对db/db小鼠胰岛素抵抗具有抑制作用。该研究初步提示：苗药组方糖宁通络降糖作用的分子机制之一，即通过上调胰岛素受体底物1（IRS-1）的磷酸化水平，修复胰岛素信号通路发挥其降糖作用有关。

以往的研究结果显示：糖宁通络具有显著降糖作用、降低胰岛素抵抗（HOMA-IR）指数，同时具有一定的降脂作用，保护胰岛β细胞。改善胰岛素抵抗从根本上改善糖代谢和血脂代谢异常，从而减轻持续性高血糖（即所谓糖毒性）和脂质紊乱造成的高FFA、TG（即所谓脂毒性）对β-细胞功能的进一步损害，使β-细胞得到多重保护。

中药复方（包括民族药）的疗效是由其组成的各种药效物质与机体大分子之间相互作用的结果。复方多成分决定了其作用的多靶点和多环节，不同组分对不同病理环节起作用，最终表现出对病理状态下机体的整体调节作用。苗药糖宁通络通过上调骨骼肌IRS-1的磷酸化水平，改善胰岛素抵抗可能是其降血糖、降血脂改善并发症等综合作用的内在网络靶点之一。糖尿病及并发症发生发展的分子机制尚不完全清楚，大致涉及炎症反应、氧化应激和血管内皮损伤等多环节相关，糖宁通络降糖及治疗并发症的作用机制尚待进一步探索研究。

## 8 影响研究可靠性和造成研究工作偏离试验方案的异常情况

在试验过程中未出现造成研究偏离试验方案的异常情况。

## **9 专题负责人与所有参加工作的人员姓名和承担的工作内容**

9.1 专题负责人：孙晓波

9.2 给药及临床症状观察负责人：孙桂波

参加人员：孙桂波、孟祥宝、陈亚萍、梁甜、汪梦霞、赵静宇

9.3 动物饲养管理及检疫负责人：孙桂波

参加人员：孙桂波、孟祥宝、陈亚萍、梁甜、汪梦霞、赵静宇

9.4 供试品保管负责人：孙桂波

9.5 资料保管负责人：孙晓波

## **10 试验资料的保存项目、地点及时间**

10.1 保存项目：专题负责人任命书、试验方案、使用动物有关资料、有关供试品的资料、原始记录及原始数据（体重、给药、一般状态观察等）、解剖相关资料、质量保证相关的资料、总结报告书及其它资料。

10.2 保存地点：中国医学科学院药用植物研究所。

**注：本试验仅对提供的供试品负责。**