

硅橡胶缓释管的筛选及体内埋植效果验证

王霞萍, 韩晓

南京医科大学江苏省人类功能基因组学重点实验室 南京市, 210029

【摘要】 目的 筛选出一种制作简便、在体内有效工作的皮下埋植用硅橡胶缓释管, 为研究药物的长期效应及毒副作用提供可靠的实验方法。**方法** 以双氢睾酮作为试验用药物、雌性 SD 大鼠为动物模型, 筛选出两种自制硅橡胶缓释管中性能(生物相容性、体内稳定性)较优者, 并进一步验证其在体内的释药效果。**结果** 用医用粘合剂制作的硅橡胶缓释管封闭牢靠(体内稳定性好)、无明显的异物排斥反应(生物相容性好), 并可在体内有效工作, 明显优于用木质敷药棒制作的缓释管。**结论** 用医用粘合剂制作的硅橡胶缓释管是一种适用于体内长期埋植的缓释管, 可用于双氢睾酮等药物长期缓释给药和构建动物模型。

【关键词】 缓释管; 双氢睾酮

【中图分类号】 R965.2

Slow-Releasing Silastic Capsule Screening and In-vivo Effect Evaluation

WANG Xiaping, HAN Xiao

The Key Laboratory of Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China

【Abstract】 Objective To screen for a slow-releasing silastic capsule, which is easy to prepare, can work effectively in vivo, and serve as a reliable experimental tool for studying long-term effects and side effects of drugs. **Methods** The superior of two slow-releasing tubes was screened out, with dihydrotestosterone as a test drug and female SD rats as animal models. It would be more stable in vivo and have better biocompatibility. Its drug-releasing effect was further evaluated in vivo. **Results** The slow-releasing silastic capsule made of medical adhesive was tightly sealed (good stability in vivo), caused no obvious rejection reaction (better biocompatibility) and worked well in vivo in female SD rats. It was superior to the slow-releasing tube sealed with wood. **Conclusion** The slow-releasing silastic capsule made of medical adhesive is suitable for long-term implantation in vivo and can be used for long-term administration of DHT or other drugs and establishment of animal models.

【Key words】 slow-releasing tube; dihydrotestosterone

缓释给药是一种能够简便而有效地维持血药浓度稳定的重要方法, 既减少了用药次数, 又提高了药物的功效, 同时也是体内药效研究的重要方法之一。商业化的缓释片因剂型少、药品种类不全、价格昂贵、进口不便、定制周期长等诸多原因, 其运

用存在明显的局限性。自制缓释管则较为经济, 并且我们可根据需求制备多种药物品类和不同剂型的缓释管。查阅相关文献, 我们发现常用的硅橡胶缓释管因制作材料不同主要有两种, 其主体材料多采用道康宁实验用硅橡胶管^[1-6], 而用于封闭两端的材料分别选用木质敷药棒^[1-5]和道康宁 A 型医用粘合剂^[6]。较多的研究采用木质敷药棒, 也有少部分研究选用 A 型医用粘合剂。缓释管的制作材料不同程度地影响缓释管的体内埋植效果, 因而, 我们拟筛选出一种制作简便、体内埋植效果可靠的自

资助项目: 国家自然科学基金 (No. 81200559)

通讯作者: 韩晓 (电话: 025-6862070, E-mail: hanxiao@njmu.edu.cn)

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 81200559)

Corresponding author: HAN Xiao (Tel: 86-25-86862698, E-mail: hanxiao@njmu.edu.cn)

制缓释管, 进而为研究药物长期效应及毒副作用提供有效的实验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠 (3 周龄) 购自上海西普尔-比凯实验动物有限公司。Silastic® laboratory tubing 和 Silastic® medical adhesive silicone, Type A 购自美国道康宁公司; 双氢睾酮标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。眼科镊、眼科剪购自苏州六六视觉科技股份有限公司; 持针器、血管钳购自上海医疗器械 (集团) 有限公司; 医用缝合针购自上海医菱医疗器械销售有限公司。速效胰岛素注射液购自江苏万邦生化医药股份有限公司。

1.2 缓释管制作

清洗硅橡胶管并晾干, 每个缓释管剪取 3 cm 长; 用 1 ml 注射器吸取 A 型医用粘合剂 (Silastic® medical adhesive silicone, Type A), 向硅橡胶管内注入 5 mm 长度的量 (缓释管 II) 以封闭缓释管一端; 晾干过夜后, 称取 7.5 mg 双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 标准品粉末, 填充入硅橡胶管内 (对照用空白管不填充); 轻轻捏住缓释管另一端以排出一定量空气后, 注入医用粘合剂将其封闭; 晾干过夜, 缓释管即制备完成; 于施行皮下置管手术前一天, 将制作完成的缓释管置于生理盐水中平衡, 备用。木质敷药棒封闭两端的缓释管 (缓释管 I), 封闭两端的材料以同样长度 (5 mm) 的木质敷药棒代替 A 型医用粘合剂, 并用强力胶使木质材料与硅橡胶管黏合, 其余步骤类似。

1.3 皮下置管手术

手术依据标准化操作程序实行无菌操作、麻醉止痛。用 3.5% 水合氯醛麻醉大鼠, 碘伏消毒其被毛后, 备皮; 手术区用碘伏消毒, 取 3~5 mm 横向切口, 钝性分离皮肤与皮下组织后植入 DHT 缓释管, 单纯间断缝合切口; 施行手术后的大鼠分笼饲养 (1 只/笼), 避免互相咬断缝线; 埋植缓释管后的前 3~4 d, 每天观察大鼠伤口愈合情况及大鼠状态; 术后 7~10 d 根据伤口愈合情况拆除手术缝线, 将鼠合笼 (4~5 只/笼)。

1.4 雌鼠阴道涂片

雌鼠颈背部皮下置管术后的第 79 d 至 90 d, 每天早上 8 点给两组鼠进行阴道涂片。动作尽量轻柔且定位准确, 缩短操作时间, 避免激惹大鼠。咽拭子用生理盐水沾湿后轻轻伸入雌鼠阴道转动两圈; 将咽拭子置于相应装有 300 μ l 生理盐水的 EP

管中涮动几下后丢弃; 轻轻混匀后吸取 EP 管内 50 μ l 细胞悬液, 按顺序加入 96 孔板相应孔内; 倒置显微镜下观察, 根据镜下细胞组成判断每只鼠所处时期并拍摄照片。

1.5 胰岛素耐量实验 (ntroperitoneal insulin tolerance test, IPITT)

根据实验所需用量, 将速效胰岛素注射液 (40 U/ml) 用灭菌生理盐水稀释 200 倍, 配制成一定量的胰岛素工作液 (0.2 U/ml)。SD 大鼠禁食 12 h 后, 按 1 U/kg 剂量腹腔注射胰岛素, 尾静脉采血检测注射前 (0 min) 和注射后 15、30、60、120 min 时间点血糖浓度。

1.6 统计学分析

所有实验均重复 3 次, 计算 3 次实验的均数和标准误 (means \pm SEM), 两组数据之间的统计学差异采用双尾 *t* 检验计算 *P* 值。

2 结果

2.1 两种自制缓释管

根据相关文献报道^[1-6], 我们制备了两种硅橡胶缓释管 (图 1), 其主体材料均为道康宁实验用硅橡胶管 (Silastic® laboratory tubing), 而用于封闭两端的材料分别选用木质敷药棒 (相应缓释管我们命名为缓释管 I) 和道康宁 A 型医用粘合剂 (相应缓释管我们命名为缓释管 II)。两种缓释管长度均为 3 cm, 两端封闭材料长 5 mm, DHT 缓释管内含 7.5 mg DHT 标准品粉末, 对照管内无填充物。

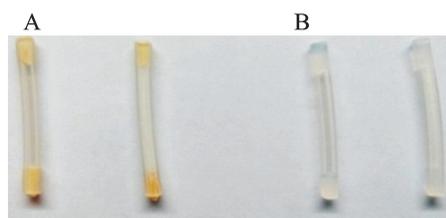


图 1 两种自制缓释管

A: 木质敷药棒和强力胶封闭两端的缓释管 I;

B: A 型医用粘合剂封闭两端的缓释管 II

2.2 缓释管的筛选、比较

比较缓释管的体内埋植效果需要合适的动物模型, 而 DHT 作用于雌性大鼠后内分泌及生殖系统表型明确^[7], 因此我们在筛选缓释管和进行体内埋植效果验证时, 均选用雌性 SD 大鼠。我们将 60 只 3 周龄雌性 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 15 只, 施行颈背部皮下置管手术 (图 2A), 分别埋植缓

释管 I 空白管、缓释管 I DHT 管、缓释管 II 空白管、缓释管 II DHT 管 (图 2B)。4 组大鼠施行手术后, 我们连续监测 90 d, 发现埋植缓释管 I 的大鼠先后有 3 只出现颈背部肿块, 有 2 只出现 DHT 粉末异常漏出 (相应 DHT 组大鼠体重增长曲线异常, 将其解剖后发现封闭缓释管的木质敷药棒脱落), 而埋植缓释管 II 的 30 只鼠未出现以上情况 (表 1)。可见, 用医用粘合剂制作的缓释管封闭牢靠 (体内稳定性好), 并且皮下埋植后机体无明显的异物排斥反应 (生物兼容性好), 明显优于用木质敷药棒和强力胶制作的缓释管。

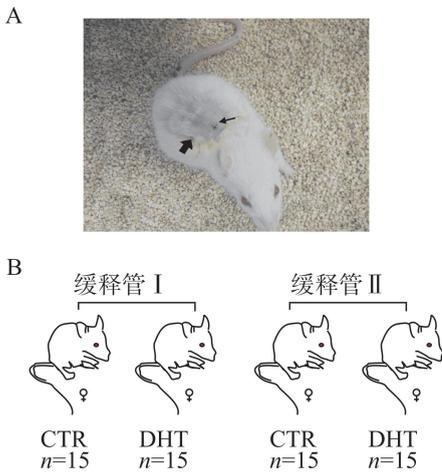


图 2 已施行手术的雌鼠及 3 周龄雌性 SD 大鼠分组造模示意图

A: 已施行皮下置管手术的 3 周龄雌性 SD 大鼠, 细长箭头所指为切口位置和缝合处, 粗短箭头所指为埋植于皮下的缓释管; B: 60 只 3 周龄雌性 SD 大鼠随机分为 4 组, 分别埋植缓释管 I 空白管、缓释管 I DHT 管、缓释管 II 空白管、缓释管 II DHT 管。CTR 表示对照组, DHT 表示埋植 DHT 缓释管组

表 1 两种缓释管性能比较

	缓释管 I	缓释管 II
颈背部硬块	3/30	0/30
DHT 异常漏出	2/15	0/15

2.3 缓释管 II 体内工作效果验证

我们的结果表明, 缓释管 II 在生物兼容性和体内稳定性方面明显优于缓释管 I, 而其体内的释药效果需进一步验证。Manneras 等^[7]指出 DHT 可引起雌性大鼠明显的胰岛素抵抗、肥胖、脂肪细胞增大和动情周期紊乱等。我们检测了埋植缓释管 II 的两组大鼠的部分表型 (如: 体重、动情周期、胰岛素敏感性等), 从而间接验证缓释管 II 体内释药

效果。

每周检测 2 组大鼠的体重变化, 我们发现从造模第二周开始, DHT 组大鼠的体重大于对照组, 并且这种差异随造模时间的延长而增大 (图 3)。

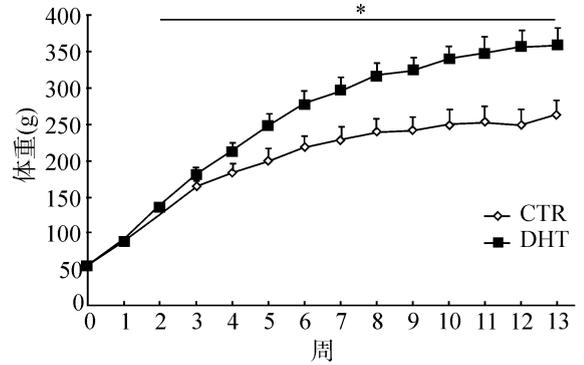


图 3 DHT 组体重明显增加

每组 15 只雌性 SD 大鼠 ($n=15$), 每周各周体重以平均值 \pm 标准误 (mean \pm SEM) 表示。CTR 表示缓释管 II 空白管的对照组, DHT 表示埋植缓释管 II DHT 管组。与对照组比较, * $P < 0.05$

我们通过 IPITT 检测了两组造模鼠的胰岛素敏感性。在造模 13 周时, 腹腔注射胰岛素后, DHT 处理组大鼠 30 min 时间点血糖明显高于对照组 (图 4)。虽然由于同组内各鼠同一时间点血糖值差异较大, 除 30 min 外其他时间点的差异并不明显, 但是同组内不同鼠的胰岛素反应曲线的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 差异较小, DHT 组 AUC 明显高于对照组, 提示 DHT 组大鼠存在胰岛素抵抗。

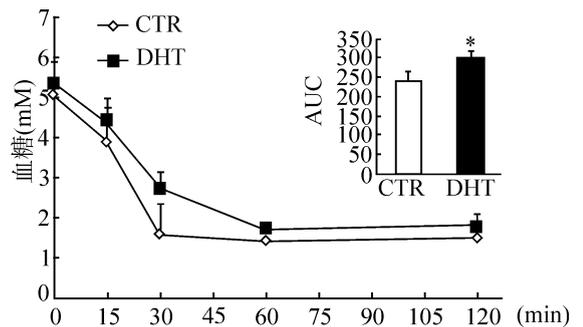


图 4 DHT 组存在明显的胰岛素抵抗

造模 13 周时, 对两组大鼠进行 IPITT 实验, 两组鼠 0、15、30、60、120 min 血糖值以 mean \pm SEM 表示, $n=6$ 。右上角柱状图为各组对应曲线下面积。CTR 表示缓释管 II 空白管的对照组, DHT 表示埋植缓释管 II DHT 管组。与对照组比较, * $P < 0.05$

阴道涂片的细胞类型及比例的改变由雌鼠体内

雌激素的波动变化造成, 并且各个时期有特定的细胞学特点。阴道涂片的结果能有效反应雌鼠体内雌激素的变化及排卵情况。为检测两组鼠排卵情况, 自造模 79 d 起, CTR 和 DHT 两组大鼠每组随机选取 5 只鼠, 每天早上 8 点对其进行阴道涂片并镜检, 持续 12 d。CTR 组的阴道涂片, 镜下所见细胞形态及组成为各期典型表现 (图 5A-5F), 而 DHT 组阴道涂片结果大多如 5E 图样细胞组成, 偶

有 5D 图样镜下表现。表明 DHT 大鼠几乎一直停留在动情间期, 偶有后期出现。对连续 12 d 的涂片结果汇总发现, 对照组雌鼠动情间期 (diestrus)、动情前期 (proestrus)、动情期 (estrus)、动情后期 (metestrus) 规律出现 (图 6A), 动情周期正常, 表明其能正常排卵。而 DHT 组大鼠动情周期明显紊乱, 无动情期出现 (图 6B), 表明 DHT 处理组雌鼠无排卵。

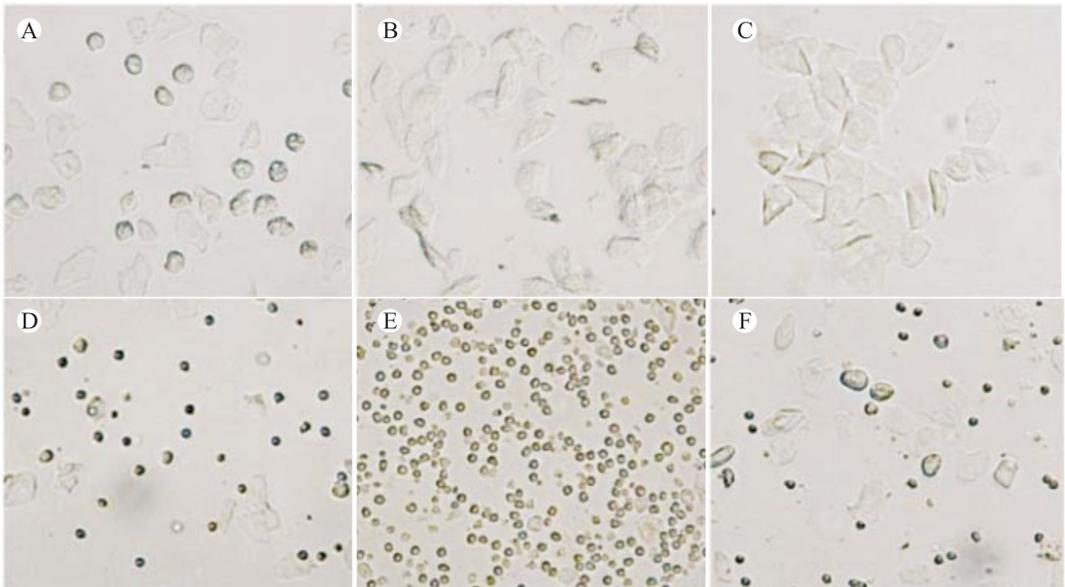


图 5 DHT 组雌鼠与 CTR 组大鼠阴道涂片 (×100)

A: 动情前期; B, C: 动情期; D: 动情后期; E, F: 动情间期

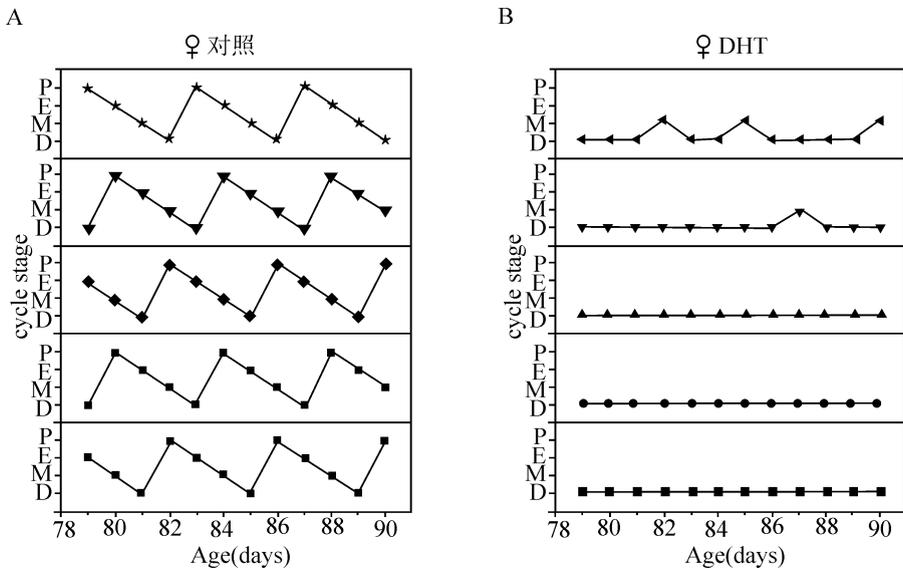


图 6 CTR 和 DHT 组大鼠动情周期

A: CTR 组 5 只大鼠连续 12 d 阴道涂片结果汇总; B: DHT 组 5 只大鼠连续 12 d 阴道涂片结果汇总。

D、E、M、P 分别表示 diestrus、estrus、metestrus、proestrus

以上雌性 SD 大鼠代谢及生殖系统表型跟以往

的研究相符^[7], 表明缓释管 II 可在 SD 大鼠体内有

效工作, 可成功构建相应的动物模型。

3 讨论

本研究以性激素作为常需缓释给药的药物的代表。性激素类常用的给药方式主要有以下几种: 皮下注射、皮下埋植缓释片、皮下埋植缓释管、口服等^[1-2]。Strom 和 Ingberg 等^[1,3]的研究表明自制硅橡胶缓释管能稳定的释放激素并维持体内相应激素浓度在一个较为稳定的状态, 因而长期用药时, 这种用药方式优于皮下注射、皮下埋植商业化激素缓释片等方法。以往研究中常用的自制硅橡胶缓释管主要有两种, 较多的研究选用木质敷药棒^[1-5], 而仅有少部分研究采用医用粘合剂^[6], 是否使用较多的即为性能较优者? 因而本研究拟筛选出一种性能相对较优的缓释管以利于科学研究。

DHT 已被较多的研究用于幼年雌性大鼠^[7,11-14]、幼年雌性 C57 小鼠^[10,15]等以构建多囊卵巢综合征动物模型, 相应动物模型具有明显的生殖系统及代谢表型, 表现为动情周期紊乱、无排卵, 体重增加、肥胖, 胰岛素抵抗, 卵巢多囊样改变等, 明确的表型可利于我们验证缓释管的体内工作效果。因而本研究以幼年雌性 SD 大鼠为动物模型、DHT 为试验用药物, 从较为常用的两种硅橡胶缓释管中初步筛选出一种制作相对简便、性能较优并且在体内有效工作的缓释管。

缓释管 I 因材料容易获得、制作过程简单、耗时短, 被较多的研究所采用^[1-5], 但我们认为木质敷药棒成分复杂, 并可能导致机体产生异物排斥反应, 其使用很可能并不恰当。我们初步比较了两种缓释管的皮下埋植效果, 发现缓释管 I 两端的木质材料与缓释管的粘并不牢靠, 容易从缓释管脱落, 并使缓释管内激素一次性大量释放。同时, 我们发现木质材料可能使 SD 大鼠产生异物排斥反应, 严重者出现局部纤维组织明显增生或纤维瘤形成。Strom 等^[3]在其文中也提到类似的现象。而埋植缓释管 II 的大鼠并未出现类似现象。因此, 我们认为 A 型医用粘合剂制作较木质敷药棒更适合用于制作硅橡胶缓释管。

体内发挥雄激素生物学效应的主要是 DHT 和睾酮, 为减少睾酮转变为雌二醇所产生的干扰效应, DHT 被较多的研究用来探讨雄激素的病理生理作用和多囊卵巢综合征 (高雄激素血症为该疾病的主要临床表现和诊断标准之一) 动物模型的构建^[10-15]。本研究用医用粘合剂制作的硅橡胶缓释管所构建的动物模型, DHT 组 SD 大鼠出现动情

周期紊乱、无排卵, 体重增加, 胰岛素抵抗等, 表型与以往研究相符^[7]。此 DHT 缓释管制作简便、耗时短, 材料相对容易获得, 并且体内工作效果可靠, 可为构建多囊卵巢综合征等动物模型和研究 DHT 等雄激素的病理生理作用提供有效的实验方法。

皮下埋植缓释管的方法已被用于较多的研究, 尤其是性激素等药物长期效应的研究^[8-10]。制作简便、体内工作效果可靠的缓释管是相应实验顺利进行的基本保障, 并且由于整个实验过程历时较长, 可靠的缓释管更是至关重要。本研究以 DHT 为试验用药, 比较了以往研究中用到的两种硅橡胶缓释管, 并发现以往研究中使用较少的缓释管 II (用医用粘合剂制作的硅橡胶缓释管) 明显优于使用较多的缓释管 I (用木质敷药棒制作的硅橡胶缓释管)。本研究将有望为研究 DHT 等药物的长期效应、毒副作用和多囊卵巢综合征等动物模型的构建提供简便而有效的实验方法, 为揭示 DHT 等药物在体内的病理生理作用研究奠定基础。

参考文献

- [1] INGBERG E, THEODORSSON A, THEODORSSON E, et al. Methods for long-term 17beta-estradiol administration to mice [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2012, 175 (1): 188-193.
- [2] ISAKSSON I M, THEODORSSON A, THEODORSSON E, et al. Methods for 17beta-oestradiol administration to rats [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011, 71 (7): 583-592.
- [3] STROM J O, THEODORSSON E, THEODORSSON A. Order of magnitude differences between methods for maintaining physiological 17beta-oestradiol concentrations in ovariectomized rats [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008, 68 (8): 814-822.
- [4] DUBAL D B, WISE P M. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats [J]. *Endocrinology*, 2001, 142 (1): 43-48.
- [5] STROM J O, THEODORSSON E, HOLM L, et al. Different methods for administering 17beta-estradiol to ovariectomized rats result in opposite effects on ischemic brain damage [J]. *BMC Neurosci*, 2010, 11: 39.
- [6] MEACHEM S J, SCHLATT S, RUWANPURA S M, et al. The effect of testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol on the re-initiation of spermatogenesis in the adult photoinhibited Djungarian hamster [J]. *J Endocrinol*, 2007, 192 (3): 553-561.
- [7] MANNERAS L, CAJANDER S, HOLMANG A, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome [J]. *Endocrinology*, 2007, 148 (8): 3781-3791.
- [8] TOUFEXIS D J, WILSON M E. Dihydrotestosterone differentially modulates the cortisol response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female rhesus macaques, and restores circadian secretion of cortisol in females [J]. *Brain Res*, 2012, 1429: 43-51.

- [9] LE T Y, ASHTON A W, MARDINI M, et al. Role of androgens in sex differences in cardiac damage during myocardial infarction[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(2):568-575.
- [10] CALDWELL A S, MIDDLETON L J, JIMENEZ M, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(8):3146-3159.
- [11] JOHANSSON J, FENG Y, SHAO R, et al. Intense electroacupuncture normalizes insulin sensitivity, increases muscle GLUT4 content, and improves lipid profile in a rat model of polycystic ovary syndrome[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(4):551-559.
- [12] TEPAVCEVIC S, VOJNOVIC M D, MACUT D, et al. Dihydrotestosterone deteriorates cardiac insulin signaling and glucose transport in the rat model of polycystic ovary syndrome[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 141:71-76.
- [13] NIKOLIC M, MACUT D, DJORDJEVIC A, et al. Possible involvement of glucocorticoids in 5alpha-dihydrotestosterone-induced PCOS-like metabolic disturbances in the rat visceral adipose tissue [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 399:22-31.
- [14] BROWN R E, WILKINSON D A, IMRAN S A, et al. Hypothalamic kiss1 mRNA and kisspeptin immunoreactivity are reduced in a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. *Brain Res*, 2012, 1467:1-9.
- [15] VAN HOUTEN E L, KRAMER P, MCLUSKEY A, et al. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6):2861-2869.
- (2015-05-29 收稿)