

雄性激素慢释药物的制备及其性能的研究

刘瑞芝 雷少琼 李希明 汤 涛* 陈文明 方月娥

董永治 韩 萍 冯炽光 赵 钢 郑 力

(中国科学技术大学, 合肥)

摘要 利用辐射聚合技术将雄激素丙酸睾酮固定在聚甲基丙烯酸 β 羟乙酯载体上, 制备慢释放雄激素药物的方法。此种慢释药可作为睾丸的替代物, 又称人工睾丸。将制得的人工睾丸植入阉割雄兔的阴囊内, 定期取血, 用放射免疫法测定血清睾酮水平。结果表明人工睾丸可在动物体内稳定地释放丙酸睾酮, 并使血清睾酮维持在 $429 \pm 36 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 水平。植入部位周围组织切片观察未见异常, 证明人工睾丸具有较好的组织相容性。

关键词 辐射聚合, 人工睾丸, 丙酸睾酮, 延缓释药, 雄激素

引 言

雄激素属 19 碳类固醇, 其中睾酮的生物活性最强, 主要由睾丸曲精细管间结缔组织中的 Leydig 氏细胞所分泌, 占雄性血浆中睾酮的 95%, 少量由肾上腺皮质产生。睾酮能促进精子的形成及成熟, 促进青春期副性征的发育, 还能促进蛋白质及骨髓细胞的合成, 可使基础代谢率增高^[1]。患有雄激素高度缺乏病症, 例如性发育不全, 性功能障碍、性器官损伤等, 需长期从外部补给, 如肌注丙酸睾酮。这样反复注射不仅麻烦, 且易导致感染。近年来科学家们正致力研究一种可植入体内长期稳定慢释放雄激素的药物, 称之为人工睾丸。最简单的制备方法是将雄激素固定在交联的高分子网络中, 制成雄激素-高聚物复合物。高聚物在媒体中溶胀, 将激素缓慢地释放出来。日本吉田等人利用低温辐射聚合技术将甲基睾酮固定, 制成了人工睾丸^[2]。辐射法具有方法简便和药物纯净等优点。国内人工睾丸的研制尚未见报道。本文采用低温辐照技术将丙酸睾酮固定在交联的聚甲基丙烯酸 β 羟乙酯载体上, 制成具有稳定慢释放雄激素功能的人工睾丸, 并将其植入阉割雄兔的阴囊内, 研究在体内释放丙酸睾酮规律及其生物相容性。

实 验

1. 材料

单体: 甲基丙烯酸 β 羟乙酯 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)。交联剂: 二甲基丙烯酸乙二醇酯 ethylene glycol dimethacrylate (2 G) 均系日本东京化成工业株式会社出品, 未经纯化直接使用。雄激素选用丙酸睾酮 testosterone propionate (TSP), 上海第十二制药厂生产。其它试剂均采用国产分析纯试剂。

2. 人工睾丸的制备方法

将单体 HEMA、交联剂 2 G 和雄性激素 TSP 按一定重量比装入备好的模具内并使其均匀混

* 安徽省人民医院

合,通氮气除去氧气后封模,迅速放入 -70°C 冷浴中骤冷并保持在该温度下,移入 ^{60}Co 辐射源装置内辐照至 5 kGy (辐照剂量率 5.198 kGy/h)。辐照后在无菌条件下碎模,得到约重 0.5 g 卵形($18\text{ mm}\times 4.5\text{ mm}$)的慢释雄激素药物,即人工睾丸。

3. 丙酸睾丸酮释放速率的测定方法

将制成的人工睾丸浸泡在 $\text{pH}=7.2$ 的缓冲液中,恒温在 37°C 。每隔一定时间测定一次浸泡液中丙酸睾丸酮(TSP)的浓度,同时更新浸泡液。TSP的释放量是用紫外分光光度法在其特征吸收波长 240 nm 下测定的。

4. 动物实验方法

选择4只健康雄家兔,取血,用放射免疫法测定血清睾丸酮水平($\text{ng}/100\text{ ml}$)^[1](所用放射免疫试剂箱和闪烁计数仪均系上海内分泌研究所生产),取其平均值作为健康雄兔的正常激素水平。同时测定白细胞数。测定后手术摘除双侧睾丸。摘除后定期取血观察,约2个月后血清睾丸酮水平下降到最低值。此时将两粒人工睾丸分别植入双侧阴囊内。植入后定时测定血清睾丸酮水平。

解剖埋植人工睾丸的家兔,仔细观察人工睾丸形状的变化及表面情况,取其周围的膜和组织进行活检(biopsy),并与正常睾丸膜和周围组织比较。

结果和讨论

1. 丙酸睾丸酮在高聚物载体中存在形态及其释放速率

TSP是白色粉末状固体,其转靶X射线衍射图谱显示出晶体特有的衍射峰(见图1),证明它是一种晶体。将TSP固定在PHEMA载体上制得的人工睾丸呈乳白色,表面光洁。将其在液氮中碎裂并取断面在电子显微镜下观察,发现TSP以 $2\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ 的颗粒均匀分散在载体中,如图2所示。为了弄清这种微小颗粒的形态,对人工睾丸碎裂断面进行X射线衍射分析,衍射谱中没有出现TSP的特征衍射峰(见图3),证明TSP是以非晶态存在于载体中。这是因为在制备人工睾丸过程中HEMA/2G/TSP均匀混合体系在骤冷时TSP来不及结晶就被“冻结”下来,当 γ 射线作用于体系时单体聚合,TSP仍以非晶态陷落在高聚物交联的网络里。

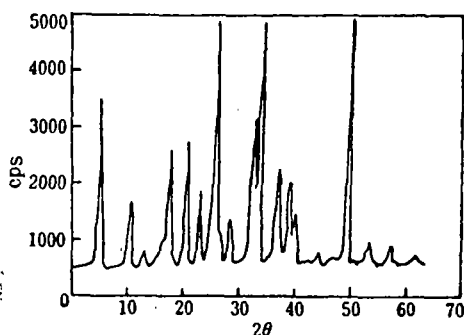


Fig 1. X-ray diffraction pattern for powder of testosterone propionate

由于HEMA是亲水性单体,其聚合物PHEMA具有优良的亲水性。当人工睾丸被浸泡在缓冲液中,载体就会慢慢溶胀并将陷落的TSP逐渐释放出来。TSP的释放速率至少取决于载体溶胀、TSP溶解和扩散三个步骤的快慢程度。用紫外分光光度法定时分析缓冲液中TSP的浓度并计算其累积释放量(每测一次后更新溶液)。将TSP的累积释放量对时间作图(见图4),图中曲线在某一时间的斜率即表示在该时间TSP的释放速率。如图所示,在浸泡

初期裸露在载体外表面未被固定的TSP很快地溶入缓冲液,致使初期释放速率较大。随后释放速率主要受载体溶胀控制,变得非常缓慢。随载体溶胀程度不断增大,溶液向载体深层渗入,TSP不断溶解,在载体网孔内的浓度逐渐增大并加快了向载体外部扩散的速率,表现在约第40d后TSP的释放速率每日增加。到第70d左右载体溶胀完全,此时陷落的TSP以一定的速率溶入缓冲液中,并以几乎不变的速率向外扩散,TSP的释放速率持续稳定。

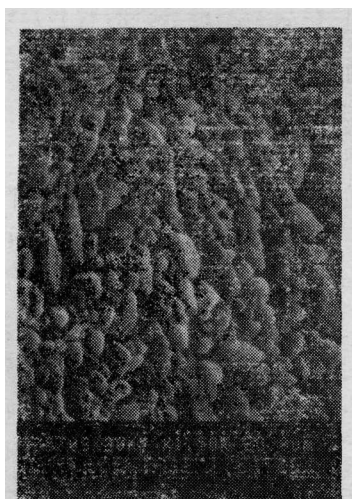


Fig 2. SEM photograph for transection of testicular prosthesis

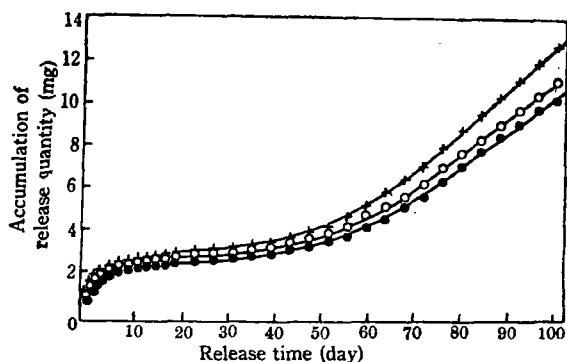


Fig 4. Slow release profile of testosterone propionate from testicular prosthesis in buffer solution
(+) 2 G 13% (O) 2 G 16% (●) 2 G 20%

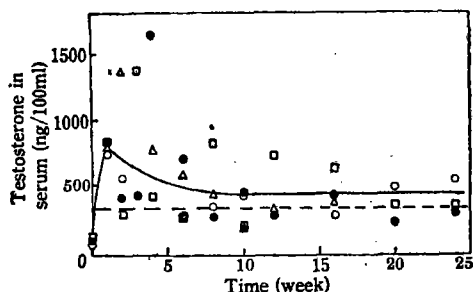


Fig 5. Slow release profile of testosterone propionate from testicular prosthesis transplanted in scrotum
Rabbit No. (●) 1 (○) 2 (□) 3 (△) 4
(---)/(—) The average serum testosterone level of rabbits before castration/after transplantation of testicular prosthesis

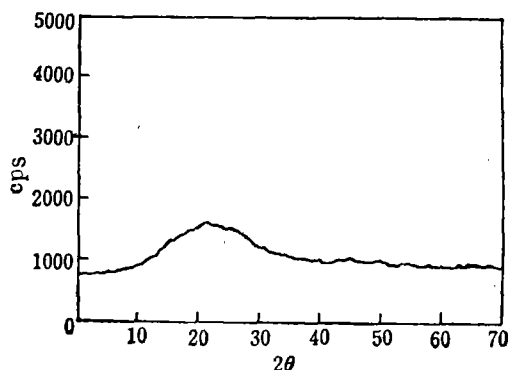


Fig 3. X-ray diffraction pattern for transection of testicular prosthesis

改变聚合体系中交联剂的量可以有效地调节 TSP 的释放速率。由图 4 可见, 2 G 含量增大, TSP 的释放速率减小。这是因为载体的交联密度随交联剂含量加大而增加, 网络变密, 溶液渗入孔道变细, 致使 TSP 向外扩散的速率变慢。选用 HEMA/2 G (87/13) 的配方, 含 TSP 40%, 制成的人工睾丸在缓冲液中浸泡, 100 d 累积释出的 TSP 约占固定药量的 4.7%, 这说明人工睾丸可以长期稳定地释放雄激素。

2. 人工睾丸在家兔体内释放 TSP 性能的研究

健康雄兔摘除双侧睾丸后, 血清睾酮水平从正常值 (平均为 329 ± 37 mg/100 ml) 逐渐下降, 雄兔变得不爱活动, 体质下降且易感染疾病。阉割后两个月, 血清睾酮水平降到最低 (平均为 109 ± 15 ng/100 ml)。此时, 用局部麻醉将两粒人工睾丸分别植入阉割家兔双侧阴囊内 (0.5 g 人工睾丸含 0.2 g TSP)。由于人工睾丸较家兔睾丸 (湿润状态 2—3 g) 小而轻, 植入宽松的阴囊内, 对家兔没有不良影响。家兔表现活泼, 抗病能力增强, 白细胞数正常 (平均 $4208/\text{mm}^3$) 两个月后体重平均增加 0.85 kg, 生长正常。

植入人工睾丸后, 家兔血清睾酮水平很快从阉割后的最低值 (109 ± 15 ng/100 ml) 回升, 第一周后 4 只实验家兔的血清睾酮都上升到 750—850 ng/100 ml, 超过了阉割前的正常水平。如图 5 所示, 在植入人工睾丸初期, 有一个释放 TSP 的高峰。这可能是因为人工睾丸外

表面那些未被固定的或者固定在载体浅表面的 **TSP** 较快从载体上溶入体液之故。这与缓冲液中释放时观察到的初期释放速率较快的现象相吻合。高峰期后,血清睾酮水平的波动较大。它不仅受载体在体液中溶胀、**TSP** 在体液中溶解和扩散的快慢所控制,同时还受到包裹人工睾丸的膜对释放出的 **TSP** 吸收多少以及向机体内输送的快慢所控制。随植入时间延长,血清睾酮水平逐渐趋于平稳。植入后 6 周至 6 个月在 $429 \pm 36 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 的范围内波动(目前仍在继续测定中)。动物的个体差异、机体本身新陈代谢周期、健康状况等都明显影响血清睾酮水平。例如人体血清睾酮在 $400\text{—}1200 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 的范围内均属正常。因此,植入人工睾丸后,家兔血清睾酮水平除初期(植入后 1—2 周)较高外,基本维持在正常范围内。

PHEMA 是一种生物相容性优良的高聚物,不仅亲水性好,且在动物体内稳定,完全不分解。图 6 是植入人工睾丸前后家兔睾丸膜和周围组织的切片图。正常家兔睾丸膜由粘膜上皮、柱状细胞和底细胞组成。在上皮间有薄层结缔组织,肌膜较薄,纤维排列不整齐,最外层是纤维膜(图 6 a₁)。植入人工睾丸后,包围人工睾丸的膜(图 6 b₁)与正常睾丸膜相比,细胞结构未见变化,只有少量膜纤维细胞增生,纤维细胞紧密。在人工睾丸表面肉眼可见包膜存在,并有微细血管。可能就是这些

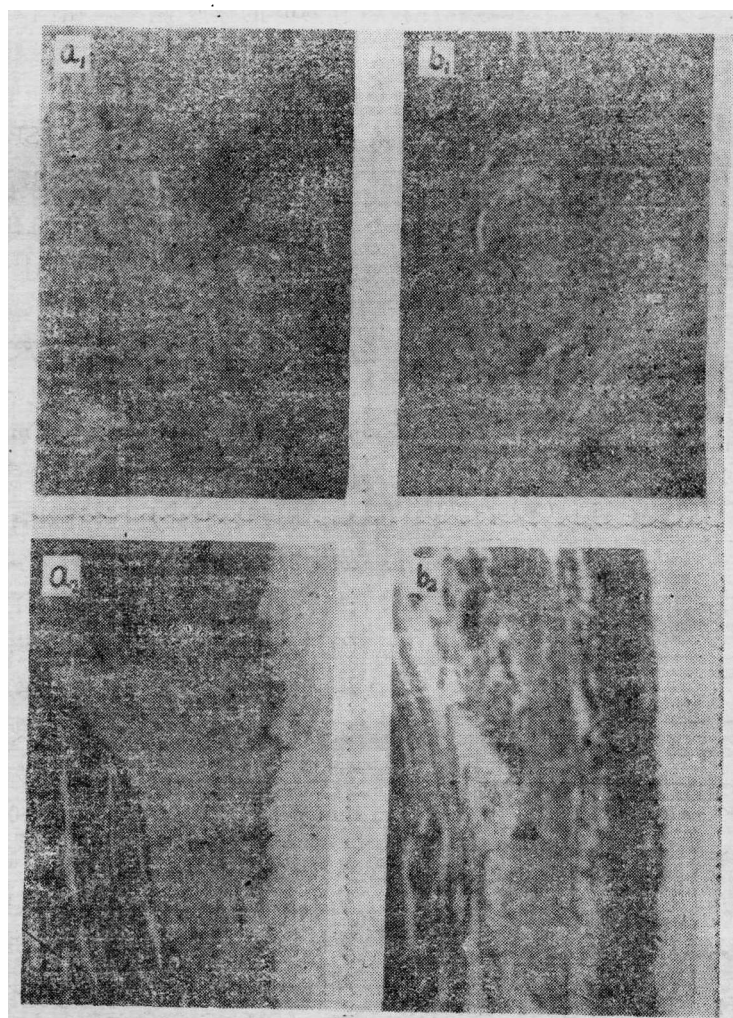


Fig 6. Micrographs of fixed membrane and tissues of testes

a₁/a₂ normal membrane/tissues, b₁/b₂ membrane/tissues after transplantation of testicular prosthesis

微血管吸收了人工睾丸释放出的 TSP 并向全身输运。正常睾丸膜与肌肉连接紧密(图 6a₂), 人工睾丸的包膜与肌肉组织间有胶原纤维细胞增生, 排列不规则而疏松(图 6b₂), 这可能是人工睾丸引起的“排异”反应。但是细胞生长正常, 无炎症细胞。这说明人工睾丸具有很好的组织相容性。

结 束 语

利用低温辐射聚合技术制备的雄激素慢释药物——人工睾丸, 是一种雄激素-聚合物复合物。丙酸睾丸酮均匀分布在载体高聚物的交联网络内。当其与体液接触时, 丙酸睾丸酮会逐渐被释放出来, 其释放速率可通过改变聚合物的交联密度来控制。聚合物亲水性好, 在体内完全不分解, 即使在丙酸睾丸酮完全释放完之后仍能保持睾丸形状, 并具有柔软性和很好的生物组织相容性。在辐射聚合的同时, 经 γ 射线杀菌, 只要手术操作严格, 不会引起感染。经家兔体内实验证明, 人工睾丸可稳定地释放雄激素, 迄本报告完稿为止, 已稳定释放半年以上, 目前仍在继续观察中, 结果将陆续报告。

参 考 文 献

- 1 李振甲, 王仁芝. 激素的放射免疫分析. 科学出版社, 1985: 373
- 2 Youshida M, Asano M, Kaetsu I. Biomaterial, 1983, 4: 33
- 3 李希明, 袁致俭, 陈文明, 谷保民, 蒋心田. 辐射研究与辐射工艺学报, 1989, 7 (3): 36

(稿件收到日期: 1990 年 12 月 3 日)

PREPARATION OF SLOWLY RELEASED MALE SEX HORMONE DRUG BY RADIATION POLYMERIZATION TECHNIQUE AND ITS EVALUATION IN VIVO

Liu Rueizhi Lei Shaoqiong Li Ximing Tang Tao
Chen Wenming Fang Yuee Dong Yongzhi Han Ping
Feng Zhiguang Zhao Gang Zheng Li
(University of Science and Technology of China, Hefei)

ABSTRACT The radiation polymerization technique was used for immobilization testosterone propionate into crosslinked network of polyhydroxyethyl methacrylate to prepare slowly released male sex hormone drug which is used for testicular prosthesis. The testicular prosthesis was transplanted into the scrotum of male rabbit whose testes was excised 2 months before the transplantation. Then the level of male sex hormone in serum was measured by radioimmunoassay once a week after transplantation. The results of measurement in a period of 6 months were shown that the testicular prosthesis has a stable release of male sex hormone. The testosterone level in serum of the castrated male rabbits rises markedly and finally stabilizes at the level of $429 \pm 36 \text{ ng/100 ml}$ after transplantation. Microscopic examination of biopsies taken from the tissues around the testicular prosthesis showed that tissue compatibility was revealed well.

KEYWORDS Radiation polymerization. Testicular prosthesis. Testosterone propionate. Drug delayed release. Male sex hormone