



壮阳药效动物实验评价方法的改进

曹莹¹, 孔焕育¹, 丘玉昌¹, 王杞妹¹, 崔东方², 林继红²

(1. 南方医科大学新药评价中心, 广州 510515; 2. 南方医科大学实验动物中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 对壮阳药效评价方法进行优化,以探求更为有效的候选药物筛选方法。方法 模型组大鼠均灌胃给予西地那非 10 mg/kg,对照组大鼠给予相同容量的生理盐水灌胃,每天1次,连续灌胃给药 14 d。每次给药后连续记录 2 h 内大鼠阴茎勃起、阴部理毛、爬背次数和参与动物数,并计算 PEI 值。采用改良的壮阳药效评价方法,整个过程采用摄像头观察并在不同时间段给予雌鼠诱导。结果 在雌鼠诱导组中,模型组大鼠给药后 2 h PEI 值较对照组明显升高($P < 0.05$)。在模型组中,与人为观察组相比,摄像头观察组大鼠给药后 2 h PEI 值明显升高($P < 0.05$);与非雌鼠诱导组相比,雌鼠诱导组大鼠给药后 2 h PEI 值明显升高($P < 0.05$);与持续诱导组相比,间断诱导组 2h PEI 值无明显差异,但 60~120 min 时间段 PEI 值明显升高($P < 0.05$)。结论 优化后的壮阳药效评价方法能更为有效的评价候选药物的壮阳药效。

【关键词】 勃起功能障碍; 西地那非; 壮阳; 阴茎勃起指数

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0066-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.01.015

Seek the More Effective Screening Method on the Assessment Methods of Strengthening Yang Efficacy

CAO Ying¹, KONG Huan-yu¹, QIU Yu-chang¹, WANG Qi-mei¹, CUI Dong-fang², LIN Ji-hong²

(1. Center of Drug Evaluation and Research, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective Optimization on the assessment methods of strengthening yang efficacy to seek the more effective screening method. **Methods** Rats of model groups were given silaenafil 10mg/kg by gavage. Rats of control groups were given normal saline only. All rats were gavaged once a day for two weeks. Rats were observed for 2 hours after each drug administration for penile erection, genital grooming and possible copulation mounting. The number of responding rats was recorded along with the number of sexual activity episodes (penile erection, genital grooming or copulation mounting). Penile erection index (PEI) was calculated for each group by multiplying the percentage of active rats (responding rats) by the total number of activity episodes. By using the modified assessment method, male rats were observed by camera. Meanwhile, we also stimulated the male rats by female rats at different periods. **Results** Among female rat-stimulated groups, the model groups compared with the control groups, PEI was significantly increased ($P < 0.05$). Among the model groups, the camera observed group compared with the human observed group, PEI was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with non-female rat-stimulated group, PEI was significantly increased in female rat-stimulated group ($P < 0.05$). The 2 h PEI shows no significant differences between sustained induction group and intermittent group. But, during the period of the second hour, PEI was significantly increased in intermittent group (P

[作者简介] 曹莹(1986-),女,讲师,研究方向:药理学。

[通讯作者] 林继红(1970-),女,高级实验师,研究方向:人类疾病动物模型。

< 0.05)。 **Conclusions** After optimized, the assessment methods can evaluated the strengthening yang efficacy of candidate drugs more effective.

【Key words】 Erectile dysfunction; Silaenafil; Strengthening yang; Penile erection index

勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 是指阴茎持续(至少 6 个月)不能达到和维持充分的勃起以获得满意的性生活^[1]。在 40 ~ 70 岁的男性中约有 50% 的男性有不同程度的 ED, ED 成为困扰男性的最常见病症之一。近年来,有关 ED 的研究进展十分迅速,基础研究不断深入,许多治疗手段广泛开展,尤其是药物治疗的快速发展^[2]。寻求一个简单有效的壮阳药效评价方法,对于筛选有效的治疗药物有很大的帮助。现行采用的较为简单的评价方法主要是通过观察记录给药前后动物性行为活动的改变,计算动物阴茎勃起指数 (penile erection index, PEI) 并做出比较,从而对候选药物的壮阳药效作出评价^[3-5]。但这种方法在实际操作过程中也存在一定的缺陷,一方面,采用传统的人工观察需要耗费大量的人力和时间,而且会因为人工操作能力的有限性和动物行为活动的不可回放性造成部分数据的丢失;另一方面,部分壮阳药在没有性刺激的情况下并不能有效的改善 ED,如经典壮阳药西地那非,若在动物性行为活动的观察期间不给予适宜的性刺激会有可能造成药物筛选的假阴性。针对这些原因,本实验对传统的壮阳药效评价方法进行了改良,采用摄像头观察动物性行为活动并在该过程中给予动物适度的性刺激,并用经典壮阳药西地那非验证该评价方法的效性。

1 材料和方法

1.1 材料

成年健康 SD 大鼠,雄性,80 只(体重 220 ± 10 g),雌性,4 只(体重 200 ± 10 g),由南方医科大学实验动物中心提供(SCXK[粤]2006-025)。枸橼酸西地那非片(辉瑞制药有限公司),特制玻璃大鼠笼及鼠笼架。

1.2 方法

80 只雄性 SD 大鼠随机分为 8 组($n = 10$): 对照 A 组、对照 B 组、对照 C 组、对照 D 组、模型 A 组、模型 B 组、模型 C 组、模型 D 组。每组 10 只,分别置于特制的玻璃鼠笼中,自由饮水和摄食,适应性饲

养 2 d 后,开始给药,模型组大鼠均灌胃给予西地那非 10 mg/kg ,对照组大鼠给予相同容量的生理盐水灌胃,每天 1 次,连续灌胃给药 14 d。每次给药后连续记录 2 h 内动物阴茎勃起、阴部理毛、爬背次数和每种性行为活动参与的动物数。

其中,对照 A 组及模型 A 组每次给药后人为观察大鼠性行为活动(人为观察组);对照 B 组及模型 B 组每次给药后于安静无人环境下采用摄像头观察大鼠性行为活动(摄像头观察组);对照 C 组及模型 C 组每次给药后将一只雌鼠于给药后 0 ~ 30 min 及 90 ~ 120 min 置于各鼠笼笼盖上对雄鼠进行性诱导并于安静无人环境下采用摄像头观察大鼠性行为活动(雌鼠间断诱导组);对照 D 组及模型 D 组每次给药后在观察的全过程(0 ~ 120 min)将一只雌鼠置于各鼠笼笼盖上对雄鼠进行性诱导并于安静无人环境下采用摄像头观察大鼠性行为活动(雌鼠持续诱导组)。

1.3 观察指标: 给药后 2 h PEI

记录各组大鼠给药 2 h 内动物阴茎勃起、阴部理毛、爬背次数和参与动物数,计算 PEI 值。(PEI = 每组大鼠相关性行为反应总次数 \times 每组中有相关性行为反应的大鼠数 / 每组大鼠数量)

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,数据均采用均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 给药后 2h 各组大鼠 PEI 值

与对照 C 组相比,模型 C 组大鼠给药后 2 h PEI 值明显升高($P < 0.05$);与对照 D 组相比,模型 D 组大鼠给药后 2 h PEI 值明显升高($P < 0.05$);与模型 A 组相比,模型 B 组、模型 C 组及模型 D 组大鼠给药后 2 h PEI 值明显升高($P < 0.05$);与模型 B 组相比,模型 C 组及模型 D 组大鼠给药后 2 h PEI 值明显升高($P < 0.05$);而模型 D 组与模型 C 组间大鼠给药后 2 h PEI 值无显著性差异。各组大鼠 PEI 值见表 1。

表 1 各组大鼠给药后 2h PEI 值的比较

Tab. 1 Comparison of 2h PEI after each drug administration

组别 Group	PEI	
	对照组 Control group	模型组 Model group
A 组	57 ± 17	60 ± 16
B 组	85 ± 13	87 ± 22 ^b
C 组	106 ± 25	210 ± 48 ^{abc}
D 组	101 ± 13	178 ± 32 ^{abc}

注:与相对应的对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型 A 组比较,^b $P < 0.05$;与模型 B 组比较,^c $P < 0.05$

Note: Vs the corresponding control group, ^a $P < 0.05$; vs model A group, ^b $P < 0.05$; vs model B group, ^c $P < 0.05$

2.2 模型 C 组及模型 D 组大鼠给药后 2 h 内各时间段 PEI 值

模型 C 组与模型 D 组给药后 0 ~ 60 min 时间段内 PEI 值比较无显著性差异;给药后 60 ~ 120 min 时间段内 PEI 值比较有显著性差异 ($P < 0.05$),模型 C 组明显高于模型 D 组(见表 2)。

表 2 大鼠给药后各时间段 PEI 值的比较

Tab. 2 Comparison of PEI for each time interval

组别 Group	PEI		
	0 ~ 60 min	60 ~ 120 min	0 ~ 120 min
C 组	106 ± 27	104 ± 31	210 ± 48
D 组	104 ± 31	71 ± 7 ^d	178 ± 32

注:与相对应时间段的模型 C 组比较, $P < 0.05$

Note: Vs the corresponding time interval of group C, $P < 0.05$

3 讨论

目前公认的勃起功能障碍的动物模型有去势建立肾虚模型、动物交配能力模型、重复应激性小鼠性行为低下模型、房劳过度致肾虚模型等^[6]。这些模型虽在一定程度上模拟了勃起功能障碍的临床表现,但操作较为繁琐、观察困难并涉及造模成功率的问题,一定程度上影响壮阳药物筛选的进度。本实验主要观察给药后动物相关性行为活动情况,通过优化观察过程中的一些影响因素,寻求一个简单有效的壮阳药效评价方法。

阴茎勃起的生理机制涉及性刺激过程中阴茎海绵体内一氧化氮(NO)的释放。NO 激活鸟苷酸环化酶导致环磷酸鸟苷(cGMP)水平增高,使海绵体内平滑肌松弛,血液充盈^[7]。西地那非能够通过抑制海绵体内分解 cGMP 的 5 型磷酸二酯酶(PDE₅)来增强 NO 的作用,对阴茎有很强的勃起作用^[8]。西地那非由美国辉瑞公司研制生产,该药于 1998 年 4 月在美国以商品名 Viagra(伟哥)上市,是

目前临床上用于治疗勃起功能障碍最有效的药物之一^[9]。因此,本实验选用西地那非作为阳性药物来评价壮阳药效评价方法是否可行。

西地那非作为 PDE₅ 抑制剂,能刺激使阴茎海绵体内释放 NO,NO 活化鸟苷酸环化酶,使 GTP 转化为 cGMP,并减少 cGMP 降解,增加海绵体动脉的最大血流速度和平均血流速度,增加血流量,促使阴茎勃起。其对离体阴茎海绵体无直接舒张作用。当性刺激引起局部 NO 释放时,西地那非抑制 PDE₅,可增加海绵体内 cGMP 水平,海绵体内平滑肌松弛,血液流入海绵体。在没有性刺激时,推荐剂量的西地那非不起作用^[10]。实验结果显示,在给予雌鼠诱导性刺激的情况下,大鼠出现较为频繁的性行为活动,给予西地那非的模型组大鼠更为明显,同对应的对照组大鼠 PEI 值相比有显著性差异。在本实验中,采用了两组雌鼠诱导方式,一组是于给药后 0 ~ 30 min 及 90 ~ 120 min 时间段给予雌鼠诱导即间断诱导,另一组置于观察的全过程(0 ~ 120 min)给予雌鼠诱导即持续诱导。在给药后 2 h 该两组大鼠 PEI 值虽无明显差异,但分两个时间段(0 ~ 60 min, 60 ~ 120 min)比较,结果显示,0 ~ 60 min 时间段两组大鼠 PEI 值相似,60 ~ 120 min 时间段间断诱导组大鼠 PEI 值明显高于持续诱导组。持续诱导方式在本实验中虽没有造成最终的药效评价结果的不同,但在今后的壮阳药物筛选过程中倘若改变数据采集的时间段会对药效评价会造成一定的影响。因此,在诱导方式的选择方面推荐采用间断诱导方式。

此外,本次实验结果证实,摄像头观察组 PEI 值明显高于人为观察组,差异有显著性。究其原因,一方面由于鼠科动物对外界刺激反应敏感,噪声能引起内分泌功能紊乱和性功能减退。摄像头观察可弱化噪声等外界环境因素的影响;另一方面,摄像头观察可录制影音资料,影音资料可反复回放进行数据的采集可保证数据完整不缺失。

综上所述,在壮阳药筛选中,可以选择在安静无人环境下、采用摄像头观察雄鼠性行为活动并在部分时间段给予雌鼠间断诱导性刺激,计算该过程 PEI 值评价候选药物的壮阳药效。

参考文献:

- [1] 李宏军. 勃起功能障碍的诊治进展与共识[J]. 中国性科学, 2011, 20(1): 4-22.

(下转第 65 页)

音,不断干扰小鼠的睡眠,符合 SAS 对睡眠结构产生影响的过程。箱内刚好容纳 22 只小鼠,此空间小鼠耐受良好,便于观察小鼠呼吸及自主运动情况,且可以成批复制小动物模型。本模型设计简单,成本低廉,易于推广。

总之,虽该实验箱存在一些缺点,但因其符合 SAS 病理过程,设计简单,成本低廉,不失为一种理想的 SAS 模型实验箱。

参考文献:

- [1] 郭彦红,姬秋和,张丙芳. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与 IL-6 关系的研究[J]. 西北国防医学杂志, 2002, 23(1): 21-22.
- [2] 李景春,徐江涛. 睡眠呼吸暂停综合征啮齿动物模型的研究进展[J]. 现代生物医学进展 2009 9(12): 2377-2379.
- [3] Nattie EE, Doble EA. Threshold of intermittent hypoxia-induced right ventricular hypertrophy in the rat [J]. Respir Physiol. 1984, 56(2): 253-259.
- [4] Fletcher EC, Lesske J, Qian W, et al. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats [J]. Hypertension, 1992, 19(6Pt1): 555-561.
- [5] Fagan KA. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia [J]. J Appl Physiol, 2001, 90(6): 2502-2507.
- [6] Park AM, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice [J]. J Appl Physiol. 2007, 102(5): 1806-1814.
- [7] McGuire M, MacDermott M, Bradford A. The effects of chronic episodic hypercapnic hypoxia on rat upper airway muscle contractile properties and fiber-type distribution [J]. Chest. 2002, 122(4): 1400-1406.
- [8] XU W, Chi L, ROW BW, et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea [J]. Neuroscience, 2004, 126(2): 313-323.
- [9] Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, et al. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(5): 2971-2976.

(修回日期)2011-07-29

(上接第 68 页)

- [2] 张石革,孙定人. 治疗勃起功能障碍药物的研究与应用进展 [J]. 中国药房 2001, 1(1): 50-51.
- [3] Benassi-Benelli A, Ferrari F, Quarantotti BP. Penile erection induced by apomorphine and N-nopropyl-norapomorphine in rats. Arch Int Pharmacodyn 1979; 242: 241-247.
- [4] El-Thaher TS, Matalka KZ, Taha HA, et al. Ferula harmonis 'zallouh' and enhancing erectile function in rats: efficacy and toxicity study. Int J Impot Res 2001; 13: 247-251.
- [5] El-Thaher TS, Khatib S, Saleem M, Shnoudeh A, et al. A novel compound JPM8: in vivo penile activity promotion in rats, effect on the relaxation and cGMP/cAMP accumulation in isolated rabbit corpora cavernosa. Int J Impot Res 2002; 14: 453-461.
- [6] 潘建春,阿地力江·伊明. 勃起功能障碍实验动物模型的研究进展 [J]. 新疆医科大学报 2010, 33(11): 1290-1292.
- [7] Burnett AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology [J]. J Urol 1997, 157: 320-324.
- [8] Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, et al. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes [J]. The Journal of Urology, 1998, 159(6): 2164-2171.
- [9] Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, et al. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction [J]. N Engl J Med. 1998 May 14; 338(20): 1397-404.
- [10] Moreland RB, Goldstein I, Traish A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells [J]. Life Sci, 1998, 62(20): 309-318.

(修回日期)2011-10-27