

实验研究

右归胶囊改善糖尿病大鼠勃起功能障碍机制的实验研究

刘晓强 吕 峥 孙 光 郭宗华 郭战军 周晓亮

(天津医科大学第二医院泌尿外科 A 区,天津市河西区平江道 23 号,300211)

摘要 目的:通过建立大鼠糖尿病性勃起功能障碍(Diabetic Erectile Dysfunction, DED)模型,研究右归胶囊对 DED 大鼠阴茎组织抗氧化能力及细胞凋亡的影响。方法:利用成年雄性 SD 大鼠建立糖尿病勃起功能障碍模型,将成模大鼠随机分为右归胶囊高剂量组、中剂量组、低剂量组及糖尿病组。给药 12 周后所有大鼠颈部皮下阿扑吗啡观察勃起情况并筛选 ED 模型,应用分光光度法及免疫组化方法检测阴茎海绵体组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化氢酶(GSH-Px)及凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的表达。结果:各组之间勃起阳性率未见明显差异;右归胶囊高剂量组与糖尿病组相比,GSH 含量增高、SOD、GSH-Px 的活性提高;右归胶囊高剂量组与糖尿病组相比,Bcl-2 阳性细胞率较高,Bax 表达较低,Bcl-2/bax 比值较高。结论:右归胶囊可通过提高阴茎海绵体抗氧化能力并调控细胞凋亡,改善 DM 大鼠勃起功能障碍氧化损伤。

关键词 糖尿病;勃起功能障碍/中医药疗法;@ 右归胶囊;细胞凋亡

Experiment on Impact of Yougui Capsule on Erectile Dysfunction in Diabetic Rats

Liu Xiaoqiang, lv Zheng, Sun Guang, Guo Zonghua, Guo Zhanjun, Zhou Xiaoliang

(Department of Urology, 2nd Hospital of Tianjin Medical University, Add.: No. 23, Pingjiang Road, Hexi District, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the antioxidant effect and impact on apoptosis of Yougui capsule on penis tissue in the diabetic rats. We established the diabetes mellitus (DM) rat model of erectile dysfunction (ED) by injecting streptozotocin (STZ). **Methods:** Adult male SD rats were randomly divided into four groups, high dose, medium dose and low dose of Yougui capsule and DM group. After 12 weeks, all rats were injected with apomorphine (APO). We observed the results and selected the erectile dysfunction model; and also detected the content of SOD, GSH, GSH-Px and Bcl-2, Bax with the application of spectrophotometry and immunohistochemistry in rats corpus cavernosus. **Results:** There was no difference between four groups in terms of the erection rate; In high dose group, the content of GSH, SOD, GSH-Px and the expression of Bcl-2, Bax and the ratio of Bcl-2/Bax were higher than those of the diabetes groups. **Conclusion:** Yougui capsule may help to treat erectile dysfunction in DM rats by enhancing antioxidant ability and regulating apoptosis of the penile corpus cavernosus.

Key Words Diabetes; Erectile dysfunction/Chinese medical therapy; @ Yougui capsule; Apoptosis

右归丸是明代名医张景岳所创,功效温补肾阳,填精止遗,中医辨证属肾阳虚精血亏虚者。用现代工艺将其制成胶囊,克服了原蜜丸的诸多缺点。右归胶囊在治疗糖尿病性勃起功能障碍中的作用机制尚不明确,本研究应用糖尿病大鼠勃起功能障碍模型,观察不同剂量右归胶囊对 DED 大鼠勃起功能的影响及大鼠阴茎海绵体细胞凋亡及抗氧化指标变化,探讨右归胶囊在治疗 DED 中的作用机制。

1 材料

试药:右归胶囊,由江西银涛药业有限公司提供,规格:0.45g/粒。动物:选用 10 周龄 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 70 只,体重(247±26)g,由中国医学科学院放射医学研究所提供(交配实验证实勃起功能正常);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sig-

ma);阿扑吗啡(apomorphin, APO, Sigma);超氧化物歧化酶试剂盒、GSH 试剂盒、GSH-Px 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;单克隆兔抗大鼠 Bcl-2 抗体、单克隆兔抗大鼠 Bax 抗体、山羊抗兔二抗显色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司;罗氏血糖仪及试纸等。STZ 溶液配制:STZ 溶于 0.1mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH=4.5)中,浓度为 20mg/mL,注意避光,现用现配。APO 溶液:APO 溶于 0.5mg/kg 的维生素 C 与生理盐水中,调整体积为 5mL/kg。

2 方法

2.1 大鼠糖尿病模型的建立与阿扑吗啡检测勃起功能 70 只大鼠适应性饲养 2 天,随机选取 60 只为模型组,称重后尾静脉注射 STZ 溶液 60mg/kg;余 10 只作

为正常对照组,尾静脉注射相应剂量 0.1mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。造模后 96h 断尾采血测定随机血糖,血糖 $>16.7\text{mmol/L}$,出现多饮、多尿、多食等糖尿病症状判定为造模成功。将造模成功的 58 只 DM 大鼠随机分为 4 组,右归胶囊高剂量组 $3.6\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=15$)、中剂量组 $2.4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=14$)、低剂量组 $1.2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=14$)、生理盐水对照组 ($n=15$),以上各组均每日灌服给药 1 次,持续 10 周。造模成功 12 周后,称重后将大鼠置于透明观察箱使大鼠适应环境 10min,保持室内安静、光线昏暗。大鼠颈项皮下注射阿扑吗啡 $100\mu\text{g/kg}$,观察 30min,记录阴茎有无勃起、勃起次数及勃起潜伏期(从给药到出现勃起的时间)。龟头充血、末端阴茎体出现则认为勃起。未勃起的 DM 大鼠为糖尿病非 ED,剔除出组。

2.2 分光光度法检测 处死动物,去除阴茎软骨、皮肤、尿道海绵体等组织,取部分阴茎海绵体组织,用小剪刀剪碎组织后,置入匀浆管后在冰水中超声匀浆后,应用离心机 3000r/min ,离心 10min。取上清进行相关指标测定。应用比色法测定组织中抗氧化剂 GSH、GSH-Px 和 SOD 含量,衡量组织中抗氧化能力。

2.3 免疫组化法检测 将部分大鼠阴茎组织置入醋酸-乙醇-福尔马林液中固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,石蜡切片,梯度下行脱蜡入水后用 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶,加入兔抗鼠 Bcl-2、Bax 抗体,滴加生物素化二抗工作液,滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液,DAB 显色,梯度上行乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。400 倍光镜下观察 Bcl-2、Bax 蛋白的表达及分布,每张切片至少观察 5 个视野并进行细胞计数,测定每个视野中表达 Bcl-2、Bax 蛋白的阳性细胞率(阳性细胞数占细胞总数的百分比),并进行统计学分析。

2.4 统计学分析 应用 SPSS17.0 统计软件,结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较应用单因素方差分析。

3 结果

3.1 DM 模型建立及 APO 诱导实验结果 60 只注射 STZ 的大鼠中 58 只成模,成模率 96.6%。饲养 12 周后各成模组大鼠均出现多饮、多食、多尿及体重减轻等糖尿病症状。成模组大鼠因感染、酮症酸中毒而死亡 8 只,病死率为 13.7%。灌胃容积为 $1\text{mL}/100\text{g}$,1 日 1 次,连续 12 周,第 12 周后颈部皮下注射阿扑吗啡 $100\mu\text{g/kg}$,观察 30min 内各组大鼠勃起情况,并记录勃起潜伏期,即从给药开始到出现阴茎勃起的时间。阴茎勃起阳性率为每组中有阴茎勃起的大鼠的百分比。如表 1,注射 STZ 12 周后,按 APO 诱导实验未出现勃

起者为 ED 的标准,高、中、低剂量组及 DM 组成 DM 性 ED 模型分别为 10、12、12、10 只,成糖尿病非勃起功能障碍模型剔除出组。正常对照组大鼠的阴茎勃起次数、勃起阳性率及勃起潜伏期与其余各组相比具有统计学意义。其余各剂量组之间阴茎勃起次数、勃起阳性率及勃起潜伏期差异无统计学意义。

表 1 对 DM 大鼠勃起功能的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	阴茎勃起阳性率 (%)	阴茎勃起次数	勃起潜伏期 (min)
DM + 高剂量组	13	9.1	1	11 ± 1
DM + 中剂量组	13	8.1	1	13
DM + 低剂量组	13	7.6	1	12
DM 组	11	9.1	1	15
正常对照组	10	100	2.3 ± 0.5 **	5 ± 2

注:正常对照组勃起次数与其他各组相比,** $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠阴茎海绵体组织 GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活性结果 表 2 表明,DM 组大鼠与正常对照组相比,阴茎海绵体组织中 GSH 含量明显降低,SOD、GSH-Px 活性明显降低;DM + 右归胶囊高剂量组与 DM 组相比,GSH 含量增加,SOD、GSH-Px 活性提高($P < 0.05$)。而右归胶囊中、低剂量组与糖尿病组相比,差异无统计学意义。

表 2 大鼠阴茎海绵体组织中 GSH 含量及抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性($\bar{x} \pm s$)

分组	数口	SOD (ng/mL)	GSH (mgGSH/gprot)	GSH-Px (U/mL)
DM + 高剂量组	10	282.12 ± 18.24 *	1.47 ± 0.71 *	172.34 ± 12.48 *
DM + 中剂量组	12	233.76 ± 14.28	1.01 ± 0.46	148.67 ± 13.51
DM + 低剂量组	12	245.69 ± 14.12	1.11 ± 0.23	133.95 ± 14.73
DM 组	10	211.45 ± 15.29 **	0.81 ± 0.21 **	128.73 ± 10.12 **
正常对照组	10	332.71 ± 29.23	2.13 ± 0.35	198.21 ± 9.23

注:与正常对照组相比,** $P < 0.01$;DM + 高剂量组与 DM 组相比,* $P < 0.05$ 。

表 3 大鼠阴茎海绵体组织凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	数口	Bcl-2 表达	Bax 表达	Bcl-2/Bax
DM + 高剂量组	10	16.78 ± 4.23 *	16.62 ± 2.34	1.01
DM + 中剂量组	12	11.19 ± 2.13	19.12 ± 2.11	0.58
DM + 低剂量组	12	12.06 ± 2.61	18.45 ± 3.81	0.65
DM 组	10	9.31 ± 3.04 **	20.23 ± 2.11 **	0.46
正常对照组	10	24.56 ± 2.34	12.11 ± 1.34	2.01

注:DM 组与正常对照组相比,** $P < 0.01$;DM + 高剂量组与 DM 组相比,* $P < 0.05$ 。

3.3 大鼠阴茎海绵体组织凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的表达 染色结果显示,Bax、Bcl-2 蛋白主要表达于阴茎海绵体血管内皮细胞及平滑肌细胞的胞浆中,多以棕色、深棕色着色为主。正常对照组与其余各组相比,Bcl-2 细胞阳性率高、Bax 细胞阳性率低,Bcl-2/Bax 比值较高;DM + 右归胶囊高剂量组与 DM 组相比,差

异有统计学意义(见表 3)。

4 讨论

右归胶囊是对原右归丸在不改变其处方组成的基础上,将蜜丸改为胶囊剂。附子、肉桂温肾阳,暖下元;鹿角胶、杜仲、菟丝子补肾阳,益精血;熟地黄、山药、山茱萸、当归、枸杞子滋肾阴,养肝血。诸药配伍,阳得阴助,体现“阴中求阳”法则。右归胶囊中多种成分具有抗氧化应激的作用,如熟地黄对慢性应激性小鼠具有良好的抗氧化作用,并能有效的缓解慢性应激引起的丙二醛含量升高、超氧化物歧化酶活性下降等^[1]。临床研究表明^[2],右归胶囊对于改善患者遗精、性功能减退有较好的改善临床症状的作用。

糖尿病是引起勃起功能障碍的常见原因,糖尿病患者 ED 患病率为 25% ~ 75%,多在 50% 左右。虽然 PDE5 抑制剂等可有效改善部分患者的症状,但是仍有部分患者不能从中受益。因而对与糖尿病性 ED 的发病机制及有效治疗有待于进一步的研究^[2]。近年来研究表明,糖尿病及其并发症的发生发展与氧化应激有关。糖尿病时血液中高浓度的葡萄糖可通过活性氧引起氧化损伤破坏血管内皮细胞的结构进而导致内皮功能障碍^[3]。氧化应激是机体内高活性分子如活性氧簇(ROS)产生过多或消除过少,引起组织损伤。生理情况下虽然有活性氧的产生,并不造成机体的氧化损伤,这主要是由于机体存在抗氧化防御系统,包括抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化物酶等)和抗氧化剂(如谷胱甘肽、维生素 E、类胡萝卜素、辅酶 Q 及维生素 C 等)使机体处于氧化抗氧化的平衡状态^[4-5]。在病理状态下活性氧产生增多、抗氧化酶和抗氧化剂合成减少活性降低,机体处于过氧化状态,即可造成机体的氧化损伤。糖尿病性 ED 大鼠海绵体组织中的抗氧化酶 SOD、GSH - Px 含量下降,GSH 含量明显减少,因此推断右归胶囊对 DM 性大鼠 ED 的保护,可能是通过增强 SOD、GSH - Px 的活性,增加 GSH 含量,增强抗氧化防御系统的能力,从而抑制机体内活性氧对组织的损伤。右归胶囊可以提高机体抗氧化能力,从而改善并延缓 DM 大鼠 ED 的氧化应激损伤。

糖尿病时由于产生较多活性氧与 NO 相互作用,形成促进细胞凋亡的因子,引起阴茎海绵体细胞凋亡^[6]。机体处于过氧化状态可能是诱发凋亡的关键原因。阴茎细胞凋亡是引起勃起功能障碍的一个原因^[7]。阴茎海绵体细胞凋亡是 Bcl - 2 与 Bax 共同参

与调节^[8]。Bcl - 2 和 Bax 基因是与细胞凋亡关系最为密切的凋亡基因,Bcl - 2 是凋亡抑制基因,编码产生 Bcl - 2 蛋白,Bax 是促凋亡基因,编码产生 Bax 蛋白。Bax 可在细胞中自我形成同源二聚体或与 Bcl - 2 形成异源二聚体。Bax - Bax 促使细胞凋亡,而 Bax - Bcl - 2 异源二聚体可以抑制细胞凋亡。Bcl - 2/Bax 比例调节了凋亡的发生^[9],比例上调时,抑制细胞凋亡;比例下调时,促进细胞凋亡的发生。糖尿病大鼠勃起功能障碍的机制之一可能是阴茎海绵体细胞凋亡,平滑肌细胞和血管内皮细胞凋亡,平滑肌数目减少及结构损害,直接影响平滑肌舒张功能,海绵窦舒张受限,动脉充盈受阻。其具体机制可能是糖尿病时,机体细胞内钙离子浓度增加,激活钙离子依赖性激酶或磷酸酶,诱导凋亡基因的表达;亦可激活蛋白酶与核酸内切酶,促进 DNA 的损伤;糖尿病时有多发神经病变,推测海绵体神经受损与细胞凋亡有关。右归胶囊高剂量组糖尿病 ED 大鼠与糖尿病 ED 组大鼠相比,Bcl - 2 蛋白表达增多,Bax 蛋白表达减少,Bcl - 2/Bax 比值较高,均提示右归胶囊可以增加组织抗凋亡的能力,其抗凋亡能力是通过改善组织氧化应激损伤实现的。但并未发现各组大鼠之间勃起阳性率之间的差异,推测可能的原因由于样本量小、给药时间较短造成,因此需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 张迪. 熟地黄及其不同部位的抗氧化作用研究[D]. 山东大学,2009.
- [2] 薛维信. 右归胶囊治疗遗精临床疗效观察[J]. 江西中医药,2001,32(6):17.
- [3] 饶可,刘继红. 氧化应激与男性勃起功能障碍[J]. 中国男科学杂志,2009,23(3):66-68.
- [4] Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online),2008,26(62):118-24.
- [5] Poyton RO, Ball KA, Castello PR, et al. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling[J]. Trends Endocrinol Metab,2009 Sep,20(7):332-40.
- [6] 刘剑新,夏仁惠,傅梧,等. 糖尿病大鼠阴茎细胞凋亡及血流动力学变化的研究[J]. 中华男科学杂志,2004,10(6):445-448.
- [7] Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, et al. Campbell's Urology M. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company,1998:1381-1452.
- [8] 王德明,谢红,王国政. 糖尿病大鼠阴茎海绵体细胞凋亡与 Bcl - 2 和 Bax 基因表达[J]. 中华男科学杂志,2004,10(11):844-848.
- [9] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ, et al. Bcl1 and Bcl2 domains of Bcl2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax[J]. Nature, 1994, 369(6478):321-323.

(2012-05-18 收稿)