文章编号:1000-5404(2010)07-0651-03

论著

模拟高原缺氧对雄性大鼠性功能的影响

熊智勇,葛 亮,季惠翔,支 轶,吴晓军,卢根生 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨模拟高原缺氧对雄性大鼠性功能的影响。**方法** 将60只SD健康雄性大鼠随机分为平原对照组、缺氧2周组、缺氧4周组、缺氧6周组,每组15只。缺氧组大鼠置于模拟海拔4 500 m低压舱中,23 h/d,连续减压2、4、6周。观察各组大鼠性行为参数(乘骑、插入、射精的次数及潜伏期)和阿朴吗啡(apomorphine,APO)诱发阴茎勃起次数的变化;用ACCESS全自动免疫分析系统测定大鼠血清睾酮的含量;用化学比色法测定阴茎海绵体组织一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)的活性;Masson染色观察阴茎海绵体组织结构变化。**结果** 与平原对照组相比,各缺氧组大鼠的性行为参数(射精次数除外)受到抑制($P<0.05$);APO诱发阴茎勃起的次数明显降低($P<0.05$);血清睾酮含量和阴茎组织中NOS活性均减低($P<0.05$);Masson染色显示:大鼠阴茎海绵体平滑肌纤维减少,胶原纤维增多,窦状隙变小、变窄。且随着缺氧时间的延长,缺氧组大鼠的性行为逐渐受到抑制($P<0.05$),血清睾酮含量及阴茎组织中NOS活性逐渐降低($P<0.05$),阴茎海绵体组织结构纤维化程度加重。**结论** 高原缺氧环境下成年雄性大鼠性功能受到抑制,且性功能受抑制程度与缺氧时间有一定的关系。

[关键词] 高原缺氧;性功能;睾酮;一氧化氮合酶
[中图法分类号] R698.02; R339.54; R-332 [文献标志码] A

Effect of hypoxia simulating high altitude on sexual function in male rats

Xiong Zhiyong, Ge Liang, Ji Huixiang, Zhi Yi, Wu Xiaojun, Lu Gensheng (Urinary Surgery Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the relationship of hypoxia simulating high altitude and sexual function of rats. **Methods** Totally 60 adult male SD rats (3 months old) were randomly divided into control and hypoxia groups for 2, 4 and 6 weeks ($n=15$ in each group). The rats of hypoxia groups were put into a hypobaric chamber simulating 4500-meter high altitude for 2, 4 and 6 weeks (23 h/d), and their sexual behaviors (times and latency of mount, intromission and ejaculation), apomorphine-induced penile erections, content of testosterone in the serum, and nitric oxide synthase (NOS) and Masson staining in penis were examined. **Results** Compared with the control group, the sexual behaviors and the number of apomorphine-induced penile erections of hypoxia groups for 2, 4 and 6 weeks were significantly inhibited ($P<0.05$), and testosterone in the serum and NOS activity in the penis of the experimental groups were reduced ($P<0.05$). Masson staining showed that smooth fibers were decreased while collagen fibers were increased. Those changes were correlated with time elapse ($P<0.05$). **Conclusion** The sexual function of rats is gradually restricted with increased time of hypoxia exposure in high altitude circumstance.

[**Key words**] hypoxia simulated high altitude; sexual function; testosterone; nitric oxide synthase

Supported by the Foundation of Medical Science Development of PLA (06MB246). Corresponding author: Lu Gensheng, Tel: 86-23-68765841, E-mail: lugeng8@hotmail.com

影响男性性功能的因素很多[1,2],其中缺氧是一个重要的影响因素,且机制尚不清楚。高原缺氧环境对男性性功能障碍的影响越来越引起人们的关注[3]。本实验在低压氧仓模拟高原缺氧环境喂养大鼠后,观察大鼠的性行为及勃起功能、血清睾酮、阴茎海绵体一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)活性及阴茎组织结构的变化,探讨模拟高原缺氧对大鼠性功能的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3月龄SD雄性大鼠60只,体质量280~320 g;2个半月龄

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB246)
[通信作者] 卢根生,电话:(023)68765841,E-mail:lugeng8@hotmail.com

SD雌鼠10只,体质量200~240 g(第三军医大学实验动物中心提供)。雄性大鼠按随机数字表分为平原对照组与缺氧2、4、6周组,每组15只。缺氧组大鼠置于模拟海拔4 500 m低压舱内23 h/d,每日9:00~10:00用来打扫仓内卫生及给大鼠补充食物饮水,连续减压2、4、6周。对照组动物于常压和常氧环境中同时饲养。最终各组雄性大鼠存活的数目为:对照组15只;缺氧2周组13只;缺氧4周组11只;缺氧6周组为10只。

1.2 大鼠性行为观察

在进行性行为观察实验2周前,雌鼠在4%水合氯醛麻醉下行卵巢切除术。实验前48 h在雌鼠的颈部皮下注射苯甲酸雌二醇0.1 mg,实验前4 h皮下注射孕酮1.0 mg,建立发情雌鼠的动物模型[4]。雌鼠发情时活动过度,脊柱前弯,与雄鼠接触时两耳轻微颤动。实验时间控制在当日的20:00~24:00,室内保持安静,红色昏暗的灯光(仅摄像可见)的条件下进行。将1只雄鼠放入观察箱(60 cm×50 cm×40 cm)中适应环境10 min,然后放入1只发情雌鼠,摄像观察15 min。分别记录各组大鼠的乘骑、插入、射精的次数及其潜伏期[5]。

1.3 阴茎勃起实验

先将SD雄鼠放入观察箱(直径16 cm,高20 cm的圆柱形玻璃缸)中,观察箱放置在玻璃桌面上,桌面下放置摄像头观察。大鼠适应环境10 min后,每只大鼠在颈部皮下注射阿朴吗啡(apomorphine,APO)(80 μg/kg, Sigma公司)溶液,然后放入观察箱中,摄像观察30 min,记录阴茎勃起的次数。计数标准为:①阴茎头充血及末端阴茎体出现为阴茎勃起1次;②出现大鼠阴茎勃起的典型表现(雄鼠的臀部或足跟向上抬起,头部埋下舔阴茎的同时,臀部有节律地运动)时记录1次[3]。

1.4 大鼠血清睾酮的测定

大鼠腹腔注射4%水合氯醛(40 mg/kg),麻醉满意后取大鼠全血2~3 ml;用ACCESS全自动免疫分析系统(美国贝克曼库尔特公司)测定各组大鼠血清睾酮的含量。

1.5 阴茎海绵体NOS活性的测定

大鼠麻醉满意后分离大鼠的阴茎,去除龟头(含阴茎软骨),切取中段阴茎组织50~100 mg,用4 ℃生理盐水漂洗,去除血液及尿道,滤纸吸干,称量,加9倍质量的40 mmol/L(pH 7.2)磷酸盐缓冲液溶液,剪碎组织,冰浴下充分研磨成组织匀浆,将制备好的10%的匀浆用低温离心机2 000 r/min,离心15 min,取上清。分别取上清液50 μl检测10%的阴茎海绵体组织匀浆的蛋白浓度及NOS活性。按考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、一氧化氮合酶测试盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行操作与计算。

1.6 大鼠阴茎海绵体组织结构变化(Masson染色)

取阴茎组织4%的多聚甲醛固定12 h,30%的蔗糖脱水24 h,OTC包埋2 h后行连续冰冻切片;切片在Bouin's溶液在56 ℃固定1 h,自来水冲洗直到黄色消失;Weigert's铁苏木精染剂着色10 min,自来水冲洗10 min;猩红酸性品红溶液着色2 min,蒸馏水漂洗;磷钼酸-磷钨酸溶液10~15 min;苯胺蓝着色5 min,蒸馏水漂洗;1%的醋酸分色3~5 min;乙醇梯度脱水,二甲苯固定,中性树胶封片。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行统计学处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数比较用方差分析。

2 结果

2.1 大鼠性行为的观察

在15 min的大鼠性行为观察中,各组雄鼠的射精次数均为1次;而缺氧2、4、6周后的雄鼠的乘骑、插入次数减少($P<0.05$);乘骑、插入、射精潜伏期延长($P<0.05$),且随着缺氧时间的延长,大鼠的性行为逐渐受到抑制。见表1。

表1 各组大鼠性行为的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	乘骑次数	乘骑潜伏期(s)	插入次数	插入潜伏期(s)	射精潜伏期(s)
正常对照组	30.1±2.1	22.4±4.1	20.6±2.0	45.7±5.7	499.9±24.7
缺氧2周组	22.4±1.6[a]	36.9±3.2[a]	14.6±1.3[a]	122.0±4.1[a]	558.0±25.6[a]
缺氧4周组	18.0±1.2[a]	46.3±3.2[a]	11.4±0.9[a]	146.1±6.4[a]	615.1±19.6[a]
缺氧6周组	13.1±1.2[a]	64.8±5.8[a]	8.6±1.2[a]	229.7±9.9[a]	696.4±24.3[a]

a: $P<0.05$,与正常对照组比较

2.2 APO诱导的阴茎勃起实验、大鼠血清睾酮含量与阴茎海绵体组织NOS活性测定的分析结果

各组大鼠阴茎勃起实验结果可见,缺氧组大鼠勃起次数比平原对照组勃起次数明显减少($P<0.05$)。缺氧组的血清睾酮含量降低($P<0.05$),且各组间均有差别($P<0.05$)。缺氧组大鼠阴茎海绵体组织NOS活性降低($P<0.05$),各组间有显著差别($P<0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠阴茎勃起次数,血清睾酮和阴茎海绵体NOS活性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	APO诱导的阴茎勃起次数	血清睾酮(ng/ml)	NOS活性(U/mg)
正常对照组	3.3±0.7	10.56±0.81	10.388±0.198
缺氧2周组	1.7±0.5[a]	7.74±0.66[a]	8.460±0.167[a]
缺氧4周组	1.4±0.5[a]	5.70±0.48[a]	7.630±0.152[a]
缺氧6周组	1.3±0.5[a]	3.65±0.73[a]	6.654±0.187[a]

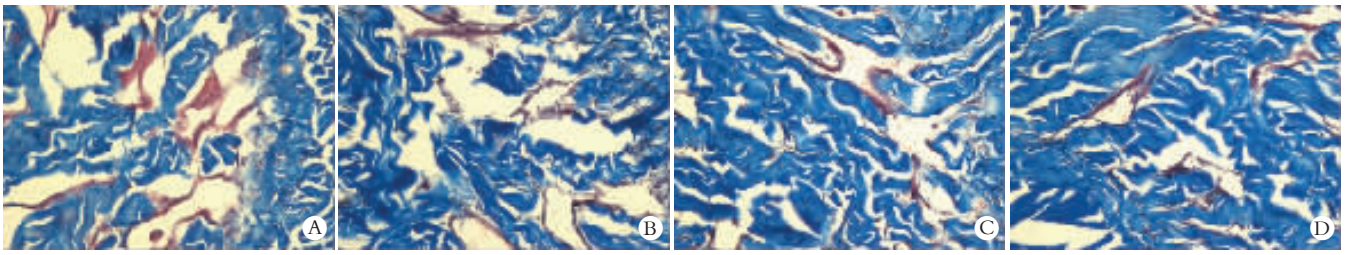
a: $P<0.05$,与正常对照组比较

2.3 大鼠阴茎海绵体组织结构的变化

阴茎组织中胶原纤维被染成蓝色,平滑肌纤维被染成红色,细胞核为黑色。阴茎组织中以胶原纤维为主,其次为平滑肌纤维,平滑肌纤维单独走行或与胶原纤维交织。正常大鼠的阴茎海绵体平滑肌非常丰富,与胶原纤维交织明显,窦间隙宽(图1A)。模拟高原缺氧2周后,阴茎海绵体平滑肌减少,与胶原纤维部分交织,窦间隙较宽(图1B)。缺氧4周后,阴茎海绵体平滑肌较少,胶原纤维增多,窦间隙变窄(图1C)。缺氧6周后,阴茎海绵体平滑肌稀少,胶原纤维粗大成团,窦间隙窄(图1D)。随着缺氧时间的延长,阴茎海绵体中的胶原纤维增多成团,平滑肌减少,且窦间隙变小、变窄。

3 讨论

Okumura等[6]在喜马拉雅高山探险者中研究发现,所有受试者从高山探险到返回后1个月都觉得有勃起功能障碍,并且可能与血清睾酮含量的降低相关。



A:正常对照组;B:缺氧2周组;C:缺氧4周组;D:缺氧6周组

图1 大鼠阴茎组织结构变化 (Masson ×200)

Soukhova-O'Hare等[7]发现慢性间歇性缺氧小鼠性欲减退,且出现勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED),并认为可能通过以下3种途径影响性功能:①中枢神经机制;②外周神经机制;③阴茎组织改变。这些研究提示缺氧可能是性功能障碍的一个独立危险因子。本实验将大鼠置于模拟海拔4 500 m的低压舱中,氧分压为14.85 kPa,可成功模拟高原缺氧环境,制作高原缺氧动物模型。与平原对照组大鼠相比,模拟4 500 m高原缺氧组大鼠性行为、勃起功能均受到抑制($P<0.05$),且随着缺氧时间的延长,大鼠性功能逐渐受到抑制。这提示高原缺氧引起大鼠性行为的改变,导致性功能障碍,且性功能障碍程度与缺氧时间有一定的相关性。

雄激素对维持正常男性及雄性动物的性欲和阴茎勃起有重要作用[8]。吴新红等[9]对雄性大鼠下丘脑室旁核注射L-精氨酸后发现,雄激素可能通过调控下丘脑室旁核的NOS的活性,从而实现中枢神经系统对阴茎勃起调控作用。NO-cGMP通路被公认为在阴茎的勃起中起着决定性的作用,NO是一种非肾上腺非胆碱能的神经递质,在引起阴茎平滑肌松弛和海绵体充盈勃起起着关键作用,在机体内必须通过NOS作用生成[10]。Vignozzi等[11]认为血清睾酮是通过调控NOS及PDE5来维持男性的性活动,NOS增加cGMP水平,PDE5起抑制作用。Farias等[12]观察长期暴露在低压缺氧环境下的雄性大鼠垂体-性腺轴功能受到抑制,其血清睾酮水平明显降低。本实验中,与平原对照组大鼠相比,各缺氧组大鼠血清睾酮水平明显降低($P<0.05$),阴茎海绵体组织中NOS的活性降低($P<0.05$),且随着缺氧时间的延长,血清睾酮水平及NOS的活性进一步降低。另外,随着缺氧时间的延长,大鼠阴茎海绵体组织中胶原纤维增多成团,平滑肌纤维减少,阴茎海绵体纤维化。因此,我们认为,缺氧可能影响了雄性大鼠下丘脑-垂体-性腺轴,导致血清睾酮水平的降低,而NOS的活性受血清睾酮的调控,最终导致大鼠的性功能障碍。另外一种途径可能是缺氧可导致大鼠阴茎海绵体组织胶原纤维增多,平滑肌纤维减少,阴茎海绵体纤维化,从而降低了大鼠的性功能。具体机制还有待在以后的实验中进一步研究和证实。

综上所述,高原缺氧能导致成年雄性大鼠阴茎海绵体组织纤维化,血清睾酮与NOS活性降低,大鼠的性功能受到抑制,且在缺氧环境暴露的时间越长,大鼠的性功能受抑制程度越严重,即大鼠性功能受抑制程度与缺氧时间有一定的相关性。

参考文献:

[1] 陈新. 男性生殖健康和男性参与生殖健康研究进展(一)[J]. 中国生育健康杂志, 2003, 14(1): 4-7.
[2] 郭应禄, 李宏军. 男性生殖健康面临的挑战[J]. 中华男科学, 2003, 9(1): 1-6.
[3] Verratti V, Di-Giulio C, Berardinelli F, *et al*. The role of hypoxia in erectile dysfunction mechanisms[J]. Int J Impot Res, 2007, 19(5): 496-500.
[4] 肖凯, 近藤保彦, 佐久间康夫. 阴茎勃起动物模型的制作与测量[J]. 中国男科学杂志, 2002, 16(1): 55-58.
[5] Benelli A, Frigeri C, Bertolini A, *et al*. Influence of mirtazapine on the sexual behavior of male rats[J]. Psychopharmacology (Berl), 2004, 171(3): 250-258.
[6] Okumura A, Fuse H, Kawauchi Y, *et al*. Changes in male reproductive function after high altitude. mountaineering[J]. High Alt Med Biol, 2003, 4(3): 349-353.
[7] Soukhova-O'Hare G K, Shah Z A, Lei Z, *et al*. Erectile dysfunction in a murine model of sleep apnea[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(6): 644-650.
[8] Lewis R W, Mills T M. Effect of androgens on penile tissue[J]. Endocrine, 2004, 23(2/3): 100-105.
[9] 吴新红, 胡礼泉. 雄激素对下丘脑室旁核中注射L-精氨酸诱发阴茎勃起的影响[J]. 中华男科学, 2002, 8(4): 270-272.
[10] Traish A, Kim N. The physiological role of androgens in penile erection: regulation of corpus cavernosum structure and function[J]. J Sex Med, 2005, 2(6): 759-770.
[11] Vignozzi L, Corona G, Petrone L, *et al*. Testosterone and sexual activity[J]. J Endocrinol Invest, 2005, 28(3 Suppl): 39 44.
[12] Farias J G, Bustos-Obregon E, Tapia P J, *et al*. Time course of endocrine changes in the hypophysis-gonad axis induced by hypobaric hypoxia in male rats[J]. J Reprod Dev, 2008, 54(1): 18-21.

(**收稿**: 2009-10-09;**修回**: 2009-11-04)
(编辑 邓强庭)