DOI:10.16016/j.1000-5404.201912208

二甲双胍激活 AMPK/mTOR 通路上调阴茎海绵体自噬增强老年 ED 大鼠勃起功能

丁 凡[1],李宏伟[2],欧阳勤[2],吴小军[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):附属第一医院泌尿外科[1],药学与检验医学系药物化学教研室[2]

[摘要] **目的** 探讨二甲双胍对老年大鼠勃起功能的影响以及其对阴茎海绵体组织纤维化、自噬的调控和相关潜在机制。**方法** 40 只健康 2 月龄雄性 SD 大鼠等分为 4 组,阿朴吗啡(apomorphine,APO)阴茎勃起实验筛选老年勃起功能障碍(erectile dysfunction,ED)大鼠。A 组(正常对照组)从 2 月龄时开始每日生理盐水灌胃 2 个月,无 ED;B、C、D 组为 ED 大鼠从 18 月龄时开始每日分别生理盐水灌胃(ED 对照组)、二甲双胍(300 mg·kg^{-1}·d^{-1})灌胃(二甲双胍组)、二甲双胍(300 mg·kg^{-1}·d^{-1})灌胃同时腹腔注射 compound C(0.2 mg·kg^{-1}·d^{-1},二甲双胍+compound C 组)2 个月。电刺激测量勃起功能,Masson 染色检测阴茎海绵体纤维化,Western blot、透射电镜检测自噬水平,免疫荧光、Western blot 检测 AMPK/mTOR 通路蛋白表达。**结果** 与正常对照组比较,ED 对照组勃起功能明显降低(P<0.05),阴茎海绵体纤维化加重,自噬和 AMPK/mTOR 通路被抑制(P<0.05);二甲双胍组大鼠轻度恢复勃起功能(P<0.05),改善阴茎海绵体纤维化,上调自噬水平(P<0.05),激活 AMPK/mTOR 通路(P<0.05),以上指标仍未达到正常对照组水平(P<0.05);二甲双胍+compound C 组与 ED 对照组差异无统计学意义(P>0.05)。**结论** 二甲双胍能改善老年 ED 大鼠阴茎海绵体纤维化,增强勃起功能,其机制可能与激活 AMPK/mTOR 通路上调自噬有关。

[关键词] 勃起功能障碍;二甲双胍;自噬;AMPK;mTOR
[中图法分类号] R698.1; R965.2; R977.15 [文献标志码] A

Metformin enhances erectile function in rats with aging-induced erectile dysfunction by activating AMPK/mTOR pathway-regulated autophagy in corpus cavernosum

DING Fan[1], LI Hongwei[2], OUYANG Qin[2], WU Xiaojun[1] [1]Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital, [2]Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of metformin on erectile function and its regulation on cavernous fibrosis and autophagy in aged rats, and explore the underlying mechanism. **Methods** Forty healthy 2-month-old male SD rats were randomly divided into groups A, B, C and D. APO at a dose of 100 mg/kg was injected intraperitoneally to the rats of the former group (at 2 months old) and of the latter 3 group (at 18 months old) to screen the rats with aging-induced erectile dysfunction. Those with ED from the latter 3 groups and those without ED in the group A were employed for the further studies. Group A (control group) was given intragastrical infusion of normal saline for 2 months from the age of 2 months. The rats of the latter 3 groups (18 months old) were injected inragastrically with normal saline, metformin at 300 mg·kg^{-1}·d^{-1} alone and combined with 0.2 mg/kg compound C for 2 months, respectively. The erectile function was measured by electrical stimulation. The cavernous fibrosis was detected by Masson staining. The autophagy level was detected by Western blotting and transmission electron microscopy. The expression of AMPK/mTOR pathway related proteins was detected by immunofluorescence assay and Western blotting. **Results** Compared with the group A, the group B had significantly decreased erectile function (P<0.05), aggravated cavernous fibrosis, and inhibited autophagy and AMPK/mTOR pathway (P<0.05). Metformin treatment

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270692)
[通信作者] 吴小军,电话:(023)68765314,E-mail:swhxj_wu@sina.com

slightly restored the erectile function in the group C ($P<0.05$), alleviated the cavernous fibrosis, upregulated autophagy ($P<0.05$), and activated the AMPK/mTOR pathway ($P<0.05$). But these indicators still did not reach the levels of the group A ($P<0.05$). There were no significant differences in above indicators between group D and group B. **Conclusion** Metformin alleviates cavernous fibrosis and improves erectile function in aging-induced erectile dysfunction rats, which may be related to the activation of AMPK/mTOR pathway to up-regulate autophagy.

[**Key words**] erectile dysfunction; metformin; autophagy; AMPK; mTOR

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270692). Corresponding author: WU Xiaojun, Tel: 86-23-68765314, E-mail: swhxj_wu@sina.com

勃起功能障碍(erectile dysfunction,ED)是泌尿男性科常见的疾病之一。随着人口老龄化的加快,ED 患者正逐年增加,对老年男性的生活质量影响很大。衰老已被公认为是 ED 的高危影响因素[1]。磷酸二酯酶 V 型抑制剂(phosphodiesterase type 5 inhibitors,PDE5Is)作为一线用药效果良好,但仍对 30%~35%的患者作用欠佳[2]。阴茎海绵体平滑肌细胞(cavernous smooth muscle cells,CSMCs)舒张是阴茎勃起的关键。研究发现,老年 ED 发生过程中,阴茎海绵体出现了纤维化过程中 CSMCs 减少、胶原纤维增多[3]。目前尚无十分理想的方式逆转上述改变。ED 患者阴茎组织中 CSMCs 减少,多数观点认为是 CSMCs 向成纤维细胞转化所致。

自噬是一种高度保守的细胞过程,能通过降解老化或受损的细胞器和蛋白质从而延缓衰老和预防疾病[4]。研究发现,老年患者发生 ED 与自噬减弱密切相关,但目前尚无抗衰老或增强自噬的理想口服药物。我们前期研究发现,老年大鼠 CSMCs 中 mTOR(mammalian target of rapamycin)通路被激活,同时自噬水平降低[5]。二甲双胍作为治疗 2 型糖尿病的一线药物,被证实还有延缓衰老的能力,同时也能够通过激活 AMPK[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase]诱导自噬[6]。二甲双胍是否对老年患者 ED 有良好防治作用,还需要进一步研究。本研究采用二甲双胍治疗老年 ED 大鼠,通过检测阴茎海绵体自噬及相关通路的表达,探讨二甲双胍能否通过增强阴茎海绵体组织自噬,最终改善勃起功能。以期为老年 ED 的治疗提供一个新的思路。

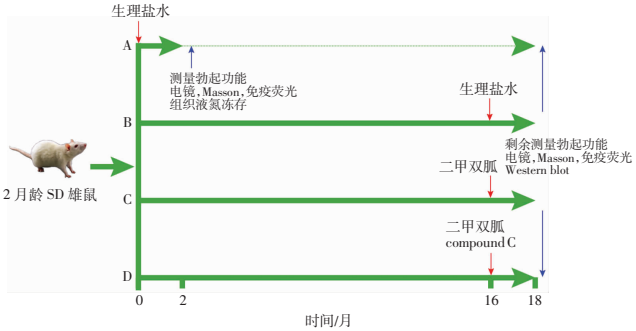
1 材料与方法

1.1 材料

40 只健康 2 月龄雄性 SD 大鼠(体质量 250~300 g)购自陆军军医大学实验动物中心。入组前观察其与发情期雌鼠交配证实具有正常的勃起功能。一抗:p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p62、LC3B 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司。二抗:兔抗 IgG Alexa Fluor 488 购自 Cell Signaling Technology 公司;山羊抗兔(鼠)IgG HRP 购自 Bio-Rad 公司。二甲双胍购自 Aladdin Biochemical Technology 公司。AMPK 抑制剂 compound C(dorsomorphin dihydrochloride)购自 Med Chem Express 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 大鼠等分为 4 组:A、B、C、D 组。各组在处理之前(A 组在 2 月龄时,其余 3 组在 18 月龄时)给予阿朴吗啡(apomorphine,APO,100 mg/kg[7])腹腔注射,暗室观察 30 min,观察勃起次数用以筛选 ED 大鼠。无勃起的视为 ED 大鼠。A 组大鼠均出现勃起;其余 3 组,每组有 2 只大鼠出现勃起,剩余大鼠未出现勃起。A 组全部大鼠和 B、C、D 组的 ED 大鼠进行后续实验。A 组(正常对照组):每日生理盐水灌胃 2 个月;其余 3 组饲养 16 个月后,每日处理如下:B 组(ED 对照组):生理盐水灌胃 2 个月;C 组(二甲双胍组):二甲双胍生理盐水溶液(300 mg/kg[8])灌胃 2 个月;D 组(二甲双胍+compound C 组):二甲双胍生理盐水溶液(300 mg/kg)灌胃,同时给予 compound C 腹腔注射(0.2 mg/kg[9]),给药 2 个月。各组处理完毕,自由喂养 1 周,给予电刺激评价勃起功能。将各组大鼠麻醉后处死,截取阴茎组织,去除结缔组织,海绵体组织用 PBS 洗净,放入液氮保存(图 1)。



A:(正常对照组);B:ED 对照组;C:二甲双胍组;D:二甲双胍+compound C 组

图 1 大鼠分组及实验流程示意图

1.2.2　电刺激测量勃起功能　　大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉,仰卧固定。下腹正中切口,暴露前列腺两侧,确认并游离部分海绵体神经以备电刺激之用。剪开覆盖在阴茎根部的皮肤暴露一侧阴茎脚,将注有 250 U/mL 肝素溶液的 6 号静脉针插入左侧阴茎海绵体,远端连接生物机能实验系统(BL-420F,成都泰盟公司)。用不锈钢电极刺激器钩住游离的海绵体神经,生理盐水湿纱布覆盖。刺激参数为电压 5 V,波宽 2 ms,频率 25 Hz,刺激持续时间 1 min;测定各组大鼠的海绵体内压(intracavernous pressure,ICP),同时穿刺颈动脉,监测平均周围动脉压(mean arterial pressure,MAP)。统计最大 ICP/MAP 值用于评价勃起功能。实验结束处死大鼠,小心切除受损部分,截取部分完整组织用做 Masson 染色、免疫荧光染色和透射电镜,余下组织液氮冻存。

1.2.3　Masson 染色　　大鼠阴茎组织固定后冰冻切片。按 Masson 三色染色试剂盒说明书操作,实验重复 3 次。

1.2.4　免疫荧光染色　　大鼠阴茎组织先用 4%多聚甲醛固定,再用含有蔗糖的 4%多聚甲醛溶液梯度脱水。将组织进行冰冻切片,0.2%Triton 室温孵育 30 min,5% BSA 室温封闭 2 h,用稀释好的一抗(p-mTOR 1∶200)4 ℃孵育过夜,稀释的荧光二抗(兔抗 IgG 1∶400),室温孵育 2 h;滤纸吸干液体,滴加少量抗荧光淬灭封片液(含 DAPI),盖玻片封片。实验重复 3 次,使用莱卡荧光显微镜观察拍照。

1.2.5　透射电镜　　大鼠阴茎组织用 2.5%戊二醛 4 ℃过夜固定。1%锇酸后固定 2 h,梯度丙酮脱水,环氧树脂包埋,常规超薄切片 70 nm,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色,JEM1400 plus 透射电镜观察拍照。每个样品随机选 3 个视野。

1.2.6　Western blot 检测　　用冷 PBS 清洗大鼠阴茎海绵体组织,切至 1 mm^3 左右,液氮下研磨,常规提取蛋白样品。BCA 试剂盒检测蛋白浓度,30 μg 蛋白上样,SDS-PAGE 凝胶 100 V 电泳 2 h,400 mA PVDF 膜转膜 2 h,5%脱脂牛奶封闭 2 h,一抗 4 ℃孵育过夜(p-AMPK 1∶1 000、AMPK 1∶1 000、p-mTOR 1∶1 000、mTOR 1∶1 000、p62 1∶1 000、LC3B 1∶1 000、GAPDH 1∶2 000),TBST 清洗 10 min×3 次,二抗室温孵育 2 h[山羊抗兔(鼠)IgG HRP 1∶3 000],TBST 清洗 20 min×3 次,ECL 发光液曝光成像,Image J 软件分析条带灰度值。实验重复 3 次。

1.3　统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey-Kramer 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

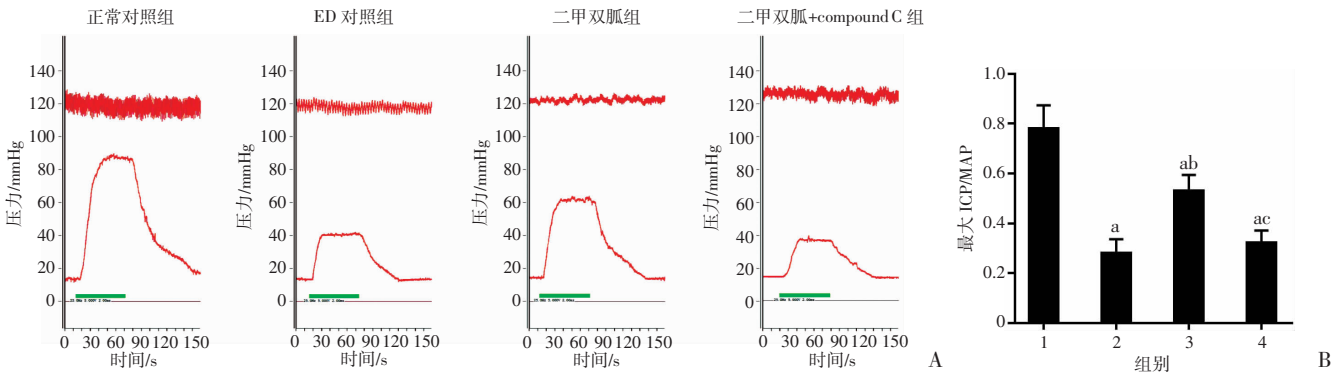
2　结果

2.1　二甲双胍增强老年 ED 大鼠勃起功能

给予大鼠电刺激后,收集各组大鼠平均动脉压和阴茎海绵体内压的比值作为测量勃起功能的量化指标。结果发现:与 A 组比较,B 组大鼠 ICP/MAP 值明显降低($P<0.05$)。与 B 组比较,C 组恢复了部分勃起功能($P<0.05$),但仍无法达到 A 组青年大鼠正常的水平($P<0.05$)。而 D 组与 B 组相比差异无统计学意义($P>0.05$,图 2)。

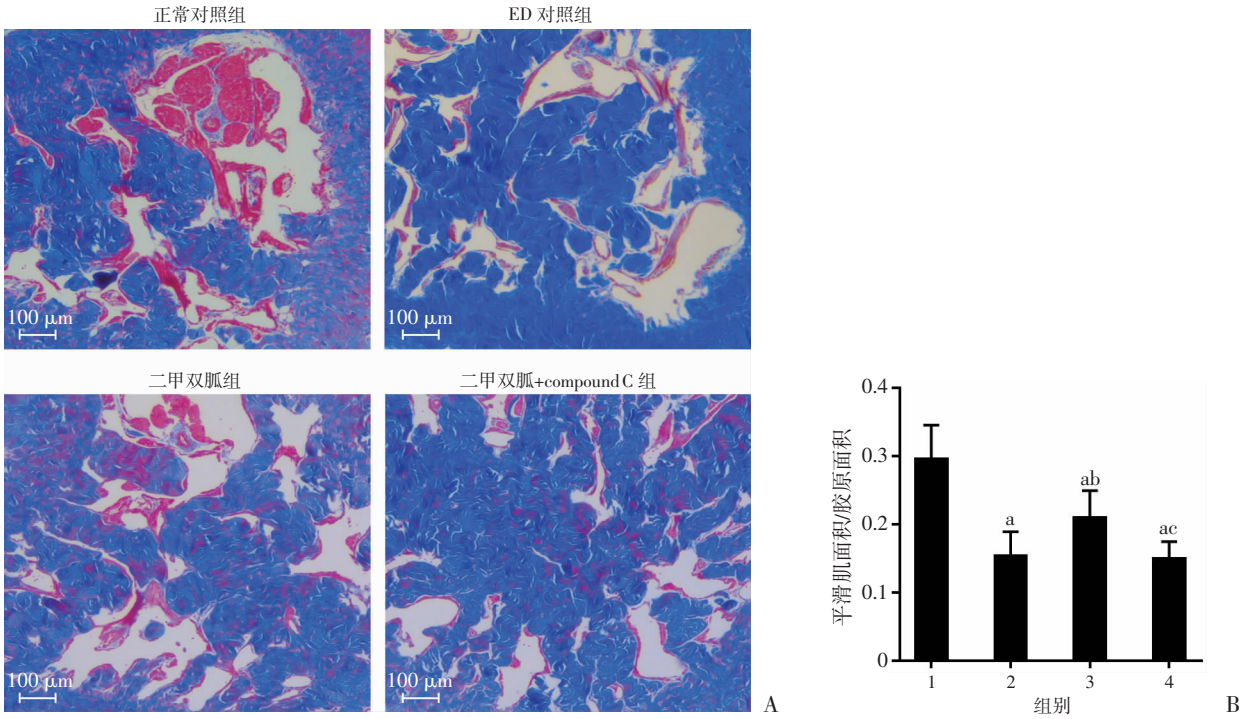
2.2　二甲双胍改善老年 ED 大鼠阴茎海绵体纤维化

通过 Masson 染色计算大鼠阴茎海绵体横截面平滑肌面积/胶原面积的值,评价纤维化情况。与 A 组比较,B 组大鼠阴茎海绵体纤维化明显加重($P<0.05$),C 组老年大鼠纤维化状况显著改善($P<0.05$),但与 A 组青年大鼠相比仍有差异($P<0.05$)。D 组纤维化情况较 A 组和 C 组严重($P<0.05$),与 B 组差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。



A:阴茎海绵体内压(ICP)和平均动脉压(MAP)变化情况;B:最大 ICP/MAP 值　1:A 组(正常对照组);2:B 组(ED 对照组);3:C 组(二甲双胍组);4:D 组(二甲双胍+compound C 组);a:$P<0.05$,与 A 组(对照组)比较;b:$P<0.05$,与 B 组比较;c:$P<0.05$,与 C 组比较

图 2　二甲双胍对大鼠勃起功能的影响



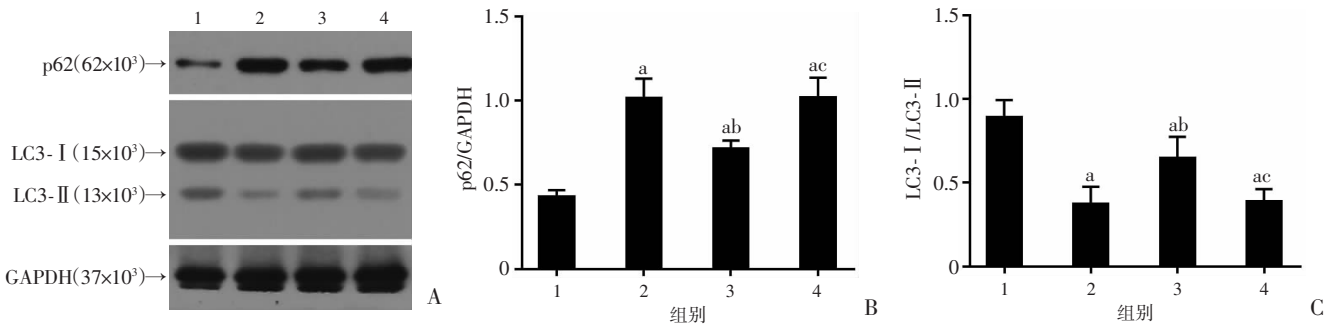
A:阴茎海绵体 Masson 染色　红色为平滑肌;蓝色为胶原;B:平滑肌面积/胶原面积　1:A 组(正常对照组);2:B 组(ED 对照组);3:C 组(二甲双胍组);4:D 组(二甲双胍+compound C 组);a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与 B 组比较;c:$P<0.05$,与 C 组比较

图 3　二甲双胍对大鼠阴茎海绵体纤维化的影响

2.3　二甲双胍增强老年 ED 大鼠阴茎海绵体自噬

Western blot 检测自噬相关指标 p62 蛋白、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白的表达,结果显示:与 A 组比较,B 组 p62 蛋白表达水平升高($P<0.05$),LC3-Ⅱ表达降低($P<0.05$)。与 B 组比较,C 组 p62 蛋白表达水平降低($P<0.05$),LC3-Ⅱ表达增加($P<0.05$);但二者仍未达到 A 组水平($P<0.05$)。D 组 p62、LC3-Ⅱ表达与 B 组相比差异无统计学意义;p62 表达高于 A 组和 C 组($P<0.05$),LC3-Ⅱ表达低于 A 组和 C 组($P<0.05$,图 4A~C)。

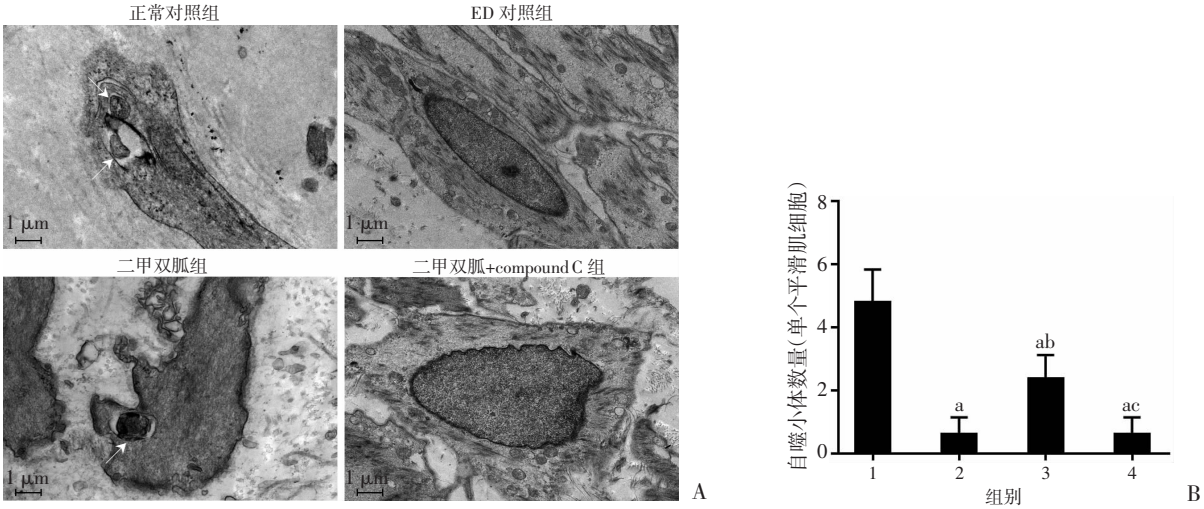
统计各组大鼠阴茎海绵体组织透射电镜图片随机视野中每个 CSMC 自噬小体的数量。结果显示:A 组可见数个聚集成团的自噬小体;C 组可见单独出现的自噬小体,较 A 组显著减少($P<0.05$);B 组和 D 组几乎没有发现自噬小体,均较 A 组和 C 组明显降低($P<0.05$,图 5A、B)。



1:A 组(正常对照组);2:B 组(ED 对照组);3:C 组(二甲双胍组);4:D 组(二甲双胍+compound C 组);a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与 B 组比较;c:$P<0.05$,与 C 组比较

A:Western blot 检测结果;B:p62 相对表达量;C:LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ相对表达量

图 4　Western blot 检测各组大鼠阴茎海绵体组织自噬相关蛋白的表达



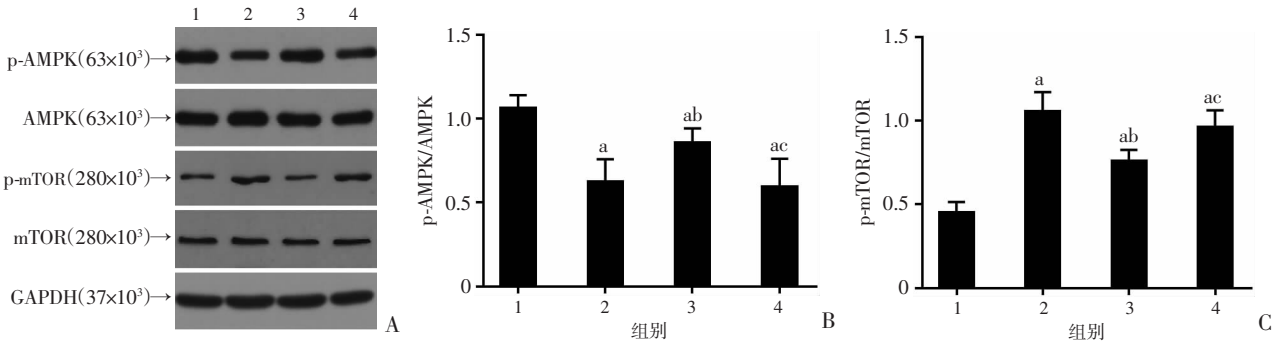
A:阴茎海绵体中海绵体平滑肌细胞(CSMCs)形态　↑:示自噬小体;B:透射电镜下每视野中 CSMCs 自噬小体数量　1:A 组(正常对照组);2:B 组(ED 对照组);3:C 组(二甲双胍组);4:D 组(二甲双胍+compound C 组);a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与 B 组比较;c:$P<0.05$,与 C 组比较

图 5　透射电镜观察各组大鼠阴茎海绵体自噬情况

2.4　二甲双胍上调老年 ED 大鼠阴茎海绵体中 AMPK/mTOR 通路

Western blot 检测 AMPK/mTOR 通路中 p-AMPK、p-mTOR 蛋白的表达水平,结果发现:与 A 组比较,B 组 p62 蛋白表达显著升高($P<0.05$),LC3-Ⅱ表达显著降低($P<0.05$)。C 组较 B 组 p62 表达显著降低($P<0.05$),LC3-Ⅱ表达显著增加($P<0.05$);但二者仍未达到 A 组水平($P<0.05$)。D 组 p62 蛋白、LC3-Ⅱ表达与 B 组差异无统计学意义($P>0.05$);p62 蛋白表达显著高于 A 组和 C 组($P<0.05$),LC3-Ⅱ表达显著低于 A 组和 C 组($P<0.05$,图 6A~C)。

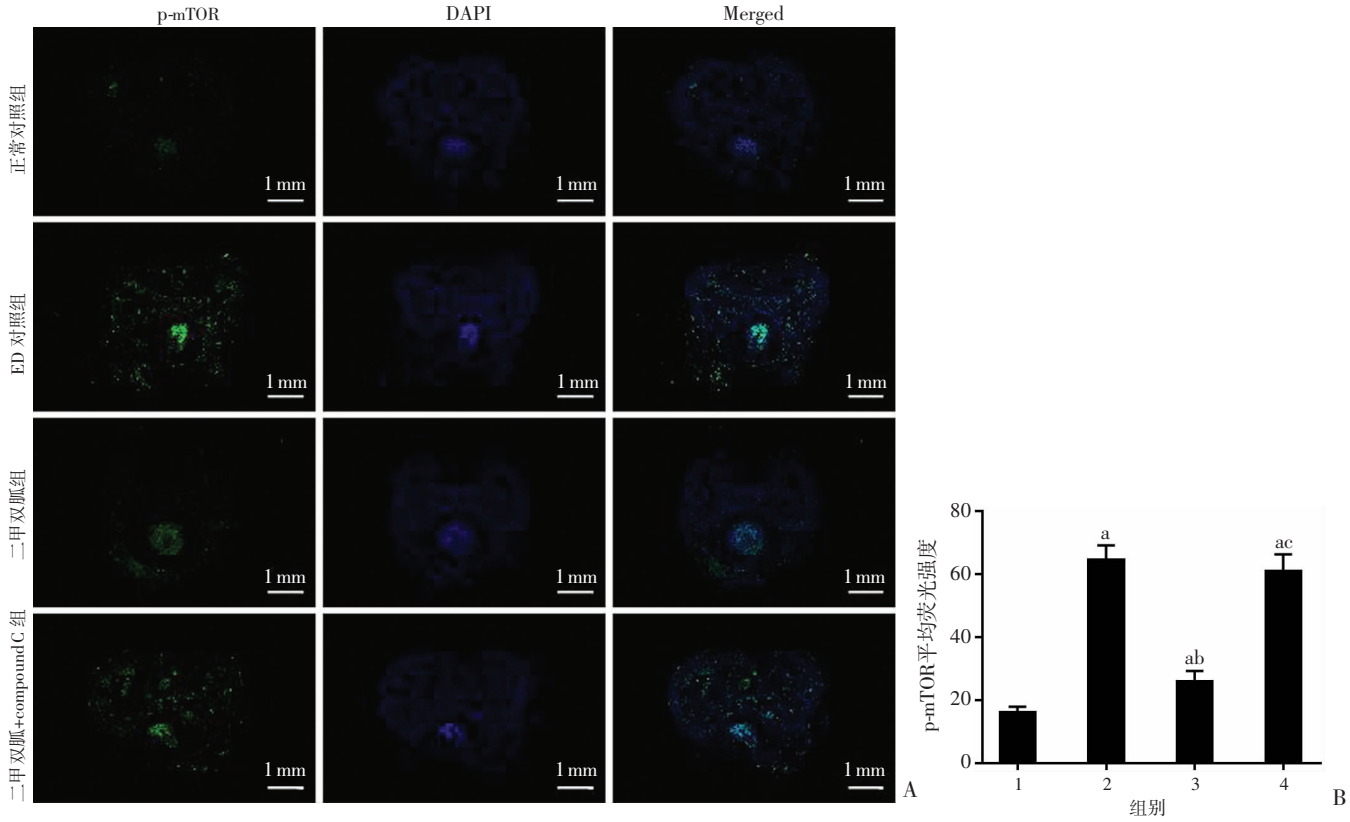
免疫荧光染色检测 p-mTOR 表达,结果显示:与 A 组比较,B 组 p-mTOR 平均荧光强度显著升高($P<0.05$)。C 组较 B 组 p-mTOR 平均荧光强度显著减少($P<0.05$),但仍高于 A 组($P<0.05$)。D 组 p-mTOR 平均荧光强度与 B 组差异无统计学意义($P>0.05$,图 7A、B)。



1:A 组(正常对照组);2:B 组(ED 对照组);3:C 组(二甲双胍组);4:D 组(二甲双胍+compound C 组);a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与 B 组比较;c:$P<0.05$,与 C 组比较

A:Western blot 检测结果;B:p-AMPK/AMPK 相对表达量;C:p-mTOR/mTOR 相对表达量

图 6　Western blot 检测各组大鼠阴茎海绵体组织 AMPK/mTOR 通路蛋白的表达



A:免疫荧光染色结果;B:各组 p-mTOR 平均荧光强度 1:A 组(正常对照组);2:B 组(ED 对照组);3:C 组(二甲双胍组);4:D 组(二甲双胍+compound C 组);a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与 B 组比较;c:$P<0.05$,与 C 组比较

图 7 免疫荧光染色观测各组大鼠阴茎海绵体 mTOR 的表达

3 讨论

现阶段,ED 治疗的一线方案主要是使用 PDE5I[10]。但该药物只能暂时起到增强勃起功能的作用,无法从根本上改变 ED 患者的本质。老年 ED 患者中,衰老过程通过损害海绵体平滑肌细胞松弛、降低阴茎弹性、顺应性和促进纤维化来影响阴茎血流动力学,最终导致 ED[1]。最新研究表明,细胞自噬与机体衰老密切相关,在衰老机制研究中,随着年龄增长,自噬功能逐渐丧失,自噬效率也相应降低[11]。近年来,已有部分研究聚焦于通过调节自噬治疗老年 ED[12]。寻找一种合理安全的自噬增强剂也许可解决此问题。

二甲双胍作为目前治疗 2 型糖尿病的一线药物,同时也是一种 AMPK 和自噬激动剂[13],近年有研究报道二甲双胍具有延缓衰老和缓解 ED 的能力[14],同时也具有逆转纤维化的功能[15]。其可能的机制有加强内皮依赖性的血管舒张和控制交感神经活动[14],但其具体机制尚未完全阐明。本研究检测各组大鼠阴茎海绵体纤维化的情况,发现二甲双胍在一定程度上抑制了老年 ED 大鼠阴茎海绵体纤维化进程。其具体机制可能是通过增强自噬,抑制了成纤维细胞活性,同时增强 CSMCs 活性。

AMPK/mTOR 信号通路在调控细胞自噬和衰老中被认为发挥了很重要的作用。AMPK 和 mTOR 经蛋白磷酸化可调节细胞代谢与自噬水平,抑制 mTOR 激酶信号通路、激活 AMPK 信号通路都能诱导细胞自噬来延缓衰老,延长生物体寿命。有关 AMPK 和 mTOR 与 ED 的研究已有不少报道。一种 AMPK 激动剂拉帕酮(β-lapachone)对兔海绵体平滑肌有很强的松弛作用,可能对治疗 ED 发挥潜在作用[16]。ZHU 等[17]报道低剂量冲击波联合间充质干细胞,通过 PI3K/AKT/mTOR 通路激活自噬,对 ED 有更好的治疗作用。本研究显示,与青年大鼠比较,老年 ED 大鼠阴茎海绵体组织中 p-AMPK 的表达明显降低,p-mTOR 表达升高,同时伴随着自噬水平的降低。这表明衰老导致了 AMPK/mTOR 通路被抑制,以及随之而来的自噬缺乏。因此,AMPK/mTOR 可能成为治疗 ED 的一个潜在靶点。

综上所述,老年大鼠勃起功能得到缓解,纤维化得到改善,可能是二甲双胍通过激活 AMPK/mTOR 通路,进而激活自噬导致的。本研究为治疗老年 ED 提供了一种可能的思路。二甲双胍联合其他药物,例如 PDE5Is 等是否对老年 ED 有更好的疗效还需要进一步研究。

参考文献:

[1] KAYA E, SIKKA S C, KADOWITZ P J, *et al*. Aging and sexual health: getting to the problem[J]. Aging Male, 2017, 20(2): 65-80. DOI:10.1080/13685538.2017.1295435.

[2] LEE M, SHARIFI R. Non-invasive management options for erectile dysfunction when a phosphodiesterase type 5 inhibitor fails[J]. Drugs Aging, 2018, 35(3): 175-187. DOI:10.1007/s40266-018-0528-4.

[3] YAFI F A, JENKINS L, ALBERSEN M, *et al*. Erectile dysfunction[J]. Nat Rev Dis, 2016, 2: 16003. DOI:10.1038/nrdp.2016.3.

[4] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. Cell, 2019, 177(7): 1682-1699. DOI:10.1016/j.cell.2019.05.026.

[5] ZHANG J, WU X J, ZHUO D X, *et al*. Effect of tankyrase 1 on autophagy in the corpus cavernosum smooth muscle cells from ageing rats with erectile dysfunction and its potential mechanism[J]. Asian J Androl, 2010, 12(5): 744-752. DOI:10.1038/aja.2010.44.

[6] BARZILAI N, CRANDALL J P, KRITCHEVSKY S B, *et al*. Metformin as a tool to target aging[J]. Cell Metab, 2016, 23(6): 1060-1065. DOI:10.1016/j.cmet.2016.05.011.

[7] ZHANG Z, ZHANG H Y, ZHANG Y, *et al*. Inactivation of the Ras/MAPK/PPARγ signaling Axis alleviates diabetic mellitus-induced erectile dysfunction through suppression of corpus cavernosal endothelial cell apoptosis by inhibiting HMGCS2 expression[J]. Endocrine, 2019, 63(3): 615-631. DOI:10.1007/s12020-018-1810-2.

[8] SILVA F H, ALEXANDRE E C, CALMASINI F B, *et al*. Treatment with metformin improves erectile dysfunction in a murine model of obesity associated with insulin resistance[J]. Urology, 2015, 86(2): 423.e1-423.e6. DOI:10.1016/j.urology.2015.04.035.

[9] KIM Y M, KIM M Y, KIM H J, *et al*. Compound C independent of AMPK inhibits ICAM-1 and VCAM-1 expression in inflammatory stimulants-activated endothelial cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Atherosclerosis, 2011, 219(1): 57-64. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.043.

[10] CHEN L, STAUBLI S E, SCHNEIDER M P, *et al*. Phosphodiesterase 5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction: a trade-off network meta-analysis[J]. Eur Urol, 2015, 68(4): 674-680. DOI:10.1016/j.eururo.2015.03.031.

[11] ESCOBAR K A, COLE N H, MERMIER C M, *et al*. Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction[J]. Aging cell, 2019, 18(1): e12876. DOI:10.1111/acel.12876.

[12] TANG Z, CUI K, LUAN Y, *et al*. Human tissue kallikrein 1 ameliorates erectile function *via* modulation of macroautophagy in aged transgenic rats[J]. Andrology, 2018, 6(5): 766-774. DOI:10.1111/andr.12512.

[13] REN J, ZHANG Y. Targeting autophagy in aging and aging-related cardiovascular diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2018, 39(12): 1064-1076. DOI:10.1016/j.tips.2018.10.005.

[14] PATEL J P, LEE E H, MENA C I, *et al*. Effects of metformin on endothelial health and erectile dysfunction[J]. Transl Androl Urol, 2017, 6(3): 556-565. DOI:10.21037/tau.2017.03.52.

[15] RANGARAJAN S, BONE N B, ZMIJEWSKA A A, *et al*. Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model[J]. Nat Med, 2018, 24(8): 1121-1127. DOI:10.1038/s41591-018-0087-6.

[16] BAE J H, KIM J W, KWEON G R, *et al*. Corpus cavernosal smooth muscle relaxation effect of a novel AMPK activator, beta-lapachone[J]. J Sex Med, 2011, 8(8): 2205-2214. DOI:10.1111/j.1743-6109.2010.01809.x.

[17] ZHU G Q, JEON S H, BAE W J, *et al*. Efficient promotion of autophagy and angiogenesis using mesenchymal stem cell therapy enhanced by the low-energy shock waves in the treatment of erectile dysfunction[J]. Stem cells Int, 2018, 2018: 1302672. DOI:10.1155/2018/1302672.

(**收稿**:2019-12-21;**修回**:2020-01-18)

(编辑 汪勤俭)