基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0721-04

西洛他唑对糖尿病模型大鼠勃起功能的影响

窦红珍[1],肖明朝[1],苟 欣[1],李国秧[2],李 静[3]
(1.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科;2.重庆市神经病学重点实验室;
3.重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨西洛他唑对糖尿病模型大鼠勃起功能的影响。方法:50 只 SD 雄性大鼠腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病动物模型,成模 8 周后随机分为糖尿病对照组(DM 组)和西洛他唑治疗组(CI 组),同时喂养 10 只大鼠为正常对照组(C 组)。各组动物灌服西洛他唑[20 mg/(kg·d)]或者 NS。灌胃处理 8 周后用阿朴吗啡(Apomorphine,APO)诱导法观察勃起功能,用电生理方法测定坐骨神经的运动神经传导速度(Motor merve conduction velocity,MNCV);并取阴茎海绵体组织用比色法检测一氧化氮合酶(Nitric oxide synthaes,NOS)水平,用 TUNEL 法观察阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡情况。结果:与 DM 组相比,CI 组的勃起功能、MNCV、NOS 水平明显改善,凋亡指数显著降低($P<0.05$)。结论:西洛他唑对 DM 大鼠勃起功能的下降具有明显治疗作用。

【关键词】糖尿病;勃起功能;凋亡;西洛他唑
【中国图书分类法分类号】R698.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-28

The effect of cilostazol on erectile function in diabetic rat model

DOU Hong-zhen, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the effect of cilostazol on erectile function in diabetic rat model. *Methods*:Diabetes were induced in 50 male adult sprague-dawley (SD) rats by an intraperitoneal injection of streptozotocin. The DM rats were randomly divided into diabetic group(DM group)and cilostazol therapy group(CI group) 8 weeks after the injection (another 10 normal SD rats as control, C group).The rats in each group were treated with cilostazol [20 mg/(kg·d)] or NS through a gastric perfusion for 8 weeks.Then the erectile function of all these rats was evaluated by apomorphine. Motor nerve conduction veloc-

作者介绍:窦红珍(1981-),男,硕士,
研究方向:勃起功能障碍。
通讯作者:肖明朝,男,副教授,E-mail: Xmz.2004@163.com。

CD36mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理学杂志,2004,20(8):1381-1384.
[3] 罗 丰,王朝晖.罗格列酮对兔动脉粥样硬化血脂和组织总抗氧化能力的影响[J]. 临床心血管病杂志,2006,22(05):295-297.
[4] 中华医学会心血管病学分会 中华心血管病杂志编辑委员会.不稳定性心绞痛诊断和治疗建议[J].中华心血管病杂志,2000,28(6):409-412.
[5] 李华波,全智华,杨 薪,等.罗格列酮对冠心病患者外周血单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(8):685-688.
[6] Naval M, Van Lenten B J, Reddy S R, et al. High-density lipoproteion and the dynamics of atherosclerotic lesions[J].Circulation, 2001, 104(20):2386-2387.
[7] Bodzioch M, Orso E, Klucken J, et al.The gene encoding ATP binding cassette transporter lismutated in Tangier disease[J]. Nat Genet, 1999, 22(4):347-351.
[8] McNeish J, Aiello R J, Guyot D, et al. High density lipoprotein deficiency and foam cell accu- mulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassettetransporter-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(8):4245-4250.
[9] 苟连平,吕 湛,秦 俭.腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 A1 在动脉粥样硬化中的作用及其受控特点[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(10):1943-1946.
[10] Goldberg R B. Impact of thiazolidenediones on serum lipoprotein levels[J]. Curr Atheroscler Rep, 2006, 8(5):397-404.
[11] Wade D P, Owen J S.Regulation of the cholesterol efflux gene, ABCA1[J].Lancet, 2001, 357(9251):161-163.
[12] Ruan X Z, Moorhead J F, Fernando R, et al.PPAR agonists protect mesangial cells from interleukin 1-induced intracellular lipid accumnlation by activating the ABCA1 cholesterol efflux pathway[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(3):593-600.
[13] Chinett G, lestavel S, Bocher V, et al. PPAR - α and PPAR-γ activators induce cholesterol from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway[J]. Nat Med, 2001, 7(1):53-58.
[14] Singaraja R R, Fievet C, Castro G, et al. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis[J]. Clin Genet, 2002, 61(2):115-125.
[15] Vaisman B L, Lambert G, Amar M, et al.ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteienmia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice[J]. J Clin Invest, 2001, 108(2):303-309.

(责任编辑:冉明会)

ity of sciatic nerve (MNCV) was evaluated by electrophysiology method. Their penis tissues were harvested to measure the level of nitric oxide synthase (NOS) by colorimetric method, and the penile cell apoptosis of smooth muscle was analyzed by TUNEL assay. *Results*: The erectile function, MNCV and NOS level in CI group significantly increased, while the apoptosis ratio significantly decreased ($P<0.05$), compared with DM group. *Conclusion*: Cilostazol has obvious therapeutic effect on the decrease of erectile function in rats with diabetes.
【Key words】Diabetes mellitus; Erectile function; Apoptosis; Cilostazol

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)在我国的发病率逐年升高,且年轻化趋势明显。糖尿病性勃起功能障碍(Diabetes mellitus induced erectile dysfunction, DMED)是 DM 的一种常见并发症。DMED 的发生机制尚不清晰,主要与血管、神经和用药因素有关[1],凋亡增加亦可能是 DMED 发生的原因之一[2]。西洛他唑(cilostazol)是一种新型磷酸二酯酶 3 型抑制剂,通过增加肝细胞生长因子浓度,对高 D—葡萄糖导致的血管内皮细胞死亡具有保护作用[3]。西洛他唑还可以改善 DM 患者周围神经传导,且疗效优于维生素[4]。鉴于西洛他唑对 DM 神经、血管病变取得的确切治疗效果,本实验对西洛他唑对 DM 模型大鼠勃起功能的影响进行了研究,并对其可能的机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及药物配制

Sigma 公司链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),用 0.1 mmol/L pH4.2 的柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液配制成 1%溶液;Sigma 公司阿朴吗啡(Apomorphine, APO),用 Vit C、NS 配制,使 APO 浓度为 40 μg/ml, Vit C 浓度为 0.2mg/ml 南京建成一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)试剂盒;Roche 公司原位末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒;西洛他唑片(培达,浙江大冢制药有限公司),用 NS 配制成 6.25 mg/ml。

1.2 实验动物及 DM 模型制备

SD 雄性大鼠 60 只,体重 250 ~ 300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。随机抽取 SD 大鼠 50 只,禁食 12 h 后于左下腹腹腔注射新鲜配制的 STZ 溶液(60 mg/kg),余 10 只作为正常对照组(C 组)。腹腔注射 STZ 72 h 后断尾测随机血糖,>16.7mmol/L 者为建模成功。成功建模 36 只,成功率为 72%。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及西洛他唑灌胃处理 饲养至成模 8 周末时,将存活的 28 只 DM 大鼠随机分为 DM 组和西洛他唑治疗组(CI 组)各 14 只。参照王哲等[5]的方法,对 CI 组以西洛他唑 20mg/(kg·d)进行灌胃处理。C 组及 DM 组用相应量的 NS 灌胃。灌胃处理满 8 周时,再次断尾测随机血糖,将灌胃期间死亡及随机血糖小于 16.7mmol/L 者剔出实验。最终进入实验统计结果的大鼠 C 组为 10 只,DM 组为 11 只,CI 组为 12 只。

1.3.2 阴茎勃起功能测定 采用 Heaton[6]的方法,将房间灯光调暗,仅够观察,室内保持安静。把大鼠放入实验铁笼(24 cm × 16 cm × 18 cm),首先使其适应环境 10min。继后在其颈部皮下注射 APO(150 μg/kg),立即持续观察 30min,对其勃起情况进行记录。判断标准:以阴茎头露出、包皮后退和阴茎膨大为阴茎勃起 1 次。每组中有勃起现象的大鼠占该组所有大鼠的百分比为勃起率。

1.3.3 大鼠坐骨神经的运动神经传导速度(Motor nerer conduction velocity, MNCV)测定 参照刘艳等[7]的方法,腹腔注射麻醉成功后,在大鼠左坐骨切迹坐骨神经走行处插入两根刺激电极(间距 2 mm),分别在左下肢踝部远端和左足第二趾间皮下插入一根记录电极,鼠尾插电极接地。打开 BL410 生物信号记录系统(成都泰盟),进行单电压粗刺激(电压 3V,刺激波宽为 0.2 ms)记录坐骨神经复合动作电位。每只大鼠重复刺激 3 次,每次刺激间隔 1 min。并测量踝部记录电极与最近刺激电极间的距离(S)。(MNCV)(m/s)=S/ 动作电位潜伏期。每只大鼠 MNCV 值取 3 次测量的均值。

1.3.4 大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡检测 将大鼠断头处死,取阴茎中段海绵体,仔细剔除筋膜组织,NS 冲洗。常规固定、石蜡包埋、切片,进行 TUNEL 法凋亡检测。凋亡指数:光学显微镜下(10 × 40)观察,随机选取 10 个视野,计算每个视野下凋亡阳性细胞数占细胞总数的百分比,取平均值。

1.3.5 大鼠阴茎海绵体 NOS 活性测定 按上述方法另取部分阴茎海绵体 -80℃冰箱保存,用比色法进行 NOS 活性测定。严格按照试剂盒说明书进行匀浆,3 000 r/min 离心,在 530 nm 波长下测定吸光度,根据吸光度的数值大小计算出 NOS 活力。以每毫克组织蛋白质每分钟生成 1 nmol NO 为 1 个酶活力单位。

1.4 统计学方法

所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述。均数间两两比较采用 Student-Newman-Keuls q 检验法。勃起率之间比较应用 χ^2 检验。以上分析均使用 SPSS 13.0 统计软件处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠勃起功能测定

各组大鼠皮下注射 APO 后均有活动增加、毛发

竖立、打呵欠等表现。与 C 组相比，DM 组大鼠勃起次数明显减少（$P<0.01$）。CI 组大鼠勃起次数明显优于 DM 组（$P<0.05$）。大鼠勃起情况结果见表 1。

2.2 大鼠坐骨神经 MNCV 测定

与 C 组相比，DM 组 MNCV 明显降低（$P<0.01$）。与 DM 组相比，CI 组 MNCV 明显改善（$P<0.05$）。MNCV 测定结果见表 2。

2.3 大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡测定

C 组仅可偶见散在的凋亡细胞。在 DM 病程在 16 周时，DM 组阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡较 C 组明显增多（$P<0.01$）。和 DM 组相比，CI 组凋亡明显减轻（$P<0.01$）。凋亡细胞形态上表现为染色质浓缩、边聚、伴有核外形改变。凋亡细胞胞核被染成棕黄色，凋亡细胞散在分布。凋亡结果见图 1~3，表 3。

2.4 大鼠阴茎海绵体组织 NOS 活性

和 C 组比较，DM 组 NOS 活性显著降低（$P<0.01$）。CI 组 NOS 活明显高于 DM 组（$P<0.01$）。各组大鼠阴茎海绵体组织 NOS 活性见表 2。

3 讨 论

DM 是导致 ED 的重要原因之一，DM 人群的ED 发病率是一般人群的 3 倍。ED 在 1 型男性 DM人群中的患病率约为 32%，在 2 型男性 DM 人群患病率约为 46%，而且 ED 可以是 DM 的首发症状[8]。磷酸二酯酶 5 型（PDE5）抑制剂是治疗 ED 的一线用药。PDE5 抑制剂对非 DM 人群 ED 治疗的有效率为 70%～89%，而对 DMED 患者的有效率仅为 56%[9]。

表 1 各组大鼠注射 APO 后阴茎勃起情况（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	勃起次数（次）	勃起率
C 组	10	2.20 ± 0.63	100%（10/10）
DM 组	11	0.36 ± 0.50*	36.4%(4/11)*
CI 组	12	1.00 ± 0.95▲	58.3%(7/12)

*$P<0.01$，DM 组和 C 组比较；▲$P<0.05$，CI 组和 DM 组比

表 2 各组大鼠 MNCV 和阴茎海绵体 NOS 测定结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	传导速度(m/s)	NOS(U/mgprot)
C 组	10	32.95 ± 8.60	1.91 ± 0.26
DM 组	11	17.88 ± 4.48*	0.65 ± 0.14*
CI 组	12	23.74 ± 5.25▲	0.93 ± 0.15●

*$P<0.01$，DM 组和 C 组比较；▲$P<0.05$，●$P<0.01$，CI 组和 DM 组比较

表 3 各组大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡指数检测结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	凋亡指数	
		（%）	平方根反正弦变换数据
C 组	10	0.88 ± 0.66	5.02 ± 2.05
DM 组	11	14.52 ± 3.56	22.25 ± 2.99*
CI 组	12	9.07 ± 2.51	17.38 ± 2.51▲

*$P<0.01$，DM 组和 C 组比较；▲$P<0.01$，CI 组和 DM 组比

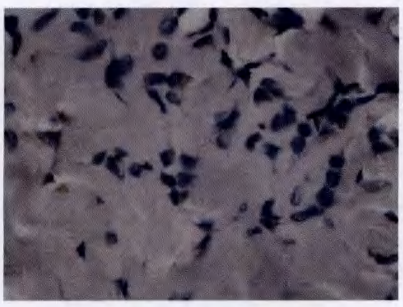


图 1 C 组（DAB 染色，10×40）

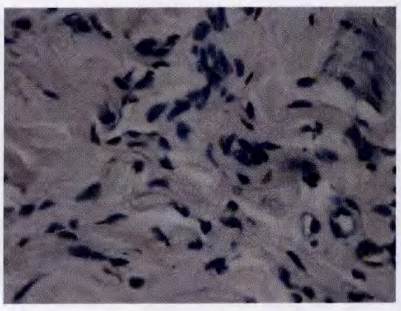


图 2 DM 组（DAB 染色，10×40）



图 3 CI 组（DAB 染色，10×40）

PDE5 抑制剂对 DMED 患者疗效较差,且疗效不能持久。神经病变和损伤的阴茎血管系统是 75% DMED 患者的主要原因。内皮细胞损伤是 DM 血管病变进展的原始触发器,也是 DMED 的发生的原因之一[10]。近年来发现磷酸二酯酶 3 型抑制剂西洛他唑除具有传统的抗凝作用,还可以保护内皮细胞、改善神经传导[3,4];通过抑制核因子－κB 的活化来控制血管粘附分子－1 的过度表达,使 DM 模型大鼠的血管免于炎性损伤[11]。对 DMED 患者多种治疗方案的选择是重要的,因此,我们对西洛他唑对 DM 模型大鼠勃起功能的影响进行了探讨。

本研究结果显示,DM 组大鼠皮下注射 APO后 30 min 内勃起次数较 C 组明显下降,而 CI 组为较 DM 组有一定的改善。本实验发现西洛他唑可以增加 DM 模型大鼠阴茎海绵体的 NOS 活性,促进一氧化氮的合成和鸟苷酸环化酶的激活,进而导致细胞内钙离子浓度降低、平滑肌舒张,使阴茎勃起。还发现西洛他唑可以减少阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡。平滑肌细胞、内皮细胞皆表达 NOS,平滑肌细胞凋亡减少和内皮细胞功能改善可能缓解了 NOS 水平的下降。足够数量的平滑肌细胞是实现白膜对静脉发挥正常"剪切"作用的重要条件,可能是西洛他唑改善勃起功能的原因之一。本实验还证实西洛他唑可以改善 DM 大鼠周围神经传导,和胡静芳等[7]报道的结果一致,可能是其改善勃起功能的另一个重要原因。海绵体神经损伤可以引起阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡[12],西洛他唑对神经传导的改善可能和平滑肌细胞凋亡减少有关。

阴茎勃起依赖于神经的完整性、有功能的血管系统和正常的海绵体组织,是神经血管共同作用的结果。当以上三方面因素不能正常作用或者相互协调时,就导致 ED 的发生[13]。本实验提示西洛他唑对上述维持阴茎正常勃起的关键因素皆具有保护作用。西洛他唑改善勃起功能的机制可能和保护内皮细胞功能、改善微循环、减轻炎性损伤有关。

本研究提示应用西洛他唑可能改善 DM 患者的勃起功能,为难治性 DMED 的临床治疗提供一个有意义的途径。但 CI 组和 DM 组之间的勃起率差异没有统计学意义,可能和样本量较小和 APO 勃起功能测定不能完全量化有关。确定用药剂量、用药周期和这些因素的最佳参数以及如何协同使用 PDE5 抑制剂还需要进一步的工作,以期可以改善 DMED 难治患者的疗效。

参 考 文 献

[1] Korenman S G. New insights into erectile dysfunction : a practical approach[J]. The American Journal of Medicine, 1998, 105(2):135-144.

[2] 柴伟栋,陈家伟,汪承亚.葡萄糖及胰岛素对牛血管内皮细胞凋亡的影响[J].中华内分泌代谢杂志,1999,15(2):100-103.

[3] Morishita R, Higaki J, Hayashi S I, et al. Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation:prevention of high D-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor[J].Diabetologia, 1997, 40(9):1053-1061.

[4] 胡静芳,苏 青,邢惠莉.西洛他唑对糖尿病患者周围神经传导速度及其肢体疼痛、麻木症状的影响[J].中国临床康复,2004,8(18):3523-3525.

[5] 王 哲,赵家军,高 聆,等.西洛他唑对糖尿病大鼠粘附分子的影响[J].中华医学杂志,2002,82(11):729-731.

[6] Heaton J P, Varrin S J, Morales A. The characterization of a bio-assay of erectile function in a rat model[J]. The Journal of Urology, 1991, 145(5):1099-1102.

[7] 刘 艳,朱栗文,宋利华.碟脉灵对糖尿病大鼠神经传导速度的影响[J].中国老年医学杂志,2007,27(2): 128-129.

[8] Vickers M A, Wright E A. Erectile dysfunction in the patient with diabetes mellitus[J]. The American Journal of Managed Care, 2004, 10 (s1):3 - 11.

[9] Rendell M S, Rajfer J, Wicker P A, et al. Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. sildenafil diabetes study group[J]. Journal of the American Medical Association, 1999, 281(5):421-426.

[10] De Angelis L, Marfella M A, Siniscalchi M, et al. Erectile and endothelial dysfunction in type II diabetes: a possible link[J]. Diabetologia, 2001, 44(9):1155-1160.

[11] Gao L, Wang F, Wang B, et al.Cilostazol protects diabetic rats from vascular inflammation via nuclear factor-β-dependent down-regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006, 318(1):53-58.

[12] 阮义生,朱广友.大鼠双侧阴茎背神经和/或海绵体神经离断后海绵体组织细胞凋亡[J].法医学杂志,2008,24(2): 97-101,161.

[13] Giuliano F A, Rampin O, Benoit G, et al. Neural control of penile erection[J].The Urologic clinics of North America, 1995, 22(4):747-766.

(责任编辑:冉明会)