维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0976-04

吡哆胺对糖尿病大鼠勃起功能影响的实验研究

蒲晓峰,苟 欣,刘德云,杨华安,郑传东

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨吡哆胺对糖尿病大鼠勃起功能的影响。方法:通过腹腔注射 STZ 建立糖尿病大鼠模型,然后随机分成 DM 组和 DM+PM 组,DM+PM 组每天用吡哆胺 200mg/kg 灌胃干预。12 周后观察各组大鼠勃起功能,并获取阴茎海绵体组织检测一氧化氮(Nitric Oxide,NO)、一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase,NOS)与环磷酸鸟苷(cGMP)水平。结果:成功建立糖尿病大鼠模型。与未使用吡哆胺灌胃干预的 DM 组相比,正常对照组(C 组)和 DM+PM 组勃起功能更好,3 个实验组大鼠勃起率分别是 46.2%,100%和 71.4%。C 组和 DM+PM 组 NO 水平明显比 DM 组高,3 个组含量分别是 (7.82 ± 0.77)、(6.47 ± 0.54) 和 (3.23 ± 0.28) μ mol/g prot($P<0.05$);NOS 活力在 DM 组为(0.69 ± 0.11)U/mg prot,较 C 组 (2.00 ± 0.30)U/mg prot 和 DM+PM 组(1.07 ± 0.15)U/mg prot 明显降低 ($P<0.05$)。cGMP 含量在 DM 组为 (36.15 ± 1.94)p mol/ml, 显著低于 C 组 (54.19 ± 2.62)pmol/ml 和 DM+PM 组 (50.57 ± 1.20)pmol/ml($P<0.05$)。结论:吡哆胺通过作用于 L-Arg-NO-cGMP 通路对糖尿病大鼠勃起功能有一定保护作用。

【关键词】勃起功能;糖尿病;吡哆胺;大鼠

【中国图书分类法分类号】R698 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-26

The effect of pridoxamine on erectile function in diabetic rats

PU Xiao-feng, et al

(*Departement of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the effect of pridoxamine on erectile function in diabetic rats. *Methods*: Male adult Sprague-Dawley rats were induced for diabetes by an intraperitoneal injection of streptozotocin, then randomly divided into DM group and DM+PM group. The rats in DM+PM group were treated with pridoxamine at a dosage of 200mg/kg through a gastric perfusion every day. Twelve weeks later the erectile function of all these rats were evaluated, and their penises tissues were harvested. The NO, NOS, and cGMP levels in corpus cavernosum were measured. *Results*: The diabetic rat model was successfully established. The erectile function was much better in normal control group (group C, 100%) and DM+PM group (71.4%) than in DM group (46.2%) ($P<0.05$). The NO level in DM group was significantly decreased (3.23 ± 0.28) μ mol/gprot, compared with group C (7.82 ± 0.77) μ mol/gprot and DM+PM group (6.47 ± 0.54) μ mol/gprot ($P<0.05$). The NOS level in group C (2.00 ± 0.30) U/mgprot and DM+PM group (1.07 ± 0.15) U/mgprot was both much higher than in DM group (0.69 ± 0.11) U/mgprot ($P<0.05$). The cGMP content in corpus cavemosum was markedly decreased in DM group (36.15 ± 1.94) pmol/ml, compared with group C (54.19 ± 2.62) pmol/ml and DM+PM group (50.57 ± 1.20) pmol/ml, ($P<0.05$). *Conclusion*: The pridoxamine has some effect of L-Arg-NO-cGMP pathway on diabetic rats' penis tissues, and may play some role in protecting the harm to erectile function caused by diabeties.

【Key words】 Erectile function; Diabetes; Pridoxamine; Rats

糖尿病性勃起功能障碍(Diabetic erectile dysfunction, DMED)是一种临床常见的疾病。有报道[1]称 DMED 的发病率高达 75%,比非糖尿病患者高 3 倍,并随年龄和病程的增长而明显增加。目前糖尿病性 ED 的发生机制尚不很清楚。有学者[2]认为糖尿病高糖血症状态下糖基化终末产物(Advanced glycation end products, AGEs)大量生成使局部 NO 灭活增加以及产生大量氧自由基等因素是导致糖尿病勃起功能障碍的关键原因。吡哆胺(Pridoxamine)是维生素 B6 3 种天然形式之一,有研究[3]发现吡哆胺能抑制 AGEs 产生,还能够清除机体内生化反所产生的活性氧化产物。如果给予糖尿病大鼠吡哆胺,能否通过减少 AGEs 对 NO 的灭活从而预防或者延缓

作者介绍:蒲晓峰(1981-),男,硕士,
研究方向:糖尿病勃起功能障碍发病机制及治疗。

通讯作者:苟 欣,男,教授,E-mail:cymnk@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

DMED 的发生?本实验通过建立糖尿病大鼠模型,给予吡哆胺后观察大鼠勃起功能和测定阴茎海绵体 NO、NOS、cGMP 含量,探讨吡哆胺对糖尿病大鼠勃起功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

成年 SD 雄性大鼠 50 只(购自重庆医科大学实验动物中心),体重 180~200g。进入实验前经交配试验证实具有正常性功能。随机设置正常对照组(C 组)10 只,剩余大鼠禁食 12h,按 65mg/kg 剂量左下腹腹腔一次注射 1%STZ(溶于 pH4.2,0.1mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)建立糖尿病模型,正常对照组于相同部位注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,操作过程注意无菌操作。血糖仪监测大鼠尾静脉血血糖,72h 后,血糖 >16.7mmol/L 为糖尿病模型建立成功。糖尿病成模大鼠随机分为糖尿病组(DM)和糖尿病-吡哆胺组(DM+PM 组)。DM+PM 组给予吡哆胺(用生理盐水配制)灌胃 200mg/(kg·d)干预;C 组、DM 组给予等量生理盐水灌胃。自由饮食,昼夜交替饲养,观察大鼠生活情况。从给予吡哆胺灌胃起共饲养 12 周。

1.2 主要试剂

链尿佐菌素(Streptozotocin,STZ)(美国 Alexis);Lifescan 血糖仪(美国强生);吡哆胺(南京德宝生化);阿朴吗啡(Apomorphine,APO)(美国 Sigama);一氧化氮(Nitric oxide,NO)、一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase,NOS)测试盒(南京建成生物工程研究所);环磷酸鸟苷(cGMP)放免试剂盒(上海中医药大学核医学实验室)。

1.3 实验方法

1.3.1 阴茎勃起试验 采用 Heaton[4]报道的方法:大鼠饲养结束后称重,在其颈后部皮下注射 APO 150μg/kg(按比例称取 APO,分别加入生理盐水,VitC,使 APO 终浓度为 8μg/ml,VitC 为 0.2mg/ml),房间灯光调暗,室内保持安静,使大鼠适应环境 10min;继后对大鼠持续观察 30min,对其勃起情况进行记录。以充血的龟头和末端阴茎体出现为阴茎勃起 1 次。

1.3.2 NO、NOS 测定 处死大鼠后取中段阴茎海绵体组织,制备 10%组织匀浆,分别按测试盒说明书加入试剂,使用721分光光度计测得光密度值,按照说明书提供的方法分别计算出待测物 NO、NOS 含量。

1.3.3 cGMP 测定 处死大鼠后取中段阴茎海绵体组织,称取 50mg 左右放入盛有 2ml 冷的 50mmol/l pH4.75 醋酸缓冲液的试管内(冰浴),匀浆,加入 2ml 无水乙醇,混匀,静止 5min,3 500r/min 离心 15min。将上清液收集在青霉素小瓶内,再用 75%乙醇 2ml 洗沉淀,匀浆分散,混匀,3 500r/min 离心 15min。合并上清液,60℃烤箱中吹干,残渣放于 4℃保存。测量时用 1ml 醋酸缓冲液溶解,取 0.1ml 按照试剂盒说明书上的加液程序加液并 4℃过夜,摇匀,室温放置 2~3h,3 500r/min 离心 15min,吸去上清,使用 SN-695 型智能放免 γ-测量仪进行测定。将所得的值乘以稀释的倍数即得出数值。

1.3.4 统计学分析 所有数据中计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,组间数据比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,使用 SPSS13.0 统计软件处理。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 糖尿病动物模型的建立

在糖尿病建模组 40 只大鼠腹腔注射 STZ 溶液后有 32 只大鼠于 72h 检测血糖值大于 16.7mmol/L,视为建模成功。糖尿病大鼠有明显的多饮、多食、多尿和消瘦症状。将建模成功的糖尿病大鼠随机等分成两组,糖尿病+吡哆胺组(DM+PM 组)16 只,每日给予吡哆胺(用生理盐水配制)灌胃 200mg/(kg·d)干预;另一组为糖尿病组(DM 组),和正常对照组每日给予等量生理盐水灌胃。其间 DM 组有 2 只大鼠分别在饲养第 4 周和第 9 周死亡,DM+PM 组有 1 只大鼠在饲养第 6 周死亡,死鼠在统计时剔除。自使用吡哆胺灌胃干预起饲养 12 周,重新检测各组血糖水平,DM+PM 组与 DM 组各1 只大鼠血糖恢复正常,统计时剔除。各实验组大鼠 12 周时空腹血糖值见表 1。

表 1 各组大鼠第 12 周空腹血糖检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血糖值
C 组	10	4.91 ± 0.45
DM 组	13	20.71 ± 2.06*
DM+PM 组	14	20.95 ± 2.23#▲

C 组和 DM 组比较,*$P<0.05$;C 组和 DM+PM 组比较,#$P<0.05$;DM 组和 DM+PM 组比较,▲$P>0.05$

2.2 阴茎勃起次数

各组大鼠皮下注射 APO 后都有活动增加,毛发竖立,打呵欠等表现。DM 组与 C 组、DM 组与 DM+PM 组、DM+PM 组与 C 组相比较阴茎勃起次数均有明显差异($P<0.05$)。各组大鼠阴茎勃起情况见表 2。

2.3 阴茎海绵体 NO、NOS 含量

DM 组与 C 组和 DM+PM 组大鼠相比较,其阴茎海绵体 NO 和 NOS 的含量明显降低($P<0.05$),DM+PM 组与 C 组比较其阴茎海绵体 NO 和 NOS 含量明显降低($P<0.05$),见表 3。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 各组大鼠注射 APO 后阴茎勃起情况($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	勃起次数	勃起率
C 组	10	2.30 ± 0.95	100%
DM 组	13	0.54 ± 0.66	46.2%
DM+PM 组	14	1.43 ± 1.16	71.4%

C 组、DM 组和 DM+PM 组间两两比较,P 均<0.05

表 3 各组大鼠阴茎海绵体 NO、NOS 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	NO(μmol/gprot)	NOS(U/mgprot)
C 组	10	7.82 ± 0.77	2.00 ± 0.30
DM 组	13	3.23 ± 0.28*	0.69 ± 0.11*
DM+PM 组	14	6.47 ± 0.54 #▲	1.07 ± 0.15 #▲

C 组和 DM 组比较,*P<0.05;C 组和 DM+PM 组比较,#P<0.05;DM 组和 DM+PM 组比较,▲P<0.05

2.4 cGMP 含量

DM 组与 C 组比较阴茎海绵体 cGMP 含量显著降低(P<0.05),与 DM+PM 组比较其 cGMP 也明显降低(P<0.05),DM+PM 组与 C 组比较 cGMP 含量明显下降 (P<0.05),见表 4。

表 4 各组大鼠阴茎海绵体 cGMP 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	cGMP(pmol/ml)
C 组	10	54.19 ± 2.62
DM 组	13	36.15 ± 1.94*
DM+PM 组	14	50.57 ± 1.20#▲

C 组和 DM 组比较,*P<0.05;C 组和 DM+PM组比较,#P<0.05;DM 组和 DM+PM 组比较,▲P<0.05

3 讨 论

NO 作为一种神经递质和平滑肌舒张因子在阴茎的勃起机制中发挥至关重要的作用。在阴茎内,NO 主要是由海绵体内皮细胞内的 NOS 作用于左旋精氨酸(L-Arg)生成的,通过改变平滑肌细胞内的 cGMP 水平介导平滑肌的松弛。阴茎勃起的分子生物学机制认为,在海绵体的内皮和非肾上腺能非胆碱能(Non-adronergic,Non-cholinergic,NANC)神经末梢有 NOS。在受到性刺激时,NOS 将 L-Arg 转化成 NO,NO 进而通过结合 G 蛋白,激活鸟苷酸环化酶(GC),生成环磷酸鸟苷(cGMP)。cGMP 进而激活依赖性的蛋白激酶,导致细胞内钙离子浓度降低,平滑肌松弛,动脉血流灌注增加,白膜下静脉回流受阻,从而使阴茎勃起。

目前已经证实糖尿病高血糖致 AGEs 大量生成是 DM 引起微血管病变的基础。

AGEs 是指蛋白质、脂质或核酸等大分子在没有酶参与的条件下,自发地与葡萄糖或其他还原单糖反应所生成的稳定共价产物。该反应过程称为非酶糖基化反应(也称为 Maillard 反应)。Reddy 等[5]研究发现 AGEs 的成分复杂,主要包括羧甲基赖氨酸(Carboxymethllysine,CML)、戊糖苷、交联素和非荧光化合物等。糖尿病高糖血症能使活性氧化中间介质形成增多和氧化应激增强,从而导致蛋白质、脂质和核酸非酶糖基化反应加速,最终使 AGEs 生成明显增多。AGEs 在机体内过量蓄积可通过灭活 NO 的生物活性及促进自由基介导的氧化作用等方面的作用引发一系列病理反应从而损伤机体器官、组织和细胞的正常功能[6]。Usta 等[7]研究发现糖尿病大鼠阴茎组织中 AGEs 水平显著上升。大量 AGEs 生成通过灭活 NO 影响 L-Arg-NO-cGMP 通路,从而减少细胞内钙离子的释放,使海绵体平滑肌松弛机制受损,导致动脉血流灌注减少,损害勃起功能。

吡哆胺是维生素 B6 3 种天然形式之一。目前已经有多个独立研究证实吡哆胺能强力抑制 AGEs 的产生,还能够清除机体内生化反应所产生的活性氧化产物[8-10]。其抑制糖基化反应的机制目前尚不十分清楚。Khalifah 等[11]研究发现,吡哆胺可抑制糖基化反应中间产物(Amadori 产物)转变为 AGEs,称吡哆胺是"Amadori 后 AGEs 抑制剂"。另外,由于AGEs 的形成过程与氧化应激密切相关,而吡哆胺被发现是一种自由基清除剂[12],因此吡哆胺可能通过抑制氧化应激而减少 AGEs 的形成。近年研究发现,反应性羰基化合物是形成 AGEs 的前体。羰基化合物能明显加速 AGEs 的形成。吡哆胺作为亲核化合物可清除羰基化合物,是吡哆胺抑制 AGEs 形成的一种可能机制[13]。

在本实验研究中我们发现,在使用吡哆胺干预后,DM+PM 组大鼠阴茎海绵体 NO、NOS、cGMP 含量(6.47 ± 0.54)、(1.07 ± 0.15)、(50.57 ± 1.20)较 DM 组(3.23 ± 0.28)、(0.69 ± 0.11)、(36.15 ± 1.94)明显增多,这表现在 DM+PM 组大鼠的勃起次数(1.43 ± 1.16)和勃起率(71.4%)较 DM 组(0.54 ± 0.66)和(46.2%)有明显的改善。上述实验结果证实了我们关于吡哆胺能通过减轻糖尿病高血糖状态对 L-arg-NO-cGMP 通路的损害从而在一定程度上保

维普资讯 http://www.cqvip.com

护勃起功能的设想是正确的,并且上述结果很可能是吡哆胺通过抑制糖尿病高血糖状态下产生的过量 AGEs 对 L-arg-NO-cGMP 通路的损害而发挥作用的。但同时我们也应注意到,①DM+PM 组的阴茎海绵体 NO、NOS、cGMP 水平仍明显低于正常对照组,勃起功能也较正常对照组明显下降,提示单用吡哆胺还不能很好的起到保护勃起功能和预防糖尿病 ED 的作用;②吡哆胺对于 L-arg-NO-cGMP 通路保护作用的具体作用机制仍不清楚,尚有待进一步研究。但本实验的结果终究说明对糖尿病个体早期给予吡哆胺在保护勃起功能、延缓 ED 的发生方面仍有一定的积极作用。

参 考 文 献

[1] Ledda A.Diabetes,hypertension and erectile dysfunction[J]. Curr Med Res Opin,2000;16(suppl 1):S17-S20.

[2] Seftel AD,Vaziri ND,Ni Z,et al. Advanced glycation end products in human penis:Elevation in diabetic tissue,site of deposition, and possible effect through iNOS or eNOS[J]. Urology,1997;50(6): 1016-1026.

[3] Alderson NL,Chachich ME,Frizzell N,et al.Effect of antioxidants and AGE inhibition on chemical modification of proteins and progression of nephropathy in the streptozotocin diabetic rat[J]. Diabetologia, 2004;47(8):1385-1395.

[4] Heaton JP,Warrin SJ,Morales A.The char acterization of a bio-assay of erectile function in a rat mode[J]. J Urol,1991;145(5): 1099-1101.

[5] Reddy S,Bichler J,Wells-Knecht KJ,et al.N epsilon-(Carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins[J]. Biochemistry,1995;34(34):10872-10878.

[6] 林炜栋.糖尿病 AGEs 的形成与生物学效应[J]. 中华国际医学杂志,2001;6(1):61-63.

[7] Usta MF,Birvalacqua TJ,Yang DY,et al.The protective effect of aminoguanidine on eretile function in streptozotocin diabetic rats[J]. J Urol,2003;170(4 Pt 1):1437-1442.

[8] Nagaraj RH,Sarkar P,Mally A,et al. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats:characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal[J]. Arch Biochem Biophys,2002;402(1):110-119.

[9] Booth AA,Khalifah RG,Hudson BG.Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products:comparison with aminoguanidine [J]. Biochem Biophys Res Commun,1996;220(1):113-119.

[10] Hudson BG,Khalifah RG,Baynes JW,et al. Amadorins:novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999;257(2):251-258.

[11] Khalifan RG,Baynes JW,Hudson BG.Amadorins:novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999;257(2):251.

[12] Jain SK,Lim G.Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation,protein glycosylation,and (Na+-K+)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes[J]. Free Radical Biol Med,2001;300(3):232.

[13] Voziyan PA,Motz TO,Baynes JW,et al. A post-Amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging Carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation[J]. J Biol Chem,2002;277(5):3397.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 913 页)

中 Survivin 和 Caspase-3 基因表达的研究[J].中华肿瘤防治杂志, 2006;13(19):1464-1467.

[5] Renner K,Amberger A,Konwalinka G,et al. Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells[J]. Biochim Biophys Acta,2003; 1642(1-2):115-123.

[6] Ohyashikl JH,Sashida G,Tauchi T. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia[J]. Oncogene,2002;21(4):1680-1987.

[7] Shay JW,Werbin H,Wright WE. Telomeres and telomerase in human Leukemias[J]. Leukemia,1996;10(8):1255-1261.

[8] Nakajima A,Tauchi T,Sashida G. Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells:possibility of antitelomerase therapy[J]. Leukemia,2003;17(3):1560-1567.

[9] Costas M,Trapp T,Pereda MP,et al. Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF-alpha priming increases glucocorticoid inhibition of TNF-alpha-induced cytotoxicity/apoptosis [J]. Clin Invest,1996;98(6):1409-1416.

[10] Kolb JP. Mechanisms involved in the pro-and anti-apoptotic role of NO in human leukemia[J]. Leukemia,2000;14(9):1685-1694.

[11] Li YH,Yan ZQ,rauner A,et al. Meconium induces expression of inducible NO synthase and activation of NF-kappaB in rat alveolar macrophages[J]. Pediatr Res,2001;49(6):820-825.

(责任编辑:冉明会)