

三七总皂苷通过保护海绵体内皮功能改善糖尿病大鼠勃起功能障碍*

樊静,康简,林帆,苟欣[△]

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016)

摘要:目的 研究三七总皂苷(PNS)对糖尿病勃起功能障碍(ED)大鼠勃起功能的影响。方法 90只雄性SD大鼠注射链脲佐菌素(STZ),构建糖尿病大鼠模型。利用阿朴吗啡诱导阴茎勃起,筛选出糖尿病ED大鼠。经过4周PNS处理后(分低、中、高剂量组),测定各组大鼠海绵体内压(ICP)值和平均动脉压(MAP)。硝酸还原酶法检测海绵体组织一氧化氮(NO)的水平,ELISA检测环磷酸鸟苷(cGMP)以及晚期糖基化总产物(AGEs)的水平。采用免疫组织化学法检测阴茎海绵体内皮细胞中内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)的表达,末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记测定(TUNEL)法检测内皮细胞的凋亡水平。结果 PNS中、高剂量组的ICP值和ICP/MAP值较糖尿病对照组(未经PNS处理的糖尿病大鼠模型)明显升高($P<0.05$)。PNS中、高剂量组阴茎海绵体组织中的eNOS表达以及NO和cGMP水平较糖尿病对照组均有所增加($P<0.05$)。3个PNS治疗组阴茎海绵体的细胞凋亡率与糖尿病对照组相比明显降低($P<0.05$)。结论 PNS通过调节NO/cGMP信号通路和控制AGEs的积聚能够使阴茎海绵体内皮细胞功能恢复,可能有助于改善糖尿病ED大鼠的勃起功能。

关键词:糖尿病;勃起功能障碍;一氧化氮;内皮型一氧化氮合成酶;阴茎海绵体内皮细胞

中图分类号:R691.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)21-2743-04

Panax notoginseng saponins improve the erectile dysfunction in diabetic rats by protecting the endothelial function of the penile corpus cavernosum*

Fan Jing, Kang Jian, Lin Fan, Gou Xin[△]

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Panax notoginseng saponins(PNS) on penile erection in rats with diabetes-associated erectile dysfunction(ED). **Methods** Ninety male Sprague-Dawley rats were established diabetic rats by injecting streptozotocin(STZ), and observing erectile phenomenon by injecting apomorphine. After 4 weeks of PNS treatment(low-dose, medium-dose, high-dose group), erectile function in each group was assessed by intracavernous pressure(ICP) and mean arterial pressure(MAP) measurement. The level of nitric oxide(NO) and cyclic guanosine monophosphate(cGMP) in cavernous tissue were detected. Immunohistochemical staining and TUNEL were performed for detecting endothelial nitric oxide synthase(eNOS) and apoptosis, respectively. **Results** ICP and ICP/MAP ratio were significantly increased in medium-dose and high-dose PNS treated groups compared with the diabetic untreated group($P<0.05$). Compared with the diabetic untreated group, the expression of eNOS and the levels of NO and cGMP were increased in medium-dose and high-dose PNS treated groups($P<0.05$). The apoptosis rate of corpus cavernosum in 3 PNS treatment groups significantly decreased than the diabetic untreated group ($P<0.05$). **Conclusion** PNS can recover the endothelial cell function in corpus cavernosum by adjusting the NO/cGMP pathway and controlling the accumulation of AGEs, and may be used for improving in diabetic ED rats.

Key words: diabetes mellitus; erectile dysfunction; nitric oxide; endothelial nitric oxide synthase; corpus cavernosum endothelium

勃起功能障碍(ED)是男性糖尿病患者常见的慢性并发症之一,严重影响患者的生活质量,且发病率逐渐增加。目前,5型磷酸二酯酶(PDE5)抑制剂治疗ED已显示出良好的效果,但对糖尿病ED则疗效较差。三七总皂苷(PNS)是多年生草本植物三七的活性成分,PNS制剂目前已广泛应用于心血管系统疾病治疗中,并取得较好疗效。对于糖尿病ED,PNS是否具有改善阴茎ED作用,国内外尚未见文献报道。血管注射制剂是以PNS为原料制成的药物,由于吸收较好,越来越广泛地用于临床。因此,本实验主要探索腹腔注射PNS对糖尿病ED大鼠勃起功能的影响及其可能的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 动物 SPF级SD大鼠90只,由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量180~200g,雄性。

1.2 试剂及仪器 链脲佐菌素(STZ)、阿朴吗啡(APO)购自美国Sigma公司,血管通冻干粉剂购自昆明制药,NO试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,大鼠晚期糖基化总产物(AGEs)ELISA试剂盒购自美国IO-TANG公司,大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)ELISA试剂盒购自美国R&D公司,末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记测定(TUNEL)试剂盒购自南京凯基公司,免疫组织化学(SABC法)试剂盒购自北京中杉金桥公司,兔抗鼠eNOS/NOS III多克隆抗体购自美国BD公司,Life Scan血糖仪及配套血糖试纸购自中国上海强生公司,BL-420F数据采集与分析系统购自成都泰盟科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验动物饲养 全部SD大鼠在SPF级条件下饲养,

大鼠自由进食饮水,12 h 光亮,12 h 黑暗,动物饲养环境温度、湿度分别在 20 ℃、60%左右。建模前适应性饲养 1 周,每只大鼠进入研究前进行交配实验,证实均有正常的勃起功能。选取 6 只作为正常对照组,其余 84 只作为糖尿病建模组。

1.3.2 药物溶液配制 STZ 溶液的配制:在避光条件下,将 800 mg 的 STZ 溶解于 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠的缓冲液 (pH=4.0)100 mL 中,配制成浓度为 8 mg/mL 的溶液,现用现配。盐酸阿朴吗啡(APO)溶液的配制:将 4 mg 的 APO 溶解于 0.5 mg/mL 的维生素 C 及生理盐水中,配制成浓度为 40 μg/mL 的溶液。

1.3.3 建立糖尿病 ED 大鼠模型 84 只 SD 大鼠禁食 16 h 后,将配制好的 STZ 溶液按照 60 mg/kg 剂量注射到大鼠腹腔内。从第 4 天开始观察注射 STZ 大鼠症状,并于 STZ 注射 4 d、1 周时经尾静脉采血以血糖测定仪测定血糖。如观察到多食、多饮、多尿症状,毛发缺乏光泽,血糖值大于 16.7 mmol/L 则说明建模成功。注射 STZ 12 周后,按 100 μg/kg 给大鼠注射 APO,观察并记录有无阴茎勃起、勃起次数。以龟头充血和阴茎体增长为阴茎勃起 1 次。未见勃起者为建模成功,筛选出符合实验要求的糖尿病 ED 大鼠。

1.3.4 PNS 处理 从 APO 筛选实验得到的 27 只糖尿病 ED 大鼠中挑选 24 只,并分为 4 组(每组均有 6 只),分别为 PNS 低剂量组、PNS 中剂量组、PNS 高剂量组和糖尿病对照组。腹腔注射血塞通剂量:PNS 低剂量组 50 mg/kg、PNS 中剂量组 100 mg/kg 和 PNS 高剂量组 150 mg/kg。糖尿病对照组和正常对照组注射等体积的生理盐水。每日注射一次,持续 4 周。在给药的第 1 天、2 周、4 周,监测大鼠的血糖和体质量变化。

1.3.5 糖尿病 ED 大鼠模型勃起功能的测定 10%水合氯醛按 100 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠。常规固定,剃毛,消毒。行下腹部正中切口,暴露膀胱和前列腺。显微镜下分离出海绵体神经。沿大鼠阴茎背侧正中剪开皮肤至耻骨联合下方,暴露阴茎海绵体。行颈部的正中切口,暴露气管两侧的颈总动脉。在右侧阴茎根部插入 1 支与压力换能器相连接的 25-G 蝴蝶针,用于监测阴茎海绵体内压(ICP)值。右侧海绵体神经用双极银制电极进行电刺激。用内部充满 250 U/mL 肝素生理盐水的 PE-50 管对大鼠右侧颈总动脉进行插管。PE-50 管与压力换能器相连,记录平均动脉压(MAP)。刺激参数为电压 10 V,频率 20 Hz,波幅 0.2 ms。刺激时间为持续 50 s,间隔 5 min。ICP 与 MAP 的实际压力通过压力换能器转换为数字信号,通过 BL-420F 生物机能实验系统记录 ICP 值和 ICP/MAP 值。

1.3.6 取材及切片 完成勃起功能测试后,于大鼠阴茎根部

剪断,将取下的阴茎组织分成相等长度的两部分。一部分组织用 4%多聚甲醛固定石蜡包埋,制备成 4 μm 的连续切片。另一部分组织称取质量,加入一定量的 PBS(pH=7.4),在 2~8 ℃条件下,用手工匀浆器将标本匀浆充分。离心,收集上清液。分装后保存于-80 ℃冰箱冷冻备用。

1.3.7 NO 水平测定 将保存于-80 ℃冰箱的各组阴茎组织的样本液放置在 2~8 ℃条件下融解备用。用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定阴茎组织中的蛋白浓度。用 NO 试剂盒测定阴茎组织中的 NO 水平。

1.3.8 ELISA 测定 用大鼠 cGMP ELISA 试剂盒测定大鼠阴茎组织内的 cGMP 水平,用大鼠 AGEs ELISA 试剂盒测定大鼠阴茎组织内的 AGEs 水平。采用 Curve Exert 软件绘制 ELISA 标准曲线,根据样品的 OD 值查出相应的浓度。再乘以稀释的倍数,得到样品的实际浓度。

1.3.9 免疫组织化学 采用免疫组织化学 SABC 法检测各组大鼠阴茎海绵体内 eNOS 的表达情况,每张组织切片在 400 倍光学显微镜下取 5 个区域进行拍照记录,使用 Image-Pro Plus 图像分析软件进行图像定量分析。

1.3.10 细胞凋亡检测 采用 TUNEL 评估阴茎海绵体组织的细胞凋亡情况。每张组织切片在 400 倍光学显微镜下选取 5 个区域进行观察,并做数字图像分析。使用 Image-Pro Plus 软件进行细胞计数分析,记录在选定区域内褐染的凋亡细胞数量与总细胞数量,计算凋亡率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,使用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

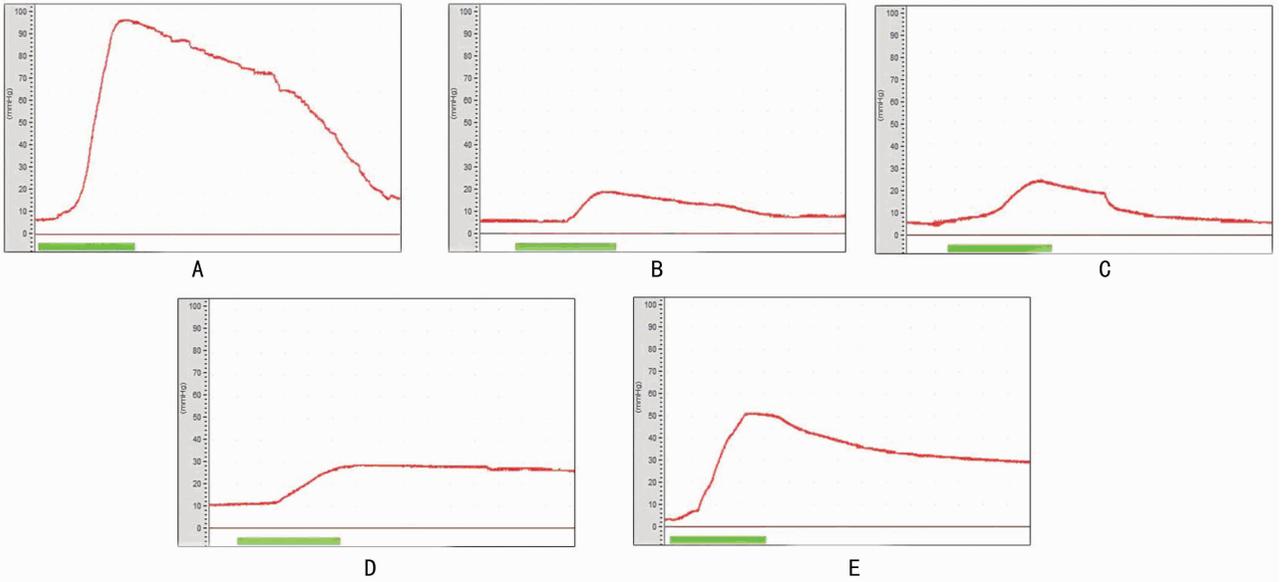
2.1 体质量和血糖水平变化 实验开始、2 周和 4 周各组大鼠的体质量与血糖水平变化结果见表 1。在 4 周的治疗过程中,糖尿病对照组和 3 组 PNS 各剂量组的大鼠体质量均明显低于正常对照组($P < 0.05$)。而在第 4 周时,中剂量和高剂量的 PNS 治疗组的体质量明显高于糖尿病对照组($P < 0.05$)。PNS 各剂量组在 PNS 治疗 4 周后,血糖水平均明显低于糖尿病对照组($P < 0.05$)。

2.2 体内勃起功能测定 电刺激海绵体神经后大鼠 ICP 的变化见图 1。糖尿病对照组与正常对照组比较,基础 ICP 值和最大 ICP 值均明显下降。各组大鼠的 ICP 值和 ICP/MAP 值分析表明,刺激海绵体神经后,糖尿病对照组的 ICP 值和 ICP/MAP 值明显低于正常对照组($P < 0.05$)。而 PNS 中剂量和高剂量组的 ICP 值和 ICP/MAP 值高于糖尿病对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 实验动物在 PNS 治疗前后体质量与血糖情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)			血糖(mmol/L)		
		治疗前	治疗后 2 周	治疗后 4 周	治疗前	治疗后 2 周	治疗后 4 周
正常对照组	6	252.0±11.0	278.0±10.0	311.0±7.0	6.6±0.7	6.5±1.0	6.5±0.8
糖尿病对照组	6	201.0±12.0 ^a	216.0±10.0 ^a	214.0±9.0 ^a	30.0±2.6 ^a	30.3±2.5 ^a	29.5±1.3 ^a
PNS 低剂量组	6	202.0±12.0 ^a	210.0±11.0 ^a	212.0±5.0 ^a	31.0±2.1 ^a	29.3±2.6 ^a	24.9±2.7 ^{ab}
PNS 中剂量组	6	201.0±11.0 ^a	227.0±9.0 ^a	239.0±12.0 ^{ab}	30.3±2.4 ^a	26.4±2.0 ^{ab}	20.7±2.8 ^{ab}
PNS 高剂量组	6	212.0±10.0 ^a	238.0±7.0 ^{ab}	248.0±10.0 ^{ab}	28.9±1.5 ^a	24.2±2.7 ^{ab}	19.9±2.2 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与正常对照组比较;^b: $P < 0.05$,与糖尿病对照组比较。



A: 正常对照组; B: 糖尿病对照组; C: PNS 低剂量组; D: PNS 中剂量组; E: PNS 高剂量组。

图 1 PNS 对糖尿病 ED 大鼠阴茎勃起功能的影响 (n = 6)

2.3 各组 NO 水平 糖尿病对照组的 NO 水平明显低于正常对照组 ($P < 0.05$)。同时, 与糖尿病对照组比较, PNS 高剂量组的 NO 水平明显增加 ($P < 0.05$)。而 PNS 中剂量组的 NO 水平也高于糖尿病对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

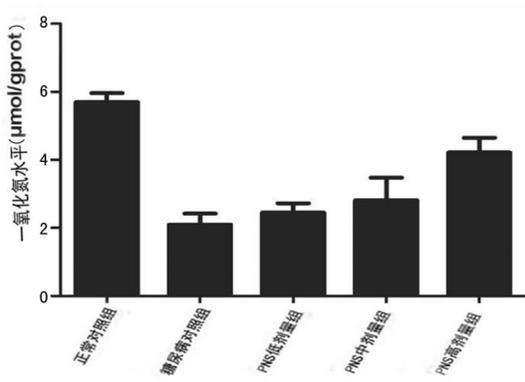
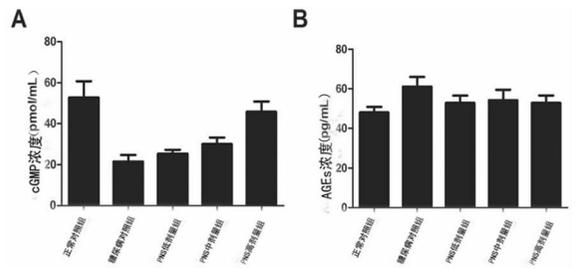


图 2 PNS 对糖尿病 ED 大鼠阴茎海绵体组织中 NO 水平的影响

2.4 cGMP 与 AGEs 水平 糖尿病对照组的 cGMP 水平明显低于正常对照组 ($P < 0.05$)。PNS 中剂量组和高剂量组与糖

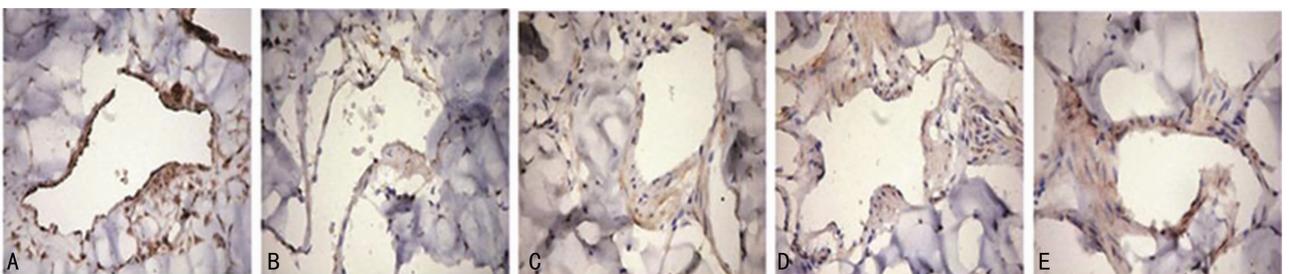
尿病对照组比较明显增加 ($P < 0.05$)。在 PNS 各剂量组中的 AGEs 水平均高于糖尿病对照组 ($P < 0.05$), 但 3 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。



A: cGMP 浓度变化; B: AGEs 浓度变化。

图 3 PNS 对糖尿病 ED 大鼠阴茎海绵体组织中 cGMP 和 AGEs 水平的影响

2.5 eNOS 表达水平 正常对照组 eNOS 呈强阳性, PNS 高剂量组 eNOS 表达呈中度水平, 而 PNS 低剂量组、PNS 中剂量组和糖尿病对照组的 eNOS 表达均呈弱阳性。分析显示, PNS 高剂量组的 eNOS 表达明显高于糖尿病对照组 ($P < 0.05$), 见图 4。



A: 正常对照组; B: 糖尿病对照组; C: PNS 低剂量组; D: PNS 中剂量组; E: PNS 高剂量组。

图 4 PNS 对阴茎海绵体组织 eNOS 表达的影响 (×200)

2.6 细胞凋亡情况 TUNEL 检测细胞凋亡结果。通过

TUNEL 进行细胞凋亡分析, 糖尿病对照组的细胞凋亡率明显

高于正常对照组 ($P < 0.05$)。而 PNS 各剂量组的糖尿病 ED 大鼠海绵体内细胞凋亡率均低于糖尿病对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5。

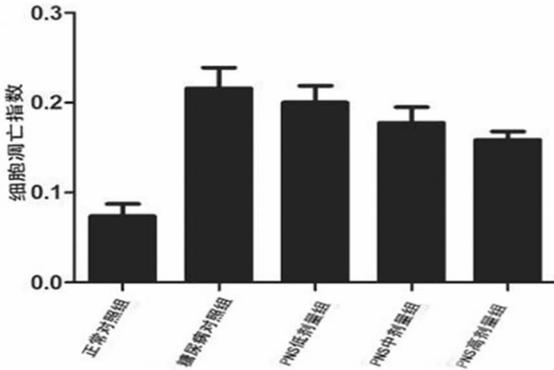


图 5 TUNEL 检测海绵体的细胞凋亡指数差异

3 讨论

研究发现 PNS 在心脑血管系统、神经系统以及抗炎、抗肿瘤等方面均有较好的生物活性^[1-2]。但 PNS 口服吸收不佳, 本实验采用腹腔注射 PNS 的给药途径^[3]。目前记录动物模型阴茎勃起反应的技术较多, 但多数研究者选择客观准确而且简便易行的 ICP 以及 ICP/MAP 值。本研究发现糖尿病对照组基础 ICP 值和最大 ICP 值均明显下降。而经 PNS 处理的各剂量组的 ICP 值和 ICP/MAP 值与糖尿病对照组比较均有不同程度的上升, 说明 PNS 具有恢复糖尿病 ED 大鼠的勃起功能的作用。推测可能是通过改善了与糖尿病 ED 有紧密关联的阴茎海绵体内皮细胞功能^[4-5]。同时, 糖尿病 ED 患者阴茎海绵体组织中 NO/cGMP 信号通路损害参与糖尿病 ED 的进展^[6]。本研究也发现糖尿病 ED 大鼠 NO, cGMP 以及 eNOS 的水平明显降低。而给予糖尿病 ED 大鼠 PNS 治疗 4 周后, 阴茎海绵体组织中 eNOS, NO 和 cGMP 的水平明显增加。PNS 对糖尿病 ED 大鼠的这种影响很有可能是来源于人参皂苷 Rg1 的功能。人参皂苷 Rg1 作为 PNS 的主要活性成分之一, 能够诱导 eNOS 的磷酸化和产生 NO, 调节血管的舒张功能^[7]。曾有研究发现, 人参皂苷 Rg1 能够下调的 miRNA-214 在人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的表达的, 从而增加 eNOS 蛋白与基因的表达, 促进 NO 的生成^[8]。以上的结果表明, PNS 能够促进阴茎海绵体内皮细胞中 eNOS 的活性, 调节 NO/cGMP 信号通路。虽然目前关于导致糖尿病患者的血管以及阴茎中血管内皮功能障碍的具体机制并不明确, 但是高血糖诱导的内皮功能障碍被认为是其主要原因。血糖水平的升高会促进 AGEs 的形成, AGEs 可以引起钙离子外流受阻, 影响阴茎海绵体血管舒张, 导致糖尿病 ED^[9]。所以有效控制 AGEs 在阴茎海绵体中积聚, 可以避免糖尿病 ED 的发生。本研究发现, PNS 可以降低糖尿病 ED 大鼠的血糖水平和阴茎海绵体的 AGEs 水平。研究证实, 糖尿病大鼠与正常大鼠比较, 阴茎海绵体组织内凋亡细胞的比例明显增加^[10]。最近的研究表明, PNS 可以通过抑制 TNF- α 和 caspase-3 的表达增加 Bcl-2 的表达^[11]。PNS 也能通过清除 ROS 和调节 Bcl-2/Bax 途径对兔骨髓基质干细胞的氧化应激性损伤和细胞凋亡起到保护作用^[12]。本实验发现, PNS 各剂量组的糖尿病 ED 大鼠的阴茎海绵体内细胞凋亡率均低于糖尿病对照组, 表明 PNS 具有对抗糖尿病 ED 大鼠阴茎组织细胞凋亡的作用, 具体机制还需要进一步的探索。综

上, 本研究发现 PNS 通过调节 NO/cGMP 信号通路和控制 AGEs 的积聚, 降低阴茎海绵体组织内细胞凋亡, 明显改善糖尿病 ED 的勃起功能, 这对于糖尿病 ED 的中药治疗又提供一个新的思路。

参考文献:

- [1] Huang YS, Yang ZC, Yan BG, et al. Improvement of early postburn cardiac function by use of Panax notoginseng and immediate total eschar excision in one operation[J]. Burns, 1999, 25(1): 35-41.
- [2] Chan P, Thomas GN, Tomlinson B. Protective effects of trilinolein extracted from panax notoginseng against cardiovascular disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(12): 1157-1162.
- [3] Han M, Fang XL. Difference in oral absorption of ginsenoside Rg1 between in vitro and in vivo models[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(4): 499-505.
- [4] De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(5): 963-974.
- [5] Musicki B, Burnett AL. Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction[J]. Int J Impot Res, 2007, 19(2): 129-138.
- [6] Angulo J, González-Corrochano R, Cuevas P, et al. Diabetes exacerbates the functional deficiency of NO/cGMP pathway associated with erectile dysfunction in human corpus cavernosum and penile arteries[J]. J Sex Med, 2010, 7(2 Pt 1): 758-768.
- [7] Leung KW, Cheng YK, Mak NK, et al. Signaling pathway of ginsenoside-Rg1 leading to nitric oxide production in endothelial cells [J]. FEBS Lett, 2006, 580(13): 3211-3216.
- [8] Chan LS, Yue PY, Mak NK, et al. Role of microRNA-214 in ginsenoside-Rg1-induced angiogenesis[J]. Eur J Pharm Sci, 2009, 38(4): 370-377.
- [9] Singh R, Barden A, Mori T, et al. Advanced glycation end-products: a review [J]. Diabetologia, 2001, 44(2): 129-146.
- [10] Alici B, Gümüstas MK, Ozkara H, et al. Apoptosis in the erectile tissues of diabetic and healthy rats[J]. BJU Int, 2000, 85(3): 326-329.
- [11] Zhang Y, Ye QF, Lu L, et al. Panax notoginseng saponins preconditioning protects rat liver grafts from ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(2): 207-212.
- [12] Qiang H, Zhang C, Shi ZB, et al. Protective effects and mechanism of Panax Notoginseng saponins on oxidative stress-induced damage and apoptosis of rabbit bone marrow stromal cells [J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(6): 525-530.