

伊木萨克片对半去势雄性大鼠勃起功能的影响

阿地力江·伊明¹, 徐磊², 张盼盼¹, 陈蓉³, 沙地克·沙吾提¹, 茹仙古丽·莎吾尔⁴, 哈木拉提·吾甫尔

5**

1 新疆医科大学人体解剖学教研室(乌鲁木齐 830011); 2 江苏省连云港市第二人民医院, 3 新疆医科大学
科研中心; 4 和田地区维吾尔医医院(和田 848000); 5 新疆医科大学维吾尔医学系(乌鲁木齐 830011)

摘要 目的 研究伊木萨克片对半去势雄性大鼠勃起功能的影响。**方法** 从 60 只性功能正常的
雄性 SD 大鼠中随机取出 10 只为正常对照组, 余 50 只行右侧睾丸摘除后随机分为半去势空
白组、男宝对照组、伊木萨克低、中、高剂量组, 经药物干预 6 周后行阿朴吗啡

(Apomorphine, APO) 勃起试验, 镜检阴茎海绵体的形态改变, 采用免疫组化 SP 法检测各组
大鼠阴茎组织中 nNOS、eNOS 蛋白表达。**结果** (1) 半去势空白组勃起潜伏期显著长于正常
组 ($P < 0.01$), 伊木萨克低、中、高剂量组勃起潜伏期显著短于去势空白组和男宝对照组
($P < 0.05$), 但长于正常组 ($P < 0.05$), 伊木萨克片低、中、高剂量组之间差异则无统计学
意义 ($P > 0.05$); (2) 半去势空白组阴茎组织中 eNOS、nNOS 蛋白表达低于正常对照组 ($P < 0.05$),
伊木萨克低、中、高剂量组大鼠阴茎组织中 eNOS、nNOS 蛋白表达均显著高于半去势空白组
和男宝对照组 ($P < 0.05$), 其中 eNOS 在伊木萨克片中剂量组显著高于正常对照组 ($P < 0.01$),
而伊木萨克片低、高剂量组与正常对照组之间的差异则无统计学意义 ($P > 0.05$, $P > 0.05$);
nNOS 在伊木萨克片低、中、高剂量组与正常对照组及伊木萨克片低、中、高剂量组之间差
异无统计学意义 ($P > 0.05$) **结论** (1) 半去势可显著影响雄性大鼠的阴茎勃起功能 (2) 伊
木萨克片干预后能够显著增强半去势大鼠的阴茎勃起功能, 其机制可能和增加阴茎组织中
eNOS、nNOS 蛋白表达有关。

关键词 伊木萨克片; 半去势; 内皮源性一氧化氮合酶; 神经源性一氧化氮合酶

The effects of the Yimusake tablet on the erectile function of hemicastration male
rats.

Adilijiang Yiming¹, Xu Lei², Shadike, Chen Rong³, Shawuti¹ Ruxianguli Shawuer⁴,
Hamulati Wufuer⁵

(1. Department of Human Anatomy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 2. second Hospital of
Lian yun gang, Lianyungang 3 Department of recherche, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 4
Hotan Region Uyghur Medecin Hospital, Hotan 848000; 5. Department of Uyghur Medicine, Medical
University, Urumqi 830011 China)

Objective: To study the effect of Yimusake tablet on the erectile function of hemicastration male rats. **Methods:** Sixty male sprague-dwaley rats were used for the study, ten of them were randomly selected for the control group. The other fifty rats were removed the right testes and then divided into five groups including the blank group, Nanbao group, Yimusake low-dose group, Yimusake medium-dose group and Yimusake high-dose

*基金项目: 新疆科技厅重点实验室开放项目 (No: XJDX0208-2006-04) 与新疆高校科研计划科学研究重点项目 (No: XJEDU2006I38) 作者简介: 阿地力江·伊明 (1968-), 男 (维吾尔族), 教授, 博士后 (在读), 硕导, 研究方向: 中维西医与生殖健康 E-mail: Adljym@yahoo.com.cn
通讯作者: 哈木拉提·吾甫尔 (1963-), 男 (维吾尔), 教授, 主任医师, 博导, 研究方向: 中维西医干预重大疾病

group. After drug treatment for six weeks later, All of the rats were injected with apomorphine to test their erectile function., and observed the morphology of penis under microscope. At last, the expression of eNOS and nNOS were detected by means of SP immunohistochemistry in the corpus cavernosum tissue of rats of each group. **Result:** (1) The erectile incubation period of blank group was longer than normal group ($P < 0.01$). The erectile incubation period of Yimusake group was significantly shorter than blank group and Nanbao group ($P < 0.01$), but longer than normal group ($P < 0.01$). The three Yimusake groups had no significant difference ($P > 0.05$). (2) The expression of eNOS and nNOS in the blank group were lower than normal group ($P < 0.05$). The expression of eNOS and nNOS in the Yimusake groups were higher than blank group and Nanbao group ($P < 0.05$). The expression of eNOS in the Yimusake middle-dose group was higher than the normal group ($P < 0.01$). But there was no significant in low-dose and high-dose group ($P > 0.05$). The expression of nNOS in the three Yimusake group had no significant difference ($P > 0.05$). And The expression of nNOS between the three Yimusake groups and normal group had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** (1) Hemicastration can influence erectile capability of male rats and lead to the decrease of sex function. (2) The Yimusake can elevate erectile capability and sex function, which due to the increase of eNOS and nNOS.

Key words: Yimusake tablet; hemicastration; endothelial nitric oxide synthase ; neuropathic nitric oxide synthase

近年来因睾丸损伤、睾丸萎缩、增龄及性腺功能低下等原因导致的性功能减退及阴茎勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 日益受到重视。对此类患者给予睾酮替代治疗可明显改善其勃起功能, 但同时睾酮对身体的多个系统或器官可产生不良影响, 在长期睾酮替代治疗时, 最重要的是肝功能、脂质代谢和前列腺最可能发生不良反应^[1-2]。伊木萨克片是新疆和田地区维吾尔医院的名老维医多年临床经验总结出来的经典方剂, 在临床使用过程中对阳痿早泄已取得较好的疗效。故本研究参考罗琼的方法^[3], 对雄性大鼠行单侧去势手术, 用该药进行干预后, 进行 APO 勃起试验, 并对阴茎海绵体组织的形态改变与阴茎组织中神经型一氧化氮合酶 (Neuropathic nitric oxide synthase, nNOS) 与内皮型一氧化氮合酶 (Endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 进行了检测, 以探讨半去势后雄性大鼠阴茎勃起功能的改变及维药伊木萨克片可能的治疗作用与机制, 为临床应用提供可靠的实验依据。

材料和方法

一、试验动物和试剂

(一) 试验动物

具有正常性功能的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只 (由交配实验证实), 体重 $197 \pm 16\text{g}$, 由新疆医科大学实验动物中心提供。实验前适应性饲养一周, 大鼠自由饮水、进食, 12/12 小时昼夜交替饲养, 动物饲养环境温度、湿度在 20°C 、50% 左右。

(二) 药物与试剂

伊木萨克片 (和田维吾尔药业有限责任公司提供, 批准文号: 国药准字 Z 6 5 0 2 0 1 4 4), 男宝 (天津力生制药股份有限公司, 生产批号 Z12020427); 兔抗鼠 eNOS 抗体 (Santa Cruz 公司)、兔抗鼠 nNOS 抗体 (Cell Signalling 公司)、免疫组化试剂盒 (北京中衫金桥生物技术有限公司)、DAB 显色系统 (北京中衫金桥生物技术有限公司)、阿朴吗啡 (Apomorphine, APO, 美国 Sigma 公司),

二、方法

(一) 半去势及分组:

从 60 只雄性 SD 大鼠中随机取出 10 只为正常对照组, 余行去势手术摘除右侧睾丸, 具体方法: 大鼠称重, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 $50\text{mg}/\text{kg}$ 麻醉后, 剪去手术野周围的毛发, 固定四肢于鼠台上, 酒精消毒, 在阴囊部位作 1cm 切口, 分离右侧睾丸及附睾, 在附睾头尾之间结扎后摘除睾丸。逐层缝合皮肤, 术后肌注青霉素 $2\text{万 u}/\text{kg}$, 每天一次, 共注射 7d。半

去势大鼠再按随机数字表,分为半去势空白组、和伊木萨克低、中、高剂量组、男宝对照组,每组 10 只。正常对照组,在阴囊部位作 1cm 切口,行假手术后,逐层缝合皮肤,并肌注青霉素,方法同上。

(二) 给药:

伊木萨克组低、中、高剂量通过人鼠等效剂量换算后分别以 78mg/kg, 156mg/kg, 313mg/kg 剂量给药,每日 1 次。男宝对照组予男宝 94mg/kg, 每日 2 次。正常对照组与半去势空白组予以等容积的蒸馏水。各组均以灌胃方式给药,时间 6 周。

(三) APO 勃起试验

干预 6 周后对上述 6 组大鼠行 APO 勃起试验。参考 Heaton 等^[4]的方法,将雄性大鼠放在玻璃箱中适应环境 10 分钟,室内保持安静,灯光调暗,仅够观察即可,然后每只大鼠在颈项皮肤松弛处注射阿朴吗啡(APO) 90 μ g/kg (APO 溶解于 0.5mg/kg 的维生素 C 与生理盐水中,调整体积为 5ml/kg),每只大鼠于注射后立刻观察阴茎勃起 30 分钟。

阴茎勃起的判定标准:表现活动增加,毛发竖起,伸身,打呵欠;勃起时呈蹲踞位,阴茎体末端露出,舔阴茎头,臀部有节律地抖动。阴茎龟头充血及末端阴茎体出现为阴茎勃起一次。

(四) 取材及切片:

大鼠药物干预 6 周后,用 1%戊巴比妥腹腔内注射麻醉,在电刺激致阴茎海绵体勃起状态下从根部取阴茎组织,洗去血渍,并除去残余皮肤、筋膜,取中段阴茎组织,置于 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋保存,制备 4 μ m 厚连续切片,HE 常规染色,SP 法免疫组织化学染色检测 eNOS、nNOS,光镜下观察并摄片,棕黄色为阳性染色。

(五) 统计学处理

所有数据中计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{X}\pm S$)进行统计描述,多组之间数据比较采用单因素方差分析(one way analysis of variance, one way ANOVA),使用 SPSS 13.0 统计软件处理。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

结 果

一、APO 勃起试验

结果显示(表 1)半去势后勃起潜伏期较正常对照组显著延长($P<0.01$),而经伊木萨克片不同剂量干预后均较半去势空白组显著缩短($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$),与正常对照

组间则无显著 ($P>0.05$)，伊木萨克片各剂量组之间差异亦无统计学意义 ($P>0.05$)；同时可见男宝对照组勃起潜伏期长于伊木萨克片中剂量组及正常对照组 ($P<0.05$)。

表 1 各组 APO 勃起时间比较

组别	勃起时间(秒)
正常对照组	457.5±185.2
半去势空白组	735.2±112.8**
男宝对照组	631.5±84.4*
伊木萨克低剂量组	533.6±145.3###
伊木萨克中剂量组	494±88### [△]
伊木萨克高剂量组	588.8±145.1 [#]

与正常对照组比* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与半去势空白组比[#] $P<0.05$ ，
$P<0.01$ ；与男宝对照组比[△] $P<0.05$

二、大鼠阴茎 HE 切片观察结果

正常大鼠阴茎 HE 切片：低倍镜下自上而下即自阴茎背侧向腹侧，依次可见位于最上端的阴茎背静脉，腔内有红细胞。其下为左右阴茎海绵体连接部位，未见明显的阴茎海绵体间隔。上端圆形结构为尿道海绵体，中间可见一不规则空腔，为尿道，尿道海绵体周围有较为致密的结缔组织包绕。高倍镜下可见正常大鼠阴茎海绵体中含有大量血窦，血窦内壁表面附着有扁平的内皮细胞，血窦小梁含有大量平滑肌及胶原纤维。

半去势空白组大鼠阴茎 HE 切片中，阴茎平滑肌细胞数量减少，胶原纤维密度增加，阴茎间质血管管壁增厚，呈纤维样变，管腔不规则；伊木萨克片组大鼠阴茎 HE 切片中，阴茎平滑肌细胞数量较半去势组有所增加，但略少于正常对照组，胶原纤维密度较半去势空白组有所减少。

三、免疫组织化学结果

(一) 大鼠阴茎组织中 eNOS 的表达

eNOS 主要表达在海绵体血管、血窦内皮细胞的细胞核和细胞浆中，阳性表达呈散在分布的棕黄色颗粒，结果显示 eNOS 在各组大鼠阴茎组织中均有表达 (表 2)，其中在半去势组较正常对照组显著降低 ($P<0.01$)，而经伊木萨克片以低、中、高剂量组分别干预 6 周后 eNOS 蛋白的表达均较半去势空白组显著增强 ($P<0.01$)，其中伊木萨克片中剂量组亦显著高于正常对照组，伊木萨克片低、高剂量组与正常对照组之间的差异则无统计学意义

($P>0.05$)；而男宝对照组的阳性表达率虽显著高于半去势空白组 ($P<0.05$)，但亦低于正常对照组与伊木萨克片各剂量组 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠阴茎组织中 eNOS、nNOS 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	eNOS 阳性面积 (%)	nNOS 阳性面积 (%)
正常组	72.5±5.9	75±8.3
半去势组	46.7±11.5 ^{**△}	61.1±9.3 ^{**}
男宝组	55.6±10.1 ^{**#}	61.3±5.8 ^{**}
伊低组	71.7±9.8 ^{##△△}	77.2±6.2 ^{##△△}
伊中组	83±5.9 ^{**#}	80.5±11.9 ^{##△△}
伊高组	77.8±5.7 ^{##△△}	80±5.3 ^{##△△}

与正常对照组比* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与半去势空白组比[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ，与男宝对照组比[△] $P<0.05$ ，^{△△} $P<0.01$

(二) 大鼠阴茎组织中 nNOS 的表达

nNOS 主要分布在阴茎海绵体动脉周围、阴茎海绵体血窦壁、尿道海绵体及阴茎背动脉周围的细胞核和细胞浆中，阳性表达呈散在分布的棕黄色颗粒。结果显示 (表 2) nNOS 虽在各组大鼠阴茎组织中均有表达，但半去势后较正常对照组显著降低 ($P<0.01$)，经伊木萨克片低、中、高剂量组分别干预后均较半去势空白组显著增强 ($P<0.01$)，与正常对照组之间比较后，组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)，伊木萨克片各剂量组之间亦无显著性差异 ($P>0.05$)；男宝对照组与半去势空白组之间无显著性差异 ($P>0.05$)，同时显著低于正常对照组与伊木萨克片各剂量组 ($P<0.01$)。

讨 论

伊木萨克片是维吾尔医药学发祥地新疆和田地区多名老维医挖掘维吾尔医药千年传统药方而成，其以维吾尔医理论为指导，由麝香、龙涎香、牛鞭、罌粟壳、西红花、乳香、丁香等 11 味药组方而成，药性干热，适用于因湿寒属性偏胜而致的异常黏液质性阳痿、早泄等病证，该药可燥湿驱寒，恢复机体体液与气质平衡，发挥养肝益心、补肾壮阳、益精固涩之功效，被称为维吾尔医药中的“伟哥”。伊木萨克片在临床上治疗勃起功能障碍已取得较好疗效，我们在前期研究中，发现该药治疗糖尿病性 ED 大鼠模型具有显著治疗效果^[5-6]，与此同时还发现该药对半去势所致的性功能减退模型亦可减缓因半去势所致的对侧睾丸的代

偿性增大,并可提高性附属腺系数,提高外周血中雄激素含量,并发挥壮阳作用^[7],但其作为一复方药物,其作用可能是多靶点的,故本研究就半去势后对大鼠勃起功能的影响进行初步研究的基础上,就该药对 NO-cGMP 转导通路可能的调节机制进行了初步的研究。

APO 为多巴胺受体激动剂,它可兴奋中枢神经系统中与性有关的多巴胺受体,可提高勃起兴奋性,并通过副交感神经丛扩张阴茎海绵体血管而引发勃起^[8]。Heaton 等^[9]报道注射 APO 可引起正常大鼠的 100%阴茎勃起,此现象可作为评价阴茎勃起功能的理想指标。本研究用 90 μg/kg APO 诱发大鼠阴茎勃起,结果显示正常对照组大鼠与半去势空白组大鼠均可 100%勃起,但半去势空白组勃起时间较正常对照组显著延长 ($P<0.01$),提示半去势可使大鼠对性刺激的反应变慢,从而延迟其勃起时间,致性功能减退。伊木萨克片各剂量组的勃起时间较半去势空白组显著缩短 ($P<0.05$),提示伊木萨克片可缩短勃起潜伏期,增强性欲,改善勃起功能,发挥壮阳作用。

本实验中可见半去势空白组大鼠阴茎组织中 eNOS 和 nNOS 蛋白表达显著下降,提示半去势后勃起功能的减退可能和阴茎组织中 eNOS 和 nNOS 蛋白表达下降,并进一步导致 cGMP 含量下调有关。但就半去势后所导致的 eNOS 和 nNOS 蛋白表达下降而言,可能和去势后组织的损伤通过上行神经传递至中枢神经系统,同时,因性激素的合成能力下降,引起血中睾酮水平的降低,作为信号传递至大脑、下丘脑及垂体,大脑、下丘脑释放某些递质和体液因子,对阴茎组织中的 eNOS 和 nNOS 进行调节,使其表达降低有关。经维药伊木萨克片进行 6 周干预后,伊木萨克片各剂量组的 eNOS、nNOS 蛋白表达显著高于半去势空白组 ($P<0.05$),提示该药可通过提高阴茎组织中 eNOS、nNOS 蛋白表达而发挥作用,究其具体机制而言,可能和 eNOS、nNOS 蛋白表达升高,从而增加阴茎组织中 NO 的生成量,通过激活 L Arg-NO-cGMP 转导通路,最终提高 cGMP 含量,影响细胞内钙离子浓度有关,从而促进阴茎血管及海绵体平滑肌舒张,使阴茎勃起,但其具体经过什么途径调节 eNOS、nNOS 蛋白表达尚需通过进一步研究来探索,至于该药是否还可通过对 PDE₅ 的调节作用而实现多靶点作用机制,尚有待于进一步研究。

参考文献

- 1 潘连军,夏欣一 雄激素缺乏与勃起功能障碍,中华男科学杂志 2006; 12(11): 1030-1034
- 2 郭应禄,胡礼泉.男科学.北京:人民卫生出版社,2005:1474.
- 3 罗琼,黄晓兰,等.枸杞多糖对雄性大鼠性功能及生殖功能的影响.营养学报 2006; 28(1): 62-65

- 4 Heaton JPW, Varrin S, Morales A. The characterization of bio-assay of erectile function in rat model. *JUrol*, 1991, 145:10-99
- 5 阿地力江·伊明, 张盼盼, 茹仙古丽·沙吾尔, 等. 伊木萨克片对糖尿病性 ED 大鼠阴茎组织中 eNOS 和 nNOS 的影响. *中国男科学* 2008; 22(8) 10-15
- 6 阿地力江·伊明, 张盼盼, 凯赛尔江·多来提, 等. 伊木萨克片对 DM 性 ED 大鼠外周血中性激素水平的影响. *中国男科学* 2008; 22(8):16-19
- 7、徐磊, 张盼盼, 阿地力江·伊明, 等. 伊木萨克片对半去势雄性大鼠睾丸及附属腺的影响. *新疆医科大学学报*, 2009; 32(6): 706-608
- 8 郑少斌. 老年人勃起功能障碍的药物治疗进展. *中国处方药* 2005; 34(1):47-50.
- 9 Heaton JP, Varrin S. The impact of alcohol ingestion on erections in rats as measured by a novel bioassay. *J Urol*, 1991, 145(1):192-194.