

基于转录组测序技术分析山药蛋白防治糖尿病性勃起功能障碍的作用机制^Δ

邢欣^{*}, 赵大庆, 王思明, 于士婷, 李懿轩, 刘美辰[#](长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117)

中图分类号 R285;R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)23-2859-10

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.23.08



摘要 目的:研究山药蛋白(DOT)防治糖尿病性勃起功能障碍(DIED)的潜在作用机制。方法:采用高糖高脂饲料+腹腔注射链脲佐菌素(40 mg/kg)的方法复制DIED大鼠模型。实验设置正常对照组(生理盐水),模型组(生理盐水),DOT低、中、高剂量组(0.3、0.6、0.9 mg/kg)和西地那非组(阳性对照,4.4 mg/kg),每组9只大鼠。在糖尿病模型已建立成功、开始诱导DIED发生的阶段,各组大鼠开始灌胃相应溶液,每天1次,连续11周。测定大鼠体质量、空腹血糖(FPG)值、勃起次数、勃起率、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(IR)以及阴茎海绵体组织中内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、环磷酸鸟苷(cGMP)含量,以评价DOT对DIED模型大鼠的干预作用。选择30 mmol/L葡萄糖诱导48 h建立高糖损伤小鼠海绵体内皮细胞(MCECs)模型,并给予125、250、500 μg/mL DOT进行干预,然后检测细胞活力,以评价DOT对高糖损伤MCECs的影响。继而采用转录组测序技术分别筛选正常MCECs与高糖损伤MCECs、高糖损伤MCECs与250 μg/mL DOT处理的MCECs中的差异表达基因,对差异表达基因进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析;分析两组细胞间共同的差异表达基因,并选择6个关键基因在mRNA水平上进行验证。结果:不同剂量DOT对DIED模型大鼠体质量降低、FINS和IR升高、勃起次数减少、勃起率降低以及阴茎海绵体组织中eNOS、cGMP含量降低均有不同程度的逆转作用,其中高剂量DOT作用后DIED模型大鼠的上述指标变化均被显著逆转($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。125、250、500 μg/mL DOT均可显著提高高糖损伤MCECs的活力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。转录组测序结果表明,与正常MCECs比较,高糖损伤MCECs中共有48个差异表达基因;与高糖损伤MCECs比较,DOT处理的MCECs中共有779个差异表达基因;两组差异表达基因在生物学过程注释中均以细胞过程为主、在细胞组分注释中均以细胞部分为主、在分子功能注释中均以结合分子功能为主,并主要富集在细胞外基质受体相互作用通路、错配修复通路、磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B(PI3K-Akt)信号通路等。在两组差异表达基因中,共得到*Aldh1a1*、*Abcc5*、*Tac1*等13个共同的差异表达基因,DOT均可显著下调高糖损伤MCECs中上述共同差异表达基因的表达。经验证,DOT可以显著逆转高糖损伤MCECs中关键基因*TGF-β₃*、*Txnip*、*Aldh1a1*、*Loxl1*、*Mt1*、*Mt2*的mRNA表达。结论:DOT对DIED模型大鼠的症状具有改善作用;其作用机制可能与抑制纤维化、降低氧化应激等生物学途径,从而改善海绵体内皮功能有关。

关键词 山药蛋白;糖尿病性勃起功能障碍;转录组测序技术;纤维化;氧化应激;差异表达基因

Analysis of the Mechanism of Yam Protein in the Prevention and Treatment of Diabetes-induced Erectile Dysfunction Based on RNA-Seq Technology

XING Xin, ZHAO Daqing, WANG Siming, YU Shiting, LI Yixuan, LIU Meichen (Jilin Institute for Ginseng Science Research, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the potential mechanism of yam protein (DOT) in the prevention and treatment of diabetes-induced erectile dysfunction (DIED). METHODS: DIED model was induced by high-glucose and high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (40 mg/kg). The experiment was set up in the normal control group (normal saline), model group (normal saline), DOT low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.3, 0.6, 0.9 mg/kg), sildenafil group (positive control, 4.4 mg/kg), with 9 rats in each group. In the stage of successful establishment of diabetes model and initiation of inducing DIED, rats in each group were given relevant solution intragastrically, once a day, for consecutive 11 weeks. Body weight, fasting plasma glucose (FPG), the times and rate of penile erection, fasting insulin (FINS), insulin resistance index (IR), the contents of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in penile cavernous tissue were determined so as to evaluate the intervention effects of DOT on DIED model rats. High-glucose damaged mice cavernous endothelial cells (MCECs) model was induced by 30 mmol/L glucose for 48 h, and then give DOT 125, 250, 500 μg/mL.

Δ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20190101010JH)

* 硕士研究生。研究方向:中药转录组学与蛋白质组学。E-mail: xingxin0902@163.com

通信作用:副研究员,博士。研究方向:中药有效成分及其传统功效。E-mail: liumc0367@163.com

The cell viability was detected so as to evaluate the effects of DOT on high-glucose damaged MCECs model. RNA-Seq technology was adopted to screen the differentially expressed genes between normal MCECs and high-glucose damaged MCECs, high-glucose damaged MCECs and MCECs treated

with 250 $\mu\text{g/mL}$ DOT. Gene ontology (GO) function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed for differentially expressed genes. The common differentially expressed genes between 2 groups were analyzed, and mRNA expressions of six key genes were validated. RESULTS: Different doses of DOT could reverse the reduction of body weight, the increase of FINS and IR, the reduction of the times and rate of penile erection, the decrease of eNOS and cGMP contents in penile cavernous tissue of DIED model rats; above indexes of DIED model rats were reversed significantly after treated with high-dose of DOT ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 125, 250, 500 $\mu\text{g/L}$ DOT could significantly improve the activity of high-glucose damaged MCECs ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). RNA-Seq technology showed that compared with normal MCECs, a total of 48 differentially expressed genes were found in high-glucose damaged MCECs. Compared with high-glucose damaged MCECs, a total of 779 differentially expressed genes were found in MCECs treated with DOT. The differentially expressed genes of 2 groups were mainly cellular process in biological process annotation, cellular part in cell component annotation and binding molecular function in molecular function annotation, which were mainly enriched in extracellular matrix receptor interaction pathway, mismatch repair pathway, phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B (PI3K-Akt) signal pathway and so on. Among differentially expressed genes of 2 groups, 13 common differentially expressed genes such as *Aldh1a1*, *Abcc5*, *Tac1* were found. DOT could significantly reverse the expression of the above common differentially expressed genes in high-glucose damaged MCECs. After validation, DOT could significantly reverse the mRNA expression of *TGF- β_3* , *Txnip*, *Aldh1a1*, *Loxl1*, *Mt1* and *Mt2* in high-glucose damaged MCECs. CONCLUSIONS: DOT could improve the symptom of DIED model rats, the mechanism of which may be related to biological pathway of inhibiting fibrosis and reducing oxidative stress, so as to improve the endothelial function of cavernous body.

KEYWORDS Yam protein; Diabetes-induced erectile dysfunction; RNA-Seq technology; Fibrosis; Oxidative stress; Differentially expressed genes

糖尿病性勃起功能障碍(diabetic erectile dysfunction, DIED)是糖尿病的常见并发症,发病率高达50%~75%,严重影响了患者的生活质量^[1-3]。高血糖引起的机体氧化应激、纤维化是致使内皮功能障碍,进而诱发DIED的重要原因^[4]。然而,由于内皮功能障碍患者的内源性一氧化氮(NO)生成率较低,致使治疗勃起功能障碍的“黄金药物”——5型磷酸二酯酶抑制剂对DIED的疗效较差^[5-7]。因此,研发可有效防治DIED的新型药物具有重要意义。

山药是薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的根茎,入肾经,是《金匱要略》《圣济总录》等医学经典著作中治疗阳痿、消渴等病症的临床常用药^[8-10]。本课题组前期研究发现,山药总蛋白能够通过改善肾虚模型大鼠睾丸组织纤维化和氧化应激,发挥治疗肾虚型勃起功能障碍的作用^[11]。然而,目前关于山药蛋白防治DIED、改善内皮功能的研究几近空白,且发挥作用的有效物质基础尚不明确。在以往的研究中,多数是以人脐静脉内皮细胞作为研究高糖所致内皮功能损伤的体外模型,但其并不能准确地模拟海绵体内皮细胞的微血管环境。因此,本研究以从山药总蛋白中分离、纯化得到的高纯度山药蛋白——DOT为研究对象,通过建立大鼠DIED模型,考察DOT对模型大鼠的干预作用,以及DOT对模型大鼠内皮功能的影响;在此基础上,采用Matrigel 3D技术分离、培养小鼠海绵体内皮细胞(MCECs),然后利用高糖诱导MCECs损伤,在体外模拟糖尿病诱导的内皮功能障碍模型,探讨DOT对高糖损伤MCECs的恢复作用;然后,进一步采用转录组测序(RNA-Seq)技术,从分子水平分析DOT对内皮功能的保

护作用机制,从改善内皮功能角度为DOT防治DIED的新治疗靶点研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

AL204型电子天平、FE20型pH计均购自德国Mettler-Toledo公司;Mini Protean型蛋白电泳仪、CFX型实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)仪购自美国Bio-Rad公司;iBrightTMFL1000型凝胶成像系统、ACCU-CHEK型血糖仪均购自上海罗氏制药有限公司;3111型CO₂细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司;EVOS型数码倒置显微镜购自美国AMG公司;Infinite 200 PRO型酶标仪购自美国Life Sciences公司;HiSeq 2500型基因测序仪购自美国Illumina公司;EVOS FL Auto型全自动荧光显微镜购自美国Life Technologies公司;WP-UO-YJ-40型超纯水机购自四川沃特尔水处理设备有限公司。

1.2 主要药品与试剂

DOT(批号CM202010003,纯度99.9%)由长春中医药大学中医药大健康创新中心制备;乙二胺四乙酸(EDTA,批号20191221)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号20200428)均购自北京索莱宝科技有限公司;一氧化氮合酶(eNOS)、环磷酸鸟苷(cGMP)、胰岛素酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒(批号均为202104)均购自上海优选生物科技有限公司;MCECs完全培养基(批号WH01112005XP)、Hank's平衡盐溶液(批号WH0111-2005XP)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;CCK-8检测试剂盒(批号I02020141G14)购自美国Invigentech公司;M199培养基(批号RNBJ1753)、青霉素-链霉素双

抗(批号 A5955)、D-葡萄糖(批号 SLCC4951)、链脲佐菌素(STZ,批号 WXBD4533V)、阿扑吗啡(APO,批号 SLCB4167,纯度 $\geq 98.5\%$)均购自美国 Sigma 公司; Matrigel 基质胶(批号 0048009)购自美国 Corning 公司;兔源血小板内皮细胞黏附分子 1(PECAM-1)多克隆抗体(批号 ab263899)、大鼠结蛋白(Desmin)多克隆抗体(批号 ab178537)均购自英国 Abcam 公司; Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗、Alexa Fluor 594 标记的山羊抗大鼠 IgG 二抗(批号分别为 146644、133283)均购自美国 Jackson Immuno Research 公司;总 RNA 提取试剂盒(批号 W9113)购自天根生化科技(北京)有限公司;RNA 逆转录试剂盒(批号 AK71647A)、TB Green® Premix Ex Taq™ 试剂盒(批号 AJG1875A)均购自日本 Takara 公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

本研究所用动物为 SPF 级雄性 SD 大鼠[鼠龄为 4~6 周龄,体质量为(200 \pm 20) g]和 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠[鼠龄为 4~6 周龄,体质量为(18 \pm 2) g],均由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(吉)2018-0007。动物购入后饲养于温度(23 \pm 2)℃、相对湿度(55 \pm 10)%的 SPF 级动物房中。本研究动物实验方案经长春中医药大学动物研究伦理委员会批准后实施(伦理批号为 2020203)。

2 方法

2.1 DOT 对 DIED 模型大鼠的防治作用考察

2.1.1 造模、分组与给药 将 60 只 SD 大鼠适应性饲养 3 d 后,分为正常对照组($n=10$)和造模组($n=50$)。其中,正常对照组大鼠饲以正常饲料,造模组大鼠饲以高糖高脂饲料。饲养 4 周后,正常对照组大鼠腹腔注射柠檬酸钠缓冲液(pH=4.5),造模组大鼠腹腔注射 40 mg/kg STZ 诱导建立糖尿病模型(建模方案是在文献[12-13]的基础上加以适当修改后确定的)。注射前大鼠均先禁食禁水 12 h。腹腔注射 7 d 后,通过大鼠尾静脉取血,测定其空腹血糖(FPG)值,以 FPG>11.1 mmol/L 为糖尿病建模成功标准^[13]。取 45 只糖尿病造模成功的大鼠,按随机数字表法随机分为模型组, DOT 低、中、高剂量组(0.3、0.6、0.9 mg/kg,剂量依据前期预实验结果设置)和西地那非组(阳性对照组,4.4 mg/kg,剂量依据文献[14]设置),每组 9 只。正常对照组和模型组大鼠灌胃生理盐水,各给药组大鼠灌胃相应药物(均以生理盐水为溶剂溶解),灌胃体积均为 2 mL,每天 1 次,连续 11 周。在实验期间,正常对照组大鼠继续饲以正常饲料;其余各组大鼠继续饲以高糖高脂饲料,以诱导 DIED 的发生。

2.1.2 指标检测 实验期间,每周记录大鼠体质量和 FPG 值。末次给药后,将大鼠放置在透明笼中适应环境

20 min,然后皮下注射 100 μ g/mL APO,观察 30 min 内大鼠阴茎的勃起次数,并计算勃起率[勃起率(%)=某组 APO 实验阳性(即阴茎有勃起)大鼠只数/同期该组大鼠只数 $\times 100\%$]。随后,利用 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,于腹主动脉取血;将血液在 4℃ 下静置 20 min,然后以 2 500 r/min 离心 10 min,收集上层血清。按胰岛素 ELISA 试剂盒说明书方法测定大鼠血清中空腹胰岛素(FINS)含量,并计算胰岛素抵抗指数(IR): $IR = FPG \times FINS / 22.5^{[19]}$ 。取大鼠阴茎海绵体组织,在 PBS 中研碎,然后以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,分别按对应试剂盒说明书方法测定大鼠阴茎海绵体组织中 eNOS、cGMP 含量。

2.2 MCECs 的分离、培养

MCECs 的分离、培养方案是在文献[16]的基础上加以适当修改后确定的。将 C57BL/6J 小鼠脱颈处死,分离其阴茎海绵体组织,镜下除去尿道及神经血管束。将干净的阴茎海绵体组织剪成 1~2 mm³ 的小块,置于预冷的 24 孔板底,每孔中补加 200 μ L 含 50 ng/mL 血管内皮生长因子 A(VEGF-A)的 Matrigel 基质胶,包被后切块;将 24 孔板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 14 d,在显微镜下观察,直至细胞长满孔底;然后加入 Dispase 酶消化 1 h,用 10 mmol/L EDTA 终止消化,以 1 100 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀,置于 MCECs 完全培养基中培养,取第 2~3 代细胞进行后续实验。

2.3 MCECs 的纯度鉴定

采用免疫荧光法进行鉴定。将 MCECs 按 2×10^4 mL⁻¹ 的密度接种在置有载玻片的 6 孔板中进行细胞爬片,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 d 后,将爬有 MCECs 的载玻片置于 4% 多聚甲醛中,室温固定 15 min;加入含 5% 山羊血清的 0.5% Triton X-100 封闭 30 min;加入 PECAM-1 一抗(内皮细胞标记物,稀释比例为 1:1 000)和 Desmin 一抗(平滑肌细胞标记物,稀释比例为 1:1 000),于 4℃ 孵育过夜;分别加入 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、Alexa Fluor 594 标记的山羊抗大鼠 IgG 二抗(稀释比例均为 1:1 000),于室温孵育 1 h;滴加 DAPI 试剂,于室温避光染色 5 min;用含荧光淬灭剂的封片液进行封片,使用荧光显微镜观察细胞染色情况(MCECs 阳性染色呈绿色荧光,阴性染色呈红色荧光)。统计阳性细胞数和细胞总数,并分析 MCECs 阳性率:阳性率(%)=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

2.4 DOT 对高糖损伤 MCECs 活力的影响

采用 CCK-8 法进行检测。取第 2~3 代 MCECs,以 MCECs 完全培养基制成密度为 2×10^4 mL⁻¹ 的细胞悬液,然后按每孔 100 μ L 接种至 96 孔板中,常规培养。待细胞贴壁后,加入无血清 M199 培养基饥饿培养 24 h,然后将细胞分为正常对照组(MCECs 完全培养基)、高糖组

(30 mmol/L D-葡萄糖)和 DOT 低、中、高浓度组(30 mmol/L D-葡萄糖+125、250、500 μg/mL DOT,浓度根据预实验结果设置),每组设置5个复孔;并设置空白组(不加细胞)。各组细胞加药或 MCECs 完全培养基常规培养 48 h 后,在各孔中分别加入 10 μL CCK-8 试剂,于室温孵育 1 h,然后用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的光密度(OD)值,并计算细胞活力:细胞活力(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(正常对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。实验重复 3 次。

2.5 MCECs 中总 RNA 提取及 cDNA 文库构建

取第 2~3 代 MCECs,以 MCECs 完全培养基制成密度为 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,然后按每孔 2 mL 接种至 6 孔板中,常规培养 24 h。弃去原培养基,每孔中加入 2 mL 无血清 M199 培养基饥饿培养 24 h,随后将细胞分为正常对照组(MCECs 完全培养基)、高糖组(30 mmol/L D-葡萄糖)、DOT 组(30 mmol/L D-葡萄糖+250 μg/mL DOT, DOT 浓度依据细胞活力实验结果设置),每组设置 3 个复孔。各组细胞加药或 MCECs 完全培养基常规培养 48 h 后,收集细胞,按照总 RNA 提取试剂盒说明书方法提取细胞中总 RNA。用带有 Oligo(dT)的磁珠富集真核生物的 mRNA,以片段化的 mRNA 为模板合成双链 cDNA,并通过 PCR 实验富集得到各组 MCECs 的 cDNA 文库(cDNA 文库的构建委托诺禾致源生物科技有限公司完成)。使用基因测序仪对建好的文库进行测序,对测序得到的原始数据(raw data)进行过滤,去除带接头(adapter)和低质量读段(reads)的数据,得到待分析数据(clean reads),并统计测序质量值大于 20、30 的碱基占总碱基的百分比。

2.6 MCECs 差异表达基因筛选及功能富集分析

使用 HISAT v2.0.4 软件将 clean reads 比对到小鼠参考基因组,使用 RSEM v1.2.12 软件计算基因和转录本表达水平。采用 poisson Dis 算法进行差异表达基因检测,以差异倍数[fold change(FC)] ≥ 1.2 且 $P \leq 0.001$ 为标准,分别筛选正常对照组与高糖组、高糖组与 DOT 组 MCECs 的差异表达基因,利用 R 语言包中的 ggplot2 包绘制差异基因火山图。通过 Cluster Profiler R 4.0.2 软件中的 phyper 函数实现差异表达基因的基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,以错误发现率(FDR) ≤ 0.01 为显著富集^[17]。在得到的两组差异表达基因及显著富集通路中,筛选出 DOT 作用后能够显著逆转的基因及信号通路,以探讨 DOT 的可能作用靶点及通路。

2.7 关键基因的表达情况验证

采用 qPCR 法对与纤维化、氧化应激相关的 6 个关键基因(*TGF-β₃*、*Txnip*、*Aldh1a1*、*Loxl1*、*Mt1*、*Mt2*)在 mRNA 水平上进行验证。取“2.6”项下总 RNA,按照 RNA 逆转录试剂盒方法将总 RNA 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,按照 TB Green® Premix Ex Taq™ 试剂

盒方法进行 PCR 扩增(引物序列及扩增产物大小如表 1 所示)。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,共 40 个循环。反应体系(共 25 μL)为:SYBR 12.5 μL,DEPC 8 μL,cDNA 模板 2.5 μL,上、下游引物各 1 μL。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的表达水平(式中,Ct 表示每个反应管内荧光信号强度达到设定阈值时所经历的循环次数)。实验重复 3 次。

表 1 引物序列及扩增产物大小

Tab 1 qPCR primer sequences and amplified product size

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增产物大小, bp
<i>TGF-β</i>	GCAAGAATCTGCCACAAGG	GATGCTGATTTCCAGACCCAAGT	113
<i>Txnip</i>	AGACCTAAACATCCCAGATACCC	GTCCACATCGTCCAGCAGAG	109
<i>Aldh1a1</i>	GGTTGTCAAGCCAGCAGAGCA	TGTTTACCACGCCAGGAGGA	92
<i>Loxl1</i>	CACCACCTATCGCCAGCCATCC	CCTCTCCACCTCCGTAGTCTCGT	234
<i>Mt1</i>	CTCAATGGTGTATATCC	CCGATGTCTAATGCC	83
<i>Mt2</i>	CCGATGGATCCTGCTCCT	GCAGCAGTTTTCTTGACAG	77
<i>GAPDH</i>	TGTTTCTCGTCCCGTAG	CAATCTCCACTTTGCCAC	106

2.8 统计学方法

使用 GraphPad Prism v 6.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 Tukey-Kramer 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 DOT 对 DIED 模型大鼠的防治作用考察结果

3.1.1 体质量、FPG 值、FINS 和 IR 测定结果 造模前和灌胃前,各组大鼠的体质量、FPG 值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。灌胃结束后,与正常对照组比较,模型组大鼠的体质量显著减少($P < 0.01$),FPG 值、FINS 和 IR 均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, DOT 低剂量组大鼠的 FINS 显著降低($P < 0.01$); DOT 中、高剂量组和西地那非组大鼠的体质量均显著增加($P < 0.01$); DOT 中、高剂量组大鼠的 FINS、IR 均显著降低($P < 0.01$)。各组大鼠的体质量、FPG 值、FINS 和 IR 测定结果见表 2。

3.1.2 勃起情况及阴茎海绵体组织中 eNOS、cGMP 含量测定结果 与正常对照组比较,模型组大鼠勃起次数显著减少($P < 0.01$),勃起率和阴茎海绵体组织中 eNOS、cGMP 含量均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较, DOT 中剂量组大鼠勃起率和阴茎海绵体组织中 eNOS 含量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); DOT 高剂量组大鼠勃起次数显著增加($P < 0.01$),勃起率和阴茎海绵体组织中 eNOS、cGMP 含量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);西地那非组大鼠勃起次数显著增加($P < 0.05$),勃起率和阴茎海绵体组织中 cGMP 含量均显著升高($P < 0.01$)。各组大鼠勃起情况和阴茎海绵体组织中 eNOS、cGMP 含量测定结果见表 3。

3.2 MCECs 的纯度测定结果

荧光显微镜下可见,细胞核呈现出蓝色卵石状的

表2 各组大鼠的体质量、FPG值、FINS和IR测定结果($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab 2 Body weight, FPG, FINS and IR of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	体质量,g			FPG值,mmol/L			FINS, μ IU/mL	IR
	造模前	灌胃前	灌胃结束后	造模前	灌胃前	灌胃结束后		
正常对照组	191.2 \pm 3.9	339.7 \pm 21.7	486.2 \pm 15.3	5.1 \pm 0.5	5.0 \pm 0.6	5.1 \pm 0.4	12.55 \pm 0.06	1.03 \pm 0.08
模型组	190.8 \pm 6.7	345.9 \pm 25.4	379.3 \pm 37.5**	5.2 \pm 0.5	18.9 \pm 4.9	19.9 \pm 5.2**	21.73 \pm 0.03**	2.93 \pm 0.25**
DOT低剂量组	192.3 \pm 5.4	354.8 \pm 16.9	396.0 \pm 20.5	5.0 \pm 0.5	19.3 \pm 2.9	21.0 \pm 1.9	20.43 \pm 0.03**	2.95 \pm 0.11
DOT中剂量组	190.7 \pm 5.2	341.7 \pm 19.5	414.7 \pm 16.8**	5.2 \pm 0.5	18.1 \pm 2.8	19.1 \pm 1.6	19.48 \pm 0.03**	2.81 \pm 0.10**
DOT高剂量组	190.9 \pm 5.9	349.0 \pm 25.7	439.7 \pm 17.2**	5.3 \pm 0.4	19.2 \pm 5.5	16.3 \pm 3.4	17.63 \pm 0.03**	2.53 \pm 0.19**
西地那非组	192.3 \pm 5.2	341.6 \pm 22.6	419.4 \pm 17.3**	4.9 \pm 0.6	18.8 \pm 2.8	19.6 \pm 3.7	21.71 \pm 0.05	2.92 \pm 0.19

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.01$

表3 各组大鼠勃起情况及阴茎海绵体组织中eNOS、cGMP含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=9$)

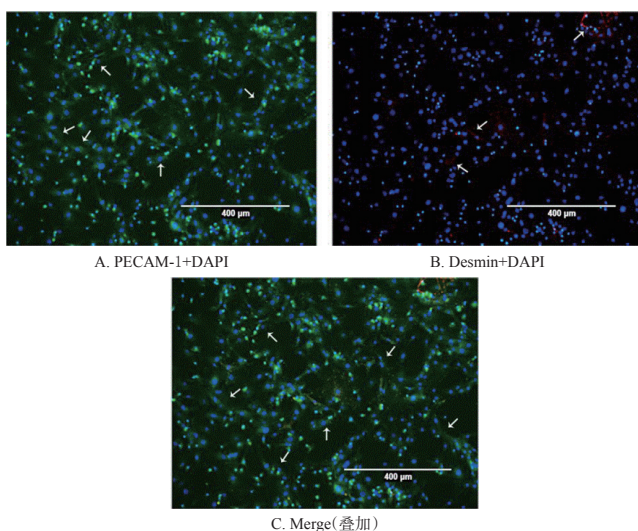
Tab 3 Erectile status and the contents of eNOS and cGMP in the penile cavernous tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	勃起情况		eNOS, μ mol/L	cGMP, mmol/L
	勃起次数	勃起率, %		
正常对照组	2.33 \pm 0.82	96.30 \pm 5.24	15.67 \pm 1.25	17.56 \pm 1.21
模型组	0.25 \pm 0.43**	11.11 \pm 9.07**	6.00 \pm 0.82**	12.31 \pm 0.88**
DOT低剂量组	0.63 \pm 0.99	25.93 \pm 5.24	7.33 \pm 0.94	13.35 \pm 1.02
DOT中剂量组	1.00 \pm 1.15	44.44 \pm 9.07**	11.50 \pm 0.50*	14.26 \pm 0.77
DOT高剂量组	1.67 \pm 1.05**	59.26 \pm 5.24**	13.00 \pm 0.82*	16.11 \pm 0.70*
西地那非组	1.25 \pm 0.83*	66.67 \pm 9.07**	8.67 \pm 1.25	17.17 \pm 1.12**

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

椭圆形轮廓,绝大多数细胞呈PECAM-1染色阳性。经分析,MCECs的阳性率在90%以上,说明细胞纯度较高,可用于后续实验。MCECs的免疫荧光染色图见图1。



注:图中箭头所指为阳性染色的位置

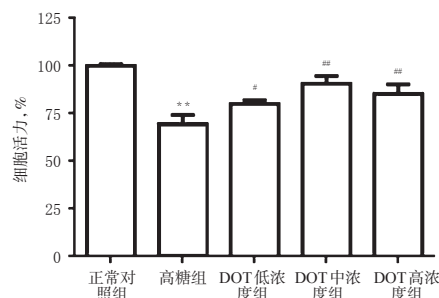
Note: arrow in the figure indicates the position of positive staining

图1 MCECs的免疫荧光染色图($\times 100$)

Fig 1 Immunofluorescence staining diagram of MCECs ($\times 100$)

3.3 DOT对高糖损伤MCECs活力的影响考察结果

与正常对照组比较,高糖组MCECs的活力显著降低($P<0.01$);与高糖组比较,DOT低、中、高浓度组MCECs的活力均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中以DOT低浓度组MCECs的活力最高。各组MCECs的活力测定结果见图2。



注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与高糖组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. high-glucose group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图2 各组MCECs的活力测定结果

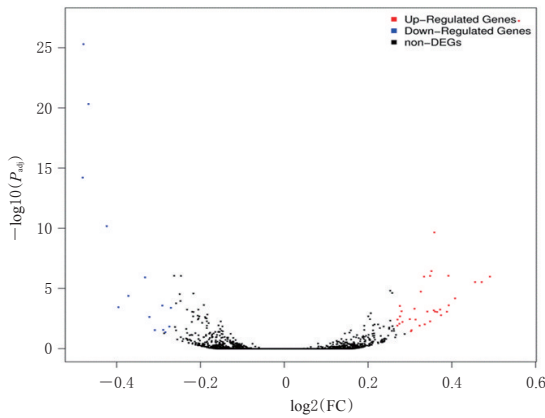
Fig 2 Cell viability of MCECs in each group

3.4 MCECs的cDNA文库测序数据评估结果

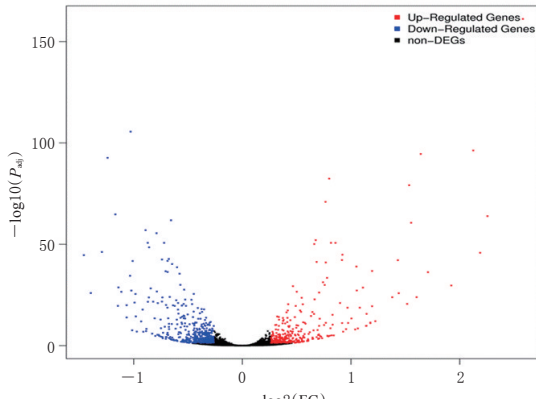
从正常对照组、高糖组和DOT组MCECs中分别得到 1.52×10^8 、 1.46×10^8 、 1.51×10^8 个clean reads,对应的总大小(clean reads的个数 \times 长度)分别为7.6 205、7.3 052、7.5 404 Gb。各组clean reads中,测序质量值大于20的碱基在所有碱基中的比例 $\geq 98\%$,质量值大于30的碱基在所有碱基中的比例 $\geq 94\%$,GC碱基对的含有量在各样本中基本保持不变。利用HISAT v2.0.4软件比对小鼠参考基因组发现,各组clean reads比对到基因组中的比率在95.52%~96.25%范围内。以上结果说明,本研究测序质量较好,测序数据符合后续分析要求^[18]。

3.5 MCECs的差异表达基因筛选及功能富集分析结果

3.5.1 差异表达基因筛选结果 与正常对照组比较,高糖组MCECs中共有48个差异表达基因,其中34个基因表达上调、14个基因表达下调;与高糖组比较,DOT组MCECs中共有779个差异表达基因,其中336个基因表达上调、443个基因表达下调。差异表达基因筛选的火山图见图3。



A.正常对照组与高糖组



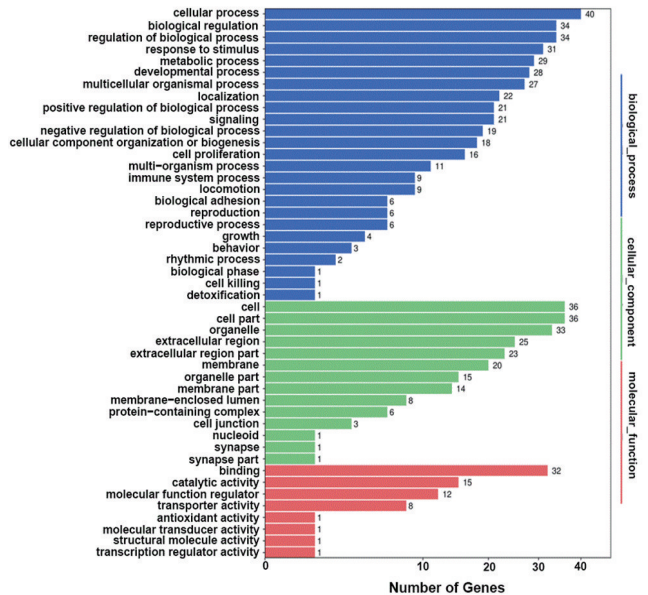
B.高糖组与DOT组

图3 MCECs差异表达基因筛选的火山图

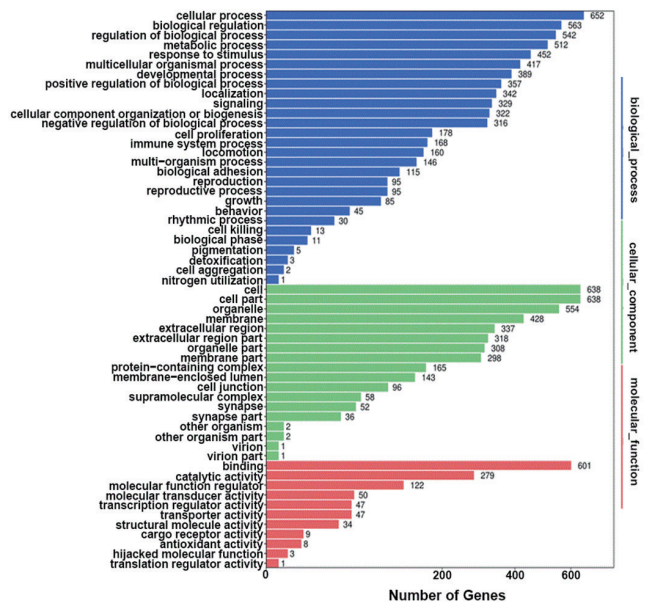
Fig 3 Volcano diagram of differentially expressed genes of MCECs

3.5.2 GO功能富集分析结果 通过对正常对照组与高糖组MCECs中48个差异表达基因进行GO功能富集分析,共得到47条GO功能注释,其中53.19%(25条)的注释为生物学过程、29.79%(14条)的注释为细胞组分、17.02%(8条)的注释为分子功能。通过对高糖组与DOT组MCECs中779个差异表达基因进行GO功能富集分析,共得到57条GO功能注释,其中49.12%(28条)的注释为生物学过程、31.58%(18条)的注释为细胞组分、19.30%(11条)的注释为分子功能。两组差异表达基因在生物学过程注释中均以细胞过程(cellular process)为主,在细胞组分注释中均以细胞部分(cell part)为主,在分子功能注释中均以结合分子功能(binding)为主。差异表达基因的GO功能富集分析结果见图4。

3.5.3 KEGG通路富集分析结果 通过对正常对照组与高糖组MCECs中差异表达基因进行KEGG通路富集分析发现,48个差异表达基因可以映射到102条不同的生物途径。其中,显著富集途径有8条,包括蛋白质消化吸收(protein digestion and absorption)、甘油脂类新陈代谢(glycerolipid metabolism)、甲状腺激素合成(thyroid hormone synthesis)等。通过对高糖组与DOT组MCECs中差异表达基因进行KEGG通路富集分析发



A.正常对照组与高糖组

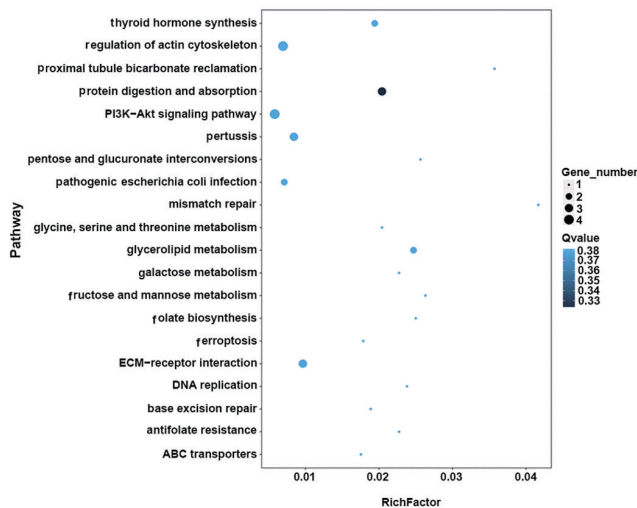


B.高糖组与DOT组

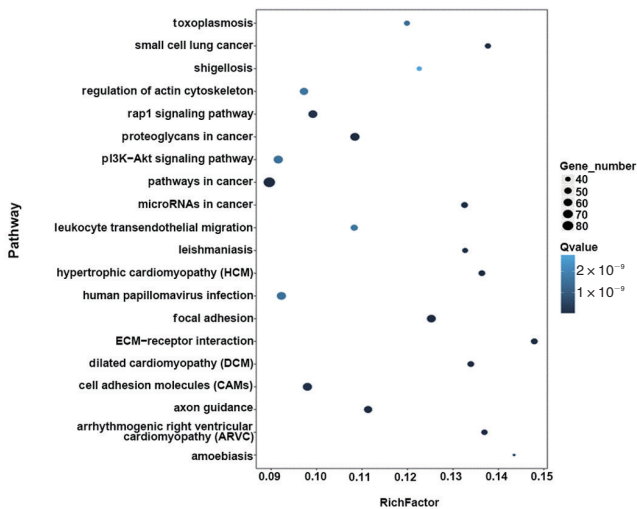
图4 MCECs差异表达基因的GO功能富集分析结果
Fig 4 Enrichment analysis result for GO function of differentially expressed genes of MCECs

现,779个差异表达基因可以映射到308条不同的生物途径。其中,显著富集途径有84条,包括黏着斑通路(focal adhesion)、细胞外基质受体相互作用通路(ECM-receptor interaction)、癌症通路(pathways in cancer)等。MCECs差异表达基因的KEGG通路富集分析结果见图5。

3.5.4 DOT对高糖损伤MCECs的多靶点调控分析结果 从正常对照组与高糖组、高糖组与DOT组MCECs中共筛选得到*Aldh1a1*、*Abcc5*、*Tac1*等13个共同的差异表达基因。这些差异表达基因产生的调控作用涉及细胞增殖、细胞迁移、氧化还原、应激反应、代谢等生物过程,



A. 正常对照组与高糖组



B. 高糖组与DOT组

图5 MCECs 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析结果

Fig 5 Enrichment analysis result for KEGG pathway of differentially expressed genes of MCECs

并涉及细胞外基质受体相互作用通路、肌动蛋白细胞骨架调控通路(regulation of actin cytoskeleton)、错配修复通路(mismatch repair)、磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B(PI3K-Akt)信号通路等4条显著富集通路。与模型组比较, DOT组 MCECs 中上述差异表达基因的表达均被显著回调, 结果见表4。

3.6 MCECs 差异表达基因的验证结果

与正常对照组比较, 高糖组 MCECs 中 *Txnip*、*Aldh1a1*、*Loxl1*、*TGF-β₃* 等基因的 mRNA 表达均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *Mt1*、*Mt2* 等基因的 mRNA 表达均显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与高糖组比较, DOT 组 MCECs 中上述基因的 mRNA 表达均被显著逆转($P < 0.01$)。该验证结果与 RNA-Seq 分析结果一致, 说明测序结果真实可信。DOT 对高糖损伤 MCECs 中 6 个关键基因 mRNA 表达的验证结果见表 5。

表4 DOT 对高糖损伤 MCECs 中差异表达基因的逆转作用分析结果

Tab 4 Analysis result for reversal effects of DOT on differentially expressed genes of high-glucose damaged MCECs

基因ID	基因名称	正常对照组与高糖组		高糖组与DOT组	
		logFC	P	logFC	P
11668	<i>Aldh1a1</i>	0.303 865	0.000 168	-1.394 385	<0.000 001
27416	<i>Abcc5</i>	0.282 195	0.000 024	-0.264 287	0.000 605
21333	<i>Tac1</i>	0.299 735	0.000 012	-0.752 364	<0.000 001
12816	<i>Coll2a1</i>	0.269 948	0.000 055	-0.603 159	<0.000 001
17748	<i>Mt1</i>	-0.479 177	<0.000 001	0.765 500	<0.000 001
14725	<i>Lrp2</i>	0.356 938	0.000 001	-1.139 709	<0.000 001
66195	<i>Lce1g</i>	-0.288 836	0.000 156	1.193 834	<0.000 001
56338	<i>Txnip</i>	0.560 094	<0.000 001	-0.295 482	<0.000 001
211577	<i>Mrgprf</i>	0.323 129	0.000 056	-0.829 663	<0.000 001
14165	<i>Fgf10</i>	0.388 249	0.000 002	-0.683 158	<0.000 001
16949	<i>Loxl1</i>	0.276 001	<0.000 001	-0.453 860	<0.000 001
17750	<i>Mt2</i>	-0.467 212	<0.000 001	0.799 490	<0.000 001
15331	<i>Hmgn2</i>	-0.371 996	<0.000 001	0.266 948	0.000 924

表5 DOT 对高糖损伤 MCECs 中 6 个关键基因 mRNA 表达的验证结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 5 Verification result for mRNA expression of 6 key genes in high-glucose damaged MCECs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	<i>Txnip</i>	<i>Aldh1a1</i>	<i>Loxl1</i>	<i>Mt1</i>	<i>Mt2</i>	<i>TGF-β₃</i>
正常对照组	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02
高糖组	4.54±0.44**	2.56±0.17**	3.18±0.25**	0.12±0.13**	0.24±0.16*	2.00±0.42*
DOT组	2.51±0.39##	0.81±0.16##	1.11±0.40##	1.72±0.23##	2.59±0.38##	0.62±0.18##

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$; 与高糖组比较, ## $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$; vs. high-glucose group, ## $P < 0.01$

4 讨论

随着糖尿病病程的延长, 糖尿病患者的勃起功能进行性下降, 造成阴茎组织出现严重病理损伤, 而高血糖引发的内皮功能障碍是诱发、加重糖尿病患者 DIED 的关键因素^[18]。因此, 发现可有效改善内皮功能障碍的活性物质已成为防治 DIED 的重中之重。为了解决上述问题, 本研究首先建立糖尿病大鼠模型, 并饲以高糖高脂饲料来诱发 DIED, 初步探究 DOT 对 DIED 的防治作用, 并选择临床治疗勃起功能障碍的一线药物西地那非作为阳性对照药物。

体质量减轻、血糖和 IR 升高、勃起功能异常是 DIED 的主要表现。控制血糖是 DIED 的治疗手段之一, 可防止高血糖对血管功能的进一步损害; IR 升高可致使胰岛素不能发挥其生物学效应, 使机体靶组织器官对葡萄糖的摄取和利用能力降低, 从而导致内皮功能障碍^[19-20]。本研究结果显示, 与模型组比较, DOT 各剂量组大鼠的体质量、勃起率均不同程度地升高, IR 均不同程度地降低。这提示, DOT 对 DIED 模型大鼠的症状具有一定的

改善作用。相关勃起生理机制研究表明,内皮细胞可在eNOS催化下合成并分泌活性物质NO,并进入海绵体平滑肌抑制cGMP水解,引起海绵体平滑肌松弛,从而促使阴茎勃起^[21]。本研究结果显示,高剂量DOT可显著升高DIED模型大鼠阴茎海绵体组织中eNOS、cGMP含量,表明DOT对DIED的防治作用可能是通过改善内皮功能实现的。

为进一步探究DOT改善高糖所致内皮功能紊乱的作用与机制,本研究选择位于海绵体内表面的原代MCECs建立体外细胞模型来进行相关研究。MCECs是维持海绵体功能最重要的细胞之一,是研究DIED内皮功能的最佳选择^[22-23]。在原代MCECs的分离方式上,本研究选择了一种新颖的非酶分离方法——Matrigel 3D技术。该技术能模拟体内细胞生长的三维环境,使MCECs与生长因子直接接触而诱导MCECs从组织中爬出,可保证MCECs的原有形态及功能特性,且方法操作省时、分离纯度高、重复性好^[24]。在以上研究基础上,本研究又利用高糖诱导模拟糖尿病环境下MCECs损伤状态,并证明了DOT能够通过提高高糖损伤MCECs的活力来发挥其改善内皮功能障碍的作用。

转录组学可从整体水平上研究基因的表达情况,从“多靶点-多通路-多途径”阐明药物的作用机制^[25-26]。为深入分析DOT改善内皮功能的可能作用途径,本研究对MCECs的转录组差异表达基因进行重点分析。结果显示,与正常对照组比较,高糖组MCECs有48个差异表达基因;与高糖组比较,DOT组MCECs有779个差异表达基因。进一步通过GO功能富集分析和KEGG通路富集分析发现,DOT对内皮功能障碍的恢复作用是通过调控多种功能基因和信号通路实现的。为明确DOT发挥作用的靶点及生理过程,本研究对获得的两组细胞(正常细胞与高糖损伤细胞、高糖损伤细胞与DOT处理细胞)中差异表达基因数据进行深度挖掘分析,发现有13个重叠基因及4条显著富集信号通路,这些基因及信号通路可能是DOT改善内皮功能障碍、防治DIED的关键靶点和途径。综合以上分析及本课题组前期研究成果,本研究筛选出了能被DOT显著调控的6个关键基因进行深入分析,包括与纤维化、氧化应激相关的*TGF-β₃*、*Txnip*、*Aldh1a1*、*Loxl1*、*Mt1*、*Mt2*。

胶原合成增加引起的纤维化因子表达上调和海绵状纤维化是诱发勃起功能障碍的重要病理、生理机制^[27]。在众多纤维化因子中,转化生长因子β(TGF-β)被认为是与纤维生成最为相关的细胞因子,其可引起组织纤维化,从而导致多种器官的功能损害^[28]。TGF-β家族包括TGF-β₁、TGF-β₂、TGF-β₃ 3种亚基,其中TGF-β₃能够促使胶原大量沉积,进而引起纤维化的发生^[29]。此外,TGF-β₁可通过激活其下游蛋白表达,造成内皮细胞纤维

化,从而抑制MCECs的迁移和增殖^[30]。本研究发现,经DOT处理后,高糖损伤MCECs中*TGF-β₃*基因的mRNA表达显著下调,表示DOT可能是通过抑制*TGF-β₃*基因的表达来抑制内皮细胞纤维化,从而发挥其改善内皮功能障碍的作用。

据报道,长期升高的葡萄糖水平可促使细胞产生活性氧(ROS)。当ROS产生后,一方面其可干扰NO的生物利用度,介导内皮功能障碍;另一方面其可诱导内皮细胞凋亡,进而破坏血管组织内稳态,影响血管舒张和阴茎勃起^[31-32]。硫氧还蛋白相互作用蛋白(Txnip)是调节糖和脂代谢的中枢蛋白,其过表达可引起ROS水平升高、NO水平降低,进而启动并放大氧化应激反应^[33-34]。乙醛脱氢酶1家族成员a1(*Aldh1a1*)是一种多功能酶,其在氧化应激状态下可在细胞中聚集,从而缓解氧化应激介导的细胞损伤;氧化应激水平降低后,细胞中*Aldh1a1*的表达量也会随之减少^[35-36]。类赖氨酸氧化酶1(*Loxl1*)是保持细胞内环境稳定的关键酶,在氧化应激状态下细胞中*Loxl1*的含量会明显升高^[37]。金属硫蛋白1(*Mt1*)和*Mt2*作为细胞内的抗氧化因子可直接发挥清除ROS的作用,参与了生物体的多种保护性应激反应^[38-41]。本研究结果显示,DOT能够显著逆转高糖损伤MCECs中*Txnip*、*Aldh1a1*、*Loxl1*等基因mRNA表达的上调,以及*Mt1*、*Mt2*等基因mRNA表达的下调。以上结果提示,DOT对内皮功能的改善作用与降低氧化应激反应相关。

综上所述,DOT对DIED模型大鼠的症状具有改善作用;其作用机制可能与抑制纤维化、降低氧化应激等生物学途径,从而改善海绵体内皮功能有关。本研究为DOT改善高糖引起的内皮功能障碍提供了治疗靶点,也为DOT防治DIED的发生发展提供了实验数据支撑。但本研究对于DOT防治DIED的分子机制研究尚不深入,有待进一步完善。

参考文献

- [1] MALAVIGE L S, LEVY J C. Erectile dysfunction in diabetes mellitus[J]. J Sex Med, 2009, 6(5): 1232-1247.
- [2] WANG J S, FENG J L, LI X, et al. Effect of leech-centipede medicine on improving erectile function in diabetes-induced erectile dysfunction rats via PDE5 signalling pathway-related molecules[J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 167-174.
- [3] KOUIDRAT Y, PIZZOL D, COSCO T, et al. High prevalence of erectile dysfunction in diabetes: a systematic review and meta-analysis of 145 studies[J]. Diabet Med, 2017, 34(9): 1185-1192.
- [4] BELBA A, CORTELAZZO A, ANDREA G, et al. Erectile dysfunction and diabetes: association with the impairment of lipid metabolism and oxidative stress[J]. Clin Biochem, 2016, 49(1/2): 70-78.

- [5] MARTÍNEZ-JABALOYAS J M, GIL-SALOM M, VILLAMÓN-FORT R, et al. Prognostic factors for response to sildenafil in patients with erectile dysfunction[J]. *Eur Urol*, 2001, 40(6):641-646.
- [6] LASKER G F, MALEY J H, KADOWITZ P J. A review of the pathophysiology and novel treatments for erectile dysfunction[J]. *Adv Pharmacol Sci*, 2010, 2010:730861.
- [7] RYU J K, SUH J K, BURNETT A L. Research in pharmacotherapy for erectile dysfunction[J]. *Transl Androl Urol*, 2017, 6(2):207-215.
- [8] 周滢, 周萍. 山药在各历史时期临床运用的研究[J]. *世界科学技术(中医药现代化)*, 2014, 16(7):1574-1577.
- [9] 祝之友. 张仲景应用山药情况[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2017, 15(7):141.
- [10] 曹雯, 喻嵘, 王琦威, 等. 《古今名医临证金鉴·消渴卷》治疗消渴病用药规律分析[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(5):1099-1011.
- [11] YU S, HAN B, BAI X, et al. The cold-soaking extract of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) protects against erectile dysfunction by ameliorating testicular function in hydrocortisone-induced KDS-Yang rats and in oxidatively damaged TM3 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263:113223.
- [12] ZHANG J, QIU H, HUANG J, et al. Establishment of a diabetic myocardial hypertrophy model in *Mus musculus castaneus* mouse[J]. *Int J Exp Pathol*, 2018, 99(6):295-303.
- [13] WANG X, PAN J, LIU D, et al. Nicorandil alleviates apoptosis in diabetic cardiomyopathy through PI3K/Akt pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8):5349-5359.
- [14] ZHANG H, TONG W T, ZHANG C R, et al. Gross saponin of *Tribulus terrestris* improves erectile dysfunction in type 2 diabetic rats by repairing the endothelial function of the penile corpus cavernosum[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12:1705-1716.
- [15] 郭璇. 辅助降糖颗粒与西格列汀联合用药对 ZDF 大鼠胰岛胰岛素抵抗作用及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [16] YIN G N, PARK S H, SONG K M, et al. Establishment of in vitro model of erectile dysfunction for the study of high-glucose-induced angiopathy and neuropathy[J]. *Andrology*, 2017, 5(2):327-335.
- [17] WANG L, FENG Z, WANG X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1):136-138.
- [18] 罗永珍. 基于转录组学和蛋白质组学的小鼠氟中毒脑损伤研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2020.
- [19] VIDELA S, VILLORIA J, SUST M, et al. Calcium dobesilate for the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes mellitus[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 103(4):360-366.
- [20] SENA C M, PEREIRA A M, SEIÇA R. Endothelial dysfunction: a major mediator of diabetic vascular disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(12):2216-2231.
- [21] GUR S, ALZWERI L, YILMAZ-ORAL D, et al. Testosterone positively regulates functional responses and nitric oxide expression in the isolated human corpus cavernosum[J]. *Andrology*, 2020, 8(6):1824-1833.
- [22] KUMAR S, WEST D C, AGER A. Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels[J]. *Differentiation*, 1987, 36(1):57-70.
- [23] BERNAS M J, CARDOSO F L, DALEY S K, et al. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(7):1265-1272.
- [24] YIN G N, RYU J K, KWON M H, et al. Matrigel-based sprouting endothelial cell culture system from mouse corpus cavernosum is potentially useful for the study of endothelial and erectile dysfunction related to high-glucose exposure[J]. *J Sex Med*, 2012, 9(7):1760-1772.
- [25] CARR H L, TURNER J D, MAJOR T, et al. New developments in transcriptomic analysis of synovial tissue[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7:21.
- [26] 张晓萌, 李健春, 王琼, 等. 转录组测序技术在中医药领域的应用[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(8):1084-1087.
- [27] RYU J K, SONG S U, HAN J Y, et al. Establishment of penile fibrosis model in a rat using mouse NIH 3T3 fibroblasts expressing transforming growth factor beta1[J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(4):916-921.
- [28] SUN T, HUANG Z, LIANG W C, et al. TGFβ₂ and TGFβ₃ isoforms drive fibrotic disease pathogenesis[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(605):0407.
- [29] RYU C M, SHIN J H, YU H Y, et al. N-acetylcysteine prevents bladder tissue fibrosis in a lipopolysaccharide-induced cystitis rat model[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):8134.
- [30] SHIN T Y, RYU J K, JIN H R, et al. Increased cavernous expression of transforming growth factor-β₁ and activation of the Smad signaling pathway affects erectile dysfunction in men with spinal cord injury[J]. *J Sex Med*, 2011, 8(5):1454-1462.
- [31] CHEN Y, ZHOU B, YU Z, et al. Baicalein alleviates erectile dysfunction associated with streptozotocin-induced type I diabetes by ameliorating endothelial nitric oxide synthase dysfunction, inhibiting oxidative stress and fibrosis[J]. *J Sex Med*, 2020, 17(8):1434-1447.
- [32] CASTELA Â, COST A C. Molecular mechanisms associated with diabetic endothelial-erectile dysfunction[J]. *Nat Rev Urol*, 2016, 13(5):266-274.
- [33] ZHANG B, LYU J, YANG E J, et al. Class I histone

白屈菜碱对四氯化碳诱导肝纤维化模型大鼠的改善作用及机制^Δ

李晓明^{1*}, 王文豹², 郭丽娜², 宋波², 董巍², 徐天娇¹, 王晓丽^{2#} (1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)23-2868-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.23.09



摘要 目的:研究白屈菜碱对四氯化碳诱导肝纤维化模型大鼠的改善作用及可能机制。方法:将48只大鼠按随机数字表法随机分成正常对照组,模型组,白屈菜碱低、中、高剂量组(0.125、0.25、0.50 mg/kg)和阳性对照组(护肝片,0.42 g/kg),每组8只。除正常对照组外,其余各组大鼠均采用腹腔注射四氯化碳-橄榄油溶液8周建立肝纤维化模型。于造模第5周开始,正常对照组和模型组大鼠灌胃水,各给药组大鼠灌胃相应药液,每天1次,连续10周。末次灌胃后,计算大鼠肝指数;测定大鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、透明质酸(HA)和肝组织中羟脯氨酸(Hyp)水平;观察大鼠肝组织中胶原纤维蛋白染色情况;测定大鼠肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、p62蛋白表达水平和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的磷酸化水平,以及上述蛋白对应的mRNA表达水平。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠肝指数,血清中AST、ALT、HA、Hyp水平,肝组织中胶原纤维蛋白阳性染色面积百分比和 α -SMA、LC3-II的mRNA及其蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);p62蛋白表达水平,PI3K、Akt、mTOR的蛋白磷酸化水平以及p62、PI3K、Akt、mTOR mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,白屈菜碱低剂量组大鼠PI3K、mTOR的蛋白磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$);白屈菜碱中、高剂量组上述指标(除中剂量组肝指数、HA水平外)的变化均被显著逆转($P < 0.05$)。结论:白屈菜碱对四氯化碳所致大鼠肝纤维化具有一定的改善作用;其机制可能与激活PI3K/Akt/mTOR信号通路、抑制细胞自噬有关。

关键词 白屈菜碱;肝纤维化;磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路;自噬

Improvement Effects of Chelidone on CCl₄-induced Hepatic Fibrosis Model Rats and Its Mechanism

LI Xiaoming¹, WANG Wenbao², GUO Lina², SONG Bo², DONG Wei², XU Tianjiao¹, WANG Xiaoli² (1. Institute of Medicine, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

- deacetylase inhibition is synthetic lethal with BRCA1 deficiency in breast cancer cells[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(4):615-627.
- [34] LI X, KOVER K L, HERUTH D P, et al. Thioredoxin-interacting protein promotes high-glucose-induced macrovascular endothelial dysfunction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(1):291-297.
- [35] JACKSON B, BROCKER C, THOMPSON D C, et al. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily[J]. Hum Genomics, 2011, 5(4):283-303.
- [36] SINGH S, BROCKER C, KOPPAKA V, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 56:89-101.
- [37] GREENE A G, EIVERS S B, DERVAN E W J, et al. Lysyl oxidase like 1: biological roles and regulation[J]. Exp Eye Res, 2020, 193:107975.
- [38] COYLE P, PHILCOX J C, CAREY L C, et al. Metallothionein: the multipurpose protein[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(4):627-647.
- [39] RUTTKAY-NEDECKY B, NEJDL L, GUMULEC J, et al. The role of metallothionein in oxidative stress[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(3):6044-6066.
- [40] MIURA T, MURAOKA S, OGISO T. Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione[J]. Life Sci, 1997, 60(21):301-309.
- [41] SARASWATHI V, GANESAN M, PERRIOTTE-OLSON C, et al. Nanoformulated copper/zinc superoxide dismutase attenuates vascular cell activation and aortic inflammation in obesity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(3):495-500.

^Δ 基金项目:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(No.2018-KYYWF-0099)

* 副研究员, 硕士。研究方向:中药药理学。电话:0452-2663375。E-mail:Liming992@126.com

通信作者:副教授, 博士。研究方向:中药药理作用及机制。电话:0452-2663375。E-mail:cwaxl@126.com

(收稿日期:2021-06-15 修回日期:2021-10-23)

(编辑:林静)