

protein quality and potential health effects of foods and dietary supplements [J]. J AOAC Int. 2008; 91 (4): 894-900.

[11] Bos C, Gaudichon C, Tome D. Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans [J]. J Am Coll Nutr. 2000; 19 (2 Suppl): 191S-205S.

[12] Walzem RL, Dillard CJ, German JB. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking [J]. Crit Rev Food Sci Nutr. 2002; 42 (4): 353-75.

[13] Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, et al. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins [J]. Am J Clin Nutr.

2004; 80 (5): 1246-53.

[14] Veldhorst MA, Nieuwenhuizen AG, Hochstenbach-Waelen A, et al. Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy [J]. Physiol Behav. 2009; 96 (4-5): 675-82.

[15] Kuzuya T, Katano Y, Nakano I, et al. Regulation of branched-chain amino acid catabolism in rat models for spontaneous type 2 diabetes mellitus [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 15; 373 (1): 94-8.

[16] Krebs M, Krssak M, Bernroider E, et al. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans [J]. Diabetes. 2002; 51 (3): 599-605.

[17] 马乃诚, 李荣, 张和顺. 糖尿病患者血浆游离氨基酸的改变 [J]. 天津医药. 1999; 27 (12): 723-725.

枸杞多糖对糖尿病性 ED 兔阴茎海绵体氧化应激的影响*

赵硕涵 罗琼 向春燕 李菁菁 耿天琪 阎俊

(武汉大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 武汉 430071)

摘要 目的: 研究 LBP 对糖尿病所导致的勃起功能障碍的影响, 为枸杞多糖预防 DIED 提供理论依据。**方法:** 四氧嘧啶造模, 测阴茎组织的 ICP, 用试剂盒测海绵体 SOD、GSH-PX、NOS 的活力和 MDA、GSH、NO 的含量。**结果:** LBP 能显著提高糖尿病兔阴茎的 Δ ICP 值, 提高 SOD、GSH-PX 的活力, 降低 MDA 含量, 增加 GSH 的含量, 提高机体的抗氧化能力, 同时提高 NOS 的活性、NO 的含量。以上各指标, 预防组效果明显好于治疗组。**结论:** LBP 能明显改善糖尿病导致的阴茎勃起功能障碍。可能的机制是 LBP 改善兔阴茎组织氧化防御系统, 上调阴茎组织中 NO 的含量以及 NOS 的活性。

关键词 枸杞多糖; 糖尿病性 ED; 海绵体内压; 氧化应激

* 该项目为武汉市科技局项目: 2013060602010277

赵硕涵 (1986-), 女, 博士研究生, E-mail: drluoqiong@sina.com

Effects of Lycium Barbarum Polysaccharides on Oxidative Stress of Penis of Diabetes-Induced Rabbits with Erectile Dysfunction

Zhao Qi-han Luo Qiong Xiang Chunyan Li Jingjing Geng Tianqi Yan Jun

(School of Public Health, Wuhan University, Wuhan, 430071, China)

Abstract: Objective: To investigate the influence of Lycium barbarum polysaccharides (LBP) on erectile dysfunction induced by diabetic, provide the theory basis for the LBP prevention DIED. **Method:** make model by alloxan, test ICP, test the vitality of SOD, GSH-PX and NOS and the content of MDA, GSH, NO of penile tissue. **Result:** LBP can significantly improve Δ ICP value, enhance the vitality of SOD, GSH-PX, reduce the content of MDA and increase GSH, enhance the antioxidant capacity of penis of diabetic rabbit. LBP can increase the activity of NOS and the content of NO at the same time. Above all indexes, the effect of prevention group is more better than treatment group. **Conclusion:** LBP can obviously improve erectile dysfunction. The mechanism may be related to LBP improve oxidative defense system of rabbit penile tissue, increase the content of NO and the activity of NOS in penis.

Keywords: Lycium barbarum polysaccharide; Diabetes-Induced Erectile Dysfunction; ICP; oxidative stress

近年来,糖尿病性勃起功能障碍(erection dysfunction, ED)发生率较高,约为27%~75%^[1,2]发病率早于非糖尿病患者^[3]。糖尿病性勃起功能障碍的发病机制与多种因素有关,其中高血糖基础上的氧化应激损伤阴茎血管内皮细胞,导致一氧化氮合酶类(nitric oxide synthase, NOS)表达和活性的改变成为研究热点。枸杞是我国传统的中药材,具有滋补强壮、益精气、祛风、壮阳、坚筋骨等功能。现代科学研究证明枸杞多糖(Lycium Barbarum Polysaccharides, LBP)为其活性成分,并具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗氧化、抗疲劳、保护生殖系统、抗衰老等作用^[4-6]。本实验主要探讨LBP对糖尿病所导致的勃起功能障碍海绵体氧化应激的影响,为枸杞多糖预防DIED提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试品及试剂

LBP由本实验室制备,纯度为83.99%;日本大耳白兔购自湖北省疾病预防控制中心动物实验中心,清洁级;四氧嘧啶购自sigma公司,西地那非(伟哥)购自辉瑞公司,BL-420F生物机能试验系统购自成都泰盟科

技术有限公司;其他试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物模型:动物模型参照文献^[7,8],同时结合本实验室经验和研究实际情况。

DM模型:日本大耳白兔,2.4±0.2kg,空腹,四氧嘧啶100mg/kg耳缘静脉注射,连续24h监控血糖值,预防低血糖的发生。72h后测空腹血糖值和糖耐量曲线,筛选DM模型。

DIED模型:DM模型成功后,先饲喂高脂饲料(1%胆固醇+4%猪油)3w,再饲喂普通饲料5w,第8w时用电刺激阴茎根部法筛选DIED模型。

1.2.2 分组及处理:实验动物随机分为5组,每组3只。具体分组如下:①正常对照组:0.9%生理盐水1ml/kg·d灌胃,连续12w;②阴性对照组:0.9%生理盐水1ml/kg·d灌胃,DM模型成功后持续12w;③阳性对照组:西地那非1mg/kg·d灌胃,DIED模型成功后持续4w;④预防组:LBP 10mg/kg·d灌胃,DM模型成功后持续12w;⑤治疗组:LBP 10mg/kg·d灌胃,DIED模型成

功后持续4w。灌胃量按1ml/kg·d计算。本课题组前期研究已证明LBP 10mg/kg·d为最佳剂量,生理盐水稀释为10mg/ml;西地那非用量按实验动物剂量换算得1mg/kg·d,稀释为1mg/ml。

1.3 测定指标

测定阴茎海绵体内压(ICP)变化评价阴茎勃起能力,阴茎组织SOD、MDA、GSH、GSH-PX等评价抗氧化能力,以及阴茎NO、NOS的含量测定。

1.4 统计学方法

用SPSS 17.0统计软件进行分析,多组间均数的比较用方差分析。

2 结果

2.1 LBP对兔阴茎海绵体内压(Δ ICP)的影响

正常对照组 Δ ICP最大,阴性对照组最小,预防组和阳性对照组比阴性对照组增加明显。与正常对照组相比,其他四组的 Δ ICP值明显下降, $P<0.001$,差异有统计学意义;与阴性对照组相比,阳性对照组、预防组和治疗组的 Δ ICP值明显增加, $P<0.001$,差异有统计学意义;治疗组比预防组的 Δ ICP值下降, $P<0.05$,差异有统计学意义。(表1)

表1 LBP对DIED兔阴茎海绵体压力的影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Δ ICP	可信区间(95%CI)
正常对照组	24.13 \pm 1.49	22.67-25.66
阴性对照组	3.75 \pm 1.23*	2.63- 4.88
阳性对照组	11.60 \pm 1.68**	9.87-13.24
预防组	11.15 \pm 0.88**	10.32-12.90
治疗组	8.77 \pm 0.90***□	7.96-9.73

注:与正常对照组比较:* $P<0.05$;与阴性对照组比较:## $P<0.05$;与阳性对照组比较:** $P<0.05$;与预防组比较:□ $P<0.05$

2.2 LBP对兔阴茎组织SOD和MDA的影响

阴茎组织SOD活力、MDA含量比较中,LBP干预后,组织SOD活性增加,MDA含量减少。

与正常对照组相比,其他四组的SOD活力降低、MDA含量增加, $P<0.05$,差异有统计学意义;与阴性对照组相比,阳性对照组、预防组和治疗组SOD活力升高、MDA含量降低, $P<0.05$,差异有统计学意义,其中预防组的变化最明显;治疗组比预防组SOD活力降低、MDA含量增加, $P<0.05$,差异有统计学意义。(表2)

表2 LBP对DIED兔海绵体SOD和MDA的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)
正常对照组	37.23 \pm 1.60	0.32 \pm 0.05
阴性对照组	11.05 \pm 5.61*	1.73 \pm 0.26*
阳性对照组	25.70 \pm 4.92**	0.89 \pm 0.19**
预防组	29.64 \pm 4.39**	0.74 \pm 0.12**
治疗组	22.02 \pm 2.30**□	1.06 \pm 0.10**□

注:与正常对照组比较:* $P<0.05$;与阴性对照组比较:## $P<0.05$;与预防组相比:□ $P<0.05$

2.3 LBP对兔阴茎海绵体GSH和GSH-PX的影响

阴茎组织GSH含量、GSH-PX活力比较中,LBP干预后,组织GSH-PX活力、GSH含量增加。

与正常对照组相比,其他四组GSH含量、GSH-PX的活力均下降, $P<0.05$,差异有统计学意义,其中阴性对照组的变化最明显;与阴性对照组相比,其他三组经干预后,GSH含量、GSH-PX活力均增加,差异有统计学意义, $P<0.05$;其中预防组含量明显更增加,与治疗组相比,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。(表3)

表3 LBP对DIED兔阴茎组织GSH和GSH-PX的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	GSH (mgGSH/gprot)	GSH-PX (U/mgprot)
正常对照组	26.88±3.90	208.05±29.99
阴性对照组	5.80±1.24*	75.60±4.20*
阳性对照组	15.72±3.53**	119.88±16.49**
预防组	20.58±2.02**	155.21±12.38**
治疗组	16.79±2.74*#□	101.11±13.66*□

注:与正常对照组比较:* $P<0.05$;与阴性对照组比较:# $P<0.05$;与阳性对照组相比:** $P<0.05$;与预防相比:□ $P<0.05$

2.4 LBP对兔阴茎海绵体NO和NOS的影响

阴茎组织NO含量、NOS的活力比较,经LBP干预后均增加。

与正常对照组相比,其他四组的NO含量、NOS活力均下降, $P<0.05$,差异有统计学意义;经干预后,阳性对照组、预防组和治疗组的NO含量、NOS活力与阴性对照组相比均增加, $P<0.05$,差异有统计学意义;经LBP干预的预防组和治疗组的比较可见,前者NO含量的增加明显高于治疗组, $P<0.05$,差异有统计学意义。(表4)

表4 LBP对DIED兔阴茎组织NO和NOS的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	NO ($\mu\text{mol/gprot}$)	NOS (U/mgprot)
正常对照组	48.47±5.90	6.17±0.91
阴性对照组	7.51±3.73*	1.89±0.33*
阳性对照组	28.40±3.59**	3.28±0.43**
预防组	32.60±5.66**	4.37±0.51**
治疗组	16.63±4.78**#□	3.91±1.19**

注:与正常对照组比较:* $P<0.05$;与阴性对照组比较:# $P<0.05$;与阳性对照组相比:** $P<0.001$,与预防组相比:□ $P<0.05$

3 讨论

目前,男性生殖健康面临十分严峻的形

势,其中ED是男性生殖健康中影响最大的疾病。调查结果表明,成年男性ED患病率达25%,40岁以上高达50%,引发ED的原因是多方面的,包括生理疾病、心理障碍等^[9]。糖尿病性勃起功能障碍是糖尿病常见的并发症,其贡献率达到生理疾病所导致的ED的30%~70%。

阴茎海绵体中,典型的结构是血窦,通过控制血液量的变化,实现阴茎勃起。在健康的机体中,海绵体的平滑肌和纤维组织的含量比应该一定,在镜下表现为均匀一致的血窦。勃起功能正常进行依赖于细胞结构、细胞之间的连接以及细胞间信息传递的正常。研究动物勃起功能的标准方法是通过电刺激海绵体神经测ICP值,此法稳定易重复,能客观准确评估阴茎的勃起程度^[10]。本实验结果发现LBP能显著提高糖尿病兔阴茎的 ΔICP 值,改善由于糖尿病引起的阴茎勃起功能障碍。

在生物进化漫长的过程中,机体为了防御生命活动中产生的氧自由基,建立起了一套完整的氧化防御系统^[11],主要包括酶促与非酶促两个部分。酶促体系包括SOD、GSH-Px、CAT等,它们共同的作用是防止新自由基产生,同时使已经产生的自由基转变为无毒分子。SOD能分解氧自由基,GSH-Px既能催化 H_2O_2 与GSH反应生成 H_2O ,在某些组织中,GSH-Px还能直接清除 H_2O_2 ^[12]。在体内,SOD和GSH-Px的活性的高低能反映机体清除自由基能力。MDA能体现脂质过氧化反应的大小和细胞受自由基损伤的程度,常与SOD合用,评价机体抗自由基攻击能力。GSH是GSH-Px的底物,能对抗自由基损伤,保护酶和细胞。糖尿病的高血糖环境破坏机体的氧化防御体系,产生大量氧自由基,破坏蛋白质、核酸等生物大分子,导致组织、细胞损伤^[14]。高糖诱导氧自由基生成过多的理论,是近年来兴起的糖尿病并发症的共同病理学机制理论,通过抗氧化剂的作用减少ROS的产生,是治疗糖尿病并发症的新方向。本研究发现,经

LBP 干预后, 可以明显提高机体的抗氧化能力, 拮抗高糖环境引起的机体损伤。

阴茎勃起, 是在 NANC-血管窦-内皮系统调节下, 诱导 L-Arg-NO-cGMP 通路完成的^[14], 在此通路中最关键的酶是 NOS, 它能专一催化 L-Arg 产生 NO, NO 是勃起的主要递质。任何能导致 NO 减少或者 NOS 表达的因素均可能是 ED 的发病因素。糖尿病所引起的 NO 含量降低在 DIED 发病中有重要意义。高糖环境下, NOS 的活性降低、糖基化终末产物^[15]、过度产生氧自由基均能导致 NO 水平降低。本研究结果显示, 经 LBP 干预后, NOS 活性升高, NO 的含量明显增加。提示 LBP 可以缓解由于糖尿病的高糖所引起的勃起功能障碍, 具体的途径需进一步研究。

参考文献

- [1] Penson DF, Lubeck DP, et al. Do impotent men with diabetes have more severe erectile dysfunction and worse quality of life than the general population of impotene patients? Results form the Exploratory Comprehensive Evaluation of Erectile Dysfunction (ExCEED) database. *Diabetes care*. 2003; 26 (4): 1093-9.
- [2] Hamdan FB, Al - Matubsi HY. Assessment of erectile dysfunction in diabetic patients. *Int J Androl*. 2009; 32 (2): 176-85.
- [3] Yohannes E, Chang J, Tar MT, et al. Molecular targets for diabetes mellitus-associated erectile dysfunction. *Mol Cell Proteomics*. 2010; 9 (3): 565-78.
- [4] 侯庆宁, 何兰杰. 枸杞多糖对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂及 TNF- α 水平的影响 [J]. *宁夏医学杂志*, 2009, 31 (3): 201-203.
- [5] 罗琼, 黄晓兰, 李卓能, 杨明亮, 阎俊. 枸杞多糖对大鼠性功能及生殖功能的影响. *营养学报*, 2006, 8 (1): 62-70.
- [6] Luo Q, Li Z, Yan J, Zhu F, Xu RJ, Cai YZ. Lycium barbarum polysaccharides induce apoptosis in human prostate cancer cells and inhibits prostate cancer growth in a xenograft mouse model of human prostate cancer. *J Med Food*. 2009 Aug; 12 (4): 695-703.
- [7] 陈国强, 白文俊, 等. 糖尿病性勃起功能障碍兔模型的建立 [J]. *中国男科学杂志*, 2005, 19 (1): 11-14.
- [8] 陈小明, 黄丹丹, 等. 新西兰兔糖尿病肾病模型的建立方法 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28 (4): 765-768.
- [9] 陕文生. 男性生殖健康的现状的研究 [J]. *甘肃科技纵横*, 2011, 40 (2): 193-194.
- [10] Nishimatsu H, Hirata Y, et al. Effects of intracavernous administration of adrenomedullin on erectile function in rats [J]. *Peptides*, 2001, 22 (11): 1913-1918.
- [11] Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage [J]. *Mutat Res*, 1996, 350 (1): 103-108.
- [12] Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable β -cell [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36: 343-347.
- [13] Yang C F, Liu J, et al. Protective effect of ebselen on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in primary rat hepatocytes [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2000, 86 (4): 156-161.
- [14] 贾晓民, 赵杰, 等. 超氧化物歧化酶对接受全身放射的荷瘤小鼠脾及外周血的影响 [J]. *徐州医学院学报*, 2003, 23 (2): 232-234.
- [15] Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology [J]. *Free Radical Res*, 1999, 31 (6): 577-596.