

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.004

骨髓间充质干细胞改善糖尿病大鼠勃起功能障碍的研究

聂永华¹, 肖明朝¹, 苟欣¹, 汤为学², 陈力学², 蔡贤福¹

(重庆医科大学附属第一医院 1. 泌尿外科; 2. 实验研究中心、重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的: 探讨骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)移植到大鼠阴茎海绵体组织后对勃起功能的影响。方法: 体外分离培养 BMMSCs 并利用形态学及流式细胞术进行鉴定证实。用腹腔注射链脲左菌素(Streptozotocin, STZ)建立糖尿病性大鼠模型, 并用阿扑吗啡(Apomorphine, APO)筛选出糖尿病勃起功能障碍(Diabetes mellitus induced erectile dysfunction, DMED)大鼠模型, 成模后将 BMMSCs(2×10^6 个)移植于大鼠阴茎海绵体内。2 周后, 分别对正常组、糖尿病组及治疗组进行海绵体内压(Intracorporeal pressure, ICP)及平均动脉压(Mean arterial blood pressure, MAP)测定并取大鼠阴茎海绵体组织, 荧光显微镜下观察 BMMSCs 的局部存活情况, 苏木素-伊红染色(Hematoxylin and eosin, HE)观察阴茎海绵体组织中血管。结果: 荧光显微镜观察提示 BMMSCs 能在糖尿病大鼠体内存活; 勃起功能测定结果表明治疗组大鼠 ICP/MAP 比值明显高于糖尿病组; HE 染色结果显示在治疗组大鼠阴茎海绵体中血管数目[(12.75 ± 1.89)根/HP]多于糖尿病组[(8.05 ± 1.43)根/HP]。结论: BMMSCs 能够有效改善糖尿病性大鼠勃起功能。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 勃起功能障碍; 糖尿病

【中国图书分类法分类号】R587.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-31

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on improving erectile dysfunction in diabetic rats

NIE Yonghua¹, XIAO Mingzhao¹, GOU Xin¹, TANG Weixue², CHEN Lixue², CAI Xianfu¹

(1. Department of Urology Surgery; 2. Experiment center, Chongqing Key Laboratory of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effect of bone marrow mesenchymal stem cells(BMMSCs) transplanted into corpus cavernosum on improving erectile dysfunction in diabetic rats. Methods: BMMSCs were separated and cultivated in vitro, then were identified by morphological method and flow cytometry. The diabetic rat model was constructed by intraperitoneal injection of streptozotocin(STZ), then model of diabetes mellitus induced erectile dysfunction(DMED) was sieved by apomorphine(APO). BMMSCs(2×10^6 pieces) were transplanted into the corpus cavernosum of the rats in DMED model. Two weeks later, the intracorporeal pressure(ICP) and mean arterial blood pressure(MAP) of normal group, diabetic group and treatment group were determined respectively, the surviving and differentiation of BMMSCs in corpus cavernosum was observed, vessels in corpus cavernosum were counted after staining the tissue by hematoxylin and eosin. Results: The separation and culture of BMMSCs as well as the construction of the rat model with diabetic erectile dysfunction were successful. Many BMMSCs survived in diabetic group under microscope after being transplanted. The results of erectile function test indicated that the ratio of ICP against MAP was higher in treatment group than in diabetic group. There were more vessels in the treatment group[(12.75 ± 1.89) radices/HP] than in diabetic group[(8.05 ± 1.43) radices/HP]. Conclusion: BMMSCs can improve erectile function of diabetic rat.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cells; erectile dysfunction; diabetes mellitus

勃起功能障碍是威胁中老年男性生活质量的疾病之一, 其中以糖尿病为代表的代谢性疾病所致的勃起功能障碍为难治性病症, 常用的 PDE5 抑制

剂对其几乎无治疗作用, 国内外报道糖尿病性勃起功能障碍(Diabetes mellitus induced erectile dysfunction, DMED)的发生率为 19.0%~86.3%^[1,2], 是非糖尿病患者的 3 倍^[3]。DMED 发生机制十分复杂, 与血管、神经、神经递质、内分泌等诸多因素有关, 至今未完全明确。糖尿病所引发的血管病变可能导致动

作者介绍: 聂永华(1982-), 男, 硕士,

研究方向: 泌尿外科基础与临床。

通信作者: 肖明朝, 男, 教授, Email: xzm.2004@163.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: CSTC, 2009BB5411)。

脉舒缩功能障碍,海绵体缺血、缺氧,进而平滑肌减少,此外糖尿病也引起神经病变。近年来有关骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)的治疗作用研究甚多,也有联合基因对老年性勃起功能障碍的治疗报道^[4],而针对 DMED 的研究报道甚少。本实验通过探讨 BMMSCs 改善 DMED 的机制,为今后的临床治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验试剂:胎牛血清(Gibico),低糖 DMEM 培养基, F12 培养基(Hyclone),兔抗大鼠 CD29、CD90、CD45、CD54(BD 公司),胰蛋白酶(Sigma),PBS(北京中杉金桥),链脲左菌素(Sigma),DAPI(碧云天),阿扑吗啡(Sigma)。

实验对象:SD 清洁级雄性大鼠 30 只由重庆医科大学实验动物中心提供。所用动物经过重庆市动物保护中心支持。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BMMSCs 的分离和培养 取 6 周龄 SD 雄性大鼠,颈部脱臼处死,碘伏浸泡 2 min,然后 75%酒精浸泡 5 min,在无菌条件下,分离股骨、胫骨和肱骨,用 0.9%的生理盐水冲洗骨髓腔,至冲洗液清亮,骨干发白。将冲洗液进行离心,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清液,加入含有血清的培养基,混匀并分装入细胞培养瓶中,放入 37 ℃,5%CO₂ 饱和湿度孵箱中培养。间隔 2 d 换 1 次液,当细胞融合度达 90%以上时,用浓度为 0.25%的胰酶消化细胞,当绝大多数细胞变圆,加入含血清的培养基中止消化,离心弃上清,再加入适量的含血清的培养基,混匀制成单细胞悬液分装入 2 个培养瓶中培养,按此方法传至 2 代备用。

1.2.2 BMMSCs 流式细胞技术鉴定 收集培养的第 2 代 BMMSCs,0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次,加入 CD29、CD90、CD54、CD45 单克隆抗体,工作浓度 1:100,4 ℃孵育 30 min,0.01 mol/L PBS洗涤 2 次,流式细胞仪检测。

1.2.3 DMED 大鼠模型的构建 按参考文献[5,6]方法选用 8 周龄 SD 雄性大鼠(重庆医科大学实验动物中心)30 只,体重 180~200 g,禁食(不禁水)14 h 后,于左下腹腔注射新鲜配制的 1%链脲左菌素[(Streptozotocin,STZ)60 mg/kg]溶液,自由饮食。72 h 后大鼠断尾测随机血糖,血糖浓度>16.7 mmol/L 者认为患有糖尿病。符合上述标准者继续饲养 2 月后,再次断尾测随机血糖,并配制阿扑吗啡(Apomorphine,APO)溶液,将 APO 按 100 μg/kg 注射大鼠颈项皮肤松软处,记录 30 min 内的勃起次数(以打哈欠、龟头充血、骨盆前推、包皮后退阴茎体增长为阴茎勃起 1 次)。血糖>16.7 mmol/L,APO 诱导实验阴性为建模成功。结果成功构建糖尿病大鼠模型 20 只,DMED大鼠模型 8 只,待用。

1.2.4 细胞移植 将 2 代细胞用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)标记细胞核,荧光显

微镜下观察细胞标记情况,同一个视野有 80%以上为标记成功。将大鼠分为 2 组,糖尿病组和治疗组,分别接受不同的处理,糖尿病组:PBS 100 μl,治疗组:BMMSCs 100 μl。注射部位为大鼠阴茎根部。

1.2.5 阴茎勃起功能观察 细胞移植 1 周后,称重,放入实验透明塑料笼(26 cm×18 cm×18 cm)。房间灯光调暗,仅够观察,室内保持安静,使大鼠适应环境 10 min。然后在其颈后部皮下注射 APO(100 μg/kg),持续观察 30 min,对其勃起情况进行记录。每组中有勃起现象的大鼠占该组所有大鼠的百分比为勃起率。

1.2.6 海绵体内压(Intracorporeal pressure,ICP)与平均动脉压(Mean arterial pressure,MAP)比值测定阴茎勃起功能 参阅文献[7,8]所用方法麻醉大鼠后,仰卧位固定于板上,通过颈正中切口,颈动脉插管监测动脉压,由此可得MAP;下腹正中切口,外科显微镜下暴露主要的盆神经节和海绵体神经,将不锈钢电极钩状电极围绕在海绵体神经上,准备电刺激,将一只装满 250 U/ml 肝素溶液并与导管相连接的 23 G 针头插进海绵体脚,准备用于监测 ICP。2 条压力通路与 2 台压力转换器连接,直接与微机控制的记录仪连接,来测量并记录全身动脉压及海绵体内部的压力;采用与微机刺激输出导线相连接电极来进行电刺激,每只电极直径 0.2 mm,两只电极分开 1 mm。刺激参数为 5.0 mV,频率 20 Hz,波幅 5.0 ms,持续 1 min。5 min 休息期后(压力回到基线),进行下一次电刺激。

1.2.7 BMMSCs 移植大鼠后的体内观察 在荧光显微镜下观察阴茎海绵体组织切片。标记有 DAPI 的 BMMSCs 呈现蓝光,以蓝色荧光的多少和强度来反应 BMMSCs 在大鼠阴茎海绵体中的多少及增殖情况。

1.2.8 苏木素-伊红(Hematoxylin and eosin,HE)染色观察阴茎海绵体血管 取大鼠阴茎海绵体做石蜡切片,标本进行 HE 染色,对比两者改变。每张切片随机选取 20 个视野,镜下计数毛细血管数目。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对毛细血管数目进行单因素方差分析,两两进行比较, $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMMSCs 的体外培养及鉴定结果

新分离获得的骨髓细胞为圆形,大小不一,悬浮于培养液中,培养 24 h 后部分细胞开始贴壁,倒置显微镜下观察细胞伸出伪足样突起,呈梭形、纺锤形或多角形。第 3 天换液,可见少量短梭形、星形细胞分散贴壁生长,少量成簇状聚集,细胞数显著增加,可见放射状排列的细胞集落,伸出长短不一、粗细不均的突起(图 1)。至第 8 天,细胞基本融合,达 85%~90%,呈旋窝状(图 2)。传代细胞贴壁较快,24 h 内基本全部贴壁、伸展,增殖很快,均匀分布生长,6~7 d 可见长梭形

细胞,90%左右铺满瓶底,传至 2 代,做流式备用。

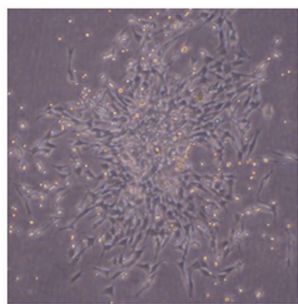


图 1 原代细胞第 3 天 (10×10)

Fig.1 Primary cells on the 3rd d (10×10)

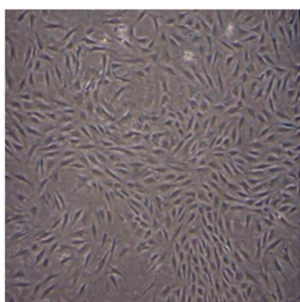


图 2 原代细胞第 8 天 (10×10)

Fig.2 Primary cells on the 8rd d (10×10)

2.2 BMMSCs 的鉴定

流式细胞术显示:CD29、CD90、CD54 阳性率分别为 99.95%、99.88%、99.68%,CD45 阴性对照为 3.13%(图 3)。

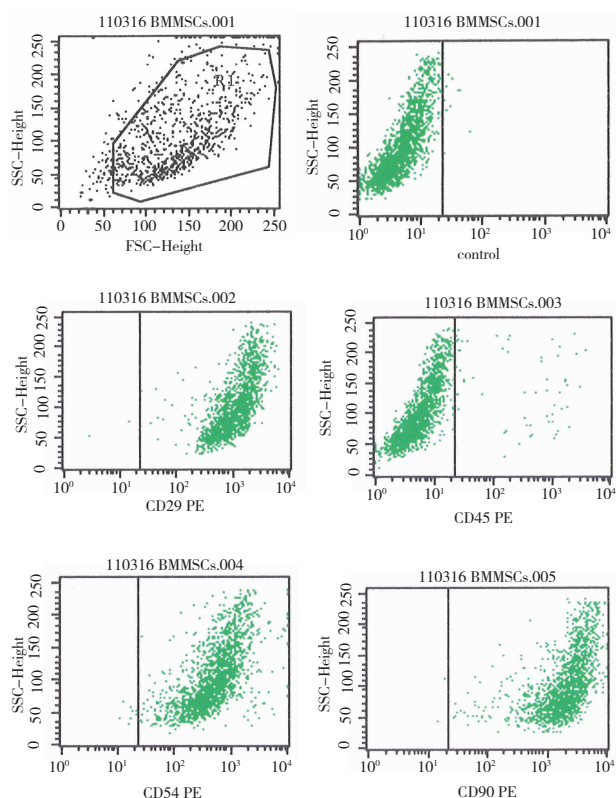


图 3 流式细胞技术鉴定 BMMSCs

Fig.3 Identification of BMMSCs by flow cytometry

2.3 DMED 大鼠筛选结果

各组大鼠注射 APO 后有焦躁、打哈欠、骨盆前推、包皮后退、阴茎勃起等活动表现。正常组大鼠阴茎均能正常勃起。与正常组相比,糖尿病组、治疗组大鼠勃起次数减少($P<0.05$) 各组大鼠勃起率无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠注射 APO 之后阴茎勃起情况

组别	数量(只)	勃起次数(次)	勃起率
正常组	6	2.33 ± 0.15	100.0% (6/6)
糖尿病组	6	1.83 ± 0.37	83.3% (5/6)
治疗组	8	1.67 ± 0.86	75.0% (6/8)

2.4 ICP/MAP 比值测定阴茎勃起功能

测定前后测血糖均在 16.7 mol/L,测定 ICP 及 MAP 二者的比值如图 4。

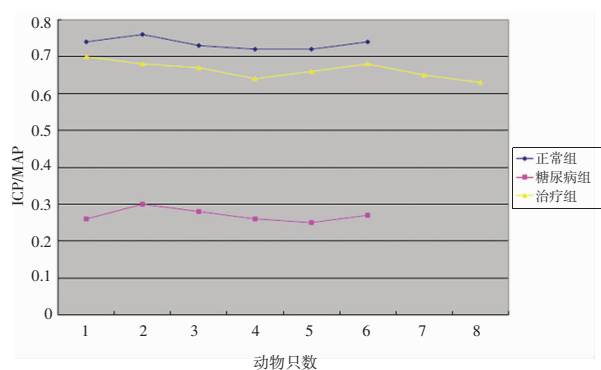


图 4 各组大鼠 ICP 与 MAP 比值

Fig.4 Ratio of ICP against MAP in each group

2.5 BMMSCs 移植大鼠后观察

荧光显微镜下观察,DAPI 标记细胞核呈蓝色(图 5)。细胞注射前先结扎大鼠阴茎根部,防止细胞随血液循环进入其他部位,注射 2 min 后,放开。细胞移植两周后,行海绵体石蜡切片,荧光显微镜观察海绵体内的 BMMSCs 情况(图 6)。

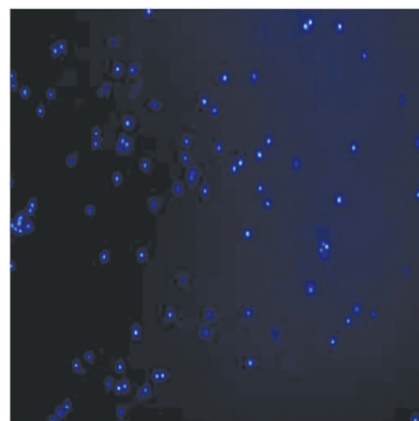


图 5 注射前,DAPI 标记 BMMSCs 细胞核 (10×10)

Fig.5 BMMSCs nucleus marked by DAPI before injection (10×10)

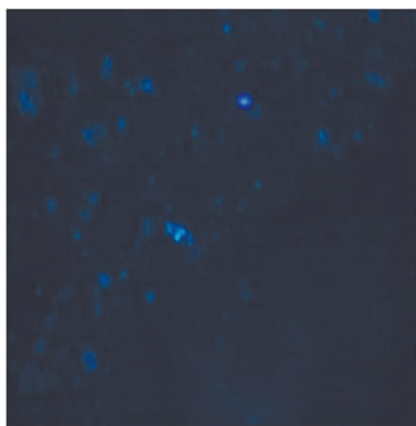
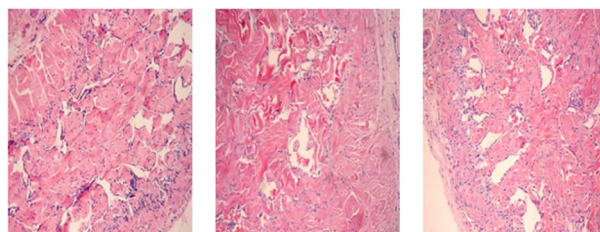


图 6 注射后, 荧光显微镜下观察大鼠阴茎海绵体组织中 DAPI 标记的细胞 (10 × 10)

Fig.6 Marked cells in corpus cavernosum under fluorescence microscope after injection (10 × 10)

2.6 观察阴茎海绵体组织中血管

阴茎海绵体组织 HE 染色(图 7), 同时镜下计数毛细血管数目并统计学分析(表 2), 分析结果显示, 治疗组与糖尿病组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.001$ 。



A. 糖尿病组 B. 正常组 C. 治疗组

图 7 海绵体组织中血管数目 (HE, 10 × 20)

Fig.7 Vascellum numerous in corpus cavernosum (HE, 10 × 20)

表 2 各组大鼠阴茎海绵体组织中毛细血管数目 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Number of the capillary in corpus cavernosum in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	毛细血管数目 (根/HP)
正常组	6	15.40 ± 3.80
治疗组	8	12.75 ± 1.89
糖尿病组	6	8.05 ± 1.43

注: 糖尿病与正常组相比, $P < 0.001$; 治疗组与糖尿病组相比, $P < 0.001$; 治疗组与正常组相比, $P = 0.002$

3 讨论

BMMSCs 是起源于中胚层的一类多功能干细胞, 具有多项分化的潜能, 可以向骨、软骨、脂肪等多方向分化^[9]。因其取材方便、便于培养、自体骨髓移植可避免排斥反应等优点, 其研究应用方面甚

广^[10]。近期有关用 BMMSCs 修复受损的心脏的研究结果表明: BMMSCs 移植治疗有效, 能够有效缩小梗死面积, 并且降低左室舒张末期容积, 提高左心射血分数, 从而改善心功能^[11~13]。BMMSCs 发挥功能的机制可能有以下几个方面: (1) 细胞间的相互接触, 周围的心肌微环境为 BMMSCs 提供定向分化所需电、机械刺激及因子, 从而使 BMMSCs 在心肌微环境下分化为心肌样细胞; (2) BMMSCs 能够分化为血管内皮细胞及平滑肌细胞, 从而有利于血管再生, 改善局部微循环; (3) 旁分泌作用。除此之外, 还开展了许多针对风湿病^[14]、糖尿病^[15]、动脉粥样硬化等^[16]多领域的研究, 在某些程度上也取得了一定的成就。BMMSCs 在促进神经纤维再生及功能的恢复的同时, 也可以分化为内皮细胞, 促进血管功能的修复^[17]。Bivalacqua 等^[18]将体外扩增培养的 BMMSCs 及转染了 eNOS 的 BMMSCs 注射入老龄大鼠海绵体内。组织学分析显示 BMMSCs 在海绵体内至少存活了 21 d, 且没有引起明显的炎症反应。ICP 测定显示植入 BMMSCs 较对照组明显提高。上述研究结果表明 BMMSCs 能够改善老龄大鼠的勃起功能。

BMMSCs 因为其自身无特异性标志物, 在植入问题上存在自身 BMMSCs 植入虽可避免排斥问题, 但是骨髓中的含量很少, 不能满足需求, 外周血中含量更少; 异体 BMMSCs 植入面临免疫排斥问题。此外, BMMSCs 在体外培养能够自我复制存活, 植入后无法调控, 是否会发生肿瘤样改变。

目前, BMMSCs 对 DMED 的治疗研究目前还处于初级阶段, 在其能否安全进入临床使用, 还有待深入研究。本研究成功分离培养了 BMMSCs, 并且通过流式细胞术鉴定了 BMMSCs、CD29(99.95%)、CD90(99.88%)、CD54(99.68%) 阳性表达, CD45(3.13%) 阴性表达。DAPI 成功标记细胞核, 移植入大鼠阴茎海绵体且在两周后处死大鼠取得的 HE 染色组织切片上观测到带有荧光标记的细胞, 证明 BMMSCs 存在于阴茎海绵体内; 同时, 成功构建了 DMED 大鼠模型, 并测定了大鼠的 ICP 以及 MAP, 二者比值反映了大鼠的阴茎勃起功能。从测得的实验数据以及组织切片 HE 染色观测血管来看, 与正常组相比较, 糖尿病组的血管数目及 ICP/MAP 的值均较低, 治疗组明显高于糖尿病组。这些实验结果表明 BMMSCs 能够在一定程度上改善 DMED 大鼠勃起功能。实验中仍有些问题有待改进, 实验中移植的 BMMSCs 的量是否足够, BMMSCs 移植入后观察时间延长, 血管

数目是否增多等,这些都是本研究今后的研究所考虑的。从实验结果来看,相对正常组、对照组,治疗组的大鼠注射 BMMSCs 后所测定的 ICP/MAP 比值反映了 BMMSCs 注射是成功的。BMMSCs 之所以能够改善 DMED 大鼠的勃起情况,可能在于 BMMSCs 在阴茎海绵体局部特定环境下定向分化为内皮细胞以及平滑肌细胞,补充了糖尿病所致失活的细胞数,这些细胞在阴茎勃起过程中发挥着重要的作用,同时,BMMSCs 在微环境下可能分化的内皮细胞、平滑肌细胞及神经细胞,可能修复受损组织,改善了勃起功能;另外,BMMSCs 自身或者周围组织可能分泌一些在勃起功能中发挥重要作用的因子如 NOs、cGMP,使细胞存活时间延长,促进血管恢复;细胞分泌某些因子激活通路传导,促进勃起功能的恢复。这些都有待深入研究,相信随着研究的深入,这些问题会逐步解决。

参 考 文 献

- [1] Fedele D, Coscelli C, Cucinotta D, et al. Incidence of erectile dysfunction in Italian men with diabetes[J]. J Urol, 2001, 166(4):1368–1371.
- [2] 邓大同, 杨明功, 陈明卫, 等. 208 例 2 型糖尿病男子性功能障碍调查[J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(3):280–281.
- Deng D T, Yang M G, Chen M W, et al. An investigation of erectile dysfunction in 208 patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Chin J Dis Control Prev, 2005, 9(3):280–281.
- [3] De Berardis G, Franciosi M, Belfiglio M, et al. Erectile dysfunction and quality of life in type 2 diabetic patients: a serious problem too often overlooked[J]. Diabetes care, 2002, 25(2):284–291.
- [4] Bivalacqua T J, Deng W, Kendirci M, et al. Mesenchymal stem cells alone or ex vivo gene modified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(3):H1278–1290.
- [5] Lawal M. Management of diabetes mellitus in clinical practice[J]. Br J Nurs, 2008, 17(17):1106–1113.
- [6] 李煜罡, 潘恩山, 朱晓光. 糖尿病性勃起功能障碍大鼠模型的建立及阴茎海绵体组织 nNOs 的变化[J]. 临床医学工程, 2009, 16(12):46–49.
- Li Y G, Pan E S, Zhu X G. Establishment of diabetic rats model with erectile dysfunction and change of nNOS in corpus cavernosum[J]. Clinical Medical Engineering, 2009, 16(12):46–49.
- [7] Christ J, Rehman J, Day N, et al. Intracorporal injection of hSlo cDNA in rats produces physiologically relevant alterations in penile function[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1998, 275(2 Pt 2):600–608.
- [8] Melman A, Zhao W, Davies K P, et al. The successful long-term treatment of age related erectile dysfunction with hSlo cDNA in rats in vivo[J]. J Urol, 2003, 170(1):285–290.
- [9] 杨钰兴, 肖明朝, 苟 欣, 等. 勃起功能障碍的干细胞治疗研究[J]. 中华内分泌外科杂志, 2009, 3(4):267–269.
- Yang Y X, Xiao M Z, Gou X, et al. The study in treatment of erectile dysfunction by stem cells[J]. Chin J Endocr Surg, 2009, 3(4):267–269.
- [10] 朱 勇, 陈良万, 林若柏, 等. SD 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养、表型鉴定及标记[J]. 吉林大学学报, 2009, 35(2):326–329.
- Zhu Y, Chen L W, Lin R B, et al. Culture, identification of phenotype, and labeling of mesenchymal stem cells in vitro in SD rats[J]. Journal of Jilin University, 2009, 35(2):326–329.
- [11] Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyeh I M, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis[J]. Arch Intern Med, 2007, 167(10):989–997.
- [12] Lipinski M J, Biondi-Zoccai G G, Abbate A, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction, a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(18):1761–1767.
- [13] Meyer G P, Wollert K C, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized controlled BOOST (bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial[J]. Circulation, 2006, 113(10):1287–1294.
- [14] Djouad F, Bouffi C, Ghanam S, et al. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic disease[J]. Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(7):392–399.
- [15] Abdi R, Fiorina P, Adra C N, et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2008, 57(7):1759–1767.
- [16] Chamberlain G, Smith H, Rainger G E, et al. Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear[J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25663.
- [17] Lin C S, Xin Z C, Wang Z, et al. Stem cell therapy for erectile dysfunction: a critical review[J]. Stem Cells and Dev, 2012, 21(3):343–351.
- [18] Bivalacqua T J, Deng W, Kendirci M, et al. Mesenchymal stem cells alone or ex vivo gene modified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(3):H1278–1290.

(责任编辑: 关蕴良)