

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20131120

三七总皂苷的抗凋亡作用对糖尿病性勃起功能障碍大鼠勃起功能的影响

李 欢, 苟 欣

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过观察三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)对糖尿病性(diabetes mellitus, DM)勃起功能障碍(erection dysfunction, ED)大鼠的阴茎细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 表达的影响,探讨 PNS 改善 DMED 大鼠勃起功能的可能性及其作用途径。**方法:**建立 DMED 大鼠模型,随机分成 PNS50、PNS100、PNS150 处理组和 DMED 组,前 3 组 DMED 大鼠每日腹腔注射 PNS 剂量分别为 50、100、150 mg/kg,DMED 组(未注射 PNS)和正常对照组(正常大鼠)腹腔注射等剂量生理盐水。4 周后,电刺激阴茎海绵体神经测定阴茎海绵体内压(intracavernosal pressure, ICP)与平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)比值;免疫组化测阴茎组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达;TUNEL 法检测阴茎组织细胞凋亡率;电镜观察阴茎组织细胞凋亡情况。**结果:**实验结束时, PNS100、PNS150 处理组与 DMED 组相比,体质量明显增高,血糖水平降低;ICP 和 ICP/MAP 均有明显升高, Bcl-2 升高而 Bax 的表达和细胞凋亡率下降($P<0.05$)。电镜观察发现: PNS50 处理组海绵体血管内皮细胞胞核肿胀,血管内皮细胞断裂。DMED 组血管内皮粗糙断裂,平滑肌细胞凋亡,血栓形成。PNS100、PNS150 处理组和正常对照组,未发现以上改变。**结论:** PNS 通过上调 Bcl-2/Bax 的比值,减少阴茎组织血管内皮细胞和平滑肌细胞的凋亡,保护细胞功能,提高 DMED 大鼠的勃起功能。

【关键词】三七总皂苷;糖尿病;勃起功能障碍;凋亡;内皮细胞;平滑肌细胞

【中国图书分类法分类号】R698+1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-21

Antiapoptotic effects of Panax notoginseng saponins on erectile function in diabetic rats with erectile dysfunction

LI Huan, GOU Xin

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

【Abstract】Objective: To detect whether Panax notoginseng saponins (PNS) could improve the erectile function of diabetic mellitus (DM) rats with erection dysfunction (ED), to find the possible ways by which PNS worked and to explore effects of PNS on Bax and Bcl-2 expressions. **Methods:** Model of DMED was established and the rats were randomly divided into four groups: PNS treated group (intraperitoneal injection with doses of 50 mg/(kg·d), 100 mg/(kg·d), 150 mg/(kg·d)) and DMED group (intraperitoneal injection with saline); at the same time, normal rats injected with saline were taken as controls (normal control group). Four weeks later, ratio of intracavernous pressure (ICP) and mean arterial blood pressure (MAP) was measured by electro-stimulating of cavernous nerve. Then cavernous bodies of penis of all experimental rats were harvested and their expressions of Bcl-2 and Bax were determined by immunohistochemistry. Apoptosis of penile tissue cell was detected by TUNEL. Changes of the cavernous bodies in ultrastructures were observed by electron microscopy. **Results:** ICP/MAP was elevated and value of Bcl-2/Bax was increased in middle and high dose group than in DMED group. Results of electron microscopy uncovered that there were ruptured endothelium and impaired smooth muscle cells in the low dose PNS group and DMED group and even thrombosis in DMED group; in the middle, high dose group and normal control group, there were no abnormal changes. **Conclusions:** PNS might elevate the value of Bcl-2/Bax to protect endothelium and smooth muscle cells from apoptosis as well as protect the function of penis cells, thereby to improve erectile function.

【Key words】 Panax notoginseng saponins; diabetes mellitus; erection dysfunction; apoptosis; endothelial cell; smooth muscle cell

勃起功能障碍(erection dysfunction, ED)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)的常见并发症之一^[1]。大约

50%~75%的 DM 患者合并 ED,并且较非 DM 患者发病早^[2]。DMED 的发病机制至今未完全阐明。一些研究认为,DM 神经病变和血管病变是 DMED 的主要原因。而越来越多的研究发现阴茎勃起组织的过度凋亡是导致 ED 发生的重要机制之一,促进 ED 发

作者介绍:李 欢, Email: lihuanwade@163.com,

研究方向:泌尿男科学。

通信作者:苟 欣, Email: cymnk@163.com。

生的高危因素均可以引起阴茎勃起器官、组织的过度凋亡,从而影响勃起功能^[3]。

三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)是利用提取、分离技术从优质三七中获得的有效药用成分,主要功用包括活血祛瘀、通脉活络。人参皂苷 Rg1、Rb1、Re 和三七皂苷 R1 是 PNS 的主要成分。大量实验研究表明 PNS 有多种生物学活性,包括预防血管内膜损伤后的血管再狭窄^[4];抑制细胞凋亡保护缺血环境下的心肌细胞^[5];改善氧化应激环境抑制过氧化氢诱导的兔骨髓间充质细胞凋亡^[6-7]。但是目前鲜有研究报道 PNS 有抑制阴茎组织细胞凋亡的作用以及 PNS 对 ED 的影响。本研究的假设是 PNS 能够改善勃起功能,可能是通过减少阴茎组织血管内皮细胞和平滑肌细胞的凋亡,保护细胞功能来实现的。

1 材料和方法

1.1 材料

6~7 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 90 只,体质量(220 ± 20) g,由重庆医科大学实验动物中心提供;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),美国 Sigama 公司;Lifescan 血糖仪及配套试纸,美国强生公司;阿扑吗啡(apomorphine, APO),美国 Sigama 公司;Bax、Bcl-2 抗体,北京博奥森公司;免疫组化 SABC 法试剂盒,北京中杉金桥公司;BL-420 生物机能实验系统,成都泰盟科技有限公司;透射电子显微镜 Hitachi-7500,日本日立公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DMED 模型的建立 参照文献[8-9]建立 DMED 模型。取 90 只 6~7 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量(220 ± 20) g, SPF 级环境饲养,自由饮食水,所有步骤都遵照中国实验动物使用规则并取得重庆医科大学伦理委员会批准。大鼠适应性饲养 1 周,注射 STZ 前禁食 16 h,不禁水,其中 84 只大鼠腹腔注射 STZ(60 mg/kg),余 6 只不注射 STZ 为正常对照组。注射 STZ 后第 4 天和第 7 天用血糖仪剪尾法测定尾血血糖,任意时间血糖 >16.67 mmol/L 为成 DM 模型纳入标准。每周测血糖 1 次,进食量及尿量明显高于正常对照组、体质量逐渐下降且持续 3 周以上即为 DM 造模成功。DMED 的筛选参照 Heaton 等^[9]的方法,DM 大鼠饲养 12 周后进行。动物称重后分别放入实验铁笼中,房间灯光调暗,室内保持安静,适应环境 10 min。将 APO 按 100 μ g/kg 比例皮下注射于大鼠颈部皮肤松软处。用录像机从笼下方对大鼠观察 30 min,记录勃起次数。大鼠阴茎勃起的标准为:龟头露出充血,包皮后退,阴茎膨大增长为勃起。未见勃起者并且血糖水平(空腹)超过 7.2 mmol/L 为 DMED 大鼠。

1.2.2 实验分组及注射药物 操作步骤:建立 DMED 模型成功后,随机将 DMED 大鼠分成 PNS50、PNS100、PNS150 处理组和 DMED 组。前 3 组腹腔注射 PNS 的剂量分别是 50、100、150 mg/(kg·d),未被注射 PNS 为 DMED 组,同时选择正常大鼠(同一批未注射 STZ)作为正常对照组,正常对照组和 DMED 组腹腔注射等量的生理盐水。各组动物(每组 6 只)每天注射 1 次,连续 4 周。

1.3 结果判定

1.3.1 阴茎海绵体内压(intracavernosal pressure, ICP)与平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)比值测定 参照文献[10-13]测定大鼠的勃起功能。用 10%的水合氯醛腹腔注射(0.35 ml/100 g)麻醉 SD 大鼠,暴露左侧颈总动脉,用充满 200 U/ml 肝素的细塑料插管插入后连接 PE-50 管,与 BL-420 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)连接,记录 MAP。下腹部正中切口,暴露前列腺一侧侧叶的背面,小心钝性分离,显露骨盆神经节和海绵体神经。用双极银制电极勾住海绵体神经并固定(两电极直径均约 0.2 mm,间距约 1 mm)连接到 BL-420 生物机能实验系统的电源上。解剖阴茎背面的皮肤和筋膜,显露阴茎海绵体至阴茎根部。23 号针连接到 1 个 PE-50 管(管内充满 200 U/ml 肝素),将针头插入到左侧海绵体阴茎根部,插入约 1~2 mm,PE-50 管连接到 BL-420 生物机能实验系统,电极刺激设置在 20 Hz 的频率,0.2 ms 脉冲宽度,刺激电压为 10 V,记录海绵体基础压后测量 ICP。刺激 30 s 休息 5 min,再进行下一次刺激,记录最高 ICP。最高 ICP/MAP 作为评估勃起功能的指标。

1.3.2 样本处理 ICP/MAP 测量完毕后,取阴茎海绵体组织,仔细剔除筋膜,在离体 1 min 之内用刀片沿肌纤维方向取 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 3 mm 的长条状组织,放入特定的电镜固定液中,整个过程在 4 $^{\circ}$ C 下操作,避免挤压,牵拉组织,然后送往电镜室透射电镜观察。取 2 mm 长的阴茎组织放入 4%多聚甲醛中固定,做石蜡包埋切片。余下组织经过液氮速冻后迅速保存在-80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3.3 免疫组化方法检测阴茎组织凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达情况 用 SABC 染色法检测各组阴茎组织 Bax 和 Bcl-2 的表达情况(操作步骤按试剂盒提供的方法进行)。用分析测量图像软件 Image pro-plus 6.0 分析各组阴茎组织免疫组化图片(400 $\times$)。每个样本均取 2 个视野,通过色调、饱和度、亮度模式选择待测视野(area of interest, AOI),分别测出 2 个视野的平均吸光度,作为该样本的统计学指标。蛋白表达指数(protein expression index, PEI)=平均吸光度 $\times$ 阳性细胞百分比 $\times$ 100。

1.3.4 TUNEL 染色法检测阴茎组织凋亡情况 用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒检测各组阴茎组织细胞凋亡(操作步骤遵照试剂盒检测说明书进行)。用分析测量图像软件 Image pro-plus 6.0 分析各组阴茎组织 TUNEL 图片(400 $\times$)。每个样本均随机取 4 个视野,褐色深染的细胞计数为凋亡细胞,它与该视野内细胞总数之比计为凋亡率,分析过程在 Image pro-plus 6.0 图像分析软件的细胞计数功能帮助下完成。

表 1 大鼠实验期间体质量与血糖变化
Tab.1 Body weights and blood glucose levels of experiment rats

分组	体质量 (g)			血糖 (mmol/L)		
	实验开始	第 1 周	第 4 周	实验开始	第 1 周	第 4 周
正常对照组	248 ± 11	268 ± 10	311 ± 7	6.6 ± 0.7	6.5 ± 1.0	6.5 ± 0.8
DMED 组	201 ± 12	210 ± 10	214 ± 9	30.0 ± 2.6	30.3 ± 2.8	29.5 ± 1.3
PNS50 处理组	202 ± 12	204 ± 11	212 ± 6	31.0 ± 2.1	29.8 ± 2.1	24.8 ± 2.7
PNS100 处理组	201 ± 11	215 ± 9	239 ± 12	30.3 ± 2.4	28.3 ± 2.0	20.7 ± 2.8
PNS150 处理组	214 ± 11	228 ± 5	248 ± 9	28.9 ± 1.5	26.2 ± 2.5	19.8 ± 1.3

1.4 统计学处理

所得各组计量资料用 Excel 2010 数据录入软件录入,均以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。多组间比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 各组大鼠实验期间体质量和血糖的改变

实验开始、实验结束以及实验第 1 周末各组大鼠的体质量和血糖变化如表 1 所示;实验结束(第 4 周末)各组实验大鼠体质量增加值和血糖降低值如表 2 所示。体质量增加值多组均数比较组间差异明显($F=16.299, P=0.000$)。血糖降低值多组均数比较组间差异明显($F=14.196, P=0.000$)。用 LSD-*t* 法两两比较后结果显示:正常对照组和 DMED 组相比,实验第 4 周末其体质量增加值明显升高($P<0.05$),差异有统计学意义(表 2)。与 DMED 组相比,PNS100 和 PNS150 处理组在实验第 4 周末其体质量增加值明显增高,同时血糖降低,差异有统计学意义(表 2)。

表 2 第 4 周末各组实验大鼠体质量增加值和血糖降低值对比
Tab.2 Contrast of body weight gain and blood glucose lose in the fourth week

分组	体质量增加值 (g)	<i>P</i> 值 ^a	血糖降低值 (mmol/L)	<i>P</i> 值 ^b
正常对照组	63.8 ± 10.6	0.000	0.1 ± 1.3	0.819
DMED 组	13.8 ± 17.3	—	0.5 ± 2.8	—
PNS50 处理组	10.5 ± 7.3	0.662	6.1 ± 2.5	0.003
PNS100 处理组	38.5 ± 11.5	0.003	9.6 ± 4.1	0.000
PNS150 处理组	34.0 ± 16.0	0.013	9.2 ± 3.6	0.000

注:a,与 DMED 组相比;b,与 DMED 组相比;—,没有数据

2.2 各组大鼠勃起功能的改变

电刺激阴茎海绵体神经后各组实验大鼠的 ICP 变化曲线如图 1 所示,ICP 和 ICP/MAP 具体值见表 3。各组之间的基础 ICP 没有统计学差异。电刺激阴茎海绵体神经后,ICP 和 ICP/MAP 随着 PNS 处理组剂量的增加而升高。ICP 多组均数比较,组间差异明显($F=52.742, P=0.000$)。ICP/MAP 多组均数比较,组间差异明显($F=89.455, P=0.000$)。用 LSD-*t* 法两两比较后结果显示:DMED 组与正常对照组相比,ICP 和 ICP/

MAP 明显降低($P<0.05$),差异有统计学意义(表 3)。经过 PNS 处理后,与 DMED 组相比,PNS100 处理组和 PNS150 处理组 ICP 和 ICP/MAP 明显增高(P 均 <0.05),差异有统计学意义(表 3)。

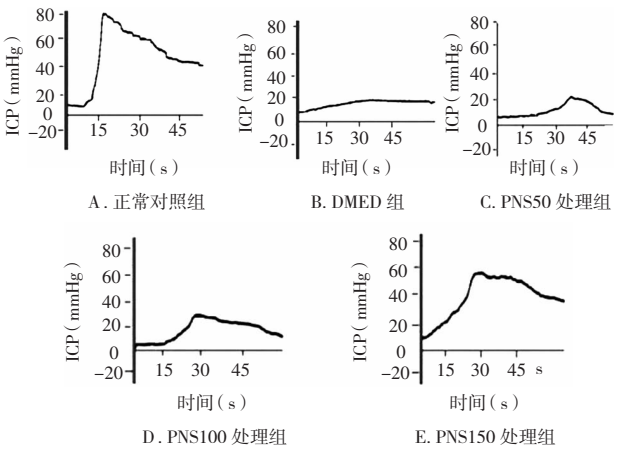


图 1 电刺激海绵体神经后 ICP 的变化曲线
Fig.1 Curve of ICP changes after electrical stimulation of cavernous nerve

表 3 各组电刺激大鼠海绵体神经后 ICP 以及 ICP/MAP
Tab.3 ICP/MAP and ICP by electrical stimulation of cavernous nerve in each experimental group

分组	ICP (mmHg)	<i>P</i> 值 ^a	ICP/MAP	<i>P</i> 值 ^b
正常对照组	100.4 ± 21.8	0.000	0.81 ± 0.023	0.000
DMED 组	21.3 ± 2.4	—	0.27 ± 0.026	—
PNS50 处理组	24.5 ± 3.5	0.616	0.28 ± 0.038	0.735
PNS100 处理组	38.9 ± 6.6	0.010	0.41 ± 0.102	0.000
PNS150 处理组	55.7 ± 7.3	0.000	0.58 ± 0.067	0.000

注:a,与 DMED 组相比;b,与 DMED 组相比;—,没有数据

2.3 各组大鼠阴茎组织中 Bcl-2 和 Bax 的表达及其比值

各组大鼠阴茎组织中 Bcl-2 和 Bax 的免疫组化图片见图 2、3,其值见表 4。Bcl-2、Bax 和 Bcl-2/Bax 多组均数比较,组间差异明显, F 分别为 18.213、16.081、16.549, P 均 $=0.000$ 。用 LSD-*t* 法两两比较后结果显示:DMED 组与正常对照组相比,Bcl-2 和 Bcl-2/Bax 明显降低,Bax 表达升高($P<0.05$,表 4)。经过 PNS 处理后,与 DMED 组相比,PNS100 和 PNS150 处理组 Bcl-2 和 Bcl-2/Bax 明显升高,Bax 表达降低($P<0.05$,表 4)。

表 4 各组大鼠阴茎组织中 Bcl-2、Bax 表达指数和 Bcl-2/Bax 的比较

Tab.4 Comparisons of PEI of Bcl-2 and Bax in penile tissues of rats and Bcl-2/Bax in each group

分组	Bcl-2 的 PEI	P 值 ^a	Bax 的 PEI	P 值 ^b	Bcl-2/Bax	P 值 ^c
正常对照组	0.910 ± 0.030	0.000	0.56 ± 0.23	0.000	1.83 ± 0.67	0.000
DMED 组	0.750 ± 0.086	—	2.51 ± 0.74	—	0.33 ± 0.13	—
PNS50 处理组	0.730 ± 0.031	0.329	2.09 ± 0.65	0.155	0.39 ± 0.15	0.790
PNS100 处理组	0.850 ± 0.027	0.002	1.13 ± 0.36	0.000	0.82 ± 0.30	0.026
PNS150 处理组	0.890 ± 0.022	0.000	0.96 ± 0.30	0.000	0.99 ± 0.29	0.004

注:a,与 DMED 组相比;b,与 DMED 组相比;c,与 DMED 组相比;—,没有数据

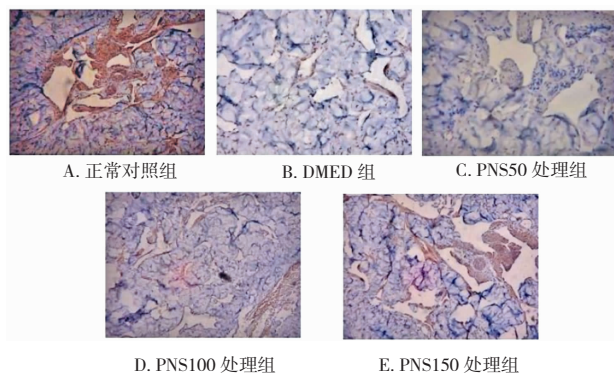


图 2 各组大鼠阴茎组织 Bcl-2 免疫组化图片对比 (400 ×)

Fig.2 Comparison on pictures of Bcl-2 expression in penile tissues stained by immunohistochemistry among five groups (400 ×)

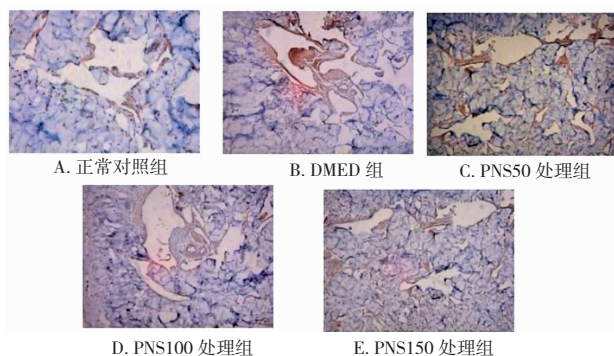


图 3 各组大鼠阴茎组织 Bax 免疫组化图片对比 (400 ×)

Fig.3 Comparison on pictures of Bax expression in penile tissues stained by immunohistochemistry among five groups (400 ×)

2.4 各组大鼠阴茎组织中细胞凋亡情况对比

各组大鼠阴茎组织中凋亡细胞 TUNEL 染色图片见图 4, 凋亡细胞比值见表 5。凋亡细胞比率多组均数比较, 组间差异明显 ($F=12.858, P=0.000$)。用 LSD- t 法两两比较后结果显示: DMED 组与正常对照组相比, 凋亡细胞比率明显升高, ($P<0.05$, 表 5)。经过 PNS 处理后, 与 DMED 组相比, PNS100 和 PNS150 处理组凋亡细胞比率降低 ($P<0.05$), 差异有统计学意义 (表 5)。

2.5 阴茎组织电镜超微结构改变

电镜观察显示: (1) DMED 组: 阴茎海绵体血管内皮粗糙断裂, 内皮细胞受损, 细胞形态异常, 血管内血栓形成, 平滑肌细胞受损、凋亡; (2) PNS50 处理组: 阴茎海绵体血管内皮

断裂, 不连续, 内皮细胞胞核肿胀, 平滑肌细胞受损; (3) PNS100、PNS150 处理组和正常对照组: 血管内皮连续, 内皮细胞形态正常, 平滑肌细胞形态正常, 未见异常改变 (图 5)。

表 5 各组大鼠阴茎组织中凋亡细胞比率的比较

Tab.5 Comparison on apoptosis rate of penile tissues among five groups

分组	凋亡细胞比率	P 值 ^a
正常对照组	0.090 ± 0.030	0.000
DMED 组	0.220 ± 0.040	—
PNS50 处理组	0.190 ± 0.034	0.118
PNS100 处理组	0.170 ± 0.031	0.017
PNS150 处理组	0.140 ± 0.032	0.000

注:a,与 DMED 组相比;—,没有数据

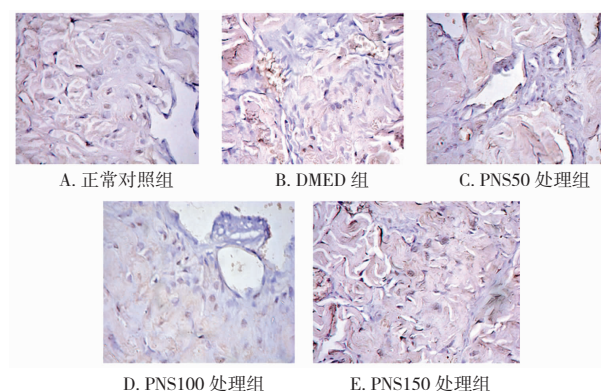


图 4 PNS 对阴茎组织凋亡情况的影响 (400 ×)

Fig.4 Effects of PNS on apoptosis in penile tissues (400 ×)

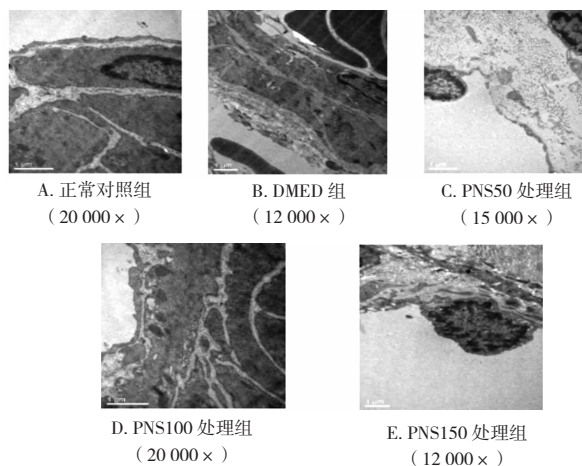


图 5 阴茎组织细胞超微结构对比

Fig.5 Comparison of ultrastructure of the penis in each group

3 讨 论

DMED 的发病机制目前仍未阐明,涉及神经、血管、内分泌等多种因素。目前,越来越多的研究发现阴茎勃起组织的过度凋亡是引起 ED 的重要机制之一。Xie 等^[14]研究发现 DMED 的小鼠阴茎的内皮细胞和平滑肌细胞过度凋亡,导致阴茎内皮细胞数目和平滑肌/胶原纤维比值下降。阴茎海绵体窦是阴茎勃起的主要组织结构,它由平滑肌和腔内壁内皮细胞组成,在阴茎勃起中起决定作用^[15],阴茎海绵体平滑肌细胞的过度凋亡使平滑肌细胞减少,可导致 ED 发生。同时,位于海绵体窦腔内壁内皮细胞和血管内皮细胞的过度凋亡可通过减少 eNOS 的合成和释放,导致 ED 发生。Yamanaka 等^[12]发现在 DM 导致 ED 的发生过程中,阴茎组织内的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,凋亡增加,诱导 ED 发生,而通过注射胰岛治疗后,阴茎组织的凋亡情况明显减少,同时勃起功能得到改善。在该作者的后续实验中,应用海绵体内注射血管内皮生长因子治疗后,其勃起功能得到改善,同时发现阴茎海绵体内抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达有所增高^[16]。以上研究都表明凋亡在 DMED 发生中起重要作用。

PNS 可以降低血小板表面活性、抑制血小板黏附和聚集,改善微循环,增加脑血管流量,主要用于心脑血管疾病的治疗。同时实验发现 PNS 有抗凋亡的作用^[5-7]。本研究利用 STZ 构建 DMED 大鼠模型,腹腔注射不同剂量的 PNS 后电生理检测 DMED 大鼠的 ICP/MAP 的变化,发现经过 PNS 处理后的 DMED 大鼠 ICP/MAP 较未处理组有明显改善,说明 PNS 能够改善 DMED 大鼠的勃起功能。

以往的研究表明,PNS 具有抑制高血糖的活性,它可以通过增加胰岛素的敏感性,增加血糖的利用和促进糖原合成,对 2 型 DM 发挥治疗作用^[17]。PNS 中的人参皂苷 Rb1 被认为是发挥降糖作用的活性成分^[18]。从本实验结果来看,PNS100 处理组和 PNS150 处理组实验动物血糖水平没有恢复到正常水平,但是和 DMED 组相比,却有明显降低。这可能在 PNS 治疗 DMED 中发挥一定作用。本实验大鼠模型是 1 型 DM 模型,目前对于 PNS 改善 1 型 DM 血糖情况及原因尚未见报道,可能在 PNS 中存在其他活性成分或者人参皂苷 Rb1 通过其他途径发挥血糖调节作用,这些值得进一步研究。

研究表明^[19],正常生理状态下细胞凋亡的主要基因有 2 大类:第 1 类为抑制细胞凋亡的基因,如 Bcl-2;另一类为促进细胞凋亡的基因,如 Bax。Bcl-2/Bax 决定了细胞对凋亡刺激的敏感性和细胞生存

与死亡的趋向^[20]。本实验检测了凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 蛋白表达,发现正常对照组与 DMED 组凋亡相关蛋白的表达均有统计学差异,其中正常对照组的抗凋亡蛋白表达(Bcl-2)高于 DMED 组,而凋亡相关蛋白 Bax 表达低于 DMED 组。PNS100、PNS150 处理组的 Bcl-2 表达高于 DMED 组,而且随着腹腔注射 PNS 剂量的增加,组织中 Bcl-2 蛋白表达也逐渐增加,Bax 与之相反,同时阴茎组织细胞凋亡率逐渐减小。进一步证实了 DMED 的发生与凋亡有关。同时发现 PNS 对 DMED 大鼠的阴茎组织细胞凋亡具有对抗作用,这种对抗作用随着 PNS 给药量的增加而加强,并且 DMED 大鼠的勃起功能也随之逐步改善。

阴茎海绵体窦在阴茎勃起中起决定作用,阴茎平滑肌细胞和内皮细胞的过度凋亡可导致 ED 的发生,本实验电镜结果显示:DMED 组和 PNS50 处理组阴茎组织均出现不同程度的内皮细胞受损,凋亡和血栓形成,平滑肌细胞受损。而 PNS100、PNS150 处理组和正常对照组的阴茎微血管的内皮细胞正常,内皮组织光滑、连续,细胞功能正常,提示 PNS 通过抑制阴茎组织内皮细胞和平滑肌细胞的过度凋亡,保护内皮细胞和平滑肌细胞的正常功能,改善 DMED 大鼠的勃起功能。

综上所述,PNS 由于其抗凋亡的作用,通过上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,下调凋亡蛋白 Bax 的表达,提高 Bcl-2/Bax 比值,抑制平滑肌细胞和血管内皮细胞的过度凋亡,保护平滑肌细胞、血管内皮细胞及其功能,保护阴茎组织,改善勃起功能。

参 考 文 献

- [1] Al-Amran F G, Zwain A A, Hadi N R, et al. Autonomic cerebral vascular response to sildenafil in diabetic patient[J]. Diabetol Metab Syndr, 2012, 4(1):2.
- [2] 郭铁成, 张木勋, 张建华, 等. 影响初发 2 型糖尿病患者 IIEF-5 评分的相关因素分析[J]. 中华男科学杂志, 2005, 11(8):577-580.
Guo T C, Zhang M X, Zhang J H, et al. Analysis of correlative factors affecting IIEF-5 scores of type 2 diabetic patients[J]. National Journal of Andrology, 2005, 11(8):577-580.
- [3] 饶 可, 刘继红. 细胞凋亡与男性勃起功能障碍[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(12):1126-1129.
Rao K, Liu J H. Cell apoptosis and male erectile dysfunction[J]. National Journal of Andrology, 2008, 14(12):1126-1129.
- [4] Wu L, Zhang W, Tang Y H, et al. Effect of total saponins of 'panax notoginseng root' on aortic intimal hyperplasia and the expressions of cell cycle protein and extracellular matrix in rats[J]. Phytomedicine, 2010, 17(3-4):233-240.
- [5] Chen S, Liu J, Liu X, et al. Panax notoginseng saponins inhibit ischemia-induced apoptosis by activating PI3K/Akt pathway in cardiomy-

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20131121

乳腺癌 B7-H4 的表达与 FOXP3⁺Treg 细胞浸润及淋巴结转移的相关性研究

黄文炼, 徐 曼, 陈 瑜, 王婷婷, 耿卫朴, 张 燕

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室、重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 B7 同源体 4(B7 homolog 4, B7-H4)在人乳腺癌组织的表达及其与肿瘤内 FOXP3⁺调节性 T 细胞(Treg)浸润数量和淋巴结转移的相关性。**方法:**应用 SP 免疫组织化学法检测 B7-H4 蛋白在 16 例正常乳腺组织和 79 例乳腺癌组织的表达;间接免疫荧光双标染色法观察 64 例浸润性乳腺癌组织中 CD3⁺T 细胞和 FOXP3⁺Treg 的浸润情况;统计学分析 B7-H4 的表达与癌间质浸润的 FOXP3⁺Treg 数量和淋巴结转移的相关性。**结果:**B7-H4 在正常乳腺组织、导管内癌和浸润性乳腺癌的阳性表达率分别为 6.3%、40.0%和 78.1%,其在浸润性乳腺癌中的表达明显高于正常乳腺组织和导管内癌组($P=0.000$, $P=0.009$),但在正常乳腺组织和导管内癌间未见明显差异($P=0.037$);B7-H4 的表达与乳腺癌间质浸润的 FOXP3⁺Treg 数量正相关($P=0.368$, $P=0.003$),而与浸润的 CD3⁺T 细胞数量负相关($r_s=-0.316$, $P=0.011$);但 B7-H4 的表达与乳腺癌的淋巴结转移无关($P>0.05$)。**结论:**B7-H4 在乳腺癌异常高表达且与肿瘤局部免疫抑制有关,但与淋巴结转移无明显相关性。

【关键词】B7 同源体 4; FOXP3⁺调节性 T 细胞; 淋巴结转移; 乳腺癌

【中国图书分类法分类号】R364.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-25

作者介绍: 黄文炼, Email: 446452172@qq.com,

研究方向: 肿瘤病理与肿瘤免疫。

通信作者: 徐 曼, Email: manxucmu08@yahoo.cn。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: CSTC, 2009BB5268)。

ocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 263-270.

[6] Qiang H, Wang K Z, Shi Z B, et al. Panax notoginseng saponins protect rabbit bone marrow stromal cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2010, 8(2): 131-137.

[7] Qiang H, Zhang C, Shi Z B, 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.

[8] Shen Z J, Wang H, Lu Y L, et al. Gene transfer of vasoactive intestinal polypeptide into the penis improves erectile response in the diabetic rat[J]. BJU Int, 2005, 95(6): 890-894.

[9] Heaton J P, Varrin S J, Morales A. The characterization of a bio-assay of erectile function in a rat model[J]. J Urol, 1991, 145(5): 1099-1102.

[10] 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.

[11] Bivalacqua T J, Usta M F, Champion H C, et al. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase partially restores nitric oxide synthesis and erectile function in streptozotocin diabetic rats[J]. J Urol, 2003, 169(5): 1911-1917.

[12] Yamanaka M, Shirai M, Shiina H, et al. Diabetes induced erectile dysfunction and apoptosis in penile crura are recovered by insulin treatment in rats[J]. J Urol, 2003, 170(1): 291-297.

[13] Gou X, He W Y, Xiao M Z, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells transfected with VEGF165 to restore erectile function in diabetic rats[J]. Asian J Androl, 2011, 13(2): 332-338.

[14] Xie D, Odronic S I, Wu F, et al. Mouse model of erectile dysfunction due to diet-induced diabetes mellitus[J]. Urology, 2007, 70(1): 196-201.

[15] Sáenz de Tejada I. Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility[J]. Int J Impot Res, 2002, 14(s1): 6-10.

[16] Yamanaka M, Shirai M, Shiina H, et al. Vascular endothelial growth factor restores erectile function through inhibition of apoptosis in diabetic rat penile crura[J]. J Urol, 2005, 173(1): 318-323.

[17] Kim J J, Xiao H, Tan Y, et al. The effects and mechanism of saponins of Panax notoginseng on glucose metabolism in 3T3-L1 cells[J]. Am J Chin Med, 2009, 37(6): 1179-1189.

[18] Yang C Y, Wang J, Zhao Y, et al. Anti-diabetic effects of Panax notoginseng saponins and its major anti-hyperglycemic components[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(2): 231-236.

[19] Thiet M P, Suwanvanichkij V, Hasselblatt K, et al. Apoptosis in human term placenta: a morphological and gene expression study[J]. Gynecol Obstet Invest, 2000, 50(2): 88-91.

[20] Qiao S, Nagasaka T, Harada T, et al. p53, Bax and Bcl-2 expression, and apoptosis in gestational trophoblast of complete hydatidiform mole[J]. Placenta, 1998, 19(5-6): 361-369.

(责任编辑: 唐秋姗)