

· 基础论著 ·

NOSTRIN 在糖尿病性勃起功能障碍大鼠 阴茎海绵体组织中的表达

权伟合 王涛 李明超 饶可 杨俊 孟祥虎 卢灿峰 刘继红 叶章群

【摘要】 目的 检测糖尿病性勃起功能障碍(ED)大鼠阴茎海绵体组织中内皮型一氧化氮合成酶运输转导物(NOSTRIN)的表达。方法 将12周龄雄性SD大鼠20只随机分为2组,对照组8只,糖尿病组12只,链脲佐菌素诱导糖尿病性ED模型,8周后检测两组大鼠阴茎海绵体内压,并取阴茎海绵体组织行 real time RT-PCR、Western blot、免疫组化染色测定 NOSTRIN、eNOS 的表达。结果 糖尿病组大鼠阴茎海绵体内压比造模前明显降低($P < 0.01$),而对照组无明显差异。与对照组比较,糖尿病组 NOSTRIN 表达升高,eNOS 表达降低($P < 0.01$)。结论 NOSTRIN 在糖尿病性 ED 大鼠阴茎海绵体中表达升高,eNOS 表达降低。

【关键词】 勃起功能障碍; 一氧化氮合酶; 大鼠

Expression of endothelial nitric oxide synthase traffic inducer in the cavernous tissues of diabetes mellitus erectile dysfunction rats QUAN Wei-he, WANG Tao, LI Ming-chao, RAO Ke, YANG Jun, MENG Xiang-hu, LU Can-feng, LIU Ji-hong, YE Zhang-qun. Department of Urology, Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442008, China

Corresponding author: LIU Ji-hong, Email: jhliu@tih.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression change of endothelial nitric oxide synthase traffic inducer (NOSTRIN) in the cavernous tissues of diabetes mellitus erectile dysfunction (DMED) rats. **Methods** Twenty male Sprague-Dawley rats were divided into Groups A (normal control, $n = 8$) and B (DM group, $n = 12$), the diabetic models were made by intraperitoneal injection of streptozocin (STZ). Eight weeks later, the erectile function of the rats was assessed through measuring the mean arterial pressure (MAP) and intracavernous pressure (ICP). The expression changes of NOSTRIN and eNOS were detected in cavernous tissues by real time reverse transcription PCR, Western blot and immunohistochemical staining. **Results** ICP of group B was significantly lower than that of group A ($P < 0.01$). Compared with group A, the expression of NOSTRIN was markedly increased, the expression of eNOS significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of NOSTRIN is increased and the expression of eNOS is decreased in the cavernous tissues of DMED rats.

【Key words】 Erectile dysfunction; Nitric oxide synthase; Rats

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一组代谢性临床综合征,全球已确诊的有1.5亿人,预测2025年将增至3亿^[1]。糖尿病患者勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)的发病率为50%~90%^[2-3],大约是非糖尿病人群的3倍,出现勃起功能障碍的年龄明显早于非糖尿病人群,勃起功能障碍症状也比非糖尿病人群严重。

2002年Zimmermann等^[4]发现一种新型蛋白质,称之为内皮型一氧化氮合酶运输转导物(endothelial nitric oxide synthase traffic inducer, NOSTRIN),其mRNA大量

表达于如胎盘、心脏、肾脏、肝脏等血管丰富的组织;而在骨骼肌、中枢神经系统中表达水平很低。NOSTRIN蛋白含有506个氨基酸,分子量约58 kD,其N-末端是CDC15区,C-末端是SH3区。Zimmermann进一步研究发现,NOSTRIN对内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的活性、运输及其功能有调控作用,并将NOSTRIN基因转染中国仓鼠卵巢癌细胞,发现NOSTRIN高表达可导致eNOS活性降低,使NO的释放量减少约65%。

阴茎同样是高度血管化的组织,糖尿病的主要病理改变也是以血管内皮损害为主,故我们推测NOSTRIN在糖尿病大鼠阴茎海绵体组织内表达有改变并可能参与了糖尿病性勃起功能障碍(DMED)的发生。本研究通过链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导DMED

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.05.035

作者单位:442008 湖北十堰,湖北医药学院附属东风医院泌尿外科(权伟合);华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科(权伟合、王涛、李明超、饶可、杨俊、孟祥虎、卢灿峰、刘继红、叶章群)

通讯作者:刘继红,Email:jhliu@tih.tjmu.edu.cn

大鼠动物模型,与对照组比较,检测 NOSTRIN 表达的差异,进一步探讨 DMED 的可能发病机制。

材料与方法

1. 主要试剂和仪器:NOSTRIN 一抗为兔抗人多克隆抗体,购自 Santa Cruz 公司,eNOS 一抗为兔抗鼠单克隆抗体,购自武汉古泰生物公司,链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司。PowerLab/4SP 数据采集设备购自澳大利亚 ADInstrument 公司,显微解剖镜购自苏州六六视觉科技股份有限公司。

2. 动物模型制备:12 周龄雄性 SD 大鼠 20 只,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,体重 280 ~ 360 g。随机分为 2 组,对照组 8 只,给予常规饲料喂养。糖尿病组 12 只,禁食 12 h 后按 60 mg/kg 腹腔注射 STZ 诱导糖尿病。STZ 溶液的配制:取适量 STZ 溶解到 0.1 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH=4.2),终浓度 0.2%,即配即用。在腹腔注射后第 3 天取尾静脉血测量血糖 ≥ 16.7 mmol/L 提示造模成功,造模成功大鼠明显多饮多尿,注意精心喂养,勤换垫料,防止感染死亡。8 周后对照组大鼠全部存活,体重明显增加,糖尿病组大鼠明显消瘦,毛色晦暗,2 只大鼠死亡。

3. 阴茎海绵体内压测量:8 周后,测量两组大鼠的平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)和阴茎海绵体内压(intracavernous pressure, ICP)。按 35 mg/kg 腹腔注射 0.2% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,解剖右侧颈动脉,PE50 管预充 250 U/ml 肝素,插入颈动脉接压力换能器,沿下腹正中切开腹腔,在前列腺背侧叶表面找到盆神经节,刺激阴茎海绵体神经,5 V, 15 Hz, 波长 1.2 ms,连续刺激 60 s,间歇 180 s。沿阴茎背侧切开包皮,暴露阴茎海绵体,25 G 针预充 250 U/ml 肝素,穿刺海绵体,接压力换能器。PowerLab/4SP 数据采集器收集数据,计算海绵体内压和动脉压的比值(ICP/MAP),比较两组大鼠的勃起功能。测压结束后处死大鼠,立即留取阴茎海绵体标本,PBS 漂洗 3 遍,去除白膜和尿道组织,用于 real time RT-PCR、Western blot、免疫组化染色检测。

4. NOSTRIN 和 eNOS mRNA 检测:NOSTRIN 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,eNOS 引物及 β -actin 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列见表 1。液氮研磨组织,Trizol RNA 提取试剂(大连宝生物公司)提取总 RNA。按逆转录试剂盒说明书操作,real-time PCR 反应体系(SYBR green 法):cDNA 1 μ l, MIX 12.5 μ l, 引物各 1 μ l, ddH₂O 9.5 μ l,循环条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,94 $^{\circ}$ C 5 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 25 s,共 40 个循环。实时定量的计算公式为

表 1 引物名称和序列

引物名称	序列(F: sense; R: antisense)
NOSTRIN	F: 5'-GCTGAGCTTGACTGCCAGTTTC-3' R: 5'-AATTTCTGCAAGCAGATCACATCC-3'
eNOS	F: 5'-ACTTCTGTGCCTTTGCTCC-3' R: 5'-TTTGCTGCTCTGTAGTTCTC-3'
β -actin	F: 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3' R: 5'-GGATCCCTGGAAAAGCGGTGAGG-3'

$2^{-\Delta\Delta Ct}$,实验组和对照组 mRNA 倍数关系为 = POWER ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), ΔCt 愈大,说明其含量愈少。

5. Western blot 检测:组织研磨并超声破碎提取总蛋白,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。1:1000 稀释 NOSTRIN 兔抗人多克隆抗体和 eNOS 兔抗鼠单克隆抗体,1:2000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(武汉谷歌生物公司),内参照为 β -actin,催化荧光底物反应,暗室曝光 5 ~ 10 s,显影定影。底片经图像分析系统进行光密度分析。

6. 免疫组织化学染色:各组大鼠新鲜阴茎海绵体组织经 PBS 漂洗后去除白膜,截取约 1/3 浸入 10% 中性甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋后 4 μ m 切片。1:100 稀释 NOSTRIN 兔抗人多克隆抗体,1:200 稀释 eNOS 兔抗鼠单克隆抗体,1:200 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(武汉谷歌生物公司),DAB 显色,目标蛋白染成棕黄色。显微镜图像采集分析系统定量分析图像灰度。

7. 统计学分析:所有数据计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 进行统计表示,两组间计量资料比较用方差分析,通过统计分析软件 SPSS 12.0 进行数据处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 血糖:两组大鼠体重和空腹血糖值在造模前后比较有显著差异($P < 0.01$),见表 2。

表 2 两组大鼠体重和空腹血糖值($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	基础体重 (g)	72 h 空腹血糖 (mmol/L)	8 周体重 (g)	8 周空腹血糖 (mmol/L)
A 组	8	317.9 \pm 28.1	5.2 \pm 0.4	409.3 \pm 44.6 ^b	5.2 \pm 0.5
B 组	10	321.4 \pm 25.1	29.1 \pm 2.1 ^a	250.6 \pm 38.0 ^{ab}	29.3 \pm 1.6 ^a

注:A:对照组;B:糖尿病组。与 A 组比较,^a $P < 0.01$;与基线体重比较,^b $P < 0.01$

2. 测量 MAP 和 ICP:两组大鼠在造模后 8 周测量 MAP 和 ICP。18 只大鼠颈动脉压 100 ~ 120 mm Hg,无

明显血压增高。糖尿病大鼠海绵体内压明显减低,两组比较有明显差异($P < 0.01$),见表3。

表3 造模后两组大鼠平均动脉压和海绵体内压比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	MAP(mm Hg)	ICP(mm Hg)	ICP/MAP
A组	8	114.8 ± 4.8	75.0 ± 6.6	0.65 ± 0.06
B组	10	110.7 ± 6.44	45.2 ± 8.85 ^a	0.41 ± 0.08 ^a

注:A:对照组;B:糖尿病组。与A组比较,^a $P < 0.01$

3. NOSTRIN 和 eNOS mRNA 检测:糖尿病组 NOSTRIN mRNA 表达升高,而 eNOS 比对照组降低,均有统计学差异($P < 0.01$),见表4。

表4 NOSTRIN 和 eNOS mRNA 在两组大鼠阴茎海绵体中的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	NOSTRIN mRNA (ΔCt)	eNOS mRNA (ΔCt)
A组	8	9.02 ± 0.63	5.58 ± 0.59
B组	10	7.56 ± 0.7 ^a	6.35 ± 0.44 ^a

注:A:对照组;B:糖尿病组。与A组比较,^a $P < 0.01$

4. Western blot 检测结果:Western blot 检测 NOSTRIN 和 eNOS 蛋白的表达水平(图1A),AlphaEaseFC 测量吸光度并与内参(β -actin)比较,显示在糖尿病组 NOSTRIN 表达升高($P < 0.01$),而 eNOS 降低($P < 0.01$)(图1B)。

5. 免疫组织化学检测:免疫组织化学法检测两组大鼠阴茎海绵体组织中 NOSTRIN 和 eNOS 蛋白表达(图2A),每片随机选取3个视野测量吸光度取平均值,糖尿病组 NOSTRIN 表达升高,而 eNOS 比对照组降低,均有统计学差异($P < 0.01$)(图2B)。

讨 论

NO 是有活性的细胞信号分子,调节 eNOS 活性可影响 NO 的生成,这种调节发生在三个水平^[5]:(1)一些附属蛋白如小凹蛋白、钙调蛋白等直接和 eNOS 相互作用;(2)eNOS 可逆的磷酸化;(3)细胞内不同部位对 eNOS 活性的调节。eNOS 在不同的亚细胞部位也有不同的调节模式^[6],钙调蛋白主要在细胞膜上起作用,而 Akt 通路的激活却发生在高尔基体上。eNOS 出现在不同的亚细胞部位受到发动蛋白的调节,在给一定的刺激后,eNOS 出现在囊泡样的结构中^[7]。然而目前并不清楚这种调节的确切机制。Jagnandan 等^[8]发现 eNOS 只有在合适的时间出现在适宜的细胞部位才能发挥最大的生物活性。一些因素如低密度脂蛋白氧化、胆固醇缺失、血压增高以及一氧化氮合酶相互影响蛋白(NOSIP)、NOSTRIN 都可以导致 eNOS 的错位分布减少 NO 释放。研究证明,eNOS 在细胞膜上活性最高,

而在细胞内一些细胞器,如线粒体、细胞核上 eNOS 的活性大大降低。所以恰当地将 eNOS 锚定在细胞膜或者细胞器对于控制酶活性是非常重要的调节步骤。

2002 年 Zimmermann 等发现了 NOSTRIN,其主要表达在高度血管化的组织中,可以促使位于细胞膜上的 eNOS 以囊泡样的结构向细胞内转运,起到下调 eNOS 活性的作用,导致 NO 释放量减少。他们在中国仓鼠细胞中高表达 NOSTRIN,结果 eNOS 的活性下降,NO 产量减少了 60% ~ 70%。NOSTRIN 属于酵母 Cdc15 同源蛋白质(Pombe Cdc15 homology, PCH)家族,影响着 eNOS 的活性和分布。典型的 PCH 作为衔接蛋白与入胞作用、细胞骨架再分布有关。PCH 家族蛋白都包含 N 末端 Fes/CIP4 (FCH) 同源结构域, C 末端 SH3 结构域以及 1 ~ 2 个螺旋卷曲结构^[9]。Ann 等^[10]在后续的研究中发现,实现 eNOS 向细胞内转运还有其他一些因素参与,如大量的 GTP 酶,发动蛋白、神经系统 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白(N-WASP)以及完整的细胞骨架。发动蛋白属于 G 蛋白家族,能够自发地自我装配到新形成的胞饮结构膜上,螺旋缠绕在包被小泡的颈部,结合并水解 GTP 酶,收缩缢断小泡与质膜间的连接,形成包被小泡^[11]。N-WASP 能激活肌动蛋白相关蛋白复合体(Arp2/3)对肌动蛋白的微丝进行核化,整个复合体则能够与微丝结合促使新的微丝生成,调节肌动蛋白和细胞骨架^[12]。NOSTRIN 优先自我联结形成三聚体复合结构,作为一个多价效应器导致 eNOS、发动蛋白和 N-WASP 聚集到它的 SH3 端上^[10]。Kirstin 等^[5]研究发现 eNOS、小凹蛋白-1 和 NOSTRIN 形成了三元复合物,这种相互作用发生在小凹蛋白的 N 末端和 NOSTRIN 的中心区域,从而使得它们的骨架结构和 SH3 结构域能够黏附 eNOS,实现 eNOS 的转运和移位。小凹蛋白的骨架区域增强了 NOSTRIN 和 eNOS 间的黏附,并且显示出对 eNOS 活性的抑制作用^[13]。

Xiang 等^[14]研究发现在子痫前期患者胎盘组织中 NOSTRIN 高表达,而 eNOS 活性降低,两者呈负相关。在少弱精子症患者睾丸组织中,NOSTRIN 表达水平降低,而 eNOS 活性增强,NO 释放增多^[15]。Mookerjee 等^[16]发现酒精性肝炎患者与肝硬化和正常人相比,NOSTRIN mRNA 和小凹蛋白 mRNA 表达增高,eNOS 活性却降低,这些都说明 NOSTRIN 的表达水平影响着 eNOS 的表达和活性。

我们利用 STZ 制作大鼠 DMED 模型,并在阴茎海绵体内检测了 NOSTRIN 的表达,发现其 mRNA 和蛋白表达增高,eNOS 表达降低。DMED 是多方面因素综合作用的结果。目前最受关注的是 NO-cGMP 信号通路,

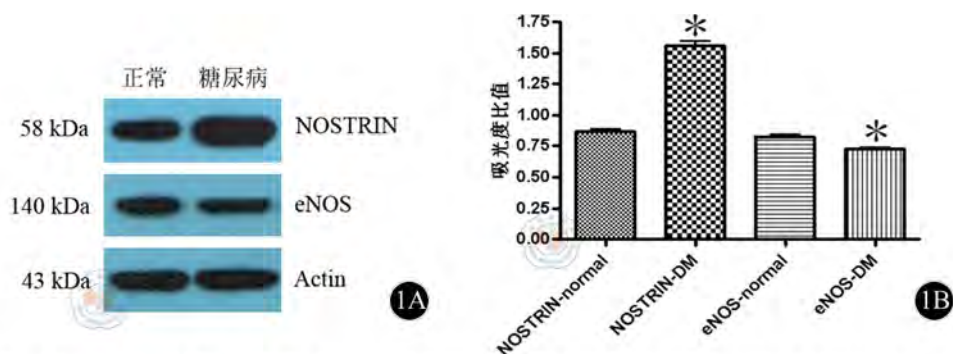


图1 Western blot检测NOSTRIN和eNOS蛋白在正常和糖尿病阴茎海绵体中的表达差异。1A: Western blot图; 1B: 数据结果, 与对照组比较, * $P < 0.01$

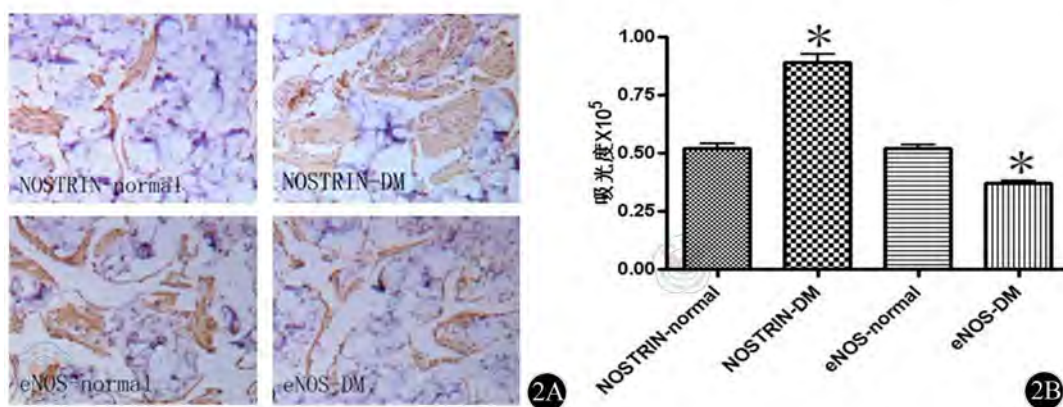


图2 免疫组织化学法检测NOSTRIN和eNOS蛋白在正常和糖尿病阴茎海绵体中的表达差异; 2A: 免疫组化 $\times 400$; 2B: 数据结果, 与对照组比较, * $P < 0.01$

糖尿病导致血管内皮功能受损,组织内一氧化氮合成酶(NOS)活性和水平均降低,NOS分为神经型(nNOS)、诱生型(iNOS)和eNOS。NOS催化左旋精氨酸(L-Arg)合成NO,NO活化细胞质内可溶性鸟苷酸环化酶(sGC),后者将三磷酸鸟苷(GTP)转化成cGMP,cGMP作为细胞内第二信使分子,激活cGMP依赖性蛋白激酶I(cGKI),降低阴茎海绵体细胞内钙离子浓度,海绵体平滑肌舒张,促使阴茎勃起。在DMED患者阴茎海绵体内,nNOS、eNOS的表达明显降低,使平滑肌细胞舒张障碍导致ED,nNOS、eNOS的改变是糖尿病导致的神经末梢和内皮系统损害的结果,也是ED发病的机制之一^[17]。王为服等^[18]观察了DMED大鼠海绵体超微结构的变化证明8周前以内皮细胞损害为主,随着病情的延长,海绵体平滑肌的超微结构改变逐渐明显。这些都限制了平滑肌的舒张和血管窦的充血,是勃起功能障碍的直接原因之一。其次,氧化应激也是引起eNOS表达和活性降低的一个原因。Ryu等^[19]发现在DMED模型中活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平随病情逐渐增高,勃起功能障碍也逐渐加重。ROS导致勃起功能障碍的机制很复杂,包括促进内皮细胞的凋亡,减少NO的生物利用度,以可在基因水平调节eNOS,使其表达减少。

总之,糖尿病与ED的关系已成共识,内皮细胞的损害、海绵体平滑肌超微结构的改变和基质的纤维化这些共同的因素影响海绵体舒张功能,导致了ED,eNOS-NO-cGMP通路的损害是其主要的分子机制之一,本课题组观察到NOSTRIN在DMED大鼠阴茎海绵体中表达升高,eNOS表达降低,理论上推测,NOSTRIN升高可能是eNOS表达降低的机制之一,但尚需更进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Lawal M. Management of diabetes mellitus in clinical practice. Br J Nurs, 2008, 17: 1106-1113.
- [2] Feldman HA, Goldstein I, Hatzichris IS, et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates; results of the Massachusetts Male Aging Study. J Urol, 1994, 151: 54-61.
- [3] Sasaki H, Yamasaki H, Ogawa K, et al. Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in Japanese diabetics. Diabetes Res Clin Pract, 2005, 70: 81-89.
- [4] Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, et al. NOSTRIN: A protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 17167-17172.
- [5] Schilling K, Opitz, Wiesenthal A, et al. Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. Molecular Biology of the Cell, 2006, 17: 3870-3880.
- [6] Fulton D, Babbitt R, Zoellner S, et al. Targeting of endothelial nitric-oxide-synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membraneregulates Akt-versus calcium-dependent mechanisms for ni-

- tric oxide release. *Biol Chem*, 2004, 279:30349-30357.
- [7] Thuringer D, Maulon L, Frelin C. Rapid transactivation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 by the bradykinin B2 receptor contributes to endothelial nitric-oxide synthase activation in cardiac capillary endothelial cells. *Biol Chem*, 2002, 277:2028-2032.
- [8] Jagnandan D, Sessa WC, Fulton D. Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289:1024-1033.
- [9] Kessels MM, Qualmann B. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with cytoskeleton. *Cell Sci*, 2004, 117:3077-3086.
- [10] Ann I, Simone M, Nils O. NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS. *Journal of Cell Science*, 2005, 118:5059-5069.
- [11] Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Cell Biol*, 2004, 5:133-147.
- [12] Fehrenbacher K, Huckaba T, Yang HC, et al. Actin comet tails, endosomes and endosymbionts. *Exp Biol*, 2003, 206:1977-1984.
- [13] Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*, 2000, 6:1362-1367.
- [14] Xiang WP, Chen HP, Hu L, et al. Endothelial nitric oxide synthase traffic inducer in the umbilical vessels of the patients with preeclampsia. *Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2009, 29:243-245.
- [15] 相文佩, 水丽君, 温子娜, 等. 少弱精子症患者睾丸组织中 NOSTRIN 的表达及其与 eNOS 的相关性研究. *华中科技大学学报: 医学版*, 2009, 38:247-249.
- [16] Mookerjee RP, Wiesenthal A, Icking A, et al. Increased gene and protein expression of the novel eNOS regulatory protein NOSTRIN and a variant in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*, 2007, 132:2533-2541.
- [17] 姚申乐, 王扬天, 陈赞, 等. 糖尿病大鼠阴茎海绵体组织中一氧化氮合酶亚型表达的研究. *中华男科学杂志*, 2009, 15:915-919.
- [18] 王为服, 张元芳, 丁强, 等. 糖尿病性阴茎勃起功能障碍大鼠模型海绵体超微结构的研究. *中华泌尿外科杂志*, 1999, 20:628-631.
- [19] Ryu JK, Kim DJ, Lee T, et al. The role of free radical in the pathogenesis of impotence in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J*, 2003, 44:236-241.

(收稿日期:2012-11-12)

(本文编辑:戚红丹)

权伟合, 王涛, 李明超, 等. NOSTRIN 在糖尿病性勃起功能障碍大鼠阴茎海绵体组织中的表达 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(5): 2003-2007.

