

脊髓损伤后大鼠阴茎组织中神经型一氧化氮合成酶的变化*

黄红拾¹ 王文婷¹ 周谋望^{1,3} 周长满² 陈亚平¹

摘要 目的:观察 SD 大鼠脊髓损伤(SCI)后阴茎组织中神经型一氧化氮合成酶(nNOS)的变化。**方法:**12 只雄性 SD 大鼠分为 SCI 组与对照组。采用改良的重物坠落法(Allen 法)制作大鼠 T₉-T₁₀ 脊髓节段不完全损伤模型。伤后 7 天行阴茎勃起功能检测和 nNOS 免疫组化,观察脊髓损伤后阴茎勃起潜伏期、勃起次数以及阴茎组织中 nNOS 神经纤维的变化。**结果:**SCI 组大鼠阴茎勃起潜伏期明显缩短,阴茎勃起次数明显减少($P<0.05$);对照组和 SCI 组大鼠阴茎中 nNOS 阳性神经纤维数目分别为 90.42 ± 3.66 、 10.13 ± 1.78 ;平均光密度分别为 0.18 ± 0.01 、 0.11 ± 0.01 ;积分光密度分别为 2.37 ± 0.08 、 1.08 ± 0.13 。与对照组相比较,SCI 组大鼠阴茎内 nNOS 阳性纤维的数量及光密度明显降低,差异具有显著性意义($P<0.05$)。**结论:**SD 大鼠脊髓损伤后阴茎内 nNOS 表达减弱,导致勃起功能障碍。

关键词 脊髓损伤;阴茎;神经型一氧化氮合成酶;勃起功能障碍

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2009)-01-0009-03

Changes of nNOS in the penis of spinal cord injury rats/HUANG Hongshi,WANG Wenting,ZHOU Mouwang,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(1):9-11

Abstract Objective: To observe the changes of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the penis of spinal cord injury(SCI) rats. **Method:** Twelve male SD rats were divided into SCI(T₉-T₁₀) group and control group. The incomplete SCI model was induced by using modified Allen's method. After SCI 7d, all experimental rats were measured for the correspondent penile erections, and sacrificed for detection of nNOS-containing nerve fibers in the penis by immunohistochemistry. **Result:** Compared with control group, there was significant reduction of latency of erection, the numbers of erection, and nNOS-containing nerve fibers in the penis of SCI rats ($P<0.05$). **Conclusion:** The appearance of erectile dysfunction after SCI may be caused by the decrease of nNOS expression in penis.

Author's address Rehabilitation Center of Peking University Third Hospital, Beijing, 100083

Key words spinal cord injury; penis; neuronal nitric oxide synthase; erectile dysfunction

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)患者中 70% 处于 40 岁以下年龄层,性的问题甚为重要^[1]。男性占 80%左右^[2],明显高于女性。阴茎勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)是指“阴茎持续地不能勃起、不能维持,因而无法达到满足的性行为”。有 60%—80%截瘫男性不能勃起^[2],严重影响患者及配偶的生存质量。

大鼠的阴茎解剖和勃起时海绵体内生理变化与人类阴茎非常相似^[3]。制作脊髓损伤大鼠模型,普遍采用标准的重物自由落下损伤脊髓损伤模型^[4]。以左旋精氨酸(L-arginine, L-Arg)为底物,由一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)催化生成的一氧化氮(nitric oxide, NO),是导致血管扩张、海绵体舒张的主要信使,参与勃起的诱导和维持^[5]。NO 呈气态且半衰期极短,直接测定困难,形态学上常以 NOS 定位来推测其合成部位及作用的靶细胞。阴茎中主要存在两种类型的 NOS,即神经型 NOS (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 和内皮型 NOS (endothelial

nitric oxide synthase, eNOS), 目前认为, nNOS 对阴茎勃起的发动起着最主要的作用^[6]。因此,研究脊髓损伤后阴茎组织中神经型一氧化氮合成酶的变化,对于分析 SCI 导致 ED 的原因,具有重要意义。但目前文献尚未见相关报道。本研究通过 nNOS 免疫组化方法观察脊髓损伤后 SD 大鼠阴茎组织的变化,探讨 SCI 引起 ED 的原因。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

12 只清洁级成年雄性 SD 大鼠 (北京大学医学部实验动物中心提供), 体重 250—300g。随机取 6

* 基金项目:国家自然科学基金(30672096);北京大学第三医院种子基金(YZZ07-1-06)资助项目

1 北京大学第三医院康复医学中心,北京,100191

2 北京大学医学部解剖学系

3 通讯作者

作者简介:黄红拾,男,博士,主治医师

收稿日期:2008-08-12

只作为正常对照组,其余6只作为脊髓损伤组。按改良 Allen 撞击法制作脊髓损伤动物模型^[4]。腹腔注射复合麻醉剂 3ml/kg 后,俯卧位取后正中切口,无菌操作,碘伏消毒,以 T₈ 棘突为中心取背部正中切口,长约 5cm,显露 T₆—T₁₀ 棘突及椎板,咬除 T₈—T₁₀ 棘突及全椎板,以脊髓为中心显露直径约 5.5 mm 圆形区,用直径 3mm、重 10g 的砝码在细玻璃管的引导下从 10cm 高处垂直落下,打击致 T₈ 脊髓急性挫伤(致伤力为 100g·cm)。对照组仅行椎板切除。用庆大霉素冲洗伤口,1—0 号丝线逐层缝合伤口,无菌敷料覆盖。正常对照组只进行椎板切除(不行脊髓损伤)后关闭缝合切口。所有动物在 23.5℃ 室温饲养,自由饮食。对术后截瘫动物进行人工按压膀胱协助排尿、排便,每日 4 次,防治并发症。

1.2 阴茎勃起功能检测

伤后第 7 天,参考 Heaton 等^[7]的方法,选择一间安静房间,尽量使光线暗淡,仅够观察即可。把大鼠放在实验笼中,允许适应环境 10min。将阿朴吗啡(apomorphin, APO, Sigma 公司)溶解于 0.5mg/L 的维生素 C 生理盐水中,终浓度 100μg/ml。在大鼠颈后松弛皮肤皮下注射 APO 80μg/kg,每只大鼠注射后观察 30min。阴茎头充血及末端阴茎体露出为勃起 1 次,观察并记录阴茎勃起潜伏期和勃起次数。

1.3 阴茎组织免疫组织化学染色

阴茎勃起功能检测结束后,灌注固定所有大鼠,取中段阴茎组织连续冰冻切片,片厚 20μm,烤箱烤干待用。切片做 nNOS 免疫组化反应。步骤大致如下:①切片入含 0.3%Triton-X100 的 0.1M PBS 中,室温下 30min;②3% H₂O₂,室温下 15min,阻断内源性过氧化物酶;③兔抗 nNOS 一抗(1:400,北京博奥森生物技术有限公司),4℃过夜;④二抗检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),室温下 30min;⑤DAB 显色反应 2min,自来水冲洗;⑥脱水、透明、中性树胶封片。以 PBS 代替一抗做阴性对照。Leica DM 2500 显微镜观察切片并摄片,每张切片取阳性纤维表达最多的 10 个视野(×400),计数视野中的阳性纤维数目,并用麦克奥迪图像分析软件做光密度比较,检测 nNOS 阳性神经纤维的表达^[8]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件包进行分析。数据以均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验或非参数检验中的曼-惠特尼 *U* 检验。

2 结果

2.1 阴茎勃起功能

注射 APO 后观察 30min,正常对照组和脊髓损伤组大鼠阴茎勃起潜伏期分别为 207s±7.38s、119.17s±9.60s;勃起次数分别为 3.67±0.51、1.66±0.52。采用 *t* 检验分析勃起潜伏期,采用非参数检验中的曼-惠特尼 *U* 检验分析勃起次数。与正常对照组相比较,SCI 组大鼠阴茎勃起潜伏期明显缩短,勃起次数明显减少(*P*<0.05)。

2.2 免疫组织化学染色结果

阴茎内 nNOS 阳性神经纤维散在分布,以阴茎背神经周围多见。在 3 个海绵体中,以两个阴茎海绵体最丰富,尤其是其四周靠近白膜处,而尿道海绵体分布很少。对照组阳性神经纤维染色深,nNOS 神经纤维染色清晰,呈棕黄色,数目较多,呈强阳性。脊髓损伤组仅可见少量阳性染色纤维,且分布不均匀,呈弱阳性(图 1,见前置彩色插页)。

正常对照组和脊髓损伤组大鼠阴茎中 nNOS 阳性神经纤维数目及平均光密度值见表 1。与正常对照组相比较,SCI 组大鼠阴茎内 nNOS 阳性纤维的数量及光密度明显降低,差异具有显著性意义(*P*<0.05)。

表 1 正常组和 SCI 组大鼠阴茎背神经

组别	nNOS 检测结果比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)		
	阳性神经纤维数目(个)	平均光密度	积分光密度
正常对照组	90.42±3.66	0.18±0.01	2.37±0.08
脊髓损伤组	10.13±1.78 ^①	0.11±0.01 ^①	1.08±0.13 ^①

①两组比较 *P*<0.05

3 讨论

ED 按病因可分为心理性、器质性和混合性 3 种。SCI 性 ED 是由于 SCI 导致传入或传出脊髓神经结构和功能损伤而出现 ED。

北京市 2002 年脊髓损伤发病率为 60/10⁶,与北京市 20 世纪 80 年代末调查的年发病率 6.8/10⁶ 相比,有了惊人的增长^[9]。SCI 患者中,70%在 40 岁以下年龄层,正处于性功能活跃期^[1]。男性占 80%左右^[2],远远多于女性。而且有 60%—80%截瘫男性不能勃起^[1],严重影响患者及配偶的生存质量。

勃起的神经兴奋和抑制机制十分复杂。常用皮下注射阿朴吗啡评价阴茎勃起功能,小剂量阿朴吗啡通过下丘脑室旁核的多巴胺受体引起阴茎勃起。Heaton 等^[7]证实小剂量皮下注射阿朴吗啡可引起正常大鼠的阴茎勃起,可作为评价阴茎勃起功能的一个较理想指标。本实验通过此法检测阴茎勃起功能,发现正常大鼠阴茎勃起潜伏期较长,SCI 大鼠勃起潜伏期明显缩短,勃起次数明显减少。这与临床上男性 SCI 患者 ED 发病情况一致。

阴茎平滑肌的舒张与收缩受到多种神经内分泌因子的调节,如一氧化氮(NO)、内皮素等,其中 NO 是最主要的舒张因子之一,使阴茎海绵体平滑肌舒张而引起阴茎勃起。NO 呈气态且半衰期极短,直接测定困难,形态学上通常以 NOS 定位来推测其合成部位及作用的靶细胞。在 NOS 的作用下,副交感神经、NANC(非肾上腺素非胆碱能)神经和血管内皮细胞释放 NO,激活 cGMP 环化酶,使 GTP 转化为 cGMP,降低细胞浆内 Ca^{2+} 浓度,松弛平滑肌,增加阴茎血流,升高海绵体内压,启动海绵体静脉闭塞功能,阴茎开始勃起并维持至射精,然后疲软。NOS 可分为神经型(nNOS)、内皮型(eNOS)及诱生型(iNOS),但在阴茎组织中主要是 nNOS^[6]。胡万里等^[10]采用大白鼠阴茎海绵体组织 NADPH2 黄递酶染色,证实大白鼠阴茎海绵体神经中存在 nNOS,同时还发现背神经中存在盆丛来源的 nNOS 神经纤维。

目前认为,神经性 ED 的原因是海绵体内 NOS 的减少,NO 降低,NOS 的表达可以间接反映阴茎的勃起功能^[11]。双侧海绵体神经损伤后大鼠发生不可逆的 ED,阴茎海绵体内 NOS 阳性神经纤维明显减少^[12]。但目前文献尚未查到有关脊髓损伤后阴茎组织中神经型一氧化氮合成酶的研究。本实验通过 nNOS 免疫组化研究观察了脊髓损伤后 SD 大鼠阴茎组织的变化,发现 nNOS 阳性神经纤维在阴茎内主要表达于阴茎背神经周围;脊髓损伤后,nNOS 阳性神经纤维的数量急剧减少,仅在阴茎背神经处可见极弱的表达。说明脊髓损伤后大鼠阴茎组织中 nNOS 神经纤维明显减少,可能是脊髓损伤后 ED 发生的主要机制之一,但 nNOS 神经纤维减少的具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周天健,镇万新,张美心. 脊髓损伤者性功能的康复与生育[A]. 见:周天健,李建军,主编. 脊柱脊髓损伤现代康复与治疗[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,2006.734—735.
- [2] 李建军,周天健. 脊髓损伤及其所致残疾的预防与预后[A]. 见:周天健,李建军,主编. 脊柱脊髓损伤现代康复与治疗[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,2006. 868.
- [3] 崔险峰,张云山,邢俊平. 阴茎勃起动物模型的建立和监测研究进展[J]. 山西医药杂志, 2006,35(10):907—908.
- [4] Nout YS,Schmidt MH,Tovar CA,et al. Telemetric monitoring of corpus spongiosum penis pressure in conscious rats for assessment of micturition and sexual function following spinal cord contusion injury[J]. J Neurotrauma, 2005,22:429—441.
- [5] Toda N, Ayajiki K,Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function[J]. Pharmacol Ther, 2005,106(2):233—266.
- [6] Cashen DE, MacIntyre DE,Martin WJ. Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase[J]. Br J Pharmacol, 2002,136(5):693—700.
- [7] Heaton JP, Varrin SJ, Morales A. The characterization of a bioassay of erectile function in a rat model[J]. J Urol, 1991,145(5):1099—1102.
- [8] 钟梅芳,胡金家,丁文龙,等. 胰岛素对糖尿病大鼠阴茎内 nNOS 神经纤维的影响[J]. 中国男科学杂志, 2007,21(5):15—18.
- [9] 李建军,周红俊,洪毅,等. 2002 年北京市脊髓损伤发病率调查[J]. 中国康复理论与实践, 2004,10(7):412—413.
- [10] 胡万里,胡礼泉,李世文,等. 大鼠阴茎背神经中 NOS 阳性纤维源于自主神经系统的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2003,20: 926—927.
- [11] 崔殿生,胡礼泉,李世文,等. 盆神经节海绵体内移植对双侧海绵体神经损伤后大鼠阴茎勃起功能的影响 [J]. 中华外科杂志, 2004,42(10):595—599.
- [12] Zhang X,Hu L,Zheng X,et al. Regeneration of nNOS - containing nerve fibers in rat corpus cavernosum[J]. Chin Med J (Engl), 2001,114(4):391—393.