

· 基础研究 ·

不同剂量尼古丁对成年大鼠阴茎海绵体内源性 CO 含量及 NOS 活性影响的研究

徐 辉¹, 于 满¹, 王志勇¹, 辛立升¹, 王振潮¹, 马英慧²

(承德医学院附属医院:1. 泌尿外科;2. 眼科, 河北承德 067000)

摘要:目的 探讨不同剂量尼古丁对成年雄性大鼠阴茎勃起功能及阴茎海绵体内源性一氧化碳(CO)含量及一氧化氮合酶(NOS)活性的影响。方法 将 32 只 12 周龄雄性大鼠随机分为 4 组,对照组、尼古丁($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、尼古丁($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、尼古丁($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组。给药方式采用皮下注射。8 周后,阿扑吗啡试验观察大鼠阴茎勃起情况。取阴茎海绵体,用改良双波长分光光度法测量其 CO 浓度。应用改良的 Griess 法测量其 NOS 活性。结果 与对照组比较,尼古丁各组阴茎勃起次数、CO 含量及 NOS 活性明显减少($P < 0.01$)。阴茎勃起次数,尼古丁($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组较尼古丁($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组明显减少($P < 0.01$),尼古丁($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组较尼古丁($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、尼古丁($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组较尼古丁($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组减少($P > 0.05$)。尼古丁给药剂量越大,CO 含量及 NOS 活性越低,尼古丁注射各组间两两比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 尼古丁可导致成年雄性大鼠阴茎勃起功能减弱,阴茎海绵体内源性 CO 含量及 NOS 活性下降;其影响呈给药剂量依赖性;表明内源性 CO 是尼古丁致阴茎勃起功能障碍(ED)的重要信使分子,尼古丁可能通过降低内源性 CO 含量及 NOS 活性致 ED。

关键词:尼古丁;一氧化碳;一氧化氮合酶;阴茎海绵体;勃起功能障碍

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)30-3183-03

Effect of different doses nicotine on the endogenous carbon monoxide level and nitile oxide synthase activity of the adult rat corpus cavernosum

Xu Hui¹, Yu Man¹, Wang Zhiyong¹, Xin Lisheng¹, Wang Zhenchao¹, Ma Yinghui²

(1. Department of Urology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China;

2. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of different doses nicotine on erectile function, the endogenous carbon monoxide (CO) level and nitile oxide synthase(NOS) activity of the adult male rat corpus cavernosum. **Methods** 32 12-week-old male rats were randomly divided into four groups: control group, nicotine($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group, nicotine($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group and nicotin($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group. Drug delivery by using subcutaneous injection. Eight weeks later, apomorphine test erection function of rats. Corpus cavernosum was drawn. CO level was detected by an improved two-wavelength spectrophotometry. NOS activity was detected by an improved Griess. **Results** Compared with control group, the number of penile erection, endogenous CO content and NOS activity of the nicotine injection group rats were significantly decreased($P < 0.01$). The number of penile erection s, nicotin($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group compared with nicotine($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group was significantly reduced($P < 0.01$), nicotine($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group compared with nicotine($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group and nicotine($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group compared with nicotine($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group reduced($P > 0.05$). The greater the dose of nicotine was, the lower levels of endogenous CO and NOS activity was. The difference between the two nicotine groups was significant($P < 0.01$). **Conclusion** Nicotine can lead to adult male rats erectile dysfunction, and reduced levels of endogenous CO and NOS activity in corpus cavernosum penis; its effects are dose-dependent manner, indicating that endogenous CO is an important messenger molecule on nicotine-induced erectile dysfunction, and nicotine possibly caused erectile dysfunction by reducing endogenous CO and NOS activity.

Key words: nicotin; carbon monoxide; nitile oxide synthase; corpus cavernosum; erectile dysfunction

阴茎勃起是一种神经血管反应过程。勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)是男子最常见的性功能障碍,其发病率占中老年男性的 50%,中国约有一亿多男性患有 ED,严重影响夫妻生活质量^[1]。近 10 余年来,对于复杂的阴茎勃起机制,研究的重点已由血流动力学移向神经介质方面。研究表明,一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸生成的一氧化氮(NO)是介导阴茎勃起的最主要的非胆碱能非肾上腺能(NANC)神经递质,在阴茎勃起过程中起着决定性作用^[2]。研究证实,内源性一氧化碳(CO)是一种新型的神经递质^[3],是阴茎勃起的一种基本递质,参与阴茎勃起过程^[4]。吸烟是公认的 ED 的危险因素。尼古丁是香烟烟雾中含量最高的一种成分,本实验通过制备成年雄性大鼠尼古丁给药动物模型,观察大鼠阴茎勃起情

况,检测阴茎海绵体 CO 含量及 NOS 活性,分析不同剂量尼古丁对其影响,进而探讨吸烟对勃起功能的影响及 ED 发生的生理机制,为临床上性功能障碍的治疗提供实验依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 成年 12 周龄雄性 Wistar 大鼠 32 只。

1.1.2 试剂及药物 考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), NOS 测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),尼古丁(Sigma 公司),连二亚硫酸钠(还原剂)(南京建成生物工程研究所), KH_2PO_4 (南京建成生物工程研究所),阿扑吗啡(APO, Sigma 公司)。

表 1 各组大鼠阴茎勃起次数及海绵体内源性 CO 浓度及 NOS 活性比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	勃起(次)	NOS(nmol · g ⁻¹ · min ⁻¹)	CO(nmol/μg)
对照组	2.63 ± 0.52	11.68 ± 0.96	13.33 ± 0.33
尼古丁组			
0.5 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	1.13 ± 0.35*	8.15 ± 0.61*	11.01 ± 0.54*
1.5 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	0.63 ± 0.74*	4.65 ± 0.51*▲	9.03 ± 0.31*▲
2.5 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	0.25 ± 0.46*▲	1.66 ± 0.21*▲■	6.35 ± 0.52*▲■

*: $P < 0.01$, 与对照组比较; ▲: $P < 0.01$, 与尼古丁(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组比较; ■: $P < 0.01$, 与尼古丁(1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组比较。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 选取纯系 12 周龄雄性 Wistar 大鼠 32 只, 随机分成 4 组, 每组各 8 只, 分别为对照组、尼古丁(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组、尼古丁(1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组、尼古丁(2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组。

1.2.2 动物模型的制备 各组动物分笼单独饲养, 标准复合饲料喂养。将尼古丁溶于生理盐水中制成注射液。尼古丁组(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)每日 1 次皮下注射尼古丁 0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 尼古丁组(1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)每日 1 次皮下注射尼古丁 1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 尼古丁(2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组每日 1 次皮下注射尼古丁 2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹。给药容积为 0.5 mL/kg, 对照组每日 1 次皮下注射等容积的生理盐水。

1.2.3 阴茎勃起功能测定 8 周后, 选择安静的房间内, 将大鼠置于玻璃板上, 在每只大鼠颈部皮下注射阿扑吗啡 90 μg/kg 体质量, 观察 30 min, 记录阴茎勃起次数。以阴茎头充血及阴茎末端露出为勃起 1 次

1.2.4 动物处理及取材 勃起功能检测后, 乙醚(99%)麻醉各组大鼠, 颈椎脱臼法处死, 切开阴茎包皮仔细分离并剥离出阴茎组织(包括球部及海绵体脚), 迅速置于冰冷的改良 Krebs 液中, 去除龟头(含阴茎软骨)、尿道海绵体及阴茎背侧血管, 取阴茎海绵体。

1.2.5 组织匀浆的制备 将取出的海绵体组织用 4℃ 蒸馏水冲洗后, 滤纸吸干, 电子天平称质量, 用眼科小剪将海绵体组织剪成小块, 加入体积总量是海绵体重量 9 倍的 0.86% 的冷生理盐水, 在冰浴中用电动内切式匀浆机制成 10% 的组织匀浆, 4℃ 低温离心机内, 以 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液即为 10% 的海绵体匀浆。

1.2.6 阴茎海绵体匀浆中蛋白含量测定(考马斯亮兰法) 取 10% 阴茎海绵体匀浆上清液用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 组织匀浆, 按试剂盒说明操作, 测各管吸光度值。将吸光度值代入公式计算蛋白含量。

1.2.7 CO 浓度的测定 取 10% 的海绵体匀浆按文献[5]的方法测定 CO 浓度。

1.2.8 NOS 活性的测定 取 10% 的海绵体匀浆按测定试剂盒说明操作, 测各管吸光度值。将吸光度变化的差异代入 NOS 酶活性计算公式算出总 NOS 活性。

1.3 统计学处理 数据输入计算机, 采用 SPSS11.5 软件分析处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较时采用 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 观察大鼠外观 对照组大鼠生长迅速, 体质量逐日增加, 毛色白, 有光泽, 活动灵敏, 进食正常。尼古丁各组大鼠出现精神不振、食欲减退、体质量减轻、毛色发黄、无光泽、粗糙稀少、对外界刺激反应迟钝、少活动等表现。

2.2 阴茎勃起功能测定 尼古丁注射各组大鼠阴茎勃起次数都较对照组降低($P < 0.01$)。尼古丁给药时间越长, 阴茎勃起

次数越少。尼古丁注射各组间两两比较, 尼古丁(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组与尼古丁(1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 尼古丁(1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组与尼古丁(2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 尼古丁(2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组与尼古丁(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 NOS 活性定量分析 尼古丁注射各组大鼠阴茎海绵体匀浆中 NOS 活性都较对照组降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。尼古丁给药时间越长, NOS 活性越低。尼古丁注射各组间两两比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

2.4 内源性 CO 浓度测定 尼古丁注射各组大鼠阴茎海绵体匀浆中 CO 浓度都较对照组降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。尼古丁给药时间越长, 内源性 CO 含量越低。尼古丁注射各组间两两比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

3 讨 论

阴茎勃起是一个复杂的心理-生理过程, 本质是一系列神经-血管活动, 是神经-内分泌调控下阴茎海绵体血流动力学变化过程。阴茎勃起和疲软态的血流动力学受海绵体平滑肌舒张和收缩调控。正常阴茎勃起机制决定于海绵体平滑肌收缩与舒张的精确平衡^[6]。海绵体平滑肌收缩由交感神经释放去甲肾上腺素激活 α-肾上腺能受体所调控, 而舒张则由副交感神经释放的乙酰胆碱和神经递质 NO 介导^[7]。ED 的病因学分为几个主要方面, 20 年前认为 80% 的 ED 是心理性的, 但现在广泛承认最常见并可解释大多数病例的原因是血管病变, 许多血管疾病的危险因素与 ED 的危险性有关, 包括吸烟, 血清总胆固醇浓度。吸烟可促进动脉粥样硬化, 引起血管收缩, 减少阴茎血流和增加血液黏稠度, 同时可增加血液中 CO₂ 含量, 减少阴茎氧供。因此, 吸烟是 ED 的危险因素, 是公认的器质性 ED 发生的危险因素。尼古丁是香烟烟雾中的一种重要成分, 是烟草致病的主要成分之一, 属吡啶衍生物类生物碱, 是一种难闻、味苦、无色透明的油质液体, 挥发性强, 在空气中极易氧化成暗灰色, 能迅速溶解于水及乙醇中, 通过口、鼻、支气管黏膜很容易被机体吸收, 有剧毒, 少量对中枢神经有兴奋作用, 能升高血压, 大量则抑制中枢神经系统, 使心脏麻痹以致死亡。本实验中参考蓝晓红等^[8]皮下注射尼古丁的方法, 制备尼古丁给药动物模型, 观察成年大鼠阴茎勃起次数, 发现尼古丁给药各组大鼠阴茎勃起次数较对照组明显下降, 说明尼古丁能导致大鼠 ED。观察中发现尼古丁给药剂量越大, 阴茎勃起次数越少, 尼古丁(2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组较尼古丁(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 尼古丁(1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组较尼古丁(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组、尼古丁(2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组较尼古丁(1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)组亦减少, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 分析原因可能与本研究设计的剂量梯度不够大、样本数偏小有关。在实验中观察发现, 尼古丁各组大鼠出现精神不振、食欲减退、体质量减轻、毛色发黄、无光泽、粗糙稀少、对外界刺激反应迟钝、少活动等表现, 再次证实吸烟的危害。现代医学认为, 吸烟对勃起功能的损害是

多方面的。主要包括:对血流动力学的影响、对外周神经递质释放的影响、对性激素的影响。已有研究表明吸烟对交感神经的影响是通过尼古丁的作用实现的。NO 在体内是通过 NOS 催化 L-精氨酸产生的,NO 非常活跃,半衰期仅为数秒钟,很难对其进行精确的研究,而 NOS 是 NO 合成过程的限速酶,可作为研究 NO 的替代,NOS 活性降低是导致 ED 的主要原因^[9]。Xie 等^[10]将成年大鼠(5 月龄)和老年大鼠(20 月龄)分别暴露在香烟的烟雾中被动吸烟 8 周,结果成年大鼠和老年大鼠阴茎组织总 NOS 活性分别下降 73%、62%。国内杜国顺和胡礼泉^[11]将 4、10、16 月龄的 Wistar 雄性大鼠放于密闭容器内被动吸烟 2 个月,发现吸烟组大鼠与对照组相比,NOS 活性分别下降 41%(4 月龄)、69%(10 月龄)和 58%(16 月龄),差异有统计学意义($P < 0.05$)。然而有关香烟烟雾的主要成分——尼古丁对大鼠阴茎海绵体 NO 类血管舒张因子影响的研究,目前报道较少。本实验通过检测尼古丁给药各组大鼠阴茎海绵体 NOS 活性,发现尼古丁给药各组大鼠 NOS 活性显著下降,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),尼古丁剂量越大,NOS 活性越低,尼古丁给药各组两两比较差异有统计学意义,说明尼古丁可通过抑制 NOS 活性,从而致 NO 合成不足,导致阴茎舒张能力减弱而致 ED。

内源性 CO 是近十几年来研究证实的重要的细胞信使分子之一。研究表明,内源性 CO 的作用方式类似于 NO^[12-13],二者在生理功能上有许多共同点。内源性 CO 主要由血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)催化分解血红素而产生。HO 有 HO-1、HO-2 和 HO-3 共 3 种同工酶。研究发现,CO 可以减弱大鼠阴茎海绵体的张力,HO 的抑制剂能抑制海绵体的舒张效应^[14]。研究发现,阴茎海绵体上的 HO-2 和内皮型 NOS 参与调节阴茎的勃起^[15]。可见,CO/HO 在阴茎勃起中起重要作用。本实验通过测定实验各组大鼠阴茎海绵体内源性 CO 含量,发现尼古丁给药的各组大鼠阴茎海绵体内源性 CO 含量显著降低,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),尼古丁剂量越大,CO 含量越低,尼古丁给药各组两两比较差异有统计学意义,说明尼古丁对大鼠勃起功能的影响有内源性 CO 的参与,从而说明内源性 CO 是吸烟引起 ED 的一种新型神经递质,为探讨吸烟致 ED 的发生机制及临床治疗提供新的途径。有关其确切机制和临床意义的研究极有价值,有待深入研究。

参考文献:

[1] 辛钟成. 重度勃起功能障碍的诊断与治疗进展[J]. 临床泌尿外科杂志,2006,21(3):161-163.

(上接第 3182 页)

- [7] Ndisang JF, Jadhav A. Heme oxygenase system enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(8):829-841.
- [8] Calabrese V, Cornelius C, Koverech G, et al. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 12(1):3-5.
- [9] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. *Nature*, 2001, 414(6):813-820.
- [10] McLaughlin B, Hartnett KA, McLaughlin B, et al. Caspase-3

- [2] 郭应禄, 胡礼泉. 临床男科学[M]. 武汉:湖北科技出版社,1996:298-306.
- [3] 薛启冀. 一氧化碳是一种新型气体神经介质[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2004,11(4):239-242.
- [4] 郭玉刚, 秦文波, 宋文君, 等. 内源性一氧化碳对离体犬阴茎海绵体平滑肌的作用[J]. 中华男科杂志,2006,12(8):685-688.
- [5] 曾锦生, 叶启发. 血浆一氧化碳测定的改良双波长分光光度法[J]. 中国现代医学杂志,2002,12(1):40-41.
- [6] Taub HC, Lerner SE, Melman A, et al. Relationship between contraction and relaxation in human and rabbit corpus cavernosum[J]. *Urology*, 1993, 42(9):698-701.
- [7] Burnett A. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology[J]. *J Urol*, 1997, 157(4):320-323.
- [8] 蓝晓红, 徐添颖, 缪朝玉. 尼古丁给药和撤药模型的制备与评价[J]. 第二军医大学学报,2008,29(2):156-158.
- [9] 刘继红, 王涛. 勃起功能障碍的基因治疗与一氧化氮合酶[J]. 现代泌尿外科杂志,2003,8(1):63-64.
- [10] Xie Y, Garban H, Ng C, et al. Effect of long-term passive smoking on erectile function and penile nitric oxide synthase in the rat[J]. *J Urol*, 1997, 157(10):1121-1126.
- [11] 杜国顺, 胡礼泉. 长期吸烟加速老龄鼠性功能的退化[J]. 中华泌尿外科杂志,1999,20(6):745-746.
- [12] Abdel Aziz MT, Mostafa T, Atta H, et al. Oral phosphodiesterase-5 inhibitors: effect of heme oxygenase inhibition on cGMP signalling in rat cavernous tissue[J]. *Andrologia*, 2007, 39(2):66-70.
- [13] Abdel Aziz MT, El-Asmer MF, Mostafa T, et al. Heme oxygenase vs. nitric oxide synthase in signaling mediating sildenafil citrate action[J]. *Sex Med*, 2007, 14(7):1098-1107.
- [14] Ushiyama M, Morita T, Kuramochi T, et al. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide[J]. *Hypertens Res*, 2004, 27(4):253-261.
- [15] Hedlund P, Ny L, Alm P, et al. Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase[J]. *J Urol*, 2000, 164(6):868-875.

(收稿日期:2012-03-27 修回日期:2012-05-23)

activation is essential for neuroprotection in preconditioning[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(6):715-720.

- [11] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage[J]. *Nature*, 2000, 404(7):787-790.
- [12] Thompson EW. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment[J]. *Am J Ana*, 1988, 182(3):270-282.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-05-21)