

文章编号 1006-8147(2020)05-0422-07

论著

胰岛素治疗对糖尿病大鼠阴茎组织中 miR-126、VEGF、eNOS 表达的影响

胡睿¹, 张威¹, 欧宁静¹, 梁震¹, 杨永姣², 刘莉¹, 刘晓强¹

(1.天津医科大学总医院泌尿外科, 天津 300052; 2.天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

摘要 目的:研究胰岛素治疗对糖尿病大鼠阴茎组织中 miR-126、VEGF、eNOS 表达的影响。方法:8 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 30 只,采用随机数字表将其分为正常对照组(NC 组)、糖尿病组(DM 组)和胰岛素治疗组(Insulin 组)。腹腔内注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病(DM)大鼠模型,Insulin 组于成模后开始注射胰岛素,连续 8 周。治疗结束后,检测各组大鼠的体重、血糖、阴茎海绵体内压(ICP)、平均颈动脉内压(MAP)及 ICP 与 MAP 比值(ICP/MAP),阴茎海绵体中内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、血管内皮生长因子(VEGF)及 miR-126 的表达量。结果:胰岛素治疗后,Insulin 组的体重较 DM 组明显增加($t=-10.481$, $P<0.001$),血糖较 DM 组显著降低($t=4.356$, $P<0.001$);Insulin 组的 ICP/MAP 较 DM 组明显增加($t=-14.349$, $P<0.001$);Western 印迹结果显示,Insulin 组阴茎海绵体中 eNOS 及 VEGF 蛋白表达量均较 DM 组显著增加($t=-6.786$, -21.177 , 均 $P<0.001$)。RT-PCR 结果显示,Insulin 组阴茎海绵体中 eNOS、VEGF 和 miR-126 的表达量均较 DM 组显著增加($t=-6.994$, -8.238 , -10.665 , 均 $P<0.001$)。但上述指标均未达到 NC 组水平。结论:胰岛素治疗可增加阴茎组织中 miR-126、VEGF 及 eNOS 的表达水平。

关键词 糖尿病性勃起功能障碍;胰岛素;miR-126;VEGF;eNOS

中图分类号 R698+R587.2

文献标志码 A

Effect of insulin treatment on miR-126, VEGF and eNOS expression in penile tissues of diabetic rats

HU Rui¹, ZHANG Wei¹, OU Ning-jing¹, LIANG Zhen¹, YANG Yong-jiao², LIU Li¹, LIU Xiao-qiang¹

(1. Department of Urology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of insulin treatment on miR-126, VEGF and eNOS expression in penile tissues of diabetic rats. **Methods:** 30 male Sprague-Dawley(SD) rats aged 8 weeks were randomly divided into three groups by random number table: normal control group(NC group), diabetes mellitus group (DM group) and insulin treatment group(Insulin group). Intraperitoneal injection of streptozotocin(STZ) to establish a rat model of diabetes mellitus (DM). Insulin group were started to inject insulin for 8 weeks after the DM model established. When the treatment was finished, the body weight, blood glucose, intracorporeal pressure (ICP), mean arterial pressure (MAP) and the ratio of ICP and MAP (ICP/MAP) of rats in different groups were measured. The expressions of eNOS, VEGF and miR-126 in the penile tissues were detected. **Results:** After 8 weeks of insulin treatment, the body weight of Insulin group significantly increased compared with DM group ($t=-10.481$, $P<0.001$), while the blood glucose significantly decreased compared with DM group ($t=4.356$, $P<0.001$). The ICP/MAP of Insulin group significantly increased compared with DM group ($t=-14.349$, $P<0.001$). The expressions of eNOS and VEGF in Insulin group by Western blot were significantly increased compared with DM group ($t=-6.786$, -21.177 , both $P<0.001$). The expressions of eNOS, VEGF and miR-126 in Insulin group by RT-PCR were significantly increased compared with DM group($t=-6.994$, -8.238 , -10.665 , all $P<0.001$). However, the above results were not equal to the level of NC group. **Conclusion:** Insulin treatment can increase the expressions of miR-126, VEGF and eNOS in penile tissues.

Key words diabetes associated erectile dysfunction; insulin; miR-126; VEGF; eNOS

糖尿病是人类常见的慢性疾病,我国成年人的糖尿病发病率约为 10.9%,世界卫生组织预计 2025 年全世界的糖尿病人数将达到 3.0 亿左右,国际糖

尿病联盟估计 2035 年全世界的糖尿病人数可能增至 5.9 亿,2045 年约为 6.9 亿,糖尿病发病率呈逐年上升趋势^[1-4]。糖尿病严重影响机体代谢,并导致神经血管功能损害,进而出现多种并发症^[5]。糖尿病的血管并发症主要包括糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病下肢缺血及糖尿病性心脏病等,血管内

基金项目 赵以成医学科学基金资助项目(ZYYFY2018031)

作者简介 胡睿(1993-),男,硕士在读,研究方向:男科疾病的临床和基础研究;通信作者:刘晓强, E-mail: liuxiaoqiangtjykd@163.com。

皮功能障碍是糖尿病血管并发症治疗和预防的关键^[6-7]。糖尿病性勃起功能障碍(DMED)是一种常见的糖尿病并发症,其在30岁男性糖尿病患者中的发病率约为15%,而在60岁男性糖尿病患者中上升至55%,高达75%的男性糖尿病患者受到DMED的影响^[8]。多项研究表明,链脲佐菌素(STZ)可用于建立糖尿病大鼠模型,大鼠成模后8周可发生勃起功能障碍(ED),控制血糖可能通过改善血管内皮功能障碍,从而治疗DMED^[9-11]。但是,胰岛素改善DMED大鼠血管内皮功能障碍的具体机制尚未阐明,还需要进一步探索。

内皮型一氧化氮合酶(eNOS)是血管内皮细胞内一氧化氮合成的关键酶,后者在维持血管稳态中发挥作用,是调节血管内皮细胞功能的重要因子^[12]。eNOS还具有扩张血管、调节血管平滑肌功能及抑制氧化应激等作用^[13-14]。血管内皮生长因子(VEGF)对内皮细胞具有特异性,能促进血管内皮细胞增殖、迁移,在组织缺血、缺氧状态下发挥促血管生成作用,是最有效的促血管生成因子之一^[15]。Micro RNA(miRNA)是一种由18~22个核苷酸组成的非编码小RNA分子,通过与mRNA的3'-UTR结合,对mRNA进行降解或翻译抑制,在转录后水平参与基因表达调节、细胞生长、迁移、凋亡等过程^[16]。miR-126(miR-126)在血管内皮细胞中特异性表达,具有调控黏附分子表达、血管炎性反应、新生血管生成及维持血管结构完整的功能^[17-18]。本研究采用胰岛素治疗糖尿病大鼠,观察治疗后糖尿病大鼠勃起功能的变化,比较大鼠阴茎海绵体中eNOS、VEGF及miR-126含量的差异,探究胰岛素治疗改善血管内皮细胞功能进而治疗DMED的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8周龄SD雄性大鼠30只,体重(280±25)g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0006,动物批号:1100111911034970。交配实验证实勃起功能正常。所有大鼠在SPF级环境下饲养,室内温度15~25℃,12 h光亮,12 h黑暗,自由进食及饮水。

1.2 主要仪器与试剂 STZ(Sigma),柠檬酸钠(Sigma),柠檬酸(Sigma),血糖试纸及血糖仪(罗氏公司),多聚甲醛(Sigma),兔抗大鼠VEGF抗体(Boster),兔抗大鼠eNOS抗体(BIOS),小鼠单抗 β -actin(武汉博士德生物工程有限公司),HRP标记羊抗小鼠二抗(武汉博士德生物工程有限公司),HRP标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司),磷酸缓冲盐溶液(PBS,武汉博士德生物工程有

限公司),实时荧光定量PCR仪(ABI),电转仪(北京六一仪器厂),酶标仪(Thermo),MedLab多通道生理记录仪(南京美易有限公司)。

1.3 建立糖尿病动物模型 30只大鼠适应性饲养1周后,选取20只建立糖尿病模型,剩余10只作为对照组(NC组)。禁食24 h后,按45 mg/kg左下腹腔单剂量注射STZ,72 h后测定尾静脉血糖,将血糖>16.7 mmol/L的大鼠确定为糖尿病大鼠。一共18只大鼠成模,成模率为90%。NC组同法注射等剂量0.1 mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,72 h后测血糖均正常。将成模大鼠随机分成糖尿病(DM组, $n=9$)和胰岛素组(Insulin组, $n=9$),Insulin组每日皮下注射1次长效胰岛素(诺和诺德公司),剂量为(10~20)U/kg,每日测量血糖,DM组同法注射等剂量PBS。NC组和DM组每周测1次血糖,所有大鼠每周测1次体重。

1.4 测定阴茎海绵体内压(ICP)与平均颈动脉压(MAP) 各组大鼠在胰岛素治疗8周后进行勃起功能检测,将大鼠腹腔注射戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉并固定。作腹部正中切口,显露前列腺,于前列腺背外侧找到盆神经节后,将盆神经及阴茎海绵体神经分离出来。切开阴茎皮肤,暴露阴茎脚,同时充分暴露阴茎海绵体;于阴茎海绵体中部置入一枚充满肝素溶液的23G静脉输液针进行穿刺,输液针导管有回血,证明穿刺成功,固定输液针,另一端通过压力换能器连接MedLab多通道生理记录仪,准备测量ICP。然后游离并暴露右侧颈总动脉,结扎远心端并夹闭近心端后,并将充满肝素溶液的PE-50导管置入颈总动脉中,另一侧通过压力换能器连接MedLab多通道生理记录仪,以监测MAP。双极不锈钢电极勾住阴茎海绵体神经,将刺激参数设置为5 V,25 Hz,5 ms脉冲宽度和60 s持续时间,进行电刺激,同时记录ICP和MAP,并在每只大鼠中记录最大ICP与MAP的比值(ICP/MAP)。

1.5 Western 印迹检测大鼠阴茎海绵体组织中eNOS、VEGF的含量 将阴茎组织尽量剪碎,组织块置于匀浆器中,加入裂解液进行匀浆,裂解30 min后,将裂解液移至1.5 mL离心管中,离心取上清分装。BSA法进行蛋白浓度测定。将提取的蛋白上清与5×蛋白上样缓冲液进行沸水浴。配分离胶、浓缩胶,恒压120 V电泳分离后转膜(eNOS:200 mA、60 min;VEGF:200 mA、70 min),用含5%脱脂奶粉的TBST封闭,加入一抗(eNOS 1:1 000;VEGF 1:500; β -actin 1:500),4℃孵育过夜。洗去一抗,加入二抗后孵育2 h,洗去多余二抗,显色曝光,扫描

胶片,用 BandScan(Glyko 公司)分析胶片灰度值,结果以 eNOS/ β -actin、VEGF/ β -actin 进行分析。

1.6 RT-PCR 法检测大鼠阴茎海绵体组织中 eNOS、VEGF、miR-126 的表达 所有引物均由 Invitrogen 公司设计合成。取 -80°C 冰箱中保存的阴茎海绵体组织研磨至粉末后,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,以 Oligo(dT)18 为引物,逆转录 mRNA 为 cDNA。取逆转录产物 4 μL 加入实时荧光定量 PCR 反应体系。PCR 反应条件: 50°C 2 min, 95°C 10 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s,40 个循环。eNOS、VEGF 以 GAPDH 作为内参校准基因,miR-126 以 U6 作为内参校准基因。采用 ABI 公司的实时荧光定量 PCR 仪对扩增后的 PCR 产物进行荧光定量检测,绘制溶解曲线,最终数据以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行分析,见表 1。

1.7 免疫组化检测阴茎组织中 eNOS、VEGF 的表达 新鲜阴茎海绵体组织经固定、包埋,石蜡块连续切片,常规脱蜡,电陶炉加热对切片进行抗原修复,3%过氧化氢去离子水孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次,山羊血清室温封闭 30 min。加一抗(1:100)后于 4°C 湿盒中孵育过夜(15 h);PBS 冲洗切片 3 次,每次 3 min,加二抗后室温孵育 20 min;PBS 冲洗切片 4 次,每次 3 min,加显色剂;Harris 苏木素复染 30 s~1 min,水洗后用 1% 的盐酸酒精分化,再用自

来水水洗返蓝;脱水,封片;显微镜下观察 eNOS、VEGF 的表达分布,棕黄色染色为阳性。

1.8 统计学处理 计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 SPSS17.0 统计软件对所有的实验数据进行统计学分析。计量资料采用两独立样本 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的血糖及体重变化 造模前,各组间血糖及体重无明显差异($P>0.05$)。造模成功后(0 周),DM 组的血糖水平明显高于 NC 组($t=-10.924$, $P<0.001$),Insulin 组的血糖水平也明显高于 NC 组($t=-21.829$, $P<0.001$);DM 组的体重较 NC 组显著降低($t=5.032$, $P<0.001$),Insulin 组的体重也显著低于 NC 组($t=5.381$, $P<0.001$)。胰岛素治疗 8 周后,Insulin 组的血糖水平明显低于 DM 组($t=4.356$, $P<0.001$),但较 NC 组高($t=-51.207$, $P<0.001$);而 Insulin 组的体重较 DM 组显著增加($t=-10.481$, $P<0.001$),但远未达到 NC 组水平($t=7.301$, $P<0.001$),见表 2,图 1。

2.2 ICP/MAP 评价勃起功能恢复 胰岛素治疗 8 周后,DM 组的 ICP[(38.44 \pm 3.58) mmHg]与 NC 组[(84.10 \pm 3.84) mmHg]相比,显著降低($t=26.826$, $P<0.001$),Insulin 组的 ICP[(62.78 \pm 3.63) mmHg]较 DM 组显著增加($t=-14.324$, $P<0.001$),但不及 NC 组

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

引物名称		引物序列(5'→3')	引物大小
eNOS	Forward	TGGCCAAAGTGACCATTTGTG	182 bp
	Reverse	GGCAGGGGACAGGAAATAGT	
VEGF	Forward	CCCACCCACATACATACATT	167 bp
	Reverse	CTCCCAACTCAAGTCCACA	
GAPDH	Forward	ACAGCAACAGGCTGCTGGAC	253 bp
	Reverse	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
mo-miR-126a-3p	loop primer	GTCGTATCCAGTGCAGGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCATTAT	
	F primer	TGCGCTCGTACCGTGAGTAATA	
U6	Forward	CGCTTCGGCAGCACATATAC	
	Reverse	AAATATGGAACGCTTCACGA	

注:eNOS:内皮型一氧化氮合酶;VEGF:血管内皮生长因子;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

表 2 各组大鼠血糖及体重测定结果($\bar{x}\pm s$)

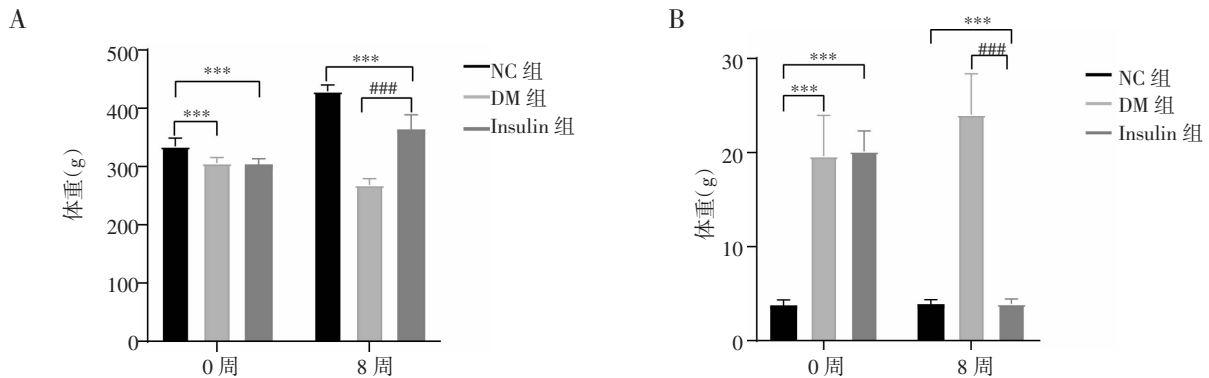
Tab 2 Blood glucose and body weight of rats in different groups($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血糖(mmol/L)		体重(g)	
		0 周	8 周	0 周	8 周
NC 组	10	3.77 \pm 0.56	3.88 \pm 0.49	334.60 \pm 41.42	429.53 \pm 10.70
DM 组	9	19.64 \pm 4.33*	24.05 \pm 4.36	306.11 \pm 9.43*	268.56 \pm 10.99
Insulin 组	9	20.13 \pm 2.19*	17.64 \pm 0.68 [#]	304.11 \pm 9.45*	363.89 \pm 24.98 [#]

注:与 NC 组相比:* $P<0.001$;与 DM 组相比:[#] $P<0.001$;NC 组:正常对照组;DM 组:糖尿病组;Insulin 组:糖尿病胰岛素治疗组

($t=12.391, P<0.001$)。Insulin 组的 ICP/MAP[(0.523 1±0.030 3)]明显高于 DM 组[(0.320 4±0.029 6), $t=-$

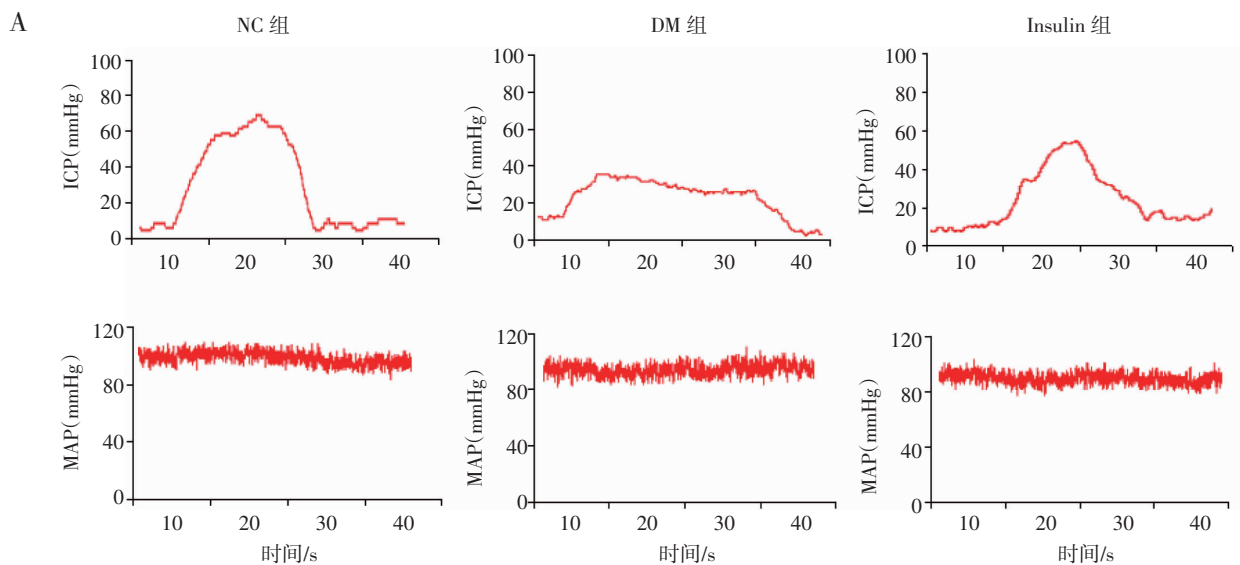
14.349, $P<0.001$], 但未达到 NC 组水平 [(0.700 8±0.032 1), $t=12.364, P<0.001$], 见图 2。



注:与 NC 组相比,*** $P<0.001$;与 DM 组相比,### $P<0.001$;NC 组:正常对照组;DM 组:糖尿病组;Insulin 组:糖尿病胰岛素治疗组

图 1 各组大鼠血糖及体重水平

Fig 1 Blood glucose and body weight of the rats in different groups



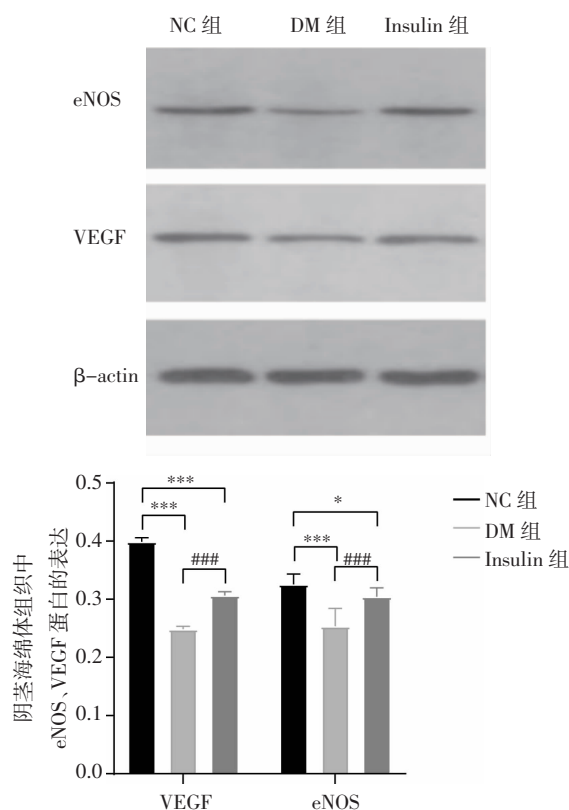
B

注:A:各组具有代表性的 ICP 及 MAP 图;B:各组间 ICP 及 ICP/MAP 的差异;与 NC 组相比,*** $P<0.001$;与 DM 组相比 ### $P<0.001$;NC 组:正常对照组;DM 组:糖尿病组;Insulin 组:糖尿病胰岛素治疗组;ICP:阴茎海绵体内压,MAP:平均颈动脉压

图 2 各组大鼠 ICP 与 MAP 水平

Fig 2 Intracorporeal pressure and mean arterial pressure of the rats in different groups

2.3 Western 印迹检测阴茎组织中 eNOS、VEGF 的蛋白表达量 胰岛素治疗 8 周后,DM 组 eNOS 蛋白表达量 ($0.253\ 0 \pm 0.028\ 9$) 与 NC 组 ($0.8535 \pm 0.062\ 5$) 相比,显著降低 ($t=6.629, P<0.001$),DM 组 VEGF 蛋白表达量 ($0.248\ 4 \pm 0.005\ 0$) 较 NC 组 ($0.398\ 8 \pm 0.007\ 3$) 显著减少 ($t=52.055, P<0.001$); Insulin 组 eNOS 蛋白表达量 ($0.323\ 8 \pm 0.012\ 0$) 与 DM 组相比,显著升高 ($t=-6.786, P<0.001$),VEGF 蛋白表达量也较 DM 组显著增加 ($t=-21.177, P<0.001$),但均未达到 NC 组水平,见图 3。



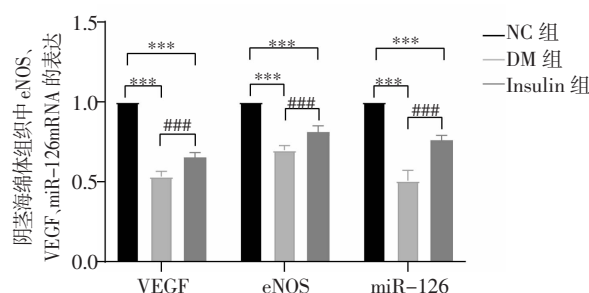
注:与 NC 组相比,* $P<0.05$;与 NC 组相比,** $P<0.01$;与 NC 组相比,*** $P<0.001$;与 DM 组相比,### $P<0.001$;NC 组:正常对照组;DM 组:糖尿病组;Insulin 组:糖尿病胰岛素治疗组;eNOS:内皮型一氧化氮合酶;VEGF:血管内皮生长因子

图 3 各组大鼠阴茎海绵体组织中 eNOS、VEGF 蛋白的表达

Fig 3 The protein expressions of eNOS and VEGF in the corpus cavernosal tissue of different groups of rats

2.4 RT-PCR 检测阴茎组织中 eNOS、VEGF、miR-126 mRNA 的表达量 胰岛素治疗 8 周后,与 NC 组相比,DM 组 eNOS mRNA 表达量 ($0.697\ 8 \pm 0.029\ 7$)、VEGF mRNA 表达量 ($0.532\ 7 \pm 0.032\ 6$)、miR-126 mRNA ($0.507\ 2 \pm 0.064\ 2$) 表达量显著降低 ($t=30.513, 43.057, 23.030$, 均 $P<0.001$);与 DM 组相比,Insulin 组 eNOS mRNA 表达量 ($0.812\ 0 \pm 0.039\ 0$)、VEGF mRNA 表达量 ($0.653\ 3 \pm 0.029\ 5$)、miR-126 mRNA 表达量 ($0.760\ 3 \pm 0.030\ 8$) 均显著升高 ($t=-6.994, -8.238,$

-10.665 , 均 $P<0.001$),但均未达到 NC 组水平(均 $P<0.001$),见图 4。

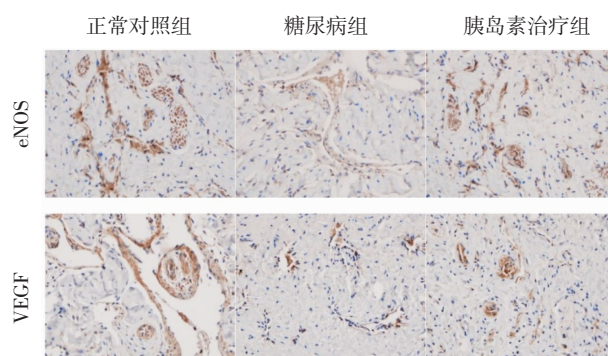


注:与 NC 组相比,*** $P<0.001$;与 DM 组相比,### $P<0.001$;NC 组:正常对照组;DM 组:糖尿病组;Insulin 组:糖尿病胰岛素治疗组;eNOS:内皮型一氧化氮合酶;VEGF:血管内皮生长因子

图 4 各组大鼠阴茎海绵体组织中 eNOS、VEGF、miR-126 mRNA 的表达

Fig 4 The mRNA expressions of eNOS, VEGF and miR-126 in the corpus cavernosal tissue of different groups of rats

2.5 免疫组化检测 eNOS、VEGF 的表达 eNOS、VEGF 的表达位置主要在阴茎海绵体的海绵窦血管内皮细胞的细胞膜上(棕黄色即为阳性表达)。eNOS、VEGF 在 DM 组、Insulin 组阴茎海绵体组织中表达水平与 NC 组相比均减少,而在 Insulin 组阴茎海绵体组织中表达水平与 DM 组相比增加,见图 5。



注:eNOS:内皮型一氧化氮合酶;VEGF:血管内皮生长因子

图 5 eNOS、VEGF 在各组大鼠阴茎海绵体组织中的表达(免疫组织化学染色,400 \times)

Fig 5 Expressions of eNOS and VEGF in the corpus cavernosal tissue of different groups of rats (Immunohistochemical staining, 400 \times)

3 讨论

阴茎勃起过程依赖于各种信号通路,其中,一氧化氮/cGMP 通路是目前最为经典、研究最为深入的分子信号通路。一氧化氮合酶(NOS)对一氧化氮的合成在阴茎勃起中起到重要作用。目前研究发现,NOS 有 3 种亚型:eNOS、神经型 NOS(nNOS)、诱

导型 NOS(iNOS),其中 eNOS 和 nNOS 在勃起中起主要作用^[19-20]。ED 是指男性不能持续获得和维持足够的阴茎勃起以完成满意的性生活^[21]。糖尿病患者的 ED 发病率高达 30%~70%,比非糖尿病患者高 2~5 倍^[22]。随着糖尿病患者年龄增长和病程的延长,ED 发生率会明显增加^[23]。DMED 的发病机制较复杂,包括神经血管等多方面的因素。糖尿病会引起晚期糖基化终末产物(AGEs)在阴茎海绵体中积聚,AGEs 与细胞内的 eNOS 结合并且抑制其功能,从而使一氧化氮的合成下降,还会造成游离一氧化氮的灭活,导致阴茎勃起过程中主要神经递质的缺失^[24]。此外,AGEs 还可沉积在阴茎海绵窦血管内皮细胞中,增加血管通透性,损伤血管内皮,诱导细胞内的氧化应激反应,产生大量氧自由基,抑制 VEGF 等促血管再生因子的合成及功能^[25-26]。Wang 等^[27]研究表明,糖尿病大鼠的 ICP/MAP 比正常大鼠显著降低,阴茎组织中 AGEs 沉积明显增加,但 eNOS 的合成显著减少,胰岛素干预能降低阴茎组织中 AGEs 沉积,增加 eNOS 的合成,改善血管内皮功能,从而治疗 DMED。本研究采用注射 STZ 成功建立糖尿病模型,与 NC 组相比,DM 组大鼠的血糖明显升高,体重及 ICP/MAP 显著降低,阴茎组织中 eNOS 的表达水平明显减少;而胰岛素治疗 8 周后,Insulin 组大鼠的上述指标得到明显改善,但低于 NC 组正常水平。说明糖尿病可引起阴茎组织中 eNOS 合成减少,进而影响一氧化氮的合成,导致大鼠发生 DMED;胰岛素治疗可增加 eNOS 表达量,从而治疗 DMED,却不能恢复大鼠的勃起功能至正常水平。

微小 RNA(microRNA)是一类内源性,长度约为 20 个核苷酸的单链非编码 RNA,其在转录水平调节基因表达、RNA 加工、翻译,并可以引导 DNA 合成或基因组重排^[28-29]。microRNA 可通过对部分基因表达调控,作用于阴茎勃起过程中一氧化氮/cGMP、RhoA/Rho 激酶等通路,参与 ED 的病理生理机制,microRNA 的潜在作用已成为 DMED 的研究热点^[30]。miR-126 在内皮细胞中大量表达,通过调节血管内皮生长因子途径的几个组成部分来维持内皮细胞的稳态和血管完整性^[31]。本研究通过比较各组大鼠阴茎海绵体组织中 VEGF、miR-126 的表达水平,发现 DM 组的 miR-126 表达水平显著低于正常对照组,胰岛素治疗组明显高于 DM 组,miR-126 可能参与调控 VEGF 在大鼠阴茎组织中的表达,在一氧化氮/cGMP 信号转导通路中具有重要作用。因此,miR-126 与 VEGF 之间是否具有调控关系,该调控关系与糖尿病大鼠勃起功能、阴茎血管内皮细

胞功能之间,及与一氧化氮/cGMP 通路之间的关系同样需要进一步研究。

综上所述,本研究发现糖尿病可导致大鼠发生 ED,胰岛素治疗通过增加 ICP/MAP,增加阴茎组织中 miR-126、VEGF 及 eNOS 的表达水平,改善血管内皮细胞功能,治疗 DMED。进一步拟研究严格控制大鼠血糖及延长胰岛素治疗时间对预防和治疗 DMED 的作用,以及探讨 miR-126 与 eNOS、VEGF 之间的关系,及其在 DMED 发生、发展和胰岛素治疗中的作用,为研究 DMED 防治新策略提供更加深入的分子研究基础。

参考文献:

- [1] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515
- [2] Zimmet P, Alberti K G, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic[J]. Nature, 2001, 414(6865): 782
- [3] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 103 (2):137
- [4] Cho N H, Shaw J E, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138: 271
- [5] Li W J, Xu M, Gu M, et al. Losartan preserves erectile function by suppression of apoptosis and fibrosis of corpus cavernosum and corporal veno-occlusive dysfunction in diabetic rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(1): 333
- [6] Beckman J A, Paneni F, Cosentino F, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II[J]. Eur Heart J, 2013, 34(31): 2444
- [7] Fernández-Velasco M, Ruiz-Hurtado G, Gómez A M, et al. Ca²⁺ handling alterations and vascular dysfunction in diabetes [J]. Cell Calcium, 2014, 56(5): 397
- [8] Castela Â, Costa C. Molecular mechanisms associated with diabetic endothelial-erectile dysfunction[J]. Nat Rev Urol, 2016, 13(5): 266
- [9] Park J, Kwon O, Cho S Y, et al. Comparison of improving effects for diabetic erectile dysfunction according to the anti-glycemic agents: phlorizin and insulin[J]. World J Mens Health, 2019, 37(2): 210
- [10] Silva Fábio H, Alexandre E C, Calmasini F B, et al. Treatment with metformin improves erectile dysfunction in a murine model of obesity associated with insulin resistance[J]. Urology, 2015, 86(2): 423
- [11] Wang L, Xu Y, Li H, et al. Antioxidant icaridin II combined with insulin restores erectile function in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(5): 960
- [12] Heiss C, Rodríguez-Mateos A, Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(14):1230
- [13] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway[J]. New Engl J Med, 1993, 329(27): 2002
- [14] De Caterina R, Libby P, Peng H B, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively re-

- duces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(1): 60
- [15] Melincovici C S, Boşca A B, şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF)—key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59(2): 455
- [16] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281
- [17] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. *Devel Cell*, 2008, 15(2): 261
- [18] Harris T A, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(5): 1516
- [19] Yafi F A, Jenkins L, Albersen M, et al. Erectile dysfunction[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16003
- [20] Lau L C, Adaikan P G. Possibility of inhibition of calcium-activated chloride channel rescuing erectile failures in diabetes [J]. *Int J Impot Res*, 2014, 26(4): 151
- [21] Burnett A L, Nehra A, Breau R H, et al. Erectile dysfunction: AUA guideline [J]. *J Urol*, 2018, 200(3): 633
- [22] Tamás V, Kempler P. Sexual dysfunction in diabetes[J]. *Handb Clin Neurol*, 2014, 126: 223
- [23] Wessells H. Insights and interventions in diabetes associated erectile dysfunction[J]. *J Urol*, 2013, 190(1): 15
- [24] Neves D. Advanced glycation end-products: a common pathway in diabetes and age-related erectile dysfunction[J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(Suppl 1): 49
- [25] Usta M F, Kendirci M, Gur S, et al. The breakdown of preformed advanced glycation end products reverses erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: preventive versus curative treatment[J]. *J Sex Med*, 2006, 3(2): 242
- [26] Chillelli N C, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycoxidation-centric" point of view[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2013, 23(10): 913
- [27] Wang L, Tian W, Uwais Z, et al. AGE-breaker ALT-711 plus insulin could restore erectile function in streptozotocin induced type 1 diabetic rats [J]. *J Sex Med*, 2014, 11(6): 1452
- [28] Cech T R, Steitz J A. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones[J]. *Cell*, 2014, 157(1): 77
- [29] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(12): 861
- [30] Jiang X, Luo Y, Zhao S, et al. Clinical significance and expression of microRNA in diabetic patients with erectile dysfunction[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(1): 213
- [31] Chistiakov D A, Orekhov A N, Bobryshev Y V. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 47

(2020-03-14 收稿)

(上接第 411 页)

- [22] Dou C Y, Cao C J, Wang Z, et al. EFEMP1 inhibits migration of hepatocellular carcinoma by regulating MMP2 and MMP9 via ERK1/2 activity[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3489
- [23] Jacob A, Jing J, Lee J, et al. Rab40b regulates trafficking of MMP2 and MMP9 during invadopodia formation and invasion of breast cancer cells[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(20): 4647
- [24] Kondratiev S, Gnepp D R, Yakirevich E, et al. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas [J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(3): 337
- [25] Wang L, Wang Q, Li H L, et al. Expression of miR200a, miR93, metastasis-related gene RECK and MMP2/MMP9 in human cervical carcinoma—relationship with prognosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(3): 2113
- [26] Liu J, Ping W, Zu Y, et al. Correlations of lysyl oxidase with MMP2/MMP9 expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(9): 6040
- [27] Cernigliaro C, D'Anneo A, Carlisi D, et al. Ethanol-mediated stress promotes autophagic survival and aggressiveness of colon cancer cells via activation of nrf2/ho-1 pathway[J]. *Cancers*, 2019, 11(4): 505
- [28] Zhang M, Zhang C, Zhang L, et al. Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 531
- [29] Pan H, Wang H, Zhu L, et al. The role of Nrf2 in migration and invasion of human glioma cell U251[J]. *World Neurosurg*, 2013, 80(3): 363
- [30] Shen H, Yang Y, Xia S, et al. Blockage of Nrf2 suppresses the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells in hypoxic microenvironment[J]. *Dis Esophagus*, 2014, 27(7): 685

(2020-03-14 收稿)