· 论著-实验研究 ·

L-肉碱对老年雄性大鼠阴茎勃起功能和结构的影响研究*

刘远华[1] 代海涛[1] 熊鹰[1] 刘昌茂[1] 黄慧[1] 张忠[1] 郑江[1] 成少平[1] 吴林杰[1]

[摘要] **目的**:探讨 L-肉碱对老年雄性大鼠阴茎勃起功能和结构的影响。**方法**:以 3 个月龄和 16 个月龄的 Wistar 雄性大鼠为研究对象,饲喂 16 个月龄雄性大鼠 L-肉碱 2 个月后,测量大鼠体重及血压。阿朴吗啡皮下注射观察 30 min 内大鼠的勃起次数和打哈欠次数。RT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 表达水平。Western blot 检测阴茎组织 TGF-β1 蛋白表达水平。F-actin 荧光染色和共聚焦显微镜观察阴茎组织平滑肌与胶原的比例。**结果**:老年组、老年 L-肉碱组大鼠体重和血压比较差异无统计学意义($P>0.05$)。老年组勃起次数及打哈欠次数明显少于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);老年 L-肉碱组中勃起次数及打哈欠次数明显多于老年组,差异有统计学意义($P<0.01$)。老年组 TGF-β1 mRNA 相对表达水平明显多于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);老年 L-肉碱组中 TGF-β1 mRNA 相对表达水平明显少于老年组,差异有统计学意义($P<0.01$)。TGF-β1 蛋白表达率在老年组中明显多于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);老年 L-肉碱组中 TGF-β1 蛋白表达率明显少于老年组,差异有统计学意义($P<0.01$)。老年组阴茎组织平滑肌与胶原的比例明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);老年 L-肉碱组阴茎组织平滑肌与胶原的比例明显多于老年组,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论**:L-肉碱可以通过抑制 TGF-β1 表达改善大鼠阴茎勃起功能。

[关键词] L-肉碱;大鼠;增龄;勃起功能
doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2017.11.014
[中图分类号] R698 [文献标识码] A

Effects of L-carnitine on erectile function and structure in elderly male rats

LIU Yuanhua DAI Haitao XIONG Ying LIU Changmao HUANG Hui
ZHANG Zhong ZHENG Jiang CHENG Shaoping GUO Linjie
(Department of Urology, First People's Hospital of Jingzhou, Jingzhou, Hubei, 434000, China)
Corresponding author: ZHENG Jiang, E-mail: zhengjiang980712@163.com

Abstract **Objective**: To explore the effect of L-carnitine on erectile function and structure in elderly male rats. **Method**: Three-month-old male rats and 16-month-old male rats were used to study. The weight and blood pressure of the 16-month-old male rats were measured after L-carnitine feeding for two months. The number of erections and yawns of rats in 30 min were observed after subcutaneous injection of apomorphine. TGF-beta 1 mRNA expression level was detected by RT-PCR. The expression level of TGF-beta 1 was detected in Western blot. F-actin fluorescence staining and confocal microscopy were used to observe the ratio of smooth muscle and collagen in the penis tissue. **Result**: There was no statistically significant difference in weight and blood pressure between the elderly group and the elderly L-carnitine group ($P>0.05$). The number of erections and yawns were significantly lower in the older group than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The number of erections and yawns in the elderly L-carnitine group were significantly higher than those in the elderly group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The relative expression level of TGF-beta 1 mRNA in elderly group was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The relative expression level of TGF-beta 1 mRNA in elderly L-carnitine group was significantly lower than that in the older group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The expression rate of TGF-beta 1 was significantly higher in the elderly group than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The expression rate of TGF-beta 1 protein in elderly L-

* 基金项目:湖北省卫生计生委科研立项项目(编号 WJ2015MB211)
[1] 荆州市第一人民医院泌尿外科(湖北荆州,434000)
通信作者:郑江,E-mail:zhengjiang980712@163.com

carnitine group was significantly lower than that in the elderly group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The ratio of smooth muscle and collagen was significantly lower in the elderly group than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The ratio of smooth muscle and collagen in the elderly L-carnitine group was significantly higher than that in the elderly group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion**: L-carnitine can improve the erectile function in rats by inhibiting TGF-beta 1 expression.

Key words L-carnitine; rats; aging; erectile function

勃起功能障碍(erectile dysfunction,ED)在男性性功能障碍中占 40%以上,严重影响着患者和伴侣的生活质量,其发病原因可为单一疾病或多种因素综合所致,其中最主要因素包括器质性疾病、年龄因素、心理性疾病等[1]。年龄因素在勃起功能中具有重要意义,随着我国人口逐年老龄化,ED 的老年男性患者发病率亦呈逐年上升趋势。常用的药物包括酚妥拉明、5 型磷酸二酯酶抑制剂、前列腺素 E_1、罂粟碱等几大类,这些药物疗效均具有一定的局限性[2]。因此探究一种新的安全有效的治疗方法是目前研究的热点。

L-肉碱(L-carnitine)又称左卡尼汀,在体内可以将脂肪转化为能量,属于类氨基酸。L-肉碱对失血性休克、脂肪肝、心血管系统、疲劳等多种组织器官疾病均具有治疗作用[3]。L-肉碱参与脂肪代谢过程,在脂肪酸氧化分解过程中发挥促进作用,L-肉碱是脂肪酸的载体。近年来国内外的多项研究发现,L-肉碱在对男性睾丸的生精功能及改善精子质量、数量等方面具有促进作用,临床上常用来治疗男性不育[4]。转化生长因子-β1(transforming growth factor-β,TGF-β1)参与 ED 的发生[5]。为了明确增龄对勃起功能的影响,探究老年大鼠阴茎组织中组织和结构的变化,了解 L-肉碱在老年大鼠阴茎勃起功能中的影响机制,本研究中以 3 个月龄和 16 个月龄的大鼠为研究对象,探究 L-肉碱在老年大鼠勃起功能中的作用机制,以期为治疗老年 ED 提供新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 个月龄 Wistar 雄性大鼠 10 只,体重 180～200 g;16 个月龄 Wistar 雄性大鼠 20 只,体重 280～300 g,均购自于武汉大学动物实验中心。

1.2 主要仪器及试剂

L-肉碱购自于东北制药厂;4℃台式离心机(美国 Eppendorf 公司);一抗(Ab1)(Santa Cruz 公司);二抗(标记的 Ab2)(武汉博士德公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);Marker DL2000(Invitrogen 公司);DYCZ-24D 型电泳装置(北京六一仪器厂);阿朴吗啡、蛋白浓度检测试剂盒、反转录试剂盒(Sigma 公司);荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Thermo);共聚焦显微镜(德国 Leica)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 对照组:3 个月龄 Wistar 雄性大鼠 10 只;老年组:16 个月龄 Wistar 雄性大鼠正常喂养,不做任何处理;老年 L-肉碱组:16 个月龄 Wistar 雄性大鼠 16 个月龄时开始喂食 L-肉碱($1.0\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$),连续饲喂 2 个月,其中老年组和老年 L-肉碱组 16 个月龄 Wistar 雄性大鼠体重差异无统计学意义。

1.3.2 大鼠体重及血压检测 各组大鼠经饲喂 2 个月后,按照 Sato 等[6]方法分别称量每组大鼠的体重检测大鼠血压。

1.3.3 阿朴吗啡实验 参照参考文献[7]各组大鼠经连续饲喂 2 个月后,放置于观察箱内,待大鼠适应 1 h 后,放置于安静的房间内,保持安静,在保证观察不受影响的情况下,保持灯光昏暗。每组大鼠按照 80 μg/kg 的剂量皮下注射阿朴吗啡,将大鼠放回观察箱内,静置观察 30 min,观察 30 min 内每组大鼠的勃起次数和打哈欠次数。

1.3.4 RT-PCR 检测 TGF-β1mRNA 的表达 取大鼠阴茎组织,剪碎后,加入 Trizol 裂解液,经氯仿抽提后,用异丙醇沉淀 RNA,75%的乙醇洗涤 RNA,在室温下晾干后,加入 DEPC 水溶解提取的 RNA。根据反转录试剂盒说明书反转录合成 TGF-β1 的 cDNA,实时荧光定量 PCR 分析 TGF-β1mRNA 水平。上游引物:5'ACTGCTGTGTTCGTCAGCTC 3'下游引物:5'ACCTTGCGTTACTGCGTGTC 3'。

1.3.5 Western Blot 检测 TGF-β1 蛋白表达 取大鼠的阴茎组织,行 Western blot 检测,经组织蛋白提取,BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测提取的蛋白浓度,100℃煮沸变性,常规方法垂直电泳,4℃转膜过夜,5%脱脂奶粉封闭后,依次与一抗、二抗孵育反应后,在暗室中曝光,分析蛋白表达水平。

1.3.6 F-actin 荧光染色观察阴茎组织平滑肌与胶原的比例 取大鼠阴茎组织,在恒冷箱切 15 μm 的切片,放置于室温下风干后,加入含有 4%的多聚甲醛缓冲液固定 7 h 后,放置于 0.1 mol/L 的 PBS 中浸润 10 min。加入鬼笔环肽-TRITC 染色 40 min,用共聚焦显微镜观察阴茎组织平滑肌与胶原含量,用 Scion Image 分析计算阴茎组织平滑肌与胶原的比例。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析所有数据，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组及多组数据用方差表示，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　大鼠体重及血压检测结果

老年组、老年 L-肉碱组大鼠体重和血压比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 1。

表 1　各组大鼠体重和血压测量结果　$\bar{x}\pm s$

组别	体重/g	血压/mmHg
老年组	198.64±11.25	123.54±1.05
老年 L-肉碱组	199.79±12.58	122.98±1.21

1 mmHg=0.133 kPa。

2.2　阿朴吗啡皮下注射观察勃起次数结果

老年组勃起次数及打哈欠次数明显少于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；老年 L-肉碱组中勃起次数及打哈欠次数明显多于老年组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见表 2。

表 2　各组大鼠阿朴吗啡皮下注射后勃起次数及打哈欠次数　$\bar{x}\pm s$

组别	勃起次数	打哈欠次数
对照组	2.18±0.01	2.67±0.05
老年组	1.10±0.07[1)]	1.84±0.02[1)]
老年 L-肉碱组	1.66±0.04[2)]	2.04±0.06[2)]

与对照组比较，[1)] $P<0.01$；与老年组比较，[2)] $P<0.01$。

2.3　RT-PCR 检测阴茎组织 TGF-β1 mRNA 的表达

老年组 TGF-β1 mRNA 相对表达水平明显多于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；老年 L-肉碱组中 TGF-β1 mRNA 相对表达水平明显少于老年组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见表 3。

表 3　阴茎组织中 TGF-β1 mRNA 表达水平　$\bar{x}\pm s$

组别	TGF-β1 mRNA 相对表达水平
对照组	1
老年组	2.13±0.23[1)]
老年 L-肉碱组	1.59±0.14[2)]

与对照组比较，[1)] $P<0.01$；与老年组比较，[2)] $P<0.01$。

2.4　阴茎组织 TGF-β1 蛋白表达结果

老年组 TGF-β1 蛋白表达率明显多于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；老年 L-肉碱组中 TGF-β1 蛋白表达率明显少于老年组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见图 1，表 4。

2.5　F-actin 荧光染色观察阴茎组织平滑肌与胶原的比例结果

老年组中阴茎组织平滑肌与胶原的比例明显低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；老年 L-肉碱组中阴茎组织平滑肌与胶原的比例明显多于老年组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见表 5。

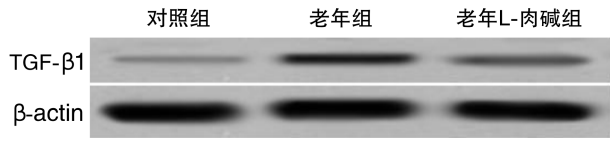

图 1　Western blot 检测阴茎组织中 TGF-β1 蛋白表达结果

表 4　Western blot 检测阴茎组织中 TGF-β1 蛋白表达水平　$\bar{x}\pm s$

组别	TGF-β1 蛋白表达率
对照组	13.61±0.67
老年组	44.24±3.25[1)]
老年 L-肉碱组	25.35±6.49[2)]

与对照组比较，[1)] $P<0.01$；与老年组比较，[2)] $P<0.01$。

表 5　阴茎组织中组织平滑肌与胶原比例结果　$\bar{x}\pm s$

组别	组织平滑肌与胶原比例
对照组	0.76±0.05
老年组	0.34±0.03[1)]
老年 L-肉碱组	0.54±0.04[2)]

与对照组比较，[1)] $P<0.01$；与老年组比较，[2)] $P<0.01$。

3　讨论

ED 的发病率随着年龄的增加而增加。增龄是目前公认的导致 ED 的重要因素[8]。随着社会老龄化的不断加剧，预计到 2025 年，全球范围内 60 岁以上的老人将超过 12 亿[9]。有研究表明，40～49 岁的男性 ED 的发病率约为 39%，而 60 岁以上的男性发病率高达 65%[10]。明确增龄对勃起功能的影响，是目前急需解决的问题。

L-肉碱是一种水溶性维生素，具有安全、无毒的优点。已经有研究表明，L-肉碱在男性生殖系统中具有抗氧化、促进精子成熟、调节细胞功能等作用[11]。连续服用 4 个月的 L-肉碱可以有效提高精子的活动率、提高精子的运动速度[12]。不育男性在服用 2 个月 L-肉碱后，精子的质量明显提高，受孕率可以高达 21%[13]。

TGF-β1 是一种多功能的细胞因子，具有调节细胞生长和分化的作用[14]。TGF-β1 的命名与其参与成纤维细胞表型变化有关[15]。TGF-β1 具有多种生物学功能，在炎症发生、胚胎发育和组织修复过程中均发挥重要作用[16,17]。TGF-β1 可以促进成纤维细胞的生长增殖，参与细胞纤维化的发

生[18]。TGF-β1 能够促进海绵体内平滑肌细胞中胶原的含量的增多，诱导 ED 的发生[19]。

本研究分别以 3 个月龄和 16 个月龄的雄性大鼠为研究对象，通过皮下注射阿朴吗啡，观察了 30 min内勃起次数和打哈欠次数，证实了老年雄性大鼠勃起功能次数少于青年大鼠，这提示增龄对勃起功能具有一定的影响。通过长期饲喂老年雄性大鼠 L-肉碱，证实了 L-肉碱对老年勃起次数具有提高的作用。通过免疫组化、Western blot 和 RT-PCR 检测雄性大鼠阴茎组织中 TGF-β1 的表达水平发现，老年组 TGF-β1 表达水平明显多于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；老年 L-肉碱组 TGF-β1 表达水平明显少于老年组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。通过 F-actin 荧光染色和共聚焦显微镜观察阴茎组织平滑肌与胶原的比例发现，老年组中比例降低，而老年 L-肉碱组中的比例有所升高，这说明 L-肉碱可以有效降低胶原的含量。而老年组中平滑肌与胶原比例低于对照组，这说明增龄对阴茎组织中的胶原含量具有一定的影响作用。

综上所述，增龄对雄性大鼠勃起功能具有一定的影响作用。L-肉碱对老年雄性大鼠勃起功能具有改善作用，作用机制与 TGF-β1 有关。这为进一步研究老年男性勃起功能的作用机制奠定了基础，为改善老年男性勃起功能提供了理论基础。

[参考文献]

1 邢俊平，宁亮，陈惠明，等. 心血管疾病患者并发勃起功能障碍的危险因素分析[J]. 中华男科学杂志，2016，22(3)：219－224.

2 刘凌琪，高阳，易小春，等. 西地那非治疗酒精依赖患者勃起功能障碍的疗效观察[J]. 中国药物依赖性杂志，2016，25(2)：209－211.

3 李洁蕾，杨培歌，冯跃进，等. L-肉碱对热应激大鼠机体脂质代谢的影响[J]. 动物营养学报，2015，27(9)：2849－2855.

4 Mandosi E，Giannetta E，Filardi T，et al. Endothelial dysfunction markers as a therapeutic target for Sildenafil treatment and effects on metabolic control in type 2 diabetes[J]. Expert OpinTher Targets，2015，19(12)：1617－1622.

5 Zhang L W，Piao S，Choi M J，et al. Role of increased penile expression of transforming growth factor-β1 and activation of the Smad signaling pathway in erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Sex Med，2008，5(10)：2318－2329.

6 Sato K，Nishiguchi K M，Maruyama K，et al. Topical ocular dexamethasone decreases intraocular pressure and body weight in rats[J]. J Negat Results Biomed，2016，15：5－5.

7 黄兴. 增龄及生长激素对老年大鼠阴茎勃起功能影响的实验研究[D]. 武汉大学，2005.

8 秦文波，迟宝进，姜大力，等. 2 型糖尿病大鼠高同型半胱氨酸血症对阴茎海绵体内钙敏感受体的影响[J]. 中国老年学杂志，2015，35(3)：134－136.

9 刘继红，栾阳. 男性勃起功能障碍的分子生物学研究进展[J]. 中华男科学杂志，2015，21(2)：99－106.

10 Seiler S E，Koves T R，Gooding J R，et al. Carnitine acetyltransferase mitigates metabolic inertia and muscle fatigue during exercise[J]. Cell Metab，2015，22(1)：65－76.

11 Panchal S K，Poudyal H，Ward L C，et al. Modulation of tissue fatty acids by L-carnitine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats[J]. Food Funct，2015，6(8)：2496－2506.

12 Balhara Y P，Sarkar S，Gupta R. Phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus：A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Indian J Endocrinol Metab，2015，19(4)：451－461.

13 Pires J，Travis M，Ellsworth P. Peyronie's Disease：Overview and Recent Treatment Advances[J]. Urol Nurs，2015，35(4)：164－179.

14 Edwards J P，Hand T W，Morais da Fonseca D，et al. The GARP/Latent TGF-β1 complex on Treg cells modulates the induction of peripherally derived Treg cells during oral tolerance[J]. Eur J Immunol，2016，46(6)：1480－1489.

15 Qi F，Cai P，Liu X，et al. Adenovirus-mediated P311 inhibits TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition in NRK-52E cells via TGF-β1-Smad-ILK pathway[J]. Biosci Trends，2015，9(5)：299－306.

16 Endo F，Komine O，Fujimori-Tonou N，et al. Astrocyte-derived TGF-β1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells[J]. Cell Rep，2015，11(4)：592－604.

17 Linehan J L，Dileepan T，Kashem S W，et al. Generation of Th17 cells in response to intranasal infection requires TGF-β1 from dendritic cells and IL-6 from CD301b＋ dendritic cells[J]. Proc Nati Acade Sci USA，2015，112(41)：12782－12787.

18 Dayer C，Stamenkovic I. Recruitment of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) to the fibroblast cell surface by lysyl hydroxylase 3(LH3) triggers transforming growth factor-β(TGF-β) activation and fibroblast differentiation[J]. J Biol Chem，2015，290(22)：13763－13778.

19 Nakajima D，Tabata Y，Sato S. Periodontal tissue regeneration with PRP incorporated gelatin hydrogel sponges[J]. Biomed Mater，2015，10(5)：055016.

（收稿日期：2017-02-09）