

• 民族医药 •

## 佧药娘母良药酒通过抑制凋亡对勃起功能障碍大鼠的机制研究

赵杰<sup>1</sup>, 罗艳<sup>1</sup>, 谢雪华<sup>1</sup>, 陈瑶<sup>1</sup>, 方鹏强<sup>2</sup>, 鲍凯<sup>3</sup>, 温伟波<sup>1,4\*</sup>, 崔换天<sup>4\*</sup>

(1. 云南省中医医院, 云南 昆明, 650021; 2. 沧源佧族自治县班老乡卫生院, 云南 临沧, 677400;

3. 沧源佧族自治县工业和科技信息化局, 云南 临沧, 677400; 4. 云南中医药大学, 云南 昆明, 650500)

**摘要:** **目的** 研究佧药娘母良药酒对勃起功能障碍(ED)大鼠的治疗作用,及对凋亡信号通路的影响。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机平均分为假手术、模型、白酒、西地那非、娘母良低剂量、娘母良高剂量 6 组。通过双侧髂内动脉结扎法建立 ED 模型。各组给药均持续 28 d,给药结束后进行 APO 实验,测定各组大鼠睾丸和附睾的质量和脏器指数、精子浓度以及精子活率。对各组大鼠阴茎海绵体与睾丸组织进行 HE 染色。采用生化试剂盒和 ELISA 检测各组大鼠阴茎海绵体组织中 NO 和 cGMP 含量,采用 Western blot 检测凋亡信号通路相关蛋白的表达。**结果** 与模型组相比,西地那非与娘母良干预后 ED 大鼠勃起次数、睾丸与附睾的质量和指数、精子数量及存活率均显著升高,阴茎海绵体与睾丸组织病理形态明显改善,阴茎海绵体组织 NO 以及 cGMP 含量升高,Bax/Bcl-2, Cleaved-caspase3 和 Cleaved-caspase9 蛋白表达下降。**结论** 娘母良药酒可以促进 NO 与 cGMP 的产生并抑制阴茎海绵体组织细胞凋亡进而改善 ED 大鼠勃起功能。

**关键词:** 娘母良药酒;勃起功能障碍;NO/cGMP;凋亡;佧药

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2023)05-0037-08

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.05.008

## Mechanistic Study of Niang-Mu-Liang Medicated Wine, A Traditional Wa Medicine, in Inhibiting Apoptosis in Rats with Erectile Dysfunction

ZHAO Jie<sup>1</sup>, LUO Yan<sup>1</sup>, XIE Xuehua<sup>1</sup>, CHEN Yao<sup>1</sup>, FANG Pengqiang<sup>2</sup>,  
BAO Kai<sup>3</sup>, WEN Weibo<sup>1,4</sup>, CUI Huantian<sup>4</sup>

(1. Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China;

2. Cangyuan County Banlao Township Hospital, Lincang 677400, China;

3. Bureau of Industry and Information Technology in Cangyuan county, Lincang 677400, China;

4. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the therapeutic effects of the traditional Wa medicine niang-mu-liang medicated wine on erectile dysfunction (ED) in rats and its impact on apoptotic signaling pathway. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into six groups: sham, model, white wine, sildenafil, niang-mu-liang low-dose, and niang-mu-liang high-dose. ED model was established using bilateral ligation of the internal iliac arteries. The treatment lasted for 28 days in each group. After the treatment, the APO experiment was conducted to measure the testicular and epididymal mass and organ indexes, sperm concentration, and sperm viability in each group of rats. HE staining was performed on the penile corpus cavernosum and testicular tissues of the rats. The levels of NO and cGMP in the penile corpus cavernosum tissue were measured using biochemical assay kits and ELISA. The expression of apoptosis-related proteins in the penile corpus cavernosum tissue was detected using Western blot analysis. **Results** Compared to the model group, the sildenafil and

基金项目: 云南省重大科技专项(生物医药)(2019ZF005)

作者简介: 赵杰(1986-),男,主治医师,E-mail: 907507885@qq.com

\* 通信作者: 温伟波(1968-),男,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:民族医学防治内分泌疾病,E-mail: wenweibo2020@163.com;崔换天(1991-),男,博士后,研究方向:民族医药药理机制研究,E-mail: 1762316411@qq.com

niang-mu-liang interventions significantly increased the number of erections, as well as the testicular and epididymal mass and indexes, sperm count, and sperm viability in the ED rats. The histological morphology of the penile corpus cavernosum and testicular tissues showed significant improvement. The levels of NO and cGMP in the penile corpus cavernosum tissue were increased. Additionally, the protein expression levels of Bax/Bcl-2, cleaved-caspase3, and cleaved-caspase9 were decreased. **Conclusion** Niang-mu-liang can improve erectile function in ED rats by inhibiting the apoptotic signaling pathway.

**KEY WORDS:** niang-mu-liang medicated wine; erectile dysfunction; NO/cGMP; apoptosis; Wa medicine

阴茎勃起功能障碍(erec-tile dysfunction, ED)是 1 种常见的男性性功能障碍,其特征是无法获得并维持足够的阴茎勃起以进行令人满意的性交,严重影响患者及其伴侣的生活质量<sup>[1]</sup>。导致 ED 的因素主要有器质性因素(神经源性、血管性、糖尿病等)<sup>[2]</sup>、心理因素(表现焦虑、压力、精神障碍等)<sup>[3]</sup>、医源性因素(手术损伤引起)<sup>[4]</sup>、年龄增长(衰老)<sup>[5]</sup>等。目前临床常用西地那非、他达拉非等药物辅助治疗<sup>[6]</sup>,但越来越多的患者表现出服药效果不佳以及其他不良反应,开发更安全有效的治疗方法迫在眉睫<sup>[7]</sup>。中医药在防治 ED 方面表现出了特殊的优势。研究表明,补肾活血方联合他达拉非可以改善海绵体血流情况,改善 ED 患者的勃起情况<sup>[8]</sup>。活血通络起痿汤联合小剂量他达拉非治疗可有效提高 ED 患者的国际勃起功能指数评分<sup>[9]</sup>。马鬃蛇石油醚提取物可抑制阴茎海绵体细胞凋亡以改善 ED 大鼠的勃起功能<sup>[10]</sup>。中药酒是传统医学中防治疾病、强身健体的优良食药产品。娘母良(佤文 Nya Miex Tiang 的音译)作为云南佤族的 1 种珍奇中草药,其炮制的药酒在佤医临床应用中颇为广泛,对强肾壮阳、安神补脑、暖宫促孕等具有明显功效<sup>[11]</sup>,但其作用机制不明。本文通过双侧髂内动脉结扎法建立 ED 大鼠模型,分析娘母良药酒对 ED 大鼠的影响,并基于凋亡通路探索其作用机制。

## 1 方法

1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 6~8 周龄 SD 大鼠,60 只,体质量 200~220 g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0008。大鼠 5 只/笼,饲养于室温(21±2)℃,相对湿度 50%~60%,明暗 12 h/12 h 的环境并使大鼠自由进食饮水。

1.2 药品试剂 53%vol 茅台镇散酒(SC11552032 110418);娘母良药酒(娘母良 200 g+53%vol 茅台镇

散酒 4 000 mL);枸橼酸西地那非片(货号:H20143255,广东白云山医药集团股份有限公司);盐酸阿扑吗啡(APO,货号:PHR2621,默克);BCA 蛋白检测试剂盒(货号:A045-4-2),一氧化氮(NO)测定试剂盒(货号:A013-2-1)均购于南京建成生物工程研究所;大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)ELISA 检测试剂盒(货号:ml003133,酶联生物);B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2,货号:ab59348),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax,货号:ab32503)均购于 Abcam 上海贸易有限公司;Cleaved caspase-3(货号:9661),Cleaved caspase-9(货号:9507)均购于 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 建立 ED 模型 使用双侧髂内动脉结扎法建立 ED 模型<sup>[12]</sup>。将大鼠麻醉后固定于手术台上,在腹部正中切口,分离腹壁肌肉组织,通过手术放大镜辅助,沿髂总动脉小心分离直至髂内动脉,以 8-0 线结扎双侧髂内动脉。假手术组大鼠接受假手术,即按建模步骤但不予结扎。

采用 APO 实验验证模型<sup>[13]</sup>:在大鼠颈项皮肤松软处注射 100 μg/kg APO,记录 30 min 内大鼠阴茎勃起次数,以阴茎体增长、未段阴茎体露出为阴茎勃起 1 次;未检测到阴茎勃起证明模型构建成功。

1.4 分组和给药 将 60 只大鼠平均分为 6 组:假手术、模型、白酒、西地那非、娘母良低剂量、娘母良高剂量组。假手术组大鼠接受假手术,其余组均使用双侧髂内动脉结扎法建立 ED 模型。造模成功后第 1 天开始给药,西地那非组每天灌胃 5 mg/kg 的西地那非,娘母良低、高剂量组每天分别灌胃 3、6 mL/kg 的娘母良药酒,白酒组每天灌胃等体积等度数白酒,假手术与模型组每天分别灌胃等体积的生理盐水作为平行对照,各组均给药持续 28 d。给药结束后,所有大鼠进行 APO 勃起实验,之后被处死,称重并收集样本。

1.5 附睾和睾丸指数检测 取各组大鼠睾丸,称质量后放入4%的多聚甲醛中备用。

脏器指数 = 脏器质量 / 体质量 × 100%。

1.6 附睾精子数量及存活率检测 取大鼠右侧附睾浸泡于37℃生理盐水中,制备精子悬液,取10 μL混匀的精子悬液,滴于血细胞计数板中,显微镜下计数精子数量,  $N = \text{镜下精子数目} / 100 \times 10^6 / \text{mL}$ ; 根据精子的活动情况,统计活动精子数,  $M = \text{镜下活动精子数目} / 100 \times 10^6 / \text{mL}$ ,计算精子活率。

精子活率 =  $M / N \times 100\%$ 。

1.7 阴茎勃起相关生物活性因子测定 完成上述实验后,将大鼠下腹及会阴消毒,灭菌动物手术器械将大鼠阴茎从根部剪断,迅速取出龟头和包皮组织,灭菌生理盐水漂洗阴茎,阴茎后端放入4%的多聚甲醛中备用。称取阴茎前端100 mg,剪碎,匀浆。按照生化试剂盒和ELISA试剂盒说明书分别检测NO、cGMP含量。

1.8 阴茎海绵体与睾丸组织病理学染色 将置于4%多聚甲醛固定的大鼠阴茎海绵体组织及睾丸组织脱水,石蜡包埋,切片,常规HE染色,中性树胶封片,显微镜下观察大鼠海绵体与睾丸组织病理变化。

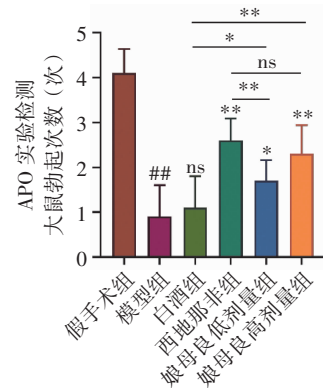
1.9 Western blot检测阴茎组织中凋亡相关蛋白表达 提取阴茎海绵体组织蛋白后,电泳分离蛋白,将蛋白转移到PVDF膜后,浸5%脱脂奶粉于摇床上室温封闭2 h,将封闭后的膜置于对应一抗稀释液中(Bcl-2, 1:10 000; Bax, 1:1 000; Cleaved caspase-3, 1:1 000; Cleaved caspase-9, 1:1 000) 4℃过夜。使用封闭液按1:6 000稀释二抗,温室孵育2 h,置于化学发光仪中曝光。

1.10 数据处理 数据利用SPSS 25.0统计软件进行数据处理及统计分析,计量资料采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用独立样本t检验,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)统计;方差不齐采用秩和检验,以  $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠勃起功能比较 APO实验结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠的勃起次数显著降低( $4.10 \pm 0.54$  vs.  $0.90 \pm 0.70, P < 0.01$ );与模型组相比,白酒组无明显差异( $0.90 \pm 0.70$  vs.  $1.10 \pm 0.70, P > 0.05$ ),西地那非组与娘母良低、高剂量组大鼠的勃起

次数均显著增多( $0.90 \pm 0.70$  vs.  $2.60 \pm 0.49, P < 0.01$ ;  $0.90 \pm 0.70$  vs.  $1.70 \pm 0.46, P < 0.05$ ;  $0.90 \pm 0.70$  vs.  $2.30 \pm 0.64, P < 0.01$ );与白酒组相比,娘母良低、高剂量组均显著增多( $1.10 \pm 0.70$  vs.  $1.70 \pm 0.46, P < 0.05$ ;  $1.10 \pm 0.70$  vs.  $2.30 \pm 0.64, P < 0.01$ );与西地那非组相比,娘母高剂量组无明显差异( $2.60 \pm 0.49$  vs.  $2.30 \pm 0.64, P > 0.05$ )。见图1。



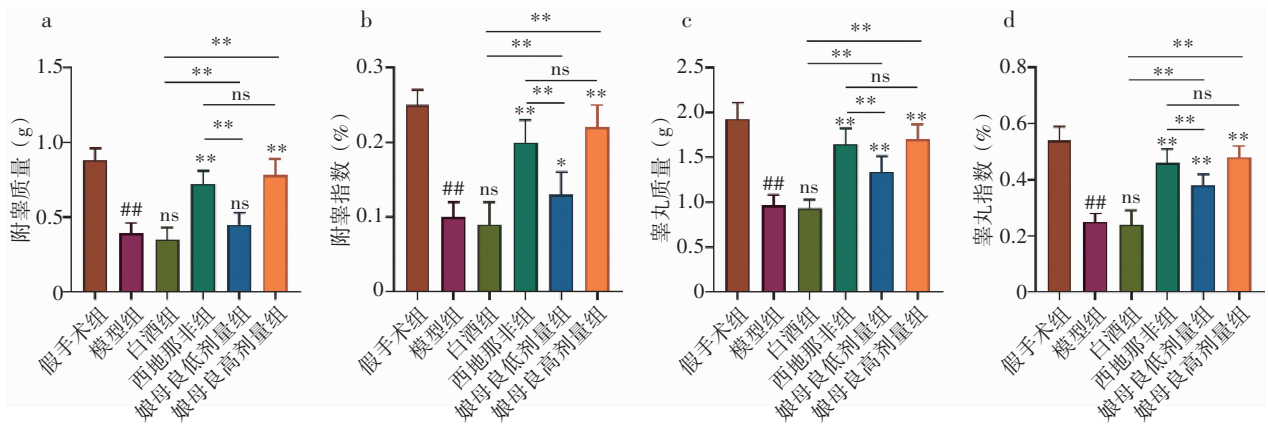
注:与假手术组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图1 各组大鼠勃起次数

2.2 各组大鼠附睾与睾丸的质量及指数比较 结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠的附睾质量、睾丸质量、附睾指数、睾丸指数均显著降低( $0.88 \pm 0.08$  vs.  $0.39 \pm 0.07, 1.93 \pm 0.18$  vs.  $0.96 \pm 0.12, 0.25 \pm 0.02$  vs.  $0.10 \pm 0.02, 0.54 \pm 0.05$  vs.  $0.25 \pm 0.03$ , 均  $P < 0.01$ );与模型组相比,白酒组无明显差异( $0.39 \pm 0.07$  vs.  $0.35 \pm 0.08, 0.96 \pm 0.12$  vs.  $0.93 \pm 0.10, 0.10 \pm 0.02$  vs.  $0.09 \pm 0.03, 0.25 \pm 0.03$  vs.  $0.24 \pm 0.05$ , 均  $P > 0.05$ ),西地那非组与娘母良各剂量组均显著升高(西地那非组, $0.39 \pm 0.07$  vs.  $0.72 \pm 0.09, 0.96 \pm 0.12$  vs.  $1.65 \pm 0.17, 0.10 \pm 0.02$  vs.  $0.20 \pm 0.03, 0.25 \pm 0.03$  vs.  $0.46 \pm 0.05$ , 均  $P < 0.01$ ;娘母良低剂量组, $0.39 \pm 0.07$  vs.  $0.45 \pm 0.08, 0.96 \pm 0.12$  vs.  $1.34 \pm 0.17, 0.10 \pm 0.02$  vs.  $0.13 \pm 0.03$ , 均  $P < 0.01, 0.25 \pm 0.03$  vs.  $0.38 \pm 0.04, P < 0.05$ ;娘母良高剂量组, $0.39 \pm 0.07$  vs.  $0.78 \pm 0.11, 0.96 \pm 0.12$  vs.  $1.70 \pm 0.17, 0.10 \pm 0.02$  vs.  $0.22 \pm 0.03, 0.25 \pm 0.03$  vs.  $0.48 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.01$ );与白酒组相比,娘母良低、高剂量组显著升高(娘母良低剂量组, $0.35 \pm 0.08$  vs.  $0.45 \pm 0.08, P < 0.05, 0.93 \pm 0.10$  vs.  $1.34 \pm 0.17, 0.09 \pm 0.03$  vs.  $0.13 \pm 0.03, 0.24 \pm 0.05$  vs.  $0.38 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.01$ ;娘母

良高剂量组,  $0.35 \pm 0.08$  vs  $0.78 \pm 0.11$ ,  $0.93 \pm 0.10$  vs  $1.70 \pm 0.17$ ,  $0.09 \pm 0.03$  vs  $0.22 \pm 0.03$ ,  $0.24 \pm 0.05$  vs  $0.48 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.01$ ); 与西地那非组相比, 娘母良高

剂量组无明显差异 ( $0.72 \pm 0.09$  vs  $0.78 \pm 0.11$ ,  $1.65 \pm 0.17$  vs  $1.70 \pm 0.17$ ,  $0.20 \pm 0.03$  vs  $0.22 \pm 0.03$ ,  $0.46 \pm 0.05$  vs  $0.48 \pm 0.04$ , 均  $P > 0.05$ )。见图 2。



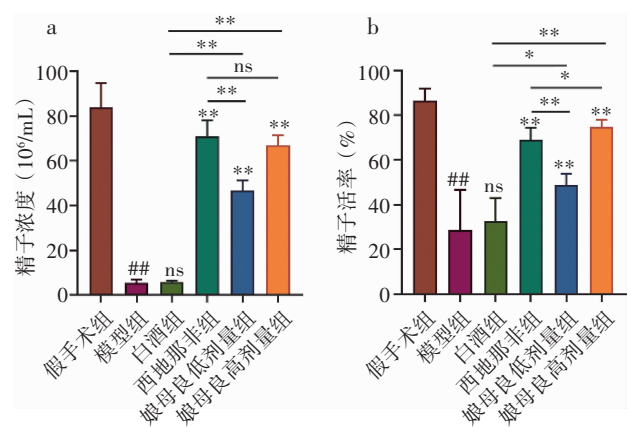
注:(a)附睾质量,(b)附睾指数,(c)睾丸质量,(d)睾丸指数。

与假手术组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与模型组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠附睾与睾丸的质量及指数

2.3 各组大鼠精子质量比较 结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠的精子数量及存活率均显著降低 ( $84.00 \pm 10.90$  vs  $5.40 \pm 1.70$ ,  $86.31 \pm 5.73$  vs  $28.59 \pm 18.15$ , 均  $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 白酒组无明显差异 ( $5.40 \pm 1.70$  vs  $5.80 \pm 0.75$ ,  $28.59 \pm 18.15$  vs  $32.70 \pm 10.20$ , 均  $P > 0.05$ ), 西地那非组与娘母良各剂量组均显著升高 (西地那非组,  $5.40 \pm 1.70$  vs  $71.10 \pm 7.09$ ,  $28.59 \pm 18.15$  vs  $69.02 \pm 5.32$ , 均  $P < 0.01$ ; 娘母良低剂量组,  $5.40 \pm 1.70$  vs  $47.00 \pm 4.30$ ,  $28.59 \pm 18.15$  vs  $48.90 \pm 4.81$ , 均  $P < 0.01$ ; 娘母良高剂量组,  $5.40 \pm 1.70$  vs  $67.05 \pm 4.49$ ,  $28.59 \pm 18.15$  vs  $74.76 \pm 3.31$ , 均  $P < 0.01$ ); 与白酒组相比, 娘母良组显著升高 (娘母良低剂量组,  $5.80 \pm 0.75$  vs  $47.00 \pm 4.30$ ,  $32.70 \pm 10.20$  vs  $48.90 \pm 4.81$ , 均  $P < 0.01$ ; 娘母良高剂量组,  $5.80 \pm 0.75$  vs  $67.05 \pm 4.49$ ,  $32.70 \pm 10.20$  vs  $74.76 \pm 3.31$ , 均  $P < 0.01$ ); 与西地那非组相比, 娘母良高剂量组精子数量无明显差异, 精子活率显著升高 ( $71.10 \pm 7.09$  vs  $67.05 \pm 4.49$ ,  $P > 0.05$ ,  $69.02 \pm 5.32$  vs  $74.76 \pm 3.31$ ,  $P < 0.05$ )。见图 3。

2.4 各组大鼠阴茎海绵体与睾丸病理的变化 HE 结果显示, 假手术组大鼠阴茎海绵体组织形态正常, 血窦丰富且排列规则, 内皮细胞完整且均匀分布于血管壁上; 模型组和白酒组大鼠阴茎海绵体组织血窦减



注:(a)精子浓度,(b)精子活率。与假手术组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与模型组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠精子质量

少并分布紊乱、内皮细胞损伤并且密度降低等病理变化; 西地那非与娘母良干预后阴茎海绵体组织形态逐渐恢复正常。见图 4。

假手术组大鼠睾丸组织生精细胞结构正常, 层次规则, 生精小管管腔饱满, 各生精小管之间接触紧密, 仅有部分生精小管呈空腔状态, 说明大部分的精子细胞完好; 模型组大鼠睾丸组织生精细胞结构异常, 排列紊乱, 生精小管管腔缩小, 各生精小管之间的间隙明显变宽; 西地那非与娘母良干预后睾丸组织形态逐渐恢复正常。见图 5。



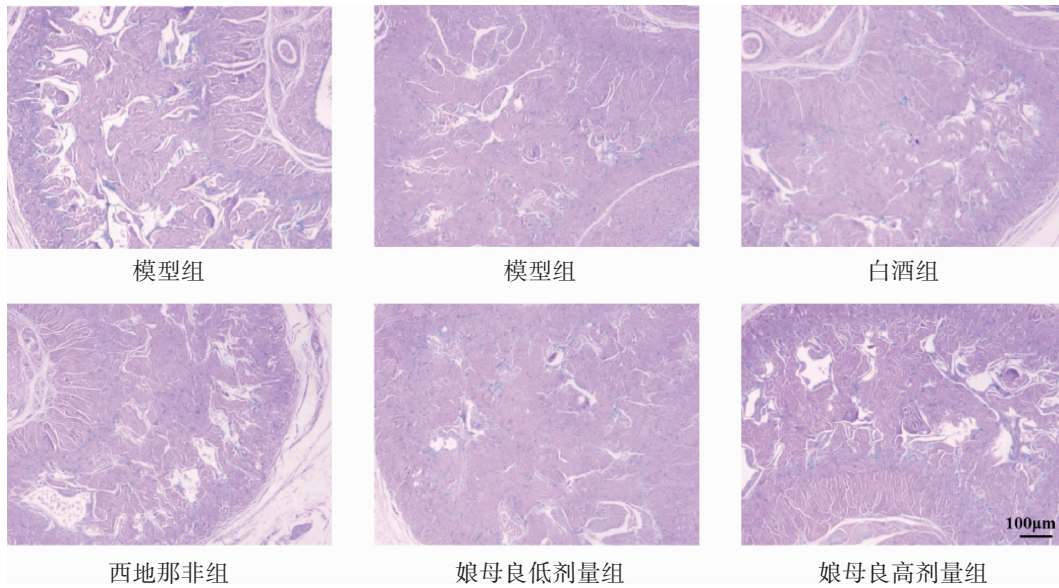


图 4 各组大鼠阴茎海绵体组织 HE 染色(100×)

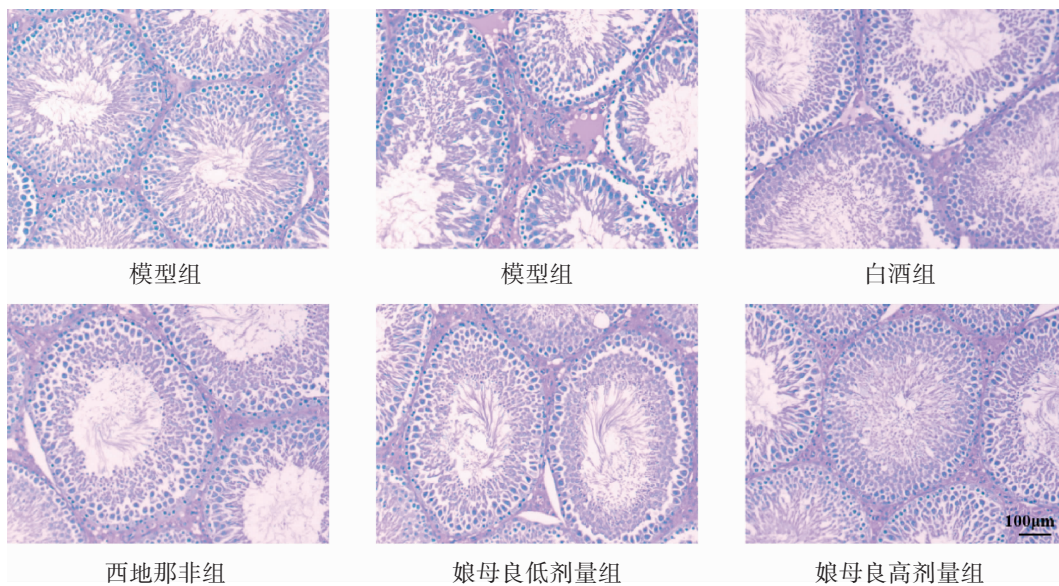
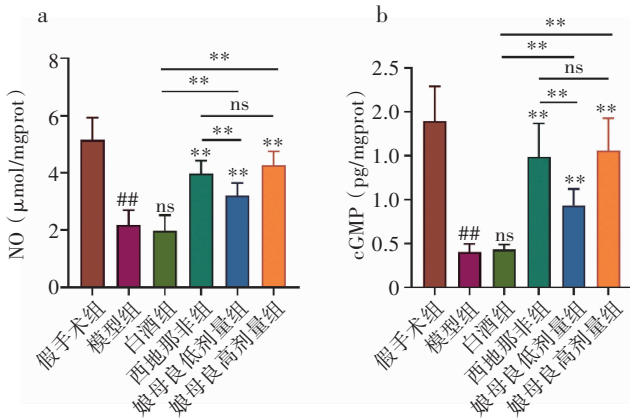


图 5 各组大鼠睾丸组织 HE 染色(100×)

2.5 各组大鼠 NO/cGMP 信号传导变化 结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠的 NO 和 cGMP 水平均显著降低 ( $5.16 \pm 0.73$  vs.  $2.18 \pm 0.50$ ,  $1.90 \pm 0.37$  vs.  $0.41 \pm 0.08$ , 均  $P < 0.01$ );与模型组相比,白酒组无明显差异 ( $2.18 \pm 0.50$  vs.  $1.98 \pm 0.52$ ,  $0.41 \pm 0.08$  vs.  $0.43 \pm 0.05$ , 均  $P > 0.05$ ),西地那非组与娘母良各剂量组均显著升高(西地那非组,  $2.18 \pm 0.50$  vs.  $3.98 \pm 0.43$ ,  $0.41 \pm 0.08$  vs.  $1.49 \pm 0.36$ , 均  $P < 0.01$ ;娘母良低剂量组,  $2.18 \pm 0.50$  vs.  $3.21 \pm 0.42$ ,  $0.41 \pm 0.08$  vs.  $0.93 \pm 0.18$ , 均  $P < 0.01$ ; 娘母良高剂量组,  $2.18 \pm 0.50$  vs.  $4.28 \pm 0.45$ ,

$0.41 \pm 0.08$  vs.  $1.56 \pm 0.35$ , 均  $P < 0.01$ );与白酒组相比,娘母良组显著升高(娘母良低剂量组,  $1.98 \pm 0.52$  vs.  $3.21 \pm 0.42$ ,  $0.43 \pm 0.05$  vs.  $0.93 \pm 0.18$ , 均  $P < 0.01$ ;娘母良高剂量组,  $1.98 \pm 0.52$  vs.  $4.28 \pm 0.45$ ,  $0.43 \pm 0.05$  vs.  $1.56 \pm 0.35$ , 均  $P < 0.01$ );与西地那非组相比,娘母良高剂量组无明显差异 ( $3.98 \pm 0.43$  vs.  $4.28 \pm 0.45$ ,  $1.49 \pm 0.36$  vs.  $1.56 \pm 0.35$ , 均  $P > 0.05$ )。见图 6。

2.6 各组大鼠凋亡相关蛋白变化 Western blot 结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠 Bax/Bcl-2, Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 的蛋白表达

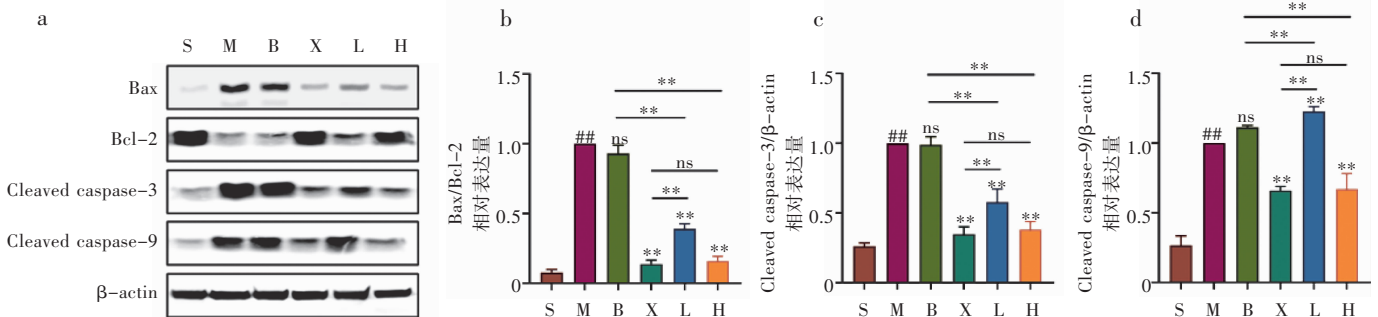


注:(a)NO 浓度,(b)cGMP 浓度。与假手术组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 6 各组大鼠 NO/cGMP 信号传导

水平均显著升高( $0.08 \pm 0.02$  vs.  $1.00 \pm 0.00$ ,  $0.26 \pm 0.02$  vs.  $1.00 \pm 0.00$ ,  $0.27 \pm 0.06$  vs.  $1.00 \pm 0.00$ , 均  $P < 0.01$ );与模型组相比,白酒组无明显差异 ( $1.00 \pm 0.00$  vs.

$0.93 \pm 0.05$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.99 \pm 0.05$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $1.06 \pm 0.06$ , 均  $P > 0.05$ ),西地那非组与娘母良组不同程度降低(西地那非组,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.14 \pm 0.02$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.35 \pm 0.04$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.66 \pm 0.02$ , 均  $P < 0.01$ ; 娘母良低剂量组,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.39 \pm 0.03$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.58 \pm 0.08$ , 均  $P < 0.01$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $1.13 \pm 0.11$ ,  $P > 0.05$ ; 娘母良高剂量组  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.16 \pm 0.02$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.38 \pm 0.05$ ,  $1.00 \pm 0.00$  vs.  $0.67 \pm 0.09$ , 均  $P < 0.01$ );与白酒组相比,娘母良组显著降低(娘母良低剂量组,  $0.93 \pm 0.05$  vs.  $0.39 \pm 0.03$ ,  $0.99 \pm 0.05$  vs.  $0.58 \pm 0.08$ , 均  $P < 0.01$ ,  $1.06 \pm 0.06$  vs.  $1.13 \pm 0.11$ ,  $P > 0.05$ ; 娘母良高剂量组  $0.93 \pm 0.05$  vs.  $0.16 \pm 0.02$ ,  $0.99 \pm 0.05$  vs.  $0.38 \pm 0.05$ ,  $1.06 \pm 0.06$  vs.  $0.67 \pm 0.09$ , 均  $P < 0.01$ );与西地那非组相比,娘母良高剂量组无明显差异 ( $0.14 \pm 0.02$  vs.  $0.16 \pm 0.02$ ,  $0.35 \pm 0.04$  vs.  $0.38 \pm 0.05$ ,  $0.66 \pm 0.02$  vs.  $0.67 \pm 0.09$ , 均  $P > 0.05$ )。见图 7。



注:(a)Western blot 结果,(b)Bax/Bcl-2 比例,(c)Cleaved caspase-3 相对表达量,(d)Cleaved caspase-9 相对表达量。

S:假手术组;M:模型组;B:白酒组;X:西地那非组;L:娘母良低剂量组;H:娘母良高剂量组。与假手术组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 7 各组大鼠凋亡相关蛋白表达

### 3 讨论

中医认为 ED 是经由肝郁、湿热、瘀滞、命门火衰、阴虚火旺、心脾血虚等原因致病。娘母良具有补肾助阳、养心安神、祛痰解痉的功效<sup>[11]</sup>。临床应用于肾虚阳萎、早泄等性功能减退症以及心悸怔忡、肾虚咳喘、宫寒带下等证<sup>[12]</sup>。并且,侏族民间早已验证其强壮、增力、抗疲劳作用,是 1 种纯天然强壮剂。娘母良药酒在娘母良的基础上组方而成,具有舒筋活血、补肾助阳的功效<sup>[13]</sup>。

在本文的研究中,采用双侧髂内动脉结扎法建立

ED 大鼠模型,使用 APO 检测造模成功与否。结果显示 ED 模型大鼠的勃起功能受限,而娘母良药酒干预后 ED 大鼠的勃起功能有所恢复。当 ED 发生时,会出现精子质量低下,阴茎海绵体和睾丸组织形态改变的现象。娘母良药酒干预后对 ED 大鼠的精子质量以及阴茎海绵体和睾丸的病理具有明显改善。NO/cGMP 信号传导在阴茎勃起中发挥关键作用。NO 刺激可溶性鸟苷环化酶,将三磷酸鸟苷转化为 cGMP,进而激活蛋白激酶,有利于海绵体平滑肌的松弛,并增强血液流入阴茎,导致阴茎勃起<sup>[14]</sup>。我们的结果发现 ED

大鼠的 NO 和 cGMP 产生受损, 但娘母良药酒干预后 NO 和 cGMP 水平明显提升。在这些结果中, 西地那非组和娘母良药酒组相比没有明显差异, 说明娘母良药酒可能是 1 种可以代替西地那非改善 ED 的潜在药物。白酒组与模型组相比没有明显差异, 白酒组与娘母良药酒组相比具有明显差异, 说明娘母良在 ED 大鼠勃起功能恢复过程中发挥了重要的作用。以上内容验证了娘母良药酒对 ED 具有良好的改善作用。

细胞凋亡是 1 种受基因调控的有序、自发的细胞死亡形式, 是维持细胞和器官正常功能的重要病理生理过程<sup>[15]</sup>。此外, 细胞凋亡也是 ED 的关键病理机制, 可能导致海绵体缺血, 从而削弱勃起功能<sup>[16-17]</sup>。既往研究报道, Akt/Bad/Bax/Caspase-3 通路可显著预防海绵体神经损伤大鼠的体细胞凋亡<sup>[18]</sup>。五子衍宗方通过抑制细胞凋亡, 有效改善与衰老相关的睾丸功能障碍<sup>[19]</sup>。Bcl-2 蛋白家族被认为是细胞凋亡的关键调节因子<sup>[19]</sup>。Bcl-2 具有抗凋亡作用, Bax 具有促凋亡作用, 二者可形成二聚体发挥作用。Bcl-2/Bax 比率降低可能会导致线粒体功能障碍, Bcl-2/Bax 的平衡是决定细胞凋亡程度的主要因素<sup>[20]</sup>。当 Bax-Bcl-2 二聚体增多时, 可以促进线粒体穿孔, 通过释放细胞色素 c 启动细胞凋亡的过程, 它激活 Caspase 级联, 导致细胞破坏<sup>[21]</sup>。Caspase-9 是 1 种起始 caspase, 在 caspase-3/-7 上游发挥作用。细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中, 与凋亡蛋白酶激活因子 1 结合形成凋亡体, 最终激活 Procaspase-9<sup>[22]</sup>。Procaspase-9 然后在大亚基和小亚基之间的亚基间连接子处裂解激活 Procaspases-3<sup>[23]</sup>。在本研究中, Western blot 结果表明, ED 大鼠 Bax/Bcl-2 比例、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 表达升高, 而娘母良药酒干预后 Bax/Bcl-2 比例、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 表达下降, 表明娘母良药酒可能是通过抑制细胞凋亡改善 ED。

综上所述, 娘母良药酒可以促进 NO 与 cGMP 的产生并抑制阴茎海绵体组织细胞凋亡进而改善 ED 大鼠勃起功能。见图 8。本研究对娘母良药酒治疗 ED 大鼠的效果及机制进行了初步探索, 以期对娘母良药酒的临床应用提供实验基础和理论依据。然而, 娘母良药酒对 ED 的深入作用机制, 还需要在未来进行多角度的研究。

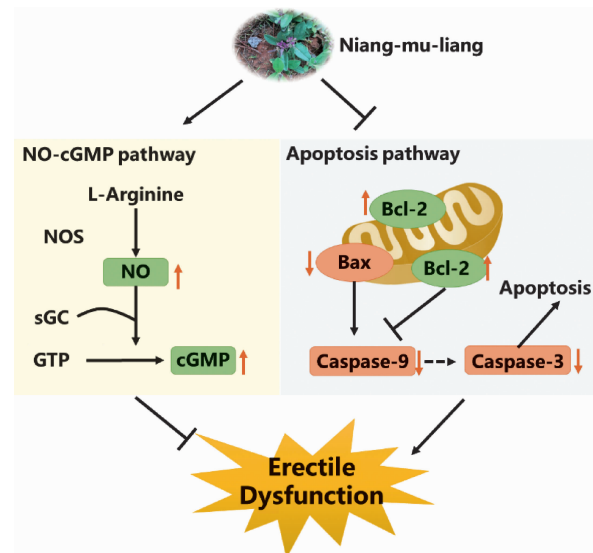


图 8 图形摘要

#### 参考文献:

- [1] SALONIA A, BETTOCCHI C, BOERI L, et al. European association of urology guidelines on sexual and reproductive health—2021 update: male sexual dysfunction[J]. European Urology, 2021, 80(3): 333-357.
- [2] CHUNG E, YOUNG L D, BROCK G B. Penile duplex ultrasonography in men with Peyronie's disease: is it veno-occlusive dysfunction or poor cavernosal arterial inflow that contributes to erectile dysfunction?[J]. The Journal of Sexual Medicine, 2011, 8(12): 3446-3451.
- [3] LI X C, ZHANG X B, LIAO Z C, et al. Is mild erectile dysfunction associated with severe psychological symptoms in Chinese patients with moderate-to-severe chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome?[J]. Asian Journal of Andrology, 2021, 23(3): 319-324.
- [4] HELLSTROM W J G, MONTAGUE D K, MONCADA I, et al. Implants, mechanical devices, and vascular surgery for erectile dysfunction[J]. The Journal of Sexual Medicine, 2010, 7(1 Pt 2): 501-523.
- [5] SLAYDAY R E, BELL T R, LYONS M J, et al. Erectile function, sexual satisfaction, and cognitive decline in men from midlife to older adulthood [J]. The Gerontologist, 2023, 63(2): 382-394.
- [6] RAHEEM O A, NATALE C, DICK B, et al. Novel treatments of erectile dysfunction: review of the current literature[J]. Sexual Medicine Reviews, 2021, 9(1): 123-132.
- [7] CAYETANO - ALCARAZ A A, THARAKAN T, CHEN R, et al. The management of erectile dysfunction in men with



- diabetes mellitus unresponsive to phosphodiesterase type 5 inhibitors[J]. *Andrology*, 2022, 11(2):257-269.
- [8] 朱慧. 补肾活血加减方联合他达拉非治疗勃起功能障碍的临床疗效观察及安全性分析[J]. *中国性科学*, 2023, 32(4):120-123.
- [9] 孙松,王继升,徐少强,等. 活血通络起痿汤联合小剂量他达拉非治疗血瘀肾虚型糖尿病勃起功能障碍临床观察[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(1):124-126.
- [10] 王永军,代晓微,严福军. 马鬃蛇石油醚提取物通过调控 Caspase-1 对动脉性勃起功能障碍大鼠勃起功能、生育功能的影响[J]. *中国中医药科技*, 2023, 30(3):447-451.
- [11] 海青山,赵杰,左爱学,等. 伍药益气通络方单药和组方成分对比及急性毒性研究[J]. *云南中医学院学报*, 2022, 45(1):59-64.
- [12] EL-SAKKA A, YEN T S, LIN C S, et al. Traumatic arteriogenic erectile dysfunction: a rat model[J]. *International Journal of Impotence Research*, 2001, 13(3):162-171.
- [13] HEATON J P, VARRIN S J, MORALES A. The characterization of a bio-assay of erectile function in a rat model [J]. *The Journal of Urology*, 1991, 145 (5):1099-1102.
- [14] HAMED M A, AKHIGBE T M, AKHIGBE R E, et al. Glutamine restores testicular glutathione-dependent antioxidant defense and upregulates NO/cGMP signaling in sleep deprivation-induced reproductive dysfunction in rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 148: 112765.
- [15] WANG B, HAN D, LI F, et al. Elevated IL-22 in psoriasis plays an anti-apoptotic role in keratinocytes through mediating Bcl-xL/Bax[J]. *Apoptosis*, 2020, 25 (9 - 10): 663 - 673.
- [16] FALL P A, IZIKKI M, TU L, et al. Apoptosis and effects of intracavernous bone marrow cell injection in a rat model of postprostatectomy erectile dysfunction[J]. *European Urology*, 2009, 56(4):716-725.
- [17] MARTIN S, HARRINGTON D A, OHLANDER S, et al. Caspase signaling in ED patients and animal models[J]. *The Journal of Sexual Medicine*, 2021, 18(4):711-722.
- [18] CHO M C, PARK K, KIM S W, et al. Restoration of erectile function by suppression of corporal apoptosis, fibrosis and corporal veno-occlusive dysfunction with Rho-kinase inhibitors in a rat model of cavernous nerve injury[J]. *The Journal of Urology*, 2015, 193(5):1716-1723.
- [19] ZHAO H, MA N, LIU Z Q, et al. Protective effect of Wuzi Yanzong recipe on testicular dysfunction through inhibition of germ cell apoptosis in ageing rats via endoplasmic reticulum stress [J]. *Andrologia*, 2019, 51 (2): e13181.
- [20] CAO K, RILEY J S, HEILIG R, et al. Mitochondrial dynamics regulate genome stability via control of caspase-dependent DNA damage[J]. *Developmental Cell*, 2022, 57 (10):1211-1225. e6.
- [21] SEKAR G, OJOAWO A, MOLDOVEANU T. Protein - protein and protein - lipid interactions of pore-forming BCL-2 family proteins in apoptosis initiation [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2022, 50(3):1091-1103.
- [22] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4):495-516.
- [23] ARAYA L E, SONI I V, HARDY J A, et al. Deorphanizing caspase-3 and caspase-9 substrates in and out of apoptosis with deep substrate Profiling[J]. *ACS Chemical Biology*, 2021, 16(11):2280-2296.

(收稿日期:2023-07-06)