

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging ResearchRIP3 介导的程序性坏死促进 DMED 大鼠
阴茎组织损伤及药物干预的研究Research on RIP3 – mediated necroptosis promotes penile tissue damage and
pharmacological intervention in DMED rats

牛立盼^{1,2}, 杨培¹, 朱兵兵^{1,2},
金秀芳^{1,2}, 杨承霞^{1,2}, 李凯鑫¹,
夏玉为¹, 刘凤霞^{1,2}

(1. 新疆医科大学 基础医学院 人体解剖学教研室, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆地方病分子生物学重点实验室, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011)

NIU Li – pan^{1,2}, YANG Pei¹,
ZHU Bing – bing^{1,2}, JIN Xiu – fang^{1,2},
YANG Cheng – xia^{1,2}, LI Kai – xin¹,
XIA Yu – wei¹, LIU Feng – xia^{1,2}

(1. Department of Human Anatomy,
College of Basic Medicine Science,
Xinjiang Medical University, Urumqi
830011, Xinjiang Uygur Autonomous
Region, China; 2. Xinjiang Key
Laboratory of Molecular Biology of
Endemic Diseases, Urumqi 830011,
Xinjiang Uygur Autonomous Region,
China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目
(81860781); 新疆维吾尔自治区自然
科学基金资助项目
(2021D01C280)

作者简介: 牛立盼(1995 –), 女, 讲师, 主要从事
男性生殖疾病的基础研究

通信作者: 刘凤霞, 教授, 硕士生导师

MP: 13579844723

E – mail: liufengxia555@126.com

摘要:目的 探究受体相互作用蛋白激酶 3 (RIP3) 介导的程序性坏死通路在糖尿病性勃起功能障碍 (DMED) 大鼠阴茎组织损伤中的作用, 以及 GSK872 和伊木萨克片的干预效果。方法 选择正常性功能的雄性 SD 大鼠, 连续 2 d 注射 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 链脲佐菌素构建糖尿病大鼠, 筛选出 DMED 大鼠, 并随机分为模型组、实验组、伊木萨克组和联合组。正常组和模型组均腹腔注射等量 0.9% NaCl 并灌胃等量蒸馏水; 实验组腹腔注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSK872 并灌胃等量蒸馏水; 伊木萨克组腹腔注射等量 0.9% NaCl 并灌胃 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 伊木萨克; 联合组腹腔注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSK872 并灌胃 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 伊木萨克。用免疫组化法和免疫荧光法检测大鼠阴茎组织中 RIP3、混合谱系激酶结构域样蛋白 (MLKL) 和瞬时受体电位阳离子通道联合亚家族 M 成员 7 (TRPM7) 的表达情况, 用蛋白质印迹法检测大鼠阴茎组织中 α – 平滑肌肌动蛋白 (α – SMA) 和 I 型胶原蛋白 (Collagen I) 的表达水平。结果 正常组、模型组、实验组、伊木萨克组和联合组阴茎组织中 RIP3 阳性面积比分别为 $(7.71 \pm 1.92)\%$ 、 $(35.72 \pm 2.73)\%$ 、 $(20.20 \pm 2.51)\%$ 、 $(19.94 \pm 2.66)\%$ 和 $(9.31 \pm 1.98)\%$, MLKL 阳性面积比分别为 $(7.39 \pm 1.73)\%$ 、 $(26.48 \pm 1.74)\%$ 、 $(15.66 \pm 1.87)\%$ 、 $(15.88 \pm 1.59)\%$ 和 $(8.45 \pm 1.65)\%$, TRPM7 阳性面积比分别为 $(6.43 \pm 2.10)\%$ 、 $(35.77 \pm 1.78)\%$ 、 $(23.76 \pm 1.79)\%$ 、 $(25.24 \pm 2.08)\%$ 和 $(9.39 \pm 1.72)\%$, α – SMA 蛋白相对表达水平分别为 1.53 ± 0.13 、 0.39 ± 0.08 、 0.88 ± 0.14 、 0.86 ± 0.12 和 1.52 ± 0.12 , Collagen I 蛋白相对表达水平分别为 0.29 ± 0.10 、 1.20 ± 0.14 、 0.73 ± 0.07 、 0.71 ± 0.11 和 0.31 ± 0.10 。模型组的上述指标与正常组比较、实验组的上述指标与模型组比较、伊木萨克组的上述指标与模型组比较、联合组的上述指标与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 RIP3/MLKL/TRPM7 程序性坏死通路可能通过促进细胞死亡和纤维化参与调控 DMED 大鼠病程, 而 GSK872 和伊木萨克片可以通过抑制该通路来改善大鼠阴茎损伤。

关键词: 伊木萨克片; GSK872; 受体相互作用蛋白激酶 3/混合谱系激酶结构域样蛋白/瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 7; 程序性坏死; 糖尿病性勃起功能障碍

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.07.016

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)07-0983-06

Abstract: Objective To investigate the role of the receptor – interacting protein kinase 3 (RIP3) – mediated necroptosis pathway in penile tissue damage in diabetes mellitus – induced erectile dysfunction (DMED) rats and the effects of GSK872 and Yimusake intervention in DMED rats. **Methods** Male SD rats with normal sexual function were

selected, and diabetic rats were constructed by 2 consecutive days injections of streptozotocin ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), DMED rats were screened and randomly divided into model group, experimental group, Yimusake group and combined group. The normal and model groups were injected intraperitoneally with an equal amount of 0.9% NaCl and gavaged with an equal amount of distilled water; the experimental group was injected intraperitoneally with $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSK872 and gavaged with an equal amount of distilled water; the Yimusake group was injected intraperitoneally with an equal amount of 0.9% NaCl and gavaged with $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Yimusake; the combined group was injected intraperitoneally with $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSK872 and gavaged with $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Yimusake. The expression of RIP3, mixed lineage kinase domain like protein (MLKL) and transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence, α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen I were detected by Western blotting in rat penile tissues. **Results** The positive area ratios of RIP3 in the penile tissues of normal, model, experimental, Yimusake and combined groups were $(7.71 \pm 1.92)\%$, $(35.72 \pm 2.73)\%$, $(20.20 \pm 2.51)\%$, $(19.94 \pm 2.66)\%$ and $(9.31 \pm 1.98)\%$; MLKL positive area ratios were $(7.39 \pm 1.73)\%$, $(26.48 \pm 1.74)\%$, $(15.66 \pm 1.87)\%$, $(15.88 \pm 1.59)\%$ and $(8.45 \pm 1.65)\%$; TRPM7 positive area ratios were $(6.43 \pm 2.10)\%$, $(35.77 \pm 1.78)\%$, $(23.76 \pm 1.79)\%$, $(25.24 \pm 2.08)\%$ and $(9.39 \pm 1.72)\%$; α -SMA protein relative expression levels were 1.53 ± 0.13 , 0.39 ± 0.08 , 0.88 ± 0.14 , 0.86 ± 0.12 and 1.52 ± 0.12 ; Collagen I protein relative expression levels were 0.29 ± 0.10 , 1.20 ± 0.14 , 0.73 ± 0.07 , 0.71 ± 0.11 and 0.31 ± 0.10 . The differences between the above indices in the model group compared with the normal group, the above indices in the experimental group compared with the model group, the above indices in the Yimusake group compared with the model group and the above indices in the combined group compared with the model group were all statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** RIP3/MLKL/TRPM7 necroptosis pathway may participate in regulating the progression of DMED rats by promoting cell death and fibrosis, while GSK872 and Yimusake may ameliorate penile injury in rats by inhibiting this pathway.

Key words: Yimusake tablet; GSK872; receptor-interacting protein kinase 3/mixed lineage kinase domain like protein/transient receptor potential melastatin 7; necroptosis; diabetes mellitus-induced erectile dysfunction

糖尿病性勃起功能障碍 (diabetes mellitus-induced erectile dysfunction, DMED) 是一种基于高血糖病症引发的男性疾病。流行病学调查研究显示, 2050 年全球糖尿病患者或可上升至 13.1 亿^[1], 结合糖尿病患者的勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 高发性^[2], DMED 患者数量也将出现大幅增加。研究表明, 高糖引发的阴茎组织损伤、勃起功能降低的病理机制较为复杂^[3]。程序性坏死是一种促炎性细胞死亡方式, 与受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor interacting protein kinase 3, RIP3) 的激活密切相关, 通过活化其下游信号级联反应, 引发细胞死亡^[4]。本课题组前期研究发现, ED 大鼠阴茎组织内 RIP3 水平升高^[5]。本研究通过制备 DMED 大鼠模型, 进一步探究 RIP3 介导的程序性坏死在 DMED 大鼠阴茎组织损伤中的作用, 以及 GSK872 和伊木萨克片干预的影响。

材料与方法

1 材料

动物 雄性 SD 大鼠, 鼠龄 6 周, 体质量 $(200 \pm 10) \text{ g}$, 新疆医科大学动物实验中心提供。本实

验经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批号: IACUC-20210405-7)。

药品与试剂 伊木萨克片, 规格: 每片 0.5 g, 批号: Z65020144, 新疆和田维吾尔药业股份有限公司生产; GSK872 (RIP3 抑制药), 规格: 每瓶 5 mg, 纯度: 99.91%, 批号: HY101872, 购自美国 MCE 公司; 阿扑吗啡 (apomorphine, APO), 规格: 每瓶 250 mg, 纯度 98%, 购自中国药品生物制品检定所。链脲佐菌素, 购自美国 Sigma 公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 鼠抗、I 型胶原蛋白 (Collagen I) 兔抗、混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain like protein, MLKL) 鼠抗, 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; RIP3 兔抗、磷酸化 (phosphorylated -, p-) MLKL 兔抗、MLKL 兔抗、瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 7 (transient receptor potential cation channel subfamily M member 7, TRPM7) 兔抗, 均购自江苏亲科生物研究中心有限公司; p-RIP3 兔抗, 购自美国 Abcam 公司。

仪器 GA-3 血糖仪, 长沙三诺生物传感股份有限公司产品; ChemiDoc MP 全能型成像系统、

1658033 垂直电泳转印系统,均为美国伯乐公司产品;DMi8 倒置荧光显微镜,德国徕卡公司产品;NanoDrop 2000C 微量分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司产品;Eclipse Ni-U 普通光学显微镜,日本尼康公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建

将大鼠随机分为正常组($n=20$)和糖尿病组($n=130$)。造模时,糖尿病组连续 2 d 腹腔注射 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 链脲佐菌素溶液,正常组注射等量柠檬酸钠缓冲液^[6]。第 3 天时,选取血糖 $>16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的作为糖尿病大鼠。继续饲养 8 周,期间每 2 周检测 1 次大鼠生物学体征和随机血糖,并开展 APO 实验检测大鼠勃起功能、交配实验检测大鼠性行为学。8 周后筛选出 DMED 大鼠模型。

2.2 动物分组与给药方法

将筛选出的 DMED 大鼠随机分为模型组、实验组、伊木萨克组和联合组,每组 10 只。正常组和模型组均腹腔注射等量 0.9% NaCl 并灌胃等量蒸馏水;实验组腹腔注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSK872 并灌胃等量蒸馏水;伊木萨克组腹腔注射等量 0.9% NaCl 并灌胃 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 伊木萨克;联合组腹腔注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSK872 并灌胃 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 伊木萨克。5 组大鼠每天给药 1 次,连续干预 2 周,期间大鼠自由饮水摄食,每 2 周检测大鼠勃起功能^[7]和性行为学^[8]。

2.3 免疫组化法检测阴茎组织中 p-RIP3、RIP3、p-MLKL、MLKL 和 TRPM7 的表达情况^[9]

石蜡切片常规脱蜡至水化。EDTA 抗原修复后,分别滴加一抗[p-RIP3 兔抗(1:50)、RIP3 兔抗(1:100)、MLKL 鼠抗(1:200)、p-MLKL 兔抗(1:100)、TRPM7 兔抗(1:50)],4℃过夜,磷酸盐缓冲溶液冲洗后,滴加二抗,37℃恒温静置 30 min,DAB 显色液显色。苏木精室温染色 2 min,脱水、透明、封片后,在光学显微镜下观察切片并采集图像,用 Image J 软件进行半定量分析。

2.4 免疫荧光法检测阴茎组织中 p-RIP3、RIP3、p-MLKL、MLKL 和 TRPM7 的表达情况^[10]

石蜡切片常规脱蜡至水化。抗原修复后,切片分别与 p-RIP3、RIP3、p-MLKL、MLKL、TRPM7 抗体孵育,4℃静置过夜,二抗孵育后,滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚盐(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) 染液,室温避光静置 5 min,最后加入丙三醇 100 μL ,封片后在倒置荧光显微镜下观察并采集图像,用 Image J 软件量化。

2.5 蛋白质印迹法检测阴茎组织中 α -SMA 和 Collagen I 的表达水平^[11]

提取大鼠阴茎组织蛋白并按照 BCA 定量试剂盒进行定量。按照 20 μg 上样量进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(恒压 80 V、30 min,转恒压 120 V、90 min);转膜恒流 250 mA、120 min。于 5% 脱脂奶粉室温孵育 2 h 后,加入一抗: α -SMA 鼠抗(1:2 000)、Collagen I 兔抗(1:1 000)、 β -actin 兔抗(1:6 000),4℃孵育过夜,清洗后加入二抗孵育 2 h,显色并采集图像后用 Image J 软件进行半定量分析。

3 统计学处理

用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用独立样本 t 检验,多组间数据比较用单因素 ANOVA 分析。

结 果

1 成功构建 DMED 大鼠模型

本研究构建并筛选获得 123 只糖尿病大鼠,每 2 周检测大鼠随机血糖、体质量、尿量、饮水量和饮食量,发现糖尿病组均出现体质量降低,尿量、饮水量和饮食量升高,伴有随机血糖高于 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (均 $P < 0.05$)。APO 和交配实验发现,造模 0 周时,糖尿病组大鼠的阴茎勃起能力和性行为学与正常组相比,均无显著性差异(均 $P > 0.05$);随着造模时间延长,糖尿病组大鼠的阴茎勃起潜伏期逐渐增加、勃起次数逐渐降低,同时伴有爬背潜伏期、插入潜伏期及射精潜伏期持续延长,爬背次数、插入次数及射精次数均显著降低(均 $P < 0.05$)。结果见表 1。8 周后筛选出 115 只 DMED 大鼠。

2 RIP3/MLKL/TRPM7 程序性坏死通路在 DMED 大鼠阴茎组织中被激活

如图 1 所示:正常组、模型组、实验组、伊木萨克组和联合组大鼠阴茎组织的 p-RIP3 阳性面积比分别为 $(4.75 \pm 1.32)\%$ 、 $(27.85 \pm 1.42)\%$ 、 $(16.54 \pm 1.91)\%$ 、 $(15.66 \pm 1.75)\%$ 和 $(7.07 \pm 1.75)\%$,RIP3 阳性面积比分别为 $(7.71 \pm 1.92)\%$ 、 $(35.72 \pm 2.73)\%$ 、 $(20.20 \pm 2.51)\%$ 、 $(19.94 \pm 2.66)\%$ 和 $(9.31 \pm 1.98)\%$,p-MLKL 阳性面积比分别为 $(3.91 \pm 1.60)\%$ 、 $(32.65 \pm 1.98)\%$ 、 $(19.18 \pm 1.79)\%$ 、 $(17.58 \pm 1.79)\%$ 和 $(5.75 \pm 1.57)\%$,MLKL 阳性面积比分别为 $(7.39 \pm 1.73)\%$ 、 $(26.48 \pm 1.74)\%$ 、 $(15.66 \pm 1.87)\%$ 、 $(15.88 \pm 1.59)\%$ 和 $(8.45 \pm 1.65)\%$,TRPM7 阳性面积比分别为 $(6.43 \pm 2.10)\%$ 、 $(35.77 \pm 1.78)\%$ 、 $(23.76 \pm 1.79)\%$ 、

表 1 造模期间大鼠随机血糖、阴茎勃起能力和性行为变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes in random blood glucose,penile erection and sexual behavior of rats during modeling($\bar{x} \pm s$)

Item	Group	0 week	2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks
Blood glucose (mmol · L ⁻¹)	Normal	5.40 ± 0.71	5.41 ± 0.76	5.19 ± 0.76	5.17 ± 0.63	5.26 ± 0.57
	Diabetes	5.51 ± 0.58	24.83 ± 3.96 *	26.68 ± 4.13 *	25.62 ± 3.52 *	26.33 ± 3.36 *
Erectile latency (s)	Normal	488.35 ± 299.96	398.60 ± 224.11	342.75 ± 207.52	250.95 ± 144.08	241.00 ± 149.63
	Diabetes	483.48 ± 266.14	594.20 ± 320.64 *	1 115.89 ± 407.23 *	1 662.37 ± 231.05 *	1 794.20 ± 27.45 *
Erectile frequency	Normal	4.40 ± 1.57	4.80 ± 1.51	7.45 ± 2.42	7.25 ± 2.02	7.70 ± 1.98
	Diabetes	4.43 ± 1.60	2.43 ± 1.24 *	1.31 ± 0.97 *	0.46 ± 0.79 *	0.07 ± 0.37 *
Mounting latency (s)	Normal	440.40 ± 285.26	294.50 ± 213.36	265.45 ± 238.22	192.15 ± 141.96	174.10 ± 109.30
	Diabetes	381.38 ± 237.02	639.68 ± 298.18 *	1 203.89 ± 405.74 *	1 633.18 ± 259.26 *	1 780.14 ± 84.47 *
Mounting frequency	Normal	4.25 ± 1.77	8.60 ± 3.82	10.80 ± 5.10	10.90 ± 3.91	12.75 ± 3.23
	Diabetes	3.92 ± 1.71	2.72 ± 1.73 *	1.76 ± 1.62 *	0.65 ± 1.04 *	0.14 ± 0.56 *
Intromission latency (s)	Normal	440.40 ± 285.26	294.50 ± 213.36	265.45 ± 238.22	192.15 ± 141.96	174.10 ± 109.30
	Diabetes	381.38 ± 237.02	639.68 ± 298.18 *	1 300.10 ± 434.14 *	1 651.25 ± 241.54 *	1 783.82 ± 72.36 *
Intromission frequency	Normal	4.25 ± 1.77	8.60 ± 3.82	10.80 ± 5.10	10.90 ± 3.91	12.75 ± 3.23
	Diabetes	3.92 ± 1.71	2.72 ± 1.73 *	1.48 ± 1.63 *	0.53 ± 0.88 *	0.11 ± 0.45 *
Ejaculation latency (s)	Normal	440.40 ± 285.26	294.50 ± 213.36	265.45 ± 238.22	192.15 ± 141.96	174.10 ± 109.30
	Diabetes	381.38 ± 237.02	639.68 ± 298.18 *	1 300.10 ± 434.14 *	1 651.25 ± 241.54 *	1 783.82 ± 72.36 *
Ejaculation frequency	Normal	4.25 ± 1.77	8.60 ± 3.82	10.80 ± 5.10	10.90 ± 3.91	12.75 ± 3.23
	Diabetes	3.92 ± 1.71	2.72 ± 1.73 *	1.48 ± 1.63 *	0.53 ± 0.88 *	0.11 ± 0.45 *

Normal group,citric acid – sodium citrate buffer($n = 20$) ; Diabetes group,45 mg · kg⁻¹ streptozotocin($n = 130$ at 0 week, $n = 123$, at 2,4,6,8 weeks) ; Compared with normal group, * $P < 0.05$.

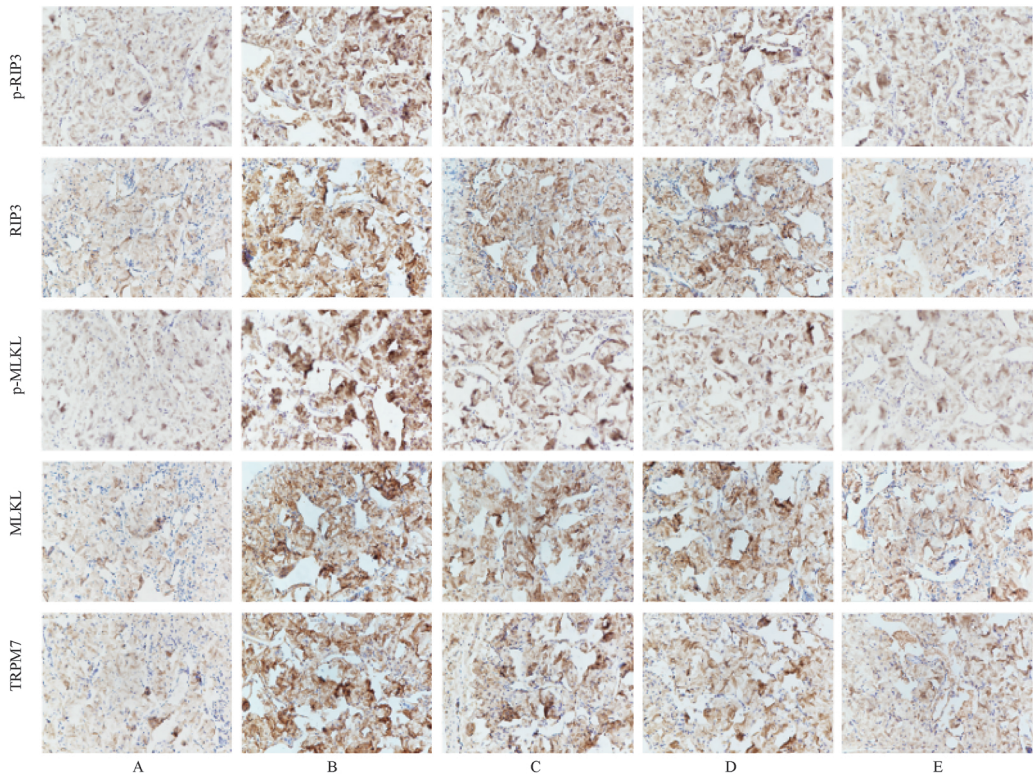


图 1 用免疫组化法检测各组大鼠阴茎组织中程序性坏死关键因子水平变化(×200)

Figure 1 Changes in necroptosis in rat penile tissue measured by immunohistochemical analysis among each group (×200)

A:Normal group,0.9% NaCl and distilled water; B:Model group,0.9% NaCl and distilled water; C:Experimental group,1 mg · kg⁻¹ GSK872 and distilled water; D:Yimusake group,0.9% NaCl and 250 mg · kg⁻¹ Yimusake; E:Combined group,1 mg · kg⁻¹ GSK872 and 250 mg · kg⁻¹ Yimusake;p – :Phosphorylated – ;RIP3:Receptor interacting protein kinase 3;MLKL:Mixed lineage kinase domain like protein;TRPM7:Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7.

表2 5组大鼠阴茎组织中关键程序性坏死因子的平均荧光强度的变化($\bar{x} \pm s$)Table 2 Changes in the mean fluorescence intensity of key necroptosis factor in rat penile among 5 groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	RIP3	p - RIP3	MLKL	p - MLKL	TRPM7
Normal	10	3.00 ± 1.01	2.28 ± 0.88	5.95 ± 1.22	3.67 ± 1.17	3.55 ± 1.24
Model	10	19.09 ± 1.13 *	17.76 ± 1.15 *	24.18 ± 1.18 *	21.68 ± 1.37 *	20.37 ± 1.70 *
Experimental	10	12.77 ± 1.24 #	12.02 ± 0.95 #	16.02 ± 1.29 #	12.08 ± 1.03 #	14.18 ± 1.37 #
Yimusake	10	11.58 ± 1.32 #	11.13 ± 1.10 #	15.30 ± 1.10 #	11.02 ± 1.06 #	12.68 ± 1.48 #
Combined	10	5.42 ± 1.10 #△▲	3.94 ± 1.07 #△▲	7.75 ± 1.16 #△▲	5.49 ± 0.96 #△▲	3.78 ± 1.37 #△▲

Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental group, △ $P < 0.05$; Compared with Yimusake group, ▲ $P < 0.05$.

(25.24 ± 2.08)% 和 (9.39 ± 1.72)%。伊木萨克组、实验组和联合组的上述指标与模型组相比,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 抑制 RIP3 介导的程序性坏死对 DMED 大鼠生物学体征的影响

干预2周后,模型组与正常组相比,阴茎组织中 p - RIP3、RIP3、p - MLKL、MLKL 和 TRPM7 荧光强度均显著升高(均 $P < 0.05$);实验组、伊木萨克组和联合组阴茎组织中 p - RIP3、RIP3、p - MLKL、MLKL 和 TRPM7 荧光强度均较模型组显著降低(均 $P < 0.05$),其中联合组降低最为明显。结果见表2。

4 抑制 RIP3 介导的程序性坏死对 DMED 大鼠阴茎组织纤维化的影响

正常组、模型组、实验组、伊木萨克组和联合组阴茎组织中 α - SMA 蛋白相对表达水平分别为 1.53 ± 0.13、0.39 ± 0.08、0.88 ± 0.14、0.86 ± 0.12 和 1.52 ± 0.12, Collagen I 蛋白相对表达水平分别为 0.29 ± 0.10、1.20 ± 0.14、0.73 ± 0.07、0.71 ± 0.11 和 0.31 ± 0.10。实验组、伊木萨克组和联合组的上述指标与模型组相比,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图2。

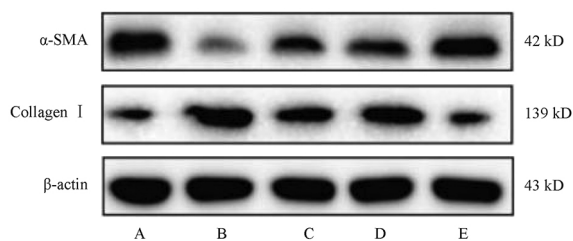


图2 用蛋白质印迹法检测大鼠阴茎组织中 α - 平滑肌肌动蛋白(α - SMA)和 I 型胶原蛋白(Collagen I)表达水平的变化

Figure 2 Changes in the expression levels of α - smooth muscle actin (α - SMA) and Collagen I in rat penile tissue by Western blotting

A - E refer to figure 1.

讨论

流行病学调查显示,近年来全球糖尿病发病率逐年升高,近75%的男性糖尿病患者会出现不同程度的ED^[12]。由于DMED病理机制复杂,现有的治疗手段的效果并不理想。本研究用连续2d注射链脲佐菌素制备DMED大鼠模型,成模率高且死亡率低,与CHOI等^[6]研究结果一致。通过定期开展的大鼠随机血糖和各项生物学体征检测,结合APO和交配实验,证明该DMED大鼠模型稳定。

程序性坏死是一种新发现的程序性死亡方式,RIP3是其中的关键核心蛋白之一^[13]。有研究发现,老龄化RIP3和MLKL敲除小鼠的雄性生殖器官仍保持年轻的形态和功能^[14],提示小鼠生殖器官功能的维持可能与程序性坏死激活有关。本课题组前期研究发现,ED大鼠阴茎组织中程序性坏死因子表达水平上调^[5,9]。本研究发现,DMED大鼠阴茎组织中 p - RIP3、RIP3、p - MLKL、MLKL 和 TRPM7 蛋白相对表达水平均较正常组显著降低,表明高血糖可能通过激活RIP3/MLKL/TRPM7程序性坏死通路,促进大鼠阴茎组织中效应细胞死亡,进而介导DMED的发生发展。还有研究发现,抑制RIP3/MLKL/TRPM7通路可以减轻小鼠的主动脉内皮损伤^[15]或改善小鼠结肠炎^[16]等,提示RIP3/MLKL/TRPM7通路的过度激活还可能通过其他途径影响大鼠阴茎勃起。

阴茎海绵体平滑肌纤维化也是DMED的一种重要病理学变化^[17]。本研究通过GSK872抑制RIP3介导的程序性坏死后发现,大鼠阴茎组织中的 α - SMA含量增加、Collagen I含量降低,海绵体平滑肌纤维化降低。另外,高血糖可以通过诱导RIP3介导的程序性坏死促进阴茎组织纤维化,引发平滑肌功能障碍。这与通过抑制RIP3/MLKL/TRPM7程序性坏死通路来改善狼疮性肾炎小鼠的肾纤维化^[18]或药物性肝损伤大鼠的肝纤维化^[19]等的研究结果一致。尽管GSK872与伊木萨克片联合干预效果在改善大鼠阴茎

组织纤维化方面更为显著,但具体机制尚需进一步探究。此外,伊木萨克片作为治疗阳痿、早泄等疾病的常用药^[20],具有改善阴茎组织炎症和纤维化作用^[21],但对 DMED 治疗效果有限。本研究用伊木萨克片干预 DMED 大鼠后,RIP3/MLKL/TRPM7 程序性坏死通路下调,提示伊木萨克片治疗机制之一或与其抑制 RIP3/MLKL/TRPM7 程序性坏死通路有关,可为该药物的二次开发提供参考。

本研究提示:RIP3/MLKL/TRPM7 程序性坏死通路可能通过促进细胞死亡和纤维化参与调控 DMED 大鼠病程,同时 GSK872 和伊木萨克片均可以通过抑制该通路来改善大鼠阴茎组织损伤。

参考文献:

- [1] GBD 2021 DIABETES COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050; A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet*, 2023, 402(10397): 203—234.
- [2] YUAN P, MA D, ZHANG Y, et al. Analysis of cardiovascular risks for erectile dysfunction in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus lacking clinical symptoms of cardiovascular diseases [J]. *Transl Androl Urol*, 2020, 9(6): 2500—2509.
- [3] GUR S, HELLSTROM W J G. Harnessing stem cell potential for the treatment of erectile function in men with diabetes mellitus: From preclinical/clinical perspectives to penile tissue engineering [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2020, 15(4): 308—320.
- [4] MORGAN M J, KIM Y S. Roles of RIPK3 in necroptosis, cell signaling, and disease [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(10): 1695—1704.
- [5] YANG P, NIU L, ZHU B, et al. Inhibition of RIP1/RIP3 necroptosis pathway promote erectile function in cold-stressed rat model [J/OL]. *Andrologia*, 2024, 2024: 1—10. 2024-03-29 [2024-09-24]. <https://vpntsg.xjmu.edu.cn:8088/ssnpp/nb2hi4dthixs653fmjxwm43dnfsw4y3ffzrwyysnf3gc5dffzrw41/wos/alldb/full-record/WOS:001197936900001>.
- [6] CHOI W S, KWON O S, CHO S Y, et al. Effect of chronic administration of PDE5 combined with glycemic control on erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Sex Med*, 2015, 12(3): 600—610.
- [7] HEATON J P, VARRIN S J, MORALES A. The characterization of a bio-assay of erectile function in a rat model [J]. *J Urol*, 1991, 145(5): 1099—1102.
- [8] YU Z, ZHANG Y, TANG Z, et al. Intracavernosal adeno-associated virus-mediated S100A1 gene transfer enhances erectile function in diabetic rats by promoting cavernous angiogenesis via VEGF-A/VEGFR2 signaling [J]. *J Sex Med*, 2019, 16(9): 1344—1354.
- [9] 刘玉莲, 牛立盼, 杨培, 等. 基于 RIP1/RIP3 探究西地那非对勃起功能障碍大鼠睾丸的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(13): 1938—1942.
- [10] 陆瑾瑜, 丁爱霞, 陆晨. 脉血康胶囊减轻 IgA 肾病大鼠肾纤维化的作用和机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(13): 1908—1912.
- [11] ZHU B, NIU Y, NIU L, et al. Exploring the application of sildenafil for high-fat diet-induced erectile dysfunction based on interleukin-18-mediated NLRP3/Caspase-1 signaling pathway [J]. *Sex Med*, 2023, 11(4): qfad044.
- [12] BALOOCH HASANKHANI M, MIRZAEI H, KARAMOOZIAN A. Global trend analysis of diabetes mellitus incidence, mortality, and mortality-to-incidence ratio from 1990 to 2019 [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 21908.
- [13] ZHOU H, ZHOU M, HU Y, et al. TNF- α triggers RIP1/FADD/Caspase-8-mediated apoptosis of astrocytes and RIP3/MLKL-mediated necroptosis of neurons induced by angiostrongylus cantonensis infection [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, 42(6): 1841—1857.
- [14] LI D, MENG L, XU T, et al. RIPK1-RIPK3-MLKL-dependent necrosis promotes the aging of mouse male reproductive system [J/OL]. *Elife*, 2017, 6: e27692. 2017-08-15 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28807105/>.
- [15] LU L Q, LI N S, LI M R, et al. DL-3-N-butylphthalide improves the endothelium-dependent vasodilation in high-fat diet-fed ApoE^{-/-} mice via suppressing inflammation, endothelial necroptosis and apoptosis [J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 956: 175938. 2023-10-05 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37536623/>.
- [16] ZHANG J, LEI H, HU X, et al. Hesperetin ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the epithelial barrier via blocking RIPK3/MLKL necroptosis signaling [J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 873: 172992. 2022-04-15 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035144/>.
- [17] LUAN Y, CUI K, TANG Z, et al. Human tissue kallikrein 1 improves erectile dysfunction of streptozotocin-induced diabetic rats by inhibition of excessive oxidative stress and activation of the PI3K/AKT/eNOS pathway [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6834236. 2020-02-28 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32190176/>.
- [18] GUO C, FU R, ZHOU M, et al. Pathogenesis of lupus nephritis: RIP3 dependent necroptosis and NLRP3 inflammasome activation [J/OL]. *J Autoimmun*, 2019, 103: 102286. 2019-05-24 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31133359/>.
- [19] CHOI H S, KANG J W, LEE S M. Melatonin attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of necroptosis [J]. *Transl Res*, 2015, 166(3): 292—303.
- [20] 杨培, 牛立盼, 朱兵兵, 等. 受体相互作用蛋白激酶 3 特异性抑制剂 GSK872 联合伊木萨克片对糖尿病性勃起功能障碍大鼠勃起功能的影响[J]. *中国性科学*, 2024, 33(1): 12—16.
- [21] 牛立盼, 阿卜杜热伊木江·如则, 靳瑾, 等. 伊木萨克对勃起功能障碍患者血清炎症相关蛋白水平的影响及其作用机制探讨[J]. *中国性科学*, 2021, 30(6): 1—4.

(收稿日期 2024-10-23)