

• 实验研究 •

腺病毒介导的激活大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞中
NO/cGMP 通路的实验研究*袁慧星¹ 王涛¹ 詹鹰¹ 王少刚¹ 刘继红¹ 叶章群¹

【摘要】 目的:探讨靶向大鼠 iNOS 基因的 shRNA 重组腺病毒载体对大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞 iNOS 基因的激活作用,为阴茎勃起功能障碍(ED)的基因治疗提供实验依据。**方法:**将前期构建的重组腺病毒 Ad5-iNOS-shRNA-EGFP(AdU6/shiNOS)和对照病毒 AdU6/shControl,分别转染大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞,分别在不同病毒 MOI(25,50,75)值下 72 小时后采样检测。采用 realtime RT-PCR 半定量检测 AdU6/shiNOS 对细胞 iNOS 基因 mRNA 表达影响;Western-blot 法检测海绵体平滑肌细胞 iNOS 蛋白表达变化。然后培养基中加 L-Arg(10 mmol/L),用酶联免疫法检测病毒转染 72 小时后海绵体平滑肌细胞内 cGMP 的浓度变化,记录 AdU6/shiNOS 对平滑肌细胞内 cGMP 的影响。**结果:**AdU6/shiNOS 转染大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞 72 小时后,和空白对照组、阴性对照组相比 iNOS 基因在 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$),呈剂量依赖性,MOI=75 时 RNAa 效果最好。而且转染 72 小时后,实验组原代平滑肌细胞内 cGMP 水平显著高于对照组及空白组($P<0.05$)。**结论:**利用腺病毒介导的 RNAa 技术,提高海绵体平滑肌细胞 iNOS 基因表达获得成功,可以增加阴茎海绵体平滑肌细胞 cGMP 水平,激活了 NO/cGMP 通路,这为勃起功能障碍的基因治疗研究开辟了新的方向。

【关键词】 勃起功能障碍;基因治疗;RNA 激活;iNOS 基因;大鼠

【中图分类号】 R697 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-1420(2013)08-0616-06

Study of adenovirus-mediated saRNA activating NO/cGMP pathway in rat
corpus cavernosum smooth muscle cells

YUAN Huixing WANG Tao ZHAN Ying WANG Shaogang LIU Jihong YE Zhangqun
(Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

Corresponding author: LIU Jihong, E-mail: jhliu@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract Objective: To explore the activation of recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA of rat inducible nitric oxide synthase to iNOS gene in rat corpus cavernosum smooth muscle cells in order to provide experimental evidence for erectile dysfunction gene therapy. **Methods:** The pre-constructed adenovirus Ad5-iNOS-shRNA-EGFP(AdU6/shiNOS) and the control virus AdU6/shControl transfected into rat cavernous smooth muscle cells. Cells were examined for iNOS expression by Real-time quantitative PCR and western blotting and different MOI(25, 50, 75) after 72 hours. Cells were then treated with 10 mmol/L L-arginine. Cyclic guanosine monophosphate(cGMP) with enzyme immunoassay (EIA) system at 72 hours after transfecting was analyzed and the effect of AdU6/shiNOS on the cGMP of smooth muscle cell was recorded. **Results:** Compared with mock group and control group, AdU6/shiNOS transfected rat corpus cavernosum smooth muscle cells after 72 hours, iNOS gene expression at the mRNA and protein were significantly increased in a dose-dependent($P<0.05$), MOI=75 works best for RNAa. Corpus cavernosum smooth muscle cells transfected with AdU6/shiNOS showed an increase of cGMP level compared with corpus cavernosum smooth muscle cells transfected with control vector and the mock group($P<0.05$). **Conclusion:** Success using of adenovirus-mediated RNAa technology to improve the iNOS gene expression in corpus cavernosum smooth muscle cells can increase the cGMP level in corpus cavernosum smooth muscle cell, and activative the NO / cGMP pathway, which opened a new research direction for the gene treatment of erectile dysfunction.

Key words erectile dysfunction; gene therapy; RNA activating; inducible nitric oxide synthase; rat

* 基金项目:国家自然科学基金(编号 30872574)

¹ 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科(武汉, 430030)

通信作者:刘继红, E-mail: jhliu@tjh.tjmu.edu.cn

迄今为止,已研究证实阴茎动脉和海绵体平滑肌不能充分舒张是阴茎勃起功能障碍(ED)发生的直接原因^[1]。现代勃起生理的研究显示,非肾上腺能非胆碱能(non-adrenergic non-cholinergic,

NANC)神经递质—氧化氮(nitric oxide, NO)是介导阴茎海绵体平滑肌松弛的主要成分,阴茎组织中 NO 是在 NOS 的催化作用下由左旋精氨酸(L-arginine, L-arg)转变而来,NOS 是这一过程的主要限速酶。NO 通过活化细胞质内可溶性鸟苷酸环化酶,把三磷酸鸟苷(GTP)转化为 cGMP,cGMP 作为细胞内第二信使分子,激活 cGMP 依赖性蛋白激酶 I(cGKI),降低阴茎海绵体细胞质内 Ca^{2+} 浓度,从而引起平滑肌舒张,促使阴茎勃起。而 cGMP 又可被 5 型磷酸二酯酶(PDE5)所降解从而终止其诱导阴茎勃起的效应。因此,目前 ED 的基因治疗研究主要通过转入 NOS 和抑制 PDE5 的功能来实现。NOS 目前发现有三种同工酶:神经型 NOS(nNOS),内皮型 NOS(eNOS)和诱导型 NOS(iNOS)^[2]。三种中只有 iNOS 是钙离子非依赖型的,能产生浓度高 NO 而且持久,因此 iNOS 基因过表达有望成为 ED 的治疗手段。

RNA 激活(RNA activation, RNAa)是一种新发现的现象。2006 年,Li 等^[3]以目的基因的启动子 DNA 为靶点,设计与基因启动子 DNA 序列互补的 dsRNA,将其导入人类肿瘤细胞,发现能够上调目的基因的表达,并将此现象命名为 RNA 激活。并且将这种能够激活目的基因表达的小分子 RNA 称做小激活 RNA(small activating RNA, saRNA)。很快另一研究小组证实了这个现象^[4]。因此,RNA 激活为我们提供了一种实用有效的调控基因过表达的新方法。小分子 dsRNA 表现出靶向性上调基因表达的特异性。进一步基因治疗的目标是构建能直接表达特异性 saRNA 的哺乳动物载体。我们利用腺病毒载体在基因治疗中的特点,即能高效导入细胞,还具有促使病毒粒子从内吞小体中逃逸并高效转运到细胞核中的功能,前期构建了靶向大鼠 iNOS 基因启动子的 shRNA 腺病毒表达载体^[5,6]。本研究主要目的是进一步将此病毒载体导入大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞中,检测其是否能上调 iNOS 基因表达并激活细胞内 NO/cGMP 通路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Trizol 试剂、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒、DNA marker 购于日本 Takara 公司;胎牛血清,DMEM(高糖型)培养基购于 Hyclone 公司;兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体购于美国 abcam 公司;HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)抗体,HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体,购于北京中杉金桥生物技术有限公司;增强化学发光法(ECL)试剂盒购于美国 Pierce 公司;大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)ELISA 试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司; α -肌动蛋白(α -actin)单克隆抗体,DAB,SAB 试剂盒

购于武汉博士德公司;I 型胶原酶购于美国 Invitrogen 公司;左旋精氨酸(L-Arg)购于 Sigma 公司。仪器:高速低温离心机,低速离心机,37℃振荡培养箱,漩涡振荡器,CO₂ 恒温培养箱,台式酶标仪,-80℃超低温冰箱,荧光显微镜,普通 PCR 基因扩增仪 PTC-100 型核酸电泳系统;Bioimaging Systems 凝胶图像分析系统,超声破碎仪,Mx3000 型荧光定量 PCR 仪,Western Blot 电泳、转膜系统。

1.2 实验方法

大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞原代培养及鉴定:过量苯巴比妥钠(80 mg/kg)处死 Sprague Dawley (SD)大鼠,SD 大鼠购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。无菌条件下迅速解剖、切断大鼠阴茎海绵体,立即将其置入含双抗(100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)的 PBS 溶液中漂洗。在解剖显微镜下分离尿道海绵体及白膜,将阴茎海绵体组织剪成约 1 mm×1 mm×1 mm 组织块,采用酶消化法进一步处理。用 5 g/L I 型胶原酶 37℃恒温振荡培养箱(120 次/min)消化 3 h。然后用 10% FBS 的 DMEM 完全培养基终止消化。消化液过滤,收集细胞悬液离心后弃上清,用 20% FBS DMEM 完全培养基重悬细胞,放置到 25 ml 无菌培养瓶中,放入 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。每 3 天换液 1 次,传代后改用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基进行培养。按 1:2 传代,5 天后可以再次传代。将第 3~4 代细胞用于本实验研究。细胞按照差速贴壁法纯化^[7]。采用差速贴壁法纯化细胞。将细胞接种到培养瓶内放置培养箱中,20 min 后在倒置显微镜下观察细胞形态,可见部分细胞贴壁,稍加振荡不浮起,此时将培养液中尚未贴壁的细胞吸到另一新培养瓶中。重复上述过程 1 次,最后得到的即是高纯度的阴茎海绵体平滑肌细胞。取原代培养细胞应用免疫组织化学染色鉴定。将无菌盖玻片置 6 孔板孔底,加入约 1 ml 细胞悬液和 2 ml 培养液,5% CO₂ 培养箱培养至适当密度,取出盖玻片,用 α -actin 单克隆抗体对培养的细胞作免疫组化鉴定。

重组腺病毒对 CSMCs 的转染:针对 iNOS 基因 RNA 激活的重组腺病毒 Ad5-iNOS-shRNA-EGFP,已由前期研究构建完成^[5,6],为 E1/E3 缺失,Ad5 型腺病毒基因组插入人源 U6 启动子和 shRNA 表达框的重组腺病毒,本部分将其简称为 AdU6/shiNOS。本研究同时设计并合成了对照腺病毒 AdU6/shControl。通过 BLAST 分析其插入的非特异性 shRNA 序列与基因组无同源性,其转录出的 shRNA 对其他任何基因均无作用。我们观察绿色荧光蛋白的表达来确定重组腺病毒 AdU6/shiNOS 对 CSMCs 的最适感染复数(multi-

plicity of infection, MOI)。在病毒转染的前一天, 将 CSMCs 接种于 6 孔板, 1×10^5 细胞/孔。当细胞生长到 70%~90% 后将旧培养基弃去, 用 PBS 液洗涤细胞 2 次。各孔分别加入不同 MOI (25、50、75、100) 的 AdU6/shiNOS 或 AdU6/shControl。在 37℃ 下培养 2 小时后, 加入 2 ml 新鲜培养基继续培养。48 小时后在倒置荧光显微镜下观察荧光表达, 在可见光下观察细胞形态, 统计表达绿色荧光蛋白的细胞占总细胞的百分数(感染效率), 根据观察结果确定最适感染复数。

重组腺病毒感染 CSMCs 后 iNOS mRNA 含量检测: 病毒转染 CSMCs 72 小时后采用 RT-PCR 法, 用 Trizol 试剂盒提取各样本总 RNA。运用逆转录试剂盒合成样本 cDNA。引物序列见表 1。以 β -actin 作为内参对照。

表 1 iNOS、 β -actin 对照引物序列

引物	序列	扩增片段大小/bp
iNOS	5'-CACCTTGGAGTTACCCAGT-3' 5'-ACCACTCGTACTTGGGATGC-3'	170
β -actin	5'-AAGAGCTATGAGCTGCCTGA-3' 5'-TACGGATGTCAACGTCACAC-3'	59

反应体系: $5 \times$ PrimeScript TMBuffer 2 μ l, PrimeScript TMRT Enzyme Mix I 0.5 μ l, 50 μ mol Oligo dT Prime 0.5 μ l, 100 μ mol Random 6 mers 0.5 μ l, 模板总 RNA 500 ng, 重蒸水(ddH₂O)加至 10 μ l。瞬时离心混匀后在普通 PCR 仪上完成逆转录反应。逆转录的反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 逆转录所得的 cDNA 作为模板用于 real-time PCR 反应。荧光定量 PCR 反应体系如下: cDNA 100 ng, 上游引物(10 μ mol) 0.5 μ l, 下游引物(10 μ mol) 0.5 μ l, ROX Reference Dye II 0.5 μ l, SYBR Primix Ex TaqTM 12.5 μ l, ddH₂O 加至 25 μ l。扩增条件: 94℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 57℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 15 s, 共 40 个循环。延伸后 72℃ 采集荧光。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法检测各组 iNOS mRNA 的相对表达量。

重组腺病毒感染 CSMCs 后 iNOS 蛋白含量检测: 病毒感染 72 小时后收集细胞提取总蛋白, 采用 Western blot 法, 兔抗大鼠 iNOS 稀释度为 1:1 000, 小鼠抗大鼠 GAPDH 稀释度为 1:5 000。HRP 标记的山羊抗兔二抗稀释度为 1:8 000, HRP 标记的山羊抗鼠二抗稀释度为 1:8 000。用 Amersham 图像分析系统对 Western-blot 目的条带进行光密度扫描, 然后用 Quantity One 软件进行灰度值分析。将 iNOS 与 β -actin 的条带扫描灰度值相比较, 以其比值做统计学分析。

重组腺病毒感染 CSMCs 后细胞内 cGMP 浓度检测: 实验细胞培养基中加入 L-Arg(10 mmol/L), 病毒感染细胞(MOI=75)72 小时后收集细胞进行检测。采用 ELISA 检测, 弃去培养板内培养液, 每孔加入 200 μ l 0.1 mol/L 盐酸, 室温下孵育 20 min, 用细胞刮刮下细胞, 混匀, 吸入离心管内, 离心 1 000 r/min, 取上清检测。按照试剂盒说明书检测, 标本测定前用标本稀释液作 1:500 稀释。

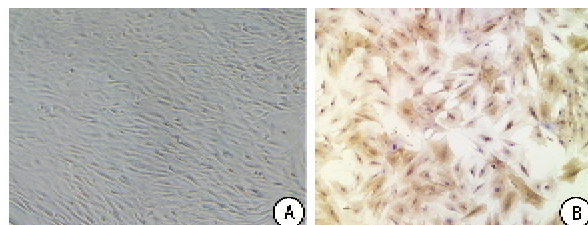
1.3 统计学分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件进行分析。两组间比较采用独立 t 检验, 多组间两两比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海绵体平滑肌细胞生长情况及免疫组化鉴定

经酶消化法获取的细胞 20 分钟后即开始贴壁, 培养的细胞主要以梭形细胞为主, 以后细胞排列出现方向性, 原代培养细胞 7~10 天后达到 90% 以上, 并可呈典型的“峰谷状”或“漩涡状”生长。采用平滑肌特异性 α -actin 平滑肌肌动蛋白单克隆抗体进行免疫细胞化学染色鉴定 CSMCs。可见培养的细胞呈梭形, 与抗体反应后出现淡蓝色细胞核和浅黄色细胞质(图 1), 并可见明显细胞内深黄色的肌动蛋白, 经计数纯度和数量达到实验设计要求。



△: 原代细胞第 7 天呈“峰谷状”或“漩涡状”; B: CSMCs 免疫组化鉴定

图 1 酶消化法原代 CSMCs 第 7 天及免疫组化鉴定图

2.2 重组腺病毒对 CSMCs 的最适 MOI

为排除重组腺病毒本身的毒性作用对细胞的影响, 我们合成的重组腺病毒载体 AdU6/shiNOS 能表达绿色荧光蛋白, 可以用它来检测 CSMCs 的最适 MOI。随着病毒感染复数的增加, 感染效率不断提高。MOI=75 时, 腺病毒对细胞的感染效率能达到 90% 以上, 细胞排列方向较一致, 细胞极性比较明显, 呈现比较典型的肌细胞状态, 细胞处于对数期生长状态。而 MOI=100 时虽然感染效率也较高, 但细胞则分化明显, 细胞胞体较大, 细胞呈现多边形和三角形, 胞浆丰富, 细胞极性不明显, 呈现分化型肌细胞形态。实验时我们需要感染效率尽可能高而 MOI 尽可能小, 观察细胞转染后没有明显的细胞毒性表现(变形或漂起)时的 MOI 作

为最适 MOI。根据实验结果,我们选择将重组腺病毒的最适 MOI 定为 75(图 2)。

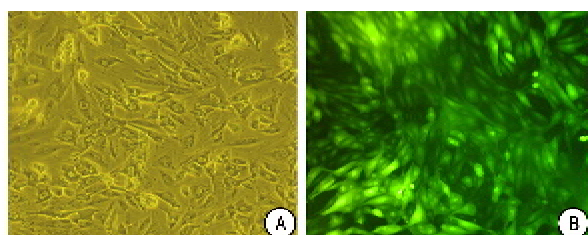


图 2 重组腺病毒 AdU6/shiNOS(MOI=75)感染 CSMCs 的镜下观察(100×)

2.3 重组腺病毒 AdU6/shiNOS 激活 CSMCs 内 iNOS 基因表达

重组腺病毒 AdU6/shiNOS(MOI:25,50,75)感染 CSMCs 72 小时后,以对照腺病毒 AdU6/shControl 感染的 CSMCs 为阴性对照,未转染的 CSMCs 为空白对照,分别用 real-time PCR 和 Western-blot 检测细胞 iNOS 基因 mRNA 表达和蛋白表达。结果显示重组腺病毒 AdU6/shiNOS 感染组的 iNOS 基因 mRNA 和蛋白水平显著高于阴性对照组和空白组,呈剂量依赖性,MOI=75 时,RNAa 效果最好,细胞内 iNOS 的 mRNA 上调 8~9 倍,iNOS 蛋白水平上升 4~5 倍, $P<0.05$ (图 3、图 4)。

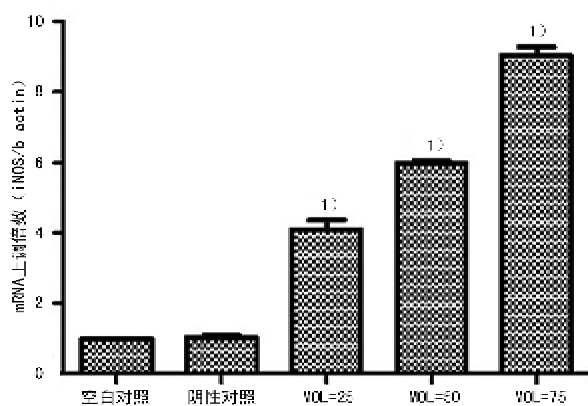


图 3 real-time PCR 分析 iNOS 表达

2.4 重组腺病毒 AdU6/shiNOS 转染 CSMCs 中 cGMP 含量

腺病毒感染 72 小时后,ELISA 检测各组细胞内 cGMP 含量,重组腺病毒感染组、对照腺病毒感染组和空白对照组分别为 (0.56 ± 0.15) nmol/L、 (0.23 ± 0.10) nmol/L、 (0.22 ± 0.08) nmol/L。转染重组腺病毒 AdU6/shiNOS 后细胞内 cGMP 含量明显高于阴性对照组和空白对照组($P<0.05$),空白对照组和对照腺病毒感染组 cGMP 含量无明显差异($P>0.05$)(图 5)。

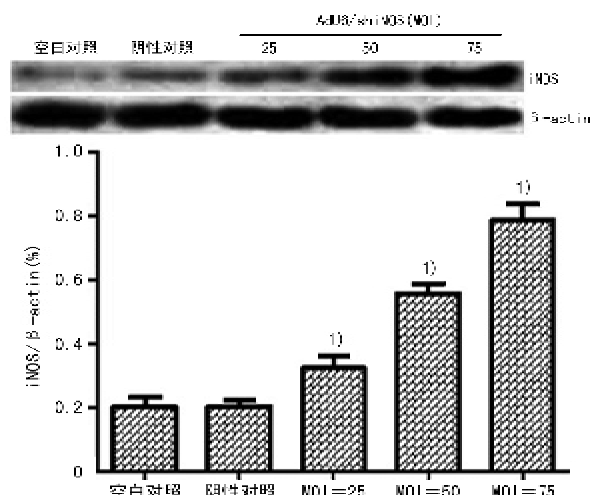


图 4 Western-blot 分析 iNOS 表达

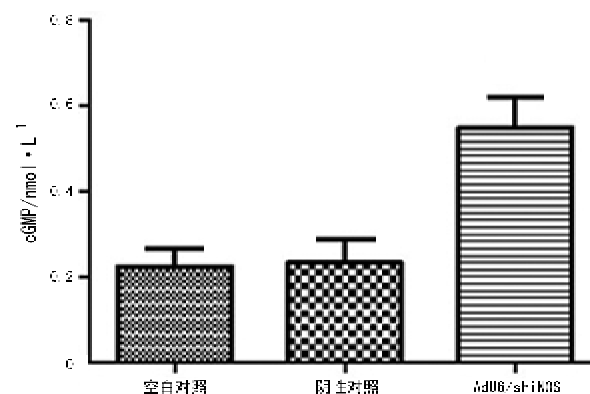


图 5 ELISA 分析细胞内 cGMP 含量

3 讨论

由于小分子 RNA 具有高效、低毒、靶向特异性高等特点,RNA 干扰已经被看作是一种极有潜力的工具用于各种疾病的基因治疗的研究^[3,6]。然而,许多疾病的机能紊乱却是由于一些内源性基因的失活引起的,但是目前一直缺乏有效的靶向激活这些内源性基因的方法。最近,国际上两个研究小组分别独立报道了他们的发现:小分子双链 RNA 作用于目的基因启动子能有效激活该基因的表达^[3,4],这种现象被他们称为 RNA 激活。据初步研究发现这种 RNA 介导的基因激活要求有 Ago2 蛋白的参与,而且还和组蛋白构象改变有关。其可能机制为外生的或细胞内的由 Dicer 酶处理后的小分子双链 RNA 在细胞内与 Argonaute 蛋白结合,然后将 dsRNA 的双链打开,正义链丢弃,只保留反义链,保留的 RNA 链作为引导链和 Argonaute 蛋白形成一种 RNA-Ago 复合物。此复合物通过主动运输或在有丝分裂过程中进入细胞核,在 RNA 链的引导下与位于基因启动子上的同源性 DNA 序列或从启动子转录的新生 RNA 序列结合。因此 Argonaute 蛋白可看作一个染色体重建平台,吸引组蛋白修饰酶如赖氨酸特异性去甲基化酶,和去甲基化酶结合到 DNA 后引起组蛋白结构

的改变,如组蛋白乙酰化和(或)甲基化状态发生改变,进而启动相关基因的转录^[10]。虽然目前 RNA 激活的具体机制尚不清楚,但 RNA 激活有良好的应用前景, RNA 激活将有希望成为质粒过表达系统的替代工具。相比传统的基因过表达系统,其具有构建简单,耗费低等特点,但是它需要前期大量的激活序列的筛选工作。在本次研究中我们运用了 RNAa 序列筛选软件,本软件由 RNA 激活的发现者加州大学旧金山分校李龙承教授设计并提供,极大程度地提高了我们的筛选效率。

目前大多数 RNAa 的研究都是使用化学合成的 dsRNA 或者质粒介导的 dsRNA 载体,但在实验中对于这些 dsRNA 载体的运用都有一些限制,比如在原代细胞中应用或者动物体内试验时由于其转染效率低而且容易被降解等,很难有效发挥激活目标基因的作用。本研究运用重组腺病毒系统 AdMax 建立了一种新的 RNAa 表达载体,我们构建的重组腺病毒 AdU6/shiNOS 能高效感染各类细胞系及宿主,能够有效的在体外激活大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞 iNOS 基因的表达。其实在本研究同时已有相似的载体系统研究报道,其运用慢病毒介导的靶向启动子的 shRNAs 成功激活了在缺血性小鼠模型中 VEGF 的表达^[11]。在我们的研究中,将重组腺病毒载体运用到体外培养的原代大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞中,证明了该载体系统同样可以应用到哺乳动物原代细胞中,而且转染效率较高,能有效激活目的基因。

NO 是阴茎勃起的主要信使,它能激活阴茎海绵体细胞质内可溶性鸟苷酸环化酶,把三磷酸鸟苷(GTP)转化为 cGMP,提高细胞内 cGMP 浓度。cGMP 水平的提高进而可以激活 cGMP 依赖性蛋白激酶 I(cGKI),降低阴茎海绵体细胞质内 Ca^{2+} 浓度,从而引起平滑肌舒张,阴茎血管的扩张,促进阴茎勃起。研究证实 NO 的合成主要靠 NOS 催化 L-Arg 完成,ED 的重要原因之一就是 NOSs 含量减少或活性下降,因此作用于 L-Arg-NO-cGMP 通路的治疗一直是 ED 基因治疗的研究热点。在 NOSs 的三种同工酶中,和另外两种亚型 NOS (eNOS, nNOS) 相比,尽管 iNOS 在细胞内表达量相对较少,但能持续合成更多的 NO, 生的 NO 是持续性 NOS 的 100~1 000 倍,生成 NO 能持续相对较长时间(几小时到几天),而且不受细胞内钙离子浓度的影响。另外, iNOScDNA 能逆转海绵体纤维化改变,具有保护细胞和抗海绵体纤维化的作用,有报道运用转基因技术将 iNOScDNA 转入 Peyronie 病大鼠模型中能够修复其纤维板块^[12]。近年来,许多研究者运用不同的方法将 iNOS 基因转入到阴茎海绵体来治疗 ED,能在短期内达到改善勃起功能的效果,可作为抗海绵体纤维化和治疗

ED 的手段之一,并且具有不改变基础 NO 水平的特点^[13~15]。所以我们相信提高 iNOS 基因表达是基因治疗 ED 的不错靶点。在本次研究中,我们应用了一种新的基因过表达技术 RNAa,也是一种新的增强内源性基因的表达方法。运用腺病毒介导的 shRNA 成功上调了海绵体平滑肌细胞 iNOS 基因的表达,进一步导致细胞内 cGMP 浓度的升高。这个研究也再次验证了 NO/cGMP 通路存在,为下一步动物体内实验奠定了基础。

总之,我们的研究证明了运用重组腺病毒介导的 shRNA 能成功上调大鼠阴茎海绵体细胞 iNOS 基因的表达,并且激活 NO/cGMP 通路。下一步研究是将重组腺病毒 AdU6/shiNOS 转入大鼠阴茎海绵体内,检测其勃起功能的改善。本研究为勃起功能障碍的基因治疗提供了新思路,为 RNAa 技术的应用扩宽了领域。相信随着基因工程技术不断发展和 RNAa 激活机制的深入研究,利用 RNAa 技术治疗勃起功能障碍是可望且可及的。

[参考文献]

- 1 Moreland R B. Pathophysiology of erectile dysfunction: the contributions of trabecular structure to function and the role of functional antagonism[J]. *Int J Impot Res*, 2000, 12: 39-46.
- 2 Gonzalez-Cadavid N F, Rajfer J. Molecular pathophysiology and gene therapy of aging-related erectile dysfunction[J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39: 1705-1712.
- 3 Li L C, Okino S T, Zhao H, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 17337-17342.
- 4 Janowski B A, Younger S T, Hardy D B, et al. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 166-173.
- 5 袁慧星,王涛,刘继红,等. 大鼠诱导型一氧化氮合酶短发夹环 RNA 质粒的构建及鉴定[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2010, 12(25): 942-944.
- 6 袁慧星,王涛,刘继红,等. 靶向大鼠诱导型一氧化氮合酶基因的 shRNA 重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 1(28): 133-135.
- 7 宋鲁杰,徐月敏,傅强. 体外分离培养兔阴茎海绵体平滑肌细胞的纯度分析[J]. *中国男科学杂志*, 2007, 21(11): 1-5.
- 8 Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs[J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 711-719.
- 9 Dykxhoorn D M, Lieberman J. Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8: 377-402.
- 10 Li L C. The multifaceted small RNAs[J]. *RNA Biol*, 2008, 5: 61-64.

阻断术等。选择安全有效方法或者药物是关键。本研究采用的丁卡因胶浆是一种表面麻醉剂,起效快,渗透性强,使用方法简单,多数患者经过数次摸索使用即可掌握好适合自己的量、涂抹范围及使用时间等技巧。其作用机理是降低阴茎头的敏感性而延迟射精,且对射精快感没有影响。当然,过量的使用可以引起阴茎完全麻木,甚至导致 ED,还会引起阴道麻木,需要在性交前擦去多余药液或使用避孕套来防止。本组 ED 发生率为 1.7%,阴茎麻木感发生率为 8.6%。经使用指导后缓解。

盐酸坦索罗辛是一种长效高选择性肾上腺能受体 1a 阻滞剂,同时具有 1a 和 1d 阻滞作用。该药治疗 PE 可能的作用机制是:①人体的泄精中枢位于脊髓 T12~L2,射精中枢位于 S2~S4,而脊髓组织中有广泛的肾上腺能受体,尤其以 1d 最为丰富^[5],通过阻滞脊髓中的 1a 和 1d 受体,降低中枢的兴奋性,从而提高射精中枢的兴奋阈值,达到延迟射精反射的目的。②前列腺基质和后尿道平滑肌组织中含有丰富的肾上腺素能神经纤维^[6],且以 1a 受体为主,1a 受体阻滞剂可阻断前列腺及后尿道的平滑肌相应受体,从而引起前列腺及后尿道平滑肌松弛,收缩减弱,延缓了射精阈值的到达时间。③输精管、射精管和精囊同样含有丰富的 1 受体,且输精管平滑肌的蠕动和收缩主要由 1a 受体介导。实验表明^[7],1 受体阻滞剂可明显抑制输精管和射精管平滑肌的蠕动和收缩,抑制泌精过程,延长精囊充盈时间,从而延缓射精。本研究中盐酸坦索罗辛的副作用主要表现为头痛、头晕,均轻微,可耐受,发生率为 1.6%,无逆行射精等。丁卡因胶浆和盐酸坦索罗辛从不同作用途径治疗 PE,两者联用效果更佳,且副作用发生率低。本研究 B、C 组虽然疗效有一定差异,可能有部分原因是由于 B

组患者经常未在性生活前 4~6 h 服用盐酸坦索罗辛,致使坦索罗辛血药浓度未达峰值。但与舍曲林等抗抑郁药一样,停药后易复发,长期维持治疗不现实。我们观察到,本研究三组患者也在停药 4 周后,IELT 及性交满意度评分均下降显著。我们认为盐酸坦索罗辛与丁卡因胶浆联合治疗 PE 安全有效,但停药易复发。我们可以肯定,盐酸坦索罗辛与丁卡因胶浆联合按需使用有一定疗效。

[参考文献]

- 1 中国性学会医学专业委员会男科组. 早泄诊断治疗指南[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(11):1043—1049.
- 2 郭军. 美国泌尿学会(AUA)早泄药物治疗指导原则[J]. 中国男科学杂志, 2004, 18(Suppl):628.
- 3 A lthof S E, Abdo C H, Dean J, et al. International society for sexual medicine's guidelines for the diagnosis and treatment of premature ejaculation[J]. J Sex Med, 2010, 7(9):2947—2969.
- 4 郭军,王福,耿强,等. 国际性医学会(ISSM)《早泄诊治指南(2010 年版)》解读[J]. 中国性科学, 2011, 20(7):5—8.
- 5 Yoshiyama M, De Groat W C. Role of spinal alpha-adrenoceptor subtypes in the bladder reflex in anesthetized rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 280(5):R1414.
- 6 Lepor H, Tang R, Shapiro E. The alpha-adrenoceptor subtype mediating the tension of human prostatic smooth muscle[J]. Prostate, 1993, 22(4):301.
- 7 Amobi N, Guilleband J, Coker C, et al. Functional characterization of alpha-adrenoceptor subtypes in longitudinal and circular muscle of human vas deferens[J]. Eur J Pharmacol, 1999, 367(2—3):291.

(收稿日期:2012-12-22)

(上接第 620 页)

- 11 Turunen M P, Lehtola T, Heinonen S E, et al. Efficient regulation of VEGF expression by promoter-targeted lentiviral shRNAs based on epigenetic mechanism; a novel example of epigenetherapy[J]. Circ Res, 2009, 105: 604—609.
- 12 Davila H H, Magee T R, Vernet D, et al. Gene transfer of inducible nitric oxide synthase complementary DNA regresses the fibrotic plaque in an animal model of Peyronie's disease[J]. Biol Reprod, 2004, 71: 1568—1577.
- 13 Garbán H, Marquez D, Magee T, et al. Cloning of rat and human inducible penile nitric oxide synthase. Appli-

cation for gene therapy of erectile dysfunction[J]. Biol Reprod, 1997, 56: 954—963.

- 14 Chancellor M B, Tirney S, Mattes C E, et al. Nitric oxide synthase gene transfer for erectile dysfunction in a rat model[J]. BJU Int, 2003, 91: 691—696.
- 15 Tirney S, Mattes C E, Yoshimura N, et al. Nitric oxide synthase gene therapy for erectile dysfunction: comparison of plasmid, adenovirus, and adenovirus-transduced myoblast vectors[J]. Mol Urol, 2001, 5: 37—43.

(收稿日期:2012-09-24)