

网络出版时间: 2021-7-28 15:00 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20210728.1015.017.html>

◇ 临床医学研究 ◇

DHEA 与褪黑素在继发性早泄疾病中的表达及意义

李 虎^{1,2} 张 耀¹ 高晶晶¹ 张贤生^{1,2,3}

摘要 目的 探讨脱氢表雄酮(DHEA)及褪黑素在继发性早泄(APE)患者外周血的表达情况及临床意义。方法 采用qPCR及ELISA检测27例APE患者和30例对照组外周血DHEA基因及褪黑素受体1基因的表达以及DHEA和褪黑素在血清中的分泌浓度,并分析两者之间的差异及其与疾病的相关性。两组间比较采用 t 检验或者非参数检验,两变量之间相关性采用Pearson或Spearman相关分析。结果 早泄组的外周血中DHEA的基因表达低于对照组($P < 0.01$) 褪黑素受体1的基因表达低于对照组($P < 0.01$),差异均有统计学意义。早泄组血清中DHEA分泌的浓度低于对照组($P < 0.05$) 血清中褪黑素的分泌浓度也低于对照组($P < 0.001$) 差异均有统计学意义。APE患者血清中褪黑素浓度的变化与中国早泄患者性功能评价表-5(CIPE-5)评分相关,差异有统计学意义($r = 0.7738, P < 0.05$)。结论 DHEA及褪黑素在APE患者外周血的表达明显降低,褪黑素与疾病的严重程度具有相关性。

关键词 脱氢表雄酮;褪黑素;继发性早泄;5-羟色胺

中图分类号 R 698

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1277-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.021

早泄(premature ejaculation, PE)是常见的男性功能障碍疾病之一,不仅影响男性生活质量及精神方面,还影响着夫妻双方^[1]。PE可以分为4种类型:原发性PE(lifelong PE, LPE)、继发性PE(acquired PE, APE)、变异型PE及主观性PE^[2]。脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)及褪黑素作为神经及内分泌系统的两大物质,在人体中发挥着重要作用。白天DHEA大量分泌对人体清醒及活动起着重要作用,傍晚DHEA的分泌逐渐减缓,松果体会开始让褪黑素进行大量分泌,两者间形成

微妙的消长。DHEA作为一种雄激素,对男女双方都有着一定的影响。近年来,褪黑素对男性生殖系统的影响也有报道^[3]。但DHEA及褪黑素在PE中的作用的研究却很少。因此,该文通过对DHEA及褪黑素与APE的关系,并分析其与疾病严重程度的关系,进一步阐述DHEA及褪黑素在APE中的研究意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 2020年5-10月从安徽医科大学第一附属医院泌尿外科及健康中心招募志愿者并提供参与研究的书面知情同意书。共有57例研究对象符合入组条件,其中APE有27例,无PE有30例。两组分为APE组和对照组。APE组年龄20~50(36.29±9.87)岁,IELT(2.55±0.73)min。对照组年龄20~49(31.48±10.77)岁,IELT(8.91±3.88)min。根据中国PE性功能评价量表-5(CIPE-5)评分,APE患者分为轻度7例,中度14例,重度6例。纳入标准:年龄在20至60岁之间,在过去6个月内有稳定的性生活,国际勃起功能指数(IEF-5) > 22。排除标准:精神病或神经病史,骨盆/会阴部创伤,肝或肾功能衰竭,尿路感染,慢性前列腺炎,解剖异常以及可能影响性功能的慢性疾病。接受5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂、 α -受体阻滞剂、磷酸二酯酶抑制剂、抗胆碱能药、抗精神病药和补充维生素D的参与者也被排除在研究之外。本研究经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器 无水乙醇购自上海臻诺生物科技有限公司;TRIzol购自哈尔滨新海基因检测有限公司;氯仿购自上海穆百生物科技有限公司;异丙醇购自上海穆百生物科技有限公司;Rnase-free水购自泽叶生物科技有限公司。qPCR试剂盒购自北京启衡星生物科技有限公司;逆转录试剂盒购自上海研卉生物科技有限公司;Elisa试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;qPCR仪购自北京科誉兴业科技发展有限公司;低温离心机购自长沙巴溪仪器有限公司;酶标仪购自上海联迈生物工程有限公司。

2020-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82071637)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

²安徽医科大学泌尿研究所,合肥 230022

³泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室,合肥 230022

作者简介:李 虎,男,硕士研究生;

张贤生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: xiansheng-zhang@163.com

1.3 方法 患者在研究开始之前被告知研究目的、内容及方法,如同意参加本研究将签署知情同意书,并在专业医护人员指导下填写调查问卷及标本采集的准备。问卷调查内容包括:PE 诊断量表(PEDT)、CIPE-5、IIEF-5、自我估计阴道内射精潜伏期(自我估计 IELT)(从开始插入阴道到阴道内射精的时间)。

1.3.1 标本采集及处理 研究对象均在隔夜空腹 >8 h 后于第二天清晨 7:00 ~ 8:00 采集外周静脉血,在室内常温下静置 20 min,外周血进行离心,3 500 r/min、30 min,分离血清和外周血沉淀物,储存在 -80 °C 环境下待测。

1.3.2 外周血 RNA 的提取 向外周血沉淀物中加入 1 ml TRIzol,15 ~ 30 °C 放置 5 min,每使用 1 ml TRIzol 加 200 μ l 氯仿,盖好管盖,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,样品分为 3 层,RNA 主要在水相中,把水相(约 500 μ l)转移到新管中,在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,室温放 20 ~ 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,去上清液,离心后在管侧和管底形成胶状沉淀,加入 1 ml 75% 乙醇(Rnase-Free 双蒸水配制)洗涤沉淀,每使用 1 ml TRIzol 至少用 1 ml 75% 乙醇对沉淀进行洗涤,洗涤 2 次,风干沉淀,加入 30 ~ 50 μ l 双蒸水,溶解沉淀。

1.3.3 反转录 使用 AG 反转录试剂盒对人体外周血提取出的 RNA 进行反转录实验,实验所有操作均在冰上进行,操作均严格按照说明书进行。使用反转录成功的 cDNA 进行后续的 qPCR 实验。

1.3.4 qPCR 实验 使用 Sigma 2X qPCR Master Mix 对反应进行标准化。SYBR 2X qPCR 预混液用于包含 2 μ l cDNA 模板的反应混合物中:2 μ l 每种引物(每 μ l 全部含 2.5 μ mol/L 的 Piry-Forward 和 Piry-Reverse);0.4 μ l 的 ROX 缓冲液(2X);10 μ l 的 SYBR 缓冲液(2X);3.6 μ l 的 Rnase-free 水,用于 20 μ l 的体积反应。反应条件:预变性 95 °C,变性 95 °C、10 s,退火 58 °C、30 s,延伸 72 °C、30 s,共计 45 个循环,最后绘制 melt curve,记录 CT 值,计算表达量。

1.3.5 ELISA 检测 提前准备好待测的人体血清以及标准品,根据浓度进行不同比例的稀释,分别设空白孔、标准品孔和待测样品孔,在酶标板上标准品精确加样 50 μ l,待测样品孔中加稀释液 40 μ l,样本加 10 μ l,封板膜封板放 37 °C 温育 30 min,1x 的洗涤液洗涤板子,重复 5 次,拍干,加入酶标试剂 50 μ l,

空白孔除外,温育半小时,再次洗涤,随后在每孔加入显色剂 A 50 μ l,显色剂 B 50 μ l,轻轻震荡混匀,37 °C 避光显色 10 min,每孔加入终止液 50 μ l,终止反应,以空白孔调零,450nm 波长测量各孔吸光度(optical density, OD 值)。

1.4 PE 诊断及严重程度评判标准 根据 PEDT 评分诊断是否属于 PE(≥ 11 分为 PE, = 9 分或 10 分疑似 PE, ≤ 8 分不属于 PE)。存在 PE 的患者若符合国际性医学学会(ISSM)委员会对 APE 的定义标准,则诊断为 APE。根据 CIPE-5 积分^[4],PE 患者可以分为轻度、中度、重度 3 种类型(轻度大于 13 分,重度 10 ~ 13 分,重度 5 ~ 9 分)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行分析,数据首先进行正态性检验,如数据符合正态分布则采用 *t* 检验,否则采用 Mann-Whitney U 检验。两变量若为正态分布数据采用 Pearson 相关分析,两变量若为非正态分布数据采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比较 APE 组与对照组外周血 DHEA 及褪黑素受体基因的表达 选取 30 例对照组患者与 27 例 APE 患者的外周血,提取 RNA 进行反转录以及 qPCR 实验,来检测 DHEA 以及褪黑素受体在外周血中的基因表达,APE 患者的外周血中 DHEA 的基因表达低于对照组($P < 0.01$),褪黑素受体 1 的基因表达低于对照组($P < 0.01$),差异均有统计学意义,见图 1。此外,褪黑素受体 2 的基因表达量过低无法统计。

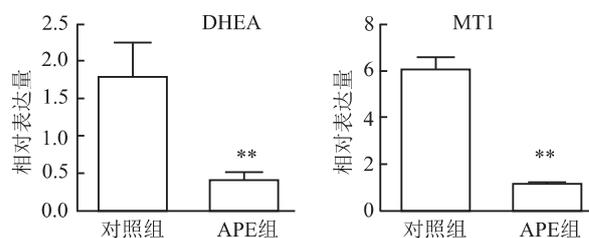


图1 对照组与 APE 组外周血 DHEA 及褪黑素受体 1 基因的表达差异
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 比较 APE 组与对照组血清中 DHEA 及褪黑素分泌浓度的差异 选取 30 例对照组患者与 27 例 APE 患者的外周血,离心取血清,进行 ELISA 实验检测血清中 DHEA 以及褪黑素的分泌浓度,显示 APE 患者血清中 DHEA 分泌的浓度低于对照组

[(4.84 ± 2.07) ng/ml vs (6.19 ± 1.78) ng/ml, $P = 0.011$], 血清褪黑素的分泌浓度也低于对照组 [(5.55 ± 2.30) pg/ml vs (13.36 ± 2.78) pg/ml, $P < 0.001$], 差异均有统计学意义, 见图 2。

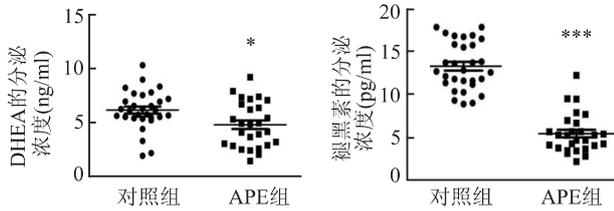


图2 对照组与 APE 组血清中 DHEA 及褪黑素分泌浓度的差异
与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.3 分析 APE 患者血清中 DHEA 及褪黑素的浓度与 APE 疾病严重程度的相关性 选取 APE 组患者外周血 DHEA 及褪黑素的分泌浓度与 CIPE-5 评分进行分析, 显示 APE 组患者血清中 DHEA 的浓度与 CIPE-5 评分不相关 ($r = 0.1546$, $P = 0.4413$), 但褪黑素浓度的变化与 CIPE-5 评分相关, 差异有统计学意义 ($r = 0.7738$, $P < 0.05$), 见图 3。

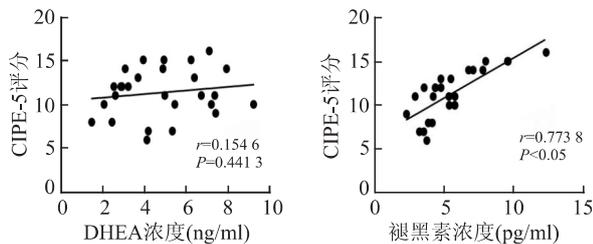


图3 APE 患者血清中 DHEA 及褪黑素的分泌浓度与 APE 疾病严重程度的相关性

3 讨论

在 PE 疾病中, APE 相比于 LPE 更为常见^[5], 然而其影响因素及病理机制尚未完全阐述。针对 APE 的治疗, 除了针对已知病因进行治疗, 还包括药物治疗、行为心理治疗、手术治疗等。目前, 药物治疗有几种选择, 如 5-HT 再摄取抑制剂(达泊西汀、氟西汀、帕罗西汀等)和局部麻醉剂, 已在临床上广泛使用。虽然一些研究表明这些方法取得了显著的成功, 然而也有一定的副作用, 包括恶心和腹泻、头痛、头晕、性欲减退、无射精、勃起功能障碍。与此同时, 行为心理治疗的结果是不受控的, 手术治疗也仍处于探索阶段。在临床上, APE 的男性比 LPE 的男性更有可能寻求医学治疗。本研究通过分析 DHEA 及褪黑素与 APE 的关系, 寻找新的病理生

理因素, 进而阐明这种性功能障碍的潜在原因, 从而发现新的治疗靶点。

本研究中, APE 组与对照组外周血的 DHEA 基因表达及血清中分泌的含量, 均具有显著差异, 这在一定程度上说明了 DHEA 在 APE 的发生与发展过程中起到了一定的作用。DHEA 是一种神经活性类固醇, 通过调节 5-HT、DA 和去甲肾上腺素的释放而具有神经生物学作用。在前脑, DHEA 作为神经甾体, 负调节 GABA 受体的功能从而可以激活 5-HT 神经元的活动^[6]。5-HT 作为神经递质, 在 PE 的发生发展过程中具有重要作用^[7]。中枢神经系统存在着 5-HT 神经元, 释放 5-HT 到突触间隙, 大部分被突触前神经末梢重摄取, 进入囊泡再贮存, 另一部分则被线粒体膜上的单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)所氧化。有研究^[8]为了探讨 DHEA 是否调节 DA 和 5-HT 的代谢, 通过对大鼠给药后 2 h 后检测大鼠纹状体(corpus striatum, CS)和伏隔核(nucleus accumbens, NAc)中神经递质及其代谢物的含量, 发现 DHEA 治疗显著降低了 CS 的 DA 周转(高达 33%), 但增加了 5-HT 周转(高达 76%), MAO 活性也降低了。临床上, 通过给予抑郁症患者 5-HT 再摄取抑制剂, 可以显著提高血清中 DHEA 的浓度, 表明内源性 DHEA 在 5-HT 系统中可能存在相互作用^[9]。

此外, 本研究显示, APE 的人群中褪黑素受体 1 基因的表达与血清褪黑素分泌浓度与对照组对比显著降低, 显示 APE 的病因与褪黑素的改变可能存在一定的相关性。褪黑素是一种 5-HT 衍生的吲哚胺, 在交感神经的控制下于夜间合成^[10]。它的生产是通过 5-HT 的乙酰化和甲基化合成的^[11]。色氨酸羟化酶作为 5-HT 的合成限制酶, 在松果体细胞中也可以表达, 然而 5-HT 的代谢途径和褪黑素的关系尚未得到很好的阐述。在以往的研究中, 褪黑素水平被观察到在焦虑、睡眠剥夺和情绪低落的情况下会降低, 而这些疾病也都于中枢 5-HT 系统的紊乱有关^[12]。最近有研究^[13]通过对 LPE 的病人口服 5-HT 再摄取抑制剂进行治疗, 发现血液褪黑素浓度显著升高, 表明 5-HT 的摄取与褪黑素的合成具有相关性。此外, 本实验分析了血清中褪黑素浓度与 CIPE-5 评分显著相关($r = 0.7738$, $P < 0.05$), 然而 DHEA 与 CIPE-5 评分无相关性, 提示血清褪黑素浓度的变化可作为 APE 疾病严重程度的标志物。

综上所述, APE 与 DHEA 以及褪黑素具有密切的关系, DHEA 与褪黑素在 APE 的发生与发展过程

中起到重要作用。DHEA 通过调控 5-HT 神经元活动来影响 5-HT 的含量,可能会导致 APE 的发生。褪黑素作为 5-HT 的产物或许可以反映中枢系统中 5-HT 含量的变化以及进一步调节 5-HT 系统。这些内在可能存在的机制需要深入研究,进而为 APE 的治疗提供新的方向。

参考文献

- [1] Gillman N, Gillman M. Premature ejaculation: aetiology and treatment strategies [J]. *Med Sci (Basel)*, 2019, 7(11): 102.
- [2] Puppo V, Puppo G. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: Premature ejaculation is not a disease [J]. *Clin Anat*, 2016, 29(1): 111–9.
- [3] Bozkurt A, Karabakan M, Aktas B K, et al. Low serum melatonin levels are associated with erectile dysfunction [J]. *Int Braz J Urol*. 2018, 44(4): 794–799.
- [4] 陈长青, 伊庆同, 陈楚红, 等. 早泄干预对继发早泄的慢性前列腺炎临床疗效的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 2016, 38(4): 393–8.
- [5] Zhang X, Tang D, Xu C, et al. The relationship between self-estimated intravaginal ejaculatory latency time and International Prostate Symptom Score in middle-aged men complaining of ejaculating prematurely in China [J]. *J Sex Med*, 2015, 12(3): 705–12.
- [6] Samardzic J, Hencic B, Jancic J, et al. Neurosteroid dehydroepiandrosterone improves active avoidance retrieval and induces antidepressant-like behavior in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 660: 17–21.
- [7] Chung E, Gilbert B, Perera M, et al. Premature ejaculation: A clinical review for the general physician [J]. *Aust Fam Physician*, 2015, 44(10): 737–43.
- [8] Pérez-Neri I, Méndez-Sánchez I, Montes S, et al. Acute dehydroepiandrosterone treatment exerts different effects on dopamine and serotonin turnover ratios in the rat corpus striatum and nucleus accumbens [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32(6): 1584–9.
- [9] Hough C M, Lindqvist D, Epel E S, et al. Higher serum DHEA concentrations before and after SSRI treatment are associated with remission of major depression [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 77: 122–30.
- [10] 陈艳梅, 洪汝涛, 岳彩飞. 褪黑素对肝星状细胞中 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(12): 1908–12.
- [11] 张玉洁, 洪汝涛, 揭磊. 褪黑素对 PDGF-BB 诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响及机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(12): 1828–33.
- [12] Laudon M, Frydman-Marom A. Therapeutic effects of melatonin receptor agonists on sleep and comorbid disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 15924–50.
- [13] Kalkanli A, Gezmis C T, Fikri O, et al. The effect of plasma melatonin levels in the treatment of lifelong premature ejaculation with selective serotonin reuptake inhibitors [J]. *Andrologia*, 2020, 52(11): e13785.

Expression and significance of DHEA and melatonin in acquired secondary premature ejaculation

Li hu^{1,2}, Zhang Yao¹, Gao Jingjing¹, et al

(¹Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Institute of Urology, Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of dehydroepiandrosterone (DHEA) and melatonin in peripheral blood of patients with acquired premature ejaculation (APE) and their clinical significance. **Methods** The peripheral blood from 27 APE patients and 30 healthy controls were collected. The expression of DHEA gene and melatonin receptor 1 gene were detected by qPCR. The secretion levels of DHEA and melatonin in serum were analyzed by Elisa. Student's *t* test or Mann-Whitney U test was used for comparison between the two groups, and the correlation between the two variables was analyzed by Pearson or Spearman correlation. **Results** The gene expression of DHEA and melatonin receptor 1 gene in peripheral blood of patients with APE was lower than that of the control group ($P < 0.01$, $P < 0.01$). The serum concentrations of DHEA and melatonin secretion in the premature ejaculation group were lower than those in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Changes in serum melatonin concentration in APE patients were correlated with Chinese Index of Sexual Function for Premature Ejaculation-5 (CIPE-5) score, which was statistically significant ($r = 0.7738$, $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of DHEA and melatonin significantly decrease in APE patients. Melatonin is associated with disease severity.

Key words dehydroepiandrosterone; melatonin; acquired premature ejaculation; 5-hydroxytryptamine