

· 博士之窗 ·

川芎嗪注射液对庆大霉素耳中毒豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70 表达的影响

倪月秋 汤 浩

内容提要 目的 研究川芎嗪注射液(四甲基吡嗪,TMP)对庆大霉素(GM)耳中毒豚鼠耳蜗螺旋神经节热休克蛋白 70(HSP70)表达的影响,探讨 TMP 对 GM 耳毒性损伤的保护作用。方法 应用 SABC 免疫组化技术、原位杂交技术及图像分析技术并结合听性脑干反应(ABR)测试,观察 TMP 对 GM 耳中毒豚鼠 ABR 阈值和耳蜗螺旋神经节 HSP70 和 HSP70mRNA 表达的影响。结果 :TMP 加 GM 组耳蜗螺旋神经节 HSP70 及 HSP70mRNA 的表达和 ABR 阈值明显低于 GM 组($P < 0.01$)。结论 :TMP 可降低耳蜗螺旋神经节 HSP70 及 HSP70mRNA 的表达,以减轻 GM 的耳毒性损伤,从而改善听功能。

关键词 川芎嗪注射液 庆大霉素 热休克蛋白 耳蜗 螺旋神经节

Effect of Ligustrazine Injection on Gentamicin Ototoxicity Induced Heat Shock Protein 70 Expression in Cochlear Spiral Ganglion Cells of Guinea Pigs NI Yue-qi, TANG Hao Hearing Research Laboratory, China Medical University, Shenyang (110001)

Objective : To explore the protective role of ligustrazine (tetramethylpyrazine, TMP) on gentamicin ototoxicity. **Methods :** Using immunohistochemistry staining, in situ hybridization histochemistry and image quantitative analysis system, combined with auditory brainstem response (ABR) to observe the effects of TMP on threshold of ABR and the heat shock protein 70 (HSP70) and HSP70mRNA expression in cochlear spiral ganglion of gentamicin intoxicated guinea pigs. **Results :** The ABR threshold, and HSP70 and HSP70mRNA expression in cochlear spiral ganglion cells of gentamicin intoxicated guinea pig significantly increased, which could be reduced significantly after treatment of TMP, $P < 0.01$. **Conclusion :** TMP could reduce the heightened HSP70 and HSP70mRNA expression in cochlear spiral ganglion cells induced by gentamicin to alleviate its ototoxicity so as to improve hearing function.

Key words ligustrazine injection, gentamicin, heat shock protein, cochlea, spiral ganglion

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)广泛存在于原核、真核细胞中,进化上高度保守,具有显著同源性,在细胞中发挥重要作用。其中 HSP70(热休克蛋白家族主要成员之一)在机体的大多数器官(如肝、肾、脑、肌肉组织、耳蜗)中均有表达,当生物细胞受到各种理化因素(如热、氧化剂、重金属、创伤、病原体感染、缺氧、某些细胞因子)刺激后发生应激反应,使热休克蛋白合成增加,起到应激保护作用^{〔1〕}。川芎嗪(ligustrazine)是中药川芎的有效成分,属酰氨基生物碱,化学结构为四甲基吡嗪(tetramethylpyrazine, TMP)。它具有强心、降低血压、抗氧化自由基和抑制血小板聚集等作用,已用于心、脑等器官的血管疾患的治疗,并取

得一定的疗效^{〔2〕}。并且它也可降低庆大霉素(gentamicin, GM)的耳毒性^{〔3〕}。但 TMP 能否通过影响 GM 耳中毒豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70 表达,从而拮抗 GM 的耳毒性,尚未见报道。本实验应用 SABC 免疫组化技术、原位杂交技术及图像分析技术并结合听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)测试,观察 TMP 对 GM 耳中毒豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70 及 HSP70mRNA 表达的影响,探讨 TMP 对 GM 耳毒性损伤的保护作用。

材料和方法

1 动物 耳廓反射灵敏的健康白色红目豚鼠 30 只,体重 200~250g,雌雄不拘,由中国医科大学第二临床医学院动物室提供。

2 药物 川芎嗪注射液,每支 2ml 含 TMP

40mg, 齐齐哈尔制药厂生产, 批号: 20010315; 硫酸庆大霉素注射液, 每支 1ml 含 GM 40 000 U, 1 万 U 约为 10mg, 沈阳第一制药厂生产, 批号: 20001008; 生理盐水注射液, 沈阳金鹰制药厂生产, 批号: 20010330。

3 试剂与仪器 试剂: HSP70 免疫组织化学方法检测试剂盒和 HSP70 原位杂交检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供; 仪器: Danac-7 型声刺激器、DAT-100 型叠加仪、VC-10 示波器, 由日本生产; MetaMorph/Coolsnapfx/AX70 显微图像分析系统, 由美国和日本联合研制。

4 实验方法

4.1 动物的分组、模型的建立及给药方法 将动物随机分成正常对照组、GM 组、TMP 加 GM 组, 每组 10 只。TMP 加 GM 组每日左侧腹腔注射川芎嗪注射液 140mg/kg, 同时在右侧腹腔注射硫酸庆大霉素注射液 100mg/kg。GM 组: 每日腹腔注射与 TMP 加 GM 组等量的硫酸庆大霉素注射液。正常对照组: 每日腹腔注射与 GM 组等量的生理盐水 (2.5ml/kg) 各组皆连续注射 10 日。各组动物混合饲养, 每日测量体重调整注射剂量。

4.2 ABR 阈值检测 在用药前和用药后第 11 天, 用 1% 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 腹腔麻醉, 利用 Danac-7 型声刺激器发出主频率为 2kHz 的 click 声刺激信号, 带通滤波 50~3000Hz, 间隔时间 90ms, 扫描时间 20ms, 耳机距豚鼠外耳道约 0.5cm。记录电极置颅顶正中, 参考电极及接地电极分别置于给声耳及对侧耳后乳突部皮下, 以 DAT-100 型叠加仪叠加 200 次, 以 VC-10 示波器输出信号, 观察时程为 20ms, 测试强度由 95dBnHL 开始, 按 10dB 递减, 接近阈值后按 5dB 逐挡递减, 听阈判定以 P_3 波为准。

4.3 耳蜗冰冻切片的制备 各组豚鼠在行第 2 次 ABR 检测后, 将豚鼠快速断头, 迅速取出听泡。打开听泡后, 充分暴露耳蜗, 在解剖显微镜下刺破圆窗膜, 将镫骨底脱位暴露卵圆窗, 在蜗顶钻一小孔, 用微量注射器缓慢注入含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液, 再将标本置于上述固定液中 4℃ 下 2h。0.1mol/L 的 PBS (pH 为 7.4) 冲洗后, 放入 10% EDTA 的磷酸缓冲液中 4℃ 脱钙 5~7 天, 再移入 25% 蔗糖磷酸缓冲液中, 4℃ 过夜。次日用 OCT 包埋, 行恒冷冰冻切片。

4.4 免疫组织化学方法检测 HSP70 切片干燥后, 用蒸馏水洗 3 次。将切片放入用甲醇稀释的 0.5% H_2O_2 中室温下浸泡 30min, 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗 3 次。滴加抗原修复液, 室温 10min, 蒸馏水洗 3 次。滴加正常血清封闭液, 室温下

孵育 20min, 甩去多余的液体, 然后滴加稀释度为 1:150 的一抗, 4℃ 过夜。用 0.01mol/L 的 PBS (pH 为 7.4) 洗 3 次。滴加二抗, 室温孵育 20min, 用 0.01mol/L 的 PBS 洗 3 次。滴加 SABC 溶液, 室温孵育 20min, 0.01mol/L 的 PBS 漂洗 4 次, DAB 显色, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察。阴性对照组用 0.01mol/L 的 PBS (pH 为 7.4) 代替一抗, 其他程序不变。

4.5 原位杂交方法检测 HSP70mRNA 切片干燥后, 用蒸馏水洗 3 次。将切片放入用甲醇稀释的 0.5% H_2O_2 中室温下浸泡 30min, 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗 3 次。每张切片滴加 20 μ l 含寡核苷酸探针的原位杂交液, 37~40℃ 杂交过夜。30~37℃ 的 2 $\times$ SSC 洗 5min, 共 3 次。临用前每张切片取 2 μ l 杂交稳定液 A 和 18 μ l 杂交稳定液 B, 混匀后, 滴加在切片上, 湿盒中 37~40℃ 反应 4~6h。2 $\times$ SSC 洗 5min, 共 3 次。滴加封闭液, 37℃ 下孵育 30min, 甩去多余的液体, 然后滴加生物素化鼠抗地高辛, 37℃ 下孵育 60min, 用 0.5mol/L 的 PBS (pH 为 7.4) 洗 5min, 共 4 次。滴加 SABC 溶液, 37℃ 下孵育 20min, 0.5mol/L 的 PBS 漂洗 5min, 共 4 次, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片; 显微镜下观察。阴性对照组用 0.5mol/L 的 PBS (pH 为 7.4) 代替一抗, 其他程序不变。

4.6 图像处理 图像分析采用 MetaMorph/Coolsnapfx/AX70 显微图像分析系统, 每组取 10 张切片, 将载玻片置于显微镜 (10 $\times$ 40) 下, 呈现图像后, 用数码相机拍照后, 将图像输入计算机, 在同等条件下测量螺旋神经节细胞 HSP70 阳性反应产物灰度值, 分别计算各组平均灰度值。

5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性检验采用 t 检验及相关分析。

结 果

1 各组豚鼠用药前后 ABR 阈值检测结果比较见表 1。各组用药前 ABR 阈值差异无显著性 ($P > 0.05$)。给药 10 天后, GM 组的 ABR 阈值明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。TMP 加 GM 组的 ABR 阈值虽

表 1 各组豚鼠用药前后 ABR 阈值比较 (dBnHL, $\bar{x} \pm s$)

组别	耳数	ABR 阈值	
		用药前	停药后
正常对照	20	2.44 $\pm$ 2.75	2.50 $\pm$ 2.75
GM	20	2.50 $\pm$ 2.75	36.55 $\pm$ 6.13* Δ
TMP 加 GM	20	2.25 $\pm$ 2.93	21.09 $\pm$ 4.50* Δ

注: 与本组用药前比较, * $P < 0.01$; 与正常对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 GM 组比较, $\Delta P < 0.01$

然在用药后也有所增高($P<0.01$),但较 GM 组明显降低($P<0.01$)。

2 光镜观察免疫组织化学方法结果 见图 1。豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70 阳性反应产物呈棕黄色颗粒。正常对照组阳性反应产物较少,呈弱阳性;GM 组的阳性反应产物明显强于正常对照组,即染色明显加深,呈强阳性;TMP 加 GM 组的阳性反应产物虽然也增多,但较 GM 组明显减少。

3 光镜观察原位杂交方法结果 见图 2。豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70mRNA 阳性反应产物呈蓝紫色颗粒,细胞核呈蓝色。正常对照组阳性反应产物较少,呈弱阳性;GM 组的阳性反应产物明显强于正常对照组,即染色明显加深呈棕蓝色,呈超强阳性;TMP 加 GM 组的阳性反应产物虽然也增多,但较 GM 组明显减少,即该组的耳蜗螺旋神经节 HSP70mRNA 阳性反应产物介于 GM 组和正常对照组之间。

4 各组豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70 和 HSP70 mRNA 阳性反应产物的平均灰度值比较 见表 2。GM 组豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70 和 HSP70mRNA 阳性反应产物的平均灰度值较正常对照组明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),即 GM 能显著增强 HSP70 及 HSP70mRNA 的表达。TMP 加 GM 组的耳蜗螺旋神经节 HSP70 及 HSP70mRNA 阳性反应产物的平均灰度值与 GM 组比较,差异有显著性($P<0.05$),即 TMP 能降低 HSP70 及 HSP70mRNA 的表达。

表 2 各组豚鼠耳蜗螺旋神经节 HSP70 和 HSP70mRNA 阳性反应产物的平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	耳数	平均灰度值	
		HSP70	HSP70mRNA
正常对照	10	120.51 $\pm$ 0.80	122.36 $\pm$ 0.97
GM	10	117.93 $\pm$ 0.18 *	98.79 $\pm$ 1.26 **
TMP 加 GM	10	118.91 $\pm$ 0.46 Δ	120.02 $\pm$ 2.41 Δ

注 与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与 GM 组比较, Δ $P<0.05$

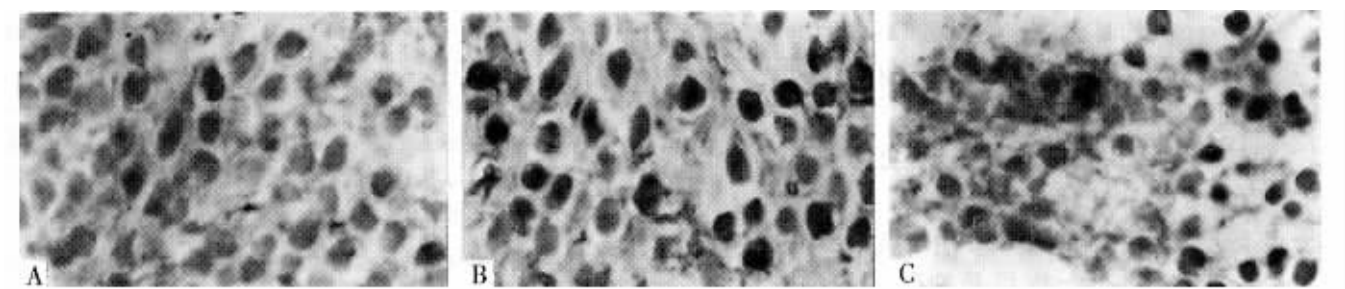


图 1 光镜观察免疫组织化学方法结果 ($\times 400$)

注 A. 正常对照组螺旋神经节 HSP70 棕黄色阳性反应产物较少,呈弱阳性;B. GM 组螺旋神经节 HSP70 棕黄色阳性反应产物较多,呈强阳性;C. TMP 加 GM 组螺旋神经节 HSP70 棕黄色阳性反应产物较 GM 组少,染色显著浅于 GM 组

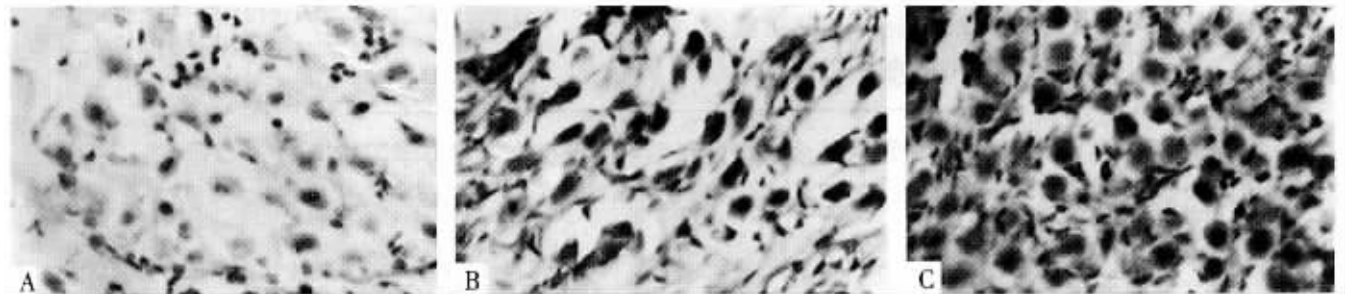


图 2 光镜观察原位杂交方法结果 ($\times 400$)

注 A. 正常对照组螺旋神经节 HSP70mRNA 蓝紫色阳性反应产物较少,呈弱阳性;B. GM 组螺旋神经节 HSP70mRNA 阳性反应产物较多,呈棕蓝色,呈超强阳性;C. TMP 加 GM 组螺旋神经节 HSP70mRNA 阳性反应产物较 GM 组少,染色显著浅于 GM 组

讨 论

对正常耳蜗内是否存在 HSP70 有不同的观点。有人认为 HSP70 存在于正常耳蜗组织中,发挥正常生理功能⁽¹⁾,而有人认为在正常、非应激的耳蜗组织中无 HSP70 的表达⁽⁴⁾。本实验表明,在正常对照组耳蜗螺旋神经节中有 HSP70 及 HSP70mRNA 的表达,进一步表明正常耳蜗内存在 HSP70 的表达。HSP70 的表达多出现在因应激刺激而容易受损的部位⁽⁵⁾,因而表明螺旋神经节容易受损。在 GM 组耳蜗螺旋神经节中有 HSP70 及 HSP70mRNA 的表达,尤其是 HSP70mRNA 的表达呈强阳性,暗示该组细胞受损严重⁽⁶⁾,这与文献报道的氨基甙类抗生素(AmAn)可导致螺旋神经节细胞退行性改变相一致⁽⁷⁾。同时也说明在应激情况下 HSP70mRNA 和 HSP70 的表达的不一致性。本实验 TMP 加 GM 组耳蜗螺旋神经节 HSP70 及 HSP70mRNA 的表达比 GM 组明显减弱,ABR 阈值较 GM 组明显降低,提示 TMP 可以降低 GM 对耳蜗螺旋神经节的毒性,减轻应激反应。

关于 AmAn 的耳毒性作用机制,有多种推断。最近, Taumida M 等⁽⁸⁾证明,注射庆大霉素后产生的 NO 自由基与超氧阴离子(O_2^-)相互作用产生过氧化亚硝酸盐,而过氧化亚硝酸盐对内耳产生更为严重的毒性作用。有文献^(8,9)报道,氧自由基亦是 HSP 诱生因素之一,这进一步证明 GM 的耳毒性与氧自由基关系密切。此外, HSP 的另一作用是抑制还原型辅酶 II (NADPH)氧化酶⁽⁹⁾,而 NADPH 氧化酶参与氧自由基的关键性反应,推测 HSP 通过反馈作用减少自由基的产生,保护耳蜗细胞,减少耳毒性。另有文献⁽⁴⁾证明 TMP 可以直接清除活性氧自由基,减少超氧化物物的生成。崔城等⁽¹⁰⁾也证明, TMP 降低 GM 中毒耳蜗一氧化氮合酶(NOS)活性。因此,我们推测 TMP 可能通过清除活性氧自由基,减少超氧化物物的生成,以减轻自

由基对内耳的损伤,从而使应激反应减弱,导致 HSP70 及 HSP70mRNA 表达减少。故认为, TMP 通过降低 GM 中毒耳蜗 NOS 活性,减少 NO 的过量生成,降低 GM 的耳毒性,并在此过程中, HSP 通过反馈作用减少自由基的产生,来协助 TMP 保护耳蜗,降低 GM 的耳毒性。

参 考 文 献

1. Lindquist S, Graig EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 1988; 22:631—677.
2. 侯连兵. 川芎嗪的新药理作用. *中草药* 1992; 23(11):583—584.
3. Taumida M, Popa R, Annio M. Free radicals in the guinea pig inna ear following gentamicin exposure. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999; 61(2):63—70.
4. 陶泽璋, 肖伯奎, 刘剑锋, 等. 那霉素耳中毒后豚鼠耳蜗热休克蛋白的表达. *听力及言语疾病杂志* 2000; 8(2):74—76.
5. Lowenstein DH, Simon RP, Sharp FR. The pattern of 72-kDa heat shock protein-like immunoreactivity in the rat brain following flurothyl-induced status epilepticus. *Brain Res* 1990; 531(1—2):173—182.
6. Gass P, Prior P, Kiessling. Correlation between seizure intensity and stress protein expression after limbic epilepsy in the rat brain. *Neuroscience* 1995; 65(1):27—36.
7. Dupont J, Guillaume A, Aran JM. Neuronal degeneration of primary cochlear and vestibular innervations after local injection sisomocin in guinea pig. *Hear Res* 1993; 68:217—226.
8. Kauffmann SHE. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990; 11(4):129—136.
9. 管阳太. 热休克蛋白在缺血性脑损伤中的作用. *国外医学脑血管病分册* 1994; 2(3):142—145.
10. 崔 城, 汤 浩, 崔桂英, 等. 川芎嗪拮抗庆大霉素耳毒性作用的实验研究. *现代康复* 2001; 5(2):55—56.

(收稿 2002-04-17 修回 2002-08-20)

第四次全国中西医结合泌尿外科学术会议征文及举办学习班通知

第四次全国中西医结合泌尿外科学术会议拟于 2003 年 6 月在浙江省宁波市召开,同时举办泌尿外科学习班,现就有关事宜通知如下。

学术会议 征文内容 尿石症、泌尿系肿瘤、前列腺疾病、性传播疾病等泌尿男性生殖系统疾病的中西医临床和实验研究进展。

学习班 授课内容 泌尿男性生殖系统疾病的中西医治疗研究进展。聘请国内著名泌尿外科专家授课。该班属于国家继续教育项目,学习期满,授予国家继续教育学分 15 分。

征文及报名方式 论文用 400 字稿纸,字迹清楚,最好打印或附软盘,字数在 3000 字以内,附 800 字论文摘要。截稿时间为 2003 年 5 月 15 日。参加学习班者请来信或电话索取招生简章 报名截止时间为 2003 年 6 月 10 日。报名及会议论文寄至浙江省杭州市邮电路 54 号(邮编 310006)浙江省中医院科教科汤军收,信封注明“征文”。电话:(0571)87013311 或 87068001 转 3072。具体会议及学习班时间地点另行通知。如需更多信息,请访问好医生网站(<http://www.haoyisheng.com>)。