

· 基础研究 ·

复方健耳剂干预庆大霉素耳毒性致豚鼠毛细胞损害的实验研究

宣伟军^{1,2} 黄力毅³ 韦瑀龙⁴ 陈 壮⁴ 宣 毅⁵ 陈思仲¹ 唐俊波¹

摘要 目的 探讨中药复方健耳剂干预豚鼠庆大霉素(gentamycin, GM)耳毒性致外毛细胞损害的作用及可能机制。**方法** 选择杂色成年豚鼠 48 只,随机分为正常对照组、GM 对照组、复方健耳剂 + GM 组(简称中药 + GM 组),每组 16 只,其中正常对照组按常规饲养至第 11 天期满;GM 对照组按 200 mg/(kg·d) 剂量,每天分 2 次连续注射 9 天,第 11 天终止饲养;中药 + GM 组按 3.994 g/(kg·d) 剂量(1/2 人工灌服,1/2 自动饮用),预先服用复方健耳剂 10 天,然后在继续服用中药同时开始注射每天同等剂量 GM,连续 9 天,第 11 天终止饲养。所有动物期满取出耳蜗,其中每组 10 只动物用于全耳蜗基底膜铺片,琥珀酸脱氢酶染色,进行耳蜗毛细胞形态学观察,另外每组 6 只动物,利用 Real-time PCR 技术检测耳蜗组织硫氧还蛋白(Trx)-1、Trx-2、凋亡信号调节激酶 1(apoptosis signal-regulating kinase 1,ASK1) mRNA 表达量。**结果** 全耳蜗基底膜检查显示,正常对照组各回三排内、外毛细胞形态正常,数量完整,排列有序;GM 对照组各回三排外毛细胞损毁严重,绝大部分细胞出现严重崩解不全,或凋亡缩小,第 1 回比其他各回损害较重($P < 0.01$),但内毛细胞仍基本存在;中药 + GM 组各回三排外毛细胞除少量和散在崩解不全外,大多仍存留可辨,形态如常,内毛细胞仍保持完整,各回外毛细胞损毁状况明显少于 GM 对照组($P < 0.01$)。中药 + GM 组 Trx-1、Trx-2 mRNA 表达明显高于 GM 对照组($P < 0.01$),ASK1 mRNA 表达则明显低于 GM 对照组($P < 0.01$)。**结论** 一定剂量 GM 连续使用可造成豚鼠耳蜗外毛细胞严重损害,并以第 1 回明显,而且以外毛细胞为主要损害靶细胞。复方健耳剂具有防治 GM 耳毒性外毛细胞损害作用,其机制可能与其调控硫氧还蛋白系统,阻止 ASK1 依赖的细胞凋亡有关。

关键词 豚鼠;庆大霉素;耳毒性;复方健耳剂;硫氧还蛋白;凋亡信号调节激酶;琥珀酸脱氢酶染色

Compound Jian'er Mixture Intervened Gentamycin-induced Ototoxic Damage to Hair Cells of Guinea Pigs XUAN Wei-jun^{1,2}, HUANG Li-yi³, WEI Yu-long⁴, CHEN Zhuang⁴, XUAN Yi⁵, CHEN Si-zhong¹, and TANG Jun-bo¹ 1 Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery Department, First Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530023); 2 Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery Department, Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530011); 3 Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital, USA (Boston MA 02114); 4 Pharmaceutical Factory, Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530011); 5 School of Engineering, Tufts University, USA (Medford MA 02155)

ABSTRACT Objective To observe the effect and possible mechanism of Compound Jian'er Mixture (CJM) in intervening gentamycin (GM)-induced ototoxic damage to hair cells of Guinea pigs. **Methods** Totally 48 variegated adult guinea pigs were randomly divided into normal control group, GM control group, CJM + GM group [Chinese herbs (CH) + GM group], 16 in each group. Of them, Guinea pigs

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81774374, No. 81373700, No. 81260552)

作者单位: 1. 广西中医药大学第一临床医学院耳鼻咽喉头颈外科(南宁 530023); 2. 广西中医药大学瑞康医学院耳鼻咽喉头颈外科(南宁 530011); 3. Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital, USA (Boston MA 02114); 4. 广西中医药大学瑞康医学院制药厂(南宁 530011); 5. School of Engineering, Tufts University, USA (Medford MA 02155)

通讯作者: 宣伟军, Tel: 0771-3102263, E-mail: xuan5352100@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180205.116

were conventionally fed until the 11th day. Those in the GM control group were injected by using GM at the daily dose of 200 mg/kg, twice per day for 9 successive days, and terminated at day 11. Those in the CH + GM group took CJM at the daily dose of 3.994 g/kg (half for artificial filling and half for automatic drinking) for 10 days in advance, and then received GM injection at equal dose for 9 successive days. And the feeding was terminated at day 11. Cochleas of all expired animals were taken out, and then whole cochlear basilar membrane of 10 animals in each group were used to be micro-dissected out, trimmed and mounted in glycerin on glass slides as flat surface preparations, and their morphology was observed by succinate dehydrogenase staining. Cochleas of the other 6 animals in each group were used for detecting expressions of thioredoxin-1 (Trx-1), Trx-2, and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by Real-time PCR. Results The examination of whole cochlear basilar membrane showed that morphology on the three rows of inner and outer hair cells in each turn of the normal control group was normal, the number was complete, and the arrangement was orderly. Three rows of the outer hair cells in each turn of the GM control group were severely damaged. Severe disintegration and incompleteness, or shrunk apoptosis occurred in most of outer hair cells. The first turn was more severely damaged than the other turns ($P < 0.01$), but the inner hair cells still basically existed. Most of three rows of the outer hair cells in each turn of the CH + GM group still remained identifiable in normal morphology, except for few amount and incomplete disintegrated cells. The inner hair cells were also kept intact. The damage of outer hair cells in each turn of the CH + GM group was significantly less, as compared with the GM control group ($P < 0.01$). The expressions of Trx-1 and Trx-2 in cochlear tissue were significantly higher in the CH + GM group than in the GM control group ($P < 0.01$). Furthermore, the ASK1 expression was significantly lower in the CH + GM group than in the GM control group ($P < 0.01$). Conclusions Continuous use of some certain dose of GM could cause severe damage of Guinea pigs' cochlear outer hair cells. The damage to the first turn was more obviously seen. Moreover, the outer hair cells were main damage target cells. CJM showed significant prevention and treatment for GM-induced damage of outer hair cells. Its protective mechanisms might be related to regulating thioredoxin system, impeding ASK1-mediated apoptosis.

KEYWORDS Guinea pig; gentamycin; ototoxicity; Compound Jian'er Mixture; thioredoxin; apoptosis signal-regulating kinase; succinate dehydrogenase stain

目前全球近 6 亿人口被估计至少有一侧耳罹患明显感音神经性聋,其中氨基甙类抗生素(aminoglycoside antibiotics, AmAn)已成为导致耳聋残疾的主要原因之一^[1],而作为属于 AmAn 最常用的药物庆大霉素(gentamycin, GM)则一直以来受到业界的高度关注,因致聋后难以逆转,迄今治疗仍以预防为主。最近研究表明,复方健耳剂具有显著对抗 C57BL/6J 小鼠老年性耳蜗毛细胞、螺旋神经节神经元凋亡及保护听力的作用^[2-4],为了解其是否也具有对抗 AmAn 耳毒性作用,近来笔者以豚鼠 GM 耳毒性作为模型,观察该复方健耳剂对 GM 耳蜗毛细胞损害防护效应,并研究其对两种硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)亚型 Trx-1、Trx-2 以及凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)表达影响,以探讨其作用机制。

材料与方法

1 动物 杂色豚鼠 48 只,健康无中耳疾患,

耳廓反射灵敏,体重平均 300 g,2 月龄,清洁级别一级,雌雄不拘,由昆明市艾尼莫实验动物养殖中心提供,动物合格证号:SCXK(滇)K2012-0002,实验过程中善待动物,符合动物伦理要求,饲养于 SPF 动物实验室。

2 药物 复方健耳剂源自国家发明专利处方(专利号:ZL2013104661403),主要由黄芪、骨碎补、葛根、丹参、女贞子、菟丝子组成,按照中成药胶囊药物提取技术和方法,经过水煮、浓缩、烘干、反复粉碎和过筛等流程,制成每克药粉相当于 6.63 g 生药材。硫酸庆大霉素注射液,80 mg/支,由贵州天地药业有限公司提供,批号:15062403B。乌拉坦,1 000 g/瓶,由都莱生物科技有限公司提供,批号:20160701。琥珀酸钠,25 g/瓶,由天津科密欧化学试剂有限公司提供,批号:20150110。氯化硝基四氮唑蓝,250 mg/瓶,由 Amresco 公司提供,批号:20151112 gl。

3 试剂及仪器 mRNA 合成单链扩增逆转录试

剂盒购自大连宝生物工程有限公司; 荧光定量 PCR 引物设计在 NCBI 数据库查找相关序列, 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成; GoldView I 型核酸染色剂购于上海索莱宝生物科技有限公司; 总 RNA 抽提试剂盒由美国 Axygen 公司提供; 采用美国 Bio-Rad 实时定量 PCR 检测系统-MyiQ5 Real Time PCR Detection System。

4 方法

4.1 动物分组及给药方法 将 48 只动物随机分为正常对照组、庆大霉素对照组 (GM 对照组)、复方健耳剂 + 庆大霉素组 (简称中药 + GM 组) 各 16 只, 其中 GM 对照组按 200 mg/(kg · d) 剂量, 每天注射 2 次, 两侧大腿及腹腔交替注射, 连续 9 天, 第 11 天终止饲养; 中药 + GM 组预先连续服用复方健耳剂 10 天, 按照《中药药理研究方法学》^[5] 实验动物用量换算法得出单倍剂量为 0.9985 g/(kg · d), 根据过去实验有效用药经验^[2-4] 并经初步研究对比最终设定该药的豚鼠实验用量为 4 倍剂量即 3.994 g/(kg · d), 然后在继续灌胃中药同时开始注射 GM, GM 用量和方法同 GM 对照组, 连续 9 天同时停药, 第 11 天终止饲养; 正常对照组则按常规饲养至 11 天。中药 + GM 组每天剂量的 1/2 用于人工灌服, 1/2 溶入自吸水瓶中, 供豚鼠同时自动饮用, 在无其他水源供应的实验条件下, 实验动物因生理需要而必须每天摄取足够的饮水, 因而也就保证了实验豚鼠每天都能摄取到规定的药物剂量。

4.2 观察指标及检测方法 实验动物期满后每组各取 10 只动物耳蜗, 应用耳蜗铺片技术, 琥珀酸脱氢酶染色方法, 观察毛细胞形态学变化, 另每组各取 6 只动物耳蜗应用 Real-time PCR 技术检测 Trx-1、Trx-2、ASK1 mRNA 表达。

4.2.1 耳蜗毛细胞形态学观察 豚鼠在 20% 乌拉坦腹腔注射全麻下, 经心脏抽吸完血液另作他用, 然后迅速断头, 打开听泡取耳蜗。供 RT-PCR 用的动物耳蜗浸泡于 RNA 保护液中, 置 -80 °C 冰箱保存。其他耳蜗用于耳蜗铺片, 主要方法是将动物蜗尖钻孔并摘除镫骨同时打开圆窗, 向耳蜗内灌入琥珀酸脱氢酶染色液, 由 0.2 mol/L 琥珀酸钠、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.1% 氯化硝基四氮唑蓝配制而成, 在 37 °C 恒温箱内作用 40 ~ 60 min, 然后将耳蜗浸入 10% 中性福尔马林固定液固定 24 h, 常规脱钙后分离取出全耳蜗基底膜, 移入载玻片上的甘油滴中, 盖上盖玻片, 中性树脂胶封固。在标记单位长度为 0.01 mm 刻度的光学显微镜下, 分别放大 200、400 倍镜观察各组实验动物全耳蜗铺片各回基底膜上毛细胞形态变化情况, 然

后分别截取每组每个样本耳蜗各回同等部位三排外毛细胞, 在同等单位距离内计数, 其中正常对照组、中药 + GM 组选择形态正常外毛细胞纳入统计范围, GM 对照组凡能够辨认出有形细胞体也纳入统计范围, 最后应用 SPSS 统计软件进行统计分析。

4.2.2 Real-time PCR 检测耳蜗 Trx-1、Trx-2、ASK1 mRNA 选择 PCR 参考引物序列 ACTB (5' - 3'): 上游 GAAGAGCTATGAGCTGCCTGA; 下游 GCAGCAAAGTAGTAACAGTCCG; 长度 441 bp。PCR 目标引物序列 Trx-1 (5' - 3'): 上游 CCTTGCTTCCAGTAGCTCGT; 下游 CACATTCTGCAGCGACATCC; 长度 247 bp。Trx-2 (5' - 3'): 上游 TGCTGGCCATCAAGAAATGGA; 下游 ACAGATGGGTGGGAAGACGA; 长度 312 bp。ASK1 (5' - 3'): 上游 ATACGCCGAGAATGGTGAGC; 下游 CTGTGCAGGGTGTGATTCCT; 长度 (bp) 482。

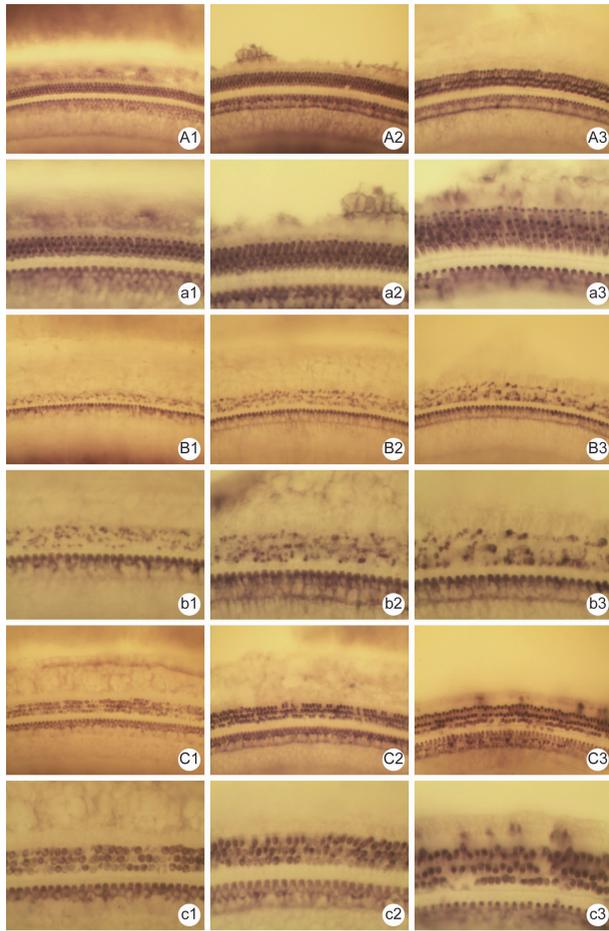
将耳蜗移至预冷的研钵中, 研磨成粉末。按照总 RNA 小量制备试剂盒步骤提取总 RNA。按照反转录反应试剂盒说明进行反转录 PCR 反应合成 cDNA。加入引物, 在实时定量 PCR 仪检测系统中, 反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 然后经过 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环, 60 °C 延伸 1 min, 测出内参基因 ACTB 和目的基因 Trx-1、Trx-2、ASK1 在不同样本中扩增的 Ct 值, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达量差异倍数。

4.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组间比较采用方差分析, 两两比较用 LSD-t 分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组豚鼠全耳蜗铺片结果比较 (图 1, 表 1) 正常对照组各回三排外毛细胞以及内毛细胞形态正常, 数量完整, 排列有序, 清晰可辨 (图 A1 - 3, a1 - 3)。GM 对照组三排外毛细胞损毁严重, 绝大部分细胞出现严重崩解不全, 或凋亡缩小, 但内毛细胞仍基本存在, 清晰可辨, 由此说明该剂量 GM 耳毒性靶细胞主要是外毛细胞 (图 B1 - 3, b1 - 3)。中药 + GM 组三排外毛细胞正常数量虽然不如正常对照组多, 但除少量而且散在崩解不全外, 大多仍存留可辨, 形态如常, 内毛细胞仍保持完整, 清晰可辨 (图 C1 - 3, c1 - 3)。各组各回三排外毛细胞统计如表 1 所示, 其中 GM 对照组第 2 回及第 3 回与第 1 回比较, 均升高明显, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。与 GM 对照组比较, 中药

+GM 组对应的第 1、2、3 回均明显升高 ($P < 0.01$), 与正常对照组比较, 差异仍有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注:A 为正常对照组;B 为 GM 对照组;C 为中药 + GM 组;大、小字母分别为放大倍数 ($\times 200, \times 400$);1、2、3 分别为耳蜗第 1、2、3 回

图 1 3 组豚鼠耳蜗各回铺片结果(琥珀酸脱氢酶染色)

表 1 3 组豚鼠耳蜗各回三排外毛细胞统计比较
(个/ 0.05 mm , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 回	第 2 回	第 3 回
正常对照	10	171.50 \pm 3.10	173.50 \pm 2.92	176.60 \pm 2.55
GM 对照	10	17.00 \pm 9.51*	30.20 \pm 9.65*▲	31.40 \pm 9.70*▲
中药 + GM	10	101.20 \pm 17.67*△	110.80 \pm 18.91*△	120.70 \pm 13.55*△

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与 GM 对照组比较, △ $P < 0.01$;与本组第 1 回比较, ▲ $P < 0.01$

2 各组豚鼠耳蜗组织 Trx-1、Trx-2、ASK1 mRNA 表达水平比较(表 2) 中药 + GM 组 Trx-1、Trx-2 mRNA 表达高于 GM 对照组 ($P < 0.01$), ASK1 mRNA 表达低于 GM 对照组 ($P < 0.01$);GM 对照组较正常对照组 Trx-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), ASK1 mRNA 升高 ($P < 0.05$)。

表 2 3 组豚鼠耳蜗组织 Trx-1、Trx-2、ASK1 mRNA 表达水平比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Trx-1 mRNA	Trx-2 mRNA	ASK1 mRNA
正常对照	6	1.31 \pm 0.29	1.08 \pm 0.15	1.01 \pm 0.13
GM 对照	6	1.22 \pm 0.16	0.67 \pm 0.39*	15.76 \pm 1.97*
中药 + GM	6	3.61 \pm 0.44△	1.37 \pm 0.46△	3.12 \pm 2.34△

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

讨 论

有研究表明, AmAn 耳毒性毛细胞损害是属于由 ROS 介导 Caspase 通路, 或激活 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路, 启动细胞死亡级联程序, 从而诱导的细胞凋亡^[6]。AmAn 所产生和累积的 ROS 构成了对宿主耳蜗毛细胞内线粒体 DNA 的直接损害, 引起伴随着耳蜗毛细胞和神经元的退化的永久性双侧重度高频感音神经性听力损失和临时性前庭功能低下, 形成铁-氨基贰类复合物, 或线粒体钙转运代谢异常则被认为是促使 ROS 介导的耳蜗内细胞损害病理过程的重要环节^[7]。最新报道, 认为在 GM 导致的耳蜗毛细胞氧化应激反应中, ROS 启动信号转导与转录激活因子 1 (STAT1) 介导的细胞死亡通路是 GM 耳毒性损害的主要原因, 应用 STAT1 抑制剂表没食子儿茶酚没食子酸酯 (EGCG), 在 Corti 器体外培养模型中, 具有保护耳蜗外毛细胞避免 GM 耳毒性损害作用, 或在强抗氧化剂藻类物二鹅掌菜酚 (Dieckol) 干预的体外耳蜗毛细胞暴露于 GM 损害 48 h 模型中, 也发现其具有较好的保护毛细胞的作用。因此, 应用抗氧化剂防治 AmAn 耳毒性已成为研究热点之一^[8,9]。

复方健耳剂以中医脾肾血瘀立论, 选择具有补肾健脾、活血通窍作用的中草药组成, 根据现代药理学研究, 该方所选中药如黄芪、骨碎补、丹参、葛根等具有促进能量代谢, 增强体内 SOD 等酶类功能, 清除 ROS, 改善微循环等作用^[10], 其早期的原始配方在干预豚鼠 GM 耳、肾毒性模型中, 通过对耳蜗神经动作电位 AP 阈值和 N₁ 潜伏期检测和耳蜗铺片和扫描电镜观察, 以及尿素氮、血肌酐、尿蛋白、尿 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶和肾组织切片等检查, 发现其具有一定拮抗豚鼠 GM 耳、肾毒性, 保护外毛细胞和听力, 保护肾组织和肾功能的作用^[11], 提示其关键作用机制之一可能是清除氧自由基, 保护细胞膜。为了进一步明确复方健耳剂是否具有清除氧自由基, 对抗细胞凋亡的药理作用, 本课题组曾选择了 C56BL/6J 小鼠作为老年性聋动物模型, 观察该中药制剂干预耳蜗丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 与 Caspase-3 的影响作用, 因该品系小鼠其听

力衰减基因定位于 10 号染色体,为隐性遗传,其发生的分子机制为成年听力下降基因转录为 mRNA 导致线粒体保护酶减少,使该小鼠对自由基的清除能力降低,其过早发生的老年性聋应与 ROS 堆积,损害 mtDNA,导致 mtDNA 突变或缺失,线粒体功能下降,介导耳蜗感音神经细胞凋亡的病理机制关系最为密切^[12]。研究显示,该复方中药具有显著降低老年性聋动物模型耳蜗 MDA 含量与下调 Caspase-3 表达的药效作用,而 MDA 则是 ROS 与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应形成的脂质过氧化终产物。由此揭示该复方中药通过抑制和降低机体细胞 ROS 产生,从而有效对抗 Caspase 介导的耳蜗毛细胞和螺旋神经节神经元凋亡的发展进程,保护听功能的作用^[3,4]。

本次研究参考已报道的豚鼠 GM 耳毒性制模成功经验^[11],重点观察了复方健耳剂干预豚鼠 GM 耳毒性外毛细胞损害模型的影响作用,耳蜗铺片结果显示,GM 对照组从耳蜗底回到顶回,外毛细胞形态毁损严重,大多崩解凋亡,其中第 1 回整体外毛细胞损害又比其它回明显,可能是药物流经先后和积蓄不同所致。其同回外毛细胞呈均匀片状崩解损害,应是 GM 经过耳蜗之处单位面积影响均匀同等结果。建模前 10 天即开始应用复方健耳剂干预的防治组外毛细胞损害则较轻,大多形态正常,清晰可辨,同回外毛细胞呈不均匀的零散损害,可能与中药复杂机制作用不均有关,耳蜗各回外毛细胞与 GM 对照组比较具有明显差别,表明复方健耳剂具有显著防护豚鼠 GM 耳毒性外毛细胞损害作用,作为一种氧自由基清除剂与细胞凋亡的拮抗剂,其重要作用机制之一,同样被认为可能是通过抑制和降低机体细胞 ROS 产生,防止细胞凋亡,达到有效保护耳蜗外毛细胞作用,符合前述学者普遍认为,AmAn 耳毒性毛细胞损害是属于由 ROS 介导包括 Caspase 通路,启动细胞死亡级联程序,从而诱导的细胞凋亡观点。但是,理论上干预和影响 ROS 诱导的细胞凋亡的相关因子众多,其中 Trx 系统是体内影响 ROS-JNK 和 ROS-MAPK 的重要氧化还原系统。Trx 有两个亚型 Trx-1、Trx-2,它们分别定位于细胞质、线粒体,均是存在于细胞内的一种多功能 12 kD 小分子蛋白,其氨基酸序列中含有调节氧化还原活性的二硫键/巯基,该结构位于保守序列 Trp-Cys-Gly-Pro-Cys 中,通过二硫键与巯基的互变来实现其强大的氧化还原调节功能,它与硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phos-

phate, NADPH)一起共同组成 Trx 系统,形成体内重要的氧化还原系统,即 TrxR 在 NADPH 催化下,促使氧化型 Trx 变为还原型 Trx,还原型 Trx 为核糖核苷酸还原酶、蛋白氨基酸硫氧还酶、Trx 依赖性过氧化物酶、酪氨酸磷酸酶提供氢电子,将 H₂O₂还原成 H₂O,进而发挥重要的抗氧化作用^[13,14]。近年来研究表明,Trx 除了直接抑制氧化应激和间接与关键信号转导分子结合而发挥抗氧化,清除 ROS,维持细胞氧化还原平衡外,Trx 在生长调控、神经保护、调节炎症反应、抗凋亡和免疫功能等方面也发挥着多种作用^[15],其中抗凋亡与 Trx 抑制凋亡信号调节激酶 1(ASK1)活性,从而预防应激和细胞因子诱导的细胞凋亡通路最重要^[16]。ASK1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于活性氧敏感的丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK)家族成员之一,在细胞中的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路中,通过磷酸化激活 MAPKK 家族中的 MAPKK3/MAPKK6-p38 和 MAPKK4/MAPKK7-C-Jun NH2-terminal kinase(JNK)途径,使 p38 和 JNK 活化,诱导 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡,因此,ASK1 在细胞因子及应激诱导细胞凋亡过程中起着关键作用,是一种激活 p38 和 c-Jun 氨基末端激酶通路的重要蛋白酶^[17,18]。Trx 是 ASK1 结合蛋白,主要是通过 Cys-32、35 的巯基与 ASK1 的 N-末端的管理域结合,抑制 ASK1 活性,从而阻止 ASK1 依赖的细胞凋亡^[19]。本次进行的中药干预豚鼠 GM 耳毒性外毛细胞损害研究同时,我们检测了各组耳蜗 Trx-1、Trx-2 和 ASK1 表达情况,结果显示,中药能够促进 Trx-1、Trx-2 高表达,同时抑制 ASK1 表达,由此提示,复方健耳剂防治豚鼠 GM 耳蜗外毛细胞损害作用关键机制可能是通过细胞质或线粒体两个途经调控 Trx 系统,维持细胞内氧化还原平衡和抗氧化功能,促进 H₂O₂转化为 H₂O,清除细胞内 ROS,抑制氧化应激反应,阻止 MAPK 通路中 ASK1 激发引起 Caspase 介导的细胞程序性死亡。此外,GM 对照组与正常对照组比较有下调 Trx 表达倾向,提示一定剂量的 GM 可能导致 Trx 系统失衡,从而加重 ROS 的产生和积蓄,最终介导细胞程序性死亡。

本次研究我们采用了琥珀酸脱氢酶染色,对评估线粒体功能,判断细胞生命活动具有一定参考意义,该染色尤其适合全耳蜗毛细胞计数及功能评估,方法科学,结果可靠。本次研究中发现,200 mg/(kg·d) GM 剂量的 GM 对照组动物死亡率较高,因此,GM 对照组系从所生存动物中随机取出纳入正式研究范围,尽管有这样的个体差异,但选择存活下来的动物比较

死亡的动物,说明它们的体质相对一致,而且数据通过了统计学齐性检验,具有对照可比性。另外,中药方中药物不同比例或拆方、最佳用药时间及对后期 GM 耳毒性影响作用等诸多问题与其他机制仍有待今后深入研究、比较和揭示,有关 GM 对照组死亡率和中药抗死亡率准确数据也有待扩大研究进一步总结和确认。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Mukherjea D, Ghosh S, Bhatta P, et al. Early investigational drugs for hearing loss [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2015, 24(2): 201-217.
- [2] 宣伟军,丁大连,蒋海燕,等.复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠 AHL 毛细胞的保护作用[J]. *中华耳科学杂志*, 2016, 14(2): 272-277.
- [3] 宣伟军,丁大连,宣毅,等.复方健耳剂对抗小鼠老年性耳蜗螺旋神经节神经元凋亡效应及机制研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2016, 35(12): 1329-1333.
- [4] 宣伟军,唐俊波,陈壮,等.中药复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠老年性聋的防护效应[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(10): 1247-1251.
- [5] 陈奇主编. *中药药理研究方法学* [M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 1103-1105.
- [6] Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, et al. Ototoxicity: mechanisms of cochlear impairment and its prevention[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(31): 4866-4871.
- [7] Esterberg R, Linbo T, Pickett SB, et al. Mitochondrial calcium uptake underlies ROS generation during aminoglycoside-induced hair cell death[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9): 3556-3566.
- [8] Jiang P, Ray A, Rybak LP, et al. Role of STAT1 and oxidative stress in gentamycin-induced hair cell death in organ of corti[J]. *Otol Neurotol*, 2016, 37(9): 1449-1456.
- [9] Chang MY, Byon SH, Shin HC, et al. Protective effects of the seaweed phlorotannin polyphenolic compound dieckol on gentamycin-induced damage in auditory hair cells[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2016, 83(4): 31-36.
- [10] 王浴生,邓文龙,薛春生. *中药药理与应用* [M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 833-835, 982-998, 190-209, 1146-1152.
- [11] Xuan W, Dong MS, Dong MM. Effects of Compound Injection of *Ryrola rotundifolia* L. and *Astragalus membranaceus* Bge. on experimental guinea pigs' gentamycin ototoxicity[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1995, 104(5): 374-380.
- [12] Staeker H, Zheng QY, Van De Water TR. Oxidative stress in aging in the C57BL/6J mouse cochlea[J]. *Acta Otolaryngol*, 2001, 121(6): 666-672.
- [13] Collet JF, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(8): 1205-1216.
- [14] Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66: 75-87.
- [15] Mahmood DF, Abderrazak A, El Hadri K, et al. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(11): 1266-1303.
- [16] Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(12): 1738-1747.
- [17] Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, et al. The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response[J]. *J Biochem*, 2004, 136(3): 261-265.
- [18] Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(11): 1325-1336.
- [19] Nishida K, Otsu K. The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in cardiomyocyte apoptosis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9-10): 1729-1736.

(收稿: 2017-05-07 在线: 2018-05-10)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶