

· 基础研究 ·

补气剂对豚鼠庆大霉素耳、肾功能损害的干预作用

宣伟军^{1,2} 陈思仲¹ 曾晶晶² 唐俊波¹ 宣毅³ 李彝¹ 王瑜¹

摘要 目的 探讨补气剂对豚鼠庆大霉素(GM)耳、肾功能损害的作用及其机制。**方法** 选择健康杂色成年豚鼠 36 只,随机分为正常组、模型组、补气组各 12 只,均饲养 11 天。正常组常规饲养;模型组注射 GM[200 mg/(kg·d)]至第 9 天,每天 2 次;补气组预先使用补气剂[1.428g/(kg·d)]10 天,人工灌服及自动饮用各半,同时注射 GM[200 mg/(kg·d)]至第 9 天,补气剂共使用 21 天。每组随机选取 6 只豚鼠于第 5、7、9 天检测听性脑干反应(ABR);另外 6 只豚鼠于 11 天后检测耳蜗毛细胞形态学。11 天后检测血清 BUN、Cr;肾脏切片苏木素-伊红染色了解肾组织病理变化;Western Blot 检测肾组织 ASK-1、Trx、HSF-1、Caspase-3 蛋白。**结果** 全耳蜗铺片结果显示模型组各回三排外毛细胞损毁严重,肾组织病理显示肾小球弥漫性增大,近曲小管上皮细胞明显浊肿,补气组有所改善。与正常组同期比较,模型组第 5、7、9 天 ABR 阈值,血清 BUN 和 Cr 水平以及 ASK-1、Caspase-3 表达升高($P < 0.05$),各回三排外毛细胞计数以及 Trx 表达减少($P < 0.05$)。与模型组比较,补气组各回三排外毛细胞计数以及 Trx、HSF-1 表达增加($P < 0.05$),第 9 天 ABR 阈值、血清 BUN 和 Cr 含量以及 ASK-1、Caspase-3 表达下降($P < 0.05$)。与本组第 5 天比较,模型组和补气组第 9 天 ABR 阈值升高($P < 0.05$)。11 天时,与本组第 3 回比较,模型组和补气组第 1 回三排外毛细胞减少($P < 0.01$)。**结论** 补气剂具有一定的保护 GM 诱导豚鼠耳、肾毒性损害的作用,其机制与抑制氧化应激反应有关。

关键词 豚鼠;庆大霉素;耳毒性;肾毒性;补气剂;氧化应激反应

Interventional Effects of Invigorating Qi Agent on Gentamycin-induced Guinea Pigs' Ototoxic and Nephrotoxic Damages XUAN Wei-jun^{1,2}, CHEN Si-zhong¹, ZENG Jing-jing², TANG Jun-bo¹, XU-AN Yi³, LI Shan¹, and Wang Yu¹ 1 Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Clinical Medical College of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530023); 2 Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Ruikang Clinical Medical College of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530011); 3 School of engineering, Tufts university, Medford MA (02155)

ABSTRACT Objective To investigate interventional effects and possible mechanisms of Invigorating Qi Agent (IQA) against guinea pigs' gentamycin (GM)-induced auricular and renal functional damage. **Methods** Totally 36 healthy variegated adult guinea pigs were divided into normal group, model group, IQA group, 12 in each group. The normal group was only conventionally fed until the 11th day. The model group were injected GM 200 mg/(kg·d) for 9 days, two times a day, and feed was terminated at the 11th day. The IQA group took IQA [1.428g/(kg·d), half for artificial filling and half for automatic drinking] for 10 days in advance, and then at the same time, received GM injection at the equal dose for 9 days and feed was terminated at the 11th day. 6 guinea pigs in each group were randomly selected for evaluation of audiology by measuring auditory brainstem response (ABR) at 5th, 7th, 9th day. Another 6 guinea pigs in each group were used to detect morphology of cochlear hair cells at 11th day. Contents of

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

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临床医学院耳鼻咽喉头颈外科(南宁 530011); 3. 美国塔夫斯大学工程学院(Medford MA 02155)

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

DOI:10.7661/j.cjim.20190815.155

blood urea nitrogen (BUN) and Creatinine (Cr) in serum were detected. Inspect renal tissue section by hematoxylin and eosin stain (HE stain) was used to investigate pathological changes of renal tissue. The expressions of thioredoxin (Trx), heat shock factor-1 (HSF-1), apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK-1) and Caspase-3 proteins in renal tissue were detected by Western Blot. Results The results of stretched surface preparation of the whole cochleae showed that three rows of the outer hair cells in each turn from model group were severely damaged. The renal tissue pathology showed renal glomerulus diffuse enlargement, and proximal convoluted tubular epithelial cells displayed marked turbidity and swelling. However, IQA group showed definite improvement. By comparison with the normal group at the same time, the ABR threshold at 5th, 7th, 9th day, contents of BUN and Cr in serum, and expressions of ASK-1 and Caspase-3 increased in model group ($P < 0.05$), but the numbers of three rows of the outer hair cells in each turn and expression of Trx decreased ($P < 0.05$). By comparison with the model group, the numbers of three rows of the outer hair cells in each turn and expression of Trx and HSF-1 increased in IQA group ($P < 0.05$), the ABR threshold at 9th day, contents of BUN and Cr in serum, and expressions of ASK-1 and Caspase-3 decreased in IQA group ($P < 0.05$). By comparison with 5th day at the same group, the ABR threshold at 9th day increased in model group or IQA group ($P < 0.05$). By comparison with the third turn of the same group, the numbers of first rows of the outer hair cells in third turn decreased in model group and IQA group at 11th day ($P < 0.05$). Conclusions IQA had definitely protective effect on GM-induced ototoxic and nephrotoxic damages. Its mechanism was related to inhibiting oxidative stress reaction.

KEYWORDS guinea pig; gentamycin; ototoxicity; nephrotoxicity; Invigorating Qi Agent; oxidative stress reaction

氨基甙类抗生素 (aminoglycoside antibiotics, AmAn) 耳毒性聋是临床因聋致残的主要原因之一, 是耳科界研究的传统重点课题。前期研究表明, 健脾补肾的复方健耳剂具有抑制豚鼠庆大霉素 (gentamycin, GM) 耳毒性外毛细胞损害的作用^[1]。本研究以补气剂作为干预药物, 观察其对耳、肾组织细胞形态和功能影响, 以及硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx)、热休克因子-1 (heat shock factor-1, HSF-1)、细胞凋亡信号调节激酶-1 (apoptosis signal regulating kinase-1, ASK-1)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 等蛋白水平变化, 探讨补气剂在防治豚鼠 GM 耳、肾损害的作用与机制。

材料与方 法

1 动物 36 只健康杂色豚鼠, 体重 250 ~ 300 g, 动物合格证号: SCXK (滇) K2012 - 0002, 由昆明市艾尼莫实验动物养殖中心提供, 清洁级别一级, 实验严格遵守《赫尔辛基宣言》基本原则。

2 药物 补气剂主要由黄芪、人参以 5:1 比例, 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 4.44 g 生药材制剂, 由广西中医药大学附属瑞康医院制药厂制备。按照《中药药理研究方法学》^[2] 实验

动物用量换算法得出单倍剂量 0.357 g/kg, 经预试验研究对比, 最终设定该药的豚鼠实验用量为 1.428 g/(kg · d)。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)。戊巴比妥钠 0.5 g/瓶, 由德国 Merck 提供 (批号: 20161201)。

3 主要试剂及仪器 琥珀酸钠 (批号: 20150110) 由天津科密欧化学试剂有限公司提供; 氯化硝基四氮唑蓝 (批号: 20151112gl) 由 Amresco 提供; 尿素氮 (批号: 20180322)、肌酐试剂盒 (批号: 20180317) 购自南京建成生物工程研究所; 中强度 RIPA 裂解液 (批号: SN338)、蛋白酶抑制剂混合物 (批号: 981532)、100 mmol/L PMSF (批号: 201801011)、蛋白磷酸酶抑制剂混合物 (批号: 216061)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: 20180029) 均由弗德生物公司提供; 5 × 蛋白上样缓冲液 (批号: 13K12B12) 由博士德公司提供; Tris-base (批号: C10197650) 由 Vetec 公司提供; 甘氨酸 (批号: C10197701)、过硫酸铵 (批号: C10037818)、N,N-甲叉双丙烯酰胺 (批号: C10174712) 均由 Macklin 公司提供; 预染蛋白 Marker (批号: 00447205) 由 Fermentas 公司提供; SDS (批号: 2352C062) 由 Amresco 公

司提供;一抗 Anti-ASK1 antibody (批号: GR48990 - 3)、Anti-TRX antibody (批号: GR40112 - 1)、Anti-HSF1 antibody (批号: GR586592)、Anti-Caspase-3 antibody (批号: GR78964 - 1)均由 Abcam 公司提供;二抗 Hrp-Goat Anti-Rabbit IgG (批号: 000000139931)、HRP-Goat Anti-Mouse IgG (批号: 000000140352)均由 Jackson 公司提供。分光光度计由上海奥析科学仪器有限公司生产(型号: UV-1901PC);听性脑干反应测试仪采用美国 TDT 公司的 TDT-III型听觉生理检测系统及 BioSigRP 软件;多功能酶标仪(型号: DG5033A)由南京华东电子集团医疗装备有限责任公司生产;电泳仪(型号: DYY-7C)由北京六一仪器厂生产。

4 动物分组及给药 将 36 只豚鼠按照动物随机盲选法分为正常组、模型组、补气组各 12 只。造模方法根据前期研究成果^[1,3],采用 GM 以 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。模型组动物耳廓反射基本消失,听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)阈值达到 90 dB SPL,耳蜗各回三排外毛细胞呈片状损害,BUN、Cr 升高,肾小球和肾小管病理损害较重。补气组预先连续服用补气剂 10 天,人工灌服及自动饮用各半,然后同时注射 GM 9 天,GM 用量和方法同模型组,第 11 天终止饲养,补气剂共使用 21 天。正常组则按常规饲养至 11 天。

5 取材 每组随机选取 6 只豚鼠用于检测 ABR,观察听功能变化。每组剩余 6 只豚鼠于第 11 天后取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;取心脏血应用分光光度计检测 BUN、Cr,观察肾功能变化;取右侧肾脏用于肾组织切片,应用 HE 染色,观察肾组织病理变化;左侧肾脏用于 Western Blot 检测肾组织 ASK-1、Trx、HSF-1、Caspase-3 蛋白。

6 检测指标

6.1 ABR 检测 采用戊巴比妥钠深度麻醉后移入测听室内的电磁屏蔽箱进行 ABR 检测,其中豚鼠颅顶正中皮下插入参考电极,耳廓后缘皮下插入测试电极,接地电极横向安放在鼻尖处,测试电极阻值小于 1k 欧,ER-10C 耳机固定在受测豚鼠的外耳道口,然后进行短声刺激,以 21 次/s 为重复率,强度范围在 10 ~ 110 dB SPL,叠加 1 024 次,在带通滤波 300 ~ 3 000 Hz,共扫描时间 10 ms,由 BioSigRP 软件汇总记录数据,计算 III 波反应阈值。观察第 5、7、9 天的 ABR 阈值。

6.2 耳蜗毛细胞形态学观察 乌拉坦麻醉后,

心脏抽吸血液用于肾功能指标检测,然后迅速断头,打开听泡取耳蜗用于耳蜗铺片或 RT-PCR 检测,同时取肾脏用于肾组织切片。供 RT-PCR 用动物耳蜗浸泡于 RNA 保护液中,置 -80 °C 冰箱保存备用。肾脏浸入 10% 中性福尔马林固定,置 4 °C 冰箱保存备用。豚鼠耳蜗铺片及染色技术采用前期成功经验及琥珀酸脱氢酶染色技术^[1,4],主要方法是将动物蜗尖钻孔并摘除镫骨同时打开园窗,向耳蜗内灌入琥珀酸脱氢酶染色液,由 0.2 m 琥珀酸钠、0.2 m 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 min 到 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 100、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。

6.3 分光光度计检测 BUN、Cr 血液离心,取上清液作为样品。按照试剂盒说明书操作方法,配置标准加样,分别做成标准管、标准空白管、测定管,其中 BUN 检测条件,各管 37 °C 水浴 10 min,640 nm 波长测定各管吸光度值。Cr 检测条件,各管 37 °C 孵育 5 min,546 nm 波长测定 A1、A2 各管吸光度值。最后按照公式计算出 BUN、Cr 终值。

6.4 肾组织切片染色 肾脏经 10% 中性福尔马林固定后,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。取 5 μm 切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,苏木素染色,盐酸乙醇分色,最后伊红染色。光学显微镜分别在 100、200、400 等放大倍数下观察肾小球、肾小管及细胞等病理改变情况并作对比。

6.5 Western Blot 检测肾组织 ASK-1、Trx、HSF-1、Caspase-3 蛋白 取豚鼠肾组织加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上彻底匀浆,匀浆液转移至离心管,振荡,冰浴 30 min,移液器反复吹打,致细胞完全裂解,离心,收集上清,即为总蛋白溶液。根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明操作,按标准曲线计算出样品蛋白浓度,加入适当体积的蛋白上样缓冲液进行沸水浴,分灌分离胶、浓缩胶,加电泳液,上样电泳(浓缩胶 75 V,分离胶 120 V),经甲醇活化的 PVDF 膜转膜(200 mA,1 h),室温下脱色摇床上用 0.5% TBST 配制的 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h,加入 TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶(或 TBST 溶解的 5% BSA)稀释一抗,4 °C 过夜,在室温下脱色摇床上 TBST 复洗,加入

稀释二抗,室温下孵育 30 min 后,在室温下脱色摇床上 TBST 复洗。常规化学发光显色法进行染色和显色,最后显影和定影,拍照,将胶片进行扫描存档,Im-age J 软件处理系统计算和分析目标带的灰度值。

7 统计学方法 应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较用 LSD-t 检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 ABR 阈值比较(表 1) 与正常组同期比较,模型组第 5、7、9 天 ABR 阈值升高($P < 0.05$)。与模型组同期比较,补气组第 9 天 ABR 阈值下降($P < 0.05$)。与本组第 5 天比较,模型组和补气组第 9 天 ABR 阈值升高($P < 0.05$)。

表 1 各组 ABR 阈值比较 (dBSPL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 5 天	第 7 天	第 9 天
正常	6	56.67 ± 4.08	56.67 ± 4.08	58.00 ± 2.74
模型	6	71.67 ± 11.69 [*]	75.00 ± 10.49 [*]	92.00 ± 8.37 ^{*▲}
补气	6	66.67 ± 5.16	71.67 ± 7.53	80.00 ± 8.94 ^{▲▲}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[▲] $P < 0.05$;与本组第 5 天比较,^{▲▲} $P < 0.05$

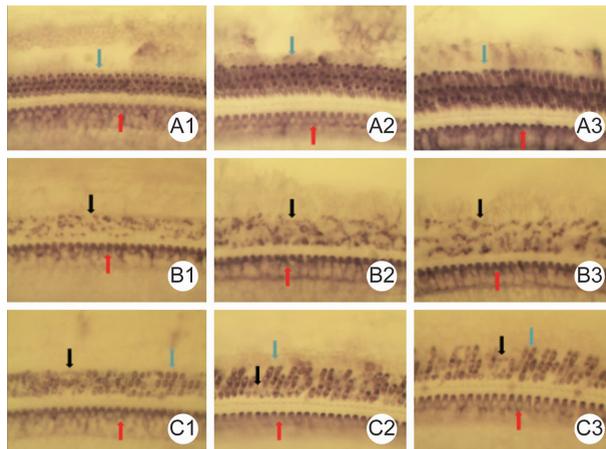
2 各组豚鼠第 11 天全耳蜗铺片结果比较(图 1,表 2) 正常组各回三排外毛细胞以及内毛细胞形态正常,数量完整,排列有序,清晰可辨。模型组各回三排外毛细胞损毁严重,绝大部分细胞出现严重崩解不全,或凋亡缩小,但内毛细胞仍基本存在,清晰可辨。补气组各回三排外毛细胞部分崩解不全,其余存留可辨,内毛细胞保持完整。与正常组比较,模型组各回三排外毛细胞计数减少($P < 0.01$)。与模型组比较,补气组各回三排外毛细胞计数增加($P < 0.01$)。与本组第 3 回比较,模型组和补气组第 1 回三排外毛细胞减少($P < 0.01$)。

表 2 各组各回三排外毛细胞计数比较 (个/0.05 mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 回	第 2 回	第 3 回
正常	6	171.33 ± 3.61	172.17 ± 4.58	176.00 ± 2.28
模型	6	11.83 ± 4.83 [*]	16.17 ± 4.83 [*]	19.17 ± 2.32 ^{*▲}
补气	6	77.33 ± 11.60 [▲]	99.83 ± 8.57 [▲]	93.00 ± 7.29 ^{▲▲}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,[▲] $P < 0.01$;与本组第 1 回比较,^{▲▲} $P < 0.01$

3 各组豚鼠血清 BUN 和 Cr 结果比较(表 3) 与正常组比较,模型组血清 BUN 和 Cr 含量升高($P < 0.05$)。与模型组比较,补气组血清 BUN 和 Cr 含量降低($P < 0.05$)。



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为补气组; 1、2、3 分别表示所在耳蜗第 1、2、3 回位置; 绿色箭头表示外毛细胞, 红色箭头表示内毛细胞, 黑色箭头表示受损外毛细胞

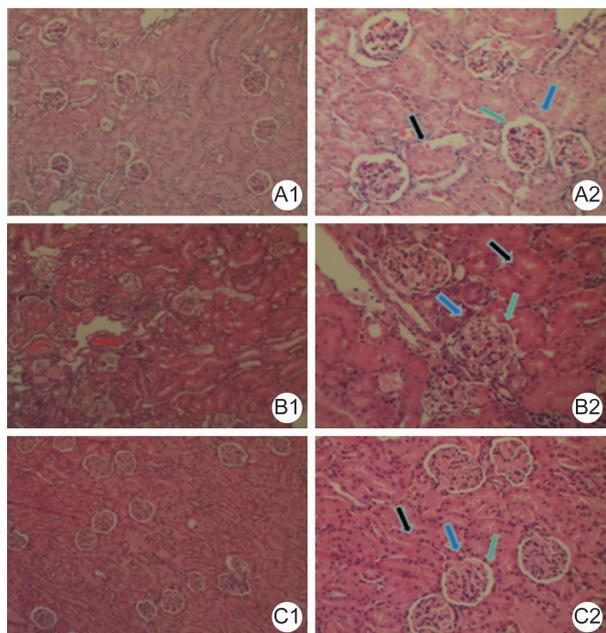
图 1 各组动物第 11 天全耳蜗铺片结果 (琥珀酸脱氢酶染色, ×200)

表 3 各组血清 BUN、Cr 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
正常	6	1.92 ± 0.45	64.49 ± 13.13
模型	6	16.17 ± 2.94 [*]	240.93 ± 60.86 [*]
补气	6	2.89 ± 1.26 [▲]	88.74 ± 18.42 [▲]

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[▲] $P < 0.05$

4 肾脏切片染色结果比较(图 2) 正常组肾皮质、髓质无改变,肾小管结构正常,肾小球毛细血管网



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为补气组; 1、2 分别为放大倍数 ×200、×400; 蓝色箭头示肾小球, 绿色箭头示肾小球囊腔, 黑色箭头示肾小管

图 2 肾组织切片 (HE 染色)

略充血。模型组肾皮质增厚,肾小球弥漫性增大,毛细血管网充血,肾小球内细胞数目明显增多,提示增生改变,部分球囊腔闭锁,或肾球囊及毛细血管间质内可见纤维素及白细胞样渗出物,近曲小管上皮细胞明显浊肿。补气组肾皮质、髓质无明显改变,少量肾小球增大,球囊腔轻度变窄及充血,其内细胞数目稍增多,部分肾小管上皮细胞轻度浊肿,余未见明显改变。

5 各组肾组织 ASK-1、Trx、HSF-1、Caspase-3 蛋白结果比较(表 4) 与正常组比较,模型组 ASK-1、Caspase-3 表达升高($P < 0.05$), Trx 表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,补气组 Trx、HSF-1 表达升高($P < 0.05$), ASK-1、Caspase-3 表达降低($P < 0.05$)。

表 4 各组动物肾组织 ASK-1、Trx、HSF-1 及 Caspase-3 蛋白结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ASK-1	Trx	HSF-1	Caspase-3
正常	6	0.65 ± 0.13	1.11 ± 0.29	0.51 ± 0.21	0.38 ± 0.12
模型	6	1.06 ± 0.17*	0.73 ± 0.17*	0.54 ± 0.22	1.06 ± 0.42*
补气	5	0.78 ± 0.11 [△]	1.04 ± 0.22 [△]	0.82 ± 0.30 [△]	0.61 ± 0.25 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

GM 属于一线 AmAn,其药物毒性作用以耳毒性和肾毒性为主^[5]。研究表明,AmAn 耳毒性毛细胞损害是属于由活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)介导 Caspase 通路,启动细胞死亡级联程序,从而诱导的细胞凋亡^[6,7]。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-氨基甙类复合物,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^[8,9]。其中由 ROS 介导 Caspase 通路则被认为是 ROS 破坏线粒体膜,导致细胞色素 C 流出,启动 Caspase 程序所致^[10],并在细胞质中与 Apaf-1 相结合,形成凋亡复合体,由此启动了下游一系列 Caspases(如 Caspase-3、Caspase-9 等)的活动并迅速完成毛细胞的程序化死亡^[11]。

AmAn 体内代谢动力学,主要从肾脏排出到体外,对肾脏可构成直接损害,可导致急性肾衰竭^[12]。肾病患者,由于肾功能不全或衰竭,应用 AmAn 导致耳毒性损害发病率明显增加^[13,14]。GM 注射大鼠后显示,血清 BUN、Cr 升高,肾组织细胞受到破坏,并且发现肾组织中丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平升

高,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性则下降,提示氧化引起的、ROS 介导的肾损伤是 GM 肾毒性主要机制,而应用抗氧化剂水飞蓟素和褪黑素,对 GM 肾毒性损害起到有效保护作用,进一步证实氧化应急反应、ROS 介导的组织细胞损伤是 GM 肾毒性的重要机制^[15-17]。Trx 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 phosphate, NADPH)一起共同组成 Trx 系统,它是清除 ROS,维持细胞氧化还原平衡,减轻氧化应激反应的体内重要氧化还原系统,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、蛋白蛋氨酸硫氧还酶、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^[18,19]。此外,ASK-1 是有丝分裂原激活的蛋白激酶激酶激酶家族成员之一,它在细胞因子及应急诱导细胞凋亡过程中起着关键作用。Trx 可通过 Cys-32、35 的巯基与 ASK-1 的 N-末端的管理域结合,抑制 ASK-1 活性,从而阻止 MAPK 径路中 ASK1 激发引起 Caspase 家族介导的细胞程序性死亡^[1,20,21]。而 HSF-1 则被认为是编码热休克蛋白基因的上调因子,其减少或缺失都可引起热休克蛋白表达的下调及相关功能减弱,同时也是细胞各种应激反应途径包括细胞自噬、凋亡、免疫应答、生长和分化的主要协调因子^[22]。研究发现^[23],细胞应激反应可通过热休克蛋白(heat shock protein, HSP)70 的表达介导细胞保护作用,从而影响细胞凋亡过程。而细胞应激反应诱导的细胞凋亡通过涉及细胞色素 C、APAF-1 和 Caspase 的生化过程进行。HSP70 防止细胞色素 C/DATP 介导的 Caspase 活化,或直接 APAF-1 结合,阻止 Caspase 向凋亡小体复合体的募集,从而抑制细胞凋亡。有学者对缺血再灌注心肌损伤或心肌梗死研究中显示,通过 HSF-1 的高表达,可减少 ROS 生成,抑制 JNK 磷酸化引起氧化应激下的心肌细胞凋亡^[24]。因此,HSP 在损伤应激后具有直接保护蛋白质合成,维持细胞膜稳定,阻止 Caspase 介导的细胞死亡程序。

受“肾主耳”中医学理论影响,一般中医治聋多从肾论治,鲜有从脾者,但古代中医早有论及脾与耳聋关系理论,如《灵枢·邪气脏腑病形》曰“十二经脉三百六十五络,其血气皆上于面而走空窍,其别气走于耳而为听”。病理上,如《素问·玉机真脏论》曰:“脾为孤脏,……其不及则令九窍不通”。《东垣试效方·卷

五》^[25]的治疗耳聋耳鸣古方一益气聪明汤,重用黄芪和人参,其立意就是从脾论治耳聋耳鸣。据此,本次研究选择具有健脾益气作用的黄芪、人参组成补气剂,并重用黄芪。最新研究显示,在 H₂O₂ 诱导大鼠肝星状细胞氧化损伤模型中,黄芪甲苷具有明显减低肝星状细胞内 ROS 水平、凋亡细胞比例和细胞内 Caspase-3 及 Caspase-9 表达水平,提高肝星状细胞活性,从而保护肝细胞的作用^[26]。而且对纤维状 A β 1-42 诱导的体外血脑屏障模型损伤模型,黄芪甲苷通过显著降低 Caspase-3,提高 ZO-1、Claudin-5、Occludin 蛋白的表达水平,起到抑制 A β 1-42 诱导的脑微血管内皮细胞凋亡及增加其连接蛋白表达而发挥血脑屏障保护作用^[27]。同样,对高糖刺激下人晶状体上皮细胞氧化应激损伤中,黄芪甲苷能够明显抑制高糖诱导的人晶状体上皮细胞内 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达,减少 ROS 生成和氧化损伤细胞^[28]。特别是对麻黄素致小鼠肾组织结构和肾功能损害模型研究中发现,经过黄芪提取物干预后,血中 BUN、Cr,肾组织 Caspase-3、MDA 均明显下降,肾组织 SOD 活性明显增加,肾功能和肾组织结构受到较好保护^[29]。此外,作为补气药之一的人参也具有对抗氧化应激损伤诱导的细胞凋亡作用,其中人参皂苷在鱼藤酮诱导的细胞氧化应激模型中,具有明显上调 SOD 等抗氧化酶活性和 Bcl-2 蛋白表达,抑制细胞色素 c 释放和 Caspase-3 激活,从而阻止细胞凋亡^[30]。人参提取物对大鼠血管性痴呆模型,具有明显上调 bcl-2 和下调 bax 蛋白的表达,海马 CA3 区的行为功能明显改善,神经元密度和血管内皮生长因子等表达增加,保护神经作用^[31]。经过人参提取物预处理的空肠内辐射诱导的细胞凋亡模型,抗凋亡蛋白(bcl-2 和 bcl-xs/l)的表达水平显著增加,促凋亡蛋白(P53、Bax、细胞色素 c 和 Caspase-3)的表达水平显著降低,因此提示,人参提取物通过抑制 p53 依赖途径和线粒体/半胱天冬酶途径来保护小鼠小肠免受辐射诱导的凋亡^[32]。研究证实,大鼠口服红参,能够明显减少顺铂诱导大鼠急性肾衰竭模型血中 BUN、Cr,以及肾组织 MDA、P53,提高 SOD 和 GSH-Px 活性,起到保护肾脏的作用^[33]。

本次研究表明,第 11 天补气组外毛细胞损害比模型组轻,但与正常组比较,差异显著,提示其对豚鼠 GM 耳蜗外毛细胞损害具有一定的保护作用,但没有完全保护。听力 ABR 阈值检测结果显示,与模型组比较,补气组第 9 天 ABR 阈值则明显下降,提示补气组对听力具有一定保护作用。与正常组比较,模型组第 5、7、9 天 ABR 阈值呈现不断升高趋势,说明 GM

使用伴随着天数增加,对听力损害越来越重,补气组 ABR 阈值后期虽然比模型组低,但仍然高于正常组,说明补气组未能完全保护听力,与细胞形态学结果一致。补气组血清 BUN、Cr 值明显低于模型组,组织病理学肾小管和肾小球损害明显轻于模型组,提示补气组对 GM 导致的肾功能和肾组织损害同样具有一定的防护作用。与模型组比较,补气组 Trx、HSF-1 表达升高,ASK-1、Caspase-3 表达降低,其中 GM 导致的肾功能和肾组织损害,以及补气药对抗氧化应激损害部分机制与前述文献报道一致。即提示补气组对 GM 导致的肾毒性损害的防护作用关键分子机制,与其增强 Trx、HSF-1 活性,降低 ASK-1 表达,减轻氧化应激损伤,从而阻止 MAPK 径路中 ASK-1 激发引起 Caspase 家族介导的细胞程序性死亡有关。而促进 GM 排泄,最终减轻 GM 耳毒性,则是其拮抗 GM 耳毒性损害的一个重要机制。

补气剂对 GM 耳毒性损害有一定的保护作用,提示古代中医耳聋治脾理论具有一定的科学依据。另外,复方药物的其他不同比例配伍、单味药应用、不同用药时间和剂量结果如何,尚有待进一步研究探索或揭示。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 宣伟军,黄力毅,韦瑀龙,等. 复方健耳剂干预庆大霉素耳毒性致毛细胞损害豚鼠的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(6): 731-736.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 丁大连,亓卫东,曲雁,等. 内耳形态学研究方法. 内耳科学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010, 50-88.
- [5] Wargo KA, Edwards JD. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity[J]. J Pharm Pract, 2014, 27(6): 573-577.
- [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] Rizzi MD, Hirose K. Aminoglycoside ototoxicity[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 15(5): 352-357.

- [8] Guthrie OW. Aminoglycoside induced ototoxicity [J]. *Toxicology*, 2008, 249(2-3): 91-96.
- [9] 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.
- [10] Bayir H, Fadeel B, Palladino MJ, et al. Apoptotic interactions of cytochrome C: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(5-6): 648-659.
- [11] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 479-489.
- [12] Bruce K, Hicks RW. Perioperative pharmacology: a focus on aminoglycosides [J]. *AORN J*, 2011, 93(4): 464-468.
- [13] Feldman L, Sherman RA, Weissgarten J. N-acetylcysteine use for amelioration of aminoglycoside-induced ototoxicity in dialysis patients [J]. *Semin Dial*, 2012, 25(5): 491-494.
- [14] Chow KM, Szeto CC, Hui AC, et al. Mechanisms of antibiotic neurotoxicity in renal failure [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 23(3): 213-217.
- [15] Ozbek E, Ilbey YO, Simsek A, et al. Rosiglitazone, peroxisome proliferator receptor-gamma agonist, ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. *Int Urol Nephrol*, 2010, 42(3): 579-587.
- [16] Kang C, Lee H, Hah DY, et al. Protective effects of *houltuynia cordata* thunb. on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats [J]. *Toxicol Res*, 2013, 29(1): 61-67.
- [17] Ghaznavi H, Mehrzadi S, Dormanesh B, et al. Comparison of the protective effects of melatonin and silymarin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 2016, 21(4): NP49-55.
- [18] Collet JF, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(8): 1205-1216.
- [19] Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66:75-87.
- [20] Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(12): 1738-1747.
- [21] 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.
- [22] Barna J, Csermely P, Vellai T. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(16): 2897-2916.
- [23] Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock-protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of proCaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(8): 469-475.
- [24] Zhang L, Jiang H, Gao X, et al. Heat shock transcription factor-1 inhibits H₂O₂-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 347(1-2): 21-28.
- [25] 刘河间, 张子和, 李东垣, 朱丹溪著. 金元四大医学家名著集成 [M]. 中国中医药出版社, 1995:617.
- [26] 王键, 宋瑞鹏, 孙丹. 黄芪甲苷对大鼠肝星状细胞氧化损伤的作用研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(9): 1-4.
- [27] 张乐裕, 刘晨阳, 于顾然. 黄芪甲苷对 A β 1-42 诱导的体外血脑屏障模型损伤的影响及机制探究 [J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4099-4105.
- [28] 兰天野, 陈婷, 王彦红, 等. 黄芪甲苷对高糖条件下人晶状体上皮细胞氧化应激的保护作用 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2018, 52(1): 6-10.
- [29] 魏娉婷, 李重阳, 俞诗源, 等. 黄芪(粗)多糖对麻黄素损伤小鼠肾组织结构 and 抗氧化酶活性及 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. *解剖学报*, 2015, 46(4): 564-571.
- [30] González-Burgos E, Fernández-Moriano C, Lozano R, et al. Ginsenosides Rd and Reco-treatments improve rotenone-induced oxidative stress and mitochondrial impairment in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017;109(Pt 1): 38-47.
- [31] Zhu JD, Wang JJ, Zhang XH, et al. Panax ginseng extract attenuates neuronal injury and cognitive deficits in rats with vascular dementia induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(4): 664-672.
- [32] Bing SJ, Kim MJ, Ahn G, et al. Acidic polysaccharide of Panax ginseng regulates the mitochondria/Caspase-dependent apoptotic pathway in radiation-induced damage to the jejunum in mice [J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(3): 514-521.
- [33] Kim YJ, Lee MY, Son HY, et al. Red ginseng ameliorates acute cisplatin-induced nephropathy [J]. *Planta Med*, 2014, 80(8-9): 645-654.

(收稿:2018-08-28 在线:2019-09-09)

责任编辑:邱禹