

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.14.015

补肾聪耳方对药物性耳聋模型大鼠 MAPK 信号通路相关蛋白的影响

关伟, 朱丽军, 郝日雯, 张琪, 李莉*

(山西中医药大学, 山西省太原市晋祠路一段 89 号, 030024)

摘要 目的 探讨补肾聪耳方治疗药物性耳聋的可能作用机制。方法 将 SD 大鼠 24 只随机分为空白组、模型组及中药组各 8 只。模型组和中药组采用肌肉注射硫酸庆大霉素注射液 100 mg/(kg·d) 共 14 天的方法造成药物性耳聋大鼠模型。中药组在造模的同时给予补肾聪耳方 2.2 g/(kg·d) 灌胃, 空白组和模型组给予生理盐水 4 ml/(kg·d) 灌胃。14 天后观察各组大鼠听性脑干反应 (ABR) 阈值, 并测定耳蜗组织丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路相关蛋白 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、细胞外调节蛋白激酶 1 (ERK1)、细胞外调节蛋白激酶 2 (ERK2) 的表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠 ABR 阈值升高, 耳蜗组织 JNK 蛋白表达升高, 而 ERK1 和 ERK2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组大鼠 ABR 阈值降低, 耳蜗组织 JNK 蛋白表达下调, 而 ERK1、ERK2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。结论 补肾聪耳方可能通过调节 MAPK 信号通路相关蛋白的表达, 从而降低 ABR 阈值以治疗药物性耳聋。

关键词 药物性耳聋; 补肾聪耳方; 听性脑干反应; MAPK 信号通路

耳聋是耳鼻喉科临床较为常见的症状, 其发病率高, 其中 0~6 岁患儿的人数每年增加 3 万, 而 0~6 岁因药物致耳聋的儿童在所有聋儿中的占比为 6.34%^[1]。西医学认为不同药物引起的耳聋不尽相同, 其中庆大霉素致聋与开通凋亡信号关系密切, 涉及到 Bcl-2、Caspase、Fas/Fas-L、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等多个信号转导通路^[2-3]。我们根据多年的临床经验总结认为, 药物性耳聋的患者多属肾虚血瘀型^[4], 故以补肾活血法为治则并结合常用方药拟定补肾聪耳方。本研究通过观察补肾聪耳方对庆大霉素致聋大鼠听力的影响及对耳蜗组织 MAPK 信号通路相关蛋白 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 及细胞外调节蛋白激酶 1 (ERK1)、细胞外调节蛋白激酶 2 (ERK2) 的调节作用, 以探讨补肾聪耳方拮抗庆大霉素耳毒性的可能作用机制。

1 材料及方法

1.1 动物

选用耳廓反应灵敏、听性脑干反应 (ABR)

测听正常的健康清洁级 SD 大鼠 24 只, 6~8 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 雌雄各半, 实验动物许可证号: SCXK-(军) 2012-0004, 饲养于中国辐射防护研究院动物房。

1.2 主要药物

补肾聪耳方颗粒由广东一方制药有限公司提供, 方剂组成: 骨碎补 15 g, 山药 15 g, 山萸肉 10 g, 牡丹皮 15 g, 泽泻 10 g, 川芎 10 g, 路路通 10 g, 石菖蒲 10 g, 甘草 10 g。以上颗粒剂溶于无菌生理盐水, 制成含生药 2.2 g/ml 溶液。硫酸庆大霉素注射液, 新乡市常乐制药有限责任公司, 批号: 14061281。

1.3 主要试剂及仪器

PBS 磷酸盐缓冲液 (批号: PAB180003)、裂解液 (批号: PAB180006)、JNK (批号: PAB10013)、ERK1 (批号: PAB10876)、ERK2 (批号: PAB14983) 试剂盒, Bio-Swamp 公司产品; 水合氯醛, 南京建成生物有限公司, 批号: 20151125; β -Actin 抗体, CST 公司, 批号: 4970。ABR 分析仪, ep25 型, 丹麦国际听力公司; 电泳仪, mini protean 3cell 型, Bio-Rad 公司; 全自动化学发光分析仪, Tanon-5200 型, 上海天能科技有限公司。

基金项目: 国家自然科学基金 (81403287); 山西中医学院博士科研启动基金

* 通讯作者: lili306871@126.com, (0351) 8618658

1.4 分组及给药

大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分为空白组、模型组、中药组各 8 只。模型组和中药组参照文献 [6] 中方法建立药物性耳聋大鼠模型, 即每日肌肉注射硫酸庆大霉素注射液 100 mg/(kg · d), 共 14 天, 空白组肌肉注射生理盐水 2.5 ml/(kg · d)。在造模同时, 中药组给予补肾聪耳方 2.2 g/(kg · d) 灌胃, 空白组和模型组予生理盐水 4 ml/(kg · d) 灌胃, 每日 1 次, 共 14 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况观察 主要观察大鼠耳廓反射、体重、体被毛状况、活动状况、饮食、饮水和排便等一般状态。

1.5.2 ABR 测定 [6] 各组大鼠分别于用药前及处死前腹腔注射 10% 水合氯醛 3 ml/kg 进行麻醉, 待大鼠镇静后, 剃毛, 将记录电极放置于颅顶, 参考电极放在耳后, 鼻根部粘贴地极, 选择插入式耳机给声, 以短波刺激, 90 dB 开始, 5 dB 一档下降, 能引起 III 波反应的最小强度为反应阈 (注: 新生儿 ABR 测定一般以 V 波作为 ABR 阈值, 但是有学者认为豚鼠前四波较为明显, 其中 III 波最为高尖 [7], 本实验虽选择了 SD 大鼠, 但从预实验结果分析发现 III 波更具代表性, 因此选择 III 波出现作为阈值), 记录统计数据。

1.5.3 耳蜗组织 JNK、ERK1、ERK2 蛋白测定 采用 Western-blot 法检测。用剪刀沿大鼠颈部剪断, 从枕骨大孔沿头正中中线剪开头骨, 暴露脑组织并去除。沿着正中中线将颅底剪开, 用眼科剪剪断两侧颞岩部, 用手顶起岩尖部, 取出听泡, 分离出耳蜗。剪去耳蜗周围骨质, 用 PBS 缓冲液冲洗耳蜗污渍。

剪碎耳蜗组织, 按每 20 mg 组织加入 150 ~ 250 μ l 裂解液, 匀浆器匀浆直至完全裂解。裂解后的样品进行离心, 取上清, 进行蛋白质定量, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。之后进行上样、电泳、转膜显色等步骤, 按试剂盒操作步骤进行, 结果用与 β -Actin 比值表示。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量资料服从正态分布且方差齐性用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠耳廓反射及一般状态均正常。模型组大鼠耳廓反射减退, 易惊, 毛发脱落, 进食减少, 饮水增多, 体重减轻, 尿量减少。中药组大鼠部分出现以上表现但较模型组均不明显。

2.2 各组大鼠 ABR 阈值比较

表 1 示, 各组大鼠 ABR 阈值在干预前比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。干预后模型组和中药组大鼠 ABR 阈值较空白组明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组干预后比较, 中药组大鼠 ABR 阈值降低 ($P < 0.05$)。各组大鼠干预后 ABR 阈值图见图 1。

表 1 各组大鼠干预后 ABR 阈值比较 (dB SPL, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	干预前	干预后
空白组	8	14.375 $\pm$ 6.232	13.750 $\pm$ 5.175
模型组	8	13.750 $\pm$ 5.825	36.875 $\pm$ 4.581*
中药组	8	13.125 $\pm$ 4.581	23.125 $\pm$ 5.939* Δ

注: ABR, 听性脑干反应; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

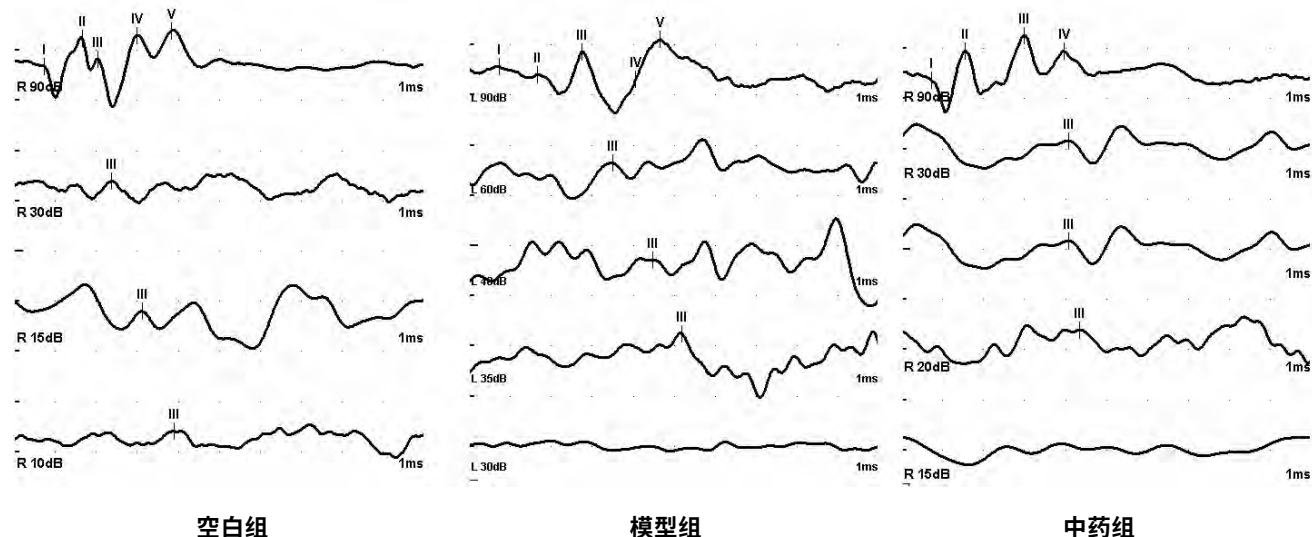


图 1 各组大鼠干预前后听性脑干反应 (ABR) 阈值图

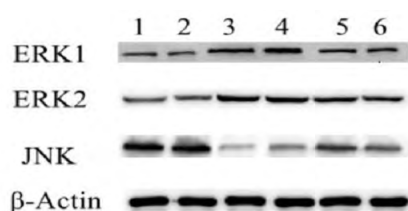
表 2 各组大鼠耳蜗组织 ERK1、ERK2、JNK 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ERK1	ERK2	JNK
空白组	8	0.727 ± 0.105	0.704 ± 0.057	0.242 ± 0.039
模型组	8	0.451 ± 0.024 [*]	0.441 ± 0.012 [*]	0.686 ± 0.055 [*]
中药组	8	0.501 ± 0.128 ^{*△}	0.520 ± 0.007 ^{*△}	0.408 ± 0.047 ^{*△}

注: ERK1, 细胞外调节蛋白激酶 1; ERK2, 细胞外调节蛋白激酶 2; JNK, c-Jun 氨基末端激酶; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠耳蜗组织 JNK、ERK1、ERK2 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组和中药组大鼠耳蜗组织中 ERK1、ERK2 蛋白表达明显降低, JNK 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药组大鼠耳蜗组织中 ERK1、ERK2 蛋白表达升高, JNK 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。各组大鼠耳蜗组织 ERK1、ERK2、JNK 蛋白电泳图见图 2。



注: ERK1, 细胞外调节蛋白激酶 1; ERK2, 细胞外调节蛋白激酶 2; JNK, c-Jun 氨基末端激酶; 1、2 为模型组; 3、4 为空白组; 5、6 为中药组

图 2 各组大鼠耳蜗组织 ERK1、ERK2、JNK 蛋白电泳图

3 讨论

有研究报道, 药物中毒性耳聋在小儿、老年患者及有慢性肾病患者中发病率较高^[8]。我们认为, 此类患者素体虚弱, 肾元亏虚, 药毒浊邪可导致脉络瘀阻, 浊邪上干耳窍, 窍络闭阻, 久而成瘀, 则耳聋产生。补肾聪耳方中骨碎补、山药、山茱萸补益肾气、益肾填精, 肾精、肾气充沛, 髓海得以充养, 则听力灵敏。牡丹皮、泽泻、川芎活血化瘀, 行气通窍。气滞则血瘀, 瘀血不行, 耳失濡养, 气机不畅, 经络阻滞, 气血阴阳不相顺接, 而成耳聋。运用行气活血之品行气通窍, 则耳能闻声。路路通、石菖蒲一通耳窍, 二通经络, 经脉通畅, 则气血津液运行无阻, 双耳能够闻五音。甘草调和诸药, 且能解耳毒性药物之毒。诸药合用可使精气调和, 肾气充足, 髓海得濡, 耳窍气行血活, 闭窍开通。

药物性耳聋的发病机制复杂, 其中与细胞凋亡通道开启关系密切^[9]。MAPK 家族中的 JNK 和多种生物细胞的凋亡有密切联系^[10]。有研究采用强声刺激豚鼠使豚鼠听力下降, 通过检测豚鼠耳蜗中

蛋白发现 JNK 的表达增强, 而大鼠耳蜗的病理切片也提示耳蜗毛细胞减少^[11], 据此认为 JNK 的开启导致了豚鼠耳蜗毛细胞的大量凋亡。MAPK 家族中的 ERK1、ERK2 则能抑制细胞凋亡, 促进细胞存活^[9]。采用腹腔注射顺铂诱导豚鼠产生药物性耳聋的观察则发现, 豚鼠 JNK 蛋白含量明显上升, 而 ERK1、ERK2 则明显下降^[12], 因此认为顺铂所致的药物性耳聋与开启细胞凋亡通道有关。

本研究结果表明, 肌肉注射硫酸庆大霉素注射液后大鼠的 ABR 阈值下降, 而补肾聪耳方干预后 ABR 阈值升高, 说明用硫酸庆大霉素注射液肌肉注射建立药物性耳聋大鼠造模成功, 且补肾聪耳方能有效提高药物所致的听力下降。庆大霉素进入内耳最先损伤耳蜗 Corti's 器, 也会造成耳蜗内、外毛细胞坏死脱落^[13]。本实验通过蛋白印迹法测得 JNK 在模型组大鼠耳蜗中表达升高, 而 ERK1、ERK2 表达降低, 中药组能明显改善模型大鼠耳蜗组织中 JNK、ERK1、ERK2 蛋白的表达, 说明补肾聪耳方能有效拮抗庆大霉素的耳毒性, 降低细胞凋亡因子的表达, 提高促细胞增殖因子的表达, 从而减轻毛细胞的凋亡, 对药物性耳聋起到治疗作用。

参考文献

- [1] 孙喜斌, 魏志云, 于丽玫, 等. 中国听力残疾人群现状及致残原因分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(7): 643-646.
- [2] 马云鹏, 姜学钧, 暴继敏. 庆大霉素致豚鼠耳蜗毛细胞凋亡时 Caspase-3 的表达 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2009, 16(3): 147-149.
- [3] 刘宏伟. 川芎嗪对顺铂诱导大鼠耳蜗毛细胞凋亡的干预机制实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [4] 王俊峰, 李莉, 吕翔, 等. 补肾活血方对肾阳虚大鼠耳蜗组织 JNK mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 758-759.
- [5] 周萍, 张晓彤, 陈彦飞. 针刺内听官穴对庆大霉素致聋大鼠听性脑干反应的影响 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2013, 19(3): 242-243.
- [6] 韩明训, 赵乌兰, 王一鸣, 等. 针刺及川芎嗪对急性药物性聋豚鼠耳蜗内氧自由基生成影响实验研究 [J]. 浙江

中西医结合杂志, 2013, 23(10): 783-784.

[7] GUAN MX. Prevalence of mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity [J]. Volta Review, 2005, 40(6): 440-443.

[8] 王影, 左瑛. 肾开窍于耳与耳毒性药物 [J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(6): 103.

[9] ALHARAZNEH A, LUK L, HUTH M. Functional hair cell mechanotransducer channels are required for aminoglycoside ototoxicity [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22347. doi: 10.1371/journal.pone.0022347.

[10] OHLEMILLER KK. Age-related hearing loss: the status

of Schuknecht's typology [J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 12(5): 439-443.

[1] 薛秋红. 内质网应激反应(ERS)参与强噪声诱导豚鼠耳蜗细胞凋亡的实验研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007: 55-56.

[2] 邢奋丽. 顺铂导致豚鼠耳蜗细胞凋亡和丝裂素活化蛋白激酶信号转导通路在顺铂耳毒性中的作用 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2005.

[3] 卢小东, 缪亦安, 施宁华, 等. BFGF 对豚鼠庆大霉素耳毒性的对抗作用 [J]. 镇江医学院学报, 1997, 7(1): 4-6.

Effect of *Bushen Conger Fang* (补肾聪耳方) on MAPK Signaling Pathway Related Proteins in Drug-induced Deafness Model Rats

GUAN Wei, ZHU Lijun, HAO Riwen, ZHANG Qi, LI Li

(Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Bushen Conger Fang* (补肾聪耳方) in the treatment of drug deafness. **Methods** Totally 24 SD rats were randomly divided into blank group, model group, and herbal medicine group with 8 in each group. The rat model of drug deafness was induced by intramuscular injection of gentamicin sulfate 100 mg/(kg · d) for 14 days in both the model group and the herbal medicine group. The herbal medicine group was given intragastric administration of *Bushen Conger Fang* 2.2 g/(kg · d) at the same time of model building. The blank group and model group were given normal saline 4 ml/(kg · d) by gavage. After 14 days, the auditory brainstem response (ABR) thresholds were observed and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway related proteins c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular regulatory protein kinase 1 (ERK1), expression of extracellular regulated protein kinase 2 (ERK2) were determined. **Results** Compared with the blank group, the ABR threshold was increased in the model group, and the expression of JNK protein in the cochlea tissue was increased, while the expression of ERK1 and ERK2 protein was decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the threshold value of ABR in the herbal medicine group was decreased, and the cochlea was decreased. The expression of JNK protein was down-regulated, while the expression of ERK1 and ERK2 protein was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Bushen Conger Fang* may improve drug deafness by regulating the expression of MAPK signaling pathway related proteins and reducing the ABR threshold.

Keywords drug-induced deafness; *Bushen Conger Fang* (补肾聪耳方); auditory brainstem response; MAPK signaling pathway

(投稿日期: 2017-12-27; 修回日期: 2018-03-18)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986 年(4 张光盘) 480 元; 1987—1994 年(1 张光盘) 260 元; 1995—2004 年(1 张光盘) 280 元; 2005—2013 年(1 张光盘) 300 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632, 网址: <http://www.jtcm.net.cn>