

耳聋胶囊对顺铂耳聋大鼠模型螺旋神经节的保护作用

崔兵¹ 党静静² 卫宏艳² 莫小莹² 范梓阳² 李想² 高盛云² 赵月璇² 刘兴超^{2,3*}

1 景忠山国药(唐山)有限公司

2 河北中医药大学

3 河北省高校中药开发与产业化应用技术研发中心

DOI:10.12238/fcmr.v7i1.12509

[摘要] 本研究旨在探讨耳聋胶囊对顺铂耳毒性引起的听力阈值升高和耳蜗形态变化的预防与治疗作用,同时评估其对氧化应激指标及NRF2、HO-1、NQO1基因与蛋白表达的影响。研究中,SPF级雄性大鼠随机分为6组:空白组、模型组、阳性药组(龙胆泻肝丸1.26g/kg/d)、耳聋胶囊低剂量组(ELJN+L,0.26g/kg/d)、中剂量组(ELJN+M,0.52g/kg/d)、高剂量组(ELJN+H,1.04g/kg/d)。通过听性脑干诱发电位(ABR)测量听力阈值,使用酶联免疫吸附法、硫代巴比妥酸法检测氧化指标,采用HE染色观察耳蜗病理变化,并通过免疫组织化学、PCR、蛋白免疫印迹检测耳蜗螺旋神经节细胞中蛋白表达。结果显示,模型组在16kHz下ABR阈值显著升高,与空白组相比差异具有统计学意义($p<0.01$)。治疗后,高剂量耳聋胶囊组的ABR阈值明显降低,与模型组相比差异显著($p<0.05$),并且中、高剂量组在SOD、CAT、GSH-PX含量上较模型组显著升高,MDA含量显著降低($p<0.01$)。结论表明,高剂量耳聋胶囊可能对顺铂耳毒性有更好的防治效果,具有防治CDDP耳毒性的潜力。

[关键词] 耳聋胶囊; 顺铂; 耳毒性; 螺旋神经节

中图分类号: R745.7 文献标识码: A

Deafness capsule protects spiral ganglion in cisplatin-induced deafness rat model based on NRF2/HO-1/NQO1 pathway

Bing Cui¹ Jingjing Dang² Hongyan Wei² Xiaoxuan Mo² Ziyang Fan² Xiang Li²

Shengyun Gao² Yuexuan Zhao² Xingchao Liu^{2,3*}

1 Jingzhongshan Guoyao (Tangshan) Co., Ltd.

2 Hebei University of Chinese Medicine

3 Hebei University Traditional Chinese Medicine Development and Industrial Application Technology Research and Development Center

[Abstract] The aim of this study is to investigate the preventive and therapeutic effects of deafness capsule on cisplatin ototoxicity induced hearing threshold elevation and cochlear morphological changes, and to evaluate its effects on oxidative stress indicators and the gene and protein expression of NRF2, HO-1, and NQO1. In the study, SPF male rats were randomly divided into six groups: Control group, model group, positive drug group (Longdanxiegan pill 1.26g/kg/d), deafness capsule low dose group (ELJN+L, 0.26g/kg/d), medium dose group (ELJN+M, 0.52g/kg/d), high dose group (ELJN+H, 1.04g/kg/d). Auditory brainstem evoked potential (ABR) was used to measure the hearing threshold, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and thiobarbituric acid method were used to detect the oxidation index, HE staining was used to observe the pathological changes of the cochlea, and immunohistochemistry, PCR and Western blot were used to detect the protein expression in cochlear spiral ganglion cells. The results showed that the ABR threshold of the model group increased significantly at 16kHz, and the difference was statistically significant compared with

the blank group ($p<0.01$). After treatment, the ABR threshold of the high-dose deafening capsule group was significantly lower than that of the model group ($p<0.05$), and the contents of SOD, CAT and GSH-PX in the medium- and high-dose deafening capsule groups were significantly higher than those in the model group, and the content of MDA was significantly lower than that in the model group ($p<0.01$). The results indicate that high dose deafness capsule may have a better prevention and treatment effect on cisplatin ototoxicity and has the potential to prevent and treat CDDP ototoxicity.

[Key words] Deafness capsule; Cisplatin; Ototoxicity; Spiral ganglion

引言

顺铂(cisplatin, CDDP)广泛应用于癌症的治疗,对常见的多种肿瘤,如膀胱癌、睾丸癌、子宫颈癌、肺癌和头颈癌等都具有较好的抗肿瘤效果^[1-2]。研究表明在临床用药过程中,其耳毒性副作用的平均发生率超过60%^[3],也有研究表明,在顺铂的化疗过程中约有50%的患者可能出现永久性听力损伤^[4],主要表现为双侧、渐进性和不可逆的感音神经性听力损失,有些患者还伴有耳鸣,极大降低了患者的生活质量,且目前临床上尚无有效预防和治疗其耳毒性的措施。因此近年来防治顺铂耳毒性的研究已引起广大医学科学家的关注^[5]。

随着中医药的发展蒸蒸日上,运用中医药手段改善顺铂毒性的报道逐渐增多^[6]。耳聋胶囊是由耳聋丸经现代制药工艺加工而成的一个中成药,耳聋丸记载于2020年版《中国药典》^[7],主要是由龙胆草、栀子、菖蒲、当归、泽泻等10味中草药组成,有清肝泻火、利湿通窍等功效^[8-9],方中以龙胆草为君,泻肝胆之火,清下焦湿热;黄芩、栀子味苦性寒,可增强泻肝胆之火的功效;泽泻、木通、菖蒲有淡渗宣湿之功效,可助君药清湿热;菖蒲和羚羊角均可开窍安神、解毒;当归、生地黄可养血滋阴,改善肝火郁滞;炙甘草调和诸药。^[10]临床常用于治疗头晕头痛、耳聋耳鸣和耳内流脓等病症^[7]。药理研究发现耳聋胶囊有镇痛、抗炎、抗氧化的作用^[11],顺铂耳毒性的机制与活性氧(ROS)的积累密切相关^[6],由于目前没有关于耳聋胶囊抑制CDDP大鼠耳毒性的报道,故本研究探讨了耳聋胶囊基于NRF2/HO-1/NQO1通路对顺铂耳聋大鼠模型螺旋神经节的保护作用,可为耳聋胶囊用于临床防治CDDP化疗导致的听力损失提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取SPF级雄性大鼠,6~7周体重180~200g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001。饲养于河北中医学院SPF级动物饲养中心,自喂食水,室内温度21℃,相对湿度40%~60%,光照时常昼夜交替12h/12h。

1.2 试剂

耳聋胶囊由河北唐山景忠山国药(唐山)有限公司提供,产品规格:0.42g*12*2板,批号:国药准字Z20030026;龙胆泻肝

丸产品规格:6g*12袋/盒,购于北京同仁堂制药有限公司,批号:国药准字Z11020653;顺铂购于毕德医药,货号:BD121788-1g;SOD、CAT、MDA和GSH-PX试剂盒购于(南京建成生物工程研究所,货号:A001-1、A007-1、A003-1、A005);2.5%戊二醛(北京索莱宝公司,SP0041);NRF2、HO-1、NQO1抗体(江苏AFFINITY BIOSCIENCES,货号:AF0639、AF5393、DF6437);内参GAPDH抗体(BIOWORLD,货号:AP0063)。

1.3 方法

1.3.1 造模与分组

将SD大鼠^[12]随机分为6组,分别为:空白组、模型组、阳性药组(龙胆泻肝丸1.26g/kg/d)、耳聋胶囊低剂量组(ELJN+L, 0.26g/kg/d)、耳聋胶囊中剂量组(ELJN+M, 0.52g/kg/d)、耳聋胶囊高剂量组(ELJN+H, 1.04g/kg/d)。除空白组外,其余五组均顺铂腹腔注射6次构建顺铂耳聋模型,间隔给药三天一次,三次为一个周期,停一周再重复给药一个周期,每次2.5mg/kg。

1.3.2 听性脑干诱发电位(ABR)

首先将大鼠麻醉,然后用酒精擦拭大鼠的颅顶中点、检测耳耳后、对侧耳耳后,分别放置记录电极、参考电极、地线,并将扬声器置于距受刺激侧耳廓10cm的位置,采用TDT RZ6/BioSigRZ系统收集ABR,click为刺激音,声刺激从90dB开始,之后10dB递减,接近阈值时5dB递减,直至能分辨出III波的最低刺激强度来确定反应阈值。

1.3.3 酶联免疫吸附实验

取治疗后的大鼠血清,将血清离心后取上清,接着按照试剂盒说明分别测定SOD、CAT、MDA和GSH-PX的含量,测定SOD时用黄嘌呤氧化酶法;测定MDA时用硫代巴比妥酸法。

1.3.4 HE染色

参照以前方法^[13],取出大鼠耳蜗,从蜗尖缓慢灌注4%多聚甲醛固定液,而后将耳蜗泡于4%多聚甲醛内固定24小时,脱钙一个月,之后用不同梯度酒精脱水,然后浸蜡,包埋,进行切片。苏木精-伊红染色,最后显微镜下观察耳蜗病理改变。

1.3.5 免疫组织化学

石蜡切片烘干1小时,温度设置60℃,然后采用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,使用柠檬酸钠缓冲液在180℃下反应90s后室温冷却,接着进行H2O2溶液封闭,1XPBS漂洗,山羊血清封闭,

用抗体稀释液按照1:1000比例分别稀释Nrf 2与HO-1抗体,4℃过夜,1XPBS漂洗,Bio-羊抗兔IgG按照1:100比例配置工作液;链霉素亲和素-POD工作液4℃孵育1h;加显色液等组织颜色在显微镜下变为棕褐色时,用蒸馏水洗涤终止反应;苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,光学显微镜下观察蛋白表达情况并拍照。

1.3.6 PCR检测

ABR测试后,将大鼠迅速断头取出耳蜗组织,每2个耳蜗合为一份样本,按试剂盒说明书步骤操作提取耳蜗中总RNA,用反转录试剂盒将每组0.1 μg的RNA合成c DNA。以此c DNA为模板,利用以下引物:GAPDH(上游引物:5'-CTGGAGAACCTGCCAAGTATG-3',下游引物:5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3')NRF2(上游引物:5'-AATTGCCACCGCCAGGACT-3',下游引物:5'-TCAAACTTCTCGACTTACCCC-3');HO-1:(上游引物:5'-CAGCATGTCCAGGATTGTC-3',下游引物:5'-CCTGACCCTTCTGAAAGTTCCTC-3'),NQO1:(上游引物:5'-GCGGTGAGAAGACCCCTGAT-3',下游引物:5'-GCTCCCTGTGATGTCGTTTC-3'),以及SYBR-GREEN荧光探针加入到荧光定量PCR反应体系中。设置反应条件为95℃15s,60℃30s,40个循环。记录达到荧光阈值时的循环次数(cycle threshold, Ct值),所有样本同时对目的基因和内参基因进行扩增,每组设3个样本,每个样本设置3个重复孔。数据分析利用2-△△Ct法。^[14]

1.3.7 蛋白印迹法

参照文献方法^[15],将耳蜗组织捣碎混匀,然后依次进行蛋白提取、蛋白电泳、蛋白转膜、膜封闭、孵育与检测的过程。

1.3.8 统计学方法

使用SPSS 25.0软件处理数据,多组数据比较采用单因素方差分析和Dunnett多重比较检验,所有数据均重复3次以上,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ABR听力阈值结果

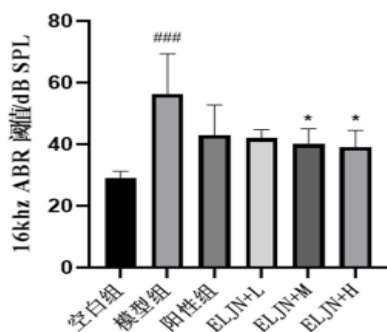


图1 大鼠ABR阈值变化

注:与空白组比较,###P<0.01,与模型组比较,*P<0.05。

在16KHZ下与空白组相比,模型组ABR阈值升高,差异有统计学意义(p<0.01)。与模型组比较,阳性药组、耳聋胶囊低剂量组治疗后ABR阈值差异无统计学意义(P>0.05),中、高剂量组ABR阈值均明显降低,差异有统计学意义(P<0.05),见图1。

2.2 血清中SOD、CAT、GSH-PX和MDA的含量

模型组较空白组SOD、CAT、GSH-PX含量均显著降低(P<0.01),MDA含量显著上升(P<0.01),耳聋胶囊各组较模型组SOD、CAT、GSH-PX含量均显著升高,特别是中、高剂量组更明显(P<0.01),MDA含量显著降低(P<0.01),见图2。

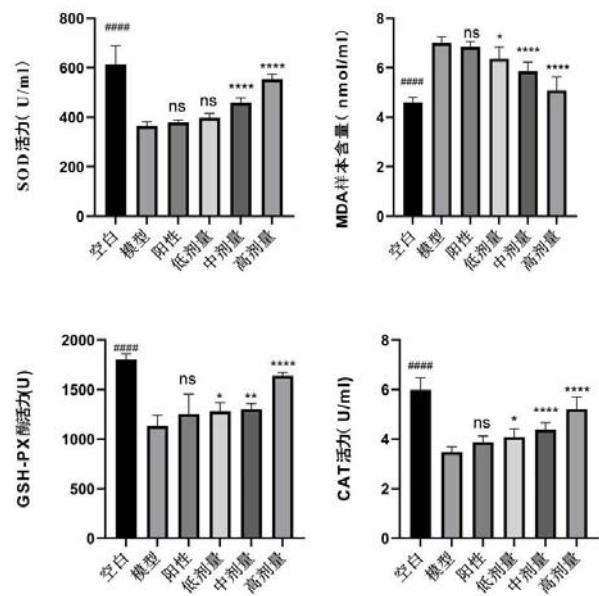


图2 各组血清中SOD、CAT、GSH-PX和MDA的含量变化

注:与空白组比较,####P<0.001,与模型组比较,***P<0.001,**P<0.01,*P<0.05。

2.3 大鼠耳蜗形态学观察

表1 两组大鼠耳蜗形态学观察对比

组别	耳蜗排列	毛细胞数量	螺旋神经节数量
空白组	规则	正常	正常
模型组	不规则	大量减少	减少

与模型组相比,给药组大鼠耳蜗毛细胞虽然出现不同程度减少,但排列尚规则,螺旋神经节数量轻微减少,核质固缩,见图3。

2.4 螺旋神经节细胞中Nrf2和HO-1的表达

在螺旋神经节细胞的胞浆中,Nrf2、HO-1蛋白呈棕褐色表达,模型组较空白组Nrf2、HO-1蛋白表达显著降低;耳聋胶囊各组

较模型组Nrf2、HO-1蛋白表达明显上调,中高剂量较明显。见图4、图5。

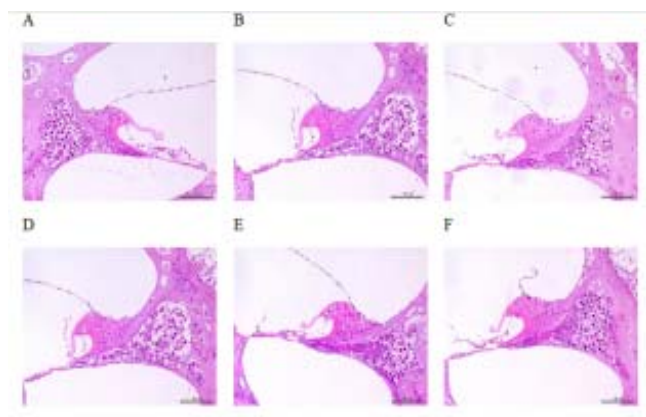


图3 各组大鼠耳蜗形态结构变化

注: A: 空白组, B: 模型组, C: 阳性药组, D: 耳聋胶囊低剂量组, E: 耳聋胶囊中剂量组, F: 耳聋胶囊高剂量组

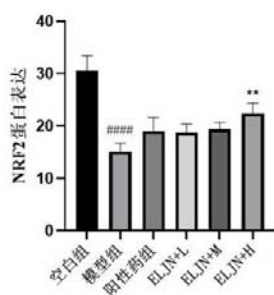
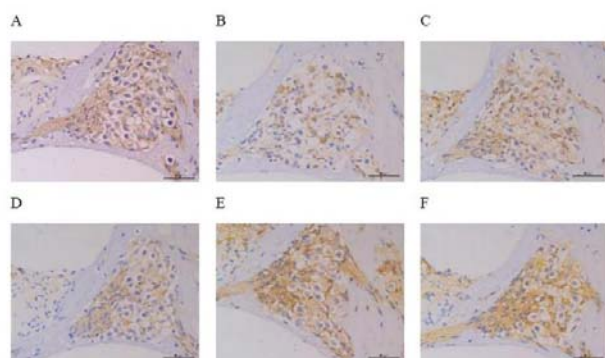


图4 各组螺旋神经节细胞中Nrf2蛋白表达情况

注: A: 空白组, B: 模型组, C: 阳性药组, D: 耳聋胶囊低剂量组, E: 耳聋胶囊中剂量组, F: 耳聋胶囊高剂量组

2.5 耳聋胶囊对大鼠耳蜗内NRF2、HO-1与NQO1mRNA表达水平的影响

与空白组相比, 顺铂组NRF2、HO-1与NQO1mRNA的表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 耳聋胶囊高剂量组与顺铂组相比, NRF2、HO-1与NQO1mRNA表达量显著升高 ($P < 0.01$); 耳聋胶囊中剂量组与顺铂组相比, NRF2、HO-1与NQO1mRNA表达量升高 ($P < 0.05$); 耳

聋胶囊低剂量组与顺铂相比, NRF2、HO-1与NQO1mRNA表达水平均无明显变化 ($P > 0.05$), 见图6。

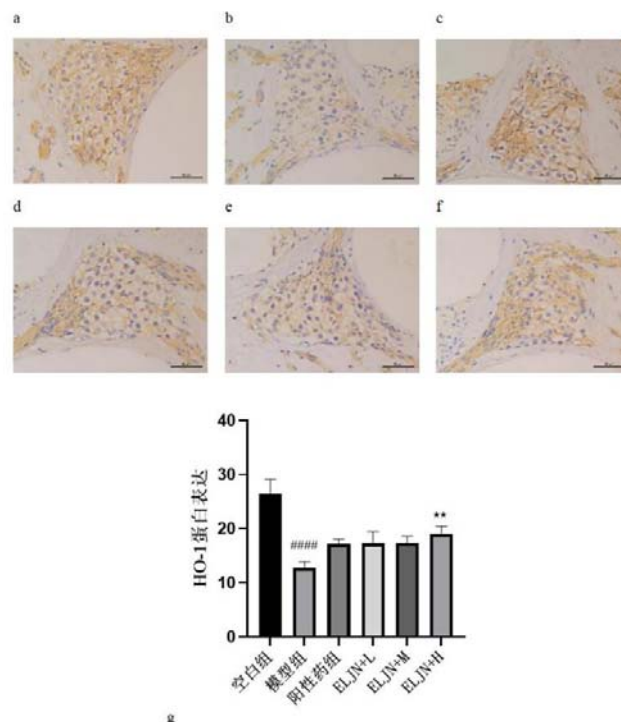


图5 各组螺旋神经节细胞中HO-1蛋白表达情况

注: a: 空白组, b: 模型组, c: 阳性药组, d: 耳聋胶囊低剂量组, e: 耳聋胶囊中剂量组, f: 耳聋胶囊高剂量组

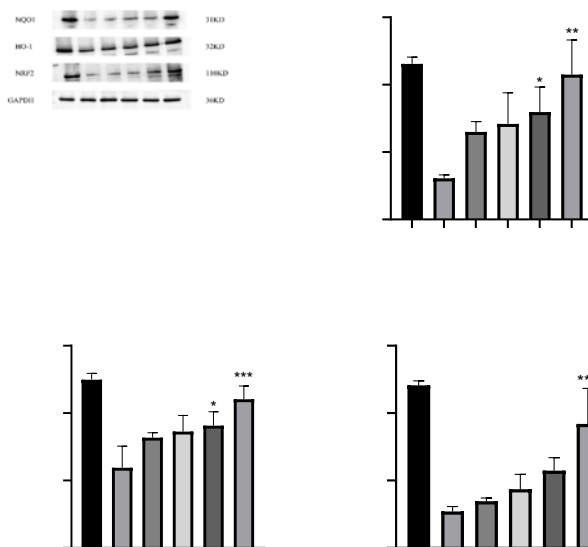


图6 大鼠耳蜗内NRF2、HO-1与NQO1mRNA表达水平

注: 与空白组比较, #### $P < 0.001$, 与模型组比较, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

2. 6耳蜗组织中Nrf2、HO-1和NQO1蛋白的表达

模型组较空白组Nrf2、HO-1和NQO1的表达水平均显著降低($P < 0.01$), 耳聋胶囊各组较模型组Nrf2、HO-1和NQO1的表达均有不同程度的升高, 高剂量组较显著($P < 0.01$), 见图7。

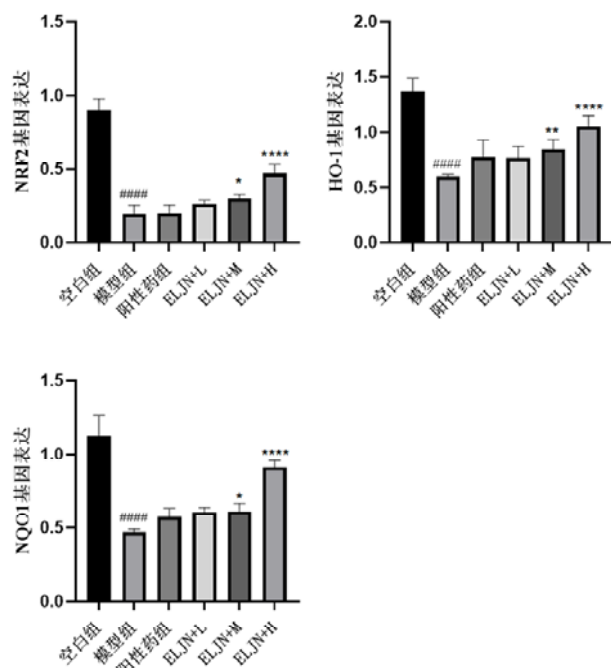


图7 各组大鼠耳蜗中组织Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达的情况

注: 与空白组比较, #### $P < 0.001$, 与模型组比较, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

顺铂是临床常用的一线抗肿瘤化疗药物, 但因其具有耳毒性, 能够引起螺旋神经节的退变, 导致内耳毛细胞的广泛损伤^[16], 通过对耳蜗毛细胞、螺旋神经节和血管纹造成不可逆性的损伤而引发听力损失^[17]造成药物性耳聋, 故其在临床上的使用广受限制。减少和预防顺铂引起的耳毒性, 成为了广大医学科学工作者临床研究的热点。前面所说的药物性耳聋是属于西医的范畴, 而据中医文献记载应属于“毒聋”的范畴, 即外邪(指药毒)入里损伤耳窍之听觉功能^[18]。现代研究表明顺铂致听力损失的主要机制是活性氧的积累^[16], 而耳聋胶囊通过多靶点和多通路治疗耳聋, 其作用机制可能与抗炎、抗氧化、调节免疫、改善循环等方面有关, 通过实验可以看出使用耳聋胶囊治疗后活性氧的积累明显减少。

本研究主要是考察耳聋胶囊的预防和治疗作用对顺铂耳毒性听力阈值和耳蜗形态结构的影响, 同时也考察了相关氧化指标和组织NRF2、HO-1、NQO1基因与蛋白表达的影响。实验证实了, 与对照组相比, 模型组ABR阈值在16KHz下明显升高。血清中MDA含量升高, SOD、CAT、GSH-PX含量降低, 螺旋神经节细胞超微结构明显破坏, 内、外毛细胞形态紊乱, 数量大量丢失, NRF2、HO

-1和NQO1基因与蛋白表达均下调。经不同剂量耳聋胶囊治疗后, 与模型组比较, ABR阈值明显降低, MDA含量降低, SOD、CAT、GSH-PX含量升高, 螺旋神经节超微结构明显改善, 内、外毛细胞形态清晰, 数量逐渐增多, NRF2、HO-1和NQO1基因与蛋白表达均上调。综上所述, 耳聋胶囊高剂量对顺铂耳毒性的防治作用效果可能更优, 更具有防治CDDP耳毒性的潜力。

[基金资助]

河北省重点研发计划项目(20373001D)。

[参考文献]

- [1]王岩, 韩锋产. 顺铂耳毒性的研究进展[J]. 中华耳科学杂志, 2023, 21(03): 401-404.
- [2]李永奇, 曾祥丽, 丁大连, 等. 顺铂耳毒性小鼠模型的建立[J]. 中山大学学报(医学版), 2019, (02): 179-186.
- [3]田雨鑫, 李壮壮, 王菁菁, 等. CACNA2D3在顺铂诱导HEI-OC1细胞凋亡中的作用及机制研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2022, 30(03): 287-292.
- [4]梁峥嵘, 程贵, 张涛, 等. 顺铂耳毒性与自噬关系的研究进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, (02): 189-192.
- [5]肖洪丽, 杜梅, 骆文龙, 等. 阿司匹林对顺铂损伤豚鼠耳蜗螺旋神经节HO-1表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2020, (08): 1169-1173.
- [6]安澜, 黄盈, 戴雨晨, 等. 中医药对顺铂耳毒性的防治作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2022, (05): 452-460.
- [7]李偲, 张东旭, 刘羽康, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS-MS法的耳聋胶囊化学成分辨析及归属[J]. 中成药, 2022, 44(1): 132-141.
- [8]彭小园, 陈子月, 崔兵, 等. 耳聋胶囊HPLC指纹图谱建立及5种成分测定[J]. 中成药, 2022, 44(03): 718-723.
- [9]林敏, 郑英松. 耳聋胶囊联合长春西汀对突发性聋患者听力功能、血液流变学及T淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国基层医药, 2022, 29(8): 1163-1167.
- [10]赵小燕, 李海涛, 佟恒博. 耳聋胶囊联合鼠神经生长因子治疗突发性耳聋临床观察[J]. 湖北中医药大学学报, 2021, 23(1): 80-82.
- [11]唐慧玲, 郭家亮, 王园. 耳聋胶囊联合甲泼尼龙治疗突发性耳聋的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(01): 130-134.
- [12]胡鹏刚, 田克勇, 毛小波, 等. 顺铂耳毒性大鼠耳聋模型的研究[J]. 现代生物医学进展, 2021, (23): 4412-4416.
- [13]周晓丹. 补肾通窍方对肾阴虚大鼠耳蜗组织ERK1/2表达的影响的实验研究[D]. 山西中医药大学, 2019.
- [14]马婷婷. 葛根素对顺铂诱导小鼠耳毒性的防护作用研究[D]. 锦州医科大学, 2019.
- [15]王青玲, 张梦娴, 周颖东, 等. 银杏叶提取物通过Nrf2/HO-1信号通路减轻老年性聋大鼠耳蜗氧化应激损伤的机制[J]. 实

用医学杂志,2022,38(03):311-317.

[16]雷文静,陆菲,米文娟,等.银杏叶提取物保护顺铂致小鼠 HEI-OC1 细胞损伤的作用及机制研究[J].听力学及言语疾病杂志,2019,27(05):519-523.

[17]张钰倩,姜文君,吕昊,等.甘草酸抑制C57BL/6J小鼠耳蜗炎症减轻顺铂诱导的耳毒性[J].中国病理生理杂志,2024,40(02):291-300.

[18]冷辉,张琦,孙海波.从“瘀毒伤络”理论探讨顺铂致药

物性耳聋机制[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(10):1456-1458.

作者简介:

崔兵(1984--),男,汉族,河北人,学士,工程师,研究方向:中药组分研究。

*通讯作者:

刘兴超(1980--),男,汉族,河北人,副教授,研究方向:中药制剂新技术及医药健康产业化。