

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201303005

· 论著 ·

石杉碱甲对 D-半乳糖诱导老年性聋大鼠听觉功能的影响评估

孔德秋¹, 顾健¹, 李聪¹, 阮清伟², 敖华飞¹

(1 上海交通大学医学院附属第三人民医院耳鼻咽喉科, 上海 200025; 2 复旦大学附属华东医院中心实验室, 上海 200040)

摘要: **目的** 通过测试听性脑干反应和复合动作电位评估石杉碱甲对 D-半乳糖致老年性聋大鼠听觉功能的改变。**方法** 出生后 3~4 W 的 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 3 组, 模型组用 5% D-半乳糖 (200 mg/kg) 行颈背部皮下连续注射 8 W 制备大鼠老年性聋模型; 干预组用 5% D-半乳糖 (200 mg/kg) 和石杉碱甲 (0.1 mg/kg) 行大鼠颈背部皮下注射; 空白组作为对照。用药前、后分别检测大鼠听性脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) 以检测听觉敏感性; 复合动作电位 (compound action potential, CAP) 测试耳蜗输出幅度; 以成对短声 (pair clicks) 为时间紧张性刺激, 通过各 CAP2/CAP2 (20 ms) 比值与短声间隔的关系函数反映耳蜗时间分辨能力。 β -半乳糖苷酶染色下丘衰老细胞。**结果** 3 组动物用药前后 ABR 阈值无明显改变 ($P > 0.05$); 和模型组相比, 干预组 8 kHz 下 80 dB SPL 时 ABR III 波潜伏期、I~V 波间期缩短, 提示听觉信号从外周到中枢的传入时间减少; 以成对短声 CAP 响应所代表的耳蜗时间分辨力干预组高于模型组, 但仍低于对照组; 模型组下丘衰老细胞密度最高, 干预组次之, 对照组最少。**结论** 石杉碱甲可以提高 D-半乳糖致老年性聋大鼠与言语识别相关的听觉处理能力, 为临床寻找改善老年患者听觉功能药物提供实验支持。

关键词: 石杉碱甲; D-半乳糖; 老年性聋; 听性脑干反应; 复合动作电位

中图分类号: R764.43; 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2013)03-0199-05

Effect of Huperzine A on auditory function of presbycusis rats induced by D-galactose

KONG De-qiu, GU Jiang, LI Cong, et al.

(Department of Otolaryngology, Affiliated NO. 3 People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of Huperzine A on auditory function of presbycusis rats induced by D-galactose through examinations of auditory brainstem response (ABR) and compound action potential (CAP). **Methods** Postnatal 3-4 weeks SD rats were randomly divided into three groups. Rats in the model group were subcutaneously injected with 200 mg · kg⁻¹ D-galactose daily for 8 weeks, and rats in the treatment group received both D-galactose (200 mg · kg⁻¹) and Huperzine A (0.1 mg · kg⁻¹) as the same way as the model group. Normal saline of the same volume as that of the model group was applied to the animals of the control group. Auditory sensitivity was evaluated using ABR and cochlear output amplitude was assessed using CAP. CAP was also recorded in response to time-stress stimuli (paired clicks with varied stimulus interval, ISI). The cochlear temporal processing ability was reflected by the changes of ratio of CAP2/CAP2 (20 ms) to the second click as a function of ISI. **Results** After interventions, the thresholds of ABR in all the three groups were insignificant changed ($P > 0.05$). However, compared with the model group, the ABR latencies of wave III and I~V interpeak latencies in the treatment group were shortened. Correspondingly, CAP detection via paired click showed that sensitivity of temporal

resolution in the treatment group was better than that of the model group, but worse than that of the control group. Meanwhile, the number of senile cells in the inferior colliculus in the treatment group was significantly less than that in the model group. **Conclusions** Huperzine A is likely to improve the auditory processing ability related to the speech recognition, which is the experimental support to look for the drug that can ameliorate the auditory function of presbycusis.

Key words: Huperzine A; D-galactose; Presbycusis; Auditory brainstem response; Compound action potential

老年性聋 (Presbycusis) 又称年龄相关性听力下降,是指随着年龄增加,双耳听力对称性、进行性下降,以高频听力下降为主的感音神经性听力损失。其中言语识别能力的损害早于听敏度的损失,且随年龄的增长损失程度不成比例增加。这使得言语识别障碍特别是噪声环境下的言语识别障碍成为老年性聋最主要的功能性障碍^[1]。但迄今为止,老年性聋的防治仍然是尚未解决的难题,近年来最重要的进展是认同氧化应激,即自由基介导的线粒体损伤作为衰老的核心机制之一^[2]。石杉碱甲 [(-)-Huperzine A, Hup A] 是我国科学家刘嘉森于1986年从民家草药千层塔(蛇足石杉)中分离得到的一种新型石松类生物碱有效单体。研究证实,石杉碱甲具有多靶点作用,除抑制乙酰胆碱酯酶活性外,还可以通过抗氧化应激和抗凋亡途径对神经元产生保护作用,因此我们推测 Hup A 是否可以通过抑制机体氧化应激达到治疗老年性聋的目的。本实验拟通过大鼠注射 D-半乳糖模拟机体衰老机制,制备老年性聋模型,观察 Hup A 是否能够延缓或改善动物的听觉功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠(3~4 W)45只,体重为(200±2.4)g,购自上海复旦大学实验动物科学部,动物合格证编号为 SCXK(沪)2009-0019。耳廓反射灵敏,动物均无强噪声暴露及耳毒性药物使用史。石杉碱甲(商品名:双益平)购于上海复旦复华药业有限公司(批号:090504),D-半乳糖购于美国 Sigma 公司,衰老特异性 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购于上海碧云天生物技术研究, TDT 系统 III (RZ6, Tucker-Davis Technology, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备及分组 所选45只3~4周

SD 大鼠适应性喂养1周,按照随机数字表法平均分为3组,具体如下:①模型组(D-gal组):15只,用5% D-半乳糖(200 mg/kg)对SD大鼠进行颈背部皮下,共8 W。②干预组(D-gal + HupA组):15只,5% D-半乳糖(200 mg/kg)和石杉碱甲(0.1 mg/kg)配成与D-gal组同体积溶液予颈背部皮下注射,共8 W。③对照组(Control组):15只,予以同体积生理盐水颈背部皮下注射,共8 W。

1.2.2 功能测试 大鼠经戊巴比妥(80 mg/kg)腹腔注射麻醉,在声电屏蔽室内接受功能测试,测试中由恒温加热垫维持体温。刺激信号的产生和诱发电位记录均由 TDT 系统 III 完成。ABR 刺激信号为 10 ms 短纯音,上升/下降时间 0.5 ms,重复率 21.1 次/s。测试频率范围 2~48 kHz,倍频程步距。在每个频率,测试从 90 dB SPL 开始,以 III 波存在的最低声强为反应阈值(peak III)。电极经由皮下针引导,颅顶正中为记录电极,两侧耳后为参考电极和接地电极。CAP 刺激信号为成对短声(pair clicks),通过改变短声之间刺激间隔(ISI)产生时间压力(time stress)。成对短声重复率为 11.1 次/s,ISI 依次为 20,10,6,4,2,1 ms,刺激强度为 90~50 dB SPL。记录电极由银丝电极引导,经手术放置于圆窗。保留动物耳廓,暴露听泡,用注射器打孔,暴露圆窗,显微镜下将银丝电极一端放入圆窗内。参考电极置于动物的眉弓之间,接地电极置于动物同侧前肢。生物电信号由电极导入 RA16PA 前置放大器,带通滤波为 100~3000 Hz,ABR 叠加 1 000 次,CAP 叠加 100 次。

1.2.3 衰老特异性 β -半乳糖苷酶染色 衰老细胞 功能测试之后,戊巴比妥 80 mg/kg 腹腔注射麻醉,开胸心脏先后灌入生理盐水和 4% 多聚甲醛,按《大鼠脑立体定位图谱》取出下丘后固定于 4% 多聚甲醛中过夜,置于 30% 蔗糖溶液中至组织块下沉。所有组织块均在液氮中保存,在 -20°C 的恒冷切片机上 5 μ m

的连续冠状切片,制作冰冻切片。取适当体积的β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定15 min。用PBS浸泡洗涤组织3次,每次不少于5 min,吸除PBS,加入适当量的染色工作液,按细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒(Senescence-Galactosidase Staining Kit)配置,37℃孵育过夜,光学显微镜下观察。

1.3 统计学处理

采用SPSS 12.0软件进行统计学处理,实验结果符合正态分布,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ABR 阈值

表1所示用药前后各组动物ABR阈值,结果显示3组动物用药前后ABR阈值无明显改变($P > 0.05$),表明D-半乳糖制备的老年性

聋模型听力敏感度无明显降低。选择3组动物8kHz下80dB SPL的ABR(图1),计算III波潜伏期、I~V波间期(interpeak latency, IPL),结果如表2所示,模型组波潜伏期和波间期最长,干预组次之,对照组最短。提示和干预组比较,模型组大鼠听觉信号由外周到中枢的传人时间延长,中枢对声音的加工过程缓慢。

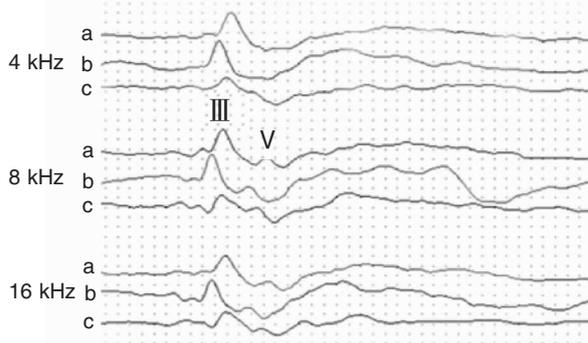


图1 3组动物短纯音下4、8、16kHz下ABR图形 a: D-gal组;b: Control组;c: D-gal + Hup A组

表1 用药前各组动物ABR阈值 (dB SPL, $\bar{x} \pm s$)

组别	术前			术后		
	4kHz	8kHz	16kHz	4kHz	8kHz	16kHz
Control组	31.34 ± 4.94	22.68 ± 5.15	16.36 ± 8.38	30.06 ± 3.79	20.16 ± 4.67	15.64 ± 4.51
D-gal组	30.97 ± 4.17	22.15 ± 3.14	15.96 ± 5.23	30.41 ± 4.51	23.04 ± 5.15	16.71 ± 4.93
D-gal + Hup A组	30.72 ± 4.70	21.47 ± 4.51	16.41 ± 4.74	31.25 ± 5.64	20.63 ± 4.49	17.16 ± 5.18

表2 短纯音8kHz下80dB SPL各组动物ABR潜伏期及波间期 (ms, $\bar{x} \pm s$)

潜伏期	Control组	D-gal + Hup A组	D-gal组
Peak III	2.63 ± 0.04	2.72 ± 0.08	2.84 ± 0.11
IPL(I ~ V)	3.05 ± 0.06	3.11 ± 0.08	3.26 ± 0.08

2.2 复合动作电位

图2示复合动作电位(compound action potential, CAP)示意图,CAP对成对短声中第2个短声的响应(CAP2)的幅度越大,即CAP2/CAP1值越接近1,表明耳蜗对声音的时间分辨能力越好,因为CAP1近似于CAP2(20 ms),为了计算上的方便,通过各CAP2/CAP2(20 ms)比值与短声间隔的关系函数反映耳蜗时间分辨能力。刺激间隔(ISI)依次为20,10,6,4,2,1 ms,CAP1和CAP2分别是以成对短声为刺激信号得到的波形,可见随着时间间隔的缩短,波形之间的距离逐渐缩短,最后融合在一起无法分辨。由于测试CAP的手术具有创

伤性,实验有一定动物损失;导致模型组2只动物死亡,干预组1只动物死亡。对照组(15只)的CAP2/CAP2(20 ms)比值最大,模型组(13只)比值最小,且随着时间间隔的延长,3组动物CAP2/CAP2(20 ms)比值间距逐渐缩小,最后融合在一起,由此可知,干预组(14只)耳蜗时间分辨力较模型组有明显改善(图3)。

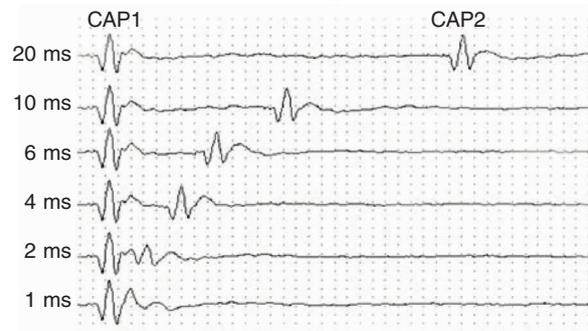


图2 图为复合动作电位(CAP)示意图

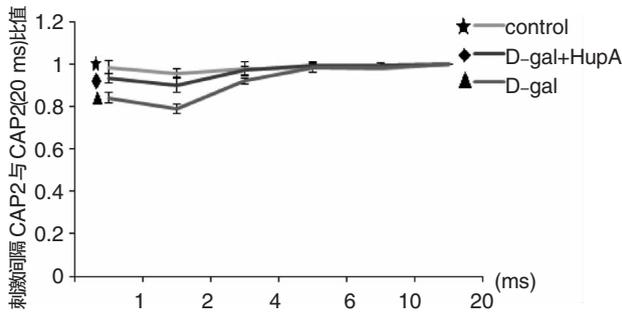


图 3 CAP2/CAP2 (20 ms) 比值与短声间隔的关系函数

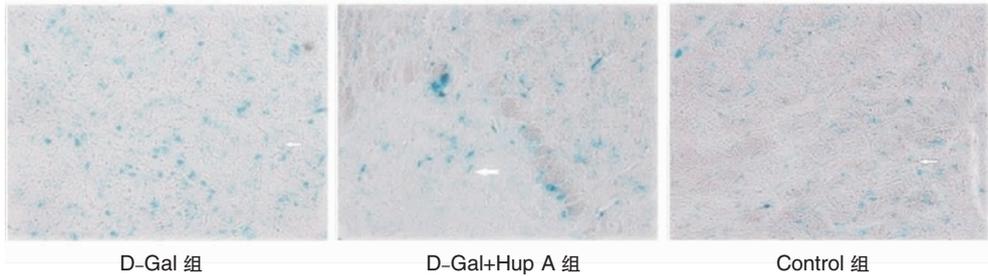


图 4 光镜下观察 3 组 β -半乳糖苷酶染色下丘衰老细胞 ($\times 200$)

3 讨论

老年性聋是多种生理机能作用的结果,至今还没有统一的发病机制理论^[3-4],其中氧化应激,即衰老的线粒体理论最引人瞩目,该理论认为:线粒体氧利用率高,是活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要亚细胞来源,当 ROS 的产生和清除之间失去平衡,就会出现氧化应激。ROS 对生物大分子具有很强的破坏作用,可导致线粒体 DNA(mtDNA)、细胞和组织的广泛损伤,随着时间推移,mtDNA 累积性缺失和突变,内源性抗氧化酶减少,线粒体膜稳定性破坏,向胞质释放细胞色素 C,通过级联反应激活 Caspase-3,最终诱导细胞凋亡。因此,设法减少机体氧自由基的产生、改善抗氧化防御和氧化损伤的修复功能,将大大提高老年性聋的防治水平。

Hup A 具有显著的抑制乙酰胆碱酯酶的作用,在我国广泛用于早老年性痴呆(alzheimer's disease, AD)和血管性痴呆(vascular dementia, VaD)的临床治疗。近年研究发现,Hup A 除了提高脑内乙酰胆碱水平外,还具有多靶点神经保护作用。Hup A 能够保护神经元细胞对抗 H_2O_2 和 β -淀粉样蛋白产生的毒性,减轻脂质

2.3 β -半乳糖苷酶染色衰老细胞

如图 4 所示下丘组织中老年性聋模型组 β -半乳糖苷酶阳性细胞密度比干预组和对照组明显增高,而干预组密度又高于对照组,表明 Hup A 能够延缓由 D-半乳糖诱导的细胞衰老,对衰老引起的神经元数目减少的退变性疾病(如老年性聋)有一定治疗效果。

氧化,并提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的产生,其机制是 HupA 抑制 ROS 的形成和 Caspase-3 酶的活性^[5-6]。研究发现,HupA 可以直接或间接通过调节线粒体依赖的 Caspase 途径阻断细胞凋亡:HupA 调节基因 bcl-2/bax 的表达,其中 bcl-2 是细胞凋亡抑制剂,bax 为细胞凋亡促发剂,抑制下游 Caspase-3 的活性和线粒体释放细胞色素 C,从而阻断细胞凋亡,具有潜在治疗多种神经退行性疾病的作用^[7-8]。

通过 ABR 各波潜伏期的变化可了解神经冲动传导是否受各种病理因素的影响而引起神经传导阻滞。本研究结果显示,和模型组相比,干预组 ABR 出现 III 波潜伏期、I-V 波间期缩短,听觉通路上神经传导加快,表明石杉碱甲可以提高中枢对声音的加工过程,这可能与改善轴突脱髓鞘变有关。然而 3 组动物用药前后 ABR 阈值未见明显改变^[9],可能由于老化过程中听敏度减退要晚于与言语识别相关的听觉处理能力。另外,CAP 结果显示干预组时间分辨力好于模型组,提示 Hup A 可能延缓耳蜗螺旋神经节细胞(spiral ganglion cell, SGC)的衰老退变。因为老年性聋早期,可以不损伤外毛细胞的功能,听觉阈值没有改变,但是支配内毛细胞(inner hair cell, IHC)的 SGC 会发

生严重损伤, IHC-SGC 之间的带状体突触会明显减少, 由于一个 IHC 接受超过 10 个 SGC 的聚合性支配, 只要一个 IHC 仍然有一个以上 SGC 的支配, 就可以保证该 IHC 能够将听觉信息传递到听觉神经中枢。但是由于通道数量的大量减少, 以及残存通道的带状体突触也有可能有一定程度的损伤, 耳蜗的阈上信号处理能力可能发生改变。由于带状体的主要功能是易化神经递质囊泡的运动, 递质的快速释放和重摄取, 从而实现快速的时间信息处理, 衰老早期带状体突触损伤的功能后果可能首先表现在耳蜗时间处理能力的下降。

因此, Hup A 对听觉功能的保护作用可能有益于老年性聋的临床治疗, 然而这一结论有待于进一步的临床数据证实。

参考文献:

- [1] Ciorba A, Bianchini C, Pelucchi S, et al. The impact of hearing loss on the quality of life of elderly adults [J]. *Clin Interv Aging*, 2012, 7: 159 - 163.
- [2] Staecker H, Zheng QY, Van De Water TR. Oxidative stress in aging in the C57B16/J mouse cochlea [J]. *Acta Otolaryngol*, 2001, 121(6): 666 - 672.

- [3] Mitchell P, Gopinath B, Wang JJ, et al. Five-year incidence and progression of hearing impairment in an older population [J]. *Ear Hear*, 2011, 32(2): 251 - 257.
- [4] 彭斌, 周媛, 谢鼎华. 增龄对年龄相关性听力减退大鼠听觉神经通路形态学的影响 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(2): 103 - 106.
- [5] Du Z, Yang Y, Hu Y, et al. A long-term high-fat diet increases oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the inner ear of D-galactose-induced aging rats [J]. *Hear Res*, 2012, 287(1-2): 15 - 24.
- [6] Xiao XQ, Zhang HY, Tang XC. Huperzine A attenuates amyloid beta-peptide fragment 25 - 35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 67(1): 30 - 36.
- [7] Zhou J, Tang XC. Huperzine A attenuates apoptosis and mitochondria-dependent caspase-3 in rat cortical neurons [J]. *FEBS Lett*, 2002, 526(1-3): 21 - 25.
- [8] Shi Q, Fu J, Ge D, et al. Huperzine A ameliorates cognitive deficits and oxidative stress in the hippocampus of rats exposed to acute hypobaric hypoxia [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(9): 2042 - 2052.
- [9] Chen B, Zhong Y, Peng W, et al. Age-related changes in the central auditory system: comparison of D-galactose-induced aging rats and naturally aging rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1344: 43 - 53.

(修回日期: 2013 - 03 - 01)

(上接第 198 页)

者表达呈正相关。在 III、IV 期组中, VEGF-C 阳性表达率与 Flt-4 阳性表达脉管数均分别高于 I、II 期组 ($P < 0.05$)。表明 VEGF-C、Flt-4 与临床分期、颈部淋巴结转移均密切相关, 支持 VEGF-C 与其受体 Flt-4 结合、促进淋巴管形成、进而导致淋巴结转移的观点^[7]。而在患者不同年龄组别之间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明鼻咽癌肿瘤淋巴管生成及淋巴结转移与临床分期有关, 而与年龄无关。

参考文献:

- [1] Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(3): 673 - 700.
- [2] Jennbacken K, Vlalbo C, Wang W, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis [J]. *Prostate*,

2005, 65(2): 110 - 116.

- [3] 郭琳, 张丹丹, 王强. 胃癌组织中 VEGF-C 及其受体的表达与淋巴结转移的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(6): 669 - 762.
- [4] 陶绍霖, 谭群友. VEGF-C/VEGF-D-VEGFR-3 信号通路在淋巴管生成及肺癌淋巴转移中作用机制的研究进展 [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(3): 796 - 799.
- [5] Furudo I, Tanaka S, Haruma K, et al. Clinical significance of vesicular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma [J]. *Oncology*, 2002, 62(2): 157 - 166.
- [6] Suzuki K, Morita T, Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Int J Urol*, 2005, 12(2): 152 - 153.
- [7] 谢振宇, 程金妹, 张鹏飞, 等. 鼻咽癌中 VEGF-C、COX-2、VEGFR-3 的表达及其意义 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(4): 259 - 262.

(修回日期: 2013 - 04 - 01)