

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.13.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200528.0925.002.html\(2020-05-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200528.0925.002.html(2020-05-28))

脑源性神经营养因子减轻神经性耳聋模型大鼠氧化应激反应的机制探究*

曾友根¹,朱欠元¹,曾宪晶²,周金凤³

(1. 井冈山大学临床医学院耳鼻咽喉头颈外科,江西吉安 343000;2. 井冈山大学附属医院中医科,江西吉安 343000;3. 井冈山大学附属医院麻醉科,江西吉安 343000)

[摘要] 目的 探究脑源性神经营养因子(BDNF)对神经性耳聋(SNHL)大鼠的保护作用机制。

方法 SD大鼠分为空白组(6只)和实验组(24只),其中空白组正常饲养,未行任何处理;实验组进行SNHL大鼠造模并筛选符合要求的大鼠(18只)进一步分为BDNF组和对照组,两组分别经大鼠圆窗渗透给予BDNF工作液与生理平衡液。2周后行听信脑干反应测定,并处死大鼠取耳蜗行苏木素-伊红(HE)染色和免疫荧光染色,检测超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力水平。**结果** HE染色和免疫荧光染色显示,空白组大鼠耳蜗内螺旋神经节细胞病理形态无明显改变,对照组大鼠耳蜗内螺旋神经节细胞结构明显受损,免疫荧光染色可见大量坏死的细胞碎片,BDNF组螺旋神经节细胞与对照组比较损伤明显减轻。给药2周后,与空白组比较,对照组和BDNF组大鼠听觉脑干诱发电位(ABR)阈值差值明显增大($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);且与对照组比较,BDNF组ABR阈值差值明显减小($P < 0.05$)。与空白组比较,对照组和BDNF组CAT、SOD、GSH-Px的表达水平明显降低,MDA表达水平明显升高($P < 0.05$);与对照组比较,BDNF组CAT、SOD、GSH-Px的表达水平明显升高,MDA表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** BDNF可减轻SNHL大鼠的氧化应激损伤反应,对受损耳蜗具有一定的保护作用。

[关键词] 脑源性神经营养因子;听觉丧失,感音神经性;氧化性应激;抗氧化剂;听性脑干反应

[中图分类号] R764.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)13-2077-05

Study on the mechanism of brain-derived neurotrophic factor alleviating oxidative stress response in rats with sensorineural hearing loss*

ZENG Yougen¹, ZHU Qianyuan¹, ZENG Xianjing², ZHOU Jinfeng³

(1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Clinical Medical

College of Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343000, China; 2. Department of TCM, Affiliated

Hospital of Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343000, China; 3. Department of Anesthesiology,

Affiliated Hospital of Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343000, China)

[Abstract] Objective To explore the mechanism of the protective effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in sensorineural hearing loss (SNHL) rats. **Methods** SD rats were divided into the blank group (6 rats) and the experimental group (24 rats). The blank group was fed normally without any treatment. In the experimental group, a rat model of SNHL was established, and 18 qualified rats were selected and divided into the BDNF group and the control group. Rats in the BDNF group and the control group were administered with BDNF working solution and physiological balance solution through round window separately. After two weeks, the auditory brainstem response (ABR) was measured. The rats were sacrificed, and the cochlea was taken for hematoxylin-eosin (HE) staining and immunofluorescence staining. Then the activity levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected. **Results** HE and immunofluorescence staining showed that the pathological morphology of spiral ganglion cells in the blank group was not significantly changed, while the structure of spiral

* 基金项目:井冈山大学重点学科建设项目课题(J2018-0814)。 作者简介:曾友根(1980—),副教授,硕士,主要从事耳鼻咽喉头颈外科临床与教学工作。

ganglion cells in the control group was significantly damaged. A large number of necrotic cell fragments were observed by immunofluorescence staining. Compared with the control group, the damage of spiral ganglion cells in the BDNF group was significantly reduced. Two weeks after administration, compared with the blank group, the changes of ABR thresholds difference in the control group and the BDNF group were significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); additionally, compared with the control group, the changes of ABR thresholds difference in the BDNF group was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the expression levels of CAT, SOD and GSH-Px in the control group and the BDNF group were significantly increased, and the expression levels of MDA was significantly increased ($P < 0.05$); additionally, compared with the control group, the expression levels of CAT, SOD and GSH-Px in the BDNF group were significantly increased, and the expression level of MDA was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** BDNF can alleviate the oxidative stress injury response of SNHL rats, and has a certain protective effect on the damaged cochlea.

[Key words] brain-derived neurotrophic factor; hearing loss, sensorineural; oxidative stress; antioxidants; auditory brainstem response

神经性耳聋 (sensorineural hearing loss, SNHL) 是五官科临床最常见的疾病之一, 该听力障碍是由各种因素导致的听觉系统对声音的感受和处理过程异常。随着人口老龄化加快, 听力损失是影响老年人健康生活的第三大慢性疾病^[1], 当前 SNHL 的发病率仍呈现上升的趋势。成人听力损失的主要影响是沟通障碍, 重者可发展为心理障碍。目前治疗手段有限, 应用助听装置是重要的解决方案, 但辅助装置的治疗效果与耳蜗内残留的细胞数量及功能状况密切相关^[2]。维持足够数量正常形态的听觉细胞是保持正常听功能的必要前提, 积极防治耳蜗内细胞的损伤尤为重要。SNHL 发病机制复杂, 氧化应激损伤反应是近年来对 SNHL 发病机制研究探索的热点。脑源性神经营养因子 (brain-derived neuro-trophic factor, BDNF) 有促进外周听觉系统发育与调节损伤修复的功能^[3]。此外, BDNF 能提高细胞内的抗氧化酶活性, 降低谷氨酸增高所致的自由基水平增高, 减轻细胞损伤^[4]。BDNF 作为潜在用于治疗 SNHL 的药物, 动物实验研究显示出良好的应用前景^[5-7], 但目前关于 BDNF 抗氧化作用的机制鲜有报道。本实验通过使用 BDNF 经大鼠圆窗渗透给药, 观察其对 SNHL 模型大鼠抗氧化物表达的影响及耳蜗内细胞病理改变情况, 为临床研究应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

成年无特殊病原体 (SPF) 级 SD 大鼠 30 只, 雌雄各半, 体质量 (250 ± 50) g, 10~12 周龄, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 (实验单位使用许可证编号 SYXK 2012-0001, 生产许可证号 SCXK 2016-0002)。在井冈山大学临床医学院实验中心适应性喂养 1 周后造模, 保证所有大鼠饲养条件一致, 动物房内室温

20~25 °C, 相对湿度 65%~70%, 安静干燥通风, 大鼠在给药前行耳廓反射测定, 并每天观察外耳道分泌物情况。

1.1.2 实验试剂

BDNF (武汉艾美捷公司, 批号: PRP110400)。溶液配置方法: 使用前 2 min, 10 000 r/min 离心, 使细胞因子沉附于管底, 加入 100 μ L 蒸馏水, 混匀, 溶解后得到 100 μ g/mL 溶液, 接着滴入 185.2 μ L 胎牛血清和 1 566.8 μ L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 后混匀, 最终所配得到 5.4 μ g/mL BDNF 工作液。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组

SD 大鼠先分为两组, 其中空白组 6 只, 正常饲养, 未行任何处理; 实验组 24 只, 参照文献 [8] 造模方法, 肌内注射庆大霉素注射液 (河南润弘制药公司, 批号: 1808183) 100 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 连续 2 周, 造模前检测大鼠听觉脑干诱发电位 (ABR) 阈值, 造模后筛选 ABR 检测阈值上升 20 dB 以上的大鼠作为实验对象, 共筛选出符合要求的大鼠 18 只, 造模成功率为 75.0%。随后将造模后的大鼠按编号分为 BDNF 组和对照组, 每组 9 只。BDNF 组: 给予 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉成功后固定, 备皮、消毒, 耳后做 C 形切口, 分离皮下及肌肉组织至颞骨和乳突区位置, 钻开骨质, 暴露圆窗, 镜下确定圆窗膜位置, 将约 200 μ L BDNF 工作液滴入圆窗膜上, 过程约 30 min, 待溶液透过圆窗膜后逐层缝合关闭, 消毒; 对照组: 滴入等量生理平衡液代替 BDNF 工作液, 术后保暖, 饲养至 2 周后取样。

1.2.2 采样制作

大鼠给予麻醉后断头处死, 从枕骨大孔处分离解剖, 暴露听泡, 取出耳蜗, 分离听小骨, 在蜗尖及圆窗膜处分别扎一小孔, 用移液管吸取生理盐水自蜗尖向

耳蜗内灌注冲洗,直至流出清亮液体,再灌注 4%多聚甲醛 PBS 溶液进行固定。24 h 后取出耳蜗,脱钙,经不同梯度乙醇脱水,浸蜡,石蜡包埋,用切片机制作约 4 μm 厚度的冠状切片,常规苏木素-伊红 (HE) 染色后,光镜下 ($\times 400$) 观察耳蜗内细胞形态病理变化。

1.2.3 耳蜗免疫荧光染色

耳蜗切片用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,接着置入 0.1% TritonX-100 和 5% 山羊血清混合液室温封闭 30 min,移去封闭液,加入兔多抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 漂洗后,加荧光二抗,室温孵育 1 h,洗涤,封片剂封片,荧光显微镜高倍视野下观察。

1.2.4 听信脑干反应测定

在实验前及结束当天进行 ABR 检测,麻醉后在声电屏蔽室内进行测试,电极放置:记录电极置于颅顶正中,参考电极及接地电极分别置于给声耳及对侧耳后皮下。刺激参数及测试参量:刺激声为滤波短声 (click),带通滤波 100~3 000 Hz,叠加 512 次,扫描时程 10 ms,耳机输出,重复率 10 次/秒,距离大鼠耳道口 0.5 cm,以 III 波为基准确定反应阈^[9]。

1.2.5 指标检测

大鼠处死后取耳蜗组织,制备组织匀浆上清液,采取生化试剂盒(上海碧云天公司,批号:Z2102164)

检测过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力水平,根据 Lambert-Beer 原理法,使用自动生化仪(奥林巴斯)检测,按试剂盒说明书严格操作。

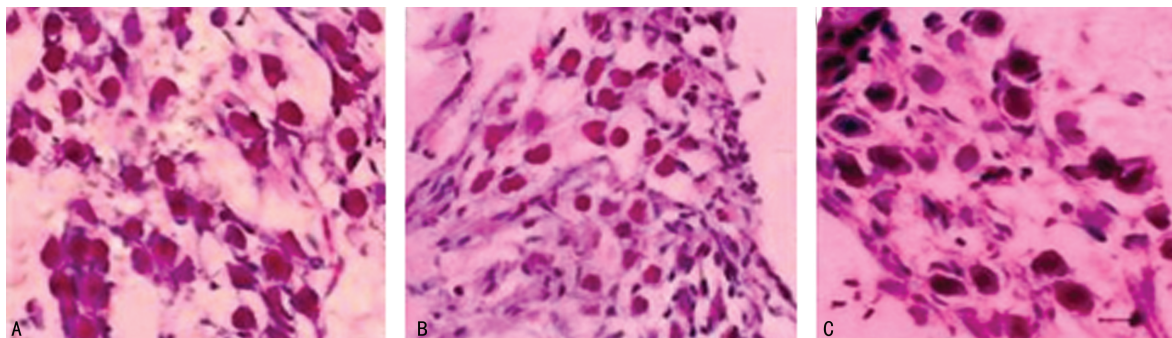
1.3 统计学处理

应用 SPSS24.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

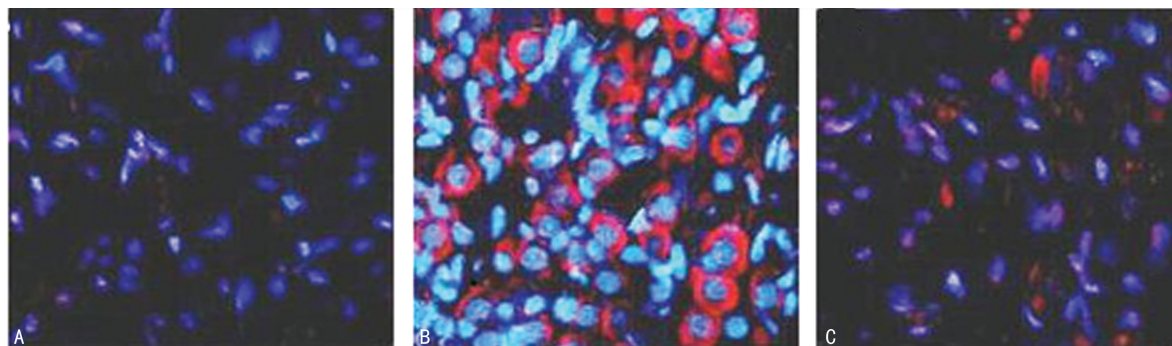
2.1 染色结果

空白组大鼠耳蜗内螺旋神经节细胞形状完整,整齐密集排列,细胞膜呈圆形或椭圆形,核仁明显,核染色质清晰均匀(图 1A);免疫荧光染色见极少的细胞碎片(图 2A)。对照组大鼠耳蜗内螺旋神经节细胞数量明显减少,细胞大小不一,排列不齐,稀疏而紊乱,疏松淡染,部分细胞固缩,细胞核消失,空泡样变性(图 1B);免疫荧光染色可见大量坏死的细胞碎片(图 2B)。BDNF 组大鼠耳蜗内螺旋神经节细胞数量较空白组减少,细胞排列稍齐,细胞膜较完整,部分细胞肿胀或固缩,胞体缩小,色深染(图 1C);免疫荧光染色见坏死细胞的碎片低于对照组,整体病理改变较对照组减轻(图 2C)。



A:空白组;B:对照组;C:BDNF 组。

图 1 各组大鼠 HE 染色 ($\times 400$)



A:空白组;B:对照组;C:BDNF 组。

图 2 各组大鼠免疫荧光染色 ($\times 200$)

2.2 听信脑干反应测定结果

在给药前测定空白组、对照组和 BDNF 组的 ABR 阈值,差异无统计学意义($P>0.05$)。给药 2 周后,与空白组比较,对照组和 BDNF 组 ABR 阈值差值增大,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与对照组比较,BDNF 组 ABR 阈值差值减小,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.3 活力检测结果

实验后检测各组 CAT、MDA、SOD、GSH-Px 表达水平变化,结果显示:与空白组比较,对照组和 BDNF 组 CAT、SOD、GSH-Px 表达水平均明显降低,

MDA 表达水平明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与对照组比较,BDNF 组 CAT、SOD、GSH-Px 的活力表达水平明显升高,MDA 表达水平明显降低($P<0.05$),见表 2。

表 1 各组大鼠造模前后 ABR 阈值变化程度($\bar{x}\pm s$,dB)

组别	n	给药前 ABR 阈值	给药后 ABR 阈值	ABR 阈值 差值
空白组	6	20.30±3.53	21.62±3.66	1.32±0.13
对照组	9	20.54±3.45	46.86±7.59	26.32±4.14 ^a
BDNF 组	9	21.02±3.35	38.16±6.38	17.14±3.03 ^{bc}

^a: $P<0.01$,^b: $P<0.05$ 与空白组比较;^c: $P<0.05$,与对照组比较。

表 2 各组大鼠氧化反应水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CAT(U/gHb)	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mgprot)
空白组	6	120.26±6.03	1.32±0.13	252.26±12.63	17.26±1.43
对照组	9	65.34±3.24 ^a	3.54±0.26 ^a	71.36±4.25 ^a	6.24±1.01 ^a
BDNF 组	9	83.31±4.16 ^{bc}	2.21±0.17 ^{bc}	141.45±7.42 ^{bc}	13.15±1.21 ^{bc}

^a: $P<0.01$,^b: $P<0.05$,与空白组比较;^c: $P<0.05$,与对照组比较。

3 讨 论

常用的氨基糖甙类抗菌药物中,庆大霉素被广泛应用于动物耳聋实验造模。本实验观察给药前后 ABR 听觉阈值的变化及造模前后螺旋神经节细胞的病理形态学变化,其结果表明庆大霉素对大鼠具有明显的耳毒性,印证了其标准的耳毒性研究模型的参考药物^[9-10]。耳蜗外毛细胞是氨基糖甙类抗菌药物的主要靶点,外毛细胞的丢失导致永久性的听力丧失,并引起外毛细胞的退化^[11]。

氨基糖甙类抗菌药物的耳毒性机制复杂,其中氧化应激反应、自由基损伤学说被认为是其重要原因^[12]。在病理情况下,体内活性氧(ROS)会导致细胞器广泛性损坏。ROS 是人体代谢的副产物,在信号通路中扮演重要角色,各种退行性疾病的 ROS 可导致广泛的细胞和组织破坏,抗氧化物如 CAT、SOD、GSH-Px,可以减轻 ROS 的损害程度,维持自由基平衡,有保护机体的作用。研究表明,部分抗氧化剂具有保护耳蜗内细胞的作用,其作用机制与阻止 ROS 触发半胱氨酸蛋白酶(Caspase)介导的细胞凋亡,保护线粒体膜有关^[13]。因此,提高机体抗氧化酶活性,清除 ROS,减轻氧化应激损伤,维持细胞内氧化还原平衡和抗氧化功能,有助于减轻耳蜗细胞的损伤,对听功能的保护具有重要意义。人体内存在的抗氧化酶 CAT、SOD、GSH-Px,能够及时清除机体内产生的自由基。研究表明,在使用庆大霉素造模时,体内氧自由基短时间内急速增加,使得抗氧化酶不能够及时清除自由基,从而造成自由基过剩,当自由基过多存

在的时候,其降解产物 MDA 便会随之增多,从而导致糖、蛋白质及核酸的代谢受到干扰,相关酶活性也会随之下降,最终导致组织细胞结构发生损坏从而影响其正常功能^[14]。本实验结果显示,对照组和 BDNF 组的 CAT、SOD、GSH-Px 表达水平较空白组明显降低,MDA 表达水平明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),提示庆大霉素可能通过干扰耳蜗内氧自由基代谢障碍而使听力损伤。

BDNF 作为一种成熟的碱性蛋白,由脑组织合成并分泌,对中枢及外周的各类神经元具有营养、支持和修复的作用。BDNF 在听神经系统中主要分布于听觉器官和前庭器官,研究证实 BDNF 基因可表达于耳蜗底回,并且与其受体表达部位一致^[15]。此外,BDNF 对螺旋神经节细胞有保护作用^[16],在移植耳蜗后,人为地使 BDNF 以一定方式释放,有利于声音信号的真实传递,BDNF 可改善耳蜗移植效果^[17]。本实验发现,在耳聋大鼠造模后于 BDNF 圆窗膜渗透给药,2 周后 BDNF 组 CAT、SOD、GSH-Px 表达水平比对照组明显升高($P<0.05$),提示 BDNF 可提高损伤耳蜗的抗氧化酶活性水平。

综上所述,本实验中观察到 BDNF 给药后大鼠耳蜗组织 CAT、SOD、GSH-Px 表达水平升高,给药前后 ABR 阈值差值减少,切片显示耳蜗内细胞损伤减轻,表明 BDNF 可明显降低大鼠耳蜗的损伤程度,减轻神经细胞的损伤,对受损耳蜗具有一定的保护作用。由于实验条件的限制,其具体机制尚需进一步探究。

参考文献

- [1] 张熙,段育任,南志勇,等.老年感音神经性耳聋的干预进展[J].世界中西医结合杂志,2018,13(11):1620-1623,1628.
- [2] 张志存.嗅鞘细胞促损伤大鼠耳蜗螺旋神经节细胞保护和修复作用的实验研究[D].上海:复旦大学,2011.
- [3] 王玉杏,徐鸥,刘砚星,等.听觉剥夺大鼠听皮层 BDNF 和 TrkB 的表达变化[J].听力学及言语疾病杂志,2013,21(4):379-382.
- [4] VANNUCCI R C, BRUCKLACHER R M, VANNUCCI S J. Intracellular Calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 126(1):117-120.
- [5] 林昱,马静,张铁松,等.脑源性神经营养因子与氨基糖苷类抗生素耳中毒[J].听力学及言语疾病杂志,2012,20(3):293-296.
- [6] 李鹏,谢景华,吴晓钟,等.腺相关病毒介导脑源性神经营养因子拮抗顺铂耳毒性的研究[J].临床医学,2010,30(1):92-94.
- [7] 刘莹莹,杨一兵,汤勇.神经营养因子对损伤的 SGNs 保护的研究进展[J].临床医学,2014,34(6):119-121,122.
- [8] MURILLO-CUESTA S, CONTRERAS J, CEDIEL R, et al. Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice[J]. Lab Anim, 2010, 44(2):124-131.
- [9] 王晨露,王永华,王一鸣,等.川芎嗪干预庆大霉素耳毒性作用的机理研究[J].中国听力语言康复科学杂志,2019,17(1):9-12.
- [10] 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豚鼠毛细胞损伤的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2018,38(6):731-736.
- [11] GEALDOR M, FREEMAN S, LI G, et al. Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds[J]. Hear Res, 1993, 69(1/2):236-242.
- [12] 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.
- [13] NIWA K, MATSUNOBU T, KURIOKA T, et al. The beneficial effect of Hangesha-shin-to (TJ-014) in gentamicin-induced hair cell loss in the rat cochlea[J]. Auris Nasus Larynx, 2016, 43(5):507-513.
- [14] 顾博思.重组灵芝免疫调节蛋白对神经性耳聋模型豚鼠的保护作用及机制研究[D].长春:吉林大学,2015.
- [15] 刘莹莹.耳蜗螺旋神经节细胞损伤后 BDNF 对其存活的影响[D].昆明:昆明医科大学,2014.
- [16] 翟所强,郭维,胡吟燕,等.脑源性神经营养因子对耳蜗螺旋神经节的保护作用[J].中华耳鼻咽喉科杂志,2002,37(2):109-111.
- [17] 朱庆丰. BDNF 在生物医学领域的研究新进展[J].安庆师范学院学报(自然科学版),2012,18(4):104-108.
- (收稿日期:2019-12-30 修回日期:2020-04-11)
- (上接第 2076 页)
- [17] 赵晨,白燕,邹平,等.阿奇霉素和穿心莲内酯磺化物的联合应用对肺炎支原体肺炎患儿临床疗效和血清炎症因子的影响[J].中国医药导刊,2018,20(4):216-220.
- [18] 徐永芳,陈刚,徐长青,等.穿心莲内酯对内毒素诱导急性肺损伤大鼠炎症介质的影响[J].中华中医药学刊,2015,33(1):159-161.
- [19] HONG C Y, ZHANG H D, LIU X Y, et al. Attenuation of hyperoxic acute lung injury by Lycium barbarum polysaccharide via inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(10):902-908.
- [20] 蒋磊,赵鸣雁. NLRP3 炎性体在肺损伤的作用进展[J].中华急诊医学杂志,2017,26(7):829-833.
- [21] 王程,陈瑞庆,傅冷西,等. miR-223 通过抑制 NLRP3 防护小鼠急性放射性肺损伤[J].中华放射医学与防护杂志,2019,39(3):166-171.
- [22] 张维康,潘灵辉. NOD 样受体蛋白 3 炎症小体在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究[J].中华危重病急救医学,2015,27(10):821-825.
- (收稿日期:2019-12-18 修回日期:2020-02-21)