

# 补肾活血通窍汤对庆大霉素耳中毒豚鼠听性脑干反应阈值的影响及机制研究

张珂 刘帅军 李红娟

(河南省安阳市第六人民医院耳鼻喉科, 安阳, 455000)

**摘要** 目的:探讨补肾活血通窍汤对庆大霉素耳中毒豚鼠听性脑干反应(ABR)阈值的影响及机制。方法:将50只豚鼠随机分为空白组、模型组和高/中/低剂量实验组,每组10只。模型组和实验组每日腹腔注射硫酸庆大霉素100 mg/kg 构建庆大霉素耳中毒模型,空白组每日腹腔注射生理盐水25 mL/kg,同时高/中/低剂量实验组分别灌胃高/中/低剂量补肾活血通窍汤(含生药量2.40、0.50、0.10 mg/mL)0.8 mL/只,模型组和空白组灌胃等量生理盐水,连续干预10 d。干预结束后检测各组豚鼠 ABR 阈值;蛋白免疫印迹法(WB)及免疫组化染色观察各组豚鼠耳蜗组织自噬相关蛋白及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达情况。结果:造模后,与空白组比较,模型组豚鼠 ABR 阈值、耳蜗组织 LC3、Beclin1 蛋白表达量及螺旋神经节细胞、毛细胞及血管纹中 Caspase-3 蛋白表达量升高( $P < 0.05$ );补肾活血通窍汤干预结束后,与模型组比较,中/高剂量实验组 ABR 阈值及耳蜗组织 LC3、Beclin1 蛋白表达量及螺旋神经节细胞、毛细胞及血管纹中 Caspase-3 蛋白表达量降低( $P < 0.05$ ),低剂量实验组上述各项指标无明显变化( $P > 0.05$ )。结论:补肾活血通窍汤可对庆大霉素耳中毒损伤起到保护作用,其机制与抑制耳蜗细胞自噬及凋亡程序的发生有关。

**关键词** 补肾活血通窍汤;耳蜗;庆大霉素;听性脑干反应;细胞自噬;凋亡

## Study on the Effects and Mechanism of Bushen Huoxue Tongqiao Decoction on Auditory Brainstem Response Threshold of Guinea Pigs with Gentamycin Ototoxicity

Zhang Ke, Liu Shuaijun, Li Hongjuan

(Department of Otolaryngology, Anyang People's Hospital No. 6, Anyang 455000, China)

**Abstract Objective:** To explore the effects and mechanism of Bushen Huoxue Tongqiao Decoction on auditory brainstem response (ABR) threshold of guinea pigs with gentamycin ototoxicity. **Methods:** A total of 50 guinea pigs were randomly divided into a blank group, a model group and high/medium/low-dose (H/M/L-dose) experiment groups, with 10 in each group. The model group and the experimental groups were established gentamycin ototoxicity model by intraperitoneal injection of gentamycin sulfate 100 mg/kg daily, and the blank group received intraperitoneal injection of normal saline 25 mL/kg daily. Meanwhile, the H/M/L-dose experiment groups were respectively given intragastric administration of high/medium/low dose of Bushen Huoxue Tongqiao Decoction (containing raw medicine dose of 2.40, 0.50 and 0.10 mg/mL) with 0.8 mL for each one. The model group and the blank group were given intragastric administration of the same amount of normal saline. The continuous intervention lasted for 10 d. After the intervention, the ABR threshold of each guinea pig was detected; and the expression of autophagy related protein and cysteine aspartic proteinase-3 (Caspase-3) protein in the cochlear tissues of the guinea pigs were observed by Western blotting (WB) and immunohistochemical staining. **Results:** After the modeling, when compared with the blank group, the ABR threshold, the expression of LC3 and Beclin1 protein in the cochlear tissue and the expression of Caspase-3 protein in the spiral ganglion cells, hair cells and stria vascularis of the guinea pigs in the model group were increased ( $P < 0.05$ ). After the intervention of Bushen Huoxue Tongqiao Decoction, when compared with the model group, the ABR threshold, the expression of LC3 and Beclin1 protein in the cochlear tissue and the expression of Caspase-3 protein in the spiral ganglion cells, hair cells and stria vascularis in the M and H-dose experiment groups were decreased ( $P < 0.05$ ). And there was no significant difference in the above indexes of the L-dose experiment group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Bushen Huoxue Tongqiao Decoction can play a protective role in the damage of gentamicin ototoxicity, and the mechanism is related to the inhibition of autophagy and apoptosis in cochlear cells.

**Key Words** Bushen Huoxue Tongqiao Decoction; Cochlea; Gentamicin; Auditory brainstem response; Autophagy; Apoptosis  
中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.05.023

感音神经性耳聋是耳鼻喉科常见病,包括噪声性聋、药物性聋、突发性聋等多种疾病类型。感音神

经性耳聋的发生与机体氧自由基、外界机械力及钙超载等导致听觉感受器损害有关<sup>[1-2]</sup>。目前临床常

规药物治疗急性期感音性耳聋虽可改善听力,延缓听力下降,但效果有限,因此人们开始寻找新的药物和治疗方法。中医认为聋属于听力减退症,其发生机制多由肾精亏损、肝火上扰、气滞血癖所致,多属肾虚血瘀证,采用补肾活血中药治疗可使耳鸣患者肾气充足、精气调和、耳窍之气行血活,效果显著,但目前关于中药治疗的作用机制的研究尚不充分<sup>[3-4]</sup>。因此本研究通过构建庆大霉素耳中毒豚鼠模型,观察中药补肾活血通窍汤对模型动物的听力改善情况,并初步研究其作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年纯白红目豚鼠 50 只,雄性,体质量(250 ± 25) g,购于中国医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SYXK(辽)2007-0003。

1.1.2 药物 补肾活血通窍汤(方为:黄芪、丹参、熟地黄各 15 g,骨碎补、淫羊藿、当归、川芎、石菖蒲各 10 g,磁石 20 g,水蛭 1 g);盐酸氯胺酮注射液(长春长红制药有限公司,批号:KH080403);硫酸庆大霉素注射液(山东恩威药业有限公司,批号:150881507);LC3、Beclin1 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(购于美国 Santa Cruz 公司),美国 Santa Cruz 公司等。

1.1.3 试剂与仪器 DS-425P 电子天平,上海寺岗电子有限公司;Allegra 64R 高速冷冻离心机,美国 Beckman Coulter 有限公司;VIASYS 脑干诱发电位仪,美国 GSI 公司;CKX-31 荧光倒置相差显微镜,日本 Olympus 公司;725 型紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;Mini Protean3Cell 小型垂直电泳仪,北京富瑞恒创科技有限公司;Motic DigiClass/DigiLab 1.2 图像分析软件,麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司等。

#### 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 根据体质量将豚鼠随机分为空白组、模型组和高/中/低剂量实验组,每组 10 只。空白组每日腹腔注射生理盐水 25 mL/kg,模型组和高/中/低剂量实验组每日腹腔注射硫酸庆大霉素 100 mg/kg,同时高/中/低剂量实验组灌胃高/中/低剂量补肾活血通窍汤(分别含生药量 2.40、0.50、0.10 mg/mL)<sup>[5]</sup>0.8 mL/只,模型组和空白组灌胃等量生理盐水,连续干预 10 d。

#### 1.2.2 检测方法

1.2.2.1 各组豚鼠听性脑干反应(ABR)阈值的检测 药物干预结束后,各组豚鼠腹腔麻醉后,耳机置

入外耳道,记录电极放置于颅顶中点处颅骨中,参考电极及地线分别置于给声耳及对侧耳突部皮下。刺激声为疏密相交替的次/秒的短声,带通滤波 50 ~ 3 000 Hz,叠加 1 024 次,扫描时程 20 ms,测试强度从 80 dB nHL 开始,10 dB 为 1 档逐级下降进行测试,以能引出Ⅲ波的最小声强确定反应阈,每只豚鼠测量 3 次后取平均值定为 ABR 阈值。

1.2.2.2 蛋白免疫印迹法(WB)检测各组豚鼠耳蜗组织细胞自噬相关蛋白表达情况 将各组豚鼠断头处死,迅速取出听泡,暴露耳蜗,小心剥除蜗壳,将蜗内组织及蜗轴取出,加入裂解液后高速匀浆粉碎后冰上裂解 30 min,将组织蛋白经 BCA 法定量后,取 50 μg 进行常规 WB 检测,以 β-actin 为参照,经 GIS-1000 数码凝胶图像分析系统分析各组细胞自噬向相关蛋白 LC3 表达情况。

1.2.2.3 免疫组化染色观察各组豚鼠耳蜗组织中 Caspase-3 蛋白表达情况 耳蜗取出后,于蜗顶钻孔,与蜗内缓慢注射多聚甲醛磷酸缓冲液,并于该固定液中 4 ℃ 固定 24 h,第 2 天将其放入乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液中脱钙 7 d,用石蜡包埋后制成切片,经二甲苯脱蜡,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶后,采用免疫组化法检测组织中 Caspase-3 蛋白表达情况,最后于光学显微镜下判定染色结果,阳性着色为细胞膜或细胞浆棕黄及棕褐色,采用 Motic DigiClass/DigiLab 1.2 图像分析软件计算各组豚鼠耳蜗组织中 Caspase-3 表达平均灰度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件分析上述指标,均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示计量资料,采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 补肾活血通窍汤对豚鼠 ABR 阈值的影响 与空白组比较,模型组豚鼠 ABR 阈值升高(*P* < 0.05),与模型组比较,中/高剂量实验组 ABR 阈值降低(*P* < 0.05),低剂量实验组和模型组 ABR 阈值无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 补肾活血通窍汤对豚鼠 ABR 阈值的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ABR (dB nHL)
空白组 (n = 10)	6.41 ± 3.52
模型组 (n = 10)	13.36 ± 8.05*
低剂量实验组 (n = 10)	12.15 ± 6.08
中剂量实验组 (n = 10)	7.69 ± 3.22 <sup>Δ</sup>
高剂量实验组 (n = 10)	8.69 ± 2.15 <sup>Δ</sup>

注:与空白组比较,\**P* < 0.05;与模型组比较,<sup>Δ</sup>*P* < 0.05

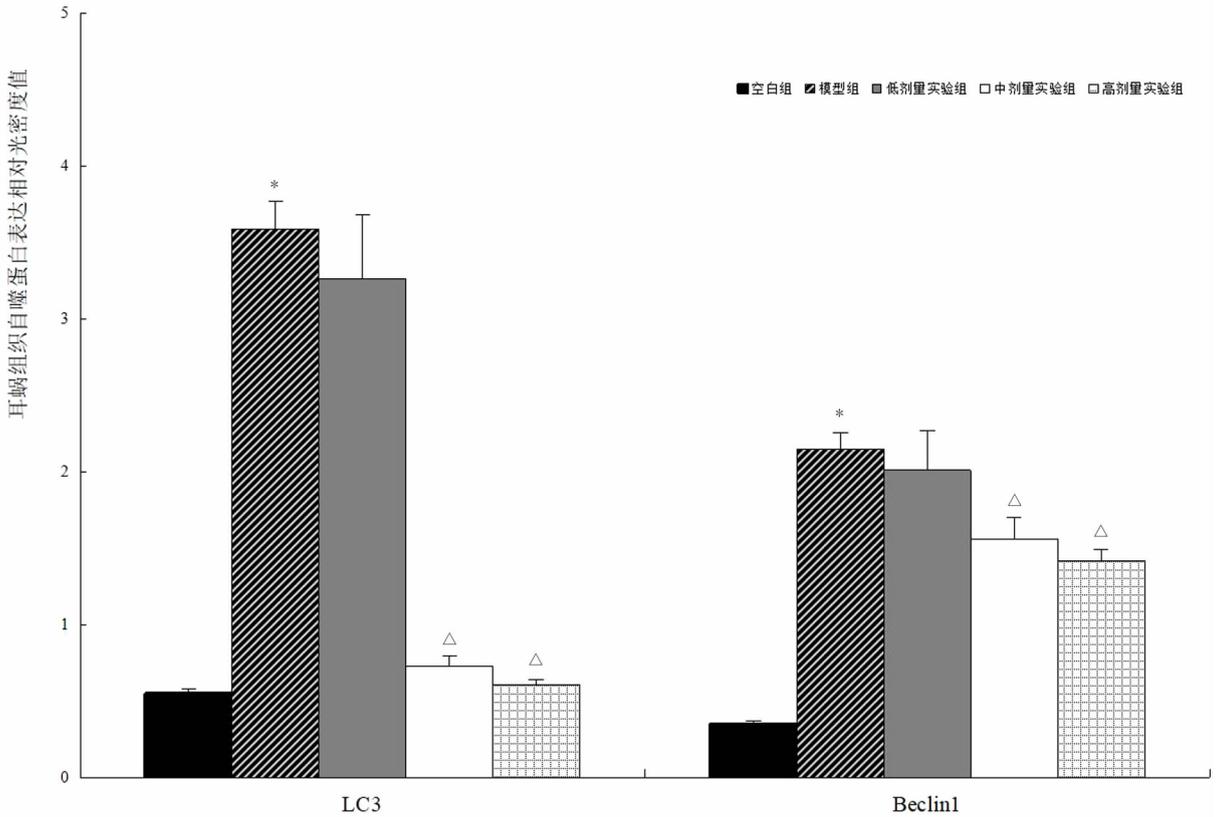
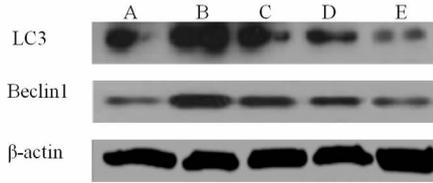


图1 补肾活血通窍汤对豚鼠耳蜗组织自噬相关蛋白表达的影响

注:A-E分别为空白组、模型组和高/中/低剂量实验组;与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表2 补肾活血通窍汤对豚鼠耳蜗组织中 Caspase-3 蛋白表达灰度值的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	螺旋神经节细胞	毛细胞	血管纹
空白组( $n = 10$ )	175.69 ± 13.25	196.25 ± 6.23	169.58 ± 4.56
模型组( $n = 10$ )	126.58 ± 10.28*	161.25 ± 7.65*	102.13 ± 8.87*
低剂量实验组( $n = 10$ )	132.36 ± 11.05	166.25 ± 8.22	108.56 ± 15.24
中剂量实验组( $n = 10$ )	152.13 ± 15.42 <sup>Δ</sup>	185.46 ± 10.24 <sup>Δ</sup>	145.26 ± 15.27 <sup>Δ</sup>
高剂量实验组( $n = 10$ )	150.16 ± 13.67 <sup>Δ</sup>	186.25 ± 12.05 <sup>Δ</sup>	146.09 ± 13.84 <sup>Δ</sup>

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 补肾活血通窍汤对豚鼠耳蜗组织自噬相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组豚鼠耳蜗组织 LC3、Beclin1 蛋白表达量升高( $P < 0.05$ ),与模型组比较,中/高剂量实验组耳蜗组织 LC3、Beclin1 蛋白表达量降低( $P < 0.05$ ),低剂量实验组和模型组耳蜗组织 LC3、Beclin1 蛋白表达量无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图1。

2.3 补肾活血通窍汤对豚鼠耳蜗组织中 Caspase-3 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组豚鼠耳蜗

组织螺旋神经节细胞、毛细胞及血管纹中 Caspase-3 蛋白表达量升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,中/高剂量实验组耳蜗组织螺旋神经节细胞、毛细胞及血管纹中 Caspase-3 蛋白表达量降低( $P < 0.05$ ),低剂量实验组和模型组耳蜗组织中 Caspase-3 蛋白表达量无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表2。

### 3 讨论

内耳毛细胞的丢失或损伤是引起感音神经性耳聋的主要原因,耳蜗毛细胞缺血缺氧,活性氧大量堆

积后,导致内耳骨迷路的微血管产生内皮素-1(ET-1)<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>显示,ET-1可以增强血管紧张素转换酶(ACE)及血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的活性,作为强烈的缩血管物质,ACE及AngⅡ协同作用使内耳缺血加重,同时ET-1可加速细胞内钙离子(Ca<sup>2+</sup>)释放,促进Ca<sup>2+</sup>通道开放及内流,造成细内钙超载,进而导致内耳毛细胞损伤及死亡。本研究参照Oishi N等<sup>[8]</sup>庆大霉素豚鼠耳毒性造模过程,选用体质量较大的雄性豚鼠,前期预实验结果显示,给予庆大霉素100 mg/kg、连续腹腔注射10 d,耳聋模型建立成功。本研究结果中也同样显示出,与空白组比较,造模后模型组豚鼠ABR阈值升高。

药物中毒性聋属中医耳聋范畴,中医学治疗耳聋具有悠久的历史,耳属肾,耳与肾关系颇为密切。中医认为肾开窍于耳,肾之精气充沛,耳得所养则听觉聪敏,肾元亏虚则耳窍失养,听力失聪<sup>[9]</sup>。《证治汇补·卷四》曰:“肾开窍于耳,因肺主气,一身之气贯于耳故也”,外邪犯肺,肺气闭郁,鼻窍不通,咽鼓管不通,则耳失聪敏。《黄帝内经》记载:“肾开窍于耳,肾和则耳能闻五音”,肾主骨生髓,髓海和肾精不足,可引起耳聋,肝失所养致肝气郁结。若药毒致肾元亏虚,浊邪内犯则耳窍失养,久而窍络闭阻,成血瘀证。因此治疗当以通耳窍、补肝肾,兼活血化瘀为治<sup>[10]</sup>。符国庆等<sup>[11]</sup>根据中医理论对110例突发性耳聋患者采用中药龙胆泻肝汤和葛根方治疗,效果显著,患者血流变学指标得以改善,耳鸣分级改善也优于单纯常规西药治疗。本研究所用的补肾活血通窍汤,方中熟地黄、骨碎补、淫羊藿益肾填精,当归、黄芪养血活血,川芎、丹参、活血化瘀通络,石菖蒲、水蛭开窍行气,磁石镇纳浮阳安神,聪耳通窍<sup>[12]</sup>。全方可发挥益肾填精、开窍通络、行气活血的功效。本研究对实验组豚鼠分别灌胃不同浓度的补肾活血通窍汤,干预10 d后结果显示,与模型组比较,中/高剂量实验组ABR阈值降低,表明庆大霉素耳中毒豚鼠听力经补肾活血通窍汤干预后听力改善显著。

当外部刺激持续存在时,细胞将发生凋亡、自噬和坏死。大量研究<sup>[13]</sup>已表明,感音神经性耳聋存在着内耳毛细胞的凋亡。Caspase-3处于凋亡有序级联反应的下游,是细胞凋亡的关键执行者。自噬是细胞的一种防御和应激,可以成为细胞应激条件下的一种保护反应,使细胞维持自身微环境的稳态,LC3-II是自噬体的标志分子,定位于自噬体膜上,对自噬小体的形成起着至关重要的作用<sup>[14]</sup>。本研究结果表明,模型组豚鼠耳蜗细胞自噬蛋白LC3、Bec-

lin1水平及螺旋神经节细胞、毛细胞及血管纹中Caspase-3蛋白表达量升高,表明庆大霉素会造成耳蜗细胞凋亡及自噬性死亡,补肾活血通窍汤保护性用药后,中/高剂量实验组豚鼠耳蜗细胞自噬蛋白LC3、Beclin1水平及螺旋神经节细胞、毛细胞及血管纹中Caspase-3蛋白表达量又发生降低,表明补肾活血通窍汤可以抑制庆大霉素耳中毒豚鼠耳蜗组织凋亡及自噬现象的发生。

综上所述,补肾活血通窍汤对于因庆大霉素造成的感音神经性耳聋具有一定的保护作用,且与药物呈现浓度依赖性,其通过抑制自噬及凋亡的发生来减轻耳蜗细胞损伤,减少听力损失,可作为治疗感音神经性耳聋的潜在药物。

参考文献

[1] 陈彩凤,陈淑慧,廖月红,等.电针配合中药穴位注射治疗感音神经性耳聋的效果及机制[J].广东医学,2016,37(13):2021-2024.

[2] 刘锦峰,戴金升,王宁宇.人工耳蜗植入对单侧感音神经性聋患者声源定位的影响[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,51(8):623-630.

[3] 周雅婷,林炎龙,何扬宇.针刺辅助治疗感音神经性耳聋的病例对照研究[J].中国中西医结合杂志,2017,37(2):250-251.

[4] 陈家麟.补肾活血在老年性耳聋患者治疗中的应用[J].医疗装备,2016,29(11):156-157.

[5] 祁青,孙勤国,江波.补肾活血化痰汤联合针刺治疗老年性神经性耳鸣的临床观察[J].湖北中医杂志,2013,35(12):40-41.

[6] 王明明,韩月臣,陈成芳,等.急性低频感音神经性聋预后相关因素分析[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,51(9):644-649.

[7] Baldwin M, Watkin P. Predicting the degree of hearing loss using click auditory brainstem response in babies referred from newborn hearing screening[J]. Ear Hear,2014,34(3):1-9.

[8] Oishi N, Kendall A, Schacht J. Metformin protects against gentamicin-induced hair cell death in vitro but not ototoxicity in vivo[J]. Neuroscience Letters,2014,583(7):65-69.

[9] 唐爱华.通窍活血汤加减联合针灸辨治气滞血瘀证突发性耳聋患者的临床研究[J].中医药学报,2016,44(6):78-81.

[10] 吴飞虎,朱丹华.通窍活血汤联合脑蛋白水解物治疗气滞血瘀型突发性耳聋的临床观察[J].中成药,2017,21(1):228-230.

[11] 符国庆,王翔,李淑芳,等.龙胆泻肝汤合葛根方辅助治疗突发性耳聋[J].中国实验方剂学杂志,2016,43(13):169-172.

[12] 王莘.自拟益气补肾活血通窍汤治疗神经性耳鸣22例疗效观察[J].临床合理用药杂志,2013,6(22):44-44.

[13] Lin C F, Lee K J, Yu S S, et al. Effect of comorbid diabetes and hypercholesterolemia on the prognosis of idiopathic sudden sensorineural hearing loss[J]. Laryngoscope,2016,126(1):142-149.

[14] Blagonravov M L, Korshunova A Y, Azova M M, et al. Cardiomyocyte Autophagia and Morphological Alterations in the Left Ventricular Myocardium during Acute Focal Ischemia[J]. Bulletin of Experimental Biology & Medicine,2016,160(3):398-400.