DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.032
458 第21卷第6期 1999年6月 第三军医大学学报 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Vol. 21, No. 6 Jun. 1999

豚鼠耳蜗毛细胞肌动蛋白在水杨酸盐耳毒性发生时的改变

Changes of expression of actin in hair cells of cochlen in sodium salicylate ototoxicity in guinesa pig

朱 瑾* 刘兆华 (第三军医大学附属大坪医院耳鼻咽喉科) 重庆,400042

提 要 目的:检测水杨酸盐耳毒性发生时耳蜗毛细胞肌动蛋白(Actin)表达的改变,并探讨其机制。方法:以脑干听觉诱发电位(BAEP)阈值作为听功能指标,建立水杨酸盐耳中毒模型。采用免疫细胞化学方法检测正常对照组和水杨酸盐耳毒性组耳蜗肌动蛋白表达。结果:正常豚鼠内/外毛细胞、支持细胞和内/外沟细胞 Actin 免疫反应呈强阳性;螺旋缘齿间细胞和血管纹上皮细胞呈弱阳性。水杨酸盐耳中毒时上述细胞内肌动蛋白免疫反应明显减弱。结论:豚鼠水杨酸盐耳中毒时耳蜗毛细胞肌动蛋白含量下降,这可能是水杨酸盐耳毒性发生机制中的重要环节。

肌动蛋白(Actin)是一种普遍存在的细胞骨架蛋白,它与中间丝、微管共同构造和维持细胞的正常功能。肌动蛋白广泛存在于鸡、豚鼠等动物和人类耳蜗毛细胞,并对维持毛细胞正常的生理功能起着非常重要的作用[1],包括赋予静纤毛抗偏移的能力、参与内耳信息传导、是毛细胞收缩的原动力等。在水杨酸类药物耳毒性机制的研究中,尽管研究表明外毛细胞功能的改变在其耳毒性的发生中起着关键性的作用[2],但确切的机制仍不清楚,国内、外亦未见关于水杨酸类药物对耳蜗上皮细胞细胞骨架影响的报道。为此,我们采用免疫细胞化学技术检测耳蜗肌动蛋白的表达,以期明确肌动蛋白在水杨酸盐耳毒性发生中的改变和作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物的分组

16只健康白色红目豚鼠,均为雄性,耳廓反射灵敏,体重250~350 g,将动物随机分为生理盐水对照组(生理盐水2 mg/kg,IP)和水杨酸钠模型组(水杨酸钠500 mg/kg,IP)。水杨酸钠为中国五联生化厂生产(批号:950511)

1.2 脑干听觉诱发电位(BAEP)的测定

分别在用药前和注射药物后2 h 采用 ZABR-200型脑干反应测听仪(北京中科电气高技术公司生产)进行 BAEP 检查以测定其听阈。动物用0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,置于隔声屏蔽箱内,耳机膜片距外耳道口3 cm,电极采用3号毫针,记录电极置于前额正中皮下,参考电极置于双侧耳后乳突区皮下,刺激声为短声。以Ⅲ波出现的声强为其反应阈值,在阈值强度重复检测一次。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验进行统计学处理。

1.3 固定与取材

在用药2 h 测定听阈后开胸,行活体心脏灌注固定,固定液为4%的中性甲醛。迅速取出双侧颞骨,4℃下再固定12 h。10% EDTA 液中室温下脱钙。完全脱钙后常规石蜡制片。

1.4 抗 Actin 抗体免疫细胞化学染色

0.3% H_2O_2-甲醛37℃孵育15 min;5%正常羊血清37℃孵育30 min;鼠抗 Actin 单克隆抗体(1∶50,DAKO 公司生产)4℃孵育12 h;生物素化羊抗鼠 IgG(1∶200,ZymED 公司生产)37℃孵育30 min;辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(1∶200,ZymED 公司生产)37℃孵育30 min;DAB 显色。上述各步骤之间用 PBS 漂洗3次,每次10 min。

在各次重复实验中,5只豚鼠骨骼肌标本用作阳性对照染色;用正常羊血清取代抗 Actin 单克隆抗体作阴性对照染色。显微镜下盲法判断染色深浅。

2 结果

2.1 BAEP 测试结果

用药前、后两组豚鼠 BAEP 阈值见表1。水杨酸钠组用药后 BAEP 阈值较用药前以及正常对照组显著升高($P<0.01$),正常对照组用药前、后 BAEP 阈值差异不显著($P>0.05$)。

表 1 2组动物用药前、后 BAEP 阈值

动物分组	用药前	用药后	t	P
正常对照组	43.64±6.74	41.43±6.90	0.648	>0.05
水杨酸钠组	43.75±7.44	67.50±8.86	0.029	<0.01
t	0.032	6.566		
P	>0.05	<0.01		

* 朱 瑾,女,30岁,主治医师,讲师,硕士,现在附属西南医院耳鼻咽喉科 重庆,400038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　抗 Actin 抗体免疫细胞化学染色结果

Actin 免疫反应阳性颗粒呈棕褐色，定位于细胞浆。阴性对照上述细胞均未见阳性反应。阳性对照可见豚鼠骨骼肌肌细胞呈强阳性。正常对照组抗 Actin 免疫反应在内/外毛细胞、支持细胞和内/外沟细胞呈强阳性；盖膜、螺旋缘和血管纹呈弱阳性。水杨酸钠组上述细胞胞浆内抗 Actin 免疫反应阳性颗粒较正常对照组相应细胞明显减少，见图1，提示细胞内肌动蛋白含量减少。



图 1　水杨酸钠耳中毒豚鼠 Corti 器内、外毛细胞和支持细胞抗 Actin 免疫细胞化学染色　(S-P×400)

⇨所指为内毛细胞，↑所指为外毛细胞

3　讨论

肌动蛋白作为一种细胞骨架，并具有一定作用，主要存在于毛细胞静纤毛、表皮板和细胞膜下。它们在细胞内形成交叉束，机械支持各种细胞结构，并与肌凝蛋白一起，形成各种高度特化收缩系统，参与细胞的活动。毛细胞内肌动蛋白在耳蜗对声音的传递过程中起着重要的作用，包括静纤毛中肌动蛋白协同一些支持肌动蛋白的蛋白复合体参与信息传导过程；组成静纤毛的肌动蛋白丝决定了毛细胞的频率选择性和静纤毛的劲度等。有学者[3]采用免疫组化等技术观察了正常豚鼠耳蜗肌动蛋白的分布，结果与我们的实验结果一致，即肌动蛋白免疫反应阳性颗粒主要位于内、外毛细胞和 Corti 器中支持细胞。此外，我们还发现正常豚鼠螺旋缘齿间细胞、内外沟细胞和血管纹上皮细胞呈现阳性染色。本实验采用水杨酸钠成功地建立了豚鼠水杨酸盐耳中毒模型，此时耳中毒豚鼠听力下降约20 dB，同时耳蜗中上述细胞肌动蛋白免疫组化染色减弱。这提示水杨酸盐耳中毒时上述细胞内肌动蛋白含量下降。

细胞内肌动蛋白含量的减少可由肌动蛋白结构破坏所致。而后者可能与水杨酸盐诱导低血钙和改变细胞渗透性有关。钙离子可减弱与膜相连的细胞骨架成分的相互作用，导致细胞骨架的短暂解聚。此外，当细胞的渗透性和营养代谢改变时亦可引起肌动蛋白结构解聚，从而影响其功能[4]。

基于上述理论，结合我们在其它实验中发现的水杨酸钠使内耳毛细胞等的细胞膜性结构发生改变、使血管通透性增加、降低内耳血流量，我们推测水杨酸类药物可能通过选择性地阻断耳蜗内源性前列腺素的生物合成[5]等途径使细胞内钙离子浓度升高，细胞内呈高渗状态，造成细胞骨架短暂解聚和断裂，引起肌动蛋白结构破坏和功能下降，肌动蛋白正常功能难以发挥，影响声音的传递，造成听阈提高。

关键词　水杨酸盐耳毒性；肌动蛋白；耳蜗；豚鼠

中图法分类号　R322.92；R595.4

参考文献

1 Ptok M, Nair T S, Altschuler R A, *et al*. Monoclonal antibodies to inner ear antigens: 1. Antigens expressed in sensory cell stereocilia. Hear Res, 1991, 57(1): 79

2 Stypulkowski P H. Mechanisms of salicylate ototoxicity. Hear Res, 1990, 46(1~2): 113

3 Pirvola U, Lehtonen E, Ylikoski J. Spatiotemporal development of cochlear innervation and hair cell differentiation in the rat. Hear Res, 1991, 52(2): 345

4 Ayscough K R, Drubin D G. Actin: general principles from studies in yeast. Ann Rev Cell Dev Biol, 1996, 12: 129

5 Park Y S, Jung T T K, Choi D J, *et al*. Effect of corticosteriod treatment on salicylate ototoxicity. Ann Otol Rhino Laryngol, 1994, 103(11): 896

(收稿：1998-11-13；修回：1999-02-02)

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net