

人参皂苷 Rg₁ 通过 Akt-Nrf2 信号通路拮抗顺铂诱导的豚鼠耳毒性作用研究

孙宪昌¹, 郭俊², 姜明春¹, 商菲菲¹

1. 泰山医学院 生理教研室, 山东 泰安 271000

2. 泰安市中心医院 妇科, 山东 泰安 271000

摘要: **目的** 探讨人参皂苷 Rg₁ (Rg₁) 对顺铂 (CDDP) 所致豚鼠听觉损伤的保护作用及其机制。 **方法** 将 80 只豚鼠随机分为 5 组, 对照组连续 7 d ip 生理盐水 3 mL/kg; CDDP 组 ip CDDP 3 mg/kg, 连续 7 d; CDDP+Rg₁ (5、10、20 mg/kg) 组连续 10 d ip Rg₁ (5、10、20 mg/kg), 第 4~10 天 ip Rg₁ 1 h 后对侧腹腔 ip CDDP 3 mg/kg。各组动物于给药前及停药后均行听觉脑干诱发电位 (ABR) 检测。实验中每天检测豚鼠体质量并观察饮食、毛发脱落及活动状况等一般情况的变化。实验结束后迅速取出豚鼠双侧耳蜗, 分别用耳蜗基底膜铺片的方法观察外毛细胞缺失情况; 用 HE 染色方法检测耳蜗内螺旋神经节损伤; 用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法检测耳蜗组织中总超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和丙二醛 (MDA) 水平; 用 Western blotting 法检测耳蜗组织内促凋亡蛋白 (Caspase-3 和 p53) 及与氧化应激密切相关的信号分子 (p-Akt 和 Nrf2) 的表达。 **结果** 与 CDDP 组相比, Rg₁ 能剂量依赖性降低 CDDP 诱导的 ABR 阈值升高, 对豚鼠听觉功能具有显著保护作用。形态学观察发现 Rg₁ 可明显减轻 CDDP 导致的豚鼠内耳外毛细胞大片缺失及螺旋神经节的损伤。耳蜗内组织化学检测则显示 CDDP 可导致耳蜗组织中 MDA 水平明显升高 ($P<0.05$) 及 SOD 活性的明显降低 ($P<0.01$); 同时应用 Rg₁ 则可显著拮抗 CDDP 诱导的上述改变。Western blotting 结果发现 Rg₁ 可明显抑制 CDDP 诱导的耳蜗组织内 Caspase-3 及 p53 表达的增加 ($P<0.05$); 并显著促进耳蜗内 p-Akt 及 Nrf2 的表达 ($P<0.05$)。 **结论** Rg₁ 可通过抗氧化及抗凋亡作用保护 CDDP 所致豚鼠听觉损伤, 该作用可能与激活 Akt-Nrf2 信号通路有关。

关键词: 人参皂苷 Rg₁; 顺铂; 耳毒性; 活性氧自由基; Nrf2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)14-3309-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.017

Ginsenoside Rg₁ attenuates cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs via Akt/Nrf2 pathway

SUN Xian-chang¹, GUO Jun², JIANG Ming-chun¹, SHANG Fei-fei¹

1. Department of Physiology, Taishan Medical University, Taian 271000, China

2. Department of Gynaecology, Central hospital of Taian, Taian 271000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of Ginsenoside Rg₁ against cisplatin (CDDP)-induced ototoxicity and its mechanisms. **Methods** Eighty guinea pigs were randomly divided into five groups with ten rats in each group, namely control group, cisplatin group, 5 mg/kg Rg₁ + CDDP group, 10 mg/kg Rg₁ + CDDP group, and 20 mg/kg Rg₁ + CDDP group. Animals in the control group were administered with normal saline (NS, 3 mL/kg) via intraperitoneal (ip) route for 7 consecutive days. Cisplatin group were injected with cisplatin alone (3 mg/kg, ip) for 7 consecutive days. Rg₁ + CDDP groups were given 3 consecutive days of Rg₁ (5 mg/kg, 10 mg/kg, and 20 mg/kg ip respectively for each group) ahead of the application of Rg₁ + cisplatin (3 mg/kg, ip) for 7 consecutive days. For the 7 consecutive days of co-treatment of Rg₁ with cisplatin, Rg₁ was injected peritoneally 1 hour before the injection of CDDP at the contralateral side. Auditory brainstem response (ABR) test was used to evaluate the auditory function of rats in each group before and after administration of CDDP. Stretched preparation of cochlear basilar membrane was examined for morphological changes of outer hair cells (OHC). The general case of diet, loss of hair, and activity status of guinea pigs were observed every day. HE staining techniques and optical microscopy were used to evaluate the lesions of spiral ganglion neurons (SGN). The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxidedismutase (SOD) activities in cochlear tissues were detected by biochemical assay kits. The protein expressions of Caspase-3, p53, p-Akt, and Nrf2 were determined by western blotting. **Results** Compared with

收稿日期: 2018-02-11

作者简介: 孙宪昌 (1977—), 男, 山东莱芜市人, 医学博士, 主要从事药物性耳聋机制与防治方面的研究。

CDDP group, Rg_1 co-treatment significantly lowered the CDDP-induced ABR threshold elevation ($P < 0.05$) in a dose dependent manner. The severe damages of cochlear OHCs and SGNs exhibited in CDDP group were also markedly attenuated by co-treatment with Rg_1 in the $Rg_1 + CDDP$ groups. In CDDP group, the MDA levels were significantly increased while the SOD activity was decreased in cochlear tissue after CDDP injection. Rg_1 treatment evidently reduced the level of MDA and enhanced the SOD activity ($P < 0.05$). Western blot results indicated that Rg_1 treatment significantly attenuated CDDP-induced pro-apoptotic protein expressions (Caspase-3 and p53). Furthermore, treatment with Rg_1 resulted in an increased expression of p-Akt and intranuclear Nrf2 in cochlear tissue compared to the CDDP group. **Conclusion** Ginsenoside Rg_1 protects auditory functions from cisplatin-induced ototoxicity via the Akt/Nrf-2 pathway in guinea pigs.

Key words: ginsenoside Rg_1 ; cisplatin; ototoxicity; reactive oxygen species; Nrf2

顺铂 (cisplatin, CDDP) 是目前临床上最为常用的广谱化疗药物之一, 广泛应用于各种实体肿瘤如卵巢癌、睾丸癌、头颈部及肺部肿瘤的治疗, 但其严重的耳、肾毒性却大大限制了其在临床的广泛应用^[1]。目前, 临床上可通过水化疗法和利尿剂的使用明显减轻 CDDP 的肾毒性^[2], 但尚无有效防护耳毒性的措施。因此如何减轻 CDDP 的耳毒性, 使其更好地发挥抗肿瘤作用成为亟需解决的问题。尽管 CDDP 耳毒性的确切机制现在仍未明确, 但已有的研究表明耳蜗内自由基异常增多及氧化应激损伤在 CDDP 诱导的内耳损伤中发挥了决定性作用^[3]。CDDP 进入耳蜗后可激发耳蜗组织产生大量的自由基、明显降低抗氧化酶的活性、加重耳蜗内脂质过氧化反应并最终导致了毛细胞及螺旋神经节细胞的凋亡。因此, 清除自由基、减轻内耳氧化应激损伤成为防治 CDDP 耳毒性的研究热点。

近年来的研究表明, Akt/Nrf2 信号通路在抗氧化应激损伤中起着重要的作用^[4]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor2, Nrf2), 是一种碱性亮氨酸拉链转录因子, 激活后可转位于细胞核内诱导抗氧化蛋白类基因、II 相解毒酶类基因、抗氧化防御因子和抗炎因子类等大量保护性基因的表达, 增强组织抗氧化、抗炎、抗肿瘤及抗凋亡的能力, 保护细胞和组织免受损伤。Nrf2 信号通路与肿瘤、炎症及神经系统疾病等病理生理进程密切相关受到广泛关注, 而最新的研究提示 Nrf2 通路与 CDDP 的副作用密切相关, 激活 Nrf2 可明显改善 CDDP 的耳毒性作用, 是防治 CDDP 耳毒性作用的重要靶点^[5]。

人参皂苷 Rg_1 (ginsenoside Rg_1 , Rg_1) 是我国传统补益中药人参的主要活性成分, 具有广泛的生理活性及药理作用。一系列研究显示 Rg_1 具有抗炎、抗氧化、清除体内自由基、降低细胞内钙浓度及对抗细胞凋亡的作用, 对神经系统具有显著的营养和保护作用^[6]。但 Rg_1 能否通过激活 Nrf2 信号通路保

护 CDDP 所致的听觉损伤尚未见报道。因此本实验通过制备 CDDP 耳毒性动物模型, 系统观察了 Rg_1 对 CDDP 所致听觉损伤的保护作用并探讨了其相关的分子机制, 为揭示 CDDP 耳毒性的机制及寻找相关的治疗药物提供实验依据。

1 材料

1.1 药品、试剂及仪器

CDDP (冻干型, 批号 H37021357, 齐鲁制药有限公司, 20 mg/支, 用生理盐水将其配成 1 mg/mL 的使用液); Rg_1 (粉末, 批号 140809, 购自上海同田生化技术有限公司, 使用前用生理盐水将其溶解为 10 mg/mL 的使用液); 超氧化物歧化酶 (SOD) 与丙二醛 (MDA) 检测试剂盒购自南京建成生物有限公司; 核蛋白提取试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司; 一抗 Caspase-3、p53 购自美国 Sigma 公司; p-Akt 和 Nrf2 购自美国 CST 公司; 听觉脑干诱发电位仪 (美国 Bio-logic Navigator PRO); SC-1 型声刺激器 (上海生理研究所); 体视显微镜 (日本 OLYMPUS SZ61); AO820 切片机 (美国 AO 公司); 普通光学显微镜 (德国 Leica DM2500); 全自动荧光、化学发光成像系统 (UVP Biospectrum 810, USA); 多功能酶标分析仪深圳市镭射科技有限公司)。

1.2 动物

成熟健康豚鼠 80 只, 体质量 300~350 g, 购自山东泰邦生物制品有限公司, 动物合格证号鲁动质字 D20140208 号, 动物许可证号 SCXK (鲁) 20090004。

2 方法

2.1 动物分组及给药

豚鼠经适应性喂养 7 d 后将其随机分为 5 组, 对照组豚鼠 ($n=20$) ip 生理盐水, 每天 3 mL/kg, 连续 7 d; CDDP 组豚鼠 ($n=20$) 每天 ip CDDP 3 mg/kg, 连续 7 d; CDDP+ Rg_1 (低、中、高剂量) 组豚鼠 (低、高剂量组 $n=10$, 中剂量组 $n=20$) 前

3 d ip Rg₁ (5、10、20 mg/kg), 第 4 天起 ip Rg₁ 1 h 后对侧腹腔 ip CDDP 3 mg/kg, 连续 7 d。实验期间每天均观察动物的活动、饮食、毛发脱落、精神状态和体质量变化并根据体质量调整每日用药量。

2.2 听觉脑干诱发电位 (auditory brainstem response, ABR) 测定

所有动物在实验前与结束后各检测 1 次 ABR 反应阈值。动物在清醒状态下用固定装置将其固定, 置于隔音静电屏蔽室内进行测试; 将记录电极插入豚鼠颅顶正中部位, 参考电极和接地电极分别插入同侧和对侧乳突部; 经 EDL-903 型耳机输出短声刺激 (生源距耳 1.0 cm), 频率 10 次/s, 滤波通频带宽为 80~3 000 Hz, 叠加 200 次, 测量时声刺激强度从 100 dB SPL 开始以 5 dB 为一档逐次递减; 以 III 波刚出现时的最小刺激强度作为动物的反应阈值, 每只动物重复测定 2 次, 取其平均值作为最终阈值进行统计学分析。

2.3 豚鼠耳廓反射测试

实验开始后, 所有动物每天在隔音室内测试 1 次耳廓反射, 测试采用 SS-1 型声刺激器发出的短声 (click) 作为声源, 经气导耳机作用于豚鼠耳廓, 分别测试 8、4、2 kHz 下豚鼠耳廓对声源的抽动反应, 记录在不同频率下能引起耳廓明显抽动的最低分贝数, 判断动物听功能的变化状态。如果耳廓反射提高 6 dB 以上则表示听力下降, 将听力下降分为 3 个等级: 提高 6~10 dB 为轻度, 11~19 dB 为中度, 20 dB 以上者为重度; 用药结束后统计每组动物听力下降的动物耳数及程度, 进行比较分析。

2.4 耳蜗基底膜铺片及琥珀酸脱氢酶 (SDH) 染色

每组各取 5 只动物, 乙醚麻醉后迅速断头取出双侧听泡, 暴露耳蜗后用细针在蜗尖钻孔, 开放圆窗和卵圆窗, 用吸管吸取新鲜配制的 SDH 作用液 (0.1% 硝基四氮唑蓝、0.2 mol/L 琥珀酸钠、0.2 mol/L 磷酸缓冲液, 配制比例为 1:1:1), 从蜗尖小孔缓慢注入经圆窗和卵圆窗流出, 每个耳蜗灌注 2~3 次, 然后将耳蜗浸入 SDH 作用液中 37 °C 孵育 1~2 h; 再用 4% 的多聚甲醛溶液自蜗顶灌流 3 次, 并将标本浸入 4% 多聚甲醛溶液中 4 °C 过夜; 解剖显微镜下剥去蜗壳, 分离基底膜置于载玻片上, 70% 甘油封片, 显微镜下观察毛细胞内 SDH 的变化及基底膜各回外毛细胞缺失情况。镜下选取耳蜗第一、二、三回中下部的 3 个连续视野进行计数, 计算 3 个视野内毛细胞的总数, 即为该回毛细胞的数量。根据实验结

果及文献报道^[7-8]底回毛细胞损伤最为明显, 本实验仅对底回外毛细胞数量进行了统计和分析。

2.5 耳蜗石蜡切片标本制备

每组取 5 只动物乙醚麻醉后断头处死, 快速取出听泡, 暴露耳蜗, 蜗尖钻孔并打开卵圆窗及圆窗, 吸管吸取 4% 多聚甲醛从蜗尖小孔灌入耳蜗, 每个标本灌流 4~5 次, 然后将标本浸入固定液中 4 °C 过夜。固定好的听泡浸入 10% EDTA 溶液中, 室温下脱钙 2 周, 脱钙液每日更换 1 次, 以骨质软化为标准。将标本用低熔点石蜡进行包埋, 平行与蜗轴方向进行连续切片, 片厚 5 μm; 切片行苏木精-伊红 (HE) 染色。并按文献所述方法^[9]对螺旋神经节进行计数, 目镜加网格片, 每小格在 40×10 放大倍数下覆盖面积 10 μm×10 μm, 计算螺旋神经节细胞数, 每只耳蜗连续计数 3 张中轴切片, 取其均值。只记录一、二回对应的耳蜗螺旋管内螺旋神经节

2.6 耳蜗 MDA 水平及 SOD 活性测定

每组取 5 只豚鼠断头后迅速取出双侧耳蜗, 蜗尖钻孔, 并在底回挑破圆窗膜, 用生理盐水充分灌洗。在显微镜下, 用分离针将蜗尖至蜗底部的蜗壳剥离, 充分暴露耳蜗蜗轴及内部组织, 将双耳耳蜗合为 1 份后称质量, 然后再用预冷的生理盐水将其制成 10% 的组织匀浆, 4 °C、1 000 r/min 离心 30 min, 取上清液用硫代巴比妥酸显色法测 MDA 的量, 用黄嘌呤氧化酶法测定耳蜗组织中 SOD 活性。测试方法严格按照试剂盒说明书进行。最后将所得实验结果与组织蛋白浓度比较后进行统计学分析。

2.7 Western blotting 检测 Caspase-3 及 p53 蛋白表达

将豚鼠麻醉处死, 迅速取出听泡, 体视显微镜下剥离出双侧耳蜗组织, 加入含有 PMSF 的 RIPA 裂解液在冰上静置 30 min, 碾磨匀浆后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min; 取上清加入上样缓冲液 (loading buffer), 蛋白变性后 -40 °C 保存; 检测 Nrf2 的样品用核蛋白提前试剂盒按照说明进行处理。蛋白浓度用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) 测定, 等量 (20 μg) 蛋白样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转膜 (PVDF 膜), 将 PVDF 膜移入 5% 胎牛血清白蛋白中常温封闭 1 h, 分别加入兔抗鼠 Caspase-3 (1:500)、兔抗鼠 p53 (1:1 000)、p-Akt (1:1 000)、Nrf2 (1:800) 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 冲洗 (5 min×3 次)

后, 加入辣根过氧化物酶标记二抗 (1:10 000 稀释), 室温孵育 1 h, ECL 化学发光液显色, 采用全自动化学发光成像系统对电泳条带进行观察分析, 读取各电泳条带的灰度值, 以 β -actin 或 Lamin B 作为内参分析目的蛋白表达水平的变化。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件处理数据, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 耳廓反射所得数据应用秩和检验 (Nemenyi 法) 分析, 其他数据应用 Graphpad Prism 6.0 统计软件进行单因素方差分析。

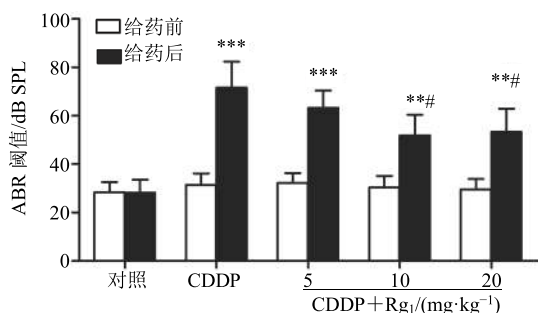
3 结果

3.1 动物给药前后 ABR 反应阈值比较

ABR 是目前公认的一个客观准确地反映听功能变化的指标, 本实验为了检测 CDDP 对豚鼠的听功能损伤情况及 Rg_1 的听觉保护作用, 在实验开始前及结束后对各组豚鼠分别进行了 ABR 测试。结果见图 1。给药前, 各组豚鼠 ABR 阈值无明显差异; 给药后, CDDP 组 ($n=7$) 豚鼠 ABR 反应阈值较用药前、对照组 ($n=10$) 明显升高 ($P<0.001$); 给予不同剂量的 Rg_1 保护后, 豚鼠的 ABR 反应阈值虽然也有升高, 但其升高幅度比 CDDP 组减轻; 特别是 Rg_1 中剂量组 ($n=10$)、高剂量组 ($n=10$) 保护作用明显 ($P<0.05$)。以上结果说明 Rg_1 对豚鼠听觉功能具有较好的保护作用, 且保护作用与剂量相关; Rg_1 中、高剂量对听功能保护作用明显好于低剂量 ($n=9$), 但两者之间并无明显差异, 故后续实验结果中 Rg_1 组的应用剂量均为 10 mg/kg。

3.2 动物一般情况的改变

对照组豚鼠给药前后日常活动及精神状态无



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与 CDDP 组比较: # $P<0.05$, 下同
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ vs CDDP group, same as below

图 1 各组豚鼠给药前后 ABR 反应阈值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Comparison on ABR thresholds of guinea pigs in each group before and after administration ($\bar{x} \pm s$)

明显变化, 体质量在实验期间略有增加; CDDP 组豚鼠给药期间活动减少, 食欲明显减退, 大量毛发脱落, 与对照组相比体质量明显下降 ($P<0.01$); CDDP + Rg_1 组给药后豚鼠也有活动减少、食欲减退、毛发疏松脱落、体质量下降等变化, 但较 CDDP 组明显减轻 ($P<0.05$)。整个实验过程中, CDDP 组有 3 只豚鼠死亡, CDDP + Rg_1 组有 1 只死亡, 对照组无死亡现象。各组动物在实验期间的体质量变化情况见图 2。

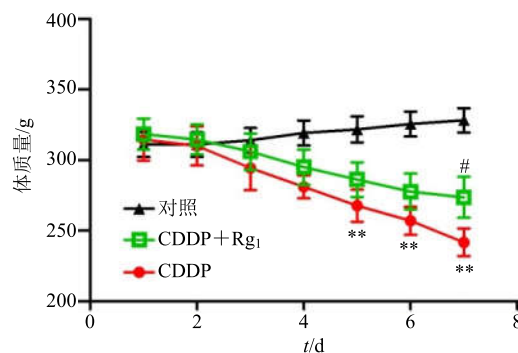


图 2 各组豚鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 2 Changes of body weight of guinea pigs in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.3 耳廓反射检测结果

结果显示所有受试动物给药前耳廓反射均灵敏正常, 对照组豚鼠用药后耳廓反射无明显变化; CDDP 组豚鼠随着给药时间的延长耳廓反射进行性减弱甚至消失, 而且频率越高耳廓反射减弱越明显; CDDP + Rg_1 组豚鼠耳廓反射也在给药后有不同程度的减弱, 但在各频率受累的豚鼠耳数比 CDDP 组明显减少 (表 1)。说明 Rg_1 能够保护豚鼠听觉功能, 减弱了 CDDP 诱导的听损伤。

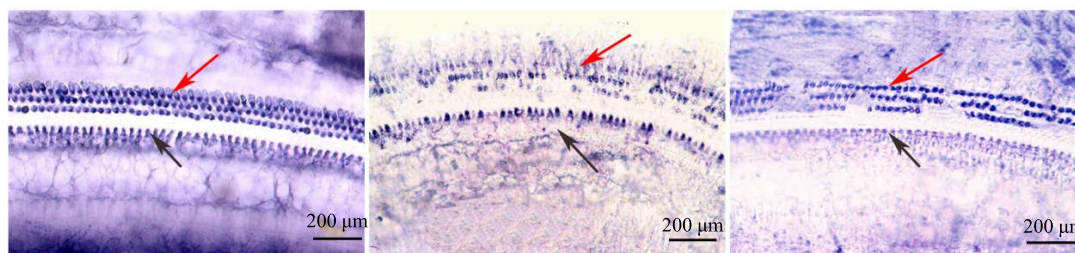
3.4 耳蜗基底膜铺片及毛细胞计数

3 组动物 SDH 染色及外毛细胞计数结果见图 3 和 4。光镜下可见正常豚鼠耳蜗基底膜上有排列整齐的 3 排外毛细胞和一排内毛细胞, 细胞染色均匀、轮廓清晰, 无明显缺失。CDDP 组豚鼠耳蜗毛细胞排列紊乱且轮廓不清, 染色明显减弱, 外毛细胞受损并伴有大片缺失, 缺失率达 54.3% (图 4); 在同一回的三排外毛细胞中又以第一排 (靠近内毛细胞的为第一排) 毛细胞受损最严重, 而内毛细胞基本正常。给予 Rg_1 保护后, 豚鼠耳蜗毛细胞染色基本正常, 虽然外毛细胞也有部分损伤缺失, 其缺失比率仅 30.5%, 比 CDDP 组明显减轻 ($P<0.05$)。

表 1 Rg₁ 对 CDDP 诱导的豚鼠听力下降程度的影响

Table 1 Effects of Rg₁ on hearing loss at different frequencies in cisplatin treatment guinea pigs

组别	耳数	2 kHz 听力下降程度/耳数				4 kHz 听力下降程度/耳数				8 kHz 听力下降程度/耳数			
		正常	轻度	中度	重度	正常	轻度	中度	重度	正常	轻度	中度	重度
对照	40	40	0	0	0	40	0	0	0	40	0	0	0
CDDP**	34	10	8	11	5	4	4	10	16	0	2	12	20
CDDP+Rg ₁ [#]	38	16	14	7	1	10	15	6	7	7	10	10	11



对照

CDDP

CDDP+Rg₁

红色箭头所示为外毛细胞, 黑色箭头所示为内毛细胞

Red arrows represent outer hair cells; black arrows represent inner hair cells

图 3 各组豚鼠耳蜗基底膜底回铺片及 SDH 染色结果 (×400)

Fig. 3 Results of SDH staining and stretched preparation of cochlear basilar membrane of guinea pigs in each group (×400)

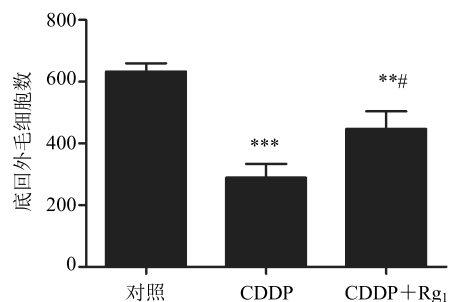
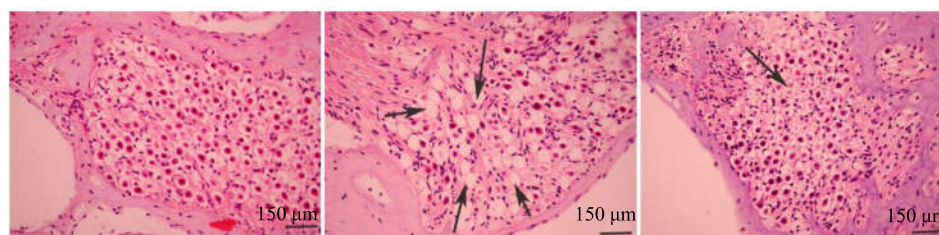


图 4 Rg₁ 对 CDDP 损伤的豚鼠耳蜗底回外毛细胞的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Protective effects of Rg₁ on OHCs in cisplatin-treated guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.5 耳蜗组织 HE 染色及螺旋神经节计数

结果见图 5 和表 2。光镜下可见豚鼠耳蜗分为 4 回, 与耳蜗 1~4 回对应的耳蜗螺旋管即是螺旋神经节存在的部位, 由蜗底到蜗顶依次称为一下、一上、二下、二上、三下、三上、四。因为 CDDP 诱导的螺旋神经节损伤主要位于蜗底, 本实验主要观察了底回和二回所对应的螺旋神经节变化。结果可见对照组豚鼠耳蜗螺旋神经节染色清晰, 分布密集, 无空泡及缺失; 给予 CDDP 后, 豚鼠螺旋神经节出现空泡样变并伴有大量缺失, 特别是一下、一上及二下缺失严重, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。而应用 Rg₁ 保护后, 豚鼠螺旋神经节受损及缺失程度明显较 CDDP 组减轻 ($P < 0.05$)。



对照

CDDP

CDDP+Rg₁

箭头指示损伤缺失的螺旋神经节

Arrowheads indicate damaged spiral ganglion neurons (SGNs)

图 5 各组豚鼠耳蜗底回螺旋神经节 HE 染色结果 (×400)

Fig. 5 HE staining of SGNs of guinea pigs in each group (×400)

表 2 Rg₁ 对 CDDP 损伤的豚鼠耳蜗内螺旋神经节细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of Rg₁ on survival number of SGNs in cisplatin treatment guinea pigs ($\bar{x} \pm s$)

组别	耳数	螺旋神经节细胞数量			
		一下	一上	二下	二上
对照	6	57.27 ± 5.35	53.25 ± 3.82	50.17 ± 6.81	49.17 ± 5.76
CDDP	6	26.41 ± 4.67**	27.32 ± 7.51**	25.36 ± 7.32**	40.24 ± 6.34
CDDP + Rg ₁	6	39.36 ± 7.32*#	38.14 ± 4.76*#	35.24 ± 8.47*#	46.41 ± 7.17

3.6 耳蜗组织 MDA 水平及 SOD 活性测定结果

实验结束后所测耳蜗组织的 MDA 水平及 SOD 活性见表 3。结果可见 CDDP 组豚鼠耳蜗组织内总 SOD 活性较对照组明显下降 ($P < 0.01$), 而 MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$); 应用 Rg₁ 保护的豚鼠 SOD

表 3 各组豚鼠耳蜗组织总 SOD 活性及 MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Changes of MDA and SOD levels in in cochlear tissues of guinea pigs in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	5	369.81 ± 10.27	4.07 ± 1.32
CDDP	5	253.21 ± 30.12**	12.19 ± 3.95*
CDDP + Rg ₁	5	314.06 ± 26.53*#	7.35 ± 1.72#

活性虽然也有降低, 但明显高于 CDDP 组 ($P < 0.05$), 其 MDA 水平与 CDDP 组比较显著降低 ($P < 0.05$)。

3.7 耳蜗组织 Caspase-3、p53、p-Akt 及 Nrf2 蛋白表达

结果见图 6, 对照组豚鼠耳蜗组织内 Caspase-3 及 p53 表达较少, 给予 CDDP 后 2 种蛋白在耳蜗内的表达较对照组明显增多 ($P < 0.01$); 而应用 Rg₁ 保护的豚鼠耳蜗组织内 Caspase-3 及 p53 蛋白表达量与对照组比较虽也有升高, 但明显低于单用 CDDP 的豚鼠 ($P < 0.05$)。对照组豚鼠耳蜗组织内 p-Akt 及 Nrf2 蛋白均有少量表达, 应用 CDDP 后 2 种蛋白表达量稍有增加, 但均无统计学意义。同时给予 Rg₁ 保护后, 耳蜗组织内 p-Akt 及 Nrf2 相对表达量比 CDDP 组明显增加 ($P < 0.05$)。

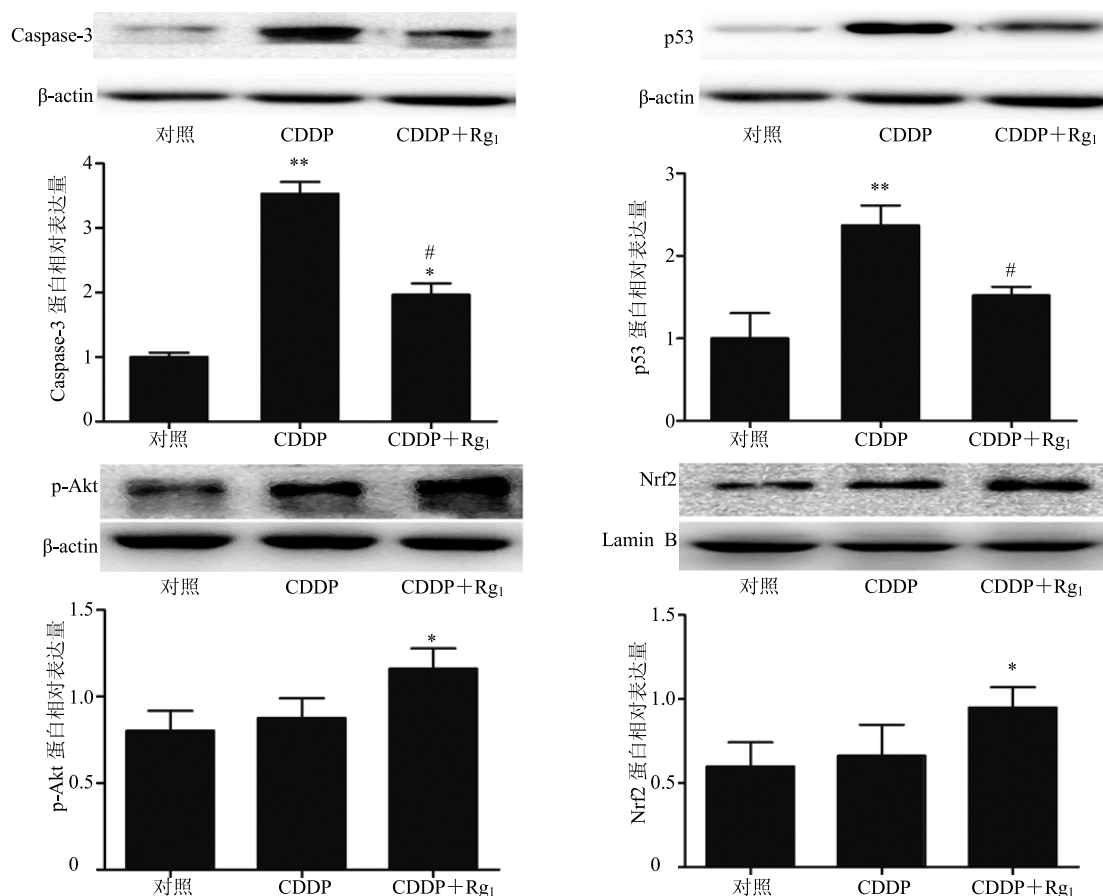
图 6 Rg₁ 对 CDDP 损伤的豚鼠耳蜗内 Caspase-3、p53、p-Akt 和 Nrf2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effects of Rg₁ on protein expressions of Caspase-3, p53, p-Akt, and Nrf2 in cochlear tissues in cisplatin treatment guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

近年来,随着肿瘤发病率的增高,化疗药物在临床中的应用日益增多,由化疗药物引起的严重副作用引起了广泛关注。CDDP 作为最常用的化疗药物,其严重的耳毒性一直是耳科学研究的热点,但到目前为止临床上仍无有效的防治措施;我国传统中药因具有多组分、多靶点、整体调节的特点,在减轻化疗毒副作用和提高肿瘤细胞化疗敏感性等方面有突出的优势^[10],如能从中筛选出即可拮抗 CDDP 耳毒性又不影响其抗肿瘤活性的药物或单体,对于改善肿瘤患者的生活质量具有重要的意义。

祖国医学在长期的耳聋诊治临床实践中摸索和积累了丰富的诊疗经验。如《明医杂著》中记载:“疾火以上升,郁于耳中为鸣,郁甚则壅闭矣。”《医林改错》记载:“耳孔内小管通脑,管外有瘀血,靠挤管闭,故耳聋。”由此可见,“火”与“瘀”是导致耳聋的重要病因,因此中药治疗耳聋的方剂中多用人参益气升阳,辅以活血化瘀通窍^[11]。唐代医药大家孙思邈在其《千金要方》中将耳聋分为了六类,并首次提出了“毒聋”的概念,毒聋与现代医学中的药物性耳聋相似;书中记载有治疗毒聋的解毒杂治方,“服五石散中毒,人参汤以解之”。综上所述,人参作为传统补益良药用于耳聋的治疗已有较久的历史。

现代药理学研究发现 Rg₁ 是人参的主要有效成分,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及清除自由基等多种生物学效应和药理作用^[12-13],有文献报道 Rg₁ 还具有较强的抗肿瘤作用,可抑制肿瘤细胞的侵袭、增殖以及抗肿瘤新生血管的形成,并且 Rg₁ 和 CDDP 联用还具有减毒增效的作用^[14-15]; Tian 等^[16]的研究显示人参皂苷可通过抗凋亡途径保护庆大霉素诱导的听觉损伤,但 Rg₁ 能否拮抗 CDDP 导致的内耳损伤并未见报道。为此应用 CDDP 诱导的豚鼠听损伤模型系统研究了 Rg₁ 的听觉保护作用。

CDDP 的耳毒性主要表现为双耳不可逆性、由高频向低频逐渐受累的感音神经性耳聋,可累及近 50%~100% 的患者,明显影响患者的生活质量^[17]。组织病理学的研究显示 CDDP 主要是通过损伤内耳毛细胞及螺旋神经节导致听功能受损^[18]。本实验的结果显示,应用 CDDP 7 d 后豚鼠体质量明显减轻、耳廓反射迟钝、ABR 阈值明显升高,听功能受损严重;进一步的结果显示耳蜗外毛细胞及螺旋神经节明显受损,损伤从耳蜗尖部到底部逐渐加重。这些

损伤特点与已有的文献报道一致,说明本实验的方法能够成功建立 CDDP 耳毒性模型;而应用 Rg₁ 保护后能明显减轻 CDDP 引起的豚鼠 ABR 阈值升高及内耳感觉细胞的丢失,对 CDDP 耳毒性表现出较好的拮抗作用。

关于 CDDP 耳毒性的确切机制目前尚未明确,但已有的证据表明耳蜗内活性氧自由基 (ROS) 增多导致的氧化应激在 CDDP 诱导的耳损伤中发挥了极为重要的作用^[19]。ROS 是细胞代谢过程中的正常产物,具有较强的氧化活性,正常情况下可以被体内的抗氧化酶及时清除而维持在较低的水平。但 CDDP 在内耳蓄积后会损伤 DNA 导致抗氧化酶的合成障碍,打破耳蜗内氧化平衡,使内耳处于一种 ROS 持续增多的氧化应激状态。在此状态下,过量的 ROS 可攻击细胞内的多种成分,使细胞内酶功能障碍、DNA 受损、脂质过氧化、膜通透性改变或钙超载,最终诱导了外毛细胞及螺旋神经节的进行性损伤凋亡^[20]。本实验检测了 ROS 脂质氧化的代表产物 MDA 的量和内耳主要的抗氧化酶 SOD 的活性,同时还观察了与细胞凋亡相关的重要蛋白 (Caspase-3 及 p53) 的表达。结果显示 CDDP 能显著增加耳蜗内 MDA 的量、减弱 SOD 活性并且使促凋亡蛋白 Caspase-3 及 p53 的表达明显增加,这与以往的文献报道相一致^[21];而 Rg₁ 能明显翻转 CDDP 诱导的 MDA 量增加及 SOD 活性的下降,明显抑制 Caspase-3 及 p53 的表达;表明 Rg₁ 可能是通过减弱 ROS 诱导的凋亡保护了外毛细胞及螺旋神经节进而拮抗了 CDDP 诱导的听功能损伤。当然, CDDP 诱导的内耳细胞凋亡还存在其他途径, Rg₁ 抗凋亡作用是否与其有关还需要进行深入研究。

为了进一步了解 Rg₁ 拮抗 CDDP 耳毒性的机制,本实验进一步观察了与氧化应激密切相关的 Akt-Nrf2 信号通路激活情况。Nrf2 是位于胞浆中的转录因子,被 p-Akt 激活后可转移至细胞核内与 DNA 上的抗氧化反应元件 (ARE) 结合,可增加细胞内抗氧化酶如 SOD、谷胱甘肽-S 转移酶 (GPx2)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 及血红素加氧酶 (HO-1) 等的表达,这些酶在清除细胞内 ROS、维持氧化平衡、预防氧化损伤方面起重要作用^[22-23]。Nrf2 的激活还能上调抗凋亡蛋白的表达,具有抑制细胞凋亡的作用。近年来的研究显示 CDDP 诱导的听觉损伤可能与该通路有关, Nrf2 作为预防 CDDP 耳毒性的主要靶点受到广泛关注^[5]。Ma 等^[24]报道银杏内酯可

通过激活 Akt-Nrf2 信号通路减轻 CDDP 的耳毒性; Youn 等^[25]应用花生芽提取物激活该通路后提高了细胞的抗氧化能力从而拮抗了 CDDP 诱导的听觉损伤。本实验对该通路中的信号蛋白进行了检测,结果显示 Rg₁ 能明显增加 p-Akt 及核内 Nrf2 的表达量,结合以上的实验结果说明, Rg₁ 的抗氧化及听觉保护作用可能与此通路的激活继而增加了耳蜗内抗氧化酶的表达有关。当然,该通路激活后引起的相关抗氧化酶的表达变化还需要进一步研究。

鉴于 ROS 在 CDDP 耳毒性中的重要作用,大量的研究试图通过降低内耳 ROS 来减轻 CDDP 耳毒性。目前已发现多种药物(如硫代硫酸钠、蛋氨酸、乙酰半胱氨酸等)在实验中可通过清除自由基或增强抗氧化能力保护 CDDP 导致的听损伤,但这些药物或者存在较大的副作用或者能干扰 CDDP 的抗肿瘤活性而不能长期应用于临床^[26]。寻找一种既能拮抗 CDDP 耳毒性、没有明显副作用又不影响其抗肿瘤活性的药物或单体已成为研究的热点。人参皂苷既有丰富的生物活性和药理作用,还具有一定的抗肿瘤作用,本研究结果也显示 Rg₁ 可通过抗氧化应激的作用保护 CDDP 诱导的耳损伤,这不仅为寻找 CDDP 耳毒性的保护药物提供新思路,还能作为中药的开发利用提供实验依据,具有重要的临床意义与应用开发价值。而关于 Rg₁ 对抗 CDDP 耳毒性的同时对 CDDP 抗瘤活性的影响有待于更进一步的研究和探讨。

参考文献

- [1] Nitz A, Kontopantelis E, Bielack S, *et al.* Prospective evaluation of cisplatin-and carboplatin-mediated ototoxicity in paediatric and adult soft tissue and osteosarcoma patients [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 311-315.
- [2] Mukherjea D, Rybak L P. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity [J]. *Pharmacogenomics*, 2011, 12(7): 1039-1050.
- [3] Wu X M, Li X F, Song Y D, *et al.* Allicin protects auditory hair cells and spiral ganglion neurons from cisplatin-Induced apoptosis [J]. *Neuropharmacology*, 2017, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.001.
- [4] Singer E, Judkins J, Salomonis N, *et al.* Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 15(6): e1601.
- [5] Fetoni A R, Paciello F, Mezzogori D, *et al.* Molecular targets for anticancer redox chemotherapy and cisplatin-induced ototoxicity: the role of curcumin on pSTAT3 and Nrf-2 signalling [J]. *British J Cancer*, 2015, 113(10): 1434-1444.
- [6] 杨秀伟, 富力. 人参中三萜类化学成分的生物活性和药理学作用 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(1): 36-55.
- [7] Gonçalves M S, Silveira A F, Teixeira A R, *et al.* Mechanisms of cisplatin ototoxicity: Theoretical review [J]. *J Laryngol Otol*, 2013, 127(5): 536-541.
- [8] 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.
- [9] 方耀云, 姚行齐, 姜泗长, 等. 老化豚鼠耳蜗毛细胞和螺旋神经节细胞定量研究 [J]. 中国体视学与图像分析, 1996, 1(23): 64-66.
- [10] 张培, 吕蒙莹, 刘劭, 等. 中药对铂类抗肿瘤药物的减毒增效作用研究进展 [J]. 药学进展, 2013, 37(5): 207-214.
- [11] 王树春, 丁国臣, 韩磊. 柴胡聪耳汤逆转庆大霉素诱发大鼠耳毒性的抗氧化机制研究 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2015, 24(3): 179-181.
- [12] 李渊, 周玥, 王亚平, 等. 人参皂苷 Rg₁ 基于 SIRT6/NF- κ B 信号通路对辐射致造血干/祖细胞衰老的保护作用 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4497-4501.
- [13] 赵琛, 苏光悦, 赵余庆. 人参皂苷及其衍生物抗结肠癌作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2477-2483.
- [14] 封颖璐, 凌昌全. 人参皂苷与肿瘤 [J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2005, 32(9): 665-668.
- [15] 石楸鸣. 人参皂苷的药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2967-2969.
- [16] Tian C J, Kim S W, Kim Y J. Red ginseng protects against gentamicin-induced balance dysfunction and hearing loss in rats through antiapoptotic functions of ginsenoside Rb1 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60(10): 369-376.
- [17] Li Y, Womer R B, Silber J H. Predicting cisplatin ototoxicity in children: Influence of age and the cumulative dose [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(16): 2445-2451.
- [18] 丁大连, 亓卫东, 张梅, 等. 顺铂及其耳毒性 [J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(2): 125-133.
- [19] Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, *et al.* Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: Review of physiopathological mechanisms in animal models [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269(12): 2455-2459.
- [20] Le Q, Tabuchi K, Warabi E, *et al.* The role of peroxiredoxin I in cisplatin-induced ototoxicity [J]. *Auris*

- Nasus Larynx*, 2017, 44(2): 205-212.
- [21] Benkafadar N, Menardo J, Bourien J, *et al.* Reversible p53 inhibition prevents cisplatin ototoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(1): 7-26.
- [22] Kim S J, Park C, Han A L, *et al.* Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nrf2 activation in auditory cells [J]. *Hear Res*, 2009, 251(1/2): 70-82.
- [23] 邓丹骆, 文 龙. HO-1 在顺铂诱导豚鼠螺旋神经元损伤中的作用 [J]. 中华耳科学杂志, 2015, 13(1): 156-160.
- [24] Ma W J, Hu J, Cheng Y. Ginkgolide B protects against cisplatin-induced ototoxicity: Enhancement of Akt-Nrf2-HO-1 signaling and reduction of NADPH oxidase [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015 75(5): 949-959.
- [25] Youn C K, Jo E R, Sim J H, *et al.* Peanut sprout extract attenuates cisplatin-induced ototoxicity by induction of the Akt/Nrf2-mediated redox pathway [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2017, 92(1): 61-66.
- [26] Bouffet E. Reducing cisplatin ototoxicity in children: Some hope and many questions [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(1): 6-7.