

血清一氧化氮变化对豚鼠庆大霉素耳毒性作用影响的实验研究

詹晓东, 蒋成义, 张明洁, 王伟

[摘要]目的: 探讨豚鼠血清一氧化氮变化在药物性耳聋过程中的作用机制。方法: 24只健康豚鼠随机均分为正常组、庆大霉素组、庆大霉素加L精氨酸(全程)组和庆大霉素加L精氨酸(半程)组。观察各种豚鼠血清中一氧化氮、听觉脑干反应、内耳外毛细胞的形态学变化。结果: 庆大霉素组血清中一氧化氮与正常组差异无统计学意义($P > 0.05$); L精氨酸全程组和半程组治疗后血清中一氧化氮高于正常组和庆大霉素组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。L精氨酸组ABR反应阈较庆大霉素组降低($P < 0.05$)。L精氨酸组内耳外毛细胞仅有散在损失。结论: 一氧化氮一定量升高对内耳毛细胞有细胞毒性作用, 进一步升高则对外毛细胞有保护作用。L精氨酸治疗能降低ABR阈值, 减少外毛细胞损害, 对耳蜗有保护作用。

[关键词] 耳聋; 庆大霉素; 一氧化氮; L精氨酸; 外毛细胞; 豚鼠

[中国图书资料分类号] R 764.43 R 978.12 [文献标识码] A

Influence of the change of nitric oxide in serum of guinea pigs on the ototoxicity of gentamicin: An experimental study

ZHAN Xiaodong JIANG Chengyi ZHANG Mingjie WANG Wei

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the influence of nitric oxide in serum on aminoglycoside antibiotic induced deafness in guinea pigs and its mechanism. **Methods** Twenty four health guinea pigs were randomly divided into four groups. 6 animals acted as normal controls. 6 were given gentamicin. 6 gentamicin with L-arginine from 1 to 19 days and 6 gentamicin with L-arginine from 10 to 19 days. Then the nitric oxide in serum was measured. The threshold of auditory brainstem response (ABR) and the pathological morphology of outer hair cells in the inner ear were evaluated. **Results** The nitric oxide in serum of the gentamicin group was not significantly higher than that of the normal control group ($P > 0.05$), the ABR threshold (95.63 dB) was significantly higher than that of the normal control group ($P < 0.05$), and the outer hair cells were massively lost. The nitric oxide in serum in the L-arginine groups was much higher than that in the normal control group and that in the gentamicin groups ($P < 0.001 \sim P < 0.005$), but the ABR threshold was lower than that in the gentamicin group and the outer hair cells were sporadically lost. **Conclusions** Some degree of nitric oxide in serum may cause toxicity to outer hair cells in guinea pigs, but higher level of nitric oxide in serum may be effective in prevention of outer hair cells in guinea pigs. The L-arginine may decrease ABR threshold and alleviate outer hair cells injury which has preventive effect to the cochlea of guinea pigs.

[Key words] deaf; gentamicin; nitric oxide; L-arginine; outer hair cell; guinea pigs

一氧化氮(nitric oxide, NO)在心血管、神经、免疫等多个系统的生理和病理过程中起到十分重要的作用。目前,在耳科领域有关NO的研究也取得很大进展,国内一些学者仅对耳蜗微循环障碍血清中NO的变化进行研究,而NO与药物性耳聋关系的研究尚无报道。本研究通过动物实验,研究NO与药物性耳聋的关系以及L精氨酸(L-Arg)治疗后耳蜗形态学和生理的变化。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作 耳廓反射正常的健康雄性杂

色豚鼠 24只(由中科院上海实验动物中心提供, No. 0000532),体重 150~270 g,随机分成 4组,每组 6只。正常对照组。药物性耳聋组(GM):硫酸庆大霉素 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔内注射,每天 1次,持续 19天。药物性耳聋加全程L精氨酸组(GM+全程L-Arg):硫酸庆大霉素 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 加L精氨酸 $450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔内注射,每天 1次,持续 19天。药物性耳聋加半程L精氨酸组(GM+半程L-Arg):硫酸庆大霉素 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔内注射,每天 1次,持续 19天,第 10天开始给予L精氨酸 $450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔内注射,每天 1次,持续 9天。动物实验期每天称体重以调整药物。

1.2 耳蜗基膜铺片 试验结束将 4组豚鼠断头处死,取颈动静脉血 2 ml,采用硝酸还原酶法(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)检测血清 NO水平。同时颞骨作耳蜗基膜铺片以观察外毛细胞形

[收稿日期] 2006-05-19

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2002kj222)

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科,安徽蚌埠 233004

[作者简介] 詹晓东(1962-),男,主任医师,副教授。

态:豚鼠断头取出听泡,剪除鼓室外侧壁,充分暴露鼓室内壁。在放大 10 倍的解剖显微镜下,用微针在蜗尖钻孔,将镫骨轻推入前庭窗,将 Zenker 氏固定液从蜗尖小孔缓缓灌入耳蜗,可见固定液前庭窗及蜗窗流出,然后将耳蜗标本浸入 Zenker 氏固定液中充分固定 4 h 在 20 倍的显微镜下以“摘帽法”去除蜗壳,分离取出耳蜗基膜并移到载玻片上,用苏木精染液浸染 3~4 min 常规制备耳蜗基膜铺片,观察顶、中、底回外毛细胞形态。

1.3 ABR 反应阈测定 实验第 19 天,用 10% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉后,采用丹迪公司 keypoint work 4 道高速诱发电位系统,在隔音屏蔽室内测试 ABR 反应阈,外耳道口给声,采用 0.35 mm 的针形电极置前额正中皮下,参考电极置测试耳外耳道口后上皮下,鼻尖接地。单耳短声 (click) 刺激,带通滤波 100~3 000 Hz 叠加 1 000 次。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

各组豚鼠血清 NO 和 ABR 阈值测定结果显示:GM 组引起血清中 NO 浓度升高,ABR 反应阈明显高于正常组 ($P < 0.01$)。内耳外毛细胞明显破坏 (见图 1、2)。加全程 L 精氨酸组及加半程 L 精氨酸,血清中 NO 浓度较正常组和 GM 组高 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$),ABR 反应阈明显低于 GM 组 ($P < 0.01$),但全程组低于半程组 ($P < 0.05$)。且内耳外毛细胞仅有散在性破坏 (见图 3、4),一定程度上内耳外毛细胞有保护作用。NO 与给予 L 精氨酸的时间无明显关系 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 各组豚鼠血清 NO 和 ABR 阈值测定结果比较 ($n_i = 6 \bar{x} \pm s$)

分组	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ABR 阈值 (dB)
正常对照组	71.78 ± 12.48	20.00 ± 2.56
GM 组	94.63 ± 19.75	95.63 ± 9.75 **
GM + 全程 L 精氨酸组	132.22 ± 22.38 ** #	34.56 ± 5.13 ** #
GM + 半程 L 精氨酸组	122.89 ± 19.79 ** #	42.38 ± 4.09 Δ ** #
F	12.63	180.55
P	< 0.01	< 0.01
$MS_{\text{组内}}$	359.580	36.165

q 检验:与正常对照组比较 ** $P < 0.01$ 与 GM 组比较 # $P < 0.05$ Δ $P < 0.01$ 与 GM + 全程 L 精氨酸组比较 Δ $P < 0.05$

3 讨论

在内耳正常情况下,NO 介导神经传导,调节血

流,并能维持内环境的稳定。同时,越来越多的资料表明,NO 在内耳病理性损伤过程中也起着重要的作用^[1]。有研究发现庆大霉素及顺铂引起的内耳损伤中 NO 浓度明显增高^[2,3]。本研究结果发现,应用耳毒性抗生素 (GM) 后血清中 NO 浓度增高,同时耳蜗外毛细胞大量破坏。进一步证明病理条件下如应用抗肿瘤药物顺铂、氨基糖苷类抗生素 GM、噪声刺激等在内耳均有诱导型一氧化氮合酶 (NOS-II) 的表达。NOS-II 可以长时间催化生成大量 NO,进而破坏其周围的组织作用^[3,4]。

另外,本实验中在耳毒性药物组中加入全程 L 精氨酸组或加半程 L 精氨酸,均导致血清中 NO 浓度继续增高,但耳蜗外毛细胞呈个别或散在破坏。说明不同时段给予外源性的 L 精氨酸对耳蜗组织起保护作用。病理情况下,机体内合成大量的 NO 会引起严重的毒性反应,造成内耳损伤。而 NO 吸入、NO 前体 (L-Arg)、NO 供体、NOS 阻滞剂和活性氧物质 (ROS) 清除剂等已应用于临床治疗内耳疾病。有实验结果显示,对 NOS 不同程度的抑制,可产生不同的治疗结果。表明 NO 在这一过程中既起到保护作用,又起到破坏作用。因此,治疗中 NO 的浓度要适度,以达到治疗目的,又不影响生理过程^[5]。本实验全程 L 精氨酸和半程 L 精氨酸的给予对血清 NO 浓度变化不显著,但 ABR 反应阈值较 GM 组下降,均对外毛细胞有保护作用。其作用机制可能为:在生理条件下,体内的 NO 对耳蜗外毛细胞 (OHC) 的保护作用可能是通过抑制 OHC 的胞内过量的 Ca^{2+} 负荷,即胞内 Ca^{2+} 超载发挥作用的,这亦可能是在病理过程的初期阶段的一种保护机制。另外, Ca^{2+} 也是一种非常重要的第二信使物质,许多细胞内过程和神经活动都需要 Ca^{2+} 的参与。而 NO 能抑制 Ca^{2+} 的内流,可能借此而参与调节 OHC 胞内生物过程和耳蜗机制^[6]。

总之,NO 在内耳的生理作用机制十分复杂,简单从血清中 NO 浓度和内耳外毛细胞变化的关系上仅能研究其部分机制,NO 在内耳疾病作用中的病理机制有待进一步研究阐明。

(本文图 1~4 见封四)

[参 考 文 献]

- [1] Ruan RS. Possible roles of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the mammalian cochlea [J]. *Ann NY Acad Sci* 2002; 963: 260-274
- [2] Takumila M, Annko M, Popa R *et al*. Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide [J]. *Acta Otolaryngol* 2004; 121(1): 16-20

[文章编号] 1000-2200(2007)02-0139-03

· 基础医学 ·

survivin基因在膀胱移行细胞癌中的表达及其意义

张家俊¹, 李庆文¹, 王萍², 承泽农²

[摘要]目的: 探讨 survivin基因在膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of bladder TCCB)发生、发展和复发中的作用。方法: 对 53例膀胱移行细胞癌和 10例正常膀胱黏膜应用原位杂交方法检测 survivin mRNA 的表达。结果: survivin mRNA 在正常的膀胱黏膜中无表达, 在 TCCB中的阳性表达率为 71.7%, 两者差异有统计学意义($P < 0.005$); survivin mRNA 在 TCCB中的阳性表达率随 TCCB的病理分级、临床分期升高而增高, 在 G₁、G₂和 G₃级 TCCB中的阳性表达率分别是 50.0%、68.2%和 94.1%, 差异有统计学意义($P < 0.005$); 在表浅性和浸润性 TCCB中的阳性表达率分别为 50.0%、92.6%, 阳性表达率两者差异有统计学意义($P < 0.01$); 在初发和复发 TCCB中的阳性表达率分别为 66.7%、85.7%, 两者阳性表达率差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: survivin mRNA 高水平表达在 TCCB的发生、发展和复发中发挥了重要作用。

[关键词] 膀胱肿瘤; 癌; 移行细胞; survivin基因; 原位杂交; 细胞凋亡

[中国图书资料分类号] R 737.14

[文献标识码] A

Expression and clinicopathologic significance of survivin mRNA in transitional cell carcinoma of bladder

ZHANG Jia jun¹, LI Qing wen¹, WANG Ping², CHENG Ze nong²

(1. Department of Urology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004)

(2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of survivin mRNA and to evaluate its effects on the tumorigenesis, progression and recurrence in transitional cell carcinoma of bladder (TCCB). **Methods** In 53 cases of TCCBs and 10 cases of normal bladder mucosa, the expression level of survivin mRNA was detected by in situ hybridization (ISH). **Results** The expression positive rate of survivin mRNA in TCCB (71.7%) was significantly higher than that in 10 normal bladder tissues ($P < 0.005$). The expression level of survivin mRNA was elevated as the grade and stage increased in TCCB. The positive rates in grade G₁, G₂, G₃ were 50.0%, 68.2% and 94.1% ($P < 0.005$), 50.0% and 92.6% in stage of Ta-T1, T2-T4 respectively. All the data in above groups were statistically significant ($P < 0.01$); and in primary and recurrent cases were 66.7% and 85.7% and the data was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The higher expression of survivin mRNA may play an important role in the tumorigenesis, development and recurrence of TCCB.

[Key words] bladder neoplasm; carcinoma, transitional cell; survivin gene; in situ hybridization; apoptosis

survivin基因是一种凋亡抑制基因, 它在分化成熟的绝大多数成人组织中不表达, 而主要分布于胚胎和分化未成熟的组织以及大多数肿瘤组织中^[1]。我们应用原位杂交方法检测 survivin mRNA 在膀胱癌移行细胞(transitional cell carcinoma of bladder TCCB)中的表达情况, 探讨其在 TCCB发生、发展及复发中的作用。

1 材料与方法

1.1 一般材料 从蚌埠医学院病理学教研室挑选我科 2001~2004年手术切除的膀胱肿瘤标本 53份, 均经病理检查证实为 TCCB, 所选病例术前均未进行放疗、化疗。其中男 44例, 女 9例; 年龄 35~89岁。初发 39例, 复发 14例。肿瘤分级按 WHO的分级标准: G₁ 24例, G₂ 22例, G₃ 17例。临床分期按 TNM 标准: Ta~T1 26例, T2~T4 27例。另取 10例正常膀胱黏膜(良性前列腺增生症患者开放手术所取标本, 并且经病理检查证实为正常膀胱黏膜)

[收稿日期] 2006-01-20

[作者单位] 1 蚌埠医学院附属医院 泌尿外科, 安徽 蚌埠 233004

2 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 张家俊(1972-), 男, 硕士, 住院医师。

[3] Takamida M, Anniko M. Brain derived neurotrophic factor and nitric oxide synthase inhibitor protect the vestibular organ against gentamicin ototoxicity [J]. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(1): 10-15.

[4] Shi X, Dai G, Nuttall AL. Altered expression of inducible nitric oxide synthase (NOS) in the cochlea [J]. *Hear Res* 2003; 177

(1-2): 43-52.

[5] 赵立, 李涛, 孙锡超, 等. 一氧化氮合酶活性的变化对大鼠脊髓继发性损害的影响 [J]. *中华医学杂志*, 1998; 78(1): 27-29.

[6] 周建波, 孔维佳. 硝普钠对豚鼠耳蜗外毛细胞全细胞钙电流作用的实验研究 [J]. *中华耳鼻喉科杂志*, 2003; 38(4): 259-262.

血清一氧化氮变化对豚鼠庆大霉素耳毒性作用影响的实验研究(正文见第 137 页)

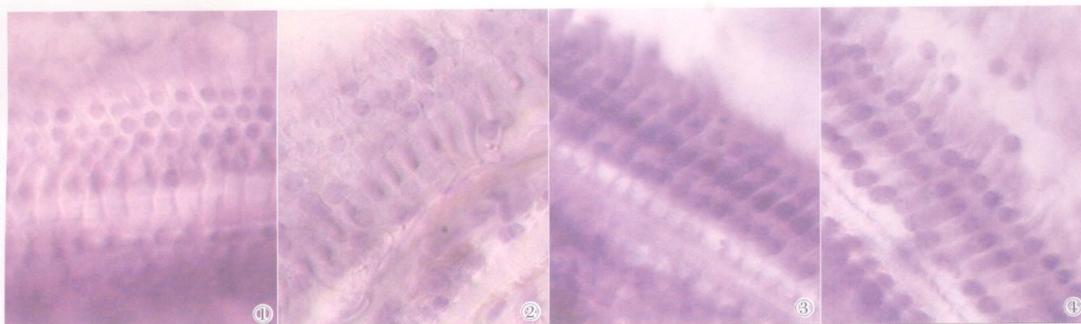


图 1 正常对照组:外毛细胞排列整齐,无缺失

图 2 GM 组:庆大霉素造成的大量外毛细胞坏死

图 3 GM+全程 L-Arg 组:个别外毛细胞坏死

图 4 GM+半程 L-Arg 组:散在性的外毛细胞坏死

丛状神经纤维瘤 12 例临床病理分析(正文见第 156 页)

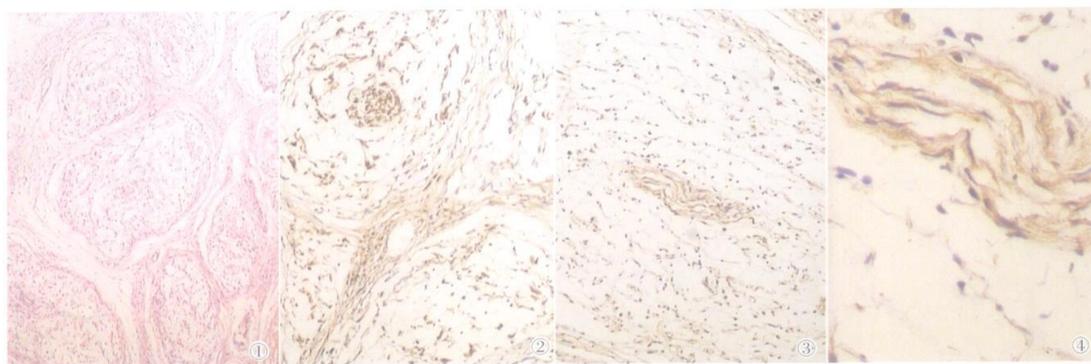


图 1 肿瘤组织形成大小不一的丛状结构,间质伴黏液样变性,HE 染色($\times 100$)

图 2 S-100 蛋白表达,SP 法($\times 100$) 图 3,4 丛状结构中的神经轴索 NSE 表达($\times 100, \times 400$)

蚌埠医学院学报

双月刊(1976 年 3 月创刊)

2007 年 第 32 卷 第 2 期(总第 146 期)

2007 年 3 月 15 日出版

主管单位:安徽省教育厅

主办单位:蚌埠医学院

主 编:祝 延

编辑出版:蚌埠医学院学报编辑部

(安徽省蚌埠市东海大道 2600 号 233030)

电话:(0552)3175456

电子信箱:bang@chinajournal.net.cn

印 刷:蚌埠市光大彩色印刷有限公司

国内订阅:全国各地邮政局

国内总发行:蚌埠市邮政局

国外总发行:中国国际图书贸易总公司

(北京 399 信箱)

Journal of Bengbu Medical College

Bimonthly(Founded in March 1976)

2007, Vol.32, No.2(Sum 146)

March 15, 2007

Responsible Institution The Education Department of Anhui Province

Sponsored by Bengbu Medical College

Editor in Chief ZHU Yan

Edited and Published by The Editorial Board of Journal of

Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China

Tel:(0552)3175456

E-mail bang@chinajournal.net.cn

Printed by Bengbu Guangda Color Printing Co.Ltd

Domestic Subscription Local Post Offices

Domestic Distribution Bengbu Post Office

Foreign Distribution China International Book Trading Corporation

(P.O.Box 399, Beijing, China)

ISSN 1000-2200
CN 34-1067/R

邮发代号:26-37 国外代号:BM 6535 广告经营许可证:皖蚌广字 039 号 国内定价:8.00 元