

• 基础研究 •

亚硒酸钠拮抗庆大霉素所致豚鼠耳蜗毒性实验研究

高良才¹, 李唐英¹, 路虹², 唐立滨¹, 张立杰¹

[摘要] 目的 观察亚硒酸钠对庆大霉素所致活体豚鼠耳蜗损害是否具有拮抗作用。方法 20 只豚鼠随机分为实验组和对照组各 10 只, 给予肌肉注射庆大霉素 200 mg/kg/d, 共 8 d; 实验组同时口服亚硒酸钠 1 mg/kg/d, 共 8 d。用药前后进行听性脑干反应(ABR)测试观察听功能变化; 通过扫描电镜(SEM)及透射电镜(TEM), 观察耳蜗形态学变化。结果 对照组动物的 ABR 阈值比实验组高约 30 dB ($P < 0.01$), I 波潜伏期较实验组延长约 0.23 ms ($P < 0.01$); SEM 示对照组动物耳蜗外毛细胞纤毛区域性缺失; 实验组纤毛形态基本正常; TEM 示对照组动物耳蜗外毛细胞线粒体外膜破坏, 局部膨出, 次级溶酶体增多, 可见髓样小体; 实验组动物耳蜗外毛细胞基本正常。结论 亚硒酸钠对庆大霉素所致活体豚鼠耳蜗损伤有拮抗作用。

[关键词] 亚硒酸钠; 庆大霉素; 耳毒性; 扫描电镜; 透射电镜

Experimental Study of Antitoxic Effect of Sodium Selenite on Guinea Pig Cochlea Injury Induced by Gentamicin in Vivo GAO Liang-cai, LI Tang-ying, LU Hong, et al. The Department of Otolaryngology, People's Hospital of Tangshan, Tangshan 063001, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of sodium selenite on gentamicin-induced ototoxicity. **Methods** Twenty guinea pigs were randomly divided into the experimental group and control group with 10 animals in each group. The animals were treated with i.m injection of gentamicin (200 mg/kg/d for 8 consecutive days, and at same time, the experimental group was added with p.o tablet of sodium selenite (1 mg/kg/d). Before and after the administration, hearing function was evaluated by examination for auditory brain stem responses (ABR). The cochlear outer haircells were observed by scanning electronic microscope (SEM) and transmission electronic microscope (TEM). **Results** ABR threshold of the control group was about 30 dB above that of the experimental group ($P < 0.01$). The latency of wave I of the control group was about 0.23 ms above that of the experimental group ($P < 0.01$). Under SEM, the cilia of the majority outer hair cells of the control group lodged even disappeared, while that of the experimental remained regular. Under TEM, in outer hair cells of the control group, mitochondrial crests were obscure, out-membrane was damaged and local protruding, the number of secondary lysosomes was increased, myeloid bodies appeared, but in the experimental group, outer hair cells basically remained normal. **Conclusion** Sodium selenite has antitoxic effect on guinea pig cochlea injury induced by gentamicin in vivo.

[Key words] sodium selenite; gentamicin; ototoxicity; scanning electron microscopy; transmission electron microscopy

中图分类号: R764.35 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)02-0131-02

[本文著录格式] 高良才, 李唐英, 路虹, 等. 亚硒酸钠拮抗庆大霉素所致豚鼠耳蜗毒性实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(2): 131-132.

庆大霉素(gentamicin, GM)具有性质稳定、抗菌谱广、杀菌力强、使用方法简便及价格便宜等优点, 至今仍是世界范围内, 尤其是发展中国家临床应用相当广泛的一种抗生素。然而, GM具有耳毒性, 而且缺乏有效的防治其耳毒性的药物。既往研究显示, 亚硒酸钠(sodium selenite, SS)可保护内耳毛细胞的线粒体膜并稳定溶酶体膜, 减轻顺铂对内耳的毒性^[1]。为了解 SS 对 GM 的内耳毒性是否同样具有防护作用, 我们进行了此项研究。

1 材料与方法

作者单位: 1. 唐山市人民医院耳鼻咽喉科, 河北唐山市 063001; 2. 河北医科大学第二附属医院耳鼻咽喉科, 河北石家庄市 050017。作者简介: 高良才(1966-), 男, 河北唐山市人, 副主任医师, 硕士研究生, 主要从事耳鼻咽喉科临床工作。指导教师: 路虹。

1.1 实验动物与药物 选用健康、白色红目豚鼠(体重 400~500 g)20 只, Preyer's 反射灵敏, 雌雄不限, 由河北省实验动物中心提供; GM 为南京第三制药厂生产, 批号: 001009; SS 为山东菏泽希力药业有限公司生产, 批号: 000918。

1.2 实验设计及分组 受试动物随机分为实验组和对照组各 10 只, 给予肌肉注射 GM 200 mg/kg/d; 实验组动物同时口服 SS 1 mg/kg/d。两组动物用药时间均为 8 d。每组动物在用药前及最后 1 次用药 24 h 后行听性脑干反应(auditory brain stem responses, ABR)检测, 测试完毕快速处死动物, 取出听泡进行形态学观察。

1.3 ABR 测试 测试前豚鼠行氯胺酮(100 mg/kg)腹腔注射, 麻醉成功后, 应用日本三荣 7S-12 型信息处理仪, 采用镀银盘形电极, 在动物头顶、耳廓及鼻尖部

位放置记录极、参考极和地极。采用单耳短声刺激,刺激声强由 80 dB 开始降至反应波消失,扫描时间 10 ms,叠加次数 1000,记录 II 波阈值及 I 波潜伏期。

1.4 扫描电镜观察 断头活杀豚鼠,迅速打开听泡,挑开蜗尖,置于 4℃ 4%戊二醛液中,固定 12 h 后剥除耳蜗骨壳,揭除前庭膜,暴露内、外毛细胞,1%钨酸后固定 1 h,脱水,二氧化碳临界点干燥,粘托,真空喷金,扫描电镜观察。

1.5 透射电镜观察 断头活杀豚鼠,取出双侧听泡,挑开蜗尖,用 2.5%戊二醛灌注并固定 48 h 后,用 10%EDTA 液脱钙 10 d,剥除耳蜗骨壳,于底回取出长约 2 mm 的基底膜,经缓冲液冲洗,1%钨酸后固定,逐级酒精脱水,树脂包埋,超薄切片,日立 H-500 型电镜下观察。

1.6 统计学处理 数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组内及组间数据比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般情况 对照组动物用药后均逐渐出现饮食量下降,活动减少,体重下降,Preyets 反射明显减弱或消失;实验组动物一般情况未见异常。

2.2 ABR 反应阈及 I 波潜伏期变化 对照组动物用药后的 ABR 反应阈及 I 波潜伏期与用药前及实验组用药后比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$),见表 1、表 2。

表 1 两组动物用药前后 ABR 阈值变化(dBSPL, $\bar{x} \pm s$)

组别	耳数	用药前	用药后
对照组	20	11.56 ± 2.39	63.17 ± 7.43 ^a
实验组	20	11.81 ± 2.26	32.59 ± 5.18

注:a.与用药前及实验组用药后比较, $P < 0.01$ 。

表 2 两组动物用药前后 80 dBSPL I 波潜伏期变化(ms, $\bar{x} \pm s$)

组别	耳数	用药前	用药后
对照组	20	1.38 ± 0.06	1.74 ± 0.12 ^a
实验组	20	1.37 ± 0.07	1.51 ± 0.11

注:a.与用药前及实验组用药后比较, $P < 0.01$ 。

2.3 扫描电镜观察 对照组动物耳蜗底回外毛细胞纤毛粘连、散乱及倒伏,可见区域性缺失;实验组动物则无粘连、散乱及倒伏,呈现个别缺失。

2.4 透射电镜观察 对照组动物耳蜗底回外毛细胞表皮板部分溶解,静纤毛排列紊乱,线粒体肿胀、变性、嵴断裂或消失,内室扩大,外膜破坏,局部膨出,次级溶酶体增多,可见多数髓样小体,部分内质网扩张;实验组动物耳蜗底回外毛细胞表皮板无溶解,静纤毛排列

整齐,线粒体无肿胀,膜完整,嵴清晰,未见次级溶酶体及髓样小体形成,内质网无扩张。

3 讨论

GM 耳蜗毒性机制的自由基学说认为,GM 催化生成自由基,自由基引起耳蜗内生物膜脂质过氧化损伤^[2-5]。本研究结果显示,SS 对 GM 所致耳毒性具有拮抗作用。我们推测,SS 对 GM 耳蜗毒性拮抗作用的机制在于 SS 分子含有微量元素硒,增加了体内硒的水平,这样既增加了谷胱甘肽过氧化酶浓度^[6],又可提高谷胱甘肽过氧化酶活性^[7],而谷胱甘肽过氧化酶参与构成耳蜗脂质自由基清除系统^[8],因而加大了对耳蜗内自由基的清除力度,使 GM 催化生成的自由基浓度下降,故减轻了有害自由基对耳蜗内生物膜的脂质过氧化损伤,使耳蜗内毛细胞膜以及毛细胞内线粒体膜和溶酶体膜免遭过量自由基的破坏,使耳蜗的听功能和形态得以保持基本正常。

由于条件所限,本研究未能对用药前后豚鼠血浆及内、外淋巴液中的自由基浓度变化进行直接检测,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1]张瀛,秦家风,员彭年. SS 拮抗顺铂内耳毒性的实验研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,1997,32(5):305.
- [2]赵玉林,董明敏,董民声. GM 耳毒性机制探讨[J]. 河南医科大学学报,1995,30(4):318—321.
- [3]Cleriei WJ, Gray BH, Lash MG, et al. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants[J]. Hear Res,1996,98:116—124.
- [4]Hirose K, Re Hirose K, Karge E, et al. Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure in vitro[J]. Hear Res,1997,104:1.
- [5]Takumida M, Popa R, Anniko M. Free radical in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec,1999,61(2):63—70.
- [6]Liu X, Yin S, Li G. Effects of selenium supplements on acute lower respiratory syncytial virus[J]. Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih,1997,31(6):358—361.
- [7]Zbikowska HM, Wachowicz B, Krajewski T. Comparative effects of selenite and selenite on the glutathione-related enzyme activity in pig blood platelets[J]. Biol Trace Elem Res,1997,57(3):259—269.
- [8]Pierson MG, Gray BH. Superoxide dismutase activity in the cochlea[J]. Hear Res,1982,6(2):141—151.

(收稿日期:2005-01-17)