

# 活性氧与耳蜗氧化损伤关系的研究进展

吴艳,程秀臻,刘儒林

[关键词] 活性氧;耳蜗氧化损伤;综述

中图分类号:R764.35 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)02-0137-03

[本文著录格式] 吴艳,程秀臻,刘儒林.活性氧与耳蜗氧化损伤关系的研究进展[J].中国康复理论与实践,2006,12(2):137-139.

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是还原氧化产生的,并在分子组成上含有氧的一类化学性质非常活泼的物质的总称,包括自由基( $O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$ 、 $NO^{\cdot}$ 、 $OOONO^{\cdot}$ 、R 等)和过氧化氢( $H_2O_2$ )。正常情况下,ROS 与耳蜗内抗氧化防御系统,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)保持动态的平衡。局部缺血、噪音、使用耳毒性药物等情况下,引起 ROS 产生增多,超过耳蜗抗氧化系统的清除能力时,就会对耳蜗造成一系列的氧化损伤。笔者就耳蜗 ROS 产生、损伤机制以及抗氧化治疗的进展进行综述。

## 1 ROS 与耳蜗氧化损伤

1.1 ROS 耳蜗损伤的实验研究 ROS 能够使器官的一些功能退化,从而使其在早期就受到损害。对急性(损伤和中风)和慢性神经变性疾病的研究验证了这一点。听神经受损包括急性损伤和慢性损伤,听力受损也存在相同的机制。早期的实验包括对听觉细胞直接应用一些 ROS 产生的化合物和应用氧化剂治疗耳蜗局部的缺血和噪声损伤,该领域的实验分为 5 个大类:①用抗氧化剂阻止耳蜗损伤<sup>[1-3]</sup>:该项研究基于中枢神经系统有抗氧化损伤功能,实验操作相对容易,而且对解释 ROS 的机理以及预测一些可能的治疗方法有价值;②证明在噪声暴露、局部缺血、使用耳毒性药物后 ROS 增加<sup>[4-6]</sup>:此种方法因 ROS 的特性(产生后立即消失)很难成功,可行的方法就是使其量化,或者使氧化后产生比较稳定的产物并显影;③在耳蜗中添加 ROS 产物,然后观察解剖和生理的改变<sup>[7]</sup>;④量化氧化脂质显影,或检测在噪声暴露和使用耳毒性药物后 DNA 的变化<sup>[8]</sup>;⑤检测在遭受破坏和环境刺激后上皮中抗氧化系统的改变<sup>[9,10]</sup>。

## 1.2 耳蜗 ROS 产生 氧分子对电子的亲合力要高于

碳和氢原子。有机化合物易遭受氧化攻击,反应中碳氧键和氢氧键代替碳氢键。哺乳动物通过氧分子的积极反应,维持细胞大部分的活动。研究表明,耳蜗具有高代谢和产生 ROS 的能力。

耳蜗进行声音转换、血管纹保持毛细胞与内淋巴间的离子平衡及外毛细胞对基底膜的调节等都需要能量 ATP,并由富含线粒体的血管纹和 Corti 氏器产生。血管纹中的血红蛋白参与 Fenton 反应,在产生能量的同时易形成  $OH^{\cdot}$ 。Corti 氏器在进行高能量代谢时也产生大量的 ROS。

Quirk 等发现了噪音暴露下 ROS 对毛细胞的损害<sup>[11]</sup>。Hirose 等利用流式细胞仪和二氯乙酰荧光素,发现庆大霉素治疗后,耳蜗底部与顶部的毛细胞迅速产生 ROS,并且检测到随着庆大霉素剂量的增加,ROS 的产生也显著增加<sup>[12]</sup>。Ohlemille 等发现,小鼠在缺血再灌注后 ROS 明显增多<sup>[13]</sup>。Yamane 发现,豚鼠耳蜗暴露于噪声后,血管纹边缘细胞表面出现  $O_2^{\cdot-}$ <sup>[14]</sup>。

目前,对于活性氧产生的机制尚有争议,但电子传递链受损是其产生的必需条件<sup>[15,16]</sup>。Mattson 等证实,谷氨酸兴奋毒性和  $Ca^{2+}$  增多也是 ROS 在耳蜗过量形成的共同机制<sup>[17]</sup>。此外,耳蜗还可能通过一些独特的机制产生 ROS,如庆大霉素形成的  $Fe$ -庆大霉素复合物催化形成 ROS<sup>[18]</sup>;噪声使血管收缩引起局部缺血再灌注或细胞膜短暂微小损伤导致产生 ROS<sup>[19]</sup>。

## 2 耳蜗 ROS 氧化损伤机制

ROS 广泛和特意性地参与噪声暴露和使用耳毒性药物后引起的急性损伤。ROS 引起听力损伤的机制,目前认为主要与基因突变、线粒体损伤和细胞凋亡等途径有关。

2.1 基因突变 渐进的听力损伤与终生的噪声暴露或者耳毒性药物使用引发的氧化应激有关。研究显示,基因相关听力损失包含一系列的连续的相关基因和环境因素的组合。最清楚的遗传促成因素与发育和先天因素有关。最近,越来越多的研究集中在基因突变,而与耳聋相关的氧化应激包括两个单独的论点:

2.1.1 ROS 是否参与了与大多数感觉神经耳聋基因相关的听细胞的损伤 虽然目前还不清楚为什么毛细胞静纤毛束中的突变导致毛细胞的死亡,但毛细胞的丢失都是通过细胞调亡完成的。在所有类型的细胞调亡中,多种 CAT 参与的类型中就有 ROS<sup>[20]</sup>。

2.1.2 耳蜗中增多的氧化应激反应是否导致耳聋基因的突变 年龄相关耳聋的研究显示,人类携带有这种突变基因,虽然不能确定人类耳聋基因能否加速耳蜗受损的速度,但突变基因的这种作用在动物身上得以证实<sup>[21-25]</sup>。这些未确定的突变基因可以通过传递易感因素或者扩大无害的突变作用对 ROS 防御系统造成损害。

2.2 线粒体损伤 线粒体可为各种细胞提供所需要的大部分 ATP,而且一直被认为是 ROS 攻击的中心部位。ROS 作为副产物在电子传递链中产生,但通常可以被线粒体中的抗氧化剂和各种清除自由基的酶清除。在耳蜗氧化应激损伤时,ROS 产生增多,但清除自由基的能力下降,大量的 ROS 堆积导致 mtDNA 突变和含大量不饱和脂肪酸的线粒体内膜脂质过氧化损伤<sup>[26,27]</sup>,表现为线粒体通透性改变。

线粒体 DNA 广泛受损包括点突变、缺失和插入的广泛突变、线粒体内膜的广泛损伤。

2.3 细胞调亡 越来越多的实验表明 ROS 与细胞调亡之间的联系,ROS 通过影响线粒体膜通透性引起线粒体释放细胞调亡起始因子(apoptotic initiating factors, AIFs),或细胞调亡蛋白酶激活因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1),进而激活半胱氨酸蛋白酶,诱导细胞调亡因子 Bcl-2 在 ROS 作用下与诱导细胞调亡分子 Bax 和 Ced-4 分离,使其参与随后的细胞调亡过程<sup>[28]</sup>。Nakagawa 等已在庆大霉素诱导的前庭毛细胞中观察到调亡的细胞<sup>[29]</sup>。Watanake 等发现,应用顺铂的豚鼠耳蜗内 iNOS 和 ssDNA 均为阳性表达,提示一氧化氮(NO)可导致细胞调亡从而引起耳蜗损伤<sup>[30]</sup>,表明了 ROS 与耳蜗细胞调亡之间的密切联系。

ROS 引起感觉细胞和神经元损伤的途径是多样的,不论是在中枢神经系统还是耳蜗,通过广泛地作用于 DNA、蛋白质和脂质,ROS 可破坏所有细胞功能,使细胞的自我修复能力降低,导致感觉细胞损伤。大多数的耳蜗损伤继发于噪声暴露和耳毒性药物使用后的一系列细胞丢失和永久性的细胞损伤。

### 3 抗氧化治疗

3.1 耳蜗内繁多的抗氧化系统及其之间的平衡 耳蜗具有自己的抗氧化防御系统,分为内源性抗氧化酶系统和非酶性抗氧化系统,主要存在于 Corti 氏器和血管纹<sup>[31]</sup>。SOD、CAT 和 GSH-Px 是 3 个主要的内源

性抗氧化酶。SOD 可以使超氧阴离子或超氧化物还原为  $H_2O_2$ 。CAT 和 GSH-Px 共同作用使  $H_2O_2$  进一步还原为  $H_2O$  和  $O_2$ 。这三者在胞内共同起协同作用,如果胞内有 ROS 如  $O_2^{\cdot-}$  产生,进入线粒体后,在 SOD 酶的催化下生成  $H_2O_2$ ,随后在 GSH-Px 的催化下生成  $H_2O$  而解毒,少量多余的  $H_2O_2$  可以渗入胞浆,被胞浆 GSH-Px 催化成  $H_2O$ ,或者进入微粒体被 CAT 催化成  $H_2O$ 。所以,细胞内抗氧化系统的相互协同,对清除胞内的 ROS、保护存活细胞有积极的意义。

非酶性抗氧化防御体系即内源性和外源性的抗氧化剂,包括维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和铜蓝蛋白等。在许多疾病和异常状态下,自由基大量产生,超出抗氧化酶系统的清除能力,需要大量的抗氧化剂拮抗自由基的损伤。另外,热休克蛋白在氧化应激时,可能对保护耳蜗和修复损伤有一定的作用。耳蜗组织中可以检测到热休克蛋白 27、12 和 90。存在于外毛细胞静纤毛上的热休克蛋白 27 随噪声引起的暂时性阈移而明显升高<sup>[31]</sup>。

3.2 抗氧化治疗的现状 随着对 ROS 耳蜗氧化损伤机制认识的不断深入,各种抗氧化药物也相继应用于临床,主要有铁螯合剂、GSH 前体药物、ROS 清除剂、营养因子、抗氧化酶诱导剂、热休克蛋白诱导剂和调亡抑制剂等。近几年来,中药抗氧化应激损伤的作用也受到关注。研究显示,丹参、银杏叶、川芎嗪、葛根素可能通过活血化瘀、改善微循环、清除体内自由基防止脂质过氧化反应等途径发挥作用<sup>[32]</sup>。

3.3 抗氧化治疗的前景 细胞复杂的氧化剂机制和抗氧化剂寻找靶细胞潜在的困难使抗氧化剂的保护急性和慢性耳蜗损伤的作用受到限制。如果能更深入地了解耳蜗上皮细胞及其各自在 ROS 产生后的抗氧化能力,就可以实施有效的治疗。研究显示,应用抗氧化剂具有低危险性,而且有许多可以改进的余地,比如,改变给药方式可以提高疗效,这其中包括:

3.3.1 激活关键系统 天然的抗氧化系统可以清除 ROS,保护特殊生物分子。如 GSH 位于细胞保护途径的关键位置,其本身作为活性氧清除剂,可保护激活酶活动中很关键的巯基蛋白,而且它也是 GSH-Px 的辅酶和去除氨基甙类抗生素毒性的辅酶。GSH 在大多数细胞中有相当高的浓度,可降低因细胞自身调节紊乱引起的功能失调。有关报道显示,噪音与耳毒性药物对 GSH 相关的抗氧化机制有一定影响,表现为单纯服用 GSH 不是很有效,不能迅速与靶细胞接触。但含有 GSH 的复合制剂则很有效。故采用 GSH 结合抗氧化保护剂,对耳蜗氧化性损伤的防治有很好的前景。

3.3.2 调整天然的抗氧化剂 通常,细胞在受到刺激时都会在一定范围内增加抗氧化剂的水平,并且保持

平衡。研究显示,激活细胞自身的防御系统可以降低破坏自身氧化平衡的危险性,还可以减少并发症;复合抗氧化剂在噪声损伤防治方面有好的效果<sup>[5,6,31]</sup>。

综上所述,单一使用抗氧化药物仅可清除某几种形式的 ROS,而且药物可能不会到达靶细胞和组织,或者破坏细胞抗氧化系统自身的平衡;而根据不同拮抗机制采用多种抗氧化药物联合应用,可以达到较好的防治效果。此外,中药川芎嗪、银杏叶等成功应用于临床,为中西医结合防治耳聋性疾病提供了新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Yamasoba T, Schacht J, Shoji F, et al. Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line derived neurotrophic factor in vivo[J]. Brain Res, 1999, 815: 317—325.
- [2] Kopke RD, Weisskopf PA, Boone JL, et al. Reduction of noise-induced hearing loss using L- NAC and salicylate in the chinchilla[J]. Hear Res, 2000, 149: 138—146.
- [3] Sha S, Schacht J. Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vivo: Dmethionine is a potential protectant[J]. Hear Res, 2000, 142: 34—40.
- [4] Ohlemiller KK, Dugan LL. Elevation of reactive oxygen species following ischemia reperfusion in mouse cochlea observed in vivo[J]. Audiol Neurotol, 1999, 4: 219—228.
- [5] Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure[J]. Audiol Neurotol, 1999, 4: 229—236.
- [6] Hara A, Serizawa F, Tabuchi K, et al. Hydroxyl radical formation in the perilymph of asphyxial guinea pig[J]. Hear Res, 2000, 143: 110—114.
- [7] Clerici WJ, Yang L. Direct effects of intraperilymphatic reactive oxygen species generation on cochlear function[J]. Hear Res, 1996, 101: 14—22.
- [8] Ohinata Y, Miller JM, Altschuler RA, et al. Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea[J]. Brain Res, 2000, 878: 163—173.
- [9] Jacono AA, Hu B, Kopke RD, et al. Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla[J]. Hear Res, 1998, 117: 31—38.
- [10] Yamasoba T, Harris C, Shoji F, et al. Influence of intense sound exposure on glutathione synthesis in the cochlea[J]. Brain Res, 1998, 804: 72—78.
- [11] Quirk WS, Shivapuja BG, Schwimmer CL, et al. Lipid peroxidation inhibitor attenuates noise-induced temporary threshold shifts[J]. Hear Res, 1994, 74: 217.
- [12] Hirose K, Hockenbery DM, Rubel EW. Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure in vitro[J]. Hear Res, 1997, 104: 1.
- [13] Ohlemiller KK, Dugan LL. Elevation of reactive oxygen species following ischemia reperfusion in mouse cochlea observed in vivo[J]. Audiol Neurotol, 1999, 4: 219—228.
- [14] Yamane H. The emergence of free radicals after acoustic trauma and strial blood flow[J]. Acta Otolaryngol, 1995, Suppl 519: 87—92.
- [15] Smith TS, Benhett JP. Mitochondrial toxins in neurodegenerative disease. In vivo brain hydroxyl radical production during systemic MPTP treatment or following microdialysis infusion of methylpyridinium or azide ions[J]. Brain Res, 1997, 765: 183.
- [16] Yu BP, Chen JJ, Kang CM. Mitochondrial aging and lipoperoxide products[J]. Annals New York Acad Sci, 1996, 786: 44.
- [17] Mattson MP, Scheff SW. Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy[J]. J Neurotrauma, 1994, 11: 30.
- [18] Song BB, Anderson DJ, Schacht J. Protection from gentamicin toxicity by iron chelators in guinea pig in vivo[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 282: 369—377.
- [19] Mulroy MJ, Henry WR, Mcnell PL. Noise-induced transient microlesions in the cell membrane of auditory hair cell[J]. Hear Res, 1998, 115: 93—100.
- [20] Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals[J]. Biochem Mol Med, 1996, 59: 93—97.
- [21] McFadden SL, Ding D, Burkard RF, et al. Cu/Zn SOD deficiency potentiates hearing loss and cochlear pathology in aged 129, CD-1 mice[J]. J Comp Neurol, 1999, 413: 101.
- [22] McFadden SL, Ding D, Reaume AG, et al. Age-related cochlear hair cell loss is enhanced in mice lacking copper/zinc superoxide dismutase[J]. Neurobiol Aging, 1999, 20: 1—8.
- [23] Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (SOD1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss[J]. Audiol Neurotol, 1999, 4: 237—246.
- [24] Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, et al. Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice[J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2000, 1: 243—254.
- [25] McFadden SL, Ding DL, Ohlemiller KK, et al. The Role of Superoxide Dismutase in Age-related and Noise-induced Hearing Loss: Clues from SOD1 Knockout Mice[M]// Willott JF. Handbook of Mouse Auditory Research: from Behavior to Molecular Biology. New York: CRC Press, 2001: 489.
- [26] Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release[J]. Blood, 1999, 93(7): 2342—2352.
- [27] Mehmetcik G, Alptekin N, Toker G, et al. Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in the liver following phorone-induced glutathione depletion[J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1977, 96(3): 353—356.
- [28] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 64—65.
- [29] Nakagawa T, Yamane H, Shibata S, et al. Gentamicin ototoxicity induced apoptosis of the vestibular hair cells of guinea pigs[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 1997, 254: 9.
- [30] Watanabe K, Hess A, Michel O, et al. Nitric oxide synthase inhibitor reduces the apoptotic change in the cisplatin-treated cochlea of guinea pigs[J]. Anticancer Drug, 2000, 11(9): 731—735.
- [31] Kopke R, Allen KA, Henderson D, et al. A radical demise: toxins and trauma share common pathways in hair cell death[J]. Ann NY Acad Sci, 1999, 884: 171—191.
- [32] 徐文康. 葛根素治疗突发性耳聋的临床观察[J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(4): 248—249.

(收稿日期: 2005-06-28)