

连翘酯苷对顺铂作用后豚鼠耳蜗 c-jun 表达的影响

安宁¹ 时胜武¹

[摘要] 目的:研究连翘酯苷对顺铂作用后豚鼠耳蜗 c-jun 表达的影响。方法:将 30 只豚鼠随机分为对照组(10 只),顺铂组(10 只)和连翘酯苷组(10 只)。腹腔注射顺铂溶液(8 mg/kg),1 次/d,连续 7 d,建立顺铂耳毒性模型;连翘酯苷组在每次注射顺铂溶液 30 min 前腹腔注射连翘酯苷 25.0 mg/kg/d,连续 7 d;对照组以生理盐水代替顺铂溶液注射,连续 7 d。实验动物被处死前,检测其 DPOAE 幅值变化;采用蛋白质印迹杂交(Western Blotting)检测各组豚鼠耳蜗 c-jun 蛋白的表达,逆转录聚合酶链反应检测各组豚鼠耳蜗 c-jun 基因 mRNA 的表达。结果:顺铂组 DPOAE 幅值明显低于对照组($P < 0.01$);相比于顺铂组,连翘酯苷组 DPOAE 幅值明显升高($P < 0.05$)。顺铂组豚鼠耳蜗 c-jun 蛋白与 mRNA 表达水平均显著高于对照组($P < 0.01$);相比于顺铂组,连翘酯苷组 c-jun 蛋白与 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$)。结论:连翘酯苷能够通过降低 c-jun 的表达防护顺铂所致的耳蜗损伤。

[关键词] 顺铂;连翘酯苷;耳毒性;c-jun;豚鼠

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.10.018

[中图分类号] R762 **[文献标志码]** A

The effect of forsythiaside on the expression of c-jun induced by cisplatin in the cochlea of guinea pig

AN Ning SHI Shengwu

(Department of Otolaryngology, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang, 110024, China)

Corresponding author: AN Ning, E-mail: lilian77@126.com

Abstract Objective: To study the effect of forsythiaside on the expression of c-jun induced by cisplatin in the cochlea of guinea pig. **Method:** Thirty guinea pigs were randomly divided into control group (10), cisplatin group (10) and forsythiaside group (10). The ototoxicity model was done with intraperitoneal injection of cisplatin solution (8 mg/kg per day) for 7 days. Forsythiaside (25 mg/kg per day) was injected 30 min before cisplatin solution treated in guinea pigs of forsythiaside group for 7 consecutive days. The saline instead of cisplatin was injected in normal control group. The distortion product otoacoustic emission (DPOAE) was detected before animals were killed. The expression of c-jun in cochlea of guinea pigs was detected by western blotting. The expression of c-jun mRNA in cochlea of guinea pigs was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** DPOAE amplitudes in cisplatin group was significantly lower than in control group ($P < 0.01$). Compared with cisplatin group, DPOAE amplitudes in forsythiaside group was increased significantly ($P < 0.05$). The expression of c-jun protein and mRNA were significantly increased in cisplatin group than in control group ($P < 0.01$). Compared with cisplatin group, the expression of c-jun protein and mRNA were significantly decreased in forsythiaside group. **Conclusion:** Forsythiaside can significantly reduce the side effects induced by cisplatin through down-regulating the expression of c-jun.

Key words cisplatin; forsythiaside; ototoxicity; c-jun; guinea pig

顺铂为铂的金属络合物,是临床上最常用的抗肿瘤药物之一,主要对泌尿生殖系的膀胱、睾丸、卵巢及头颈部恶性肿瘤有效,但内耳毒性是其重要毒副作用,一旦发生,将会严重影响肿瘤患者的生活质量,目前尚无有效的防治及拮抗手段。连翘酯苷是中药连翘中一个主要的有效成分,具有广泛的药理活性。现代药理学研究结果表明连翘酯苷有显著的抗氧化、抗微生物感染和清除自由基、减轻

过氧化损伤的作用。然而,连翘酯苷能否通过清除耳蜗氧自由基,从而对顺铂的耳毒性起防护作用,尚未见报道。故本实验在建立顺铂导致豚鼠耳损伤模型的基础上,观察连翘酯苷对顺铂耳毒性的防护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

注射用顺铂(10 mg/支,齐鲁制药厂,批号 0211003),连翘酯苷冻干粉(天津一方科技有限公司,批号 100225),兔抗 c-jun 多克隆抗体(Santa-

¹ 沈阳医学院附属奉天医院耳鼻咽喉科(沈阳,110024)
通信作者:安宁, E-mail: lilian77@126.com

Cruz 公司),生物素标记羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),二乙基焦碳酸盐(DEPC)(美国 SIGMA 公司),Trizol 试剂(北京鼎国生物公司),OligodT 引物(北京奥科生物技术公司合成),LB563BEA 型耳声发射分析测试系统(美国 IHC 公司)。

1.2 动物分组及处理

选用 30 只健康豚鼠,体重 250~300 g,雌雄不限,所有动物耳廓反射灵敏,由中国医科大学实验动物中心提供,随机分为:对照组(10 只)、顺铂组(10 只)和连翘酯苷组(10 只)。动物自由食水,自然光照周期,稳定 1 周后用于实验。顺铂组:将注射用顺铂用 10 ml 生理盐水溶解成 1 mg/ml 溶液备用,每天腹腔注射顺铂 8 mg/kg,连续 7 d;对照组:以生理盐水代替顺铂溶液注射,连续 7 d;连翘酯苷组:在每天腹腔注射顺铂溶液 30 min 前,腹腔注射连翘酯苷 25.0 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,连续 7 d。实验期间所有动物均在安静状态下饲养并给予常规饮食。

1.3 DPOAE 检测

在实验开始后的第 8 天,将豚鼠以戊巴比妥腹腔注射麻醉(50 mg/kg),在隔声室内采用 LB563BEA 型耳声发射分析测试系统(IHC 公司,美国),对处于麻醉状态的豚鼠进行 DPOAE 检测。选择初始纯音 f₁ 与 f₂,f₁/f₂ = 1.22,强度差 L₁ - L₂ = 10 dB SPL,取 DPOAE 幅值超过本底噪音 3 dB 为 DPOAE 检出标准,测试频率 f₀² = f₁ × f₂ 为 1、2、4、6、8kHz 处的幅值。

1.4 Western Blot 检测耳蜗组织 c-jun 蛋白的表达

在实验开始后的第 8 天,将豚鼠麻醉处死,剥离出双侧耳蜗,置于 4℃ 预冷的 PBS 中。在解剖显微镜下剥离蜗壳,取出耳蜗组织(基膜及血管纹),剪碎,加入组织裂解液中,4℃ 下匀浆,离心后提取上清,采用 Bradford 方法测定蛋白样品浓度,计算上样量,电泳分离、转印、5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜,一抗 c-jun(1 : 200)和 β-actin(1 : 400)室温孵育 2 h,TTBS 洗涤 10 min,3 次,二抗(1 : 2 000)室温孵育 2 h,TTBS 洗涤 10 min,3 次,ECL 显影并扫描测光密度值,以 β-actin 为内参照,以目的蛋白与 β-actin 的相对比值代表目的蛋白的相对表达含量。

1.5 RT-PCR 检测耳蜗组织 c-jun mRNA 的表达

在实验开始后的第 8 天,将豚鼠麻醉处死,剥离出双侧耳蜗,按 RNAout 说明书进行总 mRNA 提取,然后以逆转录(RT 法)先合成 cDNA,再进行

PCR 扩增;c-jun 基因扩增引物的上游序列为 5'-ATGACTGCAAAGATGGAAACGACC-3',下游序列为 5'-GATGTGCCCGTTGCTGGACTG-GAT-3',扩增产物的全长为 264 bp;β-actin 扩增引物的上游序列:5'-GAGACCTTCAACAC-CCAGCC3';下游序列为:5'-GCGGGGCATCG-GAACCGCTCA-3',扩增产物全长 374 bp。反应条件:95℃ 预变性 1 min、95℃ 变性 15 s、58℃ 退火 15 s、72℃ 延伸 45 s,进行 45 个循环。对结果进行图像分析,以目的基因与 β-actin 的相对比值代表目的基因的相对表达含量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组比较采用方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

顺铂组在给药期间,动物活动减少,食欲减退,毛发稀疏脱落,体重减轻。反应迟钝。对照组小鼠在实验期间无异常表现,耳廓反射灵敏,体重略有上升。连翘酯苷组体重无明显减轻,时有食欲减退现象。

2.2 DPOAE 幅值检测

与对照组相比,DPOAE 的幅值在连续给予顺铂注射 7 d 后明显下降(P < 0.01),尤其是在 2 kHz 以上处,随着频率的增加差异越来越显著,而在连续给予连翘酯苷干预 7 d 后,DPOAE 的幅值显著升高(P < 0.05),各组豚鼠 DPOAE 幅值的比较见图 1。

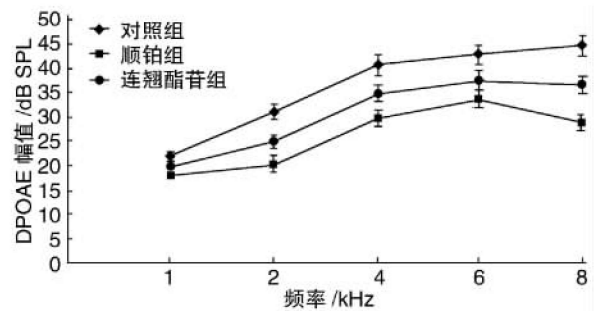


图 1 各组豚鼠 DPOAE 幅值检测

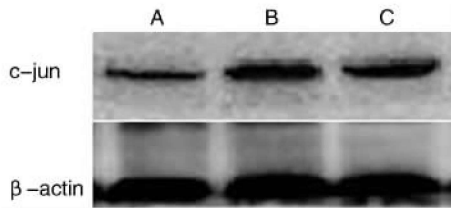
2.3 Western Blot 结果

Western Blot 检测各组豚鼠耳蜗 c-jun 蛋白的表达,顺铂组豚鼠耳蜗 c-jun 蛋白表达的相对光密度值为(0.27 ± 0.03),相比于对照组(0.13 ± 0.01)显著升高,差异有统计学意义(P < 0.01);而与顺铂组比较,连翘酯苷组豚鼠耳蜗 c-jun 蛋白表达的

相对光密度值为(0.19±0.02),显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

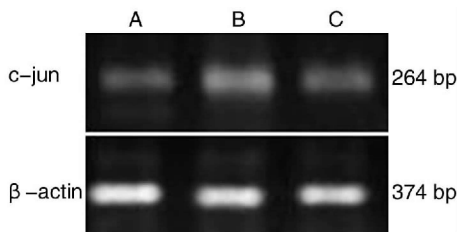
2.4 RT-PCR 结果

RT-PCR 方法检测各组豚鼠耳蜗 c-junmRNA 的表达,顺铂组豚鼠耳蜗 c-junmRNA 表达的相对吸收度值为(0.37±0.04),相比于对照组(0.14±0.01)显著升高, $P<0.01$;而与顺铂组比较,连翘酯苷组豚鼠耳蜗 c-junmRNA 表达的相对吸收度值为(0.26±0.03),显著降低($P<0.05$)。见图 3。



A: 对照组; B: 顺铂组; C: 连翘酯苷组。

图 2 Western Blot 检测各组豚鼠耳蜗 c-jun 蛋白的表达



A: 对照组; B: 顺铂组; C: 连翘酯苷组。

图 3 RT-PCR 检测各组豚鼠耳蜗 c-jun mRNA 的表达

3 讨论

顺铂耳毒性的作用机制目前尚未完全阐明,有学者认为顺铂与耳蜗组织结合后可激发产生大量的自由基,诸如超氧化物,过氧化氢,毒性脂质过氧化物等,这些氧自由基的增加可引起耳蜗毛细胞内的钙离子浓度增高并因此导致毛细胞凋亡^[1],顺铂在增加细胞内自由基活动的同时,还可明显降低耳蜗组织中抗氧化酶类的活性^[2]。所以应用抗氧化剂来减轻顺铂耳毒性的相关报道很多,例如向鼓室圆窗内注射乙酰半胱氨酸^[3]、咖啡酸苯乙酯^[4]、维生素 E、硫普罗宁^[5]、水杨酸钠等^[6]均可降低顺铂的耳毒性。

近来的研究显示,细胞凋亡在顺铂的耳毒性作用中占有重要地位。研究证实,顺铂可以通过其细胞毒作用,诱导非靶器官凋亡,产生耳毒性,肾毒性或其它损伤^[7]。研究发现,在联合应用顺铂和尿酸钠能够激活 Caspase-8,进而引起的毛细胞凋亡^[8];在耳蜗离体培养实验中发现,螺旋神经节凋亡和毛细胞凋亡在顺铂耳中毒引起的 Caspase 活动有着不

同的表现。在顺铂损害的早期。螺旋神经节细胞中不仅立刻出现 Caspase-8 的活动,而且 Caspase-9 也同时被激活^[9],在顺铂损害耳蜗毛细胞和前庭毛细胞的器官培养模型中发现了大量的肿瘤抑制基因——p53 免疫组织化学阳性产物,说明顺铂能够通过调控 p53 引起耳蜗毛细胞凋亡^[10]。

c-jun-N-端激酶(JNK)是一种应激酶,在内、外环境刺激使细胞处于应激状态时会被激活(磷酸化)。激活的 JNK 可激活 c-jun 前凋亡转录因子,使核内某些基因表达发生变化,从而启动细胞的凋亡行为。另外,JNK 通路的激活可促使细胞色素 c 从线粒体释放至细胞质,从而激活 Caspase 通路,使细胞凋亡^[11]。研究发现,耳蜗细胞凋亡时 c-jun 蛋白表达增加,表明 c-jun 可能参与了耳蜗细胞凋亡的调控,是顺铂导致感音神经性聋的一个重要因素^[12]。

连翘酯苷作为连翘属植物中的咖啡酰糖苷类中主要有效成分之一,有很强的抗菌活性,抗菌谱广,对多种革兰氏阳性菌、阴性菌均有抑制作用,而且还有较强的抗病毒和调节免疫分子的作用^[13]。有研究发现,连翘酯苷对 HO⁻、H₂O₂ 及 O²⁻ 具有较强的清除能力^[14],在通过对体外培养的牛动脉内皮细胞研究连翘酯苷的抗氧化作用时发现,连翘酯苷能明显降低 mOx-LDL 介导的细胞毒性,抑制脂质过氧化反应,进而对细胞提供保护作用^[15],然而,连翘酯苷能否通过调节 c-jun 的表达从而对顺铂的耳毒性起防护作用,尚未见文献报道。

我们研究发现,豚鼠耳蜗的 DPOAE 值在给予顺铂注射前后,随着频率的增高,差异越来越大,提示毛细胞的功能在高频处损伤明显,结果提示顺铂的耳毒性损伤主要是高频的听力损伤,而在给予连翘酯苷处理后,DPOAE 值明显上升,说明连翘酯苷对顺铂的耳毒性起到了一定的防护作用,但是其具体的机制尚不清楚。我们进一步利用蛋白免疫印记与 RT-PCR 方法检测各组豚鼠耳蜗 c-jun 蛋白及基因的表达,结果证实,顺铂组豚鼠耳蜗 c-jun 在蛋白水平和基因水平均显著高于对照组,而在给予连翘酯苷处理后,c-jun 的表达下调,结果提示,下调 c-jun 的表达可能是连翘酯苷对顺铂的耳毒性防护作用的机制之一。

参考文献

- [1] HAMERS F P, WIJBENGA J, WOLTERS FL, et al. Cisplatin ototoxicity involves organ of Corti, stria vascularis and spiral ganglion; modulation by alpha MSH and ORG 2766[J]. *Audiol Neurootol*, 2003, 8: 305-315.

- [2] LEE J E, NAKAGAVA T, KIM T S, et al. Role of reactive radicals in degeneration of the auditory system of mice following cisplatin treatment [J]. *Acta Otolaryngol*, 2004, 124: 1131-1135.
- [3] MINAMI S B, SHA S H, SCHACHT J. Antioxidant protein In a new animal of cisplatin-induced ototoxicity [J]. *Hear Res*, 2004, 198: 137-143.
- [4] KIZILAY A, KALCIOGLU M T. Caffeic acid phenethyl ester ameliorated ototoxicity induced by cisplatin in rats [J]. *J Chemother*, 2004, 16: 381-387.
- [5] FETONI A R, SERGI B. Protective effects of alpha-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity [J]. *Acta Otolaryngol*, 2004, 124: 421-426.
- [6] HYPOLITO M A, DC OLIVEIRA J A, ROSATO M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate [J]. *Eur Arch otorhinolaryngol*, 2006, 263: 798-803.
- [7] ALAM S A, IKEDA K, OSHIMA T, et al. Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea [J]. *Hear Res*, 2000, 141: 28-38.
- [8] DING D, JIANG H, WANG P, et al. Cell death after co-administration of cisplatin and ethacrynic acid [J]. *Hear Res*, 2007, 226: 129-139.
- [9] ZHANG M, LIU W, DING D, et al. Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis [J]. *Neuroscience*, 2003, 120: 191-205.
- [10] PODRATZ J L, STAFF N P, FROEMEL D, et al. *Drosophila melanogaster*: a new model to study cisplatin-induced neurotoxicity [J]. *J Neurobiol Dis*, 2011, 43: 330-337.
- [11] 张凤英, 刘啸白, 商秀丽. 卡那霉素对小鼠耳蜗内毛细胞带状突触数量的影响 [J]. *解剖科学进展*, 2012, 18(1): 74-78.
- [12] 邢奋丽, 邓毅, 王林娥, 等. 即早基因 c-jun 在顺铂诱发豚鼠耳蜗 Corti 器细胞凋亡中的作用 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2013, 21(2): 151-154.
- [13] 刘文博, 李德朋, 张桂林, 等. 连翘酯苷药理活性研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(7): 236-238.
- [14] MARTIN-NIZARD F, SAHPAZ S, FURMAN C, et al. Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 207-211.
- [15] MARTIN-NIZARD F, SAHPAZ S, KANDOUSSI A, et al. Natural phenylpropanoids inhibit lipoprotein-induced endothelin-1 secretion by endothelial cells [J]. *Pharm Pharmacol*, 2004, 56: 1607-1611.

(收稿日期: 2013-07-06)

2014 上海东方耳鼻咽喉研究所颅底外科国际论坛及 国家级继续教育项目第 2 轮通知

由上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉科、上海交通大学耳鼻咽喉科研究所、上海东方耳鼻咽喉科研究所举办的“上海东方耳鼻咽喉科研究所颅底外科国际论坛暨第 3 届上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科国际论坛”定于 2014 年 7 月 31 日—8 月 4 日进行。本次论坛围绕耳鼻咽喉头颈外科学领域的最新动态,重点讲述颅底解剖、颅底疾病诊治的基本知识、经典技术及最新进展。本次论坛除邀请国内从事颅底外科工作的著名专家授课之外,还邀请意大利的 Sanna 教授团队、西班牙的 Aristegui 教授、以及美国匹兹堡大学颅底外科中心的 Snyderman 和 Gardner 教授,分别进行侧颅底及内镜颅底外科方面的讲座,并进行手术演示或解剖示教。同期还将举办 5 项国家级继续教育学习班,包括第 34 期“颞骨解剖-耳显微外科技术学习班”(7 月 30 日—8 月 7 日)、第 8 期“内镜鼻窦-鼻颅底解剖及手术技术学习班”(7 月 29 日—8 月 4 日)、第 6 期“鼾症外科技术学习班”(7 月 29 日—8 月 4 日)、第 3 期“BPPV 诊疗技术学习班”(7 月 28 日—8 月 4 日)、第 6 期“耳科科研技术学习班”暨第 3 期“上海市研究生暑假学校”(7 月 27 日—8 月 4 日)。欢迎广大临床、科研工作者及在读研究生踊跃报名。所有项目均采取网上注册报名,评估录取,额满即止。详情请登录上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉科网站(<http://ent.6thhosp.com/>)。垂询电话 021-24058706,或 18930172200,黄老师;邮箱:18930172200@163.com。

上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉科