

• 实验研究 •

顺铂对豚鼠耳蜗及螺旋神经节细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响*

李鹏¹ 张威¹ 张奕¹ 符秋养¹ 孟庆翔² 谢景华² 梁勇¹

[摘要] 目的:探讨顺铂对凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 在豚鼠耳蜗及螺旋神经节细胞(SGC)中表达的影响。方法:选取健康豚鼠 20 只,随机分为顺铂组和对照组,每组各 10 只。顺铂组一次性腹腔注射顺铂 16 mg/kg,对照组腹腔注射等量生理盐水。每组豚鼠给药前和给药后 7 d 均行畸变产物耳声发射(DPOAE)检测。Western Blot 及免疫组织化学检测 Bcl-2、Bax 在耳蜗及 SGC 中的表达。结果:对照组和顺铂组耳蜗 Bcl-2 蛋白表达水平分别为 0.7278 ± 0.0169 和 0.4676 ± 0.0201 , Bax 蛋白表达水平分别为 0.3848 ± 0.0217 和 0.7356 ± 0.0223 , 2 组比较均差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。对照组和顺铂组 SGC 中 Bcl-2 的表达灰度值为 99.00 ± 2.42 , 149.80 ± 2.37 , Bax 的表达灰度值为 154.50 ± 2.80 , 104.50 ± 3.09 , 2 组比较均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论:与对照组比较,顺铂组 Bcl-2 表达下降而 Bax 表达增强,这可能是顺铂诱导豚鼠耳蜗及 SGC 凋亡的因素之一。

[关键词] Bcl-2; Bax; 顺铂; 螺旋神经节细胞

doi: 10.13201/j.issn.1001-1781.2016.01.013

[中图分类号] R764 **[文献标志码]** A

Effectiveness of cisplatin on the expressions of Bcl-2 and Bax in cochlea and spiral ganglion cells of guinea pigs

LI Peng¹ ZHANG Wei¹ ZHANG Yi¹ FU Qiuyang¹
MENG Qingxiang² XIE Jinghua² LIANG Yong¹

(¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510515, China; ²Department of Otorhinolaryngology, Guangzhou First People's Hospital)

Corresponding author: LIANG Yong, E-mail: yliang@fimmu.com

Abstract Objective: To investigate the effectiveness of cisplatin on the expressions of Bcl-2 and Bax in cochlea and spiral ganglion cells (SGC) of guinea pigs. **Method:** Twenty guinea pigs were randomly divided into cisplatin ($n=10$) and control groups ($n=10$). Cisplatin group were administrated with a dose of intraperitoneal injection of 16 mg/kg, while the control group were received intraperitoneal injection of normal saline as placebo. Before and 7 days following injections, the ototoxic effect was measured with distortion product otoacoustic emission (DPOAE). Bcl-2, Bax in cochlea were detected by Western Blot. Immunohistochemical staining was used to detect the protein levels of Bcl-2 and Bax in spiral ganglion cells. **Result:** In control and cisplatin group, Bcl-2 protein levels were 0.7278 ± 0.0169 and 0.4676 ± 0.0201 , Bax protein levels were 0.3848 ± 0.0217 and 0.7356 ± 0.0223 in cochlea respectively, both $P < 0.01$. In Control and cisplatin group, the grey values of Bcl-2 in SGC were 99.00 ± 2.42 and 149.80 ± 2.37 respectively, the grey values of Bax were 154.50 ± 2.80 and 104.50 ± 3.09 respectively, both $P < 0.05$. **Conclusion:** Decreased expression of Bcl-2 and increased expression of Bax may be involved in cisplatin-induced apoptosis in cochlea and SGC of guinea pigs.

Key words Bcl-2; Bax; cisplatin; spiral ganglion cells

顺铂是一种常见的化疗药物,用于治疗多种肿瘤,但严重不良反应如肾毒性、胃肠道毒性、耳毒性和神经毒性大大限制了其临床使用。虽然可以通过水疗减轻肾毒性,但耳毒性仍无有效处理措施。

耳毒性一般表现为双耳不可逆感音神经性聋,60%~80%的患者听力阈值提高,近15%的患者有严重听力障碍。研究表明,顺铂可诱导毛细胞、血管纹和螺旋神经节细胞(spiral ganglion cells, SGC)凋亡,机制尚不十分明确。耳蜗 SGC 是听觉系统的第一级神经元,在听觉感知调节和言语识别中具有重要意义,其受损程度可直接反映听力的损害程度。探索顺铂耳毒性的发病机制,寻求有效的

* 基金项目:广东省科技计划项目(No:2014A020212491)

¹南方医科大学附属南方医院耳鼻咽喉头颈外科(广州, 510515)

²广州市第一人民医院耳鼻咽喉科

通信作者:梁勇, E-mail: yliang@fimmu.com

防治方法,一直是耳科学家们关注的热点。Bcl-2 家族是重要的凋亡相关基因,对一定因素诱导的凋亡起着抑制或促进作用。本研究应用 Western Blot 检测顺铂对豚鼠耳蜗 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响,并采用免疫组织化学方法进一步检测 Bcl-2 和 Bax 在 SGC 中的表达情况,探讨 Bcl-2 家族是否参与了顺铂诱导的耳蜗 SGC 凋亡。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

健康成年豚鼠 20 只,体重 250~350 g,耳廓反射灵敏(由广东省实验动物中心提供),随机分为顺铂组和对照组,每组各 10 只。顺铂组豚鼠单次腹腔注射顺铂 16 mg/kg,对照组腹腔注射等量生理盐水。给药前和给药后第 7 天均检测各组豚鼠畸变产物耳声发射(DPOAE)值,然后处死动物。每组均做 Bcl-2、Bax 免疫组织化学检测。

1.2 药品与试剂

兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗鼠 Bax 多克隆抗体(Santa CruzBio technology,美国)。GTVision™ II 型免疫组织化学检测试剂盒(基因科技上海有限公司),包括:试剂 A(反应增强剂),试剂 B(GTVision™ II 型聚合物)。4%多聚甲醛和 10% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA,pH=7.4)与磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L)及 3%双氧水(北京鼎国生物公司),DAB 显色试剂盒(中山公司),顺铂(齐鲁制药厂)。

1.3 DPOAE 检测

在隔声室内,动物用 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,起效后检查外耳道和鼓膜,清除耵聍,排除中耳炎症。固定好豚鼠头部,用小号耳塞封闭外耳道,调整探头的位置对准鼓膜方向。设置参数:初始纯音 f_1 与 f_2 , $f_1/f_2=1.22$,强度差 $L_1-L_2=10$ dB SPL,以 DPOAE 幅值高于本底噪声 3 dB 视为检出标准,检测频率 $f_0^2=f_1 \times f_2$ 为 1、2、4、6、8 kHz 等处的幅值。

1.4 制作石蜡切片

将豚鼠断颈处死,迅速取出听泡放入冰冷的磷酸盐缓冲液中,解剖显微镜下修剪去除多余颞骨,暴露耳蜗,蜗顶钻孔,挑出镫骨,刺破卵圆窗和圆窗,用吸管以 4%多聚甲醛(4℃,pH=7.4)自蜗顶缓慢灌注耳蜗,每个标本灌 5 遍,约 5 ml。然后将耳蜗置入 4%多聚甲醛中,4℃固定 24 h。取出耳蜗用 PBS 冲洗后再置入 10% EDTA 中脱钙 7~10 d,每天更换 10% EDTA,直至蜗壳的骨壁完全脱钙,并再次去除多余的部分。PBS 清洗,常规石蜡切片,以平行蜗轴切片,切片厚度为 5 μ m。

1.5 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡水化,微波抗原修复,PBS (pH=7.4)冲洗 3 次,每次 3 min;滴加 3%过氧化

氢避光孵育 10 min,去除内源性过氧化物酶,PBS 冲洗;除去 PBS,切片上分别滴加一抗(兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体(1:100)和兔抗鼠 Bax 多克隆抗体(1:100),室温孵育 60 min,PBS 冲洗。除去 PBS,切片上滴加反应增强剂(A液),室温孵育 10 min,PBS 冲洗。切片上滴加二抗(GTVision™ II 型聚合物,B液),室温孵育 10 min,PBS 冲洗。滴加预备好的显色剂(DAB 工作液),孵育 10 min。蒸馏水冲洗,苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每张切片选取 3 个视野在 400 倍显微镜下观察螺旋神经节,采用 Leica 分析系统检测灰度值,记录平均值。

1.6 Western Blot 检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达

豚鼠断头后快速取下双侧耳蜗放入玻璃研磨器中加入液氮研磨,研磨成粉末后放入离心管,加入蛋白裂解液,超声粉碎,离心后取上清分装至 0.5 ml 离心管中,用 Biorad 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE,转 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,PBST 缓冲液洗膜 3 次。分别加入一抗(Bcl-2 1:200 或 Bax 1:200; β -actin 1:3000)。室温下孵育 4 h,PBST 洗膜 10 min \times 3 次,加入二抗(羊抗兔 IgG 1:3000)。室温下孵育 1 h,PBST 洗膜 10 min \times 3 次,化学发光法显色。用凝胶成像系统软件进行分析结果,将 Bcl-2、Bax 蛋白与 β -actin 积分光密度的比值作为 Bcl-2、Bax 蛋白的相对表达水平,以判断其表达变化。

1.7 统计学方法

用 SPSS 12.0 统计软件分析数据,Bcl-2 和 Bax 蛋白表达灰度值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数差异的显著性检验采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DPOAE 检测结果

与用药前相比,用药后顺铂组各频率 DPOAE 幅值均明显降低($P < 0.01$),而对照组用药前后无明显变化($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 Bcl-2 免疫组织化学检测结果

对照组 Bcl-2 染色表现为细胞核膜和细胞质内有淡褐色染色颗粒分布(图 1a),呈中等强度的表达,图像分析仪检测其表达灰度值为 99.00 ± 2.42 。顺铂组豚鼠 SGC 中 Bcl-2 蛋白表达减弱(图 1b),灰度值为 149.80 ± 2.37 ,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 Bax 免疫组织化学检测结果

对照组豚鼠耳蜗 SGC 细胞质内 Bax 染色较弱(图 2a),灰度值为 154.50 ± 2.80 。顺铂组豚鼠 SGC 的 Bax 蛋白表达明显增强(图 2b),灰度值为 104.50 ± 3.09 ,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 动物用药前后 DPOAE 幅值的比较

dB, $\bar{x} \pm s$

频率/kHz	对照组		顺铂组	
	用药前	用药后	用药前	用药后
1	15.47±3.543	14.87±3.044	16.20±3.550	8.73±2.492 ¹⁾
2	24.20±3.858	21.80±3.121	24.80±3.529	14.80±2.957 ¹⁾
4	29.27±4.399	27.07±3.826	27.67±3.811	17.00±3.873 ¹⁾
6	32.07±3.936	30.60±3.832	31.33±3.994	19.00±4.192 ¹⁾
8	39.47±3.420	38.47±4.454	37.47±5.397	22.67±4.952 ¹⁾

与顺铂组用药前比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

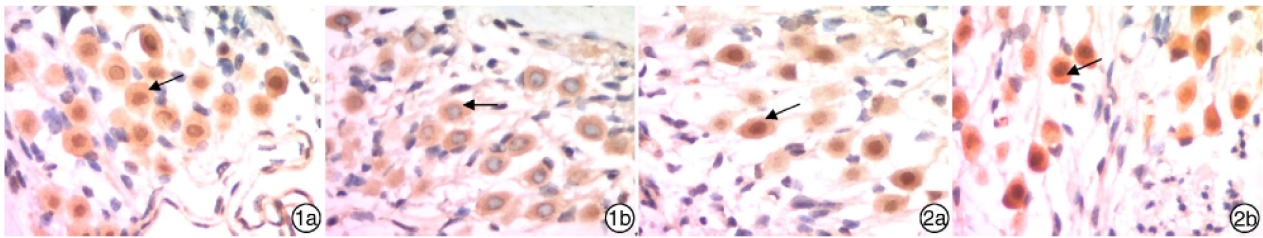


图 1 Bcl-2 的表达 1a:在对照组呈中等强度表达 $\times 400$;1b:在顺铂组呈弱阳性表达 $\times 400$; 图 2 Bax 的表达 2a:在对照组呈弱阳性表达 $\times 400$;2b:在顺铂组呈中等强度表达 $\times 400$ 。

2.4 Western-Blot 测定 Bcl-2、Bax 蛋白的表达结果

Bcl-2、Bax 蛋白电泳图见图 3。对照组 Bcl-2 积光密度值为 0.7278 ± 0.0169 , 顺铂组为 0.4676 ± 0.0201 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对照组 Bax 积光密度值为 0.3848 ± 0.0217 , 顺铂组为 0.7356 ± 0.0223 , 表达明显增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

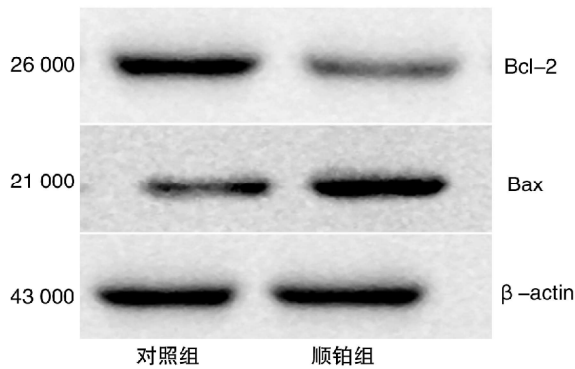


图 3 Western Blot 检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达情况

3 讨论

本实验观察到豚鼠单次较大剂量顺铂 (16 mg/kg) 腹腔注射后 DPOAE 幅值降低, 与对照组比较差异有统计学意义, 表明豚鼠耳蜗听觉功能产生了明显变化, 出现听功能障碍, 顺铂已对豚鼠耳蜗产生了毒性作用。此外, 发现豚鼠在高频区 DPOAE 幅值的下降程度较低频区明显增大, 提示顺铂耳毒性损伤是按照由高频到低频的顺序发展的, 与临床上患者的表现一致。因此, 应用豚鼠可

以建立可靠的顺铂耳毒性模型。

顺铂是一种烷化剂, 可杀死细胞周期中各期细胞, 抑制 DNA 合成、复制和 RNA 的转录, 或诱导细胞凋亡。研究发现豚鼠在使用顺铂 2 d 后, 大量 SGC 出现凋亡, 且半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 表达量显著升高, 第 4 d 达到更高水平, 表明顺铂所致的听力下降与 caspase-3 激活后所致的细胞凋亡有关。但是关于凋亡发生的详细信号转导通路目前尚不清楚。

细胞凋亡由多种相关基因和其蛋白调节, Bcl-2 家族蛋白是调控细胞凋亡的关键分子, 其中与细胞凋亡关系最紧密的凋亡调控基因是 Bcl-2、Bax, 其调控凋亡途径的靶点在线粒体。

Bcl-2 存在于细胞的线粒体、核膜和内质网膜上, 能对抗各种凋亡的刺激而保护细胞, 被认为是抗凋亡基因; Bax 则属促凋亡基因。当 Bcl-2 和 Bax 形成异源二聚体时表现为 Bcl-2 抑制细胞凋亡, 而 Bax 形成同源二聚体时则诱导细胞凋亡^[1]。Bcl-2/Bax 形成一个动态平衡, 其表达的蛋白比例决定了细胞受到刺激后是存活还是凋亡, Bcl-2 蛋白表达占优则细胞存活, 而 Bax 蛋白表达占优则细胞凋亡。线粒体膜上的通透性转换孔 (PTP)、转运体和 Bcl-2 形成的通道对线粒体钙稳态起维持作用。通常情况下大多数 PTP 处于闭合状态, 受到各种凋亡诱导因素刺激后线粒体跨膜电位降低, PTP 开放, 线粒体膜通透性增大, 导致凋亡启动因子如细胞色素-C (Cyt-C) 等从线粒体释放出来^[2]。Cyt-C 进入细胞质后与胞液中的凋亡蛋白水解酶活化因子 (Apaf-1) 聚合形成 Cyt-C/Apaf-1 复合物, 使 caspase-9 得到激活, 活化的 caspase-9 进一步激

活 caspase-3, 从而启动 caspase 级联反应, 活化的 caspase-3 标志着凋亡进入不可逆阶段, 最终引起细胞凋亡。Bax 能允许 Cyt-C 穿过线粒体膜进入细胞质, 导致细胞凋亡; 而 Bcl-2 的作用正好相反, 它可以关闭 Bax 形成通道的活性, 使某些促凋亡的小分子不可自由通透, 从而阻止细胞凋亡。在听觉系统, 损毁耳蜗后过度表达的 Bcl-2 蛋白在转基因小鼠中能阻止因此导致的耳蜗核神经元的死亡。其他实验给予 Bax siRNA 将 Bax 基因沉默后能使培养的耳蜗 Corti 器毛细胞 Bax 基因和蛋白表达下降, 从而减轻肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的毛细胞凋亡^[3]。Coffin 等^[4]报道通过转基因技术抑制 Bax 的表达, 增加 Bcl-2 的表达能减轻氨基苷类抗生素的耳毒性。

本研究通过 Western Blot 方法证实顺铂组耳蜗 Bcl-2 表达量显著下降, 而 Bax 表达量增加, Bcl-2/Bax 比值降低。因此推测顺铂通过抑制 Bcl-2 的表达, 使 Bcl-2/Bax 比值降低, 激活 Bax 向线粒体移位导致线粒体 PTP 开放, 释放 Cyt-C, 进而触发 caspases 级联反应促使细胞凋亡。

由于保持足够数量且生理功能正常的 SGC 在处理 and 传导听觉信号过程中十分重要, 本实验采用 Western Blot 方法已证实顺铂可对耳蜗 Bcl-2、Bax 的表达造成影响, 因此有必要进一步明确顺铂耳毒性过程中 Bcl-2、Bax 表达的变化与 SGC 凋亡是否存在联系。研究表明, 某些刺激因素致使耳蜗细胞凋亡时, Bcl-2 家族相关基因的表达参与了 SGC 凋亡的过程。Hansen 等^[5]发现 Bcl-2 过表达能明显提高 SGC 的存活。Wang 等 (2001) 观察到出生后第 1~7 天, 新生大鼠 SGC 中 Bax 的表达明显高于成年大鼠, 表明 SGC 发育过程中 Bax 参与了神经元的凋亡。李明栋等 (2006) 在研究中发现, 豚鼠使用庆大霉素 14 d 后 Bcl-2 在 SGC 中的表达有低于正常对照组表达水平的趋势, Bax 则高于正常对照组。通过腺病毒载体介导 Bcl-2 基因转染体外培养的新生大鼠耳蜗 SGC, 对顺铂所致 SGC 损伤有一定的拮抗作用。由于顺铂与氨基苷类抗生素的耳毒性有相似的发生机制, 因此推测在顺铂致 SGC 凋亡过程中, Bcl-2、Bax 可能参与其中。本研究采用免疫组织化学方法观察到在 SGC 中顺铂可促进

Bax 的表达, 降低 Bcl-2 的表达, 从而降低 Bcl-2/Bax 的水平, 致使 SGC 凋亡, 出现听力损害。说明 Bcl-2、Bax 表达的变化可能是 SGC 凋亡的分子机制, Bcl-2、Bax 表达的变化参与了顺铂诱导的 SGC 凋亡的调控。此外, Bcl-2 可抑制线粒体活性氧的生成, 还能通过降低线粒体膜电位和增加线粒体存储钙离子的能力抑制活性氧导致的凋亡, 而活性氧增加所致的氧化应激是引起凋亡的主要诱因^[6], 由于顺铂可刺激内耳生成大量活性氧, 因此 Bcl-2 表达下降可使细胞易于凋亡。

综上所述, 本研究证实顺铂耳毒性的发生机制可能与顺铂能够下调耳蜗及 SGC 抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 上调促凋亡基因 Bax 的表达有关。从而为顺铂耳毒性的防治提供了新的途径, 即有可能通过维持 Bcl-2 和 Bax 的平衡来抑制耳蜗及 SGC 的凋亡达到保护听力的目的。

参考文献

- [1] BURGUILLOS M A, HAJJI N, ENGLUND E, et al. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus evidence in Parkinson's disease patients[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 9:1-12.
- [2] 刘莹, 王淑秋, 李喆. 2 型糖尿病大鼠肾脏的钙稳态失衡、细胞色素 C 的变化与灵芝孢子粉的干预[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(3):267-269.
- [3] DINH C, BAS E, DINH J, et al. Short interfering RNA against Bax attenuates tnfa-induced ototoxicity in rat organ of corti explants[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 148:834-840.
- [4] COFFIN A B, RUBEL E W, RAIBLE D W, et al. Bax, Bcl2, and p53 differentially regulate neomycin and gentamicin-induced hair cell death in the zebrafish lateral line [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2013, 14:645-659.
- [5] HANSEN M R, ROEHM P C, XU N, et al. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL prevents spiral ganglion neuron death and inhibits neurite growth [J]. *Dev Neurobiol*, 2007, 67:316-325.
- [6] MOSKOWITZ M A, LO E H, IADECOLA C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments [J]. *Neuron*, 2010, 67:181-198.

(收稿日期:2015-10-06)