

腺苷对噪声暴露豚鼠耳蜗谷氨酸和复合动作电位的影响

章 岚^{1*}, 王小平², 宋诚荣², 宋茂海², 江 键²

(1. 第二军医大学基础医学部生理学教研室, 上海 200433; 2. 基础医学部数理教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究腺苷在急性噪声性声损伤中对耳蜗谷氨酸和复合动作电位的影响。**方法:** 豚鼠暴露于白噪声 118 dB SPL (sound pressure level, 声压水平) 30 min, 同时耳蜗灌注单纯或含不同浓度 (0.1、1 或 5 mmol/L) 腺苷的人工外淋巴液, 高效液相色谱检测分析噪声暴露前、后外淋巴中谷氨酸浓度, 测试噪声暴露前后听神经复合动作电位的阈值。**结果:** 噪声暴露后耳蜗外淋巴液中谷氨酸含量显著升高, 给予 1 mmol/L 和 5 mmol/L 腺苷可以抑制谷氨酸浓度的升高。噪声暴露后复合动作电位阈值增大, 同时给予腺苷灌注组阈移减小。**结论:** 腺苷可使噪声暴露后耳蜗外淋巴中谷氨酸浓度明显降低, 复合动作电位阈移减小, 提示腺苷对急性声损伤耳蜗有保护作用。

[关键词] 腺苷; 谷氨酸; 噪声; 外淋巴灌注

[中图分类号] R 764.433

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2005)02-0164-03

Effect of adenosine on perilymph glutamate concentration and compound action potentials in guinea pigs exposed to white noise

ZHANG Lan^{1*}, WANG Xiao-ping², SONG Cheng-rong², SONG Mao-hai², JIANG Jian² (1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Maths and Physics, College of Basic Medical Sciences)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the protective effect of adenosine on cochlea in acute acoustic trauma. **Methods:** Guinea pigs were exposed to 118 dB SPL white noise for 30 min. During the process of exposure, artificial perilymph or artificial perilymph containing adenosine (0.1 mmol/L, 1 mmol/L or 5 mmol/L) was infused into the cochlea through perilymphatic perfusion. Concentration of glutamate in perilymph and thresholds of compound action potentials (CAP) were measured before and after noise exposure. **Results:** After exposure, the concentration of glutamate and the mean threshold shifts evoked by click were significantly higher than those of before exposure. Concentration of glutamate and thresholds of CAP in adenosine (1 mmol/L and 5 mmol/L) treated groups were significantly lower than those of the control group. **Conclusion:** Adenosine can inhibit the elevation of glutamate and decrease the threshold shift of CAP after exposure to noise, which can protect cochlea in acute acoustic trauma in guinea pigs.

[KEY WORDS] adenosine; glutamate; noise; perilymph perfusion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 164-166]

腺苷作为一种神经调质, 能抑制多种神经递质的释放, 减弱神经递质的过度作用, 保护组织器官。在中枢神经系统, 腺苷能抑制诱发的突触电位以及传入神经放电, 能减弱兴奋性氨基酸如谷氨酸的释放。研究发现, 耳蜗毛细胞膜和传入神经末梢质膜上存在腺苷受体^[1], 因此推测腺苷在耳蜗毛细胞及传入神经也可能有重要作用。

谷氨酸是毛细胞释放的神经递质, 在正常的耳蜗电生理活动中起着重要作用, 噪声暴露时谷氨酸可能在突触间隙过度积蓄, 从而引起毛细胞或传入神经损伤。本实验用含一定浓度腺苷的人工外淋巴灌注耳蜗, 研究腺苷对噪声暴露耳蜗外淋巴中谷氨酸浓度和听神经复合动作电位的影响, 探讨腺苷对噪声暴露耳蜗传入神经末梢损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物与分组 健康豚鼠(第二军医大学实验动物中心提供)40只, 体质量 250~400 g, 雌雄各半, Preyer 反射正常, 随机分为单纯人工外淋巴灌注组(对照组)、0.1 mmol/L 腺苷外淋巴灌注组、1 mmol/L 腺苷外淋巴灌注组、5 mmol/L 腺苷外淋巴灌注组, 每组 10 只。

1.2 手术与外淋巴液灌注 豚鼠腹腔注射 20% 乌拉坦 1.5 g/kg 麻醉, 置于恒温实验台上, 保持动物肛温 37~38℃。气管插管, 用 ALC-V8 动物呼吸机

[基金项目] 国家自然科学基金(30100038)。

[作者简介] 章 岚(1969-), 女(汉族), 硕士, 副教授。

* Corresponding author. E-mail: book2003100@yahoo.com.cn

行人工呼吸,调节呼吸频率 60 次/min,潮气量 3 ml。固定动物头部,腹外侧切口打开右侧鼓泡,在耳蜗底回鼓阶开一直径 0.2 mm 的小孔,作为灌流入口。用微推进器将直径 0.15 mm 的玻璃微电极经此插入。在前庭阶再开一小孔作出口。人工外淋巴液从鼓阶流入,从前庭阶流出。灌流速度 6 μ l/min。人工外淋巴的成分为 (mmol/L): NaCl 137, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 1, 葡萄糖 11, 调节 pH 为 7.4。在上述单纯人工外淋巴液中加入不同浓度 (0.1、1、5 mmol/L) 腺苷,即为腺苷人工外淋巴液。

1.3 实验方法 将银球记录电极放在靠近圆窗的地方,参考电极置于同侧颈部肌肉,地线置于鼻尖。用 ALC-MPA 多道生物信号系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)记录分析电信号。用短声诱发复合动作电位(compound action potential, CAP),记录分析噪声暴露前后的右耳 CAP 反应阈值。测定方法:持续外淋巴灌流,各组分别灌流单纯人工外淋巴液或含 0.1 mmol/L、1 mmol/L、5 mmol/L 腺苷的人工外淋巴液,同时暴露 118 dB SPL (sound

pressure level,声压水平)白噪声 30 min。测定噪声暴露前后 CAP(复合动作电位)阈值;收集噪声暴露前后耳蜗外淋巴液,采用反相高效液相色谱-荧光法^[2]测定谷氨酸浓度。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对测定结果以 Excel 2000 数据分析工具包进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 腺苷对耳蜗外淋巴谷氨酸浓度的影响 各组暴露 118 dB SPL 30 min 后,外淋巴中谷氨酸浓度较噪声暴露前比较均显著升高 ($P < 0.01$);比较各组噪声暴露后的谷氨酸浓度,发现 0.1 mmol/L 腺苷灌流组与对照组比无显著差异,而 1 mmol/L 腺苷灌流组及 5 mmol/L 腺苷灌流组与对照组比有显著差异 ($P < 0.01$),0.1 mmol/L、1 mmol/L 与 5 mmol/L 腺苷灌流组之间均差异显著 ($P < 0.01$);提示噪声暴露后外淋巴中谷氨酸浓度显著升高,在噪声暴露过程中同时给予 1 mmol/L 腺苷及 5 mmol/L 腺苷可以降低外淋巴液中谷氨酸浓度的升高(表 1)。

表 1 噪声暴露前后谷氨酸浓度、CAP 阈值和 CAP 阈移的变化

Tab 1 Glutamate concentration, CAP thresholds and CAP threshold shifts before and after noise exposure

($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Glutamate (cib, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		CAP threshold (dB SPL)		
	Pre-exposure	Post-exposure	Pre-exposure	Post-exposure	Shifts
Control	3.914 \pm 0.228	7.923 \pm 0.786**	20.42 \pm 3.78	62.47 \pm 6.10**	42.01 \pm 4.62
Adenosine 0.1 mmol/L	3.904 \pm 0.260	7.764 \pm 0.801**	20.30 \pm 4.57	56.11 \pm 4.43**	35.82 \pm 5.77
1 mmol/L	3.896 \pm 0.361	6.472 \pm 0.598** $\Delta\Delta$	21.82 \pm 4.61	42.70 \pm 5.29** $\Delta\Delta$	20.91 \pm 5.95 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
5 mmol/L	3.926 \pm 0.289	5.233 \pm 0.679** $\Delta\Delta$	20.11 \pm 3.57	37.22 \pm 4.61** $\Delta\Delta$	17.22 \pm 3.61 $\Delta\Delta\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ vs pre-exposure group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs 0.1 mmol/L adenosine treated group

2.2 腺苷对 CAP 阈值改变的影响 各组噪声暴露后 CAP 阈值较噪声暴露前均显著升高 ($P < 0.01$);噪声暴露后 0.1 mmol/L 腺苷灌流组与对照组比无显著差异,而 1 mmol/L 腺苷灌流组及 5 mmol/L 腺苷灌流组与对照组比有显著差异 ($P < 0.01$);0.1 mmol/L 腺苷灌流组与 1 mmol/L 及 5 mmol/L 腺苷灌流组之间差异显著 ($P < 0.01$);1 mmol/L 腺苷灌流组与 5 mmol/L 腺苷灌流组之间无显著差异(表 1)。噪声暴露后 CAP 平均阈移 (42.01 \pm 4.62) dB SPL,给予腺苷后,阈移减小,但 0.1 mmol/L 腺苷灌流组阈移与对照组比无显著差异,1 mmol/L 腺苷灌流组和 5 mmol/L 腺苷灌流组阈移则显著减小,两组阈移减小程度无显著差异(表

1)。提示噪声暴露导致 CAP 阈值显著升高,噪声暴露过程中同时给予 1 mmol/L 腺苷或 5 mmol/L 腺苷可以使 CAP 阈移减小。

3 讨论

随着国民经济的日益发展,噪声及其所带来的各种问题越来越突出,对噪声性听力损伤的研究具有重要的现实意义。噪声不仅损伤耳蜗内的感受细胞(毛细胞),影响声电换能过程,也作用于毛细胞下的毛细胞/传入神经突触、传入神经和传入神经元,影响信号的跨膜传递和向中枢的传送。噪声引起的毛细胞致聋国内外已有大量研究,但对突触和突触后结构损伤致聋,尤其是其防治的研究,国内外均较

为少见。

毛细胞底部与传入神经末梢构成的突触是一种化学性突触,毛细胞释放的神经递质谷氨酸在耳蜗信息传递中起重要作用。但谷氨酸又是一种具有神经毒性的化学物质,在各种病理情况下,谷氨酸过度释放或清除障碍,可造成谷氨酸在传入神经突触处的堆积,突触后膜谷氨酸受体过度激活,钠、钙离子过度内流,导致细胞损伤^[3]。

噪声、缺血、缺氧可引起耳蜗内毛细胞下传入神经末梢的水肿,耳蜗灌注谷氨酸受体激动剂可引起类似的耳蜗病理变化,提示噪声、缺血、缺氧所引起的耳蜗病理改变与传入神经递质谷氨酸在耳蜗中的堆积有关。实验发现,噪声暴露后耳蜗外淋巴中谷氨酸浓度升高,说明噪声暴露使毛细胞释放谷氨酸增加^[4]。噪声暴露引起毛细胞兴奋性神经递质谷氨酸过度释放,继而引起耳蜗神经毒性损伤,可能是传入神经突触和传入神经元损伤的重要原因^[5]。

腺苷类物质作为一种神经调质,在中枢神经系统内,可以抑制中枢神经元的谷氨酸过度释放,从而减轻和预防谷氨酸对中枢神经系统的神经毒性。我们之前的实验发现,通过耳蜗灌注的方法将含腺苷的人工外淋巴液持续灌流入耳蜗外淋巴间隙,能使腺苷与毛细胞膜和传入神经末梢质膜上的腺苷受体结合而发挥作用,可准确控制外淋巴中的药物浓度,且不影响耳蜗功能^[6]。本实验结果表明,在噪声暴露时,用含一定浓度腺苷的人工外淋巴液灌注耳蜗,可以抑制噪声暴露后外淋巴中谷氨酸浓度的升高,同时减小CAP阈移,提示腺苷对耳蜗内周围神经系统的作用与其中枢神经系统作用相似,腺苷能抑制毛细胞分泌谷氨酸,从而减弱谷氨酸浓度过高可能导致的耳蜗传入神经突触和传入神经元损伤,从而发挥保护作用。

耳蜗毛细胞膜(突触前膜)和传入神经末梢质膜上都存在有腺苷 A1 受体,腺苷可能通过与突触前膜 A1 受体结合,增强钾内流,使膜超极化而限制细胞外钙的内流,从而减缓囊泡的迁移和胞吐,抑制谷

氨酸分泌;腺苷和突触后膜 A1 受体结合,减弱电压依赖性和 NMDA 受体偶联的钙内流,防止神经元细胞内钙超载^[7,8]。

研究发现,1 mmol/L 和 5 mmol/L 腺苷作用显著,而 0.1 mmol/L 腺苷虽然有同样的作用趋势,但统计学显示与对照组比无显著差异,提示腺苷的保护作用需要达到一定的浓度。在 CAP 阈移测试中,1 mmol/L 和 5 mmol/L 腺苷都显著减小了噪声导致的阈移,但两种浓度腺苷的作用无显著差别,提示腺苷的浓度与其作用有一定的范围,其机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ford MS, Maggirwar SB, Rybak LP, *et al.* Expression and function of adenosine receptors in the chinchilla cochlea[J]. *Hear Res*, 1997, 105(1/2):130-140.
- [2] 顾拥军,倪文,包维丽,等.反相高效液相色谱法测定氨基酸类神经递质[J].上海医科大学学报,1995,22(3):210-212.
- [3] Pujol R, Puel JL. Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1999, 884(1):249-254.
- [4] Gao WY, Jiang YP. Effect of noise on concentration of amino acid in perilymph of guinea pig cochlea[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao(Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2002, 23(1):41-44.
- [5] Rebillard G, Ruel J, Nouvian R, *et al.* Glutamate transporters in the guinea-pig cochlea: partial mRNA sequences, cellular expression and functional implications[J]. *Euro J Neurosci*, 2003, 17(1):83-87.
- [6] Zhang L, Gao WY. Protective effect of adenosine on temporary threshold shift of audition caused by intensive white noise in guinea pigs[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao(Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2001, 22(7):624-627.
- [7] Tabuchi K, Ito Z, Wada T, *et al.* Effect of A1 adenosine receptor agonist upon cochlear dysfunction induced by transient ischemia[J]. *Hear Res*, 1999, 136(1):86-90.
- [8] Fridlberger A, Flock A, Ulfendahl M, *et al.* Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+} concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ [J]. *Proc Natl Sci USA*, 1998, 95(12): 7127-7132.

[收稿日期] 2004-10-22

[修回日期] 2004-12-20

[本文编辑] 孙岩