

# 丹参对听功能损伤模型豚鼠的保护作用研究<sup>△</sup>

张再兴\*,付兴华(河北联合大学附属医院,河北唐山 063000)

中图分类号 R276.1;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1749-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.08

**摘要** 目的:研究丹参对听功能损伤模型豚鼠的保护作用。方法:连续5 d腹腔注射顺铂2 mg/kg以复制豚鼠听功能损伤模型。实验分为3组,即对照(等容生理盐水,5 d)、模型、丹参(8 ml/kg,7 d)组,腹腔注射给药,每天1次。测定豚鼠听性脑干反应(ABR)阈值与I波潜伏期变化;透射电镜观察内耳形态变化。结果:与对照组比较,模型组豚鼠ABR阈值显著升高、I波潜伏期显著延长( $P<0.01$ );与模型组比较,丹参组豚鼠ABR阈值显著降低、I波潜伏期显著缩短( $P<0.01$ )。丹参组内耳毛细胞变性坏死程度较模型组明显减轻。结论:丹参对顺铂导致的内耳损伤有一定的保护作用。

**关键词** 丹参;顺铂;豚鼠;听功能;形态;内耳

## Study of the Protective Effect of *Salvia miltiorrhiza* on Hearing Function Damage Model of Guinea Pig

ZHANG Zai-xing, FU Xing-hua (The Affiliated Hospital of Hebei United University, Hebei Tangshan 063000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of *Salvia miltiorrhiza* on hearing function in cisplatin injury model guinea pigs. METHODS: The hearing function injury model was induced by intraperitoneal injection of cisplatin 2 mg/kg for consecutive 5 days. The model rats were divided into 3 groups, i.e. control (constant volume of normal saline, 5 d), model, *S. miltiorrhiza* (8 ml/kg, 7 d) groups. They were given medicines intraperitoneally once a day. The changes of auditory brainstem response (ABR) threshold and latency of wave I were determined, and the morphological changes of inner ear were observed by transmission electron microscope. RESULTS: Compared with control group, ABR threshold in model group increased significantly, and latency of wave I prolonged significantly ( $P<0.01$ ); compared with model group, ABR threshold in *S. miltiorrhiza* group decreased significantly, and latency of wave I shortened significantly ( $P<0.01$ ). The necrosis of bristle cells in inner ear in *S. miltiorrhiza* group was slighter than in model group. CONCLUSIONS: *S. miltiorrhiza* shows protective effects against cisplatin-induced injury to the inner ear.

**KEY WORDS** *Salvia miltiorrhiza*; Cisplatin; Guinea pigs; Hearing function; Morphology; Inner ear

顺铂主要用于治疗头颈部和泌尿系统的恶性肿瘤,内耳损伤是其主要副作用之一,减轻内耳损伤是研究顺铂副作用的重要方向。有研究报道,丹参被广泛应用于治疗心脑血管

疾病、肝肾疾病、颈肩腰腿疾患等多种疾病,疗效令人满意<sup>[1]</sup>,但丹参是否能减轻顺铂造成的内耳损伤还未知。本研究拟采用顺铂内耳损伤的动物模型,通过听性脑干反应(ABR)测定、

成蓄积,是多糖化合物中促组胺释放作用最显著的物质<sup>[10]</sup>。本研究表明,黑面神水提取物可显著减少尾iv右旋糖酐-40所致全身瘙痒模型小鼠的30 min内瘙痒次数和瘙痒持续总时间,表现出良好的止痒作用;同时,黑面神水提取物也可抑制外源性磷酸组胺引起的小鼠皮肤毛细血管通透性增高。由此提示,黑面神水提取物对内源性组胺和外源性组胺均有抑制作用,表明黑面神水提取物可通过抑制组胺的释放而发挥抗I型超敏反应的药理作用。

### 参考文献

- [1] 梅全喜.广东地产药材研究[M].广州:广东科技出版社,2011:617.
- [2] 范文昌,梅全喜,李楚源.广东地产清热解毒药物大全[M].北京:中医古籍出版社,2011:615.
- [3] 彭伟文,谭泳怡,梅全喜,等.黑面神水提取物抗炎作用实验

研究[J].今日药学,2012,22(3):145.

- [4] 彭伟文,梅全喜,戴卫波.广东地产药材黑面神研究进展[J].亚太传统医药,2010,6(7):137.
- [5] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].1版.北京:人民卫生出版社,2005:1067.
- [6] 徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1412.
- [7] 李忻红,陈兴,关洪全.消敏颗粒抗皮肤I型超敏反应的实验研究[J].中国中医药信息杂志,2008,15(4):32.
- [8] 龚非力.医学免疫学[M].北京:科学出版社,2004:293.
- [9] 朱学俊,顾有守,沈下丽.实用皮肤病性病治疗学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:69.
- [10] 林宇红,徐建华.组胺释放剂及其作用机制的研究进展[J].生理科学进展,1994,25(1):42.

<sup>△</sup>基金项目:河北联合大学博硕基金项目(No.2002-17)

\*副主任医师,副教授,博士。研究方向:耳科学基础与临床。电话:0315-3725279。E-mail:bj1368317@126.com

(收稿日期:2012-06-05 修回日期:2012-09-24)

透射电镜观察等方法,观察豚鼠听功能及内耳形态变化,以探讨丹参对其影响的可能机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

7S-12型脑干听觉诱发电位仪(日本三荣公司);S-3500型扫描电镜(日本Jeol公司);MICROW HM340E型石蜡切片机(德国Carl Zeiss公司);BX60型荧光显微镜摄像机(日本Olympus公司);BMJ-III型包埋机及冷冻台(常州市中威电子仪器有限公司);HPLAS-1000图像分析系统(中国武汉同济千屏影像工程公司)。

### 1.2 药品与试剂

顺铂注射用无菌粉末(山东德州制药厂,批号:37020523,规格:10 mg/支);丹参注射液(上海第一生化药业公司,批号:31022558,规格:2 ml/支);10%水合氯醛(河北联合大学附属医院自制)。

### 1.3 动物

成熟健康、耳廓反射灵敏的白色红目豚鼠33只,♀♂兼用,体质量250~300 g,购于中国医学科学院实验动物中心[动物使用合格号:SCXK(京)2008-0006]。

## 2 方法

### 2.1 复制模型与分组、给药

实验前测定豚鼠的ABR阈值与I波潜伏期。实验分为3组,对照组豚鼠连续5 d ip 等容生理盐水;模型组豚鼠连续5 d ip 顺铂2 mg/kg;丹参组第1、2天ip 丹参注射液8 ml/kg,第3~7天ip 顺铂2 mg/kg,同时在ip 顺铂1 h后ip 丹参注射液8 ml/kg。

### 2.2 指标的检测

2.2.1 一般情况观察 观察豚鼠进食、饮水、毛发、体质量情况。

2.2.2 豚鼠ABR阈值与I波潜伏期测定 各组豚鼠于用药前与停药后测试听功能变化,操作在隔音与电磁屏蔽室内进行。ip 10%水合氯醛麻醉后,将电极的正极置于豚鼠颅顶正中,地极置于鼻尖,两侧耳廓为参考电极。电反应系统发出刺激信号,耳机给声,滤波短声刺激,扫描时间10 ms,叠加1 000次,反应由电极引出,经前置放大器放大,计算机处理后显示于荧光屏,根据图形判定ABR阈值及I波潜伏期。

2.2.3 豚鼠内耳形态学观察 对照组与模型组于给药第6天,丹参组于给药第8天断头处死豚鼠。快速取出听泡,暴露耳蜗将其浸于固定液中,并在解剖显微镜下取出镫骨,挑破卵圆窗、蜗窗,蜗顶钻孔,并以吸管固定液灌注5遍,约5 ml。标本以4%戊二醛固定,次日取出以0.01 mol/L PBS清洗,置于10%乙二胺四乙酸中脱钙,在解剖显微镜下取下第一转螺旋器,PBS清洗后锇酸固定,逐级脱水,Epon包埋,超薄切片,以透射电镜观察。

### 2.3 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件包统计分析,所有测得数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 豚鼠的一般状态

对照组豚鼠进食、饮水情况正常。模型组豚鼠在给药期间均出现活动减少、食欲减退、毛发稀疏脱落、体质量减轻、耳廓反射减退甚至消失等现象。丹参组豚鼠轻度毛发稀疏、活动与食欲减少、体质量减轻的情况较模型组明显。

### 3.2 豚鼠ABR阈值及I波潜伏期的变化

与对照组比较,模型组豚鼠ABR阈值显著增加,I波潜伏期显著延长( $P < 0.01$ );与模型组比较,丹参组豚鼠ABR阈值显著减小,I波潜伏期显著缩短( $P < 0.01$ )。豚鼠ABR阈值、I波潜伏期测定结果分别见表1、表2。

表1 豚鼠ABR阈值测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Determination of ABR threshold of guinea pigs( $\bar{x} \pm s$ )

组别	耳数	ABR 阈值, dB SPL	
		用药前	停药后
对照组	22	13.64 ± 2.75	13.41 ± 2.84
模型组	22	13.25 ± 2.94	39.50 ± 3.83*
丹参组	22	13.52 ± 2.56	18.41 ± 2.38*

与对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: # $P < 0.01$   
vs. control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: # $P < 0.01$

表2 豚鼠I波潜伏期测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Latency of wave I of guinea pigs( $\bar{x} \pm s$ )

组别	耳数	I波潜伏期, ms	
		用药前	停药后
对照组	22	1.27 ± 0.08	1.27 ± 0.10
模型组	22	1.32 ± 0.12	1.75 ± 0.16*
丹参组	22	1.26 ± 0.15	1.41 ± 0.12*

与对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: # $P < 0.01$   
vs. control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: # $P < 0.01$

### 3.3 豚鼠内耳形态学变化

由透射电镜可以看出,顺铂对豚鼠内耳造成了明显损伤,而ip 丹参后内耳损伤情况明显减轻。对照组豚鼠耳蜗螺旋器外毛细胞静纤毛结构清楚,表皮板厚度均匀、一致,线粒体结构正常。模型组外毛细胞静纤毛部分缺失,毛细胞核变性,染色质分布不均匀,部分染色质聚集于核膜下。丹参组外毛细胞静纤毛无倒伏,线粒体结构清楚。豚鼠内耳形态学变化见图1。

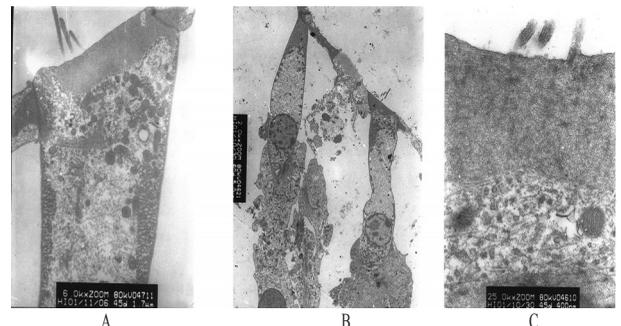


图1 豚鼠内耳形态学变化

A. 对照组; B. 模型组; C. 丹参组

Fig 1 Morphological changes of inner ear of guinea pigs

A. control group; B. model group; C. *S. millioninza* group

## 4 讨论

豚鼠应用顺铂后,引起了明显的听功能变化,这些改变可

能与毛细胞变性坏死有关,它们导致了神经冲动传导速度下降,反映在ABR上,出现阈值提高,I波潜伏期延长。同时,通过透射电镜对内耳的观察,可以看到模型组豚鼠内耳毛细胞及细胞器均出现了明显的损伤,这与国外学者观察的结果基本一致<sup>[2-4]</sup>。ip丹参后豚鼠ABR阈值显著减少,I波潜伏期明显缩短( $P<0.01$ )。

顺铂造成的内耳损伤是一个复杂的过程<sup>[5]</sup>。有研究发现,顺铂内耳损伤与自由基密切相关,自由基耗解了耳蜗谷胱甘肽和抗氧化酶,从而产生过氧化造成内耳损伤<sup>[6-7]</sup>。近来有研究证实,维生素E、银杏叶提取物、黄芪等能够减轻顺铂导致的内耳损伤<sup>[8-12]</sup>。丹参是活血化瘀中药,主要含有水溶性的黄酮类化合物,如丹参素、原儿茶醛以及丹酚酸B等和脂溶性的醌类化合物,如二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II等<sup>[13]</sup>。顾坚等<sup>[14]</sup>证实,丹参含有丹参酮II<sub>A</sub>磺酸钠和丹参素,可降低过氧化脂质含量,稳定线粒体膜及提高超氧化物歧化酶的活性,同时可保护三磷酸腺苷,减少其降解。本研究通过透射电镜观察到,线粒体空泡变性减轻,这充分证实了丹参注射液在保护细胞器膜稳定性中的作用。同时,余万东等<sup>[15]</sup>证实丹参能明显增加耳蜗蜗轴、外侧壁血流,增加对螺旋器的血氧供应,而且它作为自由基清除剂,通过对超氧阴离子的清除作用,阻止细胞膜脂质过氧化。本研究结果表明,与模型组比较,丹参组ABR阈值下降及I波潜伏期缩短,证明丹参对顺铂导致的听力损伤有一定的保护作用。这种保护作用可能与毛细胞或耳蜗神经功能改善有关,这与陈宇清等<sup>[16]</sup>报道的丹参注射液对脑损伤神经病变有一定保护作用相符合。透射电镜观察证实,丹参对顺铂导致的内耳形态学变化有明显改善作用。丹参减轻顺铂内耳损伤的机制可能与内耳中自由基活性降低,从而减轻过氧化造成的内耳损伤有关。

总之,丹参具有保护听功能,减轻顺铂致内耳损伤的作用。本研究证实了活血化瘀中药在顺铂内耳损伤治疗过程中的重要价值,这将为临床上防治肿瘤化疗引起的并发症提供理论依据,对提高癌症患者的生存质量有着重要的临床意义。

#### 参考文献

[1] 朱伟,姚丽梅.丹参注射液计算机系统药理学研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):145.  
[2] de Freitas MR, de Castro Brito GA, de Carvalho JV jr, et al. Light microscopy study of cisplatin-induced ototoxicity in rats[J]. *J Laryngol Otol*, 2009, 123(6):590.  
[3] Kim CH, Kang SU, Pyun J, et al. Epicatechin protects auditory cells against cisplatin-induced death[J]. *Apoptosis*, 2008, 13(9):1184.  
[4] Yumusakhuylyu AC, Yazici M, Sari M, et al. Protective

role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2012, 76(3):404.

[5] Abi-Hachem RN, Zine A, Van De Water TR. The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotectives strategies[J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2010, 5(2):147.  
[6] Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, et al. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 219(3):177.  
[7] Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(11):3933.  
[8] Huang X, Whitworth CA, Rybak LP. *Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats[J]. *Otol Neurotol*, 2007, 28(6):828.  
[9] Tokgoz SA, Vuralkan E, Sonbay ND, et al. Protective effects of vitamins E, B and C and L-carnitine in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity in rats[J]. *J Laryngol Otol*, 2012, 126(5):464.  
[10] Paksoy M, Ayduran E, Sanli A, et al. The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin-induced ototoxicity are demonstrated in rats[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(2):615.  
[11] Hill GW, Morest DK, Parham K. Cisplatin-induced ototoxicity: effect of intratympanic dexamethasone injections [J]. *Otol Neurotol*, 2008, 29(7):1005.  
[12] Xiong M, He Q, Wang J, et al. Astragalosides reduce cisplatin ototoxicity in guinea pigs[J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2011, 73(3):131.  
[13] 周立运,朱晓新.丹参及其化学成分药理学研究的进展[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(3):66.  
[14] 顾坚,黄星原.丹参注射液对病毒性心肌炎小鼠心肌HSP70与SOD的影响[J].医药导报,2006,25(5):418.  
[15] 余万东,吴展元.川芎嗪丹参对豚鼠耳蜗血流的影响[J].中华耳鼻咽喉科杂志,1991,26(1):18.  
[16] 陈宇清,薛梅,张亚明.丹参注射液对新生鼠缺氧缺血性脑损伤神经细胞的保护作用研究[J].中国药房,2010,21(47):4439.

(收稿日期:2012-11-11 修回日期:2012-12-26)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅