

## 灌胃 $\alpha$ -硫辛酸对豚鼠噪声性听力损伤的防护作用研究

王希营<sup>1</sup>, 朱全刚<sup>1</sup>, 高静<sup>2</sup>, 高申<sup>1</sup>, 潘勇华<sup>1</sup>, 苗鹏<sup>3</sup> (1. 第二军医大学附属长海医院药学部, 上海 200433, 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433, 3. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233030)

**[摘要]** 目的 观察自由基清除剂  $\alpha$ -硫辛酸对噪声性听力损伤的保护作用。方法 24 只体重为 250 ~ 300 g 的雄性纯白色豚鼠, 按体重随机分为  $\alpha$ -硫辛酸低、中、高剂量组 ( $n=3 \times 6$ )、噪声对照组 ( $n=6$ )。各组动物暴露倍频程噪声 (4 kHz 中心频率) 115 dB SPL (sound pressure level, 声压级) 4 h。 $\alpha$ -硫辛酸组动物暴露前 2 d、暴露当天至暴露后 7 d 连续灌胃给予  $\alpha$ -硫辛酸 30 mg/(kg·d) (低剂量组)、60 mg/(kg·d) (中剂量组)、120 mg/(kg·d) (高剂量组); 对照组动物相应时间灌胃给予等量的生理盐水。暴露后不同时间 (3、7、10 d) 测试各组动物在不同频率 (8、16、24、32 kHz) 下的听觉脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) 值, 组织学检查内外毛细胞缺失和损伤程度, 以测试时的听阈值与暴露前听阈值 (听阈偏移) 反映听力受损情况。**结果** 暴露后 3 d, 低、中、高剂量组在 8、16 kHz 频率下, 与噪声对照组相比较具有显著性差异; 低、高剂量组在 24、32 kHz 频率下与噪声对照组相比较具有显著性差异; 暴露后 7 d, 中、高剂量组在 8、16、24 kHz 频率下与噪声对照组相比较具有显著性差异; 低、高剂量组在 32 kHz 频率下与噪声对照组相比较具有显著性差异; 暴露后 10 d, 高剂量组与噪声对照组比较具有显著性差异。组织学检查,  $\alpha$ -硫辛酸组动物无明显内外毛细胞缺失, 毛细胞形态结构破坏较轻。对照组动物内耳外毛细胞显示水肿、空泡变性等病变。**结论** 高、中、低剂量的  $\alpha$ -硫辛酸对噪声性听力损伤均有一定的预防作用; 高剂量的  $\alpha$ -硫辛酸对噪声性听力损伤具有很好的预防和治疗作用。

**[关键词]** 噪声性听力损伤; 听觉脑干反应;  $\alpha$ -硫辛酸; 保护作用; 预防作用

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)02-0103-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.02.007

## Protective effect of $\alpha$ -lipoic acid on noise induced hearing loss in guinea pigs

WANG Xi-ying<sup>1</sup>, ZHU Quan-gang<sup>1</sup>, GAO Jing<sup>2</sup>, GAO Shen<sup>1</sup>, PAN Yong-hua<sup>1</sup>, MIAO Peng<sup>3</sup> (1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the protection of free radical scavenger:  $\alpha$ -lipoic acid on the explosive hearing loss in rats. **Methods** 24 pure white male guinea pigs weighted between 250 ~ 300 g, which were randomly divided into  $\alpha$ -lipoic acid low, medium, high group ( $n=3 \times 6$ ), Noise controlled group ( $n=6$ ). Each group of animals was exposed to octave band noise (4 kHz center frequency) 115 dB SPL 4 h.  $\alpha$ -Lipoic acid group were administered  $\alpha$ -lipoic acid 30 mg/(kg·d), 60 mg/(kg·d), 120 mg/(kg·d) for 10 days (2 days before the exposure, 7 days after); Noise controlled group animals were given normal saline orally. After exposure, auditory brainstem response (ABRs) was tested in animals in each group at different times; hair cell loss and damage were examined through histological means. **Results** After exposure of 3 days, lower/middle/high dose group had significant differences with noise control group at frequencies 8, 16 kHz; low and high dose group had significant differences with noise control group at frequencies 24, 32 kHz; 7 days after exposure, middle/high dose group had significant differences with noise control group at frequencies of 8, 16, 24 kHz), low and high dose group had significant differences with noise control group at frequencies 32 kHz; after 10 days, high dose group had significant differences with noise control group at each frequencies. In the histological examination, animals of three  $\alpha$ -lipoic acid dose group were found little inside and outside hair cell loss or damage. Noise controlled animals showed outer hair cells in the ear edema/vacuolar degeneration and other diseases. **Conclusions** Low, middle, high doses of  $\alpha$ -lipoic acid on the explosive hearing loss had a preventive effect. High dose  $\alpha$ -lipoic acid could take a good prevention and treatment in noise-induced hearing loss.

**[Key words]** noise induced hearing loss; auditory brainstem response;  $\alpha$ -lipoic acid; protective effect; preventive effect

**[基金项目]** 国家十二五“重大新药创制”专项 (2011ZXJ09106-07B)。

**[作者简介]** 王希营 (1982-), 男, 硕士研究生. Tel: 13508638614, E-mail: miss5700@sian.com.

**[通讯作者]** 高申. Tel: (021)81873715, E-mail: liullk@126.com.

噪声是一种常见的危害人类身心健康的环境因素。研究表明, 噪声暴露会影响耳蜗内外毛细胞, 使其 ATP 需要量增加, 毛细胞和支持细胞的耗氧量、耗葡萄糖量增加, 出现局部相对缺血, 破坏耳蜗的抗氧化体系, 导致耳蜗内部氧化和抗氧化失衡, 产生大

量活性氧自由基。过量的氧自由基可以诱发脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)的大量产生,影响细胞内重要生化反应,对耳蜗组织产生损伤。抗氧化剂的使用可以在一定程度上改善毛细胞的功能状态、减轻噪声引起的听力损失。

$\alpha$ -硫辛酸是一种高效亲脂的自由基清除剂,在脂质相中有较好的溶解性,易穿过细胞膜,且毒性低,对血脑屏障有较好的穿透性,对许多自由基引起的疾病有较好的效果。它在预防及治疗与自由基有关的疾病(癌症、衰老、糖尿病、动脉粥样硬化、脑和神经组织的退化等)中发挥着重要的作用。实验发现通过腹腔注射给予 $\alpha$ -硫辛酸能降低噪声引起的听力损伤的程度<sup>[1]</sup>,但灌胃不同剂量该药物对噪声性听力损伤的作用目前尚不清楚。本实验主要研究了灌胃不同剂量的 $\alpha$ -硫辛酸对噪声性听力损伤的预防和治疗作用。

## 1 材料和方法

**1.1 动物和分组** 24只健康雄性白色成年豚鼠,体重250~300g左右,由上海生旺实验动物养殖有限公司提供,耳廓反射正常,耳镜检查排除外耳道耵聍栓塞及中耳感染。上海交通大学附属第六人民医院医学动物中心饲养,实验过程中动物的处理符合动物伦理学标准。

根据动物体重随机分为四组:噪声对照组( $n=6$ ,给生理盐水)、 $\alpha$ -硫辛酸低剂量组: $n=6$ ,30 mg/(kg·d); $\alpha$ -硫辛酸中剂量组: $n=6$ ,60 mg/(kg·d); $\alpha$ -硫辛酸高剂量组: $n=6$ ,120 mg/(kg·d)。 $\alpha$ -硫辛酸各剂量组动物在噪声暴露前2d、暴露当天至暴露后7d连续10d灌胃给予相应量的 $\alpha$ -硫辛酸;噪声对照组动物在噪声暴露前2d、暴露当天至暴露后7d连续10d灌胃给予等剂量的生理盐水;各组动物饲养环境保持一致。实验期间每天测定实验动物体重以调整给药量。

**1.2 药物和制剂**  $\alpha$ -硫辛酸(上海现代制药股份有限公司,批号:1104008,usp),生理盐水(上海长征富民金山制药有限公司),戊巴比妥钠(美国Sigma,批号:69020100),氢氧化钠(NaOH,上海凌峰化学试剂有限公司),盐酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),多聚甲醛(Sigma)。 $\alpha$ -硫辛酸配制方法:将精密称量后的 $\alpha$ -硫辛酸溶于适量1 mol/L的氢氧化钠溶液中,超声约5 min,待其完全溶解后,用1 mol/L盐酸调节pH值至7.4左右即得。

**1.3 噪声暴露** 24只豚鼠单只/笼置于混响室中心位置,持续暴露于115 dBA(混响室四角与中心强度差异 $\leq 1$  dBA)窄带噪声(中心频率4 kHz,带宽1

kHz),暴露时间4 h。

噪声发生过程:信号经BK1207信号发生器产生,经Feile-FJD系列功率放大器放大,经Dbx-223电子分频器进行高低频信号的频率分离,由Feile系列高低频喇叭发声。

噪声监测:用BK2230精密声级计对混响室噪声进行强度测量与频谱分析。

**1.4 指标测试方法** 单频脑干听觉诱发电位(auditory brainstem response, ABR)测试:各组豚鼠分别在噪声暴露前1d进行第1次ABR阈值测定,强噪声暴露后1d进行第2次ABR阈值测定,强噪声暴露后7d进行第3次ABR阈值测定,强噪声暴露后10d进行第四次ABR阈值测定。

单频ABR测试在隔声屏蔽室内进行,测试仪器为美国TDT system 3电反应测听系统(TUCKER. DAVIS)。豚鼠用戊巴比妥钠(35 mg/kg, ip)麻醉后,固定于垫有软布的桌上。测试时,安放皮下针形电极,记录电极置于给声侧的耳后乳突,参考电极置于颅顶两耳中线处,接地电极置于鼻根。内置扬声器置于豚鼠耳道内约1 cm位置处。记录ABR的参数设置:刺激声:纯音8、16、24、32 kHz;扫描时间窗:10.24 ms;刺激声重复率:21.1次/s;平均叠加次数为500次;滤波带宽:0.1~3 kHz;极性:疏、密波交替;强度:根据各组预估的阈值选定起始强度(一般为90 dB SPL),依次降低5 dB SPL至阈值出现,重复2次;极间阻抗: $< 3$  k $\Omega$ 。阈值判定主要依据听觉诱发电位图中较明显且稳定的II、III波变化,该波消失前的最低强度判定为该豚鼠该耳的听力阈值,阈值小于20 dB SPL记为20 dB SPL,大于100 dB SPL记为100 dB SPL。

**1.5 组织学标本制备** 动物在最后一次ABR测试后,麻醉状态下快速断头,取出双侧颞骨,挑破圆窗膜,打开卵圆窗,用针在蜗尖挑一小孔,用2.5%戊二醛做蜗管内灌注固定,置冰箱内连续8 h,随后去除耳蜗骨壳、螺旋韧带、前庭膜,充分暴露Corti(柯蒂)器。0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗后,1%四氧化锇固定2 h,单宁酸导电染色,梯度酒精脱水,HCP-2型临界点干燥仪干燥,E-102型离子溅射仪镀金,Hitachi S-800扫描电镜观察内外毛细胞结构。

**1.6 统计学方法** 实验所得资料采用SPSS13.0统计软件,对各组数据按完全随机设计多个样本均数比较的方差分析进行统计比较。

## 2 结果

**2.1 不同频率刺激声时豚鼠听力阈移** 各实验组动物在不同频率刺激声时,噪声暴露后不同时

间的听阈偏移值见表1。实验数据行完全随机设计多样本均数比较的方差分析。结果表明,噪声对照组和 $\alpha$ -硫辛酸组均有明显听力损伤,表现为听阈上移。

表1 不同频率对豚鼠听觉脑干诱发电位(ABR)阈移值(dB SPL,  $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别(mg/kg)	暴露后3 d	暴露后7 d	暴露后10 d
8 kHz			
$\alpha$ -硫辛酸 30	40.83 $\pm$ 9.17 <sup>2)</sup>	28.13 $\pm$ 8.84	25.00 $\pm$ 7.07
$\alpha$ -硫辛酸 60	43.50 $\pm$ 12.92 <sup>2)</sup>	20.00 $\pm$ 11.06 <sup>1)</sup>	21.88 $\pm$ 11.63
$\alpha$ -硫辛酸 120	24.38 $\pm$ 13.74 <sup>2)</sup>	13.75 $\pm$ 9.16 <sup>2)</sup>	6.25 $\pm$ 7.44 <sup>2)</sup>
噪声对照组	66.67 $\pm$ 5.77	30.00 $\pm$ 4.63	30.63 $\pm$ 8.21
16 kHz			
$\alpha$ -硫辛酸 30	47.50 $\pm$ 6.89 <sup>2)</sup>	36.25 $\pm$ 8.76	25.00 $\pm$ 7.07
$\alpha$ -硫辛酸 60	55.00 $\pm$ 10.54 <sup>1)</sup>	24.50 $\pm$ 8.96 <sup>2)</sup>	31.25 $\pm$ 22.95
$\alpha$ -硫辛酸 120	54.38 $\pm$ 6.78 <sup>1)</sup>	14.38 $\pm$ 12.37 <sup>2)</sup>	11.88 $\pm$ 15.10 <sup>1)</sup>
噪声对照组	72.50 $\pm$ 3.54	40.00 $\pm$ 4.63	31.43 $\pm$ 7.48
24 kHz			
$\alpha$ -硫辛酸 30	50.83 $\pm$ 3.76 <sup>1)</sup>	35.00 $\pm$ 16.04	17.50 $\pm$ 17.68
$\alpha$ -硫辛酸 60	57.00 $\pm$ 9.19	22.00 $\pm$ 10.06 <sup>2)</sup>	22.14 $\pm$ 16.55
$\alpha$ -硫辛酸 120	49.38 $\pm$ 8.63 <sup>1)</sup>	20.00 $\pm$ 18.52 <sup>2)</sup>	11.25 $\pm$ 14.82 <sup>2)</sup>
噪声对照组	63.33 $\pm$ 5.77	41.25 $\pm$ 5.18	32.86 $\pm$ 9.94
32 kHz			
$\alpha$ -硫辛酸 30	55.83 $\pm$ 3.76 <sup>1)</sup>	45.00 $\pm$ 6.55 <sup>2)</sup>	30.00 $\pm$ 7.07
$\alpha$ -硫辛酸 60	64.00 $\pm$ 6.58	50.50 $\pm$ 8.96	47.50 $\pm$ 12.82
$\alpha$ -硫辛酸 120	56.88 $\pm$ 14.38 <sup>1)</sup>	37.14 $\pm$ 17.04 <sup>2)</sup>	25.00 $\pm$ 21.02 <sup>2)</sup>
噪声对照组	71.67 $\pm$ 2.89	59.38 $\pm$ 6.78	51.88 $\pm$ 19.81

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , 与噪声对照组比较。

噪声暴露结束后3 d,检查指标主要反映药物对于噪声损伤的预防作用。8、16 kHz 刺激声时,低、中、高剂量组与噪声对照组相比均有显著性差异;24、32 kHz 的低、高剂量组与噪声对照组相比有显著性差异。表明低、高剂量的 $\alpha$ -硫辛酸对各频率的听力损伤具有良好的预防作用。

噪声暴露结束后7 d,检查指标主要反映药物对于噪声损伤暂时性听阈偏移的治疗作用。8、16、24 kHz 刺激声时,中、高剂量组与噪声对照组相比均有显著性差异;32 kHz 刺激声时,低、高剂量组与噪声对照组相比有显著性差异。表明中、高剂量的 $\alpha$ -硫辛酸对各频率听力损伤的暂时性听阈偏移具有良好的治疗作用。

噪声暴露结束后10 d,检查指标主要反映药物对于噪声损伤永久性听阈偏移的治疗作用。8、16、24、32 kHz 纯音刺激时,高剂量组与噪声对照组比较有显著性差异。表明高剂量的 $\alpha$ -硫辛酸对噪声所致听力损伤具有良好的治疗作用。

暴露前后给予120 mg/kg的 $\alpha$ -硫辛酸既能起到预防作用又能达到治疗效果;暴露前给予30 mg/kg的 $\alpha$ -硫辛酸即可起到预防作用。

2.2 组织学检查 耳蜗内外毛细胞在5 000倍和2 000倍放大倍数下观察发现:对照组动物耳蜗外毛细胞在噪声暴露后有明显的倒伏、水肿、空泡变性,个别细胞死亡(见图1);低、中剂量组毛细胞有一定的倒伏现象,未发现水肿、空泡变性等(见图2、图3);高剂量组实验动物毛细胞排列整齐,无明显缺失,形态正常(见图4)。

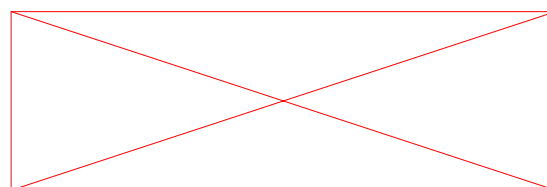


图1 噪声对照组豚鼠耳蜗外毛细胞扫描电镜图片(5 000x、2 000x)

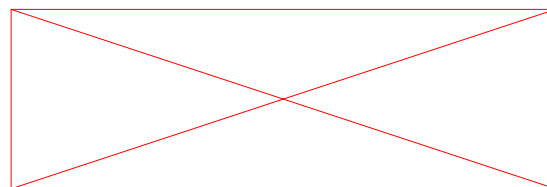


图2  $\alpha$ -硫辛酸低剂量组豚鼠耳蜗外毛细胞扫描电镜图片(5 000x、2 000x)

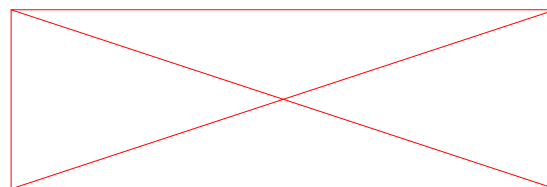


图3  $\alpha$ -硫辛酸中剂量组豚鼠耳蜗外毛细胞扫描电镜图片(5 000x、2 000x)

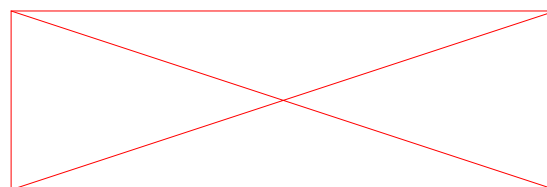


图4  $\alpha$ -硫辛酸高剂量组豚鼠耳蜗外毛细胞扫描电镜图片(5 000x、2 000x)

### 3 讨论

关于噪声性听力损伤的发生机制说法众多,过量氧自由基的产生是公认的重要病因之一。氧自由基是指含有一个或多个不成对电子的基团,包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)、活性氮(reactive nitrogen species, RNS)等。噪声暴露可破

耳蜗的抗氧化体系,导致氧化-抗氧化失衡,在耳蜗产生大量活性氧自由基,过量的氧自由基会损坏细胞膜脂质、蛋白、DNA等的结构,对耳蜗组织产生损伤<sup>[2]</sup>。Colleen等<sup>[3]</sup>通过临床研究发现,噪声暴露1~2h,耳蜗内羟基数增加近4倍,而DNA对羟基敏感,很容易受到羟基损伤。耳蜗细胞会在噪声暴露后7~10d连续产生大量氧自由基,证实活性氧自由基的产生是引起耳蜗损伤的重要原因。更为严重的是,过量氧自由基还会向下发展,引起内耳血管发生一系列改变:血管痉挛收缩、血流速度变慢、局部血液灌注量减少、血管内皮肿胀、通透性增加、血液浓缩导致粘滞度显著增高、血小板和红细胞聚集、血栓形成等,导致微循环障碍,形成永久性阈移。

$\alpha$ -硫辛酸是一种超强的抗氧化剂,是机体细胞利用糖类能源物质产生能量所需的一种限制性必需营养物质,广泛用于预防和治疗心脏病、糖尿病等多种疾病。一般认为它能保存和再生其它抗氧化剂,如维生素C和维生素E等,并能平衡血糖浓度,可有效强化体内免疫系统,使之免受氧自由基的破坏。 $\alpha$ -硫辛酸能预防因噪声引起的豚鼠血清总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAC)下降,限制耳蜗中一氧化氮(nitric oxide, NO)的大量产生,对噪声性听力损伤具有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。这种保护作用可能与减少氧自由基水平和限制NO含量有关。在噪声状态下,耳蜗生成大量NO及ROS,NO和ROS对耳蜗产生毒性作用。 $\alpha$ -硫辛酸不仅可以清除次氯酸、NO、氧、过氧化氢,还具有很强的铁离子螯合的能力。 $\alpha$ -硫辛酸的铁离子螯合能力也可能是它抗氧化效果的一个重要因素。

Subramaniam等<sup>[5]</sup>对噪声暴露后第1天至第15天的听力情况进行了细致研究,结果表明:动物暴露于稳态噪声4h,听力阈值在暴露第7天后基本恢复至噪声暴露前水平,说明听阈提高为暂时性阈移;暴露后的第3天,动物听力处于损伤急性期,听力阈值基本可以反映药物提前干预对噪声损伤的预防作用;噪声暴露10d以后,动物听力的自我恢复能力对听力影响较小,基本可以反映药物对永久性听阈偏移的治疗作用。因此,我们的试验通过采集噪声暴露后第3天、第7天、第10天的数据,分别考察药物的预防作用、对暂时性听阈偏移的治疗作用、对永久性听阈偏移的治疗作用。我们的实验结果表明,与噪声对照组相比,噪声暴露前灌胃低剂量 $\alpha$ -硫辛酸(30 mg/kg·d)对噪声引起的豚鼠听力损伤有很好的预防作用;噪声暴露前后,灌胃高剂量 $\alpha$ -硫辛酸(120 mg/kg·d)不仅具有很好的预防作用,而且

具有很明显的治疗作用,可减轻急性期暂时性听力损失的程度,也能促进阈移的恢复,预防永久性听力损失。组织形态学检查结果也印证了这一点。噪声暴露前后灌胃中剂量的 $\alpha$ -硫辛酸也可起到一定的防治作用,但是效果不明显。本实验的不足之处主要是:①考察的噪声频率略少。我们的实验考查了实验动物在8、16、24、32 kHz纯音刺激下的听力情况,受制于实验条件,未能对1、2、4 kHz的纯刺激音的情况进行研究。②形态学观察比较粗略。我们通过耳蜗扫描电镜观察豚鼠耳蜗毛细胞的损伤情况,未对其内部形态变化做更加细致的研究。

以 $\alpha$ -硫辛酸为代表的抗氧化剂在噪声性听力损伤防治方面的研究较多,效果比较确切。但是此类药物具有一定的局限性:①普遍用量较大。Wu等<sup>[6]</sup>研究表明腹腔注射325 mg/(kg·d)体重的N-乙酰半胱氨酸(NAC),暴露前2d开始给药,连续14d,可有效保护单纯噪声性听力损伤。本实验中各剂量的 $\alpha$ -硫辛酸的效果比较也体现了一定的剂量依赖性。②大多为注射给药或鼓室给药,使用不方便。③大多作用于单一环节,效果有待提高。噪声性听力损伤的多发机制决定了单一用药在防治方面的不足和局限。药物联合应用则可以降低药物用量、减小副作用<sup>[7]</sup>。因此,针对单一用药的局限性,开发一种疗效确切、安全度高、使用方便的复方药物成为一种趋势和方向。

## 【参考文献】

- [1] Seidman MD, Khan MJ, Bai U, *et al.* Biologic activity of mitochondrial metabolites on aging and age-related hearing loss[J]. *Am J Otol*, 2000, 21:161.
- [2] 郑贵亮,翟所强. 噪声性耳聋的发病机制研究进展[J]. *山东医药*, 2008, 48(15):115.
- [3] Le Prell CG, Yamashita D, Minamic SB, *et al.* Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention[J]. *Hear Res*, 2007, 226:22.
- [4] 刁明芳,刘海瑛,张琰敏,等. 噪声刺激后豚鼠耳蜗抗氧化能力的变化和 $\alpha$ -硫辛酸对声损伤的保护作用[J]. *生理学报*, 2003, 55(6):672.
- [5] Subramaniam M, Salvi RJ, Spongr VP, *et al.* Changes in distortion product otoacoustic emissions and outer hair cells following interrupted noise exposures[J]. *Hear Res*, 1994, 74:204.
- [6] Wu HP, Hsu CJ, Cheng TJ, *et al.* N-acetylcysteine attenuates noise-induced permanent hearing loss in diabetic rats[J]. *Hear Res*, 2010, 267: 71.
- [7] Coleman JKM, Kopke RD, Liu J, *et al.* Pharmacological rescue of noise induced hearing loss using N-acetylcysteine and acetyl-L-carnitine[J]. *Hear Res*, 2007, 226: 104.

[收稿日期]2011-11-24

[修回日期]2012-01-11