

GSH-Px 活力和 MDA 水平的影响及砷对脑组织 SOD 和 GSH-Px 酶活力的影响与文献报道^[10-14]一致。本研究未发现氟暴露与大鼠大脑皮质组织 SOD 酶活力有关,与文献报道^[10-11]不一致,可能与受试对象、染毒剂量、时间和方式不同有关。

参考文献

- [1] Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L, et al. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water [J]. *Cad Saude Publica*, 2007, 23 (Suppl 4) : S579 - 587.
- [2] Wasserman GA, Liu X, Parvez F, et al. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Arahazar, Bangladesh [J]. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(2) : 285 - 289.
- [3] Wang SX, Wang ZH, Cheng XT, et al. Arsenic and fluoride exposure in drinking water; children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China [J]. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(4) : 643 - 647.
- [4] Jomova K, Jenisoza Z, Feszterova M, et al. Arsenic; toxicity, oxidative stress and human disease [J]. *J Appl Toxicol*, 2011, 31 (2) : 95 - 107.
- [5] Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 255 (1 - 2) : 67 - 78.
- [6] 王国明, 李积胜, 周红军, 等. 不同剂量慢性染氟对大鼠学习记忆行为的影响 [J]. *微量元素与健康研究*, 2006, 23(2) : 1 - 2.
- [7] Rodriguez VM, Carrizales L, Jimenez-Capdeville ME, et al. The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat [J]. *Brain Res Bull*, 2001, 55 : 301 - 308.
- [8] 席淑华, 孙贵范, 孙文娟, 等. 砷对仔代大鼠神经行为和学习记忆功能影响 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(5) : 559 - 560.
- [9] Luo JH, Qiu ZQ, Shu WQ, et al. Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 184(2) : 121 - 125.
- [10] Narayanaswamy M, Piler MB. Effect of maternal exposure of fluoride on biometals and oxidative stress parameters in developing CNS of rat [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2010, 133(1) : 71 - 82.
- [11] Zhang M, Wang AG, He WH, et al. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons [J]. *Toxicology*, 2007, 236(3) : 208 - 216.
- [12] Rao MV, Avani G. Arsenic induced free radical toxicity in brain of mice [J]. *Indian J Exp Biol*, 2004, 42(5) : 495 - 498.
- [13] Das J, Ghosh J, Manna P, et al. Arsenic-induced oxidative cerebral disorders; protection by taurine [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2009, 32(2) : 93 - 102.
- [14] Flora SJ, Mittal M, Mishra D. Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain [J]. *J Neurol Sci*, 2009, 285(1 - 2) : 198 - 205.

收稿日期: 2012-10-11

(解学魁编辑 张翠校对)

· 实验研究 ·

气导听觉剥夺大鼠螺旋神经节 NSE 表达及凋亡

谢宁¹, 朱晓全¹, 王玉平², 王海波², 夏阳¹

摘要:目的 观察发育期气导听觉剥夺大鼠螺旋神经节神经元特异性烯醇化酶(NSE)表达及细胞凋亡变化。方法 60只新生SD大鼠随机分为听觉剥夺组和对照组,每组30只,听觉剥夺组于出生后早期行外耳道隔离,饲养于密闭隔音室,对照组正常食水、声音环境饲养;42d后进行听觉脑干诱发电位(ABR)检测,耳蜗切片进行螺旋神经节NSE染色神经元计数及细胞染色观察。结果 听觉剥夺组大鼠ABR反应阈值[(38.18±5.54)dB SPL]较对照组[(26.67±3.89)dB SPL]增高($P < 0.01$);NSE免疫组化染色神经元着色浅淡,神经纤维着色基本正常;听觉剥夺组大鼠神经元计数[(7.883±0.987)个/视野]较对照组[(10.643±1.104)个/视野]减少($P < 0.05$);听觉剥夺组大鼠螺旋神经节可见散在凋亡细胞。结论 发育期气导听觉剥夺可造成大鼠螺旋神经节I型NSE表达下降,神经元数量减少,出现细胞凋亡。

关键词:听觉剥夺;螺旋神经节;神经元特异性烯醇化酶(NSE);细胞凋亡

中图分类号:R 764

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2013)06-0840-03

Neuron-specific enolase expression and cell apoptosis in spiral ganglion in rats with air conduction hearing deprivation

XIE Ning*, ZHU Xiao-quan, WANG Yu-ping, et al (* Affiliated Hospital of Aeromedicine Institute, Air Force of People's Liberation Army, Beijing 100089, China)

Abstract: Objective To observe spiral ganglion neuron-specific enolase (NSE) expression and cell apoptosis in spiral ganglion in rats with air conduction hearing deprivation. **Methods** Totally 60 newborn Sprague-Dawley rats were randomly divided into auditory deprivation group ($n=30$) and the control group ($n=30$). The rats in auditory deprivation group were administered external auditory canal isolation after birth and reared in confined soundproof room. The rats in control group were reared with normal drinking water in sound environment. Auditory brainstem evoked potentials

作者单位:1. 空军航空医学研究所附属医院,北京 100089;2. 空军后勤部卫生部

作者简介:谢宁(1962-),男,辽宁沈阳人,副主任医师,本科,主要从事体检、预防医学、健康管理工。

(ABR) was measured. Cochlea tissue slice and spiral ganglion staining were conducted for neuron number count and observations of NSE expression and cell structure change. **Results** The ABR reactor threshold (38.18 ± 5.54 dB SPL) of auditory deprivation rats was significantly higher compared with that of the control group (26.67 ± 3.89 dB SPL) ($P < 0.01$). The staining of NSE immunohistochemical neurons was pale. The neuron count (7.88 ± 0.99 per field of view) was significantly reduced in auditory deprivation rats ($P < 0.05$). Scattered apoptotic cells were observed in spiral ganglion of auditory deprivation rats. **Conclusion** Air conduction hearing deprivation can decrease type I NSE expression and the number of neurons, and induce cell apoptosis in spiral ganglion of rats during development period.

Key words: auditory deprivation; spiral ganglion; neuron-specific enolase; apoptosis

以往研究发现,动物的感觉系统在发育过程中均有一个关键时期,在这个时期内,去除或者改变传入神经冲动对中枢神经系统的结构和功能可以产生明显影响^[1-2]。听觉剥夺效应定义为由于声学信息的减少导致的听觉功能逐渐下降。在现实生活中,越来越多的耳科医生注意到听觉剥夺对耳病患者的听觉产生了不良影响,包括听阈提高和言语识别率降低。大脑发生听觉剥夺效应后产生的解剖生理学改变,目前研究都是通过动物实验间接获得。耳蜗切除是常用的听觉剥夺动物模型,因其破坏了耳蜗毛细胞的完整性,不能通过听觉电生理的方法检测动物的听功能,同时使得对听觉传导通路的起始部位(螺旋器)的研究无法进行。本研究选择幼年动物进行气导听觉剥夺,一方面减少发育关键期听觉系统声音信号输入,另一方面保持耳蜗正常结构,探讨听觉剥夺对听觉系统中螺旋神经节发育影响。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 乳鼠 60 只,雌雄不限,由中国人民解放军第四军医大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(军)2002-005。

1.2 主要试剂与仪器 兔抗神经元特异性烯醇化酶(neuronal specific enolase, NSE)多克隆抗体、链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)试剂盒(武汉博士德公司)。凋亡细胞检测试剂盒(美国 Promega 公司)。听觉电生理检测仪(美国旅行者快递 E 生物公司),冰冻切片机(德国 LEICA CM1850)。

1.3 动物分组与处理 将实验动物随机分为对照组和听觉剥夺组,每组 30 只。听觉剥夺组动物饲养于密闭隔音室,生后 12 d 起行耳道填塞^[3]至生后 42 d;对照组正常饮食饮水、声音环境饲养。采用听觉电生理检测仪于出生后 42 d 分别检测听觉脑干诱发电位(auditory brainstem response, ABR);大鼠耳蜗冰冻切片,动物麻醉,4%多聚甲醛心内灌注固定,断头取听泡置 4%多聚甲醛后固定过夜,10%乙二胺四乙酸钙 30%蔗糖脱水至沉底,聚乙二醇和聚乙烯醇混合剂包埋,冰冻切片连续切片,厚 10 μm 。

1.4 指标与方法

1.4.1 ABR 检测 实验动物以 2%戊巴比妥钠 100 mg/kg 腹腔麻醉。记录电极刺入矢状缝与两外耳道连线交点皮下,参考电极放置在刺激耳后皮下,接地电极放置在大鼠尾根部皮下。交替短声刺激,声源距外耳孔 1.0 cm,刺激间隔为 0.1 ms,滤波带通为 100 ~ 2 000 Hz,扫描时间为 10 ms,叠加次数 512 次。大鼠 ABR 共有 5 个波,其中以 II、III 波为主,以刚刚出现可以辨认的 II 或 III 波为标准,记录 ABR 听阈,并分别记录潜伏期和幅值。测试在双层屏蔽室内进行,环境噪声 ≤ 40 dB(中音公司耳机放大器)。测试时注意动物保温。

1.4.2 螺旋神经节 NSE 染色及神经元计数 于耳蜗冰冻切片上滴加兔抗 NSE 多克隆抗体(一抗,浓度 1:300),生物素标记的羊抗兔二抗。二氨基联苯胺显色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察,照相。阴性对照以磷酸盐缓冲液代替一抗。每张切片选取耳蜗第二转螺旋神经节,随机取 60 个高倍视野进行细胞计数。

1.4.3 细胞凋亡检测 采用原位末端标记法(TUNEL),具体操作参照试剂盒说明书进行,反应至浅棕色,去离子水漂洗后 100%甘油封片,光学显微镜下观察,照相。

1.5 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 听觉剥夺对 ABR 阈值及潜伏期影响 气导听觉剥夺至出生后 42 d,对照组及听觉剥夺组大鼠 ABR 阈值分别为(26.67 ± 3.89)和(38.18 ± 5.54) dB SPL,与对照组比较,听觉剥夺组大鼠 ABR 阈值升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。对照组与听觉剥夺组大鼠 ABR I ~ V 波潜伏期分别为(0.94 ± 0.24)、(1.76 ± 0.21)、(3.61 ± 5.80)、(3.67 ± 0.57)、(4.84 ± 0.61)和(1.01 ± 0.31)、(1.77 ± 0.49)、(2.44 ± 0.85)、(3.64 ± 1.12)、(4.76 ± 0.74) dB SPL,对照组和听觉剥夺组大鼠 ABR 中 I ~ V 波各波潜伏期差异均无统计意义($P > 0.05$)。

2.2 听觉剥夺对 ABR 波幅影响(表 1) 与对照组比较,听觉剥夺组大鼠 ABR 中 II、V 波幅值下降,而 III 波幅值上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 ABR 各波幅值(μV , $\bar{x} \pm s, n = 30$)

| 组别 | I 波 | II 波 | III 波 | IV 波 | V 波 |
|-------|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| 对照组 | 2.07 ± 1.20 | 3.77 ± 1.76 | 0.36 ± 2.17 | 0.56 ± 1.53 | 2.39 ± 0.90 |
| 听觉剥夺组 | 2.23 ± 1.36 | 1.81 ± 1.53 ^b | 1.96 ± 1.57 ^a | 0.88 ± 1.86 | 1.07 ± 1.10 ^b |

注:与对照组比较, a $P < 0.05$, b $P < 0.01$ 。

2.3 2 组大鼠脑干传导时间比较 ABR 各波中 V 波最为稳定,且振幅最高, I ~ V 波间期也称为脑干传导时间或中枢传递时间。对照组与听觉剥夺组大鼠 ABR 中 I ~ V 波间期分别为(3.978 ± 0.435)、(3.629 ± 0.616) μV , 听觉剥夺组大鼠 ABR 中 I ~ V 波间期低于对照组,差异有统计学意义($t = 4.78$, $P < 0.01$)。

2.4 听觉剥夺对螺旋神经节神经元形态及计数影响(图 1) 螺旋神经节 NSE 免疫组织化学染色可见,对照组正常神经元 NSE 主要存在于胞浆,胞体着色明显,核着色略浅淡;胞体排列有一定密度,不能从形态上区分 2 型神经元,胞体发出的神经纤维着色较胞体略浅。听觉剥夺组大鼠神经元显色较对照组明显变浅,形态模糊,排列紊乱,神经纤维着色基本正常。神经元计数结果显示,对照组与听觉剥夺组大鼠分别为(10.643 ± 1.104)、(7.883 ± 0.987) 个/视野,听觉剥夺组大鼠螺旋神经节神经元数量少于对照组,差异有统计学意义($t = 36.32$, $P < 0.05$)。螺旋神经节经 TUNEL 染色后,对照组

大鼠螺旋神经节未见明显凋亡细胞,听觉剥夺组大鼠螺旋神经节可见散在胞核呈棕黄色的凋亡细胞。

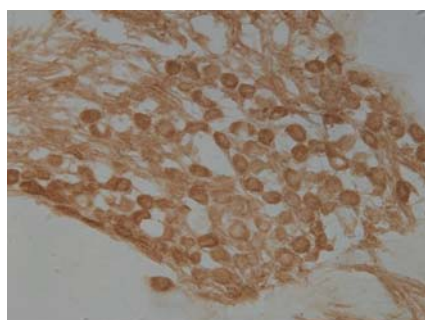
3 讨论

改变嗅觉、视觉和听觉系统中感觉输入信号会影响相应系统神经网络在形态和功能上的发育与成熟;听觉剥夺可以延缓大鼠上外橄榄核神经元抑制性突触的发育。破坏出生后 1 周大鼠的耳蜗将导致与抑制性突触相关的、轴索和树突正常形态学再变构过程的阻断;通过破坏幼年砂鼠单侧耳蜗以阻断声输入则可以阻断神经元抑制性突触和树突的形态发育。听觉剥夺导致耳蜗螺旋神经节细胞发生退行性变,可能是声刺激的减少;完全缺乏声刺激(耳蜗毁损)较听觉剥夺对螺旋神经节细胞的影响更为明显^[4]。大鼠生后发育关键期一般认为从第 12 d 开始,到第 30 d 结束^[5],本研究选择生后 12 ~ 42 d 大鼠进行听觉剥夺,目的在于减少发育关键期听觉系统声音信号输入,期望从相反方向证明正常声音刺激对螺旋神经节发育的促进作用。本研究结果显示,与对照组比较,听觉剥夺组大鼠 ABR 听阈升高,波幅降低($P < 0.05$); I ~ V 波间期下降($P < 0.01$)。提示气导听觉剥夺可对动物听觉功能造成损害,进而对听觉传导通路的相关部位产生不良影响。

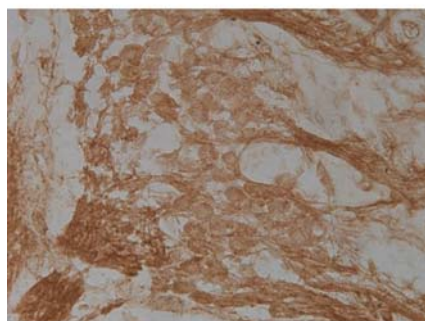
烯醇化酶是糖酵解途径中关键酶,普遍存在于生物体的糖酵解代谢中,在细胞能量代谢中起重要作用^[6],NSE 主要分布于神经元和神经内分泌细胞的胞浆中,周围神经中含量远低于脑组织,相差 10 ~ 100 倍。本研究结果表明,听觉剥夺组大鼠螺旋 NSE 染色着色变浅,听阈较对照组提高,可能与神经传入信号减少继发细胞能量代谢障碍,诱导基因表达下调,影响神经元细胞内正常糖酵解过程,使三磷酸腺苷减少,干扰神经元的正常功能有关。

参考文献

- [1] Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, et al. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory [J]. J Neurosci, 2002, 22: 2679 - 2689.
- [2] Di Cristo G, Berardi N, Cancedda L, et al. Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity [J]. Science, 2001, 292: 2337 - 2340.
- [3] 王枫,王方圆,黑任轶,等. 早期气导听觉剥夺对幼鼠听觉发育的影响[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2011, 19(2): 141 - 143.
- [4] Leake PA, Stakhovskaya O, Hradek GT, et al. Factors influencing neurotrophic effects of electrical stimulation in the deafened developing auditory system [J]. Hear Res, 2008, 242: 86 - 99.
- [5] Nakahara H, Zhang LL, Merzenich MM. Specialization of primary auditory cortex processing by sound exposure in the 'critical period' [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 7170 - 7174.
- [6] Subramanian A, Miller DM. Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc proto-oncogene [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (8): 5958 - 5965.



对照组



听觉剥夺组

图 1 螺旋神经节 NSE 免疫组织化学染色($\times 60$)