

# 观察 5 磷酸二酯酶抑制剂对神经性聋豚鼠疗效的研究

梁媛, 马桂琴, 黄跃雁, 曹静, 张洁, 李庆红, 刘春丽, 袁玉洁, 李俊鹏  
(承德医学院附属医院耳鼻喉科, 河北 承德 067000)

**【摘要】目的:** 探讨 5 磷酸二酯酶(PDE5)抑制剂对神经性聋豚鼠疗效的影响。**方法:** 采用随机数字表法将 36 只豚鼠分为阴性对照组、PDE5 抑制剂组和银杏叶片组, 每组各 12 只。三组豚鼠在白噪声暴露 14 d 后分别腹腔注射 NaCl 注射液  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、伐地那非  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、银杏叶  $1.92 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连续给药 28 d。分别测试噪声暴露前 1 d、噪声暴露后及给药后 7、14 及 28 d 听性脑干反应(ABR)阈值及 80 dB HL 下 ABR I 波潜伏期, 并通过扫描电镜观察噪声暴露后 28 d 豚鼠耳蜗毛细胞的形态变化。**结果:** 对照组在噪声暴露后、给药 7 d、14 d、28 d 后较噪声暴露前 ABR 阈值呈升高趋势, I 波潜伏期呈延长趋势, PDE5 抑制剂组和银杏叶组噪声暴露后、给药 7 d 后 ABR 阈值及 I 波潜伏期呈延长趋势, 给药 14 d 后其 ABR 阈值及 I 波潜伏期均呈不同程度下降, 且 PDE5 抑制剂组较银杏叶组下降幅度大。扫描电镜显示, 对照组豚鼠耳蜗外毛细胞出现听毛紊乱、融合及缺失; 而 PDE5 抑制剂组及银杏叶组毛细胞病变均较对照组轻, 听毛有不同程度的倒伏、融合现象。PDE5 抑制剂组较银杏叶组病变轻。**结论:** PDE5 抑制剂同银杏叶片一样可以减轻豚鼠听功能及毛细胞因神经性听力损伤造成的损害, 但其效果优于银杏叶组。

**【关键词】** 5 磷酸二酯酶抑制剂; 神经性聋; 银杏叶; 耳蜗; 听性脑干反应

**【中图分类号】** R764.43 **【文献标志码】** A

## Effect of the inhibitor of PDE5 to the sensorineural hearing loss in guinea pigs

LIANG Yuan, MA Gui-qin, HUANG Yue-yan, CAO Jing, ZHANG Jie, LI Qing-hong, LIU Chun-li, YUAN YU-jie, LI Jun-peng

(Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei, China)

**【Abstract】 Objective:** To study the effects of the inhibitor of PDE5 to the sensorineural hearing loss in guinea pigs. **Methods:** 36 guinea pigs were randomly divided into negative control group, the inhibitor of PDE5 group and ginkgo biloba group, 12 cases in each group. After 14 days of white noise exposure, the three groups were injected with Vardenafil ( $1 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ ), Ginkgo biloba ( $1.92 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ ) and NS ( $4 \text{ ml/kg} \cdot \text{d}$ ) of guinea pigs respectively for 28 days. Auditory brainstem response (ABR) threshold and ABR I latency at 80 dB HL were measured 1 d before noise exposure, after noise exposure and 7 d, 14 d and 28 d after administration. Morphological changes of hair cells in cochlea of guinea pigs were observed by scanning electron microscope on 28 days after noise exposure. **Results:** In the control group, ABR threshold increased, and the latency of wave I was prolonged after noise exposure and 7 d, 14 d and 28 d after administration. The ABR threshold and wave I latency of PDE5 inhibitor group and Ginkgo biloba group were prolonged after noise exposure and 7 d after administration, and the ABR threshold and wave I latency decreased after 14 d of administration, and the decreased in PDE5 inhibitor group was greater than that in Ginkgo biloba group. Scanning electron microscopy showed that, within the negative control group guinea pig cochlea, the outer hair cells were disordered hair appeared to listen, integration and deletion, the inhibitor of PDE5 group and Ginkgo biloba group cochlear lesions less in different extent, Mao listen only slightly lodging, fusion phenomenon, and the lesions in the inhibitor of PDE5 group were less severe than those in Ginkgo biloba group. **Conclusion:** The inhibitor of PDE5 can reduce the damage of hearing function and hair cells caused by nerve hearing loss in guinea pigs as Ginkgo biloba leaves, but its effect is better than that of Ginkgo biloba group.

**【Key words】** Inhibitor of PDE5; Sensorineural hearing loss; Ginkgo biloba; Cochlea; ABR

感音神经性聋属于耳鼻喉科常见病, 发病率较高, 病因多样, 以噪声、药物多见, 也有相当一部分是突然起病、原因未明的, 其病理机制复杂, 机制不明,

但有研究<sup>[1]</sup>表明, 良好的内耳微循环有利于维持内耳的基本功能, 如耳蜗电位的维持即内淋巴液的产生, 而神经性听力损失的发生很大程度上因内耳微

循环障碍所致。神经性聋给患者精神、心理造成严重的损害,已占据我国五大公害之首。目前,尚无确切有效的治疗方法。发病初期及时正确有药是治疗成功的关键。所以,保护和改善受损的耳蜗毛细胞,探索有效预防和治疗的途径,长期以来就是感音神经性耳聋科研临床工作的重心。Jaumamm 等<sup>[2]</sup>在实验中首次发现 Prkg1 (环磷酸鸟苷依赖性蛋白激酶-1) 和 5-磷酸二酯酶 (5-phosphodiesterase, PDE5) 在耳蜗毛细胞中一起表达,并且确定内耳中存在保护性 cGMP-Prkg1 信号级联作用。先前基础研究<sup>[3]</sup>发现 PDE5 抑制剂能降低噪声对豚鼠的听觉损害,但其疗效尚未研究。伐地那非 (vardenafil) 属于选择性 5-磷酸二酯酶抑制剂。本研究拟利用噪声将豚鼠致聋,再在其体内分别注射伐地那非制剂和银杏叶制剂,观察豚鼠听功能及耳蜗毛细胞形态的变化,探讨 PDE5 抑制剂对神经性聋的疗效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂和仪器

银杏叶制剂 (贵州信邦制药股份有限公司),伐地那非制剂 (德国拜耳医药保健有限公司);显微镜 (日立, S-3500N 型,日本);诱发电位机 (Dantec, Keyponit4 通道型,丹麦)。

### 1.2 动物模型分组和预处理方法

在安静环境下,选择耳廓反射正常的健康杂色雄性豚鼠,共计 36 只 (河北医科大学实验动物中心),豚鼠体质量范围 250 ~ 305 g。通过随机数字表法将豚鼠平均分为三组,分别是:对照组、PDE5 抑制剂组以及银杏叶制剂组,每组数量分别为 12 只。预处理方法:所有豚鼠进行常规腹腔麻醉,药物为戊巴比妥钠 (剂量标准:40 mg/kg),在豚鼠颅顶部进行手术常规消毒后,予以其双侧皮层听区硬膜外埋入不锈钢材质电极细丝,作为记录使用,同时予以牙科水泥将电极细丝固定,7 d 后,判定电极稳定后进入下一阶段实验。

### 1.3 造模

三组豚鼠均暴露于噪声环境 14 d。具体方法:将三组豚鼠均放置于边长为 20 cm 正立方体小笼内,1 只/笼,后将其放入体积为 26 m<sup>3</sup> 的噪声暴露舱;制造产生白噪声,噪声频率为 20 ~ 2 000 Hz,由 GY 型 0.4 kW 扩音器将噪声放大后向暴露舱内播放;同时对噪声进行持续监测,将声压控制在 120 dB (A 计权) 范围,整个暴露范围内声场不均匀度控制在  $\pm 1$  dB 范围。每只豚鼠暴露时间 1 次/d, 2 h/次,持续时间 14 d。

### 1.4 给药方法

三组豚鼠在噪声暴露结束后立刻予以药物,对照组豚鼠通过腹腔注射生理盐水 (中国大冢制药有

限公司生产),注射剂量:4  $\mu$ L/g, 1 次/d;PDE5 抑制剂组豚鼠在其腹腔注射伐地那非注射用,使用剂量:1  $\mu$ g/g (伐地那非采用生理盐水稀释,稀释浓度为 4  $\mu$ L/g, 1 次/d),银杏叶制剂组豚鼠通过腹腔注射银杏叶制剂 1.92  $\mu$ g/g (银杏叶制剂采用生理盐水稀释,稀释浓度为 4  $\mu$ L/g, 1 次/d),持续 28 d 给药。

### 1.5 听性脑干反应测试和 I 波潜伏期测试

将实验豚鼠保持清醒,同时半限制于测试笼中,统一放置于隔声电屏蔽室内。分别在噪声暴露前 1 d,给药后第 7 天、14 天、28 天进行听性脑干反应 (ABR) 检测。电极放置在豚鼠颅顶位置,参考电极位于同侧,接地电极放于其对侧乳突位置。设置滤波带通频率在 30 ~ 3 000 Hz 范围,叠加次数:1 024 次,扫描时间设置为 15 ms。通过 100 微秒方波脉冲刺激声,频率设置范围:20 Hz,将 III 波起始出现时的刺激强度设置为 ABR 的阈值,同步记录 I 波潜伏期时间。

### 1.6 电子显微镜标本制作

三组豚鼠中任随机抽取 6 只,取其右侧耳蜗,进行扫描电子显微镜观察。在终末给药和 ABR 检测后 (也即噪声暴露后 28 d),统一采取断头处死方法,将豚鼠颞骨取出,镜下打开豚鼠耳蜗听泡部位,进行蜗尖钻孔操作,使得镫骨脱位,使用 2.5% 戊二醛前固定,配置 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液进行漂洗 3 次,10 min/次,再予以浓度为 1% 锇酸进行固定 1 h,再漂洗、乙醇脱水干燥,最后予以金属镀膜,完成标本制作。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 分析软件对研究数据进行统计学处理。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行描述,对重复测量数据进行重复测量方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ABR 阈值

对照组豚鼠噪声暴露后,其 ABR 阈值呈现逐步升高趋势,PDE5 抑制剂组和银杏叶组噪声在暴露后,两组豚鼠的 ABR 阈值存在不同程度延长,但在给药 7 d、14 d、28 d 后其 ABR 阈值均出现不同程度下降,其中 PDE5 抑制剂组下降程度与银杏叶制剂组比较更为显著。通过重复测量方差分析,组别、时间在 ABR 阈值中具有显著效应以及交互效应 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 三组豚鼠不同时间的 ABR 阈值 ( $\bar{x} \pm s$ , dB)

组别	噪声暴露前	噪声暴露后	给药 1 周后	给药 2 周后	给药 4 周后
阴性对照组	24.45 $\pm$ 0.72	42.63 $\pm$ 0.79	44.85 $\pm$ 1.29 <sup>#</sup>	50.55 $\pm$ 1.3 <sup>#</sup>	56.63 $\pm$ 1.91 <sup>#</sup>
银杏叶组	24.21 $\pm$ 0.48	42.54 $\pm$ 0.95	38.79 $\pm$ 1.34 <sup>*</sup>	37.94 $\pm$ 1.11 <sup>*</sup>	33.39 $\pm$ 2.11 <sup>*</sup>
PDE5 抑制剂组	24.39 $\pm$ 0.66	43.50 $\pm$ 1.98	37.27 $\pm$ 0.69 <sup>#*</sup>	34.45 $\pm$ 1.29 <sup>#*</sup>	30.68 $\pm$ 2.32 <sup>#*</sup>

\*  $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较; #  $P < 0.05$ , 与银杏叶组比较。

## 2.2 I 波潜伏期

三组实验豚鼠通过不同治疗以后,听性脑干反应的 I 波潜伏期均发生不同程度变化。阴性对照组豚鼠从噪声暴露之后开始 I 波潜伏期就出现持续性延长,银杏叶组、PDE5 抑制剂组豚鼠从噪声暴露之后给予相应的药物干预,在给药 7 d、14 d、28 d 时这两组豚鼠 I 波潜伏期相较于噪声暴露结束时的水平,均出现不同程度的持续性下降。通过重复测量方差分析,三组间均在 I 波潜伏期中存在显著效应

以及交互效应( $P < 0.05$ )。见表 2。

## 2.3 电镜观察

电子显微镜显示对照组豚鼠耳蜗外毛细胞损伤明显,听毛分布杂乱、有的甚至融合融合直至消失,见图 1。PDE5 抑制剂组及银杏叶组豚鼠耳蜗损伤均较对照组不同程度减轻,其耳蜗外毛细胞形态结构未出现明显异常,但均存在外毛细胞听毛一定比例程度的倾倒融合,其中 PDE5 抑制剂组损伤程度较银杏叶组明显偏轻。见图 2、图 3。

表 2 三组豚鼠不同时间点 I 波潜伏期变化( $\bar{x} \pm s$ , ms)

组别	噪声暴露前	噪声暴露后	给药 7 d 后	给药 14 d 后	给药 28 d 后
阴性对照组 ( $n = 12$ )	1.292 ± 0.014	1.657 ± 0.024	1.727 ± 0.017 <sup>#</sup>	1.870 ± 0.034 <sup>#</sup>	1.918 ± 0.078 <sup>#</sup>
银杏叶组 ( $n = 12$ )	1.298 ± 0.011	1.654 ± 0.017	1.624 ± 0.019 <sup>*</sup>	1.572 ± 0.019 <sup>*</sup>	1.543 ± 0.017 <sup>*</sup>
PDE5 抑制剂组 ( $n = 12$ )	1.288 ± 0.014	1.650 ± 0.040	1.589 ± 0.027 <sup>**</sup>	1.532 ± 0.022 <sup>**</sup>	1.454 ± 0.021 <sup>**</sup>

\*  $P < 0.05$ ,与阴性对照组比较;# $P < 0.05$ ,与银杏叶组比较。

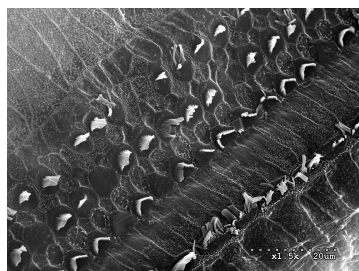


图 1 阴性对照组耳蜗毛细胞扫描电镜形态 (外毛细胞×1500)

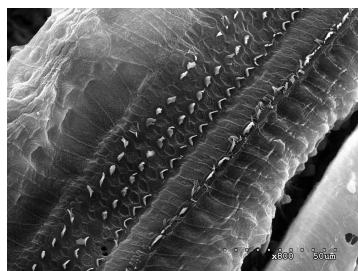


图 2 银杏叶组豚鼠耳蜗毛细胞扫描电镜形态 (外毛细胞×800)

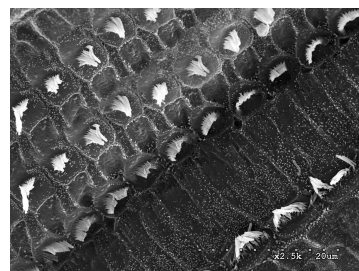


图 3 PDE5 抑制剂组豚鼠耳蜗毛细胞电子显微镜形态变化 (外毛细胞×2500)

## 3 讨论

感音神经性聋是耳鼻咽喉科领域的常见疾病,严重干扰人与人之间的正常交流,降低生活质量。根据世界卫生组织 2005 年的统计<sup>[4]</sup>,全球重度听力障碍人口约有 2.78 亿,预计到 2050 年这一数字将增加到 7 亿,感音神经性聋已成为严重危害我国人口健康及生活质量的多发病,也是我们目前急需解决的全球性社会问题之一,人们对其危害越来越重视。其病因复杂,病变部位主要在耳蜗毛细胞和(或)听觉的初级传入神经元,即螺旋神经元处。

研究表明,内耳中存在的 NO/cGMP 途径能够调节内耳的微循环,尤其是在听觉传导、内环境的稳定及微循环改善方面,它与存在于耳蜗中的 ATP/ $Ca^{2+}$  共同参与耳蜗生理功能的调节。先前已证实高强度的噪声会引起机体内耳蜗血管收缩、血流速度减慢,进而引起耳蜗内毛细胞通透性增强,造成血栓,最终导致毛细胞损伤<sup>[5]</sup>。耳蜗中毛细胞死亡可能是由于耳蜗中过量的  $Ca^{2+}$  进入,或者通过 L 型  $Ca^{2+}$  通道或通过嘌呤能受体<sup>[6]</sup>。值得注意的是,声音过度暴露显示提高  $Ca^{2+}$  浓度并在 OHCs 的核上部分明显触发 NO 释放,其中表达神经元 NO 合

酶<sup>[7]</sup>。同时,在外毛细胞的相同亚细胞区域中检测到 PDE5 和 Prkg1 非常接近,这是外毛细胞中存在 cGMP 信号传导复合物的要求。由于激活 NO 合酶和 NO 的产生,因噪声诱导产生的细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增加可能会触发一系列事件,引起活化可溶性鸟苷酸环化酶、cGMP 的产生和随后的 Prkg1 活化。Prkg1 反过来可能限制细胞溶质  $Ca^{2+}$  浓度,例如通过调节 L 型  $Ca^{2+}$  通道或  $Ca^{2+}$  隔离到细胞内储存中。实际上,体外研究表明 NO 在反对由过度刺激引起的毛细胞中有害的  $Ca^{2+}$  浓度升高中起重要作用。此外,通过 Prkg1 所激活的抑制激素,以及通过去极化而诱导细胞内升高的  $Ca^{2+}$ ,能够利用激活转录因子环 AMP 响应元件,共同增加存活基因的表达<sup>[8]</sup>。支持细胞位移可能一定程度的调节、控制听觉敏感度,当听觉暴露在异常强度的噪声环境中时,此时支持细胞发挥着保护听觉的重要作用。而当大量连接蛋白 26、连接蛋白 30 等多种缝隙连接蛋白存在耳蜗内的支持细胞中,以及连接组织细胞中时,通过这些缝隙连接蛋白实现了 cGMP、环磷酸腺苷等阴离子参与细胞之间的信号传递与能量的代谢<sup>[9]</sup>。所以 NO-cGMP 途径可能是通过调节支持细胞的功能状态,从而影响耳蜗外毛细胞生理功能。临床上,因

银杏叶及银杏叶提取物能够改善内听动脉等微循环障碍从而一定程度上改善了听功能,因此被长期广泛应用于治疗各种类型感音神经性聋。本实验发现,阴性对照组、PDE5 抑制剂组及银杏叶组均在噪声暴露后 ABR 阈移上升,而 I 波潜伏期延长,较噪声暴露前有显著差异( $P < 0.05$ )。但随着病程的延长及不同的给药方式,阴性对照组豚鼠的阈值及 I 波潜伏期呈现持续增高,而 PDE5 抑制剂组及银杏叶组的上升幅度明显低于阴性对照组,两组 ABR 阈值及 I 波潜伏期均较噪声暴露后这一点有明显的下降,且 PDE5 抑制剂组较银杏叶组下降更显著,在给药 4 周后,已基本接近噪声暴露前水平。扫描电镜结果也显示 PDE5 抑制剂组及银杏叶组豚鼠耳蜗毛细胞损伤均较阴性对照组均不同程度明显减轻,但 PDE5 抑制剂组损伤程度较银杏叶组相对较轻。由此可见,PDE5 抑制剂组和银杏叶组一样经治疗后可以减小 ABR 阈值,缩短 I 波潜伏期,但其效果较银杏叶更明显。

PDE5 抑制剂是通过抑制海绵体内分解 cGMP 的 PDE5 来增强 NO 进而发挥作用。cGMP 作用于特异性受体蛋白,包括 cGMP 依赖性蛋白激酶(Prkg,也称为 cGK 或 PKG),表达 Prkg 神经元和非神经元细胞类型,包括豚鼠耳蜗支持细胞和螺旋神经节神经元(SGNs)<sup>[10]</sup>,通过 PDE 水解第二信使分子 cGMP 使 PDE5 抑制剂终止信号。国外研究<sup>[11-12]</sup>表明,耳蜗毛细胞内存在有大量 PDE5-Prkg1-cGMP-PARP 信号肽。而 PARP1 是一种普遍表达的 DNA 缺口末端感受器,通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)作为底物催化 PAR 加入受体蛋白,主要是组蛋白、转录因子和聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP)本身,PARP 因 DNA 断裂被激活,促进其转录、复制以及修复。然而,一氧化氮的毒性作用和 DNA 损伤以及 PARP1 的过度表达有关,并且伴随 NAD<sup>+</sup> 耗尽或 ATP 耗尽导致细胞死亡。在这种情况下,PDE5 抑制剂既可以增强 cGMP 信号传导的保护作用又不会加速过多 NO 引起的潜在破坏作用,特别是因为 cGMP 可能直接引起 PARP 活化<sup>[13]</sup>。由此显示了 PDE5 抑制剂诱导的 PAR 浓度升高的促生存效应,这可能也反映了 PARP 的抗衰老能力<sup>[14]</sup>。

本研究观察到 PDE5 抑制剂和银杏叶同样对神经性听力损伤有一定的逆转,对神经性聋听功能的

治疗作用是存在的,同时发现 PDE5 抑制剂效果可能较银杏叶等更明显,但具体作用机制仍需进一步研究。本实验与 Jaumamm 等<sup>[2]</sup>得出的结论相符合,即建议使用 PDE5 抑制剂作为保护神经性聋的感觉和神经组织的潜在新方法,为噪声性聋的药物治疗提供一点启示和实验依据。

#### 参考文献

- [1] 刘涛,窦艳玲. 甲强龙全身及耳后注射对全聋型突聋临床疗效分析[J]. 川北医学院学报,2018,33(1):56-58.
- [2] Jaumann M, Dettling J, Gubelt M, et al. cGMP-Prkg1 signaling and Pde5 inhibition shelter cochlear hair cells and hearing function [J]. *Bmc Pharmacology & Toxicology*, 2013, 14(1):1.
- [3] 梁媛,张淑君,张勋. 西地那非对豚鼠噪声性听力损伤耳蜗毛细胞形态学的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,13(29):1216-1217.
- [4] Crowson MG, Tucci DL, Kaylie D. Hearing loss on social media: Who is winning hearts and minds? [J]. *Laryngoscope*, 2017, 128(6):1453-1461.
- [5] 贾占伟,何强,张玉波,等. 前列地尔联合针刺对噪音性耳聋大鼠耳蜗毛细胞血管内皮生长因子、Bcl-2 及 Bax 表达的影响[J]. 川北医学院学报,2018,33(3):388-391.
- [6] Meltser I, Tahera Y, Canlon B. Glucocorticoid receptor and mitogen-activated protein kinases activity after restraint stress and acoustic trauma [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(10):1835-1845.
- [7] Horváth T, Polony G, Fekete Á, et al. ATP-Evoked Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling of Different Supporting Cells in the Hearing Mouse Hemicochlea [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(1-2):1-12.
- [8] Filadi R, Basso E, Lefkimiatis K, et al. Beyond Intracellular Signaling: The Ins and Outs of Second Messengers Microdomains [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 981:279-322.
- [9] 张璞,林曦,曲雁. Connexin 蛋白与耳聋[J]. 中华耳科学杂志, 2013, 11(1):156-159.
- [10] 王希营,朱全刚,高静,等. 噪声性听力损伤药物防治的研究进展[J]. 药学服务与研究,2012,12(2):139-144.
- [11] Langelier MF, Zandarashvili L, Aguiar PM, et al. NAD<sup>+</sup> analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):844.
- [12] Pascal JM. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2018, 71:177-182.
- [13] Sahaboglu A, Tanimoto N, Kaur J, et al. PARP1 gene knock-out increases resistance to retinal degeneration without affecting retinal function [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(11):e15495.
- [14] Gibbs-Seymour I, Fontana P, Rack JGM, et al. HPF1/C4orf27 Is a PARP-1 interacting Protein that Regulates PARP-1 ADP-Ribosylation Activity [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(3):432-442.

(收稿日期:2020-04-27)

学术编辑:刘海)