

· 实验与方药 ·

羟基红花黄色素 A 对耳鸣大鼠下丘 γ -氨基丁酸和谷氨酸的影响

李雪¹ 贾志姣² 江洪¹

¹重庆医科大学附属永川医院耳鼻咽喉头颈外科, 重庆 402160; ²河南省中医院耳鼻喉科, 郑州 450003

通信作者: 江洪, Email: lx314123780@126.com

【摘要】 目的 观察羟基红花黄色素 A 对耳鸣大鼠下丘神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)和谷氨酸(Glu)水平的影响。方法 采用水杨酸钠诱导联合饮水抑制法建立大鼠耳鸣模型, 大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、卡马西平组(5 mg/kg)、羟基红花黄色素 A 组(20 mg/kg)。腹腔注射给药 15 d 后, 记录各组条件反射消退时间, 检测不同声音频率(4、12、20、28 kHz)下大鼠听性脑干反应(ABR)阈值, 采用液质联用法检测大鼠下丘 GABA、Glu 含量。结果 与模型组比较, 羟基红花黄色素 A 组条件反射消退时间[(3.55±0.69)d 比(1.83±0.58)d]延长($P<0.01$); 在 4、12、20、28 kHz 声音频率下, 羟基红花黄色素 A 组 ABR 阈值降低($P<0.01$); 羟基红花黄色素 A 组大鼠下丘 GABA 水平[(2.25±0.26) $\mu\text{mol/g}$ 比(1.96±0.19) $\mu\text{mol/g}$]升高($P<0.05$), Glu 水平[(2.95±0.34) $\mu\text{mol/g}$ 比(3.71±0.39) $\mu\text{mol/g}$]降低($P<0.01$)。结论 羟基红花黄色素 A 可改善水杨酸钠所致大鼠耳鸣症状, 可能与恢复听觉中枢兴奋性和抑制性递质的平衡有关。

【关键词】 羟基红花黄色素 A; 耳鸣; γ -氨基丁酸; 谷氨酸; 大鼠

基金项目: 重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目(20182051)

Effect of hydroxysafflor yellow a on γ -aminobutyric acid and glutamic acid levels in the inferior colliculus of rats with tinnitus

Li Xue¹, Jia Zhijiao², Jiang Hong¹

¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; ²Department of Otolaryngology, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Jiang Hong, Email: lx314123780@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the therapeutic effect of hydroxysafflor yellow A (HYA) on rats with tinnitus and investigate its influence on γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid (Glu) levels of inferior colliculus. **Methods** The model of rats with tinnitus received an injection of sodium salicylate and "water-drinking suppression" was established, and then were divided into four groups with random number table method: normal group, model group, positive control (carbamazepine 5 mg/kg) and HYA (20 mg/kg) groups. Animals were intraperitoneally injected for 15 days. The recovery time of water-drinking suppression of all groups were recorded. The threshold value of auditory brainstem response (ABR) under the different frequency (4, 12, 20 and 28 kHz) in each rat was measured. The levels of GABA and Glu in inferior colliculus in rats with tinnitus were detected by LC-MS/MS. **Results** Compared with the model group, the recovery time of water drinking suppression [(3.55±0.69)d vs. (1.83±0.58)d] in HYA group was significantly prolonged ($P<0.01$). Compared with the model group, the threshold value of ABR under different

DOI: 10.3760/cma.j.cn115398-20220308-00095

收稿日期 2022-03-08 本文编辑 张琪

引用本文: 李雪, 贾志姣, 江洪. 羟基红花黄色素 A 对耳鸣大鼠下丘 γ -氨基丁酸和谷氨酸的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2022, 44(6): 657-660. DOI: 10.3760/cma.j.cn115398-20220308-00095.



frequency (4, 12, 20 and 28 kHz) were significantly reduced in HYA group ($P < 0.01$). The GABA levels [(2.25±0.26) $\mu\text{mol/g}$ vs. (1.96±0.19) $\mu\text{mol/g}$] in inferior colliculus of tinnitus rats in HYA group was significantly increased ($P < 0.05$) while the Glu levels [(2.95±0.34) $\mu\text{mol/g}$ vs. (3.71±0.39) $\mu\text{mol/g}$] were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** HYA treatment could relieve tinnitus symptoms induced by sodium salicylate, which might be related to the recovery of excitatory/inhibitory neurotransmitter balance.

【Key words】 Hydroxysafflower yellow A; Tinnitus; gamma-Aminobutyric acid; Glutamic acid; Rats

Fund program: Medical Research Program of Health and Family Planning Commission of Chongqing (20182051)

耳鸣指无外界声源或电刺激时,患者耳内或颅内主观存在的听觉感受,发病率较高,据针对成年人的流行病学调查显示,患有不同程度耳鸣者约占 10%~18%^[1]。耳鸣可影响患者工作和生活,严重者可致听觉中枢及相关脑功能发生病变,给患者带来极大的身心创伤。

红花有效成分羟基红花黄色素 A 属查尔酮苷类化合物,具有抗炎、抗氧化、影响血小板活性、改善局部微循环等作用,已被普遍用于心脑血管疾病的治疗^[2]。研究发现,羟基红花黄色素 A 腹腔注射给药可有效防治水杨酸引起的小鼠耳鸣^[3]。本研究通过建立耳鸣大鼠模型,观察羟基红花黄色素 A 对实验性耳鸣大鼠中枢神经递质水平的影响,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,体重(200±10)g,耳郭反射灵敏、无中耳感染、听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)监测两耳反应阈为 20~30 dB 声压级,由重庆医科大学实验动物中心提供,生产许可证号 SCXK(渝)2018-0003。饲养于安静整洁的动物房,温度 20~23 °C,相对湿度 60%~70%,明暗光照 12 h/12 h,常规灭菌饲料喂养,自由饮水。本实验经重庆医科大学附属永川医院动物伦理委员会批准(CQMU.No20200043)。

1.2 实验仪器

MB11 听觉脑干诱发电位仪(丹麦 Madsen 公司); TES-1357 声级计(泰仕电子工业股份有限公司); RZ6 听觉电生理系统(美国 TDT 公司); MP8003 脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司); DY-89 自动匀浆机(金瑞鸿捷生物科技有限公司); XP205 分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); Mikro320R 高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司); LTQ-Orbitrap XL 超高效液相色谱串联质谱仪

(美国 Thermo Fisher 公司); Molatom1820a 超纯水机(重庆摩尔水处理设备有限公司)。

1.3 药品和试剂

羟基红花黄色素 A(德国 PhytoLab, 批号 ZPG-83127),以 DMSO 配成所需浓度。水杨酸钠(美国 Sigma-Aldrich, 批号 037K1755),以生理盐水配成所需浓度。卡马西平(美国 Supelco, 批号 D32-19629),以 DMSO 配成所需浓度。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)对照品(美国 Sigma-Aldrich, 批号分别为 BCBN2643V、SLBS4960);乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Tedia 试剂公司)。

1.4 造模、分组与给药

将大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、羟基红花黄色素 A 组、卡马西平组,每组 12 只。除正常组外,其余各组大鼠参照文献[4]方法制备耳鸣模型。大鼠禁水 2 d,使其处于干渴状态,置于隔音室(本底噪声小于 20 dB 声压级)中进行饮水抑制训练。播放 55 dB 声压级的白噪声并记录大鼠饮水情况,白噪声停止时电刺激大鼠足底以中断其饮水行为,交替多次,建立“声音出现、饮水开始,声音停止、饮水中断”的抑制性条件反射。抑制性条件反射建立后,进入条件反射消退期(不再给予电刺激),除正常组外,其余各组每天腹腔注射水杨酸钠 350 mg/kg,正常组腹腔注射等体积生理盐水。同时,羟基红花黄色素 A 组腹腔注射羟基红花黄色素 A 溶液 20 mg/kg^[3],卡马西平组腹腔注射卡马西平溶液 5 mg/kg^[4],正常组和模型组腹腔注射等体积溶媒,连续给药 15 d。

观察大鼠饮水抑制率(Rb), $Rb=B/(A+B)$,A 为停止白噪声前 1 min 内饮水时间,B 为停止白噪声后 1 min 内饮水时间;训练前,大鼠 Rb 值稳定在 0.5 左右;训练后,以 Rb 值小于 0.2 为建立稳定条件反射的标准;以 Rb 值恢复到 0.5 左右为条件反射完

全消退的标准。记录各组大鼠条件反射消退时间,以造模组与正常组条件反射消退时间差异有统计学意义($P<0.05$),判定耳鸣模型建立成功。

1.5 听性脑干反应阈值变化检测

末次给药 2 h 后,大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,将其置于固定架上,连接听觉电生理系统,采用不同频率(4~28 kHz)进行单耳给声,声音强度为 5~80 dB 声压级,记录每只大鼠的 ABR 反应阈值。

1.6 下丘神经递质水平检测

将大鼠快速处死,置于冰台上,颅顶钻孔暴露大脑表面,参照《大鼠脑立体定位图谱》^[5],以脑前囟为坐标原点,定位于下丘,切取下丘部位脑组织,精确称重,加入 10 倍量甲醇冰浴匀浆,4 °C、15 000 r/min 离心(离心半径 15 cm)15 min,取上清,经微孔滤膜过滤后备用。称取 GABA、Glu 对照品,以超纯水配制成标准曲线工作液。

采用 HPLC-质谱法检测下丘 GABA、Glu 含量。色谱柱为 RP-C18(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相为乙腈:水(V/V 2: 98),柱温 35 °C,流速 0.1 ml/min,进样量 2 μl;采用电喷雾离子源离子化样品,多重反应监测模式检测 GABA、Glu 含量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。数据行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,其中不同频率的 ABR 阈值比较采用两因素重复测量方差分析,其他计量资料采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 校正。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠条件反射消退时间比较

羟基红花黄色素 A 组和卡马西平组各有 1 只因顺应性差未成功建立模型。

与正常组比较,模型组及给药组条件反射消退时间缩短($P<0.01$);与模型组比较,羟基红花黄色素 A 组和卡马西平组条件反射消退时间延长($P<0.01$),提示羟基红花黄色素 A 和卡马西平对水杨酸钠所致大鼠耳鸣有一定抑制作用,见表 1。

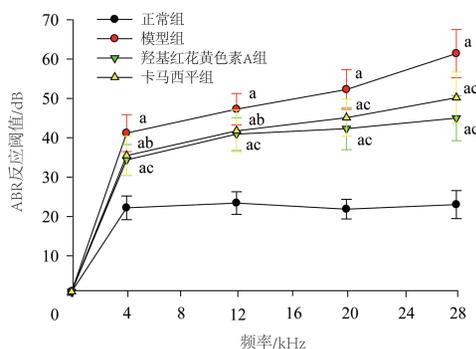
2.2 各组大鼠听性脑干反应阈值比较

与正常组比较,模型组及给药组大鼠在不同声音频率下 ABR 反应阈值明显升高($P<0.01$);与模型组比较,羟基红花黄色素 A 组和卡马西平组在不同声音频率下 ABR 反应阈值下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图 1。

表 1 各组大鼠条件反射消退时间比较($d, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	消退时间
正常组	12	5.50±0.90
模型组	12	1.83±0.58 ^a
羟基红花黄色素 A 组	11	3.55±0.69 ^{ab}
卡马西平组	11	2.91±0.70 ^{ab}

注 与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$



注 ABR:听性脑干反应;与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$

图 1 各组大鼠 ABR 反应阈值比较($\bar{x} \pm s, n=11$ 或 12)

2.3 各组大鼠下丘神经递质水平比较

与正常组比较,模型组及给药组下丘 GABA 水平降低($P<0.01$),Glu 水平升高($P<0.01$);与模型组比较,羟基红花黄色素 A 组和卡马西平组下丘 GABA 水平升高($P<0.05$),Glu 水平降低($P<0.01$);与卡马西平组比较,羟基红花黄色素 A 组下丘 GABA 水平升高($P<0.01$),Glu 水平降低($P<0.01$),见表 2。

表 2 各组大鼠下丘 GABA、Glu 水平比较($\mu\text{mol/g}, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	GABA	Glu
正常组	12	2.69 ± 0.17	2.06 ± 0.11
模型组	12	1.96 ± 0.19 ^a	3.71 ± 0.39 ^a
羟基红花黄色素 A 组	11	2.25 ± 0.26 ^{abc}	2.95 ± 0.34 ^{abc}
卡马西平组	11	3.08 ± 0.31 ^{ab}	3.38 ± 0.30 ^{ad}

注 GABA:γ-氨基丁酸;Glu:谷氨酸;与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$;与卡马西平组比较,^d $P<0.01$

3 讨论

本研究采用水杨酸钠诱导联合饮水抑制法建立大鼠耳鸣模型,观察羟基红花黄色素 A 对耳鸣大鼠的影响。结果显示,正常组大鼠将白噪声停止作为危险信号,长时间处于抑制状态,因而条件反射消退所需时间较长;模型组大鼠可能将水杨酸钠所致耳鸣音与白噪声混淆,对白噪声停止的恐惧感较低,其饮水行为的抑制作用较弱,条件反射消退时

间较短;羟基红花黄色素 A 组大鼠条件反射消退时间较模型组延长,表明羟基红花黄色素 A 对耳鸣有抑制作用。ABR 可作为评价听觉功能及耳鸣程度的客观指标,研究表明,水杨酸钠所致耳鸣大鼠的 ABR 反应阈值比正常大鼠明显升高,且呈现剂量依赖性^[6]。本研究结果显示,羟基红花黄色素 A 可显著降低耳鸣大鼠 4~28 kHz 尤其是高频声音刺激下的 ABR 阈值,进一步表明羟基红花黄色素 A 可较好地抑制水杨酸钠诱导的大鼠耳鸣症状。

神经递质及其受体在听觉的生理病理过程中发挥重要作用。研究表明,耳鸣患者的听觉中枢传导通路存在兴奋与抑制作用的失衡,如神经递质异常释放、递质受体重新分布等现象,这些中枢神经系统可塑性变化可引起听觉皮层的自发性放电活动过度增加,导致耳鸣相关症状的产生^[7]。GABA 是听觉通路的主要抑制性神经递质,参与听觉中枢中继核团下丘部位的声音频率分析、时间和空间编码等;GABA 介导抑制作用的缺失或减弱,可降低其处理声音信息的功能,从而产生耳鸣。研究表明,腹腔注射水杨酸钠可致大鼠下丘部位 GABA 水平降低,提示 GABA 参与了耳鸣的病理进程^[8]。大鼠产生耳鸣症状后,其听觉和边缘系统存在神经元的过度活跃,之后中枢某些区域出现 GABA 受体结合增强现象,可能与强化介导抑制性神经活动、进而缓解耳鸣相关^[9]。Glu 是听觉通路主要的兴奋性递质,研究发现,噪声刺激可使大鼠下丘 Glu 释放增多,认为 Glu 的兴奋性毒性与听觉功能损害有关^[10]。研究表明,大鼠下丘 Glu 水平在腹腔注射水杨酸钠数小时后显著升高,认为兴奋性递质 Glu 的升高及抑制性递质 GABA 的降低与下丘神经元活动增高有关,二者失衡可能是导致大鼠耳鸣产生的原因^[8]。Brozoski 等^[11]采用质子磁共振波谱法检测慢性耳鸣大鼠脑内的递质水平,表明耳蜗背侧核、下丘、听皮层等区域存在 GABA 水平降低或 Glu 水平升高,提示慢性耳鸣存在中枢递质失衡现象,恢复抑制性递质及兴奋性递质之间的平衡或许是较为有效的耳鸣治疗方式。本研究采用液质联用法检测了听觉中枢重要的中继核团下丘部位的递质水平变化,结果显示,水杨酸钠所致耳鸣大鼠的下丘 GABA 水平降低, Glu 水平升高,表明耳鸣大鼠存在神经递质的失调;羟基红花黄色素 A 可升高耳鸣大鼠下丘 GABA 水平,降低 Glu 水平,提示羟基红花黄色素 A 通过调控 GABA、Glu 表达,恢复抑制性递质及兴奋性递质之间的平衡,促进神经元异常放电

活动的恢复,改善耳鸣症状。

本研究结果显示,羟基红花黄色素 A 可改善水杨酸钠所致大鼠耳鸣,可能与恢复听觉中枢兴奋性和抑制性递质的平衡等途径相关。鉴于听觉核团调节机制的复杂性及神经递质在耳鸣致病中的不确定性,羟基红花黄色素 A 改善耳鸣的作用机制尚需更深入探究。

利益冲突 除基金项目支持外,本文全体作者未接受过第三方的资助或服务,无个人或企业的经济利益

作者贡献声明 李雪:实验设计、实施研究、采集数据、撰写文章;贾志姣:实施研究、采集数据、统计分析;江洪:获取研究经费、设计实验、工作指导、审阅文章

参 考 文 献

- [1] Langguth B, Elgoyhen AB, Cederroth CR. Therapeutic Approaches to the Treatment of Tinnitus[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 291-313. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021556.
- [2] Zhao F, Wang P, Jiao Y, et al. Hydroxysafflor Yellow A: A Systematical Review on Botanical Resources, Physicochemical Properties, Drug Delivery System, Pharmacokinetics, and Pharmacological Effects[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 579332. DOI: 10.3389/fphar.2020.579332.
- [3] 马春蕾,宋韶清. 羟基红花黄色素 A 防治耳鸣的实验研究[J]. *滨州医学院学报*, 2020, 43(1): 8-10. DOI: 10.19739/j.cnki.issn1001-9510.2020.01.002.
- [4] Wan I, Pokora O, Chiu T, et al. Altered intensity coding in the salicylate-overdose animal model of tinnitus[J]. *Biosystems*, 2015, 136: 113-119. DOI: 10.1016/j.biosystems.2015.06.010.
- [5] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [M]. San Diego, CA: Academic Press, 2006.
- [6] Domarecka E, Olze H, Szczepiek AJ. Auditory Brainstem Responses (ABR) of Rats during Experimentally Induced Tinnitus: Literature Review[J]. *Brain Sci*, 2020, 10(12): 901. DOI: 10.3390/brainsci10120901.
- [7] Lee AC, Godfrey DA. Current view of neurotransmitter changes underlying tinnitus[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(3): 368-370. DOI: 10.4103/1673-5374.153680.
- [8] 刘俊秀,马芙蓉,李学佩,等. 水杨酸钠对大鼠下丘内谷氨酸和 γ -氨基丁酸的影响[J]. *中华耳科学杂志*, 2009, 7(3): 212-215. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2922.2009.03.009.
- [9] Wu C, Bao W, Yi B, et al. Increased metabolic activity and hysteretic enhanced GABA(A) receptor binding in a rat model of salicylate-induced tinnitus[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 364: 348-355. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.02.037.
- [10] 谢华顺,宋为明,上官隽华,等. 在体微透析研究条件性噪声对下丘听觉通路谷氨酸水平的影响[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2007, 39(4): 409-411. DOI: 10.3321/j.issn:1671-167x.2007.04.018.
- [11] Brozoski T, Odintsov B, Bauer C. Gamma-aminobutyric acid and glutamic acid levels in the auditory pathway of rats with chronic tinnitus: a direct determination using high resolution point-resolved proton magnetic resonance spectroscopy (H-MRS) [J]. *Front Syst Neurosci*, 2012, 6: 9. DOI: 10.3389/fnsys.2012.00009.