

monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and the transforming growth factor-β1 (TGF-β1) pathway in myocardial infarction mice [J].Am J Transl Res,2016,8(10):4425-4433

[7]李玲,全沁果,沈艳欣,等.野葛藤地上部分葛根素的提取及稳定性研究[J].食品工业科技,2016,37(9):235-239

[8]叶惠焯,李芝,李小军,等.湘葛一号茎叶中 5 种异黄酮成分的高效液相色谱法定量分析[J].食品科学,2014,35(14):141-144

[9]黄璐琦,苏钢强,张小波,等.中药材产业扶贫重点优先区域划分和推荐种植中药材名录整理[J].中国中药杂志,2017,42(22):4319-4328

[10]Mun SC,Mun GS.Dynamics of phytoestrogen, isoflavonoids, and its isolation from stems of Pueraria lobata (Willd.) Ohwi growing in Democratic People's Republic of Korea[J].J Food Drug Anal,2015,23(3):538-544

(收稿日期: 2019-05-21)

# 布美他尼与呋塞米 K<sup>+</sup>转运蛋白抑制剂对小鼠听觉功能的影响

钱迪 郑伟昌 敬光怀 陈翠霞 黄俊焯 汤国栋

(广东省深圳市龙华区人民医院耳鼻喉科 深圳 518109)

**摘要:**目的:探讨布美他尼与呋塞米两类 K<sup>+</sup>转运蛋白抑制剂对小鼠听觉功能的影响。方法:以 30 只健康小鼠为研究对象,采用随机数字表法分为健康对照组 10 例,布美他尼处理组 10 例,呋塞米处理组 10 例。对照组小鼠不予处理,布美他尼处理组予以布美他尼处理,呋塞米处理组予以呋塞米处理。分别对各组小鼠进行听觉脑干反应检测,对比三组小鼠听觉脑干反应阈值,以及布美他尼处理组、呋塞米处理组小鼠给药前后和恢复后听觉脑干反应阈值。结果:给药后,布美他尼处理组、呋塞米处理组平均听觉脑干反应阈值均高于健康对照组(P<0.05),且布美他尼处理组平均听觉脑干反应阈值高于呋塞米处理组(P<0.05)。停止给药恢复后,布美他尼处理组、呋塞米处理组平均听觉脑干反应阈值均低于给药后(P<0.05),与给药前接近。结论:布美他尼 K<sup>+</sup>转运蛋白抑制剂对钠钾氯协同转运蛋白 1 的抑制作用高于呋塞米,对小鼠听觉功能的损伤影响高于呋塞米。

**关键词:**K<sup>+</sup>转运蛋白抑制剂;布美他尼;呋塞米;听觉功能

中图分类号:R764

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2019.08.091

钠钾氯协同转运蛋白 1(NKCC1)是中枢神经系统内分布于微血管内皮细胞、神经元细胞膜及星形胶质细胞上的离子转运蛋白,不仅对维持神经元细胞及星形胶质细胞内离子的正常浓度、细胞容积及维持血脑屏障通透性具有重要的意义,还是参与耳蜗 K<sup>+</sup>循环生理机制,对听觉生理功能进行维护的重要功能通道。有相关研究报道证实,NKCC1 蛋白的低表达在听觉功能损伤中发挥了重要的作用<sup>[1]</sup>。布美他尼、呋塞米是目前临床上应用较为广泛的两类抑制 NKCC1 蛋白的 K<sup>+</sup>转运蛋白抑制剂。本研究以 30 只健康小鼠为研究对象,以对比布美他尼、呋塞米对 NKCC1 蛋白的抑制作用,探讨布美他尼/呋塞米两类 K<sup>+</sup>转运蛋白抑制剂对小鼠听觉功能的影响。现报道如下:

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 选取由我市动物中心提供的 30 只健康小鼠为研究对象,小鼠经近交自行繁殖培育,均系 12 周龄,可保持长时间稳定的听力,体质量 12~18 g,平均(15.41± 4.33) g。采用随机数字表法将 30 只小鼠分为健康对照组 10 例,布美他尼处理组 10 例,呋塞米处理组 10 例。

**1.2 研究方法** (1)听觉脑干反应(ABR)检测。布美他尼处理组 10 只小鼠和呋塞米处理组 10 只小鼠,予以三溴乙醇腹腔注射麻醉,用量 0.53 mg/g。采用银针电极,于头顶正中皮下插入正极,于左耳皮下

插入参考电极,于右耳皮下插入地极电极。ABR 检测仪器采用美国产 ABR 仪,刺激参数设置由电脑产生设定的短声、短纯音的 8、16、32 kHz 为刺激声。实验中以能分辨出 ABR I 波的最低刺激强度作为 ABR 阈值,ABR 检测 3 次,取平均值<sup>[2]</sup>。(2)K<sup>+</sup>转运蛋白抑制剂处理。布美他尼处理组 10 只小鼠于药物处理前行 ABR 检测,予以腹腔内注射麻醉后,给予 NKCC1 抑制剂布美他尼注射,注射 30 min 后再予以 ABR 检测;停药 3 d,后再次行 ABR 检测。呋塞米处理组 10 例小鼠于药物处理前行 ABR 检测,予以腹腔内注射麻醉后给予 NKCC1 抑制剂呋塞米注射,注射 30 min 后再予以 ABR 检测;停药 3 d,后再次行 ABR 检测。

## 1.3 观察指标

**1.3.1 健康对照组、布美他尼处理组、呋塞米处理组小鼠 ABR 阈值比较** 根据检测结果,对比分析健康对照组、布美他尼处理组、呋塞米处理组小鼠 ABR 阈值。

**1.3.2 布美他尼处理组、呋塞米处理组小鼠给药前后及恢复后 ABR 阈值比较** 根据检测结果,对比分析布美他尼处理组、呋塞米处理组小鼠给药前后及恢复后 ABR 阈值。

**1.4 统计学方法** 数据处理采用 SPSS20.0 统计学软件。计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 t 检验。多组间数据的简单比较用方差分析。以 P<0.05 为差异有

统计学意义。

## 2 结果

2.1 三组小鼠 ABR 阈值比较 给药前三组平均 ABR 阈值比较, 差异无统计学意义 ( $t=2.103, P=0.925$ ); 给药后, 布美他尼处理组、呋塞米处理组平均 ABR 阈值均高于健康对照组 ( $t=7.142, 8.261, P=0.041, 0.039$ ), 且布美他尼处理组平均 ABR 阈值高于呋塞米处理组 ( $t=7.563, P=0.040$ )。见表 1。

表 1 三组小鼠 ABR 阈值比较 (dB SPL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	给药前	给药后
健康对照组	10	22.34± 4.25	-
布美他尼处理组	10	23.45± 5.21	65.20± 10.41
呋塞米处理组	10	23.14± 5.32	50.35± 8.56

2.2 布美他尼处理组、呋塞米处理组小鼠给药前后及恢复后 ABR 阈值比较 停止给药恢复后, 布美他尼处理组、呋塞米处理组平均 ABR 阈值均低于给药后 ( $t=8.284, 8.556, P=0.037, 0.036$ ), 与给药前接近。见表 2。

表 2 布美他尼、呋塞米处理组给药前后及恢复后 ABR 阈值比较 (dB SPL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	给药前	给药后	停止给药恢复后
布美他尼处理组	10	23.45± 5.21	65.20± 10.41	27.45± 6.26
呋塞米处理组	10	23.14± 5.32	50.35± 8.56	25.15± 5.54

## 3 讨论

NKCC1 是  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  内向共转运体 ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$  浓度梯度共同驱动), 与  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  外向共转运体 (钾浓度梯度驱动) 同属于氯偶联的共转运体家族, 市面上针对 NKCC 靶点的药物开发主要集中在心脑血管疾病治疗领域, 包括高血压、水肿以及心力衰竭等<sup>[1]</sup>。近年来, 随着临床医学及动物实验对耳聋疾病病理机制研究的不断深入, 诸多文献报道强调 NKCC1 蛋白的低表达在听觉功能损伤中发挥了重要的作用<sup>[4]</sup>。临床上, 关于 NKCC1 在听觉功能中的作用尚无确切结论, 但国内外一致持有如下观点: NKCC1 可通过对内向性  $\text{Na}^+$  浓度梯度的利用以  $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$  的比例将离子转运至边缘细胞, 而经边缘细胞顶膜上的 KCNQ1 通道将  $\text{K}^+$  分泌至淋巴, 进而形成 EP; 同时分泌至耳蜗内淋巴中的  $\text{K}^+$  经基底膜毛细胞与螺旋韧带间的通道进行转运, 再次进入边缘细胞, 以此循环, 构成耳蜗  $\text{K}^+$  循环机制, 进而对听觉功能进行维持<sup>[5]</sup>。布美他尼 / 呋塞米两类  $\text{K}^+$  转运蛋白抑制剂对 NKCC1 蛋白的表达具有显著的抑制作用, 这两类药物所造成的听力损伤是双侧对称性, 这主要是因为该两类药物与内耳毛细胞膜接触, 增加了内耳毛细胞的通透性, 而祥利尿剂以较高

的浓度进入到细胞内, 引起了毛细胞的损伤。

褚汉启等的研究中应用 NKCC1 抑制剂呋塞米对 CBA/CaJ 和 Castel 两种鼠系进行了离子转运蛋白抑制 - 听觉实验, 并对小鼠 ABR 阈值进行检测, 结果显示小鼠经呋塞米注射 30 min 后, ABR 阈值显著高于注射前 ( $P<0.01$ ), 且显著高于正常对照组 ( $P<0.01$ ), 提示呋塞米对 NKCC1 具有显著的抑制作用, 会对小鼠听觉功能造成影响, 这与本次研究结果一致<sup>[6]</sup>。王桥生等按随机数字法将 SD 大鼠分成假手术组、脑缺血组和布美他尼组, 结果显示大鼠予布美他尼干预后, NKCC1 表达均显著下降 ( $P<0.05$ ), 证实布美他尼可通过下调 NKCC1 表达水平改善缺血性脑水肿和神经功能<sup>[7]</sup>。而目前尚无关于布美他尼 / 呋塞米两类  $\text{K}^+$  转运蛋白抑制剂对小鼠听觉功能及 NKCC1 抑制作用的对比研究文献报道。本研究采用对照研究的方法, 分别对健康对照组、布美他尼处理组、呋塞米处理组小鼠的 ABR 进行检测, 结果给药后, 布美他尼处理组、呋塞米处理组平均 ABR 阈值均高于健康对照组 ( $P<0.05$ ), 即经布美他尼、呋塞米两类  $\text{K}^+$  转运蛋白抑制剂处理后, 小鼠听觉功能明显损伤。经药物处理后, 布美他尼处理组平均 ABR 阈值高于呋塞米处理组 ( $P<0.05$ ), 停止给药恢复后, 布美他尼处理组、呋塞米处理组平均 ABR 阈值均低于给药后 ( $P<0.05$ ), 与给药前接近, 提示布美他尼对 NKCC1 的抑制作用高于呋塞米, 对小鼠听觉功能的损伤影响高于呋塞米。

综上所述, 布美他尼  $\text{K}^+$  转运蛋白抑制剂对 NKCC1 的抑制作用高于呋塞米, 对小鼠听觉功能的损伤影响高于呋塞米。

### 参考文献

- [1] 徐辰, 魏汉东, 姜颖. 布美他尼对肿瘤细胞增殖的抑制作用及其与 NKCC1 表达的相关性[J]. 军事医学, 2015, 39(7): 495-498
- [2] 李亚昌. 布美他尼治疗慢性顽固性心力衰竭临床观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(7): 57-58
- [3] 杨旭, 王琦越, 黄秀深, 等. 基于水协同转运蛋白 KCC1、KCC3、KCC4、NKCC1 含量及  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活性变化研究湿阻中焦证的水液代谢机制[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(3): 627-630, 673
- [4] 王根保, 刘志群, 吴论, 等. 布美他尼后处理对大鼠创伤性颅脑损伤后 NKCC1 表达及脑含水量的影响[J]. 广东医学, 2014, 35(8): 1170-1172
- [5] 张碧茹, 林瀚青, 陈勇明, 等.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  联合转运子 1 与钠钾交换 ATP 酶在 C57BL/6J 小鼠中的表达[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2019, 26(2): 71-73
- [6] 褚汉启, 熊浩, 韩芳, 等. 离子转运蛋白抑制 - 听觉实验研究 NKCC1 和  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  在耳蜗  $\text{K}^+$  循环中的作用[J]. 华中科技大学学报 (医学版), 200, 35(5): 630-632, 637
- [7] 王桥生, 蔡鸣, 符晖, 等. 布美他尼可通过下调 NKCC1 和 AQP4 表达减轻缺血性脑水肿及神经损伤[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(6): 514-517

(收稿日期: 2019-06-10)