

研究论文

谷氨酸受体在噪声所致豚鼠螺旋神经节细胞损伤中的作用

张琰敏, 马蓓*, 高文元, 文文, 刘海瑛

第二军医大学生理学教研室, 上海 200433

摘要: 本文旨在研究谷氨酸及其受体在噪声致豚鼠螺旋神经节细胞损伤中的作用。实验分为在体和离体两部分。(1)在体实验: 豚鼠分为生理盐水(NS, 10 μ L)组, NS (10 μ L) + 噪声组和犬尿喹啉酸(kynurenic acid, KYNA, 5 mmol/L, 10 μ L) + 噪声组, 每组 15 只。用微量注射器经完整圆窗膜表面给予 NS 或 KYNA; 暴露于白噪声 110 dB SPL, 1 h。在圆窗给药前及噪声暴露后测试听觉脑干诱发电位(auditory brainstem response, ABR)阈值及 N1 波幅值, 听神经复合动作电位(compound action potential, CAP)阈值及 N1 波幅值和潜伏期, 测试后取基底膜进行透射电镜观察。(2)离体实验: 观察高浓度谷氨酸对急性分离的豚鼠螺旋神经节细胞的影响。结果显示, NS + 噪声组豚鼠 ABR 及 CAP 阈移显著高于 KYNA + 噪声组, 且 N1 波和 N1 波幅值明显降低, 潜伏期明显延长。NS + 噪声组豚鼠毛细胞及传入神经末梢急性水肿和线粒体结构破坏; KYNA + 噪声组豚鼠的毛细胞和传入神经末梢无明显变化。离体胞外施加谷氨酸可引起螺旋神经节细胞逐渐出现水肿、变性, 最后死亡。本实验提示, 噪声暴露可引起豚鼠听功能损伤, 毛细胞/传入神经突触的结构破坏和螺旋神经节细胞变性、死亡; 这种损伤可能与噪声暴露引起谷氨酸的过度释放有关; 谷氨酸通过其受体介导导致螺旋神经节细胞损伤, 谷氨酸受体的广谱拮抗剂 KYNA 可减轻噪声对螺旋神经节细胞的损伤。

关键词: 螺旋神经节细胞; 听力损伤; 谷氨酸; 谷氨酸受体; 犬尿喹啉酸

中图分类号: R764

Role of glutamate receptors in the spiral ganglion neuron damage induced by acoustic noise

ZHANG Yan-Min, MA Bei*, GAO Wen-Yuan, WEN Wen, LIU Hai-Ying

Department of Physiology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate the role of glutamate receptors in the damage of spiral ganglion neurons (SGNs) induced by acute acoustic noise. This investigation included *in vivo* and *in vitro* studies. *In vivo*, kynurenic acid (KYNA), a broad-spectrum antagonist of glutamate receptors, was applied to the round window of guinea pigs, and its protective effect was observed. The animals were divided into three groups: control (saline, 0.9%, 10 μ L), saline (0.9%, 10 μ L) + noise and KYNA (5 mmol/L, 10 μ L) + noise. Saline and KYNA were applied to the round window membrane with a microsyringe. The animals were exposed to 110 dB SPL of white noise for 1 h. Hearing thresholds for auditory brainstem responses (ABRs) and compound action potentials (CAPs) in all animals were measured before and after treatment. The amplitudes of III waveform of ABR and N1 waveform of CAP and the latency of N1 waveform at different stimulation levels (intensity-amplitude and intensity-latency functions) were also measured. The cochleas were then dissected for transmission electron microscopy (TEM) after final electrophysiological measurement. *In vitro*, the SGNs of the normal guinea pigs were isolated and glutamate (100 μ mol/L or 1 000 μ mol/L) was added into the medium. The morphology of the SGNs was examined by light microscopy. *In vivo* results showed that the hearing function and morphology of the inner ear including hair cells and SGNs in the control group were normal. Compared with that in the control group the thresholds for ABR and CAP (click and tone burst) in saline + noise group were elevated significantly. The input-output functions showed that the amplitudes of III waveform of ABR and N1 waveform of CAP decreased and the latency of N1 waveform increased obviously. There was significant difference in the amplitude and latency between saline + noise group and KYNA + noise group ($P < 0.05$). TEM indicated obvious swelling and vacuoles

Received 2006-08-03 Accepted 2006-11-30

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30470419).

*Corresponding author. Tel: +86-21-25074321; Fax: +86-21-25074321; E-mail: mabei2004@yahoo.com.cn

at the terminate of dendrites of SGNs in NS + noise group. On the contrary, the afferent dendrites in KYNA + noise group showed normal appearance without swelling and vacuoles. *In vitro* experiment showed that the isolated SGNs of guinea pigs obviously swelled and even died after application of 100 $\mu\text{mol/L}$ or 1 000 $\mu\text{mol/L}$ glutamate. These results suggest that noise exposure causes hearing impairment, damage of hair cells and hair cell/afferent synapse and death of SGNs. The antagonist of glutamate receptors provides protective effects against hearing loss and SGN damage. It is inferred that excessive release of glutamate from the inner hair cells induced by noise may be responsible for these damages. Glutamate receptors are involved in the degeneration and death of SGNs.

Key words: spiral ganglion neuron; hearing loss; glutamate; glutamate receptors; kynurenic acid

暴露于一次短暂强噪声或长期反复的噪声引起的听力下降称为噪声性听力损失(noise-induced hearing loss, NIHL)。噪声对听觉损伤的机制是多因素和复杂的。噪声不仅可以损伤声-电换能细胞——毛细胞,也可单独或合并引起听冲动传递细胞——型螺旋神经节细胞(spiral ganglion neurons, SGNs)变性、消亡,导致听力暂时下降甚至永久缺失。噪声通过机械、代谢和血液运输等途径损伤耳蜗毛细胞的机制已初步阐明^[1,2],但是在声损伤中SGNs变性消亡的确切原因,却不清楚。

型SGNs的树突末梢与内毛细胞构成的突触(又称为毛细胞/传入神经突触)是化学性突触,该突触间隙宽40~60 nm,浸浴在耳蜗外淋巴液中。兴奋性氨基酸——谷氨酸为该突触重要的神经递质^[3-5]。谷氨酸储存在毛细胞底部的囊泡内。内毛细胞兴奋后,囊泡迁移融合,倾囊释放谷氨酸,谷氨酸扩散与突触后膜上谷氨酸受体结合。突触后膜上离子型谷氨酸受体有AMPA、kainate和NMDA三种类型^[6-9]。实验发现,在中枢神经系统,窒息、缺氧引起的谷氨酸的过度释放使胞外谷氨酸堆积,可使神经元经历早期水肿、空泡、变性,后期死亡的病变过程。这种过程和谷氨酸受体的过度或长时间激活,介导异常离子流有关。谷氨酸首先和AMPA受体结合,引起该受体离子通道的开放,胞外 Na^+ 、 Cl^- 及其带动的水分子进入胞内,导致细胞水肿;AMPA受体激活引起的膜去极化又使NMDA受体激活,胞外 Ca^{2+} 内流入胞内,导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高和钙超载,后者激活一系列酶和引起氧自由基堆积,是细胞死亡的主要原因^[10-13]。

声暴露可以引起毛细胞过度释放谷氨酸,使其在耳蜗体液内的浓度升高,135 dB噪声暴露30 min后,耳蜗体液内的谷氨酸浓度是正常浓度的1.5倍^[14]。我们的前期研究也发现:115 dB噪声暴露60 min后,豚鼠耳蜗外淋巴液中谷氨酸浓度升高47%,并与SGNs周围突末梢(即传入神经末梢)损伤程度相关^[15];用外源性谷氨酸进行人工外淋巴液灌流,形成耳蜗

体液的高浓度谷氨酸环境,电镜下可见SGNs末梢的质膜加厚、末梢水肿,然后出现SGNs的死亡;用毛细胞释放谷氨酸的抑制剂——腺苷,可减轻SGNs的死亡^[16,17]。国外研究也发现,耳蜗内谷氨酸转运体(存在于胶质细胞胞膜,将外淋巴液中谷氨酸转运至胞内)功能的降低和缺乏可使噪声损伤听力加重^[18]。这些结果都提示:噪声引起内毛细胞过量释放谷氨酸,使传入神经末梢质膜上谷氨酸受体过度或长时间激活,可能是声损伤中SGNs变性消亡的重要原因。

国内外许多研究发现,应用某些谷氨酸受体的拮抗剂可以减轻声暴露后毛细胞和听功能损伤的程度^[19]。我们的前期研究也发现,在噪声暴露(115 dB, 5 h)前和暴露过程中,使用NMDA受体的竞争性拮抗剂可以明显减轻毛细胞丢失、SGNs损伤和听觉脑干诱发电位(auditory brainstem response, ABR)阈值提高的程度^[20]。但是这些在体的拮抗剂干预实验多采用外淋巴灌流给药途经,对动物的内耳结构和完整性破坏较大,与临床的实际应用相距较远。许多实验只观察单一的电生理阈值变化指标,缺乏离体研究资料。犬尿喹啉酸(kynurenic acid, KYNA)是谷氨酸受体的广谱拮抗剂,低浓度时可阻断NMDA受体,高浓度时也可阻断AMPA受体。KYNA可以穿透半透性的生物膜^[3],对声损伤的保护作用未见实验报道。本实验采用完整圆窗膜给药途径,在体研究KYNA在声损伤中对听功能[ABR及听神经复合动作电位(compound action potential, CAP)阈值、强度-幅值函数和潜伏期]的影响和毛细胞、传入神经末梢超微结构损伤的作用;离体研究外源性谷氨酸对分离的SGNs的毒性作用,以探讨谷氨酸及其受体在噪声暴露引起SGNs损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 KYNA、型胶原酶、刀豆蛋白A、谷氨酸、多聚甲醛和戊二醛均购自Sigma公

司, Hanks' 液购自 Gibco 公司, 戊巴比妥钠购自上海化学试剂公司。

1.2 动物分组 健康杂色雄性豚鼠 45 只, 体重 250~300 g, 耳廓反射正常。随机分为生理盐水(NS, 0.9%, 10 μ L)组, NS (0.9%, 10 μ L) + 噪声组和 KYNA (5 mmol/L, 10 μ L) + 噪声组。每组 15 只。

1.3 圆窗给药及噪声暴露 参照 Khan 等^[21]的方法, 动物用 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg, i.p.)麻醉后, 电热毯包裹, 维持肛温(38 ± 0.5)。严格无菌操作下, 耳后切口, 暴露右侧听泡, 在体视显微镜下, 找到圆窗龛, 将微量进样器放在圆窗龛, 使液体通过圆窗膜缓缓渗入耳蜗鼓阶, 维持圆窗表面朝上体位 10 min。最后消毒, 缝合切口。动物置于通风良好的小型隔音箱(120 cm \times 60 cm \times 60 cm)内, 箱壁由双层钢板组成, 中间填充泡沫隔音材料, 舱内背景噪声 40 dB SPL。噪声由噪声发生器(B&K 1405)产生, 经功率放大器(FJG600-1)后, 输入扬声器。扬声器置于箱内侧壁和顶壁。用 4145 微型话筒连接 B&K 2610 频率放大器监测声压, 测试系统用 124 dB 活塞发生器校准。隔音箱内任何点声压均匀度误差不超过 ± 1 dB。噪声中心频率为 4 kHz 的倍频程噪声, 强度为 110 dB SPL, 暴露 1 h。

1.4 听功能指标测试

1.4.1 ABR 测试 在声电屏蔽的测听室内, 采用 Spirit 2000 诱发电位仪(Nicolet, 美国)记录 ABR 反应阈值。测试豚鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉后, 记录电极置于外耳道口后上缘皮下, 参考电极置于颅顶, 接地电极置于鼻尖。采用短声(click)和短纯音(tone burst)(2、4、6、8 kHz)刺激, THD-39P 型耳机给声。Click 时程 0.1 ms, 重复速率 11.1 次/s; 纯音上升下降时间 0.1 ms, 扫描时间 10 ms, 滤波带宽 100~3 000 Hz, 叠加 128 次平均。以刚出现 ABR 波形中 波所需最低声强度为阈值。以实验后和实验前 ABR 阈值的差值为阈移。同时记录实验前、后 波的幅值。

1.4.2 CAP 测试 实验方法同上, 记录 click 和短纯音(2、4、6、8 kHz)刺激时的 CAP 阈值。以刚出现 N1 波形所需最低声强度作为阈值, 以实验后和实验前 CAP 阈值的差值为阈移。选择波形中峰值最高的 N1 波幅值作为 CAP 幅值, 并测试 CAP 阈值时的潜伏期(N1 latency)。

1.5 透射电镜标本制备 在听功能测试后, 动物断头取出耳蜗, 行耳蜗内 1% 多聚甲醛和 2% 戊二

醛 1:1 混合液灌流后, 置于该混合液中 4 过夜。解剖显微镜下剥去耳蜗外壳, 剥离完整的基底膜, 经过漂洗、后固定、脱水、浸透, Epon812 平板包埋。经修块和定位后行超薄切片, 片厚 700 \AA 。切片经铀和铅染色, 透射电镜观察毛细胞内超微结构。

1.6 SGNs 分离 豚鼠 20% 戊巴比妥钠麻醉后断头, 打开听泡, 暴露耳蜗于 Hanks' 液中, 在显微镜下去除骨性蜗壳, 暴露蜗轴, 游丝镊取出蜗轴, 剥离血管纹等结构, 将蜗轴放入 0.1 mg/mL 的 型胶原酶中, 室温消化 10 min, 用 Hanks' 液洗涤、终止消化。将蜗轴碾碎, 以抛光玻璃吸管吹打, 得到细胞悬液, 接种于事先涂有刀豆蛋白 A 的培养皿上。

1.7 统计学处理 所有的数据用 means \pm SEM 表示, 采用 EXCEL, 双项差别进行配对 *t* 检验, 多项之间的差别采用单因素方差分析等方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 KYNA 对噪声致豚鼠听功能损伤中 ABR、CAP 阈移的影响

NS 组豚鼠在实验前、后听阈稳定, 几乎无阈移; NS + 噪声组豚鼠噪声暴露于 click 及短纯音(2、4、6、8 kHz), ABR 的阈移达 30~39.5 dB, CAP 阈移为 29~36.5 dB; KYNA + 噪声组的 ABR 阈移为 7.5~11 dB, CAP 阈移为 6.5~13.5 dB。NS + 噪声组豚鼠 ABR、CAP 的阈移显著大于 NS 组和 KYNA + 噪声组, 并有统计学差异($P < 0.05$)(图 1)。NS 组豚鼠在圆窗给予 NS 后, ABR 和 CAP 听阈稳定, 毛细胞、毛细胞/传入神经突触和 SGNs 形态正常, 提示本实验采用的手术方法对耳蜗功能和结构都未构成损害。

2.2 KYNA 对噪声致豚鼠听功能损伤中 ABR、CAP 幅值的影响

整个实验过程中, NS 组豚鼠在相同刺激强度的 click 诱发的 ABR 波及 CAP N1 波幅值较稳定, 幅值随刺激强度减小而近似线性降低; NS + 噪声组豚鼠在噪声暴露后, 90、80、70、60、50、40、30 dB click 诱发的 ABR 波及 CAP N1 波幅值与暴露前比较明显下降, 强度-幅值输入输出函数下移; KYNA + 噪声组豚鼠噪声暴露后各强度 click 诱发的 ABR 波及 CAP N1 波幅值与暴露前比较,

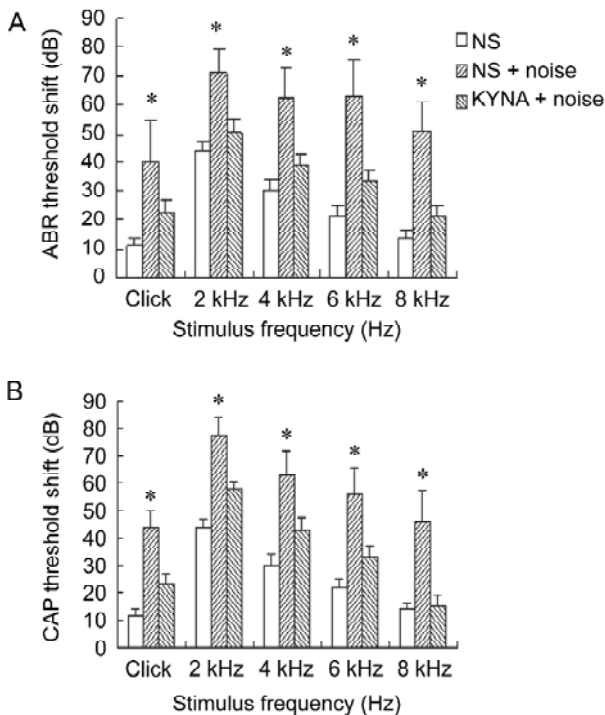


图 1. KYNA 对噪声致听觉脑干诱发电位阈移和听神经复合动作电位阈移的影响

Fig. 1. Effect of KYNA on noise-induced threshold shifts of the auditory brainstem response (A) and compound action potential (B). * $P < 0.05$ vs NS group and KYNA + noise group.

下降不明显, 和 NS + 噪声组相比有显著差异($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 KYNA 对噪声致豚鼠听功能损伤中 CAP 的 N1 波潜伏期的影响

NS 组豚鼠在整个实验过程中 CAP N1 波潜伏期在 0.8~1.6 ms 范围, 随刺激强度减弱而延长; NS + 噪声组豚鼠在噪声暴露后, 90、80、70、60、50、40、30 dB click 诱发的 N1 波的潜伏期, 与暴露前比较明显延长, 强度 - 潜伏期输入输出函数上移; KYNA + 噪声组豚鼠各强度 click 诱发的 CAP 的 N1 波潜伏期在噪声暴露后略有延长, 但明显短于 NS + 噪声组($P < 0.05$), 和暴露前比较无统计学差异($P > 0.05$)(图 3)。

2.4 KYNA 对噪声致豚鼠耳蜗毛细胞、毛细胞 / 传入神经突触损伤的影响

每组动物实验后立即取耳蜗, 在透射电镜下进行耳蜗毛细胞、毛细胞 / 传入神经突触超微结构的形态学观察。NS 组豚鼠外毛细胞(outer hair cells, OHCs)呈试管状, 形态正常, 胞膜光滑完整, 胞内无水肿、空泡和变性; 内毛细胞 / 传入神经突触

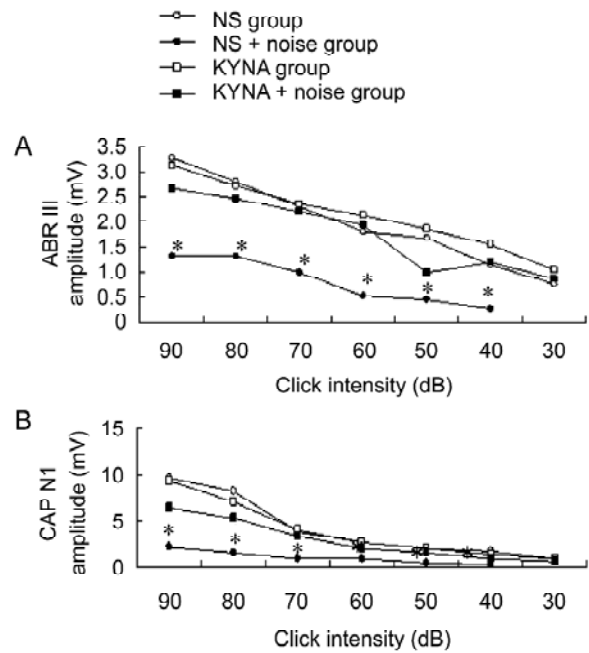


图 2. KYNA 对噪声致听觉脑干诱发电位幅值和听神经复合动作电位幅值的影响

Fig. 2. Effect of KYNA on noise-induced amplitudes of the auditory brainstem response (A) and compound action potential (B).

* $P < 0.05$ vs KYNA + noise group.

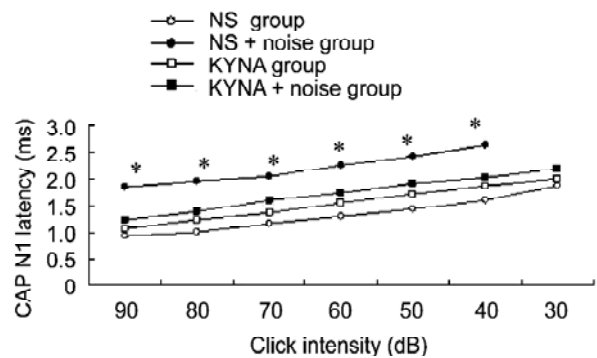


图 3. KYNA 对噪声致听神经复合动作电位 N1 波潜伏期的影响

Fig. 3. Effect of KYNA on noise-induced N1 latency of compound action potential. * $P < 0.05$ vs KYNA + noise group.

形态结构正常, 突触前、后膜无增厚, 电子密度正常, 突触间隙内无异物物质, 传入神经末梢无水肿, 末梢内线粒体结构正常(图 4); NS + 噪声组豚鼠 OHCs 水肿样变性, 胞膜轻微外凸, 胞膜下出现小空泡, 胞内出现大空泡, 毛细胞 / 传入神经突触的间隙稍微变宽, 传入神经末梢明显水肿, 透明度增加, 末梢内出现多个空泡, 线粒体肿胀, 空

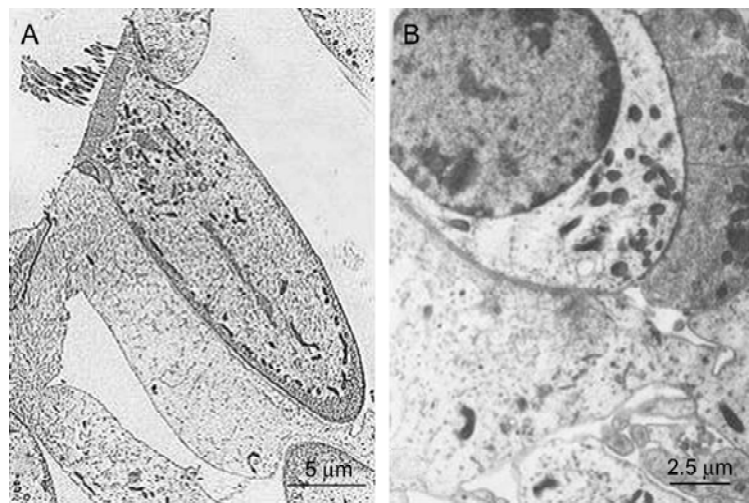


图 4. 生理盐水组外毛细胞、毛细胞 / 传入神经突触透射电镜图

Fig. 4. Transmission electron microscopy pictures of one outer hair cell and the hair cell/afferent synapse in the saline group. A: The outer hair cell displayed normal appearance and structure. Scale bar, 5 μm . B: The hair cell/afferent synapse showed normal structure without swelling and intracellular vacuoles. Scale bar, 2.5 μm .

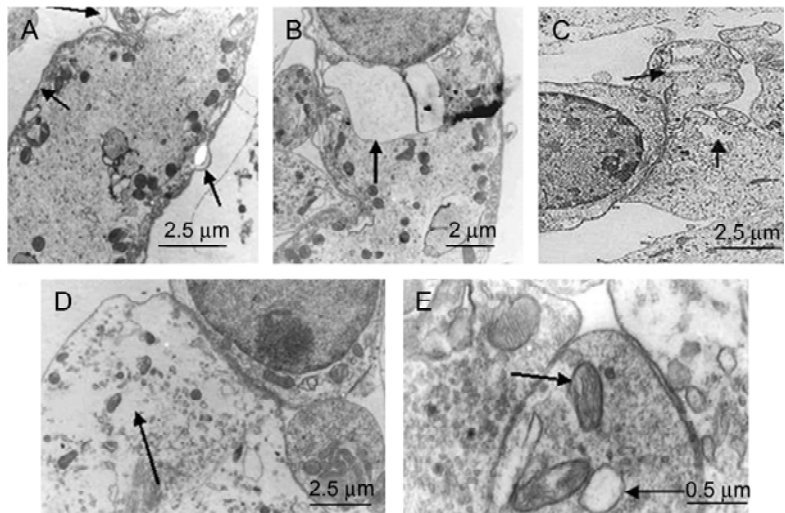


图 5. NS + 噪声组外毛细胞、毛细胞 / 传入神经突触透射电镜图

Fig. 5. Transmission electron microscopy pictures of the outer hair cell and the hair cell/afferent synapse in NS + noise group. A: The outer hair cell showed swelling with small vacuoles beneath the membrane (arrows). Scale bar, 2.5 μm . B: A large vacuole appeared in the cytoplasm of one outer hair cell. Scale bar, 2 μm . C: Some relative large vacuoles in the afferent dendrites. Scale bar, 2.5 μm . D: The afferent dendrites had a severe swelling appearance. Scale bar, 2.5 μm . E: The mitochondria in the afferent dendrites showed edema with vacuoles inside. Scale bar, 0.5 μm .

泡形成，嵴结构消失(图 5)；KYNA + 噪声组豚鼠 OHCs 形态结构正常，胞膜下和胞内均未见空泡，耳蜗毛细胞 / 传入神经突触超微结构的形态学正常，与 NS 组豚鼠无明显差别(图 6)。

2.5 谷氨酸对急性分离的豚鼠单离 SGNs 的毒性作用

急性分离豚鼠的 SGNs，在正常培养液中形态

正常，为双极神经元，胞体略呈椭圆型，胞膜光滑，胞浆光亮，胞核染色较深。此正常形态可维持 5~6 h。加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度的谷氨酸后 1 个半小时，SGNs 逐渐出现水肿，胞膜皱缩，胞浆失去光亮，胞核变形。部分 SGNs 高度水肿，细胞呈不规则形状，胞浆暗淡，最后发展至死亡(图 7)。

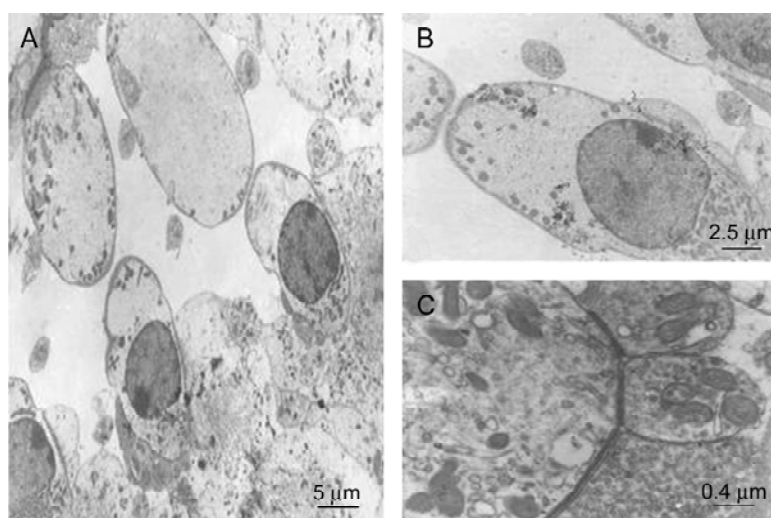


图 6. KYNA + 噪声组外毛细胞、毛细胞 / 传入神经突触透射电镜图

Fig. 6. Transmission electron microscopy pictures of the outer hair cells and the hair cell/afferent synapse in KYNA + noise group. A, B: The outer hair cells displayed normal appearance without swelling and vacuoles inside. The hair cell/afferent synapse showed normal structure. Scale bar, 5 μm and 2.5 μm , respectively. C: There was no swelling and vacuoles in the dendrites and the mitochondria had normal structure. Scale bar, 0.4 μm .

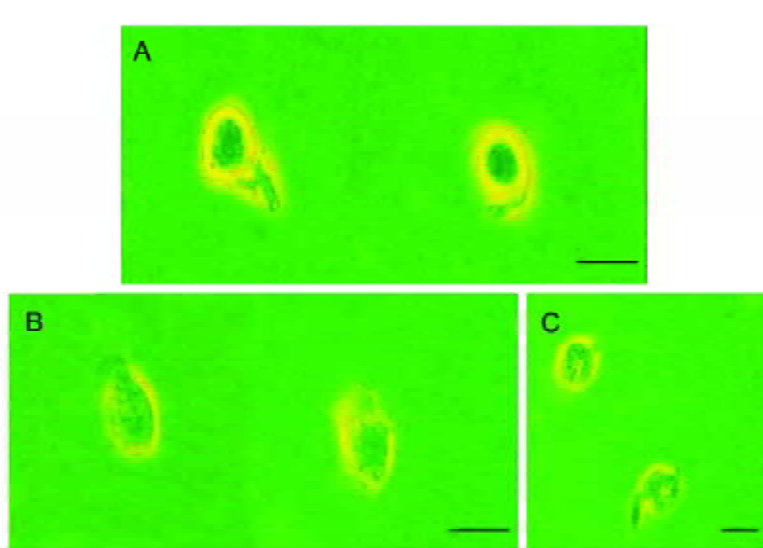


图 7. 外源性谷氨酸对豚鼠单离螺旋神经节细胞的毒性作用

Fig. 7. The toxic effect of glutamate on the isolated spiral ganglion neurons of guinea pigs. A: The isolated spiral ganglion neurons in the normal medium showed normal appearance. Scale bar, 25 μm . B: Spiral ganglion neurons showed swelling and vacuoles 1 h after application of glutamate in the medium. Scale bar, 25 μm . C: Degeneration and death of spiral ganglion neurons after application of glutamate. Scale bar, 25 μm .

3 讨论

SGNs 是听觉传入的初级神经元，在听觉形成过程中起到重要作用^[22]。在噪声环境下，SGNs 会出现变性、消亡，其中的机制尚不清楚，但至少可以排除以下两点：(1) SGNs 被“包埋”在耳蜗骨螺旋板下的结缔组织内，声波在基底膜上产生的行波不会带动它们振动。因此，高强度的噪声引起

的机械损伤可以造成不同程度的盖膜 - 毛细胞的破坏，却不能损伤 SGNs^[2]。(2) 听觉初级传入突触处的多普勒测试表明，噪声暴露前后并未有血液流速、红细胞密度和血液黏度等血液动力学参数的变化，因而也排除了噪声致血液运输障碍引起的 SGNs 损伤^[23]。以往研究发现，作为听觉初级传入的化学性递质，谷氨酸的大量释放或再循环不彻底

对突触后的传入神经末梢具有神经毒性，其中谷氨酸受体发挥了重要作用^[24,25]；我们的前期研究也证实噪声暴露会引起耳蜗内过量谷氨酸的释放。这些结果都提示了谷氨酸及其受体在噪声致型SGNs的损伤中可能起到重要作用。

在本研究中，NS + 噪声组动物噪声暴露后click及短纯音(2、4、6、8 kHz)引起ABR阈移在30~39.5 dB，CAP阈移为29~36.5 dB，造成了严重的听力损失，ABR和CAP的阈移十分接近，表明听力损伤主要起源于耳蜗，脑干听觉传导通路尚未形成损害；给予KYNA的动物，ABR阈移在7.5~11 dB，CAP阈移为6.5~13.5 dB，与NS + 噪声组比较，听功能损伤明显减轻，且两者之间存在显著性差异($P < 0.05$)。该结果说明，运用谷氨酸受体的广谱拮抗剂KYNA后，噪声性阈移程度减轻，NIHL得到一定程度的保护。同时也说明，NIHL确和谷氨酸受体的过度激活有关，抑制这种过度激活就能发挥保护作用。

CAP是多个毛细胞换能，再经过突触传递后的终产物。CAP N1波的潜伏期主要和毛细胞/传入神经突触传递的过程有关。正常情况下，随着刺激强度的增强，N1波潜伏期缩短，但至少长于一个突触延搁(0.5 ms)。本实验正常动物N1波潜伏期在0.8~1.6 ms范围，随着刺激强度的增强而缩短。NS + 噪声组动物噪声暴露后，各强度click诱发的N1波的潜伏期与暴露前比较明显延长，说明毛细胞/传入神经突触传递的过程延长，这种突触延搁时间的延长应和噪声引起的传入神经末梢水肿、末梢内空泡形成和线粒体的病理改变有关，而肿胀与AMPA受体被谷氨酸过度或长时间激活有关。AMPA受体是离子通道型受体，激活后通道打开，胞外 Na^+ 和 Cl^- 进入末梢内，提高了胞内渗透压，带动水进入末梢，形成末梢的水肿。KYNA + 噪声组动物噪声暴露后，各强度click诱发的N1波的潜伏期与暴露前比较接近，无明显延长，形态学检查表明该组毛细胞/传入神经突触结构基本正常，无传入神经末梢水肿、末梢内空泡形成和线粒体的病变等表现。形态和功能的检查结果说明，应用谷氨酸受体拮抗剂KYNA，阻断受体过度激活，可以减轻SGNs周围突末梢的损伤，从而保护听力。

CAP幅值的输入-输出函数是反映有功能的SGNs同步化放电的重要指标^[26]。其数目减少或功能的损伤，导致同步化发放电的数目减少，可引起

幅值降低，函数曲线下移。本实验NS + 噪声组动物在噪声暴露后，90、80、70、60、50、40、30 dB click诱发的CAP N1波幅值以及ABR波幅值与暴露前比较明显下降，函数曲线下移幅度较大，提示SGNs同步化放电功能减弱。该组动物SGNs传入神经末梢的形态学损伤的检查结果也符合这种功能损伤的表现。KYNA + 噪声组动物在噪声暴露后，各强度click诱发的CAP N1波幅值与暴露前比较，下降不明显，和NS + 噪声组相比有显著差异，说明KYNA在声损伤中，通过抑制谷氨酸受体保护SGNs，使其免除谷氨酸的神经毒性和同步放电能力的降低。本实验进一步提示，噪声致毛细胞过度释放谷氨酸，导致SGNs轴突的水肿，空泡变性，是形成听功能受损伤的结构基础之一。

另外，本实验发现，NS + 噪声组动物在噪声暴露后OHCs的胞膜下和胞浆内出现空泡，细胞肿胀。应用KYNA后，KYNA + 噪声组动物在同样强度噪声暴露后，未见到OHCs的这种病变。该结果提示，OHCs的胞膜也可能存在谷氨酸受体，内毛细胞释放的谷氨酸可能通过外淋巴液的扩散，作用于OHCs，引起OHCs的神经毒性，而KYNA可预防这种损伤。

本研究在离体实验中，观察了外源性谷氨酸对分离的SGNs的影响。SGNs在正常培养液和适宜的条件下可存活20 h。细胞胞膜光滑完整，胞浆光亮，核染色较深，核膜形态正常。在给予外源性100 $\mu\text{mol/L}$ ，1 000 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸后，出现细胞水肿，胞膜皱缩，胞浆失去光亮，空泡形成。部分细胞高度水肿，呈不规则形状，胞浆暗淡，最后发展至死亡。这种结果说明，和中枢神经元相同，过量的细胞外谷氨酸可对周围神经元——SGNs形成毒性作用。和中枢神经元的损伤性质和顺序相似，谷氨酸在胞外堆积，先引起SGNs的水肿，然后胞膜、胞浆和核的病变，最后死亡。我们在前期研究中发现，对单离的SGNs，将低浓度(1 $\mu\text{mol/L}$ ，10 $\mu\text{mol/L}$)谷氨酸加入培养液中，光学显微镜下未能观察其形态学改变，也未能观察到谷氨酸的内向电流(未发表资料)。本实验使用高浓度的外源性谷氨酸，才观察到离体毛细胞细胞水肿，胞膜皱缩，空泡，最后发展至死亡的过程。这可能是离体和体细胞不同的内环境，及谷氨酸受体在细胞浆膜和神经末梢质膜分布的密度不同所致。

由此得出结论：噪声暴露可引起豚鼠听功能损

伤和 ABR、CAP 幅值和潜伏期的变化, 并引起毛细胞 / 传入神经突触的结构破坏和 SGNs 变性、死亡, 这种损伤可能与噪声暴露引起谷氨酸的过度释放有关; 谷氨酸通过其受体介导导致 SGNs 损伤, 谷氨酸受体的广谱拮抗剂 KYNA 可减轻噪声对 SGNs 的损伤。

参考文献

- Kotarbinska E. Hearing protectors in prevention of occupational hearing loss. *Med Pr* 2000; 51(2): 185-196.
- Chertoff ME, Yi X, Lichtenhan JT. Influence of hearing sensitivity on mechano-electric transduction. *J Acoust Soc Am* 2003; 114 (6 Pt 1): 3251-3263.
- Eybalin M. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 1993; 73(2): 309-373.
- Puel JL. Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* 1995; 47(6): 449-476.
- Glowatzki E, Fuchs PA. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 2002; 5(2): 147-154.
- Ryan AF, Brumm D, Kraft M. Occurrence and distribution of non-NMDA glutamate receptor mRNAs in the cochlea. *Neuroreport* 1991; 2(11): 643-646.
- Niedzielski AS, Wenthold RJ. Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci* 1995; 15(3 Pt 2): 2338-2353.
- Usami S, Matsubara A, Fujita S, Shinkawa H, Hayashi M. NMDA (NMDAR1) and AMPA-type (GluR2/3) receptor subunits are expressed in the inner ear. *Neuroreport* 1995; 6 (8): 1161-1164.
- Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP. Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* 1996; 15; 16(14): 4457-4467.
- Koch RA, Barish ME. Perturbation of intracellular calcium and hydrogen ion regulation in cultured mouse hippocampal neurons by reduction of the sodium ion concentration gradient. *J Neurosci* 1994; 14(5 Pt 1): 2585-2593.
- Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 81 (3): 163-221.
- Diao MF (刁明芳), Gao WY. The effect of NO in noise-induced hearing loss: research progress. *Chin J Ophthalmol Otolaryngol* (中国眼耳鼻喉科杂志) 2004; 4(3): 191-193 (Chinese, English abstract).
- Diao MF (刁明芳), Liu HY, Zhang YM, Gao WY. Changes in antioxidant capacity of the guinea pig exposed to noise and the protective effect of α -lipoic acid against acoustic trauma. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2003; 55(6): 672-676 (Chinese, English abstract).
- Jager W, Gojny M, Herrera-Marschitz M, Brundin L, Fransson A. Noise-induced aspartate and glutamate efflux in the guinea pig cochlea and hearing loss. *Exp Brain Res* 2000; 134(4): 426-434.
- Gao WY, Jiang YP. Effect of noise on concentration of amino acid in perilymph of guinea pig cochlea. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报) 2002; 23(1): 41-44.
- Zhang L (章岚), Wang XP, Song CR, Song MH, Jiang J. Effect of adenosine on perilymph glutamate concentration and compound action potentials in guinea pigs exposed to noise. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报) 2005; 26(2): 164-166 (Chinese, English abstract).
- Zhang L, Gao WY. Protective effect of adenosine on temporary threshold shift of audition caused by intensive white noise in guinea pigs. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报) 2001; 22(7): 624-627.
- Hakuba N, Koga K, Gyo K, Usami SI, Tanaka K. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci* 2000; 20(23): 8750-8753.
- Chen GD, Kong J, Reinhard K, Fechter LD. NMDA receptor blockage protects against permanent noise-induced hearing loss but not its potentiation by carbon monoxide. *Hear Res* 2001; 154(1-2): 108-115.
- Diao MF (刁明芳), Zhang YM, Liu HY, Han H, Gao WY. Observation on the protective effect of MK-801 against hearing loss in acoustic trauma. *J Clin Otorhinolaryngol* (临床耳鼻喉科杂志) 2005; 19(1): 27-30 (Chinese, English abstract).
- Khan MJ, Seidman MD, Quirk WS, Shivapuja BG. Effects of kynurenic acid as a glutamate receptor antagonist in the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257(4): 177-181.
- Beutner D, Moser T. The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing. *J Neurosci* 2001; 21(13): 4593-4599.
- Seidman MD, Quirk WS, Shirwany NA. Mechanism of alteration in the microcirculation of the cochlea. *Ann NY Acad Sci* 1999; 884: 226-232.
- Jager W, Gojny M, Herrera-Marschitz M, Brundin L, Fransson A, Canlon B. Noise-induced aspartate and glutamate efflux in the guinea pig cochlea and hearing loss. *Exp Brain Res* 2000; 134(4): 426-434.
- Pujol R, Puel JL. Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann NY Acad Sci* 1999; 884: 249-254.
- Gao WY (高文元), Chi FL, He BK. *Clinical Auditory Physiology*. Beijing: People's Military Medical Press, 2004, 130-137 (Chinese).