

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201803011

· 论 著 ·

NADPH 氧化酶在鼓室硬化症大鼠模型中的表达

胡 璟,杜政德,杨 琼,刘 飞

(深圳市南山区人民医院 深圳大学第六附属医院 耳鼻咽喉科,广东 深圳 518052)

摘 要: **目的** 研究 NADPH 氧化酶(NOX, NOX2 及 NOX3)在鼓室硬化症大鼠模型的中耳组织中的表达,探讨鼓室硬化症氧化性损伤的发生机制。**方法** 20 只雄性、体重 250 ~ 300 g 的 Sprague-Dawley 大鼠随机分成两组(实验组 15 鼠 30 耳,对照组 5 鼠 10 耳):①实验组:鼓膜后上象限人工制造 2 mm 大小穿孔,连续饲养 18 d;②对照组:不做任何处理,连续饲养 18 d。造模完成后,利用内镜检查两组大鼠鼓膜形态;利用 RT-PCR 法检测 NOX 基因的表达;采用列联表二项分类逻辑回归分析,分析鼓膜穿孔和 NOX 基因表达的相关性以及鼓室硬化和两种 NOX 基因表达的相关性。**结果** 实验组 15 只大鼠全部造模成功,对照组大鼠无一出现鼓膜钙化及浑浊;RT-PCR 检验大部分实验组大鼠发现 NOX2 及 NOX3 基因同步表达;而对照组大部分大鼠 NOX2 及 NOX3 基因表达均为阴性,通过列联表二项分类逻辑回归分析,提示鼓膜穿孔可致 NOX2 及 NOX3 基因的表达增强($P < 0.01$),而 NOX 基因的激活与鼓室硬化症的发生相关,并具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 在穿孔导致的鼓室硬化症发病过程中,NOX 是活性氧的来源之一,可能是导致鼓室硬化氧化性损伤发生的重要原因。

关 键 词: NADPH 氧化酶;鼓室硬化症;氧化性损伤
中图分类号:Q786;R764. 29 文献标识码:A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2018,24(3):248-251,256]

Expression of NADPH oxidase in a rat model of tympanosclerosis

HU Jing, DU Zheng-de, YANG Qiong, LIU Fei

(Department of Otolaryngology, Shenzhen Nanshan People's Hospital and the 6th Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518052, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of NADPH oxidases (NOX2 and NOX3) in an experimental rat model of tympanosclerosis and their possible roles in the oxidative damage of this disease. **Methods** Twenty healthy, adult, male, Sprague-Dawley rats (40 ears) weighing 250 – 300 g, were randomly divided into two groups. Of them, 5 (10 ears) were chosen to serve as controls, and the other 15 (30 ears) were used in the experimental group. On the first day, rats in the experimental group received myringotomy to the superior-posterior quadrant of the tympanic membrane of both ears making a perforation of 2 mm diameter, while rats in the control group got no operation. All the rats received otoscopy and were sacrificed on the 18th day. Gene expressions of NOXs in middle ear tissue were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Two-way contingency table logistic regression analysis was adopted to analyze the relationship between tympanic membrane perforation and expression of NOX genes as well as that between tympanosclerosis and expression of NOX genes. **Results** At the 18th day, sclerotic changes (calcification and opacification) of tympanic membrane were observed in all the rats of the experimental group while no evidence of sclerotic changes in those of the control group. RT-PCR showed coincident expressions of NOX2 and NOX3 in most specimens of the experimental group with negative expressions in most specimens of the control group. Two-way contingency table logistic regression analysis revealed that tympanic membrane perforation may activate the expression of NOX genes ($P < 0.01$), which may be related to the occurrence of tympanosclerosis ($P < 0.01$). **Conclusion** In the process of tympanosclerosis caused by tympanic membrane perforation, NOX may be an important source of reactive oxygen species which may induce oxidative damage of tympanosclerosis.

Key words: NADPH oxidase; Tympanosclerosis; Oxidative damage
[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2018, 24(3): 248 – 251, 256]

患者,其主要临床表现为鼓膜增厚、浑浊、钙化斑形成,并可累及听骨链、鼓岬、上鼓室及前庭窗等部位。鼓室硬化症的持续进展,可导致鼓膜传音功能减弱,严重的病例可以出现听骨链固定和破坏,造成听力严重下降。对于累及听骨链的重症患者,手术是唯一的治疗方式,风险较大,可导致面瘫和内耳损伤,且病灶难以完全清除,有再次复发的风险。

Mattsson 等^[1]学者通过一系列动物实验发现,患有急性中耳炎和健康鼓膜切开后均出现明显的鼓膜硬化表现,而未经鼓膜切开的急性中耳炎发生鼓膜硬化程度反而较轻,考虑鼓膜切开是导致发病的重要原因。使用氧自由基清除剂可抑制鼓室硬化的发生^[2],提高中耳腔氧气浓度可以加重鼓室硬化的程度^[3],从而提出鼓室硬化的病因可能是鼓膜穿孔引起过度通气,使中耳氧分压增加导致氧自由基产生增多造成氧化应激损伤。但导致这种氧化性应激和黏膜变性的活性氧来源并不清楚。NADPH 氧化酶(NOX)是活性氧的重要来源。NADPH 氧化酶不仅存在于免疫系统,其不同的亚型也存在于其他类型的细胞,发挥重要的生理功能。NOX2 及 NOX3 是其中两个重要亚型,其总体结构有高度相似性^[4],并有研究发现二者在毗邻中耳的耳蜗组织中均有表达,并参与老化大鼠听觉系统氧化损伤的病理过程^[5]。

本研究模拟鼓膜切开手术选择 SD 大鼠造模,通过观察鼓膜形态判断造模是否成功;使用 RT-PCR 检测对比造模的大鼠和对照组大鼠中耳组织 NOX2 及 NOX3 的表达,了解鼓膜穿孔对中耳 NOX 基因表达的影响;分析 NOX2 及 NOX3 在造模成功大鼠和对照组大鼠的表达差异,了解二者激活在鼓室硬化症中的作用,为下一步开展靶向性氧化应激干预预防鼓室硬化症打下基础。

1 材料与方法

1.1 鼓室硬化症大鼠模型的构建

选择由广东省实验动物中心提供的健康 SPF (Specific pathogen Free) 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 20 只,检测无中耳疾病,耳廓反射灵敏,体重 250 ~ 300 g,进行适应性喂养 1 周后随机分为两组:①实验组 15 只(30 耳):第 1 天腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)全身麻醉满意后于鼓膜后上象限穿刺制造直径 2 mm 的穿孔,连续饲养 18 d;②对照组 5 只(10 耳):同等条件下饲养 18 d,

不做任何处理。所有动物均饲养在室温约 20 ~ 22℃,12 h 昼夜交替的环境中,自由进食饮水。两组动物均无噪声暴露史,无其他药物使用史。

1.2 鼓室硬化症大鼠模型的鼓膜形态学检查

动物准备及内镜检查:第 18 天两组大鼠腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)全身麻醉满意后,耳内镜行双侧鼓膜形态学观察,并对钙化情况进行评估。未见硬化灶,透明度好判断为阴性,出现钙化斑,或肉眼可见的鼓膜透明度下降判断为阳性。

1.3 NOX3 和 NOX2 mRNA 表达的检测

1.3.1 总 RNA 的提取 两组大鼠肌肉注射过量水合氯醛麻醉后处死,快速取出双侧听泡,显微镜下快速刮取中耳黏膜软组织放入装有 TRIzol (TaKaRa, 大连, 中国)的匀浆器中,冰上充分匀浆,提取总 RNA。

1.3.2 逆转录生成 cDNA 使用逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo 公司)将 RNA 逆转录成 cDNA。

1.3.3 PCR 检测 NOX3 和 NOX2 mRNA 的表达 运用 Taq MasterMix (CWBI0 公司)检测中耳黏膜及软组织 NOX3 和 NOX2 mRNA 的表达,反应总体积:20 μ l。反应条件:①预变性:94℃ 120 s,共 1 个循环;②PCR 反应:94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环;③终延伸 72℃,2 min。所用引物序列如下: NOX3: 上游引物: 5'-TCGACGAATGGCAG-GAAGC-3'; 下游引物: 5'-ATGGATGGGCACTG-GATAAAG-3'; NOX2: 上游引物: 5'-ACATTTTCGT-CAAGCGTCCC-3'; 下游引物: 5'-CCCAGCTCCCAC-TAACATCA-3'; 1% 凝胶电泳法检测目标条带的表达。

1.4 统计学方法

使用 IBM SPSS Statistics(第 22 版)统计软件进行二项逻辑回归分析,评价穿孔操作对 NOX 基因激活的影响,以及 NOX 基因激活和鼓室硬化之间的关系。

2 结果

2.1 鼓室硬化症大鼠造模结果

实验结束时对照组大鼠鼓膜均未出现浑浊及钙化斑(图 1);实验组大鼠鼓膜穿孔均已愈合,并出现不同程度肉眼可见的钙化斑块或局部鼓膜透明度下降,且病变范围并不局限于穿孔周围,说明鼓室硬化症造模成功(图 2)。

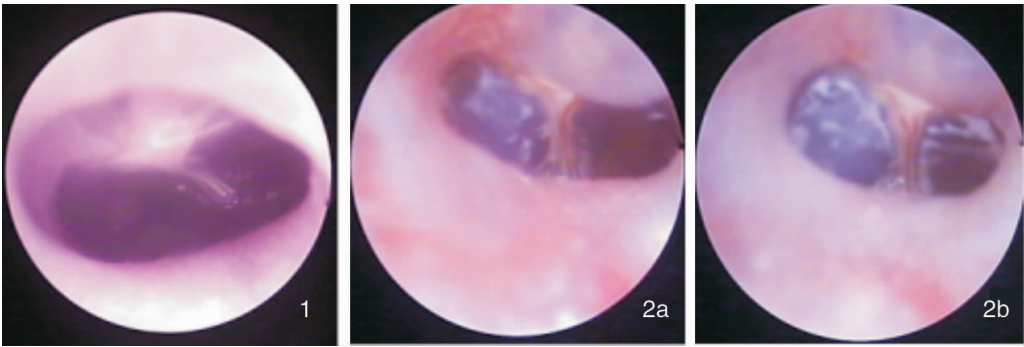


图 1 对照组的鼓膜影像,可见鼓膜透亮,无明显病灶形成 图 2 实验组造模成功大鼠的鼓膜 2a:可见穿孔周围钙化明显,其他部分病变情况较轻;2b:除穿孔位置外,锤骨柄周围及前上象限的鼓膜均可见明显钙化斑形成

2.2 NOX3 和 NOX2 mRNA 的表达

逆转录产物经凝胶电泳检测发现 NOX3 和 NOX2 目标条带的表达(图 3、4)

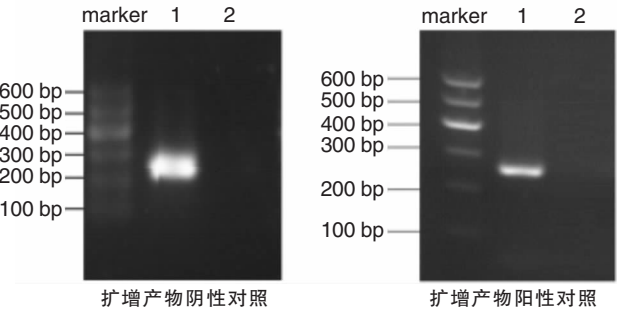


图 3 NOX2 扩增产物片段 图 4 NOX3 扩增产物片段

经过检测,对照组发现 9 耳标本 NOX2 及 NOX3 基因表达均呈阴性,1 耳标本 NOX2 和 NOX3 基因表达同时阳性;实验组 23 耳中耳标本 NOX2 及 NOX3 基因出现同时表达阳性,其余 7 耳标本中 NOX2 及 NOX3 基因表达检测均呈阴性。详细结果如表 1~3。

表 1 NOX3 基因和 NOX2 基因表达的一致性 (耳)		
项目	NOX2 阳性标本	NOX2 阴性标本
NOX3 阳性	24	0
NOX3 阴性	0	6
合计	24	6

表 2 鼓膜穿刺对 NOX2(NOX3) 基因表达的影响 (耳)		
分组	NOX2(NOX3) 阳性	NOX2(NOX3) 阴性
实验组	23	7
对照组	1	9
合计	24	16

表 3 NOX2(NOX3) 基因表达对鼓室硬化症的影响 (耳)

项目	实验组	对照组
NOX2(NOX3) 阳性	23	1
NOX2(NOX3) 阴性	7	9
合计	30	10

2.3 列联表二项分类逻辑回归分析结果

由表 1 可见,NOX2 基因和 NOX3 基因的表达完全同步。通过列联表二项分类逻辑回归分析鼓膜穿刺对 NOX2(NOX3) 基因表达的影响,结果显示:

在 10 耳未行鼓室穿刺样本中,NOX2(NOX3) 未表达基因占了 9 耳,占未行鼓室穿刺样本的 90.0%,NOX2(NOX3) 表达基因占了 1 耳,占未行鼓室穿刺样本的 10.0%;在 30 耳行鼓室穿刺样本中,NOX2(NOX3) 未表达基因占了 7 耳,占行鼓室穿刺样本的 23.3%,NOX2(NOX3) 表达基因占了 23 耳,占行鼓室穿刺样本的 76.7%。

由于资料中(25%)预期计数小于 5,预期的计数下限为 4.00,所以采用了耶兹校正(连续性校正), χ^2 检验显著性概率值为 $P = 0.001$,表示鼓室穿刺与 NOX2(NOX3) 基因是否表达有显著关联,两个变量之间不是相互独立的。

由于鼓膜穿刺与 NOX2(NOX3) 基因表达均为二分名义变量,二者之间的相关性采用 ϕ 相关,phi 值为 0.589, $P = 0.000$,显示鼓室穿刺与 NOX2(NOX3) 基因表达之间存在显著正相关。

根据对称性量数为 0.385,不区分自变量和因变量,可以增加 38.5% 的预测力,“NOX2(NOX3) 基因表达因变量”的 γ 系数为 0.500,表示根据鼓室穿刺情况预测样本 NOX2(NOX3) 基因是否表达的正确性达 50%。

通过列联表二项分类逻辑回归分析 NOX2(NOX3) 基因表达对鼓室硬化症的影响,结果如下:

在 16 个 NOX2 (NOX3) 未表达的基因中,患鼓室硬化症 7 耳,占 NOX2 (NOX3) 基因表达样本的 43.8%;未患鼓室硬化症 9 耳,占 NOX2 (NOX3) 基因表达样本的 56.3%;在 24 个 NOX2 (NOX3) 表达的基因中,患鼓室硬化症 23 耳,占 NOX2 (NOX3) 基因表达样本的 95.8%;未患鼓室硬化症 1 耳,占 NOX2 (NOX3) 基因表达样本的 4.2%。

由于检测结果中(25%)预期计数小于 5,预期的计数下限为 4.00,所以同样采用耶兹校正(连续性校正), χ^2 检验显著性概率值为 $P=0.001$,提示 NOX2 (NOX3) 基因表达与鼓室硬化症发生有显著的关联存在,两个变量之间不是相互独立的。进一步行 ϕ 相关分析, ϕ 值为 0.589, $P=0.000$,提示 NOX2 (NOX3) 基因表达与鼓室硬化症发病之间存在显著正相关。

根据对称性量数为 0.385,不区分自变量和因变量,可以增加 38.5% 的预测力,“鼓室硬化症因变量”的 γ 系数为 0.200,表示当知道 NOX2 (NOX3) 基因是否表达时可以增加预测样本有无鼓室硬化症的正确性达 20%。

3 讨 论

鼓室硬化症是中耳术后的常见并发症之一,中耳术后的发病率报道为 7.7%~44.1%^[6-8],其中长期置管的患者发病率更高。中耳炎症的慢性刺激学说被多数学者认为是鼓膜硬化最重要的病因,根据这一理论利用细菌接种成功制造鼓室硬化的动物模型^[9],但自 Mattsson 等学者^[1-3]经一系列动物实验提出过度通气导致氧化应激损伤引起鼓室硬化症以来,越来越多的证据表明,氧化应激损伤可能是更重要的原因。

张艳飞等^[9]学者将鼓膜切开和细菌接种两种方式行鼓室硬化症造模的效率并进行对比,发现鼓膜切开法造模成功率明显高于后者;有学者在 2017 年发布的一项大型回顾性临床研究中报道慢性中耳炎手术并发鼓室硬化症的患者中 88.7% 有鼓膜穿孔,无穿孔患者仅占 11.3%;以上证据均提示鼓膜穿孔是诱发鼓室硬化的更重要的因素;而不同方式的鼓膜切开,均可导致中耳鼓室内氧气浓度的增加^[10]和活性氧的增加^[11]。全身和局部应用抗氧化剂如维生素 C、左旋肉碱、咖啡酸苯乙基酯^[12-14]等均显示不同程度抑制鼓室硬化的效果,为这一理论提供了进一步佐证。

本次实验模拟中耳鼓膜切开手术,在大鼠鼓膜后上象限穿刺形成直径 2 mm 大小的穿孔,通过 18 d 的观察,发现所有穿孔的大鼠均未出现鼓膜充血、鼓室流脓等感染表现,穿孔后第 18 天,全部实验组大鼠鼓膜均已经愈合,并出现透明度下降,钙化斑形成,造模成功率 100%。部分大鼠的钙化病灶严重,广泛分布,未受到穿刺损伤,距离穿孔较远的部位同样可出现明显病变。结合以上事实,我们认为,单纯机械刺激或局部炎症不足以解释广泛的病变形成,氧化应激损伤不仅可能是更重要的致病原因,而且可能是一个相对独立的病因。

NADPH 氧化酶是一种黄素细胞色素,为多系统成分,主要包括黄素蛋白、细胞色素 b558 和辅酶 Q 等,它们组成了一个类似于电子传递链样的酶系统,当遇到应激源激活时,NADPH 氧化酶能够将 NADPH 的电子传递给分子氧,生成超氧阴离子,是重要的活性氧来源^[15]。通过鼓膜穿刺与 NOX3 和 NOX2 mRNA 表达的列联表二项分类逻辑回归分析,显示鼓膜穿刺与 NOX3 和 NOX2 mRNA 表达呈显著正相关,差异具有统计学意义($P<0.01$),从而推论,鼓膜穿刺后中耳腔的氧分压增加,有可能激活中耳组织 NOX3 和 NOX2 mRNA 表达。进一步对 NOX3 和 NOX2 mRNA 表达与鼓室硬化症发病的关联进行分析显示,NOX3 和 NOX2 mRNA 表达与鼓室硬化症发病同样存在显著正相关,差异具有统计学意义($P<0.01$);提示 NOX3 和 NOX2 mRNA 表达有可能是鼓室硬化症的病因之一。根据 Mattsson 等^[1]学者的实验基础,我们推论,由于氧分压的增加导致中耳腔广泛的 NOX3 和 NOX2 表达激活,进一步造成氧化应激损伤,有可能是广泛钙化斑形成的原因,其中的详细机制,仍有待进一步的证实。

鼓膜穿孔可造成中耳 NOX3 和 NOX2 mRNA 表达增加,引起的氧化性损伤可能是导致鼓室硬化症发生的重要原因。NOX 有可能成为预防鼓室硬化症的潜在药物靶点。

参考文献:

- [1] Mattsson C, Magnuson K, Hellstrom S. Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis [J]. *Laryngoscope*, 1998, 108 (1 Pt 1): 102-106.
- [2] Mattsson C, Marklund SL, Hellstrom S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1997, 106 (6): 513-518.

(下转第 256 页)