

腺,这一般只在巨大肾癌或肾上极肾癌时才会出现。即使术后有肾上腺转移,国外有文献报道,手术切除转移病灶(肾上腺肿瘤切除),也有较好的疗效。

肾癌根治手术是否同时切除同侧肾上腺始终是泌尿外科医生争论的问题之一,不同的文献有不同的观点。基于本研究的临床观察结果,肾癌肾上腺转移的发生率极低,早期肾细胞癌的发现率显著增加,对肾脏和肾上腺胚胎学、解剖学基础的充分认识以及肾上腺转移采用手术切除能取得良好的疗效的前提下。笔者认为传统的肾癌根治术,即使小肿瘤位于肾上极者,术中切除肾上腺也没有必要。除非术前影像学检查或术中探查发现同侧肾上腺被侵犯或转移。在当前影像学检查非常先进的情况下,术前未发现异常的肾上腺尽可以保留,毕竟在肿瘤根治的前提下,减少创伤、保护尽可能多的脏器功能是外科发展的方向。

参考文献

- Blom JH, van Poppel H, Maréchal JM, *et al.* Radical nephrectomy with and without lymph - node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881[J]. *Eur Urol*, 2009, 55(1): 28 - 34
- Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, *et al.* Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy[J]. *J Urol*, 2004, 171(3): 1066 - 1070
- van Poppel H, Bamelis B, Oyen R, *et al.* Partial nephrectomy for renal cell carcinoma can achieve long - term tumor control[J]. *J Urol*, 1998, 160(3): 674 - 678
- Skinner DG, Colvin RB, Vermilion CD. Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathological study of 309 cases [J]. *Cancer*, 1971, 28(5): 1165 - 1167
- Tsui KH, Shvarts O, Barbaric Z, *et al.* Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511 radical nephrectomies[J]. *J Urol*, 2000, 163(2): 437 - 441
- Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 1969, 101: 297 - 301
- Shalev M, Cipolla B, Guille F, *et al.* Is ipsilateral adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? [J]. *J Urol*, 1995, 153(5): 1415 - 1417
- Sagalowsky AI, Kadesky KT, Ewalt DM, *et al.* Factors influencing adrenal metastasis in renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 1994, 151(5): 1181 - 1184
- Kletscher BA, Qian J, Bostwick DG, *et al.* Prospective analysis of the incidence of ipsilateral adrenal metastasis in localized renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 1996, 155(6): 1844 - 1846
- von Knobloch R, Schrader AJ, Walther EM, *et al.* Simultaneous adrenalectomy during radical nephrectomy for renal cell carcinoma will not cure patients with adrenal metastasis[J]. *Urology*, 2009, 73(2): 333 - 336
- Yap SA, Alibhai SM, Abouassaly R, *et al.* Do we continue to unnecessarily perform ipsilateral adrenalectomy at the time of radical nephrectomy? A population based study[J]. *J Urol*, 2012, 187(2): 398 - 404
- Weight CJ, Kim SP, Lohse CM, *et al.* Routine adrenalectomy in patients with locally advanced renal cell cancer does not offer oncologic benefit and places a significant portion of patients at risk for an asynchronous metastasis in a solitary adrenal gland[J]. *Eur Urol*, 2011, 60(3): 458 - 464
- Miekos E. Connections of superficial and internal adrenal veins[J]. *Int Urol Nephrol*, 1976, 8(4): 277 - 281
- Vaughan ED, Blumenfeld JD, Pizzo JD, *et al.* The adrenal. In: Wash PC(Ed), *campbell's urology* (8th edition) [J]. Saunders, 2002, 3508 - 3510
- Robey EL, Schellhammer PF. The adrenal gland and renal cell carcinoma: is ipsilateral adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? [J]. *J Urol*, 1986, 135(3): 453 - 455

(收稿日期:2013 - 08 - 26)

(修回日期:2013 - 10 - 17)

石杉碱甲对 D - 半乳糖诱导老年性聋的局部抗炎作用

顾 健 李 聪 敖华飞 阮清伟 孔德秋

摘 要 目的 研究石杉碱甲对 D - 半乳糖诱导的老年性聋大鼠的局部抗炎作用。**方法** 将 30 只 SD 雄性大鼠随机平均分为 3 组,均行颈背部皮下连续注射 8 周:D - gal 组予 5% D - 半乳糖(200mg/kg);D - gal + HupA 组予同体积的 5% D - 半乳糖(200mg/kg)和石杉碱甲(0.1mg/kg),对照组予同体积生理盐水。利用免疫组织化学检测耳蜗组织中的施万细胞和 NF - κ B 的

作者单位:201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院耳鼻咽喉 - 头颈外科(顾健、李聪、敖华飞、孔德秋);复旦大学附属华东医院中心实验室(阮清伟)

通讯作者:敖华飞,博士,电子信箱:david5882004@126.com

活化情况;通过定量 RT-PCR 分析检测耳蜗组织中的炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 。结果 与对照组相比,D-gal 组的施万细胞被激活、NF- κ B 活化,而 D-gal + HupA 组的施万细胞和 NF- κ B 变化无差别;同时 D-gal 组和 D-gal + HupA 组相比,D-gal + HupA 组耳蜗组织内 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量明显低于 D-gal 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 石杉碱甲可以抑制 D-半乳糖诱导老年性聋大鼠的耳蜗组织内的施万细胞的激活和 NF- κ B 活化,进而抑制炎症因子的释放,起到局部抗炎作用。

关键词 石杉碱甲 D-半乳糖 老年性聋 NF- κ B 炎症因子

[中图分类号] R764 [文献标识码] A

Effects of Huperzine A on Local Anti-inflammatory of Presbycusis Rats Induced by D-galactose. Gu Jian, Li Cong, Ao Huafei, Ruan Qingwei, Kong Deqiu. Department of Ophthalmology, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Abstract Objective To evaluate effects of Huperzine A on local anti-inflammatory of Presbycusis rats induced by D-galactose. **Methods** A total of 30 Sprague-Dawley male rats were divided into three group. The rats were daily subcutaneously injected for 8 weeks. In D-gal group, rats were received 200mg/kg D-galactose, and in D-gal + HupA group, rats were received both D-galactose (200mg/kg) and Huperzine A (0.1mg/kg) and in Control group, rats were given the vehicle. Immunohistochemistry was performed to detect the activation of Schwann cells and NF- κ B in cochlear tissues. And quantitative RT-PCR analysis was performed to detect inflammatory cytokines of IL-1 β , IL-6, TNF- α in cochlear tissues. **Results** Compared with the control group, the D-gal group showed that the Schwann cells and NF- κ B were activated. There was insignificantly difference in Schwann cells and NF- κ B between the D-gal + HupA group and controls. While compared with the D-gal group and D-gal + HupA group, the content of IL-1 β , IL-6, TNF- α in cochlear tissue of the D-gal + HupA group were significantly lower than the D-gal group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Huperzine A can inhibit the activation of the Schwann cells and NF- κ B in cochlear tissue of Presbycusis induced by D-galactose, thereby inhibiting the release of inflammatory cytokines. Thus plays it a local anti-inflammatory effect.

Key words Huperzine A; D-galactose; Presbycusis; NF- κ B; Inflammatory cytokines

老年性聋又称年龄相关性听力下降,主要指随着年龄的增长,在排除噪音、耳毒性药物和遗传因素的参与情况下,听觉器官随同身体其他组织器官一起发生的老化过程,主要表现为双耳渐进性对称性的感音神经性听力损失,以高频听力下降为主,伴言语识别率降低等^[1]。但迄今为止,老年性聋的防治仍然是尚未解决的难题,近年来最重要的进展是认同氧化应激。石杉碱甲素有“植物中的黄金”之称,已经在临床上用于治疗阿尔茨海默病等神经退行性疾病^[2,3]。故本实验组拟通过注射 D-半乳糖模拟机体衰老机制制备老年性聋模型,具体观察石杉碱甲是否具有局部抗炎作用。

材料与方法

1. 实验动物:清洁级 SD 雄性大鼠 30 只,体重为 220 ~ 250g,购自上海复旦大学实验动物科学部,合格证编号:[SCXK(沪)2009-0019]2009001918815,无噪声暴露和药物使用史,耳廓反射灵敏,电子耳镜检查外耳道、鼓膜均无异常。

2. 实验试剂:D-半乳糖(D-gal)购于美国 Sigma 公司;石杉碱甲(Hup A)购于上海复旦复华药业有限公司(批号:090504);小鼠抗人 S-100 单克隆抗体、NF- κ Bp65 购于 Santa Cruz Biotechnology Inc 公司。

3. 模型制备及分组:所选的 SD 大鼠在清洁安静的环境下

适应性喂养 1 周后随机平均分为 3 组,均行颈背部皮下连续注射 8 周。D-gal 组给予 5% D-半乳糖(200mg/kg);D-gal + HupA 组予 5% D-半乳糖(200mg/kg)和石杉碱甲(0.1mg/kg)配成与模型组同体积溶液;对照组(control 组)予以同体积生理盐水。

4. 组织准备:上述模型制备后将各组的 SD 大鼠经戊巴比妥(80mg/kg)腹腔注射麻醉,开胸后用 4% 的多聚甲醛行心脏灌注。后迅速断头,取出耳蜗,放入 4% 的多聚甲醛中固定,4℃ 过夜;常规行 10% 的 EDTA 脱钙 2 周;后行梯度浸糖,先浸入 15% 蔗糖溶液,再浸入 30% 蔗糖溶液,至组织块下沉。所有组织块均在液氮中保存,在 -20℃ 的恒冷切片机上以 5 μ m 连续冠状切片,制作冷冻切片。

5. 免疫荧光染色:取各组不同 SD 大鼠的冷冻切片置于室温下 30min,入 4% 的丙酮固定 10min,0.01mol/L PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次;用 3% 过氧化氢孵育 5min,以消除内源性过氧化物酶的活性;再用 0.01mol/L PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次;10% 羊血清封闭 30min,倾去不洗,滴加 1 抗(1:100),4℃ 过夜,次晨 37℃ 复温 1h,PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次;滴加 2 抗(1:100),37℃ 孵育 60min,滴加 SABC 复合物(1:100),37℃ 孵育 30min,PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次,加 DAB 显色 5min,终止反应,双蒸水充分洗涤,常规脱水、透明、封片。

6. 定量 RT-PCR 分析:总 RNA 的提取及反转录为 cDNA 所需试剂由美国 Invitrogen 公司提供。使用 SYBR Premix RT

- PCR 试剂盒,根据制造商的说明进行 PT - PCR 操作。引物序列列表见表 1。

表 1 定量 RT - PCR 所用的引物列表

定量 RT - PCR	序列
TNF - α - F1	5' - CAGCGTTGGGAAGCTGTCTT - 3'
TNF - α - R1	5' - GGGGACCAGATGGGGATAGC - 3'
IL - 1 β - F1	5' - CTATGCTCTTGCCCGTGCAGC - 3'
IL - 1 β - R1	5' - AGAGGACGGGCTCTTCTTCAA - 3'
IL - 6 - F1	5' - ATTCTGCTCTCGAGCCACCA - 3'
IL - 6 - R1	5' - CTGGCTGGAAGTCTCTTGCG - 3'

7. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 进行统计分析,数据统计描述采用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$),采用 *t* 检验对计量资料进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 石杉碱甲阻止施万细胞的激活、阻止 NF - κ B 的活化:S - 100 标记的施万细胞及 NF - κ B 的免疫荧光染色如下图 1 所示,由图可知。3 组大鼠耳蜗组织中 S - 100 标记的施万细胞和 NF - κ B 增亮影基本

重叠,说明在胶质细胞中 NF - κ B 参与细胞的激活。与对照组 (control 组) 比, D - gal 组耳蜗组织中的施万细胞和 NF - κ B 均高度显色,说明此时施万细胞被激活,同时 NF - κ B 被活化,即 D - 半乳糖诱导形成的老年性聋耳蜗内的神经胶质细胞激活。而 D - gal + HupA 组耳蜗组织中的施万细胞和 NF - κ B 均正常显色,说明 D - 半乳糖诱导的老年性聋经石杉碱甲作用后耳蜗组织的施万细胞的激活被抑制。即表明石杉碱甲具有阻止施万细胞激活和 NF - κ B 的活化的作用。

2. 石杉碱甲抑制 D - 半乳糖诱导老年性聋的局部炎症反应:耳蜗组织中测定的 IL - 1 β 、IL - 6、TNF - α 的含量如下图 2 所示。与对照组相比, D - gal 组内的 IL - 1 β 、IL - 6、TNF - α 明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而与 D - gal + HupA 组相比, D - gal 组内的 IL - 1 β 、IL - 6、TNF - α 也明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

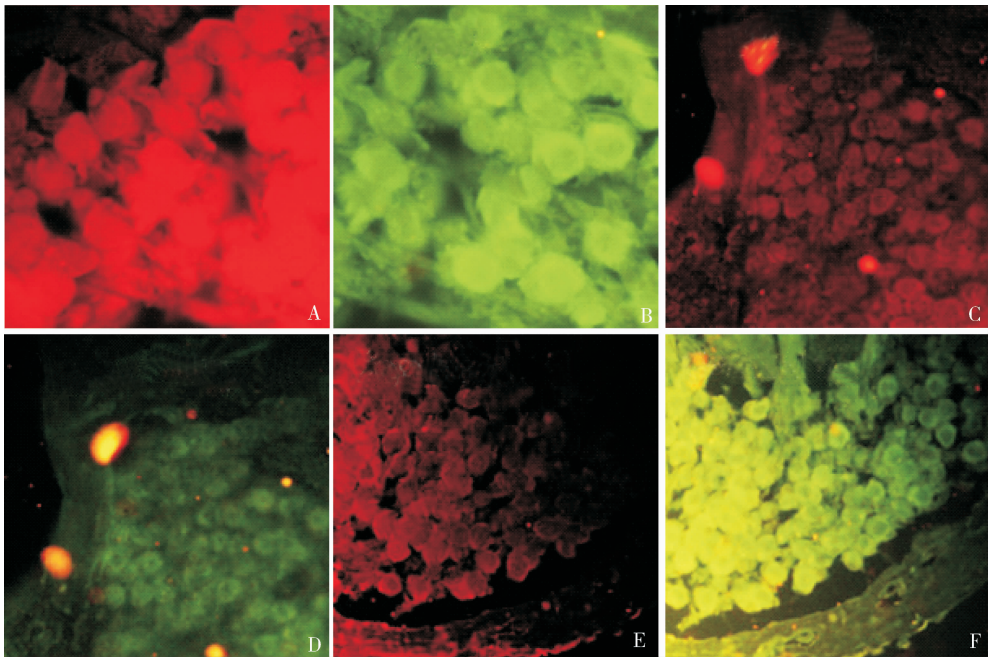


图 1 耳蜗组织中施万细胞、NF - κ B p65 免疫荧光

红色为 S - 100 标记的施万细胞,绿色为 NF - κ B p65; A、B. D - gal 组; C、D. D - gal + HupA 组; E、F. 对照组

讨 论

老年性聋是人体老化过程在听觉器官中的表现,其发病机制较为复杂,至今还没有统一的发病机制理论^[4]。其中线粒体老化计时假说最引人瞩目,该理论认为:线粒体氧利用率高,是活性氧的主要亚细胞来源,当活性氧的产生和清除之间失去平衡,就会出

现氧化应激^[5]。活性氧对生物大分子具有很强的破坏作用,可导致线粒体 DNA、细胞等广泛的损伤,内源性抗氧化酶减少,线粒体膜稳定性破坏,向细胞释放细胞色素 C,通过级联反应激活最终导致细胞凋亡。因此,设法减少机体氧自由基的产生、改善抗氧化防御和氧化损伤的修复功能,将大大提高老年性聋

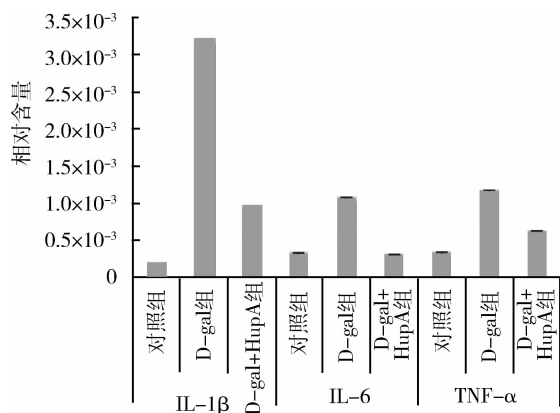


图 2 耳蜗组织中炎症因子的 RT-PCR

的防治水平。

石杉碱甲 (HupA) 是从草药蛇足石杉中分离得到的一种新型石松类生物碱有效单体。因其具有易透过血脑屏障、口服生物利用度好、且持续作用时间更长和外周不良反应少等优点,目前已在临床上用于阿尔茨海默病 (AD)、重症肌无力、精神分裂症以及其他神经退行性疾病。目前国内外已有文献报道石杉碱甲有抗炎、抗衰老的作用。故本实验组就利用石杉碱甲的此优点研究其对老年性聋的局部抗炎作用^[6,7]。

在前期的实验中,笔者已经通过检测 ABR 对各组大鼠的各波潜伏期的变化进行了观察,D-gal + HupA 组 ABR 阈值出现 III 波潜伏期、I ~ V 波间期缩短,听觉通路上神经传导加快,表明石杉碱甲可以提高中枢对声音的加工过程,进而推断这可能与改变轴突脱髓鞘变有关^[8]。在本实验中为了进一步探究此推断。

施万细胞是一种周围神经胶质细胞,为轴突提供支持并形成髓鞘,其功能极其活跃,可分泌多种活性物质,这些物质对维持神经纤维的存活、生长及再生具有重要的意义。而 NF- κ B 是近年来发现的转录因子家族的新成员,是细胞内最重要的核转录因子,在许多细胞刺激介导的细胞信息转录调控中起核心作用,参与多种基因的表达和调控,是细胞激活的标志。NF- κ B 一般存在于静息细胞中,在多种因素激活下进入细胞核,与 DNA 模板上的特蛋白结合,诱导转录、产生和释放各种细胞因子。故本实验将石杉

碱甲的局部抗炎作用放于施万细胞和 NF- κ B 是否激活受抑制,进而说明石杉碱甲是否具有对局部神经的抗炎、抗氧化作用。

D-gal 组的实验结果即可显示施万细胞的激活和 NF- κ B 的活化是一致的,而 D-gal + HupA 组则明显受抑制。即表明:石杉碱甲具有抑制施万细胞的激活和 NF- κ B 的活化。在此基础上,本实验继续探究了 NF- κ B 依赖的炎症因子 (如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 的表达,实验结果的一致性进一步说明石杉碱甲的局部抗炎作用。我们即可得石杉碱甲阻止了施万细胞、抑制 NF- κ B 的活化,继而下调 NF- κ B 依赖的炎症因子 (如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 的表达。

因此,石杉碱甲对耳蜗组织的局部抗炎作用将有益于老年性聋的临床治疗,然而这一结论还有待于进一步的临床研究证实。

参考文献

- Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss [J]. Ageing Res Rev, 2002,1(3):331-343
- Xiao XQ, Yang JW, Tang XC. Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury [J]. Neurosci Lett, 1999,275(2):73-76
- Xiao XQ, Yang JW, Tang XC. Huperzine A and tacrine attenuate β -amyloid peptide induced oxidative injury [J]. Neurosci Res, 2000,61(5):564-569
- Mitchell P, Gopinath B, Wang JJ, et al. Five-year incidence and progression of hearing impairment in an older population [J]. Ear Hear, 2011,32(2):251-257
- Moon H, Baek D, Lee B, et al. Soybean ascorbate peroxidase suppresses Bax-induced apoptosis in yeast by inhibiting oxygen radical generation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,290(1):457-462
- Ruan Q, Liu F, Gao Z, et al. The anti-inflammatory and hepatoprotective effects of huperzine A in D-galactose-treated rats [J]. Mech Aging Dev, 2013,134(3-4):89-97
- Wang ZF, Wang J, Zhang HY, et al. Huperzine A exhibits anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat model of transient focal cerebral ischemia [J]. J Neurochem, 2008,106(4):1594-1603
- 孔德秋,顾健,李聪等. 石杉碱甲对 D-半乳糖诱导老年性聋大鼠听觉功能的影响评估 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2013,19(19):199-203

(收稿日期:2013-09-05)

(修回日期:2013-09-22)