

水杨酸钠诱导耳鸣的神经机制

陈林, 王海涛, 陆云刚, 罗彬

(中国科学技术大学生命科学学院听觉研究实验室, 安徽合肥 230027)

摘要:水杨酸是阿司匹林的主要代谢产物,也是起药理作用的有效成分。高剂量的水杨酸钠可以在动物上可靠地诱导出耳鸣样行为,因此经常被用于研究耳鸣产生的神经机制。因为水杨酸能够在脑脊液中达到较高的浓度,我们设想水杨酸钠通过改变中枢听觉系统的兴奋-抑制平衡而产生耳鸣。为了验证这个假设,我们实验室在过去几年中利用全细胞膜片钳技术研究了水杨酸钠对中枢听觉系统神经元响应和突触传递的影响。我们发现该药物显著地压制 GABA 神经元的自发活动水平,提示水杨酸钠通过提高中枢听觉系统的兴奋性诱导耳鸣。

关键词:耳鸣;水杨酸钠;全细胞膜片钳;GABA 神经元;中枢听觉系统

中图分类号:R764.45 **文献标识码:**A

Neural mechanisms underlying tinnitus induced by sodium salicylate

CHEN Lin, WANG Hai-tao, LU Yun-gang, LUO Bin

(Auditory Research Laboratory, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: Sodium salicylate (NaSal) is the metabolite and active component of aspirin. NaSal is often used for tinnitus research because it can reliably induce a tinnitus-like behavior in animals at a high dose. Given that NaSal can reach a high concentration in the cerebrospinal fluid, we propose that NaSal induces tinnitus by changing the balance between excitation and inhibition in the central auditory system. In order to test this hypothesis, a series of studies were conducted to investigate the effects of NaSal on the neuronal responses and synaptic transmissions in the central auditory region with whole-cell patch-clamp techniques. It has been found that NaSal significantly suppresses the functional activity of GABA neurons, suggesting that NaSal raises excitability in the central auditory system to induce tinnitus.

Key words: tinnitus; sodium salicylate; whole-cell patch-clamp; GABA neuron; central auditory system

收稿日期:2008-06-15; **修回日期:**2008-07-01

基金项目:国家自然科学基金(30470560, 30730041),中国科学院知识创新工程(KSCX1-YW-R-36)和国家重点基础研究发展(973)计划(2007CB512306)资助。

作者简介:陈林(通讯作者),博士/教授。1985年在中国科学院上海生理研究所获硕士学位,1995年在美国纽约州立大学取得博士学位。1995~1998年先后在美国纽约州立大学和加拿大卡尔顿大学从事博士后工作。1999~2001年先后在纽约州立大学和美国 Cymfony 公司任研究助理教授和研究员。2002年回国建立中国科学技术大学听觉研究实验室。2004年入选国家七部委首批“新世纪百千万人才工程”。2006年当选美国耳鼻喉研究学会国际委员会委员,2007年起担任 Hearing Research 期刊编委。2002年以来承担了中国科学院知识创新项目1项,国家基金委2个面上项目、1个海外杰出青年基金项目(国内合作者)、1个重点项目。长期从事听觉科学研究,论文发表在 PNAS, Neuroscience, Hearing Research 等国际著名学术期刊上。
E-mail: linchen@ustc.edu.cn

0 引言

耳鸣(tinnitus)是一种在无外界声源刺激情况下的听觉感受,患者感到耳边或颅内有吼叫声、嘶嘶声或是单调声等。耳鸣可以间歇发作,也可以持续存在。病人感到的耳鸣声可以很弱,也可以轰响如雷鸣。耳鸣严重时会给患者的心理造成极大的困扰和压力。耳鸣的发生率呈现性别差异和年龄差异。男性人群的耳鸣发生率高于女性人群并随着年龄的增长而快速增加。耳鸣在45岁以下人群中的发生率约为1%,而在65岁以上的老年人群中耳鸣的发生率超过10%。在美国,大约有1千2百万人因为耳鸣症状去看医生,而其中的2百万耳鸣病人难以正常交流、工作和睡眠。

耳鸣经常在外周听觉系统受损后发生,但在听力正常的情况下,耳鸣也有可能发生。头颈外伤、疾病、药物的副作用和衰老也可以诱发耳鸣。目前对耳鸣尚缺乏有效的治疗方法,原因之一就是人们缺乏对耳鸣发生的神经机制的足够认识。为了研究耳鸣发生的神经机制,人们建立了耳鸣的动物行为学模型。在动物模型上诱导耳鸣的最常用的工具药物就是水杨酸钠(sodium salicylate)(图1)。水杨酸钠是阿司匹林(aspirin,乙酰水杨酸)(图1)的代谢产物和起药理作用的有效成分。这两种药同属非甾类抗炎药,在临床上有着广泛的应用,但是它们的副作用之一是能够诱发耳鸣。虽然水杨酸钠诱导的耳鸣是可逆的,一般不需要临床治疗,但研究其产生的机制,可以帮助我们寻找其他因素导致耳鸣的原因和治疗方法。

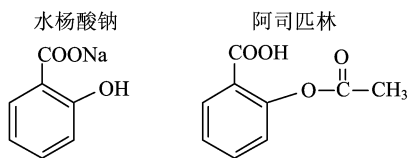


图1 水杨酸钠和阿司匹林的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of sodium salicylate and aspirin

目前关于耳鸣的神经机制的研究绝大多数局限于整体水平和生物化学方面。通过这些研究,已经知道耳鸣虽然大多数情况下在外周听觉系统的损伤后发生,但却经常由所引发的中枢听觉系统的改变所引起。典型的例子就是因为听神经瘤手术使听神经受到完全破坏的病人在完全丧失了听觉功能后却往

往出现耳鸣症状。但究竟大脑内出现了什么样的改变导致了耳鸣的发生,人们对此了解得极为肤浅。起源于中枢神经系统的耳鸣我们称之为中枢性耳鸣。现在一般的看法是外周听觉系统的损伤后中枢听觉系统的抑制/兴奋的平衡受到破坏,从而导致了中枢性耳鸣。但这个理论仍然存在争议,其最终证明需要研究耳鸣发生后在细胞水平上听觉神经系统发生了哪些功能变化,而目前这方面的研究报道很少。作者领导的研究小组在过去的几年中采用脑片、培养神经元细胞和全细胞膜片钳的方法较系统地研究了水杨酸钠对中枢听觉系统神经元响应和突触传递的影响,试图增加对中枢性耳鸣发生的细胞神经生物学基础的认识。因为水杨酸钠能够在脑脊液中达到较高的浓度,我们设想水杨酸钠能够直接作用于中枢听觉系统的神经元,从而改变听觉系统的兴奋-抑制平衡而产生耳鸣。我们发现水杨酸钠明显地抑制GABA能系统的效能,并据此提出了一个水杨酸钠诱导耳鸣的机制模型。我们的研究结果将加深对耳鸣发生机制的了解,对耳鸣的预防和治疗将有潜在的理论指导意义。本综述将首先简要回顾国际上和耳鸣相关的研究背景,然后介绍我们在研究水杨酸钠诱导耳鸣的机制方面所做的部分工作。

1 中枢性耳鸣被认为是神经系统可塑性的一种负面效应

耳鸣和幻肢痛(phantom limb pain)之间存在非常明显的相似性:幻肢痛的患者感知已经不存在(被截肢)的肢体疼痛,而许多耳鸣患者则感知已经损毁或者完全失去功能的耳蜗内传来声音。可以从对幻肢痛的认识中得到一些关于耳鸣产生机制的启示。皮层内的重组可能是幻肢痛产生的原因^[1],因此使人联想到中枢性耳鸣是否也是由于听觉皮层的重组导致。事实上,很多研究者认为中枢性耳鸣的本质是外周听觉系统受损后中枢神经系统产生的可塑性变化所带来的一种负面效应^[2]。在正常动物中,听觉皮层从前部到后部存在着一种很有秩序的频率特征分布(tonotopic frequency organization),这种频率分布反映了听觉系统在各个水平上遵守部位编码原则。在用噪声或其他方法引起听力损伤后,中枢听觉系统的可塑性变化使得初级听皮层的频率拓扑图结构发生了改变^[3]。若某一皮层神经元的特征频率处在听力受损区,那么所对应的听觉皮层神经元不再按照原来的拓扑图对相应频率的外界声音起反应,

而是调谐到受损区域附近的频率. 这种频率拓扑图变化的机制可以解释为耳蜗受损区段解除了由内膝体核团投射到听皮层的侧抑制(disinhibition), 使得耳蜗完好区段的边缘频率扩展到受损的频率区域. 这也解释了为什么耳鸣病人感受到的耳鸣声往往位于听力损伤的频率边缘. 由去抑制而导致的超兴奋也表现在听觉系统的其他神经核团. 例如, 在噪声暴露使得动物听力受损后, 从下丘核团记录到诱发电位的幅度反而大大增强.

除了导致去抑制, 耳蜗损伤还导致中枢听觉系统中神经元活动的阵发性(burst firing)和同步化(synchronization)这两种可塑性变化. 神经元的阵发性活动同耳鸣直接的关系仍不清楚, 但是出现的同步化被认为同耳鸣相关. 因为耳蜗受损而得不到正常神经输入的皮层细胞, 会逐渐地被其周边的不同特征频率的细胞的侧枝纤维所支配和兴奋. 正常情况下, 皮层细胞不仅接受反馈抑制还接受前馈抑制, 去传入的细胞缺少了前馈抑制, 这样它们就处于去抑制状态, 而皮层神经细胞去抑制和自发放电的增加可以延长突触后去极化的时间窗, 并且增加在时程上耦合在一起的突触输入汇聚于同一突触的可能性, 结果导致了神经元发放同步化的增强. 在正常的听觉神经系统中, 由丘脑输入产生的周边抑制可以抑制同步化的发生, 从而使听皮层神经元调谐于听觉刺激的频率, 但是这种周边抑制减弱后, 同步化活动可以在皮层比较广泛地形成并稳定下来, 从而导致了实际上不存在的听觉刺激的感知^[4]. 一种观点认为, 超兴奋、阵发性和同步化神经活动是在听觉通路的各个水平上兴奋与抑制之间失去平衡所导致的后果, 是引发耳鸣的原因^[5,6]. 也就是说, 外周听觉损伤导致中枢听觉系统发生可塑性改变, 打破了兴奋与抑制之间的平衡, 进而诱发耳鸣现象.

2 水杨酸钠诱导的耳鸣

服用高剂量的水杨酸钠或阿司匹林对人可以引起耳鸣现象, 这方面的报道可以追溯到 19 世纪. 在哺乳动物上, 也可以使用水杨酸钠诱导出耳鸣样行为. 大量的临床观察和动物实验表明水杨酸钠诱导的耳鸣有如下几个特点:

(I) 可逆性. 当水杨酸钠的使用停止后, 绝大多数情况下耳鸣症状会随之消失.

(II) 快速性. 耳鸣在口服或注射水杨酸钠后的几个小时内即可出现.

(III) 耳鸣的主观响度和血清中的水杨酸浓度成正比. 也就是说, 水杨酸钠的剂量越大, 引起的耳鸣越严重. 血清中水杨酸的浓度超过 100 mg/l(约 0.6 mM)时就能开始引起耳鸣, 超过 300 mg/l(约 1.8 mM)时, 耳鸣的响度可达 60 dB.

(IV) 水杨酸钠诱导的耳鸣被描述为纯音样或高频噪音样. 在大鼠上, 水杨酸钠诱导的耳鸣音调在 16 kHz 左右.

由于水杨酸钠导致的耳鸣是可逆的, 因此大多数情况下并不需要临床干预. 但是目前许多动物研究仍然用水杨酸钠来诱导耳鸣^[7~12]. 这些研究能够在多大程度上促进我们了解和治理其他因素所诱导的慢性耳鸣还不清楚. 如果不同诱因所引起的耳鸣在某种程度上具有共同神经机制的话, 那么对水杨酸钠诱导耳鸣神经机制的研究将有助于我们了解由听力丧失、耳毒性药物或衰老所导致耳鸣的神经机制并开发有效的治疗策略.

水杨酸钠通常经过口服或注射而具有全身作用, 所以它究竟通过外周还是中枢听觉系统作为作用靶点来产生耳鸣成为一个悬而未决的问题. 在给予水杨酸钠处理后的动物上, 耳蜗内和脑脊液中都可以测出较高浓度的水杨酸, 因此不能排除水杨酸直接作用于中枢听觉系统导致耳鸣的可能性. 目前有很多证据表明水杨酸钠作用于中枢听觉系统引发耳鸣. 例如, 水杨酸钠引起的中枢听觉系统变化与噪声引起的变化有非常类似之处, 例如去抑制、阵发性发放和活动同步性增强; 水杨酸钠停用后, 听力先恢复到正常, 耳鸣可能还依然持续一些时间再恢复到正常. 因此有必要研究水杨酸钠如何作用外周和中枢听觉系统.

有实验表明耳蜗 NMDA 受体可能参与了水杨酸钠诱导的耳鸣. 在耳蜗内给予 NMDA 受体的阻断剂后, 动物不再表现出行为学上可检测的耳鸣症状^[9]. 推测水杨酸钠对环氧合酶(COX)的抑制功能是导致耳鸣产生的关键所在, 因为直接给予 COX 抑制剂后能模拟水杨酸钠诱导耳鸣的效应. 由磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)作用产生的花生四烯酸在环氧合酶的作用下生成前列腺素^[13,14]. 在缺血和惊厥的病理情况下花生四烯酸会在脑内蓄积^[15], 而水杨酸钠在阻断花生四烯酸的 COX 代谢途径后也有可能导致花生四烯酸在脑内的蓄积. 花生四烯酸能够增加 NMDA 受体介导的电流^[16]以及兴奋性氨基酸的转运体电流^[17]. 如果水杨酸钠导致

花生四烯酸蓄积,那么耳蜗内 NMDA 依赖的兴奋性水平就有可能提高.除了作用于兴奋性神经递质的受体,花生四烯酸也抑制甘氨酸转运体^[18]和 GABA_A受体介导的电流^[19],这些神经递质系统的改变有可能成为耳鸣产生的原因.但是最近一项研究表明,NMDA 受体拮抗剂 memantine 对水杨酸钠所诱导的耳鸣动物的行为学表现并没有影响^[11].这些结果之间的相互矛盾尚待进一步的实验来解决.

水杨酸钠引起的耳鸣也可能是所导致的听皮层可塑性改变引起.高剂量水杨酸钠可引起听皮层和杏仁核区中反映可塑性的蛋白 arg3.1 和 c-fos 表达增加,提示水杨酸钠诱导的耳鸣有神经可塑性增强的机制的参与^[20].由于杏仁核往皮层投射丰富的胆碱能纤维,使用胆碱能抑制剂 scopolamine 后,水杨酸钠不再改变 arg3.1 和 c-fos 的表达.这说明水杨酸钠可能导致杏仁核的应激,由此激活了皮层的胆碱能系统,从而影响了皮层的兴奋性和可塑性^[21].最近在水杨酸钠所诱导的耳鸣动物的耳蜗核上还观察到一氧化氮合成酶表达的升高,而一氧化氮是参与长时程突触可塑性的重要逆行信号分子,这为突触可塑性的改变可能参与了水杨酸钠诱导的耳鸣提供了新的实验证据^[22].

但也有实验证据提示水杨酸钠不能增强神经系统的可塑性.长时程抑制(long term potentiation, LTP)被认为在细胞水平上反映了神经系统的可塑性.有实验表明视皮层的 LTP 依赖于前列腺素 E2 受体 EP2 和 EP3 的双向转运^[23].我们知道前列腺素的生成依赖于诱导型 COX 的作用.利用基因敲除的方法让 COX2 功能下调后,视皮层上无法诱导出 LTP.水杨酸钠是 COX2 的抑制剂,那么是否水杨酸钠在听皮层也引起同样的改变呢?水杨酸钠诱导的耳鸣究竟是由于神经系统可塑性的增强还是减弱需要进一步的实验证实.或许水杨酸钠对视觉系统和听觉系统具有差异性作用.

3 水杨酸钠对外周听觉系统的影响

耳蜗的内毛细胞主要功能是将声音的机械震动转换为听觉神经的动作电位,而耳蜗的外毛细胞具有电致运动性,因而对听觉信息高敏感和高精确感受.耳蜗的中阶存在一个大约为+80 mV 的直流电位,而毛细胞的静息电位为-60 mV,如此高的电位差为毛细胞实现声音的机械-电化学转导提供了充分的驱动力.耳蜗毛细胞的活动产生微音器电位和

总和电位,耳蜗外毛细胞的电致运动使得耳产生声发射现象,听神经的活动产生复合动作电位.

在显微和超微结构水平上,水杨酸钠只是轻微地损伤耳蜗外毛细胞,而对内毛细胞没有明显影响^[24].水杨酸钠对耳蜗结构无明显的损伤与水杨酸钠诱导的耳鸣在终止用药后消失的事实相符合.但是,水杨酸钠能够影响到耳蜗各个结构的功能特性:①水杨酸钠降低耳蜗的微音器电位和总和电位^[25~27],但是它对耳蜗内淋巴电位的影响不显著^[25,28];②水杨酸钠能够使自发耳声发射消失,并且降低诱发耳声发射^[29,30],说明水杨酸钠抑制耳蜗外毛细胞的功能.水杨酸钠对诱发耳声发射影响的时间窗口明显晚于自发耳声发射,而且这些改变都是可逆的;③水杨酸钠能够降低声音诱发的听觉神经复合动作电位的幅度和阈值.有两个理由使得我们相信水杨酸钠对听觉神经纤维活动水平的改变可能是整个听觉系统灵敏度发生改变的重要原因.首先,水杨酸钠对耳蜗电位、微音器电位、总和电位和复合动作电位的影响程度相当.再者,在听觉信息传递到耳蜗核、下丘^[31]和听皮层^[32]的过程中,水杨酸钠并没有进一步改变神经对声音刺激的反应阈值,提示听觉中枢发生的改变只是中继了耳蜗水平发生的改变;④水杨酸钠的急性作用似乎不改变听觉神经纤维的自发放电^[33],但其慢性作用使得从耳蜗圆窗记录到的自发电活动水平上升^[7];⑤水杨酸钠显著并可逆地降低橄榄耳蜗束的功能(如减小听觉复合神经动作电位的幅度)^[34].耳蜗除了具有上行传入纤维外,还接受来自于橄榄核的橄榄耳蜗束的下行投射,它们主要支配耳蜗基部.根据部位编码原则,橄榄耳蜗束主要影响高频区,而水杨酸钠导致听力损失和耳鸣均特异性表现在高频段;⑥亦有研究报道水杨酸钠减少耳蜗的血液供应,进而影响耳蜗的功能特性^[16].

只有少数离体研究工作在细胞和分子水平上探索了水杨酸钠影响耳蜗功能的机制.水杨酸钠可以浓度依赖地并可逆地改变分离的耳蜗外毛细胞电动性和形态^[35].在外毛细胞上,水杨酸钠能够减少电荷移动、改变膜电容以及改变电诱导的细胞长度,而且这种改变并不是由于水杨酸钠引起的 pH 改变所导致的^[36].Prestin 蛋白是决定耳蜗外毛细胞电动性的关键蛋白,实际上它是一种 Cl⁻ 和 HCO₃⁻ 的交换体,为外毛细胞的电动性提供能量.而水杨酸钠竞争 prestin 蛋白的 Cl⁻ 结合位点,从而影响听觉信息

感受的敏感性^[37]. 在培养的耳蜗螺旋神经节细胞上,水杨酸钠显著地增加 NMDA 受体所介导的电流,而对 AMPA 和 KA 受体所介导的电流却没有影响^[38]. 兴奋性作用的增加以及 NMDA 受体所引起的胞内 Ca^{2+} 的增加可能是听觉外周兴奋性升高的原因所在,这为水杨酸钠慢性作用引起的听觉神经纤维自发放电水平升高提供了一些解释.

4 水杨酸钠对中枢听觉系统的影响

较之其他感觉系统,听觉系统要处理高频和快速变化的声音信号,所以其结构明显复杂. 中枢听觉系统包括耳蜗核、斜方体核、橄榄核、外侧丘系核、下丘、内膝体和听皮层. 除了负责听觉信息的上行传递外,中继核团还接受来自上级核团的下行调控,如下丘的背侧皮层和背侧耳蜗核等,这些丘系外通路对信息处理的精确性有着重要的调控功能. 关于水杨酸钠影响听觉中枢的研究多数集中于耳蜗核、下丘和听皮层. 使用 2-脱氧葡萄糖 (2-deoxyglucose, 2-DG) 以及即刻反应基因 *c-fos* 作为指标的研究表明水杨酸钠提高中枢听觉系统的代谢活动水平. 水杨酸钠导致内侧膝状体和听皮层的 2-DG 摄取提高,而听觉通路的其他核团没有出现显著变化^[39]. 在水杨酸钠处理后的沙鼠中,*c-fos* 的表达具有类似的特点:听皮层具有清晰的 *c-fos* 标记. 此外在其他部位诸如前额叶、内嗅皮层以及边缘系统的杏仁核也发现明显的 *c-fos* 表达,提示不仅听觉系统,而且情绪相关的脑区也可能参与了耳鸣的发生^[40].

使用在体电生理研究手段时,一般先给予动物腹腔注射水杨酸钠后再记录神经元的自发放电以及声音诱发的放电. 水杨酸钠处理后,听觉脑干下丘神经元的自发放电水平出现明显的增加,但下丘背侧和腹侧神经元自发放电的增加并没有差异性,尽管下丘背侧对低频刺激声音起反应,腹侧对高频刺激声音起反应^[41]. 后来一项类似的研究发现水杨酸钠处理后,下丘中特征频率为 12~16 kHz 的神经元的自发放电水平增加的幅度最大,而特征频率高于 16 kHz 的神经元自发放电水平是下降的,并且还发现了阵发性放电的增加^[42]. 水杨酸钠引起下丘神经元自发放电增加的效应能够被利多卡因所抑制^[43]. 利多卡因是一种局部麻醉剂,但在临床上也被用于暂时缓解耳鸣症状. 水杨酸钠也影响听皮层神经元的自发活动. 在被麻醉了的动物实验中,水杨酸钠使听皮层高自发放电神经元的发放速率下降,却使低

自发放电神经元的发放速率增加^[32]. 水杨酸钠可降低初级听皮层特征频率高于 10 kHz 的神经元的自发放电,但却增加次级听皮层和前听区具有较高特征频率神经元的自发放电^[8].

长期以来,关于耳鸣的在体电生理研究结果基本上都是在麻醉的整体动物上得到的. 但许多麻醉剂如戊巴比妥等能显著地压抑中枢神经元的自发放电,这使得一些研究结果变得不可靠和相互矛盾. 而且在深度麻醉状态下,动物应该是感知不到耳鸣的. 考虑到麻醉带来的缺陷,最新的一些工作运用慢性植入电极方式在清醒动物上研究了水杨酸钠对听皮层的神经元活动的影响. 因为消除了麻醉的影响,使用慢性植入电极在清醒动物上能观察到听觉皮层神经元具有很高的自发放电水平. 在清醒的、用水杨酸钠诱导的耳鸣模型动物上,神经元自发放电速率并没有像先前所普遍认为的那样升高,事实上反而下降^[12]. 有意思的是,在清醒动物上水杨酸钠还增强了声音刺激诱发的局部场电位的幅度^[11,12],提示局部场电位可以作为用来鉴别动物是否具有耳鸣的指标.

水杨酸钠可以通透血脑屏障,说明外周听觉系统和中枢听觉系统都可以是它的作用靶点. 使用整体动物研究耳鸣带来的问题是:水杨酸钠处理后中枢听觉系统发生的变化既可能是水杨酸钠直接作用于中枢听觉系统的结果,也可能是水杨酸钠对外周听觉系统作用所继发的现象,当然更有可能是双重作用的结果. 采用脑片和细胞培养技术可以研究水杨酸钠对中枢听觉神经元的直接作用,将该药物对外周听觉系统的影响分离开来. 运用胞外记录方法在下丘脑片上发现水杨酸钠能改变大多数神经元的自发放电特性:水杨酸钠增加其中 70% 细胞的自发放电,但是降低其余细胞的自发放电^[44],这和在全身给药的结果非常类似. 运用全细胞膜片钳的方法发现水杨酸钠对各种神经元离子通道/受体有作用. 在分离的下丘神经元上,水杨酸钠可以浓度依赖地减少钠电流的幅度,使得钠电流的失活曲线向超极化方向移动^[45],这提示水杨酸钠阻断静息状态和失活状态的钠离子通道. 水杨酸钠对 L 型 Ca^{2+} 通道的起压抑作用^[46]. 水杨酸钠还可以浓度依赖地减小瞬时外向钾电流和影响延迟整流钾电流的激活和失活曲线^[47,48]. 水杨酸钠对延迟整流钾电流的影响令人感兴趣. 这种类型的钾通道是由 $\text{Kv}3.1$ 和 $\text{Kv}3.2$ 亚单位所组成的,对介导神经元的复极化过程^[49]、

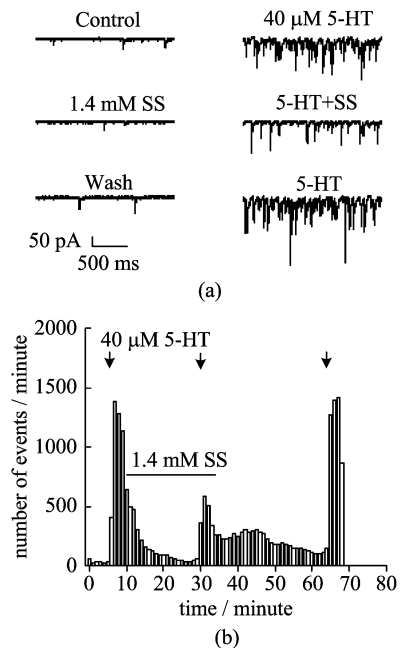
神经网络的同步化和振荡起着非常关键的作用^[50,51]. 与其他感觉系统相比, 听觉系统核团丰富地表达 Kv3.1 和 Kv3.2 蛋白, 而且该表达具有频率拓扑分布特征^[49,52]. Kv3.1 在听觉核团的高频区高表达, 而且听觉刺激可以改变 Kv3.1 的磷酸化状态^[53]. 据此推测, 水杨酸钠将 Kv3.1 钾通道作为靶点是其特异性地作用于听觉系统的机制之一.

5 水杨酸钠压制 GABA 神经元的自发活动水平

抑制性网络与兴奋性网络之间的平衡是听觉系统正常工作的基础. 由神经递质 GABA, 突触后 GABA_A受体所介导的突触后神经元的超级化是中枢听觉系统内最为广泛和重要的抑制系统. 在神经环路中, 尽管兴奋性的神经元是其主要的组成元素, 但 GABA 能神经元所介导的抑制性对神经环路的稳定性起着极其重要的作用. 因为水杨酸钠能够穿过血脑屏障, 我们设想该药物有可能直接作用于中枢听觉系统中的 GABA 能神经元来削弱抑制功能而诱发耳鸣. 我们采用了听觉下丘脑片和全细胞膜片钳技术在细胞和突触水平上研究了这个问题^[54].

将下丘核团切成约 400 μm 厚的组织薄片并让其在通氧的人工脑脊液中保持存活. 由于下丘核团存在谷氨酸能和甘氨酸能神经纤维投射, 所以在灌流的人工脑脊液中加入了 1 mM 犬尿酸和 0.5 μM 士的宁, 这样便可在全细胞电压钳下记录到药理学分离的 GABA 能自发的抑制性突触后电流 (sIPSCs). 在这样的条件下记录到的 sIPSCs 反映了突触前 GABA 能神经元的自发活动水平. GABA 能神经元受到 5-羟色胺 (5-HT) 能系统的调控, 但由于下丘脑片中 5-HT 能投射被切断, 其调控被削弱, 表现为 sIPSCs 的频率很低. 因此我们先灌流 40 μM 的 5-HT 来提高 GABA 能 sIPSCs 水平. 通常情况下, 在第一次给予 5-HT 10 分钟后, 我们一般再次给予 5-HT 以验证该神经元的反应. 下丘神经元对 5-HT 的反应各异, 有的没有反应, 有的则表现出持续或瞬态的增加, 而且不同神经元的增加幅度也具有较大差异. 从统计意义上说, 5-HT 极其显著地增强了 sIPSC 的幅度和频率, 也就是说, 5-HT 增强 GABA 能神经元的活动水平. 图 2(a) 表示在 40 μM 5-HT 情况下一个神经元的 sIPSCs. 统计结果表明灌流给予 40 μM 5-HT 显著增加了 GABA 能 sIPSCs 的频率和幅度.

我们接下来发现水杨酸钠能够十分显著地压制 5-HT 对下丘神经元 GABA 能 sIPSCs 的增强作用. 在实验中, 我们选取 1.4 mM 的水杨酸钠, 这是应用水杨酸钠诱导耳鸣的动物模型的脑脊液中水杨酸的典型浓度. 我们在成功记录到一个下丘神经元后就灌流 40 μM 5-HT 检测该神经元对 5-HT 的敏感性, 然后灌流至少 10 分钟水杨酸钠, 并在水杨酸钠存在的情况下再次给予 40 μM 5-HT, 以检测水杨酸钠对 5-HT 诱发的 GABA 能 sIPSCs 增强的影响. 结果表明水杨酸钠显著压抑 5-HT 诱发的 GABA 能 sIPSCs 增强, 而且在水杨酸钠洗脱后, 5-HT 的增强作用能够恢复 (图 2(b)). 归一化数据表明水杨酸钠导致 5-HT 介导的 GABA 能 sIPSCs 频率显著下降了 53.1%, 而幅度下降了 19.7%.



SS: 水杨酸钠; 5-HT: 5-羟色胺

图 2 水杨酸钠抑制 5-羟色胺诱导的 sIPSCs 增强效应

Fig. 2 Sodium salicylate suppresses 5-HT-induced enhancement of sIPSCs

6 水杨酸钠诱导耳鸣的机制模型

许多实验支持听力损失或耳毒性药物 (如水杨酸钠) 打破了中枢听觉系统中兴奋和抑制之间的平衡从而导致耳鸣的产生这一假说^[5,6,55]. 水杨酸钠可以直接影响中枢听觉系统, 那么在细胞水平它是如何作用于中枢神经元和突触的呢? 目前报道的实验结果显示水杨酸钠有非常广泛的药理学作用靶点诸如 Ca^{2+} ^[46]、 K^{+} ^[47]、 Na^{+} ^[45] 通道以及 NMDA 受

体^[38]和 GABA_A受体^[56]. 我们的实验结果则说明, 与水杨酸钠对其他类型的突触传递、离子通道以及受体的影响相比, 水杨酸钠更为显著地压低了 5-HT 诱发的 GABA 能 sIPSCs. 我们推测水杨酸钠有可能偏向性地作用于 GABA 能神经元, 从而减弱了 GABA 能抑制性突触传递, 进而造成了中枢听觉系统兴奋和抑制之间的失衡.

我们提出了一个机制模型来解释水杨酸钠是如何通过偏向性的作用于 GABA 能神经元来改变听觉中枢系统的兴奋和抑制平衡(图 3). 鉴于 5-HT 神经元主要投射的靶点在中间神经元上^[57], 而且 5-HT 对抑制性突触传递比兴奋性突触传递的调控更为明显^[58], 我们在模型中假定 5-HT 神经元支配 GABA 能神经元而不是谷氨酸能神经元. 尽管 GABA 能突触传递也受到其他神经调质如去甲肾上腺素^[59]、多巴胺^[60]以及胆碱^[61]能系统的调控, 为了简化起见, 在此模型中仅考虑到 5-HT 能系统对 GABA 能神经元的支配. 在下丘中 5-HT 受体在 GABA 能和非 GABA 能神经元上都有表达^[62], 但我们在该模型中没有考虑 5-HT 纤维对谷氨酸神经元的支配. 在正常情况下, 从谷氨酸能神经元释放的谷氨酸和从 GABA 能神经元释放的 GABA 处于平衡状态, 所以神经元“T”正常地自发放电(图 3(a)). 为了使 GABA 释放到突触后膜以平衡谷氨酸的释放, GABA 神经元依赖于 5-HT 神经元的兴奋性调控, 所以其自发放电水平高于神经元“T”. 当存在水杨酸时, 由于它对 GABA 能神经元的偏向性作用, GABA 能神经元的自发放电水平降低, 导致 GABA 释放减少而不能平衡兴奋性谷氨酸的作用(图 3(b)). 在这样的情况下, 神经元“T”的发放增加, 但是其增加的程度要低于 GABA 能神经元发放降低的程度. 故水杨酸钠破坏了兴奋和抑制的平衡, 降低了中枢神经系统总体的自发放电活动, 易化了兴奋性突触传递, 进而导致了耳鸣的产生.

该模型解释了许多令人迷惑的水杨酸钠的神经生理作用. 比如说该模型可以解释水杨酸钠导致的听皮层自发性神经放电下降和声音诱发神经活性的增加^[12]. 根据该模型, 在听皮层水杨酸钠造成 GABA 能神经元自发放电的显著下降, 然而谷氨酸神经元自发放电的增加相对较少. 水杨酸钠增加了声音诱发的反应是因为水杨酸钠损伤的是 GABA 能抑制性突触传递而不是谷氨酸能的兴奋性突触传递. 该模型还解释了为什么水杨酸钠增加某些下丘

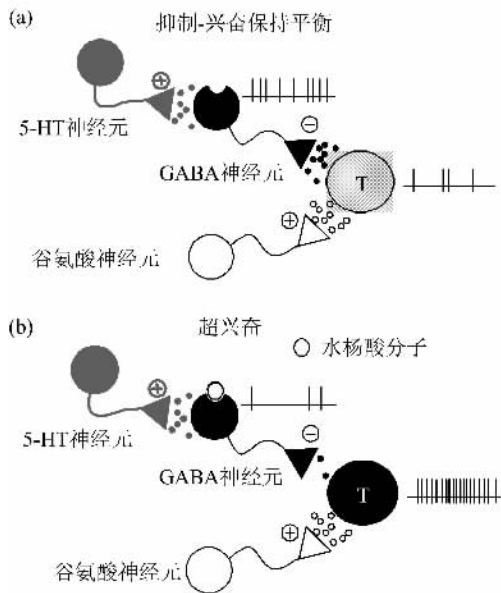


图 3 水杨酸钠诱导耳鸣的机制模型

本图根据参考文献[54]重新绘制

Fig. 3 A proposed model for neural mechanism of tinnitus
Redrawn from Reference [54]

神经元的自发放电活动却减少另一些神经元的自发放电^[44]. 根据该模型, 水杨酸钠会降低 GABA 能神经元自发放电, 但增加 GABA 能神经元所支配的兴奋性神经元(图 3 中的神经元“T”)自发放电, 因此记录的神经元放电增加或减少将取决于该神经元是属于哪一类. 我们的模型解释了高剂量的水杨酸钠为什么会使听皮层和下丘中的 5-羟色胺水平增加 2~3 倍^[63]. 这是因为水杨酸钠损伤的是 GABA 能系统, 而不是 5-羟色胺系统. 水杨酸钠导致 5-羟色胺水平上升可能是由于补偿性机制被激活. 该模型还预测, 耳鸣发生时听觉中枢系统神经元自发放电并非总是增加. 如果抑制性神经元的自发活动降低, 那么也会引起超兴奋进而产生耳鸣.

7 展望

我们采用全细胞膜片钳和脑片方法, 在中枢听觉系统上研究了水杨酸钠对 GABA 能抑制性突触传递的影响. 结果表明水杨酸钠能够显著压抑 5-HT 所诱导的 sIPSCs 的增强, 据此提出水杨酸钠通过抑制 GABA 神经元的突触传递, 引起听觉中枢系统兴奋和抑制的失衡进而引起耳鸣的理论. 虽然我们的工作具有一个良好的开端, 但要能够清楚地了解水杨酸钠诱导耳鸣的神经机制还有很长一段路要走. 我们还有许多问题需要深入研究, 例如: ①我

们检测了水杨酸钠对抑制性突触传递的压制作用,但是没有对兴奋性突触传递进行研究.正如文中所述,兴奋和抑制的失平衡可能导致耳鸣的产生,所以需要分别研究听觉系统中 GABA 能中间神经元和谷氨酸能的锥体神经元,以观察水杨酸钠是否偏向性地靶定 GABA 能系统;②水杨酸钠抑制 GABA 神经元活动水平是通过何种信号通路来实现的;③需要了解水杨酸为何特异性地对听觉系统产生耳鸣副作用,而相对较少对其他感觉系统如视觉、躯体感觉系统产生影响;④关于耳鸣产生的假说之一是突触可塑性的改变,是否水杨酸钠会直接改变听觉中枢的可塑性,尚需离体实验证明;⑤需要先建立水杨酸钠诱导的耳鸣动物模型,然后使用来源于该动物模型的离体脑片证实 GABA 能神经元的功能发生了改变;⑥需要在做行为学实验时避开水杨酸钠对听觉外周的影响,以确定水杨酸钠是否仅仅通过作用于听觉中枢就会诱导出动物的耳鸣样行为。

致谢 作者与所在的中国科学技术大学听觉研究实验室诸多成员以及合作者共同完成和正在进行有关耳鸣的研究工作,在此谨表谢意。

参考文献(References)

- [1] Flor H, Elbert T, Knecht S, et al. Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation [J]. *Nature*, 1995, 375(6 531): 482-484.
- [2] Saunders J C. The role of central nervous system plasticity in tinnitus [J]. *J Commun Disord*, 2007, 40(4): 313-334.
- [3] Eggermont J J, Komiya H. Moderate noise trauma in juvenile cats results in profound cortical topographic map changes in adulthood [J]. *Hear Res*, 2000, 142(1-2): 89-101.
- [4] Seki S, Eggermont J J. Changes in spontaneous firing rate and neural synchrony in cat primary auditory cortex after localized tone-induced hearing loss [J]. *Hear Res*, 2003, 180(1-2): 28-38.
- [5] Eggermont J J. Tinnitus: neurobiological substrates [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(19): 1 283-1 290.
- [6] Eggermont J J, Roberts L E. The neuroscience of tinnitus [J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27 (11): 676-682.
- [7] Cazals Y, Horner K C, Huang Z W. Alterations in average spectrum of cochleoneural activity by long-term salicylate treatment in the guinea pig: a plausible index of tinnitus [J]. *J Neurophysiol*, 1998, 80(4): 2 113-2 120.
- [8] Eggermont J J, Kenmochi M. Salicylate and quinine selectively increase spontaneous firing rates in secondary auditory cortex [J]. *Hear Res*, 1998, 117(1-2): 149-160.
- [9] Guitton M J, Caston J, Ruel J, et al. Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(9): 3 944-3 952.
- [10] Jastreboff P J, Brennan J F, Coleman J K, et al. Phantom auditory sensation in rats: an animal model for tinnitus [J]. *Behav Neurosci*, 1988, 102 (6): 811-822.
- [11] Lobarinas E, Yang G, Sun W, et al. Salicylate- and quinine-induced tinnitus and effects of memantine [J]. *Acta Otolaryngol Suppl*, 2006, (556): 13-19.
- [12] Yang G, Lobarinas E, Zhang L, et al. Salicylate induced tinnitus: behavioral measures and neural activity in auditory cortex of awake rats [J]. *Hear Res*, 2007, 226(1-2): 244-253.
- [13] Elattar T M, Lin H S, Tira D E. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the metabolism of 14C-arachidonic acid by human gingival tissue in vitro [J]. *J Dent Res*, 1983, 62(9): 975-979.
- [14] Siegel M I. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on arachidonic acid metabolism [J]. *Headache*, 1981, 21(6): 264-271.
- [15] Siesjo B K, Agardh C D, Bengtsson F, et al. Arachidonic acid metabolism in seizures [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, 559: 323-339.
- [16] Didier A, Miller J M, Nuttall A L. The vascular component of sodium salicylate ototoxicity in the guinea pig [J]. *Hear Res*, 1993, 69(1-2): 199-206.
- [17] Barbour B, Szatkowski M, Ingledew N, et al. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells [J]. *Nature*, 1989, 342(6 252): 918-920.
- [18] Pearlman R J, Aubrey K R, Vandenberg R J. Arachidonic acid and anandamide have opposite modulatory actions at the glycine transporter, GLYT1a [J]. *J Neurochem*, 2003, 84(3): 592-601.
- [19] Saxena N C. Inhibition of GABA (A) receptor (GABAR) currents by arachidonic acid in HEK 293 cells stably transfected with alpha1beta2gamma2 GABAR subunits [J]. *Pflugers Arch*, 2000, 440(3): 380-392.
- [20] Mahlke C, Wallhausser-Franke E. Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3. 1 and c-fos immunocytochemistry [J]. *Hear Res*, 2004, 195(1-

- 2); 17-34.
- [21] Wallhausser-Franke E, Cuautle-Heck B, Wenz G, et al. Scopolamine attenuates tinnitus-related plasticity in the auditory cortex [J]. *Neuroreport*, 2006, 17(14): 1 487-1 491.
- [22] Zheng Y, Seung Lee H, Smith P F, et al. Neuronal nitric oxide synthase expression in the cochlear nucleus in a salicylate model of tinnitus [J]. *Brain Res*, 2006, 1 123(1): 201-206.
- [23] Akaneya Y, Tsumoto T. Bidirectional trafficking of prostaglandin E2 receptors involved in long-term potentiation in visual cortex [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(40): 10 209-10 221.
- [24] Douek E E, Dodson H C, Bannister L H. The effects of sodium salicylate on the cochlea of guinea pigs [J]. *J Laryngol Otol*, 1983, 97(9): 793-799.
- [25] Puel J L, Bobbin R P, Fallon M. Salicylate, mefenamate, meclofenamate, and quinine on cochlear potentials [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1990, 102(1): 66-73.
- [26] Ramsden R T, Latif A, O'Malley S. Electrocochleographic changes in acute salicylate overdose [J]. *J Laryngol Otol*, 1985, 99(12): 1 269-1 273.
- [27] Silverstein H, Bernstein J M, Davies D G. Salicylate ototoxicity. A biochemical and electrophysiological study [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1967, 76(1): 118-128.
- [28] Tanaka Y, Brown P G. Action of metabolic inhibitors and energy-rich phosphate compounds on cochlear potentials [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1970, 79(2): 338-351.
- [29] Arruda J, Jung T T, McGann D G. Effect of leukotriene inhibitor on otoacoustic emissions in salicylate ototoxicity [J]. *Am J Otol*, 1996, 17(5): 787-792.
- [30] Ueda H, Yamamoto Y, Yanagita N. Effect of aspirin on transiently evoked otoacoustic emissions in guinea pigs [J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 1996, 58(2): 61-67.
- [31] Kurata K, Yamamoto M, Tsukuda R, et al. A characteristic of aspirin-induced hearing loss in auditory brainstem response of conscious rats [J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(1): 9-15.
- [32] Ochi K, Eggermont J J. Effects of salicylate on neural activity in cat primary auditory cortex [J]. *Hear Res*, 1996, 95(1-2): 63-76.
- [33] Muller M, Klinke R, Arnold W, et al. Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited [J]. *Hear Res*, 2003, 183(1-2): 37-43.
- [34] Stypulkowski P H. Mechanisms of salicylate ototoxicity [J]. *Hear Res*, 1990, 46(1-2): 113-145.
- [35] Kakehata S, Santos-Sacchi J. Effects of salicylate and lanthanides on outer hair cell motility and associated gating charge [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(16): 4 881-4 889.
- [36] Tunstall M J, Gale J E, Ashmore J F. Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the guinea-pig cochlea [J]. *J Physiol*, 1995, 485(Pt 3): 739-752.
- [37] Oliver D, He D Z, Klocker N, et al. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein [J]. *Science*, 2001, 292(5 525): 2 340-2 343.
- [38] Peng B G, Chen S, Lin X. Aspirin selectively augmented N-methyl-D-aspartate types of glutamate responses in cultured spiral ganglion neurons of mice [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 343(1): 21-24.
- [39] Wallhausser-Franke E, Braun S, Langner G. Salicylate alters 2-DG uptake in the auditory system; a model for tinnitus? [J]. *Neuroreport*, 1996, 7(10): 1 585-1 588.
- [40] Wallhausser-Franke E. Salicylate evokes c-fos expression in the brain stem: implications for tinnitus [J]. *Neuroreport*, 1997, 8(3): 725-728.
- [41] Jastreboff P J, Hansen R, Sasaki P G, et al. Differential uptake of salicylate in serum, cerebrospinal fluid, and perilymph [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1986, 112(10): 1 050-1 053.
- [42] Chen G D, Jastreboff P J. Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats [J]. *Hear Res*, 1995, 82(2): 158-178.
- [43] Manabe Y, Yoshida S, Saito H, et al. Effects of lidocaine on salicylate-induced discharge of neurons in the inferior colliculus of the guinea pig [J]. *Hear Res*, 1997, 103(1-2): 192-198.
- [44] Basta D, Ernst A. Effects of salicylate on spontaneous activity in inferior colliculus brain slices [J]. *Neurosci Res*, 2004, 50(2): 237-243.
- [45] Liu Y, Li X. Effects of salicylate on voltage-gated sodium channels in rat inferior colliculus neurons [J]. *Hear Res*, 2004, 193(1-2): 68-74.
- [46] Liu Y, Li X, Ma C, et al. Salicylate blocks L-type calcium channels in rat inferior colliculus neurons [J]. *Hear Res*, 2005, 205(1-2): 271-276.
- [47] Liu Y, Li X. Effects of salicylate on transient outward and delayed rectifier potassium channels in rat inferior colliculus neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 369(2): 115-120.
- [48] Liu Y X, Li X P, Liu J X, et al. Inhibition of

- salicylate on potassium channels in rat inferior colliculus neurons[J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2005, 40(11): 835-839.
- [49] Rudy B, McBain C J. Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(9): 517-526.
- [50] Joho R H, Ho C S, Marks G A. Increased gamma and decreased delta-oscillations in a mouse deficient for a potassium channel expressed in fast-spiking interneurons [J]. *J Neurophysiol*, 1999, 82 (4): 1 855-1 864.
- [51] Tateno T, Robinson H P. Quantifying noise-induced stability of a cortical fast-spiking cell model with Kv3-channel-like current [J]. *Biosystems*, 2007, 89(1-3): 110-116.
- [52] von Hehn C A, Bhattacharjee A, Kaczmarek L K. Loss of Kv3. 1 tonotopicity and alterations in cAMP response element-binding protein signaling in central auditory neurons of hearing impaired mice [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(8): 1 936-1 940.
- [53] Song P, Yang Y, Barnes-Davies M, et al. Acoustic environment determines phosphorylation state of the Kv3. 1 potassium channel in auditory neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(10): 1 335-1 342.
- [54] Wang H T, Luo B, Huang Y N, et al. Sodium salicylate suppresses serotonin-induced enhancement of GABAergic spontaneous inhibitory postsynaptic currents in rat inferior colliculus in vitro [J]. *Hear Res*, 2008, 236(1-2): 42-51.
- [55] Eggermont J J. Central tinnitus [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2003, 30 Suppl: S7-12.
- [56] Xu H, Gong N, Chen L, et al. Sodium salicylate reduces gamma aminobutyric acid-induced current in rat spinal dorsal horn neurons [J]. *Neuroreport*, 2005, 16 (8): 813-816.
- [57] Smiley J F, Goldman-Rakic P S. Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy [J]. *J Comp Neurol*, 1996, 367(3): 431-443.
- [58] Zhou F M, Hablitz J J. Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex [J]. *J Neurophysiol*, 1999, 82 (6): 2 989-2 999.
- [59] Bennett B D, Huguenard J R, Prince D A. Adrenergic modulation of GABAA receptor-mediated inhibition in rat sensorimotor cortex [J]. *J Neurophysiol*, 1998, 79 (2): 937-946.
- [60] Gorelova N, Seamans J K, Yang C R. Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex [J]. *J Neurophysiol*, 2002, 88(6): 3 150-3 166.
- [61] Christophe E, Roebuck A, Staiger J F, et al. Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons [J]. *J Neurophysiol*, 2002, 88(3): 1 318-1 327.
- [62] Peruzzi D, Dut A. GABA, serotonin and serotonin receptors in the rat inferior colliculus [J]. *Brain Res*, 2004, 998(2): 247-250.
- [63] Liu J, Li X, Wang L, et al. Effects of salicylate on serotonergic activities in rat inferior colliculus and auditory cortex [J]. *Hear Res*, 2003, 175 (1-2): 45-53.