

GLAST 基因敲除对小鼠表型及听力功能的影响*

吴芳杉^{1,2}, 马科锋², 郑鹏芳^{1,2}, 余晓俊², 刘洪涛², 翟庆峰^{1Δ}, 崔博^{1,2Δ}

(1. 潍坊医学院公共卫生学院, 山东 潍坊 261053; 2. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050)

【摘要】 目的: 观察谷氨酸天冬氨酸转运蛋白 (GLAST) 缺失对小鼠正常听觉功能的影响。**方法:** 我们选用 C57BL/6J 背景的 GLAST^{+/-} 小鼠进行杂交, 用琼脂糖凝胶电泳进行后代小鼠基因型鉴定。我们选用 9~10 周龄雌性小鼠, 用免疫荧光染色技术检测耳蜗中 GLAST 蛋白表达, 对敲除结果进行验证 ($n=3$)。比较雌雄小鼠出生后 7d 至 30 d 体重变化及 30 d 的体长 ($n=8$)。听性脑干反应 (ABR) 测试 9-10 周龄雌性和雄性小鼠听觉阈值及其 I 波振幅的变化 ($n=5$)。**结果:** 雄性 GLAST^{-/-} 小鼠与雄性 GLAST^{+/+} 和 GLAST^{+/-} 小鼠相比, 体重及体长均显著降低 ($P<0.01$), 其中雄性 GLAST^{-/-} 小鼠与 GLAST^{+/+} 相比, 在 P7 至 P30 统计时间里, 均表现出明显差异; 与雄性 GLAST^{+/-} 小鼠相比, P15 后均表现出体重显著性降低。而雌性 GLAST^{-/-} 小鼠与雌性 GLAST^{+/+} 和 GLAST^{+/-} 小鼠相比, 体重及体长均未见明显差异。雄性和雌性小鼠三种基因型之间 ABR 检测到听力阈值变化均无差异, 但与雄性 GLAST^{+/+} 小鼠相比雄性 GLAST^{-/-} 小鼠 I 波振幅明显降低 ($P<0.01$); 而雌性的 I 波振幅在整个刺激强度都有降低, 但是多只在高强度刺激 (如 80 dB, 90 dB) 时具有显著性 ($P<0.05$)。**结论:** GLAST 敲除影响雄性小鼠正常生长发育, 同时降低 ABR I 波振幅, 但不改变阈值, 这提示 GLAST 敲除可能导致突触病变, 且这种影响存在性别差异。

【关键词】 谷氨酸天冬氨酸转运蛋白; 基因敲除; 基因型鉴定; 谷氨酸; 听觉功能; 小鼠

【中图分类号】 R764

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-107-006

【DOI】 10.12047/j.cjap.6363.2022.092

Effects of GLAST gene knockout on phenotype and hearing in mice

WU Fang-shan^{1,2}, MA Ke-feng², ZHENG Peng-fang^{1,2}, SHE Xiao-jun², LIU Hong-tao²,
ZHAI Qing-feng^{1Δ}, CUI Bo^{1,2Δ}

(1. School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang 261053; 2. Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects of glutamate aspartate transporter (GLAST) deletion on the normal auditory function of mice. **Methods:** We hybridized GLAST^{+/-} mice with C57BL/6J background and identified the genotypes of their offspring by agarose gel electrophoresis. 9-10-week-old mice were selected to detect the expression of GLAST protein in the cochlea by immunofluorescence staining and to verify the knockout results ($n=3$). The changes in weight from 7 days to 30 days after birth and the 30-day body length of male and female mice were compared ($n=8$). The auditory brainstem response (ABR) was used to detect the auditory threshold and the amplitude of wave I in 9-10-week-old male and female mice ($n=5$). **Results:** Male GLAST^{-/-} mice had shown significantly lower weight and body length compared to male GLAST^{+/+} and GLAST^{+/-} mice ($P<0.01$), and male GLAST^{-/-} mice showed significant differences compared to GLAST^{+/+} from P7 to P30 statistical time. Male GLAST^{-/-} mice exhibited a significant reduction in weight after P15 compared to male GLAST^{+/-} mice. In contrast, no significant differences in weight and body length were observed in female GLAST^{-/-} mice compared with female GLAST^{+/+} and GLAST^{+/-} mice. There was no difference in the hearing threshold detected by ABR between the three genotypes in both male and female mice, but the amplitude of wave I in GLAST^{-/-} mice was significantly lower than that in male GLAST^{+/+} mice ($P<0.01$). In contrast, the amplitude of wave I in females was reduced throughout the stimulus intensity but was most significant only at high-intensity stimulation (e.g. 80 dB, 90 dB) ($P<0.05$). **Conclusion:** GLAST knockout affects the normal growth and development of male mice, and decreases the amplitude of wave I, but do not change the threshold, suggesting that GLAST knockout may lead to synaptic pathological changes, and there are gender differences in this effect.

【KEY WORDS】 glutamate-aspartate transporter; gene knockout; gene identification; glutamate; auditory function; mice

隐性听力损失 (hidden hearing loss, HHL) 与噪

声暴露, 耳毒性药物, 老化和周围神经系统疾病有关^[1]。其表现为噪声环境下言语识别率降低^[2]。若此阶段及时发现并给予治疗, 内耳损伤大多可以恢复^[3]。目前, 内毛细胞和听神经纤维之间的带状突触损伤是 HHL 公认的致病机制之一, 其与谷氨酸

*【基金项目】国家自然科学基金面上项目 (81673136)

【收稿日期】 2022-07-08 【修回日期】 2022-09-28

Δ【通讯作者】 Tel: 15069696130, 13821388321; E-mail: sdzqqf@163.com, iamcuib@sina.com

兴奋性毒性有关^[4,5]。谷氨酸是神经系统中主要的兴奋性神经递质,当病理情况下,其合成释放过多或再摄取减少时,都会造成突触间隙谷氨酸浓度堆积,产生兴奋性毒性,造成神经元变性死亡^[6]。

GLAST 是 Na⁺ 依赖的高亲和力谷氨酸转运蛋白,它通过转运三个钠离子(Na⁺)和一个质子(H⁺)以及逆向转运一个钾离子(K⁺)来介导细胞外谷氨酸的再摄取^[7]。研究证明 GLAST 是目前已知耳蜗中唯一发挥谷氨酸再摄取功能的谷氨酸转运蛋白,它可以调控听神经突触间隙谷氨酸浓度,防止谷氨酸浓度过高产生兴奋性毒性^[5,8]。研究发现,GLAST 缺失与癫痫,精神分裂症等中枢神经系统疾病密切相关^[9-12],而 GLAST 缺失与外周听觉系统关系的研究还相对较少。我们前期研究发现噪声诱导的 HHL 模型小鼠 GLAST 表达可能降低。为了进一步探究 GLAST 在耳蜗突触病变过程中的作用,本实验拟用 GLAST 基因敲除小鼠,通过后代三种基因型表型及听觉功能对比,探究 GLAST 缺失是否影响内耳正常功能。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 GLAST^{+/-} C57BL/6J 小鼠 3 只(1 雄 2 雌),由赛业(广州)生物科技有限公司购入。其包括所有后代小鼠均饲养于军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所 SPF 级实验动物中心。室温(23±3)℃,12 h 光照/黑暗循环,自由取食、饮水,所有操作均符合实验动物伦理学要求。

1.2 主要试剂及仪器

蛋白酶 K (Biofroxx, 1124MG100), 5×TBE (Bio-sharp, BL548A), 4S Green 核酸染色剂 (Sangon, A616694), 兔抗 GLAST (Abcam, Ab416), 100 bp DNA ladder (Biosharp, BL101A), DNA 上样缓冲液 (Biosharp, BL532A), Alexa Fluor 549 山羊抗兔 IgG 荧光抗体 (Bioworld, 美国)、封片剂 (Bioworld, 美国)

梯度 PCR 仪 (Verti, 美国), 琼脂糖凝胶电泳槽 (Clever MSCHOICETRIO), 凝胶成像仪 (Amersham Image 680), 高速冰冻离心机 (Sigma 3k 15), 荧光显微镜 (Olympus BX51, 日本), 体式显微镜 (Olympus, SZX7, 日本), ABR 检测仪 (TDT, BioSigRZ6, 美国)

1.3 GLAST 基因敲除小鼠的后代表型观察

将购入的 3 只 GLAST^{+/-} 小鼠合笼,进行保种繁殖,并对生产情况进行详细记录。后代小鼠出生后第 1 日即为 P1。出生后每周观察仔鼠的生长发育情况(雌雄小鼠均包含在内),包括皮肤,被毛颜色、

光泽、有无褪毛,外观有无畸形等。并从 P7 可以区分辨认后开始监测体重变化情况直至 P30,同时记录小鼠 P30 体长对比。

1.4 GLAST 基因敲除鼠后代基因型鉴定

鼠趾尖组织基因组 DNA 提取:小鼠 P7 时,剪鼠趾尖组织 1~2 mm(同时用以标号)进行 DNA 提取。组织放于加入蛋白酶 K 的裂解液中,56℃ 水浴锅中过夜孵育。第 2 日从水浴锅中取出,立即放于 98℃ 金属板加热 15 min,后将样品高速离心 15 min。离心后所取上清液即为 DNA 模板。

PCR 扩增:PCR 引物序列由(赛业(广州)生物科技有限公司敲除报告中提供,上海生工生物工程股份有限公司合成)。序列如下:PCR Primers1 (Annealing Temperature) 60.0℃: F1: 5'-CTCA-CAAGGTGAACCTTAGCCTATC-3', R1: 5'-GGGGCTAGACCATAGGCTAAGT-3' (Product size: 659 bp); PCR Primers2 (Annealing Temperature 60.0℃): F1: 5'-CTCACAAGGTGAACCTTAGCCTATC-3', R2: 5'-ACAGCAATGATGGTAGTAGT-CATGT-3' (Product size: 427 bp)。以上 F1、R1、R2 3 种引物按照 1:1:1 比例混合,加入 Premix Taq 12.5 μl, DNA 1.5 μl,加入 ddH₂O 补至总体积 25 μl,进行 PCR 反应。反应体系配置完成后,于梯度 PCR 仪上按条件进行扩增,最后 4℃ 停留,扩增产物即为后续电泳样品(表 1)。

琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 扩增产物 5 μl,加入 DNA loader,在 2.5% 琼脂糖凝胶(0.5×TBE 配置)中以电压 105 V 由负极向正极进行电泳,时间 50 min。所得凝胶在化学发光凝胶成像系统中拍照分析,按照条带不同进行基因型鉴定。

Tab. 1 PCR reaction conditions

Step	Temp	Time	Cycles
Initial denaturation	94℃	3 min	1
Denaturation	94℃	30 s	
Annealing	60℃	35 s	35
Extension	72℃	35 s	
Additional extension	72℃	5 min	1

1.5 GLAST 基因敲除鼠后代听力检测

仔鼠出生后 9~10 周,选取 GLAST^{+/+}、GLAST^{+/-}、GLAST^{-/-} 雄性和雌性小鼠各五只,在电声屏蔽室中测量听觉脑干反应(the auditory brainstem response, ABR)。用戊巴比妥钠(1%, 0.01 ml/g)麻醉小鼠,将记录电极插入头部额中点,将参照电极放置在右耳乳突皮下,将接地针插入后爪皮下。在 click、4、8、16 和 32 kHz 刺激频率下记录 ABR 波形。刺激强度以 10 dB 为间隔,在接近阈值时,刺激强度

改为 5 dB 为间隔。以 II 波的最低刺激强度作为听阈,并重复 3 次以确定阈值。记录每个频率阈上刺激强度的 I 波振幅及潜伏期。

1.6 免疫荧光染色技术检测耳蜗中 GLAST 蛋白表达情况

仔鼠出生后 9 ~ 10 周,选取 GLAST^{+/+}、GLAST^{+/-}、GLAST^{-/-} 雄性小鼠各一只,对基因型鉴定结果进行验证。用戊巴比妥钠(1%,0.01 ml/g)麻醉小鼠,脱臼处死。仔细取出耳蜗,在体式显微镜下于 PBS 中小心地剔除肌肉组织,并在耳蜗顶钻一个小洞,用注射器从圆窗向耳蜗腔内缓慢注入 4% 多聚甲醛,冲出残留血液,直至耳蜗顶流出液体变清澈。用 4% 多聚甲醛固定 24 h,后置入 10% 乙二胺四乙酸中脱钙 24 ~ 48 h。在 PBS 中剥离耳蜗基底膜,将耳蜗组织在含有 1% Triton-×100 的 PBS 中室温孵育 30 min,然后在含有 0.2% Triton-×100 和 5% BSA 的 PBS 中室温孵育 1 h。兔抗 GLAST(1 : 200, Abcam, Ab416)常温条件下过夜孵育。第二日用含 1% Triton-×100 的 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。Alexa Fluor549 山羊抗兔 IgG 荧光抗体(1 : 500, Bioworld)孵育 1 h,用含 1% Triton-X 100 的 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。洗涤后铺片,于荧光显微镜拍照分析。

1.7 统计学处理

结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均用 GraphPad Prism 8 软件处理,多组间比较使用双因素方差分析。

2 结果

2.1 GLAST 基因敲除小鼠基因型鉴定

琼脂糖凝胶电泳基因型片段为:仅有一条 659 bp 条带为 GLAST^{-/-}、有 659 bp 和 427 bp 各一条带为 GLAST^{+/-}、仅有 1 条 427 bp 条带为 GLAST^{+/+}。WT 为野生型对照,ddH₂O 为空白对照(图 1A)。然后在基因型鉴定结果的基础上,通过 GLAST 免疫荧光染色技术,从不同角度证明敲除的可靠性,进一步对敲除小鼠进行确认(图 1B)。GLAST^{+/+} 与 GLAST^{+/-} 小鼠在耳蜗基底膜支持细胞处均可见 GLAST 阳性表达。而 GLAST^{-/-} 未见阳性表达。证明所用 GLAST^{-/-} 小鼠均为纯合体。

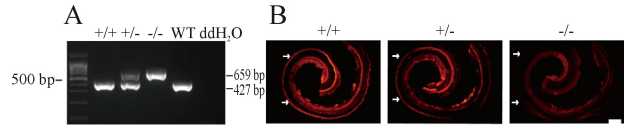


Fig. 1 Genotype identification and analysis of GLAST expression in mouse cochlea(Immunofluorescence ×100)

A: Identification of mouse genotypes (+/+ : GLAST^{+/+}; +/- : GLAST^{+/-}; -/- : GLAST^{-/-}; WT: Wild type control; ddH₂O: Blank control); B: The cochlear tissue of adult male mice were stained with immunofluorescence-GLAST (red), Scale=200 μ m. →The location of the supporting cells in the cochlea was indicated by GLAST, and the red fluorescence showed the positive expression of DNA

2.2 GLAST 缺失影响小鼠体重及体长

C57BL /6J 遗传背景的后代新生仔鼠无毛,皮肤红润,闭眼,双耳与皮肤黏连,身体向腹侧蜷缩,但 GLAST^{-/-} 仔鼠相较 GLAST^{+/+} 仔鼠个头明显较小。雄性 GLAST^{-/-} 小鼠体重明显低于 GLAST^{+/+} 与 GLAST^{+/-} 小鼠,而 GLAST^{+/-} 小鼠与 GLAST^{+/+} 小鼠之间体重无明显差异(图 2A);体长与体重结果一致,P30 的 GLAST^{-/-} 小鼠体长明显小于 GLAST^{+/+} 与 GLAST^{+/-} (图 2C)。而雌性小鼠三种基因型之间体重及体长均未见明显差异(图 2B、D)。

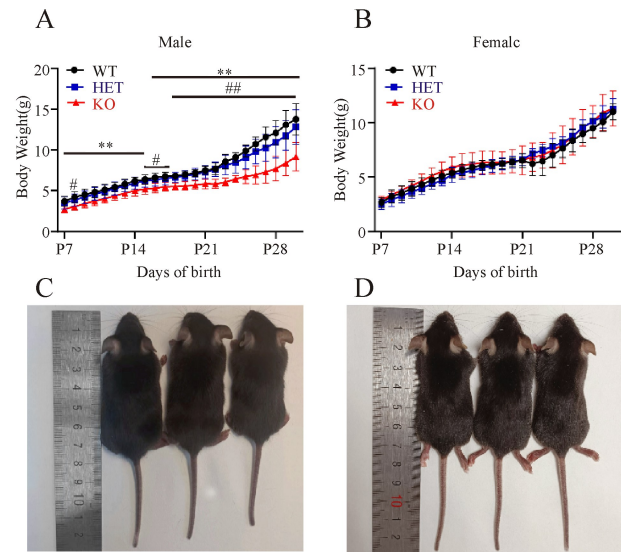


Fig. 2 Weight change of P7-P30 and comparison of body length of P30

A, B: Changes of P7-P30 body weight in three groups of newborn male and female mice ($n = 8$); WT: GLAST^{+/+}; HET: GLAST^{+/-}; KO: GLAST^{-/-}; C, D: Comparing the body length of P30 between male and female mice of the three groups, GLAST^{+/+} GLAST^{+/-} GLAST^{-/-} mice were from left to right

2.3 GLAST 缺失损伤小鼠正常听觉功能

我们对成年(9 ~ 10 周龄)雄性和雌性 GLAST 基因敲除小鼠进行 ABR 检测,结果显示三种基因型

小鼠彼此之间听力阈值没有差异(图3,4A,5A)。在所有检测频率阈上刺激强度,雄性和雌性 $GLAST^{+/-}$ 小鼠与 $GLAST^{+/+}$ 小鼠 I 波振幅均未表现出明显差异;但雄性 $GLAST^{-/-}$ 小鼠 I 波振幅明显低于前两组(图4B-F),而雌性 $GLAST^{-/-}$ 小鼠 I 波振幅仅在高刺激强度(如 80 dB,90 dB)时明显低于前两组(图5B-F)。结果表明 $GLAST$ 缺失影响 I 波振幅,但是不影响阈值,且在雄性之间这种影响存在差异。

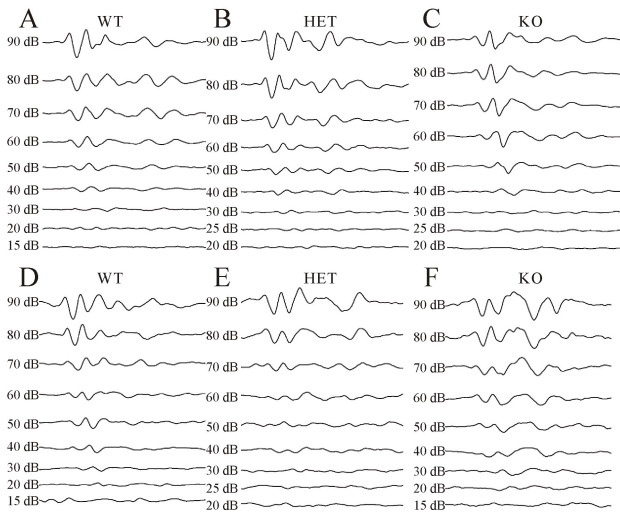


Fig. 3 16KHz waveform display

A-C: Comparison of ABR 16 kHz waveforms in $GLAST^{+/+}$, $GLAST^{+/-}$ and $GLAST^{-/-}$ male mice; D-F: Comparison of ABR 16 kHz waveforms in $GLAST^{+/+}$, $GLAST^{+/-}$ and $GLAST^{-/-}$ female mice

3 讨论

本实验的主要目的为揭示 $GLAST$ 基因敲除对 C57 小鼠生长发育和耳蜗听觉功能的影响。Yu 等^[13]发现 $GLAST$ 基因敲除杂合小鼠后代出现非孟德尔杂交定律,纯合子小鼠仅占 10% 左右,这是 $GLAST$ 基因敲除鼠饲养繁育的难点之一。

我们的研究发现 $GLAST^{-/-}$ 小鼠体重、体长均比 $GLAST^{+/+}$ 小鼠低,说明 $GLAST$ 缺失可能影响雄性小鼠正常生长发育或者代谢功能。研究发现长期高脂饮食诱导的小鼠肥胖模型中,星形胶质细胞上 $GLT-1$ 、 $GLAST$ 表达上调。这一调节可能是防止胞外谷氨酸累积产生兴奋性毒性^[14]。Fuente-Martin^[15]等发现在新生营养过剩大鼠幼鼠中, $GLT-1$ 和 $GLAST$ 表达较高。而禁食后空腹也会诱导 $GLAST$ 升高,这与谷氨酸摄取增加和星形胶质细胞神经元活动保持一致,而神经元活动增加会刺激葡萄糖摄取。 $GLAST$ 缺失可能阻碍这一功能,导致小鼠进食欲望减少,体重下降。总之,谷氨酸的稳态失衡可能是导致这一现象的关键,可能通过控制食欲或调节能量代谢的方式,其复杂机制仍需进一步探索。而雌性小鼠体重体长均未发现明显差异,这可能是由于雌激素对于谷氨酸兴奋性毒性的神经保护作用抵消了 $GLAST$ 缺失在生长发育方面造成的影响^[16]。

谷氨酸作为神经系统的重要兴奋性神经递质,其中枢神经系统中的作用及机制得到广泛关注,

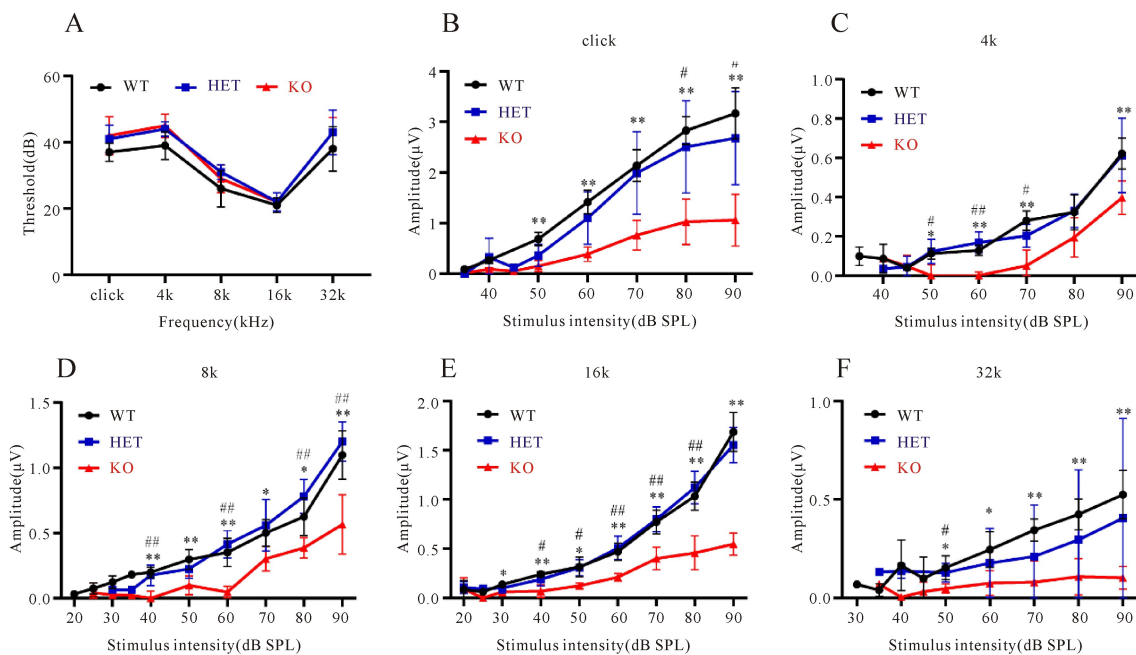


Fig. 4 Threshold and amplitude changes in males

A: The ABR threshold of adult male $GLAST^{+/+}$, $GLAST^{+/-}$ and $GLAST^{-/-}$ mice aged 9-10 weeks ($n=5$); B-F: The amplitude of wave I ($n=5$)

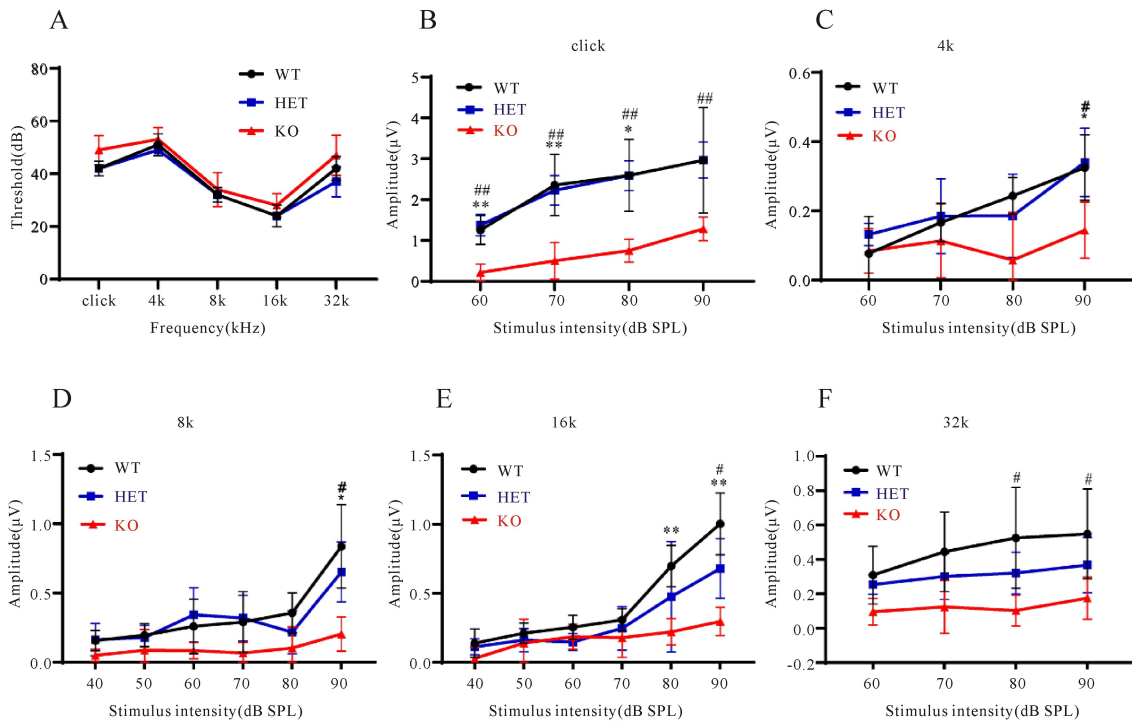


Fig. 5 Threshold and amplitude changes in females

A: The ABR threshold of adult female $GLAST^{+/+}$, $GLAST^{+/-}$ and $GLAST^{-/-}$ mice aged 9-10 weeks ($n=5$); B-F: The amplitude of wave I ($n=5$)

而对外周听觉系统作用的研究相对较少。Carozzi^[17]等研究发现谷氨酸在外周感觉输入的传导中有重要作用。Hakuba^[18]等发现 $GLAST$ 缺失耳蜗外淋巴谷氨酸水平是野生型小鼠的两倍, $GLAST$ 缺失造成小鼠约 10 dB 的阈移,但在毛细胞或树突水平上没有观察到明显的结构异常。他认为 $GLAST$ 缺失造成的谷氨酸浓度升高可能会导致阈值升高,但不至于产生结构损伤;或者还有一些可能引起阈值升高的结构损伤没被发现,说明谷氨酸的兴奋性毒性影响听觉功能。最近 Tserga 等^[19]研究发现 $GLAST^{-/-}$ 小鼠阈值并未发生改变,但出现 ABR I 波振幅降低,配对带状突触减少。这些研究都说明 $GLAST$ 缺失确实对听觉系统产生影响。我们的实验选取成年雄性和雌性小鼠进行 ABR 检测,发现检测频率下三种基因型小鼠阈值无差异。但与 $GLAST^{+/+}$ 小鼠相比, $GLAST^{-/-}$ 小鼠 I 波振幅降低。雄性在阈上刺激强度振幅均有降低,但雌性小鼠仅在较高刺激强度时有一定程度的降低。这可能与雌激素对于听力有一定的保护作用有关^[20]。有趣的是,只有 $GLAST^{-/-}$ 小鼠才表现出听觉功能的损伤,而 $GLAST^{+/-}$ 小鼠听力阈值与 I 波振幅均未发现明显差异,说明单倍体有足够的听力保护作用。我们的结果与一些研究结果是一致的。

综上所述, $GLAST$ 缺失造成小鼠听觉功能损伤, ABR 结果显示出隐性听力损失的特点;推测其

与 $GLAST$ 缺失造成谷氨酸再摄取障碍,产生兴奋性毒性有关,提示 $GLAST$ 可能是隐性听力损失过程中一个关键蛋白。本研究为下一步探讨 $GLAST$ 在隐性听力损失中的作用及其调控机制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Kohrman DC, Wan G, Cassinotti L, et al. Hidden hearing loss: A disorder with multiple etiologies and mechanisms [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10 (1): 1-20.
- [2] 孙 娟. 隐性听力损失在职业健康监护中的研究进展 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2021, 39(6): 478-480.
- [3] Ding T, Yan A, Liu K. What is noise-induced hearing-loss? [J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2019, 80(9): 525-529.
- [4] 马科锋, 余晓俊, 崔 博. 隐性听力损失的发生与内耳 $GLAST$ 相关性的研究进展 [J]. *中华耳科学杂志*, 2021, 19(6): 973-976.
- [5] Ma K, Zhang A, She X, et al. Disruption of glutamate release and uptake-related protein expression after noise-induced synaptopathy in the cochlea [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 720902.
- [6] Hu N, Rutherford MA, Green SH. Protection of cochlear synapses from noise-induced excitotoxic trauma by blockade of $Ca(2+)$ -permeable AMPA receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(7): 3828-3838.

- [7] Pajarillo E, Rizor A, Lee J, *et al.* The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 161: 107559.
- [8] Glowatzki E, Cheng N, Hiel H, *et al.* The glutamate-aspartate transporter GLAST mediates glutamate uptake at inner hair cell afferent synapses in the mammalian cochlea [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(29): 7659-7664.
- [9] Nagatomo K, Ueda Y, Doi T, *et al.* Functional role of GABA transporters for kindling development in GLAST KO mice [J]. *Neurosci Res*, 2007, 57(2): 319-321.
- [10] Tsuru N, Ueda Y, Doi T. Amygdaloid kindling in glutamate transporter (GLAST) knockout mice [J]. *Epilepsia*, 2002, 43(8): 805-811.
- [11] Karlsson RM, Tanaka K, Heilig M, *et al.* Loss of glial glutamate and aspartate transporter (excitatory amino acid transporter 1) causes locomotor hyperactivity and exaggerated responses to psychotomimetics; rescue by haloperidol and metabotropic glutamate 2/3 agonist [J]. *Biol Psychiatry*, 2008, 64(9): 810-814.
- [12] Uchida M, Hida H, Mori K, *et al.* Functional roles of the glial glutamate transporter (GLAST) in emotional and cognitive abnormalities of mice after repeated phencyclidine administration [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2019, 29(8): 914-924.
- [13] Yu H, Vikhe Patil K, Han C, *et al.* GLAST deficiency in mice exacerbates gap detection deficits in a model of salicylate-induced tinnitus [J]. *Front Behav Neurosci*, 2016, 10: 158.
- [14] Cano V, Valladolid-Acebes I, Hernandez-Nuno F, *et al.* Morphological changes in glial fibrillary acidic protein immunopositive astrocytes in the hippocampus of dietary-induced obese mice [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(11): 819-822.
- [15] Fuente-Martin E, Garcia-Caceres C, Granado M, *et al.* Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 3900-3913.
- [16] Lan YL, Zhao J, Li S. Estrogen receptors' neuroprotective effect against glutamate-induced neurotoxicity [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(11): 1657-1662.
- [17] Carozzi V, Marmioli P, Cavaletti G. Focus on the role of glutamate in the pathology of the peripheral nervous system [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2008, 7(4): 348-360.
- [18] Hakuba N, Koga K, Gyo K, *et al.* Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(23): 8750-8753.
- [19] Tserga E, Damberg P, Canlon B, *et al.* Auditory synaptopathy in mice lacking the glutamate transporter GLAST and its impact on brain activity [J]. *Prog Brain Res*, 2021, 262: 245-261.
- [20] 陈龙, 杨玉琪, 冯子奕, 等. 雌激素对老年 C57BL/6J 小鼠耳蜗螺旋神经节细胞凋亡的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(6): 529-533.

(上接第 95 页)

症反应,降低 BALF 中 IL-4、IL-13 及 TNF- α 的含量,抑制肺组织 SP、PGP9.5 的表达,提高脑组织中具有镇咳作用的 5-HT 水平;进一步的研究显示,当归可降低肺组织 cAMP、Epac1 基因及蛋白的表达水平。

综上所述,当归对阴虚证慢性咳嗽有明显的止咳作用,下调 cAMP/Epac 信号通路,缓解气道神经源性炎症、降低咳嗽神经通路敏感性是当归治疗慢性咳嗽的作用机制之一,而降低 cAMP 水平也是当归缓解阴虚证表征指标的机制之一。

【参考文献】

- [1] 赵凌云, 李宏云. 慢性咳嗽的治疗新进展 [J]. *中国全科医学*, 2022, 24(8): 930-940.
- [2] 韩曙光, 赵弘卿. Epac: 新的支气管哮喘治疗靶分子 [J]. *中华哮喘杂志(电子版)*, 2013, 7(6): 448-451.
- [3] 孟景春. 当归治久咳、夜咳 [J]. *江苏中医*, 1995, 16(8): 24.
- [4] 陈千, 熊富良, 张雪琼. 甘草苷对感染后咳嗽(肺阴虚证)小鼠的止咳作用机制及抗氧化作用的研究 [J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 54(5): 841-848.
- [5] 姚楠, 韦凌霞, 王志旺, 等. 当归对阴虚哮喘小鼠气道黏液高分泌及 TNF- α /NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(2): 97-100.
- [6] 程羽, 陈静, 张晓梅, 等. 玉屏风散加味方干预慢性阻塞性肺疾病气道重塑的探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(22): 108-112.
- [7] 王志旺, 刘雪枫, 妥海燕, 等. 当归对阴虚哮喘小鼠肺组织水通道蛋白 1 表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(1): 95-98.
- [8] Ju W, Zhao K, Li RX. Progress in the treatment of chronic cough in children with traditional chinese medicine through anti-inflammatory action [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2020, 47(8): 858-866.
- [9] Mazzone SB, Chung KF, McGarvey L. The heterogeneity of chronic cough: a case for endotypes of cough hypersensitivity [J]. *Lancet Resp Med*, 2018, 6(8): 636-646.
- [10] 袁欢欢, 李琳, 李全民. Epac1 与神经性疼痛的研究进展 [J]. *医学综述*, 2018, 24(5): 868-872.