

中山醫學大學醫學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Medicine

Chung Shan Medical University

L-Arginine 與 Taicatoxin 對外毛細胞運動性之
影響

Effects of L-Arginine and Taicatoxin on the
Motility of Outer Hair Cells

指導教授：林瑞生教授 Ruey-Hseng Lin, Ph.D.

林明忠教授 Min-Jon Lin, Ph.D.

研究生：洪垂瑱 Chui-Chen Hung

中華民國九十二年六月

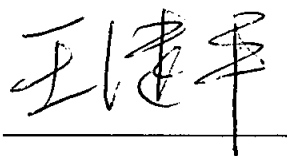
June, 2003

本論文為中山醫學大學授予學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

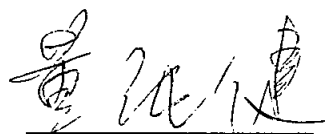
台中榮總教研部教授

王繼平



中山醫學大學生理學科副教授

黃純健



台中榮總教研部助理教授

陳春榮



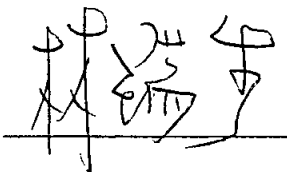
中山醫學大學生命科學系助理教授
(論文共同指導教授)

林明忠



中山醫學大學藥理學科教授
(論文指導教授)

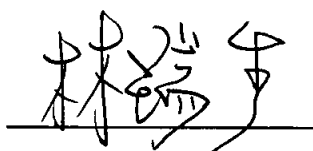
林瑞生



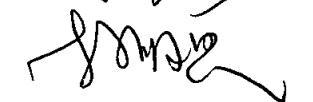
中華民國九十二年六月

學生洪垂瑱論文題目為「L-Arginine 與 Taicatoxin 對天竺鼠外毛細胞運動性的影響」，其論文已經中山醫學大學醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 林瑞生

簽名：

林明忠

簽名：

中華民國九十二年六月

誌謝

論文終究是完成了，雖然過程不算順利，成果談不上輝煌，但它真的出爐了。撰寫論文的這段日子裡，我要感謝我的指導老師林明忠老師、林瑞生老師細心且耐心的指導，也要感謝劉秉慧老師在我徬徨的時候為我點燃一盞燈，助我找到前進的方向。感謝博甦、弘泰、健中為實驗室的付出，為我們帶來了歡笑；杏美、美智、珮岑、亭萱對我的鼓勵；感謝珀玉、家豪陪我做最後的衝刺。感謝醫研所靜宜小姐於我們在學期間給予的協助；還要感謝我最親愛的同學佩珊，兩年來對我的支持與包容。最後要感謝我的家人，尤其是我的母親，從等待放榜到口試結束，抱歉讓您憂心了。

在中山的兩年，感覺好長，發生了很多事，遇到了很多好人，學習到另一種思考模式，這種感覺怎麼形容呢？對了，就好像「當兵兩年」的心情，令人又愛又恨。

縮寫表

8-br-cGMP	8-bromo-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin-dependent kinase II
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
Co ²⁺	Cobaltous chloride
EGTA	Ethylene glycol-bis (β -aminoethylether)- N, N',N'- tetraacetic acid
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
7-NINA	7-nitroindazole
MLCK	Myosin light chain kinase
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
pCPT-cGMP	8-(-4-chlorophenylthio)guanosine 3', 5'-cyclic mono- phosphate
sGC	Soluble guanylyl cyclase

中文摘要

本研究在探討 L-arginine 與 taicatoxin 對天竺鼠之耳蝸外毛細胞的作用。L-arginine 能增加天竺鼠外毛細胞的長度，而 D-arginine 或其他類似胺基酸（如 L-aspartate 或 L-glutamate）的作用卻不會引起相同的反應。同樣的，一種具有穿透細胞膜能力的環鳥糞嘌呤核苷單磷酸(cGMP)類似物，8-(-4 chlorophenylthio) guanosine 3' , 5' -cyclic monophosphate (pCPT - cGMP) 或 8 - bromo-guanosine 3' , 5-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) 也能延長天竺鼠外毛細胞。L-arginine 延長外毛細胞之作用以一氧化氮合成酶抑制劑 (NOS) , N^G - nitro - L - arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) 或 7 - nitroindazole (7-NINA), 前處理 30 分鐘可減弱。比較 L-arginine 和 ionomycin 延長外毛細胞的作用後發現，L-arginine 不會改變細胞內鈣離子的螢光表現強度。用 EGTA (3 mM) 預處理外毛細胞 40 分鐘來減少細胞外鈣離子濃度，並不能改變 L-arginine 的作用。這些結果指示，一氧化氮(NO)/環鳥糞嘌呤核苷單磷酸(cGMP)路徑可能參與哺乳類動物外毛細胞的運動性。此外，L-arginine 的作用並不依賴細胞外的鈣離子濃度。

Taicatoxin 萃取自澳洲大斑蛇(*Oxyuranus scutellatus*), 爲一種高閾值鈣離子管道阻斷劑以及低傳導鈣離子依賴性鉀離子管道阻斷劑 (small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels)。以 taicatoxin ($0.19 \mu\text{M}$) 前處理外毛細胞能明顯阻斷高鉀溶液 (50 mM) 縮短外毛細胞之作用。同樣的, cobaltous chloride, 一種非選擇性鈣離子管道阻斷劑, 亦能明顯阻斷高鉀溶液縮短毛細胞之作用, 但 ionomycin 延長毛細胞之作用不受其影響。其他的鈣離子管道阻斷劑 nifedipine (L-型阻斷劑)、 ω -conotoxin GVIA (N-型阻斷劑)、 ω -agatoxin IVA (P-型阻斷劑), 皆無法影響高鉀溶液所誘發之細胞長度的改變。比較 taicatoxin 和 cobaltous chloride 影響外毛細胞之長度與細胞內鈣離子濃度的變化, taicatoxin 與 cobaltous chloride 二者都能阻斷高鉀溶液縮短毛細胞, 但 taicatoxin 不能抑制高鈣溶液 (5 mM) 增加細胞內鈣離子濃度。總而言之, taicatoxin 的作用與細胞膜鈣離子管道或細胞內鈣離子濃度之間並無直接關係。

不論 L-arginine 或 taicatoxin 的作用皆與鈣離子濃度的變化或鈣離子管道無關, 這也支持了之前其它實驗室所發表的非鈣依賴性的毛細胞運動假說。

Abstract

The effect of L-arginine on the mammalian cochlear outer hair cell was studied in this experiment. L-arginine but not D-arginine or other amino acids (L-aspartate or L-glutamine) induced length increases of guinea pig outer hair cell. Similarly, a membrane permeable cyclic GMP analog, 8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (pCPT-cGMP) or 8-bromo-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate induced length increases of guinea pig outer hair cells. These length increases induced by L-arginine can be attenuated by a 30 min preincubation of the cells with the nitric oxide synthase inhibitors, N^G-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) or 7-nitroindazole (7-NINA). Comparison on the elongate effect of cell length of L-arginine and ionomycin, L-arginine did not change the fluorescence intensity of fluo-3. Preincubation of the cells with EGTA (3 mM) for 40 min to reduce the extracellular calcium concentration did not influence the effect of L-arginine. The results demonstrated that nitric oxide/cGMP pathway involved in regulating the slow motility of mammalian outer hair cell can not be ruled out. In addition, the effect of L-arginine is independent of extracellular calcium concentration.

Taicatoxin isolated from the venom of the Australian taipan

snake (*Oxyuranus scutellatus*), has been previously regarded as a blockers of high threshold Ca^{2+} channels and small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. Taicatoxin (0.19 μM) significantly prevented the cell shortening induced by high potassium (50 mM) medium. Similarly, cobaltous chloride, a nonselective calcium channel blocker, was to significantly reduced the effect of cell shortening induced by high potassium but not the effect of cell elongation induced by ionomycin. Other calcium channel blockers, nifedipine, ω -conotoxin GVIA, ω -agatoxin IVA did no such effect in prevented the cell length change induced by high potassium. Comparing the effects of taicatoxin and cobaltous chloride on the cell length and intracellular calcium change in outer hair cell, both taicatoxin and cobaltous chloride were able to prevent the cell shortening induced by high potassium but taicatoxin did not prevent the intracellular calcium increase induced by high calcium medium. The effect of taicatoxin was no relative with the membrane calcium channels or intracellular calcium concentration. In summary, the effects of L-arginine and taicatoxin were not relative with the calcium channels or cellular calcium concentration.

Neither the action of L-arginine, nor taicatoxin were relative with the changes of calcium concentration or calcium channels. These findings support the hypothesis of calcium-independent slow motility of outer hair cells as described previously.

第一章、緒論

1 - 1. 聲音訊息的傳入機制

聲波震動外耳與中耳內的空氣，再經由卵圓窗 (oval window) 傳入內耳。內耳主要構造是耳蝸 (cochlear) 中間充滿淋巴液，外形呈螺旋狀旋轉 2.75 圈 (圖 1-1)。而耳蝸內柯蒂氏器 (organ of cortis) 與毛細胞 (hair cell) 的互動控制著聲音訊息的傳遞。聽覺受器毛細胞的上端有纖毛，而毛細胞又分為兩種，圖 1-2 左為內毛細胞 (inner hair cell)；右邊為外毛細胞 (outer hair cell)。而外毛細胞主要負責聲波放大的機制。

1 - 1.1 耳蝸的機制

我們已經知道哺乳類動物能運用耳蝸分區毛細胞的機械特性，將組成複雜的聲波頻率分析出來。約六十年前物理學者首先將耳蝸機制簡化成一種簡單的數學模式，在這個模式中耳蝸被簡化成一個充滿液體的管子，而基底膜將此管子依縱向分區。1940 年代 von Békésy 已將不同的聲音頻率沿著耳蝸分區繪製成共鳴興奮區域圖，因而耳蝸被視為所有音域的機械性頻率分析者。

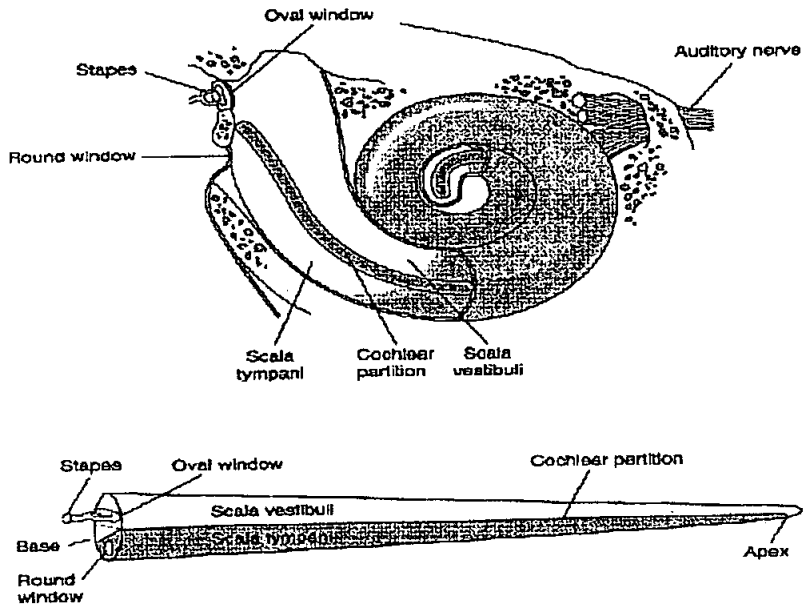


圖 1-1 耳蝸。圖下方為耳蝸拉直後的簡化模式。

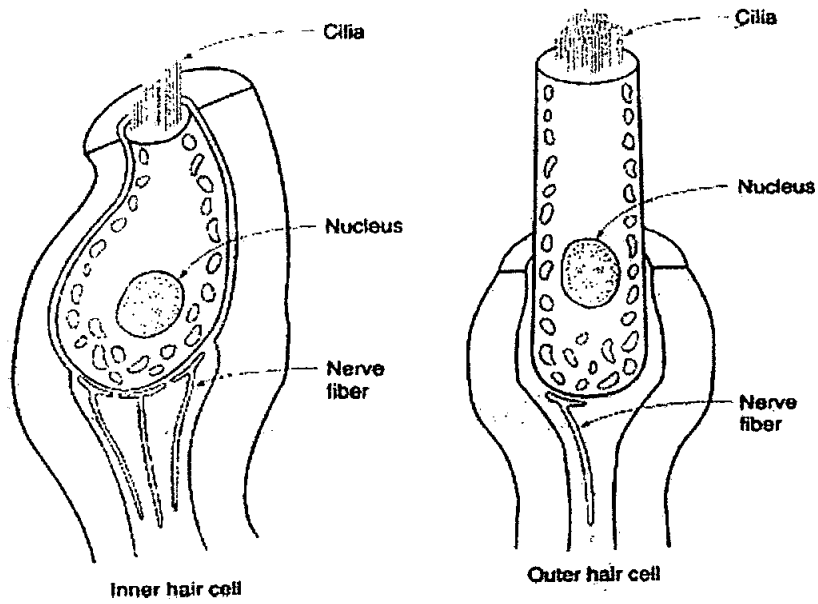


圖 1-2 內、外毛細胞。圖左為內毛細胞呈葫蘆型，圖右為外毛細胞數量約為內毛細胞數量的三倍。

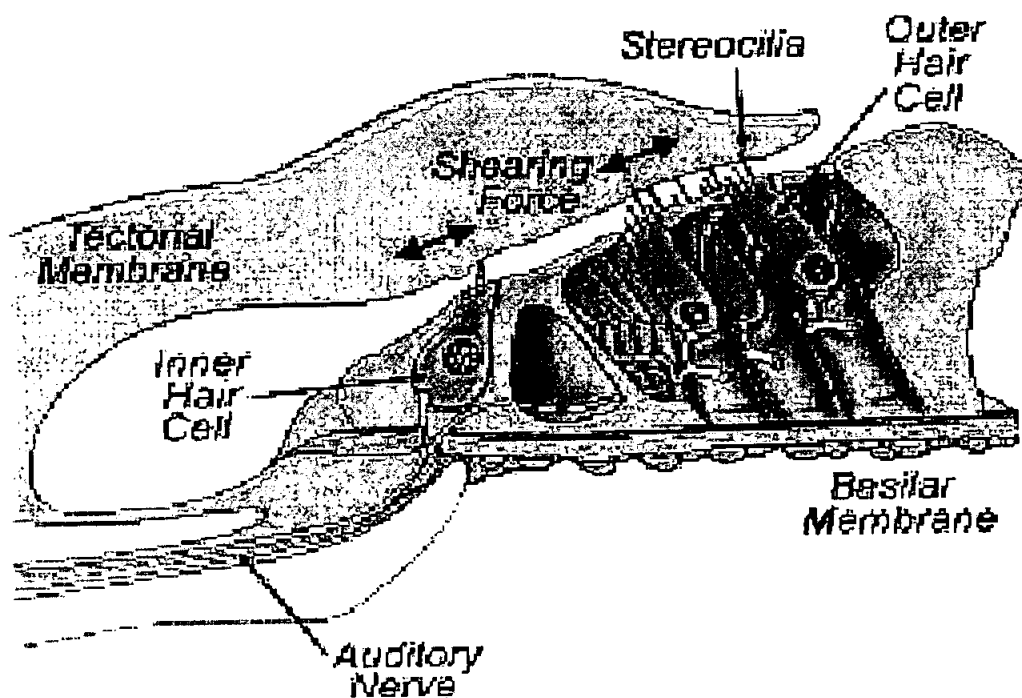


圖 1-3 耳蝸內柯蒂氏器結構圖。

1 - 1.2 機械-電性 傳導 (mechano-electric transduction)

當聲波震動蓋膜 (tectorial membrane；圖 1-3) 時纖毛會彎曲，機械性的交錯擺動控制著傳導管道並在細胞內產生接受器電位 (receptor potentials)。這個正向增加電位的力量來自毛細胞纖維束浸泡的內淋巴液，離子穿過機械-電性傳導通道 (mechano-electrical transduction channels) 而形成。

內淋巴液的離子組成是特殊的與細胞外液有些相似 (Citron et al., 1956; Bosher and Warren, 1968; Bosher and Warren, 1978; Sellick and Johnstone, 1975)：含有高濃度鉀、低

鈣、低鈉、低鎂。長纖毛和與他們相連接的傳導管道浸泡於階室的內淋巴液中。活化 *stria vascularis* 的幫浦能使鉀離子穿過鉀離子管道外流至階室的溶液中，以維持細胞內鉀離子的濃度。雖然傳導管道的本質是陽離子選擇性的，但是當鉀離子為主要陽離子時，它會表現出鉀離子管道的功能將電荷帶入細胞。鉀離子穿過毛細胞的基底側膜離開細胞，它能決定細胞所有的電位變化。因此對於聲波引起的反應鉀離子管道扮演重要的角色。外毛細胞最少有三種型態的鉀離子管道，在負電位被活化並且保持外毛細胞的過極化性 (hyperpolarization)。

去極化接受器電位活化了在靜止狀態下原本關閉的電位控制鈣離子通道 (voltage-gated calcium channels)，伴隨突觸前活化區釋放神經傳導物質，並在突觸後傳入神經纖維 (afferent nerve fiber) 引發動作電位。大部分的傳入神經纖維每一條支配一個內毛細胞，而卻以一條神經產生許多分支的方式同時支配多個外毛細胞 (Spoendlin, 1984)。聲音的傳入引起一連串的動作電位，將不同頻率與強度的聲波轉換成不同的訊息密碼，再由腦幹的聽覺核 (auditory nuclei) 分析這些傳入的密碼 (Knudsen, 1983; Goldberg and Brown, 1969; Moiseff and Konishi, 1983)。

1 - 1.3 耳蝸中外毛細胞的運動性 (motility) 依賴細胞膜

在很早以前 Kalinec 和 Kachar 就已經證明一些化學製劑像是水楊酸 (salicylic acid)、硫氫製劑 (sulfhydryl reagents)(1993) 會抑制外毛細胞的運動性，但因為這些製劑影響多種細胞內功能，以致無法分辨主要的抑制途徑。外毛細胞的運動與其他細胞明顯不同，它的作用並不需要 ATP 的存在 (Kachar et al., 1986; Holley and Ashmore, 1988b) 而且它不受促進肌動蛋白 (actin) 以及微管 (tubulin) 聚合或分解藥物之影響(Holley and Ashmore, 1988a)。硫氫製劑對毛細胞運動的抑制顯示了蛋白質的介入 (Kalinec and Kachar, 1993)。

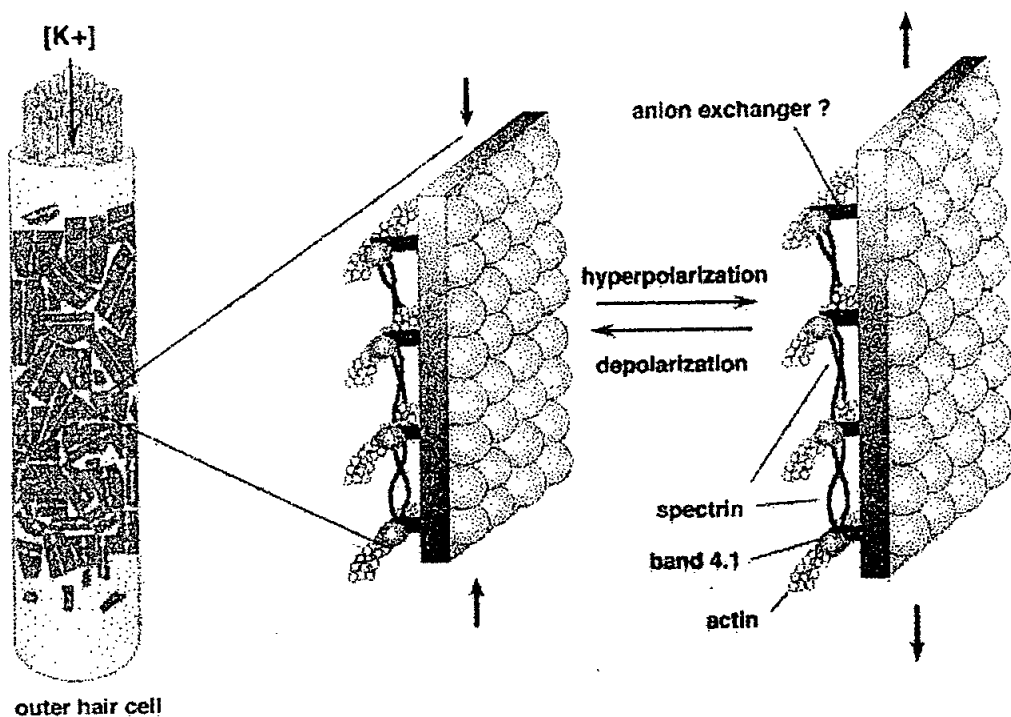


圖 1-4. 外毛細胞力生成單元模型圖

外毛細胞自體支撐 (self-supporting) 維持型態主要是靠皮質結構 (cortical structure) 和一種位於皮質的格子狀構造，排列於細胞側膜內的雙向細胞骨架 (cytoskeleton) (Holley and Ashmore, 1998a, 1990; Gregory et al., 1998)(圖 1 - 4)。環繞的肌動蛋白纖維束與縱向的 spectrin 交叉連接決定了縱向的皮質格狀結構 (Holley et al., 1992; Tolomeo et al., 1996)，而觀察外毛細胞的運動反應主要著眼於縱向變化。Diamide 能氧化半胱氨酸 (cysteine) 的硫氫基成雙硫基 (disulfide) 而影響 spectrin，但對肌動蛋白並沒有影響 (Becker et al., 1986)。外毛細胞在處理過 diamide 後運動反應仍能持續，這表示細胞運動並不需要完整的細胞骨架存在。

1 - 1.4 耳蝸對聲波放大作用 (amplification) 的分子組成

當細胞內某種力產生時外毛細胞會以細胞運動將它表現出來，而這種力形成的分子組成已經被瞭解。這種力的分子組成來自於外毛細胞基底側膜 (basolateral membrane) 緊密排列的運動元分子，它能利用穿越細胞膜的電荷產生出能量。從這些側膜顆粒也發現了電生理特徵，當膜電位改變時外毛細胞膜會形成一種快速且短暫的電流，類似電荷的移動。這種現象

被發現在離子管道遭受構型改變時，就好像是限制電荷的進出一樣。生物物理學者用最簡單的方法表示出運動元的作用模式，而它屬於一種區域性運動元。當膜電位改變，細胞膜上的每一分子都會遭受構型的改變。運動元的高密度排列是爲了確保蛋白質的一點小變化能放大成顯微鏡下可觀察出來的長度改變，因此所有的運動元是一連串序列。

最近已有更明顯的進展，一種作用類似區域性運動元的蛋白質已於外毛細胞（內毛細胞不存在）被鑑定出來。它是一種由 744 個胺基酸組成的蛋白質，當表現在腎臟細胞株它能顯現出毛細胞運動元的生物物理學特性，這個蛋白質已經被命名爲 ‘prestin’。(Lieberman et al., 2002 ; Dallos 2002 ; Ashmore , 2002)。

1 - 2. NO 的研究與發展

NO 是空氣污染物 NOX 主要成份之一，NOX 普遍存在於汽車排放的廢氣中，它也是酸雨形成的主要因子，在過去真是惡名昭彰，但如今被發現是人體內許多重要生物作用的媒介，相當令人驚訝。

Ferid Murad 在 1977 年的幾篇論文中描述，NO 可以活化一種稱爲 guanylate cyclase (GC) 的酵素，此種酵素可將鳥糞

嘌呤核苷三磷酸（GTP）轉化成環鳥糞嘌呤核苷單磷酸（cGMP），而且 cGMP 的增加與平滑肌的舒張有關，這對當時普遍認為環鳥糞嘌呤核苷單磷酸導致肌肉收縮的觀念，已經是一個挑戰。他更進而根據實驗結果，提出如硝基氫氰酸鹽（nitroprusside）及硝化甘油（nitroglycerin）等臨床上使用之血管鬆弛劑的作用機制與釋放一氧化氮有關。

血管的收縮與鬆弛是血壓調節的基本機制。Furchgott 一直在研究調控血管的收縮與放鬆的藥物，但是經常得到不一致的結果。一九七〇年代使用離體的動脈來研究乙醯膽鹼（acetylcholine）對動脈平滑肌的作用。乙醯膽鹼在當時已經確知在動物活體內可引發極顯著的血管放鬆；但是在離體血管實驗中，乙醯膽鹼有些時候會造成血管平滑肌放鬆，但大部分時候卻造成血管肌肉收縮。經過詳細追蹤實驗過程，Furchgott 發現在血管肌肉會放鬆的實驗中，研究助理並沒有把分離出來的血管「清理乾淨」，亦即血管最內層的一層薄薄的內皮（endothelium）細胞被「不小心」地保留了。於是他大膽的假設血管內皮細胞受乙醯膽鹼刺激後會分泌一種物質，而這種物質會導致血管肌肉鬆弛。他設計了一個簡單但極具巧思的實驗，亦即比較內皮完整的血管以及內皮被膠原蛋白酶（collagenase）去除掉的血管，受到乙醯膽鹼刺激的反應。他並將這個自血管內皮細胞所分泌的不明物質稱為「內皮衍生

之舒張因子」 (endothelium-derived relaxing factor, 簡稱 EDRF) 。直到數年後 Ignarro (1986) 證實 EDRF 就是 NO , 從而開創了另一個 NO 的研究風潮。

1 - 2.1 NO 的合成

NO 所扮演的角色既是神經傳道物質也是神經調節物質。興奮性胺基酸 (excitatory amino acid; EAA) 直接活化酵素 NOS 繼而刺激 NO 的生成, NO 能活化 GC 促進生成 cGMP (Schuman and Madison, 1994) 。過度刺激興奮性胺基酸的釋放會使 cGMP 過度作用, 擾亂細胞電生理 (Garthwaite, 1991; Guevara-Guzman et al., 1994) (見圖 1-5) 。NO 證實能調節興奮性胺基酸所誘導的神經毒性, 而 NO 引起細胞死亡的同時, 也可觀察到 cGMP 濃度隨著增加 (Dawson et al., 1991; Kollegger et al., 1993) 。圖 1-5 列出 NO 生成與作用路徑 (Dais et al., 1996) 。圖 1-6 為 NO 在細胞的分子作用圖。

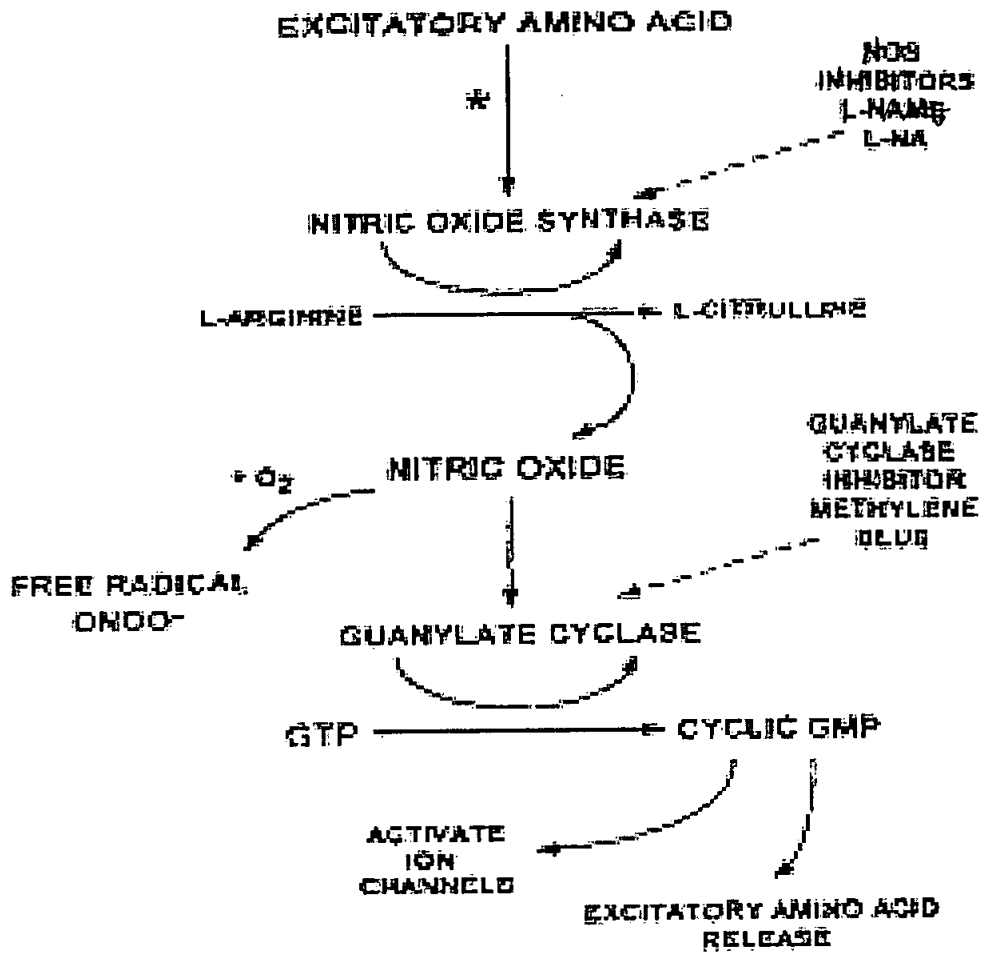


圖 1-5 NO 的生成與作用路徑。NO 主要的作用包括活化 GC 而增加 cGMP 的濃度以及誘發游離自由基的產生。部分的 NO 可能經由提高 cGMP 的濃度來調控聽覺的作用。*興奮性胺基酸刺激引起細胞內鈣離子濃度增加，經攜鈣素間接作用活化 NOS。

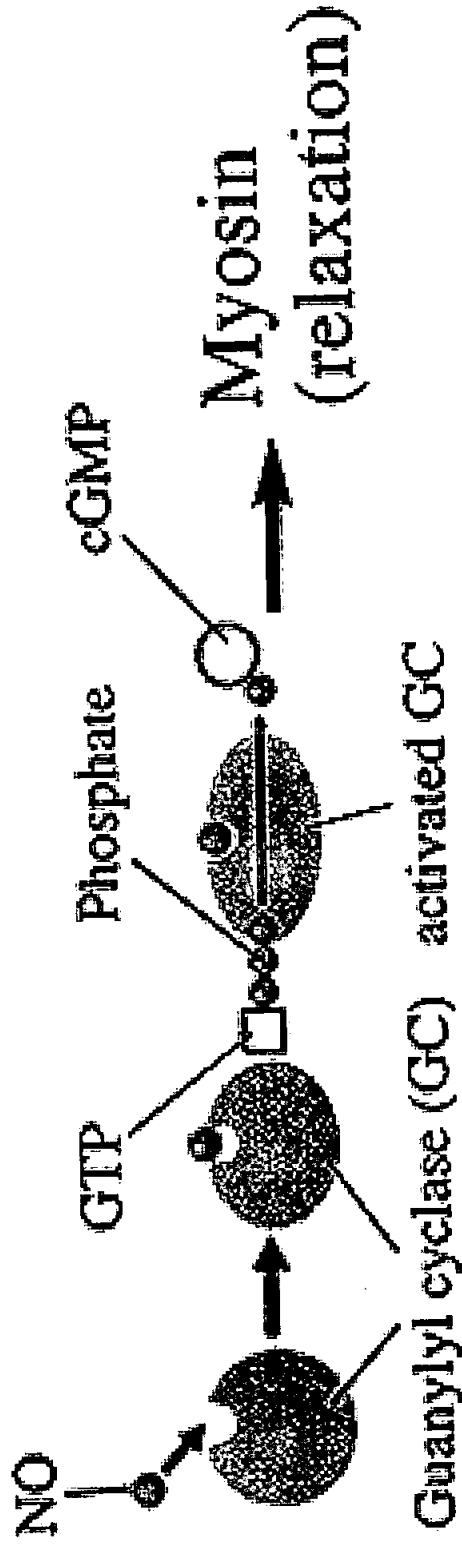


圖 1-6 NO 在細胞的分子作用。NO 活化 GC 後 GC 能將 GTP 轉變成 cGMP，而 cGMP 則會作用於 myosin 使 actin 無法與 myosin 結合，導致肌肉放鬆。

1 - 2.2 NO 的生理作用

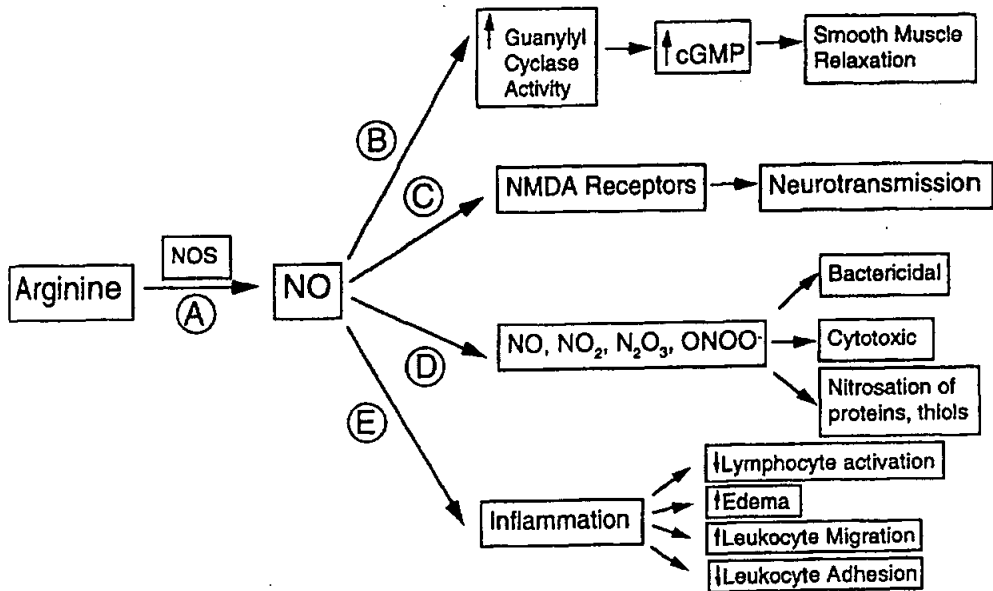


圖 1-7 NO 的功能 (Robbin et al., 1997)。 (A) 酵素 NOS 使 arginine 裂解生成 NO。 (B) NO 刺激 GC 生成環 cGMP, cGMP 的作用使平滑肌放鬆, 例如使血管平滑肌放鬆能降低血壓。 (C) NO 能影響 glutamate 與 NMDA 接受器結合。 (D) NO 或它的過氧化物 (如 NO_2 、 N_2O_3 和 ONOO^-) 能產生殺菌或細胞毒害的作用, 它們也會改變蛋白質的結構進而影響蛋白質功能。 (E) NO 調控誘發抗發炎作用, 如減少淋巴細胞的活性; 也能誘導發炎前反應, 如增加白血球的轉移。

1 - 2.3 NO 的常見用途

在動脈硬化的病人，其血管內皮 NO 的產生受到阻滯。利用硝化甘油一類的 NO 釋出劑，或可補充受傷的內皮細胞所減產之 NO。根據目前到 NO 訊息傳導的認知，許多研究室及藥廠正致力於更強效及特異性的 NO 釋出劑。重度細菌感染引致的敗血症常併發細菌性休克，病人因細菌感染誘發體內許多細胞（包括巨噬細胞及血管內皮細胞）產生大量的 NO，進而使得血管失控放鬆，血壓急速下降，是為休克。此時主要生命器官包括大腦因缺血缺氧而壞死，病人喪失意識，死亡率極高。治療此類疾患應可嘗試使用能降低 NO 生成的抑制劑，包括 NOS 抑制劑，以及直接破壞或清除 NO 的藥劑等(Bone et al., 1992；Camussi et al., 1998)。

許多肺部疾病如氣喘、肺高壓及肺栓塞，可以經吸入 NO，達到改善肺泡氣體交換及局部血液循環的功效。臨床上已有許多報告，證實 NO 的吸入治療，對於相當廣泛的心肺或其他系統的疾病，包括心臟衰竭、呼吸窘迫症候群、及凝血疾病等均很有效(Cruchaud et al., 1977；Remme and Swedberg, 2001)。NO 是巨噬細胞對抗細菌、黴菌的主要武器之一。由於 NO 可以造成癌

細胞之程式死亡 (apoptosis)(Cruchaud et al., 1977)，因此在對抗癌細胞的戰爭中 NO 顯然扮演極重要角色。

許多性無能的患者是因為陰莖海綿體血管張力的調節出了問題。NO 刺激陰莖海綿體血管內皮產生 cGMP，如前所述，環 cGMP 可鬆弛血管平滑肌，進而使海綿體充血而勃起。cGMP 之代謝，係由海綿體內的酵素第五型磷酸二酯酶 (PDE-5) 將 cGMP 水解。許多病人的陰莖海綿體血管並無放鬆的問題，但是第五型磷酸二酯酶卻提早破壞了 cGMP，所以無法讓血管持續地鬆弛，海綿體也就垮下，便成了陽痿。「威而剛」(viagra) 便是一種第五型磷酸二酯酶的抑制劑，本來是冠狀動脈用來治療心肌梗塞，卻意外發現服用威而剛的心臟病患者，其性生活竟也明顯改善(Gorge et al., 2003)。

1 - 2.4 NO 在聽覺系統的研究

a. NO/cGMP 路徑近年來在聽神經系統的研究

我們已知 NO 對於血管平滑肌，神經傳訊，組織發炎反應扮演重要的角色。主要合成 NO 的酵素 (即一氧化氮合成酶，簡稱 NOS)，其主要有三種異類型分別是：神經型 NOS (nNOS)，誘導性 NOS (iNOS) 及內皮性 NOS (eNOS)。這些 NOS

皆可將 L-arginine 轉換成 NO 及 L-citrulline。有關 NO 在聽神經系統的研究始於 1970 年代末 (Guth and Stockwell, 1977; Thalmann et al., 1979)，然而較詳細的研究則始於 1990 年代初。

b. 酵素的活性

NOS 及 GC 二酵素證實在聽神經耳蝸的側壁及神經上皮存在 (Fessenden et al., 1994; Fessenden and Schacht, 1997)。神經藥理學的研究顯示在耳蝸 NOS 的類型主要是 nNOS，eNOS 可在側壁中發現。有趣的是耳蝸 NOS 的活性與小腦比較是相對低很多，然而 soluble guanylyl cyclase (sGC) 的活性則與小腦相當。

c. NOS 的分佈

NOS 的分佈之研究主要是用 NADPH-diaphorase 組織化學的方式來呈現。在柯蒂氏器，支配內毛及外毛細胞的神經末梢可能有 NOS 的存在 (Fessenden et al., 1994)。此外在聽神經神經節的部分亦發現有 NOS 的存在 (Fessenden et al., 1994; Zdanski et al., 1994)，此結果進一步的經由抗 citrulline 的免疫化學實驗證實 (Zdanskiet al., 1994)。相反的在耳蝸使用免

疫化學的偵測方式有部分產生相衝突的結果，例如 Gosepath et al. (1997) 在內毛及外毛細胞偵測到 nNOS 的存在，然而 Franz et al. (1996) 發現 nNOS 僅存在於外毛細胞；又 Gosepath et al. (1997) 發現 eNOS 存在於血管內皮和神經節細胞，而 Franz et al. (1996) 則偵測到 eNOS 存在於內、外毛細胞，神經節細胞及內皮細胞。爲什麼會產生這樣的差別呢？主要可能有幾個原因，第一，可能是免疫化學實驗的敏感度或方法學應用上的差異所致特別是在組織固定時。第二，可能是不同動物種別抗體的使用，例如聽神經的動物實驗大多數都是使用天竺鼠，然而抗體的來源都是來自小鼠 (mice) 或大鼠 (rat) 所致，故不排除其種別的差異性。

d. Soluble guanylyl cyclase 的分佈

免疫化學的研究顯示 sGC 存在於柯蒂氏器，既可在 Hensen's 及 Deiter's 細胞中發現，但在感覺細胞 (sensory cells) 並沒有發現 (Fessenden and Schacht, 1997)。這個結果令人感到意外，因爲 NOS 存在於支配外毛細胞的神經末梢中，因此有一可能性就是 NO 是由支撐細胞所產生，而不是在毛細胞本身。由於支撐細胞之間有間隙連接 (gap junction) (Slepecky, 1996)，因此在生理情況下 NO 的產生很容易就影響整個支撐細胞組織。這個結果對於耳蝸內 NO 的生理角色深具

影響，也因此釐清 NO 在耳蝸內的角色包括毛細胞與支撐細胞將是很重要的課題。

e. NOS 和 sGC 在側壁組織 (lateral wall tissues) 的分佈

在側壁組織，eNOS 的活性以及 NADPH-diaphorase 的活性皆可在側壁血管的內皮細胞被偵測到 (Yamane et al., 1997)。sGC 存在於耳蝸側壁的平滑肌層及血管週邊 (Fessenden and Schacht, 1997)。這個發現與 sGC 在其它組織的發現一致。然而，sGC 的活性並不存於所有類型的周邊細胞。

1-2.5 NO/cGMP 路徑近年來在外毛細胞的研究

查詢過去 NO/cGMP 對於毛細胞的研究非常的少。有文獻指 cGMP 可以調節外毛細胞的電運動性 (Szonyi et al., 1999)，此外 Shi 等人 (2001) 以 NO 的螢光染劑 4,5 - diaminofluorescein diacetate 證明外毛細胞有 NO 的產生，有趣的是 sGC 無法在毛細胞本身偵測到，卻可在支撐細胞測得 (Fessenden and Schacht, 1997, 1998; Tian et al., 1999)。因此 NO 在外毛細胞測得，除了之前所述及的實驗所用之抗體特異性的問題外還另一個可能，NO 可能從神經末梢釋出擴散到毛細胞

內或由支撐細胞所產生再擴散到毛細胞內。而我們最近對於外毛細胞功能性的研究也顯示產生 NO 的前驅物質 L - arginine 的確對於毛細胞的運動性有所影響 (Lin et al., 2003)，當然此假說需要更進一步延續的實驗釐清。

1-2.6 NO 在耳蝸可能的生理意義及重要性

耳蝸外毛細胞的運動性可分為快速運動性 (electromotility or fast motility) 與慢速運動性 (slow motility)。耳蝸外毛細胞快速運動性主要是扮演訊號放大 (mechanical amplification) 的角色也就是生理上的主要角色，而外毛細胞的慢速運動性與病理變化或毒性變化較有關聯，例如環境噪音，過多的自由基當然也包括了 NO。過量的產生 NO 會造成毛細胞數目的減少。在生理濃度下的 NO 經由 sGC 的活化參與了調節耳蝸血管的血流，神經傳訊以及耳蝸放大機制的調節。耳蝸毛細胞與聽神經末端有一交會突觸 (afferent synapse)，已知耳蝸毛細胞可釋放神經傳訊物質如 glutamate 或其它可能性物質如 NO，NO 可能扮演回朔控制的角色 (retrograde) 來調控外毛細胞的運動性，進而對耳蝸對頻率 (聲波震動) 的區分選擇扮演重要的角色，也可能調控著另一個重要的離子管道，鈣離子依賴性鉀離子管道 (Ca^{2+} -activate K^+ channel)，細胞內鈣離子濃度上升可以活化此

管道，而 NO 可以降低鈣離子的敏感度。此管道的活化可使細胞膜恢復穩定狀態，以避免細胞膜持續的去極化而使得毛細胞可再接受下一個刺激，這對於我們持續接受聲音的訊息以及頻率的區分很重要。因此 NO 也有可能間接調控鈣離子依賴性鉀離子管道。由於二級傳遞訊息 NO 對哺乳類耳蝸外毛細胞運動性的調控並不清楚，此方面的資料付諸缺如，也因此本研究有助於填補聽神經傳訊過程中的未知環節，也期待對於臨床上藥物及老化現象造成毛細胞及神經節細胞的損害機制可以進一步的釐清。

1-2.7 Ionomycin 在外毛細胞的研究

在 1990 年 Didier Dulon 等人將鈣離子載體 (ionophore) ionomycin 加入單離外毛細胞的溶液中，用來調整細胞內的鈣離子濃度，並以 fluo-3 當指示劑觀察鈣離子的濃度變化。當細胞外液有 1.25 mM 的鈣離子存在時，ionomycin 會在 30 - 60 秒間使細胞內游離鈣離子增加，並且伴隨著細胞延長、體積縮小，不論是頂端 (apical) 或底部 (basal) 的外毛細胞都會有這樣的反應。在細胞外液中加入 2 mM 的 EGTA 處理 5 分鐘，無鈣狀態下細胞仍然有相同的運動反應表示鈣離子載體也能釋放細胞內貯存鈣離子。若完全排空細胞內鈣離子（以 EGTA 處理 30 - 60 分鐘），則會抑制鈣離子訊息與細胞反應。

Ionomycin 延長毛細胞之可能途徑如下。首先，細胞型態的改變可能源自一種滲透壓機制，外毛細胞內已證實有鈣離子依賴性鉀離子通道及氫離子通道的存在 (Ashmore and Meech, 1986; Gitter et al., 1986; Santos-sacchi and Gilger, 1988)，細胞質鈣離子的增加可能引起氯化鉀流失進而伴隨水分排出，致細胞型態改變。曾在某些種類的細胞證實鈣離子載體會引起這樣的現象 (Grinstein et al., 1982; Hoffmann, 1985)，但在外毛細胞 TEA 能阻斷鉀離子通道而抑制鉀離子的外流 (Santos-Sacchi and Dilger, 1988)，然而無法抑制鈣離子載體延長毛細胞之作用。第二個途徑，可能因細胞內 pH 值改變而引起的型態變化，鈣離子載體 ionomycin 能使鈣/氫離子交換 (Gomperts et al., 1981)，在某些種類的細胞已證實 ionomycin 能使細胞內環境鹼化 (Di Virgilio and Gomperts, 1983)，但是當缺少細胞外鈣離子時 ionomycin 所引起的反應仍然存在，細胞型態改變的因素顯然不是建立在 pH 值的變化上。第三種也是最有可能的機制藉由攜鈣素 (calmodulin; CaM) 抑制劑的作用被表現出來。攜鈣素抑制劑，trifluoperazine 和 pimozide，能阻斷 ionomycin 所引起的細胞運動，而細胞內鈣離子濃度增加的反應並沒有被影響。這樣的結果突顯出外毛細胞的鈣離子依賴性周邊收縮 (calcium-dependent circumferential contraction) 經由攜鈣素調控。而之前的證據

顯示細胞膜與膜下皮質在延長反應時能維持細胞的環狀型態 (Dulon et al., 1989)。

1997 年 Birgit Puschner 和 Jochen Schacht 實驗結果表示 ionomycin 反應到達最大值 (最長) 需要 3 分鐘左右，而不論是 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 或 0.1% 的 DMSO 溶於 HBSS 中 (ionomycin 的溶媒) 的控制組實驗結果也顯示，與時間零點之細胞長度做比較，5 分鐘時二者細胞長度皆為 $98.5 \pm 0.5\%$ 。

Birgit Puschner 和 Jochen Schacht 定義出蛋白激酶 (protein kinase) 參與外毛細胞慢速運動的可能途徑。實驗顯示鈣離子 / 攜鈣素依賴蛋白激酶 (calcium/CaM-dependent protein kinase) 能啟動外毛細胞的慢速運動，而其中又以 CaMKII (calmodulin-dependent kinase II) 與 MLCK (myosin light chain kinase) 兩種可能性最大，基於它們在收縮程序中已確立的角來推測外毛細胞慢速運動的機制。提升細胞內鈣離子濃度能增加 CaMKII 或 MLCK 的活性，且預料能使肌凝蛋白輕鏈 (myosin light chain) 或一種未知的標的物磷酸化，這些物質磷酸化後能維持半徑收縮與細胞延長等細胞反應。圖 1-8 列出依賴鈣離子的外毛細胞之運動工作模式 (Coling et al., 1998)。

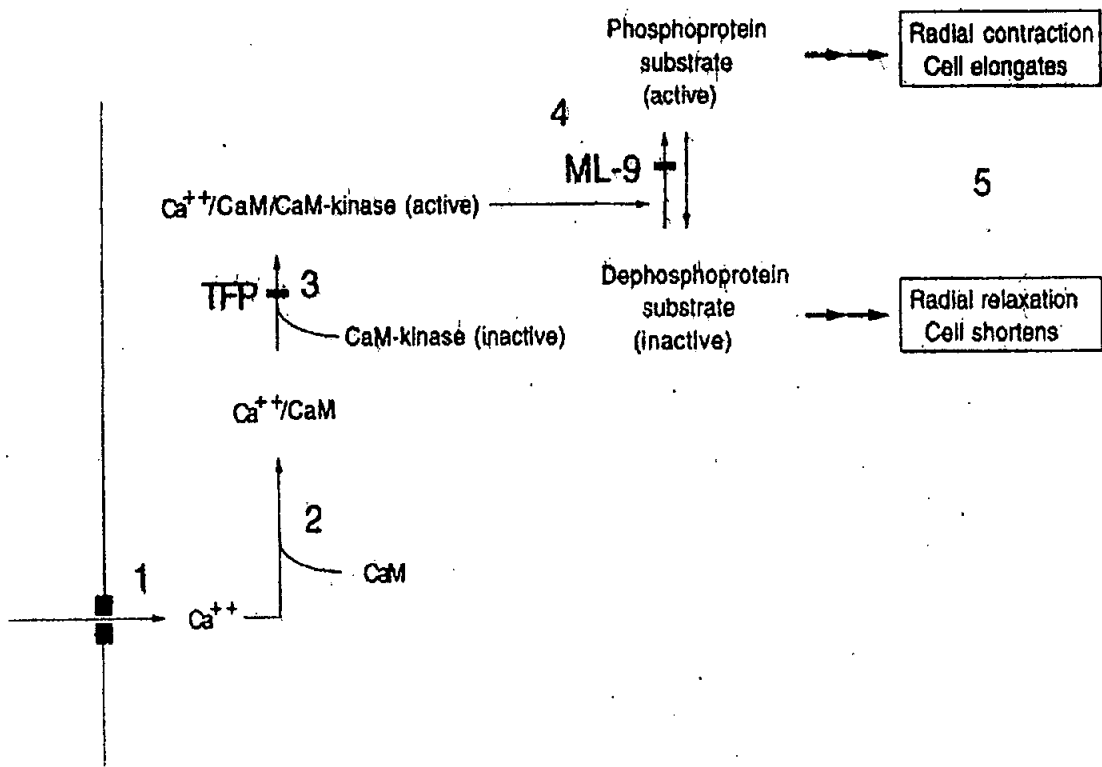


圖 1-8 鈣離子依賴的外毛細胞運動工作模式。程序 1：運用細胞內貯存的鈣離子來提升細胞內游離鈣濃度（Wangemann and Schacht, 1996），或從細胞外穿越細胞膜鈣離子通道進入細胞內（Kros, 1996）或由鈣離子載體帶入。程序 2：形成鈣離子/攜鈣素複合體。程序 3：鈣離子/攜鈣素複合體結合上蛋白激酶並活化之（能被 trifluoperazine 阻斷，Dulon et al., 1990）。程序 4：蛋白質受質被磷酸化後活化（能被 ML-9 阻斷）。程序 5：細胞運動開始並維持（可能還包括其他額外增加的程序）。

1 - 3. 鈣離子管道的研究

鈣離子進入神經末梢內啓動一連串的生化訊息，促使 ACh 釋放，而鈣離子管道對鈣離子進入的控制扮演著關聯性的角色。近年來，由於選擇性神經毒素的發展，對於鈣離子管道類型的分類有很大的助益如錐螺毒素 GVIA (ω -Conotoxin GVIA)(Olivera et al., 1994)，黑寡婦蜘蛛毒 IVA (ω -Agatoxin IVA)(Olivera et al., 1991) 等。鈣離子管道的分類依功能及分子結構之不同可分為下列幾項：T, L, N, P, Q, 及 R-型鈣離子管道 (Dunlap et al., 1995)。其中 L, N, P 和 Q- 型屬於高閾值活化型鈣管道，T- 型屬於低閾值活化型鈣管道，R- 型屬於中閾值活化型鈣管道。

1 - 3. 1 區別鈣管道選擇性的藥物和毒素

一般鈣管道的選擇性抑制劑可用來研究鈣管道的種類性質等。如 1,4-dihydropyridines (DHPs; nifedipine) 可選擇性的阻斷 L- 型的鈣電流，並且有電位和使用依賴性；而 ω -conotoxin GVIA 則可阻斷 N- 型鈣管道，是屬於非電位依賴性的。 ω -agatoxin IVA 雖然在低濃度時可抑制 P- 型鈣電流

(IC₅₀ 約 1 nM)，但它在較高的濃度亦可抑制 Q- 型鈣電流 (IC₅₀ 約 100 nM)。

1,4-dihydropyridines (DHP ; nifedipine) 在所有的脊椎動物，可以用來鑑別 L- 型的鈣管道(包括了內分泌細胞)。DHP- 敏感性鈣電流的特性是具有長久維持的電流 (long-lasting)，且它的不活化 (inactivation) 較不受靜止膜電位的影響，而單一離子管道的傳導度約 25 pS。L- 型鈣管道對於骨骼肌、心肌及平滑肌的興奮-收縮聯合 (E-C coupling) 作用扮演主要的角色，其拮抗劑在臨床上的應用如抗高血壓。

雖然 L- 型鈣電流也在某些神經元被發現，但是它的角色較不顯著。於是近年來分離出的毒素，有助於區隔 L- 型與其它類型的鈣管道。命名為 ω 開頭的毒素 (ω -toxins) 意為作用在神經末梢的毒素，例如 ω -conotoxin GVIA，從一種會獵魚類的海洋錐螺中分離出來的。在神經細胞體中證實 ω -conotoxin GVIA 可抑制 DHP- 不敏感的鈣電流，且 ω -conotoxin GVIA 並不會抑制肌肉的反應，因此將 ω -conotoxin GVIA 敏感性的鈣電流命名為 N 型電流，它單一離子管道的性質已證實傳導度為 12-18 pS。

在大鼠的蒲金氏神經元 (Purkinje neurons) 的實驗中發現大部份的鈣電流對於 DHP 和 ω -conotoxin GVIA 不反應，但它對於從蜘蛛分離出來的毒素 ω -agatoxin IVA 非常敏

感， ω -agatoxin IVA 在 nM 的範圍即可阻斷鈣電流，因此此電流命名為 P- 型電流。P- 型電流與 N- 及 L- 型電流動力學相似，它的不活化 (inactivate) 很慢。P- 型鈣管道它的傳導度約從 10-20 pS，由於 P- 型管道它的動力學模式與其它的高閾值活化鈣電流相似，因此要分出 P- 型電流唯有仰賴 ω -agatoxin IVA 的幫助。

另一型的高閾值活化性電流對於 DHP， ω -conotoxin GVIA 以及 ω -agatoxin IVA 皆不反應命名為 R- 型電流，至目前為止尚未有選擇性的阻斷劑。而 T- 型鈣電流，它有快的 inactivation Kinetics 和低的活化電位，且它的單一離子管道傳導度很小。T- 型電流對現已知的選擇性阻斷劑不反應，除了低濃度的 Ni^{2+} ($<50 \mu\text{M}$)，但目前欲分別 T- 型與其它的鈣電流，大部份以它特異的生物物理性質來區分。

其它的鈣電流阻斷劑如 FTX (一個 polyamine 從蜘蛛 *Agelenopsis* 毒液分出來)， ω -agatoxin IA、IIIA、 ω -conotoxin MVIIA 和 MVIIC、 ω -grammotoxin SIA、 Cd^{2+} 和 Ni^{2+} 也在一些實驗中，用來區分鑑別鈣電流，但它們的選擇性並不是很好。因此至目前為止 DHP， ω -conotoxin GVIA 和 ω -agatoxin IVA 是對鈣電流選擇性最好的藥物，可用來研究鈣管道的功能及分子生物結構的探討。

1-3.2 聽神經系統鈣離子管道的研究

耳蝸毛細胞及神經節細胞已知至少有 L- 型鈣離子管道 (Kollmar et al., 1997; Hisashi et al., 1995) 的存在，至於是否受到 NO/cGMP 系統的調控目前並不清楚。查尋過去已發表的相關文獻指出在鳥類的毛細胞膜上具機械-電性傳導管道 (mechano-electrical transduction channel ; 為一種陽離子管道)，當其受 stretch 所活化時，會使整個細胞去極化，近而促使 L- 型鈣管道打開，結果誘發神經傳訊物釋放 (Koyano and Ohmori, 1996)，此 L- 型鈣管道對於耳蝸神經傳訊過程扮演著重要的角色。然而類似的研究在哺乳類 (如天竺鼠及小鼠) 毛細胞及耳蝸神經節細胞鈣離子管道甚少，研究較詳細的是鳥類毛細胞上的鈣離子管道 (Kollmar et al., 1997) ，得知毛細胞的 L- 型鈣管道的分子序列不同於心臟 (α_{1c}) 及骨骼肌 (α_{1s}) 的 L- 型鈣管道，毛細胞的 L- 型鈣管道 α pore 是屬於 α_{1D} ，這或許與耳蝸神經節的 L- 型鈣管道不同。在毛細胞 L- 型鈣離子管道的電生理性質也不同於其它組織中的 L- 型鈣離子管道，毛細胞 L- 型鈣離子管道的活化 (activation) 速率比骨骼肌還快 100 倍 (McDonall et al., 1994)，而且不太容易不活化，毛細胞 L- 型鈣離子管道其活化電位比其它 L- 型鈣離子管道還低約 $-60 \text{ mV} \sim -45 \text{ mV}$ ，且其鈣管道較無鈣依

賴不活化的現象 (Ca^{2+} -dependent inactivation ; 超過數百毫秒的刺激期間也未見有不活化的現象)。總之毛細胞 L- 型鈣離子與其它組織中的 L- 型鈣離子管道的電生理性質有三個主要的不同點，低閾值活化電位 (low activation threshold)，快速活化 (rapid activation) 和無顯著的鈣依賴不活化的現象。然而不同種別的動物鈣離子管道分佈可能有所不同，在耳蝸毛細胞最近的研究得知牛蛙 saccular hair cells 的膜上可能存有二種類型的鈣管道 (Su et al., 1995)，即 L- 型及 N- 型，這種多種類鈣管道來共同調控神經傳訊物質的釋出可能是由於多樣性演化的結果，如此一來可彈性的調節神經傳訊。近年來已知有許多中樞神經元及其神經末梢存在有多種類型的鈣管道 (Dunlap et al., 1995)。在哺乳類耳蝸毛細胞及神經節細胞已知是 L- 型鈣管道對於其它的選擇性鈣管道阻斷劑是否有不同的敏感度仍需進一步的探討。在天竺鼠耳蝸毛細胞的研究顯示 L- 型鈣離子管道在毛細胞的分佈是非均質化的 (Oshima et al., 1996)，靠近基底側膜的鈣管道較密而頂端 (apical) 區的鈣管道則密度較低，這種非均質化的分佈可能與細胞骨架的某些組成有關才會造成這樣的分佈，另一造成鈣管道 clusters 的可能則是與毛細胞傳出 (efferent) 終端的位置有關。NO 在耳蝸側壁組織的生理角色是否也包含了調控這些離子管道也有待釐清。

第二章、實驗材料與方法

2 - 1. 外毛細胞的分離

取天竺鼠 (250-450g ; Hartley, National Laboratory Animal Breeding and Research Center, Taiwan) 置於密閉玻璃容器中以二氧化碳灌入充滿容器，約5分鐘後待天竺鼠昏迷取出斷頸。顳骨 (temporal bones) 快速移除露出 bulla，打開 bulla 將耳蝸 (cochlear) 取出置於室溫中裝有 Hanks' balanced salt solution 或 L-15 medium 的 dish 中。打開耳蝸並將柯蒂氏器取出移到另一個裝有乾淨 Hanks' balanced salt solution 或 L-15 medium 的 dish 中，以針尖挑出耳蝸尖端第一、第二圈 (apical turn 1 和 turn 2) 的毛細胞串 (strip)。用 pipette 分別收集分段的毛細胞串 20 μ l/滴 3 滴放在一新的 dish 裡，每滴都加入 collagenase 0.25 mg/ml + trypsin (sigma) 0.25 mg/ml。加入酵素處理的細胞置於 incubator 37°C 中 15 分鐘後，取出用 pipette 加 Hanks' balanced salt solution 或 L-15 medium 至 100 μ l；目的是將酵素 (collagenase 和 trypsin) 稀釋避免它繼續作用破壞了外毛細胞的細胞膜蛋白結構而影響實驗結果。再次用 pipette 分取 20 μ l 到裝有玻片的

chamber；裝上玻片前在 chamber 邊緣塗上一層防水矽膠 (vacuum grease silicone； Beckman) 防止溶液外漏影響實驗。玻片用 polylysine coating 過，能使單離的外毛細胞黏附於玻片上以便於觀察細胞在處理藥物時的形態反應。用 pipette 重複吸放數次藉由機械衝擊力加強外毛細胞從細胞串上單離出來。Chamber 加蓋靜置於室溫下 15 分鐘使單離的外毛細胞能沉澱附著於玻片上，加入 Hanks' balance salt solution 或 L-15 medium 至 250 μ l 再次靜置 1 小時讓外毛細胞能完全沉澱。細胞單離的過程全部都是在解剖顯微鏡下 (Meiji, Tokyo)，室溫中 (23-27°C) 進行。本實驗所使用單離耳蝸尖端外毛細胞的長度範圍介於 60~80 μ m。若細胞有腫脹、細胞核異位或突出、細胞呈現顆粒狀等損傷癥狀將被排除在觀察統計數據之外。

2 - 2. Hanks' balanced salt solution 和 L-15 medium 的配製

Hank' s balanced salt solution：取兩容器各盛裝 250 ml 的二次蒸餾水；其中一容器加入 137 mM NaCl， 5.4 mM KCl， 0.33 mM Na₂HPO₄， 10 mM D-glucose 和 5 mM HEPES 等一價離子試劑充分混和後再以 1N NaOH 調整 pH 值至 7.35~7.40。將混合二價離子 1.25 mM CaCl₂， 0.5 mM MgCl₂，

0.4 mM MgSO₄ 後的溶液緩緩加入一價離子溶液中；一價及二價離子分別混合的目的是要避免磷酸根與二價離子螯合產生沉澱的現象。滲透壓則控制在 310 ± 3 mOsm。

L-15 medium 含有：NaCl 137 mM，KCl 5.36 mM，CaCl₂ 1.25 mM，MgCl₂ 1.0 mM，Na₂HPO₄ 1.0 mM，KH₂PO₄ 0.44 mM，MgSO₄ 0.81 mM。以 1N NaOH 調整 pH 值至 7.35~7.40，用 D-glucose 調整滲透壓至 310 ± 3 mOsm。

2 - 3. 玻片的 coating

先用拭鏡紙擦拭玻片後將玻片浸泡於 75% 的酒精中 2 小時，取出玻片後烘乾。Cell-Tak (BD) 附著劑溶於 0.1M NaHCO₃ 中，混合後的溶液以 $3.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 鋪於烘乾的玻片上浸漬 2 小時；Cell-Tak 附著劑是一種含有 polyphenolic proteins 成分的配方，polyphenolic proteins 粹取自海洋貝類容易被熱分解破壞，必須貯存於低溫狀態下；移除玻片上溶液並風乾玻片，再用二次蒸餾水浸泡清洗 2-3 分鐘。所有 coating 步驟皆有防塵處理，而 coating 好的玻片貯存於 2-8°C 的冷藏櫥中。

2 - 4. 外毛細胞運動的觀察

觀察單離外毛細胞運動性是使用正立(Axioskop FS2, Zeiss)或倒立式螢光相位差顯微鏡 (Axiovert 25, Zeiss) 在放大 400 X 下觀察。細胞外溶液是L- 15 medium 或 HBSS；另外引起細胞縮短的高鉀貯存溶液(stock solution)之配製為：KCl 142.4 mM，CaCl₂ 1.25 mM，MgCl₂ 0.5 mM，MgSO₄ 0.4 mM，Na₂HPO₄ 0.33 mM，D-glucose 10 mM，5 mM HEPES 用 KOH 調整 PH 值至 7.35~7.40；實驗中使用的為稀釋後高鉀溶液，濃度分別為50mM、75mM。使細胞螢光強度增加的高鈣溶液是在 L- 15 medium 或 HBSS 中外加 3.75 mM 的 CaCl₂，最終總鈣離子濃度為 5 mM。從零點開始每10秒照一張相片，觀察每個時間點外毛細胞的長度變化。

2 - 5. 化學試劑

胺基酸

L-arginine (3 mM，10 mM)，D-arginine (3 mM)，L-glutamate (3 mM)，L-aspartate (3 mM)。

NOS 抑制劑

N^G-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME；3 mM)，7-nitroindazole (7-NINA；1 mM)。

鈣離子載體 (calcium ionophore)

Ionomycin (10 μ M)。

螯合鈣離子試劑

Ethylene glycol-bis(β -aminoethylether) - N, N', N', N' -tetraacetic acid (EGTA)。

具細胞膜穿透性的環鳥糞嘌呤核苷單磷酸類似物

8-(-4-chlorophenylthio) guanosine 3', 5' -cyclic monophosphate (pCPT-cGMP; 1 mM), 8-bromo-guanosine 3', 5' -cyclic monophosphate (8-br-cGMP; 1 mM)。

鈣離子管道阻斷劑

Cobaltous chloride (3 mM), taicatoxin (0.19 μ M), ω -conotoxin GVIA (1 μ M), ω -agatoxin IVA (0.5 μ M), nifedipine (50 μ M)。

藥物來源為 Sigma (St. Louis, MO, USA), 只有 7-nitroindazole (7-NINA) 是來自 Tocris (Ballwin, MO, USA)。

所有的藥物都溶於 Hank's balanced salt solution 或 L-15 medium 中, 而 Fluo-3/AM 和 pCPT-cGMP、ionomycin 則

溶於 dimethyl sulphoxide (DMSO)。DMSO 於溶液中的最終濃度不能超過 0.5 %。所有實驗中使用的藥物滲透壓都被控制在 310 ± 3 mOsm。

2 - 6. 鈣離子螢光表現

外毛細胞內游離鈣離子濃度的測量使用鈣離子螢光指示劑，Fluo-3/AM (Molecular Probes。Eugene, OR)，並以共軛焦雷射掃描螢光顯微鏡表現 (Zeiss Confocal LSM 410 equipped with an argon-krypton laser)。Fluo-3/AM 溶於 DMSO 中，取 $5 \mu\text{M}$ 的 Fluo-3/AM 處理外毛細胞40分鐘來表現鈣離子螢光。細胞中 Fluo-3/AM 的螢光表現用倒立式顯微鏡觀察 (Zeiss Axiovert 135M, Germany)，激發波長為488nm，而發射波長為525nm。外毛細胞內的鈣離子濃度改變可由 Fluo-3 螢光強度的表現得知。每10秒照一張相片，觀察每個時間點外毛細胞螢光表現強度的變化。

2 - 7. 細胞長度的測量

外毛細胞的長度測量為 cuticular plate 與細胞突觸終端 (synaptic ending) 之間的垂直距離。

2 - 8. 統計

所有數據都是 means \pm S.E.M.。使用 Student' s *t*-test 來比較數據間的差異性。當多組數據與一組控制組作比較時，用 one-way analysis of variance (ANOVA) 分析後，接著用 Dunnet' s test 比較數據的差異。可信值 $P < 0.05$ 被認為是有意義的。

第三章、NO 對外毛細胞運動性的影響

3 - 1. 實驗結果

3 - 1. 1 L-arginine 能延長細胞反應而 D-arginine 卻不行

典型的單離毛細胞頂部有纖毛 (cilia; c) 而聽神經末梢則連接於細胞底部 (synapse; s) 如 Fig. 3 - 1 A。而 Fig. 3 - 1 B 是加入 L-arginine (3 mM) 120 秒後所照的照片。L-arginine 的作用除了使外毛細胞延長外，不會改變細胞的外觀型態。以 L-型的 arginine (3 mM) 灌流外毛細胞會引起細胞延長，但以 D-型的 arginine 去作用卻不會引發相同的反應 (Fig. 3 - 1 C)，當 L-型的 arginine 被洗掉時這個作用是可逆的。L-arginine (3 mM) 的類似胺基酸 L-glutamate (3 mM) 和 L-aspartate (3 mM) 對外毛細胞作用並不會產生相同的延長反應。L-arginine 引起的細胞延長作用在反應起始 180 秒後達到最大值 ($102.8 \pm 0.6 \%$; $n = 11$; Fig. 3 - 1 C)。其他胺基酸，如 D-arginine (3 mM; $99.5 \pm 0.3 \%$; $n = 4$)、L-glutamate (3 mM; $99.6 \pm 0.4 \%$; $n = 6$)、L-aspartate (3 mM; $99.7 \pm 0.4 \%$; $n = 4$) 或 HEPES 溶液 ($99.7 \pm 0.3 \%$; $n = 4$) 對外毛細胞都沒有明顯的延長現象 (Fig. 3 - 2 A)。劑量反應曲線顯示 L-arginine

的濃度從 2 mM 上升至 3 mM，細胞延長反應有明顯增加的趨勢 (Fig. 3 - 2 B)。在更高濃度 L-arginine (10 mM)的處理下細胞的長度仍會再增加 (114% 之於處理 L-arginine 之前)，而且伴隨嚴重的型態改變 (例如：細胞腫脹，細胞核突出、異位等)。L-arginine (3 mM) 不會產生細胞毒性因此被廣用於這個實驗中。

3 - 1.2 NOS 抑制劑會減弱 L-arginine 的作用

將外毛細胞用 NOS 抑制劑，N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 3 mM, Fig. 3-3 A 和 3-3 B) 或 7-nitro-indazole (7-NINA, 1 mM; Fig. 3 - 3 B)，前處理 30 分鐘後會明顯的減弱 L-arginine (3 mM) 對細胞作用所引起的延長反應。前處理 L-NAME (n = 7) 後的外毛細胞對 L-arginine (3 mM) 反應的延長最大值為 $100.5 \pm 0.3 \%$ ($P < 0.05$ 與單獨用 L-arginine 作用的細胞相較； $102.8 \pm 0.6 \%$ ，n = 11)，而前處理 7-NINA (n = 5) 則為 $100.7 \pm 0.4 \%$ ($P < 0.05$ 與單獨用 L-arginine 作用的細胞相較) (Fig. 3 - 3 B)。

3 - 1.3 具細胞膜穿透性的 cGMP 類似物誘發細胞延長反應

具細胞穿透性 cGMP 類似物，8-(-4-chlorophenylthio)

guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (pCPT-cGMP, 1 mM) 或 8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-br-cGMP, 1 mM), 反應起始後 3 分鐘達到細胞延長變化的最大值 (Fig. 3 - 4)。pCPT-cGMP 的延長最大值是控制組的 $101.5 \pm 0.3\%$ ($P < 0.05$ 與處理藥物之前的細胞長度做比較, $n = 7$) 而 8-br-cGMP 的作用為控制組的 $101.1 \pm 0.3\%$ ($P < 0.05$ 與處理藥物之前的細胞長度做較, $n = 5$)。cGMP 的類似物很明顯能引起外毛細胞的延長, 但這個反應結果卻不如 L-arginine 的作用那麼強烈。

3-1.4 L-arginine 不會改變細胞內游離鈣離子濃度

外毛細胞在處理過 Fluo-3/AM 後再以 3 mM L-arginine 作用, 結果 Fluo-3/AM 的鈣離子螢光表現強度並沒有改變 (Fig. 3 - 5 A)。然而加入高鉀溶液 (稀釋後最終濃度為 75 mM KCl) 後 Fluo-3/AM 的螢光表現強度會明顯增加, 若接著加入 ionomycin (10 μ M) 螢光表現仍會繼續增強 (Fig. 3 - 5 B)。由此看來細胞內的鈣離子濃度與細胞長度的改變並沒有直接關係。Fig. 3 - 5 C 列出各時間點的細胞長度變化, L-arginine 和 ionomycin 二者皆能誘發外毛細胞的延長反應, 而高鉀溶液卻是使細胞縮短。

3-1.5 L-arginine 的作用不依賴細胞外鈣離子濃度

外毛細胞浸泡於無鈣 Hank's balanced solution (用 3 mM EGTA 配置) 處理 40 分鐘後再以 3 mM 的 L-arginine 作用仍然會引起外毛細胞的延長反應 (Fig. 3 - 6 A)，而細胞內鈣離子的濃度也沒有改變 (Fig. 3 - 6 B)。

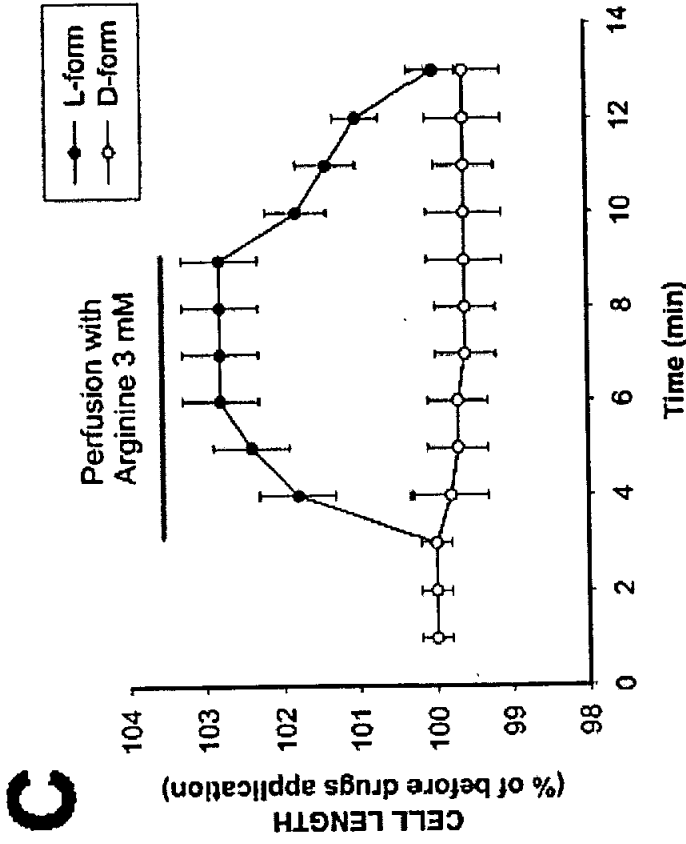
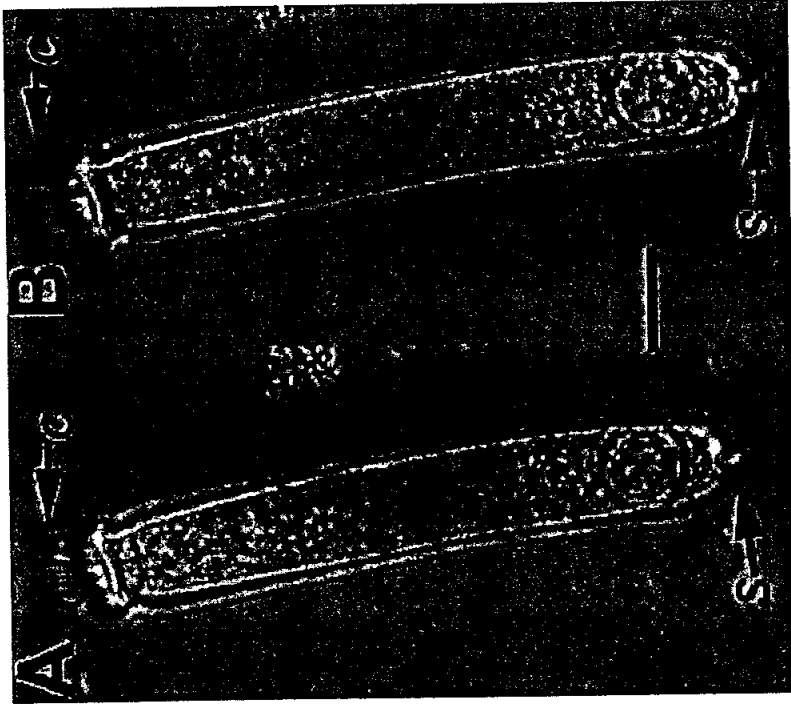


Fig. 3-1 天竺鼠外毛細胞在 L-型與 D-型 arginine 的作用下長度的改變。(A) 圖為典型的完整單離外毛細胞，圖中可以清楚的看到頂端的纖毛束 (c) 與細胞底部的突觸 (s)。加入 3 mM 的 L-arginine 能誘發細胞延長 (B 圖為加入 L-arginine 後 130 秒的照片)。(C) 外毛細胞灌注 3 mM 的 L-型與 D-型 arginine 後細胞長度變化與時間的作圖 (每一曲線的 $n = 4 - 6$)。細胞長度增加量與加入 arginine 之前的細胞長度作比較以百分比表示。Scale bar in panel A and B: 12 μm 。Values are mean \pm S.E.M.。

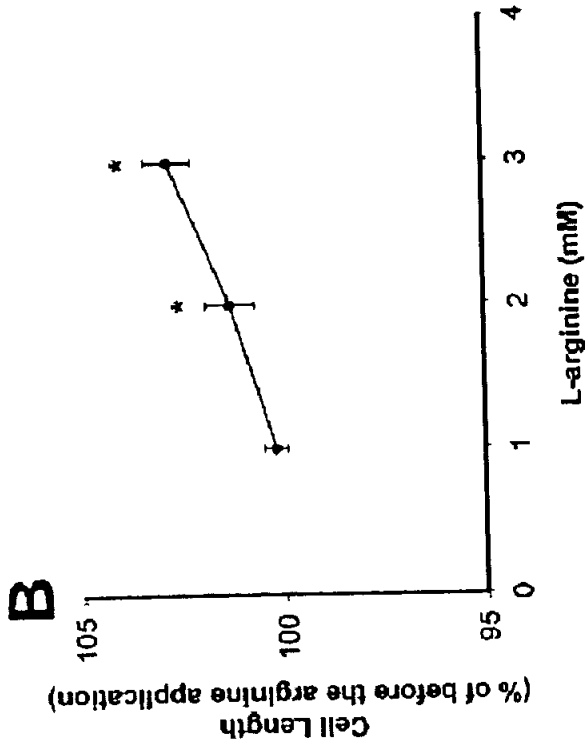
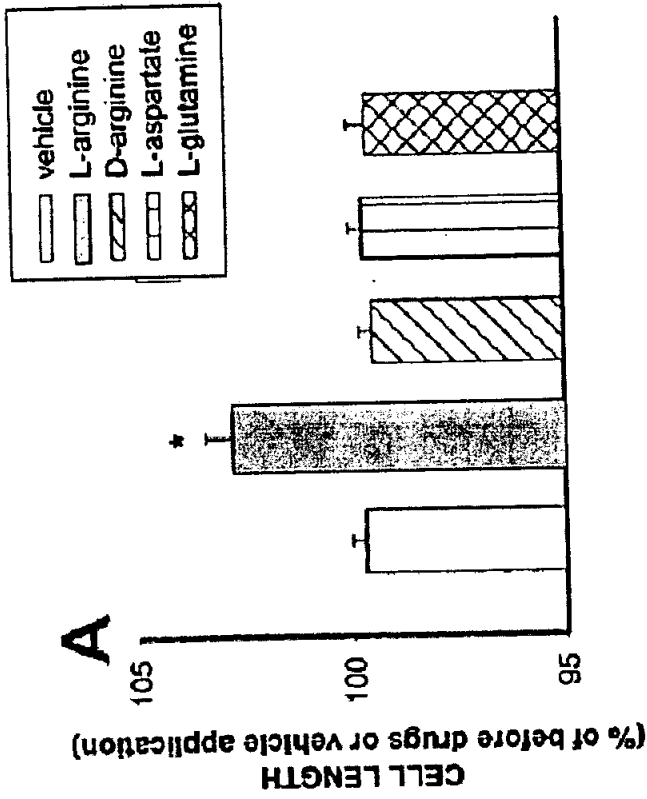


Fig. 3 - 2 L-arginine, D-arginine, L-glutamate and L-aspartate 對外毛細胞長度改變的比較圖。(A) 四種胺基酸對外毛細胞引起的最大長度變化百分比。L-arginine (3 mM; n = 11) 能夠誘發外毛細胞延長的反應，而其它胺基酸 D-arginine (3 mM; n = 4), L-glutamate (3 mM; n = 6), L-aspartate (3 mM; n = 5) 或溶液 (n = 4) 都無法引起相同的反應，長度變化與零時間點的細胞長度作比較以百分比表示 (加入 3 mM 的胺基酸之前)。(B) L-arginine (1 - 3 mM) 的劑量 - 反應曲線。Values are mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ 與溶液對照組 (於 A 圖) 或加入 arginine (於 B 圖) 之前作比較。

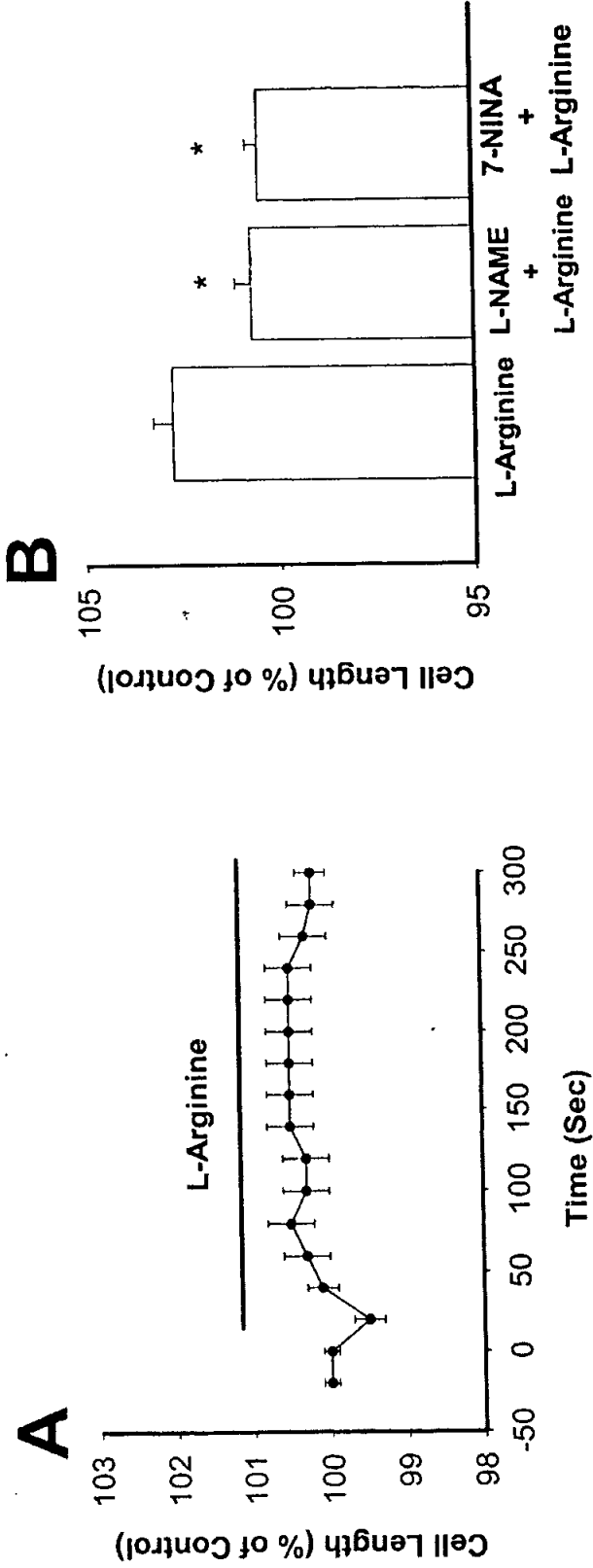


Fig.3 - 3 以 NOS 抑制劑 L-NAME 和 7-NINA 前處理能減弱 L-arginine 延長外細胞的作用。細胞以 NOS 酶抑制劑 L-NAME (3 mM) 和 7-NINA (1 mM) (B) 處理 30 分鐘後 L-arginine (3 mM) 對外毛細胞無法引起明顯的伸長作用。(A)圖為以 L-NAME 前處理後外毛細胞對 L-arginine 之時間反應曲線。Values are mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ 與控制組作比較。

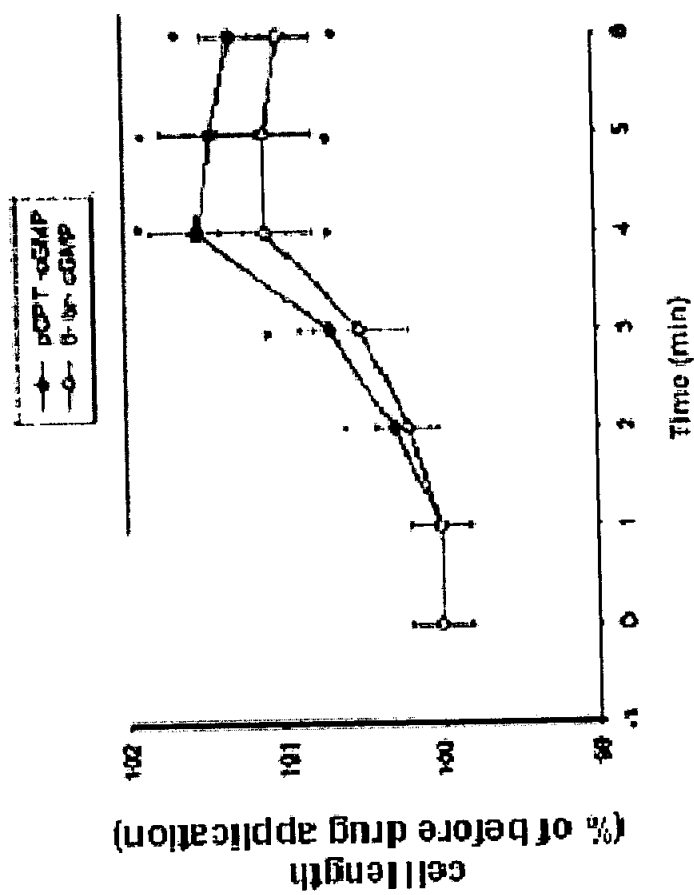


Fig. 3 - 4 具細胞穿透性 cGMP 類似物，pCPT-cGMP (1 mM) 和 8-br-cGMP (1 mM)，作用於外毛細胞的長度變化。pCPT-cGMP (1 mM) 和 8-br-cGMP (1 mM)，能夠使外毛細胞明顯延長。Values are mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ 與加入 pCPT-cGMP (1 mM) 和 8-br-cGMP (1 mM) 之前作比較。

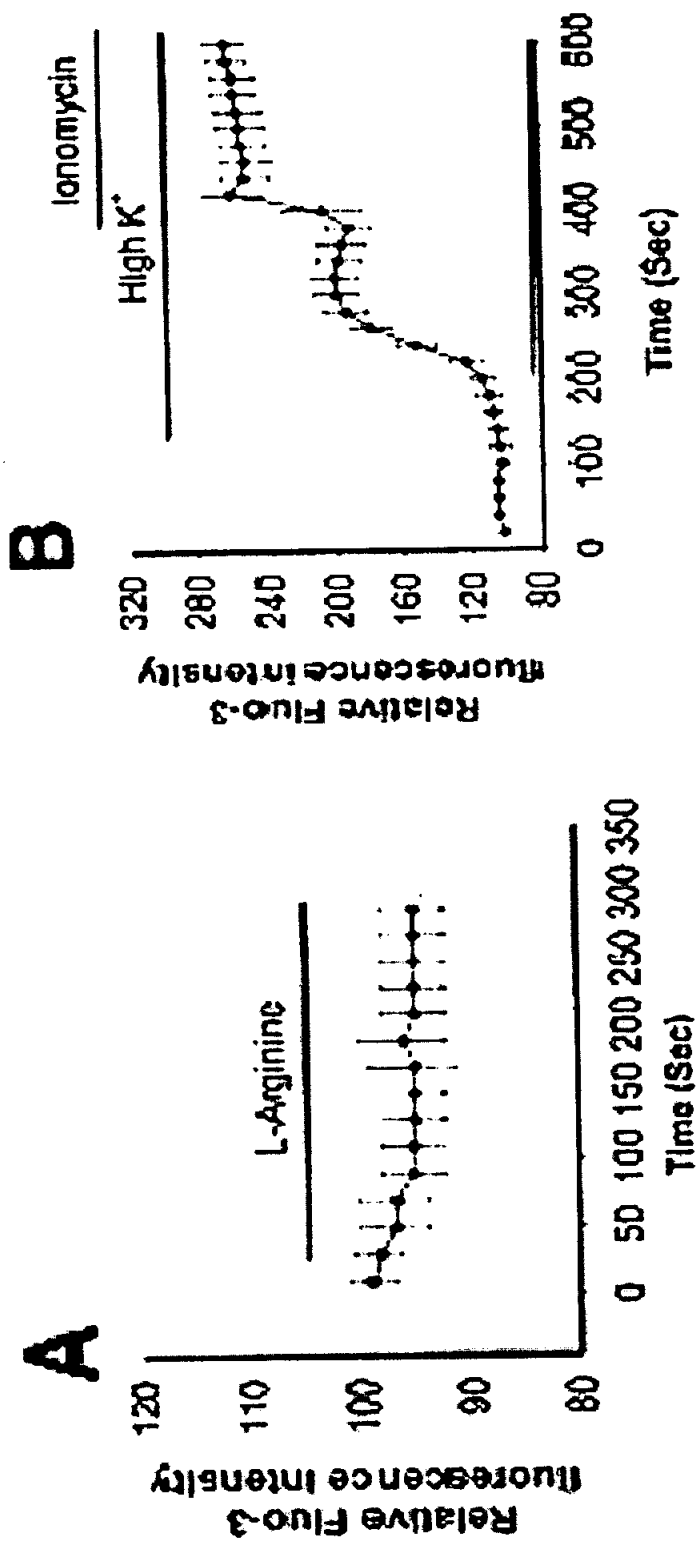


Fig. 3 - 5

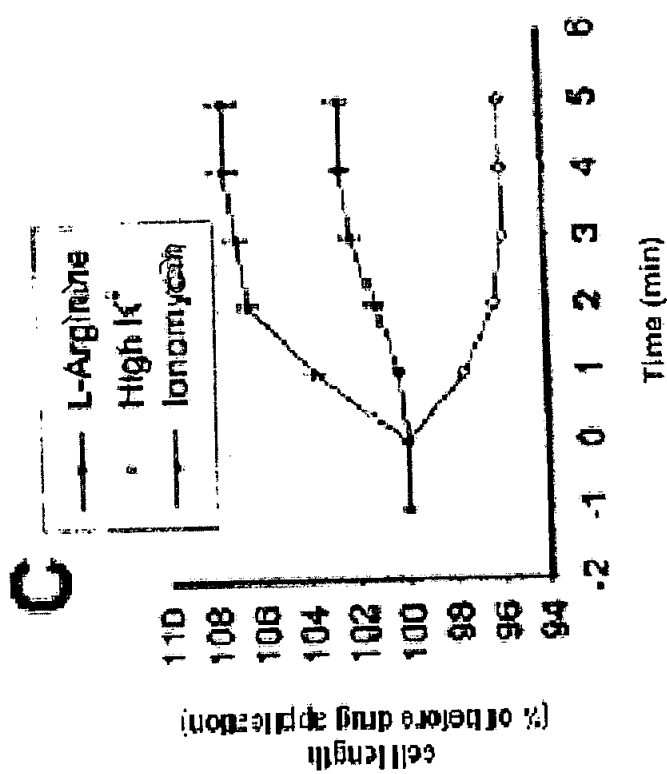


Fig.3 - 5(續) L-arginine、高鉀溶液與 ionomycin 作用於外毛細胞所引起細胞內 Fluo-3 螢光表現強度 (A, B) 與細胞長度 (C) 的變化。(A) L-arginine (3 mM) 不會使外毛細胞內鈣離子濃度增加。(B) 細胞外單獨灌流高鉀溶液 (75 mM), 或加入 ionomycin (10 μ M) 都會使細胞內鈣離子濃度明顯上升。(C) 比較 L-arginine、高鉀溶液和 ionomycin 作用於外毛細胞所引起的長度變化。L-arginine 或 ionomycin 會使外毛細胞長度增加, 而高鉀溶液卻導致外毛細胞縮短。結果顯示細胞內鈣離子濃度與細胞長度的變化並沒有直接關係。Values are mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ 與處理藥物之前作比較。

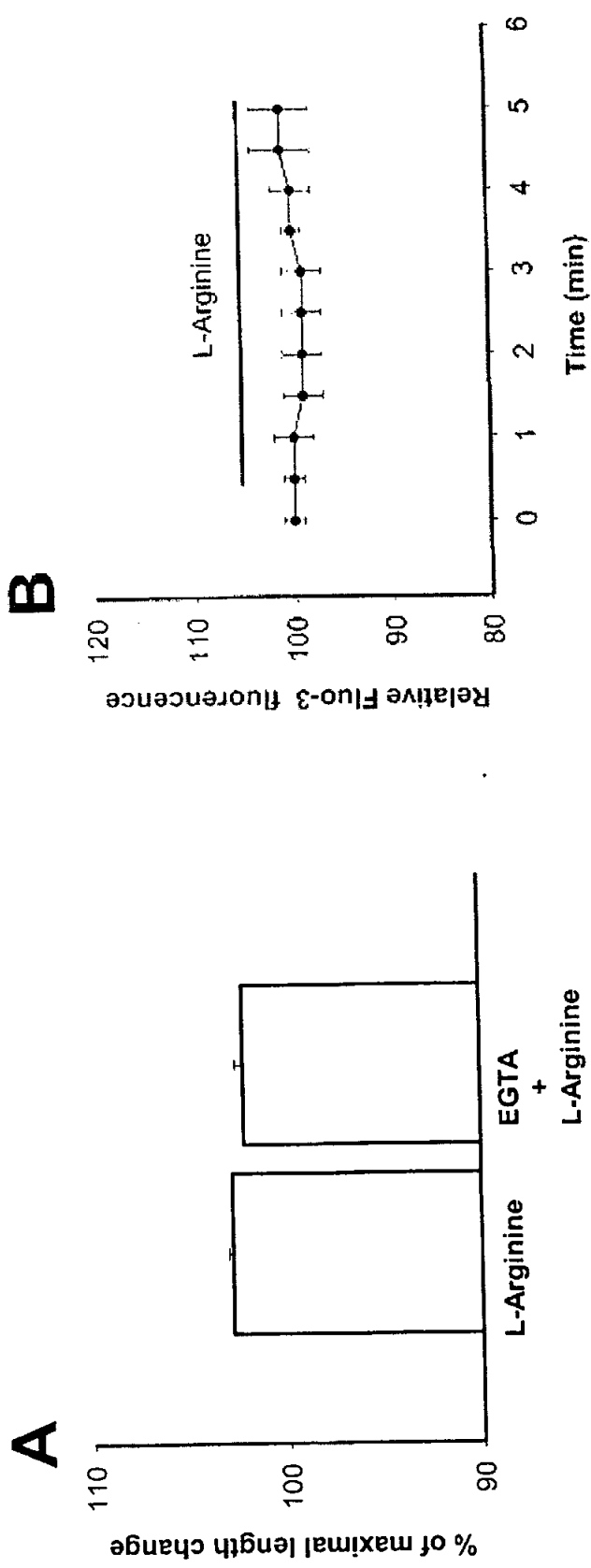


Fig. 3 - 6 用 EGTA (3 mM) 處理外毛細胞 40 分鐘將毛細胞外鈣離子濃度降低後，再加入 L-arginine，其延長細胞的最大值不受改變 (A)。在 Fluo-3 鈣離子影像分析實驗中，以 EGTA (3 mM) 前處理 40 分鐘後，L-arginine 仍然無法改變細胞內鈣離子螢光表現強度(B)。Values are mean \pm S.E.M.

3 - 2. 討論

此實驗顯示 L-arginine 能延長外毛細胞，而 D-arginine 或其他胺基酸 (L-aspartate 和 L-glutamate) 作用於外毛細胞卻不會有相同的反應。若將外毛細胞以 NOS 抑制劑 (L-NAME 以及 7-NINA) 做前處理，則 L-arginine 的作用會被減弱，因此不能排除 NO/cGMP 路徑存在於調控外毛細胞慢速運動的程序中。而這些結果也支持了別的學者所主張外毛細胞慢速運動是可經由一種非依賴鈣離子路徑來調節 (Coling, et al., 1998)。

3 - 2. 1 L-arginine 的專一性作用

先前已有報告指出組成 pillars 的纖維間電荷會影響細胞長度的變化 (Steele, 1990)。然而長纖毛之間的靜電也可能影響毛細胞纖維束的機械特性 (Dolgobrodov, et al., 2000)。在這個實驗中我們嚐試著用幾種不同的四種極胺基酸 (L-arginine, D-arginine, L-aspartate or L-glutamate) 分別作用在單離的外毛細胞上。結果顯示所有的極性胺基酸除了 L-arginine 外皆無法對外毛細胞誘發延長反應。所以我們推論 L-arginine 的作用並非來自它的極性特質。而從 D- 型 arginine 對外毛細

胞無法引起延長反應的角度判斷，我們可以很清楚的知道 L-arginine 的作用是具有特殊性的。

3 - 2. 2 比較 L-arginine 與 ionomycin 的作用

鉀離子溶液 (Zenner, 1985)、電刺激與化學物質 ATP (Schacht and Zenner, 1987; Flock et al., 1986)、ionomycin (Dulon et al., 1990) 皆能引發外毛細胞的運動。Ionomycin 作用後細胞內鈣離子濃度開始上升，接著周邊或皮質力量增加細胞延長。Ionomycin 的作用會被肌凝蛋白輕鏈激酶或鈣離子 (MLCK) / 攜鈣素依賴蛋白激酶II (CaMKII) 的抑制劑所阻斷 (Pushner and Schacht, 1997; Coling et al., 1998)。這個結果暗示了改變外毛細胞型態的鈣離子依賴程序可能被蛋白激酶活性所調控。高鉀溶液和 ionomycin 都會增加細胞內鈣離子濃度，高鉀溶液使外毛細胞縮短而 ionomycin 卻使細胞延長 (Fig.3-5B 和 3-5C)。雖然高鉀溶液和 ionomycin 都能使細胞內鈣離子濃度增加，它們的作用必定是經由不同的機制。我們從實驗結果發現，L-arginine 在不改變細胞內鈣離子濃度的情況下仍能使外毛細胞延長。要使去極化反應後的外毛細胞放鬆必須有鈣離子的存在 (Zenner et al., 1985; Dulon et al., 1990)，因此 L-arginine 不需要鈣離子而延長細胞的作用可能是經由另一條作用途徑。

3 - 2.3 NO/cGMP 訊息路徑

NO/cGMP 訊息路徑在某些生理功能是很重要的，其中包括血管平滑肌的放鬆、神經元的訊息傳遞和抑制血小板凝集等等 (Robbins and Grisham, 1997)。而過度刺激 sGC 之前已有人推測可能會經由誘發過多 NO 而造成耳蝸毒性 (Dais et al., 1996)。最近已有研究在柯蒂氏器的神經末梢將 NOS 定位出來 (Michel et al., 1999)。NO 的目標酵素，sGC 和蛋白激酶 G，已知存在於支持細胞但在感覺毛細胞卻沒有發現。NO/cGMP 路徑對控制支持細胞的鈣離子恆定狀態和調節耳蝸血流扮演一個重要的角色 (Fessenden and Schacht, 1998)。相對的，在外毛細胞使用螢光染色劑 4,5-diaminofluorescein diacetate 當指示劑時，卻能發現 NO 的蹤跡；接近內毛細胞旁的傳入神經和它們假設存在的神經末梢，以及外毛細胞旁的傳出神經末梢 (Shi et al., 2001)。NO 在外毛細胞的運動是扮演一個怎樣的調控角色，還需要未來的深入探討。將外毛細胞以 NOS 抑制劑前處理後，L-arginine 所引起的慢速運動很明顯的被減弱，所以我們不能排除 NO/cGMP 路徑在外毛細胞的慢速運動可能扮演一種角色。甚至已經有人發表出 cGMP 依賴路徑 (cGMP - dependent pathway) 對外毛細胞電運動性的調控關係 (Szönyi et al.,

1999) 。L-arginine 所引起外毛細胞的慢速運動應該經由幾種可能機制。首先，在聽覺神經末端被發現 NOS 和 GC 的存在而 NO 可能被當成回朔訊息去作用在外毛細胞的突觸前細胞膜。再者，可能因為 NOS 和 GC 在外毛細胞的量太低以致於無法被定位出來。第三，L-arginine 也可能直接作用在外毛細胞細胞膜上的運動蛋白，而確實的分子機制仍待未來的研究來確立。總而言之，本實驗證實了 L-arginine 所引起外毛細胞的延長作用是經由一種非依賴鈣離子的方式，而這個可能的非依賴鈣離子路徑或許參與調控外毛細胞之慢速運動。

第四章、Taicatoxin 對外毛細胞運動性的影響

4 - 1. 實驗結果

4 - 1. 1 Taicatoxin 阻斷高鉀溶液對外毛細胞的收縮作用

外毛細胞置於 L-15 medium 中，在顯微鏡下觀察 600 秒作為控制組，如 Fig. 4 - 1 B 所示 450 秒時細胞長度縮短至 $98.8 \pm 0.2 \%$ (與時間點零之細胞長度做比較， $n = 6$)。高鉀溶液 (50 mM) 作用於外毛細胞會呈現收縮的現象，於反應後 570 秒到達收縮反應最大值 $90.3 \pm 1.1 \%$ ($P < 0.05$ 與 L-15 medium 之控制組做比較， $n = 12$ ；Fig. 4 - 1 B)。曾有文獻指出 taicatoxin 可能是一種鈣離子管道阻斷劑；用 taicatoxin (0.19 μM) 前處理外毛細胞 10 分鐘後再以高鉀溶液 (50 mM) 作用，於反應後 600 秒到達收縮反應的最大值 $97.8 \pm 0.6 \%$ ($n = 12$)。從 Fig. 4 - 1 B 可觀察到，經 taicatoxin (0.19 μM) 處理過之外毛細胞對高鉀溶液 (50 mM) 的反應，與 L-15 medium 控制組之時間與細胞長度反應曲線接近重疊。Fig. 4 - 1 A 左圖為高鉀溶液 (50 mM) 作用於外毛細胞 0、150、300、450、600 秒之照片，可以觀察到明顯的細胞收縮現象。Fig. 4 - 1 A 右圖是高鉀溶液 (50 mM) 作用於經 taicatoxin

(0.19 μM) 處理過之外毛細胞於 0、150、300、450、600 秒之照片，細胞並沒有顯著的長度變化。

4 - 1. 2 Cobaltous chloride 前處理對於高鉀溶液或 ionomycin 所引發外毛細胞慢運動性的影響

Ionomycin 為一種鈣離子載體，能直接穿過細胞膜使細胞內鈣離子濃度上升而表現出細胞延長的現象；外毛細胞加入 ionomycin (10 μM) 後細胞延長反應的最大值為 $106.5 \pm 0.7\%$ (與時間點零之細胞長度做比較， $n = 14$)。將外毛細胞經鈣離子管道抑制劑 cobaltous chloride (Co^{2+} , 3 mM) 前處理 10 分鐘，加入 ionomycin (10 μM) 後之細胞延長反應最大值為 $104.2 \pm 0.6\%$ ($n = 6$; Fig. 4 - 2)，所以可部份抑制 ionomycin (10 μM) 延長外毛細胞之作用 ($P < 0.05$)。高鉀溶液對外毛細胞的作用正好與 ionomycin 相反，細胞會呈現收縮現象；高鉀溶液 (50 mM) 作用於外毛細胞之細胞收縮最大值為 $90.3 \pm 1.1\%$ ($n = 12$)。同樣的，以 cobaltous chloride (Co^{2+} , 3 mM) 處理外毛細胞 10 分鐘後加入高鉀溶液 (50 mM)，收縮的現象很明顯的被阻斷了。經 Co^{2+} 處理過的細胞於高鉀溶液作用後的收縮最大值只有 $97.8 \pm 0.5\%$ ($P < 0.01$ 與單獨加入高鉀溶液之細胞做比較， $n = 6$; Fig. 4 - 2)

4 - 1. 3 其他鈣離子阻斷劑對高鉀溶液縮短外毛細胞作用之影響

Fig. 4 - 3 列出三種鈣離子管道阻斷劑與高鉀溶液於外毛細胞的反應關係。高鉀溶液 (50 mM) 作用於外毛細胞之細胞收縮最大值為 $90.3 \pm 1.1\%$ ($n = 12$)。以另外三種鈣離子管道阻斷劑，nifedipine (50 μM ；L- 型鈣離子管道阻斷劑)、 ω -conotoxin GVIA (1 μM ；N- 型鈣離子管道阻斷劑)、 ω -agatoxin IVA (0.5 μM ；P - 型鈣離子管道阻斷劑)，處理過的外毛對高鉀溶液 (50 mM) 的反應最大值分別為 $90.7 \pm 1.1\%$ ($n = 10$)、 $90.1 \pm 0.5\%$ ($n = 7$)、 $92.7 \pm 0.4\%$ ($n = 10$)。結果顯示三者皆無法阻斷高鉀溶液縮短外毛細胞之作用 (Fig. 4 - 3)。

4 - 1. 4 經 fluo-3/AM 處理過的外毛細胞對高鉀溶液的反應減弱

外毛細胞在加入高鉀溶液 (50 mM) 後會呈現明顯收縮現象，反應後 570 秒到達收縮反應最大值 $90.3 \pm 1.19\%$ ($n = 12$)。細胞觀察鈣離子濃度變化所使用的螢光表現物質 fluo-3/AM (5 μM) 處理過 30 分鐘後，從 Fig. 4 - 4 中可得知高鉀溶液對外毛細胞的作用被明顯的抑制了。處理過

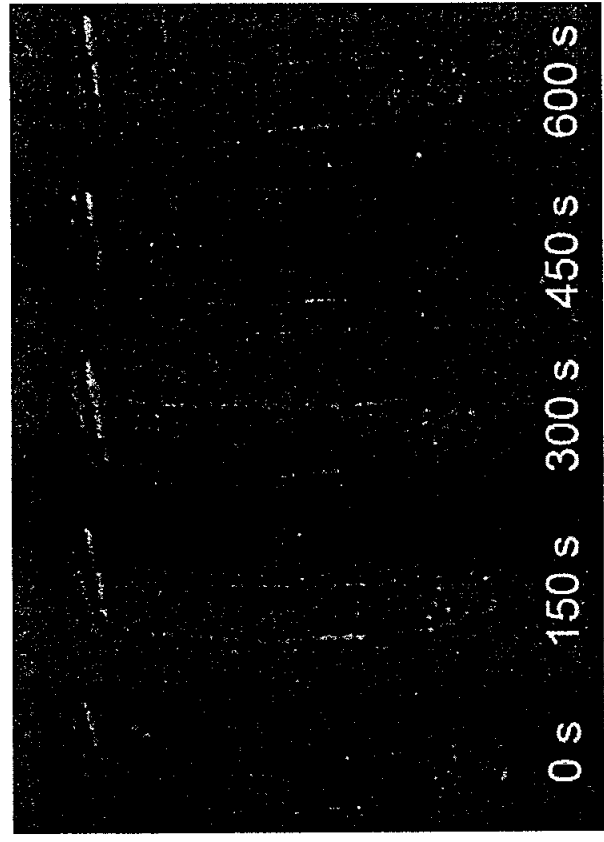
fluo-3/AM 的細胞在加入高鉀溶液後呈現的收縮現象緩慢且不明顯，600 秒時細胞到達收縮反應最大值 $96.9 \pm 0.4\%$ ($P < 0.05$ 與單獨加入高鉀溶液的控制組細胞作比較， $n = 16$)。

4 - 1. 5 外毛細胞內鈣離子螢光增加之作用被 cobaltous chloride 所抑制但不受 taicatoxin 所影響

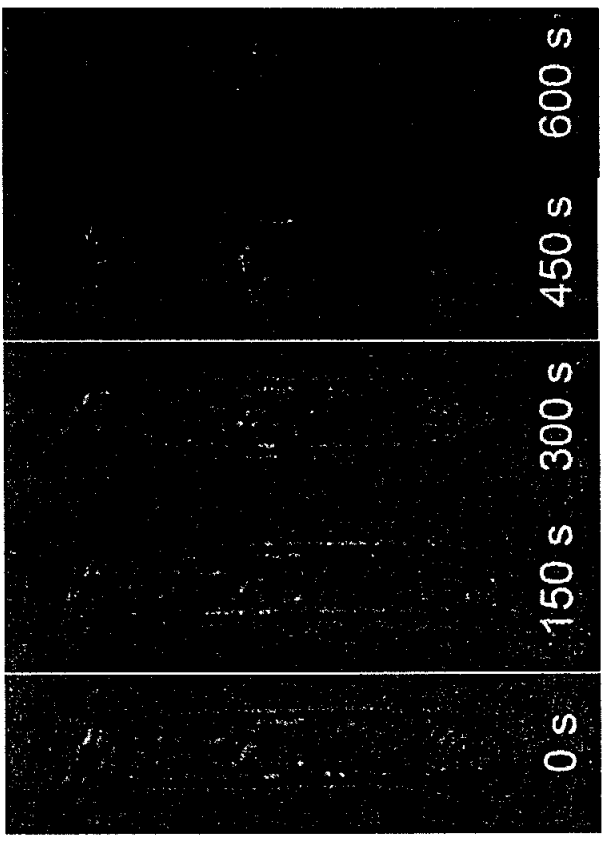
將外毛細胞處理 fluo-3/AM 40 分鐘後在共軛焦雷射顯微鏡下觀察細胞內鈣離子螢光的變化，Fig. 4 - 5 A 列出外毛細胞在 0、150、300、450、600 秒等時間點之螢光照片，細胞呈現的基礎 (0 秒時，未加入任何試劑前) 鈣離子相對螢光強度值固定在 35。當加入 CaCl_2 (外加 3.75 mM 的 CaCl_2 加上 L-15 或 HBSS 溶液內含有 1.25 mM 的鈣離子，細胞外總鈣離子濃度為 5 mM) 時細胞內鈣離子螢光會開始增加 (Fig. 4 - 5 Aa) 持續至 600 秒時到達相對螢光強度最大值 59.2 ± 6.4 (與基礎相對螢光強度做比較， $n = 8$; Fig. 4 - 5 B)。將外毛細胞以 cobaltous chloride (Co^{2+} , 3 mM) 前處理 10 分鐘，當加入 CaCl_2 (5 mM) 時我們觀察到鈣離子螢光強度並沒有增加 (Fig. 4 - 5 Ab)，相對鈣離子螢光強度值在 600 秒時為 34 ± 4.9 (與基礎相對螢光強度做比較， $n = 8$)。從 Fig. 4 - 5 C 中觀察到以 taicatoxin (0.19 μM) 前處理過的外毛細胞對 CaCl_2 (5 mM) 的螢光表現反應與單獨使用 CaCl_2 (未處理過

taicatoxin) 的細胞反應有些類似。細胞以 taicatoxin ($0.19 \mu\text{M}$) 前處理 10 分鐘後加入 CaCl_2 (5 mM)，在 450 秒到達相對螢光強度的最大值 57.6 ± 7.8 ($n = 9$)，這與單獨使用 CaCl_2 時的表現相仿 (600 秒時最大值為 59.2 ± 6.4)。Fig. 4 - 5 Ac 為以 taicatoxin 處理過之外毛細胞對 CaCl_2 反應的螢光表現圖，螢光強度並沒有顯著的增加。

A



加入高鉀溶液(50mM)



以 taicatoxin 處理過

+

加入高鉀溶液(50mM)

Fig. 4 - 1.

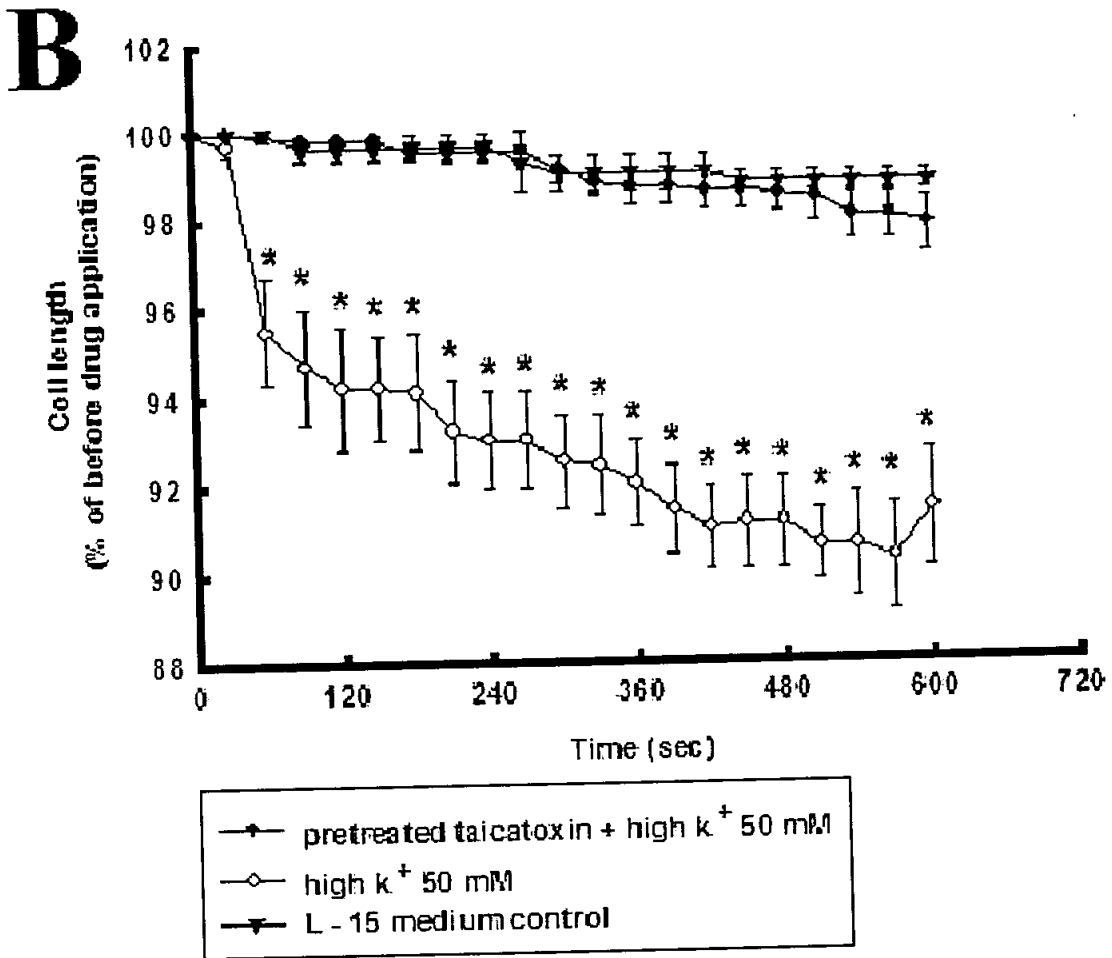


Fig. 4 - 1.(續) Taicotoxin ($0.19 \mu\text{M}$) (-▼-)阻斷高鉀溶液 (50 mM) 縮短外毛細胞之作用。(A) 左圖為典型單離外毛細胞於高鉀溶液 (50 mM) 作用後，細胞在 0、150、300、450、600 秒於顯微鏡下所拍 400 倍照片，細胞明顯縮短。右圖經 taicotoxin ($0.19 \mu\text{M}$) 處理過後，對高鉀溶液 (50 mM) 之反應減弱。(B) Taicotoxin ($0.19 \mu\text{M}$) 阻斷高鉀溶液 (50 mM) 對外毛細胞縮短之反應曲線。(-○-)：高鉀溶液 (50 mM)；(-●-)：經 taicotoxin ($0.19 \mu\text{M}$) 前處理；(-▼-)：L - 15 medium 控制組。* $P < 0.05$ 與 L - 15 medium 控制組做比較 (-○-)。

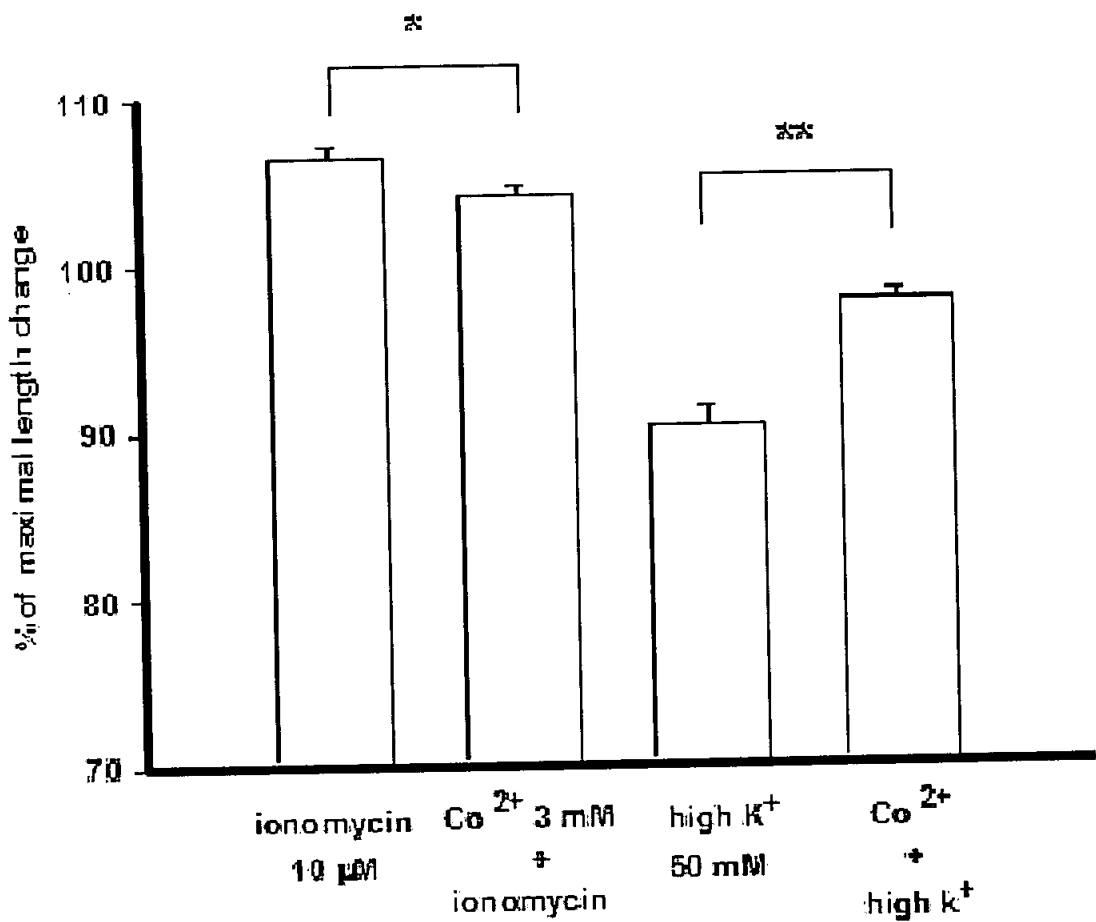


Fig. 4 - 2. Cobaltous chloride 前處理對於高鉀溶液或 ionomycin 所引發外毛細胞慢運動性的影響。Cobalt chloride (Co²⁺, 3 mM) 明顯地阻斷了高鉀溶液 (50 mM) 縮短外毛細胞之作用，其阻斷 ionomycin (10 μ M) 延長外毛細胞之作用較弱，但仍具統計意義。* $P < 0.05$ 與單獨加入高鉀溶液之細胞做比較。* $P < 0.01$ 與單獨加入高鉀溶液之細胞做比較。

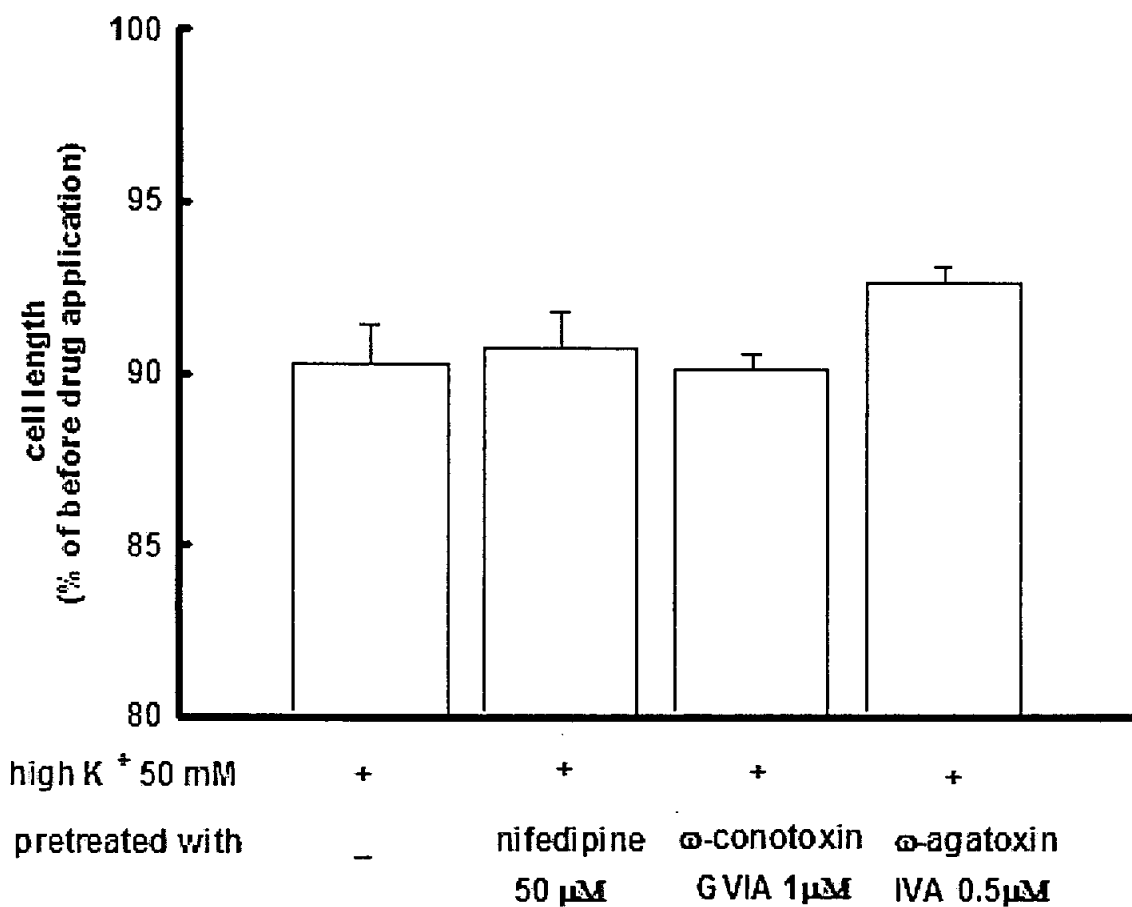


Fig. 4 – 3 Nifedipine (50 μM)、ω-conotoxin GVIA (1 μM)、ω-agatoxin IVA (0.5 μM)，對高鉀溶液 (50 mM) 引起之細胞長度改變的影響。三種鈣離子管道阻斷劑並不影響高鉀溶液 (50 mM) 之作用。

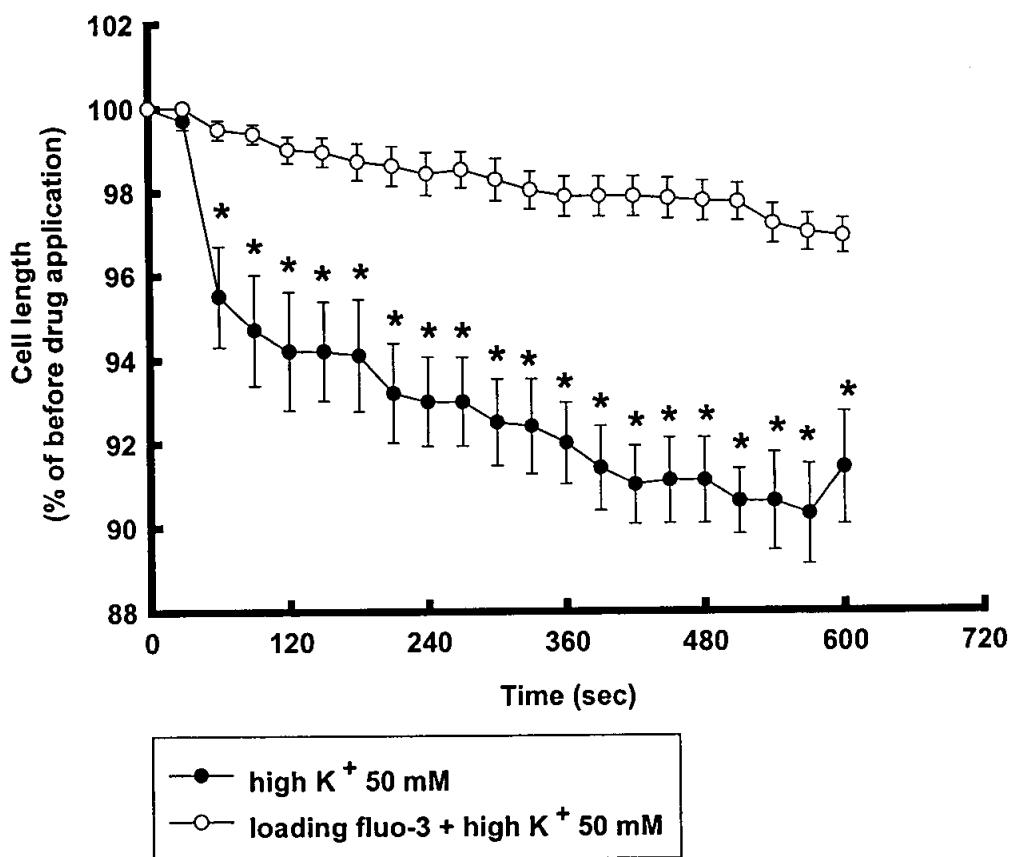
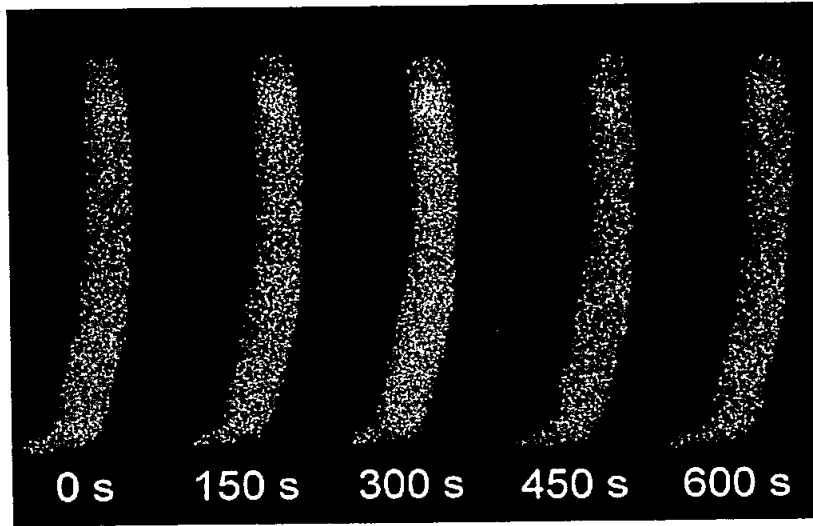
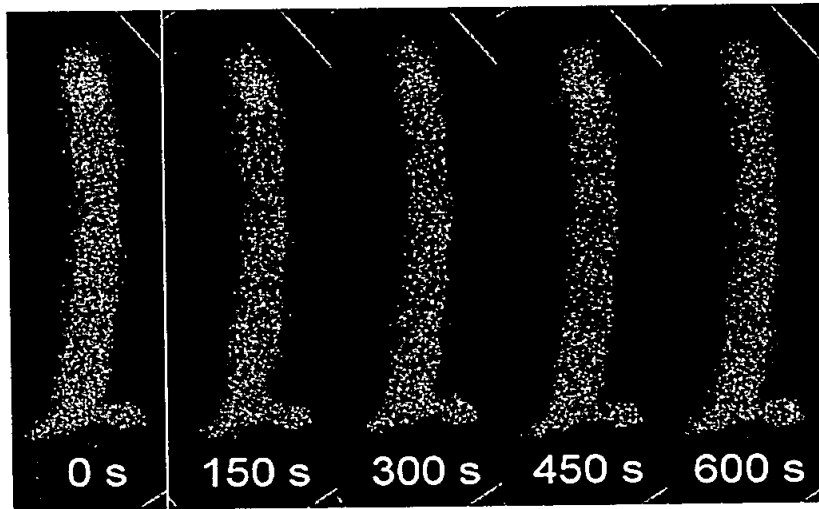


Fig. 4 - 4. Fluo-3 / AM (5 μ M ; -○-) 對高鉀溶液 (50 mM ; -●-) 引起之細胞長度改變的影響。Fluo-3 / AM (5 μ M) 明顯地減弱高鉀溶液 (50 mM) 縮短外毛細胞之作用。Values are mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ 與高鉀溶液組做比較 (-●-)。

a



b



c

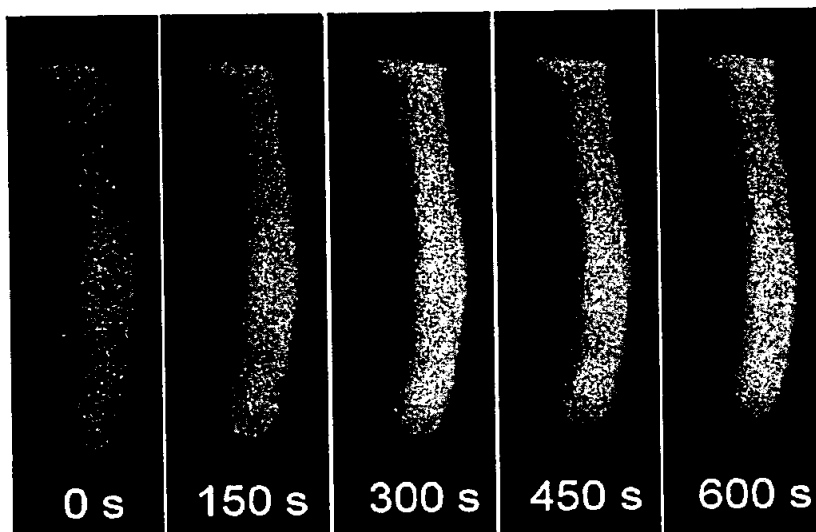


Fig. 4 - 5. A

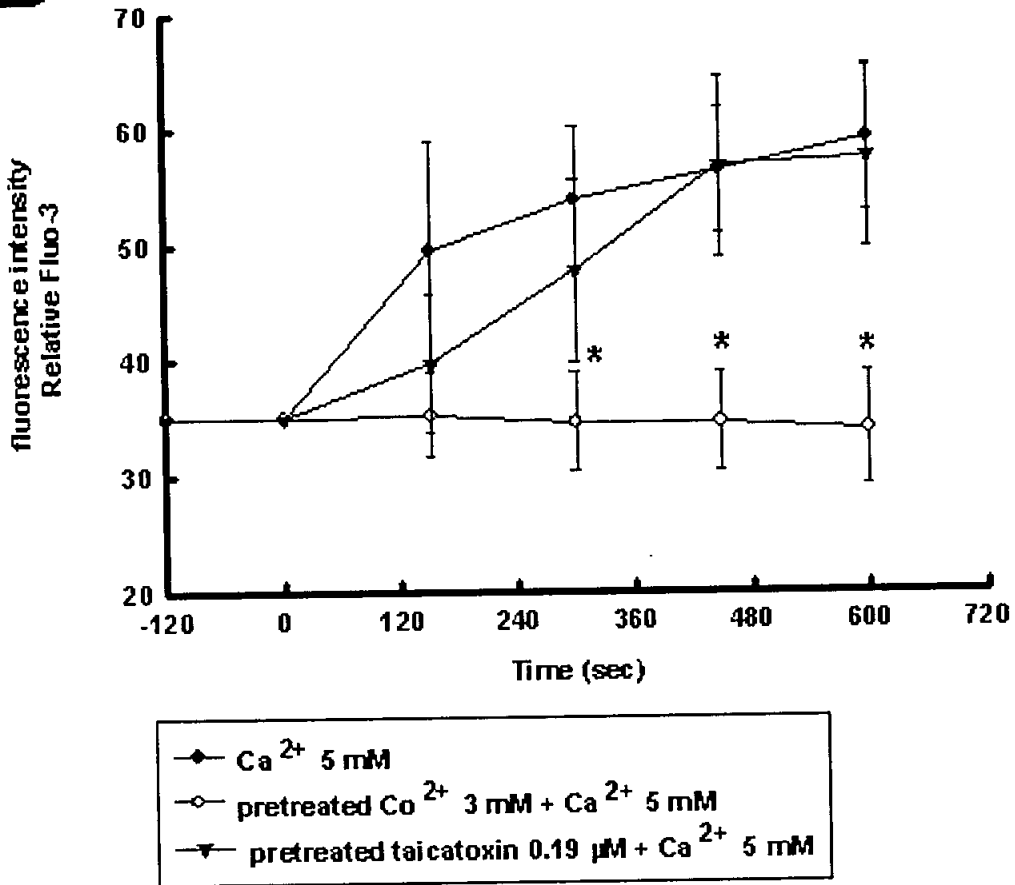
B

Fig. 4 - 5. B (續) 比較 cobaltous chloride (Co^{2+} , 3 mM) 與 taicatoxin ($0.19 \mu\text{M}$) 對外毛細胞內 fluo-3 螢光強度之影響。(A) 圖示 0、150、300、450、600 秒時外毛細胞之螢光強度變化；控制組 (a)：高鈣溶液 (5 mM)；前處理 cobaltous chloride (b)；taicatoxin 前處理(c)。(B) Cobaltous chloride (Co^{2+} , 3 mM) 與 taicatoxin ($0.19 \mu\text{M}$) 前處理之外毛細胞，於時間零點加入高鈣溶液之時間與螢光強度反應曲線圖。以 cobaltous chloride (-○-) 前處理之細胞沒有螢光上升的現象，而以 taicatoxin (-▼-) 前處理的螢光反應曲線與高鈣溶液的曲線 (-●-) 差異不大。* $P < 0.05$ 與高鈣溶液控制組做比較。

4 - 2. 討論

本研究顯示 taicatoxin 及 cobaltous chloride 可以有有意義的抑制高鉀縮短外毛細胞之作用，而其他的鈣離子管道阻斷如 P- 型鈣離子管道阻斷劑 ω -agatoxin IVA, N- 型鈣離子管道阻斷劑 ω -conotoxin GVIA 及 L- 型鈣離子管道阻斷劑 nifedipine 對於高鉀溶液所引起外毛細胞縮短之作用並沒有顯著的影響。Taicatoxin 與 cobaltous chloride 是否是經由鈣離子管道的抑制而產生對外毛細胞運動性的影響是存疑的。在 Fluo-3 鈣離子螢光的實驗顯示 cobaltous chloride 可以抑制由高鈣溶液所引發的細胞內鈣上升作用，但 taicatoxin 無法有效的抑制細胞內鈣上升的作用，此實驗顯示 cobaltous chloride 與 taicatoxin 對於外毛細胞慢運動性的影響是經由不同作用機制的。其它類型的鈣離子管道阻斷劑如 ω -agatoxin IVA 並不影響高鉀溶液縮短外毛細胞之作用，對 ω -agatoxin IVA 敏感性的鈣離子管道已被選殖出來，他的 α_1 次元即是 α_{1A} (Sather et al., 1993)。 ω -agatoxin IVA 在 30 ~ 100 nM 濃度的範圍即對此管道有好的阻斷作用，爲了研究此鈣管道的生物物理及藥理特性，於是將 α_{1A} 次元的 cDNA 注射入爪蟾的卵細胞內，讓它表現以測量單一離子管道及巨觀的電流。這種表現的鈣離子

管道對於 dihydropyridines 以及 ω -conotoxin GVIA 是不反應的。

多形式的鈣離子管道已證實共同存在哺乳類的中樞神經細胞體(Mintz,1922;Usowicz, 1922 ; Dunlap et al., 1995) 以及神經終端 (Takahashi and Momiyama, 1993 ; Wheeler et al., 1994)。在青蛙神經-肌聯結，有兩種鈣離子管道被證實是屬於 ω -conotoxin GVIA 敏感性 (Katz et al.,1995)。在中樞神經系統，可以用高鉀溶液或增強電刺激強度促進神經傳訊物質釋出來研究鈣離子管道。如用 60mM 鉀溶液在大鼠紋狀體神經末梢，使之去極化 (Luebke et al., 1993)，或在 CA1 區的錐狀細胞體增強電刺激 (Dunlap et al., 1995) 來增強神經傳訊物質的釋出，發現在此條件下， ω -conotoxin GVIA 或 ω -agatoxin IVA 只有微弱的抑制作用。然而將此兩毒素一起加入，則會產生明顯的相乘抑制作用。從這個結果可以得知，至少有兩類型鈣離子管道共同存在於神經末梢。在本篇的實驗中，taicatoxin 及 cobaltous chloride 可以對抗高鉀縮短外毛細胞的作用，cobaltous chloride 是非選擇性鈣離子管道阻斷劑，對於高鈣溶液所引起細胞內鈣離子螢光上升具有抑制作用，因此 cobaltous chloride 對於對抗高鉀所引起的外毛細胞的作用可能與抑制鈣離子管道有關。雖然 taicatoxin 之前的報告顯示是 L- 型鈣離子管道阻斷劑或鈣依賴性鉀電流阻斷劑

(Doorty et. al., 1997) 但本實驗中 taicatoxin 並不會抑制高鈣溶液增加細胞內鈣離子螢光強度的作用，並且其它 L- 型管道抑制劑 nifedipine 對外毛細胞的運動性亦無影響。因此 taicatoxin 對外毛細胞的作用可能是經由直接對外毛細胞膜上運動蛋白 (prestin) 的作用。總之，從實驗中我們得知 taicatoxin 對於外毛細胞的影響其作用機制並不同於 cobaltous chloride 或是 L- 型鈣管道抑制劑 nifedipine。Taicatoxin 的作用有可能直接影響到外毛細胞膜表面的運動蛋白 prestin，此作用有待更進一步的實驗加以證實。

結論

耳蝸內的外毛細胞其主要的功能是放大聲波的機制以及區分不同聲頻。本論文的研究顯示一氧化氮的前驅物質 L-arginine 對於外毛細胞的運動性有顯著的影響，因此 NO/cGMP 的路徑在參與調控外毛細胞之慢速運動上扮演某些程度的角色。生理上它的詳盡角色仍需要更進一步的探討釐清。

另外，澳洲大斑蛇毒液所純化出來的成分-taicatoxin 能對高鉀溶液縮短外毛細胞之作用，taicatoxin 不是經由影響鈣離子管道而來的，可能是對於外毛細胞膜上運動蛋白的直接作用。總之，不論是 L-arginine 或 taicatoxin 的作用皆與鈣離子濃度的變化或鈣離子管道無關，因此我們推測有另一條非鈣離子依賴性作用途徑能引起外毛細胞慢速運動。

References

- Ashmore, J., 2002. Biophysics of the cochlea – biomechanics and ion channelopathies. *British Medical Bulletin* 63, 59-72.
- Becker, P.S., Cohen, C.M., Lux, S.E., 1986. The effect of mild diamide oxidation on the structure and function of human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* 261, 4620-4628.
- Blatter, L.A., Wier, W.G., 1994. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* 15, 122-131.
- Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101, 1028.
- Bosher, S.K., Warren, R.L., 1968. Observations on the electrochemistry of the cochlear endolymph of the rat. *Proc. R. Soc. B* 171, 227-247.
- Bosher, S.K., Warren, R.L., 1978. Very low calcium content of cochlear endolymph, an extracellular fluid. *Nature* 273, 377-378.

Camussi G., Ronco C., Montrucchio G., 1998. Role of soluble mediators in sepsis and renal failure. *Kidney Int*, 53(Suppl 53):S 38-42.

Citron, L., Exley, D., Hallpike, C.S., 1956. Formation, circulation and chemical properties of the labyrinthine fluid. *Br. Med. Bull.* 12, 101-104.

Coling, D.E., Bartolami, S., Rhee, D., Neelands, T., 1998. Inhibition of calcium-dependent motility of cochlear outer hair cells by the protein kinase inhibitor, ML-9. *Hear. Res.* 115, 175-183.

Cruchaud, A., 1977. Specific and non-specific defense mechanisms against infection. *Schweiz Med Wochenschr.* 107(48):1721-8.

Dais, C.G., Prazma, J., Ball, S.S., Zdanski, C., Carrasco, V., Pillsbury, H.C., 3rd, 1996. Effect of sodium nitroprusside on compound action potential thresholds in the gerbil cochlea. *Hear. Res.* 99, 1-6.

Dallos, P., Fakler, B., 2002. Prestin, a new type of motor protein. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 104-111.

Dawson, V., Dawson, T.M., London, E.D., Brecht, D.S., Snyder, S.H., 1991. Nitric oxide mediates glutamate toxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 6368-6371.

Dolgobrodov, S.G., Lukashkin, A.N., Russell, I.J., 2000. Electrostatic interaction between stereocilia: II. Influence on the mechanical properties of the hair bundle. *Hear. Res.* 150, 94-103.

Doorty, K.B., Bevan, S., Wadsworth, J.D.F., Strong, P.N., 1997. A novel small conductance Ca^{2+} - activated K^{+} channel blocker from oxyuranus taipan venom. *J. Biol. Chem.* Vol. 272, No 32, pp 19925-19930.

Dulon, D., Aran, J.-M., Schacht, J., 1987. Osmotically induced motility of outer hair cells: implications for Meniere's disease. *Arch. Otorhinolaryngol.* 224, 104-107.

Dulon, D., Zajic, G., Schacht, J., 1990. Increasing intracellular free calcium induces circumferential contraction in isolated cochlear outer hair cells. *J. Neurosci.* 10, 1388-1397.

Dunlap, K., Luebke, J.I., Tuner, T.J., 1995. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 18, 89-98.

Fessenden, J.D., Altschuler, R.A., Seasholtz, A.F., Schacht, J., 1999. Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in the peripheral and central auditory system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 404, 52-63.

Fessenden, J.D., Schacht, J., 1997. Distribution of soluble guanylate cyclase activity suggests regulation of blood flow and supporting cell physiology in the inner ear. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 1401-1408.

Fessenden, J.D., Schacht, J., 1998. The nitric oxide/cyclic GMP pathway: A potential major regulator of cochlear physiology. *Hear. Res.* 118, 68-176.

Flock, A., Flock, B., Ulfendahl, M., 1986. Mechanisms of movement in OHCs and a possible structural basis. *Arch. Otorhinolaryngol.* 243, 83-90.

Garthwaite, J., 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14, 60-67.

Goldberg, J.M., Brown, P.B., 1969. Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization. *J. Neurophysiol.* 32, 613-636.

Gorge, G., Fluchter, S., Kirstein, M., Kunz, T., 2003. Sex, erectile dysfunction, and the heart: a growing problem. *Herz.* 28(4):284-90.

Hisashi, K., Nakagawa, T., Yasuda, T., Kimitsuki, T., Komune, S., Komiyama, S., 1995. Voltage-dependent Ca^{2+} channels in the spiral ganglion cells of guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 91:196-201.

Holley, M.C., Ashmore, J.F., 1988a. A cytoskeletal spring in cochlear outer hair cells. *Nature* 335, 635-637.

Holley, M.C., Ashmore, J.F., 1990. Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. *J. Cell Sci.* 96, 283-291.

Holley, M.C., Kalinec, F., Kachar, B., 1992. Structure of the cortical cytoskeleton in mammalian outer hair cells. *J. Cell Sci.* 102, 569-580.

Kachar, B., Brownell, W.E., Altschuler, R., Fex, J., 1986. Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322, 365-368.

Kalinec, F., Kachar, B., 1993. Inhibition of outer hair cell electromotility by sulfhydryl specific reagents. *Neurosci. Lett.* 157, 231-234.

Knudsen E.L., 1983. Space coding in the vertebrate auditory system. *In: Bioacoustics: A Comparative Approach*, ed. Lewis, B., Academic Press, New York, pp. 311-344.

Kollegger, H., McBean, G.J., Tipton, K.F., 1993. Reduction of striatal NMDA toxicity by inhibition of nitric oxide synthase. *Biochem. Pharmacol.* 45, 260-264.

Kollmar, R., Montgomery, L. G., Fak, J., Henry, L. J., Hudspeth, A. J. (1997) Predominance of the α_{1D} subunit in L-type voltage-gated Ca^{2+} channels of hair cells in the chicken's cochlea. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 94: 14883-14888..

Koyano, K. and Ohmori, H. (1996) Cellular approach to auditory signal transmission. Jap. J. Physiol. 46: 289-310.

Lieberman, M.C., Gao, J., He, D. Z.Z., Wu, X., Jia, S., Zuo, J., 2002. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. Nature 419, 300-304.

Lin, M.J., Su, M.C., Tan, C.T., Su, C.C., Li, S.Y., Lin, R.H., Lin-Shiau, S.Y., Hung, C.C., Lee, S.Y., 2003. The effect of L-arginine on slow motility of mammalian outer hair cell. Hear. Res. 178, 52-58.

Luebke, J.I., Dunlap, K., Turner, T.J., 1993. Multiple calcium channels types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. Neuron 11, 895-902.

McDonald TF. Pelzer S. Trautwein W. Pelzer DJ. (1994) Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. Physiol. Rev. 74 : 365-507.

- Michel, O., Hess, A., Bloch, W., Stennert, E., Su, J., Addicks, K., 1999. Localization of the NO/cGMP-pathway in the cochlea of guinea pigs. *Hear. Res.* 133, 1-9.
- Mintz, I.M., Adams, M.E., Bean, B.P., 1992. P – type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9, 85-95.
- Moiseff, A., Konishi, M., 1983. Binaural characteristics of units in the owl's brainstem auditory pathway: precursors of restricted special receptive fields. *J. Neurosci.* 3, 2553-2562.
- Olivera, B.M., Imperial, J.S., Cruz, L.J., Bindokas, V.P., Venema, V.J., Adams, M.E., 1991. Calcium channel – targeted polypeptide toxins. *Ann. New York Acad. Sci.* 635, 114-122.
- Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J., Adams, M.S., 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The ω -conotoxins and ω -agatoxin. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 823-867.
- Oshima, T., Ikeda, K., Furukawa, M., Ueda, N., Suzuki, H., Takasaka, T., 1996. Distribution of Ca^{2+} channels on cochlear outer hair cells revealed by fluorescent dihydropyridines. *Am. J. Physiol.* 271, C944-9.
- Puschner, B., Schacht, J., 1997. Calmodulin-dependent protein kinases

mediate calcium-induced slow motility of mammalian outer hair cells. *Hear. Res.* 110, 251-258.

Remme, W.J., Swedberg, K., 2001. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *European Heart J.* 22, 1527-1560.

Robbins, R.A., Grisham, M. B., 1997. Molecules in focus nitric oxide. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 857-860.

Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., Adams, M.E., Tsien, R.W., 1993. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel $\alpha 1$ subunits. *Neuron* 11, 291-303.

Schacht, J., Zenner, H.P., 1987. Evidence that phosphoinositides mediate motility in cochlear outer hair cells. *Hear. Res.* 31, 155-159.

Schuman, E.M., Madison, D.V., 1994. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 153-183.

Sellick, P.M., Johnstone B.M., 1975. Production and role of inner ear fluid. *Prog. Neurobiol.* 5, 337-362.

Shi, X., Ren, T., Nutall, A. L., 2001. Nitric oxide distribution and production in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 153, 23-31.

Spoendlin, H., 1984. Efferent innervation of the cochlear *In: Comparative Physiology of Sensory System*, ed. Bolis, L., Keynes, R.D., Maddrell, S.H.P., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 163-188.

Steele, C., 1990. Elastic behavior of the outer hair cell wall. In: P. Dallos, C.D. Geisler, J.W. Matthews, M.A. Ruggero, C.R. Steele (Eds.), *The Mechanics and Biophysics of Hearing*. Springer-Verlag, New York, pp. 76-83.

Su, Z. L., Jiang, S. C., Gu, R., Yang, W. P. (1995) Two types of calcium channels in bullfrog saccular hair cells. *Hear. Res.* 87: 62-68.

Szönyi, M., He, D.Z.Z., Ribári, O., Sziklai, I., Dallos, P., 1999. Cyclic GMP and outer hair cell electromotility. *Hear. Res.* 137, 29-42.

Takahashi, T., Momiyama, A., 1993. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366, 156-158.

Tan, C.T., Hsu, C.J., Lee, S.Y., Liu, S.H., Lin-Shiau, S.Y., 2001 Potentiation of noise-induced hearing loss by amikacin in guinea pigs. *Hear. Res.* 161, 72-80.

Tian, F., Fessenden, J.D. and Schacht, J. (1999) Cyclic GMP-dependent

protein kinase-I in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 131, 63-70.

Tolomeo, J.A., Steele, C.R., Holley, M.C., 1996. Mechanical properties of the lateral cortex of mammalian auditory hair cells. *Biophys. J.* 71, 421-429.

Ulfendahl M., 1987. Motility in auditory sensory cells. *Acta Physiologica Scandinavica.* 130, 521-527.

Wheeler, D.B., Randall, A., Tsien, R.W., 1994. Roles of N – type and Q – type Ca^{2+} channels in an adult mammalian neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6802-6806.

Zenner, H.P., 1986. Motile responses in outer hair cells. *Hear. Res.* 22, 83-90.

Zenner, H.P., Zimmermann, U., Schmitt, U., 1985. Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear. Res.* 18, 127-133.

博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本，92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學 大學(學院) 醫研 系所

丙 組 九十一 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：L-Arginine 在 Taicetoxen 對天竺鼠外毛細胞運動性抑制影響

同意 不同意 (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路；本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利（未申請者本條款請不予理會）的附件之一，申請文號為：_____，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未夠選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：

研究生簽名：
(視筆正措)

洪垂瑛

學號：9002023
(務必填寫)

日期：民國 92 年 7 月 8 日

1. 本授權書(得自<http://sticnet.stic.gov.tw/sticweb/html/hesecs/authorize.html> 下載或至<http://www.stic.gov.tw/> 首頁右下方下載)請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請確認學校是否代收，若無者，請個別再寄論文一本至台北市(106-36)和平東路二段106號1702室 國科會科學技術資料中心 黃善平小姐。(電話:02-27377606 傳真:02-27377689)
3. 本授權書已民國85年4月10日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿，89.11.21部份修正。
4. 本案依據教育部國家圖書館85.4.19台(85)圖編字第712號函辦理。