

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1826.014.html\(2021-12-15\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1826.014.html(2021-12-15))

自噬对噪声性耳聋急性损伤期毛细胞凋亡的作用机制研究*

李林¹,于佳雪¹,黄宏明²,崔勇²,盛晓丽^{2Δ}

(1. 广东省人民医院珠海医院/广东省珠海市金湾中心医院耳鼻喉头颈外科 519040;

2. 广东省医学科学院/广东省人民医院耳鼻咽喉头颈外科 510080)

[摘要] **目的** 探讨自噬在噪声性耳聋防治中的作用及机制。**方法** 建立大鼠噪声性耳聋模型。随机分为 3 个组:对照组(每次 2 mL 生理盐水);自噬激动剂雷帕霉素(RAP)组(每次 7.5 mg/kg);自噬抑制剂 3-甲基嘌呤(3MA)组(每次 30 mg/kg 3MA),以上各组均于噪声暴露前 24、暴露前 2 h 和暴露后即刻进行腹腔注射。听觉脑干反应(ABR)阈值检测评估大鼠 ABR 情况。应用双重免疫荧光染色检测氧化应激(OS)标记物 3-硝基酪氨酸(3-NT)阳性表达细胞。Western blot 检测自噬标记 LC3-II/LC3-I 和 Beclin-1 表达水平。使用 TUNEL 法检测细胞凋亡。**结果** 噪声暴露后小鼠 ABR 阈值较暴露前升高。RAP 组在噪声暴露后 1、12、24 h 各时间点的 ABR 阈值较对照组均明显增加;而 3MA 组在以上各时间点的 ABR 阈值较对照组则明显减少(均 $P < 0.05$);噪声暴露后各耳蜗毛细胞自噬标记蛋白表达水平较暴露前明显升高。RAP 组噪声暴露 1、12、24 h 耳蜗毛细胞自噬标记蛋白表达水平明显高于对照组,而 3MA 组以上各时间点耳蜗毛细胞自噬标记蛋白表达水平则明显低于对照组(均 $P < 0.05$);噪声暴露后各组耳蜗毛细胞 3-NT 水平明显较暴露前增高,RAP 组暴露 1、12、24 h 3-NT 水平较对照组增加;而 3MA 组以上各时间点 3-NT 水平较对照组减少(均 $P < 0.05$);噪声暴露后各组耳蜗毛细胞凋亡较暴露前明显增加,RAP 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组增加,而 3MA 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组减少(均 $P < 0.05$)。**结论** 在噪声性耳聋损伤的急性期,自噬表达明显上调,并通过 OS 途径诱导毛细胞凋亡;抑制自噬能够明显改善毛细胞程序性凋亡的发生,进而改善听力。

[关键词] 自噬;噪声性耳聋;氧化应激;耳蜗;毛细胞**[中图分类号]** R764.433**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1112-05

Mechanism of autophagy on the apoptosis of hair cells during acute damage of noise deafness*

LI Lin¹, YU Jiaxue¹, HUANG Hongming², CUI Yong², SHENG Xiaoli^{2Δ}

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Zhuhai Hospital of Guangdong Provincial People's Hospital / Zhuhai Golden Bay Central Hospital, Zhuhai, Guangdong 519040,

China; 2. Department of Otorhinolaryngology, Guangdong Academy of Medicine Sciences/Guangdong General Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and mechanism of autophagy in the prevention and treatment of noise-induced deafness. **Methods** The rat model of noise-induced deafness was established. The rats were randomly divided into three groups: the control group (2 mL saline daily); the autophagy agonist rapamycin (RAP) group (7.5 mg/kg daily); the autophagy inhibitor 3 methylpurine (3MA) group (30 mg/kg daily). Auditory brainstem response (ABR) threshold assay was used to assess the auditory threshold shift in rats. Double immunofluorescence staining was applied to detect positive cells for the reactive oxygen species (ROS) marker 3-nitrotyrosine (3-NT). Western blot was used to detect the expression levels of autophagy marker proteins LC3-II/LC3-I and Beclin-1. Apoptosis was detected by using the TUNEL method. **Results** The ABR threshold was higher after noise exposure than before exposure. Compared with the control group, the ABR thresholds of the RAP group at the time point of 1, 12, and 24 h after noise exposure were significantly increased; while the ABR thresholds of the 3MA group at the above time points were significantly lower than those of the control group (all $P < 0.05$). The expression levels of autophagy marker proteins in cochlear hair

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(B2019095)。 作者简介:李林(1984-),副主任医师,本科,主要从事耳鸣、耳聋等治疗研究。

Δ 通信作者, E-mail: emp05939170j@163.com。

cells after exposure were significantly higher than those before exposure. The expression levels of autophagy marker proteins in cochlear hair cells in the RAP group were significantly higher than those in the control group after 1, 12, and 24 h of noise exposure, while the expression levels of autophagy marker proteins in cochlear hair cells in the 3MA group at the time points above were significantly lower than those in the control group (all $P < 0.05$). The level of 3-NT in cochlear hair cells after noise exposure was significantly higher than that before exposure. The level of 3-NT in cochlear hair cells in the RAP group was higher than that in the control group after noise exposure for 1, 12, and 24 h, while the expression level of autophagy 3-NT in cochlear hair cells in the 3MA group at the time points above were significantly lower than those in the control group (all $P < 0.05$). The apoptosis of cochlear hair cells after noise exposure was significantly increased compared with that before exposure, the apoptosis of cochlear hair cells in the RAP group was higher than that in the control group, however, the apoptosis of cochlear hair cells in the 3MA group was lower than that in the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** In the acute stage of noise deafness injury, the expression of autophagy is significantly up-regulated, and the apoptosis of hair cells is induced through the OS pathway. Inhibiting autophagy can significantly improve the programmed apoptosis of hair cells, thereby improving hearing.

[Key words] autophagy; noise-induced deafness; oxidative stress; cochlear; hair cells

噪声性耳聋是感音神经性耳聋里最常见的原因之一,目前其发病机制及治疗是全世界共同难题之一。导致噪声性耳聋的一个关键因素是感觉毛细胞的氧化损伤。研究表明活性氧(ROS)的过度产生已成为各种内耳损伤的常见病理机制,如噪音暴露和耳毒性药物所致的耳蜗损伤^[1-2]。既往研究发现在噪声暴露前后给予抗氧化剂治疗能够有效减少噪声引起的毛细胞死亡从而有效改善噪声性耳聋的发生^[3-4]。越来越多的证据表明 ROS 会通过诱导自噬发生来保护细胞,这一过程是通过形成自噬小体来介导的,自噬小体与溶酶体融合,对吞噬的成分进行酶解^[4]。通过程序性地处理这些可能受损的细胞成分,包括受损的细胞器和错误折叠的蛋白,起到了限制病理进展的作用^[4-5]。

自噬与 ROS 表达水平的复杂关系表明自噬在噪声性耳聋的发生发展中起着潜在关键作用,然而其具体的调控机制仍不明确。越来越多的证据表明自噬诱导的氧化应激(OS)与耳聋密切相关^[6-8]。脂质过氧化、线粒体 DNA 氧化损伤和谷胱甘肽结合蛋白的过表达都被证明与小鼠耳蜗老化密切相关^[6,9-10]。因此,探寻自噬导致的耳蜗细胞变性的确切机制及可能导致耳聋的关键分子靶标,无疑对噪声性耳聋患者的治疗有着极为重要的意义。本研究拟观察自噬在噪声性耳聋中的确切表达情况,以及其对 ROS 水平的调控机制,进一步明确自噬和 ROS 与听觉阈值之间的相关性,为临床治疗噪声性耳聋奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

健康成年 SD 大鼠 48 只,雌雄不限,体重 220~240 g,由华南理工大学动物实验中心提供,分为 3 组:对照组,自噬抑制剂 3-甲基嘌呤(3MA)组和自噬激动剂雷帕霉素(RAP)组。RAP、3MA 购自上海宝曼生物科技有限公司;TUNEL 试剂盒购自瑞士 Roche 公司;酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;LE2202S

型电子天平购自德国 Sartorius 公司;Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司);LeicaDC500 病理图像分析系统(德国 Leica 公司);H-7650 透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

1.2 噪声暴露

噪声性耳聋模型按既往文献进行造模^[11],即将大鼠放入暴露舱(0.5 m×1.5 m×0.5 m),用 UZ-3 型噪声发生器发声,平均声强为 106 dB。动物暴露范围内声扬不均匀度为±2 dB,噪声频率为 4 kHz,持续暴露 6 h。

1.3 腹腔注射给药

RAP 以 75 mg/mL 溶于 DMSO 并在 -20 °C 下储存;3-MA 以 30 mg/mL 溶于 0.9% 的生理盐水并在 -20 °C 下储存。根据文献报道使用剂量^[11],即每只大鼠共接受 3 次腹腔内注射,RAP 的剂量为每次 7.5 mg/kg,3-MA 的剂量为每次 30 mg/kg。使用时间为在噪声暴露前 24 h、前 2 h 和暴露后即刻进行腹腔注射。

1.4 听觉脑干反应(auditory brainstem response, ABR)

按以往文献描述对大鼠行 ABR 检测^[11]。即分别以 10% 水合氯醛(30 mg/kg)腹腔麻醉,在静电屏蔽室内采用 Nicolet Compass 系统测试 ABR。ABR 阈值即为观察到有刺激反应的最低刺激水平和无刺激反应的最高水平。所有的 ABR 阈值测量都由同一个实验者进行。

1.5 末端 DNA 转移酶 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法检测凋亡

耳蜗基底膜组织切片常规脱蜡至水,按照试剂盒说明书完成余下操作后,镜下观察耳蜗毛细胞凋亡情况,光镜下 400 倍视野观察拍照。细胞核呈绿色颗粒伴核形态不规则或固缩的即为凋亡细胞。

1.6 免疫荧光定量分析

按免疫荧光染色按试剂盒说明书操作,使用的一

抗分别为稀释浓度 1:50 的多克隆兔抗 LC3B(美国丹佛 Cell Signaling Technology 公司), 1:50 的多克隆兔抗 3-硝基酪氨酸(3-NT, 美国比尔里卡 EMD Millipore 公司)。Alexa Fluor 594 标记二抗的稀释浓度为 1:200, Alexa Fluor 488 标记的二抗的稀释浓度为 1:100(美国 Life Technologies 公司)。所有切片均置于电子显微镜下观察摄片, 并使用 ImageJ 软件量化处理。

1.7 Western blot

耳蜗基底膜组织切片经 PBS 清洗后按蛋白提取试剂盒说明书提取组织总蛋白, 100 °C 变性 5 min。然后各泳道等量蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白并转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。经 5% 的牛血清清蛋白(BSA)封闭 1 h 后加入相应的一抗(LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白一抗), 4 °C 过夜孵育。第 2 天加入相应二抗, 室温孵育 1.5 h。最后加入发光液, 以 GAPDH 为内参于凝胶成像仪进行曝光拍照并进行条带灰度值分析。

1.8 统计学处理

采用 Stata13.0 软件分析数据, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用非配对 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

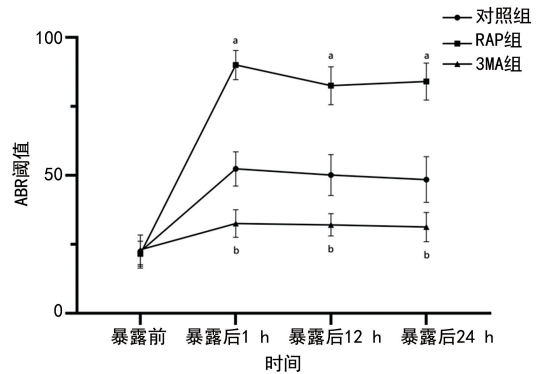
2.1 抑制自噬能够降低 ABR 阈值

噪声暴露后 1、12、24 h 检测各组 ABR 阈值后发现, 各组 ABR 阈值较暴露前升高。RAP 组在噪声暴露后 1、12、24 h 各时间点的 ABR 阈值较对照组均明显增加; 而 3MA 组在以上各时间点的 ABR 阈值对

照组则明显减少(均 $P < 0.05$)。见图 1。

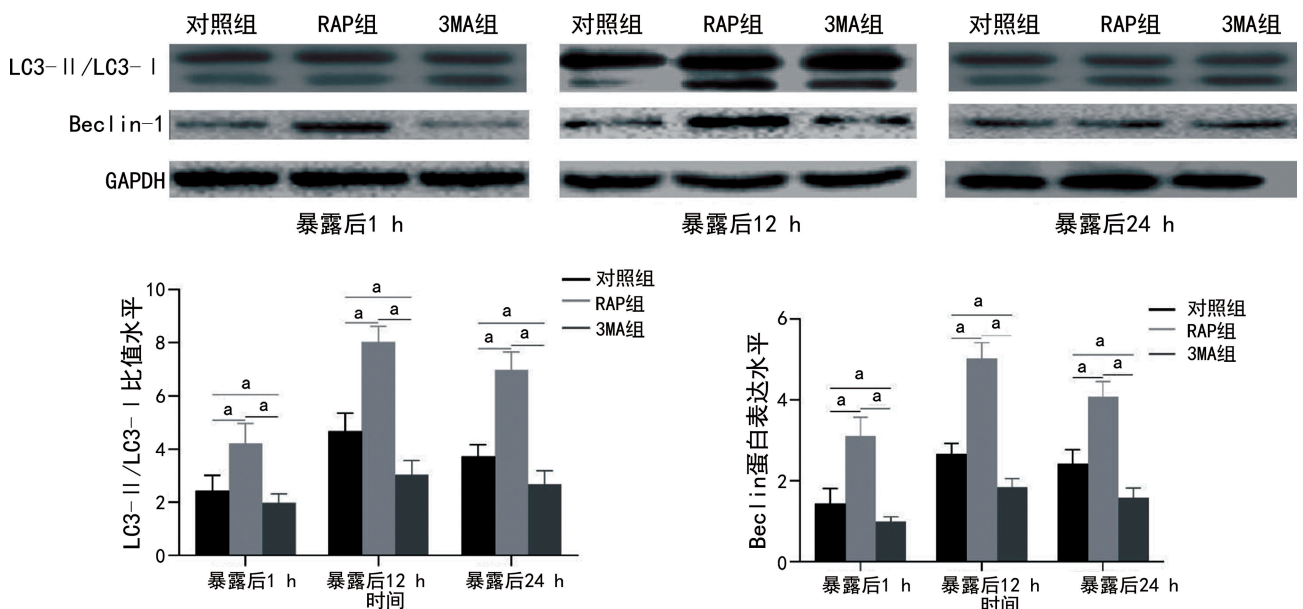
2.2 抑制自噬能够抑制耳蜗毛细胞中自噬标志蛋白和 ROS 表达水平

在噪声暴露后 1、12、24 h 分别检测各组耳蜗毛细胞自噬标志蛋白 LC3-II/LC3-I 和 Beclin-1 发现, 各组噪声暴露后耳蜗毛细胞自噬标志蛋白表达水平明显升高。RAP 组噪声暴露 1、12、24 h 耳蜗毛细胞自噬标志蛋白表达水平明显高于对照组, 而 3MA 组以上各时间点耳蜗毛细胞自噬标志蛋白表达水平则明显低于对照组(均 $P < 0.05$), 见图 2。为进一步验证自噬表达与细胞程序性死亡的终末产物 ROS 水平的相关性, 本研究检测了噪声暴露后 1、12、24 h 3-NT 水平后发现, 噪声暴露后耳蜗毛细胞 3-NT 水平明显较暴露前增高, RAP 组暴露 1、12、24 h 3-NT 水平较对照组增加; 而 3MA 组以上各时间点 3-NT 水平较对照组减少(均 $P < 0.05$), 见图 3。



^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图1 噪声暴露后大鼠 ABR 阈值变化



A: Western blot; B: Western blot 定量分析图; ^a: $P < 0.05$ 。

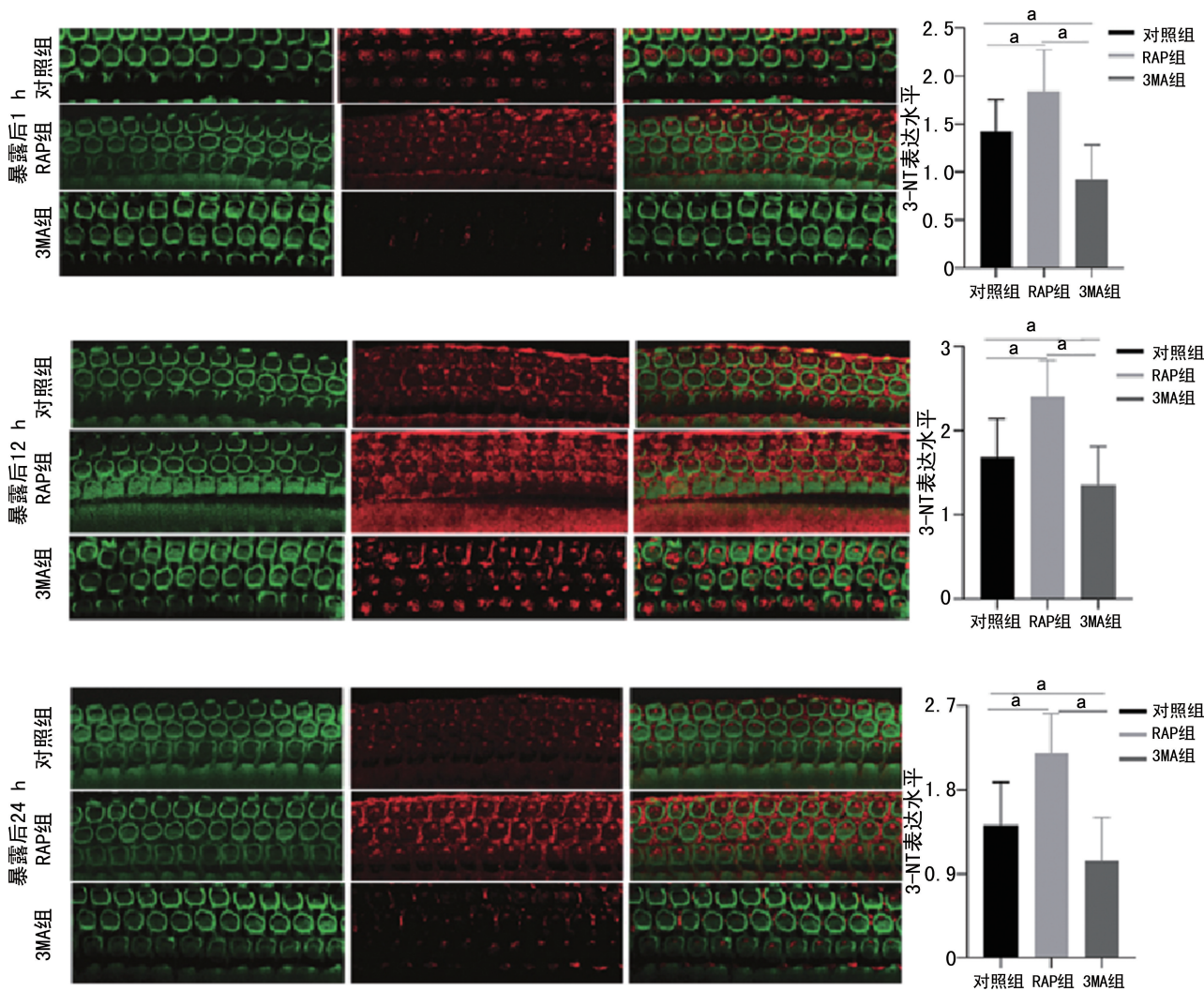
图2 各组大鼠毛细胞自噬标志蛋白表达分析

2.3 抑制自噬能够抑制毛细胞凋亡发生

为验证自噬是否会导致细胞程序性死亡, 本研究

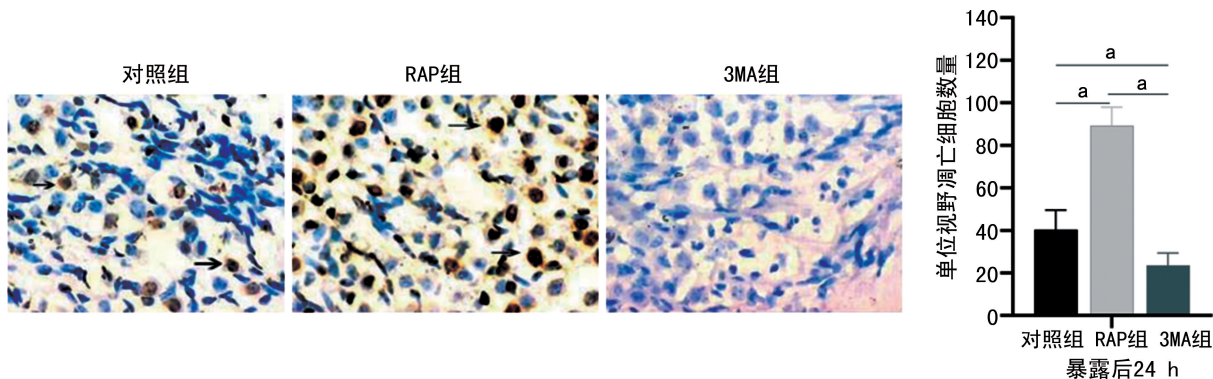
检测了噪声暴露后 24 h 的细胞凋亡情况。结果发现噪声暴露后各组耳蜗毛细胞凋亡较暴露前明显增加,

RAP 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组增加,而 3MA 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组减少(均 $P < 0.05$),见图 4。



^a: $P < 0.05$ 。

图 3 双重免疫荧光检测各组毛细胞的 OS 损伤情况



^a: $P < 0.05$ 。

图 4 TUNEL(普通法)检测各组毛细胞凋亡的影响

3 讨 论

耳蜗毛细胞属高度分化的终末细胞,毛细胞作为听觉传入的重要神经信号传导细胞,它的损伤程度直接反映了听力的受损程度。但毛细胞一旦损伤凋亡,则无法再生,进而出现感音神经性耳聋。因此如何保护毛细胞避免噪声性损伤导致毛细胞死亡成为防治

噪声性耳聋的首选策略。本研究发现,在噪声性耳聋发生时,自噬表达明显上调,OS 标记物如 3-NT 水平明显增加,进而导致毛细胞的程序性凋亡。抑制自噬能够有效改善毛细胞的 OS 损伤,同时明显抑制毛细胞凋亡的发生。

耳蜗毛细胞极易受到噪声的损伤,既往研究证明

噪声引起 OS,耳蜗组织蛋白 3-NT 水平明显增加^[10,12-13]。本研究进一步证明了这一结论,即噪声暴露会导致 OS,耳蜗毛细胞中 3-NT 的表达水平升高。值得注意的是尽管既往文献同时发现 OS 导致细胞凋亡的发生,但其具体途径仍未明确阐述^[14-16]。OS 的形成,如超氧化物、羟基自由基和一氧化氮,可能会根据压力的不同机制而发生。噪声暴露后耳蜗中 OS 系统激活的确切信号机制十分复杂。目前公认有以下几种可能:超氧自由基的增加是由于其他自由基的连锁反应形成,这一过程可能是由于线粒体氧化过程加强所致;组织末梢血管收缩引起的长时间组织缺氧也可能导致 OS 表达增加,或组织局部的缺血再灌注损伤^[14,16]。但在噪声性耳聋中针对毛细胞的损伤凋亡以上理论均有待商榷。

自噬也称为 II 型程序性细胞死亡,参与了许多退变性疾病的发生发展,如帕金森病、阿尔茨海默病等神经退行性疾病,骨性关节炎、风湿性关节炎等^[17-19]。但在噪声性耳聋中,自噬的具体作用机制仍存在争议。自噬和 OS 的相关性仍缺乏系统研究。本研究揭示噪声性耳聋急性期的自噬和 OS 的确切作用机制,结果表明,急性损伤期毛细胞的自噬表达明显增加,诱导细胞通过 OS 系统进入程序性凋亡状态。在抑制自噬表达后 OS 标记蛋白 3-NT 随之下降,同时细胞凋亡数量也明显降低。

综上所述,强噪声暴露后耳蜗毛细胞在急性损伤期通过自噬途径诱导 OS 系统激活,进而诱导细胞程序性死亡。这一结论为噪声性耳聋特别是急性期的防治提供了新的思路和研究方向。通过深入研究自噬和噪声性耳聋的具体作用机制可以为防治噪声性耳聋提供新的药物作用靶点及基因治疗策略。

参考文献

- [1] 管连城,陈雨佳,张孟之,等.从维生素 D 与中医肾藏精、耳聋的关系探讨氨基糖苷类抗生素耳毒性机制[J].中医药导报,2019,25(17):118-120,132.
- [2] SHI X, NUTTALL A L. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress[J]. Brain Res, 2003, 967(1/2):1-10.
- [3] FETONI A R, DE BARTOLO P, ERAMO S L, et al. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense[J]. J Neurosci, 2013, 33(9):4011-4023.
- [4] FETONI A R, PACIELLO F, ROLES R, et al. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 135:46-59.
- [5] 弓晶,解新科.内质网应激和细胞自噬对肝细胞凋亡的影响[J].临床肝胆病杂志,2019,35(12):2828-2832.
- [6] 石磊,蒋晴晴,于宁,等.氧化应激在噪声性听力损失中的作用机制及药物防治[J].中国听力语言康复科学杂志,2021,19(2):113-117.
- [7] 于慧柠,郑体花,郑庆印.氧化应激在年龄相关性耳聋中的作用研究进展[J].中华耳科学杂志,2019,17(5):777-782.
- [8] 毕丹,蒋睿果.葛根素注射液联合长春西汀治疗突发性耳聋的临床研究[J].现代药物与临床,2019,34(5):1430-1434.
- [9] 曾友根,朱欠元,曾宪晶,等.脑源性神经营养因子减轻神经性耳聋模型大鼠氧化应激反应的机制探究[J].重庆医学,2020,49(13):2077-2081.
- [10] 刘晓斌,尚万兵,管志江,等.耳复康口服液对豚鼠耳聋模型血清中 SOD、MDA 含量及耳蜗组织形态的影响[J].中医学报,2018,33(3):426-429,472.
- [11] YUAN H, WANG X, HILL K, et al. Autophagy attenuates noise-induced hearing loss by reducing oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(15):1308-1324.
- [12] 宋伟伟.鼓室内注射鼠神经生长因子联合泼尼松龙对突发性耳聋的影响[J].医学研究杂志,2016,45(6):180-183.
- [13] 陈立伟,于宁,翟所强.氧化应激反应与噪声性耳聋[J].中华耳科学杂志,2014(1):155-157.
- [14] 李芊芊.氧化应激诱导细胞凋亡通路的研究进展[J/CD].世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2019,19(12):63-64.
- [15] 叶记林,于有江,吴爱莲,等.氧化应激在 TRAIL 诱导 Hela 细胞凋亡中的作用[J].安徽医药,2015,19(11):2090-2093.
- [16] 朱若岑,蒋维维,谭柱良,等.动物体内活性氧、氧化应激与细胞凋亡以及抗氧化剂研究进展[J].中兽医医药杂志,2015,34(3):21-25.
- [17] 杨梦馨,丁佩惠,王一玉,等.细胞自噬参与调控牙周病发病机制的研究进展[J].临床医学进展,2021,11(2):567-574.
- [18] 夏丹.细胞自噬调控的研究进展[J].临床医学进展,2019,9(3):163-179.
- [19] 赵丹,刘玉萍,吴继周,等.自噬与老年病的研究进展[J].生物医学,2017,7(3):31-36.