

Nr4a1 激动剂胞孢子酮B挽救小鼠噪声性听力损失

苏波, 赖彦冰, 王晓迪, 褚汉启, 冰丹

摘要 目的:探究核受体亚家族4A组成员1(nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, Nr4a1)Nr4a1激动剂胞孢子酮B(cytosporone B, Csn-B)对小鼠噪声暴露后听力损失的治疗作用。**方法**:采用双氧水刺激HEI-OC1毛细胞系的方法构建氧化应激细胞模型;通过实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)检测细胞中Nr4a1的mRNA表达水平;分别通过细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK8)及流式细胞术的方法检测细胞活力和细胞凋亡水平以评估Csn-B预处理后经双氧水刺激的细胞状态。构建小鼠噪声性听力损失模型,运用qPCR和免疫荧光技术检测噪声暴露后Nr4a1在小鼠耳蜗中的表达;通过检测听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)评估噪声暴露后以及Csn-B连续治疗13 d后小鼠听力情况。**结果**:双氧水刺激后HEI-OC1毛细胞中Nr4a1表达上升,细胞活力显著下降,凋亡水平显著升高;Csn-B预处理HEI-OC1毛细胞经双氧水刺激,细胞活力显著高于对照组而凋亡水平则显著低于对照组。在体研究结果显示,噪声暴露后小鼠听力显著降低,Nr4a1在小鼠耳蜗中的表达水平显著升高。噪声暴露后经Csn-B治疗小鼠听力得到改善,主要表现为Click-ABR以及Tone Burst-ABR(4 000、8 000Hz处)阈值下降。**结论**:Nr4a1激动剂Csn-B增强内耳毛细胞对氧化应激损伤的抵御能力,部分改善噪声暴露后的小鼠听力。

关键词 Nr4a1;Csn-B;噪声性耳聋;氧化应激

中图分类号 R741;R764.43+3 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20230854

The Nr4a1 Agonist Cytosporone B Rescues Noise-induced Hearing Loss in Mice SU Bo, LAI Yanbing, WANG Xiaodi, CHU Hanqi, BING Dan. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To investigate the therapeutic effects of the nuclear receptor subfamily 4 group A member 1(Nr4a1) agonist cytosporone B (Csn-B) on noise-induced hearing loss in mice. **Methods:** The HEI-OC1 outer hair cell line was subjected to hydrogen peroxide stimulation to establish an oxidative stress cell model. PCR was utilized to assess Nr4a1 expression in the cells. Cell viability was measured using CCK8, and flow cytometry was employed to evaluate apoptosis in cells pre-treated with Csn-B before hydrogen peroxide stimulation. By exposing mice to noisy audio, a model for noise-induced hearing loss was established, and PCR and immunofluorescence techniques were employed to detect Nr4a1 expression in the cochlea following noise exposure. ABR testing was conducted to assess mouse hearing both after noise exposure and following 13 days of continuous Csn-B treatment. **Results:** Nr4a1 expression increased in HEI-OC1 cells after hydrogen peroxide stimulation, accompanied by a significant decrease in cell viability and an increase in apoptosis. Pre-treatment with Csn-B enhanced cell viability and reduced apoptosis in HEI-OC1 cells exposed to hydrogen peroxide compared to the control group. In vivo studies revealed an increase in Nr4a1 expression in the cochlea of mice after noise exposure, associated with a decline in auditory function. Significant hearing recovery was observed after Csn-B treatment, evidenced by decreased thresholds in Click-ABR and Tone Burst-ABR (at 4000 and 8000Hz). **Conclusion:** The Nr4a1 agonist Csn-B enhances cellular resilience to oxidative stress and partially rescues noise-induced hearing loss in mice.

Keywords nuclear receptor subfamily 4 group A member 1; cytosporone B; noise-induced hearing loss; oxidative stress

噪声性耳聋(noise-induced hearing loss, NIHL)是世界范围内的重大健康问题,据统计约有1.3亿人因暴露于噪声环境下出现听力损失,同时大约有16%的成人听力损失是由暴露于工作场所中的过度噪声引起^[1,2]。在美国,这种职业性NIHL每年给社会带来了约242.4亿美元的经济负担^[3]。因此,探究NIHL的发病机制以及寻找其防治策略一直

是亟待解决的问题。

目前NIHL的发病机制主要包括氧化应激^[4]、炎症^[5]、钙离子超载^[6-8]及谷氨酸兴奋性毒性^[9,10]等。其中氧化应激学说被广泛接受,研究证实,噪声暴露后的耳蜗中会生成大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[11-14],破坏细胞内DNA、蛋白质、胞质分子等组分,引起细胞损伤^[15]。同时动物实验证实全

作者单位

华中科技大学同济医学院附属同济医院耳鼻咽喉-头颈外科

武汉 430030

基金项目

湖北省重点研发计划(突发性耳聋预后预测与精准分型诊疗智能协同体系构建, No. 2022BCA006);武汉市知识创新专项(婴幼儿耳聋筛查防治体系构建及遗传机制研究, No. 2022022101015011);同济医院科研基金重点项目(慢性睡眠剥夺活化内耳巨噬细胞经由NLRP3/IL-1 β /IL1R导致听力损失, No. 2023A01)

收稿日期 2023-12-25

通讯作者 冰丹 didibing1981@aliyun.com

身或局部应用抗氧化剂能有效减轻噪声导致的听觉系统损伤^[16-20]。

核受体亚家族 4A 组成员 1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, Nr4a1) 是一种孤儿核受体, 激活后能作为转录因子调控基因转录, 介导多种生物学效应^[21-23]。研究表明, 上调 Nr4a1 的表达可以减少细胞内 ROS 的含量^[24]。同时一项耳蜗测序的研究报道, 经过噪声暴露后的大鼠耳蜗中 Nr4a1 的表达显著上升^[25]。但 Nr4a1 是否在噪声暴露后的耳蜗中起保护作用尚不清楚。胞孢子酮 B (cytosporone B, Csn-B) 是 Nr4a1 天然的激动剂, 通过与 Nr4a1 的配体结合阈结合, 激活其转录活性, 启动靶基因转录, 发挥效应^[23]。本研究拟探讨 Nr4a1 及 Csn-B 在抗氧化应激以及抵御噪声诱导的听损伤方面的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 BALB/c 小鼠 56 只, 体质量 20 ~ 24g, 在单纯噪声暴露实验中, 动物分组为对照 (Control) 组 8 只、噪声暴露后 6 h (AT+6 h) 组 8 只、噪声暴露后 12 h (AT+12 h) 组 8 只、噪声暴露后 24 h (AT+24 h) 组 8 只和噪声暴露后 3 d (AT+3 d) 组 8 只; 在噪声暴露后药物治疗实验中, 动物分组为噪声暴露后二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 治疗组 8 只, 噪声暴露后 Csn-B 治疗组 8 只。在麻醉和药物治疗过程中, 噪声暴露后 DMSO 治疗组小鼠死亡 2 只, 噪声暴露后 Csn-B 治疗组小鼠死亡 1 只。小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于同济科研大楼实验动物中心恒温、恒湿的 SPF 环境中。本研究设计通过同济医院动物福利委员会批准, 操作均遵守动物伦理标准。

1.1.2 实验细胞系 小鼠耳蜗毛细胞系 (House Ear Institute-Organ of Corti 1, HEI-CO1) 来自中山孙逸仙纪念医院。在 H₂O₂ 时间梯度刺激实验中, 细胞分组为对照组、H₂O₂ 刺激 3 h 组、H₂O₂ 刺激 6 h 组、H₂O₂ 刺激 9 h 组和 H₂O₂ 刺激 12 h 组; 在 H₂O₂ 浓度梯度刺激实验中, 细胞分组为对照组、1 mmol/L H₂O₂ 刺激组、2 mmol/L H₂O₂ 刺激组和 3 mmol/L H₂O₂ 刺激组; 在单纯 Csn-B 处理实验中, 细胞分组为对照组、10 μ mol/L Csn-B 处理组、20 μ mol/L Csn-B 处理组和 30 μ mol/L Csn-B 处理组; 在药物预处理后 H₂O₂ 刺激实验中, 细胞分组为 DMSO 处理组、Csn-B 处理组、DMSO 与 H₂O₂ 共处理组及 Csn-B 与 H₂O₂ 共处理组。

1.1.3 主要试剂与材料 三溴乙醇 (购于南京爱贝生物科技有限公司); DMSO (购于美国 Sigma 公司); Csn-B、CCK8 溶液 (购于上海 MCE 公司); ABR 检测系统 (购于深圳具安科技公司); 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS)、4% 多聚甲醛、10% EDTA 脱钙液、破膜液、Cy3 标记的驴抗兔抗体、DAPI、抗荧光淬灭封片剂、DMEM 高糖培养基、Rippa 裂解液、cocktail、磷酸化蛋白酶抑制剂 A、磷酸化蛋白酶抑制剂 B、BCA 试剂盒、聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF)、ECL 显影液、兔抗 Gapdh antibody、HRP 标记的山羊抗兔抗体 (购于武汉 Servicebio 公司); OCT 包埋剂 (购于美国 Sakura 公司); 冰冻切片机 (购于德国 Leica 公司); 驴血清 (购于北京索莱宝公司); 兔抗 Nur77 抗体 (购于杭州 HUBIO 公司); 荧光显微镜 (购于日本 Olympus 公司); 胎牛血清 (购于武汉 HYCEZMBIO 公司); 双氧水 (购于美国 Sigma 公司); Trizol (购于日本 Takara 公司); 氯仿、异丙醇、无水乙醇 (购于北京鼎国昌盛公司); 低温高速离心机 (购于美国赛默飞公司); 逆转录试剂盒以及 PCR 试剂 (购于南京诺唯赞公司); PCR 仪、电泳仪 (购于美国 Bio-Rad 公司); 一步法快速凝胶试剂盒、双色预染 marker、快速封闭液 (购于上海雅酶公司); 化学发光凝胶成像仪 (购于广州博鹭腾公司); Annexin V-APC/PI 凋亡检测试剂盒 (购于江苏 KeyGen BioTECH 公司); 流式细胞仪 (购于美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 噪声模型 小鼠置于铁笼中, 放于小型转台上。在小鼠上方 15 cm 处放置喇叭。噪声播放后, 启动转台, 确保各个小鼠接受相同强度噪声。使用的噪声声强为 110 分贝 (decibel, dB) 声压级 (sound pressure level, SPL), 持续时间为 2 h。整个噪声暴露过程于隔音室中完成。

1.2.2 小鼠噪声暴露后药物治疗 噪声暴露完成后, 进行给药治疗。将 Csn-B 溶解于 1 mL DMSO 中, 配制成 10 mg/mL 浓度的储备液。在给药前, 使用生理盐水将储备液稀释为 1 mg/mL 浓度的工作液。噪声暴露后 Csn-B 治疗组每只小鼠按照 50 mg/kg 的剂量通过腹腔注射的方式给药。从噪声暴露即刻开始, 连续给药 13 d。噪声暴露后 DMSO 治疗组给予相同剂量的 DMSO (10%, 生理盐水稀释) 处理作为噪声暴露后 Csn-B 治疗组的对照。

1.2.3 听性脑干反应检测 分别于噪声暴露前、噪声暴露后即刻以及连续给药 13 d 后检测小鼠听性脑干反

应(auditory brainstem response, ABR)评估小鼠ABR阈值的变化情况。ABR检测前,通过腹腔注射三溴乙醇(20 $\mu\text{L/g}$)对小鼠进行麻醉。随后将小鼠置于加热板上维持小鼠体温。待小鼠对针刺无反应后,分别于头顶皮下置入记录电极、左耳后下置入参考电极以及右腿后上方置入接地极。检测过程中分别使用Click声以及Tone Burst声(4、8、12、16、24、32 kHz)进行刺激。对于Click声,声音强度从90 dB开始以5 dB的声强递增至5 dB,每种声音强度重复500次。Tone Burst声则从90 dB开始以10 dB声强递增至10 dB。ABR检测系统将每次记录下的波形进行拟合,形成稳定的波形图。随着声强减弱,听力波幅值降低,直到听力波无法被识别出来,则将该声音强度定为该频率的ABR阈值。

1.2.4 小鼠耳蜗冰冻切片以及免疫荧光染色 将小鼠麻醉后,使用颈椎脱臼法处死小鼠。断颈,取耳蜗。将耳蜗置于PBS溶液中清理多余的骨质、血管和肌肉,暴露圆窗和卵圆窗。再将耳蜗置于4%的多聚甲醛溶液中,使用针灸针于蜗尖钻孔,通过200 μL 枪头从钻孔处灌注4%多聚甲醛,室温固定过夜。固定后的耳蜗经10%的EDTA溶液脱钙3 d,每天换液。待耳蜗半规管不易被镊子夹断,则标志脱钙完全。将耳蜗转入30%的蔗糖溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 脱水过夜。随后将耳蜗浸入OCT包埋剂中包埋,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。切片时,将耳蜗置于样品坐中央,速冻。使用冰冻切片平行于耳蜗蜗轴将耳蜗切成6 μm 的切片,粘于载玻片上,晾干后放入 -80°C 保存。

将切片使用PBS清洗3次,每次5 min,清除OCT。使用0.5%Triton-X破膜30 min。PBS清洗3次后,使用5%驴血清封闭1 h。随后将样本与稀释后的一抗孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。使用的一抗为兔抗Nur77抗体,1:100稀释。孵育完毕后,将切片复温30 min,PBS清洗3次。样本与二抗避光孵育1 h。二抗为Cy3标记的驴抗兔,1:100稀释。随后使用PBS清洗3次,滴加DAPI染核10 min。PBS清洗3次后,使用抗荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察。

1.2.5 细胞培养 HEI-CO1细胞使用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清)进行培养。培养环境设置为35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温、5% CO_2 浓度。细胞密度达到80%进行传代。

1.2.6 细胞给药处理及氧化应激模型 在 H_2O_2 时间梯度刺激实验中,待细胞密度达到90%时,给细胞换液,分别于收取细胞前3 h、6 h、9 h和12 h加入 H_2O_2 刺激,

终浓度为2 mmol/L,对照组细胞只做换液处理。在 H_2O_2 浓度梯度刺激实验中,待细胞密度达到90%时,给细胞换液同时加入 H_2O_2 刺激6 h,终浓度分别为1 mmol/L、2 mmol/L和3 mmol/L,对照组细胞只做换液处理。在单纯Csn-B处理实验中,待细胞密度达到50%时,给细胞换液同时加入不同剂量的Csn-B,终浓度分别为10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 和30 $\mu\text{mol/L}$,对照组换液后加入对应30 $\mu\text{mol/L}$ Csn-B中的DMSO量。在药物预处理后 H_2O_2 刺激实验中,待细胞密度达到50%时,Csn-B组和Csn-B与 H_2O_2 共培养组在给细胞换液同时向培养基中加入Csn-B,终浓度为30 $\mu\text{mol/L}$,培养24 h。DMSO处理组和DMSO与 H_2O_2 共培养组则加入对应含量的DMSO。待Csn-B与 H_2O_2 共培养组和DMSO与 H_2O_2 共培养组细胞密度达到90%,向这两组培养基中加入 H_2O_2 刺激,终浓度为2 mmol/L,培养24 h后进行后续处理。

1.2.7 细胞活力检测 将96孔板中的旧培养基更换为无血清培养基配置10%的CCK8溶液,培养箱中孵育1 h。在450 nm处检测溶液吸光度,每组细胞3孔,根据OD值大小评估细胞活力。

1.2.8 RNA水平检测 对于小鼠耳蜗的RNA提取。处死小鼠后,在提前预冷的PBS溶液中去多余组织,取出耳蜗内容物包括血管纹、外侧壁、基底膜和螺旋神经等组织,放入Trizol中,等待后续处理。对于细胞的RNA提取来说,使用PBS清洗一次细胞后,直接加入Trizol进行裂解。组织或细胞在裂解5 min后,加入20%Trizol体积的氯仿,充分混匀后静置5 min。待溶液分层后,放入离心机4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 rpm,离心20 min。取上清,加入等体积异丙醇,轻柔颠倒后,室温静置30 min,随后4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 rpm,离心15 min。弃去液体,加入75%的乙醇,轻柔颠倒清洗沉淀,然后4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 rpm,离心10 min。弃去液体并控干水分,视RNA沉淀量加入适量DEPC水溶解RNA,置于 -80°C 保存。根据逆转录试剂盒说明,20 μL 的mix溶液中加入1 μg RNA进行逆转录。转录程序为50 $^{\circ}\text{C}$,15 min;85 $^{\circ}\text{C}$,5 s。根据RT-PCR试剂盒说明,10 μL 的mix体系中加入0.5 μL cDNA进行PCR反应。PCR程序为预变性95 $^{\circ}\text{C}$,30 s;40次循环:变性95 $^{\circ}\text{C}$,10 s;退火与延伸60 $^{\circ}\text{C}$,30 s。PCR结果按照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值进行处理,比较基因的相对表达量。使用的PCR引物为: β -actin:上游引物:5'-GCGCAAGTACTCTGTGTGGA-3',下游引物:5'-GAAAGGGTGTAAC GCAGC-3';Nr4a1:上游引物:5'-TTGAGTTCGGCAAGCCTACC-3',下游引物:

5'-GTGTACCCGTCCATGAAGGTG-3'。

1.2.9 蛋白水平检测 使用RIPA裂解液、cocktail、磷酸化蛋白酶抑制剂A、磷酸化蛋白酶抑制剂B按照100:2:1:1的比例配置蛋白提取液。向收取的细胞中加入适量蛋白提取液,并使用超声破碎仪在低温环境下充分裂解细胞,静置15 min后,放入离心机,4 ℃、12 000 rpm,离心10 min。取上清,使用BCA试剂盒检测蛋白浓度,在562 nm处检测吸光度,根据蛋白标准品计算蛋白浓度。向上清加入25%体积的蛋白上样缓冲液,充分混匀后,100 ℃,水浴15 min。制作电泳凝胶,每个上样孔中加入10 mg蛋白样品,两侧上样控制加入适量marker。在60 mV恒压条件下跑胶,直至目的蛋白区域分开,停止电泳。随后在240 mA恒流条件下,转膜40 min,将蛋白转印至PVDF膜上。将PVDF膜放入快速封闭液中,封闭30 min,随后与稀释后的一抗在4 ℃条件下孵育过夜。次日,使用TBST清洗PVDF膜3次,每次5 min。PVDF膜再与二抗室温孵育1 h。TBST清洗3次后,加入显影液于成像仪中曝光。一抗为兔抗Gapdh抗体(1:1 000)、兔抗Nur77抗体(1:1 000)。二抗为HRP标记的山羊抗兔(1:1 000)。

1.2.10 流式细胞术凋亡检测 将处理后的细胞使用0.25%不含EDTA的胰酶消化,收集到流式管中。按照Annexin V-APC/PI凋亡检测试剂盒说明加入染料,室温避光孵育15 min。随后上机得到的数据使用FlowJo软件(Treestar)进行分析。

1.3 统计学处理

所有数据通过Graphprism 9软件进行统计学分析,计数资料以($\bar{x}\pm s$)表示,独立样本t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 噪声暴露后小鼠耳蜗Nr4a1上调

小鼠耳蜗组织的qPCR结果显示,Nr4a1的表达在噪声暴露后6 h显著升高(图1A)。同时,小鼠耳蜗冰冻切片的免疫荧光结果显示,噪声暴露后12 h、24 h以及3 d的耳蜗中NR4A1的免疫荧光强度相较于对照组显著增强,尤其是在噪声暴露后12 h及3 d这两个时间节点(图1B)。另外,值得注意的是,噪声暴露后的小鼠耳蜗中NR4A1主要表达于血管纹、毛细胞及螺旋缘。

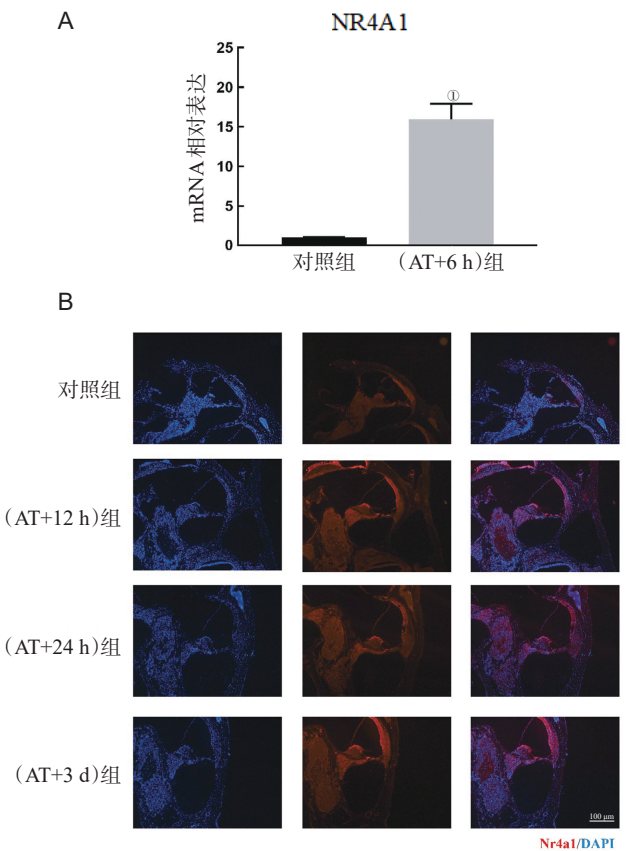
2.2 经H₂O₂刺激后HEI-OC1细胞中Nr4a1的表达上调

为了进一步探究噪声暴露后NR4A1在耳蜗中的作用,本研究首先在外毛细胞系HEI-OC1细胞中验证Nr4a1中的表达。通过给予细胞H₂O₂刺激模拟噪声暴

露后外毛细胞受到的氧化应激损伤,发现细胞中Nr4a1的mRNA水平在H₂O₂刺激后6 h、9 h及12 h显著提高(图2A)。同时,在H₂O₂刺激相同的时间,随着所用H₂O₂的浓度提高,Nr4a1的表达水平也进一步升高(图2B)。

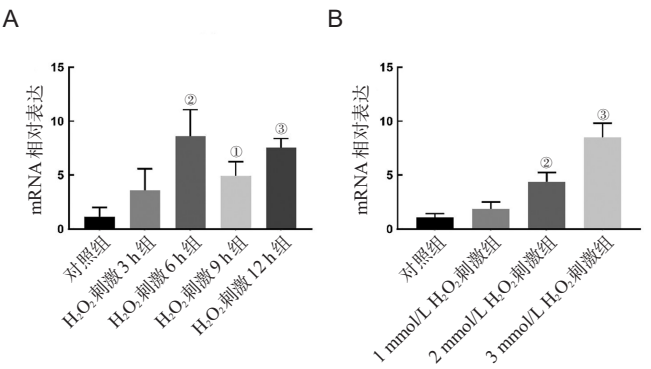
2.3 Csn-B上调HEI-OC1中NR4A1的表达

Csn-B是NR4A1的激动剂,Csn-B可以激活



注:A:(AT+6 h)组小鼠耳蜗Nr4a1 mRNA水平检测(n=3); B:各组小鼠耳蜗冰冻切片免疫荧光检测,红色为Nr4a1,蓝色为DAPI。AT(acoustic trauma)为声创伤。^① $P<0.001$ 。

图1 噪声暴露后小鼠耳蜗Nr4a1表达上调



注:A:按照H₂O₂刺激时间梯度刺激细胞后Nr4a1 mRNA水平检测(H₂O₂刺激3 h、6 h、9 h和12 h); B:按照H₂O₂浓度梯度刺激细胞6 h后Nr4a1 mRNA水平检测(H₂O₂浓度1 mmol/L、2 mmol/L和3 mmol/L)。^① $P<0.05$,^② $P<0.01$,^③ $P<0.001$ 。

图2 H₂O₂刺激后细胞中Nr4a1表达上调

NR4A1并上调其表达^[26]。本研究在分子水平上验证了Csn-B上调细胞内NR4A1表达的作用。蛋白免疫印迹结果显示,随着Csn-B浓度的增加,细胞内NR4A1的表达量也随之增高(图3A)。

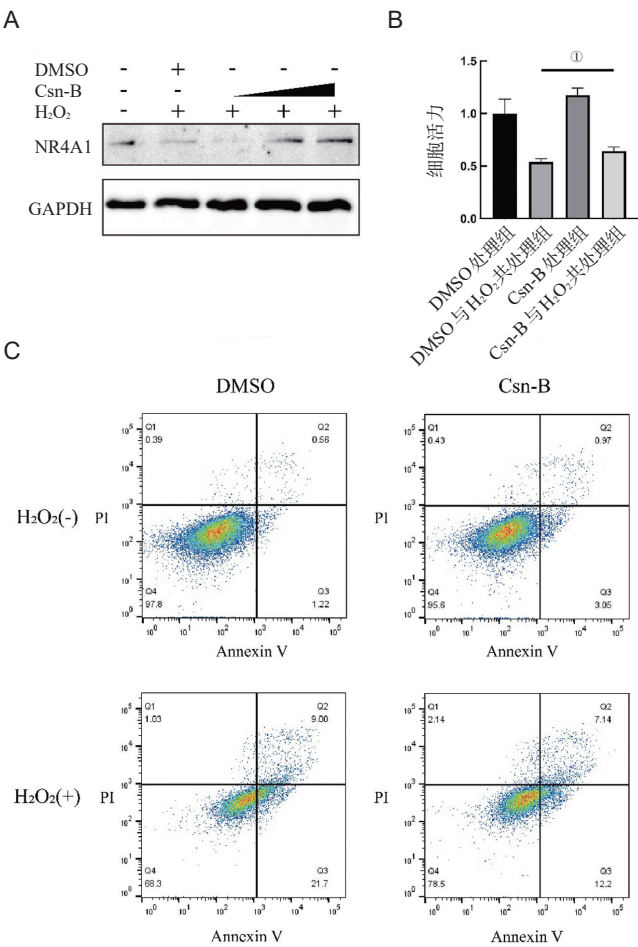
2.4 Csn-B减少H₂O₂引起的毛细胞死亡

为了进一步探究上调NR4A1的表达是否减少H₂O₂导致的细胞死亡,本研究在Csn-B预处理24 h的HEI-OC1细胞中加入H₂O₂,24 h后检测细胞活力。结果表明Csn-B与H₂O₂共培养组细胞活力显著高于DMSO与H₂O₂共培养组(图3B)。另外,通过流式细胞术检测细胞凋亡水平的结果显示,Csn-B与H₂O₂共培养组细胞早期凋亡和晚期凋亡的细胞数量较DMSO和H₂O₂共培养组减少(图3C)。

2.5 Csn-B改善小鼠噪声诱导的听力损失

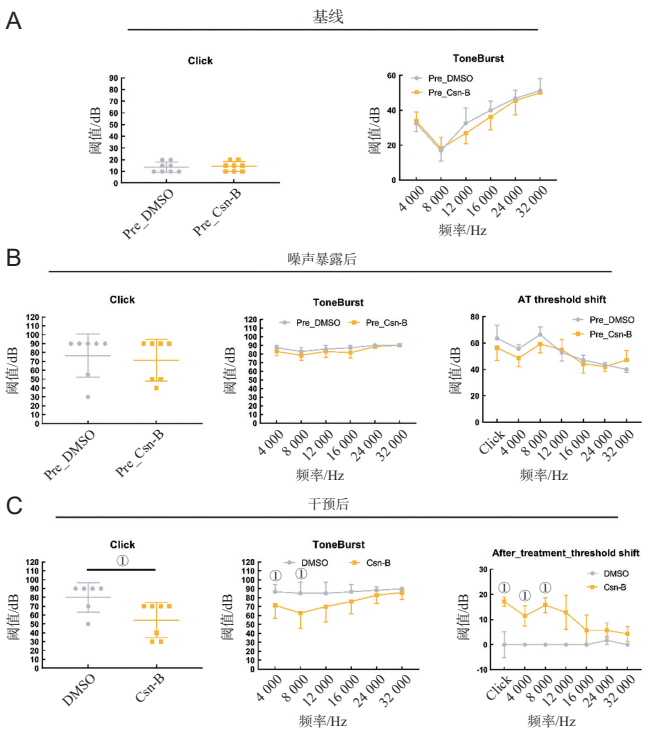
为了进一步明确Csn-B对噪声暴露后的小鼠听力是否有改善效果,本研究于噪声暴露后即刻小鼠腹腔

注射Csn-B,连续注射13 d后通过ABR检测小鼠听力水平。实验结果显示,噪声暴露后Csn-B治疗组小鼠基线听力与噪声暴露后DMSO治疗组小鼠无显著差异(图4A);经过噪声暴露后,2组小鼠的Click-ABR及Tone Burst-ABR阈值均上升,且两组之间均无显著差异(图4B);而经药物治疗13 d后,相较于噪声暴露后DMSO治疗组小鼠,噪声暴露后Csn-B治疗组小鼠Click-ABR阈值显著降低,同时Tone Burst-ABR在4 000 Hz和8 000 Hz处阈值显著降低,这些结果表明Csn-B对噪声暴露后小鼠的听力损失有改善效果(图4C)。



注:A:梯度浓度Csn-B预处理细胞24 h后,细胞中Nr4a1蛋白水平检测(CsnB浓度为10 μmol/L、20 μmol/L和30 μmol/L);B:Csn-B预处理细胞24 h后,使用H₂O₂刺激细胞,细胞活力检测结果;C:Csn-B预处理细胞24 h后,使用H₂O₂刺激细胞,流式细胞术检测细胞凋亡。①P<0.05。

图3 Csn-B保护细胞抵御氧化应激损害



注:A:小鼠噪声暴露前Click-ABR及Tone Burst-ABR检测;B:小鼠噪声暴露后Click-ABR、Tone Burst-ABR检测及小鼠噪声暴露后相较噪声暴露前的ABR阈移分析;C:小鼠噪声暴露后,连续药物治疗13 d后,Click-ABR、Tone Burst-ABR检测及药物治疗后相较噪声暴露后即刻的ABR阈移分析。①P<0.05。

图4 Csn-B改善噪声暴露后小鼠听力损失

3 讨论

本研究证明使用NR4A1激动剂Csn-B能部分挽救噪声暴露引起小鼠的听力损失,这提示Csn-B作为未来治疗噪声性耳聋的潜在药物的可能,同时凸显NR4A1可作为治疗的潜在分子靶点。

目前大多数研究表明NIHL的机制主要涉及氧化应激、炎症、钙离子超载以及谷氨酸毒性等,其中氧化应激尤为关键^[4-10]。线粒体电子传递链是组织及细胞中ROS的主要来源,在生理情况下含量极低^[27,28]。Ohlemiller等^[4]指出,噪声暴露后耳蜗外淋巴液中的

ROS水平升高4倍。大量ROS的产生会破坏耳蜗中的氧化平衡进而损伤DNA、蛋白质及细胞的结构^[29]。因此ROS的清除和提高抗氧化能力在保护听觉系统和抵御噪声损伤中起着关键作用。在大量ROS的环境中,抗氧化基因会被诱导性上调,如经典的抗氧化基因Nrf2在噪声暴露后的耳蜗中表达显著上调^[30]。本研究结果表明在噪声暴露后的小鼠耳蜗以及双氧水刺激后的HEI-OC1细胞中Nr4a1的表达均显著上调,这提示NR4A1在内耳抗氧化应激中可能发挥重要作用。此外,研究表明噪声暴露后耳蜗液以及部分耳蜗组织如毛细胞、血管纹中有更高的ROS含量^[27]。这也与本研究在毛细胞及血管纹处观察到更高的NR4A1荧光强度相对应。

ROS积累与噪声性耳聋中毛细胞凋亡有着密切联系。研究显示,ROS累积将引起线粒体受损,进而释放凋亡诱导因子以及核酸内切酶G^[31]。这些促凋亡因子入核后将触发凋亡反应^[32]。同时诱导凋亡的JNK信号通路被认为是介导毛细胞凋亡的介质,而ROS是JNK通路的重要激活剂^[33,34]。通过抗氧化治疗如使用抗氧化分子水杨酸盐、N-乙酰半胱氨酸(N-Acetylcysteine, NAC)、D-蛋氨酸及谷胱甘肽等能减少噪声暴露后毛细胞的凋亡数量^[35]。双氧水刺激是模拟氧化应激的常用手段,除了在听觉系统中,神经系统的研究中也较为常见。例如使用双氧水刺激PCP12细胞系模拟脊髓损伤中的氧化应激部分^[36]。为了验证ROS对毛细胞凋亡的影响,本研究使用双氧水刺激HEI-OC1细胞系,发现细胞凋亡比例增加;而双氧水刺激的同时,应用Csn-B能降低细胞凋亡数量并提高细胞活力。大量研究已表明NR4A1在抗氧化应激方面有重要作用。研究显示,NR4A1通过增强MKP7的表达下调ROS引起的JNK磷酸化,还可通过增强谷胱甘肽过氧化物酶1的表达减少ROS诱导的胰腺β细胞的凋亡^[24,37]。然而NR4A1的抗氧化能力也是一把双刃剑,如在胰腺癌中,NR4A1通过抑制氧化应激和内质网应激表现出促癌活性^[38]。Yu等^[39]指出,NR4A1通过增强Sirt1稳态减弱氧化应激,这反而促进细胞衰老。这些研究提示Csn-B激活的NR4A1可能通过类似的机制来减少双氧水对毛细胞的损伤,促进噪声暴露后听力水平的恢复,但其具体机制仍有待后续研究阐明。

在噪声暴露的动物模型中,抗氧化剂的治疗效果不尽相同。例如,使用NAC治疗噪声性听力损失能显著降低中低频阈值上移(4 kHz、8 kHz及16 kHz)^[40];依布硒治疗则能够降低全频(4~32 kHz)的阈移^[41]。本

研究结果显示,Csn-B治疗主要降低低频(4、8 kHz)的阈移。这种疗效的差异不仅来自于药物的不同,也与噪声暴露声强、实验动物种类、药物治疗的时间窗口及给药方式密切相关。已有的研究显示ROS在噪声暴露后即刻产生,并在耳蜗中持续存在7~10 d^[31]。在噪声暴露后24 h内至噪声暴露后10 d进行抗氧化治疗能够达到治疗的最好效果,但这时间窗口仅代表NAC、乙酰左旋肉碱、4-羟基苯基N-叔丁基硝基联合用药^[42]。本研究的治疗时间段为噪声暴露后即刻至噪声暴露后第13天,覆盖了ROS的持续时间,是否延长治疗时间能够增加疗效有待研究。另外,因为血迷路屏障的存在,全身性给药治疗噪声性耳聋面临着不小的困难。研究表明,全身性给药后内耳地塞米松的浓度比鼓室内注射约低88倍^[43]。因此,有研究人员尝试使用甘露醇提高血迷路屏障的通透性配合全身性给予抗氧化剂对内耳进行抗氧化治疗,取得了一定效果^[44]。这种策略应用于Csn-B的治疗方案具有一定潜力。

虽然本研究揭示了Csn-B可能作为未来NIHL的潜在治疗药物及NR4A1可以作为干预NIHL的分子靶点,但本研究仍存在许多局限性。首先,激活后的NR4A1是如何发挥其对细胞氧化性损伤的保护作用以及促进噪声后听力水平的恢复作用仍未可知。其次,本研究仅采用腹腔注射的方式进行药物干预,通过圆窗注射这一直接经内耳给药的治疗方式是否能取得更加显著的效果有待进一步探究。未来的研究应明确NR4A1的作用机制并考虑不同的给药方式以进一步探明这一分子在治疗NIHL方面的潜力。

综上所述,噪声性听力损失目前来说并没有明确的有效药物治疗,探索治疗噪声性听力损失的药物仍然是非常具有吸引力的领域。目前,本研究根据Nr4a1在噪声性耳聋中可能的机制引入了相应的工具药物Csn-B,发现其对NIHL具有保护性作用。这对噪声性听力损失的治疗以及机制的探索具有重要的创新意义。

参考文献

- [1] Nelson DI, Nelson RY, Concha-Barrientos M, et al. The global burden of occupational noise-induced hearing loss[J]. *Am J Ind Med*, 2005, 48: 446-458.
- [2] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380: 2163-2196.
- [3] Chen KH, Su SB, Chen KT. An overview of occupational noise-induced hearing loss among workers: epidemiology, pathogenesis, and preventive measures[J]. *Environ Health Prev Med*, 2020, 25: 65.
- [4] Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL. Early elevation of cochlear

- reactive oxygen species following noise exposure[J]. *Audiol Neurotol*, 1999, 4: 229-236.
- [5] Frye MD, Ryan AF, Kurabi A. Inflammation associated with noise-induced hearing loss[J]. *J Acoust Soc Am*, 2019, 146: 4020.
- [6] Fridberger A, Flock A, Ulfendahl M, et al. Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+} concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 7127-7132.
- [7] Ikeda K, Kusakari J, Takasaka T. Ionic changes in cochlear endolymph of the guinea pig induced by acoustic injury[J]. *Hear Res*, 1988, 32: 103-110.
- [8] Uemaetomari I, Tabuchi K, Nakamagoe M, et al. L-type voltage-gated calcium channel is involved in the pathogenesis of acoustic injury in the cochlea[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 218: 41-47.
- [9] 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: 8750-8753.
- [10] Kim KX, Payne S, Yang-Hood A, et al. Vesicular Glutamatergic Transmission in Noise-Induced Loss and Repair of Cochlear Ribbon Synapses[J]. *J Neurosci*, 2019, 39: 4434-4447.
- [11] Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, et al. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss[J]. *Ear Hear*, 2006, 27: 1-19.
- [12] Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Extremely rapid induction of outer hair cell apoptosis in the chinchilla cochlea following exposure to impulse noise[J]. *Hear Res*, 2006, 211: 16-25.
- [13] Shi X, Nuttall AL. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress[J]. *Brain Res*, 2003, 967: 1-10.
- [14] Vlajkovic SM, Lee KH, Wong AC, et al. Adenosine amine congener mitigates noise-induced cochlear injury[J]. *Purinergic Signal*, 2010, 6: 273-281.
- [15] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47-95.
- [16] Bielefeld EC, Kopke RD, Jackson RL, et al. Noise protection with N-acetyl-L-cysteine (NAC) using a variety of noise exposures, NAC doses, and routes of administration[J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127: 914-919.
- [17] Fetoni AR, Mancuso C, Eramo SL, et al. In vivo protective effect of ferulic acid against noise-induced hearing loss in the guinea-pig[J]. *Neuroscience*, 2010, 169: 1575-1588.
- [18] Heinrich UR, Fischer I, Brieger J, et al. Ascorbic acid reduces noise-induced nitric oxide production in the guinea pig ear[J]. *Laryngoscope*, 2008, 118: 837-842.
- [19] Le Prell CG, Gagnon PM, Bennett DC, et al. Nutrient-enhanced diet reduces noise-induced damage to the inner ear and hearing loss[J]. *Transl Res*, 2011, 158: 38-53.
- [20] McFadden SL, Woo JM, Michalak N, et al. Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs[J]. *Hear Res*, 2005, 202: 200-208.
- [21] Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2012, 110: 416-427.
- [22] Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles[J]. *Nucl Recept Signal*, 2006, 4: e002.
- [23] Zhan Y, Du X, Chen H, et al. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 548-556.
- [24] Pu ZQ, Yu TF, Liu D, et al. NR4A1 enhances MKP7 expression to diminish JNK activation induced by ROS or ER-stress in pancreatic β cells for surviving[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7: 133.
- [25] Cho Y, Gong TW, Kanicki A, et al. Noise overstimulation induces immediate early genes in the rat cochlea[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 130: 134-148.
- [26] Liang H, Xie X, Song X, et al. Orphan nuclear receptor NR4A1 suppresses hyperhomocysteinemia-induced hepatic steatosis in vitro and in vivo[J]. *FEBS Lett*, 2019, 593: 1061-1071.
- [27] Sha SH, Schacht J. Emerging therapeutic interventions against noise-induced hearing loss[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26: 85-96.
- [28] Cobley JN. Mechanisms of Mitochondrial ROS Production in Assisted Reproduction: The Known, the Unknown, and the Intriguing[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9: 933.
- [29] Prasad KN, Bondy SC. Increased oxidative stress, inflammation, and glutamate: Potential preventive and therapeutic targets for hearing disorders [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 185: 111191.
- [30] Wang X, Zeng C, Lai Y, et al. NRF2/HO-1 pathway activation by ATF3 in a noise-induced hearing loss murine model[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2022, 721: 109190.
- [31] Yamashita D, Jiang HY, Schacht J, et al. Delayed production of free radicals following noise exposure[J]. *Brain Res*, 2004, 1019: 201-209.
- [32] Yamashita D, Miller JM, Jiang HY, et al. AIF and EndoG in noise-induced hearing loss[J]. *Neuroreport*, 2004, 15: 2719-2722.
- [33] Wang J, Ruel J, Ladrech S, et al. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase-mediated mitochondrial cell death pathway restores auditory function in sound-exposed animals[J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71: 654-666.
- [34] Lo YY, Wong JM, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 15703-15707.
- [35] Op de Beeck K, Schacht J, Van Camp G. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell[J]. *Hear Res*, 2011, 281: 18-27.
- [36] 胡春雷, 廖博, 王琪, 等. 槲皮素通过抑制细胞凋亡减轻脊髓损伤[J]. *神经损伤与功能重建*, 2023, 18: 584-588.
- [37] Yang Y, Xie F, Qin D, et al. The orphan nuclear receptor NR4A1 attenuates oxidative stress-induced β cells apoptosis via up-regulation of glutathione peroxidase 1[J]. *Life Sci*, 2018, 203: 225-232.
- [38] Lee SO, Jin UH, Kang JH, et al. The orphan nuclear receptor NR4A1 (Nur77) regulates oxidative and endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12: 527-538.
- [39] Yu Y, Song X, Wang X, et al. Oxidative stress impairs the Nur77-Sirt1 axis resulting in a decline in organism homeostasis during aging[J]. *Aging Cell*, 2023, 22: e13812.
- [40] Kopke RD, Weisskopf PA, Boone JL, et al. Reduction of noise-induced hearing loss using L-NAC and salicylate in the chinchilla [J]. *Hear Res*, 2000, 149: 138-146.
- [41] Kil J, Pierce C, Tran H, et al. Ebsele treatment reduces noise induced hearing loss via the mimicry and induction of glutathione peroxidase[J]. *Hear Res*, 2007, 226: 44-51.
- [42] Choi CH, Chen K, Du X, et al. Effects of delayed and extended antioxidant treatment on acute acoustic trauma[J]. *Free Radic Res*, 2011, 45: 1162-1172.
- [43] Bird PA, Murray DP, Zhang M, et al. Intratympanic versus intravenous delivery of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate to cochlear perilymph[J]. *Otol Neurotol*, 2011, 32: 933-936.
- [44] Noman A, Mukherjee S, Le TN. Manipulating the blood labyrinth barrier with mannitol to prevent cisplatin-induced hearing loss[J]. *Hear Res*, 2022, 426: 108646.

(本文编辑:王晶)