

宣伟军, 黄力毅, 宣毅, 等. 复方健耳剂对抗老年性耳蜗神经细胞凋亡超微结构观察及上调 NeuN 和 BDNF 定位表达作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 338-344.

Xuan WJ, Huang LY, Xuan Y, et al. Ultrastructural age-related effects of a compound healthy ear agent on apoptosis in cochlear neurocytes and brain-derived neurotrophic factor and neuron-specific nuclear antigen expression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 338-344.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.007

复方健耳剂对抗老年性耳蜗神经细胞凋亡超微结构观察 及上调 NeuN 和 BDNF 定位表达作用

宣伟军^{1,2*}, 黄力毅², 宣毅³, 唐俊波¹, 韦瑀龙⁴

(1. 广西中医药大学第一临床医学院耳鼻咽喉科, 南宁 530023; 2. Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA 02114, USA; 3. School of Engineering, Tufts University, Medford, MA 02155, USA; 4. 广西中医药大学瑞康医学院制药厂, 南宁 530011)

【摘要】 目的 利用透射电镜观察中药复方健耳剂干预小鼠老年性耳蜗外毛细胞(outer hair cell, OHC)、螺旋神经节神经元(spiral ganglion neurons, SGN)凋亡作用;共聚焦显微镜,结合形态学多重免疫荧光技术,观察复方健耳剂对耳蜗 SGN 的特异性核抗原蛋白(NeuN)、脑源性神经营养因子(BDNF)定位表达影响作用,探讨其作用机制。**方法** 选择1月龄 C57BL/6J 小鼠22只并随机分为两组,其中11只小鼠每日饮用自来水直到7个月作为老年性耳蜗退变对照组(简称7月龄对照组);11只小鼠每日饮用复方健耳剂 1.83 g/(kg·d)直到7个月作为中药干预组(简称7月龄中药组)。所有动物期满后取出耳蜗,制备石蜡包埋切片,在透射电镜下,重点选择观察7月龄对照组耳蜗底回存留尚未解体的 OHC 以及对应部位的 SGN 超微结构变化,同时与7月龄中药组相同部位的 OHC 和 SGN 进行对照。利用激光共聚焦显微镜,结合形态学多重免疫荧光技术,观察 NeuN 与 BDNF 在 SGN 定位表达,并进行统计分析。**结果** 7月龄对照组耳蜗底回存留尚未解体的 OHC 以及对应部位的 SGN,胞体萎缩,胞核不整,核染色质聚集成团、边集,纹理结构模糊,电子密度高,尤其是 SGN 大小形态不一,数量明显减少,甚至核染色质溶解,形成空泡,或解体缺如等,呈现严重凋亡状况。而7月龄中药组耳蜗底回 OHC 或 SGN 凋亡状况不明显,细胞形态结构较完整,数量较多,核染色质分布较均匀,纹理结构清晰,电子密度低,仅个别胞核溶解,形成空泡。与7月龄对照组比较,7月龄中药组耳蜗底回 SGN 中的 NeuN 与 BDNF 定位表达密度较高,数量较多($P < 0.05$)。**结论** 耳蜗 OHC 或 SGN 细胞核超微结构改变、NeuN 表达减少是老年性耳蜗神经细胞凋亡的重要特征;同期 SGN 凋亡早于 OHC;中药复方健耳剂具有明显对抗 OHC 或 SGN 超微结构改变,其对 SGN 中的 NeuN 表达明显增多,提示中药具有明显保护 SGN 作用,与透射电镜观察一致,其作用机制与促进 BDNF 表达,从而发挥系列生物学效应有关。

【关键词】 小鼠,老年性聋,耳蜗神经细胞,超微结构,中医药,NeuN, BDNF

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)03-0338-07

Ultrastructural age-related effects of a compound healthy ear agent on apoptosis in cochlear neurocytes and brain-derived neurotrophic factor and neuron-specific nuclear antigen expression

XUAN Weijun^{1,2*}, HUANG Liyi², XUAN Yi³, TANG Junbo¹, WEI Yulong⁴

(1. Department of Otorhinolaryngology, the First Clinical Medical College of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China. 2. Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA 02114, USA. 3. School of Engineering, Tufts University, Medford, MA 02155, USA. 4. Pharmaceutical Factory,

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81973913, 81774374, 81373700, 81260552)。

Funded by National Nature Science Foundation of China (81973913, 81774374, 81373700, 81260552)。

【通信作者】 宣伟军(1958—)男,教授,博士,研究方向:耳聋及其他耳鼻咽喉科疾病;光动力医学。Email: xuan5352100@sina.com

the Ruikang Clinical Medical College of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

Corresponding author: XUAN Weijun. E-mail: xuan5352100@sina.com

【Abstract】 Objective To examine the effect of a compound healthy ear agent (CHEA) from traditional Chinese medicine (TCM) on i) age-related apoptosis of cochlear hair cells (OHC) and spiral ganglion neurons (SGN) using transmission electron microscopy (TEM), and on ii) localized expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neuron-specific nuclear antigen (NeuN) to investigate mechanisms of CHEA actions. **Methods** Twenty-two C57BL/6J mice were randomly divided into two groups at 1 month of age. Eleven animals were provided tap water daily until 7 months of age; the age-related cochlear degeneration control group (7-month-old control group). Another 11 animals drank CHEA 1.83 g/(kg·d) until 7 months of age; the TCM-treated group (7-month-old TCM group). Cochlea of euthanized animals were removed and processed into paraffin-embedded slices. Using TEM, ultrastructural changes were examined in the remaining and undisintegrated OHC and SGN associated with OHC at the basal region of cochlea from 7-month-control and 7-month-old TCM groups. Localized expression of BDNF and NeuN in SGN was observed by LCM combined with a morphological multi-overlap immunofluorescence technique, and examined using statistical analyses. **Results** In the 7-month-old control group, remaining and undisintegrated OHC and SGN associated with OHC in cochlea basal regions exhibited atrophied cytotomes, irregular nuclei and chromatin structure, texture structure presented vague, and high electron density; in particular, SGN were different in size and shape, significantly decreased in number, and exhibited nuclei chromatin that had disintegrated or dissolved to form vacuoles, representing the presence of apoptosis. However, the 7-month-old TCM group had no obvious apoptosis in OHC or SGN of basal cochlear regions, which exhibited more complete morphological structures and nuclei with a uniform chromatin distribution, texture structure presented clear, a lower electron density, and only individual nuclei had dissolved to form vacuoles. The localized expression levels of BDNF and NeuN in the basal cochlear region were higher ($P < 0.05$) in the 7-month-old TCM versus the 7-month-control group. **Conclusions** Ultrastructural changes of nuclei and decreased expression of NeuN in cochlear OHC or SGN were important apoptotic features in aging cochlear neurocytes. Apoptosis in SGN was earlier than in OHC. The TCM reduced the ultrastructural changes in OHC or SGN, and increased NeuN expression in SGN, which suggests that TCM had a protective effect upon SGN, consistent with TEM observations. The mechanism of action may involve promotion of BDNF expression, which exerts a series of biological effects.

【Keywords】 mouse; presbycusis; cochlear neurocyte; ultrastructure; traditional Chinese medicine; NeuN; BDNF
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

老年性聋(Presbycusis)又称年龄相关性听力损失(Age-related hearing loss, AHL),随着世界人口的老龄化,其发病率逐年递增^[1],其病因病机复杂,防治极其困难,是当前耳科学研究的重要热门课题之一^[2-4]。前期研究表明,中药复方健耳剂在普通光镜下观察发现具有明显对抗 C57BL/6J 小鼠老年性耳蜗毛细胞、耳蜗螺旋神经节神经元(spiral ganglion neurons, SGN)凋亡,以及保护听功能的药效作用^[5-7],但以往缺如小鼠老年性耳蜗神经细胞形态学电镜超微观察以及中药细胞靶向作用机制研究,因此,我们继续选择 C57BL/6J 小鼠作为 AHL 模型,利用透射电镜重点观察老年性耳蜗外毛细胞(outer hair cell, OHC)、SGN 细胞核超微结构改变,利用形态学多重免疫荧光技术,配合激光共聚焦显微镜重点观察 SGN 中神经元特异性核抗原蛋白(neuron-specific nuclear antigen, NeuN)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)

定位表达,以及中药干预影响作用,以进一步揭示其对抗细胞凋亡以及靶向作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 1 月龄刚断奶健康 C57BL/6J 小鼠 22 只,雌雄各半,体重 16 ~ 18 g,由北京维通利华实验动物技术公司提供【SCXK(京)2012-0001】,清洁级别一级,饲养于本单位 SPF 动物实验室【SYXK(桂)2019-0001】,所有操作均符合广西中医药大学实验动物伦理学要求(审批号: IACUC 20161015)。

1.1.2 药物

复方健耳剂主要由葛根、丹参、黄芪、骨碎补等组成,由广西中医药大学瑞康医学院制药厂制备。经过水煮、浓缩、烘干、反复粉碎和过筛等流程,制成每克药粉相当于 6.63 g 生药材。按照《中药药理

研究方法学》^[8]小鼠与成人用量换算法,计算出该药的小鼠用量定为 1.83 g/(kg·d)。

1.1.3 试剂和仪器

VECTASHIELD HardSet Mounting Medium with DAPI (Vector, H-1500), NeuN 一抗 (Millipore, MAB377), BDNF 一抗 (ThermoFisher, OSB00017 W), 二抗 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor Plus 488 (Invitrogen, PIA32731)、二抗 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 555 (Invitrogen, PIA32727), Vector Laboratories Supplier Diversity Partner H3300 (Fishersci, NC9401067), 碳酸钠缓冲液 (Electron Microscopy Sciences, 11652), 样品组织自动处理器 LYNX II Automated Tissue Processor (Electron Microscopy Sciences, L12600), 甲苯胺蓝染色剂 (Electron Microscopy Sciences, 14950), tEpon-812 环氧树脂 (Tousimis, 3131), NMA-ultrapure (Tousimis, 3143), DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride) (Tousimis, 3123), DMP-30 (Dimethylaminomethyl) Phenol (Tousimis, 3103)。透射电镜型 (Philip CM10 TEM, 荷兰), 激光共聚焦显微镜 (Olympus IX 81 + Olympus Fluoview FV1000, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药方法

将 22 只动物随机分为 7 月龄老年性耳蜗退变对照组 (7 月龄对照组)、7 月龄中药干预组 (7 月龄中药组) 各 11 只。7 月龄对照组只喂饲常规饲料和自来水, 中药组食用相同的常规饲料同时, 饮用中药溶液以代替日常饮水, 具体是中药粉加适量比例水配兑 (一般为 0.05 g 药粉加 5 mL 水), 盛于动物自吸喂养瓶内供小鼠自动饮用, 在没有其它水源供应的实验条件下, 实验动物因生理需要而必须每天摄取足够的饮水, 因而也就保证了实验小鼠每天都能摄取到规定的药物剂量, 到 4 月龄后改用人工灌服中药溶液至期满。月龄期满终止实验, 取耳蜗切片, 进行 OHC、SGN 细胞核超微结构观察, 以及 SGN 中 NeuN、BDNF 定位表达研究。

1.2.2 观察指标及检测方法

实验动物期满后, 所有动物用 20% 乌拉坦全麻, 剪开右心房, 左心室灌注生理盐水排出体内血液, 接着灌注 10% 福尔马林磷酸盐缓冲液, 断头取耳蜗, 在蜗尖钻孔并摘除镫骨同时打开园窗, 将 10% 福尔马林磷酸盐缓冲液从蜗尖孔灌入耳蜗, 然后浸入上述固定液固定 24 h 以上, 石蜡包埋备用。其中每组 5 只动物耳蜗利用透射电镜, 观察 OHC 以

及对应部位的 SGN 超微结构变化。每组另外 6 只动物耳蜗利用形态学多重免疫荧光技术, 配合激光共聚焦显微镜, 观察 SGN 中 NeuN、BDNF 定位表达。

1.2.3 透射电镜观察 OHC、SGN 细胞核超微结构

将制备的耳蜗石蜡包埋标本切片, H&E 染色, 在显微镜下定位耳蜗底回柯替氏器 OHC 和同一部位的 SGN, 明确区域, 从石蜡块上取出相同区域组织, 60℃ 熔化石蜡, 梯度乙醇水化, 0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液漂洗, 4℃ 下组合固定液 (由 2.5% 戊二醛、2% 多聚甲醛、0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液配制) 固定 24 h, 0.1 mol/L PBS 洗, 1% 锇酸后固定 2 h, 0.1 mol/L PBS 漂洗, 在样品组织自动处理器中经双蒸水、1% 鞣酸、双蒸水、梯度乙醇、环氧丙烷、梯度 EPON 处理和包埋 (EPON 由 tEpon-812、DDSA、NMA-ultrapure、DMP-30 配制而成), 将 EPON 块切割 0.5 μm 的半薄切片, 甲苯胺蓝染色, 显微镜下检查染色载玻片, 进一步确认薄切片的所要观察的区域, 将 EPON 块进一步修整成 <2 毫米宽范围, 超薄切片机金刚石刀将 EPON 块切成 80 nm 薄片, 将薄片加载到透射电镜金属网格上, 醋酸铀和柠檬酸铅染色网格, 透射电镜观察, 其中重点选择观察 7 月龄对照组耳蜗底回存留尚未解体的 OHC 以及对应部位的 SGN 超微结构变化, 同时与 7 月龄中药组相同部位的 OHC 和 SGN 进行对照。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察 SGN 中 NeuN 与 BDNF 定位表达

实验方法采用笔者探索和应用的形态学多重免疫荧光方法^[9-12], 将制备的耳蜗石蜡包埋标本切片, Xylene 脱蜡, 梯度乙醇水化, PBS 液漂洗, 转入 10mM、pH6.0 Citrate 缓冲液, 选择微波炉进行抗原热修复, 温度 199F, PBS 漂洗后, 加入 2% goat serum, 1% BSA, 0.1% cold fish gelatin, 0.05% sodium azide 封闭孵育, 置换 5% BSA 配制的 NeuN、BDNF 目标抗体液, 每个抗体室温下相继孵育 1 h, 置 4℃ 冰箱过夜。分别以 0.1% Triton PBS、PBS 漂洗, 以各自对应匹配并耦合 488、555 不同荧光素吸收谱的羊抗一抗 IgG, 室温孵育 50 min。同样分别以 0.1% Triton PBS、PBS 漂洗。最后以 VECTASHIELD HardSet Mounting Medium with DAPI 进行 DAPI 细胞核染色, 中性树脂封片, 激光共聚焦显微镜下, 以相应匹配的荧光素吸收谱不同激光发射, 并配以不同颜色标记不同目标基因或蛋白以及 DAPI, 观测样品。每组耳蜗切片样本截取同部位各 12 张照片, 其中重点选择观察耳蜗底回 SGN, 最后应用 Image-J 分别测算 NeuN、BDNF、DAPI 灰度值, 按 NeuN/

DAPI, BDNF/NeuN 灰度值比进行统计并比较。

1.3 统计学分析

应用 SPSS16.0 软件进行统计分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两两比较用 LSD-*t* 检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

透射电镜下,重点选择观察的 7 月龄对照组耳蜗底回存留尚未解体的 OHC 所见,胞体萎缩,胞核固缩不整,深染,核染色质浓集致密,聚集成团,并向核膜内侧边集,纹理结构模糊不清,电子密度高,有的核膜不完整,胞质内质网减少,呈现凋亡态势(图 1A),同样,对应于 OHC 部位的 7 月龄对照组耳蜗底回 SGN 变化与 OHC 相同,但凋亡状况更为严重,大小形态不一,数量明显减少,不少神经元变性固缩、核不规则,核染色质聚集成团、边集,电子密度高,甚至胞核溶解,形成空泡,或解体缺如(图 1C)。而 7 月龄中药组耳蜗底回 OHC 胞体饱满,胞核圆形完整,核膜完整光滑,双层结构清晰,核内染色质均匀,纹理结构清晰可见,电子密度低,胞质内质网丰富,呈现较为健康(图 1B),其耳蜗底回 SGN 结构变化与 OHC 相同,凋亡状况较轻,数量较多,仅个别胞核溶解,形成空泡,但整体较为健康(图 1D)。

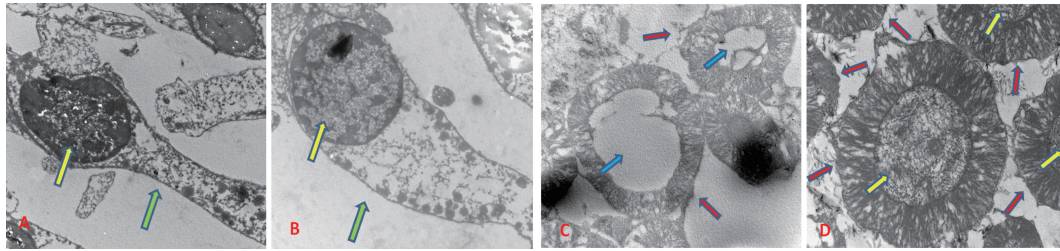
激光共聚焦显微镜下,耳蜗切片柯替氏器和螺旋神经节(spiral ganglion, SG)清晰显示不同色彩靶标形态表达(图 2),红色显示 NeuN,其作为神经元的特殊标志蛋白,代表着 SGN 识别身份,表示存在的 SGN;绿色显示 BDNF,代表着 BDNF 的识别身份;蓝色显示 DAPI,作为细胞核 DNA 特异性标记物,代表着各种细胞核。通过形态重叠表达,可以精确明确靶向细胞和分布位置,即 NeuN+DAPI 重叠表达定位为 SGN;NeuN+BDNF+DAPI 重叠表达定位为 SGN 所呈现的 BDNF 表达,并可根据颜色多寡和有无比较,即可了解和判断表达量和分布的差异,或提示神经元凋亡现状,例如 1 个细胞中的 NeuN 单位面积表达量明显减少,说明该神经元已经出现凋亡状况,若无 NeuN 表达,说明非 SGN。通过两组相同部位图像直观比较,耳蜗底回螺旋神经节 7 月龄对照组 NeuN+DAPI 分布明显减少,说明 SGN 神经元凋亡明显增多(图 2A),而 7 月龄中药组 NeuN+DAPI 分布较多且密集,说明 SGN 神经元保存较高(图 2B),与透射电镜一致,两组差异具有显著性($P < 0.05$)(表 1)。耳蜗底回螺旋神经节所见,与 7 月龄对照组比较,7 月龄中药组 NeuN+

BDNF+DAPI 表达量及密度明显增多(图 2C,D),两组差异具有显著性($P < 0.05$)(表 1)。

3 讨论

人类 AHL 临床耳蜗细胞形态学以及细胞内在分子机制研究难于开展甚至无法了解,其防治性研究也就极其困难,因此,动物模型成为目前 AHL 研究可行性的主要方式和途径,目前研究 AHL 所选动物一般选择不同种株近交系小鼠,如 C57BL/6J、CBA/CaJ 等小鼠,缘于该类小鼠的生命周期较短和或 AHL 相关基因缺陷小鼠模型的成功建立,研究发现,不同种株近交系小鼠耳蜗外毛细胞的退变随着年龄的增长存在着截然不同的病变发生时间和病理学改变进程,其中 C57BL/6J 小鼠在出生后更早出现蜗毛细胞的退变^[13-15],通过对 3 个月、6 个月、9 个月、12 个月、15 个月和 18 个月龄时测量 8 kHz、16 kHz 和 32 kHz 纯音刺激的 ABR 阈值比较, C57BL/6J 小鼠 32 kHz ABR 阈值在 6 月龄时明显增高,至 12 个月龄时,16 kHz 阈值显著增高^[16]。C57BL/6J 小鼠出现 AHL 较早,与基因遗传学密切相关,通过对小鼠四种基因型 ABR 听力检测研究发现, *Sod1*^(+/+) *Cdh23*^(+/+) 小鼠在 15 个月龄前仍保持正常听力,其中 *Sod1*^(-/-) *Cdh23*^(ahl/ahl) 小鼠表现出听力损失最早而且发病最严重,其次是 *Sod1*^(+/+) *Cdh23*^(ahl/ahl), *Sod1*^(-/-) *Cdh23*^(+/+), 由此认为, *Cdh23*^(ahl/ahl) 基因缺陷型是导致 C57BL/6J 小鼠早期出现 AHL 病变的主要原因^[17-18]。因此, C57BL/6J 小鼠是研究 AHL 理想动物模型之一。

但一直以来我们的研究只局限于普通光镜下的研究,分子机制研究也仅局限于整个耳蜗 PCR 等研究,其电镜下耳蜗 HC 和 SGN 超微形态学及中药细胞靶向分子作用仍不清楚,以往也缺乏有关文献报道和参考,这缘于小鼠耳蜗解剖过于细微,观察范围极小,如要定位为耳蜗某点用于电镜观察,则技术要求更高,难度更大。这次我们使用原已备有的耳蜗石蜡包埋标本转用于透射电镜的研究尚属首次,国内外也均未见报道,以往透射电镜生物样品制备采用的是环氧树脂包埋切片,通过摸索证明,石蜡包埋切片同样可以转用于透射电镜生物样品制备,只是有的地方和步骤不同。本次研究观察所见,7 月龄 C57BL/6J 小鼠耳蜗底回 OHC 和 SGN 出现细胞凋亡特征,如胞体萎缩、核固缩,核染色质聚集成团、边集,电子密度高,尤其是 SGN 凋亡特征比 OHC 更为严重,不少甚至溶解消失,形成空泡,或分崩离析,残缺不全,或解体缺如等,由此还

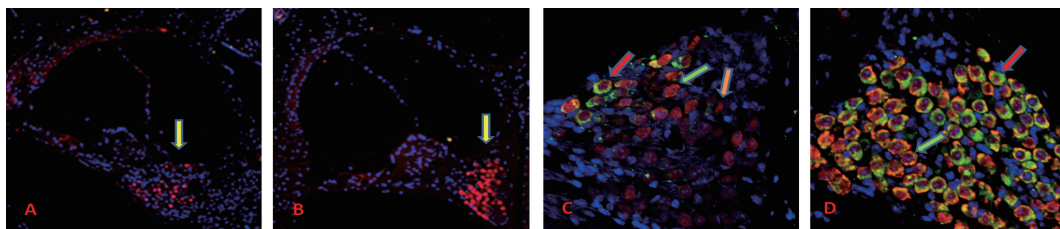


注: A, B 分别为 7 月龄对照组、7 月龄中药组耳蜗底回外毛细胞。黄色箭头为外毛细胞核, 绿色箭头为外毛细胞体。C, D 分别为 7 月龄对照组、7 月龄中药组耳蜗底回螺旋神经节神经元。黄色箭头为神经元细胞核, 红色箭头为神经元细胞体, 蓝色箭头为细胞核溶解消失所形成的空泡。(A, B: $\times 2750$ 。C, D: $\times 4900$)

图 1 透射电镜下两组耳蜗底回外毛细胞、螺旋神经节神经元比较

Note. A and B were the OHC at cochlear base of the 7-month-old control group and the 7-month-old TCM group, respectively. Yellow arrows indicate the nuclei of OHC and green arrows indicate the bodies of OHC. C and D were the SGN at cochlear base of the 7-month-old control group and the 7-month-old TCM group, respectively. Yellow arrows indicate the nuclei of neuron, red arrows indicate the cell bodies of neuron, and blue arrows show the vacuole formed by the dissolution and disappearance of nuclei. (A, B: $\times 2750$. C, D: $\times 4900$)

Figure 1 Comparison of OHC or SGN in the cochlear base of two groups under transmission electron microscopy



注: A, B 分别为 7 月龄对照组、7 月龄中药组耳蜗底回螺旋神经节($\times 20$)。黄色箭头为螺旋神经节部位, 红色为 NeuN 表达, 代表存在的神经元; 蓝色为 DAPI, 代表各种细胞的细胞核。C, D 分别为 7 月龄对照组、7 月龄中药组螺旋神经节($\times 40$)。绿色箭头为 NeuN + DAPI 表达, 红色箭头为 NeuN + BDNF + DAPI 表达, 橙色箭头为残缺 NeuN 表达, 表示凋亡的螺旋神经节神经元残体。红色为 NeuN, 绿色为 BDNF, 蓝色为 DAPI。

图 2 激光共聚焦显微镜下两组耳蜗底回螺旋神经节比较

Note. A and B were the SG at cochlear base in the 7-month-old control group and the 7-month-old TCM group ($\times 20$), respectively. Yellow arrows indicate the SG location, and red indicate the NeuN expression, representing neurons present; blue indicates DAPI, representing nuclei of various cells. C and D the SG at cochlear base in the 7-month-old control group and the 7-month-old TCM group ($\times 40$), respectively. Green arrows are the NeuN + DAPI expression, red arrows are the NeuN + BDNF + DAPI expression, and orange arrows are residual NeuN expression, indicating the apoptotic SGN residues. Red is NeuN, green is BDNF, and blue is DAPI.

Figure 2 Comparison of SG in the cochlear base of two groups under confocal laser microscope

表 1 两组动物耳蜗底部附近螺旋神经节 NeuN、BDNF 表达量比较(灰度值, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of NeuN or BDNF expression in SG near the cochlear base between two groups (gray value, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	只 n	NeuN/DAPI	BDNF/NeuN
7 月龄对照组 7-month-old control group	6	0.57 $\pm$ 0.12	0.35 $\pm$ 0.09
7 月龄中药组 7-month-old TCM group	6	1.19 $\pm$ 0.19 [△]	0.77 $\pm$ 0.10 [△]

注: 与 7 月龄对照组比较, [△] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the 7-month-old control group, [△] $P < 0.05$.

提示, SGN 凋亡要早于 HC, 这与先前我们通过耳蜗铺片、普通光镜下所见结论一致, 即 7 月龄则耳蜗同时出现基底部内、外毛细胞、螺旋神经节神经元凋亡或变性, 并显示同期螺旋神经节神经元凋亡比毛细胞相对更重, 提示 AHL 神经元退变早于毛细胞, 由此推断在 AHL 中的毛细胞有赖于神经元提供

营养支持^[19]。而 7 月龄中药组无论 HC, 还是 SGN, 出现的凋亡现象则轻得多, 从超微细胞形态学观察中, 进一步证实了中药复方健耳剂具有对抗耳蜗 OHC 和 SGN 凋亡的显著作用。

NeuN 是脊椎动物中一种神经元特异性的 DNA 结合核蛋白, 是神经元的极好特殊标记物。在小鼠

的整个神经系统中,包括在小脑、大脑皮层、海马、丘脑和脊髓,以及周围神经系统的背根神经节、交感链神经节和肠神经节中均有表达^[20-21]。本次研究在耳蜗螺旋神经节中首次观测到 NeuN 表达,说明 NeuN 表达定位于神经元,是神经元特有标志蛋白,在 SGN 的表达,代表了 SGN 的分布,具有识别和定位 SGN 靶目标作用和意义。本次实验通过形态学多重免疫荧光技术研究结果显示,耳蜗底部螺旋神经节 7 月龄对照组对 NeuN 表达明显低于 7 月龄中药组,因此提示 SGN 伴随着年龄增长和老化呈现凋亡的发展趋势,复方健耳剂具有保护老年性 SGN 的药效作用,这些研究与前期利用甲苯胺蓝染色、普通显微镜下观察结果和结论一致^[6]。本次研究还表明,7 月龄中药组对 BDNF 表达明显高于 7 月龄对照组,表明中药对定位于 SGN 的 BDNF 含量保持较高水平,由此提示,复方健耳剂能够有效对抗老年性耳蜗 OHC、SGN 凋亡,保护听功能,其关键作用机制之一与其促进 SGN 中的 BDNF 表达密切相关。

BDNF 是神经营养因子家族中的重要成员,主要分布于中枢神经系统中,部分初级感觉神经元也可合成 BDNF,其最具神经元营养活性,对神经元的生长、发育、分化和神经形成,以及成熟神经元的突触可塑性起着关键作用,中枢神经系统退行性疾病如阿尔茨海默病、帕金森病等,与 BDNF 营养支持的减少有关。由于 BDNF 及其高亲和力受体遍布整个中枢神经系统,且 BDNF 是一种有效的神经保护剂,因此认为,该营养因子是治疗某些中枢神经系统疾病的良好候选因子^[22-24]。然而,BDNF 受何种分子调控,通过何种途径,实现对神经细胞存活、迁移、生长、发育和分化,轴突和树突的生长、突触发生、传递和突触重塑等作用目前仍未明了,多数学者认为,BDNF 与高亲和力蛋白激酶受体酪氨酸蛋白激酶 B (Trk B) 特异性结合,激活酪氨酸激酶,磷酸化的酪氨酸与信号系统的其它分子结合,进一步使其其它分子磷酸化,导致激酶瀑布效应从而激活整个信号传递系统,即主要通过 Ras/MAPK 信号转导途径,或 PI3-K/Akt 信号转导通路,发挥其生物学作用^[25-26]。后来有研究表明,外源性 BDNF 能够通过抑制乙醇神经毒性诱导的细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生,阻止 Bax 蛋白向线粒体膜的转运或线粒体膜电位中断,从而防止新生小鼠发育过程中的神经元凋亡^[27],或 BDNF 作为一种蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 激活剂,通过 PKA/cAMP 通路的磷酸化和脱磷酸化作用,调节细

胞有氧代谢,阻止乙醇激活的下丘脑神经元氧化应激和凋亡过程^[28]。由此提示 BDNF 还可通过激活体内细胞抗氧化系统,或抑制 ROS 产生,阻止 caspase 家族介导的细胞程序性死亡即凋亡。过去普遍认为活性氧 ROS 产生和累积损害被认为是 AHL 发生过程的重要因素之一,即老年人耳蜗毛细血管退变,微循环障碍,血液灌注不足,线粒体能量代谢功能下降,ROS 不断累积,可损害线粒体,诱导线粒体基因 (mtDNA) 缺失或突变,引起细胞凋亡^[29-31]。因此认为,中药复方健耳剂通过促进 BDNF 的产生,激活 Ras/MAPK,或 PI3-K/Akt,或 PKA/cAMP 信号转导途径,发挥系列生物学效应,其中包括抑制 ROS 产生,阻止 caspase 家族介导的细胞程序性死亡,是其具有保护老年性耳蜗螺旋神经节神经元凋亡作用重要机制之一。

致谢:本次实验中透射电镜样品处理技术方案及仪器操作承蒙美国哈佛大学医学院马萨诸塞州总医院病理中心主任 Jenny Zhao 博士指导,在此表示衷心感谢!

参 考 文 献 (References)

- [1] Sprinzel G, Riechelmann H. Current trends in treating hearing loss in elderly people; a review of the technology and treatment options-aminireview [J]. Gerontology, 2010, 56(3):351-358.
- [2] Vaisbuch Y, Santa Maria PL. Age-related hearing loss: innovations in hearing augmentation [J]. Otolaryngol Clin North Am, 2018, 51(4):705-723.
- [3] Humes LE. The world health organization's hearing-impaired grading system: an evaluation for unaided communication in age-related hearing loss [J]. Int J Audiol, 2019, 58(1):12-20.
- [4] Han C, Ding D, Lopez MC, et al. Effects of long-term exercise on age-related hearing loss in mice [J]. J Neurosci, 2016, 36(44):11308-11319.
- [5] 宣伟军,丁大连,蒋海燕,等. 复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠 AHL 毛细胞的保护作用 [J]. 中华耳科学杂志, 2016, 14(2):272-277.
Xuan WJ, Ding DL, Jiang HY, et al. Protective effects of the compound healthy ear agent against presbycusis in C57BL/6J mice [J]. Chin J Otolaryngol, 2016, 14(2):272-277.
- [6] 宣伟军,丁大连,宣毅,等. 复方健耳剂对抗小鼠老年性耳蜗螺旋神经节神经元凋亡效应及机制研究 [J]. 中华老年医学杂志, 2016, 35(12):1329-1333.
Xuan WJ, Ding DL, Xuan Y, et al. Effects of healthy ear compound of traditional Chinese medicine against age-induced apoptosis on cochlear spiral ganglion neurons in C57BL/6J mice and research on mechanisms by regulating caspase-3 [J]. Chin J Geriatr, 2016, 35(12):1329-1333.
- [7] 宣伟军,唐俊波,陈壮,等. 中药复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠老年性聋的防护效应 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(10):1247-1251.
Xuan WJ, Tang JP, Chen Z, et al. Protecting effects of Jian'erji on age-related hearing loss of C57BL/6J mice [J]. Med Chin J Integr Tradit West Med, 2016, 36(10):1247-1251.

- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社; 1993.
- Chen Q. Methodology of pharmacological study in traditional Chinese medicine [M]. Beijing: People's medical publishing house; 1993.
- [9] 宣毅, 宣伟军. 脑损伤模型中基于形态学多重免疫荧光技术的神经细胞研究方法[J]. 中华神经医学杂志, 2015, 14(11): 1118-1121.
- Xuan Y, Xuan WJ. Multi-overlap immunofluorescence techniques used in nerve cells based on morphology in brain injury models [J]. Chin J Neuromed, 2015, 14(11): 1118-1121.
- [10] Xuan W, Vatansever F, Huang L, et al. Transcranial low-level laser therapy improves neurological performance in traumatic brain injury in mice: effect of treatment repetition regimen [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53454.
- [11] Xuan W, Vatansever F, Huang L, et al. Transcranial low-level laser therapy enhances learning, memory, and neuroprogenitor cells after traumatic brain injury in mice [J]. J Biomed Opt, 2014, 19(10): 108003.
- [12] Xuan W, Huang L, Hamblin MR. Repeated transcranial low-level laser therapy for traumatic brain injury in mice: biphasic dose response and long-term treatment outcome [J]. J Biophotonics, 2016, 9(11-12): 1263-1272.
- [13] Ding DL, McFadden S, Salvi RJ. Cochlear hair cell densities and inner-ear staining techniques. Handbook of Mouse Auditory Research [M]. Florida: CRS Press; 2001.
- [14] Willott JF, Erway LC, Archer JR, et al. Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds [J]. Hear Res, 1995, 8(1-2): 143-155.
- [15] 周凌, 宣伟军, 丁大连. CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞随着年龄增长不同损害模式的比较[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 790-799.
- Zhou L, Xuan WJ, Ding DL. Comparison of different damage patterns of cochlear hair cells between CBA/CaJ and C57BL/6J mice with aging [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 790-799.
- [16] Kane KL, Longo-Guess CM, Gagnon LH, et al. Genetic background effects on age-related hearing loss associated with Cdh23 variants in mice [J]. Hear Res, 2012, 283(1-2): 80-88.
- [17] Zheng QY, Ding D, Yu H, et al. A locus on distal chromosome 10 (ahl4) affecting age-related hearing loss in A/J mice [J]. Neurobiol Aging, 2009, 30(10): 1693-1705.
- [18] Johnson KR, Yu H, Ding D, et al. Separate and combined effects of Sod1 and Cdh23 mutations on age-related hearing loss and cochlear pathology in C57BL/6J mice [J]. Hear Res, 2010, 268(1-2): 85-92.
- [19] 宣伟军, 黄正团, 丁大连. 中药健耳 II 号胶囊对抗 C57BL/6J 小鼠老年性耳蜗损害的实验研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(1): 47-50.
- Xuan WJ, Huang ZT, Ding DL. Experimental study in prevention of age-related Cochlear damage in C57BL/6J mice using Jianer II capsule of Chinese traditional medicine [J]. J Aud Speech Pathol, 2007, 15(1): 47-50.
- [20] Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker [J]. Acta Naturae, 2015, 7(2): 42-47.
- [21] Saito S, Shiina T, Shimizu Y. NeuN immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis* [J]. Tissue Cell, 2017, 49(4): 514-519.
- [22] Pezet S, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders [J]. Expert Opin Ther Targets, 2004, 8(5): 391-399.
- [23] Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, et al. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function [J]. Front Neuroendocrinol, 2004, 25(2): 77-107.
- [24] Binder DK. The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system [J]. Adv Exp Med Biol, 2004, 548: 34-56.
- [25] Ohira K, Hayashi M. A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity [J]. Curr Neuropharmacol, 2009, 7(4): 276-285.
- [26] Tong L, Balazs R, Soiamponkul R, et al. Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction [J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(9): 1380-1393.
- [27] Heaton MB, Paiva M, Siler-Marsiglio K. Ethanol influences on Bax translocation, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species generation are modulated by vitamin E and brain-derived neurotrophic factor [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2011, 35(6): 1122-1133.
- [28] Boyadjieva NI, Sarkar DK. Cyclic adenosine monophosphate and brain-derived neurotrophic factor decreased oxidative stress and apoptosis in developing hypothalamic neuronal cells: role of microglia [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2013, 37(8): 1370-1379.
- [29] Han C, Someya S. Mouse models of age-related mitochondrial neurosensory hearing loss [J]. Mol Cell Neurosci, 2013, 55: 95-100.
- [30] Someya S, Tanokura M, Weindrich R, et al. Effects of caloric restriction on age-related hearing loss in rodents and rhesus monkeys [J]. Curr Aging Sci, 2010, 3(1): 20-25.
- [31] Yamasoba T, Someya S, Yamada C, et al. Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss [J]. Hear Res, 2007, 226(1-2): 185-193.

[收稿日期] 2019-11-17