

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201701013

· 论著 ·

p-ERK5 在快速衰老小鼠耳蜗血管纹中的增龄性变化

祝 涵¹, 刘强和¹, 张红佳²

(1. 桂林医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科 桂林医学院耳鼻咽喉科学研究所, 广西 桂林 541001; 2. 解放军总医院第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 北京 100037)

摘要: **目的** 探讨快速衰老小鼠耳蜗血管纹中磷酸化的细胞外信号调节激酶5 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 5, p-ERK5) 表达的增龄性变化。**方法** 选用3、5、7月龄的快速衰老小鼠亚系8 (senescence accelerated mouse, SAMP8) 各6只, 分别进行8kHz短纯音听性脑干反应 (ABR) 检测, 并用免疫组化染色方法分别检测各月龄组小鼠耳蜗血管纹细胞中 p-ERK5 的表达, 分析其增龄性变化。**结果** 3、5、7月龄小鼠耳蜗血管纹细胞中 p-ERK5 平均光密度值分别为 0.3838 ± 0.0020 、 0.3646 ± 0.0010 、 0.3423 ± 0.0036 ; p-ERK5 在不同月龄快速衰老小鼠耳蜗组织中的表达光密度值随着月龄增加而显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 随着年龄相关性功能减退, 快速衰老小鼠耳蜗血管纹中 p-ERK5 的表达水平逐渐降低, 推测 p-ERK5 可能与维持正常的耳蜗功能及听觉有关。

关键词: 快速衰老小鼠; 耳蜗血管纹; 磷酸化的细胞外信号调节激酶5

中图分类号: R764

文献标识码: A

[中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(1): 59-62]

Extracellular signal regulated kinase 5 (p-ERK5) in senescence accelerated mice

ZHU Han¹, LIU Qiang-he¹, ZHANG Hong-jia²

(1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College; Otolaryngology Institute of Guilin Medical College, Guilin 541001, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: **Objective** To study degenerative changes of age-related expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 5 (p-ERK5) in the cochlear stria vascularis of rapid aging mouse. **Methods** 18 mice of senescence accelerated mouse subline 8 (SAMP8) with age of 3 months ($n=6$), 5 months ($n=6$) and 7 months ($n=6$) were studied. Auditory brainstem response (ABR) was elicited with 8KHZ short pure tone, expression of p-ERK5 in the cochlear stria vascularis was detected using immunohistochemical staining, and the age-related changes were analyzed in all the mice. **Results** The average optical densities of p-ERK5 in the cochlear stria vascularis cells in the 3, 5 and 7 months old mice were 0.3838 ± 0.0020 , 0.3646 ± 0.0010 and 0.3423 ± 0.0036 respectively. The optical density of p-ERK5 declined significantly with age ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression level of p-ERK5 in the cochlear stria vascularis of rapid aging mice declines with the age-related hypofunction. This indicates that p-ERK5 is probably related to maintenance of cochlea function and auditory function.

Key words: Rapid aging mouse; Cochlear stria vascularis; Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 5

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(1): 59-62]

老年性耳聋或老年相关性听力损失是伴随年龄衰老(一般发生在60岁以上)而发生的听觉系统退行性变导致的耳聋,是双耳对称、缓慢进行性的听力

下降,主要表现在高频听力损失^[1]。老年性耳聋与耳蜗血管纹细胞、螺旋神经节细胞、内外毛细胞萎缩及减少密切相关^[2]。最近几年,刘强和等^[3-5]通过实验研究发现:在快速衰老小鼠耳蜗中大量表达了神经生长因子(NGF)及其受体TRKA,其增龄性与其表达呈负相关,说明了其可能与耳蜗功能及听觉有关,但作用机制尚不明了。细胞外信号调节激酶

基金项目:国家自然科学基金项目(81060083)。

作者简介:祝 涵,女,在读硕士研究生。

通信作者:刘强和,Email:lqh@glmc.edu.cn

5 (extracellular signal-regulated kinase 5, p-ERK5) 属于丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族, 其中 ERK5 是 MAPK 家族中的重要组成部分, 也是相对较新的一条通路, 能够被神经生长因子、神经递质等多种细胞外信号激活, 磷酸化的细胞外信号调节激酶 5 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 5, p-ERK5) 是其活化形式, 可调节细胞生长、增殖、分化及凋亡等^[6-7]。快速衰老小鼠 (senescence accelerated mouse, SAM) 是一种常用于老化相关实验的动物模型, 包括 SAMP (senescence accelerated prone mouse, SAMP) 和 SAMR (senescence accelerated resistant mouse, SAMR) 两种品系, 该品系小鼠出现身体各部位功能衰老现象较早。SAMP8 是 SAMP 的一个亚系, 其小鼠平均寿命为 12.1 个月, 成熟期为 4~6 个月, 从 5 月龄开始出现衰老征象, 步入老化前期, 7 月龄则表现出明显的老化体征, 进入快速衰老期^[8]。SAMP8 小鼠随月龄增长可出现与听功能变化相一致的组织病理变化, 如: 耳蜗螺旋神经节细胞及内外毛细胞的缺失和凋亡与人类衰老时耳蜗形态学及其改变相似, 因此可以作为研究老年性耳聋的动物模型^[1,9]。本研究拟通过检测 SAMP8 小鼠 3 个发育时间点 (3、5 和 7 月龄) 听功能及耳蜗组织中 p-ERK5 表达的增龄性变化特点, 进而探讨 NGF 及其酪氨酸受体 TrkA 在老年性耳聋发病的分子机制中是否有 p-ERK5 信号通路参与作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

3 组均选用 SAMP8 雄性小鼠各 6 只, 月龄分别为 3、5、7, 体重 20~24g, SPF 级, 来源于桂林医学院实验动物中心, 习服 1 周, 所有动物按照国际实验动物准则进行处理。所有小鼠外耳道均通畅、无异常分泌物, 鼓膜完整, 中耳无阻塞及分泌物, 无噪声暴露及药物应用史。

1.2 听性脑干反应 (ABR) 检测

所有实验动物的听力评估均在桂林医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科隔音屏蔽室内进行, 采用的测试系统为美国 ICS MEDICAL 公司 CHARTR EP 系统。步骤如下: ①采用尾静脉注射, 先将小鼠固定在鼠筒内, 使尾巴露出, 用酒精擦拭使血管扩张, 以左手拇指和食指捏住鼠尾两侧, 从尾下 1/4 处进针, 先缓注少量 1% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 进行注射麻

醉, 如无阻力, 表示针头已进入静脉, 可继续注入。麻醉后, 小鼠出现四肢肌肉松弛、皮肤夹掐反射消失, 说明麻醉适度; ②无躁动后, 将小鼠固定在自制的测试盒内。参照文献^[10]方法应用银针电极经皮下记录反应信号, 记录电极置于小鼠两耳间连线中点, 参考电极插于给声耳垂下, 极间电阻在 0~5 k Ω ; ③左右耳交替给声, 将耳机固定于测试盒上, 耳机距外耳道口在 0.3~0.6 cm 之间; 给予刺激声为 8 kHz 短纯音, 滤波为 100~3 000 Hz, 刺激重复率 21 次/s, 声刺激持续时间 10 ms, 间歇期 100 ms, 上升/下降时间为 1 ms, 叠加 1 024 次; ④刺激声强度从 100 dB SPL 开始, 从 10 dB 开始递减, 接近反应阈值时, 再以 5 dB SPL 递减, 到刚好出现波形, 再重复一次, 若波形能重复, 即可判断其为 ABR 听阈值, 如果 100 dB SPL 短纯音还不能得到听阈, 就认为其阈值是 105 dB SPL。

1.3 耳蜗标本预处理

各月龄组小鼠经 ABR 阈值测定完毕后, 剖开左心室, 采用钳夹腹主动脉, 依次用氯化钠注射液 18 ml、4% 多聚甲醛固定液 (0.1 mol/L, pH 7.5, Sigma) 15~25 ml, 进行上半身灌注处死, 游离右侧听泡, 并在解剖显微镜下打开听泡 (同种固定液), 蜗尖钻孔, 剔除全部听泡、切除听骨及鼓膜, 开放圆窗膜, 再置于固定液中于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次日从 4 $^{\circ}$ C 冰箱将标本取出, 用 0.1 mol/L, pH 7.4 PBS 缓冲液反复冲洗, 放入 10% 乙二胺四乙酸 (pH 7.4) 中连续脱钙 1 周, 针刺无阻力即脱钙成功。

1.4 耳蜗石蜡切片制作

取各月龄组小鼠右侧耳蜗标本用蒸馏水冲洗干净。将内耳组织放入自动组织脱水机中脱水并浸蜡, 然后用石蜡包埋机进行包埋。等蜡块凝固后进行连续切片, 并进行染色。

免疫组化染色: ①脱蜡、水化: 脱蜡前, 应将切片在 60 $^{\circ}$ C 恒温箱中放置 20 min。取出切片后在二甲苯中浸泡 10 min, 重换二甲苯后再浸泡 10 min。随后分别在无水酒精、95% 乙醇、75% 乙醇、55% 乙醇以及 35% 乙醇中浸泡 5 min; ②用 PBS 洗 3 次, 各 5 min。然后 3% H_2O_2 滴在切片上, 常温静止 10 min。再用 PBS 洗 3 次, 各 5 min; ③抗原修复: 采用的是微波热修复法, 先在微波中加热枸橼酸钠缓冲液, 沸腾后, 将切片放入, 断电后间隔 10 min, 反复 2 次; ④用 PBS 洗 3 次, 各 5 min。随后滴加封闭液, 在室温中放置 20 min, 甩掉多余液体; ⑤滴加一抗 (Sigma-Aldrich 公司) 1 滴, 室温下静置 1 h, PBS 冲

洗 3 次,每次 5 min;⑥滴加二抗(北京博奥森生物技术有限公司)1 滴,二抗中可加入 0.05% 的 tween-20,于室温下静置 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 4 min;⑦ DAB (Sigma-Aldrich 公司)显色 15 min;⑧蒸馏水洗涤 10 min;⑨苏木素复染 2 min;⑩自来水冲洗 10 min 返蓝、梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片、镜检。

图像分析方法:光学显微镜下观察,数码拍照(细胞核和胞浆有棕黄色或黄色颗粒或斑片者为 p-ERK5 阳性细胞),用图像分析系统(Image-Pro Plus6.0)对每张切片在 40 倍倒置显微镜下分别随机选取 4 个视野的耳蜗底周血管纹细胞,分别于 400 倍镜下检测平均光密度值,进行定量分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计学分析;各月龄组小鼠 ABR 反应阈组间均数比较采用单因素方差分析;各月龄组小鼠耳蜗切片耳蜗血管纹细胞免疫组化染色平均光密度值组间均数比较采用单因素方差分析及两独立样本 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各月龄组小鼠双耳 ABR 反应阈比较

各月龄组小鼠双耳 ABR 反应阈随年龄增加而显著增高,5 月龄组与 3 月龄组(左侧 $t = 22.295$, $P < 0.05$ 、右侧 $t = 24.525$, $P < 0.05$)、7 月龄组与 3 月龄组(左侧 $t = 23.738$, $P < 0.05$ 、右侧 $t = 31.786$, $P < 0.05$)、7 月龄组与 5 月龄组(左侧 $t = 3.485$, $P < 0.05$ 、右侧 $t = 4.044$, $P < 0.05$)各组间比较,差异均具有统计学意义。

表 1 各月龄组小鼠双耳 ABR 反应阈(dB SPL, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	左耳	右耳
3 月龄组	6	32.805 \pm 1.444	32.359 \pm 0.980
5 月龄组	6	52.296 \pm 0.984	54.637 \pm 1.231
7 月龄组	6	58.392 \pm 1.183	58.375 \pm 1.024

2.2 各月龄组小鼠耳蜗血管纹 p-ERK5 的表达

各月龄组小鼠耳蜗血管纹的胞核、胞浆均可见棕黄色颗粒(DAB 显色)的阳性表达,而除去一抗的阴性对照标本无 p-ERK5 着色,在血管纹的表达相对较少(图 1)。定量分析结果显示,随着快速衰老小鼠月龄的增加,血管纹 p-ERK5 免疫组化染色平均光密度值水平均呈下降趋势。3 月龄与 5 月龄组

耳蜗血管纹细胞平均光密度值比较,差异具有统计学意义($t = 8.389$, $P < 0.01$);3 月龄与 7 月龄组耳蜗血管纹细胞平均光密度值比较,差异具有统计学意义($t = 9.990$, $P < 0.01$);5 月龄与 7 月龄组耳蜗血管纹细胞平均光密度值比较,差异具有统计学意义($t = 5.961$, $P < 0.01$),具体结果见表 2。

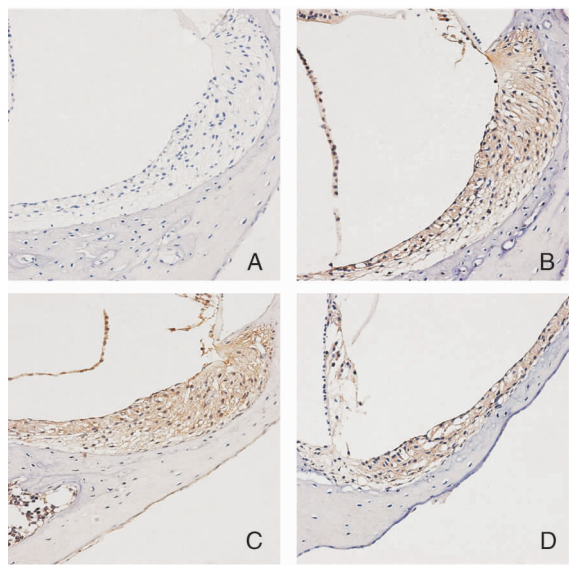


图 1 各月龄组小鼠耳蜗血管纹 p-ERK5 比较(免疫组化 $\times 200$) A:阴性对照;B:3 月龄组;C:5 月龄组;D:7 月龄组

表 2 各月龄组小鼠耳蜗血管纹 p-ERK5 平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	p-ERK5
3 月龄组	0.3838 \pm 0.0020
5 月龄组	0.3646 \pm 0.0010
7 月龄组	0.3423 \pm 0.0036

3 讨论

衰老是生命过程中不可避免的自然过程,而老年性耳聋已成为影响老年人生活质量的重要因素,影响着他们的心理,加重了家庭负担。目前很多学者认为,老年性耳聋与耳蜗血管纹细胞、内外毛细胞萎缩及减少密切相关^[2]。而成熟毛细胞需要正常的血管纹功能和内淋巴的离子环境中存活,但是血管纹的存活与功能并不依赖柯蒂氏器的功能^[11]。由此可见,耳蜗血管纹细胞的萎缩是影响老年性耳聋的关键因素之一。但是,老年性耳聋在传统防治上并无太大进展,耳蜗血管纹细胞随着年龄增长,其凋亡机制尚未研究明确,目前也没有有效的药物或治疗方法能够逆转血管纹细胞的凋亡。

神经生长因子(NGF)是最早被发现、研究最深

的一种神经细胞调节因子,具有神经营养、神经保护和促进神经生长的作用。它对周围及中枢神经元的发育、分化、生长及再生的表达具有重要的调控作用^[12]。NGF结合酪氨酸受体 TrkA,引起胞内4条信号通路:Ras/Raf/Mek/Erk 蛋白激酶通路、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3-K)/Akt 激酶通路、磷脂酶 c (PLC- γ)通路以及 SNT^[13]。Ras/Raf/Mek/Erk 蛋白激酶信号通路是人类研究得最早及与人类密切相关的一条通路^[14-15]。其基本的信号传递及激活模式为^[16-18]:细胞外各种刺激因素可通过与受体结合激活 Ras;活化后与 Raf-1 结合,使其磷酸化,将磷酸化的产物传递给下游底物,先激活 MEK2/3,然后 MEK2/3 激活 MEK5,虽然 MEK5 并不被 Raf-1 磷酸化或活化,不过它最终参与了 Raf-1 的信号转导,最后激活 ERK5。ERK5 通过逐级的磷酸化作用引起 ERK5 分子的激活及核定位,活化下游因子,引起基因转录和表达,最终介导细胞的一系列反应。ERK5 被激活后其活化形式 p-ERK5 在介导细胞广泛的生物学效应中发挥重要作用^[18]。本研究结果显示:随着快速衰老小鼠月龄的增加,耳蜗血管纹细胞中 p-ERK5 的表达呈明显下降趋势,与之相对应的各月龄 SAMP8 小鼠的 ABR 反应阈呈上升趋势。推测 p-ERK5 可能参与维持耳蜗的功能状况,而且 NGF 与 TrkA 对于耳蜗功能状态维持有可能是通过激活 Ras/Raf/Mek/Erk 蛋白激酶通路实现的。

综上所述,p-ERK5 与耳蜗血管纹细胞的衰老及死亡有一定联系,p-ERK5 也可能存在于耳蜗内外毛细胞或耳蜗其他部位,但目前尚未有文献报道。Ras/Raf/Mek/Erk 信号通路与老年性耳聋的发病和防治分子机制仍有待进一步研究阐明,本实验为老年性耳聋分子机制的进一步阐明及其基因治疗提供了有价值的参考依据,有望对老年性耳聋的防治带来新思路 and 希望。

参考文献:

- [1] 刘强和,罗香林,耿宛平,等.快速衰老小鼠的听功能和耳蜗毛细胞的增龄性变化[J].华夏医学,2008,21(2):213-215.
- [2] Nelson EG, Hinojosa R. Presbycusis: a human temporal bone study of individuals with downward sloping audiometric patterns of hearing loss and review of the literature[J]. The Laryngoscope, 2006, 116(S112): 1-12.
- [3] 刘强和,黄鑫,王永宝,等.快速衰老小鼠耳蜗组织神经生长因子的增龄性变化[J].中国现代医学杂志,2011,21(27):3364-3367.
- [4] 刘强和,王永宝,王亮亮,等.神经生长因子在小鼠耳蜗中的表达分布及年龄相关性变化[J].重庆医学,2012,41(24):2457-2458.
- [5] 王翔,刘强和,王杰.快速衰老小鼠听功能及耳蜗组织神经生长因子受体酪氨酸激酶受体 A 的增龄性变化[J].实用医学杂志,2014,30(13):2038-2041.
- [6] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2015, 35(6): 600-604.
- [7] Chen X, Cai H, Chen Q, et al. Effects of Wenyangzhenshui Granule on ERK1/2 and ERK5 activity in the myocardial tissue in a rabbit model of adriamycin-induced chronic heart failure[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20732-20741.
- [8] 褚芹,于建春,潘建明,等.快速老化模型小鼠 SAMP8 行为学的增龄性变化[J].现代生物医学进展,2008,8(10):1801-1804.
- [9] 刘强和,罗香林,耿宛平,等.快速衰老小鼠的听功能和耳蜗螺旋神经元的增龄性变化[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(3):215-217.
- [10] Mackinnon JC, Huether P, Kalisch BE. Effects of Nerve Growth Factor and Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Amyloid Precursor Protein mRNA Levels and Protein Stability[J]. The Open Biochemistry Journal, 2012, 6(1):31-39.
- [11] 李轶,刘会占,龚树生,等.耳蜗毛细胞与血管纹的相互依存关系的研究[J].中华耳科学杂志,2014,12(3):475.
- [12] 黎柱杨,王春.鼠神经生长因子治疗突发性耳聋的临床观察[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2015,21(4):340-341.
- [13] Hirose M, Kuroda Y, Murata E, et al. NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain[J]. Pain Practice, 2015,16(2):175-182.
- [14] Xin L, Ma X, Xiao Z, et al. Coxsackievirus B3 induces autophagy in HeLa cells via the AMPK/MEK/ERK and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2015, 36(1): 46-54.
- [15] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007, 1773(8): 1263-1284.
- [16] Kiga M, Tanzawa F, Iwasaki S, et al. Antitumor effects of novel highly hydrophilic and non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, SMK-17[J]. Anti-cancer drugs, 2012, 23(1): 119-130.
- [17] Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CEP, et al. ERK5: structure, regulation and function[J]. Cellular signalling, 2012, 24(11): 2187-2196.
- [18] Nishimoto S, Nishida E. MAPK Signalling: Erk5 versus Erk1/2[J]. EMBO reports, 2006, 7(8): 782-786.

(收稿日期:2016-08-10)