

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202524213

· 耳科疾病专栏 ·

栀子苷调节 Nrf2/HO-1 信号通路 对急性中耳炎大鼠听力损伤的影响

易庆鹤, 刘闽, 董龙宝

(中国人民解放军海军特色医学中心 耳鼻咽喉科, 上海 200050)

摘要: **目的** 探讨栀子苷对急性中耳炎(AOM)大鼠听力损伤及核转录因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1(Nrf2/HO-1)信号通路的影响。**方法** 构建 AOM 大鼠模型,随机将实验大鼠分为对照组(Control 组)、AOM 组、栀子苷低、中、高剂量组(Geni-L、Geni-M、Geni-H 组)、栀子苷高剂量 + 通路抑制剂 ML385 组(Geni-H + ML385 组);各组大鼠进行听力检测;ELISA 检测血清炎症因子及氧化应激水平;HE 染色观察耳黏膜组织病理损伤;免疫印迹检测 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达。**结果** AOM 组较 Control 组中耳黏膜组织结构紊乱,耳黏膜细胞肿胀、脱落明显,炎性细胞浸润及纤维组织增生明显,黏膜厚度明显增厚,听觉脑干诱发电位(ABR)反应阈值、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)水平及 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1(KEAP1)表达升高,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)活性及 Nrf2、HO-1 表达降低($P < 0.05$);Geni-L、Geni-M、Geni-H 组较 AOM 组中耳黏膜组织病理症状减轻,黏膜肿胀程度及炎性细胞浸润减轻,黏膜厚度变薄,ABR 反应阈值、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平及 KEAP1 表达降低,SOD、GSH 活性及 Nrf2、HO-1 表达升高,Geni-H 组变化最明显($P < 0.05$);Geni-H + ML385 组较 Geni-H 组中耳黏膜组织病理症状加重,耳黏膜细胞肿胀、脱落明显,炎性细胞浸润及纤维组织增生加重,黏膜厚度增加,ABR 反应阈值、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平及 KEAP1 表达升高,SOD、GSH 活性及 Nrf2、HO-1 表达降低($P < 0.05$)。**结论** 栀子苷可改善 AOM 大鼠听力损伤,其作用机制与激活 Nrf2/HO-1 信号通路相关。

关键词: 急性中耳炎;听力损伤;栀子苷;核转录因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 信号通路
中图分类号: R764.21

Effect of geniposide regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway on hearing loss in rats with acute otitis media

YI Qinghe, LIU Min, DONG Longbao

(Department of Otorhinolaryngology, the Navy Special Medical Center of the People's Liberation Army of China, Shanghai 200050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of geniposide on hearing loss and nuclear transcription factor E2 related factor 2/ heme oxygenase-1 (Nrf2/HO-1) signaling pathway in rats with acute otitis media (AOM). **Methods** AOM rat model was constructed, and the experimental rats were randomly divided into control group, AOM group, Geni low-dose, medium-dose, and high-dose groups (Geni-L, Geni-M, Geni-H groups), and Geni high-dose + pathway inhibitor ML385 group (Geni-H + ML385 group). Rats in each group were subjected to hearing tests. Enzyme-linked immunosorbent assay was applied to detect serum inflammatory factors and oxidative stress level. HE staining was applied to observe pathological damage of ear mucosal tissue. Western blot was applied to detect the expressions of Nrf2/HO-1 signaling pathway related proteins. **Results** Compared with the control group, the middle ear mucosa in the AOM group was disorganized, with obvious swelling and shedding of ear mucosal cells, significant infiltration of inflammatory cells and proliferation of fibrous tissue, and significantly thickened mucosal thickness. Meanwhile, the auditory brainstem response threshold, levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA), and expression of Kelch-like epichlorohydrin-associated protein-1 (KEAP1) were elevated, the activities of superoxide

dismutase (SOD) and glutathione (GSH), and the expression of Nrf2 and HO-1 were reduced ($P < 0.05$). Compared with the AOM group, the pathological symptoms of the middle ear mucosal tissue in the Geni-L, Geni-M, and Geni-H groups were reduced, the degree of mucosal swelling and inflammatory cell infiltration were reduced, the mucosal thickness became thinner, and the ABR response threshold, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA and expression of KEAP1 were decreased, the activities of SOD and GSH and the expressions of Nrf2 and HO-1 were increased, with the most obvious changes observed in the Geni-H group ($P < 0.05$). The pathological symptoms of the middle ear mucosal tissue in the Geni-H + ML385 group were aggravated compared to the Geni-H group, with obvious swelling and shedding of ear mucosal cells, increased inflammatory cell infiltration and fibrous tissue proliferation and increased mucosal thickness, the ABR response threshold, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA and expression of KEAP1 were elevated, the activities of SOD and GSH, and the expressions of Nrf2 and HO-1 were reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Geniposide can improve hearing loss in AOM rats, and its mechanism is related to the activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Keywords: Acute otitis media; Hearing loss; Geniposide; Nuclear transcription factor E2 related factor 2/heme oxygenase-1 signaling pathway

急性中耳炎(acute otitis media, AOM)属于细菌感染性疾病,是中耳炎的一种,其主要表现为耳痛、发烧、听力丧失等,由于儿童尤其是3岁以下幼儿免疫系统发育不完善、抵抗力弱及儿童咽鼓管解剖结构的特殊性等,导致AOM发病率居高不下,再者其发作迅速且极易反复,导致大部分儿童具有不同程度听力障碍,进而影响语言发育、社交技能及认知能力^[1-2]。目前主要通过抗生素进行治疗,但随着抗生素的大量使用,导致耐药菌株增多,抗生素耐药现象加剧。为降低AOM的发病率,寻求新的预防治疗AOM的有效药物极为迫切。栀子苷是中药栀子的主要活性成分,属于环烯醚萜类化合物,具有镇痛抗炎、抗氧化、抗内毒素、降糖、保护脑血管等多种药理作用,其中栀子苷可直接结合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),降低血清内毒素水平,对脓毒症模型小鼠发挥明显的保护作用^[3]。核转录因子E2相关因子2/血红素加氧酶-1(nuclear transcription factor E2 related factor 2/heme oxygenase-1, Nrf2/HO-1)信号通路在多种炎症、氧化应激反应相关疾病中发挥重要作用,研究显示,激活Nrf2/HO-1信号通路可促进抗氧化剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,减少LPS引起的活性氧的产生,发挥抗炎和抗氧化作用,减轻小鼠AOM^[4]。栀子苷能否通过调控Nrf2/HO-1信号通路调控AOM大鼠听力损伤尚未可知,本研究主要探索栀子苷对AOM大鼠听力损伤及Nrf2/HO-1信号通路的影响,为AOM预防治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 主要材料

8周龄SPF级SD大鼠购自上海斯莱克实验动

物有限责任公司,生产许可号为SCXK(沪)2022-0004;栀子苷(HPLC $\geq 98\%$, D1773)购自上海宝曼生物科技有限公司;ML385(Nrf2抑制剂, HY-100523)购自MedChemExpress公司;白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、ELISA试剂盒(ER008-16、ER003-48、ER006)购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、SOD ELISA试剂盒(YLK-E3495D、YLK-E3496D)购自优利科(上海)生命科学有限公司;谷胱甘肽(glutathione, GSH) ELISA试剂盒(CD-108890-EA)购自武汉纯度生物科技有限公司;Nrf2、HO-1、KEAP1(10-P1828、SPC-211D-HRP、10-P1658)抗体购自北京达科为生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 AOM大鼠模型构建 各组大鼠适应性喂养1周,耳镜检查所有大鼠,确保鼓膜正常,无中耳积液,随后麻醉大鼠,将1.0 mg/mL LPS通过鼓膜注入双侧中耳腔,建立急性中耳炎动物模型^[5]。所有大鼠均饲养于上海斯莱克实验动物有限责任公司SPF级动物房。经上海斯莱克实验动物有限责任公司动物伦理委员会批准。

1.2.2 分组及处理 随机将实验大鼠分为对照组(Control组)、AOM组、栀子苷低、中、高剂量组(Geni-L、Geni-M、Geni-H组)、栀子苷高剂量+通路抑制剂ML385组(Geni-H + ML385组);Geni-L、Geni-M、Geni-H组^[3]:给予7、14、28 mg/kg栀子苷腹腔注射,注射剂量根据大小鼠之间剂量换算而得;Geni-H + ML385组^[6]:给予28 mg/kg栀子苷及30 mg/kg ML385腹腔注射;Control组与AOM组腹腔注射与Geni-L、Geni-H组等量生理盐水,给药持续7 d。

1.2.3 听力检测 给药结束,检测大鼠听觉脑干诱

发电位(auditory brainstem evoked potential, ABR)反应阈值以检测听功能,先将大鼠麻醉后置于隔声屏蔽室,电位仪记录电极插入颅顶正中,参考电极及接地电极分别插入给声耳后皮下及对侧耳后皮下,并在给声耳道口 0.5 cm 处放置扬声器,进行每秒 10 次100~3 000 Hz,叠加 512 次滤波短声刺激,最后以Ⅲ波为基准,10 ms 扫描时程,记录 ABR 反应阈值。

1.2.4 炎症因子及氧化应激水平检测 听力测试结束,麻醉处死大鼠,取腹主动脉血,离心后取上清液,ELISA 试剂盒检测血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA、SOD、GSH 水平。取血同时取出中耳黏膜组织,清洗后冰箱冻存待用。

1.2.5 耳黏膜组织病理损伤观察 各组任取 6 个冻存的中耳黏膜组织,甲醛固定,常规石蜡包埋切片,随后再脱蜡、苏木精-伊红染色(HE)、脱水透明封片,光学显微镜观察切片组织病理变化并测量中耳黏膜厚度。

1.2.6 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达 将各组剩余 6 个中耳黏膜组织,与蛋白裂解液充分研磨反应,提取总蛋白定量,取适量蛋白变性,电泳分离,再转膜封闭,将膜与 Nrf2、HO-1、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein-1, KEAP1)一抗共反应,次日与 HRP 标记二抗共反应,ECL 曝光显影,分析蛋白条带灰度值并进行定量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 栀子苷对 AOM 大鼠听力的影响

AOM 组较 Control 组 ABR 反应阈值升高($t = 71.2, P < 0.05$);Geni-L、Geni-M、Geni-H 组较 AOM 组 ABR 反应阈值降低,Geni-H 组变化最明显($t = 23.65, P < 0.05$; $t = 46.47, P < 0.05$; $t = 67.67, P < 0.05$);Geni-H + ML385 组较 Geni-H 组 ABR 反应阈值升高($t = 39.09, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 ABR 反应阈值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	ABR
Control 组	23.17 ± 1.64
AOM 组	72.64 ± 3.11 ^a
Geni-L 组	56.21 ± 2.79 ^b
Geni-M 组	40.35 ± 2.26 ^{bc}
Geni-H 组	25.62 ± 1.79 ^{bed}
Geni-H + ML385 组	52.78 ± 2.51 ^e

注:^a与 Control 组比较, $P < 0.05$; ^b与 AOM 组比较, $P < 0.05$; ^c与 Geni-L 组比较, $P < 0.05$; ^d与 Geni-M 组比较, $P < 0.05$; ^e与 Geni-H 组比较, $P < 0.05$; ABR(听觉脑干诱发电位); AOM(急性中耳炎)。下同。

2.2 栀子苷对 AOM 大鼠炎症因子水平的影响

AOM 组较 Control 组 IL-1β($t = 60.12, P < 0.05$)、IL-6($t = 74.46, P < 0.05$)、TNF-α($t = 76.07, P < 0.05$)水平升高;Geni-L、Geni-M、Geni-H 组较 AOM 组 IL-1β($t = 15.94, P < 0.05$; $t = 32.48, P < 0.05$; $t = 51.98, P < 0.05$)、IL-6($t = 18.16, P < 0.05$; $t = 38.19, P < 0.05$; $t = 61.15, P < 0.05$)、TNF-α($t = 22.40, P < 0.05$; $t = 46.45, P < 0.05$; $t = 72.07, P < 0.05$)水平降低,Geni-H 组变化最明显;Geni-H + ML385 组较 Geni-H 组 IL-1β($t = 29.29, P < 0.05$)、IL-6($t = 35.01, P < 0.05$)、TNF-α($t = 41.87, P < 0.05$)水平升高。见表 2。

表 2 各组大鼠炎症因子水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
Control 组	80.33 ± 5.47	102.54 ± 8.59	35.49 ± 1.28
AOM 组	213.56 ± 9.56 ^a	326.17 ± 12.53 ^a	106.57 ± 4.86 ^a
Geni-L 组	178.24 ± 8.33 ^b	271.63 ± 11.18 ^b	85.64 ± 3.97 ^b
Geni-M 组	141.58 ± 7.61 ^{bc}	211.48 ± 10.06 ^{bc}	63.17 ± 2.85 ^{bc}
Geni-H 组	98.37 ± 6.52 ^{bed}	142.51 ± 9.24 ^{bed}	39.23 ± 1.74 ^{bed}
Geni-H + ML385 组	163.28 ± 7.90 ^e	247.65 ± 10.35 ^e	78.35 ± 3.27 ^e

注:^a与 Control 组比较, $P < 0.05$; ^b与 AOM 组比较, $P < 0.05$; ^c与 Geni-L 组比较, $P < 0.05$; ^d与 Geni-M 组比较, $P < 0.05$; ^e与 Geni-H 组比较, $P < 0.05$; IL-1β(白细胞介素-1β); IL-6(白细胞介素-6); TNF-α(肿瘤坏死因子-α)。

2.3 栀子苷对 AOM 大鼠氧化应激水平的影响

AOM 组较 Control 组 MDA($t = 5.50, P < 0.05$)含量升高,SOD($t = 46.89, P < 0.05$)、GSH($t = 9.67, P < 0.05$)活性降低;Geni-L、Geni-M、Geni-H 组较 AOM 组 MDA($t = 1.63, P < 0.05$; $t = 3.31, P < 0.05$; $t = 5.02, P < 0.05$)含量降低,SOD($t = 13.15, P < 0.05$; $t = 27.60, P < 0.05$; $t = 43.25, P < 0.05$)、GSH($t = 2.47, P < 0.05$; $t = 5.09, P < 0.05$; $t = 8.11,$

$P < 0.05$) 活性升高, Geni-H 组变化最明显; Geni-H + ML385 组较 Geni-H 组 MDA ($t = 2.75, P < 0.05$) 含量升高, SOD ($t = 19.11, P < 0.05$)、GSH ($t = 4.92, P < 0.05$) 活性降低。见表 3。

表 3 各组大鼠氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD(U/mL)	GSH($\mu\text{mol/L}$)
Control 组	1.01 $\pm$ 0.63	71.87 $\pm$ 4.89	7.36 $\pm$ 2.88
AOM 组	2.39 $\pm$ 1.02 ^a	19.64 $\pm$ 2.67 ^a	1.72 $\pm$ 0.92 ^a
Geni-L 组	1.98 $\pm$ 0.95 ^b	34.29 $\pm$ 3.15 ^b	3.16 $\pm$ 1.48 ^b
Geni-M 组	1.56 $\pm$ 0.83 ^{bc}	50.38 $\pm$ 3.86 ^{bc}	4.69 $\pm$ 1.91 ^{bc}
Geni-H 组	1.13 $\pm$ 0.74 ^{bcd}	67.81 $\pm$ 4.52 ^{bcd}	6.45 $\pm$ 2.55 ^{bcd}
Geni-H + ML385 组	1.82 $\pm$ 0.98 ^e	46.53 $\pm$ 3.61 ^e	3.58 $\pm$ 1.73 ^e

注:^a 与 Control 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 AOM 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 Geni-L 组比较, $P < 0.05$; ^d 与 Geni-M 组比较, $P < 0.05$; ^e 与 Geni-H 组比较, $P < 0.05$; MDA (丙二醛); SOD (超氧化物歧化酶); GSH (谷胱甘肽)。

2.4 栀子苷对 AOM 大鼠中耳黏膜组织病理损伤的影响

Control 组中耳黏膜组织正常呈暗红色, 无病理损伤改变; AOM 组较 Control 组中耳黏膜组织结构紊乱, 耳黏膜细胞肿胀、脱落明显, 炎性细胞浸润及纤维组织增生明显, 黏膜厚度较 Control 组明显增加 ($t = 62.84, P < 0.05$); Geni-L、Geni-M、Geni-H 组较 AOM 组中耳黏膜组织病理症状减轻, 黏膜肿胀程度及炎性细胞浸润减轻, 黏膜厚度变薄 ($t = 18.26, P < 0.05; t = 37.35, P < 0.05; t = 58.33, P < 0.05$), Geni-H 组变化最明显; Geni-H + ML385 组较 Geni-H 组中

耳黏膜组织病理症状加重, 耳黏膜细胞肿胀、脱落明显, 炎性细胞浸润及纤维组织增生加重, 黏膜厚度增加 ($t = 34.58, P < 0.05$)。见图 1、表 4。

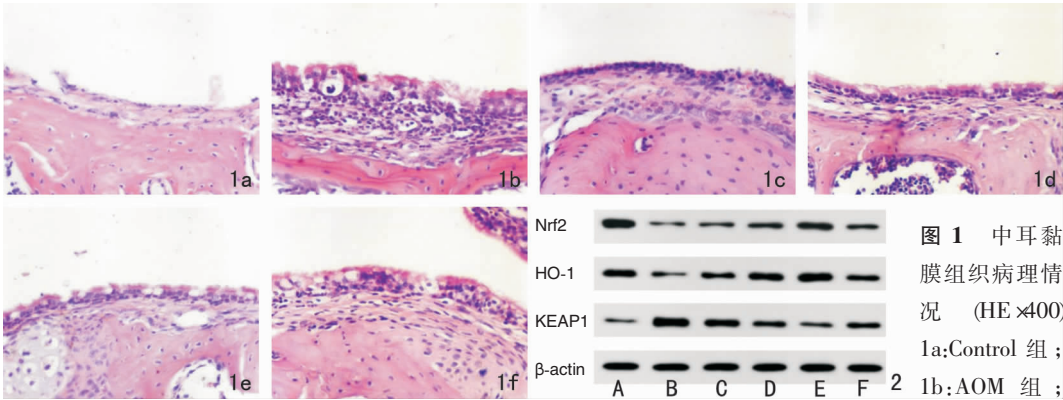
表 4 各组大鼠中耳黏膜厚度比较 ($\mu\text{m}, \bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	中耳黏膜厚度
Control 组	38.69 $\pm$ 2.54
AOM 组	163.57 $\pm$ 6.89 ^a
Geni-L 组	127.28 $\pm$ 5.77 ^b
Geni-M 组	89.34 $\pm$ 4.32 ^{bc}
Geni-H 组	47.65 $\pm$ 3.16 ^{bcd}
Geni-H + ML385 组	116.37 $\pm$ 5.13 ^e

注:^a 与 Control 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 AOM 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 Geni-L 组比较, $P < 0.05$; ^d 与 Geni-M 组比较, $P < 0.05$; ^e 与 Geni-H 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 栀子苷对 Nrf2/HO-1 信号通路的影响

AOM 组较 Control 组 Nrf2 ($t = 42.35, P < 0.05$)、HO-1 ($t = 18.87, P < 0.05$) 表达降低, KEAP1 ($t = 34.89, P < 0.05$) 表达升高; Geni-L、Geni-M、Geni-H 组较 AOM 组 Nrf2 ($t = 6.62, P < 0.05; t = 18.53, P < 0.05; t = 31.32, P < 0.05$)、HO-1 ($t = 5.44, P < 0.05; t = 11.51, P < 0.05; t = 17.91, P < 0.05$) 表达升高, KEAP1 ($t = 11.50, P < 0.05; t = 22.60, P < 0.05; t = 33.31, P < 0.05$) 表达降低, Geni-H 组变化最明显; Geni-H + ML385 组较 Geni-H 组 Nrf2 ($t = 20.73, P < 0.05$)、HO-1 ($t = 10.87, P < 0.05$) 表达降低, KEAP1 ($t = 19.03, P < 0.05$) 表达升高。见图 2、表 5。



1c: Geni-L 组; 1d: Geni-M 组; 1e: Geni-H 组; 1f: Geni-H+ML385 组

图 2 Western blot 检测 Nrf2、HO-1、KEAP1 表达 注: A 为 Control 组; B 为 AOM 组; C 为 Geni-L 组; D 为 Geni-M 组; E 为 Geni-H 组; F 为 Geni-H+ML385 组; Nrf2 (核转录因子 E2 相关因子 2); HO-1 (血红素加氧酶-1); KEAP1 (Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1)。下同。

表 5 各组大鼠 Nrf2/HO-1 信号通路
相关蛋白比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Nrf2	HO-1	KEAP1
Control 组	1.19 ± 0.08	0.99 ± 0.10	0.33 ± 0.03
AOM 组	0.23 ± 0.02 ^a	0.40 ± 0.04 ^a	1.21 ± 0.09 ^a
Geni-L 组	0.38 ± 0.04 ^b	0.57 ± 0.06 ^b	0.92 ± 0.07 ^b
Geni-M 组	0.65 ± 0.06 ^{bc}	0.76 ± 0.08 ^{bc}	0.64 ± 0.05 ^{bc}
Geni-H 组	0.94 ± 0.07 ^{bcd}	0.96 ± 0.10 ^{bcd}	0.37 ± 0.04 ^{bcd}
Geni-H + ML385 组	0.47 ± 0.04 ^e	0.62 ± 0.06 ^e	0.85 ± 0.07 ^e

注: ^a 与 Control 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 AOM 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 Geni-L 组比较, $P < 0.05$; ^d 与 Geni-M 组比较, $P < 0.05$; ^e 与 Geni-H 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

AOM 是儿童引起听力障碍的主要原因之一,主要是由感冒等上呼吸道感染诱发,又因其治疗缓慢且易反复,导致病情延长发展为慢性中耳炎,进一步造成儿童听力、语言、社交认知障碍,严重影响患者身心健康^[7-8]。目前对于 AOM 治疗尚无特效药物,治疗 AOM 已成为全球性问题,寻求有效治疗药物是当前 AOM 的研究重点。了解 AOM 的发病机制根据其致病机理寻求特效药物至关重要。LPS 作为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,其可通过激活炎症细胞释放促炎介质,参与感染性疾病发展,其中 LPS 可通过刺激耳蜗促进炎症细胞浸润,促使内外毛细胞肿胀变性凋亡,及促使内毛细胞释放大谷氨酸,产生兴奋性神经毒性,加剧听力损伤^[9-10]。而栀子苷是传统中草药栀子主要活性成分环烯醚萜类化合物的代表,具有抗菌抑炎、抗感染、抗氧化、免疫调节等多种药理活性,尤其在感染性疾病方面得到广泛应用^[11]。研究显示,栀子苷可通过中和 LPS,减少炎症因子释放和细胞死亡,抑制 LPS 诱导细胞炎症^[12]。本研究以 LPS 诱导建立 AOM 大鼠模型,通过检测各组大鼠听力及炎症、氧化应激反应,以探索栀子苷的治疗效果。结果显示,栀子苷可降低 ABR 反应阈值,减轻炎性细胞浸润及纤维组织增生,减少黏膜增厚,改善 AOM 大鼠听力损伤。

炎症与氧化应激反应是引起 AOM 的主要病理基础,抑制炎症和氧化应激反应对于改善 AOM 至关重要。已知 IL-6、TNF- α 可通过抑制 T 淋巴细胞活性,参与机体免疫应答,诱发炎性反应及自身免疫性疾病,IL-1 β 也可通过与其他生长因子相互调节制约,共同发挥免疫调节作用,参与 AOM 疾病的发展^[13-15]。研究显示,促进 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达,

可促进 AOM 的发生^[16]。抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,可抑制炎症反应,对分泌性中耳炎大鼠发挥保护作用^[17]。当耳遭到刺激,活性氧含量升高,导致脂质过氧化产物大量增多,MDA 作为典型脂质过氧化物代表之一,其含量随之升高,而具有抗氧化活性的酶 SOD、GSH 等活性降低,清除氧自由基的能力下降,导致氧化与抗氧化严重失衡,氧化应激反应增强,进而加重 AOM 发展。研究显示,降低 IL-6、MDA 水平可减轻机体炎症反应及氧化应激反应,改善化脓性中耳炎合并真菌感染患者听力功能^[18]。降低 MDA、TNF- α 水平,升高 SOD 活力,可抑制耳蜗组织炎症反应及氧化应激反应,改善 LPS 所致大鼠听力损伤^[19]。本文研究结果显示,栀子苷可降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,抑制炎症反应,同时可降低 MDA 含量,提高 SOD、GSH 等抗氧化酶活性,抑制氧化应激反应,保护 LPS 所致大鼠听力损伤。

Nrf2/HO-1 信号通路参与中耳炎的发展并在其中发挥重要作用,在正常生理情况下, Nrf2 与 KEAP1 在细胞质结合不参与反应,一旦机体受到氧化应激刺激, Nrf2 与 KEAP1 分离,并转移进入细胞核, Nrf2 被激活后可与靶基因启动子中的抗氧化反应元件序列结合,促使细胞内编码抗氧化酶的基因激活,促进 NADH 醌氧化还原酶、HO-1 等抗氧化酶及其他参与细胞防御机制蛋白的产生,进而抑制氧化应激反应^[20]。研究显示,激活 Nrf2 信号通路可抑制氧化应激及炎症反应,保护成骨细胞免受氧化应激诱导的功能障碍^[21]。恢复炎症巨噬细胞中 Nrf2 表达,可抑制促炎因子水平及氧化水平,预防 AOM 向慢性中耳炎的转变^[22]。另外栀子苷可通过降低 Nrf2 磷酸化降解途径,改善牙周病大鼠牙槽骨吸收及炎症反应进程^[23]。本文研究结果显示,栀子苷可升高 Nrf2、HO-1 表达,降低 KEAP1 表达,改善 LPS 所致 AOM 大鼠听力损伤,推测其可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路而发挥作用。在栀子苷高剂量处理的基础上进行 Nrf2 通路抑制剂 ML385 处理,发现 Nrf2、HO-1 表达下调, KEAP1 表达上调,说明栀子苷可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善 AOM 大鼠听力水平。

综上所述,栀子苷可改善 AOM 大鼠听力损伤,其作用机制与激活 Nrf2/HO-1 信号通路相关。本研究仍存在局限性,栀子苷对 AOM 及 Nrf2/HO-1 信号通路的作用机理尚不清楚,仍需进一步实验验证。

参考文献:

[1] Otteson T. Otitis media and tympanostomy tubes[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2022, 69(2):203–219.

[2] Parrino D, Val M, Lovato A, et al. Pediatric temporomandibular joint ankylosis and arthritis: Forgotten complications of acute otitis media[J]. *Am J Otolaryngol*, 2022, 43(5):103599.

[3] Zheng X, Yang D, Liu X, et al. Identification of a new anti-LPS agent, geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, and its ability of direct binding and neutralization of lipopolysaccharide in vitro and in vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(10):1209–1219.

[4] Guo H, Li M, Xu LJ. Apigenin treatment attenuates LPS-induced acute otitis media through suppressing inflammation and oxidative stress[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:1978–1987.

[5] Rao Y, Zhong D, Qiu K, et al. Single-cell transcriptome profiling identifies phagocytosis-related dual-feature cells in a model of acute otitis media in rats[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:760954.

[6] Dang R, Wang M, Li X, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1):41.

[7] Lee HH, Chin A, Pak K, et al. Role of the PI3K/AKT pathway and PTEN in otitis media[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 387(1):111758.

[8] 张萃, 蒋正举, 吴应玲, 等. 柴胡皂苷 D 调节 Th1/Th2 平衡对小鼠急性中耳炎的治疗作用及其机制研究[J]. *中医药导报*, 2023, 29(2):24–27,34.

[9] Zhou QQ, Dai YH, Du XP, et al. Aminophylline restores glucocorticoid sensitivity in a guinea pig model of sudden sensorineural hearing loss induced by lipopolysaccharide[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2736.

[10] Fernandez KA, Watabe T, Tong M, et al. Trk agonist drugs rescue noise-induced hidden hearing loss[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(3):e142572.

[11] 卜妍红, 吴虹, 孙明慧, 等. 栀子化学成分及药理作用研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(6):89–93.

[12] 游丽娇, 杨小芳, 耿欢, 等. 基于 Caspase-1 细胞焦亡信号通路探讨栀子苷对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(13):1574–1578.

[13] Alam MS, Otsuka S, Wong N, et al. TNF plays a crucial role in inflammation by signaling via T cell TNFR2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(50):e2109972118.

[14] Liu S, Guo L, Chen M, et al. Evaluation of caspase-1, interleukin-1 β , and interleukin-18, in the middle ear effusion in children with otitis media with effusion[J]. *Front Pediatr*, 2021, 9:732973.

[15] Cetinkaya EA, Ciftci O, Alan S, et al. The efficacy of hesperidin for treatment of acute otitis media[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2019, 46(2):172–177.

[16] 闫晶晶, 邓安春, 朱先柏, 等. 急性中耳炎中 IL-27 通过信号通路 PI3K 对肺炎链球菌清除的影响[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2021, 27(4):408–413.

[17] 王月田, 刘鑫国, 杨愚. 槲皮素调控 p38 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号通路对大鼠分泌性中耳炎的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(4):672–678.

[18] 洪伟, 蔡福果, 刘慧娟, 等. 氟康唑注射液治疗化脓性中耳炎合并真菌感染的随机对照研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(13):1977–1981.

[19] 高雅倩, 马诗经, 唐健, 等. 葎萆提取物的抗氧化活性及改善 LPS 所致大鼠听力损伤的作用研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2023, 31(2):154–159.

[20] Wang L, He C. Nrf2-mediated anti-inflammatory polarization of macrophages as therapeutic targets for osteoarthritis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:967193.

[21] Li X, Chen Y, Mao Y, et al. Curcumin Protects Osteoblasts From Oxidative Stress-Induced Dysfunction via GSK3 β -Nrf2 Signaling Pathway[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8:625.

[22] Fan W, Xu H, Shen C, et al. Nrf2 orchestrates transition from acute to chronic otitis media through inflammatory macrophages[J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1170388.

[23] 山玲莉, 王振宇, 高永红. 栀子苷对牙周病大鼠 GSK3 β /Nrf2 通路及牙槽骨丢失的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(7):1711–1715.

(收稿日期:2024–06–11)

本文引用格式:易庆鹤,刘闽,董龙宝. 栀子苷调节 Nrf2/HO-1 信号通路对急性中耳炎大鼠听力损伤的影响[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2025, 31(2):24–29. DOI:10.11798/j.issn.1007–1520.202524213

Cite this article as:YI Qinghe, LIU Min, DONG Longbao. Effect of geniposide regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway on hearing loss in rats with acute otitis media[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2025, 31(2):24–29. DOI:10.11798/j.issn.1007–1520.202524213