

聪耳通窍剂经 NEFM/MAPK 通路对抗小鼠老年性耳蜗感音神经细胞凋亡机制的探讨

宣伟军^{1,2}, 文艺群³, 黄力毅⁴, 唐俊波³, 陈思仲², 陆灵娟³, 丁大连^{1,2,5}

(1. 广西中医药大学第一临床医学院 耳鼻咽喉科, 广西 南宁 530023; 2. 广西国际壮医医院 耳鼻咽喉头颈外科, 广西 南宁 530201; 3. 广西中医药大学研究生院, 广西 南宁 530200; 4. 广西医科大学第一附属医院 感染科, 广西 南宁 530021; 5. 纽约州立布法罗大学 耳聋与听力中心, 纽约 布法罗 14214)

摘要: **目的** 探讨聪耳通窍剂通过调控 C57BL/6J 小鼠耳蜗神经丝中链多肽(NEFM)/丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)信号转导对抗老年性耳蜗感音神经细胞凋亡的机制。**方法** 实验选取刚断奶 1 月龄 C57BL/6J 小鼠 54 只, 随机分为 3 组, 其中 10 只小鼠饮用自来水至出生后 2 个月作为幼龄对照组(2 月龄对照组); 22 只小鼠饮用自来水至出生后 7 个月作为老年性耳蜗感音神经细胞凋亡模型对照组(7 月龄对照组); 22 只小鼠饮用聪耳通窍剂至出生后 7 个月作为中药治疗组(7 月龄中药组)。各组小鼠月龄期满即终止实验, 每组分别取 5 只小鼠进行全耳蜗基底膜铺片观察内/外毛细胞形态学, 5 只小鼠进行耳蜗环氧树脂包埋切片观察螺旋神经节神经元(SGNs)形态学。另从 7 月龄对照组和 7 月龄中药组中每组各取 6 只小鼠耳蜗通过蛋白质组学技术检测 NEFM 丰度值, 6 只小鼠耳蜗通过 RT-PCR 技术检测 MAPK14 表达量。将数据结果进行统计学分析, 并结合 String 和 KEGG 数据库分析分子信号转导机制。**结果** 各组耳蜗钩端附近区域基底膜转弯处内/外毛细胞及相应区域耳蜗 SGNs 比较显示, 2 月龄对照组耳蜗内/外毛细胞及 SGNs 完好无缺, 7 月龄对照组内/外毛细胞及 SGNs 丧失殆尽, 7 月龄中药组内/外毛细胞及 SGNs 损失明显减少($P < 0.001$)。蛋白质组学研究发现众多富集差异蛋白之一且表达强度排序前列的耳蜗 NEFM 在中药干预下, 与 7 月龄对照组比较, 丰度值显著增加($P < 0.001$)。RT-PCR 研究显示, 与 7 月龄对照组比较, 7 月龄中药组耳蜗 MAPK14 表达量明显下调($P < 0.001$)。NEFM 与 MAPK14 介导的 MAPK 信号转导通路和超氧化物歧化酶 1(SOD1)介导的抗氧化信号转导通路密切相关, 进而和活性氧(ROS)/Bcl-2/Bax/caspase-9 等与细胞凋亡或抗凋亡因子形成上下信号转导调控相互关系。**结论** 聪耳通窍剂具有对抗老年性耳蜗感音神经细胞凋亡的作用, 其机制可能通过 NEFM/MAPK14 调控 SOD1/ROS 介导的抗细胞凋亡信号转导通路从而达到药物效果, 提示 NEFM 和 MAPK14 可能是聪耳通窍剂有效对抗老年性感音神经细胞凋亡作用的重要靶点之一。

关键词: 老年性聋; 耳蜗; 小鼠; 神经丝中链多肽; 丝裂原活化蛋白激酶 14; 中药
中图分类号: R764.43⁺1

Investigation on mechanism of Cong'er-Tong' qiao agent against age-related cochlear sensorineural apoptosis in mice via NEFM/MAPK pathway

XUAN Weijun^{1,2}, WEN Yiqun³, HUANG Liyi⁴, TANG Junbo³, CHEN Sizhong², LU Lingjuan³, DING Dalian^{1,2,5}
(1. Department of Otorhinolaryngology, the First Clinical Medical College of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530201, China; 3. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 4. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 5. Center for Hearing Deafness, the State University of New York at Buffalo, NY 14214, USA)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Cong'er-Tong' qiao agent (CTA) against age-related

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973913, 81774374, 81373700, 81260552)。
第一作者简介: 宣伟军, 男, 博士, 教授。
通信作者简介: 陆灵娟, 女, 副主任医师; 唐俊波, 男, 主管技师; 宣伟军, 男, 博士, 教授。

cochlear sensorineural apoptosis in the C57BL/6J mice by regulating neurofilament medium polypeptide (NEFM)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Methods** Fifty-four C57BL/6J mice at 1 month of age were selected for the experiment. Among them, 10 mice drank tap water until two months after birth as the young control group (2M control group). Twenty-two mice drank tap water until 7 months after birth as the control group of the age-related cochlear sensorineural apoptotic model (7M control group). Twenty-two mice were given the CTA until 7 months after birth as the CTA treating group (7M CTA group). After the expiration of the animal experiments in each group, five animals in each group were used for whole cochlear basilar membrane spread preparations to observe the morphology of inner and outer hair cells, and five animals were used for cochlear epoxy resin embedding and sectioning to observe the morphology of spiral ganglion neurons (SGNs). In addition, from the 7M control group and the 7M CTA group, the cochlear samples of 6 animals were selected from each group to detect the abundance value of NEFM through proteomics technology, and the expression level of MAPK14 was detected in 6 animals' cochleae through real time PCR (RT-PCR) technology. The data were subjected to statistical analysis, and the molecular signal transduction mechanism was analyzed in combination with the String and Kegg databases. **Results** By comparison of inner and outer hair cells at basal turn near hook region or SGNs at corresponding region in each group, it was shown that all the inner and outer hair cells and SGNs were intact in the 2M control group, while almost all the inner and outer hair cells or SGNs were missing in the 7M control group, but the losses of the inner and outer hair cells and SGNs were significantly reduced in the 7M CTA group ($P < 0.001$). Proteomic studies revealed that NEFM, one of the abundant enrichment proteins with significant differences and at the top in rank of expression intensity, was significantly increased in abundance after intervention with CTA in the 7M CTA group, compared to the 7M control group ($P < 0.001$). The RT-PCR study showed that, compared with the 7M control group, the expression level of cochlear MAPK14 in the 7M CTA group was significantly decreased ($P < 0.001$). The MAPK signaling pathway mediated by NEFM and MAPK14 was closely related to the antioxidant signaling pathway mediated by superoxide dismutase 1 (SOD1), and subsequently formed an up-down signal transduction regulatory interrelationship with reactive oxygen species (ROS)/Bcl-2/Bax/caspase-9 and other factors related to apoptosis or anti-apoptosis. **Conclusions** The CTA has the effect of combating age-related sensorineural apoptosis. The mechanism may be that NEFM/MAPK14 regulate the SOD1/ROS-mediated signaling pathway of anti-apoptosis to achieve pharmacodynamic effect. It suggests that NEFM and MAPK14 may be one of the important targets of CTA on effectively resisting age-related sensorineural apoptosis.

Keywords: Presbycusis; Cochlea; Mouse; NEFM; MAPK14; Traditional Chinese medicine

前期研究表明,聪耳通窍剂具有显著对抗豚鼠庆大霉素耳毒性聋作用^[1],为了研究和揭示聪耳通窍剂对抗老年性耳蜗感音神经细胞凋亡药效作用与机制,采用国产 C57BL/6J 小鼠作为老年性耳蜗感音神经细胞凋亡动物模型,在聪耳通窍剂干预下,通过全耳蜗铺片和切片,观察和了解其对耳蜗内/外毛细胞、螺旋神经节神经元 (spiral ganglion neurons, SGNs) 的影响作用。利用蛋白质组学技术检测耳蜗神经丝中链多肽 (neurofilament medium polypeptide, NEFM) 影响作用,利用 RT-PCR 技术检测丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14) 影响作用,结合 String 和 KEGG 数据库检索分析它们的分子信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择 SPF 级 1 月龄刚断奶国产健

康 C57BL/6J 小鼠 54 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 聪耳通窍剂组成和制备同文献报道^[1],即主要由黄芪、葛根、骨碎补、女贞子、丹参等组成。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》^[2]小鼠与成人用量换算法计算出该药的小鼠用量为 $3.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.1.3 蛋白质组学研究主要试剂和仪器 选择 Thermo Scientific 公司提供的 TMT10 标记试剂盒、质谱级乙腈、质谱水、BCA 试剂盒、异丙醇;ThermoFisher 公司提供的羟胺;生工生物工程股份有限公司提供的 PMSF、40% Acr-Bis、Tris-HCl/pH6.8/pH8.8、APS、TEMED、Tris、DTT、溴酚蓝、TFA、IAA、

G-250;SIGMA 提供的 TEAB;国药集团化学试剂有限公司提供的甘氨酸、SDS;碧云天生物技术研究所提供的 SDS 裂解液;北京华利世科技有限公司提供的胰酶。

选择 Thermo Fisher 公司提供的 Q Exactive 质谱仪(型号:IQLAAEGAAPFALGMBDK)、Easy-nLC 1200 液相系统(型号:Easy-nLC 1200)、Orbitrap Fusion(型号:IQLAAEGAAPFADBMBXC)、Q Exactive HF(型号:IQLAAEGAAPFALGMBFZ);Agilent 公司提供的高 pH 分离液相色谱仪(型号:Agilent 1100 series)。

1.1.4 RT-PCR 主要试剂和仪器 荧光定量 PCR 引物设计在 NCBI 数据库查找相关序列,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。选择 Axygen 公司提供的总 RNA 抽提试剂盒;上海索莱宝生物科技有限公司提供的 GoldView I 型核酸染色剂;大连宝生物工程有限公司提供的 mRNA 合成单链扩增逆转录试剂盒;弗德生物公司提供的蛋白磷酸酶抑制剂混合物、BCA 蛋白定量试剂盒、中强度 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、100 mM PMSF;Macklin 公司提供的甘氨酸、过硫酸铵、N,N-甲叉双丙烯酰胺;Vetec 公司提供的 Tris-base;Millipore 公司提供的 PDVF 膜;Fermentas 公司提供的预染蛋白标志物;Amresco 公司提供的 SDS;Abcam 公司提供的一抗(Anti-ASK1 antibody、Anti-TRX antibody、Anti-Caspase-3 antibody);Jackson 公司提供二抗(Hrp-Goat Anti-Rabbit IgG、HRP-Goat Anti-Mouse IgG)。

采用美国 Bio-Rad RT-PCR 检测系统-MyiQ5 RT-PCR Detection System;选择南京华东电子集团医疗装备有限责任公司提供的多功能酶标仪(型号:DG5033A);北京六一仪器厂提供的电泳仪(型号:DYY-7C)。

1.2 动物分组及给药

将 54 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组,其中 10 只小鼠出生后 2 个月作为幼龄对照组(2 月龄对照组);22 只小鼠出生后 7 个月作为老年性耳蜗感音神经细胞凋亡动物模型对照组(7 月龄对照组);22 只小鼠饮用聪耳通窍剂至出生后 7 个月作为中药治疗组(7 月龄中药组)。喂养和用药剂量与方法同我们前期研究文献报道^[3]。各组小鼠月龄期满即终止实验,每组分别取 5 只小鼠进行全耳蜗基底膜铺片观察内外毛细胞形态学变化情况,5 只小鼠进行耳蜗环氧树脂包埋切片观察 SGNs 变化情况。另从 7 月龄对照组和 7 月龄中药组各取 6 只小鼠耳蜗,通

过蛋白质组学技术检测 NEFM 丰度值,再取 6 只小鼠耳蜗通过 RT-PCR 技术检测 MAPK14 表达量。

1.3 检测方法

1.3.1 耳蜗铺片和耳蜗切片 具体方法和步骤与我们前期研究文献报道基本一致^[3,4]。耳蜗铺片:即小鼠断头后在体视显微镜下解剖暴露岩部,依次取出耳蜗、打开耳蜗圆窗、福尔马林磷酸盐缓冲液由蜗顶灌入耳蜗固定、盐酸溶液脱钙、分离取出全耳蜗基底膜、苏木素染液常规染色,最后将全耳蜗基底膜移入载玻片的甘油滴中,盖上盖玻片,中性树胶封固,在置有显微测量尺目镜的光学显微镜下,全耳蜗基底膜逐个视野依次计数内/外毛细胞,并将采集的数据输入到计算机中,数据经耳蜗图软件与正常 C57BL/6J 小鼠耳蜗数据进行比较,耳蜗基底膜的实际全长被转换为百分比长度单位,单位长度内的毛细胞实际数量被转换成细胞密度并按照百分比分布在耳蜗基底膜的各个部位,从而建立该耳蜗的曲线分析图,其中将 7 月龄对照组与 7 月龄中药组数据结果进行统计学分析。耳蜗切片:将取出的耳蜗经福尔马林磷酸盐缓冲液经蜗顶灌注固定后,环氧树脂包埋,半薄切片分别获取耳蜗骨性螺旋板的疆孔切片蜗轴螺旋管的中轴切片,片厚 3 μm ,最后 0.1% 甲苯胺蓝常规染色,每组取对等间隔切片,在显微镜下观察 SGNs 变化情况,并计数全视野单位面积内神经元数量,其中将 7 月龄对照组与 7 月龄中药组数据结果进行统计学分析。

1.3.2 蛋白质组学检测 取 7 月龄对照组与 7 月龄中药组动物耳蜗用于蛋白质组学检测研究。具体方法和步骤与我们前期研究文献报道一致^[5],即采用 Thermo 公司体外标记技术(tandem mass tags, TMT)进行蛋白质组学研究。分别通过蛋白浓度测定、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、胰蛋白酶酶解及标记、反相色谱分离等步骤。

1.3.3 RT-PCR 检测 选取 7 月龄对照组与 7 月龄中药组小鼠耳蜗用于 RT-PCR 检测 MAPK14 研究。选择 PCR 参考引物序列 ACTB(5'-3'):上游 AGTGTGACGTTGACATCCGT;下游 AGTAACAGTCCGCTAGAAGC;长度(bp)291。PCR 目标引物序列 MAPK14(5'-3'):上游 TCCTCCGAGGGCTGAAGTAT;下游 GTAGCCACGTAGCCTGTCAT;长度(bp)154。检测方法和步骤与我们前期研究文献报道基本一致^[4]。按照总 RNA 小量制备试剂盒步骤提取总 RNA。按照反转录反应试剂盒说明进行反转录 PCR 反应合成 cDNA。加入引物,在实时定量 PCR

仪检测系统中,反应条件为 95 ℃ 预变性 10 min,然后经过 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共 40 个循环,60 ℃ 延伸 1 min,测出内参基因 *ACTB* 和目的基因 *MAPK14* 在不同样本中扩增的 Ct 值, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达量差异倍数。

1.4 统计学分析

蛋白质组学数据分析采用 Proteome Discoverer™2.2(美国 Thermo 公司)软件和 UniProt 小鼠数据库。肽段鉴定的假阳性率控制在 1% 以下。对得到的检索结果按照 Score Sequest HT > 0 且 unique peptide ≥ 1,并去除空白值的标准筛选可信蛋白,基于筛选出的可信蛋白(多组重复以均能鉴定到的可信蛋白结果为基础进行分析),最后利用 OmicsBean 组学数据整合分析云平台,对筛选出的差异蛋白进行了基因本体(gene ontology, GO)功能注释和富集分析,用 OmicsBean 组学数据整合分析云平台,对筛选出的差异蛋白进行 String、KEGG Pathway 等分析。用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,检测数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较用 LSD-*t* 检验法;构成比比较以(%)表示,用 χ^2 检验法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 耳蜗铺片检测情况

耳蜗铺片各组位于耳蜗钩端附近区域基底膜同一部位比较显示,2 月龄对照组所有内/外毛细胞完好无缺(图 1A);7 月龄对照组内/外毛细胞则丧失殆尽(图 1B);7 月龄中药组仅在非常靠近钩端区有所缺失,但在朝着底回基底膜中段一端的内/外毛细胞则完整无损(图 1C)。各组小鼠统计平均全耳蜗毛细胞图显示,2 月龄对照组各回区域内/外毛细胞完整无损失(图 2A);7 月龄对照组内/外毛细胞缺损主要集中在耳蜗底回高频听阈区,越往底回高频听阈区则损失越重,并朝低频听阈区延伸发展(图 2B),截取距离耳蜗顶回 60%、70%、85%、90% 间区统计平均损失外毛细胞分别为 50%、70%、100%、100%,内毛细胞分别为 20%、40%、85%、95%。7 月龄中药组内/外毛细胞损失则明显较轻(图 2C),同等截取距离耳蜗顶回 60%、70%、85%、90% 间区统计平均损失外毛细胞分别为 0%、5%、65%、85%,内毛细胞分别为 0%、0%、10%、30%。两组外/内毛细胞损失比较经 χ^2 检验差异均具有统计学意义($\chi^2_{外} = 65.570, \chi^2_{内} = 20.729; P$ 均 <

0.001)。表明聪耳通窍剂具有显著对抗老年性耳蜗毛细胞凋亡作用。

2.2 耳蜗切片检测情况

耳蜗切片各组位于耳蜗钩端区 SGNs 比较显示,2 月龄对照组 SGNs 完整无损(图 3A),7 月龄对照组 SGNs 损失严重,几乎缺如(图 3B),而 7 月龄中药组 SGNs 仍有较多存在,保护较好(图 3C)。7 月龄对照组与 7 月龄中药组相同区域神经元密度定量比较,差异具有统计学意义($t = 13.306, P < 0.001$),结果与耳蜗铺片毛细胞变化情况相对应。由此可见,聪耳通窍剂同时具有显著对抗老年性耳蜗 SGNs 凋亡作用。

2.3 蛋白质组学检测情况

蛋白质组学筛选出两组小鼠耳蜗差异显著性富集蛋白 NEFM,在数百差异显著性蛋白中排序位居前列,所测特性结果显示其覆盖率为 52,鉴定出不同肽段总数目 47,肽段匹配到二级谱图数目 103, unique 肽段数目 1,氨基酸残基数 848,分子量 95.9,等电点 4.77,Sequest 程序分 366.7。所测结果符合 AlphaFold 蛋白质结构数据库鉴定的 NEFM 蛋白结构属性。两组小鼠耳蜗组织 NEFM 丰度值均数比较及统计结果如表 2 所示,7 月龄中药组 NEFM 丰度值(1.58 ± 0.04)明显高于 7 月龄对照组(0.90 ± 0.05),经两两比较 *t* 检验显示差异具有统计学意义($t = 26.013, P < 0.001$),7 月龄中药组与 7 月龄对照组差异倍数 FC 为 1.45。表明中药能显著促进 NEFM 高表达,而丰度值越高代表该蛋白质含量就越多。

2.4 RT-PCR 检测情况

7 月龄中药组 MAPK14 mRNA 表达量均数为 0.86 ± 0.19 ,7 月龄对照组 MARK14 mRNA 表达量均数为 1.48 ± 0.18 ,两组比较差异具有统计学意义($t = 5.803, P < 0.001$)。

2.5 相关生物信息检索

String 数据库检索到 NEFM 直接与 MAPK14、超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)形成密切关系(图 4),即根据所提供的线路标注说明,NEFM 与 MAPK14、SOD1 形成高度比率关联性,并且通过介导 MAPK14、SOD1 调控 Bcl-2、Bax、caspase-9 等涉及细胞凋亡或抗凋亡基因蛋白并形成密切关联性。KEGG 数据库检索到 NEFM 信号转导信息显示(图 5),NEFM 主要通过两个途径起到抗细胞凋亡作用:①通过调控 p38MAPK 抑制 MAPK 介导的细胞凋亡信号转导通路;②通过调控 SOD1 抑制活性

氧(reactive oxygen species,ROS)介导的细胞凋亡信号转导通路。KEGG 数据库相关因子所介导的信号转导通路与 String 数据库检索结果一致。

综合 String 和 KEGG 数据库检索互证结果显示,NEFM 直接与 p38MAPK (MAPK14) 介导的 MAPK 信号转导通路和SOD1介导的抗氧化信号转

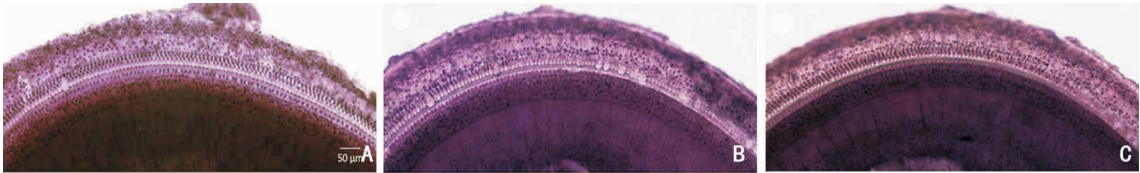


图 1 各组耳蜗钩端附近区域基底膜转弯处的毛细胞缺失情况 (苏木素 ×100) A:2 月龄对照组;B:7 月龄对照组;C:7 月龄中药组

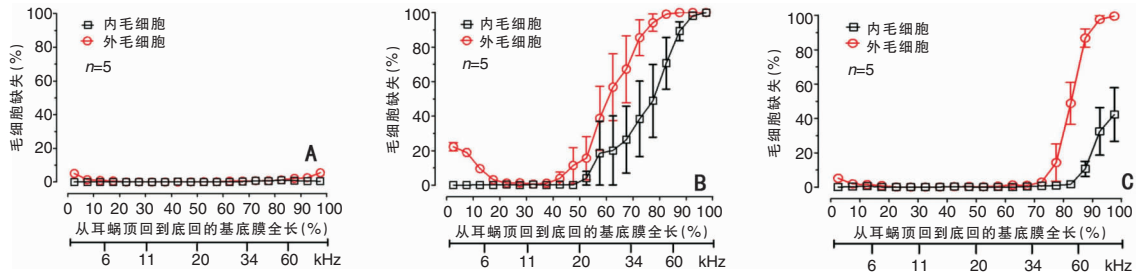


图 2 各组平均耳蜗图情况 A:2 月龄对照组;B:7 月龄对照组;C:7 月龄中药组

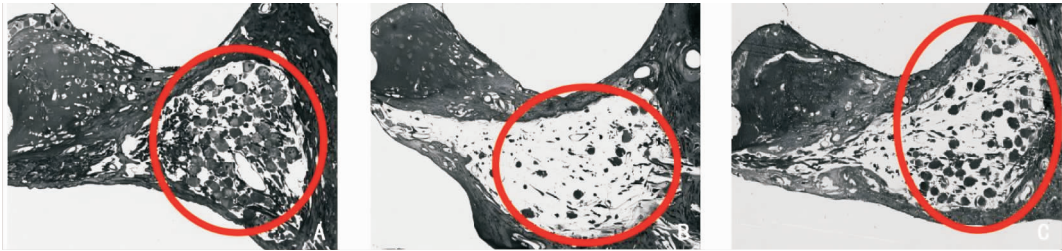


图 3 各组耳蜗钩端区 SGNs 密度情况 (甲苯胺蓝 ×400) A:2 月龄对照组;B:7 月龄对照组;C:7 月龄中药组 注:SGNs (螺旋神经节神经元)。

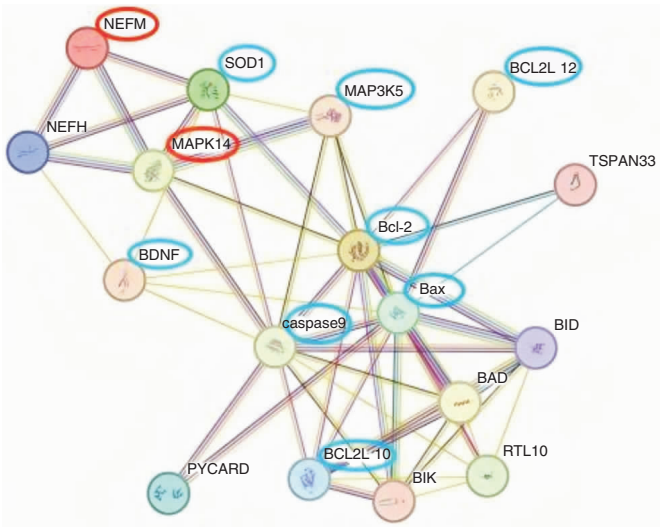


图 4 String 数据库检索图 注:NEFM(神经丝中链多肽);MAPK(丝裂原活化蛋白激酶);SOD1(超氧化物歧化酶 1)。下同。

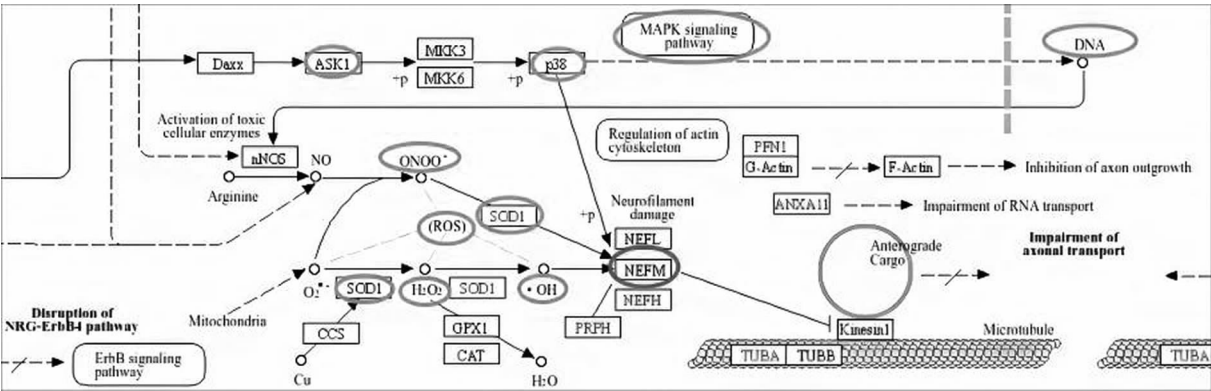


图 5 KEGG 数据库检索图 注:ROS(活性氧)。

导通路形成密切关联,进而与 ROS/Bcl-2/Bax/caspase-9 等与细胞凋亡或抗凋亡因子形成上下信号转导调控相互关系。由此推断中药可能经 NEFM/MAPK14 介导 MAPK 信号转导径路、SOD1/ROS 信号转导径路,从而实现对老年性耳蜗感音神经细胞凋亡作用。

3 讨论

本批次国产 C57BL/6J 小鼠全耳蜗铺片结果显示,2 月龄对照组耳蜗各回内/外毛细胞完好无损,可视为正常对照组;7 月龄对照组耳蜗内/外毛细胞损失主要集中于耳蜗底回高频区域,遵循着从耳蜗底部向上蔓延发展变化规律;7 月龄中药组耳蜗内/外毛细胞损失明显较轻。耳蜗铺片结果与耳蜗铺片对应区域一致,2 月龄对照组底回钩端附近耳蜗 SGNs 呈现较高密度;7 月龄对照组神经元损失严重,几乎缺如;7 月龄中药组神经元损失明显减少。研究结果表明,聪耳通窍剂具有较好保护老年性耳蜗毛细胞和 SGNs 凋亡作用。本次国产 C57BL/6J 小鼠动物模型与过去研究同属动物模型在毛细胞、SGNs 重点损失部位、发展变化规律均基本一致^[34,6],符合建模要求,并可科学对比说明问题。

NEFM 属于 3 种神经丝之一,即 NEFM 与重链多肽神经丝蛋白(neurofilament heavy polypeptide, NEFH)和轻链多肽神经丝蛋白(neurofilament light polypeptide, NEFL)形成复合物,共同构成神经丝,而 NEFM 是构成神经丝主要蛋白,是成熟神经元细胞骨架的结构成分,也是脊椎动物有髓轴突中最丰富的细胞骨架成分,对细胞内到神经轴突和树突的运输、生物力学与神经元基因转录之间的联系及轴突长期生长机制等起到重要作用,而神经突触和神经

纤维是保证神经信号转导的基础^[7-8]。研究表明,NEFM 高表达在诱导型一氧化氮合酶的上调、通过涉及一氧化氮瓜氨酸循环的信号传导显著促进脂肪组织来源的干细胞向成熟神经元细胞的分化中扮演着重要角色^[9]。另有研究表明在 221 例遗传性额颞叶痴呆家族的脑脊液样本中 4 种蛋白最重要,即 NEFM、神经元五聚蛋白 2、神经分泌蛋白和水通道蛋白 4。这 4 种蛋白质的组合特征能成功地将有症状的个体与没有症状的个体(未受影响)以及有症状前的个体与突变非携带者分开,即与未受影响的个体相比,受影响个体的 NEFM 和水通道蛋白 4 水平更高,神经元五聚蛋白 2 水平更低,提示这些蛋白质与遗传性失智症病理生理机制的潜在关联^[10]。更多研究将 NEFM 作为鉴定神经元和轴突生物标志物^[11-12]。本次老年性聋动物模型在中药聪耳通窍剂干预下的耳蜗蛋白质组学研究发现,涉及上调或下调富集显著差异蛋白众多,各种信号转导径路和机制复杂,其中上调基因蛋白中,NEFM 表达强度或含量位居众多富集显著差异蛋白前列,统计结果表明,中药具有显著上调 NEFM 作用,提示中药聪耳通窍剂通过影响 NEFM 表达,调节神经元突触、神经元轴突、神经元迁移和神经肽信号传导,提示 NEFM 是其重要药效靶标之一。

MAPK 信号转导通路是生物体内将信号从细胞表面传导细胞核内部的重要信号传导系统之一,在基因表达、细胞增殖与分化、细胞存活与凋亡、应激与免疫反应等细胞功能中起着至关重要的作用。参与调控细胞凋亡的 MAPK 信号转导通路主要包括细胞外信号调节激酶 1/2、p38MAPK 和 c-Jun N-末端激酶,它们是神经退行性变的重要分子^[13]。而激酶和磷酸酶分别是 MAPK 激活剂和抑制剂,激酶磷酸化 MAPKs,启动和控制激活的幅度。相比之下,

MAPK 磷酸酶使 MAPK 去磷酸化,下调和控制信号的持续时间^[14]。p38MAPK 家族包含 4 种异构体 p38 α 、p38 β 、p38 γ 和 p38 δ ,由 4 种不同的基因编码,p38 α /MAPK14 则是该家族的原型成员^[15],因此,MAPK14 实际属于 p38MAPK。不同 MAPK 通路可有促进或抑制细胞凋亡的作用,通常细胞外信号调节激酶 1/2 级联介导抗凋亡过程,而 p38 MAPK 和 c-Jun N-末端激酶级联介导促凋亡过程,它们在平衡细胞存活和死亡中起着关键作用,而这些机制通过内源性或外源性途径,引起细胞凋亡^[16]。即在 p38 通路中,MAPK14(即 p38MAPK)进一步通过诱导转录因子及激酶促进细胞凋亡,抑制细胞增殖。本研究表明,中药聪耳通窍剂明显下调 MAPK14 的表达,提示聪耳通窍剂可通过 p38 通路,使 MAPK 去磷酸化,从而抑制 MAPK14 即 p38MAPK 介导 MAPK 细胞凋亡信号转导通路,从而起到对抗老年性耳蜗感音神经细胞凋亡的作用。

String 数据库检索到 NEFM 直接与 MAPK14、SOD1 形成高度比率关联性,并且通过介导 MAPK14、SOD1 调控 Bcl-2、Bax、caspase-9 等涉及细胞凋亡或抗凋亡基因蛋白并形成密切关联性。KEGG 数据库检索到信号转导信息显示,NEFM 主要通过调控 p38MAPK 抑制 MAPK 介导的细胞凋亡信号转导通路,或通过调控 SOD1 抑制 ROS 介导的细胞凋亡信号转导通路。上述两种数据库检索结果互证进一步提示,聪耳通窍剂有效对抗老年性耳蜗感音神经细胞凋亡作用。前期研究聪耳通窍剂在有效保护豚鼠庆大霉素耳毒性聋机制中发现^[1],其对耳蜗 SOD1 表达明显高于正常对照组和模型对照组,对肾组织 caspase-3 表达则明显低于模型对照组,与前述 SOD1 介导的抗氧化信号转导通路,进而抑制 ROS/Bax/caspase-9 等凋亡因子启动的细胞凋亡程序观点一致。此外,早期研究也表明^[17],聪耳通窍剂原始方还具有对抗老年性耳蜗神经纤维损害的作用。作为构成神经丝主要蛋白的 NEFM,在聪耳通窍剂干预下高表达,因此可认为 NEFM 是保护神经纤维的一个重要靶标因子。

参考文献:

[1] 李彝,唐俊波,韦瑀龙,等. 聪耳通窍剂干预豚鼠庆大霉素耳毒性聋作用的机制探讨[J]. 中华耳科学杂志, 2018, 16(6): 894 – 902.

[2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993;1103 – 1105.

[3] 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.

[4] 宣伟军,丁大连,宣毅,等. 复方健耳剂对抗 C57BL/6J 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.

[5] Xuan W, Huang L, Xuan Y, et al. Use of the traditional Chinese medicine “compound healthy ear agent” to protect against age-related hearing loss in mice: A proteomics study [J]. Heliyon, 2024, 10(5): e26914.

[6] 丁大连,李鹏,卫卫东,等. 不同种属实验动物耳蜗毛细胞年龄相关性缺失的不同模式[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2023, 29(4): 7 – 13.

[7] Campos-Melo D, Hawley ZCE, Strong MJ. Dysregulation of human NEFM and NEFH mRNA stability by ALS-linked miRNAs [J]. Mol Brain, 2018, 11(1): 43 – 51.

[8] Loverde JR, Tolentino RE, Soteropoulos P, et al. Biomechanical forces regulate gene transcription during stretch-mediated growth of mammalian neurons[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 600136.

[9] Hayashi D, Okubo T, Suzuki T, et al. Valproic acid up-regulates the whole NO-citrulline cycle for potent iNOS-NO signaling to promote neuronal differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. Nitric Oxide, 2021, 106: 35 – 44.

[10] Bergström S, Öjjerstedt L, Remnestrål J, et al. A panel of CSF proteins separates genetic frontotemporal dementia from presymptomatic mutation carriers: a GENFI study[J]. Mol Neurodegener, 2021, 16(1): 79 – 93.

[11] Liu M, Xu P, Guan Z, et al. Ulk4 deficiency leads to hypomyelination in mice[J]. Glia, 2018, 66(1): 175 – 190.

[12] Hofsl E, Wheeler TE, Langaas M, et al. Identification of novel neuroendocrine-specific tumour genes[J]. Br J Cancer, 2008, 99(8): 1330 – 1339.

[13] Gravandi MM, Abdian S, Tahvilian M, et al. Therapeutic targeting of Ras/Raf/MAPK pathway by natural products: A systematic and mechanistic approach for neurodegeneration[J]. Phytomedicine, 2023, 115: 154821.

[14] Hepworth EMW, Hinton SD. Pseudophosphatases as regulators of MAPK signaling[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12595.

[15] Corre I, Paris F, Huot J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 55684 – 55714.

[16] Yue J, López JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2346.

[17] 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.

(收稿日期:2024 – 12 – 23)

本文引用格式:宣伟军,文艺群,黄力毅,等. 聪耳通窍剂经 NEFM/MAPK 通路对抗小鼠老年性耳蜗感音神经细胞凋亡机制的探讨[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2025, 31(5): 6 – 12. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202524543

Cite this article as:XUAN Weijun, WEN Yiqun, HUANG Liyi, et al. Investigation on mechanism of Cong' er-Tong' qiao agent against age-related cochlear sensorineural apoptosis in mice via NEFM/MAPK pathway[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2025, 31(5): 6 – 12. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202524543