

NF- κ B/iNOS信号通路在感音神经性听力损失小鼠模型中对螺旋神经节的影响*

陈凯¹, 赵锐^{1,2}, 周利³, 龙莉莉⁴, 唐玥玟^{1 Δ}

1. 四川大学华西医院耳鼻咽喉-头颈外科(成都 610041); 2. 川北医学院附属医院耳鼻咽喉-头颈外科(南充 637000);
3. 四川大学华西医院公共实验技术中心(成都 610041); 4. 四川大学华西保健医院耳鼻喉科(成都 610065)

【摘要】目的 探究在3-硝基丙酸(3-NP)诱导的感音神经性听力损失小鼠模型中核转录因子 κ B(NF- κ B)/诱导型一氧化氮合酶(iNOS)信号通路的表达水平变化对听力损失的影响。**方法** 本研究采用鼓室注射法进行动物建模。将C57BL/6雄性小鼠分为3组, 每组9只。3-NP组(鼓室内注射3-NP溶液), 3-NP+EVP4593组(鼓室内注射3-NP溶液, 腹腔注射NF- κ B抑制剂EVP4593溶液), 以及对照组[鼓室内注射磷酸缓冲液(PBS)]。在注射前后进行听性脑干反应检测。4周后取出耳蜗, 并进行NF- κ B p65、RelB、iNOS、Caspase-3抗体的免疫组织化学及实时荧光染色定量(qRT)-PCR检测。**结果** 3-NP组小鼠反应阈值较对照组和3-NP+EVP4593组高($P<0.05$), 且3-NP+EVP4593组的听阈比对照组高($P<0.05$)。免疫荧光染色和qRT-PCR结果显示3-NP暴露可导致螺旋神经节区域NF- κ B p65和RelB、iNOS表达较对照组增加($P<0.05$), 其表达可随着EVP4593的应用而减少($P<0.05$)。3-NP组螺旋神经节细胞Caspase-3表达高于对照组, 3-NP+EVP4593组Caspase-3的表达较3-NP组减少($P<0.05$)。**结论** 3-NP可通过激活NF- κ B/iNOS信号通路导致感音神经性听力损失模型小鼠的耳蜗螺旋神经节发生炎症反应, 这可能在感音神经性听力损失的发病中起重要作用。

【关键词】 3-硝基丙酸 感音神经性听力损失 螺旋神经节 NF- κ B 诱导型一氧化氮合酶

Effect of the NF- κ B/iNOS Signaling Pathway on Spiral Ganglion in Mouse Model of Sensorineural Hearing Loss

CHEN Kai¹, ZHAO Rui^{1,2}, ZHOU Li³, LONG Li-li⁴, TANG Yue-di^{1 Δ} . 1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 3. Core Facility of West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Department of Otorhinolaryngology, Sichuan University Hospital of Sichuan University, Chengdu 610065, China

Δ Corresponding author, E-mail: tangyd@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of changes in the expression level of necrosis factor (NF)- κ B/inducible nitric oxide synthase (iNOS) signaling pathway on hearing loss in a mouse model of sensorineural hearing loss (SNHL) induced by 3-nitropropionic acid (3-NP). **Methods** The animal model was established by tympanic injection. C57BL/6 male mice were divided into three groups, 3-NP group receiving tympanic injection of 3-NP solution, 3-NP+EVP4593 group receiving tympanic injection of 3-NP solution and intraperitoneal injection of EVP4593 solution, and a control group receiving tympanic injection of phosphate buffered saline (PBS). Auditory brainstem response (ABR) was tested before and after injection. After 4 weeks, the cochlea was harvested and immunohistochemistry and qRT-PCR of NF- κ B p65, RelB, iNOS, and Caspase-3 were conducted accordingly. **Results** The hearing thresholds of the 3-NP group were higher than those of the control group and the 3-NP+EVP4593 group ($P<0.05$), and the hearing thresholds of the 3-NP+EVP4593 group were also higher than those of the control group ($P<0.05$). Immunofluorescence staining and qRT-PCR results showed that 3-NP exposure caused an increase in the expressions of NF- κ B p65, RelB, and iNOS in the spiral ganglion in comparison with those of the control group ($P<0.05$), and their expressions decreased with the administration of EVP4593 ($P<0.05$). The expression of Caspase-3 in the spiral ganglion cells in the 3-NP group was higher than that in the control group, while in the 3-NP+EVP4593 group, it was lower than that in the 3-NP group ($P<0.05$). **Conclusion** This study found that, by activating the NF- κ B/iNOS signaling pathway, 3-NP may cause inflammation in the spiral ganglion of the cochlear in the SNHL model mice, which may play an important role in the pathogenesis of SNHL.

【Key words】 3-nitropropionic acid Sensorineural hearing loss Spiral ganglion NF- κ B iNOS

核转录因子 κ B(NF- κ B)参与表达与炎症、损伤、细胞凋亡、胚胎发育和增殖有关的各种基因, 其在所有细胞类

型中都有表达, 包括p65、RelB、NF- κ B1、NF- κ B2和REL^[1-2]。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)介导的活性氧可引起细胞和DNA损伤, 这一现象常由NF- κ B过度表达所致^[3]。有研究提出NF- κ B/iNOS信号通路参与了噪声暴露后内耳的损

* 四川省科技计划项目(No. 2021YJ0183)资助

Δ 通信作者, E-mail: tangyd@hotmail.com

伤^[4-5]。3-硝基丙酸(3-nitropropionic acid, 3-NP)通过不可逆地抑制琥珀酸脱氢酶, 阻断线粒体电子传递链复合体 II^[6-7]。3-NP通过激活NF- κ B而导致细胞功能障碍, 进而导致多种器官功能障碍^[8]。在2004年, HOYA等^[9]报道了在大鼠的内耳中使用3-NP能够诱发感音神经性听力损失(sensorineural hearing loss, SNHL)。但是, NF- κ B/iNOS信号通路在SNHL中螺旋神经节损伤的机制尚不完全清楚。我们推测SNHL小鼠模型的听力下降可能和NF- κ B/iNOS信号通路有关。

本研究通过鼓室注射法将3-NP导入小鼠耳蜗, 构建SNHL小鼠模型, 探究螺旋神经节NF- κ B/iNOS信号通路的表达水平变化, 并通过使用NF- κ B抑制剂EVP4593研究了NF- κ B在SNHL动物模型螺旋神经节病理改变中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康的雄性C57BL/6小鼠(4周龄)饲养于四川大学华西医院实验动物中心, 在相同条件下进行饲养。所有动物实验的步骤均获得四川大学华西医院动物伦理委员会批准。

1.2 主要仪器与试剂

3-NP(Sigma); EVP4593(GLP BIO); Anti-NF- κ Bp65(博士德); Anti-RelB(博士德); Anti-iNOS(HUABIO); Caspase-3(ZEN BIO); 随机光学重构超高/共聚焦/全内反射显微镜(尼康); 体式显微镜 Discovery V8(蔡司); NIKON荧光图像高清采集系统(尼康); NIKON荧光图像分析重建软件(尼康); CFX96 Real-Time PCR 检测仪(Bio-Rad); 听觉生理工作站RZ6(TDT)。

1.3 模型构建与验证

实验分3组: 对照组、3-NP组及3-NP+EVP4593组, 每组9只小鼠。

3-NP处理组和3-NP+EVP4593组小鼠经单次左侧鼓室注射3-NP溶液(7 μ L/只)^[3], 构建SNHL小鼠模型。对照组小鼠使用磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。3-NP+EVP4593组小鼠除鼓室注射3-NP溶液外, 需经腹腔注射EVP4593, 每3 d 1次, 总共注射2次。经鼓膜注射给药后, 术耳朝上静置5 min。所有小鼠在鼓室注射后均在相同条件下饲养7 d。

模型验证: 在术前(0 d)及术后第7天, 分别选取对照组、3-NP组及3-NP+EVP4593组小鼠各3只进行听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR), 检测小鼠听力反应阈值。采用听觉生理工作站RZ6(TDT)进行测试, 使用短声Click作为刺激音。小鼠麻醉满意后, 取俯卧位固

定, 3个电极分别插入小鼠的两侧耳廓连线中点皮下、同侧耳垂皮下和对侧大腿皮下。分别在短声click和4个频率(8、16、24和32 kHz)下测试刺激音的听力反应阈值。实验组小鼠的听力阈值较对照组明显升高则提示小鼠出现听力损失, 模型建立成功。待小鼠麻醉苏醒后继续进行后续实验。

1.4 耳蜗取材、固定、石蜡包埋

每组各取6只小鼠进行实验。在施用3-NP 1周后, 将小鼠充分麻醉后固定在操作台上, 经心尖灌注PBS, 待右心耳流出洁净PBS后, 多聚甲醛液继续灌注至小鼠全身僵硬。快速断头, 迅速取出耳蜗组织放入多聚甲醛液固定过夜。加入乙二酸四乙酸液中脱钙。3 d后将充分脱钙后的耳蜗组织放入包埋盒内, 梯度酒精脱水、包埋。切片厚度为4 μ m。

1.5 耳蜗石蜡切片免疫荧光染色

通过免疫荧光染色检测NF- κ B p65、RelB、iNOS和Caspase-3在耳蜗螺旋神经节的表达。耳蜗石蜡切片在65 $^{\circ}$ C条件下烤片30 min后按步骤放入TO生物透明剂浸泡、梯度酒精脱水。PBS冲洗后, 将标本放入水浴加热至70 $^{\circ}$ C的0.01 mmol/L的柠檬酸钠溶液(pH6.0)中修复2 h后, 加入100 μ L 10%山羊血清溶液, 37 $^{\circ}$ C条件下避光封闭20 min。加入一抗, 避光条件下4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜。使用的一抗及工作浓度如下: Anti-NF- κ B p65 1 : 100; Anti-RelB 1 : 200; Anti-iNOS 1 : 100; Caspase-3 1 : 100。次日PBS冲洗后滴加二抗, 37 $^{\circ}$ C避光孵育40 min后滴加30 μ L DAPI工作液(1 : 1 000), 在避光、室温条件下孵育5 min, 最后进行封片。使用尼康随机光学重构超高/共聚焦/全内反射显微镜的共聚焦模式观察拍摄, 使用NIKON NIS-Elements AR软件进行图像处理。使用Image J分析软件分析平均荧光强度值。

1.6 实时荧光染色定量(qRT)-PCR检测小鼠耳蜗螺旋神经节组织中NF- κ B p65、RelB、iNOS的表达

每组各取3只小鼠进行实验。在施用3-NP 1周后, 麻醉动物并处死, 快速取出耳蜗后在体式显微镜下迅速分离螺旋神经节组织, 放入1 mL Trizol中提取出总RNA, 然后通过逆转录得到cDNA。采用CFX96 Real-Time PCR Detection System进行qRT-PCR检测。PCR扩增反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min, 然后95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共40个循环, 最后65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。以GAPDH为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的mRNA表达水平。用于qRT-PCR检测的引物及内参基因(擎科生物)序列见表1。

1.7 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方

表 1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Target gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Production length/bp
NF-κB p65	CTTCCTCAGCCATGGTACCTCT	CAAGTCTTCATCAGCATCAAACTG	126
RelB	CTTTGCCTATGATCCTTCTGC	GAGTCCAGTGATAGGGGCTCT	122
iNOS	CTATCAGGAAGAAATGCAGGAGAT	GAGCACGCTGAGTACCTCATT	125
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CTCGCTCTGGAAGAATGGTG	121

差分析, 两组间比较采用非配对*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNHL小鼠模型建立情况

对3组小鼠分别以Click、8、16、24和32 kHz作为声刺激。结果(图1)显示3-NP组小鼠听力反应阈值较对照组和3-NP+EVP4593组小鼠均有所升高($P<0.05$), 且3-NP+EVP4593组小鼠的听力反应阈值比对照组高($P<0.05$)。

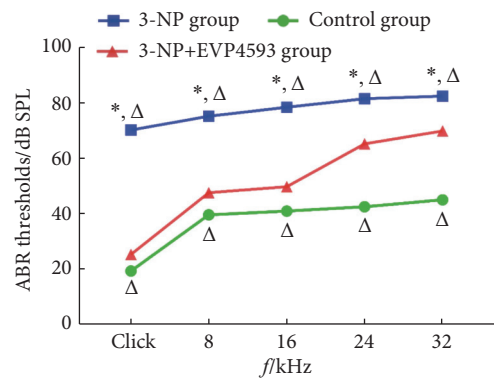


图 1 小鼠ABR听力反应阈值变化
Fig 1 ABR threshold shifts after exposure to 3-NP and 3-NP plus EVP4593

* $P<0.05$, vs. control group; Δ $P<0.05$, vs. 3-NP+EVP4593 group. $n=3$.

2.2 耳蜗螺旋神经节NF-κB p65、RelB和iNOS的蛋白表达比较

表2、图2显示小鼠耳蜗螺旋神经节区域NF-κB p65、RelB及iNOS的表达情况。在对照组中, NF-κB p65及RelB在螺旋神经节区域均呈现低表达状态。而在3-NP组中, 二者的免疫反应性明显增强($P<0.05$)。3-NP组耳蜗螺旋神经节区域细胞核中的NF-κB p65表达水平增加(见图2白色箭头所指区域), 而3-NP+EVP4593组中, 这种现象被抑制。RelB未见明显核异位现象。3-NP+EVP4593组可见NF-κB p65及RelB表达较3-NP组减弱($P<0.05$)。iNOS在对照组中呈现低表达状态, 而在3-NP组中表达增强($P<0.05$)。iNOS的增强表达被EVP4593所抑制($P<0.05$)。

2.3 耳蜗螺旋神经节NF-κB p65、RelB和iNOS基因的表达比较

qRT-PCR发现(表2), 3-NP组中螺旋神经节的NF-κB p65、RelB和iNOS基因的表达水平较对照组增加($P<0.05$), 而三者3-NP+EVP4593组的表达较3-NP组减少($P<0.05$)。

2.4 3-NP导致螺旋神经节细胞Caspase-3过表达

图2显示, 3-NP组(97.70 ± 3.76 , $P<0.05$)中螺旋神经节区域Caspase-3的表达水平较对照组(63.14 ± 4.30 , $P<0.05$)

表 2 耳蜗螺旋神经节iNOS、NF-κB 65和RelB的表达平均荧光强度值及基因表达变化
Table 2 The mean fluorescence intensity and expression trend of iNOS, NF-κB p65, and RelB in the spiral ganglion

Index	Group	<i>n</i>	Mean fluorescence intensity (protein)	<i>n</i>	Relative expression (gene)
iNOS	Control	6	62.04±1.81 [#]	3	1.05±0.07 [#]
	3-NP	6	82.99±2.61	3	1.80±0.04
	3-NP+EVP4593	6	58.87±1.98 [#]	3	1.15±0.06 [#]
NF-κB p65	Control	6	70.03±2.94 [#]	3	0.95±0.09 [#]
	3-NP	6	95.27±2.15	3	1.85±0.04
	3-NP+EVP4593	6	68.21±3.52 [#]	3	1.24±0.17 ^{#, Δ}
RelB	Control	6	35.50±3.95 [#]	3	1.10±0.03 [#]
	3-NP	6	104.40±4.66	3	2.20±0.10
	3-NP+EVP4593	6	66.00±3.88 ^{#, Δ}	3	1.20±0.16 [#]

$P<0.05$, vs. 3-NP group; Δ $P<0.05$, vs. control group.

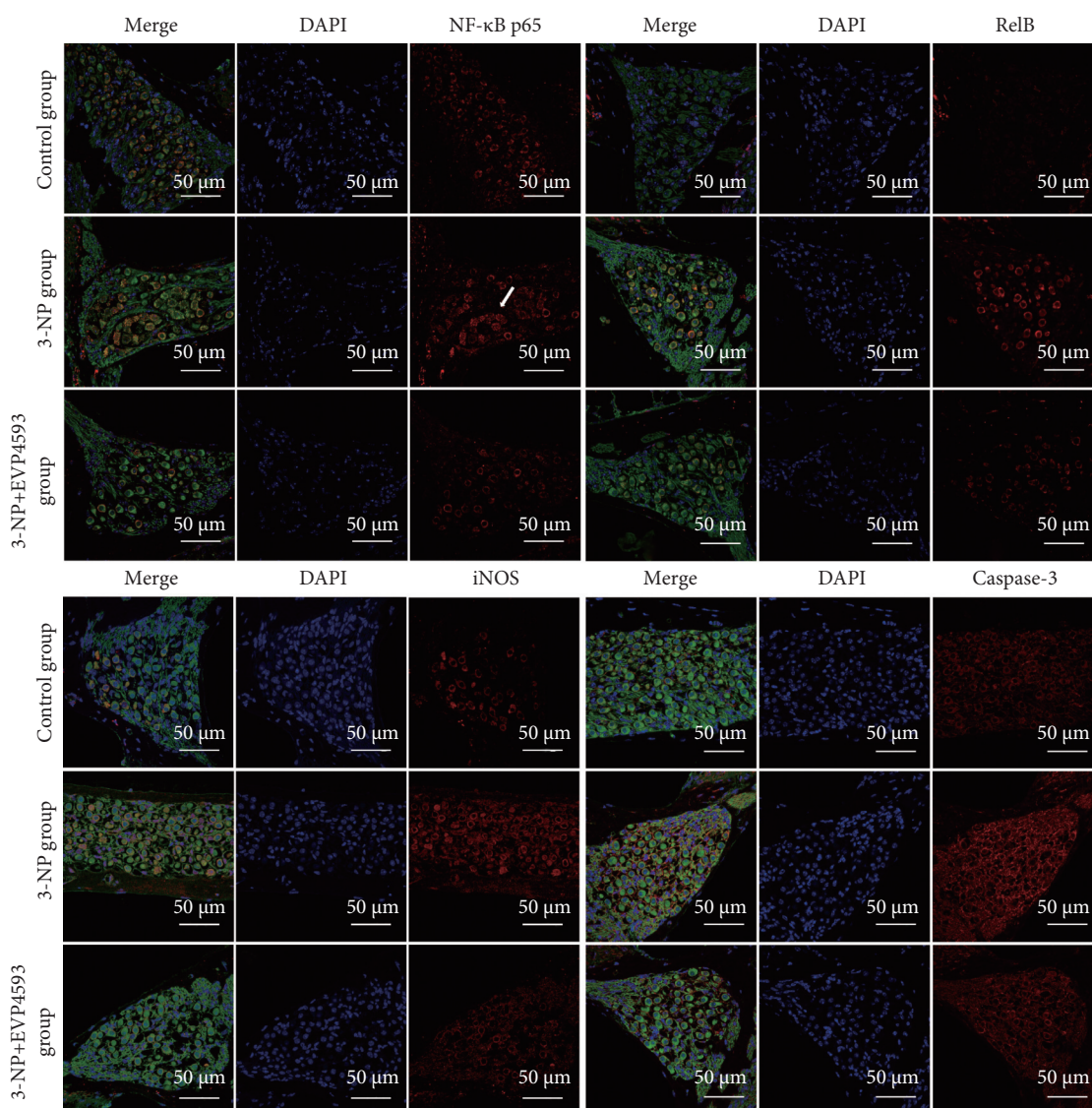


图 2 耳蜗螺旋神经节NF-κB p65、RelB、iNOS及Caspase-3的表达

Fig 2 The expression of NF-κB p65, RelB, iNOS, and Caspase-3 in the spiral ganglion

White arrow: Nuclear translocation of NF-κB p65.

增加, 3-NP+EVP4593组(76.66 ± 2.67 , $P < 0.05$)Caspase-3的表达较3-NP组减少。

3 讨论

SNHL是常见的听力损失, 由内耳或听觉中枢的器质性病变引起。TIAN等^[10]报道了在小鼠鼓室内注射3-NP建立SNHL, 并发现鼓室内注射3-NP是评估听力保护效果的合适方法。研究发现在3-NP给药后检测出螺旋韧带中的Ⅱ型纤维细胞、血管纹边缘层、中间层细胞、螺旋神经节细胞的变性, 导致暂时或永久的听觉障碍^[9-10]。鼓膜穿刺、鼓室内注射法操作简单, 对小鼠造成的创伤小, 故在本研究中, 我们选择鼓室内注射法建立动物模型。

NF-κB在调节细胞炎症反应以及细胞分化、凋亡和

增殖中起重要作用^[11-15]。NF-κB的激活可分为经典激活途径和非经典激活途径, 后者主要由RelB参与。WATANABE等^[4]报道了在顺铂治疗的小鼠中, iNOS通过激活NF-κB触发耳蜗细胞凋亡。螺旋神经节将收集到的听觉信息传输到大脑, 它的变性是听力损失的重要原因之一。然而, NF-κB对SNHL螺旋神经节的影响在很大程度上未被发现。

在本次研究中我们选择了鼓室注射法注射3-NP在C57BL/6小鼠中建立SNHL模型, 并通过ABR验证了动物模型。本研究发现, 3-NP可导致螺旋神经节区域NF-κB p65及RelB的过表达, 并且NF-κB抑制剂EVP4593可明显降低它们的表达, 提示3-NP可通过活化NF-κB导致螺旋神经节发生炎症反应。其中在NF-κB p65的免疫荧光染色结果可见明显的核异位现象, 随着EVP4593的应用, 可

减少NF- κ B p65转位入核现象,提示经典激活途径可能在SNHL的发病中起更为重要的作用。NF- κ B的表达与炎症、损伤、细胞凋亡有关,而NF- κ B p65参与了各种生理和病理生理变化。本次研究发现3-NP可导致Caspase-3在螺旋神经节区域的表达水平明显增加,表明3-NP暴露所致的NF- κ B过表达可导致螺旋神经节区域出现细胞凋亡。

NF- κ B/iNOS信号通路是机体氧化应激的重要通路之一^[16]。NF- κ B的活化促使许多炎症介质和细胞因子表达增加,从而激活iNOS的表达,导致细胞和DNA损伤^[8]。本次研究结果表明螺旋神经节区域iNOS显著升高,EVP4593可抑制其表达,揭示了3-NP可通过NF- κ B/iNOS信号通路导致螺旋神经节炎症反应。

综上所述,本研究通过小鼠鼓室注射方法建立了SNHL小鼠模型,发现了NF- κ B/iNOS信号通路可能在SNHL螺旋神经节的病理改变中起重要作用,为进一步研究SNHL的螺旋神经节的病理生理变化提供了一定的实验基础,但本研究还未涉及细胞实验,后续还需进一步研究完善。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] YAMAMOTO H, OMELCHENKO I, SHI X, *et al.* The influence of NF- κ B signal-transduction pathways on the murine inner ear by acoustic overstimulation. *J Neurosci Res*, 2009, 87(8): 1832–1840.
- [2] DOHI T, KAWASHIMA R, KAWAMURA Y I, *et al.* Pathological activation of canonical nuclear-factor κ B by synergy of tumor necrosis factor α and TNF-like weak inducer of apoptosis in mouse acute colitis. *Cytokine*, 2014, 69(1): 14–21.
- [3] CONTI A, MISCUSI M, CARDALI S, *et al.* Nitric oxide in the injured spinal cord: Synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 205–218.
- [4] WATANABE K, INAI S, JINNOUCHI K, *et al.* Nuclear-factor kappa B (NF-kappa B)-inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) pathway damages the stria vascularis in cisplatin-treated mice. *Anticancer Res*, 2002, 22(6C): 4081–4085.
- [5] MASUDA M, NAGASHIMA R, KANZAKI S, *et al.* Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. *Brain Res*, 2006, 1068(1): 237–247.
- [6] SONE M, HAYASHI H, YAMAMOTO H, *et al.* Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation. *Hear Res*, 2005, 204(1-2): 140–146.
- [7] YIN H Y, MA X F, LIU F, *et al.* Protective effect of geranylgeranylacetone on cisplatin ototoxicity. *Chemotherapy*, 2009, 55(1): 1–5.
- [8] CHANG M Y, RHEE J, KIM S H, *et al.* The protective effect of Egb 761 against 3-nitropropionic acid-induced hearing loss: The role of Sirtuin 1. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2018, 11(1): 9–16.
- [9] HOYA N, OKAMOTO Y, KAMIYA K, *et al.* A novel animal model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. *Neuroreport*, 2004, 15(10): 1597–1600.
- [10] TIAN C, KIM Y H, KIM Y C, *et al.* Korean red ginseng ameliorates acute 3-nitropropionic acid-induced cochlear damage in mice. *Neurotoxicology*, 2013, 34: 42–50.
- [11] GERONDAKIS S, GRUMONT R, GUGASYAN R, *et al.* Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6781–6799.
- [12] VALLABHAPURAPU S, KARIN M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 693–733.
- [13] HOFFMANN A, BALTIMORE D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev*, 2006, 210: 171–186.
- [14] BAUD V, KARIN M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(1): 33–40.
- [15] KEARNS J D, HOFFMANN A. Integrating computational and biochemical studies to explore mechanisms in NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*, 2009, 284(9): 5439–5443.
- [16] LISAKOVSKA O, SHYMANSKYI I, MAZANOVA A, *et al.* Vitamin D₃ protects against prednisolone-induced liver injury associated with the impairment of the hepatic NF- κ B/iNOS/NO pathway. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(2): 213–222.

(2021-08-17收稿, 2022-03-12修回)

编辑 吕熙