

网络出版时间:2021/12/22 15:35 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211221.0959.001.html

◇基础医学研究◇

Epac1 信号介导大鼠噪声暴露后内耳毛细胞损伤作用与机制

王成^{1,2}, 孙凡凡¹, 张俊戈³, 孙家强³, 董六一¹

摘要 目的 探究环腺苷酸结合蛋白1(Epac1)信号分子介导噪声暴露大鼠内耳毛细胞损伤作用及其机制。方法 20只SPF级SD大鼠均分为对照组和噪声暴露组。噪声暴露组大鼠给予频率为4 kHz,声压级为101 dB SPL,暴露8 h。噪声暴露前后检测大鼠听性脑干反应(ABR)。噪声暴露结束后处死大鼠通过耳蜗基底膜铺片染色、免疫荧光和透射电镜,观察噪声暴露后大鼠内耳毛细胞损伤以及Epac1蛋白在耳蜗中的功能定位。免疫蛋白印迹法检测耳蜗组织中Epac1、Rap1、CaMK-II、Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3(CC3)、cleaved caspase-9(CC9)等蛋白的表达。结果 与对照组比较,噪声暴露组大鼠的ABR阈值增加($P < 0.05$);耳蜗铺片染色结果显示,噪声暴露组大鼠耳蜗三层外毛细胞的缺失高于对照组($P < 0.05$);透射电镜检测结果显示,噪声暴露组大鼠毛细胞底部溶解,静纤毛丢失或融合增多,细胞器损伤严重,线粒体外膜破裂,线粒体脊断裂或消失,出现空泡化;免疫荧光检测结果显示,噪声暴露组中大鼠外毛细胞中Epac1呈现高表达($P < 0.05$);Western blot检测结果显示,噪声暴露组大鼠耳蜗组织中Epac1、Rap1和CaMK-II蛋白的表达上调($P < 0.05$),凋亡相关蛋白Bcl-2表达下调,Bax、CC3和CC9蛋白表达上调($P < 0.05$)。结论 Epac1-Rap1信号通路介导了噪声暴露条件下内耳的早期病理性损伤过程,并参与调控噪声暴露诱导的内耳毛细胞凋亡。Epac1-Rap1通路有望成为新的干预噪声性耳聋的潜在靶点。

关键词 环腺苷酸结合蛋白;噪声性耳聋;内耳毛细胞;凋亡

中图分类号 R 764

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)01-0001-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.001

2021-10-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH250)

作者单位:安徽医科大学¹基础医学院药理学教研室、²第一临床医学院物理诊断学教研室,合肥 230032

³中国科学技术大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科,合肥 230001

作者简介:王成,男,硕士;

孙家强,男,博士,主任医师,责任作者,E-mail:sunjiaq0605@126.com;

董六一,男,博士,教授,责任作者,E-mail:dongly@ahmu.edu.cn

听力损失是临床上常见的感觉障碍形式,噪声性听力损失(noise-induced hearing loss, NIHL)占成年人听力损失的16%^[1],且有逐年增加的趋势。目前,临床上尚缺乏有效的预防或治疗措施^[2],对NIHL的关注和研究已成为当前世界各国临床耳科医学工作者的研究热点。

环磷酸腺苷(adenosine cyclophosphate, cAMP)作为细胞内重要的第二信使,可调控多种信号通路,如细胞再生、修复等。cAMP的效应器除了已被充分研究的cAMP蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)外,还有由cAMP直接激活的环腺苷酸结合蛋白(exchange protein directly activated by cAMP, Epac)^[3]。Epac是Ras家族小分子G蛋白Rap的交换因子,可促使无活性的GDP转换为有活性的GTP,并激活Rap蛋白,参与下游信号转导。研究^[4]表明Epac-Rap1作为一个新的重要途径在cAMP信号通路中发挥重要作用。已有大量文献^[5]报道Epac在神经元生长、再生与修复等功能作用中的相关研究,但Epac在NIHL中作用的研究国内外未见相关报道。该文主要探讨在噪声暴露条件下Epac1信号是否介导大鼠内耳毛细胞病理性损伤过程并初步研究其作用与机制,期望为NIHL的防治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SPF级雄性SD大鼠20只,体质量为250~350 g,耳廓反应灵敏,于饲养室(22±3)℃,湿度40%~70%,饲养1周。动物购于安徽医科大学实验动物中心,生产许可证号:[SCXK(皖)2017-001],动物伦理报告编号:LLSC20200760。SD大鼠随机分为对照组和噪声暴露组,10只/组。

1.2 药品与试剂 10% EDTA脱钙液购自西安赫特生物科技有限公司;PMSF购自美国Sigma公司;RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;预染蛋白marker购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔来源Epac1一抗、兔来源CaMKII一抗、

鼠来源 Rap1 一抗、兔来源 Bax、Bcl-2 购自美国 Abcam 公司;cleaved caspase-3/9 一抗;内参 β -actin 购自美国 CST 公司;兔来源 Epac1 一抗(免疫荧光)购自北京博奥森生物科技有限公司;iFluor⁴⁸⁸ 标记鬼笔环肽(绿色)购自上海翊圣生物科技有限公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗和山羊抗兔 IgG 二抗、ITC 标记山羊抗兔 IgG、封闭用羊血清(批号:ZLI-9022)购自北京中杉金桥有限公司;Triton X-100 购自上海索莱宝生物科技有限公司。

1.3 仪器设备 静音室(广州声左声学技术有限公司);噪声扬声器(上海创目公司);功能放大器(日本 YAMAHA 公司);声压计(杭州爱华公司);Tucker Davis Technologies(TDT)系统(美国 Tucker-Davis 公司);测听扬声器(美国 Tucker-Davis 公司);校准麦克(美国 Tucker-Davis 公司);超低温冰箱(日本 Sanyo 公司);TGL-16H 高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);DIAX-900 内切式组织匀浆机(德国 Heidolph 公司);TE300 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司);SpectraMax190 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);WD-9405B 水平摇床(北京市六一仪器厂);Bioshine ChemiQ4600 荧光及化学发光成像系统(上海欧翔科学仪器公司);透射电子显微镜(日本日立公司);蔡司显微镜(德国 ZEISS 公司);冷冻研磨仪(上海净信公司)。

1.4 方法

1.4.1 噪声暴露 将噪声暴露组大鼠暴露于中心频率为 4 kHz,声强度为 101 dB SPL 的宽频噪声中 8 h。应用声级计测量和调整噪声强度。

1.4.2 听觉脑干反应(auditory brainstem responses, ABR)测量 实验前,噪声暴露后分别对两组大鼠进行 ABR 检测。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg)麻醉大鼠。将皮下电极插入颅骨的顶点,参考电极插入左耳下的乳突处接地电极插入右耳下的乳突处。以宽频的 Click(0.1 ms, 21 次/s)声及 Tone burst 声(4、8、12、16、20、24、32 kHz;0.5 ms 上升/下降期,无平台期,交替相位)为刺激声,Tucker Davis Technology(TDT)系统 III 硬件及 Biosig 软件进行测量。每个刺激水平的重复高达 521 次。从 90 dB 开始,每 5 dB 逐级下降,直到检测不到重复的波形,确定阈值。所有 ABR 测量均由同一实验者进行。

1.4.3 基底膜铺片染色 对照组与噪声暴露组大鼠($n=3$)于噪声暴露 24 h 后,用戊巴比妥钠麻醉后迅速断头,取出颞骨,磷酸盐缓冲液(phosphate buff-

er saline, PBS)漂洗 1 次,将耳蜗浸泡在 4% 多聚甲醛中,4 °C 过夜后取出耳蜗,PBS 漂洗 3 次,10% EDTA 脱钙液中浸泡 5 d。在解剖显微镜下去除侧壁、Reissner 膜和覆膜,将基底膜用 iFluor⁴⁸⁸ 标记鬼笔环肽(在 PBS 中 1:1 000 稀释)染色 30 min,用 PBS 漂洗后,置于载玻片上,在荧光显微镜下观察毛细胞。

1.4.4 免疫荧光染色 将大鼠耳蜗基底膜置于 3% Triton X-100 溶液中透化 30 min,PBS 洗涤 3 次(10 min/次)后于室温下山羊血清封闭 30 min,4 °C 与 Epac 1(1:100)孵育 24 h,洗涤 3 次后,置于 FITC 标记山羊抗兔 IgG 的二抗(1:50)中,4 °C 避光过夜。将样品用 PBS 洗涤 3 次,并与 iFluor⁴⁸⁸ 鬼笔环肽(1:1 000)室温下避光孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,置于载玻片上,荧光显微镜观察。

1.4.5 透射电镜 将大鼠耳蜗基底膜进行乙醇梯度脱水,用 spurr 环氧树脂进行包埋、切片,约 70 nm/片。将制好的切片用 1% 甲苯胺蓝进行染色,透射电镜下观察耳蜗超微结构。

1.4.6 Western blot 使用 Western blot 法检测大鼠耳蜗组织 Epac1、CaMK-II、Rap1 通路相关蛋白和 Bax、Bcl-2、CC3、CC9 等凋亡蛋白表达的变化($n=3$)。通过 Bioshine ChemiQ 4600 荧光及化学发光成像系统显影,用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.5 统计学处理 使用 Graphpad Prism 6 软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 t 检验用于比较对照组和噪声暴露组之间的数据分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠噪声暴露前后 ABR 阈值变化 ABR 检测,噪声暴露后,对照组与噪声暴露组大鼠在 12 kHz 时的 ABR 波形。实验结果显示,噪声暴露前对照组与噪声暴露组大鼠的 ABR 阈值差异无统计学意义。噪声暴露后对照组大鼠 4、8、12、16、20、24 及 32 kHz ABR 听力阈值分别为(31.00 ± 1.87)、(30.00 ± 2.74)、(31.00 ± 1.87)、(32.00 ± 3.39)、(36.00 ± 3.32)、(38.00 ± 2.00)、(39.00 ± 2.45) dB SPL,噪声暴露组大鼠听力阈值为(64.00 ± 1.87)、(67.00 ± 5.61)、(73.00 ± 2.55)、(74.00 ± 1.87)、(73.00 ± 2.25)、(84.00 ± 2.45)、(82.00 ± 1.13) dB SPL,差异有统计学意义($t = 7.747、8.687、9.860、9.860、10.303、10.800、10.100, P < 0.01$)。噪声暴露后对照组大鼠的 Click 值为(25.00 ± 2.24) dB SPL,噪声暴

露组大鼠为(52.00 ± 5.83) dB SPL, 差异有统计学意义($t = 8.416, P < 0.01$)。

2.2 噪声暴露后大鼠内耳外毛细胞损伤情况 鬼笔环肽对大鼠耳蜗基底膜进行铺片染色结果显示, 对照组大鼠内耳三层外毛细胞排列整齐, 形态清晰, 基本无细胞缺失; 噪声暴露组大鼠内耳三层外毛细胞排列较整齐, 但外毛细胞缺失明显。见图 1 A。内耳外毛细胞计数结果显示, 对照组大鼠耳蜗外毛细胞缺失率显著低于噪声暴露组, 差异显著($t = 7.869, P < 0.05$)。透射电镜结果显示, 对照组大鼠耳蜗毛细胞形态完整, 胞质均匀, 线粒体形态正常, 内部线粒体嵴清晰可见; 噪声暴露组大鼠毛细胞形态不规则, 静纤毛丢失或融合, 细胞器损伤严重, 线粒体外膜破裂, 线粒体脊断裂或消失, 出现空泡化等。见图 1B。

2.3 免疫荧光检测大鼠内耳毛细胞 Epac1 蛋白表达 采用免疫荧光量化外毛细胞中 Epac1 免疫标记, 结果显示, 对照组大鼠的耳蜗外毛细胞中 Epac1 表达较弱, 而噪声暴露组大鼠耳蜗外毛细胞中 Epac1 高表达($t = 6.276, P < 0.05$)。见图 2。

2.4 大鼠噪声暴露后耳蜗组织中 Epac1、Rap1 和 CaMK- II 蛋白表达情况 Western blot 结果显示, 与对照组比较, 噪声暴露组大鼠耳蜗组织中 Epac1 蛋白表达上调($t = 6.322, P < 0.05$), 提示噪声暴露后 Epac1 蛋白激活, 并促进其下游 Rap1 ($t = 2.871, P < 0.05$) 和 CaMK- II ($t = 2.932, P < 0.05$) 蛋白表达。见图 3。

2.5 噪声暴露后大鼠耳蜗组织中凋亡相关蛋白表达情况 Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, 噪声暴露组大鼠耳蜗组织中 Bcl-2 蛋白表达下调, Bax 表达上调, 其 Bcl-2/Bax 比值下降($t = 3.230, P < 0.05$); 另外噪声暴露诱导耳蜗组织中 CC3 与 CC9 激活, 其 CC3 ($t = 3.014, P < 0.05$) 和

CC9 ($t = 4.058, P < 0.05$) 表达增加, 促进毛细胞凋亡。见图 4。

3 讨论

噪声暴露对内耳毛细胞损伤主要通过两种途径: 一种是直接的机械损伤, 机械震动可破坏毛细胞的静纤毛导致毛细胞缺失, 并损伤支持和螺旋神经节^[6]; 另一种是细胞凋亡或坏死导致毛细胞死亡的生化途径^[7]。目前已知噪声导致内耳毛细胞发生凋亡的机制有氧化应激、能量代谢障碍、中性粒细胞浸润、钙超载等^[8]。然而这些非特异性变化与耳蜗损伤间的具体联系并无定论, 其机制尚不明确。

该文参照了 Coleman et al^[9] 的造模方法, ABR 结果显示噪声暴露组大鼠的听力阈值较对照组大鼠显著升高($P < 0.05$), 提示模型构建成功。鬼笔环

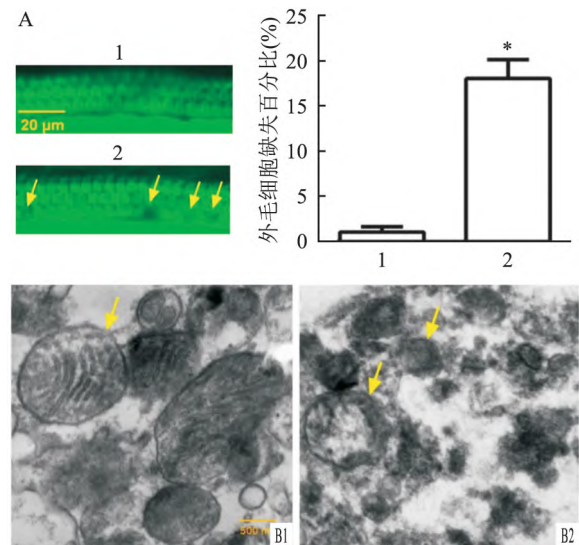


图 1 噪声暴露后大鼠内耳外毛细胞损伤情况

A: 对照组与噪声暴露组大鼠耳蜗基底膜铺片鬼笔环肽染色 $\times 200$; B: 对照组与噪声暴露组大鼠耳蜗基底膜透射电镜观察结果 $\times 5000$; 1: 对照组; 2: 噪声暴露组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

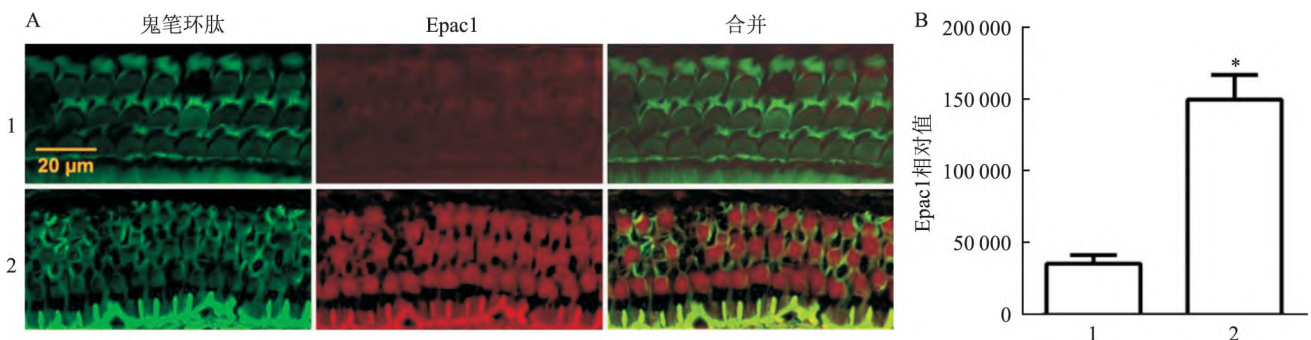


图 2 Epac1 免疫标记在对照组与噪声暴露组大鼠中的表达

A: Epac1 蛋白表达 $\times 200$; B: Epac1 蛋白半定量分析; 绿色荧光: 鬼笔环肽染色; 红色荧光: Epac1 蛋白表达; 1: 对照组; 2: 噪声暴露组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

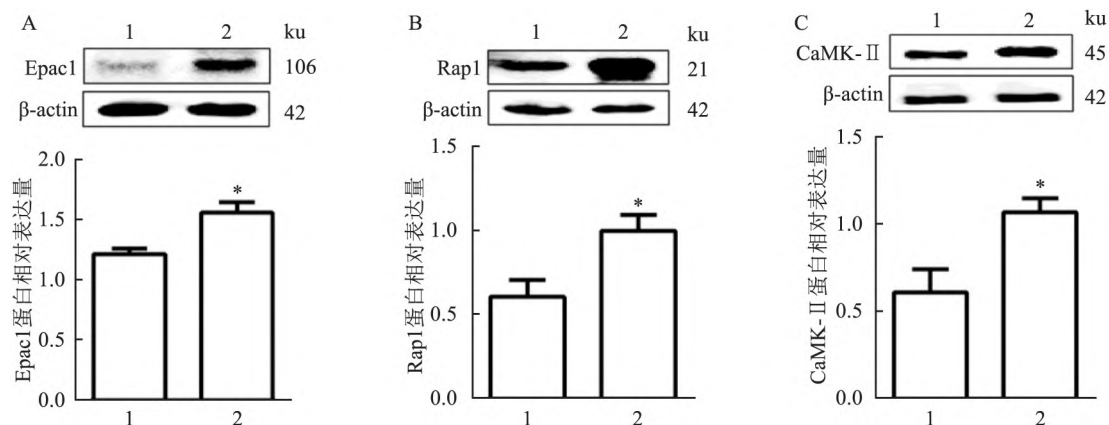


图3 对照组与噪声暴露组大鼠耳蜗 Epac1、Rap1 和 CaMK- II 蛋白表达量的变化

A: Epac1 蛋白表达; B: Rap1 蛋白表达; C: CaMK- II 蛋白表达; 1: 对照组; 2: 噪声暴露组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

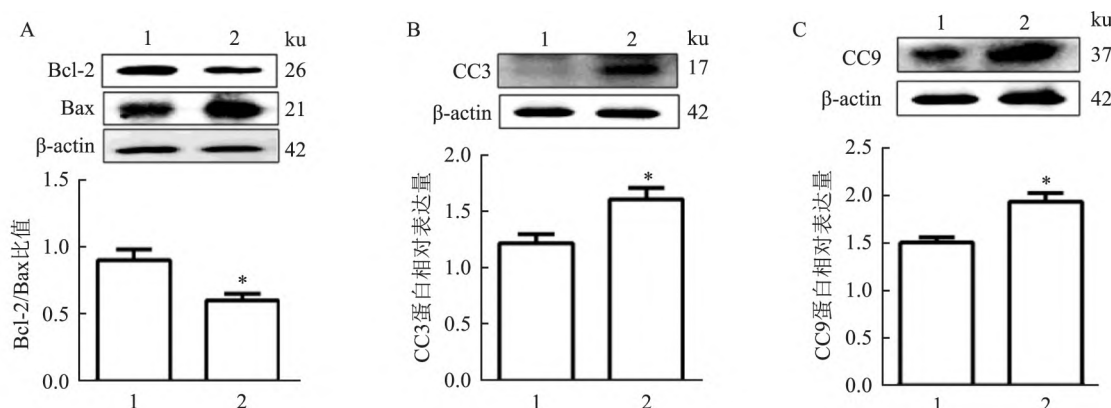


图4 对照组与噪声暴露组大鼠耳蜗 Bcl-2/Bax、CC3、CC9 蛋白表达量的变化

A: Bcl-2 蛋白表达; B: CC3 蛋白表达; C: CC9 蛋白表达; 1: 对照组; 2: 噪声暴露组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

肽染色及透射电镜结果均显示内耳毛细胞形态发生异常,证实了噪声暴露可导致内耳毛细胞形态结构损伤。

Epac1 作为 cAMP 激活的下游信号传导途径,主要存在于中枢神经系统、心脏、血管、肾脏中,涉及如细胞生长、黏附、分化、分裂、胞吐和炎症等广泛的细胞功能,同时也是一种影响细胞钙摄取的关键介质^[10]。该实验结果表明,与正常对照组比较,噪声暴露组大鼠耳蜗毛细胞 Epac1 免疫荧光显示高表达。另外,Western blot 结果也证实噪声暴露组大鼠耳蜗组织中 Epac1、Rap1 和 CaMK- II 蛋白表达均明显上调。据文献^[11]报道,Epac 的高表达会激活下游的 Rap1 通路,增加钙的摄取; Fazal et al^[12]在心肌细胞研究中发现 Epac 家族蛋白对心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} 的摄取有激活作用,并且是通过 CaMK- II 调控 Ca^{2+} 进入线粒体的; Lezcano et al^[13]研究表明 Epac 可以通过 CaMK- II 调控内质网对钙的释放与摄取,进而影响细胞质中 Ca^{2+} 浓度。该实验结果提示 Epac 通路参与了噪声诱导大鼠内耳损伤过程,而 Rap1 与 CaMK- II 作为 Epac 的下游蛋白,其表达水

平均显著上调,提示 Epac 激活介导大鼠噪声暴露内耳损伤可能与调控其下游 Rap1 与 CaMK- II 蛋白表达,促进内耳毛细胞钙超载有关。

细胞凋亡是维持机体稳态的重要生理过程。正常细胞中促凋亡和抗凋亡因子之间保持平衡,使细胞维持正常的增殖和生长。如果该平衡被破坏会导致人体多种疾病的发生,而听力障碍则是其中一种。已知长时间的钙超载会导致 Bax 活化,诱导线粒体外膜的通透性和细胞色素 C 的释放,激活下游的 Caspase 通路从而使细胞发生凋亡,而 Bcl-2 可拮抗 Bax 的表达,调节细胞的凋亡过程^[14-15]。该研究结果显示噪声暴露组大鼠耳蜗组织中 Bcl-2 表达降低,Bax 表达上调,并且 Caspase 级联反应中的关键蛋白 CC3 和 CC9 激活,导致 CC3 与 CC9 表达上调。

参考文献

- [1] Liu Y, Ao L, Li Y, et al. The SIRT2 inhibitor AK-7 decreases cochlear cell apoptosis and attenuates noise-induced hearing loss [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(3): 641-6.
- [2] Kurioka T, Matsunobu T, Satoh Y, et al. ERK2 mediates inner hair

- cell survival and decreases susceptibility to noise-induced hearing loss[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:16839.
- [3] de Rooij J, Zwartkruis F J, Verheijen M H, et al. Epac is a Rap 1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP[J]. *Nature*, 1998, 396(6710):474-7.
- [4] Yang Y, Shu X, Liu D, et al. EPAC null mutation impairs learning and social interactions *via* aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation[J]. *Neuron*, 2012, 73(4):774-88.
- [5] Boomkamp S D, McGrath M A, Housley M D. Epac and the high affinity rolipram binding conformer of PDE4 modulate neurite outgrowth and myelination using an *in vitro* spinal cord injury model[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(9):2385-98.
- [6] Kapoor N, Mani K V, Shukla M. Distortion product oto-acoustic emission: a superior tool for hearing assessment than pure tone audiometry[J]. *Noise Health*, 2019, 21(101):164-8.
- [7] Kurabi A, Keithley E M, Housley G D, et al. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss[J]. *Hea Res*, 2017, 349:129-37.
- [8] Wu J, Ye J, Kong W, et al. Programmed cell death pathways in hearing loss: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(11):e12915.
- [9] Coleman J K, Kopke R D, Liu J, et al. Pharmacological rescue of noise induced hearing loss using N-acetylcysteine and acetyl-L-carnitine[J]. *Hear Res*, 2007, 226(1-2):104-13.
- [10] Jeevaratnam K, Salvage S C, Li M, et al. Regulatory actions of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on osteoclast function: possible roles of Epac-mediated signaling[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1433(1):18-28.
- [11] Breckler M, Berthouze M, Laurent A C, et al. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(8):1257-66.
- [12] Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, et al. Multifunctional mitochondrial Epac1 controls myocardial cell death[J]. *Circ Res*, 2017, 120(4):645-57.
- [13] Lezcano N, Mariángelo J I E, Vittone L, et al. Early effects of Epac depend on the fine-tuning of the sarcoplasmic reticulum Ca handling in cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114:1-9.
- [14] 韩维举, 史晓瑞, Nuttall A. 噪声刺激致豚鼠外毛细胞凋亡时半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3激活和凋亡诱导因子转移[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 42(7):515-9.
- [15] Kurioka T, Matsunobu T, Niwa K, et al. Activated protein C rescues the cochlea from noise-induced hearing loss[J]. *Brain Res*, 2014, 1583:201-10.

Epac1 signaling mediates the injury of inner ear hair cells induced by noise exposure in rats and its mechanism

Wang Cheng^{1,2}, Sun Fanfan¹, Zhang Junge³, Sun Jiaqiang³, Dong Liuyi¹

(¹Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Diagnostics, The First Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of (exchange protein directly activated by cAMP-1) on inner ear hair cell injury with noise-induced hearing loss and its potential mechanism in rats. **Methods** Twenty Specific pathogen-free (SPF) Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group and noise exposure group. The rats of noise exposure were exposed to 4 kHz at 101 dB sound pressure level (SPL) for 8 h. Auditory brainstem responses (ABR) were measured in animals before noise exposure and 24 h after noise exposure. Surface preparation, transmission electron microscopy and immunohistochemistry were performed on cochlea tissue to elucidate changes in Epac expression in rat after noise exposure. The expression levels of Epac1, Rap1, CaMK-Ⅱ, Bax, Bcl-2, cleaved caspase3 (CC3) and cleaved caspase9 (CC9) were analyzed using Western blot. **Results** There was found a stable temporary threshold shift after noise exposure ($P < 0.05$). The missing of outer hair cells occurred after noise exposure ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy indicated that the epidermis plate of HCs was partially dissolved, with loss or fusion of stereocilia, some HC organelles showed serious injuries after noise exposure. Epac1 immunostaining intensities were substantially enhanced in OHCs after noise exposure ($P < 0.05$). The expression levels of Epac1, CaMK-Ⅱ and Rap1 protein were significantly up-regulated after noise exposure ($P < 0.05$). The expression level of Bcl-2 was significantly down-regulated after noise exposure ($P < 0.05$). The expression levels of Bax, CC3 and CC9 were significantly up-regulated after noise exposure ($P < 0.05$). **Conclusion**

Epac1-Rap1 signaling pathway mediates the early pathological damage in noise-exposed cochlea, and participates in the regulation of inner ear hair cells apoptosis. Epac1-Rap1 pathway is expected to become a new target for intervention in noise-induced hearing loss.

Key words Epac; noise-induced hearing loss; inner hair cell; apoptosis