

鼠神经生长因子抗 C57BU/6J 小鼠毛细胞凋亡与保护作用的研究



葛珊珊,杜毓锋,钱力,武婷

摘要:目的 研究 C57BU/6J 小鼠耳蜗内神经生长因子(NGF)随年龄改变的分布特点及鼠神经生长因子干预小鼠耳蜗毛细胞的凋亡机制。方法 对不同月龄 C57BU/6J 小鼠注射 NGF 后,通过 Western blot 方法检测各组耳蜗基膜中 NGF 蛋白的表达,同时检测 caspase-3 的表达变化情况。结果 与对照组相比,注射 NGF 处理组小鼠耳蜗基膜 NGF 蛋白表达明显高于对照组($P < 0.001$),而 caspase-3 在对照组中的表达显著低于 NGF 处理组小鼠($P < 0.001$)。结论 NGF 注射后可提升小鼠耳蜗基底膜中该蛋白的表达,通过降低耳蜗组织中 caspase-3 的表达,抑制老龄大鼠内耳毛细胞凋亡而发挥相应保护作用。

关键词:鼠神经生长因子;毛细胞;凋亡;神经生长因子

中图分类号:R329 R285.5 **文献标识码:**A **doi:**10.12102/j.issn.1672-1349.2019.07.012

老年性耳聋是指随年龄增加而逐渐发生的以高频听力下降为主的感音神经性耳聋。随着我国逐渐步入老龄化社会,老年性耳聋发病率逐年增高,同时由于神经性耳聋治疗效果欠佳,老年性耳聋已经成为老年人生活质量下降的重要原因之一。目前老年性耳聋的发病机制尚未完全阐明,研究显示毛细胞和螺旋神经节细胞发生凋亡可能是重要的分子机制。鼠神经生长因子(NGF)对听觉上皮、听觉神经元细胞的增殖分化、活化及发育成熟起着重要作用,而且对损伤后残存神经元起着修复和保护作用。本研究以具有退变性耳聋病变特征的 C57BU/6J 小鼠作为实验对象,注射 NGF 后检测 NGF 及 caspase-3 在基膜的免疫印迹表达情况,探究 NGF 对耳蜗毛细胞凋亡的逆转作用,从而评价 NGF 对内耳毛细胞是否起到保护作用,为临床治疗提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 动物模型 选择 C57BU/6J 小鼠作为研究对象^[1],C57BU/6J 小鼠具有退变性耳聋病变的特征,该种系小鼠耳蜗毛细胞在成年早期开始蜕变,随年龄增长,听力损失符合感音性老年性耳聋的变化规律,符合研究要求。健康 C57BU/6J 小鼠购自北京维通利华公司,分别将 C57BU/6J 小鼠分为对照组、3 周龄处理组、12 周龄处理组,每组 12 只,雌雄不限,单笼饲养 IVC 系统中。

1.2 试剂与方法 鼠神经生长因子(恩经复)购自厦门未名生物医药有限公司。处理组给予腹腔注射鼠神经生长因子,每次 6 kU,1 次/日,持续 1 周,对照组以同样方法注射生理盐水。重组 NGF 抗体购于美国 CST 公司,兔抗 caspase-3 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,HRP 直标 GAPDH 抗体购自康为世纪生物科技有限公司。预制胶购置于上海翊圣公司。

1.3 耳蜗基膜制备 麻醉下处死小鼠,将小鼠耳蜗取出,放置于冰盘上的无菌玻璃皿中,剔除听泡、听骨、鼓膜,迅速剥离基膜后用于总蛋白提取。

1.4 总蛋白和 Western Blot 提取方法 基膜置于 1.5 mL 组织匀浆器中,加入裂解液 RIPA、PMSF、NaF(100:1:1),研磨 30 min 至组织透亮、无颗粒,静置 10 min,吸出组织液至 1.5 mL 离心管,然后 4 °C 离心机 12 500 r/min,离心 30 min,小心吸取上清,置于 0.5 mL 离心管中,于 -80 °C 保存备用。

Western Blot 提取法:取出蛋白,用酶标仪测出蛋白浓度,根据上样质量来计算上样体积,按量加入蛋白等,在沸水中煮 5 min;预制胶上胶架,点样后电泳,刚开始 60 V 后转至 120 V;转膜,100 V,45 min;封闭,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h;剪膜,加入一抗孵育过夜,复温 1 h;洗膜, TBST 清洗 1 次 10 min,共 3 次;加入二抗,HRP 标记的 IgG 二抗(1:10 000);洗膜, TBST 清洗 1 次 10 min,共 3 次;加入 1×TBS;显影,用 ECL 化学发光检测试剂盒显影。其中兔抗 caspase-3 多克隆抗体(1:1 000),重组 NGF 抗体(1:1 000)。

1.5 统计学处理 免疫印迹条带在凝胶分析仪采集并进行灰度值读取并记录,各组灰度值用对应内参灰度值进行校正后所有数据,均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 SPSS 18.0 软件分析数据,各组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

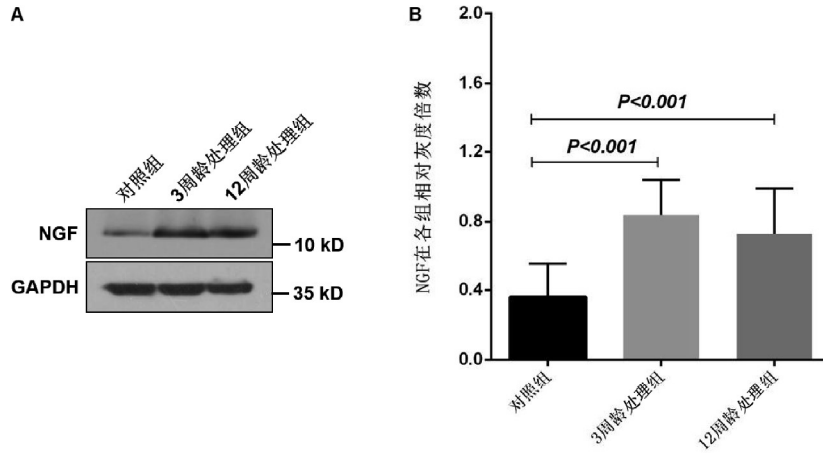
基金项目 山西省基础研究计划青年科技研究基金(No.2014021039-4)
作者单位 山西医科大学第一医院(太原 030001),E-mail: geshanhan1@163.com

引用信息 葛珊珊,杜毓锋,钱力,等.鼠神经生长因子抗 C57BU/6J 小鼠毛细胞凋亡与保护作用的研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(7):1005-1007.

2 结果

2.1 NGF 在 C57BU/6J 小鼠耳蜗组织中的表达 经 Western Blot 检测,NGF 蛋白在实验组 C57BU/6J 小鼠耳蜗中的表达相对倍数为(0.36±0.19),低于 3 周龄

处理组的(0.84±0.20)和 12 周龄处理组的(0.73±0.26, $P < 0.001$)。3 周龄处理与 12 周龄处理组相比,NGF 蛋白的表达无统计学意义($P = 0.218$)。详见图 1。

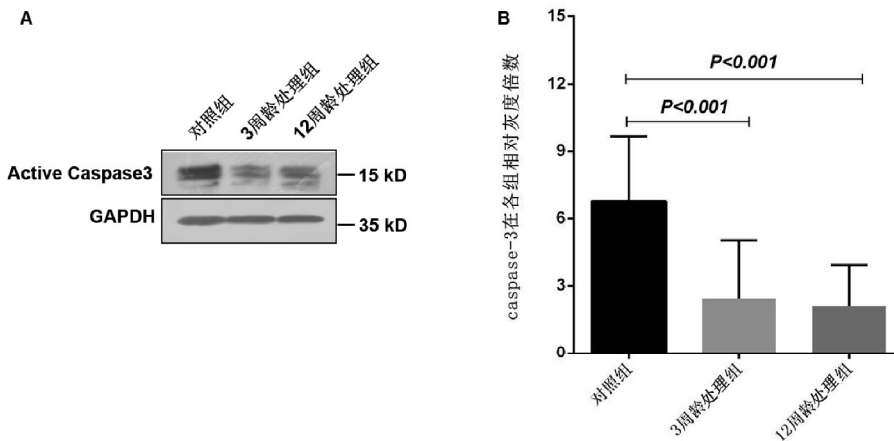


A 为 NGF 蛋白分别在对照组、3 周龄处理组、12 周龄处理组小鼠中的表达;
B 为 NGF 蛋白分别在各组中相对灰度倍数(经内参 GAPDH 校正)

图 1 NGF 蛋白在 C57BU/6J 小鼠耳蜗组织中的表达

2.2 Caspase-3 在 C57BU/6J 小鼠耳蜗组织中的表达 经 NGF 注射处理后,经 Western Blot 检测 caspase-3 在各组中的表达,对照组该蛋白相对表达倍数为(6.76±2.91),分别高于 3 周龄处理组的(2.43±2.59, $P <$

0.001)和 12 周龄处理组的(2.12±1.79, $P < 0.001$),3 周龄处理组与 12 周龄处理组相比差异无统计学意义($P = 0.772$)。详见图 2。



A 为 caspase-3 蛋白分别在对照组、3 周龄处理组、12 周龄处理组小鼠中的表达;
B 为 caspase-3 蛋白分别在各组中相对灰度倍数(经内参 GAPDH 校正)

图 2 Caspase-3 蛋白在 C57BU/6J 小鼠耳蜗组织中的表达

3 讨论

鼠神经生长因子是从小鼠颌下腺分离纯化出的细胞生长因子,是一种相对分子质量为 265 000 kD 的生物活性蛋白^[2]。NGF 兼有神经营养因子与促进神经突起生长因子双重作用,对神经细胞的生长发育、分化、再生发挥着调节作用^[3-5]。景阳等^[6]经鼓膜穿刺局部使用鼠神经生长因子通过蜗窗膜后,在内耳淋巴液

中维持较高的浓度,达到营养神经的功能,促进内耳的功能恢复。在神经系统遇物理、化学等多种损害时,外源性神经生长因子可以保护感觉神经元和交感神经元,减轻伤害的程度,促进再生神经纤维生长,有利于神经功能的恢复。因此,NGF 对损伤后的中枢神经系统神经元有保护作用,可防止因损伤导致的神经元萎缩与死亡,促进中枢神经系统损伤后神经功能恢复^[7]。

本实验通过小鼠腹腔注射 NGF 后,发现处理组中不同周龄小鼠耳蜗组织内 NGF 的表达均增高,且与对照组相比差异有统计学意义,说明小鼠腹腔注射 NGF 后可弥散到达耳蜗。

老年性耳聋具体的发病机制尚未完全阐明,目前研究认为主要与内耳微循环缺血缺氧、毛细胞和螺旋神经节细胞凋亡和坏死^[8-11]等有关。细胞凋亡是细胞在死亡信号刺激后发生的一系列级联激活的主动性细胞死亡过程。Caspase 家族在诱导细胞凋亡的分子机制中起着关键作用,Caspase-3 是其中主要的效应者分子,在细胞凋亡机制网络中居中心地位^[12-15]。检测 caspase-3 的表达情况,有助于评价 NGF 是否对毛细胞发挥抑制凋亡并起到保护作用。本实验发现,注射 NGF 后的小鼠基膜中,对照组 caspase-3 蛋白表达显著低于 NGF 处理组,提示注射 NGF 后可以抑制毛细胞凋亡,从而发挥一定的保护作用。

综上所述,NGF 注射后可提升小鼠耳蜗基膜中该蛋白的表达,通过降低耳蜗组织中 caspase-3 的表达,抑制老龄大鼠内耳毛细胞凋亡而发挥相应保护作用,为临床治疗提供理论支撑。

参考文献:

[1] 徐延军,杨仕明,胡吟燕,等.C57BL/6 小鼠内耳形态学和年龄相关性听力损失的研究[J].中华耳科学杂志,2008,6(4):398-402.
 [2] 董为伟.神经保护的基础与临床[M].北京:科学出版社,2002:239-245.
 [3] 李培建.神经营养因子的生物学作用及其应用[J].现代康复,2001,5(1):70-71.

[4] 赵重熙,马军,何宁,等.局部应用神经生长因子对周围神经损伤后骨折早期愈合的影响[J].中国组织工程研究,2015,19(15):2320-2324.
 [5] 彭成为,余开峰,杨镭镭,等.人神经生长因子 β 基因转染对神经病理理性痛大鼠脊髓背角致痛物质含量的影响[J].中华麻醉学杂志,2009,29(2):129-132.
 [6] 景阳,张文,王宇娟,等.鼠神经生长因子不同给药方式治疗突发性耳聋的效果比较[J].中国医药导报,2016,13(15):127-130.
 [7] 王炜,赵海霞.注射用鼠神经生长因子对大鼠缺血脑组织神经生长因子及脑源性神经营养因子表达的影响[J].中国药物与临床,2017,17(2):171-174.
 [8] HUGHES L F,TURNER J G,PARRISH J L, et al .Processing of broadband stimuli across A1 layers in young and aged rats[J].Hear Res,2010,264(1/2):79-85.
 [9] 侯志强,兰兰,王大勇,等.老年突发性耳聋的临床特征和转归[J].中华耳科学杂志,2010,8(2):141-148.
 [10] 张欣,杨秋英,武王将.基于细胞凋亡的老年性耳聋发病机制研究进展[J].中国医学装备,2015,12(12):84-86.
 [11] 谢静,龚树生.衰老与老年性耳聋[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,30(6):367-370.
 [12] CHOUDHARY G S,AL-HARBI S,ALMASAN A.Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J].Methods Mol Biol,2015,12(19):1-9.
 [13] 弓娟琴.Fas 介导的凋亡与 caspase 家族[J].国外医学:皮肤性病学分册,2001,27(5):279-281.
 [14] 尹志利,吴玮,王刚,等.低频强噪声对大鼠听力的影响及内耳 Caspase-3 的表达[J].中华耳科学杂志,2014,12(3):503-506.
 [15] 韩维举,陈星睿.噪声暴露引起耳蜗损伤机制的研究[J].中华耳科学杂志,2013,11(3):357-362.

(收稿日期:2018-04-08)

(本文编辑 王雅洁)

(上接第 992 页)

[3] VOROS S,JOSHI P H,VAZQUEZ G, et al .Cardiovascular computed tomographic assessment of the effect of combination lipoprotein therapy on coronary arterial plaque:rationale and design of the AFRICA(Atorvastatin plus Fenofibric acid in the Reduction of Intermediate Coronary Atherosclerosis) study[J].J Cardiovasc Comput Tomogr,2010,4(3):164-172.
 [4] 曹珊,王峰,刘紫阳,等.丹蒾片抗动脉粥样硬化作用的临床研究[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(13):156-159.
 [5] 张淑英.中西医结合治疗动脉硬化 34 例疗效观察[J].世界中西医结合杂志,2014,20(12):1315-1317.
 [6] 陈洁,蔡宏文,缪静,等.丹蒾片抗痰瘀互结型动脉粥样硬化大鼠炎症反应及机制[J].中国中西医结合杂志,2016,36(6):703-708.
 [7] 郑静红,吴文君,余子瑜,等.贝前列素钠联合阿托伐他汀治疗 TIA 合并颈动脉斑块的对照研究[J].中国生化药物杂志,2014,34(1):125-126;129.
 [8] 陈灏珠,林果为.实用内科学[M].13 版.北京:人民卫生出版社,2009:1490.
 [9] 中华人民共和国卫生部.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国中医药科技出版社,2002:181-182.

[10] 国家技术监督局.中华人民共和国国家标准 GB/T16751.1-1997 中医临床诊疗术语(疾病部分、证候部分、治法部分)[M].北京:中国标准出版社,1997:9-10.
 [11] 李悦梅.国际动脉粥样硬化化学会预防动脉粥样硬化性心血管疾病临床指南(摘要)[J].中国动脉硬化杂志,2003,11(5):484-492.
 [12] 张亚楠,邢瑜,李辉,等.颈动脉粥样硬化斑块与脑梗死的临床相关分析[J].脑与神经疾病杂志,2016,24(2):108-112.
 [13] 焦岩,徐江涛,阿托伐他汀治疗急性缺血性卒中患者颈动脉粥样硬化斑块的临床研究[J].重庆医学,2012,41(6):550-551.
 [14] 张艳,于睿,刘文华,等.心脑血管粥样硬化中医证型与易患因素分析研究[J].时珍国医国药,2010,21(3):699-700.
 [15] 徐丹,杨关林.从痰瘀方面浅谈冠心病病因病机[J].中外健康文摘,2009,6(25):256-257.
 [16] 支艳,马建伟,魏汉林,等.试论中医痰瘀相关理论[J].中医临床研究,2011,3(2):58-60.
 [17] 潘卫东.基于个体化治疗的神经病学精准医疗与辨证论治[J].神经病学与神经康复学杂志,2016,12(2):57-63.

(收稿日期:2018-12-14)

(本文编辑 王雅洁)