

氧化/抗氧化失衡在大鼠中枢听觉系统老化过程中的作用

胡 璟¹,高春生¹,刘 林²,杜政德^{1*}

(1. 广东医学院附属南山医院耳鼻咽喉科,广东 深圳 518052;2. 广西医科大学药学院)

摘要: **目的** 研究氧化/抗氧化失衡在 D-半乳糖诱导的大鼠老化中枢听觉系统听皮层组织中的作用,探讨老年性耳聋氧化性损伤的发生机制。 **方法** 48 只 1 月龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分成 4 组(各 12 只),不同剂量 D-半乳糖每日颈背部皮下注射 D-半乳糖(500 mg/kg)造模,连续 8 周。造模完成后,取 4 组大鼠中枢听觉系统听皮层组织,检测活性氧指标过氧化氢、总抗氧化能力指标抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总水平、DNA 氧化损伤生物标记物 8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-OHdG)的表达以及最常发生的年龄相关性 mtDNA 损伤线粒体 DNA(mtDNA)4 834 bp 大片段缺失的累积水平。将实验数据采用方差分析进行分析。 **结果** 与对照组大鼠相比较,D-半乳糖诱导的老化大鼠听皮层组织中过氧化氢含量明显增多,而总抗氧化能力明显下降($P < 0.01$)。同时,DNA 氧化损伤的产物 8-OHdG 的表达和线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变的累积明显增多($P < 0.01$)。 **结论** 在中枢听觉系统老化过程中,氧化/抗氧化失衡可能是导致老年性耳聋发生的重要原因。

关键词: 氧化/抗氧化失衡; 老化; 中枢听觉系统; 氧化性损伤; 线粒体 DNA

中图分类号: R764.43 **文献标识码:** A

The Role of Oxidation/Antioxidant Imbalance in the Age-related Damage of the Rat Central Auditory System

HU Jing, GAO Chunsheng, LIU Lin, et al

(Department of Otorhinolaryngology, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518052, China)

Abstract: Objective To explore the effects of oxidation/antioxidant imbalance on the auditory cortex of central auditory system of D-galactose-induced aging rats and investigate the mechanism of oxidative damage of age-related hearing loss.

Methods Forty-eight 1-month male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups (12 rats in each group), and were injected subcutaneously with different dose of D-gal once a day for 8 weeks. After the experiment termination, the tissues were harvested from the auditory cortex of central auditory system. Investigate the expression of hydrogen peroxide, total antioxidant capacity, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and the accumulation of mitochondrial DNA 4 834 bp deletion. All experimental data was analysed with one-way ANOVA. **Results** The expression of hydrogen peroxide in the auditory cortex of rats of D-galactose groups was significantly increased compared with the control group, while the expression of the total antioxidant capacity was significantly decreased (all $P < 0.01$). Meanwhile, the expression of 8-OHdG and the accumulation of mitochondrial DNA 4 834 bp deletion were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusions** In the aging process of central auditory system, the oxidation/antioxidant imbalance may be an important cause for the age-related hearing loss.

Key words: oxidation/antioxidant imbalance; aging; central auditory system; oxidative damage; mitochondrial DNA

收稿日期:2015-01-20;修回日期:2015-8-21

基金项目:广东省医学科研基金(B2014370);深圳市科技计划(JCYJ20140411092351692);深圳市南山区技术研发和创意设计项目分项资金(南科研卫2012014号)。

* 通讯作者, E-mail: duzhengde@163.com.

老化是生物体对抗各种应激、损伤和疾病的能力逐渐下降的过程^[1]。年龄相关性听力损失,又称为老年性耳聋,是老化在听觉系统的表现。然而,老年性耳聋听觉系统退行性变的确切机制仍不十分清楚。

由于在活体的人体听觉系统组织不可获得以及

伴有听力损失的个体所处环境不同,老年性耳聋的研究在一定程度上受到限制。因此,研究者建立许多老年性耳聋的动物模型。其中,通过给实验大鼠慢性注射 D-半乳糖的方法可以很好的模拟大鼠的自然老化过程,成为研究老年性耳聋的理想模型^[2-4]。

目前,大量研究已经证实氧化性应激是导致老化的重要原因^[5-7]。但是,体内氧化性应激和抗氧化能力的相互作用在老化大鼠中枢听觉系统退行性变过程中的作用仍不完全清楚。本研究利用 D-半乳糖诱导的老化大鼠模型,通过检测中枢听觉系统听皮层组织中活性氧指标过氧化氢、总抗氧化能力、DNA 氧化损伤的产物 8-羟基-2-脱氧鸟苷的表达和人类线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)4 977 bp 缺失(在大鼠与之相对应的 mtDNA CD 为 4 834 bp)的累积,探讨氧化/抗氧化失衡在 D-半乳糖诱导的老化大鼠中枢听觉系统氧化损伤过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 D-半乳糖诱导的老化大鼠模型的构建

选耳廓反射灵敏且无中耳疾患的 SPF 级 1 月龄雄性 SD 大鼠 48 只,由广西医科大学实验动物中心提供,适应性喂养 1 周,随机分为 4 组(每组各 12 只):① 对照组:每日颈背部皮下注射生理盐水,连续 8 周;② 低剂量 D-半乳糖组:每日颈背部皮下注射 D-半乳糖(150 mg/kg),连续 8 周;③ 中剂量 D-半乳糖组:每日颈背部皮下注射 D-半乳糖(300 mg/kg),连续 8 周;④ 高剂量 D-半乳糖组:每日颈背部皮下注射 D-半乳糖(500 mg/kg),连续 8 周。所有动物均饲养在室温约 20~22 °C 左右,12 h 昼夜交替的环境中,自由进食饮水。两组动物均无噪声暴露史,无其它药物使用史。

1.2 过氧化氢和总抗氧化力的检测

4 组大鼠(每组 6 只)肌肉注射氯胺酮(30 mg/kg)和氯丙嗪(15 mg/kg)麻醉后处死,快速取出双侧听皮层。一侧用于过氧化氢和总抗氧化力(主要由抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总的水平决定)的检测,另一侧保存于 -80 °C 冰箱用于线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变的累积水平的检测。使用组织过氧化氢检测试剂盒(南京建成生物,中国)和总抗氧化力检测试剂盒(碧云天,中国)检测各组大鼠听皮层内过氧化氢和总抗氧化力的水平。听皮层组织总蛋白浓度采用 BCA 法进行蛋白定量。

1.3 线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变的检测

1.3.1 基因组 DNA 的提取

将听皮层组织分别放入 GA 缓冲液(Tiagen Biotech Co., LTD, 北京, 中国)中匀浆,提取基因组 DNA。

1.3.2 Taqman PCR 检测线粒体 DNA(mtDNA)常见 4 834 bp 大片段大片段缺失突变(CD)的累积

运用 Taqman PCR 检测耳蜗软组织和听皮层组织线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变(mtDNA CD),由于 mtDNA CD D-loop 区很少发生突变,为 mtDNA CD 的保守序列,因此用 D-loop 作为内参。根据荧光扩增曲线确定 Ct 值。mtDNA CD 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。 $\Delta\Delta Ct = D - \text{半乳糖组}(Ct_{\text{mtDNA CD}} - Ct_{\text{mtDNA D-loop}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{mtDNA CD}} - Ct_{\text{mtDNA D-loop}})$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 代表各 D-半乳糖组 mtDNA CD 的量与对照组 mtDNA CD 的量的比值。使用 Taqman PCR 扩增试剂盒(TaKaRa, 大连, 中国)进行 PCR 反应。反应总体积:20 μ L。反应条件:①预变性:95 °C 30 s,共 1 个循环;②PCR 反应:95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。所用引物和探针序列如下:D-loop:上游引物:5'-GGT TCT TAC TTC AGG GCC ATC A-3';下游引物:5'-GAT TAG ACC CGT TAC CAT CGA GAT-3';探针:5'-FAM-TTG GTT CAT CGT CCA TAC GTT CCC CTT A-TAMRA-3'。CD:上游引物:5'-AAG GAC GAA CCT GAG CCC TAA TA-3';下游引物:5'-CGA AGT AGA TGA TCC GTA TGC TGT A-3';探针:5'-FAM-TCA CTT TAA TCG CCA CAT CCA TAA CTG CTG T-TAMRA-3'。

1.4 DNA 氧化损伤标记物 8-OHdG 的检测

1.4.1 取材及免疫组织化学标本的制作

4 组大鼠(每组 6 只)肌肉注射氯胺酮(30 mg/kg)和氯丙嗪(15 mg/kg)麻醉后,0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)心脏快速灌注大鼠,继而 4% 多聚甲醛心脏灌注,快速取出大脑,放入 4% 多聚甲醛中,4 °C 过夜。第 2 天,将固定好的大脑经脱水、透明、石蜡包埋和切片过程,最终制成 5 μ m 厚的切片。大脑沿冠状位切片,根据《大鼠脑立体定位图谱》选取听皮层层面的切片,放入 -20 °C 冰箱保存备用。

1.4.2 免疫组织化学染色检测 8-OHdG

听皮层石蜡切片依次放入二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III、100% 乙醇 I、100% 乙醇 II、95% 乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水各 20 min、15 min、10 min、5 min、2 min、1 min、1 min、1 min、1 min、2 min,然后滴加浓度为 20 μ g/mL 蛋白酶 K(碧云天,中国)进行修复,37 °C 15 min,甩去修复液,继续

滴加 3% 的过氧化氢以阻断内源性过氧化物酶, 室温孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。甩干玻片, 用免疫组画笔在组织周围画圈, 滴加 5% BSA 封闭以减少非特异性染色, 室温 30 min。甩去封闭液, 滴加一抗 anti-8-OHdG (1:4 000, abcam, 美国) 4 °C 过夜。第二天, 37 °C 复温 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。滴加 CY3 标记的二抗 (博士德, 中国) 20 ~ 37 °C 孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。DAPI (碧云天, 中国) 复染细胞核, 室温 5 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。抗荧光猝灭封片液 (碧云天, 中国) 封片, 荧光显微镜 (Nikon, 日本) 观察。

2 结 果

2.1 听皮层组织中过氧化氢和总抗氧化力的表达

不同剂量 D-半乳糖诱导的老化大鼠听皮层组织中过氧化氢的表达比对照组显著升高, 而总抗氧化力比对照组显著降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

2.2 听皮层组织中 DNA 氧化损伤产物 8-羟基-2-脱氧鸟苷的表达

DNA 氧化损伤产物 8-羟基-2-脱氧鸟苷主要在老化大鼠中枢听觉系统听皮层神经

元胞浆中表达, 且不同剂量 D-半乳糖组均比对照组表达显著增强 (图 2)。

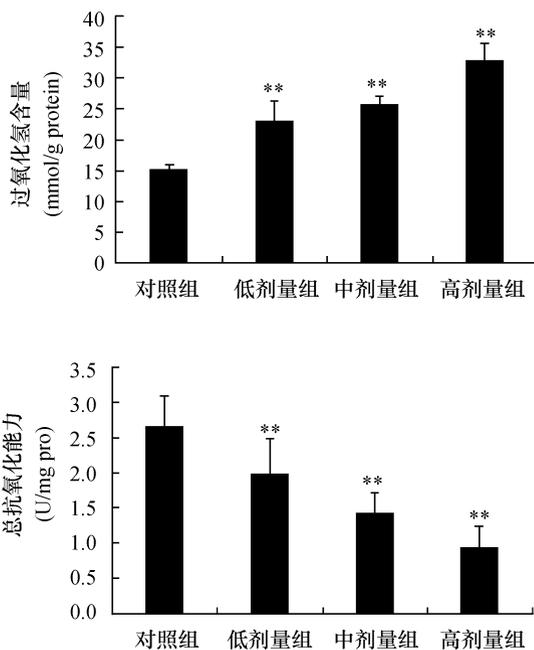


图 1 过氧化氢和总抗氧化力在听皮层中的表达 与对照组比较, * *: $P < 0.01$

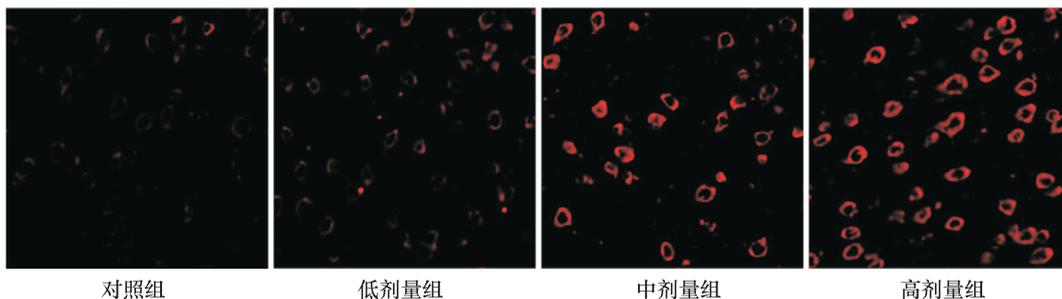


图 2 DNA 氧化损伤产物 8-羟基-2-脱氧鸟苷在听皮层中的表达 (400 ×)

2.3 听皮层组织中线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变的累积

不同剂量 D-半乳糖诱导的老化大鼠听皮层组织中线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变的累积比对照组显著升高 (图 3), 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

听觉系统由外周听觉系统和中枢听觉系统组成。听皮层是中枢听觉系统的最高级中枢, 是声音

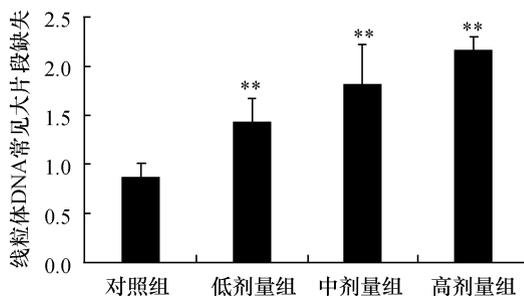


图 3 线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变在听皮层中的累积 与对照组比较, * *: $P < 0.01$

信号被活体认知的最终部位。越来越多的研究已经证实中枢听觉系统的退行性变是导致老年性耳聋的重要原因^[8-10]。本研究发现 D-半乳糖诱导的老化大鼠中枢听觉系统听皮层组织中不仅活性氧指标过氧化氢含量增加,而且总抗氧化能力下降,提示氧化/抗氧化失衡可能在老年性耳聋的发病过程有着重要的作用。

氧化/抗氧化失衡引起的氧化性应激可损伤细胞内蛋白质、脂质、RNA 和 DNA 等^[7]。本研究发现不同剂量 D-半乳糖诱导的老化大鼠听皮层组织中 DNA 氧化损伤标记物 8-羟基-2-脱氧鸟苷明显增加,与此同时线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变的累积也明显增加,表明氧化/抗氧化的失衡可引起细胞内 DNA,特别是线粒体 DNA 的损伤。线粒体 4834 - bp 大片段缺失是最常发生的年龄相关的线粒体 DNA 缺失突变,是老化的生物标记^[11-13]。越来越多的文献报道老年性聋和线粒体 4 834 bp 大片段缺失突变的累积密切相关^[14-16]。线粒体 DNA 的突变不仅可影响线粒体的能量代谢,还可诱导依赖线粒体的细胞凋亡途径的激活,最终导致细胞的凋亡^[7]。

综上所述,在 D-半乳糖诱导的老化大鼠中枢听觉系统的老化过程中,氧化/抗氧化失衡引起的氧化性应激可导致线粒体 DNA 突变的累积增加,在老年性耳聋的发病过程中可能扮演了重要的角色,而维持氧化/抗氧化的平衡对预防和延缓老年性耳聋的发生和发展有着重要的意义。

参考文献:

[1] Wei YH, Wu SB, Ma YS, et al. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging [J]. *Chang Gung Med J*, 2009, 32(2):113-132.

[2] Ho SC, Liu JH, Wu RY, et al. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose [J]. *Biogerontology*, 2003, 4(1):15-18.

[3] Du Z, Yang Y, Hu Y, et al. A long-term high-fat diet increases oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the inner ear of d-galactose-induced aging rats [J]. *Hear Res*, 2012, 287(1-2):15-24.

[4] Chen B, Zhong Y, Peng W, et al. Age-related changes in the central auditory system: comparison of D-galactose-induced aging rats and naturally aging rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1344:43-53.

[5] Yuliya M, Andreas D, Sebastian S, et al. Mitochondrial ox-

idative stress, mitochondrial DNA damage and their role in age-related vascular dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7):15918-15953.

[6] Krishnan V, Sandhya K, Tai TC, et al. Oxidative stress in aging-matters of the Heart and Mind [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9):17897-17925.

[7] Hiona A, Leeuwenburgh C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging [J]. *Exp Gerontol*, 2008, 43(1):24-33.

[8] Wang H, Brozoski TJ, Ling L, et al. Impact of sound exposure and aging on brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptors levels in dorsal cochlear nucleus 80 days following sound exposure [J]. *Neuroscience*, 2011, 172:453-459.

[9] Gates GA, Feeney MP, Mills D, et al. Cross-sectional age-changes of hearing in the elderly [J]. *Ear Hear*, 2008, 29(6):865-874.

[10] Frisina RD, Walton JP. Age-related structural and functional changes in the cochlear nucleus [J]. *Hear Res*, 2006, 216-217:216-223.

[11] Zeng LL, Yang Y, Hu YJ, et al. Age-related decrease in the mitochondrial sirtuin deacetylase sirt3 expression associated with ROS accumulation in the auditory cortex of the mimetic aging rat model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88019.

[12] Nicklas JA, Brooks EM, Hunter TC, et al. Development of a quantitative PCR (TaqMan) assay for relative mitochondrial DNA copy number and the common mitochondrial DNA deletion in the rat [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2004, 44(4):313-320.

[13] Edris W, Burgett B, Stine OC, et al. Detection and quantitation by competitive PCR of an age-associated increase in a 4.8-kb deletion in rat mitochondrial DNA [J]. *Mutat Res*, 1994, 316(2):69-78.

[14] Yin S, Yu Z, Sockalingam R, et al. The role of mitochondrial DNA large deletion for the development of presbycusis in Fischer 344 rats [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 27(3):370-377.

[15] Markaryan A, Nelson EG, Hinojosa R, et al. Quantification of the mitochondrial DNA common deletion in presbycusis [J]. *Laryngoscope*, 2009, 119(6):1184-1189.

[16] Ren HM, Ren JH, Liu W, et al. Recognition and Control of the Progression of Age-Related Hearing Loss [J]. *Rejuvenation Res*, 2013, 16(6):475-486