

论著·基础研究

星形胶质细胞在噪声损伤后小鼠耳蜗核突触修复中的作用

周卫军^{1,2,3}, 刘思迪^{1,2,3}, 蔡瑞捷^{1,2,3}, 刘宏超^{1,2,3}, 王美建^{1,2,3}, 吴皓^{1,2,3}, 刘辉辉^{1,2,3#}, 汪照炎^{1,2,3#}

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200011; 2. 上海交通大学医学院耳科学研究所, 上海 200125; 3. 上海市耳鼻疾病转化医学重点实验室, 上海 200125

[摘要] **目的**·通过形态学分析和分子生物学技术, 探究噪声引起的耳蜗核损伤的病理生理变化以及星形胶质细胞对损伤的调节功能。**方法**·将48只C57BL/6J雄性小鼠随机分成2组暴露在110 dB声压级 (sound pressure level, SPL) 的宽频噪声下, 持续2 h。然后在噪声暴露后的第1、7、14、30和90日对小鼠进行听性脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) 测试; 并对耳蜗核组织进行免疫荧光染色观察耳蜗核神经元、听觉突触损伤情况以及星形胶质细胞激活程度; 此外, 通过蛋白质印迹法 (Western blotting) 进一步验证噪声对耳蜗核神经元与神经突触的损伤情况。**结果**·噪声暴露后, 腹侧耳蜗核中丛细胞数量显著减少。Western blotting结果显示耳蜗核神经元中神经纤维严重丢失, 表明噪声对耳蜗核神经元造成了严重的损害。囊泡谷氨酸转运蛋白1 (vesicular glutamate transporter 1, Vglut1) 标记的听觉神经突触明显丧失, 其中在噪声暴露后的第14日丧失最为严重, 随后在第90日呈缓慢恢复趋势。此外, 在噪声暴露后, 耳蜗核中星形胶质细胞呈现出明显的聚集和激活。通过胶质酸性纤维蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 染色, 提示在噪声暴露之前, 大多数星形胶质细胞分布在耳蜗核的周边、颗粒细胞区和听觉神经根周围, 并且形态较小。然而, 在噪声暴露后的第14日, 腹侧耳蜗核中大量激活的星形胶质细胞积聚, 并且它们都表现出在突触周围生长的模式。**结论**·噪声暴露导致耳蜗核神经突触损伤, 星形胶质细胞可能参与其损伤和修复过程。这些研究结果将为进一步理解耳蜗核中声音信号分析、整合和神经可塑性的机制提供关键基础。

[关键词] 噪声性聋; 耳蜗核; 星形胶质细胞; 突触可塑性

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.04.005 **[中图分类号]** R764.43^{†3} **[文献标志码]** A

Role of astrocytes in the repair of auditory synapses in the cochlear nucleus after noise damage

ZHOU Weijun^{1,2,3}, LIU Sidi^{1,2,3}, CAI Ruijie^{1,2,3}, LIU Hongchao^{1,2,3}, WANG Meijian^{1,2,3}, WU Hao^{1,2,3}, LIU Huihui^{1,2,3#}, WANG Zhaoyan^{1,2,3#}

1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Ear Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Translation Medicine on Ear and Nose Disease, Shanghai 200125, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the pathological and physiological changes underlying noise-induced cochlear nucleus damage and the regulating function of astrocytes on the damage, using a combination of morphological analysis, and molecular biology techniques. **Methods**·Forty-eight male C57BL/6J mice were randomly divided into two groups and exposed to 110 dB SPL (sound pressure level) broadband noise for 2 hours. Auditory brainstem response (ABR) tests were performed on the mice on days 1, 7, 14, 30, and 90 after the noise exposure. Immunofluorescence staining of cochlear nuclear tissue was conducted to observe cochlear nuclear neurons and auditory synapses, as well as astrocyte activation levels. In addition, the damage to the cochlear nuclear neurons and synapses caused by noise was verified through Western blotting. **Results**·A significant decrease in cochlear nuclear Bushy cells after noise exposure was observed. The Western blotting results showed that there was severe loss of nerve fibers in cochlear nuclear neurons, indicating that noise caused significant damage to cochlear nucleus neurons. Moreover, a

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82101211); 黄浦区产业扶持基金 (XK2019011); 上海市科学技术委员会“科技创新行动计划”基础研究领域项目 (21JC1404000); 上海市耳鼻疾病转化医学重点实验室 (14DZ2260300)。

[作者简介] 周卫军 (1998—), 男, 硕士生; 电子信箱: drzhouwj@126.com。

[通信作者] 刘辉辉, 电子信箱: liuhent9h@163.com。汪照炎, 电子信箱: wzyent@163.com。[#]为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (82101211); Huangpu District Industrial Support Fund (XK2019011); Science and Technology Innovation Action Plan of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (21JC1404000); Shanghai Key Laboratory of Translational Medicine on Ear and Nose Diseases (14DZ2260300)。

[Corresponding Author] LIU Huihui, E-mail: liuhent9h@163.com. WANG Zhaoyan, E-mail: wzyent@163.com. [#]Co-corresponding authors.

significant loss of auditory synapses labeled with vesicular glutamate transporter 1 (Vglut1) was observed, which was the severest on day 14 after noise exposure and slowly recovered on day 90. Interestingly, astrocytes in the cochlear nucleus displayed obvious clustering and activation after noise exposure. By staining with glial fibrillary acidic protein (GFAP), most astrocytes were distributed around the cochlear nucleus, granule cell area, and auditory nerve root before noise exposure, and they had a small size. However, on day 14 after noise exposure, a large number of activated astrocytes aggregated in the ventral cochlear nucleus, and they all showed a pattern of growth around the synapses. **Conclusion** Noise exposure leads to significant damage in the cochlear nucleus, and it is possible that astrocytes are involved in its damage and repair processes. These findings will provide a crucial foundation for further understanding the mechanisms of sound signal analysis, integration, and neural plasticity in the cochlear nucleus.

[Key words] noise-induced hearing loss; cochlear nucleus; astrocytes; synaptic plasticity

听力障碍是最常见的致残性疾病之一。世界卫生组织发布的《2021年世界听力报告》预估, 至2050年, 将有近25亿人患有不同程度的听力损失。其中在所有的听力障碍性疾病中, 感音神经性耳聋是最常见的感官和功能缺陷性疾病。其中噪声性耳聋最常见的非遗传性感音神经性耳聋, 长时间或过度暴露在环境噪声中会导致听力丧失、耳鸣和听觉过敏^[1]。

而位于脑干的耳蜗核 (cochlear nucleus, CN) 是听神经上行直接支配的核团, 是听觉信息上传中枢的第一站。耳蜗核可以根据解剖分为腹侧核和背侧核。其中腹侧核的主要细胞是丛细胞 (bushy cell, BC), 听神经纤维通过巨大的突触末端 (endbulb of held, EH) 与BC形成连接, 这种特化的突触结构容易受到各种损伤因素影响^[2]。既往研究发现, 噪声暴露导致腹侧耳蜗核 (ventral cochlear nucleus, VCN) 的听神经突触丢失, 表现为耳蜗核标记囊泡谷氨酸转运蛋白1 (vesicular glutamate transporter 1, Vglut1) 减少^[3-5], 并可一直延续到噪声暴露后9个月^[6-7]。此外, 噪声损伤后的突触结构会发生一定程度的重塑^[8-9], 但是目前关于EH损伤以及突触可塑性的研究相对匮乏, 且机制不明。因此, 研究噪声损伤后耳蜗核听觉突触的损伤与修复机制, 对于指导耳聋预防及治疗均具有重要意义。而我们前期研究发现, 噪声暴露会导致Vglut1标记的突触结构丢失, 这种损伤在噪声暴露后第1日即出现, 直到第30日Vglut1标记的突触结构有部分的再生, 提示耳蜗核突触具可塑性。

此外, 星形胶质细胞是中枢神经系统中一类功能重要的胶质细胞。它为神经元提供营养支持、促进突触的形成和功能成熟以及参与血脑屏障形成等。星形胶质细胞与神经突触的关系十分密切, 突触周围星形

胶质细胞与神经元突触前、突触后结构形成了一种特殊的结构, 称作“三方突触 (tripartite synapse)”, 这是其相互作用的结构基础^[10]。突触周围星形胶质细胞在发育过程中协助突触形成^[11], 参与突触功能调控^[12]以及分泌血小板素蛋白 (thrombospondin, TSP) 家族^[13]和分泌性富含半胱氨酸的酸性蛋白 (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC) 家族蛋白, 参与突触重塑与再生^[14-16]。尽管星形胶质细胞与神经突触的密切联系已经在中枢神经系统中有了较为广泛的验证, 而在耳蜗核中星形胶质细胞功能研究匮乏, 其是否参与到耳蜗核损伤后的突触修复过程目前不得而知。而我们前期实验发现, 噪声暴露后耳蜗核星形胶质细胞浸润并明显活化, 粗大的突起围绕突触伸长。因此, 揭示星形胶质细胞参与耳蜗核听觉突触的相关修复作用及其分子靶点, 将为耳聋的预防与治疗提供一个全新的思路。

1 对象与方法

1.1 实验动物

1月龄雄性C57BL/6J小鼠均购自南京集萃药康生物科技股份有限公司。小鼠随机分成2组, 分别为噪声暴露组和对照组。噪声暴露组小鼠进行2 h、110 dB声压级 (sound pressure level, SPL)、2~20 kHz的宽带噪声暴露。对照组小鼠不做任何处理。

1.2 主要试剂及仪器

豚鼠源Vglut1抗体 (Synaptic system, 德国), 兔源钙结合蛋白2 (calretinin, Calb2) 抗体、兔源胶质酸性纤维蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体、辣根过氧化物酶 (peroxidase horseradish, HRP) 标记抗兔免疫球蛋白G

(immunoglobulin G, IgG)、HRP 标记抗鼠 IgG、兔源 β -actin 抗体 (Abcam, 英国), 兔源肌腱膜纤维肉瘤基因 B 型 (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein B, Mafb) 抗体 (Millipore, 美国), 兔源神经丝蛋白重链 (neurofilament-heavy, NF-H) 抗体、兔源神经丝蛋白中链 (neurofilament-middle, NF-M) 抗体、兔源神经丝蛋白轻链 (neurofilament-light, NF-L) 抗体 (Proteintech, 美国), 二抗山羊抗兔 488 IgG、二抗山羊抗鼠 555 IgG1 抗体、二抗山羊抗鼠 647 抗体 IgG2a、二抗山羊抗豚鼠 647 抗体 IgG2a、含 4', 6'-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 封片剂、蛋白酶及磷酸酶抑制剂 (Invitrogen, 美国)。

XR 凝胶成像分析系统 (Bio-Rad, 美国), 5425 R 小型台式冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), RZ6 听觉电生理工作站、TDT ES1 静电宽频扬声器 (Tucker-Davis Technologies TDT, 美国), Zeiss LSM 880 激光共聚焦显微镜 (卡尔蔡司, 德国), Amersham Imager 600 化学发光成像仪 (通用医疗, 英国), TCS SP8 激光共聚焦显微镜、CM1520 冰冻切片机 (莱卡, 德国)。

1.3 研究方法

1.3.1 噪声性耳聋小鼠模型构建 事先准备好暴露用铁笼, 半径约 10 cm, 高约 12 cm, 其内有 8 个铁丝网隔间。而后, 将 4 只小鼠间隔至于铁笼隔间内。校准: 将校准探头放置于铁笼位置, 扬声器放置于铁笼正上方约 20 cm 处, 连接喇叭和 RZ6 听觉电生理工作站系统, 调整输出电压为 0.85 mV, 使探测器检测到噪声强度为 110 dB SPL。将小鼠置于安静环境 2 h 后, 转移至铁笼隔间内, 连接好扬声器后, 进行噪声干预, 强度为 110 dB SPL, 频率为 2~20 kHz, 暴露时间设置为 2 h。在噪声暴露后第 1、7、14、30 日对小鼠进行听性脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) 检测, 选取 16 kHz ABR 阈值提高 40 dB 以上小鼠用于后续实验。

1.3.2 小鼠听性脑干反应检测 应用 RZ6 听觉电生理工作站系统分别对噪声暴露组和对照组小鼠进行 ABR 测试。通过赛拉嗪 ($\omega=20$ mg/kg) 和氯胺酮 ($\omega=100$ mg/kg) 混合腹腔注射对小鼠进行麻醉。将小鼠放置在预热的恒温电热毯上, 温度监测探头放置在小

鼠腹部底下, 使其体温维持在 37 °C。在开放场的模式下开始 ABR 检测实验, 将喇叭放置于小鼠头颅正前方距离双侧耳朵连线中点 10 cm 处。将 3 种电极放置于小鼠皮下, 包括颅骨顶部正中 (记录电极)、左侧的乳突部 (参考电极)、右侧的乳突部 (接地电极)。连接好电极后, 检查各电极间的电阻是否均 $\leq 10 \Omega$; $\leq 10 \Omega$ 说明电极摆放合适, 能够开始 ABR 检测。给予小鼠短纯音刺激, 刺激频率为 4.0、5.6、8.0、11.3、16.0、22.6 和 32.0 kHz, 以及 Click 刺激, 刺激声以 5 dB 步长从 90 dB SPL 降至 0 dB SPL, 以可引起任何明显 ABR 反应的最小刺激强度作为听力阈值。每只小鼠预计记录 30 min, 后置于 37 °C 恒温垫复苏。

1.3.3 小鼠耳蜗核免疫荧光染色 用赛拉嗪 ($\omega=20$ mg/kg) 和氯胺酮 ($\omega=100$ mg/kg) 混合腹腔注射至小鼠深度麻醉后, 用 10 mL 冰冷的磷酸盐缓冲盐 (phosphate buffered saline, PBS) 和 10 mL 冰冷的 4% 多聚甲醛进行心脏灌注。显微镜下解剖出耳蜗核, 在 4 °C 下用甲醛固定 1 h。随后, 标本在 PBS 中洗涤 30 min, 在 4 °C 下用 30% 蔗糖脱水 2 h。将耳蜗核置最佳切割温度复合物 (optimal cutting temperature compound, OCT) 包埋剂中, 使用 CM1520 冰冻切片机制备 20 μ m 厚的切片。然后, 在室温下使用 1% Triton X-100 和 5% BSA 溶液通透并封闭非特异性结合蛋白 60 min, 然后用稀释液 (1% 牛血清白蛋白 (BSA)、0.3% Triton X-100) 稀释一抗, 稀释后的一抗在 4 °C 孵育过夜。将切片用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min, 用稀释液稀释二抗后, 室温避光孵育 1 h, 再清洗切片 3 次, 每次 10 min, 洗去游离二抗。最后, 使用含 DAPI 封片液在每张玻片上室温下处理 10 min。然后, 用显微镜盖玻片覆盖切片。利用 TCS SP8 激光共聚焦显微镜获得共聚焦图像。

1.3.4 小鼠耳蜗核蛋白质印迹实验 用赛拉嗪 ($\omega=20$ mg/kg) 和氯胺酮 ($\omega=100$ mg/kg) 混合腹腔注射至小鼠深度麻醉后, 立即在冰冷的 PBS 中解剖出耳蜗核。每个样品收集 4~6 个耳蜗核并混合, 在含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀法 (radio immuno precipitation assay, RIPA) 裂解液中裂解。然后, 样品以 13 000 \times g 的速度在 4 °C 下离心 20 min。收集上清液, 并使用 BCA (bicinchoninic acid) 蛋白质定量试剂盒确定总蛋白质浓度。相等量的总蛋白质被加载到 8% 的 Bis-tris 凝胶中。在 80 V 的电泳条件下

电泳 90 min 后, 蛋白质以 400 mA 的电流转移到聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 转膜时间为 35 min。在室温下, 使用 5% BSA 封闭 1 h, 用稀释液 (1% BSA) 稀释一抗, 并在 4 °C 过夜孵育。然后, 用 TBST 缓冲液清洗 10 min, 3 次, 后膜与 HRP 偶联的二级抗体在室温下孵育 1 h, 并重复洗涤步骤。最后, 使用 Amersham Imager 600 化学发光成像仪进行增强型化学发光实验, 可视化蛋白质条带。使用 ImageJ 软件计算目标蛋白质的相对密度。

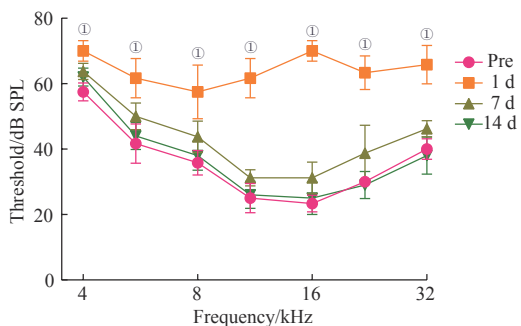
1.4 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于同时符合正态分布和方差齐的数据, 使用独立样本 *t* 检验进行两两比较, 组间比较采用 Bonferroni 校正的单因素方差分析; 对于不符合正态分布或方差齐的数据, 采用 Welch 法校正的 *t* 检验进行两两比较, 组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 噪声性聋模型建立

ABR 结果提示 (图 1), 相较噪声暴露前, 噪声暴露后第 1 日小鼠听觉阈值在 4.0、5.6、8.0、11.0、16.0、22.0、32.0 kHz 显著提升 (均 $P = 0.000$, $n_{\text{mice}} = 6$), 而噪声暴露后第 7、14 日听觉阈值逐渐恢复至暴露前水平 (均 $P > 0.05$, $n_{\text{mice}} = 6$)。该结果提示: 该强度噪声造成了小鼠听觉出现暂时性阈值上升 (temporal threshold shift, TTS), 提示噪声性耳聋小鼠造模成功。



Note: Comparison of mouse auditory brainstem response (ABR) thresholds after noise exposure. ^① $P = 0.000$, compared with the Pre (control) group.

图 1 噪声性损伤小鼠模型建立

Fig 1 Establishment of a noise-induced hearing loss mouse model

2.2 噪声暴露导致耳蜗核神经元变性丢失

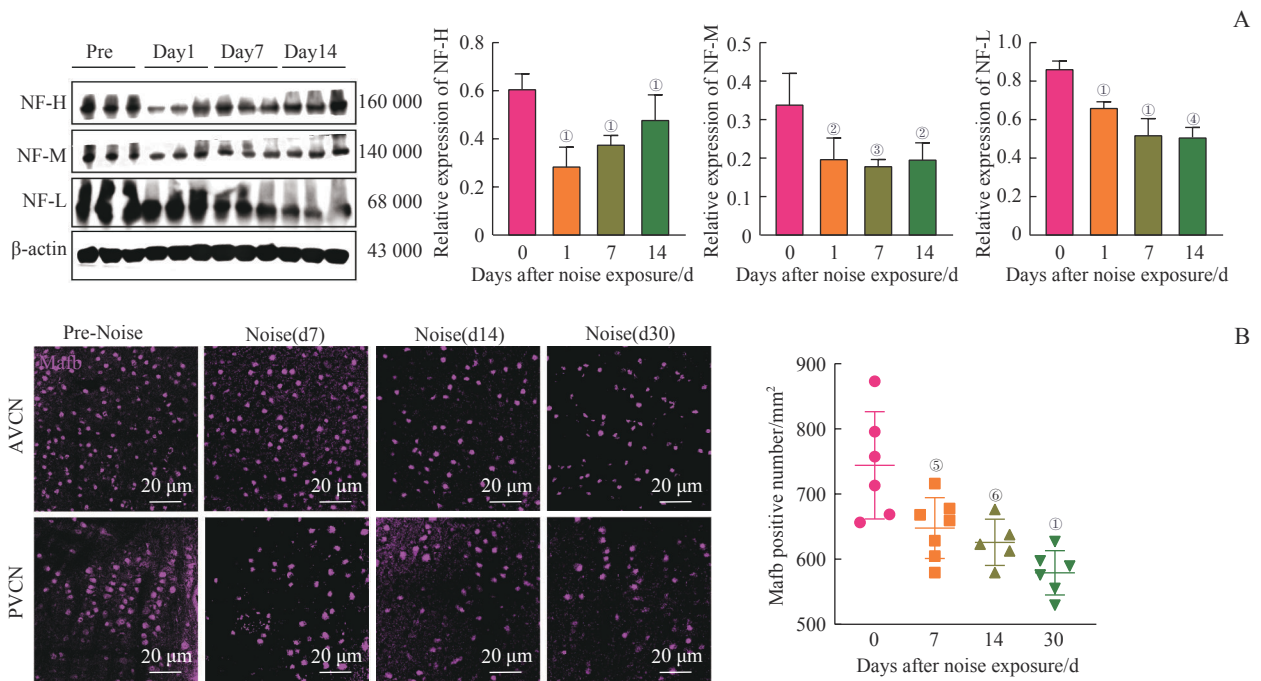
神经元在各类损伤条件下, 包括炎症、衰老、脱髓鞘改变后, 均可能发生神经纤维变性, 表现为轴突或树突发生退化或破坏, 严重影响神经信号的传递和连接。因此, 探索噪声暴露是否会造成耳蜗核神经元损伤和变性具有重要意义。Western blotting 实验结果提示, 噪声暴露导致耳蜗核神经元神经纤维相关蛋白如 NF-H、NF-M、NF-L 等出现明显的下调, 差异具有统计学意义 ($n_{\text{mice}} = 6$, 均 $P < 0.05$, 图 2A)。此外, 通过免疫荧光染色, 发现 MafB 标记的丛细胞在噪声暴露后明显减少 ($n_{\text{mice}} = 6$, $P < 0.05$, 图 2B)。结果提示, 噪声暴露会导致耳蜗核神经元变性丢失。

2.3 噪声暴露导致耳蜗核丛细胞听觉突触丢失

听神经纤维与位于耳蜗核腹侧核的丛细胞形成特化巨大的 EH, 从而保证声音信号的高保真传递。因此, 我们通过免疫荧光实验观察噪声暴露对于耳蜗核 EH 突触的损伤情况, 发现噪声暴露导致 Vglut1 标记的耳蜗核丛细胞听觉突触明显丢失, 而这种突触损伤, 在噪声暴露后第 1 日即十分明显 ($n_{\text{mice}} = 6$, 均 $P < 0.05$, 图 3A)。然而, Calb2 标记的 Ia 型听神经纤维也表现出延迟噪声暴露后损伤, 即噪声暴露后 7 d 才出现明显的丢失, 这提示 Ib、Ic 型听神经纤维可能在噪声暴露后损伤发生较早, 而 Ia 型听神经纤维损伤发生较晚 ($n_{\text{mice}} = 6$, 第 1 日 $P = 0.775$, 第 7、14、30、90 日均 $P < 0.05$, 图 3B)。此外, Ia 型听神经纤维也表现出一定的修复。高分辨率 ($\times 63$) 共聚焦成像也可以观察到, 丛细胞周围听觉突触在噪声暴露后 7 d 丢失明显, 在 90 d 明显恢复。结果提示, 噪声暴露会导致耳蜗核丛细胞听觉突触损伤明显, 且突触丢失呈现一定的可塑性, 在暴露后第 90 日逐渐恢复 (图 3C)。

2.4 噪声暴露导致耳蜗核星形胶质细胞激活

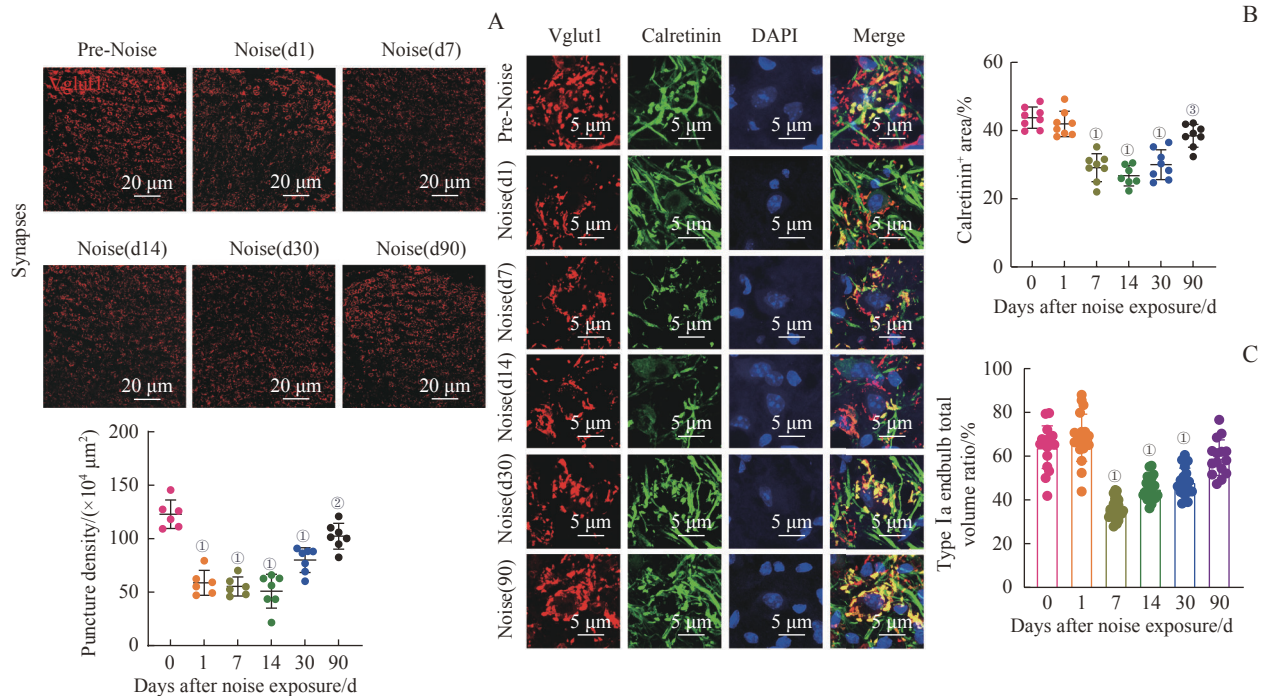
星形胶质细胞参与兴奋性突触的组装与成熟^[11], 并在突触功能调控中发挥重要作用^[12]。因此, 探究星形胶质细胞参与耳蜗核突触损伤修复相关机制具有重要意义。通过 GFAP 标记耳蜗核星形胶质细胞, 提示噪声暴露前, 星形胶质细胞密度相对稀疏, 分布在耳蜗核周围、颗粒细胞区和听觉神经根周围, 突起较少。而噪声暴露后第 7 日, 星形胶质细胞明显活化, 细胞数目和突起增多明显 (图 4A)。此外, 激活的星



Note: A. Western blotting and grayscale analysis of cochlear nucleus in mice after noise exposure, showing significant downregulation of neurofilament-associated proteins, indicating neuronal degeneration. B. Immunofluorescence staining (MafB) of bushy cells in mice after noise exposure and corresponding statistical analysis. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.004$, ^③ $P=0.001$, ^④ $P=0.016$, ^⑤ $P=0.013$, ^⑥ $P=0.005$, compared with the D0 (control) group.

图2 噪声暴露导致耳蜗核神经元变性丢失

Fig 2 Noise exposure leads to degeneration and loss of cochlear nucleus neurons



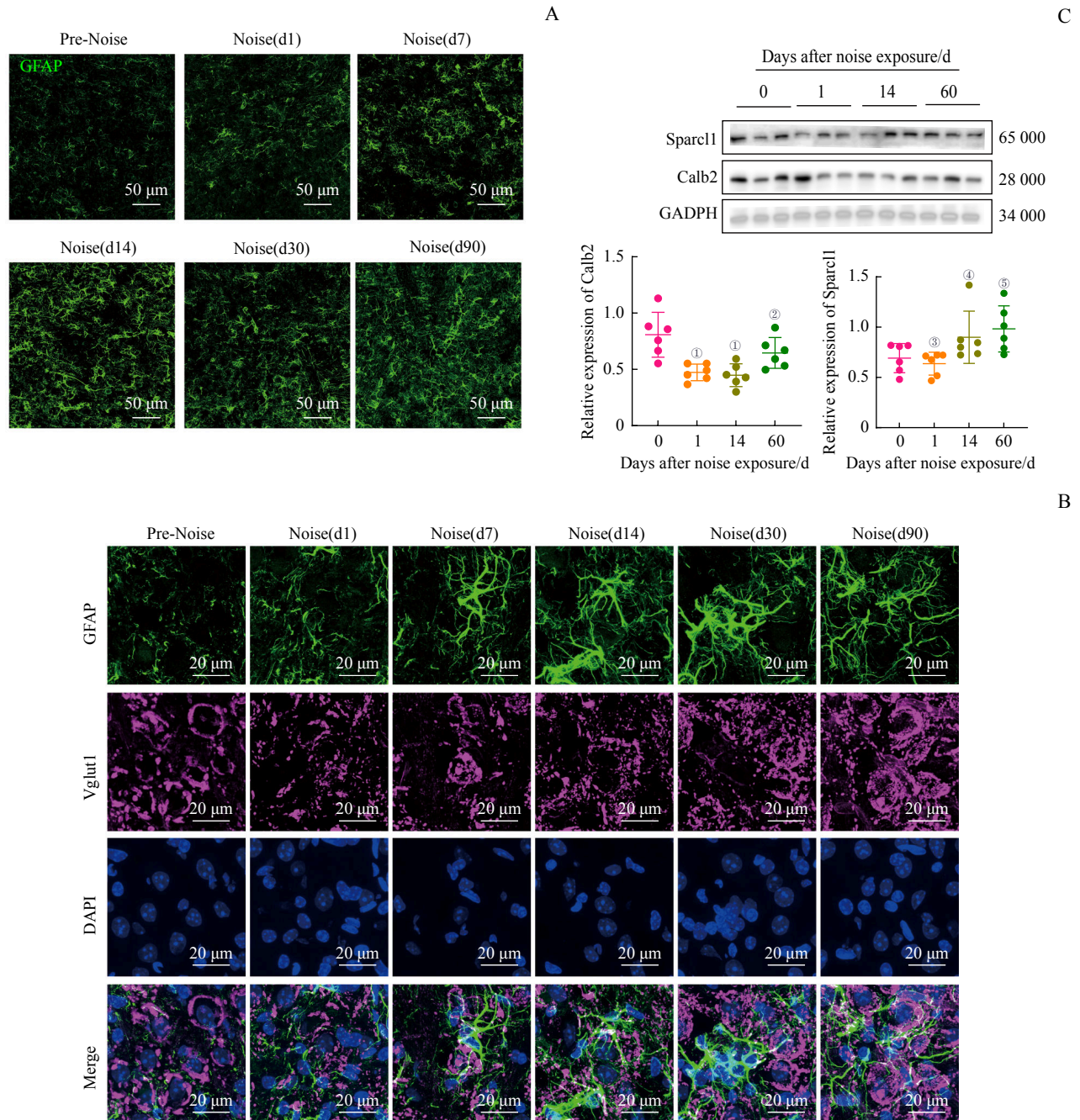
Note: A. Immunofluorescence staining (Vglut1) of cochlear nucleus auditory nerve synapses after noise exposure. B. Immunofluorescence staining ($\times 63$) of cochlear nucleus auditory nerve synapses after noise exposure, showing auditory nerve synapses (Vglut1), Ia-type auditory nerve (Calretinin), and cell nuclei (DAPI). C. Statistical analysis of the proportion of Ia-type auditory nerve synapses after noise exposure. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.023$, ^③ $P=0.024$, compared with the D0 (control) group.

图3 噪声暴露导致耳蜗核从细胞听觉突触丢失

Fig 3 Noise exposure leads to the loss of auditory synapses in the cochlear nucleus bushy cells

形胶质细胞多围绕 Vglut1 阳性的突触长出巨大的突起 (图 4B)。而 SPARC 样蛋白 1 (SPARC-like protein 1, Sparcl1) 是星形胶质细胞分泌, 用于兴奋性突触组装和成熟的关键蛋白^[17]。Western blotting 结果提示:

噪声暴露后, 耳蜗核 Calb2 蛋白表达在噪声暴露后第 1、14 日明显下调 ($n_{\text{mice}}=6$, 均 $P=0.001$); 而 Sparcl1 蛋白在第 14 日 ($n_{\text{mice}}=6$, $P=0.019$) 和第 60 日 ($n_{\text{mice}}=6$, $P=0.048$) 明显上调 (图 4C)。



Note: A. Immunofluorescence staining (GFAP) of cochlear nucleus astrocytes after noise exposure. B. Immunofluorescence staining ($\times 63$) of cochlear nucleus auditory nerve synapses and astrocytes after noise exposure, showing auditory nerve synapses (Vglut1), astrocytes (GFAP), and cell nuclei (DAPI). C. Western blotting results of cochlear nucleus after noise exposure. ^① $P=0.001$, ^② $P=0.130$, ^③ $P=0.929$, ^④ $P=0.019$, ^⑤ $P=0.048$, compared with the D0 (control) group.

图 4 噪声暴露导致耳蜗核星形胶质细胞激活

Fig 4 Noise exposure leads to the activation of cochlear nucleus astrocytes

3 讨论

本研究发现: ①给予小鼠 110 dB SPL、持续时间 2 h 噪声暴露后, 小鼠 ABR 听觉阈值出现暂时性上升。②噪声暴露导致腹侧耳蜗核神经元丢失 (MafB 阳性)。Western blotting 结果提示神经纤维相关蛋白 (如 NF-H、NF-M、NF-L) 表达下调, 提示噪声暴露造成耳蜗核神经元变性。③噪声暴露导致 EH 结构破坏。免疫荧光结果发现 Vglut1、Calb2 标记的突触结构破坏减少, 提示噪声暴露对于听神经突触造成了损伤。④噪声暴露还激活了星形胶质细胞。免疫荧光实验发现, 通过 GFAP 成功标记星形胶质细胞, 并且发现星形胶质细胞在噪声暴露后大量聚集在耳蜗核腹侧核, 并且具备活化形态, 如围绕突触的巨大突起等。结合听神经突触在噪声暴露后 60 d 开始逐渐恢复, 以及星形胶质细胞持续活化, 提示星形胶质细胞可能参与到突触重塑与神经可塑性过程。

内毛细胞 (inner hair cell, IHC) 和外毛细胞 (outer hair cell, OHC) 都由螺旋神经节神经元 (spiral ganglion neuron, SGN) 支配。其中 I 型 SGN 纤维支配 IHC, 而 II 型 SGN 支配 OHC, 其中 I 型 SGN 将声音信息传输到中枢神经系统, 而 II 型 SGN 主要负责损伤感知与疼痛信号传递^[18]。SUN 等^[19]通过单细胞测序技术, 发现 I 型 SGN 可分为 I a、I b、I c 亚型, 且 Calb2、Calb1、POU 结构域 4 类转录因子 1 (POU domain class 5 transcription factor 1, Pou4f1) 可分别对亚型进行标记, 且这 3 类亚型的 I 型 SGN 纤维对于损伤易感性均存在差异。一项针对衰老小鼠耳蜗核的研究^[20]发现, I a 亚型 SGN 纤维损伤发生较晚, I b/I c 亚型则损伤发生较早。同样, 本研究发现这种亚型特异性的损伤也存在于噪声暴露模型。噪声暴露后小鼠耳蜗核 Calb2 阳性突触丢失表现出滞后性, 即直到损伤后第 7 日才出现明显丢失, 这提示 I b/I c 纤维在噪声损伤早期即发生损伤。

星形胶质细胞在神经系统中具有重要的功能, 包括神经元营养、血脑屏障形成以及突触功能调控等, 其中星形胶质细胞与突触联系尤为紧密^[21]。星形胶质细胞与突触前后结构锚定形成三方突触结构, 通过分泌 TSP 以及 Hevin (又称 Sparcl1) 蛋白来促进兴奋性突触组装与成熟^[17,22]。此外, 星形胶质细胞在听神经系统发育和突触形成中也有重要作用。以往针

对耳蜗核发育的研究^[23]发现, 星形胶质细胞在耳蜗核腹侧核富集明显, 其中损伤后第 14 日 (postnatal day 14, P14) 的富集最为明显 (P14 时, 小鼠耳道开放, 是听觉形成关键时期)。星形胶质细胞还能够在体外介导螺旋神经节与耳蜗核神经元体外形成突触连接。

而先前对于耳蜗核损伤后星形胶质细胞的相关研究相对匮乏。本研究发现, 噪声暴露后星形胶质细胞富集于耳蜗核 endbulb 突触结构周围, 而富集的星形胶质细胞究竟是来源于有丝分裂增殖 (proliferation), 还是仅仅只是活化 (reactivation), 这是一个值得探究的研究方向。此外, 一项针对星形胶质细胞转录组的研究^[24]发现, 星形胶质细胞在分子水平可分为 A1 和 A2 型。其中, A1 型高表达炎症相关基因, 参与突触破坏和神经系统炎症; 而 A2 型高表达神经营养因子相关基因, 参与神经突触可塑性以及神经元支持。本研究通过 Western blotting 实验证实, 星形胶质细胞分泌的成突触蛋白 Sparcl1 在噪声暴露后的耳蜗核明显上调, 提示耳蜗核噪声暴露后富集的星形胶质细胞可能归属 A2 型, 即可能参与耳蜗核突触的重塑与修复过程。但是, 其是否还存在其他分子细胞机制参与突触重塑目前还尚不明确, 故未来将结合 RNA-Seq、ATAC-seq 等技术筛选可能的分子靶点, 为治疗噪声及其他类型的听觉神经系统损伤以及寻找神经突触再生可能靶点奠定基础。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有实验均已通过上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会审核批准 (文件号: SH9H-2021-A477-SB)。所有实验过程均遵照上海交通大学医学院实验动物伦理委员会相关条例进行。

All experimental protocols in this study were reviewed and approved by Ethical Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. SH9H-2021-A477-SB), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

作者贡献/Authors' Contributions

刘辉辉、汪照炎、王美建参与了课题指导, 周卫军、刘宏超、蔡瑞

捷参与了实验设计与实验操作; 周卫军、刘思迪参与了数据整理、论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

LIU Huihui, WANG Zhaoyan and WANG Meijian participated in project guidance. ZHOU Weijun, LIU Hongchao, and CAI Ruijie participated in experimental design and operation. ZHOU Weijun and LIU Sidi participated in data collation, paper writing, and revision. All

authors have read the final manuscript and agreed to the submission.

- Received: 2023-11-26
- Accepted: 2024-01-26
- Published online: 2024-04-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] YANG W P, HENDERSON D, HU B H, et al. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise[J]. *Hear Res*, 2004, 196(1/2): 69-76.
- [2] KUENZEL T. Modulatory influences on time-coding neurons in the ventral cochlear nucleus[J]. *Hear Res*, 2019, 384: 107824.
- [3] KURIOKA T, LEE M Y, HEERINGA A N, et al. Selective hair cell ablation and noise exposure lead to different patterns of changes in the cochlea and the cochlear nucleus[J]. *Neuroscience*, 2016, 332: 242-257.
- [4] BARKER M, SOLINSKI H J, HASHIMOTO H, et al. Acoustic overexposure increases the expression of VGLUT-2 mediated projections from the lateral vestibular nucleus to the dorsal cochlear nucleus[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e35955.
- [5] ZENG C H, NANNAPANENI N, ZHOU J X, et al. Cochlear damage changes the distribution of vesicular glutamate transporters associated with auditory and nonauditory inputs to the cochlear nucleus[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(13): 4210-4217.
- [6] BAIZER J S, WONG K M, MANOHAR S, et al. Effects of acoustic trauma on the auditory system of the rat: the role of microglia[J]. *Neuroscience*, 2015, 303: 299-311.
- [7] MULY S M, GROSS J S, MOREST D K, et al. Synaptophysin in the cochlear nucleus following acoustic trauma[J]. *Exp Neurol*, 2002, 177(1): 202-221.
- [8] BILAK M, KIM J, POTASHNER S J, et al. New growth of axons in the cochlear nucleus of adult chinchillas after acoustic trauma[J]. *Exp Neurol*, 1997, 147(2): 256-268.
- [9] MICHLER S A, ILLING R B. Acoustic trauma induces reemergence of the growth- and plasticity-associated protein GAP-43 in the rat auditory brainstem[J]. *J Comp Neurol*, 2002, 451(3): 250-266.
- [10] ARAQUE A, PARPURA V, SANZGIRI R P, et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner[J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(5): 208-215.
- [11] REDDY L V, KOIRALA S, SUGIURA Y, et al. Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction *in vivo*[J]. *Neuron*, 2003, 40(3): 563-580.
- [12] HALASSA M M, FELLIN T, TAKANO H, et al. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(24): 6473-6477.
- [13] CHRISTOPHERSON K S, ULLIAN E M, STOKES C C, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis[J]. *Cell*, 2005, 120(3): 421-433.
- [14] JOHNSTON I G, PALADINO T, GURD J W, et al. Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC[J]. *Neuron*, 1990, 4(1): 165-176.
- [15] LIVELY S, BROWN I R. The extracellular matrix protein SC1/hevin localizes to excitatory synapses following status epilepticus in the rat lithium-pilocarpine seizure model[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(13): 2895-2905.
- [16] LIVELY S, RINGUETTE M J, BROWN I R. Localization of the extracellular matrix protein SC1 to synapses in the adult rat brain[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(1): 65-71.
- [17] SINGH S K, STOGSDILL J A, PULIMOOD N S, et al. Astrocytes assemble thalamocortical synapses by bridging NRX1 α and NL1 *via* hevin[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 183-196.
- [18] PERKINS R E, MOREST D K. A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics[J]. *J Comp Neurol*, 1975, 163(2): 129-158.
- [19] SUN S H, BABOLA T, PREGERNIG G, et al. Hair cell mechanotransduction regulates spontaneous activity and spiral ganglion subtype specification in the auditory system[J]. *Cell*, 2018, 174(5): 1247-1263. e15.
- [20] WANG M J, ZHANG C G, LIN S Y, et al. Biased auditory nerve central synaptopathy is associated with age-related hearing loss[J]. *J Physiol*, 2021, 599(6): 1833-1854.
- [21] CLARKE L E, BARRES B A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(5): 311-321.
- [22] KUCUKDERELI H, ALLEN N J, LEE A T, et al. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(32): E440-E449.
- [23] DINH M L, KOPPEL S J, KORN M J, et al. Distribution of glial cells in the auditory brainstem: normal development and effects of unilateral lesion[J]. *Neuroscience*, 2014, 278: 237-252.
- [24] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.

[本文编辑] 张慧俊

