

噪声损伤模型中XIAP对耳蜗毛细胞保护的机制

闫琳, 杨见明*

安徽医科大学第二附属医院耳鼻喉头颈外科, 安徽 合肥

收稿日期: 2024年11月27日; 录用日期: 2024年12月21日; 发布日期: 2024年12月31日

摘要

噪声是导致听力损失的常见原因之一。凋亡抑制蛋白XIAP被认为在众多IAPs家族成员中是最有效的细胞死亡调控因子。目前XIAP对耳蜗毛细胞保护的研究有很多, 但主要是其抗凋亡作用, 对于炎症方面并未进行深入探索。本研究将采用耳蜗毛细胞系进行探索, 发现XIAP与炎症具有重要关系, 我们发现通过过表达XIAP水平可以缓解炎症, 从而减轻耳蜗毛细胞损伤, 减少噪声所引起的听力损失, 为临床上治疗噪声所引起的听力损失提供了新的靶点和治疗思路。

关键词

噪声性耳聋, 毛细胞, X连锁凋亡抑制蛋白

The Protective Mechanism of XIAP on Cochlear Hair Cells in Noise Damage Model

Lin Yan, Jianming Yang*

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Nov. 27th, 2024; accepted: Dec. 21st, 2024; published: Dec. 31st, 2024

Abstract

Noise is one of the most common causes of hearing loss. X-linked inhibitor of apoptosis protein is considered to be the most potent regulator of cell death among many IAPs family members. At present, there are many studies on the protection of XIAP on cochlear hair cells, but the anti-apoptotic effect is the main one, and the inflammation aspect has not been deeply explored. In this study, cochlear hair cell lines will be used for exploration, and it is found that XIAP has an important relationship with inflammation. We found that overexpression of XIAP can alleviate inflammation,

*通讯作者。

文章引用: 闫琳, 杨见明. 噪声损伤模型中 XIAP 对耳蜗毛细胞保护的机制[J]. 临床个性化医学, 2024, 3(4): 2547-2552.
DOI: 10.12677/jcpm.2024.34363

thereby reducing cochlear hair cell damage and hearing loss caused by noise, providing a new target and therapeutic idea for the clinical treatment of hearing loss caused by noise.

Keywords

Noise Induced Deafness, Hair Cells, X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

噪声暴露导致的听力损失是世界范围内的一个重大健康问题[1]。噪声性听力损失(NIHL)是一种常见的社会问题。据估计,有13亿人因接触噪音而遭受听力损失[2]。噪声性聋严重影响了人们的生活质量,对患者的心理状况和就业能力产生了严重的负面影响。NIHL主要损伤耳蜗毛细胞,严重者可引起耳蜗神经元及突触的损伤。噪声不仅对耳蜗毛细胞造成直接的物理损伤,还通过多种生物学机制引发细胞死亡[3]-[5]。这些机制包括氧化应激、细胞凋亡和炎症反应等。然而,经过数十年的努力,NIHL的问题仍在继续增长。因为耳蜗毛细胞一旦受损,其再生能力极为有限,因此寻找有效的保护和修复策略至关重要。尽管噪音抑制器可以部分缓解损伤,但许多人对佩戴噪音抑制器有抵制,因其对工作和军事行动有所限制。目前,由于对介导毛细胞死亡和存活过程的研究取得了重大进展。这些过程揭示了耳蜗损伤机制的潜在位点,并且可以进行干预性保护,在保护听力免受噪声损伤方面具有相当大的潜力。先前的研究表明,噪声暴露会增加耳蜗中ROS的水平,随后激活导致细胞死亡的信号通路[6]。在此背景下,XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)作为一种重要的抗凋亡因子,其在耳蜗毛细胞损伤中的作用逐渐受到重视。

2. 材料与方法

本研究主要使用过氧化氢(H_2O_2)来模拟噪声损伤,因为 H_2O_2 是ROS的一种,而噪声主要的损伤机制是ROS损伤。因此,根据以往的研究,我们使用 H_2O_2 来处理耳蜗毛细胞,模拟噪声所产生的ROS损伤。然后通过细胞实验和分子实验来观察XIAP与耳蜗毛细胞损伤的相关蛋白表达。细胞实验中,我们采用小鼠耳蜗毛细胞系(House Ear Institute-Organ of Corti 1, HEI-OC1),该细胞系在研究耳蜗炎症反应和凋亡通路上具有重要的作用。在分子实验中,我们主要进行了western blot实验,观察目的蛋白的表达变化。

2.1. 传代与铺板

我们在37℃培养箱,二氧化碳浓度为5%的环境中培养HEI-OC1细胞,待细胞密度达到90%左右时进行细胞传代和铺板。次日待培养板的细胞密度到达70%左右时,进行 H_2O_2 加药处理或者进行转染,最后进行收样提蛋白。

2.2. 转染

待培养板密度达到60%~70%时,进行细胞转染。细胞转染是指将外源分子(如DNA, RNA等)导入(真核)细胞的实验技术之一。随着分子生物学和细胞生物学研究的不断发展,转染已经成为研究和控制真核细胞基因功能的常规工具。细胞转染可分为瞬时转染和稳定转染,瞬时转染指外源DNA/RNA不整合

到宿主染色体中, 通常只持续几天, 在转染后 24~72 小时内分析结果, 多用于启动子和其他调控元件的分析。稳定转染指外源 DNA 可以整合到宿主染色体中。我们使用的是瞬时转染, 转染的目的是使得基因进入细胞中进行表达, 从而影响该基因或者其相关基因的表达, 最后通过 western blot 进行验证蛋白水平。

2.3. 分子实验

分子实验主要进行了 western blot, Western blot (也称为蛋白质免疫印迹) 是一种常用于研究中分离和鉴定蛋白质的技术, 蛋白通过在不同浓度的 SDS-Page 凝胶中进行分离, 分离后的蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上, 通过将膜进行一抗孵育和二抗放大蛋白的表达, 从而在相应条带位置附近得到目的蛋白, 最终通过化学发光法得到目的蛋白的最终表达量, 条带的粗细和强度则代表蛋白的表达量。

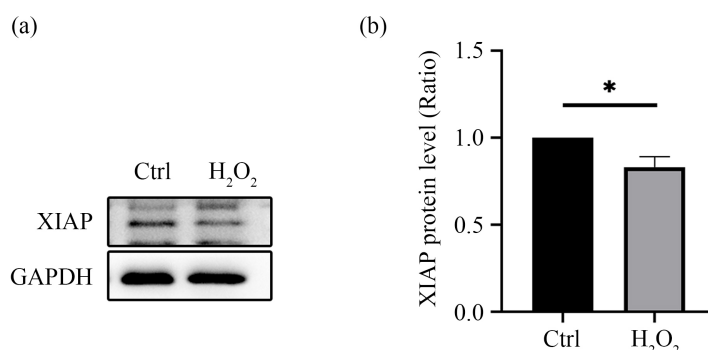
3. 统计学处理

Western blot 中所有的蛋白表达使用 imagej 进行统计分析, 分析后使用 EXCEL 表格进行整理, 使所有的结果进行归一化处理, 最后使用单样本 T 检验, $p < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

4. 结果

4.1. HEI-OC1 细胞中 XIAP 的表达

XIAP 作为凋亡抑制蛋白, 在真核生物中具有重要作用, 因为其具有抗凋亡作用, 因此在本研究中我们猜测 XIAP 亦可以在耳蜗毛细胞中发挥重要作用。我们使用 HEI-OC1 细胞系作为噪声损伤模型中的耳蜗毛细胞, 使用 H_2O_2 处理细胞, 作为模拟噪声的损伤。我们发现, 当 HEI-OC1 细胞经过 H_2O_2 处理后, 我们经过 western blot 实验进行分析检测, 发现跟未进行 H_2O_2 处理组相比, XIAP 在噪声损伤后表达量降低(图 1)。



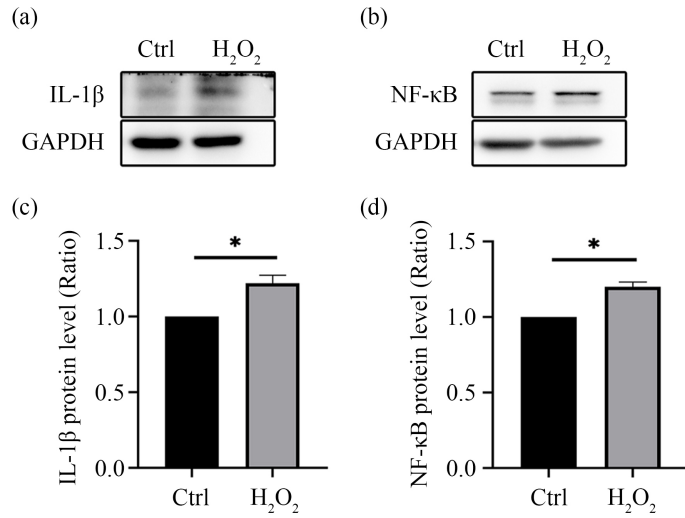
(a) 表示 western blot 可见 H_2O_2 处理后 XIAP 的表达降低; (b) 是(a)的 western blot 统计图。

Figure 1. Changes of XIAP expression in HEI-OC1 cells during noise damage induced by H_2O_2

图 1. 在 HEI-OC1 细胞中, H_2O_2 诱导噪声损伤中 XIAP 的表达变化

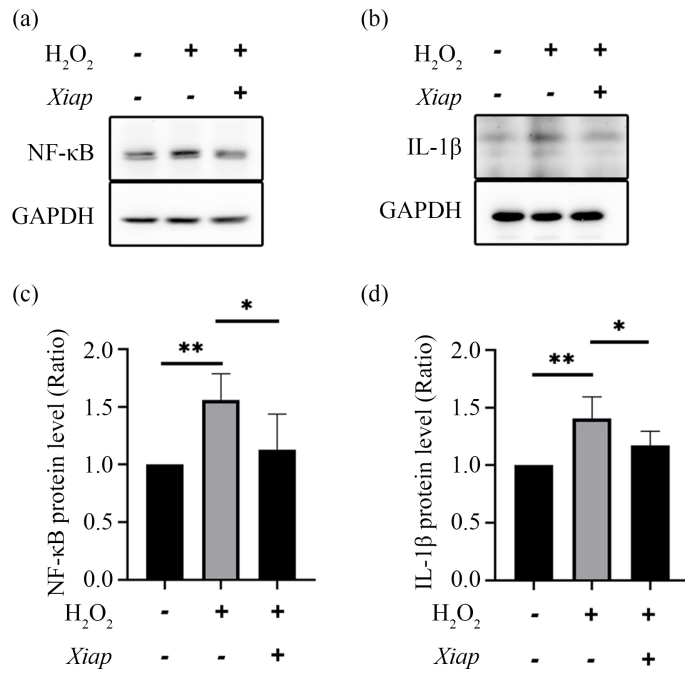
4.2. HEI-OC1 细胞中炎症因子的表达变化

噪声暴露不仅直接导致耳蜗毛细胞的损伤, 还通过激活炎症反应加重细胞损伤。噪声诱导的炎症反应涉及多种细胞因子的释放, 例如 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和 $TNF-\alpha$ 等。这些因子会刺激内耳组织中巨噬细胞和其他免疫细胞的活化, 导致局部炎症的进一步发展。因此在本研究中, 我们观察了炎症因子 $NF-\kappa B$ 、 $IL-1\beta$ 的表达变化。我们发现, HEI-OC1 细胞经过 H_2O_2 处理后, 炎症因子 $NF-\kappa B$ 及 $IL-1\beta$ 的表达均增加, 表明噪声损伤引起的炎症因子表达增加(图 2)。



(a) 表示 western blot 可见 H₂O₂ 处理后 IL-1 β 的表达增加; (b) 表示 western blot 可见 H₂O₂ 处理后 NF- κ B 的表达增加; (c) 表示(a)的 western blot 统计图; (d) 表示(b)的 western blot 统计图。

Figure 2. In HEI-OC1 cells, H₂O₂ induced changes in the expression of inflammatory factors NF- κ B and IL-1 β in noise damage
图 2. 在 HEI-OC1 细胞中, H₂O₂ 诱导噪声损伤中炎症因子 NF- κ B 及 IL-1 β 的表达变化



(a) 表示 western blot 可见过表达 XIAP 水平后 NF- κ B 的表达降低; (b) 表示 western blot 可见过表达 XIAP 水平后 IL-1 β 的表达降低; (c) 表示(a)的 western blot 统计图; (d) 表示(b)的 western blot 统计图。

Figure 3. Changes in the expression of inflammatory factors NF- κ B and IL-1 β in HEI-OC1 cells after overexpression of XIAP level in noise damage induced by H₂O₂
图 3. 在 HEI-OC1 细胞中, H₂O₂ 诱导噪声损伤中过表达 XIAP 水平后炎症因子 NF- κ B 及 IL-1 β 的表达变化

4.3. HEI-OC1 细胞中过表达 XIAP 水平后炎症因子的表达变化

由于 XIAP 作为凋亡抑制因子, 具有抗凋亡作用, 但对于炎症反应是否有效, 目前研究报道仍然较少。因此, 我们在耳蜗毛细胞中研究了 XIAP 是否可以调控炎症因子, 减少炎症反应。通过过表达 XIAP 水平, 我们发现跟单独进行 H_2O_2 处理相比, 过表达 XIAP 水平后, 炎症因子 NF- κ B 及 IL-1 β 的表达减少, 炎症减轻。表明 XIAP 可以减轻噪声引起的炎症反应(图 3)。

在 HEI-OC1 细胞中, 我们发现由 H_2O_2 诱导的噪声损伤中, 炎症因子 NF- κ B 及 IL-1 β 表达增加, XIAP 的表达降低。当我们过表达 XIAP 蛋白水平后, 发现炎症因子 NF- κ B 及 IL-1 β 表达减少, 炎症减轻。说明 XIAP 可以缓解噪声损伤所产生的炎症。

5. 讨论

NIHL 是一种复杂的疾病, 由遗传和环境因素相互作用所引起, 但主要由噪声暴露引起的生物损害程度所决定。噪声可导致 Corti 器官的破坏, 可能由两种机制导致: 短时间暴露于极端噪声强度所致的机械性破坏或持续性暴露于温和噪声所致的病理性代谢失代偿[7]。目前的代谢损伤理论集中在过度噪声刺激引起的自由基和谷氨酸兴奋性毒性的形成上, 随后激活导致细胞死亡的信号通路。最近, 越来越多的研究表明炎症在噪音诱导的耳毒性中起关键作用[8]。当发生听力损失后, 在耳蜗中发现代表 CD45 和 Iba1 阳性的炎症细胞浸润, 尤其是在血管纹中[9]-[11]。这些炎症细胞可以合成和释放多种促炎细胞因子, 如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) [12]。有研究表明核因子 kappa B (NF- κ B) 在炎症调节中起核心作用。研究在噪声损伤中 NF- κ B 信号级联反应被激活, 而抑制 NF- κ B 可降低促炎细胞因子的含量[13]。这些研究表明噪声损伤会引起炎症。而 IAPs 是一种凋亡抑制蛋白, 目前已经确定了八个人类 IAPs 家族, BIRC1 (NAIP), BIRC2 (cIAP1), BIRC3 (cIAP2), BIRC4 (XIAP), BIRC5 (Survivin), BIRC6 (Apollon), BIRC7 (Livin) and BIRC8 [14]。在众多 IAPs 家族成员中, XIAP 被认为是最有效和最多方面的细胞死亡调控因子[15]。XIAP 含有 3 个重复的 BIR (BIR1-3) 域, 一个锌结合体, 其可通过蛋白-蛋白的相互作用调节 XIAP 抑制剂的活性[16]。XIAP 还有一个羧基末端 RING 结构域, 具有 E3 泛素连接酶活性[17]。此外, 它还含有一种与泛素化蛋白结合的泛素相关(UBA)结构域[18] [19]。BIR2 与 caspase 3 和 caspase 7 的 IBM 结合, BIR3 与 caspase 9 的 IBM 结合, 而这些酶的 IBM 区域是 caspase 酶活性所必需的[20]。因此 XIAP 抑制了 caspase 3、caspase 7、和 caspase 9 的活性。但对于噪声损伤所引起的炎症反应, 目前研究仍然较少。因此, 在本研究我们通过使用 H_2O_2 构建了噪声损伤模型, 观察噪声损伤模型中确实有炎症因子增加。接着我们探索了 XIAP 与炎症因子之间的调控, 发现 XIAP 可以减少炎症因子的产生, 缓解噪声所产生的炎症, 这对于未来临床上噪声损伤的治疗提供了新的靶点和思路。最近有研究表明提出噪声损伤过程中有自噬的参与, 促进自噬可以缓解噪声损伤所引起的 ROS 损伤[21]。而有研究表明 XIAP 也可促进自噬, 但在听力研究中仍然较少。因此, 未来的研究中我们将针对 XIAP 是否可以通过促进自噬缓解噪声所引起的炎症进行更深一步的探索。

6. 结论

凋亡抑制蛋白 XIAP 可以减轻噪声损伤引起的炎症反应, 为临床上噪声损伤的治疗提供了新的靶点。

基金项目

安徽医科大学研究生科研与实践创新项目(编号: YJS20230136)。

参考文献

- [1] Śliwińska-Kowalska, M. and Zaborowski, K. (2017) WHO Environmental Noise Guidelines for the European Region:

- A Systematic Review on Environmental Noise and Permanent Hearing Loss and Tinnitus. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **14**, Article No. 1139. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101139>
- [2] Vos, T., Flaxman, A.D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., *et al.* (2012) Years Lived with Disability (YLDs) for 1160 Sequelae of 289 Diseases and Injuries 1990-2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, **380**, 2163-2196.
- [3] Park, S., Kim, D., Park, Y., Back, S., Kim, H., Park, H., *et al.* (2014) Protective Effect of Unilateral and Bilateral Ear Plugs on Noise-Induced Hearing Loss: Functional and Morphological Evaluation in Animal Model. *Noise and Health*, **16**, 149-156. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.134915>
- [4] Wu, F., Xiong, H. and Sha, S. (2020) Noise-Induced Loss of Sensory Hair Cells Is Mediated by ROS/AMPK α Pathway. *Redox Biology*, **29**, Article ID: 101406. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101406>
- [5] Xu, F., Cheng, Y. and Yan, W. (2021) Up-Regulation of Autophagy and Apoptosis of Cochlear Hair Cells in Mouse Models for Deafness. *Archives of Medical Science*, **17**, 535-641. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.75348>
- [6] Hudspeth, A.J. (1997) How Hearing Happens. *Neuron*, **19**, 947-950. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80385-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80385-2)
- [7] Henderson, D., Bielefeld, E.C., Harris, K.C. and Hu, B.H. (2006) The Role of Oxidative Stress in Noise-Induced Hearing Loss. *Ear & Hearing*, **27**, 1-19. <https://doi.org/10.1097/01.aud.0000191942.36672.f3>
- [8] He, Z., Zou, S., Li, M., Liao, F., Wu, X., Sun, H., *et al.* (2020) The Nuclear Transcription Factor FoxG1 Affects the Sensitivity of Mimetic Aging Hair Cells to Inflammation by Regulating Autophagy Pathways. *Redox Biology*, **28**, Article ID: 101364. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101364>
- [9] Lutze, R.D., Ingersoll, M.A., Thotam, A., Joseph, A., Fernandes, J. and Teitz, T. (2023) ERK1/2 Inhibition Alleviates Noise-Induced Hearing Loss While Tempering down the Immune Response.
- [10] Lutze, R.D., Ingersoll, M.A., Thotam, A., Joseph, A., Fernandes, J. and Teitz, T. (2024) ERK1/2 Inhibition via the Oral Administration of Tizaterkib Alleviates Noise-Induced Hearing Loss While Tempering down the Immune Response. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article No. 6305. <https://doi.org/10.3390/ijms25126305>
- [11] Xu, K., Chen, S., Xie, L., Qiu, Y., Liu, X., Bai, X., *et al.* (2022) The Protective Effects of Systemic Dexamethasone on Sensory Epithelial Damage and Hearing Loss in Targeted Cx26-Null Mice. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 545. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04987-3>
- [12] Fujioka, M., Kanzaki, S., Okano, H.J., Masuda, M., Ogawa, K. and Okano, H. (2006) Proinflammatory Cytokines Expression in Noise-Induced Damaged Cochlea. *Journal of Neuroscience Research*, **83**, 575-583. <https://doi.org/10.1002/jnr.20764>
- [13] Sai, N., Shi, X., Zhang, Y., Jiang, Q., Ji, F., Yuan, S., *et al.* (2020) Involvement of Cholesterol Metabolic Pathways in Recovery from Noise-Induced Hearing Loss. *Neural Plasticity*, **2020**, Article ID: 6235948. <https://doi.org/10.1155/2020/6235948>
- [14] Wang, J., Tymczyszyn, N., Yu, Z., Yin, S., Bance, M. and Robertson, G.S. (2011) Overexpression of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Protects against Noise-Induced Hearing Loss in Mice. *Gene Therapy*, **18**, 560-568. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.172>
- [15] He, Z., Li, M., Fang, Q., Liao, F., Zou, S., Wu, X., *et al.* (2021) FOXG1 Promotes Aging Inner Ear Hair Cell Survival through Activation of the Autophagy Pathway. *Autophagy*, **17**, 4341-4362. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1916194>
- [16] Baugh, J.M., Viktorova, E.G. and Pilipenko, E.V. (2009) Proteasomes Can Degrade a Significant Proportion of Cellular Proteins Independent of Ubiquitination. *Journal of Molecular Biology*, **386**, 814-827. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.081>
- [17] Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M.M., Zender, L., Xue, W., *et al.* (2008) IAPs Contain an Evolutionarily Conserved Ubiquitin-Binding Domain That Regulates NF- κ B as Well as Cell Survival and Oncogenesis. *Nature Cell Biology*, **10**, 1309-1317. <https://doi.org/10.1038/ncb1789>
- [18] Blankenship, J.W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., Izrael-Tomasevic, A., *et al.* (2008) Ubiquitin Binding Modulates IAP Antagonist-Stimulated Proteasomal Degradation of C-IAP1 and C-IAP2. *Biochemical Journal*, **417**, 149-165. <https://doi.org/10.1042/bj20081885>
- [19] Eckelman, B.P., Salvesen, G.S. and Scott, F.L. (2006) Human Inhibitor of Apoptosis Proteins: Why XIAP Is the Black Sheep of the Family. *EMBO Reports*, **7**, 988-994. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400795>
- [20] Aredia, F., Guamán Ortiz, L.M., Giansanti, V. and Scovassi, A.I. (2012) Autophagy and Cancer. *Cells*, **1**, 520-534. <https://doi.org/10.3390/cells1030520>
- [21] Yuan, H., Wang, X., Hill, K., Chen, J., Lemasters, J., Yang, S., *et al.* (2015) Autophagy Attenuates Noise-Induced Hearing Loss by Reducing Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, **22**, 1308-1324. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6004>