

· 基础医学 ·

ApoE 敲除导致小鼠耳蜗螺旋神经元功能损伤

汤序军,王红顺,姚 俊,曹 新*

南京医科大学医学遗传学系,江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**探究载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因缺陷引起小鼠耳蜗螺旋神经节处听神经损伤的可能机制。**方法:**对ApoE基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠进行听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)检测,并分析波群振幅及延迟期。免疫荧光及HE染色分析耳蜗螺旋神经节内听神经及带状突触的病理损伤情况。蛋白质印迹、qRT-PCR等实验检测Lim激酶1(LIM domain kinase 1, Limk1)、丝切蛋白1(cofilin1)蛋白表达及磷酸化水平,并检测磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)通路激活情况。**结果:**ApoE^{-/-}小鼠ABR检测中波I的振幅缩短,延迟期延长。螺旋神经节处染色结果显示ApoE^{-/-}小鼠带状突触及听神经纤维数量减少,并伴随结构受损。Western blot、qRT-PCR及免疫荧光染色发现Limk1与cofilin1在ApoE敲除后蛋白磷酸化水平出现显著性下降,同时PI3K通路激活被抑制。**结论:**ApoE基因缺陷会引起耳蜗螺旋神经节处带状突触及听神经损伤,并可能与神经元肌动蛋白细胞骨架密切相关。

[关键词] 载脂蛋白E;耳蜗;螺旋神经元**[中图分类号]** R392.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)02-156-09**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230202

Functional impairment of cochlear spiral neurons caused by ApoE defect in mice

TANG Xujun, WANG Hongshun, YAO Jun, CAO Xin*

Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to investigate the possible mechanism of auditory nerve injury at the spiral ganglion of the cochlea induced by apolipoprotein E (ApoE) gene deficiency in mice. **Methods:** Auditory brainstem response (ABR) were measured in ApoE knockout (ApoE^{-/-}) mice, and the amplitude and latency of the wave groups were analyzed. Immunofluorescence and H&E staining were used to analyze the pathological damage of auditory nerve and ribbon synapses in the spiral ganglion. Western blot and qRT-PCR were used to detect the protein expression and phosphorylation levels of LIM kinase 1 (Limk1) and cofilin1, and to detect the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) pathway activation. **Results:** The amplitude of wave I in ApoE^{-/-} mice by ABR was shortened and the latency was prolonged. The spiral ganglion staining showed that the number of ribbon synapses and auditory nerve fibers were reduced in ApoE^{-/-} mice, accompanied by the structural damage. Western blotting, qRT-PCR and immunofluorescence staining revealed that Limk1 and cofilin1 showed a significant decrease in protein phosphorylation levels after ApoE knockdown, while the PI3K pathway activation was inhibited. **Conclusion:** ApoE gene deficiency could damage the ribbon synapse and auditory nerve at the spiral ganglion of the cochlea, which might be related to the actin cytoskeleton of the auditory nerve.

[Key words] apolipoprotein E; cochlear; spiral ganglion neurons

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(02): 156-163, 168]

载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)是一类脂结合蛋白,在肝和脑内含量丰富^[1-2]。ApoE通过受

体介导,参与将胆固醇传递至靶组织/细胞,从而广泛参与到胆固醇代谢、突触可塑性、神经突生长、突触发生和炎症发生等生物学过程中^[3-4]。已知ApoE功能缺陷会导致血脂异常、动脉粥样硬化以及其他综合征,如阿尔兹海默病、帕金森病^[1,5]等。近期研

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(32070587)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: caoxin@njmu.edu.cn

究提示,ApoE功能缺陷也会影响个体的听觉功能,ApoE的脂质转运功能受损,会造成内耳组织结构的损伤^[6]。本课题组前期研究发现,ApoE基因缺陷小鼠在出现听力阈值上升的同时,还存在听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)波形的异常,且ABR波形出现波I振幅缩短及延迟期延长的现象,提示内毛细胞(inner hair cell, IHC)与螺旋神经节神经元(spiral ganglion neurons, SGN)连接处的带状突触(ribbon synapse)以及SGN内的听神经纤维可能发生了损伤,但围绕ApoE与带状突触及SGN损伤的机制尚不清楚。

为探究ApoE基因缺失是否会引起SGN内听神经及带状突触损伤,并揭示其可能的作用机制,本研究首先对ApoE基因敲除的小鼠听觉功能进行了检测,明确其听力损失情况,并分析了ABR的波形特征;其次对耳蜗螺旋神经节内带状突触及听神经的病理表型进行检测;最后通过实验解释ApoE缺陷引起听神经及带状突触损伤可能的分子基础,从而揭示ApoE缺失引起听力损失的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

用于实验的ApoE^{-/-}小鼠购自南京大学模式动物研究所,由南京医科大学动物中心净化并配繁。实验经过南京医科大学实验动物福利伦理委员会同意(ACUC-2002003)。

实验所用抗体包括: Ctlp2 抗体(612044, BD Biosciences 公司,美国), NF-H 抗体(ab207176, Abcam 公司,美国), Map2 抗体(8707, CST 公司,美国), Phospho-PI3K 抗体(AP0854)、PI3K 抗体(A19742)、Phospho-Dab1 抗体(AP0929)、Dab1 抗体(A10349)、Phospho-Cofilin1 抗体(AP0178)、Phospho-Akt1 抗体(AP063)、Phospho-Limk1 抗体(AP0387)、Limk1 抗体(A16664)(武汉 ABclonal 公司), cofilin1 抗体(5175, CST 公司,美国), Akt 抗体(10176)、山羊抗鼠、抗兔 IgG 二抗(SA00001-1、SA00001-2)(武汉 Proteintech 公司), 荧光标记山羊抗鼠、抗兔二抗(1741782、1748346, Thermo 公司,美国)。

其他包括:苏木素、伊红染液(G1004、G1001, 武汉赛维尔公司)、SYBR[®]Green Master Mix (2x)(Q131, 南京 Vazyme 公司)、TGX Stain-Free[™] Fast-Cast[™] Acrylamide Kit 12% 预混胶(1610185TA, Biolab 公司,美国)、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (R323-01, 南京 Vazyme 公司)、BCA 蛋白浓度检测试

剂(P0012, 上海碧云天公司);基因扩增引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 组织标本采集

选择实验小鼠及同窝对照小鼠,麻醉后使用0.9%生理盐水心脏灌注,取出小鼠耳蜗组织,置于4%多聚甲醛固定。固定过夜后将耳蜗组织置于5% EDTA 脱钙液中脱钙7~10 d。

1.2.2 ABR 检测及波 I 分析

小鼠麻醉后放置于隔音箱中,ABR 检测使用美国 TDT 公司设备及 BioSigRZ 软件系统给声并采集信号。纯音通过开放声场 MF1 磁性扬声器传送,扬声器置于距外耳道 5 cm 处。参考电极置于给声耳廓后,记录电极置于两耳间连线中点,地电极置于对侧耳廓后。测试声强从 90 dB 开始,以 10 dB 逐步递减,每个声级重复叠加 512 次取均值。一般小鼠 ABR 由 5 个波组成,以其中重复性最好、最稳定的 II 波作为波群主波,II 波最后消失的声强作为反应阈,记录 Click 刺激以及纯音刺激在 4、8、16、24、32 kHz 频率下的 ABR 阈值^[7]。在每个频率 90 dB 水平上测量 I 波波峰至基线距离即 I 波振幅,测量 I 波波峰至波群起始点时长即 I 波潜伏期。

1.2.3 HE 染色

脱钙后的耳蜗样本梯度酒精中脱水,二甲苯溶液透明组织,浸蜡 2~3 h 后进行石蜡包埋,切成 5 μ m 的薄片。60 $^{\circ}$ C 烘干后经过二甲苯及梯度酒精脱蜡,切片经苏木素染色 5~8 min,1% 盐酸酒精分化 2~5 s,0.6% 氨水返蓝。再放入伊红染液 1~3 min,脱水后中性树脂封片,显微镜下观察 HE 染色结果。

1.2.4 免疫荧光染色

脱钙后的耳蜗组织样本,在体视显微镜下分离耳蜗基底膜,清洗后使用 0.3% Triton X-100 透膜处理 20 min。耳蜗石蜡切片样本脱蜡后经柠檬酸盐缓冲液抗原修复,自然冷却后 PBS 缓冲液清洗,0.1% Triton X-100 透膜处理 20 min。样本经 Triton X-100 透膜处理后,使用 10% 山羊血清室温封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜。次日 PBS 清洗,避光 37 $^{\circ}$ C 孵育二抗 1 h, PBS 清洗后使用含 DAPI 的抗淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察染色情况。

1.2.5 蛋白质免疫印迹

取小鼠耳蜗组织,使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行组织匀浆,提取总蛋白,使用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度定量。取等量蛋白,通过 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,并转移至 PVDF 膜上。在 5%

脱脂奶粉溶液中封闭 2 h, TBST 清洗后, 4 ℃ 孵育一抗过夜。TBST 清洗后 37 ℃ 孵育二抗 2 h, 清洗后加 ECL 发光液, 使用凝胶成像系统观察。

1.2.6 实时定量 PCR

取小鼠耳蜗组织, 使用 TRIzol 在组织匀浆器中提取总 RNA, 测量浓度后取 1 μg 总 RNA 进行反转录, 生成 cDNA 保存, 随后进行实时定量 PCR 检测。采用 20 μL 扩增体系: SYBR®Green Master Mix (2x) 10 μL, cDNA 1 μL, 上游引物与下游引物各 0.5 μL, ddH₂O 8 μL。扩增程序如下: 预变性 95 ℃ 5 min, 变性 95 ℃ 10 s, 退火/延伸 60 ℃ 30 s, 共 40 个循环。目标基因 CT 值使用 Gapdh 基因校正, 引物序列见表 1。

1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 软件进行相关统计学分析, 每组实验至少重复 3 次。实验数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用两独立样本 *t* 检验进行组间比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

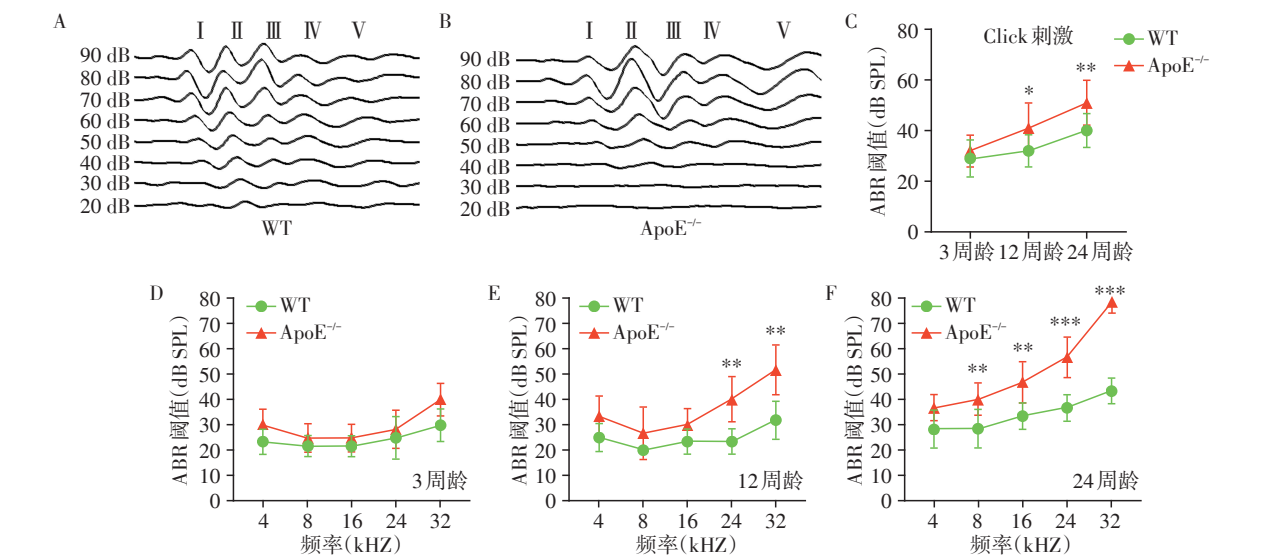
2 结果

2.1 ApoE^{-/-}小鼠 ABR 检测

根据前文 ABR 检测阈值判断方法对两组小鼠听力阈值进行统计, 图中波形可以看出 12 周龄的 WT 小鼠在 24 kHz 频率刺激下, 波 II 在 20 dB 时依然存在, 故其听力阈值为 20 dB。而同样条件下, ApoE^{-/-}小鼠在 40 dB 时存在波 II, 30 dB 时波 II 消

表 1 实时定量 PCR 引物序列	
Table 1 Primer sequences of qRT-PCR	
基因	序列(5'→3')
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Vldlr	上游 GGCAGCAGGCAATGCAATG
	下游 GGGCTCGTCACTCCAGTCT
ApoER2	上游 CCAATGGAATCACCTGGACT
	下游 CTTTGGCTCGTTCAGCTCG
Lrp1	上游 GCGGTGTGACAACGACAATG
	下游 AGCCACCAGGAGGTCTTGTA

失, 判断该小鼠听力阈值为 40 dB (图 1A、B)。对 3、12 及 24 周的 WT 及 ApoE^{-/-}小鼠 ABR 阈值统计发现, ApoE^{-/-}小鼠与对照组相比, 在 Click 刺激下, 3 周龄时并没有明显的阈值差异; 但随着小鼠周龄增加, 从 12 周龄开始, ApoE^{-/-}小鼠听力阈值出现显著上升 (图 1C)。ApoE^{-/-}小鼠在 4~32 kHz 频率下进行纯音听力阈值的分析, 发现 ApoE^{-/-}小鼠在 3 周时表现出正常的听力阈值, 与 WT 组相比没有明显差异 (图 1D)。12 周龄 ApoE^{-/-}小鼠在高频听力区域 (24、32 kHz) 处出现听力阈值的显著增高 (图 1E)。在 24 周龄时, 相比于 WT 组, ApoE^{-/-}小鼠的听力阈值从 8 kHz 开始就出现明显上升, 并且高频区域听力损失更加严重 (图 1F)。这些听力检测结果显示, ApoE^{-/-}小鼠从 12 周开始便出现了听力损失, 随着年龄增加情况逐渐严重, 并且从高频区域开始受损,



A、B: ABR 检测 WT 小鼠(A)和 ApoE^{-/-}小鼠(B)波形图(12 周龄, 24 kHz 频率); C: Click 刺激下 WT 组与 ApoE^{-/-}组听力阈值比较; D、E、F: 3 周龄(D)、12 周龄(E)和 24 周龄(F)的两组小鼠在纯音刺激下各频率的听力阈值。两组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 (*n* = 6)。

图 1 ApoE^{-/-}小鼠 ABR 检测
Figure 1 ABR detection in the ApoE^{-/-} mice

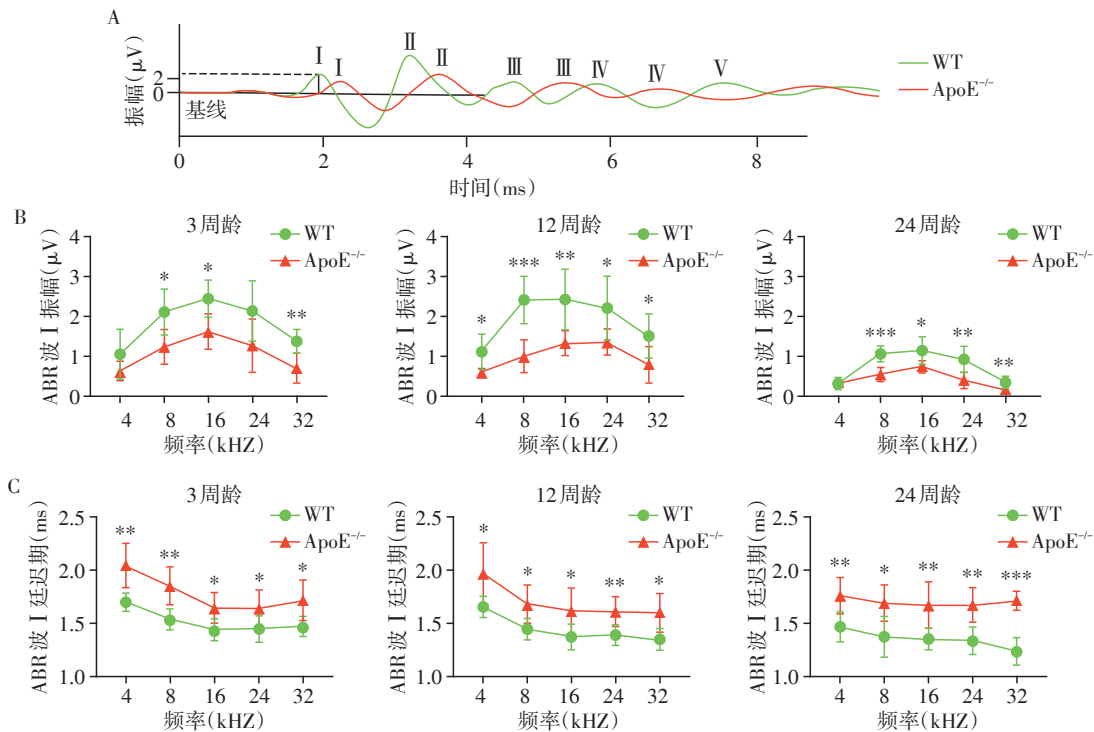
逐渐累及中低频区域。

2.2 ApoE^{-/-}小鼠ABR检测波 I 振幅及延迟期分析

与WT组相比,ApoE^{-/-}小鼠的ABR波 I 呈现较低的振幅,以及较长的延迟期(图2A)。波 I 的振幅分析显示,在3周龄小鼠中,ApoE^{-/-}小鼠在各个频率区域均有振幅缩短的趋势,并且在8、16、32 kHz处的缩短具有统计学意义($P < 0.05$)。在12周龄小鼠的波 I 振幅分析中发现,ApoE^{-/-}小鼠在各个频率区域的振幅缩短均具有统计学差异($P < 0.05$)。当小鼠24周龄时,其振幅平均值在两组小鼠中均下降,但ApoE^{-/-}小鼠的振幅下降更加明显,并且除4 kHz处无明显差异外,其余各频率区域差异具有统计学意义($P < 0.05$,图2B)。波 I 的延迟期分析显示,相较于WT组,ApoE^{-/-}小鼠的ABR波 I 延迟期在各个周龄、各个频率区域均有显著上升,且差异均具有统计学意义($P < 0.05$,图2C)。在波形分析中,波 I 的振幅与耳蜗带状突触对于听觉信号的接收能力有关,而延迟期表示听觉信号由IHC经过带状突触传递进入听神经的时间长度。这些结果提示ApoE^{-/-}小鼠耳蜗螺旋神经节处带状突触及听神经可能存在结构与功能上的异常,导致听觉信号传导障碍。

2.3 ApoE^{-/-}小鼠耳蜗带状突触数量分析

在耳蜗IHC底部存在连接SGN中听神经纤维的突触结构,由于其在空间上呈现带状分布,故被称为带状突触。每个SGN只与1个IHC存在突触联系,而每个IHC与10~30个神经元存在树突联系^[8]。IHC上的大量带状突触组合可以对持续、分级的听觉刺激进行反应,将听觉信号准确、连续及敏感地传入听神经,所以突触的数量对于听觉信号的传导起重要作用。本研究使用C端连接蛋白(C-terminal-binding protein,Ctbp2)对IHC底部的带状突触数量进行检测。Ctbp2是目前已知的带状突触上唯一的结构蛋白,常被认为参与构成带状突触结构的细胞骨架,Ctbp2可作为带状突触的标志分子^[9]。在12周龄小鼠耳蜗基底膜中,分别进行顶、中、底回Ctbp2免疫荧光染色(图3A),计算各回中单一IHC底部所含有的平均带状突触数量。在WT组中,顶回单个IHC含有(12.7±1.6)个突触,中回含有(14.5±1.9)个突触,底回含有(12.4±1.1)个突触。而在ApoE^{-/-}小鼠中,顶、中、底回的平均带状突触数量分别为(8.7±1.6)、(10.9±2.1)及(9.0±1.8)个。与WT组相比,ApoE^{-/-}小鼠耳蜗带状突触数量存在显著下降,差异有统计学意义($P < 0.001$,图3B)。对耳蜗内



A: ABR波形趋势图(12周龄,90 dB,8 kHz纯音刺激),黑色实线表示波峰至基线距离,即波 I 振幅,黑色虚线表示波 I 峰值至波群起始点时长,即波 I 延迟期;B:不同周龄的两组小鼠在纯音刺激下各频率的90 dB位置波 I 振幅比较;C:不同周龄的两组小鼠在纯音刺激下各频率的90 dB位置波 I 延迟期比较。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n=6$)。

图2 ApoE^{-/-}小鼠ABR检测波 I 振幅及延迟期分析

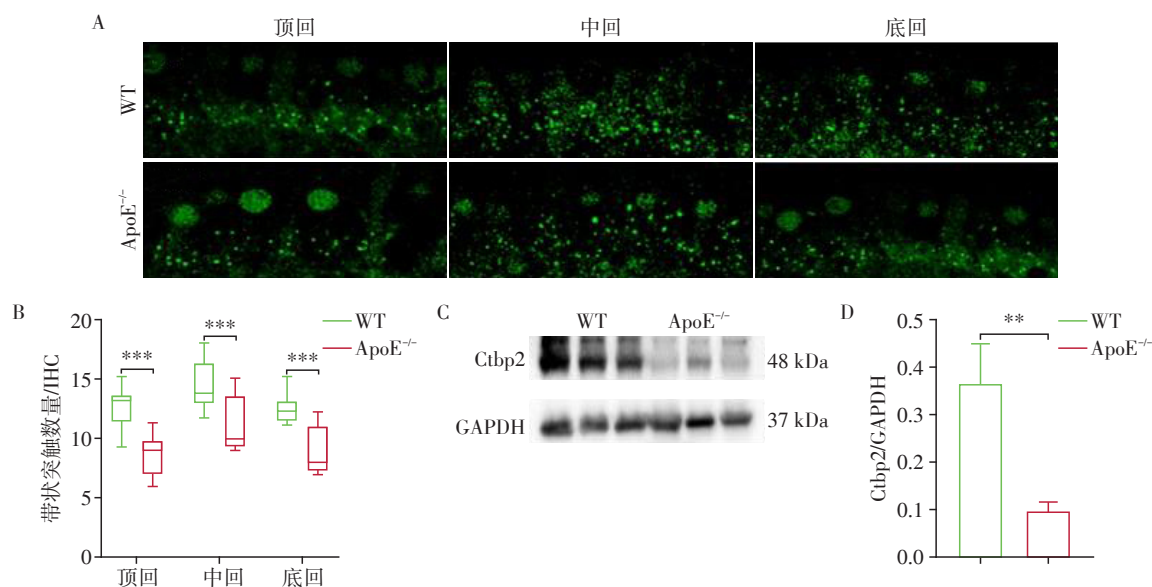
Figure 2 ABR wave I amplitude and latency analysis in ApoE^{-/-} mice

Ctbp2 蛋白表达进行分析,发现其在 $ApoE^{-/-}$ 小鼠中的表达明显下降(图 3C、D)。以上结果说明耳蜗带状突触数量的减少可能是造成 $ApoE^{-/-}$ 小鼠听觉信号传导功能异常的原因之一。

2.4 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 SGN 形态结构分析

为了研究 $ApoE^{-/-}$ 小鼠在发生带状突触丢失的同时是否伴随着 SGN 的损伤,对 SGN 区细胞数量、神经元细胞骨架进行了检查。通过 HE 染色对小鼠耳蜗的 SGN 区所含细胞进行标记,发现 $ApoE^{-/-}$ 小鼠

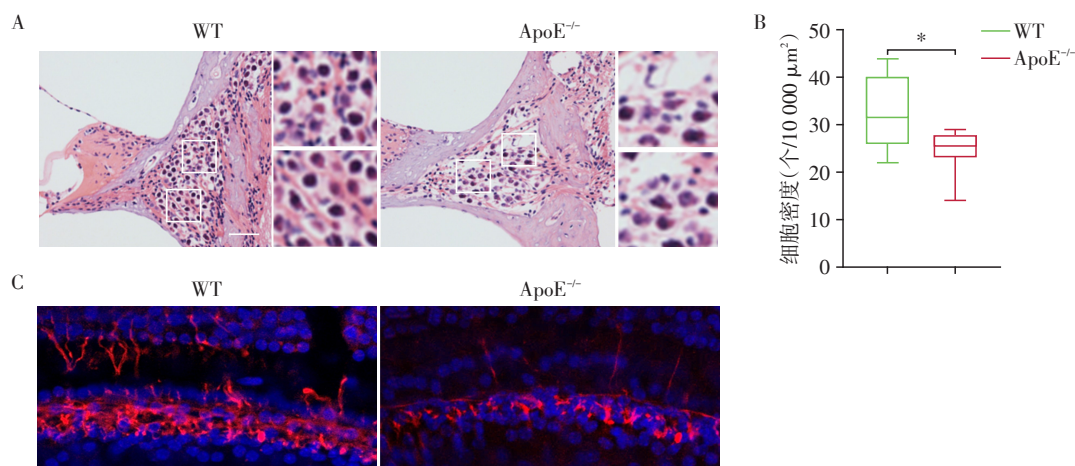
SGN 区的单位面积细胞数量减少,统计结果显示,WT 组小鼠每 10 000 μm^2 所含细胞数为 (33.4 ± 7.3) 个,大于 $ApoE^{-/-}$ 小鼠的 (24.5 ± 4.5) 个,并且两者的差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 4A、B)。神经元细胞骨架可以通过神经丝(neurofilament, NF)进行标记,细胞骨架的表达情况可以用来鉴定神经元是否存在变性情况,判断神经元功能是否受损。在 $ApoE^{-/-}$ 耳蜗内 NF 数量显著减少,听觉神经元出现变性情况(图 4C)。这些结果提示, $ApoE^{-/-}$ 小鼠耳蜗带



A: 耳蜗带状突触染色结果,带状突触使用 Ctbp2 抗体(绿)标记($\times 1\ 000$);B:耳蜗顶、中、底回带状突触数量分析(计算 3 只小鼠的 40~50 个 IHC 所含平均带状突触数量);C:蛋白质印迹法检测 Ctbp2 在小鼠耳蜗中的表达情况;D:以 GAPDH 做为内参,定量分析 Ctbp2 下降情况。两组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 3 $ApoE^{-/-}$ 小鼠带状突触数量检测

Figure 3 Detection of the number of cochlear ribbon synapses in $ApoE^{-/-}$ mice



A: 耳蜗 SGN 区域 HE 染色($\times 400$);B:SGN 区域细胞密度统计,两组比较, * $P < 0.05$ ($n=4$);C:小鼠耳蜗基底膜神经元细胞骨架染色,神经元细胞骨架由 NF-H(红)抗体标记,细胞核由 DAPI(蓝)标记($\times 1\ 000$)。

图 4 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 SGN 结构检测分析

Figure 4 Analysis of SGN structure in $ApoE^{-/-}$ mice

状突触损伤时也会伴随着SGN的功能损害,并可推测SGN内细胞骨架的显著减少可能是造成神经元数量减少的原因之一。

2.5 ApoE^{-/-}小鼠 Limk1-cofilin1 磷酸化水平检测

在神经系统中,神经元的肌动蛋白细胞骨架对于突触可塑性及神经元树突棘复杂度起着决定性作用^[10-11]。cofilin1作为肌动蛋白的关键分子,参与几乎所有真核细胞中的肌动蛋白功能调控^[12]。Limk1是cofilin1的上游分子,通过对cofilin1磷酸化修饰,维持肌动蛋白聚合与解聚的平衡。对ApoE^{-/-}小鼠的耳蜗组织cofilin1与Limk1表达水平及活性

状态进行检测,结果发现Limk1表达水平无明显变化,而磷酸化Limk1表达减少;另外cofilin1在耳蜗组织中蛋白表达上升,而磷酸化cofilin1的表达量减少(图5A)。统计磷酸化Limk1与cofilin1蛋白表达占总体Limk1及cofilin1的表达的相对量,发现两个蛋白的磷酸化水平均明显下降($P < 0.01$,图5B)。在耳蜗SGN区对磷酸化cofilin1进行免疫荧光强度检测,发现其在ApoE^{-/-}小鼠神经元中表达量减少(图5C、D)。如上结果显示,参与调控肌动蛋白解聚的Limk1与cofilin1,在ApoE^{-/-}小鼠耳蜗组织中磷酸化修饰而失活,减弱了参与维持细胞骨架稳定的作用。

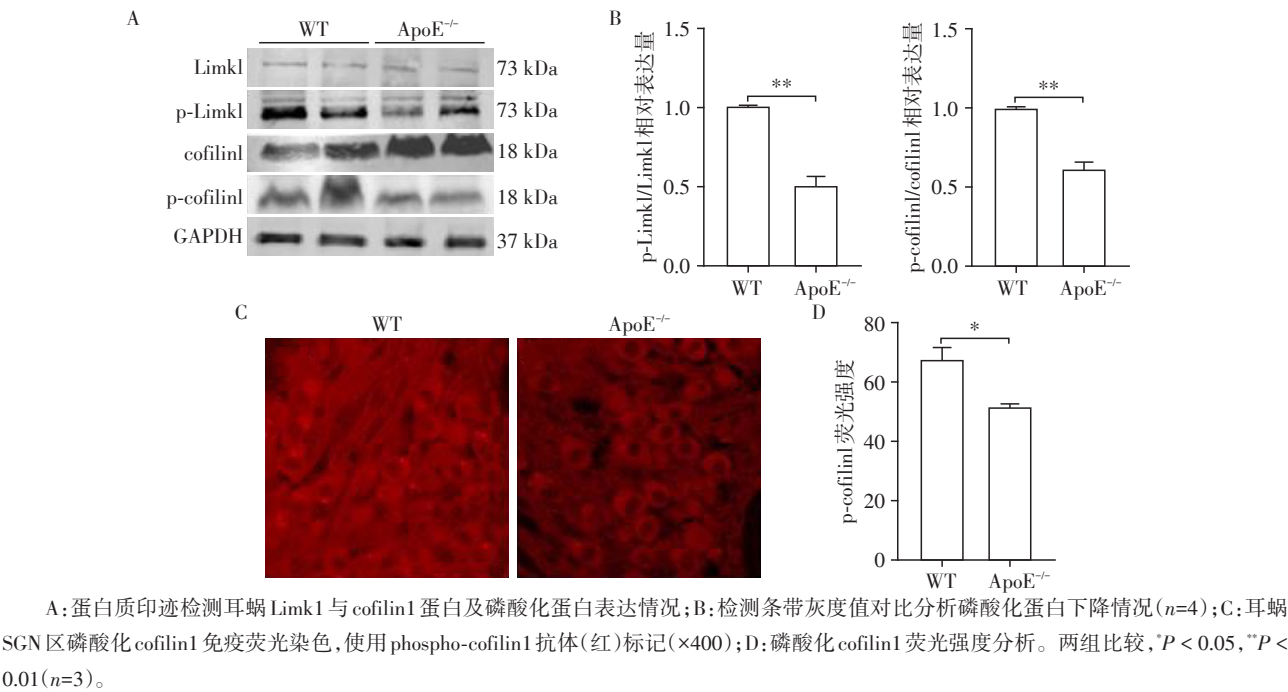


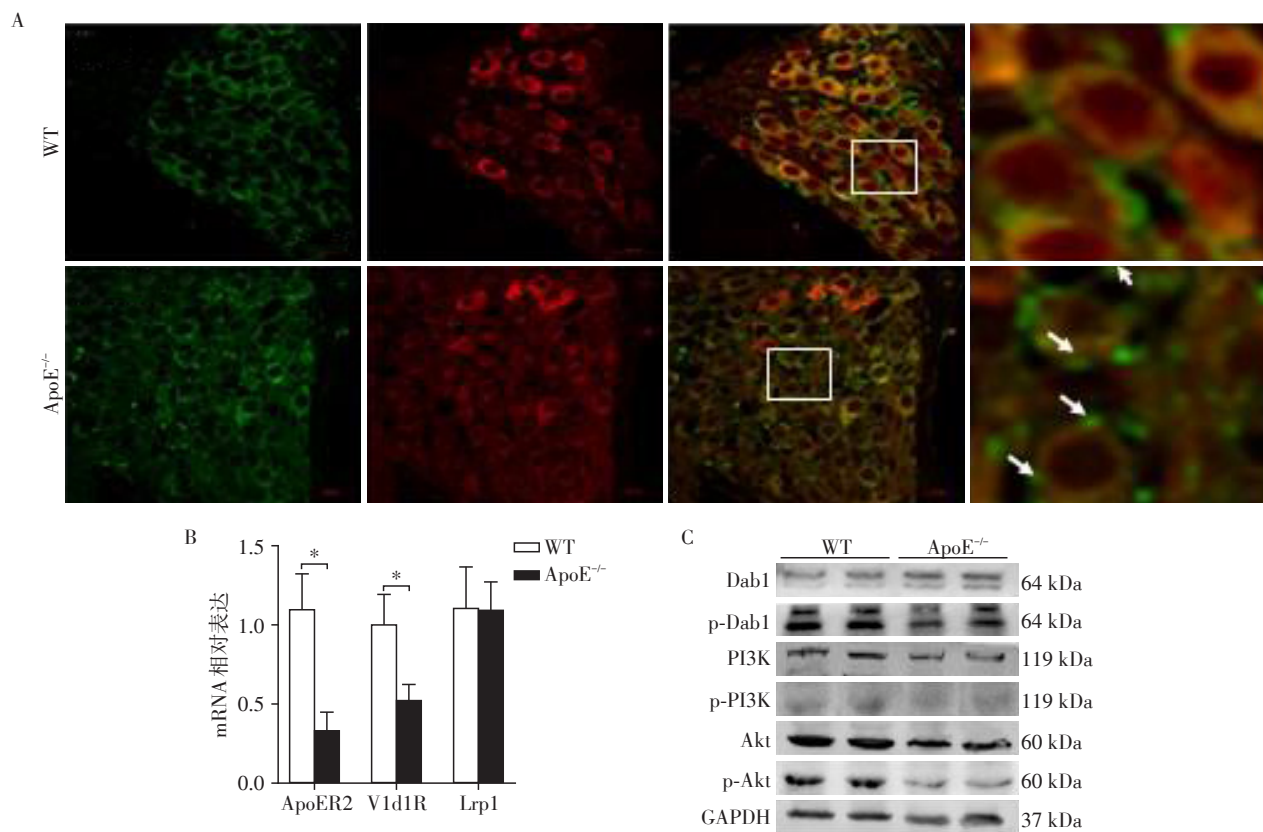
图5 ApoE^{-/-}小鼠 Limk1-cofilin1 磷酸化水平检测
Figure 5 Phosphorylation of Limk1-cofilin1 in ApoE^{-/-} mice

2.6 ApoE^{-/-}小鼠耳蜗SGN区 cofilin棒染色分析

当磷酸化失活的cofilin1减少,而活性cofilin1浓度升高,会促进肌动蛋白成核,并在其尖端不断组装聚合,形成cofilin棒(cofilin rod)。cofilin棒的过度堆积会引起神经功能损伤,其对于突触重塑性、树突棘复杂度等神经生理功能均有影响。在对ApoE^{-/-}小鼠耳蜗SGN区cofilin1进行染色时,发现在神经元细胞位置,出现明显棒状堆积结构,显示活性的cofilin1增多的确引起ApoE^{-/-}小鼠耳蜗内cofilin棒的增多(图6A)。这些结果显示,ApoE^{-/-}小鼠SGN区内磷酸化cofilin1减少会引起cofilin棒的异常堆积,后者是cofilin1活性增多引起的肌动蛋白解聚紊乱的直接表现,而cofilin棒的产生是造成神经元损

伤的重要原因。

在神经细胞中ApoE主要与载脂蛋白受体2(apolipoprotein E receptor 2, ApoER2)、极低密度脂蛋白受体(very-low-density lipoprotein receptor, VldlR)及低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LDLR-related receptor 1, Lrp1)结合。qRT-PCR显示前两种受体在ApoE^{-/-}小鼠耳蜗中表达显著降低,而同属LDLR家族成员的Lrp1在耳蜗中表达并无明显差异(图6B)。当细胞内ApoER2以及VldlR在与配体ApoE结合后,内接头蛋白(disabled1, Dab1)发生磷酸化,该蛋白被认为参与PI3K通路的调控。我们发现在ApoE^{-/-}小鼠的耳蜗组织中,Dab1的磷酸化程度降低,表明其对PI3K通路的激活作用减少;对PI3K及



A:SGN区 cofilin 棒染色,使用 cofilin1 抗体(绿)标记 cofilin1, Map2(红)标记神经细胞($\times 400$);B:qRT-PCR 检测耳蜗中 LDLR 受体表达情况,两组比较, $P < 0.05(n=3)$;C:PI3K 通路相关蛋白及其磷酸化水平检测。

图6 ApoE^{-/-}小鼠耳蜗SGN区 cofilin 棒染色结果

Figure 6 Results of cofilin rod staining in SGN region of the ApoE^{-/-} mice cochlea

Akt 分子及其磷酸化蛋白进行检测时,也发现其在耳蜗中表达量的下降(图6C)。有报道指出 PI3K 参与 Limk1-cofilin1 的调控,ApoE^{-/-}小鼠 PI3K 通路激活被抑制可能是耳蜗内 Limk1 与 cofilin1 磷酸化减少的重要原因之一。

3 讨论

先前研究提示 ApoE 功能缺陷的小鼠会引起耳蜗内毛细胞缺失、SGN 区细胞凋亡及血管纹毛细血管减少等损伤,并可导致听觉功能丧失^[13]。本研究发现,ApoE 缺陷还会引起耳蜗带状突触及听神经的损伤,并且该损伤发生在 ApoE 功能缺陷的早期。这验证了听神经的损伤一般出现在听力阈值上升或耳蜗细胞死亡之前的研究报道^[14],提示耳蜗 SGN 区听觉神经的损伤可能是 ApoE^{-/-}小鼠发生听力损失的另一重要原因。

在神经系统中,肌动蛋白在神经元轴突及树突的形成中起重要作用,甚至参与驱动神经元间突触形成以协助神经间连接。肌动蛋白的聚合与解聚在调节突触前神经递质释放、突触可塑性以及树突

棘复杂度等起着核心作用^[10,15]。cofilin1 是调节细胞内肌动蛋白组装与分解的关键分子之一,其蛋白表达水平对于肌动蛋白组装的调控起重要作用。当 cofilin1 蛋白浓度较低时,更倾向于切断肌动蛋白,促进肌动蛋白丝尖端解聚。在高浓度情况下,cofilin1 使肌动蛋白丝成核,以促进其组装^[16]。cofilin1 的活性主要是通过磷酸化状态来调控的,本研究发现 cofilin1 的磷酸化水平降低,同时具有活性的非磷酸化状态 cofilin1 表达上升。这就提示在 ApoE^{-/-}小鼠中存在高浓度的活性 cofilin1,可能导致了神经细胞内肌动蛋白的聚合异常。

Limk1 是中枢神经系统中磷酸化 cofilin1 的主要修饰分子,Limk1 的磷酸化会导致其自身失活,失活后的 Limk1 则不能继续调控 cofilin1 的磷酸化水平^[17-18]。本研究也发现,在 ApoE 调控的神经细胞生理过程中存在 Limk1 与 cofilin1 基因的异常表达。在 ApoE^{-/-}小鼠中,Limk1 的磷酸化水平降低,同时 Limk1 的磷酸化是造成活性 cofilin1 浓度升高的主要原因。当活性 cofilin1 浓度过高时,其切断肌动蛋白丝的效率降低,肌动蛋白丝不断添加到 cofilin 与肌

动蛋白的复合体上,形成cofilin棒^[12]。cofilin棒过度堆积被认为会损伤中枢神经系统的神经功能,在神经退行性疾病中,cofilin棒与磷酸化tau蛋白存在共定位现象^[19]。本研究对耳蜗SGN区域的cofilin棒进行特异染色,发现在神经细胞周围存在明显的cofilin棒堆积现象,也验证了上述推论中活性cofilin1的增多会引起神经细胞内肌动蛋白异常聚合。因此,ApoE^{-/-}小鼠听神经及带状突触功能损伤可能的原因之一是源于细胞内肌动蛋白的异常聚合。

ApoE对神经元的作用主要通过与其细胞表面LDLR家族成员结合,如ApoER2、VldlR和Lrp1^[20-21]。受体与ApoE结合后,进一步激活细胞内的相关信号通路,参与突触的囊泡释放、钙离子电流调节、肌动蛋白聚合及β淀粉样蛋白清除等生理过程^[22]。研究表明ApoE在与ApoER2或VldlR结合后,会诱导其下游Dab1的磷酸化,而磷酸化的Dab1会激活PI3K通路。磷酸化的Dab1招募PI3K上的p85α亚基,并进一步触发下游Akt分子的磷酸化^[23]。本研究对耳蜗内的Dab1分子以及其调控的PI3K通路及下游Akt分子进行了蛋白表达及磷酸化水平检测,发现均出现了磷酸化水平减少的现象,说明当ApoE功能缺陷时,其对于PI3K通路激活能力下降,PI3K通路被抑制。研究也表明PI3K会使Limk1磷酸化,进而抑制cofilin1的活性,阻断cofilin1的主动聚合活性,使得神经细胞树突棘生长增加、复杂性增高,用以维持突触后Ca²⁺稳态及信号传导功能^[22,24]。本研究中,ApoE^{-/-}小鼠耳蜗中出现明显的PI3K活性降低,并可通过Akt分子的磷酸化水平降低进一步获得验证^[25-26]。因此,可初步推测ApoE^{-/-}小鼠中Limk1-cofilin1磷酸化降低,是由于PI3K的激活被部分抑制引起。

综上所述,通过对ApoE^{-/-}小鼠的听觉功能进行分析,发现ApoE基因缺陷会引起小鼠听力损失,并且SGN区的损伤是其重要原因之一。而SGN区中带状突触及听神经纤维的损伤,可能源于神经细胞内肌动蛋白解聚功能异常。进一步推测其异常是由ApoE功能缺陷破坏了cofilin1对肌动蛋白的解聚作用引起的。以上为进一步探究ApoE在听觉神经系统中的生物学功能奠定了理论与实验基础。

[参考文献]

[1] HUEBBE P, RIMBACH G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors [J]. Ageing Res Rev, 2017, 37: 146-161

[2] MUÑOZ S S, GARNER B, OOI L. Understanding the role of apoe fragments in Alzheimer's disease [J]. Neurochem Res, 2019, 44(6): 1297-1305

[3] REBECK G W. The role of APOE on lipid homeostasis and inflammation in normal brains [J]. J Lipid Res, 2017, 58(8): 1493-1499

[4] HUSAIN M A, LAURENT B, PLOURDE M. APOE and Alzheimer's disease: from lipid transport to physiopathology and therapeutics [J]. Front Neurosci, 2021, 15: 630502

[5] BUTTERFIELD D A, JOHNSON L A. APOE in Alzheimer's disease and neurodegeneration [J]. Neurobiol Dis, 2020, 139: 104847

[6] ZHU S, DU X, CAI Q, et al. Impaired stria vascularis in the inner ear of apolipoprotein E gene knockout mice [J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2008, 70(6): 373-380

[7] 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

[8] JOHNSON S L, SAFIEDDINE S, MUSTAPHA M, et al. Hair cell afferent synapses: function and dysfunction [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019, 9(12): a033175

[9] ZHANG W, PENG Z, YU S, et al. Loss of cochlear ribbon synapse is a critical contributor to chronic salicylate sodium treatment-induced tinnitus without change hearing threshold [J]. Neural Plast, 2020, 2020: 3949161

[10] GENTILE J E, CARRIZALES M G, KOLESKA A J. Control of synapse structure and function by actin and its regulators [J]. Cells, 2022, 11(4): 603

[11] PELUCCHI S, VANDERMEULEN L, PIZZAMIGLIO L, et al. Cyclase-associated protein 2 dimerization regulates cofilin in synaptic plasticity and Alzheimer's disease [J]. Brain Commun, 2020, 2(2): fcaa086

[12] BAMBURG J R, MINAMIDE L S, WIGGAN O, et al. Cofilin and actin dynamics: multiple modes of regulation and their impacts in neuronal development and degeneration [J]. Cells, 2021, 10(10): 2726

[13] KIM J, BASAK J M, HOLTZMAN D M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease [J]. Neuron, 2009, 63(3): 287-303

[14] SERGEYENKO Y, LALL K, LIBERMAN M C, et al. Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline [J]. J Neurosci, 2013, 33(34): 13686-13694

[15] KANG D E, WOO J A. Cofilin, a master node regulating cytoskeletal pathogenesis in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2019, 72(s1): S131-s144

(下转第168页)

- flammation to fibrosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112
- [5] 郑育聪, 陆敏杰, 陈秀玉, 等. 主动脉瓣关闭不全患者心肌纤维化的磁共振成像特征及其影响因素分析[J]. *中华心血管病杂志*, 2019, 47(8): 622-627
- [6] LIANG K, BARITUSSIO A, PALAZZUOLI A, et al. Cardiovascular magnetic resonance of myocardial fibrosis, edema, and infiltrates in heart failure[J]. *Heart Fail Clin*, 2021, 17(1): 77-84
- [7] 杨钰粒, 赵铭哲, 于 瀛, 等. 肥厚型心肌病患者左心室纤维化特点及延迟钆增强心脏磁共振的临床应用现状[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(11): 1676-1680
- [8] RAMAN B, ARIGA R, SPARTERA M, et al. Progression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and clinical implications [J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2019, 20(2): 157-167
- [9] 邓晓娴, 夏 成, 周红梅. 安立生坦对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌纤维化保护作用及机制研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 2020, 38(2): 47-50
- [10] FRANGOGIANNIS N G. Cardiac fibrosis: cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 70-99
- [11] KHALIL H, KANISICAK O, PRASAD V, et al. Fibroblast-specific TGF-beta-Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3770-3783
- [12] KONG P, CHRISTIA P, FRANGOGIANNIS N G. The pathogenesis of cardiac fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4): 549-574
- [13] 严晓靖, 阳 军. 心肌纤维化的发病机制及诊疗进展[J]. *中国医师杂志*, 2021, 23(6): 954-957
- [14] KHOLMOVSKI E G, MORRIS A K, CHELU M G. Cardiac MRI and fibrosis quantification[J]. *Card Electrophysiol Clin*, 2019, 11(3): 537-549
- [15] KARAMITSOS T D, ARVANITAKI A, KARVOUNIS H, et al. Myocardial tissue characterization and fibrosis by imaging [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(5): 1221-1234
- [16] GUPTA S, GE Y, SINGH A, et al. Multimodality imaging assessment of myocardial fibrosis [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2021, 11: S1936- 878X(21)00151-0
- [17] 潘建衡, 曹占鸿, 李 娜, 等. 常见心肌纤维化模型的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(1): 84-88
- [18] RAI V, SHARMA P, AGRAWAL S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 424(1-2): 123-145
- [19] ALLAWADHI P, KHURANA A, SAYED N, et al. Isoproterenol - induced cardiac ischemia and fibrosis: Plant - based approaches for intervention [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(10): 1908-1932
- [收稿日期] 2022-03-19
(本文编辑:唐 震)

(上接第163页)

- [16] RUST M B. ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(18): 3521-3529
- [17] LEE M H, KUNDU J K, CHAE J I, et al. Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(6): 481-491
- [18] PRUNIER C, PRUDENT R, KAPUR R, et al. LIM kinases: cofilin and beyond [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 41749-41763
- [19] WHITEMAN I T, GERVASIO O L, CULLEN K M, et al. Activated actin - depolymerizing factor/cofilin sequesters phosphorylated microtubule-associated protein during the assembly of alzheimer-like neuritic cytoskeletal striations [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(41): 12994-13005
- [20] ZHAO N, LIU C C, QIAO W, et al. Apolipoprotein e, receptors, and modulation of Alzheimer's disease [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(4): 347-357
- [21] DLUGOSZ P, NIMPF J. The reelin receptors apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and VLDL receptor [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3090
- [22] LANE - DONOVAN C, HERZ J. ApoE, ApoE receptors, and the synapse in Alzheimer's disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(4): 273-284
- [23] GABBOUJ S, RYHÄNEN S, MARTTINEN M, et al. Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain - special emphasis on PI3K-Akt pathway [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 629
- [24] CARONI P, CHOWDHURY A, LAHR M. Synapse rearrangements upon learning: from divergent-sparse connectivity to dedicated sub - circuits [J]. *Trends Neurosci*, 2014, 37(10): 604-614
- [25] SHARMA A, MEHAN S. Targeting PI3K-AKT/mTOR signaling in the prevention of autism [J]. *Neurochem Int*, 2021, 147: 105067
- [26] 刘淑梅, 李丽华, 鲁俊华, 等. PI3k/Akt信号通路在维生素D促进神经递质分泌中的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(11): 1597-1602
- [收稿日期] 2022-07-19
(本文编辑:唐 震)