

抑制 Drp1 通过减轻氧化应激和凋亡改善噪声性耳聋

周 曦 成 航 李 鹏 (通讯作者)

山东省职业卫生与职业病防治研究院 山东 250062

【摘 要】：噪声性听力损失由不可逆的耳蜗毛细胞损伤引起，由于对内源性保护机制了解有限，目前缺乏有效的治疗方法。本研究旨在探讨 Drp1 在噪声性听力损失发病中的作用及其机制。通过建立小鼠噪声暴露模型，采用 qRT-PCR、听觉脑干反应检测、ELISA 及蛋白质印迹法等技术进行分析。结果显示，噪声暴露可显著上调耳蜗组织中 Drp1 的 mRNA 表达；Drp1 抑制剂 Mdivi-1 能有效降低噪声暴露后各时间点的 ABR 阈值，减轻听功能损伤。进一步机制研究表明，Mdivi-1 干预可显著改善氧化应激，降低 MDA 水平、提高 SOD 活性并调节 TAC 水平，同时逆转噪声引起的 Bax/Bcl-2 比值升高及 Caspase-3 活化。结果表明，Drp1 通过促进氧化应激及激活线粒体依赖性凋亡通路参与噪声性耳聋的发病过程，抑制 Drp1 可能成为防治该病的潜在策略。

【关键词】：噪声性听力损失；线粒体动力相关蛋白 1；细胞凋亡

DOI:10.12417/2811-051X.26.02.081

引言

在职业环境中获得的噪声性听力损失（Noise induced hearing loss, NIHL）是工业化国家听力障碍最为常见的原因之一^[1]。在哺乳动物听觉系统中，耳蜗内的机械感觉毛细胞主要分为外毛细胞和内毛细胞，两者在听觉感知过程中发挥关键作用。声音振动经由耳蜗基底膜传递时，外毛细胞负责对机械信号进行放大，而内毛细胞则承担机械刺激至电信号的转换功能。随后，这些电信号通过高度特化的突触前结构传递至耳蜗神经元，最终将听觉信息传导至大脑^[2]。NIHL 会导致毛细胞发生不可逆死亡，并引发突触病变。噪声暴露还会导致与 NIHL 相关的氧化应激、炎症和细胞凋亡等因素的代谢过度刺激^[3]。

耳蜗内与噪声相关的氧化应激被认为是 NIHL 发病机制中的一个关键因素，其机制可能涉及线粒体活动过度、谷氨酸兴奋性毒性以及耳蜗血供的缺血/再灌注损伤等多种过程的共同作用^[4]。这些病理生理变化最终导致活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS）和活性氮（Reactive Nitrogen Species, RNS）的生成增加，进而引起细胞内的 DNA 和蛋白质损伤。此类损伤可进一步造成细胞器功能障碍，最终导致细胞凋亡或坏死性死亡。

动力相关蛋白 1（Dynamin-related protein 1, Drp1）是一种由 DNMI1L 基因编码的机械化学蛋白，是动力蛋白样 GTP 酶超家族的成员。尽管 Drp1 的功能域已经被简要表征^[5]，但其功能意义尚未得到彻底探索。在人类中，Drp1 广泛表达，并存在多种可变剪接体，其在心脏、骨骼肌、脑、肾和睾丸中的表达水平较高。在基础状态下，大多数 Drp1 定位于细胞质中；

而当线粒体发生分裂时，Drp1 会通过与线粒体外膜蛋白相互作用，被募集到线粒体分裂位点，以驱动裂变。由于细胞在应激状态下或死亡过程中常观察到线粒体碎片化现象，Drp1 被认为与细胞死亡的发病机制相关^[6-8]。尽管线粒体分裂调控异常导致的线粒体功能障碍可能间接引发细胞死亡，但越来越多的证据表明^[9-11]，当 Drp1 与线粒体稳定结合时，它能通过调控线粒体外膜通透性，更直接地参与细胞凋亡过程。例如，在 HeLa 细胞的凋亡过程中，Drp1 会在线粒体分裂位点与 Bax 蛋白结合。然而，Drp1 本身及线粒体分裂过程本身可能均不足以诱导细胞死亡。在 HeLa 细胞中，Drp1 的缺失可通过抑制细胞色素 c 的释放来阻止线粒体碎片化及细胞凋亡，但不会影响 Bax 向线粒体的移位，这提示 Drp1 通过作用于 Bax 移位的下游、细胞色素 c 释放的上游来调控细胞死亡^[12,13]。在 HeLa 细胞的凋亡过程中，Drp1 以 Bax/Bak 依赖但不依赖于线粒体碎片化的方式与线粒体膜稳定结合。这种结合可诱导线粒体的内外膜及嵴发生重塑，而这一过程早于线粒体外膜通透化、细胞色素 c 完全释放及最终线粒体膜电位丧失。

耳蜗毛细胞凋亡是 NIHL 发生的关键病理基础，而耳蜗毛细胞线粒体功能异常是介导此类凋亡过程的重要机制之一。目前，关于 Drp1 是否参与噪声暴露下小鼠耳蜗毛细胞凋亡的调控，尚未见相关研究报道。本研究通过探讨 Drp1 在噪声暴露诱导的小鼠耳蜗毛细胞凋亡中的作用及其机制，旨在揭示其作用特征、规律及相关分子通路。该研究为验证噪声暴露可能通过上调 Drp1 表达，引起线粒体动力学失衡，进而促进毛细胞凋亡并导致 NIHL 提供理论依据。

作者简介：周曦，女（1986.11-），汉族，山东人，硕士研究生，主治医师，研究方向为职业性噪声聋机制相关研究。

成航，女（1987.01-），汉族，山东人，硕士研究生，主管检验师，研究方向为尘肺机制相关研究。

李鹏，男（1974.06-），汉族，山东人，学士本科，主任医师，研究方向为职业性噪声聋机制相关研究。

基金项目：本文为山东省医药卫生科技发展计划面上项目（编号：202212010489）研究成果。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

本研究采用8周龄野生型C57BL/6J小鼠构建噪声性听力损失模型。实验期间,小鼠饲养于无特定病原体环境中,环境温度恒定,食物和水均自由获取。所有动物实验均严格遵循山东省职业卫生与职业病防治研究院动物伦理委员会批准的实验方案,以保障动物福利。

1.2 噪声暴露与Mdivi-1干预

将小鼠暴露于频率范围为8-16 kHz、声压级为108 dB的倍频程噪声中12小时或24小时,以诱导永久性阈值偏移。将清醒的小鼠单独放置在尺寸为9厘米×5厘米×5厘米的矩形金属网笼中。在配备扬声器的腔室中进行噪声暴露,使用便携式声级计校准和测量暴露的声强,以确保一致的声场,并在暴露前后进行测量以验证稳定性。Mdivi-1干预方案如下:在噪声暴露前30min,给小鼠腹腔注射25 mg/kg的Mdivi-1或等体积的溶媒(含二甲基亚砜的生理盐水);从噪声暴露开始,每2天持续腹腔注射Mdivi-1或溶媒,直至实验结束。

1.3 听觉脑干反应(Auditory Brainstem Response,ABR)

用1%戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉小鼠。有源电极置于前额,参比电极放置在左耳廓下方,接地电极位于右耳下方。使用与TDT BioSig III系统关联的BioSig32软件在鼠的左耳测量频率为8、16和32 kHz的ABR阈值。每个频率的声级从90 dB逐渐降低到10 dB,随后的每次刺激相对于前一个级别降低10 dB SPL,并计算出平均1024个响应进行分析。ABR阈值定义为产生可识别响应的最低水平。通过测量初始波的峰值和波谷之间的电压差来计算I波幅度,通过测量从刺激开始到第一波峰值的时间间隔来确定潜伏期。

1.4 RNA提取和定量实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

根据厂家说明书,使用RNA Express纯化试剂盒从耳蜗中提取RNA;使用NanoDrop仪器测定RNA浓度。使用RNA逆转录试剂盒、qPCR SYBR Green Master Mix及罗氏LightCycler检测系统(Roche LightCycler 480 II)。扩增引物由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)

各组小鼠眼球取血,4000 r/min、4℃离心10min,取上清。根据试剂盒说明书检测小鼠血清中TAC、SOD、MDA表达水平。

1.6 蛋白质印迹分析(Western blot)

安乐死小鼠,收集耳蜗样本,在液氮中快速冷冻。用PBS洗涤后,使用细胞刮刀在冰上收集细胞。使用补充蛋白酶和磷酸酶抑制剂在预冷的RIPA缓冲液在4℃下进行蛋白质提取。对于耳蜗组织,均质样品以14,000×g离心10 min,以去除细

胞碎片并获得可溶性蛋白质裂解物。使用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质匀浆。将分离的蛋白质转移到0.22μm聚偏二氟乙烯转移膜上,随后在室温下用含有5%脱脂牛奶的TBST在Tris缓冲盐水中封闭2小时。此后,将膜与一抗孵育16小时。然后用TBST冲洗膜,HRP偶联的山羊抗兔抗体孵育二抗,最后在室温下放置1 h。使用化学发光检测蛋白质条带并在胶片上可视化。使用ImageJ软件测量条带的灰度以进行进一步分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析,以表示。两组间比较采用卡方检验,若满足正态性再采用Levene's Test进行两组间方差齐性检验,若方差齐则采用Tukey Test检验进行组间两两比较,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若方差不齐则采用非参数秩和检验。

2 结果

2.1 噪声暴露后耳蜗组织中Drp1表达上调

目前,Drp1是否与NIHL是否存在相关性,目前尚未见研究报道。我们首先利用C57BL/6J小鼠监测了噪声暴露过程中其表达变化。qRT-PCR分析结果显示,与对照组相比,噪声暴露12小时和24小时后,小鼠耳蜗组织中Drp1的转录本水平显著升高(图1)。结果提示,噪声暴露可诱导耳蜗内Drp1的表达。

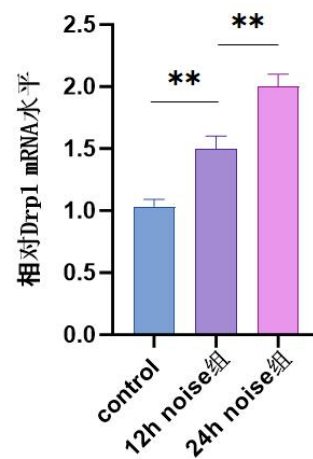


图1 在小鼠NIHL模型中耳蜗内Drp1表达上调

2.2 Drp1抑制剂Mdivi-1对NIHL具有保护作用

Mdivi-1是一种选择性DRP1抑制剂,通过抑制DRP1 GTP酶活性来抑制过度的线粒体分裂。我们在噪声暴露后第1天、第7天和第14天进行ABR测量。结果显示,与DMSO对照组相比,接受Mdivi-1处理的小鼠在噪声暴露后1天(图2A)、7天(图2B)和14天(图2C)测得的ABR阈值均显著降低($P<0.01$)。结果表明,Drp1抑制剂Mdivi-1可降低小鼠模型对

NIHL 的敏感性。

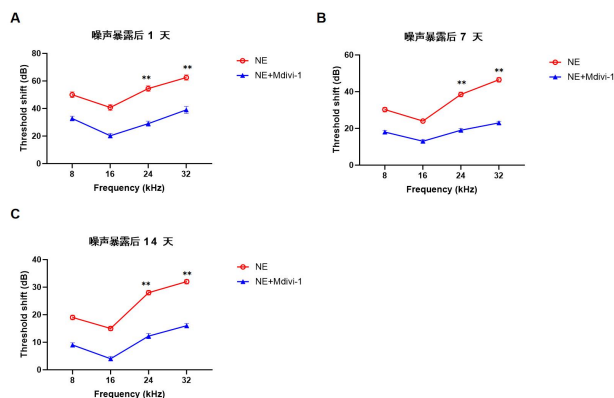


图2 Drp1 抑制剂 Mdivi-1 可减轻 NIHL 的严重程度

2.3 Drp1 抑制剂 Mdivi-1 减少氧化应激

氧化应激反应是 NIHL 进展的关键机制。丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 水平反映了细胞或组织的氧化损伤程度, 而超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 和总抗氧化能力 (Total Antioxidant Capacity, TAC) 则具有抗氧化应激作用。Elisa 检测结果显示, 与正常对照组相比, 噪声暴露组 TAC 水平显著增加, 而 Mdivi-1 显著降低了接受噪声的小鼠组中的 TAC 水平 (图 3A)。与正常对照相比, 噪声暴露组中 MDA 水平也显著增加, 并且在 Mdivi-1 处理后 MDA 水平显著降低 ($P<0.05$) (图 3B)。我们的研究结果还表明, 与正常对照相比, 噪声暴露组中的 SOD 水平显著降低, 而 Mdivi-1 组的 SOD 水平显著增加 (图 3C)。

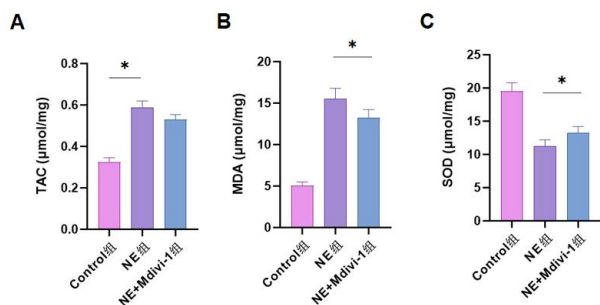


图3 小鼠血清中 TAC、MDA 和 SOD 表达水平

2.4 Drp1 介导了线粒体依赖性凋亡通路

采用蛋白质印迹法分别检测各组小鼠耳蜗组织中线粒体凋亡通路相关蛋白 Bax, Bcl-2, Cleaved Caspase-3 的表达水平。结果显示 (图 4), 噪声暴露组促凋亡蛋白 Bax 表达上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, Cleaved Caspase-3 水平显著升高。Mdivi-1 干预组可逆转上述蛋白的表达变化, 表明 Drp1 介导了线粒体依赖性凋亡通路。

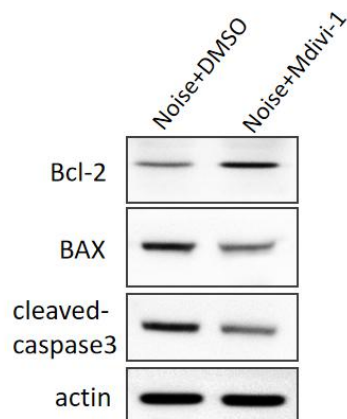


图4 Drp1 抑制剂 Mdivi-1 对凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

本研究证实 Drp1 在 NIHL 小鼠耳蜗组织中表达上调, 且 Drp1 抑制剂 Mdivi-1 可通过调控氧化应激与线粒体依赖性凋亡通路发挥 NIHL 保护作用, 为 NIHL 的发病机制及干预策略提供了新策略。

噪声暴露后耳蜗内 Drp1 转录本水平显著升高, 提示 Drp1 可能参与 NIHL 的病理进程。既往研究表明^[14], Drp1 作为线粒体分裂关键调控因子, 其异常激活可导致线粒体过度分裂, 破坏线粒体稳态, 而线粒体功能障碍是 NIHL 的核心病理环节之一。本研究中, Mdivi-1 显著降低噪声暴露后 1 天、7 天及 14 天的 ABR 阈值, 明确了 Drp1 在 NIHL 中的作用, 证实靶向抑制 Drp1 可减轻噪声诱导的听力损伤。

进一步机制探究发现, Mdivi-1 可逆转噪声引发的氧化应激失衡: 降低脂质过氧化产物 MDA 水平, 上调抗氧化酶 SOD 活性, 同时调节总抗氧化能力 TAC, 提示 Drp1 可能通过介导线粒体源性氧化应激参与 NIHL 进展。线粒体是活性氧的主要来源, Drp1 异常激活导致的线粒体结构破坏可能加剧氧化应激, 而 Mdivi-1 对 Drp1 的抑制可恢复线粒体功能, 进而改善氧化平衡。

此外, 本研究证实 Drp1 参与调控线粒体依赖性凋亡通路。噪声暴露导致促凋亡蛋白 Bax 上调、抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调, 激活 Cleaved Caspase-3, 而 Mdivi-1 可逆转该变化, 表明 Drp1 可能通过调控线粒体凋亡通路介导耳蜗细胞死亡。

4 结论

综上, Drp1 在 NIHL 中扮演促损伤角色, 其抑制剂 Mdivi-1 可通过改善氧化应激与抑制线粒体依赖性凋亡保护听力, 为 NIHL 的防治找到了新靶点。后续研究可进一步探索 Drp1 调控耳蜗损伤的上游信号通路, 为开发更精准的干预药物奠定基础。

参考文献:

- [1] Liu D, Ji H, Chen Y, et al. Global impact of Occupational Noise-Induced Hearing Loss (ONIHL): trends, gender disparities, and future projections: 1990-2036[J]. *Front Glob Womens Health*, 2025, 6: 1584639.
- [2] Xu K, Xu B, Gu J, et al. Intrinsic mechanism and pharmacologic treatments of noise-induced hearing loss[J]. *Theranostics*, 2023, 13(11): 3524-3549.
- [3] Kitama T, Nishiyama T, Hosoya M, et al. Noise-Induced Hearing Loss: Overview and Future Prospects for Research on Oxidative Stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(10).
- [4] Yuan C, Ma T, Liu M, et al. Ferroptosis, oxidative stress and hearing loss: Mechanistic insights and therapeutic opportunities[J]. *Heliyon*, 2024, 10(20): e38553.
- [5] Rios L, Pokhrel S, Li S J, et al. Targeting an allosteric site in dynamin-related protein 1 to inhibit Fis1-mediated mitochondrial dysfunction[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4356.
- [6] Chang X, Niu S, Shang M, et al. ROS-Drp1-mediated mitochondria fission contributes to hippocampal HT22 cell apoptosis induced by silver nanoparticles[J]. *Redox Biol*, 2023, 63: 102739.
- [7] Ansari M Y, Novak K, Haqqi T M. ERK1/2-mediated activation of DRP1 regulates mitochondrial dynamics and apoptosis in chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(2): 315-328.
- [8] Wang N, Wang X, Lan B, et al. DRP1, fission and apoptosis[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 150.
- [9] Song J E, Alves T C, Stutz B, et al. Mitochondrial Fission Governed by Drp1 Regulates Exogenous Fatty Acid Usage and Storage in HeLa Cells[J]. *Metabolites*, 2021, 11(5).
- [10] Zhang Z, Yi J, Xie B, et al. Parkin, as a Regulator, Participates in Arsenic Trioxide-Triggered Mitophagy in HeLa Cells[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(6): 2759-2771.
- [11] Ota A, Ishihara T, Ishihara N. Mitochondrial nucleoid morphology and respiratory function are altered in Drp1-deficient HeLa cells[J]. *J Biochem*, 2020, 167(3): 287-294.
- [12] Clerc P, Ge S X, Hwang H, et al. Drp1 is dispensable for apoptotic cytochrome c release in primed MCF10A and fibroblast cells but affects Bcl-2 antagonist-induced respiratory changes[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8): 1988-1999.
- [13] Kumar R, Bhat T A, Walsh E M, et al. Cytochrome c Deficiency Confers Apoptosome and Mitochondrial Dysfunction in African-American Men with Prostate Cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(7): 1353-1368.
- [14] Nishimura A, Shimauchi T, Tanaka T, et al. Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence[J]. *Sci Signal*, 2018, 11(556).