研究论文

# 老年C57BL/6J小鼠内皮细胞上S1PR1对血迷路 屏障通透性的影响

余蒙<sup>1,2</sup> 余苗<sup>2,3</sup> 孙诗恒<sup>2</sup> 王皓阳<sup>2</sup> 曾宪思<sup>2</sup> 刘志丹<sup>2</sup> 姜文君<sup>1,2</sup> 李丽<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>浙江中医药大学基础医学院,杭州 310000; <sup>2</sup>嘉兴学院医学院,基础医学部,嘉兴 314000; <sup>3</sup>石河子大学医学院生理教研室,石河子 832002)

摘要 该研究通过检测不同月龄C57BL/6J小鼠血管纹上S1PR1的表达情况,进一步探究老年 耳蜗血管纹内皮细胞上S1PR1变化对血迷路屏障通透性的影响。用听性脑干反应(auditory brain response, ABR)检测听觉功能;伊文思蓝染色检测耳蜗血迷路屏障的通透性;免疫荧光检测耳蜗血管 纹上S1PR1和紧密连接蛋白表达水平;ELISA检测S1P的释放量;Transwell小室检测内皮细胞通透 性;Western blot检测EC上S1PR1和紧密连接蛋白的表达水平。结果显示,12m组小鼠听力阈值明显 增高且高频听力损失明显,耳蜗血迷路屏障通透性升高,S1PR1和紧密连接蛋白表达水平均降低。 在细胞水平,D-gal+EC组中S1P的释放量降低,S1PR1表达水平下降,加入外源S1P后,S1PR1表达水 平增加;D-gal+EC组常等中和成量降低,给予S1PR1和通透性增加,加入外源S1P后,紧密连接 蛋白表达水平增加,内皮细胞通透性降低,给予S1PR1抑制剂干预后,紧密连接蛋白表达水平降低, 内皮细胞通透性增加。在衰老状态下,耳蜗血管纹内皮细胞上S1PR1表达下降,这可能会下调紧密 连接蛋白的表达,进而影响血迷路屏障通透性。

关键词 衰老; S1PR1; 紧密连接蛋白; 血迷路屏障; 老年性聋

# Effect of S1PR1 on Blood-Labyrinth Barrier Permeability in Aged C57BL/6J Mice

YU Meng<sup>1,2</sup>, YU Miao<sup>2,3</sup>, SUN Shiheng<sup>2</sup>, WANG Haoyang<sup>2</sup>, ZENG Xiansi<sup>2</sup>, LIU Zhidan<sup>2</sup>, JIANG Wenjun<sup>1,2</sup>, LI Li<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China;
<sup>2</sup>College of Basic Medicine, Jiaxing University College of Medicine, Jiaxing 314000, China;
<sup>3</sup>Department of Physiology, Shihezi University College Xinjiang, Shihezi 832002, China)

**Abstract** In this study, the paper examined the expression of S1PR1 in stria vascularis of C57BL/6J mice at different ages to explore the effect of S1PR1 on the permeability of blood-labyrinth barrier in endothelial cells of stria vascularis of the aged cochlea. ABR (auditory brain response) was used to measure auditory function. Evans blue staining for the permeability of the cochlear blood-labyrinth barrier. The expression of S1PR1 and connexin in stria vascularis of cochlea was detected by immunofluorescence. The release of S1P was detect-

\*通讯作者。Tel: 0573-83640036, E-mail: lily7588@163.com

收稿日期: 2023-03-30 接受日期: 2023-06-19

国家自然科学基金(批准号: 81960188)和浙江省政府自然科学基金(批准号: LY21H130001)资助的课题

Received: March 30, 2023 Accepted: June 19, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81960188), and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LY21H130001)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-573-83640036, E-mail: lily7588@163.com

ed by ELISA. The permeability of endothelial cells was measured by Transwell chamber. The expression levels of S1PR1 and tight junction protein in EC were detected by Western blot. The results showed that the hearing threshold and high frequency hearing loss were significantly increased in the 12m group, the permeability of cochlear blood-labyrinth barrier was increased, and the expression levels of S1PR1 and tight junction protein were decreased. At the cellular level, the release of S1P and the expression of S1PR1 were decreased in the D-gal+EC group, and S1PR1 expression was increased after the addition of exogenous S1P, while the expression of tight junction protein were significantly was increased and endothelial permeability was decreased. When S1PR1 inhibitor was given, tight junction protein expression was decreased and endothelial permeability was decreased. The decrease of S1PR1 expression in vascular stria endothelial cells of the cochlea during senes-cence may down-regulate the expression of tight junction protein, and then affect the permeability of blood labyrinth barrier.

Keywords senescence; S1PR1; tight junction protein; blood-labyrinth barrier; presbycusis

老年性聋是一种年龄相关的进行性疾病,其 主要表现为双侧对称性、进行性高频听力下降和 耳鸣等,该病的人群发病率可达60%<sup>[1-2]</sup>。血管纹 型老年性聋是其中的一种类型,主要表现为血管 纹萎缩,血迷路屏障通透性增加[3-4]。血迷路屏障 (blood-labyrinth barrier, BLB)是位于耳蜗血管纹 内的一团特殊的毛细血管网,主要是由内皮细胞 (endothelial cells, ECs)、周细胞和巨噬细胞样-黑 素细胞组成<sup>[5-6]</sup>。S1PR1是一种G蛋白偶联受体,主 要在内皮细胞中表达,并被鞘氨醇-1-磷酸(sphingosin-1-phosphate, S1P)激活后可保护血管屏障<sup>[7-11]</sup>。 DING等<sup>[12]</sup>在肺内皮细胞中发现鞘氨醇-1-磷酸1型 受体(sphingosine-1-phosphate receptor 1, S1PR1)的 表达量会随着年龄的增加逐渐减少。但是,衰老对 耳蜗血管纹内皮细胞上S1PR1表达的影响及S1PR1 表达变化对耳蜗血迷路屏障通透性的影响目前尚 不清楚。因此,本研究探讨衰老对小鼠耳蜗血管纹 内皮细胞上S1PR1的影响以及衰老情况下S1PR1的 改变对血迷路屏障通透性的影响,从而为老年性聋 的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验动物

雌性C57BL/6J小鼠购于新疆医科大学实验动物中心,在适宜的环境中饲养一周,使其适应。动物饲养及实验过程严格遵守《石河子大学医学院伦理委员会条例》,批号为A2019-077-01。本研究按照衰老过程中听力的变化情况进行分组:3月龄(3m组,

听力正常)、9月龄(9m组,出现明显的听力下降)和 12月龄(12m组,听力几乎接近全聋),每组15只。细 胞分组:EC组、D-gal+EC组、D-gal+EC+S1P组和 D-gal+EC+W146组。

## 1.2 试剂

S1P购自英国Tocris Bioscience公司。D-半乳糖购 自美国Sigma-Aldrich公司。W146、Anti-vWF、Anti-CD31、Anti-Desmin、Anti-VE-cadherin、Anti-ZO-1、 山羊抗兔IgG/FITC二抗和山羊抗小鼠IgG/FITC二抗 均购自Abcam公司。ECM培养基购自美国ScienCell 公司。CCK-8购自美国ApexBio科技公司。β-半乳 糖苷酶原位染色试剂盒购自上海碧云天生物技术 公司。ELISA试剂盒购自美国Echelon Biosciences 公司。Transwell板和96孔板购自美国Corning公司。 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)、10% EDTA 和Triton-X 100购自北京索莱宝科技有限公司。 FITC-BSA、DAPI染液、小鼠抗GAPDH、小鼠抗 β-actin、山羊抗兔IgG二抗和山羊抗小鼠IgG二抗均 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.3 仪器

ABR听力设备(TDT RZ6)购自美国SmartEP公司。伯乐垂直电泳仪(522BR)购自美国Bio-Rad公司。激光共聚焦显微镜(FV3000)和荧光倒置显微镜(BX53)购自日本Olympus公司。ECL化学发光仪(5200Multi)购自上海天能科技有限公司。

#### 1.4 ABR检测

小鼠称重后,腹腔注射10%戊巴比妥钠(40 mg/kg), 麻醉后,置于隔声室的加热垫上,保持小鼠体温恒 定。电极位置:参考电极位于乳突;记录电极位于颅 顶正中;地极位于对侧耳乳突。电极针头插入皮下且 未插入肌肉,当电极间阻抗小于3kΩ时才能进行测试, 调整给声耳塞使其插入外耳道,且声音不被外耳道壁 阻挡。短声(click)ABR的刺激速率为21.1次/s,扫描时间 为10 ms,叠加1024次。短纯音(tone burst, TB)听性脑干 反应(auditory brain response, ABR)的刺激速率为11.1次/s, 扫描时间为10 ms,叠加520次。90 dB SPL开始给声,以 10 dB SPL递减,直至未有波形引出,上升5 dB SPL进行 测试,若有波形引出,则降低10 dB SPL,若无波形引 出,则上升5 dB SPL。观察小鼠ABR波形中I波是否 有引出,以分辨可重复的ABR I波的最低刺激强度, 重复该强度3次,3次中2次有I波波形引出,判定该强 度为听力阈值。Click ABR测试完成后,立即进行TB ABR测试,阈值判断方法相同。

#### 1.5 伊文思蓝检测耳蜗血管纹微血管

消毒小鼠尾巴并使其尾静脉扩张后,从尾静脉 的远端开始,30°的倾斜角度进针,缓慢注射0.5%伊 文思蓝20 kg/mL,观察到小鼠耳廓变蓝后,用无菌棉 球止血,待循环8 h后,麻醉小鼠取出耳蜗血管纹,将 血管纹放入含有4% PFA的EP管中固定,4°C过夜。 次日,用PBS清洗血管纹,将血管纹铺在载玻片上, 甘油封片,盖上盖玻片,4°C避光保存,用激发光波 长为568 nm的激光扫描成像。

## 1.6 制备耳蜗石蜡切片

麻醉小鼠,取出耳蜗放入生理盐水中清洗,再 放入4°C、4% PFA中固定过夜。次日,取出耳蜗,用 PBS洗3次,放入含有4°C、5 mL 10% EDTA的EP管 中,摇晃EP管,发现耳蜗可以悬浮飘起,表明脱钙成 功。脱钙后,无水酒精脱水,浸蜡后,将耳蜗于平行 蜗轴方向浸蜡包埋,平行蜗轴方向连续切片(3 μm), 65°C烤片,4 h。

## **1.7** C57BL/6J小鼠耳蜗血管纹EC的原代培养及 鉴定<sup>[13]</sup>

将11~14天的C57BL/6J小鼠用75%酒精消毒, 取出耳蜗,浸入4°C无菌D-Hank's液中。显微镜下 分离出血管纹,再将其放入含有培养基的培养皿中, 并置于37°C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。耳蜗 血管纹EC鉴定<sup>[13]</sup>: EC用血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF)、血小板-内皮细胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 和结蛋白(desmin)进行免疫荧光染色鉴定。用4% PFA室温固定细胞10 min, PBS洗净后, 用0.3% Triton-X 100破膜30 min, PBS洗净后, 15% BSA室温封闭2 h, PBS洗净后, 加入对应的一抗(1:100), 4 ℃孵育过夜。 次日, 复温后PBS洗3次, 避光加入对应的二抗(1:200), 避光4 ℃温箱中孵育4 h。DAPI(1:1 000) 4 ℃染细胞 核10 min, 甘油封片后, 在激光共聚焦显微镜下观察 并拍照。

## 1.8 原代EC衰老模型的建立和鉴定

确定15 mg/mL的D-gal干预细胞72 h<sup>[14]</sup>; 衰老 相关-β-半乳糖苷酶染色检测耳蜗血管纹EC衰老 程度; Western blot检测P53、P21和P16的表达水 平。

## 1.9 ELISA检测S1P的释放水平

收集细胞上清,使用3 kDa过滤器将细胞培养基浓缩2.5倍,并应用于ELISA板。按照制造商的说明书检测细胞培养液中S1P的释放水平。

#### 1.10 Transwell小室检测EC通透性<sup>[14]</sup>

将EC按密度1×10<sup>5</sup>个/孔,置于Transwell小室的 上室细胞培养箱37 °C培养24 h后,再将FITC-dextran 工作液加入上室中,每隔15 min吸出下室100 μL溶 液于96孔板内,吸出后再加入100 μL FITC-dextran工 作液补齐,持续2 h,计算不同时间FITC-dextran渗透 差异。用激发光495 mm、发射波519 mm酶标仪检测, 根据标准公式,计算渗透浓度,最后对所有的渗透进 行分析,计算出每分钟FITC-dextran渗透的差异。

## **1.11 Western blot**检测S1PR1和紧密连接蛋白表 达水平

将蛋白样品加入 8% SDS-PAGE的胶后,恒压 120 V电泳2 h,进行转膜,10%脱脂牛奶室温封闭2 h后, 分别孵育兔抗S1PR1(1:1 000)、兔抗ZO-1(1:1 000),兔 抗VE-cadherin(1:1 000)抗体和小鼠抗β-actin(1:1 000) 的内参。4°C过夜,复温10 min,用TBST洗膜3次,室 温下孵育相应二抗(1:1 000) 1 h,用TBST洗膜8次,每 次7 min, ECL化学发光仪曝光拍照。

## 1.12 免疫荧光检测 S1PR1和紧密连接蛋白表达 情况

将含有血管纹的石蜡切片进行脱蜡、水化和 抗原修复后,用0.3% Triton-X 100破膜3次,每次 5 min, PBS洗净后,15% BSA室温封闭2 h,加入一 抗(1:100),放入湿盒,4°C孵育过夜。次日,复温后, 用PBS洗涤,避光加入对应的二抗(1:200),避光放入 4°C冰箱中孵育4 h。PBS洗涤3次,DAPI(1:1 000) 进行阈值分割。S1PR1表达水平量化为S1PR1面积 与内皮细胞标记面积的比率。

## 1.13 统计学方法

本研究采用 SPSS 20.0软件分析数据, Graph-Pad Prism 8.0和ImageJ处理图像, *t*检验用于两组间 比较,多组数据比较时采用单因素方差分析(ANO-VA)的Dunnet-*t*检验分析, *P*<0.05认为差异有统计 学意义。

## 2 结果

## 2.1 ABR检测小鼠听力阈值

如图1A所示,与3m组相比,9m组和12m组的听力阈值明显增高;与9m组相比,12m组听力阈值明显增高,差异有统计学意义(P<0.01)。如图1B所示,与3m组相比,9m组和12m组的8 kHz、16 kHz、24 kHz和32 kHz的听力阈值明显增高;与9m组相比,12m组的8 kHz、16 kHz、24 kHz和32 kHz的听力阈值明显增高,差异有统计学意义(P<0.01)。

## 2.2 伊文思蓝检测小鼠耳蜗血管纹通透性

用波长 568 nm激发光扫描血管纹铺片,如图2 所示,在3m组中,耳蜗血管纹毛细血管轮廓清晰,几 乎未观察到伊文思蓝渗漏;而在9m中,可见红色荧 光渗漏于毛细血管外的组织间隙中,伊文思蓝渗漏 增加;12m组红色荧光渗漏更加明显,差异具有统计 学意义(P<0.01)。

#### ·研究论文 ·

## 2.3 免疫荧光检测小鼠耳蜗血管纹上S1PR1的表达

用内皮细胞特异性标记物CD31(红色)与 S1PR1(绿色)共标,如图3所示,S1PR1主要分布于耳 蜗血管纹内皮细胞上;与3m组相比,9m组小鼠耳蜗 血管纹EC上S1PR1的表达量降低;与9m组相比,12m 组小鼠耳蜗血管纹EC上S1PR1的表达量降低,该差 异有统计学意义(P<0.01)。

## 2.4 免疫荧光检测小鼠耳蜗血管纹内皮细胞间 VE-cadherin和ZO-1的表达情况

用内皮细胞特异性标记物CD31(红色)与 VE-cadherin(绿色)或ZO-1(绿色)共标,如图4所示, 与3m组相比,9m组和12m组小鼠耳蜗血管纹内皮 细胞间VE-cadherin和ZO-1的表达量均降低,与9m 组相比,12m组小鼠耳蜗血管纹内皮细胞间VE-cadherin和ZO-1的表达量均降低,差异有统计学意义 (P<0.05)。

## 2.5 C57BL/6J小鼠耳蜗血管纹内皮细胞的原代 培养及鉴定

如图5所示,原代EC呈铺路石样,用内皮细胞特 异性标记物血管性血友病因子(vWF)与血小板-内皮 细胞黏附分子(CD31)和周细胞特异性标记物结蛋白 (Desmin)进行鉴定。结果显示,vWF(深蓝色)和(CD31) (红色)表达呈阳性,Desmin(绿色)表达呈阴性。

### 2.6 细胞衰老模型的建立和鉴定

使用衰老相关-β-半乳糖苷酶对EC进行染色。 如图6A和图6B所示,与对照组相比,15 mg/mL的D-半乳糖(D-galactose, D-gal)干预细胞衰老的阳性率 达80%,差异有统计学意义(P<0.01)。Western blot检



A: click ABR listening threshold; B: Tone Burst ABR hearing threshold. All the mean values were  $\bar{x}\pm s$ , n=3, \*\*P<0.01.

图1 各组小鼠听力阈值

Fig.1 Hearing threshold of mice in each group

测内皮细胞上衰老蛋白P53和P21的表达水平。如图 6C和图6E所示,15 mg/mL浓度D-gal干预后,与对照 组相比,ECs上的P53、P21和P16的蛋白表达水平明 显增加,差异有统计学意义。

## 2.7 ELISA、免疫荧光和Western blot分别检测 内皮细胞S1P和S1PR1表达水平

ELISA检测EC释放S1P的量,如图7A所示,EC 衰老后的S1P的释放水平明显下降,差异具有统计



A:耳蜗血管纹伊文思蓝红色荧光图像,箭头表示血管内荧光强度降低; B:各组微血管外间隙渗漏平均荧光密度差异统计图。所有均值显示均为*x*±*s*, *n*=3, \*\**P*<0.01。

A: blue and red fluorescence image of Evans in the vascular veins of cochlea. Arrows indicate that the fluorescence intensity in the vessels is reduced; B: statistical chart of mean fluorescence density difference of extravascular space leakage in each group. All the mean values were  $\bar{x}\pm s$ , n=3, \*\*P<0.01.



## 图2 小鼠耳蜗血管纹通透性 Fig.2 Vascular permeability of mouse cochlea

A: 激光共聚焦显微镜显示耳蜗血管纹内皮细胞上S1PR1荧光图像; B: 各组血管纹S1PR1半定量统计图。所有均值显示均为x±s, n=3, \*\*P<0.01。</li>
A: laser confocal microscopy showed S1PR1 fluorescence images on endothelial cells in the cochlea vascularis; B: statistical chart of mean fluorescence density difference of S1PR1 in vascular veins among all groups. All the mean values were x±s, n=3, \*\*P<0.01.</li>
图3 各组小鼠耳蜗血管纹上S1PR1的表达

Fig.3 The expression of S1PR1 in the cochlear veins of mice in each group



A: 激光共聚焦显微镜显示耳蜗血管纹内皮细胞间VE-cadherin荧光图像; B: 各组血管纹VE-cadherin半定量统计图; C: 激光共聚焦显微镜显示耳 蜗血管纹内皮细胞间ZO-1荧光图像; D: 各组血管纹ZO-1半定量统计图。所有均值显示均为家±s, n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01。 A: VE-cadherin fluorescence images of endothelial cells in cochlear vascular veins by laser confocal microscopy; B: statistical diagram of the difference of the mean fluorescence density of VE-cadherin in the vascular veins among all groups; C: fluorescence images of ZO-1 between endothelial cells in cochlear vascular striae by laser confocal microscope; D: statistical chart of ZO-1 mean fluorescence density difference in vascular veins among all groups. All mean values are x±s, n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

图4 各组小鼠耳蜗血管纹内皮细胞间紧密连接蛋白的表达水平 Fig.4 Expression level of tight junction protein in endothelial cells of cochlea in each group

学意义(P<0.01)。免疫荧光和Western blot检测EC上 S1PR1的表达水平,如图7B和图7E所示,与EC组相 比,衰老后S1PR1的表达水平明显下降;在衰老的EC 中加入S1P后,发现S1PR1的表达水平明显增加,差 异具有统计学意义(P<0.01)。

#### 2.8 Transwell检测内皮细胞通透性

FITC-BSA作为检测体外内皮细胞通透性的指标,

取100 μL下层外侧室中的液体,上机检测荧光强度。 如图8B所示,通过检测小室下层液体荧光强度发现, D-gal致衰老的EC荧光强度明显增加;加入S1P后,发现 荧光强度降低;而给予W146(S1PR1拮抗剂)干预后,发 现荧光强度明显增加,差异具有统计学意义(P<0.01)。

2.9 Western blot检测EC间紧密连接蛋白的表达 如图9所示,与EC组相比,D-gal+EC组VE-



A: EC图像; B: 免疫荧光鉴定vWF(深蓝色)和细胞核(蓝色); C: 免疫荧光鉴定CD31(红色)和细胞核(蓝色); D: 免疫荧光鉴定Desmin(绿色)和细胞核(蓝色)。

A: EC image; B: immunofluorescence identification of vWF (dark blue) and nucleus (blue); C: immunofluorescence identification of CD31 (red) and nucleus (blue); D: immunofluorescence identification of Desmin (green) and nucleus (blue).

图5 小鼠耳蜗血管纹内皮细胞培养和鉴定

#### Fig.5 Culture and identification of mouse cochlear vascular endothelial cells



A:内皮细胞衰老相关-β-半乳糖苷酶染色; B:内皮细胞衰老相关-β-半乳糖苷酶染色阳性细胞计数; C:内皮细胞P53、P21和P16的蛋白条带; D:内皮细胞P53蛋白相对表达量分析; E:内皮细胞P21蛋白相对表达量分析; F:内皮细胞P16蛋白相对表达量分析。所有均值显示均为<del>x±s</del>, n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01。

A: endothelial cell aging related- $\beta$ -galactosidase staining; B: endothelial cell aging related- $\beta$ -galactosidase staining positive cell count; C: protein bands of endothelial cells P53, P21 and P16; D: analysis of relative expression of P53 protein in endothelial cells; E: relative expression of P21 protein in endothelial cells; F: analysis of relative expression of P16 protein in endothelial cells. All the mean values were  $\bar{x}\pm s$ , n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

图6 D-gal诱导内皮细胞衰老 Fig.6 D-gal induced endothelial cell senescence

cadherin和ZO-1蛋白的表达水平明显降低,差异具有统计学意义(P<0.05);加入S1P后,发现VE-cadherin和ZO-1蛋白的表达水平均明显增加;给予W146干预后,发现VE-cadherin和ZO-1蛋白的表达水平明显降低,差异具有统计学意义(P<0.01)。

## 3 讨论

随着全球老龄化的快速进程,老年性聋的发生率 逐年增加<sup>[15]</sup>。ABR是客观判定听力阈值的金标准<sup>[16-17]</sup>, 并且Tone Burst声具有频率特异性<sup>[18]</sup>,可以反映老年 性聋高频听力损失的特点。ABR测试发现,随着年 龄的增加,小鼠听力阈值和高频听力阈值都明显升 高,符合老年性聋高频听力损失的特点。BLB是位 于耳蜗血管纹上的微血管屏障,能控制血循环中的 物质转运,从而保证内耳微环境的稳定<sup>[1,15]</sup>。本课题 组前期研究成果表明,随着年龄的增加,小鼠耳蜗血 管纹结构发生退化,微血管管腔变形,紧密连接疏 松、断裂以及基底膜增厚<sup>[14]</sup>。WU等<sup>[19]</sup>研究发现,存





A: analysis of S1P release level; B: fluorescent images of S1PR1 on endothelial cells in the cochlea vascularis; C: S1PR1 average fluorescence density difference statistical diagram; D: protein band of S1PR1; E: relative expression of S1PR1 protein in endothelial cells. All the mean values were  $\bar{x}\pm s$ , n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01.



在听力损失时, 伊文思蓝渗漏增加, 耳蜗血迷路屏障 通透性明显增加。本实验采用伊文思蓝染色也发现, 伊文思蓝渗的渗漏量随着年龄的增加而增多。根据 上述结果, 说明随着年龄的增加, 血迷路屏障通透性 增加与高频听力损失存在正相关。

S1PR1是一种细胞表面的S1P受体,参与血管稳 定和屏障通透性的调控<sup>[9,11,19]</sup>。在衰老的肺血管内 皮细胞中发现,S1PR1的表达量随着年龄的增加而 逐渐减少<sup>[12]</sup>。我们采用免疫荧光双标技术,发现耳 蜗血管纹S1PR1主要分布于内皮细胞上,并且S1PR1 的表达水平随着年龄的增加逐渐减少。D-gal致衰 老模拟动物和细胞自然老化模型,被广泛用于老化 的研究中<sup>[21-22]</sup>。本研究进一步在细胞水平,通过D-gal 诱导原代耳蜗血管纹内皮细胞衰老,发现S1PR1的 表达水平明显减少。S1P是由鞘氨醇激酶磷酸化鞘 氨醇产生的一种生物活性脂质,是S1PR1的天然配 体<sup>[20]</sup>。ANWAR等<sup>[23]</sup>发现,S1PR1调控屏障通透性 这一过程,是需要被S1P激活才能实现。CHEN等<sup>[24]</sup> 在小鼠肺中发现,S1P的水平升高,S1PR1表达水平 增加。本研究通过ELISA检测发现,D-gal致衰老的 EC释放S1P的水平下降,而给予外源的S1P后,发现 S1PR1的表达水平增加。上述结果提示,衰老耳蜗 血管纹内皮细胞上S1PR1的表达水平下降,该下降 可能与S1P水平变化有关。



A:内皮细胞Transwell模式图; B:各组内皮细胞间荧光强度差异统计图。所有值均显示为x±s, n=3, \*\*P<0.01。

A: Transwell pattern of endothelial cells; B: statistical diagram of fluorescence intensity difference between endothelial cells in each group. All values were shown as  $\bar{x}\pm s$ , n=3, \*\*P<0.01.

图8 各组内皮细胞通透性的改变





A: VE-cadherin和ZO-1的蛋白条带; B: 内皮细胞间VE-cadherin蛋白相对表达量分析; C: 内皮细胞间ZO-1蛋白相对表达量分析。所有均值显示 均为 <u>x±s</u>, *n*=3, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01。

A: protein bands of VE-cadherin and ZO-1; B: analysis of the relative expression level of VE-cadherin protein between endothelial cells; C: analysis of the relative expression of ZO-1 protein between endothelial cells. All mean values are  $\bar{x}\pm s$ , n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01.



血管屏障通透性与紧密连接蛋白相关<sup>[25-26]</sup>。血 管内皮钙黏蛋白(vascularendothelial cell cadherin, VE-cadherin)与闭锁小带(zonula occludens-1, ZO-1) 是内皮细胞上最重要的两个连接蛋白<sup>[25-26]</sup>。由VEcadherin及其连环蛋白形成的黏附连接在内皮屏障 的形成中起着主要作用<sup>[25]</sup>。HAWKINS等<sup>[27]</sup>在血脑

屏障中发现,ZO-1与血管内皮细胞的通透性高度相关。研究表明,在血脑屏障中,S1P激活的S1PR1可以通过调节连接蛋白的表达,参与血管稳定和屏障 通透性的调控<sup>[9,11,19]</sup>。因此,本研究进一步探究了衰 老条件下S1PR1表达的变化是否通过影响紧密连 接蛋白,从而调控血迷路屏障通透性。本研究发现, D-gal致衰老的EC间VE-cadherin和ZO-1的表达水 平降低,血迷路屏障通透性升高;S1P干预后,D-gal 致衰老的EC间VE-cadherin和ZO-1的表达水平增加, 血迷路屏障通透性降低;而给予S1PR1的抑制剂后, D-gal致衰老的EC间VE-cadherin和ZO-1的表达水平 明显降低,血迷路屏障通透性升高更加明显。以上 实验结果提示,S1PR1表达的变化可以调控耳蜗血 管纹EC间紧密连接蛋白的表达,参与血迷路屏障通 透性的调控。

总之,本研究发现S1PR1主要分布于耳蜗血管 纹内皮细胞上;在衰老状态下,耳蜗血管纹内皮细胞 上S1PR1表达下降,可能通过降低紧密连接蛋白的 表达,进而影响血迷路屏障通透性。然而,在血迷路 屏障中还存在周细胞,周细胞也可以释放S1P<sup>[28]</sup>,那 么周细胞是否参与了S1PR1调控紧密连接蛋白的表 达,从而调控血迷路屏障,这一问题有待于我们进一 步探究。

#### 参考文献 (References)

- WATSON N, DING B, ZHU X, et al. Chronic inflammation inflammaging in the ageing cochlea: a novel target for future presbycusis therapy [J]. Ageing Res Rev, 2017, 40: 142-8.
- [2] WANG J, PUEL J L. Presbycusis: an update on cochlear mechanisms and therapies [J]. J Clin Med, 2020, 9(1): 218.
- [3] NYBERG S, ABBOTTB N J, SHI X, et al. Delivery of therapeutics to the inner ear: the challenge of the blood-labyrinth barrier [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(482): eaao0935.
- [4] 张桐,韩维举.耳蜗血管纹血-迷路屏障病理生理学研究进展 [J]. 中华耳科学杂志(ZHANG T, HAN W J. Advances in pathophysiological studies of cochlear blood-labyrinth barrier [J]. Chinese Journal of Otology), 2017, 2: 257-62.
- [5] EYRE J J, WILLIAMS R L, LEVIS H J. A human retinal microvascular endothelial-pericyte co-culture model to study diabetic retinopathy *in vitro* [J]. Exp Eye Res, 2020, 201: 108293.
- [6] HEYMANSEYMANS M, FIGUEIREDO R, DEHOUCK L, et al. Contribution of brain pericytes in blood-brain barrier formation and maintenance: a transcriptomic study of cocultured human endothelial cells derived from hematopoietic stem cells [J]. Fluids Barriers CNS, 2020, 17(1): 48.
- [7] YANG T, WANG X, ZHOU Y, et al. Sew2871 attenuates anitinduced hepatotoxicity by protecting liver barrier function via sphingosine 1-phosphate receptor-1-mediated ampk signaling pathway [J]. Cell Biol Toxicol, 2021, 37(4): 595-609.
- [8] PAIK J H, SKOURA A, CHAE S S, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of n-cadherin mediates vascular stabilization [J]. Genes Dev, 2004, 18(19): 2392-403.
- [9] PRAGERRAGER B, SPAMPINATO S F, RANSOHOFF R M. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier [J]. Trends Mol Med, 2015, 21(6): 354-63.
- [10] SALMINEN A T, MCCLOSKEY M C, AHMAD S D, et al.

Molecular mechanisms underlying the heterogeneous barrier responses of two primary endothelial cell types to sphingosine-1-phosphate [J]. Eur J Cell Biol, 2022, 101(3): 151233.

- [11] YANAGIDA K, LIU C H, FARACO G, et al. Size-selective opening of the blood-brain barrier by targeting endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(17): 4531-6.
- [12] DING B S, YANG D, SWENDEMANS L, et al. Aging suppresses sphingosine-1-phosphate chaperone apom in circulation resulting in maladaptive organ repair [J]. Dev Cell, 2020, 53(6): 677-90.
- [13] NENG L, ZHANG W, HASSAN A, et al. Isolation and culture of endothelial cells, pericytes and perivascular resident macrophagelike melanocytes from the young mouse ear [J]. Nat Protoc, 2013, 8(4): 709-20.
- [14] 邓双, 董波, 徐少然, 等. C57BL/6J小鼠衰老耳蜗血管纹微血 管周细胞对内皮细胞通透性影响的研究 [J]. 中华耳鼻咽喉头 颈外科杂志 (DENG S, DONG B, XU S R, et al. Effect of microvascular pericytes of cochlear stria vascularis on endothelial cell permeability in C57BL/6J mice [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg), 2021, 56(11): 1185-93.
- [15] 贺祖宏,李明,邹圣宇,等. 老年性聋的发病机制及干预研究 进展[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志(HE Z H, LI M, ZOU S Y, et al. Research progress on pathogenesis and intervention of presbycusis [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg), 2020, 55(11): 1105-10.
- [16] LOBARINAS E, SPANKOVICH C, LEPRELL C G. Evidence of "hidden hearing loss" following noise exposures that produce robust tts and abr wave-i amplitude reductions [J]. Hear Res, 2017, 349: 155-63.
- [17] JIANG Y, SAMUELO W, ZHANG H, et al. Towards effective assessment of normal hearing function from abr using a timevariant sweep-tone stimulus approach [J]. Physiol Meas, 2021, doi: 10.1088/1361-6579/abcdf2.
- [18] EDER K, POLTERAUER D, SEMMELBAUER S, et al. Comparison of abr and assr using narrow-band-chirp-stimuli in children with cochlear malformation and/or cochlear nerve hypoplasia suffering from severe/profound hearing loss [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2022, 279(6): 2845-5.
- [19] WU J, HAN W, CHEN X, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 contribute to functional integrity and noise induced damage to the blood-labyrinth-barrier [J]. Mol Med Rep. 2017;16(2): 1731-8.
- [20] ZHU D, WANG Y, SINGH I, et al. Protein s controls hypoxic/ ischemic blood-brain barrier disruption through the tam receptor tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor [J]. Blood, 2010, 115(23): 4963-72.
- [21] ELFAR A H, LEBDA M A, NORELDIN A E, et al. Quercetin attenuates pancreatic and renal d-galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4348.
- [22] LIANG X, YAN Z, MA W, et al. Peroxiredoxin 4 protects against ovarian ageing by ameliorating d-galactose-induced oxidative damage in mice [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(12): 1053.
- [23] ANWAR M, MEHTA D. Post-translational modifications of s1pr1 and endothelial barrier regulation [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2020, 1865(9): 158760.
- [24] CHEN L, LI L, SONG Y, et al. Blocking sphk1/s1p/s1pr1 signaling pathway alleviates lung injury caused by sepsis in acute etha-

nol intoxication mice [J]. Inflammation, 2021, 44(6): 2170-9.

- [25] GAVARD J. Breaking the ve-cadherin bonds [J]. FEBS Lett, 2009, 583(1): 1-6.
- [26] KITAJIRI S I, FURUSE M, MORITA K, et al. Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear [J]. Hear Res, 2004, 187(1/2): 25-34.
- [27] HAWKINS B T, DAVIS T P. The blood-brain barrier/neurovas-

cular unit in health and disease [J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(2): 173-85.

[28] MCGUIRE P G, RANGASAMY S, MAESTAS J, et al. Pericytederived sphingosine 1-phosphate induces the expression of adhesion proteins and modulates the retinal endothelial cell barrier [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(12): e107-15.