

雌激素通过ERK途径降低MMP-9水平改善 中年小鼠的听觉功能

邓双^{1,2#} 余蒙^{1,3#} 王艳萍¹ 余苗² 胡奕程¹ 司军强² 李丽¹ 贾金婧^{1*}

(¹嘉兴大学医学院, 嘉兴 314001; ²石河子大学医学院, 石河子 832002; ³浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310000)

摘要 雌激素对听觉毛细胞和螺旋神经节细胞具有保护作用。然而, 雌激素对耳蜗血迷路屏障是否具有保护作用尚不清楚。该研究探讨了雌激素对中年小鼠耳蜗血管纹血迷路屏障通透性的影响。采用12月龄雌性C57BL/6J小鼠(中年小鼠)作为老年性耳聋的动物模型, 对其进行卵巢切除术(ovariectomy, OVX), 再于皮下注射17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)。此外, 建立了用衰老诱导剂D-半乳糖(D-galactose, D-gal)处理的血迷路屏障原代周细胞和内皮细胞的体外共培养模型, 用来研究雌激素的保护机制。与3月龄小鼠组(3m组, $n=12$)相比, 中年小鼠组(12m组, $n=12$)的听力阈值和血迷路屏障通透性显著增加, 而在OVX中年小鼠组(12mOVX组, $n=12$)中血迷路屏障通透性进一步增加。与12mOVX组相比, E2治疗组(12mOVX+E2组, $n=12$)听力阈值和血迷路屏障通透性显著降低。免疫组织化学和免疫荧光染色进一步证实, 与12mOVX组相比, E2治疗显著上调了12mOVX+E2组血迷路屏障中紧密连接蛋白(VE-cad和ZO-1)的表达, 并降低了基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达水平。E2治疗显著回复了D-gal诱导的MMP-9、VE-cad和ZO-1的变化, 这些作用可被细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)抑制剂U0126预处理部分抑制。以上结果表明, 雌激素通过ERK途径降低MMP-9水平, 从而改善听觉功能, 这表明雌激素可能是预防和治疗老年性耳聋的潜在候选药物。

关键词 老年性耳聋; 雌激素; 内皮细胞; 周细胞; 紧密连接; MMP-9

Estrogen Ameliorates Auditory Function of Middle-Aging Mice by Decreasing MMP-9 via ERK Pathway

DENG Shuang^{1,2#}, YU Meng^{1,3#}, WANG Yanping¹, YU Miao², HU Yicheng¹, SI Junqiang², LI Li¹, JIA Jinjing^{1*}

(¹Medical College, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; ²Medical College, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

³School of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China)

Abstract Previous studies have focused on the protective effect of estrogen on auditory hair cells and spiral ganglion cells. However, whether estrogen could protect the cochlear BLB (blood-labyrinth barrier) is largely unknown. Here, the effect of estrogen on the permeability of the stria vascular BLB in the middle-aging cochlea was examined. Female 12-month-old C57BL/6J mice (middle-aging) were used as an animal model of presbycusis,

收稿日期: 2024-12-23

接受日期: 2025-04-20

国家自然科学基金(批准号: 81960188)、浙江省自然科学基金(批准号: LY21H130001、LMS25H130002)、嘉兴市“星耀南湖”领军人才计划创新团队(批准号: 2022A100001)和嘉兴大学大学生研究训练计划(批准号: 8517241018)资助的课题

*共同第一作者

*通信作者。Tel: 13569748494, E-mail: jiajinjing1986@126.com

Received: December 23, 2024

Accepted: April 20, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81960188), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LY21H130001, LMS25H130002), the Starlit South Lake Leading Elite Program Innovation Team (Grant No.2022A100001), and the Jiaxing University Student Research and Training Program (Grant No.8517241018)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13569748494, E-mail: jiajinjing1986@126.com

subjected to OVX (ovariectomy) and then subcutaneously injected with E2 (17 β -estradiol). An *in vitro* co-culture model of BLB primary pericytes and endothelial cells treated with D-gal (D-galactose), an aging inducer, was established to study the protective mechanisms of estrogen. Compared to that of 3-month-old mice (3m group, $n=12$), the hearing threshold and the permeability of BLB in middle-aging mice (12m group, $n=12$) were significantly increased, which were further aggravated in middle-aging mice subjected to OVX (12mOVX group, $n=12$) and then reversed by E2 treatment (12mOVX+E2 group, $n=12$). Immunohistochemistry and immunofluorescence staining further demonstrated that E2 treatment markedly up-regulated the expression of tight junction proteins (VE-cad and ZO-1) and decreased the expression of MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) in the BLB of 12mOVX+E2 group compared to that in 12mOVX group. E2 treatment significantly restored the changes of MMP-9, VE-cad and ZO-1 induced by D-gal. These effects were partially inhibited by pretreatment of U0126, an inhibitor of ERK (extracellular signal-regulated kinase). In conclusion, estrogen ameliorates auditory function by decreasing MMP-9 via ERK pathway, suggesting that estrogen may be a promising candidate for the prevention and treatment of presbycusis.

Keywords presbycusis; estrogen; endothelial cells; pericytes; tight junctions; MMP-9

老年性耳聋又称年龄相关性听力损失,是因听觉系统衰老而引发的听觉功能障碍。老年性耳聋是导致老年人慢性残疾的第三大原因,人群发病率可达60%左右^[1-2]。老年性耳聋会影响沟通能力,逐渐导致患者与社会隔离,抑郁和沮丧,最终诱发老年性痴呆症,该疾病可极大地影响人们的生活质量和心理健康^[3]。与年轻人相比,成年人的波V阈值明显更高,所以随着年龄的增长,听力会逐渐下降^[4]。

内耳是最易受老化影响的器官^[5]。内耳毛细胞的变化是导致老年性耳聋的主要原因,如听神经纤维退化^[6]、炎症老化^[7]和线粒体功能障碍^[8]。一些研究表明,内耳结构中的血管纹功能障碍也是老年性耳聋的重要原因^[9-10]。随着年龄增长,内耳的结构发生退化、耳蜗血管纹开始出现萎缩,血流减少,同时伴随着离子稳态的改变,最终引发老年性耳聋^[11]。周细胞和内皮细胞是血迷路屏障的主要组成部分。血迷路屏障是位于血管纹内一种特殊分化的毛细血管网络,对维持内耳稳态和离子转运具有重要作用^[12-13]。周细胞的丢失和凋亡会增加血迷路屏障的通透性,从而提高听力阈值^[14-18]。此外,周细胞可能通过上调紧密连接蛋白的表达来促进血管生成^[19-22]。

雌激素是一类重要的类固醇激素,主要包括雌酮、17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)和雌三醇,在细胞分化和增殖中发挥重要的作用^[23]。有研究显示,雌激素具有减少听力损失的潜力,表明雌激素具有听力保护的功能^[24-27],这也可能是男女听力功能有差异的原因之一。在接受卵巢切除术(ovariectomy, OVX)的小鼠中,听觉脑干反应(auditory brainstem response, ABR)潜

伏期延长,而雌激素干预后,ABR潜伏期缩短^[24]。然而,目前关于雌激素保护听力的研究主要针对感觉毛细胞或神经元^[9,12,28],而雌激素能否通过作用于血管纹血迷路屏障发挥对听觉的保护作用,目前仍不清楚。在人体中,E2是雌激素的主要形式,也是作用最强的一种^[29]。因此,本研究采用E2来研究雌激素对血迷路屏障通透性的影响及其具体机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

实验所用雌性C57BL/6J小鼠(12只新生小鼠和36只9月龄小鼠)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于无特定病原体环境中,分笼饲养,温度为(24 $\pm$ 3) °C,相对湿度为40%~70%,光照/黑暗周期为12 h循环,小鼠可自由进食饮水。新生小鼠饲养3个月用于3月龄组(3m组, $n=12$)。36只9月龄雌性小鼠随机等分为三组:12月龄组(12m组, $n=12$, 进行假手术)、12月龄卵巢切除组(12mOVX组, $n=12$, 9月龄时进行卵巢切除)和12月龄卵巢切除+E2组(12mOVX+E2组, $n=12$, 9月龄时进行卵巢切除),并于10月龄起连续2个月在颈部皮下注射E2(0.10 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, Sigma, 美国;溶于棉籽油)。实验流程见图1A。小鼠于3月龄或12月龄时处死,并进行生理盐水心脏灌注。动物实验经石河子大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号: A2019-077-01)。

1.2 卵巢切除手术

在12mOVX组和12mOVX+E2组中,9月龄雌性小鼠通过肌肉注射唑拉西泮(20 mg $\cdot$ kg⁻¹)和赛拉嗪

(20 mg·kg⁻¹)进行麻醉。随后, 通过背部切口摘除小鼠双侧卵巢。手术后, 将小鼠移至加热垫上恢复。12mOVX组小鼠仅进行双侧卵巢切除术, 未进行其他处理。12mOVX+E2组小鼠则在双侧卵巢切除术后接受E2皮下注射。

1.3 ABR检测

将C57BL/6J小鼠以1%戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉, 置于隔声屏蔽室内, 连接针式电极, 测试参考电极, 记录电极插入颅顶正中皮下。测试电阻小于3 kΩ。调整给声喇叭使其贴近外耳道但不接触耳廓。ABR波形记录一系列短声刺激反应, 双耳, 21.1次/s。扫描时间10 s, 叠加次数1 024, 刺激强度由90 dB SPL开始, 以10 dB SPL递减, 观察小鼠ABR检测下I波潜伏期的变化, 以能分辨出可重复的ABR波III的最低刺激强度为阈值。在80 dB SPL下, 波形分化效果更佳。记录并比较不同组在该刺激强度下的I波潜伏期。

1.4 酶联免疫吸附测定(ELISA)

当小鼠3个月和12个月时, 从小鼠的眼眶静脉丛采集血液(0.5 mL)。将血液在4 °C下以3 800 ×g的离心力离心10 min, 分离出血清。使用ELISA试剂盒(CEA461Ge, 灵敏度: 4.93 pg·mL⁻¹, 测定范围: 12.35~1 000.00 pg·mL⁻¹, 武汉云克隆科技股份有限公司)测定小鼠血清中的E2水平, 使用ELISA试剂盒(ab253227, 灵敏度: 38.91 pg·mL⁻¹, 测定范围: 140.63~9 000.00 pg·mL⁻¹, Abcam, 美国)测定培养基中的基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)蛋白水平。使用酶标仪(ThermoFisher Scientific, 美国)在450 nm的激发波长下检测反映E2或MMP-9水平的荧光信号, 并通过560 nm的滤光片获取发射光。

1.5 伊文思蓝染色

C57BL/6J小鼠均使用尾静脉固定器进行固定, 拉直尾巴, 并用酒精棉球反复擦拭以充分扩张其尾静脉。使用微量注射器[0.33×13 mm(29G)U-40, 上海康德莱医疗器械股份有限公司]在静脉远端注射伊文思蓝(Evans blue, EB, 2%, 25 μL, 北京索莱宝科技有限公司)。进针后, 经过血液循环, 小鼠的皮肤和黏膜立即呈现蓝色。待其循环2 h后, 通过腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)将小鼠麻醉, 颈椎脱位法处死小鼠并迅速取出耳蜗组织, 生理盐水灌注直至无血液或其他杂质后, 剥离其他部分, 并分离出血管

纹, 置于4%多聚甲醛中4 °C固定过夜。使用激光共聚焦显微镜(CarlZeiss, 德国)观察并拍摄血管纹组织的图像。使用ImageJ软件, 通过随机选择3个视野来检测血管纹的渗漏情况。

1.6 透射电镜

通过腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)对C57BL/6J小鼠进行麻醉, 并通过颈椎脱位法处死。随后立即分离出耳蜗组织, 用4 °C的PBS快速洗涤, 固定于4 °C戊二醛(pH7.4)中。将组织块的大小控制在1 mm×1 mm×3 mm。样本经1%锇酸4 °C固定2 h后, 用4 °C的PBS洗涤, 然后依次用30%、50%、70%、80%、90%和100%的乙醇脱水, 每个浓度处理10 min, 再用100%丙酮进行浸透处理。获取耳蜗的横截面和基底横截面, 并用柠檬酸铅和醋酸铀进行电子染色。使用透射电镜(JEM-1230, JEOL, 日本)观察切片。在标尺校准后, 测量基底膜的宽度, 即图中基底膜明亮对称的两点之间的距离。

1.7 耳蜗血管纹内皮细胞和周细胞的提取和鉴定

选取3~4只10~15日龄的C57BL/6J小鼠, 处死后, 切取小鼠的颞骨, 并将其置于4 °C的D-Hank's溶液(武汉博士德生物工程有限公司)中。在无菌培养皿中, 用镊子剥离出整个螺旋韧带连同耳蜗血管纹组织, 将组织更换至新的含有4 °C D-Hanks液的培养皿中, 显微镜下仔细分离出血管纹, 将分离后的血管纹移至含800 μL培养基的培养皿内, 并将其剪碎成约0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm的小块, 使其分布均匀, 并在37 °C和5% CO₂的恒温培养箱中培养。26 h后, 加入1 mL细胞培养液。每隔24 h在倒置显微镜下观察细胞贴壁和生长情况。10~14天后, 分别使用内皮细胞培养基(含0.1% ECGS, Sciencell, 美国)和周细胞培养基(含0.1% PEDF, Sigma, 美国)对内皮细胞和周细胞进行纯化。

采用细胞免疫荧光法鉴定内皮细胞(Desmin、vWF和CD31标记)和周细胞(Desmin、vWF和PDGFR标记)。将培养的内皮细胞或周细胞在4%多聚甲醛中4 °C固定过夜, 用PBS(pH7.3)冲洗, 在0.5% Triton X-100(Sigma, 美国)中透化1 min, 并用5% BSA(ThermoFisher Scientific, 美国)封闭1 h。将细胞与稀释在1% BSA中的一抗在4 °C下孵育过夜。用PBS洗涤3次, 每次30 min, 在室温下用二抗孵育样本1 h(表1)。在激光共聚焦显微镜(CarlZeiss, 德国)下观察荧光分布情况。

表1 本研究使用的抗体
Table 1 The antibodies used in this study

抗体名称 Antibody name	厂家 Manufacturer	货号 Catalogue number	稀释比 Dilution ratio	来源 Resource	反应特异性 Reaction specificity
β-actin (WB)	ZSGB-BIO	TA-09	1:1 000	Rabbit	Human, mouse, rat, monkey, dog
Desmin (IF)	Abcam	ab227651	1:100	Rabbit	Mouse, rat, human
vWF (IF)	Abcam	ab11713	1:100	Sheep	Mouse, human, pig
CD31 (IF)	Abcam	ab7388	1:100	Rat	Mouse
PDGFR (IF)	eBioscience	14-1402-82	1:100	Rat	Mouse
ZO-1 (WB)	Abcam	ab96587	1:1 000	Rabbit	Mouse, human
VE-cad (WB)	Abcam	ab205336	1:1 000	Rabbit	Mouse
MMP-9 (WB)	Abcam	ab228402	1:1 000	Rabbit	Mouse, rat
Goat anti-mouse HRP-linked antibody	ZSGB-BIO	ZB-2305	1:20 000	Goat	Mouse
Goat anti-rat HRP-linked antibody	ZSGB-BIO	ZB-2307	1:30 000	Goat	Rat
Donkey anti-sheep HRP-linked antibody	Abcam	ab6900	1:40 000	Donkey	Sheep
Goat anti-rabbit HRP-linked antibody	ZSGB-BIO	ZB-2301	1:20 000	Goat	Rabbit
Goat anti-mouse FITC-linked antibody	ZSGB-BIO	ZF-0312	1:100	Goat	Mouse
Goat anti-rabbit FITC-linked antibody	ZSGB-BIO	ZF-0311	1:100	Goat	Rabbit

IF: 免疫荧光; WB: 蛋白免疫印迹。

IF: immunofluorescence; WB: Western blot.

1.8 Transwell

将小鼠耳蜗血管纹毛细血管内皮细胞按 1.2×10^5 /孔接种于24孔Transwell小室上层, 相同数量的周细胞接种于下层, 在培养箱中培养并待其形成单层细胞后, 正常内皮细胞组按常规培养, 其他组预先用剂D-半乳糖(D-galactose, D-gal)干预72 h, 然后再共培养24 h。小室的上层加入FITC-BSA, 下层加入D-Hank's液, 放入37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养60 min。用荧光酶标仪检测下层液体中的FITC-BSA荧光强度变化, 用以判断内皮细胞的通透性变化。

1.9 免疫组化和免疫荧光

采集耳蜗, 在4 °C下用4%多聚甲醛固定过夜后, 用PBS(37 °C, pH7.3)冲洗以去除残留的多聚甲醛。组织样本的石蜡切片在0.5% Triton X-100(Sigma, 美国)中透化30 min, 随后在10%山羊血清(Sigma, 美国)和1%牛血清白蛋白(ThermoFisher Scientific, 美国)中37 °C封闭1 h。切片用一抗(表1)于4 °C孵育过夜。用PBS冲洗3次, 每次30 min, 样本在室温下与二抗(表1)孵育1 h。切片再次用PBS冲洗3次, 每次30 min, 激光共聚焦显微镜(CarlZeiss, 德国)下观察。使用ImageJ软件测量每个像素的灰度值, 该值代表该点的荧光强度大小。针对特定区域的荧光强度计算公式为: 平均荧光强度(mean)=该区域荧光强度总和(IntDen)/该区域面积(area)。

1.10 蛋白免疫印迹

用Western blot检测衰老内皮细胞中ZO-1和VE-cad的水平。等量的蛋白质通过10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并转移到PVDF膜(Merck Millipore, 美国)上。室温下, 用脱脂奶粉封闭膜1 h。4 °C下一抗(1:1 000)孵育过夜(表1), 进行特异性免疫检测。洗涤3次后, 室温孵育二抗1 h(稀释比参考表1)。使用eECL Western blot试剂盒(ThermoFisher Scientific, 美国)评估蛋白表达水平。

1.11 统计学方法

本实验中的数据分析采用的是SPSS 20软件, 图像处理所用软件为GraphPad Prism 8.0。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较多组间数据的差异。每项实验的数据均重复3次以上, 所有结果均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 雌激素通过降低血迷路屏障通透性来降低听力阈值

与12m小鼠相比, 12mOVX小鼠的血清雌激素水平显著降低($P < 0.001$), E2干预后, 与12mOVX组相比, 雌激素水平升高($P < 0.001$, 图1B)。本研究采用ABR评估雌激素对听力功能的影响。12m组

小鼠的I波潜伏期较3m组延长, ABR听力阈值升高($P<0.001$), 12mOVX组小鼠的I波潜伏期较12m组延长, ABR听力阈值升高($P<0.001$)。E2干预后, 与12mOVX组相比, 12mOVX+E2组I波潜伏期缩短, ABR听力阈值降低($P<0.001$, 图1C~图1E), 这表明雌激素能够改善中年小鼠的听力功能。考虑到年龄相关性听力损失发展过程中会出现血迷路屏障的破坏, 本研究探讨了雌激素对听力功能的保护作用是否与血迷路屏障相关。EB染色结果显示, 与12m小鼠组相比, 12mOVX组小鼠耳蜗血管纹的红色荧光渗漏显著增加($P<0.001$, 图1F和图1G)。同时, 与12mOVX组相比, E2治疗显著减少了12mOVX+E2组小鼠血管纹的红色荧光渗漏($P<0.001$, 图1F和图1G), 这表明雌激素能够降低OVX小鼠血管纹血迷路屏障通透性。

2.2 雌激素通过上调小鼠内皮细胞中紧密连接蛋白的表达来降低血迷路屏障通透性

上述结果表明, 雌激素可通过降低血迷路屏障的通透性来保护听力, 其具体机制尚不清楚。我们进一步使用透射电镜观察雌激素对耳蜗血管纹的影响, 包括内皮细胞和周细胞胞质中空泡的出现、染色质细胞器的丢失、基底膜的增厚以及内皮细胞中紧密连接的断裂和疏松的情况。3m组内皮细胞和周细胞无肿胀, 细胞质细胞核丰富, 周细胞贴附于互相紧密连接的内皮细胞外侧, 内皮细胞间紧密连接(tight junction, TJ)完整; 12m组内皮细胞和周细胞肿胀, 染色质细胞器丢失, 内皮细胞间紧密连接断裂、疏松; 与12m组相比, 12m OVX组内皮细胞和周细胞胞质出现空泡, 染色质细胞器丢失, 内皮细胞间紧密连接断裂、疏松更明显; 而E2干预后, 与12mOVX组相比, 12mOVX+E2组内皮细胞和周细胞染色质和细胞核较致密, 细胞肿胀和紧密连接疏松断裂的情况有所改善(图2A)。与3m组相比, 12m组基底膜的厚度显著增加($P=0.000\ 3$), 12mOVX小鼠基底膜的厚度进一步增加($P=0.008\ 1$); 而E2治疗几乎使12mOVX+E2组小鼠的基底膜厚度恢复到与12m小鼠相当的水平($P=0.018\ 6$)(图2A和图2B)。同时, 我们观察了雌激素对小鼠耳蜗血管纹上紧密连接的影响。通过免疫组织化学方法检测了主要表达于耳蜗血管纹的两种紧密连接蛋白(VE-cad和ZO-1)的表达情况。与3m小鼠相比, 12m小鼠耳蜗血管纹上VE-cad($P=0.003\ 7$)和ZO-1($P=0.000\ 8$)的表达水平显著降低。与12m小

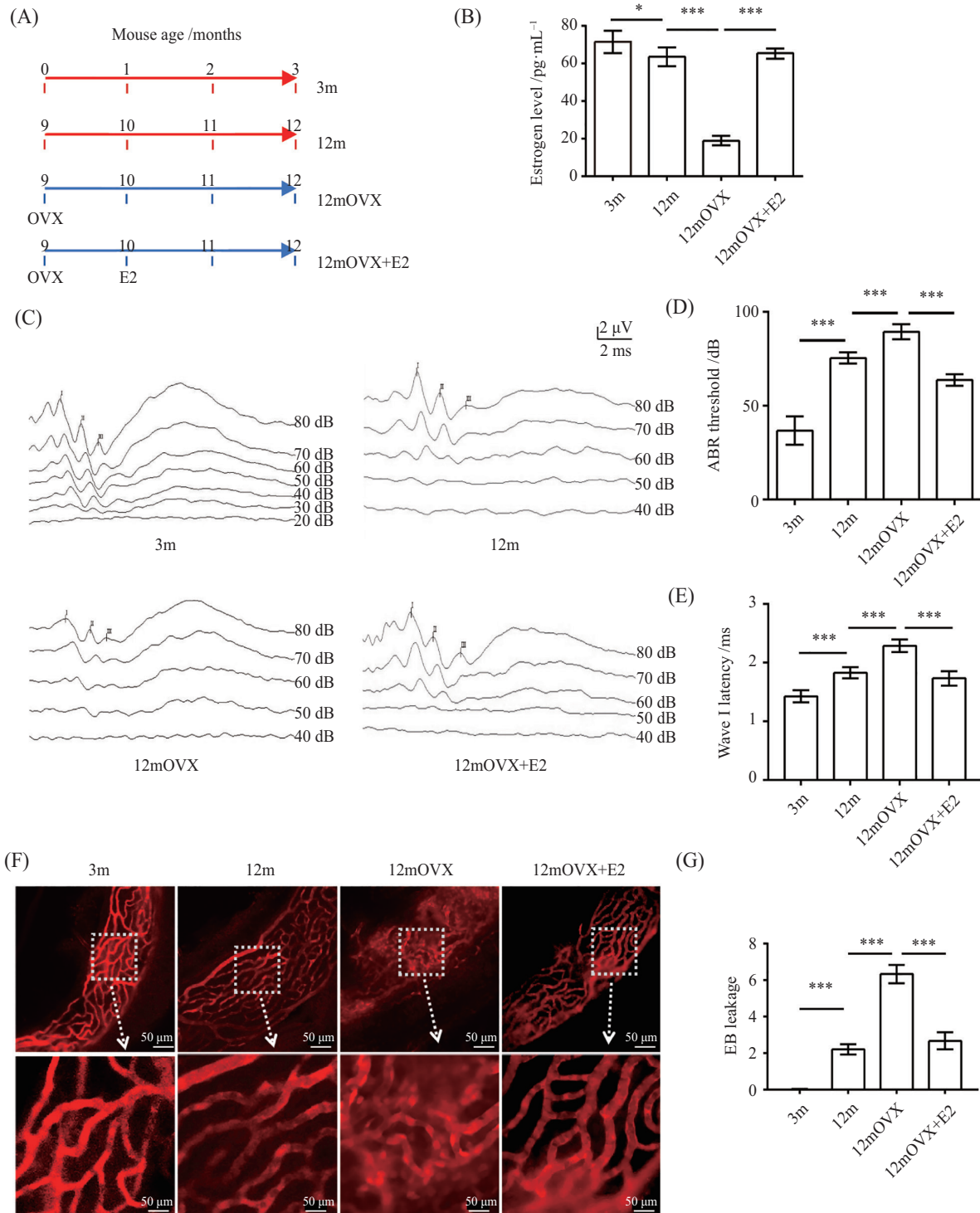
鼠相比, 12mOVX小鼠耳蜗血管纹上这两种蛋白的表达水平进一步降低($P=0.046\ 6$ 、 $P=0.044\ 8$); 而E2干预后, 与12mOVX组相比, 12mOVX+E2组小鼠VE-cad和ZO-1的表达水平升高($P=0.043\ 9$ 、 $P=0.007\ 6$)(图2C~图2E)。免疫荧光染色也获得了相同的结果(图2F~图2I)。这些数据表明, OVX进一步降低了衰老内皮细胞中紧密连接蛋白的表达水平, 而雌激素恢复了血迷路屏障内皮细胞中紧密连接蛋白的表达。

2.3 雌激素降低了体内MMP-9的表达水平

已有研究表明, MMP-9的上调破坏了耳蜗血迷路屏障的完整性^[30]。为了阐明雌激素降低血迷路屏障通透性的机制, 我们采用免疫组织化学和免疫荧光方法检测了内皮细胞中MMP-9的表达情况。免疫组织化学结果显示, 与3m组小鼠相比, 12m组小鼠耳蜗血管纹上MMP-9的表达水平显著增加($P<0.001$), 而在12mOVX小鼠耳蜗血管纹上MMP-9表达水平进一步增加($P<0.001$); E2干预后, 与12mOVX组小鼠相比, 12mOVX+E2血管纹上MMP-9的表达水平降低($P<0.001$)(图3A和图3B)。免疫荧光染色所得结果与免疫组织化学结果一致(图3C和图3D)。vWF是内皮细胞的特异性蛋白标志物, 用于定位内皮细胞(图3C)。这些结果表明, C57BL/6J中年小鼠耳蜗血管纹上MMP-9的表达水平增加, 特别是在卵巢切除的C57BL/6J中年小鼠中, 而雌激素干预降低了血管纹上MMP-9的表达水平。

2.4 雌激素通过细胞外信号调节激酶信号通路降低MMP-9的表达水平

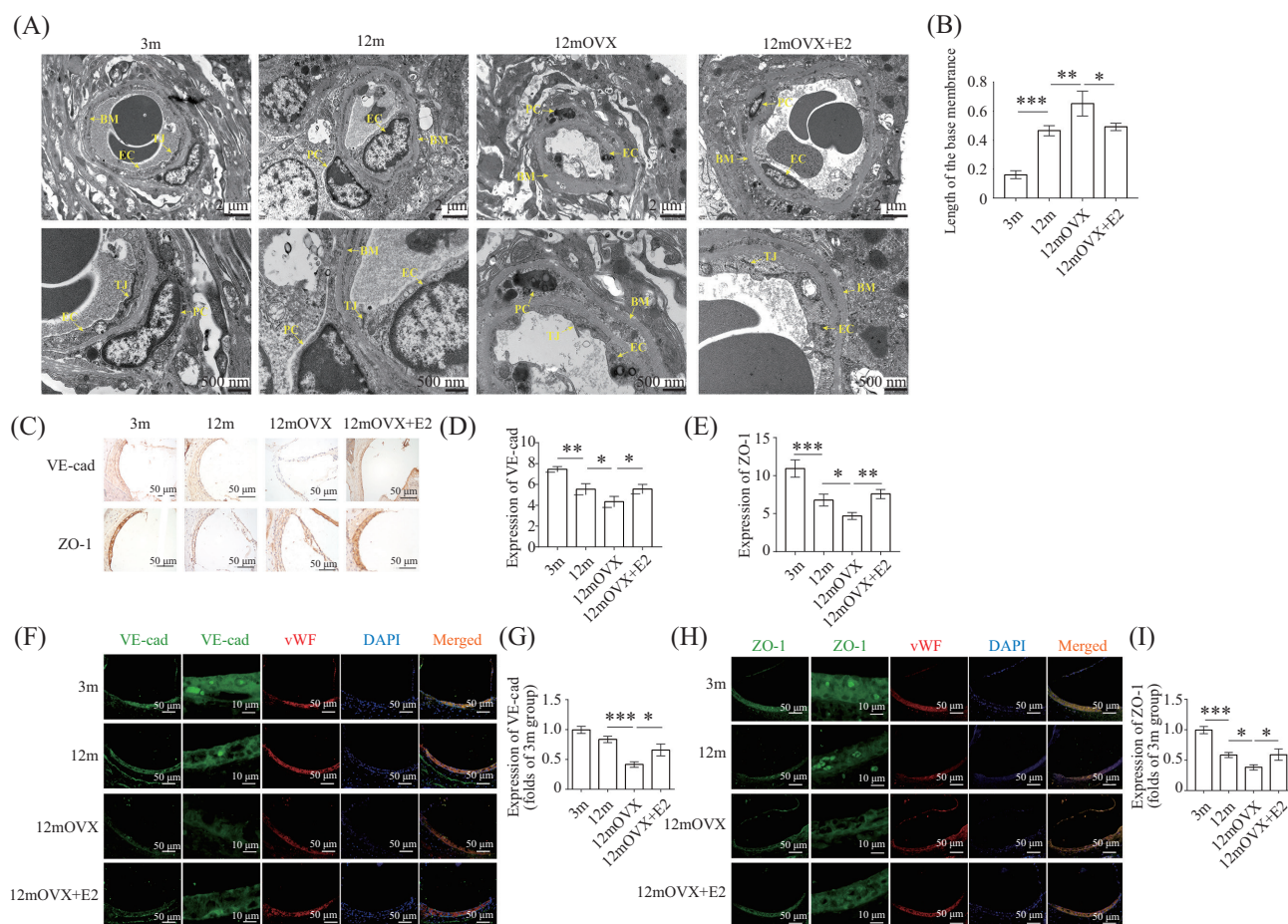
在重症急性胰腺炎中, 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路参与了由MMP-9引起的血脑屏障功能障碍^[31]。为了确定ERK信号通路是否与MMP-9增加血迷路屏障通透性有关, 我们从新生C57BL/6J小鼠(10~15日龄)中分离出了耳蜗血迷路屏障的原代内皮细胞和周细胞。利用细胞免疫荧光法鉴定了内皮细胞(vWF、CD31和Desmin标记)(图4A~图4C)和周细胞(Desmin、PDGFR和vWF标记)(图4D~图4F), 并建立了内皮细胞与周细胞的共培养模型(图4G)。为了探究雌激素在体外上调紧密连接蛋白表达的机制, 我们使用ELISA法测定了上层细胞培养液中MMP-9的水平。D-gal干预后, 与内皮细胞(endothelial cell, EC)组相比, D-gal+EC组MMP-9表达水平增加($P<0.001$); EC和周细胞(pericyte, PC)用D-gal干预后, 再共培养, 与D-



A: 实验安排; B: 各组(3m、12m、12mOVX、12mOVX+E2)血清雌激素水平的ELISA分析; C: 各组(3m、12m、12mOVX、12mOVX+E2) ABR波形的代表性图像; D: ABR阈值的统计学分析; E: I波潜伏期的统计分析; F: 各组小鼠(3m、12m、12mOVX、12mOVX+E2)耳蜗血管纹迷路屏障通透性变化; G: 各组(3m、12m、12mOVX、12mOVX+E2)血管外渗漏的平均荧光强度比较。各组数值均以均值±标准差表示, $n=6$ 。 $*P<0.05$, $***P<0.001$ 。

A: the experiment schedule; B: ELISA analysis of serum levels of estrogen in each group (3m, 12m, 12mOVX, 12mOVX+E2); C: representative images of ABR waveforms in each group (3m, 12m, 12mOVX, 12mOVX+E2); D: statistical analysis of ABR threshold; E: statistical analysis of wave I latency; F: changes in the microvascular permeability of the cochlear stria vascularis in each group (3m, 12m, 12mOVX, 12mOVX+E2); G: comparison of the average fluorescence density of extra-microvascular space leakage in each group (3m, 12m, 12mOVX, 12mOVX+E2). All values are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=6$. $*P<0.05$, $***P<0.001$.

图1 雌激素可以保护听觉功能
Fig.1 Estrogen protected auditory function



A: C57BL/6J小鼠耳蜗血管纹的超微结构, 其中BM代表基底膜, EC代表内皮细胞, PC代表周细胞, TJ代表紧密连接; B: 基底膜厚度的定量分析; C: 耳蜗内皮细胞中VE-cad和ZO-1表达的免疫组织化学染色图像; D: 免疫组织化学中内皮细胞VE-cad表达的定量分析; E: 免疫组织化学中内皮细胞ZO-1表达的定量分析; F: VE-cad免疫荧光染色; G: 免疫荧光中VE-cad表达的定量分析; H: ZO-1免疫荧光染色; I: 免疫荧光中ZO-1表达的定量分析。所有值均表示为均值±标准差, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

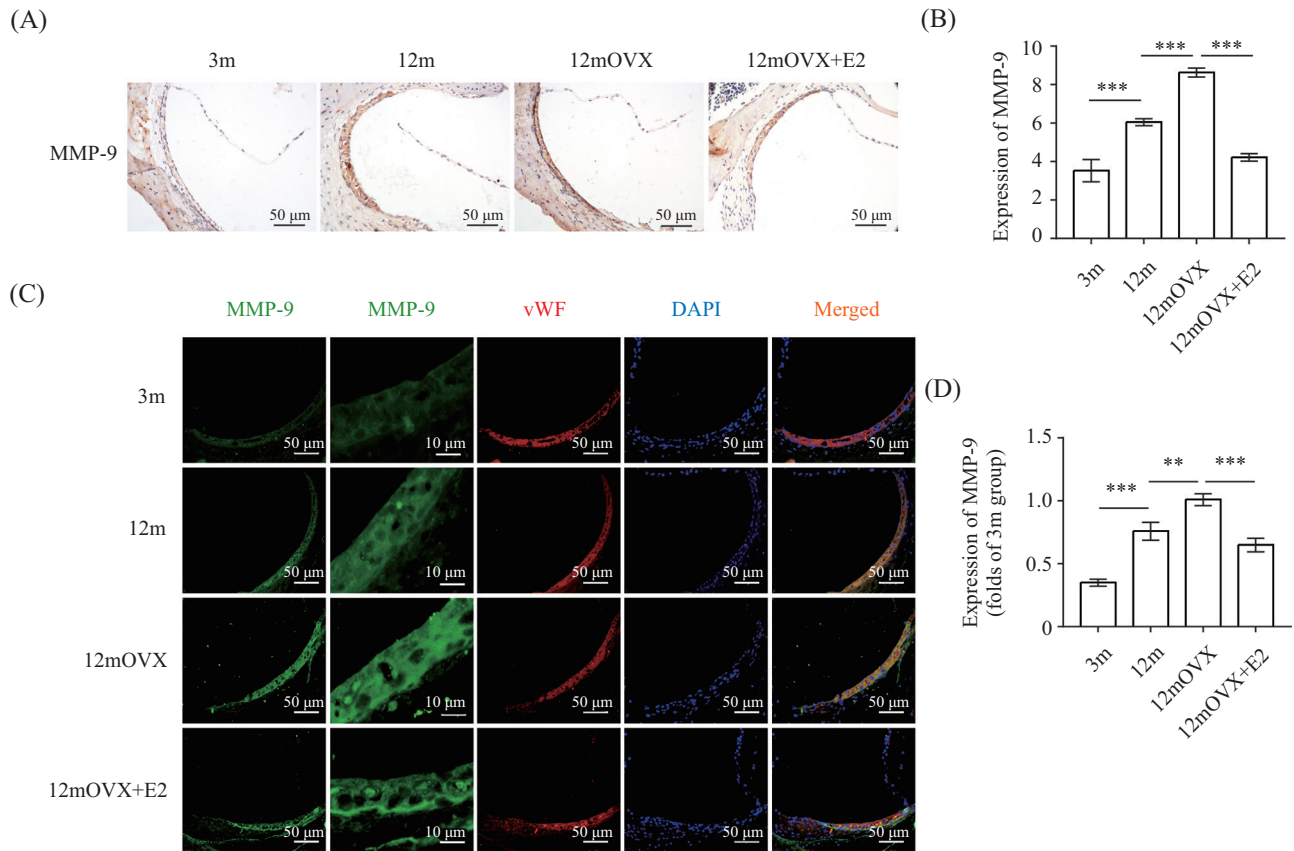
A: ultrastructure of stria vascularis in C57BL/6J mouse cochlea, BM: basement membrane, EC: endothelial cells, PC: pericytes, TJ: tight junctions; B: quantitative analysis of the thickness of BM; C: immunohistochemistry staining image of VE-cad and ZO-1 expression in the ECs of the cochlea; D: quantitative analysis of VE-cad expression in the ECs for immunohistochemistry; E: quantitative analysis of ZO-1 expression in the ECs for immunohistochemistry; F: VE-cad immunofluorescence staining; G: quantitative analysis of VE-cad expression for immunofluorescence; H: ZO-1 immunofluorescence staining; I: quantitative analysis of ZO-1 expression for immunofluorescence. All values are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图2 雌激素上调中年小鼠内皮细胞VE-cad和ZO-1表达水平

Fig.2 Estrogen increased the expression of VE-cad and ZO-1 in the ECs of middle-aged mice

gal+EC组相比, D-gal+EC+PC组MMP-9表达水平降低($P<0.001$); 与D-gal+EC组相比, E2干预后, D-gal+E2+EC组MMP-9表达水平降低($P<0.001$); 与D-gal+EC+PC组相比, D-gal+E2+EC+PC组MMP-9表达水平降低($P<0.001$); ERK通路阻断剂U0126干预后, 与D-gal+E2+EC+PC组相比, D-gal+E2+EC+PC+U0126组MMP-9表达水平增加($P=0.037$ 1)(图4H)。此外, 我们用荧光酶标仪测定了共培养模型下层细胞培养液中FITC-BSA的荧光强度。与EC组相比, D-gal+EC组下层培养液的荧光强度显著增加($P<0.001$); EC

和PC均用D-gal干预后, 再共培养, 其荧光强度较D-gal+EC组降低($P<0.001$); 与D-gal+EC组相比, E2干预后, D-gal+E2+EC组荧光强度降低($P<0.001$); 与D-gal+EC+PC组相比, D-gal+E2+EC+PC组荧光强度降低($P<0.000$ 1); 提前给予U0126后, 与D-gal+E2+EC+PC组相比, D-gal+E2+EC+PC+U0126组荧光强度增加(图4I)。我们进一步检测了内皮细胞VE-cad和ZO-1的表达水平。与EC组相比, D-gal+EC组VE-cad和ZO-1表达水平显著降低($P<0.001$); EC和PC均用D-gal干预后, 再共培养, 与D-gal+EC组相比, D-gal+EC+PC组VE-



A: 小鼠血管纹上MMP-9表达的免疫组织化学染色; B: 免疫组织化学检测MMP-9表达的统计分析; C: MMP-9和vWF的共免疫荧光染色。其中, MMP-9用绿色荧光标记, vWF用红色荧光标记, 细胞核用DAPI标记; D: 免疫荧光染色检测MMP-9表达的统计分析。所有值均表示为均值±标准差, $n=3$ 。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: immunohistochemistry staining of MMP-9 expression on stria vascularis; B: statistical analysis of the expression of MMP-9 in immunohistochemistry experiment; C: co-immunofluorescence staining of MMP-9 and vWF. MMP-9 was labeled with green fluorescence, vWF was labeled with red fluorescence and nucleus were labeled with DAPI; D: statistical analysis of the expression of MMP-9 in immunofluorescence staining. All values are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 雌激素降低内皮细胞MMP-9的表达水平

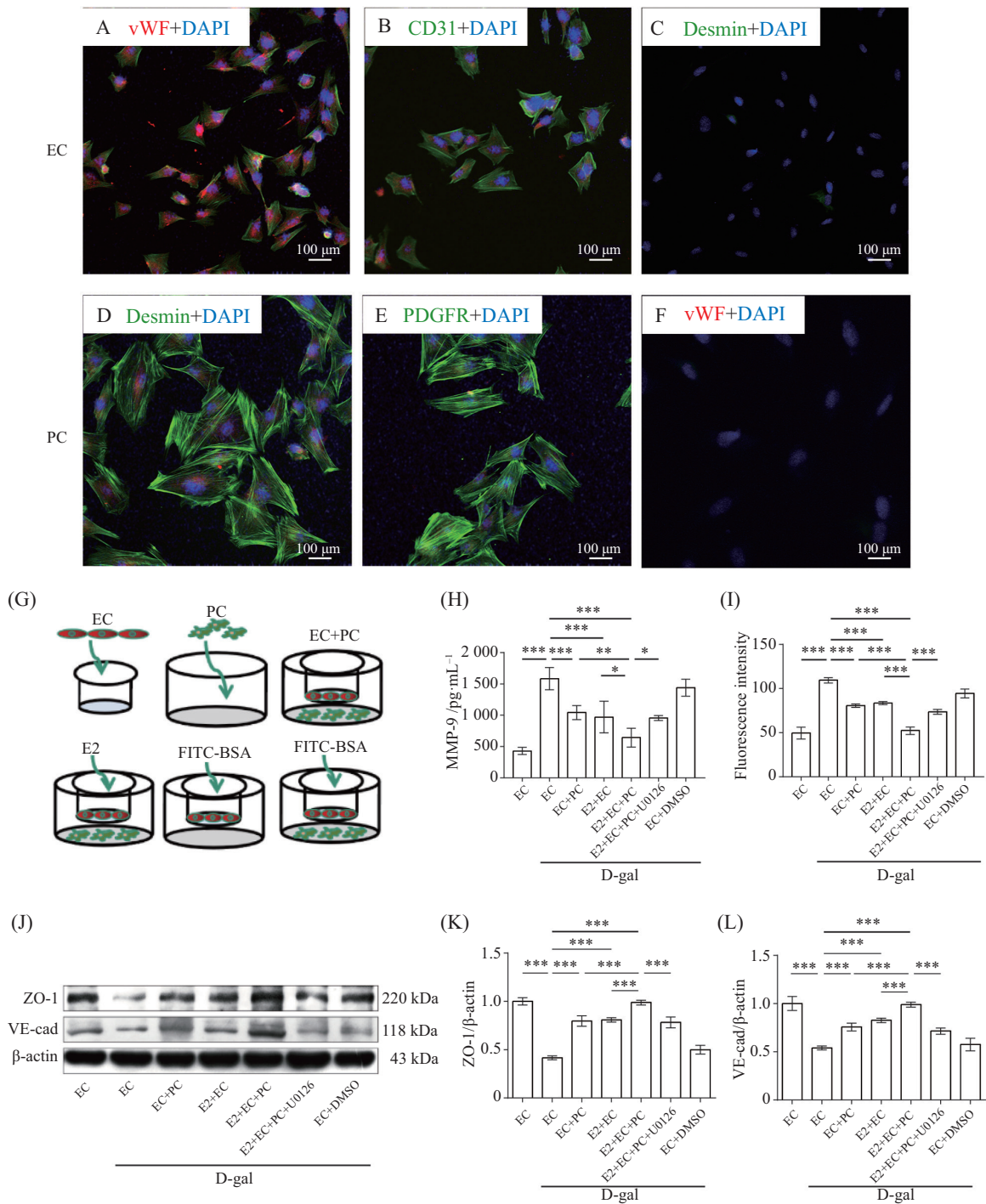
Fig.3 Estrogen decreased the expression of MMP-9 in endothelial cells

cad和ZO-1表达水平增加($P<0.001$); 与D-gal+EC组相比, E2干预后, D-gal+E2+EC组内皮细胞上VE-cad和ZO-1表达水平增加($P<0.001$); 与D-gal+EC+PC组相比, D-gal+E2+EC+PC组VE-cad和ZO-1表达水平增加($P<0.001$); 但U0126预处理部分抑制了E2对VE-cad和ZO-1蛋白表达的影响($P<0.001$)(图4J~图4L)。在体外建立的血迷路屏障模型中, 雌激素对ZO-1和VE-cad水平的影响被U0126所阻断($P<0.001$)(图4J~图4L)。这些数据表明, 雌激素通过ERK信号通路降低了MMP-9的表达水平, 进而降低了内皮细胞的通透性。

3 讨论

随着人口老龄化的加剧, 我国老年性耳聋的发生率逐渐增加。先前研究表明, 雌激素对听力具有

保护作用^[32-33], 并且已在内耳中发现丰富的雌激素受体^[28]。此外, 雌激素能够抑制周细胞的凋亡^[34], 而其具体机制尚不明确。为了探究雌激素对听力的影响, 本研究采用了切除小鼠双侧卵巢后给予雌激素处理的方法(图1)。E2处理后, 小鼠血清雌激素水平恢复至平均水平, 表明动物模型制备成功(图1B)。随着年龄增长, ABR检测表现出潜伏期延长和阈值升高^[35-38]。ABR结果显示, 12mOVX组小鼠的I波潜伏期延长, 听力阈值增加。E2治疗后, I波潜伏期缩短, 听力阈值降低(图1C~图1E), 表明雌激素在年龄相关性听力损失中具有保护作用。随着年龄的增加, 耳蜗血迷路屏障结构被破坏、通透性增加进而导致内耳微循环障碍, 这是导致老年性耳聋的重要因素之一。在本研究中, 我们通过向小鼠尾静脉注射EB



A~F: 原代耳蜗内皮细胞(EC)和周细胞(PC)的分离与鉴定; 原代培养耳蜗内皮细胞中vWF、CD31、VE-cad和Desmin的表达与定位(A~C); 原代培养耳蜗周细胞中Desmin、PDGFRβ和vWF的表达与定位, 细胞核用DAPI(蓝色)复染(D~F); G: 内皮细胞与周细胞的共培养模式; H: ELISA分析上层内皮细胞培养液中MMP-9的水平; I: 各组细胞下层液体中FITC-BSA的荧光强度; J: 通过Western blot分析内皮细胞中ZO-1和VE-cad的表达情况; K: ZO-1蛋白表达的定量分析; L: VE-cad蛋白表达的定量分析。所有值均表示为均值±标准差, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A~F: isolation and identification of primary cochlea EC (endothelial cell) and PC (pericyte); expression and localization of vWF, CD31, VE-cad and Desmin in primary cultured cochlear EC (A~C); Desmin, PDGFRβ and vWF expression and localization in primary cultured cochlear PC; the nucleus is counterstained with DAPI (blue) (D~F); G: co-culture pattern of EC and PC; H: ELISA analysis the MMP-9 levels in the upper EC culture medium; I: fluorescence intensity of FITC-BSA in the lower layer liquid of each group of cells; J: Western blot analysis of ZO-1 and VE-cad in EC; K: quantitative analysis of ZO-1 protein expression; L: quantitative analysis of VE-cad protein expression. All values are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 雌激素通过ERK通路降低MMP-9的表达水平

Fig.4 Estrogen decreased the expression of MMP-9 via ERK signal pathway

来检测血迷路屏障通透性的变化。E2给药后,EB渗漏减少,血迷路屏障通透性降低(图1F和图1G),这与先前关于感音神经性耳聋的研究结果一致^[39-40]。

有研究表明,血迷路屏障通透性的变化与内皮细胞之间的紧密连接蛋白密切相关^[28]。我们推测,雌激素对血迷路屏障通透性的调节可能与紧密连接有关。在年轻小鼠的血管纹中,内皮细胞和周细胞紧密连接,细胞未出现肿胀;而在中年小鼠的血管纹中,内皮细胞和周细胞明显肿胀,周细胞发生迁移,基底膜显著增厚^[15]。利用透射电镜观察内耳的结构,我们发现3m组小鼠的周细胞足突紧邻内皮细胞,内皮细胞的紧密连接结构完整;而12m小鼠的周细胞足突则远离内皮细胞,且基底膜增厚。此外,在12mOVX小鼠中,基底膜进一步增厚,紧密连接变得更为松弛和断裂(图2A和图2B)。E2在一定程度上抑制了上述病理变化(图2A和图2B),这表明雌激素能够改善中年C57BL/6J小鼠血管纹中内皮细胞和周细胞的退行性变,并影响内皮细胞之间的紧密连接。为了进一步探究雌激素对紧密连接的调节作用,我们通过免疫组织化学和免疫荧光技术检测了VE-cad和ZO-1的表达情况。结果显示,12mOVX组血管纹上VE-cad和ZO-1的表达水平降低,而E2干预后VE-cad和ZO-1的表达水平增加(图2C~图2I)。这些实验结果表明,雌激素可能通过增加中年C57BL/6J小鼠血迷路屏障中内皮细胞间VE-cad和ZO-1的表达水平,从而降低血迷路屏障通透性。

已知MMP-9可调节紧密连接蛋白的表达^[41-45]。此外,小鼠海马体和听觉皮层中MMP-9的表达水平随年龄增长而呈现上升趋势^[42,44]。本研究发现,在小鼠血管纹(图3A~图3D)以及小鼠耳蜗的细胞实验(图4H)中,MMP-9的表达水平随年龄增长而增加。已有报道指出,雌激素可通过下调MMP-9的表达来维持屏障完整性^[46-47]。在本研究中,E2处理下调了细胞外MMP-9的表达(图4G)。ERK可上调紧密连接蛋白的表达,从而减轻内皮细胞病变程度^[48-50]。抑制ERK信号通路会上调MMP-9的表达。为了进一步探究雌激素如何下调MMP-9的表达,我们使用原代培养的内皮细胞和周细胞建立了体外血迷路屏障模型(图4G)^[51-52]。在D-gal干预后,加入ERK信号阻断剂部分抑制了E2对MMP-9的作用,并降低了内皮细胞间紧密连接蛋白的表达水平(图4J~图4L)。动物模型和细胞模型的结果表明,雌激素可能通过激活

ERK途径来抑制MMP-9的表达。

本研究发现,在C57BL/6J小鼠耳蜗血管纹血迷路屏障的内皮细胞中,紧密连接蛋白的表达水平在中老年后下降,同时血迷路屏障的通透性增加。E2通过ERK信号通路抑制MMP-9的表达,上调VE-cad和ZO-1的表达,从而降低血迷路屏障的通透性,在年龄相关性听力损失中起保护作用。综上所述,雌激素可能通过ERK途径降低MMP-9的表达水平,从而改善中年小鼠的听力功能,这表明雌激素可能是预防和治疗老年性耳聋的潜在候选药物。

参考文献 (References)

- [1] CIORBA A, HATZOPOULOS S, BIANCHINI C, et al. Genetics of presbycusis and presbystasis [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2015, 28(1): 29-35.
- [2] HOMANS N C, METSELAAR R M, DINGEMANSE J G, et al. Prevalence of age-related hearing loss, including sex differences, in older adults in a large cohort study [J]. *Laryngoscope*, 2017, 127(3): 725-30.
- [3] ZHENG Q, XU Z, LI N, et al. Age-related hearing loss in older adults: etiology and rehabilitation strategies [J]. *Front Neurosci*, 2024, 18: 1428564.
- [4] AEDO-SANCHEZ C, OLIVEROS J, ARANGUIZ C, et al. Subclinical hearing loss associated with aging [J]. *J Otol*, 2023, 18(3): 111-7.
- [5] MALVIYA N, SARAVANAN P. Effect of age on distortion product otoacoustic emissions at extended high frequencies [J]. *J Int Adv Otol*, 2024, 20(5): 450-7.
- [6] TEMBOURY-GUTIERREZ M, MARCHER-RORSTED J, BILLE M, et al. Electrocochleographic frequency-following responses as a potential marker of age-related cochlear neural degeneration [J]. *Hear Res*, 2024, 446: 109005.
- [7] LU M, XIAN F, JIN X, et al. Upregulation of the Ca_v1.3 channel in inner hair cells by interleukin 6-dependent inflammaging contributes to age-related hearing loss [J]. *Aging Cell*, 2024, 23(12): e14305.
- [8] ZHANG A, PAN Y, WANG H, et al. Excessive processing and acetylation of OPA1 aggravate age-related hearing loss via the dysregulation of mitochondrial dynamics [J]. *Aging Cell*, 2024, 23(4): e14091.
- [9] GATES G A, MILLS J H. Presbycusis [J]. *Lancet*, 2005, 366(9491): 1111-20.
- [10] FENG Z Y, HUANG T L, LI X R, et al. 17beta-estradiol promotes angiogenesis of stria vascular in cochlea of C57BL/6J mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 913: 174642.
- [11] SEKULIC-JABLANOVIC M, PAPROTH J, SGAMBATO C, et al. Lack of NHE6 and inhibition of NKCC1 associated with increased permeability in blood labyrinth barrier-derived endothelial cell layer [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 862119.
- [12] SHI X, HAN W, YAMAMOTO H, et al. The cochlear pericytes [J]. *Microcirculation*, 2008, 15(6): 515-29.
- [13] HUANG T L, JIANG W J, ZHOU Z, et al. Quercetin attenuates cisplatin-induced mitochondrial apoptosis via PI3K/Akt mediated

- inhibition of oxidative stress in pericytes and improves the blood labyrinth barrier permeability [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 393: 110939.
- [14] ARMULIK A, ABRAMSSON A, BETSHOLTZ C. Endothelial/pericyte interactions [J]. *Circ Res*, 2005, 97(6): 512-23.
- [15] NENG L, ZHANG J, YANG J, et al. Structural changes in the stria blood-labyrinth barrier of aged C57BL/6 mice [J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 361(3): 685-96.
- [16] SHI X. Cochlear pericyte responses to acoustic trauma and the involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(5): 1692-704.
- [17] SHI X. Resident macrophages in the cochlear blood-labyrinth barrier and their renewal via migration of bone-marrow-derived cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 342(1): 21-30.
- [18] ANFUSO C D, COSENTINO A, AGAFONOVA A, et al. Pericytes of stria vascularis are targets of cisplatin-induced ototoxicity: new insights into the molecular mechanisms involved in blood-labyrinth barrier breakdown [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15790.
- [19] GERHARDT H, BETSHOLY C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis [J]. *Cell Tissue Res*, 2003, 314(1): 15-23.
- [20] NAKAGAWA S, DELI M A, NAKAO S, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, 27(6): 687-94.
- [21] PAGE-MCCAW A, EWALD A J, WERB Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(3): 221-33.
- [22] SA-PEREIRA I, BRITES D, BRITO M A. Neurovascular unit: a focus on pericytes [J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 45(2): 327-47.
- [23] YANG P, FENG X, LI J, et al. Ionizing radiation downregulates estradiol synthesis via endoplasmic reticulum stress and inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1029.
- [24] CHEN S, ZHANG J. Cyclophilin A/cluster of differentiation 147 interactions and blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage [J]. *Crit Care Med*, 2015, 43(12): e593-4.
- [25] HEDERSTIERNA C, HULTCRANTZ M, COLLINS A, et al. The menopause triggers hearing decline in healthy women [J]. *Hear Res*, 2010, 259(1/2): 31-5.
- [26] KILICDAG E B, YAVUZ H, BAGIS T, et al. Effects of estrogen therapy on hearing in postmenopausal women [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(1): 77-82.
- [27] DE ANGELIS F, ZELENZNIK O A, WENDT F R, et al. Sex differences in the polygenic architecture of hearing problems in adults [J]. *Genome Med*, 2023, 15(1): 36.
- [28] SHUSTER B Z, DEPIREUX D A, MONG J A, et al. Sex differences in hearing: probing the role of estrogen signaling [J]. *J Acoust Soc Am*, 2019, 145(6): 3656.
- [29] PETROVSKA S, DEJANOVA B, JURISIC V. Estrogens: mechanisms of neuroprotective effects [J]. *J Physiol Biochem*, 2012, 68(3): 455-60.
- [30] JIANG Y, ZHANG J, RAO Y, et al. Lipopolysaccharide disrupts the cochlear blood-labyrinth barrier by activating perivascular resident macrophages and up-regulating MMP-9 [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019, 127: 109656.
- [31] GUO P, LIU L, YANG X, et al. Irisin improves BBB dysfunction in SAP rats by inhibiting MMP-9 via the ERK/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2022, 93: 110300.
- [32] WILLIAMSON T T, DING B, ZHU X, et al. Hormone replacement therapy attenuates hearing loss: mechanisms involving estrogen and the IGF-1 pathway [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3): e12939.
- [33] ZHANG J, ZHANG T, YU L, et al. Effects of ovarian reserve and hormone therapy on hearing in premenopausal and postmenopausal women: a cross-sectional study [J]. *Maturitas*, 2018, 111: 77-81.
- [34] KURMANN L, OKONIEWSKI M, DUBEY R K. Estradiol inhibits human brain vascular pericyte migration activity: a functional and transcriptomic analysis [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2314.
- [35] ALVARADO J C, FUENTES-SANTAMARIA V, GABALDON-ULL M C, et al. Age-related hearing loss is accelerated by repeated short-duration loud sound stimulation [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 77.
- [36] NG C W, NAVARRO X, ENGLE J R, et al. Age-related changes of auditory brainstem responses in nonhuman primates [J]. *J Neurophysiol*, 2015, 114(1): 455-67.
- [37] PARTHASARATHY A, DATTA J, TORRES J A, et al. Age-related changes in the relationship between auditory brainstem responses and envelope-following responses [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2014, 15(4): 649-61.
- [38] SCIMEMI P, SANTARELLI R, SELMO A, et al. Auditory brainstem responses to clicks and tone bursts in C57 BL/6J mice [J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2014, 34(4): 264-71.
- [39] LI X, SHI X, QIAO Y, et al. Observation of permeability of blood-labyrinth barrier during cytomegalovirus-induced hearing loss [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78(7): 995-9.
- [40] 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.
- [41] BRILHA S, ONG C W M, WEKSLER B, et al. Matrix metalloproteinase-9 activity and a downregulated Hedgehog pathway impair blood-brain barrier function in an *in vitro* model of CNS tuberculosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16031.
- [42] DONG Y, GUO C R, CHEN D, et al. Association between age-related hearing loss and cognitive decline in C57BL/6J mice [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1726-32.
- [43] LEE S Y. Anti-metastatic and anti-inflammatory effects of matrix metalloproteinase inhibition by ginsenosides [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(2): 198.
- [44] RITZEL R M, LAI Y J, CRAPSER J D, et al. Aging alters the immunological response to ischemic stroke [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 136(1): 89-110.
- [45] SAUNDERS W B, BOHNSACK B L, FASKE J B, et al. Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3 [J]. *J Cell Biol*, 2006, 175(1): 179-91.
- [46] GOLD S M, SASIDHAR M V, MORALES L B, et al. Estrogen treatment decreases matrix metalloproteinase (MMP)-9 in autoimmune demyelinating disease through estrogen receptor alpha (ERalpha) [J]. *Lab Invest*, 2009, 89(10): 1076-83.
- [47] NA W, LEE J Y, KIM W S, et al. 17beta-estradiol ameliorates tight junction disruption via repression of MMP transcription [J]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29(9): 1347-61.

- [48] ARREOLA-MENDOZA L, DEL RAZO L M, MENDOZA-GARRIDO M E, et al. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2 [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 191(2/3): 279-88.
- [49] NISHI H, KURODA M, ISAKA K. Estrogen and estrogen receptor induce matrix metalloproteinase-26 expression in endometrial carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2): 751-6.
- [50] SHAN B, LI W, YANG S Y, et al. Estrogen up-regulates MMP2/9 expression in endometrial epithelial cell via VEGF-ERK1/2 pathway [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(10): 826-30.
- [51] NAKAGAWA S, DELI M A, KAWAGUCHI H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3/4): 253-63.
- [52] ZHANG B, XU X, CHU X, et al. Protective effects of angiopoietin-like 4 on the blood-brain barrier in acute ischemic stroke treated with thrombolysis in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 645: 113-20.