

CAMK4 介导胆红素所致听觉中枢神经元氧化应激损伤

柯冰冰¹, 陈铭¹, 王洪阳², 李春燕¹, 殷善开¹

1. 上海交通大学医学院附属第六人民医院 耳鼻咽喉头颈外科/上海交通大学耳鼻咽喉研究所, 上海 200233

2. 解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科医学部 耳鼻咽喉内科/国家耳鼻咽喉疾病临床医学研究中心/教育部聋病重点实验室/聋病防治北京市重点实验室, 北京 100853

摘要: **目的** 探讨钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 4 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV, CAMK4) 在胆红素介导的听觉中枢神经毒性中的作用。 **方法** 通过分子对接和微量热泳动技术 (microscale thermophoresis, MST) 评估 CAMK4 与胆红素的结合能力。采用石蜡切片免疫荧光染色法检测 CAMK4 在耳蜗核中的表达。在体外培养的耳蜗核原代神经元中, 分别给予胆红素 (25 $\mu\text{mol/L}$) 或胆红素联合 CAMK4 抑制剂 KN-93 (1 $\mu\text{mol/L}$) 处理, 随后评估神经元的 ROS 水平、线粒体膜电位变化, 进行 Annexin V/PI 染色及活/死细胞染色。 **结果** 分子对接分析显示, 胆红素与 CAMK4 的结合能为 -9.71 kcal/mol , MST 检测得到平衡解离常数值为 $(1.294 \pm 1.080) \mu\text{mol/L}$, 提示二者具有较强的结合潜力。在耳蜗核中, CAMK4 主要表达于神经元。体外实验结果表明, CAMK4 抑制剂 KN-93 能够显著抑制高浓度胆红素诱导的耳蜗核神经元 ROS 蓄积、线粒体膜电位下降, 以及细胞晚期凋亡和存活率下降。 **结论** CAMK4 在胆红素介导的听觉中枢氧化应激损伤中发挥重要作用。

关键词: 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 4; 胆红素; 神经毒性; 氧化应激

中图分类号: R764.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-3770(2025)03-0001-10

引用格式: 柯冰冰, 陈铭, 王洪阳, 等. CAMK4 介导胆红素所致听觉中枢神经元氧化应激损伤 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2025, 39(3): 1-10. KE Bingbing, CHEN Ming, WANG Hongyang, et al. CAMK4-mediated oxidative stress injury in auditory central neurons induced by bilirubin [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(3): 1-10.

CAMK4-mediated oxidative stress injury in auditory central neurons induced by bilirubin

KE Bingbing¹, CHEN Ming¹, WANG Hongyang², LI Chunyan¹, YIN Shankai¹

1. Shanghai Key Laboratory of Sleep Disordered Breathing, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Otolaryngology Institute of Shanghai JiaoTong University, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China

2. Department of Audiology and Vestibular Medicine, College of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Chinese PLA General Hospital, Chinese PLA Medical School, National Clinical Research Center for Otolaryngologic Diseases, Key Lab of Hearing Science, Ministry of Education, Beijing Key Lab of Hearing Impairment for Prevention and Treatment, Beijing 100853, China

Abstract: Objective The present study aims to investigate the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase 4 (CAMK4) in bilirubin-mediated auditory central neurotoxicity. **Methods** The binding ability between CAMK4 and bilirubin was assessed using molecular docking and micro-scale thermophoresis (MST). The expression of CAMK4 in the cochlear nucleus was detected by immunofluorescence staining on paraffin sections. Primary cochlear nucleus neurons were cultured in vitro and treated with bilirubin (25 $\mu\text{mol/L}$) or bilirubin combined with the CAMK4 inhibitor KN-93 (1 $\mu\text{mol/L}$). The neuronal ROS levels, mitochondrial membrane potential changes, Annexin V/PI staining, and live/dead cell staining were then evaluated. **Results** The molecular docking analysis revealed that the binding energy between bilirubin and CAMK4 was -9.71 kcal/mol , and the MST analysis gave a dissociation constant of $(1.294 \pm 1.080) \mu\text{mol/L}$, suggesting a strong binding affinity between the two. In the cochlear nucleus, CAMK4 was predominantly expressed in neurons. In vitro experiments demonstrated that the CAMK4 inhibitor KN-93 significantly suppressed bilirubin-induced ROS accumulation, mitochondrial membrane potential decline, late-stage apoptosis, and reduced cell survival in cochlear nucleus neurons. **Conclusion** CAMK4 has been demonstrated to play a crucial role in bilirubin-mediated oxidative stress injury in auditory central neurons.

Key words: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV; bilirubin; neurotoxicity; oxidative stress

收稿日期: 2024-10-09

基金课题: 国家自然科学基金优秀青年科学基金 (82322020); 国家自然科学基金 (82071042); 国家重点研发计划青年科学家项目 (2023YFC2509800)

通信作者: 李春燕. E-mail: 7250012693@shsmu.edu.cn

根据世界卫生组织的世界听力报告,新生儿高胆红素血症(即新生儿黄疸)是导致听觉中枢功能损伤的常见原因^[1]。在溶血、感染等病理因素作用下,新生儿血清胆红素水平升高,过高的游离胆红素通过血—脑屏障,沉积于耳蜗核、上橄榄核、海马等脑区,引起急性听觉和认知损伤,形成核黄疸谱系障碍^[2-3]。

胆红素能抑制神经元的氧化呼吸链,从而引发氧化应激和炎症损伤^[2,4]。先前研究^[5-9]发现,胆红素通过激活钙离子通道、酸敏感通道及钾离子通道,增加谷氨酸能突触传递,引起钙离子超载和兴奋毒性。钙超载激活酶系统产生氧自由基(reactive oxygen species, ROS),引发氧化应激,损伤线粒体并诱导神经元凋亡^[6]。尽管这些研究揭示了胆红素下游的损伤机制,但其上游分子靶点仍需进一步探索。胆红素可以广泛抑制蛋白质磷酸化^[10]。蛋白质磷酸化是由蛋白激酶介导的细胞内最重要的翻译后修饰之一,在信号转导、基因表达调控以及细胞生存等多个生物学过程中发挥着关键作用。在前期研究中^[11],我们通过磷酸化组学分析发现,胆红素对听觉中枢神经元具有广泛的蛋白磷酸化调控作用。结合热蛋白结合组学分析,我们筛选出 38 个与胆红素具有结合潜力的差异磷酸化蛋白。根据这些蛋白的已知功能,我们选定钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 4 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV, CAMK4) 作为候选靶点,并进行后续验证。作为丝氨酸/苏氨酸激酶家族的成员,CAMK4 在海马、小脑颗粒细胞等中枢神经系统区域富集^[12-13],参与转录因子调控、线粒体功能损伤以及细胞凋亡等多个生物学过程^[14-15]。已有研究^[16]表明,CAMK4 的异常活化与多种中枢神经系统损伤的病理过程密切相关。例如,CAMK4 过度激活可促进 tau 蛋白磷酸化并诱导神经元凋亡^[17];CAMK4 异常激活还可干扰轴突内囊泡的正常运输,破坏活动依赖的突触生成,进而影响神经元之间的正常连接和信号传递^[18]。本研究采用结构生物学等技术,探讨 CAMK4 与胆红素的结合能力及其在胆红素诱导的中枢神经毒性中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

出生后 1~3 d (P1~3) 以及出生后 7 d (P7) 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由上海昇敞生物科技有限公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2021-0002。动物实验已通过上海市第六人民医院动物福利伦理委员会审核(2023-0348)。

1.1.2 主要实验试剂

DMEM 高糖培养液、4% (w/v) 多聚甲醛固定液(paraformaldehyde, PFA)、多聚-L-赖氨酸、胎牛血清购于中国生工生物。Neurobasal-A 培养基、B27、N2、L-谷氨酰胺购于美国 Gibco。Calcein-AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、增强型线粒体膜电位 Jc-1 检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、活性氧检测试剂盒购于中国碧云天。木瓜蛋白酶购于美国 Worthington。DNaseI 购于美国 Stemcell。TransIntro[®] EL 转染试剂购于中国全式金。M-PER[™] 哺乳动物蛋白抽提试剂购于美国 ThermoFisher。磷酸酶抑制剂购于美国 Cell Signaling Technology。CAMK4 抗体、MAP2 抗体购于中国 Proteintech。GFAP 直接标记抗体(Alexa Fluor[™] 647)、Alexa Fluor[™] 555 购于美国 Invitrogen。Alexa Fluor[®] 488 购于英国 Abcam。KN-93 购于中国 MedChemExpress。

1.2 方法

1.2.1 分子对接

分子对接可模拟分子相互作用,预测蛋白质和小分子之间的结合模式和亲和力。从 Protein Data Bank (PDB) 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载已被解析的 CAMK4_HUMAN 的晶体结构,PDB 代码为 2W4O,去除无序结构,对蛋白结构进行优化,包括添加氢原子、优化侧链位置等。胆红素化合物结构通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载,使用 MOE 软件(2022)进行分析,利用 GBVI/WAS 打分函数进行评估,对筛选构象进行聚类以挑选最佳对接构象。

1.2.2 微量热泳动(microscale thermophoresis, MST)

构建 CAMK4 过表达质粒 PGMLV-CMV-H_CAMK4-eGFP-PGK-Puro,DNA 测序确认构建成功。用 TransIntro[®] EL 转染试剂对 293T 细胞进行 CAMK4 过表达质粒转染,对照组则进行 PGMLV-CMV-MCS-eGFP-PKG-Puro 空载质粒转染。48 h 后,将磷酸酶抑制剂 1:100 稀释加入裂解液中,在预冷的条件下裂解细胞以提取蛋白。含 0.05% (v/v) Tween20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline with Tween 20, PBST)作为胆红素和蛋白质的稀释缓冲液,通过 Monolith NT.115 仪器(NanoTemper, 德国)检测胆红素和蛋白质混合物。用 Mo. Affinity Analysis 软件进行分析,取 3 次重复实验数据绘制平衡解离常数(equilibrium dissociation constant, Kd)拟合曲线图,亲和力以 Kd 值表示。

1.2.3 耳蜗核脑组织石蜡切片、HE 染色以及免疫荧光检测

取 P7 健康 SD 大鼠,心脏灌注后浸泡于 4%

PFA 中 4 ℃ 固定 24 h, 石蜡包埋后以 3 μm 厚度进行连续切片。切片脱蜡进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 通过显微镜 (Leica, 德国) 观察耳蜗核定位并拍照。组织免疫荧光染色用二甲苯 I、II 依次脱蜡 15 min, 无水乙醇 I 和 II、95% 和 75% 乙醇依次浸泡 5 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 5 min 后加入柠檬酸抗原修复液, 微波炉煮沸后置于 95 ℃ 中 30 min, PBS 洗涤 5 min。用 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 于室温封闭 45 min, 加 CAMK4、MAP2 抗体、GFP 抗体于 4 ℃ 孵育过夜。复温后 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入稀释好的二抗于室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 用含 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的抗荧光淬灭封片剂进行封片, 激光扫描共聚焦显微镜 (Nikon A1, 日本) 观察并拍照。

1.2.4 原代耳蜗核神经元培养及药物处理

取 P1~3 SD 大鼠断头处死, 剥除颅骨取脑, 显微镜 (Leica, 德国) 下取出耳蜗核置于 4 ℃ 预冷的 DMEM 高糖培养基中, 整个过程冰上操作。静置吸取上清, 弃液, 加入预先用 DMEM 高糖培养基、木瓜蛋白酶 (40 U/mL)、DNase I (125 U/mL) 配置好的消化液, 37 ℃ 消化 10 min, 每 5 min 摇晃一次。用含 10% (v/v) FBS 的 DMEM 培养液终止消化, 轻柔吹打, 静置取上清, 重复一次。1 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 吹打重悬细胞, 70 μm 细胞滤网过滤。以 5×10^5 /mL 密度接种于预先经多聚-L-赖氨酸包被的 48 孔板或 35 mm 玻底皿中, 4~6 h 后换成无血清神经元维持培养液, 培养液包括 Neurobasal-A 培养基、B27 (1×)、N2 (1×)、L-谷氨酰胺 (2 mmol/L), 每 2 天半量换液一次。

原代耳蜗核神经元接种于 48 孔板或 35 mm 玻底皿中培养 4 d 后进行药物处理。所有药物均以二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 配制, 并用培养基稀释至所需的最终浓度, 确保 DMSO 的浓度不超过 1% v/v。实验分为 4 组: 对照组 (1% DMSO)、胆红素组 (25 μmol/L)、KN-93 抑制剂组 (1 μmol/L)、KN-93 抑制剂联合胆红素处理组。在线粒体膜电位检测、Annexin V/PI 细胞凋亡检测、活/死细胞检测实验中, 对照组、胆红素组和 KN-93 抑制剂组的药物处理时间为 12 h; 而 KN-93 抑制剂联合胆红素处理组则以 1 μmol/L KN-93 抑制剂预处理 2 h, 随后加入最终浓度为 25 μmol/L 的胆红素, 继续处理 12 h。

1.2.5 活性氧 ROS 检测

原代耳蜗核神经元分别于胆红素 (25 μmol/L) 处理 6、12、24 h 后进行 DCFH-DA 荧光探针染色与

检测。吸弃旧培养基, 加入按照 1:1 000 稀释的 DCFH-DA 荧光染料, 37 ℃ 避光孵育 30 min, 使用倒置荧光显微镜 (Nikon, 日本) 观察 ROS 生成情况。ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF (绿色), 代表 ROS 水平。使用 Image J 软件进行荧光平均强度 (荧光强度与区域面积的比值) 分析。根据统计分析结果, 该检测采用 24 h 处理时间以更充分反映 ROS 水平的积累过程。KN-93 抑制剂联合胆红素处理组中, 以 1 μmol/L KN-93 抑制剂预处理 2 h 后加入胆红素, 继续处理 24 h, 再进行上述检测。

1.2.6 线粒体膜电位检测

Jc-1 是常用的线粒体膜电位染料探针, 能扩散到线粒体基质中特异性与线粒体内膜结合, 在细胞内以聚合体和单体两种不同的形式存在, 可反映细胞 $\Delta\Psi_m$ 的变化, 提示线粒体去极化作用的强弱。当线粒体膜电位水平较高时, Jc-1 形成聚合物发出红色荧光, 当线粒体膜电位水平较低时, Jc-1 以单体形式存在发出绿色荧光。原代耳蜗核神经元处理结束后, 吸弃旧培养基, 加入 1:200 稀释的 Jc-1 工作液, 37 ℃ 避光孵育 20 min。孵育完成后使用激光扫描共聚焦显微镜 (Nikon A1, 日本) 观察并拍照。图像使用 Image J 软件进行荧光强度定量分析, 计算红/绿荧光强度比值以反映膜电位变化。

1.2.7 Annexin V/PI 细胞凋亡检测

细胞凋亡水平通过 Annexin V-FITC/PI 双染法进行检测。原代耳蜗核神经元处理结束后, 吸弃旧培养基, 按照每孔 5 μL Annexin V、5 μL PI 和 195 μL Annexin V 结合缓冲液的比例配制染液, 加入染液室温避光孵育 10 min 后, 滴加 Hoechst 33342 (终浓度 10 μg/mL), 继续室温避光孵育 10 min, 倒置荧光显微镜 (Nikon, 日本) 观察并拍照。FITC 通道用于检测早期凋亡细胞 (绿色), PI 通道用于检测晚期凋亡或坏死细胞 (红色), Hoechst 用于标记细胞核。图像分析通过 Image J 软件计数不同类型细胞的比例。

1.2.8 活/死细胞荧光染色

细胞活性通过 Calcein-AM/PI 双染法检测。原代耳蜗核神经元处理结束后, 吸弃旧培养基, 加入 1:1 000 稀释的 Calcein-AM/PI 工作液, 37 ℃ 避光孵育 30 min。通过倒置荧光显微镜 (Nikon, 日本) 观察并拍照计数。Calcein-AM 在活细胞中被胞内酯酶水解后发出绿色荧光; PI 则穿透死亡细胞膜并结合 DNA, 发出红色荧光。通过 Image J 图像分析软件计数绿色 (活细胞) 和红色 (死细胞) 荧光细胞数, 计算活细胞占总细胞的百分比作为细胞存活率。

1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism 10.0 软件。计量资料以

$\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析, Turkey 检验进行两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 CAMK4 和胆红素的亲和力

根据 CAMK4_Human 的晶体结构 (PDB ID: 2W4O), 研究通过 MOE 软件 (2022) 将 CAMK4_Human 以及胆红素分别作为对应的受体和配体进行分子对接的预处理和对接模拟, 最终得出两者之间的对接分数为 -9.71 kcal/mol 。CAMK4_Human 和胆红素对接如图 1A 所示, 结合模式如图 1B、1C

所示, 胆红素可与 CAMK4 激酶结构域中的氨基酸位点 G124 (Gly)、D185 (Asp) 形成氢键相互作用, 和 G53 (Gly)、V60 (Val)、E168 (Glu) 形成芳香环-氢堆积效应。

通过 MST 实验进一步验证胆红素和 CAMK4 的结合亲和力。对照质粒转染 293T 细胞后提取蛋白质, 检测发现蛋白质与胆红素之间并不能形成 Kd 拟合曲线 (图 2A), 而在 293T 细胞中过表达 CAMK4 后, 提取的蛋白质和胆红素之间形成拟合曲线, Kd 值为 $(1.294 4 \pm 1.080 3) \mu\text{mol/L}$ (图 2B)。

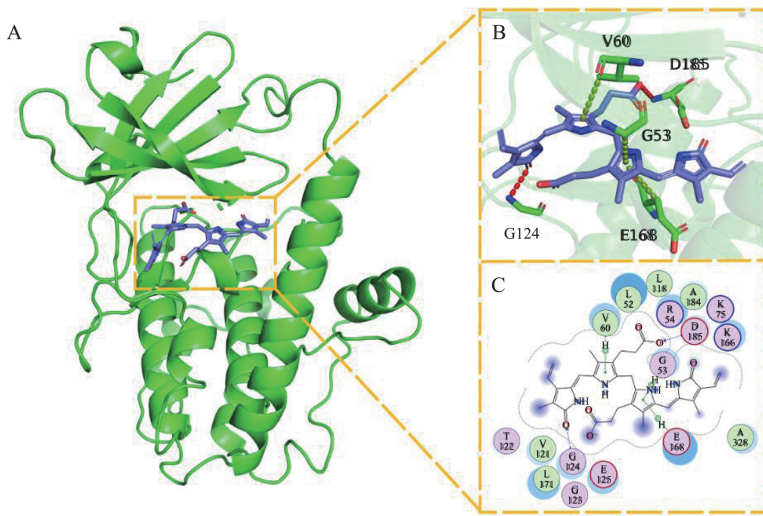


图 1 分子对接模拟胆红素与 CAMK4_HUMAN 蛋白结合模式

A: CAMK4 和胆红素复合物的整体结构; B: 3D 结合模式局部放大图 (氨基酸结构碳原子以绿色 Sticks 显示, 配体碳原子以紫色 Sticks 显示, 氧原子红色, 氮原子为蓝色, 红色虚线为氢键相互作用, 绿色虚线为芳香环-氢堆积效应); C: 2D 结合模式图

Figure 1 Molecular docking simulation of bilirubin binding to the CAMK4_HUMAN protein

A: Overall structure of the CAMK4-bilirubin complex; B: Enlarged 3D view of the binding mode. Carbon atoms of amino acid residues are shown as green sticks, carbon atoms of the ligand are shown in purple, oxygen atoms in red, and nitrogen atoms in blue. Red dashed lines indicate hydrogen bonds, and green dashed lines indicate π -H interactions; C: 2D schematic representation of the binding interactions

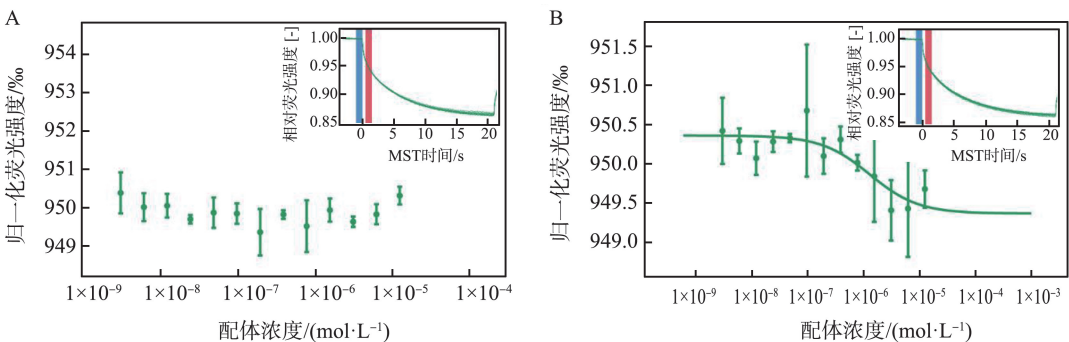


图 2 MST 检测胆红素和 CAMK4 的结合能力 (右上为归一化的 MST 时间轨迹图, 时间选择 1.5~2.5 s)

A: 对照质粒转染细胞后蛋白质和胆红素之间的 Kd 拟合曲线; B: CAMK4 过表达质粒转染细胞后蛋白质和胆红素之间的 Kd 拟合曲线

Figure 2 MST analysis of the binding affinity between bilirubin and CAMK4 (Top right: normalized MST time traces, with the analysis window set to 1.5-2.5 s)

A: Kd fitting curve of bilirubin binding to proteins extracted from cells transfected with control plasmid. B: Kd fitting curve of bilirubin binding to proteins from cells transfected with CAMK4-overexpressing plasmid

2.2 CAMK4 在耳蜗核神经元中的表达

研究采用 Brain RNA-seq 数据库对不同细胞类型中的 Camk4 表达进行了分析,结果显示 CAMK4 主要表达于神经元(图 3A)。耳蜗核解剖位置如图

3B 所示。通过耳蜗核的脑组织石蜡切片免疫荧光染色,我们进一步证实了 CAMK4 在耳蜗核中的表达,并与 MAP2 阳性的神经元表达共定位(图 3C),提示 CAMK4 主要在耳蜗核神经元中发挥作用。

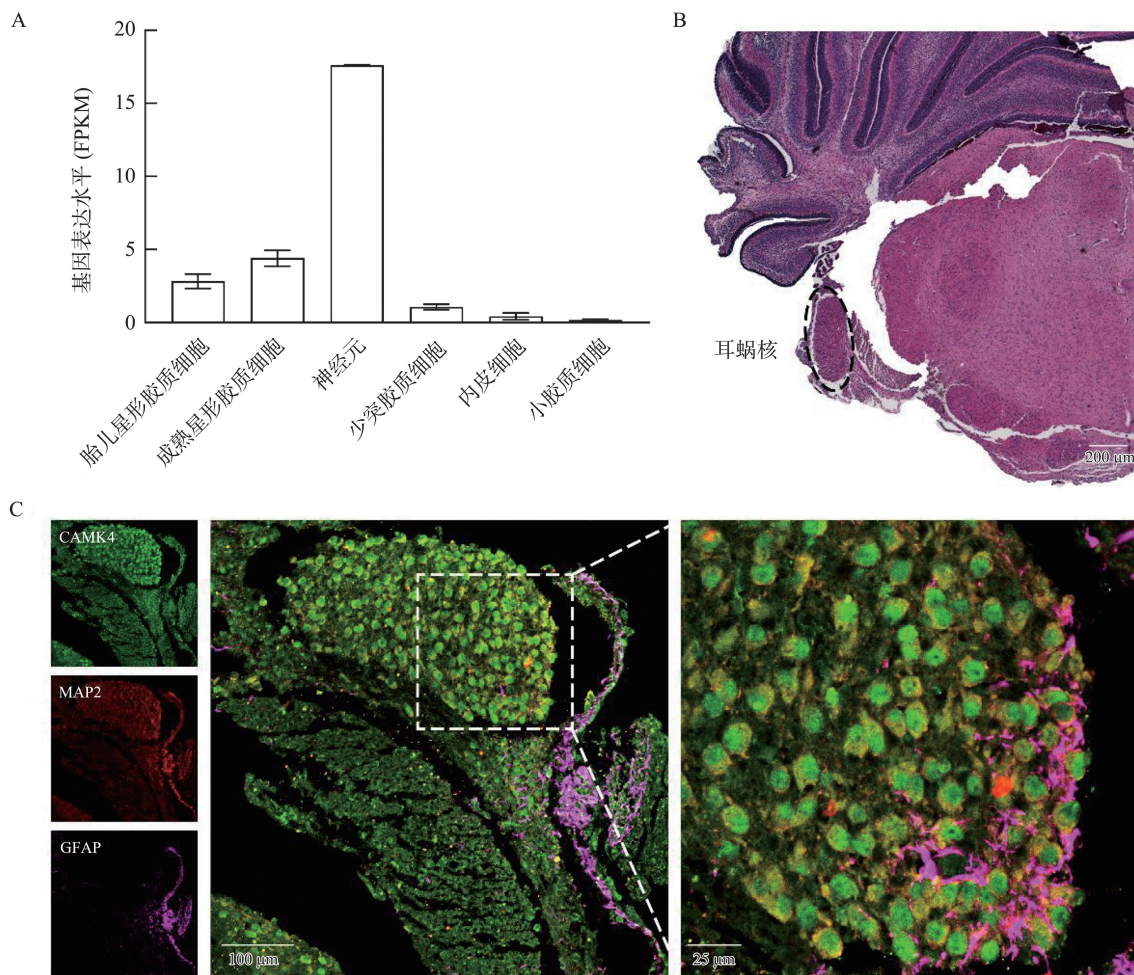


图 3 耳蜗核团解剖位置及 CAMK4 的表达

A:不同细胞类型中 Camk4 的表达水平;B:耳蜗核石蜡切片 HE 染色图(黑色虚线圆圈为耳蜗核部位);C:耳蜗核石蜡切片免疫荧光染色图

Figure 3 Anatomical localization of the cochlear nucleus and CAMK4 expression

A: Expression levels of Camk4 in different cell types; B: HE staining of paraffin-embedded cochlear nucleus sections (the cochlear nucleus region is indicated by a black dashed circle); C: Immunofluorescence staining of cochlear nucleus sections

2.3 CAMK4 抑制剂抑制胆红素诱导的神经元 ROS 蓄积

通过 DCFH-DA 探针对原代耳蜗核神经元的 ROS 水平进行检测。结果如图 4A、B 所示,对照组绿色荧光的平均强度为 24.86 ± 2.35 。胆红素 ($25 \mu\text{M}$) 处理 6 h 后未见明显荧光强度变化 ($25.36 \pm 1.539, P = 0.996$);处理 12 h 后,平均荧光强度升至 35.47 ± 4.04 ($P = 0.007$);24 h 后,ROS 水平进一步上升,绿色荧光的平均强度达到 53.25 ± 2.52 ($P < 0.001$),表明 ROS 水平随着处理时间延长而逐步积累,多组间差异具有统计学意义 ($F = 69.33, P < 0.001$)。因此,我

们后续选择 24 h 作为胆红素处理时间点,以更充分反映其诱导的氧化应激损伤进程。

为探讨 CAMK4 在胆红素诱导 ROS 蓄积中的作用,我们采用 KN-93 抑制剂 ($1 \mu\text{M}$) 对耳蜗核神经元进行 2 h 预处理后,再进行胆红素处理 24 h。统计分析结果如图 4C、D 所示,KN-93 预处理能够有效抑制胆红素诱导的 ROS 蓄积,绿色荧光平均强度从胆红素单独处理组的 52.52 ± 1.93 下降至 25.05 ± 1.63 ($P < 0.001$),各组之间差异具有统计学意义 ($F = 198.5, P < 0.001$)。

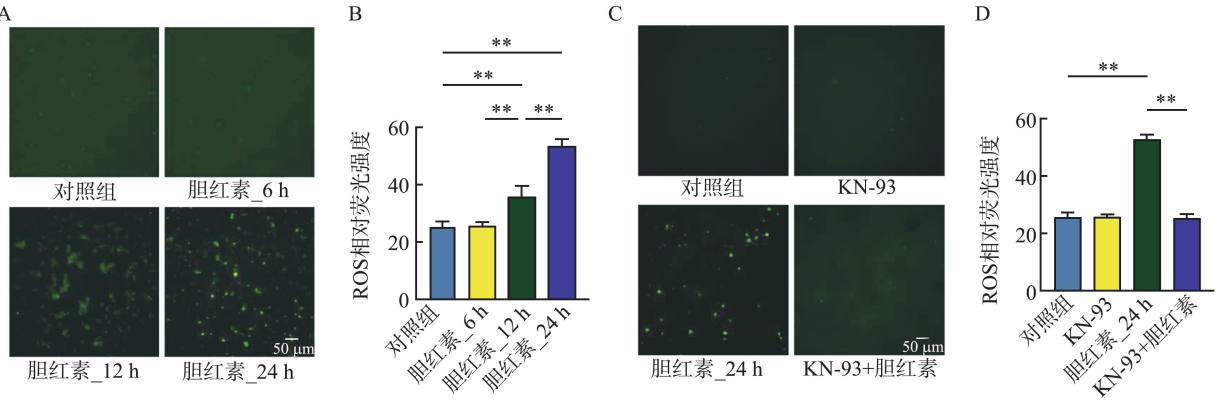


图 4 CAMK4 抑制剂抑制胆红素所致耳蜗核神经元的 ROS 蓄积 (** $P < 0.001$)

A: 对照组及不同胆红素处理时间的 DCF 荧光检测; B: 各组间 ROS 平均荧光强度的统计分析; C: 不同药物处理 24 h 的 DCF 荧光检测; D: 各组间 ROS 平均荧光强度的统计分析

Figure 4 CAMK4 inhibitor attenuates bilirubin-induced ROS accumulation in cochlear nucleus neurons (** $P < 0.001$)

A: DCF fluorescence images showing ROS levels in control group and after bilirubin treatment; B: Quantification of average ROS fluorescence intensity across groups; C: DCF fluorescence images after 24 h of different treatments; D: Quantification of average ROS fluorescence intensity across treatment groups

2.4 CAMK4 抑制剂抑制胆红素诱导的线粒体膜电位下降

不同处理组的原代耳蜗核神经元 Jc-1 染色结果如图 5A、B 所示, 对照组红绿荧光比值百分比为 $(196.90 \pm 13.48)\%$ 。胆红素 $(25 \mu\text{m}, 12 \text{ h})$ 可诱导线粒体膜电位下降, 红绿荧光比值百分数下降至 $(117.90 \pm$

$13.03)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。而 CAMK4 抑制剂 KN-93 的预处理可抑制胆红素所致的线粒体膜电位变化, 红绿荧光比值百分比为 $(170.00 \pm 17.45)\%$, 和对照组相比差异无统计学意义 ($P = 0.082$), 各组之间差异具有统计学意义 ($F = 22.09, P < 0.001$) (图 5B)。

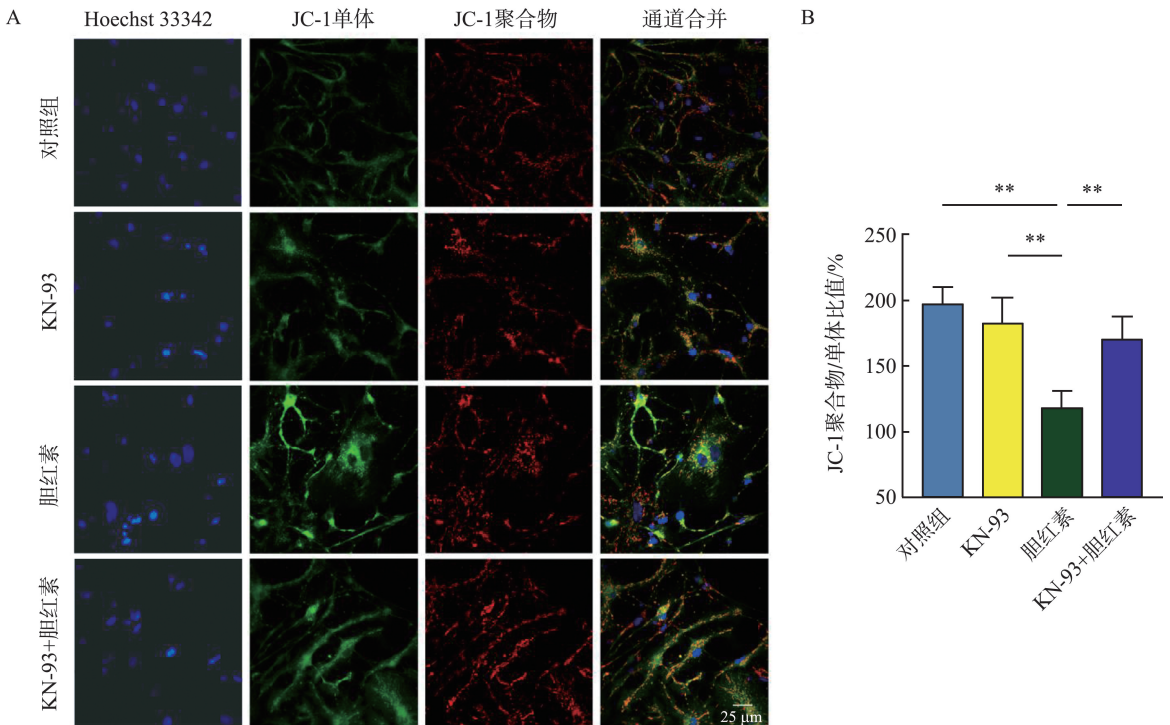


图 5 CAMK4 抑制剂减轻胆红素诱导的线粒体膜电位下降积 (** $P < 0.001$)

A: 不同处理组神经元的线粒体膜电位 ($\Delta\psi\text{m}$) 变化; B: Jc-1 聚集体和单体的比值统计

Figure 5 CAMK4 inhibitor alleviates bilirubin-induced mitochondrial membrane potential loss (** $P < 0.001$)

A: Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) changes in neurons from different treatment groups; B: Statistical analysis of the ratio of Jc-1 aggregates to monomers

2.5 CAMK4 抑制剂对胆红素诱导的神经元凋亡的保护作用

我们通过 Annexin V/PI 染色评估神经元的凋亡情况(图 6A)。统计结果如图 6B 所示,胆红素(25 μm , 12 h)处理后,早期凋亡细胞从(4.41 \pm 0.47)%增加至(11.00 \pm 1.30)%($P < 0.001$),晚期凋亡细胞从(2.99 \pm 0.59)%增加至(17.32 \pm 1.24)%($P < 0.001$)。单独使用 CAMK4 抑制剂 KN-93 处理的神

经元,其早期、晚期凋亡细胞比例均与对照组相比差异无统计学意义($P = 0.166$; $P = 0.977$)。在 KN-93 预处理 2 h 后再加入胆红素处理,晚期凋亡细胞比例降至(3.985 \pm 0.80)%,与胆红素组相比差异无统计学意义($P = 0.559$),但其早期凋亡细胞比例与胆红素处理组相比,差异无统计学意义($P = 0.858$),早期、晚期凋亡细胞各组之间的差异具有统计学意义($F = 51.99$, $P < 0.001$)。

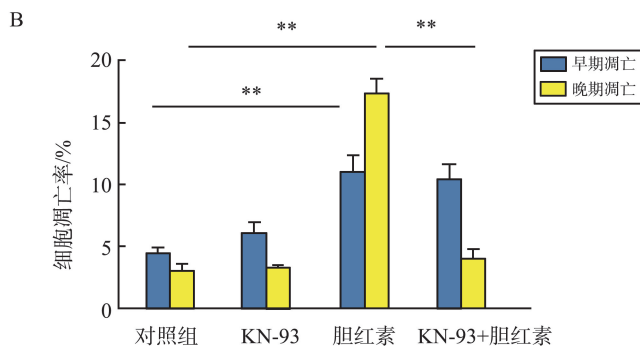
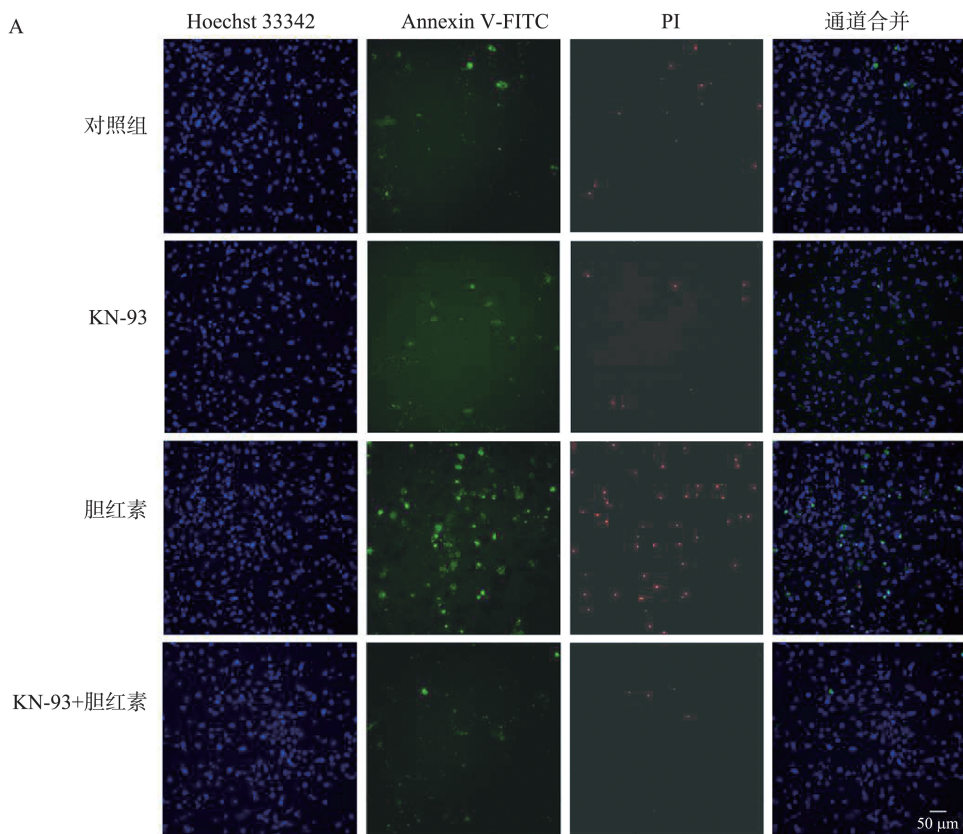


图 6 CAMK4 抑制剂对胆红素诱导神经元凋亡的影响 (** $P < 0.001$)

A: 不同处理下耳蜗核神经元的凋亡检测; B: 各组的早期和晚期凋亡细胞的比例及统计差异

Figure 6 Effect of CAMK4 inhibitor on bilirubin-induced neuronal apoptosis (** $P < 0.001$)

A: Apoptosis detection of cochlear nucleus neurons under different treatments; B: The proportion of early and late apoptotic cells in each group and statistical differences. Blue bars represent early apoptotic cells, red bars represent late apoptotic cells

2.6 CAMK4 抑制剂抑制胆红素所致的耳蜗核神经元死亡

我们通过 Calcein-AM/PI 染色检测细胞活性(图 7A)。结果显示,原代耳蜗核神经元的细胞存活率为(91.31±1.68)%。KN-93 处理组(1 μmol/L)的细胞存活率为(89.26±0.04)% ,与对照组相比差异无统计学意义($P=0.721$) ;而胆红素处理后,细胞

存活率下降至(77.09±0.03)% ,表明胆红素对耳蜗核神经元具有显著的毒性作用($P < 0.001$)。在 KN-93 预处理 2 h 后,再加胆红素处理,耳蜗核神经元的存活率显著提高至(87.74±0.51)% ,与胆红素组相比差异具有统计学意义($P = 0.003$) (图 7B) ,各组之间差异具有统计学意义($F = 21.71, P < 0.001$)。

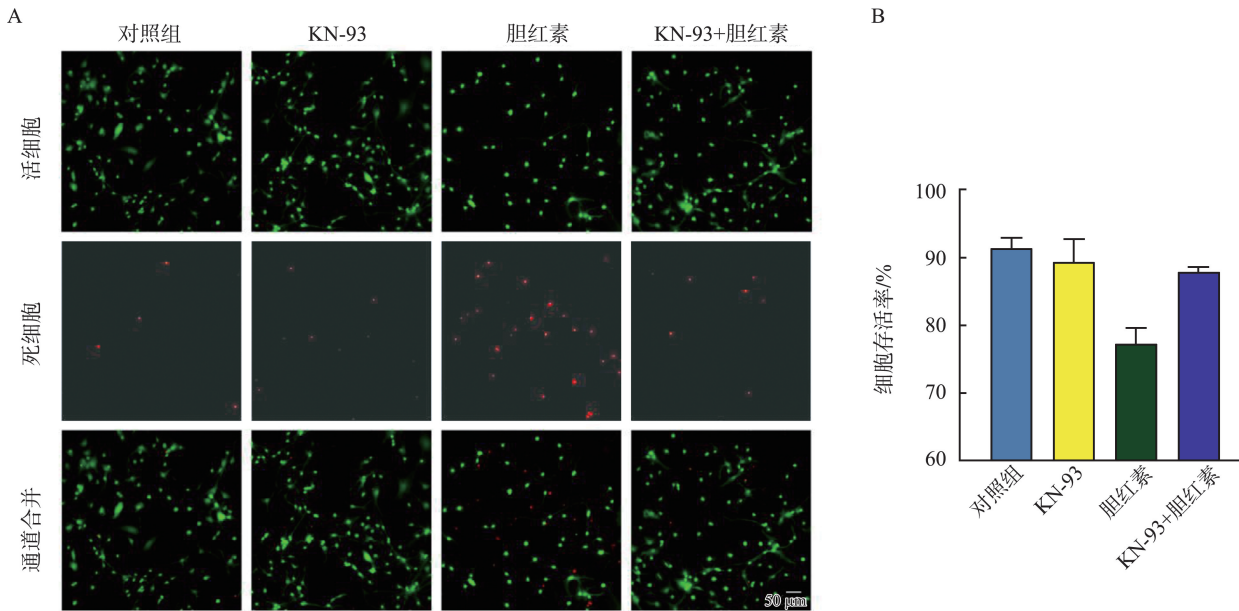


图 7 CAMK4 抑制剂对胆红素处理的耳蜗核神经元活性影响

A: 不同药物处理下的活/死细胞染色; B: 各组细胞存活率

Figure 7 Effect of CAMK4 inhibitor on cochlear nucleus neuron viability after bilirubin treatment

A: Live/dead cell staining under different treatments; B: Cell viability in each group

3 讨论

新生儿高胆红素血症所致听觉功能障碍目前尚无有效防治措施,因此,揭示胆红素的作用机制并探索高效防治靶点至关重要。本研究基于前期磷酸化组学富集分析,探讨了 CAMK4 在胆红素诱导的耳蜗核神经元毒性中的作用。已有研究^[19]表明,神经元对胆红素的敏感性显著高于胶质细胞。我们发现,CAMK4 主要表达于耳蜗核神经元,并且与胆红素之间存在直接结合能力。CAMK4 抑制剂能够显著抑制高浓度胆红素诱导的耳蜗核神经元 ROS 蓄积和线粒体去极化,进而减少神经元的凋亡和活性下降。这些研究结果表明,CAMK4 在胆红素所致听觉中枢神经毒性中发挥着重要作用,并有望成为拮抗胆红素所致听觉中枢功能损伤的新靶点。

已知胆红素可以直接与线粒体膜相互作用,导致线粒体受损,同时引起神经元钙超载,钙超载进一步增加线粒体 ROS 的生成,ROS 过度积累则可破坏线粒体,释放细胞色素 C 等促凋亡分子到胞浆中,激活细胞凋亡通路,最终导致神经元凋亡^[4,20-22]。本研

究发现,CAMK4 抑制剂对胆红素诱导的耳蜗核 ROS 蓄积、线粒体膜电位下降及神经元凋亡这三个关键损伤环节具有显著抑制作用,提示 CAMK4 抑制剂 KN-93 可能通过线粒体膜依赖性的细胞凋亡途径,发挥神经保护作用。CAMK4 可能通过放大或维持胆红素引发的损伤信号,例如调控下游信号通路及细胞抗氧化防御系统^[15,16],从而间接增强神经元对胆红素毒性损伤的敏感性。既往的研究表明,胆红素能够损伤神经元的多种蛋白功能。胆红素可能通过靶向不同的蛋白介导不同的生物学效应。例如,Meixiong 等^[23]报道,高浓度胆红素通过激活 Mas 相关 G 蛋白偶联受体 4 引发皮肤瘙痒。此外,胆红素还可通过与 TRPM2 受体结合加剧脑卒中的损伤^[9],并通过结合 PPARα 受体调控代谢通路^[24]。前期我们通过联合磷酸化组学与热蛋白结合组学筛选出 38 个潜在与胆红素结合并发生磷酸化修饰变化的蛋白,本研究证实 CAMK4 在胆红素诱导的神经毒性中发挥关键作用,然而对其他潜在靶点的研究有望深度揭示胆红素的生理及病理作用机制。

KN-93 是一种常用的 CAMK4 抑制剂^[25-28], 其主要通过竞争性结合钙调蛋白抑制激酶活性^[29]。我们的研究发现, KN-93 能够显著减轻胆红素引发的氧化应激和神经元损伤, 然而其在临床应用中仍面临若干挑战。首先, 由于物种间药代动力学差异, KN-93 在人体内的有效剂量窗口可能与大鼠模型不一致。其次, KN-93 的临床应用还需要克服中枢药物递送的应用问题。KN-93 对 CAMKII 也具有抑制作用^[29-31], 这可能增加临床干预脱靶风险。CAMKII 广泛参与心脏和免疫系统功能, 可能导致 KN-93 的心脏毒性(如 QT 间期延长)和免疫抑制等副作用^[26, 32-34]。因此, 研发能够高效穿透血—脑屏障、靶向胆红素损伤脑区且具有高生物安全性的 CAMK4 特异性抑制剂具有重要意义。近年来, 随着纳米技术的迅速发展, 利用纳米载体的特殊性能, 可以有效克服中枢给药面临的水溶性差、靶向性不足和血脑屏障通透性低等挑战^[35-36]。基于本研究中揭示的 CAMK4-胆红素复合物结构, 筛选或设计具有高选择性的变构抑制剂, 并结合纳米递送系统, 可能为胆红素所致听觉中枢损伤提供更精准的治疗策略。

本研究通过一系列结构生物学及细胞实验, 揭示了 CAMK4 在胆红素诱导的听觉毒性中的作用, 为研发胆红素神经毒性的干预策略提供了理论依据。未来, 我们将进一步探索 KN-93 在动物体内模型中的疗效和安全性, 评估其临床应用潜力, 并结合纳米技术改善其血—脑屏障通透性及靶向性, 以期实现更加精准和有效的治疗。

参考文献:

[1] World Health Organization. World report on hearing [M]. Geneva: World Health Organization, 2021

[2] Watchko JF, Tiribelli C. Bilirubin-induced neurologic damage: mechanisms and management approaches[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(21): 2021-2030. doi:10.1056/nejmra1308124

[3] Qian S, Kumar P, Testai FD. Bilirubin encephalopathy [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2022, 22(7): 343-353. doi:10.1007/s11910-022-01204-8

[4] Hansen TWR, Wong RJ, Stevenson DK. Molecular physiology and pathophysiology of bilirubin handling by the blood, liver, intestine, and brain in the newborn[J]. *Physiol Rev*, 2020, 100(3): 1291-1346. doi:10.1152/physrev.00004.2019

[5] Lai K, Song XL, Shi HS, et al. Bilirubin enhances the activity of ASIC channels to exacerbate neurotoxicity in neonatal hyperbilirubinemia in mice[J]. *Sci Transl Med*,

2020, 12(530): eaax1337. doi:10.1126/scitranslmed.aax1337

[6] Shi HS, Lai K, Yin XL, et al. Ca²⁺-dependent recruitment of voltage-gated sodium channels underlies bilirubin-induced overexcitation and neurotoxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 774. doi:10.1038/s41419-019-1979-1

[7] Gong LN, Liu HW, Lai K, et al. Selective vulnerability of GABAergic inhibitory interneurons to bilirubin neurotoxicity in the neonatal brain [J]. *J Neurosci*, 2024, 44(45): e0442242024. doi:10.1523/jneurosci.0442-24.2024

[8] 张玲, 叶海波, 时海波. 胆红素所致听觉系统神经损害的新机制 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2019, 33(3): 31-35. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.1.2018.044

ZHANG Ling, YE Haibo, SHI Haibo. A new mechanism of bilirubin-induced auditory nervous system injury [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2019, 33(3): 31-35. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.1.2018.044

[9] Liu HW, Gong LN, Lai K, et al. Bilirubin gates the TRPM2 channel as a direct agonist to exacerbate ischemic brain damage [J]. *Neuron*, 2023, 111(10): 1609-1625. e6. doi:10.1016/j.neuron.2023.02.022

[10] Hansen TW, Mathiesen SB, Walaas SI. Bilirubin has widespread inhibitory effects on protein phosphorylation [J]. *Pediatr Res*, 1996, 39(6): 1072-1077. doi:10.1203/00006450-199606000-00023

[11] Mao L, Lu J, Yang Q, et al. Bilirubin Targeting WNK1 to Alleviate NLRP3-Mediated Neuroinflammation [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025. doi:10.1002/adv.202407349.

[12] Wu H, Suo GH, Li TC, et al. CaMKIV mediates spine growth deficiency of hippocampal neurons by regulation of EGR3/BDNF signal axis in congenital hypothyroidism [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 482. doi:10.1038/s41420-022-01270-4

[13] Tang QY, Chen SX, Wu H, et al. Congenital hypothyroidism impairs spine growth of dentate granule cells by downregulation of CaMKIV [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 143. doi:10.1038/s41420-021-00530-z.

[14] Li ZZ, Lu JY, Zeng G, et al. miR-129-5p inhibits liver cancer growth by targeting calcium calmodulin-dependent protein kinase IV (CAMK4) [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 789. doi:10.1038/s41419-019-1923-4

[15] Zhang XH, Griepentrog JE, Zou BB, et al. CaMKIV regulates mitochondrial dynamics during sepsis [J]. *Cell Calcium*, 2020, 92: 102286. doi:10.1016/j.ceca.2020.102286

[16] Sałaciak K, Koszałka A, Żmudzka E, et al. The calcium/calmodulin-dependent kinases II and IV as therapeutic targets in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders

- [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4307. doi:10.3390/ijms22094307
- [17] Yin Y, Gao D, Wang Y, et al. Tau accumulation induces synaptic impairment and memory deficit by calcineurin-mediated inactivation of nuclear CaMKIV/CREB signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(26): E3773-E3781. doi: 10.1073/pnas.1604519113
- [18] Park D, Na M, Kim JA, et al. Activation of CaMKIV by soluble amyloid- β -1-42 impedes trafficking of axonal vesicles and impairs activity-dependent synaptogenesis[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(487): eaam8661. doi:10.1126/scisignal.aam8661
- [19] Brito MA, Rosa AI, Falcão AS, et al. Unconjugated bilirubin differentially affects the redox status of neuronal and astroglial cells[J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(1): 30-40. doi:10.1016/j.nbd.2007.07.023
- [20] Rodrigues CMP, Solá S, Brito MA, et al. Bilirubin directly disrupts membrane lipid polarity and fluidity, protein order, and redox status in rat mitochondria[J]. *J Hepatol*, 2002, 36(3): 335-341. doi:10.1016/s0168-8278(01)00279-3
- [21] Bianco A, Dvůřák A, Capková N, et al. The extent of intracellular accumulation of bilirubin determines its anti- or pro-oxidant effect[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8101. doi:10.3390/ijms21218101
- [22] Vasavda C, Kothari R, Malla AP, et al. Bilirubin links heme metabolism to neuroprotection by scavenging superoxide[J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(10): 1450-1460.e7. doi:10.1016/j.chembiol.2019.07.006
- [23] Meixiong J, Vasavda C, Green D, et al. Identification of a bilirubin receptor that may mediate a component of cholestatic itch[J]. *eLife*, 2019, 8: e44116. doi:10.7554/elife.44116
- [24] Gordon DM, Hong SH, Kipp ZA, et al. Identification of binding regions of bilirubin in the ligand-binding pocket of the peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) [J]. *Molecules*, 2021, 26(10): 2975. doi:10.3390/molecules26102975
- [25] Koga T, Otomo K, Mizui M, et al. Calcium/calmodulin-dependent kinase IV facilitates the recruitment of interleukin-17-producing cells to target organs through the CCR6/CCL20 axis in Th17 cell-driven inflammatory diseases[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(8): 1981-1988. doi:10.1002/art.39665
- [26] Koga T, Sato T, Furukawa K, et al. Promotion of calcium/calmodulin-dependent protein kinase 4 by GLUT1-dependent glycolysis in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(5): 766-772. doi: 10.1002/art.40785
- [27] Pezhouman A, Singh N, Song Z, et al. Molecular basis of hypokalemia-induced ventricular fibrillation [J]. *Circulation*, 2015, 132(16): 1528-1537. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016217
- [28] Santulli G, Cipolletta E, Sorriento D, et al. CaMK4 gene deletion induces hypertension [J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(4): e001081. doi: 10.1161/JAHA.112.001081
- [29] Wong MH, Samal AB, Lee MK, et al. The KN-93 molecule inhibits calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity by binding to Ca²⁺/CaM [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(7): 1440-1459. doi:10.1016/j.jmb.2019.02.001
- [30] Lin ZD, Xu GY, Lu X, et al. Piezo1 exacerbates inflammation-induced cartilaginous endplate degeneration by activating mitochondrial fission via the Ca²⁺/CaMKII/Drp1 axis[J]. *Aging Cell*, 2024: e14440. doi: 10.1111/ace1.14440
- [31] Lu S, Liao ZD, Lu XY, et al. Hyperglycemia acutely increases cytosolic reactive oxygen species via O-linked GlcNAcylation and CaMKII activation in mouse ventricular myocytes[J]. *Circ Res*, 2020, 126(10): 80-96. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.316288
- [32] Zhao YL, James NA, Beshay AR, et al. Adult zebrafish ventricular electrical gradients as tissue mechanisms of ECG patterns under baseline vs. oxidative stress [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(8): 1891-1907. doi:10.1093/cvr/cvaa238
- [33] Ni YJ, Deng J, Bai HY, et al. CaMKII inhibitor KN-93 impaired angiogenesis and aggravated cardiac remodeling and heart failure via inhibiting NOX2/mtROS/p-VEGFR2 and STAT3 pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(2): 312-325. doi:10.1111/jcmm.17081
- [34] Dai XM, Meng JS, Deng SK, et al. Targeting CAMKII to reprogram tumor-associated macrophages and inhibit tumor cells for cancer immunotherapy with an injectable hybrid peptide hydrogel [J]. *Theranostics*, 2020, 10(7): 3049-3063. doi:10.7150/thno.42385
- [35] Fu LY, Zhang Y, Farokhzad RA, et al. 'Passive' nanoparticles for organ-selective systemic delivery: design, mechanism and perspective[J]. *Chem Soc Rev*, 2023, 52(21): 7579-7601. doi:10.1039/d2cs00998f
- [36] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(2): 101-124. doi:10.1038/s41573-020-0090-8