

doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2025.054

· 上海市第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科献礼“六院 120 周年”纪念专题 ·

NAD⁺ 对顺铂所致毛细胞氧化应激损伤的拮抗作用及相关基因表达调控

陈铭, 柯冰冰, 崔雅琦, 吴翠萍, 陈正依, 李春燕, 殷善开

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 200233

摘要: **目的** 探究烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)对顺铂(cisplatin, Cis)诱导耳毒性的拮抗效果和机制。**方法** 体外实验采用 HEI-OC1 细胞系和出生后 3 d 的 C57BL/6J 乳鼠耳蜗基底膜培养模型,评估 NAD⁺对 Cis 毒性的拮抗作用;在体实验通过鼓室注射 Cis 和 NAD⁺于 C57BL/6J 成年小鼠,并进行听觉脑干反应测试;采用转录组测序分析 HEI-OC1 细胞中 Cis 组与 Cis+NAD⁺组之间的差异基因;定量聚合酶链式反应对关键基因进行验证。**结果** NAD⁺能够显著提高 HEI-OC1 细胞在 Cis 处理下的细胞活力,并有效减少细胞凋亡。NAD⁺显著提高耳蜗毛细胞的存活率以及减少活性氧的产生,并有效拮抗 Cis 引起的听力损失。转录组分析结果显示,Cis+NAD⁺组中共有 204 个基因上调表达、214 个基因下调表达,差异表达基因显著富集于“铂类药物抗药性”和“谷胱甘肽代谢”等信号通路,并且 Gstm6 和 Gsta2 与抗氧化应激、药物代谢和细胞保护相关的关键基因表达显著上调。**结论** NAD⁺在一定程度上能够拮抗 Cis 引起的耳毒性,其机制可能与调控谷胱甘肽代谢通路从而拮抗氧化应激损伤有关,提示了 NAD⁺具有一定的治疗潜力。

关键词: 顺铂;毛细胞;基底膜;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;活性氧;氧化应激;听力障碍

中图分类号:R764.43

文献标志码:A

文章编号:1673-3770(2025)03-0011-08

引用格式:陈铭,柯冰冰,崔雅琦,等. NAD⁺对顺铂所致毛细胞氧化应激损伤的拮抗作用及相关基因表达调控[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2025, 39(3):11-18. CHEN Ming, KE Bingbing, CUI Yaqi, et al. The antagonistic effects of NAD⁺ on cisplatin-induced oxidative stress injury in hair cells and the regulation of related gene expression[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(3):11-18.

The antagonistic effects of NAD⁺ on cisplatin-induced oxidative stress injury in hair cells and the regulation of related gene expression

CHEN Ming, KE Bingbing, CUI Yaqi, WU Cuiping, CHEN Zhengnong, LI Chunyan, YIN Shankai

Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China

Abstract: Objective The present study aims to investigate the effect and underlying mechanism of nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺). The present study aims to explore the mitigating effect of NAD⁺ on cisplatin-induced ototoxicity, with a view to elucidating the underlying mechanism. **Methods** *In vitro*, HEI-OC1 cells and cochlear basement membrane cultures from 3-day-old C57BL/6J mice were utilized to evaluate the protective effects of NAD⁺ against cisplatin-induced toxicity. *In vivo*, the administration of cisplatin and NAD⁺ was conducted via tympanic injections in adult C57BL/6J mice, followed by auditory brainstem response testing. Transcriptome sequencing was performed to analyze differential gene expression between the cisplatin and cisplatin+ NAD⁺ groups in HEI-OC1 cells, and the quantitative polymerase chain reaction was applied to validate the key genes. **Results** The present study investigates the impact of NAD⁺ on the viability of HEI-OC1 cells exposed to cisplatin, with a particular focus on the phenomenon of apoptosis. The results demonstrate a significant enhancement in cell viability in the presence of NAD⁺, accompanied by a substantial reduction in apoptosis. In the cochlear basilar membrane model, NAD⁺ significantly increased hair cell survival and decreased reactive oxygen species (ROS) production. Furthermore, NAD⁺ effectively mitigated cisplatin-induced hearing loss *in vivo*. Transcriptome analysis revealed 204 genes to be significantly overexpressed and 214 genes to be significantly underexpressed in the cisplatin + NAD⁺ group, with differential genes notably enriched in the Platinum drug resistance and Glutathione metabolism pathways. Key genes associated with oxidative stress, drug metabolism, and cyto-protection, such as Gstm6 and Gsta2 were signifi-

收稿日期:2025-02-10

基金课题:国家自然科学基金优秀青年科学基金(82322020);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

cantly upregulated. **Conclusion** NAD⁺ has been demonstrated to possess a protective effect against cisplatin-induced ototoxicity, potentially by modulating the glutathione metabolism pathway in order to counteract oxidative stress. Consequently, these findings imply that NAD⁺ has therapeutic potential in preventing cisplatin-induced hearing loss.

Key words: Cisplatin; Hair cells; Cochlear basement membrane; Nicotinamide adenine dinucleotide; Reactive oxygen species; Oxidative stress; Hearing impairment

顺铂(cisplatin, Cis)作为第一代含铂类抗癌药物,广泛应用于多种恶性肿瘤的治疗^[1]。然而,Cis引发的感音神经性听力损失(cisplatin-induced hearing loss, CIHL)是临床治疗中最为严重的剂量限制性毒性之一^[2-3]。流行病学调查显示,Cis造成的耳毒性发病率高达 11%~97%,平均发病率约为 62%^[4],但目前临床上仍缺乏有效的防治手段^[5]。研究表明 Cis 通过诱导耳蜗内氧化应激和炎症反应导致毛细胞损伤,这是耳毒性发生的主要病理机制^[6]。基于这一机制,氨磷汀、双硫仑和硫代硫酸钠等药物虽被报道具有缓解 Cis 耳毒性的潜力,但由于其毒性较大、临床证据不足、价格昂贵及作用机制不明确等问题,尚未实现临床转化^[7]。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)作为细胞能量代谢和氧化还原反应的核心辅酶,在调控氧化应激、维持细胞稳态等方面发挥关键作用^[8-9]。目前,烟酰胺、烟酸和烟酰胺核苷等 NAD⁺前体已被证实能够在一定程度上减轻氨基糖苷类和铂类药物诱导的毛细胞损伤^[9-11]。然而,NAD⁺前体在代谢过程中可能产生不良反应,且存在合成工艺复杂、成本较高等局限性^[12-13]。目前 NAD⁺本体是否能够直接拮抗 Cis 诱导的氧化应激并保护毛细胞尚未明确。为此,我们进行此研究旨在探讨 NAD⁺本体对 Cis 诱导的耳毒性的防护作用,并通过转录组学技术深入解析其潜在作用机制,以此为推进 Cis 耳毒性的药物防治提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 实验动物

6~8 周龄的 C57BL/6J 雄性小鼠购于北京斯贝福公司;出生 3 d 的雄性乳鼠购于上海杰斯捷实验动物有限公司。小鼠的饲养和实验操作严格遵守上海交通大学医学院附属上海市第六人民医院动物管理中心规定,并通过动物伦理委员会审核(DWLL2023-0404)。

1.1.2 主要材料与试剂

高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶、DMEM/F12 培养基、B27 添加剂、N2 添加剂和胎牛血清购自美国

Gibco 公司; Cis 粉末、NAD⁺粉末和 CCK8 试剂盒购自美国 MCE 公司;含 7-AAD 的 APC 膜联蛋白 V 细胞凋亡检测试剂盒购于中国达科为公司;鼠尾胶原蛋白 I 型购自美国的 Corning 公司;抗 Myosin-VIIa 抗体(DSHB_MY07A 138-1)购自美国的派克生物公司;荧光二抗购自美国的 Abcam 公司;Mito-sox 染剂购自美国 ThermoFisher Scientific 公司;4%的多聚甲醛、Triton X-100 和 BSA 购自中国生工生物工程(上海)股份有限公司;RNAeasy™动物 RNA 抽提试剂盒(离心柱式)购自中国上海碧云天生物技术有限公司;BME 粉末和 DAPI 染色封片剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司。RNA 纯化试剂盒、有色反转录试剂盒和彩色 SYBR 试剂盒 2X(货号:A0012-R2)购自美国 EZBioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞生存率测试

在高糖 DMEM 培养基中加入体积分数为 5% 的胎牛血清和青霉素链霉素双抗(青霉素浓度为 100 U/mL,链霉素浓度为 0.1 mg/mL)。在 33 ℃、10% CO₂ 的培育环境中进行细胞培养。初始孵育药物 24 h 后加入 CCK8 试剂,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下孵育 2 h,随后使用酶标仪检测 HEI-OC1 细胞存活率。

1.2.2 流式细胞术

在消化贴壁的 HEI-OC1 细胞时,使用胰蛋白酶处理并将其悬浮于膜联蛋白(Annexin V)结合缓冲液中,调整细胞浓度至(0.25~1.00)×10⁷ 细胞/mL。随后,将 100 μL 细胞悬液转移至试管中,加入 5 μL 藻红蛋白(allophycocyanin, APC)标记的 Annexin V 荧光染料和 5 μL 7-氨基-放线菌素 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD)染料,轻轻涡旋混匀,并在室温下避光孵育 15 min。结束后再向每个试管中加入 400 μL Annexin V 结合缓冲液,最后将样品置于流式细胞仪中进行检测与分析。Annexin V 是一种膜结合蛋白,能够特异性识别并结合暴露在细胞膜外侧的磷脂酰丝氨酸,是细胞凋亡的重要标志。APC 是一种荧光染料,可与 Annexin V 共价结合,形成 Annexin V-APC 探针,结合具有高 DNA 结合常数的 7-AAD 染料,可用于流式细胞术中区分早期凋亡(Annexin V 阳性/7-AAD 阴性)和晚期凋亡或坏死

细胞(Annexin V 阳性/7-AAD 阳性)。

1.2.3 耳蜗基底膜培养

基底膜培养是体外模拟基底膜体内环境来维持毛细胞生长存活的技术。首先,将鼠尾胶原蛋白、2%碳酸钠溶液和 10×BME 按 9:1:1 的比例混合制备胶原凝胶。取 20 μL 胶原凝胶滴入基底膜培养皿中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min,直到凝胶完全固化。随后,对出生 3 d 的 C57BL/6J 小鼠进行头部消毒并麻醉。使用眼科剪切开后颅骨,通过粗镊子取出两侧耳蜗,换用细镊子轻轻取出耳蜗中的基底膜并放置于基底膜培养皿中的胶原凝胶上,静置 10 min,确保基底膜与凝胶充分接触。制备含有 DMEM/F12 培养基、B27 和 N2 添加剂的基底膜培养基,轻轻添加至基底膜周围。移入培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、20% O_2 和 75% N_2) 中进行孵育。离体培养的基底膜分为对照组(无处理)、Cis 组(10 μM Cis)和 Cis+NAD⁺组(10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 与 20 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺联合用药),Cis 和 NAD⁺孵育 24 h 后在无处理培养基中恢复 48 h。

1.2.4 免疫荧光染色

将基底膜周围的原有培养基取出,并且在含有 5 mmol/L 的 Mito-sox 新培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 30 min。培养结束后,在室温下用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定 30 min。随后用体积分数为 1% 的 Triton X-100 溶液进行处理 30 min,BSA 溶液封闭 1 h 以减少非特异性结合。基底膜在室温下与 1:200 稀释的抗 Myosin-VIIa 抗体孵育过夜。次日,使用 PBS 清洗基底膜 30 min,用 BSA 稀释的荧光二抗(1:1 000)在室温下孵育 2 h。PBS 清洗 2 次,每次 10 min,最后滴入含 DAPI 的封片剂,使用共聚焦显微镜(Carl Zeiss AG 公司,德国)进行成像观察。采用 Myosin-VIIa(绿色荧光)标记毛细胞,Mito-sox(红色荧光)染色检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,ROS 是氧化应激的一个重要指标^[14-15]。毛细胞计数在共聚焦显微镜 20×和 63×镜下拍照,计算每 100 μm 基底膜的毛细胞数量。

1.2.5 听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)测试

将成年小鼠随机分为对照组、Cis 组和 Cis+NAD⁺组。采用消毒过的针头轻微刺破小鼠的鼓膜,通过 Microfil 微量管从鼓膜孔洞处分别对对照组、Cis 组和 Cis+NAD⁺组注入生理盐水、0.01 mL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis、0.01 mL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 与 20 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺。鼓室注射前 1 天和后 3 天分别进行开放声场 ABR 记录,测定各频率的听力阈值,并观察记录

两次检测时阈值的差值。

ABR 实验均在隔声屏蔽室内进行。首先,采用腹腔注射 1% 戊巴比妥(75 mg/kg)对小鼠进行麻醉,并将小鼠安置于恒温加热垫上以维持其体温在 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右。使用金霉素眼膏涂抹小鼠裸露的眼部,防止造成眼部损伤。在电极定位方面,记录电极插入小鼠头皮正中皮下,参考电极放置于小鼠两侧乳突下。通过不同频率(4.0、8.0、16.0、22.6、32.0、45.2 kHz)的短纯音刺激声进行听力测试,刺激声强度从 90 dB 起始,每次递减 5 dB,直到无法检测到响应为止。该过程旨在确定小鼠在不同频率下的听力阈值,并进一步分析其听力变化。

1.2.6 转录组测序及分析

对经过 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 作用 24 h 的 HEI-OC1 细胞,以及在 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 NAD⁺联合用药 24 h 的 HEI-OC1 细胞进行转录组测序,每 3 个复孔作为 1 个样本,每组各 3 个样本。转录组测序和分析由北京贝瑞和康生物技术有限公司进行。首先对 RNA 进行提取,使用 Nanodrop(ThermoFisher Scientific 公司,美国)进行 RNA 浓度和纯度测定,确保 RNA 质量符合测序要求,再进行反转录合成 cDNA 和文库构建。使用高通量测序平台对 cDNA 文库进行测序,再进行测序数据过滤,以获得高质量数据用于后续数据分析。使用 edgeR 软件进行差异表达分析,筛选显著差异表达的基因,筛选阈值为:log₂ 差异倍数 ≥ 1 且 $P < 0.05$ 。接着再对差异基因进行基因本体(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)路径富集分析。

1.2.7 定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)

利用 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 或 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 联合 20 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺孵育 HEI-OC1 细胞 24 h,每组 3 个样本,随后分别在每个样本中加入 200 μL 的裂解液,使用 RNA 纯化试剂盒提取 RNA。根据 RNA 浓度使用反转录试剂盒反转 RNA 为互补 cDNA,再利用彩色 SYBR 试剂盒进行实时定量分析,每个样本设置 3 个复孔,根据目标 RNA 的 GAPDH 水平计算 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 值。小鼠 GAPDH 正向引物为 CCCTCAAGATTGTCAGCAATG,反向引物为 AGTTGTCATGGATGACCTTGG。Gsta2 正向引物为 CGGGAATTTGATGTTTGACC,反向引物为 AGAATG-GCTCTGGTCTGTGC。Gstm6 正向引物为 CT-GAGCGTTGCTATCTCGGAG,反向引物为 TTCT-GTGTATTCCAGGAGCAGC。

1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism 9.5 软件进行数据分析及作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用 Turkey 进行两两比较。对于仅包含两组的比较,采用非配对 t 检验进行分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 NAD⁺对 Cis 诱导的 HEI-OC1 细胞损伤的保护作用

细胞存活率结果显示,使用不同浓度梯度的 Cis(0、1、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HEI-OC1 细胞 24 h 后,以 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cis 作为对照,细胞在 1、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cis 中的存活率分别为 $(94.34 \pm 4.88)\%$ 、 $(80.63 \pm 6.13)\%$ 、 $(55.58 \pm 4.24)\%$ 、 $(28.81 \pm 9.28)\%$ 、 $(24.36 \pm 1.32)\%$,表明 Cis 浓度越大,HEI-OC1 细胞的存活率越小(图 1A)。10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 作用 24 h 后,HEI-OC1 细胞的活力下降约 50%,基

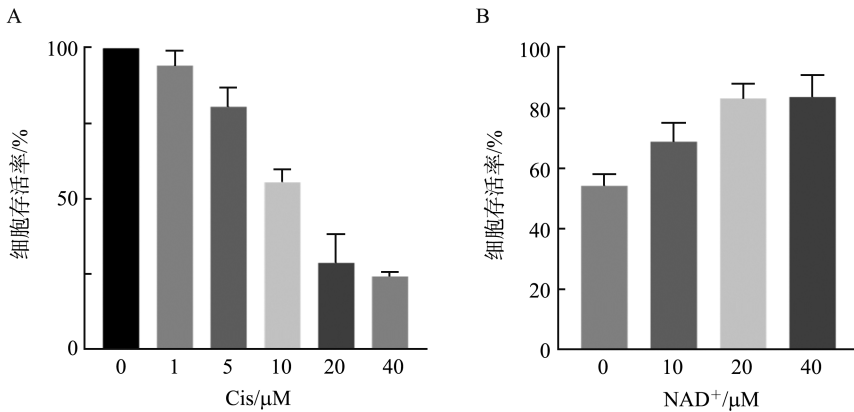


图 1 NAD⁺对 Cis 诱导的 HEI-OC1 细胞活性损伤的保护作用

A: 不同浓度的 Cis 对细胞活性的影响; B: 不同浓度的 NAD⁺对 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 所致细胞活性损伤的干预效果

Figure 1 The protective effect of NAD⁺ against Cis-induced viability damage in HEI-OC1 cells

A: The effect of different concentrations of Cis on cell viability; B: The protective effect of different concentrations of NAD⁺ against 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis-induced cell viability damage

2.2 NAD⁺对 Cis 诱导的 HEI-OC1 细胞凋亡的影响

细胞凋亡是 Cis 产生细胞毒性的最终结果,采用流式细胞术进行凋亡细胞检测,各组流式细胞代表图如图 2A 所示。流式细胞实验结果显示,对照组、Cis 组和 Cis+NAD⁺组的早期凋亡率分别为 $(1.48 \pm 0.39)\%$ 、 $(3.47 \pm 0.54)\%$ 、 $(2.06 \pm 0.41)\%$,各组之间差异具有统计学意义($F = 15.45$, $P = 0.0043$)。晚期凋亡率分别为 $(0.31 \pm 0.04)\%$ 、 $(3.91 \pm 1.07)\%$ 、 $(2.34 \pm 0.42)\%$,各组之间差异具有统计学意义($F = 22.15$, $P = 0.0017$)。与 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 组相比,NAD⁺能明显改善细胞的早期凋亡率($P = 0.020$)(图 2B)及晚期凋亡率($P = 0.063$)(图 2C),表明 NAD⁺可抑制 Cis 引起的 HEI-OC1 细胞死亡。

于此,我们在随后的所有实验中都选择了 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 浓度,以此在诱导适当细胞损伤的同时,确保有足够的细胞数量进行分析。

采用不同浓度的 NAD⁺(0、10、20 和 40 μM)和 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 共同处理 HEI-OC1 细胞,并且以未经过 Cis 和 NAD⁺处理的细胞作为对照,基于细胞存活率评估细胞活性。结果显示,0、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺和 10 $\mu\text{mol/L}$ Cis 共同处理的细胞存活率分别为 $(54.38 \pm 3.78)\%$ 、 $(69.06 \pm 6.19)\%$ 、 $(83.46 \pm 4.73)\%$ 、 $(83.84 \pm 7.20)\%$,多组间差异具有统计学意义($F = 24.76$, $P < 0.001$)。与 0 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺($P < 0.001$)和 40 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺($P < 0.001$)均可明显提高 HEI-OC1 细胞在 Cis 处理下的存活率,20 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺及 40 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺处理下的细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.999$),表明 20 μM NAD⁺已达到饱和效应。因此研究选择 20 $\mu\text{mol/L}$ NAD⁺应用于后续实验。

2.3 NAD⁺对 Cis 诱导的耳蜗基底膜毛细胞氧化应激损伤的保护作用

氧化应激在 Cis 诱导的毛细胞损伤中发挥着关键作用,ROS 的产生是氧化应激的一个重要指标。免疫荧光结果显示,对照组、Cis 组和 Cis+NAD⁺组的底回毛细胞存活数量组间差异具有统计学意义($F = 24.99$, $P = 0.0012$),分别为 $(66.33 \pm 1.53)/100 \mu\text{m}$ 、 $(27.00 \pm 8.71)/100 \mu\text{m}$ 、 $(47.00 \pm 7.81)/100 \mu\text{m}$,红色荧光强度组间也具有统计学意义($F = 125.6$, $P < 0.001$),分别为 (123.45 ± 23.01) RFU、 (440.34 ± 35.39) RFU、 (312.30 ± 6.22) RFU。与 Cis 组的基底膜相比,Cis+NAD⁺组基底膜底回存活毛细胞的数量增加($P = 0.027$),红色荧光强度降低($P =$

0.001 7),提示 ROS 水平下降(图 3)。以上结果表明 NAD⁺可有效缓解 Cis 诱导的基底膜毛细胞的氧化应激损伤。

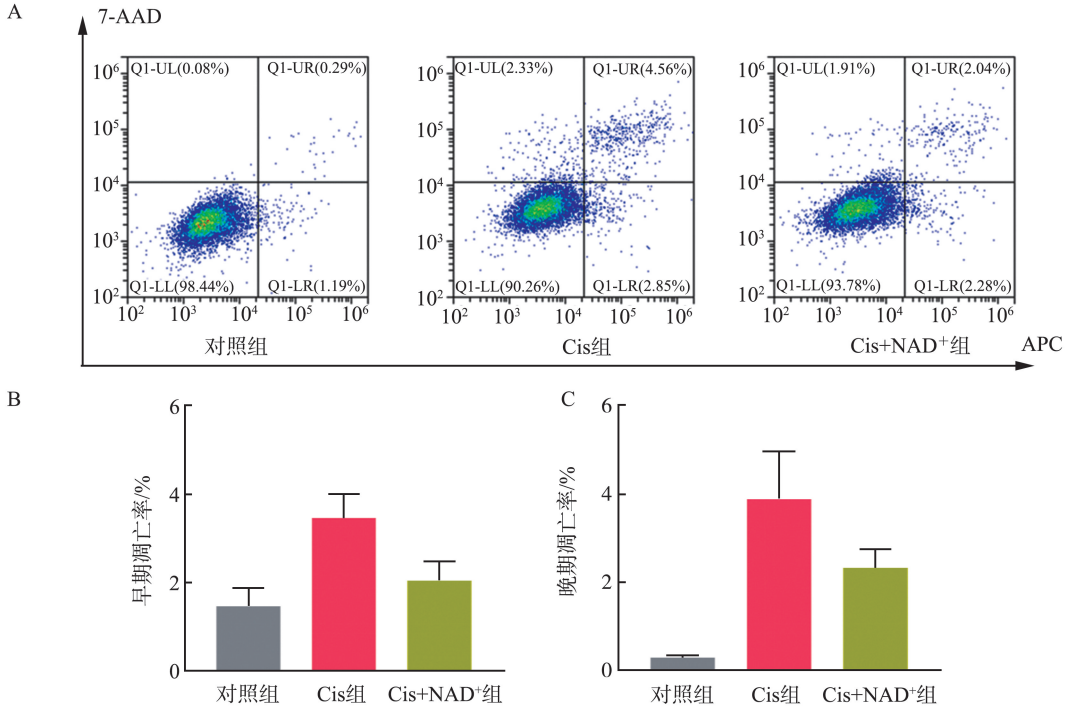


图 2 Cis 和 NAD⁺对 HEI-OC1 细胞凋亡的影响
 A: 流式细胞术各组代表图; B: 早期凋亡率; C: 晚期凋亡率
 Figure 2 Effects of Cis and NAD⁺ on apoptosis of HEI-OC1 cells
 A: Representative flow cytometry plots for each group; B: Early apoptosis rate; C: Late apoptosis rate

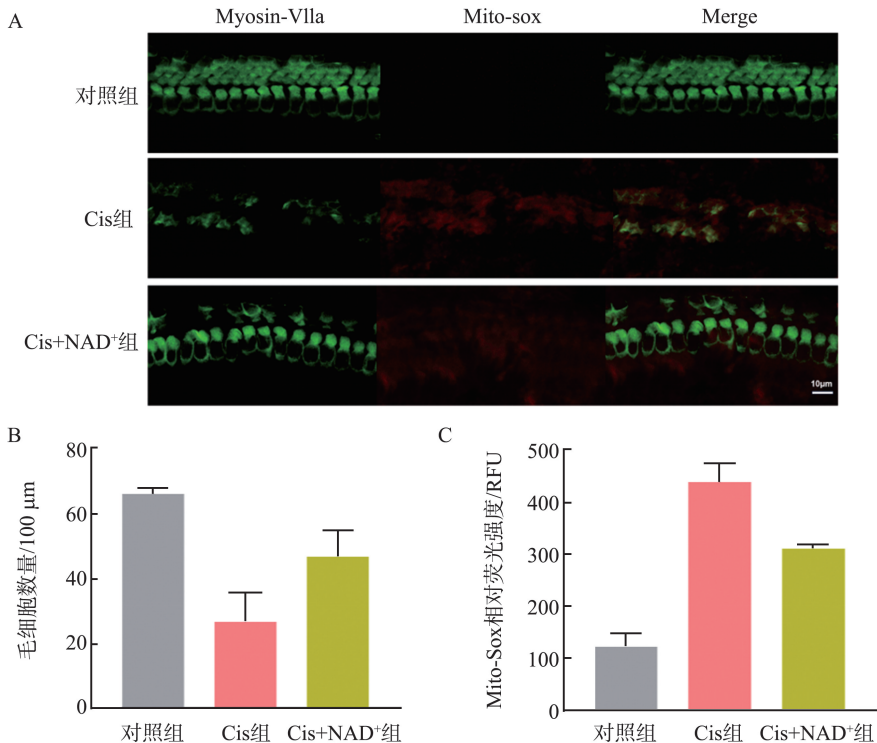


图 3 NAD⁺对 Cis 诱导的耳蜗基底膜毛细胞氧化应激损伤的保护作用
 A: 各组基底膜代表图; B: Myosin-VIIa 阳性的毛细胞计数; C: Mito-sox 阳性细胞的定量分析
 Figure 3 The protective effect of NAD⁺ against Cis-induced oxidative stress damage in cochlear basilar membrane hair cells
 A: Representative images of the basilar membrane in each group; B: Quantification of Myosin-VIIa-positive hair cells; C: Quantitative analysis of Mito-sox-positive cells

2.4 NAD⁺能有效拮抗 Cis 导致的小鼠听力损失

基于体外实验中 NAD⁺对 Cis 所致 HEI-OC1 细胞和离体培养基底膜毛细胞损伤的保护作用,我们进一步检测 NAD⁺对 Cis 所致小鼠听觉损伤的影响。

ABR 测试结果显示,所有小鼠的双耳原始听力均正常且差异无统计学意义($F=0.015, P=0.985$),见图 4A。在注射 10 μmol/L Cis 后,小鼠听力阈值相比对照组均升高,其中包括 4.0 kHz [(1.66 ± 2.89)dB vs. (30.00 ± 13.23)dB, $P=0.050$]、8.0 kHz [(5.00 ± 5.00)dB vs. (48.33 ± 24.66)dB, $P=0.023$]、16.0 kHz [(6.67 ± 2.89)dB vs. (55.00 ± 21.79)dB, $P=0.009$]、22.6 kHz [(3.33 ± 5.77)dB

vs. (60.00 ± 5.00)dB, $P<0.001$]、32.0 kHz [(8.33 ± 10.40)dB vs. (40.00 ± 5.00)dB, $P=0.025$]、45.2 kHz [(10.00 ± 13.23)dB vs. (33.33 ± 2.89)dB, $P=0.043$]这 6 个频率,见图 4B。

而 Cis+NAD⁺组的小鼠听力阈值相较于 Cis 组显著降低,包括 8.0 kHz [(48.33 ± 24.66)dB vs. (10.00 ± 0.00)dB, $P=0.041$]、16.0 kHz [(55.00 ± 21.79)dB vs. (5.00 ± 5.00)dB, $P=0.0079$]、22.6 kHz [(60.00 ± 5.00)dB vs. (8.33 ± 7.64)dB, $P<0.001$]、32.0 kHz [(40.00 ± 5.00)dB vs. (13.33 ± 12.58)dB, $P=0.0254$]这 4 个频率(图 4B、4C、4D)。以上研究表明,经鼓室共同注射 NAD⁺可显著改善 Cis 造成的听力损失。

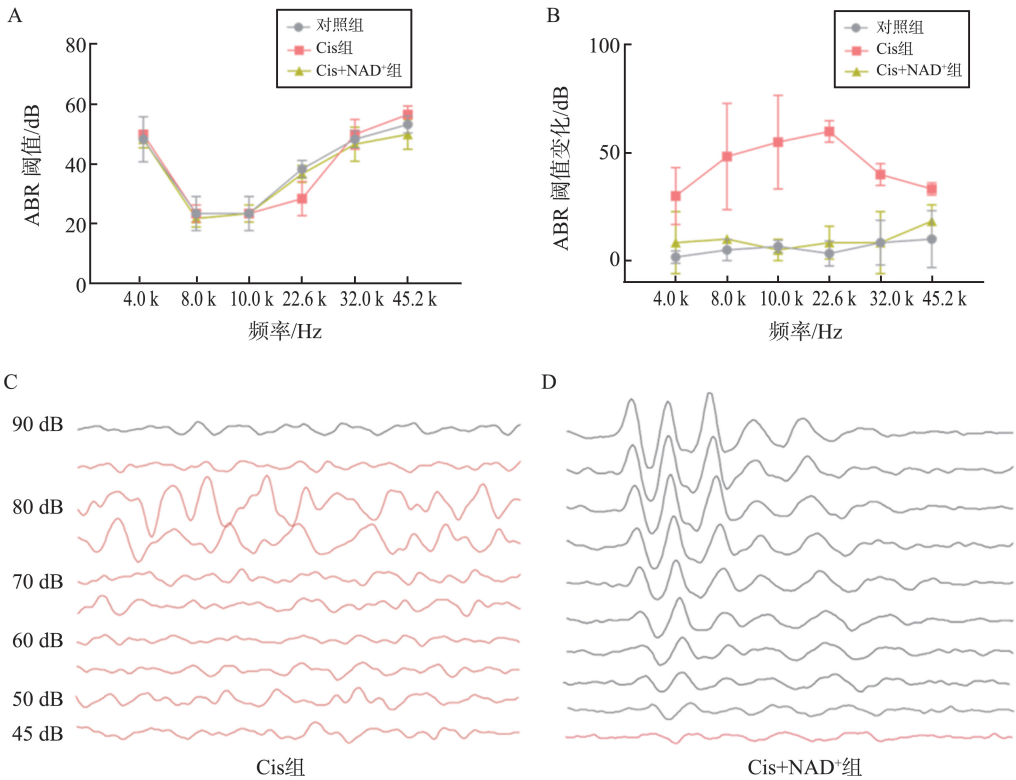


图 4 不同处理组给药前后 ABR 展示

A: 小鼠给药前 1 天的 ABR 阈值; B: 小鼠给药后 3 天 ABR 阈值与给药前 1 天 ABR 阈值的差值变化; C: Cis 组在 22.6 kHz 下的波形图; D: Cis+NAD⁺组在 22.6 kHz 下的波形图

Figure 4 ABR demonstration before and after administration of different treatment groups

A: ABR thresholds of mice one day prior to drug administration; B: Changes in ABR thresholds measured three days after drug administration, expressed as the difference from baseline; C: Representative ABR waveform at 22.6 kHz in the Cis group; D: Representative ABR waveform at 22.6 kHz in the Cis+NAD⁺ group

2.5 NAD⁺通过转录组层面影响毛细胞拮抗 Cis 诱导的损伤

为了探究 NAD⁺对 Cis 所致毛细胞损伤保护作用的潜在机制,我们分别对 Cis 处理组和 Cis 与 NAD⁺联合用药组的 HEI-OC1 细胞进行转录组测序。火山图(图 5A)显示了两组 HEI-OC1 差异表达基因的整体分布情况,共有 204 个差异基因表达上

调和 214 个差异基因表达下调。对差异基因进行 GO 的富集分析结果提示差异表达基因主要富集于衰老相关异染色质组装、谷胱甘肽代谢过程、AMPA 谷氨酸受体集群、NADPH 氧化酶复合体和谷胱甘肽转移酶活性等 GO 条目中(图 5B)。进一步对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析,结果显示 NAD⁺拮抗 Cis 造成的毛细胞损伤主要影响的通路

是铂类药物抗药性、谷胱甘肽代谢和细胞色素 P450 代谢相关等通路 (图 5C)。富集到“铂类药物抗药性”这条通路中的基因包括 *Gstm6*、*Gsta2*、*Gsta1*、*Gsta7*、*Gstp1*、*Fasl* 和 *Gstp2* (图 5D), 其中 *Gstm6* 和 *Gsta2* 在 Cis+NAD⁺ 组中显著上调, qPCR 实验也进

一步验证了这一结果 (图 5E), Cis + NAD⁺ 组的 *Gstm6* 表达水平比 Cis 组提高了 5.78 倍 ($t=3.777$, $P=0.0195$), *Gsta2* 表达水平提高了 5.28 倍 ($t=3.728$, $P=0.0203$)。

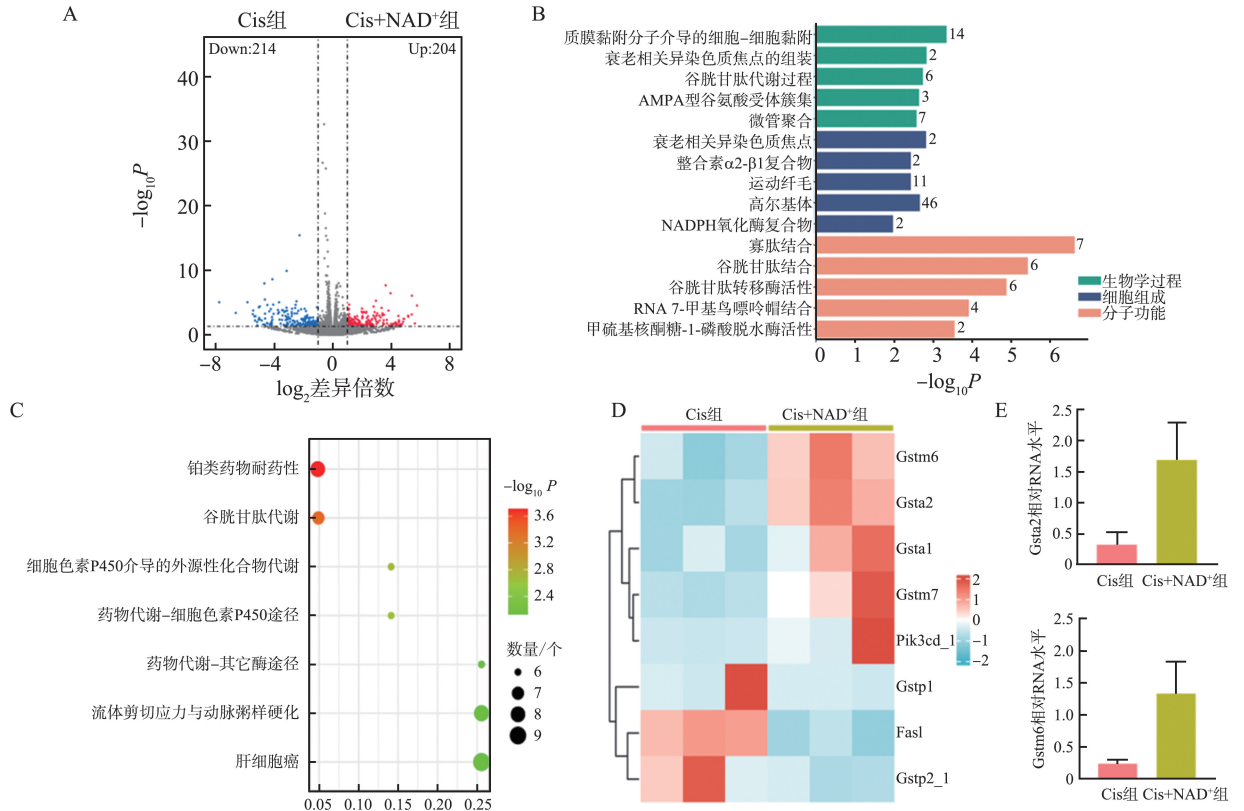


图 5 Cis 组与 Cis+NAD⁺ 组的转录组分析及验证
A: 差异基因筛选火山图; B: GO 富集分析; C: KEGG 通路富集分析; D: “铂类药物抗药性”通路的差异基因热图; E: qPCR 检测 *Gsta2* 和 *Gstm6* 基因表达差异

Figure 5 Transcriptome analysis of Cis group and Cis+ NAD⁺ group and validations
A: Differential gene screening volcano map; B: GO enrichment analysis; C: KEGG pathway enrichment analysis; D: Differential gene heatmap of Platinum drug resistance pathway; E: The validations of *Gsta2* and *Gstm6*'s expressions by qPCR

3 讨论

本研究通过细胞及动物实验证实, NAD⁺ 能显著减轻 Cis 处理后的毛细胞氧化应激损伤, 提高毛细胞活性, 减少早期及晚期毛细胞的凋亡, 从而拮抗 Cis 引起的小鼠听力损伤。这些结果提示 NAD⁺ 本体具有防治 CIHL 的重要前景和潜能。

NAD⁺ 作为细胞能量代谢和信号转导的核心调控分子, 在维持细胞稳态中发挥着不可替代的作用。研究表明^[16], NAD⁺ 水平的动态平衡与机体健康状态密切相关, NAD⁺ 水平上调可显著促进组织修复和延缓衰老进程, 而 NAD⁺ 耗竭则会增加多种疾病的易感性。在听觉系统研究中, 既往研究发现 Cis 损伤基底膜毛细胞时呈现典型的 NAD⁺ 代谢双相变化, 损伤早期 NAD⁺ 代偿性升高, 但随着损伤程度加

重 NAD⁺ 在后期被明显消耗^[10]。噪声暴露同样会引发耳蜗毛细胞 NAD⁺ 水平下降^[17], 这一发现提示 NAD⁺ 稳态失衡可能是多种外界损伤导致毛细胞损伤的共同分子机制。基于 NAD⁺ 在细胞保护中的重要作用, 目前通过补充 NAD⁺ 前体来提升细胞内 NAD⁺ 水平已成为对抗衰老、缺血再灌注损伤以及代谢性疾病的有效策略^[11]。本研究创新性地证实了 NAD⁺ 本体对毛细胞具有直接保护作用, 能够有效抵御氧化应激损伤, 这一发现不仅拓展了 NAD⁺ 的生物学功能认知, 更为防治感音神经性听力损失提供了新的理论依据。

本研究利用转录组测序分析初步揭示了 NAD⁺ 拮抗 Cis 诱导毛细胞损伤的潜在分子机制。研究发现, 谷胱甘肽代谢通路及谷胱甘肽转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 活性相关的 GO 条目显著

富集,提示 NAD⁺可能通过调控谷胱甘肽代谢平衡来拮抗 Cis 诱导的氧化应激损伤。在显著富集的 KEGG 通路中,“铂类药物抗药性”通路尤为突出。其中,GSTs 家族成员 *Gstm6* 和 *Gsta2* 的表达水平在 Cis+NAD⁺组中明显上调。*Gstm6* 和 *Gsta2* 能够催化谷胱甘肽与多种亲电子化合物(包括 Cis)的结合,在抗氧化应激和药物解毒过程中发挥重要作用^[18-19]。这些结果表明,NAD⁺可能通过激活 GSTs 介导的抗氧化防御系统,增强细胞对 Cis 的解毒能力,从而减少 Cis 诱导的 ROS 积累,最终减轻 Cis 对毛细胞的损伤。这一发现提示 GSTs 介导的谷胱甘肽代谢途径可能是 NAD⁺拮抗 Cis 耳毒性的关键分子靶点。

相较于 NAD⁺前体,NAD⁺本体在临床转化应用中具有显著优势:①NAD⁺本体无需经过复杂的代谢转化过程即可直接发挥生物学功能,这确保了其作用的高效性和即时性;②NAD⁺本体的使用避免了前体代谢过程中可能产生的中间代谢产物积累,降低了潜在的毒副作用风险;③NAD⁺本体的剂量效应关系更为明确,有利于临床精准用药。此外,NAD⁺本体的作用机制更为直接,可以快速补充细胞内 NAD⁺库,在急性损伤保护方面具有独特优势。这些特性使得 NAD⁺本体在临床转化应用中具有更高的安全性和可靠性,特别是在需要快速起效的临床场景中,如 Cis 诱导的急性耳毒性防护等方面展现出独特的应用价值。然而,NAD⁺拮抗 Cis 诱导毛细胞损伤的具体分子机制仍不清楚,下游信号通路及关键分子尚未明确,后续需要结合分子生物学实验进行探究。

研究证实 NAD⁺本体在拮抗 Cis 诱导耳毒性中的显著保护效果,并通过转录组分析发现 NAD⁺可能通过调控谷胱甘肽代谢通路和激活 GSTs 介导的抗氧化防御系统,保护毛细胞免受损伤。

参考文献:

- [1] Rancoule C, Guy JB, Vallard A, et al. 50th anniversary of cisplatin[J]. *Bull Cancer*, 2017, 104(2): 167-176. doi:10.1016/j.bulcan.2016.11.011
- [2] Karasawa T, Steyger PS. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 237(3): 219-227. doi:10.1016/j.toxlet.2015.06.012
- [3] Hazlitt RA, Min J, Zuo J. Progress in the development of preventative drugs for cisplatin-induced hearing loss[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(13): 5512-5524. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01653
- [4] Marshak T, Steiner M, Kaminer M, et al. Prevention of cisplatin-induced hearing loss by intratympanic dexamethasone: a randomized controlled study[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2014, 150(6): 983-990. doi:10.1177/0194599814524894
- [5] Laurell G. Pharmacological intervention in the field of ototoxicity[J]. *HNO*, 2019, 67(6): 434-439. doi:10.1007/s00106-019-0663-1
- [6] Gentilin E, Simoni E, Candito M, et al. Cisplatin-induced ototoxicity: updates on molecular targets [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(12): 1123-1132. doi:10.1016/j.molmed.2019.08.002
- [7] Freyer DR, Brock PR, Chang KW, et al. Prevention of cisplatin-induced ototoxicity in children and adolescents with cancer: a clinical practice guideline[J]. *Lancet Child Adolesc Health*, 2020, 4(2): 141-150. doi:10.1016/S2352-4642(19)30336-0
- [8] Katsyuba E, Romani M, Hofer D, et al. NAD⁺ homeostasis in health and disease[J]. *Nat Metab*, 2020, 2(1): 9-31. doi:10.1038/s42255-019-0161-5
- [9] Kim HJ, Oh GS, Shen A, et al. Augmentation of NAD(+) by NQO1 attenuates cisplatin-mediated hearing impairment[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(6): e1292. doi:10.1038/cddis.2014.255
- [10] Zhan T, Xiong H, Pang JQ, et al. Modulation of NAD⁺ biosynthesis activates SIRT1 and resists cisplatin-induced ototoxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 349: 115-123. doi:10.1016/j.toxlet.2021.05.013
- [11] Fang J, Wu HM, Zhang JN, et al. A reduced form of nicotinamide riboside protects the cochlea against aminoglycoside-induced ototoxicity by SIRT1 activation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 113071. doi:10.1016/j.biopha.2022.113071
- [12] Hwang ES, Song SB. Possible adverse effects of high-dose nicotinamide: mechanisms and safety assessment [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 687. doi:10.3390/biom10050687
- [13] Shen Q, Zhang SJ, Xue YZ, et al. Biological synthesis of nicotinamide mononucleotide [J]. *Biotechnol Lett*, 2021, 43(12): 2199-2208. doi:10.1007/s10529-021-03191-1
- [14] Dehne N, Lautermann J, Petrat F, et al. Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 174(1): 27-34. doi:10.1006/taap.2001.9171
- [15] Guo XR, Bai XH, Li L, et al. Forskolin protects against cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting apoptosis and ROS production[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 530-536. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.080