

# 不同发育时期小鼠初级听觉皮层中芳香化酶及雌激素受体表达与听力的相关性

唐茜<sup>1</sup>, 黄茂凌<sup>1</sup>, 张吉强<sup>2</sup>, 钟诚<sup>1</sup>

1. 陆军军医大学第一附属医院 耳鼻咽喉科, 重庆 400038

2. 陆军军医大学基础医学院 神经生物学教研室, 重庆 400038

**摘要:**目的 探讨初级听皮层(primary auditory cortex, A1)中芳香化酶(aromatase, AROM)及三种雌激素受体(estrogen receptors, ERs):雌激素受体 $\alpha$ (estrogen receptor alpha, ER $\alpha$ )、雌激素受体 $\beta$ (estrogen receptor beta, ER $\beta$ )和G蛋白偶联受体30(G protein-coupled receptor, GPR30)在听觉发育中的表达及作用。方法 选取出生后7日龄(P7)、14日龄(P14)、21日龄(P21)、30日龄(P30)和60日龄(P60)的C57BL/6J雄性小鼠,采用听觉脑干诱发电位(auditory brainstem response, ABR)检测听阈;采用qRT-PCR、Western blotting、免疫组化等检测小鼠A1内AROM和ERs表达变化;进行表达量与听阈的Spearman相关性分析。结果 ABR从P14可检测后持续下降( $P < 0.05$ ),于P30达到成熟水平。qPCR显示AROM、GPR30和ER $\beta$ 表达随日龄递增( $P < 0.05$ );ER $\alpha$ 在P30时达到峰值( $P < 0.05$ )。蛋白水平(Western blotting和免疫组化)实验的结果表明AROM和ERs的表达量随发育显著升高( $P < 0.05$ )。Spearman相关性分析结果表明,AROM、ER $\beta$ 的表达与听力阈值的发育变化为强相关( $|r_s|$ 分别为0.75、0.72),GPR30呈弱相关( $|r_s|$ 为0.64),ER $\alpha$ 无显著相关性。结论 小鼠出生后听力逐渐发育完善,A1内AROM及GPR30、ER $\beta$ 表达水平逐渐升高,提示AROM-GPR30/ER $\beta$ 信号轴可能促进了小鼠听觉功能的建立和成熟。

**关键词:**芳香化酶;雌激素;雌激素受体;雌激素受体 $\alpha$ ;雌激素受体 $\beta$ ;G蛋白偶联受体30;听皮层

中图分类号:R339.16

文献标志码:A

文章编号:1673-3770(2025)06-0046-08

**引用格式:**唐茜,黄茂凌,张吉强,等.不同发育时期小鼠初级听觉皮层中芳香化酶及雌激素受体表达与听力的相关性[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2025,39(6):46-53. TANG Xi, HUANG Maoling, ZHANG Jiqiang, et al. Developmental expression patterns of aromatase and estrogen receptors in the mouse primary auditory cortex and their correlation with hearing function[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(6):46-53.

## Correlation between aromatase and estrogen receptor expression in the primary auditory cortex of mice at different developmental stages and hearing ability

TANG Xi<sup>1</sup>, HUANG Maoling<sup>1</sup>, ZHANG Jiqiang<sup>2</sup>, ZHONG Cheng<sup>1</sup>

1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of the Army Military Medical University, Chongqing, 400038, China

2. Department of Neurobiology, College of Basic Sciences, Army Military Medical University, Chongqing, 400038, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression and potential regulatory roles of aromatase (AROM) and three estrogen receptors (ERs)—estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), estrogen receptor beta (ER $\beta$ ), and G protein-coupled receptor 30 (GPR30)—in the primary auditory cortex (A1) during auditory development. **Methods** Male C57BL/6J mice at different postnatal stages—postnatal day 7 (P7), P14, P21, P30, and P60—were selected. Auditory thresholds were measured by auditory brainstem response (ABR), and qRT-PCR, Western blotting, and immunohistochemistry were performed to examine the expression changes of AROM and ERs in the A1. Spearman correlation analysis was conducted between expression levels and hearing thresholds. **Results** ABR thresholds decreased significantly from P14 onward ( $P < 0.05$ ), reaching maturity at P30. qPCR revealed that the expression of AROM, GPR30, and ER $\beta$  increased with age ( $P < 0.05$ ) while ER $\alpha$  peaked at P30 ( $P < 0.05$ ). Protein levels (Western blotting and immunohistochemistry) confirmed a significant developmental increase in AROM and ERs expression ( $P < 0.05$ ). Spearman correlation analysis showed strong correlations between the developmental changes in hearing thresholds and the expression of AROM ( $|r_s| = 0.75$ ) and ER $\beta$  ( $|r_s| = 0.72$ ), a weak correlation with GPR30 ( $|r_s| = 0.64$ ), and no significant correlation with ER $\alpha$ .

**Conclusion** Postnatal auditory development in mice progressively matures, accompanied by increasing expression levels of AROM, GPR30, and ER $\beta$  in the A1. The AROM-GPR30/ER $\beta$  axis is suggested to potentially facilitate the establishment and maturation of auditory function in mice.

**Key words:** Aromatase; 17 $\beta$ -Estradiol; Estrogen receptors; ER $\alpha$ ; ER $\beta$ ; G protein coupled receptor 30; Auditory cortex

听觉损伤的机制复杂,涉及外周听觉器官、传导通路与中枢神经系统的多因素调控,目前尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。雌激素(17 $\beta$ -estradiol, E2)在听觉功能中的作用备受关注。临床研究发现,女性在绝经前听力功能优于男性,绝经后听力下降速度明显加快,而外源性雌激素治疗可部分改善绝经后女性的听力功能<sup>[2]</sup>。然而雌激素替代疗法或雌激素受体激动剂的应用存在明显局限性,包括疗效有限<sup>[3-4]</sup>,以及可能诱发雌激素反应性肿瘤等副作用<sup>[5]</sup>。因此,探索雌激素调控听觉功能的新靶点具有重要意义。

研究发现,脑组织可自主合成高水平雌激素,即脑源性雌激素<sup>[6]</sup>。这类雌激素在突触可塑性、神经保护等过程中发挥关键作用,但其对听觉功能的具体调控机制尚不清楚<sup>[7-9]</sup>。芳香化酶(aromatase, AROM)作为雌激素合成的关键酶,其表达水平直接影响局部雌激素水平<sup>[10]</sup>。研究表明,AROM基因敲除的小鼠表现出明显的听觉功能障碍<sup>[11]</sup>,提示AROM介导的雌激素合成可能参与听觉调控。此外,雌激素的三种受体——雌激素受体 $\alpha$ (estrogen receptor alpha, ER $\alpha$ )、雌激素受体 $\beta$ (estrogen receptor alpha, ER $\beta$ )和G蛋白偶联受体30(G protein-coupled receptor, GPR30)在听觉系统中的分布与功能逐渐被阐明,如螺旋神经节神经元表达的ER $\beta$ 可能介导了雌激素对耳蜗突触病变的保护作用<sup>[12-13]</sup>。然而,在高级听觉中枢初级听皮层(primary auditory cortex, A1)中,AROM与雌激素受体(estrogen receptors, ERs)的表达如何随听觉发育动态变化、是否参与调控听觉功能成熟等问题仍有待阐明。本研究通过检测小鼠不同发育阶段的听阈变化,结合A1中AROM及ERs的表达分析,旨在揭示脑源性雌激素调控听觉发育的潜在机制,为开发靶向脑源性雌激素系统的听觉保护策略提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

选取健康C57BL/6J雄性小鼠,按不同发育阶段分为5组:7日龄(P7)、14日龄(P14)、21日龄(P21)、30日龄(P30)和60日龄(P60),每组各9只(购自中国湖南斯莱克景达实验动物公司)。所有

小鼠均在SPF级屏障环境中饲养,维持12 h/12 h昼夜光照循环,自由摄食饮水,环境温度控制在20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度保持在50%~70%。本研究的动物实验方案经陆军军医大学实验动物福利与伦理委员会审批通过(批准号:AMUWEC20242056)。

#### 1.1.2 试剂

实验所用逆转录试剂盒(RR047A)和荧光定量PCR试剂盒(RR820A)购自日本Takara公司。一抗包括:AROM(货号R23529,中国成都正能生物技术公司)、ER $\alpha$ (货号ab32063,美国Abcam公司)、GPR30(货号ab39742,美国Abcam公司)、ER $\beta$ (货号PA1-311,美国ThermoFisher公司),以及内参 $\beta$ -actin(货号AA128,中国上海碧云天生物技术有限公司)。山羊抗兔IgG/辣根酶标记抗体(货号:A0208),山羊抗小鼠IgG/辣根酶标记抗体(货号:A0216),山羊抗兔IgG/生物素标记抗体(货号:A0277)、辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(货号:A0305),BCA试剂盒(货号:PP0010S)均购自中国上海碧云天生物技术有限公司。DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒(货号:ZLI-9019)购自中国北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 听觉脑干诱发电位实验检测小鼠听觉阈值变化

实验动物采用盐酸氯胺酮注射液(45 mg/kg)和甲苯噻嗪(6.4 mg/kg)按1:1比例混合腹腔注射麻醉。待麻醉起效后,将动物置于屏蔽室内恒温毯上固定。采用皮下电极记录法:颅顶正中置记录电极,测试耳乳突部置参考电极,臀部皮下置接地电极,确保各电极阻抗及极间电阻维持在1~3 k $\Omega$ 范围内。声刺激系统采用MF1扬声器,固定于距外耳道口0.5 cm处。听觉脑干诱发电位(auditory brainstem response, ABR)检测使用美国Tucker-Davis Technologies公司的RZ6测试系统进行声刺激发放和电信号采集。测试采用Click刺激,起始强度为90 dB开始,以10 dB为步长递减;接近阈值时改为5 dB步长递减。以能分辨I波或II波波形的最低刺激强度确定为阈值。每个强度水平的刺激均重复播放512次并进行信号平均,以获得稳定可重复的ABR波形。测试结束后,将动物置于恒温毯上观察至完全苏醒。其中查阅文献可得,P7小鼠外耳道未

开放,无法行 ABR 测试(阈值记为 90 dB)<sup>[14-15]</sup>。

### 1.2.2 qRT-PCR 检测 AROM 和 ERs 的表达

#### 1.2.2.1 RNA 提取与 cDNA 合成

取各组小鼠听皮层组织,采用 Trizol 抽提总 RNA。随后按照逆转录试剂盒操作说明书操作流程,将 mRNA 逆转录为 cDNA。

#### 1.2.2.2 qRT-PCR 反应体系与条件

采用荧光定量 PCR 试剂盒进行检测,反应体系 20  $\mu$ L。反应程序设置为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95  $^{\circ}$ C 变性 5 s;60  $^{\circ}$ C 退火 20 s;72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s;重复 39 个循环;熔解曲线分析的温度梯度为:55~95  $^{\circ}$ C,升温速率为每 5 s 递增 0.5  $^{\circ}$ C,实时读取荧光信号。实验在 CFX96 实时荧光定量 PCR 检测系统(美国 Bio-Rad 公司)上进行。目的基因的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行计算。目的基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

基因	方向	序列(5'-3')
Cyp19a1	forward	GTCACTACATCTCCCGA
	reverse	CTCCACACAAACTTCCAC
Esr1	forward	TGAAAGGCGGCATACGG
	reverse	CAAGGACAAGGCAGGGCTA
Esr2	forward	ATGCTCCTGGCGACGAC
	reverse	CTTCTGGCTTGCGGTAG
Gper1	forward	ATCCTGGTGGCTGACTCCC
	reverse	TGCGTGGTGGCTTGGTGC
$\beta$ -actin	forward	GTGACGTTGACATCCGTAAGA
	reverse	GCCGGACTCATCGTACTCC

### 1.2.3 Western blotting 法检测 AROM 和 ERs 的表达

取各组小鼠听皮层组织,裂解、离心并收集上清液,获得蛋白样本。采用 BCA 法测定蛋白质量。根据测定结果,用上样缓冲液调整蛋白样品质量至 5  $\mu$ g/ $\mu$ L。每孔上样量为 10  $\mu$ L。电泳条件为:分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%;电压 80 V 电泳 30 min 后转为 120 V 电泳 60 min。采用湿转法转至 PVDF 膜,转膜条件为 200 mA,120 min。转膜后用脱脂奶粉(TBST 缓冲液配制),室温摇床封闭 1 h。封闭后分别加入一抗,稀释比例为:AROM (1:1 000)、ER $\alpha$  (1:1 000)、ER $\beta$  (1:1 000)、GPR30 (1:250)和  $\beta$ -actin (1:1 000),4  $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。过夜后用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。洗膜后加入辣根酶标记的二抗(1:1000)室温摇床孵育 2 h。孵育完成后用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。最后加入 ECL 化学发光试剂显影;采用化学发光成

像系统 FUSION FX(法国 VILBER 公司)采集图像、Image J2 2.3.0 软件进行条带灰度值分析。以  $\beta$ -actin 为内参计算目的蛋白相对表达量。

### 1.2.4 免疫组织化学染色检测 AROM 和 ERs 的表达

石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,采用柠檬酸钠缓冲液(pH=6.0)进行抗原修复,3%过氧化氢溶液室温孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶;PBS 清洗 3 次后,加入 10%山羊血清封闭液室温封闭 1 h;分别滴加一抗 AROM (1:100)、ER $\alpha$  (1:1 000)、ER $\beta$  (1:1 000)和 GPR30 (1:1 000),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,同时设 PBS 代替一抗作阴性对照;次日 PBS 清洗后滴加山羊抗兔 IgG/生物素标记抗体(1:200),37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBS 清洗后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(1:200)37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBS 清洗后加入 DAB 显色,并用中性树胶封片后置于显微镜下观察,以出现棕黄色颗粒为阳性表达。每组选取 3 张不同小鼠切片,20 倍物镜下拍摄听皮层区域,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算目标分子平均光密度值。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 27.0 统计学软件。符合正态分布的计量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。采用单因素方差分析比较不同年龄组听力阈值、目标分子表达量的差异,采用 Tukey-HSD 检验进行组内两两比较。采用 Spearman 相关分析听力阈值与目标分子表达量的相关性,Spearman 相关系数( $r_s$ )介于-1 与 1 之间, $r_s>0$  为正相关, $r_s<0$  为负相关。 $r_s$  的绝对值( $|r_s|$ )越大,变量间的相关性越强。 $r_s$  等级划分:当  $0.9<|r_s|<1$ ,为高度相关;当  $0.7<|r_s|<0.9$ ,为强相关;当  $0.4<|r_s|<0.7$ ,为中度相关;当  $0.2<|r_s|<0.4$ ,为弱相关性;当  $0<|r_s|<0.2$ ,为极弱相关或无相关性。检验水准  $\alpha=0.05$ (双侧)。

## 2 结果

### 2.1 不同发育时间点小鼠听力阈值的变化

ABR 检测听力阈值结果显示,P14、P21、P30、P60 组小鼠的 ABR 阈值分别为(31.7 $\pm$ 2.88) dB、(28.3 $\pm$ 2.88) dB、(23.33 $\pm$ 2.88) dB、21.67 $\pm$ 2.88 dB,组间差异有统计学意义( $F_{(4,10)}=7.56,P<0.05$ ),P60 小鼠听阈低于 P14、P21 小鼠,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 2.2 不同发育时间点小鼠 A1 内 AROM 和雌激素受体 mRNA 的表达变化

qPCR 结果显示, AROM mRNA 在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的相对表达量分别为  $1.00 \pm 0.17$ 、 $1.34 \pm 0.20$ 、 $1.29 \pm 0.10$ 、 $1.69 \pm 0.21$ 、 $1.56 \pm 0.14$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 7.681, P < 0.01$ ); 其中 P30 和 P60 小鼠 mRNA 的相对表达量高于 P7 小鼠, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

GPR30 mRNA 在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的相对表达量分别为  $1.00 \pm 0.24$ 、 $3.22 \pm 0.60$ 、 $3.01 \pm 0.42$ 、 $3.22 \pm 0.53$ 、 $3.45 \pm 0.93$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 8.352, P < 0.01$ )。

ER $\alpha$  mRNA 在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的相对表达量分别为  $1.00 \pm 0.10$ 、 $1.57 \pm 0.42$ 、 $1.51 \pm 0.19$ 、 $1.98 \pm 0.15$ 、 $1.17 \pm 0.26$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 6.865, P < 0.01$ )。P30 小鼠 mRNA 的相对表达量高于 P7 和 P60 小鼠, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

ER $\beta$  mRNA 在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的相对表达量分别为  $1.00 \pm 0.21$ 、 $2.94 \pm 0.55$ 、 $2.73 \pm 0.56$ 、 $2.95 \pm 0.34$ 、 $3.44 \pm 0.69$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 10.59, P < 0.01$ )。

## 2.3 不同发育时间点小鼠 A1 内 AROM 和雌激素受体蛋白的表达水平变化

Western blot 结果显示, AROM 蛋白在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的表达量分别为  $0.29 \pm 0.02$ 、 $0.36 \pm 0.03$ 、 $0.75 \pm 0.03$ 、 $0.95 \pm 0.08$ 、 $1.03 \pm 0.09$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 98.26, P < 0.01$ )。

雌激素受体 GPR30 蛋白在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的表达量分别为  $0.14 \pm 0.02$ 、 $0.13 \pm 0.02$ 、 $0.39 \pm 0.02$ 、 $0.50 \pm 0.08$ 、 $3.70 \pm 0.11$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 14.97, P < 0.01$ ); 其在 P60 小鼠的表达水平较 P30 上调 7 倍, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

ER $\alpha$  蛋白在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的表达量分别为  $0.08 \pm 0.02$ 、 $0.33 \pm 0.10$ 、 $0.68 \pm 0.16$ 、 $1.22 \pm 0.13$ 、 $0.64 \pm 0.26$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 88.22, P < 0.01$ ); 其在 P30 小鼠表达水平最高, 与 P21 和 P60 相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

ER $\beta$  蛋白在 P7、P14、P21、P30、P60 组小鼠 A1 中的表达量分别为  $0.65 \pm 0.06$ 、 $0.95 \pm 0.05$ 、 $1.09 \pm 0.06$ 、 $1.10 \pm 0.10$ 、 $1.19 \pm 0.07$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(4,10)} = 13.42, P < 0.01$ ); P14 小鼠的表达水平高

于 P7, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

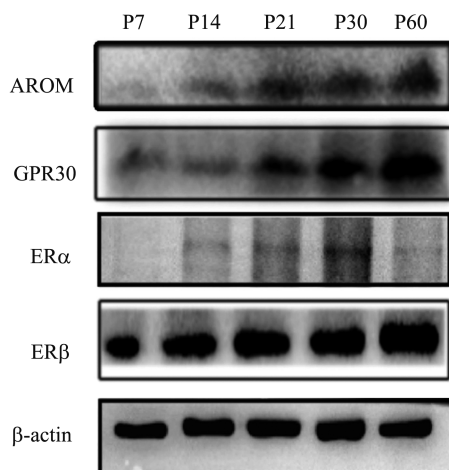


图 1 AROM 及雌激素受体 (GPR30、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ) 蛋白在不同发育阶段雄性小鼠 A1 中的表达

Figure 1 AROM and ERs (GPR30, ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) protein expression in male murine A1 across developmental stages

## 2.4 不同发育时间点小鼠 A1 内 AROM 和雌激素受体免疫组化染色结果

免疫组织化学染色结果显示, AROM 蛋白在 P7、P21 和 P60 组小鼠 A1 中平均光密度值分别为  $0.05 \pm 0.01$ 、 $0.09 \pm 0.01$  和  $0.13 \pm 0.01$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(2,6)} = 55.79, P < 0.01$ )。

GPR30 蛋白在 P7、P21 和 P60 组小鼠 A1 中平均光密度值相对表达量分别为  $0.07 \pm 0.01$ 、 $0.14 \pm 0.02$  和  $0.16 \pm 0.00$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(2,6)} = 40.60, P < 0.01$ )。

ER $\alpha$  蛋白在 P7、P21 和 P60 组小鼠 A1 中平均光密度值分别为  $0.11 \pm 0.02$ 、 $0.26 \pm 0.03$  和  $0.22 \pm 0.00$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(2,6)} = 21.13, P < 0.01$ )。

ER $\beta$  蛋白在 P7、P21 和 P60 组小鼠 A1 中平均光密度值分别为  $0.06 \pm 0.00$ 、 $0.08 \pm 0.00$  和  $0.09 \pm 0.00$ , 差异有统计学意义 ( $F_{(2,6)} = 14.60, P < 0.01$ )。见图 2。

## 2.5 小鼠听力变化与 A1 内 AROM 及雌激素受体表达的相关性分析

Spearman 相关分析小鼠听力阈值与 AROM 及雌激素受体 mRNA 的发育表达变化相关性的结果显示, A1 中 AROM 与雌激素受体 (GPR30、ER $\beta$ ) 的发育表达模式与听力阈值的发育变化存在线性相关性, 其相关系数  $r_s$  分别为  $-0.75 (P < 0.05)$ 、 $-0.64 (P < 0.05)$  和  $-0.72 (P < 0.05)$ ; ER $\alpha$  的发育表达模式与听力阈值的发育变化无线性相关性 ( $r_s = -0.23, P > 0.05$ )。见图 3。

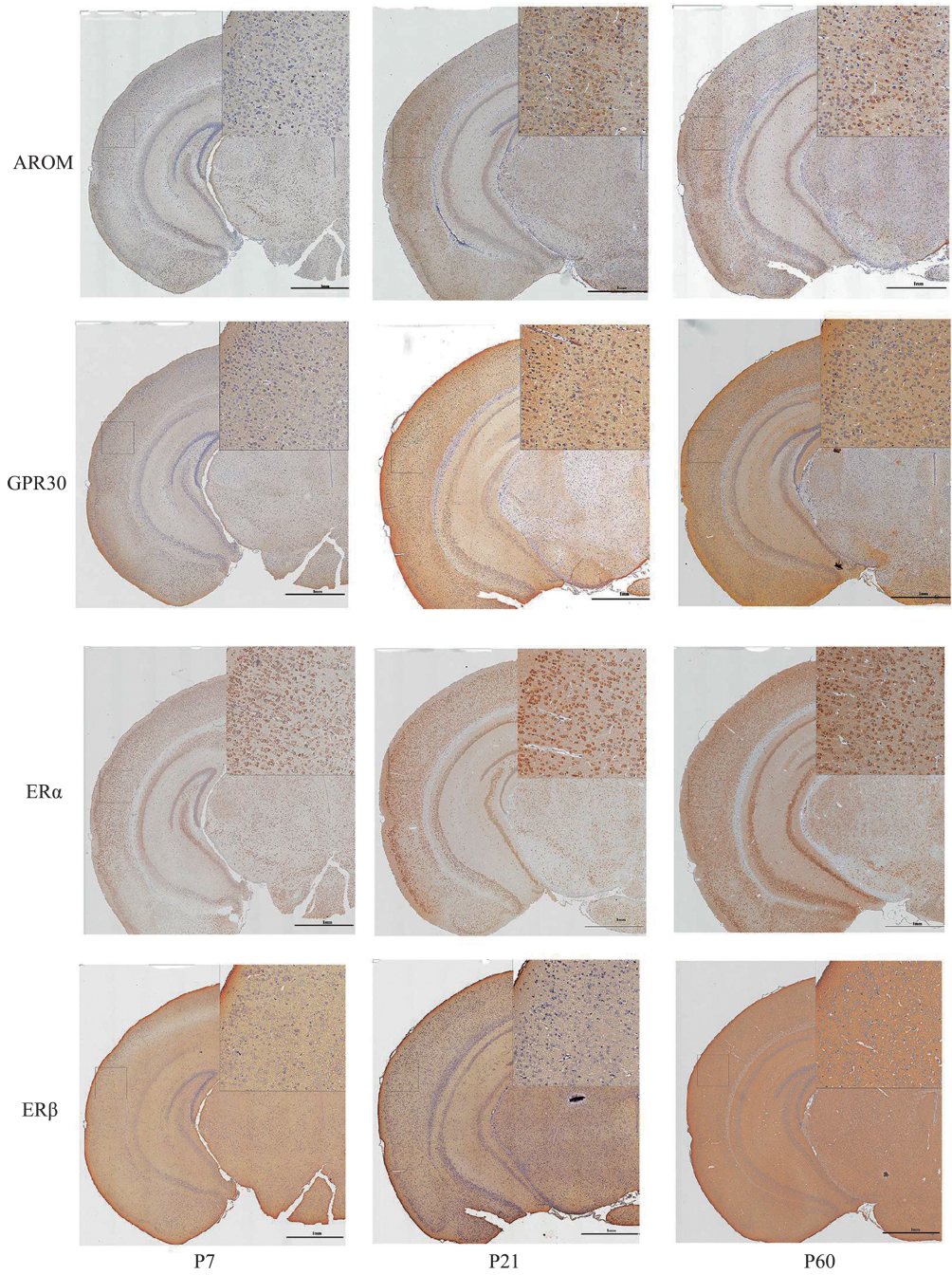
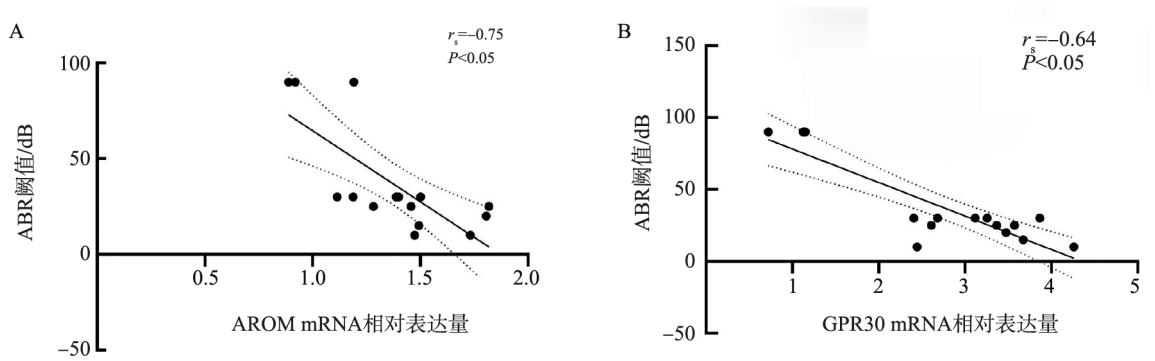


图 2 不同发育阶段雄性小鼠 A1 中 AROM 及雌激素受体的免疫组化染色  
Figure 2 AROM and ERs immunohistochemistry in male murine A1 across developmental stages



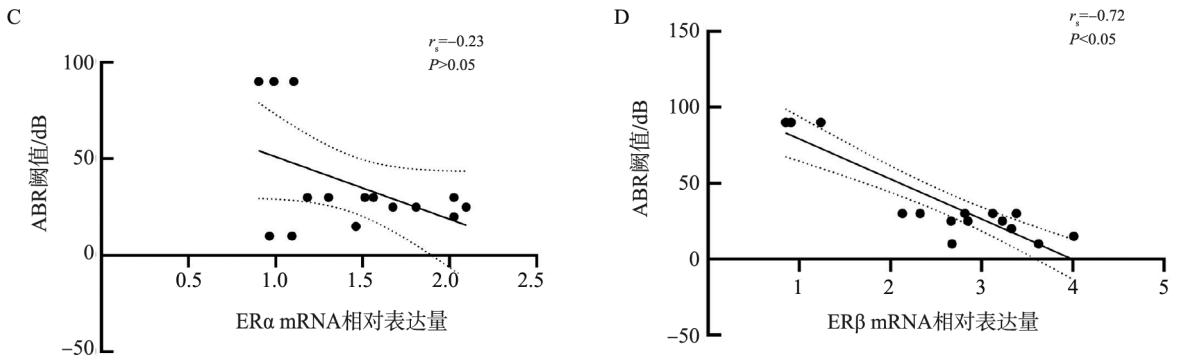


图3 雄性小鼠 ABR 阈值与 A1 内 AROM 及雌激素受体 mRNA 发育表达量相关性分析散点图及 Spearman 线性相关分析  
A: AROM; B: GPR30; C: ERα; D: ERβ

Figure 3 Correlation analysis (Spearman) of developmental changes in ABR thresholds versus AROM and ERs mRNA expression in male mouse A1 cortex

A: AROM; B: GPR30; C: ERα; D: ERβ

### 3 讨论

研究表明,外周血 E2 水平与听觉功能密切相关<sup>[16-19]</sup>,但雌激素替代疗法在改善听觉功能方面的效果并不理想<sup>[3-5]</sup>,提示除循环系统来源的雌激素外,可能还存在更为关键的局部调控机制。作为雌激素合成的关键限速酶,AROM 因其能在脑内局部合成雌激素,并通过旁分泌或自分泌的方式精准调控神经功能而备受关注<sup>[20-22]</sup>。既往研究表明,AROM 在下丘脑、海马等多个脑区的表达呈现显著的时空特异性,并与这些脑区发育密切相关<sup>[23-27]</sup>。然而,AROM 在听觉中枢 A1 的表达模式及其与 ERs 的协同调控机制至今未达成共识。尽管部分研究报道成年动物 A1 中存在 AROM 的高表达<sup>[28]</sup>,但关于其主要下游效应分子 ERs 的表达情况以及二者在听觉发育不同阶段的动态变化规律存在争议<sup>[29-31]</sup>。本研究系统揭示了小鼠 A1 中 AROM 与 ERs 在发育全程的共表达特征,并探讨了其与听功能成熟的相关性,为理解内源性雌激素如何精确塑造听觉中枢功能提供了新的实验依据。

既往研究表明,皮层中的 AROM 水平在妊娠晚期和出生后早期开始稳步上升<sup>[32]</sup>。本研究发现,在 A1 这一特定感觉区域中,AROM 的表达模式具有其独特性:其 mRNA 与蛋白水平随发育逐渐增加,形态学结果也显示 AROM 阳性细胞数量及染色强度同步上升;从新生儿到成年期,A1 中 AROM 的表达呈持续增加的发育趋势,与上述研究不完全一致。这提示感觉皮层可能存在区别于其他脑区、脑源性的雌激素调控机制。本研究还发现,AROM 表达量与听觉发生、发育与成熟关键时间点的听力阈值呈显著负相关,提示 A1 区域内局部雌激素合成潜力的持续增强,在小鼠听觉功能的发生与发展中具有

重要作用。

既往研究表明,GPR30 在成年动物脑内如海马、皮层等多个脑区中广泛表达<sup>[33-34]</sup>。本研究发现,在听力发生的关键期(P14),GPR30 表达显著上调,并持续维持高水平,与上述研究基本一致,提示其可能参与听觉功能建立的早期调控过程。

ERβ 已被证实可通过调控皮层分层、神经元迁移<sup>[35]</sup>及 TRKB/BDNF 信号通路发挥神经保护作用<sup>[36]</sup>,但其在听觉功能发育中的具体机制仍需进一步研究。本研究发现,A1 区中 ERβ 的表达趋势与 GPR30 相似,二者均与听力阈值呈显著负相关,提示它们可能通过协同或互补机制参与听觉发育的调控。

本研究发现,ERα 的表达峰值出现时间(P30)早于 GPR30 和 ERβ(P60),且与听力阈值无显著相关,该结果与 Wilson 等报道的海马发育中 ERα 和 ERβ 差异表达的现象一致<sup>[37-38]</sup>,提示不同雌激素受体亚型可能以保守且各异的方式参与脑区发育的精细调控。

本研究存在一定局限性:①尚未深入验证脑源性雌激素通过旁分泌/自分泌途径调控听觉功能的具体机制,后续研究需通过基因敲除或激动/拮抗剂干预等方法,进一步明确不同雌激素受体与听觉功能之间的因果关系;②虽初步提示 GPR30 和 ERβ 可能是介导 A1 听觉发育过程的核心受体,但尚未解析其共表达神经元的具体亚群特征,需借助单细胞测序等技术进行更为精细的细胞分型和功能阐释;③虽然发现 ERα 的表达模式与听力阈值无显著相关性,但其在听觉神经回路后期维持的潜在作用尚未通过实验验证。

综上所述,本研究从发育学视角证实,AROM、GPR30 和 ERβ 在听觉皮层中的表达水平与听阈呈显著负相关,提示 AROM-GPR30/ERβ 信号轴可能

通过协同作用,在听觉功能的建立与成熟过程中发挥重要调控作用。

## 参考文献:

- [1] 杨旻, 朱晓燕, 王旭. 感音神经性聋的代谢组学研究进展 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2024, 38(2): 113-121. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2023.263  
YANG Min, ZHU Xiaoyan, WANG Xu. Progress in metabolomics research in sensorineural hearing loss [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2024, 38(2): 113-121. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2023.263
- [2] Pearson JD, Morrell CH, Gordon-Salant S, et al. Gender differences in a longitudinal study of age-associated hearing loss [J]. *J Acoust Soc Am*, 1995, 97(2): 1196-1205.
- [3] Pottou FH, Bhowmik M, Vohora D. Raloxifene protects against seizures and neurodegeneration in a mouse model mimicking epilepsy in postmenopausal woman [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 65: 167-173. doi: 10.1016/j.ejps.2014.09.002
- [4] Hederstierna C, Hulterantz M, Collins A, et al. Hearing in women at menopause. Prevalence of hearing loss, audiometric configuration and relation to hormone replacement therapy [J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(2): 149-155. doi: 10.1080/00016480600794446
- [5] Predná L, Habánová M, Sláviková E, et al. Hormonal contraceptives and hormone replacement therapy as a possible factor of breast cancer [J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2015, 66(3): 269-274.
- [6] Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, et al. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues [J]. *Recent Prog Horm Res*, 1975, 31: 295-319. doi: 10.1016/b978-0-12-571131-9.50012-8
- [7] Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, et al. History of aromatase: Saga of an important biological mediator and therapeutic target [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(4): 343-375.
- [8] McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, et al. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(25): 8701-8705.
- [9] Nilsen J, Mor G, Naftolin F. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system [J]. *J Neurobiol*, 2000, 43(1): 64-78.
- [10] Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, et al. Production and actions of estrogens [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(5): 340-352.
- [11] Meltser I, Tahera Y, Simpson E, et al. Estrogen receptor beta protects against acoustic trauma in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(4): 1563-1570.
- [12] Milon B, Mitra S, Song Y, et al. The impact of biological sex on the response to noise and otoprotective therapies against acoustic injury in mice [J]. *Biol Sex Differ*, 2018, 9(1): 12. doi: 10.1186/s13293-018-0171-0
- [13] Shuster B, Casserly R, Lipford E, et al. Estradiol protects against noise-induced hearing loss and modulates auditory physiology in female mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12208. doi: 10.3390/ijms222212208
- [14] Webster DB. A critical period during postnatal auditory development of mice [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 1983, 6(2): 107-118.
- [15] Abe T, Kakehata S, Kitani R, et al. Developmental expression of the outer hair cell motor prestin in the mouse [J]. *J Membr Biol*, 2007, 215(1): 49-56.
- [16] Bilger RC, Matthies ML, Hammel DR, et al. Genetic implications of gender differences in the prevalence of spontaneous otoacoustic emissions [J]. *J Speech Hear Res*, 1990, 33(3): 418-432.
- [17] Jerger J, Hall J. Effects of age and sex on auditory brainstem response [J]. *Arch Otolaryngol*, 1980, 106(7): 387-391.
- [18] Alves C, Oliveira CS. Hearing loss among patients with Turner's syndrome: literature review [J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2014, 80(3): 257-263.
- [19] Curhan SG, Eliassen AH, Eavey RD, et al. Menopause and postmenopausal hormone therapy and risk of hearing loss [J]. *Menopause*, 2017, 24(9): 1049-1056.
- [20] Cornil CA, Charlier TD. Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase [J]. *J Neuroendocrinol*, 2010, 22(7): 664-673.
- [21] Azcoitia I, Yague JG, Garcia-Segura LM. Estradiol synthesis within the human brain [J]. *Neuroscience*, 2011, 191: 139-147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.012
- [22] Balthazart J, Ball GF. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? [J]. *Trends Neurosci*, 2006, 29(5): 241-249.
- [23] Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase [J]. *Steroids*, 2012, 77(1/2): 27-35.
- [24] Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. Aromatization of androstenedione by the diencephalon [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1971, 33(2): 368-370.
- [25] Colciago A, Celotti F, Pravettoni A, et al. Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2005, 155(2): 107-116.
- [26] Vierk R, Brandt N, Rune GM. Hippocampal estradiol

- synthesis and its significance for hippocampal synaptic stability in male and female animals [J]. *Neuroscience*, 2014, 274: 24-32. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.003
- [27] Negri-Cesi P, Poletti A, Celotti F. Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 $\alpha$ -reductase and aromatase in brain differentiation and functions [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996, 58(5/6): 455-466.
- [28] Soutar CN, Grenier P, Patel A, et al. Brain-generated 17 $\beta$ -estradiol modulates long-term synaptic plasticity in the primary auditory cortex of adult male rats [J]. *Cereb Cortex*, 2022, 32(10): 2140-2155.
- [29] Yokosuka M, Okamura H, Hayashi S. Transient expression of estrogen receptor-immunoreactivity (ER-IR) in the layer V of the developing rat cerebral cortex [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1995, 84(1): 99-108.
- [30] Sharma PK, Thakur MK. Expression of estrogen receptor (ER) alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex and gonadal steroids [J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(6): 880-887.
- [31] Charitidi K, Canlon B. Estrogen receptors in the central auditory system of male and female mice [J]. *Neuroscience*, 2010, 165(3): 923-933.
- [32] Montelli S, Peruffo A, Zambenedetti P, et al. Expression of aromatase P450 (AROM) in the human fetal and early postnatal cerebral cortex [J]. *Brain Res*, 2012, 1475: 11-18. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.010
- [33] Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, et al. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441(1): 94-99.
- [34] Krentzel AA, Macedo-Lima M, Ikeda MZ, et al. A membrane G-protein-coupled estrogen receptor is necessary but not sufficient for sex differences in Zebra finch auditory coding [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(3): 1360-1376.
- [35] Fan XT, Xu HW, Warner M, et al. ERbeta in CNS: new roles in development and function [J]. *Prog Brain Res*, 2010, 181: 233-250. doi: 10.1016/S0079-6123(08)81013-8
- [36] Spencer-Segal JL, Tsuda MC, Mattei L, et al. Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation [J]. *Neuroscience*, 2012, 202: 131-146. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.035
- [37] Tremere LA, Burrows K, Jeong JK, et al. Organization of estrogen-associated circuits in the mouse primary auditory cortex [J]. *J Exp Neurosci*, 2011, 2011(5): 45-60.
- [38] Wilson ME, Westberry JM. Regulation of oestrogen receptor gene expression: new insights and novel mechanisms [J]. *J Neuroendocrinol*, 2009, 21(4): 238-242.

(编辑:郑潇)