

耳聋左慈丸对 HEI-OC1 细胞氧化应激治疗作用的机制研究

卢国侠^{1#}, 顾云双^{1#}, 郑亦文², 彭 英¹, 阿基业¹, 王广基¹, 孙建国^{1*}⁽¹ 中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009; ² 新西兰奥塔哥大学生物医学学院药理毒理学系, 达尼丁 9054)

摘 要 探究耳聋左慈丸对过氧化氢 (H₂O₂) 致小鼠耳蜗毛细胞株 HEI-OC1 氧化应激的保护作用并利用细胞代谢组学的手段研究作用机制。实验具体分组如下: 对照组、模型组、耳聋左慈丸提取液低、中、高剂量组及阳性对照抗坏血酸组。以 HEI-OC1 细胞为研究对象, 0.9 mmol/L 的 H₂O₂ 诱导 12 h 为条件进行造模。CCK-8 试剂盒用于检测不同状态下 HEI-OC1 细胞的增殖能力; 乳酸脱氢酶 (LDH)、活性氧 (ROS) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒分别对 HEI-OC1 细胞中对应物质的活性和含量进行检测; 并从代谢组学的角度分析了细胞内源性代谢物的变化。与模型组相比, 耳聋左慈丸给药后可以显著提高细胞的增殖率, 而且能改善由 H₂O₂ 造模带来的 ROS 和 LDH 的含量升高, 抗氧化酶 SOD 活性下降的情况。代谢组学结果显示, 各组之间的偏最小二乘法判别分析得分图差异明显, 并且耳聋左慈丸组有将模型组回调至空白组的趋势。耳聋左慈丸对 HEI-OC1 细胞氧化应激的代谢调控主要影响核苷酸代谢和氨基酸代谢。综上所述, 耳聋左慈丸可以对 H₂O₂ 致 HEI-OC1 细胞氧化应激起到一定的保护作用, 具有抗氧化的药理活性, 这种保护作用可能是增加尿苷和苯丙氨酸等氨基酸的含量进而调节嘧啶代谢、苯丙氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成以及组氨酸代谢等通路所产生的。

关键词 耳聋左慈丸; 小鼠耳蜗毛细胞株 HEI-OC1; 过氧化氢; 氧化应激; 代谢组学

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2025)02-0188-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024102701

引用本文 卢国侠, 顾云双, 郑亦文, 等. 耳聋左慈丸对 HEI-OC1 细胞氧化应激治疗作用的机制研究 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 188 – 195.

Cite this article as: LU Guoxia, GU Yunshuang, ZHENG Yiwen, *et al.* Therapeutic mechanism of of *Erlong Zuoci* Pills on oxidative stress in HEI-OC1 cells[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 188 – 195.

Therapeutic mechanism of of *Erlong Zuoci* Pills on oxidative stress in HEI-OC1 cellsLU Guoxia^{1#}, GU Yunshuang^{1#}, ZHENG Yiwen², PENG Ying¹, A Jiye¹, WANG Guangji¹, SUN Jianguo^{1*}¹Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;²Department of Pharmacology and Toxicology, School of Biomedical Sciences, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand

Abstract To the present study aimed to investigate the protective effects of *Erlong Zuoci* Pills on oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) in House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) and to explore the mechanism by cellular metabolomics. There were 6 groups in the experiment: the control group, model group, three dose groups of ELZC (low, medium, and high), and positive control ascorbic acid group. The oxidative stress injury model was established in the HEI-OC1 by inducing 0.9 mmol/L H₂O₂ for 12 h. The proliferation of HEI-OC1 cells was observed by CCK-8 assay; the contents and activity of lactate hydrogenase (LDH), reactive oxygen species (ROS), and superoxide dismutase (SOD) in HEI-OC1 cells were detected by corresponding kits. Finally, the endogenous substances of cells were analyzed from the perspective of metabolomics. Compared with the model group, ELZC groups could significantly increase the cell proliferation rate after administration. Moreover, they could also ameliorate the increase of ROS and LDH content and the decrease of antioxidant

收稿日期 2024-10-27 * 通信作者 Tel: 13915990907 E-mail: jgsun@cpu.edu.cn

基金项目 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”重点专项资助项目 (2017YFE0109600)

[#]卢国侠和顾云双为共同第一作者

enzyme SOD caused by H_2O_2 . Metabolomic results revealed significant differences among multiple groups in the scores of partial least squares discriminant analysis. The ELZC group could relocate the model group back to the control group. The metabolic regulation of ELZC on oxidative stress in HEI-OC1 cells mainly affects nucleotide metabolism and amino acid metabolism. In summary, the results indicate that ELZC exhibits protective effects on H_2O_2 -induced oxidative stress in HEI-OC1 cells. Additionally, this protective effect may be produced by increasing the content of amino acids such as uridine and phenylalanine, thereby regulating pathways such as pyrimidine metabolism, phenylalanine metabolism, biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, and histidine metabolism.

Key words *Erlong Zuoci Pills*; HEI-OC1 cells; hydrogen peroxide; oxidative stress; metabolomics

This study was supported by the National Key Research and Development Program for Intergovernmental Cooperation in International Science and Technology Innovation (2017YFE0109600)

*LU Guoxia and GU Yunshuang contributed equally to this work

耳鸣作为耳科常见症状之一,一般是指在无外部声音的刺激下,患者自身感知到有声音的感觉,通常是耳聋的先兆。有研究表明,随着年龄的增加,耳鸣的发病率也会出现升高的现象^[1]。同时,耳鸣会引起患者一系列不良反应,包括失眠、焦虑、注意力不集中、沮丧等,严重者甚至自残、自杀等^[2-3]。此外,严重的抑郁症也会加重耳鸣^[4]。产生耳鸣的原因有很多,内耳缺氧^[5]、噪声^[6]、耳毒性药物^[7]、衰老^[8]和其他疾病^[9-10]等多种因素都可能会引起耳蜗毛细胞损伤而造成耳鸣耳聋,由于其复杂的致病原因,应针对具体情况选择不同的药物进行准确治疗。

耳聋左慈丸(*Erlong Zuoci Pills*, ELZC)作为经典名方,其核心成分建立在传统的六味地黄丸这一补肾方剂上,另外添加了竹叶柴胡和磁石两味药材。已有研究证实该药在临床上对耳聋患者有很好的疗效^[11-14]。课题组前期发现 ELZC 的组成物质大多都有抗氧化作用(未发表)。熟地黄是 ELZC 复方中的君药,其主要成分毛蕊花糖苷可以减轻心肌细胞在缺氧/复氧的状态下受到的损伤^[15]。因此本研究推测,ELZC 对受损的小鼠耳蜗毛细胞(house ear institute-organ of Corti 1, HEI-OC1)也可能显示出一定的保护效果。目前关于耳损伤的细胞研究大多选用过氧化氢(H_2O_2)作为模型药物^[16-17],本实验同样利用 H_2O_2 建立氧化应激模型,对 ELZC 的药理作用进行研究。以抗氧化和增强免疫力的特性闻名的抗坏血酸(vitamin C, VC)在本研究中被选作阳性对照^[18]。

代谢组学(metabonomics)是一种研究生物体系受到外界环境刺激包括饮食、环境压力、微生物

群以及疾病和治疗状态后体内代谢产物变化的技术手段。在研究药物治疗和疾病发展过程中,代谢组学的结果能与体内的病理生理状态直接对应^[19]。因细胞实验存在易于控制、重复性高、成本较低的特点,细胞代谢组学也正广泛运用于筛选疾病发生过程中的代谢标志物^[20]。当 HEI-OC1 受到有害刺激时,ELZC 是否对受损细胞的内源性代谢物产生影响,目前尚不得知。因此本实验在考察 ELZC 对 HEI-OC1 细胞氧化应激保护作用的基础上,再通过检测胞内代谢物质的改变情况来为 ELZC 的药效机制提供研究方向。

1 材料

1.1 仪器

UFLC 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); Triple TOF5600 质谱仪(美国 Sciex 公司);台式低温高速离心机、真空旋转挥干仪(美国赛默飞世尔科技公司);多功能微孔板检测仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.2 试剂

DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(美国赛默飞世尔科技公司);细胞培养耗材(美国康宁公司);活性氧检测试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、总超氧化物歧化酶活性检测试剂盒、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒、增强型 CCK-8 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);30% 过氧化氢(南京化学试剂股份有限公司);毛蕊花糖苷(批号: RH260383, 罗恩化学试剂);耳聋左慈丸原料药粉末(批号: 20210309, 杭州胡庆余堂药业有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 细胞

小鼠耳蜗毛细胞株 HEI-OC1 由东南大学生命科学研究院柴人杰教授惠赠。

2 方法

2.1 ELZC 提取液的制备

称取 ELZC 原药粉末 1.88 g, 溶于乙醇-水 (V/V, 1:1) 溶液 30 mL 中, 超声提取 3 h, 弃去底部不溶的沉淀, 上清液用 0.22 μm 针式滤器过滤, 生药浓度为 0.06 g/mL。取出部分滤过液, 用甲醇稀释 100 倍后进样分析, 利用课题组先前建立的方法确定提取液中毛蕊花糖苷的浓度^[21], 用毛蕊花糖苷的浓度来表征 ELZC 的不同剂量, 剩余提取液存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.2 实验分组及氧化应激模型建立

实验分为空白组 (Control)、模型组 (Model)、ELZC 高剂量组 (TQH)、中剂量组 (TQM)、低剂量组 (TQL) 和阳性药抗坏血酸组 (VC)。HEI-OC1 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在二氧化碳浓度为 5%, 温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 90% 的培养箱中进行正常培养, 当细胞达到对数生长期时, 将细胞按适宜的密度在不同孔板中正常培养 24 h 后, 弃去上清液, 空白组和模型组加入 DMEM 培养基, 给药组分别加入含不同浓度 ELZC (最终生药浓度为 0.6、0.3 和 0.06 g/L, 即毛蕊花糖苷的含量为 1110、555 和 111 $\mu\text{g/L}$), VC 组 (250 $\mu\text{g/L}$) 的空白 DMEM 培养基生长 12 h, 弃去上清液, 除空白组更换成 DMEM 培养基外, 其他各组均加入用 DMEM 培养基配制的 0.90 mmol/L 的 H_2O_2 造模 12 h, 到达时间后再进行后续指标测定。

2.3 细胞增殖率测定

将细胞按适宜的密度在 96 孔板中正常培养 24 h 后, 弃去上清液, 空白组加入 DMEM 培养基, 其他各组加入不同浓度的 H_2O_2 溶液, 造模 12 h 后弃上清液, 将用 DMEM 培养基配制的浓度为 10% 的 CCK-8 溶液 100 μL 加入到需要测定的孔中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱里孵育 20 min 后, 在 450 nm 处进行吸光度测定。

2.4 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放检测

实验分组同“2.2”项。在造模 11 h 时, 把 LDH 释放试剂 20 μL 加入到空白组中的各孔里, 此时该组为最大酶活性对照组。继续培养至造模预定时间后, 将孔中液体分别转移至 1.5 mL 的离心管

中, 随后使用 LDH 细胞毒性检测试剂盒进行样品测定。

2.5 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平检测

实验分组同“2.2”项。造模 12 h 后弃去培养液, 把 DMEM 培养基稀释 1000 倍的荧光探针溶液在 6 孔板的每孔中各加 1 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱里继续培养 30 min, 弃去探针溶液, 用预冷的生理盐水对 6 孔板进行 3 次清洗后, 每孔加入裂解液 (氢氧化钠-水-甲醇, W/V/V, 4:1:1) 600 μL , 反复吹打混匀后, 选择低温离心的方式, 以 6000 r/min 转速把裂解液离心 5 min, 缓慢吸取上清液 200 μL 至 96 孔全黑酶标板中, 立即使用酶标仪在 488 和 525 nm 下进行双波长吸光度检测。

2.6 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测

实验分组同“2.2”项。造模 12 h 后弃去上清液, 用预冷的生理盐水清洗 1 遍, 然后加入 SOD 样品制备液反复吹打后, 继续按照说明书进行检测。

2.7 代谢组学处理

本实验所用色谱条件、质谱条件及样品处理方法与课题组先前发表的文章一致^[22]。

2.8 数据分析与处理

利用本实验室前期建立的内源代谢物鉴定库对样品的质谱信息进行积分与鉴定^[23]。使用 MultiQuant 2.0 软件和 SIMCA-P 14.1 软件对数据进行初步处理和多元分析。其中初步处理包括剔除异常值、归一化等, 多元分析包括主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法分析 (OPLS-DA)。以 $P < 0.05$ 、差异倍数 (Fold Change, FC) > 1.2 和变量投射重要性 (Variable Importance in Projection, VIP) > 1 为限定条件对特征代谢物进行筛选, 最后在 Metabo-Analyst 6.0 网站 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 上对符合条件的物质进行代谢途径分析。药效数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 GraphPad 9.0 统计软件中的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 方法在多组别之间进行差异比较, 以 $P < 0.05$ 认为结果具有统计学意义。

3 结果

3.1 H_2O_2 浓度的选择

随着 H_2O_2 浓度的增加, HEI-OC1 细胞的增殖

能力逐步下降(图 1)。分析数据求得 H_2O_2 对 HEI-OC1 细胞的 IC_{50} 为 0.92 mmol/L, 为了便于操作, 后续实验选择以 0.90 mmol/L 的 H_2O_2 诱导 12 h 作为造模条件。

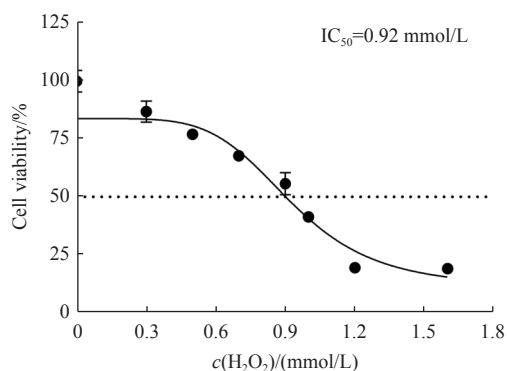


Figure 1 Proliferation rate of House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) cells under different concentrations of hydrogen peroxide ($\bar{x} \pm s, n=5$)

上述结果表明 0.9 mmol/L 的 H_2O_2 可对 HEI-OC1 细胞造成明显的损伤, 根据前期预实验结果,

本实验中对细胞采用了先给药后造模的处理方式。ELZC 的低、中、高 3 个浓度都能够显著提高细胞的增殖能力(图 2-A)。CCK-8 结果直观地反映了 ELZC 对氧化应激状态下 HEI-OC1 细胞的保护作用。

3.2 ELZC 对 H_2O_2 诱导的 HEI-OC1 细胞 LDH 释放量的影响

模型组的 LDH 释放量与空白组相比明显增多, ELZC 给药保护可以改善这种情况, 降低 LDH 在细胞培养液中的释放量(图 2-B)。结果表明 ELZC 可以减少 HEI-OC1 细胞受损时 LDH 的释放量。

3.3 ELZC 对 H_2O_2 诱导的 HEI-OC1 细胞 ROS 水平的影响

HEI-OC1 细胞在 H_2O_2 刺激后 ROS 水平激增, 在 ELZC 的给药干预下, 细胞中的 ROS 含量有降低至空白组的趋势(图 2-C)。数据显示 ELZC 有效地消除了 H_2O_2 诱导的 HEI-OC1 细胞中 ROS 的积累。

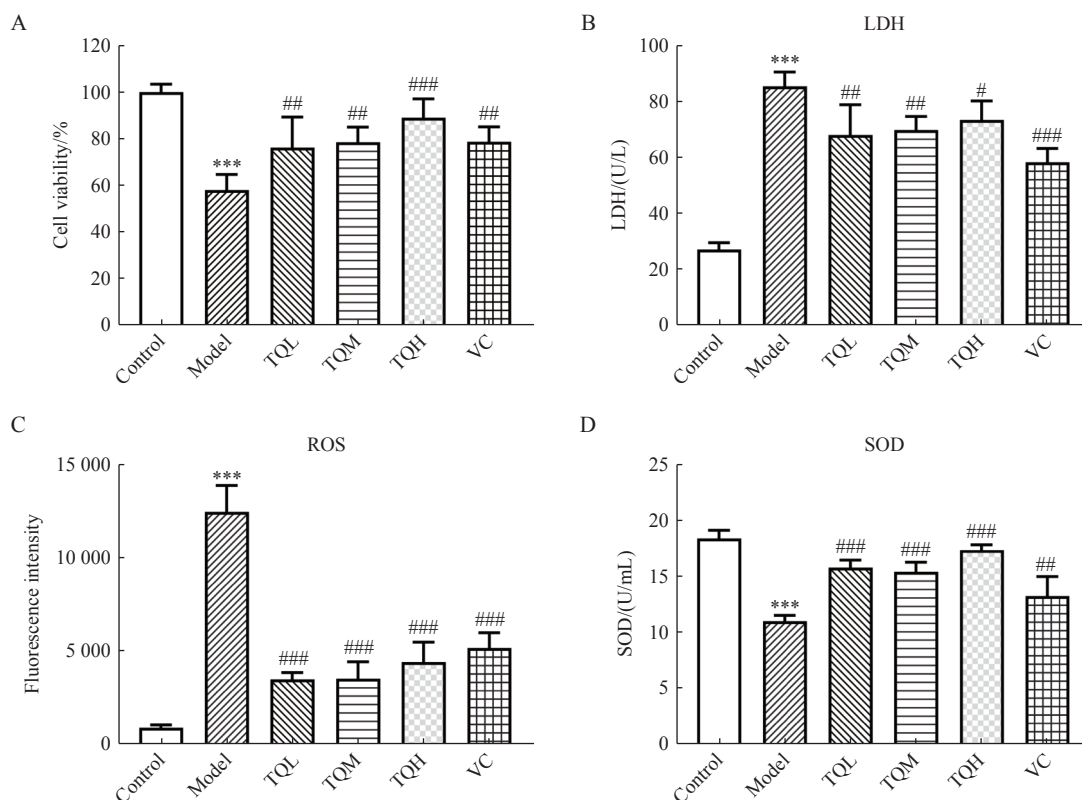


Figure 2 Pharmacodynamic indexes ($\bar{x} \pm s, n=5$)

A: Cell viability of HEI-OC1 cells; B: Different drugs on lactate dehydrogenase (LDH) release amounts in HEI-OC1 cells supernatant; C: Different drugs on reactive oxygen species (ROS) content in HEI-OC1 cells; D: Different drugs on superoxide dismutase (SOD) activity in HEI-OC1 cells. (Control: Control group; Model: Model group; TQH, TQM, TQL: High, medium, and low dose groups of ELZC; VC: Ascorbic acid group)

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group

3.4 ELZC 对 H_2O_2 诱导的 HEI-OC1 细胞 SOD 活性的影响

模型组中 HEI-OC1 细胞的 SOD 活性与空白组相比呈现下降趋势, 证明 H_2O_2 对细胞造成了损伤, 体内抗氧化能力降低, 模型有效。而 ELZC 给药保护后可以逆转这种现象(图 2-D)。结果表明 3 种浓度的 ELZC 都能将造模后细胞中的 SOD 活性恢复至正常水平。

3.5 代谢组学结果分析

3.5.1 多元统计分析 结合前期药效结果, 该部分选择空白组、模型组和 TQM 3 组进行代谢组学分析。PCA 和 PLS-DA 得分图显示各组内聚集性良好, 组间差异明显(图 3-A、3-B)。其中 QC 组分布在图形中央, 表明检测方法稳定可靠。空白组分布在图片的右侧, 模型组位于左侧, 说明造模后细胞

在代谢物水平上的变化较明显, TQM 组分布在图片中间部分, 即给药后存在将内源性代谢物回调至空白组的趋势。R² 和 Q² 分别对应模型的可解释性和预测性, 置换检验结果显示所有样本点都低于右上方基准值, 并且两条斜线斜率均为负值, 表明该模型在拟合条件下表现良好(图 3-C)。

3.5.2 差异代谢物筛选及通路富集分析 以 $\text{FC} > 1.2$ 且 $P < 0.05$ 作为条件对检测到的内源性物质进行筛选。该部分共测到 166 个内源性物质, 在空白组与模型组之间存在 110 种物质上调, 4 种代谢物下调; 而模型组与 TQM 组中有 4 种物质上调, 108 种物质下调(图 4-A、4-D)。同时对处理后的数据进行 OPLS-DA 分析, 结果发现空白组、模型组和 TQM 组之间存在明显差异(图 4-B、4-E), 并得到了两两对比的 VIP 图用于代谢物筛选(图 4-C、4-F)。最终以 $\text{VIP} > 1$ 、 $\text{FC} > 1.2$ 和 $P < 0.05$ 为限定条件对差异代谢物进行筛选, 最后在空白组、模型组和 TQM 中发现 24 个符合条件的差异代谢物。从热图和代谢通路的角度对差异代谢物进行整合, 热图结果表明, 尿苷、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、组氨酸等多种物质在模型组下调, 给药后能纠正这些物质的含量变化(图 5-A)。从影响度 (pathway impact) 和 P 值两方面综合考虑, ELZC 对 HEI-OC1 细胞的氧化应激的保护作用主要通过调节嘧啶代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢以及组氨酸代谢途径来实现(图 5-B)。

4 讨论

本研究首先讨论了 H_2O_2 引起 HEI-OC1 细胞发生氧化应激时, ELZC 是否具有保护作用。过量的 ROS 产生诱导机体发生氧化应激, 同时出现 SOD 活性下降以及 LDH 释放量变多的现象, 最终导致细胞死亡、蛋白质功能受损及组织损伤^[24-25]。本研究也证明了在 H_2O_2 诱导下, 模型组的细胞出现存活能力下降、SOD 活性降低、ROS 水平升高和 LDH 释放量显著增加的现象, 符合氧化应激时机体抗氧化能力下降的特点。在 ELZC 给药保护后, 细胞中 ROS 水平以及上清液的 LDH 释放呈现下降趋势, 并与模型组 ROS 水平差异明显; SOD 活性也上升至空白组附近, 该结论证明了 ELZC 在 HEI-OC1 细胞发生氧化应激时具有保护作用。随后, 本研究继续考察了 ELZC 在 HEI-OC1 细胞氧化应激时对内源性代谢物质的影响。通路分析表明,

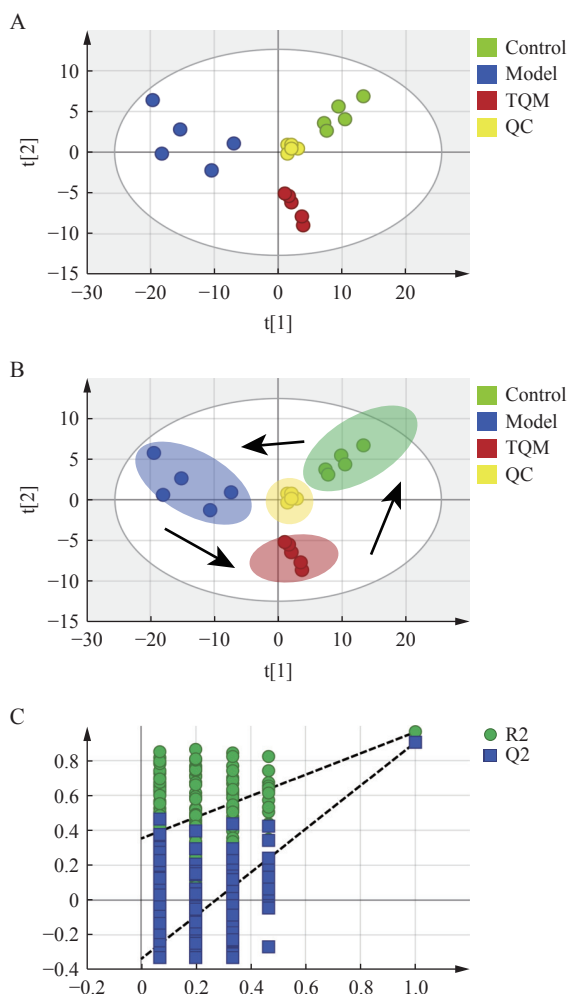


Figure 3 Multivariate statistical analysis plots ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A: Principal component analysis plot; B: Partial least squares discriminant analysis plot; C: Permutation test

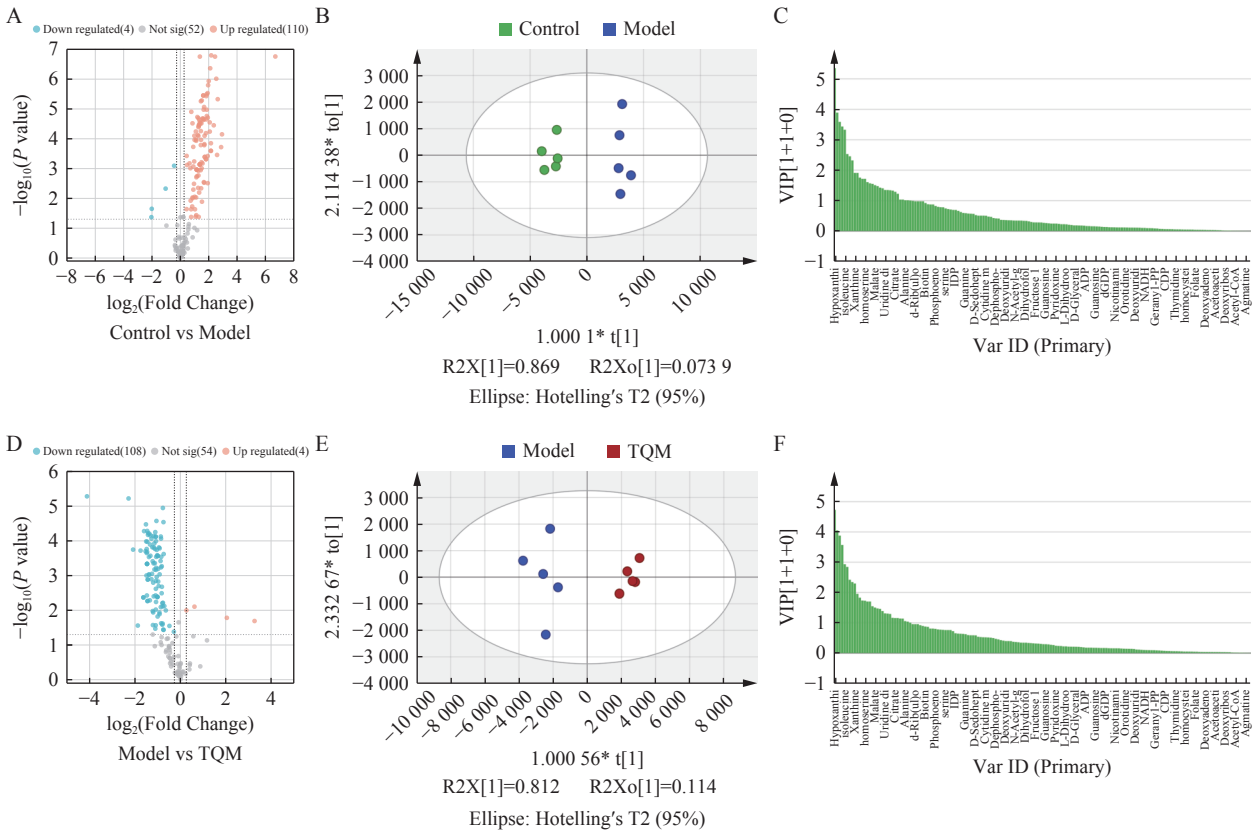


Figure 4 Differential metabolite screening analysis($\bar{x} \pm s, n=5$)

A: Volcano plot of all tested substances between Control group and Model group; B: Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) score chart between Control group and Model group; C: All tested substances between Control group and Model group are sorted by Variable Importance in Projection (VIP) value; D: Volcano plot of all tested substances between Model group and TQM group; E: OPLS-DA score chart between Model group and TQM group; F: All tested substances between Model group and TQM group are sorted by VIP value

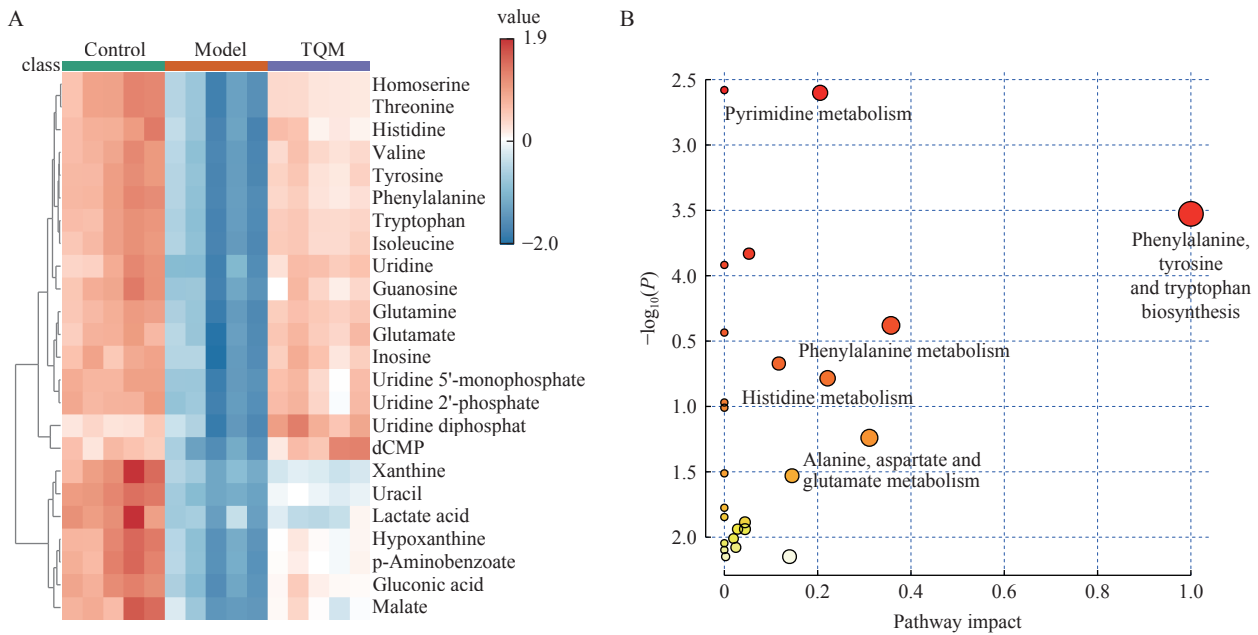


Figure 5 Metabolomics analysis($\bar{x} \pm s, n=5$)

A: Heat map; B: Metabolic pathway analysis diagram

ELZC 主要对嘧啶代谢产生影响,对苯丙氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成以及组氨酸代谢途径也具有一定的调节作用。

在嘧啶代谢过程中,尿苷是重要代谢产物之一。尿苷被认为是一种有效的再生促进因子,其在具有较高再生潜力的组织或细胞中含量更高^[26]。另外,尿苷的抗氧化作用被广泛报道^[27-28]。外源性尿苷给药可以防止高氧损伤模型带来的 ROS 浓度升高^[29],还有研究表明给予尿苷治疗可以防止脂多糖诱导产生炎症因子的增加^[30]。模型组的尿苷含量降低,破坏氧化系统稳态,给药后细胞内的尿苷含量升高,推断 ELZC 可能通过干预嘧啶代谢来改善 H₂O₂ 对 HEI-OC1 细胞造成的氧化应激。

氨基酸代谢作为细胞增殖发育的必经过程之一,已有文献报道,氨基酸代谢的紊乱与多囊卵巢综合征的发病机制有关^[31]。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸均属于芳香族氨基酸,它们是合成单胺类神经递质的重要前体,这些物质在体内发挥着重要作用^[32]。临床试验通过检测中青年重度抑郁症患者的尿液样本,发现与健康受试者相比,患者体内的苯丙氨酸代谢受到显著影响^[33]。随着病情的加重,稳定型心绞痛患者、急性心肌梗死患者体内 L-苯丙氨酸的表达水平显著下调^[34]。另有数据表明,色氨酸合成不足会引起亚临床抑郁症患者体内的 5-羟色胺水平下降,进而导致抑郁症。苯丙氨酸代谢和苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸生物合成途径的紊乱会引起抑郁症状和脑功能性网络的变化^[35]。叶酸缺失会导致各种健康问题,在小麦育种的过程中,添加一定比例的芳香族氨基酸,可以提高小麦幼苗叶酸的积累,向消费者提供更多的叶酸^[36]。另外,将色氨酸适当添加到鹅的基础饲料中,对扬州鹅血清中 SOD 的活性和总抗氧化能力均有显著的改善作用^[37]。在膳食中补充色氨酸也可以改善热应激肉鸡的直肠温度,改善盲肠微生物群落,增强免疫力^[38]。褪黑素、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸等作为色氨酸的代谢产物,也参与畜禽体内抗氧化、泌乳、免疫反应和动物采食等生理过程^[39]。组氨酸是哺乳动物必需氨基酸之一,在不同物种中起到特定的代谢功能^[40]。每日摄入组氨酸可以改善有疲劳感的中年男性的情绪状态和记忆能力^[41]。在戊二烯四唑诱导的癫痫大鼠中,组氨酸可以通过剂量依赖的方式抑制癫痫发作^[42]。在本研究中,HEI-OC1 细胞因受到外界有害刺激而导致氨基酸代谢紊乱,而 ELZC 给药后通过增加苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸等氨基酸的含量,对

氨基酸代谢紊乱产生了一定的修正作用,恢复了机体的抗氧化能力。

综上,本研究以证明 ELZC 抗氧化的药理活性为基础,利用细胞代谢组学的手段,发现 ELZC 给药可以增加细胞内尿苷及苯丙氨酸、酪氨酸等氨基酸的含量,推测该复方可能是通过正向调节嘧啶代谢、苯丙氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成以及组氨酸代谢等通路对氧化应激状态下的 HEI-OC1 细胞进行保护。该研究首次从代谢组学的角度阐明了 ELZC 对 HEI-OC1 细胞的作用机制,从抗氧化的角度为耳鸣的治疗和研究提供有力支撑。

References

- [1] Baguley D, McFerran D, Hall D. Tinnitus[J]. *Lancet*, 2013, **382**(9904): 1600-1607.
- [2] Bauer CA. Tinnitus[J]. *N Engl J Med*, 2018, **378**(13): 1224-1231.
- [3] Cheng YF, Xirasagar S, Kuo NW, et al. Tinnitus and risk of attempted suicide: a one year follow-up study[J]. *J Affect Disord*, 2023, **322**: 141-145.
- [4] LI L, YAO J, LIU LF, et al. Research status of chronic tinnitus patients complicated with anxiety and depression[J]. *Medical Innovation of China* (中国医学创新), 2023, **20**(22): 181-185.
- [5] Sonbay ND, Saka C, Oktay Arslan B, et al. The effect of hypoxia on hearing function[J]. *Turk J Med Sci*, 2019, **49**(5): 1450-1454.
- [6] Liebenberg A, Oosthuizen J, Reed S. A current affair: worker perceptions of noise exposure and occupational hearing loss in Australian coal mines[J]. *Ann Work Expo Health*, 2023, **67**(9): 1111-1120.
- [7] Chirtes F, Albu S. Prevention and restoration of hearing loss associated with the use of cisplatin[J]. *Biomed Res Int*, 2014, **2014**: 925485.
- [8] Zhang WB, Ruan J, Zhang RX, et al. Age-Related Hearing Loss with tinnitus and physical frailty influence the overall and domain-specific quality of life of Chinese community-dwelling older adults[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, **8**: 762556.
- [9] Dorobisz K, Pazdro-Zastawny K, Misiak P, et al. Sensorineural hearing loss in patients with long-COVID-19: objective and behavioral audiometric findings[J]. *Infect Drug Resist*, 2023, **16**: 1931-1939.
- [10] Nawaz MU, Vinayak S, Rivera E, et al. Association between hypertension and hearing loss[J]. *Cureus*, 2021, **13**(9): e18025.
- [11] Yan AJ, Yu YY. Clinical study on *Erlong zuoci* pills combined with sound therapy for chronic tinnitus of kidney essence depletion type[J]. *New Chin Med* (新中医), 2023, **55**(3): 151-154.
- [12] Zheng P, Wang ZH. Acupuncture combined with *Erlong zuoci* pill in the treatment of senile tinnitus for 25 cases[J]. *Chin Med*

- Mod Distance Edu China* (中国中医药现代远程教育), 2020, **18**(17): 100-101.
- [13] Ge ZH, Li F, Li GB, *et al.* Clinical study on *Erlong zuoci* pill combined with water acupuncture in treatment of senile sudden deafness with kidney Yin deficiency type[J]. *Mod Chin Med* (现代中医药), 2022, **42**(5): 111-115.
- [14] Zou LY. Clinical study on *Erlong zuoci* pills for presbycusis[J]. *J New Chin Med* (新中医), 2020, **52**(23): 25-27.
- [15] Ping Y, Zhang Q, Feng XM. Effects of verbascoside on hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte injury[J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis* (中西医结合心脑血管病杂志), 2022, **20**(20): 3698-3703.
- [16] Wu LY, Wu TT, Li YL, *et al.* A model of H₂O₂-induced oxidative stress damage in hair cell-like HEI-OC1 cells[J]. *Chin J Otol* (中华耳科学杂志), 2023, **21**(4): 514-521.
- [17] Dong JF, Lu L, Lin CY, *et al.* Graphene inhibits damage to hair cells by oxidative stress[J]. *Chin J Otol* (中华耳科学杂志), 2021, **19**(1): 101-107.
- [18] Gęgotek A, Skrzydlewska E. Ascorbic acid as antioxidant[J]. *Vitam Horm*, 2023, **121**: 247-270.
- [19] Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, **15**(7): 473-484.
- [20] Li WW, Yang Y, Wang SC, *et al.* Research progress of cellular metabolomics[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2017, **33**(2): 187-192.
- [21] Gu YS, Wang R, Su N, *et al.* Pharmacokinetic study of *Erlong zuoci* pill in rats[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2022, **53**(4): 481-489.
- [22] He MZ, Peng Y, Wang GJ, *et al.* Mechanism of sodium salicylate-induced damage to HEI-OC1 cells based on metabolomics[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2021, **52**(5): 566-572.
- [23] Lu ZY, Li SJ, Sun RB, *et al.* *Hirsutella sinensis* treatment shows protective effects on renal injury and metabolic modulation in db/db mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 4732858.
- [24] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine[J]. *Redox Biol*, 2015, **4**: 180-183.
- [25] Zhang BG, Huang CH, Xu DM, *et al.* Patulin induces ROS-dependent cardiac cell toxicity by inducing DNA damage and activating endoplasmic reticulum stress apoptotic pathway[J]. *Eco-toxicol Environ Saf*, 2024, **269**: 115784.
- [26] Liu ZP, Li W, Geng LL, *et al.* Cross-species metabolomic analysis identifies uridine as a potent regeneration promoting factor[J]. *Cell Discov*, 2022, **8**(1): 6.
- [27] Jiang N, Zhao Z. Intestinal aging is alleviated by uridine via regulating inflammation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro*[J]. *Cell Cycle*, 2022, **21**(14): 1519-1531.
- [28] Adant I, Bird M, Decru B, *et al.* Pyruvate and uridine rescue the metabolic profile of OXPHOS dysfunction[J]. *Mol Metab*, 2022, **63**: 101537.
- [29] Al N, Çakir A, Koç C, *et al.* Antioxidative effects of uridine in a neonatal rat model of hyperoxic brain injury[J]. *Turk J Med Sci*, 2020, **50**(8): 2059-2066.
- [30] Mironova GD, Khrenov MO, Talanov EY, *et al.* The role of mitochondrial KATP channel in anti-inflammatory effects of uridine in endotoxemic mice[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, **654**: 70-76.
- [31] Paczkowska K, Rachoń D, Berg A, *et al.* Alteration of branched-chain and aromatic amino acid profile as a novel approach in studying polycystic ovary syndrome pathogenesis[J]. *Nutrients*, 2023, **15**(19): 4153.
- [32] Lynch JH, Dudareva N. Aromatic amino acids: a complex network ripe for future exploration[J]. *Trends Plant Sci*, 2020, **25**(7): 670-681.
- [33] Chen JJ, Xie J, Li WW, *et al.* Age-specific urinary metabolite signatures and functions in patients with major depressive disorder[J]. *Aging*, 2019, **11**(17): 6626-6637.
- [34] di Marino S, Viceconte N, Lembo A, *et al.* Early metabolic response to acute myocardial ischemia in patients undergoing elective coronary angioplasty[J]. *Open Heart*, 2018, **5**(1): e000709.
- [35] Zhao SG, Khoo S, Ng SC, *et al.* Brain functional network and amino acid metabolism association in females with subclinical depression[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, **19**(6): 3321.
- [36] Xie C, Wang P, Chang JW, *et al.* Effect of amino acids on folates accumulation in wheat seedlings during germination under red light radiation[J]. *Molecules*, 2022, **27**(20): 6868.
- [37] Wei ZY, Wang HR, Pan XH, *et al.* Effects of feeding regimen and dietary tryptophan level on immune function and antioxidant indices of Yangzhou geese[J]. *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2012, **24**(12): 2356-2365.
- [38] Li QF, Ouyang JX, Deng CX, *et al.* Effects of dietary tryptophan supplementation on rectal temperature, humoral immunity, and cecal microflora composition of heat-stressed broilers[J]. *Front Vet Sci*, 2023, **10**: 1247260.
- [39] Li HW, Zhu Q, Wu LY, *et al.* Physiological function and dietary application of tryptophan in livestock and poultry[J]. *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2016, **28**(3): 659-664.
- [40] Moro J, Tomé D, Schmidely P, *et al.* Histidine: a systematic review on metabolism and physiological effects in human and different animal species[J]. *Nutrients*, 2020, **12**(5): 1414.
- [41] Sasahara I, Fujimura N, Nozawa Y, *et al.* The effect of histidine on mental fatigue and cognitive performance in subjects with high fatigue and sleep disruption scores[J]. *Physiol Behav*, 2015, **147**: 238-244.
- [42] Chen Z, Li WD, Zhu LJ, *et al.* Effects of histidine, a precursor of histamine, on pentylenetetrazole-induced seizures in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23**(4): 361-366.