中药复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠老年性聋的防护效应

宣伟军^{1,2} 唐俊波¹ 陈 壮³ 韦瑀龙³ 丁大连^{1,2,4}

摘要 目的 观察 C57BL/6J 小鼠老年性听力下降现象并研究中药复方健耳剂对老年性聋小鼠的保护作用及其可能机制。**方法** 将 36 只 C57BL/6J 小鼠分为正常对照组($n=6$)、老年性聋对照组($n=12$)及高剂量中药健耳剂组(简称中药高剂量组, $n=12$)及低剂量中药健耳剂组(简称中药低剂量组, $n=6$)。正常对照组小鼠自断奶后每日饮用自来水直至出生后 2 个月;老年性聋对照组小鼠自断奶后每日饮用自来水直至出生后 7 个月;中药高、低剂量组小鼠自断奶后分别每日饮用 3.65、0.91 g/(kg·d)的中药复方健耳剂直至出生后 7 个月。每组 6 只小鼠在实验终止日应用听性脑干诱发电位仪检测小鼠的听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)阈。中药高剂量组与同期老年性聋对照组 6 只小鼠在终止实验即刻取出耳蜗、听皮层脑组织及肝脏,采用丙二醛考马斯亮蓝试剂盒,利用紫外分光光度计,检测所取组织中丙二醛含量。**结果** 2 月龄正常对照组小鼠在 4~48 KHz 频率范围的不同短纯音诱发的 ABR 阈值保持正常。与 2 月龄正常对照组比较,7 月龄老年性聋对照组小鼠 ABR 阈值明显升高($P<0.05$),与高剂量中药组在 8~48 KHz 频率范围 ABR 阈值比较,差异亦有统计学意义($P<0.05$)。与 7 月龄老年性聋对照组比较,高剂量中药组小鼠耳蜗、听皮层、肝脏组织中丙二醛含量明显降低($P<0.01$)。**结论** C57BL/6J 小鼠在出生后 7 个月表现出明显的高频性老年性聋症状。每日饮用高剂量中药健耳剂可显著延缓老年性聋的发生和发展。中药健耳剂保护听觉延缓老年性聋发生的作用,可能与其所含中药的抗氧化效应有关。

关键词 C57BL/6J 小鼠;老年性聋;中药复方;丙二醛

Protecting Effects of Jian'erji on Age-related Hearing Loss of C57BL/6J Mice XUAN Wei-jun^{1,2}, TANG Jun-bo¹, CHEN Zhuang³, WEI Yu-long³, and DING Da-lian^{1,2,4} 1 Ear, Nose, Throat, Head and Neck Surgery, First Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530023); 2 Ear, Nose, Throat, Head and Neck Surgery, Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530011); 3 Pharmaceutical Factory, Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530011); 4 Center for Hearing Deafness, the State University of New York at Buffalo, USA (Buffalo NY 14214)

ABSTRACT Objective To observe decreased hearing in aged C57BL/6J mice, and to study protective effects of Jian'erji (JEJ) for age-related hearing loss (AHL) and its possible mechanism. **Methods** Totally 36 C57BL/6J mice were randomly divided into four groups, i.e., the normal control group ($n=6$), the AHL control group ($n=12$), the high dose JEJ group ($n=12$), the low dose JEJ group ($n=6$). Mice in the normal control group drank tap water from ablactation till 2 months old. Mice in the AHL control group drank tap water from ablactation till 7 months old. Mice in high and low dose JEJ groups drank JEJ at the daily dose of 3.65 g/kg and 0.91 g/kg respectively from ablactation till 7 months old. Six mice were selected from each group for auditory brainstem response (ABR) using brainstem e-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81260552, No. 81373700); 广西自然科学基金资助项目(No. 2014GXNSFAA118162)

作者单位:1. 广西中医药大学第一临床医学院耳鼻咽喉头颈外科(南宁 530023); 2. 广西中医药大学瑞康医学院耳鼻咽喉头颈外科(南宁 530011); 3. 广西中医药大学瑞康医学院制药厂(南宁 530011); 4. Center for Hearing Deafness, the State University of New York at Buffalo, USA (Buffalo NY 14214)

通讯作者:宣伟军, Tel: 0771-3102263, E-mail: xuan5352100@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1247

voked potentiometer on the day of ending the test. The cochlear tissue, auditory cortex, and liver were immediately collected from 6 mice of the high dose JEJ group and 6 of the AHL control group at the same ages. Contents of malondialdehyde (MDA), end product of lipid peroxidation were detected by UV spectrophotometer using MDA coomassie blue kit. Results ABR thresholds evoked by short-pure tone from 4 to 48 KHz were in the normal range of 2 months old mice in the normal control group. Compared with 2 months old mice in the normal control group, ABR thresholds were significantly elevated in 7 months old mice of the AHL control group ($P < 0.05$). Significant differences also existed in ABR thresholds from 8 to 48 KHz in the high dose JEJ group ($P < 0.05$). Compared with 7 months old mice of the AHL control group, MDA contents in cochlear tissue, auditory cortex, and liver were obviously reduced in the high dose JEJ group ($P < 0.01$). Conclusions C57BL/6J mice showed significant symptoms of AHL in high frequency range at 7 months old. Daily drinking of high dose JEJ could significantly delay the occurrence and progress of AHL. Its protection might be related to antioxidant effects JEJ contained.

KEYWORDS C57BL/6J mice; age-related hearing loss; Compounds of Chinese herbs; malondialdehyde

老年性聋是指随着年龄增加而逐渐发生的以高频听力下降为主并向低频发展的双侧感音神经性听力损失,又称为年龄相关性聋(age-related hearing loss, AHL),因其起病隐匿,病程日久,且病因病机复杂,防治极为困难。既往本课题组通过动物耳蜗病理学实验证实两个临床原始配方分别具有不同程度对抗老年性耳蜗毛细胞损害和螺旋神经节神经元凋亡的作用^[1,2]。在前期实验研究基础上,笔者对中药复方健耳剂配方进一步优化,并将其应用于 C57BL/6J 老年性聋模型小鼠,观察改良的中药复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠老年性聋的防治效果及对机体多个组织器官脂质氧化终产物—丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平的影响。

材料与方法

1 动物 36 只 1 月龄 SPF 级健康 C57 BL / 6J 小鼠,体重 16 ~ 18 g,雌雄各半,由北京维通利华实验动物技术公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2012 - 0001。饲养于 SPF 动物实验室。

2 药物 复方健耳剂由葛根、丹参、黄芪、骨碎补、女贞子、菟丝子组成(该复方中药成分及用药剂量获国家发明专利保护,专利号:ZL2013104661403)。经过水煮、浓缩、烘干、反复粉碎和过筛等流程,制成每克粉末药相当于 6.63 g 生药材制剂。氯胺酮及甲苯噻嗪由 The State University of New York at Buffalo 实验室提供。

3 试剂及仪器 MDA 考马斯亮蓝试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号:20141011);756 型紫外可见分光光度计购自上海菁华科技仪器有限公司。美国 TDT III 系统 RZ6 型听性脑干反应测试仪

(美国 TDT 公司)。

4 动物分组及给药 将 36 只 C57 BL / 6J 小鼠随机分为 4 组,即正常对照组、老年性聋对照组及高、低剂量中药健耳剂组。各组干预及给药方法如下:正常对照组小鼠($n = 6$)自断奶后食用常规饲料并每日饮用自来水直至出生后 2 个月;老年性聋对照组小鼠($n = 12$)自断奶后每日饮用自来水直至出生后 7 个月;高、低剂量中药健耳剂组(n 分别为 12,6,简称中药高、低剂量组)小鼠自断奶后分别每日饮用 3.65、0.91 g / (kg · d) 的中药健耳剂(按照“中药药理研究方法学”^[3]小鼠与成人用量换算,分别相当于临床用量的 9、3 倍)。直至出生后 7 个月。具体方法为:在 1 ~ 3 月龄,用中药粉末加适量比例水配兑(一般为 0.05 g 药粉加 5 mL 水),盛于动物自吸喂养瓶内供小鼠饮用。在无其他水源供应的条件下,小鼠每日饮下规定的内服中药剂量,待动物成长至 4 月龄,改用人工灌喂法以进一步确保动物每日饮下足量中药。

5 观察指标及检测方法 小鼠 7 月龄时终止实验,在老年性聋对照组及中药高剂量组中各抽取 6 只小鼠迅速断头,并在解剖显微镜下打开颅骨,分别取出大脑颞叶听皮层脑组织和耳蜗,同时打开腹腔取出肝组织,用于检测 MDA 水平,另各组 6 只小鼠全部用于听力检测。

5.1 听觉功能检测 参照参考文献[4,5],各组受试小鼠在实验终止前测试听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)。常规腹腔注射氯胺酮(80 mg/kg)和甲苯噻嗪(15 mg/kg)麻醉小鼠,然后将麻醉小鼠置放在 37 °C 体温保温垫上。在电声屏蔽室内对小鼠进行 ABR 测试。具体方法如下:测试

ABR 的记录电极针插入到小鼠颅顶头皮下,参考电极针插入到测试耳的乳突皮下,接地电极针则插入到对侧耳乳突皮下。声音刺激采用短纯音,测试声音的频率分别为 4、8、12、16、32、48 KHz。短纯音从 TDT III 系统的实时处理器 (TDT, RP 2.1, 100 KHz sampling rate) 在固定时相产生并通过一个高频扬声器 (model: AS-TH400A) 发放声音刺激。各频率短纯音声刺激参数的上升和下降时间均为 0.5 ms,时程 2 ms,短纯音的刺激重复率为 21 次/s。发放声刺激的扬声器置于距离小鼠头部前方 15 cm 处,记录 ABR 波形的实时观察窗为 10 ms,ABR 波形的振幅通过 TDT Headstage-4 生物放大器扩大 5 000 倍,带通滤波为 100~3 000 Hz。记录每个频率声诱发的 ABR 波形叠加 250 次。测试每个频率短纯音诱发的 ABR 波形以 10 dB 依次递降直到引不出 ABR 波形为止,再以每 5 dB 逐渐递增,最后确定最低强度声刺激所引出的 ABR 阈值。

5.2 耳蜗、大脑颞叶及肝组织 MDA 含量检测

终止实验时,迅速取出小鼠等量的耳蜗组织、大脑颞叶听皮层脑组织及肝脏组织,按 1:9 比例浸入 PBS (pH 7.4) 液体存放于 -20 °C 冰箱。样品制备及检测严格按照 MDA 考马斯亮蓝试剂盒说明书操作,首先将测试样品置入冰水浴研钵,在液态氮下将测试组织研磨捣碎,分别稀释制备 10% 耳蜗组织液、1% 大脑组织液及 1% 肝脏组织液。将配备好的各种试剂及所测标本液按说明书配置标准加样,分别制成标准管、标准空白管、测定管、测定空白管,用涡混匀器将组织匀浆液混和均匀,保鲜薄膜封盖并扎一小孔,开盖煮沸水浴 40 min 后用流水冷却。以 4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。用紫外可见分光光度计对测试液体以 532 nm 波长和 1 cm 光径调蒸馏水样品为零,然后再测定各管组织液的吸光值,同时将前述同样各组织匀浆稀释液经 2 500 r/min 离心 10 min,取上清液,采用考马斯亮蓝法,应用紫外分光光度计分别测得小鼠耳蜗、大脑、肝脏的蛋白含量。参照说明书提供的标准计算公式换算 MDA 含量 (nmol/mg protein)。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠 ABR 阈值比较 (表 1) 2 月龄正常对照组 C57 BL / 6J 小鼠在 4、8、12、16、32、48 KHz 各个不同频率短纯音所诱发的 ABR 阈值比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 2 月龄正常对照组比较,7 月龄老年性聋对照组小鼠各不同频率短纯音诱发的 ABR 阈值均有所提高 ($P < 0.05$),且频率越高,听力损失越明显,尤其是 48 KHz 短纯音诱发的 ABR,在声刺激强度达到 90 dB 声压级 (SPL) 最高声强时几乎完全不能引出 ABR 波形。与同龄老年性聋对照组比较,除较低频 4 KHz 外,7 月龄中药高剂量组各频率 ABR 阈值均降低,而低剂量组在低频 4 KHz ABR 阈值明显降低 (均 $P < 0.05$)。

2 各组小鼠耳蜗、大脑颞叶、肝组织 MDA 含量比较 (表 2) 与 7 月龄老年性聋对照组小鼠比较,7 月龄中药高剂量组 C57BL/6J 小鼠耳蜗组织、大脑颞叶听皮层脑组织及肝脏组织中的 MDA 含量明显减少 ($P < 0.01$)。

表 2 两组小鼠耳蜗、大脑颞叶及肝组织 MDA 含量比较 (nmol/mgprot, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	耳蜗	大脑	肝脏
老年性聋对照	6	12.61 ± 4.06	1.19 ± 0.59	7.79 ± 2.97
中药高剂量	6	6.46 ± 1.89*	0.59 ± 0.09*	3.50 ± 0.58*

注:与老年性聋对照组比较,* $P < 0.01$

讨 论

AHL 其主要病理改变包括毛细胞、血管纹,并传入螺旋神经节神经元以及中枢听觉通路,其中血管纹变性或动脉粥样硬化,耳蜗血流障碍,活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在耳蜗累积,氧化应激效应引起线粒体 DNA (mtDNA) 损伤,诱使 mtDNA 突变

表 1 各组小鼠 ABR 阈值比较 (dB SPL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	4 KHz	8 KHz	12 KHz	16 KHz	32 KHz	48 KHz
正常对照	6	45.00 ± 8.94	51.67 ± 13.29	56.67 ± 8.16	56.67 ± 5.16	60.00 ± 8.94	58.33 ± 7.53
老年性聋对照	6	61.67 ± 9.31*	70.00 ± 10.95*	73.33 ± 10.33*	75.00 ± 8.37*	83.33 ± 5.16*	>90.00 ± 0*
中药高剂量	6	48.33 ± 15.06	53.33 ± 13.66 [△]	60.00 ± 14.14 [△]	65.00 ± 10.49 [△]	63.33 ± 8.16 [△]	68.33 ± 11.69 [△]
低剂量	6	49.17 ± 3.76 [△]	60.00 ± 8.94	63.33 ± 10.33	73.33 ± 5.16	85.00 ± 5.48	>90.00 ± 0

注:与正常对照组同频率比较,* $P < 0.05$;与老年性聋对照组比较,[△] $P < 0.05$

或缺失, 线粒体功能下降, 诱导耳蜗细胞凋亡则是 AHL 重要病因病机^[6]。通过 10 ~ 85 岁不同年龄人类颞骨标本研究中发现, 血管纹 (stria vascularis, SV) 和螺旋神经节 (spiral ganglion, SG) 均表现出随着年龄的增长逐渐萎缩趋势发展, 而以耳蜗底回的 SV 萎缩最明显^[7]。因此, 耳蜗正常血液供应对维持蜗内电位、离子转运、内淋巴液平衡, 保持耳蜗内环境稳定和听功能至关重要, SV 变性及耳蜗微循环障碍甚至被认为是老年性耳聋的重要原因之一^[8,9]。

复方健耳剂以中医学脾肾瘀立论, 由具有补肾健脾、活血通窍作用的中草药组成, 临床应用其原始方随证化裁加减, 治疗各种感音性神经性聋, 常获较好疗效^[10,11]。该方所选中药如丹参、葛根、黄芪、骨碎补等具有显著改善微循环、促进能量代谢、增强体内 SOD 等酶类功能, 清除 ROS 等有害代谢产物的作用^[12], 符合针对前述 AHL 病因病机的药理选择。MDA 是 ROS 与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应形成的脂质过氧化终产物, 属于 ROS 理论范畴, 因此是判断脂质过氧化, 氧自由基产生的一个重要指标。而机体组织中的 MDA 含量升高与许多老年性病变之间存在着密切的关系^[13]。

本研究证实, 当 C57BL/6J 小鼠开始发生老年性聋时, 不仅耳蜗组织内 MDA 含量升高, 机体其他组织器官内的脂质过氧化终产物的含量也明显升高, 长期饮用中药健耳剂能明显降低老年性聋小鼠耳蜗内组织、大脑和肝脏 MDA 含量, 说明其不仅可减少脂质过氧化终产物在内耳的堆积, 也降低脂质过氧化终产物在机体其他脏器中的囤积, 提示中药健耳剂可能对维持组织器官内的氧化/抗氧化平衡具有一定的作用, 其有效保护小鼠 AHL 模型耳蜗感音神经细胞和听力作用与其清除 ROS 有害代谢产物密切相关。最新研究发现, 通过对过氧化氢 (H_2O_2) 在体外诱导成年大鼠脊髓神经氧化应激反应性损害模型研究发现, 24 h 氧化应激导致脊髓神经细胞存活率明显降低, 而经脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 预处理的 48 h 脊髓神经细胞内活性氧受到明显抑制, 其生存率也明显提高, 这种生存效应与凋亡细胞数量的显著减少及 BDNF 诱导抗氧化酶谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶活性显著增加密切相关^[14]。既往本课题组研究发现, 复方健耳剂原始配方可提高小鼠耳蜗组织 BDNF 表达^[15], 因此认为, 复方健耳剂保护听力药效机制之一, 可能还通过上调 BDNF, 以达到抑制 ROS 有害代谢产物如 MDA

损伤耳蜗感音神经细胞作用。

C57BL/6J 小鼠是目前研究老年性聋的常用动物模型之一, 其寿命周期短, 成长早年即开始出现毛细胞自然凋亡^[16]。本课题组早期研究表明, 毛细胞、螺旋神经节神经元退变, 和疆孔神经纤维变性自出生后前半年即开始出现, 并随着年龄增长, 由耳蜗底回高频区向顶回低频区不断扩张发展^[1]。C57BL/6J 小鼠其听力衰减基因定位于 10 号染色体, 为隐性遗传, 其发生的分子机制为成年听力下降基因转录为 mRNA 导致线粒体保护酶减少, 使该小鼠对自由基的清除能力降低^[17], 因此, 该品系小鼠过早发生的 AHL 应与 ROS 堆积, 损害 mtDNA, 导致 mtDNA 突变或缺失, 线粒体功能下降, 介导耳蜗感音神经细胞凋亡的病理机制关系最为密切^[18]。有文献报道, 利用 16 KHz 短音听惊吓反射检测 C57BL/6J 小鼠, 发现振幅在 7 周时最高, 以后随着年龄增长逐渐下降, 与 7 周龄比较, 14 ~ 36 周龄小鼠 ABR 不敏感, 听力损失约 25 ~ 30 dB, 其中低频听力损失 10 ~ 15 dB, 但 60 周出现全频听力损失 45 ~ 50 dB^[19]。由此可见, C57BL/6J 小鼠的听觉障碍随着年龄增长而进行性加重。从本实验结果可以看出, 该品系小鼠在生长发育早期 (出生后 7 个月) 即开始出现明显的高频听力下降, 与既往报道基本一致^[18,20,21]。C57BL/6J 的 ABR 在出生后 2 个月保持正常, 但在出生后 7 个月, ABR 阈值在高频区呈现陡峭阈移, 提示发生在 C57BL/6J 小鼠的 ABR 障碍是从高频听觉障碍向低频听觉障碍发展, 这种听觉损害特征与临床老年性聋检测情况基本相符。值得注意的是, 高剂量中药健耳剂 C57BL/6J 小鼠在出生后 7 个月的 ABR 阈值虽然有所升高, 但各频率与出生后 2 个月的 C57BL/6J 小鼠比较, 未出现明显的差异。上述结果提示饮用高剂量中药健耳剂的 C57BL/6J 小鼠在出生后 7 个月基本上仍然保持着相当于出生后两个月的正常听力, 提示高剂量复方健耳剂能有效延缓 C57BL/6J 小鼠老年性聋的发生和发展。本次研究还发现, 饮用高剂量中药健耳剂的 C57BL/6J 小鼠在出生后 7 个月延缓老年性聋造成的听觉障碍作用较较低剂量中药健耳剂显著, 提示药物剂量不同, 将直接影响药物对老年性聋的防治效果。

参 考 文 献

- [1] 宣伟军, 黄正团, 丁大连. 中药健耳 II 号胶囊对抗 C57BL/6J 小鼠老年性耳蜗损害的实验研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(1): 47-50.
- [2] 宣伟军, 周仲昭. 补肾健脾胶囊延缓老年性耳蜗毛细胞

- 凋亡的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(2): 114-117.
- [3] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1103-1105.
- [4] Kane KL, Longo-Guess CM, Gagnon LH, et al. Genetic background effects on age-related hearing loss associated with Cdh23 variants in mice [J]. *Hearing Res*, 2012, 283(1-2): 80-88.
- [5] Zheng QY, Ding D, Yu H, et al. A locus on distal chromosome 10 (ahl4) affecting age-related hearing loss in A/J mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(10): 1693-1705.
- [6] Yamasoba T, Lin FR, Someya S, et al. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways [J]. *Hearing Res*, 2013, 303(9): 30-38.
- [7] Suzuki T, Nomoto Y, Nakagawa T, et al. Age-dependent degeneration of the stria vascularis in human cochleae [J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(10): 1846-1850.
- [8] Fetoni AR, Picciotti PM, Paludetti G, et al. Pathogenesis of presbycusis in animal models: a review [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(6): 413-425.
- [9] Kurata N, Schachern PA, Paparella MM, et al. Histopathologic evaluation of vascular findings in the cochlea in patients with presbycusis [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016, 142(2): 173-178.
- [10] 宣伟军, 黄煜猷, 何晓凤. 肝脾肾瘀兼顾论治近期感音神经性聋 45 例 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2003, 11(5): 222-224.
- [11] 宣伟军, 何晓凤, 唐俊波, 等. 以中医肝胆立论治疗突发性聋 50 例临床观察 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2015, 23(1): 21-23.
- [12] 王浴生, 邓文龙, 薛春生主编. 中药药理与应用 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 190-209, 833-835, 982-998, 1146-1152.
- [13] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease [J]. *Toxicology*, 2011, 283(2-3): 65-87.
- [14] Hachem LD, Mothe AJ, Tator CH. Effect of BDNF and other potential survival factors in models of *in vitro* oxidative stress on adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells [J]. *Biores Open Access*, 2015, 4(1): 146-159.
- [15] 宣伟军, 褚汉启, 宣毅. 复方健耳剂对国产 DBA/2J 小鼠耳蜗组织 BDNF 表达影响的初步研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2748-2751.
- [16] Ison JR, Allen PD, O'Neill WE. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice has both frequency-specific and non-frequency-specific components that produce a hyperacusis-like exaggeration of the acoustic startle reflex [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2007, 8(4): 539-550.
- [17] Staeker H, Zheng QY, van De Water TR. Oxidative stress in aging in the C57BL/6J mouse cochlea [J]. *Acta Otolaryngol*, 2001, 121(6): 666-672.
- [18] 丁大连主编. 内耳科学/曲雁, 丁大连, 蒋涛, 等. 老年性听觉损伤 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 145-168.
- [19] Ison JR, Allen PD. Low-frequency tone pips elicit exaggerated startle reflexes in C57BL/6J mice with hearing loss [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2003, 4(4): 495-504.
- [20] Ison JR, Allen PD, O'Neill WE. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice has both frequency-specific and non-frequency-specific components that produce a hyperacusis-like exaggeration of the acoustic startle reflex [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2007, 8(4): 539-550.
- [21] Fujita T, Yamashita D, Uehara N, et al. A high-fat diet delays age-related hearing loss progression in C57BL/6J mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0117547.

(收稿: 2015-07-31 修回: 2016-06-21)