

小鼠幼年期听力剥夺导致成年期社交障碍

周学华 金琳 沈霞[△]

(复旦大学附属耳鼻喉科医院麻醉科 上海 200031)

【摘要】 目的 观察小鼠幼年期听力剥夺对其成年期社交能力的影响。**方法** 新生昆明小鼠被随机分成对照组($n=36$)和听力剥夺组($n=32$)。听力剥夺组小鼠在出生后第7天开始连续1周予以皮下注射新霉素200 mg/kg;对照组则予以注射同等剂量的生理盐水。在1月龄和3月龄分别采用听觉脑干反应(auditory brainstem response, ABR)进行听力测试。在小鼠3月龄时,采用三箱社交实验检测社交能力、旷场实验检测焦虑程度以及Y迷宫检测学习记忆能力。**结果** 新生鼠新霉素皮下注射导致持久的听力损害。与对照组相比,听力剥夺组3月龄时小鼠社交互动时间缩短[(64.89±9.58)s vs. (107.20±39.18)s, $P<0.05$]和社交记忆损害;听力剥夺组小鼠与1号陌生小鼠的社交时间与2号陌生小鼠社交时间相当[83.28 (40.32~85.72) s vs. 57.48 (45.56~64.36) s, $P>0.05$];旷场实验中在中心区域逗留时间较短[157.00 (57.68~180.20) s vs. 202.50 (169.80~230.80) s, $P<0.05$];在Y迷宫中正确的轮替率较低(47.23%±11.81% vs. 61.28%±7.70%, $P<0.05$)。**结论** 小鼠幼年期听力剥夺可导致其成年期社交能力下降、焦虑程度增加和学习记忆能力受损,提示完整的听力功能是保持正常认知功能的重要前提条件。

【关键词】 听力剥夺; 社交能力; 焦虑; 认知功能; 海马; 小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2023.03.014

Hearing deprivation in early period causes impaired social competence in adult mice

ZHOU Xue-hua, JIN Lin, SHEN Xia[△]

(Department of Anesthesiology, Eye and ENT Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China)

【Abstract】 Objective To identify the relationship between hearing deprivation and social skills. **Methods** The mice were randomly divided into control group ($n=36$) and hearing deprivation group ($n=32$). On postnatal day 7 (P7), the experimental mice received one daily neomycin dose for 7 consecutive days (200 mg/kg, subcutaneous injection), and the corresponding dose of sterile saline was separately injected into the control group mice. The auditory brainstem response test (ABR) was applied to compare hearing thresholds of mice at the age of 1 month and 3 month. In mice at three months of age, three-chamber social interaction test was used to evaluate the social ability, Open field experiment was used to evaluate the anxiety level, and Y maze were used to evaluate the learning and memory function. **Results** Neomycin administration to mice in early period caused long lasting and severe hearing loss in adulthood. Compared with the controls, mice with hearing deprivation showed impaired social interaction capability [(64.89±9.58) s vs. (107.20±39.18) s, $P<0.05$) and social memory the hearing loss mice spent comparable time with strange mouse 1 and strange mouse 2 [83.28(40.32~85.72) s vs. 57.48(45.56~64.36) s, $P>0.05$] in the 3-chambered social test, elevated anxiety level in the open field test [157.00 (57.68~180.20) s vs. 202.50 (169.80~230.80) s, $P<0.05$], and impaired learning and memory function in the Y

国家自然科学基金(81671045,82171184)

[△]Corresponding author E-mail: shenxiash@gmail.com

网络首发时间:2023-05-11 16:26:53 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/31.1885.R.20230511.1025.006.html>

maze test ($47.23\% \pm 11.81\%$ vs. $61.28\% \pm 7.70\%$, $P < 0.05$). **Conclusion** Our study demonstrated that hearing deprivation in early period in mice may lead to impaired social competence, elevated anxiety level and impaired learning and memory function. The findings support that hearing input is required for the development of hippocampal dependent normal cognitive function.

【Key words】 hearing deprivation; social competence; anxiety; cognitive function; hippocampus; mice

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81671045, 82171184).

大脑发育过程中,外界信息的感知对塑造大脑功能起着重要的作用^[1]。听力损害是感官功能损害的主要表现形式之一,儿童听力损失也很普遍,一项人群研究报告显示约20%的儿童存在听力损害^[2]。听力损害的儿童常表现为日常交流困难、社交隔离和认知功能损害^[3-4]。但具体机制尚不明确。

海马参与社交记忆即在社交活动中记住已熟悉的同伴和辨识新伙伴^[5]。人群研究已经证实听力损害儿童社交功能下降^[6]。海马也是与学习记忆密切相关的脑区,动物研究证实听力损失会导致小鼠学习记忆功能下降^[7]。影像学研究发现中年出现听力损害的人群继发海马萎缩^[8],提示听力损失会对海马产生不良作用。目前关于听力损害与认知功能障碍之间关系的研究多为人群调查,基础研究多以成年动物为研究对象,较少有研究关注幼年期听力损害与社交能力及认知功能之间的关系。因此,我们拟采用动物模型观察小鼠幼年期听力剥夺对其成年期海马依赖的社交能力和学习记忆功能的影响。

材 料 和 方 法

实验动物 采用北京维通利华实验动物技术有限公司的昆明孕鼠,饲养于复旦大学上海医学院动物房。实验动物操作严格遵守《复旦大学实验动物管理条例》,并得到复旦大学实验动物管理中心实验动物管理委员会的许可。动物房的环境设置为:12 h/12 h昼夜循环,7:00~19:00 开灯,其余时间关灯。小鼠可随意获取食物和水。

给药处理 将昆明小鼠随机分为对照组和听力剥夺组。采用成熟的新霉素耳毒性模型^[9]剥夺听力。新霉素听力剥夺组(Neomycin)小鼠在出生后第7天开始皮下注射新霉素200 mg/kg,连续注射7天。对照组(Control)小鼠皮下注射生理盐水。注

射完毕将小鼠归还至母鼠,待小鼠23日龄时将其与母鼠分笼饲养,每笼3~5只。

动物分组 本实验中共29只小鼠进行听觉脑干反应(auditory brainstem response, ABR)听力检测,其中对照组15只,听力剥夺组14只。因ABR检测在小鼠麻醉后实施,为避免麻醉药物对认知行为学实验结果的影响,完成ABR检测的小鼠不再参加后续的行为学实验。

本实验中每只小鼠只参加一种行为学实验,参加任一行行为学实验的小鼠均为同笼窝鼠。母鼠每次生产仔鼠11~16只,故本实验中被分配至各对照组和听力剥夺组的小鼠数量不完全相同,但是保证每组小鼠数量不少于5只。本实验中,14只小鼠完成三箱社交实验,每组各7只小鼠;11只小鼠完成旷场实验,对照组6只,听力剥夺组5只;14只小鼠完成Y迷宫实验,对照组8只,听力剥夺组6只。

听力检测 在小鼠1月龄和3月龄时,腹腔注射50 mg/kg 艾斯氯胺酮和25 mg/kg 甲苯噻嗪混合物。待小鼠麻醉后采用TDT系统(Tucker-Davis Technology System3)进行ABR检测,测量双耳听力阈值。采用带通滤波为300~3000 Hz的纯音刺激,从90 dB声压级(sound pressure level, SPL)开始,以5 dB SPL为逐步下降直至不再出现可重复的波形。ABR阈值定义为引出可重复出现波形的最小声音强度。听力测试期间维持小鼠体温在37℃左右。

社交能力检测 采用三箱社交行为测试实验^[10-11]。该装置由一个三室装置组成,其中左右两室内各含有一个完全相同的笼子。社交互动阶段:在其中一个笼中放入一只同性别的陌生小鼠(体重和年龄相近的同种属小鼠),记为1号陌生小鼠(S1),随后让实验小鼠在3个箱内自由探索10 min,记录实验小鼠与陌生小鼠接触时间;社交记忆阶段:在另一侧箱室的金属笼子中放入相同要求的第

二只陌生小鼠,记为2号陌生小鼠(S2),分别记录10 min内实验小鼠与2只陌生小鼠接触时间。所有小鼠的运动轨迹由Noldus运动轨迹跟踪系统全程记录。本实验中我们定义实验小鼠鼻尖靠近金属笼附近2 cm范围内即为社交互动。

焦虑程度检测 采用旷场实验进行小鼠焦虑程度检测^[12-13]。将小鼠置于一长宽高分别为50 cm×50 cm×50 cm的透明箱子中,中心区域定义为距离箱壁25 cm的正方形区域。小鼠因趋触性喜欢紧贴墙壁,这在有焦虑样行为的小鼠中更为明显,即焦虑程度较低的小鼠倾向于在旷场的中央区域停留更多时间。每只小鼠分别被放置在箱子中心位置,由Omnitech全自动旷场追踪系统记录随后30 min的运动轨迹,并记录小鼠在中心区域的探索时间。

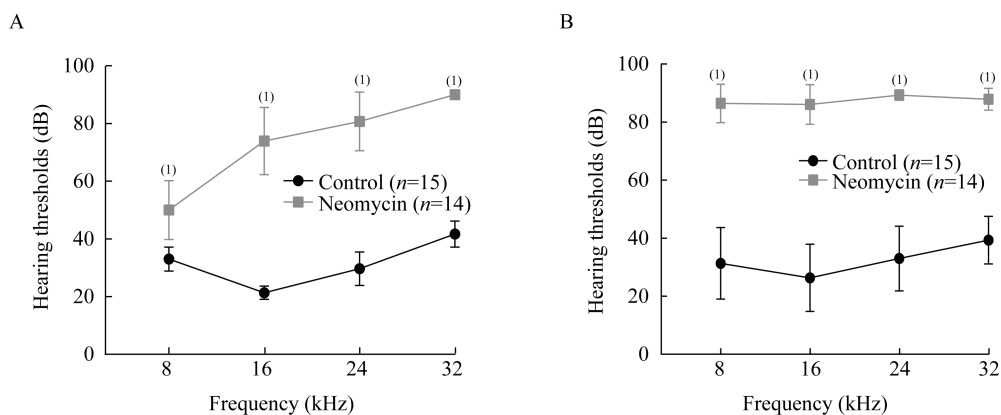
学习记忆能力检测 采用Y迷宫测试小鼠的短时程空间记忆和对新环境的探索能力^[13-14]。该装备由3个完全相同的臂(40 cm×8.5 cm×15 cm,夹角120°)组成,将3个臂分别标示为A、B、C。实验开始时每只小鼠被置于迷宫的中间区域。随后允许小鼠自由探索8 min,并使用Noldus运动轨迹跟踪系统记录每只小鼠进入不同臂的次数以及正确轮替数(连续进入3个不同的臂,如ABC、BCA等)。以(轮替数/最大轮替次数-2)×100计算出正确轮替所占的百分比。

统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行统计分

析。计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验或校正 t 进行比较。计量资料不符合正态分布故以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用Mann-Whitney非参数检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

幼鼠皮下注射新霉素致其成年后持续听力损害 ABR测试结果显示:在1月龄时听力剥夺组小鼠($n=14$)的ABR阈值在4个检测频率均高于对照组小鼠($n=15$),即8 kHz [(50.00±10.19) dB vs. (33.00±4.14) dB, $P < 0.0001$]、16 kHz [(73.93±11.63) dB vs. (21.33±2.29) dB, $P < 0.0001$]、24 kHz [(80.71±10.16) dB vs. (29.67±5.82) dB, $P < 0.0001$]和32 kHz [(90.00±0) dB vs. (41.67±4.50) dB, $P < 0.0001$] (图1A)。同样,3月龄时听力剥夺组小鼠的听力阈值在4个检测频率均高于对照组小鼠,即8 kHz [(86.67±6.46) dB vs. (31.33±1.67) dB, $P < 0.0001$]、16 kHz [(86.33±6.67) dB vs. (26.33±11.57) dB, $P < 0.0001$]、24 kHz [(89.33±1.76) dB vs. (33.00±11.15) dB, $P < 0.0001$]和32 kHz [(90.00±0.31) dB vs. (39.33±8.21) dB, $P < 0.0001$] (图1B)。上述结果提示幼鼠新霉素皮下注射可导致其成年后的听力永久损害。



A: Hearing deprived mice at 1 month old; B: Hearing deprived mice at 3 months old. Data were shown as $\bar{x} \pm s$, and analyzed by unpaired t -test. ⁽¹⁾ $P < 0.0001$.

图1 幼年小鼠注射新霉素后导致的听力剥夺

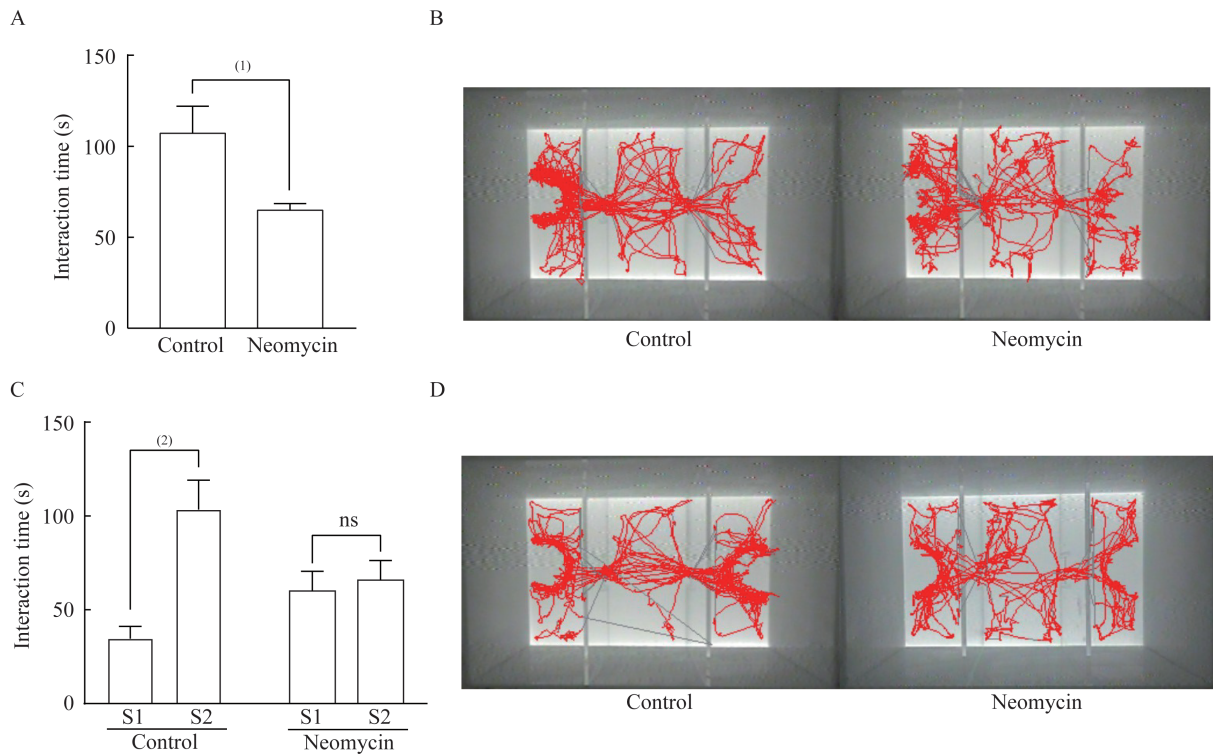
Fig 1 Hearing deprivation of neomycin in mice of early period-induced hearing deprivation mice

听力剥夺小鼠社交功能下降 我们采用三箱社交实验检测听力剥夺对社交功能和社交记忆的影响。我们发现在第一阶段的实验中,3月龄听力

剥夺小鼠($n=7$)与S1小鼠的社交时间短于对照组小鼠($n=7$) [(64.89±9.58) s vs. (107.20±39.18) s, $P = 0.0287$],提示听力剥夺组小鼠的社交能力下降。小

鼠还具有“喜新厌旧”的特性,因此在第二阶段中,小鼠应该会更喜欢与新出现的S2小鼠社交。然而在第二阶段中,听力剥夺组小鼠与S1和S2小鼠之间的互动时间相当,差异无统计学意义[83.28(40.32~85.72) *vs.* 57.48(45.56~64.36)s, $P=0.5350$]。

而对照组小鼠与S2小鼠的互动时间比其与S1小鼠的互动时间长,差异有统计学意义[(103.40±41.35) s *vs.* (34.67±17.05) s, $P=0.0016$]。上述结果提示听力剥夺小鼠的社交记忆功能受损(图2)。



A: The hearing deprived mice spent less time interacting with S1 mouse 1 in the social interaction test ($n=7$ per group). B: Representative tracks of control and hearing deprivation mice in the social interaction test. C: The hearing deprived mice showed impaired social memory in the social novelty test compared with the control mice. D: Representative tracks of control and hearing deprived mice in the social memory test. Data were shown as $\bar{x} \pm s$ analyzed by unpaired *t*-test or $M(P_{25}, P_{75})$ analyzed by Mann-Whitney test. ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$. S1: An unfamiliar mouse, stranger 1; S2: Another unfamiliar mouse, stranger 2.

图2 三箱社交实验显示3月龄听力剥夺小鼠社交互动和社交记忆功能损害

Fig 2 The hearing deprived mice at 3 months old showed impaired social interaction and social memory in a three-chamber social interaction experiment

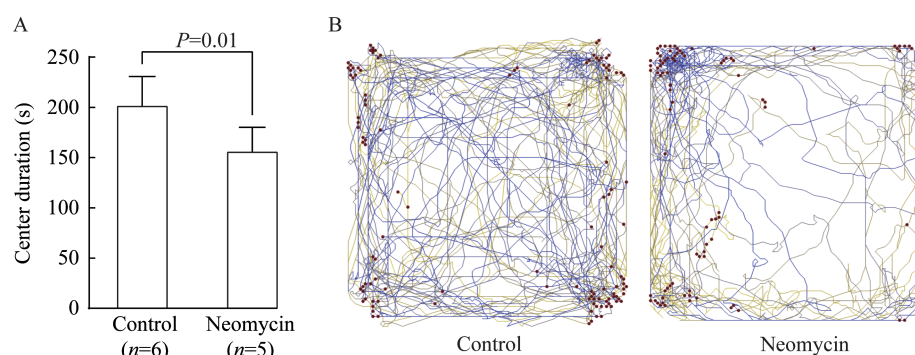
听力剥夺小鼠焦虑程度增加 听力剥夺组小鼠($n=5$)较对照组小鼠($n=6$)在中央区的逗留时间缩短,差异有统计学意义[157.00(57.68~180.20) s *vs.* 202.50(169.80~230.80)s, $P=0.0098$],提示听力剥夺组小鼠的焦虑程度增加(图3)。

听力剥夺小鼠学习记忆功能下降 我们发现听力剥夺组小鼠($n=6$)较对照组($n=8$)正确轮替占最大轮替次数的百分比下降,差异有统计学意义(47.23%±11.81% *vs.* 61.28%±7.70%, $P=0.0193$)。上述结果提示幼年期听力剥夺会导致小鼠成年期学习记忆功能下降。

讨 论

本研究中,我们发现在幼年期被剥夺听力的小鼠在成年期表现为社交功能损害,而且表现为焦虑程度增加和学习记忆功能损害。这提示保持正常的听觉功能对于维持完整的认知功能具有重要的作用。

氨基糖甙类药物具有耳毒性作用,是导致后天获得性神经感应性耳聋的常见药物。新霉素属于氨基糖甙类药物,不通过血脑屏障^[15]。新霉素致神经感应性耳聋是成熟的小鼠听力损伤模型^[9]。我们采用ABR发现,听力剥夺小鼠在1月龄时各频段的



A: The hearing deprived mice spent less time exploring the central area in the open field test; B: Representative tracks of control and hearing deprived mice in the open field test. Data were shown as $M(P_{25}, P_{75})$ analyzed by Mann-Whitney test.

图3 旷场实验显示3月龄听力剥夺小鼠焦虑程度增加

Fig 3 The hearing deprivation mice at 3 months old showed elevated anxiety level in the open field tests

听力阈值较对照组显著升高,在3月龄时各频段的听力阈值仍然维持在较高的数值。上述结果证实新生鼠皮下注射新霉素可导致持久且不可逆转的听力损害。

社交是人们通过传递信息、交流思想来达到某种目的的活动。人通过社交融入社会,对于很多动物来说,社交同样重要。个体的感觉器官在感受环境变化后对此变化产生相应的行为是社交行为生成的机制。故听觉功能在社交中发挥着重要的作用。但是在声音嘈杂的环境中,听力损害的人群通常无法进行正常的社交互动。人群研究已经证实听力损害儿童的社交技能下降^[6],动物实验也证实先天性听力缺失的小鼠在成年期表现为社交记忆功能损害^[7]。海马参与社交记忆,听力损害的动物除听觉中枢神经网络异常外还伴随有海马神经网络功能异常,提示听力损害导致与社交相关的神经网络发育异常^[16]。社交隔离的动物海马中的小清蛋白中间神经元数量减少,进而损害社交记忆功能^[17]。本研究中发现小鼠幼年期被剥夺听力后,在成年期(3月龄)时表现为社交互动能力下降和社交记忆功能损害,进而证实听力对于维系正常的社交功能具有重要的作用。

焦虑是源于对未知事件或对所处情境的不可控而产生的恐惧情绪。焦虑的产生可能与前额叶皮层、杏仁核和海马及其之间的神经环路异常有关^[18],提示海马也与情绪行为有关。人群研究发现听力损害的老年人中焦虑发生率较高^[19]。在儿童中,听力损害的学龄儿童和青少年较听力正常的同龄人焦虑程度显著升高^[20]。在本实验中,我们采用旷场实验也验证了剥夺听力小鼠的焦虑程度较对

照组小鼠显著升高。

目前有观点支持听力损害与认知功能损害之间存在因果关系^[4]。小鼠遭受声创伤后除听力损害还会继发学习记忆功能下降^[21]。即使发育期短暂的听力剥夺也会导致大鼠在成年期表现为空间记忆功能的损害,且海马出现病理性改变^[22]。本研究中发现听力剥夺组小鼠较对照组小鼠正确轮替次数减少,也证实了听力损害会导致与海马相关的学习和工作记忆功能损害。可能的机制包括:首先,海马神经元对听觉信号产生反应^[23],而声音信号的缺失可导致海马神经回路电活动异常,从而导致学习记忆功能损害;其次,社交缺乏是发生痴呆的独立危险因素^[24],故本研究中听力剥夺小鼠社交能力下降也是导致其学习记忆功能下降的原因。

本研究有一定的局限性。首先,未研究听力剥夺如何导致社交障碍、焦虑程度增加以及认知功能受损的具体机制。其次,社交障碍以及严重焦虑也可导致认知功能受损,关于它们之间的关系尚不明确,有待进一步研究。最后,未观察轻中度听力损害对社交能力和认知功能的影响。

本研究结果验证了临床现象,即听力损害儿童表现为社交隔离和学习记忆功能下降。此外,儿童在成长过程中可能受药物、噪音等不良作用而导致听力损害,故应重视对高危儿童的听力功能保护和筛查,并进行及时有效的干预(如佩戴助听器或者植入电子耳蜗等设备)。

总之,我们的动物研究发现小鼠自幼年期永久性听力剥夺可导致其成年期与海马功能相关的社交能力下降、焦虑程度增加和学习记忆能力下降,该研究证实了听力损害和认知功能障碍之间的密切关系。

致谢 李华伟教授对本文初稿进行了评论和指导。

作者贡献声明 周学华 数据采集,统计分析,论文撰写。金琳 数据采集,论文撰写。沈霞 论文构思、撰写和修订,数据采集。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] KILGARD MP, PANDYA PK, VAZQUEZ J, *et al.* Sensory input directs spatial and temporal plasticity in primary auditory cortex[J]. *J Neurophysiol*, 2001, 86(1): 326-38.
- [2] LIEU JEC, KENNA M, ANNE S, *et al.* Hearing loss in children: a review[J]. *JAMA*, 2020, 324(21): 2195-205.
- [3] MOORE DR, ZOBAY O, FERGUSON MA. Minimal and mild hearing loss in children: association with auditory perception, cognition, and communication problems[J]. *Ear Hear*, 2020, 41(4): 720-732.
- [4] GRIFFITHS TD, LAD M, KUMAR S, *et al.* How can hearing loss cause dementia? [J]. *Neuron*, 2020, 108(3): 401-12.
- [5] HITTI FL, SIEGELBAUM SA. The hippocampal CA2 region is essential for social memory[J]. *Nature*, 2014, 508(7494): 88-92.
- [6] FITZPATRICK EM, GABOURY I, DURIEUX-SMITH A, *et al.* Auditory and language outcomes in children with unilateral hearing loss[J]. *Hear Res*, 2019, 372: 42-51.
- [7] GUO R, LI Y, LIU J, *et al.* Complete elimination of peripheral auditory input before onset of hearing causes long-lasting impaired social memory in mice [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 723658.
- [8] CROLL PH, VERNOOIJ MW, REID RI, *et al.* Hearing loss and microstructural integrity of the brain in a dementia-free older population [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 16(11): 1515-1523.
- [9] YU H, LIN Q, WANG Y, *et al.* Inhibition of H3K9 methyltransferases G9a/GLP prevents ototoxicity and ongoing hair cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e506.
- [10] BENTEA E, VILLERS A, MOORE C, *et al.* Corticostriatal dysfunction and social interaction deficits in mice lacking the cystine/glutamate antiporter [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(9): 4754-4769.
- [11] SOLIE C, CONTESTABILE A, ESPINOSA P, *et al.* Superior Colliculus to VTA pathway controls orienting response and influences social interaction in mice [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 817.
- [12] LIU WZ, ZHANG WH, ZHENG ZH, *et al.* Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2221.
- [13] YOSHIZAKI K, ASAI M, HARA T. High-fat diet enhances working memory in the Y-maze test in male C57BL/6J mice with less anxiety in the elevated plus maze test [J]. *Nutrients*, 2020, 12(7): 2036.
- [14] STOVER KR, CAMPBELL MA, VAN WINSEN CM, *et al.* Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 289: 29-38.
- [15] SEGAL JA, HARRIS BD, KUSTOVA Y, *et al.* Aminoglycoside neurotoxicity involves NMDA receptor activation[J]. *Brain Res*, 1999, 815(2): 270-277.
- [16] QU T, QI Y, YU S, *et al.* Dynamic changes of functional neuronal activities between the auditory pathway and limbic systems contribute to noise-induced tinnitus with a normal audiogram[J]. *Neuroscience*, 2019, 408: 31-45.
- [17] DENG X, GU L, SUI N, *et al.* Parvalbumin interneuron in the ventral hippocampus functions as a discriminator in social memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(33): 16583-16592.
- [18] BISHOP SJ. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account[J]. *Trends Cogn Sci*, 2007, 11(7): 307-316.
- [19] CONTRERA KJ, BETZ J, DEAL J, *et al.* Association of hearing impairment and anxiety in older adults [J]. *J Aging Health*, 2017, 29(1): 172-184.
- [20] THEUNISSEN SC, RIEFFE C, SOEDE W, *et al.* Symptoms of psychopathology in hearing-impaired children [J]. *Ear Hear*, 2015, 36(4): e190-198.
- [21] LIU L, SHEN P, HE T, *et al.* Noise induced hearing loss impairs spatial learning/memory and hippocampal neurogenesis in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20374.
- [22] ZHAO H, WANG L, CHEN L, *et al.* Temporary conductive hearing loss in early life impairs spatial memory of rats in adulthood [J]. *Brain Behav*, 2018, 8(7): e01004.
- [23] ITSKOV PM, VINNIK E, HONEY C, *et al.* Sound sensitivity of neurons in rat hippocampus during performance of a sound-guided task [J]. *J Neurophysiol*, 2012, 107(7): 1822-34.
- [24] KUIPER JS, ZUIDERSMA M, OUDE VOSHAAR RC, *et al.* Social relationships and risk of dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 22: 39-57.

(收稿日期: 2022-10-11; 编辑: 王蔚)