

· 论 著 ·

## 耳后进路大鼠耳蜗中阶侧壁显微注射携带 EGFP 慢病毒的实验研究\*

潘松<sup>1,2#</sup>, 付勇<sup>3</sup>, 刘杰<sup>1</sup>, 刘立思<sup>1△</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院耳鼻喉-头颈外科, 湖北武汉 430030; 2. 咸宁学院附属第一医院耳鼻喉科, 湖北咸宁 437100; 3. 浙江大学附属第一医院耳鼻喉科, 浙江杭州 310003)

**摘要:**目的 探讨经大鼠耳后进路耳蜗中阶侧壁导入携带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)慢病毒的实验可行性,为后续携带目的基因慢病毒治疗大鼠感音神经性聋的实验打下基础。方法 大鼠经耳后进路,耳蜗中阶侧壁开孔,显微注射携带 EGFP 慢病毒液或人工内淋巴液。术后 3 周,处死动物取耳蜗,行耳蜗冰冻切片,荧光显微镜下观察携带 EGFP 慢病毒的表达情况。术前和术后 3 周动物处死前,行听性脑干反应(ABR)检测其听功能改变。结果 术中、术后动物一般情况好。EGFP 可见在耳蜗中阶血管纹边缘细胞、Corti 器、螺旋神经和螺旋神经节细胞内表达。术后实验组大鼠手术耳 ABR 阈值提高(55.8±4.9)dB SPL。结论 大鼠经耳后进路,耳蜗中阶侧壁开窗,可将慢病毒携带的 EGFP 基因导入,并在耳蜗中阶 Corti 器表达。

**关键词:**大鼠;耳后进路;慢病毒;显微注射;增强型绿色荧光蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.019

中图分类号:R764.431;R459.9

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2593-03

## A study of a postauricular approach to rat cochlear scala media lateral wall for microinject lentivirus with EGFP\*

PAN Song<sup>1,2#</sup>, FU Yong<sup>3</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, et al.

(1. Department of otolaryngology-head neck surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Xianning College, Xianning Hubei 437100, China; 3. Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

**Abstract:** Objective To assess the feasibility of lentivirus with enhanced green fluorescent protein (EGFP) by postauricular microinjection via cochlear scala media lateral wall in rat, and give the foundation for the experiment of treating rat sensorineural hearing loss using lentivirus with target gene. **Methods** Rats were implanted with lentivirus or artificial endolymph by postauricular microinjection through cochlear scala media lateral wall. On 3 weeks after the surgery, rats were sacrificed and the cochlea were taken. The cochlea was frozen and cut into slices. Expression of EGFP was observed by fluorescence microscope. The auditory function was detected by auditory brainstem response (ABR) test before and 3 weeks after the surgery. **Results** Animals' general conditions were good during and after the surgery. Expression of EGFP was observed in cochlear scala media strial marginal cell, Corti organ, spiral nerve and spiral ganglion cell. Threshold of ABR was improved (55.8±4.9)dB after operation in experimental rat group. **Conclusion** Lentivirus with EGFP gene can be brought into cochlea and EGFP gene can express in cochlear corti organ when rat was operated by postauricular microinjection via cochlear scala media lateral wall.

**Key words:** rat; postauricular approach; lentivirus; microinjection; enlarged green fluorescent protein

外周性感音神经性聋是一种严重影响人类生活质量的疾病,其病因主要是由于耳蜗毛细胞的损伤引起,而毛细胞在成年哺乳动物不可自行再生。针对毛细胞再生的治疗方式包括基因治疗和细胞替换治疗。基因治疗可用于保护毛细胞<sup>[1]</sup>或产生新的毛细胞<sup>[2]</sup>,细胞替换治疗是利用干细胞产生新的毛细胞和听神经。不管是基因治疗还是细胞替换治疗,经耳蜗行局部显微注射,将基因和细胞导入耳蜗是最有效的方式。本课题组前期研究发现经大鼠圆窗导入绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的神经干细胞后,可以在前庭阶和鼓阶发现 GFP 的表达,但在血管纹和 Corti 器无明显绿色荧光表达<sup>[3-4]</sup>。如何将外源性基因或细胞导入耳蜗 Corti 器部位,从而更好地发挥针对 Corti 器损伤的治疗作用。本实验以此为出发点,通过大鼠耳后切开手术进路,经耳蜗中阶侧壁显微注

射携带增强型绿色荧光蛋白基因(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的慢病毒,并观察其在耳蜗的表达情况,为后续的经耳蜗中阶导入以慢病毒为载体的基因治疗提供实验基础。现报道如下。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 携带 EGFP 的慢病毒购于上海比昂公司,病毒滴度为  $2 \times 10^8$  TU/mL。人工内淋巴液参照文献<sup>[5]</sup>配置, NaCl 1 mM, KCl 126 mM, KHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.025 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.025 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.4 mM。

**1.2 动物分组** 健康 SD 大鼠 12 只,雄性,体质量 250~300 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,耳廓反射正常,听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)检查示双耳听力正常。将大鼠随机分为两组:实验组 6 只,经耳蜗中

\* 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2080334);浙江省医药卫生科学研究基金课题(2008A056)。 # 华中科技大学同济医学院在读博士研究生。 △ 通讯作者, E-mail: liulisient@yahoo.com.cn。

阶侧壁行 EGFP 慢病毒显微注射;对照组 6 只,经耳蜗中阶侧壁行人工内淋巴液显微注射。

**1.3 动物手术** 大鼠用氯胺酮(40 mg/kg)和氯丙嗪(15 mg/kg)行大腿肌肉注射麻醉后,取头上脚下位侧俯卧于自制加热平板上并维持温度在 37℃左右,头偏右侧使左耳向上。行耳后备皮后,碘伏消毒,手术器械术前经高温灭菌消毒。沿耳廓后沟 2 mm 处 4 点到 7 点的位置弧形剪开皮肤及皮下组织,向下分离腺体后剪开颈阔肌,用自制拉钩拉开切口,向深处钝性分离可见胸锁乳突肌,向上牵开胸锁乳突肌后,可见面神经和二腹肌后腹(封 2 图 1a);向后分离并牵开二腹肌后腹,在面神经和二腹肌围成的三角区域内向深处分离并去除听泡外侧面覆盖的软组织和筋膜,可暴露听泡外侧壁(封 2 图 1b);沿听泡后外侧磨除骨壁并扩大,可暴露镫骨动脉、圆窗窝、耳蜗外侧壁(封 2 图 1c);在耳蜗底周外侧壁色素沉着区,尽量远离镫骨动脉和便于操作处确定开口,用三棱针穿破耳蜗中阶外侧壁骨质,再用细钩针穿破内壁软组织膜,可见少许血液和清亮的淋巴液流出,将微量操纵器上固定的玻璃微电极导入开口,用 5 min 将 EGFP 慢病毒或人工内淋巴液 5  $\mu$ L 缓慢注入耳蜗中阶(封 2 图 1d);完成后以自体小块颈阔肌覆盖,再用牙科水门汀覆盖颈阔肌,封闭耳蜗开口,行中耳腔碘伏清洗消毒后,用少许明胶海绵堵塞中耳腔;复位肌肉和软组织,分层缝合切口。缝合口处以乙醇消毒。待大鼠清醒后,回笼中喂养。术后肌注青霉素 20 万 IU/d,连续 3 d。

**1.4 ABR 检测** 于动物手术前和手术后 3 周在动物处死前行 ABR 测试。采用 Nicolet Compass 系统,刺激声为短声,时程 0.1 ms,重复率为 11.1 次/秒,滤波带宽 150~2 000 Hz,叠加 1 000 次,扫描周期 10 ms。采用银丝电极,正极插入头顶正中皮下,参考电极插入检测耳颌面部皮下,地极电极插入对侧耳颌面部皮下。刺激声经插入式耳塞给入,给声策略采用升 10 降 5 法;以 III 波消失的刺激强度确定阈值,并要求至少能重复 1 次。

**1.5 标本取材和制备** 术后 3 周,待 ABR 检测完后,将两组大鼠断头立即取出耳蜗,挑开蜗尖、前庭窗和蜗窗,从蜗尖灌注 4%多聚甲醛至无血性物流出,并在 4%多聚甲醛中 4℃下固定过夜,再以 20%EDTA 脱钙 2 周后,20%蔗糖脱水,OCT 包埋,沿蜗轴水平冰冻切片。整个过程注意避光操作。

**1.6 荧光显微镜观察** 切片以 PBS 洗 3 遍,20%甘油封片,在荧光显微镜下观察、拍照。

**1.7 统计学方法** 全部数据经 SPSS16.0 统计软件处理,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。ABR 阈值比较采用配对 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 大鼠的一般情况** 两组术中、术后均无动物死亡。术后大鼠无明显歪头、斜颈、行走不稳、面瘫、食欲减退及切口感染等症状。术后 3 周手术耳听泡打开后未见化脓感染,明胶海绵有少量残余,耳蜗开窗处可见白色的牙科水门汀封闭,未见明显异常。

**2.2 ABR 阈值的变化** 手术后实验组大鼠的手术耳 ABR 阈值提高(55.8 $\pm$ 4.9)dB SPL;对照组大鼠的手术耳 ABR 阈值提高(56.7 $\pm$ 6.1)dB SPL;两组大鼠手术耳的 ABR 阈值比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );两组大鼠的非手术耳在手术前、后 ABR 阈值无明显变化;两组大鼠的手术耳,在手术后听

力均高于手术前,且差异有统计学意义(表 1)。

表 1 两组大鼠手术前、后 ABR(click)阈值(dB SPL)

组别	术前手术耳	术前非手术耳	术后手术耳	术后非手术耳
实验组	35.8 $\pm$ 3.8	36.7 $\pm$ 4.1	91.7 $\pm$ 5.2*	37.5 $\pm$ 5.2
对照组	36.7 $\pm$ 6.0	36.7 $\pm$ 4.1	93.3 $\pm$ 4.1*	39.2 $\pm$ 3.8

与同组术前手术耳比较,\*: $P < 0.05$ 。

**2.3 耳蜗内 EGFP 慢病毒的表达** 在荧光显微镜下可见,术后 3 周实验组可见耳蜗内有 EGFP 的绿色荧光表达,其主要位于耳蜗中阶的血管纹边缘细胞、Corti 器、螺旋神经和螺旋神经节细胞等部位;对照组的耳蜗内无 EGFP 的绿色荧光表达(封 2 图 2)。

## 3 讨 论

在外周性感音神经性聋动物模型的活体实验中,如何经耳蜗快速成功地导入基因或细胞是实验的关键。大鼠由于其基因组与人类的同源基因组相似,成为进行内耳研究的常用对象<sup>[6]</sup>。另外大鼠的手术耐受性和抗感染能力均强于小鼠,故本实验选取大鼠为研究对象。大鼠麻醉对手术的顺利进行显得很重要,氯胺酮和氯丙嗪的复合麻醉可以维持 2 h 左右,药量不可过大,否则可致动物死亡。

在耳蜗基因导入手术的进路选择上,国内外较多应用的是腹侧<sup>[7-8]</sup>和耳后<sup>[9]</sup>进路。大鼠听泡的位置较深,腹侧进路须经过气管、大的面静脉和颈动脉分支等结构,损伤后均可导致动物术中、术后发生死亡;而耳后进路经过的重要结构相对较少。本研究采取耳后进路,术中随时以手指探触骨性听泡的位置,切开颈阔肌,向上牵拉胸锁乳突肌,然后以面神经和二腹肌后腹围成的三角为解剖标志,即面神经下方、二腹肌后腹的前方,进一步向深处分离骨性组织上覆着的软组织和筋膜,即可暴露听泡;在听泡的前方有颈内动脉,操作时切勿靠前损伤而导致动物死亡。听泡开窗时位置选择靠前外,可避免损伤耳蜗侧壁和镫骨动脉,开窗的大小以能看见耳蜗底周骨质和镫骨动脉为宜,不宜过大。韩朝和迟放鲁<sup>[8]</sup>报道听泡打孔的位置选择在听泡下壁的前偏外侧,与作者观点一致。

在耳蜗中阶外侧壁开口口的定位上,作者发现血管纹在耳蜗侧壁上呈现一较明显的色素沉着区,遂以耳蜗底周外侧壁色素沉着区为解剖标志带,选取尽量远离镫骨动脉且便于操作处为开口,在显微镜下将 EGFP 慢病毒导入耳蜗中阶。Iguchi 等<sup>[10]</sup>报道通过观察耳蜗骨壁色素沉着区,在该部位开孔可将细胞导入内淋巴系统,这与作者的观点一致。本实验采用的 EGFP 是一种优化的突变型 GFP,将 64 位丝氨酸用苏氨酸代替,65 位苯丙氨酸用亮氨酸代替,使其产生的荧光比野生型 GFP 强 35 倍,大大增强了报告分子的灵敏度,该分子的激发波长为 488 nm,发射波长为 507 nm。经中阶导入后,可以在血管纹边缘细胞、Corti 器、螺旋神经和螺旋神经节细胞等部位有 EGFP 的绿色荧光表达,提示可以通过慢病毒为载体,将外源基因导入到 Corti 器部位,更好地发挥针对 Corti 器损伤的基因治疗。韩朝等<sup>[11]</sup>报道经圆窗入路导入的腺病毒不能感染内外毛细胞和支持细胞;经耳蜗中阶侧壁导入的腺病毒,可以感染听器的支持细胞和血管纹缘细胞。

耳蜗侧壁开口后,对大鼠听功能产生一定的影响。本研究发现手术前、后实验组大鼠 ABR 阈值提高了(55.8 $\pm$ 4.9)dB。Bogaerts 等<sup>[12]</sup>报道 CBA/CaH 小鼠耳蜗侧壁开口术后 3 个月 ABR 阈值提高了 15~45 dB,并认为听力损失与开口的大小

有关,小的开孔口导致小量的听力损失,大的开孔口导致大量的听力损失和术后转圈行为。Iguchi 等<sup>[10]</sup>报道 C57BL/6 小鼠耳蜗侧壁开孔术后听力损失 40~70 dB,而外半规管开孔导致的听力损失小于耳蜗侧壁开孔。韩朝等<sup>[13]</sup>报道通过豚鼠耳蜗中阶输注腺病毒后,ABR 阈值为(33.33±11.69)dB。作者发现经耳蜗中阶外侧壁导入慢病毒和人工内淋巴的大鼠,术后 ABR 阈值无明显差异,提示 ABR 的阈值增高与导入内淋巴的物质无关,可能与手术和显微注射的过程有关;韩朝等<sup>[13]</sup>也报道向豚鼠耳蜗中阶输注的不同药物成分对其听力造成的影响在 2 周时无差别,听力损害只与灌注的机械性损伤有关。作者认为耳蜗开孔口尽可能的小,中耳操作时尽量不损伤听小骨、鼓膜、镫骨动脉等重要结构,可最大限度地减少手术过程造成的听力损失;选用可缓慢、匀速控制的显微注射系统可最大限度地减少显微注射过程造成的听力损失。对于如何既能将基因导入耳蜗中阶、又能尽量减小听功能的损伤还有待进一步的研究。

综上所述,本实验描述了一种安全、有效地将基因导入大鼠耳蜗中阶的方法,导入的外源性基因可以在耳蜗中阶的 Corti 器表达,为后续针对性地经耳蜗中阶导入治疗基因,治疗 Corti 器损伤的外周性感音神经性聋提供了实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Kawamoto K, Sha SH, Minoda R, et al. Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity [J]. *Mol Ther*, 2004, 9(2):173.
- [2] Izumikawa M, Minoda M, Kawamoto K, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals[J]. *Nat Med*, 2005, 11(3): 271.
- [3] 付勇,汪审清,王建亭,等.大鼠胚胎神经干细胞经蜗窗移植到正常耳蜗的研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*,

2008, 43(12):944.

- [4] Fu Y, Wang S, Liu Y, et al. Study on neural stem cell transplantation into natural rat cochlea via round window [J]. *Am J Otolaryngol*, 2009, 30(1):8.
- [5] Ishimoto S, Kawamoto K, Warpeha RL, et al. Gene transfer into supporting cells of the organ of Corti[J]. *Hear Res*, 2002, 173(1-2):187.
- [6] Anson BJ, Donaldson JA, Warpeha RL, et al. The surgical anatomy of the ossicular muscles and the facial nerve[J]. *Laryngoscope*, 1967, 77(8):1269.
- [7] Qiu J, Olivius P, Tong B, et al. Ventral approach to rat inner ear preserves cochlear function[J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(3):240.
- [8] 韩朝,迟放鲁.腺病毒载体经豚鼠耳蜗中阶导入内淋巴系统的实验观察[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2007, 7(2):79.
- [9] Lu W, Xu J, Shepherd RK. Cochlear implantation in rats: a new surgical approach[J]. *Hear Res*, 2005, 205(1):115.
- [10] Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, et al. Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea[J]. *Acta Otolaryngol Suppl*, 2004, 124(1):43.
- [11] 韩朝,迟放鲁,杨娟梅,等.腺病毒通过不同径路导入豚鼠耳蜗后的实验观察[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 23(13):607.
- [12] Bogaerts S, Douglas S, Corlette T, et al. Microsurgical access for cell injection into the mammalian cochlea[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 168(1):156.
- [13] 韩朝,迟放鲁,黄一波,等.注射用水及腺病毒中阶输注对豚鼠听力的影响[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2008, 8(4): 214.

(收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-08-20)

(上接第 2592 页)

用可吸收止血纱布填压肿瘤剜除术后腔隙,出血少、创伤小、恢复快、效果好。

对直径大于 4 cm 的 RAML 患者应给予积极的手术探查,手术方式根据瘤体大小、部位及是否有恶性潜能而决定,尽可能选择保肾手术。若肿瘤位于肾实质部分较表浅,则无需阻断肾动脉而直接行肿瘤剜除术;若肿瘤包膜不明显、与正常肾脏界限不清或冷冻切片病理检查证实为上皮样 RAML,考虑行肾部分切除术;若肿瘤巨大、位于肾门处、术中冷冻切片不能排除恶性可能或破裂出血引起休克等,则可考虑行肾切除术。

#### 参考文献:

- [1] 王勤.肾血管平滑肌脂肪瘤影像学诊断[J]. *中国医学影像技术*, 2008, 24(12):2033.
- [2] 刘晖,唐丽瓿,纪祥瑞.肾血管平滑肌脂肪瘤的临床及病理特征[J]. *青岛大学医学院学报*, 2008, 44(1):93.
- [3] Cibas ES, Goss GA, Kulke MH, et al. Malignant epithelioid angiomyolipoma of the kidney: a case report and review of the literature[J]. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25:

121.

- [4] 刘晖,王宏桥,李霞,等.恶性上皮样肾血管平滑肌脂肪瘤 1 例[J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36(9):640.
- [5] Steiner MS, Goldman SM, Fishman EK, et al. The natural history of renal angiomyolipoma[J]. *J Urol*, 1993, 150: 1782.
- [6] 刘雨,董克权,王文成,等.肾血管平滑肌脂肪瘤(附 8 例报道)[J]. *临床泌尿外科杂志*, 1992, 7(3):166.
- [7] 王精兵,王悍,安潇,等.超选择性节段性肾动脉栓塞治疗肾血管平滑肌脂肪瘤破裂出血[J]. *介入放射学杂志*, 2008, 17(9):637.
- [8] 崔亮,高江平,董隽,等.腹腔镜下肾血管平滑肌脂肪瘤单纯剜除术[J]. *中国微创外科杂志*, 2008, 8(4):305.
- [9] 刑念增,张军晖,李建业,等.介入超声在腹腔镜下保留肾单位手术中的应用[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2009, 30(4): 231.

(收稿日期:2010-04-22 修回日期:2010-06-11)