

· 基础研究 ·

乳鼠耳蜗单离外毛细胞膜 Prestin 分布的实验研究*

张 博,尹时华[△]

(广西医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科,南宁 530021)

摘要:目的 探讨乳鼠耳蜗外毛细胞(OHC)细胞膜上动力蛋白 Prestin 的分布。方法 获取 7 日龄的 Wistar 乳鼠单离的耳蜗 OHC,利用 Prestin 特异性抗体染色,在荧光显微镜下观察 Prestin 在 OHC 细胞膜上的表达与分布。结果 单离 OHC 侧膜存在较为均一的 Prestin 抗体阳性染色;OHC 基底部细胞膜亦见阳性染色,但较弱;侧膜与基底部细胞膜结合部位未见阳性染色。结论 Prestin 主要分布在 Wistar 乳鼠耳蜗 OHC 的侧膜,基底部膜也有少量表达。

关键词:乳鼠;耳蜗;外毛细胞;Prestin

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)29-3178-02

Experimental study the prestin distribution at the membrane of single outer hair cells of cochlea in newborn rat*

Zhang Bo, Yin Shihua[△]

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the Prestin distribution at the membrane of single outer hair cells of cochlea in newborn rat. **Methods** In this experiment, single cell of outer hair cells was geted from 7-day-old wistar rat, the distribution of prestin was examined by immunofluorescent staining and fluorescence microscopy. **Results** The staining was expressed on the lateral membrane; the base membrane was also expressed, but weaker; on the bottom side of the membrane and the lateral membrane-binding site, The staining was not expressed. **Conclusion** Prestin is mainly distributed on the lateral membrane, and basal membrane is also a small amount of expression.

Key words: newborn rat; cochlea; outer hair cell; prestin

Prestin 是一种特异存在于耳蜗外毛细胞(outer hair cell, OHC)的动力蛋白,该蛋白在解释哺乳动物耳蜗的高度敏感性和频率选择性以及 OHC 的电动特性机制上具有重要意义。近年来,关于 Prestin 在 OHC 的表达、定位以及 Prestin 与 OHC 电运动和耳蜗放大效应之间的关系成为研究热点。早期研究认为采用全细胞电压钳技术,在 OHC 细胞核平面以上的侧膜区域能够记录到与电运动相关的非线性电容,在平面以下的侧膜区域则不能记录到明显的非线性电容,因此,有人推测 OHC 细胞膜在细胞核平面以下部位无 Prestin 分布^[1-4]。而近年来有人运用荧光双染及复合染色等方法观察发现,Prestin 不仅分布于成年大鼠和豚鼠 OHC 侧膜,在细胞底部也有分布^[5]。但有关 Prestin 在乳鼠耳蜗单离 OHC 细胞膜上的分布尚未见报道。本研究以 Wistar 乳鼠为研究对象,观察 Prestin 在乳鼠耳蜗单离 OHC 细胞膜上的分布定位。

1 材料与方 法

实验动物与 OHC 的分离:选择出生 7 d 的 Wistar 乳鼠 20 只,雌雄不限,迅速断头,在解剖显微镜下取出耳蜗基底膜。基底膜置于浓度为 0.25 mg/mL 的木瓜蛋白酶中,37 ℃ 孵育 10~15 min,轻柔吹打后用加有 10% 胎牛血清的 DMEM 液终止消化。悬液经离心后去上清液,加入 1 mL 培养液在 37 ℃,5% CO₂ 孵箱孵育 24 h。4% 多聚甲醛固定 30 min,封闭液(10% 山羊血清和 1% BSA)30 min,1:1 000 一抗 4 ℃ 过夜,1:64 FITC 兔抗羊 IgG 二抗(武汉博士德公司生产)室温下孵育 1 h,荧光显微镜下观察。

2 结 果

荧光显微镜下显示,经 Prestin 抗体标记的乳鼠单离 OHC 的侧膜可见明显的 Prestin 抗体阳性染色;OHC 基底部细胞膜亦见阳性染色,但较弱(图 1);侧膜与基底部膜结合部位未见阳性染色。

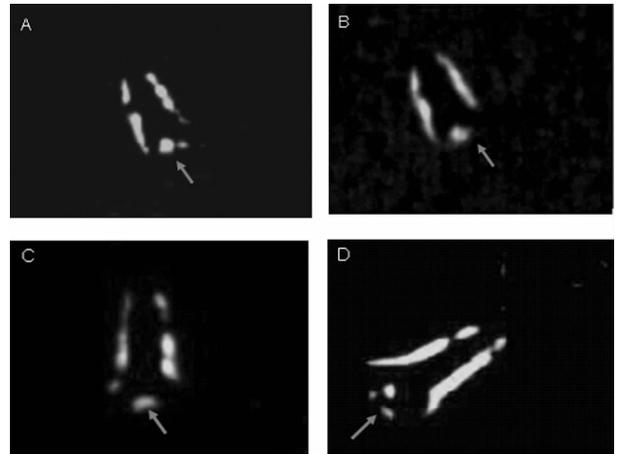


图 1 荧光显微镜下基底部细胞膜部位(箭头所示)

3 讨 论

在耳蜗放大机制中,OHC 能够将电信号转化为细胞长度的机械性改变^[6]。当外界声音引发耳蜗内液体波动及基底膜机械振动时,内毛细胞和 OHC 表面的纤毛束可将这种机械刺激转换为电信号。其中 OHC 电位变化除小部分作为声音信息传入大脑外,大部分都通过引发胞体电运动转化为机械能,并反馈给基底膜,进一步增强基底膜的振动,使内毛细胞感受的机械刺激得以放大^[7]。此过程中,OHC 电运动成为关键。Prestin 作为 OHC 的运动蛋白,是电运动和耳蜗放大效应的分子基础,并特异性地在耳蜗 OHC 侧膜上表达,而在耳蜗内毛细胞及心脏、脑、肾脏、肺和肌肉等重要组织中均未发现 Prestin 表达^[8-10]。通过基因敲除动物模型,也进一步证实了 Prestin 是 OHC 电运动及耳蜗放大效应所必需的运动蛋白^[11]。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860312);国家博士后基金资助项目(20080440819);广西自然科学基金资助项目(桂科自 0728134)。

[△] 通讯作者: Tel: 13978865695; E-mail: shihuayin@yahoo.com.cn。

近年来,有人运用荧光双染及复合染色等方法观察发现,成年大鼠和豚鼠 OHC 除了侧膜有明显的 Prestin 抗体阳性染色之外,在 OHC 基底部的细胞膜上也有较强的阳性染色,同时在细胞核平面以下的侧膜即侧膜与基底部细胞膜结合处也有阳性染色存在^[5]。

本实验是以出生 7 d 乳鼠为研究对象,利用 Prestin 特异性抗体染色,在荧光显微镜下观察 Prestin 在乳鼠耳蜗单离 OHC 细胞膜上的表达与分布。本研究结果显示:(1)OHC 侧膜存在较为均一的 Prestin 抗体阳性染色;(2)OHC 底端细胞膜亦见阳性染色,但着色较弱;(3)侧膜与底端细胞膜结合部位未见阳性染色。通过本实验的结果可以推测:成年大鼠 OHC 基底部细胞膜以及细胞核平面以下的侧膜上分布的 Prestin 蛋白不是一出生就存在的,而是逐步产生增多的。有文献报道了 Prestin 的表达可被控制,并且在细胞生命周期中处于不间断更新过程中,并推测 OHC 的基底部可能存在 Prestin 的储存库^[5,12]。从本实验结果来看,储存库可能存在于 OHC 侧膜,侧膜上的 Prestin 在耳蜗 OHC 成熟过程中不断增加,并向基底部膜扩散,这也能比较好地解释成年 Wistar 大鼠 OHC 细胞核平面以上的侧膜、基底部膜和细胞核平面以下的侧膜上 Prestin 密度逐渐减少这一现象。

参考文献:

- [1] Huang G, Santos-Sacchi J. Mapping the distribution of the outer hair cell motility voltage sensor by electrical amputation[J]. *Biophys J*, 1993, 65(16): 2228-2231.
- [2] Adler HJ, Belyantseva IA, Merritt RC, et al. Expression of prestin, a membrane motor protein, in the mammalian auditory and vestibular periphery[J]. *Hear Res*, 2003, 184(1): 27-29.
- [3] Yu N, Zhai SQ, Yang SM, et al. Distribution of prestin on outer hair cell basolateral surface[J]. *J Otolaryngol*, 2008, 3(2): 92-97.

(上接第 3177 页)

也见于其他患者。鉴别诊断:临床上应与休克、脑外伤、呼吸窘迫综合征鉴别。

目前,尚无 1 种药物可以直接溶解脂肪,消除脂栓,因此,均以对症治疗为主。关键是早期诊断,早期治疗^[6]。重点纠正低氧血症,支持肺功能。适当应用激素,保护血小板和细胞微粒体膜的稳定性,阻滞由脂肪酸引起的肺部炎症反应,降低毛细血管通透性,防止血流在毛细血管内滞留;高压氧治疗可以提高血氧分压,纠正组织缺氧,改善心、肺、脑等重要脏器的功能。早期大剂量使用甲基强的松龙,可以提高治愈的概率^[7-8]。

尽管 FES 是外伤及骨折等创伤患者的严重并发症,亦有吸脂术中出现的 FES^[9]以及结肠破裂肠内容致肺栓塞^[10]的报道,国外有与手术相关的 FES 的报道^[11],而本例胃癌手术中并发 FES 死亡的病例实属罕见,国内外文献未见有类似报道。因此,如何防止此类事件的发生是需要关注的一个问题。作者认为术中轻柔操作,特别是在助手拉钩过程中,不能过分挤压大网膜等脂肪组织。纤维蛋白原及 D-二聚体的变化可作为脂肪栓塞的前瞻性检验指标,对预防性治疗的疗效观察也有一定指导意义^[12-13]。

参考文献:

- [1] 史朝红. 脂肪栓塞综合征治疗进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(20): 3232-3234.
- [2] Muller C, Rahn BA, Pfister U, et al. The incidence, pathogenesis, diagnosis, and treatment of fat embolism[J]. *Orthop Rev*, 1994, 23(1): 107-117.
- [3] Evert AE, Pellegrini DC. Incidence of pulmonary fat em-

- [4] Belyantseva IA, Adler HJ, Curi R, et al. Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(2): 116-118.
- [5] 于宁, 翟所强, 赵红波. 外毛细胞基底侧膜动力蛋白分布均一性的研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2009, 17(5): 461-463.
- [6] Matsumoto N, Kalinec F. Prestin-dependent and prestin-independent motility of guinea pig outer hair cells[J]. *Hearing Res*, 2005, 208(1): 1-13.
- [7] 陈伟, 杨仕明. Prestin-外毛细胞运动蛋白[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 42(5): 394-396.
- [8] Zheng J, Shen W, He DZ, et al. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells[J]. *Nature*, 2000, 40(2): 149-153.
- [9] Belyantseva IA, Adler HJ, Curi R, et al. Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(1): 116-119.
- [10] Zheng J, Long KB, Shen W, et al. Prestin topology: localization of protein epitopes in relation to the plasma membrane[J]. *Neuroreport*, 2001, 12(8): 929-932.
- [11] 郭运凯, 谢鼎华, 杨新明. Prestin 基因敲除小鼠听力和毛细胞改变的相关性研究[J]. *中华耳科学杂志*, 2004, 2(4): 245-249.
- [12] Yu N, Zhu ML, Zhao HB. Long-term usage of salicylate upregulates prestin expression in the guinea pig cochlea[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(3): 407-409.

(收稿日期:2012-04-29 修回日期:2012-05-23)

bolism at autopsy; an undiagnosed epidemic[J]. *J Trauma*, 2011, 71(2): 312-315.

- [4] 张伯勋, 滕青山, 张群. 脂肪栓塞综合征发病因素的实验研究[J]. *军医进修学院学报*, 1997, 18(2): 105-107.
- [5] Gurd AR. Fat embolism; an aid to diagnosis[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1970, 52(6): 732-737.
- [6] 张云峰, 刘卫华, 孙占胜. 脂肪栓塞综合征的诊断和治疗[J]. *创伤外科杂志*, 2005, 7(1): 33-35.
- [7] 肖卫贤. 早期创伤治疗及并发脂肪栓塞综合征的临床分析[J]. *中外医疗*, 2011, 15(4): 53-54.
- [8] Bederman SS, Bhandari M, McKee MD. Do corticosteroids reduce the risk of fat embolism syndrome in patients with long-bone fractures? A meta-analysis[J]. *Can J Surg*, 2009, 52(3): 386-393.
- [9] 张慎, 吕明. 吸脂术中发生脂肪栓塞综合征 3 例[J]. *罕少疾病杂志*, 2002, 9(1): 59-61.
- [10] 李志强, 于建渤, 郑林. 外伤性乙状结肠破裂肠内容致肺栓塞 1 例[J]. *中国法医学杂志*, 2004, 19(3): 185-186.
- [11] Peltier LF. Fat embolism, A perspective[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1988, 38(2): 263-270.
- [12] 杨齐鸣, 杨宇明. 凝血 4 项与 D-二聚体含量变化对骨折患者并发脂肪栓塞前后的临床意义[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2004, 6(1): 25-26.
- [13] 胡去建. D-二聚体测定在肺栓塞诊断中的应用价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2002, 25(1): 95-97.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-05-21)