

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.12.004

# 锌指蛋白 A20 拮抗庆大霉素致豚鼠耳蜗 毛细胞损伤的实验研究\*

蒋晓君<sup>1</sup>,周小清<sup>2</sup>,龙浩<sup>3</sup>,骆晓琴<sup>3</sup>,贾立峰<sup>3</sup>,袁伟<sup>3△</sup>

(1. 中国科学院大学重庆仁济医院/重庆市第五人民医院耳鼻咽喉头颈外科 400062; 2. 重庆市巴南区人民医院耳鼻咽喉头颈外科 401320; 3. 陆军军医大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 重庆 400038)

**[摘要]** **目的** 探讨细胞保护性基因锌指蛋白 A20 对内耳毛细胞的保护作用,为修复受损的听功能提供方法。**方法** 采用锌指蛋白 A20 基因重组腺病毒(pAdEay-1/A20)耳蜗圆窗膜显微注射,通过免疫组织化学染色、扫描电镜、ABR 等办法,观察其在庆大霉素(GM)损伤条件下对毛细胞的保护作用。**结果** 功能上,pAdEay-1/A20/GM 组和人工外淋巴液/GM 组听力阈值均明显升高( $P < 0.05$ ),但 pAdEay-1/A20/GM 组听力损伤较轻。形态学上,pAdEay-1/A20/GM 组与 pAdEay-1/GM 组、人工外淋巴液/GM 组比较,毛细胞的损伤数目减少,电镜观察下,此组也只有少量纤毛细胞发生倒伏或缺失,内毛细胞大部分正常,也较其他实验组损伤轻。**结论** 构建的 pAdEay-1/A20 载体可有效感染毛细胞,从功能和形态上可对 GM 造成的毛细胞损伤起到一定的保护作用,但这种保护作用有一定的限度。

**[关键词]** 耳蜗;毛细胞;锌指蛋白 A20;庆大霉素**[中图分类号]** R856.76**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)12-1907-04

## Experimental study of zinc finger protein A20 antagonizing gentamicin-induced damage of guinea pig cochlear hair cells\*

JIANG Xiaojun<sup>1</sup>, ZHOU Xiaoqing<sup>2</sup>, LONG Hao<sup>3</sup>, LUO Xiaoqin<sup>3</sup>, JIA Lifeng<sup>3</sup>, YUAN Wei<sup>3△</sup>

(1. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Chongqing Renji Hospital, University of Chinese Academy of Sciences/Chongqing Municipal Fifth People's Hospital, Chongqing 400062, China; 2. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Chongqing Banan District People's Hospital, Chongqing 401320, China; 3. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effect of cell protective gene zinc finger protein (A20) on the inner ear hair cells to provide a method for repairing damaged hearing function. **Methods** A20 gene recombinant adenoviral expression vector pAdEay-1/A20 was injected into cochlea round window membrane. Its protective effect on hair cells under the gentamicin (GM) injury condition was observed by using the immunohistochemical staining, scanning electron microscope and ABR. **Results** In the function, the hearing threshold value in the pAdEay-1/A20/GM group and artificial perilymphatic fluid/GM group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), but the hearing impairment in the pAdEay-1/A20/GM group was mild. In the morphology, compared with the pAdEay-1/GM group and artificial perilymphatic fluid/GM group, the number of hair cells injury in the pAdEay-1/A20/GM group was decreased, under the electronic microscopic observation, only a small amount of ciliated cells in this group developed lodging or deletion, the majority of inner hair cells were normal, their damage was milder than that in the other experiment groups. **Conclusion** The constructed recombinant pAdEay-1/A20 adenoviral vector can effectively infect the hair cells and play a certain protective role on the injury of hair cells caused by GM in terms of function and morphology, but this protective effect has a certain limit.

**[Key words]** cochlea; hair cells; zinc finger protein A 20; gentamicin据世界卫生组织报告,全球有 3.6 亿人因使用抗生素等特殊药物而丧失听力<sup>[1]</sup>。庆大霉素(GM)是临

床上应用最广泛的氨基糖苷类抗生素之一,其对革兰阴性( $G^-$ )菌感染具有广谱的抑制作用,但它却可带来不可逆的耳毒性,常常表现为延迟性、进行性听力下降、耳鸣和平衡障碍,其听力下降发生率可高达 20%<sup>[2]</sup>。有研究表明,造成损伤的可能原因是因为此药物在淋巴液聚集,再加上内耳环境的特殊性,造成此药物在内耳的积累难以清除,从而对 Corti's 器内的毛细胞、支持细胞等结构造成损伤<sup>[3]</sup>。但对于哺乳动物,毛细胞的损伤是不可逆的,因此怎样预防和治理此类药物带来的耳毒性成为重要研究内容。

锌指蛋白 A20 是一种保护性基因,通过它的锌指区可以连接到一系列功能蛋白如 14-3-3、ABINs、潜伏膜蛋白 1(LMP1)等而发挥作用,在内皮细胞、神经细胞等研究中发现其能有效抑制细胞凋亡、坏死及炎症反应<sup>[4-7]</sup>,而细胞凋亡是毛细胞损伤最常见的原因<sup>[8]</sup>。笔者既往研究表明,锌指蛋白 A20 在正常毛细胞中沉默表达,受到损伤后毛细胞会出现锌指蛋白 A20 的短暂表达,但持续时间仅仅数小时,不论是持续时间还是量都不足以对毛细胞起到保护作用<sup>[9]</sup>,鉴于此,本研究构建了锌指蛋白 A20 基因重组腺病毒(pAdEeay-1/A20),进一步研究锌指蛋白 A20 是否能拮抗 GM 致耳蜗毛细胞的损伤,为改善和修复受损的听功能提供依据,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用健康 SPF 级豚鼠 25 只,耳廓反射灵敏,无中耳感染,雌雄不限,体重(250±25)g。购于陆军军医大学实验动物中心,经动物实验伦理委员会审批通过,动物使用许可证批号:SYXK(渝)20170002,严格遵守批准机构的动物保健和使用协议。

### 1.2 试剂及仪器

采用注射用硫酸 GM(西南制药有限公司,生产批号:07050016)、Pcaggs flag ma20 质粒(保存于陆军军医大学解剖学教研室)、抗鼠锌指蛋白 A20 抗体(美国 Ebioscience)、DH50 荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、S-4800 型超高分辨率扫描电子显微镜(日本日立公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 pAdEeay-1/A20 的构建

参照文献<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 实验分组

选用健康封闭群豚鼠 25 只,采用随机数字表法分为 5 组,每组 5 只。(1)对照组:未做任何处理;(2)pAdEeay-1/A20/GM 组:每个耳蜗注射 pAdEeay-1/A20 5  $\mu$ L,3 d 后予以硫酸 GM(120 mg/kg)腹腔注射;(3)人工外淋巴液/GM 组:注入人工外淋巴液(NaCl 125 mmmol/L, KCl 3.5 mmmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.20 mmmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 25 mmol/L, 葡萄糖 5 mmmol/L, pH=7.4),3 d 后给予硫酸 GM(120 mg/kg)腹腔注射;(4)pAdEeay-1/

GM 组:注射 5  $\mu$ L pAdEeay-1,3 d 后给予硫酸 GM(120 mg/kg)腹腔注射;(5)pAdEeay-1 组:注射 5  $\mu$ L pAdEeay-1。

### 1.3.3 处理方法

(1)外科手术:将 2%戊巴比妥钠(美国 Sigma)按 30 mg/kg 腹腔注射麻醉豚鼠。从耳后剪开皮肤和肌肉组织,暴露听泡,在其上打一小孔可见耳蜗底回,用 5  $\mu$ L 微量注射器从圆窗中缓慢注入病毒注射液或人工外淋巴液,每耳注入 5  $\mu$ L。凝血片贴于圆窗膜,肌肉组织封堵造孔处,缝合切口。(2)GM 注射:采用硫酸 GM(120 mg/kg)腹腔注射给豚鼠,每天注射 1 次,持续 10 d,4 d 后解剖观察。(3)听性脑干反应(ABR)阈值测试参照文献<sup>[10]</sup>。(4)耳蜗基底膜铺片及毛细胞计数<sup>[11]</sup>,碘化丙啶(PI)染色:用 4%多聚甲醛固定耳蜗组织,脱钙,解剖出底回基底膜,室温下用 100  $\mu$ g/mL PI 溶液在黑暗中染色 20 min,在磷酸盐缓冲液(PBS)中洗涤 5 次,每次 4 min。然后将组织铺在玻片上,用 50%的甘油固定。在倍数×400 长度为 0.2 mm 的显微镜取景范围内分别计数耳蜗第一次存活和死亡的内、外毛细胞数。固定后的耳蜗基底膜 PI 染色后可见正常、凋亡、坏死和缺失 4 种毛细胞核形态<sup>[12]</sup>。(5)耳蜗毛细胞扫描电镜观察:通过电镜观察毛细胞的损失和纤毛变化,分析 GM 对毛细胞的影响及 A20 对毛细胞的保护作用。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析比较 5 组间的 ABR 阈值及内、外毛细胞存活数目,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组豚鼠 ABR 阈值测试结果比较

对照组和 pAdEeay-1 组在药物注射前后 ABR 阈值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );pAdEeay-1/GM 组在药物注射前后 ABR 阈值变化明显( $P < 0.01$ );解剖前 pAdEeay-1/A20/GM 组和人工外淋巴液/GM 组 ABR 阈值明显升高,两组与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但 pAdEeay-1/A20/GM 组 ABR 阈值增高程度低于人工外淋巴液/GM 组,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 各组 ABR 阈值测试结果比较( $\bar{x} \pm s$ , SPL)

组别	n	注射前	注射后	解剖前
对照组	5	15.0±5.0	14.0±4.2	15.0±5.0
pAdEeay-1 组	5	13.0±4.5	15.0±5.0	18.0±5.7
pAdEeay-1/GM 组	5	14.0±4.2	17.0±5.7	59.0±6.5 <sup>a</sup>
pAdEeay-1/A20/GM 组	5	13.0±4.5	15.0±5.0	25.0±2.2 <sup>bc</sup>
人工外淋巴液/GM 组	5	15.0±6.1	16.0±6.5	61.0±9.6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与同组注射前比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与人工外淋巴液/GM 组比较。

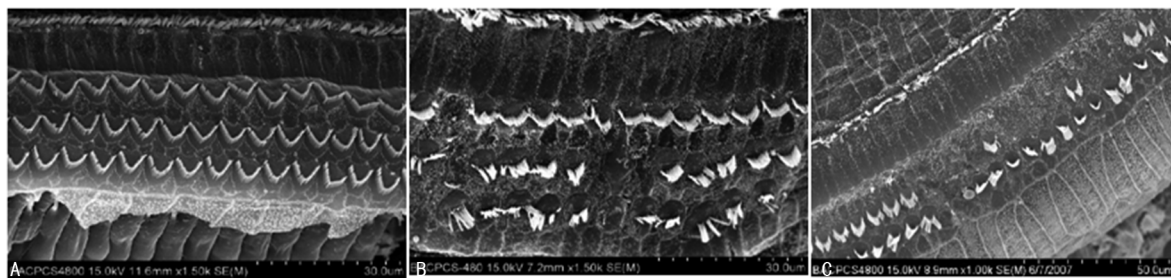
### 2.2 各组豚鼠耳蜗毛细胞计数结果比较

把凋亡、肿胀、缺失都计为毛细胞损伤数目,统计

表 2 耳蜗基底膜毛细胞在 GM 摄取模型中的数量变化( $\bar{x} \pm s$ , 个)

组别	n	内毛细胞	第 1 排外毛细胞	第 2 排外毛细胞	第 3 排外毛细胞
对照组	5	101.5 ± 1.3	118.5 ± 1.3	119.0 ± 1.4	119.8 ± 1.0
pAdEeay-1 组	5	101.6 ± 1.3	118.2 ± 1.9	116.0 ± 1.9	117.4 ± 1.1
pAdEeay-1/GM 组	5	91.4 ± 1.3 <sup>ab</sup>	37.6 ± 7.8 <sup>ab</sup>	58.6 ± 16.5 <sup>ab</sup>	56.6 ± 12.7 <sup>ab</sup>
pAdEeay-1/A20/GM 组	5	95.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	110.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	104.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	107.8 ± 2.6 <sup>a</sup>
人工外淋巴液/GM 组	5	90.3 ± 1.0 <sup>ab</sup>	54.4 ± 6.4 <sup>ab</sup>	53.5 ± 7.3 <sup>ab</sup>	55.5 ± 3.7 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 pAdEeay-1/A20/GM 组比较。



A: 对照组; B: pAdEeay-1/A20/GM 组; C: 人工外淋巴/GM 组。

图 1 耳蜗毛细胞扫描电镜图

学分析发现对照组与 pAdEeay-1 组各排毛细胞数目比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); pAdEeay-1/GM 组、pAdEeay-1/A20/GM 组、人工外淋巴液/GM 组与对照组外毛细胞数比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); pAdEeay-1/A20/GM 组与 pAdEeay-1/GM 组、人工外淋巴液/GM 组比较, 外毛细胞损伤数目明显减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

### 2.3 耳蜗毛细胞扫描电镜观察结果

对照组豚鼠的耳蜗基底膜 3 排外毛细胞、1 排内毛细胞整齐排列, 纤毛呈现直立排列, 无散乱、缺失; pAdEeay-1/A20/GM 组的螺旋器可见少数外毛细胞的部分纤毛发生倒伏或缺失, 内毛细胞大部分正常; 人工外淋巴液/GM 组许多外毛细胞的纤毛发生倒伏, 融合, 部分缺失, 甚至有的外毛细胞的纤毛全部缺失。从整体来看, 第 1 排外毛细胞比第 2 排和第 3 排外毛细胞损伤要重, 内毛细胞的纤毛呈大致均匀的簇状排列, 少有缺失, 与 pAdEeay-1/A20/GM 组比较, 人工外淋巴液/GM 组损伤明显加重, 见图 1。

### 3 讨论

感应神经性聋影响全球 13 亿人, 内耳损伤尤其是毛细胞损伤是引起此疾病的重要原因。而氨基糖苷耳毒性主要靶器官则是毛细胞<sup>[13]</sup>。本研究发现, GM 功能上可造成听力下降, 形态上可以造成毛细胞损伤, 其损伤主要表现为外毛细胞, 且第 1 排损伤程度重于第 2、3 排。因毛细胞是终末分化, 无法再生, 且毛细胞一旦受损, 任何细胞营养因子或促细胞生长因子都不能达到满意的治疗效果<sup>[12-15]</sup>。因此, 需要寻找一种保护机制来预防及治疗氨基糖苷类药物带来的耳毒性。

研究表明, 氨基糖苷类药物带来毛细胞损伤主要原因是活性氧自由基参与了耳蜗和前庭的毒性损伤,

引起毛细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。内耳积聚高浓度 GM 激活丝裂原活化蛋白激酶 p38(p38MAPK) 和 C-jun 氨基末端激酶(JNK), 改变线粒体膜电位, 使细胞色素 C 释放, 激活 caspase-8 和 caspase-3, 以及下游级联反应, 使毛细胞发生凋亡。而 caspase-3 被认为是所有 caspases 中最重要的一个<sup>[16-17]</sup>。它能引起 DNA 和染色质损伤, 重新排列细胞骨架, 破坏细胞内运输、细胞分裂和信号转导。因此阻断上述通路可保护毛细胞免受损伤, 防止听力进一步下降。细胞保护基因锌指蛋白 A20 可能有助于防止毛细胞的进一步损伤。

现已证实, 锌指蛋白家族由细胞保护基因组成, 包括 A20 基因。该基因长 4 426 bp, A20 基因的 C 端由 7 个 Cys2/Cys2 锌指组成。通过这些锌指, A20 可以结合一系列功能蛋白, 如肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAFs)、14-3-3、ABINs、TXBP151、LMP1、IKK-/NEMO/IKKAP1, 然后发挥作用。锌指蛋白 A20 基因过表达可通过抑制 caspase-3、caspase-8 的活化和细胞色素 C 的释放, 稳定线粒体, 有效抑制细胞凋亡、细胞坏死和炎症。也有研究表明, 锌指蛋白 A20 基因可以阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[8,18]</sup>, 通过抑制 caspase-3 来保护内皮细胞和神经细胞免受损伤。由于毛细胞损伤的机制与锌指蛋白 A20 基因的防损伤机制一致, 因此, 锌指蛋白 A20 基因可能会抑制毛细胞的凋亡和坏死, 从而保护毛细胞, 防止听力进一步受损。

鉴于此, 笔者探讨了基因治疗, 以及模拟靶向药物的价值。既往研究表明, pAdEeay-1/A20 可通过毛细胞高效表达<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, 对照组豚鼠和 pAdEeay-1 组豚鼠在药物进入耳蜗前后 ABR 的听力阈值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 说明这种给药方式和重组腺病毒对 ABR 的听力阈值无明显影响。在

pAdEeay-1/GM 组豚鼠中观察到明显变化,提示 pAdEeay-1 对听力损失无保护作用。与对照组比较, pAdEeay-1/A20/GM 组和人工外淋巴液/GM 组 ABR 的听力阈值明显升高。但 pAdEeay-1/A20/GM 组阈值明显低于人工外淋巴液/GM 组。根据基底膜毛细胞计数结果,GM 主要损伤外毛细胞,与既往研究一致<sup>[9]</sup>。从形态上比较,pAdEeay-1/A20 也可以对毛细胞损伤起到保护作用,GM 的损伤主要表现为外毛细胞凋亡、坏死、丢失等,施加 pAdEeay-1/A20 因素后与对照组比较毛细胞缺失、凋亡、坏死细胞明显减少,外毛细胞损伤明显得到了改善。这些形态学观察结果与 ABR 检测结果一致。

综上所述,锌指蛋白 A20 对 GM 耳毒性所致的听力损失具有保护作用,能有效防止毛细胞的进一步损伤,但保护作用不完全。以上研究结果为预防和治疗氨基糖苷类药物带来的耳毒性提供了新思路。此外, pAdEeay-1/A20 对毛细胞的保护作用是直接作用于毛细胞上,还是作用其他细胞后间接参与保护毛细胞,以及他们之间的联系,尚待研究解决, pAdEeay-1/A20 是否仅保护耳蜗毛细胞,对螺旋神经节细胞和耳蜗其他部位是否同样具有保护作用也是以后研究的重点。

## 参考文献

- [1] ALI B H. Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research[J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(11):1447-1452.
- [2] XIE J, TALASKA A E, SCHACHT J. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity[J]. *Hear Res*, 2011, 281(1/2):28-37.
- [3] 卢宇涵,徐青文,陈琳,等. 左西孟旦拮抗庆大霉素致豚鼠耳蜗毛细胞损伤的研究[J]. *中国听力语言康复科学杂志*, 2017, 15(6):405-409.
- [4] PABO C O, PEISACH E, GRANT R A, et al. Design and selection of novel Cys2 His2 zinc finger proteins[J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70(3):313-340.
- [5] OPIPARI A W, HU H M, YABKOWITZ R, et al. The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(18):12424-12427.
- [6] WISSING D, MOURITZEN H, JÄÄTTELÄ M. TNF-induced mitochondrial changes and activation of apoptotic proteases are inhibited by A20[J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25(1):57-65.
- [7] HEYNINCK K, DENECKER G, DE VALCK D, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-induced necrotic cell death by the zinc finger protein A20[J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(4B):2863-2868.
- [8] MORRILL S, HE D Z. Apoptosis in inner ear sensory hair cells[J]. *J Otol*, 2017, 12(4):151-164.
- [9] 袁伟. 腺病毒介导的 A20 基因对耳蜗毛细胞保护作用的实验研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2008.
- [10] 袁伟,张学渊. 鼠 A20 基因的腺病毒载体构建及耳蜗毛细胞表达[J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(3):337-339, 345.
- [11] 陈晓栋,王焯. 庆大霉素耳毒性模型大鼠耳蜗凋亡诱导因子表达及阿司匹林的拮抗作用[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2014, 22(4):395-398.
- [12] 蔡琴芳,蒋立新. 豚鼠耳蜗基底膜硝酸银染色铺片法的改良与观察[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2010, 18(3):282-283.
- [13] HU B H, HENDERSON D, NICOTERA T M. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise[J]. *Hear Res*, 2002, 166(1/2):62-71.
- [14] JIA Z, HE Q, SHAN C, et al. Tauroursodeoxycholic acid attenuates gentamicin-induced cochlear hair cell death in vitro[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 294(1):20-26.
- [15] NIWA K, MATSUNOBU T. The beneficial effect of Hangesha-shin-to (TJ-014) in gentamicin-induced hair cell loss in the rat cochlea[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2016, 43(5):507-513.
- [16] WERTZ I E, O'ROURKE K M, ZHOU H, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signaling[J]. *Nature*, 2004, 430(7000):694-649.
- [17] ZHU C H, YING D J, MI J H, et al. The zinc finger protein A20 protects endothelial cells from burns serum injury[J]. *Burns*, 2004, 30(2):127-133.
- [18] YU L, MIAO H, HOU Y, et al. Neuroprotective effect of A20 on TNF-Induced postischemic apoptosis[J]. *Neurochem Res*, 2006, 31(1):21-32.
- [19] TORES-RUIZ N M, GRANADOS O, MEZA G. Aminoglycosides: therapeutics, ototoxicity and hypersensitivity of mitochondrial genetic origin[J]. *Proc West Pharmacol Soc*, 2011, 54(1):49-51.