

Ad5-atoh1/EGFP 在体诱导近成年豚鼠耳蜗产生毛细胞样细胞*

韩朝¹ 丛宁¹ 杨娟梅¹ 黄一波¹ 靳楷¹ 李雯²

[摘要] 目的:在近成年豚鼠耳蜗内携带 atoh1/EGFP 基因的腺病毒是否能够将基膜上残留的支持细胞分化为新的毛细胞。方法:选用体重在 200~250 g 的健康花豚鼠 12 只,将构建同时表达 atoh1 和 EGFP 基因的 E1/E3 区缺失的人类免疫 5 型腺病毒 5 μ l,通过耳蜗侧壁打孔灌注导入中阶内淋巴系统。其中 6 只于灌注 2 周后处死,6 只灌注 4 周后处死,基膜铺片观察 EGFP、毛细胞标记物 myosin VIIa 和 Dapi 核染色情况。结果:灌注 2 周处死的 6 只豚鼠中有 2 只在基膜外毛细胞外区域发现有散在的细胞核大、细胞体梭形的、表达 EGFP 的新生细胞。灌注 4 周的动物中有 3 只在基膜原外毛细胞位置和外毛细胞外区域发现有相似的同时表达 EGFP 和 Myosin VIIa 的新生细胞。结论:atoh1 基因可以在近成年豚鼠体内将部分支持细胞转分化为毛细胞样细胞。这部分支持细胞位于外毛细胞位置和外毛细胞外区域的基膜上。

[关键词] 腺病毒;atoh1;豚鼠;毛细胞;转分化

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2012)10-0463-03

Transdifferentiation of some supporting cells in the cochlea induced by Ad5 atoh1/EGFP in the young adult guinea pigs

HAN Zhao¹ CONG Ning¹ YANG Juanmei¹ HUANG Yibo¹ JIN Kai¹ LI Wen²

(¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Eye Ear Nose Throat Hospital of Fudan University, Shanghai, 200031, China; ²Central Laboratory, Affiliated Eye Ear Nose Throat Hospital of Fudan University)

Corresponding author: HAN Zhao, E-mail: sfhanzao@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To explore whether the Ad5-atoh1/EGFP could transdifferentiate the supporting cells into the new hair cells in young adult guinea pigs cochlea in vivo. **Method:** Twelve healthy pigmented guinea pigs weighed 200~250 g were included in this experiment. 5 μ l of Ad5-E1/E3 defected-atoh1/EGFP were infused into the scala media through a hole made on the lateral wall of the cochlea. Six of the 12 animal were killed 2 weeks after the infusion operation. The others were killed 4 weeks after the operation. The whole mount of the basal membranes were directly observed under the fluorescence microscope for the expression of the EGFP (enhance green fluorescent protein) or for the expression of the hair cell specific marker and nuclear after staining with myosin VIIa rabbit polyclonal antibody and Dapi dye. **Result:** New cells with big nuclear, ellipse body and expressed with EGFP were found in the region near to the outmost row of the outer hair cells in 2 animal 2 weeks after the infusion. Moreover there were 3 animals with specific morphologic new cells in the location where ever been located by the outer hair cells and the region as 2 weeks animals 4 weeks after the infusion. Those cells were stained by myosin VIIa antibody. **Conclusion:** Atoh1 gene could transdifferentiate some supporting cells in the basal membrane into hair cell like cells in young adult guinea pigs in vivo. These supporting cells locate in the region of outer hair cells and the basal membrane which do not belong to the region of outer hair cells.

Key words adenovirus; atoh1; guinea pig; hair cell; transdifferentiation

耳聋的一个很重要的原因是由于司职声音信号向神经信号转化的内耳毛细胞受到损害,而对于人类和哺乳动物来说,这种由于衰老、耳毒性药物、感染和噪声等各种原因造成的损害是不可逆的^[1]。但是最新的研究显示,通过转录因子 atoh1 基因在

内耳的过表达,可以在基膜上产生新的毛细胞。在 atoh1 基因诱导下,培养的基膜中的部分支持细胞可转分化具有纤毛的毛细胞,并表达毛细胞特异性蛋白 myosin VIIa^[2]。将载有 atoh1 基因的腺病毒通过中阶导入豚鼠耳蜗内淋巴系统中获得了同样的结果^[3,4]。最近实验也提示如果是胚胎期诱导产生,这些新生的细胞能够产生发挥功能的结构^[5]。但是到目前为止,国外只有一个实验小组有在活体内使用腺病毒携带转录因子 atoh1 基因获得新生

* 基金项目:上海市科委自然科学基金项目(No:09ZR1405700)

¹ 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院耳鼻咽喉头颈外科(上海, 200031)

² 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院中心实验室

通信作者:韩朝, E-mail: sfhanzao@yahoo.com.cn

毛细细胞的实验报道,国内只有离体实验的报道^[6]。体内实验的成功是向前推进该项研究的关键。本实验通过在腺病毒基因中插入 *atoh1* 基因和指示基因 EGFP,将构建的腺病毒导入近成年豚鼠的耳蜗中,发现在基膜上产生了新生的毛细胞样细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

选取健康的近成年花豚鼠 12 只,耳廓反射灵敏,毛发光亮,体重 200~250 g。所有动物左耳为处理耳(手术耳),右耳为非处理耳(对照耳)。Carl Zeiss 手术显微镜和显微耳科手术器械。聚亚酰胺微管内径 0.08 mm,外径 0.1 mm(Code 039-I, MicroLumen),微量泵(53110V Single Syringe Pump, infusion, 220 V, STOELTING), Ad5-E1/E3 缺陷-*atoh1*/EGFP 腺病毒总感染性滴度(PFU)为 1.0×10^{11} (委托北京诺赛基因组研究中心有限公司构建),Leica DMR 显微镜(荧光和自然光),leica DFC300 FX 图像采集系统,leica Qwin V3 图像处理系统,Leica DMIRE2 共聚焦荧光显微镜(Leica Microsystems)。Myosin VII a Rabbit Polyclonal Antibody (PN25-6790, DayMoon Industries, Inc)。DAPI 核染料(S7113, Chemicon)。Alexa Fluor[®] Goat anti-Rabbit IgG (A21428, Molecular Probes/invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 麻醉与消毒 氯胺酮(肌内注射,40 mg/kg,临床剂型),2%利多卡因(皮下注射,0.5 ml/次,临床剂型)和甲苯噻嗪(肌内注射,10 mg/kg,南京法姆化工厂)。0.5%碘伏消毒毛皮。

1.2.2 手术方法^[7] 动物仰卧伸颈位,颈前入路,暴露骨性听泡,上自制撑开器。打开听泡骨质,进入听泡,即可见耳蜗。在倒数第二转(基本上覆盖 40%~70%的区域频率在 1~8 kHz 之间的基膜区)的色素带(血管纹)中下部用纤细的自制钢针(尖端达到 20 μ m)打孔。沿着该孔将聚亚酰胺微管导入中阶,使用微量泵将 5 μ l 病毒液通过微管于 10 min 内缓慢注入中阶。术后用小块颈阔肌封闭骨孔,牙科磷酸锌水泥封闭听泡骨性开口,分层缝合切口。

1.3 标本的处理和免疫组化染色步骤

6 只豚鼠于 2 周处死,6 只豚鼠于 4 周处死。豚鼠在过度麻醉后断头,取出听泡,暴露耳蜗,开放顶端及两窗,从顶端缓慢灌注 4%多聚甲醛,固定液内 4℃ 过夜,完整剥离基膜, PBS 冲洗 3 次 \times 5 min, 0.3% Triton-100 常温通透 40 min, PBS 冲洗 3 次 \times 5 min, Myosin VII a (1 : 100) 4℃ 孵育 48 h, PBS 冲洗 3 次 \times 5 min, Alexa Fluor[®] Goat anti-Rabbit IgG (1 : 200), 37℃ 孵育 1 h, PBS 冲洗

3 次 \times 5 min, 0.3% Triton-100 常温通透 15 min, Dapi (1 : 4) 常温孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次 \times 5 min, 10% 甘油封片, 荧光显微镜下观察拍照。

1.4 图片处理

图片使用 PHOTOSHOP 8.0 软件进行图标的加注。

2 结果

术后 2 周的豚鼠中有 2 只基膜上发现了表达 EGFP 的新生细胞,这些细胞多数散在分布于外毛细胞外的区域,细胞体大呈梭形,细胞核大而圆, Dapi 核染色较其他细胞核淡。尽管在内外柱细胞等位置也有 EGFP 表达的细胞,但细胞形态没有变化(图 1)。术后 4 周的豚鼠中有 3 只基膜上发现了表达 EGFP 的新生细胞,而且同时表达毛细胞特异性标记物 Myosin VII a(图 2~4)。图 2 和图 4 中可以看出内毛细胞基本正常,而部分外毛细胞也存在,但是在新生细胞位置几乎没有正常的外毛细胞,且新生细胞明显较原有外毛细胞体积大。新生细胞的位置分布除了毛细胞外侧区域,原来外毛细胞所在区域也可见,形态同 2 周的结果。

3 讨论

本实验使用经过耳蜗侧壁打孔进入中阶的手术入路,我们已经证实该入路对耳蜗结构和功能的影响主要是外毛细胞的丢失^[8],腺病毒的分布能够到达希望的位置^[9]。我们将携带目的基因 *atoh1* 的腺病毒导入内淋巴中,并最终在基膜上获得了新生的毛细胞样细胞。该灌注方法已经证实,可以造成灌注部位两侧的一段基膜上的外毛细胞丢失率几乎达到百分之百^[10-11],而本实验获得的新生细胞也是位于这一段基膜上,从图 1 中可以看出新生的细胞不是原来的毛细胞。首先从位置上可以看出至少在原来外毛细胞的位置以外区域的基膜上出现的细胞不是原来基膜上存在的毛细胞,我们既往的研究过程中也从没有发现脱落外毛细胞异位存活的现象;其次这些细胞表达 EGFP 的事实说明是感染过腺病毒的细胞,而毛细胞特异性标记物 myosin VII a 的表达和这些细胞具有的类似毛细胞的形态(椭圆形、核位于底部)都显示这些细胞是新生的类毛细胞样细胞。其中尽管有些细胞产生于原来外毛细胞所处的位置,但是除了表达 EGFP 证实这些细胞被成功转染了腺病毒外,从图 2~4 中可以看出这些细胞与原来的外毛细胞在排列方式和胞体大小等方面差别很大,不可能是原来残留的外毛细胞。而在我们的实验中,几乎没有看到毛细胞被腺病毒转染的现象。单纯使用 ad5-EGFP 腺病毒转染也没有发现有类似新生细胞产生^[9]。

实验发现支持细胞中的内外柱细胞是极易被腺病毒转染的一类细胞,是细胞本身特点决定了其

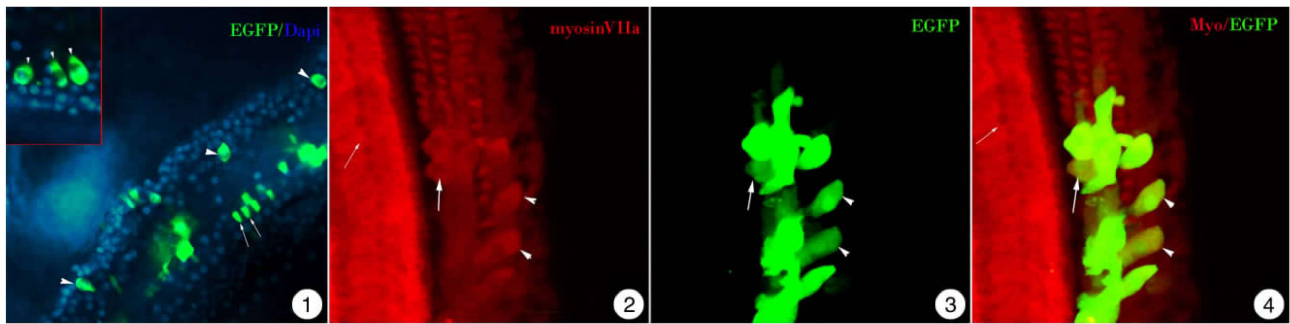


图 1 术后 2 周基膜上出现散在的表达 EGFP 的新生细胞 箭头所示为新生细胞,形状呈梭形,位置位于外毛细胞外侧的区域,而支持细胞也有 EGFP 表达,但形态没有发生变化 $\times 200$;插图显示位于外毛细胞外侧的支持细胞区域的新生细胞,Dapi 核染色浅(箭头所示) $\times 400$; 图 2~4 术后 4 周基膜上外毛细胞的位置和外毛细胞外区域有新生毛细胞产生 箭头指示位于外毛细胞外区域的新生的毛细胞,粗箭指示位于外毛细胞位置的新生毛细胞,细箭指示基膜上原来的内毛细胞;图 2 为 myosin VIIa 染色;图 3 为 EGFP 的表达;图 4 为图 2、3 的叠加,颜色呈黄色表示该细胞同时表达 myosin VIIa 和 EGFP $\times 200$ 。

易感性,还是本实验所进行的操作起了关键作用,目前尚不清楚。但是这些细胞即使很好的表达了 EGFP,其形态和在基膜的排列方式都没有发生变化。这也提示并不是所有基膜上的细胞都有很好的腺病毒转染率,而在被转染的细胞中,也不是所有的细胞都能够被转化为毛细胞样细胞。从本实验结果来看,内外柱细胞不能被 atoh1 基因转化为毛细胞样细胞,细胞保持原有特点,而在基膜上 Deiters 细胞和外毛细胞外的支持细胞中有部分可以在 atoh1 基因的作用下转化为毛细胞样细胞。

最近一项研究通过新霉素将小鼠致聋,在毛细胞丢失的同时支持细胞也受到很大的损害,然后导入 atoh1 基因没有发现毛细胞样新生细胞产生^[12]。结合本实验观察到的 atoh1 基因使部分支持细胞转分化为毛细胞样细胞的现象,证实了支持细胞存在是 atoh1 转化新毛细胞样细胞的前提。本实验提示,要获得功能需要的毛细胞数量,就必须首先在基膜上产生足够的可被 atoh1 利用转化为毛细胞样细胞的支持细胞,但是目前为什么这些支持细胞能够被转分化,这些支持细胞与其他支持细胞有何区别并不清楚。

本实验所用的动物中并不是所有的动物耳蜗基膜都发现有新生细胞,这是因为这种灌注方法,有一定的失败概率^[7],这主要受到豚鼠耳蜗中阶的尺寸和所用材料的影响,考虑到人类的耳蜗要大的多,这种情况在以后应用到人体上时不存在技术障碍。

参考文献

- [1] IZUMIKAWA M, MINODA R, KAWAMOTO K, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals [J]. Nat Med, 2005,11:271-276.
- [2] SHOU J Y, ZHENG J L, GAO W Q. Robust generation of new hair cells in the mature mammalian inner

ear by adenoviral expression of Hath1[J]. Molecular Cell Neurosci,2003,23:169-179.

- [3] IZUMIKAWA M, MINODA R, KAWAMOTO K, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals [J]. Nat Med,2005,440:1-6.
- [4] WHITE P M, DOETZLHOFER A, LEE Y S, et al. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells[J]. Nature, 2006, 441:984-987.
- [5] GUBBELS S P, WOESSNER D W, MITCHELL J C, et al. Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer[J]. Nature, 2008,455:537-541.
- [6] 张媛,胡吟燕,郭维,等. Hath1 基因诱导新生大鼠大上皮嵴细胞形成毛细胞样细胞[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2008,43(5):360-363.
- [7] 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):79-81.
- [8] 韩朝,迟放鲁,黄一波,等. 两种内淋巴给药方式对豚鼠耳蜗功能和形态的影响[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,44(4):329-334.
- [9] 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感染细胞的实验观察[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,23(13):607-609.
- [10] 韩朝,迟放鲁,黄一波,等. 注射用水及腺病毒中阶灌注对豚鼠听力的影响[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2008,8(4):214-216.
- [11] ISHIMOTO S, KAWAMOTO K, KANZAKI S, et al. Gene transfer into supporting cells of the organ of Corti[J]. Hear Res, 2002,173:187-197.
- [12] IZUMIKAWA M, BATTS S A, MIYAZAWA T, et al. Response of the flat cochlear epithelium to forced expression of Atoh1[J]. Hear Res, 2008,240:52-56.

(收稿日期:2010-10-29)