

• 论著——实验研究 •

P19ink4d 蛋白在耳聋发生和发展中的表达及研究^{*}赖若沙¹ 李葳¹ 王恬¹ 李京鲲¹ 胡鹏¹ 董云鹏¹ 谢鼎华¹ 杨新明¹

【摘要】 目的:建立稳定有效的噪声性听觉损伤模型,并观察 P19ink4d 在小鼠耳蜗中的变化,为探索噪声性聋的发病机制提供新的思路。对极重度感音神经性聋患者进行 P19ink4d 基因测序,试图发现 P19ink4d 基因突变致聋的家系,建立国人 P19ink4d 基因突变谱。**方法:**将 CBA/J 小鼠在 101 dB 的宽带噪声持续暴露 2 h 后,通过小鼠听性脑干反应(ABR)阈值测量、耳蜗基膜铺片及 DAB 毛细胞染色方法检测毛细胞的病理损伤过程,并采用免疫荧光法和 Western blot 检测基膜 P19ink4d 蛋白的表达,检测噪声对耳蜗毛细胞形态、数量及对 P19ink4d 蛋白的影响。在 400 例重度或极重度感音神经性聋儿童患者中,采用遗传性聋基因芯片排除由 4 个常见致聋基因突变致聋的患者,对未携带或仅带有单个杂合突变的患者应用 PCR-DNA 测序法对 P19ink4d 基因序列进行测定,分析有无突变。**结果:**噪声刺激后,各实验组听力与刺激前及对照组(未暴露噪声组)相比均明显下降;1 d 组较其他实验组下降更明显,7 d 与 14 d 组间听力下降程度无明显差异。通过铺片检测发现随着时间的延长,外毛细胞排列发生混乱、变形以及缺损数量逐渐增加,内毛细胞未见明显缺失。噪声暴露 3 h 后,外毛细胞 P19ink4d 蛋白免疫荧光染色明显增强,至噪声暴露后 24 h, P19ink4d 蛋白的荧光染色强度基本恢复。通过 Western blot 检测发现噪声刺激后显示 P19ink4d 蛋白在 3~6 h 出现暂时性的上调。本研究在 400 例极重度感音神经性聋患者中均未发现致 P19ink4d 基因的致病突变。**结论:**P19ink4d 在耳蜗毛细胞上的表达在噪声刺激后显著增加,可能作为特异性基因在噪声性聋的发生、发展中起着重要作用。

【关键词】 噪声性聋;先天性聋;耳蜗毛细胞;听性脑干反应;P19ink4d

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.02.014

【中图分类号】 R764.43 **【文献标志码】** A

The expression of P19ink4d in the pathogenesis and development of hearing loss

LAI Ruosha LI Wei WANG Tian LI Jingkun HU Peng
DONG Yunpeng XIE Dinghua YANG Xinming

(Department of Otorhinolaryngology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410011, China)

Corresponding author: LI Wei, E-mail: 187271545@qq.com

Abstract Objective: This study aimed to investigate the P19ink4d expression in cochlea of mice model with noise induced hearing loss and the role of P19ink4d in the degeneration of inner ear cells. It also searched for P19ink4d gene alterations in patients with profound sensorineural deafness. **Method:** CBA/J mice were exposed to broad band noise at 101 dB SPL for 2 hours, auditory brainstem response (ABR) were examined to confirm noise lead to the permanent threshold shift. Immunohistochemical staining, Western blotting, and real-time polymerase chain reaction (PCR) were performed on cochlear tissues, to elucidate changes in P19ink4d expression in mice after noise exposure. For clinical evaluation, 400 children from unrelated families with severe or profound sensorineural hearing loss (SNHL) were recruited, genomic DNA was obtained from the patients and was subjected to DNA microarray to screen mutations in 4 most common genes. The sample that carried none of the common mutant alleles were subjected to PCR and sequenced to detect mutations in P19ink4d gene. **Result:** The ABR threshold shift of mice in the experimental group significantly increased after noise exposure and was higher than that in the null-noise group. The ABR of 1 day post noise was least among experimental groups and there is no statistical different between ABR of 7 days and 14 days post noise. The missing of outer hair cells occurred after noise exposure, while the inner hair cells hardly miss. It was found that the P19ink4d expression increased significantly in the inner ear cells 3 hours after noise exposure, then recovered in 24 hours. Western blot indicated that the amount of P19ink4d increased transiently 3-6 h after the noise. However, no mutation existed within the coding exons of P19ink4d in the patients with profound sensorineural deafness. **Conclusion:** The results support the concept that P19ink4d may play an important role in the pathogenesis and development of noise induced hearing loss.

Key words noise deafness; congenital deafness; cochlear hair cells; auditory brainstem response; P19ink4d

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81670938)

¹ 中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉科(长沙,410011)

通信作者:李葳, E-mail:187271545@qq.com

噪声性聋是获得性耳聋的主要原因之一,噪声的长时间刺激可以引起耳蜗毛细胞内的氧自由基活动增强和能量代谢障碍,最终导致耳蜗毛细胞坏死或凋亡^[1]。噪声性聋的发生是由环境和基因双重因素共同导致。P19ink4d (CDKN2D)^[2] 属于 INK4 (inhibitors of CDK4) 蛋白家族,是一个重要的抑癌基因,能特异性地抑制 G1 激酶 (cyclinDs/CDK4,6) 的活性。近年来研究发现,P19ink4d 在维持毛细胞的存活中起着重要作用。本研究通过构建噪声性聋小鼠模型,应用免疫组织化学和 Western blot 技术监测在噪声损伤耳蜗毛细胞的过程中 P19ink4d 的表达变化,验证 P19ink4d 的毛细胞保护及拮抗凋亡的作用。另一方面,本研究还对 P19ink4d 的 2 个外显子进行测序,试图发现 P19ink4d 基因在耳聋患者中的突变,构建国人的 P19ink4d 基因突变谱,丰富 P19ink4d 基因突变患者的临床表型和家系资源,为进一步研究 P19ink4d 的表达,研究 P19ink4d 对毛细胞的保护作用及其调控因素奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用 12 周龄雄性 CBA/J 小鼠,体重约 30 g。实验动物常规饮食,室内温度保持在 (22.0 ± 1.0) °C 下,12 : 12 h 的标准光暗周期。小鼠均无中耳炎病史,无药物、噪声等接触史。

1.2 噪声刺激

CBA/J 小鼠置于噪声暴露室内,噪声频率为中心频率 2~20 kHz 的宽带噪声 (WBN),给声强度为 101 dB SPL,持续噪声暴露 2 h。白噪声由声音编辑软件 (Audition 3; Adobe System, Inc.) 创建,并通过软件 CD 播放器 (model CD-200; Tascam TEAC American) 经功率放大器 (model XLS 202D; Crown Audio) 传至扬声器 (model 2450 H; JBL) 产生,4 只小鼠分别置于不锈钢笼中同时噪声暴露。用数字式噪声测试仪分别在噪声暴露前后,在 4 个笼子的各个位置进行监测 (model 1200; Quest Technologies),确保噪声声强的稳定性,在小鼠活动范围内声强相差最大不超过 1 dB。对照组小鼠置于噪声暴露室内 2 h,不给予噪声刺激。

1.3 听性脑干诱发电位 (ABR) 检测

在噪声暴露前 7 d 和噪声暴露后 7 d 和 14 d 分别进行 ABR 测试。采用甲苯噻嗪 (10 mg/kg) 和氯胺酮 (100 mg/kg) 腹腔注射麻醉,应用脑干诱发电位仪 (tucker davis technology, TDT) System III 以及 SigGen/Biosig 软件进行测试,测试过程中用热水袋保持小鼠体温。记录电极置于颅顶正中皮下,参考电极和地极分别置于测试耳及对侧耳耳廓下软组织 (乳突)。使用一根自制的塑料管连接耳机并插入外耳道。刺激声强度从 100 dB SPL 开始,先以 10 dB

递减,然后以 5 dB 递减,能分辨出 I 波波型的最低刺激强度确定为 ABR 阈值,并重复 2 次。

1.4 动物取材

小鼠处死后断头,剪开颞骨,取出听泡,置于 4% 多聚甲醛中。在解剖显微镜下取出耳蜗,用针尖刺破卵圆窗和蜗窗,并在蜗顶处钻一小孔。使用 1 ml 注射器将 4% 多聚甲醛从蜗顶小孔缓慢注入。除去耳蜗周围多余肌肉组织后,将耳蜗保存于 4% 多聚甲醛中 4 °C 过夜 (>10 h)。固定后的耳蜗标本,使用 PBS 溶液漂洗 3 次,在 4% EDTA 溶液中脱钙 48 h,每天换一次脱钙液。然后再使用 PBS 溶液漂洗 3 次后,置于 PBS 溶液中保存,进行下一步免疫组织化学染色。用作 Western blot 检测的耳蜗,置于冰水中在显微镜下取出耳蜗后直接置入液氮中急冻,3 只小鼠共计 6 只耳蜗作为一个标本保存,保存于 -80 °C 冰箱。

1.5 免疫荧光染色

用 4% EDTA 脱钙后,在显微镜下解剖去除软化的蜗壳、血管纹和顶盖膜等。其余组织,包括蜗轴和耳蜗基膜,使用 3% Triton X-100 作用 30 min 后,以 PBS 溶液漂洗 3 次,每次 10 min,10% 羊血清室温封闭 30 min,再加入配备好的一抗:抗 P19ink4d 的多克隆兔抗 (orb100-506, 1 : 50, PBS 溶液稀释) 放入 4 °C 冰箱,孵育 72 h 后取出标本, PBS 溶液漂洗 3 次,每次 5 min,加入 Alexa Fluor 594 结合的二抗 (1 : 200, PBS 溶液稀释),4 °C 避光过夜,再以 PBS 溶液漂洗 3 次,每次 10 min,加 Alexa Fluor 488 phalloidin 常温避光反应 1 h 后用 PBS 溶液漂洗 3 次,每次 10 min。用 PBS 冲洗干净后,在 PBS 中去除蜗轴,并将基膜分为 3 段 (顶转、中间转和底转)。将基膜用荧光凝胶和 Tris 缓冲液 (Electron Microscopy Sciences # 17985-10) 固定在载玻片上。免疫荧光染色激光共聚焦显微镜 (Zeiss LSM 510) 下观察。使用 Image J 软件对 63 倍数的原始荧光图片进行免疫荧光定量,测定耳蜗底回 22~32 kHz 频率范围内的免疫荧光强度。该耳蜗片段内约有 60 个外毛细胞 (OHC)。OHC 的边缘使用圆圈工具圈定,背景荧光减去后计算出平均荧光强度,具体方法如文献 [3] 所示。

1.6 Western blot 检测

耳蜗放入玻璃研磨器中加入液氮研磨,研磨成粉末后放入离心管,加入蛋白裂解液,超声粉碎,离心后取上清分装至 0.5 ml 离心管中,用 Biorad 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE,转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h, PBST 缓冲液洗膜 3 次。分别加入一抗 (p19INK4D 1 : 200 或 Bax 1 : 200; GAPDH 1 : 3 000)。4 °C 下孵育 24 h, PBST 洗膜 10 min × 3 次,加入二抗 (羊抗兔 IgG 1 : 3 000)。室温下孵育

1 h, PBST 洗膜 10 min × 3 次, 化学发光法显色。用凝胶成像系统软件进行结果分析。

1.7 受试者招募及临床检测

1.7.1 临床资料 实验中的受试者为中南大学湘雅二医院接受人工耳蜗植入术的重度和极重度感音神经性聋青少年患者 400 例, 其中男 216 例, 女 184 例; 年龄 1~12 岁。其中重度聋(平均听阈 70~95 dB) 89 例, 极重度聋(平均听阈 > 95 dB) 311 例。受试者均行全面的听力学评估(纯音测听、ABR、声导抗、耳声发射、多频稳态诱发电位、耳部 CT 及 MRI、精神智力评估等), 并进行了详细的全身系统检查以排除综合征性聋, 及耳鼻咽喉科专科检查以排除中耳炎、耳外伤和梅尼埃病等其他致聋因素。

1.7.2 gDNA 提取 收集受检者外周血 5 ml, 使用 TIANGEN 公司试剂盒 (DP319-01 RelaxGene Blood DNA System) 提取 DNA。使用紫外分光光度计对 gDNA 进行定量和纯度检测后, 置于 -20℃ 保存备用。

1.7.3 基因芯片检测 400 例患者均使用耳聋基因芯片(北京博奥生物有限公司)进行国人耳聋相关基因中的 9 个热点突变筛查, 包括 GJB2 (176del6 bp, 299delAT, 35delG, 235delC), SLC26A4 (IVS7-2A>G, 2168A>G), GJB3 (538C>T), 和线粒体 12SrRNA (1494C>T 及 1555A>G)。其中有 49 例患者被检测出携带上述 9 个常见致聋基因的热点突变, 而未携带 9 种突变的 351 例患者则接受下一步的 P19ink4d 基因测序分析。

1.7.4 引物设计与合成 P19ink4d 基因位于人类染色体 19p13.2 区域内, 其含有 2 个外显子。在 NCBI 查取其序列后, 使用 Primer3 在线引物设计软件设计引物。共设计出 2 对引物: 外显子 1: 1R: AGGAGGGAGGGTGTAGTTAGG, 1F: TCGATCCTCATCCCGCTTAG; 外显子 2: 2R: TGACCCCTTTTGTGGAACCT, 2F: TGTTTCTCCCTCTCTTCTGA。由北京华大基因公司合成。

1.7.5 PCR 扩增 反应体系在实验中, 外显子 1 因为 GC 含量较高, 需加入甜菜碱防止引物二聚体形成。外显子 1 引物 PCR 反应体系及试剂: DNA 4 μl, Buffer 2.5 μl, primers (0.5 + 0.5) μl, dNTP 2.5 μl, Tap 0.125 μl, Betaine (5 mol/L) 5 μl, ddH₂O 25 μl; 外显子 2 引物 PCR 反应体系及试剂: DNA 3 μl, Buffer 2.5 μl, Primers (0.5 + 0.5) μl, dNTP 2.5 μl, Tap 0.2 μl, ddH₂O 25 μl。

外显子 1 及外显子 2 的反应条件均设置为: 首先 95℃ 预变性 5 min 彻底变性。然后设置 30 个循环条件为: 95℃ 变性 60 s, 59℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s。完成 30 个循环后, 72℃ 延伸 10 min 后于 4℃ 保存。

1.7.6 测序 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。选取凝胶电泳图中条带清楚、溶度及纯度较好的样本, 送华大基因公司测序。使用 DNASTar 的 Seqman 软件和 Editseq 软件对测序结果进行分析, 标准序列为由 NCBI 网查询所得人 P19ink4d 基因的碱基序列 (Gene bank accession number: NG-027801)。

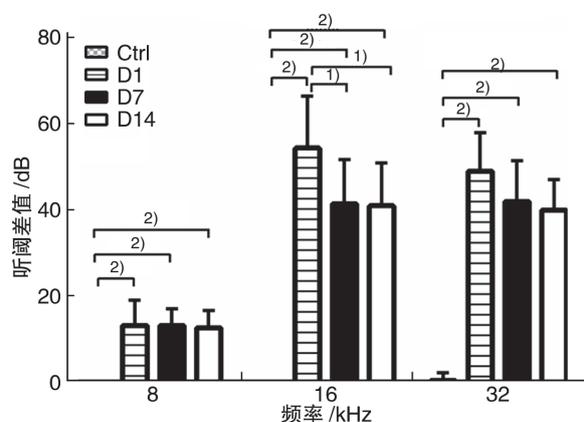
1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 各组计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验和单因素方差分析进行差异性比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ABR 测试结果

ABR 检测结果显示噪声刺激后, 各组 ABR 阈值提高与噪声暴露前比较差异均有统计学意义 (P < 0.0001, 数据在本文中未具体列出), 在暴露后 1 d ABR 阈值达到最高, 在第 7 天略有下降, 而噪声暴露后 2 周, ABR 阈值保持稳定。各组小鼠噪声刺激后 ABR 阈值见图 1。可以看出, 在 16 kHz 1 d 组分别与 7、14 d 组比较差异均有统计学意义 (均 P < 0.05), 7 d 组与 14 d 组间比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。



与 D1 组比较, ¹⁾ P < 0.05; 与阳性组比较, ²⁾ P < 0.01。

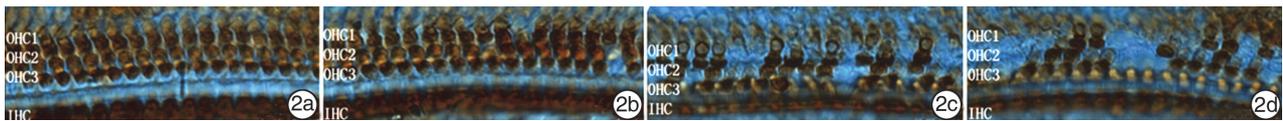
图 1 各组小鼠噪声刺激后的阈值改变

2.2 基膜铺片结果

在倒置相差显微镜 (×400) 下, 对照组小鼠耳蜗底回基膜 (22~32 kHz) 可见 3 排 OHC 和一排内毛细胞 (IHC) 均排列整齐, 无明显毛细胞缺失。1 d 组 IHC 排列较整齐, OHC 排列混乱, 大小不一, 缺失较少; 7 d 组 IHC 仍排列整齐, OHC 见明显缺失, 主要集中在第 1 排和第 2 排; 14 d 组 OHC 见大量缺失, IHC 仍排列整齐。见图 2。

2.3 耳蜗毛细胞表达 P19ink4d 的免疫荧光观察

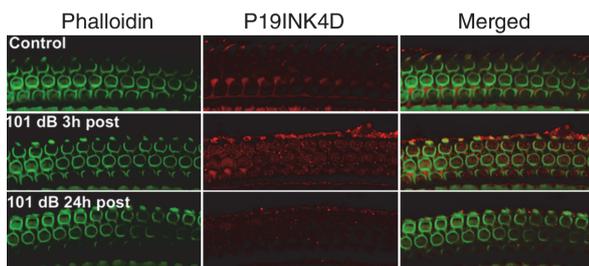
小鼠耳蜗 P19ink4d 蛋白免疫荧光激光共聚焦显微镜观察提示: P19ink4d 蛋白定位于毛细胞细胞



2a: 对照组; 2b: 1 d 组; 2c: 7 d 组; 2d: 14 d 组。

图 2 对照组及实验组小鼠耳蜗基膜铺片结果($\times 400$)

质内,阴性对照组染色见 P19ink4d 蛋白表达较弱。噪声暴露 3 h,外毛细胞 P19ink4d 荧光染色明显增强,到噪声暴露后 24 h,P19ink4d 蛋白的荧光染色又明显下降,后经 ImageJ 软件分析各图 P19ink4d 蛋白荧光灰度值,噪声暴露 3 h 后 P19ink4d 蛋白表达量比对照组明显增高,其比值为 1.6 : 1 ($P < 0.01, n = 4$),噪声暴露 24 h 后,P19ink4d 蛋白表达量与 3 h 比显著下降 ($P < 0.01, n = 4$),与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。IHC 的荧光染色变化不明显。



绿色荧光为 Actin,标记细胞骨架;红色荧光为 P19ink4d 蛋白。

图 3 小鼠耳蜗 P19ink4d 蛋白免疫荧光激光共聚焦显微镜观察($\times 400$)

2.4 Western blot 分析毛细胞凋亡过程中 P19ink4d 蛋白的表达

各组小鼠 P19ink4d 蛋白相对表达量见图 4。噪声暴露后 3 h,P19ink4d 蛋白表达明显增加 [$P < 0.05, t(3) = 3.365$]。

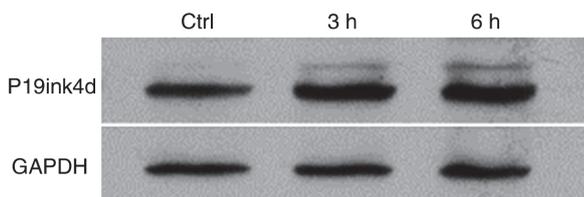


图 4 小鼠耳蜗 P19ink4d 在噪声前后表达的差异

2.5 测序结果

400 例患者未发现有意义的致病突变,发现外显子 2 同义突变 1 例。见图 5。

3 讨论

噪声性聋是最常见的听力致残因素,其发病率仅次于老年性聋,在工业、建筑业和交通等行业等

特殊职业人群中占 30%~70%^[4],且呈逐年上升的趋势。暴露于过量的噪声,即使是在短时间内,也可能导致听力损失,可能是暂时的听阈改变,可随后完全恢复至正常水平,也可能导致永久性听阈改变,不能恢复至噪声暴露前的听阈水平(PTS)。给予足够的声音刺激,超过小鼠耳蜗的复原能力,可导致 PTS 的发生,听觉阈值的这种永久性改变主要与耳蜗毛细胞损伤和丢失有关^[5]。

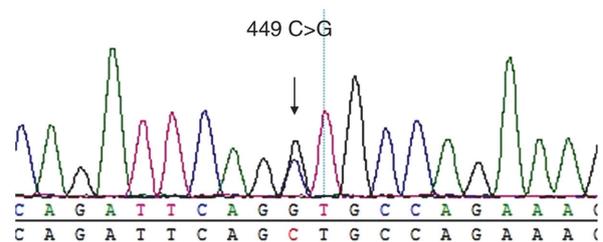


图 5 同义突变 449C>G 正向测序图

Chen 等^[6]对敲除 P19ink4d 基因的基因缺陷小鼠(Ink4d^{-/-})进行研究时,发现在胚胎发育过程中及出生后毛细胞及支持细胞形态正常,且 ABR 检查听力正常。而在出生后 2.5 周开始出现毛细胞及支持细胞的丢失,并显示出较大幅度的听力损失。由此推测,P19ink4d 并不影响耳蜗及毛细胞的分化,但是在维持毛细胞及支持细胞的生存中起着重要的作用。Liu 等^[7]发现在小鼠出生后 3 d,P19ink4d 开始在 OHC 和 IHC 表达,P19ink4d 基因敲除小鼠从出生后 7 d 开始出现耳蜗毛细胞的丢失,而前庭的毛细胞并不受影响。P19ink4d 不同于其他 INK 蛋白家族的成员,它在细胞分裂的 G0/G1 开始出现较低表达,并缓慢积累进入 S 期,在 S 期表达呈持续性升高进入 G2 期,其过表达将导致细胞周期在 G1 和 G2 期即停滞^[8]。大量的研究表明,重新进入细胞周期而导致的细胞凋亡主要是 G1 期的重新激活导致的^[9-11]。P19ink4d 的正常表达可以阻止毛细胞进入异常的细胞周期,导致细胞周期的停滞,这种停滞有利于毛细胞的损伤修复。实验结果表明,P19ink4d 基因具有监管和诱导细胞凋亡的作用,并保护细胞防止发生凋亡,允许更多有效的 DNA 发挥修复的作用^[12-13]。但是其提高 DNA 修复水平的具体机制尚未被研究清楚。因此,推测 P19ink4d 基因的表达会增加耳蜗毛细胞 DNA 损伤的自我修复能力,从而在拮抗毛细胞凋

亡、维持其正常生理功能以及延长其生存时间方面起着重要的作用,但是其具体保护机制尚不清楚。本研究通过检测噪声性聋小鼠模型的耳蜗毛细胞中 P19ink4d 表达变化,来探讨其在噪声性聋致病机制中的作用。

本实验采用 101 dB 宽带噪声建立永久性听力损失的噪声聋小鼠模型。实验结果显示噪声刺激暴露后小鼠的 ABR 平均阈值明显较噪声刺激前提高,而 1 d 组 ABR 平均阈值(16 kHz)显著高于 7 d 和 14 d,7 d 与 14 d 组之间无差异,表明噪声刺激后 7 d 开始,实验小鼠听力已发生永久性听阈改变,此时的毛细胞损伤超过小鼠耳蜗的复原能力,虽然随时间增长,平均阈值逐渐恢复(7 d 组明显低于 1 d 组),但不能恢复至噪声暴露前的听阈水平^[14-15],听阈改变在第 7 天基本稳定。永久性听阈改变显著的病理特征就是耳蜗细胞的形态和功能发生不可逆的损伤,其中 OHC 最易受损害,然后是支持细胞,最后可能出现 IHC 的损伤^[16]。本实验中对小鼠耳蜗基膜铺片染色,发现对照组基膜上内外毛细胞均排列整齐且无毛细胞缺失。而在噪声暴露后,随着时间延长,OHC 的损失逐渐增加,由此符合永久性听力损失的特征性病理改变,表明该噪声性聋小鼠 PTS 模型造模基本成功。

本实验中,对照组以及噪声暴露组均可见 P19ink4d 染色,因此我们认为 P19ink4d 在毛细胞的正常生理状态同样存在持续的表达。噪声暴露后的 3 h,外毛细胞染色显著增加。而在 24 h 染色变浅,与对照组基本相同。而 Western blot 结果显示 P19ink4d 蛋白在 3~6 h 出现上调。从基膜铺片结果,我们发现毛细胞的损伤约自 24 h 开始,而在 24 h 内,毛细胞无明显的损失之前,P19ink4d 表达出现了一个先上升后下降的过程。由此可见 P19ink4d 基因在噪声致毛细胞损伤过程中起着重要的作用。

P19ink4d 蛋白由定位于人类染色体 19p13 上的 CDKN2D (cyclin-dependent kinase inhibitor 2D) 基因编码。CDKN2D 是常染色体隐性遗传性聋基因(DFNB 68)区域内的候选基因之一。我们未能在 400 例极重度感音神经性聋患者中发现致 P19ink4d 基因的致病突变,国内外至今未发现 P19ink4d 基因突变致聋家系的相关文献报道,这可能和 P19ink4d 基因片段较短、稳定性较高有关。另外,Zindy 等^[17]发现,缺失 P19ink4d 基因的小鼠存在发育不良,同时伴随着帕金森病和肌无力的出现,并且在出生后 18 d 多数因为恶病质和脱水出现死亡。由此推测,先天性 P19ink4d 突变患儿由于其基因功能完全丧失,可能导致宫内或出生早期即因恶病质或肿瘤夭折而不能被检测到。另一方面,Chen 等^[6]报道 INK4D(-/-)的大鼠在出生后 1 周

开始出现听力损失并随着年龄增大进行性听力下降,在 7 个月时 ABR 听阈为 50 dB SPL,并未达到极重度感音神经性聋。我们推论人的 P19ink4d 基因突变也只能导致听力随年龄增大的进行性损伤,并不能导致先天性极重度感音神经性聋,所以在我们所选取的样本里突变的概率更低,以至于未被我们检测到。

本实验建立了稳定的噪声性聋小鼠 PTS 模型,并发现 P19ink4d 蛋白参与噪声诱发毛细胞损伤过程,但是 P19ink4d 蛋白的具体调控机制我们还需要进一步研究。我们在先天性感音神经性聋的患者中并未检测到 P19ink4d 致病突变,P19ink4d 基因在遗传性耳聋中的研究需要我们进一步扩大样本量和优化受试者范围。

参考文献

- [1] RYTER S W, KIM H P, HOETZEL A, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9: 49-89.
- [2] HIRAI H, ROUSSEL M F, KATO J Y, et al. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6 [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 2672-2681.
- [3] CHEN F Q, ZHENG H W, HILL K, et al. Traumatic noise activates Rho-family GTPases through transient cellular energy depletion [J]. *J Neurosci*, 2012, 32: 12421-12430.
- [4] SMITH I M, TURNBULL L W, SELLAR R J, et al. A modified screening protocol for the diagnosis of acoustic neuromas [J]. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1990, 15: 167-171.
- [5] SEBTI S M, DER C J. Opinion: searching for the elusive targets of farnesyl transferase inhibitors [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 945-951.
- [6] CHEN P, ZINDY F, ABDALA C, et al. Progressive hearing loss in mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor Ink4d [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 422-426.
- [7] LIU D X, GREENE L A. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint [J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 305: 217-228.
- [8] MA Q, GRATI M, BAI F, et al. Rescue from early-onset hearing loss in a mouse model lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor p19Ink4d [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2131.
- [9] THULLBERG M, BARTKOVA J, KHAN S, et al. Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. *FEBS Lett*, 2000, 470: 161-166.
- [10] HERRUP K, YANG Y. Pictures in molecular medicine: contemplating Alzheimer's disease as cancer: a loss of cell-cycle control [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7: 527-527.

完全矫正。由此印证鼻内镜泪前隐窝入路修复眶底壁骨折是一种安全有效的方法。

随着鼻内镜技术的不断发展,选择不同手术入路,术后效果也有所不同:①泪前隐窝入路与上颌窦根治术相比,其优势在于避免了术后颌面部肿胀,减轻了术后感染的风险;②泪前隐窝入路与中鼻道入路手术相比,其优势在于拥有更广阔的手术视野及操作空间,尤其是需要处理上颌窦前壁、内壁、泪前隐窝以及齿槽隐窝病变的患者;③泪前隐窝入路与下鼻道入路手术相比其优势在于有效地回避了下鼻甲对术区的影响,使术者拥有良好的视野。但选择泪前隐窝入路时应熟练掌握其解剖标志及手术的正确步骤,尤其注意保护鼻泪管,避免其损伤。

除了手术方式的选择外,鼻腔填塞物的选择也是患者术后恢复的关键,本研究选择了耳鼻咽喉科常用的鼻腔填塞物——碘仿纱条,其具有不易被吸收能够起到支撑作用,促进眶壁骨折对位愈合,且能有效抗菌,不易引起感染、不易导致过敏等特点^[10]。不论是填充还是取出都能简单、方便,不易损伤周围组织。这不仅满足了患者对于健康的需求,也减轻患者的经济负担。

无论是选择哪一种手术方式,术后并发症可能出现术侧疼痛、复视、眶底麻木。眶底麻木可能为外伤导致的神经损伤或长时间的压迫(外伤因素或手术因素)致使神经功能受损。对于眶下神经感觉异常的患者经过保守治疗无效后,可以考虑行眶下神经减压术或眶下神经闭塞术,可缓解该神经所支配区域的麻木感和刺痛感^[11]。

经鼻内镜泪前隐窝入路治疗眶底壁骨折是一种安全、有效的手术方法,具有术中创伤小、面部无切口、术中视野清晰,手术操作空间开阔、费用较低

的特点,更符合现代“微创”和“美观”的追求,值得临床推广。

参考文献

- [1] MOON S J, SUH H S, BO Y P, et al. Safety of Silastic Sheet for Orbital Wall Reconstruction[J]. Arch Plast Surg, 2014, 41: 362-365.
- [2] LEE S C, PARK S H, HAN S K, et al. Prognostic factors of orbital fractures with muscle Incarceration[J]. Arch Plast Surg, 2017, 44: 407-412.
- [3] KIM H S, JEONG E C. Orbital floor fracture[J]. Arch Craniofac Surg, 2016, 17: 111-118.
- [4] 章华, 范若皓, 谢志海, 等. 内镜下中鼻道联合泪前隐窝入路治疗眶壁骨折[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(3): 246-249.
- [5] 周兵, 韩德民, 崔顺九, 等. 鼻内镜下鼻腔外侧壁切开上颌窦手术[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 42(10): 743-748.
- [6] 冀永进, 薛金梅, 关芳灵, 等. 鼻内镜下鼻腔外侧壁切开在上颌窦病变中的应用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(11): 1009-1011.
- [7] 郭文兵. 眼外伤致眶壁骨折 56 例临床分析[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(12): 1631-1632.
- [8] 徐璐璐, 郭庆. 眶壁骨折后眶壁重建的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(4): 652-655.
- [9] FELIX V, VEERASIGAMANI N. Endoscopic Endonasal Approach of Blow Out Fracture Reduction-A Novel Technique [J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11: MD06-MD08.
- [10] 赵娟, 徐金操. 鼻内镜下眶下壁骨折修复方式及材料应用研究进展[J]. 中国临床医学, 2018, 25(2): 314-317.
- [11] 刘璐, 陈明, 苏志彩, 等. 眼眶骨折中眶下神经损伤和治疗的研究现状[J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(4): 681-683.

(收稿日期: 2018-11-01)

(上接第 156 页)

- [11] NGUYEN M D, MUSHYNSKI W E, JULIEN J P. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration[J]. Cell Death Differ, 2002, 9: 1294-1306.
- [12] TAVERA-MENDOZA L E, WANG T T, WHITE J H. p19INK4D and cell death[J]. Cell Cycle, 2006, 5: 596-598.
- [13] CERUTI J M, SCASSA M E, FLÓ J M, et al. Induction of p19INK4d in response to ultraviolet light improves DNA repair and confers resistance to apoptosis in neuroblastoma cells[J]. Oncogene, 2005, 24: 4065-4080.
- [14] 张志远, 刘凯, 陈燕红, 等. miR-183 家族在噪声性聋发生发展中的表达及研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(7): 468-472.
- [15] SAMSON J, WIKTOREK-SMAGUR A, POLITANSKI P, et al. Noise-induced time-dependent changes in oxidative stress in the mouse cochlea and attenuation by D-methionine[J]. Neuroscience, 2008, 152: 146-150.
- [16] 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: 62-71.
- [17] ZINDY F, CUNNINGHAM J J, SHERR C J, et al. Postnatal neuronal proliferation in mice lacking Ink4d and Kip1 inhibitors of cyclin-dependent kinases[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 13462-13467.

(收稿日期: 2018-09-04)