

分类号: R764.33

学号: 2014110456

重 庆 医 科 大 学

硕 士 学 位 论 文

(学术学位)

论文题目 醛固酮对豚鼠耳蜗功能及 Af9 表达的调控作用

作者姓名 秦 丽

指导教师姓名 (职称、单位名称) 钟时勋 教授
 重庆医科大学附属第一医院

一级学科名称 临床医学

二级学科名称 耳鼻咽喉科学

论文答辩年月 2017 年 5 月

重庆医科大学

研究生学位论文独创性声明

本人申明所提交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得重庆医科大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

学位论文作者签名： 秦丽 日期： 2017.3.31

学位论文授权使用授权书

本人完全了解重庆医科大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属重庆医科大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署名单位为重庆医科大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外），并编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他手段保存论文。保密论文在解密后适用本授权书。

论文作者签名： 秦丽

指导教师签名： 秦丽

日期： 2017.3.31

目 录

英汉缩略语名词对照.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	4
论文正文：醛固酮对豚鼠耳蜗功能及 Af9 表达的调控作用.....	6
前言.....	6
1 材料与amp;方法.....	8
2 结果.....	17
3 讨论.....	24
全文总结.....	28
参考文献.....	29
文献综述.....	32
致谢.....	40
攻读学位期间发表的论文.....	41

英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
MD	Ménière's disease	梅尼埃病
EH	endolymphatic hydrops	内淋巴积水
Af9	The putative transcription factor ALL1-fused gene from chromosome 9	转录因子 Af9
Dot1a	the histone H3 Lys79 methyltransferase disruptor of telomeric silencing alternative splice variant a	组蛋白甲基转移酶 Dot1a
ENaC	Epithelial sodium channel	上皮钠通道
Sgk1	serum- and glucocorticoid-induced kinase-1	血清糖皮质激素诱导激酶 1
ABR	auditory brainstem response	听性脑干反应
HE	Hematoxylin-Eosin staining	苏木精-伊红染色
IHC	immunohistochemistry	免疫组织化学
IF	immunofluorescence	免疫荧光
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
BSA	bull serum albumin	牛血清白蛋白
MR	mineralocorticoid receptor	盐皮质激素受体
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
AOD	Average optical densities	平均光密度值

醛固酮对豚鼠耳蜗功能及 Af9 表达的调控作用

摘 要

目的: 梅尼埃病 (MD) 的典型病理特征是内淋巴积水 (EH)。醛固酮能诱导 EH 形成, 但其与 MD 的关系尚未阐明。因此, 本实验通过检测豚鼠耳蜗组织中 Af9 蛋白的表达情况, 并且分析醛固酮对耳蜗功能及 Af9 表达的调控作用, 从而探讨醛固酮与 Af9 分子在内淋巴积水中的作用机制。

方法: 将 30 只豚鼠随机分为两组, 对照组腹腔注射 0.05ml 生理盐水, 实验组腹腔注射醛固酮 $0.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (0.05ml), 各 5 天。1 月后通过听性脑干反应 (ABR) 检测内耳的功能学改变; 应用苏木素-伊红染色(HE)检测两组内耳组织的形态学改变, 利用免疫组织化学 (IHC) 及免疫荧光(IF)检测 Af9 蛋白在耳蜗组织中的定位表达, 采用 Western blot 和荧光定量 PCR 方法从蛋白和 mRNA 水平上检测醛固酮作用前后 Af9 分子表达水平的变化。

结果: 醛固酮作用后, ABR 提示实验组 (23.33 ± 2.38 dB SPL) 听力阈值较对照组 (18.33 ± 2.73 dB SPL) 升高 ($P < 0.05$)。HE 证实实验组豚鼠耳蜗内淋巴积水率达到 73%, 而对照组未见内淋巴积水形成。IHC 及 IF 显示 Af9 蛋白在血管纹、前庭膜、螺旋缘、Corti 器、螺旋神经节均有表达, 并且 Western blot 显示实验组耳蜗 Af9 蛋白表达量 (0.75 ± 0.15) 低于对照组 (1.06 ± 0.08); 荧光定量 PCR 显示实验组耳蜗 Af9 mRNA (0.36 ± 0.07) 表达量低于对照组 (1.00 ± 0.00), 差异均有统计

学意义($P<0.05$),表明醛固酮在蛋白及 mRNA 水平上均能有效下调 Af9 分子的表达。

结论:耳蜗组织中存在与 Na^+ 代谢相关的 Af9 分子,醛固酮对内淋巴的调控可能与耳蜗 Af9 分子密切相关,即醛固酮通过下调 Af9 的表达来参与内淋巴代谢,形成内淋巴积水,进而影响耳蜗功能。

关键词: 醛固酮, Af9, 内淋巴积水, 梅尼埃病, 耳蜗功能

EFFECT OF ALDOSTERONE ON COCHLEAR AF9 EXPRESSION AND HEARING IN GUINEA PIG

ABSTRACT

Objective: Endolymphatic hydrops (EH) is the pathological characteristic of Ménière's disease (MD). Aldosterone could induce EH, but its relationship with MD is still controversial. The aim of the present study is to investigate Af9 protein expression in guinea pig cochlea, and regulation of Af9 expression and cochlear function by aldosterone. The role of Af9 in pathogenesis of EH is discussed.

Methods: Thirty guinea pigs were randomly divided into two groups. The animals in the treatment group were intraperitoneally injected with aldosterone $0.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 5 days, while those in the control group were done with saline. After one month, cochlea function was tested by auditory brainstem response (ABR), morphology of cochlea was examined by hematoxylin-eosin staining (HE), the location of Af9 protein was detected by immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF), and the expression of Af9 gene was detected by Western blot and fluorescence quantitative PCR at the protein and mRNA level.

Results: Compared to the control group (18.33 ± 2.73), The ABR threshold in the treatment group (23.33 ± 2.38) was higher ($P < 0.05$). 73% of animals in the treatment group had EH, while the control group no EH. Af9 protein was found in stria vascularis, Reissner's membrane, spiral limbus,

organ of Corti and spiral ganglion in both groups. Western blot showed that Af9 protein expression (0.75 ± 0.15) in the treatment group was lower than that in the control group (1.06 ± 0.08), and the expression of Af9 mRNA (0.36 ± 0.07) in the treatment group was also lower than that in the control group (1.00 ± 0.00), which indicated that aldosterone inhibited Af9 gene expression at both the protein and mRNA level.

Conclusion: Af9 gene in cochlea may be closely related to endolymph regulation by aldosterone and thus may be involved in pathogenesis of endolymphatic hydrops (EH).

Key words: aldosterone, Af9, endolymphatic hydrops, Ménière's disease, cochlea function

醛固酮对豚鼠耳蜗功能及 Af9 表达的调控作用

前 言

梅尼埃病(Ménière's disease, MD)为常见内耳疾病,其典型症状为间歇发作性眩晕(每次持续数小时)、波动性感音神经性听觉损失、耳鸣及耳胀满感。目前一致认为耳蜗内淋巴积水(endolymphatic hydrops, EH)为该病的典型组织病理学改变,但具体发病机制尚不清楚^[1]。Na⁺、K⁺转运代谢失衡易导致内淋巴液的高K⁺低Na⁺环境改变,从而诱导内淋巴积水的产生。醛固酮(aldosterone)在体内主要负责调控钠和钾代谢及液体容量平衡,而醛固酮受体在耳蜗有分布,并且主要表达于血管纹、Corti器、螺旋韧带等部位^[2]。研究发现醛固酮可诱导内淋巴积水形成,但作用机制仍不清楚^[3,4]。

在肾脏疾病研究中证实,ENaC,即上皮钠通道(epithelial sodium channel),是Na⁺转运的重要通道蛋白,转录调节因子Af9(the putative transcription factor ALL1-fused gene from chromosome 9)在肾脏的肾小管和部分肾小球中有表达^[5],醛固酮可抑制Af9蛋白与组蛋白甲基转移酶Dot1a(the histone H3 Lys79 methyltransferase disruptor of telomeric silencing alternative splice variant a)蛋白的相互作用,促进ENaC的转录,从而导致肾脏Na⁺代谢障碍,进而引起肾脏纤维化、高血压等疾病^[6]。但Af9分子在内耳中是否有表达尚不清楚,且在内耳中Af9蛋白与醛固酮是否一同参与内耳内淋巴调节的相关机制亦缺乏相

应的研究支持。

我们推测醛固酮可能与 Af9 分子作用参与耳蜗内淋巴代谢调节。为此，本实验采用醛固酮构建豚鼠耳蜗内淋巴积水模型，研究 Af9 在耳蜗组织中的表达情况及醛固酮对 Af9 表达及耳蜗功能的调控作用机制，进而探讨内淋巴积水形成的可能分子机制，为梅尼埃病的发病机理寻找新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康白化红目豚鼠，雄性，体重 200-250g，由重庆医科大学实验动物中心提供，声反射灵敏。将动物随机分为实验组和对照组，共 30 只（实验组 15 只，对照组 15 只）。

1.1.2 主要仪器

仪器名称	品牌	产地
普通光学显微镜	OLYMPUS	日本
倒置荧光显微镜	OLYMPUS	日本
诱发电位仪	INTELLEGENT HEARING	美国
电泳仪、电转液	Bio-Rad	美国
CFX96 PCR 仪	Bio-Rad	美国
凝胶成像系统	Bio-Rad	美国
酶标仪	Bio-Rad	美国
紫外分光光度仪	Thermo Fisher	美国
低温离心机	Eppendorf	美国
4℃/-20℃/-80℃冰箱	海尔	中国

1.1.3 主要试剂

试剂名称	来源	产地
兔抗鼠 Af9 多克隆抗体	Abcam	英国
醛固酮 (aldosterone)	Sigma	美国
三氯甲烷 (无菌)	天津市灏洋生物制品科技有限 责任公司	中国
SABC 免疫组化试剂盒	博士德	中国

HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体	联科生物	中国
兔抗鼠 β -actin	北京博奥龙免疫技术有限公司	中国
驴抗兔荧光二抗	Proteintech	中国
Western 显影液	碧云天	中国
Af9 基因 PCR 引物	Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd	中国
β -actin 基因 PCR 引物	Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd	中国
Total RNA 提取试剂盒	TaKaRa	日本
逆转录试剂盒	TaKaRa	日本
SYBR Premix Ex Taq II	TaKaRa	日本

1.1.4 主要试剂的配制

(1) 醛固酮溶液

氯仿与醛固酮的最佳溶解比例是 1ml: 20mg (由于氯仿有毒, 应尽量减少用量)。操作如下: 将 25mg 醛固酮粉末中加入 1.25ml 无菌氯仿, 充分混匀溶解后, 分装至 1.5ml 无菌 EP 管中, 用封口胶密封, 避光保存于常温下。

(2) 10% 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)

将 25g EDTA 粉剂倒入 250ml 容量瓶中, 再加入 0.01mPBS 溶液定量为 250ml, 放入 60°C 水浴锅加热溶解, 并加入氢氧化钠粉剂至 EDTA 溶解完全, 再缓慢加浓盐酸将 PH 调至 7.4, 并将溶液另装瓶保存。

(3) 4% 多聚甲醛

取 20g 多聚甲醛粉末倒入 500ml 容量瓶中, 加入 ddH₂O 定量 500ml, 放入 60°C 水浴锅中加热溶解 (或放入 60°C 烤箱中过夜), 并将溶液另装瓶保存。

(4) 0.05% 胰酶修复液

胰酶 0.1g

氯化钙 0.2g

加 ddH₂O 至 200ml, 于 4°C 保存备用。

(5) TBST

Tris-base	2.42g
NaCl	8.8g
ddH ₂ O	1000ml
浓 HCl	1ml
Tween-20	1ml

于 4℃ 保存备用。

(6) 电泳缓冲液

甘氨酸	18.8g
Tris-base	3.0g
SDS	1.0g

加 ddH₂O 至 1000ml。

(7) 电转移缓冲液

甘氨酸	14.4g
Tris-base	3.03g
甲醇	200ml

加 ddH₂O 至 1000ml, 4℃ 保存备用。

(8) 10% 分离胶 (10ml)

ddH ₂ O	2.7ml
30% Acr-Bis (29:1)	3.3ml
1M Tris, pH8.8	3.8ml
10% SDS	0.1ml
10% 过硫酸铵	0.1ml
TEMED	0.004ml

(9) 5% 电泳浓缩胶 (3ml)

ddH ₂ O	2.1ml
30% Acr-Bis (29:1)	0.5ml
1M Tris, pH6.8	0.38ml
10% SDS	0.03ml

10%过硫酸铵	0.03ml
TEMED	0.003ml

1.2 方法

1.2.1 构建豚鼠内淋巴积水模型

(1) 建模方法

对照组豚鼠每天腹腔注射生理盐水 0.05ml, 共 5 天, 实验组豚鼠每天腹腔注射醛固酮 $0.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 0.05ml, 共 5 天。喂饲常规饮食, 一个月后取材, 行 HE 染色观察内淋巴积水形成。

(2) 定量评估内淋巴积水

为了定量评估耳蜗各转中内淋巴液体积的改变, 我们对各转(底转, 第二转, 第三转, 顶转)中阶的横切面积增加率(IR-S)进行了测量, 而具体的测量方法参照于相关文献^[7,8]。分析测量结果时, 我们运用了两个参数: (1) 膨隆中阶的横切面积 S; (2) 理想的中阶横切面积 S_0 , 即这条线段代表前庭膜(Reissner's 膜)在血管纹的上缘处的假定基线位置与在螺旋缘处的正常内侧的连线。运用这些参数, 我们使用以下公式计算各转横截面积的增加率: 总 $\text{IR-S}(\%)=100\times\Sigma(S_x-S_0)/\Sigma S_0$ (x: 底转, 第二转, 第三转, 顶转)。前庭膜向前庭阶膨隆为积水形成的标志。将内淋巴积水程度分为轻度、中度及重度, 膨隆的部分面积占前庭阶面积的 0~1/3 为轻度积水; 1/3~2/3 为中度积水; 2/3 以上为重度积水。

1.2.2 行为学观察

建模期间, 间隔 3 天观察一次动物日常活动, 如耳廓反射灵敏度, 有无眼球震颤、行走迟缓、摇晃等现象。

1.2.3 ABR 检测

造模前与造模 1 月的豚鼠在取材前均进行豚鼠双耳听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)阈值测试。测试方法如下:

(1) 测试在电声屏蔽室内进行, 仪器采用美国诱发电位仪, 测试的软件为 SMART EP, 刺激声为短声, 极性为交替波。

(2) 动物用 1%戊巴比妥钠按 $40\text{mg}/\text{kg}$ 腹腔内注射进行麻醉。

(3) 置入电极：记录电极置于颅顶，参考电极置于测试耳耳廓后，地极置于对侧耳耳廓后。

(4) 打开测试软件，采取单频单耳刺激给声，带通滤波为 100-3000Hz。

(5) 检测从 80dB 开始，每 20dB 为一阶梯下降，观察快接近阈值时再以 10dB、5dB 下降，将 III 波的最低阈值作为 ABR 的反应阈。

(6) 记录听力阈值。

1.2.4 形态学检测

(1) 动物常规麻醉。

(2) 待麻醉充分后，立即分别以生理盐水及 4%多聚甲醛行心脏灌流，待头颈完全僵硬后快速断头游离颞骨。

(3) 剪开听泡，保留内耳，蜗尖钻孔，打开蜗窗及前庭窗，同时也取出肾脏。

(4) 4%多聚甲醛中固定 48 h。

(5) 10%的 EDTA 溶液脱钙 1 个月(脱钙液 2 天更换 1 次)。

(6) 随后梯度酒精脱水。

(7) 透明。

(8) 石蜡包埋。

(9) 与蜗轴平行连续切片，片厚为 4 μ m。

(10) HE 染色步骤如下：

① 脱蜡：二甲苯 15min \times 3 次。

② 水化：无水乙醇 5min \times 2 次；95%乙醇 5min \times 2 次；70%乙醇 5min \times 1 次。

③ 洗涤：双蒸水洗 2min。

④ 染色：苏木素 5min，水洗；蒸馏水浸泡 3min；1%盐酸酒精分化数秒 5s；碳酸锂反蓝 30s，蒸馏水中浸泡 3min；伊红染色 3min。

⑤ 脱水：75%乙醇 30s，95%乙醇 5min，100%乙醇 5min。

⑥ 透明：二甲苯 10min。

⑦ 封片。

1.2.5 免疫组化检测 Af9 蛋白的表达

将耳蜗石蜡切片按照 SABC 法免疫组化试剂盒说明书操作如下（部分步骤稍有调整）：

- (1) 烤片 2h。
- (2) 脱蜡、水化及洗涤：同 HE 染色。
- (3) 0.05%胰酶修复 30min，PBS 浸泡 5min×3。
- (4) 3%的双氧水室温孵育 10min，PBS 洗 5min×3。
- (5) 封闭：山羊血清封闭 1h。
- (6) 去除山羊血清后，滴加一抗（一抗为兔抗鼠 Af9 多克隆抗体(Af9: PBS=1: 500)，0.01M PBS 代替一抗做阴性空白对照，用已知阳性的肾脏做阳性对照。），4℃过夜。
- (7) 去除一抗，PBS 浸泡 5min×3。
- (8) 滴加二抗，37℃孵育 30min，PBS 洗 5min×3。
- (9) 滴加 SABC，37℃孵育 30min，PBS 洗 5min×3。
- (10) 滴加 DAB 显色剂。
- (11) 苏木素复染。
- (12) 盐酸分化 3-4S，冲洗 5min。
- (13) 碳酸锂 1.5min，冲洗 2min。
- (12) 梯度脱水：75%、80%、995%、100%乙醇各 2min。
- (13) 二甲苯 I、II 透明 5min。
- (14) 中性树胶封片。
- (15) 显微镜下观察拍照。

结果判定：将显微镜下耳蜗中细胞膜和/或细胞质棕黄色颗粒者作为 Af9 蛋白阳性表达，无棕黄色颗粒者为阴性表达。对两组动物的底转和第二转进行平均光密度值（Average optical densities, AOD）比较，采用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算 AOD 值。

1.2.6 免疫荧光检测 Af9 蛋白的定位表达

- (1) 从-20℃中拿出冰冻切片，先复温 30min。

- (2) Triton 破膜 30min, PBS 浸泡 5min×3。
- (3) 0.05%胰酶修复 30min, PBS 浸泡 5min×3。
- (4) 5%驴血清封闭 1h。
- (5) 加入兔抗鼠多克隆抗体 Af9 (1:200), 4℃孵育过夜。
- (6) 取出后复温 30min, PBS 浸泡 5min×3。
- (7) 滴加驴抗兔荧光二抗 (1:100) 于 37℃孵育 1.5h, PBS 浸泡 10min×4。
- (8) DAPI 染核 7min, PBS 浸泡 5min×3。
- (9) 甘油封片, 尽快于倒置荧光显微镜下拍照, 分析结果。

1.2.7 Western blot 检测 Af9 蛋白的表达

(1) 取材及提取耳蜗组织蛋白

① 豚鼠造模结束当日, 给予 1%戊巴比妥钠 (40mg/kg) 深度麻醉后, 快速断头开颅, 取出听泡后置于冰面培养皿内, 打开听泡, 修剪耳蜗周围组织。

② 剪开耳蜗放入 EP 管中, 两只耳蜗混合为一组, 加入蛋白裂解液 RIPA600 μ l 与蛋白酶抑制剂 PMSF15 μ l (约 40:1), 用移液管反复吹打。

③ 冰面静置 30min, 4℃20000g 低温离心 15min, 吸取上清液。

④ 使用 BCA 试剂盒检测每组蛋白液浓度。

⑤ 蛋白液与 5 倍上样缓冲液按 1:5 混匀, 沸水中煮 5min, -80℃分装冻存。

(2) SDS-PAGE 凝胶电泳

① 固定装置;

② 配胶: 先配制 10%分离胶 10ml, 为防止气泡产生, 需加入 1ml 无水乙醇, 室温静置 30min, 倒去乙醇, 加入 5%浓缩胶 3ml, 插入梳子, 各室温静置 30min。

③ 加样: 拔掉梳子后, 将电泳槽中加入电泳液, 将完全凝固后的胶放入电泳槽内, 每孔加入 蛋白样品, Marker 蛋白为参照。

④ 电泳: 接通电源后, 浓缩胶电泳时稳压 60V 约 1h, 分离胶为 80V, 电泳至目的蛋白完全跑出后终止。

⑤ 转膜: 以 Marker 及目的蛋白分子量大小切胶, 并剪切相对大小的 PVDF 膜, 将 PVDF 膜放入甲醇中活化约 30s, 再浸泡于电转液中。再固定转膜的装置, 排尽各层的气泡, 放入装有电转液的槽内, 冰上恒流电转 (250mA), 1.5h。

⑥ 封闭: 将 PVDF 膜泡入 1%牛血清白蛋白 (BSA) 中室温封闭 2h。

⑦孵育一抗：TBST 洗膜液洗膜 10min×3 次，加入相应的兔抗鼠多克隆抗体 Af9 稀释液 (Af9:TBST=1:1000)，兔抗鼠 β -actin 稀释液 (β -actin: TBST=1: 3000)，4℃孵育过夜，次日用 TBST 洗膜 10min×3 次。

⑧孵育二抗：加入羊抗兔 IgG-HRP 稀释液 (二抗: TBST =1:5000)，37℃孵育 1.5h，TBST 洗膜 10min×3 次。

⑨显色：避光条件下将显色液按 1: 1 配置，均匀滴在 PVDF 膜上，于凝胶成像仪器 (FUSION-FX7 Spectra) 上进行显色。

⑩分析条带的灰度值。

1.2.8 荧光定量 PCR 检测 Af9 mRNA 的表达

(1) 引物设计

通过搜索 NCBI 核酸资料库，检索 Af9 核苷酸序列长度，选取 β -actin mRNA 序列作为内参引物，利用 Primer Premier 软件对序列 CDS 区域碱基序列进行引物设计，再通过 BLAST 对序列进行分析，选最佳引物进行合成。引物序列如下：

		引物序列
Af9	F	5-AAGCCGCAGAGTTAGCTTGA -3
	R	5-GTACGCCTTGTCGCATTCAC -3
β -actin	F	5-AAGCCGCAGAGTTAGCTTGA -3
	R	5-ATGCCACAGGATTCCATACC-3

(2) 组织总 RNA 的提取

①动物深度麻醉后断头，冰浴下游离听泡，取出耳蜗组织，2 对耳蜗组织混合为一组，用 DEPC 水冲洗一遍。

②立即加入 Trizol 进行裂解 5min，同时用镊子夹碎耳蜗，无酶枪头反复敲打数次使其裂解充分。

③12000g4℃离心 5min，吸取上清液入 1.5mL 无酶 EP 中。

④加入 1/5 上清液等容量的氯仿，振荡混匀 15s 后，冰上放置 5min。

⑤12000g4℃离心 15min 后，吸取上清液移至另外的 1.5mL 无酶 EP 管中，切勿吸到中间的白色层。

⑥加入与上清液等体积的异丙醇，冰上放置 10min。

⑦4℃ 12000g 离心 10min，去除上清液，保留沉淀，加入 75%乙醇 1mL 稀释沉淀，清洗沉淀。

⑧4℃ 12000g 再次离心 5min，倒去乙醇，用干净滤纸吸出管壁残留液体，然后将 RNA 溶解 DEPC 水中。

⑨测 RNA 浓度。

⑩溶解后的 RNA 分装保存于-80℃冰箱。

(3) 逆转录合成 cDNA

逆转录的操作方法分如下两步（所有操作需在冰上进行）：

①

试剂	用量
5×gDNA Eraser Buffer	2.0μ l
gDNA Eraser	1.0μ l
Total RNA	1μ g
RNase Free H ₂ O	加至至反应总体积为 10μ l

将上述试剂混匀后，室温放置 5min。

②

试剂	用量
步骤①的反应液	10μ l
5×Prime Scrip Buffer2	4.0μ l
Prime Script RT Enzyme Mix1	1.0μ l
RT Primex Mix	1.0μ l
RNase Free H ₂ O	4.0μ l

将上述试剂充分混匀后，放入 PCR 反应仪中，反应参数：37℃，15min；85℃5s。

合成后的 cDNA 进行分装冻存于-20℃。

(4) 荧光定量 PCR 反应

利用 SYBR Green qPCR 来检测 mRNA 的表达水平。具体操作步骤如下：

试剂	用量
SYBR Premix Ex Taq II	5 μ l
PCR 上游引物	0.3 μ l
PCR 下游引物	0.3 μ l
CDNA 模板	2 μ l
DEPC 水	2.4 μ l

总反应体系为 10 μ l。按 95 °C 预变性 30s、95°C 变性 5S、60 °C 退火 30 s、60°C 延伸 1 min 的条件进行扩增，循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析^[9]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 及 GraphPad Priam5 软件对数据进行统计分析，ABR 数据分析应用配对 t 检验，其余数据均采用独立样本 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。计量资料数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述。

2 结果

2.1 行为学观察

观察豚鼠耳廓反射灵敏，胆小易惊，未捕捉到眼球震颤、行走不稳症状。

2.2 ABR 检测结果

如表 1 可见，对照组中，实验前后 ABR 阈值的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；而在实验组中，实验前后 ABR 阈值的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。图 1 所示为，实验组醛固酮作用前后 ABR 阈值变化图。

表 1 两组实验前后 ABR 阈值比较 (dB SPL, n=30)

Table 1 The ABR thresholds of all animals (dB SPL, n=30)

Group	n	ABR threshold	ABR threshold	<i>P</i>
		before treatment	after treatment	
The control group	15	19.00 \pm 3.32	18.33 \pm 2.73	0.21
The treatment group	15	18.17 \pm 3.08	23.33 \pm 2.38	0.00

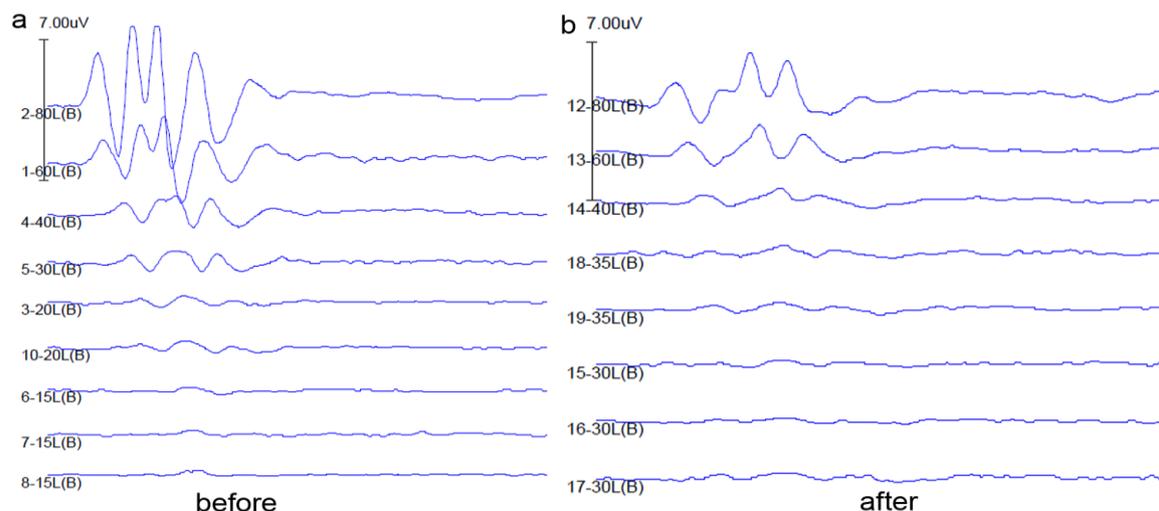


图 1 实验组中 1 只动物实验前后左耳 ABR 阈值的变化情况 (实验前: 20dB, 实验后: 35dB)

Fig. 1 ABR thresholds of left ear of one guinea pig before and after aldosterone treatment
(before: 20dB, after: 35dB).

2.3 形态学检测结果 (HE 染色)

观察正常豚鼠切片发现耳蜗前庭阶面积与蜗管的面积比值随顶转到底转逐渐变大, 前庭阶、蜗管、鼓阶的结构正常, 且前庭膜未向前庭阶膨隆。按 Reissner's 膜向前庭阶膨隆的程度可分为轻、中、重度积水, 造模一月后对照组豚鼠耳蜗未见明显积水形成, 实验组取 15 只耳蜗, 发现有 11 只出现轻度积水, 底转尤为明显, 余 4 只耳蜗未见明显积水, 造模成功率 73%。见图 2(a、b)。表 2 定量评估耳蜗各转中内淋巴液体积的改变中发现, 在耳蜗底转中实验组的 IR-S (%) 较对照组明显增大, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

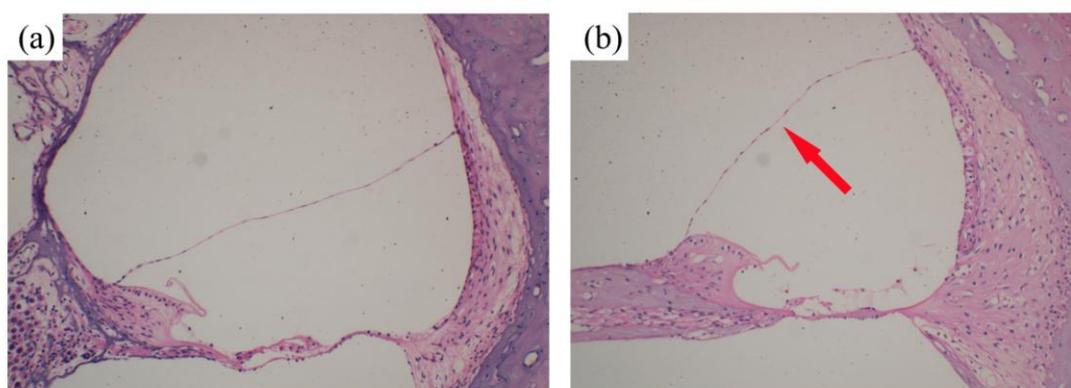


图 2 豚鼠耳蜗病理组织学切片 (a:对照组:耳蜗结构正常 b: 对照组:内淋巴积水 HE $\times 100$)

Fig. 2 The histopathological sections of guinea pig cochleas (a: the control group: normal cochlea; b: the treatment group: endolymphatic hydrops in cochlea HE $\times 100$)

表 2 耳蜗内淋巴液体积变化的定量分析情况

Table 2 Result of quantitative analysis of endolymphatic space

Group	<i>n</i>	IR-S (%)	<i>P</i>
The control group	6	2.25 \pm 0.32	<0.05
The treatment group	6	18.80 \pm 1.16	

2.4 Af9 在豚鼠耳蜗中定位表达及半定量表达变化

2.4.1 免疫组化结果

对照组与实验组豚鼠耳蜗组织中均有 Af9 蛋白表达, 主要表达于血管纹、前庭膜、螺旋缘、Corti 器、螺旋神经节的细胞质、细胞膜及部分细胞核处, 呈棕黄色颗粒状, 且在血管纹、前庭膜及螺旋缘处的表达尤为明显 (图 3(a,b))。用肾脏作为阳性对照, Af9 蛋白主要表达于肾小管上皮的细胞膜和细胞质, 呈棕黄色颗粒 (图 4)。表 3 通过对两组耳蜗底转及第二转的 AOD 值进行分析后, 得出对照组的 AOD 明显高于实验组 ($P<0.05$), 且两组底转的 AOD 值均明显高于第二转 ($P<0.05$)。

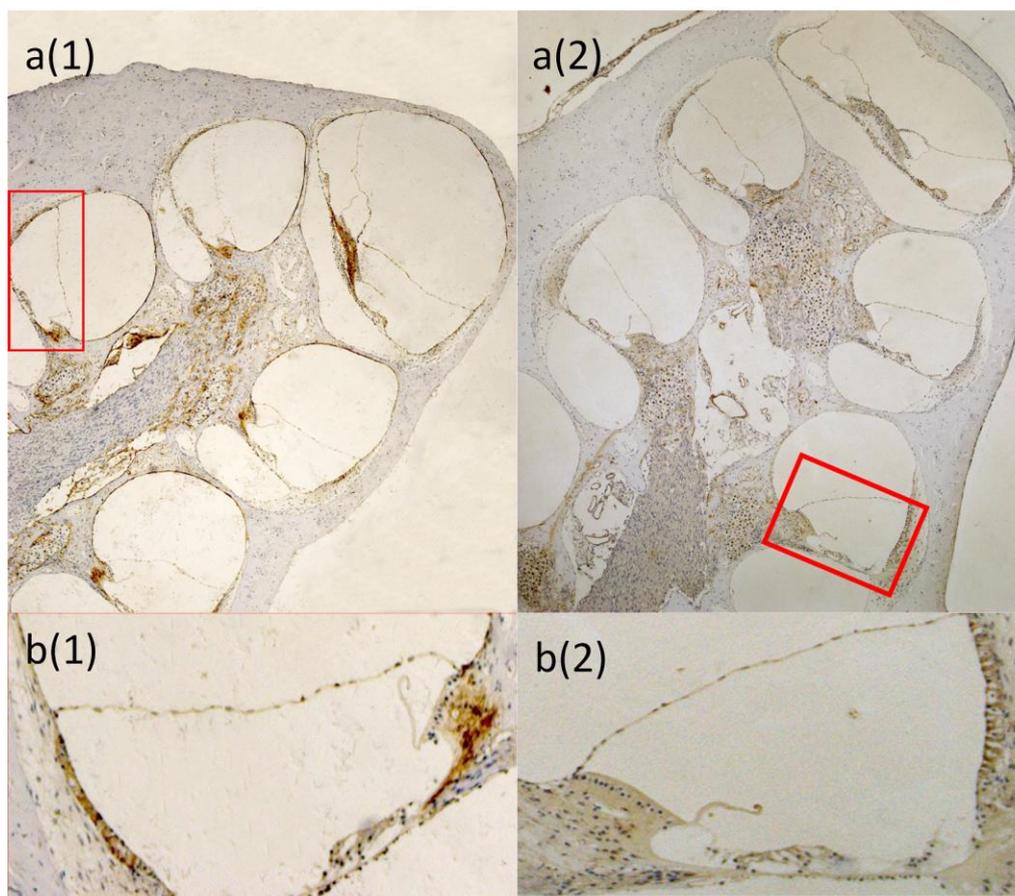


图3 耳蜗免疫组化显示 Af9 蛋白在耳蜗中的表达分布
对照组、实验组均表达于血管纹、前庭膜、螺旋缘、Corti 器、螺旋神经节 对照组: a(1),b(2)
实验组: a (2), b(2)

Fig. 3 Immunohistochemical staining of Af9 protein in guinea pig cochleas. Af9 protein was shown in both groups in the stria vascularis, Reissner's membrane, spiral limbus, organ of Corti and spiral ganglions. (a (1) , b(1) : the control group; a(2), b(2): the treatment group)

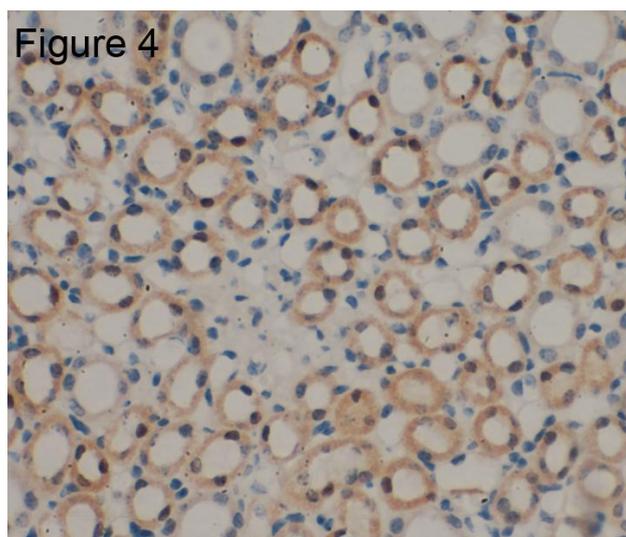


图 4 肾脏免疫组化显示 AF9 蛋白在肾脏中的表达分布 (×100)

Fig. 4 The immunohistochemical staining pattern for AF9 protein in guinea pigs kidney (×100)

Table 3 两组耳蜗底转与第二转的 AOD 值变化情况

Table 3 The AOD of AF9 proteins in the basal turn and second turn of two groups

Group	The Basal Turn	The Second Turn	<i>P</i>
The Control Group	0.61±0.03	0.51±0.51	<i>P</i> =0.04
The Treatment Group	0.35±0.02	0.22±0.52	<i>P</i> =0.02
<i>P</i>	<i>P</i> =0.001	<i>P</i> =0.01	

2.4.2 免疫荧光结果

免疫荧光结果显示：对照组与实验组均可见绿色荧光表达，说明两组豚鼠耳蜗组织中均有 Af9 蛋白表达，且在螺旋缘、血管纹及前庭膜的表达呈强阳性，Corti 器、螺旋神经节处的表达呈弱阳性。如图 5 所示。

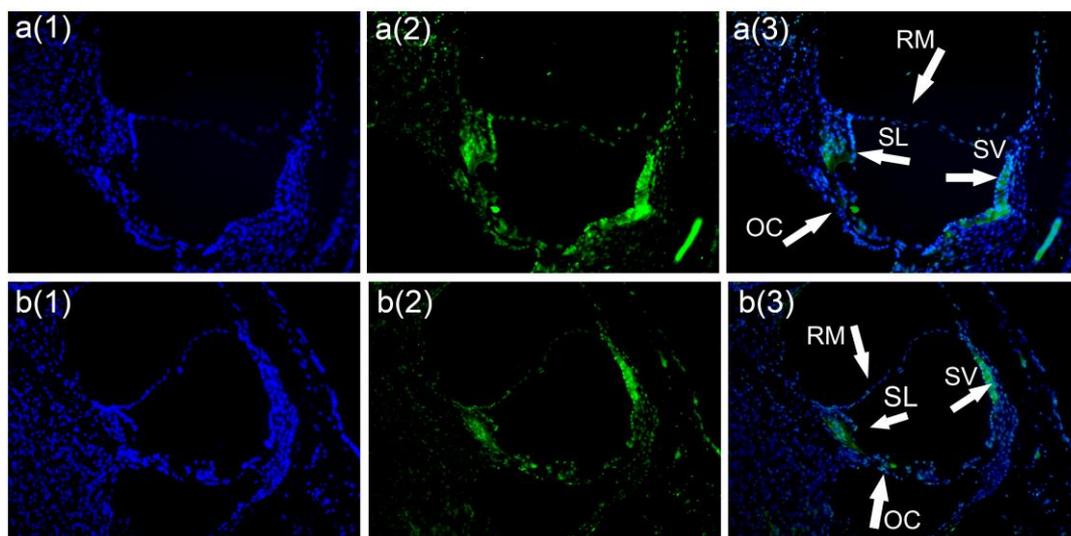


图 5 耳蜗免疫荧光显示 Af9 蛋白在耳蜗中的表达分布

Af9 主要表达与血管纹 (SV)、前庭膜 (RM)、螺旋缘 (SL)、Corti 器 (OL)、螺旋神经节。
a 为对照组; b 为实验组; a(1),b(1)为蓝色荧光定位细胞核; (a(2), b(2))为绿色荧光定位耳蜗组
织中 Af9 蛋白的表达部位; (a(3), b(3))为两种荧光的叠加图。

Fig.5 The expression of Af9 in the cochleas of two groups shown by immunofluorescent staining.

Af9 protein was shown in both groups in the stria vascularis(SV), Reissner's membrane(RM), spiral limbus(SL), organ of Corti(OC), spiral ganglions. (a(1),b(1)): Blue indicated nuclei. (a(2), b(2)): Green fluorescence indicated Af9 protein. (a(3), b(3)): Overlap of (1) and (2) showed Af9 and nuclei. (a: the control group b: the treatment group)

2.5 Western blot 检测 Af9 蛋白的表达

图 5 (a) 显示, Af9 蛋白的分子量为 63 KDa, β -action 的分子量为 42KDa。Af9 的表达量在实验组中明显降低。图 5 (b), 定量分析结果显示实验组与对照组的蛋白相对表达量分别为 0.75 ± 0.15 和 1.06 ± 0.08 ($P < 0.05$)。表明醛固酮在蛋白水平上能有效下调 Af9 的表达。

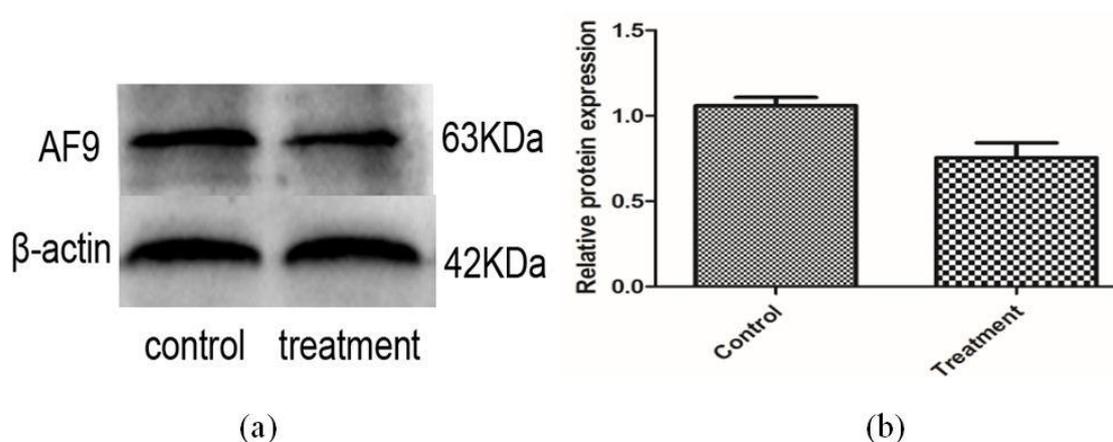


图 6 两组动物耳蜗 Af9 蛋白的 Western blot 分析 (a) 及蛋白定量分析结果 (b)

Fig.6 (a) Western blot of Af9 protein in the cochleas of two groups. (b) The relative expression of Af9 protein was lower in the treatment group compared to the control group

2.6 荧光定量 PCR 检测 Af9 mRNA 的表达

图 7 显示, 实验组与对照组中 Af9 mRNA 相对表达量分别为 0.36 ± 0.07 和 1.00 ± 0.00 ($P < 0.05$), Af9 mRNA 的表达量在实验组中明显降低。表明醛固酮在 mRNA 水平上能有效下调 Af9 的表达。

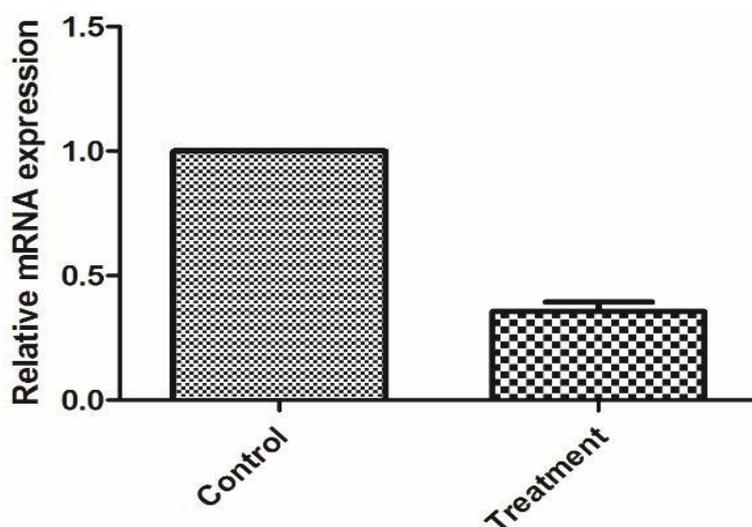


图 7 组耳蜗的 Af9 mRNA 定量分析结果

Fig.7 The expression of Af9 mRNA in the cochleas in both groups

3 讨论

目前, MD 的病因及发病机制仍不清楚, 临床也主要通过症状、实验室检测和排它法来诊断梅尼埃病。目前认为梅尼埃病最主要的组织病理学改变为内淋巴积水。受伦理道德局限, 无法获取大量人体颞骨样本以及活体无法进行膜迷路积水组织病理学研究, 因此选择恰当的内淋巴积水动物模型对于研究梅尼埃病发病机制至关重要。醛固酮是由肾上腺皮质球状带分泌的作用最强的一种盐皮质激素, 主要用于维持体内水容量平衡及钠钾代谢。1997 年, Dunnebier 等人利用两相法通过手术破坏单耳内淋巴囊及内淋巴管后 3 周, 给予醛固酮建立膜迷路积水模型后, 手术耳出现中、重度内淋巴积水, 对侧耳出现轻度内淋巴积水, 推测醛固酮影响内耳中 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性, 出现 Na^+/K^+ 代谢紊乱所致^[3, 10-12]。随后国内有学者进行了单一的醛固酮建模, 并对手术单耳建模、手术双耳建模、注射醛固酮组以及注射血管加压素组建模方法进行了对比研究, 认为醛固酮建模适于研究膜迷路积水的可能内分泌代谢机制^[4, 13]。

上皮钠通道是体内调节水、 Na^+ 代谢的重要分子。我们的前期研究证实内耳组织中有 ENaC 的表达^[14, 15]。运用小鼠敲除 Pendrin 基因和豚鼠腹腔注射醋酸去氨加压素构建内淋巴积水模型的实验研究证实, ENaC 参与内淋巴积水形成^[16, 17]。肾脏相关研究发现, 醛固酮可下调 Af9 与 Dot1a 分子的表达来促进 ENaC 的转录, 导致肾脏钠离子代谢障碍^[5, 6]。而在内耳中是否也存在这种调节机制, 参与内淋巴代谢尚不清楚。本实验通过豚鼠腹腔注射醛固酮构建内淋巴积水, 对豚鼠内耳的症状学、功能学及形态学的改变进行研究, 并初步探索了 Af9 分子在内耳中的表达模式及与醛固酮、内淋巴代谢之间的可能关系。

在造模过程中, 本实验未能捕捉到豚鼠出现眼球震颤、行动迟缓等典型梅尼埃病症状。最近有学者通过对确诊为 MD (无临床症状) 的人体颞骨标本进行病例研究, 认为膜迷路积水的病理改变与 MD 的临床特征不一定相一致^[1], 而动物的主观症状本身亦较难获取。

实验组造模后豚鼠平均听阈提高约 5dB, 具有统计学意义。从临床角度考虑, 此听力损害较轻, 这可能与种属个体差异、药物剂量、有效浓度维持时间、听力损害程度及听力损害已向痊愈方向转归等因素有关。但临床上也存在血浆醛固酮

水平低（听力在正常值范围）的老年人，较醛固酮水平高者（正常高值）的听力更差^[18]；在对自身免疫性听力损失的小鼠模型研究中^[19]，盐皮质激素（包括醛固酮）与糖皮质激素对听力恢复疗效相当，甚至优于糖皮质激素。研究发现，自身免疫性听力损失的小鼠给予 $3\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 共 2 月的长期低剂量醛固酮给药对听力并无影响^[20]，而本实验采用的是 $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 共 5 天的短期高剂量醛固酮给药。因此，本文推测醛固酮在安全用量范围对听力具有一定的保护作用，当超过了安全剂量，可能触发机体某些损伤作用机制，对听力造成损害。

如图 2 所示，由于动物对药物的反应有差异，个别耳蜗积水形成较不明显，但是耳蜗内淋巴积水率仍达到 73%。醛固酮造模方法相对于手术法^[3]、免疫法等造模方法安全性高，稳定性好。本文耳蜗积水主要存在于底转，随着积水程度加重，可能诱发高频听力下降。

看似无关联的肾脏和内耳却都存在 ENaC、非选择性阳离子通道、 Na^+ ， H^+ -交换体（NHE3）、 Na^+ ， K^+ -ATP 酶、 Na^+ ， K^+ ， Cl^- 协同转运蛋白（NKCC1）等 Na^+ 转运相关通道及转运蛋白^[21]。当肾脏和内耳中的这些通道或转运蛋白发生障碍时，肾脏和内耳都会出现代谢失调^[21, 22]。可见肾脏和内耳可能具有相似的代谢调节机制。ENaC 属高选择性 Na^+ 通道，在多种具有 Na^+ 重吸收的组织（如肾脏、肺脏等）中有表达，拥有高 K^+ 低 Na^+ 特性的内淋巴液的耳蜗组织中同样有 ENaC 的定位表达，它能调节内淋巴液容积，维持内淋巴稳态^[14, 15]。在肾脏研究中证实，醛固酮对肾脏集合管上皮钠通道（ENaC）基因及上皮 Na^+ 吸收起到重要调控作用。过表达 Af9 基因可导致内源性 α ENaC 启动子的组蛋白 H3Lys79 超甲基化，从而抑制 mRNA 水平上的 α ENaC，并与 Dot1a 协同干扰 α ENaC 启动子荧光素酶合成；干扰 Af9 基因的实验得出相反的结果，因此认为醛固酮能在 mRNA 及蛋白质水平下调 Af9 的表达^[23]。因此，推测内耳中也可能同样存在醛固酮通过 Dot1a-Af9 途径作用于 ENaC 的表观遗传学通路。

有研究显示 Af9 在肾脏的肾小管和部分肾小球中有表达，且参与醛固酮对 ENaC 的调节^[5]。本实验将肾脏做为阳性对照，也成功得出 Af9 在肾小管上皮有表达（图 4）。但目前尚未有文献报道在内耳中有 Af9 表达。本实验首次证实内耳中有 Af9 分子的表达，并且在螺旋缘、血管纹及前庭膜的表达呈强阳性，Corti 器、螺旋神经节处的表达呈弱阳性，与 ENaC 的三个不同亚基在内耳中的表达部位相

似^[14]，这些皆是参与 Na^+ 代谢的重要部位。因此，Af9 分子在内耳中可能也参与对 ENaC 的调节，共同维持内耳 Na^+ 稳态。

Corti 器感受声音刺激，螺旋神经则可能参与听觉传导，目前尚未证实 ENaC 是负责哺乳类听觉的机械感觉通道^[24]。如图 3, 5 所示，本实验中 Af9 蛋白在 Corti 器、螺旋神经处表达很弱，因此推测该部位不是 Na^+ 转运的主要场所。而 Af9 蛋白在血管纹、前庭膜及螺旋缘处表达呈强阳性（图 3(b1)、5(a2)）。内耳中血管纹边缘细胞中的离子转运蛋白负责分泌出 K^+ 进入中阶，然后主要依靠 Corti 器的机械敏感细胞被动排出 K^+ 以维持内淋巴液成分及蜗管内静息电位的稳定^[25]。ENaC 对 Na^+ 的吸收受前庭膜、球囊斑上皮、半规管上皮、内淋巴囊^[26]及血管纹边缘细胞的管腔膜^[27]控制。前庭膜主要通过阿米洛利选择性通道主动从内淋巴液中吸收 Na^+ ，维持内淋巴液低钠内环境，且不参与转运 K^+ 及内淋巴 K^+ 稳态的维持^[28]。如图 3 所示，实验组醛固酮作用后的内淋巴处于高 Na^+ 环境，内耳中的血管纹、前庭膜等部位的 Af9 蛋白表达量较正常组明显降低，增强了 ENaC 蛋白的转录。推测前期血管纹及前庭膜代偿性将内淋巴中 Na^+ 转运至外淋巴，同时血管纹的离子转运蛋白将 K^+ 转运至内淋巴；后期内耳处于失代偿阶段时，内淋巴逐渐处于异常低钾高钠内环境。前庭膜渗透性的被动吸收，从而导致内淋巴积水的产生。

本实验研究表明，醛固酮可在蛋白及 mRNA 水平上有效的下调耳蜗组织中的 Af9 分子，这可能意味着内耳 Af9 分子参与了表观遗传学修饰。表观遗传调控不会改变 DNA 序列以及传播遗传密码信息的潜力。有研究报道，Sgk1 是 ENaC 促进醛固酮与 MR 激活的调节蛋白之一^[29]。我们前期研究已证实 Sgk1 在耳蜗中有表达^[15]。Af9 是 Sgk1 的生理靶点，Sgk1 能下调 Dot1a-Af9 抑制复合物，以此调控 ENaC 转录。ENaC 与醛固酮相关信号传导通路的表观遗传学机制已在肾脏研究中得到证实^[5, 30, 31]。近期有文献总结了 ENaC 转录调控以及 Dot1a-Af9 介导的抑制组蛋白 H3 K79 靶向高甲基化的表观遗传学机制^[32]。这些发现与我们的研究结果结合表明，内耳中可能存在醛固酮调控 Af9-ENaC 的表观遗传学机制。

综上所述，醛固酮对内淋巴积水的形成起着重要的作用，可能导致内耳形态学及功能学的改变。本实验首次证实 Af9 在内耳血管纹、前庭膜、螺旋缘等 Na^+ 代谢的重要部位有表达，且醛固酮明显下调 Af9 内耳中的表达。提示耳蜗中可能存在醛固酮通过 Dot1a-Af9 途径作用于 ENaC 的表观遗传学通路，参与内淋巴代谢，

这也可能是 MD 的一种新的发病机制，值得进一步研究。

全文总结

1. 醛固酮对内淋巴积水的形成起着重要的作用，可导致内耳形态学及功能学均发生变化。
2. 首次证实了 Af9 分子在内耳血管纹、前庭膜、螺旋缘等 Na^+ 代谢的重要部位有表达，Af9 可能参与内耳的内淋巴代谢。
3. 醛固酮作用后，Af9 在内耳中的表达明显减弱，提示内耳组织中可能存在醛固酮通过 Dot1a-Af9 途径作用于 ENaC 的表观遗传学通路，共同参与内淋巴积水的形成，这可能是 MD 的一种新的发病机制。

参考文献

- [1] Merchant S N, Adams J C, Nadol Jr J B. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? [J]. *Otology & Neurotology*. 2005, 26(1): 74-81.
- [2] Yao X, Rarey K E. Localization of the mineralocorticoid receptor in rat cochlear tissue [J]. *Acta otolaryngologica*. 1996, 116(3): 493-496.
- [3] Dunnebier E A, Segenhout J M, Wit H P, et al. Two-phase endolymphatic hydrops: a new dynamic guinea pig model [J]. *Acta oto-laryngologica*. 1997, 117(1): 13-19.
- [4] 蒋子栋, 张连山. 醛固酮诱发豚鼠双耳膜迷路积水[J]. *中国医学科学院学报*. 2002, 24(5): 501-504.
- [5] Zhou Q, Liu K, Wu H, et al. Spironolactone rescues Dot1a-Af9-mediated repression of endothelin-1 and improves kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *PloS one*. 2012, 7(10): e47360.
- [6] Zhang D, Yu Z, Cruz P, et al. Epigenetics and the control of epithelial sodium channel expression in collecting duct [J]. *Kidney international*. 2009, 75(3): 260-267.
- [7] Egami N, Kakigi A, Sakamoto T, et al. Morphological and functional changes in a new animal model of Meniere's disease[J]. *Lab Invest*. 2013; 93:1001–1011.
- [8] Egami N, Kakigi A, Takeda T, et al. Dehydration effects of a V2 antagonist on endolymphatic hydrops in guinea pigs[J]. *Hearing research*. 2016, 332: 151-159.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*. 2001, 25(4): 402-408.
- [10] Verheul J, Segenhout JM, Dunnebier EA, Albers FW, Blaauw EH, Wit HP. Ultrastructure of the endolymphatic sac in two-phase endolymphatic hydrops in the guinea pig[J]. *Acta Otolaryngol*. 1999; 119(3): 345-50.
- [11] Dunnebier EA, Segenhout JM, Dijk F, et al. Sensory cell damage in two-phase

- endolymphatic hydrops: a morphologic evaluation of a new experimental model by low-voltage scanning techniques [J]. *Otol Neurotol* 2001; 22(5): 655-661.
- [12] Dunne EA, Segenhout JM, Dijk F, et al. Cochlear ultrastructure in two-phase endolymphatic hydrops in the guinea pig [J], *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2002, 259(1): 17-23.
- [13] 蒋子栋, 高帆, 孙程成. 不同方法构建豚鼠膜迷路积水模型的对比研究[J]. *中华耳科学杂志.* 2015, 13(4): 734-737.
- [14] Zhong S X, Liu Z H. Immunohistochemical localization of the epithelial sodium channel in the rat inner ear [J]. *Hearing research.* 2004, 193(1): 1-8.
- [15] Zhong S X, Hu G H, Liu Z H. Expression of ENaC, SGK1 and Nedd4 isoforms in the cochlea of guinea pig[J]. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 2014, 52(2): 144-148.
- [16] 温雅, 钟时勋. 去氨加压素对耳蜗功能及上皮钠通道表达的调节作用[J]. *中华耳科学杂志,* 2014, 12(3): 498-502.
- [17] Kim B G, Kim J Y, Kim H N, et al. Developmental changes of ENaC expression and function in the inner ear of pendrin knock-out mice as a perspective on the development of endolymphatic hydrops [J]. *PloS one,* 2014, 9(4): e95730.
- [18] Tadros S F, Frisina S T, Mapes F, et al. Higher serum aldosterone correlates with lower hearing thresholds: a possible protective hormone against presbycusis [J]. *Hearing research.* 2005, 209(1): 10-18.
- [19] Trune D R, Beth Kempton J, Kessi M. Aldosterone (Mineralocorticoid) Equivalent to Prednisolone (Glucocorticoid) in Reversing Hearing Loss in MRL/MpJ - Fas^{lpr} Autoimmune Mice [J]. *The Laryngoscope.* 2000, 110(11): 1902-1906.
- [20] Trune DR, Kempton JB. Low dose combination steroids control autoimmune mouse hearing loss. *J Neuroimmunol.* 2010, 229: 140-145.
- [21] Kim S H, Marcus D C. Regulation of sodium transport in the inner ear [J]. *Hearing research.* 2011, 280(1): 21-29.
- [22] Lang F, Vallon V, Knipper M, et al. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney[J]. *American Journal of*

- Physiology-Cell Physiology. 2007, 293(4): C1187-C1208.
- [23] Zhang W, Xia X, Reisenauer M R, et al. Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaC α in an aldosterone-sensitive manner[J]. Journal of Biological Chemistry. 2006, 281(26): 18059-18068.
- [24] Corey D P. What is the hair cell transduction channel? [J]. The Journal of physiology. 2006, 576(1): 23-28.
- [25] Patuzzi R. Ion flow in stria vascularis and the production and regulation of cochlear endolymph and the endolymphatic potential [J]. Hearing research. 2011, 277(1): 4-19.
- [26] Kim S H, Marcus D C. Regulation of sodium transport in the inner ear [J]. Hearing research. 2011, 280(1): 21-29.
- [27] Kakigi A, Okada T, Takeda T, et al. Presence and regulation of epithelial sodium channels in the marginal cells of stria vascularis [J]. Acta oto-laryngologica. 2008, 128(3): 233-238.
- [28] Yamazaki M, Kim K X, Marcus D C. Sodium selectivity of Reissner's membrane epithelial cells [J]. BMC physiology. 2011, 11: 4.
- [29] Stockand JD. New ideas about aldosterone signaling in epithelia [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2002; 282: 559–576.
- [30] Zhang W, Yu Z, Wu H, et al. An Af9 cis-element directly targets Dot1a to mediate transcriptional repression of the alpha ENaC gene [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2013; 304:F367–375.
- [31] Yu Z, Kong Q, Kone BC. Aldosterone reprograms promoter methylation to regulate alphaENaC transcription in the collecting duct [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2013; 305:F1006–1013.
- [32] Zhang W. Epigenetics of epithelial Na⁺ channel-dependent sodium uptake and blood pressure regulation [J]. World J Nephrol. 2015; 4:363–366.

文献综述

醛固酮与内淋巴代谢相关性研究进展

梅尼埃病 (Ménière's disease, MD) 是耳科的一种常见病,以内淋巴积水 (Endolymphatic Hydrops, EH) 为基本病理基础,临床特征为间歇发作性眩晕、波动性感音神经性听力损失、耳鸣和耳胀满感等。由于梅尼埃病的病因和病理生理学尚不清楚,因此有关其发病机制和治疗等主要围绕内淋巴积水进行研究。激素作为梅尼埃病、突聋等听觉系统疾病的主要治疗药物已有半个世纪。但目前激素对内耳的作用机制尚未阐明。本文重点对醛固酮与内淋巴代谢相关机制进行了文献综述。

1. 醛固酮

人体盐皮质激素包括醛固酮 (aldosterone)、皮质酮 (corticosterone)、去氧皮质酮 (deoxycorticosterone) 等,尤其以醛固酮在体内最重要且作用最强。醛固酮主要在体内的肾上腺皮质球状带部位合成,负责调控钠钾代谢及液体容量平衡。研究发现,醛固酮的合成与分泌主要受血管紧张素 II (angiotension II)、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotropin hormone)、血钾^[1]、生物节律、情绪、体位等诸多因素影响。

人体内淋巴液长期处于高钾低钠的环境中,如果 Na^+ 、 K^+ 转运代谢异常使内淋巴液高钾低钠的环境改变,可能出现内淋巴液吸收和/或过度,最终导致内淋巴积水形成^[2, 3]。内耳功能代谢与激素水平关系密切。有研究表明,梅尼埃病患者的血浆抗利尿激素和加压素水平显著升高^[4, 5]。同时有研究证明,将动物全身输注肾上腺素后,外淋巴钠钾浓度、复合动作电位及听性脑干反应发生改变,由此得出应激相关激素可改变内耳液体的稳态和听觉功能^[6]。而梅尼埃病可能与高度的焦虑或其它形式的心理疾病有关,当人体处于情绪紧张时,通过下丘脑的介导,使来自垂体前叶的促肾上腺皮质激素分泌,然后促进肾上腺皮质产生糖皮质激素和盐皮质激素等,增加醛固酮、血管加压素等紧张相关性激素释放入血,导致梅尼埃病发作或加重^[7]。因此,临床医生应增加梅尼埃病患者心理健康的询问,并根据需要

提供相应的心理辅导和治疗。但也有文献报道,在梅尼埃病的静止期,血浆醛固酮水平未见明显改变,而对梅尼埃病的发作前后期的血浆醛固酮水平未做相关研究^[8]。由此可见,要将检测血浆醛固酮应用于临床诊治梅尼埃病还需进一步的研究证实。

2. 盐皮质激素受体 (MR) 与内耳

醛固酮在人体发挥作用主要通过两种途径:基因组和非基因组途径。其中基因组的作用方式是指醛固酮通过与其受体(mineralocorticoid receptor, MR)结合,进而调控下游的作用元件,达到功能的发挥;而非基因组方式则指在醛固酮不再与MR结合,而与作用元件直接结合发挥其作用^[9]。以往研究证实,醛固酮是盐皮质激素重要的生理性配体,MR与配体单一结合不能产生生理效应,必须有转录协同相关因子参与,来共同维持机体水钠平衡。而MR基因可因错义、框移、缺失等变异形成功能缺失而引起I型假性低醛固酮血症,也可因功能获得而引起早发型高血压。

1989年,Rarey最早在耳蜗组织样品中检测出MR I型受体,指出类固醇激素参与内耳中液体与离子的转运调节^[10]。随后有学者利用原位杂交方式发现大鼠耳蜗组织血管纹的边缘细胞及螺旋神经节细胞中有MR I型受体 mRNA表达^[11]。利用免疫组织化学也发现大鼠耳蜗组织的Corti器的外内毛细胞、血管纹、螺旋韧带及螺旋神经节中有MR表达,进一步证明了耳蜗组织是盐皮质激素的靶标组织之一^[12]。在经典的上皮组织中,如肾脏、汗腺和大肠,MR通过信号传递来直接刺激细胞膜上离子转运体(上皮钠通道(ENaC)、 Na^+ , K^+ -ATP泵)的活性,促进 Na^+ 的重吸收,并排出 K^+ 和 H^+ ,从而调节机体容量平衡,同时激活相关基因(上皮钠通道亚单位、 Na^+ , K^+ -ATP泵亚单位、Sgk和K-ras基因)的表达,这是MR的经典作用。当然,内耳作为人体重要的上皮组织,MR也同样为其发挥关键性作用。

3. 醛固酮与内淋巴积水

Dunnebieer等人利用两相法通过手术破坏单耳内淋巴囊及内淋巴管后3周,给予醛固酮建立内淋巴积水模型后,手术耳出现中、重度内淋巴积水,对侧耳出现轻度内淋巴积水,推测可能机制是醛固酮激活血管纹的边缘细胞以及前庭暗细胞上的肾上腺皮质激素受体,使内耳中 Na^+ , K^+ -ATP酶活性改变, Na^+ / K^+ 代谢紊乱所致^[13-16]。

随后国内有学者进行了单一的醛固酮建模, 并对手术单耳建模、手术双耳建模、注射醛固酮组以及注射血管加压素组建模方法进行了对比研究, 认为醛固酮建模适于研究膜迷路积水的可能内分泌代谢机制^[17,18]。李琦等^[19]也利用此方法建立内淋巴积水模型, 探索醛固酮作用后不同时期水通道蛋白 (aquaporin) 及 ENaC 的表达变化, 认为醛固酮在内耳中通过基因组作用方式发挥作用, 改变了内耳中离子浓度, 从而诱导了内淋巴积水的发生。另外两个实验组均运用小鼠腹腔注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和醛固酮 5 天后引起内淋巴积水, LPS 在内耳中引起免疫反应, 醛固酮+LPS 组比 LPS 组的积水更明显, 并且部分囊腔有破裂^[20, 21]。目前, 醛固酮在梅尼埃病的临床意义的探索研究多存在于动物实验中, 故醛固酮对梅尼埃病的临床价值还有待进一步研究。

4. 醛固酮的 Na⁺代谢相关信号通路研究

醛固酮在调节水盐平衡和心血管及肾脏疾病中作用明显。许多受醛固酮、加压素以及细胞内信号传导 (包括泛素化和/或磷酸化) 调节的基因 (如 ENaC) 是肾脏和其他上皮对 Na⁺转运的关键因素。

醛固酮提高 ENaC 的功能分两个阶段: 在早期阶段, 醛固酮诱导的 Sgk1 以 PY 基序依赖的方式与泛素蛋白连接酶 Nedd4-2 相互作用, 并在 Ser444 上 (或较小程度在 Ser338 上) 磷酸化 Nedd4-2。这种磷酸化减少 Nedd4-2 和 ENaC 之间的相互作用, 导致 ENaC 细胞表面表达升高^[22]。在醛固酮作用于 ENaC 的晚期阶段, 通过 α ENaC 启动子中配体的盐皮质激素受体直接与激素反应元件结合^[23]或其他蛋白质的间接机制以激活转录^[24,25]。Sgk1 也通过对特定的、尚未定义的转录因子磷酸化刺激 ENaC 转录来参与晚期阶段^[26]。

从表观遗传学的角度研究醛固酮对 ENaC 的调控机制发现, 在正常状况下, 组蛋白 H3 Lys-79 的甲基转移酶 Dot1a 和 DNA 结合蛋白 Af9 在 α ENaC 的 5' 端形成复合物, 使得 Dot1a 可超甲基化启动子区, 产生的染色质构型将抑制 α ENaC 的转录; 醛固酮作用后, 可在蛋白和 mRNA 水平下调 Dot1a 和 Af9 的表达, 从而使得 Lys79 低甲基化。因此 Dot1a-Af9 可对组蛋白 H3 Lys79 启动子区的甲基化进行调节, 进而影响 α ENaC 的转录^[27]。而这一调控机制也许同样发生于一些其他受醛固酮调节的基因, 包括编码连接组织生长因子、周期同源物和前内皮素的基因^[27]。Af9 成为 Sgk1 的生理靶点, Sgk1 像其他醛固酮诱导基因一样负性调节 Dot1a-Af9

阻抑物复合物，以此控制 α ENaC 的转录^[28]。一般情况下，在 α ENaC 启动子中汇集了端粒沉默（Dot）1a 和相应的 H3K79 甲基转移酶破坏物，保持其抑制状态，这种抑制状态通常是由 α ENaC 启动子的 Sirt1 和其他关键蛋白质（比如 MR）的 Dot1a 复合物形成介导的，但能被醛固酮和其他刺激因素激活^[29,30]。

前期研究发现内耳组织中有 ENaC 的表达^[31-33]，并且主要表达于耳蜗血管纹、螺旋韧带、Reissner 膜、Corti 器、螺旋缘等部位。内耳中血管纹边缘细胞中的离子转运蛋白负责分泌出 K^+ 进入中阶，然后主要依靠 Corti 器的机械敏感细胞被动排出 K^+ 以维持内淋巴液成分及蜗管内静息电位的稳定^[34]。ENaC 对 Na^+ 的吸收受前庭膜、球囊斑上皮、半规管上皮、内淋巴囊^[35]及血管纹边缘细胞的管腔膜^[36]控制。前庭膜主要通过阿米洛利选择性通道主动从内淋巴液中吸收 Na^+ ，维持内淋巴液低钠内环境，且不参与转运 K^+ 及内淋巴 K^+ 稳态的维持^[37]。而内耳中是否同样存在醛固酮通过醛固酮受体、Sgk1、Dot1a 与 Af9 途径作用于 ENaC 的表观遗传学通路还需后续的研究进一步证实。

5. 醛固酮治疗内耳疾病前景

研究发现，内耳中水盐稳态与其功能密切相关，任何原因影响了内耳稳态都有可能引起听力障碍^[38]。糖皮质激素（glucocorticoid）对 MR 具有很强的亲和力，其在人体中主要起到了调节离子稳态和液体平衡的作用。临床研究中，血浆醛固酮水平低（听力在正常值范围）的老年人，较醛固酮水平高（正常高值）的听力更差^[39]；且文献^[40]在对自身免疫性听力损失的小鼠模型研究中，盐皮质激素（包括醛固酮）与糖皮质激素对听力恢复疗效相当，甚至优于糖皮质激素。也有学者采用安体舒通（spironolactone）阻断盐皮质激素受体研究（prednisone）的作用后发现，螺内酯可有效阻断泼尼松龙改善自身免疫性聋小鼠听力的功能^[41]；并且采用 RU486 阻断糖皮质激素受体（glucocorticoid receptor, GR）的方法中，进一步提示临床中糖皮质激素作为治疗听力障碍的有效药物，有可能是盐皮质激素受体在间接发挥维持水盐稳态的功能，而盐皮质激素无免疫抑制等副作用，还能缓解听力障碍^[42]。由此可见，醛固酮将来有可能成为临床治疗听觉障碍等常见疾病的新选择。

6. 展望

MD 的病因及发病机制与内耳内淋巴代谢密切相关，醛固酮已被证实参与了内

淋巴的水盐代谢调节，且可能与内耳复杂的信号通路共同维持着内淋巴代谢通路正常运转，调节内耳功能。而醛固酮在内耳中的具体作用机制及今后在临床中的诊疗价值还有待进一步的研究取证。

参考文献

- [1] Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion [J]. *Annu Rev Physiol*, 1988, 50: 409-426.
- [2] Eckhard A, Gleiser C, Arnold H, et al. Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness [J]. *Molecular aspects of medicine*. 2012, 33(5): 612-637.
- [3] Takeda T, Taguchi D. Aquaporins as potential drug targets for Ménière's disease and its related diseases [J]. Springer Berlin Heidelberg. 2009: 171-184.
- [4] Takeda T, Kakigi A, Saito H. Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol* 1995;519:219-22.
- [5] Aoki M, Hayashi H, Kuze B, et al. The association of the plasma vasopressin level during attacks with a prognosis of Ménière's disease [J]. *Int J Audiol*. 2010, 49(1):1-6.
- [6] Juhn S K, Li W, Kim J Y, et al. Effect of stress-related hormones on inner ear fluid homeostasis and function [J]. *Otology & Neurotology*. 1999, 20(6): 800-806.
- [7] Takahashi M, Ishida K, Iida M, et al. Analysis of Lifestyle and Behavioral Characteristics in Ménière's Disease Patients and a Control Population [J]. *Acta oto-laryngologica*. 2001, 121(2): 254-256.
- [8] Mateijsen D J M, Kingma C M, De Jong P E, et al. Aldosterone assessment in patients with Ménière's disease [J]. *ORL*. 2001, 63(5): 280-286.
- [9] Williams HG. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action [J]. *Heart Failure Reviews*. 2005, 10, 7-13.
- [10] Rarey K E, Luttge W G. Presence of type I and type II/IB receptors for adrenocorticosteroid hormones in the inner ear [J]. *Hearing research*. 1989, 41(2): 217-221.

- [11]Furuta H, Mori N, Sato C, et al. Mineralocorticoid type I receptor in the rat cochlea: mRNA identification by polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridization [J]. *Hearing research*. 1994, 78(2): 175-180.
- [12]Yao X, Rarey K E. Localization of the mineralocorticoid receptor in rat cochlear tissue [J]. *Acta oto-laryngologica*. 1996, 116(3): 493-496.
- [13]Dunnebier EA, Segenhout JM, Wit HP, et al. Two-phase endolymphatic hydrops: a new dynamic guinea pig model, *Acta Otolaryngol*. 1997, 117(1): 13-19.
- [14] Verheul J, Segenhout JM, Dunnebier EA, et al. Ultrastructure of the endolymphatic sac in two-phase endolymphatic hydrops in the guinea pig. *Acta Otolaryngol*. 1999, 119(3): 345-50.
- [15]Dunnebier EA, Segenhout JM, Dijk F, et al. Sensory cell damage in two-phase endolymphatic hydrops: a morphologic evaluation of a new experimental model by low-voltage scanning techniques. *Otol Neurotol*, 2001, 22(5): 655-661.
- [16]Dunnebier EA, Segenhout JM, Dijk F, et al. Cochlear ultrastructure in two-phase endolymphatic hydrops in the guinea pig, *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2002, 259(1): 17-23.
- [17]蒋子栋, 张连山. 醛固酮诱发豚鼠双耳膜迷路积水[J]. *中国医学科学院学报*. 2002, 24(5): 501-504.
- [18]蒋子栋, 高帆, 孙程成. 不同方法构建豚鼠膜迷路积水模型的对比研究[J]. *中华耳科学杂志*. 2015, 13(4): 734-737.
- [19]Williams HG. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action [J] . *Heart Failure Reviews*. 2005, 10, 7-13.
- [20]Takumida M, Akagi N, Anniko M. A new animal model for Meniere's disease. *Acta Otolaryngol* 2008; 128: 263-71.
- [21]Kim CH, Kim YC, Choi BY, et al. Expression of osmotic stress protein 94 in murine endolymphatic hydrops model. *Acta Otolaryngol*. 2012, 132:118-123.
- [22]Debonneville C, Flores S Y, Kamynina E, et al. Phosphorylation of Nedd4 - 2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression [J]. *The EMBO journal*. 2001, 20(24): 7052-7059.

- [23] Thomas C P, Itani O A. New insights into epithelial sodium channel function in the kidney: site of action, regulation by ubiquitin ligases, serum-and glucocorticoid-inducible kinase and proteolysis [J]. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004, 13(5): 541-548.
- [24] Asher C, Wald H, Rossier B C, et al. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996, 271(2): C605-C611.
- [25] Sayegh R, Auerbach S D, Li X, et al. Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5' -flanking region of the human epithelial sodium channel α subunit gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274(18): 12431-12437.
- [26] Boyd C, Náráy-Fejes-Tóth A. Gene regulation of ENaC subunits by serum-and glucocorticoid-inducible kinase-1[J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005, 288(3): F505-F512.
- [27] Zhang W, Xia X, Reisenauer M R, et al. Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaC α in an aldosterone-sensitive manner[J]. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281(26): 18059-18068.
- [28] Zhang W, Xia X, Reisenauer M R, et al. Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel α [J]. *The Journal of clinical investigation*. 2007, 117(3): 773-783.
- [29] Zhang W, Yu Z, Wu H, et al. An Af9 cis-element directly targets Dot1a to mediate transcriptional repression of the α ENaC gene [J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2013, 304(4): F367-F375.
- [30] Yu Z, Kong Q, Kone BC. Aldosterone reprograms promoter methylation to regulate alphaENaC transcription in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 305:F1006-1013.
- [31] Gründer S, Müller A, Ruppertsberg JP. Developmental and cellular expression pattern of epithelial sodium channel alpha,beta and gamma subunits in the inner ear

- of the rat. *Eur J Neurosci*. 2001, 13(4): 641-648.
- [32] Zhong SX, Liu ZH. Immunohistochemical localization of the epithelial sodium channel in the rat inner ear. *Hear Res* 2004, 193(1-2): 1-8.
- [33] Zhong SX, Hu GH, Liu ZH. Expression of ENaC, SGK1 and Nedd4 isoforms in the cochlea of guinea pig [J]. *Folia Histochem Cytobiol*. 2014, 52(2):144-148.
- [34] Patuzzi R. Ion flow in stria vascularis and the production and regulation of cochlear endolymph and the endolymphatic potential [J]. *Hearing research*. 2011, 277(1): 4-19.
- [35] Kim S H, Marcus D C. Regulation of sodium transport in the inner ear [J]. *Hearing research*. 2011, 280(1): 21-29.
- [36] Kakigi A, Okada T, Takeda T, et al. Presence and regulation of epithelial sodium channels in the marginal cells of stria vascularis [J]. *Acta oto-laryngologica*. 2008, 128(3): 233-238.
- [37] Yamazaki M, Kim K X, Marcus D C. Sodium selectivity of Reissner's membrane epithelial cells [J]. *BMC physiology*, 2011, 11: 4.
- [38] Trune DR. Ion homeostasis in the ear: mechanisms, maladies, and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010, 18: 413-419.
- [39] Tadros S F, Frisina S T, Mapes F, et al. Higher serum aldosterone correlates with lower hearing thresholds: a possible protective hormone against presbycusis [J]. *Hearing research*. 2005, 209(1): 10-18.
- [40] Trune D R, Beth Kempton J, Kessi M. Aldosterone (Mineralocorticoid) Equivalent to Prednisolone (Glucocorticoid) in Reversing Hearing Loss in MRL/MpJ - Faslpr Autoimmune Mice [J]. *The Laryngoscope*. 2000, 110(11): 1902-1906.
- [41] Gross ND, Kempton JB, Trune DR. Spironolactone blocks glucocorticoid-mediated hearing preservation in autoimmune mice. *Laryngoscope*. 2002, 112: 298-303.
- [42] Trune DR, Kempton JB. Blocking the glucocorticoid receptor with RU-486 does not prevent glucocorticoid control of autoimmune mouse hearing loss [J]. *Audiol Neurootol*. 2009, 14: 423-431.

致谢

本文的完成首先要感谢我的导师重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科的钟时勋教授，从一开始的论文题目选取，到实验设计，实验数据分析及研究论文的撰写，每一个环节都凝聚着您细致入微的指导和帮助。您是我遇到过的最和蔼可亲的老师，温和谦逊，博学多识，医德高尚，这些美好的品质值得我一辈子去学习。

感谢实验研究中心全体的老师们，是您们为我提供了良好和谐的实验环境，每当实验过程中出现问题的时候，总是能得到您们热心的帮助，论文中的实验是在你们的关心指点下完成的。

感谢听力中心的雷艳、潘小燕及马国庭老师，是您们无私的为实验提供了动物测听场地，并耐心的教会了我如何使用测听仪器。

感谢耳鼻喉科的全体老师、同学、师兄师姐、师弟师妹们，当在临床中遇到难题而感到困惑时，你们总是很热情的指导我，解除麻烦。在这里我要尤其感谢我的师妹章碧云，为人诚恳，性格开朗，在实验准备过程中给予我热心的帮助。

感谢我的室友柏露、刘佳丽、逯春梅，每当研究工作亦或生活中出现困难时，是你们陪伴我一起聊天、游玩，互帮互助，排忧解难，共同进步，在温馨的氛围中度过了三年的求学生涯。

最后我还要感谢我的家人、朋友对我学习、生活、情感等各方面的关怀，在我遇到困难的时候，给予我无限的鼓励和帮助，让我自信从容的面对人生挑战！

攻读学位期间发表的论文

- [1] 秦丽, 章碧云, 钟时勋. 醛固酮对豚鼠耳蜗功能及 AF9 蛋白表达的调节作用 [J]. 中华耳科学杂志, 2016, 14(6): 788.
- [2] Li Qin, Biyun Zhang, Qianying Wang, Shixun Zhong. Effect of aldosterone on cochlear Af9 expression and hearing in guinea pig. Acta Otolaryngol. 2017. (in press)