

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201302001

· 论著 ·

# 增龄相关性听力损失大鼠耳蜗 TMPRSS3 和 ENaC- $\alpha$ 蛋白的表达

汪 芹, 葛圣雷, 伍伟景, 李友忠

(中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科, 中南大学耳科研究所, 湖南长沙 410011)

**摘要:** **目的** 通过检测增龄相关性听力损失 SD 大鼠耳蜗中跨膜丝氨酸蛋白酶 3 (transmembrane protease, serine 3, TMPRSS3)、表皮钠通道  $\alpha$  (epithelial sodium channel- $\alpha$ , ENaC- $\alpha$ ) 蛋白的表达, 初步探讨其在增龄相关性听力损失中的作用。**方法** 选用 3、12 及 24 月龄 SD 大鼠各 30 只, 应用免疫组化、Western blot 技术检测各组大鼠耳蜗中 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白表达水平。**结果** 随月龄增大, 大鼠 ABR 阈值逐渐升高, 耳蜗 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白表达水平逐渐降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。**结论** 增龄相关性听力损失大鼠的耳蜗 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白随月龄增大而降低。ENaC- $\alpha$  蛋白的变化与 TMPRSS3 呈相关性, 提示 TMPRSS3 可能通过调节 ENaC- $\alpha$  蛋白而起作用。

**关键词:** 增龄相关性听力损失; 跨膜丝氨酸蛋白酶 3; 表皮钠通道  $\alpha$ ; 耳蜗

中图分类号: R764.43; Q341 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2013)02-0093-05

## Expression of TMPRSS3 and ENaC- $\alpha$ in the cochlea of rats with age-related hearing loss

WANG Qin, GE Sheng-lei, WU Wei-jing, et al.

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Xiangya Hospital, Institute of Otology, Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the role of TMPRSS3 and ENaC- $\alpha$  in sensorineural deafness via investigating the expression in the cochlea of SD rats with age-related hearing loss. **Methods** Rats used for age-related hearing loss were divided into three groups, for 3-month-old group, 12-month-old group and 24-month-old group. The auditory function was evaluated by evoked auditory brainstem responses (ABR). The expression of TMPRSS3 and ENaC- $\alpha$  in the cochlea was detected by Paraffin-embedded immunohistochemistry and Western blot assay. **Results** ABR threshold increased and expression of TMPRSS3, ENaC- $\alpha$  decreased with aging in the cochlea of SD rats. **Conclusions** The expression of TMPRSS3, ENaC- $\alpha$  decreases with aging in the cochlea of SD rats. The change of ENaC- $\alpha$  expression has some correlation with TMPRSS3 which indicates that TMPRSS3 may regulate the expression of ENaC- $\alpha$ .

**Key words:** Age-related hearing loss; TMPRSS3; ENaC- $\alpha$ ; Cochlea

跨膜丝氨酸蛋白酶 3 (transmembrane protease, serine 3, TMPRSS3) 属于 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶 (type II transmembrane serine proteases, TTSPs) 家族中的成员, 也称为 ECHOS1、TADG12, 是一类跨膜的蛋白水解酶。TMPRSS3

基因缺陷是非综合征型常染色体隐性遗传性聋 DFNB8 与 DFNB10 的遗传学基础<sup>[1]</sup>, 它是发现的第 1 个能引起耳聋的蛋白酶。ENaC 蛋白是唯一发现的 TMPRSS3 在内耳作用的底物。在体外试验发现 TMPRSS3 蛋白水解过程与 ENaC 蛋白介导的电流增加相关。本研究通过检测增龄相关性听力损失的 SD 大鼠耳蜗中 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白的表达特点, 探讨它们是否有相关性, 是否参与老龄性聋的病理过

基金项目: 国家自然科学基金 (30700940)。

作者简介: 汪 芹, 女, 博士, 住院医师。

通讯作者: 葛圣雷, Email: gsl\_geger@yahoo.com.cn.

程,初步分析它们在耳聋中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验大鼠购自成都大学实验动物学部;山羊抗鼠 TMRSS3 多克隆抗体、兔抗鼠 ENaC- $\alpha$  多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;二抗抗 TMRSS3 多克隆抗体 GoatBA-9200、二抗抗 ENaC- $\alpha$  抗体-HRP 多聚体、PV 免疫组织化学染色试剂盒购自美国 Vector 公司;浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中衫金桥公司;组织细胞蛋白裂解液购自碧云天生物技术研究所;ECL 显影剂、PVDF 膜购自美国 Amersham 公司;辣根过氧化物酶标记二抗及  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Cell Signal 公司产品;解剖显微镜购自日本 Nikon 公司。

### 1.2 耳蜗标本制备及分组

SD 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉后,置于隔音电屏蔽室中,用 KeyPoint ABR 听性脑干诱发电位测试仪检测。记录电极置于颅顶,参考电极置于给声侧耳垂,接地电极置于鼻尖。刺激声为 8 kHz 和 16 kHz 短纯音 (tone burst),带通滤波 0.1 ~ 3 kHz,重复率 11 次/s,叠加 1 024 次,扫描时程 10 ms。刺激强度从 115 dB SPL 开始,10 dB 递减,接近阈值时改为 5 dB 递减,以能引出可重复 III 波的最小声压级为听反应阈。实验动物最后一次行 ABR 测试后收集耳蜗标本,选择听力正常的 3 月龄 SD 大鼠及有听力下降的 12 月龄和 24 月龄 SD 大鼠 3 组各 30 只,均在 8.16 kHz 短纯音刺激下测平均听阈。两组动物均无强噪声暴露及耳毒性药物使用史,无中耳炎病史。

1% 戊巴比妥钠全身麻醉,取仰卧位固定,打开胸腔,显露心脏,4% 多聚甲醛 PBS 心脏灌注固定,迅速断头,中线剪开颅骨,快速取出听泡,解剖显微镜下蜗尖钻孔,开放圆窗和卵圆窗,4% 多聚甲醛经两窗和蜗尖灌流,将标本置于固定液 4℃ 过夜,第 2 天用 0.1 M PBS (pH 7.4) 冲洗后置入 10% EDTA (pH 7.4) 中脱钙,每天更换脱钙液,连续 10 d 充分脱钙。石蜡定向包埋标本,沿耳蜗中轴切片,每一标本取 1 张行 HE 染色,光镜观察,根据耳蜗螺旋神经元、Corti 器进行质量评估再行石蜡切片。

### 1.3 免疫组化染色

按照 PV 免疫组织化学染色试剂盒说明书对本行免疫组化染色。步骤如下:切片脱蜡、水化,3% 过氧化氢孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶,抗原修复,滴加试剂 A (内源性过氧化物酶阻断剂 3%  $H_2O_2$ ) 室温孵育 15 min,滴加一抗,4℃ 冰箱过夜。PBS 冲洗,滴加二抗,室温下孵育 15 min, PBS 冲洗, DAB 显色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片。光学显微镜下观察并照相,染色阳性为细胞内有棕黄色或黄色颗粒或斑片状 DAB 显色,阴性细胞不着色。采用北航图像管理分析系统 (GMIA 2000 型) 对每一张免疫组化切片测定阳性细胞灰度值。

### 1.4 Western 印迹检测

将耳蜗组织捣碎,加入 Western 及免疫沉淀细胞裂解液,玻璃匀浆器匀浆,直至细胞充分裂解。12 000 g 离心 5 min,取上清。二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,用 5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 进行电泳分离,转 PVDF 膜。封闭液室温封闭 1 h,加一抗 (1:500),4℃ 孵育过夜 TBST 洗 3 次,加辣根过氧化物酶标记二抗 (1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,用 ECL 显色并曝光显影。用凝胶成像仪分析、扫描输入电脑,应用 ImageMaster VDS 3.0 软件分析系统 (美国 Amersham Pharmacia Biotech) 对 Western Blot 的电泳条带行积分光密度测定, $\beta$ -actin 作为内参照。

### 1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件系统进行分析,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本均数差异的统计学处理采用 *t* 检验,多个样本均数差异统计学采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 增龄相关性听力损失大鼠的 ABR 反应阈值

ABR 反应阈在 16 kHz 由高到低依次为:24 月龄组 > 12 月龄组 > 3 月龄组,两两比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 在 8 kHz, 24 月龄组较 3 月龄组及 12 月龄组 ABR 反应阈明显升高,但 3 月龄组与 12 月龄组间差异无统计学意

义 ( $P > 0.05$ ); 12 月龄组与 24 月龄组 16 kHz ABR 反应阈高于 8 kHz ABR 反应阈 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

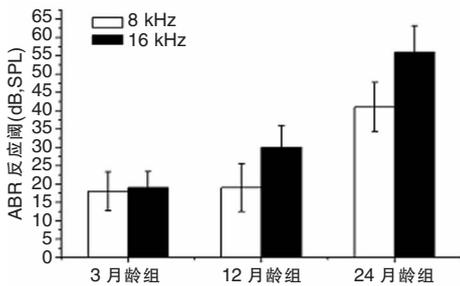


图 1 增龄相关性听力损失大鼠 ABR 反应阈值

## 2.2 增龄相关性听力损失大鼠耳蜗 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$ 蛋白的表达

2.2.1 耳蜗 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白免疫组化观察 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白在增龄相关性听力损失大鼠耳蜗螺旋神经元细胞中呈阳性表达。随月龄增长,SD 大鼠耳蜗染色阳性程度逐渐变弱(图 2)。

2.2.2 耳蜗 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白 Western 印迹分析 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白在增龄相关性听力损失大鼠各组的 Western Blot 检测积分光密度值比较为:随年龄增大,积分光密度值逐渐减弱,各组间比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )(图 3)。

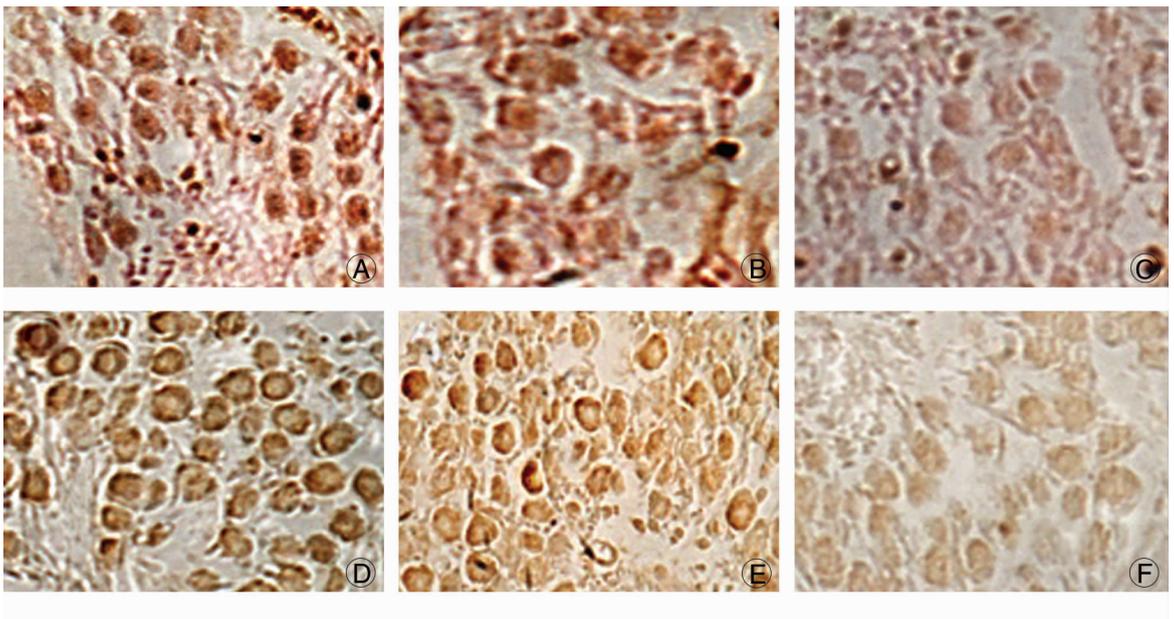


图 2 增龄相关性听力损失大鼠螺旋神经元细胞中 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白表达(免疫组化  $\times 400$ )。A、B、C 分别为 3、12、24 月龄组大鼠 TMPRSS3 的表达;D、E、F 分别为 3、12、24 月龄组大鼠 ENaC- $\alpha$  的表达

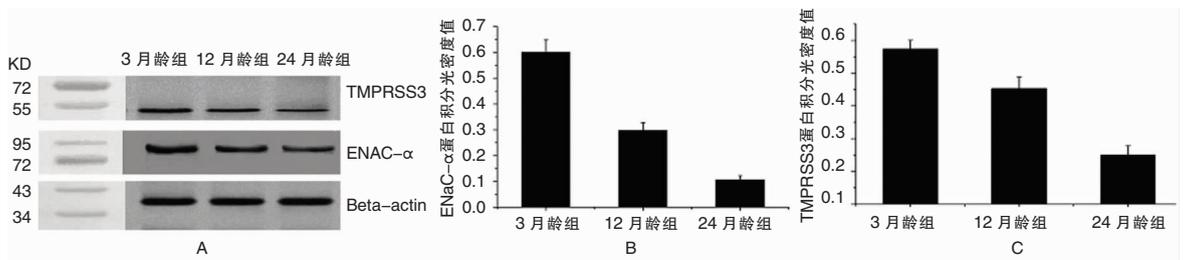


图 3 增龄相关性听力损失大鼠耳蜗 TMPRSS3、ENaC- $\alpha$  蛋白表达变化 A:免疫印迹图片;B:TMPRSS3 蛋白相对表达;C:ENaC- $\alpha$  蛋白相对表达

### 3 讨论

2001年Scott等<sup>[1]</sup>最早发现TMPRSS3是非综合征型常染色体隐性遗传性聋DFNB8/10的突变基因,它是第一个被发现的致聋的蛋白酶。目前已在多个国家耳聋人群中发现TMPRSS3基因存在突变<sup>[2,4]</sup>。在欧洲,TMPRSS3突变致聋占儿童听力损失人数的0.5%(3/543),巴基斯坦约为1.8%(8/449),突尼斯约为5%(2/39)。而在土耳其TMPRSS3突变致聋占儿童听力损失人数的8%,可见,它仍然是不容忽视的遗传性耳聋的重要致病因素,尤其排除常见的GJB2、SLC26A4、mtDNA1555G基因突变外,该基因更应值得考虑<sup>[5]</sup>。TMPRSS3是TTSP家族中的成员,是一类跨膜的蛋白水解酶。有5种转录本,即TMPRSS3a、b、c、d、e,但以TMPRSS3a形式表达最多,TMPRSS3a转录本编码的多肽含有454个氨基酸,包括跨膜蛋白的胞内区、跨膜区(TM)、低密度脂蛋白受体A类结构域(LDLRA)、A组清道夫结构域(SRCR)和丝氨酸蛋白酶结构域(SP)。其中SP结构域是TMPRSS3的催化活性中心<sup>[6]</sup>。在理论上结构相似的TTSPs其他成员可以代偿TMPRSS3缺乏,然而事实却不是<sup>[7]</sup>。因此TMPRSS3的功能对于维持内耳功能正常是必要的。

既往对TMPRSS3的研究大多在遗传学领域,近年来发现TMPRSS3的多种突变形式可致聋。TMPRSS3蛋白在大鼠卡那霉素耳中毒后耳蜗的表达,是随着卡那霉素注射时间延长,大鼠ABR阈值逐渐升高,耳蜗TMPRSS3蛋白表达水平逐渐降低<sup>[8]</sup>。而我们在实验中发现,在增龄相关性听力损失大鼠耳蜗的TMPRSS3蛋白与ABR反应阈的变化也是负相关的。提示TMPRSS3可能在表达减少的过程中,伴随了其维持内耳功能的作用逐渐丧失,导致内耳功能紊乱,从而出现听力损失。而ENaC蛋白是Na<sup>+</sup>进入细胞内的重要通道蛋白,对Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>的选择性之比大于20:1,因而允许Na<sup>+</sup>被动进入细胞内,它是唯一发现的TMPRSS3在内耳作用的底物,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 3个亚单位组成,对维持身体内环境的稳定方面发挥着重要作用。Guipponi等<sup>[9]</sup>利用体外爪蟾卵表达系统,证实

了TMPRSS3也能催化激活ENaC,并且发现螺旋神经节、血管纹、Corti's器均有两者的表达。在体外试验发现TMPRSS3蛋白水解过程与ENaC介导的电流增加相关<sup>[10]</sup>。相反,TMPRSS3致聋的突变体无法激活ENaC- $\alpha$ ,表明TMPRSS3通过自身水解直接或间接作用于ENaC。而ENaC可能在其表达减少的过程中,伴随了其维持内淋巴离子浓度平衡的作用逐渐丧失,导致内耳离子通道功能紊乱,从而出现听力损失,但该假设也有待于实验进一步证实。

老年性耳聋也称为年龄相关性耳聋,是指随着年龄的增加逐渐出现的听力下降,是多机制多途径共同作用所致,与脂质过氧化损伤<sup>[11]</sup>、听觉中枢退化<sup>[12]</sup>等有关。在实验中TMPRSS3和ENaC- $\alpha$ 在不同年龄组的大鼠间,均随年龄增大而表达下调,提示两者可能参与了老年性聋的致聋过程。

目前对于ENaC在调节内耳内淋巴代谢、维持内耳正常功能方面的机制尚不清楚。确定ENaC是否在活体上是TMPRSS3的作用底物还有很多路要走,我们尚需运用膜片钳测定大鼠致聋模型中的耳蜗内钠电流是否与TMPRSS3变化有相关性,同时观察醛固酮的变化情况,排除其对ENaC的干扰。同时我们可以运用RNA干扰技术使耳蜗内TMPRSS3 mRNA发生降解而导致基因表达沉默,此时检测实验动物的听功能有无改变,ENaC在开放能力及在细胞表面的表达数量上是否有相应变化。总之,随着对ENaC的研究深入,其神秘面纱也将逐渐揭开,这将更有助于深入了解听觉信号转导通路,从而更好的认识耳聋的病因机制。

#### 参考文献:

- [1] Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, et al. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness [J]. *Nat Genet*, 2001, 27(1): 59-63.
- [2] Weegerink NJ, Schraders M, Oostrik J, et al. Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2011, 12(6): 753-766.
- [3] Wattenhofer M, Di Iorio MV, Rabionet R, et al. Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients [J]. *J Mol Med*, 2002, 80

- (2): 124 - 131.
- [4] Lee Y J, Park D, Kim SY, et al. Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3 [J]. *J Med Genet*, 2003, 40(8): 629 - 631.
- [5] Wattenhofer M, Sahin-Calapoglu N, Andreasen D, et al. A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein [J]. *Hum Genet*, 2005, 117(6): 528 - 535.
- [6] Guipponi M, Tan J, Ping ZFC, et al. Mice deficient for the type II transmembrane serine protease, TMPRSS1/hepsin, exhibit profound hearing loss [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(2): 608 - 616.
- [7] Guipponi M, Toh MY, Tan J, et al. An integrated genetic and functional analysis of the role of type II transmembrane serine proteases (TMPRSSs) in hearing loss [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29(1): 130 - 141.
- [8] 彭安全,葛圣雷,汪芹,等. 大鼠卡那霉素耳中毒后耳蜗 TMPRSS3 蛋白的表达 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2011, 36(10): 987 - 991.
- [9] Guipponi M, Vuagniaux G, Wattenhofer M, et al. The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(23): 2829 - 2836.
- [10] Guipponi M, Antonarakis SE, Scott HS. TMPRSS3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness [J]. *Front Biosci*, 2008, 1(13): 1557 - 1567.
- [11] 苗英章,张勋,李秀霞,等. 老年人听觉功能个体差异的 ECochG 和 ABR 研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 1996, 2(4): 201 - 203.
- [12] 吕向光,刘云超,臧秀琴. 老年性聋与脂质过氧化损伤的关系 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 1998, 1(1): 61.

(修回日期:2012-12-01)

## · 消息 ·

## 《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》2013 年征订启事

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》是中华人民共和国教育部主管、中南大学主办、中南大学湘雅医院承办、国内外公开发行的医学学术性期刊,已被列入中国科技论文统计源期刊。本刊以耳鼻咽喉颅底外科工作者为主要读者对象,重点报道耳鼻咽喉颅底外科领域内领先的科研成果、基础理论研究及先进的临床诊疗经验。本刊设有论著、短篇论著、临床报道、经验交流、技术与方法、病案报道、综述等栏目。本刊为双月刊,定价12.00元,全年72.00元,全国各地邮局均可订阅,邮发代号42-171。本刊编辑部可免费为读者代办邮购。通讯地址:湖南省长沙市湘雅路87号中南大学湘雅医院《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》编辑部(湘雅医院内),邮编:410008,投稿网址: <http://www.xyosbs.com>, Email: [xyent@126.com](mailto:xyent@126.com), 电话(传真):0731-84327469;0731-84327210。欢迎踊跃投稿、积极订阅。