

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221204

· 论著 ·

昆明小鼠耳蜗内脂肪酸转运蛋白4的表达与分布

胡一勇¹, 鄢斌成¹, 于宁², 吕萍³

(1. 自贡市第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 自贡 643000; 2. 中国人民解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科解放军耳鼻咽喉研究所 国家耳鼻咽喉疾病临床医学研究中心 聋病教育部重点实验室 聋病防治北京市重点实验室, 北京 100853; 3. 川北医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 南充 637000)

摘要: **目的** 探索昆明小鼠耳蜗组织中脂肪酸转运蛋白4 (FATP4) 的表达与分布。**方法** 选取健康成年(10周)昆明小鼠8只(16耳), 其中2只(4耳)用于免疫荧光染色, 6只(12耳)用于Western blot蛋白检测。通过耳蜗石蜡切片免疫荧光染色检测FATP4在耳蜗内各组织中的表达分布, Western blot蛋白检测耳蜗组织FATP4的表达水平。**结果** 耳蜗石蜡切片免疫荧光染色提示FATP4主要分布于耳蜗螺旋神经节、蜗轴、支持细胞、内毛细胞、外毛细胞、血管纹的中间细胞, Western blot蛋白检测结果进一步验证了FATP4在昆明小鼠耳蜗表达。**结论** 本研究初步揭示了FATP4在成年昆明小鼠耳蜗中的表达具有一定的特异性, 为进一步研究耳蜗内脂肪酸代谢提供了理论依据。

关键词: 耳蜗; 昆明小鼠; 脂肪酸转运蛋白4; Hensen细胞

中图分类号: R764

Expression and distribution of fatty acid transporter 4 in Kunming mice cochlea

HU Yiyong¹, YAN Bincheng¹, YU Ning², LYU Ping³

(1. Department of Otorhinolaryngology, Zigong First People's Hospital, Zigong 643000, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Institute of Otolaryngology, Chinese PLA General Hospital; National Clinical Research Center for Otolaryngologic Diseases; Key Lab of Hearing Impairment Science of Ministry of Education; Key Lab of Hearing Impairment Prevention and Treatment of Beijing, Beijing 100853, China; 3. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression and distribution of fatty acid transporter 4 (FATP4) in the cochlea of Kunming mice. **Methods** Eight healthy adult (10 weeks) Kunming mice (16 ears) were used, including 2 mice (4 ears) for immunofluorescence staining and 6 mice (12 ears) for Western blot. The expression and distribution of FATP4 in various tissues of the cochlea were detected by immunofluorescence staining of the paraffin section of the cochlea, and Western blot was used to observe the expression level of FATP4 in the cochlea. **Results** Immunofluorescence staining indicated that FATP4 was mainly distributed in spiral ganglion, modiolus, supporting cells, inner and outer hair cells as well as intermediate cells of stria vascularis. Western blot results further verified the expression of FATP4 in the cochlea of Kunming mice. **Conclusion** The distribution of FATP4 in the cochlea of adult Kunming mice possesses tissue specificity, which provides a theoretical basis for further research of fatty acid metabolism in the cochlea.

Keywords: Cochlea; Kunming mouse; FATP4; Hensen cell

脂肪酸转运蛋白家族(fatty acid transport protein 4, FATPs)是促进长链和极长链脂肪酸进入细胞的完整跨膜蛋白, 在脂肪酸摄取、转运过程中起到重要

作用^[1-2]。FATPs在人体各个器官和组织都有分布, 已知的FATPs有6种亚型, 在各组织的分布与功能研究较为透彻, 但是目前在耳蜗的研究报道较

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470700H1304); 四川省教育厅项目(16ZB0231); 自贡市科技局项目(2019YLSF24)。

第一作者简介: 胡一勇, 男, 硕士研究生, 医师。

通信作者: 吕萍, Email: lping8250@sohu.com

少^[3]。FATP4作为亚型之一,对长链脂肪酸具有高度亲和力和参与脂肪酸的摄取与转运^[4-5];脂肪酸 β -氧化是心肌的慢性舒缩运动的主要能量来源^[6],而耳蜗主动放大机制需要大量的能量支持^[7]。所以FATP4是否也在耳蜗内表达发挥调节耳蜗脂肪酸代谢的作用,以前的研究还未涉及。本实验通过免疫荧光染色检测FATP4在耳蜗各组织的表达分布情况,并应用Western blot法检测耳蜗组织FATP4的表达水平,以此来探索FATP4在耳蜗的表达与分布情况,为进一步研究耳蜗内脂肪酸代谢提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康成年(10周)昆明小鼠8只,体重40~50 g,雌雄不限(四川省川北医学院动物中心提供)。参照以往研究^[8],应用ABR测听技术筛选听力正常的昆明小鼠。2只(4耳)用于免疫荧光染色,6只(12耳)用于Western blot蛋白检测。

1.2 主要试剂和设备

兔抗鼠FATP4单克隆抗体(abcam公司,ab221783),羊抗兔荧光二抗Alexa fluor 647(博奥森公司,bs-0295),羊抗兔IgG(博士德公司,BA1054),内参 β -actin(bioss公司,bs-0061R),山羊血清(absin公司,abs933a),BCA蛋白浓度测定试剂盒(博士德公司,AR0146),DAPI染色液(博士德公司,AR1177),SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(博士德公司,AR1112),SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(博士德公司,AR0138),ECL化学发光液(碧云天公司,P0018A)。脑干诱发电位分析仪(美国Otometrics, chartr EP),共聚焦显微镜(上海,OLYMPUS FV3000),SDS-PAGE电泳仪,酶标仪等。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠听性脑干反应(ABR)检测 使用水合氯醛(0.5 g/kg)腹腔注射对动物进行麻醉。待动物完全麻醉后,检查小鼠双侧外耳道,确保外耳道无阻塞,并将其简单固定,覆盖布料保暖。用脑干诱发电位分析仪在隔音环境中测听:将记录电极刺入小鼠颅顶(双耳连线中点处)皮下,参考电极刺入测试耳下方皮下,地极刺入对侧耳下方皮下。将测试耳机放置在外耳道口,确保无阻碍。参数:选择“Click”,滤波宽度500~3 000 Hz,刺激频率12.1次/s,增益100 K,扫描时间10 ms。声音强度设定为80~

25 dB SPL,按10 dB SPL递减,当声音强度衰减到接近听阈时,递减间隔为5 dB SPL,以能分辨出可重复的ABR I波的最低刺激声音强度为阈值。同样方法检测对侧耳。

1.3.2 耳蜗标本制备 两组小鼠用水合氯醛(0.5 g/kg)腹腔注射进行麻醉,断头,迅速取下双侧颞骨,分离取出耳蜗。将耳蜗置于预冷的PBS中,并置于冰上,体视显微镜视野下,在蜗尖处打一小孔,迅速从小孔向周围小心剥离蜗壳,尽量去除骨质;然后将其置入EP管中,液氮迅速冷冻后置于-80℃冰箱中保存待用。将耳蜗置于4%多聚甲醛溶液中,体视显微镜视野下,在蜗尖处打一小孔,戳破圆窗膜、前庭窗膜,在窝尖小孔处缓慢灌入4%多聚甲醛溶液;将灌流好的耳蜗置于4%多聚甲醛溶液中,4℃过夜,再经10% EDTA溶液脱钙1周,可见耳蜗透明、柔软。将脱钙的耳蜗石蜡包埋后切片,60℃温度下烤片后,放入4℃冰箱保存待用。

1.3.3 免疫荧光染色 耳蜗石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,0.01 M PBS溶液冲洗10 min,用0.01 M 枸橼酸缓冲液(PH 6.0)煮沸法(95~100℃)修复抗原,0.25% tritonx-100处理,滴加10%免疫羊血清封闭非特异性抗原30 min,甩去血清,滴加一抗稀释液(FATP4,1:400)4℃过夜(阴性对照用PBS代替一抗)。次日,取出切片,37℃复温20 min,0.01 M PBS溶液漂洗15 min,滴加二抗稀释液(Alexa fluor 647,1:800),37℃孵育40 min,PBS漂洗后,用DAPI复染细胞核10 min,最后抗荧光淬灭封片剂封片。用共聚焦显微镜观察实验结果。

1.3.4 Western blot检测 提取耳蜗组织总蛋白,按BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书操作步骤检测总蛋白浓度,测定标准曲线为 $Y = 0.0007, X = 0.0227 (R^2 = 0.9967)$,根据吸光度和标准曲线计算出样本的蛋白浓度,按测得的蛋白浓度计算并配制上样缓冲液。按SDS-PAGE凝胶制备试剂盒说明书配制10%分离胶和5%浓缩胶,电泳:72 V恒压直至看到Marker有红色条带出现,转120 V恒压约60 min,终止电泳。转膜:100 V恒压1 h。根据Marker条带指示裁剪PVDF膜,获取目的蛋白和内参蛋白;用5%脱脂牛奶/TBST封闭PVDF膜1 h后,分别加入一抗稀释液(FATP4,1:1 000; β -actin,1:3 000)4℃过夜;次日充分漂洗PVDF膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液(羊抗兔,1:4 000)室温孵育1 h。PVDF膜充分漂洗后,用特敏型ECL化学发光液显色,凝胶成像系统显影。最后结果均

以目的蛋白条带灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达量。

1.4 统计学分析

实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Western blot 条带采用 Image J 软件测量其灰度值。

2 结果

2.1 ABR 检测结果

以昆明小鼠 ABR 曲线的 I 波为判断标准, 小鼠 ABR 反应阈平均为 (26.25 ± 2.34) dB SPL, I 波潜伏期平均为 (1.19 ± 0.17) ms。

2.2 FATP4 的免疫荧光染色结果

在共聚焦显微镜下, DAPI 标记细胞核呈蓝色, FATP 阳性呈红色, 分别与阴性对照组在同等激光强度下比较, 显示 FATP4 主要表达于昆明小鼠耳蜗的耳蜗螺旋神经节 (spiral ganglion, SG)、蜗轴 (modiolus, MO)、支持细胞 (supporting cells, SC)、内毛细胞 (inner hair cells, IHC)、外毛细胞 (outer hair cells, OHC)、血管纹的中间细胞 (intermediate cell, IC)。见图 1。

2.3 FATP4 的 Western blot 结果

图 2 表明在昆明小鼠耳蜗内有 FATP4 表达。内参 β -actin 的分子大小为 43 kDa, 小鼠的 FATP4

分子大小在 72 kDa 左右。FATP4 在昆明小鼠耳蜗内的相对表达量 (FATP4/ β -actin) 为 0.695 ± 0.165 ($n=3$)。

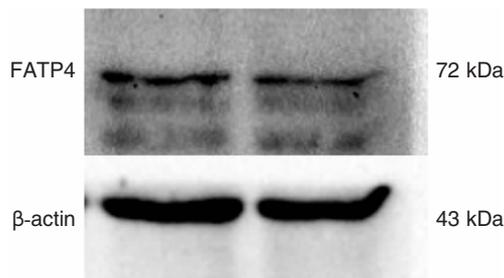


图 2 FATP4 的 Western blot 结果

3 讨论

脂肪酸在机体中发挥着重要的生理功能, 过多、过少都会使机体产生一系列的疾病: 肥胖、心脑血管疾病、生长发育障碍等; 近年来也有报道显示: 长期补充 ω -3 脂肪酸或长期食用富含 ω -3 脂肪酸的鱼类可以延缓年龄相关性听力损失的发生和发展^[9-10]。而具有转运脂肪酸功能的 FATPs 是调节脂肪酸代谢的一个重要因子。FATPs 有 6 种亚型, 分别是 FATP 1-6, 其中 FATP4 对长链脂肪酸具有高度亲和力而参与脂肪酸的摄取与转运^[4-5]。Hensen 细胞是耳蜗中唯一含有脂滴的支持细胞, 分布于耳蜗 corti

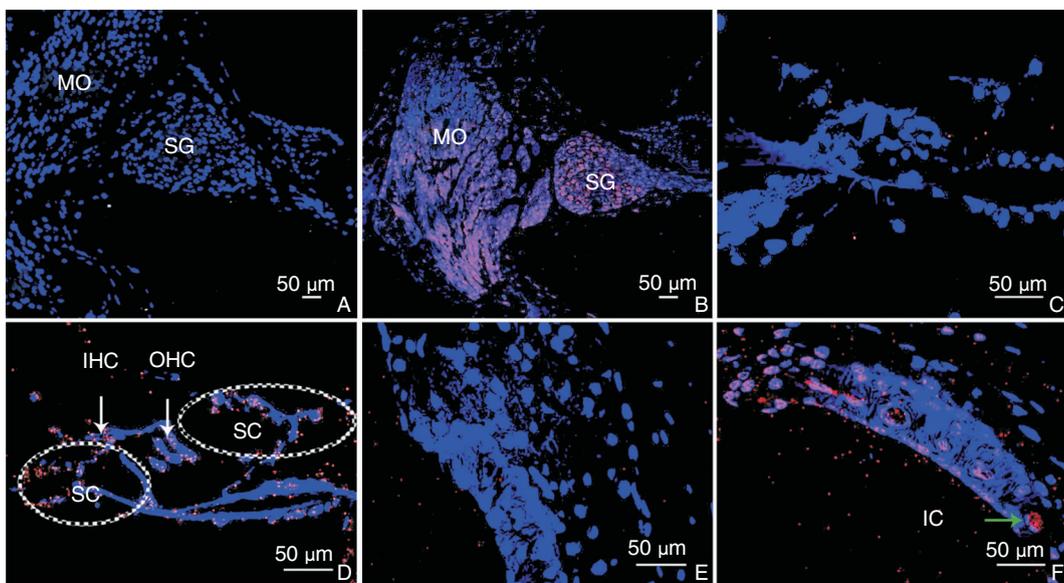


图 1 FATP4 的免疫荧光染色结果 A、B: 耳蜗蜗轴及螺旋神经节 ($\times 200$), A 为阴性对照, B 为 FATP4 在耳蜗螺旋神经节、蜗轴表达; C、D: 耳蜗 corti 器 ($\times 400$), C 为阴性对照, D 为 FATP4 表达于耳蜗支持细胞 (椭圆形处)、内毛细胞、外毛细胞; E、F: 耳蜗血管纹 ($\times 400$), E 为阴性对照, F 为 FATP4 在血管纹中间细胞表达 (箭头) 注: 耳蜗螺旋神经节: SG; 蜗轴: MO; 支持细胞: SC; 内毛细胞: IHC; 外毛细胞: OHC; 血管纹的中间细胞: IC。

器外侧,而脂滴的核心组成是长链脂肪酸以及三酰甘油等脂类物质^[11],所以 FATP4 可能是主要参与耳蜗脂肪酸代谢的脂肪酸转运蛋白。Suzuki 等^[12]通过免疫组织化学发现小鼠耳蜗支持细胞、螺旋神经节和血管纹有脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding proteins, FABP)表达。FABP 与 FATP 都是参与脂肪酸代谢的重要蛋白,本实验结果显示昆明小鼠支持细胞、外毛细胞、内毛细胞、血管纹的中间细胞、蜗轴、螺旋神经节都有 FATP4 表达,与 Saino-Saito、Suzuki 等证明的 FABP 在小鼠耳蜗内表达和分布结果较为一致。

外毛细胞具有双向放大作用,一方面是将机械的声波转换为膜电位,另一方面膜电位形成的同时使外毛细胞收缩伸展,产生主动放大作用,这个过程极可能需要消耗大量的能量^[7]。所以,早在二十世纪五十年代就有人提出在听觉器官受刺激的过程中,为了获得营养和氧气,毛细胞必须有一个高度专业化的营养辅助系统。耳蜗基底膜外侧的支持细胞—Hensen 细胞拥有大量脂滴,是主要营养细胞之一^[13]。但是 Hensen 细胞自身没有与脂肪酸代谢相应的线粒体和内质网系统^[14],而与之相邻的外毛细胞含有发达的线粒体及内质网系统^[15]。所以为适应外毛细胞的生理功能,Hensen 细胞内脂类物质可能通过 FABP 介导转移到细胞膜周围,再通过 FATP 转运到外毛细胞,最后通过 β -氧化,为外毛细胞提供能量,维持外毛细胞“耳蜗放大器”的功能。血管纹、螺旋神经节细胞也有 FATP4、FABP 表达,因此血管纹和螺旋神经节可能利用脂肪酸代谢调节自身的功能,这更好的有利于血管纹对内淋巴离子浓度、能量转换、无机盐、水的调控和转运以及螺旋神经节细胞对听觉冲动的产生和传递^[16]。既往对耳聋发生机制的研究多集中于毛细胞的机械性损伤、代谢性损伤、药物性损伤、钙超载学说等^[7]。但是耳蜗细胞通过能量代谢调节耳蜗功能的研究还未涉及。本实验通过免疫荧光染色、Western blot 检测发现了耳蜗中脂肪酸代谢的证据,为进一步研究耳蜗内脂肪酸代谢提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Ouali F, Djouadi F, Merlet-Bénichou C, et al. Regulation of fatty acid transport protein and mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation gene expression by fatty acids in developing rats[J]. *Pediatr Res*,2000,48(5):691-696.
- [2] Stahl A. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27)

- [J]. *Pflugers Arch*,2004,447(5):722-727.
- [3] Anderson CM, Stahl A. SLC27 fatty acid transport proteins[J]. *Mol Aspects Med*,2013,34(2-3):516-528.
- [4] Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, et al. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice[J]. *Hepatology*,2006,44(5):1191-1205.
- [5] Gertow K, Bellanda M, Eriksson P, et al. Genetic and structural evaluation of fatty acid transport protein-4 in relation to markers of the insulin resistance syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004,89(1):392-399.
- [6] Dyck JR, Lopaschuk GD. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? [J]. *J Physiol*,2006,574(Pt 1):95-112.
- [7] 李兴启,孙建和,杨仕明,等. 耳蜗病理生理学[M]. 北京:人民军医出版社,2011.
- [8] 王敏姣,张超,程馨,等. 不同品系正常成年小鼠听性脑干反应特点[J]. *听力学及言语疾病杂志*,2017,25(6):634-639.
- [9] Martinez-Vega R, Partearroyo T, Vallecillo N, et al. Long-term omega-3 fattyacid supplementation prevents expression changes in cochlear homocysteine metabolism and ameliorates progressive hearing loss in C57BL/6J mice[J]. *J Nutr Biochem*,2015,26(12):1424-1433.
- [10] Gopinath B, Flood VM, Rochtchina E, et al. Consumption of omega-3 fatty acids and fish and risk of age-related hearing loss [J]. *Am J Clin Nutr*,2010,92(2):416-421.
- [11] Saino-Saito S, Suzuki R, Tokuda N, et al. Localization of fatty acid binding proteins (FABPs) in the cochlea of mice[J]. *Ann Anat*,2010,192(4):210-214.
- [12] Suzuki J, Oshima T, Yoshida N, et al. Preservation of cochlear function in *Fabp3* (H-Fabp) knockout mice[J]. *Neurosci Res*, 2014,81-82:64-68.
- [13] Engstrom H, Wersall J. Is there a special nutritive cellular system around the hair cells in the organ of Corti[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*,1953,62(2):507-512.
- [14] Burgess BJ, Adams JC, Nadol JJ, et al. Morphologic evidence for innervation of Deiters' and Hensen's cells in the guinea pig[J]. *Hear Res*,1997,108(1-2):74-82.
- [15] Lim DJ, Melnick W. Acoustic damage of the cochlea. A scanning and transmission electron microscopic observation[J]. *Arch Otolaryngol*,1971,94(4):294-305.
- [16] 王坚. 听觉科学概论[M]. 北京:科学技术出版社,2005:72-73.

(收稿日期:2021-06-05)

本文引用格式:胡一勇,鄢斌成,于宁,等. 昆明小鼠耳蜗内脂肪酸转运蛋白4的表达与分布[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2022,28(2):46-49. DOI:10.11798/j. issn. 1007-1520.202221204

Cite this article as:HU Yiyong, YAN Bincheng, YU Ning, et al. Expression and distribution of fatty acid transporter 4 in Kunming mice cochlea[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2022,28(2):46-49. DOI:10.11798/j. issn. 1007-1520.202221204