

论著·基础研究

基于腺相关病毒血清型8型介导的 *Gjb2* 基因 c.109G>A 纯合突变耳聋小鼠的基因治疗成桢哲^{1,2,3}, 金晨曦^{1,2,3}, 冯宝怡^{1,2,3}, 郑晓飞^{1,2,3}, 刘祎晴^{1,2,3}, 吴皓^{1,2,3#}, 陶永^{1,2,3#}

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200011; 2. 上海市耳鼻疾病转化医学重点实验室, 上海 200125; 3. 上海交通大学医学院耳科学研究所, 上海 200125

[摘要] **目的**·探究腺相关病毒血清型8型 (adeno-associated virus serotype 8, AAV8) 介导的野生型缝隙连接蛋白β2 (gap junction protein β2, *Gjb2*) 基因在 *Gjb2* 基因 c.109G>A 纯合突变小鼠 (简称 *Gjb2* 纯合突变小鼠) 耳蜗支持细胞区域的表达情况及安全性, 以及对呋塞米引起的听力下降的影响。**方法**·将带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的 AAV8-GFP 病毒, 经耳蜗中阶注射入新生 *Gjb2* 纯合突变小鼠的内耳, 注射 14 d 后取小鼠耳蜗, 荧光显微镜观察基底膜 GFP 的表达情况。将载有野生型 *Gjb2* 基因的 AAV8-GJB2-GFP 病毒经中阶注射入新生 *Gjb2* 纯合突变小鼠内耳后, 于 4 周后通过实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测耳蜗 *Gjb2* mRNA 及其编码的连接子蛋白 (connexin 26, CX26) 的表达水平, 通过免疫荧光法观察其具体表达位置。通过听性脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) 实验评价新生纯合突变小鼠中阶注射 AAV8-GJB2-GFP 后 4 周龄时 5.66~45.00 kHz 的听力阈值。采用呋塞米试验比较野生型小鼠及 *Gjb2* 纯合突变小鼠腹腔注射呋塞米前后的 ABR 阈值变化, 以及观察 *Gjb2* 纯合突变小鼠经 AAV8-GJB2-GFP 治疗后能否缓解呋塞米导致的听力下降。**结果**·AAV8-GFP 注射 14 d 后耳蜗顶圈、中圈、底圈支持细胞的转染率分别为 (11.60±1.28) %、(10.33±1.55) %、(5.40±0.86) %。AAV8-GJB2-GFP 注射 4 周后耳蜗 *Gjb2* mRNA 水平约为未注射耳的 1.26 倍 ($P=0.014$), CX26 蛋白水平是未注射耳的 1.31 倍 ($P=0.001$); 注射后通过荧光显微镜观察到耳蜗支持细胞表达 CX26, 内毛细胞区域也有 CX26 异位表达。ABR 检测显示, 给药耳各频率听力阈值与对侧耳无明显差异, 表明其安全性较好。*Gjb2* 纯合突变小鼠经呋塞米诱导后较野生型小鼠产生更明显的听力阈移, 注射 AAV8-GJB2-GFP 4 周后突变小鼠阈移小于未治疗小鼠, 在 8.00、11.32、16.00 kHz 测得的阈值, 2 组间差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。**结论**·在新生 *Gjb2* 纯合突变小鼠中阶注射 AAV8-GJB2-GFP, 可使小鼠成年后耳蜗支持细胞表达外源性 *Gjb2*, 挽救呋塞米诱导的听力下降。

[关键词] 腺相关病毒; 缝隙连接蛋白β2; 支持细胞; 呋塞米; 基因治疗**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.06.007 **[中图分类号]** R764.43 **[文献标志码]** AAdeno-associated virus serotype 8-mediated gene therapy in *Gjb2* mutant c.109G>A homozygous miceCHENG Zhenzhe^{1,2,3}, JIN Chenxi^{1,2,3}, FENG Baoyi^{1,2,3}, ZHENG Xiaofei^{1,2,3}, LIU Yiqing^{1,2,3}, WU Hao^{1,2,3#}, TAO Yong^{1,2,3#}

1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Translational Medicine on Ear and Nose Diseases, Shanghai 200125, China; 3. Ear Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China

[Abstract] **Objective**·To determine the expression and safety of the wild-type gap junction protein β2 (*Gjb2*) gene delivered by adeno-associated virus serotype 8 (AAV8) into cochlear supporting cell region, and its effect on furosemide-induced hearing loss in *Gjb2* mutant c.109G>A homozygous mice (*Gjb2* homozygous mice). **Methods**·The AAV8-GFP viruses with green fluorescent protein (GFP) were injected into the inner ears of newborn *Gjb2* homozygous mice through the cochlear scala media, and the GFP expression in the basilar membrane was evaluated by fluorescence microscope 14 d after injection. AAV8-GJB2-GFP viruses with wild-type *Gjb2* gene were injected into the inner ears of neonatal *Gjb2* homozygous mice, and then the *Gjb2* mRNA and its encoded protein connexin 26 (CX26) expression level and location in the cochleae were detected by RT-qPCR, Western blotting and immunofluorescence. The auditory brainstem response (ABR) test was performed to evaluate the hearing thresholds at 5.66–45.00 kHz of the 4-week-old homozygous mice, which were injected with AAV8-GJB2-GFP at the neonatal stage. The furosemide

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (81730028)。**[作者简介]** 成桢哲 (1996—), 男, 硕士生; 电子信箱: chengzhenzhe@sjtu.edu.cn。**[通信作者]** 吴皓, 电子信箱: wuhao@shsmu.edu.cn。陶永, 电子信箱: taoyent@foxmail.com。[#]为共同通信作者。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81730028)。**[Corresponding Author]** WU Hao, E-mail: wuhao@shsmu.edu.cn. TAO Yong, E-mail: taoyent@foxmail.com. [#]Co-corresponding authors.

test was used to compare the changes of ABR thresholds before and after intraperitoneal injection in wild-type mice and *Gjb2* homozygous mice, and observe whether furosemide-induced hearing loss could be alleviated by AAV8-GJB2-GFP injection in the homozygous mice. **Results** • Fourteen days after AAV8-GFP injection, the transfection rates of supporting cells in the apex, middle, and basal turns of the cochleae were $(11.60 \pm 1.28)\%$, $(10.33 \pm 1.55)\%$, and $(5.40 \pm 0.86)\%$. Four weeks after AAV8-GJB2-GFP injection, the *Gjb2* mRNA expression level was 26% higher than that in the uninjected side, and CX26 protein level was 31% higher than that in the uninjected side. The expression of CX26 protein was observed in the supporting cells and ectopic expression of CX26 was also observed between the inner hair cells by using fluorescent microscope. The ABR thresholds did not shift after AAV8-GJB2-GFP injection, indicating its safety. *Gjb2* homozygous mice exhibited worse hearing loss than wild-type mice after furosemide injection, whereas AAV8-GJB2-GFP alleviated furosemide-induced hearing loss in *Gjb2* homozygous mice, and the thresholds measured at 8.00, 11.32 and 16.00 kHz were significantly different between the treated mice and the untreated ones ($P < 0.05$). **Conclusion** • The injection of AAV8-GJB2-GFP into the scala media of neonatal *Gjb2* homozygous mice can make the cochlear supporting cells express exogenous *Gjb2* in the adulthood, which alleviate the furosemide-induced hearing loss.

[Key words] adeno-associated virus (AAV); gap junction protein beta 2 (*Gjb2*); supporting cell; furosemide; gene therapy

遗传性耳聋是人类最常见的遗传性疾病之一,其发病率为2‰~3‰^[1-2];而缝隙连接蛋白 $\beta 2$ (gap junction protein $\beta 2$, *GJB2*) 基因突变是迟发性耳聋以及遗传性非综合征性耳聋最常见的病因^[3-4]。*GJB2* 基因主要在支持细胞、血管纹以及螺旋韧带中表达。它编码连接子蛋白 (connexin 26, CX26), 与CX30蛋白一起参与构成耳蜗基底膜非感觉上皮区域以及血管纹外侧壁区域的缝隙连接通道^[5], 涉及包括耳蜗发育、耳蜗内淋巴电位产生、耳蜗主动放大、第二信使转导以及钾循环在内的多项听觉生理过程^[6-9]。腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 介导的基因治疗作为一种极具潜力的治疗手段,在遗传性耳聋模式动物的治疗中已有多篇成功报道^[10-12]。迄今为止的*Gjb2* 基因治疗主要集中于CX26条件性敲除小鼠模型,即在新生鼠时期实现CX26蛋白的敲除,敲除小鼠成年后表现为螺旋神经节神经元以及内外毛细胞大量死亡,听力完全丧失。随后研究者通过AAV介导外源正常CX26蛋白表达,通过听性脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) 实验仅在12 kHz和24 kHz两个频率测得听力阈值的下调^[13-14]。目前报道的*Gjb2* 点突变的隐性纯合突变小鼠模型仅有1种,即*Gjb2* 基因c.109G>A纯合突变小鼠 (下文简称*Gjb2* 纯合突变小鼠),表现为轻中度渐进性听力损失^[15],并且在注射呋塞米后相较野生型小鼠,听力阈值会显著升高。本研究拟向新生*Gjb2* 纯合突变小鼠注射带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和野生型*Gjb2* 基因的AAV8-GJB2-GFP,在成年后检测小鼠能否减轻呋塞米引起的阈值升高反应,从而评价*GJB2* 用于遗传性耳聋基因治疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验病毒 病毒AAV8-GFP [5.80×10^{13} GC/mL (GC: genomic copies)] 及AAV8-GJB2-GFP (4.19×10^{13} GC/mL) 均购自山东维真生物公司 (ViGene Biosciences)。所有AAV都由CMV启动子控制。

1.1.2 实验小鼠 本研究使用的*Gjb2* 纯合突变小鼠及其年龄和性别匹配的野生型对照小鼠均为129T2/SvEmsJ品系小鼠^[15];通过对小鼠尾基因组DNA测序来确认基因型。野生型小鼠和*Gjb2* 纯合突变小鼠均饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心,实验动物使用许可证号为SYXK (沪) 2020-0025。

1.1.3 主要试剂及仪器 多聚甲醛 (16005)、Triton (T8787)、动物组织RNA稳定保存液RNAlater (R0901)、盐酸赛拉嗪 (X1251) 购自美国Sigma公司,0.5 mol/L EDTA溶液 (E1170) 购自北京索莱宝科技有限公司,驴血清 (BMS0140) 购自美国Abbkine公司,SYBR Green Premix Pre Taq HS qPCR Kit 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司,蛋白酶抑制剂 (04693116001) 购自美国Roche公司,RIPA裂解液 (P0013B)、BCA蛋白浓度测定试剂盒 (P0012)、5×loading buffer (P0015) 购自碧云天生物公司,舒泰50 (WK001) 购自法国维克公司,呋塞米 (C822848) 购自上海麦克林生化科技有限公司,抗CX26抗体 (33-5800)、二抗及封片剂购自美国Invitrogen公司,抗SOX2抗体 (AF2018) 购自美国R&D公司,抗肌球蛋白7a (myosin 7a, MYO7a) 抗体 (25-6790) 购自美国Proteus BioSciences公司,抗 β -actin抗体 (4967S) 购自美国CST公司。

共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 购自德国 Leica 公司, 匀浆机 (JXFSTPRP-48) 购自上海净信公司, 荧光定量 PCR 仪 (Roche LightCycler 480) 购自美国 Roche 公司, 化学发光仪 (Amersham Imager 600) 购自美国 GE 公司, 37 °C 直流电热垫 (557020) 购自美国 Harvard 公司, TDT 听觉诱发电位工作站 (TDT System3 RZ6 workstation) 购自美国 Tucker-Davis Tech 公司。

1.2 方法

1.2.1 新生鼠注射 将出生 2 d 内 (P0~P2) 的新生小鼠放在冰上低温麻醉。取耳前入路, 暴露镫骨动脉后, 用拉制的玻璃电极在显微镜直视下将 AAV8-GFP 或 AAV-GJB2-GFP 病毒注射入新生鼠右侧内耳中阶。每只新生鼠注入 0.3 μ L 病毒。手术结束后置于 37 °C 恒温加热垫上至完全复苏。

1.2.2 免疫荧光染色 小鼠处死后, 快速取出耳蜗, 进行 4% 多聚甲醛灌流固定。随后将组织放置在 4% 多聚甲醛中 4 °C 固定过夜, 随后换成 0.5 mol/L EDTA 室温脱钙 6 h。脱钙结束后将耳蜗按顶圈、中圈、底圈解剖分离。用含有 8% 驴血清、0.3% Triton 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 室温封闭组织 1 h, 加入抗 SOX2 抗体 (1 : 300 稀释)、抗 myosin 7a 抗体 (1 : 300 稀释) 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗 3 遍, 每遍 5 min。加入对应的二抗 (1 : 500 稀释) 室温孵育 1 h, PBS 清洗 3 遍, 每遍 5 min。滴入含 DAPI 的抗淬灭剂后封片, 进行共聚焦成像。使用 Image J 分别对顶圈、中圈、底圈的 GFP 转染的内毛细胞及支持细胞进行计数。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 将快速获取的耳蜗组织放入 RNA later 中防止 RNA 降解, 去除前庭后放入匀浆机研磨匀浆 (总运行时长 37 s, 运行 7 s 后中断 3 s, 频率为 65 Hz)。随后按照 TRIzol 法提取组织 RNA, 反转录成 cDNA 后, 使用 SYBR Green Premix Pre Taq HS qPCR Kit 在荧光定量 PCR 仪中对 *Gjb2*、*Gjb6* 以及 *Rpl19* (ribosomal protein L19) 进行 PCR 扩增。扩增引物见表 1。扩增程序为: 95 °C 孵育 5 min; 随后 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 45 个循环。目的基因的相对表达值用 *Rpl19* 进行标准化换算。

1.2.4 Western blotting 实验 将去前庭的耳蜗组织放入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中, 放入匀浆机研磨匀浆 (总运行时长 2 min, 运行 3 s 后中断 8 s, 频率为 70 Hz)。随后 4 °C, 17 000 \times g 离心 30 min。取

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences for real-time qPCR

Name	Sequence (5'→3')
<i>Gjb2</i> -Forward	ATCCTCGGGGGTGTCAACAA
<i>Gjb2</i> -Reverse	AGACAAAATCGGCTTGCTCATC
<i>Gjb6</i> -Forward	ACCAGCATAGGGAAGGTGTG
<i>Gjb6</i> -Reverse	TGCAGAGTGTTCAGACAAAG
<i>Rpl19</i> -Forward	ACCTGGATGAGAAGGATGAG
<i>Rpl19</i> -Reverse	ACCTTCAGGTACAGGCTGTG

上清液用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测得蛋白浓度, 并将各样品稀释成相同的浓度。加入 5 \times loading buffer 放入 95 °C 水浴 5 min。每个样品上样量为 20 μ g 总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 随后转膜至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭后, 抗 CX26 抗体 (1 : 1 000 稀释) 以及抗 β -actin 抗体 (1 : 1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, 对应二抗室温孵育 1 h 后, 使用化学发光仪曝光显影。

1.2.5 ABR 实验 采用 TDT 听觉诱发电位工作站 (TDT System3 RZ6 workstation), 按 20 mg/kg 盐酸赛拉嗪和 65 mg/kg 舒泰 50 的剂量腹腔注射麻醉小鼠, 待小鼠全麻后置于 37 °C 直流电热垫上。将记录电极置于颅顶正中皮下, 参考电极置于待测耳乳突下, 接地电极置于另一侧大腿皮下。选择 5.66 kHz、8.00 kHz、11.32 kHz、16.00 kHz、21.35 kHz、32.00 kHz、45.00 kHz 短音作为刺激声频, 叠加次数为 512 次, 强度从 90 dB 声压级 (sound pressure level, SPL) 开始记录, 每次递减 5 dB SPL, 以可以检测到的振幅的最低刺激强度定为该频率阈值。

1.2.6 吠塞米试验 将小鼠按 “1.2.5” 的方法腹腔注射麻醉后, 快速腹腔注射吠塞米溶液 200 mg/kg, 等待 30 min 后用 ABR 检测稳定的听力阈移数值, 并用同龄野生型小鼠作为对照组。

1.2.7 统计学方法 使用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行分析, 定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析 (ANOVA) 以及 Bonferroni 校正。将 $P<0.05$ 定义为有统计学意义。

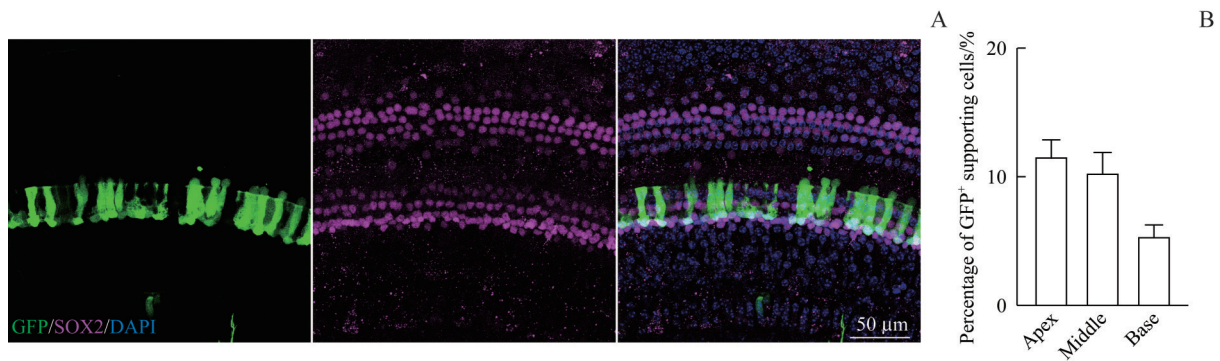
2 结果

2.1 AAV8-GFP 在 *Gjb2* 纯合突变小鼠耳蜗的转染情况

于新生 *Gjb2* 纯合突变小鼠内耳中阶注射 1.74×10^{10} GC 的 AAV8-GFP 病毒, 14 d 后获取耳蜗组织进行免疫荧光染色, 用 SOX2 抗体标记基因治疗靶细胞

即耳蜗支持细胞 (图 1A)。顶圈、中圈、底圈的支持细胞 AAV8-GFP 病毒转染率分别为 $(11.60 \pm 1.28)\%$ 、

$(10.33 \pm 1.55)\%$ 、 $(5.40 \pm 0.86)\%$ (图 1B)。可见 AAV8-GFP 病毒可用于后续 *Gjb2* 转染的载体。



Note: A. Representative images of GFP transfection in supporting cells of homozygous mice (middle turn). B. Statistical results of virus transfection in the apex, middle and basal turns of the cochlea in homozygous mice.

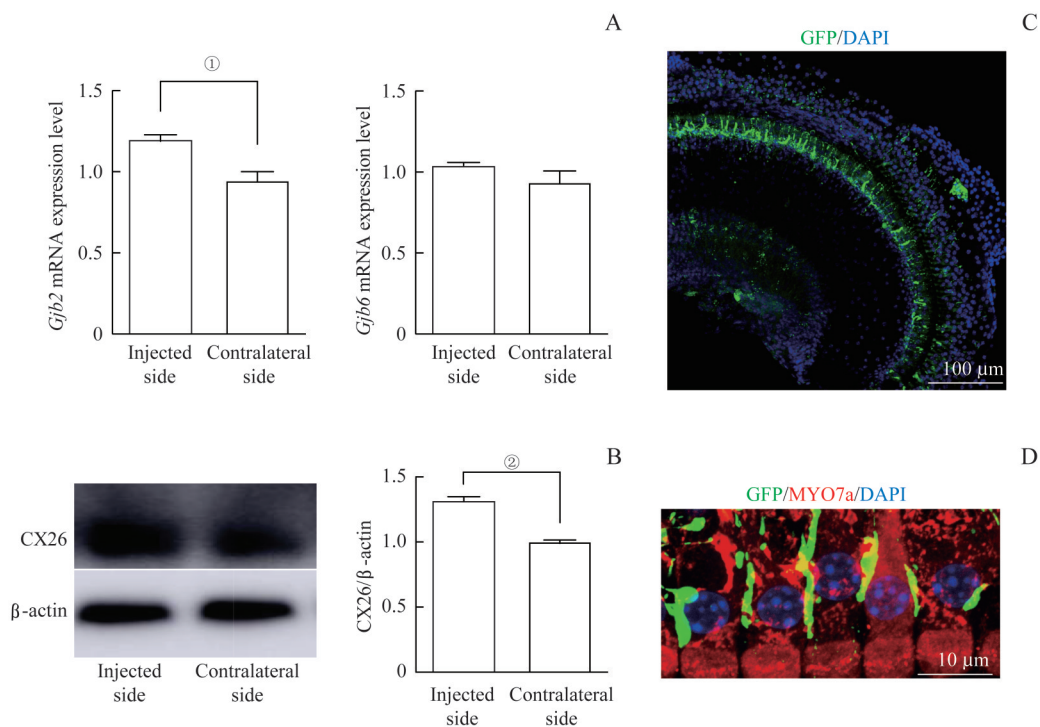
图1 *Gjb2* 纯合突变小鼠耳蜗中阶注射 AAV8-GFP 14 d 后支持细胞转染情况

Fig 1 Supporting cells transfection 14 d after AAV8-GFP injection in the scala media of the cochlea of *Gjb2* homozygous mice

2.2 AAV8-GJB2-GFP 在 *Gjb2* 纯合突变小鼠耳蜗的转染情况

新生 *Gjb2* 纯合突变小鼠中阶注射 1.26×10^{10} GC 的 AAV8-GJB2-GFP 病毒, 4 周后取注射耳以及未注射耳的耳蜗组织进行实时荧光定量 PCR, 结果显示病毒注射后耳蜗 *Gjb2* mRNA 表达量为未注射耳的 1.26 倍

($P=0.014$), 编码 CX30 蛋白的 *Gjb6* 基因表达差异并无统计学意义 (图 2A)。Western blotting 结果显示 CX26 的蛋白表达量为未注射耳的 1.31 倍 (图 2B)。耳蜗免疫荧光染色结果提示外源性 CX26 (绿色荧光) 成功在支持细胞区域表达 (图 2C), 部分内毛细胞间可观察到 CX26 的异位表达 (图 2D)。



Note: A. mRNA expression levels of *Gjb2* and *Gjb6* detected by RT-qPCR ($n=3$); B. Western blotting results and statistics of CX26 expression ($n=3$). C. CX26 (with GFP) expression in the basilar membrane of the top turn of the cochlea. D. Ectopic expression of CX26 (with GFP) between the hair cells observed under high magnification. ^① $P=0.014$, ^② $P=0.001$.

图2 *Gjb2* 纯合突变小鼠耳蜗中阶注射 AAV8-GJB2-GFP 4 周后 *Gjb2* 及其蛋白 CX26 在耳蜗的表达和定位

Fig 2 Expression and location of *Gjb2* and it's expression protein CX26 in the cochlea of *Gjb2* homozygous mice 4 weeks after AAV8-GJB2-GFP injection in the scala media

2.3 AAV8-GJB2-GFP 对新生小鼠内耳的安全性

选择新生 (P0~P2) *Gjb2* 纯合突变小鼠, 通过耳蜗中阶的注射方式给予 1.26×10^{10} GC 的 AAV8-GJB2-GFP 后, 于小鼠 4 周龄时用 ABR 分别检测给药耳与对侧未给药耳的各频率听力阈值 ($n=10$), 两侧耳听力阈值一致 (图 3)。

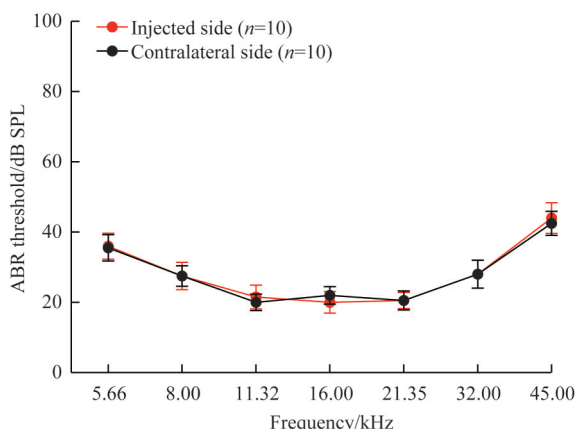
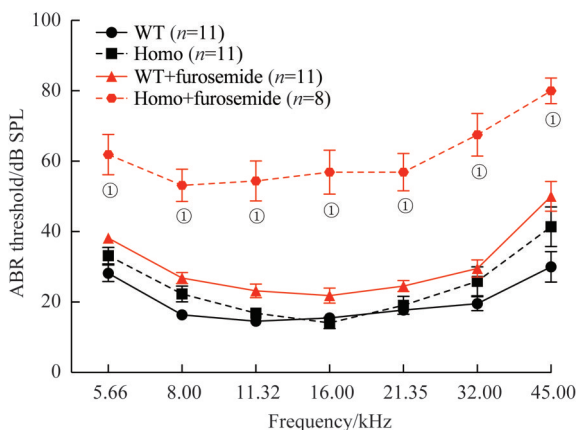


图 3 *Gjb2* 纯合突变小鼠一侧耳蜗中阶注射 AAV8-GJB2-GFP 4 周后 ABR 阈值与未注射侧的比较

Fig 3 Comparison of ABR thresholds between AAV8-GJB2-GFP injected side and contralateral side of cochleae after 4 weeks in *Gjb2* homozygous mice

2.4 呋塞米试验在 *Gjb2* 纯合突变小鼠的反应

野生型小鼠及 *Gjb2* 纯合突变小鼠腹腔注射呋塞米前后的 ABR 阈值变化见图 4。野生型 4 周龄小鼠基础听力与 *Gjb2* 纯合突变小鼠差异无统计学意义。在呋塞米注射后 30 min, 测量 2 组的 ABR 阈值, 结果发现, 野生型小鼠全频听力与注射前无明显变化, 而 *Gjb2* 纯合突变小鼠全频听阈较注射前均显著升高 (均 $P<0.01$)。



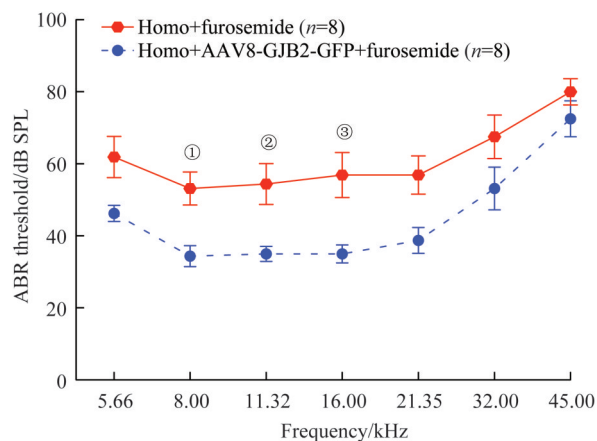
Note: WT—wild type mice; Homo—*Gjb2* homozygous mice. ① $P=0.000$, vs Homo.

图 4 4 周龄野生型小鼠及 *Gjb2* 纯合突变小鼠注射呋塞米前后 ABR 阈值变化

Fig 4 Changes of ABR thresholds before and after furosemide injection in 4-week-old wild type mice and *Gjb2* homozygous mice

2.5 *Gjb2* 纯合突变小鼠注射 AAV8-GJB2-GFP 后呋塞米试验的反应

新生 *Gjb2* 纯合突变小鼠中阶注射 AAV8-GJB2-GFP 病毒 4 周后进行呋塞米试验, 发现治疗组较未治疗组整体听力阈值明显降低, 在 8.00、11.32 和 16.00 kHz 测得的 ABR 阈值, 2 组之间差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 5)。



Note: ① $P=0.037$, ② $P=0.028$, ③ $P=0.009$.

图 5 *Gjb2* 纯合突变小鼠注射 AAV8-GJB2-GFP 4 周后在呋塞米试验中的 ABR 阈值变化

Fig 5 Changes of ABR thresholds in furosemide test in the *Gjb2* homozygous mice 4 weeks after AAV8-GJB2-GFP injection

3 讨论

迄今为止, 已经发现有超过 300 种的 *GJB2* 基因突变位点与不同程度的耳聋相关 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>), 占我国遗传性非综合征性耳聋的 18.31%, 是遗传性非综合征性耳聋最常见的原因^[16]。*GJB2* 基因 c.109G>A 突变是在东亚人群中携带率最高的突变类型, 在中国汉族人口中携带率为 6.2%^[17]。为研究 *GJB2* 突变致聋的相关机制, 本课题组前期构建该点突变敲入小鼠, 并证实其可模拟人类轻度、迟发性、渐进性耳聋听力表型^[15], 并且在应对环境 (噪声刺激)、药物 (呋塞米试验) 压力下表现出与野生型小鼠不同的表型反应^[18]。

关于 *GJB2* 的基因治疗, 最早由林曦教授团队率先开展, 构建 CX26 条件敲除小鼠 (Foxg1-cCx26KO)。该小鼠表现为重度感音神经性聋, 随后通过腺相关病毒 1 型介导 *Gjb2* 基因表达, 成功转染部分支持细胞, 并在体外细胞层面 (钙黄绿素染色实验) 发现功能有部分恢复, 但在体研究 (电生理实验) 未发现功能恢复^[13]。IKEDA 团队对另一种

CX26条件敲除的耳聋小鼠模型进行AAV介导的基因治疗,但仅有部分频率的听力阈值从100 dB SPL恢复到70 dB SPL,而该听力阈值仍无法用于日常沟通交流^[14]。也有研究通过病毒过表达脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的方法,试图减轻CX26内耳条件敲除小鼠神经元的丢失,结果仅在耳蜗中圈、底圈观察到神经元数量的恢复,而听觉电生理实验无明显改善^[19]。然而上述基因治疗均基于CX26条件性敲除小鼠耳聋模型,其听力表型为重度听力下降,不符合大部分人群的GJB2突变表型。在听力下降的GJB2突变人群中,轻中度听力损失比例超60%^[20],相较于CX26条件性敲除小鼠模型,本研究使用的*Gjb2*纯合突变小鼠表现为轻中度、迟发性耳聋,对其进行基因治疗更具有临床意义。

病毒注射治疗后免疫荧光染色结果表明,过表达GJB2部位包括内毛细胞和支持细胞,尽管存在内毛细胞区域有异位表达,但ABR检测结果仍正常。这与RAPHAEL团队结果一致^[21],提示内毛细胞GJB2异位表达可能不会对毛细胞以及ABR听力检测结果产生影响。

LUSTIG团队将AAV1-VGLUT3病毒导入Vglut3(vesicular glutamate transporter type 3)基因敲除小鼠模型中,使敲除小鼠听力恢复并维持到注射后3~6个月,首次证实基因治疗可用于遗传性耳聋治疗^[10]。随后很多团队证实AAV介导的基因治疗可成功实现耳聋模式小鼠的听力恢复^[10-12]。但发病率最高的GJB2基因治疗尚无突破。本课题组前期证实AAV8可安全高效转染内耳细胞^[22-23]。通过AAV8-GJB2-GFP中阶注射入新生小鼠内耳,可成功靶向支持细胞,介导外源GJB2的表达。然而转染位置主要集中在顶中圈,支持细胞转染率也较低。后续可以AAV8病毒为模版,进行衣壳或者启动子改造^[24],以期获得在支持细胞转染率高、在毛细胞转染率低的病毒工具。

呋塞米是一种袪利尿剂,不良反应之一是导致一过性听力下降,其机制可能是引起血管纹细胞水肿,导致内淋巴电位迅速降低,短暂性地引起小鼠听力阈值的升高^[25]。团队前期测得*Gjb2*纯合突变小鼠基础的内淋巴电位仅为88 mV,而野生型小鼠可达100 mV。野生型小鼠以及*Gjb2*纯合突变小鼠腹腔注射200 mg/kg呋塞米后,野生型小鼠测得的内淋巴电

位下降为78 mV,仅有轻微的听力阈值上升;而*Gjb2*纯合突变小鼠内淋巴电位下降至42 mV,听力阈值上升也更明显^[18]。以此作为实验基础,观察基因治疗能否保护呋塞米导致的*Gjb2*纯合突变小鼠听力下降。本实验结果表明基因治疗后,*Gjb2*纯合突变小鼠能缓解呋塞米引起的听力阈值升高。

本研究通过团队前期基础,利用耳聋家系发现的点突变*Gjb2*纯合突变小鼠进行病毒介导的过表达治疗研究。利用野生型小鼠和*Gjb2*纯合突变小鼠在呋塞米刺激下的阈值上升程度的不同进行实验,发现中阶注射AAV8-GJB2-GFP病毒后*Gjb2*纯合突变小鼠ABR阈值上升幅度明显小于未注射病毒的小鼠,AAV介导的基因治疗使呋塞米对*Gjb2*纯合突变小鼠的听力损伤程度减小。这表明了*Gjb2*基因过表达策略可能可以治疗*Gjb2*点突变导致的听力改变。

*Gjb2*纯合突变小鼠为一种迟发性渐进性耳聋的模型,目前我们仅观察了AAV-GJB2-GFP在4周龄小鼠的表达效果。后期,我们将通过长期观察判断AAV介导的基因治疗能否改善*Gjb2*纯合突变小鼠的渐进性听力下降。

本研究证实新生小鼠中阶注射AAV8-GJB2-GFP可以递送*Gjb2*靶向小鼠耳蜗支持细胞,并介导外源性*Gjb2*在支持细胞表达。AAV8-GJB2-GFP内耳注射不损伤*Gjb2*纯合突变小鼠听力,*Gjb2*过表达可减轻呋塞米导致的*Gjb2*纯合突变小鼠听力下降。本研究为治疗GJB2相关遗传性耳聋的基因治疗提供了可行性证据。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会的审核批准(批件号HKDL[2017163])。所有实验过程均遵照《实验动物饲养管理和使用指南》及《上海交通大学医学院附属第九人民医院动物中心管理手册》进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Ethics Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter HKDL[2017163]). And all experimental animal protocols were carried out by following Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and Manual for Laboratory Animals Management of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

作者贡献/Authors' Contributions

成桢哲参与数据采集和分析、论文撰写;金晨曦、冯宝怡参与论文修改;郑晓飞参与实验设计;刘祎晴参与论文修改;吴皓参与实验指导;陶永参与实验设计、监督及论文修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

CHENG Zhenzhe acquired and analyzed the data, and drafted the manuscript. JIN Chenxi and FENG Baoyi revised the manuscript. ZHENG Xiaofei designed the study. LIU Yiqing revised the

manuscript. WU Hao participated in the experimental study guidance. TAO Yong designed the study and participated in the manuscript correction. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2022-02-18
- Accepted: 2022-06-19
- Published online: 2022-06-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] MARAZITA M L, PLOUGHMAN L M, RAWLINGS B, et al. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population[J]. Am J Med Genet, 1993, 46(5): 486-491.
- [2] MORTON C C, NANCE W E. Newborn hearing screening: a silent revolution[J]. N Engl J Med, 2006, 354(20): 2151-2164.
- [3] KELSELL D P, DUNLOP J, STEVENS H P, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness[J]. Nature, 1997, 387(6628): 80-83.
- [4] KELLEY P M, HARRIS D J, COMER B C, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (*DFNB1*) hearing loss[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 792-799.
- [5] JAGGER D J, FORGE A. Connexins and gap junctions in the inner ear: it's not just about K⁺ recycling[J]. Cell Tissue Res, 2015, 360(3): 633-644.
- [6] SANTOS-SACCHI J, DALLOS P. Intercellular communication in the supporting cells of the organ of Corti[J]. Hear Res, 1983, 9(3): 317-326.
- [7] KIKUCHI T, KIMURA R S, PAUL D L, et al. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis[J]. Anat Embryol (Berl), 1995, 191(2): 101-118.
- [8] WANG Y F, CHANG Q, TANG W X, et al. Targeted connexin26 ablation arrests postnatal development of the organ of Corti[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(1): 33-37.
- [9] MEI L, CHEN J, ZONG L, et al. A deafness mechanism of digenic Cx26 (*GJB2*) and Cx30 (*GJB6*) mutations: reduction of endocochlear potential by impairment of heterogeneous gap junctional function in the cochlear lateral wall[J]. Neurobiol Dis, 2017, 108: 195-203.
- [10] AKIL O, SEAL R P, BURKE K, et al. Restoration of hearing in the *Vglut3* knockout mouse using virally mediated gene therapy[J]. Neuron, 2012, 75(2): 283-293.
- [11] ASKEW C, ROCHAT C, PAN B F, et al. *Tmc* gene therapy restores auditory function in deaf mice[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(295): 295ra108.
- [12] GYÖRGY B, MEIJER E J, IVANCHENKO M V, et al. Gene transfer with AAV9-PHP.B rescues hearing in a mouse model of usher syndrome 3A and transduces hair cells in a non-human primate[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2018, 13: 1-13.
- [13] YU Q, WANG Y, CHANG Q, et al. Virally expressed connexin26 restores gap junction function in the cochlea of conditional *Gjb2* knockout mice[J]. Gene Ther, 2014, 21(1): 71-80.
- [14] IIZUKA T, KAMIYA K, GOTOH S, et al. Perinatal *Gjb2* gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(13): 3651-3661.
- [15] CHEN Y, HU L X, WANG X L, et al. Characterization of a knock-in mouse model of the homozygous p. V37I variant in *Gjb2*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 33279.
- [16] YUAN Y Y, YOU Y W, HUANG D L, et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China[J]. J Transl Med, 2009, 7: 79.
- [17] LI L, LU J R, TAO Z, et al. The p. V37I exclusive genotype of *GJB2*: a genetic risk-indicator of postnatal permanent childhood hearing impairment[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36621.
- [18] LIN X, LI G, ZHANG Y, et al. Hearing consequences in *Gjb2* knock-in mice: implications for human p. V37I mutation[J]. Aging, 2019, 11(18): 7416-7441.
- [19] TAKADA Y, BEYER L A, SWIDERSKI D L, et al. Connexin 26 null mice exhibit spiral ganglion degeneration that can be blocked by *BDNF* gene therapy[J]. Hear Res, 2014, 309: 124-135.
- [20] HUANG S S, HUANG B Q, WANG G J, et al. The relationship between the p. V37I mutation in *GJB2* and hearing phenotypes in Chinese individuals[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129662.
- [21] GUO J Y, MA X B, SKIDMORE J M, et al. *GJB2* gene therapy and conditional deletion reveal developmental stage-dependent effects on inner ear structure and function[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2021, 23: 319-333.
- [22] KANG W, ZHAO X L, SUN Z E, et al. Adeno-associated virus vector enables safe and efficient Cas9 activation in neonatal and adult Cas9 knockin murine cochleae[J]. Gene Ther, 2020, 27(7/8): 392-405.
- [23] ZHAO X L, JIN C X, DONG T T, et al. Characterization of promoters for adeno-associated virus mediated efficient Cas9 activation in adult Cas9 knock-in murine cochleae[J]. Hear Res, 2020, 394: 107999.
- [24] LI C W, SAMULSKI R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2020, 21(4): 255-272.
- [25] DING D L, LIU H, QI W D, et al. Ototoxic effects and mechanisms of loop diuretics[J]. J Otol, 2016, 11(4): 145-156.

[本文编辑] 瞿麟平