文章编号:1000-5404(2012)07-0577-04

论著

Smad4 条件基因敲出小鼠的前庭功能检测

邓安春[1],杨仕明[2],黄德亮[2],孙建和[2],杨 晓[3] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院耳鼻咽喉科[1];100853 北京,解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科,解放军耳鼻咽喉研究所[2];100071 北京,军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室[3])

[摘要] **目的** 通过设计的一系列前庭功能检测实验对同窝成组的软骨组织 Smad4 条件基因敲除野生型、杂合子、纯合子小鼠的前庭功能进行评估。**方法** 前庭功能检测方法:一般行为观察;空间姿势反射;游泳实验;前庭眼反射(VOR),使用前庭功能检查系统记录眼震电图;短声刺激前庭诱发肌源性电位(VEMP)记录麻醉下椎前颈长肌表面第 3 颈椎水平的声刺激诱发电位。**结果** 虽然软骨组织 Smad4 条件基因敲除小鼠的耳蜗感受声音能力下降,但没有发现软骨组织 Smad4 条件基因敲除小鼠出现行为、步态、空间姿势反射和游泳实验等前庭综合功能障碍;3 个基因型小鼠均能诱出眼震且相互之间没有差别($P>0.05$);VEMP 的潜伏期在 3 个基因型组间无差异($P>0.05$),与野生型和杂合子相比,纯合子小鼠 VEMP 的反应阈值明显增加($P<0.01$)。**结论** 只有 Smad4 条件基因敲除纯合子小鼠的部分球囊功能受到一定程度的影响,其他前庭功能不受影响。

[关键词] Smad4;条件基因敲除;前庭功能
[中图法分类号] R322.923; R394.3; R764.02 [文献标志码] A

Evaluation of vestibular functions in Smad4 conditional knockout mice

Deng Anchun[1], Yang Shiming[2], Huang Deliang[2], Sun Jianhe[2], Yang Xiao[3] ([1]Department of Otolaryngology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, Institute of Otolaryngology, General Hospital of PLA, Beijing, 100853; [3]Genetic Laboratory of Development and Diseases, Institute of Biotechnology, Beijing, 100071, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the vestibular functions in Smad4 conditional knockout mice. **Methods** Vestibular functions were evaluated through general behavioral observation, air righting reflex, and swimming test in 3 genotypes of mice, Smad4$^{+/+}$. Smad4$^{+/-}$, and Smad4$^{-/-}$. Vestibular ocular reflex (VOR) was recorded using vestibular function examination system. Vestibular evoked myogenic potential (VEMP) were recorded by loud clicks evoking on the pre-vertebral muscle at the level of the third cervical vertebral bone using silver ball electrodes under general anesthesia. **Results** Though cochlear perceiving sound was reduced in Smad4$^{-/-}$ mice, their behaviors, gaits, air righting reflex and swimming test were normal. The 3 genotypes of mice were induced identical nystagmus through rotation, but no difference was found among them ($P>0.05$). Latency of VEMP had no difference among the 3 genotypes of mice ($P>0.05$), but the response threshold of VEMP in Smad4$^{-/-}$ mice were obviously elevated ($P<0.01$). **Conclusion** Only partial functions of saccule are damaged to some extent in Smad4 conditional knockout mice, and other vestibular endorgans have normal functions.

[**Key words**] Smad4; conditional knockout; vestibular functions

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 program, 2007AA02Z150), the Key and General Program of National Natural Science Foundation of China (30730040, and 30571017, 30871398), the Starting Funds for Scholars Returning From Overseas of Chongqing (CSTC2010BB5032), and the Starting Funds for Scholars Returning From Overseas of Third Military Medical University (2010XHG05). Corresponding author: Deng Anchun, E-mail: dane1971@gmail.com; Yang Shiming, E-mail: Yangsm301@263.net

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2007AA02Z150);国家自然科学基金重点项目(30730040);国家自然科学基金面上项目(30571017;30871398);重庆市回国人员启动基金(CSTC2010BB5032);第三军医大学回国人员启动基金(2010XHG05)
[通信作者] 邓安春,E-mail:dane1971@gmail.com
杨仕明,E-mail:Yangsm301@263.net

前庭末梢感受器精细三维结构的形成是一个复杂的过程,在该过程中,众多基因的参与是决定性因素,他们的变异或剔除会使半规管或毛细胞、耳石、淋巴囊腔等前庭结构的发育发生障碍,最终导致前庭功能障碍。Smads 是转化生长因子-β(TGF-β)的下游调节基

因,其中的Smad4作为TGF-β信号转导通路中唯一的公共Smad,在细胞增殖、分化、移行、凋亡等过程中起着非常重要的作用,其可能参与了内耳前庭结构和功能的形成。Smad4基因敲除纯合子小鼠($Smad4^{-/-}$)全部在胚胎期死亡,而嵌合体小鼠不能完全反映该基因对前庭发育和功能的影响[1-2]。基于loxP-Cre系统条件基因敲除技术而构建的软骨组织Smad4条件基因敲除纯合子小鼠($Smad4^{-/-}$)听力严重受损[3],但其前庭功能是否受到影响少见文献报道,我们对此做了研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生型($Smad4^{+/+}$)小鼠、Smad4条件基因敲除杂合子($Smad4^{+/-}$)小鼠、Smad4条件基因敲除纯合子($Smad4^{-/-}$)小鼠均由中国军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室杨晓研究员提供并鉴定基因型,动物统一编号,统一饲养。动物的使用获得中国人民解放军总医院动物伦理委员会的授权。

1.2 主要试剂与仪器

注射用速眠新(长春军需大学兽医研究所),用生理盐水按1∶10稀释,稀释后用量根据小鼠体质量决定,0.1~0.2 ml/10 g,腹腔注射;VTS-Ⅲ型人体前庭功能检查系统(北京和平医疗设备厂);自制小鼠固定盒;Smart EP诱发电位仪(美国智听公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠一般行为观察 $Smad4^{+/+}$、$Smad4^{+/-}$和$Smad4^{-/-}$3个基因型小鼠各10只,共30只,从小鼠出生时开始观察并记录,一直观察到出生后2个月。观察内容有:有无步态不稳、头左右晃动、躯干卷曲、肢体外展、强迫环行运动(转圈)、过度活跃、四肢无力等平衡异常表现。

1.3.2 空间姿势反射 选用2月龄$Smad4^{+/+}$、$Smad4^{+/-}$和$Smad4^{-/-}$3个基因型小鼠各10只,共30只。在暗室内将小鼠置于50cm高处,呈四脚向上的仰卧位,使其自由降落于松软平面,四肢着地为正常,记录为阴性;体侧着地或背部着地为异常,记录为阳性。每只小鼠实验5次,计算平均阳性率。

1.3.3 游泳实验 选用2月龄$Smad4^{+/+}$、$Smad4^{+/-}$和$Smad4^{-/-}$3个基因型小鼠各10只,共30只。游泳实验采用的装置为自制的长80 cm,宽50 cm的长方形塑胶水箱,加室温水至水深35 cm,水面距水箱上表面15 cm。将小鼠置于水箱中央的水面,身体与水箱长轴平行,松手,令其自由游泳,观察其游泳的姿势。头向上并露出水面,姿势平稳地游泳者记为3分,头向上并部分露出水面,姿势不太平稳者记为2分,头不能向上或头不能露出水面者记为0分,此时必须马上将其从水中救出,避免溺死。测试交替进行,防止过度劳累影响测试结果。每只小鼠测试3次,每次2段,每段1 min,每次中间休息10 min,取平均值。测试在室温、暗室中进行。

1.3.4 前庭眼反射(vestibular ocular reflex,VOR)检测 前庭眼反射的检测通过转椅旋转实验完成。选用2月龄$Smad4^{+/+}$、$Smad4^{+/-}$和$Smad4^{-/-}$3个基因型小鼠各6只,共18只。所用仪器为VTS-Ⅲ型人体前庭功能检查系统(北京和平医疗设备厂制造),用配套的眼震电图记录仪记录并分析诱发出的眼震情况。清醒小鼠用自制固定盒固定于转椅中央,小鼠头部位于转轴中心,头低30°,使双侧水平半规管与地面平行。自制针式电极分别固定在颅顶和两眼外眦部,颅顶为参考电极,两眼外眦为记录电极。常规定标后,进行正弦谐波转椅摆动实验。摆动刺激参数为峰速60 d/s,刺激频率为0.08 Hz和0.16 Hz 2个频率。测试在暗室中进行,为了避免小鼠睡着,不定时地间歇性地开灯并用掌声刺激。

1.3.5 短声刺激前庭诱发肌源性电位(vestibular evoked myogenic potential,VEMP) 选用2月龄$Smad4^{+/+}$、$Smad4^{+/-}$和$Smad4^{-/-}$3个基因型小鼠各5只,共15只。方法与Matsuzaki[4]的相同。腹腔注射速眠新全麻,麻醉满意后,腹侧入路暴露椎前颈长肌,将银球电极置于该肌表面第3颈椎水平,针式参考电极置于胸骨前肌肉内。用IHS诱发电位仪给声,刺激声用click,带通滤波为100~3 000 Hz,叠加次数200次,扫描时间24 ms,ER 3A插入式耳机。反映球囊功能。

1.4 统计学方法

用SPSS 18.0统计软件进行计算。组间比较采用F检验(方差分析)。

2 结果

2.1 一般行为观察、空间姿势反射及游泳实验

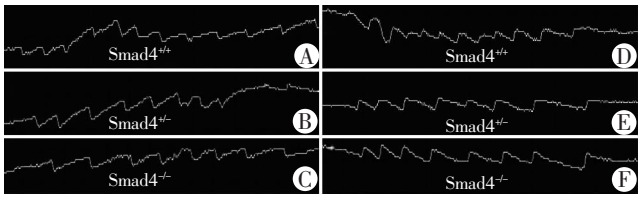
野生型($Smad4^{+/+}$)、Smad4条件基因敲除杂合子($Smad4^{+/-}$)及Smad4条件基因敲除纯合子($Smad4^{-/-}$)3个基因型小鼠在从出生到2月龄的整个生长过程中,均始终未见到有步态不稳、头左右晃动、躯干卷曲、肢体外展、强迫环行运动(转圈)、过度活跃、四肢无力等前庭功能异常的表现;所有2月龄小鼠的空间姿势反射均为阴性,即均是四肢着地的正常状态,没有1只小鼠出现体侧着地或背部着地的阳性情况;所有2月龄小鼠在游泳实验中得分均为3分,表现相当稳定。

2.2 前庭眼反射检测结果

正弦谐波转椅摆动诱发前庭眼反射,通过眼震电图曲线反映。由眼震电图曲线计算得出眼震频率、眼震慢相速度、增益和相位4个方面的数据结果,见表1。经方差分析发现,在3个基因型小鼠之间,各个指标均无差异($P>0.05$)。眼震电图曲线见图1和图2。

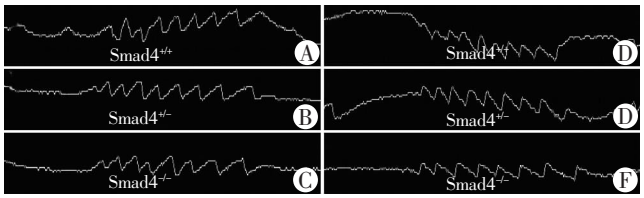
表1 3个基因型组小鼠之间前庭眼反射结果的比较($n=6, \bar{x}\pm s$)

基因型	0.08 Hz				0.16 Hz			
	眼震频率	慢相速度	增益	相位	眼震频率	慢相速度	增益	相位
$Smad4^{+/+}$	2.56±0.23	25.30±3.31	0.56±0.08	1.98±1.74	2.53±0.29	34.03±7.12	0.66±0.04	21.56±4.76
$Smad4^{+/-}$	2.58±0.14	23.89±4.69	0.54±0.04	2.19±1.92	2.45±0.27	29.04±10.05	0.66±0.07	21.57±4.82
$Smad4^{-/-}$	2.46±0.21	21.83±2.42	0.54±0.08	2.14±2.07	2.32±0.20	31.48±9.64	0.64±0.04	21.32±6.88



A～C:左向眼震;D～F:右向眼震

图 1　0.08 Hz 正弦谐波转椅摆动诱发眼震电图典型曲线



A～C:左向眼震;D～F:右向眼震

图 2　0.16 Hz 正弦谐波转椅摆动诱发眼震电图典型曲线

2.3　短声刺激前庭诱发肌源性电位

短声刺激前庭诱发肌源性电位发现,Smad4$^{+/+}$小鼠和Smad4$^{+/-}$小鼠的反应阈和潜伏期均无差异($P>0.05$),Smad4$^{-/-}$小鼠的反应阈明显提高($P<0.01$),潜伏期与Smad4$^{+/+}$小鼠和Smad4$^{+/-}$小鼠没有差异($P>0.05$),见表 2。短声刺激前庭诱发肌源性电位典型曲线见图 3。

表 2　3 个基因型组小鼠短声刺激前庭诱发肌源性电位结果比较($\bar{x}\pm s$)

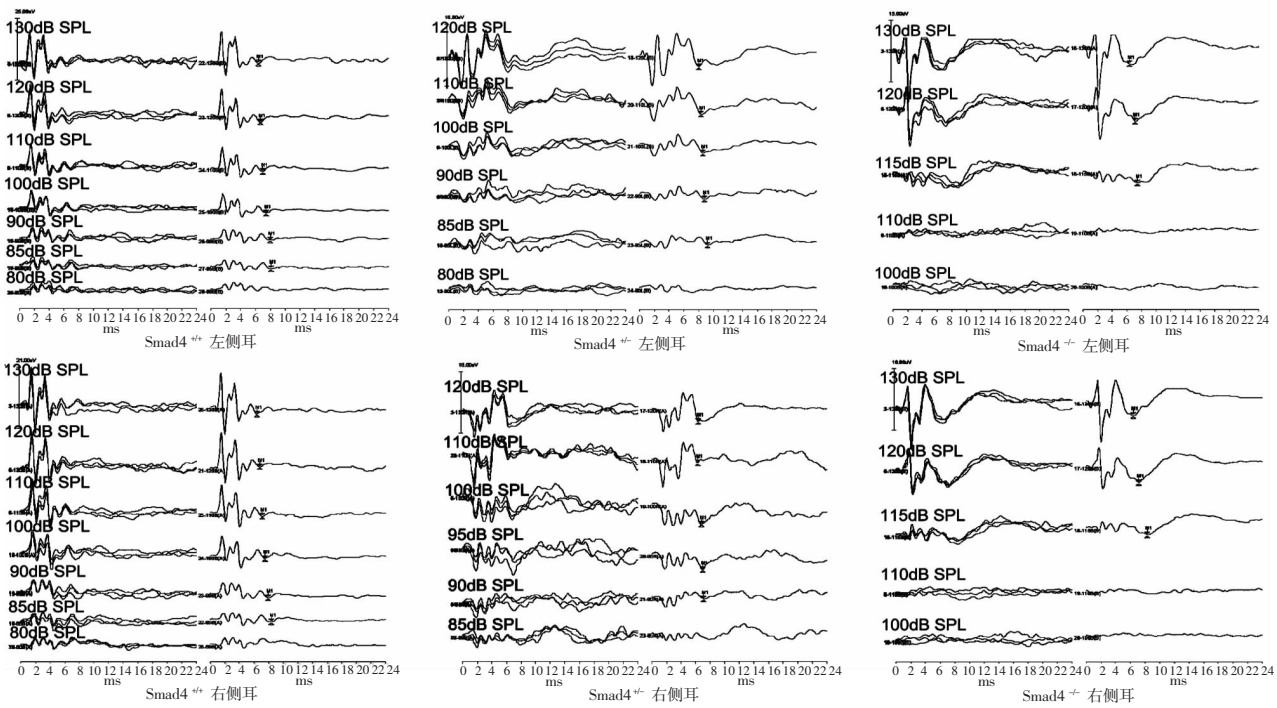
基因型	n	阈值(dB)	阈值点潜伏期(ms)
Smad4$^{+/+}$	10	90.00±4.08[a]	7.39±0.52
Smad4$^{+/-}$	10	92.00±4.08[a]	7.39±0.48
Smad4$^{-/-}$	10	118.00±4.88	7.82±0.32

a:$P<0.01$,与纯合子(Smad4$^{-/-}$)比较

3　讨论

动物前庭功能的检测比较困难,有 3 类检测方法:行为、步态、空间姿势反射和游泳实验等全身的综合表现;前庭眼反射;前庭电位。行为、步态、空间姿势反射和游泳实验等反映前庭综合功能。由于小鼠个体小,生命力脆弱,实验过程中极易死亡,所以有较多文献采用这种方法来评价实验动物的前庭功能,尤其在基因变异后对小鼠前庭发育影响的研究中应用广泛[5-9]。在我们的实验中,没有发现任何小鼠出现行为、步态、空间姿势反射和游泳实验等这类前庭综合功能的障碍。尽管实验中尽可能地将视觉和本体感受器的影响降到最低但并不能完全消除,而且还受到肌张力自身因素的影响,所以其结论受到一定限制。

国外设计制造出专门用于小动物前庭功能检测的实验装置,可以予以精确前庭刺激并记录眼震,从而精确反映小动物前庭功能[10-13],遗憾的是我们没有此类装置。尝试做冰水实验但未能成功记录到眼震。利用人体前庭功能检查系统(转椅)对小鼠进行前庭眼反射的检测,可以在一定程度上反映其前庭半规管功能,设置的体位反映水平半规管功能。本实验前庭眼反射的结果提示 3 个基因型的小鼠均能诱出眼震且相互之间没有差别,说明纯合子小鼠的前庭功能没有完全消失,至少其水平半规管功能是健全的。这个结果与前面的行为、步态、空间姿势反射和游泳实验等前庭综合功能检测结果是一致的。



每幅图中,左侧为 3 次重复,右侧为 3 次叠加

图 3　短声刺激前庭诱发肌源性电位典型曲线

前庭电位的记录是反映前庭功能比较好的方法，目前国内多使用短声刺激前庭诱发的肌源性电位记录。在动物有3种相似的检查方法：颈髓膜电位、清醒状态下的颈部肌源性电位以及麻醉状态下的颈部肌源性电位的记录，均能较好地反映球囊功能[4,14-15]。本研究采用Matsuzaki[4]的方法，记录麻醉状态下的颈部肌源性电位，发现该电位的潜伏期在3个基因型组间无差异，但与野生型（$Smad4^{+/+}$）和杂合子（$Smad4^{+/-}$）相比，纯合子（$Smad4^{-/-}$）小鼠产生该电位的阈值明显增加。从进化学的观点看，低等动物如鱼没有耳蜗，通常由球囊起听觉器官的作用，而在哺乳动物前庭感觉器官如球囊也能感受声音，尽管这部分听力可能没有实质性意义[16-18]。比球囊发育更晚的耳蜗的声音感受能力明显下降，在一定程度上说明$Smad4^{-/-}$小鼠该电位产生的阈值增加与前庭毛细胞感受声音的敏感程度降低有关。

总体上看，软骨组织Smad4条件基因敲除对前庭已退化的感受声音的功能有一定的影响，但对小鼠其他前庭功能的影响不大。因为Smad4基因本身对于TGF-β超家族成员的信号转导虽然重要，但其信号转导通路不是唯一的，TGF-β超家族成员尚可通过非Smads信号通路途径转导信号，譬如MAPK（mitogen-activated protein kinase）、PI3K（磷脂酰肌醇激酶3）[19-20]。在正常情况下的前庭里，这些非Smads信号通路途径只起次要的补充作用，当Smads途径被切断了以后，可能它们可以迅速增加以代偿信号的转导，从而尽可能小地影响前庭的发育。另外，我们构建的条件基因敲除小鼠是在胚胎发育过程中，间充质浓聚开始形成软骨时敲除软骨组织里的Smad4，它会对软骨迷路、骨迷路的形成有影响，但对前庭感觉上皮的形成、分化的影响作用是有限的，最大可能是改变感觉上皮的正常位置，部分影响其功能。半规管功能基本正常而部分球囊功能有障碍，球囊的形成晚于半规管，球囊功能中退化的听感觉发育就更晚，推测Smad4可能在前庭功能发育的后期作用更明显。

参考文献：

[1] 卢云云，杨仕明，郭维维，等. Smad4基因敲除对小鼠听力和前庭功能的影响[J]. 听力学及言语疾病杂志，2005，13(6)：424-426.

[2] 胡吟燕，杨仕明，卢云，等. Smad4基因缺陷小鼠耳形态学改变的初步研究[J]. 中华耳科杂志，2006，4(3)：172-175.

[3] 侯昭晖，杨仕明，郭维，等. Smad4条件基因敲除小鼠听功能初步研究[J]. 中华耳科杂志，2006，4(3)：176-180.

[4] Matsuzaki M, Murofushi T. Disappearance of click-evoked potentials on the neck of the guinea pig by pharmacological and surgical destruction of the peripheral vestibular afferent system[J]. Hear Res, 2003, 184(1/2): 11-15.

[5] Minasyan A, Keisala T, Zou J, *et al*. Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009, 114(3/5): 161-166.

[6] Loscher W. Abnormal circling behavior in rat mutants and its relevance to model specific brain dysfunctions[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2010, 34(1): 31-49.

[7] Lv K, Huang H, Lu Y, *et al*. Circling behavior developed in Dmp1 null mice is due to bone defects in the vestibular apparatus[J]. Int J Biol Sci, 2010, 6(6): 537-545.

[8] Jones S M, Jones T A, Johnson K R, *et al*. A comparison of vestibular and auditory phenotypes in inbred mouse strains[J]. Brain Res, 2006, 1091(1): 40-46.

[9] Khan H A, Alhomida A S, Arif I A. Neurovestibular toxicities of acrylonitrile and iminodipropionitrile in rats: a comparative evaluation of putative mechanisms and target sites[J]. Toxicol Sci, 2009, 109(1): 124-131.

[10] Matsumoto Y, Katayama K, Okamoto T, *et al*. Impaired auditory-vestibular functions and behavioral abnormalities of Slitrk6-deficient mice[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16497.

[11] Migliaccio A A, Meierhofer R, Della-Santina C C. Characterization of the 3D angular vestibulo-ocular reflex in C57BL6 mice[J]. Exp Brain Res, 2011, 210(3/4): 489-501.

[12] Cryns K, van-Alphen A M, van-Spaendonck M P, *et al*. Circling behavior in the Ecl mouse is caused by lateral semicircular canal defects[J]. J Comp Neurol, 2004, 468(4): 587-595.

[13] Harrod C G, Baker J F. The vestibulo ocular reflex (VOR) in otoconia deficient head tilt (het) mutant mice versus wild type C57BL/6 mice[J]. Brain Res, 2003, 972(1/2): 75-83.

[14] 吴子明，郭维维，张素珍，等. 大鼠颈髓膜表面短声诱发电位及起源[J]. 听力学及言语疾病杂志，2004，12(4)：244-246.

[15] Yang T H, Young Y H. Click-evoked myogenic potentials recorded on alert guinea pigs[J]. Hear Res, 2005, 205(1/2): 277-283.

[16] Eleftheriadou A, Koudounarakis E. Vestibular-evoked myogenic potentials eliciting: an overview[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2011, 268(3): 331-339.

[17] Mudduwa R, Kara N, Whelan D, *et al*. Vestibular evoked myogenic potentials: review[J]. J Laryngol Otol, 2010, 124(10): 1043-1050.

[18] Curthoys I S. A critical review of the neurophysiological evidence underlying clinical vestibular testing using sound, vibration and galvanic stimuli[J]. Clin Neurophysiol, 2010, 121(2): 132-144.

[19] 唐静，戴立里，闵琳琳，等. 肝纤维化中丹参素对$TGF\beta_1$/Smads/ERK信号通路的影响及其相互关系[J]. 第三军医大学学报，2011，33(11)：1159-1164.

[20] Lan H Y, Chung A C. Transforming growth factor-β and Smads[J]. Contrib Nephrol, 2011, 170: 75-82.

（**收稿**：2011-10-24；**修回**：2011-11-16）

（编辑　张　维）