

- 12 Juhn S, Hamaguchi Y, Goycoolea M. Review of round window membrane permeability [J]. Acta Otolaryngol Suppl, 1989, 457: 43-48
- 13 Wareing M, Mhatre AN, Pettis R, *et al.* Cationic liposome mediated transgene expression in the guinea pig cochlea [J]. Hear Res, 1999, 128(1-2): 61-69
- 14 Schuknecht HF. Ablation therapy in the management of meniere's disease [J]. Acta Otolaryngol. Suppl, 1957, 132: 3-42
- 15 Sakata E, Ito Y, Itoh A. Clinical experiences of steroid targeting therapy to inner ear for control of tinnitus [J]. Int Tinnitus, 1997, 3(2):

117-121

- 16 Jackson LE, Silverstein H. Chemical perfusion of the inner ear [J]. Otolaryngol Clin North Am, 2002, 35(3): 639-653
- 17 Hong SM, Park CH, Lee JH. Hearing outcomes of daily intratympanic dexamethasone alone as a primary treatment modality for ISSHL [J]. Otolaryngol Head Neck Surg. 2009; 141(5): 579-583

(收稿: 2012-06-13)

(修回: 2012-07-05)

维甲酸在内耳发育中的作用及其机制

管 明 徐娅苹

感音神经性耳聋患者在临床上多见, 约占总人口的 10%。主要是因为衰老、噪声、耳毒性药物、外伤、感染、肿瘤、遗传、免疫等体内外因素所致, 且哺乳动物耳蜗毛细胞破坏后再生能力有限, 常引起不可逆性的听力下降, 治疗困难。随着内耳发育机制研究的深入和干细胞组织工程技术的逐渐成熟, 科学家们发现许多因子, 如 EGF、FGF、TGF- α 、甲状腺素等在内耳毛细胞、支持细胞的分化、成熟、再生中起作用, 试图通过加入这些活性因子促进毛细胞再生, 或诱导干细胞分化为毛细胞来治疗感音神经性耳聋。维甲酸(RA)作为维生素 A 的活性衍生物, 在许多器官的发育中必不可少。同样, RA 在胚胎期内耳发育和出生后内耳功能维持中起关键作用。本文就维甲酸合成酶、维甲酸分解酶, 维甲酸受体在内耳中的特异性表达及维甲酸在内耳发育中的作用及其机制做综述。

一、维甲酸的代谢及维甲酸合成酶和分解酶在内耳的分布

1. 维甲酸的代谢: 在细胞内, 维生素 A 与维生素 A 结合蛋白(CRBP)紧密结合后, 首先, 在酒精脱氢酶家族(ADH 家族)的作用下, 维生素 A 氧化成视黄醛; 接着, 视黄醛在视黄醛脱氢酶(RALDHs, 又称 RA 合成酶, 包括 RALDH1、RALDH2、RALDH₃、RALDH4)的作用下, 视黄醛氧化成全反式维甲酸(ATRA)和 9-cis 维甲酸(9-cisRA)^[1]。而在细胞色素 P450 超家族成员 CYP26(又称 RA 分解酶: 包括 CYP26A1、CYP26B1、CYP26C1)的作用下, RA 被代谢分解。RA

在内耳的特定时间、特定部位的表达是通过 RALDHs 和 CYP26 来调控的, 所以了解 RALDHs 和 CYP26 在内耳的表达有助于我们理解 RA 在内耳发育过程中的作用。

2. RA 合成酶在内耳的表达: RALDH1、RALDH2、RALDH3 存在于胚胎第 9.5~10 天(E9.5~10)的听泡中。在 E10.5, RALDH1、2、3 表达局限于听泡上皮。其中 RALDH1 表达范围最广, 表达在内淋巴管原基和听泡上皮腹外侧; RALDH2 仅表达于听泡上皮侧面; RALDH3 表达于听泡上皮腹侧和中间区。在所有 RALDH 中, RALDH2 在此期表达量最高。在 E12.5, RALDH1、2、3 存在于将发育为前庭、耳蜗上皮的听泡上皮区, 另外 RALDH1、2 还存在于内淋巴管上皮中。在 E14.5, RALDH1 存在于半规管上皮、内淋巴管、壶腹嵴; RALDH2 存在于前庭邻近壶腹嵴的上皮区及耳蜗非感觉上皮区。在 E18.5, RALDH1 局限于前庭球囊、椭圆囊和嵴的一些区域及耳蜗柯替氏器。RALDH2 局限于耳蜗血管纹、前庭膜及前庭邻近壶腹嵴的上皮区。而在 E14.5、E18.5, RALDH3 均表达于半规管、壶腹嵴、球囊、椭圆囊的感觉上皮区及耳蜗螺旋神经节^[2]。

3. RA 分解酶在内耳的表达: 在 E9.5, CYP26A1 已存在于听泡上皮侧面和腹侧, 及其周围间质。在 E10.5, CYP26A1 局限于听泡上皮的腹侧, 但在周围间质腹侧、中间区、侧面表达丰富; CYP26B1 表达局限于听泡上皮侧面和中间区; CYP26C1 存在于听泡上皮腹侧和间质区。在 E12.5, CYP26A1 表达在听泡上皮腹侧、侧面, 及围绕后半规管的间质区; CYP26B1 表达在听泡间质的腹侧及围绕水平半规管的间质区,

并存在于将发育为前庭、耳蜗感觉上皮的听泡上皮区。随着胚胎发育, CYP26A1 表达下降, 在 E14.5 局限于耳蜗和球囊, 在 E18.5 未发现有表达。相反, CYP26B1 在 E14.5、E18.5 的耳蜗、前庭感觉上皮有高水平表达, 在出生后开始下降。CYP26C1 在 E10.5 ~ E12.5 的听泡上皮腹侧和邻近间质表达^[3]。

如上所述, 在胚胎发育的不同时期, RA 合成酶 (RALDHs) 和 RA 分解酶 (CYP26) 在内耳的表达部位不同, 从而协调 RA 在内耳的表达, 这是内耳发育所必须的。Frenz 等^[4]研究发现 RA 过量和不足都将导致内耳发育的畸形。

二、维甲酸受体在内耳的分布

维甲酸是通过结合于细胞核内特异性受体, 调节目标基因转录, 发挥作用的, 维甲酸受体 (retinoic acid receptors) 的变异和缺失将引起内耳发育畸形。维甲酸受体属于细胞核受体中类固醇/甲状腺素激素超家族成员, 分为两类: RARs 和 RXRs。RARs 能被全反式维甲酸和 9-cis 维甲酸激活, 而 RXRs 仅能被 9-cis 维甲酸激活。RARs 可分为: RAR α 、RAR β 、RAR γ ; 而 RXRs 包含 RXR α 、RXR β 、RXR γ 。每一种 RARs 又能和任何一种 RXRs 在体内外形成异二聚体。结合了维甲酸的 RARs、RXRs、RARs/RXR α 异二聚体通过 RA 反应元件 (RAREs) 作用于许多目标基因, 转录功能蛋白, 发挥生物活性作用。RA 受体在转导 RA 信号上是必须的, 了解 RA 受体在内耳的表达有助于我们了解 RA 在内耳发育中的作用。

在 E10.5, RAR β 、RAR γ 主要位于将发育成内淋巴管的听泡上皮周围间质细胞上。在 E12.5, RAR α 位于听泡上皮大部分区域和邻近间质区域; RAR β 主要位于听泡上皮中间区和邻近的间质上; RAR γ 局限表达在听泡周围间质上; RXR α 在除了将发育为内淋巴管的听泡上皮没有表达外, 在听泡上皮和周围间质广泛表达; RXR β 在听泡上皮广泛表达, 还表达在周围间质侧面和中间区, 但在腹侧没有表达; RXR γ 局限于听泡上皮的特殊区域。在 E18.5, RAR α 、RAR γ 、RXR α 、RXR β 分布在耳蜗几个区域, 相反 RAR β 、RXR γ 局限于蜗轴和基膜。

如上所述, 维甲酸受体在胚胎内耳的表达部位是特殊的, 同样在胚胎内耳的发育中起着不同的作用。Romand 等^[2]提出听泡中央部位的感觉上皮 RA 信号的传导主要依靠 RAR α 和 3 种 RXR, 其最终发育形成耳蜗和球囊, 而 RAR γ 和 RXR α 主要在软骨性耳囊 (otic capsule) 成形过程中起转导信号的作用。

三、维甲酸在软骨性耳囊发育中的作用

1977 年, Lim 首次提出 RA 在软骨性耳囊中的作用, 接着 RA 在软骨性耳囊发育中的作用和作用途径得到了进一步的阐述。1996 年, Frenz 报道在胚胎发育的特殊时期, 暴露于过多的外界 ATRA 下会使软骨性耳囊畸形发育。1998 年, Underhill 和 Weston 阐述 RARS 基因不适当的表达将抑制软骨性耳囊发育。2002 年, Romand 等^[2]更加详细的阐述了 RA 在软骨性耳囊发育中的作用, 并发现 RAR α 和 RAR γ 是 RA 调节内耳软骨性耳囊发育的受体。因为 RAR α 、RAR β 、RAR γ 基因单独缺失突变和 RAR α /RAR β 、RAR β /RAR γ 基因无效突变, 并不产生内耳畸变, 但 RAR α /RAR γ 基因无效突变, 将产生严重的内耳畸变。主要表现在: ①到胚胎第 10.5 天, 听泡的大小只有正常的一半; ②内淋巴管缺失; ③到 E14, 半规管发育停止。

RA 在软骨性耳囊发育中的作用途径: 软骨性耳囊发育的早期, 两条信号起了重要作用。①听泡上皮与周围间质之间的相互作用。La Mantia 等^[5]阐述在听泡发育的早期, 间质和上皮之间的相互作用包含多条途径, 而 RA 是上皮和间质之间相互作用的途径之一; ②菱脑神经组织与听泡外胚层之间的作用。Mc-caffery 等^[6]报道菱脑神经组织和听泡外胚层之间的相互作用包含多种因子, 而 RA 是其中的一种。如上所述, RA 在软骨性耳囊发育的两条途径中都发挥了重要作用。

四、维甲酸在耳蜗毛细胞分化成熟中的作用

1. 维甲酸在毛细胞分化和再生中的作用: ①在生理条件下, RA 存在于成年哺乳动物前庭上皮、鸟类前庭上皮和耳蜗血管纹上, 而在成年哺乳动物耳蜗上没有发现 RA 的存在; 相应的, 成年哺乳动物前庭上皮和成年鸟类所有上皮均能再生, 而成年哺乳动物耳蜗感觉上皮在无外加诱导条件的作用下不能再生, 说明 RA 可能在耳蜗感觉上皮的发育中起作用; ②在体外培养条件下, 外源性 RA 的加入能促进毛细胞分化和再生。例如将小鸟听泡体外培养, 加入 RA 后, 引起毛细胞分化的提早和毛细胞数量的增加; 新生大鼠耳蜗柯替氏器体外培养中, 加入新霉素破坏耳蜗毛细胞, 再加入 RA 后, 可诱导毛细胞再生。

2. 维甲酸促进毛细胞分化和再生的作用途径: 在 Raz 的实验中, RA 加入到胚胎柯替氏器培养体系中, 诱导产生额外数量的毛细胞和支持细胞, 这些额外数量的毛细胞和支持细胞并不是通过促使原有毛细

胞和支持细胞有丝分裂产生的,所以 RA 的作用不是促进细胞的有丝分裂^[7]。Raz 认为 RA 的作用在于诱导内耳干细胞分化为内耳感觉前体细胞,然后内耳感觉前体细胞在细胞与细胞相互作用机制下发育成毛细胞或支持细胞。

五、维甲酸在内耳发育中所涉及的相关因子

1. HOXA-1 基因:RAR β /RAR γ 基因无效突变引起的发育不全类似于 HOXA-1 基因缺失,将致大部分耳蜗结构如听觉毛细胞、螺旋神经元均缺失。而且 HOXA-1 启动子上拥有维甲酸反应元件(RAREs),RA 调节 HOXA-1RNA 的转录。所以 HOXA-1 基因接受 RA 的调节,对内耳的发育起作用。

2. FGF3 基因:由中胚层和听泡邻近的神经组织分泌的 FGF3 是听泡发育的主要诱导因子,而 RA 和 FGF3 之间关系密切:①在 Phillips 体外培养实验中,RA 诱导形成异位或额外数量听泡的作用,是通过诱导 FGF3 表达增加实现的,且拮抗 FGF3 即阻断外源性 RA 的作用,不形成异位或额外数量听泡;②在小鼠,RALDH2 无效突变将引起 FGF3 表达下降和表达失控;③Wendling 的实验发现 RAR α /RAR β 、RAR α /RAR γ 无效突变的小鼠胚胎和维生素 A 缺乏的大鼠胚胎中,FGF3 异位表达,并出现额外的小听泡;④Liu 的研究结果显示,过量的 RA 将破坏 FGF3 信号通路,致内耳发育畸形^[8-11]。所有这些实验都证实了 FGF3 在 RA 诱导听泡发育过程中起作用。

3. BMP 基因:BMP 基因是 TGF 超家族成员,至今已经发现 14 类 BMP 基因。BMP4 在听泡上皮和临近周围间质中表达,是听泡软骨发育和毛细胞分化的调节因子。BMP4 基因拥有 RA 反应元件,接受 RA 的直接调节,而且 RA 的作用是抑制听泡 BMP4 表达的。

4. Shh 基因:Shh 无效突变,产生内耳,尤其是耳蜗畸变,类似于 RAR α /RAR γ 无效突变引起的内耳畸形。而且 Shh 基因启动子上有 RA 反应元件,所以 Shh 基因接受 RA 的调节,对内耳的发育起作用。

5. TGF- β 基因:TGF 超家族成员之一,包括 TGF- β_1 和 TGF- β_2 。TGF- β 在听泡上皮上表达;Butts 的研究发现:在体外培养中,加入致畸水平的 RA,将使 TGF- β 表达下降,从而抑制软骨发育,影响感觉上皮分化。

6. OTX1 和 OTX2 基因:OTX1 和 OTX2 是 RA 可能的下游作用因子。在听泡中表达,对半规管和耳蜗的形成起作用。在鼠胚胎期内耳中,OTX2 的表达对

RA 的浓度高度敏感。

7. 其他:McCaffery 等^[6]报道一些生长因子同样受 RA 调节,包括 NT-3、BDNF。它们在听泡中表达,是位听神经节神经元存活所必需的。

综上所述,维甲酸合成酶、维甲酸分解酶、维甲酸受体、维甲酸在内耳有着特异性协调表达,维甲酸在内耳听泡软骨和内耳感觉上皮细胞分化中起作用,是听泡形成和内耳感觉上皮细胞分化的重要条件之一。尽管我们例举了在耳发育中与维甲酸有关的许多因子,但是究竟是哪些因子在其中起着最为重要的作用,以及他们相互之间关系还有待进一步阐明。

参考文献

- Lin M, Zhang M, Abraham M, *et al.* Mouse RALDH4: molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells[J]. J Biol Chem, 2003, 27(11): 9856-9861
- Romand R, Hashino E, Dolle' P, *et al.* The retinoid acid receptors RAR α and RAR γ are required for inner ear development[J]. Mech Dev, 2002, 119(2): 213-223
- Tahayato A, Dolle' P, Petkovich M. Cyp26C1 encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development[J]. Gene Expr Patterns, 2003, 3(4): 449-454
- Frenz DA, Liu W, Cvekl A, *et al.* Retinoid signaling in inner ear development: a "Goldilocks" phenomenon[J]. Am J Med Genet A, 2010, 152A(12): 2947-2961
- La Mantia AS, Bhasin N, Rhodes K, *et al.* Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation[J]. Neuron, 2000, 28(2): 411-425
- McCaffery P, Drager UC. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(3): 233-249
- Raz Y, Kelley MW. Retinoic acid signaling is necessary for the development of the organ of Corti[J]. Dev Biol, 1999, 213(1): 180-193
- Hatch EP, Noyes CA, Wang X, *et al.* Fgf3 is required for dorsal patterning and morphogenesis of the inner ear epithelium[J]. Development, 2007, 134(20): 3615-3625
- Phillips BT, Bolding K, Riley BB. Zebrafish fgf3 and fgf8 encode redundant functions required for otic placode induction[J]. Dev Biol, 2001, 235(2): 351-365
- Wendling O, Ghyselink NB, Chambon P, *et al.* Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning[J]. Development, 2001, 128(11): 2031-2038
- Liu W, Levi G, Shanske A, *et al.* Retinoic acid-induced inner ear teratogenesis caused by defective Fgf3/Fgf10-dependent Dlx5 signaling[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2008, 83(2): 134-144

(收稿:2012-03-22)

(修回:2012-04-17)