

LLY-283 在顺铂诱导的内耳毛细胞损伤中的保护作用研究

张悦¹, 韩京宏², 聂国辉^{1*}

(1. 南华大学衡阳医学院 深圳市第二人民医院研究生协作培养基地, 中国湖南 衡阳 421001; 2. 深圳市第二人民医院, 中国广东 深圳 518035)

摘要: 为了探究蛋白精氨酸甲基转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 选择性抑制剂 LLY-283 对经顺铂诱导的内耳毛细胞损伤作用的影响, 本研究首先建立顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞损伤模型, 确定合适损伤浓度后, 设置对照组、顺铂损伤组及 LLY-283 预处理实验组(给予 40~140 $\mu\text{mol/L}$ 梯度浓度的 LLY-283 预处理 2 h 后, 再加入顺铂损伤 24 h), 通过 CCK-8 实验检测各组细胞存活率, 并采用流式细胞术观察凋亡情况。随后, 建立新生鼠基底膜体外培养模型和斑马鱼模型, 进一步验证 LLY-283 在顺铂诱导的毛细胞损伤中的保护作用。结果显示, 与顺铂损伤组相比, LLY-283 可显著降低顺铂的细胞毒性, 抑制顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞凋亡, 增加 HEI-OC1 细胞的存活率; 同时, LLY-283 能够降低顺铂诱导的小鼠基底膜毛细胞死亡率, 并减轻顺铂对斑马鱼侧线毛细胞的损伤作用。实验初步表明, LLY-283 可拮抗顺铂的毛细胞毒性并保护听觉毛细胞, 有望成为防治顺铂诱发药物性耳聋的潜在药物。

关键词: 蛋白精氨酸甲基转移酶 5 (PRMT5) 抑制剂; LLY-283; 顺铂; 听觉毛细胞

中图分类号: Q74, R764.43

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)04-0298-07

LLY-283 Antagonizes Cisplatin-induced Damage to Auditory Hair Cells

ZHANG Yue¹, HAN Jinghong², NIE Guohui^{1*}

(1. Graduate Collaborative Training Base of Shenzhen Second People's Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China; 2. Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong, China)

Abstract: To investigate the effect of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) selective inhibitor LLY-283 on cisplatin-induced inner ear hair cell injury, a cisplatin-induced HEI-OC1 cell injury model was first established. After the appropriate injury concentration was determined, the control group, cisplatin injury group and LLY-283 pretreatment group were set up. For the LLY-283 pretreatment group, the cells were pretreated with gradient concentrations of LLY-283 (40~140 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h, and then treated with cisplatin for 24 h. The cell viability was detected by CCK-8 assay, and the apoptosis was observed by flow cytometry. Subsequently, an *in vitro* culture system of neonatal rat basement membrane was established and a zebrafish model was introduced to further verify the protective effect of LLY-283 on cisplatin-induced auditory hair cell damage. The results showed that, compared with the cisplatin injury group, the LLY-283 pretreatment group showed a significant reduction in cytotoxic effects of cisplatin, an increased survival rate of HEI-OC1 cells, and significant inhibition of the apoptosis induced by cisplatin. At the same time, LLY-283 reduced cisplatin-induced mortality of hair cells in the basement membrane of mice and also reduced cisplatin-induced damage to zebrafish lateral line hair cells. The preliminary experiments revealed that LLY-283 could

收稿日期: 2023-03-11; 修回日期: 2023-05-29; 网络首发日期: 2023-07-27

基金项目: 国家自然科学基金重大研究项目(82192865); 国家自然科学基金面上项目(81970875); 国家自然科学基金青年科学基金项目(82000982)

作者简介: 张悦(1995—), 女, 黑龙江双鸭山人, 硕士研究生; * 通信作者: 聂国辉(1963—), 男, 湖南岳阳人, 博士, 教授, 主要从事内耳毛细胞损伤与保护研究, E-mail: nieguohui_szu@163.com.

antagonize the toxicity of cisplatin and protect auditory hair cells, indicating that the PRMT5 inhibitor may be a potential drug for the prevention and treatment of cisplatin-induced hearing loss.

Key words: protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitor; LLY-283; cisplatin; auditory hair cell
(*Life Science Research*, 2023, 27(4): 298-304)

顺铂是临床治疗中的常见化疗药物,对肿瘤患者具有良好的治疗效果^[1],但同时也有着不可忽视的副作用^[2]。其中,顺铂引起的听力损失近年来受到广泛关注^[3-4]。目前,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和中国国家药品监督管理局尚未批准任何治疗药物或方法来预防及治疗化疗药物引起的听力损失。因此,针对顺铂致药物性耳聋的机制研究和内耳保护药物的探索具有重要的临床意义。

现代药理学研究表明,表观遗传调控与内耳发育密切相关^[5-6]。表观遗传调控是指治疗药物通过染色质结构的翻译后修饰来调节基因表达,而不涉及DNA序列的改变。其中,蛋白质的精氨酸甲基化是一类重要的翻译后修饰,通过调节转录和转录后RNA加工,在细胞生长、增殖、凋亡及血管生成等关键阶段发挥着不可或缺的作用^[7]。这种修饰是由蛋白精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferase, PRMT)家族催化的,PRMT家族的异常表达会导致多种疾病^[8]。迄今为止,研究人员已经鉴定出9种人类PRMT,根据精氨酸甲基化催化的类型,其可进一步细分为I型、II型、III型和IV型。PRMT5是主要的II型PRMT,作为关键酶参与基因转录调控和信号转导、DNA损伤后修复和细胞增殖等生物学过程^[9]。同时,PRMT5在体内明显催化多种组蛋白和非组蛋白底物的对称甲基化,并在调节多个细胞过程中发挥重要作用,包括转录、RNA代谢、信号转导、高尔基体体系结构的维护和细胞分化^[9-10]。在细胞核中,PRMT5还可以与SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable)相互作用,催化组蛋白H2A精氨酸3 (H2AR-3me2s)、H3精氨酸8 (H3R8me2s)和H4精氨酸3 (H4R3me2s)底物的对称二甲基化,抑制下游周期调控因子和肿瘤抑制基因的转录^[11-12]。

目前,选择性PRMT5抑制剂LLY-283已被发现可降低头颈部鳞状细胞癌、裸鼠皮下移植瘤的形成或增殖能力^[13]。同时也有团队发现,LLY-283可能通过抑制活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累,激活PI3K/Akt信号通路,来发挥对噪声性听力损失小鼠的治疗作用^[14]。而且,已有研

究初步表明,LLY-283可抑制顺铂诱导的PRMT5表达升高,并在化疗药物造成的听觉细胞损伤中具有保护作用^[15]。不过,现阶段在体证明LLY-283对内耳毛细胞具有保护作用的证据仍然不足。基于此,本文主要利用多种体外模型深入探讨LLY-283在顺铂诱导的内耳毛细胞损伤中的潜在作用,为该药物及其他选择性PRMT5抑制剂的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用的HEI-OC1细胞由上海复旦大学附属耳鼻喉科医院李华伟教授团队赠送,野生型C57BL/6j新生鼠购自珠海百试通生物科技有限公司。所有操作均按照深圳市第二人民医院动物保护与利用机构委员会的指导方针进行。实验使用的Tg(*brn3c*: mGFP)s356t转基因斑马鱼毛细胞带有绿色荧光。根据标准饲养方法(参照*The Zebrafish Book*, <http://www.zfin.org>),斑马鱼置于净水系统中养殖,系统水温及环境温度恒定为(28±0.5)℃,水质酸碱度控制在7.4~7.5,设定14 h/10 h光暗循环,通过自然配对受精得到斑马鱼胚胎。胚胎年龄用受精后天数(days post-fertilization, dpf)标记。

实验使用的试剂主要包括: LLY-283 (纯度99.12%)、顺铂(纯度99.84%) (Selleck公司, 美国); 10% 驴血清、高糖DMEM培养基(Hyclone公司, 美国); 胎牛血清(Gibco公司, 美国); CCK-8试剂(Dojindo公司, 日本); Annexin-V/PI 647试剂盒(四正柏生物科技有限公司); DMEM/F12培养基、N2添加剂、B27添加剂(Thermo Fisher公司, 美国); Cell-Tak细胞组织粘合剂(Corning公司, 美国); rabbit anti-myosin 7a 一抗(Proteus Biosciences公司, 美国); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)荧光染料、488 donkey anti-rabbit 二抗、anti-green fluorescent protein 一抗(Invitrogen公司, 美国)。

1.2 HEI-OC1细胞培养及最佳顺铂损伤浓度确立
HEI-OC1细胞培养于33℃含有10% CO₂的

培养箱内, 培养基为含有 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(不含抗生素)。每两天更换一次培养基, 细胞密度至 80%~90%后传代培养。为确立最适宜的顺铂损伤浓度, 使用不同浓度的顺铂处理 HEI-OC1 细胞 24 h, 其中顺铂浓度梯度分别为 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 HEI-OC1 细胞药物处理

将正常的 HEI-OC1 细胞随机分为 3 组: 对照组、顺铂损伤组及 LLY-283 预处理实验组, 其中 LLY-283 预处理的浓度梯度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 、120 $\mu\text{mol/L}$ 、140 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组在正常生长条件下进行培养; 损伤组在含有 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂的培养基中孵育 24 h; 实验组经 LLY-283 各剂量预处理 2 h 后, 添加 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂继续孵育 24 h。

1.4 CCK-8 检测细胞增殖

将处于对数生长期的 HEI-OC1 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 1.0×10^4 个细胞, 培养液 100 μL , 每组 5 个复孔。各组细胞经对应药物处理后, 置于 33 $^{\circ}\text{C}$ 含 10% CO_2 的培养箱中培养。培养结束后直接加入 10 μL CCK-8 溶液并继续孵育 2 h, 随后测定 450 nm 处对应的吸光度值(A), 计算细胞存活率(R)。依据 CCK-8 试剂盒说明书, 细胞存活率的计算公式为: $R = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.5 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的 HEI-OC1 细胞均匀地接种在 6 孔培养皿中, 每孔接种密度为 $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液 1 mL, 孵育过夜。LLY-283 预处理实验组细胞需在加入 140 $\mu\text{mol/L}$ LLY-283 预处理 2 h 后加入顺铂损伤 24 h, 损伤组细胞加入顺铂损伤 24 h, 对照组细胞不做处理, LLY-283 组即在对照组基础上加入 140 $\mu\text{mol/L}$ LLY-283 预处理 2 h。按照试剂盒说明书, 使用 Annexin-V/PI 647 试剂盒进行细胞凋亡检测, 采用流式细胞术进行分析。

1.6 基底膜顺铂损伤模型建立及药物处理

新生鼠(3 d)头部取材并迅速转移至预冷的 PBS 缓冲液中, 从枕骨大孔处沿颅骨正中剪开颅骨, 取出颞骨, 在解剖显微镜下分离完整基底膜, 将基底膜转移至预先用 Cell-Tak 细胞组织粘合剂处理过的 4 孔培养皿中; 每孔加 100 μL 培养液后, 放入含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 无菌培养箱中进

行贴壁培养。培养液为 DMEM/F12 培养基, 并添加有 N2 (100 \times)、B27 (50 \times)以及 5 mg/mL 氨苄青霉素。将新生鼠基底膜分为对照组、LLY-283 组、顺铂损伤组以及 LLY-283 预处理实验组。为建立小鼠基底膜体外损伤模型, 损伤组小鼠的培养液中加入 30 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂, 损伤 24 h 后用培养液洗去顺铂, 换新鲜培养液继续培养 3 d。LLY-283 预处理实验组的基底膜在含有 140 $\mu\text{mol/L}$ LLY-283 的培养液中预处理 2 h 后, 再加入 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂进行损伤处理。对照组无特殊处理, LLY-283 组即在对照组基础上加入 140 $\mu\text{mol/L}$ LLY-283 预处理 2 h。

1.7 基底膜毛细胞的免疫荧光标记和细胞计数

培养结束后, 将新生鼠基底膜置于 4%多聚甲醛溶液(paraformaldehyde solution, PFA)中, 室温下固定 30 min。固定后的基底膜用 1 \times PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min。基底膜用含有 1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液通透 1 h 后, 继续在含有 10% 驴血清和 1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液中室温封闭 1 h。室温孵育一抗 rabbit anti-myosin 7a (1 : 400) 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 第 2 天, 经 1 \times PBS 缓冲液漂洗 3 次后, 加入二抗 488 donkey anti-rabbit (1 : 400) 和 DAPI 室温孵育 1 h。取出样品并经抗淬灭剂封片后在激光扫描共聚焦显微镜上观察成像, 同时统计基底膜顶、中、底各段中 myosin 7a 特异性标记的毛细胞数目, 以确定各组新生鼠基底膜毛细胞数量, 并进行比较分析。

1.8 斑马鱼顺铂损伤模型建立及药物处理

转基因斑马鱼 Tg(*brn3c*: mGFP)*s356t* 受精 3 d 后, 在荧光显微镜下观察其侧线神经丘毛细胞(即鱼类听觉毛细胞), 细心挑选出绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)呈阳性表达的斑马鱼。另行培养 2 d 后将斑马鱼随机等份分为对照组、LLY-283 组、顺铂损伤组和 LLY-283 预处理实验组, 并对相应组别进行顺铂损伤模型构建。LLY-283 预处理实验组的斑马鱼先在含有 140 $\mu\text{mol/L}$ LLY-283 的饲养鱼水中处理 2 h, 再加入顺铂, 该饲养鱼水的顺铂浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$, 损伤时间为 7 h; 损伤组用同浓度顺铂损伤 7 h; 对照组无需特殊处理; LLY-283 组即在对照组基础上加入 140 $\mu\text{mol/L}$ LLY-283 预处理 2 h。

1.9 斑马鱼侧线毛细胞的免疫荧光标记和细胞计数

斑马鱼经顺铂和/或 LLY-283 药物处理后,

置于 4% PFA 室温固定 2 h; PBS 缓冲液漂洗 3 次后加入含 1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液常温通透 1 h; 重复上述漂洗步骤后加入含 10% 胎牛血清的 PBS 缓冲液常温封闭 1 h。加入一抗 anti-green fluorescent protein (1 : 1 000) 并在 4 °C 下过夜; 次日, 经 PBS 缓冲液润洗 3 次后, 加入二抗 488 donkey anti-rabbit (1 : 1 000) 和 DAPI 常温孵育 1 h。抗淬灭剂封片后, 用 Zeiss 共聚焦显微镜观察成像, 像素设置为 1 024×1 024, 记录各组侧线毛细胞的 GFP+ 细胞数量, 并进行统计分析。

1.10 统计分析

数据结果为平均值±标准误($\bar{x}\pm s$)。对于显著性分析, 细胞增殖实验采用配对 *t* 检验, 其余实验均采用非配对 *t* 检验, $^{###}P<0.001$ 。

2 结果

2.1 不同浓度的顺铂对 HEI-OC1 细胞存活率的影响

为确定最适宜的顺铂损伤浓度, 使用不同浓度的顺铂(0~40 $\mu\text{mol/L}$)处理 HEI-OC1 细胞, 并采用 CCK-8 实验检测细胞存活率。结果显示, 在顺铂浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 、损伤时间为 24 h 的条件下, 细胞存活率为 50%左右(图 1A)。因此, 本研究选择 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂作用 24 h 作为损伤条件, 进行后续实验。

2.2 LLY-283 显著提高 HEI-OC1 细胞存活率

为评估 LLY-283 抵抗顺铂对 HEI-OC1 细胞的损伤作用, 将 HEI-OC1 细胞随机分为对照组、顺铂损伤组及不同浓度 LLY-283 预处理实验组,

采用 CCK-8 实验对各组细胞活力进行检测。实验结果显示, 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 24 h 后细胞存活率明显下降, 而 LLY-283 (40 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 、120 $\mu\text{mol/L}$ 、140 $\mu\text{mol/L}$)预处理细胞 2 h 则可显著减轻顺铂损伤, 且 LLY-283 浓度为 140 $\mu\text{mol/L}$ 时保护效果最显著(图 1B)。

2.3 LLY-283 显著减少顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞凋亡

为探究 LLY-283 对顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞凋亡的影响, 将 HEI-OC1 细胞随机分为对照组、LLY-283 组、顺铂损伤组及 LLY-283 预处理实验组, 采用流式细胞术检测各组 HEI-OC1 细胞凋亡情况。实验中, 膜联蛋白 V (annexin-V) 用来标记凋亡早期细胞磷脂质膜的损伤情况, 碘化丙啶(propidium iodide, PI)用来检测细胞膜的完整性。实验结果显示, 对照组凋亡细胞为 2.72%, 顺铂损伤组凋亡细胞为 53.90%, 而 LLY-283 预处理实验组凋亡细胞则显著减少至 20.31% (图 2), 表明 LLY-283 显著减少了顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞凋亡。

2.4 LLY-283 显著降低顺铂对新生鼠耳蜗基底膜毛细胞的损伤

为探究 LLY-283 对哺乳动物毛细胞的保护作用, 构建了新生鼠基底膜体外培养模型和顺铂损伤模型。结果显示, 经顺铂损伤后新生鼠耳蜗基底膜的顶圈、中圈、底圈毛细胞的数量明显减少; 且顺铂导致毛细胞结构受损。与顺铂损伤组相比, LLY-283 预处理实验组的毛细胞数量明显增多, 细胞排列相对整齐, 毛细胞的形态得到较好

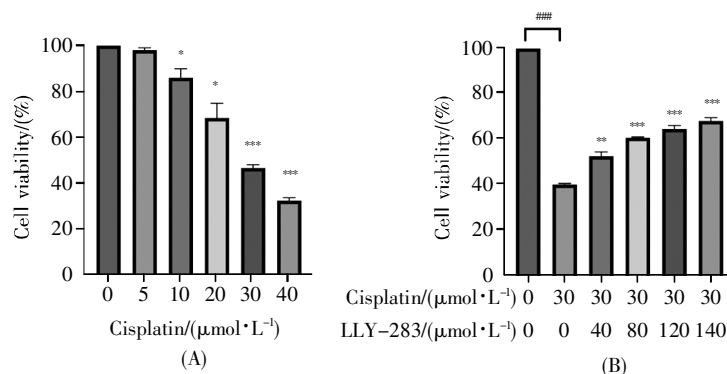


图 1 作用于 HEI-OC1 细胞的顺铂损伤浓度探索及 LLY-283 保护作用研究($n=5$)

(A) 不同浓度顺铂对 HEI-OC1 细胞存活率的影响。*: $P<0.05$, ***: $P<0.001$, 均与对照组比较; (B) 不同浓度 LLY-283 对 HEI-OC1 细胞损伤模型的保护作用。**: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, 均与顺铂损伤组比较。

Fig.1 Damaging effect of cisplatin concentration and protective effect of LLY-283 on HEI-OC1 cells ($n=5$)

(A) Effects of different concentrations of cisplatin on the survival rate of HEI-OC1 cells. *: $P<0.05$, ***: $P<0.001$, compared with the control group; (B) Protective effects of different concentrations of LLY-283 on the injury model of HEI-OC1 cells. **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, compared with the cisplatin damage group.

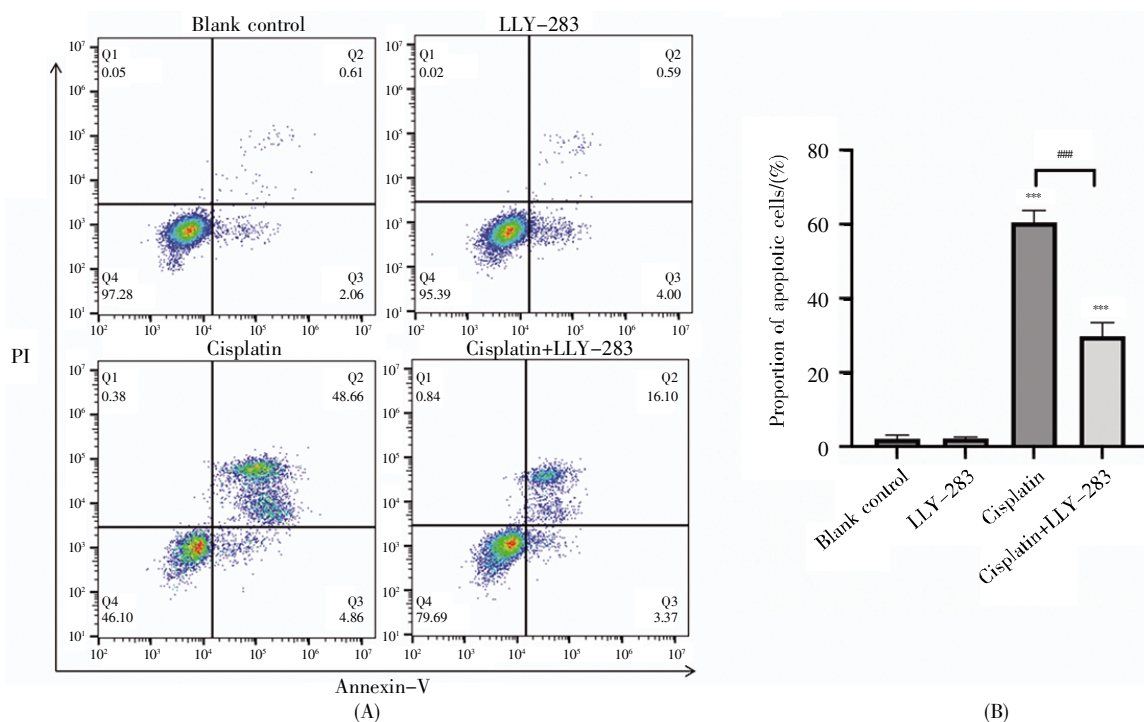


图2 流式细胞术检测 LLY-283 对经顺铂诱导的小鼠 HEI-OC1 细胞损伤模型的作用($n=3$)

(A) LLY-283 干预下的流式细胞术代表性检测图。左下象限为正常细胞, 右下象限为早期凋亡细胞, 左上象限为坏死细胞, 右上象限为晚期凋亡细胞, 散点越多表示对应细胞占比越大; (B) LLY-283 干预下的细胞凋亡情况统计图。***: $P<0.001$, 与对照组比较。

Fig.2 Protective effect of LLY-283 on cisplatin-induced mouse HEI-OC1 cell injury model using flow cytometry ($n=3$)

(A) Representative flow cytometry plots of cells with LLY-283 intervention. The scattered dots in the left lower quadrant, right lower quadrant and two upper quadrants are the state of viable cells, the state of early apoptosis, and the state of necrotic cells and late apoptosis, respectively. The more the scattered dots, the larger the proportion of cells; (B) Apoptotic cell proportion in 140 $\mu\text{mol/L}$ LLY-283 pretreatment group. ***: $P<0.001$, compared with the control group.

保护(图 3)。新生鼠基底膜体外培养实验结果表明, LLY-283 可以抑制顺铂对毛细胞的损伤作用, 对基底膜毛细胞具有显著保护作用。

2.5 LLY-283 显著降低顺铂对斑马鱼侧线神经丘毛细胞的损伤

为进一步探究 LLY-283 对斑马鱼侧线毛细胞的保护作用, 利用转基因斑马鱼 $Tg(brn3c: mGFP)$ s356t 构建了顺铂损伤模型。免疫荧光染色结果显示, 顺铂损伤后斑马鱼侧线毛细胞的数量较对照组显著减少, 且毛细胞结构明显受损, 多数纤毛消失(图 4); 当 LLY-283 干预时, 与顺铂损伤组相比, 斑马鱼侧线毛细胞数量明显增多, 形态也有所改善。上述结果表明, LLY-283 可以抑制顺铂导致的毛细胞损伤, 显著保护斑马鱼侧线神经丘毛细胞。

3 讨论

哺乳动物的内耳是一种高度专业化的感觉器官, 其功能是感知和转导声波, 以及检测空间平衡和方向变化。毛细胞是内耳中重要的功能细胞, 在

正常情况下能将声音产生的机械信号转换为电信号并经听觉神经传递到中枢, 从而产生听觉。噪声、衰老以及耳毒性药物(如铂类抗肿瘤药^[16]、氨基糖苷类抗菌药^[17]、非甾体类抗炎药^[18]等)的应用都可以导致听觉毛细胞的损伤, 这类细胞在损伤后往往无法自发修复或再生^[19], 因此导致不可逆的耳聋。

已有文献证明, 表观遗传机制是调节内耳发育过程的重要途径之一^[20-21]。近期研究表明, PRMT5 抑制剂 LLY-283 可有效防治噪声性听力损失^[14], 但其拮抗耳毒性药物损伤的作用尚未见报道。HEI-OC1 细胞是为数不多的常用于体外研究的小鼠听觉细胞系之一, 可作为筛选耳毒性药物的体外系统, 用于探究细胞保护机制、凋亡途径、自噬和衰老、炎症反应、细胞分化、缺氧的影响、氧化和内质网应激, 以及分子通道和受体的表达等, 具有较好的普适性^[22]。在内耳病理学和药理学研究中, 新生鼠耳蜗基底膜体外培养是广泛应用的方法之一^[23]。此外, 斑马鱼具有典型的内耳结构, 该类结构集中分布在斑马鱼侧线毛细胞上, 且表

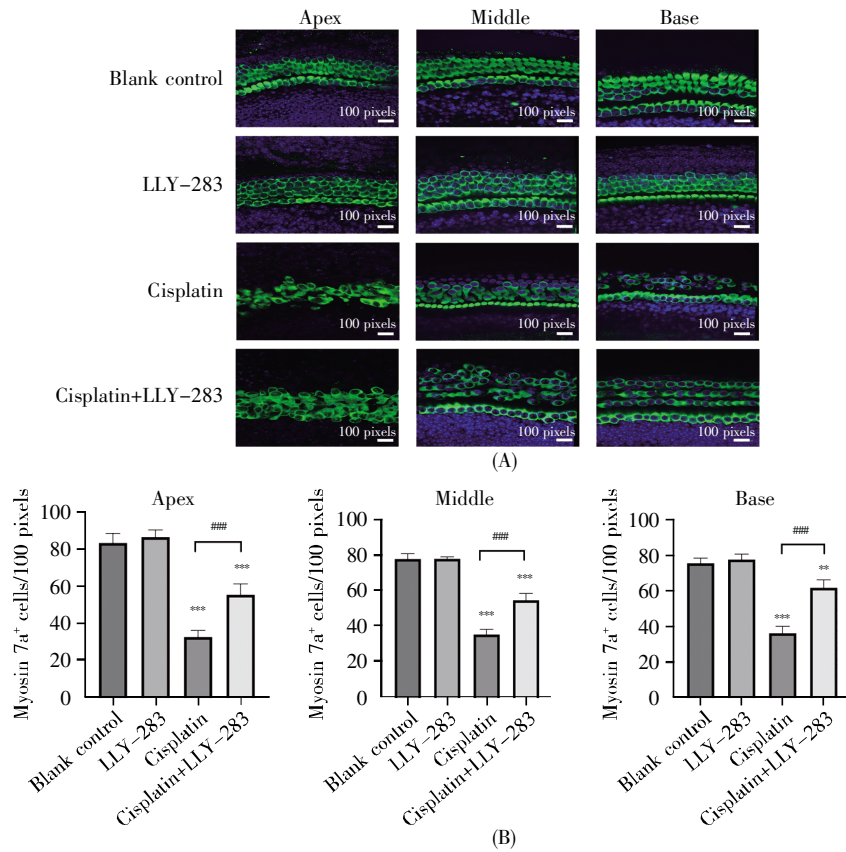


图 3 LLY-283 药物作用于经顺铂诱导的基底膜毛细胞模型的免疫荧光染色情况(n=6)

(A) 基底膜毛细胞模型中各组的免疫荧光观察图; (B) 基底膜毛细胞模型中各组顶圈、中圈、底圈的毛细胞计数情况。*: $P < 0.01$, **: $P < 0.001$, 与对照组比较。

Fig.3 Immunofluorescence staining of basement membrane hair cells in cisplatin-induced cell model treated with LLY-283 (n=6)

(A) Photos of immunofluorescence staining of the basement membrane hair cells in each group; (B) The number of hair cells in the top, middle and bottom rings of each group in the basement membrane hair cell model. *: $P < 0.01$, **: $P < 0.001$, compared with the control group.

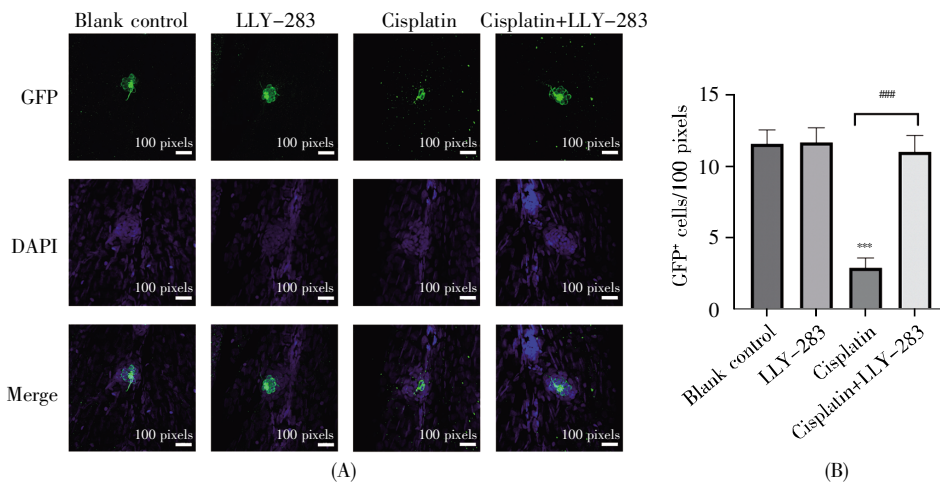


图 4 LLY-283 药物作用于经顺铂诱导的斑马鱼侧线神经丘毛细胞模型的免疫荧光染色情况(n=6)

(A) 斑马鱼侧线神经丘毛细胞模型中各组的免疫荧光染色图; (B) GFP⁺细胞数量的统计分析结果。*: $P < 0.001$, 与对照组比较。

Fig.4 Immunofluorescence staining of cisplatin-induced zebrafish lateral line neuromast hair cells model treated with LLY-283 (n=6)

(A) Immunofluorescence staining plots of the zebrafish lateral line neuromast hair cell in each group; (B) Number of GFP⁺ cells. **: $P < 0.001$, compared with the control group.

现出与哺乳动物极其相似的功能及形态,是一种理想的研究潜在毛细胞保护的模型^[24-25]。基于此,本研究选用 HEI-OC1 细胞、新生鼠耳蜗基底膜及斑马鱼来验证抑制剂 LLY-283 拮抗耳毒性药物致听力损伤的作用。

在 HEI-OC1 细胞模型中,本研究通过 CCK-8 和流式细胞凋亡实验发现, LLY-283 对顺铂诱导的细胞毒性具有拮抗作用,可显著提高细胞存活率(图 1),减少细胞凋亡(图 2)。新生鼠基底膜体外培养模型的验证结果显示, LLY-283 对哺乳动物的听觉毛细胞也具有保护作用(图 3)。另外,本研究还开展了斑马鱼体内验证实验,选用转基因斑马鱼 Tg(*brn3c*: mGFP)*s356t* 模型,其侧线毛细胞表达绿色荧光蛋白,研究者可在共聚焦显微镜下观察并计数侧线毛细胞数量。斑马鱼体内验证结果显示, LLY-283 对顺铂引起的细胞毒性确实具有拮抗作用, LLY-283 可显著保护斑马鱼侧线毛细胞(图 4)。需要指出的是,用于肿瘤治疗的顺铂通常为全身给药,而小分子药物 LLY-283 则为内耳局部给药,几乎不影响顺铂对肿瘤的杀伤作用。综上可知,本文通过构建多种模型对 LLY-283 拮抗顺铂耳毒性进行了全面验证,相关结果证实 PRMT5 抑制剂 LLY-283 可作为一种潜在的听觉毛细胞保护药物,有效防治顺铂导致的药物性听力损失。

参考文献(References):

- [1] ROTTENBERG S, DISLER C, PEREGO P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 21(1): 37-50.
- [2] MARTINHO N, SANTOS T C B, FLORINDO H F, *et al.* Cisplatin-membrane interactions and their influence on platinum complexes activity and toxicity[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1898.
- [3] KROS C J, STEYGER P S. Aminoglycoside- and cisplatin-induced ototoxicity: mechanisms and otoprotective strategies[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2019, 9(11): a033548.
- [4] VAN AS J W, VAN DEN BERG H, VAN DALEN E C. Platinum-induced hearing loss after treatment for childhood cancer[J]. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016, 2016(8): CD010181.
- [5] BALENDRAN V, RITTER K E, MARTIN D M. Epigenetic mechanisms of inner ear development[J]. *Hearing Research*, 2022, 426: 108440.
- [6] LAYMAN W S, ZUO J. Epigenetic regulation in the inner ear and its potential roles in development, protection, and regeneration[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, 8: 446.
- [7] WU Q, SCHAPIRA M, ARROWSMITH C H, *et al.* Protein arginine methylation: from enigmatic functions to therapeutic targeting[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(7): 509-530.
- [8] JARROLD J, DAVIES C C. PRMTs and arginine methylation: cancer's best-kept secret?[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2019, 25(11): 993-1009.
- [9] MOTOLANI A, MARTIN M, SUN M Y, *et al.* The structure and functions of PRMT5 in human diseases[J]. *Life*, 2021, 11(10): 1074.
- [10] WU X, WANG B, LI J X, *et al.* Inhibition of PRMT5 attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation and pyroptosis through suppression of NF- κ B/NLRP3 axis[J]. *Neuroscience Letters*, 2022, 776: 136576.
- [11] CHEN H, LORTON B, GUPTA V, *et al.* A TGF β -PRMT5-MEP50 axis regulates cancer cell invasion through histone H3 and H4 arginine methylation coupled transcriptional activation and repression[J]. *Oncogene*, 2017, 36(3): 373-386.
- [12] MEI M, ZHANG R D, ZHOU Z W, *et al.* PRMT5-mediated H4R3me2 confers cell differentiation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clinical Cancer Research*, 2019, 25(8): 2633-2643.
- [13] 陈祺, 谢非, 季颖颖, 等. LLY-283 靶向 PRMT5 抑制头颈部鳞癌增殖和转移的实验研究[J]. *上海口腔医学*(CHEN Qi, XIE Fei, JI Yingying, *et al.* LLY-283 inhibits proliferation and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma by targeting PRMT5[J]. *Shanghai Journal of Stomatology*), 2022, 31(2): 142-147.
- [14] LIU C, TANG D M, ZHENG Z W, *et al.* A PRMT5 inhibitor protects against noise-induced hearing loss by alleviating ROS accumulation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 243: 113992.
- [15] ZHAO B, ZHANG D D, SUN Y X, *et al.* Explore the effect of LLY-283 on the ototoxicity of auditory cells caused by cisplatin: a bioinformatic analysis based on RNA-seq[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2022, 36(2): e24176.
- [16] 李彦璋, 肖伯安. 儿童顺铂耳毒性研究进展[J]. *儿科药理学杂志*(LI Yanzhang, XIAO Boan. Process of cisplatin ototoxicity in children[J]. *Journal of Pediatric Pharmacy*), 2021, 27(6): 63-66.
- [17] 邵微豪, 韩雨婕, 殷瑜, 等. 基于斑马鱼模型的 4 种氨基糖苷类药物的耳肾毒性比较[J]. *中国医药工业杂志*(SHAO Weihao, HAN Yujie, YIN Yu, *et al.* Comparison of oto- and renal toxicities of four aminoglycosides in zebrafish[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*), 2021, 52(7): 934-939.
- [18] 赵艳, 蒋军, 陈学敏, 等. 耳毒性药物的种类及其对内耳的损伤机制与预防[J]. *西北国防医学杂志*(ZHAO Yan, JIANG Jun, CHEN Xuemin, *et al.* Types of ototoxic drugs and mechanisms of inner ear injury and its prevention[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China*), 2019, 40(11): 718-723.
- [19] WAGNER E L, SHIN J B. Mechanisms of hair cell damage and repair[J]. *Trends in Neurosciences*, 2019, 42(6): 414-424.
- [20] AHMED M, STREIT A. Lsd1 interacts with eMyb to demethylate repressive histone marks and maintain inner ear progenitor identity[J]. *Development*, 2018, 145(4): dev160325.
- [21] PATEL D, SHIMOMURA A, MAJUMDAR S, *et al.* The histone demethylase LSD1 regulates inner ear progenitor differentiation through interactions with Pax2 and the NuRD repressor complex[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191689.
- [22] KALINEC G, THEIN P, PARK C, *et al.* HEI-OC1 cells as a model for investigating drug cytotoxicity[J]. *Hearing Research*, 2016, 335: 105-117.
- [23] 卢顺兰, 何金玲, 莫伟坚, 等. 新生小鼠耳蜗基底膜的取材培养技术[J]. *听力学及言语疾病杂志*(LU Shunlan, HE Jinling, MO Weijian, *et al.* Extraction and culture techniques of neonatal mouse cochlear basement membrane[J]. *Journal of Audiology and Speech Pathology*), 2022, 30(5): 533-536.
- [24] CHIU L L, CUNNINGHAM L L, RAIBLE D W, *et al.* Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity[J]. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 2008, 9(2): 178-190.
- [25] 秦彦筠, 范纯新, 王建. 1-苯基 2-硫脲通过 Tp53 调控自噬活性来保护斑马鱼神经丘毛细胞[JOL]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*(QIN Yanjun, FAN Chunxin, WANG Jian. 1-Phenyl 2-thiourea protects hair cells in zebrafish neuromast by regulating autophagy through Tp53[J]. *Periodical of Ocean University of China*), 2022 (2022-12-09) [2023-02-20]. <https://doi.org/10.16441/j.cnki.hdxh.20220399>.