

# AAV-ie-*Tnfaip8l2* 的包装及其对 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠听觉功能的改善效果

王敏, 刘皓, 姜露涵, 谭立约, 李文, 付小龙

山东第一医科大学(山东省医学科学院)医学科技创新中心, 山东 济南 250117

**摘要:**目的 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是基因治疗的重要载体。本研究旨在包装 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 病毒,系统评估能否以 AAV 为载体实现 *Tnfaip8l2* 蛋白在耳蜗的原位过表达,并探索其在基因敲除小鼠模型内耳组织中的转导效率及对该基因敲除小鼠的听觉功能治疗效果。方法 采用分子克隆技术构建重组表达载体 AAV-ie-*Tnfaip8l2*。将 AAV-ie 衣壳质粒及辅助质粒共转染至 293T 细胞中,进行病毒颗粒的组装和复制。通过超速离心和层析纯化获得高纯度、高滴度的重组腺相关病毒制剂。运用显微注射技术,经圆窗膜对 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 新生鼠进行圆窗注射 AAV-ie-*Tnfaip8l2*。待 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠生长至 35 d 龄(典型听力损失显现期)时,通过听力检测、扫描电镜、免疫荧光等方法评估疗效。结果 高滴度的 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 病毒可成功包装用于耳蜗圆窗注射,以实现 *Tnfaip8l2* 基因在 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠耳蜗原位高效过表达。听力学检测显示,与对照组相比,AAV-ie-*Tnfaip8l2* 回补组小鼠 Click、短纯音(4 k、8 k、12 k、16 k、24 k、32 k)以及 DPOAE 阈值降低( $P < 0.05, n = 3$ );扫描电镜显示外毛细胞静纤毛束排列紊乱现象得到了明显的改善。结论 本研究证实 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 可通过圆窗注射实现 *Tnfaip8l2* 基因在小鼠耳蜗原位的高效表达,部分挽救 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠的听力功能,为老年性耳聋的治疗方案提供新的实验依据。

**关键词:**腺相关病毒;听力损失;TNFAIP8L2;基因功能补偿

**中图分类号:**R764 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-3770(2026)03-0007-09

**引用格式:**王敏,刘皓,姜露涵,等. AAV-ie-*Tnfaip8l2* 的包装及其对 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠听觉功能的改善效果[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2026, 40(3):7-15. WANG Min, LIU Hao, JIANG Luhan, et al. Packaging of AAV-ie-*Tnfaip8l2* and its effect on improving auditory function in *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2026, 40(3):7-15.

## Packaging of AAV-ie-*Tnfaip8l2* and its effect on improving auditory function in *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice

WANG Min, LIU Hao, JIANG Luhan, TAN Liyue, LI Wen, FU Xiaolong

Medical Science and Technology Innovation Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, Shandong, China

**Abstract: Objective** Adeno-associated virus (AAV) serves as a critical vector for gene therapy. This study aimed to package AAV-ie-*Tnfaip8l2* virus, systematically evaluate whether AAV could be used as a vector to achieve in situ overexpression of *Tnfaip8l2* protein in the cochlea, and explore its transduction efficiency in the inner ear tissues of gene knockout mouse models and therapeutic effects on auditory function. **Methods** The recombinant expression vector AAV-ie-*Tnfaip8l2* was constructed using molecular cloning techniques. AAV-ie capsid plasmids and helper plasmids were co-transfected into 293T cells to complete the assembly and replication of viral particles. High-purity, high-titer recombinant AAV preparations were obtained via ultracentrifugation and chromatography purification. Using microinjection technology, AAV-ie-*Tnfaip8l2* was injected into the round window of newborn *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice through the round window membrane. When the *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice reached 35 days of age (the typical period when hearing loss becomes apparent), the therapeutic effects were evaluated using methods such as audiological tests, scanning electron microscopy, and immunofluorescence. **Results** High-titer AAV-ie-*Tnfaip8l2* virus could be successfully packaged for cochlear round window injection, enabling efficient in situ overexpression of the *Tnfaip8l2* in the cochlea of *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice. Audiological function tests showed that compared with the control groups, the click, tone burst (4 k, 8 k, 12 k, 16 k, 24 k, 32 k),

收稿日期:2025-04-16

基金课题:国家自然科学基金项目(82201296)

通信作者:付小龙. E-mail: fuxiaolongshifan@163.com

and DPOAE thresholds in the AAV-*ie-Tnfaip8l2* replenishment group mice were significantly reduced ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). Scanning electron microscopy revealed that the disordered arrangement of stereociliary bundles in outer hair cells was significantly improved.

**Conclusion** This study confirmed that AAV-*ie-Tnfaip8l2* can achieve efficient in situ expression of the *Tnfaip8l2* in the mouse cochlea via round window injection, partially rescuing the hearing function of *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice. These findings provide new experimental evidence for therapeutic strategies for age-related hearing loss.

**Key words:** Adeno-associated virus; Hearing loss; TNFAIP8L2; Gene function compensation

随着基因治疗技术的迭代升级,基于腺相关病毒的递送系统凭借其非致病性、低免疫原性以及高效稳定的基因表达特性,已成为基因治疗领域的首选递送载体<sup>[1]</sup>。在单基因遗传病的临床转化方面,该技术已在遗传性视网膜病变(RPE65 突变相关)、血友病 A (FIX 缺陷) 及脊髓性肌萎缩症等多个重大疾病领域实现治疗突破<sup>[2-3]</sup>。特别值得关注的是,腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的基因治疗在单基因遗传性耳聋的临床研究中展现出里程碑式进展,6 例 OTOF 突变耳聋幼儿临床研究显示,5 名受试者在耳蜗微创给药后 26 周平均 ABR 阈值明显降低<sup>[4]</sup>。单次 AAV-OTOF 治疗,使 OTOF 突变至聋的儿童 Click 阈值恢复至生理范围,并实现成年患者治疗后 9 个月 Click 阈值降低至 40 dB,听力改善至正常交流水平<sup>[5-6]</sup>,说明 AAV 介导的基因治疗在儿童和成人患者中都具有良好效果。

老年性耳聋(age-related hearing loss, ARHL)是一种常见的听觉退行性疾病。75 岁以上人群中患病率约达 50%,呈进行性且不可逆<sup>[7-8]</sup>。其病理机制与线粒体功能障碍及氧化应激介导的耳蜗多结构退化密切相关:血管纹功能异常导致耳蜗内电位降低,外毛细胞电运动能力减弱引发高频听力损失,而神经元退行性病变则是语言辨别障碍的主要原因<sup>[9]</sup>。ARHL 与 mTORC1 通路异常激活存在密切关联。研究表明,衰老小鼠耳蜗中 mTORC1 活性显著升高,而抑制该通路可有效防治 ARHL:雷帕霉素(mTORC1 抑制剂)处理老年小鼠能显著降低听力阈值并减少毛细胞损失,且对年轻小鼠听力无影响,证实 mTORC1 过度激活的特异性致病作用<sup>[10]</sup>。通过降低 mTORC1 联合上调 mTORC2 可以作为治疗老年性耳聋的有效策略<sup>[11]</sup>。然而,至今为止,尚未有药物能够专一地通过靶向 mTORC1 信号通路来抵抗老年性耳聋的发生。作为前期研究的延续,团队通过整合 CRISPR 筛选数据,确定了免疫调节因子 TNFAIP8L 通过双重抑制 RHEB/RAC1 的 GTP 酶活性,维持耳蜗毛细胞 mTORC1 信号稳态,是老年性耳聋的关键驱动因素<sup>[12-13]</sup>。

本研究聚焦于 AAV 的应用,尝试通过分子克

隆的方法将 *Tnfaip8l2* 编码区整合至 AAV 质粒,进而包装、纯化得到高滴度的 AAV-*ie-Tnfaip8l2* ( $\geq 1 \times 10^{13}$  vg/mL) 病毒颗粒,通过乳鼠圆窗注射的方法将病毒注入小鼠耳蜗,并检测病毒的感染效率、初步评估 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠听觉功能的恢复情况以及毛细胞纤毛等亚细胞结构的变化,以探究能否实现 *Tnfaip8l2* 基因在 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠耳蜗原位过表达。结果表明,AAV 介导的基因回补可成功实现耳蜗 *Tnfaip8l2* 的原位过表达,并展现出良好效果,为靶向 *Tnfaip8l2*-mTORC1 信号轴的基因疗法转化研究及临床应用提供参考和可靠数据。

## 1 材料与方

### 1.1 实验材料与设备

*Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠自 2 月龄时表现出自发性多器官炎症,如关节炎、肠炎等<sup>[14]</sup>。本研究中的 *Tnfaip8l2* 基因敲除小鼠(C57BL/6J 品系)购自北京百奥赛图生物科技有限公司,由山东大学基础医学院张利宁教授实验室惠赠;AAV-CAG-EGFP-HA 质粒由东南大学提供;DMEM 高糖培养基购自 gibco;青链霉素、免疫染色固定液、免疫荧光一抗、二抗稀释液购自上海碧云天生物科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 VivaCell;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)购自索莱宝;2×SYBR Green qPCR Mix 购自南京诺唯赞生物技术有限公司;4% 多聚甲醛溶液(paraformaldehyde, PFA)购自 Biosharp;兔源 Myo7a 抗体购自 Proteus Biosciences;Dylight 488 山羊抗兔 IgG 荧光二抗以及 Phalloidin 594 鬼笔环肽标记素购自美国 Abcam 公司。本研究所用动物实验经山东第一医科大学实验动物伦理委员会审核通过(W202406120593)。小鼠测听使用 Tucker-Davis Technologies (TDT) 系统;病毒滴度测定使用赛默飞实时荧光定量 PCR 仪;使用 Bio-Rad 梯度 PCR 仪获取 CDS 序列;使用奥林巴斯倒置荧光显微镜观察细胞及基底膜病毒感染效果。

### 1.2 质粒构建及 AAV-*ie-Tnfaip8l2* 纯化

从成年 WT 小鼠(C57BL/6J 品系)的脾脏和胸

腺组织中提取 RNA,通过逆转录技术将其转化为 cDNA。运用 PCR 程序获取 *Tnfaip8l2* 基因的全长 CDS 序列。选用 BamHI 作为酶切位点对载体实施线性化操作。借助同源重组酶技术,将经过纯化处理的线性载体与 *Tnfaip8l2* 基因的 CDS 区进行连接,并将连接产物导入感受态细胞以完成转化。将转化后的感受态细胞均匀涂布于固体 LB 培养基上,37 °C 过夜培养。第 2 天挑取单克隆菌落,将其置于含有 Amp 的 LB 培养基中,37 °C 摇床扩增培养 16 h。随后,将菌液加入 800 mL 含有 Amp 的 LB 培养基中进一步扩增,16 h 之后进行质粒抽提。把 AAV 重组质粒与 AAV-ie 融合质粒和 AAV-Helper 辅助质粒共同转染至 HEK 293T 细胞中。在转染后的 2~4 d,收集细胞培养基的上清液,以此为原料进行病毒纯化操作,操作步骤如先前研究所示<sup>[15]</sup>。最后运用定量聚合酶链反应对病毒的滴度进行测定,并将其调整至  $1 \times 10^{13}$  vg/mL 正向引物序列为 5'-GTCAGGCAACGTGGCGTGTG - 3';反向引物序列为 5'-GGCGATGAGTTCCGCCGTGGC - 3'。选取空载质粒 AAV-CAG-EGFP-HA 与 AAV-ie、AAV-Helper 共转染,按照相同的流程和方法制备对照病毒 AAV-Control。

### 1.3 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 内耳圆窗注射

目前靶向内耳的给药途径有后半规管注射,椭圆囊注射,圆窗膜注射以及耳蜗造口术<sup>[16]</sup>。本研究选择圆窗膜注射进行 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 递送。对 3 d 龄(P3)的乳鼠进行 2 min 的冰上麻醉处理。随后对乳鼠左耳附近的皮下组织进行钝性分离,拨开肌肉,暴露听泡结构,定位圆窗膜。接着利用玻璃微管吸取 1.5  $\mu$ L 的病毒原液,并将其注入圆窗膜内。完成注射操作后移除玻璃微管,并使用医用胶水对皮肤伤口进行封闭。最后,将小鼠置于加热垫上,将加热垫温度设定为 42 °C,直至其完全恢复清醒状态。

### 1.4 基底膜免疫荧光

小鼠通过颈椎脱位法处死后,迅速取出新鲜的耳蜗组织。在耳蜗顶部进行穿孔,随后使用 1 mL 注射器将 4% PFA 注入鼓阶。完成灌注后,将耳蜗组织置于 4% 的 PFA 中,4 °C 摇床固定过夜,10% EDTA 脱钙 6~8 h 至耳蜗组织完全软化。在显微镜下将基底膜从耳蜗组织中分离出来。使用 PBS 对基底膜漂洗 3 次,每次持续 5 min。接着,将基底膜置于含有 0.3% Triton-X100 的溶液中进行通透处理 20 min。将基底膜转移到含有 10% 山羊血清的溶

液中,在室温下封闭 1 h,随后将基底膜置于兔源 Myo7a 中(1:800)的溶液中,4 °C 孵育过夜。第 2 天,将基底膜从一抗溶液中取出,并使用 PBS 进行漂洗,然后在室温下孵育二抗,二抗稀释比例为 1:400,一抗和二抗均需用 PBS 进行稀释。

### 1.5 听力测试

听力测试的程序如前研究<sup>[17]</sup>,小鼠通过腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉。对于听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR),待小鼠麻醉后,将记录电极置于小鼠头部正中皮下,参考电极插入一侧耳部皮下,而接地电极则插入背部皮下。在电脑端启动 BioSigRZ 软件,产生 click 和短纯音刺激声,并记录下反应波形。刺激声的强度范围设定在 10 dB 至 90 dB 之间,测试从 90 dB 开始,以 5 至 10 dB 的步长逐渐降低,直至达到无波形的最小刺激声强度,该强度即为阈值。

对于畸变产物耳声发射(distortion product otoacoustic emission, DPOAE)测试,将探头插入待测小鼠的外耳道。在 BioSigRZ 软件的控制下,由探头传出  $f_1$  和  $f_2$  的初始刺激音,其中  $f_1$  与  $f_2$  的频率比为 1.25。在 4、8、16、24、32 KHz 频率测试听力阈值,并进行 80 至 20 dB SPL 的强度水平检测,每次降低 10 dB。以能够引出 DPOAE 的最低刺激强度作为阈值。

### 1.6 统计学处理

实验数据均采用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,Click 数据采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析(one-way ANOVA),短纯音数据采用双因素方差分析(two-way ANOVA)。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠表现出进行性的听力损失

基于 TNFAIP8L2 蛋白在免疫系统中的重要作用以及 MTORC1 在老年小鼠耳蜗中过度激活的现象<sup>[18]</sup>,推测 TNFAIP8L2 可能在耳蜗中通过负向调控 MTORC1 发挥功能。为了探究 *Tnfaip8l2* 基因缺失对小鼠听力的影响,对不同年龄的 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠进行 ABR 测试。实验结果如图 1 A 所示,21 d 龄的 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠已经出现轻微的听力异常,而到 35 d 龄时则发展为全频段的听力损失(图 1 B),并伴有中回三排外毛细胞纤毛排列紊乱的表型(图 1 C)。

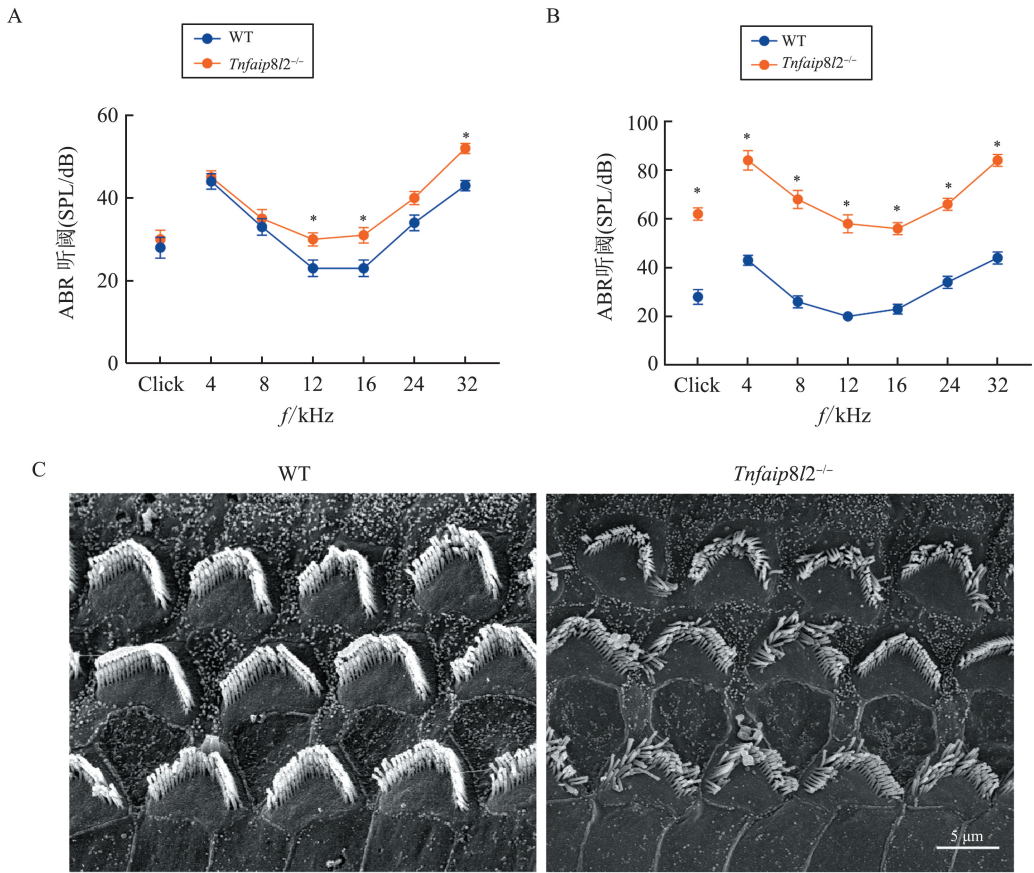
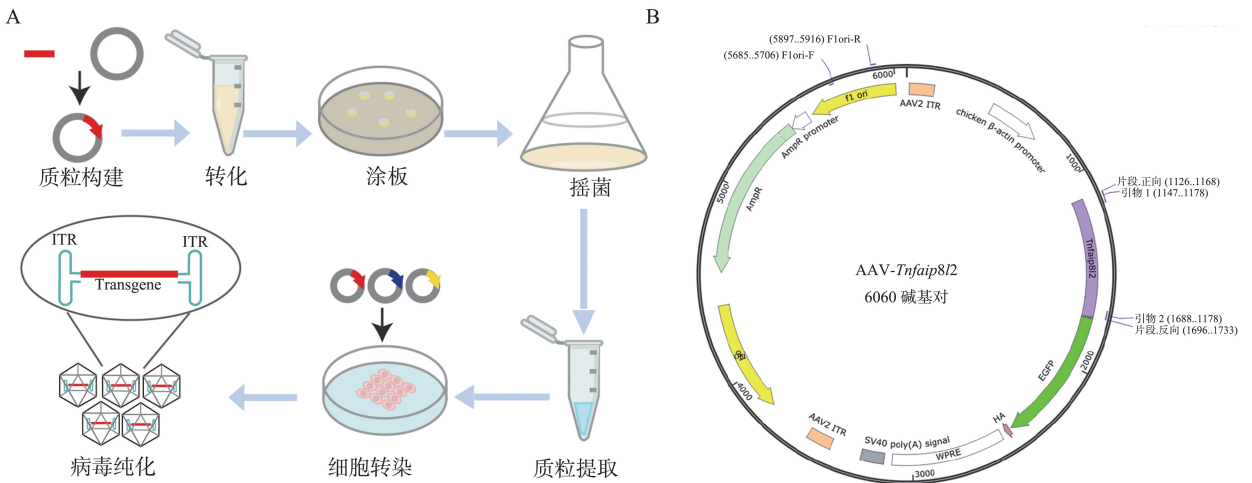


图 1 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠听力损失及毛细胞纤毛紊乱 (\**P*<0.05)  
 A:P21 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠 ABR 测试;B:P35 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠 ABR 测试;C:P35 WT 和 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠中回外毛细胞扫描电镜  
 Figure 1 Hearing loss and hair cell stereocilia disorganization in *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice (\**P*<0.05)  
 A: ABR testing of P21 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice; B: ABR testing of P35 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice; C: Scanning electron microscopy of mid-turn outer hair cells in P35 WT and *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice

### 2.2 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 包装及荧光表达验证

本研究选取的构建体涵盖 CAG 启动子、WPRE 盒、AAV ITR、Poly A 序列以及 EGFP 荧光报告基因等重要元件。质粒构建和病毒纯化的步骤如图 2A 所示。*Tnfaip8l2* 基因在小鼠免疫系统高表达,从脾脏组织的 cDNA 中获取 CDS 序列连接至载体质粒,质粒图谱如图 2B 所示。待重组质粒完成转

化、扩增后,取部分质粒进行测序,如图 2C 所示,序列比对后表明质粒序列与基因序列完全一致,过表达质粒构建成功。为了明确该重组质粒是否能够正常表达 *Tnfaip8l2* 蛋白,将病毒组装相关质粒转染至 293T 细胞中,进行病毒的组装和扩增。结果如图 2D 所示,重组质粒的荧光蛋白可在 293T 细胞中正常表达。



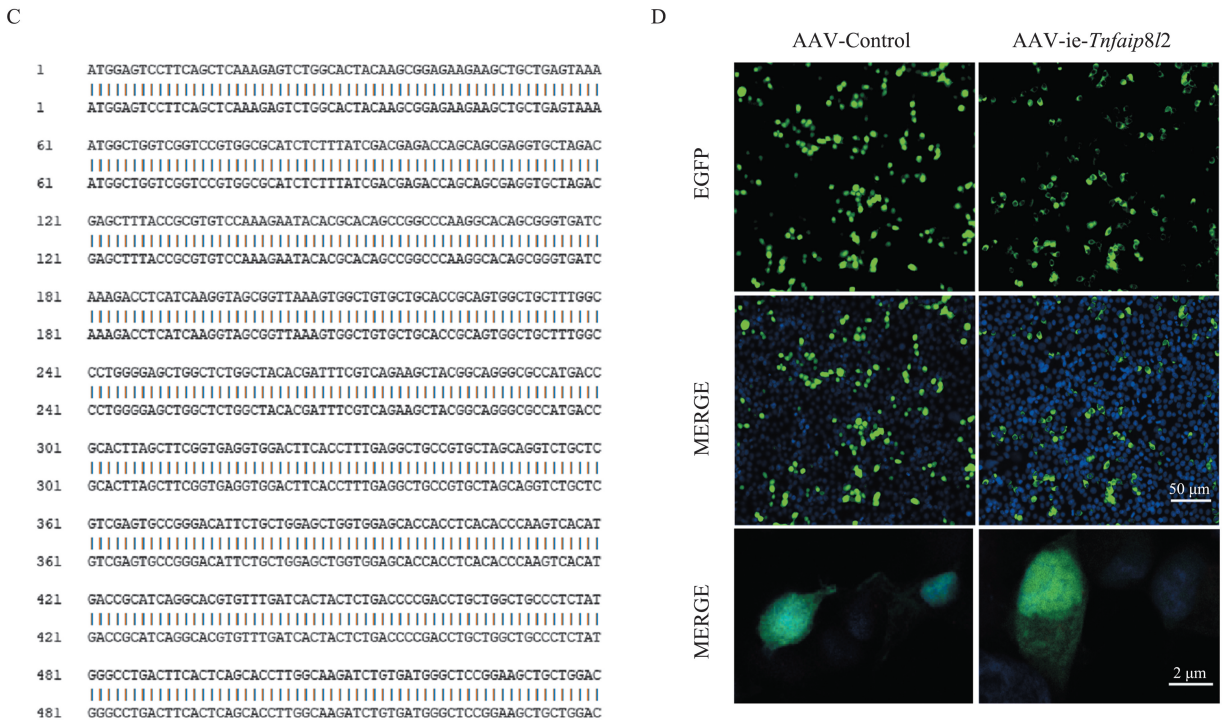


图 2 病毒包装及 *Tnfaip8l2* 表达验证

A: AAV-*Tnfaip8l2* 质粒构建及病毒纯化流程图; B: *Tnfaip8l2* 基因重组质粒图谱; C: *Tnfaip8l2* 基因 CDS 序列比对; D: HEK 293T 细胞转染病毒验证 TNFAIP8L2 荧光蛋白定位

Figure 2 Virus Packaging and TNFAIP8L2 Expression Validation

A: Flowchart of AAV-*Tnfaip8l2* plasmid construction and AAV-ie-*Tnfaip8l2* virus purification; B: Schematic diagram of the *Tnfaip8l2* gene recombinant plasmid; C: Sequence alignment of the *Tnfaip8l2* gene CDS; D: Verification of TNFAIP8L2 fluorescent protein localization in HEK 293T cells transfected with the virus

### 2.3 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 在内耳毛细胞中的感染效率

AAV-ie 能够高效感染多种内耳细胞类型,包括支持细胞、毛细胞以及螺旋神经节神经元<sup>[19]</sup>。为了深入评估该病毒在毛细胞中的感染效率,选择对 3 d 龄的 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠进行 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 病毒回补实验,并以同 d 龄 WT 鼠注射对照病毒 AAV-Control 作为对照组。当两组注射病毒的小鼠生长至 21 d 龄时,取出其耳蜗组织并剥离出基底膜。通过对基底膜进行免疫荧光染色,使用 myo7a 标记毛细胞,并观察毛细胞表达的 EGFP 绿色荧光蛋白。结果显示,AAV-ie-*Tnfaip8l2* 病毒在内毛细胞和外毛细胞中均表现出高效的感染能力(图 3C),其中顶回、中回、底回外毛细胞的感染效率分别约为 89.3%、85.7%、84.3%(图 3D)。值得注意的是,WT 鼠注射对照病毒后的 ABR 和 DPOAE 参数与未注射组无统计学差异(图 3E-F),证明病毒载体本身对听力无不良影响。

### 2.4 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 部分恢复 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 鼠听力

为了系统评估 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 基因治疗的恢复效果,本研究对 3 d 龄的 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠进行 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 病毒的回补,并以同龄 WT 和 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠注射 AAV-Control 病毒作为平行对照组。在 35 d 龄时通过 ABR 测试发现:接受 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 回补的 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠 click 阈值平均约为 48 dB,较注射 AAV-Control 的 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠组表现出阈值降低的趋势,差异有统计学意义( $P=0.0121$ )。短纯音测试结果进一步证实,病毒回补可以部分恢复 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠 8 k、12 k、32 k 范围的听力阈值(图 4A)。

在外毛细胞的功能层面,DPOAE 测试结果显示,AAV-ie-*Tnfaip8l2* 回补组的耳蜗放大功能得到了有效的恢复,效果优于 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠对照组(图 4B)。扫描电镜结构分析表明,AAV-ie-*Tnfaip8l2* 回补组 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠外毛细胞静纤毛束排列规整度得到了一定程度的提升(图 4C)。

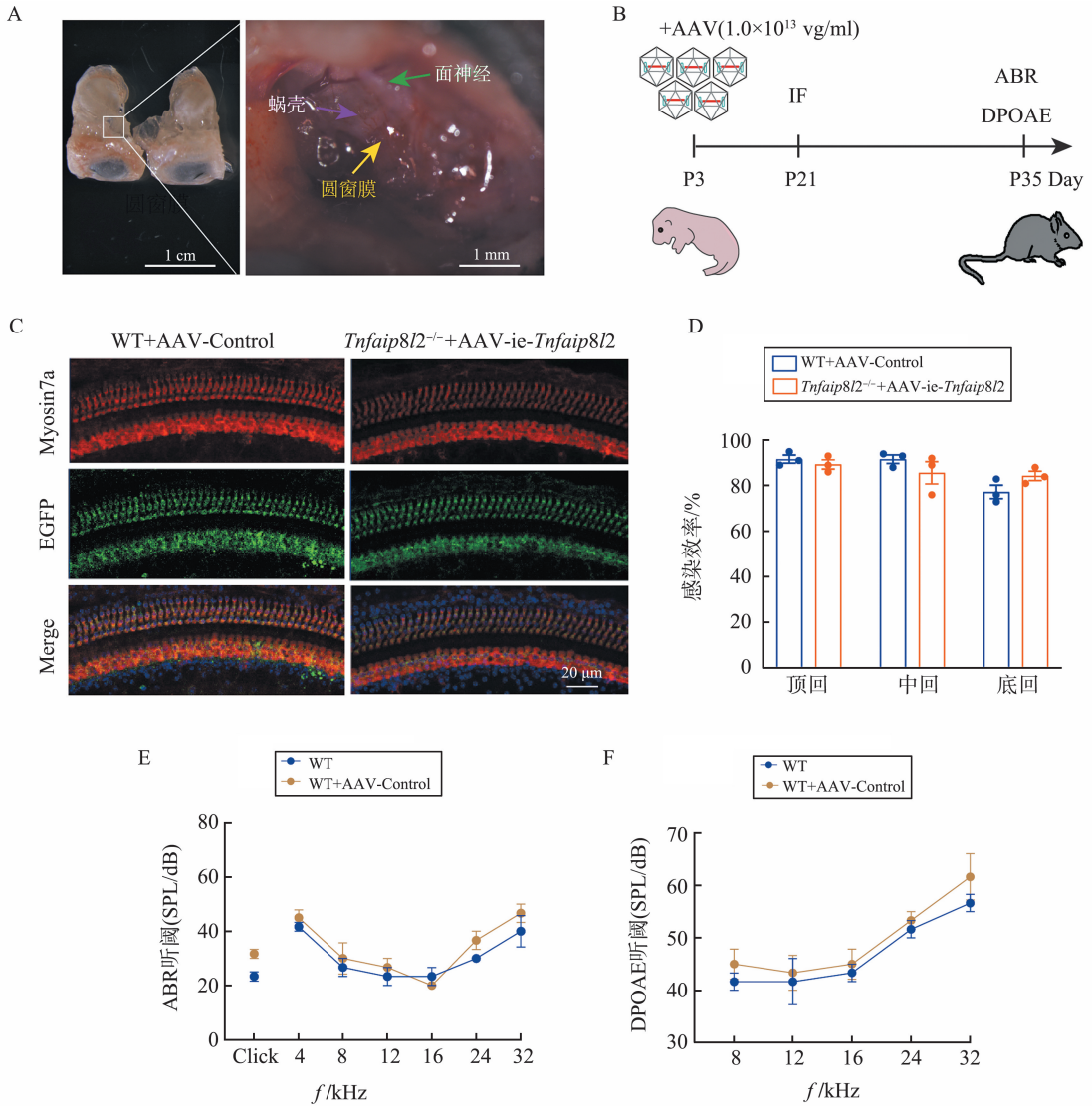
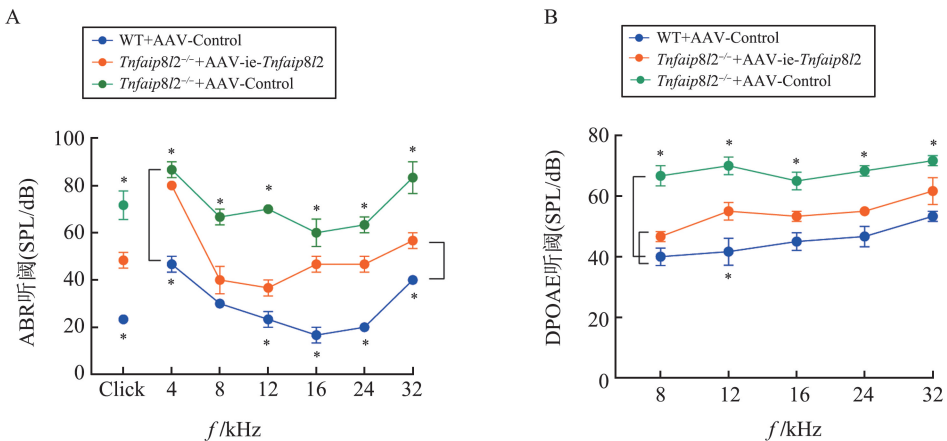


图3 AAV-ie-Tnfaip8l2 在内耳中的感染效果

A: 圆窗注射部位示意图; B: 病毒注射流程图; C: 病毒在 WT 和 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠中回毛细胞中的感染效率; D: 外毛细胞感染效率统计; E: P35 WT 小鼠及 WT 注射 AAV-Control 病毒 ABR 测听结果; F: P35 WT 小鼠及 WT 注射 AAV-Control 病毒 DPOAE 测听结果

Figure 3 Infection Efficiency of AAV-ie-Tnfaip8l2 in inner ear

A: Schematic diagram of the round window injection site; B: Flowchart of virus injection; C: Infection efficiency of the viruses in outer hair cells of WT and *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice; D: Statistical analysis of infection efficiency



ABR听阈(SPL/dB)

DPOAE听阈(SPL/dB)

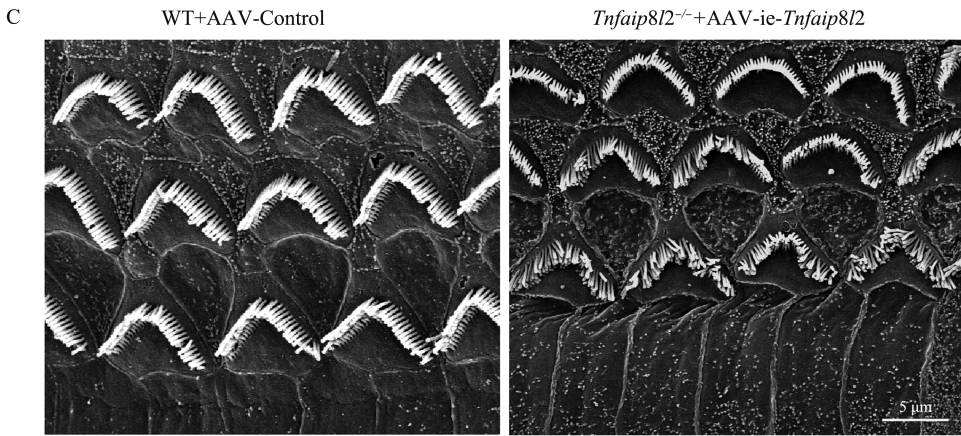


图 4 注射病毒后 35 d 龄 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 鼠听力恢复情况 (\**P*<0.05)

A: P35 WT 小鼠注射 AAV-Control, *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 注射 AAV-Control, *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 注射 AAV-ie-*Tnfaip8l2* ABR 测听结果;  
B: P35 WT 小鼠注射 AAV-Control, *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 注射 AAV-Control, *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 注射 AAV-ie-*Tnfaip8l2* DPOAE 测听结果;  
C: P35 WT 小鼠注射 AAV-Control, *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 注射 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 扫描电镜结果

Figure 4 Hearing recovery in 35-day-old *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice post virus injection (\**P*<0.05)

A: ABR results of P35 WT mice injected with AAV-Control, *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-Control, and *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-ie-*Tnfaip8l2*; B: DPOAE results of P35 WT mice injected with AAV-Control, *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-Control, and *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-ie-*Tnfaip8l2*; C: Scanning electron microscopy results of P35 WT mice injected with AAV-Control, and *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-ie-*Tnfaip8l2*

### 3 讨论

通过 CRISPR 筛选和构建基因敲除小鼠,我们明确 TNFAIP8L2 在耳蜗中通过靶向小 GTP 酶 RAC1 和 RHEB 调控 mTORC1 信号活性,其缺失可导致外毛细胞中 mTORC1 异常激活,进而加速老年性耳聋的病理进程<sup>[13]</sup>。在本研究中,基于 TNFAIP8L2 蛋白在内耳的表达分布特点及 AAV-ie 载体的内耳靶向特性,将鼠源 *Tnfaip8l2* 编码序列整合至 AAV 质粒并与 AAV-ie、AAV-Helper 共转染至 293T 细胞中进行病毒包装、复制,经过离心、纯化获得了高滴度的 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 病毒颗粒,并通过圆窗注入小鼠耳蜗。实验数据表明,该病毒在耳蜗毛细胞中均表现出较高的感染效率并显著改善 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠的毛细胞的纤毛结构和听觉功能。这些数据充分验证 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠的听力损失是由内耳 TNFAIP8L2 蛋白缺失所引起的,同时也说明通过使用 AAV 作为载体恢复 TNFAIP8L2 蛋白在内耳的表达切实可行,为后续针对 ARHL 治疗的相关转化及治疗提供参考。值得关注的是,尽管 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 在内耳特定的细胞类型中实现高效表达,却未能使 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠听力完全恢复至生理水平。在本研究中,未检测更长的回补时间 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠听力恢复效果,因此 AAV-ie-*Tnfaip8l2* 在内耳中的持续作用时间可能是影响治疗效果的因素之一。其次,AAV-ie-*Tnfaip8l2* 的感

染效率并未达到 100%,这一因素也可能影响 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup> 小鼠听觉恢复效果。雷帕霉素作为 mTOR 抑制剂,可激活自噬、清除受损线粒体,在小鼠体内可有效延缓 ARHL 的进展<sup>[10]</sup>。但其长期应用面临免疫抑制风险<sup>[20]</sup>,且高剂量使用可能导致耳蜗内 mTORC1/AKT 信号通路受到抑制<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,AAV 治疗手段可实现 TNFAIP8L2 蛋白在耳蜗内的递送,为开发雷帕霉素的潜在替代药物提供了新方向。

目前,AAV 作为基因递送载体在单基因遗传性耳聋的临床转化中已展现出独特优势,但其临床应用中仍然面临免疫反应与递送效率优化等关键挑战<sup>[21-22]</sup>。研究表明,虽然 AAV 天然免疫原性较低,但高剂量给药或重复暴露可能诱发慢性炎症反应<sup>[23-24]</sup>,且中和抗体检测方法的标准化程度有待提升<sup>[25]</sup>。此外,虽然经衣壳蛋白改造后的 AAV 载体基因组整合风险降低,但在长期基因表达过程中,仍存在因随机插入突变导致致癌基因激活的潜在风险<sup>[26]</sup>。AAV 载体有限的包装容量难以容纳大片段基因<sup>[27]</sup>。虽然可以通过双 AAV 策略(如 DNA 重组、mRNA 反式剪接)拆分基因片段进行递送,但其操作复杂性及体内重组效率仍需优化<sup>[28]</sup>。同时,成人听力损失多由环境因素与基因突变共同作用,导致开发个体化治疗方案面临挑战,也在一定程度上限制了 AAV 基因疗法的适用范围<sup>[29]</sup>。

总之,本研究成功构建高滴度的 AAV-ie-

*Tnfaip8l2*病毒颗粒,并评估其在小鼠耳蜗内的转导效率及治疗效果。虽然注射 AAV-*ie-Tnfaip8l2* 病毒的 *Tnfaip8l2*<sup>-/-</sup>小鼠在 35 d 龄时听力部分恢复,但该病毒在小鼠体内的长期安全性评估仍需系统开展,为 AAV 载体在耳聋治疗中的安全性提供更多依据。

## 参考文献:

- [1] Pupo A, Fernández A, Low SH, et al. AAV vectors: the Rubik's cube of human gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(12): 3515-3541. doi:10.1016/j.ymthe.2022.09.015
- [2] Hu mL, Edwards TL, O'Hare F, et al. Gene therapy for inherited retinal diseases: progress and possibilities [J]. *Clin Exp Optom*, 2021, 104(4): 444-454. doi:10.1080/08164622.2021.1880863
- [3] He XJ, Urip BA, Zhang ZJ, et al. Evolving AAV-delivered therapeutics towards ultimate cures [J]. *J Mol Med*, 2021, 99(5): 593-617. doi:10.1007/s00109-020-02034-2
- [4] Lv J, Wang H, Cheng XT, et al. AAV1-hOTOF gene therapy for autosomal recessive deafness 9: a single-arm trial [J]. *Lancet*, 2024, 403(10441): 2317-2325. doi:10.1016/S0140-6736(23)02874-X
- [5] Qi JY, Tan FZ, Zhang LY, et al. AAV-mediated gene therapy restores hearing in patients with DFNB9 deafness [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(11): 2306788. doi:10.1002/advs.202306788
- [6] Qi JY, Xu L, Zeng FG, et al. OTOF-related gene therapy: a new way but a long road ahead [J]. *Lancet*, 2025, 405(10481): 777-779. doi:10.1016/S0140-6736(25)00248-X
- [7] Sun GQ, Zheng YD, Fu XL, et al. Single-cell transcriptomic atlas of mouse cochlear aging [J]. *Protein Cell*, 2023, 14(3): 180-201. doi:10.1093/procel/pwac058
- [8] Eshel M, Miron B, Hertzano R, et al. The cells of the sensory epithelium, and not the stria vascularis, are the main cochlear cells related to the genetic pathogenesis of age-related hearing loss [J]. *Am J Hum Genet*, 2024, 111(3): 614-617. doi:10.1016/j.ajhg.2024.01.008
- [9] Ege T, Tao LT, North BJ. The role of molecular and cellular aging pathways on age-related hearing loss [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(17): 9705. doi:10.3390/ijms25179705
- [10] Fu XL, Sun XY, Zhang LQ, et al. Tuberous sclerosis complex-mediated mTORC1 overactivation promotes age-related hearing loss [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(11): 4938-4955. doi:10.1172/JCI98058
- [11] Fu XL, Li PP, Zhang LQ, et al. Activation of Rictor/mTORC2 signaling acts as a pivotal strategy to protect against sensorineural hearing loss [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(10): e2107357119. doi:10.1073/pnas.2107357119
- [12] Li W, Li YL, Guan YT, et al. TNFAIP8L2/TIPE2 impairs autolysosome reformation via modulating the RAC1-MTORC1 axis [J]. *Autophagy*, 2021, 17(6): 1410-1425. doi:10.1080/15548627.2020.1761748
- [13] Li W, Li Y, Wang M, et al. TNFAIP8L2 maintains hair cell function and regulates age-related hearing loss via mTORC1 signaling [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(7): 3036-3055. doi:10.1016/j.ymthe.2025.03.046
- [14] Sun HH, Gong SY, Carmody RJ, et al. TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis [J]. *Cell*, 2008, 133(3): 415-426. doi:10.1016/j.cell.2008.03.026
- [15] Zhang LY, Chen X, Wang XL, et al. AAV-mediated gene cocktails enhance supporting cell reprogramming and hair cell regeneration [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(29): 2304551. doi:10.1002/advs.202304551
- [16] Andres-Mateos E, Landegger LD, Unzu C, et al. Choice of vector and surgical approach enables efficient cochlear gene transfer in nonhuman primate [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1359. doi:10.1038/s41467-022-28969-3
- [17] Fu XL, Wan PF, Lu L, et al. Peroxisome deficiency in cochlear hair cells causes hearing loss by deregulating BK channels [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(20): 2300402. doi:10.1002/advs.202300402
- [18] Lee YY, Ha J, Kim YS, et al. Abnormal cholesterol metabolism and lysosomal dysfunction induce age-related hearing loss by inhibiting mTORC1-TFEB-dependent autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17513. doi:10.3390/ijms242417513
- [19] Tan FZ, Chu CF, Qi JY, et al. AAV-*ie* enables safe and efficient gene transfer to inner ear cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3733. doi:10.1038/s41467-019-11687-8
- [20] Chen Y, Xu ZY, Sun HX, et al. Regulation of CD8<sup>+</sup> T memory and exhaustion by the mTOR signals [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(9): 1023-1039. doi:10.1038/s41423-023-01064-3
- [21] Costa Verdera H, Kuranda K, Mingozzi F. AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(3): 723-746. doi:10.1016/j.ymthe.2019.12.010
- [22] Ivanchenko MV, Hathaway DM, Mulhall EM, et al. PCDH15 dual-AAV gene therapy for deafness and blindness in Usher syndrome type 1F models [J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(23): e177700. doi:10.1172/jci177700
- [23] Mingozzi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, et al. AAV-1-me-

- diated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells [J]. *Blood*, 2009, 114(10): 2077-2086. doi: 10.1182/blood-2008-07-167510
- [24] Hinderer C, Katz N, Buza EL, et al. Severe toxicity in nonhuman Primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(3): 285-298. doi:10.1089/hum.2018.015
- [25] Weber T. Anti-AAV antibodies in AAV gene therapy: current challenges and possible solutions[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 658399. doi: 10.3389/fimmu.2021.658399
- [26] Martins KM, Breton C, Zheng Q, et al. Prevalent and disseminated recombinant and wild-type adeno-associated virus integration in macaques and humans [J]. *Hum Gene Ther*, 2023; hum.2023.134. doi: 10.1089/hum.2023.134
- [27] Qi J, Fu X, Zhang L, et al. Current AAV-mediated gene therapy in sensorineural hearing loss [J]. *Fundam Res*, 2022, 5(1): 192-202. doi: 10.1016/j.fmre.2022.08.015
- [28] Lau SC, Grati M, Isgrig K, et al. Dual-AAV vector-mediated expression of MYO7A improves vestibular function in a mouse model of Usher syndrome 1B [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, 30: 534-545. doi: 10.1016/j.omtm.2023.08.012
- [29] Liu SY, Song WQ, Xin JR, et al. NRN1 and CAT gene polymorphisms, complex noise, and lifestyles interactively affect the risk of noise-induced hearing loss [J]. *Biomed Environ Sci*, 2021, 34(9): 705-718. doi: 10.3967/bes2021.098

(编辑:王磊)

(上接第 6 页)

- [21] Sato A, Omichi R, Maeda Y, et al. A glucocorticoid-regulating molecule, Fkbp5, may interact with mitogen-activated protein kinase signaling in the organ of Corti of mice cochleae [J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 7506. doi:10.1038/s41598-025-92400-2
- [22] 廖行伟, 任毅, 黄巧, 等. P38MAPK 调控 AQP2 参与内淋巴积水的形成 [J]. *中华耳科学杂志*, 2022, 20(4): 605-611. doi: 10.3969/j.issn.1672-2922.2022.04.013
- LIAO Xingwei, REN Yi, HUANG Qiao, et al. P38MAPK participates in formation of endolymphatic Hydrops by regulating AQP2 [J]. *Chinese Journal of Otolaryngology*, 2022, 20(4): 605-611. doi: 10.3969/j.issn.1672-2922.2022.04.013
- [23] Gao ZW, Schwieger J, Matin-Mann F, et al. Dexamethasone for inner ear therapy: biocompatibility and bioefficacy of different dexamethasone formulations in vitro [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1896. doi:10.3390/biom11121896
- [24] Johns JD, Adadey SM, Hoa M. The role of the stria vascularis in neglected otologic disease [J]. *Hear Res*, 2023, 428: 108682. doi:10.1016/j.heares.2022.108682
- [25] Terakado M, Kumagami H, Takahashi H. Distribution of glucocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in the rat inner ear [J]. *Hear Res*, 2011, 280(1/2): 148-156. doi: 10.1016/j.heares.2011.05.00
- [26] Froehlich MH, Lambert PR. The physiologic role of corticosteroids in menière's disease: an update on glucocorticoid-mediated pathophysiology and corticosteroid inner ear distribution [J]. *Otol Neurotol*, 2020, 41(2): 271-276. doi: 10.1097/mao.0000000000002467
- [27] Inagaki K, Yoshida T, Kobayashi M, et al. Impact of endolymphatic Hydrops on DPOAE in subjects with normal to mild hearing loss [J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2022, 8(1): 262-268. doi: 10.1002/lio2.998
- [28] Liang JY, Wang JK, Yao WJ. Hearing loss caused by hair cell lesions [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2025, 72(8): 2544-2554. doi: 10.1109/TBME.2025.3547059

(编辑:郑潇)