

大鼠线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变在内耳和肾及骨骼肌组织中的差异

韩月臣^{1,2} 孔维佳¹ 王海波² 樊兆民²

【摘要】 目的:探讨阿霉素诱导大鼠线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变动物模型中,内耳、肾脏和骨骼肌组织中该缺失突变的不同发生情况及可能机制。方法:Wistar 大鼠 28 只,随机分为实验组(18 只)和空白对照组(10 只)。实验组给予阿霉素 1 mg/kg,腹腔注射,每周 2 次,共 3 个月;空白对照组给予生理盐水。采用巢式 PCR 技术,检测内耳、肾脏和骨骼肌组织中线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变的发生情况。PCR 产物直接测序。结果:实验组和对照组分别有 2 只动物死亡。实验组大鼠内耳、肾脏和骨骼肌组织的线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变发生率分别为 68.75%(11/16),75.00%(12/16) 和 100.00%(16/16),经统计学检验(Fisher 精确概率检验),内耳组织和肾脏组织间突变发生率差异无统计学意义($P>0.05$);内耳组织和骨骼肌组织间差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组大鼠的 3 种组织均未检测到该缺失突变。结论:阿霉素可以诱发大鼠线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变,并且在大鼠内耳和骨骼肌组织中,线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变发生率显著不同,提示该突变存在组织特异性。

【关键词】 内耳;肾脏;骨骼肌;线粒体 DNA;突变

【中图分类号】 R322.9 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-1781(2008)19-0899-05

The difference of mitochondrial DNA 4 834 bp deletion mutation in tissues of inner ear and kidney and skeletal muscle of rat

HAN Yuechen^{1,2} KONG Weijia¹ WANG Haibo² FAN Zhaomin²

(¹Department of Otorhinolaryngology, the Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Department of Otorhinolaryngology, Shandong Provincial Hospital)

Abstract Objective: To explore the difference of mitochondrial DNA 4 834 bp deletion mutation in tissues of inner ear, kidney and skeletal muscle and to discuss the possible mechanism of this kind of mutation in doxorubicin induced mtDNA 4 834 bp deletion mutation rat model. **Method:** Twenty-eight Wistar rats were randomly divided into two groups, one was experimental group(18 rats), the other was the blank control group (10 rats). The rats of experimental group were treated with intraperitoneal injection doxorubicin (1 mg/kg) twice a week for 3 months. The blank controls received an equivalent volume of saline instead. The tissues of inner ear, kidney and skeletal muscle were harvested and the mitochondrial DNA 4 834 bp deletion mutation was detected by nested-PCR (nested polymers chain reaction) technique. The product of PCR was sequenced directly. **Result:** Two rats of the experimental group and the blank group died during the experiment. The frequency of the mitochondrial DNA 4 834 bp deletion mutation of inner ear, kidney and skeletal muscle were 68.75%(11/16), 75.00%(12/16) and 100.00%(16/16) respectively. The difference of this kind of mutation between tissues of the inner ear and the skeletal muscle was statistic significance ($P<0.05$). There were no significant difference between the inner ear tissue and the kidney tissue($P>0.05$). None of the rats of the blank control group carry this kind of mitochondrial DNA mutation. **Conclusion:** The mitochondrial DNA 4 834 bp deletion mutation could be induce by doxorubicin in rats, and a notable difference were found of the frequencies of this kind of mutation between tissues of the inner ear and the skeletal muscle. So it suggested that this kind of mitochondrial DNA common deletion mutation was tissue specific.

Key words Inner ear; Kidney; Skeletal muscle; Mitochondrial DNA; Mutation

线粒体 DNA 是位于细胞核外的遗传物质,为约 1 600 bp 大小的环形 DNA 分子,位于细胞质的

线粒体内,随母系遗传,具有半自主性,异质性,多拷贝,缺乏完善的修复机制等特点。线粒体 DNA 4 977 bp 缺失突变(大鼠相应为 4 834 bp 缺失突变),被称为“common deletion”,是老年化的分子生物学指标之一。该缺失突变广泛存在于机体的老

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院耳鼻喉科(武汉,430022)

²山东大学附属省立医院耳鼻喉-头颈外科
通讯作者:孔维佳(E-mail: wjkong@whuh.com)

化过程^[1],神经肌肉疾病^[2,3],末期肾病^[4],心脏疾病^[5]及多种实体肿瘤组织中^[6,7]。本文旨在探讨在阿霉素诱导的大鼠线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变动物模型中,内耳、肾脏和骨骼肌等 3 种不同的组织该缺失突变的发生情况及其可能的病理意义。

1 材料与方 法

1.1 动物模型的建立

健康 Wistar 大鼠 28 只(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),要求耳廓反射敏感,ABR 听阈正常,没有中耳炎情况,体重大约 200 g,3 个月龄。随机分为 2 组。实验组 18 只,腹腔注射阿霉素 1 mg/kg,每周 2 次,共 3 个月;空白对照组 10 只,仅给予生理盐水。ABR 的检测参考孔维佳等^[8]建立的方法。

1.2 组织总 DNA 的提取

1.2.1 内耳组织总 DNA 的提取 将大鼠麻醉后断头处死,迅速取出双侧听泡置入 4℃ 预冷的 PBS 缓冲液中,显微镜下解剖出螺旋韧带、基底膜、半规管、椭圆囊、球囊等内耳组织,加入 1 ml Trizol 溶液,匀浆,4℃ 12 000×g 离心 15 min,分离上清,下层有机相加入 0.3 ml 无水乙醇,室温下放置 2~3 min,4℃ 2 000×g 离心 5 min,除去上层水相,加入含有 0.1 mol/L 柠檬酸钠的 10% 乙醇 1 ml 反复洗涤 2 次,4℃ 2 000×g 离心 5 min,移弃上层,加入 1 ml 75% 乙醇常温洗涤,,4℃ 2 000×g 离心 5 min,移弃上层,空气干燥 5~15 min,50 μl 8 mmol/L NaOH 溶液溶解,-20℃ 保存备用。

1.2.2 肾脏和骨骼肌组织 DNA 的提取 采用改进的酚、氯仿、异戊醇抽提法,提取全基因组 DNA。基本步骤如下:①大约 50 mg 肿瘤组织剪碎,悬浮于细胞裂解液,37℃ 保温 1 h,间歇振荡;②加入蛋白酶 K,终浓度 10 mg/ml,55℃ 水浴 3 h,间歇振荡;③加入等体积 tris 饱和酚,温和振荡 10 min,5 000×g 常温离心 15 min;④留取水相,加入等体积酚,氯仿,异戊醇(25:24:1),抽提 1~2 次;⑤留取水相,加入等体积 tris 饱和酚,抽提 1 次;⑥留取水相,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠,-20℃ 保存 1 h;⑦离心 12 000×g,4℃,10 min;⑧加入 75% 乙醇 1 ml 洗涤 1 次,12 000×g 离心 5 min,弃上清,空气干燥;⑨所得 DNA 溶于 50 μl TE 溶液,-20℃ 保存备用。

1.3 PCR 检测

1.3.1 线粒体 DNA 保守片段的扩增 所有的标本内耳组织总 DNA 进行扩增,使用引物 Sense primer (4395) 5'-AGGACTTAACCAGACCCAAA CACG-3'; Antisense primer (5164) 5'-CCTCTTTT CTGATAGGCGGG-3',均可扩增出线粒体 DNA 保守片段,长度 770 bp。PCR 反应体系为 20 μl,终浓度为:Taq 酶 0.5 U, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP

各 250 μmol/L,引物各 0.5 μmol/L,模板 DNA 约 200 ng,反应条件:首次变性 95℃ 2 min,然后 94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 45 s,共 40 个循环,末次延伸 72℃ 7 min。

1.3.2 线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变后融合基因片段的扩增 检测 4 834 bp 缺失突变使用巢氏 PCR,首先使用引物 Sense primer (7682) 5'-GCGAAGCTTAGAGCGTTAAC-3'; Antisense primer (13129) 5'-AGTGAGATAAGGAAGCCT-GC-3',反应体系为 20 μl,终浓度为:Taq 酶 0.5 U, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 各 250 μmol/L,引物各 0.5 μmol/L,模板 DNA 约 200 ng。反应条件:首次变性 95℃ 2 min,然后 94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 45 s,共 40 个循环,末次延伸 72℃ 7 min,扩增预期大小为 614 bp 的产物。然后以第 1 次 PCR 产物 2 μl 为模板,使用引物 Sense primer (7825) 5'-TTTCTTCCCAAACCTTTTCTT-3'; Antisense primer (13117) 5'-AAGCTTGCTAGGATGCTTC-3' 进行第 2 次 PCR,反应体系为 20 μl,终浓度为:Taq 酶 0.5 U, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 各 250 μmol/L,引物各 0.5 μmol/L,模板为第 1 次 PCR 产物 2 μl,反应条件:首次变性 95℃ 2 min,然后 94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,共 40 个循环,末次延伸 72℃ 7 min,含有突变线粒体 DNA 可以扩增出预期大小为 549 bp 的目的条带。

1.4 测序

使用 ABI100 型自动测序仪进行测序,所得序列和 GeneBank 线粒体 DNA 序列(GeneBank 序号 X14848)进行比对。

1.5 统计学检验

内耳、肾脏和骨骼肌组织间线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变发生率的差异显著性采用 Fisher 精确概率检验(n<40,有 1 个以上的理论数<5)。实验组大鼠和空白对照组大鼠 3 种组织该缺失突变发生率差异分析也采用相同的检验方法。

2 结果

动物模型建立过程中,由于阿霉素本身毒性的影响及操作损伤,实验组和空白对照组各死亡 2 只。

2.1 PCR 电泳结果

所有肾脏、骨骼肌及内耳组织提取的总 DNA 标本均可以扩增出线粒体 DNA 保守片段,1% 琼脂糖电泳可以看到清晰的大小约 770 bp 的条带(图 1)。携带线粒体 4 977 bp 缺失突变的总 DNA 标本可以扩增出大小为 459 bp 的片段(图 2)。由于 Taq 酶功能及 PCR 延长时间的限制,野生型线粒体 DNA 不能扩增出长 5 000 bp 的片段。本实验采用的巢式 PCR 与一般的 PCR 相比,具有更高的准确性和灵敏度。

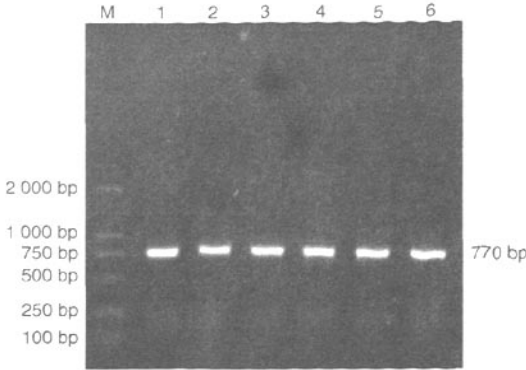


图 1 提取的组织标本总 DNA 均可以扩增出 770 bp 的线粒体 DNA 保守片段(1%琼脂糖电泳, M-Mark DL-2000, 1~6 为泳道序号)

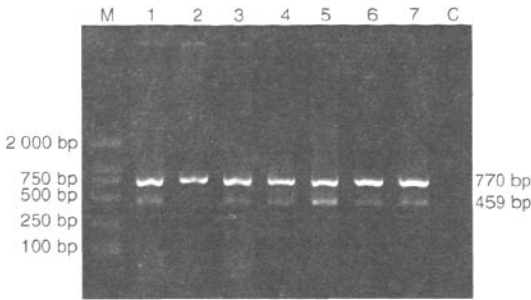


图 2 携带线粒体 4 977 bp 缺失突变的总 DNA 4 834 bp 缺失突变阳性者通过巢式 PCR 可以扩增出 459 bp 的 DNA 片段(1%琼脂糖电泳, M-Mark DL-2000, 1~6 为泳道序号, 1, 3~7 泳道为阳性, 2 为阴性, C 为空白对照)

2.2 测序结果

459 bp 产物测序结果证实所扩增出的片段为大鼠线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变后形成的融合基因片段(图 3)。基因库 X14848 号野生型大鼠线粒体 DNA 序列如下:

```

8041  acactgacta atcaaaacta tcatcaasca aataatgta attcacacac caaaggagc
8101  aacctgagcc ctaataattg tatccctaat tatatttatt .....
.....  nt8103~nt8118                               nt12937~nt12952
.....
12901 tcatcatcga agccatcac acgtgtaaca ccaacgctg agccctaata atcactttaa
12961  tgcgccacat cataactgct gtgtacagca tacggtatc ctacttctc accatgacaa
  
```

因此 4 834 bp(nt 8103-nt12936) 碱基对缺失后融合基因的序列预期序列应为 CAAAAG-GACGAACCTGAGCCCTAATAATCACTTTAA TCGCCACATCCATAACTGCT, 测序结果和预期序列相符。画线的序列为线粒体 DNA 直接重复序列 5'-CCTGAGCCCTAATt-3' (分别位于 nt8103~

nt8118 或 nt12937~nt12952)。

2.3 3 种不同组织线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变发生率的差异

实验组大鼠内耳组织和骨骼肌组织线粒体 DNA 4 834 bp 缺失突变发生率的差异采用 Fisher 精确概率检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 内耳组织和肾脏组织间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。和空白对照组相比, 内耳、肾脏和骨骼肌 3 种组织间的突变发生率均差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

线粒体是重要细胞器之一, 细胞能量的供应 95% 来自线粒体内的氧化磷酸化过程。线粒体的异常改变存在于众多疾病的病理过程中, 早期的研究表明在多种神经肌肉衰退病变存在线粒体形态学改变, 包括肿胀, 嵴减少或消失, 空泡样变性等^[9]。

随着分子生物学技术的发展, 线粒体 DNA 在线粒体疾病中的作用日益受到重视。线粒体 DNA 是惟一一种核外遗传物质, 编码构成呼吸链的 13 种蛋白质和翻译必需的 22 种 tRNA, 因此, 线粒体 DNA 的突变可以影响线粒体的正常功能, 诱发病变。由于线粒体存在于所有细胞中, 所以线粒体疾病一般表现为多系统、多器官受累的综合征性疾病。Guillausseau 等^[10]报道在 MIDD 患者(母系遗传性糖尿病和耳聋)46% 的患者发病时为非胰岛素依赖型糖尿病, 在几乎所有患者患有神经性聋, 86% 有黄斑营养不良, 43% 的有肌病, 15% 有心脏病, 18% 有精神症状, 肾病的发病率是 28%, 并且证实该疾病和线粒体 DNA 3243A-G 突变有关。进一步的研究表明该突变具有组织特异性^[11~13]。

线粒体 DNA 4 977 bp 缺失突变是一种常见缺失突变类型, 其发生机制尚不清楚, 目前认为可能是线粒体 DNA 复制过程中, 直接重复序列滑动错配所引起的, 和氧化自由基的损伤密切相关^[14]。线粒体 DNA 4 977 bp 缺失突变影响构成线粒体呼吸链的 7 个多肽的基因编码, 和线粒体蛋白质合成必需的 22 个 tRNA 中的 5 个, 造成呼吸链中断, 形成电子漏, 影响氧化磷酸化过程, 从而导致大量氧化自由基的产生。当氧自由基的蓄积超出细胞自身的清除能力, 氧自由基将进一步加重核酸的损伤, 形成恶性循环, 并且可以改变正常细胞周期, 导致细胞周期折返, 诱发受累细胞凋亡^[15]。

据文献报道该缺失突变存在于多种组织, 并且突变发生率和突变的异质性水平存在差异。Liu 等^[16]研究在人体老化过程中, 肌肉、心脏和肾脏组织中线粒体 DNA 4 977 bp 缺失突变的发生规律, 发现该突变的发生率和突变水平(突变线粒体 DNA 占总线粒体 DNA 的百分比)在肌肉组织明显

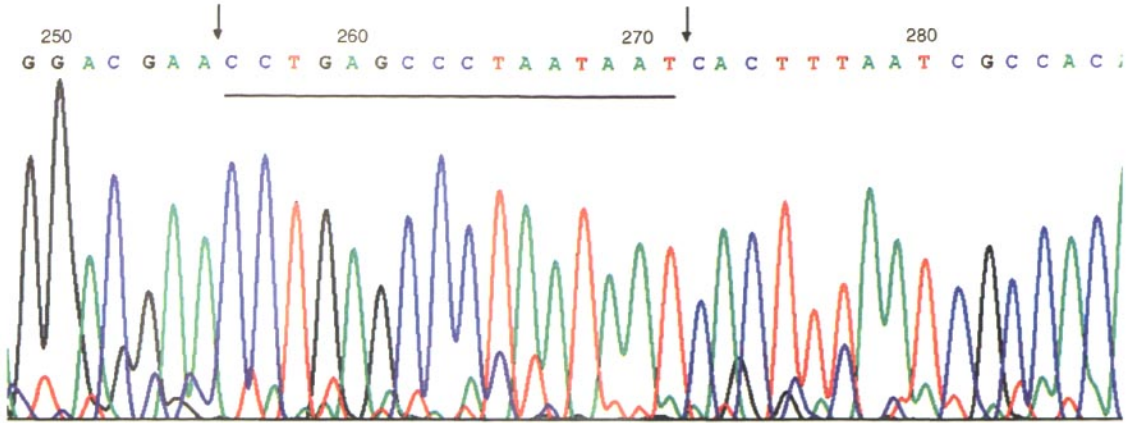


图3 PCR产物直接测序结果 显示线粒体DNA缺失融合片断,下划线部分碱基为直接重复序列5'-CCTGAGC-CCTAATt-3'(分别位于nt8103~nt8118或nt12937~nt12952),箭头位置为可能的断裂融合位点

高于心脏和肾脏组织,并且认为该突变的发生情况反应了不同组织的代谢水平和敏感程度。韩维举等^[17]的研究表明在大鼠不同组织中线粒体DNA 4 834 bp缺失突变随年龄增加而增加,而且存在组织差异,其中突变水平在肝脏组织最高,脑组织次之,外周血最低。而且该突变在外周血不存在随着年龄的增加而增加的趋势^[18]。因此该突变的病理意义并不十分清楚。

因为阿霉素是一种蒽环类肿瘤药,具有很强的全身多器官不良作用,心脏和肾脏是其主要的靶器官。阿霉素可以嵌入到DNA的碱基对中,引起DNA变形,改变DNA的构象,从而影响DNA的复制过程,促进基因突变的发生。此外,它还可以通过氧化还原作用,产生反应性很强的氧自由基,引起膜脂质和DNA的损伤。孔维佳等^[19]首次报道阿霉素可以诱发大鼠内耳组织线粒体DNA 4 834 bp缺失突变,并且该突变可以增加突变携带个体对氨基糖甙类抗生素耳毒性的敏感性。Adachi等^[20]研究也证实了阿霉素心脏损伤小鼠模型的心肌组织检测到线粒体DNA约4 000 bp的却是突变,并且该突变与用药的时间和剂量有关。Lebrecht等^[21]研究阿霉素诱发的大鼠肾病组织发现线粒体DNA 4 834 bp缺失突变降低呼吸链功能,促进超氧化物产物产生在致病过程中起重要作用。因此应用阿霉素可以诱发大鼠不同组织器官线粒体DNA发生4 834 bp缺失突变。

本研究结果表明在大鼠内耳、肾脏和骨骼肌组织线粒体DNA 4 834 bp缺失突变的发生情况存在差异。骨骼肌组织最高,肾脏次之,内耳组织相比最低,经统计学检验,骨骼肌组织和内耳组织间的突变发生率差异有统计学意义,和Liu等^[16]报道的结果相似。这种差异可能是由于不同组织存在不同代谢水平和能量需求引起的。结合文献报

道^[16,17]推测线粒体DNA 4 977 bp缺失突变在不同组织的发生情况,由高到低可能依次为骨骼肌>心脏>肾脏>内耳>外周血,且突变发生率在不同组织之间并不存在明显的相关性。

线粒体DNA 4 977 bp突变(大鼠相应为线粒体DNA 4 834 bp缺失突变)的病理意义尚不清楚。von Wurmb等^[22]在大于20岁的健康人群外周血检测到该缺失突变,认为该突变是一个生理过程。孔维佳等^[23]则认为该突变在内耳组织是一种基础性病理改变,可以增加机体对外界各种不良刺激的敏感程度。本研究发现在病理状态下的内耳、肾脏和肌肉组织均存在线粒体DNA 4 834 bp缺失突变,进一步提示该突变是多种疾病过程中的一种共同的分子水平病理改变,在一些病理和生理过程中,这也许是线粒体受累的一个敏感和早期的标志。该突变存在组织差异,即在不同组织突变的发生率不同,不同组织对该突变的耐受阈值也不同,这一特性也许可以用来解释在该突变携带者不同组织存在显著不同表现的现象。

参考文献

- [1] WEI Y H. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events [J]. *Mutat Res*, 1992, 275:145-155.
- [2] LEZZA A M, CORMIO A, GERARDI P, et al. Mitochondrial DNA deletions in oculopharyngeal muscular dystrophy [J]. *FEBS Lett*, 1997, 418: 167-170.
- [3] UEDA N, OSHIMA T, IKEDA K, et al. Mitochondrial DNA deletion is a predisposing cause for sensorineural hearing loss [J]. *Laryngoscope*, 1998, 108: 580-584.
- [4] LIU C, KO L Y, LIM P S, et al. Biomarkers of DNA damage in patients with end-stage renal disease: mitochondrial DNA mutation in hair follicles [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 16: 561-565.

- [5] MULLER-HOCKER J, JACOB U, SEIBEL P. The common 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA preferentially accumulates in the cardiac conduction system of patients with Kearns-Sayre syndrome [J]. *Mod Pathol*, 1998, 11:295-301.
- [6] 韩月臣,孔维佳,张松,等. 喉鳞状细胞癌组织中线粒体基因 4977 bp 缺失突变的检测[J]. *癌症*, 2004,23(11):1297-1301.
- [7] LOHRER H D, HIEBER L, ZITZELSBERGER H. Differential mutation frequency in mitochondrial DNA from thyroid tumours [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 1577-1582.
- [8] 孔维佳,汪吉宝,钟乃川. 豚鼠耳蜗电图及听觉脑干电位同步记录法的探讨[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1989, 3(4):148-152.
- [9] 田刚,刘治全,袁祖怡,等. 阿霉素对大鼠心肌细胞膜磷脂损伤及 CoQ10 的保护作用 [J]. *西安医科大学学报*, 1997, 9(3): 329-333.
- [10] GUILLAUSSEAU P J, MASSIN P, DUBOIS-LAFORGUE D. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study [J]. *Ann Intern Med*, 2001, 134: 721-728.
- [11] REMES A M, MAJAMAA K, HERVA R, et al. Adult-onset diabetes mellitus and neurosensory hearing loss in maternal relatives of MELAS patients in a family with the tRNA(Leu(UUR)) mutation [J]. *Neurol*, 1993, 43:1015-1020.
- [12] CHINNERY P F, ZWIJENBURG P J, WALKER M, et al. Nonrandom tissue distribution of mutant mtDNA[J]. *Am J Med Genet*, 1999, 85:498-501.
- [13] HANSROTE S, CROUL S, SELAK M, et al. External ophthalmoplegia with severe progressive multiorgan involvement associated with the mtDNA A3243G mutation [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 197:63-67.
- [14] BERNEBURG M, GREYHER-BECK S, KURTEN V, et al. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 15345-15349.
- [15] KLEIN J A, ACKERMAN S L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration [J]. *J Clin Invest*; 2003, 111: 785-793.
- [16] LIU V W, ZHANG C, NAGLEY P. Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26:1268-1275.
- [17] 韩维举,韩东一,杨维炎,等. 大鼠不同组织器官线粒体 DNA 缺失定量分析及其与老年化的关系[J]. *军医进修学院学报*, 2002, 23(4): 305-307.
- [18] MEISSNER C, MOHAMED S A, KLUETER H, et al. Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system [J]. *Forensic Sci Int*, 2000, 113:109-112.
- [19] 孔维佳,刘俊,董俊华. 线粒体 DNA 缺失突变在氨基糖甙类抗生素耳毒性易感中的作用[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2000, 35(2):94-97.
- [20] ADACHI K, FUJIURA Y, MAYUMI F, et al. A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993,195:945-951.
- [21] LEBRECHT D, SETZER B, ROHRBACH R, et al. Mitochondrial DNA and its respiratory chain products are defective in doxorubicin nephrosis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004,19:329-336.
- [22] VON WURMB N, OEHMICHEN M, MEISSNER C. Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood [J]. *Mutat Res*, 1998,422: 247-54.
- [23] 孔维佳,韩月臣,王莹,等. 维生素 E 和辅酶 Q10 对大鼠内耳组织线粒体 DNA4834bp 缺失突变的预防作用 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2004, 39(12): 707-711.

(收稿日期:2007-07-31)

(上接第 898 页)

用机制还不清楚,需要以 M 受体激动剂和拮抗剂作用于绒球来进一步研究前庭小脑机制。

参考文献

- [1] BABALIAN A L, VIDAL P P. Floccular modulation of vestibuloocular pathways and cerebellum-related plasticity: an in vitro whole brain study[J]. *J Neurophysiol*, 2000,84:2514-2528.
- [2] DARLINGTON C L, SMITH P F. Molecular mechanisms of recovery from vestibular damage in mammals: recent advances[J]. *Prog Neurobiol*, 2000,62: 313-325.
- [3] JOHNSTON A R, SECKL J R, DUTIA M B. Role of the flocculus in mediating vestibular nucleus neuron plasticity during vestibular compensation in the rat

[J]. *J Physiol*, 2002 ,545:903-911.

- [4] JOHNSTON A R, JONATHAN R. Role of the flocculus in mediating vestibular nucleus neuron plasticity during vestibular compensation in the rat[J]. *J Physiol*, 2002,545:903-911.
- [5] XIA J, CHUNG H J, WIHLER C, et al. Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins[J]. *Neuron*, 2000,28:499-510.
- [6] CXUBAYKO U, SULTAN F. Two types of neurons in the rat cerebellar nuclei as distinguished by membrane potentials and intracellular fillings[J]. *J Neurophysiol*, 2001,85:2017-2029.

(收稿日期:2008-07-03)