

· 论 著 ·

缺氧调控耳蜗听神经元电压门控性钾通道的表达^{*}冯 爽, 刘少锋, 周佳霖, 黄振云, 罗仁忠, 孙昌志[△]

(广州市妇女儿童医疗中心耳鼻咽喉科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 研究缺氧后大鼠螺旋神经节神经元电压门控性钾通道(Kv)亚单位表达的特点。方法 取出生 3~5 d SD 大鼠, 断头后分离并原代培养螺旋神经节神经元。将载有螺旋神经节神经元的培养皿分为对照组及实验组(无氧处理 24 h), 随后提取总 RNA, 通过实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR), 检测 caspase-3, Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 α 亚单位 mRNA 表达的特点。结果 无氧处理 24 h 后, 大鼠螺旋神经节神经元 caspase-3 mRNA 表达增加; 同时, Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 α 亚单位 mRNA 在该神经元的表达也上调, 与对照组相比, 分别增加 3.71、3.59、4.33 倍。结论 严重缺氧可显著上调初级听神经节神经元 Kv mRNA 的表达, 这可能是缺氧影响听力的机制之一。

[关键词] 电压门控钾通道; 神经元; 耳蜗; 听神经

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.01.003

中图法分类号:R764.4

文章编号:1009-5519(2023)01-0012-04

文献标识码:A

Hypoxia regulates expression of voltage-gated potassium channels in cochlear auditory neurons^{*}FENG Shuang, LIU Shaofeng, ZHOU Jialin, HUANG Zhenyun, LUO Renzhong, SUN Changzhi[△]

(Department of Otorhinolaryngology, Guangzhou Municipal Women and Children Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

[Abstract] **Objective** To study the characteristics of voltage gated potassium channel (Kv) subunit expression in rat spiral ganglion neurons (SGNs) after hypoxia. **Methods** SGNs were isolated and cultured in SD rats on 3–5 d after decapitated. The rats were divided into the control group and experiment group (anoxic treatment for 24 h), and then total RNA was extracted. The real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the mRNA expression characteristics of caspase-3, Kv1.1, Kv1.2 and Kv3.1 α subunits. **Results** After anoxic treatment for 24 h, caspase-3 mRNA expression in rat spiral ganglion neurons was increased; meanwhile the expressions of Kv1.1, Kv1.2 and Kv3.1 α mRNA in these neurons were also up-regulated, compared with the control group, which were increased by 3.71, 3.59, 4.33 times respectively. **Conclusion** Severe hypoxia can significantly up-regulate the expression of voltage gated potassium channel Kv mRNA in primary auditory ganglion neurons, which may be one of the mechanism of anoxia affecting hearing.

[Key words] Voltage-gated potassium channel; Neuron; Cochlea; Acoustic nerve

耳蜗缺氧性损伤是新生儿缺氧性脑病常见的并发症,可引起中到重度感音神经性耳聋。此外,耳蜗组织缺血缺氧,同样是众多感音神经性耳聋,如噪声性聋、突发性聋、药物性聋等的病理生理学机制之一。因此,探索缺氧后耳蜗损伤的机制,对耳聋防治具有重要的临床治疗指导意义。已知听神经元对缺氧十分敏感,缺氧程度越重,持续时间越长,对听神经元不可逆的损害越严重,听力恢复也越困难。缺氧后可导

致耳蜗螺旋神经节神经元(spiral ganglion neurons, SGN)水肿、坏死,听神经传入纤维大量崩解及缺失,损伤 SGN。SGN 的损伤程度与缺氧时间呈正比^[1]。可见 SGN 是缺氧引起耳蜗损伤的靶器官之一。最近研究还发现,缺氧后可影响听神经元的兴奋性。SGN 急性缺氧后,可增强其外向钾电流,促进钾离子外流到细胞外,使 SGN 细胞膜电位超极化,影响听神经动作电位发放频率^[2]。可见,缺氧可影响听神经动作电

* 基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212019)。

作者简介:冯爽(1980—),博士,主治医师,主要从事内耳的病理及生理学研究。△ 通信作者, E-mail:sunchzhent@126.com。

位。缺氧对 SGN 外向钾电流的促进过程,主要通过 TEA 敏感的大电导钙激活钾通道电流(BKCa)介导,但对 SGN 电压门控性钾通道(Kv)电流无明显影响,可能并不作用于 Kv 电流。然而,在中枢神经缺氧后可影响 Kv 的表达及功能,而且该作用具有亚型特异性的特点,不同的 Kv 亚型有不同的表现,如缺氧可增大 Kv2.1 的电流大小,并使其在神经元的表达定位发生变化,使细胞膜电位超极化而抑制神经元的兴奋性;对于 Kv4.2 和 Kv4.3,缺氧后则降低其在神经元的表达,并抑制电流大小,促进细胞膜去极化而增强神经元兴奋性^[3-5]。目前尚不明确缺氧后对 SGN Kv 表达的作用特点。已知 Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 均在 SGN 表达,可介导听神经动作电位的产生和传导,确保维持正常听力^[6]。因此,本研究将探讨缺氧后 SGN Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 表达的特点,明确缺氧对 SGN Kv 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 大鼠由南方医科大学动物中心提供,出生后 3~5 d,不论雄雌。

1.2 方法

1.2.1 SGN 的原代培养 大鼠断头处死后,取出耳蜗,迅速置于 4 °C Hank's 平衡盐溶液中,在立体显微镜下,打开耳蜗,剥离螺旋韧带、血管纹及 Corti's 器,将螺旋神经节组织切碎,置入 0.25% 胰蛋白酶中,37 °C 下孵育 10 min。吸去胰酶并终止消化,吹打后收集上清液,离心后再弃去上清液,细胞重悬后,种植到装有预热好的 DMEM/F12+10% FBS 培养皿中。培养 24 h 后,给予缺氧处理。

1.2.2 缺氧处理及分组 将载有 SGN 的培养皿随机分为对照组和实验组。对照组置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。实验组置于缺氧罐内(“无氧环境”)培养 24 h(37 °C,气体浓度为 95% N₂、5% CO₂、O₂ < 0.5%)。

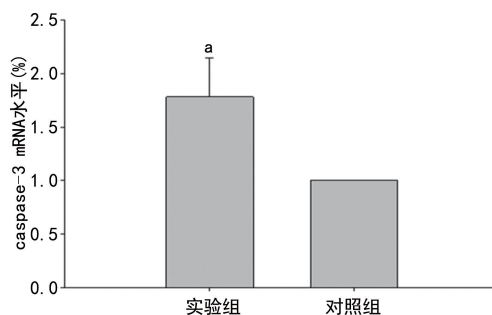
1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR) 利用 Trizol 法分别提取对照组和实验组细胞的总 RNA,随后将提取到的 RNA 进行逆转录,以 ACTB 为内参,在 PCR 仪上进行扩增,ACTB 的上游引物序列为 5'-TCAGCAAGCAGGAGTACGATG-3';下游引物序列为 5'-GTGTAAAACGCAGCTCAGTAACA-3',扩增产物为 88 bp。Caspase-3 上游引物序列为 5'-GAGCTTGGAACGCGAAGAAA-3',下游引物序列为 5'-AGTCCATCGACTTGCTTCCA-3',扩增产物为 112 bp。Kv1.1 α 亚单位的上游引物序列为 5'-GC-CGCAGCTCCTCTACTATC-3',下游引物序列为 5'-CCTGCCTGTAGTGGGCTATG-3',扩增产物为

84 bp。Kv1.2 α 亚单位的上游引物序列:5'-AGT-GAGAAGATGTGACGGGAC-3',下游引物序列为 5'-GGAGCTGAGGTTCTCTCCTTG-3',扩增产物为 85 bp。Kv3.1 α 亚单位的上游引物序列为 5'-TACGGACCCTGCTTCCTCTT-3',下游引物序列为 5'-TGCAAAGATCCTTTCTCATTCT-3',扩增产物为 76 bp。将扩增完毕的 cDNA,按照 qPCR 法进行定量分析,结果重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

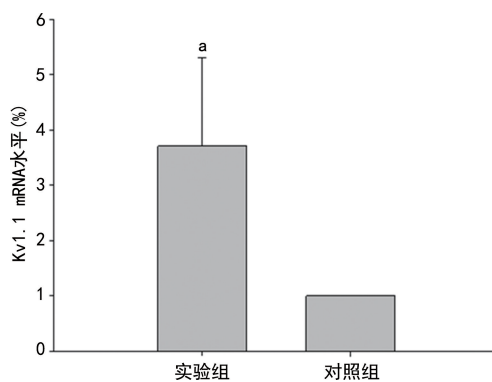
2.1 缺氧对 caspase-3 在 SGN 表达的影响 原代培养的 SGN 进行无氧处理 24 h 后,收集细胞。提取全部 RNA 后,qPCR 结果显示凋亡执行因子 caspase-3 mRNA 在 SGN 的表达出现明显上调,与对照组相比增加 78.3% ($n=5, P < 0.05$),见图 1。



注:^a $P < 0.05$ 。

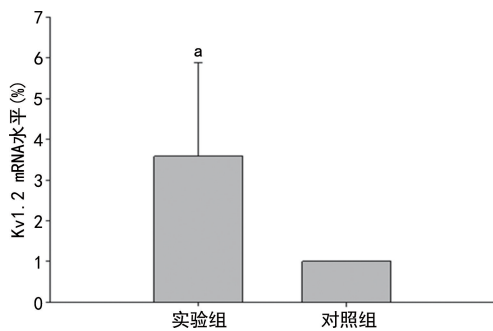
图 1 无氧处理 24 h 后 SGN caspase-3 mRNA 表达上调

2.2 缺氧对 Kv 在 SGN 表达的影响 进一步实验发现,在无氧环境下,SGN Kv1.1、Kv1.2 及 Kv3.1 α 亚单位 mRNA 表达水平均显著上调;与对照组相比,其相对表达量分别增加 3.71 倍 ($n=5, P < 0.05$)、3.59 倍 ($n=5, P < 0.05$) 及 4.33 倍 ($n=5, P < 0.05$),见图 2~4。



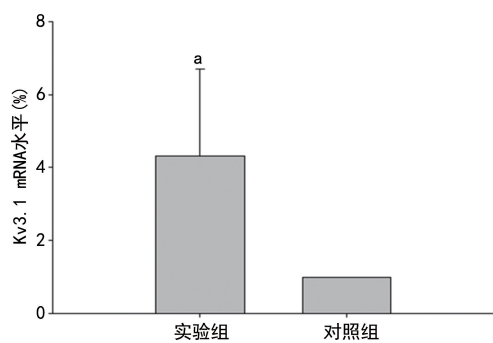
注:^a $P < 0.05$ 。

图 2 无氧处理 24 h 后 SGN Kv1.1 α 亚基 mRNA 表达上调



注：^a $P < 0.05$ 。

图 3 无氧处理 24 h 后 SGN Kv1.2 α 亚基 mRNA 表达上调



注：^a $P < 0.05$ 。

图 4 无氧处理 24 h 后 SGN Kv3.1 α 亚基 mRNA 表达上调

3 讨 论

Kv 主要由 α 和 β 两种亚单位构成。关于 Kv 的分类,曾有多种不同分类方法,但各有缺陷。按照最新的分类方法,根据通道蛋白结构和种系发生特点,将 Kv 分为 3 大类 38 种亚型^[7]。在中枢神经系统,神经元对缺氧十分敏感。当出现缺氧后,神经元出现短暂的超极化后,神经元迅速显著地去极化,并伴随钙离子内流,从而使神经元过度兴奋,加重缺氧引起的神经元损伤。有研究发现,缺氧后出现短暂超极化,主要是由于缺氧早期后,大量消耗 ATP,对 ATP 十分敏感的 ATP 敏感型钾通道开放,钾离子外流,细胞膜超极化,这可能有助于防止神经元过度兴奋而损伤。然而,随着缺氧的持续,神经元逐渐去极化,出现兴奋毒性作用,此过程较为复杂,主要包括两方面,抑制 Kv,减少钾离子外流,以及促进钠离子通过电压门控性钠通道或其他离子通道大量内流。如在海马神经元,缺氧后可使 Kv2.1 发生快速可逆的磷酸化反应,钾离子外流减少,使 NMDA 受体出现过度兴奋,介导以钙离子及钠离子内流为主要特征的兴奋毒性作用。因此,有观点认为,激活 Kv 有助于防止缺氧后对神经元造成的兴奋毒性损伤。研究发现,氟吡啶作为 Kv 通道开放剂,可减轻缺氧导致的神经组织损伤,部分恢复由缺氧引起的学习及记忆能力受损^[8]。然

而,另有研究发现,缺氧后可使有活性的 Kv 离子通道增加,电流密度增加^[9]。可见在不同部位神经元,缺氧后 Kv 的表现差异较大。

现已发现所有 Kv 的亚型均在 SGN 上表达,其中 Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 在 SGN 是高表达,主要定位于基底回^[6]。Kv1.1、Kv1.2 主要介导低电压激活的外向钾电流,具有快速激活、快速失活的特点,使细胞膜电位保持在接近动作电位阈值的状态,有助于听神经元高频放电^[10]。Kv3.1 是介导延时整流外向电流的主要成分,有助于 SGN 膜电位快速复极化,有利于动作电位的产生,因此也是确保听神经元高频放电的重要因素^[11]。因此,Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 在基底回高表达的原因,可能是有利于此处 SGN 易于高频放电的原因。在本研究中,SGN 处于无氧环境下处理 24 h 后,Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 α 亚单位 mRNA 表达均显著上调,说明长时间严重缺氧,可上调 Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 在 SGN 的表达。由此可推测,增加神经元放电频率,将影响听神经动作电位的传导,这可能是其引起听力下降的机制之一。

然而,本研究结果与既往文献报道的结果不同。有研究发现,急性缺氧(无氧处理 5~15 min)后 SGN 的 TEA 敏感的 BKCa 电流大小增加,而 4-AP 敏感的 Kv 则无明显改变,因此认为介导缺氧对外向钾通道电流作用的主要是 BKCa,认为 Kv 可能不参与此过程^[2]。结合本研究结果,分析产生差异的原因,可能与缺氧处理时间不同有关。在本研究中,SGN 持续处于无氧环境下 24 h,属于长期严重缺氧;而文献报道的无氧状态最长仅维持 15 min,属于短期急性缺氧。缺氧时间的不同,可能对 SGN 不同类型钾通道有不同的作用。推测在缺氧早期,主要影响 SGN BKCa 的功能,随着缺氧持续时间的延长,可能进一步影响 Kv 的表达,共同促使细胞膜电位超极化,抑制 SGN 放电,影响听觉动作电位。

本研究还发现,缺氧后可以增加 caspase-3 的表达,这说明缺氧可促进 SGN 凋亡过程,导致 SGN 损伤。既往有研究发现,Kv 与凋亡过程有关。如通过调控细胞膜表面 Kv1.1 及 Kv1.3 的表达及其电生理学特性,增加开放频率,促进钾离子外流,使胞质钾离子浓度降低,细胞内容量降低,细胞皱褶,引起细胞凋亡过程^[12]。另有研究也发现,敲除 Kv1.1 在细胞的表达,可增加抑制-Bcl 的表达;而敲除 Kv1.3,则减少 caspase-3 和促凋亡因子 Bad 的表达。可见在凋亡过程中,Kv 可影响 caspase-3 等凋亡相关因子的表达,从而影响凋亡过程^[13]。因此,推测缺氧后 SGN Kv1.1、Kv1.2 和 Kv3.1 表达增加,增加钾离子外流,可能

引发 caspase-3 介导的细胞凋亡过程,加重 SGN 的损伤,这有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] 王丽萍,王莘,杜波,等. 缺氧对体外培养耳蜗螺旋神经节细胞及神经纤维的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2008,21(22):1040-1042.
- [2] 王艳萍,朱贺,马克涛,等. 急性缺氧对 SD 乳鼠耳蜗螺旋神经节细胞钾通道的影响[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,50(10):823-828.
- [3] LIU Y Q, HUANG W X, SANCHEZ R M, et al. Regulation of Kv4. 2 A-type potassium channels in HEK-293 cells by hypoxia [J]. *Front Cell Neurosci*,2014,8:329.
- [4] ITO T, NURIYA M, YASUI M. Regulation of Kv2. 1 phosphorylation in an animal model of anoxia[J]. *Neurobiol Dis*,2010,38(1):85-91.
- [5] MISONOU H, MOHAPATRA D P, MENE-GOLA M, et al. Calcium-and metabolic state-dependent modulation of the voltage-dependent Kv2. 1 channel regulates neuronal excitability in response to ischemia[J]. *J Neurosci*,2005,25(48):11184-11193.
- [6] RUSZNÁK Z, SZÜCS G. Spiral ganglion neurones:an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function[J]. *Pflugers Arch*,2009,457(6):1303-1325.
- [7] GUTMAN G A, CHANDY K G, ADELMAN J P, et al. International union of pharmacology. XLI. compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels[J]. *Pharmacol Rev*,2003,55(4):583-586.
- [8] SAMPATH D, LAM P M, LAOPRASERT M, et al. Effects of a Potassium Channel opener on brain injury and neurologic outcomes in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic injury [J]. *Pediatr Res*,2020,88(2):202-208.
- [9] YANG Y S, CHOI J H, RAH J C. Hypoxia with inflammation and reperfusion alters membrane resistance by dynamically regulating voltage-gated Potassium channels in hippocampal CA1 neurons[J]. *Mol Brain*,2021,14(1):147.
- [10] MO Z L, ADAMSON C L, DAVIS R L. Dendrotoxin-sensitive K(+) currents contribute to accommodation in murine spiral ganglion neurons[J]. *J Physiol*,2002,542(Pt 3):763-778.
- [11] GARCÍA-DÍAZ J F. Development of a fast transient potassium current in chick cochlear ganglion neurons[J]. *Hear Res*,1999,135(1/2):124-134.
- [12] KOEBERLE P D, WANG Y, SCHLICHTER L C. Kv1. 1 and Kv1. 3 channels contribute to the degeneration of retinal ganglion cells after optic nerve transection in vivo[J]. *Cell Death Differ*,2010,17(1):134-144.
- [13] BACHMANN M, LI W, EDWARDS M J, et al. Voltage-gated potassium channels as regulators of cell death[J]. *Front Cell Dev Biol*,2020,8:611853.

(收稿日期:2022-03-16 修回日期:2022-08-18)