· 综述 ·

内向整流钾离子通道 Kir4.1 对听觉功能的影响

孔德秋 综述, 阮清伟 敖华飞 审校

(上海交通大学医学院附属第三人民医院 耳鼻咽喉科, 上海 200025)

关键词: Kir4.1; 耳蜗内电位; 胶质细胞; 感音神经性聋

中图分类号: R764

文献标识码: C

文章编号: 1007-1520(2012)05-0409-04

离子通道是生物膜上的蛋白质, 具有亲水性孔道, 可以有选择地让离子跨膜流动, 传递信息, 是生命活动的基础, 在许多细胞活动中都起关键作用。内向整流钾通道 (inwardly rectifying potassium channel, Kir) 4.1 分布于耳蜗中的多种细胞, 介导耳蜗内电位的形成和神经细胞的兴奋性, 可以显著影响听觉功能。本文从以下几方面阐述 Kir4.1 对听觉功能的影响。

1 Kir4.1 的结构和分布

1949年 Bernard Kat 首次在骨骼肌细胞上发现了 Kir4.1, 随后 1955年当双微电极技术尚处在萌芽状态时, 这一技术的先驱者之一 Silvio Weidmann 在羊普肯耶纤维细胞膜上发现一种近似于骨骼肌细胞上发现的具有内向整流特性的电流, 后来将其命名为 Ik1。目前为止, 内向整流 K⁺ 通道 (Kir) 家族按分子组成和电生理特性共分为 7 个亚族, 即 Kir1.0 ~ Kir7.0, 包括约 20 多个亚型。Kir 通道是四聚体结构, 每个亚基具有共有的基本结构, 即 N 末端起始于细胞内, 经两次跨膜折叠后 C 末端结束于细胞内, 两个跨膜链 (two-transmembrane, 2TM) 之间是一个包含保守的 H5 片段的 P-回环 (P-loop), 即 2TM/P。4 个亚基中的 P-回环对称的围成一个狭窄的选择性过滤器, 即传导离子的中央孔道, 恰好让 K⁺ 通过^[1]。

Kir 通道中 K⁺ 流入细胞内的效率远比流向细胞外容易, Kir 通道在静息膜电位 (Resting

membrane potential, RMP) 附近电导较大, 且电导随膜去极化而逐渐下降, 这种现象称为整流特性。目前认为内向整流是膜去极化时细胞内多胺 (主要是精胺) 和 Mg²⁺ 阻塞离子孔区所致^[2-3]。当 RMP 负于 K⁺ 的平衡电位 (E_k) 时, 内向电流增加; 当 RMP 正于 K⁺ 的平衡电位时, K⁺ 外流, 且电流随膜去极化逐渐下降, 最终, 细胞内精胺和 Mg²⁺ 进入离子孔, 阻止 K⁺ 的外向流动。可见 Kir 具有电压依赖性, 使 RMP 始终维持在平衡电位水平。

Kir 亚基的结构相似, 在组织中分布广泛, 通过维持细胞膜静息电位及兴奋性发挥广泛的生理功能。其中, Kir4.1 由基因 KCNJ10 编码, 主要分布在脑 (大脑皮层、丘脑、海马和脑干)、脊髓、眼、内耳、肾脏等器官, 分别在胶质细胞 (主要是星形细胞和少突胶质细胞)、视网膜 Müller 细胞、耳蜗血管纹中间细胞和肾小管上皮细胞表达, KCNJ10 变异可导致癫痫、共济失调、感音神经性耳聋和电解质失衡, 即 EAST (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and renal tubulopathy) 综合征, 表明 Kir4.1 参与调节神经兴奋性、电解质平衡及维持正常听觉功能, 对机体功能的发挥有重要作用^[4-5]。

2 Kir4.1 与耳蜗内电位

在耳蜗未受刺激时, 如果以鼓阶外淋巴的电位为参考零电位, 则可测出蜗管内淋巴的电位为 +80 mV 左右, 称为耳蜗内电位 (endocochlear potential, EP)。EP 和内淋巴高 K⁺ 离子浓度对听功能的建立有重要作用。正的蜗内电位 (+80 mV) 和负的毛细胞 RMP (-40 mV

作者简介: 孔德秋, 男, 硕士研究生。
通讯作者: 敖华飞, Email: david5882004@126.com.

~ -50 mV) 共同构成跨过毛细胞顶部膜的电压梯度,耳蜗隔膜的运动引起毛细胞静纤毛弯曲,后者通过牵引静纤毛之间的连接而使静纤毛机械-电转换通道开放,内淋巴内 K^+ 顺着电化学梯度进入毛细胞,引起毛细胞去极化,内毛细胞形成感受器电位,后者引起毛细胞释放化学递质而兴奋听神经纤维;外毛细胞则表现出电运动性,兴奋的外毛细胞能动性调节自身长度,改变基底膜和盖膜的机械特性,从而敏化内毛细胞对听阈附近刺激的反应。可见 K^+ 为机械-电通道内的离子流载体,EP 为 K^+ 跨膜运动提供驱动力,小鼠耳蜗 EP 缺失可导致严重耳聋。

EP 的产生与 K^+ 在耳蜗内的循环密切相关^[6]。 K^+ 循环的可能过程:进入毛细胞的 K^+ 通过基底外侧膜上的 K^+ 通道 (KCNQ41, KCNN2, KCNMA1) 出胞,经鼓阶外淋巴途径或 Deiters' 细胞、根细胞及细胞间缝隙联接进入耳蜗外侧壁^[7-8]。 K^+ 离子先进入位于螺旋韧带的外淋巴液,经 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶 (ATP1A1/ATP1B2) 和 Na^+ 、 K^+ 、 $2Cl^-$ 共同转运体 (SLC12A2) 进入纤维细胞 (主要是 II 型和 IV 型纤维细胞),然后通过缝隙连接进入血管纹基底细胞。进入基底细胞的 K^+ 通过细胞间的缝隙连接进入中间细胞,再由中间细胞顶部的 Kir4.1 通道进入纹内间隙,在此过程中产生耳蜗内电位。纹内间隙中的 K^+ 被血管纹边缘细胞基底外侧膜上的 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Na^+ 、 K^+ 、 $2Cl^-$ 共同转运体转运至边缘细胞胞浆中,再由顶部的 KCNQ1/KCNE1 通道排入中阶的内淋巴,构成 K^+ 的蜗内循环^[9]。

参与 K^+ 循环的血管纹是一含多层结构的上皮组织,细胞由内向外依次是:边缘细胞 (mairinal cell)、中间细胞 (intermediate cell) 和基底细胞 (basal cell),各细胞之间形成一定的功能连接:①边缘细胞间以连接蛋白形成的紧密连接 (tight junction) 方式连接;②中间细胞和基底细胞间以缝隙连接 (gap junction) 方式连接;③基底细胞与螺旋韧带的纤维细胞间亦以缝隙连接方式连接;④基底细胞间以紧密连接方式连接。上述连接蛋白基因突变后 K^+ 循环遭到破坏,推测间隙连接参与内耳离子平衡^[10]。由此,中间细胞、基底细胞和纤维细胞形成一功能性合胞体,边缘细胞和基底细胞则分别形

成了两道屏障,屏障间为纹内间隙 (intrastrial space, IS),内有液体和毛细血管,内皮细胞和两道屏障使纹内间隙液体与内淋巴液、外淋巴液及血液隔开,形成电隔离性。

目前双细胞模型 (two-cell model/five-compartment model) 假说是最新 EP 形成的可能机制^[6]。该假说认为中间细胞产生 EP,边缘细胞维持 IS 内的低 K^+ 浓度。Hiroshi 等^[11] 在该假说的基础上作了进一步补充,认为 EP 的产生依赖于 IS 的电隔离性和血管纹内两 K^+ 扩散电位。中间细胞顶膜选择性的允许 K^+ 通过 (Kir4.1 是目前为止中间细胞顶膜发现的唯一离子通道),并且膜两侧存在离子梯度,由 Nernst 方程计算得 K^+ 的平衡电位 (+90 mV),即为顶膜两侧的电势差,因为合胞体内电压近乎为 0 mV,所以 IS 内电位近似于中间细胞膜两侧扩散电位。同时,IS 具有电隔离性,使 IS 内保持较高的电势。边缘细胞靠近 IS 的基底外侧膜无 K^+ 通道表达,只有 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Na^+ 、 K^+ 、 $2Cl^-$ 共同转运体,所以此处无 K^+ 电导,此膜两侧的 K^+ 浓度梯度就不能形成电势差,使边缘细胞内电位近似于 IS 内电位。此处边缘细胞的作用主要是通过 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Na^+ 、 K^+ 、 $2Cl^-$ 共同转运体吸收 IS 内的 K^+ ,维持 IS 内的低 K^+ 浓度。边缘细胞靠近内淋巴的顶膜表达 KCNQ1/KCNE1 通道,且膜两侧存在电势差,由 Nernst 方程得膜两侧电势差为 10 mV,所以电势由边缘细胞到内淋巴降低 10 mV,形成耳蜗内电位 (+80 mV)。研究发现敲除小鼠 Slc26a4 基因,耳蜗血管纹 Kir4.1 丧失,EP 几乎完全消失,表现为感音神经性耳聋,证明 Kir4.1 影响 EP 的形成^[12-13]。

3 Kir4.1 与螺旋神经节细胞兴奋性

螺旋神经节细胞 (Spiral ganglia neurons, SGNs) 位于耳蜗蜗轴的 Rosenthal 小管内,根据其形态结构特征又分为两型:I 型及 II 型神经元。I 型神经元占神经节细胞总数的 90% ~ 95%,为双极神经元,胞体及其中枢突和周围突有髓鞘包绕。II 型神经元占神经节细胞总数的 5% ~ 10%,为假单极神经元,一般无髓鞘或仅有薄层髓鞘包绕神经元。作为听觉通路的第 1 级神经元,螺旋神经节将毛细胞产生的

动作电位传递到耳蜗核,在信息传递中起中继站的作用。在螺旋神经节胞体外部包被有卫星细胞,两个以上的卫星细胞形成多层髓鞘包绕 SGNs 胞体,不仅作为电隔离屏障将 SGNs 与周围神经细胞分开,而且通过转移 SGNs 外 K^+ 浓度,改变神经细胞兴奋性,从而参与调节听觉功能。

Hibino 等^[14]用免疫组织化学的方法证实, Kir4.1 在 SGNs 卫星细胞的表面有强烈表达,并且 Kir4.1 的表达伴随着蜗神经动作电位的出现。在小鼠耳蜗内,神经动作电位在出生后第9天(P9)首次发现, P14 达到最大并保持稳定,此时听力发生。卫星细胞的 Kir4.1 在 P1~P5 没有表达, P8 出现少量表达, P14 达最大。Tang 等^[14]细胞外应用 Kir 通道阻滞剂 Ba^{2+} 、 Se^+ 、地昔帕明,小鼠卫星细胞的内向 K^+ 电流几乎完全消失,敲除编码 Kir4.1 的基因 KCNJ10, Kir4.1 -/- 小鼠卫星细胞静息膜电位(-65 mV)和 Kir4.1 +/- 小鼠静息膜电位(-79 mV)相比表现为去极化, Kir4.1 +/- 小鼠卫星细胞内向 K^+ 电流和野生型相比减少 50%, Kir4.1 -/- 小鼠和野生型相比,卫星细胞内向 K^+ 电流几乎完全消失,证明 Kir4.1 是卫星细胞上主要的 Kir 通道。以上结果表明 Kir4.1 参与了 SGNs 外钾离子的转移,并起主要作用。

但是 Kir4.1 是如何通过调节神经节细胞外 K^+ 浓度,介导 SGNs 兴奋性的呢?螺旋神经节细胞发生动作电位时, K^+ 外流,使得细胞外 K^+ 浓度升高,如果不能及时纠正,神经细胞发生去极化,静息电位与阈电位之间差距变小,细胞兴奋性升高,实际上卫星细胞 Kir4.1 此时通过内向整流特性将细胞外过多的 K^+ 吸收进胞浆,但是进入胞浆的 K^+ 是通过电压依赖性钾通道还是通过其他通道或载体排出胞外还需要验证。

Kir4.1 不仅可以介导 SGNs 的兴奋性,对 SGNs 及其神经纤维的生长发育也有重要影响。Nora 等^[7]检测 KCNJ10 基因敲除小鼠、惊跳反射实验测得 Kir4.1 -/- 小鼠阈值明显升高,听力显著下降。同时,在 P18 时 SGNs 数量减少 50%,中枢束和周围束出现不同程度萎缩,推测可能为 Kir4.1 可以维持 SGNs 卫星细胞的 RMP,而 RMP 参与调控跨膜物质的浓度梯度,

这些物质与信号转导、细胞分化和髓鞘形成有关,所以 Kir4.1 缺失间接导致 SGNs 凋亡及纤维退缩。

4 Kir4.1 可能参与中枢听觉系统功能和发育调节

在中枢神经系统几乎分布所有的 Kir 亚基,其中 Kir4.1 在胶质细胞特异性表达,目前已知脊髓、脑皮质、下丘和海马等星形胶质细胞、少突胶质细胞、脑干 Bergmann 细胞及视网膜 Müller 细胞中 Kir4.1 选择性表达^[15],且在所有 Kir 亚基中占主导地位,是决定胶质细胞膜上 K^+ 电导的主要通道。Kir4.1 使星形胶质细胞膜具有高 K^+ 通透性及强的负静息电位(约 -80 mV),参与缓冲神经细胞外 K^+ 浓度,清除突触间谷氨酸盐,从而调节神经细胞兴奋性,并且 Kir4.1 的表达可以促进少突胶质细胞的成熟,影响神经纤维髓鞘的形成。虽然没有研究直接表明听觉中枢 Kir4.1 的变化对听力的影响,但从 Kir4.1 的分布和功能可以推断, Kir4.1 可能参与中枢听觉系统功能和发育的调节。

神经细胞兴奋时释放 K^+ 至胞外,细胞间隙内 K^+ 浓度升高 1 mM 甚至更多。星形胶质细胞缓冲胞外 K^+ 浓度有两种假说机制,一种机制为随着胞外 K^+ 浓度的不断升高, Kir(主要是 Kir4.1)内向电流逐渐增加,与 K^+ 的平方根成比例,由于星形胶质细胞内静息电位强弱不等,进入胞内的 K^+ 通过细胞间缝隙连接在胶质细胞联合体内重新分布,随着进入胶质细胞内的 K^+ 浓度不断升高, K^+ 通过 Kir4.1 外流,到达血管外间隙或神经细胞外间隙的低 K^+ 浓度区,称为空间缓冲作用或虹吸作用^[16];另一种机制为 K^+ 和 Cl^- 共同进入细胞,无电荷变化,同时伴随水进入细胞,使细胞水肿,其中 Cl^- 和水分别通过氯离子通道(chloride channel-2, ClC-2) Cl^- 和水通道 4(aquaporin 4, AQP4) 进入胞内^[17]。

神经细胞兴奋时释放到突触间隙的谷氨酸盐,由星形胶质细胞分泌的谷氨酸盐转运体 Glt-1 和 GLAST 转运进入胶质细胞,在酶的作用下被代谢清除,避免了谷氨酸盐在突触间长时间存留,缩短了兴奋持续时间,用 Ba^{2+} 阻断 Kir4.1 可使 Glt-1 转运的谷氨酸盐的吸收减少

30% ,证明 Kir4.1 参与了谷氨酸盐的转运清除^[18]。

处在分裂期的细胞膜电位约为 $-30\text{ mV} \sim -50\text{ mV}$,和分化成熟的细胞相比 (-80 mV) 负值偏小。当细胞膜电位处于强的负电位时,细胞很少进入分裂期,细胞分裂的开始伴随着膜电位负向增长的变化和 Kir 表达上调。当 Kir 被药物阻断后,细胞分化和细胞分裂延迟,选择性地剔除 Kir4.1,少突胶质细胞膜电位去极化并且发生成熟障碍,神经纤维脱髓鞘,表明 Kir4.1 决定少突胶质细胞静息电位和髓鞘的形成^[19]。

5 展望

Kir4.1 亚基在耳蜗电位的形成、神经兴奋性及突触传导的过程中都发挥着重要的调节作用,它的突变与听力损失之间的关系已越来越受到人们的关注,虽然现在的研究成果还不能完全揭示 Kir4.1 与听力下降之间具体的关系,尚需要学者们在以后的科研过程中去研究和探索,但是已为寻找并开展感音神经性耳聋特异性的药物治疗提供了靶点。

参考文献:

[1] Choe S. Potassium channel structures [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2002, 3(2): 115 - 121.

[2] Olsen ML, Sontheimer H. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K^+ buffering to cell differentiation [J]. J Neurochem, 2008, 107(3): 589 - 601.

[3] Pegg AE, Wang X. Mouse models to investigate the function of spermine [J]. Commun Integr Biol, 2009, 2(3): 271 - 274.

[4] Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, et al. KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(32): 14490 - 14495.

[5] Freudenthal B, Kulaveerasingam D, Lingappa L, et al. KCNJ10 Mutations Disrupt Function in Patients with EAST Syndrome [J]. Nephron Physiol, 2011, 119(3): 40 - 48.

[6] Wangemann P. K^+ cycling and the endocochlear potential [J]. Hear Res, 2002, 165(1-2): 1 - 9.

[7] Rozengurt N, Lopez I, Chiu CS, et al. Time course of inner ear degeneration and deafness in mice lacking the Kir4.1 potas-

sium channel subunit [J]. Hear Res, 2003, 177(1-2): 71 - 80.

- [8] Jagger DJ, Nevill G, Forge A. The Membrane Properties of Cochlear Root Cells are Consistent with Roles in Potassium Recirculation and Spatial Buffering [J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2010, 11(3): 435 - 448.
- [9] Nin F, Hibino H, Doi K, et al. The endocochlear potential depends on two K^+ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear [J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105(5): 1751 - 1756.
- [10] 肖自安,谢鼎华. 内耳间隙连接和连接蛋白基因家族与遗传性聋 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2005, 11(3): 205 - 208.
- [11] Hibino H, Nin F, Tsuzuki C, et al. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus [J]. Pflugers Arch, 2010, 45(4): 521 - 533.
- [12] Marcus DC, Wu T, Wangemann P, et al. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282(2): C403 - C407.
- [13] Wangemann P, Itza EM, Albrecht B, et al. Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model [J]. BMC Med, 2004, 2(1): 30.
- [14] Hibino H, Horio Y, Fujita A, et al. Expression of an inwardly rectifying K^+ channel, Kir4.1, in satellite cells of rat cochlear ganglia [J]. Am J Physiol, 1999, 277(4 Pt 1): C638 - C644.
- [15] Tang XF, Schmidt TM, Perez-Leighton CE, et al. Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 is responsible for the native inward potassium conductance of satellite glial cells in sensory ganglia [J]. Neuroscience, 2010, 166(2): 397 - 407.
- [16] Holthoff K, Witte OW. Directed spatial potassium redistribution in rat cortex [J]. Glia, 2000, 29(3): 288 - 292.
- [17] Sik A, Smith RL, Freund TF. Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus [J]. Neuroscience, 2000, 101(1): 51 - 65.
- [18] Kucheryavykh YV, Kucheryavykh LY, Nichols CG, et al. Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes [J]. Glia, 2007, 55(3): 274 - 281.
- [19] Greenwood K, Bolton S, Butt AM. Evidence of a role for the inwardly rectifying potassium channel (Kir) 4.1 in oligodendrocyte development [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2005, 10(1): 33 - 44.

(修回日期:2012-07-19)