

论著·基础研究

钙离子转运ATP酶B2杂合突变导致小鼠渐进性前庭功能障碍

刘祎晴^{1,2,3}, 金晨曦^{1,2,3}, 冯宝怡^{1,2,3}, 成桢哲^{1,2,3}, 孙怡琳^{1,2,3}, 郑晓飞^{1,2,3}, 董庭婷⁴, 吴皓^{1,2,3}, 陶永^{1,2,3}

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200011; 2. 上海交通大学医学院耳科学研究所, 上海 200125; 3. 上海市耳鼻疾病转化医学重点实验室, 上海 200125; 4. 上海交通大学医学院附属第九人民医院样本库, 上海 200125

[摘要] **目的**·研究不同月龄钙离子转运ATP酶B2 (ATPase plasma membrane Ca^{2+} transporting 2, ATP2B2) Oblivion杂合突变小鼠前庭毛细胞结构和前庭功能的变化。**方法**·选取2月龄及8月龄Atp2b2 Oblivion杂合突变雄性小鼠各10只, 以同龄C57BL/6J野生型雄性小鼠作为对照。通过免疫荧光实验观察不同月龄2组小鼠前庭毛细胞ATP2B2表达情况, 并对微纹区及纹外区毛细胞数量进行统计; 通过扫描电子显微镜 (电镜) 观察小鼠前庭毛细胞纤毛形态; 通过透射电镜观察小鼠前庭毛细胞带状突触和线粒体; 采用前庭诱发电位 (vestibular evoked potential, VsEP)、前庭肌源性诱发电位 (vestibular evoked myogenic potential, VEMP), 及转棒、平衡木实验检测小鼠的前庭功能。**结果**·2组小鼠ATP2B2均主要表达于前庭毛细胞纤毛, 2月龄及8月龄Atp2b2 Oblivion杂合突变小鼠微纹区及纹外区毛细胞数量与野生型小鼠均无明显差异。扫描电镜下, 2月龄及8月龄杂合突变小鼠椭圆囊毛细胞纤毛无明显结构异常。透射电镜下, 2月龄杂合突变小鼠前庭毛细胞表皮板与神经连接部位附近的线粒体结构无异常, 突触结构无异常; 8月龄杂合突变小鼠前庭毛细胞表皮板附近线粒体出现空泡样变性, 神经连接部位附近的线粒体及突触结构无异常。2月龄及8月龄杂合突变小鼠VsEP及VEMP阈值均较野生型小鼠显著上升, VsEP波形分析显示杂合突变小鼠P1潜伏期延长, PIN1波幅降低 (均 $P<0.05$)。2月龄杂合突变小鼠转棒、平衡木实验结果未见明显改变, 但8月龄杂合突变小鼠完成转棒、平衡木能力较野生型小鼠显著下降 (均 $P<0.05$)。**结论**·Atp2b2 Oblivion杂合突变小鼠2月龄时前庭电生理功能下降, 8月龄时出现前庭相关行为学异常, Atp2b2 Oblivion杂合突变小鼠呈渐进性前庭功能障碍。

[关键词] 钙离子转运ATP酶B2; 前庭功能障碍; 前庭毛细胞; 纤毛**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.06.007 **[中图分类号]** R764.3 **[文献标志码]** A

Atp2b2 Oblivion heterozygous mutation causes progressive vestibular dysfunction in mice

LIU Yiqing^{1,2,3}, JIN Chenxi^{1,2,3}, FENG Baoyi^{1,2,3}, CHENG Zhenzhe^{1,2,3}, SUN Yilin^{1,2,3}, ZHENG Xiaofei^{1,2,3}, DONG Tingting⁴, WU Hao^{1,2,3}, TAO Yong^{1,2,3}

1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Ear Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Translation Medicine on Ear and Nose Disease, Shanghai 200125, China; 4. Biobank of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China

[Abstract] **Objective**·To study the alterations in vestibular hair cell morphology and function of ATPase plasma membrane Ca^{2+} transporting 2 oblivion (Atp2b2 Oblivion) heterozygous mice at different ages. **Methods**·Atp2b2 Oblivion heterozygous male mice aged 2 months and 8 months were selected with ten in each kind and C57BL/6J wild-type mice with the same gender, age and number were selected as the control group. Expression patterns of ATP2B2 in vestibular hair cells and numbers of hair cells in the striola zone and the extra striola zone in the two groups of mice at different ages were observed and calculated respectively through immunofluorescence assay. Hair bundle structures were detected by scanning electron microscopy (SEM), and mitochondria and ribbon synapse structures were observed by transmission electron microscopy (TEM). Vestibular evoked potential (VsEP), vestibular evoked myogenic potential (VEMP), rotarod rod test, and balance beam test were adopted for the evaluation of vestibular functions.

[基金项目] 国家自然科学基金优秀青年基金 (82122019); 国家自然科学基金面上项目 (82371145)。**[作者简介]** 刘祎晴 (1998—), 女, 硕士生; 电子信箱: liuyiqing@sjtu.edu.cn。**[通信作者]** 陶永, 电子信箱: taoyent@foxmail.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China for Excellent Young Scholars (82122019); National Natural Science Foundation of China (82371145).**[Corresponding Author]** TAO Yong, E-mail: taoyent@foxmail.com.**[网络首发]** <https://link.cnki.net/urlid/31.2045.R.20240616.0859.002> (2024-06-18 16:58:56)。

Results ATP2B2 was mainly expressed in the hair bundle of vestibular hair cells in the two groups of mice. Hair cell numbers in the striola zone and the extra-striola zone did not exhibit any differences between *Atp2b2* Oblivion heterozygous mutant mice and wild-type mice of 2-month-old and 8-month-old. No visible structural abnormality in the hair bundle could be seen through SEM. TEM results implied no morphological abnormality in mitochondria or ribbon synapses in the 2-month-old heterozygous mutant mice, while vacuolar degeneration was discovered in the mitochondria under the cuticular plate in the 8-month-old heterozygous mutant mice with the normal ribbon synapses and the normal mitochondria near the innervation site. VsEP and VEMP thresholds of 2-month-old and 8-month-old *Atp2b2* Oblivion heterozygous mutant mice were significantly elevated compared with the wild-type mice. Analysis of VsEP waveform manifested prolonged P1 latency and declined P1N1 amplitude in heterozygous mutant mice ($P < 0.05$). Results of rotarod rod test and balance beam test acquired from 2-month-old *Atp2b2* Oblivion heterozygous mutant mice were not significantly different from the wild-type mice, while the ability of the mutant mice to accomplish the tests descended significantly at 8 months of age compared with the wild-type mice ($P < 0.05$). **Conclusion** *Atp2b2* Oblivion heterozygous mutant mice showed defective vestibular electrophysiological function at 2 months old, and abnormalities in vestibule-related behaviors can be detected at 8 months old. The vestibular function of *Atp2b2* Oblivion heterozygous mutant mice deteriorate progressively.

[Key words] ATPase plasma membrane Ca^{2+} transporting 2 (ATP2B2); vestibular dysfunction; vestibular hair cell; hair bundle

钙离子转运ATP酶B2 (ATPase plasma membrane Ca^{2+} transporting 2, ATP2B2) 属于p型初级离子转运ATP酶家族, 由*Atp2b2*基因编码, 特异性表达于某些组织如内耳^[1]、脑^[2]、乳腺^[3]、心脏等^[4-5]。在内耳中, *Atp2b2*高表达于耳蜗外毛细胞和前庭毛细胞纤毛^[1], 在耳蜗内毛细胞及螺旋神经元中也有表达。ATP2B2在外毛细胞纤毛上可将细胞内钙离子外排至纤毛附近的内淋巴中, 从而调节细胞内及内淋巴中的钙离子水平^[6-7]; ATP2B2在前庭系统中还可能通过维持细胞外钙离子浓度参与耳石的形成^[8], 是维持听觉及平衡觉功能的重要蛋白。已在遗传性耳聋家系中证实ATP2B2基因存在多个突变位点, 能以单倍剂量不足(haploinsufficiency)的方式引起常染色体显性遗传非综合征性耳聋82 (autosomal dominant non-syndromic hearing loss 82, DFNA82)^[9]。携带杂合突变患者通常可通过出生时听力筛查, 部分患者3~6岁开始出现进行性高频听力障碍, 前庭功能轻度异常^[10]。小鼠*Atp2b2*基因位于6号染色体上, 与人的ATP2B2基因同源, 目前已经报道了数个小鼠*Atp2b2*基因突变模型, 如*Atp2b2* Oblivion、*dfw*^{2J}、*dfw*⁵、*dfw*^[11-13]等。*Atp2b2* Oblivion杂合突变小鼠出现了与人类表型类似的高频听力障碍, 而纯合突变小鼠除听力障碍外还可出现明显平衡功能障碍如头部震颤、打转等异常行为^[8,11,14-15], 表明*Atp2b2*纯合突变可能损伤前庭功能。*Atp2b2*杂合突变小鼠无明显的平衡功能障碍, 但尚无报道证实其前庭结构及功能是否受到影响^[9,13]。本研究通过测试2月龄、8月龄*Atp2b2* Oblivion杂合突变小鼠前庭电生理及行为学表现, 结合前庭毛细胞的形态、计数及超微结构分析, 研究*Atp2b2* Oblivion杂合突变小鼠前庭功能障碍及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级2月龄及8月龄雄性*Atp2b2* Oblivion杂合突变小鼠及对照野生型C57BL/6J小鼠均购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号为SCXK(苏)2023-0009。在*Atp2b2*基因16号外显子引入S877F点突变(ENSMUST00000089003.11), 即第877个氨基酸由丝氨酸突变为苯丙氨酸, 对应的核酸序列由TCC突变为TTC。通过对小鼠尾基因组PCR扩增及Sanger测序分析确认基因型。所有小鼠均饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心, SPF级饲养环境, 每日光照时间8:00至20:00, 环境噪声低于60 dB, 食物及饮水供应充足, 实验动物使用许可证号为SYXK(沪)2020-0025。

1.1.2 主要试剂与仪器 多聚甲醛(16005, 美国Sigma), 戊二醛(96049, 美国Ted pella), 0.5 mol/L乙二胺四乙酸(EDTA)溶液(E1170, 北京索莱宝科技有限公司), 曲拉通X-100(T8787, 美国Invitrogen), 驴血清(BMS0140, 美国Abbkine), ATP2B2抗体(PA1-915, 美国Invitrogen), Alexa Fluor 488鬼笔环肽(A12379, 美国Invitrogen), 转录因子SOX-2(SRY-box transcription factor 2)抗体(AF2018, 美国R&D公司), 肌球蛋白7A(myosin 7A, MYO7A)抗体(25-6790, 美国Proteus BioSciences), Alexa Fluor 594驴抗兔抗体(R37119, 美国Invitrogen), Alexa Fluor 647驴抗山羊抗体(A21447, 美国Invitrogen), 封片剂(36308ES20, 翌圣生物科技上海股份有限公司), 盐酸赛拉嗪(X1251, 美国Sigma)及舒泰50

(WK001, 法国维克)。

听觉诱发电位工作站 (System 3 RZ6 workstation, 美国TDT), 加速度传感器 (14140, 上海北智电子科技有限公司), 小鼠转棒式疲劳仪 (XR-6C, 上海欣软信息科技有限公司), 体视镜 (Stemi 305, 德国Zeiss), 共聚焦显微镜 (DMi8, 德国Leica), 扫描电子显微镜 (扫描电镜, Gemini300, 德国Zeiss), 透射电子显微镜 (透射电镜, HT7800, 日本Hitachi), 切片机 (CM3050S, 德国Leica)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组与处理 选取2月龄及8月龄 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠 (Obl/+组) 及对应月龄 C57BL/6J 小鼠 (Wt 组) 各 10 只。首先通过前庭诱发电位 (vestibular evoked potential, VsEP)、前庭肌源性诱发电位 (vestibular evoked myogenic potential, VEMP)、转棒实验、平衡木实验检测所有小鼠的前庭功能, 然后每组每个月龄小鼠取 3 只用于免疫荧光实验观察小鼠椭圆囊纤毛结构 (左侧耳) 及毛细胞存活情况 (右侧耳), 3 只用于扫描电镜观察椭圆囊纤毛结构 (双侧耳), 4 只用于透射电镜观察椭圆囊毛细胞的超微结构 (双侧耳)。

1.2.2 VsEP 利用 TDT 听觉诱发电位工作站系统进行 VsEP 检测。小鼠以 20 mg/kg 盐酸赛拉嗪和 50 mg/kg 舒泰腹腔注射麻醉, 然后置于 37 °C 电加热垫上维持体温。将记录电极置于颅顶正中皮下, 参考电极置于待测耳侧乳突下, 接地电极置于另一侧大腿皮下。使用非侵入性头夹将小鼠头部固定在振动发生装置上, 振动发生装置沿鼻枕轴的方向振动, 从而刺激小鼠球囊和椭圆囊。采用持续时间为 2.0 ms 的矩形脉冲进行刺激, 通过加速度传感器设定振动脉冲由 51 dB (相当于 $2\times g/ms$) 输出开始, 逐次递减, 每次 3 dB, 直至 27 dB (相当于 $0.125\times g/ms$), 记录并分析波形。

1.2.3 VEMP 利用听觉诱发电位工作站系统进行 VEMP 检测。按 “1.2.2” 的方式麻醉、保温。使用定制的支架固定小鼠, 在检测过程中, 小鼠呈俯卧位, 头部抬高, 与水平线呈 45°, 保持小鼠颈部过度伸展状态。将记录电极置于待测耳侧胸锁乳突肌内, 参考电极置于颅顶正中皮下, 接地电极置于另一侧大腿皮下。给予小鼠 2~20 kHz 声音刺激, 刺激速率为 5 次/s, 从 120 dB 开始, 逐次递减, 每次 5 dB, 记录并分析波形。

1.2.4 转棒及平衡木实验 转棒实验: 转棒测试转速为 8、25、35 r/min。正式测试前小鼠需连续训练 3 d, 每日每种转速训练 3 次。正式测试前小鼠至少休息 30 min, 初始转速为 5 r/min, 然后再调整至测试转速, 记录小鼠掉落的时间, 限时 300 s。每只小鼠进行同一转速的重复测试之间间隔 10 min, 在进行另一转速测试前需至少间隔 30 min。每只小鼠每种转速测试 3 次, 计算平均值作为该转速下的停留时间。

平衡木实验: 平衡木为一根长 100 cm、宽 1 cm 的木条, 将鼠笼放在木条下提供保护。正式测试前小鼠需连续训练 3 d, 要求小鼠可自行单向通过平衡木且没有明显停顿或折返, 小鼠通过平衡木后提供水果果冻作为奖励; 如果小鼠在平衡木上排泄, 需清理排泄物并用乙醇擦拭去除气味。记录小鼠在平衡木上移动 80 cm 的时间, 每只小鼠测试 3 次, 计算平均值作为小鼠的通过时间。

1.2.5 免疫荧光实验 小鼠按 “1.2.2” 的方式麻醉后, 颈椎脱臼处死。断头, 取出耳蜗, 体视镜下快速取出椭圆囊, 于 4% 多聚甲醛中室温固定 40 min, 继续于 0.5 mol/L EDTA 中室温脱钙 15~18 min, 随小鼠月龄增长适当延长脱钙时间。将椭圆囊在室温下用含 8% 驴血清和 0.1% 曲拉通 X-100 的 PBS (10 mmol/L, pH 7.4) 封闭 1 h, 以此封闭液稀释一抗和二抗。一抗 4 °C 孵育过夜, 一抗包括 ATP2B2 抗体 (1:300)、MYO7A 抗体 (1:300)、SOX2 抗体 (1:300), ATP2B2 抗体用于标记野生型及突变 ATP2B2 蛋白, MYO7A 抗体用于标记前庭毛细胞, SOX2 抗体用于标记前庭 II 型毛细胞及支持细胞的细胞核。次日用含有 0.1% 曲拉通 X-100 的 PBS 清洗 3 次, 二抗及 Alexa Fluor 488 鬼笔环肽 (1:100) 室温孵育 1 h, 二抗包括 Alexa Fluor 594 驴抗兔抗体 (1:300)、Alexa Fluor 647 驴抗山羊抗体 (1:300), 鬼笔环肽用于标记前庭毛细胞细胞骨架。封片后在共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 扫描电镜样品制备及观察 按 “1.2.5” 的方式取出小鼠椭圆囊, 用 2.5% 戊二醛室温固定 30 min 后, 用蛋白酶在 37 °C 下消化前庭组织耳石膜 3~5 min, 随小鼠月龄增长适当延长消化时间; 分离耳石膜以暴露下方纤毛, 随后用 1% 四氧化锇于室温下固定 1 h, 洗涤后用 1% 硫代卡巴肼于室温下避光反应 30 min, 洗涤后再次用 1% 四氧化锇于室温下固定

1 h, 洗涤后进行梯度乙醇脱水, 临界点干燥, 喷金, 扫描电镜观察。

1.2.7 透射电镜样品制备及观察 按“1.2.5”的方式取出小鼠椭圆囊, 2.5%戊二醛 4℃固定过夜, 后用 1%四氧化锇于室温下固定 2 h, 随后用 0.1 mol/L PB 缓冲液洗涤, 乙酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, 洗涤后依次在乙醇和丙酮中进行梯度脱水, 在环氧树脂中包埋、聚合, 之后将椭圆囊切片、染色, 透射电镜观察。

1.3 统计学分析

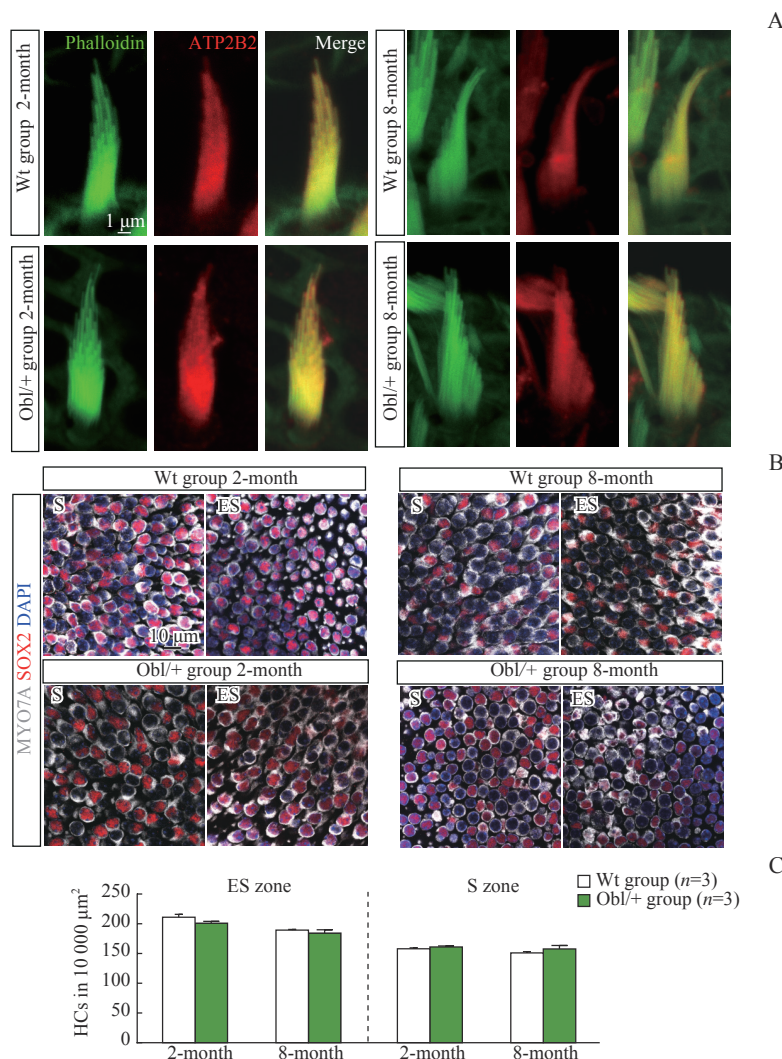
使用 GraphPad Prism 10.0 软件进行数据统计分析, 定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠椭圆囊 ATP2B2 表达情况及毛细胞计数

通过免疫荧光实验观察 2 月龄和 8 月龄 Wt 组及 Obl/+ 组小鼠椭圆囊纤毛结构以及 ATP2B2 表达情况, 发现 2 月龄及 8 月龄 Obl/+ 组小鼠纤毛结构正常, ATP2B2 表达于前庭毛细胞纤毛, 与 Wt 组无明显差别 (图 1A)。

观察 2 月龄及 8 月龄的 2 组小鼠椭圆囊毛细胞 (图 1B), 对椭圆囊微纹区 (striola zone, S zone) 及纹外区 (extra-striola zone, ES zone) 毛细胞分别计数, 结果显示 2 月龄和 8 月龄 Obl/+ 组小鼠椭圆囊微纹区及纹外区毛细胞数量与 Wt 组差异无统计学意义 (图 1C)。



Note: A. Representative confocal images with F-actin (green) and ATP2B2 (red) stained at utricles ($\times 1\ 000$). Scale bar=1 μm . B. Representative confocal images with MYO7A (gray), SOX2 (red) and nuclei (blue) stained at utricles ($\times 126$). Scale bar=10 μm . C. Numbers of hair cells (HCs) in an area of 10 000 μm^2 in the ES zone and the S zone.

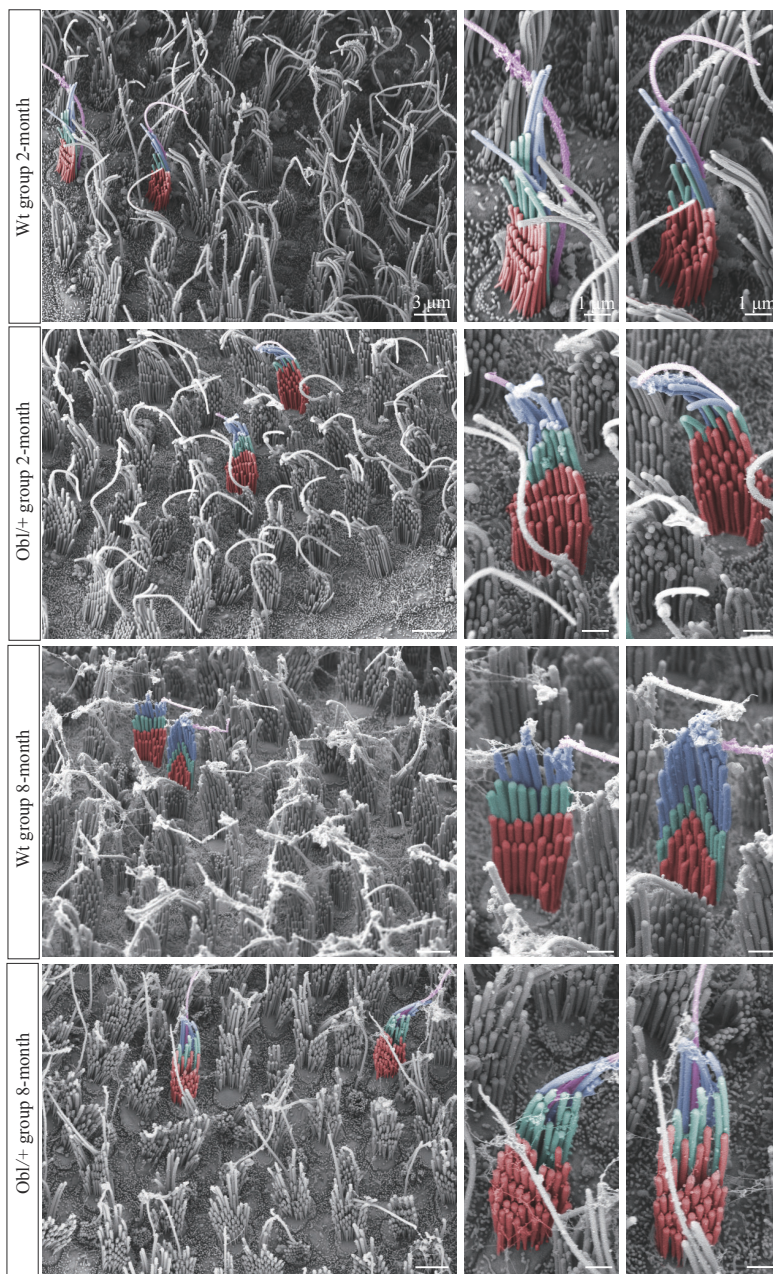
图1 Wt组及Obl/+组小鼠前庭椭圆囊ATP2B2表达情况及毛细胞计数

Fig 1 Expression of ATP2B2 and hair cell count in vestibular utricles of the Wt group and the Obl/+ group mice

2.2 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠椭圆囊毛细胞纤毛结构

扫描电镜观察2月龄及8月龄 Wt 组及 Obl/+ 组小鼠椭圆囊毛细胞纤毛形态。2月龄和8月龄时2组小

鼠椭圆囊毛细胞纤毛形态正常,均由一根较长动纤毛及数排静纤毛组成,有正确的纤毛朝向,未观察到明显异常(图2)。



Note: Different colors represent different rows of stereocilia (red—row 3; cyan—row 2; blue—row 1) and violet represents kinocilia. The left column, $\times 3\,000$, scale bar=3 μm ; the right two columns are partial magnifications of the left column, scale bar=1 μm .

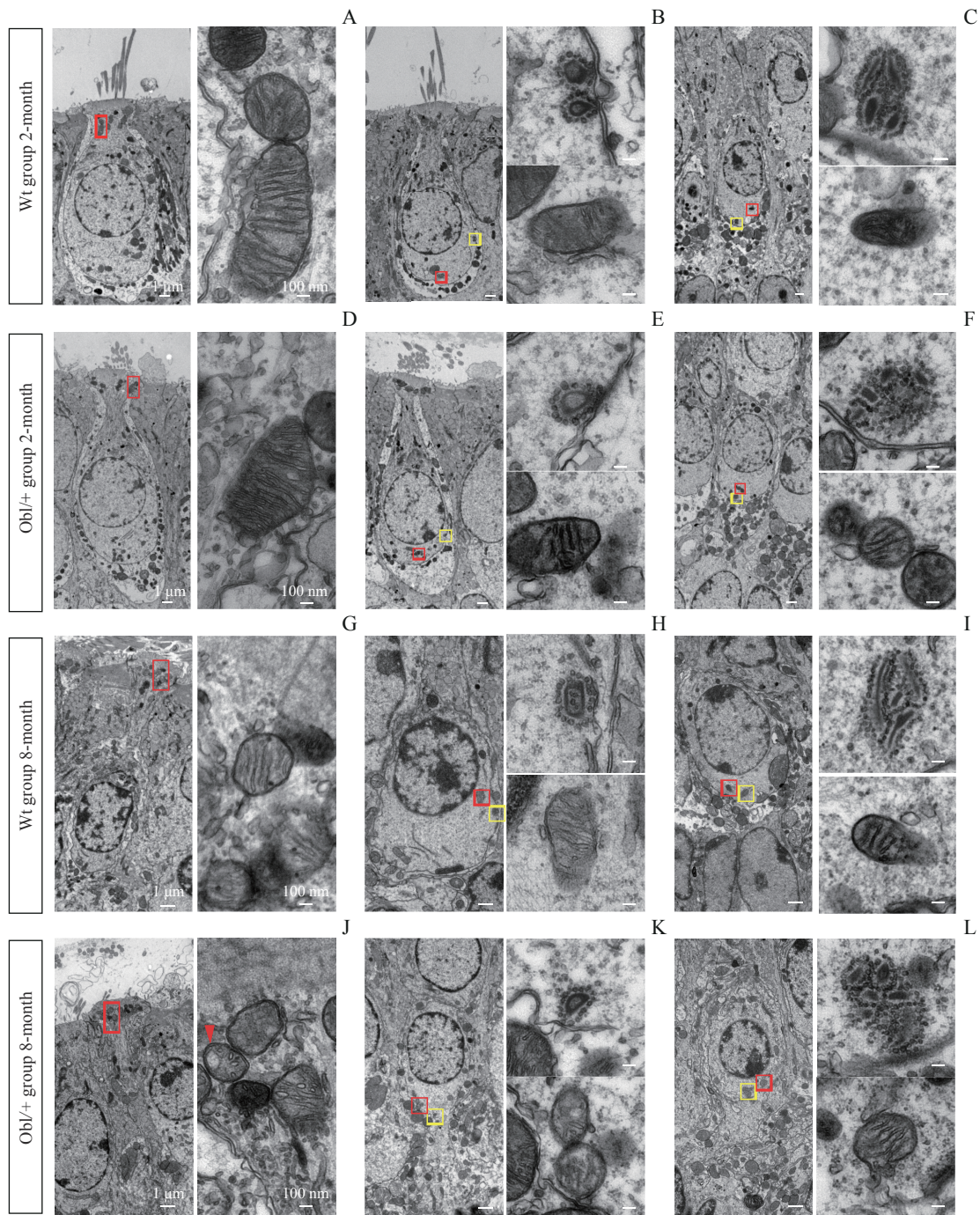
图2 Wt组及 Obl/+组小鼠前庭椭圆囊毛细胞纤毛超微结构

Fig 2 Ultrastructure of hair cell stereocilia in vestibular utricles of the Wt group and the Obl/+ group mice

2.3 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠椭圆囊毛细胞线粒体及带状突触结构

透射电镜观察2月龄及8月龄 Wt 组及 Obl/+ 组小鼠椭圆囊毛细胞(以 I 型毛细胞为代表)表皮板附近线粒体和神经连接部位线粒体,以及带状突触结构

(图3)。结果显示:2月龄 Obl/+ 组小鼠线粒体和突触均无明显异常,在毛细胞底部还观察到数个带状突触形成的“聚合体”;而8月龄 Obl/+ 组小鼠前庭毛细胞表皮板附近部分线粒体出现空泡样变性,毛细胞底部线粒体及带状突触结构仍无明显异常。



Note: A/D/G/J. Ultrastructure of mitochondria under the cuticular plate in the type I utricle hair cells. The images on the right are partial enlargements of the boxes in the left images. Scale bar=1 μm [left: 2-month ($\times 1\,500$), 8-month ($\times 2\,500$)] or 100 nm (right: $\times 15\,000$). B/C/E/F/H/I/K/L. Ultrastructure of mitochondria and ribbon synapses at the synaptic site in utricle hair cells. The images on the right are partial enlargements of the boxes in the left images. Scale bar=1 μm [left: 2-month ($\times 1\,500$), 8-month ($\times 2\,500$)] or 100 nm (right: $\times 15\,000$). The red boxes indicate mitochondria; the yellow boxes indicate ribbon synapses; the arrow indicates mitochondrion with vacuole-like denaturation.

图3 Wt组及Obl/+组小鼠椭圆囊毛细胞线粒体及带状突触超微结构

Fig 3 Ultrastructure of mitochondria and ribbon synapses of hair cells in utricles of the Wt group and the Obl/+ group mice

2.4 2月龄 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠前庭电生理检测异常而行为学检测无异常

2月龄时, Obl/+组小鼠 VsEP 阈值较 Wt 组小鼠显著上升, P1 潜伏期延长, P1N1 波幅降低, VEMP

阈值显著上升, 差异均有统计学意义 (图 4A~F, 均 $P<0.05$)。转棒及平衡木实验结果显示, Obl/+ 组 2月龄小鼠与 Wt 组小鼠平衡功能无明显差异 (图 4G、H)。

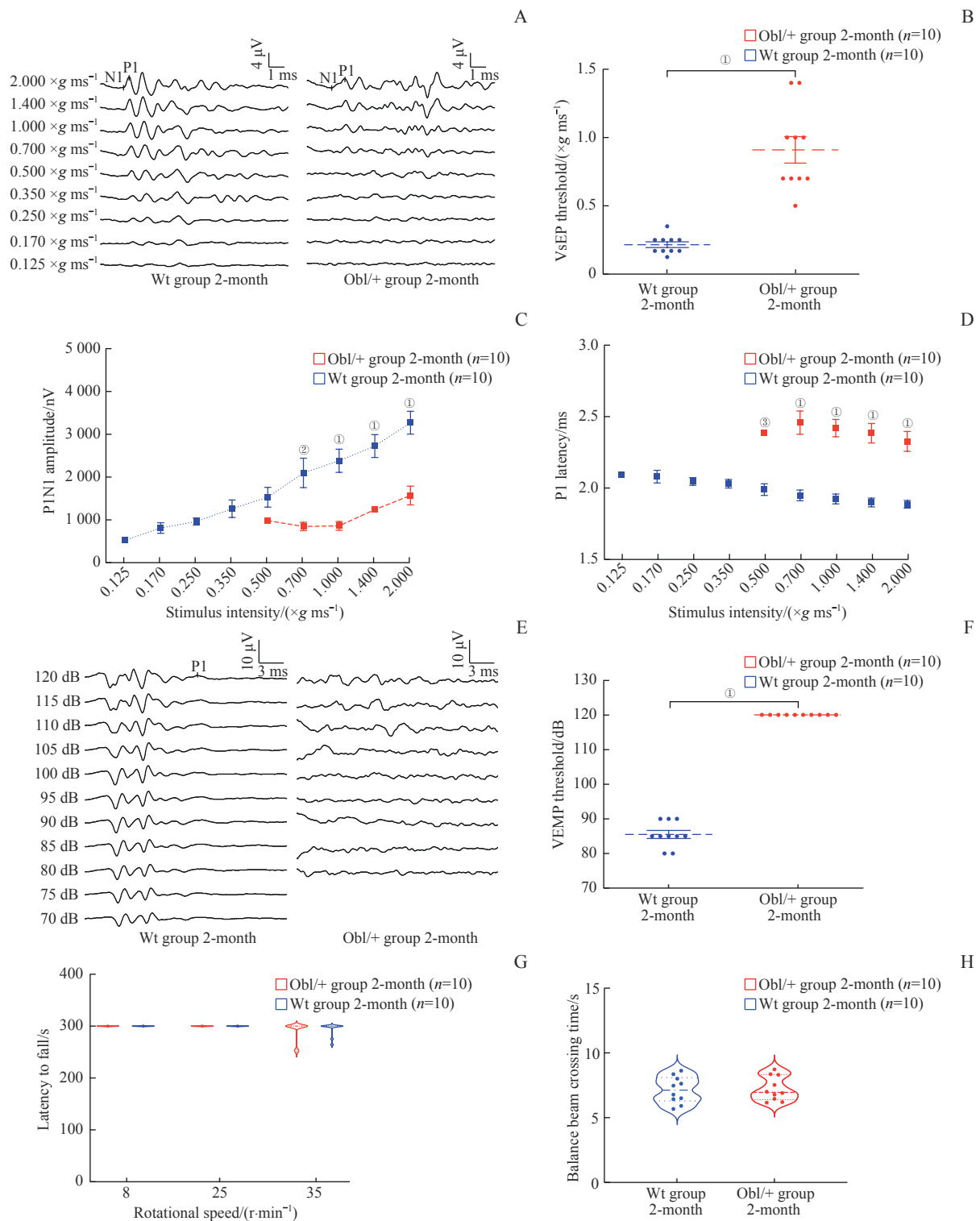


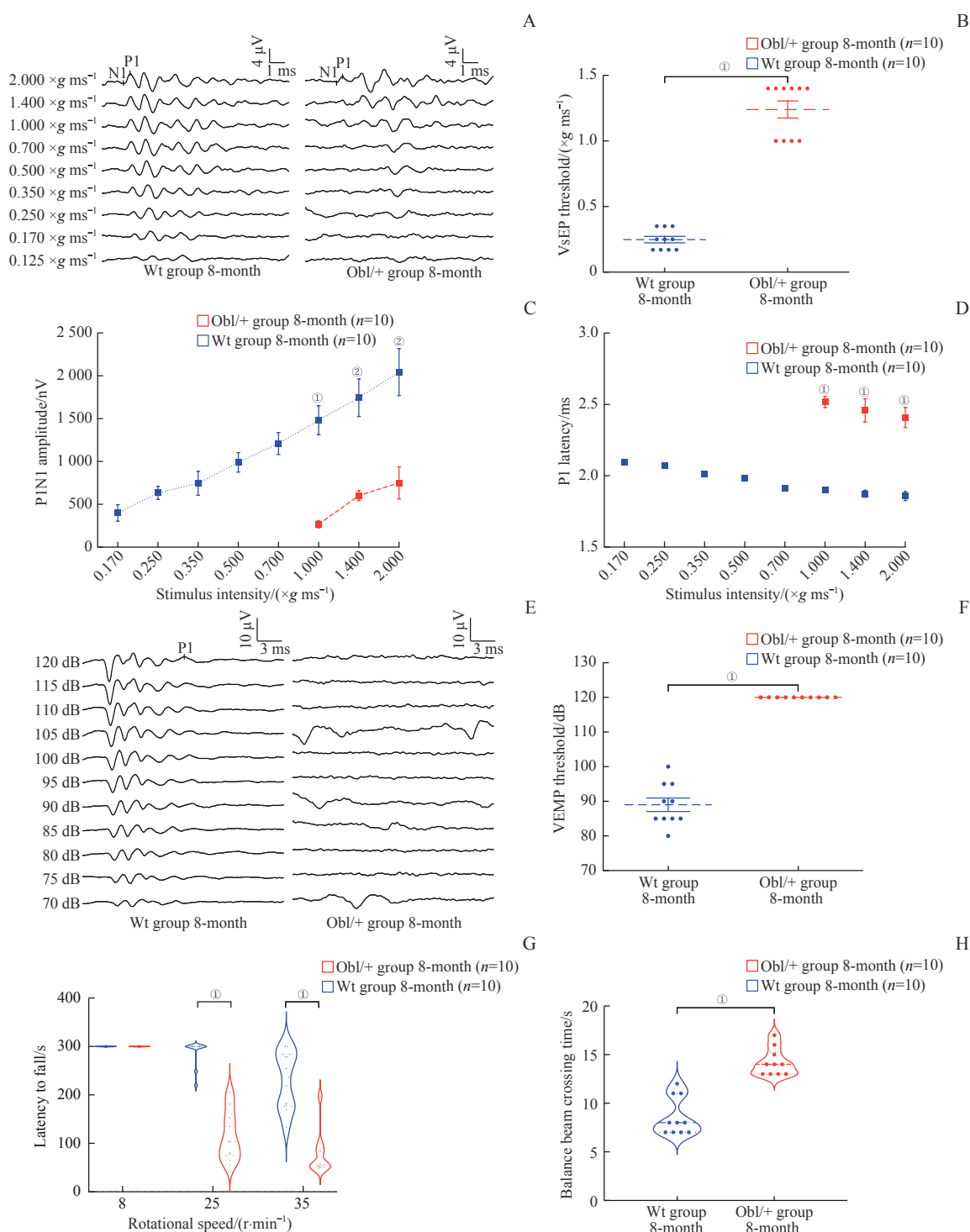
图4 2月龄Wt组及Obl/+组小鼠VsEP、VEMP及行为学实验

图4 VsEP, VEMP and behavioral tests of 2-month-old mice in the Wt group and the Obl/+ group

2.5 8月龄Atp2b2 Oblivion杂合突变小鼠前庭电生理检测异常伴有行为学检测异常

8月龄时, Obl/+组小鼠VsEP阈值较Wt组小鼠显著上升, P1潜伏期延长, P1N1波幅降低, VEMP阈

值显著上升, 差异均有统计学意义(图5A~F, 均 $P<0.05$)。转棒及平衡木实验结果显示, Obl/+组8月龄小鼠平衡功能较Wt组显著变差(图5G、H), 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。



Note: A. VsEP waveform. B. VsEP threshold comparison. C. P1N1 amplitude comparison. D. P1 latency comparison. E. VEMP waveform. F. VEMP threshold comparison. G. Latency to fall from the rotary rod within 300 s. H. Time to pass 80 cm balance beam. ① $P=0.000$, ② $P=0.001$.

图5 8月龄Wt组及Obl/+组小鼠VsEP、VEMP及行为学实验

Fig 5 VsEP, VEMP and behavioral tests of 8-month-old mice in the Wt group and the Obl/+ group

3 讨论

在内耳中, ATP2B2高表达于耳蜗外毛细胞以及前庭毛细胞的纤毛部位^[1]。作为真核细胞重要的钙离子通道^[16], ATP2B2对钙离子有较高亲和力^[17],

因而对维持细胞内局部区域较低水平的钙离子有重要作用^[6-7]。除此之外, ATP2B2还可影响纤毛附近内淋巴的钙离子浓度, 进而影响耳石器表面所覆盖的耳石膜的维持^[8], 是维持听觉及平衡觉功能的重要蛋白。

遗传性耳聋家系研究证实ATP2B2基因存在多个

突变位点,可导致常染色体显性遗传非综合征性耳聋^[9],仅少数患者伴有前庭功能轻度异常^[10]。小鼠 *Atp2b2* 基因位于6号染色体上,目前也有数个小鼠 *Atp2b2* 基因突变报道,杂合突变小鼠表现出与人类表型类似的高频听力障碍,但未表现出明显的因前庭障碍导致的行为异常^[11-15,18]。与之不同的是,在 *Atp2b2* 敲除及纯合突变小鼠可观察到明显的前庭相关的行为异常,如头部震颤、打转等^[4,8-9],提示ATP2B2在维持正常的前庭功能中起到一定的作用。但在既往研究^[8]中,并未观察到 *Atp2b2* 敲除小鼠前庭系统椭圆囊及球囊位觉斑的异常,仅观察到敲除小鼠部分耳石缺失;然而由于内耳样品制作过程中有脱钙处理,可能出现假阳性的结果。在 *Atp2b2* 敲除小鼠的小脑中观察到浦肯野细胞数量增加、颗粒细胞数量减少、分子层变薄,然而这些变化不足以解释其严重的平衡缺陷^[8],因此ATP2B2在前庭系统中的作用机制仍有待探索。

本研究涉及的 *Atp2b2* Oblivion 突变是经乙酰基亚硝基脲诱导形成的突变体,该突变为错义突变,突变蛋白可正常表达^[19]。纯合突变表现为听力和前庭功能障碍;杂合突变小鼠1月龄即出现底圈外毛细胞的丢失和听力下降并随年龄加重,至3月龄仍未出现明显前庭相关的行为异常^[15]。此前关于 *Atp2b2* 突变小鼠前庭功能的研究主要在行为学层面,结果显示出生后5周 *Atp2b2* *dfw*^{js} 杂合突变小鼠转棒测试结果以及出生后6周杂合突变小鼠游泳测试结果均与野生型小鼠无显著差异^[13]。然而前庭有代偿机制,简单的行为学功能检测无法早期发现和定量外周前庭功能改变。通过对 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠前庭功能检测,我们发现虽然2月龄 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠在行为学测试中与野生型小鼠无显著差异,但是前庭电生理指标异常;前庭功能异常在8月龄时明显加重,表明 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变导致前庭功能渐进性下降,提示 *Atp2b2* 单倍体剂量不足现象在前庭系统亦存在。

Atp2b2 Oblivion 杂合突变小鼠前庭毛细胞ATP2B2表达未见明显改变,2月龄及8月龄杂合突变小鼠椭圆囊微纹区及纹外区毛细胞数量较野生型小鼠无显著差异。扫描电镜也未发现前庭毛细胞纤毛结构异常。结合此前研究结果, *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠耳蜗毛细胞纤毛形态观察显示残余的外毛细胞纤毛大多有正常的“W”形态,尤其是顶圈部位的纤毛,仅少量退化的毛细胞纤毛出现融合^[15]。这表明 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变基本不影响毛细胞的发育及

纤毛的结构。

ATP2B2是毛细胞钙外排重要通道,感觉毛细胞钙稳态对机械感觉适应、突触传递和传出调制尤其重要^[20]。为探究 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变导致前庭功能障碍机制,我们利用透射电镜观察前庭毛细胞的超微结构。钙离子通过机械传导通道进入纤毛后,迅速与内源性钙离子螯合剂结合^[21],可将钙离子限制在纤毛附近^[22]。此外,集中在表皮板下方的线粒体也可储存大容量的钙离子^[23],钙离子还可快速被纤毛处ATP2B2输出至内淋巴^[6],从而维持细胞内钙稳态。因此ATP2B2的功能异常可能会对毛细胞顶部乃至整个毛细胞的钙离子浓度产生影响,并通过多种途径引起功能障碍和细胞死亡。我们对毛细胞表皮板附近的线粒体进行观察,2月龄杂合小鼠线粒体结构无明显异常,8月龄杂合小鼠部分线粒体出现空泡样变性,而对照组小鼠并没有出现此异常,提示可能是表皮板附近区域钙离子浓度过高导致的线粒体损伤^[24]。此外我们也观察了毛细胞神经连接部位的结构,此处钙离子浓度及线粒体功能可对毛细胞带状突触产生影响^[25],由于钙超载引起的线粒体损伤可导致突触病变^[26]。通过透射电镜观察2月龄及8月龄 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠前庭毛细胞底部带状突触及线粒体结构,均未发现明显异常。提示 *Atp2b2* 杂合突变通过影响纤毛附近区域钙稳态导致前庭功能障碍。

本研究对前庭终末器官椭圆囊开展了较为细致的形态学观察,发现 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠随年龄增长出现线粒体轻微结构改变;通过电生理及行为学检测证实 *Atp2b2* Oblivion 杂合突变小鼠2月龄即出现显著前庭电生理改变,随时间进行性加剧,至8月龄时由于前庭中枢对外周功能障碍的失代偿或伴有前庭中枢自身的迟发病变^[27]而出现行为学改变。由于本研究仍处于初步探索阶段,仅凭借形态学观察无法对前庭功能障碍机制做出明确阐述,仍需深入研究,并进一步探索前庭毛细胞退行性改变的机制,为前庭功能障碍的防治提供思路。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院附属第九

人民医院伦理委员会的审核批准(批件号SH9H-2023-A803-1)。所有实验过程均遵照《实验动物饲养管理和使用指南》及《上海交通大学医学院附属第九人民医院动物中心管理手册》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Ethics Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval No. SH9H-2023-A803-1). And all experimental animal protocols were carried out by following *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and *Manual for Laboratory Animals Management of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*.

作者贡献/Authors' Contributions

刘伟晴负责实验操作、数据采集和分析、论文撰写;金晨曦、冯

宝怡、成桢哲、孙怡琳参与论文修改;陶永负责实验设计、实验指导及论文修改;郑晓飞参与实验设计;董庭婷、吴皓参与实验指导。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

LIU Yiqing operated the experiment, acquired and analyzed the data, and drafted the manuscript. JIN Chenxi, FENG Baoyi, CHENG Zhenzhe and SUN Yilin participated in manuscript modification. TAO Yong designed and guided the study and revised the manuscript. ZHENG Xiaofei participated in study designing. Dong Tingting and WU Hao participated in study guidance. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2023-11-26

• Accepted: 2024-03-04

• Published online: 2024-06-18

参·考·文·献

- [1] CHEN Q G, MAHENDRASINGAM S, TICKLE J A, et al. The development, distribution and density of the plasma membrane calcium ATPase 2 calcium pump in rat cochlear hair cells[J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 36(3): 2302-2310.
- [2] STAHL W L, EAKIN T J, OWENS J W Jr, et al. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by *in situ* hybridization[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992, 16(3/4): 223-231.
- [3] REINHARDT T A, FILOTEO A G, PENNISTON J T, et al. Ca^{2+} -ATPase protein expression in mammary tissue[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279(5): C1595-C1602.
- [4] PRASAD V, OKUNADE G, LIU L, et al. Distinct phenotypes among plasma membrane Ca^{2+} -ATPase knockout mice[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1099: 276-286.
- [5] GREEB J, SHULL G E. Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(31): 18569-18576.
- [6] DUMONT R A, LINS U, FILOTEO A G, et al. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2a is the PMCA of hair bundles[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(14): 5066-5078.
- [7] YAMOA H E N, LUMPKIN E A, DUMONT R A, et al. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase extrudes Ca^{2+} from hair cell stereocilia[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(2): 610-624.
- [8] KOZEL P J, FRIEDMAN R A, ERWAY L C, et al. Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(30): 18693-18696.
- [9] MCCULLOUGH B J, TEMPEL B L. Haplo-insufficiency revealed in deafwaddler mice when tested for hearing loss and ataxia[J]. *Hear Res*, 2004, 195(1/2): 90-102.
- [10] SMITS J J, OOSTRIK J, BEYNON A J, et al. De novo and inherited loss-of-function variants of ATP2B2 are associated with rapidly progressive hearing impairment[J]. *Hum Genet*, 2019, 138(1): 61-72.
- [11] STREET V A, MCKEE-JOHNSON J W, FONSECA R C, et al. Mutations in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice[J]. *Nat Genet*, 1998, 19(4): 390-394.
- [12] SPECA D J, RABEE N, CHIHARA D, et al. A genetic screen for behavioral mutations that perturb dopaminergic homeostasis in mice[J]. *Genes Brain Behav*, 2006, 5(1): 19-28.
- [13] WATSON C J, TEMPEL B L. A new *Atp2b2* deafwaddler allele, *dfw¹⁵*, interacts strongly with *Cdh23* and other auditory modifiers[J]. *Hear Res*, 2013, 304: 41-48.
- [14] BORTOLOZZI M, BRINI M, PARKINSON N, et al. The novel PMCA2 pump mutation *Tommy* impairs cytosolic calcium clearance in hair cells and links to deafness in mice[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(48): 37693-37703.
- [15] SPIDEN S L, BORTOLOZZI M, DI LEVA F, et al. The novel mouse mutation *Oblivion* inactivates the PMCA2 pump and causes progressive hearing loss[J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(10): e1000238.
- [16] CARAFOLI E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane[J]. *Annu Rev Physiol*, 1991, 53: 531-547.
- [17] LEHOTSKÝ J. Plasma membrane Ca^{2+} -pump functional specialization in the brain. Complex of isoform expression and regulation by effectors[J]. *Mol Chem Neuropathol*, 1995, 25(2/3): 175-187.
- [18] TAKAHASHI K, KITAMURA K. A point mutation in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene causes deafness in Wriggle Mouse Sagami[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261(3): 773-778.
- [19] HRABÉ DE ANGELIS M H, FLASWINKEL H, FUCHS H, et al. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(4): 444-447.
- [20] LENZI D, ROBERTS W M. Calcium signalling in hair cells: multiple roles in a compact cell[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1994, 4(4): 496-502.
- [21] HACKNEY C M, MAHENDRASINGAM S, PENN A, et al. The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(34): 7867-7875.
- [22] RICCI A J, WU Y C, FETTIPLACE R. The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in auditory hair cells[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(20): 8261-8277.
- [23] BEURG M, NAM J H, CHEN Q G, et al. Calcium balance and mechanotransduction in rat cochlear hair cells[J]. *J Neurophysiol*, 2010, 104(1): 18-34.
- [24] GLANCY B, BALABAN R S. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(14): 2959-2973.
- [25] WONG H C, ZHANG Q X, BEIRL A J, et al. Synaptic mitochondria regulate hair-cell synapse size and function[J]. *Elife*, 2019, 8: e48914.
- [26] FLIPPO K H, STRACK S. Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity[J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(4): 671-681.
- [27] FAKIRA A K, GASPERIS L D, THOMAS A P, et al. Purkinje cell dysfunction and delayed death in plasma membrane calcium ATPase2-heterozygous mice[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2012, 51(1/2): 22-31.

[本文编辑] 瞿麟平

