

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.005

缺氧对椭圆囊毛细胞谷氨酸递质合成及释放的影响*

张敏¹ 李家卉¹ 刘玉辉¹ 李聪聪¹ 黄立桂² 王小成^{1Δ}

(1 空军军医大学航空航天医学系 陕西 西安 710032; 2 联勤保障部队庐山康复疗养中心 江西 九江 332900)

摘要 目的:探讨缺氧对豚鼠前庭耳石器椭圆囊毛细胞内兴奋性神经递质谷氨酸的合成及释放的影响。**方法:**分离 4 周龄豚鼠双侧椭圆囊进行体外培养,分别置于常氧(21% O₂)和低氧(1% O₂)环境下处理 30 min,利用 Western blotting、酶活性检测等方法检测前庭外周感受器椭圆囊斑毛细胞中谷氨酰胺酶的活性和表达水平,评价谷氨酸合成变化情况;利用 ELISA、免疫荧光等方法检测椭圆囊组织中谷氨酸含量和毛细胞内谷氨酸分布情况。**结果:**在给予缺氧处理后,豚鼠椭圆囊毛细胞中谷氨酸合成关键酶谷氨酰胺酶的表达、酶活性均未发生显著性变化($P>0.05$);ELISA 结果提示,相较于对照组,低氧组椭圆囊组织中谷氨酸水平降低 5.6% (对照组 vs. 缺氧组: 15.86 ± 2.19 vs. 13.02 ± 1.21 , $P<0.05$);免疫荧光结果提示,相较于对照组,低氧组椭圆囊毛细胞内的谷氨酸更加广泛的分布于毛细胞基底部,而在纤毛一侧分布较少。**结论:**在体外培养的椭圆囊组织中,低氧处理并未影响毛细胞谷氨酸的合成过程,但会显著增加毛细胞内兴奋性神经递质谷氨酸的释放。

关键词: 缺氧; 椭圆囊; 毛细胞; 谷氨酸

中图分类号: R-33; R322.923; R852.11 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2021)11-2023-05

Effects of Hypoxia on Synthesis and Release of Glutamate Acid in Utricle Hair Cells*

ZHANG Min¹, LI Jia-hui¹, LIU Yu-hui¹, LI Cong-cong¹, HUANG Li-gui², WANG Xiao-cheng^{1Δ}

(1 School of Aerospace Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Lushan rehabilitation and recuperation center, joint logistics support forces, Jiujiang, Jiangxi, 332900, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of hypoxia on the synthesis and release of glutamate acid in utricle hair cells in guinea pigs. **Methods:** Bilateral utricles of 4-week-old guinea pigs were isolated and treated in a constant oxygen (21% O₂) and hypoxia (1% O₂) condition for 30 minutes, respectively, in vitro. Western blotting and enzyme activity analysis were used to detect the activity and expression of glutaminase in hair cells and evaluate the change of synthesis of glutamate acid. The distributions of glutamate acid in utricles were detected by ELISA and immunofluorescence. **Results:** After exposed to hypoxia, the expression and activity of glutaminase, which are the key enzyme for synthesis of glutamate acid, did not change significantly. However, compared to the control group, ELISA results showed a 5.6% reduction of glutamate levels in hypoxia group ($P<0.05$), the results of immunofluorescence indicated that glutamate acid was more widely distributed in the basal area than area that close to kinocilium in cytoplasm of utricle hair cells in hypoxia group. **Conclusions:** Hypoxia treatment did not change the glutamate synthesis of hair cells, but increased the release of glutamate acid significantly in utricle hair cells *in vitro*.

Key words: Hypoxia; Utricle; Hair cells; Glutamate acid

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R322.923; R852.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)11-2023-05

前言

缺血缺氧是前庭诸多损伤的因素的共同病理生理基础,新生儿窒息、椎基底动脉供血不足等导致缺血性疾病以及高海拔低气压环境暴露等因素造成的缺氧改变,对前庭功能都会造成不良影响,包括前庭稳定性下降、失去对称性,导致空间定向障碍、运动病、躯体协调性及视觉稳定性降低等改变^[1-3]。缺血缺氧

性前庭系统异常可能与前庭感受器内兴奋性神经递质异常改变密切相关,在体阻断血液供应后,前庭输入神经元呈现神经末梢肿胀、毛细胞和神经盖之间的细胞间隙扩大等形态学改变特点,谷氨酸可能是造成以上病理性改变的主要因素^[4]。有研究表明,在内耳毛细胞与支持细胞之间存在的谷氨酸循环在维持正常输入神经功能有着重要作用^[5,6],但目前尚未有研究关注在缺氧条件下前庭外周器官内谷氨酸循环是否发生病理性变化。

* 基金项目: 全军实验动物专项科研项目(SYDW[2018]19号);

空军军医大学航空航天医学系后备人才创新基金项目(2019HBRC12); 中央军委后勤保障部卫生局保健专项科研项目

作者简介: 张敏(1991-),男,助教,主要研究方向:前庭系统疾病, E-mail: zhangmin2015@fmmu.edu.cn

Δ 通讯作者: 王小成(1978-),男,硕士研究生导师,副教授,主要研究方向:前庭系统疾病,

E-mail: wxcnose@126.com, 电话: 13572262385

(收稿日期: 2020-09-28 接受日期: 2020-10-23)

本研究采用离体椭圆囊培养模型,探究缺氧处理对毛细胞内谷氨酸生成与释放过程的影响,有助于更加深入理解外周前庭器官缺血缺氧性损伤的潜在致病机理,为下一步深入的机制和干预研究奠定理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4周龄 SPF 级豚鼠,均为雄性,饲养条件:专用饲料、定量摄入已灭菌饮用水、室温 20~25℃,湿度为 45~65%,光照 12 h 昼夜循环。实验动物由空军军医大学实验动物中心提供[SCXK(陕)2019-001]。实验所有操作遵循空军军医大学伦理道德委员会指导原则。

1.1.2 主要试剂 鬼笔环肽 (Phalloidin-iFluor 488, ab176753) 购自于美国 Abcam 公司,谷氨酰胺酶抗体 (Glutaminase ab-DF13334) 购自于 Affinity 公司; β -Actin 抗体 (MA6002) 购自 AntiProtech 公司,谷氨酰胺酶活性检测试剂盒 (SH190W) 购自于 G-clone 公司。荧光二抗 (Dylight 594, SAG59402) 购买自 AntiProtech 公司。I 型鼠尾胶原 (IC-1921) 购自 InCellGenE 公司。谷氨酸抗体 (AB133) 购自 sigma 公司。谷氨酸 ELISA 检测试剂盒购自于 Cloud-clone 公司。

1.2 实验分组

同一只豚鼠左右两侧椭圆囊按照随机数表法随机分为对照组和缺氧组。

1.3 方法

1.3.1 椭圆囊体外培养 按照文献报道的方法建立体外前庭外周器官组织培养模型^[7]。方法简述如下:首先制备鼠尾胶原三维凝胶,在无菌离心管中加入 28.56 μ L 无菌超纯水和 6 μ L 10 \times 无菌 DMEM 培养基,再加入 1.44 μ L 无菌 0.1 mol/L NaOH 溶液,三者混匀后,将其加入到 24 μ L 2 mg/mL I 型鼠尾胶原溶液中,轻柔吹打混匀后,立刻吸取 12 μ L 滴至 35 mm 培养皿中心,室温静置 20 min,形成具有三维结构的凝胶。其次,进行椭圆囊取材,以 10% 水合氯醛麻醉豚鼠,断头后取出听泡,放置于预冷的 Hanks 液中,去除耳蜗,保留完整前庭池,小心剥离前庭神经,游离椭圆囊,揭去耳石膜结构,保留椭圆囊基底膜。最后,在已经制备好凝胶的培养皿中加入 1.3 mL 高糖 DMEM 培养基,将取出的椭圆囊基底膜平整铺放在三维凝胶上,将培养皿放置于培养箱中培养。

1.3.2 椭圆囊缺氧处理 实验组椭圆囊组织放置于缺氧装置中,将装置内气体置换为 5% 的二氧化碳和 95% 氮气混合气,最终实现装置内残余 1% 氧气,以此实现缺氧处理。将缺氧装置密封良好后,置于 37℃ 恒温培养箱内,处理时间为 30 分钟。

1.3.3 免疫荧光 利用免疫荧光的方法观察两组椭圆囊组织中谷氨酰胺酶表达和谷氨酸分布变化情况。处理后的椭圆囊以预冷 Hanks 液清洗 3-5 次以去除培养基中谷氨酸对实验结果的影响,4% 多聚甲醛溶液固定 30 min; PBS 溶液清洗 3 次; 0.05% TritonX-100 破膜 10 min, 以 1% BSA 溶液封闭 30 分钟后,进行一抗孵育 24 小时,而后进行二抗孵育、鬼笔环肽染色后封片,利用激光共聚焦显微镜观察。

1.3.4 谷氨酰胺酶活性检测 处理后的椭圆囊以预冷 Hanks 液清洗 3-5 次以去除培养基中谷氨酸对实验结果的影响,按照

谷氨酰胺酶活性检测试剂盒的方法进行操作,每个椭圆囊组织加入 150 μ L 提取液,冰上匀浆后于 4℃, 12000 \times g 离心 15 min, 取上清进行酶活性检测。检测的原理是利用靛酚蓝比色法测定谷氨酰胺酶催化谷氨酰胺生成的氨来计算其酶活性。

1.3.5 谷氨酰胺酶表达检测 取两组处理后的椭圆囊组织,提取总蛋白,应用 SDS-PAGE 凝胶电泳法,电泳完毕后,转移至 PVDF 滤膜中。Western blot 法测定谷氨酰胺酶蛋白表达情况,凝胶成像系统扫描条带,记录并比较各组蛋白和内参照灰度值的比值。

1.4 统计学分析

采用 SPSS22.0, 计量资料以 ($\bar{x} \pm$ SEM) 表示, 成对样本两两比较行成对样本 t 检验法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组椭圆囊谷氨酰胺酶蛋白表达及酶活性的比较

利用免疫荧光法及 Western blot 方法发现,与对照组相比,

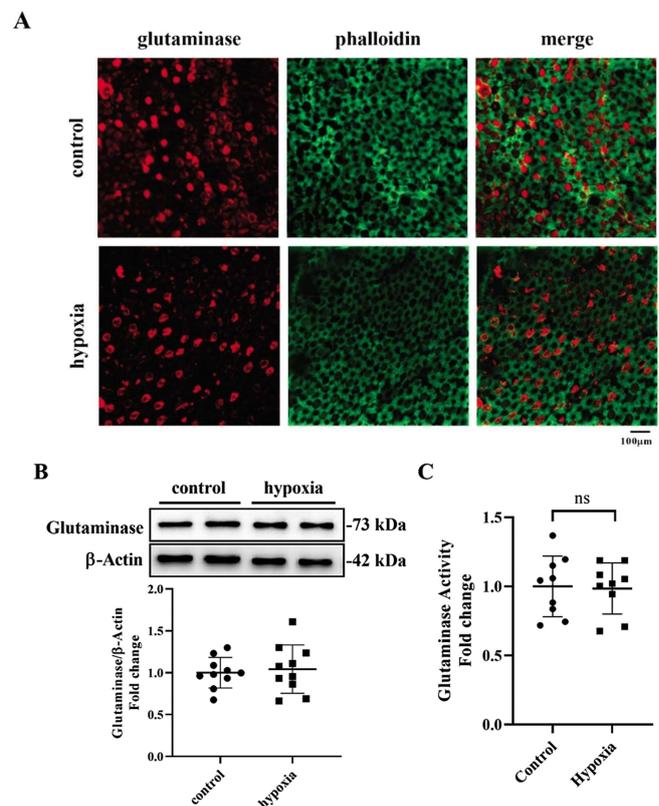


图 1 两组谷氨酰胺酶蛋白表达和酶活性的比较

注:(A)两组谷氨酰胺酶(红色)、鬼笔环肽(绿色)免疫荧光染色典型图。(B)两组谷氨酰胺酶蛋白表达 western blot 典型图和统计学分析。(C)两组谷氨酰胺酶活性检测。数据表示为 $\bar{x} \pm$ SEM, $n > 6$, ns: 两组差异不具备统计学意义。

Fig. 1 Comparison of expression and enzyme activity of glutaminase protein between two groups

Note: (A) Representative immunofluorescence images of glutaminase (red) and phalloidin (green) in control and hypoxia group. Scale bar, 100 μ m. (B) Representative western blot images and statistical analysis of glutaminase expression in control and hypoxia group. (C) Comparison of glutaminase activity between control and hypoxia groups. Data were expressed as $\bar{x} \pm$ SEM, $n > 6$, ns: no significance.

缺氧组谷氨酰胺酶表达并未发生显著性变化 ($P>0.05$), 见图 1A-B。谷氨酰胺酶活性检测发现, 与对照组相比, 缺氧组谷氨酰胺酶活性并未发生显著性变化 ($P>0.05$), 见图 1C。

2.2 两组椭圆囊组织中谷氨酸水平的比较

利用 ELISA 的方法检测两组椭圆囊组织匀浆液中的谷氨酸水平, 结果表明, 与对照组相比, 缺氧组的椭圆囊组织中的谷氨酸水平显著性降低 (对照组 vs. 缺氧组: 15.86 ± 2.19 vs. 13.02 ± 1.21 , $P<0.05$), 见图 2。

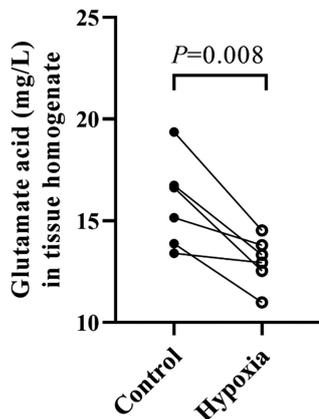


图 2 两组椭圆囊组织中谷氨酸水平的比较

Fig.2 Comparison of glutamic acid levels in utricle tissues of two groups

2.3 两组椭圆囊组织中谷氨酸在毛细胞内分布的比较

通过激光共聚焦 Z 轴扫描的方法观察谷氨酸在椭圆囊毛细胞内的分布改变, 结果发现, 在对照组椭圆囊毛细胞内, 谷氨酸在大量分布在毛细胞胞浆中靠近纤毛一侧, 而在远离纤毛一侧分布较少。而在缺氧组椭圆囊毛细胞内, 谷氨酸则更多的分布于毛细胞胞浆内远离纤毛、靠近基底部的一侧。见图 3。

3 讨论

前庭神经系统是人空间定向、保持人体平衡的重要系统, 它与人体其他系统在组织上和功能上有着极其广泛的联系, 并且相互影响^[8,9]。有研究表明, 前庭神经系统对缺氧暴露较为敏感, 各种因素导致的中枢和外周前庭系统缺血缺氧都将导致前庭功能异常, 出现空间定向障碍、运动病、躯体协调性及视觉稳定性降低等症^[1,10-12]。事实上, 缺血缺氧是诸多外周和中枢神经系统疾病的直接致病因素, 而在缺血缺氧引发的神经系统功能异常时, 兴奋性递质谷氨酸在其中发挥重要作用^[13-15]。当中枢前庭神经系统因颅脑外伤、脑卒中、OSAHS、低血糖等因素处于缺血缺氧状态时, 脑干前庭核、小脑和皮层的前庭中枢的神经元突触结构中均会出现不同程度的谷氨酸过度释放的病理性改变, 由此所造成的谷氨酸毒性是引发前庭神经系统症状的重要原因^[16,17]。大量研究更加深入的从钙离子通道、神经元内的氧化应激及关键信号分子改变等多个层次探索了缺氧引起中枢前庭系统谷氨酸递质释放及造成病理性损伤的机制^[14, 18-20], 有学者以改善谷氨酸毒性为靶点研究多种药物改善缺氧性中枢损伤的作用机制^[21,22]。但在外周前庭感受器当中, 缺氧所致的前庭终器损伤的相关研究却并不深入, 兴奋性神经递质谷氨酸

在其中所起的作用依然需要更多的实验证据。

在正常生理条件下, 前庭外周感受器毛细胞受到适宜刺激后, 胞膜去极化, 向突触间隙释放兴奋性神经递质谷氨酸^[23], 作用于突触后膜, 前庭输入神经产生动作电位, 从而传递运动信息至上位中枢。为了避免谷氨酸在突触间隙过度堆积, 在中枢神经系统、耳蜗的突触部位都存在着谷氨酸循环: 在耳蜗 corti 氏器, 毛细胞向突触间隙释放神经递质谷氨酸, 突触间隙内的谷氨酸与突触后膜上的谷氨酸受体相互作用, 使细胞膜去极化, 而后毛细胞周围支持细胞上的谷氨酸-天冬氨酸转运体能将突触间隙过量的谷氨酸转运进入支持细胞, 在谷氨酸合成酶的作用下合成谷氨酰胺, 维持突触间隙内谷氨酸的平衡, 支持细胞内的谷氨酰胺进一步被释放到胞外, 由毛细胞摄入, 进入毛细胞的谷氨酰胺进一步在毛细胞内谷氨酰胺酶的催化下生成谷氨酸, 这就是哺乳动物耳蜗内的谷氨酸循环通路^[24]。在病理因素存在时, 谷氨酸循环过程发生异常, 谷氨酸过度释放至突触间隙, 同时再摄取障碍, 造成突触结构和功能受损, 产生相应的神经系统症状, 称为谷氨酸毒性^[25]。研究证据表明, 在前庭感受器毛细胞和支持细胞之间同样存在着谷氨酸循环, 在维持谷氨酸水平正常和前庭功能稳定发挥重要作用^[26], 但在前庭外周感受器, 尤其是毛细胞内的谷氨酸循环过程在缺氧暴露时是如何变化的, 目前依然不清楚, 并且目前仅有为数不多的研究报告了前庭感受器谷氨酸在缺氧暴露时对突触结构的毒性作用^[27], 采用的模型为在体阻断迷路动脉, 通过超声的方法评估动脉血流减少程度以反映内耳缺血缺氧程度, 事实上, 由于内耳供血动脉较为丰富且存在一定变异性^[28], 用这种方法对前庭器官的缺氧程度评估的精确性有待商榷, 并且这种方法无法实现对前庭感受器缺氧程度的有效控制和评估^[29], 即使发现了谷氨酸毒性作用, 其缺氧程度阈值和时间阈值也无法评估, 这成为后续机制和干预研究的瓶颈性问题。本研究旨在通过建立前庭器官体外培养模型, 评价缺氧条件对于毛细胞内谷氨酸循环的影响, 包括谷氨酸合成的关键酶的表达和活性, 谷氨酸在毛细胞内分布的含量的改变。

本研究发现, 在缺氧处理 30 分钟后椭圆囊毛细胞内谷氨酸合成的关键酶谷氨酰胺酶的表达和活性均未发生明显变化, 提示毛细胞内的谷氨酸的合成并未发生改变。谷氨酰胺酶是将谷氨酰胺合成谷氨酸的关键酶, 在细胞线粒体能量代谢中发挥着重要的作用, 因此, 目前针对缺氧对谷氨酰胺酶的研究主要集中在肿瘤领域, 肿瘤细胞局部因生长过快造成局部缺血缺氧条件, 而此时谷氨酰胺酶表达的上调在肿瘤细胞增殖和侵袭的过程中发挥重要作用^[30,31]。这与我们实验得出的结论相悖, 其中原因分析如下: 我们的研究对象是正常的椭圆囊组织, 不同于肿瘤组织, 其能量代谢处于正常水平, 同时, 我们依据 Sasaki 等^[27]人的研究证据, 给予椭圆囊 30 分钟的缺氧处理, 相对缺氧时间较短, 而肿瘤组织则长期处于能量代谢负平衡状态。

在进一步的研究中, 我们发现在对照组椭圆囊毛细胞内, 谷氨酸在大量分布在毛细胞胞浆中靠近纤毛一侧, 而在远离纤毛一侧分布较少。在缺氧组椭圆囊毛细胞内, 谷氨酸则更多的分布于毛细胞胞浆内远离纤毛的一侧。这提示, 在缺氧条件下, 谷氨酸聚集在毛细胞突触一侧, 这将有助于迅速大量的释放出

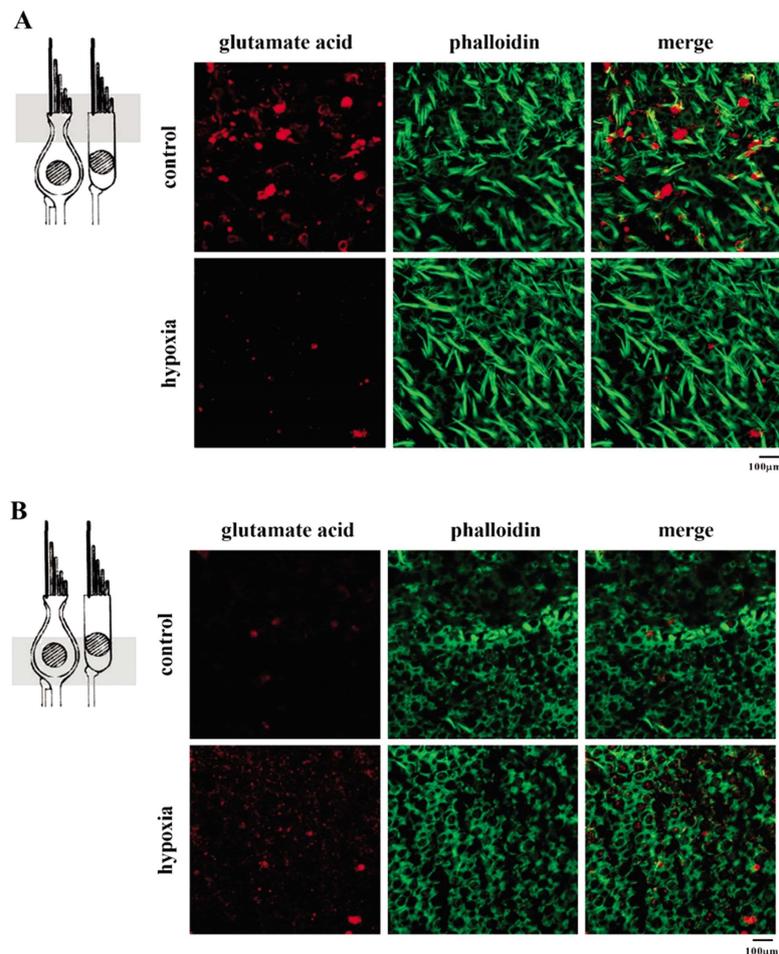


图3 两组椭圆囊组织中谷氨酸在毛细胞内分布的比较

注: (A) 两组椭圆囊组织中谷氨酸(红色)在毛细胞内靠近纤毛一侧的分布情况。(B) 两组椭圆囊组织中谷氨酸在毛细胞内靠近底部一侧的分布情况。图中前庭毛细胞模式图引用参考自《前庭功能检查技术》, 于立身, 2013

Fig. 3 Comparison of glutamate distribution in hair cells between two groups

Note: (A) Representative immunofluorescence images of glutamate(red) in area that close to kinocilium in cytoplasm of utricle hair cells in control and hypoxia group. Scale bar, 100 μ m. (B) Representative immunofluorescence images of glutamate(red) in area that close to basal membrane in cytoplasm of utricle hair cells in control and hypoxia group. Scale bar, 100 μ m. The pattern diagram of vestibular hair cells in the figure is quoted from Vestibular Function Examination Technology, YU Li-shen, 2013

胞。ELISA 实验结果表明, 与对照组相比, 缺氧组的椭圆囊组织中的谷氨酸水平显著性降低, 这与以往实验研究结果相佐证^[4], 提示缺氧条件暴露使得椭圆囊毛细胞内的谷氨酸过量释放, 可能由此造成突触结构和功能的改变, 出现相应前庭神经系统症状。

综上, 本实验发现了离体条件下缺氧处理 30 分钟对椭圆囊毛细胞内的谷氨酸合成的关键酶谷氨酰胺酶的表达和活性均无影响, 但缺氧处理增加了椭圆囊毛细胞谷氨酸的释放。本研究首次报道了离体条件下前庭感受器椭圆囊缺氧模型的应用, 该模型能够较为准确的实现缺氧程度和缺氧时间的控制, 为后续机制和干预研究奠定基础, 此外, 本研究较为全面的评价了外周前庭器官毛细胞中谷氨酰胺循环在缺氧 30 分钟时的变化情况。但支持细胞谷氨酸重新摄取和形成谷氨酰胺的关键酶的改变尚不清楚, 此外, 本研究尚未评估离体条件下谷氨酸过度释放对于突触间隙结构和功能的影响, 建立离体条件下的缺氧致前庭外周感受器谷氨酸毒性研究模型将有助于开展相

关机制和治疗方面的研究, 这也是课题组下一步的研究方向。

参考文献(References)

- [1] 韩学平, 张方, 徐斌, 等. 缺氧对前庭功能稳定性的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 1999, (02): 65-66
- [2] Cingi C, Erkan A N, Rettinger G. Ear, nose, and throat effects of high altitude[J]. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2010, 267 (3): 467-471
- [3] Mees K, Suckfull M. Cochlear and vestibular risk at high altitude[J]. Laryngorhinootologie, 2002, 81(7): 465-468
- [4] 张颀琳, 孔维佳. 利用免疫电镜分析缺血模型的前庭终器中谷氨酸的神经毒性作用 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(02): 122-126
- [5] 赖玉婷, 梁琴. 耳蜗谷氨酸循环在听力损伤机制中的研究进展[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2013, 13(06): 403-405
- [6] Schousboe A. Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission [J]. Neuroscience Letters, 2019, 689: 11-13

- [7] 于进涛, 丁大连, 李鹏, 等. 幼鼠内耳单个器官培养步骤及分类方法 [J]. 中华耳科学杂志, 2015, 13(01): 64-70
- [8] Cheng Z, Gu Y. Vestibular system and self-motion [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 12: 456
- [9] Casale J, Browne T, Murray I, et al. *Physiology, vestibular system* [J/OL]. reasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020
- [10] 吴曙辉, 刘丹, 阎勇, 等. 大电导钙激活钾通道参与缺氧致前庭内侧核神经元兴奋性异常[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2017, 25(01): 44-48
- [11] Pujol R., 姜捷. 谷氨酸的耳蜗神经毒性:老年人缺血或缺氧状态的可能后果[J]. 国外医学.耳鼻喉科学分册, 1992, (06): 331-332
- [12] 吕凡, 王利一, 黄魏宁, 等. 光化学法诱导豚鼠前庭局灶性缺血的水冰试验研究 [J]. 临床耳鼻喉头颈外科杂志, 2018, 32(08): 603-605
- [13] Suzue T, Wu G B, Furukawa T. High susceptibility to hypoxia of afferent synaptic transmission in the goldfish sacculus [J]. *J Neurophysiol*, 1987, 58(5): 1066-1079
- [14] Hwang S, Ham S, Lee S, et al. Hypoxia regulates the level of glutamic acid decarboxylase enzymes and interrupts inhibitory synapse stability in primary cultured neurons [J]. *NeuroToxicology*, 2018, 65: 221-230
- [15] Lee S Y, Kim J H. Mechanisms underlying presynaptic Ca^{2+} transient and vesicular glutamate release at a CNS nerve terminal during in vitro ischaemia[J]. *The Journal of Physiology*, 2015, 593(13): 2793-2806
- [16] Mutlu M, Bayır Ö, Yücece M B, et al. Vestibular evoked myogenic potential responses in obstructive sleep apnea syndrome[J]. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2015, 272(11): 3137-3141
- [17] Ulusoy B, Gül O, Elsürer Ç, et al. The relationship between the findings of vestibular evoked myogenic potentials and severity of obstructive sleep apnea syndrome [J]. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2020, 277(1): 37-46
- [18] Awwad H O, Durand C D, Gonzalez L P, et al. Post-blast treatment with Nociceptin/Orphanin FQ peptide (NOP) receptor antagonist reduces brain injury-induced hypoxia and signaling proteins in vestibulomotor-related brain regions[J]. *Behavioural Brain Research*, 2018, 340: 183-194
- [19] Park E C, Rongo C. The p38 MAP kinase pathway modulates the hypoxia response and glutamate receptor trafficking in aging neurons [J]. *eLife*, 2016, 5: e12010
- [20] Holstein G R, Jr. Friedrich V L, Martinelli G P. Glutamate and GABA in vestibulo-sympathetic pathway neurons [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2016, 10: 7
- [21] Zhu J J, Wu S H, Chen X, et al. Tanshinone IIA suppresses hypoxia-induced apoptosis in medial vestibular nucleus cells via a Skp2/BKCa axis[J]. *Curr Pharm Des*, 2020 [Epub ahead of print]
- [22] Prentice H, Pan C, Gharibani P M, et al. Analysis of neuroprotection by taurine and taurine combinations in primary neuronal cultures and in neuronal cell lines exposed to glutamate excitotoxicity and to hypoxia/re-oxygenation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 975 Pt 1: 207-216
- [23] Yu Z, Mcintosh J M, Sadeghi S G, et al. Efferent synaptic transmission at the vestibular type II hair cell synapse [J]. *J Neurophysiol*, 2020 [Epub ahead of print]
- [24] 曹效平, 黄志纯, 李兴启. 耳蜗中的谷氨酸-谷氨酰胺循环[J]. 国外医学.耳鼻喉科学分册, 2005(06): 8-10
- [25] 曹德茂, 申宝奎, 武永康, 等. 谷氨酸受体以及兴奋性毒性研究进展[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2017, 3(2): 109-113
- [26] 吕达娜, 林淑瑜, 黄阳, 等. 谷氨酸在晕动病发病机制中的作用及相关药物研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(14): 1462-1465
- [27] Sasaki A, Matsubara A, Tabuchi K, et al. Immunoelectron microscopic analysis of neurotoxic effect of glutamate in the vestibular end organs during ischemia [J]. *Acta Oto-Laryngologica*, 2012, 132(7): 686-692
- [28] 张奎启, 王福, 张元鑫, 等. 迷路动脉的解剖学观测[J]. 中华耳鼻喉科杂志, 2002, (02): 26-28
- [29] 何景春, 周维榕, 殷善开. 内耳缺血性损伤模型及其应用[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2008, (01): 75-77
- [30] Xiang L, Mou J, Shao B, et al. Glutaminase 1 expression in colorectal cancer cells is induced by hypoxia and required for tumor growth, invasion, and metastatic colonization[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(2): 40
- [31] Du F, Chen J, Liu H, et al. SOX12 promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis by regulating asparagine synthesis [J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(3): 239