DOI: 10.16016/j.1000-5404.201912021

老年性聋小鼠内耳突触调控钾通道基因的筛选与鉴定

陈小玲,唐 峰,贾立峰,李 海,李静雅,袁 伟 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院耳鼻咽喉-头颈外科

[**摘要**] **目的** 通过筛选内耳突触调控基因,探索老年性聋发生过程中突触损伤特点。**方法** 利用转录组测序技术检测成年组(4周)和老年组(40周)C57BL/6J小鼠内耳基底膜,筛选差异表达基因(differentially expression genes, DEGs)。分析DEGs基因本体(GO)功能富集,京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集情况,并筛选突触调控差异基因,最后利用实时荧光定量PCR及免疫荧光染色验证结果。**结果** 共筛选出3 267个DEGs,其中下调1 521个,上调1 746个(FC≥1.5,P<0.05)。功能富集显示,下调基因主要参与电压门控离子通道活性调控和突触调控,上调基因主要参与免疫调控。筛选出突触调控基因64个,其中6个钾通道基因Kcnq2,Kcnk3,Kcnmb4,Kcnk9,Kcnh5,Kcnc2富集度最高。qRT-PCR验证了6个调控突触的钾通道基因在不同年龄组内耳的差异表达;免疫荧光显示KCNQ2、KCNMB4在老年鼠内耳表达明显下降。**结论** 筛选了老年性聋突触调控基因,其中6个钾通道基因表达明显下降,可能是导致老年性聋突触改变的重要因素。

[**关键词**] 老年性聋;内耳;突触;转录组测序;钾离子通道
[**中图法分类号**] R322.923;R394.3;R764.436 [**文献标志码**] A

Screening and identification of synaptic regulatory genes in the inner ear of mice with presbycusis

CHEN Xiaoling, TANG Feng, JIA Lifeng, LI Hai, LI Jingya, YUAN Wei Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To screen synaptic regulatory genes in the inner ear and explore the mechanism of synaptic damage in presbycusis. **Methods** We examined the mRNA expression of the genes in the basilar membrane of the inner ear of adult (4-week-old) mice and aged (40-week-old) mice using transcriptome sequencing. Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment of the differentially expressed genes (DEGs) were analyzed to identify synaptic regulatory DEGs, and the results were verified using real-time quantitative PCR and immunofluorescence staining. **Results** We identified a total of 3 267 DEGs, including 1 521 down-regulated genes and 1 746 up-regulated genes (FC ≥ 1.5, P < 0.05). GO function enrichment analysis showed that the down-regulated DEGs mainly participated in the regulation of voltage-gated cation channel activity and synaptic function, and the up-regulated DEGs were mostly responsible for regulation of immune functions. We screened 64 synaptic regulatory genes, among which 6 down-regulated potassium channel genes (Kcnq2, Kcnk3, Kcnmb4, Kcnk9, Kcnh5, and Kcnc2) had the highest enrichment. qRT-PCR verified the differential expression of the 6 genes in the inner ear of mice at different ages; immunofluorescence assay demonstrated that the expression of KCNQ2 and KCNMB4 were significantly decreased in the inner ear of aged mice. **Conclusion** Among the synaptic regulatory genes screened in mice with presbycusis, 6 potassium channel genes show significantly decreased expressions in the inner ear of aged mice, suggesting their important involvement in synaptic changes in presbycusis.

[**Key words**] presbycusis; inner ear; synapse; transcriptome sequencing; potassium channel

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81873702, 81470694). Corresponding author: YUAN Wei, E-mail: weiyuan175@sina.com

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81873702, 81470694)
[**通信作者**] 袁 伟,E-mail: weiyuan175@sina.com

老年性聋(presbycusis)又称年龄相关性聋(age-related hearing loss,ARHL),是成年人听力损失的最常见类型之一,是引起摔倒、抑郁、痴呆、孤独、认知能力下降的独立危险因素[1]。老年性聋通常为感音神经性聋,从外周听觉感受器到听觉中枢的病变都可引起[2]。内毛细胞(inner hair cells, IHCs)将声音的机械刺激转化为电信号后通过突触传递至螺旋神经节细胞,再以动作电位的模式传导至听觉中枢。而内毛细胞和Ⅰ型螺旋神经节之间的神经传递是由内耳特殊的突触结构——带状突触介导[3]。若因带状突触数量、结构或功能改变,导致突触传递异常而引起的听力障碍,即为耳蜗突触病(cochlear synaptopathy, CS)[4-5]。随着年龄增加,内耳突触数量明显下降,功能减退,带状突触损伤被认为是老年性聋的重要致病因素之一[6-7],但是目前仍缺乏相关的基因调控机制研究。因此,对老年性聋突触调控基因的检测与筛选十分必要。

转录组测序(RNA-seq)能够对物种的整个转录组进行单核苷酸水平的测序,提供组织全部的基因表达数据,得到最全面的转录组信息[8],目前已广泛应用于内耳的研究中[9-11]。本研究通过对成年组和老年组C57BL/6J小鼠内耳基底膜进行转录组测序,筛选差异表达基因(DEGs)。通过基因本体(GO)数据库和KEGG数据库对DEGs进行功能及通路富集,筛选突触调控基因,并用qRT-PCR和免疫荧光验证差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 选用健康SPF级C57BL/6J小鼠,耳郭反射灵敏,无中耳感染,雌雄不拘,购于陆军军医大学实验动物中心,动物实验通过伦理委员会审批[编号SYXK(渝)20170002],严格遵守批准机构的动物保健和使用协议。

1.1.2 实验试剂 测序总RNA提取试剂盒(Qiagen),逆转录试剂盒(Promega),Real-time PCR试剂、Actb、目的序列(Thermo Fisher),TRIzol(Takara),兔多克隆一抗KCNQ2(Abcam),KCNMB4(Bio-techne),山羊抗兔二抗(Abcam),封闭山羊血清(索莱宝)。

1.2 实验方法

1.2.1 转录组测序 按鼠龄分为成年组(4周龄,$n=18$)与老年组(40周龄,$n=18$),解剖并制备基底膜[12],以6只小鼠(共12个基底膜)为一个样本。总RNA提取根据试剂盒操作执行,RNA的质控方法采用NanoDrop 2000、凝胶电泳28s/18s和Agilent 4200 TapeStation System,RNA质量测定采用Qubit2.0。利用Illumina Hiseq X Ten测序平台进行转录组学测序,4周龄和40周龄小鼠分别进行3组生物学重复。采用HISAT2工具将过滤得到的clean reads与参考基因组比对,FeatureCounts对mRNA进行注释和定量,DESeq2对两组样本进行差异基因筛选。差异倍数(fold change, FC)≥1.5且$P<0.05$视为DEGs。

1.2.2 GO数据库和KEGG数据库分析 采用R包(clusterprofiler)对DEGs基于GO数据库进行基因功能注释,筛选出DEGs所体现的显著性功能。DEGs的通路分析基于KEGG数据库(http://www.genome.jp/kegg/),从数据库中筛选出与DEGs显著相关的通路。富集显著性标准均为$P<0.05$。

1.2.3 实时荧光定量PCR TRIzol法提取基底膜总RNA,测定RNA浓度及纯度。按照逆转录试剂盒(Promega)操作进行逆转录,逆转录引物序列见表1。按照Real-time PCR(Thermo Fisher)试剂说明书,以Actb作为内参,反应条件为50 ℃ 2 min,95 ℃ 2min,(95 ℃ 15 s,60 ℃ 1min)×40个循环周期。计算两组样本目标mRNA相对表达量,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对Ct值。每组样本进行3次生物学重复。

1.2.4 免疫荧光染色 基底膜漂洗后0.25% Triton X-100破膜30 min,5%山羊血清封闭1 h,弃血清分别加入1∶100 KCNQ2,1∶50 KCNMB4兔多克隆一抗。4 ℃过夜,漂洗后按1∶250的比例避光孵育山羊抗兔二抗(荧光激发波长568 nm)1 h,洗净后用含DAPI的抗荧光淬灭剂封片。激光共聚焦显微镜(LSM 880,ZEISS)观察。

表1 qRT-PCR基因引物

基因	上游	下游
Kcnq2	AGGGACCTGGGTATTTGG	TTGGATTCTAGCAGAGGCA
Kcnk3	GCAGACGCAGCCGCAGTATG	GCTCCGCATCACGCTTCTCG
Kcnmb4	GCGAAGCTCAGGGTGTCTTAC	CCGGAGACGATGAGGAACAA
Kcnq9	GAGTCGGACCATGAGATGCG	GAGCTGATGTTGTACTTGCCT
Kcnh5	TGGACTGGCCTGTAGTTTATAGT	GGTGCGATTTGCATGTAAAACC
Kcnc2	TCGCCACCCAGGAGTATTC	CTCCACGTCGGTCTCATCG
Actb	GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG	ATGCCACAGGATTCCATACC

1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两独立样本 t 检验对 qRT-PCR 相对 Ct 值进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

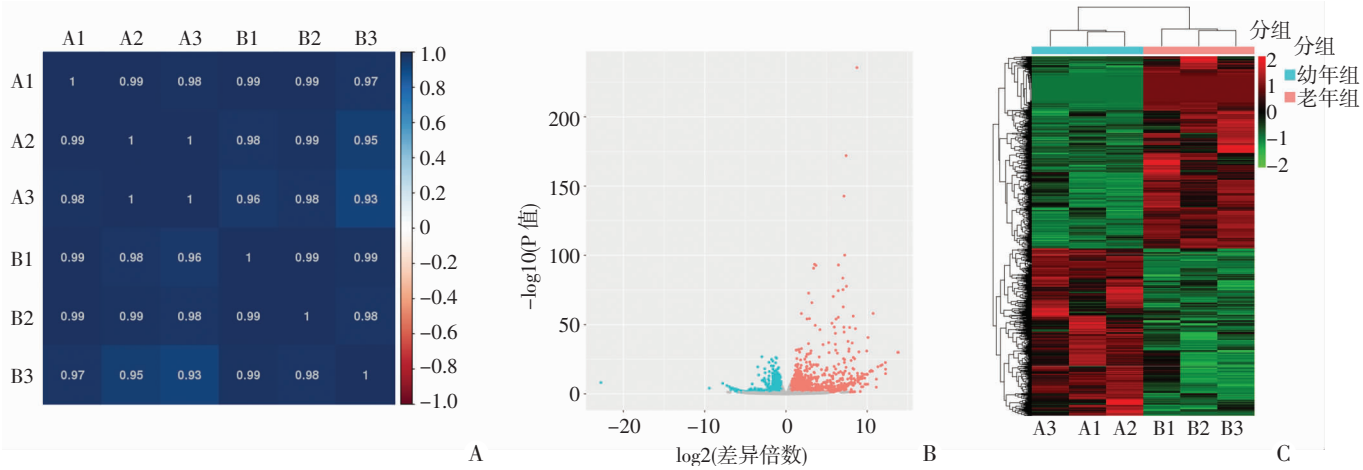
2 结果

2.1 内耳基底膜 DEGs 分析

基于 RNA 测序表达谱数据,共检测到 33 911 个 mRNA,包含 DEGs 3 267 个,其中下调基因 1 521 个,上调基因 1 746 个。两组样本间相关性分析(图 1A),相关系数均大于 0.9,表明样本相关性很好。火山图用于观察和评估两组间 mRNA 表达的变化(图 1B)。DGEs 聚类分析热图显示 6 个测序样本聚集为两个组,差异基因功能聚类为两个功能区(图 1C)。

2.2 GO,KEGG 分析揭示 DEGs 功能及通路

对全部 DEGs 进行 GO 数据库功能富集分析及 KEGG 通路分析。GO 富集分析显示下调基因功能主要富集在电压门控离子通道活性调控和突触调控,其中钾通道复合体富集分数最高,上调基因功能主要富集在免疫调控。富集分数较高的部分条目见表 2。KEGG 通路分析结果显示,329 个下调基因富集到 38 条通路,538 个上调基因富集到 82 条通路。差异基因数量富集较多的通路见表 3。



A:样本相关性分析;B:DEGs 火山图,绿点表示下调基因(共 1 521 个),红点表示上调基因(共 1 746 个),灰点表示差异不显著的基因(共 30 644 个);C:DEGs 层次聚类热图,红色代表 DEGs 在分组样本中表达上调,绿色代表 DEGs 在分组样本中表达下调

图 1 内耳基底膜 DEGs 分析

表 2 差异基因 GO 富集分析

GO 生物学过程条目	基因数	P 值	富集分数	趋势
voltage-gatedcation channel activity	38	1.55×10^{-19}	5.963063322	↓
voltage-gated channel activity	45	8.11×10^{-20}	5.075469193	↓
voltage-gated ion channel activity	45	8.11×10^{-20}	5.075469193	↓
potassium channel complex	29	3.15×10^{-17}	6.962919762	↓
cation channel complex	53	1.09×10^{-25}	5.704461018	↓
axon part	56	6.47×10^{-25}	5.20660882	↓
signal release from synapse	31	1.13×10^{-14}	5.326543552	↓
neurotransmitter secretion	31	1.13×10^{-14}	5.326543552	↓
synaptic vesicle cycle	29	1.08×10^{-13}	5.271162267	↓
immunoglobulin receptor binding	109	1.5×10^{-108}	13.84106866	↑
antigen binding	127	1.5×10^{-105}	10.959927	↑
chemokine activity	22	1.14×10^{-17}	9.777635659	↑
MHC protein complex	18	1.46×10^{-18}	13.38534669	↑
immunoglobulin complex, circulating	103	4.3×10^{-99}	13.04933592	↑
immunoglobulin complex	105	3.3×10^{-100}	12.91990897	↑
immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway	146	4.6×10^{-104}	8.933463096	↑
adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	180	3.1×10^{-120}	8.195691134	↑
positive regulation of lymphocyte activation	171	4.2×10^{-111}	7.930856965	↑

2.3 突触调控基因

通过对 DEGs 的 GO 功能富集及 KEGG 通路富集,筛选出参与突触调控的 DEGs 共 64 个,其中下调基因 43 个,上调基因 21 个。下调基因中包含离子转运调控基因 19 个,其中钾离子通道数量最多(Kcnq2,Kcnk3,Kcnmb4,Kcnk9,Kcnh5,Kcnc2),且富集分数最高。参与突触调控基因名称及表达值见图 2。

2.4 qRT-PCR

因下调基因中钾离子通道基因数量最多且富集分数最高,提示其对老年性聋突触调控可能有重要意义。我们采用 qRT-PCR 验证内耳下调钾离子通道基因(Kcnq2,Kcnk3,Kcnmb4,Kcnk9,Kcnh5,Kcnc2)mRNA 表达差异。通过 qPCR 的 ΔCt 值和测序结果 FC 值计算 ΔΔCt 值,钾通道基因 qRT-PCR 变化趋势与测序结果一致,均为表达下降($P<0.05$,图 3)。

表 3 差异基因 KEGG 通路分析

通路条目	基因数	*P* 值	富集分数	趋势
Neuroactive ligand-receptor interaction	38	3.69E-09	2.854347902	↓
Calcium signaling pathway	21	1.03E-05	2.904424181	↓
Retrogradeendocannabinoid signaling	18	1.55E-05	3.136778116	↓
cAMP signaling pathway	18	0.001186	2.229937049	↓
Cytokine-cytokine receptor interaction	84	2.76E-34	4.536320707	↑
Epstein-Barr virus infection	55	9.71E-19	3.822531114	↑
Chemokine signaling pathway	51	9.81E-19	4.076208178	↑



图 2 参与突触调控的差异基因

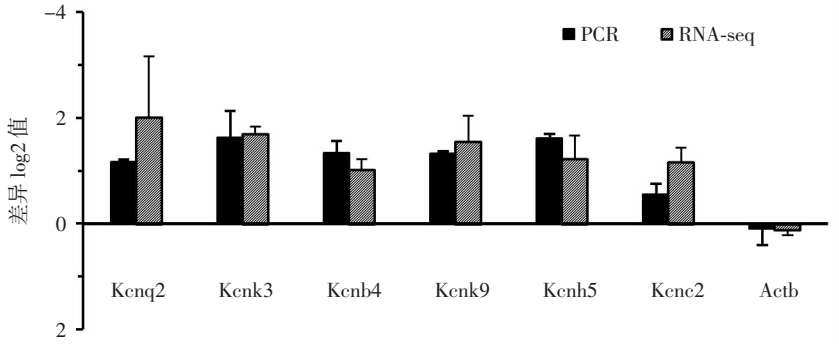
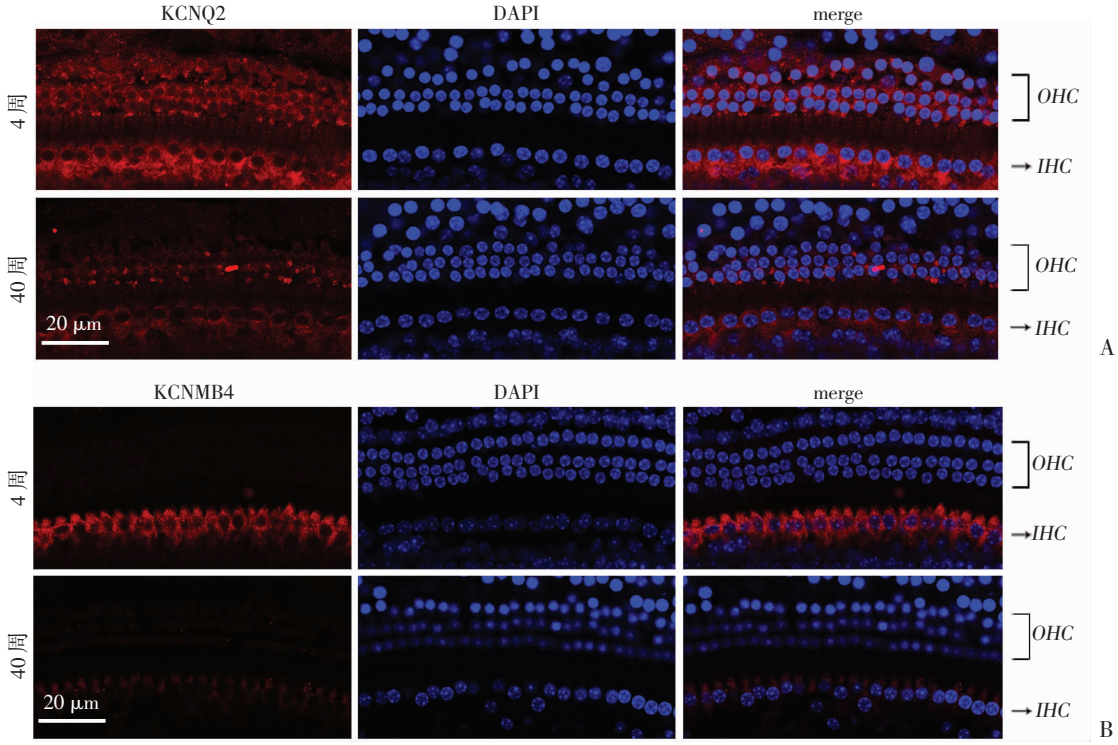


图 3 qRT-PCR 验证钾离子通道基因差异



红色表示 KCNQ2、KCNMB4 阳性表达,蓝色表示细胞核

图 4 成年组和老年组内耳基底膜 KCNQ2(A)、KCNMB4(B)免疫荧光染色观察

2.5 免疫荧光

免疫荧光验证钾通道基因中差异倍数较大的 KCNQ2 和 KCNMB4 差异表达。结果显示:KCNQ2 在内外毛细胞均有表达,散点状分布在毛细胞胞质,尤其高表达在内毛细胞基底部,老年鼠 KCNQ2 表达量明显降低(图 4A);KCNMB4 仅特异性高表达在成年鼠内毛细胞胞质,呈散点状分布,老年鼠与成年鼠相比,仅内毛细胞核周有少量表达,表达量明显下降(图 4B)。

3 讨论

老年性聋发病机制的研究仍存在较大争议。既往认为,老年性聋可能与毛细胞数量减少,螺旋神经节和神经细胞退化相关[13]。近年来有研究发现突触对损伤更敏感,在毛细胞和螺旋神经节神经元形态及 ABR 尚正常时,先出现突触损伤[4],而突触损伤后再生能力非常有限。因此,耳蜗突触病(CS)被认为可能与老年性聋发生发展有关,但其机制仍不明确。部分学者认为谷氨酸兴奋毒性累积,导致神经末梢肿胀及传导受损是可能的机制之一[6-7]。也有学者认为与氧化应激解偶联蛋白 UCP2 上调有关,但目前仍缺乏功能和机制验证[14]。

C57 小鼠是研究老年性聋的理想模型,从 6 月龄开始出现耳蜗底回带状突触数量减少,10 月龄开始各回均明显减少[15]。本研究对 C57 小鼠成年组与老年组内耳基底膜进行转录组测序,通过 DEGs 分析,筛选突触调控基因,发现下调基因中有较多基因参与离子转运。离子通道是蛋白质孔隙,通过调节离子流动产生电流启动电信号,在保证毛细胞正常发育,维持细胞功能及耳蜗内淋巴电位等方面不可或缺[16],因此离子转运对突触调控可能具有重要功能。其中钾离子是维持正常听觉的重要元素,在耳蜗钾循环和神经信号传导中发挥重要作用。内淋巴液高钾环境能为毛细胞机械传导提供钾离子驱动力及维持毛细胞功能所必需的静息电位[17]。实验表明,增加钾离子浓度可促进毛细胞钙离子的内流,进而促进突触囊泡融合及突触后神经元去极化[18]。

KCNQ2 是 KCNQ 钾通道家族中的一员,是 M 型电流的基础[19]。抑制 M 型电流可使细胞兴奋性增高,导致小鼠癫痫发生[20]。使用 KCNQ2/3 激活剂激活耳蜗钾通道,可减轻水杨酸引起的听力损害,说明 KCNQ2 对听功能的维持有保护作用[21]。KCNQ2 在老年鼠内耳的表达情况目前尚少见报道,我们通过免疫荧光显示 KCNQ2 主要表达在内、外毛细胞胞质,尤其高表达在内毛细胞基底部,并在老年鼠中的表达明显

降低。既往研究表明,对感觉系统持续刺激会产生兴奋毒性,累积后可导致突触损伤[22]。钾离子通道是神经元信号的阻断剂,可识别细胞去极化及中止动作电位,KCNQ2 在老年鼠中表达下降可能通过对细胞兴奋性调控参与老年性聋突触变化。

KCNMB4 是大电导钙激活钾通道(large conductance calcium-activated potassium,BKCa)家族中的一员。突触前 BK 通道激活将缩短电压门控钙通道的开放,从而减少钙内流和递质释放[23],可能起到保护细胞免于因过度活跃,产生兴奋毒性和死亡的作用[24]。KCNMB4 目前在内耳研究尚不清楚,我们发现 KCNMB4 特异性高表达在内毛细胞,并在老年鼠中的表达明显降低。老年性聋突触损伤可能与 KCNMB4 表达降低,其对毛细胞的保护作用减弱有关。

综上所述,本研究通过对 4 周龄和 40 周龄 C57 小鼠内耳基底膜转录组测序,揭示 DEGs 功能主要富集在电压门控离子通道活性调控与突触调控。筛选出突触调控基因后,验证了 6 个钾离子通道基因(包括 KCNQ2,KCNMB4)在老年鼠内耳基底膜表达下调。我们猜想钾通道基因的表达下降,使其对毛细胞兴奋性的调控作用降低,导致兴奋毒性累积,进而引起内毛细胞突触损伤,是老年性聋突触损伤的可能机制。我们的结果可以为老年性聋突触损伤机制研究提供新的思路。

参考文献:

[1] TAWFIK K O, KLEPPER K, SALIBA J, *et al*. Advances in understanding of presbycusis[J]. J Neurosci Res, 2019. DOI: 10.1002/jnr.24426.

[2] RIQUELME R, CEDIEL R, CONTRERAS J, *et al*. A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor I deficientmice[J]. Front Neuroanat, 2010, 4: 27. DOI: 10.3389/fnana.2010.00027.

[3] SAFIEDDINE S, EL-AMRAOUI A, PETIT C. The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly tofunction[J]. Annu Rev Neurosci, 2012, 35: 509-528. DOI: 10.1146/annurev-neuro-061010-113705.

[4] SERGEYENKO Y, LALL K, LIBERMAN M C, *et al*. Age-related cochlearsynaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline[J]. J Neurosci, 2013, 33(34): 13686-13694. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1783-13.2013.

[5] MOSER T, PREDOEHL F, STARR A. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearingimpairment[J]. Otol Neurotol, 2013, 34(6): 995-1004. DOI: 10.1097/MAO.0b013e3182814d4a

[6] LIBERMAN M C, KUJAWA S G. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms[J]. Hear Res, 2017, 349: 138-147. DOI: 10.1016/j.heares.2017.01.003.

[7] KUJAWA S G, LIBERMAN M C. Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea: Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss[J]. Hear Res, 2015, 330(Pt B): 191-199. DOI: 10.1016/j.heares.2015.02.009.

[8] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(1): 57-63. DOI: 10.1038/nrg2484.

[9] SCHRAUWEN I, HASIN-BRUMSHTEIN Y, CORNEVEAUX JJ, *et al*. A comprehensive catalogue of the coding and non-coding transcripts of the human inner ear[J]. Hear Res, 2016, 333: 266-274. DOI: 10.1016/j.heares.2015.08.013.

[10] HAN J H, WU H W, HU H Y, *et al*. Characterization of the transcriptome of hair cell regeneration in the neonatal mouseutricle[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(3): 1437-1447. DOI: 10.1159/000495592.

[11] GUO Y, ZHANG P, SHENG Q H, *et al*. LncRNA expression in the auditory forebrain during postnatal development[J]. Gene, 2016, 593(1): 201-216. DOI: 10.1016/j.gene.2016.08.027.

[12] 李胜利, 武坤毅, 任晓勇. 年龄相关听力损失 DBA/2J 小鼠耳蜗毛细胞马达蛋白-prestin 表达下调与耳聋的关系[J]. 中华耳科学杂志, 2018, 16(4): 562-569. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2922.2018.04.025.
LI S L, WU K Y, REN X Y. Down-regulated prestin expression in cochlear outer hair cells in DBA/2J mice with age-related hearing loss[J]. Chin J Otol, 2018, 16(4): 562-569. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2922.2018.04.025.

[13] OHLEMILLER K K. Age-related hearing loss: the status of Schuknecht's typology[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 12(5): 439-443. DOI: 10.1097/01.moo.0000134450.99615.22.

[14] 魏薇, 杨丽辉, 熊伟, 等. 老年性聋小鼠耳蜗带状突触损伤特点及机制研究[J]. 中华耳科学杂志, 2019, 17(2): 198-202.
WEI W, YANG L H, XIONG W, *et al*. Characteristics of cochlear ribbon synapses damage in aging mice and possible-mechanisms[J]. Chin J Otol, 2019, 17(2): 198-202.

[15] 李晓瑞, 蒋兴旺, 张延平. C57B L/6J 小鼠随年龄增长耳蜗内毛细胞带状突触数量变化的观察[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2015, 23(2): 176-180. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7299.2015.02.014.
LI X R, JIANG X W, ZHANG Y P. The changes of the

number of ribbon synapse in inner hair cells of C57BL/6J mice with age[J]. J Audiol Speech Pathol, 2015, 23(2): 176-180. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7299.2015.02.014.

[16] NILIUS B, FLOCKERZI V. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface[J]. Handb Exp Pharmacol, 2014, 223: v-vi.

[17] STEEL K P, KROS C J. A genetic approach to understanding auditory function[J]. Nat Genet, 2001, 27(2): 143-149. DOI: 10.1038/84758.

[18] CONTINI D, PRICE S D, ART JJ. Accumulation of K^+ in the synaptic cleft modulates activity by influencing both vestibular hair cell and Calyx afferent in the turtle[J]. J Physiol (Lond), 2017, 595(3): 777-803. DOI: 10.1113/JP273060.

[19] WANG JJ, LI Y. KCNQ potassium channels in sensory system and neural circuits[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(1): 25-33. DOI: 10.1038/aps.2015.131.

[20] SOH H, PARK S, RYAN K, *et al*. Deletion of KCNQ2/3 potassium channels from PV+ interneurons leads to homeostatic potentiation of excitatorytransmission[J]. Elife, 2018, 7: e38617. DOI: 10.7554/eLife.38617.

[21] SUN W, LIU J, ZHANG C, *et al*. Potassium channel activator attenuates salicylate-induced cochlear hearing loss potentially amelioratingtinnitus[J]. Front Neurol, 2015, 6: 77. DOI: 10.3389/fneur.2015.00077.

[22] FETTIPLACE R. Hair cell transduction, tuning, and synaptic transmission in the mammaliancochlea[J]. Compr Physiol, 2017, 7(4): 1197-1227. DOI: 10.1002/cphy.c160049.

[23] ROBITAILLE R, CHARLTON M P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassiumchannels[J]. J Neurosci, 1992, 12(1): 297-305.

[24] LEE U S, CUI J M. BK channel activation: structural and functionalinsights[J]. Trends Neurosci, 2010, 33(9): 415-423. DOI: 10.1016/j.tins.2010.06.004.

(收稿:2019-12-02;修回:2020-01-24)

(编辑 张 维)