

利用单细胞 RNA-seq 研究 *Mitf-M* 基因突变对荣昌猪耳蜗血管纹边缘细胞的影响

龙 熙^{1,2}, 柴 捷^{1,2}, 涂 志^{1,2}, 张 亮^{1,2}, 张利娟^{1,2}, 潘红梅^{1,2}, 张力丹², 王 清², 郭宗义^{1,2*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 国家生猪技术创新中心, 重庆 402460)

摘 要: 本文旨在研究 *Mitf-M* 基因突变对荣昌猪耳蜗血管纹边缘细胞的影响, 为后续深入解析荣昌猪的耳聋机制提供理论依据。以 3 月龄野生型荣昌猪 (*Mitf-R*) 和耳聋荣昌猪 (*Mitf-r*) 为研究对象, 基于单细胞 RNA-seq 技术并结合边缘细胞标记基因, 注释耳蜗血管纹边缘细胞, 统计边缘细胞数量, 筛选差异表达基因。通过 UMAP 聚类 and 边缘细胞标记基因 *KCNQ1*、*SLC12A2* 注释出了 *Mitf-R* 和 *Mitf-r* 的边缘细胞。细胞数量统计结果表明 *Mitf-M* 突变导致了血管纹边缘细胞数量的减少。差异基因表达分析发现了 140 个差异倍数 2 倍以上的基因, 其中 *Mitf-R* 相对 *Mitf-r* 有 122 个基因上调, 18 个下调, 包括 *KCNAB1*、*KCNQ1*、*NALCN*、*SLC26A7*、*SLC9A4*、*SLC16A7*、*TRPM3* 等离子通道相关基因。差异基因 GO 功能富集分析表明这些基因显著富集在离子跨膜转运、离子跨膜所需的转运复合物的形成以及离子跨膜转运蛋白的活性等生物学过程。KEGG 信号通路分析结果表明, 差异表达基因主要在 MAPK、钙离子、Rap1、ErbB 等调节细胞生长、分化、迁移的信号通路以及氧化磷酸化、cAMP 等与离子通道蛋白活化相关的信号通路上富集。*Mitf-M* 基因突变减少了耳聋荣昌猪血管纹边缘细胞的数量以及导致 140 个基因的差异表达, 这些差异基因对边缘细胞的影响主要涉及细胞的生长、分化、迁移以及细胞的离子跨膜运输等功能。

关键词: 单细胞 RNA-seq; 荣昌猪; 耳聋; *Mitf-M*; 边缘细胞

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250211-03

荣昌猪是世界八大优良猪种之一, 具有肉质好、适应性强、瘦肉率高、配合力好、鬃质优良等特点, 是优良的遗传资源。课题组前期在荣昌猪群体中发现了一个自发性耳聋家系, 在实际生产过程中, 这种家系的后代极易被压死, 这对养猪生产造成了极大的经济损失。并且, 该家系的耳聋特征与人类 Warfield 综合征表型高度相似, 可作为国内外首个自听力缺陷的大型哺乳动物模型, 是感音神经性耳聋早期干预、人工听力重建、基因治疗的极其珍贵的遗传研究材料^[1]。

收稿日期: 2025-02-11; 修回日期: 2025-04-16

资助项目: 重庆市科研院所绩效激励引导专项项目 (19540); 国家重点研发计划项目主要农业单胃动物和水产生物珍稀濒危种质资源的抢救性保护 (2021YFD1200303); 重庆市现代农业产业技术体系资助 (CQMAITS202312)

作者简介: 龙熙 (1990-), 女, 四川资阳人, 硕士, 副研究员, 主要从事猪遗传育种与繁殖研究, E-mail: 13618288075@163.com

* 通信作者: 郭宗义 (1965-), 男, 四川资中人, 硕士, 研究员, 主要从事猪遗传育种与繁殖, E-mail: guozongyi@sina.com

课题组前期研究证实荣昌猪群体内的耳聋表型是由于 *Mitf-M* 基因突变导致耳蜗血管纹功能异常引起的^[1-2]。正常血管纹主要包括边缘细胞、中间细胞和基底细胞 3 种细胞成分^[3], 任一细胞的功能障碍均会导致感音神经性耳聋^[4]。其中, 边缘细胞的主要功能是通过调节 K⁺ 的跨膜转运来维持内淋巴液的电位差^[5-7]。本课题组前期研究发现 *Mitf-M* 基因突变影响了离子通道相关基因的表达, 但并未明确具体的细胞类型^[1]。此外, 现有的研究大多关注的是 *Mitf-M* 基因突变对血管纹中间细胞的影响, *Mitf-M* 基因突变是否对边缘细胞也造成了影响尚未有报道。鉴于边缘细胞在离子转运中的重要作用, 从单细胞水平揭示 *Mitf-M* 对血管纹边缘细胞的影响非常有必要。

单细胞 RNA-seq 可以揭示单个细胞内的转录组异质性和复杂性, 以及组织、器官内不同细胞类型和功能^[8], 已经广泛应用于人类^[9]、动物^[10]、植物^[11] 和微生物^[12] 等各个研究领域。本研究首先利用单细胞 RNA-seq 对野生型 (*Mitf-R*) 和耳聋荣昌猪 (*Mitf-r*)

的血管纹组织进行测序，通过均匀流形逼近与投影（Uniform Manifold Approximation and Projection, UMAP）聚类以及边缘细胞标记基因对边缘细胞进行注释。随后对 *Mitf-R* 和 *Mitf-r* 血管纹组织中注释出来的边缘细胞进行数量统计和差异表达基因分析，并对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 信号通路分析。研究结果为揭示荣昌猪的耳聋机制提供了进一步的基础数据，同时也可作为遗传性感音神经性耳聋的早期干预、人工听力重建、基因治疗等提供基础数据和理论依据，并为与耳蜗内淋巴点异常相关的老年性耳聋提供潜在的治疗靶点。

1 材料方法

1.1 试验材料 试验用 3 月龄听力正常（*Mitf-R*）和耳聋荣昌（*Mitf-r*）（各 3 头）由重庆市荣昌区国家级荣昌猪保种场提供。

1.2 耳蜗血管纹组织获取 处死 *Mitf-R* 和 *Mitf-r* 猪后，解剖内耳。于体视显微镜下进行显微解剖，快速分离耳蜗血管纹组织。分离后的血管纹组织立即置于液氮中速冻，待全部样品采集完成后，迅速于干冰环境下运送至上海伯豪生物技术有限公司进行后续试验（由于耳蜗血管纹组织极小，为了保证单细胞测序细胞上样数量，将 3 个生物学重复中所获得的血管纹组织全部进行混合，然后进行单细胞悬液的制备）。

1.3 组织分离和细胞纯化 将组织转移至无菌培养皿中，用 1×PBS 缓冲液（Thermo Fisher, Cat. No. 14190 144）冲洗干净，再将组织转移至 2 mL 离心管中并置于冰面上，用眼科剪将组织剪碎。随后将剪碎的组织放入含有 0.25% 胰蛋白酶（Thermo Fisher, Cat. No. 25200-072）、10 ug/mL DNase I（Sigma, Cat. No. 11284932001）、5% 胎牛血清（Thermo Fisher, Cat. No. SV30087.02）的 PBS 裂解液中，在 37℃ 水浴和 50 rpm 的条件下消化 40 min。消化后的细胞悬液过 40 μm 的细胞筛进行过滤，然后 500 g 离心 10 min，弃上清液，得到细胞沉淀，加入 1 mL 的红细胞裂解液（Thermo Fisher, Cat. no. 00-4333-57）重悬细胞，去除其中的红细胞。用含有 2% 胎牛血清的 1×PBS 洗涤细胞，吸取适量洗涤后的细胞悬液，以 9:1 的比例加入 0.4% 的台盼蓝染色，结合血细胞计数器在显微镜下统计活细胞和死细胞个数。细胞活率大于 80% 的样本才可进行后续

试验。

1.4 10× 文库制备和测序 10×cDNA 文库制备和测序由上海伯豪生物技术有限公司完成。文库制作方法参照 10× genomic 公司说明书（CG000206 RevD）。利用 Agilent 4200 Bioanalyzer 检测片段大小和 Qubit High Sensitivity DNA Assay 检测文库浓度。符合要求的 cDNA 文库在 Illumina Novaseq 6000 平台进行双端 150 bp 测序。

1.5 数据分析 测序数据首先利用 10× Genomics 官方软件 Cell Ranger 2.1.0 进行处理，将测序数据的 fastq 文件对比到猪基因组上（Sscrofa11.2），最终得到基因的表达式定量矩阵。然后将表达式定量矩阵导入 Seurat v2.3.0 R 工具包，进行数据的质量控制和下游分析，所有的参数都为默认值。利用 UMAP 聚类进行细胞类群划分。利用方差分析进行差异显著性分析， $P<0.05$ 表示差异显著。以 $|\log_2(\text{FoldChange})|>1$ 、 $P<0.05$ 为标准筛选差异表达基因。利用 metascape 软件对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析。

2 结果与分析

2.1 血管纹组织细胞类群划分及边缘细胞注释 基于单细胞转录组测序结果，对血管纹组织主要细胞类型进行 UMAP 聚类，结果显示血管纹组织可区分为 5 个细胞亚群（图 1）。利用已经报道的边缘细胞标记基因 *KCNQ1* 和 *SLC12A2*，注释出了血管纹组织中的边缘细胞，即图 1、图 2 中的第 4 类群的细胞（图 2）。

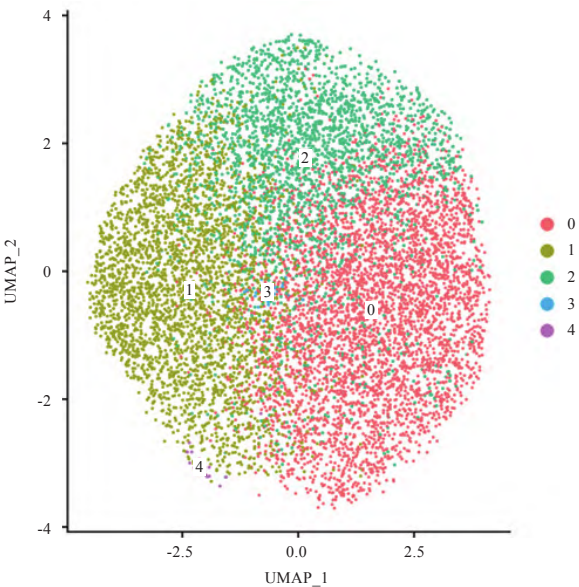


图 1 血管纹组织各类细胞 UMAP 可视化结果

2.2 *MITF-M* 突变对边缘细胞数量的影响 对 *Mitf-R* 和 *Mitf-r* 猪血管纹各类群细胞数量进行统计发现, *Mitf-R*、*Mitf-r* 边缘细胞的数量分别占有所有检测到的边缘细胞总数的 61.54% 和 38.46%; *Mitf-R*、*Mitf-r* 中间层细胞的数量分别占有检测到的中间层细胞总数的 100.00% 和 0.00%; *Mitf-R*、*Mitf-r* 内皮细胞的数量分别占有检测到的内皮细胞的 60.49% 和 39.51%, 即 *Mitf-M* 突变的猪血管纹边缘细胞、中间层细胞和内皮细胞的数量有所减少。*Mitf-R*、*Mitf-r* 基底细胞的数量分别占有检测到的基底细胞的 43.09% 和 56.91%; *Mitf-R*、*Mitf-r* 纺锤细胞的数量分别占有检测到的纺锤细胞的 39.13% 和 60.87%, 即 *Mitf-M* 突变的猪血管纹基底细胞和纺锤细胞的数量有所增加 (图 3)。

2.3 *MITF-M* 突变对边缘细胞基因表达的影响 以 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$ 、 $P < 0.05$ 为标准筛选 *Mitf-R* 和 *Mitf-r*

猪血管纹边缘细胞差异表达基因, 结果发现, 差异倍数在 2 倍以上的基因共 140 个, 其中, *Mitf-R* 相对 *Mitf-r* 上调的有 122 个, 包括 *KCNAB1*、*KCNQ1*、*NALCN*、*SLC26A7*、*SLC9A4*、*SLC35F3*、*SLC16A7* 等离子通道相关基因。*Mitf-R* 相对 *Mitf-r* 下调的有 18 个, 包括离子通道基因 *TRPM3* (图 4、表 1)。

2.4 差异基因 GO 功能富集 本研究差异表达基因显著富集的前 10 条生物进程为单原子阳离子跨膜转运、单原子阳离子输运、无机阳离子跨膜转运、无机离子跨膜转运、单原子阳离子跨膜转运的调控、金属离子输运规律、跨膜转运的调控、单原子离子跨膜转运的调控、肌肉系统过程、基于肌动蛋白丝的进程。差异表达基因显著富集的前 10 条细胞组分为转运复合体、跨膜转运蛋白复合体、神经元之间的突触、电压门控钙通道复合体、突触后密度、突触的不对称性、突触后特异化、阳

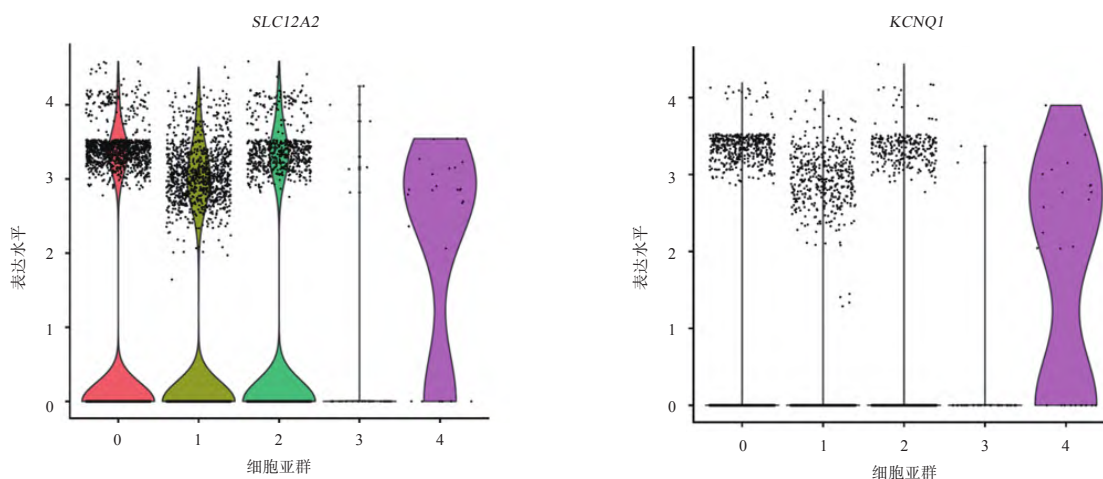


图 2 *SLC12A2*、*KCNQ1* 基因在血管纹组织各类群细胞中的表达分析

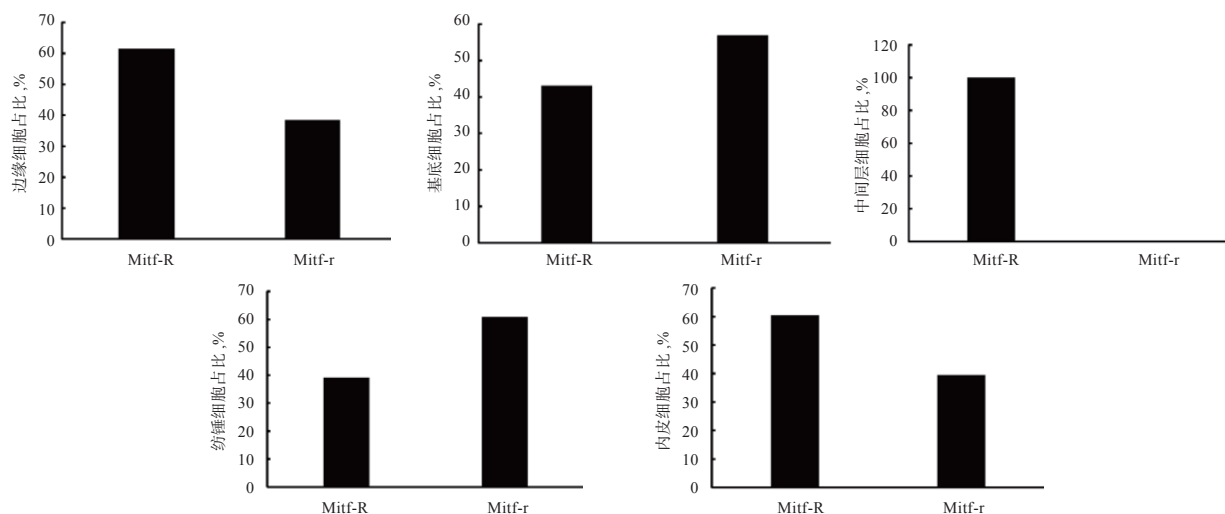


图 3 *Mitf-M* 突变对耳蜗血管纹组织各类型细胞数量的影响

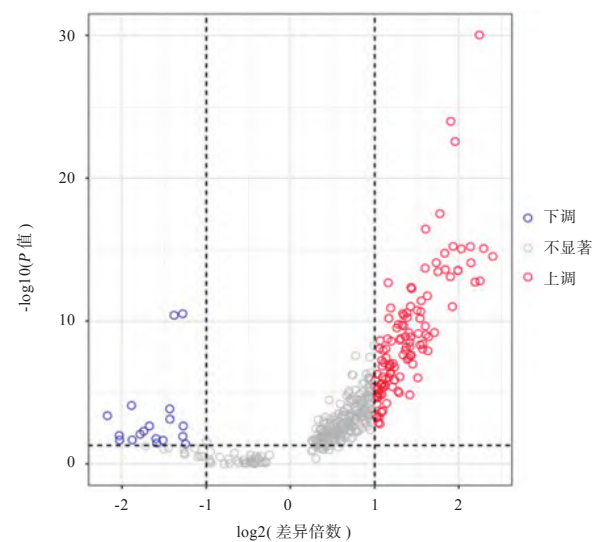


图 4 边缘细胞差异基因火山图

表 1 边缘细胞中 Mitf-R 相对 Mitf-r 差异表达的离子通道、能量代谢相关基因

基因名称	差异倍数	P 值	基因功能
KCNAB1	1.24	1.31E-06	电压门控钾通道
SLC26A7	1.29	1.04E-05	氯离子通道蛋白
SLC9A4	1.43	9.35E-12	钠离子浓度调节
上调 NALCN	1.43	4.34E-13	漏钠离子通道蛋白
KCNQ1	1.55	3.79E-12	缓慢延迟整流钾电流 (I _{ks}) 通道
SLC35F3	1.90	1.05E-24	三羧酸循环底物硫胺素的转运
SLC16A7	2.14	8.40E-15	单羧酸代谢
下调 TRPM3	-1.43	0.000718	阳离子渗透性离子通道蛋白

离子通道复合体、钙离子通道复合体、质膜蛋白复合物。差异表达基因显著富集的前 10 条分子功能为单原子阳离子跨膜转运蛋白活性、单原子离子跨膜转运蛋白活性、无机阳离子跨膜转运蛋白活性、无机分子实体跨膜转运蛋白活性、肌动蛋白结合、钙离子结合、单原子阳离子通道活性、单原子离子通道活性、跨膜转运蛋白结合、金属离子跨膜转运蛋白活性（图 5）。由此可知，Mitf-M 突变，可能影响了边缘细胞的离子跨膜转运、离子跨膜所需的转运复合物的形成以及离子跨膜转运蛋白的活性。

2.5 KEGG 代谢通路分析 对差异表达基因进行 KEGG 信号通路分析，结果发现，显著富集的前 10 条信号通路为心肌收缩、MAPK 信号通路、胃酸分泌、心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、肥厚型心肌病、扩张型心肌病、甲状旁腺激素的合成、分泌和作用、致心律失常性右心室心肌病、肌动蛋白细胞骨架的调控、Ras 信号通路（图 6）。此外，显著富集的信号通路还包括钙离

子信号通路、Rap1 信号通路、氧化磷酸化、cAMP 信号通路、黑色素瘤、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗、cGMP-PKG 信号通路、ErbB 信号通路等。

3 讨论

耳蜗血管纹组织由边缘细胞、基底细胞、中间细胞和毛细血管网等组成，对耳蜗内淋巴电位的稳定、离子转运循环以及听觉感觉上皮细胞的存活均具有重要作用^[2]。本课题组前期研究发现了一个血管纹组织功能异常导致的耳聋荣昌猪模型，并证实该病变是由 Mitf-M 基因突变导致中间层细胞丢失，继而引起内淋巴电位丢失导致的。但是 Mitf-M 基因突变对边缘细胞的影响还未进行进一步研究。本研究首先利用单细胞 RNA-seq 对野生型（Mitf-R）和耳聋荣昌（Mitf-r）猪的血管纹组织进行测序，通过 UMAP 聚类以及边缘细胞标记基因对边缘细胞进行注释。随后对 Mitf-R 和 Mitf-r 血管纹组织中注释出来的边缘细胞进行数量统计和差异表达基因分析，并对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 信号通路分析。研究结果为揭示荣昌猪的耳聋机制提供了进一步的基础数据，同时也可遗传性感音神经性耳聋的早期干预、人工听力重建、基因治疗等提供基础数据和理论依据，并为与耳蜗内淋巴点位异常相关的老年性耳聋提供潜在的治疗靶点。

单细胞测序对细胞类群进行注释时，主要的方法就是利用已经报道的细胞类群的标志基因，对细胞类群进行注释，通常若 2 个标记基因同时在某一类群中特异性高表达，则可注释该细胞类群^[13]，而 KCNQ1 和 SLC12A2 是已经报道的边缘细胞的标记基因，因此，本研究基于 KCNQ1 和 SLC12A2 的表达特征来进行边缘细胞的注释。本研究首先基于边缘细胞标记基因 KCNQ1 和 SLC12A2 注释出了边缘细胞^[14]，并对边缘细胞的数量进行了统计，发现 Mitf-M 突变型（Mitf-r）的边缘细胞数量较野生型（Mitf-R）边缘细胞的数量更少，陈林军等^[2]利用组织形态学方法对 Mitf-r 和 Mitf-R 血管纹边缘细胞的数量进行统计发现两者之间并无显著差异，这可能与其所使用的猪只日龄为出生后 7、10、30 d 和 40 d，而本研究所使用的猪只为 3 月龄有关，这也说明 Mitf-M 突变对边缘细胞产生影响的时间节点可能是在出生后一段时间，但是，这一结果还需在 3 月龄的耳聋荣昌猪中进行验证。目前认为 Mitf-M 突变直

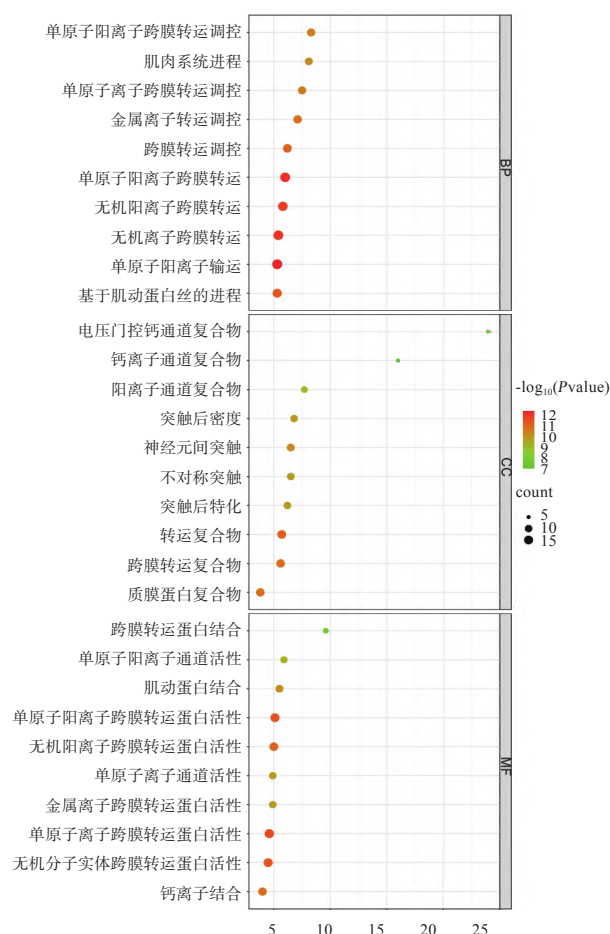


图 5 差异基因 GO 富集分析

接影响的是中间层细胞^[1], 因此, *Mitf-M* 突变对边缘细胞的影响更有可能是继发性的影响, 当然, 这也需要进一步的试验进行证实。值得注意的是, 此次单细胞测

序检测到的细胞数量较少, 可能原因是边缘细胞的表面有许多微绒毛, 细胞腔表面含有单根动纤毛, 并且胞体下部有许多突起^[15], 边缘细胞的尺寸和形态可能因物种和发育阶段的不同而有所差异, 这一特征导致其在测序时被捕获地较少。

随后, 本研究对 *Mitf-R* 和 *Mitf-r* 边缘细胞内差异表达基因进行了分析, 共发现了 140 个差异表达基因, 其中, *Mitf-R* 相对 *Mitf-r* 上调的有 122 个, 包括 *KCNAB1*、*KCNQ1*、*NALCN*、*SLC26A7*、*SLC9A4*、*SLC35F3*、*SLC16A7* 等。*Mitf-R* 相对 *Mitf-r* 下调的有 18 个, 包括 *TRPM3* 基因。*KCNAB1* 主要编码电压门控钾通道 β 亚基, 电压门控钾通道是一种跨膜蛋白分子, 能够通过选择性通透钾离子来调节细胞内外钾离子的浓度^[16]。*KCNQ1* 主要编码缓慢延迟整流钾电流 (Delayed after Potassium Current, *I_{ks}*) 通道的成孔亚基, *I_{ks}* 通道在内耳中的主要作用是维持内耳内淋巴液中 K^+ 稳态, 产生耳蜗内电位^[17]。在小鼠上的研究发现, *KCNQ1* 蛋白表达缺失, 会导致内耳中内淋巴电位异常, 引起内淋巴液减少, 使内耳结构异常, 听力缺失^[18]。*NALCN* 基因编码漏钠离子通道 (Sodium Leak Channel, *NALCN*) 蛋白, 属于电压门控钠 / 钙离子通道家族中的一员, 主要形成的是一个与电压无关的非选择性阳离子通道^[19], 可被细胞外的钙离子浓度调控^[20]。*NALCN* 基因敲除小鼠血清中钠离子含量显著升高, 表明 *NALCN* 在维持离子平衡中发挥着重要作用^[21]。本研究中, *NALCN* 出现差异表达, 推测 *Mitf-M* 突变是

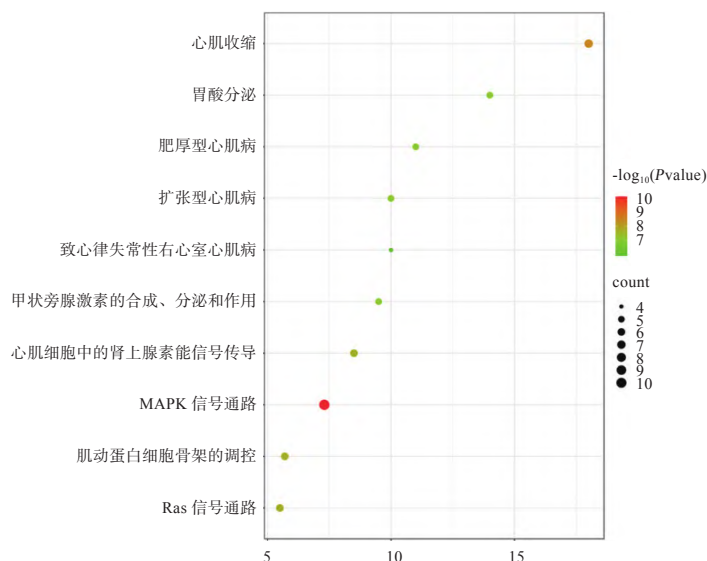


图 6 差异基因 KEGG 信号通路分析

通过调节 *NALCN* 的表达,影响离子通道的功能,引起内淋巴电位的稳态紊乱,导致了耳聋表型的产生。*SLC* 家族转运蛋白的主要功能是利用电化学电位差或离子梯度将其底物运输穿过生物膜,当前已鉴定出了超过 300 种 *SLC* 蛋白,包括 *SLC26A7*、*SLC9A4*、*SLC35F3* 和 *SLC16A7* 等^[22]。*SLC26A7* 基因是耳蜗功能重要的候选基因,主要作为氯离子的通道蛋白参与氯离子的转运^[23-25]。*SLC9A4* 对钠离子敏感,可调节细胞内外钠离子的浓度^[26]。众所周知,边缘细胞的功能就是通过调节离子转运,维持内淋巴电位的稳定,继而对听力功能的形成发挥重要作用^[5-6],因此,推测,*Mitf-M* 突变后,引起了 *SLC26A7* 和 *SLC9A4* 的表达变化,继而影响了边缘细胞的离子转运,从而导致了耳聋表型。综上所述,*KCNAB1*、*KCNQ1*、*NALCN* 等离子通道相关基因的差异表达表明,*Mitf-M* 突变可能是通过影响 *KCNAB1*、*KCNQ1*、*NALCN*、*SLC26A7*、*SLC9A4* 基因的表达来影响边缘细胞上的钾离子、钠离子通道的功能,继而影响了内淋巴电位的形成,最终影响了血管纹组织的功能,这也与前人研究发现的边缘细胞的主要功能相一致^[5, 27]。

SLC35F3 编码的是一种促进细胞内硫酸素迁移的蛋白质,这种蛋白质可将硫酸素运输到细胞中,硫酸素是丙酮酸脱氢酶的辅酶,两者在三羧酸循环中发挥着关键作用,这正是碳水化合物代谢的决定性步骤^[28]。*SLC16A7* 编码羧酸转运蛋白 2,主要功能为催化单羧酸如 L-乳酸盐、丙酮酸盐和酮体通过质膜的质子连接转运,并高度参与代谢过程和维持 pH 稳态^[29]。此外,*SLC16A7* 可间接参与钾离子的转运^[30]。由上可知,*Mitf-M* 突变还可能影响了边缘细胞的能量代谢过程,而离子的主动转运需要能量,因此,*Mitf-M* 突变也可能是通过影响离子转运相关的能量代谢,影响离子的跨膜转运,从而影响了边缘细胞的功能。

TRPM 亚家族包括 8 个亚型,分别为 TRPM1、TRPM2、TRPM3、TRPM4、TRPM5、TRPM6、TRPM7、TRPM8,此通道类型大部分参与了细胞增殖和细胞变异的相关特性^[31]。*TRPM3* 基因编码 TRPM3 蛋白,该蛋白的主要作用为在质膜上形成阳离子渗透性离子通道,参与离子的转运^[32],说明 *TRPM3* 的主要功能是调节细胞增殖和变异相关的离子通道。本研究发现,*TRPM3* 基因在 *Mitf-R* 中相对 *Mitf-r* 下调,即 *Mitf-M*

突变导致了边缘细胞内 *TRPM3* 基因的上调表达。本研究对 *Mitf-R* 和 *Mitf-r* 边缘细胞的数量统计发现 *Mitf-r* 边缘细胞的数量减少,推测 *Mitf-M* 突变虽然会导致边缘细胞数量降低,但边缘细胞自身可能也在启动增殖程序以产生更多的边缘细胞来补偿细胞的丢失。但是,值得注意的是,当前的研究结果仅从 RNA 表达层面揭示了 *Mitf-M* 突变对边缘细胞离子通道相关基因的表达,*Mitf-M* 突变是否对边缘细胞内离子转运相关蛋白表达的影响还需进一步验证。

本研究针对差异表达基因,进行了 GO 富集和 KEGG 信号通路分析。GO 富集分析发现,差异表达基因显著富集的前 10 条生物进程、细胞组分及分子功能绝大多数均与离子跨膜转运有关。KEGG 信号通路分析发现,差异表达基因显著富集在 MAPK^[33]、钙离子^[34]、Rap1^[35]、ErbB^[36] 等调节细胞生长、分化、迁移的信号通路上。此外,还显著富集在氧化磷酸化、cAMP 等与离子通道蛋白活化相关^[37]的信号通路。据此可以推测,*Mitf-M* 突变可能通过调控离子跨膜转运以及离子通道蛋白活化相关基因的表达影响边缘细胞的功能,此外,通过调控细胞生长、分化和迁移等相关通路,影响边缘细胞的数量。

4 结 论

Mitf-M 基因突变减少了耳聋荣昌猪血管纹边缘细胞的数量,导致 140 个基因的差异表达,这些基因对边缘细胞的影响主要涉及细胞的生长、分化、迁移以及细胞的离子跨膜运输等功能。

参考文献:

- [1] Chen L, Guo W W, Ren L L, et al. A de novo silencer causes elimination of MITF-M expression and profound hearing loss in pigs[J]. BMC Biol, 2016, 14: 52.
- [2] 陈林军,邱士伟,龙熙,等. *Mitf-M* 基因突变对猪耳蜗血管纹发育的影响[J]. 中华耳科学杂志, 2018, 16(4): 483-487.
- [3] Johns J D, Adadey S M, Hoa M. The role of the stria vascularis in neglected otologic disease[J]. Hearing Res, 2023, 428: 108682.
- [4] Zhang Q, Ota T, Yoshida T, et al. Electrochemical properties of the non-excitable tissue stria vascularis of the mammalian cochlea are sensitive to sounds[J]. J Physiol, 2021, 599(19): 4497-4516.
- [5] Raphael Y, Altschuler R A. Structure and innervation of the cochlea[J]. Brain Res Bull, 2003, 60(5-6): 397-422.
- [6] Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential[J]. Hearing Res, 2002, 165(1-2): 1-9.

- [7] Bovee S, Klump G M, Köppl C, *et al.* The Stria Vascularis: renewed attention on a key player in age-related hearing loss[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10): 5391.
- [8] Jovic D, Liang X, Zeng H, *et al.* Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e694.
- [9] Wang L W, Liu Y H, Dai Y T, *et al.* Single-cell RNA-seq analysis reveals BHLHE40-driven pro-tumour neutrophils with hyperactivated glycolysis in pancreatic tumour microenvironment[J]. *Gut*, 2023, 72(5): 958-971.
- [10] Cai S F, Hu B, Wang X Y, *et al.* Integrative single-cell RNA-seq and ATAC-seq analysis of myogenic differentiation in pig[J]. *BMC Biol*, 2023, 21(1): 19.
- [11] Zhang T Q, Xu Z G, Shang G D, *et al.* A single-cell RNA sequencing profiles the developmental landscape of arabidopsis root[J]. *Mol Plant*, 2019, 12(5): 648-660.
- [12] Wang J C, Sang Y C, Jin S X, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals early heterogeneity during aging in yeast[J]. *Aging Cell*, 2022, 21(11): e13712.
- [13] Soumya K, Ian T, Rafal O, *et al.* Single cell and single nucleus RNA-Seq reveal Cellular heterogeneity and homeostatic regulatory networks in adult mouse stria vascularis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 316.
- [14] Korrapati S, Taukulis I, Olszewski R, *et al.* Single cell and single nucleus RNA-Seq reveal cellular heterogeneity and homeostatic regulatory networks in adult mouse stria vascularis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 316.
- [15] 孟家豪, 林泽华, 孙月晨, 等. 棕榈酸对内耳血管纹边缘细胞损伤的作用机制 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2024, 46(5): 1-5.
- [16] Tiong S Y X, Oka Y, Sasaki T, *et al.* Kcnab1 is expressed in subplate neurons with unilateral long-range inter- areal projections[J]. *Front Neuroanat*, 2019, 13: 39.
- [17] Dixit G, Dabney-Smith C, Lorigan G A. The membrane protein KCNQ1 potassium ion channel: functional diversity and current structural insights[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020, 1862(5): 183148.
- [18] Casimiro M C, Knollmann B C, Ebert S N, *et al.* Targeted disruption of the Kcnq1 gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(5): 2526-2531.
- [19] Lu B X, Su Y H, Das S, *et al.* The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm[J]. *Cell*, 2007, 129(2): 371-383.
- [20] Chua H C, Wulf M, Weidling C, *et al.* The NALCN channel complex is voltage sensitive and directly modulated by extracellular calcium[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(17): eaaz3154.
- [21] Senatore A, Monteil A, Minnen J V, *et al.* NALCN ion channels have alternative selectivity filters resembling calcium channels or sodium channels[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55088.
- [22] Liu X D. SLC family transporters[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 101-202.
- [23] Kim K X, Sanneman J D, Kim H M, *et al.* Slc26a7 chloride channel activity and localization in mouse Reissner's membrane epithelium[J]. *PLoS one*, 2014, 9(5): e97191.
- [24] Kim K H, Shcheynikov N, Wang Y X, *et al.* SLC26A7 is a Cl⁻ channel regulated by intracellular pH[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 6463-6470.
- [25] Ullah A K M S, Rumley A C, Peleh V, *et al.* SLC26A7 protein is a chloride/bicarbonate exchanger and its abundance is osmolarity- and pH-dependent in renal epithelial cells[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020, 1862(6): 183238.
- [26] Sakuta H, Lin C H, Hiyama T Y, *et al.* SLC9A4 in the organum vasculosum of the lamina terminalis is a [Na⁺] sensor for the control of water intake[J]. *Pflugers Arch*, 2020, 472(5): 609-624.
- [27] Wangemann P. Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cells and strial marginal cells[J]. *Hear Res*, 1995, 90(1-2): 149-157.
- [28] Park H, Shin D. Effects of interaction between SLC35F3 and carbohydrate intake on the incidence of metabolic syndrome in Korean middle-aged adults[J]. *Nutrients*, 2023, 15(2): 469.
- [29] Halestrap A P. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 337-349.
- [30] Yao S, Xu M D, Wang Y, *et al.* Astrocytic lactate dehydrogenase a regulates neuronal excitability and depressive-like behaviors through lactate homeostasis in mice[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 729.
- [31] 杨璇. TRPM4 通道离子选择性通透机制的研究 [D]. 天津: 河北工业大学, 2020.
- [32] Oberwinkler J, Philipp S E. TRPM3[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, 222: 427-459.
- [33] Sun Y, Liu W Z, Liu T *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [34] Sayedyahosseini S, Thines L, Sacks D B. Ca²⁺ signaling and the Hippo pathway: intersections in cellular regulation[J]. *Cell Signal*, 2023, 110: 110846.
- [35] Yang J F, Liao Q, Lu C L. SOX9 promotes the invasion and migration of lung adenocarcinoma cells by activating the RAP1 signaling pathway[J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23(1): 421.
- [36] Gholipour A, Zahedmehr A, Shakerian F, *et al.* Significance of microRNA-targeted ErbB signaling pathway genes in cardiomyocyte differentiation[J]. *Mol Cell Probes*, 2023, 69: 101912.
- [37] Yang L H. Neuronal cAMP/PKA signaling and energy homeostasis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1090: 31-48.

(责任编辑: 石丽丹)