

Cx30 基因的慢病毒质粒构建及其对高糖环境耳蜗毛细胞活力影响

王志宏 张艳霞 火艺璇^{通讯作者}
兰州市第一人民医院耳鼻喉科
DOI:10.32629/bmtr.v8i2.18917

[摘要] 目的：构建过表达 Cx30 基因的慢病毒质粒，研究 Cx30 对高糖诱导耳蜗毛细胞凋亡、增殖影响。方法：本研究通过慢病毒载体构建了携带 Flag 标签过表达 CX30 的复合质粒，利用瞬时转染技术过表达 CX30、通过 CCK-8 实验检测细胞活力，流式细胞术检测细胞线粒体膜电位与细胞凋亡。结果：成功构建 CX30 真核表达质粒。在 HEI-OC1 细胞中建立 NC 组和过表达 CX30 组，在 25mmol/L 条件下，NC 和 CX30 组细胞数差异显著 ($P<0.01$)，CCK-8 实验显示，在 25mmol/L 浓度时，CX30 组 OD490nm 高于 NC 组 ($P<0.05$)。流式细胞检测细胞凋亡：在 25mmol/L 浓度时，NC 组晚期凋亡率 3.4%；CX30 组晚期凋亡率 4.72%。激光共聚焦显微镜成像显示 CX30 与 PLVAP 空间共定位于细胞质及细胞膜。结论：过表达 CX30 可能通过调控 PLVAP 抑制凋亡，减轻高糖诱导耳蜗毛细胞损伤。

[关键词] CX30；慢病毒包装；细胞凋亡；增殖；HEI-OC1
中图分类号：R339.1 文献标识码：A

Construction of Lentiviral Plasmid for Overexpression of Cx30 Gene and its Effects on High Glucose-induced Apoptosis and Proliferation of Cochlear Hair Cells

Zhihong Wang, Yanxia Zhang, Yixuan Huo^{Corresponding Author}

Otorhinolaryngology Department, First People's Hospital of Lanzhou City

[Abstract] Objective: To construct a lentiviral plasmid for the overexpression of the Cx30 gene and study the effects of Cx30 on high glucose-induced apoptosis and proliferation of cochlear hair cells. Methods: In this study, a composite plasmid carrying Flag-tagged overexpressed CX30 was constructed using a lentiviral vector. The transient transfection technique was used to overexpress CX30, and cell viability was detected using the CCK-8 assay. Flow cytometry was used to detect mitochondrial membrane potential and cell apoptosis. Results: The CX30 eukaryotic expression plasmid was successfully constructed. NC group and CX30 overexpression group were established in HEI-OC1 cells. Under 25mmol/L conditions, the difference in cell numbers between the NC and CX30 groups was significant ($P<0.01$). The CCK-8 assay showed that at a concentration of 25mmol/L, the OD490nm of the CX30 group was higher than that of the NC group ($P<0.05$). Flow cytometry detected cell apoptosis: at a concentration of 25mmol/L, the late apoptosis rate of the NC group was 3.4%; the apoptosis rate of the CX30 group was 4.72%. Laser confocal microscopy imaging showed that CX30 co-localized with PLVAP in the cytoplasm and cell membranes. Conclusion: Overexpression of CX30 inhibits apoptosis by regulating PLVAP, alleviating high glucose-induced damage to cochlear hair cells.

[Key words] CX30; Lentiviral packaging; Apoptosis; proliferation; HEI-OC1

引言

糖尿病是一种临床常见的老年基础性疾病，可引起内耳在内的微血管病变，导致耳蜗与耳蜗神经变性，使得听力受损^[1]。其发病机制与微血管病变^[2]、氧化应激损伤^[3]及听觉神经元代谢障碍直接相关^[4]。研究表明，糖尿病患者听力损失的发生与其病程长短及血糖控制水平密切相关。即便在调整

了噪声暴露等传统混杂因素后，该关联仍具有统计学意义，提示高血糖及其持续状态是听力损失的独立危险因素^[4-5]。

糖尿病引起耳蜗毛细胞损伤的机制主要通过氧化应激和线粒体功能障碍。糖尿病患者血清蛋白氧化产物显著升高 ($p<0.05$)，同时维生素 C/E 水平与听力阈值呈负相关 ($r=-0.318$ 至 -0.500)，提示氧化应激可直接损害耳蜗毛细胞线

粒体功能^[3]。动物实验证实, 高血糖环境中活性氧 (ROS) 积累可诱发毛细胞凋亡, 这与糖尿病患者高频听力损失的特征一致^[6]。线粒体 mtDNA A3243G 突变患者中, 94% 出现听力损失, 该突变引起毛细胞能量代谢障碍, 其螺旋神经节萎缩及耳蜗神经纤维减少^[7]。

目前发现的耳聋相关基因中, 编码缝隙连接蛋白的 GJB 基因突变是导致非综合征性遗传性耳聋 (Non-syndromic hereditary hearing impairment) 最主要的原因之一^[8]。有研究显示核基因 GJB2 和 GJB6 致病突变主要在重度和极重度耳聋中检出^[9]。在 1 例 Clouston 综合征家系的病例报告中通过全外显子测序发现 GJB6 基因杂合突变 c.31G>A (p.G11R)/-, 将该突变与 OMIM 数据库收录的明确致病相关基因进行比较, 怀疑为致病的分子病因^[10]。CX30 是连接蛋白 30 (connexin 30), 由 GJB6 基因编码^[11]。它是缝隙连接 (gap junction) 蛋白家族 (连接蛋白) 的重要成员^[12-13]。连接蛋白形成缝隙连接的跨膜蛋白, 六个连接蛋白构成一个连接子, 相邻细胞膜上的连接子对接, 形成细胞间通道^[12]。这些通道允许小于 1kDa 的小分子、离子和第二信使在直接接触的细胞之间自由扩散^[14]。CX30 介导细胞通讯调控组织内离子浓度、代谢废物交换^[15]。CX30 在哺乳动物内耳中高表达, 主要位于螺旋韧带、基底膜、血管纹和柯蒂氏器, 包括 Deiters 细胞、Hensen 细胞、Claudius 细胞^[16-17]。它在耳蜗钾离子循环中通过支持细胞的缝隙连接网络调控毛细胞微环境稳态^[18]。CX30 功能受损可导致耳蜗钾离子循环障碍。研究显示 CX30 的缺失能够加速耳蜗衰老和年龄相关的听力损失^[19]。CX30 缺乏在导致听力损失同时也能降低内耳电位和 ATP 释放^[20]。其机制在于内耳淋巴液中的高浓度钾离子因重吸收受阻而滞留, 继而扩散并积聚于支持细胞与结缔组织的细胞间隙中, 这种离子稳态的破坏最终诱发毛细胞功能障碍, 从而导致感音神经性听力损失^[21]。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒和病毒

HEI-OC1 细胞购自赛业生物科技有限公司。人胚胎肾细胞 (HEK-293T)、慢病毒包装质粒 pLV-puro-3×Flag 载体 (Clontech)、psPAX2 (Addgene, 12260) 和 pMD2.G (Addgene, 12259) 由中国农业科学院兰州兽医研究所惠赠。pCDNA3.1-Plvap-Myc 质粒由金开瑞生物公司合成。

1.2 主要试剂和抗体

本研究所用主要试剂与材料包括: 大肠杆菌 DH5 α 感受态 (TIANGEN); T4 DNA 连接酶、BamH I-HF、Nhe I-HF、Cutsmart buffer (B7204S, 10×Concentrate) (诺唯赞); 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 与 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (雅酶生物科技); 琼脂糖凝胶回收试剂盒

与无内毒素质粒小提试剂盒 (OMEGA); 线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒、 β -Actin 鼠单克隆抗体 (AF0003) (碧云天); 转染试剂 Polyplus jet PRIME (基因生物公司); 以及 Anti-Flag M2 antibody (F1804)、Anti-c-Myc Tag antibody (SAB4700447) (Sigma)。

1.3 引物设计与合成

在 NCBI 中查询 CX30 基因序列 (Gene ID: 10804), 设计特异性引物: CX30-F: 5' GCT GGA GGT GTT TGT GCT CT -3' (NheI-HF), CX30-R: 5' -GGA CAA GGC AAG GAC AAG AC -3' (BamHI-HF)。引物委托生工生物科技有限公司合成。

1.4 CX30 基因扩增

细胞总 RNA 经 Trizol 法提取后反转录为 cDNA。以 HEK-293T 细胞 cDNA 为模板, 采用 CX30 特异性引物扩增目标片段。PCR 在 50 μ L 体系中进行, 包含: 25 μ L 2×Phanta Max Master Mix, 各 2 μ L 的上、下游引物, 2 μ L 模板 cDNA, 以及 19 μ L ddH₂O。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物 (Fig1A), 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目标条带, 以备后续实验使用。

1.5 重组慢病毒过表达质粒的构建

取 1.4 项中回收的 CX30 基因片段与空载质粒 pLV-puro-3×Flag, 使用 NheI-HF 和 BamHI-HF 进行双酶切。50 μ L 酶切体系包含: 两种限制性内切酶各 1 μ L、10×Cutsmart Buffer 5 μ L、40 μ L 胶回收产物, 用 ddH₂O 补足至 50 μ L。37°C 反应 5 h 后, 回收酶切产物。在 16°C 过夜进行连接反应。10 μ L 连接体系包含: T4 DNA 连接酶 1 μ L、相应缓冲液 1 μ L、双酶切载体 pLV-puro-3×Flag 及胶回收目的基因片段 7 μ L。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆进行测序。将测序正确的菌株扩大培养并提取质粒。利用 Western blot 验证重组质粒的表达: 以 β -Actin 作为内参, 使用抗 Flag 标签抗体进行检测 (Fig1B)。验证正确的质粒放置于 -20°C 保存。

将 293T 细胞培养至第二代, 观察其生长状况良好, 接种于共聚焦小皿, 培养 12 小时, 待细胞汇合度约 60% 时, 使用 Polyplus jetPRIME 试剂, 以质粒: 转染试剂按 1:2 比例, 通过瞬时转染方法, 转染对照质粒和 PLV-CX30-Flag 质粒, 继续培养 24 小时弃原培养基, 加入 4% 多聚甲醛 4°C 固定, 随后使用 0.3% Triton X-100 在室温下处理 30 分钟以进行细胞通透, PBS 清洗 3 次, 加入 5% BSA 在 4°C 封闭 4 小时, 加入鼠抗 Flag 一抗, 在 4°C 下孵育过夜, PBST 清洗后, 随后添加鼠抗 488 荧光二抗, 在常温下孵育 2 小时, PBST 清洗, 最后加入 DAPI 进行细胞核染色, 并用激光共聚焦显微镜 (100×) 拍摄免疫荧光图像 (图 2)。

1.6 高糖环境 CX30 对 HEI-OC1 细胞活力影响

将 HEI-OC1 细胞培养至第三代, 观察生长状况良好, 消化成单细胞悬液后以 5×10^4 细胞密度接种于 12 孔板, 待细胞生长密度达到约 60% 时, 通过瞬时转染空载质粒 PLV-CX30-Flag 复合质粒后, 将对照 (NC) 组和过表达 CX30 组分别培养于 5.5mmol/L 和 25mmol/L 葡萄糖浓度中, 继续培养 24 小时, 将两组细胞在倒置显微镜 (10X) 拍照 (图 3A)。

将上述实验分组细胞以密度为 1×10^3 接种于 96 孔板, 每组设 5 个复孔, 每孔 100 μ L, 并设立空白对照孔。细胞培养箱中培养 24 h 至细胞贴壁。每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 轻轻振荡培养板使其混匀, 继续在培养箱中孵育 2 h。取出培养板, 使用酶标仪在 490 nm 波长 (参考波长 630 nm) 下测定各孔的吸光度 (OD 值)。按以下公式计算: 细胞活力 (%) = (实验组 OD 值 - 空白对照孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白对照孔 OD 值) \times 100% (图 3B)。

1.7 线粒体膜电位与凋亡检测

将 HEI-OC1 细胞培养至第三代, 观察细胞生长状况良好, 以密度为 1×10^5 接种 6 孔板, 待细胞生长密度约 70% 时, 利用瞬时转染方法, 转染空载质粒和 PLV-CX30-Flag 复合质粒后, 将细胞分组为 5.5mmol/L、25mmol/L 两组体外环境, 继续培养 24 小时, 待细胞汇合度 100% 时, 原培养基挪至 1.8mL 离心管, PBS 清洗, 用不含酚红的胰酶消化成单细胞悬液, 加入原培养基终止消化, 3000rpm 离心 5 分钟, 弃上清。PBS 重悬后 countstar 计数仪计数, 调整细胞密度为 1×10^5 , 离心弃上清, 利用线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒, 参照说明, 按分组每管加入 188 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 2 μ L Mito-Tracker Red CMXRos 染色液, 5 μ L Annexin V-FITC, 混匀后室温避光孵育 30min, 冰浴保存, 流式细胞仪检测, Flowjo 软件处理数据 (图 4)。

1.8 生信分析 CX30 互作蛋白及细胞定位

通过数据库挖掘并利用 R 代码分析, 得出与 CX30 可能发生蛋白相互作用的调控网络 (图 5A,B)。将培养至第二代, 生长状况良好的 293T 细胞接种共聚焦小皿, 培养 12 小时, 待细胞汇合度约 60%, 使用 Polyplus jetPIME 试剂, 以 1:2 比例, 通过瞬时转染方法转染 PLV-CX30-Flag 质粒和 Pc3.1-Plvap-Myc 质粒, 24 小时弃原培养基, 加入 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 30min, 加入 0.3% Triton X-100 室温通透 30min, PBS 清洗 3 次, 加入 5% BSA 4 $^{\circ}$ C 封闭 4 h, 加入鼠抗 Flag 一抗和兔抗 Myc 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗 3 次, 每次 10min, 加入对应的荧光二抗, 室温孵育 2 h, PBST 洗 3 次, 最后加入 DAPI 进行细胞核染色, 并用激光共聚焦显微镜 (60 \times) 拍摄免疫荧光图像进行蛋白相互作用的亚细胞定

位 (图 5C)。

1.9 数据分析

用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析并作图, 两组间比较采用 LSD-t 检验, 多组间比较采用双因素方差分析, 多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。*代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$, ****代表 $P < 0.0001$ 。

2 结果

2.1 CX30 真核表达质粒的鉴定

通过引物对 CX30 基因进行 PCR 扩增后, 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 观察到约 830 bp 左右目的条带 (图 1A), 其长度与预期一致。将经过 NheI-HF 和 BamHI-HF 双酶切处理的片段与 pLV-puro-3 \times Flag 载体进行连接, 并将重组质粒转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 提取质粒。利用瞬时转染技术将 PLV-CX30-Flag 质粒转入 293T 细胞中, 并通过标签抗体检测进行验证, 如图 1B 所示, 能够观察到目的条带, 其大小与预期相符, 大小与预期相符, 进一步验证 CX30 真核表达质粒的成功构建。

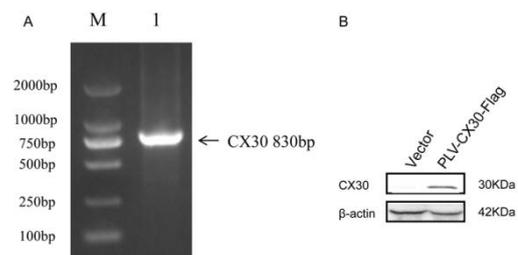


图 1 CX30 真核表达质粒 PLV-CX30-Flag 的构建与鉴定

2.2 间接免疫荧光

采用瞬时转染技术将 PLV-CX30-Flag 基因转染至 293T 细胞, 利用激光共聚焦显微镜进行免疫荧光成像, 结果显示 CX30 基因在细胞内稳定表达, 并主要定位于细胞质及细胞膜。(图 2)。

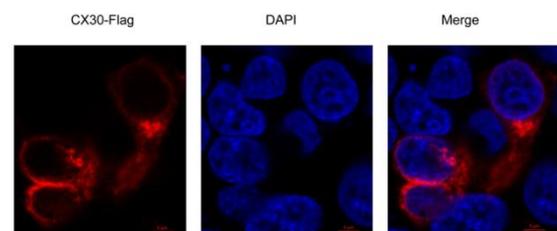


图 2 间接免疫荧光验证 CX30 表达

2.3 葡萄糖毒性对 HEI-OC1 细胞体外生长影响

将培养至第三代, 细胞生长状况良好的 HEI-OC1 细胞按实验设置分为 NC 组和 CX30 组, 分别在 5.5mmol/L 和 25mmol/L 条件下培养。结果显示: 在 5.5mmol/L 时, NC 组和 CX30 组细胞密度无明显差异; 在 25mmol/L 时, NC 组细

胞密度显著降低,而 CX30 组细胞密度比 NC 组明显提升(图 3A)。ImageJ 软件细胞计数结果显示: 5.5mmol/L 下 NC 和 CX30 组细胞数无显著差异 (ns)。在 25mmol/L 条件下, NC 和 CX30 组细胞数差异显著 ($P<0.01$) (图 3B)。通过 CCK-8 实验进行细胞活力检测, OD 值代表细胞活力。在 5.5mmol/L 浓度下: NC 组与 CX30 组的 OD490nm 无显著差异 (ns); 在 25mmol/L 高糖浓度时, CX30 组的 OD490nm 显著高于 NC 组 ($P<0.05$) (图 3C)。

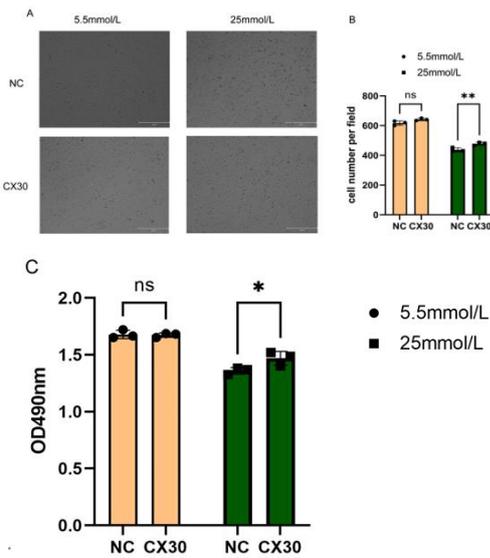


图3 高糖对 HEI-OC1 细胞活力影响

2.4 高糖环境中 CX30 对 HEI-OC1 细胞线粒体膜电位与凋亡影响

利用瞬时转染方法将 PLV-CX30-Flag 转染于细胞生长状况良好的 HEI-OC1 细胞中, 分为 NC 组和 CX30 组, 在 5mmol/L 和 25mmol/L 条件下培养 24 小时。利用流式细胞仪检测高糖环境中 CX30 对 HEI-OC1 细胞线粒体膜电位与凋亡影响, 流式散点图的象限 (Q1-Q4) 中, Q1 区域代表坏死或机械损伤细胞、Q2 为晚期凋亡细胞, Q3 为早期凋亡细胞, Q4 为存活细胞。结果显示: 25mmol/L 高糖组的存活细胞 (Q4) 占比显著低于 5mmol/L 组: NC 组: Q4 占比从 87.0% (5mmol/L) 降至 81.8% (25mmol/L); CX30 组: Q4 占比从 91.0% (5mmol/L) 降至 77.4% (25mmol/L); 相同糖浓度下, CX30 组存活细胞 (Q4) 占比显著高于 NC 组;

5mmol/L 时: CX30 组 Q4 (91.0%) > NC 组 Q4 (87.0%); 25mmol/L 时: CX30 组 Q4 (77.4%) > NC 组 Q4 (81.8%); 在 5.5mmol/L 培养条件下, NC 组晚期凋亡率为 4.21%; CX30 组晚期凋亡率为 2.15%; 在 25mmol/L 培养条件下, NC 组晚期凋亡率约 3.4%; CX30 组凋亡率约 4.72%。(图 4)。

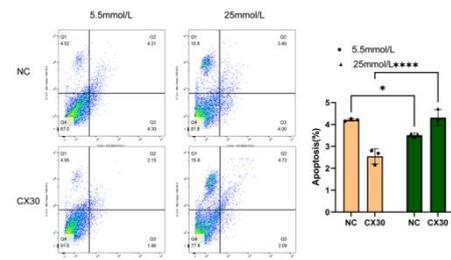


图4 高糖环境 CX30 对 HEI-OC1 细胞线粒体膜电位与凋亡影响

2.5 生信分析 CX30 互作蛋白及细胞定位

通过 R 代码分析发现 CX30 可能与 PLVAP 相互调控展示了一组蛋白的相互作用网络, 互作的蛋白包括 GJB6 (CX30, 缝隙连接蛋白 30)、GJC2、GJE1、GJA4、CNST、GJC1 和 PLVAP。结果: 节点代表蛋白, 连线代表蛋白间的相互作用。可见 GJB6 与其他多个蛋白存在密集的相互作用, 同时 PLVAP 也与 GJA4 等存在互作。通过数据库挖掘数据集 (GSE151367) 结果显示曲线呈现明显的峰值, 提示 CX30 在听力损失相关疾病明显富集 (图 5B), 通过间接免疫荧光技术利用激光共聚焦显微镜进行亚细胞定位, Merge 图中红色与绿色信号存在重叠, 说明 CX30 和 PLVAP 在细胞内的亚细胞定位存在共区域。二者共定位于细胞质及细胞膜 (图 5C)。

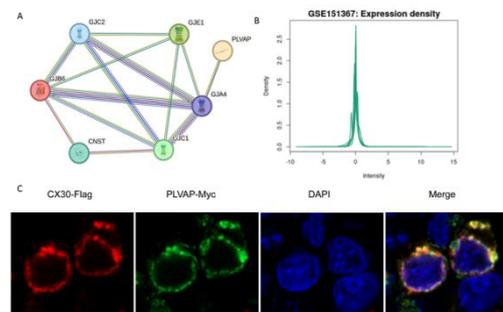


图5 CX30 蛋白互作蛋白及亚细胞定位

3 讨论

2 型糖尿病通常是由于后天的生活方式和环境因素所导致的, 随着疾病的进展和病程的延续, 患者的听力损害发生率也会逐渐增加, 对早发型 2 型糖尿病 (诊断年龄 < 40 岁) 的研究显示, 21.7% 的患者存在听力损失, 且多表现为轻度高频听力下降^[22]。已有研究显示糖尿病病程是 2 型糖尿病患者听力损害的独立危险因素^[23]。糖尿病引起内耳毛血管基底膜增厚和周围神经病变影响耳蜗毛细胞功能^[24], 部分患者可出现耳蜗功能正常但神经信号传导异常^[25]。听力下降可能是糖尿病并发症的早期标志之一^[26]。CX30 作为内耳间隙连接蛋白, 其复合体主要在维持细胞间通讯和听觉功能中发挥重要作用^[27]。CX30 缺失的小鼠模型, 因为细胞间的电耦合

和化学信号传递功能受损, 导致明显听力损失^[28]。

本研究利用 PCR 扩增技术获得特异的 CX30 基因片段, 构建 CX30 基因过表达质粒。利用瞬时转染技术将 PLV-Flag-CX30 复合质粒转染于 293T 细胞, 发现其表达于细胞质及细胞膜。设置 NC 组和 CX30 组, 分别在 5.5mmol/L 和 25mmol/L 条件下培养 HEI-OC1 细胞, 通过倒置显微镜观察 HEI-OC1 细胞生长状态。5.5mmol/L 时, NC 组和 CX30 组细胞密度无明显差异。25mmol/L 时, NC 组细胞密度显著降低, 而 CX30 组细胞密度比 NC 组明显增加, 提示高糖会抑制细胞活力, 而 CX30 可缓解高糖对细胞的损伤作用; CCK-8 实验结果提示 CX30 在正常糖浓度下对细胞活力无明显影响, 但在高糖浓度下可增强细胞活力, 具有高糖环境下的保护效应; 同时上述实验结果显示: 高糖本身会抑制细胞活力, 而 CX30 可在一定条件下抑制高糖导致的细胞功能损伤。利用流式细胞仪检测 5.5mmol/L 和 25mmol/L 中 CX30 对 HEI-OC1 细胞线粒体膜电位与凋亡影响, 研究结果显示, 高糖环境能诱导引发耳蜗毛细胞的损伤, 这一发现为“高糖毒性”作为糖尿病引起听力损害的机制提供了理论依据。同时 CX30 过表达可显著提高耳蜗毛细胞在高糖环境下的活细胞占比, 提示 CX30 可保护耳蜗毛细胞免受糖尿病(高糖)毒性损伤。为进一步探究 CX30 作用, 探索 CX30 在 HEI-OC1 细胞中对凋亡通路的影响。利用 R 代码分析发现 CX30 可能与 PLVAP 间接发生蛋白相互作用, 其中间间隔 GJA4 介导蛋白互作。通过公共数据集的疾病表达谱分析, 验证了 CX30 在数据集中的表达模式, 该结果为后续解析其转录调控机制提供了数据支持。利用间接免疫荧光技术, 通过激光共聚焦显微镜成像, 发现在 293T 细胞中, CX30 与 PLVAP 共同定位于细胞质及细胞膜, 结合图 A 的互作预测, 进一步支持二者存在功能关联, 进一步提示 CX30 可能通过 PLVAP 调控高糖环境对 HEI-OC1 细胞活力的影响。为“靶向 CX30 防治糖尿病听力损害”提供了理论基础。

综上所述, 本实验结果为 CX30 可能作为糖尿病听力损害中潜在的监测指标及听力治疗靶点的研发提供了便捷工具。本研究局限性在于未进行蛋白互作免疫沉淀实验及体内实验, 后续将结合动物模型进行毛细胞电生理及听力学检测, 进一步阐释 CX30 的作用靶点及作用机制。

[利益冲突]所有作者声明无利益冲突。

[参考文献]

[1]易虹, 谢杏强. 2 型糖尿病患者听力特征性改变的分析研究[J]. 海军医学杂志, 2021, 42(5): 609-12.

[2]MAIA C A, CAMPOS C A. Diabetes mellitus as etiological factor of hearing loss [J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2005, 71(2): 208-14.

[3]ALADAG I, EYIBILEN A, GÜVEN M, et al. Role of oxidative stress in hearing impairment in patients with type two diabetes mellitus [J]. J Laryngol Otol, 2009, 123(9): 957-63.

[4]YADAV M K, YADAV K S. Etiology of Noise-Induced Hearing Loss (NIHL) and its Symptomatic Correlation with Audiometry Observations in Type II Diabetes [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2018, 70(1): 137-44.

[5]BENER A, AL-HAMAQ A, ABDULHADI K, et al. Interaction between diabetes mellitus and hypertension on risk of hearing loss in highly endogamous population[J]. Diabetes Metab Syndr, 2017, 11 Suppl 1: S45-s51.

[6]LI Y H, LIU B. [Characteristics of early hearing impairment in patients with diabetes mellitus] [J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2018, 53(3): 223-6.

[7]DESCHAUER M, MÜLLER T, WIESER T, et al. Hearing impairment is common in various phenotypes of the mitochondrial DNA A3243G mutation[J]. Arch Neuro, 2001, 58(11): 1885-8.

[8]米彦芳. 缝隙连接蛋白 30 基因敲除小鼠听力损伤机制研究[D]; 郑州大学, 2020.

[9]张初琴, 陈波蓓, 伊松, 等. 非综合征型耳聋的不同听力学表型与常见致聋基因的相关性[J]. 温州医科大学学报, 2020, 50(11): 873-7.

[10]曲春燕, 王锋, 马登科, 等. Clouston 综合征家系的病例报告 1 例[J]. 中华耳科学杂志, 2022, 20(03): 522-5.

[11]COMMON J E, BECKER D, DI W L, et al. Functional studies of human skin disease- and deafness-associated connexin 30 mutations [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 298(5): 651-6.

[12]XU J, NICHOLSON B J. Divergence between Hemichannel and Gap Junction Permeabilities of Connexin 30 and 26 [J]. Life (Basel), 2023, 13(2).

[13]LEVIN M, MERCOLA M. Expression of connexin 30 in Xenopus embryos and its involvement in hatching gland function [J]. Dev Dyn, 2000, 219(1): 96-101.

[14]MCCULLOCH F, CHAMBREY R, ELADARI D, et al. Localization of connexin 30 in the luminal membrane of cells in the distal nephron [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 289(6): F1304-12.

[15]石敏, 于宁, 丁大雄, 等. 对 Hensen 细胞在耳蜗 K+ 循环中角色的新认识 [J]. 中华耳科学杂志, 2020, 18(03):

607-12.

[16]KELLY J J, SHAO Q, JAGGER D J, et al. Cx30 exhibits unique characteristics including a long half-life when assembled into gap junctions [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(21): 3947-60.

[17]吴涛,韩东一,杨伟炎. 耳蜗内电位产生机理及钾离子动态平衡的研究进展[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2004(06): 62-4.

[18]KIKUCHI T, ADAMS J C, MIYABE Y, et al. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness [J]. *Med Electron Microsc*, 2000, 33(2): 51-6.

[19]PACIELLO F, ZORZI V, RASPA M, et al. Connexin 30 deletion exacerbates cochlear senescence and age-related hearing loss [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 950837.

[20]CHEN J, CHEN P, HE B, et al. Connexin30-Deficiency Causes Mild Hearing Loss With the Reduction of Endocochlear Potential and ATP Release [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 819194.

[21]CHEN B, XU H, MI Y, et al. Mechanisms of hearing loss and cell death in the cochlea of connexin mutant mice [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(3): C569-c78.

[22]LERMAN-GARBER I, CUEVAS-RAMOS D, VALDÉS S, et al. Sensorineural hearing loss—a common finding in early-onset type 2 diabetes mellitus [J]. *Endocr Pract*, 2012, 18(4): 549-57.

[23]李晋莹. 2型糖尿病患者的血糖在目标范围内的时间与听力损害的相关性研究[D]. 暨南大学, 2023.

[24]DENG Y, CHEN S, HU J. Diabetes mellitus and hearing loss [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 141.

[25]GIRAUDET F, MULLIEZ A, DE RESENDE L M, et al. Impaired auditory neural performance, another dimension of hearing loss in type-2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab*, 2022, 48(6): 101360.

[26]LIU L, XU Q, ZHU M, et al. An Umbrella Review of Diabetes Mellitus and Hearing Impairment [J]. *J Evid Based Med*, 2025, 18(2): e70030.

[27]XIA A, KATORI Y, OSHIMA T, et al. Expression of connexin 30 in the developing mouse cochlea [J]. *Brain Res*, 2001, 898(2): 364-7.

[28]SCHÜTZ M, SCIMEMI P, MAJUMDER P, et al. The human deafness-associated connexin 30 T5M mutation causes mild hearing loss and reduces biochemical coupling among cochlear non-sensory cells in knock-in mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(24): 4759-73.

作者简介:

王志宏(1974-),男,汉族,甘肃,本科学历,单位:兰州市第一人民医院,主任医师,研究方向:听力损害。

基金项目:

甘肃省自然科学基金(23JRRA1788);兰州市卫生健康科技发展项目(2021005);甘肃中医药大学研究生创新创业基金项目。