

邻近标记技术对活体小鼠耳蜗毛细胞表面蛋白进行特异性标记

王暖^{1,2}, 王欣阳^{1,2}, 吉长皓^{1,2}, 刘敏², 高建刚^{2,3}, 孙锦^{1,2}

1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院) 实验动物学院, 山东 济南 250117

2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院) 医学科技创新中心, 山东 济南 250117

3. 山东大学生命科学学院/实验畸形学教育部重点实验室, 山东 济南 250100

摘要: **目的** 开发标记小鼠耳蜗毛细胞的细胞表面蛋白的方法, 为测定耳蜗毛细胞表面蛋白质组提供依据。 **方法** 构建在毛细胞中特异性表达一种辣根过氧化物酶融合蛋白 (HRP fused with a transmembrane domain, HRP-TM) 的重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV), HRP-TM 可以定位到毛细胞膜的外表面。通过显微注射将病毒注射到 2 d 新生 C57BL/6 小鼠的后半规管中, 30 d 时检测听觉脑干反应 (auditory brainstem response, ABR), 并通过基底膜免疫荧光染色检测耳蜗中 HRP 表达和蛋白标记情况。 **结果** ABR 结果显示, 注射病毒的小鼠和未注射病毒的对照小鼠相比, 听力无明显差异。基底膜免疫荧光染色结果显示, HRP-TM 在毛细胞中特异性表达, 内毛细胞的病毒感染效率超过 95%, 外毛细胞的病毒感染效率达到 80% 左右。而且, 毛细胞的形态和排列与对照相比无明显差异。用荧光偶联链霉亲和素进行免疫荧光染色, 只有表达 HRP-TM 的毛细胞的细胞膜表面有明显荧光信号。 **结论** 本研究中构建的 rAAV 病毒可以高效特异性的标记耳蜗毛细胞的细胞表面蛋白, 并且无明显的细胞毒性, 不影响毛细胞的正常生理功能, 为下一步分离耳蜗毛细胞的细胞表面蛋白并进行质谱分析奠定了基础。

关键词: 耳蜗毛细胞; 邻近标记; 重组腺相关病毒; 辣根过氧化物酶; 细胞表面蛋白质组

中图分类号: Q95-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2026)01-0006-07

引用格式: 王暖, 王欣阳, 吉长皓, 等. 邻近标记技术对活体小鼠耳蜗毛细胞表面蛋白进行特异性标记[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2026, 40(1):6-12. WANG Nuan, WANG Xinyang, JI Changhao, et al. In vivo proximity labeling of cell-surface proteins in mouse cochlear hair cells[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2026, 40(1):6-12.

In vivo proximity labeling of cell-surface proteins in mouse cochlear hair cells

WANG Nuan^{1,2}, WANG Xinyang^{1,2}, JI Changhao^{1,2}, LIU Min², GAO Jiangang^{2,3}, SUN Jin^{1,2}

1. School of Laboratory Animal, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, Shandong, China

2. Medical Science and Technology Innovation Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, Shandong, China

3. School of Life Science, Key Laboratory of the Ministry of Education for Experimental Teratology, Shandong University, Jinan, 250100, Shandong, China

Abstract: Objective To develop a method for labeling cell-surface proteins of cochlear hair cells in mice and establish conditions for profiling the cell-surface proteome of these cells. **Methods** A recombinant adeno-associated virus (rAAV) was engineered to express a horseradish peroxidase fusion protein (HRP-TM) specifically in hair cells, targeting the outer surface of the cell membrane. The virus was microinjected into the posterior semicircular canal of 2-day-old C57BL/6 mice. At 1 month of age, auditory brainstem response (ABR) was measured, and HRP expression and protein labeling were assessed via basilar membrane immunofluorescence staining. **Results** ABR results showed no significant hearing differences between virus-injected and control mice. Immunofluorescence revealed HRP-TM was specifically expressed in hair cells, with >95% transduction efficiency in inner hair cells and ~80% transduction efficiency in outer hair cells. Hair cell morphology and arrangement remained normal. Fluorescent

收稿日期: 2024-12-30

基金课题: 山东省自然科学基金 (ZR2023MC207)

通信作者: 孙锦. E-mail: sunjin@sdfmu.edu.cn

streptavidin staining confirmed membrane-specific labeling exclusively in HRP-TM-expressing hair cells. **Conclusion** The rAAV-HRP-TM system efficiently and specifically labels cochlear hair cell surface proteins without cytotoxicity or functional impairment, providing a foundation for isolating and analyzing these proteins via mass spectrometry.

Key words: Cochlear hair cells; Proximity labeling; rAAV; HRP; Cell-surface proteome

毛细胞包括外毛细胞 (outer hair cells, OHCs) 和内毛细胞 (inner hair cells, IHCs), 丢失会导致听力损失^[1-2]。毛细胞的跨膜通道样蛋白 (transmembrane channel-like proteins, TMCs) 对于毛细胞正确行使功能至关重要^[3-4]。对毛细胞表面蛋白质组学进行测定可以促进声音感知分子机制的研究。传统的膜蛋白分离的方法需大量的细胞, 且会丢失重要蛋白, 只适合于体外培养, 难应用到体内^[5-6]。邻近标记技术使用靶向特定细胞或特定细胞器的标记酶, 添加底物后发生反应, 短时间内标记附近一定范围内的蛋白。它不需要对细胞器进行分离, 适合应用于体内特定细胞区域内的蛋白质组学研究^[7-8]。HRP 作为标记酶, 其是否具有活性与其所处的环境有关, HRP 标记蛋白时可以使用生物素苯酚的类似物 BxxP 作为底物, 而 BxxP 不能透过细胞膜, 使 HRP 标记细胞表面蛋白具有较高的特异性, 因此 HRP 更适合用于细胞表面蛋白质组学研究^[9-10]。已有 HRP 在果蝇和小鼠神经细胞表面蛋白质组学研究中的成功应用^[11-12]。但是, HRP 在耳蜗毛细胞的表面是否具有活性尚不明确。

本研究构建一种耳蜗毛细胞特异性表达 HRP 的 rAAV 病毒, 并将其注射到新生小鼠的后半规管处的膜半规管中。结果表明, 病毒可高效地感染耳蜗毛细胞, 在毛细胞中特异性表达 HRP, 且不影响毛细胞的正常生理功能。表达的 HRP 可以定位到毛细胞的细胞膜上, 成功地标记毛细胞表面蛋白。本研究为耳蜗毛细胞表面蛋白质组学研究提供了有力工具。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

SPF 级 C57BL/6 小鼠购自赛业(苏州)生物科技有限公司, 由本实验室饲养和繁殖。小鼠在标准条件下饲养, 温度为 (22±1) °C, 湿度为 (50±1) %, 光照循环为 12 h 光照/12 h 黑暗, 自由采食和饮水。所有动物实验均经过山东第一医科大学伦理委员会

审核并批准 (2023-126)。

rAAVs 由赛业(苏州)生物科技有限公司包装, 血清型为 AAV-ie-K558R。PBS (P1010)、山羊血清 (SL038) 购自北京索莱宝科技有限公司; Triton X-100 (ST795) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 10% EDTA 洗液 (R10002) 购自北京雷根生物技术有限公司; Trolox (60309ES25) 购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; L-抗坏血酸钠 sodium ascorbate (A7631)、BxxP (SML3484) 购自 Sigma-Aldrich; 4% 多聚甲醛固定液 (BL539A) 购自白鲨 (Biosharp); 含 DAPI 的抗荧光淬灭剂 (ab104139) 购自 abcam 公司; 鼠源 HA-Tag (26D11) mAb (M20003S) 购自 abmart 公司; 兔源 anti-Myo7a (25-6790) 购自 proteus-biosciences 公司; Streptavidin-AF488 labeled (M216203) 购自 abmart 公司; DMEM 高糖培养基 (11995040)、Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed ReadyProbes™ Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 594 (R37121) 购自英潍捷基公司; Alexa Fluor® 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (ZF-0511) 购自中杉金桥公司。

1.2 实验方法

采用已发表的半规管注射方法注射^[13]。2 d 龄的新生 C57BL/6 小鼠置于冰桶中低温麻醉, 然后将麻醉的小鼠转移至冰垫上进行手术, 后续手术时间不超过 5 min。每只小鼠只对右耳进行手术, 在耳后 2 mm 处作小切口露出后半规管, 用 World Precision Instruments 公司的 NANOLITER2020 注射器将病毒注射进后半规管。每只小鼠注射 1.5 μL rAAV 病毒 (5.00×10¹² GC/mL), 注射时间为 30 s。注射完成后, 用 3M 公司的 vetbond™ 组织粘合剂 (1469SB) 封闭切口。在温热垫上恢复 10 min 后, 将小鼠放回母鼠旁边继续饲养。注射后小鼠的存活率约为 90%。

测听前用生理盐水配制 1% 戊巴比妥钠溶液。测量小鼠体重, 按照 0.01 mL/g 的剂量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液, 使小鼠深度麻醉。深度麻醉的小鼠置于测听屏蔽室中, 三根电极分别插入小鼠皮下, 其中记录电极插入到小鼠两耳中间的颅顶处, 参考

电极插入到小鼠左耳耳垂下,接地电极插入到小鼠的背中中线处。采用 TDT RZ6/BioSigRZ 听觉生理工作站进行听觉脑干反应 (ABR) 检测。用短声 (click) 和短纯音 (tone burst) (4、8、16、24、32 kHz) 作为刺激声,叠加 512 次,初始刺激强度为 90 dB 声压级 (sound pressure level, SPL), 衰减间隔为 5 dB SPL, 可以检测到振幅的最低刺激强度为该频率的阈值。

颈椎脱位法处死小鼠,取出小鼠耳蜗,在 PBS 中将多余组织剔除干净。在蜗顶处打孔,灌注 4% PFA, 4 °C 固定过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 min, 然后用 10% EDTA 溶液脱钙 6 h。再用 PBS 洗 3 次 (5 min/次) 后,在体视显微镜下剥离基底膜。PBS 洗 3 次 (5 min/次), 将基底膜放入含 0.2% Triton X-100 的 PBS 中 15 min。用含 5% 山羊血清的 PBS 封闭 30 min。加入一抗, 4 °C 孵育过夜。PBS 洗 3 次 (5 min/次), 加入二抗孵育 1 h。PBS 洗 3 次 (5 min/次), 用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片。

耳蜗取出并在蜗顶处打孔后,置于含 100 μM BxxP 的 DMEM 细胞培养液 (含 10% 胎牛血清) 中, 室温孵育 30 min。孵育过程中每 10 min 灌注一次含 100 μM BxxP 的 DMEM 细胞培养液。按照 1:100 的比例加入 0.3% H₂O₂ 溶液, 混匀后灌注耳蜗一次, 继续孵育 5 min。用含 5 mM Trolox 和 10 mM sodium ascorbate 的 PBS (终止反应液) 快速洗 5 次, 灌注 4% PFA, 4 °C 固定过夜。后面的步骤和基底膜铺片染色相同。AF488 荧光偶联的链霉亲和素作为一抗, 用来检测生物素标记的蛋白。

2 结果

2.1 邻近标记病毒载体的设计

为了特异性标记细胞膜表面的蛋白, rAAV 载体中克隆了 HRP-TM 蛋白编码序列 (图 1)。HRP-TM 是一个融合蛋白, HRP 的 C 端融合了血小板衍生生长因子受体 PDGFRβ 蛋白的跨膜结构域, N 端融合了一个小鼠的 IgK 分泌信号肽和 HA 标签^[10]。载体中克隆的 HRP-TM 基因序列来源于质粒 pCAG HRP-TM (addgene, #44441)。另外, rAAV 载体中克隆了小鼠 *Atoh1* 基因的 Eh3 增强子和热激蛋白 hsp68 的最小启动子, 来调控 HRP-TM 在毛细胞中

特异性表达 (图 1)^[14]。为了提高标记效率, 病毒的血清型采用了已报道的可以高效感染耳蜗毛细胞的 AAV-ie-K558R 血清型^[15], HRP-TM 表达盒的两侧是 AAV2 反向末端重复序列 (图 1)。下文中将该病毒标记为 rAAV-HRP-TM。

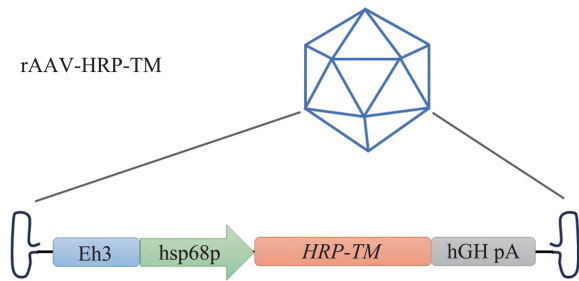


图 1 rAAV-HRP-TM 病毒载体示意图

Figure 1 Schematic diagram of the rAAV-HRP-TM viral vector

2.2 半规管注射 rAAV-HRP-TM 病毒对听力无明显影响

为了感染小鼠耳蜗毛细胞, 7.5×10^9 GC 的 rAAV-HRP-TM 病毒通过显微注射仪注射到 2 d 新生小鼠的后半规管中, 每只小鼠只注射右耳 (图 2A)。注射后的小鼠继续饲养至 30 d 时, 进行 ABR 检测, 确定 rAAV-HRP-TM 病毒是否影响耳蜗正常的生理功能 (图 2A)。结果显示, 和没有注射病毒的同窝对照小鼠相比, 注射病毒的小鼠各频率的听力阈值无明显变化 (图 2B、C)。这表明在本研究所用的注射条件下, rAAV-HRP-TM 病毒不会产生明显的耳毒性。

2.3 HRP 在毛细胞中高效特异性表达

为了验证 HRP-TM 在耳蜗中的表达情况, 将测听后的小鼠进行基底膜铺片的免疫荧光染色, 用 Myo7A 的抗体特异性标记毛细胞^[16]。结果显示, HRP-TM 只在表达 Myo7A 的细胞中表达, 而且毛细胞形态正常, 排列规则 (图 3A), 但是内毛细胞中 HRP-TM 的表达量高于外毛细胞。这表明在耳蜗中, HRP-TM 在毛细胞中特异性的表达, 并且对毛细胞形态无明显影响。为了检测 rAAV-HRP-TM 病毒感染的效率, 对表达 HRP-TM 的毛细胞占有所有毛细胞的比例进行统计。结果显示, 顶回、中回和底回的内毛细胞的感染效率接近, 都超过 95%; 外毛细胞的感染效率也达到 80% 左右 (图 3B)。

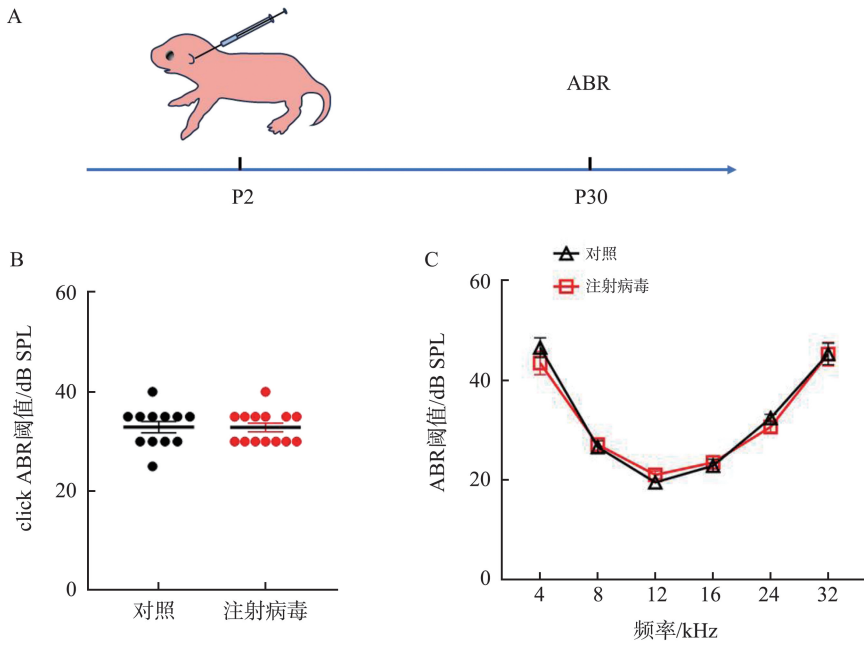


图 2 注射病毒对小鼠 ABR 阈值的影响

A: 病毒注射实验设计示意图(2 d 小鼠注射病毒,30 d 时检测 ABR 反应); B: 短声 ABR 反应的阈值比较; C: 短纯音 ABR 反应的阈值比较

Figure 2 Effect of viral injection on ABR thresholds in mice

A: Schematic of viral injection experimental design (injection at 2 days old, ABR testing at 30 days); B: Comparison of click ABR thresholds; C: Comparison of tone burst ABR thresholds

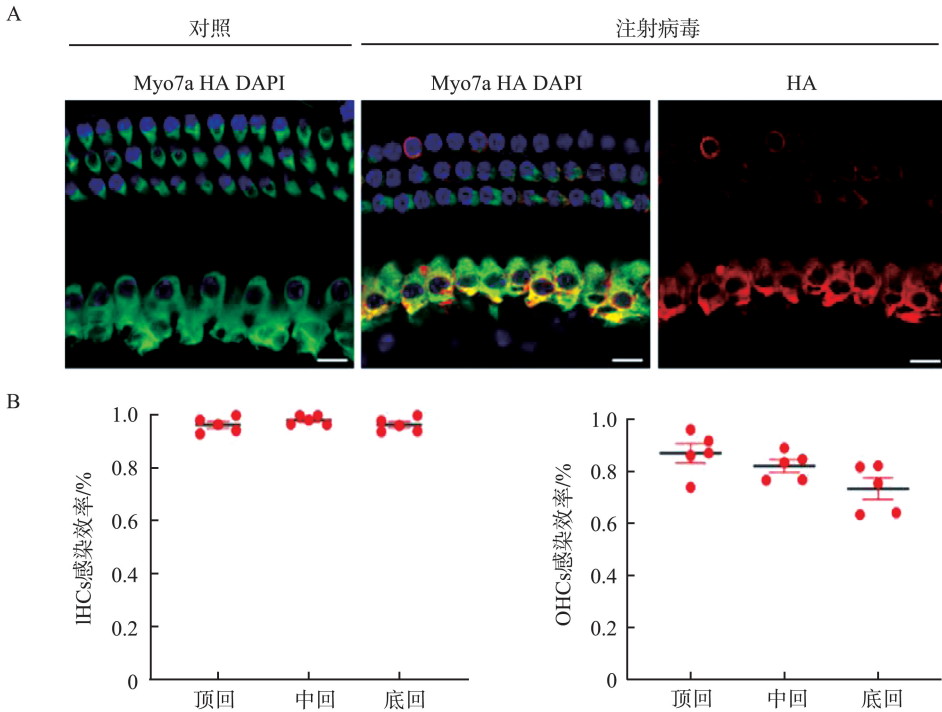


图 3 HRP-TM 在耳蜗毛细胞中的表达情况

A: 小鼠耳蜗基底膜免疫荧光染色(中回); B: rAAV-HRP-TM 病毒的感染效率统计图

Figure 3 Expression of HRP-TM in cochlear hair cells

A: Immunofluorescence staining of the middle turn of the mouse cochlear basilar membrane; B: Statistical analysis of rAAV-HRP-TM viral transduction efficiency

2.4 HRP-TM 能够特异性的标记耳蜗毛细胞膜表面蛋白

在合适的条件下,HRP 可以利用底物将自身附近有限距离内的蛋白标记上生物素^[10,17]。为了验证 HRP-TM 是否能标记毛细胞细胞膜外的蛋白,用 HRP 的底物 BxxP 和 H₂O₂ 与耳蜗一起孵育,反应 5 min,立刻用终止反应液洗 5 次,然后再用 4% PFA

固定,通过基底膜铺片免疫荧光染色,用 AF488 荧光偶联的链霉亲和素检测生物素。结果显示,荧光信号只出现在表达 HRP-TM 的耳蜗毛细胞的表面(图 4)。这表明毛细胞中表达的 HRP-TM 具有催化活性,可以特异性的标记耳蜗毛细胞的细胞表面蛋白。

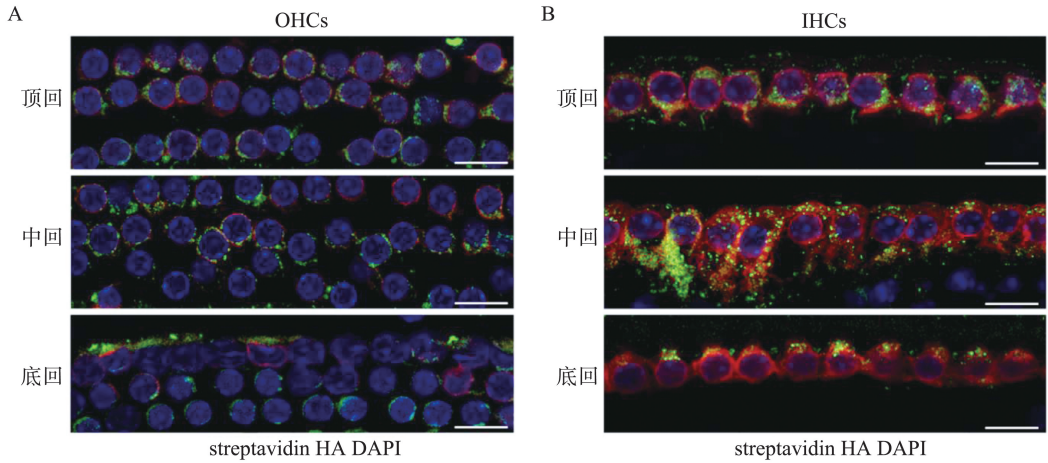


图 4 注射病毒小鼠耳蜗毛细胞表面蛋白标记情况

A: 外毛细胞免疫荧光染色; B: 内毛细胞免疫荧光染色

Figure 4 Cell-surface protein labeling in cochlear hair cells of virus-injected mice

A: Immunofluorescence staining of outer hair cells; B: Immunofluorescence staining of inner hair cells

3 讨论

细胞表面蛋白包括分泌到细胞外的蛋白和跨膜蛋白,在介导细胞生理功能和细胞间通讯过程中发挥重要作用^[18-19],但是,已报道的耳蜗毛细胞蛋白质组学研究多聚焦在毛细胞整体或囊泡等便于分离的细胞器^[20-21],缺乏毛细胞表面蛋白质组学的研究。表面蛋白质组学是利用质谱技术对细胞表面蛋白进行系统测定的学科,首先需要对细胞表面蛋白进行标记和分离。本研究探讨一种利用邻近标记技术特异性标记耳蜗毛细胞的细胞表面蛋白的方法。标记酶的选择是需要考虑的首要因素之一。HRP 只在蛋白质分泌途径和细胞表面有活性,而且它的催化活性比 APEX 等过氧化物酶更高,在细胞外的标记半径为 200~300 nm^[22],非常适合细胞表面蛋白质组学的研究。同时,它的底物生物素苯酚可以改造成不能渗透过细胞膜的形式 BxxP,避免 HRP 对分泌途径中蛋白的标记,进一步提高特异性^[10]。因此,本研究选用 C 端融合有跨膜结构域的 HRP-TM 作为标记酶,使 HRP 催化结构域可以定位在细胞膜外。另外一个需要考虑的因素是如何在耳蜗毛细胞中特异性的表达 HRP。常用的方法有两种:①将 HRP 表达盒插入到小鼠基因组中,构建转基因

小鼠;②病毒载体递送。转基因小鼠能够稳定的表达目的基因,但是构建过程费时费力。病毒载体递送更加快速简便。rAAV 是最常用的病毒之一,它具有良好的安全性与生物相容性,且感染效率高^[23]。更重要的是,已有文献报道了一种对耳蜗毛细胞具有很高感染效率的血清型 AAV-ie-K558R^[15]。因此,本研究选用该血清型构建了 rAAV-HRP-TM 病毒,介导 HRP 在耳蜗毛细胞中的表达。

病毒注射感染耳蜗毛细胞有两种途径:①经圆窗直接注射进耳蜗^[13];②注射到后半规管中,病毒经内淋巴液流入耳蜗内^[13]。在新生小鼠中,耳后切口后,后半规管更容易辨认,注射更方便,且能有效感染耳蜗^[13]。因此,本研究将病毒注射到新生小鼠的后半规管中,30 d 时检测 ABR 反应,结果显示听力阈值和野生型小鼠相当。免疫荧光染色结果也显示毛细胞的形态正常、排列规则。这表明 rAAV-HRP-TM 病毒没有明显的耳毒性,不影响毛细胞的正常生理功能。同时,免疫荧光染色结果证明 HRP 在毛细胞中特异性表达,可以定位到毛细胞的细胞膜上,而且加入底物后,成功地标记细胞的膜蛋白。这表明 HRP 在耳蜗毛细胞的细胞膜表面具有催化活性。另外,统计病毒的感染效率发现,表达 HRP 的内毛细胞的比例超过 95%,外毛细胞也达到 80%

左右,和文献报道的一致^[15]。可能因为该病毒对内外毛细胞表面受体的不同识别和结合能力,导致该病毒对内外毛细胞的感染效率不同^[24-25]。另外,尽管结果显示病毒感染后内毛细胞中 HRP-TM 的表达量比外毛细胞高,但是链霉亲和素免疫荧光染色实验显示外毛细胞的表面蛋白同样可以被标记上,这也和文献的报道一致,HRP-TM 少量的表达就可以完成细胞表面蛋白的标记^[10]。rAAV-HRP-TM 病毒感染的高效性将更有利于后续利用亲和层析对毛细胞表面蛋白进行富集。本研究采用的是含有 AAV2 反向末端重复序列的通用载体,只将启动子更换为毛细胞特异性启动子,调控 HRP 只在毛细胞中表达。如果更换其他细胞特异性启动子,将可以使 HRP 在其他细胞中特异性表达,或许可以用来标记其他细胞的表面蛋白。综上,本研究提供一种高效特异性标记耳蜗毛细胞表面蛋白的方法,为毛细胞表面蛋白质组学研究奠定基础,也为其他细胞表面蛋白的体内标记提供参考。

参考文献:

- [1] Liberman MC, Gao JG, He DZZ, et al. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier [J]. *Nature*, 2002, 419(6904): 300-304. doi: 10.1038/nature01059
- [2] Salvi R, Sun W, Ding DL, et al. Inner hair cell loss disrupts hearing and cochlear function leading to sensory deprivation and enhanced central auditory gain [J]. *Front Neurosci*, 2017, 10: 621. doi: 10.3389/fnins.2016.00621
- [3] George SS, Ricci AJ. Lipid bilayer regulation of cochlear hair cells involves transmembrane channel-like proteins [J]. *Biophys J*, 2024, 123(3): 506a. doi: 10.1016/j.bpj.2023.11.3060
- [4] Ballesteros A, Swartz KJ. Regulation of membrane homeostasis by TMC1 mechanoelectrical transduction channels is essential for hearing [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(31): eabm5550. doi: 10.1126/sciadv.abm5550
- [5] Masuda T, Ito S, Ohtsuki S. Advances in sample preparation for membrane proteome quantification [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2021, 39: 23-29. doi: 10.1016/j.DDTec.2021.06.005
- [6] Helbig AO, Heck AJR, Slijper M. Exploring the membrane proteome: challenges and analytical strategies [J]. *J Proteom*, 2010, 73(5): 868-878. doi: 10.1016/j.jprot.2010.01.005
- [7] Guo JY, Guo S, Lu SA, et al. The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 269. doi: 10.1186/s12964-023-01310-1
- [8] Gentzel M, Pardo M, Subramaniam S, et al. Proteomic navigation using proximity-labeling [J]. *Methods*, 2019, 164/165: 67-72. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.03.028
- [9] Cho KF, Branon TC, Udeshi ND, et al. Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(12): 3971-3999. doi: 10.1038/s41596-020-0399-0
- [10] Loh KH, Stawski PS, Draycott AS, et al. Proteomic analysis of unbounded cellular compartments: synaptic clefts [J]. *Cell*, 2016, 166(5): 1295-1307. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.041
- [11] Li JF, Han S, Li HJ, et al. Cell-surface proteomic profiling in the fly brain uncovers wiring regulators [J]. *Cell*, 2020, 180(2): 373-386. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.029
- [12] Shuster SA, Li JF, Chon U, et al. In situ cell-type-specific cell-surface proteomic profiling in mice [J]. *Neuron*, 2022, 110(23): 3882-3896. doi: 10.1016/j.neuron.2022.09.025
- [13] Isgrig K, McDougald DS, Zhu JL, et al. AAV2.7m8 is a powerful viral vector for inner ear gene therapy [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 427. doi: 10.1038/s41467-018-08243-1
- [14] Luo ZN, Du Y, Li ST, et al. Three distinct Atoh1 enhancers cooperate for sound receptor hair cell development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(32): e2119850119. doi: 10.1073/pnas.2119850119
- [15] Tao Y, Liu XY, Yang L, et al. AAV-ie-K558R mediated cochlear gene therapy and hair cell regeneration [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 109. doi: 10.1038/s41392-022-00938-8
- [16] Underhill A, Webb S, Grandi FC, et al. MYO7A is required for the functional integrity of the mechanoelectrical transduction complex in hair cells of the adult cochlea [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122(1): e2414707122. doi: 10.1073/pnas.2414707122
- [17] Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging [J]. *Science*, 2013, 339(6125): 1328-1331. doi: 10.1126/science.1230593
- [18] Sun QH, Zhang LY, Chen T, et al. AAV-mediated Gpm6b expression supports hair cell reprogramming [J]. *Cell Prolif*, 2024, 57(7): e13620. doi: 10.1111/cpr.13620
- [19] Sun YW, Liu ZY. Recent advances in molecular studies on cochlear development and regeneration [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2023, 81: 102745. doi: 10.1016/j.conb.2023.102745
- [20] Hickox AE, Wong AC, Pak K, et al. Global analysis of protein expression of inner ear hair cells [J]. *J Neurosci*.

- 2017, 37(5): 1320-1339.
- [21] Cepeda AP, Ninov M, Neef J, et al. Proteomic analysis reveals the composition of glutamatergic organelles of auditory inner hair cells [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2024, 23(2): 100704. doi: 10.1016/j.mcpro.2023.100704
- [22] Oakley JV, Buksh BF, Fernández DF, et al. Radius measurement via super-resolution microscopy enables the development of a variable radii proximity labeling platform[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(32): e2203027119. doi: 10.1073/pnas.2203027119
- [23] György B, Sage C, Indzhukulian AA, et al. Rescue of hearing by gene delivery to inner-ear hair cells using exosome-associated AAV[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(2): 379-391. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.010
- [24] Lopez-Gordo E, Chamberlain K, Riyad JM, et al, et al. Natural adeno-associated virus serotypes and engineered adeno-associated virus capsid variants: tropism differences and mechanistic insights [J]. *Viruses*, 2024, 16(3): 442. doi: 10.3390/v16030442
- [25] Bedbrook CN, Deverman BE, Gradinaru V. Viral strategies for targeting the central and peripheral nervous systems[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2018, 41: 323-348. doi: 10.1146/annurev-neuro-080317-062048
- (编辑:王磊)
-
- (上接第 5 页)
- [15] Green BN, Brownske LKM, Rosenthal CMD. Elongated styloid processes and calcified stylohyoid ligaments in a patient with neck pain: implications for manual therapy practice[J]. *J Chiropr Med*, 2014, 13(2): 128-133
- [16] Wang J, Liu Y, Wang ZB, et al. Intraoral and extraoral approach for surgical treatment of Eagle's syndrome: a retrospective study [J]. *Eur Arch Oto Rhino Laryngol*, 2022, 279(3): 1481-1487
- [17] Hardin FM, Xiao R, Burkey BB. Surgical management of patients with eagle syndrome [J]. *Am J Otolaryngol*, 2018, 39(5): 481-484
- [18] Mohanty S, Thirumaran NS, Gopinath M, et al. Significance of styloidectomy in Eagle's syndrome: an analysis [J]. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009, 61(4): 262-265
- [19] 徐丽娜, 张庆翔, 于振坤, 等. 茎突截短术治疗茎突综合征的临床分析 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 33(7): 670-672
- XU Lina, ZHANG Qingxiang, YU Zhenkun, et al. Clinical analysis of styloid process shortened surgical in the treatment of styloid process syndrome [J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2019, 33(7): 670-672
- [20] Bargiel J, Gontarz M, Marecik T, et al. Minimally invasive cervical styloidectomy in stylohyoid syndrome (eagle syndrome) [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(21): 6763. doi: 10.3390/jcm12216763
- [21] 郑鹏凌, 耿少筠, 卢俊, 等. 经颈外内镜辅助下茎突截短术 48 例的临床分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2020, 26(5): 581-583
- ZHENG Pengling, GENG Shaojun, LU Jun, et al. Treatment of styloid process truncation assisted by endoscope through the marginal mandibular branches in 48 patients [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 2020, 26(5): 581-583
- [22] 朱宇宏, 赵利敏. 茎突截短术的并发症 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2006, 20(2): 165-166
- ZHU Yuhong, ZHAO Limin. Complications after styloid process surgery [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2006, 20(2): 165-166
- [23] Ferreira MS, Miranda G, Almeida FT, et al. Complications in intraoral versus external approach for surgical treatment of Eagle syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cranio*, 2024, 42(5): 570-582
- [24] Albayat A, Al Habeeb A, Jawad M. Dysphagia due to an extremely long styloid process: a case report of eagle syndrome [J]. *Cureus*, 2023, 15(1): e34250. doi: 10.7759/cureus.34250
- (编辑:郑潇)