

# 盐酸氯米帕明保护听觉毛细胞免受新霉素诱导的损伤

周静<sup>1</sup>, 毕秀丽<sup>2</sup>, 肖雨<sup>3</sup>, 胡俊<sup>4</sup>, 付小龙<sup>2</sup>, 于亚峰<sup>1</sup>

1. 苏州大学附属第一医院 耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 苏州 215006

2. 山东第一医科大学 科技创新中心, 山东 济南 250117

3. 山东大学 生命科学学院, 山东 济南 250100

4. 温州医科大学附属第一医院 耳鼻咽喉头颈外科, 浙江 温州 325035

**摘要:**目的 筛选出能有效抑制新霉素导致的毛细胞系(HEI-OC1)细胞死亡的小分子药物,并在小鼠耳蜗外植体和斑马鱼侧线毛细胞中进行验证。方法 通过 Cell Counting Kit-8(CCK8)计算细胞存活率来筛选出对新霉素导致的 HEI-OC1 细胞系死亡有保护作用的小分子药物;通过免疫荧光染色的方法在小鼠耳蜗外植体和斑马鱼侧线毛细胞中进行验证。结果 在筛选的 350 种小分子药物发现能显著提高新霉素处理的 HEI-OC1 的细胞中存活率的药物—盐酸氯米帕明;在耳蜗外植体及斑马鱼侧线毛细胞中发现盐酸氯米帕明对新霉素导致的毛细胞死亡有保护作用。结论 盐酸氯米帕明作为 FDA 批准的临床用药一定程度缓解了新霉素导致的毛细胞死亡,说明其对新霉素导致的毛细胞死亡有一定的保护作用。

**关键词:**新霉素;氨基糖苷类;毛细胞;盐酸氯米帕明;耳聋

中图分类号:R764.43

文献标志码:A

文章编号:1673-3770(2024)04-0022-06

**引用格式:**周静,毕秀丽,肖雨,等. 盐酸氯米帕明保护听觉毛细胞免受新霉素诱导的损伤[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2024,38(4):22-27. ZHOU Jing, BI Xiuli, XIAO Yu, et al. Clomipramine hydrochloride protects auditory hair cells from neomycin-induced damage[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(4):22-27.

## Clomipramine hydrochloride protects auditory hair cells from neomycin-induced damage

ZHOU Jing<sup>1</sup>, BI Xiuli<sup>2</sup>, XIAO Yu<sup>3</sup>, HU Jun<sup>4</sup>, FU Xiaolong<sup>2</sup>, YU Yafeng<sup>1</sup>

1. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China

2. Science and Technology Innovation Center, Shandong First Medical University, Jinan 250117, Shandong, China

3. College of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, Shandong, China

4. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

**Abstract: Objective** The aim of this study was to identify small-molecule drugs that inhibit neomycin-induced hair-cell-like cell (HEI-OC1) death, and to verify their effects on hair cells in cochlear explants and the lateral line of zebrafish. **Methods** Small-molecule drugs that increased the viability of HEI-OC1 cells were identified using Cell Counting Kit-8. The protective effect of the identified small-molecule drugs was verified in hair cells of cochlear explants and zebrafish by Immunofluorescence staining. **Results** Of the 350 small-molecule drugs screened, clomipramine hydrochloride was found to significantly improve the survival rate of neomycin-treated HEI-OC1 cells. In addition, clomipramine hydrochloride was found to have a protective effect on hair cells of neomycin-treated mouse cochlear explants and the lateral line of zebrafish. **Conclusion** Clomipramine hydrochloride, which as an FDA-approved clinical drug, has a protective effect against neomycin-induced hair cell damage.

**Key words:** Neomycin; Aminoglycosides; Hair cells; Clomipramine hydrochloride; Deafness

听力损失可由噪音、衰老、耳毒性药物制剂、遗传疾病等引起<sup>[1]</sup>。新霉素(neomycin, Neo)是临床中常用的一种氨基糖苷类抗生素,但这类抗生素的应用往往带有严重的耳毒性不良反应。到目前为止,临床上对氨基糖苷类抗生素的耳毒性仍然缺乏

有效的治疗药物,更多的措施是尽量降低其耳毒性风险的发生。因此很多实验研究以探索小分子药物干预新霉素耳毒性从而达到保护听觉毛细胞为目标。盐酸氯米帕明(clomipramine HCl, Clo),又名盐酸安拿芬尼,分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>·HCl,研究表

明抑郁症的发病机制与  $\text{Ca}^{2+}$  和一些炎症因子有关, 盐酸氯米帕明可通过抑制 5-羟色胺转运蛋白、去甲肾上腺素转运体和多巴胺转运蛋白, 阻断中枢神经系统中去甲肾上腺素和 5-羟色胺的再摄取<sup>[2]</sup>, 发挥抗抑郁作用, 作为 FDA 批准的药物已广泛应用于临床。目前关于盐酸氯米帕明的研究报道主要集中在抑郁症的治疗上, 对毛细胞的影响尚未见报道。在本研究中, 我们通过小分子药物筛选, 发现盐酸氯米帕明在一定程度上能提高新霉素损伤的 HEI-OC1 细胞存活率。在此基础上我们在体外构建了耳蜗外植体和斑马鱼侧线毛细胞的新霉素损伤模型, 以期验证盐酸氯米帕明的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

HEI-OC1 细胞系是一种广泛使用的听觉毛细胞系<sup>[5-9]</sup>。健康成年 C57BL/6 小鼠。斑马鱼 (*Danio rerio*) 系 Tg (*brn3c*; GFP)。高糖 DMEM 购自上海源培生物科技股份有限公司; 5% 胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、Phosphate Buffered Saline (PBS) 购自美国 BIOEXPLORER 公司; 生理盐水购自青州尧王制药有限公司; CCK8 购自美国 GLP BIO 公司; 盐酸氯米帕明购自美国 MCE 公司; 新霉素购自德国 Sigma 公司; 4% 多聚甲醛; 抗 Myosin 7a 抗体购自英国 Proteus 公司; 山羊血清、荧光二抗购自美国 Abbkine 公司; 封片剂 (含 DAPI) 购自英国 Abcam 公司、Cell-Tak 购自美国 Corning 公司。

96 孔板购自无锡耐思生命科技有限公司; 共聚焦小皿、显微镜载玻片购自北京兰杰科技有限公司; 金属浴购自杭州奥盛仪器有限公司; 多功能酶标仪购自美国 MOLECULAR DEVICES 公司; 荧光倒置显微镜购自宁波永新光学股份有限公司; 体视显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; 共聚焦显微镜 (Zeiss 900, 德国) 由山东第一医科大学科技创新中心提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 优化新霉素损伤模型

高糖 DMEM 中添加 5% 胎牛血清、双抗, 在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培育。在初始孵育 24 h 后, 用磷酸盐缓冲液, 2 mM、4 mM、6 mM、8 mM、10 mM、12 mM 新霉素分别处理 12 h、24 h、48 h 后去除新霉素加入 PBS, 再添加 CCK8 在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下处理 1 h 后, 使用酶标仪测细胞的存活率。

#### 1.2.2 小分子药物筛选

高糖 DMEM 中添加 5% 胎牛血清、双抗, 细胞在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培育。在初始孵育 24 h 后, 在 96 孔板中加入小分子药预处理 24 h 后去除小分子药, 加入 10 mM 新霉素处理 24 h 后去除新霉素加入 PBS, 再添加 CCK8 在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下处理 1 h, 使用酶标仪测细胞的存活率。

#### 1.2.3 优化盐酸氯米帕明的浓度

高糖 DMEM 中添加 5% 胎牛血清、双抗, 细胞在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培育。在初始孵育 24 h 后, 将细胞分为 8 个组, 分别为对照组 (只有细胞)、实验组 (0  $\mu\text{M}$  Clo+10 mM Neo、10  $\mu\text{M}$  Clo+10 mM Neo、15  $\mu\text{M}$  Clo+10 mM Neo、20  $\mu\text{M}$  Clo+10 mM Neo、25  $\mu\text{M}$  Clo+10 mM Neo、30  $\mu\text{M}$  Clo+10 mM Neo、35  $\mu\text{M}$  Clo+10 mM Neo), 用倒置显微镜对细胞进行成像, 加入 CCK8 用酶标仪测定细胞的存活率。

#### 1.2.4 耳蜗外植体培养

从出生后 1~2 d 小鼠中解剖耳蜗, 培养方法: C57BL/6 小鼠出生后 (P) 2 在 PBS 中解剖。耳蜗外植体被粘在一个涂有 Cell-Tak 的共聚焦小皿上。耳蜗外植体在添加 N2/B27 (Invitrogen) 和氨基苄西林的 DMEM/F12 培养基中培养, 放 37 °C、5% 的  $\text{CO}_2$  培养箱中过夜。外植体培养组织将细胞分为 6 个组, 分别为对照组、只加盐酸氯米帕明 (Clo) 组、只加 15 mM 新霉素 (Neo) 损伤组、55  $\mu\text{M}$  Clo+15 mM Neo、60  $\mu\text{M}$  Clo+15 mM Neo、65  $\mu\text{M}$  Clo+15 mM Neo。除了只加新霉素的损伤组外, 其他处理组加对应浓度的盐酸氯米帕明预处理 24 h, 再加入 15 mM 新霉素处理 24 h, 然后进行免疫荧光染色观察毛细胞存活情况。

#### 1.2.5 斑马鱼

从 A、B 系获得的野生 AB 系斑马鱼 (*Danio rerio*) 和转基因 TG (*Bm3c*; *gfp*) 在全自动斑马鱼饲养系统中饲养和维持。斑马鱼胚胎是通过成年斑马鱼自然产卵获得的, 在受精后 5 d, 从孵化的斑马鱼胚胎中获得幼鱼。在 24 孔板中用药物处理 5 dpf 的斑马鱼幼体, 分为 6 个组, 分别为对照组、只加盐酸氯米帕明 (Clo) 组、只加 20 mM 新霉素 (Neo) 损伤组、100  $\mu\text{M}$  Clo+20 mM Neo、125  $\mu\text{M}$  Clo+20 mM Neo、150  $\mu\text{M}$  Clo+20 mM Neo。除了只加新霉素的损伤组外, 其他组加对应浓度的盐酸氯米帕明预处理 1 h 后加入 20 mM 新霉素 6 h 损伤毛细胞, 换生长盐水恢复 1 h。在 4% 多聚甲醛中固定过夜后通过共聚焦显微镜进行成像。

### 1.2.6 免疫荧光

耳蜗外植体在 4% 多聚甲醛中室温固定 30 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 2.5% TritonX-100 在 37 °C 通透 15 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 10% 山羊血清在 37 °C 封闭 30 min; 样品用 PBS 稀释的肌球蛋白 7a 抗体 (Myosin7a) 1:400 在 4 °C 下过夜。第 2 天用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用 PBS 稀释的荧光二抗 1:400 在 37 °C 孵育 1 h; 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴上封片剂 (含 DAPI), 通过共聚焦显微镜进行成像。

### 1.3 统计学处理

所有实验至少重复 3 次。所有的统计分析均使

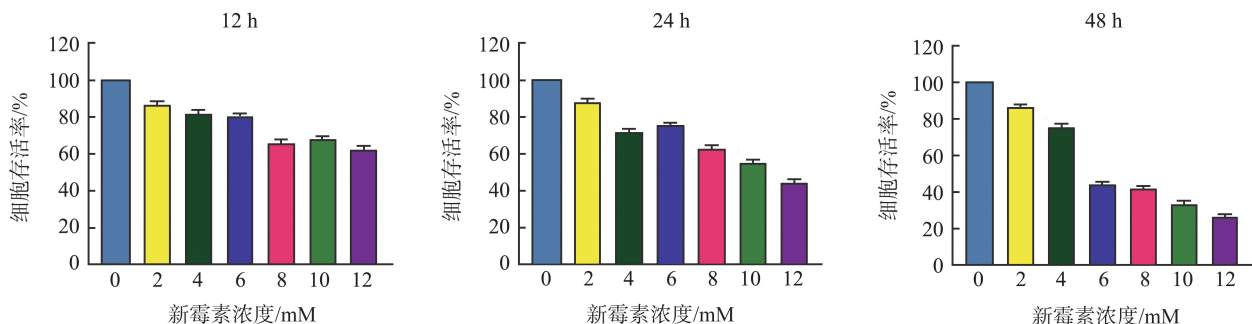


图 1 HEI-OC1 细胞的新霉素细胞毒性模型的优化  
Figure 1 Optimization of the neomycin-induced cell cytotoxicity model using HEI-OC1 cells

如图 1 所示, 新霉素以时间和剂量依赖性的方式显著降低了细胞活力。新霉素处理 HEI-OC1 细胞 12 h 或 48 h 后, 随着新霉素浓度的增加 (0、2、4、6、8、10、12 mM), CCK-8 实验检测 HEI-OC1 细胞活力未能达到 50%。细胞活力结果显示, 10 mM 新霉素处理 HEI-OC1 细胞 24 h 时, HEI-OC1 活力与对照相比降低到约 50%。因此, 在后续的检测

用 WPS 的 Excel、GraphPad Prism 9、Image J 进行。当比较两组时, 使用非配对 *t* 检验来确定统计学意义, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 盐酸氯米帕明可以保护 HEI-OC1 细胞免受新霉素导致的损伤

HEI-OC1 细胞系用不同浓度梯度的新霉素 (0、2、4、6、8、10、12 mM) [3-4] 分别处理 12 h、24 h 或 48 h 后, 使用 CCK8 检测处理后细胞的存活率, 以建立最优的新霉素 HEI-OC1 细胞毒性模型 (图 1)。

中选择 10 mM 新霉素处理 HEI-OC1 细胞 24 h 作为细胞毒性的造模条件。我们共筛选了 350 种小分子药物, 发现了其中的 3 种药物能显著提高 HEI-OC1 细胞毒性模型下的细胞存活率, 其中盐酸氯米帕明提高 HEI-OC1 细胞存活率的效果最好 (图 2)。因此, 我们选择了盐酸氯米帕明作为后续检测的目标药物。

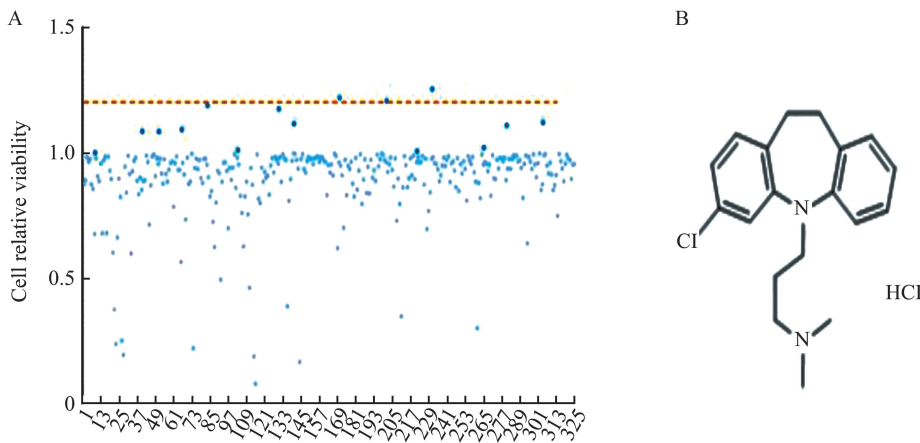


图 2 小分子药物筛选  
A: 共筛选了 350 种小分子药, 细胞存活率 1.2 以上的小分子药有 3 种; B: 盐酸氯米帕明分子式

Figure 2 The screening of small molecule drugs  
A: A total of 350 small-molecule drugs were screened, and three were found to induce a cell survival rate of more than 1.2; B: The molecular formula of clomipramine hydrochloride

为了检测盐酸氯米帕明是否能够有效保护 HEI-OC1 细胞免受新霉素导致的细胞毒性的损伤,我们用不同浓度的盐酸氯米帕明和 10 mM 新霉素共同处理 HEI-OC1 细胞,然后通过 CCK8 实验测定处理过的 HEI-OC1 细胞的存活率。结果发现在 10 mM 新霉素损伤条件下,给予不同浓度的盐酸氯米帕明预处理可提高 HEI-OC1 细胞的存活率,最佳效果的浓度为 25  $\mu\text{M}$ ,而当盐酸氯米帕明浓度增加到 30  $\mu\text{M}$ 、35  $\mu\text{M}$  时细胞的存活率下降(图 3)。

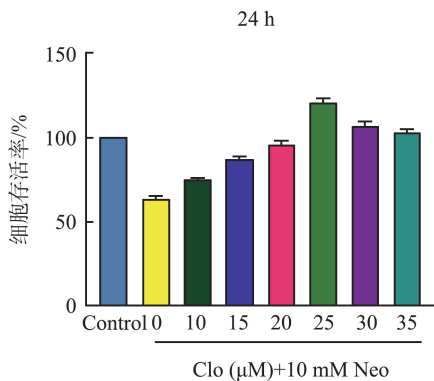


图 3 不同浓度盐酸氯米帕明和新霉素处理条件下的 HEI-OC1 细胞的存活情况

Figure 3 The viability of HEI-OC1 cells treated with different concentrations of clomipramine hydrochloride and neomycin

因此,本部分实验结果说明在一定浓度范围内盐酸氯米帕明可显著抑制新霉素对 HEI-OC1 细胞的毒性损伤,保护 HEI-OC1 细胞,且 25  $\mu\text{M}$  盐酸氯米帕明的保护效果最好,但过高浓度的盐酸氯米帕明具有潜在的细胞毒性作用。

## 2.2 盐酸氯米帕明可以预防新霉素导致的耳蜗外植体毛细胞的丢失

小鼠耳蜗外植体被认为是体内耳蜗模型的替代品,可用于药物筛选<sup>[10]</sup>。为了检测盐酸氯米帕明是否能够保护耳蜗外植体毛细胞免受新霉素诱导的耳毒性的影响,本研究设计实验:用不同浓度的盐酸氯米帕明预处理 P3- P4, C57BL/6 小鼠耳蜗外植体,再用新霉素处理 24 h,最后通过免疫荧光染色检测经过药物处理的耳蜗外植体中的毛细胞数量与状态。

Myosin7a 阳性(绿色荧光)、有毛细胞形态的将被记入统计。免疫荧光染色结果显示,与仅用新霉素处理的耳蜗外植体相比,盐酸氯米帕明预处理可以降低耳蜗外植体毛细胞的损失数量,盐酸氯米帕明浓度 60  $\mu\text{M}$  预处理时提高毛细胞数量的效果最显著(图 4)。以上结果说明,一定浓度范围的盐酸氯米帕明预处理可有效缓解新霉素对耳蜗外植体毛细胞的细胞毒性。

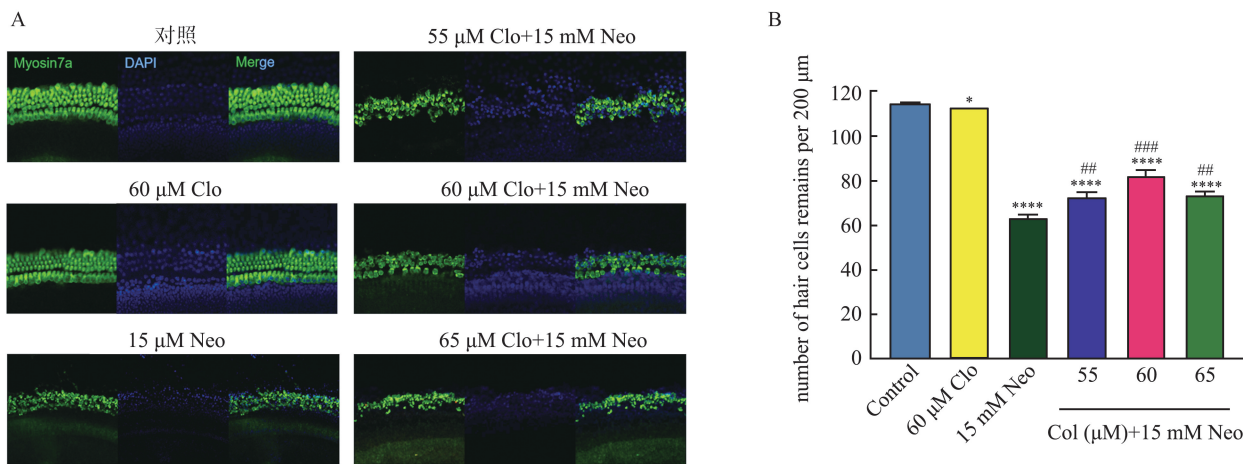


图 4 盐酸氯米帕明显著缓解新霉素对耳蜗外植体毛细胞的影响

A:不同药物处理后基底膜毛细胞免疫荧光染色情况;B:耳蜗外植体中回 Myosin7a 阳性细胞数量的统计分析

Figure 4 Clomipramine hydrochloride significantly attenuated the neomycin-induced cytotoxicity in hair cells of cochlear explants A:Immunofluorescence staining of hair cells of the basilar membrane under different treatments; B: Statistical analysis of the number of myosin-7a-positive cells in the medial region of the basilar membrane

## 2.3 盐酸氯米帕明对新霉素导致的斑马鱼侧线毛细胞的丢失有保护作用

斑马鱼在听觉相关研究领域也有广泛的应用,主要是因为斑马鱼具有与哺乳动物类似的内耳结构,即耳囊(otic vesicle)。斑马鱼的内耳中,负责听觉和平衡觉的主要细胞类型即为毛细胞,其结构和

功能与哺乳动物的内耳毛细胞类似,而斑马鱼除了具有内耳毛细胞外,还具有侧线神经丘毛细胞<sup>[17-21]</sup>。为了验证盐酸氯米帕明在斑马鱼毛细胞丢失中的作用,先用不同浓度的盐酸氯米帕明处理斑马鱼 1 h,再用 20 mM 新霉素处理 6 h,换生长盐水恢复 1 h,在 4%多聚甲醛中固定过夜后通过共聚

焦显微镜进行成像(图 5)。

如图 5 所示,与只有新霉素处理相比,盐酸氯米帕明处理可以显著提高新霉素处理的斑马鱼侧线毛细胞的数量,且盐酸氯米帕明浓度为 125  $\mu\text{M}$  时的

效果最好,过低(100  $\mu\text{M}$ )或过高(150  $\mu\text{M}$ )时的效果都有所下降。该实验结果说明,盐酸氯米帕明能有效缓解新霉素导致的斑马鱼侧线毛细胞的细胞毒性。

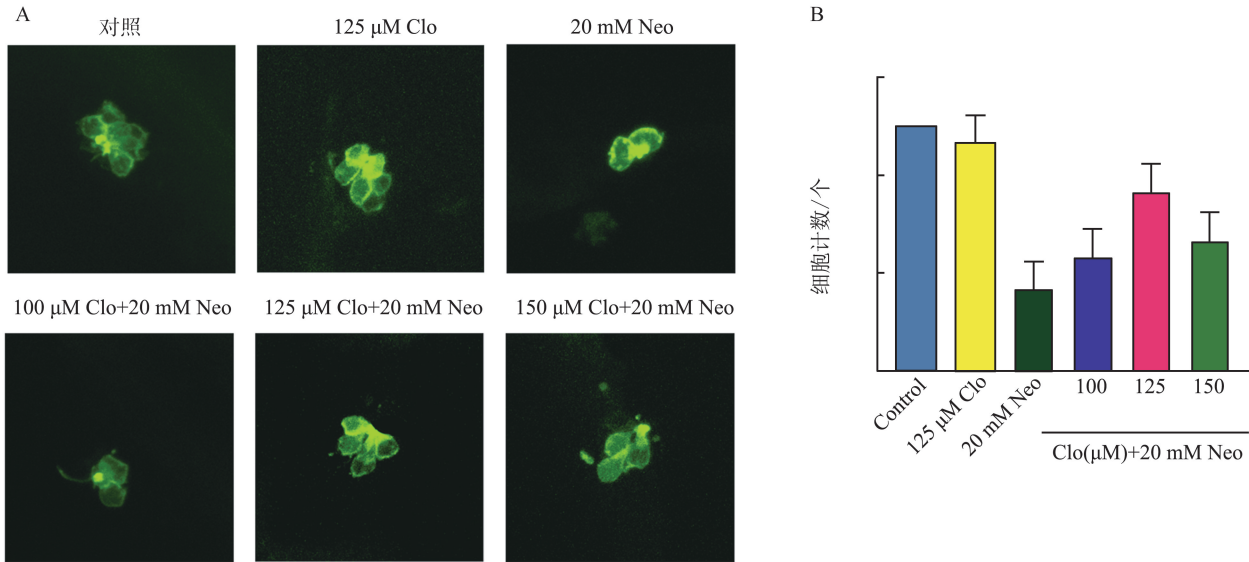


图 5 盐酸氯米帕明有效缓解新霉素处理对斑马鱼侧线毛细胞细胞毒性的影响

A: 不同处理后斑马鱼侧线毛细胞情况; B: 斑马鱼侧线神经丘毛细胞数量的统计学分析

Figure 5 Clomipramine hydrochloride significantly attenuated neomycin-induced cytotoxicity in hair cells of the lateral line of zebrafish

A: Hair cells of the lateral line of zebrafish under different treatments; B: Statistical analysis of the number of the hair cells of lateral line of zebrafish

### 3 讨论

耳毒性药物是引起感音神经性听力损失的常见原因,而氨基糖苷类药物是最常见的耳毒性药物<sup>[11]</sup>。耳蜗 HCs 易受氨基糖苷介导的细胞毒性影响,耳蜗毛细胞一旦受损就不能再生,因此氨基糖苷类药物导致的耳毒性通常与永久性感音神经性耳聋有关<sup>[22]</sup>。新霉素作为氨基糖苷类药物中常用的一种,被广泛用于严重感染的治疗;然而,新霉素使用给患者带来的一个严重不良反应就是耳毒性<sup>[12,23]</sup>。因此,探讨耳毒性药物引起的听觉感觉细胞损伤机制,为预防和治疗这类疾病提供理论基础变得尤为迫切。

抗抑郁药是一组异质化合物,根据其主要作用机制可分为 4 种不同的类别:去甲肾上腺素再摄取抑制剂、选择性血清素再摄取抑制剂、血清素/去甲肾上腺素再摄取抑制剂和单胺氧化酶抑制剂<sup>[13]</sup>。在市场上推出的首批抗抑郁药中,三环类抗抑郁药主要为 SNRIs<sup>[14]</sup>。氯米帕明是一种三环类抗抑郁药,在抑郁期间,大脑神经细胞释放的去甲肾上腺素和血清素的数量会减少<sup>[16]</sup>。这些化学物质的释放会产生刺激情绪兴奋的效果。盐酸氯米帕明的药理

作用是阻止这些化学物质回到神经细胞<sup>[15]</sup>,它主要通过抑制 5-羟色胺转运蛋白、去甲肾上腺素转运体和多巴胺转运蛋白,阻断中枢神经系统中去甲肾上腺素和 5-羟色胺的再摄取发挥抗抑郁作用。有报道称,氯丙咪嗪抑制了广泛表达的动力蛋白 2 和在肺中表达的动力蛋白 3 的 L- $\alpha$ -磷脂酰-L-丝氨酸刺激的 GTPase 活性<sup>[24]</sup>。但是盐酸氯米帕明在抑制耳毒性方面尚未有报道。

为了探寻抑制新霉素耳毒性的更多可能性药物,我们用 HEI-OC1 细胞在 350 种 FDA 批准用药的小分子药物中进行筛选,最终筛选出能有效抑制新霉素耳毒性的药物—盐酸氯米帕明。

为了探究盐酸氯米帕明对新霉素诱导的损伤的保护作用,我们在体外使用 HC 样 HEI-OC1 细胞、耳蜗器官外植体培养、斑马鱼培养。结果表明,3 种系统均显示盐酸氯米帕明显著抑制细胞凋亡,防止新霉素诱导的细胞死亡。耳蜗器官外植体培养显示,盐酸氯米帕明对新霉素诱导的耳蜗基底膜 HC 损失有保护作用。我们还发现,盐酸氯米帕明的保护作用是剂量依赖性的,60  $\mu\text{M}$  的盐酸氯米帕明的保护作用明显大于 55  $\mu\text{M}$  盐酸氯米帕明,但在 65  $\mu\text{M}$  时,保护作用开始下降,表明高浓度的盐酸氯

米帕明可能损害耳蜗基底膜 HC。药物剂量在未来的动物或人类实验中得到充分考虑是必要的。斑马鱼毛细胞培养显示盐酸氯米帕明对新霉素诱导的斑马鱼侧线毛细胞损失有保护作用。盐酸氯米帕明的保护作用是剂量依赖性的,125  $\mu\text{M}$  的盐酸氯米帕明的保护作用明显大于 100  $\mu\text{M}$  盐酸氯米帕明,但在 150  $\mu\text{M}$  时,保护作用开始下降,表明高浓度的盐酸氯米帕明可能损害斑马鱼侧线毛细胞。我们还发现在不同的系统中盐酸氯米帕明的最佳保护浓度是不同的。综上所述,我们的研究表明,盐酸氯米帕明能够有效缓解新霉素耳毒性导致的小鼠外植体和斑马鱼侧线毛细胞的死亡,为预防和治疗氨基糖苷类药物导致的耳毒性提供了新的可能性的策略。这些结果提示盐酸氯米帕明可能具有潜在的临床价值。但研究中我们也发现盐酸氯米帕明的保护效果有限,而且对于盐酸氯米帕明是通过什么途径抑制新霉素导致的毛细胞细胞毒性的机制尚不清楚,以待后续进一步研究。

### 参考文献:

[1] Prasad KN, Bondy SC. Increased oxidative stress, inflammation, and glutamate: potential preventive and therapeutic targets for hearing disorders [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 185: 111191. doi:10.1016/j.mad.2019.111191

[2] 丘春柳. 舍曲林对强迫症患者临床症状、执行功能和职业功能的远期效果 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2014, 23 (6): 507-510. doi: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2014.06.009

[3] He ZH, Sun S, Waqas M, et al. Reduced TRMU expression increases the sensitivity of hair-cell-like HEI-OC-1 cells to neomycin damage in vitro [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29621. doi:10.1038/srep29621

[4] Zhou MJ, Sun GY, Zhang LL, et al. STK33 alleviates gentamicin-induced ototoxicity in cochlear hair cells and House Ear Institute-Organ of Corti 1 cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (11): 5286-5299. doi: 10.1111/jcmm.13792

[5] Kalinec GM, Webster P, Lim DJ, et al. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening [J]. *Audiol Neurotol*, 2003, 8 (4): 177-189. doi: 10.1159/000071059

[6] He ZH, Sun S, Waqas M, et al. Reduced TRMU expression increases the sensitivity of hair-cell-like HEI-OC-1 cells to neomycin damage in vitro [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29621. doi:10.1038/srep29621

[7] Kalinec G, Thein P, Park C, et al. HEI-OC1 cells as a model for investigating drug cytotoxicity [J]. *Hear Res*, 2016, 335: 105-117. doi:10.1016/j.heares.2016.02.019

[8] Yang QQ, Zhou YW, Yin HY, et al. PINK1 protects against gentamicin-induced sensory hair cell damage: possible relation to induction of autophagy and inhibition of p53 signal pathway [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 403. doi: 10.3389/fnmol.2018.00403

[9] Zhou MJ, Sun GY, Zhang LL, et al. STK33 alleviates gentamicin-induced ototoxicity in cochlear hair cells and House Ear Institute-Organ of Corti 1 cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (11): 5286-5299. doi: 10.1111/jcmm.13792

[10] Ogier JM, Burt RA, Drury HR, et al. Organotypic culture of neonatal murine inner ear explants [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 170. doi:10.3389/fncel.2019.00170

[11] Nadol JB Jr. Hearing loss [J]. *N Engl J Med*, 1993, 329 (15): 1092-1102. doi:10.1056/nejm199310073291507

[12] Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics [J]. *Audiol Neurotol*, 2000, 5 (1): 3-22. doi:10.1159/000013861

[13] Yumi Sugimoto, et al. The tricyclic antidepressant Clomipramine increases plasma glucose levels of mice [J]. *Pharmacol Sci*, 2003, 93 (1): 74-79. doi: 10.1254/jphs.93.74

[14] Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7 (2): 137-151. doi:10.1038/nrn1846

[15] Mushtaq Ahmed. Comparative study of the inhibitory effect of antidepressants on cholinesterase activity in Bungarus sindanus (krait) venom, human serum and rat striatum [J]. *Enzyme Inhib Med Chem*, 2008, 23 (6): 912-7. doi: 10.1080/14756360701809977

[16] Cavaliere F, Fornarelli A, Bertan F, et al. The tricyclic antidepressant clomipramine inhibits neuronal autophagic flux [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 4881. doi: 10.1038/s41598-019-40887-x

[17] Yao Q, DeSmidt AA, Tekin M, et al. Hearing assessment in zebrafish during the first week postfertilization [J]. *Zebrafish*, 2016, 13 (2): 79-86. doi:10.1089/zeb.2

[18] Riley BB, Moorman SJ. Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish [J]. *J Neurobiol*, 2000, 43 (4): 329-337. doi: 10.1002/1097-4695 (20000615)43:4<329::aid-neu2>3.0.co;2-h

[19] Sun P, Zhang YL, Zhao F, et al. An assay for systematically quantifying the vestibulo-ocular reflex to assess vestibular function in zebrafish larvae [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 257. doi:10.3389/fncel.2018.00257

[20] Tanya T Whitfield, Bruce B Riley, et al. Development of the zebrafish inner ear [J]. *Dev Dyn*, 2002, 223 (4): 427-458. doi: 10.1002/dvdy.10073