

Wnt 信号通路在毛细胞分化和再生过程中的作用

范晴晴, 孟飞龙, 房冉, 李高鹏, 赵小立

浙江大学生命科学院遗传与再生生物学研究所, 浙江省细胞与基因工程重点研究实验室, 杭州 310058

摘要: Wnt 信号通路在生物发育和维持内环境稳态过程中起着重要作用。Wnt 配体通过与 Frizzled 受体结合参与体轴的形成、细胞分化和细胞命运决定等生命活动。在小鼠内耳发育过程中, Wnt 信号通路扮演了重要角色: 在内耳发育早期阶段, 参与听基板特化和听泡的形成; 在内耳发育后期阶段, 调控毛细胞分化及毛细胞纤毛束的定向。本文综述了 Wnt 信号通路在内耳毛细胞发育分化及再生过程中的研究进展, 以期为从事相关领域的科研人员提供参考。

关键词: Wnt 信号通路; 听基板; 听泡; 毛细胞再生

Functions of Wnt signaling pathway in hair cell differentiation and regeneration

Qingqing Fan, Feilong Meng, Ran Fang, Gaopeng Li, Xiaoli Zhao

Key Laboratory for Cell and Gene Engineering of Zhejiang Province, Institute of Genetics and Regenerative Biology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Wnt signaling pathway plays important roles in the development and homeostasis of multicellular organisms. Through their bindings with the Frizzled receptors, the Wnt ligands regulate a wide range of developmental processes, such as axis patterning, cell division, and cell fate specification. Wnt signaling plays vital roles in the development of inner ear of the mouse. In the early stages of inner ear development, Wnt signaling specifies the size of the placode and the formation of the otic vesicle. In later stages, Wnt signaling mediates hair cell specification and orients the stereociliary bundles in a uniform direction. In this review, we summarize the current knowledge on the roles of Wnt signaling in hair cell differentiation and regeneration, which may provide references and insights for investigators in the field.

Keywords: Wnt signaling pathway; otic placode; otic vesicle; hair cell regeneration

收稿日期: 2017-02-08; 修回日期: 2017-04-03

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)(编号: 2012CB967900)资助[Supported by the National Program on Key Basic Research Project (973 Program)(No.2012CB967900)]

作者简介: 范晴晴, 硕士研究生, 专业方向: 干细胞分化。E-mail: 21407051@zju.edu.cn

通讯作者: 赵小立, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 干细胞分化。E-mail: zhaoxiaoli@zju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-037

网络出版时间: 2017/9/19 17:02:47

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170919.1702.002.html>

Wnt 信号通路是一条进化上高度保守的信号转导通路,从低等生物至高等哺乳动物,其成员都具有高度同源性。*Wnt* 基因最早由 Logan 等^[1]研究小鼠(*Mus musculus*)乳腺癌病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)转录机制的过程中发现的,由于此基因激活依赖小鼠乳腺癌相关病毒基因的插入,因此被命名为 *Int1* 基因,后来发现该基因与果蝇无翅基因(*Wingless*)同源,于是将 *wingless* 和 *Int1* 合并,统一命名为 *Wnt*^[2]。目前,已经在哺乳动物中发现了至少 19 种 *Wnt* 家族成员,分别用 *Wnt1*、*Wnt2*、*Wnt3a* 等方法表示。根据 *Wnt* 配体在胚胎发育和在细胞信号传导过程中作用的不同,将 *Wnt* 配体分为两大类:第一类称为 *Wnt1* 型,包括 *Wnt1*、*Wnt2a*、*Wnt3a* 和 *Wnt8*,它们主要是通过调控“经典”信号通路(canonical pathway)激活细胞内信号,发挥相应的生理功能;第二类称为 *Wnt5a* 型,包括 *Wnt4*、*Wnt5a* 和 *Wnt11*,它们主要参与调控“非经典”信号通路(non-canonical pathway)^[3,4]。*Wnt* 基因属于原癌基因,翻译产物为 350~400 个氨基酸组成的分泌型糖蛋白,该糖蛋白含一段信号肽以及 23 或 24 个保守的半胱氨酸残基^[5]。*Wnt* 配体通过与细胞膜表面的跨膜受体卷曲蛋白(*Frizzled*, *Fzd*)结合以激活胞内信号,引起细胞核内特异性基因表达进而产生相应的生物学功能^[6]。

Wnt 信号通路可分为以下两类:经典 *Wnt*/ β -catenin 信号通路(canonical *Wnt* signaling pathway)和非经典 *Wnt* 信号通路(non-canonical *Wnt* signaling pathway);其中非经典 *Wnt* 信号通路主要包括:*Wnt*/平面细胞极性通路(*Wnt*/PCP 信号通路)和 *Wnt*/calcium 信号通路^[7]。现阶段经典的 *Wnt*/ β -catenin 信号通路研究的较为清楚,该通路通过调节细胞内 β -catenin 的活性而发挥生物学活性。在无 *Wnt* 配体存在时,细胞内糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase3 β , GSK3 β)、活化轴蛋白(*Axin*)和结肠腺瘤性息肉病蛋白(*adenomatous polyposis coli*, *APC*)三者形成复合物, GSK3 β 使 β -catenin 发生磷酸化,磷酸化的 β -catenin 进而被泛素化,随后被蛋白酶体系统降解,因此胞内 β -catenin 浓度较低,下游靶基因转录呈沉默状态。然而,当 *Wnt* 配体与细胞膜上的受体

Fzd 及辅助受体脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor related protein, LRP5/6)结合后, *Wnt* 信号通路被激活, *Axin*-*APC*-GSK3 β 复合体遭到破坏,使得 β -catenin 从这个降解复合体中释放出来,游离的 β -catenin 在细胞内积累并进入细胞核与转录因子 *Tcf/Lef* 结合,指导下游靶基因转录,从而产生多种生物学功能^[8](图 1)。*Wnt*/PCP 信号通路受 GTP 酶 *RhoA* 和 *Ras* 的调节, *RhoA* 和 *Ras* 可激活 *JNK* 和 *ROCK*,引起细胞骨架重排,导致细胞形态改变;在 *Wnt*/calcium 信号通路中, *Wnt* 配体和 *Fzd* 受体结合后,促使胞内甘油二酯(DAG)、三磷酸肌醇(IP₃)活化,引起钙离子的释放,促使钙离子依赖性酶类的激活,如蛋白激酶 C(PKC)、钙调蛋白依赖性激酶 II (CaMK II) 的激活,该通路在胚胎发育阶段的细胞运动和体轴建立过程中发挥重要作用^[9](图 2)。

研究表明,经典 *Wnt*/ β -catenin 信号通路和 *Wnt*/PCP 信号通路参与哺乳动物内耳发育过程。经典 *Wnt*/ β -catenin 信号通路在内耳发育早期阶段,主要调控听基板(otic placode)特化以及听囊(otic vesicle)的分化;自 E12.5(Embryonic day 12.5)起,主要参与感觉上皮区域细胞命运的决定;*Wnt*/PCP 信号通路在毛细胞静纤毛的排列和蜗管的延伸过程中起着重要作用^[10]。目前为止,内耳发育过程中未发现 *Wnt*/calcium 信号通路的作用。

1 内耳的发生

内耳结构复杂,由前庭和耳蜗两部分组成。在发育生物学上,内耳来源于后脑两侧的外胚层。在脊椎动物胚胎发育时期,后脑两侧的表面外胚层在周围信号分子的影响下增厚,形成听基板;听基板通过内陷、融合形成听囊,听囊分化形成腹侧的耳蜗囊和背侧的前庭囊,继而发育形成完整的内耳结构^[11,12]。在内耳发育的整个过程中, *Wnt*、*Notch*、*BMP*/*Smad*、*FGF* 和 *IGF* 等多条信号通路通过控制不同转录因子的表达来调控内耳的发育^[13~19]。

1.1 *Wnt* 信号通路与听基板、听囊的发育

研究表明,所有的颅面部感觉器官(包括内耳)在发育早期都来源于一个共同的外胚层“前板样区

域”(pre-placodal region, PPR)。来自神经板和中胚

层的信号分子如 FGF 信号通路促使前板样区域的形

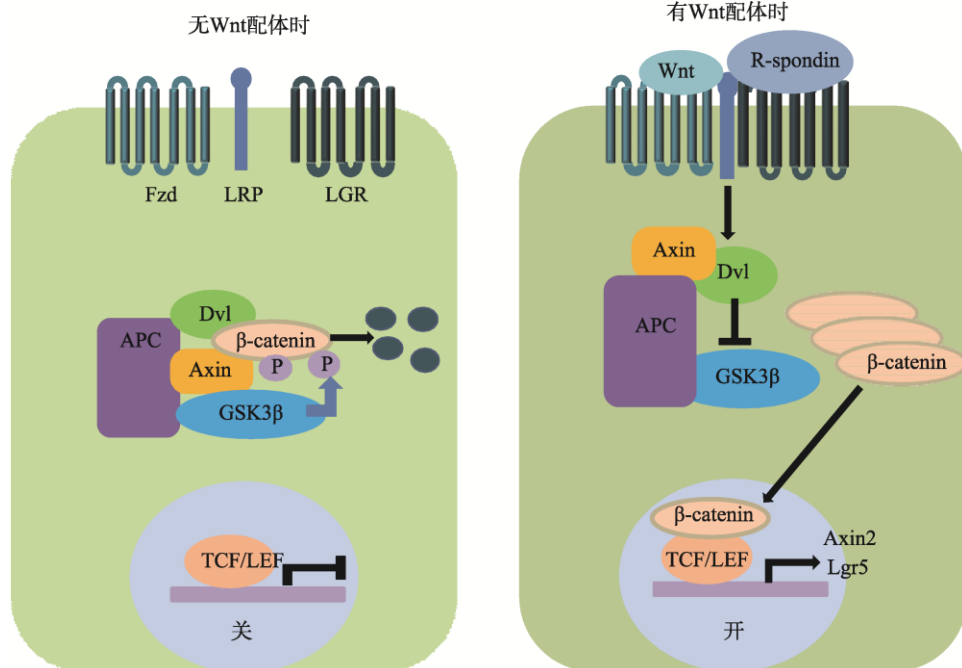


图 1 Wnt/β-catenin 信号通路

Fig. 1 Wnt/β-catenin signaling pathway

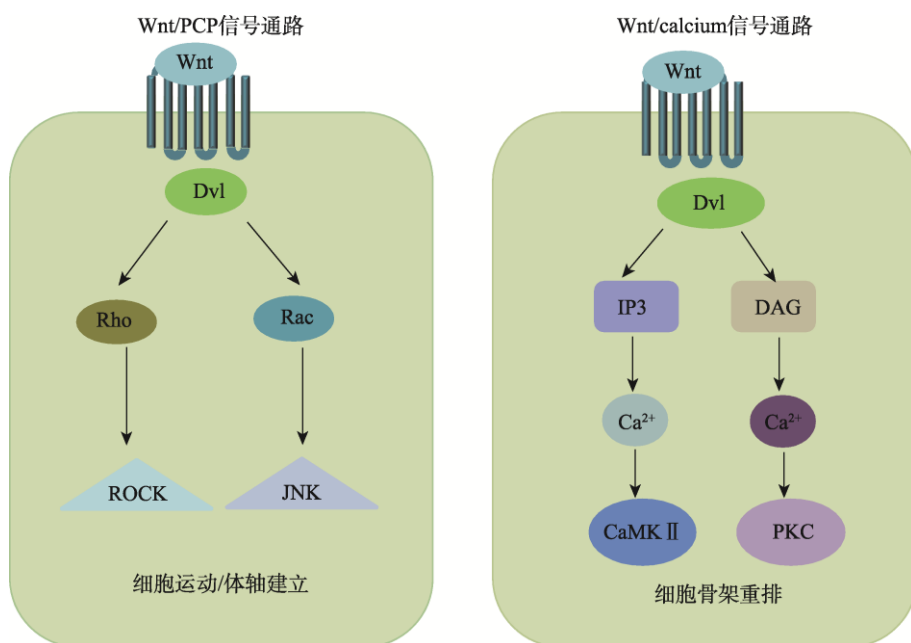


图 2 非经典 Wnt 信号通路

Fig. 2 Non-canonical Wnt signaling pathway

成,同时 BMP 信号通路和 Wnt 信号通路的失活对于神经板附近“前板样区域”的有序分布至关重

要^[20~22]。随后“前板样区域”进一步分化为嗅板(olfactory placode)、晶状体板(lens placode)、三叉神

经板(trigeminal placode)、听基板(otic placode)和鳃上基板(epibranchial placode),最后形成相应的颅面部感觉器官^[23,24]。在内耳发育的最初阶段,FGF 信号通路参与早期听基板的形成。在 FGF 信号分子的作用下,外胚层“前板样区域”进一步分化形成表达 *Pax2/8* 的细胞区域,此区域被认为是内耳发育的起源部位;在非羊膜动物中,此区域表达 *Pax8*,在羊膜动物中此区域表达 *Pax2*;谱系追踪实验发现,*Pax2* 区域不仅可以作为听祖细胞(otic progenitor cell)前体分化形成内耳结构,而且也可以分化形成上皮板结构或鳃上板结构^[25~28]。因此,表达 *Pax2* 的区域亦可被称为耳前体区域或内耳-鳃上板区域(otic-epibranchial progenitor domain, OEPD)。然而,促使表达 *Pax2* 的祖细胞选择性分化为听基板或者鳃上板的机制是什么呢?

研究表明在 OEPD 区域分化过程中,至少存在两种重要的信号调节机制决定了此区域的分化方向。高表达的 Wnt 信号通路上调 Notch 信号通路组成成分的表达,如 *Jag1* 配体的表达;随后 *Jag1* 配体通过与 Notch 受体结合,反过来增强了此区域的 Wnt 信号通路的强度^[29,30]。此外在内耳早期发育过程中,听基板区域分化开始后,通过上调 FGF 信号通路负调控基因如 *Sprouty* 基因和 *MKP3* 基因的表达,导致 FGF 信号通路作用强度的减弱,促进此区域往内耳方向分化。研究发现 OEPD 产生的鳃上板区域,没有检测到 *Sprouty* 基因的表达,表明持续表达的 FGF 信号通路有利于此区域往鳃上板方向分化^[31]。综上所述,内耳发育过程中通过上述机制调控 OEPD 区域的细胞分化方向,即高表达的 Wnt/Notch 信号通路和低表达 FGF 信号通路有利于 OEPD 区域往听基板方向分化,低表达的 Wnt/Notch 信号通路和高表达 FGF 信号通路促进 OEPD 区域往鳃上板方向分化。

1.2 Wnt 信号通路与内耳前庭器官的发育

内耳前庭器官由 3 对半规管、椭圆囊及球囊组成,能够感受头部位置变动情况,主要与维持身体平衡有关。研究表明,Wnt 信号通路在背侧听囊发育为耳前庭的过程中发挥重要作用^[32]。来源于背侧后脑区域的 Wnt 信号分子调节听囊背侧区域相关基

因如 *Dlx5/6*、*Hmx2/3* 和 *Gbx21* 的表达,这些基因对于前庭系统内淋巴管和半规管的发育有重要作用^[33,34]。在脊椎动物内耳前庭发育过程中,Wnt1 和 Wnt3a 分子扮演着重要角色。Riccomagno 等^[35]研究发现,分别敲除 Wnt1 和 Wnt3a 时,与野生型相比,听囊中 *DLX5* 的表达量不变;而当同时敲除 Wnt1 和 Wnt3a 时,听囊中 *DLX5* 的表达量明显下降,同时 *Gbx2* 的表达也明显下降;然而,同样作为 Wnt 信号通路下游调控基因的 *Hmx3* 和 *BMP4* 基因的表达量保持不变。以上实验表明同时敲除 Wnt1 和 Wnt3a 时,优先降低了 *DLX5/6*、*Gbx2* 的表达,避免了背侧耳细胞的丢失。从内耳形态上观察,在 E14.5 时,分别敲除 Wnt1 和 Wnt3a 时,内耳形态发育正常;然而同时敲除 Wnt1 和 Wnt3a 时,出现了包括椭圆囊和球囊在内的前庭器官的缺失。此外对内耳的形态观察发现,同时敲除 Wnt1 和 Wnt3a 时,耳蜗结构并没有消失;但由于内耳腹侧结构的发育受到影响,造成耳蜗发育不全。Riccomagno 等^[35]认为内耳前庭器官的缺失可能是由于同时敲除 Wnt1 和 Wnt3a 时降低了 *DLX5* 和 *Gbx2* 的表达引起的;由于不清楚 *DLX5* 和 *Gbx2* 在耳蜗发育中的具体作用,因此并不能确定是否是由于 *DLX5* 和 *Gbx2* 的表达量的下降造成耳蜗发育不全。

1.3 Wnt 信号通路与耳蜗毛细胞的形成

研究表明在胚胎发育过程中,Wnt 信号通路主要参与内耳背侧结构的形成,但其在包括耳蜗在内的内耳腹侧结构形成中的作用,仍是现阶段研究的热点^[36]。在 E10.5-11 时,蜗管形成于听泡最腹侧,几乎同时蜗管的最底层形成前感觉区,此区域也是螺旋器形成的基础;前感觉区细胞的分化起始于 E14.5 蜗管的底部中间区域,随后其分化趋势向顶部和底部方向延伸,最终分化形成毛细胞、支持细胞等内耳细胞^[37]。其中毛细胞将接受到的声信号转换成电信号,传递给螺旋神经元,通过螺旋神经元将声信号传递给中枢听觉系统,支持细胞则为毛细胞的长期存活提供结构及营养的支持^[38,39]。

1.3.1 Wnt 信号通路参与耳蜗毛细胞的分化

耳蜗内毛细胞和支持细胞起源于共同的耳祖细胞,分化过程经历以下阶段:主细胞阶段(progenitor cell

state)→感觉前体细胞增殖阶段(proliferative prosensory cell state)→有丝分裂后的感觉前体细胞阶段(post-mitotic prosensory cell state)→最终分化为毛细胞

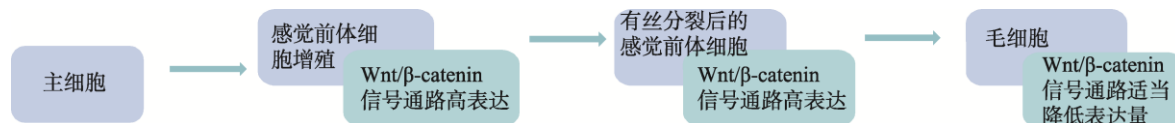


图 3 毛细胞分化过程

Fig. 3 The process of hair cell differentiation

在耳蜗细胞发育过程中, *Sox2* 作为感觉前体细胞区域较早出现的标志基因之一, 是内耳前感觉区形成所必需的, 耳蜗发育过程中该基因表达的缺乏或减少, 将会严重影响耳蜗以及整个内耳的发育^[41]。Kempfle 等^[42]证实转录因子 *Sox2* 通过与细胞内 *Atoh1* 基因(较早出现的毛细胞标志基因)增强子结合, 引起胞内 *Atoh1* 表达量上升, 因此转录因子 *Sox2* 是内耳毛细胞早期分化所必需的。在内耳感觉上皮中, *Sox2* 最初表达于所有的前体感觉细胞(prosensory cells)区域, 随后表达于支持细胞和毛细胞直到 E15.5; 毛细胞后期的分化则需要降低 *Sox2* 的表达, 因此 *Sox2* 最终只表达于支持细胞内。Jacques 等^[43]利用 *TCF/Lef:H2B-GFP* 转基因小鼠, 通过观察小鼠体内 GFP 的表达, 检测 Wnt/β-catenin 信号通路在毛细胞分化过程中的表达情况。结果表明, 在蜗管发育早期(E12 和 E13.5 时期)的感觉前体细胞阶段, 检测到较强的 GFP 信号, 这些表达 GFP 的细胞区域同样表达感觉前体区域标志基因 *Sox2*; 在 E14.5 时, 感觉前体细胞开始向毛细胞分化, 此时蜗管的顶部表达 *Sox2* 区域仍然能检测到高表达的 GFP 信号, 而在蜗管基部 GFP 的表达量降低; 在 E17.5 时, 耳蜗内毛细胞分化完成, 毛细胞内 GFP 的表达量很低, 最后只在支持细胞内表达。因此, 在耳蜗的发育过程中 Wnt 信号通路高表达于感觉前体区域, 毛细胞在细胞分化起始后则需要适当降低 Wnt 信号通路的表达。

1.3.2 Wnt 信号通路与耳蜗感觉前体细胞的形成

在耳蜗发育过程中, 感觉前体细胞的建立可分为两个阶段: 增殖阶段和有丝分裂后阶段。已知 Wnt/β-catenin 信号通路调控神经主细胞和干细胞的增殖

细胞(hair cell)(图 3)。*Sox2* 作为 SOXB1 转录因子家族中的一员, 不仅在维持干细胞多潜能性方面发挥关键作用, 同时也是内耳细胞早期发育所必需的基因^[40]。

分裂^[44]。在 E12 时, 感觉前体区域细胞还处于增殖分裂阶段。Jacques 等^[43]利用 *TCF/Lef:H2B-GFP* 转基因小鼠, 通过观察 GFP 的表达, 发现 Wnt/β-catenin 信号通路表达于耳蜗发育早期的感觉前体细胞阶段, 提示 Wnt/β-catenin 信号通路可能参与调控感觉前体区域细胞的增殖分裂。如果 Wnt/β-catenin 信号通路对于感觉前体细胞的建立是必需的, 那么抑制或激活此信号通路将会引起此区域细胞数量的减少或增多。为验证以上假设, Jacques 等^[43]将 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 FH535(TCF 抑制剂)或 IWR(其作用是保持 Axin 表达量稳定, 随后促进 β-catenin 的降解)^[45]作用于 E12 的耳蜗外植体(cochlear explants), 导致 Wnt/β-catenin 信号通路被抑制, 引起表达 *Sox2* 的感觉前体区域细胞数量的减少。相反, 加入 LiCl(Wnt 信号激活剂, 通过抑制 GSK3β 的活性, 避免 β-catenin 的降解)^[46], 以激活 Wnt/β-catenin 信号通路, 促使表达 *Sox2* 因子的感觉前体区域细胞数量的增加, 同时引起毛细胞数量的增加。因此以上实验证明在 E12 时, 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路显著降低感觉前体细胞的增殖分裂, 而该信号通路的激活则有利于感觉前体细胞的增殖分裂。自 E13.5 起耳蜗感觉前体区域细胞停止分裂, 此时加入 LiCl, 也可以引起表达 *Sox2* 的感觉前体细胞区域细胞数量的增多; 因此, 在 E13.5 时, Wnt/β-catenin 信号通路的激活可引起已停止分裂的感觉前体细胞区域重新增殖分裂。与 E12 不同的是, 此时感觉前体细胞数量的增加主要集中在感觉前体区域的侧面, 而不是发生在整个感觉前体区域^[43]。

1.3.3 Wnt 信号通路与耳蜗内毛细胞的形成

在 E12 时, 耳蜗内大多数的感觉前体细胞已经

形成,此时加入 Wnt 信号通路抑制剂 FH535 虽然可抑制感觉前体细胞的增殖分裂,但并不能完全解释毛细胞近乎完全缺失的现象,表明 Wnt/ β -catenin 信号通路可能参与了毛细胞的后期分化过程。同样,将 E13.5 的耳蜗外植体置于含有 Wnt 信号通路抑制剂 FH535 的培养液中,体外培养 3 天,发现分化形成的毛细胞数量明显减少;将上述经 FH535 处理的耳蜗外植体冲洗去除 FH535 的作用,置于不含有 FH535 的培养液中继续培养,耳蜗内形成的毛细胞状态和数量正常^[43]。研究还证实将 E13.5 耳蜗外植体先置于不含有 FH535 的培养液中培养 3 天,随后放置于含有 FH535 的培养液中,发现并未影响耳蜗内毛细胞的形成^[43]。以上实验说明,与调控感觉前体区域细胞增殖作用不同,Wnt/ β -catenin 信号通路调控在 E13.5-E16 时主要参与调控毛细胞的分化。此外,将 E13.5 的耳蜗外植体置于含有 Wnt 信号通路激活剂 LiCl 的培养液中处理 3 天左右,耳蜗内形成的内毛细胞和外毛细胞的数量都显著增加^[43]。

综上所述,Wnt 信号通路调控耳蜗毛细胞的分化全过程,在最初阶段 Wnt 信号通路高表达于感觉前体区域并调节此区域细胞的增殖分裂;毛细胞分化起始后则需要适当降低 Wnt 信号通路的表达,此阶段 Wnt 信号通路主要参与了毛细胞的分化过程。因此,Wnt 信号通路在哺乳动物耳蜗发育过程中起着双重调节作用。

1.4 R-Spondin2 在哺乳动物内耳毛细胞发育中的作用

Jin 等^[47]发现以 R-Spondins(roofplate-specific spondin)蛋白家族作为配体,通过与 Lgr 蛋白家族受体结合调控 Wnt 信号通路,此过程对于干细胞发育和再生起着重要的作用。在众多的组织发育过程中,通常认为 R-Spondins 可与 Lgr4、Lgr5、Lgr6 这 3 种受体蛋白结合,以加强下游 Wnt 信号通路的作用强度^[48](图 1)。近年来,相关研究证实:R-Spondins 共有 4 种蛋白(R-Spondin1-4),在耳蜗发育过程中只有 R-Spondin2 蛋白参与耳蜗感觉上皮细胞的形成^[49]。

已知耳蜗内感觉上皮区域细胞的正确分布是正常听力产生所必须的,其中内毛细胞在内柱细胞的内侧排成一列,外毛细胞排成三列,在人耳蜗的某

些部位则排列成四列甚至五列,散落在支持细胞中。R-Spondin2 通常被认为是经典 Wnt 信号通路的增强因子,但其在耳蜗毛细胞发育中的作用并不是很清楚。Mulvaney 实验室^[50]研究发现,E18.5 时将小鼠耳蜗内的 R-Spondin2 特异性敲除后,耳蜗内形成的外毛细胞数量增多,内毛细胞的数量没有改变。为了进一步证明 R-Spondin2 在毛细胞发育中的作用,Mulvaney 等^[50]又将 E13.5 的耳蜗外植体置于含有 R-Spondin2 蛋白(5 μ g/mL)的培养液中,连续培养 6 天后,对毛细胞标志基因 *Myosin VI* 进行免疫荧光检测,发现形成的内毛细胞的数量不变,但外毛细胞的数量略微减少。以上实验结果证实,R-Spondin2 缺失可引起毛细胞的异常增多,外源性的 R-Spondin2 蛋白则会引起毛细胞数量减少。鉴于 Jacques 等^[43]发现 Wnt/ β -catenin 信号通路激活引起毛细胞和支持细胞表达量的上升,而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路阻碍了毛细胞的分化。因此在耳蜗毛细胞发育过程中,R-Spondin2 并不是作为 Wnt 信号通路的激活剂以促进毛细胞的形成。我们推测在耳蜗发育过程中,R-Spondin2 可能通过调节非经典 Wnt 信号通路以抑制毛细胞的形成,但其具体的作用机制尚待进一步阐明。

1.5 Wnt/PCP 信号通路

平面细胞极性(planar cell polarity, PCP)通常指上皮细胞平面细胞的方向性。Wnt/PCP 信号通路属于 Wnt 信号通路中的非经典通路,最早是在果蝇的相关研究中发现的,此信号通路对于果蝇体部纤毛及复眼等高度有序化结构的排列和形成至关重要^[51,52]。Wnt/PCP 信号通路在进化上十分保守,从无脊椎动物到脊椎动物具有一套核心调控组件,PCP 核心基因主要包括 *Frizzled(FZ)*、*Dishevelled(Dsh/Dvl)*、*Strabismus/Vangogh(Stam/Vangl)*、*Flamingo(Fmi)*和 *Diego(Dgo)*^[53]。在内耳发育过程中,PCP 信号途径作为关键性调控通路参与毛细胞纤毛束的定向排列和蜗管形成过程中的汇聚延伸(convergent extension, CE)。

Dabdoub 等^[54]证实,通过抑制 Wnt 配体与受体的结合,破坏了完整 Wnt/PCP 信号通路,导致形成的毛细胞纤毛束定向紊乱,表明 Wnt 配体对于耳蜗内形成正确的 PCP 是必不可少的。此外,Dabdoub

等^[54]在蜗管的延伸过程中发现 *Wnt7a* 的表达, 将耳蜗外植体置于含有 *Wnt7a* 蛋白的条件培养液中培养, 发现形成的毛细胞出现纤毛束的定向紊乱现象, 但 *Wnt7a* 突变小鼠形成的毛细胞束并未出现异常。以上研究表明, *Wnt7a* 参与了毛细胞纤毛束的定向, 但并不是毛细胞纤毛束定向过程中主要的调控因子; 同时也证实了在耳蜗毛细胞束形成过程中, *Wnt7a* 突变时, 有其他 *Wnt* 相关基因补偿了因 *wnt7a* 缺失引起的毛细胞定向紊乱, 这也是人们熟知的基因冗余(*gene redundancy*)。Qian 等^[55]发现 *Wnt5a* 作为 *Wnt/PCP* 信号通路的另一重要配体, 在毛细胞束的形成过程中起着重要作用。分泌型卷曲相关蛋白 3 (*secreted frizzled-related protein 3*, *SFRP3* 或 *Frzb*) 作为 *Wnt* 信号通路抑制剂, 通过阻碍 *Wnt* 配体与受体 *Fzd* 的结合以抑制 *Wnt* 信号通路。向培养的野生型耳蜗外植体中加入 *Frzb* 抑制剂后, 可抑制蜗管的延伸并引起毛细胞纤毛束定向紊乱, 表明 *Wnt* 信号通路的激活对于正确的 *PCP* 形成是至关重要的; 如果向培养的耳蜗外植体加入 *Frzb* 抑制剂之前加入 *Wnt5a* 则可避免上述现象的产生, 因此认为 *Wnt5a* 可能在毛细胞定向和蜗管延伸过程中发挥了重要作用^[55]。此外体内实验也证实, 与 *Wnt7a* 缺失的小鼠不同, 当小鼠体内 *Wnt5a* 缺失时, 小鼠耳蜗发育过程中出现了明显的 *PCP* 缺陷; 具体表现为毛细胞定向紊乱, 形成的蜗管与野生型小鼠相比较短; 同时沿着蜗轴方向多长出数排毛细胞, 此现象在蜗轴的顶轴末端区域更为突出, 因此形成的耳蜗较野生型宽而短^[55]。

2 Wnt 信号通路与毛细胞再生

2.1 内耳毛细胞再生现象的发现

内耳毛细胞为感受声波刺激的感觉上皮细胞, 也被称为听觉感受器, 通过接受外界传来的声波并将其转变成神经冲动, 神经冲动沿听神经传到大脑皮层的听觉中枢, 形成听觉。哺乳动物绝大多数内耳毛细胞在胚胎期形成, 出生后由于先天性感染、噪声及耳毒性药物如氨基糖苷类抗生素的不当使用, 引起毛细胞损伤, 毛细胞损伤后的不可逆性导致永久性听觉障碍^[56]。与哺乳动物不同, 鱼类和鸟

类在整个生命过程中都可形成毛细胞。动物体内毛细胞损伤后的再生现象直到 20 世纪 80 年代才被发现, 在此之前研究人员认为出生后体内毛细胞损伤后的再生是不可能的, 因此并未对其进行过多的研究。研究表明, 向新生鸡体内注入庆大霉素后, 通过显微镜观察毛细胞数量的变化, 发现鸡内耳听觉上皮-基底乳头(*basilar papilla*, *BP*)基部约 1/3 的地方出现了毛细胞的损伤, 一周后毛细胞的损伤扩散到更大的范围; 随着进一步观察, 研究人员发现在毛细胞最先损伤的基部末端出现了新的毛细胞, 两周后基底乳头区域的毛细胞数量恢复到损伤前的水平^[57]。上述现象的发现才使人们认识到某些脊椎动物(如鸟纲)内耳基底乳头区域毛细胞损伤后可再生。此后, 对脊椎动物(如鱼类、鸟类、爬行类、哺乳类)前庭器官和听觉器官内毛细胞再生现象的研究逐渐被科学家们重视。

根据最近几十年科研人员对毛细胞再生机制的研究发现, 鱼类和鸟类等脊椎动物内耳毛细胞损伤后可通过毛细胞再生机制恢复到正常水平, 这主要通过以下两种途径: (1)有丝分裂后的再生机制(*mitotic regeneration*), 即支持细胞首先增殖分裂, 随后一部分支持细胞分化为毛细胞; (2)转分化机制(*direct trans-differentiation*), 即支持细胞不经历增殖分裂直接分化形成毛细胞。虽然成年哺乳动物内耳支持细胞与低等脊椎动物内耳支持细胞有许多共同特征, 但当成年哺乳动物内耳毛细胞损伤后, 内耳支持细胞不能通过上述机制形成毛细胞^[58]。因此, 哺乳动物内耳毛细胞的损伤是不可逆的(除在胚胎期和出生后较短时间内耳毛细胞具有再生能力), 毛细胞的损伤也造成了成年哺乳动物永久的听觉障碍^[59]。

2.2 Wnt 信号通路参与鱼类和鸟类毛细胞再生

已知经典 *Wnt* 信号通路不仅在鱼类侧线器(*lateral line*)末端的神经丘(*neuromast*)发育过程中起着重要作用, 并且还参与神经丘内毛细胞的再生过程。正常情况下成熟神经丘内的大多数细胞已停止增殖分裂, 但 Head 等^[60]却发现通过加入 *Wnt* 信号通路激活剂 *AZ* (*1-azakenpallone*, 抑制 *GSK3 β* 的活性), 以激活 *Wnt* 信号通路, 可促使神经丘内停止分裂的

支持细胞重新进入细胞周期,开始增殖分裂。当毛细胞出现损伤后,Wnt 信号通路促进神经丘内支持细胞的增殖分裂,以补偿丢失的毛细胞。此外,研究表明 *Dkk1b* 过表达时,Wnt 信号通路受到抑制,支持细胞则不能够通过再次的增殖分裂以弥补毛细胞损伤,毛细胞再生过程受到抑制,说明 Wnt 信号通路对于毛细胞再生过程中支持细胞的增殖分裂至关重要;同样,加入 GSK3 β 抑制剂(AZ 或 LiCl)能够激活 Wnt 信号通路,促进损伤后支持细胞的增殖分裂,促进毛细胞的再生^[61]。

与鸟类前庭器官和鱼类侧线器内毛细胞可持续再生不同的是,鸟类基底乳头(basilar papilla)内的毛细胞只有损伤后才能再生。Alvarado 等^[62]对鸡耳蜗和椭圆囊内毛细胞损伤后再生过程研究发现,Wnt 信号通路可通过调控支持细胞的增殖分裂促进毛细胞再生。当用 RNAi 干扰技术敲低 β -catenin 和 *Wnt4* 表达时,能抑制支持细胞的增殖分裂,抑制毛细胞损伤后再生;而当加入外源性的 Wnt 配体(如 *Wnt4* 和 *Wnt5a*)时,可进一步增强支持细胞的增殖分裂,促进毛细胞损伤后再生^[62,63]。以上实验证明鸟类毛细胞损伤后,Wnt 信号通路通过调控支持细胞的增殖分裂,促进毛细胞的再生。

2.3 Wnt 信号通路与哺乳动物毛细胞再生

尽管经典 Wnt 信号通路在哺乳动物内耳发育过程中的作用已研究的十分清楚,但直到最近研究人员才开始阐明其在内耳毛细胞再生过程中的重要作用。Shi 等^[64]和 Chai 等^[65]研究发现,刚出生的哺乳动物耳蜗中,在大上皮嵴(greater epithelial ridge, GER)区域的非感觉上皮细胞和支持细胞(内部边界细胞、内指细胞及第三排的 Deiters 细胞)中发现 *Lgr5* 的表达;随后从新生小鼠耳蜗中分离出这些细胞并在体外进行培养,发现表达 *Lgr5* 的支持细胞可进行增殖分裂并转分化为毛细胞。此外,小鼠体内实验发现耳蜗内毛细胞缺失后,*Lgr5*⁺支持细胞可自发增殖分裂形成毛细胞。基于上述实验证据,研究人员将表达 *Lgr5* 的支持细胞称为主细胞样细胞(progenitor-like cells),其在哺乳动物内耳毛细胞再生过程的作用也受到广泛关注^[64,65]。

富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5(leucin-

erich repeat-containing G protein-coupled receptor 5, *Lgr5*)是 G 蛋白偶联受体家族成员之一,也是近年来新发现的 Wnt 信号通路的靶基因,主要参与细胞的增殖分化和肿瘤的发生过程。Shi 等^[66]通过 β -catenin 的功能获得性(gain-of-function)实验发现,在哺乳动物内耳发育过程中,E13.5-14.5 时支持细胞即停止分裂,随后在整个生命过程中都保持有丝分裂后的状态,但在外部 Wnt 信号刺激下可以重新恢复分裂增殖的能力。通过新生小鼠内耳毛细胞体外再生实验发现,从耳蜗内分离出来的表达 *Lgr5* 的支持细胞需要在 Wnt 信号的刺激下才能重新获得增殖分裂的能力,进而分化形成毛细胞。此外,小鼠体内再生实验发现,在 β -catenin 作用下,*Lgr5*-CreER 小鼠体内表达 *Lgr5* 的细胞只出现了短暂的增殖过程,然而在 Sox2-CreER 小鼠体内表达 *Lgr5* 的细胞出现了新生毛细胞^[66]。该结果是否是由于 Sox2 单倍剂量(Sox2 haploinsufficiency)不足造成了上述两种品系小鼠内耳表达 *Lgr5* 的支持细胞分化方式的差异,目前还不清楚。转录因子 *Atoh1* 是内源性调控因子碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子家族成员之一,是内耳感觉细胞分化过程中的重要正调控因子;在支持细胞中过表达 *Atoh1* 基因,可以促使支持细胞转分化为毛细胞^[67,68]。上述分化为毛细胞的方法均存在分化周期长、分化效率低等缺点,并且大多数支持细胞并未分化形成毛细胞。

为了进一步提高新生小鼠耳蜗毛细胞的再生效率,Kuo 等^[69]在 *Lgr5*⁺支持细胞中共同过表达 β -catenin 和 *Atoh1*,结果发现在 β -catenin 和 *Atoh1* 的共同作用下,促进 *Lgr5*⁺支持细胞的增殖分裂,由此分化而来的毛细胞数量增加,并且毛细胞可一直存活到小鼠成年时期;但是由于未检测到成熟内耳毛细胞标志基因 *VGlut3*(成熟内毛细胞标志基因)和 *Prestin*(成熟外毛细胞标志基因),并且由于毛细胞的形态与内源毛细胞不同等原因,此方法形成的毛细胞还是未完全成熟的毛细胞。尽管如此,Kuo 等^[69]用 β -catenin 和 *Atoh1* 共同表达的方法诱导毛细胞的形成,为人们今后研究哺乳动物内耳毛细胞再生提供了新思路。

3 结语与展望

最近几十年, 科研人员用大量的动物模型研究揭示了 Wnt 信号通路在内耳毛细胞增殖、分化和再生等方面具有重要作用。由于该通路在进化上具有高度的保守性, 推测在人类内耳发育过程中也有类似重要的调节作用。然而, Wnt 信号通路在内耳发育中的机制网络仍不完全明确。首先尽管相关研究证实 Wnt/ β -catenin 信号通路在毛细胞分化与再生中起着重要作用, 但在此过程中是哪几类 Wnt 配体与 Fzd 受体的组合激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路的还不明确; 其次, 在哺乳动物内耳发育过程中, Wnt/PCP 信号途径一直是研究最多的非经典 Wnt 信号通路分支, 在毛细胞静纤毛的排列和蜗管的延伸过程发挥重要作用, 但其调控机制尚未完全阐明; 此外, Wnt/calcium 信号通路是否参与内耳发育过程还需要进一步探究; 最后, 内耳发育受到 Wnt、Notch、BMP/Smad、FGF 及 IGF 等多种信号通路的调控, 但 Wnt 信号通路与其他信号通路如何相互作用共同调节内耳发育也有待进一步探索。总之, 随着对 Wnt 信号通路调节机制的深入研究, 不仅在分子生物学水平上对内耳的发育过程有一个深入的理解, 而且为靶向调控 Wnt 信号通路相关分子促进毛细胞再生带来新的希望。

参考文献(References):

- [1] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781–810.
- [2] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14(1): 59–88.
- [3] van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 2009, 136(19): 3205–3214.
- [4] Flaherty MP, Dawn B. Noncanonical Wnt11 signaling and cardiomyogenic differentiation. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18(7): 260–268.
- [5] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science*, 2004, 303(5663): 1483–1487.
- [6] Petersen CP, Reddien PW. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell*, 2009, 139(6): 1056–1068.
- [7] Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22429–22433.
- [8] Munnamalai V, Fekete DM. Wnt signaling during cochlear development. *Semin Cell Dev Biol*, 2013, 24(5): 480–489.
- [9] Gómez-Orte E, Sáenz-Narciso B, Moreno S, Cabello J. Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends Genet*, 2013, 29(9): 545–553.
- [10] Geng RH, Noda T, Mulvaney JF, Lin VYW, Edge ASB, Dabdoub A. Comprehensive expression of Wnt signaling pathway genes during development and maturation of the mouse cochlea. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148339.
- [11] Barald KF, Kelley MW. From placode to polarization: new tunes in inner ear development. *Development*, 2004, 131(17): 4119–4130.
- [12] Fritsch B, Pan N, Jahan I, Elliott KL. Inner ear development: building a spiral ganglion and an organ of Corti out of unspecified ectoderm. *Cell Tissue Res*, 2015, 361(1): 7–24.
- [13] Zhang YP, Chen Y, Ni WL, Guo L, Lu XL, Liu LM, Li W, Sun S, Wang L, Li HW. Dynamic expression of *Lgr6* in the developing and mature mouse cochlea. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 165.
- [14] Pirvola U, Ylikoski J, Trokovic R, Hébert JM, McConnell SK, Partanen J. FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron*, 2002, 35(4): 671–680.
- [15] Pan W, Jin Y, Stangerc B, Kiernan AE. Notch signaling is required for the generation of hair cells and supporting cells in the mammalian inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(36): 15798–15803.
- [16] Kiernan AE, Xu J, Gridley T. The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS Genet*, 2006, 2(1): e4.
- [17] Ono K, Kita T, Sato S, O'Neill P, Mak SS, Paschaki M, Ito M, Gotoh N, Kawakami K, Sasai Y, Ladher RK. FGFR1-Frs2/3 signalling maintains sensory progenitors during inner ear hair cell formation. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004118.
- [18] Ohyama T, Basch ML, Mishina Y, Lyons KM, Segil N, Groves AK. BMP signaling is necessary for patterning the sensory and nonsensory regions of the developing mammalian cochlea. *J Neurosci*, 2010, 30(45): 15044–15051.
- [19] Camarero G, Avendano C, Fernández-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, Pichel JG, Varela-Nieto I. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci*, 2001, 21(19): 7630–7641.
- [20] Brown AS, Rakowiecki SM, Li JYH, Epstein DJ.

- The cochlear sensory epithelium derives from Wnt responsive cells in the dorsomedial otic cup. *Dev Biol*, 2015, 399(1): 177–187.
- [21] Ladher RK, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL, Schoenwolf GC. FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. *Genes Dev*, 2005, 19(5): 603–613.
- [22] Wright TJ, Mansour SL. Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development*, 2003, 130(15): 3379–3390.
- [23] Lleras-Forero L, Streit A. Development of the sensory nervous system in the vertebrate head: the importance of being on time. *Curr Opin Genet Dev*, 2012, 22(4): 315–322.
- [24] Groves AK, Fekete DM. Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. *Development*, 2012, 139(2): 245–257.
- [25] Chen JC, Streit A. Induction of the inner ear: stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors. *Hear Res*, 2013, 297: 3–12.
- [26] Wright KD, Mahoney Rogers AA, Zhang J, Shim K. Cooperative and independent functions of FGF and Wnt signaling during early inner ear development. *BMC Dev Biol*, 2015, 15: 33.
- [27] Groves AK, LaBonne C. Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border. *Dev Biol*, 2014, 389(1): 2–12.
- [28] Koehler KR, Mikosz AM, Molosh AI, Patel D, Hashino E. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature*, 2013, 500(7461): 217–221.
- [29] Li WY, Wu JF, Yang JM, Suna S, Chai RJ, Chen ZY, Li HW. Notch inhibition induces mitotically generated hair cells in mammalian cochleae via activating the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 112(1): 166–171.
- [30] Chai RJ, Kuo B, Wang T, Liaw EJ, Xia AP, Jan TA, Liu ZY, Taketo MM, Oghalai JS, Nusse R, Zuo J, Cheng AG. Wnt signaling induces proliferation of sensory precursors in the postnatal mouse cochlea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(21): 8167–8172.
- [31] Ohyama T, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Groves AK. Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development*, 2006, 133(5): 865–875.
- [32] Waqas M, Zhang SS, He ZH, Tang ML, Chai RJ. Role of Wnt and Notch signaling in regulating hair cell regeneration in the cochlea. *Front Med*, 2016, 10(3): 237–249.
- [33] Lin ZS, Cantos R, Patente M, Wu DK. Gbx2 is required for the morphogenesis of the mouse inner ear: a downstream candidate of hindbrain signaling. *Development*, 2005, 132(10): 2309–2318.
- [34] Robledo RF, Lufkin T. *Dlx5* and *Dlx6* homeobox genes are required for specification of the mammalian vestibular apparatus. *Genesis*, 2006, 44(9): 425–437.
- [35] Riccomagno MM, Takada S, Epstein DJ. Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes Dev*, 2005, 19(13): 1612–1623.
- [36] Chen ZQ, Han XH, Cao X. Sonic Hedgehog signaling pathway and regulation of inner ear development. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(9): 1058–1064.
陈志强, 韩新焕, 曹新. Sonic Hedgehog 信号通路对内耳发育调控. *遗传*, 2013, 35(9): 1058–1064.
- [37] Kelley MW. Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(11): 837–849.
- [38] Nayagam BA, Muniak MA, Ryugo DK. The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems. *Hear Res*, 2011, 278(1–2): 2–20.
- [39] Hudspeth AJ. Integrating the active process of hair cells with cochlear function. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(9): 600–614.
- [40] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, 122(6): 947–956.
- [41] Dabdoub A, Puligilla C, Jones JM, Fritzsche B, Cheah KSE, Pevny LH, Kelley MW. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(47): 18396–18401.
- [42] Kempfle JS, Turban JL, Edge ASB. Sox2 in the differentiation of cochlear progenitor cells. *Sci Rep*, 2016, 6: 23293.
- [43] Jacques BE, Puligilla C, Weichert RM, Ferrer-Vaquer A, Hadjantonakis AK, Kelley MW, Dabdoub A. A dual function for canonical Wnt/ β -catenin signaling in the developing mammalian cochlea. *Development*, 2012, 139(23): 4395–4404.
- [44] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9–26.
- [45] Handeli S, Simon JA. A small-molecule inhibitor of Tcf/ β -catenin signaling down-regulates PPAR γ and PPAR δ activities. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(3): 521–529.
- [46] Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the ef-

- fect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(16): 8455–8459.
- [47] Jin YR, Yoon JK. The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(12): 2278–2287.
- [48] de Lau WB, Snel B, Clevers HC. The R-spondin protein family. *Genome Biol*, 2012, 13(3): 242–252.
- [49] deLau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VSW, Teunissen H, Kujala P, Haegebarth A, Peters PJ, van de Wetering M, Stange DE, van Es J, Guardavaccaro D, Schasfoort RBM, Mohri Y, Nishimori K, Mohammed S, Heck AJR, Clevers H. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 2011, 476(7360): 293–297.
- [50] Mulvaney JF, Yatteau A, Sun WW, Jacques B, Takubo K, Suda T, Yamada W, Dabdoub A. Secreted factor R-Spondin 2 is involved in refinement of patterning of the mammalian cochlea. *Dev Dyn*, 2013, 242(2): 179–188.
- [51] Schuijers J, Clevers H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J*, 2012, 31(12): 2685–2696.
- [52] Klein TJ, Mlodzik M. Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 155–176.
- [53] Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, Boutros M, Cruciat CM, Niehrs C. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep*, 2011, 12(10): 1055–1061.
- [54] Dabdoub A, Donohue MJ, Brennan A, Wolf V, Montcouquiol M, Sassoon DA, Hseih JC, Rubin JS, Salinas PC, Kelley MW. Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development*, 2003, 130(11): 2375–2384.
- [55] Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang XH, Steel KP, Dai X, Chen P. Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol*, 2007, 306(1): 121–133.
- [56] Furness DN. Molecular basis of hair cell loss. *Cell Tissue Res*, 2015, 361(1): 387–399.
- [57] Rubel EW, Furrer SA, Stone JS. A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hear Res*, 2013, 297: 42–51.
- [58] Jansson L, Kim GS, Cheng AG. Making sense of Wnt signaling-linking hair cell regeneration to development. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 66.
- [59] Wu JF, Li WY, Lin C, Chen Y, Cheng C, Sun S, Tang ML, Chai RJ, Li HW. Co-regulation of the Notch and Wnt signaling pathways promotes supporting cell proliferation and hair cell regeneration in mouse utricles. *Sci Rep*, 2016, 6: 29418.
- [60] Head JR, Gacioch L, Pennisi M, Meyers JR. Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line. *Dev Dyn*, 2013, 242(7): 832–846.
- [61] Yin A, Korzh S, Winata CL, Korzh V, Gong ZY. Wnt signaling is required for early development of zebrafish swimbladder. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18431.
- [62] Alvarado DM, Hawkins RD, Bashiardes S, Veile RA, Ku YC, Powder KE, Spriggs MK, Speck JD, Warchol ME, Lovett M. An RNA interference-based screen of transcription factor genes identifies pathways necessary for sensory regeneration in the avian inner ear. *J Neurosci*, 2011, 31(12): 4535–4543.
- [63] Jacques BE, Montgomery IV WHM, Uribe PM, Yatteau A, Asuncion JD, Resendiz G, Matsui JI, Dabdoub A. The role of Wnt/ β -catenin signaling in proliferation and regeneration of the developing basilar papilla and lateral line. *Dev Neurobiol*, 2014, 74(4): 438–456.
- [64] Shi FX, Hu LX, Edge ASB. Generation of hair cells in neonatal mice by β -catenin overexpression in Lgr5-positive cochlear progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(34): 13851–13856.
- [65] Chai RJ, Xia AP, Wang T, Jan TA, Hayashi T, Birmingham-McDonogh O, Cheng AGL. Dynamic expression of Lgr5, a Wnt target gene, in the developing and mature mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2011, 12(4): 455–469.
- [66] Shi FX, Hu LX, Jacques BE, Mulvaney JF, Dabdoub A, Edge ASB. β -Catenin is required for hair-cell differentiation in the cochlea. *J Neurosci*, 2014, 34(19): 6470–6479.
- [67] Liu ZY, Fang J, Dearman J, Zhang LL, Zuo J. *In vivo* generation of immature inner hair cells in neonatal mouse cochleae by ectopic Atoh1 expression. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89377.
- [68] Kawamoto K, Ishimoto SI, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. *Math1* gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. *J Neurosci*, 2003, 23(11): 4395–4400.
- [69] Kuo BR, Baldwin EM, Layman WS, Taketo MM, Zuo J. *In vivo* cochlear hair cell generation and survival by coactivation of β -catenin and atoh1. *J Neurosci*, 2015, 35(30): 10786–10798.

(责任编辑: 杨中州)