

内耳毛细胞再生相关的信号通路及信号互作 研究进展

杨影¹ 陈凤娇¹ 陆婷婷² 陆莹³ 丁洁^{1*}

(¹贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵阳 550025; ²珠海市金湾区三灶镇中心小学, 珠海 519040; ³贵州中医药大学基础医学院解剖学教研室, 贵阳 550025)

摘要 内耳毛细胞是一种感受器, 负责将机械声能转化为神经脉冲, 使机体感知外界声音。毛细胞的功能丧失是永久性感音性神经耳聋的主要原因之一, 毛细胞在成体哺乳动物中不会自发再生, 研究人员通过模拟哺乳动物内耳损伤, 发现Notch信号通路通过侧抑制和侧诱导作用形成新的感觉毛细胞。Notch的下游信号Wnt和上游信号FGF-FGFR是促进内耳发育、细胞增殖、分化以及毛细胞再生的关键信号通路。因此, 了解Notch、Wnt、FGF等信号通路及相关转录因子在哺乳动物内耳毛细胞再生过程中的作用机制极为重要, 该文重点阐述Notch信号通路以及相关信号分子互作在内耳毛细胞再生中的调控作用, 旨在分析耳蜗毛细胞增殖和再生的调控机制, 为耳聋治疗方法的实验研究和临床应用提供理论参考。

关键词 内耳毛细胞再生; Notch; Wnt; FGF; 信号互作

Research Progress of Signaling Pathways and their Interactions in Inner Ear Hair Cell Regeneration

YANG Ying¹, CHEN Fengjiao¹, LU Tingting², LU Yin³, DING Jie^{1*}

(¹Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology&Agro-Bioengineering (CICMEAB), College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²Sanzao Town Central Primary School, Jinwan District, Zhuhai 519040, China; ³Department of Deplaning, Basic Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract Hair cells are sensory receptors located in the inner ear, which are responsible for converting mechanical sound energy into nerve impulses, allowing the body to perceive external sounds. In mature mammals, when hair cells in the inner ear are destroyed, they cannot regenerate and cause permanent sensor neural hearing loss. Researchers simulated the injury of the inner ear in mammals and found that the Notch signaling pathway forms new sensory hair cells through lateral inhibition and lateral induction. Notch's downstream signal Wnt and upstream signal FGF-FGFR are the key signal pathways that promote inner ear development, cell proliferation, differentiation and hair cell regeneration. Therefore, it is extremely important to understand the mechanism of Notch, Wnt, FGF and other signaling pathways and related transcription factors in the process of mammalian inner ear hair

收稿日期: 2021-09-09 接受日期: 2021-12-06

贵州省科技厅(批准号: ZK (2021) 108)、贵州省教育厅(批准号: KY (2017) 113)和国家自然科学基金(批准号: 81960838)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18085108128, E-mail: 47734092@qq.com

Received: September 9, 2021 Accepted: December 6, 2021

This work was supported by the Science and Technology Department of Guizhou Province (Grant No.ZK (2021) 108), the Education Department of Guizhou Province (Grant No.KY (2017) 113), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81960838)

*Corresponding author. Tel:+86-18085108128, E-mail: 47734092@qq.com

cell regeneration. This article focuses on the regulation of the Notch signaling pathway and the interaction of related signal molecules in the regeneration of inner ear hair cells, aiming to analyze the regulation mechanism of cochlear hair cell proliferation and regeneration, and provide theoretical reference for experimental research and clinical application of deafness treatment.

Keywords inner ear hair cell regeneration; Notch; Wnt; FGF; signal interactions

耳聋和听力障碍是全球性重大的健康问题。耳是人类重要的听觉以及平衡器官,内耳毛细胞是听觉转换的关键感觉细胞,它能把声音转化为传送给大脑的电刺激,其损伤或丢失是诱发耳聋和听力丧失的主要原因之一。外界噪音的持续干扰、氨基糖苷类耳聋毒性药物和衰老创伤等因素都能导致毛细胞损伤^[1-2]。目前针对听力障碍的干预措施侧重于助听器和人工耳蜗植入,这些技术成本高昂且效果因人而异,不能从根本上治愈耳聋。因此耳聋相关的机制研究和干预治疗迫在眉睫。

随着内耳发育及毛细胞再生研究领域的发展,发现鸟类和鱼类等非哺乳类动物内耳损伤后通过两种机制来实现毛细胞再生。第一种是转分化,由内耳中的支持细胞转分化为毛细胞^[3],即以损失支持细胞为代价的再生方式;第二种是有丝分裂再生,即支持细胞或内耳祖细胞重新进入细胞周期进行增殖,由多种信号通路和相关转录因子的相互作用调控毛细胞的分化^[4]。然而,哺乳动物的内耳毛细胞损伤后不能自我更新,将导致永久性听觉功能障碍^[5]。研究者提出细胞疗法和基因疗法将是未来潜在的两种主要的耳聋治疗方式^[6]。其中,通过调节Notch、FGF和Wnt等相关信号通路使内耳中的支持细胞转分化为毛细胞或有丝分裂再生毛细胞来重塑哺乳动物的听力功能是一条有效的途径。

近年来,大量研究表明:Notch的侧向抑制和侧向诱导作用、Wnt的双重效应以及FGF信号转导在参与调控内耳发育、感觉上皮的细胞分化和增殖以及毛细胞再生的过程中不是单一作用的,而是相互协同或拮抗调控以促进听觉系统的构建。例如:在早期听基板诱导过程中,Wnt信号上调Notch配体Jag1,随后Jag1与Notch受体结合进一步增强Wnt的活性,以决定听基板结构^[7]。事实上,在耳前体区域开始分化后,FGF负调控因子Spry(sprouty)表达上调,抑制FGF信号并结合高表达的Notch/Wnt信号共同促进听基板细胞的分化^[8]。在内耳毛细胞再生过程中,Notch是Wnt信号的上游调控因子,Notch1敲除的

支持细胞增殖过程随着 β -catenin的缺失而消失,并且抑制Notch有助于Wnt介导支持细胞增殖并分化为毛细胞^[9]。此外,FGF也在Notch信号通路的调控下参与前感觉区域的维持和特化^[9]。因此,Notch、Wnt以及FGF信号通路组成重要的反馈回路,它们在复杂的网络中相互调节着彼此的表达,通过调控Atoh1和Sox2等相关转录因子的表达,共同参与内耳支持细胞的增殖以及毛细胞再生过程,本文就近年内耳毛细胞再生的相关信号通路及信号互作研究进展进行综述。

1 内耳毛细胞再生的相关信号通路

1.1 Notch信号通路

Notch信号通路是一种进化保守的局部细胞信号转导途径,参与调控胚胎发育、血管形成、神经发生及肿瘤形成等多种生理过程。哺乳类动物的内耳感觉上皮细胞中Notch配体Delta1、Jagged1和Jagged2与相邻细胞的受体Notch1和Notch2特异性结合,后者经不同蛋白酶(TACE、 γ -分泌酶)剪切得到的Notch受体胞内段(Notch intracellular domain, NICD)被释放到胞质中,并转移到细胞核内与CSL转录因子(CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1)以及MAML(Mastermind/Lag-3)蛋白家族结合,形成NICD-CSL-MAML转录激活物,驱动下游碱性螺旋-环-螺旋类转录因子(basic helix-loop-helix, bHLH)如Atoh1、Hes/Hey家族(hairy/enhancer of Split/Hey-hairy/enhancer of split related with YRPW motif family members)的转录表达。

Notch信号通路通过侧向抑制(lateral inhibition)和侧向诱导(lateral induction)作用来调控内耳感觉前体细胞的增殖,并维持耳蜗感觉上皮细胞数量和结构的稳态^[10]。其中侧向诱导作用是通过正反馈机制激活相邻细胞Jag1表达的,使细胞分化为内耳祖细胞,而侧向抑制作用是通过负反馈机制来调节内耳感觉前体细胞定向分化为毛细胞和支持细胞的过程及其嵌合体的形成^[11],如图1所示,活化的Notch受

体抑制信号细胞Notch配体(Jag2、Dll1)和神经源性基因*Atoh1*的表达,使信号细胞分化为支持细胞,而相邻细胞分化为毛细胞。

Notch信号通路在调控支持细胞和毛细胞的分化和内耳发育过程中起着非常重要的作用。研究显示,新生小鼠耳蜗毛细胞损伤后,支持细胞和其他非感觉上皮细胞中过表达Notch1,此时自发再生的毛细胞数量减少近92%^[12]。然而,通过典型Notch通路的抑制剂[如DAPT、LY411575(γ -分泌酶抑制剂)、TAPI-1(TACE抑制剂)]处理,抑制Notch信号,*Atoh1*在支持细胞中激活和积累,Hes1、Hes5下调,支持细胞转分化为具有功能性静纤毛束的毛细胞样细胞^[13]。此外,研究人员采用基因工程编辑技术使*Dll1*、*Jag2*或*Notch1*等Notch信号通路相关基因缺失或下调也能促使大量感觉毛细胞产生^[14]。值得注意的是:转分化再生方式将导致支持细胞的缺失,会造成新分化的毛细胞死亡,这是由于支持细胞有助于维持毛细胞适宜发育和微环境稳态^[15]。因此,消耗支持细胞以促进毛细胞再生并不是维持毛细胞数量的有效策略。SHU等^[4]将携带Myc/NICD的腺病毒注射到成年转基因小鼠的耳蜗中,短暂激活细胞周期性关键因子Myc和Notch1,有效地增加了支持细

胞和毛细胞数量。然而,再生毛细胞不完全具有成熟毛细胞特性,有短而均匀且不规则的立体纤毛结构。综上所述,Notch信号通路是感觉毛细胞的再生及发育的基础,抑制Notch通路可以促进静纤毛束的生成,但不足以形成成熟毛细胞。耳蜗发育过程中Notch信号不同的下游基因及其组合介导不同的听觉效应,其分子调控机制和时间表达模式能否有效促进成熟毛细胞再生以重塑听力仍需深入探索。

1.2 Wnt信号通路

Wnt信号通路是一种高度保守的信号通路,从低等至高等哺乳动物,其组成具有高度同源性,可分为三类:经典Wnt/ β -catenin信号通路、Wnt/平面细胞极性通路(Wnt/PCP信号通路)和Wnt/calcium信号通路^[16-17]。其中与内耳毛细胞再生及发育密切相关是Wnt/ β -catenin信号通路。当无Wnt配体时, β -catenin与由结肠腺瘤性息肉(adenomatous polyposis coli, APC)蛋白、轴蛋白(Axin)和糖原合成激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)组成的三元复合物结合,GSK3 β 使 β -catenin氨基末端磷酸化, β -catenin改变构象后被泛素连接酶复合物中的 β -Trcp识别,使 β -catenin泛素化并被蛋白酶体降解。致使细胞内的 β -catenin含量较低,不能活化细胞核

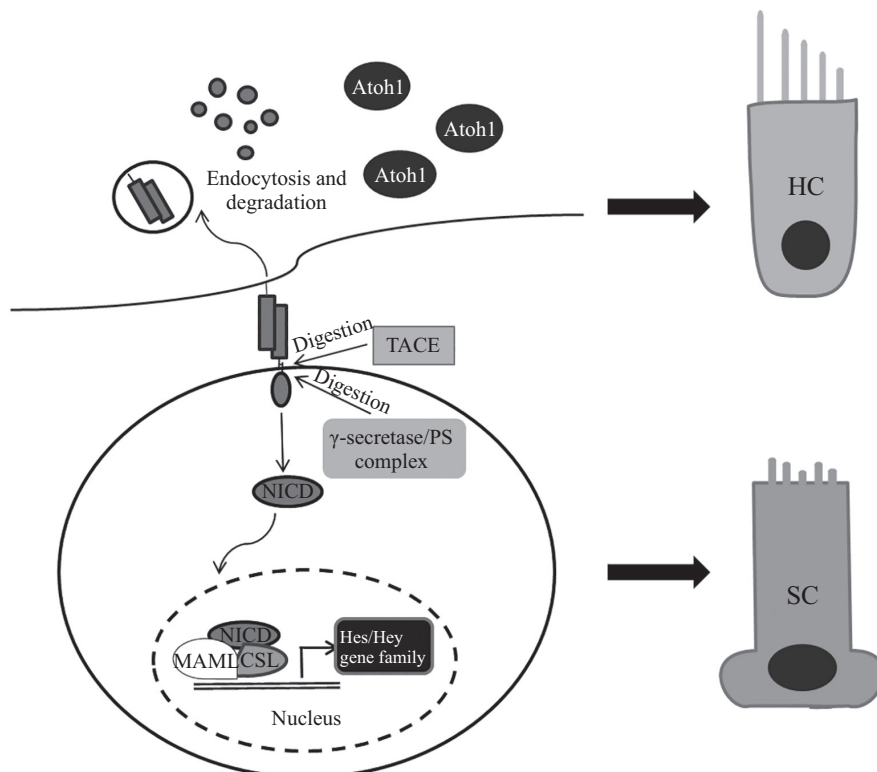


图1 Notch信号通路在支持细胞和毛细胞中的调控作用

Fig.1 The regulation of Notch signaling pathway in hair cells and supporting cells

内的TCF/LEF(T cell factor/lymphoid enhancer factor), 阻断了 *Atoh1*、*Lgr5*、*c-Myc*等 Wnt信号调控的下游靶基因的表达。当 Wnt配体存在时, 分泌型蛋白的 Wnt配体与 Wnt受体复合物 FZD/LRP5/6(frizzld/lipoprotein receptor related protein 5 or 6)结合, 破坏 APC/GSK3 β /Axin蛋白复合体, 导致游离的 β -catenin 进入核内与 TCF/LEF 结合, 从而激活 Wnt 信号通路介导的信号级联反应并发挥多种生物学功能^[18-19](图2)。

Wnt/ β -catenin 信号通路调控听基板的特化和耳泡的分化, 并在耳蜗感觉前体细胞和支持细胞中表达上调, 促进感觉前体细胞、支持细胞增殖和毛细胞的分化, 具有双重功能^[18]。典型的 Wnt 主要是向 *Lgr5*⁺ 祖细胞发出增殖信号, 该细胞既能在新生小鼠耳蜗毛细胞损伤后自发再生毛细胞又能在离体培养后分化为感觉毛细胞^[20]。ZHANG 等^[21]发现, *Fzd9*⁺ 细胞具有与 *Lgr5*⁺ 祖细胞相似的能力, 并且分化的毛细胞皆需 *Atoh1* 和 Notch 信号的辅助以维持其特性。研究表明, 氯化锂(LiCl)可激活 Wnt 信号下游靶点, 促进支持细胞和神经祖细胞增殖, 同时促进 *Atoh1* 介导的毛细胞自发再生^[22]。然而, 过表达 *DKK1* 会负调控 Wnt 信号, 从而抑制支持细胞分化和再生过程中的增殖^[23]。此外, 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路对毛细胞损伤具有一定的保护作用。LIU 等^[24]在用新霉素

(Neomycin) 诱导转基因小鼠毛细胞损伤的过程中发现, 上调 β -catenin 抑制了细胞凋亡相关基因(*Foxo3*、*Bim*)和活性氧 ROS 的表达水平, 使毛细胞的生长与发育得以维持。激活 Wnt 信号可阻断耳毒性药物引起炎症因子所介导的毛细胞阵列的破坏和脱落^[25]。综上所述, β -catenin 介导的 Wnt 信号通路在耳蜗毛细胞再生以及细胞毒性中的保护作用具有重要意义, 并且在内耳发育及毛细胞重塑方面的研究也值得深入探索。

1.3 FGF 信号通路

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)家族是一组结构相关的多肽生长因子, 也是高分泌碱性蛋白^[26]。现已发现有 22 种 FGFs 家族成员存在于哺乳动物中, 典型的 FGF 信号通路是细胞分泌的 FGFs 与同源跨膜蛋白受体 FGFR(FGFR1、FGFR2)结合, 随后与硫酸肝素蛋白多糖(heparin sulfate proteoglycans, HSPGs)作用形成一种包含 FGF、FGFR 和 HSPGs 的三分子聚合物, 其中 HSPGs 辅助 FGF 与 FGF 受体(FGFRs)的结合以及 FGFRs 的酪氨酸酶磷酸化, 并由此激活下游信号通路: 丝裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇-3-激酶-Akt(phosphoinositide 3-kinase-Akt, PI3K-Akt)、信号转导和转录激活子(signal

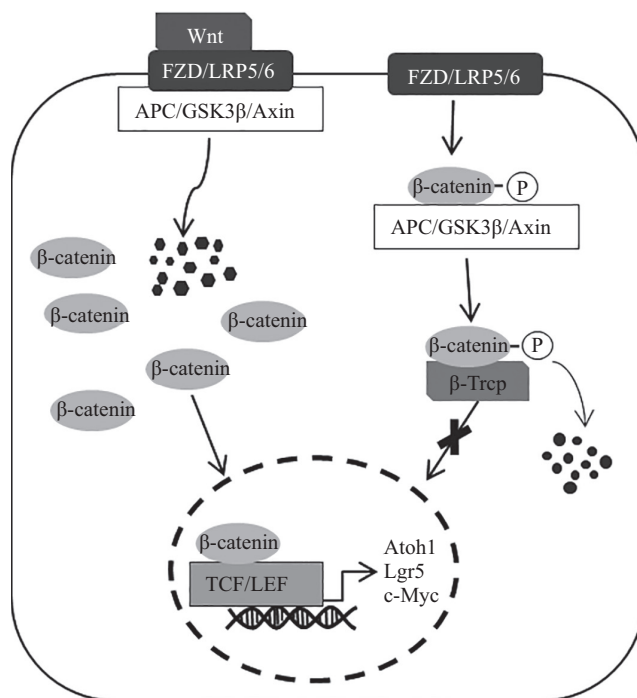


图2 Wnt信号通路

Fig.2 Wnt signaling pathway

transducer and activator of transcription, STAT)、m-TOR通路和磷脂酶C α /蛋白激酶C α (phospholipase C α /protein kinase C α , PLC γ /PKC α)^[31], 并且这些信号通路通过调控细胞核内基因表达, 进而在胚胎发育、伤口修复、炎症、恶性肿瘤生长和血管生成等许多生理和病理过程中起着关键作用^[27-28](图3)。

FGF信号通路与内耳听基板的诱导、耳泡形态发生和感觉上皮细胞的增殖及分化密切相关。其中FGF8和FGF3是Atoh1上游激活因子, 与Atoh1同时被激活会导致整个耳囊的背侧和侧壁中的毛细胞急剧扩张形成异位感觉区域^[29]。此外, 在新霉素损伤斑马鱼后的恢复期加入碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF), 可导致支持细胞和毛细胞数量相继增加^[30]。然而, FGF负信号调节因子Spry2可拮抗FGF8的表达, 阻止细胞命运转换, 维持内耳结构的稳态^[31]。事实上, 若在离体培养的小鼠耳蜗和鸟类基底乳头中添加FGF受体酪氨酸激酶抑制剂SU5402抑制FGF信号, 将实现毛细胞再生^[30]。综上所述, 复杂的FGF信号通路随着研究物种模型的改变所引起的效应有所不同, 但FGF通路是增殖祖细胞和支持细胞数目以及毛细胞再生所必需的。值得注意的是: FGF配体与受体在不同的内耳发育时期有冗余功能即不同基因具有相同或相似的功能。同一个FGF亚家族的FGF9和FGF20与间充质细胞的FGFR1和FGFR2结合, 可促进感觉上皮细胞增殖和分化。若单独敲除FGF9或FGF20, 不会导致神经祖细胞的增殖障碍, 但两者同时缺失可对祖

细胞增殖和耳蜗管长度变化产生显著影响^[9,32]。这说明, FGF9和FGF20在内耳毛细胞的发育及再生过程中具有相似的功能性。在后续的研究中, 深入探索FGF受体和配体在内耳耳蜗的发育表达谱, 将有助于我们了解FGF信号通路调控毛细胞和支持细胞形成的机制。

1.4 其他信号通路

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)属于转化生长因子- β 超家族, 参与调节内耳形态发生、创伤修复以及肿瘤治疗等生理学和病理学过程^[33]。在经典的BMP/Smad信号通路中, BMP配体与两种跨膜丝氨酸/苏氨酸受体形成复合物(BMPRI、BMPRII), 诱导BMPRII磷酸化BMPRI并使其活化, 接着招募下游Smad蛋白并启动下游信号转导。其中BMP4的时空表达在内耳感觉上皮的发育和毛细胞再生过程中起着关键作用。BMP4与受体结合可拮抗支持细胞中Atoh1(毛细胞转录因子)的积聚, 防止支持细胞转分化为毛细胞, 加入BMP4抑制剂Noggin可促进毛细胞数量增加^[34]。因此, BMP4在毛细胞再生过程中起着负调控作用。此外, 在小鼠耳蜗外植体中, 发现BMP4可正向调控Id13, 后者又通过抑制BMP拮抗基因*Grem1*的表达来维持BMP4的表达, 并指出BMP-Id信号通路是外毛细胞分化所必需的^[33]。

Hh(Hedgehog)信号通路是维持感觉前体细胞的特性, 毛细胞正常分化、排列以及听力功能所必需的^[35-36]。大多数脊椎动物都含有*Shh*(sonic hedgehog)、*Ihh*(indian hedgehog)和*Dhh*(desert hedgehog)三种

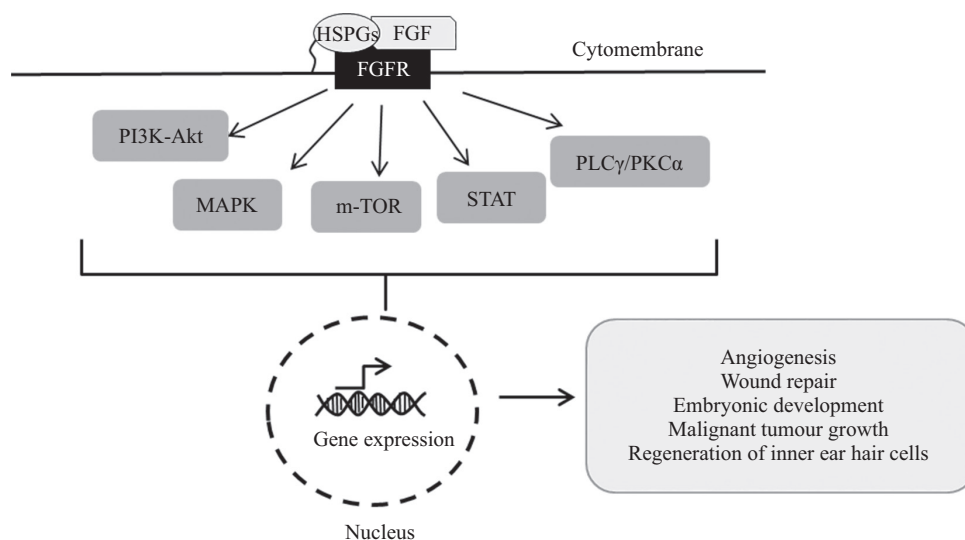


图3 FGF信号通路

Fig.3 FGF signaling pathway

Hh基因。其中对Shh信号通路研究较为广泛, Shh与受体Ptc(Patched)结合, 随之解除对Smo(smoothened)的抑制作用, 促使Gli蛋白复合物进入核内激活下游靶基因转录^[37]。小鼠耳蜗损伤后, 加入外源重组Shh蛋白处理Lgr5⁺祖细胞, 使得毛细胞的数量呈Shh蛋白剂量依赖性增加, 说明Lgr5⁺祖细胞向毛细胞的分化依赖于Hh信号传导^[35]。这可能是由于Shh诱导神经祖细胞中Atoh1的表达, 使神经祖细胞进入毛细胞谱系, 最终分化为新生的听觉毛细胞^[38]。

综上所述, 内耳毛细胞再生涉及Notch、FGF、Wnt、BMP和Shh等信号通路在不同时空表达模式中的单独或相互作用, 进而重塑毛细胞功能及生存微环境。

2 调控信号通路互作促进内耳毛细胞再生

成年哺乳动物的听觉毛细胞损伤会造成永久感音神经性耳聋, 再生毛细胞是重建内耳功能的重要方法。听觉毛细胞再生受多靶点多基因的共同调控, Notch、Wnt和FGF等信号通路之间相互作用所介导的细胞基因表达级联与信号协同调控内耳祖细胞或支持细胞的增殖和分化, 以获得新生内耳毛细胞。激活典型的Wnt信号通路可诱导支持细胞增殖和有限的毛细胞再结合Notch通路的下调促进更多的支持细胞向毛细胞转分化^[39]。Hes/Hey家族在FGF信号通路的调控下参与了听觉毛细胞和柱状细胞的分化^[40]。Notch还与Hh、BMP等信号通路互作在内耳感觉上皮各种细胞特化起着关键作用^[41-42]。因此, 阐述Notch信号通路以及Notch与相关因子互作在听觉细胞增殖和分化的调控作用, 研究内耳毛细胞的再生机制, 以明确信号互作调控对内耳功能再生的作用机制显得尤为重要。

2.1 Notch信号通路与Wnt信号通路互作

Notch和Wnt信号通路是高度保守的信号通路, 典型的Wnt和Notch介导的信号互作调节感觉上皮细胞间的空间模式、细胞增殖并诱导毛细胞再生^[43]。无论是在遗传学还是在药理学上, Notch抑制和Wnt激活的结合对支持细胞增殖和毛细胞再生具有协同调控作用^[44]。Wnt通路可正向调控Notch配体Jag1和下游基因Hes1和Hey1的表达, 其中Jag1存在 β -catenin结合的双TCF/LEF位点, Wnt/ β -catenin信号通路直接激活Jag1来调控Notch的侧抑制作用以维持有丝

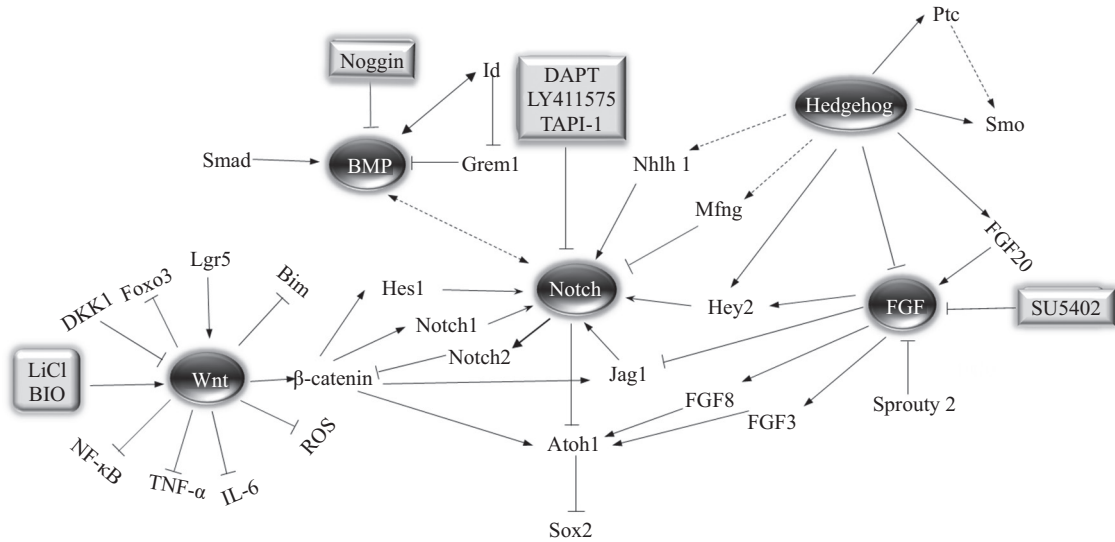
分裂增殖的支持细胞特性^[24-45]。此外, LI等^[43]通过使用DAPT处理小鼠耳蜗以及Notch1敲除小鼠模型, 发现Notch抑制主要通过上调 β -catenin的表达来激活典型的Wnt通路, 使Lgr5⁺祖细胞和Sox2⁺支持细胞重新进入细胞周期(CyclinD1的上调和P27kip1的下调), 并诱导祖细胞和支持细胞分化为毛细胞。然而, 在支持细胞的增殖和发育中, Wnt和Notch并非都是协同调控的。SAMARAJEEWA等^[46]的研究发现, 激活Wnt导致Sox2⁺支持细胞的Notch2表达下调, 以限制Wnt通路串扰引起的高水平Notch信号, 这种现象可能是一种负反馈调控机制。值得注意的是: 抑制Notch和激活Wnt诱导内耳毛细胞再生的效率较低, 并且这种再生途径伴有年龄依赖性。综上所述, Notch和Wnt在耳蜗的相互作用不足以重塑听觉功能, 结合Sox2⁺、FGF、SHH和BMP等相关的关键因子和信号通路协同调控将为恢复内耳毛细胞损伤引起的感音性神经耳聋提供新的研究方向。

2.2 Notch信号通路和FGF信号通路互作

FGF作为Notch的上游调控通路, 与Notch信号通路共同参与调控和维持内耳前感觉区域的发育、细胞数量和结构的稳态。Hey/Hes家族成员是Notch通路的重要下游靶基因, 其中Hey2的表达受FGF调控, Hey2通过抑制Hes5的表达来维持柱状细胞(一种支持细胞)的命运。FGF信号缺失后, Notch能冗余地维持Hey2的表达以及柱状细胞的特性, 但当两条通路均失活则导致Atoh1上调以及柱状细胞转分化为毛细胞^[47]。此外, 抑制FGF信号可上调Hey1、Hes5和下调Jag1的表达^[48]。因此, FGF和Notch的信号互作在内耳发育和感觉上皮细胞的特化中起着关键作用。MUNNAMALAI等^[49]研究发现, 加入外源性FGF20或FGF9均能减弱DAPT对FGF20的表达和前感觉区域中各种细胞形成的抑制作用。值得注意的是: 在缺乏FGF20的情况下, Notch信号的侧抑制作用不能诱导依赖FGF20介导的感觉前体细胞分化为毛细胞^[9]。上述研究表明, Notch通路介导的支持细胞增殖和毛细胞分化部分依赖FGF信号通路的协同作用。然而FGF与Notch在耳蜗发育以及毛细胞再生中的相互作用机制还需进一步的研究。

2.3 Notch信号通路与其他信号通路互作

Notch还与Shh、BMP等信号通路互作参与调控内耳毛细胞的再生过程。BAI等^[50]利用庆大霉素处理小鼠耳蜗发现, Notch抑制剂DAPT和BMP抑制



→ : 激活; ⊖ : 抑制; ···· : 有待验证; 方块: 信号通路相关的抑制剂或激活剂; 椭圆: 信号通路。

→ : activation; ⊖ : inhibition; ···· : to be verified; square: activators or inhibitors of signaling pathways; ellipse: signaling pathways.

图4 内耳毛细胞再生过程中的信号互作网络

Fig.4 Signal interaction networks regulate hair cell regeneration in the inner ear

剂Noggin联合处理组诱导的毛细胞数量显著高于DAPT、Noggin单独处理组。与之相类似的另一项研究中, DAPT、Noggin以及LiCl联合治疗能在不消耗支持细胞的情况下, 实现毛细胞的再生^[41]。上述研究揭示, Notch、BMP和Wnt在毛细胞再生过程中具有协同作用。此外, 在毛细胞再生研究领域, Notch与Hedgehog信号通路也存在互作。研究表明: Notch靶基因*Hey1*和*Hey2*在Hedgehog信号通路的调控下参与原感觉上皮结构的形成^[51], 并且与FGF20协同参与了前感觉细胞的维持, 过表达的Hedgehog可能延缓依赖于FGF20-*Hey2*介导的柱状细胞分化进程, 但下调Hedgehog可阻断FGF20的表达从而促进依赖于Notch信号转导的毛细胞形成^[42]。因此, Notch、Hedgehog和FGF信号通路在内耳感觉上皮特化过程中构成了一个复杂的反馈回路。CHEN等^[35]在实验中使用新霉素破坏小鼠耳蜗毛细胞, 以激活支持细胞中的Hedgehog信号, 发现Notch信号的负调控因子Mfng和靶基因*Nhh1*均上调并且感觉上皮细胞数量均显著增加, 这揭示Mfng和*Nhh1*可能是Hedgehog调控Notch信号通路介导的神经祖细胞分化和毛细胞形成的中介因子^[52,55]。然而Hedgehog和Notch在内耳毛细胞再生中的确切互作关系目前仍不清晰, 需进一步深入探索。

综上所述, Notch、FGF、Wnt、BMP和Hedgehog等信号通路之间的信号级联效应进一步揭示了

有效的毛细胞再生是一个复杂的过程(图4)。多种信号通路之间存在协同效应和拮抗作用。因此, 需要深入研究互作效应的关键因子, 以及其基因产物如何在时空表达模式中紧密互作, 以调控毛细胞再生。

3 总结和展望

综上所述, Notch信号通路及其相关的信号通路在内耳耳蜗发育、细胞增殖分化和毛细胞再生过程中起着重要调控和维持作用。通过药物干扰或基因敲除下调Notch信号通路能促进早期毛细胞标记基因*Atoh1*的表达, 从而促使毛细胞再生。*Atoh1*表达会下调Sox2, Sox2通过上调Hes/Hey家族及Aotch1拮抗因子以控制毛细胞数量^[54-55]。然而仅调控Notch信号不足以高效和持续地再生成熟的毛细胞, 需要Notch上游或下游的信号通路及相关转录因子协助或拮抗完成毛细胞结构的重塑。上文的表述揭示信号互作是复杂多变的, Notch和Wnt、FGF、BMP以及Hedgehog的信号互作最终结果取决于信号细胞能力状态以及信号通路间各成员的时空表达模式, 而这又随着细胞的发育过程而发生变化, 信号间偶联机理的深入探索为毛细胞的增殖和再生的有效控制提供理论策略。

目前研究中大多使用DAPT抑制Notch信号诱导额外的毛细胞, 然而, γ -分泌酶抑制剂除抑制Notch受体外还能切割大量的细胞表面蛋白, 对毛

细胞发育是否具有副作用需深入探索并且Notch信号的抑制剂需进一步开发^[56]。DU等^[57]将生物相容性聚乳酸纳米粒(PLGA NPs)包裹的Notch通路基因(*Hes1*)的小干扰RNA(siRNAs)导入噪声损伤的成年豚鼠耳蜗,使得毛细胞再生范围扩大,进而促进成年豚鼠的听力恢复。此外,陈智斌等^[58]发现,miR-385-5p即微型miRNA(microRNA)对Notch1和DII4具有负调控作用,为内耳毛细胞再生和修复提供新的干预靶点。因此,后续研究除了适当调节Wnt、Notch、FGF和其他通路多重效应表达以及通过靶向表观遗传修饰来改变支持细胞增殖或转分化的关键基因的活性外,还可在体内探索调控Notch以及其他信号通路相关的miRNA和siRNA,为内耳毛细胞再生基因治疗的实现开辟新的途径,进一步加深对内耳毛细胞再生过程的理解,为治疗感音性神经耳聋提供理论依据,以便更好地指导并实现毛细胞再生,重筑内耳听力功能。

参考文献 (References)

- [1] WELLS H R R, NEWMAN T A, WILLIAMS F M K. Genetics of age-related hearing loss [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(9): 1698-704.
- [2] GUO J, CHAI R, LI H, et al. Protection of hair cells from ototoxic drug-induced hearing loss [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1130: 17-36.
- [3] KONG L, XIN Y, CHI F, et al. Developmental and functional hair cell-like cells induced by *Atoh1* overexpression in the adult mammalian cochlea *in vitro* [J]. *Neural Plast*, 2020, 2020: 8885813.
- [4] SHU Y, LI W, HUANG M, et al. Renewed proliferation in adult mouse cochlea and regeneration of hair cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5530.
- [5] NI W, LIN C, GUO L, et al. Extensive supporting cell proliferation and mitotic hair cell generation by *in vivo* genetic reprogramming in the neonatal mouse cochlea [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(33): 8734-45.
- [6] DING J, TANG Z, CHEN J, et al. Induction of differentiation of human embryonic stem cells into functional hair-cell-like cells in the absence of stromal cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81(Pt A): 208-22.
- [7] JAYASENA C S, OHYAMA T, SEGIL N, et al. Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode [J]. *Development*, 2008, 135(13): 2251-61.
- [8] WRIGHT K D, MAHONEY ROGERS A A, ZHANG J, et al. Cooperative and independent functions of FGF and Wnt signaling during early inner ear development [J]. *BMC Dev Biol*, 2015, 15: 33.
- [9] HUH S H, JONES J, WARCHOL M E, et al. Differentiation of the lateral compartment of the cochlea requires a temporally restricted FGF20 signal [J]. *PLoS Biol*, 2012, 10(1): e1001231.
- [10] BROWN R, GROVES A K. Hear, Hear for Notch: control of cell fates in the inner ear by Notch signaling [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 370.
- [11] KIERNAN A E, CORDES R, KOPAN R, et al. The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear [J]. *Development*, 2005, 132(19): 4353-62.
- [12] MCGOVERN M M, ZHOU L, RANDLE M R, et al. Spontaneous hair cell regeneration is prevented by increased Notch signaling in supporting cells [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 120.
- [13] LI Y, JIA S, LIU H, et al. Characterization of hair cell-like cells converted from supporting cells after Notch inhibition in cultures of the organ of corti from neonatal gerbils [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 73.
- [14] JUNG J Y, AVENARIUS M R, ADAMSKY S, et al. siRNA targeting *Hes5* augments hair cell regeneration in aminoglycoside-damaged mouse utricle [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(4): 834-41.
- [15] WAN G, CORFAS G, STONE J S. Inner ear supporting cells: rethinking the silent majority [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2013, 24(5): 448-59.
- [16] SHI F, HU L, JACQUES B E, et al. beta-Catenin is required for hair-cell differentiation in the cochlea [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(19): 6470-9.
- [17] GORDON M D, NUSSE R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22429-33.
- [18] 范晴晴, 孟飞龙, 房冉, 等. Wnt信号通路在毛细胞分化和再生过程中的作用[J]. *遗传*(FAN Q Q, MENG F L, FANG R, et al. Functions of Wnt signaling pathway in hair cell differentiation and regeneration [J]. *Hereditas*), 2017, 39(10): 897-907.
- [19] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/beta-Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-99.
- [20] JIANG H, ZENG S, NI W, et al. Unidirectional and stage-dependent roles of Notch1 in Wnt-responsive *Lgr5*⁺ cells during mouse inner ear development [J]. *Front Med*, 2019, 13(6): 705-12.
- [21] ZHANG S, LIU D, DONG Y, et al. Frizzled-9⁺ supporting cells are progenitors for the generation of hair cells in the postnatal mouse cochlea [J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 184.
- [22] JACQUES B E, MONTGOMERY W H, URIBE P M, et al. The role of Wnt/beta-catenin signaling in proliferation and regeneration of the developing basilar papilla and lateral line [J]. *Dev Neurobiol*, 2014, 74(4): 438-56.
- [23] HEAD J R, GACIOCH L, PENNISI M, et al. Activation of canonical Wnt/beta-catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line [J]. *Dev Dyn*, 2013, 242(7): 832-46.
- [24] LIU L, CHEN Y, QI J, et al. Wnt activation protects against neomycin-induced hair cell damage in the mouse cochlea [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2136.
- [25] KIM S J, LIM J Y, LEE J N, et al. Activation of beta-catenin by inhibitors of glycogen synthase kinase-3 ameliorates cisplatin-induced cytotoxicity and pro-inflammatory cytokine expression in HEI-OC1 cells [J]. *Toxicology*, 2014, 320: 74-82.
- [26] BEENKEN A, MOHAMMADI M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(3): 235-53.
- [27] XIE Y, SU N, YANG J, et al. FGF/FGFR signaling in health and

- disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 181.
- [28] BERMINGHAM-MCDONOGH O, LEE S G, HUANG M, et al. Myc and Fgf are required for zebrafish neuromast hair cell regeneration [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157768.
- [29] SWEET E M, VEMARAJU S, RILEY B B. Sox2 and Fgf interact with Atoh1 to promote sensory competence throughout the zebrafish inner ear [J]. *Dev Biol*, 2011, 358(1): 113-21.
- [30] JACQUES B E, DABDOUB A, KELLEY M W. Fgf signaling regulates development and transdifferentiation of hair cells and supporting cells in the basilar papilla [J]. *Hear Res*, 2012, 289(1/2): 27-39.
- [31] SHIM K, MINOWADA G, COLING D E, et al. Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(4): 553-64.
- [32] HUH S H, WARCHOL M E, ORNITZ D M. Cochlear progenitor number is controlled through mesenchymal FGF receptor signaling [J]. *Elife*, 2015, 4: e05921.
- [33] SAKAMOTO S, TATEYA T, OMORI K, et al. Idgenes are required for morphogenesis and cellular patterning in the developing mammalian cochlea [J]. *Dev Biol*, 2020, 460(2): 164-75.
- [34] LEWIS R M, KELLER J J, WAN L, et al. Bone morphogenetic protein 4 antagonizes hair cell regeneration in the avian auditory epithelium [J]. *Hear Res*, 2018, 364: 1-11.
- [35] CHEN Y, LU X, GUO L, et al. Hedgehog signaling promotes the proliferation and subsequent hair cell formation of progenitor cells in the neonatal mouse cochlea [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 426.
- [36] LU N, CHEN Y, WANG Z, et al. Sonic hedgehog initiates cochlear hair cell regeneration through downregulation of retinoblastoma protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(2): 700-5.
- [37] GOROJANKINA T. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(7): 1317-32.
- [38] HU X, HUANG J, FENG L, et al. Sonic hedgehog (SHH) promotes the differentiation of mouse cochlear neural progenitors via the Math1-Brn3.1 signaling pathway *in vitro* [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(5): 927-35.
- [39] WAQAS M, ZHANG S, HE Z, et al. Role of Wnt and Notch signaling in regulating hair cell regeneration in the cochlea [J]. *Front Med*, 2016, 10(3): 237-49.
- [40] LUSH M E, DIAZ D C, KOENECKE N, et al. scRNA-Seq reveals distinct stem cell populations that drive hair cell regeneration after loss of Fgf and Notch signaling [J]. *eLife*, 2019, 8: e44431.
- [41] BAI H, YANG S, XI C, et al. Signaling pathways (Notch, Wnt, Bmp and Fgf) have additive effects on hair cell regeneration in the chick basilar papilla after streptomycin injury *in vitro*: additive effects of signaling pathways on hair cell regeneration [J]. *Hear Res*, 2021, 401: 108161.
- [42] TATEYA T, IMAYOSHI I, TATEYA I, et al. Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea [J]. *Development*, 2013, 140(18): 3848-57.
- [43] LI W, WU J, YANG J, et al. Notch inhibition induces mitotically generated hair cells in mammalian cochleae via activating the Wnt pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(1): 166-71.
- [44] WU J, LI W, GUO L, et al. The crosstalk between the Notch, Wnt, and SHH signaling pathways in regulating the proliferation and regeneration of sensory progenitor cells in the mouse cochlea [J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 386(2): 281-296.
- [45] M. K. Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 17(4): 681-5.
- [46] SAMARAJEEWA A, LENZ D R, XIE L, et al. Transcriptional response to Wnt activation regulates the regenerative capacity of the mammalian cochlea [J]. *Development*, 2018, 145(23): dev1666579.
- [47] DOETZLHOFFER A, BASCH M L, OHYAMA T, et al. Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(1): 58-69.
- [48] PETROVIC J, GALVEZ H, NEVES J, et al. Differential regulation of Hes/Hey genes during inner ear development [J]. *Dev Neurobiol*, 2015, 75(7): 703-20.
- [49] MUNNAMALAI V, HAYASHI T, BERMINGHAM-MCDONOGH O. Notch prosensory effects in the mammalian cochlea are partially mediated by FGF20 [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(37): 12876-84.
- [50] BAI H, JIANG L, WANG X, et al. Transcriptomic analysis of mouse cochleae suffering from gentamicin damage reveals the signalling pathways involved in hair cell regeneration [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10494.
- [51] BENITO-GONZALEZ A, DOETZLHOFFER A. Hey1 and Hey2 control the spatial and temporal pattern of mammalian auditory hair cell differentiation downstream of Hedgehog signaling [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(38): 12865-76.
- [52] BASCH M L, BROWN R M, 2ND, JEN H I, et al. Fine-tuning of Notch signaling sets the boundary of the organ of Corti and establishes sensory cell fates [J]. *eLife*, 2016, 5: e19921.
- [53] ZAK M, VAN OORT T, HENDRIKSEN F G, et al. LGR4 and LGR5 regulate hair cell differentiation in the sensory epithelium of the developing mouse cochlea [J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 186.
- [54] NEVES J, VACHKOV I, GIRALDEZ F. Sox2 regulation of hair cell development: incoherence makes sense [J]. *Hear Res*, 2013, 297: 20-9.
- [55] NEVES J, UCHIKAWA M, BIGAS A, et al. The prosensory function of Sox2 in the chicken inner ear relies on the direct regulation of Atoh1 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30871.
- [56] HAAPASALO A, KOVACS D M. The many substrates of presenilin/gamma-secretase [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 25(1): 3-28.
- [57] DU X, CAI Q, WEST M B, et al. Regeneration of cochlear hair cells and hearing recovery through Hes1 modulation with siRNA nanoparticles in adult guinea pigs [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(5): 1313-26.
- [58] 陈智斌, 浦懋懋, 姚俊, 等. 靶向Notch信号通路与内耳发育相关microRNA的筛选及microRNA-384-5p的实验分析 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志 (CHEN Z B, PU M M, YAO J, et al. Screening of micornas targeting Notch signaling pathway implicated in inner ear development and the role microRNA-384-5p [J]. Chinese journal of Otolaryngology Head and Neck Surgery), 2018, 53(11): 830-7.*