

DOI: 10.13376/j.cbbs/2025071

文章编号: 1004-0374(2025)06-0717-07

腺病毒介导Notch与Wnt通路对小鼠内耳 毛细胞再生的研究进展

张信文^{1,3*}, 翁梦露², 赵汝霞², 杨思远^{1,2}, 牛巧花², 曾少举^{2*}

(1 海南科技职业大学医药学院, 海口 571126; 2 北京师范大学基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875; 3 海南师范大学生命科学学院, 海口 571158)

摘要: 人类及其他哺乳动物的耳蜗毛细胞一旦受损便无法再生修复, 从而导致永久性的听力损伤。研究发现, 通过腺病毒携带特定基因调控 Notch 与 Wnt 信号通路, 可在小鼠内耳中实现部分毛细胞的再生。通过构建腺病毒 NICD-RNAi 抑制 Notch 信号通路, 以及 β -catenin-AD 激活 Wnt 信号通路, 转染庆大霉素损伤的鼠耳蜗后, 结果显示较低滴度腺病毒仅转染支持细胞, 而较高滴度病毒能同时转染支持细胞和部分毛细胞。NICD-RNAi-AD 能促进支持细胞通过直接转分化再生出毛细胞; β -catenin-AD 能促进支持细胞有丝分裂并向毛细胞分化。这些研究表明, 通过腺病毒介导 Notch 信号通路的抑制和 Wnt 信号通路的激活, 可实现小鼠毛细胞损伤后的部分再生, 这为治疗听力丧失提供了一种新的可能途径。本文对调控 Notch 与 Wnt 信号通路的机制及其在内耳毛细胞再生中的相关研究进行了系统总结, 为未来毛细胞受损后的再生修复予以展望。

关键词: 腺病毒转染; Notch 通路; Wnt 通路; 毛细胞再生; 小鼠

中图分类号: {Q28}; R764.3 **文献标志码:** A

Research progress on adenovirus-mediated Notch and Wnt pathways in the regeneration of hair cells in the mouse inner ear

ZHANG Xin-Wen^{1,3*}, WENG Meng-Lu², ZHAO Ru-Xia², YANG Si-Yuan^{1,2}, NIU Qiao-Hua², ZENG Shao-Ju^{2*}

(1 College of Pharmacy, Hainan Vocational University of Science and Technology, Haikou 571126, China; 2 Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3 College of Life Science, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: In humans and other mammals, once the hair cells in the cochlea are damaged, they cannot regenerate naturally, leading to permanent hearing loss. Research has found that by using adenovirus vectors carrying specific genes to regulate the activities of Notch and Wnt signaling pathways, partial regeneration of hair cells can be achieved in the inner ear of mice. Specifically, adenoviral vectors designed to modulate these two signaling pathways were first constructed. By using qt-PCR, it was found that after successful transfection into the inner ear tissue, the activities of Notch signaling pathway have been effectively inhibited by NICD-RNAi while the activities of Wnt signaling pathway have been significantly activated after infection with β -catenin-AD. In the experiment, a mouse model of inner ear hair cell damage was established using gentamicin, observing a gradient increase from the apex to the base of the cochlea. Subsequently, empty adenoviruses were transfected into the inner ear at different titers, revealing that at lower titers, supporting cells were primarily infected by the adenoviruses, whereas at higher

收稿日期: 2024-11-03; 修回日期: 2024-12-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860269); 海南省自然科学基金项目(319QN238)

*通信作者: E-mail: zhangxw2844@sina.com (张信文); sjzeng@bnu.edu.cn (曾少举)

titers, both supporting and hair cells were infected. Further, after NICD-RNAi-AD and β -catenin-AD were separately transfected into the gentamicin-damaged inner ears of mice, the former promoted the direct transdifferentiation of supporting cells into hair cells, while the latter stimulated the mitotic division of supporting cells and guided their differentiation towards hair cells. These results indicate that by using adenovirus vector technology to inhibit the Notch signaling pathway and activate the Wnt signaling pathway, partial regeneration of hair cells can be obtained after inner ear damage in mice, providing new strategy for the treatment of hearing loss. This review outlines the studies on hair cell regeneration after damage and the mechanisms under which Notch and Wnt signaling pathways are involved in these processes, and also provides some prospects of gene therapy for the loss of hair cells.

Key words: adenovirus transfection; Notch signaling pathway; Wnt signaling pathway; hair cell regeneration; mouse

鸟类及其他非哺乳动物毛细胞 (hair cells, HCs) 受到噪声或者庆大霉素影响损伤后, 一周会自我再生恢复, 长出新的毛细胞并且恢复听觉; 而哺乳动物内耳毛细胞一旦受到损伤将无法再生修复, 导致听力出现永久性丧失^[1]。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 发布《世界听力报告》指出: 目前约有 4.3 亿人的听力受到中度及以上的损伤, 近 80% 的听力受损患者来自中低收入国家, 并且大多数患者都无法接受治疗^[2]。造成听力损伤的原因有很多, 例如服用耳毒性药物 (包括滥用氨基糖苷类抗生素)、长时间使用耳机、长期有负面情绪、身体过度劳累、压力过大、自然衰老、长期处于噪声环境和遗传因素等^[3-4]。目前临床上主要采用人工电子耳蜗植入, 但不能从根本上恢复自然听力^[4-5]。若通过药物调控信号通路促进毛细胞的再生, 临床治疗上存在一些局限性, 如药物可能无法通过血-内耳屏障等^[5]。毛细胞的再生过程在很大程度上与其发育过程相似^[6], 利用基因治疗手段, 通过转染相关病毒调控毛细胞发育和再生过程中的 Notch、Wnt 等信号通路^[7], 使哺乳动物内耳支持细胞再生, 参与损伤后的毛细胞修复, 可为人类内耳毛细胞损伤后的再生与修复提供新的策略。

1 Notch与Wnt信号通路对内耳毛细胞发育与再生的调控作用

研究证明鸡与小鼠的毛细胞发育和再生在形态和结构上很相似^[6], 多条重要的信号通路 (Notch、FGF、BMP、Wnt、Hh) 参与调控毛细胞发育和再生。在非哺乳类动物中, 损伤后的毛细胞可通过支持细胞 (supporting cells, SCs) 有丝分裂或直接转分化方式得以补充修复, Notch 和 Wnt 信号通路是毛细胞再生与分化中起关键作用的两条信号

通路^[7-8]。

1.1 腺病毒介导Notch信号通路活性改变对小鼠耳蜗毛细胞再生的影响

研究表明, Notch 信号通路和毛细胞再生密切相关, 具有诱导哺乳动物内耳毛细胞再生的潜能^[7-8]。通过使用小分子药物 DAPT 或 LY411575 抑制小鼠 Notch 信号通路活性, 能促进毛细胞的再生^[9]; 激活 Notch 信号通路会阻止毛细胞再生^[7, 10]。Notch 信号通路受到抑制时, *Atoh1*、*Gfi1* 和 *Pou4f3* 上调, 导致支持细胞向毛细胞方向分化^[11-13]。Notch 信号通路可作用于细胞周期抑制因子 p27^{kip1} 的上游^[8], 抑制细胞增殖。在毛细胞再生过程中, Notch 靶基因 (*Hes1*、*Hes5*、*Hey1*、*HeyL* 和 *Jagged1*) 都表达下调, 间接导致毛细胞命运决定的关键基因 *Atoh1* 表达上调, 从而诱导毛细胞的生成^[10, 14-15]。

1.2 Wnt信号通路对内耳毛细胞发育和再生的调控作用

在小鼠耳蜗发育的早期阶段, Wnt 信号通路调控毛细胞的命运、细胞分裂和分化等^[7, 16]。体外添加 Wnt 信号通路的激动剂 (LiCl), 或 GSK3 的抑制剂 (Azakenpaullone, AZK) 激活 Wnt 信号通路, 可促进表达 Sox2 的前感觉区域形成, 增加毛细胞的数量^[17]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键蛋白, 它移入细胞核内可激活下游靶基因表达, 这些靶基因控制着干细胞的增殖和分化。在 β -catenin 转基因小鼠中, 降低 β -catenin 的表达会抑制前感觉细胞和毛细胞的分化, 而过表达 β -catenin 会促进毛细胞的形成^[7, 16]。另外, 通过逆转录病毒载体过表达 β -catenin 以激活 Wnt 信号通路, 发现小鸡感觉上皮中会产生异位毛细胞^[18-19]。*Atoh1* 基因 3' 端增强子部位有 β -catenin 靶向结合点。 β -catenin

表达水平增加,导致 *Atoh1* 上调,诱导毛细胞生成^[7, 18, 20]。

1.3 毛细胞发育和再生中Notch和Wnt信号通路的联合调控作用

在鸡与小鼠实验中,通过药物调节单条 Notch 或 Wnt 信号通路来促进毛细胞的再生,并不能获得非常好的结果^[7, 18]。因为在内耳发育过程中信号通路之间存在相互影响,共同调控毛细胞的再生^[21-22]。Notch 和 Wnt 信号在毛细胞分化中是必不可少的两条联合作用通路^[9, 22-23]。若单独调控 Notch 信号通路,会促进 *Atoh1*、*Gfi* 和 *Pou4f3* (调控毛细胞命运的关键基因)上调,从而使支持细胞以直接转分化方式生成毛细胞,但是长期采取此方式,会导致支持细胞数量耗竭,不利于后续再生毛细胞的存活^[11, 23-24]。若单独调控 Wnt 信号通路,会促进 *Ki67*、*Ccnb1*、*Dbf4*、*Nuf2* 和 *Kifc1* (支持细胞增殖的关键基因)上调,诱导支持细胞增殖,通过有丝分裂形成少量的毛细胞^[25]。研究发现 Notch 信号通路对 Wnt 通路活性有负调控作用,可降低 β -catenin 的表达,并促进支持细胞增殖的关键基因(*Ki67*、*Ccnb1*、*Dbf4*、*Nuf2* 和 *Kifc1*)下调,从而对支持细胞增殖起抑制作用^[7, 11, 23-25]。因此,这两条信号通路对支持细胞增殖有相反的作用。通过上调 β -catenin 来激活 Wnt 信号通路,同时干扰 Notch1 来抑制 Notch 信号通路活性,这种方法可使大量表达干细胞标志基因的 *Lgr5*⁺ 支持细胞增殖, *Atoh1* 表达上调,从而使耳蜗支持细胞通过转分化的方式再生毛细胞^[7, 11, 15, 25]。将以上方法运用在前庭中,也能使前庭的毛细胞显著增加^[15]。

在新生小鼠耳蜗中,用药物同时增强 Wnt 信号通路活性和降低 Notch 信号通路活性,可促进支持细胞以细胞分裂方式再生毛细胞,且再生的毛细胞数量比调节单条通路显著增加^[7, 12, 22, 26]。此外,也可共同激活 *Math1* 和 β -catenin,达到支持细胞增殖和促进内耳支持细胞通过转分化再生更多毛细胞的结果^[7, 26-27]。在转基因鼠中将 Notch1 敲除以阻断 Notch 信号通路,同时敲除 β -catenin 的外显子 3 (exon3) 来激活 Wnt 信号通路,发现双通路调控虽然比单独调控 Notch 信号通路的毛细胞再生总数量略少,但比单独调控 Wnt 信号通路产生的毛细胞数量显著增多^[22]。在毛细胞发育和再生过程中,联合调控 Notch 和 Wnt 信号通路活性可避免支持细胞过度耗竭,促进毛细胞损伤后的再生修复^[23-24, 28]。

2 腺病毒和腺相关病毒介导毛细胞损伤后的再生与修复

2.1 基因治疗应用于内耳毛细胞损伤后的再生修复

在基因治疗 (gene therapy) 中,利用载体将外源基因或基因调控元件导入内耳细胞,从而治疗听力损伤疾病^[29]。通过基因治疗可使 *GJB2* 缺失小鼠恢复部分听力^[30],上调 bHLH 转录因子 (如 *Atoh1*) 表达或者用 siRNA 降低 Notch 信号通路活性,可促进耳蜗感觉上皮中的支持细胞转分化为毛细胞^[31],基因治疗已逐渐在临床上得到应用^[32]。基因治疗中需要基因导入载体,其中一类是非病毒载体 (例如质粒)。质粒转染到耳蜗听觉细胞的效率低,因此不是耳蜗基因治疗的有效载体^[33]。另一类是病毒载体,常见的是腺病毒 (adenovirus, AD)^[34]、腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV)^[33, 35]、单纯疱疹病毒 (HSV)、慢病毒 (LV) 和逆转录病毒 (retrovirus)^[29, 36] 等。不同病毒载体具有不同的优缺点,因此选取安全有效的病毒载体是基因治疗的关键。研究表明慢病毒 (LV)、单纯疱疹病毒 (HSV) 和逆转录病毒都不能有效转染哺乳动物耳蜗的听觉细胞^[29, 37],它们通常不作为内耳基因治疗的病毒。在内耳基因治疗中使用比较多的病毒载体是腺病毒和腺相关病毒^[7, 33, 35]。

2.2 腺病毒和腺相关病毒应用于内耳毛细胞损伤后的再生修复

许多研究通过小分子药物调节几种与发育再生相关的信号通路使毛细胞再生^[38-40],但耳蜗的药物治疗在临床运用中具有许多缺点,如很多药物可能无法通过血-内耳屏障,药物传递难度高,以及系统用药潜在的不良反应^[29, 31-32]。因此,尝试基因治疗方法,调节与内耳发育及毛细胞损伤后再生修复相关的信号通路,促使哺乳动物的毛细胞再生,已受到人们的关注。基因治疗使用的病毒载体包括腺病毒 (AD) 和腺相关病毒 (AAV),两种病毒载体的优缺点如下^[7, 18, 24, 41]:

1) 腺相关病毒能将携带的基因整合到宿主中,可高效转染毛细胞和螺旋神经节细胞,所转染基因能长时间表达,但极少转染到支持细胞中^[7, 33, 35, 41-42],因此腺相关病毒比较适用于治疗遗传性耳聋^[7, 33, 35, 41-42],但有一些缺点,例如腺相关病毒会插入宿主基因组,具有安全隐患,不适用于非遗传因素导致的基因治疗^[7, 33, 35, 41-43]。

2) 毛细胞损伤后再生修复的来源是支持细胞,因此支持细胞是病毒载体转染目的基因的靶细胞。

腺病毒转染支持细胞效率比腺相关病毒高,感染时不会将目的基因整合到宿主基因组内,仅在宿主中短暂表达后就被清除,因此安全系数相对较高。此外,腺病毒承载的外源基因长度比腺相关病毒大^[7,44]。基于毛细胞因非遗传因素损伤后的再生修复,与腺相关病毒相比,腺病毒更适合作为基因治疗的载体^[7,42-44]。

3) 腺病毒能转染到分裂细胞和非分裂细胞中,转染时不会引起耳蜗形态的变化^[7, 24, 44, 45]。腺病毒介导毛细胞形成的关键因子 *Atoh1* 表达上调,可使损伤后的前庭毛细胞数量增加^[46-48]。利用腺病毒介导某些神经营养因子的表达,可在一定程度上治疗因耳毒性药物或噪声等因素造成的内耳听力疾病^[5, 28, 29, 47],在非遗传因素导致的听力损伤中,腺病毒是安全有效的病毒载体^[7, 29, 36, 44]。但腺病毒也同样存在一些缺点,例如感染细胞类型的特异性不强、目的基因持续表达时间短暂、机体会产生应对感染细胞的免疫毒性等^[7, 45]。

3 腺病毒介导Notch与Wnt信号通路对小鼠毛细胞损伤后的再生修复

我们以小鼠为实验对象,通过腺病毒携带目的基因或片段,抑制 Notch 和激活 Wnt 信号通路活性,可实现小鼠内耳损伤后部分毛细胞的再生修复^[7]。

3.1 重组腺病毒对Notch与Wnt信号通路的作用效果

当小鼠内耳毛细胞受损时,为了让支持细胞尽可能转变为毛细胞,我们选择腺病毒作为基因载体,将目的基因导入小鼠内耳支持细胞中,从而抑制 Notch 和激活 Wnt 信号通路活性^[7]。

研究表明腺病毒滴度影响转染细胞的类型和转染细胞的效率^[1, 48]。包装合成抑制 Notch 信号通路的 NICD-RNAi-AD 后,通过 RT-PCR 检测 Notch 信号通路中的关键作用蛋白 NICD 的表达,从而评判腺病毒 NICD-RNAi-AD 抑制 Notch 信号通路的效果,结果发现 NICD-RNAi-AD 滴度为 5×10^8 PFU/mL 时, *NICD* 相对表达量下调 32%,较对照显著下降 ($t = 27.849$, $p \approx 0$)^[7]。

包装合成表达 Wnt 信号通路中起关键作用的 β -catenin 腺病毒,通过 RT-PCR 检测后发现:当 β -catenin-AD 滴度为 5×10^8 PFU/mL 时, β -catenin 和 Wnt 信号通路的靶基因 *Lgr5* 相对表达量分别上调 43% 和 74%,与对照相比均显著上调^[7, 41]。在较低滴度 (5×10^7 PFU/mL、 1×10^8 PFU/mL) 下,腺病毒转染支持细胞,极少数转染毛细胞;但在较高滴度 (5×10^8 PFU/mL、 1×10^9 PFU/mL) 下,腺病毒

绝大多数转染支持细胞,且转染毛细胞的数量也有增加^[7]。在转染支持细胞水平上,当腺病毒滴度从 5×10^7 PFU/mL 增加到 1×10^9 PFU/mL 时,转染支持细胞的效率逐渐增加到约 45%。在转染毛细胞水平上,当腺病毒滴度从 5×10^7 PFU/mL 增加到 1×10^8 PFU/mL 时,腺病毒转染毛细胞的效率不足 1%。当腺病毒滴度从 5×10^8 PFU/mL 增加到 1×10^9 PFU/mL 时,腺病毒转染毛细胞的效率不足 5%^[7]。因此,腺病毒总体上转染支持细胞^[7, 24, 26, 41, 48]。

3.2 腺病毒介导的抑制Notch信号通路对小鼠毛细胞损伤后的再生修复

我们构建了小鼠内耳毛细胞体外损伤模型,小鼠耳蜗毛细胞在不加庆大霉素损伤情况下基本没有影响,但经过庆大霉素损伤处理后,毛细胞受损程度从顶端 (Apex) 到基底部 (Base) 逐渐增加,没有检测到有任何新的毛细胞形成。与对照相比,每个区域的毛细胞都显著减少,造成不同区域毛细胞损伤程度差异的原因可能是不同区域的毛细胞对庆大霉素敏感程度不同^[7, 26]。将不同滴度的 NICD-RNAi-AD 转染到小鼠耳蜗中,结果显示,在滴度为 5×10^7 PFU/mL 时,能观察到顶端和中部 (Middle) 的毛细胞数量显著增加,支持细胞数量减少不明显,体外培养一周后出现正在直接转分化的 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+$ 细胞或 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+/\text{GFP}^+$ 细胞^[7]。在滴度为 1×10^8 PFU/mL 时,与对照相比毛细胞数量增加,顶端和中部的支持细胞数量显著降低,培养一周后出现许多正在直接转分化的 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+$ 或 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+/\text{GFP}^+$ 细胞,同时也有少量成熟的 $\text{Myo}7a^+/\text{GFP}^+$ 细胞出现。在滴度为 5×10^8 PFU/mL 时,与对照相比支持细胞数明显降低,毛细胞数量显著增加,培养一周后存在正在转分化的 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+/\text{GFP}^+$ 细胞,出现 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+$ 细胞可能是因为支持细胞被转染后诱导周围的支持细胞向毛细胞方向分化^[7, 26],或者可能是 GFP 表达下调导致原 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+/\text{GFP}^+$ 细胞转变为 $\text{Sox}2^+/\text{Myo}7a^+$ 细胞。 1×10^8 PFU/mL NICD-RNAi-AD 抑制 Notch 信号通路更有利于毛细胞的再生^[7, 26]。

研究表明,当抑制 Notch 信号通路时,支持细胞通过直接转分化方式生成毛细胞^[7, 36],支持细胞数量会减少^[26, 36]。腺病毒传递 NICD-RNAi 抑制 Notch 信号通路, NICD-RNAi-AD 能促进毛细胞以转分化形式重新形成,且 1×10^8 PFU/mL 滴度的 NICD-RNAi-AD 抑制 Notch 信号通路更有利于内耳毛细胞的再生^[7, 26]。因此,通过构建调控 Notch 信

号通路的腺病毒抑制 Notch 信号, *Atoh1*、*Gfi1* 和 *Pou4f3* 上调, 导致支持细胞向毛细胞方向分化^[7, 36], 降低 Notch 信号通路活性能引起一些关键因子表达, 从而促进毛细胞的再生。

3.3 腺病毒介导Wnt信号通路激活对小鼠内耳毛细胞损伤后的再生修复

敲除 β -catenin 的外显子 3 (76 个氨基酸残基, 含有丝/苏氨酸水解位点, 敲除后可使 β -catenin 免于水解, 但整个蛋白分子的功能和活性不受影响), 过表达 β -catenin 可以增强 Wnt 信号通路活性^[7, 16]。已有研究表明, 利用逆转录病毒作为载体, 使 β -catenin 表达增加, 增强 Wnt 信号通路活性, 小鸡感觉上皮中出现异位毛细胞^[19]。

利用腺病毒过表达 β -catenin 而激活 Wnt 信号通路, 对小鼠耳蜗毛细胞再生有显著影响: β -catenin-AD 能诱导支持细胞发生细胞分裂, 并朝着毛细胞方向分化, 并且 β -catenin-AD 在 1×10^8 PFU/mL 的滴度下激活 Wnt 信号通路, 促进耳蜗毛细胞再生的数量最多^[7]。过表达 β -catenin 可以增强 Wnt 信号通路活性, β -catenin-AD 能诱导支持细胞发生细胞分裂, 并朝着毛细胞方向分化^[7, 26]。与 7.5 mmol/L LiCl 药物^[26]和转基因鼠过表达 β -catenin 相比, 利用 β -catenin-AD 激活 Wnt 信号通路使耳蜗毛细胞和支持细胞增加的数量相对较少, 不能达到类似的作用效果, 但可达到使支持细胞增殖和毛细胞再生的目的^[7, 49]。其中使用 7.5 mmol/L LiCl 促进 Wnt 信号通路能使小鼠顶端毛细胞每 100 μ m 增加约 10 个, 支持细胞增加约 5~10 个, 顶端正在增殖的支持细胞 (Sox2⁺/BrdU⁺ 细胞) 增加约 6 个^[7]。而转基因鼠过表达 β -catenin 的方式使毛细胞和支持细胞数量增加的程度, 超过了通过 LiCl 增强 Wnt 信号通路活性使毛细胞再生的效果^[7, 16]。但这方面还需要进一步改善实验方案, 调整腺病毒滴度和腺病毒转染时间来提高支持细胞增殖数量和毛细胞再生的程度。

综上, 通过腺病毒携带目的基因或片段, 调控 Notch 与 Wnt 信号通路可促使小鼠耳蜗毛细胞再生。(1) 利用实时定量 PCR 检测腺病毒转染耳蜗后, NICD-RNAi-AD 能显著抑制 Notch 信号通路, β -catenin-AD 能显著激活 Wnt 信号通路^[7]。(2) 利用庆大霉素损伤耳蜗毛细胞, 构建体外小鼠毛细胞损伤模型, 毛细胞从顶端到基底部损伤程度逐渐增加^[7, 26]。(3) 将不同滴度的空载腺病毒转染到耳蜗中, 体外培养一周后观察腺病毒转染结果, 在较低滴度下腺病毒主要转染支持细胞, 较高滴度下大多数腺病毒转

染支持细胞, 同时转染毛细胞的数量也增加^[7]。

(4) 将不同滴度的 NICD-RNAi-AD 和 β -catenin-AD 分别转染到庆大霉素损伤的耳蜗中, 体外培养后观察毛细胞再生结果, 显示 NICD-RNAi-AD 能促进毛细胞通过直接转分化方式再生, 并且在 1×10^8 PFU/mL 滴度下效果最佳; β -catenin-AD 能促进支持细胞有丝分裂, 并向毛细胞方向分化, 在 1×10^8 PFU/mL 滴度下效果最佳^[7]。因此, 通过腺病毒介导抑制 Notch 信号通路和激活 Wnt 信号通路, 能实现小鼠耳蜗损伤后支持细胞再生出部分毛细胞, 这是一种通过腺病毒介导调节 Notch 与 Wnt 信号通路的活性, 使哺乳动物小鼠耳蜗再生毛细胞的有效的办法^[7, 13, 18, 24, 26]。

4 结语

目前, 内耳疾病的基因治疗处于初步阶段^[29, 36], 未来可望用于内耳毛细胞损伤后的再生与修复^[29, 32]。在耳蜗基因治疗中, 腺病毒和腺相关病毒是使用最多的病毒载体, 能够转染到听觉上皮细胞中, 使目的基因表达发生改变, 以治疗听力损伤^[35, 43, 50]。在先天性耳聋疾病的研究中, 腺相关病毒是不错的载体选择, 但是由于腺相关病毒会影响宿主基因组, 对于非遗传因素造成的听力损伤治疗并不安全^[35-42, 51]。抑制 Notch 信号通路能通过转分化方式形成毛细胞, 由于支持细胞正常情况下不会发生细胞分裂, 因此长时间持续抑制 Notch 信号通路会造成支持细胞消耗殆尽, 对修复后毛细胞的持续生长是不利的^[7, 24, 36, 44, 52]。为了使支持细胞增殖, 通过腺病毒转染敲除 β -catenin 基因的 *exon3* 序列, 激活 Wnt 信号通路, 可达到支持细胞增殖的目的^[7]。Notch 和 Wnt 信号通路之间存在联合调控作用, 可避免支持细胞过度耗竭, 并使毛细胞尽可能多地再生^[7, 18, 53]。利用合适滴度的腺病毒介导联合调控 Notch 和 Wnt 信号通路的活性, 可以促使毛细胞再生的数量多于单信号通路调控的效果。通过腺病毒转染调节信号通路的外源基因^[7, 23, 24, 50], 促使毛细胞再生是促进哺乳动物内耳毛细胞再生的有效策略^[53-59]。

[参 考 文 献]

- [1] Liu Q, Zhang L, Zhu MS, et al. High-throughput screening on cochlear organoids identifies VEGFR-MEK-TGFB1 signaling promoting hair cell reprogramming. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 2257-73
- [2] Chadha S, Kamenov K, Cieza A. The world report on hearing, 2021. *Bull World Health Organ*, 2021, 99: 242-

- 242A
- [3] Pepermans E, Petit C. The tip-link molecular complex of the auditory mechano-electrical transduction machinery. *Hear Res*, 2015, 330: 10-7
 - [4] Lesica NA. Why do hearing aids fail to restore normal auditory perception?. *Trends Neurosci*, 2018, 41: 174-85
 - [5] Oishi N, Schacht J. Emerging treatments for noise-induced hearing loss. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2011, 16: 235-45
 - [6] Atkinson PJ, Huarcaya NE, Sayyid ZN, et al. Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. *Development*, 2015, 142: 1561-71
 - [7] Weng M, Zhao R, Niu Q, et al. Adenovirus-mediated effects of Wnt and Notch signalling pathways on hair cell regeneration in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 658: 44-54
 - [8] Waqas M, Zhang S, He Z, et al. Role of Wnt and Notch signaling in regulating hair cell regeneration in the cochlea. *Front Med*, 2016, 10: 237-49
 - [9] Mizutani K, Fujioka M, Hosoya M, et al. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron*, 2013, 78: 403
 - [10] McGovern MM, Zhou L, Randle MR, et al. Spontaneous hair cell regeneration is prevented by increased Notch signaling in supporting cells. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 120
 - [11] Ni W, Zeng S, Li W, et al. Wnt activation followed by Notch inhibition promotes mitotic hair cell regeneration in the postnatal mouse cochlea. *Oncotarget*, 2016, 7: 66754-68
 - [12] 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 Neurosci*, 2016, 36: 8734-45
 - [13] Bai H, Wan X, Gao X, et al. Study of the mechanisms by which aminoglycoside damage is prevented in chick embryonic hair cells. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2019, 20: 21-35
 - [14] Zhang B, Hu Y, Du H, et al. Tissue engineering strategies for spiral ganglion neuron protection and regeneration. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22: 458
 - [15] Wu J, Li W, Lin C, et al. 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
 - [16] Shi F, Hu L, Jacques BE, et al. β -Catenin is required for hair-cell differentiation in the cochlea. *J Neurosci*, 2014, 34: 6470-9
 - [17] Romero-Carvajal A, Navajas Acedo J, Jiang L, et al. Regeneration of sensory hair cells requires localized interactions between the Notch and Wnt pathways. *Dev Cell*, 2015, 34: 267-82
 - [18] Jiang LL, Xu JC, Jin R, et al. Transcriptomic analysis of chicken cochleae after gentamicin damage and the involvement of four signaling pathways (Notch, FGF, Wnt and BMP) in hair cell regeneration. *Hear Res*, 2018, 361: 66-79
 - [19] Stevens CB, Davies AL, Battista S, et al. Forced activation of Wnt signaling alters morphogenesis and sensory organ identity in the chicken inner ear. *Dev Biol*, 2003, 261: 149-64
 - [20] Shi F, Cheng YF, Wang X, et al. β -catenin up-regulates Atoh1 expression in neural progenitor cells by interaction with an Atoh1 3' enhancer. *J Biol Chem*, 2010, 285: 392-400
 - [21] Tona Y, Hamaguchi K, Ishikawa M, et al. Therapeutic potential of a γ -secretase inhibitor for hearing restoration in a guinea pig model with noise-induced hearing loss. *BMC Neurosci*, 2014, 15: 66
 - [22] 杨思远, 曾少举, 张信文, 等. Notch和 Wnt信号通路联合对雏鸡听觉毛细胞再生的影响. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 55: 215-20
 - [23] 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. *Hearing Res*, 2021, 401: 108161
 - [24] Jiang LL, Jin R, Xu J, et al. Hair cell regeneration or the expression of related factors that regulate the fate specification of supporting cells in the cochlear ducts of embryonic and posthatch chickens. *Hear Res*, 2016, 332: 17-28
 - [25] Kuo BR, Baldwin EM, Layman WSJ, et al. *In vivo* cochlear hair cell generation and survival by coactivation of β -Catenin and Atoh1. *J Neurosci*, 2015, 35: 10786-98
 - [26] 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. *Cell Tissue Res*, 2021, 386: 281-96
 - [27] 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. *Sci Rep*, 2019, 9: 10494
 - [28] Diensthuber M, Stöver T. Strategies for a regenerative therapy of hearing loss. *HNO*, 2018, 66: 39-46
 - [29] Wang J, Zheng J, Wang H, et al. Gene therapy: an emerging therapy for hair cells regeneration in the cochlea. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1177791
 - [30] Iizuka T, Kamiya K, Gotoh S, et al. Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: 3651-61
 - [31] Shibata SB, West MB, Du X, et al. Gene therapy for hair cell regeneration: review and new data. *Hear Res*, 2020, 394: 107981
 - [32] Gao X, Tao Y, Lamas V, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. *Nature*, 2018, 553: 217-21
 - [33] Zhao LQ, Xi B, Peng HS. Advances on research of adeno-associated virus vectors. *Curr Biotechnol*, 2012, 2: 110-5
 - [34] Rejali D, Lee VA, Abrashkin KA, et al. Cochlear implants and *ex vivo* BDNF gene therapy protect spiral ganglion neurons. *Hear Res*, 2007, 228: 180-7
 - [35] Shu Y, Tao Y, Wang Z, et al. Identification of adeno-associated viral vectors that target neonatal and adult

- mammalian inner ear cell subtypes. *Hum Gene Ther*, 2016, 27: 687-99
- [36] Gu Y, Huang Y, Jia G, et al. Generation of p27^{icreER} transgenic mice: a tool for inducible gene expression in supporting cells in the cochlea. *Hearing Res*, 2023, 431: 108727
- [37] Sacheli R, Delacroix L, Vandenackerveken P, et al. Gene transfer in inner ear cells: a challenging race. *Gene Ther*, 2013, 20: 237-47
- [38] Choi SW, Abitbol JM, Cheng AG. Hair cell regeneration: from animals to humans. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2024, 17: 1-14
- [39] Cotanche DA, Kaiser CL. Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hear Res*, 2010, 266: 18-25
- [40] Li W, Wu J, Yang J, et al. Notch inhibition induces mitotically generated hair cells in mammalian cochleae via activating the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 166-71
- [41] Gu X, Chai R, Guo L, et al. Transduction of adeno-associated virus vectors targeting hair cells and supporting cells in the neonatal mouse cochlea. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 8
- [42] Liu Y, Okada T, Nomoto T, et al. Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea *in vivo*. *Exp Mol Med*, 2007, 39: 170-5
- [43] Mittal R, Debs LH, Nguyen D, et al. Signaling in the auditory system: implications in hair cell regeneration and hearing function. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 2710-21
- [44] Xu C, Qi J, Hu X, et al. Rps14 upregulation promotes inner ear progenitor proliferation and hair cell regeneration in the neonatal mouse cochlea. *Cell Prolif*, 2023, 56: e13458
- [45] Luebke AE, Foster PK, Muller CD, et al. Cochlear function and transgene expression in the guinea pig cochlea, using adenovirus- and adeno-associated virus-directed gene transfer. *Hum Gene Ther*, 2001, 12: 773-81
- [46] Chen Y, Gu Y, Li Y, et al. Generation of mature and functional hair cells by co-expression of Gfi1, Pou4f3, and Atoh1 in the postnatal mouse cochlea. *Cell Rep*, 2021, 35: 109016
- [47] Baker K, Brough DE, Staecker H. Repair of the vestibular system via adenovector delivery of Atoh1: a potential treatment for balance disorders. *Adv Otorhinolaryngol*, 2009, 66: 52-63
- [48] Luo WW, Yang JM, Han Z, et al. Atoh1 expression levels define the fate of rat cochlear nonsensory epithelial cells *in vitro*. *Mol Med Rep*, 2014, 10: 15-20
- [49] Shi F, Hu L, Edge AS. Generation of hair cells in neonatal mice by β -catenin overexpression in Lgr5-positive cochlear progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 13851-6
- [50] Zhang L, Fang Y, Tan F, et al. AAV-Net1 facilitates the trans-differentiation of supporting cells into hair cells in the murine cochlea. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80: 86
- [51] Matsunaga M, Yamamoto R, Kita T, et al. Stepwise fate conversion of supporting cells to sensory hair cells in the chick auditory epithelium. *iScience*, 2023, 26: 106046
- [52] Kolla L, Kelly MC, Mann ZF, et al. Characterization of the development of the mouse cochlear epithelium at the single cell level. *Nat Commun*, 2020, 11: 2389
- [53] Qi J, Huang W, Lu Y, et al. Stem cell-based hair cell regeneration and therapy in the inner ear. *Neurosci Bull*, 2024, 40: 113-26
- [54] Ginn SL, Mandwie M, Alexander IE, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2023-an update. *J Gene Med*, 2024, 2: e3721
- [55] Gu X, Wang D, Xu Z, et al. Prevention of acquired sensorineural hearing loss in mice by *in vivo* Htra2 gene editing. *Genome Biol*, 2021, 22: 86
- [56] McKinley KL, Longaker MT, Naik S. Emerging frontiers in regenerative medicine. *Science*, 2023, 380: 796-8
- [57] Cumpata AJ, Labusca L, Radulescu LM. Stem cell-based therapies for auditory hair cell regeneration in the treatment of hearing loss. *Tissue Eng Part B Rev*, 2024, 30: 15-28
- [58] Benkafadar N, Sato MP, Ling AH, et al. An essential signaling cascade for avian auditory hair cell regeneration. *Dev Cell*, 2024, 59: 280-91.e5
- [59] Reynard P, Thai-Van H. Drug-induced hearing loss: listening to the latest advances. *Therapie*, 2024, 79: 283-95