

• 实验研究 •

cAxin2 调控鸡胚内耳早期发育*

张小兵¹ Brand-Saberi B² 戴方平² 侯赞¹

[摘要] 目的:探讨 Wnt 家族副调节因子 cAxin2 对鸡胚内耳早期发育的调控机制。方法:采用增强的绿荧光蛋白、cAxin2 和短发夹 RNA 构建了一个带 EGFP 的干扰质粒,通过活体电穿孔技术转染在耳囊中,用原位杂交技术检测基因 cAxin2、cPax2(Paired Box2)及 cBMP4(Bone Morphogenetic Protein 4)在转染后耳囊中的表达。结果:转染侧耳囊显示 cAxin2 的表达被短发夹 RNA 抑制,cPax2 被下调而 cBMP4 被上调,并能看到一个异常增大的耳囊。结论:cAxin2 是一个内耳发育过程中非常重要的调控基因。

[关键词] 鸡 cAxin2;内耳发育;RNA 干扰

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.11.011

[中图分类号] R764 **[文献标志码]** A

The function of regulator cAxin2 in inner ear development of chick embryo

ZHANG Xiaobing¹ BRAND-SABERI B² DAI Fangping² HOU Yun¹

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China; ²Department of Anatomy and Molecular Embryology, Institute of Anatomy, Ruhr University Bochum, 44780 Bochum, Germany)

Corresponding author: ZHANG Xiaobing, E-mail: 790736924@qq.com

Abstract Objective: To study the mechanism of the Wnt families'negative regulator cAxin2 in early inner ear development of chick embryo. **Method:** Plasmid was constructed with enhanced green fluorescent protein(EGFP), cAxin2 and short hairpin RNA(shRNA), which was transfected in otic vesicle by in ovo electroporation. Expression of cAxin2, cPax2 (Pared box2), and cBMP4 (bone morphogenetic protein 4) genes was investigated in the transfected otic vesicle with situ hybridization. **Result:** cAxin2 expression was inhibited by shRNA, cPax2 was down regulated and cBMP4 was up regulated as well as an abnormally enlarged otic vesicle was discovered in the transfected otic vesicle. **Conclusion:** cAxin2 is an important regulatory gene required for inner ear development.

Key words chick cAxin2; inner ear development; RNA interference

在脊椎动物的内耳发育中,细胞分化命运的决定有赖于复杂的基因调节通路,此调节通路涉及 Wnt 家族^[1-2]。经典 Wnt 信号通路调节内耳细胞的增殖和分化^[3]。Axin2 是经典的 Wnt 调节通路中一个负性调节因子,它通过促进 β -catenin 的降解,抑制信号的传导^[4]。实验证明, Wnt 信号传导通路存在于大多数颅面发育过程中^[5-7]。因此,研究 Wnt 信号传导通路中的负性调节因子 Axin2 在内耳发育过程中的具体调节机制对了解内耳发育、先天性疾病及肿瘤等有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鸡胚:将 60 只已受精的白来亨鸡蛋(兰州正大有限公司种鸡场提供)置入温度 38℃、相对湿度 80%的孵化箱内孵化至实验要求的阶段 HH 15~

16 期和 HH 17~18 期。鸡胚发育按 Hamburger 等(1951)标准分期。质粒:pEGFP-cAxin2-shRNA 质粒和对照质粒是由德国波鸿鲁尔大学的 Beate Brand-Saberi 教授及戴方平博士提供^[8],见图 1。

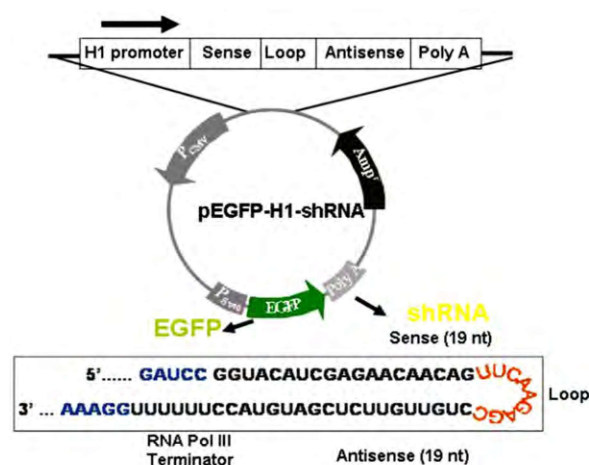


图 1 pEGFP-H1-shRNA 质粒构建的设计和序列示意图

* 基金项目:甘肃省卫生厅行业科技计划项目(No:GSW-ST2011-060);甘肃省中医药科学技术研究课题(No:GZK-2011-22)

¹ 兰州大学第一医院耳鼻咽喉头颈外科(兰州,730000)

² 鲁尔大学解剖研究所解剖与分子胚胎研究室

通信作者:张小兵, E-mail: 790736924@qq.com

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 按照 cAxin2 mRNA 序列 (NM_204491), 用正义链引 (5'-CCGGAGCCAT-GAGCAGCGCCGTGCTCCTC-3') 和反义链引物 (5'-AACACAGATGCCATCAATCGATCCTTTCTA-3') 进行 RT-PCR。最终的 RT-PCR 产物被克隆入 pDrive 载体质粒中或重建于 pCMS-EGFP 载体质粒中并测序确定。实验中所用的 pEGFP-cAxin2-shRNA 质粒包含 EGFP 表达成分和对 cAxin2 干扰的 shRNA。

将 EGFP-cAxin2-shRNA 质粒 (2~3 $\mu\text{g/L}$) 按 5:1 的比例溶解在辅助液中备用。50 μl 标准辅助液含 25 μl 羧基-甲基纤维素, 7.5 μl fast green 3.0 μl MgCl_2 , 7.5 μl 20 $\times$ PBS, 7.0 μl H_2O 。

1.2.2 电穿孔装置的装配 用 TBX 830 Square Wave Electroporator 电转移产生电脉冲。一对电极构成是由约 0.5 mm 直径的一根白金导线做正电极, 一根钨线做负极。将电极的尖端 (约 2 mm 长) 弯曲成适当的角度并用指甲油覆盖绝缘 (除电机手柄连接端)。电极连在电穿孔仪的输出导线上。将硼硅毛细玻璃管 (外径 = 1.5 mm, 内径 = 1.17 mm; 由 Clerk 公司提供) 一端在 Sutter P-97 Puller 上拉细, 折断尖端, 尽可能得到一个越细越好的毛细管开口。玻璃毛细管安装在一个橡皮管上, DNA 溶液用嘴吸入毛细管内并注入鸡胚耳囊腔内。

1.2.3 活体电穿孔术 所有电穿孔操作均在鸡胚的右侧耳进行, 左侧耳作为对照。实验操作前, 先用宽的粘胶带加固蛋壳顶侧, 用剪刀从鸡蛋的加固顶侧剪成一个 15~20 mm 大小卵圆形的窗用以观察胚胎。将印度墨水用 Ringer 液按 1:10 稀释后注入胚胎下方的卵黄内以增加对照便于观察鸡胚。用锋利的钨丝针仔细地将覆盖在鸡胚右耳表面的卵黄膜去除。将玻璃毛细管针尖端插入或刺入右耳杯 (HH 15~16 期) 或耳囊 (HH 17~18 期)。用嘴吹将 DNA 液注入耳杯或耳囊内, 注入后, 将大约 2 ml 消毒 Ringer 液滴在胚胎的上方。正极和负极分别置于胚胎的左侧和右侧并与后脑平行。用绝缘的负极轻轻按压胚胎躯干头侧部分的右侧使右侧和左侧内耳与两侧电极尖端的裸露部分保持在一条直线上。使用参数: 5 个方脉冲、30 V (HH 15~16 期)~40 V (HH 17~18 期)、20 ms。之后, 用胶带封闭蛋窗重新置入孵化箱中孵化至预期阶段。

1.2.4 探针的准备 用 EcoRI 解链 pCMS-EGFP-cAxin2 质粒, 再用 T3 RNA 多聚酶合成 cAxin2 的反序列探针。作为对照, 顺序列 cAxin2 探针的制备是先用 XbaI 解链 pCMS-EGFP-cAxin2 质粒, 再用 T7 RNA 多聚酶合成。cBMP4、cPax2、

cLmx1、cWnt1 和 cWnt3a 反序列探针是分别按照实验室质粒数据库的质粒图制备的。

1.2.5 原位杂交 获取电穿孔术后有绿荧光蛋白表达 HH19~24 期的鸡胚用 4% 的 PFA 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中固定过夜, 用于靶基因 cAxin2 干预效果的检测。然后, 固定的鸡胚在甲醇中经过逐级脱水, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中储存。所有用于表达 cAxin2、cBMP4、cPax2、cLmx1、cWnt1 和 cWnt3a 的探针均用地高辛 RNA 标记盒 (Roche) 标记。全胚胎原位杂交并拍照。挑选鸡胚用 Leica 震动切片机做切片, 厚度 30~40 μm 。

2 结果

2.1 EGFP 在鸡胚耳囊内的表达提示 RNAi 干预靶侧 cAxin2 沉默

将表达 pEGFP-cAxin2-shRNA 的 DNA 质粒显微注射入鸡胚的右侧耳杯或耳囊内并立刻进行活体电穿孔技术。再孵化 24 h 分别至胚胎 HH 19~20 期或 HH 23~24 期, 将鸡蛋内的活鸡胚置于荧光显微镜下观察实验侧鸡胚耳囊内的 EGFP 荧光。发源于 EGFP 表达的荧光信号可显示内耳的靶基因转染部位。我们观察到由 pEGFP-cAxin2-shRNA 质粒的 EGFP 表达的强荧光信号在 HH 19+ 期和 HH 24 期都显示在试验侧右耳囊的局限区域内 (图 2a、3a 中白色箭头所示)。为了检测 cAxin2 是否在转染侧耳被沉默, 我们用 cAxin2 探针做了实验胚胎的全胚胎原位杂交, 发现只有转染侧右耳囊内的 cAxin2 表达被抑制。背侧及侧面观显示: 和对照侧耳囊 (左侧) 相比 (图 2c、2d、3c、3d 中黑色箭头所示), 实验侧右耳囊内的 cAxin2 杂交信号被明显的减弱 (图 2b、2d、3b、3d 中黑色箭头所示)。HH 19+ 期与 HH 24 期耳囊横切片均显示, 与左侧对照耳相比 (图 2f~h、3f~h 中黑色箭头所示), 右侧耳囊背侧内的 cAxin2 杂交信号被显著的减少, 特别是内淋巴导管和内侧壁上部上皮内的 cAxin2 杂交信号减少尤为明显 (图 2f~h、3f~h 中黑色箭头所示)。

为了进一步了解 cAxin2 在内耳发育中的功能, 特别是在前庭器官形成过程中其分子生物学机制及在其表达的耳囊背侧对下游基因的调节机制, 我们将表达 EGFP-cAxin2-shRNA 并靶向 cAxin2 的 DNA 质粒用活体电转技术导入耳囊上皮, 再用已知也表达于内耳发育中的基因 cPax3、cBMP4、cWnt1、cWnt3a 和 cLmx1b 用原位杂交检测, 来分析我们所构建的沉默靶基因质粒的特性。本研究发现用短发夹 shRNA 靶向 cAxin2 的 RNA 干扰技术处理后 cPax2 在耳囊内的表达被显著抑制, 而 cBMP4 在耳囊内的表达显著增强, cWnt1、cWnt3a 和 cLmx1b 的表达未见明显有意义的改变 (数据未显示)。

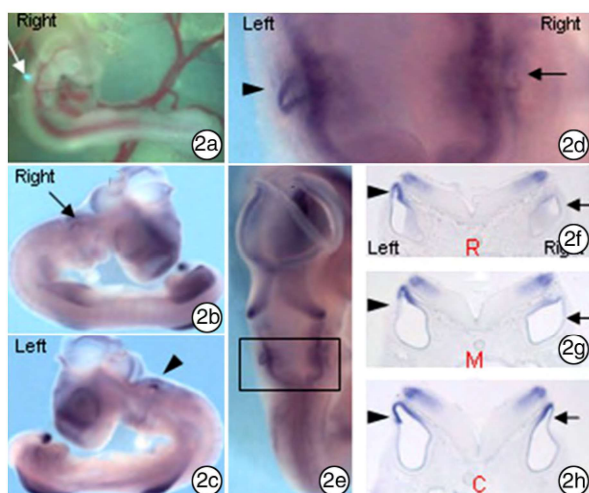


图 2 RNA 诱导靶基因 cAxin2 沉默于 HH 19+ 期 EGFP 表达的转染侧耳囊

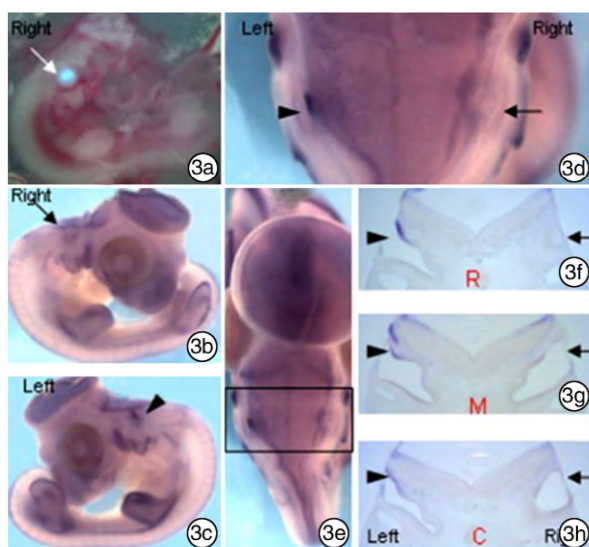


图 3 RNA 诱导靶基因 cAxin2 沉默于 HH 24 期 EGFP 表达的转染侧耳囊

2.2 cAxin2 被特异性的沉默后 cPax2 下调

cPax2 是一个表达于发育早期耳囊内的至关重要的塑型因子。通过电穿孔技术将表达 EGFP-cAxin2-shRNA 并靶向 cAxin2 的 DNA 质粒导入内耳上皮细胞,再用原位杂交技术检测 cPax2。在短发夹 shRNA 靶向 cAxin2 特异性的干扰后, Pax2 的表达被明显影响。在 HH 17 期鸡胚右耳电穿孔导入 DNA 质粒, cAxin2 被特异性干扰并再孵化 24 h 后于胚胎 HH 24 期,可看到实验侧耳囊内有强烈的 EGFP 信号(图 4a 中白色箭头所示),背面及侧面观察探针 cAxin2 的原位杂交胚胎全景像,与对照左耳相比(图 4d、4c 中黑色箭头所示),可见实验侧右耳内 cAxin2 表达范围明显减少(图 4b、4d 中黑色箭头所示)。在横切片上可见,与对照侧左耳相比(图 4f~h 中黑色箭头所示),cPax2 的

杂交信号在整个内淋巴导管、耳囊的背侧及内侧壁上部和内侧壁前上及后上部消失(图 4f~h 中相应的黑色箭头所示),正好与 cAxin2 的高表达区相重叠。但在耳囊较腹侧部分, cPax2 呈不连续的散在分布(图 4f~h 中相应的红色箭头所示)。

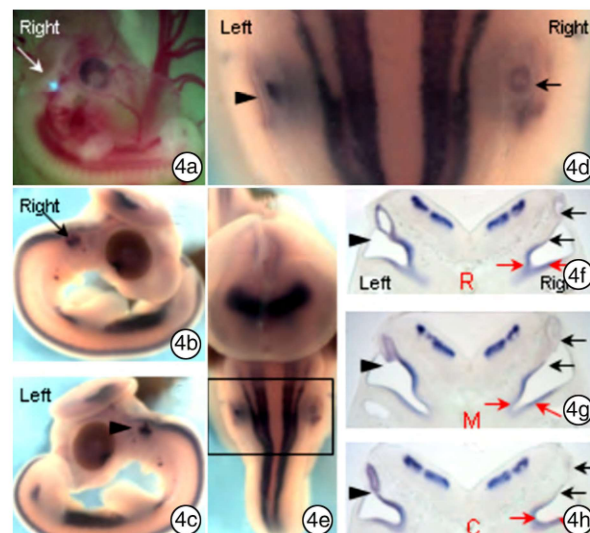


图 4 特异性沉默 cAxin2 后 cPax2 下调

2.3 cAxin2 被特异性的沉默后 cBMP4 上调

本研究还观察用另一个已知参与胚胎发育早期耳囊塑型的基因 cBMP4 在 cAxin2 被特异性的沉默后的变化。将 pEGFP-cAxin2-shRNA 质粒注射入 HH 15 期胚胎耳杯的腔内,电穿孔技术导入,再孵化 24 h 后,用 cBMP4 做原位杂交。我们发现在 cBMP4 耳囊内的表达区域内出现了非常有意义的结果。背侧面及侧面观 HH 19+ 期原位杂交胚胎全景像,与左侧对照耳相比(图 5d、5c 中黑色箭头所示),右侧实验耳内 cBMP4 表达范围显著增加(图 5b、5d 中黑色箭头所示)。EGFP 信号显示右侧耳囊的转染部位(图 5a 中白色箭头所示)和原位杂交后 CBMP4 上调(图 5f~h 中黑色箭头所示)。我们还发现,与对照侧左耳相比(图 5c、5d 中黑色箭头所示),转染侧右耳囊异常增大(图 5g 中黑色箭头所示)。横切片上,不仅在耳囊最前部及在最后部都可以看到 cBMP4 强标记的区域,其分别与未来的前壶腹嵴和后壶腹嵴上皮发育有关^[9-10]。而且阳性信号还向腹侧、外侧及内侧延伸(图 5f~h 中相应的黑色箭头所示)。还可以看到在外侧壁和腹内侧壁有两处 cAxin2 阳性区域(图 5g 中黑色箭头所示)。

2.4 关于细胞凋亡

在应用电穿孔技术将表达的 DNA 质粒导入耳囊后,我们还考虑到是否有异常的细胞死亡发生。EGFP 质粒导入右侧耳转染成功表达的绿荧光信号(图 6a 中白色箭头所示); Nile Blue sulfate solution 全胚胎染色凋亡实验显示:与左侧对照耳

相比(图 6b、6c 中相应的黑色箭头所示),右侧实验耳未见异常的细胞程序性死亡(图 6c、6d 中相应的黑色箭所示)。

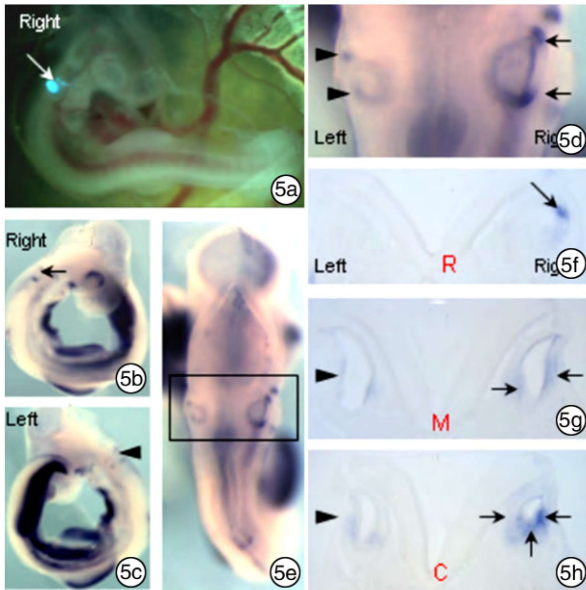


图 5 特异性沉默 cAxi2 后 cBMP4 上调

3 讨论

Wnt 信号通路在细胞增殖分化和形态形成过程中起着非常重要的作用。调控的稳定性是 Wnt 信号传导通路的中心环节。cAxi2 突变致其功能缺失或 β -catenin 功能获得的主要作用均是在细胞质及细胞核内提升 β -catenin 的水平。由于 cAxi2 功能失调, β -catenin 与 TCFs 结合的能力增强并且改变了随后 TCF 调节基因的转录^[11-12]。因此,激活 β -catenin-TCF 调节的靶基因是发育学和癌症发生中 Wnt 信号通路失调的主要结果。

据报道, Wnt 信号传导通路调控颌面形态发生^[13]。Wnt1 和 Wnt3a 都表达在神经管的背外侧区域, 而此区域产生颅面神经脊细胞^[14]。Wnt1^{-/-}, Wnt3a^{-/-} 双基因敲除致突变小鼠显示没有前庭器官组份所有残留下来的只是缩短了耳

蜗样结构^[15]。Axi2 突变小鼠显示出成骨祖细胞表达增强、骨化加速、成骨成分表达激活及骨矿化增加。灭活 Axi2 在体内和体外均可促进增殖和分化^[16]。在实验小鼠中发现, 灭活 Axi2 可诱发颅骨骨化过程, 此现象类似人类先天性缺陷疾病, 该缺陷常和视觉、听觉和呼吸障碍有关^[17]。这种在 Axi2 突变小鼠中所观察到的颅骨骨缝早熟性骨化融合与激活 β -catenin 信号传导通路有关^[16]。本研究中, 由 shRNA 诱导的 cAxi2 沉默所产生的结果可能是由于增强了 β -catenin 信号的激活。

为了更好地了解 Wnt- β -catenin-TCF-Axi2 通路在内耳发育中被激活的结果, 我们回顾了 cAxi2 的功能和它所调节的靶基因。通过活体电穿孔技术和 EGFP-cAxi2-RNAi 诱导靶基因沉默, 检测发育内耳中靶基因 cAxi2 的表达。发现 cAxi2 仅在转染侧内耳被抑制, cAxi2 阳性信号在耳囊背侧部分, 特别是在内淋巴导管和内侧壁的背侧上皮内显著减少。为了了解内耳发育过程中潜在的细胞分化和形态变化的分子生物学机制, 通过电穿孔导入表达 cAxi2-cAxi2-shRNA 的质粒, 靶向沉默内耳的 cAxi2, 再原位杂交检测 cPax2 和 cBMP4 并观察了 cAxi2-cAxi2-shRNA 的质粒的特异性效果。在 cPax2 和 cBMP4 表达区域观察到非常有意义的结果。在 shRNA 特异性地干扰 cAxi2 后, cPax2 和 cBMP4 的表达方式受到显著影响。

转录因子 cPax2 是鸡发育内耳中最早的区域化基因之一^[18-22], 被认为是耳发生的标记基因, 常用于有关早期耳基板诱导和以后的细胞命运决定研究。Pax2 是耳蜗及耳蜗-前庭神经节形成的 Shh 依赖基因, Shh 是 Pax2 沿耳囊内侧壁表达所必须的, 提示 Pax2 是耳囊内 Shh 信号通路中的下游效应者^[23]。已知小鼠 Pax2 基因突变致功能缺失可引起耳蜗发育不全和听神经节缺失以及附近球囊部分改变^[24-27]。

已证实, 内耳早在基板阶段就成为 Wnt 信号

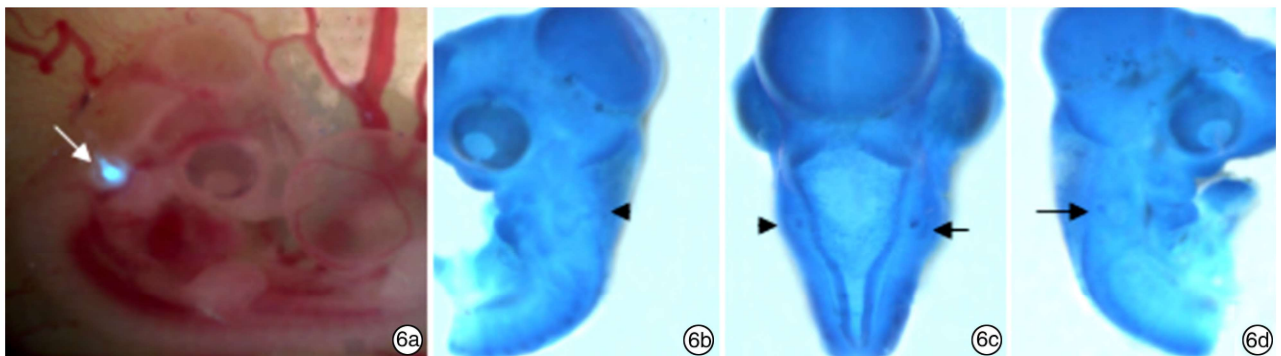


图 6 Nile Blue sulfate solution 全胚胎染色细胞程序性死亡试验

的直接靶器官。在小鼠,从耳基板阶段到耳囊,内耳的背内侧部分细胞对与 Wnt 关联的 Topgal 标记呈阳性染色,交尾 9.5 d 后的野生型小鼠胚胎用 β -catenin 抗体染色后,在耳囊背侧细胞内可见 β -catenin^[15]。耳囊背部是正规的 Wnt 信号通路的活性部位,神经管背侧分泌的 Wnt 信号激活并调节耳囊背侧的 *Dlx5/6* 基因^[15]。所以,cAxin2 在正规的 Wnt 信号通路中参与 β -catenin 降解复合物的形成。

沉默 cAxin2 造成降解 β -catenin 复合物形成障碍,导致 β -catenin 在细胞质内堆积,进而转移到核内作用于 Wnt 信号传导靶基因的转录。来自于脊索的 Shh 信号调节包括 Pax2 在内的基因的转录。Shh 还限制 Wnt 通路的活性,进而影响 *Dlx5/6* 在耳囊背侧区域的表达^[15,23]。此外,还有一个从神经管背侧分泌的信号,可能是 BMP 家族成员,也限制 Shh 靶基因移向耳囊的腹内侧区域。在背侧和腹侧之间的这种平衡是在耳囊上皮中促进区域化形成及调整前庭器官和听觉器官形态发生的关键步骤^[15,23]。同样的腹背部塑型过程也存在于体节中,Wnt 家族和 BMP 在背部形成信号中占优势,而 Shh 和 noggin 负责腹侧的塑型^[27]。

本实验中,cPax2 阳性区域在转染的内耳中,特别在耳囊的背侧区域呈明显减少但在最腹侧仍有散在分布。这提示可能作为 Wnt 信号通路中的负调节基因 cAxin2 的沉默造成 Wnt 信号的增加,进而导致 Shh 依赖基因 Pax2 的抑制。因此,我们推测不仅有来自于耳囊背侧部分的 Wnt 信号和来自于腹侧部分的 Shh 调节通路之间的调节平衡,而且很可能在这些背侧和腹侧信号之间还存在一个信号浓度梯度,这些信号交互反向逐步减少并且部分重叠以影响未来不同感觉器官的细胞命运。如 Shh 和 Wnt 形成的浓度梯度的这种塑型方式也曾经在体节塑型过程中有过描述^[28]。

BMP4 是原位杂交鸡胚内耳中所有未来感觉器官的标记因子^[9]。在 HH 19 期,BMP4 在鸡胚内耳中表达,表现为 2 个杂交信号的集合,即分别在最前或最后区域形成前条或前点和后点^[9]。令人惊讶的是,我们发现 cBMP4 阳性信号不仅分别强表达在最前和最后区域,而且还向腹侧外侧及内侧较大范围地延伸,还可在外侧和内侧低位上皮中散在有 cBMP4 信号。特异地破坏 cAxin2 将增加 cBMP4 基因在发育内耳中的表达范围,提示一种公认的机制即 cAxin2/Wnt 信号对于耳囊内不同感觉器官的适宜发育是需要的。因此,刺激 β -catenin 信号对促进内耳中细胞命运的决定和分化不仅是必须而且是充分的。作为不同感觉器官中正规 Wnt 信号通路中的负调节因子,cAxin2 防止其过发育及早熟,从而控制这些发育过程的加速。另

外,特异性地沉默 cAxin2 可以明显地干扰 BMP 通路的细胞信号。据报道,神经管背侧 BMP 和 Wnts 协同作用调节体节背区的塑型,BMP 的活性直接由 Wnt1 和 Wnt3a 调节^[27]。

本研究还发现,cAxin2 被特异性沉默的胚胎显示有异常增大的耳囊。与此相反,据报道,Wnt1-/-,Wnt3a-/-双敲除胚胎显示有小耳囊表现型,BMP4 检测表现为该基因在耳囊表达前后区域之间的距离减少,此现象很可能是由于耳囊大小的减少所致^[15]。BMP5 基因确实导致突变小鼠呈小耳畸形,该突变小鼠还显示出许多颅面和轴骨骼畸形^[28-29],上述结果都与本实验中特异性沉默 cAxin2 后,cBMP4 检测显示异常增大的耳囊相互一致。

BMP4 在生物发育的许多方面起着非常重要的作用,包括中胚层的形成和许多器官如心脏、牙齿和肢体的发育^[30-31]。Wnts 是鸡胚发育中神经和上皮命运确定的关键因子。连续的 Wnt 信号能够阻止外胚层细胞对 FGF 信号的应答,允许 BMP4 的表达及发出表皮命运的 BMP4 信号。相反,当外胚层细胞缺乏 Wnt 信号影响时,FGFs 诱导细胞则向神经细胞命运发育^[32]。本实验中,cBMP4 表达范围的增加和耳囊的异常增大可能是由于 cAxin2 沉默后内耳结构出现了异常早熟,正如 cAxin2 基因敲除小鼠中所观察到的早熟性颅骨骨性连接一样^[16]。但还需要做进一步的研究来详细了解由于 cAxin2 沉默对以后各期内耳结构发育所造成的影响。虽然 cAxin2 作为负调节因子作用于 Wnt 信号通路^[11],但是在本实验中,cAxin2 被特异性地沉默后,Wnt1 和 Wnt3a 探针原位杂交,鸡胚耳囊仍未见有意义的改变。然而,也有报道 Axin2 的表达和 β -catenin 信号也可在没有 Wnt 表达的区域中发挥作用^[16]。尽管如此,cAxin2 的沉默主要影响 β -catenin 在细胞质内的稳定性,进而导致其下游基因的转录。

参考文献

- [1] NAKAJIMA Y. Signaling regulating inner ear development: cell fate determination, patterning, morphogenesis, and defects[J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2015, 55:17-25.
- [2] CHEN Z Q, HAN X H, WEI Q J, et al. Comparative analysis of conservation and regulatory network on core transcription factors in mouse inner ear development[J]. *Yi Chuan*, 2013, 35:1198-1208.
- [3] BOHNENPOLL T, TROWE M O, WOJAHN I, et al. Canonical Wnt signaling regulates the proliferative expansion and differentiation of fibrocytes in the murine inner ear[J]. *Dev Biol*, 2014, 391:54-65.
- [4] JHO E H, ZHANG T, DOMON C, et al. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22:1172-1183.

- [5] MOURA R S, CARVALHO-CORREIA E, DAMOTA P, et al. Canonical Wnt signaling activity in early stages of chick lung development[J]. *PLoS One*, 2014, 9:e112388.
- [6] LOHI M, TUCKER A S, SHARPE P T. Expression of Axin2 indicates a role for canonical Wnt signaling in development of the crown and root during pre- and postnatal tooth development[J]. *Dev Dyn*, 2010, 239:160–167.
- [7] CHAI R, XIA A, WANG T, et al. Dynamic expression of Lgr5, a Wnt target gene, in the developing and mature mouse cochlea[J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2011, 12:455–469.
- [8] DAI F, YUSUF F, FARJAH G H, et al. RNAi-induced targeted silencing of developmental control genes during chicken embryogenesis[J]. *Dev Biol*, 2005, 285:80–90.
- [9] WU D K, OH S H. Sensory organ generation in the chick inner ear[J]. *J Neurosci*, 1996, 16: 6454–6462.
- [10] VAN DEN EIJNDE S M, LUIJSTERBURG A J, BOSHART L, et al. In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure[J]. *Cytometry*, 1997, 29: 313–320.
- [11] LEUNG J Y, KOLLIGS F T, WU R, et al. Activation of AXIN2 expression by β -Catenin-T cell factor[J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 21657–21665.
- [12] PARR B, SHEA M J, VASSILEVA G, et al. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds[J]. *Development*, 1993, 119: 247–261.
- [13] MCMAHON A P, JOYNER A L, BRADLEY A, et al. The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1-mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum[J]. *Cell*, 1992, 69:581–595.
- [14] RICCOMAGNO M M, TAKADA S, EPSTEIN D J. Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh[J]. *Genes Dev*, 2005, 19:1612–1623.
- [15] YU H M, JERCHOW B, SHEU T J, et al. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis[J]. *Development*, 2005, 132:1995–2005.
- [16] WILKIE A O, MORRISS-KAY G M. Genetics of craniofacial development and malformation[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2:458–468.
- [17] BARALD K F, KELLEY M W. From placode to polarization: new tunes in inner ear development[J]. *Development*, 2004, 131:4119–4130.
- [18] HERBRAND H, GUTHRIE S, HADRY S, et al. Two regulatory genes, cNkx5-1 and cPax2, show different responses to local signals during otic placode and vesicle formation in the chick embryo[J]. *Development*, 1998, 125: 645–654.
- [19] HUTSON M R, LEWIS J E, NGUYEN-LUU D, et al. Expression of Pax2 and patterning of the chick inner ear[J]. *J Neurocytol*, 1999, 28:795–807.
- [20] GROVES A K, BRONNER-FRASER M. Competence, specification and commitment in otic placode induction[J]. *Development*, 2000, 127: 3489–3499.
- [21] SÁNCHEZ-CALDERÓN H, MARTÍN-PARTIDO G, HIDALGO-SÁNCHEZ M, et al. Pax2 expression patterns in the developing chick inner ear[J]. *Gene Expr Patterns*, 2005, 5:763–773.
- [22] RICCOMAGNO M M, MARTINU L, MULHEISEN M, et al. Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog[J]. *Genes Dev*, 2002, 16:2365–2378.
- [23] TORRES M, GÓMES-PARDO E, GRUSS P. Pax2 contributes to inner ear patterning and otic nerve trajectory[J]. *Development*, 1996, 122: 701–707.
- [24] FAVOR J, SANDULANCHE R, NEUHAUSER-KLAUS A, et al. The mouse Pax2 (1Neu) mutation is identical to human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in development defects of the brain, ear, eye, and kidney[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93:13870–13875.
- [25] FEKETE D M, WU D K. Revisiting cell fate specification in the inner ear[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, 12:35–42.
- [26] BURTON Q, COLE L K, MULHEISEN M, et al. The role of Pax2 in mouse inner ear development[J]. *Dev Biol*, 2004, 272:161–175.
- [27] MARCELLE C, STARK M R, BRONNER-FRASER M. Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite[J]. *Development*, 1997, 124:3955–3963.
- [28] KINGSLEY D M, BLAND A E, GRUBBER J M, et al. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily[J]. *Cell*, 1992, 71:399–410.
- [29] KING J A, MARKER P C, SEUNG K J, et al. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice[J]. *Dev Biol*, 1994, 166:112–122.
- [30] FAINSOD A, STEINBEISSER H, DE ROBERTIS E M. On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo[J]. *EMBO J*, 1994, 13:5015–5025.
- [31] WINNIER G, BLESSING M, LABOSKY P A, et al. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse[J]. *Genes Dev*, 1995, 9:2105–2116.
- [32] WILSON S I, RYDSTRÖM A, TRIMBORN T, et al. The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo[J]. *Nature*, 2001, 411:325–330.

(收稿日期:2015-10-30)