

文章编号: 1674-5566(2013)06-0801-06

Eya1-Six1 信号在斑马鱼侧线神经丘毛细胞再生过程中的表达

周婷婷^{1,2}, 范纯新^{1,2}, 邹莎^{1,2}, 宋佳坤^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 海洋生物系统和神经科学研究所, 上海 201306)

摘要: 机械感觉毛细胞对于脊椎动物的听力和平衡能力至关重要, 低等脊椎动物毛细胞在遭受损伤后具有很强的再生能力。鱼类侧线神经丘毛细胞与内耳毛细胞具有相似的结构、功能、发育和再生过程。我们将受精后 5~6 d 的斑马鱼仔鱼置于 400 $\mu\text{mol/L}$ 新霉素溶液中处理 1 h 破坏神经丘毛细胞。分别对处理后 2、4、8、12 及 24 h 的斑马鱼仔鱼进行组织学切片及功能基因 *eya1* 和 *six1b* 的整体原位杂交。组织学切片结果显示: 对照组神经丘毛细胞与支持细胞形态及排布都很规则, 毛细胞和支持细胞分别位于上层和下层; 处理后 2~4 h, 上层毛细胞数量显著下降; 处理后 8~12 h, 支持细胞和毛细胞之间界限模糊, 部分支持细胞变长, 且与基膜脱离; 处理后 24 h, 部分神经丘内毛细胞及支持细胞数量、形态及排布接近对照组水平。整体原位杂交结果显示: *eya1* 和 *six1b* 在对照组斑马鱼仔鱼整个神经丘都有表达; 处理后 4 h 内神经丘中央毛细胞中 *eya1* 和 *six1b* 的表达量显著下降, 周围的支持细胞中仍保持一定量的表达; 这两个基因的表达量从处理后 8 h 起逐渐提高, 在处理 12~24 h 恢复甚至超过对照组。综上所述结果表明: 神经丘毛细胞再生过程中可能有支持细胞的参与, 且重启了神经丘毛细胞发育过程中的功能基因 *eya1* 和 *six1b*。

研究亮点: 人类及其它哺乳动物耳蜗内的毛细胞完全丧失了再生能力, 如果损伤, 将会终身耳聋。而鱼的内耳和侧线感觉毛细胞具有再生功能。毛细胞再生过程及其调控机制的阐明, 将有利于我们了解哺乳动物内耳毛细胞无法再生的原因, 加快我们对听力障碍和平衡失调的解决。

关键词: 斑马鱼; 神经丘; 毛细胞; 再生; *eya1*; *six1b*
中图分类号: S 917; Q 174
文献标志码: A

脊椎动物的内耳是感受机械振动的重要器官, 但其对噪音、氨基糖甙类抗生素、铜离子和衰老等因素极为敏感。人类及其它哺乳动物仅前庭毛细胞具有非常微弱的再生能力, 而耳蜗内的毛细胞完全丧失了再生能力^[1]。这主要是因为哺乳类听觉上皮中能够分化为毛细胞的干细胞在成体中急剧减少, 并且无法得到补充^[2]。在鸟类、两栖类和鱼类等低等脊椎动物中, 内耳的感觉毛细胞在遭到破坏后可以再生, 重新恢复到原来的结构并获得功能^[3-4]。新生的毛细胞或通过祖细胞增殖分化形成, 抑或由祖细胞直接转分化而来, 但目前多数研究都表明新生毛细胞来自于支持细胞或支持细胞亚群^[5-7]。

转录辅激活物及磷酸酶 Eya1 及其辅因子

Six1 在感觉器官形成过程中发挥重要作用。斑马鱼胚胎发育早期, *eya1* 和 *six1* 在整个头部神经基板中表达, 随后在多个分化的基板中维持, 并在内耳和侧线神经丘的感觉细胞前体和分化中的感觉细胞中表达^[8-9]。目前尚不清楚 Eya1-Six1 信号在毛细胞再生过程中的调控机制。侧线神经丘是位于鱼类体表的一系列机械感受器, 可感受水流运动。因为易于观察和实验操作, 且与内耳在结构、功能、发育和再生等方面存在大量的相似之处^[5,10], 因此斑马鱼侧线神经丘可作为研究毛细胞损伤和再生的理想模型。本文利用新霉素破坏斑马鱼神经丘毛细胞, 建立毛细胞再生模型, 通过组织学切片及分子生物学技术检测再生过程中细胞形态及相关转录因子 *eya1* 和

收稿日期: 2013-04-24

修回日期: 2013-06-26

基金项目: 国家自然科学基金(30970365); 科技部重点项目国家 973 计划(2011CB111608)

作者简介: 周婷婷(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为再生生物学。E-mail: zhoutingting_1989@126.com

通信作者: 宋佳坤, E-mail: jksong@shou.edu.cn

six1b 的表达变化。

1 材料与方法

1.1 斑马鱼饲养与新霉素处理

本实验所用斑马鱼胚胎均为成对 AB 品系雌雄亲本交配所得,胚胎饲养于灭菌后的胚胎水(1 mol/L 硫酸镁,120 μ mol/L 磷酸二氢钾,74 μ mol/L 磷酸氢二钠,1 mmol/L 氯化钙,500 μ mol/L 氯化钾,15 mmol/L 氯化钠及 500 μ mol/L 碳酸氢钠)。成鱼养殖系统水温维持在 27.5 ~ 28.5 $^{\circ}$ C, 10 ~ 14 h 的光暗周期,每天早晚各喂食一次卤虫^[11]。

用新霉素(neomycin sulfate, Bio Basic)处理受精后 5 d 的斑马鱼仔鱼,破坏神经丘毛细胞。受精 5 d 后侧线(PLL)的初级神经丘(primary neuromast)已完全成熟,之前未成熟的斑马鱼神经丘毛细胞对新霉素具有一定的抗性^[12-13]。用灭菌胚胎水将新霉素储液(50 mmol/L)稀释到 400 μ mol/L 的使用浓度。将 5 dpf 能够自由游动的斑马鱼仔鱼浸泡于 400 μ mol/L 的新霉素溶液中 1 h 后,胚胎水清洗 3 次,每次 5 min,然后转移至新鲜胚胎水中 28.5 $^{\circ}$ C 下培养使其恢复,在处理 2、4、8、12 和 24 h 分别取样作为处理组,未经新霉素处理的仔鱼作为对照组。

1.2 毛细胞计数

FM1-43 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-dibutylamino-styryl) pyridinium dibromide] 可以特异性地标记具有活性的斑马鱼侧线毛细胞^[14]。将斑马鱼浸泡于 3 μ m FM1-43 染色 10 min,经 0.05% MS-222 麻醉 1 min 后,再经胚胎水润洗 3 次后置于体视显微镜(Carl Zeiss Stereo discovery V12)下观察,其激发波长为 500 nm,反射波长为 625 nm。图 1 所示的绿色荧光亮点为 FM1-43 特异性标记的 5 dpf 斑马鱼侧线毛细胞。将以上实验所取得的斑马鱼仔鱼(每组 6 尾),分别进行 FM1-43 染色,选取每条鱼后侧线系统(即体部侧线系统)的第一个神经丘内的毛细胞进行计数,求其均值和标准差,以此观察再生过程中毛细胞数量的变化趋势。

1.3 石蜡切片及 HE 染色

将以上实验所取得的斑马鱼仔鱼(每组 7 ~ 10 尾)麻醉后,浸泡于新鲜配制的波恩氏液室温固定 30 min。固定完成后用 70% 乙醇进行冲洗,

除去残留的固定液以免影响 HE 染色。可向乙醇溶液中滴加氨水,加速苦味酸颜色的褪去。脱色结束后将样品置于 1.5 mL 离心管,经梯度乙醇(80%, 90%, 95% 和 100%)进行脱水,每个梯度 1 min。经 100% 乙醇与二甲苯 1:1 混合液作用 30 s,二甲苯透明 1 min 及石蜡浸泡 30 min 后,将其包埋在叠好的纸盒中,注入足量的石蜡(60 $^{\circ}$ C),调整好样品位置,于室温慢慢冷却后备用。将修整好的蜡块固定于木块后放到石蜡切片机(RM2235, LEICA)上进行横向连续切片,切片厚度为 5 ~ 6 μ m。将切好的蜡片置于 40 $^{\circ}$ C 温水中展片,再将其粘贴在载玻片上,置于烤片机中 37 $^{\circ}$ C 烘烤 1 ~ 2 d 备用。

将烘烤好的切片在二甲苯中脱蜡两次,每次 5 min。经梯度乙醇(100%, 95%, 80%, 70%, 自来水)复水,每个梯度 2 min,将切片浸入苏木精染液 8 min 使细胞核染色。自来水浸洗 1 min 后,1% 盐酸-乙醇浸洗数次进行分色,用显微镜观察切片以控制分色程度。再浸入 0.5% 伊红乙醇溶液使细胞质染色。经脱水透明后进行树脂封片,封片结束置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 1 ~ 2 d 后镜检。

1.4 整体原位杂交

首先利用引物从斑马鱼胚胎 cDNA 中 PCR 扩增得到 *eya1* 和 *six1b* 片段,所用引物分别为 *eya1*F: 5'-TGACCTTGAGCGCGTGTTCATTTG-3' 和 *eya1*R: 5'-CAGGGCTTCAATTTCTGCTCGCAA-3'; *six1*F: 5'-ATTCCGCTTCCTTCGTAGCATCCA-3' 和 *six1*bR: 5'-GTTCTGTTTGTAGCGCCCGTGT-3'。然后将 cDNA 片段亚克隆至 pBSK 载体中,通过体外转录法以线性化的重组质粒为模板,合成地高辛标记的特异性反义 RNA 探针。整体原位杂交过程是在先前的研究基础上做了部分调整^[15]。样品经新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,然后用 3% H_2O_2 (用 0.5% KOH 配制)室温脱色 1 h,再经蛋白酶 K (10 mg/mL) 于室温下消化 45 min 增大通透性,4% 多聚甲醛后固定 30 min。预杂交及杂交温度为 65 $^{\circ}$ C,杂交后的样品洗去非特异结合探针,经过 BSA 封闭,碱性磷酸酶-抗地高辛抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入 NBT/BCIP 充分显色后,利用梯度甲醇脱去背景色。最后在解剖镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 侧线神经丘毛细胞再生过程的观察

受精后 5 d 的斑马鱼仔鱼置于 400 $\mu\text{mol/L}$ 的新霉素溶液中处理 1 h, 然后分别对新霉素处理后 2、4、8、12 和 24 h, 分别经 FM1-43 染色及 HE 染色后, 观察毛细胞再生过程中毛细胞数量及神经丘内各类细胞的组织形态学变化。对照组神经丘内可见界限分明的上下两层细胞, 上层为毛细胞, 下层为支持细胞, 毛细胞和支持细胞形态规则。毛细胞呈梨形, 顶部为红色的胶质顶区, 细胞核位于毛细胞的基部; 支持细胞大小和

形态均一, 紧密地排布于毛细胞下方, 多数支持细胞与基膜紧密相连(图版-1~2)。而经过新霉素处理后的神经丘内, 毛细胞数量及毛细胞与支持细胞的形态和分布都发生了显著变化。新霉素处理后毛细胞形态异常, 数量少于对照组, 处理后 4 h 毛细胞数量降至最低, 而后逐渐增多(表 1, 图 2, 图版-5); 在处理 8 h 和 12 h, 毛细胞和支持细胞之间界限模糊, 支持细胞变长, 且部分支持细胞与基膜脱离(图版-6 中箭头所示); 处理后 24 h, 神经丘的毛细胞数量明显增多, 支持细胞与毛细胞的形态恢复规则, 且支持细胞与基膜重新紧密结合(表 1, 图 2, 图版-8)。

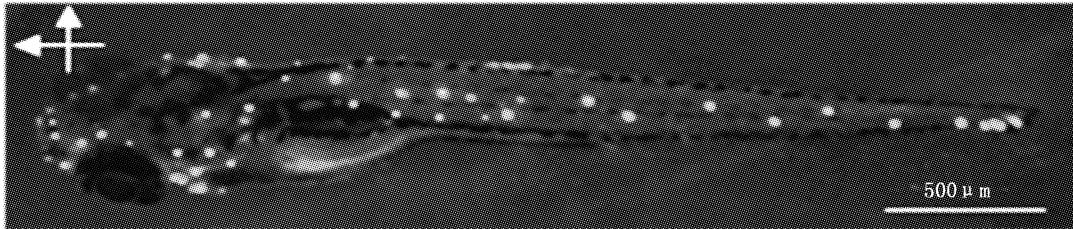
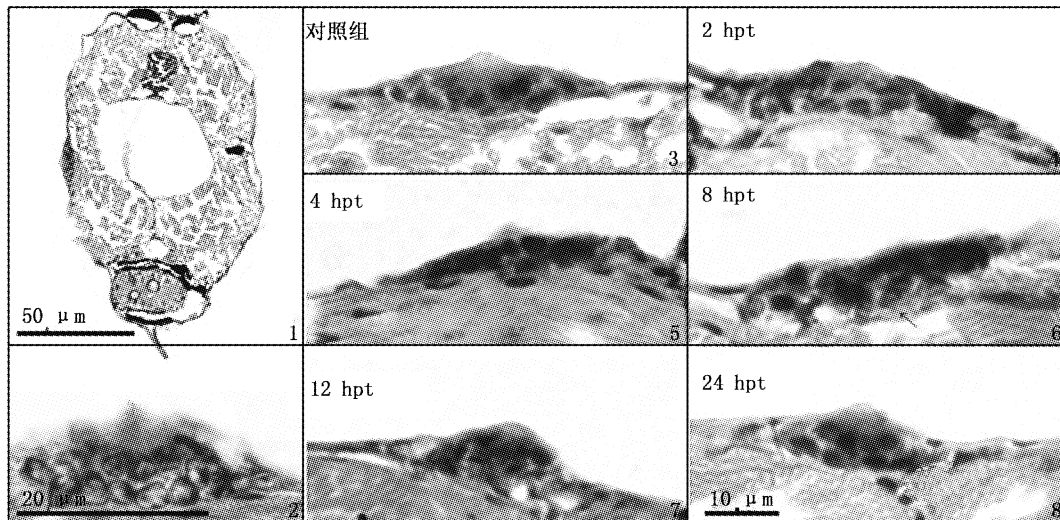


图 1 5 dpf 斑马鱼侧线神经丘分布

Fig. 1 Lateral line neuromasts stained with FM1-43

水平箭头示头部走向, 竖直箭头示背部走向。



图版 再生过程不同时间节点处理组及对照组仔鱼的横向连续切片

Plate Neomycin-treated and control larvae were fixed at different time-points and processed for consecutive sections

1. 框内为神经丘; 2. 为图 1 所示神经丘的放大图; 3 为对照组神经丘; 4-8 为再生过程中各个时间点的神经丘; 6. 箭头表示支持细胞与基膜脱离的部位。

2.2 神经丘毛细胞再生过程中 *eya1* 和 *six1b* 的表达变化

我们借助整体原位杂交技术来检测毛细胞

再生过程中基因 *eya1* 和 *six1b* 的表达变化。实验结果如图 3 所示, 受精后 5 d 的对照组斑马鱼仔鱼中, *eya1* 和 *six1b* 在成熟的侧线初级神经丘的

毛细胞与支持细胞中都有表达,且在新生的次级神经丘中也有表达;其中 *eya1* 的表达水平较 *six1b* 更高。说明在神经丘的发育及功能维持过程中,都需要 *eya1* 和 *six1b* 的参与。斑马鱼仔鱼经过新霉素处理后,神经丘中的 *eya1* 和 *six1b* 表达呈现动态特征。处理后 2 h 和 4 h, *eya1* 和 *six1b* 的表达量显著下降,但神经丘的中心及周围细胞中仍检测到微弱的表达信号。这可能是由于此阶段神经丘内存在少量对新霉素具有抗性的未成熟毛细胞以及新霉素无法损伤的支持细胞中存在基因表达造成的。在新霉素处理后 8、12 和 24 h,虽然 *six1b* 表达较微弱,但相对于处理后 4 h, *eya1* 和 *six1b* 的表达开始逐渐提高。在处理后 12 h 和 24 h 它们的表达水平达到甚至超过对照组。

表 1 新霉素处理后的毛细胞再生

Tab. 1 Hair cell regeneration in neomycin-treated neuromast (mean \pm SD)

时间节点	数量	对照组	处理组
0 hpt	6	13.0 \pm 1.0	4.0 \pm 0
2 hpt	6	13.0 \pm 1.0	2.8 \pm 0.75
4 hpt	6	13.0 \pm 1.0	1.5 \pm 0.5
8 hpt	6	13.5 \pm 0.5	5.0 \pm 1.0
12 hpt	6	13.5 \pm 0.5	7.0 \pm 1.0
24 hpt	6	15.0 \pm 1.0	8.0 \pm 0
48 hpt	6	15.0 \pm 1.0	11.5 \pm 0.5

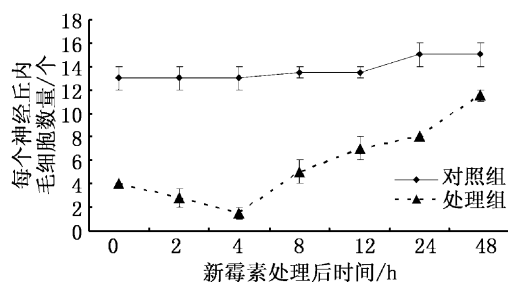
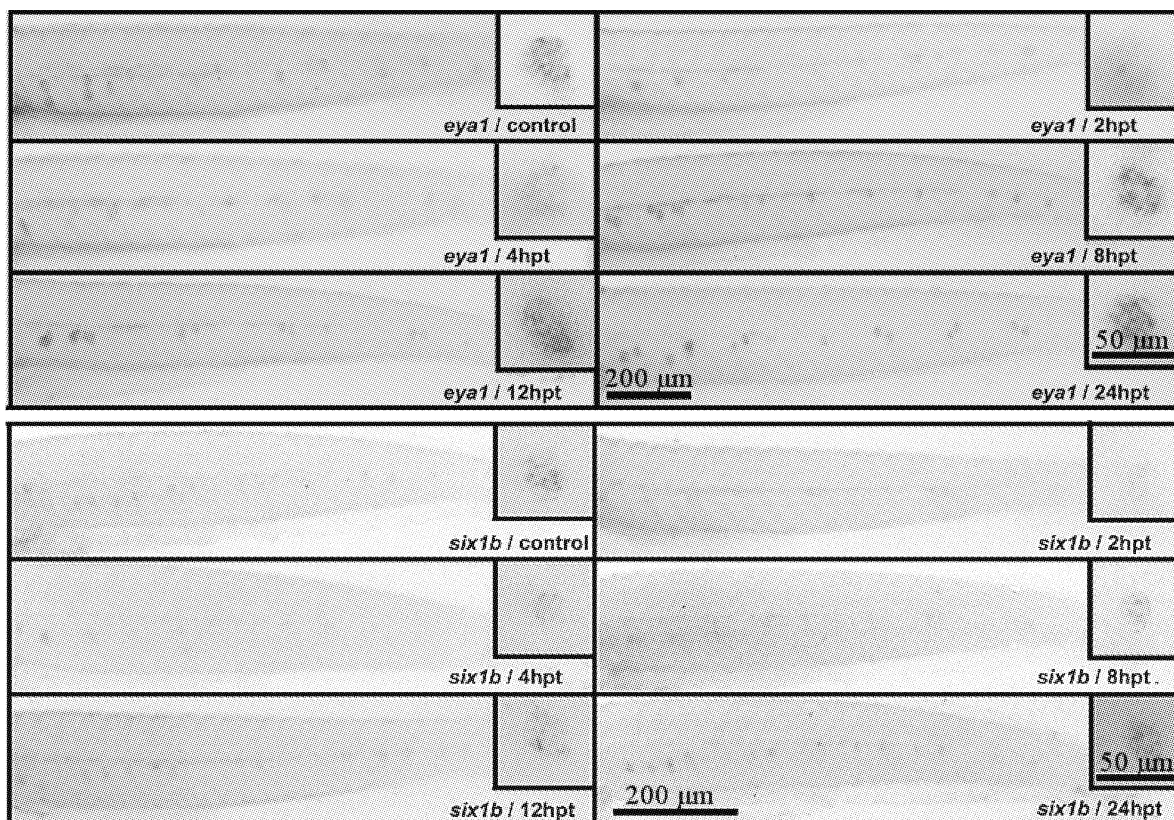


图 2 新霉素处理后的毛细胞再生

Fig. 2 Hair cell regeneration in neomycin-treated neuromast

图 3 毛细胞再生过程中基因 *eya1* 和 *six1b* 的表达变化Fig. 3 The expression of *eya1* and *six1b* in neuromasts during regeneration

水平箭头示头部走向,垂直箭头示背部走向,hpt 为新霉素处理后时间(h)。

3 讨论

本文利用组织切片技术观察了斑马鱼侧线神经丘毛细胞再生过程中,毛细胞和支持细胞形态和排布的变化,并通过整体原位杂交技术分析了毛细胞发育过程所涉及的重要基因 *eyal* 和 *six1b* 在神经丘毛细胞再生过程中的动态表达。大量研究发现氨基糖甙类抗生素或铜离子处理可致鱼类侧线神经丘毛细胞死亡,而毛细胞在死亡后的短期内可在数量上恢复至正常水平^[5,7,10]。利用扫描电镜和活性染料标记斑马鱼神经丘毛细胞,发现新霉素处理后 4 h 毛细胞下降至最低,处理后 24 h 毛细胞显著增多^[7,16]。我们的组织学结果显示:新霉素处理后 4 h 之内,神经丘内主要的形态学变化是上层毛细胞数量的剧烈减少;而在处理后 8 h 和 12 h 下层支持细胞的形态和排布发生显著变化,包括细胞变长和脱离基膜,但在整个再生过程中我们并未观察到下层支持细胞数量的显著增多,我们推测支持细胞很有可能进行了不对称分裂:一个分化为毛细胞,另一个仍保持支持细胞状态。但对于支持细胞是否可作为毛细胞的前体直接分化为毛细胞,还是先经历去分化转化为前体细胞再分化为毛细胞,还需进一步阐明。

Eya1-Six1 信号在小鼠内耳毛细胞发育过程中可通过激活 *atoh1* 启动毛细胞分化^[17]。*eyal* 和 *six1b* 也是斑马鱼内耳和神经丘发育所必需^[8,18]。由此可见,*eyal* 和 *six1b* 基因在调节脊椎动物机械感觉毛细胞的发育过程中发挥重要作用。本研究展示了斑马鱼侧线神经丘毛细胞再生过程中也有 *eyal* 和 *six1b* 基因的参与,*eyal* 和 *six1b* 的表达量经历了先减少后增多的过程,且这两个基因表达量发生改变的时间均先于支持细胞形态发生变化的时间。另外,从表达位置可以看出这两个基因在整个神经丘(包括中心的毛细胞和周围的支持细胞)都有表达。因此,我们推测:毛细胞发育所涉及的重要基因 *eyal* 和 *six1b* 在斑马鱼侧线毛细胞再生过程中被重新激活,且这两个基因可能通过影响支持细胞的行为来参与毛细胞的再生。神经丘毛细胞再生过程中可能有支持细胞的参与,且重启了神经丘毛细胞发育中的关键基因;斑马鱼侧线神经丘是研究脊椎动物毛细胞再生的一个理想模型。

参考文献:

- [1] WHITE P M, DOETZLHOFER A, LEE Y S, et al. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells [J]. *Nature*, 2006, 441:984-987.
- [2] WARCHOL M E, LAMBERT P R, GOLDSTEIN B J, et al. Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans [J]. *Science*, 1993, 259: 1619-1622.
- [3] CHENG A G, CUNNINGHAM L L, RUBEL E W, et al. Hair cell death in the avian basilar papilla: characterization of the in vitro model and caspase activation [J]. *Association of Research in Otolaryngology*, 2003, 4 (1):91-105.
- [4] YAN H Y, SAIDEL W M, CHANG J S, et al. Sensory hair cells of a fish ear: evidence of multiple types based on ototoxicity sensitivity [J]. *Biology Science*, 1991, 245:133-138.
- [5] MA E Y, RUBEL E W, RAIBLE D W. Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line [J]. *Neuroscience*, 2008, 28:2261-2273.
- [6] TAYLOR R R, FORGE A. Hair cell regeneration in sensory epithelia from the inner ear of a urodele amphibian [J]. *Comparative Neurology*, 2005, 484(1):105-120.
- [7] HERNANDEZ P P, OLIVARI F A, SARRAZIN A F. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal [J]. *Development Neurobiology*, 2007, 67:637-654.
- [8] SAHLY I, ANDERMANN P, PETIT C. The zebrafish *eyal* gene and its expression pattern during embryogenesis [J]. *Development Genes Evolution*, 1999, 209:399-410.
- [9] BESSARAB D A, CHONG S W, KORZH V. Expression of zebrafish *six1* during sensory organ development and myogenesis [J]. *Development Dynamic*, 2004, 230:781-786.
- [10] SONG J, YAN H Y, ARTHUR N P. Damage and recovery of hair cells in fish canal (but not superficial) neuromasts after gentamicin exposure [J]. *Hearing Research*, 1995, 91(1/2):63-71.
- [11] WANG X, HE H, TANG W, et al. Two origins of blastemal progenitors define blastemal regeneration of zebrafish lower jaw [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e45380.
- [12] MURAKAMI S L, CUNNINGHAM L L, WERNER L A, et al. Developmental differences in susceptibility to neomycin-induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Hearing Research*, 2003, 186: 47-56.
- [13] SANTOS F, MACDONALD G, RUBEL E W, et al. Lateral line hair cell maturation is a determinant of aminoglycoside susceptibility in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Hearing Research*, 2006, 213:25-33.
- [14] SEILER C, NICOLSON T. Defective calmodulin-dependent

- rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants [J]. *Neurobiology*, 1999, 41:424–434.
- [15] THISSE C, THISSE B. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(1):59–69.
- [16] HARRIS J, CHENG A, CUNNINGHAM L, et al. Neomycin induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Association Resource Otolaryngol*, 2003, 4:219–234.
- [17] AHMED M, WONG E Y M, SUN J, et al. *Eya1-six1* interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating *atoh1* expression in cooperation with *sox2* [J]. *Developmental Cell*, 2012, 22(2):377–390.
- [18] KOZLOWSKI D J, WHITFIELD T T, HUKRIEDE N A, et al. The zebrafish dog-eared mutation disrupts *eya1*, a gene required for cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line [J]. *Development Biology*, 2005, 77:27–41.

The expression of *Eya1-Six1* signaling in the regeneration of hair cell in zebrafish lateral line neuromasts

ZHOU Ting-ting^{1,2}, FAN Chun-xin^{1,2}, ZOU Sha^{1,2}, SONG Jia-kun^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute for Marine Biosystem and Neurosciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Mechanoreceptive hair cells are essential for hearing and balance in vertebrates. They have an ability of spontaneous regeneration after damage in lower vertebrate but not in mammals. The lateral line hair cells in fish share structural, functional, developmental and regenerative similarities with those in the inner ear. In order to understand the mechanism of hair cell regeneration and the role of key functional genes, *eya1* and *six1b* during this process, zebrafish lateral line neuromast hair cells were taken as the study subject in this report. We destroyed neuromast hair cells by treating zebrafish larvae of 5 days postfertilization in 400 $\mu\text{mol/L}$ neomycin for 1 hour. Both the control and treatment groups were observed at 2, 4, 8, 12 and 24 hours post-treatment (hpt) via methods of histological sections and *in situ* hybridization (ISH). It was found that, in control group, hair cells and supporting cells with regular shape were distributed ordinarily in top and lower respectively as two layers; however, the number of the cell in the top layer was significantly decreased during 2–4 hpt. During 8–12 hpt, the boundary between the top and lower layer was indistinct, and some supporting cells were elongated and separated from basement membrane. By 24 hpt, the number, shape, distribution of hair cells and supporting cells in some neuromasts were nearly recovered to the level of control samples. ISH results showed that both *eya1* and *six1b* were expressed in the whole neuromast of the zebrafish larvae in control group. The expression levels of *eya1* and *six1b* in hair cells, but not supporting cells, were significantly reduced during 2–4 hpt. The levels started increasing at 8 hpt, and gradually reached full recovery or even exceeded the level in the control group during 12–24 hpt. Our results indicate that, both the key functional genes *eya1* and *six1b* are reactivated during the hair cell regeneration process in zebrafish lateral line neuromasts and the supporting cells may be involved in hair cell regeneration.

Key words: zebrafish; neuromast; hair cell; regeneration; *eya1*; *six1b*