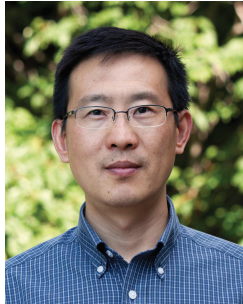


特约综述



本实验室以蝾螈、爪蟾及小鼠等多种动物为模型, 研究器官再生特别是断肢再生的细胞与分子生物学机理, 并探讨诱导哺乳动物器官再生的途径。研究方向包括小鼠断趾再生机制及诱导、两栖类动物断肢再生与创伤愈合机理以及多能干细胞向器官前体细胞的定向诱导分化等。

http://life.tongji.edu.cn/Show.aspx?info_id=1717&info_lb=298&flag=98

两栖动物器官再生的细胞与分子机制

杨 荔 林古法*

(同济大学附属东方医院转化医学研究中心, 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200120)

摘要 包括人类在内的哺乳动物仅具有极为有限的再生能力, 然而以蝾螈、非洲爪蟾等为代表的两栖类动物则能在特定时期完全修复缺损的组织器官。该文对近年来两栖类动物组织器官再生的细胞及分子机制研究作一综述, 并以诱导成体爪蟾断肢再生为例, 探讨诱导器官再生的研究策略。

关键词 两栖类; 器官再生; 细胞来源; 分子机制; 诱导

Cellular and Molecular Mechanisms in Amphibian Appendage Regeneration

Yang Li, Lin Gufa*

(Research Center for Translational Medicine at Shanghai East Hospital, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200120, China)

Abstract The ultimate goal of regenerative medicine is to stimulate the regeneration and functional reconstruction of damaged tissues and injured organs. While mammals, including humans, only have very limited regenerative ability, amphibians such as the Salamanders and the African clawed frog *Xenopus* can fully regenerate their lost tissues, such as appendages including the limb and the tail, in a particular period of life time. Here we review the cellular origins and molecular mechanisms in amphibian regeneration, where recent findings have provided new strategies for stimulating organ regeneration.

Keywords amphibian regeneration; cell origins; molecular mechanisms; stimulation

实现人类器官再生是发育生物学与再生医学研究者梦寐以求的目标。为破解器官再生的奥秘, 研究者们选取大量模式生物, 通过对比机体正常组织与创伤修复再生后组织的特征与功能, 研究组织

器官的重建机制, 以期寻找有效的生物治疗方法, 促进机体的自我修复与再生。相较于哺乳动物(包括人类)的有限再生能力, 一些低等动物则具有完全再生受损器官的能力^[1-3]。在脊椎动物中, 以蝾螈(Salamanders)为代表的有尾两栖类, 因其令人惊羨的再生能力而得到研究者的青睐。有尾两栖类动物的组织器官包括四肢、尾、心脏、颌骨、脑及视网膜等

*通讯作者。Tel: 021-65983272, E-mail: lingufa@tongji.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-65983272, E-mail: lingufa@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2015-06-03 16:41

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150603.1641.003.html>

受到损伤后, 均可完全再生。其再生的组织器官在形态和功能方面与正常器官无异, 且该再生能力贯穿于整个生命周期。因此, 人们对有尾两栖类的研究也最为深远。近年来, 以非洲爪蟾(*Xenopus*)为代表的无尾两栖类也逐渐进入人们的视野, 成为器官再生研究的新模型^[4]。不同于有尾两栖类, 爪蟾的再生能力随着其发育成熟而逐渐丧失。如早期蝌蚪的肢体在离断后可以完全再生, 而晚期蝌蚪的肢体及变态后的成体断肢不可再生^[5]。这一再生行为特性使爪蟾成为研究器官再生的理想模型。通过诱导激活成体爪蟾器官再生的研究, 或许可以为最终实现器官再生的诱导提供理论基础。

近年来, 研究者们一直致力于对机体组织器官再生的细胞及分子生物学机理进行研究, 深入讨论再生组织的细胞来源及诱导再生的分子机制。随着细胞谱系追踪技术的应用以及转基因技术的发展, 人们正一步步揭示器官再生之谜。本文将对目前关于两栖类动物器官再生的细胞来源及分子机制的主要研究进展进行简要综述, 并以爪蟾断肢再生诱导为例, 说明两栖类动物器官再生研究对哺乳动物器官再生研究的启示意义。

1 再生组织的细胞来源

在两栖类肢体被截断后, 受损肢体残端将形成一个被称为再生芽基或胚基(blastema)的结构介导肢体的再生; 晶状体被摘除后, 亦将产生新的晶状体细胞及晶状体纤维, 从而形成一个新的正常晶状体。那么, 器官再生所需要的细胞从何而来? 随着人们对再生医学的兴趣越来越浓厚, 该问题对基于细胞移植或细胞介导的再生医学研究也具有重要意义。研究表明, 再生组织中的新细胞可能有三种来源: 来自于创口附近细胞的去分化(dedifferentiation)、来自于不同类型终末分化细胞的转分化(transdifferentiation)以及来自成体干细胞(adult stem cells)或谱系限定的前体(祖)细胞(lineage specific progenitor cells)。有趣的是, 同一物种不同组织器官的再生可能采用了不同的细胞来源途径, 而某一器官的再生在不同动物模型中可通过相似或多样化的机制实现再生器官的重建。

1.1 去分化

创面残端组织通过去分化这一机制为再生组织器官提供新细胞主要见于断肢再生。去分化首先

由Thornton于1938年在研究斑点钝口螈(*Ambystoma maculatum*)幼体前肢肌肉再生时提出^[6]。后来的亚显微结构观察显示, 在肢体截断后, 断肢残端的多核肌纤维发生细胞核的增大, 进而崩解形成单核的成肌细胞。这些前体细胞重新进入S期, 获得活跃的增殖分化潜能, 进入断肢再生芽基^[7]。早期(1960年代)研究提示, 肌纤维去分化形成的细胞是新生断肢肌肉的来源^[8-9]。但由于缺乏可靠的细胞示踪标记技术, 这种说法并没有很快被接受。直到1993年, Brookes实验室^[10]才首先在绿红东美螈(*Notophthalmus viridescens*, 东美螈, Newt)断肢再生中应用细胞标记技术确凿证实了肌纤维的去分化作为肌肉组织再生的细胞来源这一机制。他们将显微注射过荧光染料罗丹明糖苷的多核肌小管植入断肢芽基并于7 d后在芽基中发现了被标记的单核细胞, 这些标记细胞在移植后可以大量增殖。为排除染色剂通过细胞膜传递的可能, 他们又利用整合到基因组的逆转录病毒永久地标记了肌小管。移植过肌小管的断肢芽基中含有标记的单核细胞, 而且这些细胞可以被BrdU标记, 说明这些细胞重新进入了细胞周期^[11]。肌肉的去分化同样在截断的墨西哥钝口螈(*Ambystoma mexicanum*, 美西螈, Axolotl)尾部被证实。Echeverri等^[12]发现, 由截面周围的肌纤维去分化形成的单核细胞约占断尾芽基细胞总数的17%。因此, 去分化是蝾螈断肢和断尾中肌肉再生的重要细胞生物学机制。

肌纤维去分化的关键是肌细胞重新进入细胞分裂周期。这一过程发生在肌纤维崩解为单核细胞之前^[11]。那么是什么因素导致了蝾螈肌纤维细胞重新进入细胞分裂周期呢?

在体外培养条件下, 蝾螈肌小管在血清刺激下进入S期伴随着成视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb蛋白)的磷酸化失活^[13]。Rb蛋白是袋状蛋白家族的一员, 通过抑制E2F转录因子, 抑制细胞G₁期向S期的转换^[14]。Tanaka等^[15]进一步证明凝血酶的水解调节去分化, 通过凝血酶活化的下游配体直接作用于肌小管诱导细胞周期的重进入。

另一与肌细胞去分化有关的重要因素是同源盒蛋白1(msh homeobox 1, *msx1*)基因, *Msx1*在体外培养中可刺激哺乳动物肌小管的去分化^[16]。Kumar等^[17]发现, 东美螈(Newt)肌纤维崩裂与*msx1*基因表达之间有密切的关系。然而, 在美西螈(Axolotl)的断尾再生模型中, 截断面周围的肌纤维中并不能检测

到*msx1*的上调,*msx1*的过表达与下调也均不影响肌纤维的去分化^[18]。单独过表达*msx1*基因本身也不能影响其他动物的断肢再生能力,如在爪蟾中,人为上调*msx1*不足以恢复晚期蝌蚪的断肢再生能力^[19]。因此,有关去分化的分子机理有待于进一步深入研究。

虽然上述实验都证实去分化的肌细胞是有尾两栖类新生肌肉的来源,但近几年研究表明,位于肌纤维肌膜与基底膜之间的肌肉干细胞——卫星细胞(satellite cell)的激活,也是蝾螈肢体肌肉再生中的重要参与者^[20]。Sandoval-Guzman等^[21]应用基于Cre-loxP的基因追踪技术,对两种蝾螈四肢骨骼肌细胞进行标记,发现在东美螈(Newt)中,再生的肌肉组织完全来自肌纤维的去分化,然而在美西螈(Axolotl)中,肌纤维去分化对蝾螈四肢再生没有贡献。Pax7阳性的卫星细胞则是美西螈断肢肌肉再生的主要来源。这表明,两种甚至是更多的方法介导了同一器官在不同物种中的再生,这也为研究者开发治疗性的移植手段提供了多种选择。

1.2 转分化

转分化是指一种类型的终末分化细胞转变成另一种类型的分化细胞的现象^[22]。通常认为,完全分化的细胞其命运是不可逆转的,但在某些情况下,细胞确实存在一定的可塑性。

关于转分化的经典例子是两栖类晶状体及视网膜的再生。Wolff^[23]首先在东美螈模型中证明,新生的晶状体细胞是由虹膜背缘色素上皮细胞转分化而来的。在晶状体再生过程中,色素上皮细胞首先去分化并重新进入细胞周期,随后大量细胞扩增形成晶状体泡,再生的晶状体其分化过程与其在胚胎发育时相同,按照不同的分化成熟阶段进行^[24-25]。然而,不同于著名的Wolffian晶状体再生,非洲爪蟾等无尾两栖类的晶状体再生是由角膜内层细胞转分化为晶状体细胞的^[26]。

另一转分化现象是东美螈的视网膜再生。受伤后,视网膜色素上皮失去原本的表型并重新进入细胞周期,形成神经上皮细胞层,最终分化为组成视网膜的所有不同细胞类型。与晶状体再生相似,东美螈的视网膜再生也发生于成年个体中^[27]。东美螈的再生能力也不随年龄增长及反复损伤而有所减低。如Tsonis实验室曾报导,30岁龄的东美螈历经18次晶状体切除手术仍保持晶状体再生的能力^[28]。

研究者们试图解释转分化的机制,希望能直

接转化细胞类型并应用于临床。成纤维生长因子1(fibroblast growth factor 1, FGF1)被报道称是诱导两栖类中晶状体再生的重要因子^[29-30]。此外,Imoka与Brookes^[31]证明,虹膜背缘的凝血酶的激活是晶状体再生的首要因素,抑制凝血酶活性将阻止细胞重新进入细胞周期,且在晶状体无法再生的美西螈中,虹膜中的凝血酶不被激活。目前,有许多关于特定因子处理后细胞直接转化的报道,包括跨胚层的转化^[32]。例如,随着一些因子的过表达,肝和胰腺细胞可以被转化,胰腺的外分泌细胞可以转化为内分泌细胞^[33-35];功能性神经元可直接由成纤维转化而成^[36]。这些诱导转分化方法的改进为大量获取细胞以用于再生医学研究提供了基础。

1.3 前体细胞

利用可整合至基因组的报告基因,如绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)基因,通过转基因技术永久标记特定组织,可使研究者精确地追溯肢体再生中的细胞来源。近年来,关于爪蟾断尾再生及美西螈断肢再生的谱系追踪实验证明,谱系限定的前体细胞(祖细胞)是肢体再生中新细胞的主要来源。

爪蟾蝌蚪尾巴截断后能完全再生,且蝌蚪尾部的组织类型界限分明,其中部的脊索(notochord)、背侧中线的脊髓(spinal cord)以及分段的肌节(myotome)作为三个主要的轴向结构被结缔组织及上皮组织包围。据此,我们与Slack实验室同事采用组织移植的方法,用GFP标记特定组织,以此来追踪再生组织的细胞来源。

已有研究证明,在有尾两栖类断肢再生中,由肌纤维崩解、肌细胞去分化形成的单核细胞是再生肌肉的前体细胞,也是构成再生芽基的重要细胞来源。为研究在爪蟾中是否也存在这样的去分化现象,我们与Slack实验室同事利用一段来自早期或晚期神经胚期的前体节中胚层(presomite mesoderm, PSM)进行移植,以标记蝌蚪尾部的肌肉组织。实验表明,无论早期或晚期神经胚期的PSM移植均能够有效标记尾部肌肉组织。但尾部截断后,来自早期神经胚PSM移植的尾部再生中的肌纤维很少被标记;而来自晚期神经胚PSM移植的断尾再生尾部中则可观察到大量GFP标记的肌纤维^[37-38]。GFP未在新生肌纤维中表达,说明在爪蟾尾部肌肉再生中并没有发生去分化的现象,而是一些其他类型的细胞提供了再生肌肉所需要的细胞前体。进一步的研

究证明, 表达Pax7的肌卫星细胞是爪蟾尾部再生中新肌肉的来源^[37,39]。肌卫星细胞在早期PSM中尚未形成, 而晚期神经胚的PSM则含有大量预定形成肌卫星细胞的前体细胞。肌卫星细胞是位于肌膜与基底膜间的微小的单核细胞^[40]。实验证明, 肌卫星细胞是哺乳动物肌肉再生的细胞来源。在哺乳动物中, 当肌肉组织受损后, 肌卫星细胞被激活, 扩增分化形成新的肌纤维^[41]。在爪蟾断尾再生中, 当肌卫星细胞被耗尽时(如通过拮抗Pax7功能), 我们可以看到再生的肌肉细胞明显地减少了^[39]。因此, 不同于部分有尾两栖类, 爪蟾蝌蚪通过肌肉干细胞重建肌肉组织, 而非利用去分化途径。

为追踪脊髓的再生, 我们标记了蝌蚪尾部脊髓的一部分。尾部截断后, 发现只要在创面有0.5 mm脊髓被标记, 整个再生的脊髓都可见荧光信号, 表明这一段脊髓提供了形成新脊髓的所有细胞^[42]。最近的研究证明, 表达转录因子Sox2的细胞可能是再生脊髓的前体。这一类细胞被发现定位于脊髓的室管膜区域, 并聚积在脊髓横切后的创伤部位。Sox2的表达程度与脊髓的再生能力有关, 下调Sox2将抑制再生^[43]。在美西螈尾部中发现, 克隆自单一脊髓细胞的神经球在移植后可以整合到脊髓中。在尾部截断后, 移植的神经球有产生再生脊髓所有细胞类型的潜力^[44]。这些研究显示, 蝾螈脊髓中可能含有一种类似于神经干细胞的细胞群体, 这些细胞为脊髓再生提供了所需的细胞前体。

蝌蚪尾部脊索的再生则很直接。当标记的脊索被截断后, 截面附近的脊索细胞大量增殖形成一个子弹形的细胞团。该细胞团提供了新生脊索的所有细胞, GFP标记的脊索细胞也只发现于再生的脊索^[37]。其他组织类型, 如表皮和色素细胞, 也来自它们相应的组织类型^[42]。

上述分析显示, 蝌蚪尾部的各类组织在再生中行为独立, 每个组织类型由它们各自的特异前体产生。因此, 我们的研究说明, 爪蟾蝌蚪的断尾再生, 特别是肌肉的再生, 采用了不同于蝾螈的机制。无尾两栖类动物爪蟾采用的再生肌肉的机制更与哺乳动物相似, 即通过肌肉干细胞的增殖分化而实现肌肉再生。运用我们的组织标记策略, Kragl等^[45]亦发现在美西螈断肢中, 再生的组织均来自于相应的前体组织。标记的上皮细胞只会形成新生上皮细胞, 断端肌肉只能再生为新的肌肉, GFP标记的施旺细

胞只能成为新的施旺细胞。标记的皮肤真皮组织能参与真皮和软骨及肌腱的再生, 但它们均属晚期中胚层, 因此并没有跨胚层再生现象。这一实验证明, 美西螈断肢再生芽基并非之前认为的均质的未分化的细胞群。相反, 芽基是由大量谱系限定的前体细胞组成, 而且各胚层间并不能实现转分化。

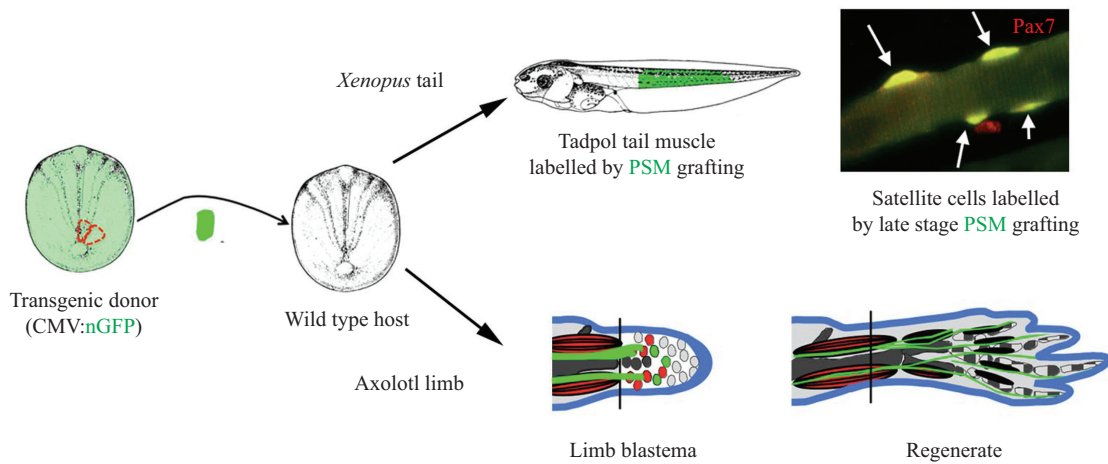
以上两栖类肢体再生的实验证明, 除了去分化与转分化, 谱系限定的前体细胞作为新生组织的细胞来源是两栖类器官再生的重要机制(图1)。

2 再生的分子机制

2.1 再生的信号通路

长期以来, 有尾两栖类动物研究受制于遗传学与分子手段的相对滞后, 而转基因技术的发展使得非洲爪蟾蝌蚪成为研究再生过程信号通路的较好模型。因此, 我们将以爪蟾蝌蚪断尾再生为例对其分子机制作一简述。爪蟾胚胎尾芽发育过程中的重要信号通路包括BMP、Notch、Wnt以及FGF^[46]。而这些信号通路同样对蝌蚪断尾再生起了重要的调控作用^[47]。抑制BMP与Notch通路将抑制再生, 而激活BMP信号通路(过表达BMP受体Alk3)或上调Notch通路(过表达NCID)可恢复爪蟾尾部在不应期(refractory period, 指的是断尾在第46/47期间相对不能再生)的再生^[47]。我们的研究亦证明了FGF和Wnt信号通路对断尾再生的重要性。我们发现, 当FGF通路在显性失活的FGF受体XFD或FGF受体拮抗剂SU5402的作用下功能下降时, 蝌蚪的尾部再生无法进行; 当Wnt通路被Wnt信号通路抑制因子1(dickkopf WNT signaling inhibitor 1, Dkk1)抑制时, 尾部再生则不发生, 而通过小分子化合物BIO激活Wnt信号或过表达持续活化的 β -catenin时, 断尾不仅能够再生, 而且断尾芽基的细胞扩增被促进而导致断尾生长速度加快^[48]。通过联合使用基因表达与小分子化合物处理, 我们阐述了这些信号通路的相互关系。抑制Wnt信号通路的同时激活FGF信号通路, 断尾可以再生; 而激活Wnt信号通路的同时抑制FGF信号则断尾不能再生; 过表达BMP抑制剂noggin则抑制Wnt及FGF信号通路中相关因子的表达^[48]。这些结果表明, BMP、Wnt及FGF三条信号通路呈BMP→Wnt→FGF线性排列(图2)。我们现有实验证据显示, 类似机理可能在爪蟾断肢再生中存在。

Ho等^[49]利用转化生长因子 β (transforming growth



通过在胚胎发育早期将转基因标记的组织移植到野生型胚胎可以标记晚期爪蟾蝌蚪尾部(上)或蝾螈肢体的特定组织,以对断尾及断肢再生的细胞来源进行分析。爪蟾中,只有含有卫星细胞的胚胎中胚层移植可以有效标记尾部卫星细胞(表达Pax7)及再生肌纤维。爪蟾断尾再生中无转分化现象。美西螈断肢再生芽基由各种前体细胞构成,再生中各组织亦来源于相应组织的前体细胞。

Labelling of specific tissue types in *Xenopus* tadpole tail and Axolotl limb can be achieved by transplanting GFP labelled embryonic tissues into wild-type embryos. The muscle tissue is labelled by PSM that contains satellite cells, as indicated by Pax7 expression. No transdifferentiation is observed during *Xenopus* tail regeneration. Similarly, the limb blastema in Axolotl consists of various types of fate restricted progenitor cells that provided cells for the regenerated limb.

图1 爪蟾断尾再生与美西螈断肢再生的细胞来源(根据文献[37-39,42,45]整理,已获授权)

Fig.1 Cell origins of the regenerated *Xenopus* tail and Axolotl limb (based on references [37-39,42,45], with permission)

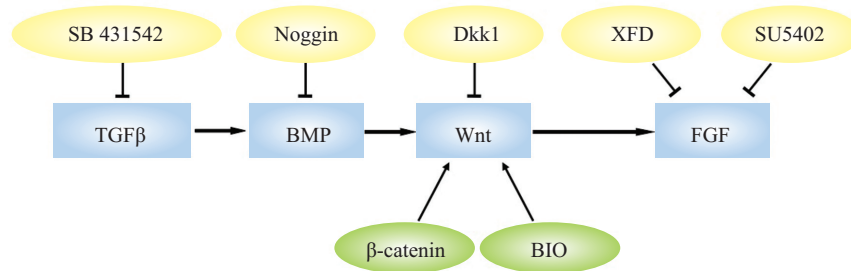


图2 非洲爪蟾断尾再生中线性信号通路(根据文献[47-49]整理)

Fig.2 A linear signaling pathway operating in the *Xenopus* tadpole tail regeneration (based on references [47-49])

factor β , TGF β)1型受体抑制剂SB 431542发现, TGF β 通路也在尾部再生中起重要的作用。有趣的是, 干扰BMP、Notch、Wnt及FGF通路对断尾创面修复并无影响, 其主要影响的是再生特异性的事件如芽基形成与增殖; 而TGF β 通路不仅在再生最早期的创伤愈合阶段起作用, 在尾部再生的不同下游阶段也发挥着重要的作用。SB 431542的处理也抑制再生芽基的形成以及BMP通路靶点的激活。

2.2 再生与细胞凋亡

Levin实验室发现了细胞凋亡在断尾再生中的作用。断尾离断后在残端有大量的细胞凋亡发生。若在断尾后的24 h内抑制细胞凋亡蛋白酶3(caspase 3)介导的细胞凋亡, 断尾再生会受到抑制, 断尾残端的细胞有丝分裂变少, 表明凋亡的细胞会分泌一些

细胞扩增信号^[50]。这一信号可能是Wnt家族成员。在水螅(Hydra)头部的再生中已证实, 细胞凋亡可以诱导Wnt3a分泌继而影响水螅再生^[51]。有意思的是, 在蝌蚪的第46/47期再生能力下降时, 断尾残端发生细胞凋亡的区域比正常再生情况下要大^[50], 说明再生过程中细胞凋亡的程度/幅度也需要精确的调控, 太多或太少的细胞凋亡均不利于再生。

2.3 再生的表观遗传学调控

近年来, 表观遗传修饰作为器官再生调节的重要因素也受到广泛重视。例如, 变态后的爪蟾断肢中 shh 启动子的高度甲基化可能导致了 shh 的低表达, 从而抑制了断肢再生^[52]。DNA的甲基化由甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)介导。在斑马鱼尾鳍再生实验中发现, $dnmt-1$ 的表达量减少可致

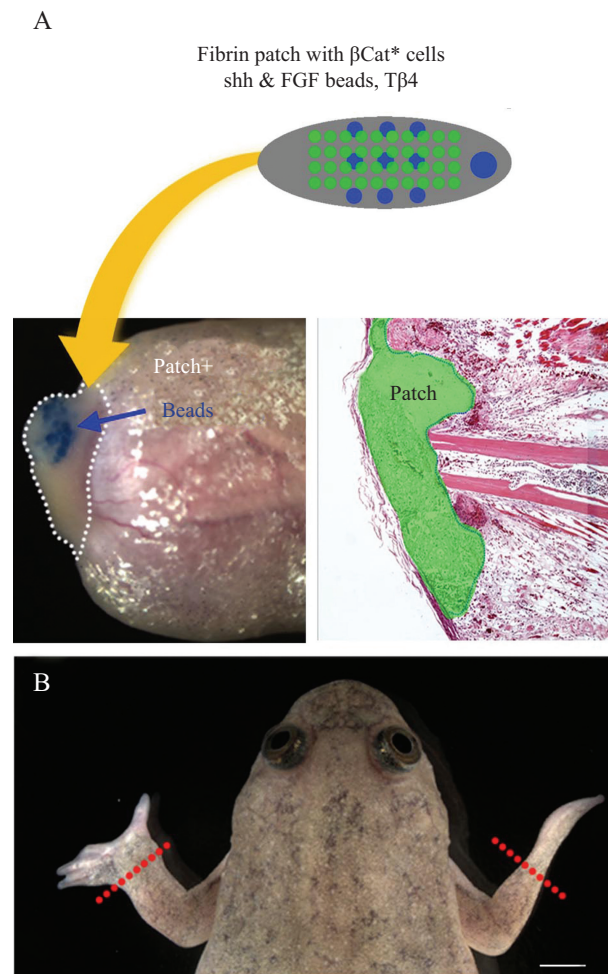
胰岛 β 细胞再生能力的增加^[53]。组蛋白的去乙酰化作用也参与调控断尾的再生, Levin实验室^[54]和Beck实验室^[55]分别证明, 抑制组蛋白去乙酰化酶(histon deacetylase, HDAC)将抑制断尾再生。抑制乙酰化对再生的最显著影响发生于创伤愈合和早期芽基形成阶段。再生过程中表观遗传学机制的研究, 对深入了解肢体再生的细胞与分子机制有重要价值。

3 两栖动物作为肢体再生诱导模型

研究动物器官包括断肢与断尾再生的终极目的是诱导人类器官再生。但目前的科研进展尚不能在哺乳动物中实现器官再生的诱导。有尾两栖类动物的断肢在创伤后一般均能再生, 因而不是测试诱导再生手段的合适模型。而无尾两栖类动物爪蟾的断肢再生特性使其成为测试刺激手段的理想模型。这是由于爪蟾蝌蚪在变态之前虽然具有较强的肢体再生能力, 但随着肢芽的分化, 这一能力逐渐丧失, 变态后四肢不能再生, 只能在肢体截断后产生不分节的针型软骨^[5]。因此, 在过去多年里, 有许多诱导无尾两栖类动物断肢再生的尝试^[3]。早期的尝试主要包括对断肢残端进行反复创伤、为断肢提供额外的神经支配以及对断肢进行电流刺激等。有些成功诱导断肢再生的报道在后来被证明不能重复, 而有些只能适用于蝌蚪期的断肢而在成体断肢中则不起作用。有报道称, 可以通过对断肢残端添加外源生长因子如Fgf10以增加变态前蝌蚪断肢再生潜能^[56], 但Fgf10的作用也仅限于蝌蚪断肢, 对成体爪蟾的断肢再生则不起作用。

断肢再生依赖于芽基形成, 而芽基由大量谱系限定的前体细胞组成。对爪蟾四肢再生的研究证明, 再生能力是发育中肢体固有的性质^[57-58]。早期发育的肢体前体细胞具有再生潜能, 而成体断肢已分化细胞则已丧失再生潜能。因此, 我们认为, 可利用肢芽前体细胞移植的方法来促进再生。我们通过将蝌蚪肢芽前体细胞移植至爪蟾前肢残端, 证明了早期的肢芽前体细胞确实可以刺激断肢再生^[59]。

实现该断肢再生的诱导必须满足两个重要条件: 一是需要Wnt/ β -catenin通路的高度活跃以及胞外因子(如Shh及Fgf10)的补充; 二是肢芽前体细胞必须以合适的载体移植入断肢残端, 例如将细胞与纤维蛋白基质混合后植入残端创面(图3A)。尽管我们所诱导的再生前肢与正常前肢还有一定差距, 但已



A: 将来自蝌蚪后肢芽基的细胞及所需外源因子与纤维基质混合后, 移植入成年爪蟾断肢残端。移植的前体细胞占据再生芽基的位置。 β cat*: 可诱导表达持续活化型 β -catenin; B: 诱导的再生前肢呈现多指且有分节, 而未刺激前肢只能长出不分节的针型软骨, 标尺=1 mm。
A: transplantation of a fibrin patch containing limb progenitor cells and exogenous factors onto adult *Xenopus* limb stump. Transplanted limb progenitor cells occupy the position of a regeneration blastema. β cat*: expressing heat shock inducible constitutive active form of β -catenin; B: a frog with stimulated limb regeneration on the left arm. The regenerated limb contains multiple digits, which are segmented (left). As control, spike formation is observed on the untreated right side. Scale bar=1 mm.
图3 刺激非洲爪蟾断肢再生策略(根据文献[59]修改, 已获授权)

Fig.3 A strategy for stimulating adult *Xenopus* limb regeneration (modified from reference [59], with permission)

出现多个指体且有指分节(图3B), 其活动受神经支配, 且表达关节标志物 $gdf5$, 显示了在这些再生肢体中可能形成了关节。我们发现, 只有来自早期蝌蚪后肢的前体细胞具有刺激成体断肢再生的能力, 而来自蝌蚪尾部芽基的具有再生能力的细胞并不具有促进断肢再生的能力, 说明器官再生需要其自身相对应的前体细胞。同时, 我们的实验证明Shh及Fgf10等生长因子的添加可以支持移植的前体细胞

的存活和扩增。但仅在断肢残端给以Shh及Fgf10处理而不进行细胞移植则无法诱导再生,揭示了前体细胞对刺激诱导再生的必要性^[59]。

值得注意的是,我们发现肢芽前体细胞移植后的再生断肢组织不仅由供体细胞组成,还有大量宿主细胞的参与,这表明移植的前体细胞不仅参与了新肢体的再生,还可动员缺乏再生能力的宿主细胞参与再生^[59]。这提示,诱导更大体量的断肢再生不一定需要巨量的细胞移植。这为探讨通过前体细胞移植来诱导哺乳动物断肢再生的可行性提供了基础。

4 结语与展望

近年来,人们以两栖动物为模型对器官再生内在机制的研究已取得了不菲的成绩。研究证实,两栖类肢体的再生主要通过谱系限定的前体细胞或成体干细胞的扩增与分化,晶状体及视网膜的再生组织则通过细胞的转分化而来。通过基因表达等分析手段,现有研究证明,BMP、Notch、Wnt以及FGF等细胞信号途径,在再生过程中起着重要的介导调控作用。

包括人类在内的哺乳动物仅有极为有限的再生能力:成年及幼年小鼠指(趾)末端的受损离断可再生^[60],人类亦可再生指尖末梢^[61]。但这种再生能力仅局限于不超过末端指节的50%部位,任何更近端的肢体损伤均不能再生。尽管如此,人类指尖再生现象说明,理论上有可能实现更近端部位的断指/断肢再生的诱导。关于小鼠趾尖再生的详细的谱系追踪分析证明,与蝌蚪尾巴及蝾螈四肢类似,芽基由谱系限定的前体细胞组成^[62-63]。因此,是否可应用前体细胞移植的方法促进哺乳动物的再生已成为研究的重点。值得注意的是,移植的前体细胞在两栖类与哺乳动物中的行为有很大不同。例如,在美西螈中,神经球移植后产生广泛的神经发生以及组成脊髓的各种类型细胞^[44];然而在哺乳动物中,神经球移植后通常导致星形胶质细胞的形成,且限制神经形成^[64-65]。对其中产生区别的内在机制的研究有利于诱导再生策略的探讨。因此,两栖动物作为出色的再生研究模型,将为应用于人类的再生治疗提供理论基础。

致谢——

衷心感谢丁小燕研究员、易静教授、陈跃磊博士对本文提出的宝贵建议。

参考文献 (References)

- 1 Brookes JP, Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 525-49.
- 2 Nacu E, Tanaka EM. Limb regeneration: A new development? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 409-40.
- 3 Carlson BM. *Principles of Regenerative Biology*. Burlington, MA: Academic Press, 2007.
- 4 Slack JM, Lin G, Chen Y. The *Xenopus* tadpole: A new model for regeneration research. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(1): 54-63.
- 5 Dent JN. Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J Morphol* 1962; 110: 61-77.
- 6 Thornton CS. The histogenesis of muscle in the regenerating forelimb of larval *Ambystoma punctatum*. *J Morphol* 1938; 62: 219-35.
- 7 Hay ED. Electron microscopic observations of muscle dedifferentiation in regenerating *Amblystoma* limbs. *Dev Biol* 1959; 1: 555-85.
- 8 Steen TP. Stability of chondrocyte differentiation and contribution of muscle to cartilage during limb regeneration in the axolotl (*Siredon mexicanum*). *J Exp Zool* 1968; 167(1): 49-78.
- 9 Hay ED, Fischman DA. Origin of the blastema in regenerating limbs of the newt *Triturus viridescens*. An autoradiographic study using tritiated thymidine to follow cell proliferation and migration. *Dev Biol* 1961; 3: 26-59.
- 10 Lo DC, Allen F, Brookes JP. Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(15): 7230-4.
- 11 Kumar A, Velloso CP, Imokawa Y, Brookes JP. Plasticity of retrovirus-labelled myotubes in the newt limb regeneration blastema. *Develop Biol* 2000; 218(2): 125-36.
- 12 Echeverri K, Clarke JD, Tanaka EM. *In vivo* imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema. *Dev Biol* 2001; 236(1): 151-64.
- 13 Tanaka EM, Gann AA, Gates PB, Brookes JP. Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 1997; 136(1): 155-65.
- 14 Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(9): 671-82.
- 15 Tanaka EM, Drechsel DN, Brookes JP. Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes. *Curr Biol* 1999; 9(15): 792-9.
- 16 Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell* 2000; 103(7): 1099-109.
- 17 Kumar A, Velloso CP, Imokawa Y, Brookes JP. The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on MSX1. *PLoS Biol* 2004; 2(8): E218.
- 18 Schnapp E, Kragl M, Rubin L, Tanaka EM. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development* 2005; 132(14): 3243-53.
- 19 Barker DM, Beck CW. Overexpression of the transcription factor Msx1 is insufficient to drive complete regeneration of refractory stage *Xenopus laevis* hindlimbs. *Dev Dyn* 2009; 238(6): 1366-78.
- 20 Morrison JI, Loof S, He P, Simon A. Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *J Cell Biol* 2006; 172(3): 433-40.
- 21 Sandoval-Guzman T, Wang H, Khattak S, Schuez M, Roensch K, Nacu E, *et al*. Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell* 2014; 14(2): 174-87.
- 22 Slack JM. Metaplasia and transdifferentiation: From pure biology

- to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5): 369-78.
- 23 Wolff G. Entwicklungsphysiologische Studien I. Die regeneration der urodelenlinse. *Wilhelm Roux's Arch Entw MechanOrg* 1895; 1: 380-90.
- 24 Yamada T. Control mechanisms in cell-type conversion in newt lens regeneration. *Monogr Dev Biol* 1977; 13: 1-126.
- 25 Mizuno N, Agata K, Sawada K, Mochii M, Eguchi G. Expression of crystallin genes in embryonic and regenerating newt lenses. *Dev Growth Differ* 2002; 44(3): 251-6.
- 26 Freeman G. Lens regeneration from the cornea in *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 1963; 154: 39-65.
- 27 Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. Lens and retina regeneration: Transdifferentiation, stem cells and clinical applications. *Exp Eye Res* 2004; 78(2): 161-72.
- 28 Eguchi G, Eguchi Y, Nakamura K, Yadav MC, Millan JL, Tsonis PA. Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing. *Nat Commun* 2011; 2: 384.
- 29 Hyuga M, Kodama R, Eguchi G. Basic fibroblast growth factor as one of the essential factors regulating lens transdifferentiation of pigmented epithelial cells. *Int J Dev Biol* 1993; 37(2): 319-26.
- 30 Bosco L, Testa O, Venturini G, Willems D. Lens fibre transdifferentiation in cultured larval *Xenopus laevis* outer cornea under the influence of neural retina-conditioned medium. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53(11/12): 921-8.
- 31 Imokawa Y, Brockes JP. Selective activation of thrombin is a critical determinant for vertebrate lens regeneration. *Curr Biol* 2003; 13(10): 877-81.
- 32 Ladewig J, Koch P, Brustle O. Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(4): 225-36.
- 33 Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2000; 2(12): 879-87.
- 34 Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol* 2003; 13(2): 105-15.
- 35 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-32.
- 36 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 37 Gargioli C, Slack JM. Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development* 2004; 131(11): 2669-79.
- 38 Daughters RS, Chen Y, Slack JM. Origin of muscle satellite cells in the *Xenopus* embryo. *Development* 2011; 138(5): 821-30.
- 39 Chen Y, Lin G, Slack JM. Control of muscle regeneration in the *Xenopus* tadpole tail by Pax7. *Development* 2006; 133(12): 2303-13.
- 40 Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 493-5.
- 41 Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(6): 628-33.
- 42 Lin G, Chen Y, Slack JM. Regeneration of neural crest derivatives in the *Xenopus* tadpole tail. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 56.
- 43 Gaete M, Munoz R, Sanchez N, Tampe R, Moreno M, Contreras EG, *et al.* Spinal cord regeneration in *Xenopus* tadpoles proceeds through activation of Sox2-positive cells. *Neural Dev* 2012; 7: 13.
- 44 McHedlishvili L, Mazurov V, Grassme KS, Goehler K, Robl B, Tazaki A, *et al.* Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(34): E2258-66.
- 45 Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH, *et al.* Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 2009; 460(7251): 60-5.
- 46 Beck CW, Slack JM. A developmental pathway controlling outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Development* 1999; 126(8): 1611-20.
- 47 Beck CW, Christen B, Slack JM. Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Dev Cell* 2003; 5(3): 429-39.
- 48 Lin G, Slack JM. Requirement for Wnt and FGF signaling in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev Biol* 2008; 316(2): 323-35.
- 49 Ho DM, Whitman M. TGF-beta signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Dev Biol* 2008; 315(1): 203-16.
- 50 Tseng AS, Adams DS, Qiu D, Koustubhan P, Levin M. Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 2007; 301(1): 62-9.
- 51 Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W, *et al.* Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev Cell* 2009; 17(2): 279-89.
- 52 Yakushiji N, Suzuki M, Satoh A, Sagai T, Shiroishi T, Kobayashi H, *et al.* Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. *Dev Biol* 2007; 312(1): 171-82.
- 53 Whited JL, Tabin CJ. Regeneration review reprise. *J Biol* 2010; 9(2): 15.
- 54 Tseng AS, Carneiro K, Lemire JM, Levin M. HDAC activity is required during *Xenopus* tail regeneration. *PLoS One* 2011; 6(10): e26382.
- 55 Taylor AJ, Beck CW. Histone deacetylases are required for amphibian tail and limb regeneration but not development. *Mech Dev* 2012; 129(9/10/11/12): 208-18.
- 56 Yokoyama H, Ide H, Tamura K. FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 2001; 233(1): 72-9.
- 57 Muneoka K, Holler-Dinsmore G, Bryant SV. Intrinsic control of regenerative loss in *Xenopus laevis* limbs. *J Exp Zool* 1986; 240(1): 47-54.
- 58 Sessions SK, Bryant SV. Evidence that regenerative ability is an intrinsic property of limb cells in *Xenopus*. *J Exp Zool* 1988; 247(1): 39-44.
- 59 Lin G, Chen Y, Slack JM. Imparting regenerative capacity to limbs by progenitor cell transplantation. *Dev Cell* 2013; 24(1): 41-51.
- 60 Simkin J, Han M, Yu L, Yan M, Muneoka K. The mouse digit tip: From wound healing to regeneration. *Methods Mol Biol* 2013; 1037: 419-35.
- 61 Illingworth CM. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J Pediatr Surg* 1974; 9(6): 853-8.
- 62 Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weissman IL. Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature* 2011; 476(7361): 409-13.
- 63 Lehoczy JA, Robert B, Tabin CJ. Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(51): 20609-14.
- 64 Akesson E, Piao JH, Samuelsson EB, Holmberg L, Kjaeldgaard A, Falci S, *et al.* Long-term culture and neuronal survival after intraspinal transplantation of human spinal cord-derived neurospheres. *Physiol Behav* 2007; 92(1/2): 60-6.
- 65 Wu S, Suzuki Y, Kitada M, Kitaura M, Kataoka K, Takahashi J, *et al.* Migration, integration, and differentiation of hippocampus-derived neurosphere cells after transplantation into injured rat spinal cord. *Neurosci Lett* 2001; 312(3): 173-6.