

# 三角涡虫: 在体筛选再生及衰老相关药物的模型生物

徐振彪 宋林霞\*

(山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

**摘要** 三角涡虫是一种具有极强再生能力的扁形动物, 其再生能力来源于几乎遍布全身各处的多能性成体干细胞, 使其成为研究干细胞分化、发育、增殖、调控等分子机制的良好模式生物。由于对三角涡虫干细胞行为的研究完全可以在在体水平进行, 因此, 涡虫在体干细胞研究比离体干细胞研究具有无可比拟的优势。鉴于三角涡虫这种独特的生物学现象及优势, 也可将其作为大规模药物筛选的模型生物, 用以筛选与再生、衰老或者肿瘤等相关药物。该文将结合所在课题组的相关研究对三角涡虫的再生机理、再生调控等有关研究进展进行综述, 为推动其成为在体药物筛选模型奠定了基础。

**关键词** 三角涡虫; 再生; 干细胞; 模式生物; 药物筛选

## Planarian, A Good Screening Model *In Vivo* for Drugs Related to Regeneration and Aging

Xu Zhenbiao, Song Linxia\*

(College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

**Abstract** Planarian has remarkable abilities of regeneration and belongs to Platyhelminthes. Its regeneration ability is due to the pluripotent adult stem cells almost all over its body and make it a good model animal for the study of stem cell differentiation, development, proliferation and regulation. Because the behavior of planarian stem cells can be studied *in vivo*, it has incomparable advantage compared with the stem cell research *in vitro*. Due to this unique biological feature and advantage, planarian can be used as a mass drug screening platform to screen drugs related to regeneration, aging and tumor. This article will review on the mechanism and regulation of planarian regeneration and lay the foundation to promote planarian to become a drug screening model *in vivo*.

**Keywords** planarian; regeneration; stem cell; model animal; drug screening

药物与人类疾病的治疗、预防及诊断息息相关。所以, 开发高效、特异的用于人类以及其他动植物的疾病治疗、预防及诊断的药物早已成为人类科研活动的重中之重。

随着科技的发展进步, 大规模药物筛选已经成为可能, 相关药物研发单位也已经建立起了大规模药物筛选平台。在药物筛选平台所用的模型中, 很

多都用到了与相关疾病有关的细胞系。但限于细胞系培养的技术繁琐、非完全的生理环境、成本高以及细胞培养过程中出现的异质性问题, 往往使药物筛选结果不甚理想。因此, 建立更加合理有效的药物筛选模型平台尤为重要。

三角涡虫是再生能力极强的一种扁形动物, 被用于模式生物研究再生、衰老等, 其再生是由干

收稿日期: 2016-02-28 接受日期: 2016-04-14

国家自然科学基金(批准号: 31550005、31350004)和山东省自然科学基金(批准号: ZR2011HM065)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0533-2781329, E-mail: slxch@163.com

Received: February 28, 2016 Accepted: April 14, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31550005, 31350004) and the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No.ZR2011HM065)

\*Corresponding author. Tel: +86-533-2781329, E-mail: slxch@163.com

网络出版时间: 2016-07-01 15:53:18 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160701.1553.002.html>

胞调控的。涡虫的再生是肉眼可见的生物学现象, 所以研究其干细胞行为及功能可以在完全的生理条件下进行, 即不用分离其干细胞, 是在体(*in vivo*)情况下进行的<sup>[1]</sup>。涡虫可用作筛选有关生长及抑制生长甚至衰老、肿瘤等的药物模型<sup>[2-3]</sup>, 又因其可以在完全的细胞生理环境条件下进行筛选, 所以比离体细胞筛选更具有准确可靠的优势。

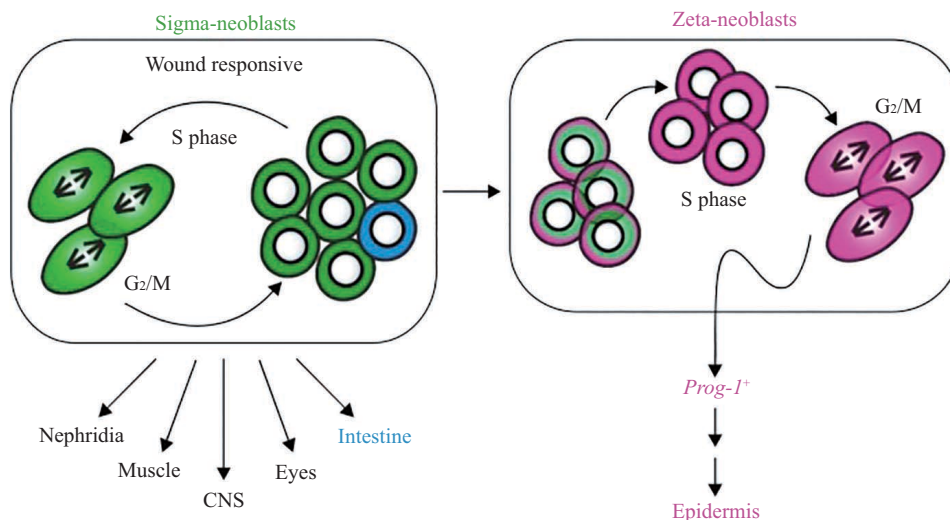
## 1 涡虫再生相关的干细胞

由于干细胞具有组织稳态维护、修复和再生等功能, 所以对机体正常生命活动具有重要意义。当干细胞不能进行组织稳态维护、修复, 并且不能再生相关细胞的时候, 机体中一些老化的细胞不能进行更新, 从而使机体表现衰老特征。另一方面, 随着年龄的增长、身体微环境的变化以及基因的累积损伤等因素的干扰, 干细胞自身也会衰老, 因此, 干细胞与机体的衰老密切相关<sup>[4]</sup>。用干细胞治疗衰老或者开发与衰老相关的药物已经成为研究的热点。

三角涡虫是扁形动物门涡虫纲的代表动物, 由于其极强的再生能力而成为研究再生、细胞分化发育、干细胞调控、衰老的理想模式材料。现有研究证实, 成体涡虫强大的再生能力是由于其体内一类有增殖分化潜能的成体干细胞的作用, 这类成体干细胞被称为“neoblasts”, 即未分化的具有较大核质

比的一群类胚胎细胞<sup>[1,5]</sup>。该类细胞通过迁移、增殖和分化等生理活动, 可使虫体损伤的组织器官进行完全修复或替换, 使涡虫再次形成一个完整生命体。研究发现, neoblasts具有如下特征: (1)无限的或较长时期的增殖与分化能力; (2)在完整涡虫成体内的数量和位置相对恒定; (3)正常情况下处于静止状态, 在机体受损或其他应激条件等情况下可被激活而表现出增殖与分化能力, 并能向损伤部位迁移; (4)能够进行自我更新, 可分化发育成各种类型的细胞<sup>[6]</sup>。有研究表明, 涡虫的干细胞可分为具有调控再生与组织更新功能的成体干细胞(somatic stem cells, SSCs)和具有产生生殖细胞的生殖干细胞(germ line stem cells, GSCs)两大类, 且成体干细胞能够转化成生殖干细胞<sup>[7]</sup>。另有研究表明, 涡虫干细胞可分为两种主要类型, Wolfswinkel等<sup>[8]</sup>将其命名为Zeta-neoblasts和Sigma-neoblasts。Zeta-neoblasts不具有自我更新的能力, 可产生大量有丝分裂期后(postmitotic lineage)的特异性细胞, 例如表皮细胞, 但它对再生不是必需的。相反, Sigma-neoblasts对损伤产生反应, 拥有广谱性, 可产生很多的后代细胞类型, 它同时可产生Zeta-neoblasts, 这两类细胞作用于不同的细胞区室(图1)。

当然, 把三角涡虫用于研究再生调控的模型生物本身的优势就是干细胞行为是在在体(*in vivo*)水



Neoblasts分为Sigma和Zeta两种类型, 代表功能上分离的区室, Sigma-neoblasts能够自我更新, 产生广泛的组织类型。在S期, Sigma-neoblasts的一组亚型获得了Zeta-neoblasts的特异性标志, 这些细胞可以产生prog-1相关的谱系和表皮细胞。CNS: 中枢神经系统。

Two classes, the Sigma-class and the Zeta-class, represent functionally separate neoblast compartments. Sigma-neoblasts are able to self-renew, and collectively gives rise to a wide range of tissue types. Over the course of S phase, a subset of the Sigma-neoblasts gains markers specific for the Zeta-class. These cells give rise to the prog-1-related lineages and to epidermal cells. CNS: central nervous system.

图1 Neoblasts的分类模型(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 Model of the neoblasts population (modified from reference [8])

平发生,是真实的生理条件反应,比离体干细胞研究所得结果更自然真实,更有价值。所以无论其干细胞如何分类,都不影响把涡虫作为整体进行实验的模型生物的优势。

目前,用于研究的三角涡虫主要有两种,一种是地中海涡虫(*Schmidtea mediterranea*),另一种是日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)<sup>[9]</sup>。前者是最为流行的品系,后者主要为日本科学家所使用。通过梳理涡虫的研究历史,我们发现,日本三角涡虫最早发现于香港,但由于我国研究不如日本深入,所以后来的国际涡虫专家在证实欧洲的涡虫品种和亚洲的涡虫品种具有不同特征不是一个品种时,将亚洲品种独立出来,并将产于中国、日本、韩国的三角涡虫命名为“日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)”,相关研究史可参阅河南师范大学陈广文教授的综述文章。在PubMed数据中进行检索,发现对涡虫分子生物学研究最为深入的文献基本也是来自于美国和日本。相较于上述两个国家,我国在对涡虫再生调控分子机制方面的研究依然滞后,这不能不说是一种遗憾。

地中海涡虫具有有性系和无性系两类,是目前广泛被欧美科学家团队认可的实验材料。地中海涡虫除了极强的再生能力外,还有稳定的二倍体特征,核型为 $2n=8$ <sup>[10]</sup>。预测它的基因组大小为 $4.8 \times 10^8$  bp,而且与其相关的基因组、转录组、蛋白质组甚至一些miRNA等相关信息已经发布,都可在一个开放的网站(<http://smedgd.neuro.utah.edu>)免费获取,有效提高了涡虫研究的效率。

研究表明,地中海涡虫neoblasts表达大约4 000个基因,其中包括像*OCT4*等参与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)多能性维持的基因<sup>[11]</sup>。通过RNAi技术、原位杂交技术、转录组测序以及生物信息学分析等现代生命科学研究技术发现,地中海涡虫中85%以上的基因是参与再生及干细胞功能调控的基因,这些基因在其他动物中都存在<sup>[12-15]</sup>,这也从干细胞研究的分子机制上找到了协同点,从而为地中海涡虫用于模式生物研究干细胞及再生调控等领域奠定了基础,也为地中海涡虫用于药物模型筛选相关再生、衰老及肿瘤等类药物奠定了基础。

## 2 涡虫损伤后再生的研究概况

涡虫在损伤条件下可以完全再生,除了伤口正常的愈合外,涡虫可再生身体任何损失部分。有研

究表明,将一个干细胞移植到用射线杀死的涡虫体内后,就可让涡虫重新存活,并且依然成为一个完整的生物个体<sup>[16]</sup>。

研究人员发现,当用切割方式制作损伤再生涡虫模型时,涡虫会经历如下再生过程:首先,伤口处肌肉快速收缩以降低创伤面积;其次,通过体内特异的杆状细胞释放黏液以达到保护伤口不发生感染及进一步恶化的可能;再次,一薄层上皮细胞在30 min内覆盖在伤口上,当然,这种细胞覆盖主要是通过细胞伸展而不是再生造成。伤口处覆盖的细胞间相互作用会引发再生响应,此时neoblasts就可以感知这种响应信号,从而进行增殖并迁移到这些切割的伤口位点。然后,neoblasts分裂增殖所形成的细胞群,就可以参与再生芽基(regeneration blastema,一种不着色的表皮/间质细胞芽)的结构形成。在余下的几天时间内,再生芽基就可分化出不同细胞用于涡虫缺少部分的组织构建;最后,涡虫完整个体得到再生,其分化细胞的行为特征也获得恢复<sup>[17-20]</sup>。

虽然,涡虫可通过干细胞增殖与分化而再生完整个体,但与其他生物体干细胞一样,涡虫干细胞的分裂、增殖和分化也是需要被严格调控的<sup>[21-22]</sup>。因此,阻止干细胞的分裂能力或者减少干细胞群的数量会使涡虫的损伤再生能力降低或缺失。当然,如果涡虫干细胞过度增殖也会引起涡虫过度发育或者形成肿瘤。因此,深入研究并揭示这些调控机制对了解涡虫损伤再生的细胞学基础及干细胞过程,或者肿瘤发生都具有重要意义。已有研究表明,再生能力越强大的动物或组织器官越容易自发或诱发形成肿瘤<sup>[23-24]</sup>。

当然,损伤除了能够诱导涡虫的再生外,还可诱导涡虫的免疫反应。已有研究表明,当涡虫受到损伤后,一种具有噬菌作用的间充质细胞,称为网状细胞(reticular cell)被激活,这些细胞可以迁移到损伤部位,对细菌进行吞噬等清除作用<sup>[25-27]</sup>。因此,深入研究这种细胞激活及迁移机制,可揭示涡虫的免疫调节过程,从而为将涡虫当作模型生物筛选免疫调节类药物打下基础。

## 3 涡虫的极性再生

涡虫再生过程中还有一个非常有趣的现象就是其极性再生,即涡虫经过切割损伤后,缺少头部的部分可以再生出头部,而缺少尾部的部分可以再生

出尾部, 即前后轴(antero-posterior axis, A/P)极性再生。当然, 涡虫的极性再生还涉及到背腹轴(dorso-ventral axis, D/V)极性问题。最近的研究表明, 相关肌肉细胞及神经细胞可以表达“位置控制基因(positional control genes, PCGs)”, 而三角涡虫的neoblasts能够通过这些围绕它的位置控制基因的表达变化来感知相应的位置信息, 并调控三角涡虫的极性再生<sup>[28]</sup>。三角涡虫这种极性再生的特征, 为药物的定向选择提供了保证。研究人员可利用其极性再生的特征设计筛选与极性生长调控相关的药物, 使药物筛选过程更具有针对性。

随着分子生物学技术的飞速发展, 越来越多的参与涡虫极性再生的基因及信号途径被发现。例如, Hedgehog(Hh)信号调控涡虫尾部再生, 而Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径调控涡虫的头部极性再生, 其他如VOCC(voltage-operated calcium channel) $\beta$ 亚基、*Scarf*及*Collar*基因、*Smed-dvl-1*及*Smed-dvl-2*基因、*notum*基因都被证实在调节涡虫的前后极性再生过程中起重要作用<sup>[29-35]</sup>。除了前后轴的极性再生外, 涡虫的背腹轴再生同样存在极性现象, 已经发现, *bmp*(bone morphogenetic protein)基因及其信号途径、类*noggin*基因等参与了涡虫背腹轴极性再生调控<sup>[36-37]</sup>。在我们的实验中曾发现, 一些miRNAs在涡虫再生和极性再生中也有不同的表达模式, 提示miRNAs除了参与涡虫再生调控外, 可能也参与了涡虫极性再生调控<sup>[38]</sup>。这些生物学规律还需深入研究揭示。

当然, 涡虫的极性再生也为其能够作为筛选精确靶点调控的药物模型奠定了基础。比如, 如果能通过涡虫的极性再生筛选出只针对头部或者神经系统再生调控的药物, 也许这个药物未来可用于人类的脑肿瘤治疗或者神经系统的治疗。

#### 4 涡虫再生研究相关技术简介

研究目标基因对涡虫再生的影响的常用技术有: RNAi、整体原位杂交(whole-mount *in situ* hybridization)以及射线照射。RNAi技术主要用于抑制或降低目标靶基因的表达水平, 从而研究该目标靶基因对研究对象的调控作用, 它是目前生命科学研究领域中研究基因功能的常规方法。在涡虫再生研究中, RNAi技术主要用于抑制或降低靶基因的表达, 从而研究靶基因对涡虫再生的调控作用。该技术是通过体外喂食含有表达目的基因dsRNA的细菌或者

小干扰RNA(siRNA)和涡虫的食物混合物, 将dsRNA或siRNA导入涡虫体内, 通过几次喂食和再生的循环, 达到抑制目的基因表达的目的, 或者通过显微注射, 将dsRNA或siRNA注射到虫体内, 然后观察目的基因被干扰后的虫体表型来推测该基因对涡虫再生的影响<sup>[39-40]</sup>。

整体原位杂交技术(whole-mount *in situ* hybridization)是将目的基因的探针通过常规的分子生物学方法, 用荧光或地高辛等进行标记, 之后与完整涡虫或再生不同时间点的涡虫进行原位杂交, 然后研究该目标靶基因在时间和空间上的表达模式, 推测该基因与再生的关系<sup>[41]</sup>。此外, 荧光定量PCR法(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)也是一种常用的定量分析涡虫相关基因表达水平的方法<sup>[42]</sup>。

在涡虫再生研究领域, 利用 $\gamma$ -射线或不同剂量的X-射线照射涡虫, 完全或者部分去除涡虫体内的neoblasts, 之后比较正常涡虫和受照射涡虫的差异表达基因来分析与neoblasts相关的基因, 这也是一种简单而又重要的方法<sup>[43-44]</sup>。

#### 5 结语与展望

目前, 三角涡虫是损伤后可再生和极性再生出包括脑和生殖系统等完整个体的唯一一种三胚层及两侧对称的生物。因其独特和强大的再生能力, 目前已将其作为研究再生及在体干细胞调控的模式生物。涡虫的独特再生魅力来源于其体内一类独特的全能干细胞, 即neoblasts。此外, 因为涡虫的基因功能很容易通过RNAi以及原位杂交等方法在成虫体内进行研究, 所以是一个用于探索分子和细胞行为的非常理想的实验系统。再者, 已经发现与涡虫干细胞分裂分化及更新的相关调节基因及信号分子在人类及其他哺乳动物中都是保守的, 而其他机体胚胎发育相关调控基因在涡虫干细胞中也可以找到同源基因, 由此可以推断, 对涡虫再生调控的研究结论应该与人和其他动物具有紧密的相关性。这些都强烈提示, 三角涡虫可以作为筛选针对再生、衰老或肿瘤等相关药物的理想模型, 而且它比利用干细胞等离体模型筛选所得结果更符合生理条件下的真实生物学过程, 因此是一个值得深入开发应用的药物筛选模型。

我国目前用于研究的三角涡虫主要为四个来源: 其一为美国引进的地中海涡虫*S. mediterranea*品

系;其二为日本引进的三角涡虫GI品系;其三为我国清华大学教授吴畏博士团队建立的一个pek1涡虫品系,采自北京香山;其四为从相关地区的野外小溪或河流中采集所得的自然品种。目前,本课题组经过近十年的探索,已经养殖成功一个来源于我国山东淄博地区的三角涡虫无性繁殖品系,命名为ZB-1,二倍体核型特征显示为 $2n=16$ ,实验室已经连续繁殖60多代,生长条件已经标准化,其生长状态非常稳定,相关的基因组结构、转录组结构以及其他与涡虫再生相关的关键特征都在研究中。我们已经初步探索了将ZB-1作为模型,以miRNAs为靶点筛选再生相关药物的条件,效果良好。这为将三角涡虫无性繁殖系ZB-1作为模型生物大规模用于再生及衰老等相关的药物筛选奠定坚实的理论基础。

### 参考文献 (References)

- Elliott SA, Sanchez Alvarado A. The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013; 2: 301-26.
- Oviedo NJ, Nicolas CL, Adams DS, Levin M. Planarians: A versatile and powerful model system for molecular studies of regeneration, adult stem cell regulation, aging, and behavior. *CSH Protoc* 2008; 2008: pdb emo101.
- Perrigue PM, Najbauer J, Jozwiak AA, Barciszewski J, Aboody KS, Barish ME. Planarians as a model of aging to study the interaction between stem cells and senescent cells *in vivo*. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* 2015; 5: 30052.
- Liu L, Rando TA. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol* 2011; 193(2): 257-66.
- Baguna J. The planarian neoblast. the rambling history of its origin and some current black boxes. *Int J Dev Biol* 2012; 56(1/2/3): 19-37.
- Salo E, Baguna J. Regeneration in planarians and other worms. New findings, new tools, and new perspectives. *J Exp Zool* 2002; 292(6): 528-39.
- Sato K, Shibata N, Orii H, Amikura R, Sakurai T, Agata K, Kobayashi S, Watanabe K. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians. *Dev Growth Differ* 2006; 48(9): 615-28.
- van Wolfswinkel JC, Wagner DE, Reddien PW. Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell* 2014; 15(3): 326-39.
- Abril JF, Cebria F, Rodriguez-Esteban G, Horn T, Fraguas S, Calvo B, *et al*. Smed454 dataset. unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics* 2010; 11: 731.
- Sanchez Alvarado A. Planarian regeneration: Its end is its beginning. *Cell* 2006; 124(2): 241-5.
- Onal P, Grun D, Adamidi C, Rybak A, Solana J, Mastrobuoni G, *et al*. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J* 2012; 31(12): 2755-69.
- van Wolfswinkel JC, Wagner DE, Reddien PW. Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell* 2014; 15(3): 326-39.
- Umehono Y, Watanabe K, Agata K. A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev Growth Differ* 1997; 39(6): 723-7.
- Sanchez Alvarado A, Newmark PA, Robb SM, Juste R. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* 2002; 129(24): 5659-65.
- Sanchez Alvarado A, Tsonis PA. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet* 2006; 7(11): 873-84.
- Wagner DE, Wang IE, Reddien PW. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 2011; 332(6031): 811-6.
- Newmark PA, Sanchez Alvarado A. Not your father's planarian: A classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet* 2002; 3(3): 210-9.
- Reisinger E, Kelbetz S. Fine structure and discharge mechanism of rhabdites. *Z Wiss Mikrosk* 1964; 65: 472-508.
- Reddien PW, Sanchez Alvarado A. Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 725-57.
- Reddien PW. Specialized progenitors and regeneration. *Development* 2013; 140(5): 951-7.
- Eisenhoffer GT, Kang H, Sanchez Alvarado A. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 327-39.
- Scimone ML, Kravarik KM, Lapan SW, Reddien PW. Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Reports* 2014; 3(2): 339-52.
- Oviedo NJ, Beane WS. Regeneration: the origin of cancer or a possible cure? *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20(5): 557-64.
- Almuedo-Castillo M, Sureda-Gomez M, Adell T. Wnt signaling in planarians: New answers to old questions. *Int J Dev Biol* 2012; 56(1/2/3): 53-65.
- Lee SM, Kok KH, Jaume M, Cheung TK, Yip TF, Lai JC, *et al*. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(10): 3793-8.
- Zhou L, Wu S, Liu D, Xu B, Zhang X, Zhao B. Characterization and expression analysis of a trypsin-like serine protease from planarian *Dugesia japonica*. *Mol Biol Rep* 2012; 39(6): 7041-7.
- Altincicek B, Vilcinskas A. Comparative analysis of septic injury-inducible genes in phylogenetically distant model organisms of regeneration and stem cell research, the planarian *Schmidtea mediterranea* and the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Front Zool* 2008; 5: 6.
- Witchley JN, Mayer M, Wagner DE, Owen JH, Reddien PW. Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. *Cell Rep* 2013; 4(4): 633-41.
- Nogi T, Zhang D, Chan JD, Marchant JS. A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated  $Ca^{2+}$  channel beta subunits: Subversion of flatworm regenerative polarity. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(6): e464.
- Petersen CP, Reddien PW. Smed-betacatenin-1 is required for anterior-posterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science*

- 2008; 319(5861): 327-30.
- 31 Almuedo-Castillo M, Salo E, Adell T. Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(7): 2813-8.
- 32 Petersen CP, Reddien PW. Polarized *notum* activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science* 2011; 332(6031): 852-5.
- 33 Petersen CP, Reddien PW. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(40): 17061-6.
- 34 Rink JC, Gurley KA, Elliott SA, Sanchez Alvarado A. Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* 2009; 326(5958): 1406-10.
- 35 Yazawa S, Umesono Y, Hayashi T, Tarui H, Agata K. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(52): 22329-34.
- 36 Gavino MA, Reddien PW. A *Bmp/Admp* regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. *Curr Biol* 2011; 21(4): 294-9.
- 37 Molina MD, Neto A, Maeso I, Gomez-Skarmeta JL, Salo E, Cebria F. *Noggin* and *noggin*-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr Biol* 2011; 21(4): 300-5.
- 38 Xu Z, Chen M, Ren Z, Zhang N, Xu H, Liu X, *et al.* Deep sequencing identifies regulated small RNAs in *Dugesia japonica*. *Mol Biol Rep* 2013; 40(6): 4075-81.
- 39 Reddien PW, Bermange AL, Murfitt KJ, Jennings JR, Sánchez Alvarado A. Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell* 2005; 8(5): 635-49.
- 40 Newmark PA, Reddien PW, Cebrià F, Sánchez Alvarado A. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 Suppl 1: 11861-5.
- 41 Pearson BJ, Eisenhoffer GT, Gurley KA, Rink JC, Miller DE, Sánchez Alvarado A. Formaldehyde-based whole-mount *in situ* hybridization method for planarians. *Dev Dyn* 2009; 238(2): 443-50.
- 42 Shibata N, Hayashi T, Fukumura R, Fujii J, Kudome-Takamatsu T, Nishimura O, *et al.* Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a planarian, *Dugesia japonica*. *Int J Dev Biol* 2012; 56(1/2/3): 93-102.
- 43 Guo T, Peters AH, Newmark PA. A bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev Cell* 2006; 11(2): 159-69.
- 44 Rossi L, Salvetti A, Marincola FM, Lena A, Deri P, Mannini L, *et al.* Deciphering the molecular machinery of stem cells: A look at the neoblast gene expression profile. *Genome Biol* 2007; 8(4): R62.