

神经系统对断肢再生的调控

林古法* 陈瑛

(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 两栖动物蝾螈和爪蛙是断肢再生能力最强的脊椎动物, 其断肢再生的一个鲜明的特点是对神经组织的成瘾性依赖。关于断肢再生神经依赖的研究已有近两百年的历史, 但神经与再生芽基和顶外胚层帽交流互作的机制仍不明朗。该文以蝾螈与爪蛙断肢再生为例, 简要回顾神经支配断肢再生的研究结果, 并结合作者实验室最近有关黑皮质素受体信号通路调控爪蛙蝌蚪断肢再生的研究进展, 探讨中枢神经系统对断肢再生的调控机理。

关键词 断肢再生; 神经依赖; 无神经肢体; Mc4r; 黑皮质素系统

Limb Regeneration under Check by the Nervous System

Lin Gufa*, Chen Ying

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

Abstract Salamanders and *Xenopus* tadpoles can fully regenerate the limb after amputation, and this regeneration depends on the presence of a certain amount of nerve tissues. Since the discovery of nerve dependent limb regeneration in 1822, there has been extensive interest in identifying the molecules mediating the effect of nerves for limb regeneration, a mission yet to be accomplished. Here we briefly review the history of study on nerve dependent limb regeneration, and provide a potential avenue for understanding limb regeneration under regulation by the central nervous system, as indicated by our recent finding on a role of the melanocortin receptor signaling in *Xenopus* limb regeneration.

Keywords limb regeneration; nerve dependent; aneurogenic limb; Mc4r; melanocortin system

两栖类动物蝾螈(salamanders)和蝌蚪期爪蛙(*Xenopus*), 可以再生多种器官和组织, 包括四肢、尾、心脏、颌骨、脑及视网膜, 是脊椎动物中仅有的具有较强器官再生能力的物种^[1-2]。断肢再生更是研究脊椎动物器官再生的理想模型。原因主要是, 与常用的研究肢体发育的小鼠及鸡胚相比, 体外发育的蝾螈和爪蛙四肢的形成相对较晚, 因此适合断肢切除、组织与细胞移植等手术以及DNA电转等实验操作。几百年来, 两栖动物的断肢再生一直具有谜一样的魅力, 吸引着人们对其机制进行不懈的探索。

哺乳动物包括人类是不能再生断肢的。但无论是否具有断肢再生能力, 肢体离断后的早期愈合过程是相似的^[1-3]。在肢体离断后, 断端创面周围的表皮细胞快速增殖、迁移并覆盖于创伤表面, 形成愈伤表皮(wound epidermis, WE)。愈伤表皮形成后, 断肢能否再生取决于后续是否有顶外胚层帽(apical epidermal cap, AEC)和再生芽基(regeneration blastema)的形成。在具有再生能力的动物中, 愈伤表皮继续增殖增厚, 形成具有多层细胞的AEC。AEC在形态和功能上类似于早期胚胎肢芽发育中的顶外胚

收稿日期: 2018-07-06 接受日期: 2018-08-07

国家自然科学基金(批准号: 31571491、31771608)资助的课题

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

Received: July 6, 2018

Accepted: August 7, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571491, 31771608)

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

网络出版时间: 2018-10-26 10:29:53

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1029.008.html>

层嵴(apical ectodermal ridge, AER)^[4-6]。正是在AEC所分泌的因子的影响下, 断肢残端的组织前体细胞被调动活化, 在断肢末端集聚形成具有快速增殖能力的细胞基团, 即再生芽基。再生芽基由具有特定分化潜能的前体细胞组成, 与AEC之间有相互反馈与调节作用(详见文献[3])。而在不能再生断肢的动物中, 断肢残端创面愈合后不能形成AEC, 也不能形成再生芽基。因此, 断肢再生是典型的依赖于芽基的割处再生(epimorphic regeneration)。再生芽基的形成机制自然是断肢再生研究的重点内容。

有趣的是, 即便是在同属于蝾螈亚目(Salamandroidea)的两个常用断肢再生动物模型墨西哥钝口螈(*ambystoma mexicanum*, axolotl)与东美螈(绿红东美螈, *Notophthalmus viridescens*, newts)中, 芽基的形成机制也不尽相同。芽基形成的物种特异性主要体现在肌肉前体细胞的来源差异上, 如墨西哥钝口螈肌肉前体细胞主要来自于表达Pax7的肌肉干细胞——肌卫星细胞, 而东美螈断肢肌肉再生的细胞主要来自于肌纤维的去分化^[7]。甚至在东美螈的幼体和成体中, 肌肉的再生机制也有很大的差别: 幼体断肢肌肉再生主要依靠肌卫星细胞的活化, 而成体肌肉再生则主要依赖于肌纤维的去分化^[8]。因此, 不同动物的断肢再生机制存在着物种特异性。

当然, 不同模型动物的断肢再生更有其共同的机制。现已证明, 无论是斑马鱼、蝾螈还是哺乳动物, 断肢再生芽基并不是由多能干细胞构成, 而是由不同组织前体细胞构成的。这些前体细胞拥有一定的分化潜能, 但其分化潜能局限于其在肢体发育时所属的胚层^[9-11]。

断肢再生的另一个共性是神经组织对再生的重要作用^[12-13]。这也是本文将主要讨论的内容。有关断肢再生中的细胞与分子机制, 有兴趣的读者可以参考相关文献^[3, 14-15]。

1 器官再生多依赖于神经组织

研究表明, 神经组织对几乎所有已知的脊椎动物组织修复与器官再生现象都有重要作用^[16-22]。哺乳动物, 特别在出生前后, 是拥有一定的再生能力的。例如, 胚胎小鼠的表皮在创伤后可以实现无疤痕修复, 但该再生现象依赖于皮肤外周神经组织^[16]。出生7天内的小鼠的心肌在部分心尖切除术后可以大量进入细胞周期、增殖完成心脏再生, 因此具有

一定的心脏再生能力^[17]。但新生小鼠的心脏再生能力在去除了支配心脏的迷走神经后则被抑制了^[18]。另一个哺乳动物再生现象是指尖再生。当损伤局限在甲基质(俗称“小太阳”)远端时, 人和小鼠的指尖是可以完全再生的。Rinkevich等^[19]报导去神经后, 小鼠趾尖再生会发生延迟或带有形态缺陷。Johnston等^[20]的研究亦显示, 终末分化的施旺细胞通过分泌oncostatin M及PDGF-AA来诱导再生芽基中的间充质细胞的增殖。因此, 小鼠趾尖再生也是依赖神外周神经的。斑马鱼的背鳍在去神经支配后不能再生^[21]。变态后的爪蛙前肢可以在截断后长出针尖样软骨结构, 但去神经后爪蛙前肢则愈合为钝形残端, 不能形成针状软骨^[22]。这些例子充分说明了神经支配对各种组织器官再生的重要性。

人们对神经组织与器官再生了解最透彻的还是蝾螈的断肢再生。

2 蝾螈断肢再生的神经依赖性

早在1823年, Todd^[23]详细报导了在蝾螈断肢再生的不同时间节点离断坐骨神经对再生的影响。Todd描述到, 如果在蝾螈肢体离断的同时将坐骨神经截断, 断肢即不能再生(图1A); 如果在断肢残端修复后(芽基形成前或芽基早期)去除坐骨神经, 则再生要么不能发生, 要么会发生严重的延迟; 若在断肢再生已经起始或者已顺利进展(芽基中后期)后分离坐骨神经, 则断肢要么发生生长停滞, 要么只能再生缩小版的远端肢体(但肢体的前后轴仍可以正常形成)。因此, Todd的实验证明了神经对再生的重要性。但神经对断肢再生组织的重要性在此后很长一段并没有得到足够的重视(详见文献[13])。到了1940~1950年, Singer等^[24-26]通过一系列实验详细分析了蝾螈断肢再生中神经组织的重要作用。Singer的一个主要发现是, 断肢再生中神经组织的类型并不重要, 不管是触觉神经还是运动神经都可以调控断肢再生, 但断肢再生依赖于在断肢残端有足够量的外周神经组织(即有一个神经阈值, nerve threshold)。Singer^[27-28]继而提出了神经营养因子(neurotrophic factors)的假说来解释神经对断肢再生的作用(详见后文)。

然而, 并不是所有的蝾螈断肢再生情形都依赖于神经支配。1959年, Yntema^[29-30]报导了肢体发育时从未受过神经支配的蝾螈肢体的断肢再生情况。

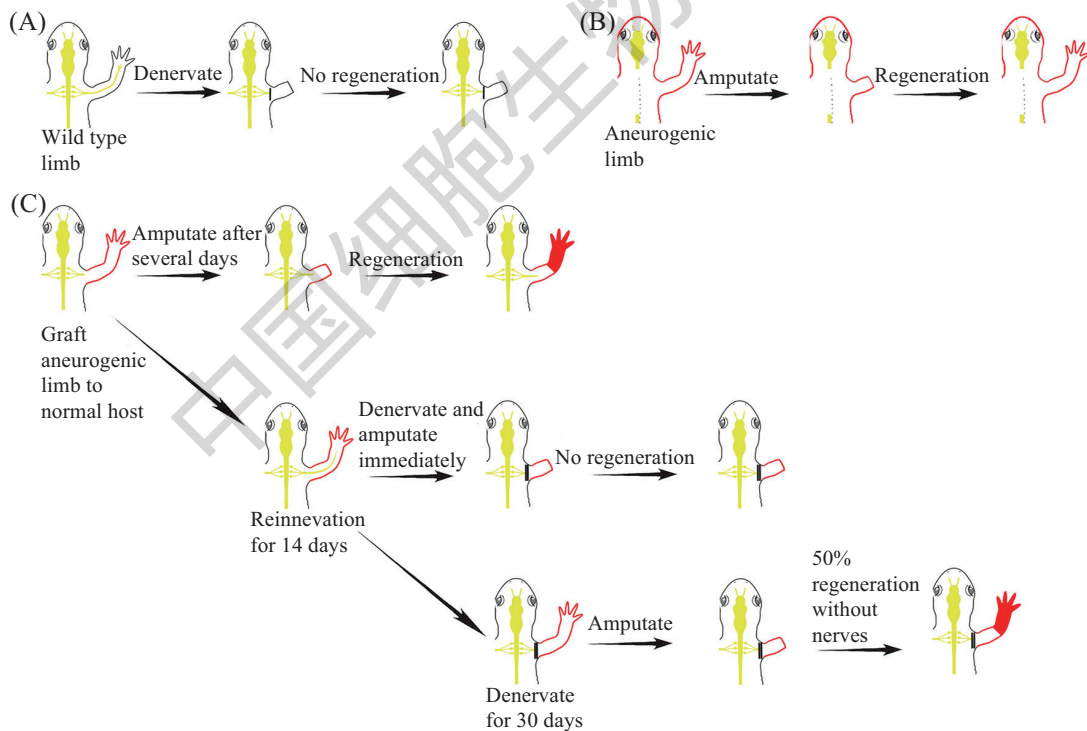
Yntema在之前已通过去除蝾螈早期神经胚的神经管并将无神经管的胚胎与正常胚胎联合, 获得了无神经支配(aneurogenic)或者仅有很少神经支配的蝾螈肢体^[31-32]。这种无神经肢体可以用来测试到底断肢再生需要多少神经组织, 以检验Singer提出的神经阈值(nerve threshold)理论。无神经肢体再生研究的另外一个背景是, Polezajev^[33]在1939年曾报导异位移植的蝌蚪早期肢芽(无或极少神经支配)具有断肢再生能力, 提示其再生并不依赖神经的支配。利用无神经肢体模型, Yntema^[29-30]发现, 在肢体发育过程中未曾受到神经支配的蝾螈肢体的断肢再生能力与正常神经支配的肢体相同, 说明其断肢再生是不需要神经的(图1B)。Steen与Thornton^[34]在1963年的实验也支持这一点。他们将无神经支配的远端肢体移植到正常神经支配的近端肢体形成嵌合体, 然后考察断肢再生的情况(图1C)。结果发现, 在移植后的一段时间内, 当移植的供体肢体仍然处于无神经支配的状态时, 断肢再生可以正常进行。然而, 由于蝾

螈能够再生肢体神经, 受体蝾螈的肢神经(臂丛神经或坐骨神经)可以长入远端无神经肢体, 对其进行神经支配。而这时候被重新支配的远端肢体的再生则依赖于神经组织的存在了, 因为如果此时对嵌合的肢体去神经的话, 断肢则不再生。有意思的是, 再次处于无神经支配状态较长时间后, 移植的远端肢体的断肢再生则部分摆脱了神经组织的控制。

因此, 断肢再生是否依赖神经组织与肢体是否曾受神经支配有关; 一旦肢体被神经支配过, 则其再生即依赖于神经组织了。而长期处于无神经支配状态的肢体的断肢再生则“摆脱”了对神经支配的依赖性。由于此现象类似于药物成瘾, 因此, 我们称之为断肢再生的“神经成瘾性依赖”。

3 断肢再生中神经的作用

如前所述, Singer^[27-28]认为, 断肢末端的外周神经组织通过分泌某种或某些神经营养因子(neurotrophic factors), 促进芽基细胞的增殖。因此, 这些因



A: 去除神经的蝾螈肢体不能再生; B: 无神经蝾螈肢体(aneurogenic limb)可以再生断肢; C: 无神经肢体移植到正常神经支配肢体后断肢再生情况; 移植后短时间内离断无神经肢体, 断肢可以再生, 而无神经肢体被重新支配后其断肢再生依赖神经支配, 但再次去神经且经较长时间无神经支配后的断肢则部分可以再生, 说明断肢再生对神经支配有“成瘾”现象。图中神经组织以浅黄色标示, 无神经肢体以红色标示。

A: salamander limb does not regenerate when denervated at the time of amputation; B: aneurogenic limb can regenerate normally; C: regeneration of the aneurogenic limb grafted to normal host. Aneurogenic limb can regenerate if amputated soon after transplantation, but if the aneurogenic limb becomes reinnervated, the aneurogenic limb does not regenerate if re-denervated. However, if the re-denervated limb is amputated long enough afterward, some can resume regeneration ability, some becomes “addicted” to nerves. Nerves are shown in yellow, aneurogenic limbs are shown in red.

图1 两栖动物断肢再生中的神经依赖与成瘾现象(根据参考文献[1]修改)

Fig.1 Limb regeneration depends on and addicts to nerves (modified from reference [1])

子具有丝裂原(mitogen)特征。如前所述, 断肢再生依赖于AEC与再生芽基的形成及其相互作用^[3]。大量实验表明, 神经组织在断肢再生中的作用靶组织主要是再生芽基。首先, 如果在芽基形成后将断肢神经组织去除, 则会导致芽基细胞有丝分裂的停滞^[35]。体外培养的断肢芽基细胞只有在神经组织存在时才能有效地增殖^[36]。这说明, 神经组织及其产生的因子是芽基细胞增殖所必需的。其次, 如果在去神经的蝾螈断肢残端人为的添加外源(健康)神经组织, 则可以有效地拯救再生芽基的生长^[37]。最近, Satoh等^[38]通过将爪蛙幼体的坐骨神经牵引到前肢, 做成超神经支配的模型然后研究前肢再生的情形, 发现超神经支配的爪蛙前肢的软骨生成得到了促进。这些证据都说明, 再生芽基是神经支配的靶组织。

神经组织对AEC的作用则没有这么清晰。一方面, 虽然在创伤表皮中有大量的触觉神经纤维, AEC的形成对神经支配的依赖性却没有再生芽基对神经支配的依赖性强。研究显示, 去掉感觉神经并不影响AEC形成^[39-40]。这可能与AEC的细胞来源相关。愈伤表皮(及AEC)细胞主要来自于断肢残端的上皮细胞的迁移及(一定量的)扩增, 而再生芽基的形成需要前体细胞的大量扩增。另一方面, 一些在愈伤表皮中上调的基因如*dlx3*(distal-less homeobox 3)及*sp9*(*sp9* transcription factor)的表达则在去神经后受到抑制^[41-42], AEC产生与分泌丝裂原的能力也受到去神经的影响^[3]。因此, AEC可能间接受神经组织的调控。鉴于AEC与再生芽基的相互作用对断肢再生的重要性, 我们认为, AEC至少在功能上是依赖于神经支配的, 也是神经的靶组织。

此外, 外周神经组织还调节了断肢新生血管的形成^[43]。尽管早期再生芽基的形成不依赖于大量的血供, 中后期再生芽基的持续生长与进一步分化则依赖新生血管的生成。

因此, 神经组织对断肢再生的调控可通过作用于多个靶组织来进行。外周神经组织分泌产生的神经营养因子对这些靶组织起了正调节的作用。这也是目前断肢再生中受到研究者青睐的观点。

从另外一个角度来看, 断肢再生对神经的依赖亦可能是由于去神经导致的断肢的微环境发生了不利于再生的改变。在研究去神经对断肢再生的影响时, 几乎所有去神经都是通过显微手术操作来实现的。因此, 术后在断肢中仍不可避免地存留了一些

神经组织, 而这些受损的、不健康的神经组织会引起炎症反应, 继而抑制再生。如Tassava及其同事^[44-45]将轴突切除的外围神经移植到断肢后导致再生芽基生长变缓, 在无神经肢体(可再生)中种植受破损的外围神经组织则会导致再生芽基不能形成。这些结果说明, 损伤(病理状态的)的外周神经组织会产生抑制再生的因子, 是(病理性)神经组织对断肢再生的负向调控。

4 断肢再生神经因子

Singer^[27-28]对断肢再生神经依赖性解释的核心是神经营养因子(neurotrophic factor Xs)介导了神经组织的作用。寻找断肢再生中的神经营养因子有助于理解神经与再生芽基及AEC相互作用的分子机制。神经营养因子必须满足一些基本要求^[3]。首先, 该因子在再生芽基表达且其表达受神经组织的调控。其次, 神经因子必须能够促进芽基细胞的增殖(如体外培养芽基细胞的有丝分裂), 或促进体内芽基组织的生长。最后, 神经因子应能拯救去神经断肢再生。

目前, 人们已发现了一些因子可能介导了断肢再生过程中的神经的作用。这些候选因子包括P物质(substance P)、胰岛素(insulin)、转铁蛋白(transferin)、神经生长因子(nerve growth factor)、纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, Fgf)加上成骨生长因子(bone morphogenesis factor)如(Fgf8+Bmp7)(这些因子的具体作用可参见文献[13])。本文以最近发现的蝾螈前梯度蛋白(newt antigen gradient, nAG)^[46]及神经调节蛋白(neuregulin, Nrg)^[46]为例说明神经营养因子的特性。

Brockes实验室长期致力于解释神经调控蝾螈断肢再生机理。他们在2007年报导了东美蝾螈中前梯度蛋白nAG是一个调控断肢再生的关键神经因子^[46]。蝾螈肢体离断后, 神经轴突先是发生退缩, 然后会沿着残留神经鞘膜向断肢残端生长, 而nAG则表达于神经鞘膜的施旺细胞中。此后, nAG在创伤表皮腺体细胞中表达, 且是芽基细胞持续增殖所必需的。去神经后, nAG则不能表达。在去神经的断肢中通过电转质粒过表达nAG则可以拯救断肢再生。nAG亦能促体外培养的肢芽细胞的增殖。因此, nAG满足神经因子的必要条件。

Brockes早期的工作还提示神经调节蛋白1(neu-

regulin 1, Nrg1)是潜在的神经营养因子^[48]。此后, Monaghan实验室^[47]在美西螈的断肢再生中阐述了Nrg1介导神经调控断肢再生的机制。Nrg1在美西螈断肢再生芽基组织中有较高的表达,并表达于外周神经及背跟神经节(图2A和图2B)。Nrg1表达量在去神经后的肢体末端被显著下调。而种植Nrg1的蛋白珠则可以拯救去神经的断肢再生(图2C~图2E)。因此,Nrg1是美西螈断肢再生中的神经营养因子。

除了断肢再生,在其他动物模型中的实验亦提示,Nrg1可作用于多种组织修复过程。Nrg1可以促进外周神经组织再生外^[49],Nrg1也可以促进斑马鱼和新生小鼠心肌细胞的增殖^[50-51],而且可以拯救去神经小鼠心脏的心肌细胞增殖^[18]。

遗憾的是,由于蝾螈的基因组直到最近才完成^[52-53],因此,对于nAG和Nrg1的研究并没有在基因敲除的基础上进行。nAG或其同源物在其他断肢再生模型,如爪蛙断肢再生中是否起了类似作用也有待于验证。此外,现有候选神经因子间的相互作用及调控关系也是一个需要探讨的问题。Stocum^[54]曾提出假设认为,Fgf2与nAG可能在促进芽基细胞增殖方面有协同作用。但目前尚没有证据表明,现有候选神经因子之间存在上下游调控机制,这些因子也并不集中于某种信号通路。因此,研究者对神经营养因子的寻找仍在继续。

5 爪蛙断肢再生的神经依赖性

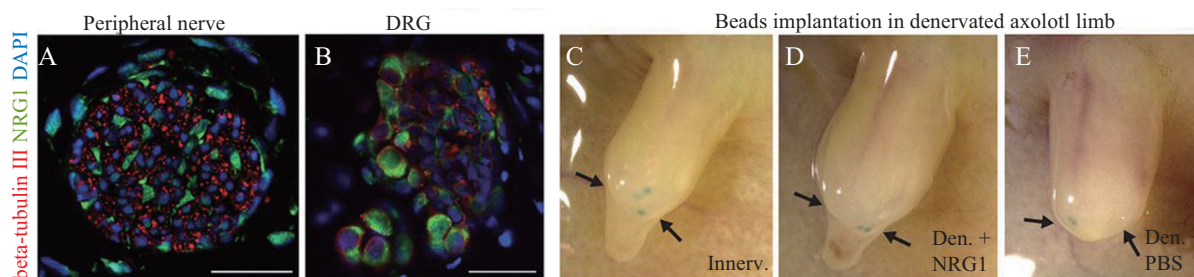
作为经典发育生物学模型的爪蛙也是研究再生的常用模型^[55]。与蝾螈不同的是,爪蛙的断肢再生能力随着肢体的发育分化而减弱直至丧失,因此有其特异性^[56]。爪蛙断肢再生对神经支配的依赖

性也是逐渐建立起来的,早期(Nieuwkoop Faber, NF stage 51-52)蝌蚪断肢再生不依赖于外周神经,而晚期蝌蚪断肢再生则依赖于神经^[33,57-58]。变态后的爪蛙断肢可以形成纤维样芽基,完成剑穗状软骨再生,但去神经后的爪蛙断肢则不能形成芽基^[22](图3)。

先前的研究认为,由于早期蝌蚪肢芽组织中存在大量的丝裂原因子,如大量成纤维细胞生长因子2(Fgf2),因此其断肢再生不依赖于神经^[59-60]。而我们最近的实验证明,早期蝌蚪(NF stage 53)的后肢在脊髓损伤后是不能再生的,说明爪蛙蝌蚪的断肢再生也是依赖于神经支配的^[61]。我们通过对早期蝌蚪(NF stage 53)的脊髓在较高位(III-V胸椎)离断以实现早期蝌蚪后肢的去神经。而早前的工作中,Filoni与Paglialunga采用的是通过离断8-9-10脊神经及相应神经节及与其相连的一段脊神经来实现蝌蚪后肢的去神经的^[57]。我们的观察提示,来自于更高位的脊髓中枢神经系统的信号调控了蝌蚪早期断肢再生。

6 爪蛙蝌蚪断肢再生中的中枢神经调控

如我们一开始提到的,近年来人们对于脊椎动物断肢再生的细胞与分子机制有了较为深入的了解。但当前研究主要侧重于断肢局部机制(如细胞来源),对再生的神经依赖机理的研究亦集中于外周神经组织,而对中枢神经系统调控断肢再生则缺少必要的重视。早期研究表明,尽管处于饥饿状态的蝾螈仍然可以很好地再生断肢,但当蝾螈的脑垂体受损后,其断肢的再生芽基要比一般再生芽基小得多,说明激素及营养对断肢再生有作用^[62]。我们实验室最近对黑皮质素系统调控断肢再生的研究则进

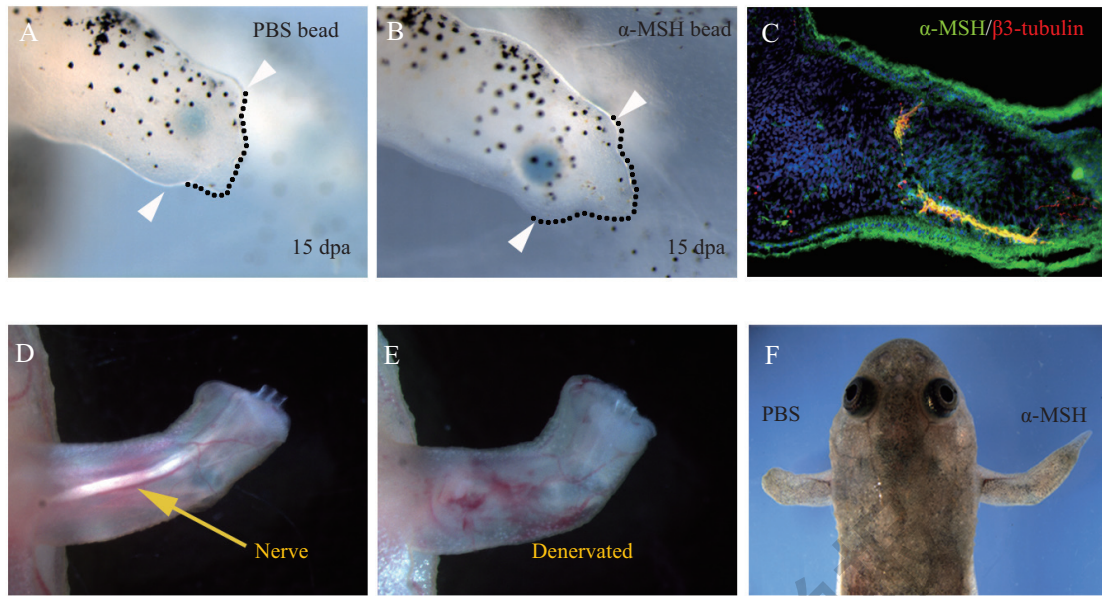


A, B: Nrg1在美西螈肢体外周神经组织及背跟神经节表达; C~E: 去神经的肢体在种植Nrg1蛋白珠后能够恢复再生,而PBS蛋白珠不能拯救去神经的断肢再生。标尺=0.1 mm。

A,B: Nrg1 is expressed in the peripheral nerve and dorsal root ganglia (DRG) in axolotl; C-E: denervated axolotl limb can regenerate after implantation of beads containing Nrg1, but fail to regenerate after PBS beads implantation. Scale bar=0.1 mm.

图2 Nrg1是美西螈断肢再生的神经因子(根据参考文献[47]修改)

Fig.2 Nrg1 is an neurotrophic factor for axolotl limb regeneration (modified from reference [47])



A、B: 爪蛙蝌蚪断肢在脊髓损伤后不能再生, 但种植 α -MSH蛋白珠可以拯救再生; C: α -MSH在蝌蚪肢体神经中高表达; D~F: 去神经爪蛙成体前肢不能再生, 但 α -MSH蛋白珠可以拯救再生芽基的形成; D: 爪蛙前肢腹侧观可见完整肢神经(黄色箭头); E: 去神经后的爪蛙前肢, 腹侧观; F: 种植 α -MSH蛋白珠的爪蛙前肢(右侧)与去神经后只种植PBS蛋白珠的前肢(左侧)。

A,B: *Xenopus* tadpole limbs do not regenerate after spinal cord transection, but regenerate after α -MSH bead implantation; C: α -MSH is highly expressed in limb nerves, as shown by immunofluorescence on a parasagittal section of tadpole limb; D-F: *Xenopus* forelimb regeneration can be rescued by α -MSH after denervation; D: ventral view of a froglet limb with intact limb nerves; E: ventral view of a froglet after removal of the limb nerves; F: a froglet 24 days post implantation of beads, either soaked in PBS (left side) or in α -MSH (right side), dorsal view.

图3 α -MSH/Mc4r通路调控爪蛙断肢再生(根据参考文献[61]修改)

Fig.3 α -MSH/Mc4r regulates *Xenopus* limb regeneration (modified from reference [61])

一步揭示中枢神经系统对断肢有着重要的影响^[61]。

下丘脑黑皮质素系统主要调控动物的进食行为及能量平衡。黑皮质素系统主要包括阿黑皮质素原(pro-opiomelanocortin, POMC)、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)、黑皮质素受体(melanocortin receptors, MCRs)以及Agouti和Agouti相关蛋白(Agouti related protein, AgRP)^[63-65]。哺乳动物中阿黑皮质素原(POMC)主要在垂体前叶和中叶、下丘脑弓形核(hypothalamus arcuate nucleus)中表达。黑皮质素在中枢神经系统及外周组织中均有生物学活性, 而其活性与所在位置及特异的黑皮质素受体(MCRs)紧密相关^[66-67]。黑皮质素受体(MCRs)在不同组织中存在不同的生理学功能。在能量平衡调控中起作用的主要是黑皮质素受体-3(Mc3r)及黑皮质素受体-4(Mc4r)。

为了研究下丘脑黑皮质素系统对断肢再生的影响, 我们以电烙损伤术对早期蝌蚪(NF stage 53)的下丘脑进行了损伤, 发现下丘脑受损的蝌蚪断肢再生受到了抑制^[61]。下丘脑损伤会下调肢体组织中的促黑素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH,

POMC前体多肽衍生物)的表达。MCR中仅有Mc4r在蝌蚪断肢再生中有显著表达。Mc4r在肢体中的表达与神经组织紧密相连, 而且受神经支配的影响。在脊髓损伤的蝌蚪断肢里, α -MSH和Mc4r的表达均被下调, 提示 α -MSH/Mc4r通路可能具有神经营养因子的作用^[61]。的确, 在去神经的早期蝌蚪后肢或爪蛙幼体前肢断端种植浸泡了 α -MSH的蛋白珠可以有效地拯救去神经导致的断肢再生缺陷^[61]。因此, 我们的结果提示, α -MSH/Mc4r通路至少可以替代神经组织调控爪蛙的断肢再生。

α -MSH的神经营养因子作用在其他实验体系亦有报导。如Plantinga等^[68]发现, 当外周神经受损后, α -MSH能够促进神经的再生, 同时Mc4r在脊髓和背根神经节有着很高的表达量。此外有研究显示, 当坐骨神经或脊髓受到损伤后, 外周的Mc4r表达量会发生显著变化^[69]。在小鼠胚胎肢体发育中, Mc4r与 α -MSH亦在肢体神经中表达^[61], 说明其在肢体发育与再生中的功能与神经支配是相关的。

尽管我们尚不完全清楚下丘脑对断肢再生是如何调控的, 我们的研究表明, 过氧化物(reactive

oxygen species, ROS)可能介导了这一过程。近年来有学者提出, 过氧化物的代谢平衡与断肢再生的神经依赖性有关^[70]。我们也发现, 在去神经或敲降Mc4r后, 蝌蚪后肢细胞中过氧化物的总量被下调了。而通过调节过氧化物产生或种植 α -MSH的蛋白珠可以提高过氧化物产量, 继而拯救断肢再生^[61]。尽管Mc4与现有候选神经因子之间的关系需要进一步的研究, 我们的研究结果将Mc4r通路、过氧化物与断肢再生的神经支配联系在了一起。

因此, 除了外围神经组织, 中枢神经系统也调控了爪蛙的断肢再生。

7 结语

现有的研究表明, 神经组织对器官稳态维持、组织修复及器官再生均有重要的调节作用。断肢再生依赖于足够量的外周神经组织的存在, 其作用可能是为了确保再生的远端肢体能够有效地与近端肢体有机地整合。已有一些因子如nAG、Nrg1、 α -MSH可能介导了神经对断肢再生的调控, 但目前我们对于神经与再生芽基之间是如何进行信息交流与相互调节的以及中枢神经系统如何调控断肢再生的了解还远远不够。鉴于蝾螈及爪蛙在基因组学及基因编辑方面的最新进展^[52-53,71-73], 我们相信, 两栖动物作为唯一能够完整再生断肢的脊椎动物模型, 将更加值得生物学研究者的重视。

参考文献 (References)

- Carlson BM. Principles of regenerative biology. Burlington MA: Academic Press 2007.
- Slack JM. Essential developmental biology, 3rd Edition. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd 2013, 384-400.
- Stocum DL. Mechanisms of urodele limb regeneration. Regeneration 2017; 4(4): 159-200.
- Fernandez-Teran M, Ros MA. The apical ectodermal ridge: morphological aspects and signaling pathways. Int J Dev Biol 2008(7): 857-71.
- Young JJ, Tabin CJ. Saunders's framework for understanding limb development as a platform for investigating limb evolution. Dev Biol 2017; 429(2): 401-8.
- Tickle C. An historical perspective on the pioneering experiments of John Saunders. Dev Biol 2017; 429(2): 374-81.
- 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.
- Tanaka HV, Ng NC, Yang Yu Z, Casco-Robles MM, Maruo F, Tsonis PA, et al. A developmentally regulated switch from stem cells to dedifferentiation for limb muscle regeneration in newts. Nat Commun 2016; 7: 11069.
- Tanaka EM, Weidinger G. Micromanaging regeneration. Genes Dev 2008; 22(6): 700-5.
- 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.
- 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.
- Kumar A, Brookes JP. Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration. Trends Neurosci 2012; 35(11): 691-9.
- Farkas JE, Monaghan JR. A brief history of the study of nerve dependent regeneration. Neurogenesis (Austin) 2017; 4(1): e1302216.
- Simon A, Tanaka EM. Limb regeneration. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2013; 2(2): 291-300.
- 杨荔, 林古法. 两栖动物器官再生的细胞与分子机制. 中国细胞生物学学报(Yang Li, Lin Gufa. Cellular and molecular mechanisms in amphibian appendage regeneration. Chinese Journal of Cell Biology) 2015; 37(6): 764-71.
- Kishi K, Ohyama K, Satoh H, Kubota Y, Tanaka T, Imanishi N, et al. Mutual dependence of murine fetal cutaneous regeneration and peripheral nerve regeneration. Wound Repair Regen 2006; 14(1): 91-9.
- Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. Science 2011; 331(6020): 1078-80.
- Mahmoud AI, O'Meara CC, Gemberling M, Zhao L, Bryant DM, Zheng R, et al. Nerves regulate cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. Dev Cell 2015; 34(4): 387-99.
- Rinkevich Y, Montoro DT, Muhonen E, Walmsley GG, Lo D, Hasegawa M, et al. Clonal analysis reveals nerve-dependent and independent roles on mammalian hind limb tissue maintenance and regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111(27): 9846-51.
- Johnston AP, Yuzwa SA, Carr MJ, Mahmud N, Storer MA, Krause MP, et al. Dedifferentiated Schwann cell precursors secreting paracrine factors are required for regeneration of the mammalian digit tip. Cell Stem Cell 2016; 19(4): 433-48.
- Simoes MG, Bensimon-Brito A, Fonseca M, Farinho A, Valerio F, Sousa S, et al. Denervation impairs regeneration of amputated zebrafish fins. BMC Dev Biol 2014; 14: 49.
- Suzuki M, Satoh A, Ide H, Tamura K. Nerve-dependent and -independent events in blastema formation during *Xenopus* froglet limb regeneration. Dev Biol 2005; 286(1): 361-75.
- Todd T. On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. Q J Sci Lit Arts 1823; 16: 84-96.
- Singer M. The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. Q Rev Biol 1952; 27(2): 169-200.
- Singer M. The nervous system and regeneration of the forelimb of adult Triturus; the influence of number of nerve fibers, including a quantitative study of limb innervation. J Exp Zool 1946; 101: 299-337.
- Singer M, Craven L. The growth and morphogenesis of the regenerating forelimb of adult Triturus following denervation at various stages of development. J Exp Zool 1948; 108(2): 279-308.
- Singer M. On the nature of the neurotrophic phenomenon in uro-

- dele limb regeneration. *Am Zoology* 1978; 18(4): 829-41.
- 28 Singer M. The trophic quality of the neuron: some theoretical considerations. *Prog Brain Res* 1964; 13: 228-32.
- 29 Yntema CL. Blastema formation in sparsely innervated and aneurogenic forelimbs of amblystoma larvae. *J Exp Zool* 1959; 142: 423-39.
- 30 Yntema CL. Regeneration in sparsely innervated and aneurogenic forelimbs of *Amblystoma larvae*. *J Exp Zool* 1959; 140: 101-23.
- 31 Yntema CL. Relations between innervation and regeneration of the forelimb in urodele larvae. *Anat Rec* 1949; 103: 108.
- 32 Yntema CL. Deficient efferent innervation of the extremities following removal of neural crest in *Amblystoma*. *Ibid* 1943; 94: 319-49.
- 33 Polezajev L. Ueber die Bedeutung des nervensystems bei der regeneration der extremitäten bei den Anuren. *C R Acad Sci URSS* 1939; 25: 543-6.
- 34 Steen TP, Thornton CS. Tissue interaction in amputated aneurogenic limbs of *Ambystoma Larvae*. *J Exp Zool* 1963; 154: 207-21.
- 35 Maden M. Neurotrophic control of the cell cycle during amphibian limb regeneration. *J Embryol Exp Morphol* 1978; 48: 169-75.
- 36 Liversage RA, Globus M. In vitro regeneration of innervated forelimb deplants of *Ambystoma larvae*. *Can J Zool* 1977; 55(7): 1195-9.
- 37 Goldhamer DJ, Tomlinson BL, Tassava RA. Ganglia implantation as a means of supplying neurotrophic stimulation to the newt regeneration blastema: cell-cycle effects in innervated and denervated limbs. *J Exp Zool* 1992; 262(1): 71-80.
- 38 Mitogawa K, Makanae A, Satoh A. Hyperinnervation improves *Xenopus laevis* limb regeneration. *Dev Biol* 2018; 433(2): 276-86.
- 39 Sidman R, Singer M. Limb regeneration without innervation of the apical epidermis in the adult newt, *Triturus*. *Journal of Experimental Zoology* 1960; 144(2): 105-9.
- 40 Thornton CS. Regeneration of asensory limbs of ambystoma larvae. *Copeia* 1960; 1960(4): 371-3.
- 41 Mullen LM, Bryant SV, Torok MA, Blumberg B, Gardiner DM. Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development* 1996; 122(11): 3487-97.
- 42 Satoh A, Graham GM, Bryant SV, Gardiner DM. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol* 2008; 319(2): 321-35.
- 43 Smith AR, Wolpert L. Nerves and angiogenesis in amphibian limb regeneration. *Nature* 1975; 257(5523): 224-5.
- 44 Irvin BC, Tassava RA. Effects of peripheral nerve implants on the regeneration of partially and fully innervated urodele forelimbs. *Wound Repair Regen* 1998; 6(4): 382-7.
- 45 Tassava RA, Olsen-Winner CL. Responses to amputation of denervated ambystoma limbs containing aneurogenic limb grafts. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2003; 297(1): 64-79.
- 46 Kumar A, Godwin JW, Gates PB, Garza-Garcia AA, Brockes JP. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 2007; 318(5851): 772-7.
- 47 Farkas JE, Freitas PD, Bryant DM, Whited JL, Monaghan JR. Neuregulin-1 signaling is essential for nerve-dependent axolotl limb regeneration. *Development* 2016; 143(15): 2724-31.
- 48 Brockes JP, Kintner CR. Glial growth factor and nerve-dependent proliferation in the regeneration blastema of *Urodele amphibians*. *Cell* 1986; 45(2): 301-6.
- 49 Fricker FR, Lago N, Balarajah S, Tsantoulas C, Tanna S, Zhu N, et al. Axonally derived neuregulin-1 is required for remyelination and regeneration after nerve injury in adulthood. *J Neurosci* 2011; 31(9): 3225-33.
- 50 Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 2009; 138(2): 257-70.
- 51 Gemberling M, Karra R, Dickson AL, Poss KD. Nrg1 is an injury-induced cardiomyocyte mitogen for the endogenous heart regeneration program in zebrafish. *Elife* 2015; doi: 10.7554/eLife.05871.
- 52 Nowoshilow S, Schloissnig S, Fei JF, Dahl A, Pang AWC, Pippel M, et al. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature* 2018; 554(7690): 50-5.
- 53 Elewa A, Wang H, Talavera-Lopez C, Joven A, Brito G, Kumar A, et al. Reading and editing the *Pleurodeles waltl* genome reveals novel features of tetrapod regeneration. *Nat Commun* 2017; 8(1): 2286.
- 54 Stocum DL. The role of peripheral nerves in urodele limb regeneration. *Eur J Neurosci* 2011; 34(6): 908-16.
- 55 Chen Y, Lin G. The *Xenopus* model for regeneration research. London: John Wiley & Sons, Ltd. 2014, 368-82.
- 56 DENT JN. Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J Morphol* 1962; 110: 61-77.
- 57 Filoni S, Paglialonga L. Effect of denervation on hindlimb regeneration in *Xenopus laevis* larvae. *Differentiation* 1990; 43(1): 10-9.
- 58 Filoni S, Bernardini S, Cannata SM. The influence of denervation on grafted hindlimb regeneration of larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 1991; 260(2): 210-9.
- 59 Cannata SM, Bagni C, Bernardini S, Christen B, Filoni S. Nerve-independence of limb regeneration in larval *Xenopus laevis* is correlated to the level of fgf-2 mRNA expression in limb tissues. *Dev Biol* 2001; 231(2): 436-46.
- 60 Filoni S, Bernardini S, Cannata SM, Ghittoni R. Nerve-independence of limb regeneration in larval *Xenopus laevis* is related to the presence of mitogenic factors in early limb tissues. *J Exp Zool* 1999; 284(2): 188-96.
- 61 Zhang M, Chen Y, Xu H, Yang L, Yuan F, Li L, et al. Melanocortin receptor 4 (Mc4r) regulates limb regeneration. *Dev Cell* 2018; 46(4): 397-409.
- 62 Tassava RA. Hormonal and nutritional requirements for limb regeneration and survival of adult newts. *J Exp Zool* 1969; 170(1): 33-53.
- 63 Anderson EJ, Cakir I, Carrington SJ, Cone RD, Ghamari-Langroudi M, Gillyard T et al. 60 YEARS OF POMC: regulation of feeding and energy homeostasis by alpha-MSH. *J Mol Endocrinol* 2016; 56(4): T157-74.
- 64 Gautron L, Elmquist JK, Williams KW. Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell* 2015; 161(1): 133-45.
- 65 Krashes MJ, Lowell BB, Garfield AS. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nat Neurosci* 2016; 19(2): 206-19.
- 66 Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin

- system. *Nat Neurosci* 2005; 8(5): 571-8.
- 67 Rodrigues AR, Almeida H, Gouveia AM. Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: current state of the art. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(7): 1331-45.
- 68 Plantinga LC, Verhaagen J, Edwards PM, Hali M, Brakkee JH, Gispen WH. Pharmacological evidence for the involvement of endogenous alpha-MSH-like peptides in peripheral nerve regeneration. *Peptides* 1995; 16(2): 319-24.
- 69 van der Kraan M, Tatro JB, Entwistle ML, Brakkee JH, Burbach JP, Adan RA, *et al.* Expression of melanocortin receptors and pro-opiomelanocortin in the rat spinal cord in relation to neurotrophic effects of melanocortins. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 63(2): 276-86.
- 70 Pirotte N, Leynen N, Artois T, Smeets K. Do you have the nerves to regenerate? The importance of neural signalling in the regeneration process. *Dev Biol* 2016; 409(1): 4-15.
- 71 Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, Toyoda A, Takahashi S, *et al.* Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* 2016; 538(7625): 336-43.
- 72 Fei JF, Schuez M, Knapp D, Taniguchi Y, Drechsel DN, Tanaka EM. Efficient gene knockin in axolotl and its use to test the role of satellite cells in limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114(47): 12501-6.
- 73 Aslan Y, Tadjuidje E, Zorn AM, Cha SW. High-efficiency non-mosaic CRISPR-mediated knock-in and indel mutation in F0 *Xenopus*. *Development* 2017; 144(15): 2852-8.

中国细胞生物学学报