

海鞘再生的细胞学过程及其调控机制研究进展与展望

范玉苹¹ 杨秀霞^{1, 2, 3*}

(¹中国海洋大学海洋生命学院, 海洋生物遗传与育种教育部重点实验室, 青岛 266003; ²青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 青岛 266237; ³中国海洋大学, 海洋生物多样性与进化研究所, 青岛 266003)

摘要 再生现象在后生动物中普遍存在, 但不同物种的再生能力存在显著差别。无脊椎动物如水螅和涡虫等再生能力较强, 具有部分组织或细胞即可再生出一个完整个体的能力, 被称为整体再生; 而脊椎动物的再生能力相对较弱, 局限在某些特定器官或身体结构, 被称为部分再生, 如蝾螈的附肢。海鞘作为进化上介于无脊椎动物与脊椎动物之间的尾索动物, 既包括具备整体再生能力的群居类型, 如拟菊海鞘(*Botrylloides leachii*), 其可以利用部分血管残片即可再生出完整个体; 也包括只具有部分再生能力的单体海鞘类型, 如玻璃海鞘(*Ciona robusta*), 其只有出入水管和神经复合体等器官才可再生。鉴于海鞘的进化地位及其具有的不同再生能力类群, 近年来逐渐成为研究再生的理想模式动物。该文系统分析总结了海鞘不同类群所具备的整体再生和部分再生的各自细胞学过程及其调控机制, 并比较归纳了导致海鞘不同群体具有不同再生能力差别的可能机制, 展望了海鞘再生研究的未来方向, 为理解后生动物再生能力的演化和调控机制提供参考。

关键词 海鞘; 整体再生; 部分再生; 细胞学过程; 调控机制

Research Progress and Prospect in Cellular Processes and Molecular Mechanisms of Regeneration in Ascidians

FAN Yuping¹, YANG Xiuxia^{1,2,3*}

(¹Ministry of Education Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; ²Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; ³Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract Regenerative ability broadly but unevenly exists across metazoan phyla. Invertebrates such as the hydra or planarian regenerate the whole body from a piece of tissue or cell population, while only part of limited organs can be regenerated in vertebrates such as the limb of salamander. The ascidian, which is invertebrate chordates and the closest relatives of vertebrates evolutionarily, shows robust but variable regenerative ability among different species. Colonial ascidians such as *Botrylloides leachii* are capable of completing regeneration of entire new bodies with nothing but small fragments of extracorporeal vasculature, while solitary ascidians such as *Ciona robusta* can only regenerate distal structures upon injury, such as the siphons and their cerebral ganglion. The ascidian has gradually become an ideal animal model for regeneration study in view of its evolutionary position and coexisting of two kinds of regeneration. This review summarizes the cellular processes and molecular mechanisms

收稿日期: 2020-08-15 接受日期: 2020-12-21

国家重点研发计划-政府间国际科技创新合作重点专项(批准号: 2019YFE0190900)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0532-82032732, E-mail: xxyang@ouc.edu.cn

Received: August 15, 2020 Accepted: December 21, 2020

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China-Key Program for Intergovernmental Science and Technology Innovation Cooperation Projects of China (Grant No.2019YFE0190900)

*Corresponding author. Tel: +86-532-82032732, E-mail: xxyang@ouc.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5498>

of whole-body and partial-body regenerations that have been identified so far in different ascidian species. The difference of mechanisms underlying two kinds of regeneration types is discussed, and the prospect is put forward for future research that hope to be helpful for the understanding of the evolution and regulation of regeneration among metazoans.

Keywords ascidian; whole-body regeneration; partial-body regeneration; cellular process; molecular mechanism

在历史上, 哲学家、自然科学家和生物学家将创伤后的残体复原称为再生。无脊椎动物真涡虫(*Schmidtea mediterranea*)和水螅(*Hydra vulgaris*)身体一分为二后, 残余的头部可长出尾部, 同样尾部可长出头部。脊椎动物斑马鱼(*Danio rerio*)的脑、眼、肾、心脏和鳍, 蝾螈(*Ambystoma mexicanum*)的附肢、脑、眼、肾、心脏、脊髓和尾等组织器官部分丢失后可重新长出。随着再生含义的进一步拓展, 现代生物学意义上的再生既包含生理性的细胞、组织、器官甚至整个个体的周期性更新, 也包括损伤后的恢复、重建和生长的过程, 甚至与医学交叉形成再生医学^[1-2]。

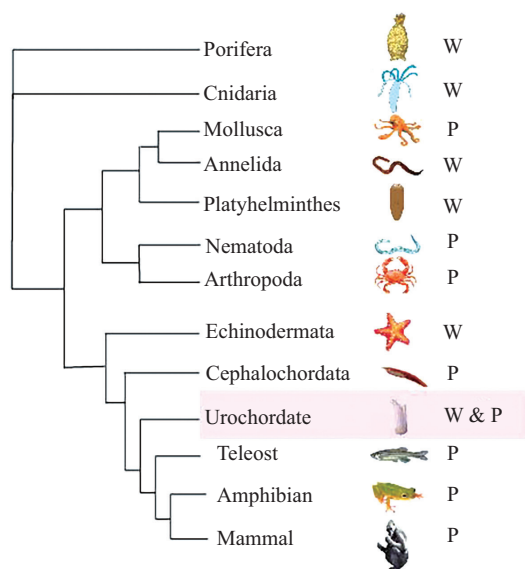
正是因为再生具有类似“长生不老”的迷人魅力, 从18世纪以来对再生的研究蓬勃开展, 先后揭示了再生的细胞来源包括多能干细胞、单能干细胞甚至终末分化细胞。例如涡虫依靠自身的多能干细胞分化形成新的组织器官^[3]; 爪蛙(*Xenopus laevis*)的尾部和蝾螈的附肢再生则分别利用组织特异的单能干细胞分别分化产生特定组织(如肌肉、神经和皮肤等)^[4]。而斑马鱼及新生小鼠的心脏再生, 则利用终末分化细胞即心肌细胞来分裂产生心脏组织^[5-6]。并确定了调控再生的重要信号通路, 例如确定了Wnt信号通路在大多数动物组织再生中均起重要作用。鉴定了BMP信号通路调控再生涡虫的体轴重建^[3]。Hedgehog信号通路调控蝾螈再生器官原基的细胞增殖^[4]。FGF和Notch信号通路对鱼类的鳍和心脏再生芽基的增殖起调控作用^[5-6]。尽管再生研究已取得了一系列突破性的研究进展, 但有关再生仍有很多问题有待发掘^[7-8], 比如, 启动再生的信号是什么? 这种信号可以开启涡虫、蝾螈等的干细胞活性, 又可以诱导斑马鱼等的终末分化细胞使之重新进入细胞周期。再者, 大多数再生需要模式重建, 该模式信息会被相应细胞读取, 并按既定模式分化形成新的组织器官? 而哺乳动物是否不存储模式信息, 或者细胞是否失去了读取信息的能力? 再生的进化是一种宏观进化(种间进化)还是一种微观进化(种内进

化)? 如果再生能力在物种起源上是保守的, 通过查清再生过程的调控机制, 是否可以重启人类非可再生组织器官再生能力? 反之, 如果再生是一种物种特异性的独立进化属性, 那么以此为模式动物找到其调控再生的分子通路和细胞学过程, 然后应用到人类自身, 是否可以诱导产生再生能力? 一系列很有意义的问题亟待解决, 找到理想的动物模型至关重要。

海鞘是与脊椎动物进化距离最为接近的尾索动物^[9]。根据生活方式不同, 海鞘可分为群居海鞘(colonial ascidians)和单体海鞘(solitary ascidians)。群居海鞘既可行有性繁殖, 又可行无性繁殖, 其无性繁殖又叫出芽繁殖, 新的个体从成体的某些特定部位出芽长成新的个体, 属于生理性再生。群居海鞘是迄今发现的脊索动物中仅有的具有整体再生能力的一类动物(图1), 如拟菊海鞘(*Botrylloides leachi*)可以由100~200个成血细胞(hemoblasts)加小段血管再生出完整的个体^[10]。而只进行有性繁殖的单体海鞘的再生能力往往仅局限于某些特定的身体结构, 通常利用身体的近端再生出远端的组织和器官, 能够再生的身体结构往往是易受环境损伤的部位, 如玻璃海鞘(*Ciona robusta*)的出入水管和神经复合体等^[11]。群居海鞘和单体海鞘在海鞘纲的三个亚目(Aplousobranchia、Phlebobranchia和Stolidobranchia)中分别都有分布, 所以每个亚目中的海鞘既有整体再生的类群, 同时又有部分再生的类群。鉴于其特殊进化地位及兼备的双重再生能力, 加之海鞘基因单拷贝、具有很强的遗传可操作性的特点, 近年来海鞘逐渐成为继涡虫、果蝇、爪蛙和蝾螈等模式动物之后的研究再生进化的理想动物模型^[12]。

1 海鞘整体再生

整体再生属群居海鞘特有的属性。群居海鞘通常由几个到数千个身体结构类似、基因相同的个体(zoid)组成, 每个个体都有一个独立的心脏和



W: 整体再生, P: 部分再生。

W indicates whole-body regeneration, and P indicates partial-body regeneration.

图1 不同进化地位物种的再生能力

Fig.1 Phylogenetic analysis of regenerative ability of animals from different phyla

一个共享的开放式循环系统, 通过群落末端壶腹(ampullae, 血管边缘的可收缩的盲端)封闭起来, 整个群落包被在半透明的被囊(tunic)中^[13]。

群居海鞘创伤后的整体再生的形态学过程通常分为6个特征性阶段^[14]。第一阶段, 损伤响应(0 h)。损伤发生后, 血淋巴聚集和血管收缩迅速止血^[13]。第二阶段, 伤口愈合(约15 h)。第三阶段, 血管重塑(约24 h)。重新形成封闭的血管网络结构。第四阶段, 再生芽基形成(2~4天)。细胞增殖形成囊胚样结构, 并建立轴向极性。第五阶段, 再生芽基发育(5~7天)。第六阶段, 新个体长成(8~10天)。通常, 群居海鞘的再生芽基间存在发育竞争, 最终只有1个芽基如光滑拟菊海鞘(*B. lenis*), 或几个芽基如初生菊海鞘(*Botryllus primigenus*), 形成新的个体, 其他芽基的发育停止, 发生凋亡后被吸收^[14]。

1.1 海鞘整体再生的细胞学过程

再生过程依赖于新细胞源源不断地补充损失的细胞分化细胞, 因而确定新细胞的来源非常关键。目前, 已鉴定的参与海鞘整体再生的细胞包括两大类, 即上皮细胞和血细胞。其中上皮细胞经再生信号诱导可发生转分化^[15], 血细胞主要进行免疫及作为干细胞的来源^[16]。

海鞘通过上皮细胞的转分化启动芽基的形成, 根据海鞘芽基起始形成的部位不同, 分为围鳃上皮(peribranchial budding)、外周血管上皮(vascular bud-

ding)、母体血管(vasal budding)上皮、匍匐丝(stolonial budding)上皮、心外膜(epicardial budding)上皮^[17]等出芽。他们的共同特点是形成双层上皮芽基, 成血细胞流通于两层上皮之间的空腔。其中, 围鳃上皮、母体血管上皮和心外膜上皮直接通过内层上皮特定位点的去分化, 以出芽或内折的形式与外层上皮共同形成新生芽基。去分化的内层上皮由鳞状变成立方形, 细胞核增大, 核仁明显, 细胞质中积累大量RNA, 细胞由静息态重新进入细胞周期^[18]。外周血管上皮出芽形成芽基, 目前的研究结论主要以史氏菊海鞘(*B. schlosseri*)为模型获得。再生发生时成血细胞增殖、聚集后, 逐渐形成一单层膜泡结构, 诱导外层上皮出芽, 最终同样形成双层膜的新生芽基, 成血细胞流通于两层膜泡上皮之间。对新生芽基进行研究发现, 胚胎特异性的转录因子可以在芽基的内层膜泡上皮某些位点上检测到, 表明上皮层产生了类似于胚胎发育的细胞学过程^[19]。芽基分化形成新的组织器官, 新生个体除表皮外, 咽、内柱、肠和神经复合体大部分通过芽基的内层上皮分化形成^[18]。

血细胞参与的再生过程贯穿于伤口愈合到新生组织细胞形成的全过程。巨噬细胞在海鞘受损伤后数目增多, 负责清除损伤细胞或组织^[20], 桑椹细胞分泌组成背囊的物质以修复伤口^[21]。而成血细胞作为海鞘血液内未分化的细胞^[22], 再生过程中分化形

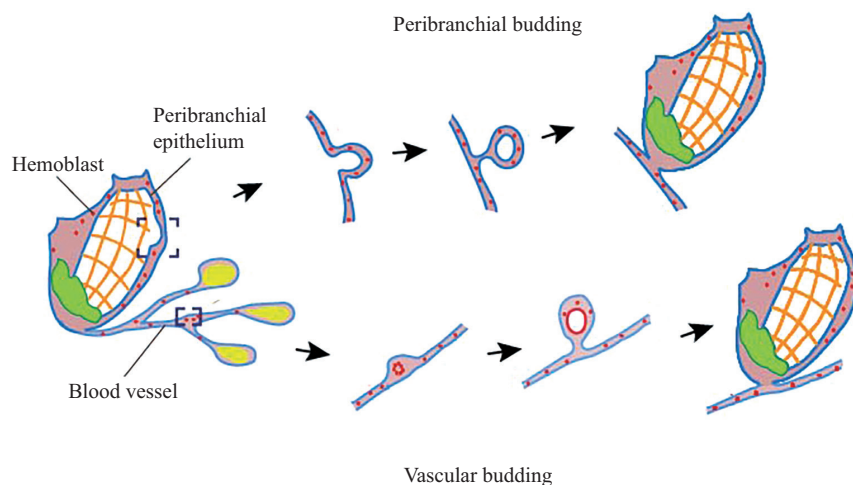
成体壁肌肉、生殖细胞、幽门组织、围心膜及背神经节等^[23-24], 因而在再生中发挥重要作用的一类血细胞。成血细胞直径大约5 μm , 具备核质比较大, 细胞质中分布多聚核糖体等典型干细胞特征, 研究成血细胞的定位及迁移是理解海鞘整体再生的信号调控及分子机制的关键, 找到合适的干细胞标志物尤为重要, CD-34、PIWI和整合素IA6(integrin alpha 6)均为鉴定成血细胞的重要标记物。拟菊海鞘和史氏菊海鞘的成血细胞高表达CD-34, 且与哺乳动物同源^[21,23], 紫拟菊海鞘(*B. violaceus*)的高表达PIWI的成血细胞, 沿着血管上皮分布并增殖旺盛, 是形成新生芽基的重要组成部分^[25]。Piwi⁺成血细胞会整合入精囊海鞘(*Polyandrocarpa misakiensis*)芽基的上皮细胞, 共同形成器官^[26]。通过RNAi敲降*piwi*会抑制史氏菊海鞘的整体再生^[27]。表达整合素IA6的成血细胞是蒂亚戈拟菊海鞘(*B. diegensis*)再生的关键细胞, 整体再生被丝裂霉素C抑制后, 通过移植IA6⁺的成血细胞可以恢复其再生能力^[28-29]。利用上述干细胞标记物定位成血细胞在海鞘体内的起源, 发现群居海鞘的干细胞巢主要位于内柱前端的腹侧^[30], 沿内柱两侧的身体腹部, 干细胞聚集形成的细胞岛^[24], 沿着血管分布的细胞聚集区^[31]以及性腺^[32]。

群居海鞘的再生芽基可以由上皮细胞启动, 也可以由血液来源的干细胞启动, 但都会形成一个由外层上皮、中央的成血细胞和内层上皮组成的新生芽基(图2), 该芽基结构上以及分化定位上高度类似

于胚胎三胚层的结构, 因而一定程度上出芽再生是胚胎发育的从头启动, 因此, 通过研究海鞘再生与发育过程中关键基因的表达与功能差异, 有助于揭示基因调控网络的保守性及调控元件的可塑性。同时群居海鞘并存的周期性的生理再生和损伤后的再生, 表明再生的启动机制也是有差异的, 进一步结合转录组分析和基因功能研究, 有助于揭示再生调控网络及特异的信号、细胞或组织类型对再生的贡献。

1.2 海鞘整体再生的分子调控

对海鞘整体再生的基因功能研究大多是通过抑制剂或Morpholino干扰技术获得的。对整体再生的拟菊海鞘使用抑制剂或RNA干扰视黄酸的合成, 会导致整体再生的阻滞和芽基的畸形, 反之, 视黄酸的激动剂会加速精囊海鞘芽基的形成及增加形成的芽基的数量^[33-34], 类似于斑马鱼鳍再生过程中视黄酸对胚基形成的调控^[35]。丝氨酸蛋白酶对整体再生中芽基的发育起重要作用, 在视黄酸处理后的海鞘中, 丝氨酸蛋白酶的表达提高^[36], 分析其功能认为可能与细胞外基质的重构相关^[37]。抑制 β -catenin后, 对芽基发育影响明显, 说明是典型的Wnt/ β -catenin信号通路影响再生过程^[38]。芽基中TGF- β 高表达, 并且TGF- β 激动剂会影响芽基的发育, 说明TGF- β 通路对再生有重要调控作用^[39]。抑制MAPK/ERK通路蛋白p-Mek1/2的活性, 会导致芽基形成畸形^[40]。拟菊海鞘整体再生时, Notch信号通路的下游靶点hes(Hairy/Enhancer of split)蛋白表达增加^[11], 可能



方框代表两种再生的出芽部位。

The boxes indicate the peribranchial budding site and vascular budding site, respectively.

图2 群居海鞘两种典型整体再生模式

Fig.2 Two typical ways of whole-body regeneration in colonial ascidians

与海鞘整体再生过程中的成血细胞的增殖和分化有关, 类似于小鼠胚胎发育中hes对造血细胞的发育的调控^[40]。

对拟菊海鞘再生的6个时期进行转录组测序发现, 再生早期, 细胞连接、代谢通路及凋亡相关通路被激活, 再生后期, 翻译活动相关基因如核糖体合成蛋白相关通路被激活, Wnt、Notch、TGF- β 和Hedgehog信号通路均在早期被激活, 再生晚期其表达下调^[11]。对正常芽基和发育受抑芽基的转录组分析发现, 上调的基因或通路大多跟胚胎发生和发育有关, 变化最明显的基因包括转录调控基因*hist1h3b*、凋亡抑制基因*g2e3*、胚胎发育相关的基因*tbx1*、*Six1*和*hmx1*, 以及干细胞增殖相关基因*osr1*和*neurog3*等^[41]。*Ptx*通常在肠上皮、入水管和神经复合体中表达^[19], 再生时其在芽基中转录, 敲降该基因导致芽基缺陷^[42]。基因*Six1/2*、*Six3/6*、*Eya*和*FoxI*通常与脊椎动物基板形成相关, 芽基发生时该基因在鳃裂形成细胞及入水管细胞中表达^[43]。

上述已鉴定的基因或信号通路对再生的作用在不同物种中是保守的, 同样, 在再生和发育过程中的作用往往也具有保守性, 随着基因编辑等技术在海鞘中的逐步成熟应用, 对蛋白功能研究的进一步深入, 海鞘再生的基因调控网络将逐步完善, 这对于理解再生在无脊椎到脊椎动物的进化机制, 对于理解脊椎动物的有限再生能力的调控机制很有助益。

2 海鞘部分再生

营固着生活的单体海鞘通常仅具有部分再生能力, 如玻璃海鞘(*C. robusta*)、萨氏海鞘(*C. savignyi*)和多果海鞘(*Polycarpa mytiligera*)等。但不同海鞘的部分再生能力有很大差别。多果海鞘具有强大的内脏和鳃片再生的能力, 当其身体受到挤压后, 动物通过入水管口吐出大部分内脏和鳃片, 并在12天后经由内层上皮组织再生出具有功能的内脏和鳃片^[44]。这种再生一定程度上类似于整体再生中的内层上皮出芽再生。多果海鞘是否是整体再生和部分再生之间的过度类型尚需实验证实。

玻璃海鞘和萨氏海鞘的再生能力相对有限。沿着玻璃海鞘身体纵轴进行切割, 远端结构包含鳃片、内柱、背索、神经以及出入水管, 近端结构包括心脏、肠、胃和性腺, 结果发现无论远端部分如何完整, 均不能再生出基底部的近端结构; 反之, 依靠仅余

部分鳃片的近端就能够再生出远端结构, 包括中枢神经系统和出入水管^[45]。进一步实验发现, 将身体沿纵轴分为三部分, 只有中间含有鳃片的部分具有再生能力, 且只会再生身体远端结构^[46], 且随着年龄增长, 海鞘再生周期延长, 再生能力下降^[47]。综上所述结果表明, 玻璃海鞘等的部分再生能力与鳃片的存在密切相关, 并且再生有方向极性。此外, 海鞘入水管结构的再生具有高度复原性。玻璃海鞘和皱瘤海鞘(*Styela plicata*)^[47]在入水管侧壁造成较大的创口后, 会再生出新的异位的入水管结构, 具备色素器官以及横向肌肉纤维。玻璃海鞘色素器官通常8个, 间隔规律地分布在水管的末端, 即使经过4轮水管末端手术切割, 其数量和分布特征与切割之前完全一致^[48]。人为封闭入水管开口, 皱瘤海鞘会迅速形成一新的有功能的入水管开口^[47]。上述结果表明, 海鞘水管上可能储存有重建的模式信息, 因而在损伤或功能受抑情况下仍可保证水管的迅速再生。

海鞘神经复合体再生过程研究比较详细, 损伤后四对神经的主分支在再生区域融合, 初步形成神经网络结构, 并不断延伸, 融合, 先后再生出神经节和神经腺, 在神经腺部位将前后神经、内脏神经、背侧神经、背侧神经丛连接起来^[40]。即使再生的神经复合体相对较小, 但对身体行为的调节功能发挥正常^[49]。

海鞘性腺也可再生。通过在被囊和体壁打孔移除性腺, 发现性腺会重新长出^[9], 玻璃海鞘的原始生殖细胞(*vasa*⁺细胞群)主要分布于尾芽期幼体的尾部组织, 手术切除尾部后, 成体仍可发育形成性腺^[50-51]。海鞘尾芽时期仍处于典型的镶嵌性发育阶段, 切除原始生殖细胞后, 理论上海鞘不再形成性腺, 因而成体期性腺的存在必然由非生殖干细胞分化形成。

2.1 海鞘部分再生的细胞学过程

目前, 有关海鞘部分再生的细胞学过程数据主要是基于入水管再生研究获得的(图3)。将海鞘水管手术切除后, 组织学观察显示上皮细胞分泌大量富含纤维素的细胞外基质, 再生出被囊, 基质层恢复后间充质细胞穿过血管上皮, 侵入新生的被囊^[52], 对于间充质细胞的来源及进一步的分化和定位等, 该研究没有进一步阐明。另有研究发现, 玻璃海鞘的入水管损伤3 h后, 鳃片部位表达碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)和PIWI蛋白的细胞增殖明显, 且增殖细胞向再生芽基迁移^[37], 但是, 随着血液循环迁移的增

殖细胞是否仅定向到新生芽基, 以及是否参与芽基的形成, 缺乏直接的证据。将切除的入水管残端作为外植体进行培养, 发现外植体远端再生出了新的色素器官(oral pigment organs), 说明入水管自身具备再生色素细胞的能力, 进一步研究证明色素器官的前体细胞巢位于入水管上^[48]。但另有研究认为, 色素器官再生的细胞来源还可能存在于水管之外的部位, 因为完全切除水管后, 色素器官仍能再生, 但数量及分布出现紊乱^[7]。水管再生和色素器官再生的过程进行对比, 发现两者的干细胞来源可能存在差异, 色素器官的再生可能主要依赖于前体细胞的分化, 但该群细胞的定位、分布以及更新机制需进一步确认。

玻璃海鞘再生神经复合体的细胞起源尚无定论, 可能涉及一种以上的细胞类型。只摘除脑神经节, 结果海鞘可迅速完成再生, 由此推测神经腺或神经管可能为脑神经节的再生提供了前体细胞^[53]。对E15转基因海鞘神经元进行绿色荧光蛋白标记, 发现摘除脑神经节后的损伤神经末端的细胞增殖明显, 通过形成神经芽基再生脑神经节^[49]。完全摘除神经复合体后, 成血细胞迅速在创伤部位聚集^[53], 并且背神经管来源的神经母细胞(GnRN阳性)也会迁移至损伤部位, 随后发展成轴突, 并合并到再生的脑神经节的后部^[40]。但所有的GnRN阳性细胞均不会发生增殖, 意味着该神经母细胞直接通过转分化形成神经复合体的某些细胞类型^[49]。由此推测, 参与神经复合体再生的细胞可能既包括多能干细胞, 同时也包括分化潜能受限的前体细胞, 这些前体细胞可能来源于就近的损伤部位, 也可能来源于背神经管的神经母细胞, 或者两者皆有。

对于单体海鞘中干细胞的定位, 研究发现玻璃

海鞘鳃片部位横向血管中分布大量活跃增殖且表达PIWI蛋白的细胞^[27]。皱瘤海鞘的肠黏膜下分布大量表达PIWI蛋白的未分化细胞, 且增殖明显^[54]。柄海鞘(*Styela clava*)的干细胞巢分布于咽附近的横向和纵向血管、体壁内侧及消化道和性腺中^[55]。海鞘干细胞在血管中以及消化道和性腺中都有检测到, 至于干细胞的起源, 尚无定论。尽管鳃片部位干细胞对再生能力起决定作用, 但是仅限于再生远端组织。对于鳃片和消化道等内脏部位同时存在干细胞的海鞘而言, 哪个部位的干细胞分化潜力更大? 这些干细胞是否起源于共同的祖细胞? 尚未有定论。利用海鞘开放式循环系统中血细胞便于分离和纯化的特性, 结合单细胞测序和空间转录组学分析, 这些问题将逐步得到解答。另外, 海鞘的成血细胞均表达PIWI蛋白, 而人类的造血干细胞也表达PIWI, 两者进化上同源^[56], 既如此, 人类的造血干细胞只分化产生血细胞谱系, 而海鞘的成血细胞可分化产生生殖、神经和肌肉等细胞类型, 所以, 理论上查清海鞘成血细胞的分化调控机制, 对于开启人类造血干细胞多向分化潜能很有借鉴意义。

2.2 海鞘部分再生的分子调控

对海鞘部分再生的分子调控机制的研究, 目前仍停留在再生过程中转录组水平上差异表达基因的鉴定。在玻璃海鞘入水管再生时, 其Notch信号通路中的*delta1*、*jagged*、*fringel*、*fringe8*和*notch*基因表达发生明显变化^[57]。原位杂交显示, *delta1*、*notch*和*hes-b*等均在入水管再生芽基中高表达。*Delta1*定位在入水管再生芽基的间充质细胞和肌肉纤维中, *notch*与*delta1*在入水管再生芽基中交替表达, *hes-b*定位在入水口远离伤口位置的肌肉纤维中, 而*notch*在鳃片部位也可以检测到, 其表达定位与干细胞位

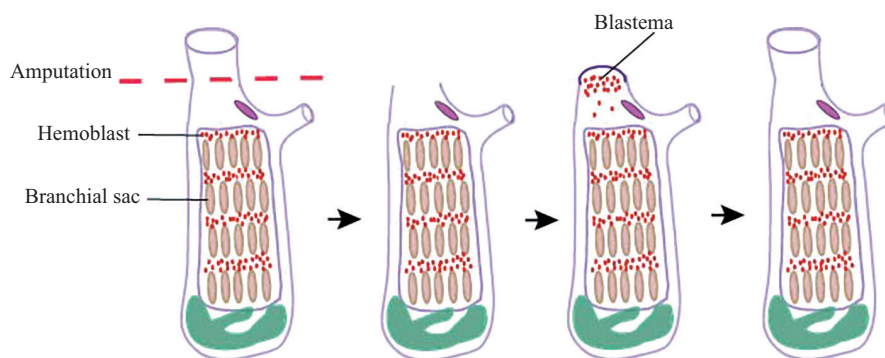


图3 单体海鞘水管再生

Fig.3 Siphon regeneration in solitary ascidians

置一致^[46]。用Notch信号通路抑制剂处理后,入水管的肌肉纤维分化以及鳃片干细胞增殖被阻断,说明Notch信号通路对玻璃海鞘再生至关重要^[58]。

另有研究利用RNA-seq鉴定了472个在入水管再生过程中差异表达的基因,包括凋亡相关基因和增殖相关基因等,其中Wnt和Hedgehog信号通路相关基因以及TGF- β 激活物表达均上调。使用TGF- β 信号通路抑制剂处理后,入水管再生被阻断^[59],表明TGF- β 是重要的再生调控通路。

综上,调控海鞘再生的信号通路在部分再生和整体再生中高度保守,比如Notch、Wnt和TGF- β 等通路。这些通路对两种不同再生的差异调控,以及对再生和对发育等其它的生物学过程的差异调控是如何体现的?既然上述通路在动物间普遍存在,是否查清整体再生和部分再生的差异调控机制,就可以一定程度上重启某些动物的再生能力。

3 思考及展望

对群居海鞘整体再生和单体海鞘部分再生进行对比(表1),两者相同之处在于再生的干细胞主体均为血液来源,再生发生时成血细胞增殖并发生迁移。Notch、Wnt和TGF- β 信号通路在两种再生中均发挥重要功能。不同之处在于整体再生能力只有群居性海鞘具备,这个类群的海鞘往往无性生殖和有性生殖两种方式兼备,同时具有周期性生理性再生和损伤诱导再生,通过100~200个血细胞加一段血管上皮即可再生出完整的个体,再生的方向没有极性;而部分再生为单体海鞘的属性,仅可再生水管、神经复合体、性腺等组织器官,只能利用身体的近端

结构再生出远端。整体再生过程中既包括血液来源的干细胞的增殖和分化,同时还需要上皮组织的转分化,形成由上皮细胞和成血细胞构成的双层膜泡的再生芽基,再进一步分化形成新的个体,而部分再生发生时需要成血细胞增殖并迁移到损伤部位,与损伤部位的上皮细胞层一起形成器官原基,这个过程的上皮细胞是否发生转分化尚不确定。总体而言,目前对两种再生发生的形态学过程研究比较清楚,而对于参与再生的细胞来源及细胞分化过程,以及分子调控机制等的研究不够完备。未来的工作,可充分利用各种组学,尤其是单细胞组学技术,发掘参与再生的干细胞的特异性分子标记,进行迁移和分化追踪,着力解决如下科学问题:

其一,海鞘胚胎及幼体属典型的镶嵌性发育,经过变态过程后,稚体和成体期重获再生潜能,因此,查清变态发育前后的基因表达变化,对于揭示再生潜能的调控意义重大,同时对于理解不同物种再生能力的差异,以及对于再生潜能的重激活很有帮助。

其二,整体再生和部分再生中,成血细胞均作为主要的细胞来源,由此引申的问题是,同一类型的细胞对群居海鞘可实现整体再生,对单体海鞘仅能实现部分再生,这其中的差异调控机制是什么?或者是造血细胞的分化潜能产生了分化限定,或者两种再生过程中调控成血细胞分化的分子机制存在差异,对此深入发掘后,对于查清动物整体再生和部分再生的差异调控机制很有帮助。

其三,海鞘整体和部分再生的信号通路和海鞘发育的信号通路,同其他物种一样^[60],有着极大的相

表1 整体再生和部分再生的比较
Table 1 Comparison of whole-body regeneration and partial-body regeneration

	整体再生 Whole-body regeneration	部分再生 Partial-body regeneration
Similarities	Stem cells are blood origin Can be regulated by Notch, Wnt and TGF- β signaling pathways	Stem cells are blood origin Can be regulated by Notch, Wnt and TGF- β signaling pathways
Specificities	Common in colonial ascidians Can regenerate the whole body No regenerative polarity Initiated by the epithelium or blood vessel budding Transdifferentiation of epithelium cells involved	Common in solitary ascidians Regeneration restricted in siphon, neuron complex and gonad Can only regenerate the distal part of the body from the proximal part Initiated by the proliferation of stem cells Transdifferentiation of epithelium cells need to be determined

似性,包括Notch、Wnt和TGF- β 等,这些保守的信号通路的调控是如何实现整体再生、部分再生以及个体发育的差别调控的?查清这一问题将帮助深度理解发育与再生的关系。

其四,将海鞘再生与其他物种的再生进行对比,如前所述,海鞘整体再生主要依赖于血液来源的干细胞,水螅再生依赖于三类干细胞,其中间质干细胞(interstitial stem cells)尤为重要,该群细胞在受到损伤诱导后会迁移到再生部位^[61]。而涡虫的再生依赖于成体干细胞(hemoblasts),也具备迁移属性^[3]。这3个物种的干细胞均高表达PIWI蛋白,并且该细胞群均具备多向分化潜能,几乎可以分化成所有类型的组织细胞。海鞘部分再生仍依赖于血液来源的干细胞,爪蛙的尾部再生和蝾螈的附肢再生分别依赖于组织特异的单能干细胞^[4],而斑马鱼及新生小鼠的心脏再生,则利用心肌细胞来分裂产生心脏组织^[5-6],该细胞群具有有限分化潜能。在再生的信号调控方面,Wnt/ β -catenin经典通路激活间质干细胞,对水螅头部模式重建至关重要^[62]。涡虫的Wnt/ β -catenin经典通路决定了再生过程中头和尾的模式重建,而BMP信号决定了背腹轴的模式重建^[3]。Wnt、BMP和Notch信号通路对鱼类鳍再生芽基的增殖以及心脏再生起调控作用^[5]。综上,再生的信号调控在物种间是保守的,尤其是Wnt信号,那么该信号通路如何实现对多能干细胞甚至分化的功能细胞的调控,实现了整体再生和部分再生,将是非常值得探讨的问题。

有研究认为,群居海鞘是由单体海鞘进化而来的^[63],所以群居海鞘整体再生能力的获得可能是单体海鞘血液系统进化的产物。也有观点认为,后生动物祖先可能均具有较强的再生能力^[64],而具有整体再生的海鞘相对于部分再生的海鞘的进化,可能体现了再生的进化灵活性。对于再生究竟是后生动物生物学属性的进化,还是对环境适应的进化,仍有待确定。但毋庸置疑的是,海鞘的多种再生方式的存在和独特的系统发育生物学地位,使得海鞘再生的研究成为理解后生动物再生的重要线索。

参考文献 (References)

[1] 徐振彪,宋林霞.三角涡虫:在体筛选再生及衰老相关药物的模型生物[J].中国细胞生物学学报(XU Z B, SONG L X. Planarian, a good screening model *in vivo* for drugs related to regen-

eration and aging [J]. Chin J Cell Biol, 2016, 38(6): 744-9.

[2] 江虎军,孙瑞娟,裴端卿.干细胞与再生医学的发展现状及重要意义[J].中国科学院院刊(JIANG H J, SUN R J, PEI D Q. Stem cells and regenerative medicine play an important role in the layout for medical science [J]. Bull Chin Acad Sci, 2011, 26(2): 174-8.

[3] IVANKOVIC M, HANECKOVA R, THOMMEN A, et al. Model systems for regeneration: planarians [J]. Dev, 2019, 146(17): dev167684.

[4] JOVEN A, ELEWA A, SIMON A. Model systems for regeneration: salamanders [J]. Dev, 2019, 146(14): dev167700.

[5] MARQUES I J, LUPI E, MERCADER N. Model systems for regeneration: zebrafish [J]. Dev, 2019, 146(18): dev167692.

[6] MADEN M, VARHOLICK J A. Model systems for regeneration: the spiny mouse, *Acomys cahirinus* [J]. Dev, 2020, 147(4): dev167718.

[7] BOURLAT S J, JULIUSDOTTIR T, LOWE C J, et al. Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida [J]. Nature, 2006, 444(7115): 85-8.

[8] BERRILL N J. Regeneration and budding in tunicate [J]. Biol Rev, 1951, 26: 456-75.

[9] JEFFERY W R. Closing the wounds: one hundred and twenty five years of regenerative biology in the ascidian *Ciona intestinalis* [J]. Genesis, 2015, 53(1): 48-65.

[10] MANNI L, ZANIOLO G, CIMA F, et al. *Botryllus schlosseri*: a model ascidian for the study of asexual reproduction [J]. Dev Dyn, 2007, 236(2): 335-52.

[11] ZONDAG L E, RUTHERFORD K, GEMMELL N J, et al. Uncovering the pathways underlying whole body regeneration in a chordate model, *Botrylloides leachi* using *de novo* transcriptome analysis [J]. BMC Genom, 2016, 17: 114.

[12] GORDON T, ROTH L, CAICCI F, et al. Spawning induction, development and culturing of the solitary ascidian *Polycarpa mytiligera*, an emerging model for regeneration studies [J]. Front Zool, 2020, 17: 19.

[13] BLANCHOU S, ZONDAG L, LAMARE M D, et al. Hematological analysis of the ascidian *Botrylloides leachii* (Savigny, 1816) during whole-body regeneration [J]. Biol Bull, 2017, 232(3): 143-57.

[14] BLANCHOU S, RINKEVICH B, WILSON M J. Whole-body regeneration in the colonial tunicate *Botrylloides leachii* [J]. Res Probl Cell Differ, 2018, 65: 337-55.

[15] KAWAMURA K, SUGINO Y, SUNANAGA T, et al. Multipotent epithelial cells in the process of regeneration and asexual reproduction in colonial tunicates [J]. Dev Growth Differ, 2008, 50(1): 1-11.

[16] ROSENTAL B, KOWARSKY M, SEITA J, et al. Complex mammalian-like haematopoietic system found in a colonial chordate [J]. Nature, 2018, 564(7736): 425-9.

[17] ALIÉ A, HIEBERT L S, SCELZO M, et al. The eventful history of nonembryonic development in tunicates [J]. J Exp Zool Part B, 2020, doi: 10.1002/jez.b.22940.

[18] SCELZO M, ALIÉ A, PAGNOTTA S, et al. Novel budding mode in *Polyandrocarpa zorritensis*: a model for comparative studies on asexual development and whole body regeneration [J]. EvoDevo, 2019, 10: 7.

[19] TIOZZO S, CHRISTIAEN L, DEYTS C, et al. Embryonic versus

- blastogenetic development in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*: insights from *Pitx* expression patterns [J]. *Dev Dyn* 2005, 232(2): 468-78.
- [20] CIMA F, PERONATO A, BALLARIN L. The haemocytes of the colonial aplousobranch ascidian *Diplosoma listerianum*: structural, cytochemical and functional analyses [J]. *Micron* 2017, 102: 51-64.
- [21] SUGUMARAN M, ROBINSON W E. Structure, biosynthesis and possible function of tunichromes and related compounds [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2012, 163(1): 1-25.
- [22] KAWAMURA K, SUNANAGA T. Hemoblasts in colonial tunicates: are they stem cells or tissue-restricted progenitor cells [J]? *Dev Growth Differ*, 2010, 52(1): 69-76.
- [23] BURIGHEL P, CLONEY R A. Urochordata: ascidiacea. In: Harrison FW, Ruppert E, editors. *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol. 15. Hemichordata, chaetognatha, and the invertebrate chordates [M]. New York: Wiley-Liss, 1997, 221-347.
- [24] RINKEVICH Y, VOSKOBOYNIK A, ROSNER A, et al. Repeated, long-term cycling of putative stem cells between niches in a basal chordate [J]. *Dev Cell*, 2013, 24(1): 76-88.
- [25] BROWN F D, KEELING E L, LE A D, et al. Whole body regeneration in a colonial ascidian, *Botrylloides violaceus* [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2009, 312(8): 885-900.
- [26] RINKEVICH Y, ROSNER A, RABINOWITZ C, et al. Piwi positive cells that line the vasculature epithelium, underlie whole body regeneration in a basal chordate [J]. *Dev Biol*, 2010, 345(1): 94-104.
- [27] WOLFSWINKEL J C V. Piwi and potency: PIWI proteins in animal stem cells and regeneration [J]. *Integr Comp Biol*, 2014, 54(4): 700-13.
- [28] KREBSBACH P H, VILLA-DIAZ L G. The role of integrin alpha 6 (CD49f) in stem cells: more than a conserved biomarker [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(15): 1090-9.
- [29] KASSMER S H, LANGENBACHER A D, DE TOMASO A W. Integrin-alpha-6+ candidate stem cells are responsible for whole body regeneration in the invertebrate chordate *Botrylloides digensis* [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4435.
- [30] VOSKOBOYNIK A, SOEN Y, RINKEVICH Y, et al. Identification of the endostyle as a stem cell niche in a colonial chordate [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(4): 456-64.
- [31] KAWAMURA K, SUGINO Y M. Cell adhesion in the process of asexual reproduction of tunicates [J]. *Microsc Res Tech*, 1999, 44(4): 269-78.
- [32] SUNANAGA T, SATOH M, KAWAMURA K. The role of Nanos homologue in gametogenesis and blastogenesis with special reference to male germ cell formation in the colonial ascidian, *Botryllus primigenus* [J]. *Dev Biol*, 2008, 324(1): 31-40.
- [33] HISATA K, FUJIWARA S, TSUCHIDA Y, et al. Expression and function of a retinoic acid receptor in budding ascidians [J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 208(10): 537-46.
- [34] HARA K, FUJIWARA S, KAWAMURA K. Retinoic acid can induce a secondary axis in developing buds of a colonial ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis* [J]. *Dev Growth Differ*, 2008, 34(4): 437-45.
- [35] AKIMENKO M A, MARÍ-BECCA M, BECERRA J, et al. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration [J]. *Dev Dyn*, 2003, 226(2): 190-201.
- [36] OHASHI M, KAWAMURA K, FUJII N, et al. A retinoic acid-inducible modular protease in budding ascidians [J]. *Dev Biol*, 1999, 214(1): 38-45.
- [37] RINKEVICH Y, DOUEK J, HABER O, et al. Urochordate whole body regeneration inaugurates a diverse innate immune signaling profile [J]. *Dev Biol*, 2007, 312(1): 131-46.
- [38] MAIO A D, SETAR L, TIOZZO S, et al. Wnt affects symmetry and morphogenesis during post-embryonic development in colonial chordates [J]. *Evo Devo*, 2015, 6: 17.
- [39] ROSNER A, ALFASSI G, MOISEEVA E, et al. The involvement of three signal transduction pathways in botryllid ascidian astogeny, as revealed by expression patterns of representative genes [J]. *Int J Dev Biol*, 2014, 58(9): 677-92.
- [40] GUIU J, SHIMIZU R, D'ALTRI T, et al. Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(1): 71-84.
- [41] COREY D M, ROSENTHAL B, KOWARSKY M, et al. Developmental cell death programs license cytotoxic cells to eliminate histocompatible partners [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2016, 113(23): 6520-5.
- [42] TIOZZO S, TOMASO A W D. Functional analysis of *Pitx* during asexual regeneration in a basal chordate [J]. *Evol Dev*, 2009, 11: 152-62.
- [43] GASPARINI F, DEGASPERI V, SHIMELD S M, et al. Evolutionary conservation of the placodal transcriptional network during sexual and asexual development in chordates [J]. *Dev Dyn*, 2013, 242(6): 752-66.
- [44] SHENKAR N, GORDON T. Gut-spilling in chordates: evisceration in the tropical ascidian *Polycarpa mytiligera* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9614.
- [45] HIRSCHLER J. Über die Restitutions- und Involutionvorgänge bei operierten Exemplaren von *Ciona intestinalis* Flem. (Teil I) nebst Bemerkungen über den Wert des Negativen für das Potenzproblem [J]. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*, 1914, 85(1): 205-27.
- [46] JEFFERY W R. Distal regeneration involves the age dependent activity of branchial sac stem cells in the ascidian *Ciona intestinalis* [J]. *Regeneration*, 2015, 2(1): 1-18.
- [47] MEDINA B N S P, ISADORA S D A, CAVALCANTE L A, et al. 3-acetylpyridine-induced degeneration in the adult ascidian neural complex: Reactive and regenerative changes in glia and blood cells [J]. *Dev Neurobiol*, 2015, 75(8): 877-93.
- [48] AUGER H, SASAKURA Y, JOLY J S, et al. Regeneration of oral siphon pigment organs in the ascidian *Ciona intestinalis* [J]. *Dev Biol*, 2010, 339(2): 374-89.
- [49] DAHLBERG C, AUGER H, DUPONT S, et al. Refining the *Ciona intestinalis* model of central nervous system regeneration [J]. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4458.
- [50] TAKAMURA K, FUJIMURA M, YAMAGUCHI Y. Primordial germ cells originate from the endodermal strand cells in the ascidian *Ciona intestinalis* [J]. *Dev Genes Evol*, 2002, 212(1): 11-8.
- [51] KAWAMURA K, TIOZZO S, MANNI L, et al. Germline cell formation and gonad regeneration in solitary and colonial ascidians [J]. *Dev Dyn*, 2011, 240: 299-308.
- [52] SUTTON M F. The Regeneration of the siphons of *ciona intestinalis*

- nalis L [J]. J Mar Biol Assoc UK, 2009, 32(1): 249-68.
- [53] BOLLNER T, HOWALT S, THORNDYKE M C, et al. Regeneration and post-metamorphic development of the central nervous system in the protochordate *Ciona intestinalis*: a study with monoclonal antibodies [J]. Cell Tissue Res, 1995, 279(2): 421-32.
- [54] JIMÉNEZ-MERINO J, ABREU I S D, HIEBERT L S, et al. Putative stem cells in the hemolymph and in the intestinal submucosa of the solitary ascidian *Styela plicata* [J]. EvoDevo, 2019, 10: 31.
- [55] WRIGHT K, COOPER E L. Phylogeny of thymus and bone marrow-bursa cells: proceedings of an international symposium on the phylogeny of T and B cells [J]. Q Rev Biol, 1977, <https://doi.org/10.1086/410107>.
- [56] ROSENTHAL B, KOWARSKY M, SEITA J, et al. Complex mammalian-like haematopoietic system found in a colonial chordate [J]. Nature, 2018, 564(7736): 425-9.
- [57] HAMADA M, GORICKI S, BYERLY M S, et al. Evolution of the chordate regeneration blastema: differential gene expression and conserved role of notch signaling during siphon regeneration in the ascidian *Ciona* [J]. Dev Biol, 2015, 405(2): 304-15.
- [58] HUDSON C, LOTITO S, YASUO H. Sequential and combinatorial inputs from Nodal, Delta2/Notch and FGF/MEK/ERK signalling pathways establish a grid-like organisation of distinct cell identities in the ascidian neural plate [J]. Dev, 2007, 134(19): 3527-37.
- [59] SPINA E J, GUZMAN E, ZHOU H, et al. A microRNA-mRNA expression network during oral siphon regeneration in *Ciona* [J]. Dev, 2017, 144(10): 1787-97.
- [60] ALVARADO A S, TSONIS P A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models [J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(11): 873-84.
- [61] VOGG M C, GALLIOT B, TSAIRIS C D. Model systems for regeneration: hydra [J]. Dev, 2019, 146(21): dev177212.
- [62] WENGER Y, BUZGARIU W, PERRUCHOUD C, et al. Generic and context-dependent gene modulations during Hydra whole body regeneration [J]. bioRxiv, 2019, doi: <https://doi.org/10.1101/587147>.
- [63] ZENG L, JACOBS M W, SWALLA B J. Coloniality has evolved once in *Stolidobranch Ascidians* [J]. Integr Comp Biol, 2006, 46(3): 255-68.
- [64] BELY A E, NYBERG K G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field [J]. Trends Ecol Evol, 2010, 25(3): 161-70.