



雷凯, 博士, 西湖大学生命科学学院特聘研究员, 博士生导师。2006年毕业于武汉大学, 获理学学士学位; 2012年毕业于复旦大学, 获发育生物学博士学位; 在美国 Stowers 研究所从事博士后研究工作至2018年; 2018年10月全职加入西湖大学生命科学学院。研究兴趣是探究组织器官再生的细胞和分子机制, 聚焦于3个研究方向: (1) 与建立组织器官再生微环境相关的分子机制; (2) 线粒体调控组织再生和干细胞命运的分子机制; (3) 组织器官再生研究模型方法学的建立及应用。实验室综合利用涡虫、哺乳动物细胞及疾病模型等多种研究对象开展研究, 以期回答最基本的与组织器官再生相关的科学问题, 为再生医学发展、衰老和退行性疾病的治疗提供帮助。

## 涡虫再生的诱发机制

张文娅<sup>1,2,3</sup> 雷凯<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>西湖大学, 生命科学学院, 生命科学与生物医学浙江省实验室, 浙江省生长调控和转化研究重点实验室, 杭州 310024; <sup>2</sup>浙江西湖高等研究院, 生物学研究所, 杭州 310024; <sup>3</sup>复旦大学, 基础医学院, 上海 200433)

**摘要** 组织再生由复杂的基因网络调控, 但基因调控网络的上游诱发机制仍有待进一步明确。解剖结构、基因组以及系统进化位置上的特征使具有全身再生能力的涡虫成为探究再生问题的良好动物模型之一。研究涡虫再生的诱发机制对于解释物种间再生能力的差异, 以及促进再生调控具有重要意义。研究发现涡虫受损后, 一些再生早期信号的快速响应是下游再生基因调控网络激活及组织正常再生的潜在诱发条件, 包括离子通道通过介导离子流引起胞内外离子浓度改变而诱导干细胞增殖; 活性氧与细胞外信号调节激酶的相互作用可激活下游调控组织分化的信号通路; ATP可能通过激活嘌呤能受体调控下游再生过程; 损伤后产生的大量黏液及一氧化氮可能作为信号因子, 通过免疫相关作用引发再生相关信号级联反应; 神经和表皮间的相互作用可能诱发芽基生成及后续再生过程。不同因素可能通过参与再生微环境的塑造, 协同激活再生基因调控网络, 促进涡虫再生。这些潜在的再生激活因素与涡虫强大的再生能力之间的确切关系, 以及再生激活因素与诱发伤口愈合因素的异同目前仍不明晰, 需要进一步探究。

**关键词** 组织损伤; 再生机制; 涡虫

## The Initiation Mechanism of Regeneration in Planarian

ZHANG Wenya<sup>1,2,3</sup>, LEI Kai<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Westlake Laboratory of Life Sciences and Biomedicine, Key Laboratory of Growth Regulation and Translational Research of Zhejiang Province, School of Life Sciences, Westlake University, Hangzhou 310024, China; <sup>2</sup>Institute of Biology, Westlake Institute for Advanced Study, Hangzhou 310024, China; <sup>3</sup>School of Basic Medical sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

收稿日期: 2022-01-28

接受日期: 2022-03-28

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31970750)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-86591637, E-mail: leikai@westlake.edu.cn

Received: January 28, 2022

Accepted: March 28, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31970750)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86591637, E-mail: leikai@westlake.edu.cn

**Abstract** Although many studies on the molecular level have shown that regeneration is regulated by a complex gene network, the upstream initiation mechanism of the gene regulatory network remains unclear. The characteristics of anatomy, genome and phylogenetic position make planarian a good animal model for regeneration studies. Studying the initiation mechanism of planarians regeneration is critical to reveal the differences in regeneration ability in nature and to find the strategies for promoting regeneration. After the injury, the immediate response of some factors is necessary to initiate the downstream gene regulatory network of regeneration followed by the regeneration. Ion channels induce the proliferation of stem cells by changing extracellular and intracellular ion concentration. The interaction between reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinases activates downstream signaling pathways that regulate cell proliferation and differentiation. ATP may regulate downstream regeneration by activating purinergic receptors. The large amount of mucus produced after injury and nitric oxide may act as signal factors, which can initiate the regeneration related signal cascade through the activity of immune system. The underlying connection between nerve and epidermis initiates a series of events that promote blastema formation and subsequent regeneration. Ultimately, different factors may be involved in establishing the regeneration microenvironment which coordinates subsequential regeneration events to promote regeneration in planarians. However, the exact relationship between these potential regeneration triggers and the strong regeneration ability of planarians is still unclear. The similarities and differences between the factors that activate regeneration and those induce wound healing are also largely unknown. These questions require further investigation.

**Keywords** tissue injury; regeneration mechanism; planarian

伤口愈合或组织再生对生物体正常生存至关重要。多数动物门包含具有再生能力的物种,但是不同物种的再生能力有所差异<sup>[1]</sup>。在人体中,部分器官具有再生能力,例如皮肤的修复能力<sup>[2]</sup>及肝脏的再生功能<sup>[3]</sup>,然而,这些器官的再生能力是有限的,一旦遭受严重损伤,则难以实现再生<sup>[4]</sup>。因此,揭示具有全身再生能力物种的再生机制,对调控人体组织器官再生能力具有重要意义。自然界中,一些无脊椎动物,如海绵、刺胞动物、贝壳动物、涡虫和海鞘等<sup>[5]</sup>,具有全身再生能力。由于涡虫在解剖结构、基因组以及系统进化位置上的特点,越来越多的研究选择涡虫作为研究对象来探究再生机制。为何涡虫具有强大的再生能力,而哺乳动物的再生能力如此有限?近年来,随着生物化学与分子生物学技术的发展,涡虫再生研究的重点主要集中于发现并鉴定调控再生的关键基因,例如发现调控成体多能干细胞命运的分子机制、调控特定组织再生的基因通路以及调控再生过程中极性重建的分子机制等。然而,诱发再生基因调控网络的上游信号仍不明确。机体受损后,涡虫体内是否存在应激反应信号的释放?应激信号的释放是否会引发下游的再生过程?诱发再生过程的核心因素是什么?探究诱发涡虫再生的机制,对揭示不同物种间再生能力差异

的本质,以及寻找有效的再生调控方法具有重要意义(图1)。本文将对涡虫中诱发再生基因调控网络的潜在上游因子进行综述,旨在引起学者们对再生诱发因素相关研究的关注,加深他们对再生差异本质的探讨,推动再生研究成果在医学中的应用。

## 1 涡虫作为再生研究对象的劣势

动物模型是研究人类疾病发病机制和治疗手段(例如糖尿病机制和相关治疗药物的研发)的重要工具<sup>[6]</sup>。除哺乳动物外,其他具有独特特征,且处于不同进化地位的动物也被广泛用于解决生物学重要问题,例如,酵母快速的繁殖周期及成熟的高通量遗传学方法使其成为揭示蛋白质折叠、蛋白质转运和细胞周期等基本生物学问题的重要工具<sup>[7-10]</sup>;秀丽隐杆线虫通体透明,易于直接观察并操控其体内的细胞学过程<sup>[11]</sup>;黑腹果蝇具有简单的基因组结构,拥有成熟的遗传学操控方法<sup>[12]</sup>,广泛应用于遗传研究。此外,伴随着现代研究工具的发展,低成本的基因组测序技术使组建更多生物的基因组成为可能,转录组、基因编辑、蛋白质组、表观组等研究策略可进一步被应用于分子机制研究<sup>[13-17]</sup>,为研究生物学问题拓宽了途径。越来越多的具有独特生物学特性和特殊系统发育地位的非模式生物,被用以探索在模式动物

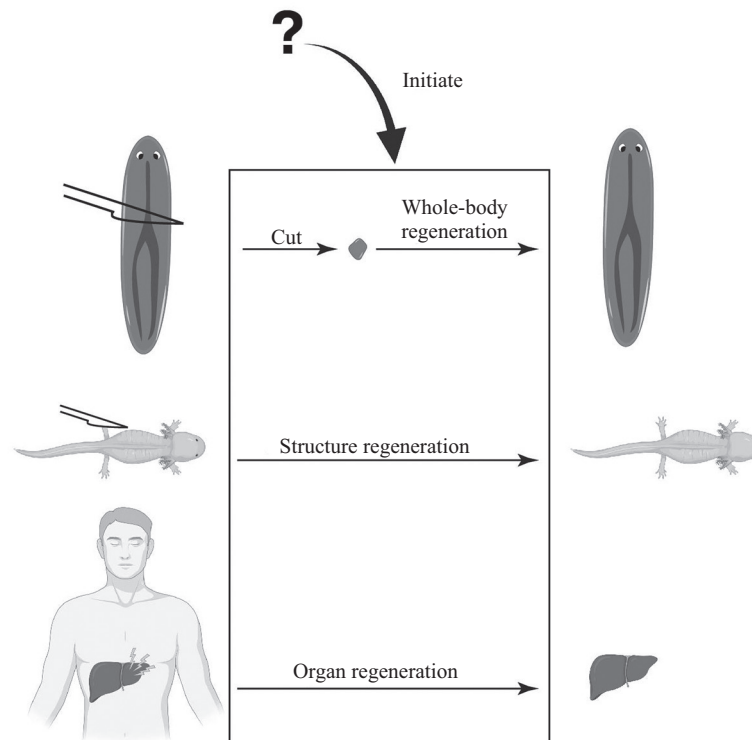


图1 再生诱发机制与再生能力

Fig.1 Initiation mechanisms of regeneration and regeneration ability

中无法研究的生命现象<sup>[18]</sup>,如涡虫、鲟鱼和裸鼯鼠已分别被用来研究再生和衰老相关问题<sup>[18-19]</sup>。

涡虫是较早出现在系统发育进化中的两侧对称三胚层动物<sup>[20]</sup>,属于扁形动物门<sup>[21]</sup>。涡虫具有表皮、肌肉、肠道、咽、神经及原肾管等多种组织,这些组织在切除后均可实现再生<sup>[22]</sup>。在分子水平上,前期研究发现涡虫中85%影响再生的基因在其他动物中存在同源基因<sup>[20,23]</sup>。在240个影响涡虫再生的基因中存在38个基因与人类疾病基因同源。此外,涡虫体内还含有大量的多能干细胞,哺乳动物胚胎干细胞和涡虫干细胞的转录组比较揭示了涡虫干细胞的多能性具有保守特性<sup>[24]</sup>。这些特征使涡虫作为揭示再生奥秘的研究动物具有较大优势。揭示涡虫强大的再生机制将为启动人体中沉默的再生调控机制提供线索。

## 2 再生诱发机制

### 2.1 损伤快速应答基因

在调控体内干细胞增殖及分化的基因网络上游,存在一组在短时间内能迅速响应损伤的转录因子,其被称为损伤快速应答基因(immediate early gene, IEG)。与其他再生调控基因相比,IEG,如*c-fos*

和*c-myc*通常在损伤后短时间内率先发生转录水平的迅速升高,继而调控其他基因的表达,引发后续的再生过程<sup>[25]</sup>。VERRIER等<sup>[26]</sup>和MARTIN等<sup>[27]</sup>分别利用NIH/3T3细胞及小鼠胚胎探究生长因子对*c-fos*的激活作用。结果表明,培养条件中是否含有血清对*c-fos*的损伤后激活并无影响,说明尽管IEG能被生长因子激活,但仍存在其他刺激因子激活IEG。在*c-fos*介导的下游反应中,*c-fos*编码的蛋白参与AP-1(activator protein 1)复合物的形成。通过与靶基因的启动子和增强子区域结合,AP-1将胞外刺激信号转换为基因表达的变化。因此,IEG是基因组在再生过程中对刺激作出快速反应的重要媒介。通过研究鲟鱼、斑马鱼及哺乳动物的再生响应增强子发现,AP-1在再生响应中的功能是保守的。AP-1通过激活再生反应增强子元件,诱导再生依赖的基因表达<sup>[28]</sup>。

IEG应激反应同样发生在涡虫受损后,且与损伤类型无关。WENEMOSER等<sup>[29]</sup>利用micro-array分析发现涡虫受损后30分钟内,伤口附近保留的组织中许多细胞类型如表皮及皮下组织细胞会出现部分基因转录水平上升的现象。大多数转录水平升高的基因如*jun-1*、*fos-1*、*egr-2*、*egr-3*、*egr-4*、*ppl-1*及*egr1-1*与其他物种中已知的IEG具有同源性,且其转

录水平的升高不受蛋白质翻译的影响。*fos-1*基因敲降的涡虫被截断后无法正常再生出芽基,表明*fos-1*可能作为IEG,能够在损伤后快速响应,进而激活下游再生基因调控网络以诱发再生。在另一种同样具有全身再生能力的扁虫*Hofstenia miamia*中发现,早期生长反应因子(early growth response, EGR)可通过改变染色质的构象及开放程度,影响其他转录因子与染色质的可及性。因此, EGR可以作为先导因子调控基因表达,如影响转录因子编码基因*runt*,信号通路相关基因*follistatin*、*nrg-1*、*nrg-2*、*nlk*等,以及编码不同功能细胞质蛋白的基因*p-protein*、*ankrd*、*mtss-1*等的表达<sup>[30]</sup>。

然而,在损伤后短时间内,IEG的表达是如何被上调的? OWLARN等<sup>[31]</sup>研究发现了存在于涡虫中的细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的磷酸化,即在截断后几分钟内ERK以一种不依赖于干细胞的方式被磷酸化激活。通过使用环己酰亚胺抑制蛋白质合成,他们发现ERK的激活不依赖于新生蛋白,说明存在未知因素作为涡虫再生的上游启动因子激活ERK,例如可能存在损伤后快速释放并发挥功能的因子,包括迅速响应的离子流、胞外ATP及活性氧(reactive oxygen species, ROS)等。

## 2.2 离子通道

当机体损伤伴随机机械刺激时,位于细胞膜的离子通道迅速感知机械刺激,并将机械力转化为生物电信号<sup>[32]</sup>,这个过程伴随着离子流的产生及细胞膜电位的改变。若离子流中包含 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ 还可作为胞内重要的信使调节激酶级联反应,响应外界损伤。细胞增殖是在多种蛋白质协同作用下发生的复杂过程,这个过程广泛涉及 $\text{Ca}^{2+}$ 信号转导。包括干细胞在内的正常细胞均需要较高的外部 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度以诱发细胞增殖<sup>[33-34]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 在线虫、斑马鱼等生物再生过程中的作用已引起广泛关注。 $\text{Ca}^{2+}$ 诱导的双亮氨酸拉链激酶(dual-leucine-zipper-bearing kinase, DLK)激活是线虫轴突损伤后再生的关键<sup>[35]</sup>。在斑马鱼中,  $\text{Ca}^{2+}$ 依赖肽酰基精氨酸脱亚胺酶(peptidyl-arginine deiminase, PAD)来传递钙信号,促使细胞内组蛋白瓜氨酸化,进而诱导创伤后体内的增殖与再生过程<sup>[36]</sup>。

最早发现 $\text{Ca}^{2+}$ 对涡虫再生的影响与DNA合成有关。在再生早期,将涡虫置于不含 $\text{Ca}^{2+}$ 的培养体

系中,涡虫无法正常再生。然而,在被截断12小时后,涡虫再生不再受培养体系中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响。此外,涡虫被切后,其体内钙含量会随再生过程发生变化。涡虫截断组织的总钙含量在涡虫被切后立即下降,直到愈合完成(被截断后6小时),然后显著上升并在被截断后12小时左右达到峰值。同时,钙调蛋白在涡虫截断后6小时内的含量也会逐渐降低,在被截断后12小时短暂升高后继续下降直到截断后48小时。涡虫体内 $\text{Ca}^{2+}$ 和钙调蛋白含量变化的时间窗口与再生过程中干细胞增殖的时间窗口对应<sup>[37]</sup>。体外实验表明,涡虫细胞在无 $\text{Ca}^{2+}$ 的培养基中培养时, DNA和RNA合成减弱,同时伴随着胞内组蛋白磷酸化水平的降低。这些过程可能与cAMP无法在细胞内正常发挥作用相关<sup>[38-39]</sup>。除外界环境 $\text{Ca}^{2+}$ 对涡虫及其细胞影响的研究外,涡虫体内 $\text{Ca}^{2+}$ 的功能研究还主要集中在 $\text{Ca}^{2+}$ 稳态对涡虫组织再生早期阶段前后轴建立的作用,以及对神经组织再生的调控作用。例如,在特定的 $\text{Ca}_v1$ 通道亚型的作用下,  $\text{Ca}^{2+}$ 流和Hedgehog信号之间建立不同的相互作用关系,从而对再生造成不同的影响<sup>[40]</sup>; Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 信号通路参与脑尤其是 $\gamma$ -氨基丁酸能(GABAergic)神经元的再生<sup>[41]</sup>。上述研究表明,  $\text{Ca}^{2+}$ 在涡虫组织再生过程中发挥作用。然而,涡虫机体损伤后,  $\text{Ca}^{2+}$ 如何在短时间内响应刺激进而调控再生仍有待研究。鉴于干细胞增殖与 $\text{Ca}^{2+}$ 之间的潜在联系,  $\text{Ca}^{2+}$ 可能是损伤后激活干细胞增殖的重要因素。

## 2.3 ROS

过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )化学性质相对稳定,是一种研究相对较多的ROS。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 能在组织内扩散,并具有穿过细胞膜的能力<sup>[42]</sup>。胞外的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可以通过水通道蛋白(aquaporin, AQP)进入细胞。进入细胞后,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用于多种蛋白质和非蛋白质靶标,继而影响靶标自身调节的多种信号通路<sup>[43]</sup>。

无论在无脊椎动物如线虫、果蝇,低等脊椎动物如斑马鱼,还是在哺乳动物中, ROS尤其是 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的损伤后激增在诱发组织再生过程中均发挥重要作用。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可通过氧化特定的半胱氨酸残基直接调节激酶活性;在果蝇和斑马鱼中,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 能够介导免疫细胞向受损组织聚集; Src家族激酶Lyn作为氧化还原传感器,可介导斑马鱼幼体早期中性粒细胞向伤口迁移<sup>[44]</sup>。ROS的激增可能涉及到NADPH氧

化酶(dual oxidases, 包括DUOX1和DUOX2)。在哺乳动物中,  $H_2O_2$ 的产生与DUOX有关, DUOX的活性同时又受到ATP及 $Ca^{2+}$ 的调控。在气道上皮受损后, 细胞外ATP通过激活细胞表面嘌呤能受体引发 $Ca^{2+}$ 结合在DUOX的 $Ca^{2+}$ 结合结构域, 进而激活DUOX并导致 $H_2O_2$ 产生, 促使上皮细胞迁移以介导修复过程<sup>[45]</sup>。

ROS水平升高在涡虫再生中同样发挥重要作用。涡虫受损后数分钟内, ROS在伤口部位激增, 且ROS的激增与损伤类型(伤口愈合型损伤或组织再生型损伤)无关。PIROTTRN等<sup>[46]</sup>发现, 用DPI(diphenyleneiodonium)或APO(apocynin)抑制ROS的产生会导致涡虫截断后缺失组织的再生障碍, 诱发再生部位芽基生成抑制和组织稳态失调等现象的发生。ROS水平的降低不会影响干细胞增殖, 但会导致干细胞无法分化为再生所需的组织细胞类型。抑制ROS激增会阻止神经系统的正常再生, 导致头部神经节减少和神经细胞异位形成。然而, 由于ROS水平降低会影响干细胞的早期分化过程及再生轴的建立, 除促进神经组织再生外, ROS可能在多种组织细胞的分化过程中均发挥重要作用<sup>[46]</sup>。

相对较长的半衰期和良好的膜渗透性使ROS可以作为二级信使, 激活再生相关的下游信号, 如激活ERK等。JAENEN等<sup>[47]</sup>发现, 涡虫中ROS和ERK之间存在密切联系, 两者的相互作用会激活下游MAPK/ERK介导的再生调控过程。无论是直接用 $H_2O_2$ 处理, 还是采用无创伤的光照刺激, 促使虫体产生ROS, 均能逆转由ERK抑制造成的尾部再生阻滞。ERK在细胞膜EGFR-3受到ROS诱导后被激活。此外, *egfr-3*的敲降同样会导致胞内ROS合成受到抑制, 说明ROS不仅能作为上游的再生启动因子, 同时可能在再生调控下游发挥功能, 如可能影响EGFR-3介导的细胞分化过程。

$H_2O_2$ 不仅能够对涡虫受到机械损伤后迅速作出响应, 当涡虫受到高温刺激、化学刺激或短波长光刺激后, 体内 $H_2O_2$ 也会迅速增加, 并介导应激行为的产生。 $H_2O_2$ 通过激活离子通道TRPA1(transient receptor potential ankyrin 1)发挥调控作用<sup>[48-49]</sup>, 表明了 $H_2O_2$ 在介导涡虫感应外界刺激中的重要性。由于缺乏适用于涡虫的转基因技术, 基于转基因的胞内特定类型ROS的标记方法, 如特异性标记 $H_2O_2$ 的HyPer荧光探针<sup>[50]</sup>, 在涡虫研究中难以使用。涡虫中

ROS的标记只能采用膜渗透性染料, 但此方法难以对ROS进行精确定位, 且难以准确区分ROS的类型。开发相应的转基因策略有助于进一步揭示ROS信号在涡虫再生中的作用机制。

## 2.4 ATP

ATP通常被认为在胞内供能及RNA合成过程中发挥重要作用。1972年, BURNSTOCK<sup>[51]</sup>发现ATP能够作为嘌呤能信号发挥转导作用。ATP作为神经递质时需要被释放到胞外发挥作用, 其释放途径有多种, 包括细胞破裂后由细胞膜完整性丧失导致的ATP释放, 胞吐作用介导的释放, 以及由细胞膜通道蛋白如ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白及连接蛋白半通道介导的释放<sup>[52]</sup>。ATP从细胞中被释放后, 通过嘌呤能受体发挥旁分泌或自分泌信号转导作用。嘌呤能受体包含P1和P2家族, 它们分别由腺苷和ATP/ADP激活。P2受体分为2个亚型, P2X和P2Y, 它们分别是配体门控离子通道和G蛋白偶联受体<sup>[53]</sup>。

组织损伤造成的细胞膜破损或细胞死亡导致胞内ATP大量释放, ATP继而发挥嘌呤能信号转导的作用。ATP信号转导与组织损伤和修复的关系在哺乳动物中研究较多, 例如在心脏损伤后, 骨髓造血干细胞表达的P2Y<sub>14</sub>(P2Y purinoceptor 14)受体在ATP作用下诱导细胞向损伤部位迁移, 然后通过激活其他嘌呤能受体, 介导细胞在损伤部位分化<sup>[54]</sup>。嘌呤能信号转导在斑马鱼中同样发挥作用。在斑马鱼视网膜受损早期, 嘌呤能受体P2RY<sub>1</sub>(P2Y purinoceptor 1)的表达增强, 并在细胞增殖峰值时期达到最高水平, 其通过促进细胞分裂调控再生过程<sup>[55]</sup>。然而, 嘌呤能信号通路是否对涡虫的再生也具有调控作用? 涡虫中存在编码P2X蛋白的基因的同源基因, 研究表明其参与调控干细胞在不同营养供应情况下的增殖过程<sup>[56]</sup>。嘌呤能受体的存在及其对干细胞的调控作用提示, 嘌呤能信号分子ATP可能是激活涡虫再生信号的潜在诱发因素。

## 2.5 免疫反应

免疫系统与组织再生之间存在密切联系。在涡虫中, 免疫反应如何诱发再生基因调控网络? 通过分析涡虫基因组并将其与其他物种基因组比较, 可发现涡虫基因组中含有大量与天然免疫因子相关的同源基因, 且这些同源基因的转录水平在组织损伤和再生时上升<sup>[57]</sup>。组织学方法鉴定出涡虫伤

口周围存在活跃的吞噬细胞,表明先天免疫系统可能会参与组织修复及再生过程<sup>[58]</sup>。自然状态下,涡虫身体表面覆盖有一层具有抗菌性能的黏液分泌物(mucus)。损伤后,大量黏液产生于伤口区域。黏液作为一层天然屏障,在许多物种中具有重要的免疫保护作用。此外,利用电子显微镜观察到涡虫黏液中存在被称为“reticular cells”的细胞,这些细胞能够在再生过程中吞噬细菌和细胞碎片<sup>[59-60]</sup>。细胞碎片的吞噬,不仅为再生组织创造空间,而且可能激活再生所需的信号级联反应。哺乳动物心肌损伤后,天然免疫反应被激活。其中,心脏巨噬细胞被激活并增殖,清除细胞碎片,分泌促进再生的因子(如营养因子、细胞因子、蛋白酶和Wnt配体等)以形成利于再生的细胞外基质<sup>[61]</sup>。当用抗炎糖皮质激素处理斑马鱼后,其心肌无法再生<sup>[62]</sup>。涡虫大量分泌的黏液是否作为上游信号引发再生过程?黏液中的吞噬细胞是否是刺激组织细胞产生再生响应的关键因素?黏液及其中的吞噬细胞在诱发下游再生过程中的作用仍有待进一步研究。对涡虫黏液的蛋白质组分析发现,涡虫黏液与人体黏液蛋白成分相似<sup>[63]</sup>,说明揭示涡虫黏液及其中的吞噬细胞在诱发再生中的作用,对促进人体组织再生具有潜在价值。

一氧化氮在许多物种中发挥细胞信号转导的功能。一氧化氮能促进细胞碎片的清除以及免疫细胞的激活、生长和死亡<sup>[64]</sup>。由于一氧化氮是气体分子,很容易通过液体和细胞膜扩散。钙依赖和非钙依赖信号均能促进一氧化氮合酶利用精氨酸合成一氧化氮。此外,乙醇脱氢酶也参与一氧化氮代谢。研究表明,一氧化氮能促使巨噬细胞被招募到斑马鱼心脏损伤部位,诱导心肌细胞增殖和血管生成加速,从而促进斑马鱼心脏再生<sup>[65]</sup>。编码一氧化氮合酶和乙醇脱氢酶的基因的同源基因已在涡虫中被发现<sup>[66-67]</sup>,提示一氧化氮可能作为信号因子激活免疫细胞,进而促进涡虫再生过程的顺利进行<sup>[57]</sup>。

## 2.6 表皮与神经的相互作用

涡虫受损后,伤口处的背腹侧表皮在短时间内互相黏附,从而闭合伤口。随后,芽基在伤口部位逐渐形成,并伴随着极性轴的建立。涡虫背腹侧表皮的接触可能是激活再生反应的上游信号。当将涡虫的组织块移植到与其背腹轴方向相反的受体涡虫体内后,该移植物会形成与再生过程中生成的

无色芽基类似的结构,并逐渐形成隆起物,同时建立自身的背腹轴,最终在再生结构的最远端(前端或后端)形成类似于头部或尾部的结构,且该结构与移植受体的前后轴极性相协调。然而,只有背腹轴反向移植能诱发此现象,前后轴反向移植则不会引发额外的再生现象。这种由背腹侧表皮接触引发的再生与正常头部或尾部的再生过程相似。以上现象表明,损伤后背腹侧表皮的融合可能会引发下游再生过程<sup>[68]</sup>。然而,与此相悖的是,当涡虫表皮的背侧和腹侧边缘被人工接触时,它们通常不会改变各自的位置,表皮的伸展和进一步的芽基形成不再发生<sup>[69]</sup>。说明表皮融合的过程仍伴随着其他事件的发生,如由神经控制的肌肉收缩,以及融合后覆盖伤口的表皮的形成,这些事件可能是引发再生的潜在重要因素。

在两栖类动物蝾螈的肢体再生研究中发现,截肢后的残肢表皮会迅速覆盖伤口表面,并形成创面表皮(wound epidermis, WE)。若通过移植抑制WE形成,则会导致伤口处早期免疫反应失调,胞外基质重塑抑制,以及生长因子相关信号通路失调,从而阻止后续芽基生成<sup>[70]</sup>。这些现象表明,创面表皮在再生激活中具有重要作用<sup>[71]</sup>。随后,在残肢的最远端,部分创面表皮会堆积形成具有多层结构的顶端上皮帽(apical epithelial cap, AEC),AEC通过表达有丝分裂调控基因维持细胞增殖,促进完整肢体的再生<sup>[72]</sup>。

不仅表皮在再生的初期起到必不可少的作用,神经因子也在蝾螈肢体再生中发挥调控作用。蝾螈的神经轴突会向断肢分泌神经营养因子,神经因子刺激芽基有丝分裂并上调再生依赖基因的表达。如果残肢中神经被移除,则无法实现肢体再生。然而,如果在芽基形成的中后期去除神经,肢体再生则不会受到阻碍<sup>[73]</sup>。这表明在机体创伤早期,神经与WE/AEC之间相互作用,并共同诱发再生。两者间的相互作用被研究证实,例如KGF/FGF作为一种内源性神经因子,能够诱导转录因子Sp9在表皮中表达,继而促进WE的角化细胞去分化,使其在芽基中保持未分化状态以实现再生<sup>[74]</sup>。神经和表皮间的相互作用促使诱导再生的特定微环境形成,从而引发芽基生成及后续再生过程。由于涡虫的神经广泛分布于全身,涡虫再生早期的表皮融合可能受到神经支配。然而,表皮和神经之间存在怎样

的相互作用? 两者的相互作用是否能够作为引发涡虫再生基因调控网络的上游信号? 这些问题仍不明确。

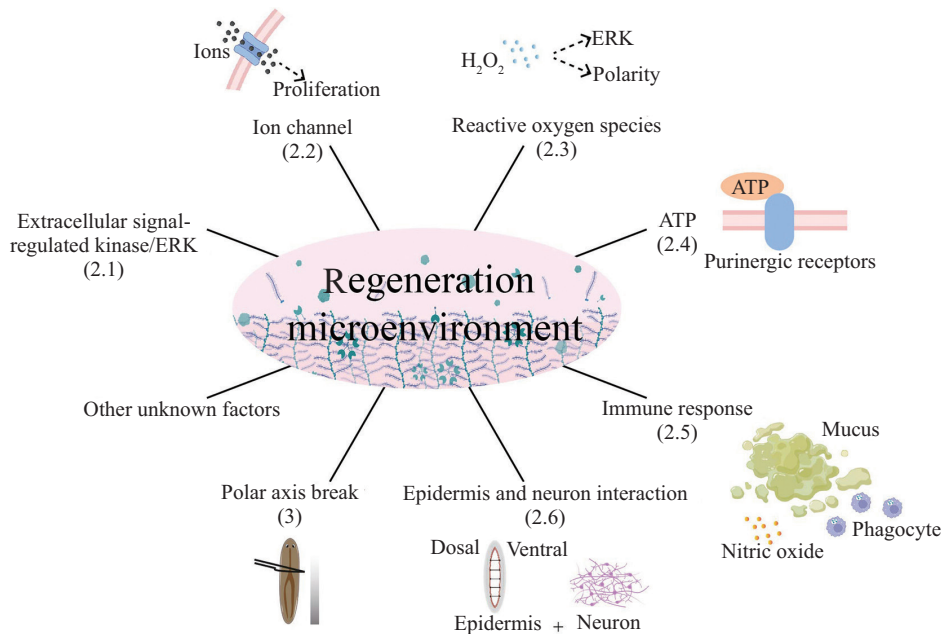
### 3 再生微环境的形成可能是引发再生过程的核心

尽管诱发再生基因调控网络的主导因素仍不明确, 但是诸多因素之间存在相互联系。因此, 再生可能需要多种再生诱发因素协同作用, 形成再生微环境(图2)。

除损伤应激信号外, 再生的诱发还可能源于体内微环境稳态的打破。在稳态维持过程中, 维持体内极性的基因(例如促进前后轴建立的Wnt信号通路相关基因)在涡虫体内具有恒定的表达模式<sup>[75]</sup>。伤口处部分组织的缺失可打破正常微环境的稳态, 进而导致伤口处不均衡的基因表达模式。OWL-ARN等<sup>[31]</sup>提出无论涡虫受到的损伤是否导致组织缺失, 创伤诱导信号都有能力启动再生, 但再生仅在特定的情况(如组织缺失或者组织内的极性信号被打破)下才会被诱导发生。然而, TEWARI等<sup>[76]</sup>发现, 当通过敲降*follistatin*抑制组织缺失导致的特异性基因表达后, 除头部因体内Wnt信号通路相关的极性建立受到影响而不能再生外, 其他部位均可实

现再生, 但再生速度减慢。组织缺失导致的基因及细胞响应具有加速再生的功能, 但不是决定再生发生与否的关键。当重塑由*follistatin*敲降打破的极性后, 涡虫头部重新实现再生。说明极性稳态在参与塑造再生微环境及诱发再生中具有重要作用, 组织缺失引起的极性重建可能是引发再生的关键。无论是内在微环境的打破, 还是损伤应激信号对微环境的重塑, 不同因素之间是否存在因果联系, 是否存在级联关系, 以及是否仍然存在其他未知的再生诱发因素, 仍需要进一步探究。

虽然上述讨论的因素对于诱发再生至关重要, 但其中一些因素同样存在于伤口愈合这一非再生过程中。例如, 线虫表皮受损后,  $Ca^{2+}$ 快速且持续增多, 促进表皮伤口愈合<sup>[77]</sup>; 无论涡虫遭受伤口愈合型损伤, 还是组织再生型损伤, ROS均会在损伤部位激增<sup>[47]</sup>; 小鼠的伤口愈合过程伴随着一系列炎症反应, 低浓度 $H_2O_2$ 会促进小鼠伤口愈合<sup>[78-79]</sup>。尽管损伤后应答在伤口愈合及再生过程中均发挥作用, 但再生诱发因素仅在部分物种的机体损伤后引发后续再生反应, 这一原因仍然未知。在涡虫中, 伤口愈合型损伤及组织再生型损伤会引发不同的损伤早期基因表达模式<sup>[29]</sup>, 表明再生的级联反应可能并非由单一因素引发, 再生微环境与引发伤口愈合所需的微环境仍存在差异。一



图中括号内数字代表正文中的标题序号。虚线箭头表示两者之间存在可能的功能联系。

The numbers in brackets in the figure represent the title numbers. The dashed arrow indicates a possible functional connection between the two.

图2 再生微环境

Fig.2 Regeneration microenvironment

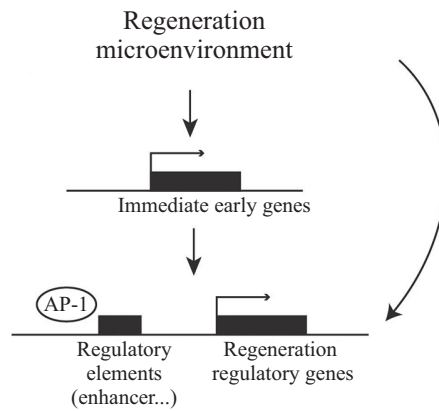


图3 再生微环境是诱发再生的潜在因素

Fig.3 Regeneration microenvironment is the potential factor to initiate regeneration

方面,微环境的差异可能源于损伤早期响应信号在体内持续作用时间的不同。无论损伤是否导致斑马鱼的鱼鳍组织缺失,ROS均会在损伤后的短时间内增多,但是,高水平的ROS在无组织缺失的情况下仅持续2小时,而在组织缺失的情况下可持续16小时<sup>[80]</sup>。另一方面,在再生基因调控网络的上游可能仍然存在未知且特有的关键诱发信号,其可参与再生微环境的构建。因此,由于诱发伤口愈合的因素不足以形成再生特定的微环境,伤口部位仅发生伤口愈合而非再生。近期研究发现,不具有肢体再生能力的成年非洲爪蟾被截肢后,在伤口处进行及时的短时间(24小时)药物处理在延迟伤口闭合的同时,在一定程度上还可引发包含皮肤、骨骼、血管及神经等在内的组织的再生,但是这些再生组织仍不同于正常肢体组织<sup>[81]</sup>。这表明,伤口微环境对于能够引起愈合过程还是再生过程至关重要。因此,进一步探究未知的参与再生微环境形成的因素,对于非再生组织实现正常再生具有重要意义。

#### 4 结论与展望

再生能力差异的本质是再生研究领域重要的研究内容之一。随着遗传学与分子生物学研究技术的不断进步,不同物种再生能力调控的分子机制逐渐被发现。然而,诱发分子调控网络的更上游的因素仍不明确。这些因素可能是导致再生能力差异的重要原因。研究表明,许多损伤后快速响应因素与再生以及再生基因调控网络有着密切联系。不同因素可能通过协同作用促使特定再生微环境形成,从而诱发下游再生相关基因转录及翻译,推动再生事

件进行(图3)。

虽然参与再生微环境形成的再生诱发因素在不同的物种之间有一定的相似性,但是为何不同物种的再生能力存在差异?不同物种之间再生微环境的哪些关键性差异导致再生能力的不同?这些问题的探究能够促进再生本质的揭示。然而,目前再生基因网络的诱发因素仍不明确,仍需进一步深入研究。研究涡虫中参与再生微环境形成的再生诱发因素,对于了解调控涡虫强大的再生能力的机制,以及开发促进人体组织器官再生的方法具有重要意义。

#### 参考文献 (References)

- [1] BELY A E, NYBERG K G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field [J]. *Trends Ecol Evol*, 2010, 25(3): 161-70.
- [2] RITTIE L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals [J]. *J Cell Commun Signal*, 2016, 10(2): 103-20.
- [3] SO J, KIM A, LEE S H, et al. Liver progenitor cell-driven liver regeneration [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(8): 1230-8.
- [4] VUNJAK-NOVAKOVIC G, TANDON N, GODIER A, et al. Challenges in cardiac tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(2): 169-87.
- [5] SRIVASTAVA M. Beyond casual resemblance: rigorous frameworks for comparing regeneration across species [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2021, 37: 415-40.
- [6] KING A J F. The use of animal models in diabetes research [J]. *Brit J Pharmacol*, 2012, 166(3): 877-94.
- [7] COUGHLAN C M, BRODSKY J L. Use of yeast as a model system to investigate protein conformational diseases [J]. *Mol Biotechnol*, 2005, 30(2): 171-80.
- [8] NAKANO A. Yeast Golgi apparatus: dynamics and sorting [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(2): 186-91.
- [9] BOWERS K, STEVENS T H. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1744(3): 438-54.
- [10] LI F T, LONG T, LU Y, et al. The yeast cell-cycle network is



- robustly designed [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(14): 4781-6.
- [11] ROSU S, COHEN-FIX O. Tracking germline stem cell dynamics *in vivo* in *C. elegans* using photoconversion [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2150: 11-23.
- [12] ADAMS M D, CELNIKER S E, HOLT R A, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 2000, 287(5461): 2185-95.
- [13] KOTWICA-ROLINSKA J, CHODAKOVA L, CHVALOVA D, et al. CRISPR/Cas9 genome editing introduction and optimization in the non-model insect *pyrrhocoris apterus* [J]. *Front Physiol*, 2019, 10.
- [14] HECK M, NEELY B A. Proteomics in non-model organisms: a new analytical frontier [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(9): 3595-606.
- [15] ETEBARI K, ASGARI S. Accuracy of microRNA discovery pipelines in non-model organisms using closely related species genomes [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84747.
- [16] COLLINS L J, BIGGS P J, VOELCKEL C, et al. An approach to transcriptome analysis of non-model organisms using short-read sequences [J]. *Genome Inform*, 2008, 21: 3-14.
- [17] BONASIO R. The expanding epigenetic landscape of non-model organisms [J]. *J Exp Biol*, 2015, 218(Pt 1): 114-22.
- [18] RUSSELL J J, THERIOT J A, SOOD P, et al. Non-model model organisms [J]. *BMC Biol*, 2017, 15(1): 55.
- [19] EDREY Y H, HANES M, PINTO M, et al. Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: a long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research [J]. *ILAR J*, 2011, 52(1): 41-53.
- [20] REDDIEN P W, BERMANGE A L, MURFITT K J, et al. Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(5): 635-49.
- [21] MEHTA A S, SINGH A. Insights into regeneration tool box: an animal model approach [J]. *Dev Biol*, 2019, 453(2): 111-29.
- [22] REDDIEN P W. The cellular and molecular basis for planarian regeneration [J]. *Cell*, 2018, 175(2): 327-45.
- [23] SANCHEZ ALVARADO A, NEWMARK P A, ROBB S M, et al. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration [J]. *Development*, 2002, 129(24): 5659-65.
- [24] LABBE R M, IRIMIA M, CURRIE K W, et al. A comparative transcriptomic analysis reveals conserved features of stem cell pluripotency in planarians and mammals [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(8): 1734-45.
- [25] SHENG M, GREENBERG M E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system [J]. *Neuron*, 1990, 4(4): 477-85.
- [26] VERRIER B, MULLER D, BRAVO R, et al. Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene [J]. *EMBO J*, 1986, 5(5): 913-7.
- [27] MARTIN P, NOBES C D. An early molecular component of the wound healing response in rat embryos: induction of c-fos protein in cells at the epidermal wound margin [J]. *Mech Dev*, 1992, 38(3): 209-15.
- [28] WANG W, HU C K, ZENG A, et al. Changes in regeneration-responsive enhancers shape regenerative capacities in vertebrates [J]. *Science*, 2020, 369(6508): eaaz3090.
- [29] WENEMOSER D, LAPAN S W, WILKINSON A W, et al. A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(9): 988-1002.
- [30] GEHRKE A R, NEVERETT E, LUO Y J, et al. Acoel genome reveals the regulatory landscape of whole-body regeneration [J]. *Science*, 2019, 363(6432): eaau6173.
- [31] OWLARN S, KLENNER F, SCHMIDT D, et al. Generic wound signals initiate regeneration in missing-tissue contexts [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2282.
- [32] PARPAITE T, COSTE B. Piezo channels [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(7): R250-R2.
- [33] AHAMAD N, SUN Y Y, DA CONCEICAO V N, et al. Differential activation of Ca<sup>2+</sup> influx channels modulate stem cell potency, their proliferation/viability and tissue regeneration [J]. *Npj Regen Med*, 2021, 6(1): 67.
- [34] BOROWIEC A S, BIDAUX G, PIGAT N, et al. Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 739: 19-25.
- [35] YAN D, JIN Y S. Regulation of DLK-1 kinase activity by calcium-mediated dissociation from an inhibitory isoform [J]. *Neuron*, 2012, 76(3): 534-48.
- [36] GOLENBERG N, SQUIRREL J M, BENNIN D A, et al. Citrullination regulates wound responses and tissue regeneration in zebrafish [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219(4): e201908164.
- [37] MARTELLY I, MOLLA A, THOMASSET M, et al. Planarian regeneration: *in vivo* and *in vitro* effects of calcium and calmodulin on DNA synthesis [J]. *Cell Differ*, 1983, 13(1): 25-34.
- [38] MARTELLY I. Calcium thresholds in the activation of DNA and RNA synthesis in cultured planarian cells: relationship with hormonal and DB cAMP effects [J]. *Cell Differ*, 1984, 15(1): 25-36.
- [39] MORACZEWSKI J, MARTELLY I, FRANQUINET R. Protein phosphorylation and the role of Ca<sup>2+</sup> in planarian turbellarian regeneration [J]. *Hydrobiologia*, 1986, 132(1): 223-7.
- [40] ZHANG D, CHAN J D, NOGI T, et al. Opposing roles of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in neuronal control of regenerative patterning [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(44): 15983-95.
- [41] ZHEN H, DENG H K, SONG Q, et al. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway is essential for the regeneration of GABAergic neurons in planarian *Dugesia japonica* [J]. *FASEB J*, 2020, 34(12): 16567-80.
- [42] BIENERT G P, SCHJOERRING J K, JAHN T P. Membrane transport of hydrogen peroxide [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2006, 1758(8): 994-1003.
- [43] BIENERT G P, CHAUMONT F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(5): 1596-604.
- [44] YOO S K, FREISINGER C M, LEBERT D C, et al. Early redox, Src family kinase, and calcium signaling integrate wound responses and tissue regeneration in zebrafish [J]. *J Cell Biol*, 2012, 199(2): 225-34.
- [45] WESLEY U V, BOVE P F, HRISTOVA M, et al. Airway epithelial cell migration and wound repair by ATP-mediated activation of dual oxidase 1 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(5): 3213-20.
- [46] PIROTTE N, STEVENS A S, FRAGUAS S, et al. Reactive oxygen species in planarian regeneration: an upstream necessity for correct patterning and brain formation [J]. *Oxid Med Cell Lon-*

- gev, 2015, 2015: 392476.
- [47] JAENEN V, FRAGUAS S, BIJNENS K, et al. Reactive oxygen species rescue regeneration after silencing the MAPK-ERK signaling pathway in *Schmidtea mediterranea* [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 881.
- [48] BIRKHOLZ T R, BEANE W S. The planarian TRPA1 homolog mediates extraocular behavioral responses to near-ultraviolet light [J]. J Exp Biol, 2017, 220(14): 2616-25.
- [49] ARENAS O M, ZAHARIEVA E E, PARA A, et al. Activation of planarian TRPA1 by reactive oxygen species reveals a conserved mechanism for animal nociception [J]. Nat Neurosci, 2017, 20(12): 1686-93.
- [50] BELOUSOV V V, FRADKOV A F, LUKYANOV K A, et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide [J]. Nat Methods, 2006, 3(4): 281-6.
- [51] BURNSTOCK G. Purinergic nerves [J]. Pharmacol Rev, 1972, 24: 509-81.
- [52] RHETT J M, FANN S A, YOST M J. Purinergic signaling in early inflammatory events of the foreign body response: modulating extracellular ATP as an enabling technology for engineered implants and tissues [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2014, 20(5): 392-402.
- [53] BURNSTOCK G. Purinergic signalling: its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future [J]. Bioessays, 2012, 34(3): 218-25.
- [54] LEE B C, CHENG T, ADAMS G B, et al. P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y14), identifies and mediates chemotaxis of bone-marrow hematopoietic stem cells [J]. Genes Dev, 2003, 17(13): 1592-604.
- [55] MEDRANO M P, BEJARANO C A, BATTISTA A G, et al. Injury-induced purinergic signalling molecules upregulate pluripotency gene expression and mitotic activity of progenitor cells in the zebrafish retina [J]. Purinergic Signal, 2017, 13(4): 443-65.
- [56] SAKURAI T, LEE H, KASHIMA M, et al. The planarian P2X homolog in the regulation of asexual reproduction [J]. Int J Dev Biol, 2012, 56(1/2/3): 173-82.
- [57] PEIRIS T H, HOYER K K, OVIEDO N J. Innate immune system and tissue regeneration in planarians: an area ripe for exploration [J]. Semin Immunol, 2014, 26(4): 295-302.
- [58] MORITA M. Structure and function of the reticular cell in the planarian *dugesia-dorotocephala* [J]. Hydrobiologia, 1995, 305(1/2/3): 189-96.
- [59] MORITA M. Phagocytic response of planarian reticular cells to heat-killed bacteria [J]. Hydrobiologia, 1991, 227: 193-9.
- [60] MORITA M, BEST J B. Electron microscopic studies of planarian regeneration. II. Changes in epidermis during regeneration [J]. J Exp Zool, 1974, 187(3): 345-73.
- [61] LEOR J, PALEVSKI D, AMIT U, et al. Macrophages and regeneration: lessons from the heart [J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 58: 26-33.
- [62] HUANG W C, YANG C C, CHEN I H, et al. Treatment of glucocorticoids inhibited early immune responses and impaired cardiac repair in adult zebrafish [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66613.
- [63] BOCCHINFUSO D G, TAYLOR P, ROSS E, et al. Proteomic profiling of the planarian *Schmidtea mediterranea* and its mucous reveals similarities with human secretions and those predicted for parasitic flatworms [J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11(9): 681-91.
- [64] SCHWENTKER A, BILLIAR T R. Nitric oxide and wound repair [J]. Surg Clin N Am, 2003, 83(3): 521-30.
- [65] ROCHON E R, MISSINATO M A, XUE J M, et al. Nitrite improves heart regeneration in zebrafish [J]. Antioxid Redox Sign, 2020, 32(6): 363-77.
- [66] GUSTAFSSON M K S, LINDHOLM A M, MANTYLA K, et al. No news on the flatworm front! Nitric oxide synthase in parasitic and free-living flatworms [J]. Hydrobiologia, 1998, 383: 161-6.
- [67] GODOY L, GONZALEZ-DUARTE R, ALBALAT R. Analysis of planarian Adh3 supports an intron-rich architecture and tissue-specific expression for the urbilaterian ancestral form [J]. Comp Biochem Phys B, 2007, 146(4): 489-95.
- [68] KATO K, ORII H, WATANABE K, et al. The role of dorsoventral interaction in the onset of planarian regeneration [J]. Development, 1999, 126(5): 1031-40.
- [69] CHANDEBOIS R. The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian [J]. Dev Growth Differ, 1979, doi: 10.1111/j.1440-169X.1979.00195.x.
- [70] MESCHER A L. Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface [J]. J Exp Zool, 1976, 195(1): 117-28.
- [71] TSAI S L, BASELGA-GARRIGA C, MELTON D A. Midkine is a dual regulator of wound epidermis development and inflammation during the initiation of limb regeneration [J]. eLife, 2020, 9: e50765.
- [72] YOKOYAMA H. Initiation of limb regeneration: the critical steps for regenerative capacity [J]. Develop Growth Differ, 2008, 50(1): 13-22.
- [73] SINGER M. The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity [J]. Q Rev Biol, 1952, 27(2): 169-200.
- [74] SATOH A, GRAHAM G M C, BRYANT S V, et al. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) [J]. Dev Biol, 2008, 319(2): 321-35.
- [75] PETERSEN C P, REDDIEN P W. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(40): 17061-6.
- [76] TEWARI A G, STERN S R, ODERBERG I M, et al. Cellular and molecular responses unique to major injury are dispensable for planarian regeneration [J]. Cell Rep, 2018, 25(9): 2577-90, e3.
- [77] XU S, CHISHOLM A D. A Galphaq-Ca<sup>2+</sup> signaling pathway promotes actin-mediated epidermal wound closure in *C. elegans* [J]. Curr Biol, 2011, 21(23): 1960-7.
- [78] ROY S, KHANNA S, NALLU K, et al. Dermal wound healing is subject to redox control [J]. Mol Ther, 2006, 13(1): 211-20.
- [79] PARK J E, BARBUL A. Understanding the role of immune regulation in wound healing [J]. Am J Surg, 2004, 187(5a): 11s-6s.
- [80] GAURON C, RAMPON C, BOUZAFFOUR M, et al. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed [J]. Sci Rep, 2013, 3: 2084.
- [81] MURUGAN N J, VIGRAN H J, MILLER K A, et al. Acute multidrug delivery via a wearable bioreactor facilitates long-term limb regeneration and functional recovery in adult *Xenopus laevis* [J]. Sci Adv, 2022, 8(4): eabj2164.