

*Hoxd13*在墨西哥钝口螈肢体发育再生中的功能研究

闫曦文^{1#} 刘宁^{2#} 丘远辉^{2,3} 卢斌斌⁴ 费继锋^{1,2,3*}⁽¹⁾广东省心血管病研究所, 广东省人民医院, 广东省医学科学院, 广州 510080;⁽²⁾华南理工大学医学院, 广州 510006; ⁽³⁾南方医科大学附属广东省人民医院/广东省医学科学院病理科, 广州 510080;⁽⁴⁾南方医科大学附属广东省人民医院/广东省医学科学院肾内科, 广州 510080)

摘要 *Hoxd13*属于Hox13旁系同源基因群,是调控脊椎动物远端附肢模式建成的重要功能基因。该研究旨在探究*Hoxd13*在墨西哥钝口螈前肢发育与再生中的表达特征,并进一步评价其在肢体发育再生中的作用。通过序列比对、切片原位杂交等实验及分析发现,HOXD13同源结构域在不同脊椎动物中高度保守;*Hoxd13*与*Hoxa13*均在螈螈幼体肢体芽基中表达,其中*Hoxd13*分布范围更广,并在尾部脊髓及背根神经节附近可见明显阳性信号。此外,原位杂交表明*Hoxd13*与*Hoxa13*在肢体再生过程中呈现差异表达。为进一步分析*Hoxd13*功能,该研究设计3条*Hoxd13* sgRNA开展CRISPR/Cas9介导靶向编辑,筛选结果显示sgRNA1和sgRNA3可实现较高修饰效率,并产生较高比例的高KO评分F0嵌合体,分别为12.3%(9/73, KO score 86.0±4.8)和14.3%(6/42, KO score 86.2±5.1)。对高KO评分F0嵌合体进行前肢发育表型观察及阿利新蓝-茜素红S染色分析,结果显示其前肢整体形态、手指数目及骨骼结构均未见明显异常。进一步针对高KO评分F0嵌合体进行截肢后再生过程追踪和再生终点骨骼染色分析,未观察到再生进程异常或再生前肢骨骼模式改变。再生指尖组织KO score保持在84~90,表明*Hoxd13*敲降后肢体再生并非来源于健康细胞的竞争效应。综上,单独靶向编辑*Hoxd13*不足以引起墨西哥钝口螈前肢发育及再生的可观察表型改变,提示*Hoxd13*可能并非有尾类附肢发育与再生的必需基因,或其功能缺失可能由*Hoxa13*等Hox13家族成员代偿。

关键词 墨西哥钝口螈; *Hoxd13*; CRISPR/Cas9; 肢体发育; 肢体再生

Functional Analysis of *Hoxd13* in Limb Development and Regeneration in *Axolotl*

YAN Xiwen^{1#}, LIU Ning^{2#}, QIU Yuanhui^{2,3}, LU Binbin⁴, FEI Jifeng^{1,2,3*}⁽¹⁾Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; ⁽²⁾School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;⁽³⁾Department of Pathology, Affiliated Hospital of Southern Medical University (Guangdong Provincial People's Hospital & Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangzhou 510080, China; ⁽⁴⁾Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southern Medical University (Guangdong Provincial People's Hospital & Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangzhou 510080, China)

Abstract *Hoxd13*, a member of the Hox13 paralog group, is an important functional gene involved in the regulation of distal appendage patterning in vertebrates. This study aimed to investigate the expression characteris-

收稿日期: 2026-04-10 接受日期: 2026-08-31

广东省人民医院高水平医院建设项目(批准号: DFJHBF202103、KJ012021012)和广州市科技计划项目基础研究计划(批准号: 2025A03J4488)资助的课题
*共同第一作者

*通信作者。Tel: 020-85212189, E-mail: jifengfei@gdph.org.cn

Received: April 10, 2026 Accepted: August 31, 2026

This work was supported by the High-Level Hospital Construction Project of Guangdong Provincial People's Hospital (Grant No.DFJHBF202103, KJ012021012) and the Basic Research Program of Guangzhou Science and Technology Plan (Grant No.2025A03J4488)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-20-85212189, E-mail: jifengfei@gdph.org.cn

tics of *Hoxd13* during forelimb development and regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and to further evaluate its role in these processes. Sequence alignment and section *in situ* hybridization showed that the HOXD13 homeodomain is highly conserved among vertebrates. Both *Hoxd13* and *Hoxa13* were expressed in the limb buds of axolotl larvae, with *Hoxd13* exhibiting a broader distribution; in addition, distinct *Hoxd13*-positive signals were detected near the spinal cord and dorsal root ganglia in tail tissues. Moreover, *in situ* hybridization showed differential expression patterns of *Hoxd13* and *Hoxa13* during limb regeneration. To further assess the function of *Hoxd13*, three sgRNAs targeting *Hoxd13* were designed for CRISPR/Cas9-mediated targeted editing. Screening results showed that sgRNA1 and sgRNA3 achieved relatively high editing efficiencies and generated relatively high proportions of high-KO-score F0 mosaic animals, accounting for 12.3% (9/73, KO score 86.0 ± 4.8) and 14.3% (6/42, KO score 86.2 ± 5.1), respectively. Forelimb developmental phenotyping and alcian blue-alizarinred S skeletal staining of high-knockdown F0 mosaics revealed no obvious abnormalities in overall forelimb morphology, digit number, or skeletal structure. Further tracking of post-amputation regeneration, together with endpoint skeletal staining, showed no evident defects in regeneration progression or skeletal patterning of regenerated forelimbs. KO scores in regenerated digit-tip tissues remained between 84 and 90, indicating that limb regeneration after *Hoxd13* editing was unlikely to result from the competitive contribution of unedited or low-edited cells.

Keywords axolotl; *Hoxd13*; CRISPR/Cas9; limb development; limb regeneration

脊椎动物肢体的建成依赖近端-远端轴、前后轴和背腹轴等多轴模式的协调建立,其中编码转录因子的同源异形盒(homeobox, HOX)家族基因在肢体模式调控中发挥核心作用,尤以Hox13亚家族与远端肢体及指(趾)结构形成密切相关^[1-2]。在小鼠等羊膜动物中,*Hoxa13*与*Hoxd13*功能缺失可引发显著的远端肢体发育异常,主要表现为手/足板发育受限、指(趾)形态畸形以及腕跗骨等远端骨元件模式紊乱,说明Hox13相关调控网络是脊椎动物远端附肢模式建成的重要环节^[1-2]。

与哺乳动物不同,有尾类两栖动物在截肢后能够重建包含骨骼、肌肉、神经和血管等多种组织在内的完整附肢,是研究肢体再生及“发育-再生”模式调控关系的重要模型。尤其是蝾螈类动物,其再生过程不仅表现为组织结构的再形成,还伴随近端-远端位置信息的重新建立。Roensch等^[3]在墨西哥钝口螈肢体再生研究中发现,缺失肢段的重建伴随HOXA9、HOXA11和HOXA13等位置相关蛋白的顺序性表达,提示有尾类附肢再生涉及近端-远端轴位置信息的逐步重建。随着基因编辑技术在有尾类动物中的应用,Hox13家族成员在附肢发育与再生中的具体作用逐渐受到关注。以伊比利亚肋突螈(*Pleurodeles waltl*)为模型的研究显示,Hox13家族成员同时参与发育期指结构形成与再生过程中指结构的重建;其中*Hoxa13*发挥主导作用,而单独*Hoxd13*

缺失引发的表型则较为有限,提示*Hoxa13*在有尾类附肢模式建成中可能发挥更主要的作用,且*Hoxd13*单基因缺失的影响可能受到其他Hox13家族成员代偿^[4]。后续研究还发现,Hox13家族成员可通过调控*Fgf10*、*Tbx4*等肢芽生长相关基因表达参与后肢芽发育,说明其功能并不局限于远端指结构形成,还可能参与肢芽早期生长调控^[5]。

墨西哥钝口螈(*Ambystoma mexicanum*, 英文名称 axolotl)是蝾螈类再生研究中应用最广泛的模式生物之一,兼具成体附肢再生能力、实验操作可及性和较成熟的遗传操作体系,适合用于解析保守发育调控基因在再生过程中的功能^[6-9]。既往研究显示,*HoxA*与*HoxD*基因簇5'端成员在墨西哥钝口螈肢体发育与再生过程中呈现明确的时空表达模式,其中*Hoxa13*在发育期肢芽中呈远端富集表达,而5'端*HoxD*基因的表达模式既保留了四足动物肢体发育的共性,也表现出了有尾类动物的物种特异性^[10-11]。近期研究进一步发现,成熟肢体结缔组织细胞在不同肢段具有差异性染色质状态,这种表观遗传特征与肢段位置身份及再生过程中的模式重建密切相关,提示墨西哥钝口螈附肢再生并非胚胎发育程序的简单重复,而是在保留核心发育调控网络的基础上,叠加了位置记忆、芽基形成和组织重建等再生特异性过程^[12]。

尽管上述研究提示,Hox13家族在有尾类附肢

发育与再生中具有重要作用,但目前相关功能验证主要集中于哺乳动物和伊比利亚肋突螈,针对墨西哥钝口螈 *Hoxd13* 的直接功能研究仍较为有限^[4]。尤其是,既往墨西哥钝口螈研究更多关注 *HoxA/HoxD* 基因簇成员的表达模式,尚缺乏对单个 *Hox13* 旁系同源基因在发育与再生过程中的功能验证。因此,明确 *Hoxd13* 在墨西哥钝口螈中的表达特征及其功能效应,有助于进一步理解 *Hox13* 家族成员在有尾类附肢模式建成中的作用及相互关系。随着 CRISPR/Cas9 基因编辑体系在墨西哥钝口螈中的成熟应用,利用 F0 代嵌合体开展基因功能快速验证已具备可操作性^[13-14]。基于此,本研究首先通过序列比对分析 *Hoxd13* 同源结构域的保守性,并结合原位杂交比较 *Hoxd13* 与 *Hoxa13* 在肢体芽基及尾部组织中的表达特征;随后利用 CRISPR/Cas9 技术靶向编辑 *Hoxd13*,观察高 KO 评分 F0 嵌合体前肢发育及截肢后再生过程中的形态和骨骼表型,旨在评价 *Hoxd13* 在墨西哥钝口螈附肢发育与再生中的作用,并为解析有尾类 *Hox13* 家族成员的作用及潜在代偿机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验所用墨西哥钝口螈为本实验室自主繁殖的 *d/d* 突变体品系,种源最初来自肯塔基大学。用于发育表型观察与再生实验的个体,均在前肢发育完全、体长约 5 cm 时被纳入实验;其中再生实验个体于截肢前单独饲养,以避免同类啃咬干扰肢体形态判断及再生进程。用于原位杂交实验的样本包括孵化后第 20 天的 *d/d* 品系幼体,以及体长约 6 cm、经左侧前肢截肢后收集的 *d/d* 品系再生组织。所有实验动物均饲养于循环水系统中,水温恒定控制在 20~22 °C。动物实验经广东省人民医院伦理审查委员会批准(伦理号: KY-O-2022-395-03)。

1.1.2 主要试剂与耗材 本研究所用主要试剂包括: 4% 多聚甲醛固定液(货号: P0099-500MI, 上海碧云天生物技术股份有限公司)、BM Purple 显色液(货号: 11442074001, Sigma 公司)、RNase A(货号: R4642, Sigma 公司)、苯佐卡因(货号: SLBL0855V, Sigma 公司)、封闭试剂(货号: 11096176001, Sigma 公司)、OCT 包埋剂(货号: 1054-00, Sakura 公司)、DIG RNA 标记混合物(货号: 11277073910, Roche 公

司)、酵母 RNA(货号: 10109223001, Roche 公司)、阿利新蓝(货号: PS0478, 北京普西唐生物科技有限公司)、茜素红 S(货号: 130-22-3, 上海麦克林生化科技股份有限公司)、2× Phanta Max 高保真酶预混液(货号: P515-03, Vazyme 公司)、T7 RNA 聚合酶(货号: EP0111, NEB 公司)、基因组 DNA 提取试剂盒(货号: EG101-01, 北京全式金生物技术股份有限公司)、PCR 产物回收试剂盒(货号: EP101-01, 北京全式金生物技术股份有限公司)、PBS 缓冲液(货号: P1010-100, 北京索莱宝科技有限公司)、蔗糖(货号: A5027920, 上海生工生物工程股份有限公司)、Triton X-100(货号: A110694, 上海生工生物工程股份有限公司)、20× SSC 缓冲液(货号: B548110, 上海生工生物工程股份有限公司)、Tween-20(货号: A100777, 上海生工生物工程股份有限公司)。本研究所用 Cas9 蛋白由课题组自制,马来酸缓冲液(maleic acid buffer, MAB)和 Marc 改良林格液(Marc's modified Ringer's solution, MMR)均为实验室自配。MAB 配制试剂包括马来酸、NaCl 和 NaOH, MMR 配制试剂包括 NaCl、KCl、CaCl₂、MgSO₄ 和 HEPES 等。其余常规试剂(无水乙醇、KOH、胰酶、硼砂等)均为国药集团分析纯产品。

1.1.3 主要仪器 本研究所用主要仪器包括: 体视显微镜(型号: SZX16, Olympus 公司)、皮升级显微注射系统(型号: PV830, WPI 公司)、水平拉针仪(型号: P-100, Sutter 公司)、冰冻切片机(型号: CM1950, Leica 公司)、普通 PCR 仪(型号: C1000, Bio-Rad 公司)、超微量分光光度计(型号: Nanodrop One, ThermoFisher Scientific 公司)、HIRAYAMA 高压蒸汽灭菌锅(型号: HVA-85)、超纯水仪(型号: Direct8, Millipore 公司)、恒温水浴锅(型号: BWS-12, 上海一恒科学仪器有限公司)、电热恒温培养箱(型号: DHG-9245A, 上海一恒科学仪器有限公司)、电子天平(型号: YP5002, 上海佑科仪器仪表有限公司)、水平摇床(型号: TS-1000, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 HOXD13 蛋白序列比对及系统发育分析 为分析 *Hoxd13* 的结构保守性,选取人、小鼠、伊比利亚肋突螈、墨西哥钝口螈和斑马鱼的 HOXD13 蛋白序列进行比对。序列比对采用 MEGA12 软件中的 MUSCLE 算法完成,比对重点为 HOXD13 的同源

结构域(homeodomain)区域。系统发育树采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建, 替换模型为泊松模型(Poisson model), 自展重复次数为1 000次, 空位处理方式成对删除法(pairwise deletion)。

1.2.2 原位杂交探针制备与切片杂交实验 根据Axolotl-omics数据库中墨西哥钝口螈*Hoxd13*(转录本编号: AMEX60DD201055612.1)和*Hoxa13*(转录本编号: AMEX60DD201021953.1)的转录本序列, 设计原位杂交探针引物, 在反向引物5'端引入T7启动子序列, 引物序列见表1。PCR扩增目的片段并纯化后, 采用DIG RNA标记体系进行体外转录, 制备DIG标记的反义RNA探针。

取孵化后第20天的*d/d*品系墨西哥钝口螈幼体, 分离肢体芽基与尾部组织, 经4%多聚甲醛4℃固定过夜, PBS漂洗后于30%蔗糖溶液中4℃脱水过夜, OCT包埋后制备10 μm冰冻切片。切片于室温下经PBST漂洗3次, 每次5 min, Triton X-100通透20 min后, 60℃预杂交1 h, 随后加入预热的探针, 60℃杂交过夜。杂交后于60℃依次经5×SSC、2×SSC和0.2×SSC缓冲液分别洗脱2次, 每次10 min, 随后经RNase A处理和封闭液封闭后, 加入抗DIG抗体4℃孵育过夜。切片经MAB充分洗片后, 采用BM Purple显色, 封片后于显微镜下观察拍照。实验操作参照已报道的有尾类两栖动物原位杂交方案并稍作优化^[15-17]。

1.2.3 sgRNA设计与CRISPR/Cas9显微注射 结合Axolotl-omics、NCBI、UCSC Genome Browser数据

库信息, 对墨西哥钝口螈*Hoxd13*基因结构进行定位注释, 通过SMART结构预测确认其同源结构域位于Exon 2, 于编码区设计3条sgRNA(sgRNA1靶向Exon 1, sgRNA2、sgRNA3均靶向Exon 2), 具体序列见表2。

将Cas9蛋白与对应gRNA于冰上配制注射混合液, 注射体系见表3。取单细胞期墨西哥钝口螈受精卵, 置于含10% Ficoll的1×MMR溶液中进行显微注射, 每枚受精卵注射体积为5 nL。注射完成后, 受精卵于含Ficoll的培养液中短时恢复, 随后转入0.1×MMR溶液继续培养, 待胚胎发育至合适阶段后转入常规饲养条件。显微注射与胚胎处理严格参照已建立的墨西哥钝口螈CRISPR/Cas9编辑方案执行^[18]。

1.2.4 基因型鉴定与高KO评分F0嵌合体筛选 显微注射后, 待幼体生长至体长约1.5 cm时, 剪取尾尖组织提取基因组DNA, PCR扩增sgRNA靶位点片段, PCR产物送金唯智生物科技有限公司进行Sanger测序。用于sgRNA1靶位点及sgRNA2/sgRNA3靶位点扩增的引物序列见表4。

将编辑样本与*d/d*对照组样本的Sanger测序峰图上传至EditCo ICE(Inference of CRISPR Edits, CRISPR编辑推断)在线分析平台, 获得各靶位点的插入/缺失突变率(indel rate)、功能性敲除评分(KO score, 以下简称KO评分)及模型拟合优度 R^2 。ICE分析通过比较编辑样本与对照样本的Sanger测序峰图, 对混合编辑信号进行分解, 从而推断不同插入/缺失(insertion/deletion, indel)突变类型及其相对贡献。插

表1 用于*Hoxd13*和*Hoxa13*原位杂交探针制备的引物序列

Table 1 Primer sequences used for *Hoxd13* and *Hoxa13* RNA probe synthesis for *in situ* hybridization

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>Hoxd13</i> -probe-FP	AGC GGA GTG CAC CTC TTC C
<i>Hoxd13</i> -probe-RP	GGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGG TCG GAC AGG TTG GTG GTG GC
<i>Hoxa13</i> -probe-FP	TCG AGC CCG TCA TGT TCC TT
<i>Hoxa13</i> -probe-RP	GGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGT GAC CTT CTT CTC TTT GAC CCT CC

表2 用于*Hoxd13*靶向编辑的sgRNA序列

Table 2 sgRNA sequences used for targeted editing of *Hoxd13*

sgRNA名称 sgRNA name	靶向区域 Target region	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
sgRNA1	Exon 1	TGG TGT CCA GCT TCG GTG
sgRNA2	Exon 2	TCG GAC ATA TGC GTG TAC
sgRNA3	Exon 2	CTC TTC TTC CTC CCG CGC

表3 CRISPR/Cas9注射混合液体系
Table 3 Composition of the CRISPR/Cas9 injection mixture

反应成分 Component	各个成分体积 Volume
Cas9 protein (5 μg/μL)	1 μL
gRNA	4 μg
10× Cas9 buffer	0.9 μL
Nuclease-free H ₂ O	Up to 10 μL

表4 用于*Hoxd13* sgRNA靶位点扩增的引物序列
Table 4 Primer sequences used for amplification of *Hoxd13* sgRNA target sites

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
sgRNA1-F	CTA CCA CTT CGG TAA CGG GTA C
sgRNA1-R	TGG GTG ACC GTG TGT AGC AT
sgRNA2/3-F	TAT TTC GGA ACG TTG GCG GTA C
sgRNA2/3-R	AGT GCG TAG AAT GAG CTG CG

入/缺失突变率表示靶位点发生插入或缺失突变的总体比例; KO评分用于估计并预测可导致靶基因功能性敲除的突变序列比例, 主要包括移码突变或 ≥ 21 bp的indel; R^2 用于评估ICE模型对测序峰图的拟合程度, 反映推断结果的可信度。参考既往CRISPR/Cas9基因编辑克隆筛选研究中对ICE分析结果的评价方式, 并结合本研究旨在优先获得靶基因功能破坏概率较高的F0嵌合体用于后续表型分析, 本研究将KO score ≥ 80 且 $R^2\geq 0.8$ 的F0嵌合体定义为高KO评分F0嵌合体^[19]。

根据上述筛选标准, 从尾尖组织基因型分析结果中选取sgRNA1高KO评分F0嵌合体9只、sgRNA3高KO评分F0嵌合体6只, 并设置*d/d*对照组5只, 用于后续前肢发育表型观察、截肢再生实验及前肢截断面组织基因型复检。

1.2.5 前肢发育表型观察与截肢再生实验 待幼体生长至体长约5 cm、前肢发育完全后, 对*d/d*对照组和高敲降组个体的左侧前肢进行外观观察, 于体视显微镜下拍摄代表性图像。实验个体经0.1%苯佐卡因麻醉后, 于左侧前肢尺桡骨中段水平进行截肢, 截肢操作同时启动肢体再生实验, 并同步收集截断面组织用于基因型复检, 截下的远端肢体用于发育期骨骼染色分析。

截肢后, 分别于截肢后1天(1 day post amputation, 1 dpa)、4 dpa、7 dpa、14 dpa、21 dpa、28

dpa、60 dpa观察再生前肢外观并拍摄图像, 记录再生进程; 60 dpa再生终点取样, 对再生前肢进行骨骼染色, 观察再生后骨骼结构。

1.2.6 阿利新蓝-茜素红S染色 取截肢获得的远端前肢组织与再生终点前肢组织, 经4%多聚甲醛4℃固定过夜, PBS漂洗后梯度乙醇脱水; 室温下以阿利新蓝染液染色1~3 d, 复水后常温下经1%胰酶/30%硼砂溶液处理30 min至组织透明, 1% KOH漂洗; 随后用茜素红S染液室温染色1~3 d, 经1% KOH梯度透明、梯度乙醇脱水、甘油-乙醇梯度置换后, 保存于100%甘油中, 体视显微镜下观察拍照。染色流程参考阿利新蓝-茜素红S染色经典方法, 并结合蝶螈样本大小进行优化^[20-21]。

1.2.7 前肢发育与再生表型判定 结合前肢外观观察、再生过程追踪及骨骼染色结果, 对前肢发育与再生表型进行综合判定。正常表型判定标准如下: (1) 前肢整体形态、长度与对照组无明显差异; (2) 4根手指完整存在; (3) 无短指、缺指、并指、弯曲、分叉等异常; (4) 近端、中段、远端肢结构完整, 排列规则; (5) 掌骨与指骨节段排布正常; (6) 无骨骼融合、缺失、异位骨元件; (7) 软骨与骨染色模式与对照组相近。再生个体额外判定标准: 再生个体另需满足在再生过程中无再生芽形成障碍、再生停滞或明显延迟。

1.2.8 统计学分析 所有数据整理与统计绘图均

采用GraphPad Prism 9软件完成。图2C、图2D分别用于展示三条sgRNA注射组全部成功测序个体尾尖样本的indel rate和KO score分布;图3B、图4C分别用于展示入组个体尾尖样本及前肢截面组织的KO score分布。散点图中每个点代表1只经ICE分析的个体,横线表示中位数。前肢发育及截肢后再生表型采用描述性统计,以异常/正常个体数进行记录;由于各组均未观察到明显异常表型,未进行组间显著性检验。

2 结果

2.1 *Hoxd13*同源结构域高度保守,且与*Hoxa13*在墨西哥钝口螈相关组织中呈差异性表达

为分析*Hoxd13*的结构保守性,对人、小鼠、伊比利亚肋突螈、墨西哥钝口螈和斑马鱼的HOXD13蛋白同源结构域进行氨基酸序列比对,并构建邻接法系统发育树。结果显示,不同物种HOXD13蛋白的同源结构域高度保守,该区域共57个氨基酸位点,多数残基在不同物种间保持一致;系统发育分析进一步表明,墨西哥钝口螈与伊比利亚肋突螈聚为一支,与哺乳动物及鱼类相区分,符合物种系统发生关系(图1A)。

进一步采用原位杂交,检测*Hoxd13*和*Hoxa13*在孵化后第20天*d/d*品系墨西哥钝口螈相关组织中的表达特征。结果显示,在肢体发育芽基中,*Hoxd13*和*Hoxa13*的表达信号均主要位于芽基远端区域;与*Hoxa13*相比,*Hoxd13*的表达范围更广,除芽基末端信号明显外,在肢体其余区域亦可见较弱信号分布,而*Hoxa13*的信号主要局限于芽基尖端附近,分布集中且背景较低(图1B)。

在尾部组织切片中,*Hoxd13*可检测到明显的表达信号,而*Hoxa13*无明显阳性信号。*Hoxd13*的表达主要分布于脊髓及背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)附近区域,局部放大图中可清晰观察到DRG附近的*Hoxd13*阳性信号(图1C和图1D)。

上述结果表明,*Hoxd13*的同源结构域在不同脊椎动物中高度保守;同时,在孵化后第20天的*d/d*品系墨西哥钝口螈中,*Hoxd13*与*Hoxa13*在肢体芽基中均有表达,但空间分布模式存在明显差异,且尾部组织中仅可检测到*Hoxd13*的阳性表达信号,提示*Hoxd13*与*Hoxa13*在墨西哥钝口螈肢体发育及尾部相关组织中可能具有不完全一致的生物学功能。

2.2 *Hoxd13*敲降F0嵌合体的构建及基因型鉴定

为评价*Hoxd13*在墨西哥钝口螈前肢中的功能,本研究利用CRISPR/Cas9技术对*Hoxd13*进行靶向编辑,并基于ICE分析结果筛选高KO评分F0嵌合体,用于后续前肢发育及再生表型分析。为此,我们首先根据墨西哥钝口螈*Hoxd13*的基因结构,在编码区内设计并验证三条sgRNA,其中sgRNA1靶向Exon 1,sgRNA2和sgRNA3靶向包含同源结构域的Exon 2。该设计可覆盖不同编码区域,并用于比较不同靶点的编辑效果(图2A)。

对注射个体进行尾尖取材、Sanger测序及ICE分析。为综合评价不同sgRNA的靶向编辑效果,本研究结合indel rate和KO score两项参数进行分析。其中,indel rate反映靶位点发生插入或缺失突变的总体编辑水平,KO score用于估计可能导致目标基因编码功能受损的突变序列比例,二者分别表征编辑发生程度和潜在功能破坏程度。

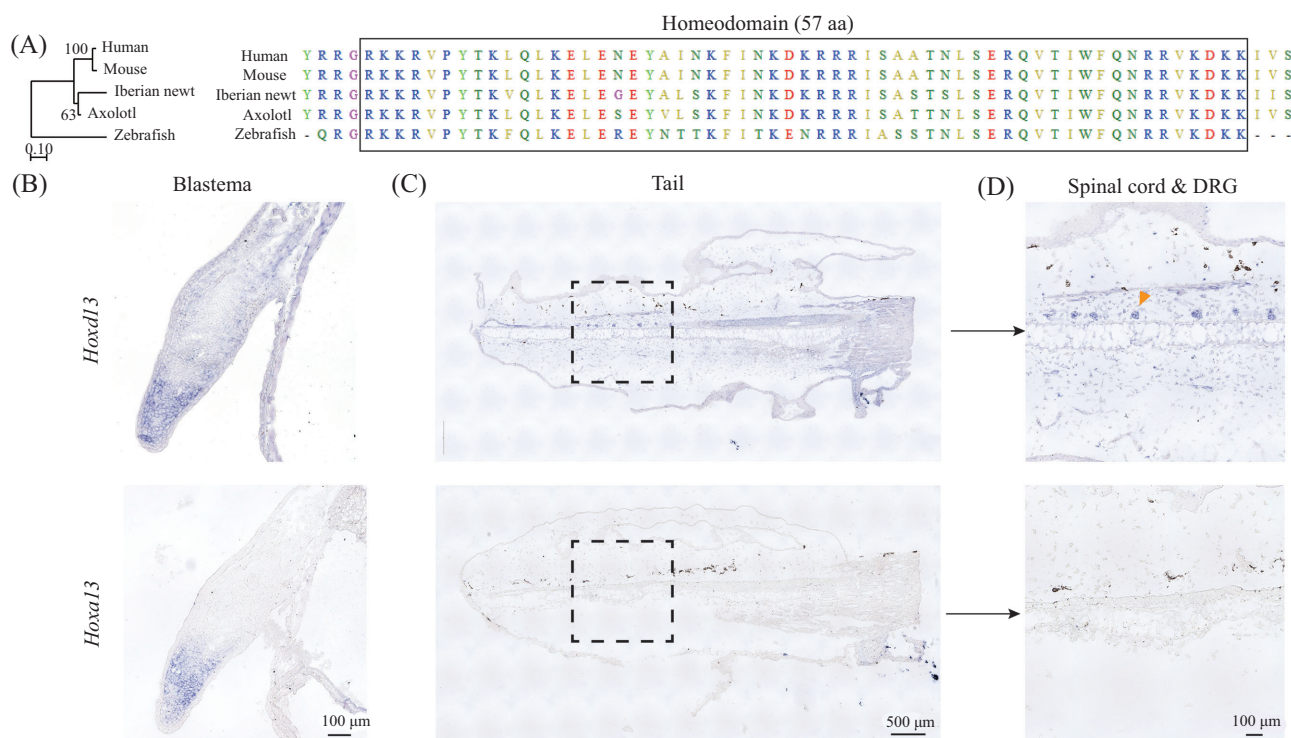
对全部成功测序个体的尾尖样本进行统计发现,三条sgRNA注射组均可检测到不同程度的靶向编辑,且indel rate呈现不同的分布特征(图2C)。进一步分析KO score分布可见,sgRNA1和sgRNA3组均可获得KO score较高的个体,而sgRNA2组虽存在靶向编辑,但未获得符合后续实验入组标准的个体(图2D)。本研究以KO score ≥ 80 且ICE模型拟合优度 $R^2 \geq 0.8$ 作为高KO评分F0嵌合体的筛选标准,最终从sgRNA1组中筛选出9/73个体、从sgRNA3组中筛选出6/42个体,用于后续前肢发育及截肢再生表型分析;sgRNA2组0/127个体符合该标准。

为直观展示入组高KO评分F0嵌合体的靶位点编辑特征,进一步选取sgRNA1和sgRNA3组代表性F0嵌合体尾尖样本进行ICE结果展示。分析结果显示,两组代表性个体在靶位点处均可检测到多种indel突变类型及其相对贡献(图2B)。

上述结果表明,sgRNA1和sgRNA3可用于获得满足后续表型分析要求的*Hoxd13*高KO评分F0嵌合体,为进一步评价*Hoxd13*在墨西哥钝口螈前肢发育与再生中的功能奠定了基因型基础。

2.3 *Hoxd13*高KO评分F0嵌合体前肢发育未见明显形态及骨骼异常

为评价*Hoxd13*靶向编辑对墨西哥钝口螈前肢发育的影响,本研究选取图2筛选获得的sgRNA1和sgRNA3高KO评分F0嵌合体进行后续表型观察。用



A: 人、小鼠、伊比利亚肋突蝾、墨西哥钝口螈和斑马鱼HOXD13蛋白同源结构域(homeodomain)氨基酸序列比对及邻接法(NJ)系统发育树分析。黑框标示高度保守的同源结构域。B: *Hoxd13*(上)和*Hoxa13*(下)在墨西哥钝口螈肢体芽基中的原位杂交结果。C: *Hoxd13*(上)和*Hoxa13*(下)在墨西哥钝口螈尾部组织中的原位杂交结果,虚线框表示放大区域。D: C中虚线框区域的局部放大图,显示尾部脊髓及背根神经节(DRG)附近的表达信号;黄色箭头指示DRG附近的*Hoxd13*阳性信号。

A.: amino acid sequence alignment of the homeodomain region of HOXD13 proteins from human, mouse, Iberian ribbed newt, axolotl and zebrafish, together with a NJ (Neighbor-Joining) phylogenetic tree. The black box indicates the highly conserved homeodomain. B: *in situ* hybridization of *Hoxd13* (upper) and *Hoxa13* (lower) in the limb bud of axolotl. C: *in situ* hybridization of *Hoxd13* (upper) and *Hoxa13* (lower) in the tail tissue of axolotl. Dashed boxes indicate the regions shown at higher magnification in D. D: enlarged views of the boxed regions in C, showing expression signals near the spinal cord and DRG (dorsal root ganglion); the yellow arrow indicates the *Hoxd13*-positive signal near the DRG.

图1 *Hoxd13*同源结构域保守性分析及*Hoxd13*、*Hoxa13*在墨西哥钝口螈相关组织中的表达

Fig.1 Homeodomain conservation of *Hoxd13* and expression of *Hoxd13* and *Hoxa13* in related tissues of axolotl

于入组分析的sgRNA1组9只个体和sgRNA3组6只个体,其尾尖样本KO score均达到预设筛选阈值(KO score ≥ 80)(图3B);其中,sgRNA1组和sgRNA3组入组个体尾尖样本KO score的中位数分别为86.0和83.5,表明所纳入个体具有较高的靶向编辑水平。

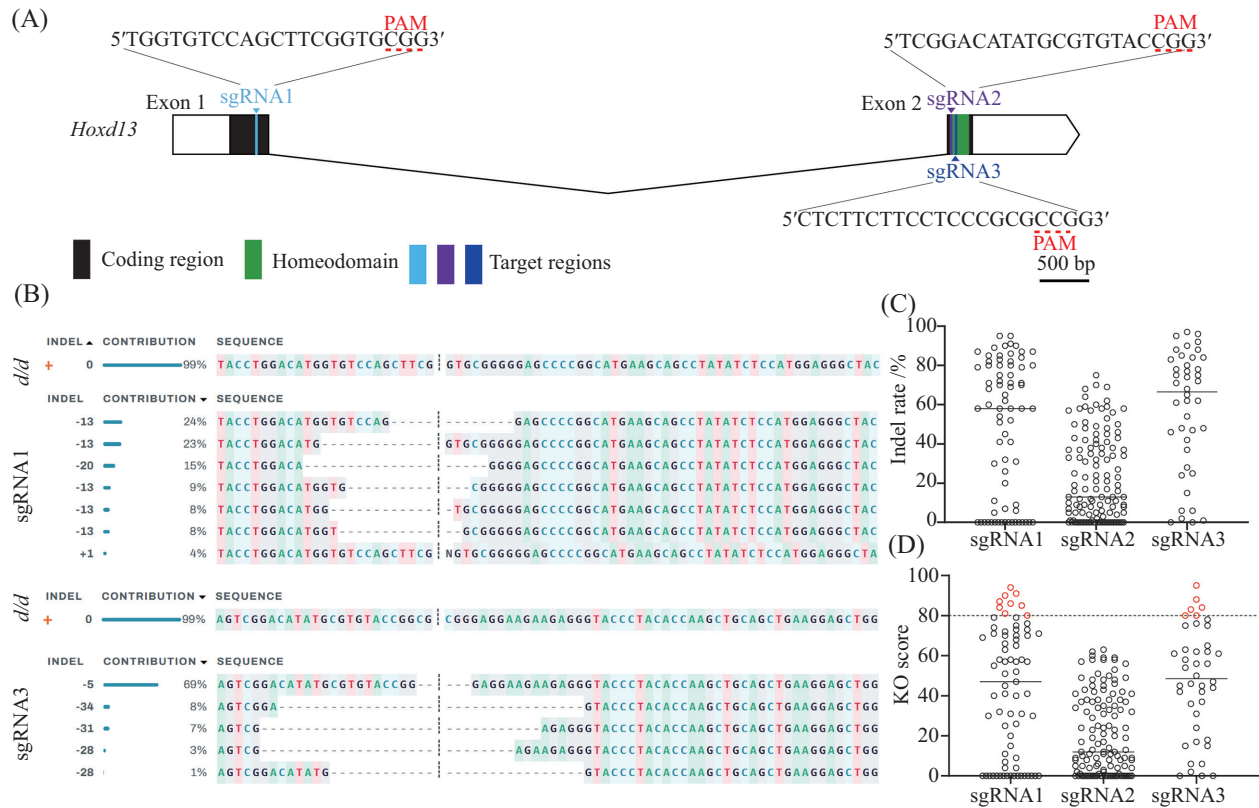
对发育期左前肢进行外观观察后发现,sgRNA1组和sgRNA3组个体的前肢整体轮廓与d/d对照组无明显差异,均形成清晰的远端肢体结构,可见4根完整手指,未观察到短指、缺指、并指、分叉或异常弯曲等外观异常(图3A)。进一步通过阿利新蓝-茜素红S染色观察前肢骨骼结构,结果显示,d/d对照组、sgRNA1组和sgRNA3组均可见排列规则的4根手指及相应骨性结构,未观察到骨骼缺失、融合或异位等异常改变(图3A)。

对三组个体的前肢发育表型进行描述性统计,

结果显示,d/d对照组5/5个体、sgRNA1组9/9个体和sgRNA3组6/6个体均未观察到前肢外观异常;三组个体的骨骼染色结果亦均未见明显结构异常。上述结果表明,在本研究观察尺度下,单独靶向编辑*Hoxd13*未引发墨西哥钝口螈前肢发育过程中的明显形态及骨骼表型异常。

2.4 *Hoxd13*敲降未引起墨西哥钝口螈前肢再生表型异常

为进一步探究*Hoxd13*靶向编辑对墨西哥钝口螈前肢再生的影响,本研究在完成发育期前肢表型观察后,对同一批入组个体进行左侧前肢截肢,并同步收集截断面组织进行基因型复检。结果显示,sgRNA1组9只个体和sgRNA3组6只个体的前肢截断面组织KO score均达到预设筛选阈值(KO score ≥ 80)(图4C);其中,sgRNA1组和sgRNA3组前肢截断面组



A: 墨西哥钝口螈 *Hoxd13* 基因结构及靶位点示意图, 红色标示PAM序列; B: sgRNA1和sgRNA3代表性F0嵌合体尾尖样本的Sanger测序及ICE分析结果, *d/d*为对照组; C: 三条sgRNA注射组全部成功测序个体尾尖样本的indel率分布; D: 三条sgRNA注射组全部成功测序个体尾尖样本的KO score分布, 虚线表示KO score=80, 红色圆点表示选取用于后续前肢发育及截肢再生表型分析的个体。C、D中每个点代表1只经ICE分析的个体, 横线表示中位数; sgRNA1, *n*=73; sgRNA2, *n*=127; sgRNA3, *n*=42。

A: schematic diagram of the *Hoxd13* gene structure and sgRNA target sites in axolotl, with PAM sequences shown in red; B: representative Sanger sequencing and ICE analysis results of tail-tip samples from sgRNA1- and sgRNA3-edited F0 mosaic animals, with *d/d* as the control group; C: distribution of the indel rate in tail-tip samples from all successfully sequenced individuals in the three sgRNA-injected groups; D: distribution of KO scores in tail-tip samples from all successfully sequenced individuals in the three sgRNA-injected groups. The dashed line indicates KO score=80, and red circles indicate individuals selected for subsequent forelimb developmental and post-amputation regeneration analyses. In C and D, each dot represents one individual analyzed by ICE, and horizontal lines indicate medians; sgRNA1, *n*=73; sgRNA2, *n*=127; sgRNA3, *n*=42.

图2 *Hoxd13*靶向sgRNA设计及F0嵌合体尾尖基因型筛选结果

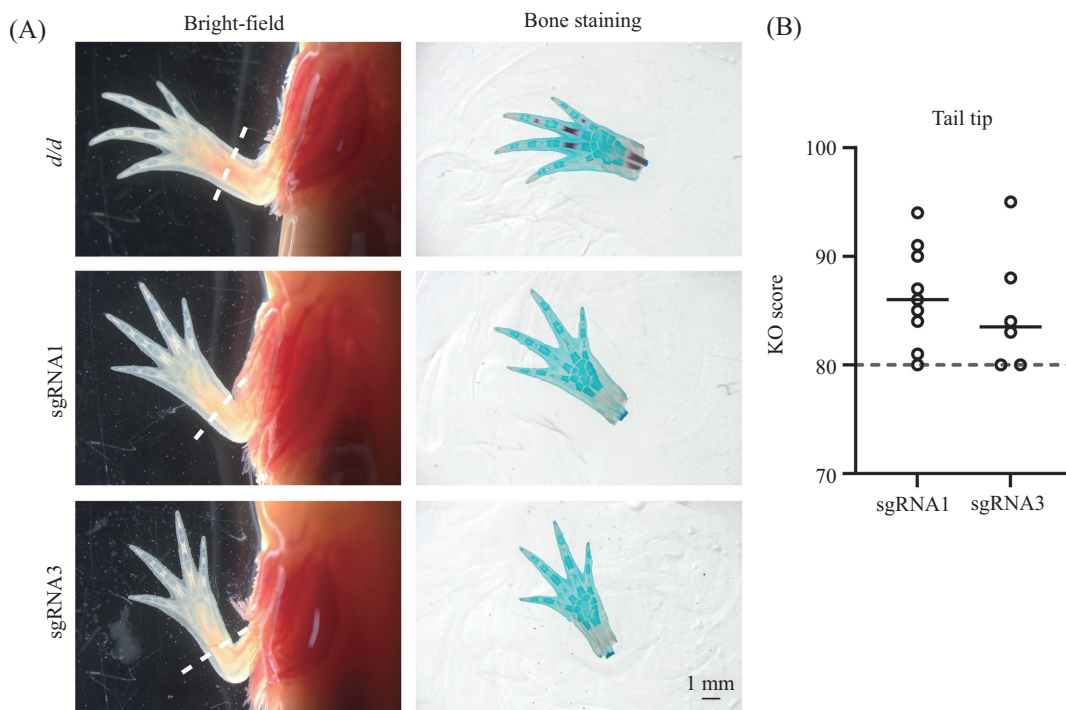
Fig.2 Design of *Hoxd13*-targeting sgRNAs and tail-tip genotyping-based screening of F0 mosaic animals

织KO score的中位数分别为85.0和85.5, 表明用于再生表型分析的前肢靶组织仍维持较高水平的基因编辑状态。同时, 前肢截断面组织的复检结果与尾尖样本初筛结果基本一致, 提示入组个体的 *Hoxd13* 敲降水平在不同取材组织中总体较为均一; 这也为在 *Hoxd13* 高敲降靶组织背景下评价前肢再生表型提供了基因型依据。

对截肢后前肢再生过程进行连续观察后发现, *d/d*对照组、sgRNA1组和sgRNA3组个体均经历了相似的再生进程。截肢后1 dpa至28 dpa, 各组再生肢体均可逐步形成再生芽并持续延长, 未观察到再生芽形成障碍、再生停滞或明显延迟; 至60 dpa时, 三组个体均形成具有清晰远端轮廓的再生前肢(图4A)。

进一步通过阿利新蓝-茜素红S染色比较再生前后前肢骨骼结构, 结果显示, *d/d*对照组、sgRNA1组和sgRNA3组再生后均可见较完整的远端骨骼结构。与再生前相比, 各组再生前肢均形成排列规则的4根手指及相应骨性结构, 未观察到短指、缺指、并指、分叉、骨骼融合或异位等明显异常改变(图4B)。

对三组个体的再生表型进行描述性统计, 结果显示, *d/d*对照组 5/5个体、sgRNA1组 9/9个体和sgRNA3组 6/6个体均未观察到再生过程异常或再生终点外观异常; 三组个体再生后前肢骨骼染色结果亦均未见明显结构异常。上述结果表明, 在前肢截断面组织维持较高KO score的前提下, 单独靶向编辑 *Hoxd13* 未引起墨西哥钝口螈前肢再生过程及再



A: *d/d*对照组、*sgRNA1*高KO评分F0嵌合体及*sgRNA3*高KO评分F0嵌合体发育期左前肢代表性外观图及阿利新蓝-茜素红S染色图, 白色虚线标示后续截肢平面; B: 用于前肢发育及后续再生表型分析的入组个体尾尖样本KO score分布。每个点代表1只经ICE分析的个体, 横线表示中位数, 虚线表示高敲降筛选阈值(KO score=80); *sgRNA1*, *n*=9; *sgRNA3*, *n*=6。

A: representative bright-field images and alcian blue-alizarin red S-stained left forelimbs from the *d/d* control group, *sgRNA1* high-KO-score F0 mosaics and *sgRNA3* high-KO-score F0 mosaics during forelimb development. White dashed lines indicate the subsequent amputation plane. B: distribution of KO scores in tail-tip samples from the selected individuals used for forelimb developmental and subsequent regenerative phenotypic analyses. Each dot represents one individual analyzed by ICE, horizontal lines indicate medians, and the dashed line indicates the screening threshold for high-KO-score (KO score=80); *sgRNA1*, *n*=9; *sgRNA3*, *n*=6.

图3 *Hoxd13*高敲降F0嵌合体前肢发育未见明显形态及骨骼异常

Fig.3 No obvious morphological or skeletal abnormalities were observed during forelimb development in *Hoxd13* high-KO-score F0 mosaic animals

生终点骨骼结构的可观察异常。

2.5 前肢再生过程中*Hox13*家族基因表达及再生组织中*Hoxd13*编辑状态验证

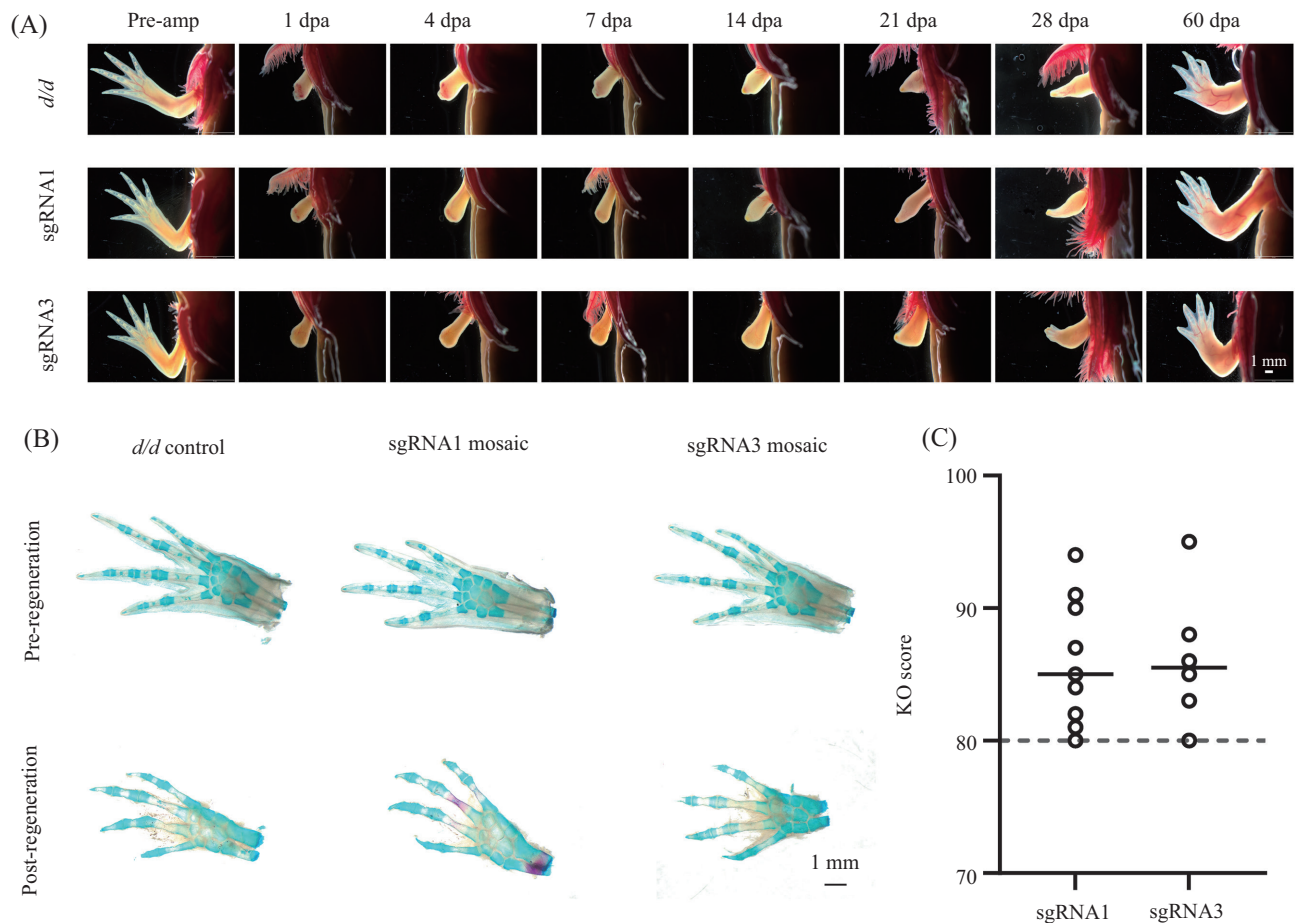
为补充分析前肢再生过程中*Hox13*基因的表达特征, 本研究选取体长约6 cm的*d/d*品系墨西哥钝口螈, 于左侧前肢肱骨中段水平截肢, 并分别于0、3和8 dpa收集截肢端或再生组织进行切片原位杂交。结果显示, *Hoxd13*在0 dpa和3 dpa样本中未见明显阳性信号, 至8 dpa时可在再生芽基前端检测到阳性信号, 且其分布较同时间点*Hoxa13*信号更为弥散; *Hoxa13*在0 dpa和3 dpa样本中呈较广泛分布, 至8 dpa时阳性信号主要集中于再生芽基尖端区域(图5A)。上述结果表明, *Hoxd13*和*Hoxa13*在墨西哥钝口螈前肢再生早期呈现不同的时空表达模式。

为进一步验证编辑个体的再生组织是否仍维持较高*Hoxd13*编辑水平, 本研究对*sgRNA1*和

*sgRNA3*编辑个体的再生指尖组织进行ICE分析。结果显示, *sgRNA1*-1、*sgRNA1*-2和*sgRNA3*样本的indel rate分别为90%、89%和94%, KO score分别为90、88和84, 模型拟合优度 R^2 分别为0.90、0.89和0.94, 均达到本研究预设的高KO score筛选标准(图5B和表5)。上述结果表明, 所检测的再生组织仍维持较高水平的*Hoxd13*靶向编辑。

3 讨论

*Hox13*亚家族在脊椎动物远端附肢模式建成中占据重要地位。经典遗传学研究显示, 小鼠中*Hoxa13*与*Hoxd13*功能缺失可引发显著的远端肢体发育异常, 同时*HoxA/HoxD*基因簇5'端成员还参与调控掌骨、指骨的骨化进程与关节形成, 是远端肢体基因表达程序建立的重要调控因子^[2,22-25]。基于这些研究, *Hoxd13*通常被认为是远端附肢模式建成



A: *d/d*对照组、sgRNA1高KO评分F0嵌合体及sgRNA3高敲降F0嵌合体左前肢截肢后再生过程的代表性外观图, 观察时间点依次为截肢前(Pre-amp)及截肢后1、4、7、14、21、28和60 dp; B: 三组个体再生前及再生后左前肢的阿利新蓝-茜素红S染色图; C: 入组个体前肢截断面组织KO score分布。每个点代表1只经ICE分析的个体, 横线表示中位数, 虚线表示高敲降筛选阈值(KO score=80); sgRNA1, $n=9$; sgRNA3, $n=6$ 。

A: representative bright-field images showing left forelimb regeneration after amputation in the *d/d* control group, sgRNA1 high-knockdown F0 mosaics and sgRNA3 high-knockdown F0 mosaics. The time points are shown as pre-amputation (Pre-amp) and 1, 4, 7, 14, 21, 28 and 60 days post-amputation; B: alcian blue-alizarin red S-stained left forelimbs before and after regeneration in the three groups; C: distribution of KO scores in forelimb stump tissues from the selected individuals. Each dot represents one individual analyzed by ICE, horizontal lines indicate medians, and the dashed line indicates the screening threshold for high knockdown (KO score=80); sgRNA1, $n=9$; sgRNA3, $n=6$.

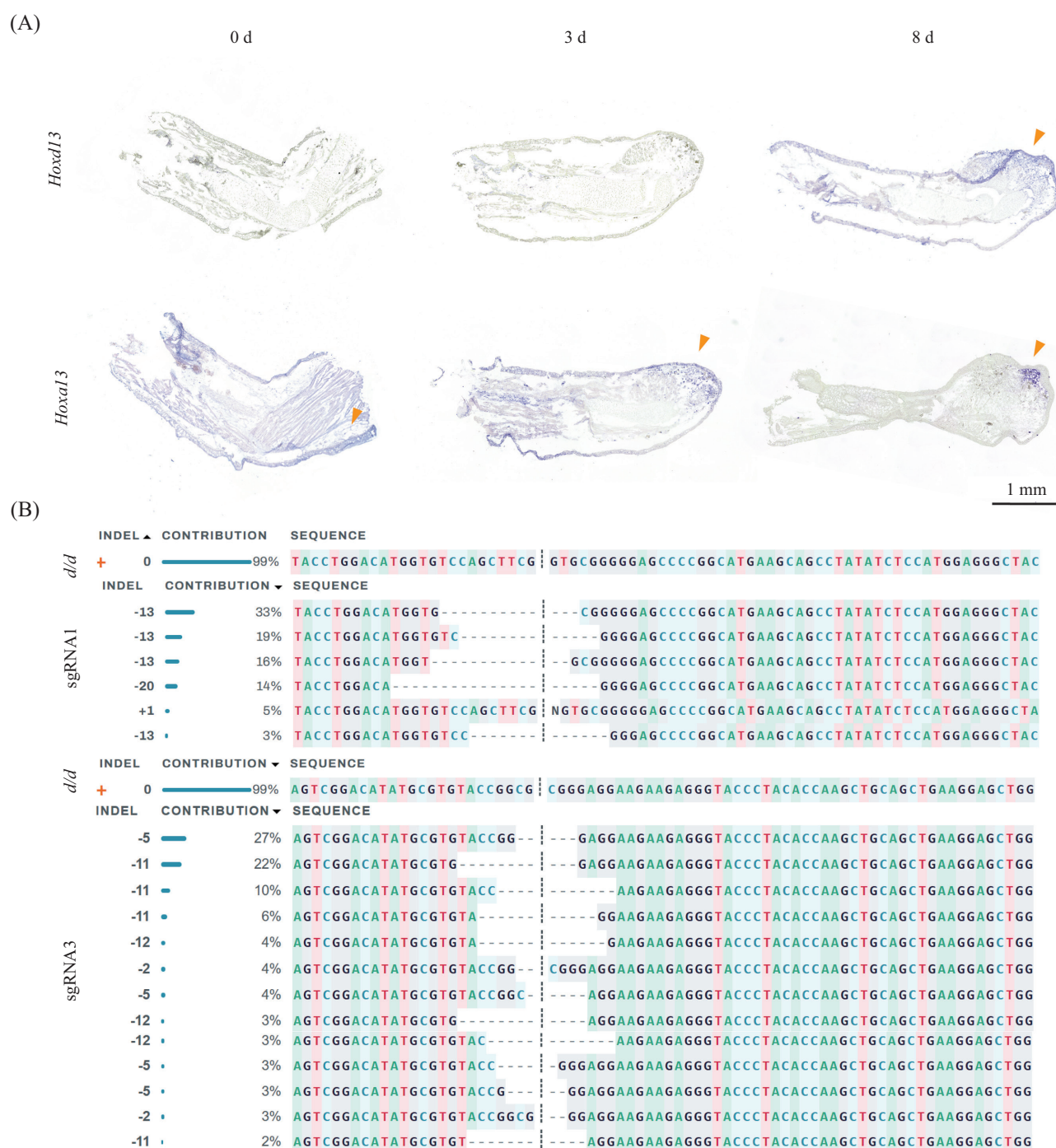
图4 *Hoxd13*高KO评分F0嵌合体截肢后前肢再生过程未见明显形态及骨骼异常

Fig.4 No obvious morphological or skeletal abnormalities were observed during forelimb regeneration after amputation in *Hoxd13* high-KO-score F0 mosaic animals

的重要候选基因。然而, 本研究在墨西哥钝口螈中获得高KO评分F0嵌合体后发现, sgRNA1和sgRNA3组个体在前肢发育及截肢后再生过程中均未出现明显的宏观形态及骨骼异常, 提示 *Hoxd13*在有尾类附肢发育与再生中的作用可能不同于哺乳动物中的经典模式。

这一结果与有尾类已有研究存在一定呼应。Takeuchi等^[4]和Tozawa等^[5]在伊比利亚肋突螈中发现, *Hoxa13*在发育及再生过程中的指结构形成中发挥主导作用, 而单独缺失 *Hoxd13*所引起的表型较为有限。结合本研究原位杂交结果, *Hoxa13*在幼体肢

体芽基中呈远端尖端富集表达, 而 *Hoxd13*的表达范围相对更广, 二者在空间分布上存在差异。进一步在 *d/d*墨西哥钝口螈前肢再生早期检测 *Hoxd13*和 *Hoxa13*表达后发现, *Hoxa13*在0 dpa和3 dpa样本中呈较广泛分布, 而 *Hoxd13*在0 dpa和3 dpa样本中未见明显阳性信号; 至8 dpa时, 均可检测到两个基因的表达, *Hoxa13*阳性信号主要集中于再生芽基尖端区域, 而 *Hoxd13*阳性信号主要分布在再生芽基前端, 且其分布较 *Hoxa13*更为弥散。上述结果提示, *Hoxd13*和 *Hoxa13*在前肢再生早期具有不同的时空表达特征。结合 *Hoxd13*编辑个体未出现明显发育及再生表型



A: *d/d*品系墨西哥钝口螈左侧前肢截肢后0、3和8 dpa的*Hoxd13*和*Hoxa13*切片原位杂交结果, 黄色箭头指示阳性信号。*Hoxa13*在0 dpa和3 dpa样本中呈较广泛分布, 而*Hoxd13*在0 dpa和3 dpa样本中未见明显阳性信号; 至8 dpa时, *Hoxa13*阳性信号主要集中于再生芽基尖端区域, *Hoxd13*阳性信号主要分布在再生芽基前端, 且其分布较*Hoxa13*更为弥散。B: *sgRNA1*和*sgRNA3*编辑个体再生指尖组织的代表性ICE分析结果, *d/d*序列作为参考对照。

A: section *in situ* hybridization of *Hoxd13* and *Hoxa13* in *d/d* forelimbs at 0, 3, and 8 dpa (days post-amputation). Yellow arrowheads indicate positive signals. *Hoxa13* signals were broadly distributed at 0 and 3 dpa, whereas no obvious *Hoxd13*-positive signals were detected at these time points. At 8 dpa, both genes were detectable: *Hoxa13* signals were mainly concentrated at the distal tip of the blastema, whereas *Hoxd13* signals were mainly distributed in the anterior region of the blastema and were more diffuse than *Hoxa13* signals. B: representative ICE analyses of regenerated digit-tip tissues from *sgRNA1*- and *sgRNA3*-edited animals, with the *d/d* sequence used as the reference control.

图5 前肢再生过程中*Hox13*基因表达及再生组织中*Hoxd13*编辑状态验证

Fig.5 Expression of *Hox13* genes during forelimb regeneration and validation of *Hoxd13* editing status in regenerated tissues

表5 再生指尖组织中*Hoxd13*靶位点的ICE分析结果
Table 5 ICE analysis of *Hoxd13* target sites in regenerated digit-tip tissues

样本 Sample	靶向sgRNA Target sgRNA	Indel rate /%	KO score	模型拟合优度(R^2) Model fit (R^2)
sgRNA1-1	sgRNA1	90	90	0.90
sgRNA1-2	sgRNA1	89	88	0.89
sgRNA3	sgRNA3	94	84	0.94

的结果,提示*Hoxd13*可能并非有尾类附肢发育与再生的必要基因;另一种可能是,*Hoxd13*功能受损后由*Hoxa13*或其他*Hox13*家族成员产生功能代偿,从而未表现出明显表型。但现有结果仍以原位杂交定性观察为主,尚不能直接证明*Hoxa13*对*Hoxd13*缺失产生了功能代偿。

针对再生过程,本研究同样未观察到单独靶向编辑*Hoxd13*引发的明显异常。既往研究已表明,肢体再生并非胚胎发育程序的简单重复^[9,26-28]。Roensch等^[3]在墨西哥钝口螈肢体再生中发现,缺失肢段的重建伴随HOXA9、HOXA11和HOXA13等位置相关蛋白的顺序性表达,提示再生过程涉及近端-远端轴位置信息的逐步重建。此外,近年来关于墨西哥钝口螈肢体再生的研究进一步显示,手部再生过程中远端区域身份相关的染色质状态与调控元件激活具有明显的区段特异性,其中*Hoxa13*相关位点在手部再生程序中表现出较高活性^[9,12,29-30]。从更广泛的再生生物学视角看,染色质重塑可通过调控染色质可及性及细胞命运相关转录程序,参与组织干细胞命运决定、损伤修复与再生过程^[31]。因此,即使某一基因在发育阶段未产生明显表型,也不能直接排除其在再生过程中具有特定作用。基于本研究结果,单独靶向编辑*Hoxd13*未导致再生芽形成、再生肢延长或再生终点骨骼结构出现可观察异常。为排除再生组织主要来源于残余低编辑或未编辑细胞的可能,本研究进一步对再生指尖组织进行了基因型复检。结果显示,sgRNA1-1、sgRNA1-2和sgRNA3样本的KO score分别为90、88和84,且模型拟合优度 R^2 均 ≥ 0.8 ,说明所检测再生组织仍维持较高水平的*Hoxd13*靶向编辑,未见低编辑序列在再生过程中明显富集。因此,本研究观察到的阴性再生表型不太可能完全由未编辑细胞选择性扩增所解释,提示在本研究观察尺度下,*Hoxd13*单基因功能受损尚不足以明显扰动墨西哥钝口螈前肢再生。

本研究仍存在一定局限性。首先,本研究虽补

充检测了0、3和8 dpa再生前肢中*Hoxd13*和*Hoxa13*的表达,但相关结果仍主要为定性观察,尚未进行表达量定量分析,也未覆盖更长时间尺度的再生阶段。其次,本研究采用F0嵌合体开展功能分析,仍无法完全替代稳定遗传突变系的验证^[32-33];此外,虽然*Hoxd13*在尾部脊髓及背根神经节附近存在表达,但本研究尚未分析其在尾部组织及尾部再生中的功能。后续可结合稳定遗传突变系、再生不同阶段的表达分析及*Hoxa13*/*Hoxd13*联合干预,进一步验证*Hox13*旁系同源基因之间的功能关系^[4,18]。

综上,本研究在墨西哥钝口螈中对*Hoxd13*进行了表达分析和F0嵌合体功能验证。结果显示,*Hoxd13*和*Hoxa13*在前肢再生早期呈现不同的时空表达模式;单独靶向编辑*Hoxd13*未导致前肢发育及截肢后再生出现明显的宏观形态或骨骼异常;再生指尖组织仍维持较高KO score,表明阴性再生表型不太可能完全由低编辑或未编辑细胞选择性扩增所致。综合上述结果,*Hoxd13*可能并非有尾类附肢发育与再生的必要基因,或其功能缺失可能由*Hoxa13*等*Hox13*家族成员代偿。该结果与伊比利亚肋突螈中*Hoxa13*作用较为突出、单独缺失*Hoxd13*表型有限的研究相呼应^[4-5]。本研究为进一步解析有尾类*Hox13*家族成员之间的功能关系提供了实验依据。

参考文献 (References)

- [1] McQueen C, Towers M. Establishing the pattern of the vertebrate limb [J]. Development, 2020, 147(17): dev177956.
- [2] Desanlis I, Kherdjemil Y, Mayran A, et al. HOX13-dependent chromatin accessibility underlies the transition towards the digit development program [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 2491.
- [3] Roensch K, Tazaki A, Chara O, et al. Progressive specification rather than intercalation of segments during limb regeneration [J]. Science, 2013, 342(6164): 1375-1379.
- [4] Takeuchi T, Matsubara H, Minamitani F, et al. Newt *Hoxa13* has an essential and predominant role in digit formation during development and regeneration [J]. Development, 2022, 149(5):

- dev200282.
- [5] Tozawa S, Matsubara H, Minamitani F, et al. Novel function of *Hox13* in regulating outgrowth of the newt hindlimb bud through interaction with *Fgf10* and *Tbx4* [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2025, 67(1): 10-22.
 - [6] Haas B J, Whited J L. Advances in decoding axolotl limb regeneration [J]. *Trends in Genetics*, 2017, 33(8): 553-565.
 - [7] Bölük A, Yavuz M, Demircan T. Axolotl: a resourceful vertebrate model for regeneration and beyond [J]. *Developmental Dynamics*, 2022, 251(12): 1914-1933.
 - [8] Reiß C. Cut and paste: the mexican axolotl, experimental practices and the long history of regeneration research in amphibians, 1864-present [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 786533..
 - [9] Zhong J, Aires R, Tsissios G, et al. Multi-species atlas resolves an axolotl limb development and regeneration paradox [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6346.
 - [10] Torok M A, Gardiner D M, Shubin N H, et al. Expression of *HoxD* genes in developing and regenerating axolotl limbs [J]. *Developmental Biology*, 1998, 200(2): 225-233.
 - [11] Gardiner D M, Blumberg B, Komine Y, et al. Regulation of *HoxA* expression in developing and regenerating axolotl limbs [J]. *Development*, 1995, 121(6): 1731-1741.
 - [12] Kawaguchi A, Wang J, Knapp D, et al. A chromatin code for limb segment identity in axolotl limb regeneration [J]. *Developmental Cell*, 2024, 59(16): 2239-2253.e9.
 - [13] Echeverri K, Fei J, Tanaka E M. The Axolotl's journey to the modern molecular era [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2022, 147: 631-658.
 - [14] Fei J F, Schuez M, Tazaki A, et al. CRISPR-mediated genomic deletion of *Sox2* in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(3): 444-459.
 - [15] Purushothaman S, Seifert A W. Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) for salamander embryos and larvae [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2562: 95-107.
 - [16] Lee J, Gardiner D M. Regeneration of limb joints in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50615.
 - [17] Rodrigo Albors A, Tazaki A, Rost F, et al. Planar cell polarity-mediated induction of neural stem cell expansion during axolotl spinal cord regeneration [J]. *eLife*, 2015, 4: e10230.
 - [18] Fei J F, Lou W P K, Knapp D, et al. Application and optimization of CRISPR-Cas9-mediated genome engineering in axolotl (*Ambystoma mexicanum*) [J]. *Nature Protocols*, 2018, 13(12): 2908-2943.
 - [19] Hub T, Cornean A, Round K, et al. Streamlined generation of CRISPR/Cas9-mediated single-cell knockout clones in murine cell lines [J]. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 2024, 7(5): 1291-1301.
 - [20] Walker M B, Kimmel C B. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae [J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 2007, 82(1): 23-28.
 - [21] Zhang P. Alcian blue: alizarin red staining of mouse skeleton [J]. *Bio-protocol*, 2012, 2(8): e162.
 - [22] Villavicencio-Lorini P, Kuss P, Friedrich J, et al. Homeobox genes *d11-d13* and *a13* control mouse autopod cortical bone and joint formation [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(6): 1994-2004.
 - [23] Fromental-Ramaint C, Warott X, Messadecq N, et al. *Hoxa-13* and *Hoxd-13* play a crucial role in the patterning of the limb autopod [J]. *Development*, 1995, 122(10): 2997-3011.
 - [24] Beccari L, Yakushiji-Kaminatsui N, Woltering J M, et al. A role for HOX13 proteins in the regulatory switch between TADs at the *HoxD* locus [J]. *Genes & Development*, 2016, 30(10): 1172-1186.
 - [25] Bastida M F, Pérez-Gómez R, Trofka A, et al. The formation of the thumb requires direct modulation of *Gli3* transcription by *Hoxa13* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(2): 1090-1096.
 - [26] Nacu E, Tanaka E M. Limb regeneration: a new development? [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27: 409-440.
 - [27] Tanaka E M. The molecular and cellular choreography of appendage regeneration [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1598-1608.
 - [28] Aztekin C. Tissues and cell types of appendage regeneration: a detailed look at the wound epidermis and its specialized forms [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 771040.
 - [29] Leigh N D, Currie J D. Rebuilding limbs, one cell at a time [J]. *Developmental Dynamics*, 2022, 251(9): 1389-1403.
 - [30] Otsuki L, Plattner S A, Taniguchi-Sugiura Y, et al. Molecular basis of positional memory in limb regeneration [J]. *Nature*, 2025, 642(8068): 730-738.
 - [31] Li X, Zhu G, Zhao B. Chromatin remodeling in tissue stem cell fate determination [J]. *Cell Regeneration*, 2024, 13(1): 18.
 - [32] Riquelme-Guzmán C, Sandoval-Guzmán T. The salamander limb: a perfect model to understand imperfect integration during skeletal regeneration [J]. *Biology Open*, 2024, 13(2): bio060152.
 - [33] McCusker C, Bryant S V, Gardiner D M. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods [J]. *Regeneration*, 2015, 2(2): 54-71.