

DOI: 10.13376/j.cblls/2021023

文章编号: 1004-0374(2021)02-0199-06

蝾螈肢体再生中终末分化细胞去分化调控机制的研究进展

谭 泓, 温晓敏, 王 雪, 叶 岗, 陈富林*

(西北大学医学院组织工程实验室, 西安 710069)

摘 要: 两栖类有尾目动物蝾螈具有极强的再生能力, 尤其在肢体受损被截断后能在较短时间内达到复原, 而哺乳动物不具备肢体再生的能力。在肢体再生中, 残肢处的终末分化细胞发生去分化是诱导再生芽基形成, 启动断肢再生的重要始动步骤。现从蝾螈断肢再生的组织形态、细胞生物学、信号分子和神经免疫调控等方面对终末分化细胞去分化调控机制的进展进行综述, 为肢体再生医学的研究提供借鉴。

关键词: 蝾螈; 肢体再生; 终末分化细胞; 去分化; 芽基形成

中图分类号: Q103; Q95-33; Q959.5 文献标志码: A

Progress of mechanisms regulating dedifferentiation of terminally differentiated cells during salamander limb regeneration

TAN Hong, WEN Xiao-Min, WANG Xue, YE Gang, CHEN Fu-Lin*

(Lab of Tissue Engineering, School of Medicine, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: *Urodele amphibians* (salamander) exhibit superior regeneration ability that mammals don't possess, especially their limbs can achieve full recovery within a relatively short period of time after amputation. Dedifferentiation of the terminally differentiated cells into blastema cells is considered to be critical in inducing blastema formation and initiating limb regeneration response. This review recapitulated the current progress of investigating regulatory mechanisms of dedifferentiation during salamander limb regeneration, in aspects of histology, cell biology, molecular signaling, neural and immuno regulation, thus shedding light on future research of regeneration medicine.

Key words: salamander; limb regeneration; terminally differentiated cell; dedifferentiation; blastema formation

1 蝾螈断肢再生的分期

有尾目两栖动物蝾螈因其独特的再生能力在脊椎动物中被冠以“再生之王”的称号。蝾螈的四肢、尾部、颌骨、眼睛(晶状体和视网膜)、脑组织、脊髓和心肌等组织器官均能再生^[1]; 并且蝾螈是唯一终生四肢反复被截断后都能完整再生的脊椎动物。目前, 研究蝾螈肢体再生的过程及其信号调控网络成为衔接再生生物学和再生医学的突破口和热点^[2]。

蝾螈断肢再生是割处再生(epimorphosis)的一个典型例子。割处再生的概念最早由Thomas Hunt Morgan于1901年提出, 其特征为上皮细胞和间充质细胞相互作用形成再生芽基(blastema); 再生芽基通

过激活形态发生(morphogenesis)的信号介导残肢完整再生^[3]。断肢再生是一个极其复杂的涵盖多种细胞组织类型, 由多个信号分子网络协调, 并在时间空间维度上精准调控以达到完美复制损失肢体的过程。许多再生生物学家通过组织学和亚显微结构观察对断肢再生过程进行了详细描述和分期^[4-7]。断肢再生过程经历以下时间上有重叠的组织学分期: 伤口愈合期、组织吞噬破坏期、残肢组织去分化期、再生芽基形成期、再生组织形态形成期和生长期^[3,7]。

收稿日期: 2020-09-08; 修回日期: 2020-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31971286, 31771055)

*通信作者: E-mail: chenfl@nwu.edu.cn; Tel: 029-88302120

断肢后, 残端肌肉软组织收缩, 牵引血管壁收缩, 出血停止。伤口为血凝块和炎性细胞(中性粒细胞、巨噬细胞)所覆盖。血细胞携带分泌的多种生长因子和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)至伤口处^[8]。伤口周边的上皮细胞被激活并发生迁移, 数小时至12小时内完全覆盖伤口表面, 形成创伤表皮(wound epidermis, WE)。在组织吞噬破坏期中, 酸性水解酶和MMPs对细胞外基质进行降解; 损伤细胞由蛋白酶裂解后被巨噬细胞胞吞^[9]。同时, WE层发生显著增厚, 形成顶端上皮帽(apical epidermal cap, AEC)的特殊结构。该时期再生相关信号分子和通路, 如Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等^[10]被激活, 决定断肢向再生复原方向进展。在残肢组织去分化期中, AEC持续增厚。神经纤维进行修复再生, 并向AEC内呈树枝状生长延伸, 所形成的神经-上皮-间质结构及组织间的相互作用对再生启动有重要作用^[11]。残肢远端处的多种终末细胞失去其成熟细胞表型和特性, 去分化为祖细胞(progenitor cells)。去分化过程在断肢后2~3周内完成。去分化形成的祖细胞仍保留其成熟细胞来源的谱系特性和位置记忆。这些谱系限定的异质性的祖细胞发生迁移, 并聚集于增厚的AEC下形成圆锥形半透明结构, 称为再生芽基。芽基与胚胎发育期的肢芽结构相似, 具有再发育的能力。芽基形成后进入形态形成期, 即芽基内通过再发育对缺失肢体组织进行完整复原。芽基内的祖细胞将依照其保留的谱系特性和获得的位置信息(背腹、前后和远近轴)进行分化生长, 以精确再生缺失的肢体部分。最终阶段为再生组织生长期。新分化的上皮细胞、肌细胞、软骨细胞、骨细胞、神经细胞和间充质细胞通过快速持续增殖聚集, 于第6~7周再生出完整的肢体。

2 终末细胞去分化在断肢再生中的重要意义

2.1 终末细胞去分化是启动再生的标志

诱导和调控残肢的成熟细胞去分化作为启动再生的关键步骤, 一直是再生领域研究中富有争议的重要问题之一。去分化是指动物体内的成熟细胞仍保留有可塑性, 受到胞外信号刺激后从已分化成熟的状态倒退至未分化成熟状态的现象^[12]。终末细胞去分化后将重新进入细胞周期。细胞核发生重编程使分化相关基因的转录受到抑制, 同时干细胞特征

基因, 以及干细胞行为(细胞迁移、增殖、黏附等)的相关基因在转录和翻译水平被激活。去分化后形成的祖细胞发生迁移进入再生芽基, 进行再分化或转分化, 最终生成与缺失组织解剖及功能完全相同的新组织。

2.2 终末细胞去分化对芽基形成的贡献

对再生中残肢组织的细胞进行谱系追踪发现, 残肢组织的上皮成纤维细胞、骨骼肌细胞、施旺氏细胞、骨骼外周细胞(periskeletal cells)等多种类型的成熟细胞均发生去分化现象而进入再生芽基^[13-14]。Muneoka等^[15]通过标记二倍体/三倍体细胞, 得出约43%的芽基细胞来源于皮肤组织(上皮细胞、成纤维细胞)。Echeverri等^[16]标记追踪骨骼肌细胞, 统计得出约30%的芽基细胞, 其由成熟肌细胞去分化而来。特殊的是软骨细胞发生去分化和增殖后不会迁移进入芽基组织^[14]。而不同类型的细胞去分化后的命运决定存在不同的机制。多个研究组通过GFP、mCherry荧光蛋白分别标记多种组织细胞并进行谱系追踪, 结果显示骨骼肌细胞、施旺氏细胞和软骨细胞去分化后形成的祖细胞仍保留其来源组织的记忆且细胞命运受到限定, 即仅能向其来源的成熟细胞方向进行再分化^[13-14, 17]。皮肤组织来源的表皮和真皮细胞去分化后具有多能干细胞(pluripotent cells)的特征, 除了再分化为上皮细胞, 亦能转分化为软骨细胞及围绕软骨组织的间质细胞(interstitial cell), 但其转分化为其他类型细胞的能力仍受限^[17]。对于通过哪些级联信号机制启动和引导终末细胞扭转其成熟细胞特性, 发生命运转变, 目前仍存有大量疑问。近年来, 科学家们的研究逐渐揭开调控终末细胞去分化的关键信号机制。

3 终末细胞去分化的调控机制

3.1 骨骼肌细胞去分化的信号研究

骨骼肌细胞是细胞去分化机制研究的热点细胞模型。研究人员通过组织和细胞生物技术观察描述了断肢再生过程中, 骨骼肌细胞去分化进入芽基的过程: (1)多核肌细胞发生核增大, 继而崩解碎片化为单核肌细胞; (2)终末分化标记蛋白的丢失, 但保存至少一个早期肌源性的标记分子; (3)肌纤维源性的细胞重新进入S期, 成为芽基中活跃的增殖分化的祖细胞^[18-20]。研究通过荧光染料罗丹明糖苷标记肌纤维示踪、Edu标记等技术观察到, 蝾螈多核肌细胞去分化生成单核肌细胞和重新进入S期活跃增殖的现象^[21]。McGann等^[22]用蝾螈再生芽基组织的

蛋白质提取物培养C2C12小鼠肌管细胞,成功诱导了哺乳动物肌管细胞发生去分化,但提取物中的蛋白质成分及作用机制并不清楚。

Wang等^[23]运用命运图谱分析等技术对蝾螈肌细胞去分化机制进行研究并揭示,骨骼肌细胞利用细胞程序性死亡机制来启动去分化。多核肌细胞通过启动caspase-3介导的细胞程序性死亡碎片化为单核肌细胞,继而细胞程序性死亡中止,单核肌细胞进入S期。而抑制caspase-3活性后,体外培养的肌细胞及在体的肌细胞在碎片化成为单核肌细胞的环节受到阻碍。

研究证实,再生初期血清中的凝血酶和纤维蛋白酶在细胞去分化过程中有重要作用。两种酶在芽基组织的表达和活性增强,介导肌细胞去分化和进入S期^[24]。Wagner等^[25]发现,蝾螈断肢初期,凝血酶和纤维蛋白酶对BMP4/7二聚体进行多位点剪切,生成活性增强约30倍的激活态BMP4/7二聚体,所生成的BMP4/7二聚体通过激活核内SMAD信号诱导肌小管重进入S期。

肌细胞去分化过程与视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb蛋白)的活性下降有密切联系。Rb蛋白在细胞生命周期中承担重要角色,包括参与调控细胞周期、细胞增殖和凋亡。Yun等^[26]发现在蝾螈肢体再生过程中,抑癌基因P53表现为芽基形成期显著下调而在形态形成期回复至基准的动态表达趋势。利用P53抑制剂 α -pifithrin和P53稳定剂nutlin3a对再生肢体以及蝾螈A1肌细胞系处理,结果证实P53通过增强Rb蛋白的磷酸化促进肌细胞去分化和重进入细胞周期。细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)也由Yun等^[27]证实通过作用于Rb蛋白调控蝾螈肌细胞的去分化。蝾螈肌细胞受到血清释放因子刺激后,ERK/c-fos信号通路保持长达48 h的持续激活状态,增强Rb蛋白的磷酸化,进而促进蝾螈肌细胞去分化和重进入细胞周期,同时成熟肌细胞特异性标记分子Sox-6表达显著下调。与之相对,哺乳动物的肌细胞受到血清释放因子刺激后ERK信号通路仅能发生一过性的激活。此研究证明ERK信号持续性的激活对启动去分化的关键作用。

从机制角度而言,目前被广泛接受的学说之一是细胞去分化由特定的胞外信号诱发,而逆转终末细胞的表型和重新进入细胞周期需要通过胞内级联信号转导至特定的转录因子完成。Johnson等^[28]报道,蝾螈肢体损伤后通过激活胞内mTOR信号通路

转导至胞核内,诱导终末细胞重进入细胞周期。转录抑制因子msx1 (muscle segment homeobox gene 1) 被证实为调控成熟肌细胞去分化的关键分子。Kumar等^[29]从幼体时期(larval stage)的蝾螈肢体中分离出肌纤维并进行体外培养。大部分的肌纤维受到机械力创伤刺激后碎片化为单核肌细胞,或者裂解为可存活的多核肌细胞片段。将msx1的morpholino反义核酸转染进入肌纤维,并移植至体内进行细胞谱系追踪,结果显示肌细胞去分化时的碎片化过程受到显著抑制。此外,生肌调节转录因子家族中的生肌因子5 (myogenic factor 5, Myf5)也被认为参与调控蝾螈肌细胞的可塑性和去分化过程^[30]。

蛋白激酶C (protein kinase C)的胞内下游分子MLP (MARCKS-like protein)的转录水平在蝾螈断肢早期(12~24 h)至少升高8倍。Suquira等^[31]用纯化的重组蝾螈MLP对肌细胞进行处理,发现MLP能诱导成熟肌细胞重进入细胞周期。体内试验也证实了MLP对截肢残面肌细胞重进入细胞周期的促进作用。有意思的是,当注射MLP至完整未受损肢体时,未观察到肌细胞的去分化行为,提示MLP的功能需要损伤诱发的应答信号来协同启动肌细胞去分化。

3.2 上皮成纤维细胞去分化的信号研究

在肢体再生中,上皮成纤维细胞是最早应对创伤刺激发生迁移和去分化的细胞,也是诱导芽基形成的关键细胞类型。上皮成纤维细胞来源的祖细胞相对于其他来源的祖细胞具有更强的移行和转分化能力。在蝾螈异位肢体再生实验中,表皮缺损处仅导入神经但未进行表皮移植的手术动物组无法形成再生芽基^[32]。

研究发现了一些生长因子和转录因子在成纤维细胞去分化中的重要作用。血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)信号通路对上皮成纤维细胞的移行和芽基形成有关键作用^[14]。Satoh等^[33]发现神经分泌生长因子FGF7/KGF信号通过调控纽扣状锌指结构转录因子(buttonhead-like zinc-finger transcription factor) Sp9诱导蝾螈断肢上皮成纤维细胞去分化。Satoh等^[34]还报道了BMP2下游的bHLH转录因子AmTwist对表皮成纤维细胞去分化有负调控作用。Midkine信号调控AEC的形成和肢体再生的启动,并且双原位杂交显示midkine和结缔组织细胞标记基因prrx-1在WE/AEC中的表达趋势和位置一致^[35],同时prrx-1也是上皮成纤维细胞去分化的标志基因^[36],提示midkine信号和去分化过程密切相关。

综上, 上皮成纤维细胞去分化对芽基形成有关键作用。由于对蝾螈上皮成纤维细胞的特性理解不足, 导致对其去分化机制以及较强的可塑性的研究存在大量空白。

3.3 软骨细胞去分化的信号研究

研究人员通过细胞标记和示踪观察到蝾螈断肢处软骨细胞发生去分化, 再分化和增殖为骨骼肌和其他类型细胞^[14-15]。维甲酸(retinoic acid)对软骨细胞去分化和参与位置信号调控有关键作用^[37-38]。蝾螈残肢局部注射维甲酸实验证实, 其通过调控酸性磷酸酶活性影响骨细胞和软骨细胞的去分化。此外, 对于蝾螈软骨细胞去分化的机制研究鲜有报道。而哺乳动物的软骨细胞在病理刺激下(如关节炎), Wnt/ β -连环蛋白、BMP等发育经典通路被激活, 也能去分化为类成纤维细胞^[37,39]。因此, 阐明蝾螈肢体再生与哺乳动物软骨细胞在病理情况下去分化的差异, 关键问题是明确再生中调控软骨细胞去分化为间充质细胞(mesenchymal cell)和关节炎中软骨细胞去分化为类成纤维细胞的信号差异。

3.4 神经调控对细胞去分化的作用

大量研究通过蝾螈原位断肢去神经模型和ALM (accessory limb model)的实验证实了神经因素对肢体再生的关键作用^[32,40-41]。高位截断神经轴突导致肢体再生失败。前芽基结构的形成并不依赖于神经调控, 而芽基细胞的生长和分化依赖于神经分泌调控^[42]。研究发现, 神经分泌多种因子支持促进再生过程, 如转铁蛋白(transferrin)^[43]、FGF/BMP^[44]、neuregulin-1^[45]、组蛋白去乙酰化酶^[46]等。神经调控亦被证实参与启动终末细胞去分化。神经细胞表达分泌的前梯度蛋白(newt anterior gradient protein, nAG)与细胞膜受体Prod1结合, 能诱导终末细胞去分化进入S期。在失神经原位断肢模型中, nAG可替代神经支持作用, 诱导断肢再生^[47-48]。神经分泌对调控上皮成纤维细胞去分化, 参与形成WE/AEC结构进而调控芽基形成和生长有重要作用。蝾螈断肢去神经后, 调控上皮细胞去分化形成芽基细胞的关键转录因子Sp9在表皮层的表达缺失。值得注意的是, 在失神经模型中, 促进伤口愈合和表皮再生的分子MMP-9的表达并不受影响, 证实芽基形成过程中既存在神经依赖性的调节机制, 也存在非神经依赖性的调控机制^[33-34]。

3.5 免疫调控对细胞去分化的影响

不同于哺乳动物创伤后免疫细胞与成纤维细胞相互作用所导致的疤痕修复病理过程, 蝾螈的伤口

愈合过程中无纤维性疤痕修复。科学家发现了免疫细胞在创面愈合诱导再生中可能发挥的重大作用。再生早期, 巨噬细胞通过直接或间接调控的方式促进细胞去分化和生成芽基组织的祖细胞池。Godwin等^[49]在蝾螈断肢后立即注射Clo-Lipo (liposome-encapsulated clodronate), 使巨噬细胞在创面愈合早期被一过性系统性地清除。结果显示, 蝾螈正常的无疤痕愈合被大量纤维增生和胶原沉积的病理修复方式所取代, 再生中止。同时, 细胞去分化标志基因*Prrx1*、*Sp9*、*Msx2*、*Dlx3*等表达发生失衡紊乱。因此, 蝾螈特殊的伤口愈合免疫调节机制对于启动再生和诱导成熟细胞去分化有关键作用, 但确切的机理仍有待深入研究。

3.6 通过基因组学对去分化机制的研究

近年来得益于高通量测序技术的快速发展, 研究人员利用转录组、蛋白质组、microRNA组以及单细胞测序手段对蝾螈肢体再生各个时期的各细胞类型的蛋白质和基因表达谱进行检测、定量后, 结合生物信息分析筛选关键信号分子^[50-52]。Gerber等^[52]利用单细胞mRNA测序证实了在芽基形成期中, 不同类型的结缔组织成熟细胞去分化形成类似胚胎芽状态的祖细胞。祖细胞遵循去分化前的谱系记忆进行增殖分化。Sousounis等^[53]通过分析蝾螈肢体再生的转录组数据, 关注到芽基形成期中DNA损伤反应/修复机制相关基因的显著上调。通过构建转基因动物模型, 他们证实了DNA损伤反应/修复机制中的Eya2 (eyes absent 2)/H2AX信号通路对调控细胞重进入细胞周期以及周期活动有重要作用, 且当Eya2/H2AX被抑制后, 动物肢体再生受到阻碍。

4 研究展望

研究人员从组织学、免疫机制、神经调控、分子生物学、基因组学、蛋白质组学等各角度探索蝾螈肢体再生的现象和分子机制, 并与其他物种进行对比分析, 取得了突破。然而对于这个领域的认知仍存在大量空白, 甚至争议。在当前阶段, 对于肢体再生的主要研究焦点仍将集中在发现和验证再生过程中的重要信号通路; 通过验证整合分子机制以期拼出启动和诱导再生的级联信号通路拼图。

由于人类和绝大部分哺乳动物细胞无去分化现象, 导致肢体和器官的再生能力极其受限。对于诠释蝾螈终末细胞去分化的现象仍有许多关键问题要解决, 如再生过程中, 细胞如何中止细胞程序性死亡重新进入细胞周期? 在终末细胞去分化过程中如

何调节去分化的程度以保持谱系限定,或突破谱系限定进入转分化?不同终末细胞类型的去分化能力为什么不同?目前对于哺乳动物细胞去分化能力缺失的学术假说有:(1)启动去分化的分子信号表达不足或缺失;(2)胞内信号不转导去分化信号;(3)终末细胞特征分子的表达无法被逆转;(4)哺乳动物特有的细胞结构导致细胞重编程去分化无法实现。近年来,研究人员开发和利用新技术,成功将基因编辑技术TALEN和CRISPR-Cas9结合蝾螈胚胎/受精卵显微注射技术建立转基因蝾螈品系,有望从遗传分子的角度促进对蝾螈再生机制的研究^[54-56]。毫无疑问,在解答如何启动肢体再生这一问题上,研究蝾螈各细胞类型的可塑性及其去分化的精准调控是关键环节。从临床角度而言,解析蝾螈肢体再生过程中细胞重编程的分子机制对帮助实现人来源细胞重编程,最终提高人类组织器官再生能力有巨大的潜在应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] Joven A, Elewa A, Simon A. Model systems for regeneration: salamanders. *Development*, 2019, 146: dev167700
- [2] Gesslbauer B, Radtke C. The regenerative capability of the urodele amphibians and its potential for plastic surgery. *Ann Plast Surg*, 2018, 81: 511-5
- [3] Carlson BM. Principles of regenerative biology [M]. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2007
- [4] Iten LE, Bryant SV. Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: length, rate, and stages. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org*, 1973, 173: 263-82
- [5] Wallace H. Vertebrate limb regeneration [M]. New York: Wiley, 1981
- [6] Tsonis PA. Limb regeneration [M]. New York: Cambridge University Press, 1996
- [7] Payzin-Dogru D, Whited JL. An integrative framework for salamander and mouse limb regeneration. *Int J Dev Biol*, 2018, 62: 393-402
- [8] Casco-Robles RM, Watanabe A, Eto K, et al. Novel erythrocyte clumps revealed by an orphan gene *Newtic1* in circulating blood and regenerating limbs of the adult newt. *Sci Rep*, 2018, 8: 7455
- [9] Vinarsky V, Atkinson DL, Stevenson TJ, et al. Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Dev Biol*, 2005, 279: 86-98
- [10] Stoick-Cooper CL, Moon RT, Weidinger G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev*, 2007, 21: 1292-315
- [11] McCusker C, Bryant SV, Gardiner DM. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration (Oxf)*, 2015, 2: 54-71
- [12] Han M, Yang X, Taylor G, et al. Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat Rec B New Anat*, 2005, 287: 14-24
- [13] Kragl M, Knapp D, Nacu E, et al. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 2009, 460: 60-5
- [14] Currie JD, Kawaguchi A, Traspas RM, et al. Live imaging of axolotl digit regeneration reveals spatiotemporal choreography of diverse connective tissue progenitor pools. *Dev Cell*, 2016, 39: 411-23
- [15] Muneoka K, Fox WF, Bryant SV. Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Dev Biol*, 1986, 116: 256-60
- [16] Echeverri K, Clarke JD, Tanaka EM. *In vivo* imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema. *Dev Biol*, 2001, 236: 151-64
- [17] Tanaka HV, Ng NCY, Yang Yu Z, et al. A developmentally regulated switch from stem cells to dedifferentiation for limb muscle regeneration in newts. *Nat Commun*, 2016, 7: 11069
- [18] Frasch M. Dedifferentiation, redifferentiation, and transdifferentiation of striated muscles during regeneration and development. *Curr Top Dev Biol*, 2016, 116: 331-55
- [19] Sandoval-Guzman T, Wang H, Khattak S, et al. Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 174-87
- [20] Wang H, Simon A. Skeletal muscle dedifferentiation during salamander limb regeneration. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 40: 108-12
- [21] Calve S, Simon HG. High resolution three-dimensional imaging: evidence for cell cycle reentry in regenerating skeletal muscle. *Dev Dyn*, 2011, 240: 1233-9
- [22] McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13699-704
- [23] Wang H, Loof S, Borg P, et al. Turning terminally differentiated skeletal muscle cells into regenerative progenitors. *Nat Commun*, 2015, 6: 7916
- [24] Straube WL, Brockes JP, Drechsel DN, et al. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration: partial purification of a serum factor that triggers cell cycle re-entry in differentiated muscle cells. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6: 333-44
- [25] Wagner I, Wang H, Weissert PM, et al. Serum proteases potentiate BMP-induced cell cycle re-entry of dedifferentiating muscle cells during newt limb regeneration. *Dev Cell*, 2017, 40: 608-617.e6
- [26] Yun MH, Gates PB, Brockes JP. Regulation of p53 is critical for vertebrate limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17392-7
- [27] Yun MH, Gates PB, Brockes JP. Sustained ERK activation underlies reprogramming in regeneration-competent salamander cells and distinguishes them from their mammalian counterparts. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 15-23
- [28] Johnson K, Bateman J, DiTommaso T, et al. Systemic cell

- cycle activation is induced following complex tissue injury in axolotl. *Dev Biol*, 2018, 433: 461-72
- [29] Kumar A, Velloso CP, Imokawa Y, et al. The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on *Msx1*. *PLoS Biol*, 2004, 2: 1168-76
- [30] Imokawa Y, Gates PB, Chang YT, et al. Distinctive expression of *Myf5* in relation to differentiation and plasticity of newt muscle cells. *Int J Dev Biol*, 2004, 48: 285-91
- [31] Sugiura T, Wang H, Barsacchi R, et al. MARCKS-like protein is an initiating molecule in axolotl appendage regeneration. *Nature*, 2016, 531: 237-40
- [32] Endo T, Bryant SV, Gardiner DM. A stepwise model system for limb regeneration. *Dev Biol*, 2004, 270: 135-45
- [33] Satoh A, Graham GM, Bryant SV, et al. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol*, 2008, 319: 321-35
- [34] Satoh A, Bryant SV, Gardiner DM. Regulation of dermal fibroblast dedifferentiation and redifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl. *Dev Growth Differ*, 2008, 50: 743-54
- [35] Tsai SL, Baselga-Garriga C, Melton DA. *Midkine* is a dual regulator of wound epidermis development and inflammation during the initiation of limb regeneration. *Elife*, 2020, 9: e50765
- [36] Satoh A, Makanae A, Hirata A, et al. Blastema induction in aneurogenic state and *Prrx-1* regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration. *Dev Biol*, 2011, 355: 263-74
- [37] Nishihara A, Fujii M, Sampath TK, et al. Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301: 617-22
- [38] Ju BG, Kim WS. Pattern duplication by retinoic acid treatment in the regenerating limbs of Korean salamander larvae, *Hynobius leechii*, correlates well with the extent of dedifferentiation. *Dev Dyn*, 1994, 199: 253-67
- [39] Deroyer C, Charlier E, Neuville S, et al. CEMIP (KIAA1199) induces a fibrosis-like process in osteoarthritic chondrocytes. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 103
- [40] Satoh A, Mitogawa K, Makanae A. Nerve roles in blastema induction and pattern formation in limb regeneration. *Int J Dev Biol*, 2018, 62: 605-12
- [41] Sinigaglia C, Averof M. The multifaceted role of nerves in animal regeneration. *Curr Opin Genet Dev*, 2019, 57: 98-105
- [42] Stocum DL. Nerves and proliferation of progenitor cells in limb regeneration. *Dev Neurobiol*, 2019, 79: 468-78
- [43] Mescher AL, Connell E, Hsu C, et al. Transferrin is necessary and sufficient for the neural effect on growth in amphibian limb regeneration blastemas. *Dev Growth Differ*, 1997, 39: 677-84
- [44] Vieira WA, Wells KM, Raymond MJ, et al. FGF, BMP, and RA signaling are sufficient for the induction of complete limb regeneration from non-regenerating wounds on *Ambystoma mexicanum* limbs. *Dev Biol*, 2019, 451: 146-57
- [45] Farkas JE, Freitas PD, Bryant DM, et al. Neuregulin-1 signaling is essential for nerve-dependent axolotl limb regeneration. *Development*, 2016, 143: 2724-31
- [46] Wang MH, Wu CH, Huang TY, et al. Nerve-mediated expression of histone deacetylases regulates limb regeneration in axolotls. *Dev Biol*, 2019, 449: 122-31
- [47] Kumar A, Godwin JW, Gates PB, et al. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science*, 2007, 318: 772-7
- [48] Nomura K, Tanimoto Y, Hayashi F, et al. The role of the *Prod1* membrane anchor in newt limb regeneration. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56: 270-4
- [49] Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 9415-20
- [50] Yu Y, Tang J, Su J, et al. Integrative analysis of microRNAome, transcriptome, and proteome during the limb regeneration of *cynops orientalis*. *J Proteome Res*, 2019, 18: 1088-98
- [51] Tsai SL, Baselga-Garriga C, Melton DA. Blastemal progenitors modulate immune signaling during early limb regeneration. *Development*, 2019, 146: dev169128
- [52] Gerber T, Murawala P, Knapp D, et al. Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science*, 2018, 362: eaaq0681
- [53] Sousounis K, Bryant DM, Martinez Fernandez J, et al. *Eya2* promotes cell cycle progression by regulating DNA damage response during vertebrate limb regeneration. *Elife*, 2020, 9: e51217
- [54] Suzuki M, Hayashi T, Inoue T, et al. Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in *Pleurodeles waltl* development and regeneration. *Dev Biol*, 2018, 443: 127-36
- [55] Matsunami M, Suzuki M, Haramoto Y, et al. A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt *Pleurodeles waltl*, an emerging model for developmental and regeneration biology. *DNA Res*, 2019, 26: 217-29
- [56] Hayashi T, Nakajima M, Kyakuno M, et al. Advanced microinjection protocol for gene manipulation using the model newt *Pleurodeles waltl*. *Int J Dev Biol*, 2019, 63: 281-6