

DOI: 10.13376/j.cbils/2022033

文章编号: 1004-0374(2022)03-0275-10

涡虫中枢神经系统再生的研究进展

宋倩, 赵博生*

(山东理工大学发育与进化生物学研究所, 淄博 255000)

摘要: 与脊椎动物有限的神经再生能力相比, 涡虫再生能力极强, 在短时间内, 切断的涡虫尾部能够再生出完整的头部, 且再生的中枢神经系统功能完整, 这使其成为研究神经再生分子机制的良好模型。阐明涡虫神经再生的细胞和分子机制对于解决再生医学领域的诸多问题至关重要。该文从多能干细胞的增殖、轴向极性的重建、干细胞的定向分化、比例和功能的恢复等方面综述了涡虫中枢神经系统再生的研究进展。

关键词: 涡虫; 中枢神经系统; 多能干细胞

中图分类号: Q42

文献标志码: A

Research progress on regeneration of central nervous system (CNS) in planarians

SONG Qian, ZHAO Bo-Sheng*

(Institute of Developmental and Evolutionary Biology, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China)

Abstract: Compared to the limited capacities for neurogenesis in adult vertebrates, the regenerative capacity of planarians is remarkable. Planarians are able to regenerate an organized and functional CNS from a tail piece within just a few days, which makes these animals a powerful model for understanding the molecular mechanism of adult neurogenesis and regeneration. Elucidation of cellular and molecular mechanisms underlying neuroregeneration in planarians is crucial for solving multiple pressing problems in the field of regenerative medicine. Here, we reviewed current studies of planarian CNS from several key events involved in regeneration: proliferation of neural stem cells, re-establishment of axial polarity, stem cell differentiation, size control and organ proportionality and functional recovery.

Key words: planarian; central nervous system; neoblasts

不同生物或同种生物不同器官的再生能力各不相同。人类脑的再生能力有限, 其神经元每年仅更新 1%~2%, 中风、疾病或创伤引起的脑损伤无法再生恢复正常功能^[1]。目前认为, 如果能够理解其他模型系统中成体神经发生和神经再生的生物学机制, 对于驱动患者自身细胞获得超再生能力, 并分化和整合为现有神经回路中的神经元具有重要意义^[2-3]。涡虫再生能力极强, 可在 7 d 内再生出完整的脑, 并能整合新组织恢复正常功能; 其脑可以随着动物的生长或收缩而调整大小和比例, 其神经元每周约更新 25%^[4-6]。了解涡虫神经再生的机制对于中风、神经系统疾病和脑损伤的治疗具有重要参考

价值。本文描述了涡虫神经系统的解剖结构, 深入探究了中枢神经系统再生和发展的分子机制及其研究进展。

1 涡虫中枢神经系统的解剖结构

涡虫的中枢神经系统由前端的双叶的脑(头神经节)、光感受器(眼睛)和两条纵贯全身的腹神经索组成。其中, 涡虫的脑可分为位于中央的海绵结

收稿日期: 2021-09-03; 修回日期: 2021-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31970430)

*通信作者: E-mail: zhaobosheng@sdut.edu.cn

构区域和九对向头部边缘延伸的侧神经,两个脑叶在前端连接^[4,7]。一些侧神经延伸到耳廓,被认为与化学感觉相关^[8-9]。涡虫的眼睛位于脑的背侧,由两种细胞组成:色素细胞和光感受器细胞,其轴突形成视交叉并投射到脑叶的背内侧区域,光信号在此被整合^[7-8,10]。脑和腹神经索中的神经元细胞体在外层(皮层)中组织,在内部神经纤维网中形成突触连接^[7]。

尽管在形态上相对简单,涡虫中枢神经系统表现出了高度的复杂性。*otx*同源基因的表达首次将涡虫的脑进一步细分为:脑内侧区域(*DjotxA*)、脑光感受器下方区域(*DjotxB*)和侧神经,而且其侧神经分支也被*Djotp*进一步划分为近端和远端两个部分(图1)^[11]。其次,涡虫具有不同类型的神经细胞,其中包括单极性和双极性神经元,神经分泌细胞和神经胶质细胞,以及胆碱能、 γ -氨基丁酸能、多巴胺能、章鱼胺能、5-羟色胺能等多种神经元^[12]。

2 涡虫中枢神经系统再生的分子机制

涡虫中枢神经系统的再生需要形成胚基,确定神经再生区,产生脑原基,形成适当的神经连接,并在功能上将新组织整合到现有的神经组织中。

2.1 胚基的形成

涡虫的再生能力依赖于多能干细胞(被称为neoblast),其分布在除头部前部和咽外的上皮细胞和肠之间的实质组织中,是无性品系中唯一能够分

裂的细胞^[13-14]。当出现损伤时,neoblasts增殖能力被激活:涡虫受到损伤后,全身的neoblasts迅速分裂,在6h达到峰值(任何伤口类型都会出现);当组织出现缺失时,在损伤后48h,neoblasts在创伤区周围达到第二个增殖峰,该过程产生新的未分化的组织——胚基^[15-16],新的脑原基在胚基中产生。尽管胚基继续生长,但有丝分裂活动主要局限于伤口附近原有的组织(直径约500mm的区域),即所谓的后胚基^[17]。后胚基中产生的不分裂的neoblasts子代细胞积累并进入胚基,从而促进胚基从基部生长^[15-16]。*Fir1*与组织缺失时neoblasts的局部增殖有关^[18],而*snail-1*、*snail-2*和*zeb-1*是细胞迁移到创伤部位和建立迁移细胞形态所必需的^[19]。

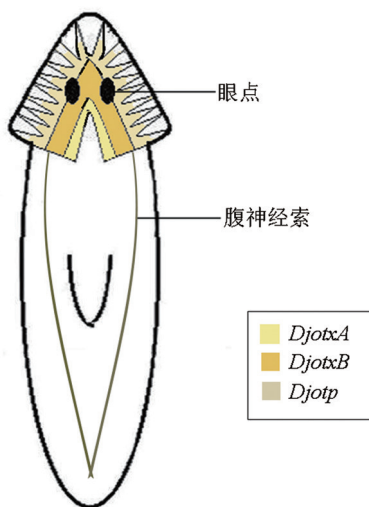
2.2 体轴和极性的建立

涡虫沿前后(anterior-posterior, AP)、背腹侧(dorsal-ventral, DV)、中外侧(medio-lateral, ML)表现出极性。在再生过程中,体轴的正确建立为中枢神经系统的再生提供了位置参考框架,确保脑在正确的位置再生,这是由肌细胞中表达的位置控制基因控制的^[20]。

2.2.1 AP轴极性的重建

研究表明,Wnt/ β -catenin信号通路在AP轴建立过程中起重要作用。抑制Wnt信号通路的主要成员(*wnt1*、 β -catenin-1、*wntless*、*dishevelled*、*teashirt*)能够使尾部缺失的涡虫再生出头或再生出异位的头^[21-24]。*wnt11-1*、*wnt11-2*、*wnt11-5*三个*wnt*基因均在P端伤口处表达,共同干扰*wnt1*与这三个基因的表达发现,干扰*wnt11-2*和*wnt11-5*加强了*wnt-1*单独干扰造成的双头表型外显率,而干扰*wnt11-1*无此作用,表明*wnt11-2*和*wnt11-5*与*wnt1*共同参与涡虫P极的重建^[22,25]。再生3~6h,*Djfgf*在伤口处已分化组织中表达,其表达受细胞外信号调节激酶(ERK)和Wnt/ β -catenin信号通路的共同调节,说明DjFGF可能是Wnt的前侧对应物,且能触发涡虫头部再生的neoblasts的反应^[26]。此外,Frizzled受体Fzd1、Fzd4-1和LRP(low receptor protein)受体LRP5/6被认为是Wnt/ β -catenin信号通路在P极的受体,Fzd1表达时间更早,受到抑制也会产生双头涡虫,被认为是该通路的直接受体,而LRP5/6则可能是Fzd1的辅助受体^[27-28]。

通过干扰*APC*、*notum*等Wnt信号通路的抑制基因从而激活该通路能够抑制头部的再生,甚至使头部缺失的涡虫再生出尾^[29-30]。*folliculin*的同源物*Smed-fst*在涡虫受伤后上调,并通过抑制TGF- β 家族成员*smed-activin*促进正常的头部和脑再生^[31]。



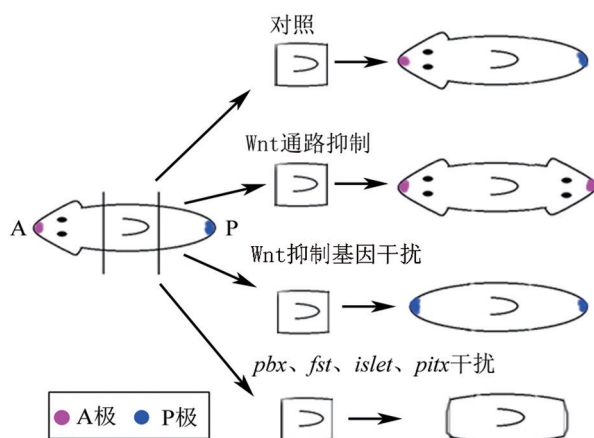
涡虫的中枢神经系统由前端的双叶的脑(头神经节)、光感受器(眼睛)和两条纵贯全身的腹神经索组成。*otx*同源基因的表达首次将涡虫的脑进一步细分为:脑内侧区域(*DjotxA*)、脑光感受器下方区域(*DjotxB*)、侧神经三部分。

图1 涡虫中枢神经系统示意图

zic-1 和 *foxD* 与 *notum* 和 *follistatin* 共表达,是分化成前端(A极)祖细胞所必需的^[32-33]。*β-catenin-1* 表达下调导致涡虫再生出双头,而在未受伤的涡虫中干扰 *β-catenin-1* 后,涡虫侧缘出现多个头部^[34]。Hedgehog 信号通路位于 *β-catenin* 通路的上游,通过调节 Wnt 基因的表达来阻断头部和脑再生^[35-36]。*pbx* 是第一个被报道对 A 极和 P 极(后端)的再生、形成都发挥作用的基因^[37]。Homeobox 转录因子 *islet* 和 *pitx* 在 A 极和 P 极都有表达,对 A 极和 P 极的建立都发挥重要作用,它们的表达量降低产生无头和无尾涡虫^[38-40]。虽然 *fst* 最初是因为它在 A 极的形成中起着至关重要的作用而被发现的,但事实上它也在 P 极中表达,它的抑制也导致了涡虫头和尾的缺失^[41](图 2)。转录因子 SP5 与 WntP-2 相互作用,抑制尾部 Wnt 依赖的躯干基因的表达来建立躯干-尾表达域^[42]。

目前已知前、后伤口之间最早出现表达差异的基因是 *notum*,那么是什么信号控制前、后伤口中 *notum* 的表达? 2021 年的研究表明, *activin-2* 能够调节 *notum* 在前、后伤口中的表达: *activin-2* 受到抑制使 *notum* 在前后伤口处都有表达,扰乱了 AP 轴的建立,使后端的尾部伤口再生出头; *activin-2* 下调也会造成 AP 轴分裂,导致前胚基中出现两个头,后胚基中出现各种头尾组合^[43]。

Aquitalea sp. FJL05 是涡虫体内的一种共生细菌,它产生的小分子吡啶可以影响涡虫再生过程中体轴的建立,导致永久双头动物的再生。通过 RNA 测序测试吡啶对涡虫组织的影响发现,吡啶通过改



抑制 Wnt 信号通路主要成员产生双头涡虫,抑制 Wnt 信号通路抑制基因产生双尾涡虫,抑制 *pbx*、*fst*、*islet*、*pitx* 等基因产生无头无尾涡虫。

图2 各基因干扰对涡虫AP极重建的影响

变 Wnt 通路等模式基因的表达改变涡虫的再生。这些数据提供了一个共生细菌在再生过程中调节模式基因转录来影响宿主解剖结构的独特例子^[44]。

生物电信号在再生的涡虫中与极性的调节有关^[45]。在再生前 3 h 通过使损伤组织去极化来简单地控制内源性生物电状态,能改变再生 6 h 的基因表达,并导致双头表型^[46]。Cervera 等^[47]构建了基于细胞离子通道和细胞间隙连接的头尾模式的生物电模型,证明生物电信号可以帮助分离的细胞域了解损伤后的相对位置,并有助于异常的双头状态和正常的头尾状态之间的转换。

2.2.2 DV轴、ML轴的重建

涡虫背腹轴的再生受 BMP 信号通路调节, RNA 干扰 BMP 信号配体 *bmp4* 或该通路成员 (*smad1*、*smad4*、*tolloid* 等) 影响 DV 轴的再生,导致渐进性的腹侧化,如神经索和纤毛表皮等腹侧组织出现在背侧。*bmp4* 表达下调的涡虫还会出现翻转腹部朝上的运动方式^[48-50]。通过对 BMP 信号通路的研究发现,其他通路的调节因子如 *admp*、*noggin* 和 *noggin-like* 等基因也参与 DV 轴的重建^[51-53]。同时, BMP 通路在 ML 极性中也起着重要作用^[49]。*TBX2/3* 与 *bmp4* 共表达,敲低 *TBX2/3* 会导致背侧中线突出物异位形成,中线和腹侧细胞标志物表达异常;研究发现, BMP 信号的抑制降低了 *TBX2/3* 在中线的表达,表明 *TBX2/3* 可能是 BMP 信号转导的下游基因,且是 DV 和 ML 轴重建的必需基因^[54]。*Slit* 与 *Wnt5* 相互作用参与 ML 轴的形成,其在再生过程中受到抑制可导致中轴受损^[4, 55-56]。此外, *pbx* 对 DV 轴的建立也发挥重要作用^[37]。

2.3 neoblasts的特化与分化

2.3.1 neoblasts具有异质性

流式细胞术和单细胞测序等技术揭示了 neoblasts 的异质性^[14, 57],其包括真正的多能干细胞以及产生不同的特定成熟组织的祖细胞^[57-58]。van Wolfswinkel 等^[57]将 neoblasts 分为 σ 、 ζ (表皮谱系) 和 γ (肠谱系) 三种亚型, σ Neoblasts 具有多能性并可以再生出 ζ Neoblasts。随后, ν Neoblasts 被鉴定为神经谱系细胞,该亚群是由 *Smedwi-2* mRNA、SMEDWI-1 蛋白和一组神经特异性转录因子的表达来定义的。这些细胞通常位于脑附近,由 σ Neoblasts 衍生而来,迁移到头神经节并分化为成熟的神经元。Molinari 和 Pearson^[58]使用 *in silico* 谱系示踪技术,在靠近脑的分裂干细胞亚群中识别了在 ν Neoblasts 中富集基因。Zeng 等^[59]对 *Piwi-1* mRNA 和蛋白富集的

细胞进行单细胞测序发现, 高表达 *Piwi-1* 蛋白的细胞包含不少于 12 个离散的 *neoblasts* 亚群, 其中, 表达 *tgs-1* 的 Nb2 组被认为是多能干细胞, 表达 *ston2* 的 Nb11 组被认为是神经祖细胞。这项工作完善了 *neoblasts* 的分类, 确定了 *neoblasts* 亚型的特定细胞表面标记物, 并证明多能干细胞可以从复杂组织中纯化。Niu 等^[60] 通过 SiR-DNA 和活细胞示踪对地中海涡虫中的 *Piwi-1*⁺ 细胞进行富集, 并将这些细胞命名为 SirNeoblasts; 对 SirNeoblasts 进行单细胞 RNA 测序发现, X1 细胞 (处于 S/G₂/M 时期的干细胞) 中所有谱系特异性祖细胞均在 SirNeoblasts 中以相当比例存在; 此外, SirNeoblasts 包含一个未曾在 X1 中报道的早期肌肉祖细胞亚群; 利用 *gcm* 作为标记物, 还发现了一个位于 Nb2 组中的细胞亚群, 而 *gcm* 表达量下降影响所有 *neoblasts* 的再生。这些研究为详细剖析调控涡虫脑再生的分子和细胞机制提供了新的科学视角。

2.3.2 影响 *neoblasts* 向中枢神经系统细胞特化与分化的相关基因

在涡虫再生过程中, 细胞命运的特化发生在 *neoblasts* 中^[61-62]。涡虫细胞命运的特化很可能是一个分级过程: 首先, cNeoblast 细胞初始“分化”, 形成数量相对较少的谱系限制的 *neoblast* 亚群; 在有丝分裂产生的祖细胞的分化过程中, 随着这些祖细胞向目标器官迁移, 细胞命运最终被决定^[63]。细胞特化是细胞分化发生的关键。当前在涡虫领域面临的一个主要问题是神经干细胞的细胞命运是如何被指定的, 需要相关研究以确定调节神经细胞特化的因素。

在涡虫中, 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号通路对 *neoblasts* 的调控、细胞命运的确定和中枢神经系统的再生至关重要^[64-67]。*Smed-egfr-3* 表达下调导致不对称细胞分裂失调, 可抑制胚基形成并影响头神经节和某些神经细胞分化^[64-65]。*Smed-egr-4* 是 *Smed-egfr-3* 的下游靶点, 主要在脑中表达, 是脑再生所必需的; 当 *Smed-egr-4* 被敲低后, 涡虫能够重新建立 A 极, 但不能诱导神经特化或形成脑原基^[68]。神经调节蛋白同源物 *Smed-nrg-7* 也在脑中表达, 调节干细胞的分裂和特化, 其干扰后表型与 *Smed-egfr-3* 敲降的表型一致; 生化分析表明 *Smed-nrg-7* 编码 *Smed-egfr-3* 的配体, 进一步暗示了它们在 *neoblasts* 命运决定中的作用^[64]。在 *Smed-egfr-4* 表达下调的涡虫中, 光感受器神经元和色素杯细胞的数量均显著减少; 相比之下, 特

异表达 *Smed-ovo* 和 *Smed-sp6-9* 的眼祖细胞数量增加; 以上研究表明, *Smed-egfr-4* 不是眼祖细胞特化所必需的, 而是其最终分化所必需的^[69]。

神经发生中最关键的一步是激活转录调节网络, 促进干细胞分化成特定的神经元。研究发现, 组织特异性转录因子在干细胞及其后代的亚群中表达^[70], 并且这些因子在指定神经干细胞命运中发挥重要作用。大量转录因子在涡虫不同的脑区域和受伤后的 *neoblasts* 中表达, 且与神经干细胞的特化有关^[61] (表 1)。

对 *neoblasts* 的 RNA 测序表明, 在创伤后的 *neoblasts* 中, 一些与神经系统相关的转录因子表达量升高, 如 *sp6-9*、*eya*、*ap-2*、*pax6A* 和 *otxA*^[61]。*sp6-9* 是涡虫视神经色素杯祖细胞形成和视神经杯再生所必需的; *eya* 在眼睛和原肾细胞再生中表达, 并在它们的再生中发挥作用; *otxA* 在光感受器神经元中表达, 是光感受器神经元再生所必需的; *ap2* 则与 *TrpA*⁺ 神经元的再生有关; *Pax6A* 在眼细胞中低水平表达, 但既不参与眼睛的维持也不参与眼睛的再生^[78]。此外, 其他神经系统相关基因如 *Tcf/Lef-1*、*neuroD-1* 和 *lhx2/9* 在创伤后的 *neoblasts* 中也表达。*Tcf1* 定义了脑背侧的祖细胞池, 其正常表达是 *chat*⁺、*gpas*⁺、*gad*⁺、*otp*⁺、*npp-4*⁺、*cintillo*⁺ 等几种背侧神经元再生所必需的。*Smed-tcf1* 通过抑制 *nkx2.1* 使 γ -氨基丁酸能神经元背侧化, 在 *Smed-tcf1* 缺失时, γ -氨基丁酸能神经元将会出现腹侧化^[73]。

bHLH 家族转录因子 *coe*、*hesl-3* 和 *sim* 在神经系统命运相关的干细胞子集中表达, 它们的功能对神经祖细胞的维持或分化至关重要。*coe* 在成熟的胆碱能、 γ -氨基丁酸能、章鱼能、多巴胺能和 5-羟色胺能神经元中表达, 而 *sim* 在章鱼能和多巴胺能神经元中表达。这两个基因表达下调导致再生脑变小, 并影响其中一些神经元的正常形成^[76]。

在中枢神经系统发育过程中, SoxB1 在建立和维持干细胞群、神经末段分化、维持分化细胞命运和功能等多个过程中发挥作用^[79]。地中海涡虫的基因组编码两个 *soxB1* 基因, 分别为 *Smed-soxB1-1* 和 *Smed-soxB1-2*^[80]。*Smed-soxB1-1* 在干细胞亚群中表达, 是前光感受器神经元再生所必需的^[74]。*Smed-soxB1-2* 是涡虫感觉神经元亚群分化和功能的关键调控基因, 抑制 *Smed-soxB1-2* 或其正调控基因会导致癫痫样运动, 并导致流变感和振动感丧失^[75]。

soxB2-2 和 *runt* 似乎都不是神经发生的必需基因, 但都影响神经祖细胞基因的表达, 这使得上述

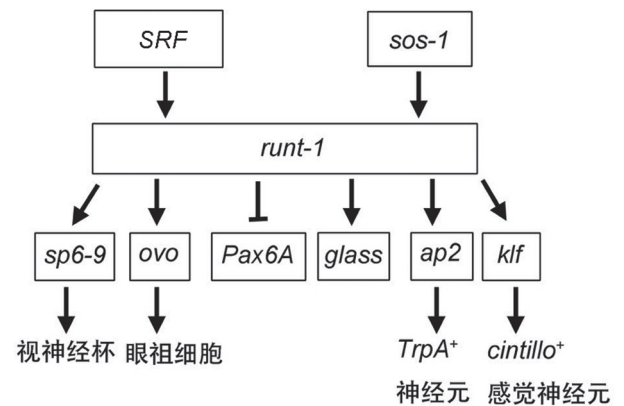
表1 与干细胞分化相关的转录因子汇总

基因	主要表达部位	影响的神经元类型	参考文献
<i>klf</i>	外周感觉神经元和脑外分支	<i>cintillo</i> ⁺ 感觉神经元	[71]
<i>ap-2</i>	<i>runt1</i> ⁺ 神经元和干细胞	<i>TrpA</i> ⁺ 神经元	[72]
<i>pax3/7</i>	脑的腹侧中线、腹神经索	多巴胺-β-羟化酶神经元	[61]
<i>tcfl</i>	神经系统和干细胞	多种背侧神经元: γ-氨基丁酸能神经元、乙酰胆碱能神经元	[61, 73]
<i>pitx</i>	血清素神经元	血清素神经元	[39, 40]
<i>lhx1/5-1</i>	血清素神经元	血清素神经元	[40, 61]
<i>soxB1-1</i>	干细胞子集	光感受器神经元	[74]
<i>soxB1-2</i>	头部周边、背纤毛条纹、咽口开口	感觉神经元	[75]
<i>soxB2-2</i>	头部细胞	多巴胺神经元	[71]
<i>nkx2.1</i>	在全身广泛表达, 中枢神经系统显著表达	腹内侧γ-氨基丁酸能、章鱼胺能神经元	[6]
<i>arx</i>	中枢神经内侧, 包括前脑和腹侧神经索	腹内侧胆碱能、章鱼胺能神经元	[6]
<i>sim</i>	脑和间质细胞	<i>npp4</i> ⁺ 、 <i>npy2</i> ⁺ 细胞	[76]
<i>coe</i>	脑和间质细胞	<i>cpp-1</i> ⁺ 、 <i>npp4</i> ⁺ 、 <i>npy2</i> ⁺ 细胞, γ-氨基丁酸能神经元, 乙酰胆碱能神经元	[76-77]
<i>hel-3</i>	脑和间质细胞	<i>cpp-1</i> ⁺ 、 <i>npp4</i> ⁺ 、 <i>npy2</i> ⁺ 细胞	[76]

两种转录因子可能影响不同的命运选择。*soxB2-2*在脑再生过程中具有促进神经前体细胞基因表达的作用^[71]。*soxB2-2*在neoblasts、neoblasts子代细胞及脑细胞中表达, 干扰*soxB2-2*可导致涡虫再生出较小的脑, 对所处水环境出现振动时的反应减弱, 并影响*hlh-1*、*otxA*、*POU2/3-2*等神经前体细胞基因的表达^[71,81]。创伤诱导*runt-1*在neoblasts中表达, 参与调节下游神经组织分化相关转录因子的表达和不同的神经元谱系的特化:*runt-1*表达下调导致*sp6-9*⁺和*ap2*⁺细胞减少, 从而影响视神经杯及*TrpA*⁺神经元的再生; 抑制*runt-1*也会导致神经前体细胞标志物*ovo*、*glass*和*klf*的表达量降低^[71-72,82]。*klf*调节脑侧神经中*cintillo*⁺细胞的再生^[61], *ovo*调控眼的再生^[74]。*SRF*和*sos-1*对诱导neoblasts中创伤诱导基因的表达具有重要作用, RNA干扰*SRF*或*sos-1*可使*runt-1*的表达量降低, 导致再生的胚基更小^[72](图3)。

在某些情况下, 神经转录因子在涡虫中被证明具有终端选择基因的功能(对于细胞整个生命周期的初始规范和神经元身份的维持是不可避免的), 例如:*Smed-lhx1/5-1*和*Smed-pitx*对5-羟色胺能神经元的维持和功能是不可或缺的^[39-40]。*Smed-cbp-3*的下调不影响涡虫胚基的生长, 但是影响了包括神经细胞在内的几个细胞系的分化^[83-84]。

经典Wnt信号通路在涡虫体轴重建的过程中发挥了重要作用, 而非经典Wnt/Ca²⁺信号通路与涡虫γ-氨基丁酸能神经元的再生有关。再生过程中,*DjWnt5a*、*DjWnt5a*下游基因*DjPLCβ*、*DjVinculin*以



涡虫受伤后*runt-1*在neoblasts中被激活, 对于正常的眼睛和特定神经元的再生有重要作用。伤口诱导*runt-1*表达需要*SRF*和*sos-1*。

图3 *runt-1*对转录因子的调控

及*DjPLCβ*的下游基因*DjCamk II*和*DjCaln*在脑中均有表达, 且表达模式相似, 它们表达量的下调可造成脑再生缺陷, 影响γ-氨基丁酸能神经元的再生, 但不影响干细胞的增殖^[85-86]。

2.4 比例重建

再生的一个重要步骤是确保所有结构都与新生涡虫的身体大小成比例, 涡虫被横向切割后产生的头部和尾部片段使用不同的机制来维持身体比例, 其中许多机制已被阐明。头部片段通过变形再生减少现有脑的大小, 以保持适当的比例, 这与细胞凋亡、自噬以及细胞凋亡引起的增殖有关^[87-89]。尾部片段切割后第3天形成脑原基, 5~7 d脑成熟, 直到10~17 d确定头部大小^[12, 87]。成纤维细胞生长因子

(FGF) 信号调节脑室的大小, 抑制其相关基因导致脑后部的巨大扩张^[90]。Wnt 家族成员 *wnt11-6* 和 Wnt 抑制剂 *notum* 形成了一个负反馈回路, 通过影响新脑细胞的生成来调节脑的大小^[5]。通过 RNA 干扰敲低 *wnt11-6* 可增加头部和躯干片段胆碱能、 γ -氨基丁酸能和化学感觉神经元的数量, 导致再生或重塑过程中的脑向后扩张, 而敲低 *notum* 则有相反的效果^[5]。基于此, 作者提出 *wnt11-6* 通过经典的 Wnt 途径, 激活其自身的抑制剂 *notum* 在脑前部的表达, *notum* 反过来通过抑制 *wnt11-6* 促进脑生长^[5]。Hippo 信号通路效应体 *yorkie* 的表达量下降会导致脑所占身体比例的增加^[91], 而 *Wnt5* 与脑的侧向扩张有关^[21, 55]。抑制 STRIPAK 复合体中的 *mob-4* 和 *striatin* 能够使 *wnt1*⁺ 信号向前扩张, 导致涡虫咽后组织明显变长, 说明 STRIPAK 通过抑制 Wnt 信号通路来调节涡虫体长^[92]。

2.5 功能恢复

脑再生不仅包括组织的正常生成, 还包括功能的恢复。涡虫的脑侧神经和耳廓被证明对化学感觉行为很重要^[9, 93]。*FLI-1* 编码 ets 家族转录因子, 该转录因子在涡虫脑侧神经的许多细胞中表达, 与对照组涡虫相比, 干扰 *FLI-1* 的涡虫迷宫喂养实验完成度显著降低, 但是其运动能力与对照组相比没有缺陷, 说明 *FLI-1* 对于在再生过程中恢复化学感觉功能非常重要^[71]。

Netrins 和 *Slits* 以轴突引导作用而闻名, 对于再生涡虫的新旧神经组织的重新连接和未受伤涡虫的神经结构的维持都是必要的^[4, 94-97]。*Smed-netrin2* 或 *netrin2* 受体基因 *Smed-netR* (与 *Dj-dcc* 同源) 敲降可导致轴突投射网络紊乱, 并使脑沿中外侧轴异位生长^[95, 97]。同样, *Smed-netrin2* 或 *Smed-netR* 功能缺失会导致光感受神经元与脑连接的缺失和负趋光性行为损伤^[95]。这可能与表达 *Dj-unc5A* 和 *Dj-dcc* 受体的光感受器神经元和脑之间的协同信号传递有关^[97-98]。RNA 干扰 *Smed-roboA* 导致视觉轴突从中心部分向前延伸, 同时干扰 *DjRoboA* 与 *DjnetB* (直接同源 *Smed-netrin2*) 或 *Netrin* 受体 *Dj-unc5A*, 导致视觉轴突完全断开^[96-97]。网格蛋白介导的内吞作用也被证明是神经元环路形成的必要条件, 其功能的丧失会导致涡虫脑神经元的形态缺陷、萎缩和死亡^[99]。细胞黏附分子 *Dj-CAM* 和 *Dj-DSCAM* 在成熟 CNS 中表达, 在再生过程中差异表达, 并在轴突形成、神经元细胞迁移、轴突生长、成束和投射中发挥作用; 抑制其表达可导致神经网络紊乱、侧

神经分支减少并损害轴突成束^[100]。

转录因子 *Smed-arrow* 和 *Smed-coe* 也参与神经系统回路的恢复。干扰 *Smed-arrowhead* 可导致脑叶无法在前连合处重新连接, 并且出现光感受器轴突模式缺陷^[71]。当再生过程中 *Smed-coe* 的表达被抑制时, 脑前连合也无法重新连接, 脑中的轴突投射显著减少^[76-77]。

神经递质系统的扰动或参与突触传递或神经肽加工的基因被抑制对神经系统功能也会产生深远的影响^[99, 101-102]。抑制 *Smed-pc2* 可损害运动能力, 多巴胺能信号中断可导致严重的运动缺陷^[103-105]。

3 总结与展望

与哺乳动物相比, 涡虫的脑具有大部分相同的神经递质和神经元细胞类型: 涡虫的脑是由多巴胺能、5-羟色胺能、章鱼胺能和 γ -氨基丁酸能等许多不同的神经元群组成的, 构成了不同的神经网络^[12]; 涡虫脑神经元表现出典型的脊椎动物神经元特征, 如涡虫神经元为多极神经元, 具有带突触结的树突棘, 具有单个轴突等^[106]; 涡虫的基因组拥有数百个神经系统相关基因, 这些基因在其他动物(包括人类和小鼠)中高度保守^[107-108]。本实验室对涡虫基因的功能研究也证实了其分子信号通路的保守性: *Rho* GTP 酶参与神经元的发育、分化和再生^[109-111], 而对东亚三角涡虫的研究发现, *RhoA*、*Cdc42*、*Rac1* 均参与涡虫的再生, *Cdc42* 在涡虫表皮再生过程中具有抑制细胞凋亡的作用^[112-113], *DjRhoA* 的下调导致涡虫再生出较小的脑并影响侧神经的再生^[114]。*miR-124* 家族在动物中高度保守, 通过促进神经分化调控神经发生, 而该家族对地中海涡虫脑和视觉系统的再生至关重要^[115], 敲低其在东亚三角涡虫中的同源序列 *dja-miR-124c1* 和 *dja-miR-124c2* 同样可导致头部病变、眼睛缺失和独眼等表型^[116], 证实了 *miR-124* 在再生过程中高度保守的作用。此外, *miR-8b* 敲低影响 *eye-53* 的表达, 可导致眼点缺失, 同时使涡虫再生出较小的脑^[117]。综上所述, 涡虫不仅是最早拥有脑的动物, 而且可能是脊椎动物脑的祖先, 脑的基本机制可能是在中枢神经系统进化的早期过程中获得的^[106, 118-119]。在神经生物学领域, 特别是神经再生领域, 涡虫是研究神经组织重建、功能恢复和简单学习行为的复杂机制的良好模型^[12]。然而, 对涡虫神经再生机制的了解还只是开始, 对受伤的神经元和轴突如何再生并整合到现有的神经回路中等问题依然知之甚少。

对于成体干细胞的异质性以及干细胞和神经元之间的谱系, 还需要进一步的研究, 以充分理解涡虫如何指导和控制无限的成体神经发生。尽管还有许多有待研究的问题, 涡虫成体干细胞的潜能、信号通路的保守性以及模型的可塑性, 依然为再生医学领域带来了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 2013, 153: 1219-27
- [2] Vasic V, Barth K, Schmidt MHH. Neurodegeneration and neuro-regeneration--Alzheimer's disease and stem cell therapy. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 4272
- [3] Petrova V, Pearson CS, Ching J, et al. Protrudin functions from the endoplasmic reticulum to support axon regeneration in the adult CNS. *Nat Commun*, 2020, 11: 5614
- [4] Cebrià F, Guo T, Jopek J, et al. Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol*, 2007, 307: 394-406
- [5] Hill EM, Petersen CP. Wnt/Notum spatial feedback inhibition controls neoblast differentiation to regulate reversible growth of the planarian brain. *Development*, 2015, 142: 4217-29
- [6] Currie KW, Molinaro AM, Pearson BJ. Neuronal sources of hedgehog modulate neurogenesis in the adult planarian brain. *Elife*, 2016, 5: e19735
- [7] Agata K, Soejima Y, Kato K, et al. Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zool Sci*, 1998, 15: 433-40
- [8] Okamoto K, Takeuchi K, Agata K. Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zool Sci*, 2005, 22: 535-46
- [9] Pigon A, Morita M, Best JB. Localization and identification of the receptors by electron micrographic and ablation studies. *J Neurobiol*, 1974, 5: 443-62
- [10] Sakai F, Agata K, Orii H, et al. Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians -- eye regeneration field and pathway selection by optic nerves. *Zool Sci*, 2000, 17: 375-81
- [11] Umesono Y, Watanabe K, Agata K. Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev Genes Evol*, 1999, 209: 31-9
- [12] Ross KG, Currie KW, Pearson BJ, et al. Nervous system development and regeneration in freshwater planarians. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2017, 6: e266
- [13] Rossi L, Salvetti A, Batistoni R, et al. Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 16
- [14] Alessandra S, Rossi L. Planarian stem cell heterogeneity. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1123: 39-54
- [15] Saló E, Bagaña J. Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol*, 1984, 83: 63-80
- [16] Wenemoser D, Reddien PW. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol*, 2010, 344: 979-91
- [17] Saló E, Bagaña J. Regeneration and pattern formation in planarians. II. and role of cell movements in blastema formation. *Development*, 1989, 107: 69-76
- [18] Han XS, Wang C, Guo FH, et al. Neoblast-enriched zinc finger protein FIR1 triggers local proliferation during planarian regeneration. *Protein Cell*, 2019, 10: 43-59
- [19] Abnave P, Aboukhatwa E, Kosaka N, et al. An X-ray shielded irradiation assay reveals EMT transcription factors control pluripotent adult stem cell migration *in vivo* in planarians. *Development*, 2017, 144: 3440
- [20] Witchley J, Mayer M, Wagner D, et al. Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. *Cell Rep*, 2013, 4: 633-41
- [21] Adell T, Saló E, Boutros M, et al. Smed-Evi/Wntless is required for β -catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development*, 2009, 136: 905-10
- [22] Petersen CP, Reddien PW. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 17061-6
- [23] Almuedo-Castillo M, Saló E, Adell T. Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 2813-8
- [24] Owen JH, Wagner DE, Chen CC, et al. *teashirt* is required for head-versus-tail regeneration polarity in planarians. *Development*, 2015, 142: 1062-72
- [25] Sureda-Gómez M, Pascual-Carreras E, Adell T. Posterior Wnts have distinct roles in specification and patterning of the planarian posterior region. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 26543-54
- [26] Auwal MA, Kashima M, Nishimura O, et al. Identification and characterization of a fibroblast growth factor gene in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ*, 2020, 62: 527-39
- [27] Stückemann T, Cleland JP, Werner S, et al. Antagonistic self-organizing patterning systems control maintenance and regeneration of the anteroposterior axis in planarians. *Dev Cell*, 2017, 40: 248-63.e4
- [28] Pascual-Carreras E, Sureda-Gómez M, Barrull-Mascaró R, et al. WNT-FRIZZLED-LRP5/6 signaling mediates posterior fate and proliferation during planarian regeneration. *Genes (Basel)*, 2021, 12: 101
- [29] Gurley KA, Rink JC, Alvarado AS. β -Catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science*, 2008, 319: 323-7
- [30] Petersen CP, Reddien PW. Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science*, 2011, 332: 852-5
- [31] Roberts-Galbraith RH, Newmark PA. Follistatin antagonizes Activin signaling and acts with Notum to direct planarian head regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110:

- 1363-8
- [32] Vasquez-Doorman C, Petersen CP. *zic-1* expression in planarian neoblasts after injury controls anterior pole regeneration. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004452
- [33] Vogg MC, Owlarn S, Perez Rico YA, et al. Stem cell-dependent formation of a functional anterior regeneration pole in planarians requires *Zic* and Forkhead transcription factors. *Dev Biol*, 2014, 390: 136-48
- [34] Iglesias M, Gomez-Skarmeta JL, Saló E, et al. Silencing of *Smed-βcatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development*, 2008, 135: 1215-21
- [35] Yazawa S, Umesono Y, Hayashi T, et al. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 22329-34
- [36] Rink JC, Gurley KA, Elliott SA, et al. Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science*, 2009, 326: 1406-9
- [37] Chen CC, Wang IE, Reddien PW. *pbx* is required for pole and eye regeneration in planarians. *Development*, 2013, 140: 719-29
- [38] Hayashi T, Motoishi M, Yazawa S, et al. A LIM-homeobox gene is required for differentiation of Wnt-expressing cells at the posterior end of the planarian body. *Development*, 2011, 138: 3679-88
- [39] Marz M, Seebeck F, Bartscherer K. A *Pitx* transcription factor controls the establishment and maintenance of the serotonergic lineage in planarians. *Development*, 2013, 140: 4499-509
- [40] Currie KW, Pearson BJ. Transcription factors *lhx1/5-1* and *pitx* are required for the maintenance and regeneration of serotonergic neurons in planarians. *Development*, 2013, 140: 3577-88
- [41] Gaviño MA, Wenemoser D, Wang IE, et al. Tissue absence initiates regeneration through Follistatin-mediated inhibition of Activin signaling. *Elife*, 2013, 2: e00247
- [42] Tewari AG, Owen JH, Petersen CP, et al. A small set of conserved genes, including *sp5* and *hox*, are activated by Wnt signaling in the posterior of planarians and coelms. *PLoS Genet*, 2019, 15: e1008401
- [43] Cloutier JK, McMann CL, Oderberg IM, et al. *Activin-2* is required for regeneration of polarity on the planarian anterior-posterior axis. *PLoS Genet*, 2021, 17: e1009466
- [44] Williams KB, Bischof J, Lee FJ, et al. Regulation of axial and head patterning during planarian regeneration by a commensal bacterium. *Mech Dev*, 2020, 163: 103614
- [45] Sureda-Gomez M, Adell T. Planarian organizers. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 87: 95-104
- [46] Durant F, Bischof J, Fields C, et al. The role of early bioelectric signals in the regeneration of planarian anterior/posterior polarity. *Biophys J*, 2019, 116: 948-61
- [47] Cervera J, Meseguer S, Levin M, et al. Bioelectrical model of head-tail patterning based on cell ion channels and intercellular gap junctions. *Bioelectrochemistry*, 2020, 132: 107410
- [48] Molina MD, Saló E, Cebrià F. The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev Biol*, 2007, 311: 79-94
- [49] Reddien PW, Bermange AL, Kicza AM, et al. BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. *Development*, 2007, 134: 4043-51
- [50] Orii H, Watanabe K. Bone morphogenetic protein is required for dorso-ventral patterning in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ*, 2010, 49: 345-9
- [51] Gaviño MA, Reddien PW. A *Bmp/Admp* regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. *Curr Biol*, 2011, 21: 294-9
- [52] Molina MD, Neto A, Maeso I, et al. *Noggin* and *Noggin*-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr Biol*, 2011, 21: 300-5
- [53] Molina MD, Saló E, Francesc C. Expression pattern of the expanded *noggin* gene family in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Gene Expr Patterns*, 2009, 9: 246-53
- [54] Tian Q, Sun Y, Gao T, et al. *TBX2/3* is required for regeneration of dorsal-ventral and medial-lateral polarity in planarians. *J Cell Biochem*, 2021, 122: 731-8
- [55] Gurley KA, Elliott SA, Simakov O, et al. Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol*, 2010, 347: 24-39
- [56] Atabay KD, LoCascio SA, de Hoog T, et al. Self-organization and progenitor targeting generate stable patterns in planarian regeneration. *Science*, 2018, 360: 404-9
- [57] van Wolfswinkel JC, Wagner DE, Reddien PW. Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 326-39
- [58] Molinaro AM, Pearson BJ. *In silico* lineage tracing through single cell transcriptomics identifies a neural stem cell population in planarians. *Genome Biol*, 2016, 17: 87
- [59] Zeng A, Li H, Guo L, et al. Prospectively isolated tetraspanin⁺ neoblasts are adult pluripotent stem cells underlying planaria regeneration. *Cell*, 2018, 173: 1593-608.e20
- [60] Niu K, Xu H, Xiong YZ, et al. Canonical and early lineage-specific stem cell types identified in planarian *SirNeoblasts*. *Cell Regen*, 2021, 10: 15
- [61] Scimone ML, Kravarik KM, Lapan SW, et al. Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 339-52
- [62] Reddien PW. The cellular and molecular basis for planarian regeneration. *Cell*, 2018, 175: 327-45
- [63] Ivankovic M, Haneckova R, Thommen A, et al. Model systems for regeneration: planarians. *Development*, 2019, 146: dev167684
- [64] Lei K, Vu TK, Mohan RD, et al. *Egf* signaling directs neoblast repopulation by regulating asymmetric cell division in planarians. *Dev Cell*, 2016: 413-29
- [65] Fraguas S, Barberán S, Cebrià F. *EGFR* signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev Biol*, 2011,

- 354: 87-101
- [66] Barberán S, Martín-Durán JM, Cebrià F. Evolution of the EGFR pathway in Metazoa and its diversification in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Sci Rep*, 2016, 6: 28071
- [67] Barberán S, Cebrià F. The role of the EGFR signaling pathway in stem cell differentiation during planarian regeneration and homeostasis. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 87: 45-57
- [68] Fraguas S, Barberán S, Iglesias M, et al. *egr-4*, a target of EGFR signaling, is required for the formation of the brain primordial and head regeneration in planarians. *Development*, 2014, 141: 1835-47
- [69] Emili E, Esteve Pallarès M, Romero R, et al. *Smed-egr-4* is required for planarian eye regeneration. *Int J Dev Biol*, 2019, 63: 9-15
- [70] Adler CE, Sánchez Alvarado A. Types or states? Cellular dynamics and regenerative potential. *Trends Cell Biol*, 2015, 25: 687-96
- [71] Roberts-Galbraith RH, Brubacher JL, Newmark PA. A functional genomics screen in planarians reveals regulators of whole-brain regeneration. *Elife*, 2016, 5: e17002
- [72] Wenemoser D, Lapan SW, Wilkinson AW, et al. A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev*, 2012, 26: 988-1002
- [73] Brown DDR, Molinaro AM, Pearson BJ. The planarian TCF/LEF factor *Smed-tefl* is required for the regeneration of dorsal-lateral neuronal subtypes. *Dev Biol*, 2018, 433: 374-83
- [74] Lapan SW, Reddien PW. Transcriptome analysis of the planarian eye identifies *ovo* as a specific regulator of eye regeneration. *Cell Rep*, 2012, 2: 294-307
- [75] Ross KG, Molinaro AM, Romero C, et al. SoxB1 activity regulates sensory neuron regeneration, maintenance, and function in planarians. *Dev Cell*, 2018, 47: 331-47.e5
- [76] Cowles MW, Brown DD, Nisperos SV, et al. Genome-wide analysis of the bHLH gene family in planarians identifies factors required for adult neurogenesis and neuronal regeneration. *Development*, 2013, 140: 4691-702
- [77] Cowles MW, Omuro KC, Stanley BN, et al. COE loss-of-function analysis reveals a genetic program underlying maintenance and regeneration of the nervous system in planarians. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004746
- [78] Pineda D, Rossi L, Batistoni R, et al. The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent. *Development*, 2002, 129: 1423-34
- [79] Wegner M, Stolt CC. Sox transcription factors in neural development [M]//Thiel G. Transcription factors in the nervous system: development, brain function, and diseases. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006: 181-203
- [80] Grohme MA, Schloissnig S, Rozanski A, et al. The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature*, 2018, 554: 56-61
- [81] Labbé R, Irimia M, Currie KW, et al. A comparative transcriptomic analysis reveals conserved features of stem cell pluripotency in planarians and mammals. *Stem Cells*, 2012, 30: 1734-45
- [82] Sandmann T, Vogg MC, Owlarn S, et al. The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Genome Biol*, 2011, 12: R76
- [83] Fraguas S, Cárcel S, Vivancos C, et al. CREB-binding protein (CBP) gene family regulates planarian survival and stem cell differentiation. *Dev Biol*, 2021, 476: 53-67
- [84] Stelman CR, Smith BM, Chandra B, et al. CBP/p300 homologs CBP2 and CBP3 play distinct roles in planarian stem cell function. *Dev Biol*, 2021, 473: 130-43
- [85] Zhen H, Deng H, Song Q, et al. The Wnt/Ca²⁺ signaling pathway is essential for the regeneration of GABAergic neurons in planarian *Dugesia japonica*. *FASEB J*, 2020, 34: 16567-80
- [86] Zhen H, Wu S, Zheng M, et al. The planarian Vinculin is required for the regeneration of GABAergic neurons in *Dugesia japonica*. *Exp Cell Res*, 2019, 383: 111540
- [87] Birkholz TR, Van Huizen AV, Beane WS. Staying in shape: planarians as a model for understanding regenerative morphology. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 87: 105-15
- [88] Pascual-Carreras E, Marin-Barba M, Herrera-Úbeda C, et al. Planarian cell number depends on blitzschnell, a novel gene family that balances cell proliferation and cell death. *Development*, 2020, 147: dev184044
- [89] Felix DA, Gutiérrez-Gutiérrez Ó, Espada L, et al. It is not all about regeneration: planarians striking power to stand starvation. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 87: 169-81
- [90] Cebrià F, Kobayashi C, Umeson Y, et al. FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature*, 2002, 419: 620-4
- [91] Lin AYT, Pearson BJ. Yorkie is required to restrict the injury responses in planarians. *PLoS Genet*, 2017, 13: e1006874
- [92] Schad EG, Petersen CP. STRIPAK limits stem cell differentiation of a WNT signaling center to control planarian axis scaling. *Curr Biol*, 2020, 30: 254-63.e2
- [93] Oviedo NJ, Newmark PA, Sánchez Alvarado A. Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev Dyn*, 2010, 226: 326-33
- [94] Killeen MT, Sybingco SS. Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev Biol*, 2008, 323: 143-51
- [95] Cebrià F, Newmark PA. Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development*, 2005, 132: 3691-703
- [96] Cebria F, Newmark PA. Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following roboA RNAi in planarians. *Development*, 2007, 134: 833-7
- [97] Yamamoto H, Agata K. Optic chiasm formation in planarian I: cooperative netrin- and robo-mediated signals are required for the early stage of optic chiasm formation. *Dev Growth Differ*, 2011, 53: 300-11
- [98] Cebria F, Nakazawa M, Mineta K, et al. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the

- expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ*, 2010, 44: 135-46
- [99] Inoue T, Hayashi T, Tak Ec Hi K, et al. Clathrin-mediated endocytic signals are required for the regeneration of, as well as homeostasis in, the planarian CNS. *Development*, 2007, 134: 1679-89
- [100] Fusaoka E, Inoue T, Mineta K, et al. Structure and function of primitive immunoglobulin superfamily neural cell adhesion molecules: a lesson from studies on planarian. *Genes Cells*, 2006, 11: 541-55
- [101] Takano T, Pulvers JN, Inoue T, et al. Regeneration-dependent conditional gene knockdown (Readyknock) in planarian: demonstration of requirement for *Djsnap-25* expression in the brain for negative phototactic behavior. *Dev Growth Differ*, 2007, 49: 383-94
- [102] Talbot JA, Currie KW, Pearson BJ, et al. *Smed-dynA-1* is a planarian nervous system specific dynamin 1 homolog required for normal locomotion. *Biol Open*, 2014, 3: 627-34
- [103] Reddien PW, Bermange AL, Murfitt KJ, et al. Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell*, 2005, 8: 635-49
- [104] Nishimura K, Kitamura Y, Inoue T, et al. Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. *Dev Neurobiol*, 2010, 67: 1059-78
- [105] Nogi T, Zhang D, Chan JD, et al. A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated Ca^{2+} channel β subunits: subversion of flatworm regenerative polarity. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3: e464
- [106] Buttarelli FR, Pellicano C, Pontieri FE. Neuropharmacology and behavior in planarians: translations to mammals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008, 147: 399-408
- [107] Mineta K, Nakazawa M, Cebria F, et al. Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 7666-71
- [108] Ireland D, Bochenek V, Chaiken D, et al. *Dugesia japonica* is the best suited of three planarian species for high-throughput toxicology screening. *Chemosphere*, 2020, 253: 126718
- [109] Kalpachidou T, Spiecker L, Kress M, et al. Rho GTPases in the physiology and pathophysiology of peripheral sensory neurons. *Cells*, 2019, 8: 591
- [110] Boueid MJ, Mikdache A, Lesport E, et al. Rho GTPases signaling in zebrafish development and disease. *Cells*, 2020, 9: 2634
- [111] Mertsch S, Neumann I, Rose C, et al. The effect of Rho kinase inhibition on corneal nerve regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Ocul Surf*, 2021, 22: 213-23
- [112] Sun YJ, Gao TT, Li JX, et al. Cdc42 regulate the apoptotic cell death required for planarian epidermal regeneration and homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 112: 107-13
- [113] Xu Z, Han Y, Li X, et al. Molecular cloning and characterization of DjRac1, a novel small G protein gene from planarian *Dugesia japonica*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526: 865-70
- [114] Song Q, Zhen H, Liu H, et al. A novel RhoA-related gene, *DjRhoA*, contributes to the regeneration of brain and intestine in planarian *Dugesia japonica*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 533: 1359-65
- [115] Sasidharan V, Marepally S, Elliott SA, et al. The *miR-124* family of microRNAs is crucial for regeneration of the brain and visual system in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Development*, 2017, 144: 3211-23
- [116] Cao Z, Rosenkranz D, Wu S, et al. Different classes of small RNAs are essential for head regeneration in the planarian *Dugesia japonica*. *BMC Genomics*, 2020, 21: 876
- [117] Liu H, Song Q, Zhen H, et al. miR-8b is involved in brain and eye regeneration of *Dugesia japonica* in head regeneration. *Biol Open*, 2021, 10: bio058538
- [118] Cebrià F. Regenerating the central nervous system: how easy for planarians! *Dev Genes Evol*, 2007, 217: 733-48
- [119] Pagán OR, Baker DL, Deats S, et al. Measuring functional brain recovery in regenerating planarians by assessing the behavioral response to the cholinergic compound cytisine. *Int J Dev Biol*, 2020, 64: 445-52