

## 组织再生研究进展

丁小燕\*, 李双伟

(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**[摘要]** 几百年来,人们一直对自然界中的再生现象怀有极大的兴趣。随着分子生物学研究手段的发展,人们在分子水平上对再生的机制有了更深入的认识。目前对两栖类再生的分子机制研究已经越来越深入,而且越来越多的实验证明哺乳类动物也具有再生能力,至少两栖类和哺乳类在损伤修复中的机制可能是保守的。因此,对再生的机制研究有可能在临床上为损伤修复带来更好的治疗手段。本文希望通过对蝾螈附肢与哺乳动物再生能力及机制研究的介绍,使读者能对这一领域有初步的认识。

**[关键词]** 组织;再生;分子机制

**[中图分类号]** R 329.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0233-04

### Progress of research on tissue regeneration

DING Xiao-yan\*, LI Shuang-wei (Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**[ABSTRACT]** For hundreds of years, scientists have been inspired by the regeneration phenomena in nature. Thanks to the development in the research tools for molecular biology, our understanding of the underlying molecular mechanisms involved in regeneration has been greatly deepened. Besides the increasing knowledge obtained from the studies on the molecular mechanisms of amphibian regeneration, accumulating evidence has proved that mammals may also have regenerative property, and the repair mechanisms should be conserved cross the species. Therefore, better clinical therapies are expected with the elucidation of regeneration mechanisms. Through introduction of the recent progress in amphibian appendage and mammalian regeneration, we expect the readers to have the fundamental understanding in this promising field.

**[KEY WORDS]** tissues; regeneration; molecular mechanism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 233-236]

### 1 再生研究的历史

再生是修复的一种,凡是发育成熟的个体在受损后仍能在已有组织的基础上重新形成已失去部分的现象都属于再生<sup>[1]</sup>。早在1712年,法国科学家Reaumur就观察到龙虾可以长出失去的附肢和螯。18世纪40年代,瑞士科学家Trembley开始研究水螅,观察到被截断的头部和尾部都可以独立再生形成既有头又有尾的完整个体。后来,Pallas发现涡虫也可以像水螅一样进行头尾的双向再生。意大利科学家Spallanzani在18世纪60年代第一次观察到有尾两栖类蝾螈的附肢、尾和颌都能再生,并第一次注意到无尾两栖类蝌蚪的尾巴可以再生。现代遗传学的奠基人Morgan对再生的研究也有重要的贡献,至今仍广泛使用的术语变形再生(morphallaxis)和渐进再生(epimorphosis)就是由他提出来的<sup>[2]</sup>。

变形再生是指体内原已存在的干细胞定向分化形成缺失的身体部分,这个过程中没有细胞的重新增殖,最典型的例子便是腔肠动物水螅;而渐进再生

则包含已分化细胞的重新增殖过程。有些生物渐进再生时会在伤处形成一种称为再生芽基的圆锥状结构,它由外面的愈伤表皮和内部的间充质细胞(mesenchyme)构成。这里的间充质细胞一般认为是由肌肉、软骨等中胚层来源的细胞去分化而形成的,在再生的过程中主要由它们分化发育成再生出来的结构。蝾螈的附肢再生和蝌蚪尾巴的再生都属于这种有再生芽基的再生。有尾两栖类晶状体受损后,虹膜的色素上皮细胞会重新进入细胞周期并专一性地转分化成晶状体细胞。这种由某种细胞类型专一性地转变成另一种细胞类型的转分化现象并不伴随再生芽基的产生,所以被称为没有再生芽基的再生。哺乳动物肝受损后肝细胞的有限去分化和增殖以及受损组织中干细胞的增殖分化等过程也都属于这种再生。

**[基金项目]** 上海市科委重大项目(03DJ14019)。

**[作者简介]** 丁小燕(1949-),女(汉族),研究员,博士生导师。

\* Corresponding author. E-mail: xyding@sunm.shenc.ac.cn

以前对再生的研究多集中在对具有再生能力的各种动物再生过程的观察、描述上,而现代分子生物学、细胞生物学和再生医学的发展使我们有可能在分子水平上对再生过程中的细胞去分化、再生结构重新定位等问题进行深入了解。同时,再生现象分子机制的阐明对我们进一步了解个体发生、形态建成等过程也会有所帮助。近年来,对有尾两栖类再生的分子机制的研究越来越深入,同时人们对哺乳动物的肌肉、中枢神经系统再生的研究也都有突破性进展。具有再生能力的 MRL 品系小鼠的发现更为人类实现再生的梦想带来了希望。本文将对以上这几个方面的进展进行介绍。

## 2 有尾两栖类的附肢再生

**2.1 附肢再生的过程** 尽管具有再生能力的物种很多,脊椎动物中成体附肢能再生的却只有有尾两栖类的蝾螈和钝口螈<sup>[3]</sup>。蝾螈的附肢再生过程可以分为伤口愈合、去分化和再发育 3 个阶段。当蝾螈附肢(前肢或后肢)被切除后,表皮收缩使伤口愈合,表皮细胞迅速迁移,形成伤愈表皮。同时伤处会发生组织自溶,将细胞从器官组织中释放出来,被释放的细胞丧失特化的表型,去分化为间充质细胞并重新进入细胞周期,分裂增殖形成再生芽基。这个过程伴随着切口处细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的溶解和组成成分的变化。当再生芽基形成之后,它会以与胚胎发育时附肢原基发育相类似的过程重新形成完整的附肢。

**2.2 附肢再生过程中的重要分子** 有许多因子可能参与使已分化细胞重新进入 S 期和有丝分裂的过程,包括凝血酶、胰岛素、生长激素和甲状腺素等。当蝾螈附肢被切除后,血清中的凝血酶原会被激活为凝血酶,然后凝血酶通过切割某种可溶性蛋白将其作用激活,从而刺激分化细胞重新进入 S 期进行复制<sup>[4]</sup>。

愈伤表皮细胞和神经细胞也会提供细胞周期调控相关的蛋白质,作用于再生芽基细胞。一些实验结果显示,愈伤表皮所产生的增殖刺激因子有一部分很可能是 FGF 家族成员。这是因为:(1)FGF-1, 2, 4 的受体 FGFR-1 在成体蝾螈早期再生芽基的间充质细胞中表达;(2)爪蟾在变态前前肢可以完全再生,但变态后随着 FGFR-1, FGFR-2 基因在再生芽基中表达的丧失,爪蟾前肢就只能进行部分再生。

同样,FGF 受体的阻抑物会导致变态前爪蟾的不完全再生;(3)FGF-1 可以刺激爪蟾附肢再生芽基细胞的体外分裂,而浸渍了 FGF-2 的硅胶片植入体内时也可以刺激它们的有丝分裂<sup>[5]</sup>。

关于神经在再生过程中的作用一直有争议。庄孝惠和王亚辉在 1954 年发现割除神经板的东方蝾螈幼虫,虽然根本不存在神经但仍可以进行正常的再生,证明神经在再生芽基的形成以及进一步分化的过程中都没有作用<sup>[6]</sup>。随后细胞所的戴荣禧在同样割除神经板的东方蝾螈幼虫中,证明摘除肱骨后,蝾螈不但可以再生,而且由肌肉和结缔组织去分化而来的再生芽基细胞也能分化出软骨,进一步明确了再生芽基细胞的来源<sup>[7]</sup>。

尽管每个再生芽基中的细胞在再生过程中具有可塑性,即并不完全按照去分化前的细胞类型发育,但整个再生芽基的发育过程却是由再生起始位置决定的<sup>[4]</sup>,即再生出的组织可以自主的调整其形态和体积使其与失去的部分的形态和体积保持一致。视黄酸(retinoic acid, RA)是所有参与两栖类再生时附肢重新定位精确性的分子中研究的最清楚的。视黄酸通过与核转录因子受体结合并识别特异的 DNA 序列来启动 RA 应答基因的表达,从而调控再生的过程。RA 能在附肢再生的过程中重新确定近/远端轴(proximal-distal axis, PD axis),在某些情况下也可以确定背腹轴和前后轴,而且在有些无尾两栖类的蝌蚪中,RA 能使尾部再生芽基的位置信息近端化使其再发育出额外的后腿<sup>[8]</sup>。

## 3 哺乳动物再生的研究

**3.1 肌肉细胞去分化的研究** 一般认为哺乳动物不能进行渐进再生的原因是已分化的组织不能去分化重新进入细胞周期进行增殖。肌微管是成肌细胞分化后融合而成的多核细胞,通过观察细胞核数目的变化可以直观地观察到去分化的过程,因此这个模型为研究参与去分化过程中的因子提供了方便。

以前的研究表明,凝血酶不能像作用于蝾螈肌微管细胞一样刺激小鼠 C2C12 细胞分化形成的肌微管重新进入细胞周期,所以当时认为哺乳动物至少在细胞水平存在再生能力的差异<sup>[3]</sup>。而 Keating 实验室的工作则显示哺乳动物与两栖类再生的差别可能并没有像以前认为的那么大。当在体外诱导分化蝾螈 A1 细胞和小鼠 C2C12 细胞形成的肌微管中



加入蝶螈再生芽基的抽提物时,二者都出现了去分化的现象。这意味着哺乳动物本身并不缺乏去分化所需的内源性的信号通路,而是因为缺少引发去分化的外源性信号,所以造成哺乳动物不能再生<sup>[10]</sup>。

*msx1* 基因编码一个包含同源框的核转录抑制因子,它在蝶螈细胞去分化起重要作用。当在体外分化的小鼠 C2C12 细胞形成的肌微管中表达 *msx1* 时,细胞会发生去分化<sup>[11]</sup>。这些实验都显示哺乳动物至少在细胞水平保持去分化再生的能力,但我们对去分化过程分子机制的认识还很初步,必须做出更多的基础研究才可能为临床研究提供理论基础。

**3.2 中枢神经系统轴突的再生** 中枢神经系统的损伤一般都伴随着轴突的严重损坏和神经元的死亡。所以治疗神经系统损伤疾病有以下 2 个思路:其一是在损伤部位植入外源的干细胞或部分分化的神经元,从而分化替代已损伤的神经元;其二是最大限度的激活神经系统本身的再生能力,从而修复损伤的神经系统<sup>[12]</sup>。两种途径中,前者一直受到广泛的关注,而最近一系列关于中枢神经系统轴突再生的研究显示后者或许会是一种更有效的途径。

事实上,哺乳动物中枢神经系统轴突是具有再生能力的,但是它的再生受到了周围环境中某些因子的抑制,尤其是髓鞘中髓磷脂的抑制作用。髓磷脂是由少突神经胶质细胞分泌的包含多种脂类和蛋白质的复合成分,当受到损伤的神经纤维接触到它时,再生便会受到抑制。这显示髓磷脂中必定包含有抑制轴突再生的成分。其中已有 3 种分子被证实对轴突再生有抑制作用,分别是 Nogo-A 分子、髓磷脂相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)和少突神经胶质细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp)<sup>[13]</sup>。

Nogo-A 分子含有两个抑制轴突再生的结构域,其中一个抑制结构域是一段含有 66 个氨基酸的序列,位于少突神经胶质细胞外表面,被称为 Nogo-66。Nogo-66、MAG 和 OMgp 具有共同的受体——Nogo 受体(NgR),而 NgR 又通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定在神经元细胞膜上。Nogo-66、MAG 和 OMgp 这 3 种分子都可以与 NgR 结合,然后 NgR 通过穿膜的 P75 蛋白将信号传入膜内,通过 Rho 鸟苷酸三磷酸酶等一系列膜内蛋白的作用,最终抑制轴突的再生<sup>[13~16]</sup>。既然 3 种抑制分子具有共同的受体,人们设想是否可以通过失活 NgR,从而使损

伤的轴突再生。实验表明,除去 GPI 耦联蛋白、用功能缺失的 NgR 转染细胞或者加入 NgR 的抗体,都可以消除 3 种分子对轴突再生的抑制。尽管这些成果要应用于治疗还要做很多工作,但确实为我们治疗神经损伤提供了一种新的思路。

### 3.3 哺乳动物再生研究的重要模型——MRI 品系小鼠

以前人们通常认为只有低等的脊椎动物才具有再生的能力,而哺乳动物则不能再生。当哺乳动物受到损伤时,成纤维细胞会迁移到受损部位形成颗粒组织,最后形成主要由胶原构成的无结构的瘢痕。但是 1998 年 Heber-Katz 等<sup>[17]</sup>发现 MRI 品系小鼠也具有再生能力,并以此为模型进行了一系列的深入研究。MRI 品系小鼠 *fas* 基因突变体的淋巴细胞能快速增殖造成自身免疫疾病,最初是用作全身性红斑狼疮的实验模型。但 MRI 品系小鼠耳朵上用来标记所打的孔能在短期内闭合,而不像其他品系的小鼠一样结痂并造成永久的损伤。只需要不到 4 周的时间,MRI 品系小鼠耳朵上的一个直径 2 mm 的孔就可以闭合,而且再生的部分具有正常的真皮、组织有序的 ECM、脉管系统和软骨。该品系的小鼠受伤后上皮细胞会迅速迁移到伤处,伤口并不结痂而是形成类似于两栖类再生芽基的环状肿胀,真皮和软骨等细胞发生去分化。而且伤口愈合的能力是数量遗传的,通过遗传表型和全基因组遗传筛选分析<sup>[17,18]</sup>,都证明这种品系小鼠的再生与 *fas* 基因的突变与否无关,因为野生型和 *fas* 基因突变型个体都具有相同的再生能力。目前已经将与再生及数量性状相关的 7 个基因定位在不同的染色体上,这些与再生相关的候选基因包括与两栖类再生也相关的基因,如视黄酸受体  $\gamma$ 、*msx2* 等。通过 EST 技术,在 MRI 品系里还鉴定了一些在炎症反应阶段表达的基因,证明还有很多未知功能的基因也参与到这一复杂的过程<sup>[19]</sup>。比如能维持细胞未分化状态的类 delta 蛋白 Pref-1 已被鉴定在受损耳部表达量增加<sup>[20]</sup>。

MRI 品系小鼠不仅能进行耳部的再生,而且它的心脏也能部分再生<sup>[21]</sup>。将 MRI 品系小鼠腹部切开,用低温探头使右心室部分组织坏死,缝合后心脏能在 2 个月后完全再生恢复功能。在此过程中,心肌细胞的有丝分裂指数与对照组相比显著增高,胶原表达量在受损后第 5 天虽也增高,但在第 15 天后显著下降,这都与在两栖类中的再生过程相似。胶

原表达量的变化并非是其 mRNA 的转录减少,但可能存在某种蛋白酶破坏了已表达的胶原,所以不能形成痂。最近,在耳部再生组织中鉴定到的基质金属蛋白酶(MMP)可能就是这种蛋白酶<sup>[22]</sup>。

对 MRL 品系小鼠的研究证明了哺乳动物可能并未完全丧失再生能力,因此可能在临床上对人类的再生研究作出贡献。

#### 4 展 望

对于人类的大部分组织和器官来说,损伤或切除就意味着永远的功能损伤,而许多退行性疾病,像心血管疾病、神经退行性疾病及衰老等归根到底都是由于再生能力的丧失。因此,人们对再生这种能力一直都怀有极大的渴望。再生的过程大多伴随着细胞的去分化,而去分化的细胞能再分化成多种类型的细胞。这也就是说,对自然界中原已存在的再生现象在细胞水平上和分子水平上机制的阐明,就可能使生物体本身在遭受损伤时,用药物诱导产生干细胞进行自主修复。这就意味着不仅可能为患者减少手术移植带来的痛苦和免疫排斥,而且在临床还可提供更为可行的治疗办法。

#### [参 考 文 献]

- [1] Wolpert L. *Principles of development* [M]. Singapore: Oxford University Press, 1998. 399-416.
- [2] Sanchez-Alvarado A. Regeneration in the metazoans: why does it happen[J]? *Bioessays*, 2000, 22: 578-590.
- [3] Brockes JP. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 81-87.
- [4] Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration[J]. *Nat Rev Mol Cell Boil*, 2002, 3(8): 566-574.
- [5] Stocum DL. *Regeneration of the urodele limb* [A]. In: *Encyclopedia of Life Sciences (Vol. 16)* [M]. London: Nature Publishing Group, 2002. 158-163.
- [6] 庄孝惠, 王亚辉. 没有神经的腿的再生[J]. *实验生物学报*, 1956, 5: 137-139.
- [7] 戴荣禧. 无神经蝶螈幼虫前肢摘除肱骨后的再生[J]. *实验生物学报*, 1978, 11: 61-69.
- [8] Maden M, Hind M. Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule[J]. *Dev Dyn*, 2003, 226(2): 237-244.
- [9] Tanaka EM, Drechsel DN, Brockes JP. Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes[J]. *Curr Biol*, 1999, 9(15): 772-799.
- [10] McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13699-13704.
- [11] Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1[J]. *Cell*, 2000, 103(7): 1099-1109.
- [12] Kruger GM, Morrison SJ. Brain repair by endogenous progenitors[J]. *Cell*, 2002, 110(4): 399-402.
- [13] Woolf CJ, Bloechlinger S. Neuroscience. It takes more than two to Nogo[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1132-1134.
- [14] Liu BP, Fournier A, GrandPre T, et al. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1190-1193.
- [15] Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 341-346.
- [16] Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, et al. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp [J]. *Nature*, 2002, 420(6911): 74-78.
- [17] Clark LD, Clark RK, Heber-Katz E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration[J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, 88(1): 35-45.
- [18] McBrearty BA, Clark LD, Zhang XM, et al. Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(120): 11792-11797.
- [19] Li X, Mohan S, Gu W, et al. Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process[J]. *Mamm Genome*, 2001, 12(1): 52-59.
- [20] Samulewicz SJ, Seitz A, Clark L, et al. Expression of preadipocyte factor-1 (Pref-1), a delta-like protein, in healing mouse ears[J]. *Wound Repair Regen*, 2002, 10(4): 215-221.
- [21] Leferovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, et al. Heart regeneration in adult MRL mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17): 9830-9835.
- [22] Gourevitch D, Clark L, Chen P, et al. Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model[J]. *Dev Dyn*, 2003, 226(2): 377-387.

[收稿日期] 2005-01-12

[修回日期] 2005-02-02

[本文编辑] 邓晓群

### 欢 迎 订 阅

《第二军医大学学报》 ISSN 0258-879X  
CN31-1001/R  
上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948X  
CN31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725