

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00856

斑马鱼在再生医学研究中的应用及进展

严丽锋, 顾爱华

南京医科大学公共卫生学院, 南京 210029

摘要: 组织器官的再生现象一直以来吸引着众多生物学家们的关注。再生能力在不同物种间差异很大, 与人及高等脊椎动物相比, 低等脊椎动物(如: 斑马鱼)有着较高的再生能力。斑马鱼的鳍、心脏、视网膜、视神经、脊髓、肝脏及感觉毛细胞等都具有很强的再生能力。因此, 从斑马鱼再生过程的研究中将获得大量有用的信息, 促进对人类再生能力缺陷的认识, 进而推动再生医学的发展。文章就斑马鱼在心脏、神经系统、肝脏、鳍再生医学研究中的进展及应用做一综述。

关键词: 斑马鱼; 心脏再生; 神经再生; 肝脏再生; 鳍再生

Progress and application of zebrafish in regenerative medicine

YAN Li-Feng, GU Ai-Hua

School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: The phenomenon of “tissue regeneration” has attracted numerous biologists for many years. Regenerative capacity differs greatly across species. The lower vertebrates such as zebrafish have exceptionally high regeneration abilities, while most high vertebrate species including humans do not have a remarkable ability for regeneration. It has been found zebrafish has a strong ability to regenerate a variety of tissues and organs including fins, heart, retina, optic nerve, spinal cord, liver, and sensory hair cells. Thus, we can learn useful information from the zebrafish regeneration model to understand the human regeneration defects and promote the development of regenerative medicine. This review summarizes the current research status for regeneration of heart, nerve, liver, and fin regeneration in zebrafish.

Keywords: zebrafish; heart regeneration; nerve regeneration; liver regeneration; fin regeneration

再生是指生物体的器官因创伤而发生部分丢失, 在剩余部分的基础上进行修复, 又生长出与丢失部分在形态和功能上相同的结构的过程。然而, 至今仍未从细胞、分子机制上彻底解释这一神秘而有趣的现象。再生能力在不同物种间也存在着巨大的差

异, 例如: 蝾螈(*Salamandrae*)在断腿处可长出新腿, 斑马鱼(*Danio rerio*)在鳍断开处可长出新鳍, 相比之下, 人类在成年后对损伤的细胞、组织乃至器官的再生能力却非常有限^[1]。因而, 研究者们希望通过对模式动物再生过程的研究, 找到可以修复人类受损

收稿日期: 2013-02-25; 修回日期: 2013-03-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81172694)和江苏省大学生创新训练计划重点项目(编号: 2012JSSPITP1018)资助

作者简介: 严丽锋, 硕士研究生, 专业方向: 生殖与发育毒理学。Tel: 15850653694; E-mail: fengli881126@yahoo.cn

通讯作者: 顾爱华, 博士, 副教授, 研究方向: 生殖与发育毒理学。E-mail: aihuagu@njmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-5-9 10:58:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130509.1058.001.html>

组织的方法。无脊椎动物(如:水螅(*Hydra*)、真涡虫(*Planarian*))尽管有极高的再生潜能,但缺乏遗传可操作性以及部分高等组织结构;两栖类(如:蝾螈、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*))不易于实验室养殖、繁殖速度慢以及缺乏相应的遗传操作技术等,使其都不能成为理想的模式动物。近年来,斑马鱼由于其自身明显的优势,越来越受到科研人员的关注。与其他脊椎动物相比,斑马鱼具有以下 3 方面的优势:(1)斑马鱼易于养殖,成本低,产卵量高;(2)已建立一系列的遗传操作技术,如:转基因技术、基因敲除/敲低技术、正向遗传筛选等,有利于深入探讨分子机制;(3)胚胎透明,体外发育,可对幼鱼在体追踪再生细胞等^[1,2]。得益于这些优势,斑马鱼正日益成为再生医学研究中最受关注的脊椎动物模型。

最初,斑马鱼用于鳍再生的研究^[3],之后又陆续发现斑马鱼的心肌^[4]、视网膜^[5]、视神经^[6]、脊髓^[7]、肝脏^[8]及感觉毛细胞^[9]等也具有较强的再生能力。这些组织按照再生的机制不同,可以分为 4 类:(1)“组织再生”:某一器官局部、有限损伤后通过重塑某种细胞类型而实现修复,如心脏再生等^[10];(2)“芽基再生”:通过形成包含重新模式形成所需的内在形态学信息的芽基而实现修复,如鳍再生^[11];(3)“干细胞再生”:损伤激活组织中的干细胞,继而根据各自的分化潜能,增殖、分化形成多种类型的细胞,如:中枢神经系统中的脊髓、视网膜等再生^[12];(4)“补偿性生长”:指非损伤部位的补偿性生长,如肝再生^[12]。无论是哪种模式的再生,都具有共同的特点:(1)组织中必须存在可以分化成受损细胞类型的干/祖细胞,而干/祖细胞可来源于细胞的去分化、转分化,或者一直存在于组织中;(2)干/祖细胞可大量增殖用于补充受损的细胞;(3)具有高度的时空调控能力,保证受损组织恢复原有的结构。

尽管人类能够再生受损伤的肝脏,修补骨、肌肉、指(趾)尖和角膜等,但是心脏、神经系统、肢体的再生能力极弱或几乎不能再生,而这些组织的损伤所造成的健康危害、社会经济损失却是巨大的。因而,科学家们希望通过斑马鱼再生模型的研究找到弥补人类组织再生缺陷的方法。本文就斑马鱼在心脏、神经系统、肝脏、鳍再生研究中的应用现状及进展进行综述。

1 斑马鱼心脏再生

1.1 斑马鱼心脏损伤模型

类似于两栖动物心脏切除模型, Poss^[4]和 Raya^[13]两个研究组切除成年斑马鱼心肌 20%后,观察损伤后的再生现象。切除后不久,迅速形成血凝块堵住伤口,损伤后 3 d,伤口由成熟的血纤蛋白凝块替代最初的血凝块。损伤后 7 d,开始 DNA 合成以及心肌细胞增殖,至第 2 周心肌细胞增殖达到顶峰。损伤后 60 d,受损的心脏基本修复完成^[4]。这种方法的成功率达 90%以上,是目前研究斑马鱼成体心脏损伤—再生的最常用方法^[14]。

此外,学者们利用冷冻消融法构建了斑马鱼心肌梗塞(MI)模型^[15-17]。利用干冰或液氮冷却探针可杀死 25%的心室肌细胞,随着大部分死亡组织的清除及邻近部位心肌细胞的增殖,至 130 d 时,心脏基本修复完成。

最近, Wang 等^[18]构建了一种转基因斑马鱼(Tg(bactin2:loxP-mCherry-STOP-loxP-DTA176)^{pd36})模型(包含他莫西林诱导的心肌细胞特异的 CreER 重组酶以及 Cre 介导重组的 DTA),在他莫西林处理后的 5~7 d, 60%的心肌细胞坏死,但不影响斑马鱼的存活,紧接着心肌细胞增生以及肌肉组织恢复,在处理后的 30 d,心脏完全修复。因此,利用这 3 类心脏损伤模型,可研究斑马鱼心脏再生过程。

1.2 斑马鱼再生心肌细胞的来源

寻找再生组织的细胞来源对于更深入地揭示再生的机制是非常关键的。Raya 等^[13]通过心脏部分切除模型发现同源盒转录因子(*nkx2.5*)、T 盒转录因子(*tbx5*)以及 CaMK 相关多肽(*carp*)这 3 种心脏发育所需因子表达下调,推测心脏再生不是心脏发育过程的重演。但 Lepilina 等^[19]却在斑马鱼再生心脏的边缘观察到心肌分化激活因子 *nkx2.5*、*tbx20*, 心脏神经脊衍生表达因子 2(*hand2*)、*tbx5* 和肌细胞增强子 2(*mef2*)的表达上调,并通过心脏肌凝蛋白轻链(*cmlc₂*)启动的 nRFP/EGFP 双转基因斑马鱼证实了再生的心肌细胞来源于未分化的前体细胞,然而双转基因 nRFP/EGFP 实验不能检测到心肌细胞快速的去分化过程,因此斑马鱼心脏是否存在前体细胞仍值得商榷。近年来,随着遗传细胞命运追踪(Genetic fate-

mapping)的应用,越来越多的研究证实心肌细胞的去分化是斑马鱼心脏再生的主要途径。2010年, Jopling^[20]和 Kikuchi^[21]两个研究组先后发现,新的心肌细胞来源于成熟心肌细胞的去分化。Jopling等^[20]利用 Cre/lox 体系追踪心肌细胞谱系的方法,发现部分切除斑马鱼心脏后,再生的心肌细胞来源于成熟心肌细胞的去分化,增殖的心肌细胞出现肌节断裂、细胞周期调节因子表达改变等去分化特征。Kikuchi等^[21]构建了一种心肌细胞带有荧光标记的斑马鱼系,在切除部分心尖后,观察到再生的心肌细胞均带有荧光标记,说明新的心肌细胞来源于已分化的心肌细胞,而非心肌干细胞增殖。上述发现在低温损伤模型中也得到证实^[18]。因而,目前认为已分化的心肌细胞的去分化是斑马鱼再生心肌细胞的主要来源。

1.3 参与斑马鱼心脏再生的基因及信号通路

去分化的心肌细胞增殖,并重新进入细胞周期,是斑马鱼心脏再生的基础。通过遗传筛选斑马鱼心脏再生的突变体,分析再生过程中的差异表达基因,研究者们发现多种细胞周期调节因子参与了心脏再生过程^[22]。单极纺锤体蛋白激酶 1(Mps1)在细胞增殖时上调表达,并在斑马鱼鳍的再生中发挥重要作用^[23], *mps1* 的突变会影响斑马鱼心脏再生及伤疤形成^[4], 丝/苏氨酸蛋白激酶(Pik1)参与有丝分裂过程^[24], 在再生的斑马鱼心脏中上调表达^[25], 药物 Cyclopolin 9 抑制后,心肌细胞的增殖明显减少,再生进程减缓^[20]。此外,鉴于斑马鱼在遗传学研究上的优势,研究人员利用定位克隆、转基因鱼系等遗传操作技术,还筛选出一些参与心脏再生的基因。例如: 锌指转录因子 4(*gata4*)在胚胎期心脏发育和血管形成中发挥重要作用^[26, 27], 在切除后的心脏再生中表达增加,且早于它在损伤部位及周围区域具有增殖能力的心肌细胞内的表达^[21]。编码同源异形框蛋白的 *msxB* 和 *msxC* 基因尽管在正常的成年斑马鱼心脏及胚胎发育过程中均不表达,但两者能在切除后的再生心脏组织中强烈表达,当心脏完全再生后不再表达,推测两者参与了心脏再生过程^[13]。神经生长因子(*ngf*)可通过刺激心肌细胞的增殖而参与应答心脏损伤的再生过程,抑制其表达会减缓心肌再生过程^[28]。神经胶质成熟因子 γ (*Gmfi*) 在微血管内皮

细胞和炎症细胞中表达量最高并调控肌动蛋白的重定位^[29], 因此推测在斑马鱼心脏再生过程中 *gmfi* 的上调能增强细胞运动性,有利于炎症细胞的浸润以及内皮或上皮细胞的迁移^[22]。

斑马鱼心内膜、心外膜细胞在心肌发育中起着关键作用,因而心脏再生过程还涉及这两类心肌细胞复杂的信号通路,包括:成纤维细胞生长因子(Fgf)、视黄酸(RA)、丝裂原活化蛋白激酶(Mapk)、Notch 信号通路的家族成员以及生长因子等。Lepilina等^[19]报道了斑马鱼心脏损伤后心肌细胞配体 *fgf17b* 以及受体 *fgfr2*、*fgfr4* 表达增加,阻断 *fgf* 信号通路后导致心外膜上皮细胞-间充质转化(EMT)、新血管形成受损以及疤痕的形成,从而阻止了再生过程。因此 Fgf 信号通路主要是通过募集心外膜细胞、激活心外膜细胞新血管的形成而促进心脏再生。Lien等^[30]通过基因芯片技术筛选出血小板衍生生长因子(*Pdgf*)家族中的 *pdgf-A* 和 *pdgf-B* 在心脏再生过程中上调表达, *Pdgf* 能促进原代培养的斑马鱼心肌细胞中 DNA 的合成,说明其具有促增殖的作用。后续的研究发现 *Pdgf* 存在于心外膜上,因而推测 *Pdgf* 信号通路通过再激活损伤部位的血管形成而促进心脏再生^[31]。Jopling等^[32]发现活化 *p38amapk* 能抑制心肌细胞的增殖而阻碍心脏再生过程,可能与 *p38amapk* 介导细胞周期阻滞有关。Raya等^[13]证实心脏部分切除后不久,心内膜 *notch1b* 及其配体 *delta C* 急剧上调,推测 Notch 信号通路参与心脏再生过程。此外,参与合成视黄酸的视黄醛脱氢酶 2 型抗体(*raldh2*)在损伤后的心外膜中高表达^[19], 阻断 RA 信号通路,抑制了再生心肌细胞增殖^[33], 因而 RA 信号通路通过局部化心肌细胞增殖而在心脏再生中发挥功能。

许多细胞生物学家认为,脊椎动物都具有使受损心脏组织再生的能力,但由于某种未知的因素,哺乳动物在进化过程中将这种再生能力“封杀”^[34]。最近, Porrello等^[35]研究发现哺乳动物的心脏在出生后短暂的“时间窗”内仍具有再生能力,但随着时间推移又迅速消失。斑马鱼心脏再生的能力却能保持至成年期,因而借助斑马鱼日趋成熟的遗传技术,越来越多的与心脏再生相关的基因与信号通路将会被筛选出,这将有助于增进对哺乳动物或者人类心脏再生能力缺陷的认识,比如: Engel等^[36]受到斑马

鱼研究结果的启发, 给予急性心肌梗死的大鼠 FGF1/p38 MAP 激酶抑制剂处理后, 发现可减少疤痕形成、促进心肌细胞增殖、提高心脏功能, 因此可用于增强心脏再生能力的治疗。

2 斑马鱼神经系统再生

2.1 斑马鱼神经系统损伤模型

从手术切除大部分脑组织到特异性杀死某类神经元, 用于研究斑马鱼神经系统再生的损伤模型有很多, 大致可以分为 3 类: 物理损伤、化学消融和转基因技术。

物理损伤是研究神经再生的最主要的模型, 包括机械损伤、激光损伤和光损伤^[2]。例如: Becker 等^[37]将斑马鱼眼球从眼眶中剥离, 不损伤眼部动脉, 将暴露的视神经捣毁, 损伤后的视神经中出现一条半透明的条带, 利用这一模型具有可追踪再生神经元路径及靶标的优势, 研究参与斑马鱼视神经再生的神经元生长、寻路和靶标识别的基因功能。此外, 还可分别剪断脊髓^[38]、部分或全部切除视网膜组织^[39]来研究脊髓或视网膜再生过程。

激光可直接损伤中枢神经系统的任何组织且具有细胞特异性。Liu 等^[40]将神经管细胞利用 CGD 指示剂标记后定位, 强激光暴露后造成标记细胞死亡。尽管这一技术尚未运用于再生研究, 但随着该技术的发展, 结合斑马鱼的透明可视、易构建转基因系的特性, 在斑马鱼特定神经元损伤、再生的研究中的应用将会有很大的潜力。此外, 斑马鱼对光敏感, 光损伤模型仅造成光感受器细胞的凋亡, 而不影响视网膜其余部分^[41], 因而也普遍应用于斑马鱼视网膜再生的研究。

化合物所致损伤, 尤其是神经毒素, 可以特异性或非特异性地作用于神经元或神经胶质细胞, 因此这类模型具有较强的靶向性。例如: Fimbel 等^[42]利用低剂量的哇巴因(一种抑制 Na^+/K^+ -ATP 酶的代谢毒物)损伤内核层(INL)视网膜细胞, 诱导视网膜的再生。Sherpa 等^[43]在注射细胞毒素哇巴因后, 观察到整个视网膜神经节细胞(RGCs)的再生。然而, 考虑到毒物本身能影响部分分子信号的表达, 运用这类模型研究再生后期的分子机制有待商榷。

条件特异性细胞消融技术结合遗传和化学方法,

短时间内可特异性消融某类神经元, 而不会造成所有类型的神经元死亡, 利用该技术产生的转基因鱼系成为研究神经再生的较佳模型。最近, Curado 等^[44]构建了一种在某类神经元特异性表达的 *nfsB*(能表达硝基还原酶(Nitroreductase, NTR))转基因斑马鱼, 加入甲硝唑可与 NTR 结合, 引起 DNA 交联, 进而造成神经元的死亡。Montgomery 等^[45]利用该技术, 消融视杆细胞, 再生的视杆细胞的来源取决于视杆细胞消融的程度。因此, 这些损伤模型的应用, 不仅可以解决研究中枢神经系统再生过程中的特定问题, 还能消除不同研究组之间的差异, 使研究结果具有可比性。

2.2 斑马鱼神经系统再生的干细胞来源

与哺乳动物相比, 斑马鱼神经发生过程可以持续至成年期, 这或许能解释其多个神经系统组织可再生的现象。因而, 在斑马鱼神经发生过程中发挥重要作用的放射状胶质细胞是神经再生的干细胞的主要来源^[46], 现以视网膜和视神经为例进行探讨。

视网膜: Müller glia 细胞是视网膜中的放射状胶质细胞, 具有维持视网膜神经元的内稳态及代谢支持等作用^[47]。近年来, 越来越多的证据证明 Müller glia 细胞是斑马鱼视网膜再生的主要干细胞来源。利用 Müller glia 细胞表达绿色荧光蛋白(GFP)的转基因鱼系结合谱系追踪技术, 研究者们发现在视网膜损伤后, Müller glia 细胞应答并活化形成祖细胞, 增殖、分化、迁移至损伤处, 从而修复损伤部位^[48, 49]。Thummel 等^[50]通过敲减增殖细胞核抗原(*pcna*), 抑制 Müller glia 细胞增殖, 给予斑马鱼视网膜光损伤刺激后, 引起 Müller glia 细胞死亡, 导致视杆细胞、圆锥细胞不能再生。由于敲减 *pcna* 的效应主要发生在 Müller glia 细胞, 有力地证明了 Müller glia 细胞是斑马鱼视网膜再生的干细胞来源。

视神经: 视网膜神经节细胞是视网膜中唯一将轴突伸向外界的神经元, 其轴突形成了视神经。啮齿类动物由于存在抑制性因子、缺乏促生长因子, 使得视网膜神经节细胞轴突不能再生, 造成视神经损伤后的不可恢复; 在斑马鱼体内, 存在着大量的促生长因子, 而抑制性因子即使表达, 其表达的时机与模式也与哺乳动物或啮齿类的不同, 视网膜神经节细胞轴突可以再生, 从而恢复视力功能^[51]。

2.3 参与斑马鱼神经系统再生的基因及信号通路

2.3.1 视网膜

利用基因芯片对视网膜中提取的 mRNA 进行分析, 研究者们发现细胞周期、增殖、凋亡、DNA 复制等通路的基因参与视网膜再生过程。视网膜再生的主要细胞来源是 Müller glia 细胞, 因而提取 Müller glia 细胞中的 RNA 进行表达分析, 可以帮助研究者直接了解参与再生过程的调控基因。如: Qin 等^[52]从光损伤的转基因斑马鱼中直接提取 Müller glia 细胞, 分析损伤后 8、16、24、36 h 的基因表达情况, 发现参与 DNA 复制、细胞周期调控的基因上调表达, 说明 Müller glia 细胞重新进入细胞周期, 而与染色体组装、离子平衡相关的基因下调表达, 说明 Müller glia 细胞的去分化。Craig 等^[53]利用视网膜光损伤模型, 提取外核层的 Müller glia 细胞衍生的祖细胞, 研究再生的光感受器细胞中的基因表达情况。损伤初期, 光感特异性基因表达下调, 而应激反应相关基因表达上调, 提示光感受器细胞死亡; 损伤后 24~48 h, 转录因子 *sox11b*、*fos*、*jun*、*pax6a* 以及编码分泌型生长因子的基因, 如: L 亚型网素 (*l-plastin*)、CC 亚族趋化因子 (*CC chemokine*)、半乳糖凝集素家族 (*Galectin family*) 成员、颗粒蛋白前体家族 (*Progranulin family*) 成员以及肝素结合细胞因子 (*Midkine*) 等显著表达。此外, 众多基因已被研究者们证实参与了视网膜的再生过程, 包括 60 kD 热休克蛋白 1 基因 (*hspd1*)^[52]、*mps1*^[52]、无刚毛鳞甲同系物基因 1 (*ash1a*)^[54]、信号传感和转录活化因子 3 (*stat3*)^[55]、少突细胞转录因子 2 (*olig2*)^[56] 以及胰岛素细胞瘤相关基因 1a (*Insm1a*)^[57] 等。

2.3.2 视神经

视网膜神经节细胞延伸轴突到达相应的靶区域, 从而完成视神经的再生, 在这个过程中, 需要 2 类信号分子的参与: (1) 视网膜神经节细胞内的促生长因子, 可诱导神经节细胞进入生长状态, 如: 微区支架蛋白家族的 *reggie-1a*、*reggie-2a*、*reggie-2b* 能调节轴突生长、神经元分化, 抑制表达后影响了视网膜神经元的再生^[58]。转录因子 *klf6a*、*klf7a* 在再生视神经轴突的生长阶段表达, 同时敲除两者可抑制视网膜神经节细胞的轴突再生^[59]。(2) 视束及顶盖中

存在的促生长因子, 调节轴突延伸、寻路以及正确的靶神经分布, 如: 免疫球蛋白家族中的蛋白 0 (P0) 在体外促进轴突的生长, 参与髓鞘形成及轴突再生, 进而促进视神经的恢复^[60]; 接触蛋白 1a (Ctnn1a) 是一种神经元和少突胶质细胞的免疫球蛋白家族识别分子, 可参与轴突生长、髓鞘形成、突触可塑、细胞迁移等^[61], 损伤视神经后出现 *ctnn1a* 再表达, 且在再生轴突处高表达^[62]、紧密连接蛋白 K (Claudin k) 是外周髓鞘型蛋白 22 家族的成员, 在少突胶质细胞和施旺细胞中表达, 视神经损伤后的 14~28 d, *claudin k* 表达明显增加, 促进髓鞘的形成^[63]。

在神经形成过程中, 神经干细胞的增殖、分化、迁移等涉及复杂的信号通路, 包括: Notch 信号通路、生长因子以及成纤维信号通路家族成员等^[64]。尽管斑马鱼神经再生与神经形成在干细胞增殖、分化、迁移、寻路、突触发生等过程相类似, 但这些信号通路在神经再生研究中却非常有限。因此, 更为深入地研究再生事件涉及的信号通路对于全面揭示斑马鱼神经再生有着重要的意义。

哺乳动物神经损伤后可形成疤痕, 阻止了损伤部位的完全恢复。研究者们采用注射神经营养因子、移植神经干细胞、基因治疗等方法, 试图恢复受损的神经系统的功能, 但由于种种原因, 均未达到理想的效果, 因此, 找到诱发自身神经元再生应答的治疗方法成为治疗神经损伤的终极目标。而斑马鱼几乎可再生所有脑区, 因此研究人员可通过斑马鱼了解神经干/祖细胞增殖以及补充神经元的分子机制等, 促进对哺乳动物或人类神经再生能力缺陷的认识, 找到促进人类神经再生的方法。

3 斑马鱼肝脏再生

3.1 斑马鱼肝脏损伤模型

部分肝脏切除术是研究啮齿类肝脏再生的常用的手段, 借鉴啮齿类动物模型, Kan^[65]和 Sadler^[8]两个研究组部分切除斑马鱼腹侧肝小叶后, 发现肝细胞迅速增殖, 在损伤后的第 7 d 基本恢复肝脏组织。此外, 遗传操作技术也可用于肝脏损伤模型的构建, 如利用硝基还原酶 (NTR)/甲硝唑系统可以条件特异性消融部分肝细胞。构建的 CFP-NTR 转基因斑马鱼, 经甲硝唑处理后, 肝细胞形态发生改变, 并出现大

量死亡, 利用该损伤模型可以研究斑马鱼肝脏再生^[66], 利用吗啉代寡聚核糖核酸局部敲低对肝细胞存活起着重要作用的线粒体外膜易位酶 22(*tomm22*)后, 可导致处理部位的肝细胞大量死亡, 利用这一模型可研究肝脏发育、肝脏再生过程中共同信号分子的功能^[67]。

3.2 斑马鱼再生肝细胞的来源

肝细胞是肝脏最主要的功能单位, 尽管在正常情况下, 肝细胞的有丝分裂能力较低, 但在损伤刺激后, 未损伤部位的肝细胞会出现大量的增殖, 对损伤部位进行补偿性修复^[12]。因此, 与哺乳动物或啮齿类相似, 分化成熟的肝细胞是斑马鱼再生肝细胞的主要来源^[65]。

肝组织中的卵圆细胞(Oval cells)是一种具有多向分化潜能的细胞, 可分化为肝细胞和胆管细胞^[68], 在肝细胞增殖受阻时, 其增殖会增加, 因而在一些动物模型中, 这或许是肝损伤修复途径中肝细胞的替代细胞^[12]。Curado 等^[67]发现肝再生过程中, 一种胆管标记阳性的细胞增殖速度增加。由于迄今为止, 在斑马鱼中仍缺乏识别卵圆细胞的特异性标记基因, 因此, 不能确定斑马鱼是否也存在这种细胞。

3.3 参与斑马鱼肝脏再生的基因和信号通路

Sadler 等^[8]发现一种细胞周期调控因子 *uhrfl* 的纯合突变在胚胎期导致“小肝畸形”及胚胎死亡, 杂合突变影响成年斑马鱼肝细胞增殖, 进而阻碍肝脏再生。Uhrfl 能调节拓扑异构酶 2a(Top2a)的活性, Dovey 等^[69]发现 Top2a 也参与肝脏再生过程, 与其在有丝分裂中促进姐妹染色单体解链的功能有关。在哺乳动物体内, 包含骨形态发生蛋白(Bmp)、Fgf、Wnt 信号通路在内的几种信号通路参与肝脏再生过程。Kan 等^[65]证实 Bmp 和 Fgf 信号通路在斑马鱼肝脏再生过程中发挥重要作用, 而 Wnt 信号通路仅在肝脏损伤后出现一个短暂的增加, 这与 Goessling 等^[70]的研究结论相一致。

损伤后的肝脏再生包括了肝脏体积和功能的恢复。在啮齿类模型中, 切除 70%的肝脏后, 可使肝细胞重新进入细胞周期, 一周内肝脏体积可恢复^[71]。然而, 调控再生过程的基因或者信号通路仍未在啮齿类模型中完全阐释清楚。斑马鱼肝脏再生的方式

与哺乳动物相似, 加之斑马鱼前向遗传学方法有利于发现潜在的调控基因的优势, 使得斑马鱼可与啮齿类模型互相补充, 促进对肝脏“补偿性再生”的理解, 进而为人类肝脏损伤的治疗提供较佳的方案。

4 斑马鱼鳍再生

4.1 斑马鱼鳍损伤模型

斑马鱼的 5 种鱼鳍均能再生, 但尾鳍结构简单、易于手术操作、损伤后不影响生存等特点, 成为研究鳍再生过程的典型部位。将成年斑马鱼麻醉后, 利用刀片截掉约 50%的尾鳍, 在尾鳍损伤后的 1~2 周内, 完成尾鳍的再生^[72]。这个再生过程大体上包含创面愈合(Wound healing)、芽基形成(Blastema formation)、再生结局(Regenerative outgrowth)3 个过程^[73]。尾鳍损伤后的 12 h, 上皮细胞通过迁移覆盖损伤表面, 随后形成顶端表皮帽(AEC)。在损伤后的 12~24 h, 间叶细胞出现紊乱、迁移、增殖, 同时芽基形成(芽基是一类祖细胞, 具有多向分化潜能)。在再生结局(损伤后的 24 h 至最终完成再生)阶段, 芽基细胞发生增殖、模式化及分化等, 从而弥补损失的细胞^[73]。直至损伤后的 1~2 周, 尾鳍的形状、体积等恢复至损伤前的状态, 完成整个再生过程。

4.2 斑马鱼再生鳍细胞的来源

斑马鱼尾鳍结构对称, 包含 16~18 个鳍条, 缺乏骨骼肌, 由纤维母细胞、成骨细胞、神经、血管及色素细胞等组成。斑马鱼尾鳍的再生依赖于芽基的形成, 然而至今仍不清楚芽基细胞来源于哪类细胞。2011 年, 几个研究组对这一问题进行了探索。Knopf 等^[74]发现成骨细胞去分化, 并且形成部分芽基, 成骨细胞下调表达骨分化的标记基因, 同时上调表达不成熟成骨细胞表达的基因。Tu 等^[75]利用基于转座子的克隆分析鉴定出成年斑马鱼鳍中的 9 个细胞系, 在鳍损伤后, 包括成骨细胞系在内的 9 个细胞系均不能去分化形成其他的细胞类型。Sousa 等^[76]发现在鳍再生过程中, 成骨细胞增殖, 下调表达标记基因, 且通过标记成骨细胞, 发现标记的成骨细胞仅能形成成骨细胞。这些研究均说明成骨细胞的去分化、增殖在鳍再生过程中起着关键或主导的作用, 但并未说明是否存在其他的细胞或多能祖细胞也参与该过程。之后, Singh 等^[77]利用遗传消融

技术摧毁全部的斑马鱼鳍成骨细胞,发现斑马鱼 2 周内恢复原有的成骨细胞的数量,说明新产生的骨细胞并非来源于成骨细胞的分化,因而鳍再生的细胞有多个来源。Stewart 等^[78]利用 Cre/lox 技术标记尾鳍的基因,对标记基因进行跟踪分析,发现不存在多能祖细胞,而包括表皮细胞、纤维母细胞、成骨细胞在内的多种细胞类型均促进尾鳍的再生,且这些细胞具有高度的谱系限制性。

4.3 参与斑马鱼鳍再生的基因及信号通路

鉴定出参与创面愈合、芽基形成、再生结局等过程的基因或者信号通路是研究斑马鱼鳍再生的核心目标。利用各种遗传操作技术,已经发现了众多的基因参与鳍再生过程。*left1* 和 *wnt5b* 是 Wnt 信号通路的成员,尾鳍损伤后的 12 h 在创口表皮表达,之后局限在表皮细胞的基底层中表达,推测 Wnt 信号通路参与芽基形成^[72]。而利用 RA 或者 Fgf 抑制剂 SU5402 不能阻止 *left1* 的表达,用 Wnt 信号通路的抑制剂 DKK1 可抑制尾鳍再生以及 Fgf 靶基因 *mkp3* 的表达,在热休克诱导的转基因斑马鱼内过表达 *dkk1* 后,可抑制尾鳍再生及 *fgf20* 的表达,因而 Wnt 信号通路是 Fgf 或者 RA 信号通路的上游通路^[79,80]。此外,Kawakami 等^[79]利用突变筛查获得一种再生缺陷的斑马鱼,在尾鳍损伤后出现 *left1*、*mkp3* 和 *msxB* 低表达,过表达 β -catenin 后,可挽救上述表型。这些研究结果说明 Wnt 信号通路在鳍再生中的重要作用。编码同源异形框蛋白的 *msxB* 和 *msxC* 在芽基细胞中表达,且能促进芽基细胞的去分化^[81,82]。*fgfr1* 在接近损伤处的间叶细胞中表达,抑制其表达后,可抑制鳍再生过程以及 *msxB* 和 *msxC* 的表达^[83]。Whitehead 等^[84]筛选出一种因 *fgf20a* 无效突变而形成缺乏芽基(dob)的突变系,该突变系不能诱发再生应答产生以及芽基的形成,因此 *fgf20a* 为鳍再生所必须。RA 通过影响伤口表皮的体积以及促进 AEC 的凋亡而抑制再生过程,RA 信号通路参与再生的模式形成的这种效应是由 RA 受体介导的基因转录的调节所引起的,如:视黄酸受体 γ (*rarg*) 在芽基中表达,暴露 RA 后,可引起再生尾鳍形态学上的改变^[85]。芽基细胞分化为成骨细胞,成骨细胞合成和分泌皮骨基质,进入到表皮下区域,最终形成再生鳍中的骨成分。Sonic hedgehog (Shh)和 Bmp 信号通路在皮

骨的再生中发挥重要作用,芽基中异位表达 *shh* 或者 *bmp2* 导致骨沉积和异常的再生模式,共注射外源性 *shh* 和 *bmp* 抑制因子腱蛋白后,可明显抑制由 *shh* 异位表达所致的骨融合^[86]。下调 *bmp* 信号通路导致成骨细胞分化和功能紊乱,影响鳍再生^[87]。此外,miRNA 表达谱学的研究也揭示了一些 miRNA 参与鳍再生过程,如:*miR-203* 可抑制 Lef1 蛋白表达水平,丢失 *miR-203* 后导致 Lef1 过表达、鳍过度生长,因而 *miR-203* 对 Lef1 的调节也许是再生调节的关键限制步骤^[88]。使用 *fgfr* 抑制剂抑制鳍再生时,发现 *miR-133* 高表达,而抑制 *miR-133* 表达后,可通过激活 Mps1 激酶,促进芽基增殖,进而加快鳍再生进程^[89]。

与哺乳动物或人类相比,斑马鱼尾鳍的地位就相当于手臂或腿。尽管人类在整个生命周期中,可不断地更新血液成分、骨骼肌、皮肤等,修复骨骼、肌肉、指尖等部位较小的损伤,但对于较大的损伤(如断肢等)却束手无策。因而,对斑马鱼鳍再生的分子机制的研究,将有利于科研人员找到促进肢体再生的方法,例如:*miR-13* 抑制斑马鱼鳍再生,那么这个基因也可能抑制哺乳动物或人类再生功能的发挥,因此研究者们找到干扰 *miR-13* 功能的途径,就能针对性地解决某个肢体再生难题。

5 结语

得益于遗传操作及相应技术的可行性,斑马鱼作为一种模式动物,在心脏、神经系统、肝脏、鳍等组织器官的再生学研究中已显示出独特的优势,使得斑马鱼再生研究成为生命科学研究热点之一。尽管目前我们对斑马鱼再生的认识仍十分有限,但随着这一领域的日趋成熟,我们从斑马鱼再生模型中掌握的知识无疑将有助于增进对人类再生能力缺陷的认识,促进人类再生医学的进展。

参考文献(References):

- [1] Poss KD. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(10): 710–722. DOI
- [2] Fleisch VC, Fraser B, Allison WT. Investigating regeneration and functional integration of CNS neurons: lessons from zebrafish genetics and other fish species. *Biochim*

- Biophys Acta*, 2011, 1812(3): 364–380. [DOI](#)
- [3] Johnson SL, Weston JA. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in zebrafish fin regeneration. *Genetics*, 1995, 141(4): 1583–1595. [DOI](#)
- [4] Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 2002, 298(5601): 2188–2190. [DOI](#)
- [5] Bernhardt RR, Tongiorgi E, Anzini P, Schachner M. Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J Comp Neurol*, 1996, 376(2): 253–264. [DOI](#)
- [6] Becker CG, Becker T. Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulfate glycosaminoglycans in zebrafish. *J Neurosci*, 2002, 22(3): 842–853. [DOI](#)
- [7] Becker CG, Lieberoth BC, Morellini F, Feldner J, Becker T, Schachner M. L1.1 is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7837–7842. [DOI](#)
- [8] Sadler KC, Krahn KN, Gaur NA, Ukomadu C. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, *uhrfl*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1570–1575. [DOI](#)
- [9] López-Schier H, Hudspeth AJ. A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49): 18615–18620. [DOI](#)
- [10] Poss KD. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(1): 36–45. [DOI](#)
- [11] Tal TL, Franzosa JA, Tanguay RL. Molecular signaling networks that choreograph epimorphic fin regeneration in zebrafish—a mini-review. *Gerontology*, 2010, 56(2): 231–240. [DOI](#)
- [12] Curado S, Stainier DY. deLiver'in regeneration: injury response and development. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(3): 288–295. [DOI](#)
- [13] Raya A, Koth CM, Buscher D, Kawakami Y, Itoh T, Raya RM, Sternik G, Tsai HJ, Rodríguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC. Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(Suppl 1): 11889–11895. [DOI](#)
- [14] 刘新星, 张雨田, 张博. 构建斑马鱼心脏损伤-再生模型的手术方法. *遗传*, 2013, 35(4): 529–532. [DOI](#)
- [15] Schnabel K, Wu CC, Kurth T, Weidinger G. Regeneration of cryoinjury induced necrotic heart lesions in zebrafish is associated with epicardial activation and cardiomyocyte proliferation. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18503. [DOI](#)
- [16] Chablais F, Veit J, Rainer G, Jazwinska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol*, 2011, 11: 21. [DOI](#)
- [17] Gonzalez-Rosa JM, Martin V, Peralta M, Torres M, Mercader N. Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development*, 2011, 138(9): 1663–1674. [DOI](#)
- [18] Wang JH, Panakova D, Kikuchi K, Holdway JE, Gemberling M, Burris JS, Singh SP, Dickson AL, Lin YF, Sabeh MK, Werdich AA, Yelon D, Macrae CA, Poss KD. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development*, 2011, 138(16): 3421–3430. [DOI](#)
- [19] Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, Poss KD. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 2006, 127(3): 607–619. [DOI](#)
- [20] Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua BJ. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, 2010, 464(7288): 606–609. [DOI](#)
- [21] Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DY, Poss KD. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4*⁺ cardiomyocytes. *Nature*, 2010, 464(7288): 601–605. [DOI](#)
- [22] 孙彬, 马鹏程, 陈桂来, 王祥川, 李云. 斑马鱼心脏再生的研究. *生命的化学*, 2011, 31(2): 312–316. [DOI](#)
- [23] Poss KD, Nechiporuk A, Hillam AM, Johnson SL, Keating MT. *Mps1* defines a proximal blastemal proliferative compartment essential for zebrafish fin regeneration. *Development*, 2002, 129(22): 5141–5149. [DOI](#)
- [24] Mundt KE, Golsteyn RM, Lane HA, Nigg EA. On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 239(2): 377–385. [DOI](#)
- [25] Petronczki M, Lénárt P, Peters JM. Polo on the rise—from mitotic entry to cytokinesis with Plk1. *Dev Cell*, 2008, 14(5): 646–659. [DOI](#)
- [26] Holtzinger A, Evans T. *Gata4* regulates the formation of multiple organs. *Development*, 2005, 132(17): 4005–4014. [DOI](#)
- [27] Hecklen-Klein A, Evans T. T-box binding sites are required for activity of a cardiac GATA-4 enhancer. *Dev Biol*, 2004, 267(2): 490–504. [DOI](#)
- [28] Lam NT, Currie PD, Lieschke GJ, Rosenthal NA, Kaye DM. Nerve growth factor stimulates cardiac regeneration via cardiomyocyte proliferation in experimental heart

- failure. *PLoS One*, 2012, 7(12): e53210. [DOI](#)
- [29] Ikeda K, Kundu RK, Ikeda S, Kobara M, Matsubara H, Quertermous T. Glia maturation factor- γ is preferentially expressed in microvascular endothelial and inflammatory cells and modulates actin cytoskeleton reorganization. *Circ Res*, 2006, 99(4): 424–433. [DOI](#)
- [30] Lien CL, Schebesta M, Makino S, Weber GJ, Keating MT. Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration. *PLoS Biol*, 2006, 4(8): e260. [DOI](#)
- [31] Kim J, Wu Q, Zhang Y, Wiens K M, Huang Y, Rubin N, Shimada H, Handin R I, Chao M Y, Tuan TL, Starnes VA, Lien CL. PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(40): 17206–17210. [DOI](#)
- [32] Jopling C, Suñe G, Morera C, Izpisua-Belmonte JC. p38 α MAPK regulates myocardial regeneration in zebrafish. *Cell Cycle*, 2012, 11(6): 1195–1201. [DOI](#)
- [33] Kikuchi K, Holdway JE, Major RJ, Blum N, Dahn RD, Begemann G, Poss KD. Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. *Dev Cell*, 2011, 20(3): 397–404. [DOI](#)
- [34] 甄一松, 惠汝太, 熊敬维. 心脏的再生性研究进展. 遗传, 2011, 33(11): 1159–1163. [DOI](#)
- [35] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 2011, 331(6020): 1078–1080. [DOI](#)
- [36] Engel FB, Hsieh PC, Lee RT, Keating MT. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(42): 15546–15551. [DOI](#)
- [37] Becker CG, Meyer RL, Becker T. Gradients of ephrin-A2 and ephrin-A5b mRNA during retinotopic regeneration of the optic projection in adult zebrafish. *J Comp Neurol*, 2000, 427(3): 469–483. [DOI](#)
- [38] Sirbulescu RF, Zupanc GK. Spinal cord repair in regeneration-competent vertebrates: adult teleost fish as a model system. *Brain Res Rev*, 2011, 67(1–2): 73–93. [DOI](#)
- [39] Cameron DA, Easter SJ. Cone photoreceptor regeneration in adult fish retina: phenotypic determination and mosaic pattern formation. *J Neurosci*, 1995, 15(3 Pt 2): 2255–2271. [DOI](#)
- [40] Liu KS, Fetcho JR. Laser ablations reveal functional relationships of segmental hindbrain neurons in zebrafish. *Neuron*, 1999, 23(2): 325–335. [DOI](#)
- [41] Shahinfar S, Edward DP, Tso MO. A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. *Curr Eye Res*, 1991, 10(1): 47–59. [DOI](#)
- [42] Fimbel SM, Montgomery JE, Burket CT, Hyde DR. Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci*, 2007, 27(7): 1712–1724. [DOI](#)
- [43] Sherpa T, Fimbel SM, Mallory DE, Maaswinkel H, Spritzer SD, Sand JA, Li L, Hyde DR, Stenkamp DL. Ganglion cell regeneration following whole-retina destruction in zebrafish. *Dev Neurobiol*, 2008, 68(2): 166–181. [DOI](#)
- [44] Curado S, Stainier DY, Anderson RM. Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 948–954. [DOI](#)
- [45] Montgomery JE, Parsons MJ, Hyde DR. A novel model of retinal ablation demonstrates that the extent of rod cell death regulates the origin of the regenerated zebrafish rod photoreceptors. *J Comp Neurol*, 2010, 518(6): 800–814. [DOI](#)
- [46] Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol*, 2006, 295(1): 263–277. [DOI](#)
- [47] Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. *Glia*, 2013, 61(5): 651–678. [DOI](#)
- [48] Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci*, 2007, 27(26): 7028–7040. [DOI](#)
- [49] Fausett BV, Goldman D. A role for α 1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci*, 2006, 26(23): 6303–6313. [DOI](#)
- [50] Thummel R, Kassen SC, Montgomery JE, Enright JM, Hyde DR. Inhibition of Müller glial cell division blocks regeneration of the light-damaged zebrafish retina. *Dev Neurobiol*, 2008, 68(3): 392–408. [DOI](#)
- [51] Becker CG, Becker T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor Neurol Neurosci*, 2008, 26(2–3): 71–80. [DOI](#)
- [52] Qin Z, Barthel LK, Raymond PA. Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(23): 9310–9315. [DOI](#)
- [53] Craig SE, Calinescu AA, Hitchcock PF. Identification of the molecular signatures integral to regenerating photoreceptors in the retina of the zebra fish. *J Ocul Biol Dis Inform*, 2008, 1(2–4): 73–84. [DOI](#)

- [54] Yurco P, Cameron D A. Cellular correlates of proneural and Notch-delta gene expression in the regenerating zebrafish retina. *Vis Neurosci*, 2007, 24(3): 437–443. [DOI](#)
- [55] Kassen SC, Thummel R, Campochiaro LA, Harding MJ, Bennett NA, Hyde DR. CNTF induces photoreceptor neuroprotection and Müller glial cell proliferation through two different signaling pathways in the adult zebrafish retina. *Exp Eye Res*, 2009, 88(6): 1051–1064. [DOI](#)
- [56] Thummel R, Kassen SC, Enright JM, Nelson CM, Montgomery JE, Hyde DR. Characterization of Müller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration. *Exp Eye Res*, 2008, 87(5): 433–444. [DOI](#)
- [57] Ramachandran R, Zhao XF, Goldman D. Insm1a-mediated gene repression is essential for the formation and differentiation of Müller glia-derived progenitors in the injured retina. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(10): 1013–1023. [DOI](#)
- [58] Munderloh C, Solis GP, Bodrikov V, Jaeger FA, Wiechers M, Malaga-Trillo E, Stuermer CA. Reggies/flotillins regulate retinal axon regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons. *J Neurosci*, 2009, 29(20): 6607–6615. [DOI](#)
- [59] Veldman MB, Bembem MA, Thompson RC, Goldman D. Gene expression analysis of zebrafish retinal ganglion cells during optic nerve regeneration identifies KLF6a and KLF7a as important regulators of axon regeneration. *Dev Biol*, 2007, 312(2): 596–612. [DOI](#)
- [60] Schweitzer J, Becker T, Becker CG, Schachner M. Expression of protein zero is increased in lesioned axon pathways in the central nervous system of adult zebrafish. *Glia*, 2003, 41(3): 301–317. [DOI](#)
- [61] Falk J, Bonnon C, Girault JA, Faivre-Sarrailh C. F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol Cell*, 2002, 94(6): 327–334. [DOI](#)
- [62] Schweitzer J, Gimnopoulos D, Lieberoth BC, Pogoda HM, Feldner J, Ebert A, Schachner M, Becker T, Becker CG. Contactin1a expression is associated with oligodendrocyte differentiation and axonal regeneration in the central nervous system of zebrafish. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 35(2): 194–207. [DOI](#)
- [63] Münzel EJ, Schaefer K, Obirei B, Kremmer E, Burton EA, Kuscha V, Becker CG, Brösamle C, Williams A, Becker T. Claudin k is specifically expressed in cells that form myelin during development of the nervous system and regeneration of the optic nerve in adult zebrafish. *Glia*, 2012, 60(2): 253–270. [DOI](#)
- [64] Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev Neurobiol*, 2012, 72(3): 429–461. [DOI](#)
- [65] Kan NG, Junghans D, Izipisua-Belmonte JC. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *FASEB J*, 2009, 23(10): 3516–3525. [DOI](#)
- [66] Curado S, Anderson RM, Jungblut B, Mumm J, Schroeter E, Stainier DYR. Conditional targeted cell ablation in zebrafish: a new tool for regeneration studies. *Dev Dyn*, 2007, 236(4): 1025–1035. [DOI](#)
- [67] Curado S, Ober EA, Walsh S, Cortes-Hernandez P, Verkade H, Koehler CM, Stainier DY. The mitochondrial import gene tomm22 is specifically required for hepatocyte survival and provides a liver regeneration model. *Dis Model Mech*, 2010, 3(7-8): 486–495. [DOI](#)
- [68] Michalopoulos GK. Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(2): 173–179. [DOI](#)
- [69] Dovey M, Patton EE, Bowman T, North T, Goessling W, Zhou Y, Zon LI. Topoisomerase II α is required for embryonic development and liver regeneration in zebrafish. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(13): 3746–3753. [DOI](#)
- [70] Goessling W, North TE, Lord AM, Ceol C, Lee S, Weidinger G, Bourque C, Strijbosch R, Haramis AP, Puder M, Clevers H, Moon RT, Zon LI. APC mutant zebrafish uncover a changing temporal requirement for wnt signaling in liver development. *Dev Biol*, 2008, 320(1): 161–174. [DOI](#)
- [71] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 836–847. [DOI](#)
- [72] Poss KD, Shen JX, Keating MT. Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev Dyn*, 2000, 219(2): 282–286. [DOI](#)
- [73] Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A. Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn*, 2003, 226(2): 202–210. [DOI](#)
- [74] Knopf F, Hammond C, Chekuru A, Kurth T, Hans S, Weber CW, Mahatma G, Fisher S, Brand M, Schulte-Merker S, Weidinger G. Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev Cell*, 2011, 20(5): 713–724. [DOI](#)
- [75] Tu S, Johnson SL. Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Dev Cell*, 2011, 20(5): 725–732. [DOI](#)
- [76] Sousa S, Afonso N, Bensimon-Brito A, Fonseca M, Simões M, Leon J, Roehl H, Cancela ML, Jacinto A. Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development*, 2011, 138(18): 3897–3905. [DOI](#)
- [77] Singh SP, Holdway JE, Poss KD. Regeneration of amputated zebrafish fin rays from de novo osteoblasts. *Dev Cell*,

- 2012, 22(4): 879–886. [DOI](#)
- [78] Stewart S, Stankunas K. Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol*, 2012, 365(2): 339–349. [DOI](#)
- [79] Kawakami Y, Rodriguez Esteban C, Raya M, Kawakami H, Marti M, Dubova I, Izpisua-Belmonte JC. Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev*, 2006, 20(23): 3232–3237. [DOI](#)
- [80] Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Riehle KJ, Hubbert C, Major MB, Fausto N, Moon RT. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development*, 2007, 134(3): 479–489. [DOI](#)
- [81] Akimenko MA, Johnson SL, Westerfield M, Ekker M. Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development*, 1995, 121(2): 347–357. [DOI](#)
- [82] Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell*, 2000, 103(7): 1099–1109. [DOI](#)
- [83] Poss KD, Shen JX, Nechiporuk A, McMahon G, Thisse B, Thisse C, Keating MT. Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol*, 2000, 222(2): 347–358. [DOI](#)
- [84] Whitehead GG, Makino S, Lien CL, Keating MT. *fgf20* is essential for initiating zebrafish fin regeneration. *Science*, 2005, 310(5756): 1957–1960. [DOI](#)
- [85] White JA, Boffa MB, Jones B, Petkovich M. A zebrafish retinoic acid receptor expressed in the regenerating caudal fin. *Development*, 1994, 120(7): 1861–1872. [DOI](#)
- [86] Quint E, Smith A, Avaron F, Laforest L, Miles J, Gaffield W, Akimenko MA. Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and *bmp2b* or exposure to cyclopamine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 8713–8718. [DOI](#)
- [87] Smith A, Avaron F, Guay D, Padhi BK, Akimenko MA. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. *Dev Biol*, 2006, 299(2): 438–454. [DOI](#)
- [88] Thatcher EJ, Paydar I, Anderson KK, Patton JG. Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(47): 18384–18389. [DOI](#)
- [89] Yin VP, Thomson JM, Thummel R, Hyde DR, Hammond SM, Poss KD. Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 728–733. [DOI](#)