DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230203

单细胞转录组学技术在肢体再生研究中的应用

尹福玲，林梓杰，王亚宁，张宏波*

（中山大学中山医学院，干细胞与组织工程教育部重点实验室，广东 广州 510080；
中山大学中山医学院-附属第一医院先进医学技术研究中心，广东 广州 510080）

【摘要】蝾螈具有极强的肢体再生能力，爪蟾在发育过程中再生能力则逐渐下降，而人类和其它哺乳动物的成年个体没有肢体再生能力。借助单细胞转录组学技术可以分析细胞转录水平的优势，以蝾螈、爪蟾等肢体可再生的动物为模型，近年研究已发现并鉴定了一系列调控肢体再生的关键基因、信号通路和细胞类群，提示再生能力存在潜在的进化保守机制。单细胞转录组学技术在跨物种研究中的应用，使得免疫细胞、成纤维细胞类型和能量代谢机制对再生的重要影响得到进一步挖掘，再生组织细胞来源和异质性得以进一步明确，为解释再生相关机制奠定理论依据。单细胞多组学技术的发展和应用将有望为进一步研究有效提升哺乳动物再生能力指明方向。

【关键词】单细胞转录组学；肢体再生；肢芽；胚芽

中图分类号：R339.3+7　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2023）02-0022-09

Single-cell transcriptomics technology and its application in limb regeneration research

Yin Fuling, Lin Zijie, Wang Yaning, Zhang Hongbo*

(Key Laboratory for Stem Cells and Tissue Engineering, Ministry of Education, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China;
Advanced Medical Technology Center, The First Affiliated Hospital, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China)

【**Abstract**】Salamanders have a strong ability to regenerate limbs, while this potential is progressively declined in frogs during development. With evolution, adults of humans and other mammals completely lose the ability to regenerate limbs. With the advantages of single-cell transcriptomics in analyzing cellular transcription, a number of key genes, cell populations and signaling pathways regulating limb regeneration have been identified using salamanders and frogs as research models in recent years. This suggest that there are potential evolutionary conserved regulatory mechanisms for limb regeneration. With the help of single-cell transcriptomics, cross-species studies have allowed the important roles of immune cells, fibroblasts and energy metabolism on regeneration to be further explored. Together with advances in confirming the regeneration origination and cell heterogeneity, the current studies using single-cell techniques have provided the theoretical basis for understanding regeneration-related mechanisms. The development and application of single-cell multi-omics technologies could hopefully figure out the way for further research to effectively enhance the regenerative capacity of mammals.

【**Keywords**】Single-cell transcriptomics; Limb regeneration; Limb bud; Blastema

---

收稿日期：2023-04-15；**修回日期**：2023-05-16

基金项目：广东省自然科学基金面上项目（2021A1515012065）；科技部国家重点研发计划项目（2019YFA0801703；2022YFA1104904）

通信作者：张宏波（1984-），男，湖南衡阳人，教授，主要从事干细胞代谢和衰老相关研究。E-mail: zhanghongbo@mail.sysu.edu.cn

动物界中存在广泛的再生现象：无脊椎动物水螅残体碎片可快速再生为完整个体[1-3]，脊椎动物中鱼纲的斑马鱼可以再生鳍[4, 5]，爬行动物壁虎断尾[6]及两栖纲蝾螈断肢均可再生[7]，但同为两栖动物的爪蟾的再生能力随生长发育而下降，进化至哺乳动物后肢体和器官的再生能力基本丢失。人类儿童期尚可以再生截断的手指尖端，而在成年后这种再生能力完全丧失。肢体再生的一般模式也得到更细致的描述，即肢端受损后伤口表面首先形成表皮，随后表皮下方形成胚芽组织，胚芽组织中细胞受到环境因素的调节，经增殖、分化和迁移，重新形成肢体或不完全再生[8, 9]。肢体再生现象与进化过程中再生能力的逐渐丧失原因及机理长期以来是生命科学和基础医学的研究热点。肢体再生不仅是揭示复杂细胞命运决定机理的理想模型，而且其深入研究对再生医学的发展具有决定性意义。肢体损伤、缺失作为常见遗传缺陷和事故中的高发疾病，可引发人们对肢体再生的直接需求。此外，多种常见疾病如糖尿病、血管疾病也容易导致肢体损伤[10, 11]，却一直没能找到完美的治疗方法，造成全球残疾人口规模庞大。肢体缺失造成的失能问题也导致患者个人生活质量下降和社会生产力的下降，进而增加社会总体负担[12, 13]。因而，肢体再生研究不仅具有重要的理论价值，也具有解决肢体损伤再生的现实医学难题、提高患者生活水平、减轻因疾病带来的家庭和社会负担的现实意义。

1 单细胞转录组学技术的发展现况

转录组是指细胞或组织在某一特定发育阶段或功能状态下其基因组转录出来的所有RNA的集合，具有作为蛋白质合成模板、指导蛋白质合成的功能。转录组对解码基因组结构和功能、鉴定生命活动背后的基因表达变化、探索基因与蛋白质之间的联系等有着重要作用。转录组学技术已经广泛应用于生物学、医学等领域，如在生物学中分析不同物种转录组差异，在分子水平上探索物种进化规律，在医学中用于研究病原微生物致病机制及其与宿主之间的相互作用等。

传统的转录组学分析是对大量混合细胞转录组进行研究（Bulk Transcriptome）。然而受单细胞分离纯化技术、单细胞可获取RNA总量及扩增技术局限，传统的混合细胞转录组学仅能对组织水平的总体基因表达进行分析，无法研究细胞水平的异质性，造成信息丢失、分辨精度下降。自2009年首个高通量单细胞RNA测序方法提出以来[14]，单细胞转录组测序（Single-cell transcriptome）技术不断发展，并衍生出多种相关单细胞技术，如Chromium、Smart-Seq、CEL-Seq、Drop-Seq、inDrop等。其中常用的Smart-Seq技术通过逆转录、预扩增等手段，提高cDNA产量和长度，提高了检测的覆盖率和精确度[15]；CEL-Seq技术通过扩增前对样本进行编码和混合，克服了单样本掩盖潜在微量表达RNA的问题，实现了对复杂组织的分析[16]；Drop-Seq技术可对大量细胞同时分析，实现了转录组学分析的提速，扩大了应用的范围[17]。独立于上述技术之外的单细胞染色体可及性检测技术scATAC-Seq可以在不检测RNA水平的条件下通过检测染色体的开放程度，从表观遗传水平研究基因的潜在转录倾向性[18]。随着技术不断进步，转录组学技术在近些年得到了广泛的应用，在肢体再生的研究领域取得了诸多进展。本论文简述单细胞转录组学的进展及其在肢体再生研究中的应用，重点讨论近年来借助单细胞组学技术发现的若干与肢体再生相关的关键机制，并从进化的角度分析哺乳动物肢体再生能力丧失的可能原因。

2 单细胞转录组学技术在肢体再生中的应用成果

2.1 进化背景下肢体再生的潜在机制

蝾螈等四足动物肢体在肌肉、骨骼和手指的发育模式已被观察到与肺鱼等肉翅目鱼类相似[19]，基于二者的亲缘关系，该发现提示其或存在相似的再生特征。的确，通过单细胞转录组学技术对比两者的再生早期胚芽与未损伤组织，并进行差异基因功能富集分析，研究发现两者具有相似的再生模式。例如，两者再生胚芽中均上调的基因有*Mmp11*、*Sall4*、*Msx2*、*Wnt5a*、*Fgf8*和*Fgf10*，均下调的基因有*Mybpc2*、*Casq1*、*Myoz1*、*Smpx*和*Tnnt3* [4]等。针对特定基因的研究发现，*Msx1*、*Fgf10*、*Runx1*基因在非洲爪蟾[20]、蝾螈[8, 21]、肉翅目鱼类[4]再生过程中呈现类似的时空表达模式。不同的是，*Dio3*和*Runx1*基因在小鼠和肉翅目鱼类虽然均在再生期间上调[4]，但呈现相反的空间分布[22]，即在小鼠和肉翅目鱼类再生第9天观察到*Dio3*主要表达于远端，而*Runx1*主要表达于近端。上述发现说明四足动物与肉翅目鱼类的再生能力存在遗传调控模式的相似性。在小鼠指尖再生胚芽中*Sox9*或*Sp7*标记的骨骼前体细胞群体主要分化为骨与骨膜细胞，*VE-*

*cadherin*或*Tie2*标记的细胞主要分化为血管内皮细胞[23, 24]，提示哺乳动物指尖再生中基因表达可能存在细胞类型特异性。借助单细胞转录组，研究进一步发现*Mest*广泛表达于胚芽，提示*Mest*可能是再生特异性的标志基因[25]。对哺乳动物如人类和小鼠相同差异表达基因在肢体再生不同时期的分布、功能差异等的进一步研究，或可解释不同物种再生能力的差异。

2.2 再生过程中幼态持续具有重要作用

蝾螈存在幼态持续（Neoteny）现象，这主要是因为其下丘脑—垂体—甲状腺轴功能低下，促甲状腺激素的释放受损且失去活性，导致成熟障碍[26]。此外，断肢再生时，编码催化甲状腺激素失活酶的*Dio3*基因表达量上调[4]，提示幼态持续在蝾螈的再生中可能存在重要的作用。有研究为探究成熟进程对蝾螈再生的影响，通过外源性补充甲状腺激素的方式使其达到最成熟的状态，发现成熟状态的蝾螈再生能力明显下降，并出现增殖速度减弱以及再生畸形[27]。进一步单细胞转录组学分析发现，幼态持续蝾螈再生组织中主要富集表达基因为*Gata4*、*Gata6*和*Pdgfra*，功能富集于发育，而成熟后蝾螈高表达的基因是Wnt信号激活因子*Caprin2*和环境应激激活因子*Ppm1d67*，功能富集于肌肉结构的发育、骨骼发育和组织形态发育等。蝾螈各器官系统的细胞类型及基因表达类型都向着成熟方向转变，使其更适应陆地生活，而脑神经和眼上皮细胞则表现出持续发育的状态，可能对维持再生能力具有重要调节作用[28]。此外，参与肿瘤抑制的*A2m*基因的表达水平在蝾螈中持续上升[28]，而在人类中则随年龄下降[29]。并且在蝾螈心、肝中鉴定出表达升高的基因和人类疾病的致病基因相同，如*Gata4*基因在心脏高表达，会导致人类的先天性心脏病[28]。上述发现提示幼态持续在蝾螈再生能力的维持中至关重要。

然而，目前关于幼态持续对哺乳动物肢体再生作用的研究较少。值得注意的是，对真社会性哺乳动物裸鼹鼠的研究发现3个月大的幼鼠和成年鼠的死亡和疾病概率均随机。据冈珀兹定律和年龄相关表型等推测，裸鼹鼠可能是一种幼态持续的哺乳动物[30]。此外在神经损伤的研究中，研究人员发现裸鼹鼠轴突损伤反应明显区别于其它哺乳动物，视网膜神经节细胞存活能力和轴突再生程度更高[31]。推测裸鼹鼠可能具有较强的肢体再生能力，但具体机制仍有待进一步研究。综合上述研究结果，我们推测哺乳类动物再生能力下降可能是机体适应复杂陆地生活的结果，与再生能力一同下降的可能还有抑制癌基因活性的能力。因此，在高等动物中以阻断发育或者延迟发育的方式构建幼态持续模型，将有望探究恢复其再生机制的可能性。同时，探究抑癌基因调控机制在蝾螈和哺乳动物之间的差别，可能能为高等动物在抑癌和再生中寻找相对平衡，从而一定程度上为再生能力的丧失提供补救方法。

2.3 解码再生的代谢调控机制

能量供应是影响再生能力的重要因素。近期研究发现[32]代谢需求增加而供能不足是年龄增长所致再生能力受限的重要原因。对衰老组和年轻组小鼠断趾胚芽的单细胞空间转录组分析发现，衰老小鼠断趾胚芽的能量代谢需求增高，造成细胞内形成低氧环境，并由此促进近端的血管标志物含量上升及血管生成、骨骼再生异常[32]。而外源补充能量代谢中产物草酰乙酸能够增强糖代谢，并部分通过WNT通路在一定程度上恢复再生能力[32]。这说明改善代谢情况有助于恢复年龄增长带来的再生受限。此外，研究发现在蝾螈胚芽中同样存在线粒体高活性细胞群体，该细胞类群以*TOMM20*为标志，在断肢再生部位高度富集。分析显示，部分软骨细胞同样具有较高的能量代谢及损伤修复活性，并且与线粒体高活性细胞群体空间定位相近[33]。此两类细胞群体的高能量代谢特性可能为促进蝾螈断肢部位细胞分化、应激抵抗等提供必要的能量以促进组织重塑。

在代谢调控机制的研究中，MC4R是哺乳动物中枢调控能量平衡中黑皮质素系统的关键参与者。有研究发现MC4R信号调节非洲爪蟾蝌蚪和小鼠的指尖再生，并且*Mc4r*基因敲除或特异性拮抗物均导致小鼠指尖再生失败，说明该代谢调控机制影响再生能力。值得关注的是，该研究还观察到α-MSH和MC4R在肢体神经中表达，并且在肢体胚芽和伤口再生表皮中上调。当肢体去神经支配时两者的表达水平会降低，由此推测α-MSH/MC4R信号传导可能协调肢体再生中的神经发挥作用[34]。此外，代谢调控方式在机体成熟过程中发生改变，如对小鼠心肌再生的研究证实甲状腺激素水平上升对再生具有抑制作用[35]。但代谢调控方式改变如何调控肢体再生仍有待进一步研究明确。

2.4 再生过程中骨骼肌细胞与软骨细胞作用的研究进展

肌肉的功能被证实与皮肤结构、内皮细胞功能

等相关[36]。研究表明，在哺乳动物中*Pax3*敲除导致肌肉迁移到肢芽失败[37]，推测骨骼肌在再生中可能存在重要作用。并且，在蝾螈中，Nowoshilow等[38]发现，*Pax3*基因缺失且功能转移到*Pax7*基因上。为探究骨骼肌在肢体再生中的重要性，有研究选用*Pax7*即骨骼肌干细胞标志基因突变的蝾螈进行试验。研究发现，*Pax7*突变致肢体骨骼肌和肌卫星细胞因早期发育缺陷而完全丧失[38]，从而提出骨骼肌对肢体再生具有重要作用。然而，最近借助单细胞测序的研究工作对这一结论提出了异议。研究人员对蝾螈进行截肢处理并以相同处理的正常蝾螈作对照，结果显示，在没有骨骼肌的情况下，实验组蝾螈出现了再生延迟的现象，但这种再生的延迟可能为肌肉缺陷导致摄食不足、营养缺乏所致。的确，骨骼肌缺失蝾螈再生后肢体的形态和结构与对照组相似，仅关节畸形，且单细胞转录组分析表明除骨骼肌外全谱系细胞类型均表达[7]。上述研究表明，骨骼肌细胞可能不是肢体再生所必需的细胞类型，但骨骼肌在关节正常结构的形成中或起重要作用。

软骨细胞在肢体再生中的作用是目前研究较少的领域。已有研究观察到，成熟非洲爪蟾肢体再生失败而产生尖刺状的软骨结构[39]，截肢位点靠近近端时再生能力出现下降[40]，考虑到近端更有可能存在成熟的软骨结构，上述发现提示，软骨具有潜在抑制再生的作用。最近的研究发现，非洲爪蟾成纤维细胞生长因子10（Fibroblast Growth Factor 10，FGF10）缺失会导致肢体发育障碍，而外源性添加FGF10能提高非洲爪蟾肢体再生能力[41]。研究进一步证实，*Fgf10*是*Noggin*上游控制基因，后者在软骨生成谱系细胞表达产生分泌性抑制因子，能阻碍非洲爪蟾的顶端—外胚层—脊（Apical-Ectodermal-Ridge，AER）形成。AER是再生组织的重要来源，抑制AER形成导致肢体再生能力下降[42]。近期研究进一步通过单细胞转录组学分析发现，FGF10处理的胚芽细胞中软骨形成相关基因下调的同时，*Wnt3a*基因的表达水平显著上调，使伤口表面组织细胞处于更活跃的增殖状态[43]，后者具有潜在促进胚芽形成的作用[44-46]。同时在肢芽与胚芽的对比中，肢芽相较于胚芽特异性表达*Nog*、*Irx3*、*Dact1*[47]。上述研究提示，软骨发育、Wnt通路活性增强是其再生能力下降的潜在因素。此外，在有关蝾螈的研究中发现，软骨细胞通过分泌COL1A1等细胞外基质成分促进顶端上皮盖（Apical Epithelial Cap，AEC）迁移，进而促进胚芽的形成[33]，提示软骨对维持再生能力也具有潜在的作用。综上所述，软骨细胞在肢体再生中存在双向性作用，再生过程中，一方面，非洲爪蟾的研究中软骨生成谱系细胞分泌抑制因子Noggin，导致肢体再生能力下降；另一方面，在蝾螈的研究中，软骨细胞通过分泌细胞外基质成分促进AEC迁移，进而促进胚芽的形成。但其具体机制尚不清楚，有待进一步研究明确。

2.5 肢体再生中免疫调节研究进展

免疫一直是再生领域研究的重点，免疫系统调控对肢体再生亦不可或缺[48]。长期以来，困于研究条件限制，人们无法真正了解免疫细胞和免疫反应在再生中的作用。借助于单细胞转录组学技术，我们得以聚类分析出再生组织中的免疫细胞类型，并为进一步研究提供方向。

巨噬细胞在纤维化中具有潜在抑制作用。纤维化过度造成疤痕形成是哺乳动物组织再生面临的重要问题，而蝾螈无疤痕完全再生的机制一直是研究的重点。再生早期的炎症反应有助于胚芽的形成[33]，已有研究证实抑制巨噬细胞可以在不同组织中减轻纤维化[49]，而巨噬细胞耗竭会导致蝾螈肢体[50]和心脏[51]的再生失败。借助单细胞转录组技术的优势，通过对蝾螈和小鼠伤口部位巨噬细胞的聚类和比较，研究发现，小鼠伤口处有关于促消炎与抗炎的一类巨噬细胞缺失[52]。另有研究通过聚类发现一类成纤维细胞与巨噬细胞联系紧密[25]。该成纤维细胞和缺失的巨噬细胞在肢体再生的功能上是否存在共性，以及是否参与调节纤维化水平都值得深入研究。同时，研究缺失的巨噬细胞类型在哺乳动物体内是否存在，或探究该类群在蝾螈再生中的作用机制都将为问题的解决提供契机。

此外，应用单细胞转录组学技术对蝾螈和小鼠的再生组织进行分析，研究发现蝾螈再生组织中细胞纤维化调控在全过程中保持低水平，且细胞外基质参与的修复机制显著区别于小鼠[52]，呈现快速沉积与重塑的趋势。具体表现为，蝾螈中纤维化调控通路关键基因*Tgf-β1*、*Runx2*、*Smad2*的表达在所有阶段都保持低水平[52]，而在小鼠中则呈现相对广泛的表达。细胞外基质沉积相关基因*Sall4*、*col12a1*、*Mmp2*、*Lama1*[53]的表达水平在蝾螈再生中持续升高，而在小鼠中未检测到或表达量很低。已有研究证实，外源性补充层粘连蛋白α1链被证实可以一定程度上挽救层粘连蛋白α2链缺乏造成

的负面影响[54]，对lama等细胞外基质沉淀蛋白的进一步深入研究将可能发现哺乳动物再生能力的补救途径。同时小鼠巨噬细胞分泌的TGF-β所介导的衰老相关下游通路活性增强[52]，提示TGF-β途径的下游调控机制可能发生改变，该途径的表达改变与巨噬细胞之间的关联也有待进一步研究。

肢体再生伴随免疫特征细胞的出现，免疫功能的改变。对蝌蚪时期的非洲爪蟾胚芽的细胞聚类和基因差异性表达分析发现，经FGF10处理促进再生的胚芽细胞中*ctsh.L*、*gzmh.L*基因出现表达含量的下调[43]，前者参与细胞粘附、抗原呈递，后者是介导细胞毒性的蛋白酶[55]。这表明再生过程中，爪蟾的免疫功能发生一定程度下调。同时，另一个以*Steap4*基因表达作为标志的免疫相关细胞群体被鉴定出来。肢体再生过程中该群体表达免疫相关基因*mmp8.L*和*chit1.S*的水平显著上调[43]，二者在活化的中性粒细胞及巨噬细胞中表达较高，提示免疫系统可能对胚芽再生起重要调控作用。此外，研究者为探究蝾螈血小板聚集迅速的潜在机制，对血小板进行了分析聚类，发现了同时表达淋巴细胞与血小板标志基因的群体[56]。这些研究表明在肢体再生过程中类似具有免疫特征细胞的出现和免疫功能的改变可能为肢体成功再生的共同特征。当前有关哺乳动物再生中免疫调控的研究仍然较少，主要原因是其再生能力受限、动物模型少及研究体系相对复杂。有相关研究发现，氯膦酸盐脂质体耗竭胚芽巨噬细胞可抑制破骨细胞生成和骨降解，并抑制胚芽形成和再分化，从而抑制小鼠指尖再生[57]。另有研究发现，脾和胸腺来源的自然杀伤细胞（Natural Killer cell，NK）在过继性转移到免疫缺陷小鼠后，可募集到其胚芽。脾来源NK细胞可能通过调控NCR1促进间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cells，MSC）增殖并分化为成骨细胞，促进骨形成，从而促进再生；胸腺来源NK细胞可能通过抑制MSC和破骨细胞增殖分化，使其凋亡，从而抑制再生[58]。这提示固有免疫细胞在哺乳动物肢体再生中存在一定调节作用。

2.6 再生组织来源的去分化学说

关于再生组织的来源有两种主要观点，即去分化学说与原始祖细胞学说。前者被认为是已分化的细胞去分化而重新获得多能性，进而再分化为不同组织，重建残肢；后者被认为是伤口底层存在的原始祖细胞增殖分化，进而进行重建。

借助单细胞转录组学技术的优势，近期研究中，去分化学说得到了较多的研究支持。为探究间充质去分化以及重塑的可能性，有研究对非洲爪蟾胚芽进行基因差异表达分析，发现一个表达相对稳定的成纤维细胞群体，在截肢后表达多种祖细胞相关基因[42]。此外同样的现象也在蝾螈的施旺细胞中被观察到[59]，支持去分化以及重塑的可能性。已知在再生过程中，细胞发生快速增殖，为探究两个学说的可能性，有研究综合考虑细胞周期及细胞数量在胚芽期间的变化，经计算推测在小鼠指尖再生中原有间充质细胞至少有20%处于未分化状态才能与中期胚芽的真实情况相符合[60]，因而去分化学说成立或占主导地位。

但现有研究结果仍不能排除原始祖细胞学说成立的可能性。有研究将再生阶段的细胞覆盖在集成数据集上进行综合分析，发现没有细胞群是孤立的，即所有未截肢的细胞类型都存在于小鼠指尖再生胚芽的不同时期[25]。同时另有研究发现了潜在的胚芽的多能祖细胞，在蝾螈胚芽早期明显增殖并高表达*Pcna*基因，并出现在细胞各时期[61]，表明原始祖细胞理论可能成立。

2.7 再生组织异质性的研究进展

肢芽和胚芽间的异质性：肢芽，指的是肢体发育中潜在形成肢体的部分；胚芽，指的是再生中伤口早期形成的组织泡。蝾螈肢体再生过程中，发育相关的转录因子如*Six1*、*Eya1*、*Scx*和*Sox2*[59]的表达提示再生与发育之间存在紧密的联系。蝾螈肢芽与胚芽之间存在少量差异性表达基因，如视黄酸受体基因*Rarres1*、原癌基因*Myc*、丝氨酸/苏氨酸激酶基因*Pim1*等。而在再生能力相对下降的非洲爪蟾中，两者之间存在明显差异，仅在肢芽中表达的基因有软骨发育标志*Nog*、骨矿化相关基因*Irx3*、Wnt通路相关基因*Dact1*，仅在胚芽中表达的基因有*matrilines*（*Matn1*和*Matn2*）、细胞粘附相关基因*Hapln3*和*Mfge8*[60]。因此，胚芽的发育与肢芽呈现不完全相关性，在蝾螈中，两者的相关性程度较高，而在非洲爪蟾中较低，提示可能是再生能力受限的潜在原因。

细胞异质性：研究发现蝾螈断肢再生的胚芽中存在极大的细胞类型及功能异质性[62]，如胚芽中存在结缔组织细胞、免疫相关细胞等多种不同细胞类型，且其功能参与断肢再生的多方面过程。有研究利用单细胞转录组分析发现蝾螈胚芽中结缔组织细胞存在多个不同亚型，如成纤维细胞型、腱细胞型、骨骼周细胞等[63]。这些细胞在再生时丢失成体表型，进入一个具有多能性的、胚胎的肢芽状表

型[63]。这种成体细胞可能对于调节肢体形态、促进肢体再生具有重要作用。肢体再生中也发现了多种免疫细胞，如朗格汉斯细胞、巨噬细胞、B细胞和T细胞等[59, 61]。这些免疫细胞对肢体再生发挥潜在调节作用，其中已有研究观察到巨噬细胞可通过分泌抗炎细胞因子促进蝾螈早期断肢再生[49]，其它机制有待进一步研究。

组织异质性：主要包括伤口表面组织异质性和伤口内部组织异质性。针对伤口表面组织的异质性，当前研究已经鉴定出了三种伤口表面组织，分别是在蝾螈中的AEC[64]、在非洲爪蟾中的AER[42]，也即定义为肢体发育期间表达*Fgf8*的表皮细胞，以及在非洲爪蟾尾部特异性表达的再生组织细胞（Regeneration-Organizing Cells，ROCs）[65]。诱导形成AEC一直是研究再生受限的一个潜在方向[66]。研究表明[42]，AEC和AER组织的基因表达与细胞特性大致相同，仅在其信号中心电位的大小上有所不同。但信号通路富集分析显示AER细胞同时高表达多个主要信号通路（FGF、BMP、WNT和TGFβ）的配体，是高效的信号中心[42]。上述结果表示[42]AER具有AEC类似的潜能，但是其活性无法达到AEC所能被激活的水平才是再生受限的潜在原因。同时AER在不同再生能力的蝌蚪中细胞数量以及基因表达也存在差异，以及Noggin处理导致AER在鸡[67]和非洲爪蟾[68]中出现相反的变化，说明AER的形成并不稳定，AEC和AER形成中的调节机制可能存在差异，有待进一步研究。针对再生组织内部的异质性，研究表明，再生组织会形成近端-远端轴，两端的基因表达存在差异，近、远端标志物分别为*Meis1*和*Hoxd13*。近期研究还发现非蝾螈特有的*Tig1*基因表达水平沿着近端-远端轴呈现分级表达，并且可能在*Prod1*基因上游发挥功能，后者是蝾螈特有基因，也是当前假定的近端-远端轴组件，说明近端-远端轴的调控作用在其进化中具有潜在保守性[69]，有助于组织类别定位的研究。AER在截肢远端部分表达活跃，而近端部分不表达，而软骨在二者之间的发育情况截然相反[42]，表明两端的发育促进机制可能存在差异。

基因表达异质性：在肢体再生胚芽中的基因组与正常组织相同，但基因表达情况不尽相同。转录组学研究发现蝾螈再生胚芽中特异性表达*Kazald1*，该基因敲除使肢体再生延迟，而过表达导致肢体畸形，提示*Kazald1*表达可能对维持蝾螈正常再生有重要作用[70]。这提示寻找肢体再生中特异性表达或沉默的基因，探索其在肢体再生中的作用，可能有助于寻找促进肢体再生的干预靶点。

3 单细胞转录组学技术向多组学联合分析发展

在单细胞研究领域中，除转录组外的其它技术也在不断发展，出现了ATAC-Seq、空间转录组学、单细胞代谢组学技术等诸多技术。ATAC-Seq技术利用转位酶研究染色体开放序列，可以鉴定核小体的位置、鉴定重要的转录因子、生成表观基因组的图谱[71]。空间转录组学技术在空间维度探究细胞类型及基因表达，可明确组织内细胞定位并揭示时序依赖的细胞谱系分化过程，有助于探究细胞-细胞互作调控[72]。单细胞蛋白质组学、表观遗传组学和代谢组学技术在生化层面解码蛋白质、表观遗传修饰和代谢物差异，有助于细胞类型、生理生化特征、基因和蛋白活性调节的研究，在疾病的研究领域有着很大的应用前景[73]。

在传统技术研究中，由于胚芽中存在细胞类型的异质性，并且部分再生相关基因在胚芽与其周围组织的细胞中存在共表达，准确识别胚芽特异基因往往受阻。而单细胞转录组学技术通过筛选出特定的细胞标志物，能够弥补传统技术无法精确区分细胞类型特异性调控机制的缺陷。然而，单细胞转录组学技术在解读代谢和空间信息、多组织时空分化以及建立肢体再生模式等方面仍存在较大局限性。空间转录组技术的成功运用能够提供更为全面的解决方案。以ATAC-Seq和空间转录组技术为例，其单独运用已揭示许多重要发现，如利用ATAC-Seq发现热带爪蟾蝌蚪尾部成功再生需要HDAC和EZH2使开放染色质发生构象改变，而抑制HDAC和EZH2后分别引起再生尾部中神经元轴突再生基因表达下降和巨噬细胞数量减少，提示染色体可及性对肢体成功再生具有重要作用[74]。有研究应用空间转录组技术发现年轻小鼠指尖再生胚芽中细胞增殖能力更为旺盛，而年老小鼠再生能力几近丧失，这与其能量需求增加而代谢水平下降密切相关[32]。

近年来，尽管多组学联合应用的意义与价值已在其它研究中得以体现[75]，但当前尚无相关研究系统性揭示肢体再生机制。未来可预期的研究策略可通过单细胞ATAC-Seq和转录组技术确定细胞特异的可及染色体区域调控、基因表达调控，联用空间转录组技术明确再生组织的空间迁移规律，将有助于发掘肢体再生中更加精细的调控机制。通过两种

及以上的组学研究方法联合应用，结合空间位置信息、表观基因组、基因转录谱、蛋白质谱、代谢相关信息，可以提高组织中细胞亚群的分辨率，获知细胞位置信息和细胞相互作用，并在分子机理上揭示转录因子对基因的激活作用、基因之间存在的沟通联系、特定细胞功能等，从而全面地研究包括肢体在内的组织再生详细分子机理。

4 结论和展望

肢体再生研究有着极为重要的基础理论价值和潜在应用前景，且相关的再生机制可能为其它器官再生提供潜在的研究方向，为医学技术发展带来更大的突破。诚然，当下研究为揭示再生机制和实现哺乳动物肢体再生提供了诸多可能性。但再生相关机制涉及通路数量众多，细胞之间的调控作用异常复杂，且研究使用的模式动物诸如斑马鱼、蝾螈、非洲爪蟾、小鼠等存在种间差异，同时蝾螈还存在种内差异，综上因素导致研究结果存在适用的局限性，且现有研究成果的跨物种应用可能性还有待进一步论证。技术进步往往能极大程度地促进理论研究，现有单细胞转录组学技术已出现诸多新进展，多组学联合分析的应用也已取得可观的成果[32，75]。然而，当下对单细胞组学技术在肢体再生中的应用研究还有待进一步发展、推广与深化。当下领域中诸多方面也有待提高，例如单细胞类群鉴定的可重复性、多平台及跨物种数据整合的可实现性和可靠性、非编码序列的可及性和可解读性、基因表达与生物学功能的可联系性等[59，61]，上述问题有望在后续技术进步和领域发展中得到解决。

参考文献

[1] BODE H R. Head regeneration in Hydra[J]. Dev Dyn, 2003, 226(2): 225-236.

[2] BOSCH T C. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration[J]. Dev Biol, 2007, 303(2): 421-433.

[3] VOGG M C, BUZGARIU W, SUKNOVIC N S, et al. Cellular, metabolic, and developmental dimensions of whole-body regeneration in hydra[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2021, 13(12): a040725.

[4] DARNET S, DRAGALZEW A C, AMARAL D B, et al. Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(30): 15106-15115.

[5] GEMBERLING M, BAILEY T J, HYDE D R, et al. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration[J]. Trends Genet, 2013, 29(11): 611-620.

[6] JACYNIAK K, MCDONALD R P, VICKARYOUS M K. Tail regeneration and other phenomena of wound healing and tissue restoration in lizards[J]. J Exp Biol, 2017, 220 (Pt 16): 2858-2869.

[7] HU Y, PAN X, SHI Y, et al. Muscles are barely required for the patterning and cell dynamics in axolotl limb regeneration[J]. Front Genet, 2022, 13: 1036641.

[8] HAAS B J, WHITED J L. Advances in decoding axolotl limb regeneration[J]. Trends Genet, 2017, 33(8): 553-565.

[9] JOHNSON G L, LEHOCZKY J A. Mammalian digit tip regeneration: moving from phenomenon to molecular mechanism[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2022, 14 (1): a040857.

[10] CHANG M, NGUYEN T T. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers[J]. Acc Chem Res, 2021, 54 (5): 1080-1093.

[11] HUSSAIN M A, AL-OMRAN M, SALATA K, et al. Population-based secular trends in lower-extremity amputation for diabetes and peripheral artery disease[J]. CMAJ, 2019, 191(35): E955-E961.

[12] ASTIN M, LAWTON D, HIRST M. The prevalence of pain in a disabled population[J]. Soc Sci Med, 1996, 42 (11): 1457-1464.

[13] RODRIGUEZ-PEREIRA J, DE ARMAS J, GARBUJO L, et al. Health care needs and services for elder and disabled population: findings from a barcelona study[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(21): 8071.

[14] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 377-382.

[15] PICELLI S, BJORKLUND A K, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells[J]. Nat Methods, 2013, 10(11): 1096-1098.

[16] HASHIMSHONY T, WAGNER F, SHER N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification[J]. Cell Rep, 2012, 2(3): 666-673.

[17] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets[J]. Cell, 2015, 161(5):1202-1214.

[18] CUSANOVICH D A, DAZA R, ADEY A, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing[J]. Science, 2015, 348 (6237): 910-914.

[19] AMARAL D B, SCHNEIDER I. Fins into limbs: recent insights from sarcopterygian fish[J]. Genesis, 2018, 56 (1): 10.

[20] SUZUKI M, SATOH A, IDE H, et al. Nerve-dependent and - independent events in blastema formation during Xenopus froglet limb regeneration[J]. Dev Biol, 2005, 286(1):361-375.

[21] KNAPP D, SCHULZ H, RASCON C A, et al. Comparative transcriptional profiling of the axolotl limb identifies a tripartite regeneration-specific gene program [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e61352.

[22] DENTICE M, AMBROSIO R, DAMIANO V, et al. Intracellular inactivation of thyroid hormone is a survival mechanism for muscle stem cell proliferation and lineage progression[J]. Cell Metab, 2014, 20(6): 1038-1048.

[23] LEHOCZKY J A, ROBERT B, TABIN C J. Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(51): 20609-20614.

[24] RINKEVICH Y, LINDAU P, UENO H, et al. Germ-layer and lineage-restricted stem / progenitors regenerate the mouse digit tip[J]. Nature, 2011, 476(7361): 409-413.

[25] JOHNSON G L, MASIAS E J, LEHOCZKY J A. Cellular heterogeneity and lineage restriction during mouse digit tip regeneration at single-cell resolution[J]. Dev Cell, 2020, 52(4): 525-540, e525.

[26] DE GROEF B, GROMMEN S V H, DARRAS V M. Forever young: endocrinology of paedomorphosis in the Mexican axolotl (Ambystoma mexicanum)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2018, 266: 194-201.

[27] MONAGHAN J R, STIER A C, MICHONNEAU F. et al. Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity[J]. Regeneration (Oxf), 2014, 1(1): 2-14.

[28] YE F, ZHANG G, E W, et al. Construction of the axolotl cell landscape using combinatorial hybridization sequencing at single-cell resolution[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 4228.

[29] KURZ S, THIEME R, AMBERG R, et al. The anti-tumorigenic activity of A2M-A lesson from the naked mole-rat[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189514.

[30] BUFFENSTEIN R, AMOROSO V, ANDZIAK B, et al. The naked truth: a comprehensive clarification and classification of current 'myths' in naked mole-rat biology [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2022, 97(1):115-140.

[31] PARK K K, LUO X, MOONEY S J, et al. Retinal ganglion cell survival and axon regeneration after optic nerve injury in naked mole-rats[J]. J Comp Neurol, 2017, 525(2): 380-388.

[32] TOWER R J, BUSSE E, JARAMILLO J, et al. Spatial transcriptomics reveals metabolic changes underly age-dependent declines in digit regeneration[J]. Elife, 2022, 11: e71542.

[33] QIN T, FAN C M, WANG T Z, et al. Single-cell RNA-seq reveals novel mitochondria-related musculoskeletal cell populations during adult axolotl limb regeneration process[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(3): 1110-1125.

[34] ZHANG M, CHEN Y, XU H, et al. Melanocortin receptor 4 signaling regulates vertebrate limb regeneration[J]. Dev Cell, 2018, 46(4): 397-409, e395.

[35] ROSS I, OMENGAN D B, HUANG G N, et al. Thyroid hormone-dependent regulation of metabolism and heart regeneration[J]. J Endocrinol, 2022, 252(3): R71-R82.

[36] SEVERINSEN M C K, PEDERSEN B K. Muscle-organ crosstalk: the emerging roles of myokines[J]. Endocr Rev, 2020, 41(4): 594-609.

[37] FRANZ T, KOTHARY R, SURANI M A, et al. The splotch mutation interferes with muscle development in the limbs[J]. Anat Embryol (Berl), 1993, 187(2): 153-160.

[38] NOWOSHILOW S, SCHLOISSNIG S, FEI J F, et al. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators[J]. Nature, 2018, 554(7690): 50-55.

[39] BECK C W, IZPISUA BELMONTE J C, CHRISTEN B. Beyond early development: xenopus as an emerging model for the study of regenerative mechanisms[J]. Dev Dyn, 2009, 238(6): 1226-1248.

[40] WOLFE A D, NYE H L, CAMERON J A. Extent of ossification at the amputation plane is correlated with the decline of blastema formation and regeneration in Xenopus laevis hindlimbs[J]. Dev Dyn, 2000, 218(4): 681-697.

[41] YOKOYAMA H, IDE H, TAMURA K. FGF-10 stimulates limb regeneration ability in Xenopus laevis[J]. Dev Biol, 2001, 233(1): 72-79.

[42] AZTEKIN C, HISCOCK T W, GURDON J, et al. Secreted inhibitors drive the loss of regeneration competence in Xenopus limbs[J]. Development, 2021, 148(11): dev199158.

[43] YANAGI N, KATO S, FUKAZAWA T, KUBO T. Cellular responses in the FGF10-mediated improvement of hindlimb regenerative capacity in Xenopus laevis revealed by single-cell transcriptomics[J]. Dev Growth Differ, 2022, 64(6): 266-278.

[44] CASCO-ROBLES R M, 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[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7455.

[45] KAWAKAMI Y, CAPDEVILA J, BUSCHER D, et al. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo[J]. Cell, 2001, 104 (6): 891-900.

[46] KENGAKU M, CAPDEVILA J, RODRIGUEZ-ESTEBAN C, et al. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud[J]. Science, 1998, 280(5367): 1274-1277.

[47] LIN T Y, GERBER T, TANIGUCHI-SUGIURA Y, et al. Fibroblast dedifferentiation as a determinant of successful regeneration[J]. Dev Cell, 2021, 56(10): 1541-1551, e1546.

[48] BOLANOS-CASTRO L A, WALTERS H E, GARCIA VAZQUEZ R O, et al. Immunity in salamander regeneration: where are we standing and where are we headed? [J]. Dev Dyn, 2021, 250(6): 753-767.

[49] GODWIN J W, PINTO A R, ROSENTHAL N A. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110 (23): 9415-9420.

[50] GODWIN J W, DEBUQUE R, SALIMOVA E, ROSENTHAL N A. Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the extracellular landscape[J]. NPJ Regen Med, 2017, 2: 22.

[51] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. Immunity, 2016, 44 (3): 450-462.

[52] LI H, WEI X, ZHOU L, et al. Dynamic cell transition and immune response landscapes of axolotl limb regeneration revealed by single-cell analysis[J]. Protein Cell, 2021, 12 (1): 57-66.

[53] RAYAGIRI S S, RANALDI D, RAVEN A, et al. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal[J]. Nat Commun, 2018, 9 (1):1075.

[54] GAWLIK K I, LI J Y, PETERSEN A, DURBEEJ M. Laminin alpha1 chain improves laminin alpha2 chain deficient peripheral neuropathy[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(18): 2690-2700.

[55] PERISIC NANUT M, SABOTIC J, JEWETT A, et al. Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells[J]. Front Immunol, 2014, 5: 616.

[56] NURDEN A T. The biology of the platelet with special reference to inflammation, wound healing and immunity [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2018, 23(4): 726-751.

[57] SIMKIN J, SAMMARCO M C, MARRERO L. et al. Macrophages are required to coordinate mouse digit tip regeneration[J]. Development, 2017, 144(21): 3907-3916.

[58] DASTAGIR N, BEAL Z, GODWIN J. Tissue origin of cytotoxic natural killer cells dictates their differential roles in mouse digit tip regeneration and progenitor cell survival[J]. Stem Cell Reports, 2022, 17(3): 633-648.

[59] LEIGH N D, DUNLAP G S, JOHNSON K, et al. Transcriptomic landscape of the blastema niche in regenerating adult axolotl limbs at single-cell resolution [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5153.

[60] STORER M A, MAHMUD N, KARAMBOULAS K, et al. Acquisition of a unique mesenchymal precursor-like blastema state underlies successful adult mammalian digit tip regeneration[J]. Dev Cell, 2020, 52(4): 509-524, e509.

[61] RODGERS A K, SMITH J J, VOSS S R. Identification of immune and non-immune cells in regenerating axolotl limbs by single-cell sequencing[J]. Exp Cell Res, 2020, 394(2):112149.

[62] AZTEKIN C. Appendage regeneration is context dependent at the cellular level[J]. Open Biol, 2021, 11(7): 210126.

[63] GERBER T, MURAWALA P, KNAPP D. et al. Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. Science, 2018, 362 (6413): eaaq0681.

[64] TASSAVA R A, LOYD R M. Injury requirement for initiation of regeneration of newt limbs which have whole skin grafts[J]. Nature, 1977, 268(5615): 49-50.

[65] AZTEKIN C, HISCOCK T W, MARIONI J C, et al. Identification of a regeneration-organizing cell in the Xenopus tail[J]. Science, 2019, 364(6441): 653-658.

[66] TASSAVA R A, OLSEN C L. Higher vertebrates do not regenerate digits and legs because the wound epidermis is not functional. A hypothesis[J]. Differentiation, 1982, 22 (3): 151-155.

[67] PIZETTE S, NISWANDER L. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge [J]. Development, 1999, 126(5): 883-894.

[68] JONES T E, DAY R C, BECK C W. Attenuation of bone morphogenetic protein signaling during amphibian limb development results in the generation of stage-specific defects[J]. J Anat, 2013, 223(5): 474-488.

[69] OLIVEIRA C R, KNAPP D, ELEWA A, et al. Tig1 regulates proximo-distal identity during salamander limb regeneration[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1141.

[70] BRYANT D M, JOHNSON K, DITOMMASO T, et al. A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors[J]. Cell Rep, 2017, 18(3):762-776.

[71] BUENROSTRO J D, GIRESI P G, ZABA L C, et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position[J]. Nat Methods, 2013, 10(12): 1213-1218.

[72] VICKOVIC S, ERASLAN G, SALMEN F, et al. High-definition spatial transcriptomics for in situ tissue profiling[J]. Nat Methods, 2019, 16(10): 987-990.

[73] GUO S, ZHANG C, LE A. The limitless applications of single-cell metabolomics[J]. Curr Opin Biotechnol, 2021, 71:115-122.

[74] ARBACH H E, HARLAND-DUNAWAY M, BRADEN C, et al. Chromatin accessibility analysis reveals distinct functions for HDAC and EZH2 activities in early appendage regeneration[J]. Wound Repair Regen, 2022, 30(6): 707-725.

[75] OGBEIDE S, GIANNESE F, MINCARELLI L. et al. Into the multiverse: advances in single-cell multiomic profiling[J]. Trends Genet, 2022, 38(8): 831-843.