

文章编号: 1674-5566(2024)03-0552-10

DOI: 10.12024/jsou.20230204074

## 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对始初小头虫再生的影响

李倩<sup>1,2,3,4</sup>, 张琳琳<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 3. 海洋生物与生物技术实验室, 山东 青岛 266237; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在涡虫等多种生物的再生中发挥重要作用, 本研究以环节动物始初小头虫 (*Capitella teleta*) 为研究对象, 初步探究 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对小头虫再生的影响。将截断损伤后的样本持续浸泡于 30  $\mu$ mol/L 浓度外源性 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路小分子化合物抑制剂 XAV-939 中, 发现小头虫的再生受到了抑制, 与对照组相比再生速度明显减慢, 且不能形成正常的再生芽基组织, 通过神经和肌肉标记发现 Wnt 信号通路被抑制后, 小头虫再生过程中的神经和肌肉生长也受到了影响。后续通过 EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) 标记发现抑制剂处理组样本的增殖细胞数量显著少于正常组样本, 表明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路被抑制后会影响到小头虫再生过程中的增殖细胞产生, 从而调控小头虫的再生过程。在几种典型物种中 Wnt 通路调控再生的比较研究表明 Wnt 信号通路在刺胞动物和冠轮动物全身再生中的功能相对保守。

**关键词:** Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 环节动物; 小头虫; Wnt 通路抑制剂; 再生; 增殖细胞

**中图分类号:** Q 418 **文献标志码:** A

1982年, NUSSE 和 VARMU 在研究乳腺癌病毒时克隆得到一个新癌基因并命名为 *Int-1*<sup>[1]</sup>。随后, NUSSE 成功在果蝇中发现、克隆得到了 *Int-1* 的同源基因 *wingless* (*wg*)<sup>[2]</sup>, 此后又将 *int-1/wingless* 合称为 Wnt 基因。随后经过众多科学家的不断研究鉴定了 Wnt 通路的各个成分并确定 Wnt 信号通路是一个复杂的调控网络。依赖  $\beta$ -catenin 发挥作用的 Wnt 信号通路被称为经典 Wnt 通路<sup>[3]</sup>, 而不依赖  $\beta$ -catenin 的通路称为非经典 Wnt 通路, 包括 Wnt/PCP (planar cell polarity pathway) 通路和 Wnt/ $Ca^{2+}$  通路, 前者通过小 G 蛋白激活 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 来调控细胞骨架重排, 后者通过释放胞内  $Ca^{2+}$  来影响细胞粘连和相关基因表达。

Wnt 信号通路是一个非常保守的信号通路, 不仅在胚胎发育、器官形成、体轴分化等方面起重要作用, 在再生中也扮演重要角色。例如在小

鼠心肌成纤维细胞中敲低 *wnt4* 基因导致心功能恶化; 若过表达 *wnt4*, 则有益于受损心肌的重建, 这表明 Wnt 通路在心脏修复中起着关键作用<sup>[4]</sup>。水螅 (*Hydra*) 是一种具有极强再生能力的淡水生物, 截断信号首先激活表皮细胞中的 *wnt3*, 完成头部再生, 或者激活间质细胞中的 *wnt3* 信号, 促使凋亡细胞诱导的代偿性细胞增殖行为发生, 即正在凋亡的细胞会释放一些生长因子提高其周围细胞的增殖能力, 随后再激活表皮中的 *wnt3* 信号, 完成头部再生<sup>[5-10]</sup>。涡虫 (*Planaria*) 也是一种再生能力极强的物种, 仅凭一小段躯体就可以完整再生。Wnt 信号通路在涡虫干细胞增殖和再生头尾极性中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。尾端损伤后, 需要 Wnt 信号通路中的  $\beta$ -catenin 1 和 *wnt1* 促进尾部再生<sup>[12-14]</sup>。

小头虫 (*Capitella teleta*) 是一种海洋多毛类蠕虫, 属于环节动物门, 可以作为水体环境污染

收稿日期: 2023-02-09 修回日期: 2023-05-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41976088); 深圳华大生命科学研究院开放基金(BGIRSZ20210013); 中国科学院 B 类战略先导科技专项(XDB42000000); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室山东省专项经费(2022QNL030004)

作者简介: 李倩(1995—), 女, 博士研究生, 研究方向为海洋生物学。E-mail: liqian@qdin.ac.cn

通信作者: 张琳琳, E-mail: linlinzhang@qdin.ac.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

的生物指示物种。它可以快速完成尾端再生,包括肌肉、神经、肠道等组织和刚毛等躯体附属结构<sup>[15]</sup>。小头虫的再生和干细胞息息相关,在其第 5~6 体节的体腔内存在一团 MPC (Multipotent progenitor cells) 细胞,这团细胞表达干细胞标记基因 *vasa*, *nanos*, *piwi*<sup>[16]</sup>, 在小头虫的再生关键时期也会表达这些干细胞标记基因<sup>[17]</sup>。但是目前关于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响小头虫再生的相关研究仍较少。在 Wnt 经典通路中, wnt 蛋白和细胞表面受体 Frizzled 蛋白家族结合,两者会结合下游的低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6 (LRP5 和 LRP6), 从而导致轴蛋白 (AXIN) 和糖原合成酶 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) 无法被募集到质膜, 最终导致无法形成  $\beta$ -catenin 降解复合体,  $\beta$ -catenin 蛋白得以被转运入核, 介导下游靶基因的转录。Tankyrase 酶是 AXIN 蛋白抑制酶, 本文中使用的药物 XAV-939 可以通过抑制 tankyrase 酶稳定 AXIN 蛋白的活性, 促进  $\beta$ -catenin 降解复合物的形成, 使  $\beta$ -catenin 被降解而无法进入细胞核内发挥下游功能, 最终可达到抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的作用。因此本研究通过外源添加药物 XAV-939 抑制小头虫体内的 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 初步探究 Wnt 经典通路对小头虫再生过程的影响, 为今后深入探究小头虫的再生机制奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料的养殖和处理

本实验使用的小头虫为实验室自野外采集后在实验室成代培养, 日常养殖在约 18 °C 培养箱内, 每周定期更换海水, 并投喂商用过滤性沉降饵料。此外, 培养小头虫的底泥取自广西红树林周边, 泥质含有较为丰富的腐殖质, 也为小头虫提供营养。在再生实验处理中, 将样本进行彻底麻醉后在第 10 体节和第 11 体节间横向截断, 之后置于过滤海水或添加抗生素的海水中进行后续实验。

### 1.2 系统发育分析

通过在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 找到人 (*homo sapiens*, Hsa)、文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*, Bfl)、猫头鹰帽贝 (*Lottia gigantea*, Lgi)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*, Cgi)、淡水水蛭 (*Helobdella robusta*, Hro)、掘穴环爪蚓

(*Perionyx excavates*, Pex) 和杜氏阔沙蚕 (*Platynereis dumerilii*, Pdu) 物种 Wnt 各亚家族的氨基酸序列, 在始初小头虫基因组中预测 Wnt 各亚家族的氨基酸序列, 随后使用 Clustal W 软件进行多序列比对, 将序列首、尾比对率非常差的序列手动去除, 随后将 fasta 格式文件通过 mafft 中的 local pair 和 maxiterate 1 000 参数进行多序列比对, 此种方法适合比对序列小于 200 条且每条少于 2 000 个氨基酸的序列; 之后使用 trimal (<https://vicfero.github.io/trimal/>) 进行序列裁剪, 使用基于相似性统计的自动方法的启发式选择 (automated 1), 最后使用 iqtree 软件, 设置 MF 自动检测最佳模型并建树 (MFP), bootstrap 次数大于等于 1 000 (bb 1 000), 得到后缀为 .treefile 文件, 随后在网站 ITOL (<https://itol.embl.de/>) 中对进化树进行美化修饰。

### 1.3 小头虫截断再生干扰实验

XAV-939 (xav, sigma, #X3004) 是小分子选择性抑制剂, 通过抑制端锚聚合酶 1 和 2 (tankyrase1/2) 来达到抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的目的。在本实验中设置了 10、30、50  $\mu$ mol/L 的 XAV 药物浓度测试对样本的毒性, 发现 50  $\mu$ mol/L 高浓度药物对样本影响较大, 浸泡 7 d 后的存活率仅为 50%, 而 30  $\mu$ mol/L 和 10  $\mu$ mol/L 药物浓度对样本的成活率没有影响, 浸泡 7 d 后虫子都可存活, 且虫体状态良好, 为保证干扰效果最大, 选择使用 30  $\mu$ mol/L 的工作浓度, 对小头虫进行 Wnt 通路抑制。

将虫体横向截断后, 分别浸泡在药物溶液和对照组溶液中, 培养在 18 °C 培养箱内, 每天更换新鲜试剂。待再生至 1 d 和 3 d 后取样进行后续实验。

### 1.4 增殖细胞标记实验

取 XAV 持续处理过 3 d 的小头虫样本进行 EdU 标记实验, 在 100  $\mu$ mol/L 的 EdU-SW (Sea water) 溶液中浸泡虫子 15~20 min, 随后使用海水洗涤样本多次, 将彻底洗掉 EdU 试剂的样本进行麻醉处理, 麻醉后的虫子样本置于 4% 多聚甲醛 (polyformaldehyde, PFA, sigma, #P6148) 中于 4 °C 固定过夜, 第二天使用 PBS 洗掉 PFA, 随后使用 1% Triton-PBS (sigma, #T8787) 透化样本 3 次, 每次 10 min, 再使用 1% BSA (索莱宝, #A8010) 洗涤样本 3 次, 每次 10 min, 接下来使用 EdU-

488 kit 细胞增殖试剂盒(碧云天, #C0071S)在黑暗中处理样本 1 h, 之后使用 1% BSA 洗涤至少 5 次, 每次 15 min, 最后使用 1x Hoechst (碧云天, #C0071S) 标记细胞核。标记完成的样本使用 ZEISS LSM 710 共聚焦显微镜进行观察、拍照。

### 1.5 免疫荧光标记和化学试剂标记

将待检样本置于 4% 多聚甲醛内, 于 4 °C 下固定过夜, 虫体在液体中自然沉降代表固定充分。随后使用 PBS 将多余的多聚甲醛充分冲洗掉, 保证后续抗体和染料顺利进入虫体。使用含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液(PBT)对虫体细胞进行透化, 便于抗体和染料可以进入细胞内。为封闭非特异性位点, 增强抗体的特异性, 在室温下使用封闭液(含有 10% 山羊血清的 PBT 缓冲液)封闭样本 1 h。随后使用 1:500 一抗 anti-acetylated tubulin antibody-封闭液标记小头虫的神经系统, 在 4 °C 下过夜孵育。第二天, 回收多余的一抗溶液, 使用 PBS 溶液洗涤样本多次至彻底洗掉一抗溶液, 接下来使用 1:500 二抗 anti-mouse secondary antibody 546 孵育样本, 室温下孵育 4 d。随后室温下使用 1:1 000 的鬼笔环肽试剂对小头虫的肌肉纤维进行标记。对于细胞核标记, 使用 0.125 μg/mL 的 hoechst 试剂对样本染色。标记结束的样本保存在 80% 的甘油溶液中, 拍照观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 冠伦动物 Wnt 基因系统发育分析

Wnt 信号通路是一个保守的信号通路, 在胚胎发育、体轴模式建成、再生等过程中扮演重要角色。为了探明环节动物始初小头虫 Wnt 信号通路的关键分子是否保守, 本文首先在始初小头虫基因组中预测并通过系统发育分析注释了 Wnt 基因家族成员。通过对人(*homo sapiens*, Hsa)、文昌鱼(*Branchiostoma floridae*, Bfl)、猫头鹰帽贝(*Lottia gigantea*, Lgi)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*, Cgi)、淡水水蛭(*Helobdella robusta*, Hro)、掘穴环爪蚓(*Perionyx excavates*, Pex)、小头虫(*Capitella teleta*, Cte)和杜氏阔沙蚕(*Platynereis dumerilii*, Pdu)物种的 Wnt 各亚家族的蛋白序列进行系统发育树构建, 发现小头虫的 wnt1 蛋白和环节动物淡水水蛭和掘穴环爪蚓的 wnt1 蛋白亲缘关系最近; wntA、wnt5、wnt8 和 wnt9 蛋白则与杜氏阔沙蚕的亲缘关系更近; wnt7 和 wnt10 蛋白分别和淡水

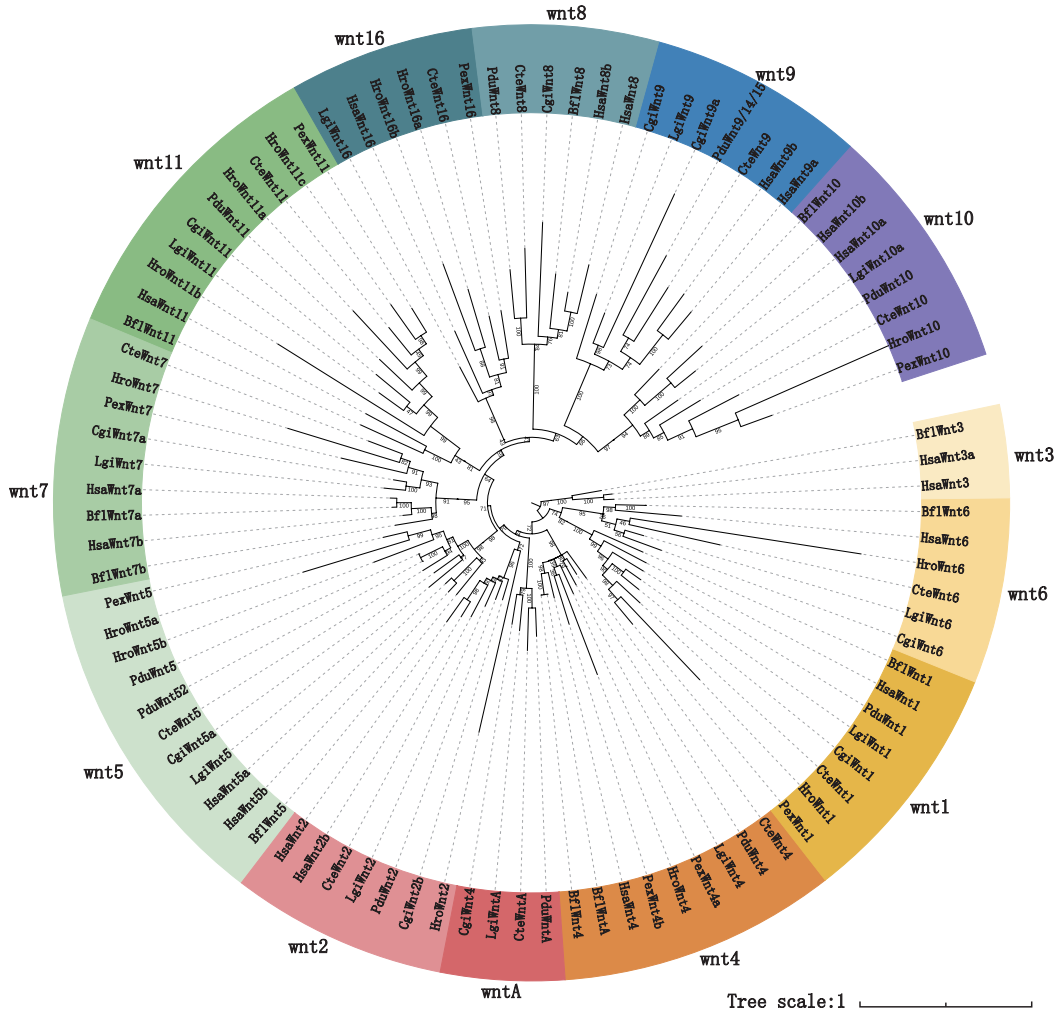
水蛭的 wnt7、掘穴环爪蚓的 wnt1 亲缘关系更近; 而 wnt16 和上述两者的 wnt16 亲缘关系更近。除此之外, 小头虫的 wnt2 蛋白和人的 wnt2 蛋白亲缘关系更近; wnt3 蛋白在环节动物和软体动物中不存在; 小头虫的 wnt4 和其余几个环节动物的 wnt4 蛋白是单独分枝的。从构建的系统发育树看, 小头虫的每个 wnt 蛋白都单独成枝, 较为保守。

### 2.2 Wnt/β-catenin 通路外源抑制剂显著影响始初小头虫再生形态

XAV-939 可通过抑制端锚聚合酶 1 和 2 (tankyrase1/2) 而稳定 AXIN 蛋白, 促进 β-catenin 的降解, 从而抑制 Wnt/β-catenin 信号通路<sup>[18]</sup>。为了探明 Wnt/β-catenin 通路被抑制后对小头虫再生的影响, 使用 30 μmol/L 的 XAV 药物, 每天更换 1 次试剂, 经过连续观察发现与对照 DMSO 组比较, 实验组样本出现了明显的再生抑制的现象。如图 2 所示, 从 12 hpa 开始, 对照组的样本基本完成伤口愈合, 而 XAV 处理组的少数样本仍然处于肠道凸出未愈合的现象, 一直到 3 dpa 时阻滞效果最为明显, 对照组已经出现明显的再生芽基, 而处理组大部分仍然处于伤口愈合或未愈合的状态(36/60), 这表明经 XAV 处理后小头虫的再生速度减慢, 再生过程受到阻滞(图版 I)。

### 2.3 Wnt/β-catenin 通路外源抑制剂影响小头虫的神经、肌肉再生

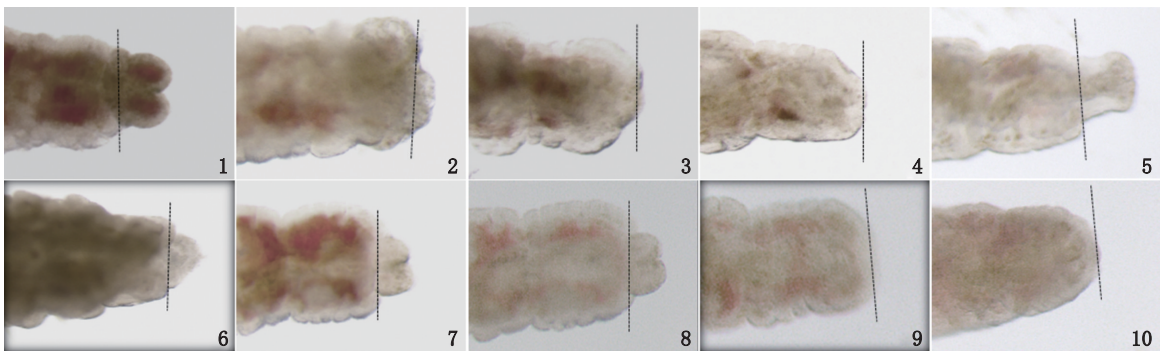
通过比较不同处理条件后小头虫的神经、肌肉标记, 发现 XAV 处理组神经和肌肉的正常再生过程受到了抑制。在小头虫截断时(0 hpa), 纵向腹神经索在损伤处有明显的断裂口, 纵肌纤维在伤口处也表现出断裂, 横肌没有明显的变化, 可能由于纵肌的突然断裂, 使伤口处的横肌结构较为松散, 通过细胞核的标记可以描绘出样本的外部轮廓, 将神经、肌肉和细胞核染色结果重叠起来, 可以更具体地同时观察三者的标记情况, 也可以更好地判断截断位置。再生 1 d 后, 对照组伤口处两条腹神经索连接起来, 这可能和伤口愈合有关, 因为此时期, 小头虫要完成伤口愈合。在 1 dpa, 伤口处横向肌肉纤维收紧, 为完成伤口愈合做准备。XAV 处理组 1 dpa 样本的神经和肌肉标记结果没有明显差异, 2 条腹神经索连接, 伤口肌肉纤维开始向内收缩。再生 3 d 时, 对照组中小头虫处于再生芽基时期, 同时开始出现神经纤维的再生, 神经纤维向着芽基内部再生, 而横



分支上的数字代表 bootstrap 支持数,数字越大,表示分支结果越可靠;使用不同的背景颜色将不同的 *wnt* 基因进行了区分。图中缩写分别代表:Has(人)、Bfl(文昌鱼)、Lgi(猫头鹰帽贝)、Cgi(长牡蛎)、Hro(淡水水蛭)、Pex(掘穴环爪蚓)、Cte(小头虫)和 Pdu(杜氏阔沙蚕)。The numbers on the branches stand for bootstrap support values, with larger numbers indicating more reliable results. Different background colors were used to distinguish the different *wnt* genes. The abbreviations represent: *homo sapiens*, Has; *Branchiostoma floridae*, Bfl; *Lottia gigantea*, Lgi; *Crassostrea gigas*, Cgi; *Helobdella robusta*, Hro; *Perionyx excavates*, Pex; *Capitella teleta*, Cte; *Platynereis dumerilii*, Pdu.

图 1 不同物种 *wnt* 基因系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *wnt* genes from different species



1-5 为对照组样本在截断后 0、12、24 h、2 d、3 d 的再生形态;6-10 为 XAV 处理组在截断后 0、12、24 h、2 d、3 d 的再生形态。虚线代表截断位置。

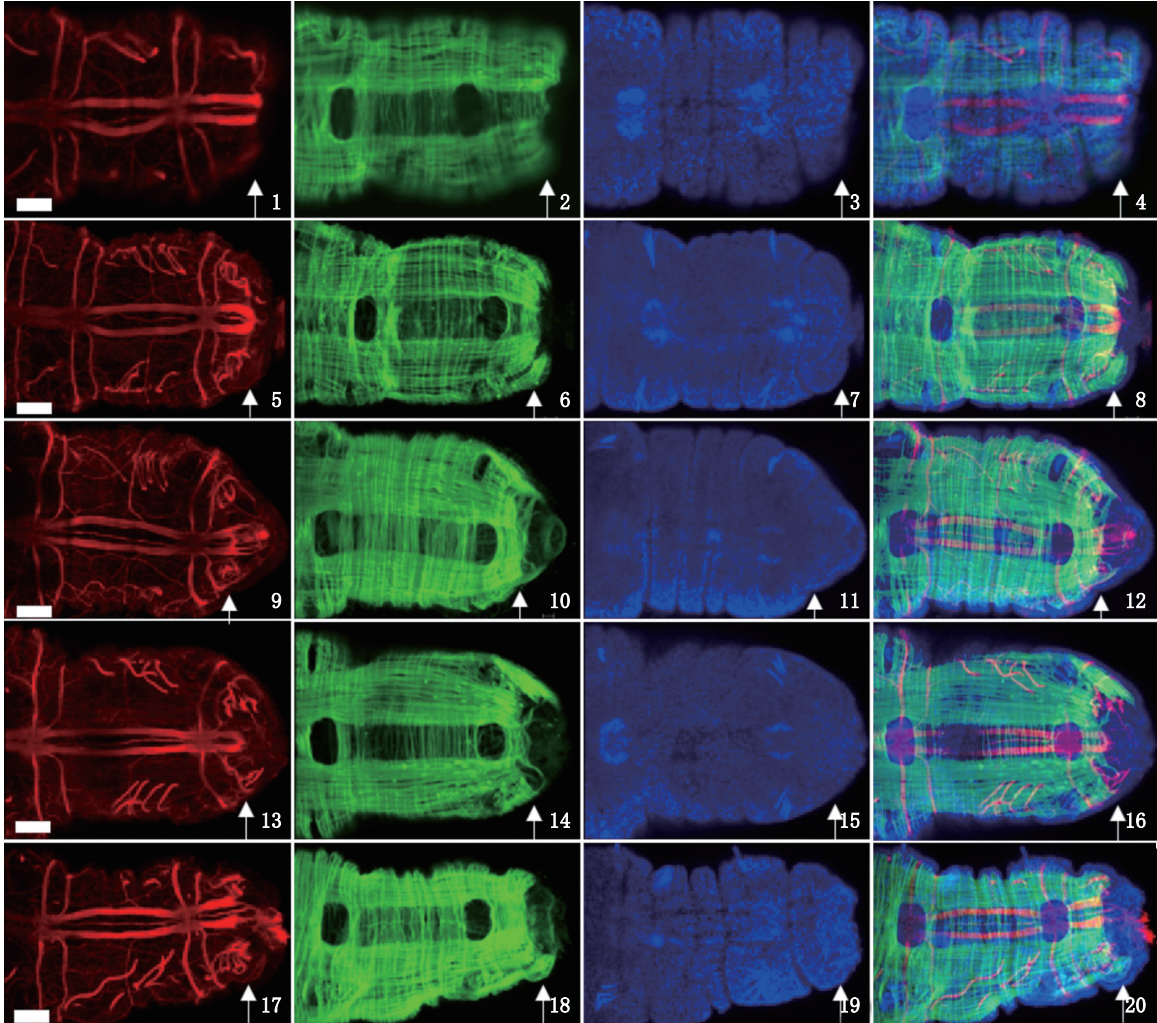
1-5 represent the control samples at the cut-off, at the 12 hours post amputation, at the 24 hours post amputation, at the 2 days post amputation, at the 3 days post amputation. 6-10 represent the XAV-treating samples at the cut-off, at the 12 hours post amputation, at the 24 hours post amputation, at the 2 days post amputation, at the 3 days post amputation. Dotted lines indicate the amputation site.

图版 I 抑制 Wnt 信号通路影响始初小头虫再生过程

Plate I Inhibition of Wnt pathway affect the regeneration *C. teleta*

向肌肉纤维也已经在末端完全封闭,但是纵肌的再生仍是不明显的,神经、肌肉和细胞核的同时标记也可以看出被细胞核标记但未有纵向肌肉的部分就是明显的再生芽基。在XAV处理组的3 dpa样本中,尽管神经纤维也有向伤口方向延伸,但是由于未能形成正常的再生芽基,纤维丝延伸到样本末端时变为非正常的缠绕形态,而不

是有序排列的纤维末梢。XAV处理后肌肉的再生也受到了影响,在3 dpa时横向肌肉纤维也呈现出杂乱无序的状态,没有和对照组样本一样向着躯体内部收缩,而只是封闭了伤口,从神经、肌肉和细胞核的同时标记可以看出XAV处理组没有形成一个明显的芽基组织(图版II)。



1-4代表截断时的样本,5-8代表对照组再生1天的样本,9-12代表对照组再生3天的样本,13-16代表XAV处理组再生1天的样本,17-20代表XAV处理组再生3天的样本。1,5,9,13,17为抗乙酰化微管蛋白抗体标记小头虫的神经系统,纵向为腹神经索,横向为体节周围神经(红色),2,6,10,14,18为鬼笔环肽标记小头虫的肌肉,包括横肌和纵肌(绿色),3,7,11,15,19为Hoechst标记的是细胞核(蓝色),4,8,12,16,20为神经、肌肉和细胞核三者的重叠图。缩略:hpa. hour post amputation; dpa. day post amputation. 标尺为50  $\mu\text{m}$ 。

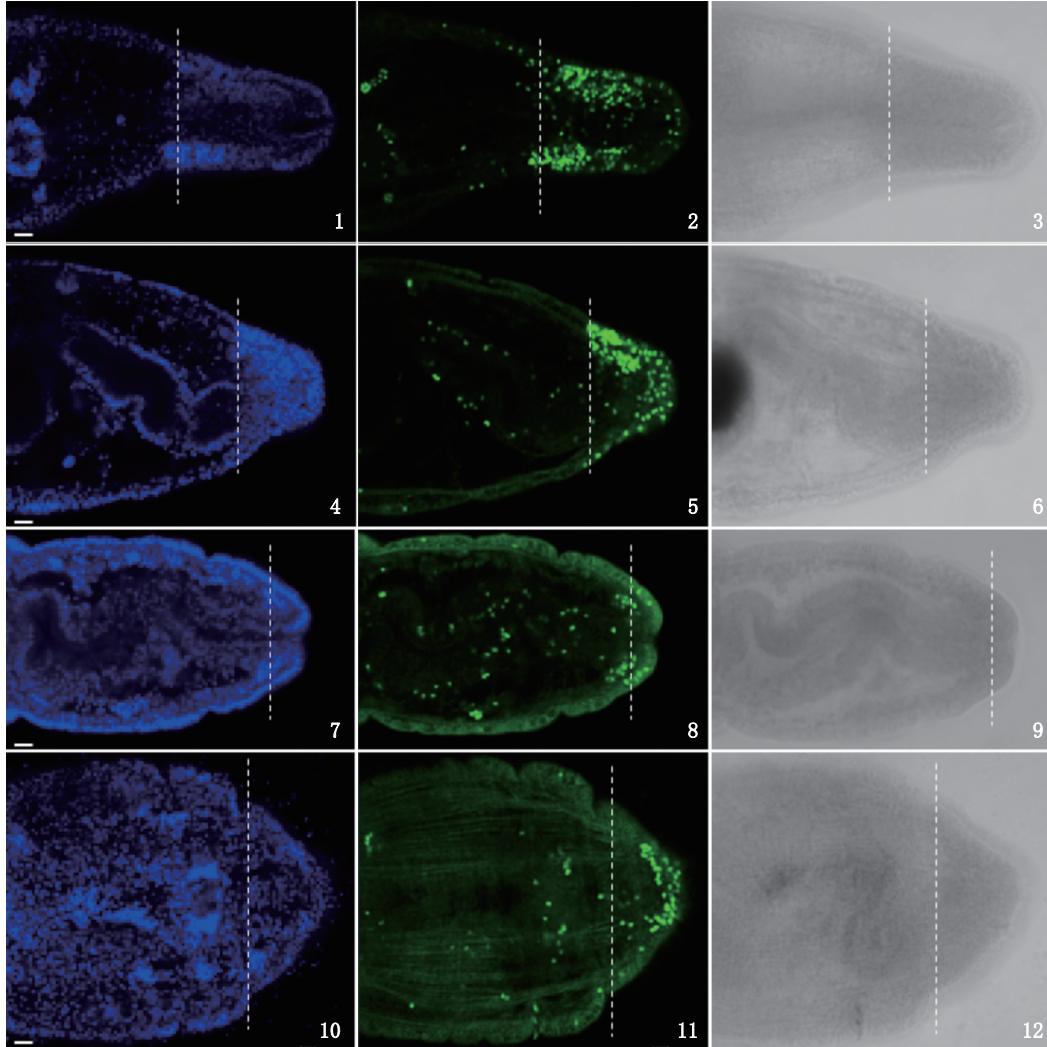
1-4 indicate the samples at cut-off. 5-8 represent the sample regenerated for 1 day in the control group. 9-12 mean the sample regenerated for 3 days in the control group. 13-16 represent the sample regenerated for 1 day in the XAV-treated group. 17-20 indicate the sample regenerated for 3 days in the XAV-treated group. 1, 5, 9, 13, 17 represent the nervous labeled by anti-acetylated tubulin antibody of *C. teleta*, ventral nerve cord in the longitudinal direction and perisomatic nerves in the transverse direction (red). 2, 6, 10, 14, 18 indicate the muscles labeled by phalloidin, including transverse and longitudinal muscles (green). 3, 7, 11, 15, 19 represent the nucleus labeled by Hoechst (blue). 4, 8, 12, 16, 20 indicate the overlap of nervous, muscles and nucleus. Abbreviations: hpa. hour post amputation. dpa. day post amputation. Scale bar is 50  $\mu\text{m}$ .

图版 II Wnt信号通路抑制后影响小头虫再生中的神经、肌肉再生  
Plate II Inhibition of Wnt signaling affects nerve and muscle regeneration

### 2.4 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路外源抑制剂显著影响始初小头虫再生中的细胞增殖过程

EdU 可以标记样本内正处于细胞分裂期 S 期的增殖细胞,使用 EdU 标记再生 3 d 的样本发现,正常处理组的 6 个小头虫样本中 EdU 阳性细胞在第 10 体节中的个数依次为 125, 248, 105, 146, 188, 179, 每个样本的平均 EdU 阳性细胞数量为

179. 在 Wnt 通路抑制剂 XAV 处理的 6 个样本中 EdU 阳性细胞数量依次是 71, 70, 58, 59, 38, 59, 每个样本的平均 EdU 阳性细胞数量为 59 (表 1), 而经 xav 处理后无论是伤口愈合样本还是未愈合样本再生中的增殖细胞与对照组样本相比数量显著减少( $P=0.0087, t$  检验)(图版 III)。



1-6 为对照组样本;7-12 为 XAV-939 处理样本;1, 4, 7, 10 中蓝色标亮的均为使用 hoechst 标记的细胞核;2, 5, 8, 11 绿色标亮的为使用 EdU 标记的增殖细胞;3, 6, 9, 12 分别为明场下所拍照片。图中虚线代表截断位置。图中的比例尺皆为 20  $\mu$ m。  
1-6 are control samples; 7-12 are XAV-939 treated samples; In 1, 4, 7, 10, the nuclei are labeled with Hoechst (blue); in 2, 5, 8, 11, the proliferating cells are labeled with EdU (green); in 3, 6, 9, 12, were taken in bright field. The dotted lines represent the location of amputation. The scale bar is 20  $\mu$ m.

图版 III 对照组和 Wnt 通路抑制剂处理组样本再生 3 d 后的 EdU 阳性细胞

Plate III EdU positive cells in control and Wnt pathway inhibitor treated group samples three days post regeneration

表1 对照组和 Wnt 通路抑制剂处理组再生 3 d 后 EdU 阳性细胞数量统计表

Tab. 1 Numbers of EdU positive cells in control and Wnt signaling inhibitor groups samples 3 post days regeneration

样本号 Samples	对照组 EdU <sup>+</sup> cells EdU <sup>+</sup> cells in control group	抑制剂组 EdU <sup>+</sup> cells EdU <sup>+</sup> cells in XAV group
1	125	71
2	248	70
3	105	58
4	146	59
5	188	38
平均 Average	162	59
方差 Variance	2 589.2	117.8

### 3 讨论

在本研究中首先构建了多个物种包括人、文昌鱼、猫头鹰帽贝、长牡蛎、淡水水蛭、掘穴环爪蚓、小头虫和杜氏阔沙蚕物种各 *Wnt* 基因亚家族的系统发育分析,尝试发现小头虫中 *Wnt* 各亚基因的进化特点。通过分析发现 *wnt3* 只在上述物种中的人和文昌鱼中存在,在冠伦动物中是缺失的,可能 *wnt3* 在进化中丢失了,有研究验证此观点,表明 *wnt3* 是在大多数类群后期演化历程中丢失了<sup>[19]</sup>。其余 *Wnt* 亚基因都在小头虫中存在。除了 *wnt3* 之外,小头虫的 12 个 *wnt* 基因都和冠伦动物的基因聚在了一起。*wnt1*, *wnt5* 和 *wnt11* 在 8 个物种中都是存在的,可能是较为保守的 3 个亚家族,在进化过程中稳定存在。*wnt1* 和 *wnt6* 是从同一支分化而来,*wnt9* 和 *wnt10* 也是从同一分支分化而来,表明这 2 对亚家族具有较高的亲缘关系,这可能是物种进化中基因复制分化的结果;而有其他研究表明,*wnt4* 和 *wnt11* 也是具有亲缘性较高的一对亚家族<sup>[20]</sup>,但是在本文中并没有体现出来。根据之前 *wnt1* 在 planaria 和 *wnt3* 在 hydra 的再生中的作用,可以为探求在小头虫中的作用打下基础。

为了探究 Wnt 通路是否参与小头虫的再生过程,本文通过外源干扰 Wnt 信号通路观察对小头虫再生的影响,发现经 Wnt 抑制剂 XAV 处理后虫子的芽基无法在正常时间形成,也影响了神经和肌肉在芽基形成时期的再生,这说明可能在小头虫芽基形成过程需要 Wnt 信号通路的参与。

为了进一步探究增殖细胞是否也受到 Wnt 信号通路被抑制的影响,本研究使用 EdU 标记经 Wnt 抑制剂处理后的小头虫,结果发现和对照组相比较,处理组的增殖细胞数量显著减少,这说明 Wnt 信号的缺失可能会影响小头虫再生中细胞的增殖,从而导致影响再生芽基的形成和再生。在水螅中也有研究表明敲低 *wnt3* 或者  $\beta$ -catenin 后增殖细胞被消除<sup>[9]</sup>,无法再生头部。

WEISMANN 曾假设过再生是一种适应性性状,再生能力和机体的复杂程度、受损伤频率和重要程度有关,因此再生在不同的分类类群中可能具有巨大的差异<sup>[21-22]</sup>。再生的两种重要形式分别为变形再生(Morphallaxis)是在修复的初始阶段将残留组织进行空间重构以完成再生,如水螅的再生<sup>[23]</sup>,而新建再生(epimorphosis)是通过形成一个由一团低分化、高增殖特点的细胞组成的再生芽基而完成再生<sup>[24]</sup>。变形再生明显的系统发育优势广泛存在于两侧对称和非两侧对称生物中;但是新建再生只存在于两侧对称生物中,基于此,可以推测新建再生是在变形再生的基础上进化来的<sup>[25-27]</sup>。但是,再生机制的整体同源性是不明显的,亲缘关系相距较远类群的再生机制可以完全不同。追踪再生能力的进化最有效的方法之一则可以是比较几种亲缘关系较近的物种的再生能力<sup>[28-29]</sup>。

为了探究 Wnt 信号通路在后生生物全身再生中的作用是否是保守的,本文筛选了几种具有再生能力的物种,包括非两侧对称生物水螅和两侧对称生物涡虫、裂虫(*Syllis malaquini*, 多毛纲)、小头虫以及瓢体虫(*Aeolosoma viride*, 寡毛纲)中关于 Wnt 通路与再生关系的研究(图 2)。在涡虫中通过 RNA 干扰敲低 *wnt1* 或者  $\beta$ -catenin-1 的表达,可以改变涡虫再生的头尾极性建立过程,导致在原本长尾巴的地方再生出头<sup>[12, 24, 30-31]</sup>,而 RNA 干扰敲低 APC ( $\beta$ -catenin 抑制因子)和 *notum*<sup>[14]</sup>(一种可以去除 Wnt 上棕榈酸酯修饰的羧酸酯酶,让 Wnt 失去 FZD 的结合能力)的表达会导致涡虫在本应再生头部的地方再生出尾巴;在水螅中 RNA 干扰 *wnt3* 和  $\beta$ -catenin 会导致水螅无法成功再生出头部<sup>[9, 32]</sup>;在瓢体虫中使用外源 Wnt 通路激活剂过度激活 Wnt 信号通路会影响头部再生中的伤口愈合和芽基细胞增殖,而当使用 Wnt 通路抑制剂处理后发现其头部再生中的神经和肌肉分化都会受到影响,可能在瓢体虫的头部

再生早期(0~24 h)需要较低浓度的 Wnt 信号,而到再生后期(24~48 h)需要较高浓度的 Wnt 信号<sup>[33]</sup>。裂虫也可以进行头尾再生,当使用 Wnt 通

路激活剂处理 8 d 后,会影响裂虫的芽基分化和体节的形成<sup>[34]</sup>。

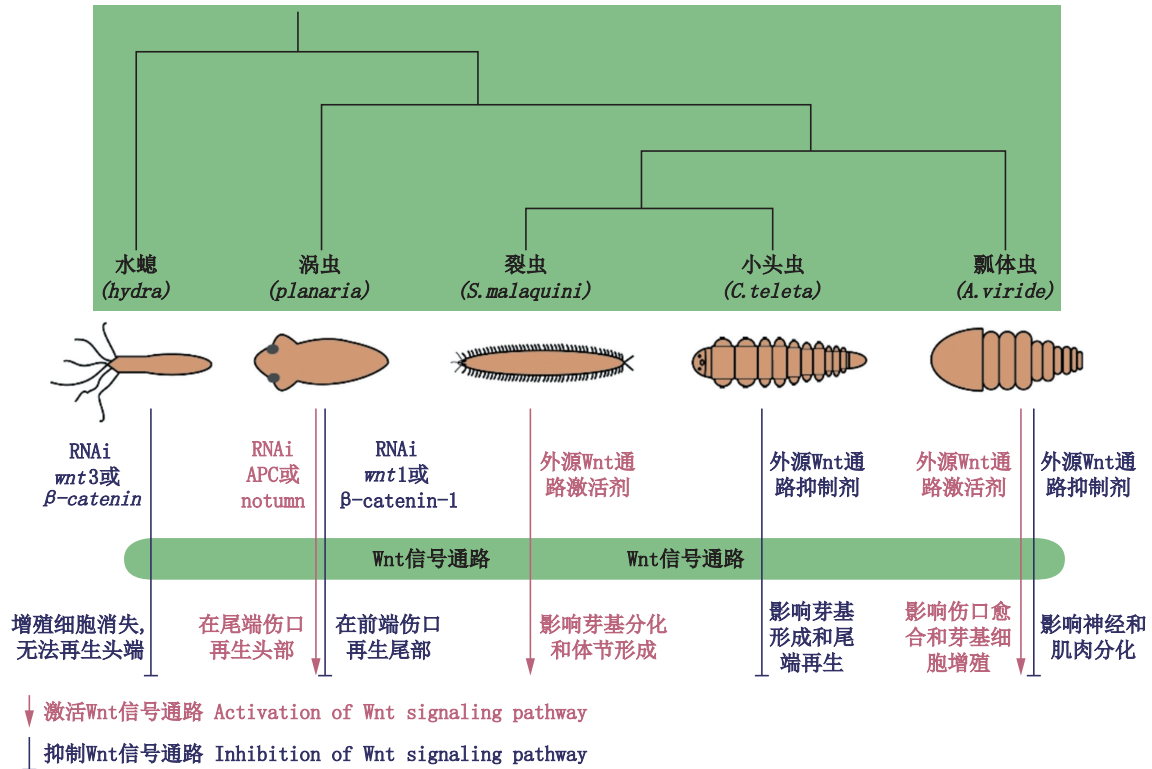


图 2 Wnt 信号通路在后生生物再生研究中的比较示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the comparison of wnt signaling in regeneration among metazoans

通过比较多个物种中 Wnt 信号通路对再生的调控研究发现 Wnt 信号通路参与后生生物再生调控可能是进化保守的。

综上所述,本研究通过外源药物抑制 Wnt 信号通路后发现小头虫的再生过程受到了抑制,这表明 Wnt 信号通路可能参与小头虫的再生过程,而且 Wnt 信号通路作为参与再生调控的角色可能是进化保守的。

感谢中国海洋大学本科彭思源对于小头虫再生表型的观察和部分实验;感谢中国科学院海洋研究所海洋大数据中心的支持。

参考文献:

[1] NUSSE R, VARMUS H E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome[J]. Cell, 1982, 31(1): 99-109.

[2] RIJSEWIJK F, SCHUERMANN M, WAGENAAR E, et al. The Drosophila homolog of the mouse mammary

oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*[J]. Cell, 1987, 50(4): 649-657.

[3] VAN AMERONGEN R. Celebrating discoveries in Wnt signaling: how one man gave wings to an entire field[J]. Cell, 2020, 181(3): 487-491.

[4] DONG W Y, ZHAO Y, WEN D Q, et al. Wnt4 is crucial for cardiac repair by regulating mesenchymal-endothelial transition via the phospho-JNK/JNK [J]. Theranostics, 2022, 12(9): 4110-4126.

[5] GALLIOT B, CHERA S. The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration [J]. Trends in Cell Biology, 2010, 20(9): 514-523.

[6] BROUN M, GEE L, REINHARDT B, et al. Formation of the head organizer in *hydra* involves the canonical Wnt pathway[J]. Development, 2005, 132(12): 2907-2916.

[7] LENGFELD T, WATANABE H, SIMAKOV O, et al. Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration [J]. Developmental Biology, 2009, 330(1): 186-199.

[8] PHILIPP I, AUFSCHNAITER R, ÖZBEK S, et al. Wnt/ $\beta$ -Catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan Hydra [J].



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(11): 4290-4295.
- [9] CHERA S, GHILA L, DOBRETZ K, et al. Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive *Hydra* head regeneration [J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(2): 279-289.
- [10] WANG R, STEELE R E, COLLINS E M S. Wnt signaling determines body axis polarity in regenerating *Hydra* tissue fragments [J]. *Developmental Biology*, 2020, 467(1/2): 88-94.
- [11] DE ROBERTIS E M. Wnt signaling in axial patterning and regeneration: lessons from Planaria [J]. *Science Signal*, 2010, 3(127): pe21.
- [12] PETERSEN C P, REDDIEN P W. *Smed-β-catenin-1* is required for anteroposterior blastema polarity in Planarian regeneration [J]. *Science*, 2008, 319(5861): 327-330.
- [13] PETERSEN C P, REDDIEN P W. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis [J]. *Cell*, 2009, 139(6): 1056-1068.
- [14] PETERSEN C P, REDDIEN P W. Polarized *notum* activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration [J]. *Science*, 2011, 332(6031): 852-855.
- [15] DE JONG D M, SEAVER E C. A stable thoracic *Hox* code and epimorphosis characterize posterior regeneration in *Capitella teleta* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149724.
- [16] DILL K K, SEAVER E C. *Vasa* and *nanos* are coexpressed in somatic and germ line tissue from early embryonic cleavage stages through adulthood in the polychaete *Capitella* sp. I [J]. *Development Genes and Evolution*, 2008, 218(9): 453-463.
- [17] GIANI JR V C, YAMAGUCHI E, BOYLE M J, et al. Somatic and germline expression of *pivi* during development and regeneration in the marine polychaete annelid *Capitella teleta* [J]. *EvoDevo*, 2011, 2: 10.
- [18] HUANG S M A, MISHINA Y M, LIU S M, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling [J]. *Nature*, 2009, 461(7264): 614-620.
- [19] 钱光辉, 王义权. Wnt信号通路与后口动物体轴的进化发育 [J]. *遗传*, 2011, 33(7): 684-694.  
QIAN G H, WANG Y Q. Wnt signaling pathway and the Evo-Devo of deuterostome axis [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(7): 684-694.
- [20] CHO S J, VALLÈS Y, GIANI JR V C, et al. Evolutionary dynamics of the *wnt* gene family: a lophotrochozoan perspective [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, 27(7): 1645-1658.
- [21] WEISMANN V A. Thatsachen und auslegungen in Bezug auf regeneration [J]. *Nature*, 1899, 60:242-243.
- [22] WEISMANN A. The Germ-plasm: a theory of heredity [M]. New York: Scribner's, 1893.
- [23] ALVARADO A S, TSONIS P A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(11): 873-884.
- [24] GURLEY K A, RINK J C, ALVARADO A S. β-Catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis [J]. *Science*, 2008, 319(5861): 323-327.
- [25] BELY A E, NYBERG K G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2010, 25(3): 161-170.
- [26] FERRARIO C, BEN KHADRA Y, CZARKWIANI A, et al. Fundamental aspects of arm repair phase in two echinoderm models [J]. *Developmental Biology*, 2018, 433(2): 297-309.
- [27] BEN KHADRA Y, SUGNI M, FERRARIO C, et al. Regeneration in stellate echinoderms: crinoidea, Asteroidea and Ophiuroidea [M]//KLOC M, KUBIAK J Z. Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine. Cham: Springer, 2018: 285-320.
- [28] ZATTARA E E, FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ F A, HIEBERT T C, et al. A phylum-wide survey reveals multiple independent gains of head regeneration in Nemertea [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2019, 286(1898): 20182524.
- [29] ELCHANINOV A, SUKHIKH G, FATKHUDINOV T. Evolution of regeneration in animals: a tangled story [J]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2021, 9: 621686.
- [30] PETERSEN C P, REDDIEN P W. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(40): 17061-17066.
- [31] IGLESIAS M, GOMEZ-SKARMETA J L, SALO E, et al. Silencing of *Smed-β-catenin1* generates radial-like hypercephalized planarians [J]. *Development*, 2008, 135(7): 1215-1221.
- [32] HOBMAYER B, RENTZSCH F, KUHN K, et al. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra* [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 186-189.
- [33] CHEN C Y, YUEH W T, CHEN J H. Canonical Wnt signaling is involved in anterior regeneration of the Annelid *Aeolosoma viride* [J]. *bioRxiv*, 2020.
- [34] RIBEIRO R P, AGUADO M T. Effects of GSK3β inhibition in the regeneration of *Syllis malaquini* (Syllidae, Annelida) [J]. *Development Genes and Evolution*, 2021, 231(5/6): 141-146.

## Experiment study on the effect of inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling on the regeneration of *Capitella teleta*

LI Qian<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Linlin<sup>1,2,3,4</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Oceanographic Research Center, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 3. Marine Biology and Biotechnology Functional Laboratory, Qingdao, 266237, Shandong, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays an important role in regeneration in multiple species such as planaria. The study aimed to investigate the effect of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling on the regeneration in the annelid, *Capitella teleta*. Sustained incubation of samples after amputation in 30  $\mu\text{mol/L}$  XAV-939, an exogenous Wnt/ $\beta$ -catenin signaling small molecular inhibitor, revealed that the regeneration of *C. teleta* was inhibited, with significantly slower regeneration compared to that in the control group and failure to form a regeneration blastema. Neural and muscle growth during regeneration were also affected by inhibition of Wnt signaling revealed by neural and muscle labeling. Subsequently, EdU labeling indicated that the number of proliferating cells in the XAV 939-treated group was significantly less than that in the control group, suggesting that the suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling may have affected the proliferating cells during the regeneration of *C. teleta*, which also further demonstrating that the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling may be involved in the regeneration of *C. teleta*, and play an important role in the early stage of regeneration. Comparative studies on the regulation of regeneration by wnt signaling in several typical species have shown that the Wnt signaling is relatively conserved in the whole-body regeneration of Cnidaria and Lophotrochozoa.

**Key words:** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; annelid; *Capitella teleta*; Wnt pathway inhibitor; regeneration; proliferating cells