

How do limbs, fins, and faces develop and evolve?

脊椎动物附肢发育及进化机制的研究进展

祁飞燕, 施鹏*

中国科学院昆明动物研究所, 进化与功能基因组学实验室, 昆明 650201

* 联系人, E-mail: ship@mail.kiz.ac.cn

2016-07-28 收稿, 2016-09-05 修回, 2016-09-08 接受, 2016-10-08 网络版发表

中国科学院战略先导科技专项(B类)(XDB13020400)和国家杰出青年科学基金(31325013)资助

摘要 动物形态的多样性造就了丰富多彩的动物世界. 脊椎动物附肢形态的发生一直以来是研究物种形态进化发育的典型例子. 脊椎动物的附肢在漫长的进化历程中发生了多次重大的改变, 这大大提高了脊椎动物的适应性. 另外, 在由水生鳍向陆生足演化以及四足动物形态各异的四肢发育过程中, 涉及很多与发育相关的基因和调控通路. 本文结合发育生物学和遗传学的证据, 综述了近年来对脊椎动物四肢发育及进化机制的相关研究, 强调了基因的时空差异表达及调控是造成生物形态适应性进化的主要驱动力.

关键词 脊椎动物, 附肢发育, 附肢进化, 适应性进化, 信号通路

脊椎动物在由水生到陆生的进化过程中, 其赖以运动的附肢经历了由成对的鳍向四肢的变化, 再由四肢到翅膀的演变, 甚至是丧失了四肢(如蛇和鲸)的演变等一系列过程. 这一复杂的四肢演变过程使脊椎动物能很好地适应水、陆、空三大生态位. 所以, 从骨骼发育和进化起源来看四足动物的前后肢与鱼的胸鳍和腹鳍是同源的, 但在功能上却发生了适应性辐射进化^[1], 这种同源却不同功能的例子还有同属哺乳类的蝙蝠的翼手和人的手. 于是, 关于脊椎动物四肢是如何进化和发育的问题一直被人们所关注. 从20世纪末开始, 人们对进化过程中形态的改变和发育过程之间的联系甚是感兴趣^[2]. 而脊椎动物的四肢是研究发育过程中形态发生以及它们最早是如何从软骨鱼类进化而来的良好模型^[3]. 近年来, 比较发育生物学、比较基因组学以及转录组数据分析的研究兴起, 可以通过对比同源发育基因在不同物种之间的差异表达模式, 以及相关信号通路上的基因差异表达来揭示脊椎动物四肢进化发育的分子机制^[4,5]. 本文结合发育生物学和分子生物学研究进展, 一方

面阐述了脊椎动物四肢从侧芽到有功能四肢的发育过程, 是由相同的发育模式和基因信号途径调控的; 另一方面通过分析脊椎动物在四肢进化过程中发生一系列形态转变的成因, 表明最终发育为不同形态和功能的四肢则是由发育相关基因的差异表达所致. 进一步强调了多学科交叉研究以及更多不同物种的基因组和转录组的解析, 是将来对非模式生物的形态发育及进化的研究趋势.

1 脊椎动物附肢发育的研究进展

脊椎动物的附肢在形态和功能上表现出系统多样性: 强健的四肢行走奔跑于陆地山野间、矫健的翅膀飞行穿梭于天宇丛林间、灵动的鱼鳍畅游河流海洋间. 但是附肢发育的基本形态发育模式是保守一致的, 主要可分为近远轴(proximal-distal, 肱骨到掌骨), 前后轴(anterior-posterior, 拇指到小指)和背腹轴(dorsal-ventral, 手背和手心)^[6,7], 见图1(a). 附肢的发育都是由侧板中胚层的侧芽发生开始^[8,9], 具体表现为: 侧板中胚层细胞增殖形成侧肢芽, 随后外胚层

引用格式: 祁飞燕, 施鹏. 脊椎动物附肢发育及进化机制的研究进展. 科学通报, 2016, 61: 3413–3419

Qi F Y, Shi P. Advances in vertebrate appendage development and its evolutionary mechanism (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 3413–3419, doi: 10.1360/N972016-00827

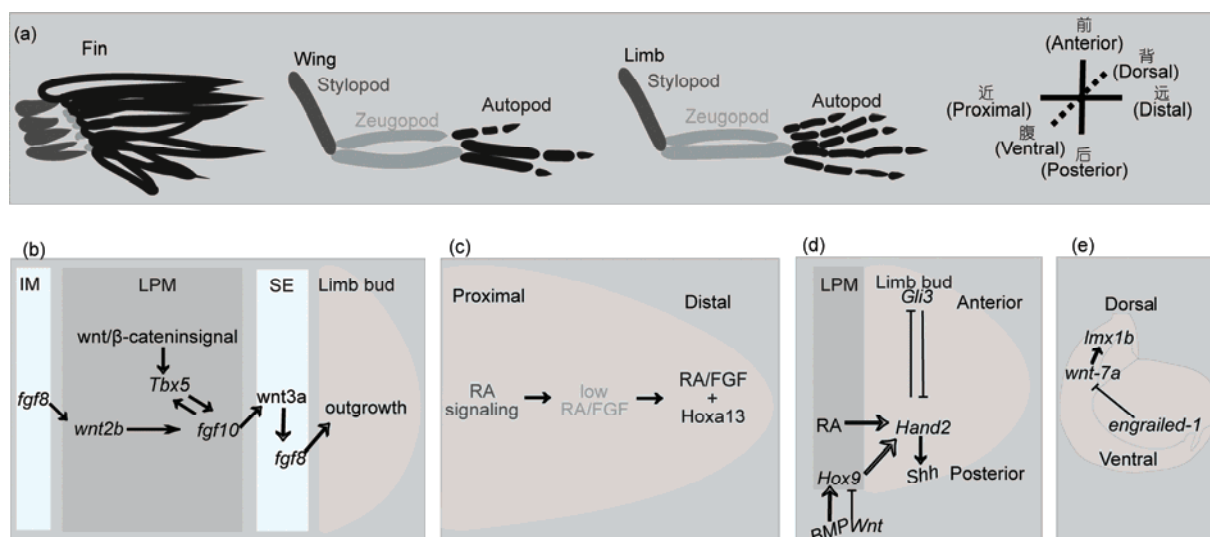


图1 脊椎动物附肢发育的概况图。(a) 鳍、翅膀和四足动物前肢示意图及其发育模式。(b) 附肢芽发生的信号调控途径, 中胚层(IM)表达的 $fgf8$ 通过 $wnt2b$ 诱导侧板中胚层(LPM) $fgf10$ 表达, $fgf10$ 通过 $wnt3a$ 使得 $fgf8$ 在周围外胚层(SE)表达, 最后形成侧肢芽(limb bud)。(c) RA信号通路调控附肢近远轴形成. RA和FGF的表达比例降低和 $Hoxa13$ 的激活导致指骨由近轴向远轴发育。(d) RA, Bmps和Shh信号通路调控附肢前后轴的发育. RA和BMP诱导 $Hand2$ 和 Shh 在肢芽后端表达, Gli 特异表达在肢芽前端. Gli 和 $Hand2$ 相互抑制维持了蛋白在前后轴的表达极性, 形成指骨的前后轴发育模式。(e) Wnts 信号通路调控附肢的背腹轴的发育. $Wnt-7a$ 和 $lmx1b$ 表达于肢芽背轴的外胚层, $engrailed-1$ 则表达于腹轴外胚层中(改自文献[7]).

Figure 1 Overview of limb development of vertebrates. (a) Schematic representation of fin, wing and forelimb skeletal elements. (b) Signaling components regulate limb bud outgrowth. *Fgf8* is expressed in intermediate mesoderm (IM), and *fgf8* induces *fgf10* expression in lateral plate mesoderm (LPM) through *wnt2b*. Finally, *fgf8* expresses in surrounding ectoderm (SE) through *wnt3a* signaling and induces limb bud initiation. (c) Low RA/FGF ratio establishes stylopod-zeugopod transition, and then *Hoxa13* expression is essential for zeugopod-autopod transition. (d) RA, Bmps and Shh signaling regulate anterior-posterior pattern of limb development. The limb is pre-established by anterior *Gli3* and the posterior *Hand2*. The polar expression pattern of *Gli3* and *Hand2* facilitate *Shh* expression in the posterior limb bud. So, the mutually antagonizing *Gli3* and *Hand2* play an important role for anterior-posterior pattern establishment. (e) Wnts signaling regulates dorsal-ventral pattern of limb development. *Wnt-7a* induces *lmx1b* expression in dorsal ectoderm. *Engrailed-1* is expressed in ventral ectoderm and represses *Wnt-7a* expression (Modified from ref. [7]).

细胞沿着肢芽边缘形成顶外胚脊(apical ectodermal ridge, AER); AER分泌纤维生长因子(Fgfs)到间充质细胞, 使肢芽进一步生长^[10], 最后从3个轴发育成不同形态的附肢. 因此, 调控附肢发育的分子机制也是保守的, 主要涉及Fgfs, Wnts, Shh, RA和Bmps等信号通路. 这些通路主要是与软骨增生和分化的调节有关^[11].

1.1 Fgfs, Wnts信号通路调控附肢侧芽的发生

侧芽的发生主要涉及T-box转录因子 $Tbx5$ 和 $Tbx4$ 以及纤维生长因子 $Fgfs8$ 和 $Fgfs10$ 正确表达在侧板中胚层, 产生附肢芽. 在敲除 $Tbx5$ 的小鼠中, 其前肢芽无法形成^[12], 同样在鸡胚中抑制 $Tbx5$ 和 $Tbx4$ 的表达, 则会形成无附肢的鸡胚^[13]. 另外, 在肢芽形成时如果FGF8没有活性, 那么形成的肢芽会很小^[10], 而FGF10在斑马鱼的胸鳍和鸡的前肢肢芽形成中维持了 $Tbx5$ 的表达^[14]. 而这些影响附肢芽形成的基因的正确表达主要由Fgfs, Wnts信号通路调控, 详情见图1(b).

1.2 RA, Fgfs信号通路调控附肢近远轴的发育

附肢前后轴包括近肢体端的肱骨, 中段的桡骨和尺骨以及远端的掌骨和指骨. 那么在发育过程中生物个体如何控制从肱骨向指骨的发育转变? 四肢的形成主要经历了软骨细胞增生、凋亡和骨节生成的阶段^[1,8]. 在此过程中, *Bmp*和 $Sox9$ 影响软骨细胞增殖与富集, 如果形成的软骨细胞较少, 发育形成的四肢则较短^[8]. Wnts信号通路是细胞增殖所必需的, 并且负调控软骨生成^[15]. 近远轴的三段骨节的形成主要是由RA/FGF的表达比例决定的. 随着RA和FGF表达的比例下降, 附肢倾向于由肱骨向桡骨和尺骨转变; 随后在较低的RA/FGF的比例下, *HoxA13*基因被激活, 形成掌骨和尺骨^[3,16], 见图1(c). 因此, 脊椎动物的附肢从肱骨到指骨的近远轴的发育是由多条信号通路相互调节决定的.

1.3 Shh, Bmps信号通路调控附肢前后轴的发育

脊椎动物前后轴的确定源于肢芽形成时, *Shh*在

肢芽后侧区域特异表达^[17], 而*Sox9*, *Gli3*和*Hand2*是确保*Shh*正确表达于肢芽后侧的关键基因^[18,19], 见图1(d). *Gli3*于肢芽前侧表达, 而*Hand2*表达在肢芽后侧^[18], 二者相互抑制呈现出表达的极性. 研究表明, *Gli3*是*Shh*的抑制因子, 对指骨的特化和数目起决定性作用, 当*Gli3*被抑制后, 小鼠则出现严重的多趾现象^[20]. 此外, *Bmp*信号通路中*Sox9*和*Bmpr1b*的表达, 使得软骨凝聚, 形成指骨, 最后*GDF5*介导指节形成^[21]. 而且基因在正确的发育时期的正确表达是附肢正常发育的前提, 如: *Bmp4*在发育早期失活, 则肢芽停止生长无法形成指节; 若在后期失活, 则会出现多指(趾)现象^[22]. 这表明, *Shh*和*Bmp*信号通路的正确调控是脊椎动物形成正常前后轴附肢的重要因素.

1.4 Wnts信号通路调控附肢背腹轴的发育

脊椎动物附肢的背腹之分主要表现为四肢远端指头背部有指甲结构而腹部则有较多的分泌腺分布. 这种结构上的差异主要是由上皮细胞和间质细胞之间相互作用的结果^[23]. 从分子层面上来看, 主要是由于Wnts信号通路调控了基因的背腹极性表达, 产生了附肢的背腹轴. 附肢芽的背轴外胚层表达WNT-7a, 进而调控*lmx1b*表达于背轴; 在腹轴肢芽外胚层中则表达EN-1 (由*engrailed-1*编码表达), 而且EN-1负调控WNT-7a的表达^[23], 见图1(e). 在小鼠中, *wnt-7a*和*lmx1b*的敲除, 都能导致背轴组织结构向腹轴结构转化^[23,24]; 同样地, 在*engrailed-1*功能散失的小鼠中, 四肢的腹轴组织结构向背轴组织结构转化^[25]. 因此, *wnt-7a*信号通路的表达调控是附肢背腹轴的正确分化的决定性因素.

2 脊椎动物四肢进化的研究进展

在探讨了脊椎动物的附肢是如何发育之后, 那么相应的问题油然而生: 脊椎动物不同形态的附肢是如何进化而来的呢? 它们进化的分子机制又是什么? 我们主要从对称鳍向四肢的演化和为适应不同环境四足动物演化出不同形态的四肢两个方面来剖析脊椎动物四肢进化的分子机制.

2.1 基因的时空表达差异与对称侧鳍向四肢的演化

约在3亿6千万年前(360 million years)^[8], 脊椎动

物的祖先离开水面进化出了适应陆生生存的四肢, 四肢最早源于硬骨鱼的两侧对称鳍, 而对称鳍则是由中部背鳍(如七鳃鳗)演化而来^[26]. 在对称鳍的出现到向四肢演变过程中主要是由*T-box*基因、*Hox*基因和*Shh*在侧芽不同部位的差异表达所致.

在上文提及附肢侧芽形成中也提到*T-box*基因对前后肢侧芽的形成起到关键作用. 研究表明, 在小鼠和斑马鱼胚胎中, *Tbx5*和*Tbx4*分别表达于形成前后肢的侧板中胚层中^[12,27]. 而文昌鱼和七鳃鳗虽然都有*Tbx5/4*, 但是在胚胎时期仅表达于背部中胚层而非侧板中胚层, 这与文昌鱼和七鳃鳗只有背鳍而无侧鳍的发育模式是一致的^[28]. 同样地, 通过原位杂交比较发现, *Hoxd*基因在软骨鱼类(如catshark)中和四足动物中有相同的时间表达模式: 在肢芽发育早期阶段(Phase I), *Hox9*表达于近端; 而在后期(Phase II), *Hox10-Hox13*沿着远端边缘表达, 表明*Hox*基因在附肢芽发育的时间表达模式是保守的, 因此, *Hox*基因成员在特定发育时间的特定表达是附肢正常发育的基础. 但是其在软骨鱼类肢芽上的表达区域要局限得多^[29], 导致四足动物四肢近远轴的形成. 这种基因的表达差异也存在于硬骨鱼类和四足动物中, 如*HoxA11*和*HoxA13*分别表达于四足动物四肢的近远轴, 但在斑马鱼的鳍芽中没有类似的表达极性, 而表现出重叠表达^[30], 因此鱼鳍没有明显的近远轴区别. 另外, 脊椎动物的四肢从鳍进化而来以后, 在形态上的一大区别就是鱼鳍无明显的前后轴之分. 鳍的内部骨骼都是在同一平面上排列且骨骼较多, 而陆生四足动物则有明显的指骨骨骼分化, 见图1(a). *Shh*信号通路在四肢前后轴形成的过程中起关键作用^[31]. 在非模式生物猫鲨(catshark)的研究中, 对培养中的卵进行前后轴相关基因的原位杂交发现: *Shh*信号通路上的2个标志性基因*Ptch1*和*Hand2*在鳍的前后端都有表达^[32], 因此猫鲨的鳍几乎没有前后端的分化; 而在四足动物中*Ptch1*和*Hand2*仅表达于后端^[7](图1(d)), 基因的这种区域性表达形成了四肢的前后轴发育模式. 另外, 基因在不同发育时期的表达及表达时间的长短也影响着附肢的形态发育. 如小鼠的第三到第五指骨的发育取决于SHH表达的量 and 表达时间的长短, 其第五指骨的形成需要SHH表达的时间最长^[33]. 同样地, 在鸡胚的不同发育时期抑制SHH的表达所生成的指骨数是不一样的^[34]. 因此, *T-box*, *Hox*和*Shh*基因在时空上的差异表达可能与硬骨鱼类

对称鳍的发生有关,同时也是对称侧鳍向陆生脊椎动物的四肢演变的重要因素。

2.2 基因的表达水平差异与四肢的适应性辐射演化

陆生脊椎动物的四肢形态多样性呈现出适应性进化:手、脚、爪子、翅膀,甚至是四肢退化等不同形态。主要差异在于指骨的数目及指节长短的差异,在进化中这些差异的形成离不开对四肢发育起重要调控作用的信号通路及其基因。首先我们关注的是与指骨形成密切相关的*Shh*信号通路。在没有四肢的爬行类(如:蛇)和两栖类(如:蚓螈)中,*Shh*的增强子序列功能发生了退化^[35];同样的由于*Shh*的信号调控使得鸡和鸟类的翅膀仅有3个指骨^[34]。除了两爬类和鸟类,*Shh*信号通路对四肢发育的调控也见于哺乳动物中:比起小鼠,在仅有两个指骨的猪和牛中,*Ptch1*在肢芽的后端表达量较低^[36];而且海豚的后肢退化也是转录因子*Hand2*和*Shh*在后肢芽上无表达的结果^[37]。在哺乳动物中除了海豚和鲸类,四肢特化比较明显的要数蝙蝠,而且近年来对蝙蝠四肢的进化发育研究也很多。以下就以蝙蝠为例,探讨基因表达水平的差异如何调控脊椎动物的四肢形态进化。

在现存的蝙蝠中,不同物种间的翅膀形态各异。无论是从翅膀的外部形态(翼尖形态、纵横比大小)还是从内部骨骼连接(有无指节)来看,都有着明显的差异,而这些差异可能与其不同的飞行环境和捕食策略有关^[38,39]。就形态而言,现生蝙蝠前肢的第I和II指节较短,第III,IV及V指节较长^[40],而且指间的组织并没有凋亡脱落,而是有一层富有弹性的肌肉组织组成为翼膜。蝙蝠指节的这种异常生长形态,是由于生长板上的软骨细胞的增殖、分化和减慢凋亡^[41]。从基因策略看,首先要抑制骨节形成,即抑制软骨细胞凋亡。在骨节形成之前,蝙蝠在指节间表达GREM(*Bmp*抑制蛋白)以及FGF8抑制细胞凋亡;另外*Fgf-Shh-bmp-Gremlin*的反馈调节作用使得指间组织增生发育,最后肢长得延伸^[42]。另一个策略就是增加软骨形成蛋白的表达量,例如影响软骨细胞增殖的*Bmp2*,*Hoxd13*和*prx1*在蝙蝠中表达显著上调。对比人和小鼠,这些基因在序列上高度保守,但是在蝙蝠中有较高的表达水平,这使得蝙蝠软骨细胞大量增殖,最终导致指节变长^[43~46]。另外,Booker等人^[47]在蝙蝠祖先基因组上发现了多个快速进化区域,

这些快速进化区域与四肢发育基因(*Twist2*,*Spry1*,*Shh*,*Spg20*,*Hoxd*)在位置上相距较近,并认为这些区域对调节四肢发育的基因有增强子的功能。因此,这些基因表达水平的上调使得蝙蝠进化出了与其他哺乳动物不同形态的四肢。

蝙蝠的四肢除了进化出与其他哺乳动物有较大差异的翼手外,其自身的前后肢也有较大的差异,即后肢明显比前肢短。从脊椎动物发育相关的信号通路^[48]来看,这些通路中基因的活性和表达量在蝙蝠前后肢上也有区别,这可能与蝙蝠前后肢形态差异有关。*Wnt/β-catenin*信号通路在前肢上受到抑制,此信号通路的作用是在软骨发育过程中抑制间质细胞的凝集,前肢此信号通路受到抑制后,大量的间质细胞凝集并发育成翅膀。*Bmps*信号通路则有两种模式:*Bmps*和*Gremlin1*在胚胎发育前期在后肢表达较高,而在胚胎发育后期则在前肢有较高的表达^[5]。对应的,一些上述信号通路中的调控基因在前后肢上也有显著的表达差异,如5'*Hoxd*,*Tbx3*,*Tbx5*,*Mut3*和*Lhx8*仅表达于前肢而且表达量相对很高,尤其是在第III和V指节中有更高的表达水平;而*Tbx4*,*Pitx1*以及激活凋亡程序的*Msx1*和*Msx2*在后肢中表达较高^[1,5,49]。除调控基因外,先前的相关研究表明,一些长链非编码RNA(LncRNAs)也与发育调控相关^[50]。在蝙蝠的四肢发育过程中,一些LncRNAs在蝙蝠中很保守而且在前后肢中存在表达差异,如*Tbx5-as1*在蝙蝠前肢中有较高的表达并影响前肢的发育^[5]。另外,基因调控区域的改变也会影响个体的形态发育^[51],蝙蝠前肢中H3K27乙酰化水平较高,而后肢则H3K27甲基化水平较高^[5]。综上所述,多因素调控下的基因表达水平差异是导致蝙蝠的前后肢呈现不同形态的主要驱动力。

3 结论与展望

现今对脊椎动物四肢发育与进化的研究慢慢从经典实验胚胎学向分子生物学延伸,以及从模式生物向非模式生物的研究转变。脊椎动物进化出不同形态的四肢,是由于基因在发育过程中的表达差异造成的。这些表达差异既包括基因区域性表达差异,也包括基因表达水平的差异。而这些差异是由复杂的调控途径相互作用实现的,包括发育相关的信号通路、转录因子、基因组的调控区域以及一些有调控功能的LncRNAs等。对于脊椎动物附肢这个复杂性

状, 从单个基因出发已经不能全面解决问题. 因此, 从进化基因组学、比较基因组学和转录组数据等多层次分析为系统揭示脊椎动物四肢如何进化提供可能. 鉴于非模式生物的研究相对较困难而且单基因组分

析显得无规律性, 那么需要研究大量的不同物种样本以及更多的全基因组数据, 并通过进化生物学的理论来筛选可能影响四肢发育的基因, 从而揭开动物形态多样性分子机制之谜.

参考文献

- 1 Ruvinsky I, Gibson-Brown J J. Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution. *Development*, 2000, 127: 5233–5244
- 2 Gerhart J, Kirschner M, Leroi A. Cells, embryos and evolution. *Trends Ecol Evol*, 1998, 13: 82
- 3 Cooper K L, Hu J K-H, ten Berge D, et al. Initiation of proximal-distal patterning in the vertebrate limb by signals and growth. *Science*, 2011, 332: 1083–1086
- 4 Montavon T, Soshnikova N, Mascres B, et al. A regulatory archipelago controls *Hox* genes transcription in digits. *Cell*, 2011, 147: 1132–1145
- 5 Eckalbar W L, Schlebusch S A, Mason M K, et al. Transcriptomic and epigenomic characterization of the developing bat wing. *Nat Genet*, 2016, 48: 528–536
- 6 Shubin N, Tabin C, Carroll S. Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature*, 1997, 388: 639–648
- 7 Sheeba C J, Andrade R P, Palmeirim I. Getting a handle on embryo limb development: Molecular interactions driving limb outgrowth and patterning. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 49: 92–101
- 8 Mariani F V, Martin G R. Deciphering skeletal patterning: Clues from the limb. *Nature*, 2003, 423: 319–325
- 9 Freitas R, Zhang G, Cohn M J. Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates. *Nature*, 2006, 442: 1033–1037
- 10 Sun X, Mariani F V, Martin G R. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, 2002, 418: 501–508
- 11 Cooper K L, Tabin C J. Understanding of bat wing evolution takes flight. *Genes Dev*, 2008, 22: 121–124
- 12 Agarwal P, Wylie J N, Galceran J, et al. *Tbx5* is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development*, 2003, 130: 623–633
- 13 Takeuchi J K, Koshiba-Takeuchi K, Suzuki T, et al. *Tbx5* and *Tbx4* trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade. *Development*, 2003, 130: 2729–2739
- 14 Ng J K, Kawakami Y, Büscher D, et al. The limb identity gene *Tbx5* promotes limb initiation by interacting with *Wnt2b* and *Fgf10*. *Development*, 2002, 129: 5161–5170
- 15 ten Berge D, Brugmann S A, Helms J A, et al. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*, 2008, 135: 3247–3257
- 16 Roselló-Díez A, Arques C G, Delgado I, et al. Diffusible signals and epigenetic timing cooperate in late proximo-distal limb patterning. *Development*, 2014, 141: 1534–1543
- 17 Xu B, Wellik D M. Axial *Hox9* activity establishes the posterior field in the developing forelimb. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 4888–4891
- 18 Delgado I, Torres M. Gradients, waves and timers, an overview of limb patterning models. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 49: 109–115
- 19 Lopez-Rios J. The many lives of SHH in limb development and evolution. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 49: 116–124
- 20 Hui C C, Joyner A L. A mouse model of Greig cephalo-polysyndactyly syndrome: the *extra-toes^l* mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet*, 1993, 3: 241–246
- 21 Storm E E, Kingsley D M. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol*, 1999, 209: 11–27
- 22 Bénazet J-D, Bischofberger M, Tiecke E, et al. A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science*, 2009, 323: 1050
- 23 Chen H, Johnson R L. Dorsal-ventral patterning of the vertebrate limb: A process governed by multiple events. *Cell Tissue Res*, 1999, 296: 67–73
- 24 Riddle R D, Ensini M, Nelson C, et al. Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT6a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*, 1995, 83: 631–640
- 25 Chen H, Johnson R L. Interactions between dorsal-ventral patterning genes *lmx1b*, *engrailed-1* and *wnt-7a* in the vertebrate limb. *Int J Dev Biol*, 2002, 46: 937–941
- 26 Freitas R, Gomez-Skarmeta J L, Rodrigues P N. New frontiers in the evolution of fin development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2014, 322: 540–552
- 27 Ahn D-g, Kourakis M J, Rohde L A, et al. T-box gene *tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud. *Nature*, 2002, 417: 754–758
- 28 Onimaru K, Shoguchi E, Kuratani S, et al. Development and evolution of the lateral plate mesoderm: Comparative analysis of amphioxus and lamprey with implications for the acquisition of paired fins. *Dev Biol*, 2011, 359: 124–136

- 29 Freitas R, Zhang G, Cohn M J. Biphasic *hoxd* gene expression in shark paired fins reveals an ancient origin of the distal limb domain. PLoS One, 2007, 2: e754
- 30 Metscher B D, Takahashi K, Crow K, et al. Expression of *Hoxa-11* and *Hoxa-13* in the pectoral fin of a basal ray-finned fish, *Polyodon spathula*: Implications for the origin of tetrapod limbs. Evol Dev, 2005, 7: 186–195
- 31 Revest J-M, Spencer-Dene B, Kerr K, et al. Fibroblast growth factor receptor 2-iiiib acts upstream of *Shh* and *Fgf4* and is required for limb bud maintenance but not for the induction of *Fgf8*, *Fgf10*, *Msx1*, or *Bmp4*. Dev Biol, 2001, 231: 47–62
- 32 Onimaru K, Kuraku S, Takagi W, et al. A shift in anterior-posterior positional information underlies the fin-to-limb evolution. eLife, 2015, 4: e07048
- 33 Harfe B D, Scherz P J, Nissim S, et al. Evidence for an expansion-based temporal *Shh* gradient in specifying vertebrate digit identities. Cell, 2004, 118: 517–528
- 34 Towers M, Signolet J, Sherman A, et al. Insights into bird wing evolution and digit specification from polarizing region fate maps. Nat Commun, 2011, 2: 426
- 35 Sagai T, Masuya H, Tamura M, et al. Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (*Shh*). Mammalian Genome, 2004, 15: 23–34
- 36 Lopez-Rios J, Duchesne A, Speziale D, et al. Attenuated sensing of SHH by *Ptch1* underlies evolution of bovine limbs. Nature, 2014, 511: 46–51
- 37 Thewissen J G M, Cohn M J, Stevens L S, et al. Developmental basis for hind-limb loss in dolphins and origin of the cetacean bodyplan. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 8414–8418
- 38 Norberg U M, Rayner J M V. Ecological morphology and flight in bats (mammalia; chiroptera): Wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. Phil Transact R Soc, 1987, 316: 335–427
- 39 Bahlman J W, Price-Waldman R M, Lippe H W, et al. Simplifying a wing: Diversity and functional consequences of digital joint reduction in bat wings. J Anat, 2016, 229: 114–127
- 40 Swartz S M. Allometric patterning in the limb skeleton of bats: Implications for the mechanics and energetics of powered flight. J Morphol, 1997, 234: 277–294
- 41 Ballock R T, Okeefe R J. Physiology and pathophysiology of the growth plate. Birth Defects Res Part C Embryo Today, 2003, 69: 123–143
- 42 Hockman D, Cretekos C J, Mason M K, et al. A second wave of sonic hedgehog expression during the development of the bat limb. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 16982–16987
- 43 Sears K E, Behringer R R, Rasweiler J J, et al. Development of bat flight: Morphologic and molecular evolution of bat wing digits. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 6581–6586
- 44 Cretekos C J, Wang Y, Green E D, et al. Regulatory divergence modifies limb length between mammals. Genes Dev, 2008, 22: 141
- 45 Cooper L, Cretekos C J, Sears K E. The evolution and development of mammalian flight. Wiley Interdiscipl Rev, 2012, 1: 773–779
- 46 Cooper L, Sears K E. How to grow a bat wing. In: Adams R A, Pedersen S C, eds. Bat Evolution, Ecology, and Conservation. New York: Springer, 2013. 3–20
- 47 Booker B M, Friedrich T, Mason M K, et al. Bat accelerated regions identify a bat forelimb specific enhancer in the *hoxd* locus. PLoS Genetics, 2016, 12: 21
- 48 Tickle C, Eichele G. Vertebrate limb development. Ann Rev Cell Biol, 1994, 10: 121–152
- 49 Wang Z, Dai M, Wang Y, et al. Unique expression patterns of multiple key genes associated with the evolution of mammalian flight. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111: 20133133
- 50 Wang K C, Yang Y W, Liu B, et al. A long noncoding rna maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. Nature, 2011, 472: 120
- 51 Carroll S B. Evolution at two levels: On genes and form. PLoS Biol, 2005, 3: 8



施鹏

中国科学院昆明动物研究所研究员。1996 年在厦门大学获得理学学士，2004 年在中国科学院昆明动物研究所获理学博士学位，同年赴美国密歇根大学进化和生态学系进行博士后工作，2007 年起任德国人类营养学研究所研究科学家，2008 年回中国科学院昆明动物研究所工作。2013 年获国家杰出青年科学基金，2016 年入选中组部“万人计划”。主要从事遗传及进化基因组学方面的研究。迄今在 *Nat Genet*, *Genome Res*, *Proc Natl Acad Sci USA* 等杂志上发表论文 40 多篇。这些研究成果已被国内外同行引用近 2000 次。

Advances in vertebrate appendage development and its evolutionary mechanism

QI FeiYan & SHI Peng

Laboratory of Evolutionary and Functional Genomics, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Vertebrates display a vast array of morphological adaptations to ecological niches. These involve multiple large-scale changes of the appendages, such as evolving limbs from fins, wings (birds, bats), and even the loss of appendages (caecilians, lizards, snakes) during the transition from water to land. Reversals also exist, such as whales evolving back to having fins. This tremendous diversity of appendages leads to development of vertebrate appendage being a model for understanding the evolution and development of appendage morphologies. The development of appendages from buds is conserved among vertebrate. Appendage growth depends on cell proliferation and specializations along proximal-distal (PD), anterior-posterior (AP) and dorsal-ventral (DV) axes. Cell proliferation in lateral plate mesoderm relates to the initiation of buds. The growth of ectodermal cells forms an apical ectodermal ridge along the bud and secreted fibroblast growth factors (Fgfs) control outgrowth of the bud. Gene expression in a specific time and region and levels of expression determines if a bud becomes a fin, wing or limb. Several genes and regulation signal pathways have evolved during transition of fins to alternative types of limbs. Fgfs, Wnts, Shh, RA and Bmps signaling regulate the genes *Tbx5*, *Tbx4*, *Fgf8*, and *Bmp* and the Hox gene family, respectively, which are essential for appendage development and evolution. These genes associate with chondrocyte proliferation and differentiation. *T-box*, *fgfs* and *wnts* in lateral plate mesoderm are essential for lateral bud initiation, which relates to the transition of ancestral median fins to paired fins. The origin of appendages for the emergence onto land was depended on regions and levels of expression for such as *Bmp4*, *Hoxd13* and *hand2*, which bmps and shh signals regulate, respectively. *Hox13* is expressed on the distal margin of fins and limbs buds while the larger-scale region of expression in the limb bud constitutes the basis of the development of the PD axis in terrestrial vertebrates. Loss of *Hand2* leads to the deficiency of hind-limbs in whales. High levels of expression of *Bmps* in the forelimb of bats lead the forelimb to be longer than the hind-one. Furthermore, not only signaling regulation, but also transcription factors, regions of genome regulation and some long non-coding RNAs (lncRNAs) play regulatory roles in gene expression during appendage development.

In this paper, we review the advances in limb development and evolution via evidence from developmental biology and genetics. We highlight that differences in temporal and spatial expression gene regulation are the main driving forces for adaptive evolution and morphological variation. We emphasize that by combining evolutionary genomics, comparative genomics and transcriptome analyses, it is possible to reveal how vertebrate appendages evolved. To verify the drivers of morphological diversity, it is necessary to consider the complex interactions of the multiple genes involved in the evolution of development through time.

vertebrate, limb development, limb evolution, adaptive evolution, signal pathway

doi: 10.1360/N972016-00827