

刺参吐脏再生的组织学研究

郑法新¹, 孙修勤², 张进兴²

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要:以中国山东地区的养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)为研究材料,将体长10~15 cm的刺参,通过注射KCl(0.35 mol/L)诱导吐脏。采用组织学方法对刺参吐脏和再生过程进行观察,结果表明,刺参吐脏后便开始再生,吐脏后的第2天可观察到呼吸树主干及分支结构。腹部肠系膜在吐脏后逐渐增厚,第5天可观察到肠上皮与肌肉组织,再生出具有功能的新肠管的时间大约为2周。本研究旨在为刺参再生的进一步研究以及刺参的养殖生产提供基础理论依据。
[中国水产科学, 2006, 13(1): 134~139]

关键词:刺参;吐脏;再生;组织学

中图分类号:Q959.269 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0134-06

棘皮动物属于后口动物门^[1],在进化上被认为是与脊索动物最近的成员,它们被广泛应用于发育生物学研究、特别是与胚胎发育相关的早期研究^[2]。

刺参作为器官发育研究的模型动物,是非常好的材料,因为其吐脏与再生均在固定的器官上,并且吐脏后能在较短时间内再生出丢失的器官,减少了用手术或激光去除脏器官产生的个体差异,为动物的发育研究提供了方便。目前,对刺参的吐脏与再生研究较少,Garcia-Arreaga等^[3]用单克隆抗体和标记技术进行了刺参再生的组织学研究,Eliseikina和Magarlamov^[4]对刺参进行了体腔液细胞的研究。国内至今尚未见关于刺参吐脏再生的报道。本实验用组织学方法描述刺参的吐脏与再生过程,旨在更深入的研究和养殖生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

刺参(*Apostichopus japonicus*)体长10~15 cm,采自山东省乳山市科合养殖公司近海养殖场。将实验刺参分成11组,每组3只。向每只刺参体腔中注射2~4 mL的KCl(0.35 mol/L),诱导其吐脏,在诱导吐脏过程及以后的饲养过程中没有观察到刺参死亡现象。将吐脏后的刺参放于网箱中,在近海边自

然海水中饲养(水温16~20℃),在整个刺参吐脏后的饲养过程中,不需要投任何饵料。在实验中同时设一组正常对照。

1.2 实验方法

对刺参吐脏的过程用数码相机拍照。在刺参再生过程的关键时期,即吐脏后2天、3天、5天、7天、9天、11天、13天、14天、21天、28天、35天分别对相应实验组刺参进行组织学研究。将取样的实验刺参和对照刺参用6%的MgCl₂溶液麻醉1~2 h,然后用锋利的剪刀从刺参泄殖腔处沿背部中央向口部剪开,最后使整个刺参呈平面状。用大头针将刺参的边缘固定,暴露出内部器官以供观察和取材。用灭菌镊子将刺参近体腔部的薄膜轻轻取下在无菌海水中润洗,之后放入Davidson固定液中固定。

膜组织在Davidson液中固定24 h,按以下程序进行脱水和透明:75%乙醇,130 min→85%乙醇,50 min→85%乙醇,50 min→95%乙醇,45 min→95%乙醇,45 min→95%乙醇,45 min→100%乙醇,45 min→100%乙醇,45 min→无水乙醇与二甲苯混合液(体积比1:1),25 min→二甲苯,20 min→二甲苯,20 min→纯石蜡,150 min。用石蜡包埋后进行组织切片,然后进行染色。

采用以下染色程序对组织切片进行苏木精-伊红染色:二甲苯,5 min→二甲苯,5 min→100%乙

收稿日期:2005-04-19; 修订日期:2005-09-02。

基金项目:国家“973”基础研究项目资助(G1999012005)。

作者简介:郑法新(1975-),男,博士研究生,研究方向:分子生物技术。E-mail:foxind@163.com

通讯作者:孙修勤。E-mail:sunxq@fsc.org.cn

醇,2 min→100%乙醇,2 min→95%乙醇,2 min→95%乙醇,2 min→80%乙醇,2 min→80%乙醇,2 min→50%乙醇,2 min→蒸馏水,2 min→苏木精,5 min→自来水冲洗,6 min→伊红,1.8 min→95%乙醇,2 min→95%乙醇,2 min→100%乙醇,2 min→100%乙醇,2 min→二甲苯,2.5 min→二甲苯,2.5 min→二甲苯,2.5 min。

样品的组织切片用光学显微镜(Nikon E-CLIPSE TE2000-U)进行观察、拍照。

2 结果

从观察结果看,海参吐脏的自割区域是恒定的,即前端在食管与肠结合处、后端在肠与肛门结合处(图版 I-1A)。药物诱导后,吐脏立即开始。首先,肠从肠系膜分离,然后从大肠与肛门的连接处断裂,与呼吸树一起排出体外(图版 I-1B、1C),紧接着咽部与小肠前端的连接处断裂,最终整个肠与呼吸树全部排出,最后体腔内只留下了肠系膜的游离边缘。从组织切片上可以观察到体腔内连系大肠和小肠的肠系膜(图版 I-2A、2B)。

在刺参吐脏 2 天后的泄殖腔切片,可以清晰看到再生的呼吸树主干和分支(图版 I-3A、3B)。在刺参吐脏后第 3~5 天再生肠组织膜的切片中,可见肠系膜出现不规则增厚,同时围绕海参的体腔内部的膜也在增厚,这些组织最终形成肠壁(图版 II-1A、1B)。在随后的几天里,特别是在第 7 天、第 9 天和第 11 天,形成肠管的膜进一步缩小变厚,肠壁的上皮层、肌肉层等组织层进一步发育完善,最终形成了一条细细的管状食道雏形(图版 II-2A、2B、2C)。此时的食道雏形的管起于食管结合处,延伸到泄殖腔。至吐脏后第 14 天左右,再生的肠管已经形成(图版 II-3A、3B、3C)。新生的消化道非常纤细,没有典型的 S 型管状结构,但在一些刺参的初期肠管里,已经观察到未被消化的泥土颗粒,这说明此时再生出的肠管已具吞食功能。吐脏后的第 21 天,肠管形成了典型的 S 型结构。之后的更高级阶段(21~35 天),再生肠管除逐渐增大、增长外,没有发现其他的比较明显的变化,此时的肠管管径几乎达到了吐脏前的水平,但长度还比吐脏前的要短。

该结果说明,在本实验条件下,刺参再生出新生肠管的时间大约为两周,此时的肠管已可容纳食物,具有了消化的功能;而肠管大小要达到吐脏前的水平,需要 35 天以上。

3 讨论

本实验发现,刺参吐脏完成后,消化和呼吸系统便开始再生。根据观察结果,本实验将肠的再生过程分为 4 个阶段。第 1 阶段为伤口愈合阶段,即吐脏后的食管、泄殖腔和肠系膜的伤口分别愈合,该过程在海参科成员中很少研究,但在其他棘皮动物如海星胃和海星臂的再生中已有报道^[5-7]。第 2 阶段为游离肠系膜增厚和沿体腔壁的肠组织膜的形成;在吐脏后第 2 天即可观察到呼吸树的主干结构,而再生后大约第 3 天,游离的肠系膜逐渐向体腔内壁扩展、增厚,形成了体腔膜。而第 3 阶段为连续管状肠管的形成阶段,在该阶段形成了可以进食的肠管,具有了容食和消化功能。第 4 阶段为再生组织逐渐接近于成熟组织的阶段。此时期,肠管形成了典型的 S 型消化道。

肠的再生也发生于其他棘皮动物,只是因种类和环境条件不同而有差异。肠管的形成时间和功能发挥有所差异,一些种类再生出肠管需要 1 个月,而另一些则需要更长的时间。例如糙海参(*Holothuria scabra*)仅需要 7 天的时间即可完成再生过程^[8];硬瓜参(*Sclerodactyla briareus*)再生出其体壁部分需 20~30 天^[9];另 1 个例子是拟刺参(*Stichopus mollis*),其新肠管的形成大约需要 145 天以上^[10]。真五角瓜参(*Eupentacta*)的横切再生时间,明显随片断长度和与前后轴的相对位置而变化^[11]。但是,需要指出的是以上的这些发现大多是在人工条件下获得的。

本实验所观察到的结果和组织切片分析结果表明,海参的再生在吐脏完成后便已经开始,特别是吐脏后的第 2 天,就发现了原呼吸树部位形成的呼吸树主干的管状结构及分支结构。这种再生功能与刺参吐脏后的生理要求相适应,因为在整个内脏器官排出后,需要在最短的时间内再生出消化和循环系统,以维持其生命运动。

García-Arriarán 认为,刺参的肌肉层和上皮细胞层首先发生于再生后 14 天,而本实验结果是在再生后的第 5 天。García-Arriarán 等报道再生肠管具有消化功能是在吐脏后的第 21 天;而本实验所养殖刺参所观察到的结果是在吐脏后的第 14 天。本研究结果与 García-Arriarán 等的报道相同之处是肠管达到吐脏前的水平大约需要 35 天以上。这些都说明刺参在吐脏后再生迅速,但具有生理功能后发育减

缓。除此之外, Garcia-Arriarús 等在肠再生完成之前,通过探针检出神经分子,表明神经系统可能在肠自身的再生过程中非常重要,他们提出假设指出起源于神经组织的因子在再生过程中起到非常重要的调节作用^[3,12,14-16]。在海星中,壁的再生依赖于神经的再生,因此,推测在海参的再生过程中,例如上皮层或肌肉层的出现,也可能是在神经的影响下^[6]。Eliseikina 和 Magarlamov 等用光学显微镜以及组织化学技术对刺参的体腔液的细胞组成进行了研究,提出在刺参体腔液当中,有祖细胞,阿米巴细胞,空泡细胞,桑椹胚细胞等^[13]。

另外一些学者和 Garcia-Arriarús 的实验清楚表明,再生也受饲养条件等环境因素的影响^[3,6-7]。因此,上述研究仅是模仿野生条件下的结果。

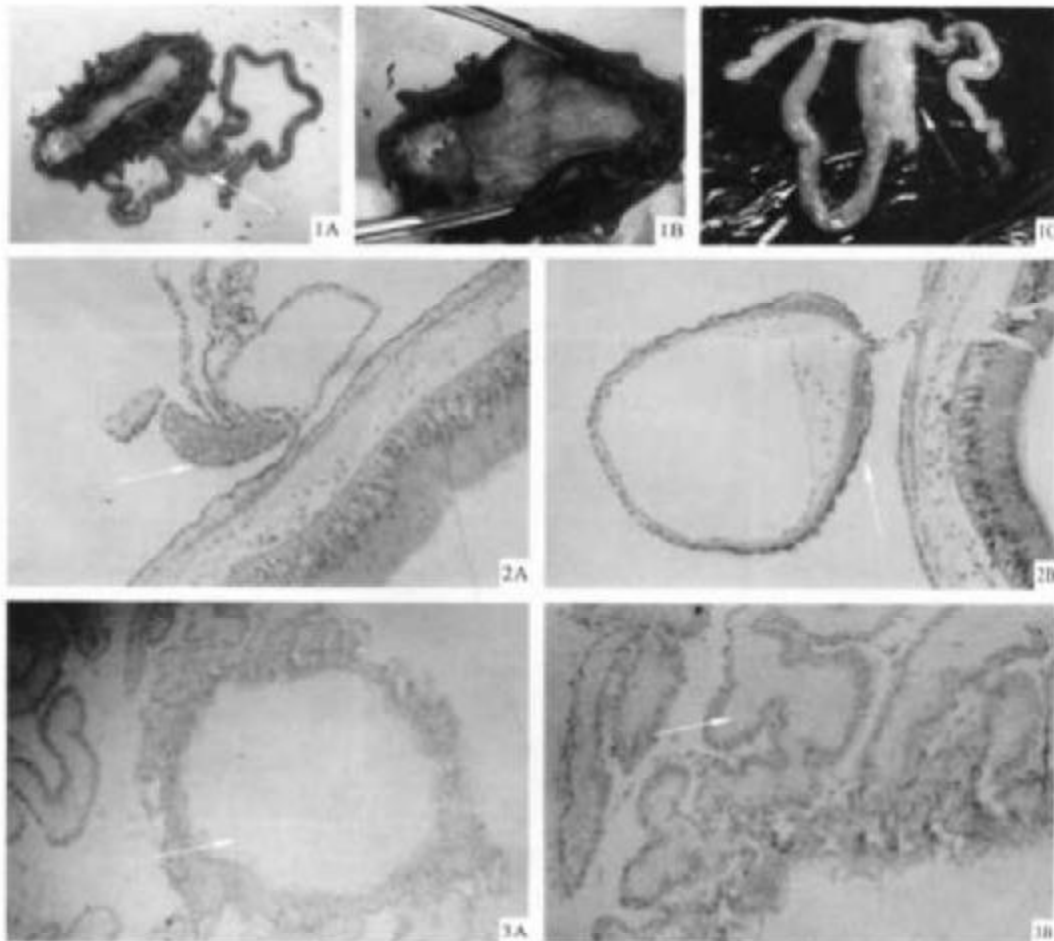
棘皮动物表现出的令人惊奇的再生能力,开启了人们回答新实验问题的大门。但是哪些基因或基因产物对刺参内脏的再生是重要的、在刺参肠的再生过程中肠神经系统对再生起什么作用以及肠的再生中存不存在特异的生长因子等等,这些都是今后值得深入研究的问题。

参考文献:

- [1] 廖玉麟. 中国动物志·棘皮动物门·海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 53-64.
- [2] Dalmatov I Y. Regeneration in echinoderms[J]. Russ J Mar Biol, 1999, 25: 225-233.
- [3] Garcia-Arriarús J E, Estrada-Rodgers L, Santiago R, et al. Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata) [J]. J Exp Zool, 1998, 281: 288-304.
- [4] Eliseikina M G, Magarlamov T Y. Coelomocyte Morphology in the Holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae) [J]. Russ J Mar Biol, 2002, 28(3): 197-202.
- [5] Anderson J M. Studies on visceral regeneration in the sea-stars. I. Regeneration of pyloric caeca in *Henricia leucocaula* [J]. Biol Bull, 1962, 122: 321-342.
- [6] Anderson J M. Studies on visceral regeneration in the sea-stars. II. Regeneration of pyloric caeca in *Asteriidae*, with notes on the source of cells in regenerating organs [J]. Biol Bull, 1965a, 128: 1-23.
- [7] Anderson J M. Studies on visceral regeneration in the sea-stars. III. Regeneration of the cardiac stomach in *Asterias forbesi* [J]. Biol Bull, 1965b, 129: 454-470.
- [8] Bai M M. Regeneration in the Holothurian, *Holothuria aurea* jagor [J]. Indian J Exp. Biol., 1971, 9: 467-471.
- [9] Kille F R. Regeneration in *Thyone briareus* Lescur following induced autotomy. Biol Bull, 1935, 69: 82-108.
- [10] Dowbin W H. Auto-evisceration and the regeneration of viscera in the holothurian *Stichopus mollis* (Hutton). Trans R Soc New Zealand, 1949, 77: 497-523.
- [11] Dalmatov Y. Regeneration of apopharyngeal complex in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuria: Dendrochirota) [J]. Monogr Dev Biol, 1992, 23: 40-50.
- [12] Garcia-Arriarús J E, Rojas-Soto M, Jim nez L B, et al. The enteric nervous system of echinoderms: unexpected complexity revealed by neurochemical analysis [J]. J Exp Biol, 2001, 204: 865-873.
- [13] Eliseikina, M G, Magarlamov T Y. Coelomocyte Morphology in the Holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae) [J]. Russ J Mar Biol, 2002, 28 (3): 197-202.
- [14] Garcia-Arriarús J E, D de-Miranda L, Torres-Vazquez I, et al. Regeneration of the enteric nervous system in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* [J]. J Comp Neurol, 1999, 406: 461-475.
- [15] Candia-Carnevali M D, Bonasoro F, Lucca E, et al. Pattern of cell proliferation in the early stages of arm regeneration in the leather star *Antedon mediterranea* [J]. Exp Zool, 1995, 272: 464-474.
- [16] Garcia-Arriarús J E, Rojas-Soto M, Jim nez L B, et al. The enteric nervous system of echinoderms: unexpected complexity revealed by neurochemical analysis [J]. J Exp Biol, 2001, 204: 865-873.

郑法新等:刺参吐脏再生的组织学研究

ZHENG Fa-xin et al: Histological studies on evisceration and regeneration in *Aponstichopus japonicus*



图版 I

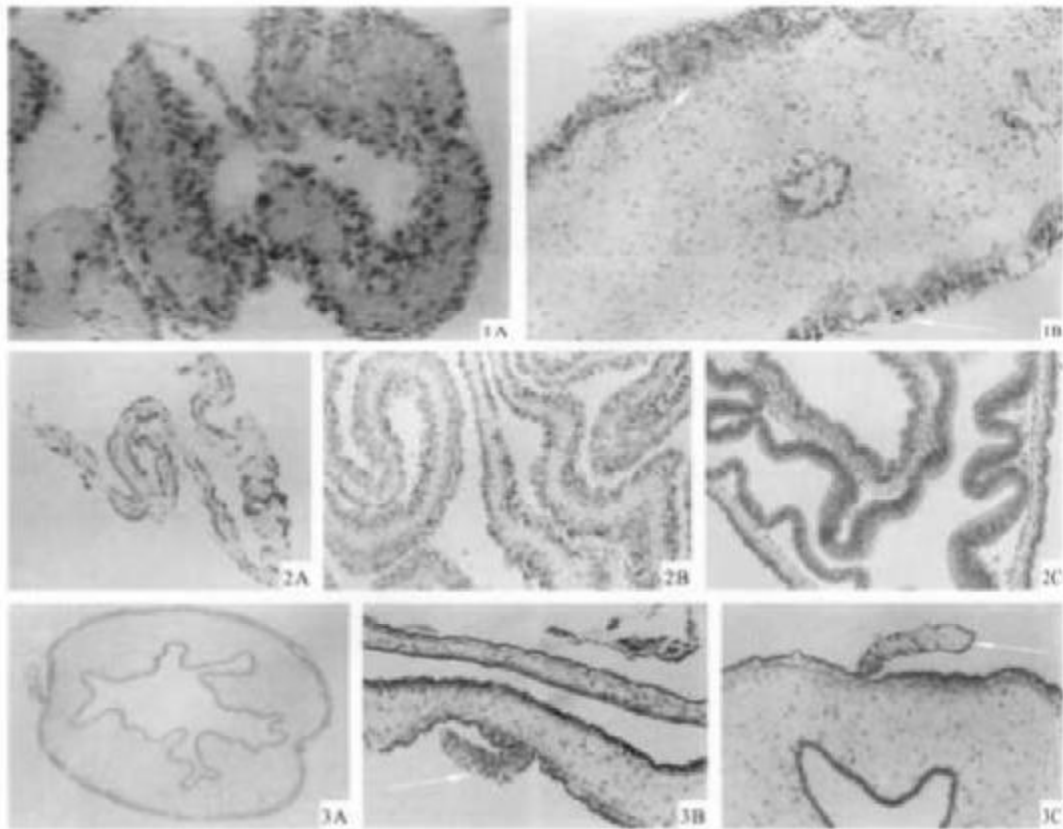
1A-1C: 吐脏的刺参, 1A: 吐出的内脏(→), 1B: 吐脏后的海参内腔, 1C: 吐出的肠管(→)与呼吸树(→),
2A-2B: 吐脏后的大肠肠系膜组织切片; 2A: 背部肠系膜(→), ×66; 2B: 腹部肠系膜(→), ×66.
3A-3B: 吐脏后第2天的刺参泄殖腔基部组织切片; 3A: 呼吸树主干(→), ×66; 3B: 呼吸树分支(→), ×66.

Plate I

1A-1C: The *A. japonicus* of evisceration, 1A: The body organs of evisceration (arrow), 1B: The inner coelom of *A. japonicus* post-evisceration, ×66. 1C: The intestine and respiratory tree of evisceration (arrow).
2A-2B: Histological sections of large intestine mesenteries, 2A: dorsal mesenteries (arrow), ×66. 2B: ventral mesenteries (arrow), ×66.
3A-3B: Histological sections of *A. japonicus* cloaca on the 2nd day post-evisceration.
3A: Trunk of respiratory tree (arrow), ×66; 3B: embranchment of respiratory tree (arrow), ×66.

郑法新等:刺参吐脏再生的组织学研究

ZHENG Fa-xin et al: Histological studies on evisceration and regeneration in *Aponstichopus japonicus*



图版 II

1A~1B: 吐脏后第 3~5 天再生肠组织的组织切片, 1A: 再生 3~5 天的肠组织膜, $\times 66$; 1B: 再生 3~5 天的肠组织上皮(→)和肌肉组织(→), $\times 132$ 。

2A~2C: 吐脏后第 7 天(2A)、第 9 天(2B)、第 11 天(2C)再生肠组织膜的组织切片。

3A~3C: 吐脏后第 14 天再生肠管的组织切片, 3A: 吐脏第 14 天再生肠管的组织横切片, 3B: 示再生的肠管背部肠系膜(→), 3C: 示腹部肠系膜(→)。

Plate II

1A~1B: Histological sections of *A. japonicus* intestine on the 3rd~5th days post-evisceration.

1A: The intestine mesenteries on the 3rd~5th days post-evisceration, $\times 66$.

1B: The luminal epithelium layer (arrow) and muscular layers (arrow) of regenerating intestine, 132.

2A~2C: Histological sections of *A. japonicus* intestine on 7th, 9th and 11th days post-evisceration.

2A ($66\times$): Histological sections of *A. japonicus* intestine on 7th day post-evisceration.

2B ($66\times$): Histological sections of *A. japonicus* intestine on 9th day post-evisceration.

2C ($66\times$): Histological sections of *A. japonicus* intestine on 11th day post-evisceration.

3A~3C: Histological sections of *A. japonicus* intestine on 14th day post-evisceration.

3A: Histological cross sections of *A. japonicus* intestine on 14th day post-evisceration.

3B: Dorsal mesenteries of regenerating intestines on 14th day post-evisceration (arrow).

3C: Ventral mesenteries of regenerating intestines on 14th day post-evisceration (arrow).

Histological studies on evisceration and regeneration in *Apostichopus japonicus*

ZHENG Fa-xin¹, SUN Xiu-qin^{2,3}, ZHANG Jin-xing²

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: Specimens of *A. japonicus* (10–15 cm) were collected in the northeast coast of Shandong province. Evisceration was induced by injecting 2–4 ml of KCl 0.35 mol/L into the coelom. We observed the evisceration and regeneration of *A. japonicus* by applying the method of histology. The result indicated that the *A. japonicus* started to regenerate immediately after the evisceration, and the respiratory tree trunk and the branched structure were observed on the 2nd day. The mesenteries gradually thickened after evisceration. The intestines epidermis and the muscular tissues were observed on the 5th day. *A. japonicus* needs 2 weeks to regenerate the newborn intestines. The results provided the information of *A. japonicus* regeneration for the further study. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1):134–139]

Key words: *Apostichopus japonicus*; evisceration; regeneration; histology

海洋出版社图书征订目录——海洋管理

图书代号	ISBN号 (7-5027)	书 名	单价(元)	出版日期	开本	作者
H005480	6165-9	论中国海洋管理	48.00	2004-09	32开	王曙光
H005270	6082-2	海域使用管理技术概论	40.00	2004-02	16开	苗丰民等
Z002990	4969-1	黄河三角洲海岸带综合管理	25.00	2000-05	16开	
H001691	4221-2	海洋管理与联合国	18.00	1998-04	32开	
H002570	4985-3	海岸带管理手册	65.00	2000-05	16开	
H004690	5757-0	海岸带可持续发展与综合管理	30.00	2002-12	16开	蒋兴伟等
H004530	5583-7	海域使用管理探究	21.00	2002-06	16开	王铁民
H004930	5916-6	海域使用测量培训教程	16.00	2003-08	32开	
H004990	5922-0	关于海域使用管理问题的量化研究	16.00	2003-09	32开	
H005550	6215-9	山东省海洋功能区划(及报告)(全套2册)	90.00	2004-11	16开	
H004590	5578-0	江苏省海洋功能区划(2001-2010年)	5.00	2002-06	16开	
H004580	5579-9	江苏省大比例尺海洋功能区划报告	60.00	2002-06	16开	江苏省海洋 渔业局
H004750	5759-7	福建省大比例尺海洋功能区划报告	55.00	2003-02	16开	
Q002390	5239-0	玉环县海洋功能区划	45.00	2001-09	16开	

海洋出版社发行部账户:

户名:海洋出版社发行部 开户行:农信海淀联社营业部 账号:041303-01-0300-0002719

以上图书零售及邮购需另加15%邮费。购买50册以上免收邮费,批销100册以上折扣优惠。

联系人:刘禹明 电话:010-62147016 传真:010-62173651

地址:北京市海淀区大慧寺路8号海洋出版社发行部 邮编:100081