

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01197

## 仿刺参纵肌带再生的形态学和组织学

李霞, 赵丽娜, 秦艳杰

1. 大连海洋大学 辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 辽宁 大连 116023;
2. 大连海洋大学 农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

**摘要:** 采用人工创伤的方法剪断仿刺参(*Apostichopus japonicus*)体腔背部的纵肌带, 然后缝合切口处的体壁, 将其在添加抗生素(100 IU/mL的青霉素和 100 µg/mL的链霉素)的海水中继续饲养。通过形态学和组织学方法对仿刺参纵肌带再生过程中的结构变化进行了观察。形态学结果显示, 创伤后 0 h, 由于纵肌带的收缩, 断端出现 0.5~1 cm 的间隙; 创伤 15 d, 创伤处出现乳白色絮状组织, 暂命名为肌前组织; 创伤 30~45 d 时, 肌前组织逐渐增厚并将断端肌肉组织连接起来; 创伤 60~90 d, 肌前组织已转化成纵肌带, 并且其厚度增至正常纵肌带的 1/2; 创伤后 110~130 d, 新生纵肌带进一步增粗, 形态上与未创伤处组织没有区别, 只是直径略小一些; 创伤 150 d, 再生的纵肌带厚度同正常状态。组织学结果显示, 创伤后 15 d, 在损伤处出现结缔组织及单个的肌纤维, 形成一条不规则的细长条带, 即肌前组织; 创伤后 30~45 d, 肌前组织中肌细胞数量大量增加, 并与体壁间形成一些“桥状”连接; 创伤后 60~90 d, 肌前组织几乎被肌纤维占据, 且“桥状”连接数量增加, 此时肌前组织已转化为肌肉带(纵肌带); 创伤后 110~130 d, 新生肌纤维数量大量增加, 和体壁相连的“桥状”连接数量减少, 创伤 150 d, 新生的纵肌带基本达到正常的结构, 且“桥状”连接消失。分析认为仿刺参纵肌带具有较强的再生能力, 且新生的肌细胞来源于体壁结缔组织细胞和体腔上皮细胞。

**关键词:** 仿刺参; 纵肌带; 再生; 形态学; 组织学

中图分类号: S968.9

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-01197-07

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)是中国北方主要的经济种类之一。它具有很强的再生能力, 当遇到不良环境时, 能吐出内脏, 阻止外来物质进入体内或逃避敌害。不仅内部器官具有再生能力, 体壁受损后也能很快修复, 甚至身体被横切为 2 段后, 较大的一段也能将缺失的部分修复起来, 所以海参类动物被认为是研究再生的模式生物。关于海参组织和器官的再生, 国内外的的工作主要是应用组织学和分子生物学方法研究了肠<sup>[1-3]</sup>、居维尔氏小管<sup>[4]</sup>、纵肌带<sup>[5]</sup>、体壁<sup>[6]</sup>等器官再生的外部形态、组织结构、细胞功能<sup>[7]</sup>以及和再生有关基因的表达<sup>[8]</sup>等, 其中关于消化管再生的研究报道较多。

关于纵肌带的再生报道, Dolmatov等<sup>[5]</sup>研究

了刺参(*Stichopus japonicus*)再生纵肌带的超微结构, Igor等<sup>[9]</sup>采用免疫细胞化学方法追踪刺参(*S. japonicus*)纵肌带再生过程中细胞的迁移过程, 认为新生的肌细胞是体腔上皮细胞去分化而形成的。本实验采用人工创伤、组织学观察的方法研究了仿刺参纵肌带的再生过程, 旨在探讨肌肉组织的再生能力, 为进一步研究棘皮动物以及高等动物(尤其是人类)的肌细胞分化、组织修复的过程及机制奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

实验用仿刺参于 2012 年 3 月取自旅顺龙王塘

收稿日期: 2013-03-31; 修订日期: 2013-06-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371099); 辽宁省自然科学基金资助项目(20052139); 辽宁省创新团队项目(2007T015).

作者简介: 李霞(1961-), 女, 教授. 主要从事细胞工程学, 发育生物学的研究. E-mail: lx@dlou.edu.cn

海区,为自然生长个体。选取规格相近的个体,体质量( $55\pm 2.6$ ) g,体长 8~10 cm。取回后于实验室 90 L 的塑料水槽中暂养 10 d,饲养用水为砂滤海水,水温保持在( $18\pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,盐度为 30~32, pH 7.8~8.4。每天定时半量换水一次,并投喂人工配合饵料。

## 1.2 方法

**1.2.1 人工创伤的形成** 将仿刺参放入盛有 0.54 mol/L 硫酸镁溶液的解剖盘中麻醉。约 1 h 后仿刺参基本处于舒展状态,此时为了防止在操作过程中出现化皮现象,需要再将其放到另一个装有正常海水的解剖盘中进行创伤实验。使用灭菌的手术刀片从它的腹部后 1/3 处向往前纵向剖开约 1 cm 的切口,深至体腔。将仿刺参体腔背部的两条纵肌带用解剖剪横向剪断。再采用单纯对合缝合法打方结的方式<sup>[10-11]</sup>对腹部伤口缝合一针<sup>[12]</sup>。然后将创伤缝合后的仿刺参放回含抗生素(100 IU/mL 的青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的链霉素)的 90 L 的海水槽中继续饲养,实验组仿刺参未经创伤直接放入含有与实验组相同海水的 25 L 的水槽中培育。水质条件与暂养时相同。实验共用仿刺参 50 只。其中实验组 40 只,进行创伤处理,对照组 10 只,不做处理。实验进行 150 d。

**1.2.2 形态学观察** 实验早期每 15 d 取样 1 次,90 d 后每 20 d 取样 1 次。取样时从水槽中随机选取 3 头仿刺参,用硫酸镁溶液(0.54 mol/L)麻醉 2 h,沿头部腹中线向肛门方向剖开,观察创伤后纵肌带的再生情况,并拍照。

**1.2.3 石蜡切片的制作** 取 1.2.2 解剖的仿刺参创伤处肌肉组织 1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 0.5 cm,用 Bouin'S 液固定,常规石蜡包埋,LeicaRM2135 型切片机切片,厚度为 5  $\mu\text{m}$ ,HE 染色,中性树胶封片,在 Olympus 显微镜下观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 解剖学观察

**2.1.1 正常仿刺参纵肌带的形态** 沿腹中线纵剖仿刺参,可发现其体壁内侧有 5 条纵肌带,前端

与石灰环相连,后端与肛门相连,呈对称辐射状排列,其中两条位于背部,3 条位于腹部。每条纵肌带通过薄层结缔组织与体腔上皮层连接。纵肌带前后粗细一致,呈白色透明状(图版 I-1)。

**2.1.2 再生纵肌带的形态** 手术后解剖可见损伤的纵肌带末端收缩,创伤处形成了 0.5~1 cm 长的间隙(图版 I-2);创伤后 15 d,在创伤后形成的间隙中出现一层很薄的乳白色膜状结构,暂称为肌前组织(图版 I-3);创伤后 30 d,肌前组织加厚,半透明,并将两处断端肌肉组织连接了起来(图版 I-4);创伤后 45 d,肌前组织明显增厚,仍呈半透明状,约是正常纵肌带厚度的 1/4(图版 I-5);创伤后 60~90 d,新生纵肌带(组织学观察此时肌前组织已被肌纤维占据,所以称为纵肌带)增厚至正常纵肌带的 1/2,并呈白色透明状(图版 I-6、7、8);创伤后 110 d,新生纵肌带进一步增粗,形态上与未创伤处组织没有区别,只是直径略细一些,所以肉眼仍能看出创伤部位;(图版 I-9);创伤后 130 d,新生纵肌带在形态上与正常组织差别不大(图版 I-10);创伤后 150 d,已经看不出创伤部位,纵肌带完成再生(图版 I-11)。

### 2.2 组织学观察

**2.2.1 正常纵肌带的组织学** 正常的仿刺参纵肌带的肌纤维为平滑肌,肌纤维呈细而狭长状,中间部位为长椭圆形细胞核。纵肌带靠体壁一侧,通过薄层结缔组织和体腔上皮层连接在一起(图版 II-1, 2)。

**2.2.2 再生不同阶段纵肌带的组织学特征** 手术后,损伤处的肌肉组织整体收缩,肌纤维排列不整齐(图版 II-3);创伤后 15 d,在损伤处出现结缔组织及单个的肌纤维,形成一条不规则的细长的条带(定名为肌前组织),并且该条带与体壁的结缔组织和体腔上皮层相连(图版 II-4, 5);创伤后 30 d,肌前组织层增厚,创伤区纵肌带断端处的体壁体腔上皮细胞增殖,这些增殖的细胞向纵肌带方向延伸,且彼此间形成狭窄的“桥状”连接。结缔组织中肌纤维的数量增加,肌前组织与断端肌肉带连接在一起(图版 II-6, 7);创伤后 45 d,肌

前组织层中肌细胞数量明显增加, 与两端受损的肌肉组织连接在一起(图版 II-8, 9); 创伤后 60~90 d, 上皮和结缔组织细胞数量有所减少, 肌前组织几乎被肌纤维占据, 此时肌前组织转变为肌肉带(纵肌带), 其厚度增至损伤肌肉组织的一半, 仍可见大量的“桥状”连接(图版 II-10, 11, 12); 创伤后 110 d, 肌细胞数量增加, 排列整齐, “桥状”连接逐渐变少(图版 II-13); 创伤后 130 d, 新生的纵肌带进一步增厚, “桥状”连接数量很少(图版 II-14); 创伤后 150 d, 再生的纵肌带与正常组织相比已没有区别, 认为纵肌带基本完成再生过程(图版 II-15)。

### 3 讨论

#### 3.1 仿刺参纵肌带的再生能力

肌肉组织主要是由肌细胞构成的, 按照细胞形态和功能可以分为骨骼肌、心肌和平滑肌 3 种。高等动物肌肉组织的再生能力较低, 其中骨骼肌损伤后依靠肌卫星细胞有很弱的再生能力<sup>[13-14]</sup>; 心肌没有再生能力, 一旦发生坏死, 难以修复<sup>[15]</sup>; 平滑肌也没有再生能力, 受到损伤后, 只能通过纤维瘢痕或者通过骨髓干细胞的移植进行修复, 不能直接再生出新的肌肉组织<sup>[15]</sup>。仿刺参体壁内侧的 5 条纵肌带为平滑肌, 实验中将仿刺参纵肌带剪断, 15 d 时肉眼即可观察到再生组织, 150 d 时可见完全修复的具有正常结构和功能的完整纵肌带。虽然较仿刺参其他组织再生的速度慢一些<sup>[2,6,16]</sup>, 但和高等动物完全不能再生相比, 仿刺参平滑肌具有较强的再生能力。高、低等动物在肌肉组织再生能力上的差异原因尚不明确, 有待进一步的研究。

#### 3.2 体腔上皮层及结缔组织的作用

体腔上皮细胞是一种已分化但又具有去分化能力的细胞, 许多学者对棘皮动物发育、生长和再生的研究中均发现体腔上皮层细胞参与再生过程。Garcia-Ararras 等<sup>[1]</sup>的研究表明 *Holothuria glaberrima* 肠再生的过程中, 再生的增殖点位于肠体腔上皮和邻近的肠系膜中; 王霞等<sup>[2]</sup>对仿刺参消化道再生的研究表明体腔上皮在其再生过程

中起到了主要的作用, 它经去分化、增殖、再分化(或不进行增殖而进行转分化)成为增厚肠系膜组织中的细胞; Dolmatov 等<sup>[5,17-20]</sup>采用免疫组织化学方法研究海参体壁纵肌带再生时发现, 肌肉前体细胞来自体腔上皮层, 而不是已经存在或受伤的肌细胞。本研究中对仿刺参纵肌带进行创伤后, 通过组织切片观察发现, 创伤初期伤口附近体壁层的结缔组织和体腔上皮层细胞数量增加, 继而逐渐往创伤处迁移, 先在创伤面表层形成一条肌前组织, 然后在组织中出现单条的肌纤维, 随肌纤维数量越来越多形成肌肉带, 与断端肌肉组织相连。肌前组织是通过多个“桥状”连接和体壁结缔组织以及体腔上皮层相连的。参考 Dolmatov 等<sup>[17-20]</sup>的研究结果, 认为新生的肌纤维由体腔上皮层和结缔组织中的细胞去分化或未分化的细胞转变而成, 而“桥状”连接是上皮细胞和结缔组织细胞往肌前组织迁移的通道。

#### 3.3 仿刺参纵肌带再生机制

海参再生的机制一般认为有 3 种, 变形再生(如水螅的再生)中, 早期细胞数量没有增加, 后期由残留组织经过重新分配及分化形成一个功能完善的新的组织器官<sup>[16]</sup>。新建再生指再生过程中发生细胞分裂, 产生新细胞代替缺失部分或形成一个胚基, 该胚基继续分化为新的组织器官, 如李霞<sup>[21]</sup>等提出仿刺参体壁表皮的再生属于此类型, 当表皮受损后, 表皮干细胞被激活, 开始分裂增殖, 形成细胞团, 进一步分化为新的组织器官。第三种再生形式是两种再生机制的结合, 如王霞等<sup>[2]</sup>通过组织学观察发现当仿刺参消化道排脏后, 其胃壁细胞增殖以及食道和胃壁的去分化细胞迁移, 参与了新生消化道组织的构建, 与此同时肠系膜的细胞发生去分化, 这些去分化的细胞聚集, 形成消化道的原基, 参与仿刺参消化道的再生, 所以其消化道的再生以新建再生为主, 变形再生为辅。Dolmatov<sup>[5]</sup>在对海参肌肉组织再生的研究中提出变形再生的机制, 认为是体腔细胞转化为肌细胞, 属于变形再生。本实验通过对仿刺参纵肌带再生整个过程的观察, 发现在纵肌带再生过程中转化为肌细胞的体腔上皮细胞数量

明显增加,认为纵肌带的再生过程中首先是体腔上皮细胞分裂增殖,然后体腔上皮细胞和结缔组织转化为肌细胞,仿刺参肌肉带的再生机制属新建再生和变形再生的结合。

#### 参考文献:

- [1] Garcia-Arraras J E, Estrada-Rodgers L, Santiago I, et al. Cellular mechanism of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothurioidea: Echinodermata) [J]. *J Exp Zool*, 1998, 281: 281–304.
- [2] 王霞, 李霞. 仿刺参消化道的再生形态学与组织学[J]. *大连水产学院学报*, 2007, 22(5): 340–346.
- [3] Leibson N L. Regeneration of digestive tube in holothurians *Stichopus japonicus* and *Eupentacta fraudatrix* (Holothurioidea, Dendrochirotida)[M]. Taban C H. Boilly B. *Keys for Regeneration (Monographs in Developmental Biology, vol.23)*. Basel: Karger, 1992, 23: 51–61.
- [4] Vandenspiegel D, Jangoux M, Flammang P. Maintaining the line of defense: Regeneration in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothurioidea)[J]. *Biol Bull*, 2000, 198(1): 34–49.
- [5] Dolmatov I Y, Eliseikina M G, Bulgakov A A, et al. Muscle regeneration in the holothurian *Stichopus japonicus*[J]. *Roux' Arch Dev Biol*, 1996, 205: 486–493.
- [6] 李霞, 周海燕, 秦艳杰. 仿刺参体壁再生形态学和组织学的研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2011, 26(4): 287–290.
- [7] Gibson A W, Burke R D. Gut regeneration by morphallaxis in the sea cucumber *Leptosynapta clarki* (Heding, 1928) [J]. *Can J Zool*, 1983, 61: 2720–2732.
- [8] Sun L, Chen M, Yang H, et al. Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Comp Biochem Phys D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(2): 195–205.
- [9] Igor Y U, Dolmatov I Y. Muscle Regeneration in Holothurians[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 55: 452–463.
- [10] 王少六. 外科缝合技术训练与应用[J]. *中国实用医药*, 2008, 3(29): 161–163.
- [11] 马蓉, 吕斌. 手术结及打结方法的规范与进展[J]. *中国实用外科杂志*, 2006, 26(1): 31–33.
- [12] 李骏珉, 王京树, 刘海. 鱼的剖腹手术试验[J]. *水利渔业*, 2001, 21(4): 11–12.
- [13] 周里, 李永智. 骨骼肌损伤后修复的组织学研究现状[J]. *西安体育学院学报*, 2000, 17(2): 89–92.
- [14] 刘丰彬, 段立公. 骨骼肌再生和骨骼肌卫星细胞相关研究的进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(5): 475–477.
- [15] 刘志军, 徐辉. 干细胞的研究及应用前景[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(14): 2072–2073.
- [16] 桂建芳, 易梅生. *发育生物学*[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 426–430.
- [17] Dolmatov I Y, Ivantey V A. Longitudinal muscle band histogenesis in holothurians[J]. *Russ J Dev Biol*, 1993, 24(6): 401–405.
- [18] Dolmatov I Y, Eliseikina M G, Ginanova T T. Muscle regeneration in holothurian *Eupentacta fraudatrix*[J]. *Russ J Dev Biol*, 1994, 25(4): 59–60.
- [19] Dolmatov I Y, Bulgakov A A, Eliseikina M G, et al. Polyclonal antibodies marking the muscle coelome epithelium in Japanese sea cucumbers[J]. *Biol Bull*, 1995(3): 266–270.
- [20] Dolmatov I Y, Eliseikina M G, Ginanova T T. Muscle reparation in holothurian *Eupentacta fraudatrix* is realized by means of transdifferentiation of coelome epithelial cells[J]. *Biol Bull*, 1995(4): 490–495.
- [21] 李霞, 聂竹兰, 魏杰. 仿刺参体壁表皮再生的组织学和超微结构观察[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(7): 1–6.

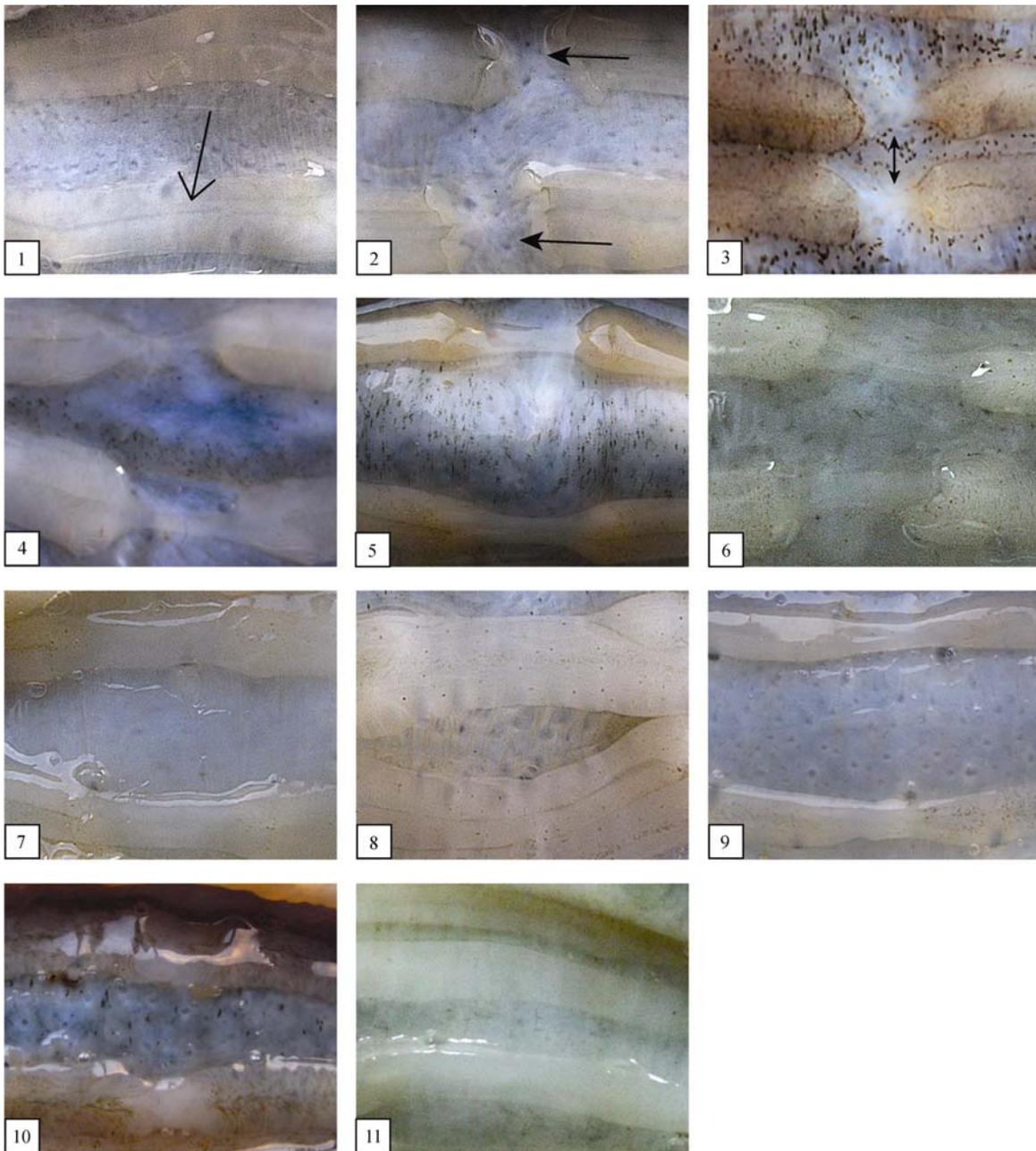
## Morphology and histology of longitudinal muscle band regeneration in *Apostichopus japonicus*

LI Xia, ZHAO Lina, QIN Yanjie

1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

**Abstract:** We documented the regeneration of longitudinal muscle bands in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. The longitudinal muscle bands at the rear of the abdominal cavity were severed with scissors. The sea cucumbers were then reared in sea water containing antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin), and the structural changes of the regenerated longitudinal muscle bands were documented using morphological and histological methods. Morphological analysis revealed a gap of 0.5–1 cm around the broken muscle bands caused by contraction of the longitudinal muscle after surgery. Ivory and flocculent tissue (muscle precursors) were observed at the trauma site 15 d after the operation. The muscle precursor thickened 30–45 d after injury and the ends of the severed muscle were reconnected. The muscle precursor gradually transformed into muscle bands that were half the thickness of the normal longitudinal muscle 60–90 d after surgery. The regenerated longitudinal muscle bands grew further, and were only slightly smaller in diameter 110–130 d after surgery. The longitudinal muscle bands were completely regenerated 150 d after surgery, and there was no significant difference from undamaged muscle fibers. Histological analysis revealed that the muscle precursor was composed of connective tissue and individual muscle fibers 15 d after surgery. At 30–45 d, the number of new muscle cells increased significantly, and there was evidence of “bridged” connections between thickening muscle precursors and the body wall. At 60–90 d, the thickening muscle precursor was largely replaced by muscle fibers, and could be classified as longitudinal muscle bands. Concurrently, the number of “bridged” connections increased. At 110–130 d, the number of new muscle fibers increased significantly and the number of “bridged” connections decreased. At 150 d, the longitudinal muscle bands had regenerated completely and the “bridged” connections had disappeared. Our observations suggest that the longitudinal muscle bands have a strong ability for regeneration and the new muscle cells are derived from the connective tissue cells in the body wall and the coelomic epithelium.

**Key words:** sea cucumber; *Apostichopus japonicus*; longitudinal muscle bands; regeneration; morphology; histology

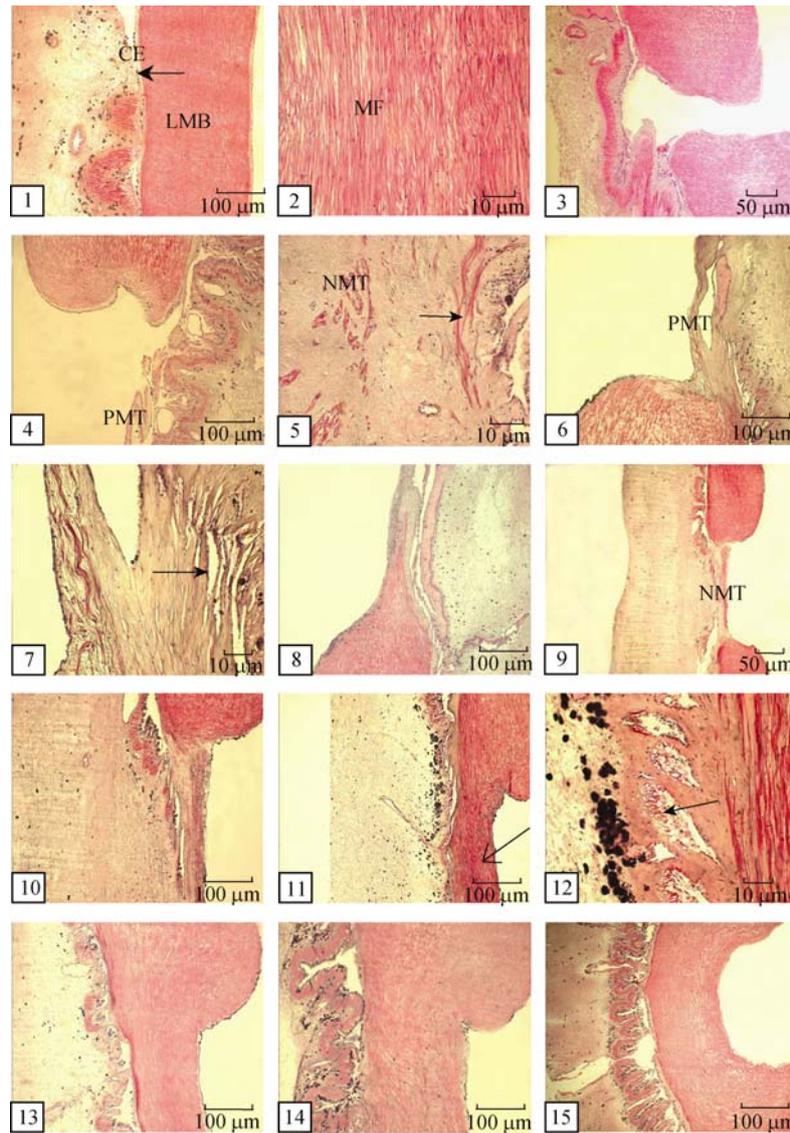


图版 I 仿刺参纵肌带再生的形态学观察

1, 正常仿刺参纵肌带, 箭头示纵肌带; 2, 创伤后 0 h 的纵肌带, 可见肌肉断端明显收缩, 箭头示创伤的纵肌带; 3, 创伤后 15 d, 在肌肉创伤处出现乳白色絮状的肌前组织, 箭头示肌前组织; 4, 创伤后 30 d, 创伤处出现半透明状的肌前组织; 5, 创伤后 45 d, 肌前组织明显增粗; 6, 创伤后 60 d, 新生的纵肌带; 7, 创伤后 75 d, 正在增厚的纵肌带; 8, 创伤后 90 d, 进一步增厚的纵肌带; 9, 创伤后 110 d, 接近正常的纵肌带; 10, 创伤后 130 d, 新生纵肌带与正常肌肉组织基本无差别; 11, 创伤后 150 d, 纵肌带基本完成再生过程。

Plate I Morphologic observation of LMBs during the regeneration in *Apostichopus japonicus*

1, Normal LMBs, arrow showing LMBs; 2, LMBs after wounded for 0 h, indicating a obvious contraction at broken ends, arrow shows the wounded LMBs; 3, Muscle precursor in ivory floccus occurring at the traumatic position after wounded for 15 d, arrow showing the muscle precursor; 4, Muscle precursor in translucent occurring at the traumatic position after wounded for 30 d; 5, Muscle precursor thickened at the traumatic position after wounded for 45 d; 6, New LMBs at the traumatic position after wounded for 60 d; 7, LMBs thickening at the traumatic position after wounded for 75 d; 8, LMBs further thickening at the traumatic position after wounded for 90 d; 9, LMBs close to the normal at the traumatic position after wounded for 110 d; 10, New LMBs at the traumatic position after wounded for 130 d, with little differences compared with the normal tissue; 11, LMBs completely regenerated at the traumatic position after wounded for 150 d.



图版 II 仿刺参纵肌带再生的组织学

1, 正常仿刺参纵肌带及体腔上皮, 箭头示体腔上皮; 2, 纵肌带放大, 示平滑肌细胞; 3, 创伤后 0 h 的纵肌带, 示肌肉组织收缩变短, 排列不规则; 并且体壁内侧的环肌也出现一定程度的收缩; 4, 创伤后 15 d 的肌前组织; 5, 肌前组织放大, 示结缔组织和肌纤维, 箭头示新生肌纤维; 6, 创伤后 30 d 的肌前组织; 7, 6 中方框区的放大, 箭头示“桥状”连接; 8、9, 创伤后 45 d, 肌前组织中肌纤维数量增加; 10, 创伤后 60 d, 肌前组织与体壁相连的“桥状”连接数量增多; 11, 创伤后 75 d 的纵肌带, 肌前组织已生长成纵肌带, 箭头示新生纵肌带; 12, 创伤后 90 d 的纵肌带, 在“桥状”连接周围有很多体腔上皮细胞, 箭头示“桥状”连接; 13, 创伤后 110 d, 新生肌纤维数量增加, 排列整齐; 14, 创伤后 130 d, 新生的纵肌带厚度与正常的组织还有差别; 15, 创伤后 150 d, 纵肌带已基本完成再生过程。

CE-体腔上皮层; CT-结缔组织; LMB-纵肌带; MF-肌纤维; MP-肌前组织; NMT-新生肌肉组织。

Plate II Histology observation of LMBs during the regeneration in *Apostichopus japonicus*

1, LMBs and body cavity epithelium of normal sea cucumber, arrow showing cavity epithelium; 2, Smooth muscles in the LMBs; 3, The contraction at broken ends after wounded for 0 h, muscle fibers arranged irregularly, and ring muscle of the inside of the body wall appearing a certain degree of contraction; 4, The muscle precursor after wounded for 15 d; 5, Muscle precursor amplified, showing connective tissue and muscle tissue occurring, arrow showing new muscle fibers; 6, The muscle precursor after wounded for 30 d; 7, Amplification from the 6th box, arrow showing the “bridged” connection; 8 and 9, Muscle fibers increasing in the muscle precursor after wounded for 45 d; 10, The number of the “bridged” connection increased after wounded for 60 d; 11, Muscle precursor transforming into LMBs after wounded for 75 d, arrow showing new longitudinal muscle; 12, Appearing lots of coelomic epithelium around the “bridged” connection after wounded for 90 d, arrow showing the “bridged” connection; 13, The number of new muscle fibers continuing to increase after wounded for 110 d; 14, The thickened of LMBs having a difference with normal LMBs after wounded for 130 d; 15, Completely regenerated LMBs after wounded for 150 d.

CE-coelomic epithelium; CT-connective tissue; LMB-longitudinal muscle band; MF-muscle fiber; MP-muscle precursor; NMT-new muscle tissue.