

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18049

## 施氏鲟外科手术后切口愈合过程的组织学观察

杨俊琳<sup>1, 2</sup>, 危起伟<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 冷小茜<sup>3</sup>, 向浩<sup>4</sup>

1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072;
2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 中国水产科学院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;
4. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070

**摘要:** 通过肉眼观察和组织学方法对施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)外科手术后不同时期的切口及周围组织进行观察, 研究切口愈合过程, 探讨施氏鲟组织修复能力, 为术后管理提供数据支持。采用 150 mg/L 的 MS-222 对 30 尾 2 龄施氏鲟进行快速麻醉, 于腹中线第 3~5 腹骨板处切开约 5 cm 的切口。采用间断缝合法对切口进行缝合, 于术后 4 d、7 d、14 d、28 d、42 d、56 d, 通过肉眼观察和组织学方法观察切口愈合过程中的宏观和微观的变化。结果发现: 术后 4~7 d 表皮沿切口边缘向腹腔内延伸, 并与腹膜相连。切口边缘出现炎性渗出物, 并有少量网状或束状的 III 型胶原纤维生成。术后 14~42 d 切口显著愈合, 红肿明显减少( $P<0.05$ )。表皮逐渐覆盖切口, 并在切口中部发生部分重叠。切口处表皮细胞层数显著增加( $P<0.05$ ), 并高于周围与对照组。切口边缘出现大量的成纤维细胞聚集和新生血管, 形成肉芽组织。42~56 d 表皮完全愈合, 与对照组无差异。肉芽组织中 I 型胶原含量显著增加( $P<0.05$ ), 成纤维细胞和血管明显减少, 形成瘢痕组织。研究结果表明, 施氏鲟具有较强的组织愈合能力, 术后 56 d 切口完成愈合。14~42 d 是切口愈合的主要时期, 这一时期应作为术后管理关注的重点时期。相比于表皮细胞的快速迁移, 真皮及皮下组织的愈合速度缓慢, 是愈合过程中的限制因素。

**关键词:** 施氏鲟; 手术; 切口愈合; 组织学

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)06-1194-11

施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)作为黑龙江中下游主要经济鱼类之一<sup>[1-2]</sup>, 由于过度捕捞和环境污染, 自然资源急剧下降<sup>[3-4]</sup>, 2015 年被世界自然保护联盟(IUCN)列为极危物种。施氏鲟的人工养殖作为保存物种、实施迁地保护和自然增殖的主要途径, 对于恢复施氏鲟的自然资源具有重要意义<sup>[5-6]</sup>。施氏鲟生长周期长, 雄鱼初次性成熟为 7~8 龄, 雌鱼为 9~10 龄, 因此人工养殖中雌雄性别的早期鉴定对于节约养殖资源, 优化养殖结构有着不可替代的作用<sup>[7]</sup>。

性腺解剖观察及穿刺活组织检查是鲟鱼性别鉴定的传统方法, 该方法直观准确但创伤较大。

近年来超声波检查及血液性类固醇水平检测等无创伤技术逐渐发展为鲟鱼性腺发育鉴别的新方法, 该方法对成鱼性腺发育检查的准确率较高<sup>[7]</sup>。但对于早期幼鱼及小个体鲟鱼, 最可靠的方法是通过术后切口对性腺进行直接观察, 相比超声波检查和腹腔穿刺, 其具有更广泛的适用范围和更高的准确度<sup>[8-12]</sup>。

术后切口的愈合对鱼类的恢复及健康至关重要, 切口愈合异常会产生炎症、溃疡以及切口与肠、性腺等内脏器官的黏连<sup>[13-16]</sup>, 甚至会导致鱼死亡<sup>[7, 17-18]</sup>。对切口愈合过程的研究, 不仅能揭示其基本病理过程, 而且能为后续的术后管理提供

收稿日期: 2018-02-02; 修订日期: 2018-08-22.

基金项目: 国家 973 计划项目(2015B150702).

作者简介: 杨俊琳(1991-), 男, 硕士, 研究方向为动物学. E-mail: yangjunlin19910517@163.com

通信作者: 危起伟, 研究员, 研究方向为鱼类生态与资源保护. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

依据。目前,对于术后切口愈合过程的研究仅在斑点叉尾鮰(*ictalurus punctatus*)中有少量报道<sup>[17, 19]</sup>,在鲟形目鱼类中鲜有报道。本研究于术后6个不同时期,对愈合过程中的手术切口的宏观和微观变化进行观察研究,为后续的术后管理提供数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象与饲养

实验鱼采用2龄施氏鲟,初始体重为(1.97±0.09) kg,全长(85.55±1.11) cm,来自中国水产科学院长江水产研究所荆州太湖中华鲟繁育基地。随机挑选30尾施氏鲟,在直径约为3.0 m,高约为0.5 m的圆形水池中驯化2周。采用表观饱食性投喂,每天定时投喂两次(8:00, 20:00),投喂后约1 h对养殖池进行清污。实验用水为充分曝气并沉淀过的地下水,养殖期间水温为(20.5±1.0) °C,溶氧为(6.0±1.2) mg/L,氨氮小于0.1 mg/L,pH为8.1±0.2。

### 1.2 手术方法及过程

手术前1 d停止投喂饵料,术后8 d开始正常投喂,共禁食8 d。以减少残饵对水体的污染和饱腹后内脏器官对切口处的压力,防止切口张力过大所导致的缝线断裂或脱落。术前对手术刀等器械进行高压蒸汽灭菌,缝线采用真空灭菌包装的爱惜康2号慕丝线。使用150 mg/L的MS-222对实验鱼进行快速麻醉,直至实验鱼出现侧翻并完全静止。麻醉后,将实验鱼放置于经70%酒精消毒的操作台上,并用含有相同浓度MS-222的水溶液对其鳃部持续进行灌注,以免因缺氧而死亡。用无菌水对鱼的腹部冲洗后,于腹中线第3~5腹骨板处,开一长约5 cm的切口。采用简单间断缝合法对切口进行缝合,每次缝合间隔1 cm,共3针,缝合后将实验鱼放入养殖池中。整个手术不超过30 min。30尾鱼中,24尾鱼进行麻醉和手术处理,6尾鱼仅麻醉作为对照。

### 1.3 样品采集与处理

于术后4 d、7 d、14 d、28 d、42 d、56 d进行采样,随机抽取5尾鱼,其中处理组4尾和对照组1尾。使用300 mg/L的MS-222对实验鱼进行

过度麻醉处死,并对切口进行拍照记录。取切口周围宽约2 cm的组织,使用福尔马林磷酸盐缓冲液固定48 h,梯度酒精脱水,常规石蜡包埋切片,切片厚度为5 μm。

**1.3.1 HE 染色** 常规脱蜡至水,苏木素1 min,分化返蓝,伊红1 min,常规脱水透明封片。显微镜下进行常规病理学观察。

**1.3.2 AB-PAS 染色** 常规脱蜡至水,阿利新蓝5 min,高碘酸10 min,雪夫试剂30 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。镜下,中性黏液细胞呈紫红色,酸性黏液细胞呈蓝色,混合性黏液细胞呈蓝紫色。

**1.3.3 天狼猩红染色** 常规脱蜡至水,天狼猩红染液45 min,无水酒精直接分化脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在偏振光显微镜下,I型胶原纤维紧密排列,显示很强的双折光性,呈黄色或红色的纤维;II型胶原纤维,显示弱的双折光性,呈多种色彩的疏松网状分布;III型胶原纤维,显示弱的双折光性,呈绿色的细纤维;IV型胶原纤维,显示弱的双折光性,呈淡黄色。

**1.3.4 免疫组织化学染色检测增殖细胞核抗原(PCNA)的表达** 常规脱蜡至水,Tris-EDTA热修复20 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育10 min祛除内源性过氧化物酶,5%的BSA封闭2 h,滴加适当稀释的一抗(1:200)4°C孵育过夜,滴加二抗37°C孵育30 min,DAB显色,苏木素复染,常规脱水透明封片。镜下PCNA阳性细胞核经DAB染色呈棕褐色,阴性细胞核被苏木素染色呈蓝色。

### 1.4 实验仪器与试剂

本研究中PCNA小鼠抗鼠单克隆抗体、SP法试剂盒、DAB显示剂均购置于武汉博士德生物技术公司。使用Nikon ECLIPSE LV100N POL偏光显微镜对天狼猩红染色切片观察并拍照,HE、AB-PAS和PCNA免疫组织化学染色切片均使用Leica DM5000B生物显微镜进行观察并拍照。

### 1.5 宏观和微观指标的测量

**1.5.1 切口的红肿与愈合程度** 将收集的照片随机编号,根据表1(参考Miller等<sup>[20]</sup>和Schoonyan等<sup>[21]</sup>)和表2(参考Boone等<sup>[22]</sup>和Rożyński等<sup>[23]</sup>)采用盲法对切口的红肿和愈合程度进行评估。

表 1 红肿评估标准<sup>[20-21]</sup>  
Tab. 1 Redness and swelling scores criteria<sup>[20-21]</sup>

红肿指数(redness and swelling index)	评估标准 assessment criteria
0 切口边缘完全没有红肿 no redness and swelling present along incision	
1 沿着切口有少量红肿(<10%)mild amount of redness and swelling present along incision(<10%)	
2 沿着切口有轻度红肿(10%~50%)mild amount of redness and swelling present along incision(10%~50%)	
3 沿着切口有中度红肿(50%~100%)moderate amount of redness and swelling present along incision(50%~100%)	
4 沿着切口有中度红肿, 范围超过了切口边缘(>100%)moderate amount of redness and swelling present along incision, beyond the border of incision(>100%)	
5 重度红肿并且范围明显超过了切口边缘 severe amount of redness and swelling present along incision, obviously beyond the border of incision	

表 2 切口愈合评估标准<sup>[22-23]</sup>  
Tab. 2 Incision healing index criteria<sup>[22-23]</sup>

愈合指数 healing index	评估标准 assessment criteria
0	切口完全愈合 incision completely closed and healed
1	切口愈合, 沿着切口处有明显的伤疤 incision healed and it remained a scar along incision
2	切口边缘相互靠拢, 但没有愈合 incision held in proximity, but not healed
3	切口部分(<25%)开裂 incision less than 25% open
4	切口(25%~75%)开裂 incision partially(25%~75%) open
5	切口(>75%)开裂 incision more than 75% open

### 1.5.2 表皮细胞层数与黏液细胞计数 镜下, 在

切口处两侧边缘与周围(距切口边缘 2 mm)各取一处, 在 40 倍视野下计数三处 10  $\mu\text{m}$  宽的区域内表皮细胞的数量并取平均值为一侧的表皮细胞层数。计数 1 mm 内的所有表皮中的黏液细胞并转化为每平方毫米的个数。计算后取两侧的平均值。

### 1.5.3 胶原的检测 在偏光显微镜下对天狼星红染色切片进行观察, 每张切片在切口边缘随机选取 5 个 20 倍视野, 并拍照。使用 Image J 1.8.0 图像处理软件对胶原的面密度进行测量。

**1.5.4 PCNA 阳性率** 在切口边缘处, 表皮取 2 个 40 倍视野(切口两侧), 真皮及皮下组织随机选取 5 个 40 倍视野。镜下, PCNA 阳性细胞经 DAB 显色后细胞核呈棕褐色, 阴性细胞被苏木素染成蓝紫色。统计 PCNA 阳性细胞数和总细胞数, PCNA 阳性率(即增殖指数)=PCNA 阳性细胞数/总细胞数。

### 1.6 数据处理与统计分析

本文中数据使用均数±标准误( $\bar{x} \pm \text{SE}$ )表示, 所有数据使用 Excel 进行整理后, 用 SPSS 19.0 进行统计分析。各组间的差异使用单因素方差分析, 多重比较使用 LSD 法, 若数据不符合正态性或方差齐性, 则采用秩和检验, 显著性差异定为

$P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 术后切口的宏观变化

观察结果(图 1)表明, 术后 4 d, 红肿指数最高( $4.50 \pm 0.29$ )。术后 14 d, 切口明显裂开( $P < 0.05$ ), 愈合指数最高( $4.50 \pm 0.29$ )。术后 14~42 d, 切口显著愈合, 红肿明显减少( $P < 0.05$ )。术后 42~56 d, 切口愈合和红肿指数均降低, 与对照组无显著性差异( $P > 0.05$ )。

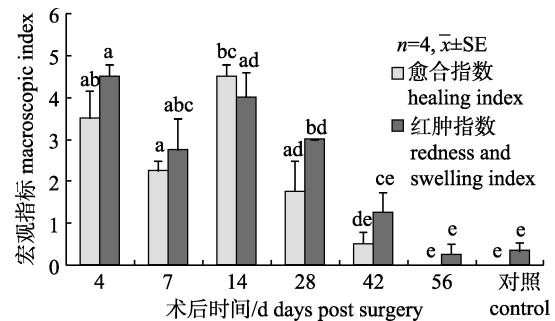


图 1 施氏鲟术后不同时期切口的愈合和红肿指数  
同一指标, 标有不同字母表示不同时期各组  
间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 1 Incision healing index and redness and swelling index at different stages post surgery (*Acipenser schrenkii*)  
At the same index, different letters mean significant difference among groups( $P < 0.05$ ).

## 2.2 术后切口的组织学观察

**2.2.1 表皮** 术后 4 d, 表皮细胞沿切口边缘向腹腔内迁移, 并与腹膜相连(图 2c, 图 2d)。切口边缘表皮的中层细胞间隙明显增加, 仅有一些细胞突触相互连接, 呈网状。表层表皮细胞相互排列紧密, 细胞间隙较少。表皮细胞核质界限清晰, 细胞核淡染, 可见核仁。表皮伴有大量炎症细胞

浸润, 主要为淋巴细胞和少量的嗜酸性粒细胞(图 2b)。术后 28 d, 表皮完全覆盖切口, 切口处的表皮厚度明显高于两侧(图 2e)。新生表皮基底层细胞排列紧密呈柱状, 与新生肉芽组织间存在明显间隙(图 2f)。术后 56 d, 切口处表皮完全愈合, 厚度与两侧无差异(图 2g), 细胞排列紧密, 表皮结构清晰可见(图 2h)。

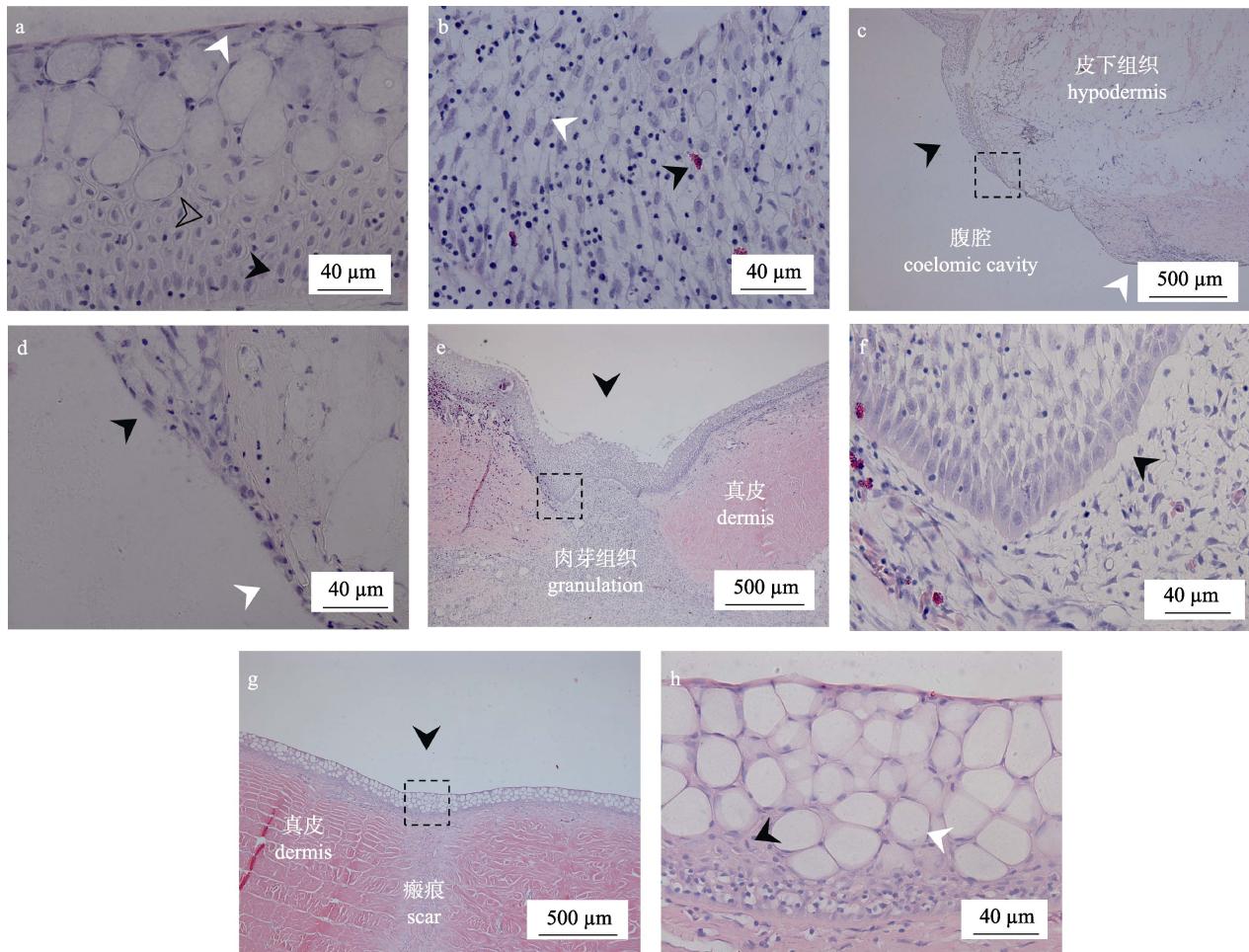


图 2 施氏鲟术后切口愈合过程中表皮的组织学变化(HE)

a: 正常表皮中的表层细胞(白色箭头), 中层细胞(空心箭头)和基底层细胞(黑色箭头); b: 术后 4 d 表皮中层的细胞间隙(白色箭头)和嗜酸性粒细胞(黑色箭头); c: 术后 4 d 沿切口边缘向腹腔内延伸的表皮(黑色箭头)与腹膜(白色箭头)相连; d: 图 c 中方框的放大, 术后 4 d 与腹膜(白色箭头)相连的表皮细胞(黑色箭头); e: 术后 28 d 切口处的表皮(黑色箭头); f: 图 e 中方框的放大, 术后 28 d 表皮基底层与新生肉芽组织间的间隙(黑色箭头); g: 术后 56 d 切口处的表皮(黑色箭头); h: 图 g 中方框的放大, 术后 56 d 切口处的表皮细胞(黑色箭头)和黏液细胞(白色箭头)。

Fig. 2 Changes of the epidermis after surgery of *Acipenser schrenkii* during the incision healing (HE)  
a: the superficial (white arrow), intermediate (hollow arrow) and basal (black arrow) layers cells in normal epidermis;  
b: the obviously increasing intercellular space (white arrow) and eosinophil granulocyte (black arrow); c: the epidermis (black arrow) extended into the coelomic cavity along the incision border and touched with peritoneum (white arrow) 4 days post surgery; d: close-up of a section of figure 2c, epidemal cells(black arrow) contacted with peritoneum (white arrow) 4 days post surgery; e: the epidermis at the incision 28 days post surgery; f: close-up of a section of figure 2e, the space between the basal layer of the epidemis and new regenerated granulation 28 days post surgery; g: the epidermis at the incision 56 days post surgery; h: close-up of a section of figure 2g, epidermal cells (black arrow) and mucus cells (white arrow) at the incision 56 days post surgery.

**2.2.2 真皮及皮下组织** 术后 4 d, 切口边缘出现炎性渗出物和大量血细胞, 伴有淋巴细胞等炎症细胞浸润(图 3b)。术后 14 d 切口边缘新生组织中有大量的成纤维细胞聚集和新生血管, 形成肉芽组织(图 3c)。术后 42 d 肉芽组织趋于成熟, 成纤维细胞等细胞成分显著减少, 细胞外基质明显增加(图 3d)。术后 56 d, 切口已基本愈合, 形成瘢痕组织, 并含有少量成纤维细胞, 胶原等细胞外基质呈网状(图 3e)。

### 2.3 术后切口的表皮变化

**2.3.1 表皮细胞层数** 结果显示, 术后 4 d 切口处的表皮细胞层数最低( $6.21\pm0.68$ ), 显著低于周围和对照组( $P<0.05$ ) (图 4)。术后 7~14 d 切口处与周围表皮细胞层数无明显变化( $P>0.05$ )。术后

14~42 d, 切口处表皮细胞层数显著增加( $P<0.05$ ), 并明显高于周围和对照组( $P<0.05$ ), 其中术后 28 d 表皮细胞层数最高( $18.46\pm1.91$ ), 切口周围的表皮细胞层数显著降低( $P<0.05$ ), 其中术后 42 d 表皮细胞层数最低( $11.04\pm0.64$ )。术后 42~56 d, 切口处表皮细胞层数显著降低( $P<0.05$ ), 与对照组无差异( $P>0.05$ )。

**2.3.2 黏液细胞密度** 如图 5 所示, 术后 4~14 d 切口处与其周围黏液细胞无明显变化, 并显著低于对照组( $P<0.05$ )。术后 14~42 d 切口处与周围黏液细胞密度显著增加( $P<0.05$ ), 术后 42 d 切口处黏液细胞数达到最大值( $19459.84\pm5365.92$ )个/ $\text{mm}^2$ 。术后 42~56 d 切口处黏液细胞逐渐减少, 与对照组无差异( $P<0.05$ )。

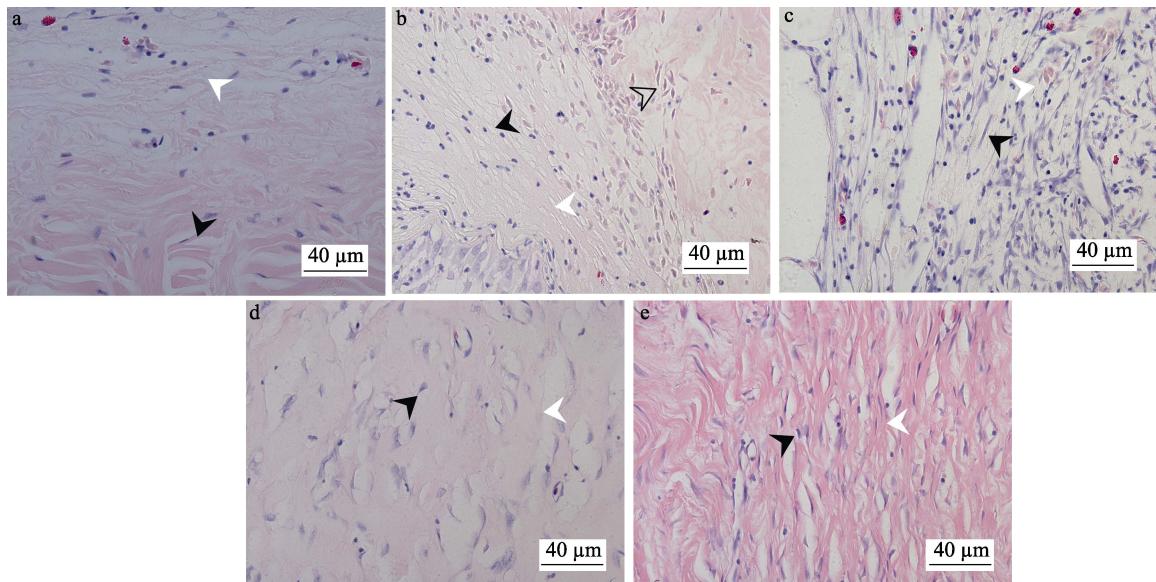


图 3 施氏鲟术后切口愈合过程中真皮及皮下的组织学变化(HE)

a: 对照组真皮中的疏松结缔组织层(白色箭头)和致密结缔组织层(黑色箭头)中的胶原; b: 术后 4 d, 切口边缘的炎性渗出物(白色箭头), 淋巴细胞(黑箭头)和血细胞(空心箭头); c: 术后 14 d 新生肉芽组织中的成纤维细胞(黑色箭头)与新生血管(白色箭头); d: 术后 42 d 肉芽组织中细胞外基质(白色箭头)和成纤维细胞(黑色箭头); e: 术后 56 d 瘢痕中的成纤维细胞(黑色箭头)和胶原纤维(白色箭头)。

Fig. 3 Changes of the dermis and hypodermis after surgery of *Acipenser schrenckii* during the incision healing (HE)  
a: collagen fiber of the stratum spongiosum (white arrow) and the stratum compactum (black arrow) in  
dermis of control; b: the inflammatory infiltrate (white arrow), lymphocyte (black arrow) and erythrocytes  
(hollow arrow) at incision edge 4 days post surgery; c: fibroblast (black arrow) and new regenerated capillary  
(white arrow) in granulation 14 days post surgery; d: the intercellular substance (white arrow) and fibroblasts  
(black arrow) 42 days post surgery; e: the fibroblast (black arrow) and collagen fiber (white arrow) in the scar 56 days post surgery.

### 2.4 切口愈合过程中胶原的变化

术后 4~7 d 切口边缘有少量胶原纤维生成, 主要是绿色的 III 型胶原, 呈束状或网状排列(图

6a)。7~14 d 新生肉芽组织中胶原纤维显著增加( $P<0.05$ )(图 6b)。14~42 d, 肉芽组织中橙色的 I 型胶原纤维明显增加(图 6c)。56 d, 瘢痕组织中胶

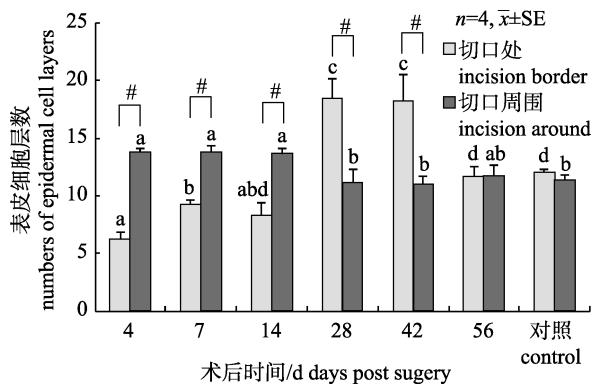


图4 施氏鲟术后不同时期切口边缘与周围表皮的细胞层数  
同一区域, 标有不同字母表示各组间存在显著性差异  
( $P<0.05$ ); 同一时期标有#表示存在显著性差异.

Fig. 4 The number of epidermal cell layers at incision border and around at different stages post surgery  
At the same region, different letters mean significant difference among groups of different stage post surgery( $P<0.05$ ).  
At the same stage, # means significant difference among groups of different region( $P<0.05$ ).

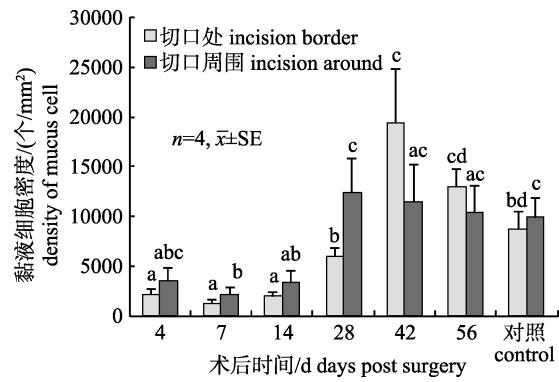


图5 施氏鲟术后不同时期切口边缘与周围黏液细胞密度  
同一区域, 标有不同字母表示不同时期各组间具有显著性差  
异( $P<0.05$ ); 同一时期, 标有#表示切口  
边缘与其周围的黏液细胞密度具有显著性差异( $P<0.05$ ).

Fig. 5 The density of mucus cells at incision border and around at different stages post surgery  
At the same region, different letters mean significant difference among groups of different stages( $P<0.05$ );  
At the same stage, # means significant difference among groups of different region( $P<0.05$ ).

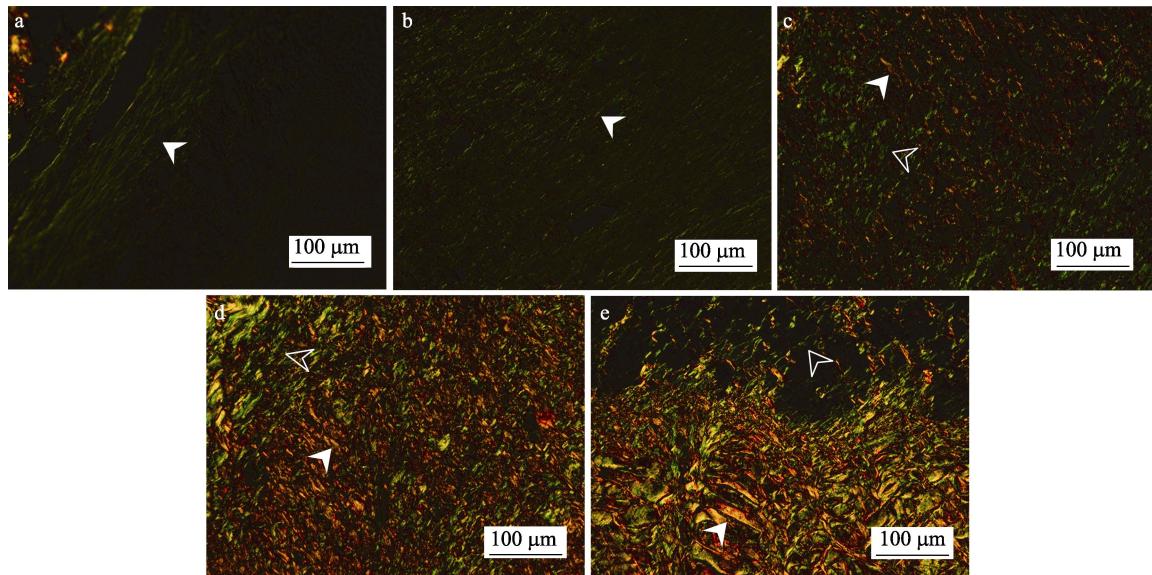


图6 施氏鲟对照组和术后不同时期新生组织中的胶原(天狼猩红染色, 偏光显微镜)

a: 术后 7 d 新生组织中的 III 型胶原; b: 术后 14 d 肉芽组织中的 III 型胶原; c: 术后 28 d 肉芽组织中的 I (白色箭头) 和 III (空心箭头) 型胶原; d: 术后 56 d 瘢痕组织中的 I (白色箭头) 和 III (空心箭头) 型胶原; e: 对照组真皮中疏松结缔组织层(空心箭头)和致密结缔组织层(白色箭头)中的胶原纤维.

Fig. 6 Collagen of control and regenerated tissue at different stages post surgery (Sirius Red staining, polarization microscope)  
a: type III collagen of new regenerated tissue 7 days post surgery; b: type III collagen in the granulation 14 days post surgery;  
c: type I (white arrow) and III (hollow arrow) collagen in the granulation 28 days post surgery; d: type I (white arrow)  
and III (hollow arrow) collagen in the scar 56 days post surgery; e: collagen fiber in the stratum spongiosum  
(hollow arrow) and the stratum compactum (white arrow) of dermis in control.

原含量最高(面密度值为  $0.33\pm0.06$ ), 以 I 型橙色胶原为主, 与对照组(面密度值为  $0.43\pm0.07$ )无显著性差异(图 6d)。

## 2.5 切口愈合过程中 PCNA 的表达

研究结果(图 7)显示, 术后 4 d 表皮中增殖细胞的比例最高(增殖指数为  $0.36\pm0.05$ ), 显著高于

对照组( $P<0.05$ )。4~7 d 表皮中增殖细胞比例明显降低( $P<0.05$ )。术后 7~14 d 真皮中增殖细胞的比例明显增加( $P<0.05$ ), 主要是成纤维细胞。术后 14~56 d 真皮中增殖细胞比例维持在较高水平, 并显著高于对照组( $P<0.05$ ), 其中术后 28 d 真皮的增殖指数最高( $0.68\pm0.07$ )。表皮细胞的增殖指数无明显变化, 与对照组无显著差异( $P>0.05$ )。

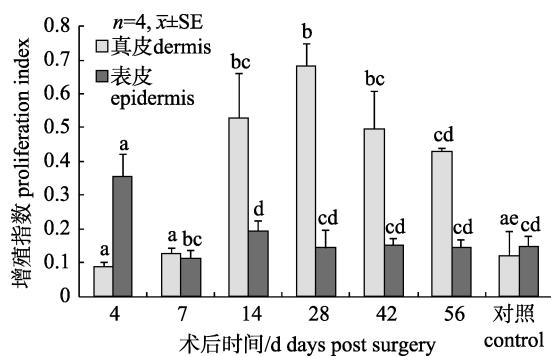


图 7 施氏鲟术后不同时期新生表皮和真皮中细胞的增殖指数

同一区域, 标有不同字母表示各组间存在显著性差异( $P<0.05$ ).  
Fig. 7 PCNA proliferation index of regenerated epidermis and dermis at different stages post surgery  
At the same region, different letters mean significant difference among groups of different stage post surgery ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 鲟鱼外科手术的应用

施氏鲟作为黑龙江中下游的主要捕捞对象, 目前其野生资源量已显著下降。野生施氏鲟繁殖群体中, 种群结构已发生了明显变化, 雌雄比例失衡<sup>[2]</sup>。目前施氏鲟的人工繁殖技术已经获得突破, 鲟鱼精液冻存技术也逐渐成熟, 雌鱼成为制约人工繁殖的重要因素。增加养殖雌鱼的数量和提高母本的质量已成为迫切的需求。因此早期的性别鉴定可减少雄鱼的养殖数量, 节约养殖成本, 优化养殖结构。通过手术切口直接对性腺组织进行肉眼观察作为早期性别鉴定的方法之一, 目前已应用于施氏鲟等鱼类<sup>[9-10, 12]</sup>。在亲鱼的选育中, 通过手术切口对性腺进行直接观察或活体取样, 可准确的判断其性腺的发育状况。

施氏鲟人工养殖及繁育技术成熟较早, 养殖群体庞大, 在中国鲟鱼产业中占有重要地位<sup>[11]</sup>。施氏鲟鱼卵具有极高的营养价值和经济价值, 被

称为“黑色黄金”。相比于杀鱼取卵等方式, 通过手术切口活体取卵可发挥施氏鲟多次产卵的优势, 节约养殖成本<sup>[18]</sup>。同时与腹部挤压采卵相比, 手术活体取卵能够一次性将卵全部取出, 不仅能省时省力, 还能提高卵的质量, 保证受精率<sup>[11]</sup>。

#### 3.2 术后切口愈合过程中的宏观变化

本研究通过对施氏鲟术后切口愈合过程的观察, 探讨施氏鲟的组织愈合能力, 为术后管理提供数据支持。通过肉眼观察发现, 施氏鲟切口愈合时期约为 56 d。这与西伯利亚鲟(*A. baerii*)的切口愈合时间相似<sup>[22]</sup>。术后 14 d 红肿与愈合指数均呈现上升的趋势。Schmidt 等<sup>[24]</sup>在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的结果表明, 伤口在损伤后 14 d 内存在明显增大的现象。Schoonyan 等<sup>[21]</sup>发现玻璃梭吻鲈(*Sander vitreus*)切口周围的红肿程度在术后早期也存在明显的增加。目前有研究表明, 在创伤的早期炎症反应逐渐加重, 分泌的白细胞介素-1(IL-1)等炎症介质逐渐增加, 导致切口及周围组织的水肿增加和毛细血管扩张<sup>[24-25]</sup>。14~42 d, 切口的愈合和红肿指数显著降低, 为愈合的主要时期。不同鱼类的研究结果显示, 其愈合时期有所不同。玻璃梭吻鲈在术后 62 d 内切口显著愈合<sup>[21]</sup>。大西洋鲟(*A. oxyrinchus*)在性腺活检后切口在 30 d 内完成愈合<sup>[7]</sup>。大嘴黑鲈(*Micropterus salmoides*)在腹部植入标志后 20 d 切口完全愈合<sup>[16]</sup>。这表明物种差异和切口大小是影响愈合时间的主要因素, 此外温度等环境因素和维生素 C 等营养状态也会显著影响愈合过程<sup>[26-27]</sup>。

#### 3.3 术后切口愈合过程中的组织学变化

切口愈合过程主要包括: 表皮再植、肉芽组织形成和组织重构等几个阶段<sup>[17, 25, 28]</sup>。表皮作为机体的最外层屏障, 其愈合过程最早发生, 主要表现为表皮细胞的迁移。Guerra 等<sup>[29]</sup>研究发现尖齿胡鮦(*Clarias gariepinus*)在创伤 6 h 后, 创伤边缘的表皮开始迁移, 12 h 后表皮完全覆盖创伤表面。双斑伴丽鱼(*Hemichromis bimaculatus*)在创伤后表皮以 500  $\mu\text{m}/\text{h}$  的速度进行迁移<sup>[30]</sup>。镜下观察发现, 术后 4 d 表皮向腹腔内延伸完全覆盖切口边缘, 并在与腹膜接触后停止。Silva 等<sup>[31]</sup>认为上皮细胞间的接触抑制会限制表皮的进一步延伸。

术后 28~42 d 切口处表皮细胞层数显著增加，并明显高于两侧的表皮。在南极鳕(*Notothenia coriiceps*)和南亚野鲮(*Labeo rohita*)上均存在类似的结果，这表明两侧表皮在愈合过程中会在伤口中部发生部分重叠<sup>[28, 31-32]</sup>。

分泌黏液是表皮的重要功能，黏液中不仅含有糖蛋白和脂肪酸，而且还含有抗体和溶菌酶等抑菌物质<sup>[33-34]</sup>。黏液附着于体表，形成一保护层，维持鱼体的渗透压平衡和防止病原微生物的侵袭。本研究中，早期表皮的黏液细胞显著减少，随后增加。这与南亚野鲮上的研究结果类似<sup>[32]</sup>。Iger 等<sup>[35]</sup>认为在早期表皮大量分泌黏液，导致合成黏液所需物质消耗殆尽，影响表皮分泌功能的恢复。本研究的结果表明，黏液细胞密度与表皮细胞层数具有相似的变化趋势，并且存在明显的相关性。这提示，表皮细胞的迁移是影响黏液细胞密度变化的重要因素。

本研究中，术后 4 d 表皮完成迁移并覆盖切口边缘，14 d 在切口边缘有肉芽组织形成，表皮中细胞的有丝分裂活动变化明显早于真皮及皮下组织。这些结果表明：与真皮及皮下组织相比，表皮的愈合速度更快。这与虹鳟<sup>[26]</sup>和斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[25]</sup>上观察到的结果一致。Richardson 等<sup>[25]</sup>认为表皮再植是一个相对独立的过程，并不依赖炎症反应的参与。表皮细胞能够在损伤和 I 型胶原等细胞外基质的刺激下快速进行迁移，启动表皮再植过程<sup>[36]</sup>。

肉芽组织的形成是真皮及皮下组织愈合的主要过程，其在填充组织缺损和切口收缩过程中起着重要作用<sup>[17, 32]</sup>。术后 4~14 d 切口及周围组织的炎症均维持在较高水平，术后 14 d 切口边缘出现肉芽组织。这与斑马鱼和虹鳟上的结果一致，表明炎症反应在肉芽组织的形成过程中具有重要作用<sup>[24-25]</sup>。成纤维细胞作为新生肉芽组织中的主要细胞成分，合成胶原是其主要功能之一。术后 14~56 d 新生肉芽组织中细胞的有丝分裂活动维持在较高水平，这一时期肉芽组织中的胶原含量显著增加。成纤维细胞的另一重要功能是表达肌动蛋白，形成肌成纤维细胞为肉芽组织的收缩提供张力<sup>[37-38]</sup>。目前，鱼类中仅在斑点叉尾鮰的肉

芽组织中发现存在肌成纤维细胞<sup>[40]</sup>。本研究中，未观察到肌成纤维细胞的出现，这有待进一步的研究。

胶原作为细胞外基质的主要成分<sup>[39]</sup>，其在肉芽组织形成过程中能够为成纤维细胞的迁移和黏附提供网状骨架<sup>[32]</sup>。结果显示，术后 14~56 d 肉芽组织中的胶原显著增加，是胶原纤维合成与沉淀的主要时期。这与虹鳟上的结果一致<sup>[24]</sup>。在愈合早期切口边缘主要合成 III 型网状胶原纤维，而后肉芽组织中 I 型胶原逐渐增加并构成细胞外基质的主要成分。这与在哺乳动物中观察到的结果一致<sup>[40]</sup>。现有研究表明早期的 III 型胶原主要由创缘固有的成纤维细胞合成<sup>[41]</sup>。Maehata 等<sup>[42]</sup>认为这与 III 型胶原具有更高的凝血细胞聚集活性有关。

综上所述，施氏鲟等鲟形目鱼类具有良好的组织愈合能力，能在术后较短的时间内完成切口的愈合。这表明，外科手术可作为鲟鱼早期性别鉴定、活体取样和标志跟踪等研究中较为理想的技术手段。术后 14~42 d 是切口愈合的主要时期，这一时期应作为术后管理的重点。真皮及皮下组织愈合速度相对缓慢，是切口愈合过程的限制因素。在愈合早期可适当提高水温加快表皮的愈合速度<sup>[27]</sup>。在切口愈合的主要时期可在饵料中添加维生素 C 等<sup>[26]</sup>胶原合成所需物资，加快这一时期肉芽组织中细胞外基质的合成，以促进切口的愈合。

## 参考文献：

- [1] Chen X H. Biology and Resources Status of *Acipenser iformes*[M]. Beijing: China Ocean Press, 2007: 92-95. [陈细华. 鲟形目鱼类生物学与资源现状[M]. 北京: 海洋出版社, 2007: 92-95.]
- [2] Wei Q W, Ke F E, Zhang J M, et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China[J]. Environmental Biology of Fishes, 1997, 48: 241-255.
- [3] Koshelev V N, Shmigirilov A P, Ruban G I. Distribution, abundance, and size structure of Amur kaluga *Acipenser dauricus* and Amur sturgeon *A. schrenckii* in the lower Amur and Amur Estuary[J]. Journal of Ichthyology, 2016, 56(2): 235-241.
- [4] Han J, Han Y, Wang Y S, et al. Status quo of breeding population structure of *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of

- Hydroecology, 2012, 33(1): 144-148. [韩骥, 韩英, 王云山, 等. 黑龙江施氏鲟繁殖群体结构现状调查[J]. 水生态学杂志, 2012, 33(1): 144-148.]
- [5] Sun D J, Qu Q Z, Ma G J, et al. Artificial reproduction of cultured *Acipenser schenckii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(6): 485-490. [孙大江, 曲秋芝, 马国军, 等. 养殖施氏鲟的人工繁[J]. 中国水产科学, 2003, 10(6): 485-490.]
- [6] Wei Q W, Li L X, Du H, et al. Research on technology for controlled propagation of cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 1-11. [危起伟, 李罗新, 杜浩, 等. 中华鲟全人工繁殖技术研究[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 1-11.]
- [7] Chapman F A, Park C. Comparison of sutures used for wound closure in sturgeon following a gonad biopsy[J]. North American Journal of Aquaculture, 2005, 67: 98-101.
- [8] Du H, Zhang X Y, Leng X Q, et al. Gender and gonadal maturity stage identification of captive Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, using ultrasound imagery and sex steroids[J]. General and Comparative Endocrinology, 2017, 245: 36-43.
- [9] Chen X H, Wei Q W, Zhu Y J, et al. Surgical techniques of sex determination in young *Acipenser sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(4): 371-374. [陈细华, 危起伟, 朱永久, 等. 低龄中华鲟外科手术性别鉴定技术[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 371-374.]
- [10] Zhang L Z, Zhuang P, Zhang T, et al. Gonadal development of cultured Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(4): 323-327. [章龙珍, 庄平, 张涛, 等. 人工养殖施氏鲟性腺发育观察[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 323-327.]
- [11] Sun D J. China Sturgeon Breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 140-146. [孙大江. 中国鲟鱼养殖[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 140-146.]
- [12] Luo Q, Luo T Y, Pan W, et al. Comparative analysis of *Acipenser schrenckii* sex identification of two trauma operation for surgical techniques[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29(5): 417-421. [罗钦, 罗土炎, 潘威, 等. 鉴别史氏鲟性别的两种创伤手术比较分析[J]. 福建农业学报, 2014, 29(5): 417-421.]
- [13] Hurty C A, Brazik D C, Law J M, et al. Evaluation of the tissue reactions in the skin and body wall of koi (*Cyprinus carpio*) to five suture materials[J]. Veterinary Record, 2002, 151: 324-328.
- [14] Deters K A, Brown R S, Carter K M, et al. Performance assessment of suture type, water temperature, and surgeon skill in juvenile Chinook salmon surgically implanted with acoustic transmitters[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2010, 139: 888-899.
- [15] Lowartz S M, Holmberg D L, Ferguson H W, et al. Healing of abdominal incisions in sea lamprey larvae: a comparison of three wound-closure techniques[J]. Journal of Fish Biology, 1999, 54: 616-626.
- [16] Cooke S J, Graeb B D S, Suski C D, et al. Effects of suture material on incision healing, growth and survival of juvenile largemouth bass implanted with miniature radio transmitters: case study of a novice and experienced fish surgeon[J]. Journal of Fish Biology, 2003, 62: 1366-1380.
- [17] Marty G D, Summerfelt R C. Wound healing in channel catfish by epithelialization and contraction of granulation tissue[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1990, 119: 145-150.
- [18] Qu Q Z, Sun D J, Zhao M H, et al. Studies on technique of egg removal from *Acipenser schrenckii* Brandt[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1995, 2(4): 94-96. [曲秋芝, 孙大江, 赵明华, 等. 史氏鲟取卵技术的研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(4): 94-96.]
- [19] Marty G D, Summerfelt R C. Inflammatory response of channel catfish to abdominal implants: a histological and ultrastructural study[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1988, 117: 401-416.
- [20] Miller E A, Froehlich H E, Cocherell D E, et al. Effects of acoustic tagging on juvenile green sturgeon incision healing, swimming performance, and growth[J]. Environmental Biology of Fishes, 2014, 97: 647-658.
- [21] Schoonyan A, Kraus R T, Faust M D, et al. Estimating incision healing rate for surgically implanted acoustic transmitters from recaptured fish[J]. Animal Biotelemetry, 2017, 5: 1-8.
- [22] Shaun-Boone S, Hernandez S M, Camus A C, et al. Evaluation of four suture materials for surgical incision closure in Siberian sturgeon[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2013, 142: 649-659.
- [23] Rożyński M, Kapusta A, Zakęś K D, et al. The effects of surgically implanted dummy tags on the survival, growth performance, and physiology of pikeperch (*Sander lucioperca*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43: 999-1010.
- [24] Schmidt J G, Andersen E W, Ersbøll B K, et al. Muscle wound healing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 48: 273-284.

- [25] Richardson R, Slanchev K, Kraus C, et al. Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133: 1655-1665.
- [26] Wahli T, Verlhac V, Girling P, et al. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2003, 225: 371-386.
- [27] Andrews M, Stormoen M, Schmidt-Posthaus H, et al. Rapid temperature-dependent wound closure following adipose fin clipping of Atlantic salmon *Salmo salar* L[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(6): 523-531.
- [28] Fontenot D K, Neiffer D L. Wound management in teleost fish: biology of the healing process, evaluation, and treatment[J]. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2004, 7: 57-86.
- [29] Guerra R R, Santos N P, Cecarelli P, et al. Healing of skin wounds in the African catfish *Clarias gariepinus*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73: 572-583.
- [30] Quilhac A, Sire J Y. Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*[J]. *The Anatomical Record*, 1999, 254: 435-451.
- [31] Silva J R M C D, Cooper E L, Sinhorini I L, et al. Microscopical study of experimental wound healing in Notothenia coriiceps, (Cabeçuda) at 0°C [J]. *Cell & Tissue Research*, 2005, 321(3): 401-410.
- [32] Kumari U, Verma N, Nigam A K, et al. Wound-healing potential of curcumin in the carp, *Labeo rohita*[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48: 2411-2427.
- [33] Ritchie K B, Schwarz M, Mueller J, et al. Survey of antibiotic-producing bacteria associated with the epidermal mucus layers of rays and skates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1-11.
- [34] Jais A M M, Matori M F, Kittakoop P, et al. Fatty acid compositions in mucus and roe of haruan, *Channa striatus*, for wound healing[J]. *General Pharmacology*, 1998, 30(4): 561- 563.
- [35] Iger Y, Abraham M. The process of skin healing in experimentally wounded carp[J]. *Journal of Fish Biology*, 1990, 36: 421-437.
- [36] Matsumoto R, Sugimoto M. Dermal matrix proteins initiate re-epithelialization but are not sufficient for coordinated epidermal outgrowth in a new fish skin culture model[J]. *Cell & Tissue Research*, 2007, 327(2): 249-265.
- [37] Gabbiani G, Le-Lous M, Bailey A J, et al. Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study[J]. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 1976, 21(2): 133-145.
- [38] Gabbiani G, Hirschel B J, Ryan G B, et al. Granulation tissue as a contractile organ a study of structure and function[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1972, 135: 719-734.
- [39] Wess T J. Collagen fibril form and function[J]. *Advances in Protein Chemistry*, 2005, 70: 341-374.
- [40] Barnes M J, Morton L F, Bennett R C, et al. Presence of type III collagen in guinea-pig dermal scar[J]. *Biochemical Journal*, 1976, 157: 263-266.
- [41] Ganeshkumar M, Ponrasu T, Krithika R, et al. Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of type I and III collagen[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 142: 14-22.
- [42] Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, et al. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative[J]. *Matrix Biology*, 2007, 26(5): 371-381.

## Histological observation of the post-surgery healing of an incision in the Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*

YANG Junlin<sup>1,2</sup>, WEI Qiwei<sup>1,2,3,4</sup>, LENG Xiaoqian<sup>3</sup>, XIANG Hao<sup>4</sup>

1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

4. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** The Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) is one of the eight species of Acipenseriformes that occur in China. The range of the Amur sturgeon is mainly restricted to the middle and lower Amur River. Sometimes sturgeons enter the Ussuri River, but they rarely occur in the Sungari River. This species supports fisheries, but stocks are declining significantly because of overfishing. Developing artificial cultures could reduce market dependence on wild fish and would assist in conservation of the wild stock. Although Amur sturgeons are gonochoristic, they exhibit no apparent sexual dimorphism and have no indicators of their sex for their first 1-2 years of life. Currently, the most reliable method of determining sex and gonad maturation in Amur sturgeons at an early age is through a surgical incision and visual examination of the gonads. The eggs of artificial spawning are also commonly obtained via an abdominal incision or caesarian section. The incisions may not always heal properly; thereby, causing infections, inflammation, and ulcerations that lead to adhesions or in some cases to mortality. Thus, it is critical to close the incisions for the recovery of Amur sturgeons post-surgery. The goals of this research were to study the process of incision healing, through visual and histological evaluations of the surgical incision at different stages post-surgery, to explore the repair capability of Amur sturgeons, and to provide data for the establishment of post-surgery system management. A total of 30 2-year-old Amur sturgeons were anesthetized quickly by immersion into a tank containing a 150 mg/L solution of tricaine methanesulfonate (MS-222). Once the fish reached a surgical plane of anesthesia, a sterile surgical blade was used to make a 5 cm incision through the ventral middle skin and linea alba into the coelomic cavity. The incisions were closed with three simple interrupted stitches. Samples were taken at 4, 7, 14, 28, 42, and 56 days post-surgery. A study on the healing of the incisions was conducted, through visual assessments and histological observations. The results indicated that the epidermal cells migrated into the coelomic cavity along the edge of incision and had contact with the peritoneum at 4 to 7 days post-surgery. The inflammatory infiltrate and Type III collagen appeared at the incision margin. The incisions healed, and redness and swelling indexes significantly decreased ( $P < 0.05$ ) from 14 to 42 days post-surgery. The epidermis covered the incision, and there was an overlap between the epidermis on the front of both sides. The epidermal cell layers at the incision margin significantly increased and were greater than that around the incision and the control. A large number of fibroblasts gathered at the edge of the incision, and new capillaries were regenerated, forming granulation. From 42 to 56 days after surgery, the epidermis healed completely, exhibiting no differences from that of the control. In the granulation, type I collagen substantially increased, but fibroblasts and capillaries decreased and disappeared. A scar remained. These results indicated that the Amur sturgeon had a strong repair capability. It took 56 days to close the surgical incisions. The surgical incision healed mainly during the period from 14 to 42 days post-surgery. It took longer to complete healing of the dermis and hypodermis, compared with that of the epidermis. The healing of the dermis and hypodermis was constraint with the progress of incision closure.

**Key words:** *Acipenser schrenckii*; surgery; incision healing; histology

**Corresponding author:** WEI Qiwei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn