第14卷第7期
2007年10月

中国水产科学
Journal of Fishery Sciences of China

Vol.14 No.7
October 2007

# 仿刺参体壁表皮再生组织学和超微结构观察

李霞，聂竹兰，魏杰
（大连水产学院，农业部海水增养殖学与生物技术重点开放实验室，辽宁 大连 116023）

**摘要**：本研究采用手术方法刮掉仿刺参（*Apostichopus japonicus* Selenka）体壁表皮，将受伤仿刺参放入海水中饲养，通过光学显微镜和透射电镜观察再生表皮的组织学、超微结构变化。表皮再生开始于手术后24 h，创面中央新生出表皮，结缔组织中出现扩增细胞。再生48 h，创面有新生角质层出现，上皮细胞单层。再生72 h，上皮细胞仍保持单层，角质层形成清晰可见，扩增细胞开始聚集。表皮再生96 h，角质层增厚，达到正常体壁角质层的厚度，角质层表面形成许多突起，上皮细胞达2～3层，扩增细胞聚集成细胞团，从结缔组织中迁移至表皮。再生13 d，扩增细胞团萎缩。再生19 d，组织基本恢复至正常形态，扩增细胞经分化后已均匀分布到新生表皮层，细胞团消失，上皮细胞排列有序，结缔组织结构疏松，质地均匀。[中国水产科学，2007，14(7)：1－6]

**关键词**：仿刺参；体壁表皮；再生；组织学；超微结构
**中图分类号**：Q959.269　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1005－8737－(2007)07－001－06

仿刺参（*Apostichopus japonicus* Selenka）属棘皮动物门，海参纲，是中国北方主要经济养殖种类之一。该类动物器官再生能力很强，可通过排出内脏来逃避敌害和抵御不良环境。国内外学者研究了海参纲动物肠[1－2]，纵肌[3]和居维尔氏小管[4]再生的外部形态、组织结构[5－10]和细胞功能[1,4,10]等。体壁再生过程和细胞学变化等方面的研究尚未见系统报道。本研究采用手术方法刮掉仿刺参体壁表皮，再将受伤仿刺参放入海水中饲养，通过光学显微镜和透射电镜观察再生表皮的组织学、超微结构变化，旨在从细胞水平探讨仿刺参表皮组织再生机制，为仿刺参“化皮病”的防治提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

仿刺参60只，于2005年3月取自大连龙王塘海域，为自然生长个体，平均体长8～12 cm。培育在大连水产学院海水增养殖学与生物技术重点开放实验室生态室，于15 ℃循环流水控温槽内饲养，平均每槽10只。每天定时换水2次，投喂人工配合饵料。

### 1.2 方法

**1.2.1 人工创伤的形成** 用无菌解剖刀刮除仿刺参背部体壁的深褐色角质层和上皮细胞层，露出均一的乳白色结缔组织。创伤面积约5 mm×5 mm，而后将实验仿刺参放回水槽中继续培育。共处理60只。分别于手术前、手术后0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、5 d、7 d、13 d、19 d取样，每次随机取6只。

**1.2.2 组织切片制作** 取正常和手术后仿刺参背部手术部位体壁组织约2 mm×2 mm×2 mm（长×宽×厚），经Bouin's液固定，常规石蜡包埋，切片厚度5 μm，HE染色，Olympus显微镜观察拍照。

**1.2.3 超薄切片制作** 从正常和手术后活体仿刺参背部手术部位取下体壁组织2 mm×2 mm×2 mm（长×宽×厚），立即放入用pH 7.2磷酸缓冲液配置的2.5%戊二醛固定液中，处理24 h。1%锇酸后固定2 h，用缓冲液漂洗3次后用梯度乙醇脱水，Epon812包埋，醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色，JEM-2000EX透射电镜观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 仿刺参正常体壁组织学与超微结构观察

正常仿刺参体壁由外向内主要有4层：表皮层、结缔组织层、肌肉层和体腔上皮层。表皮层由角质层和多层上皮细胞组成（图版Ⅰ－1，2）。角质层由无核细胞组成，细胞界限不清，结构不完整，表现为细胞膜破裂，形成许多细胞碎片，细胞器解体甚至消

收稿日期：2007－01－29；修订日期：2007－06－26.
基金项目：国家自然科学基金(30371099)；辽宁省自然科学基金(20052139).
作者简介：李霞，女(1961－)，教授，主要从事水产动物细胞工程学研究. E-mail：lx@dlfu.edu.cn

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

失(图版Ⅱ-1),溶酶体尤其是环状片层状的次级溶酶体很多(图版Ⅱ-2)。角质层游离端有许多指状胞质突起(图版Ⅱ-3)。角质层中还夹杂一些充满颗粒的腺细胞。角质层下方由2~3层上皮细胞组成,细胞排列紧密,界线不清,和结缔组织间没有基膜分隔,胞核分别处于不同平面,内质网很多,主要分布在核周围(图版Ⅱ-4),高尔基体丰富(图版Ⅱ-5)。细胞间也可见单个的腺细胞。结缔组织层疏松,由纤维细胞和大量胶原纤维构成。肌肉层由内环外纵的平滑肌组成,纵肌发达。体腔上皮层为排列紧密的单层扁平细胞。

### 2.2 仿刺参体壁表皮再生组织学与超微结构观察

表皮再生0 h,手术部位的角质层与上皮细胞层都已被去除,创面处疏松结缔组织直接暴露,分布均匀(图版Ⅰ-3)。

表皮再生24 h,创面有一薄层细胞出现,细胞排列不规则(图版Ⅰ-4),结缔组织中出现扩增细胞[11]。该细胞体积比正常上皮细胞大,内质网丰富,经常可见同一个细胞中存在2个细胞核的情况(图版Ⅱ-6)。扩增细胞主要分布在靠近表皮层的结缔组织中。

表皮再生48 h,上皮细胞数量有所增加,部分细胞处于自溶状态(图版Ⅲ-1),扩增细胞数量增加。

表皮再生72 h,上皮细胞层增厚(图版Ⅰ-5),细胞排列稀疏,界线清晰,但仅有一层发育完好,其余处于角化状态。在此阶段,角质层的形成过程清晰可见,基本能分为3期:角质层形成初期,上皮细胞膜折入,将细胞质分隔成网格状结构,线粒体等细胞器解体;角质层形成中期,细胞界限模糊(图版Ⅲ-2),邻近的细胞相互愈合,细胞核开始固缩,细胞器解体甚至消失,出现许多细胞碎片(图版Ⅲ-3);角质层形成晚期,各细胞碎片向外周迁移,其中还有少数含粗大颗粒的腺细胞,角质层的游离指状突起形成(图版Ⅲ-4)。结缔组织中的扩增细胞的数量明显增加(图版Ⅰ-5)。

表皮再生96 h,角质层继续增厚,达到正常体壁中角质层厚度。扩增细胞聚集,形成细胞团,从结缔组织向表皮迁移(图版Ⅰ-6)。上皮细胞出现2~3层,细胞排列稀疏,界线清楚,且结构完整。

表皮再生5 d、7 d,细胞团细胞大量向表面迁移,再生表皮层继续加厚。

表皮再生13 d,上皮细胞层和角质层的厚度基本与正常表皮层相同,但细胞排列仍显稀疏,细胞团体积明显减小(图版Ⅰ-7)。

表皮再生19 d,组织基本恢复正常形态。扩增细胞经分化后已均匀分布到新生表皮层,细胞团消失。上皮层细胞排列有序,结缔组织层疏松,细胞和纤维分布均匀(图版Ⅰ-8)。

## 3 讨论

### 3.1 仿刺参体壁角质层

角质层对于动物生存具有重要意义,可用于抵御外界不良环境[12]和防止摩擦引起的机械损伤[13-14]。在养殖过程中,经常可以观察到仿刺参体表附着有大量的黏附物,尤其是在机体受到某些环境因子刺激或者受病原感染时,黏附物的量会增加。这种黏附物可能是仿刺参体壁角质层中腺细胞分泌的黏液和脱落的角质层碎片共同构成的,黏附物除具有机械保护作用外,还可能有保护机体不受病原体的入侵等作用。

仿刺参体壁角质层的形成包括上皮细胞膜折入,细胞解体,核固缩,细胞器消失,表皮中的腺细胞分泌黏液等过程,此过程与高等动物非常相似[15],反映了仿刺参较高的进化地位。

### 3.2 仿刺参表皮再生的机制

在研究海参纲动物消化道等内脏器官再生的过程中,研究者们提出了变形再生(Morphallaxis)、新建再生(Epimorphosis)以及两种再生机制结合的3种再生模式。变形再生是指自切排脏后的残留组织经过重新分配、重新改造形成一个功能完善的组织器官。细胞主要是通过由现存的组织分化或迁移而来,而不是分裂增殖。如Dolmatov等[3]指出海参体壁纵肌的再生过程没有细胞增殖,而是依靠细胞变形再生;又如Smith[6-7]和Gibson等[9]研究得出无管足类海参(*Leptosynapta*)体壁横切后的肠再生属于变形再生的机制。新建再生模式是指在再生过程中发生细胞分裂,产生新细胞,直接替代缺失部分或形成一个胚基,这个胚基主要是靠新细胞的增殖形成的,胚基继续分化为新的组织器官替代缺失组织。如*H. glaberrima*细胞分裂并不局限于一个位置,而是存在几个独立的细胞增殖中心,即肠外膜、肌肉层和上皮层。对于第三种再生模式的例子如楯手目和枝手目的海参[7],其肠的再生机制就是变形再生和新建再生的结合。Vandenspiegel等[16]提出*H. forskali*居维尔氏小管的再生机制也属于两种机制的结合。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

从本实验结果看,仿刺参体壁表皮的再生机制主要是新建再生。仿刺参的上皮层与结缔组织层之间无基膜隔离,再生上皮细胞存在于上皮细胞层与结缔组织层交界处,通常情况下这些细胞处于休眠状态,而一旦上皮受损,细胞即自动激活,分裂增殖,称为扩增细胞。随着数量增加,聚集形成细胞团。细胞分裂速度是比较快的,在表皮再生 24 h,靠近表皮的结缔组织出现扩增细胞,并于 96 h 形成一个巨大的细胞团,随后,新生上皮层增厚,同时增生细胞团不断变小。19 d 表皮结构同正常情况。由此可见刺参表皮再生能力非常强。作者认为在机械损伤情况下,表皮短时间内完全可以自我修复,但病原生物或某些化学因子对表皮造成损伤后其修复情况,还需做进一步研究。

参考文献:


[1] Garcia-Arraras 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(4): 288 – 304.

[2] Leibson N L. Regeneration of digestive tube in holothurians *Stichopus japonicus* and *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroides, Dendrochirota) [M]. Taban C H, Boilly B. Keys for Regeneration (Monographs in Developmental Biology, vol. 23). Basel: Karger, 1992, 23: 51 – 61.

[3] Dolmatov I Y, Eliseikina M G, Bulgakov A A, et al. Muscle regeneration in the holothurian *Stichopus japonicus* [J]. Roux's Arch Dev Biol, 1996, 205: 486 – 493.

[4] VandenSpiegel D, Jangoux M, Flammang P. Maintaining the line of defense: Regeneration of Cuvierian tubules in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) [J]. Biol Bull, 2000, 198(1): 34 – 49.

[5] 崔相. ナマコの研究 [M]. 日本: 海文堂出版社, 1962, 159 – 168.

[6] Smith G N. Regeneration in the sea cucumber *Leptosynapta*. Ⅰ. The process of regeneration [J]. J Exp Zool, 1971, 177: 319 – 330.

[7] Smith G N. Regeneration in the sea cucumber *Leptosynapta*: Ⅱ. The regenerative capacity [J]. J Exp Zool, 1971, 177: 331 – 342.

[8] Leibson N L. Regenerations of the digestive tract in holothurians [A]. Billich G L. Modern Problems of Regeneration [C]. Yoshkar-Ola: Mari State University, 1982, 165 – 170.

[9] Gibson A W, Burke R D. Gut regeneration by morphallaxis in the sea cucumber *Leptosynapta clarki* (Heding, 1928) [J]. Can J Zool, 1983, 61: 2 720 – 2 732.

[10] Hetzel H R. Studies of coelomocytes type 1: Survey on coelomocyte type [J]. Biol Bull, 1963, 125: 289 – 301.

[11] 孙小庆, 付小兵, 盛志勇. 表皮干细胞. 中华创伤杂志 [J], 2000, 16(10): 635.

[12] 张孟闻. 脊椎动物比较解剖学(上) [M], 北京: 高等教育出版社, 1986.

[13] Roberts T R. Unculi (Horny projection arising from single cells), an adaptive feature of the epidermis of Ostariophysan fishes [J]. Zool Scription, 1982, 11(1): 55 – 76.

[14] 张鹗, 沈建中. 真骨鱼类皮肤角质化衍生物——单细胞角质突起 [J]. 动物学杂志, 1999, 34(1): 43 – 47.

[15] 林惠芬, 李斌, 李伟光, 等. 表皮角质层的更新及其测定 [J]. 日用化学工业, 1998, 2(1): 43 – 45.

[16] Vandenspiegel D, Jangoux M. Cuvierian tubules of *Holothuria forskali* (Echinodermata): a morphofuntional study [J]. Mar Boil, 1987, 96: 163 – 275.


## The histology and ultrastructure research about epidermis regeneration of *Apostichopus japonicus* Selenka


LI Xia, NIE Zhu-lan, WEI Jie

(Key Laboratory of Mariculture & Biotechnology, Agriculture Ministry: Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

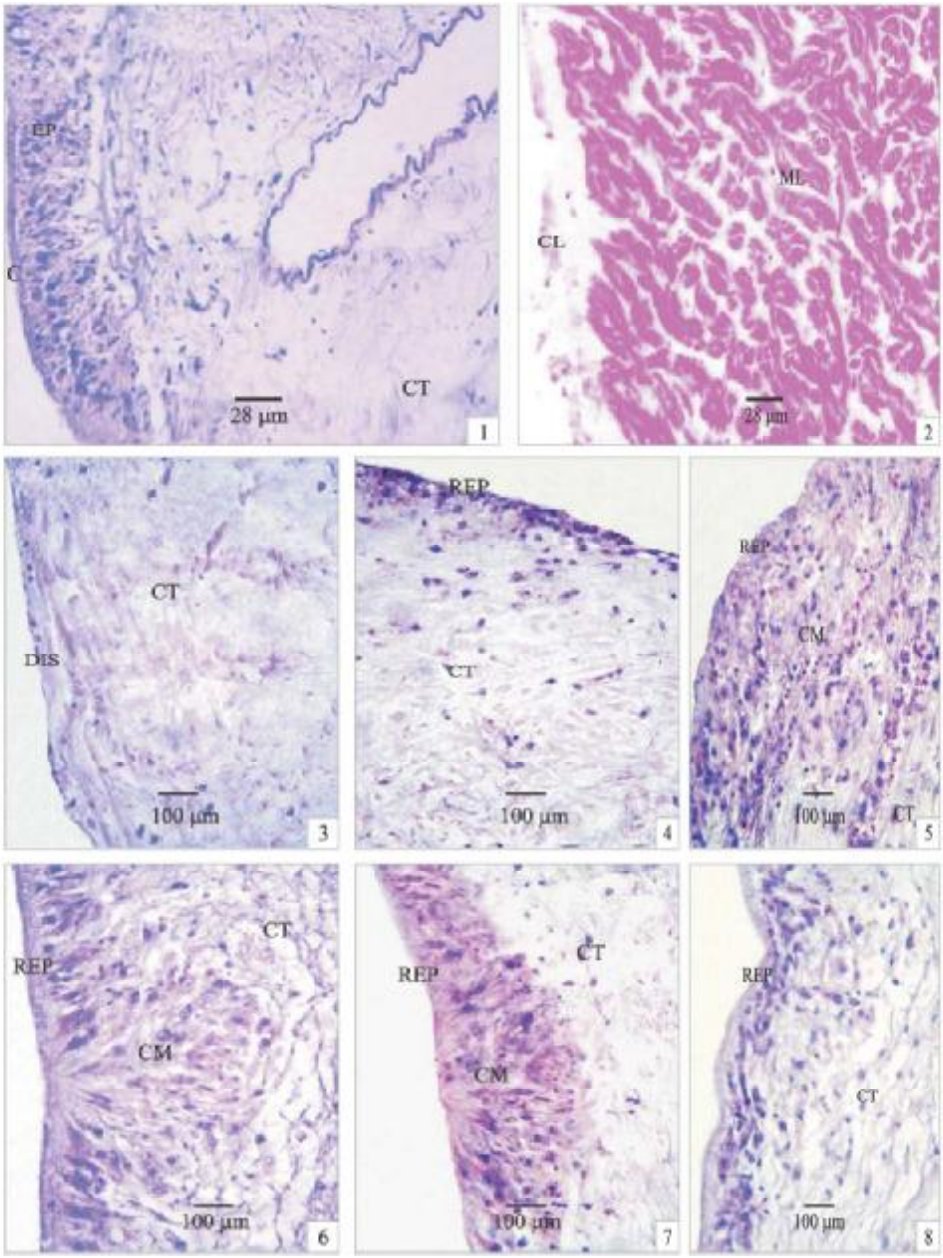


**Abstract:** The cuticle of body wall of different regeneration time was observed by optical microscope and transmission electron microscope, after operation on the *Apostichopus japonicus*. The result suggested that the epidermis began to regenerate and amplifying cell could be observed 24 hours after the operation and thickened on and on along with time. During the process of regeneration, amplifying cells gathered at the edge which was injured and the cell cluster became to the biggest mass at 96 h, then atrophyed gradually. Then the cell cluster moved towards epidermis. On the other hand, the epidermis began to enlarge at 24 hours and kept mono-layer normal epidermis during 48 – 72 h. The epidermis of body wall of *Apostichopus japonicus* Selenka got normal with 2 – 3 layers after 96 hours. At day 19, the process of regeneration in epidermis ended. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(7): 1 – 6]



**Key words:** *Apostichopus japonicus* Selenka; body wall cuticle; regeneration; histology; ultrastructure


PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn




**图版Ⅰ　Plate Ⅰ**

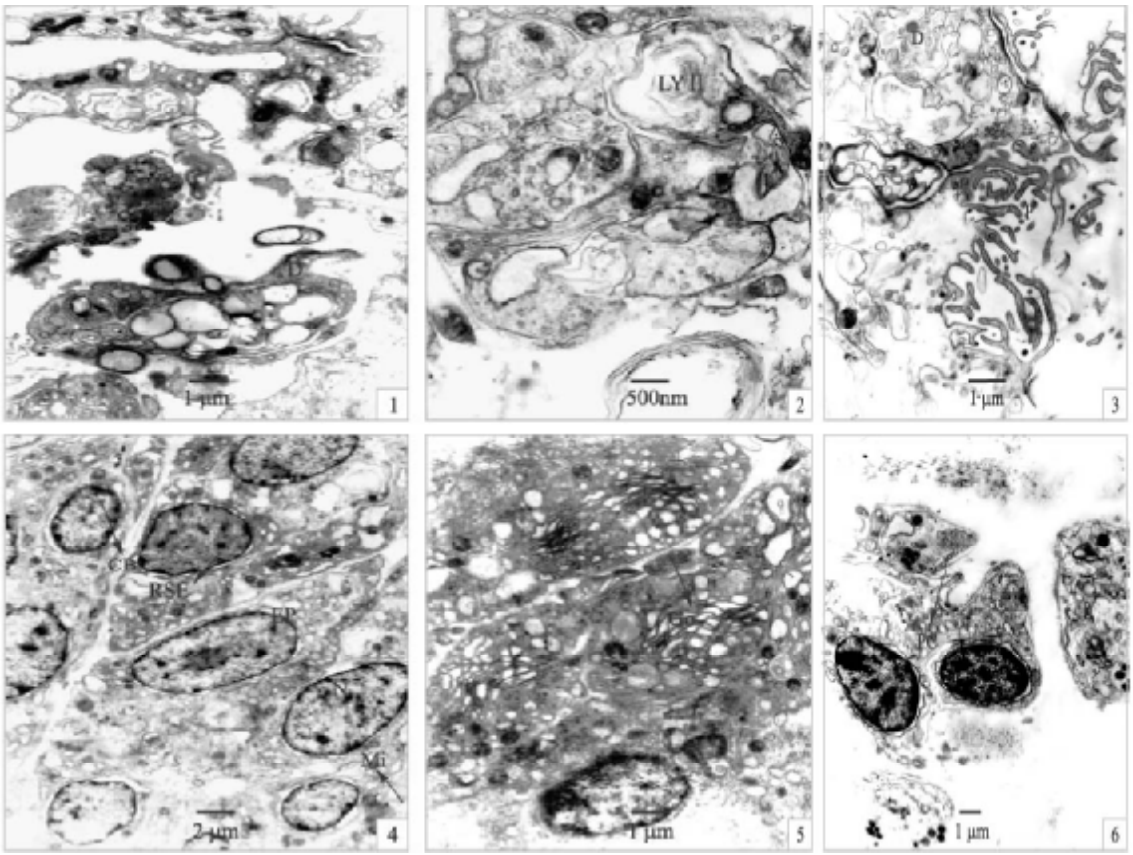
1~2. 正常刺参体壁组织;3. 表皮再生 0 h,创伤面仅见结缔组织;4. 表皮再生 24 h,在结缔组织的表面再生出一薄层上皮细胞;5. 表皮再生 72 h,扩增细胞在结缔组织表层聚集,形成细胞团;6. 表皮再生 96 h,细胞团结构明显;7. 表皮再生 13 d,细胞团萎缩,上皮层增厚;8. 表皮再生 19 d,细胞团细胞均匀分布为上皮细胞.

注:C－角质层;CL－体腔上皮层;CM－细胞团;CT－结缔组织;DIS－结缔组织游离端;EP－上皮细胞;REP－再生上皮.

1－2. Histology of body wall of normal *Apostichopus japonicus*: 3. The connective tissue of the regenerated cuticle at 0 h; 4. A layer of epithelial cell of the regenerated cuticle at 24 h; 5. The proliferated cells got together on the connective tissue at 72 h; 6. The cell mass was obvious on the connective tissue at 4 d; 7. The cell mass shrank at 13 d; 8. The cell mass was transformed to cuticle at 19 d.

Note: C－Cuticula; CL－Coelomic Lining; CM－Cell mass; CT－Connective tissue; DIS－Distal of connective tissue; EP－Epithelial cell; REP－Regenerated epithelium.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn




**图版Ⅱ　Plate Ⅱ**

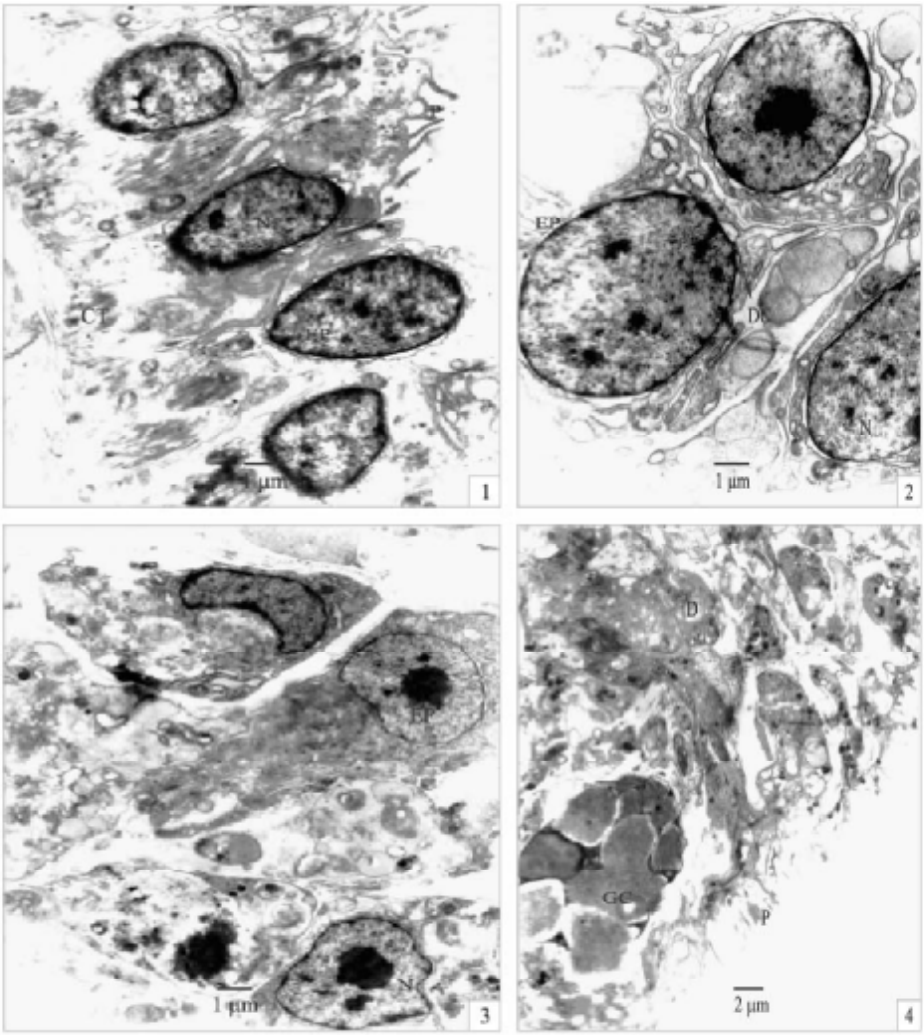
1. 角质层中解体细胞及细胞碎片;2. 角质层中的环层片状溶酶体;3. 角质层中细胞碎片和游离端的指状突起;4. 上皮细胞以及细胞器;5. 上皮细胞中的高尔基复合体;6. 表皮再生 24 h 的扩增细胞.

注:CB－细胞界线;D－细胞碎片;EP－上皮细胞;Go－高尔基复合体;LYⅡ－环层片状次级溶酶体;Mi－线粒体;N－细胞核;P－角质层突起;PC－扩增细胞;RSE－粗面内质网.

1. The degenerating cells and debris of cuticula; 2. The multilamellated Lysosome Ⅱ of cuticula; 3. The debris and finger-like protrusions of cuticula; 4. The epithelial cell and its organelle; 5. The Golgi complex in the epithelial cells; 6. The proliferated cells of the regenerated cuticle after 1 d of injury.

Note: CB－Cellular borderline; D－Debrisl; EP－Epithelial cell; Go－Golgi complex; LYⅡ－Lysosome Ⅱ; Mi－Mitochrondrion; N－Nucleus; P－Protrusions; PC－Proliferated cell; RSE－Rough-surfaced endoplasmic reticulum.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn




**图版Ⅲ　Plate Ⅲ**

1. 表皮再生 48 h 的角质层和上皮细胞;2. 角质层形成初期,上皮细胞开始解体,细胞界线不清;3. 角质层形成中期,细胞器解体,核固缩,细胞界限完全消失;4. 角质层形成晚期,上皮细胞解体成细胞碎片以及腺细胞和分泌颗粒.

注:CT－结缔组织;D－细胞碎片;DC－细胞膜折入,细胞开始解体;EP－上皮细胞;GC－腺细胞;N－细胞核;P－角质层突起.

1. The epithelial cell and cuticula of the regenerated cuticle at 48 h;2. The epithelial cell disassembled, and then the side ling of epithelial cell was blurry at the beginning of the regeneratied cuticula;3. The organelle disassembled, nucleus shrank, and two or three epithelial cells fused at the metaphase of the regenerated cuticula;4. The epithelial cell debris and gland cell granules at the end of the regenerated cuticula.

Note: CT－Connective tissue; D－Debrisl; DC－Dissolutive cell; EP－Epithelial cell; GC－Gland cell; N－Nucleus; P－Protrusions.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn