

海参再生的研究

Study on the regeneration of sea cucumber

聂竹兰, 李霞

(大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

中图分类号: S968.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)05-0078-05

海参(sea cucumber, Holothurians)属于棘皮动物门海参纲,分布世界各地不同深度的海底。全世界约有900多种海参,可供食用的约有40种。中国海域约有100多种海参,可供食用的约有20种,其中有10种具有较高的商品价值^[1]。

海参在受到损伤、遭遇敌害、过度拥挤、水质污染、水温过高、氧气缺乏等强烈刺激或处于不良环境时,身体强烈收缩,随即内脏排除,消化道、呼吸树、居维尔氏小管、生殖腺甚至全部内脏器官由肛门排出体外,这就是海参的排脏现象。排出的内脏器官的种类及其数量因海参种类、所受刺激强度以及所处环境条件等不同而有差异。当环境条件适合时,内脏排出后能再生出新的内脏器官。少数种类海参被横切为2~3段,各段也能再生为完整个体^[1]。由此可见,海参具有很强的再生能力。作者综述了海参再生的研究现状、过程、方式和机制,旨在丰富海参生物学内容,并为动物再生的研究提供一些参考资料。

1 海参再生的研究现状及意义

1.1 海参再生的研究现状

国内有关海参再生的报道仅局限于关于海参具有再生能力的特征性描述,对其再生的方式、过程、机制等还未做过进一步的研究。而国外早在19世纪就开始研究海参的再生情况^[2]。到目前为止,国外的众多学者已在海参再生的外部形态、组织结构^[3~7]、细胞功能^[7~9]等方面做了大量的研究工作。研究的种类主要有仿刺参(*Apostichopus japonicus*)、*Eupentacta fraudatrix*、*Holothuria forskali*、*Holothuria glaberrima*、*Leptosynapta clarki*、*Leptosynapta crassipatina*等。研究的主要器官有肠^[9]、体壁^[3,10]和居维尔氏小管^[11]等。其中比较系统的是肠道的再生。海参身体被横切后再生的研究也有报道^[3~5,7]。

研究方法一般是用肉眼观察再生器官的外部形态特征,如再生的部位、程度、形状、颜色等的变化情况^[3];采用组织切片技术,用光学、电子显微镜在显微

和亚显微结构水平上,观察器官再生过程中各组织层和细胞的生长、分布等变化特征^[11,12];采用³H-T(甲基-胸腺嘧啶核苷)标记的放射自显影技术^[7,13]或BrdU(5-溴脱氧尿苷)标记的免疫细胞化学方法,检测再生器官组织中的细胞分裂、增殖的数量及其分布;此外,还采用单克隆抗体和免疫细胞化学相结合的方法检测某一组织层(如肠道的肌肉层)在再生过程中出现的确切时间及位置^[9]。

1.2 研究海参再生的意义

在发育生物学领域,器官和组织的发生已经被视为未解决的疑难问题之一^[14]。深入研究一个器官形成的具体过程是很困难的,一方面由于其过程很复杂,有许多的调控因子起作用;另一方面由于绝大部分器官的形成是在胚胎发育过程中完成的。而海参具有超强的再生能力,在表皮损伤和自切排脏后,当环境条件适合时能很快再生出各种新的功能完善的内脏器官。此再生过程是在时间上、空间上与胚胎发育过程相分离的。因此,研究海参的再生为研究组织、器官的发生提供了一个独特的模型对象。生物体损伤后,某些残存组织可一定程度上再生,这种再生修复的优点是新生组织是自体的,可形成与原来组织形态结构以及功能相同的组织器官。而研究海参体壁表皮和消化道的再生,主要围绕细胞来源、促进组织再生的理化因子、生物物质等方面展开。因此,研究海参的再生,对设计更理想的促进再生的人工基质提供有价值的线索,对研究高等动物(尤其是人类)的细胞分化(differentiation)、组织修复的确切机制和激发再生修复潜能奠定理论基础。

收稿日期: 2005-08-23; 修回日期: 2006-02-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371099)

作者简介: 聂竹兰(1979-),女,硕士研究生,主要从事水产发育学研究, E-mail: niezh12004@163.com; 李霞,通讯作者,教授, E-mail: Lx@dlfu.edu.cn

由于海参在人工养殖以及运输过程中的“化皮”和排脏现象时常发生,因此,研究海参体壁的再生,并与“化皮”海参的再生进行对照,找出其再生过程中的适宜条件和促进体壁与消化道修复的生物物质,从而减少养殖和运输过程中的损失,这对水产养殖业也有重要的实践指导意义。

2 海参肠的再生

2.1 海参肠的再生过程

不同种类的海参,排出的器官不完全相同,再生过程及方式也有很大差异。主要有3种再生方式。

(1) 排出消化道后,分别在食道和泄殖腔处形成2个断面。如 *H. glaberrima*^[9]。

(2) 在排脏后体腔内仅剩下石灰环、咽-食道的残肢以及泄殖腔。如 *A. japonicus*^[13]。

(3) 由口端排出消化道(大多数海参的排脏部位是泄殖腔),排脏后在体腔内剩下泄殖腔、呼吸树和性腺,但没有咽-食道的残肢。如 *E. fraudatrix*^[13]。

前2种方式都是体腔中残留的肠系膜游离边缘增厚,成为富含细胞团的间充质组织,随后形成消化道原基(rudiment)。二者不同之处主要有2点:一是消化道原基的形成不同。方式一指出在体中部形成一个消化道原基(rudiment)像一个坚实的杆状物贯穿于食道和泄殖腔之间,沿着腹部和侧部的肠系膜整体延长。最后新生细薄的消化道打通,形成一个空心的消化道。方式二强调了体前部和体后部由食道残肢和泄殖腔残肢分别形成了2个原基,这2个原基沿着增厚的肠系膜游离边缘分别向体中部生长,并侵入到杆状的间充质中,最后在中部相遇,结合为一条细小的消化道;二是肠腔的形成不同。再生方式一中肠腔是由食道和泄殖腔2个盲端管形成的,盲管的尖端产生上皮细胞进而形成腔隙,腔隙不断向体中部移进,最后形成一个空心的消化道。而再生方式二则在肠系膜增厚的间充质内部,出现一些微孔、腔隙,这些微小的孔、隙不断合并,最后与残余的腔融合形成一个肠腔。

第3种再生方式与前2种模式差异较大。在体前端出现2个结缔组织的增厚物,一个位于撕裂的步带末端伤口处,一个位于肠系膜的游离边缘。2个增厚部位很快愈合为一个前端的主要原基,并且不断增大,最后形成一个小型的管伸向体后端,这个原基和体后部由泄殖腔残肢生长出的较短的原基相向生长,最后互相愈合。主要的形态发生出现在体前端,在间充质基质内,出现的细胞群形成微小的腔,分裂,最后愈合为肠原基内惟一的腔。

2.2 海参肠再生的组织层起源

肠的组织结构分为上皮层(粘膜层)、粘膜下层、肌肉层、体腔上皮层(浆膜层)。作者从以下3个方面阐述了肠再生过程中的组织层起源以及细胞的来源和作用。

上皮层的形成与肠腔的形成密切相关,对于肠腔形成过程中上皮细胞的来源,有以下几种观点:(1) 肠上皮的增殖来源于泄殖腔和食道^[4,5];(2) 肠上皮来源于肠系膜增厚处的间充质细胞^[6,15,16];(3) 肠上皮是由体腔上皮内陷形成^[17];(4) 肠腔上皮由食道、泄殖腔残肢的侵入以及肠系膜的体腔上皮和结缔组织内大量细胞的移入形成^[13];(5) 肠上皮的生成既来源于泄殖腔和食道,又靠肠系膜增厚处的增殖来完成的^[9]。由此可见, Garcia-Arraras^[9] 和 Smith^[4,5] 都认为肠上皮来源于新生肠道的可增殖尖端。

肠的粘膜下层是由肠系膜的结缔组织形成的^[9]。再生过程中,肠道结缔组织的增厚主要靠肠系膜边缘的增厚来实现的,从而为形成新的肠道提供结构基础。肠系膜结缔组织内细胞的补充和细胞外基质物质的增多是肠系膜游离边缘增厚以及胚基样结构形成的关键因素。在再生的早期阶段,血细胞在结缔组织中的总数有明显的增加,可能有助于向再生中的组织运输更多的氧和营养物质等;桑椹胚细胞的数量没有发生明显的变化是由于它们用于产生基质或为其他细胞提供能量或营养物质^[9]。

肠道新生的肌肉层起源于残余的肠系膜还是起源于体腔上皮有待进一步研究。但能确定肌肉层的出现发生在再生阶段的后期^[15,17]。

3 海参体壁的再生

海参体壁组织结构为上皮层、结缔组织层、肌肉层、体腔上皮层,其中肌肉层是由内环外纵的平滑肌构成。以下阐述了纵肌带以及横切后的体壁再生情况。

3.1 海参表皮再生

作者曾以刺参为试验材料,进行了表皮再生的研究。结果表明:刺参表皮损伤后,其修复过程即上皮干细胞分化增殖的过程;分化增殖的细胞主要来源于未受伤处的表皮干细胞以及损伤处结缔组织内上皮干细胞;结缔组织的上皮干细胞首先分化,之后激起未受伤处表皮干细胞的分化增殖,密集成团;尔后增殖的细胞向中间无上皮的区域迁移;最后伤口处表皮细胞分布均匀达到正常水平,色素恢复。



3.2 海参纵肌带的再生

肌细胞发育和生长主要是通过体腔上皮细胞的肌原性分化而成。Dolmatov^[10]研究了 *A. japonicus* 的纵肌带(LMBs)的再生,用 LMBs 特有的细胞骨架蛋白作为抗原,制备多克隆抗体。该抗体只与覆盖在 LMBs 表面的体腔上皮细胞呈免疫反应活性。在 LMBs 的再生过程中,免疫反应按时间顺序出现的部位:(1) LMBs 的表面即体腔上皮细胞;(2) 既在体腔上皮细胞又在 LMBs 原基的细胞束内;(3) 新生肌细胞的边缘。实验表明,体腔上皮细胞内的抗原蛋白较稳定,降解速度缓慢,当体腔上皮细胞转变为肌细胞后仍保留在细胞内,但在分化过程中被新产生的大量的肌纤维排挤到了细胞边缘。

在 LMBs 的再生过程中没有观察到肌(原)细胞的去分化、迁移、细胞有丝分裂现象。在受伤部位,受损的肌细胞退化,肌细胞束裂解。体腔上皮细胞发生了去分化,并侵入到 LMBs 组织中,这些细胞形成簇,即肌带的原基。呈簇的细胞群在数量和大小上不断增加、延长,发育为有收缩能力的纵肌带。从而进一步证实了该海参肌肉再生的主要机理:新生的 LMBs 来源于覆盖与其表面的体腔上皮细胞,这些上皮细胞转移到受损伤的 LMBs 处,再转变为肌细胞。

3.3 海参横切后的再生

海参横切后的再生研究较多的是无足目(Apoda)的海参,无足目种类的海参仅含口的前半部可再生为完整的新个体。在再生过程中,细胞迁移起了主要作用,其来源可能是体内残留的组织。也有少数学者研究了红刺参和绿刺参横切后的再生。作者根据研究目的和方法的不同,将其分为3种类型:(1)在胃肠交界处切断个体。切断 *L. crassipatina* 伤口愈合后,消化道在腹部、背部及侧部的肠系膜牵引下,按正常食道、胃、肠的比例重组改造为正常的消化道组织,以后再整体长大^[4]。*L. clarki* 被横切后,胃上皮细胞的典型特征逐渐再分化为肠上皮细胞的典型特征^[7]。再生组织细胞不进行分裂增殖,也没有细胞的去分化现象。肌细胞在海参的体壁横切的断面有明显的退化现象^[10,18],但还不能证实肌肉提供细胞或营养物质。(2)在体壁中间等分、体前部占2/3、体前部占1/3的3种比例分别切断个体^[3]。由于个体的切割部位不同,体前部和体后部的再生率也不同。体后部的再生效果较好。最终,切断个体重新长出了和原来的组织有明显区别的口和肛门,口周围排列着一定数目的小触手。体前部长出了呼吸树,整个的身体很小,但能摄食饵料。(3)在体壁背部及腹部横向和纵向切开一个2~3 cm的伤口。如红刺参和绿刺

参的体壁再生^[3]。色素1周后开始沉着,腹部色素沉着速度比背部色素沉着速度快,最终不能辨别。切开伤口不管是腹部还是背部,不论是横向还是纵向,绿刺参的治愈率都要比红刺参的高。但在手术时,若切断了纵肌,则不管在哪种海参中治愈都延期。

作者对刺参横切的研究表明:个体切断后,首先切断处体壁收缩形成新的体腔;随后,形成的新个体出现排脏现象,并重新再生出内脏器官;最后再生为一个新的、功能完善的个体。再生过程中体壁伤口未完全愈合的刺参最终死亡。

4 海参居维氏管的再生

居维氏管的数量因海参种类不同而不同。它可伸长,具粘性或毒性,受刺激时将其排出作为防御器官^[19]。其组织结构为间皮层、结缔组织层、内皮层。

Vandenspiegel^[11]研究了 *H. forskali* 居维氏管的再生,指出其再生过程按去分化、增殖、再分化的顺序进行。当 *H. forskali* 受到较轻刺激时,排出的居维氏管数量较少,并不立即启动再生过程,若干天潜伏期过后同时进入再生过程。当受到较严重刺激时,排出的管数较多,立即进入再生过程,但分组分批进行再生。

间皮层是活跃分裂增殖的未分化细胞形成的,增殖细胞在间皮层中所占的比例随着颗粒细胞和肌细胞的分化而逐渐减少;未分化的细胞可能起源于体腔上皮细胞,体腔上皮细胞可能通过去分化(dedifferentiation)、增殖、再分化(redifferentiation)为其它类型的细胞;肌细胞起源于间皮层,间皮层细胞首先分化为肌上皮细胞,然后转移到结缔组织中。从它们在再生过程中出现的顺序来推测,I类细胞去分化转变为II类细胞,然后II类细胞进行活跃增殖,最后分化为II类细胞^[11,12,20]。变形细胞也可能在再生过程中起重要的作用,这种细胞具有多种功能,如吞噬、凝结伤口和吸收营养等作用^[8]。

5 海参的再生机制

在研究海参再生的过程中,研究者们提出了变形再生(morphallaxis)和新建再生(epimorphosis)2种再生机制。变形再生机制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。细胞主要是通过分化或由现存的组织中迁移而来,而不是分裂增殖。如Dolmatov^[10]指出海参体壁纵肌的再生过程没有细胞增殖,而是细胞变形再生的代表;又如Smith^[4,5]和Gibson^[7]都研究得出无足类海参(*Leptosynapta*)体壁横切后的肠再生完全属

于变形再生的机制。新建再生机制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。去分化的残余组织细胞或(和)多潜能干细胞迁移到伤口部位(如肠系膜撕裂边缘等)形成具有分裂增殖功能的胚基。

这2个基本理论因物种的差异性而在不同种类间呈现出复杂的多变性。海参中大多数的再生过程是属于变形再生和新建再生2种机制的结合。如 *H. glaberrima* 肠的再生机制就是变形再生和新建再生的结合,同桶手目和枝手目的海参^[9]。一方面,肠的现存原有组织重新改组(变形再生),另一方面,细胞分裂并不局限于一个位置,使得其成为新生器官的各组织层的细胞来源,而是存在几个独立的细胞增殖中心:肠外膜、肌肉层以及上皮层(新建再生)^[9,21]。Vandenspiegel^[11]提出 *H. forskali* 居维尔氏小管的再生机制也属于2种机制的结合,再生的最初过程是新建再生,间皮的增厚处可看作是一个胚基,即具有增殖和分化能力的未分化细胞的聚集之处。但它也不是可产生所有组织层的真正的胚基,而是一个临时的胚基样结构,仅作用于间皮的再生,而对居维尔氏小管结缔组织层和内皮层的形成不起作用。这2个组织层各自有其分裂的细胞群。随着再生的进展,分裂细胞的百分比下降,到再生的后期阶段,居维尔氏小管的组织发生主要表现为变形再生,新的分化的细胞从间皮迁移到结缔组织。

6 存在的问题及展望

目前,虽然已对海参的再生做了许多工作,但仍存在很多问题。例如变形再生中细胞迁移、转分化的基因表达、调控;新建再生中增殖细胞的来源以及细胞去分化、增殖、再分化的分子机制;细胞外基质或间充质中各成分的变化及其作用;排泄、再生过程中各种促进形态发生的生长因子的表达及作用;再生过程与胚胎发育过程间的异同等问题都有待解决。此外,找出一些特异的分子标记、抗体对于研究海参的再生过程有重要作用,尚需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] 廖玉麟. 我国的海参[J]. 生物学通报, 2001, 35(9): 1-4.
- [2] Clark H L. The synaptas of the New England coast [J]. *Bull of the US Fish Comm*, 1899, 19: 21-31.
- [3] 崔相. ナマコの研究[M]. 日本: 海文堂出版社, 1962. 159-168.
- [4] Smith G N. Regeneration in the sea cucumber *Leptosynapta*. I. The process of regeneration[J]. *J Exp Zool*, 1971, 177: 319-330.
- [5] Smith G N. Regeneration in the sea cucumber *Leptosynapta*: II. The regenerative capacity [J]. *J Exp Zool*, 1971, 177: 331-342.
- [6] 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.
- [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] Hetzel H R. Studies of coelomocytes type 1: Survey on coelomocyte type[J]. *Biol Bull*, 1963, 125: 289-301.
- [9] Garcia-Ararras J E, Estrada-Rodgers L, Santiago R, et al. Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata) [J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(4): 288-304.
- [10] 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.
- [11] VandenSpiegel D, Jangoux M, Flamman P. Maintaining the line of defense: Regeneration of Cuvierian tubules in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) [J]. *The Biological Bulletin*, 2000, 198(1): 34-49.
- [12] VandenSpiegel D, Jangoux M. Cuvierian tubules of *Holothuria forskali* (Echinodermata): a morphofunctional study[J]. *Mar Biol*, 1987, 96: 163-275.
- [13] Leibson N L. Regeneration of digestive tube in holothurians *Stichopus japonicus* and *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota) [A]. Taban C H, Boilly B. Keys for Regeneration (Monographs in Developmental Biology. Vol. 23) [C]. Basel: Karger, 1992. 23: 51-61.
- [14] Barrinaga M. Looking to development's future[J]. *Science*, 1994, 266: 561-564.
- [15] Dawbin W H. Auto-evisceration and the regeneration of viscera in the holothurian *Stichopus mollis* (Hutton) [J]. *Trans R Soc New Zealand*, 1949, 77: 497-523.
- [16] Marushkina N B, Gracheva N D. Autoradiographical study of proliferative activity of the esophageal epithelium in *Stichopus japonicus* under normal conditions and after autotomy (in Russian) [J]. *Tsitologia*,



- 1978,20:426-431.
- [17] Mosher C. Observations on evisceration and visceral regeneration in the sea cucumber, *Actinopyga agassizi* Selenka[J]. **Zoological NY**, 1956, 41:17-26.
- [18] Hyman L. The Invertebrates: Echinodermata[M]. New York: McGraw-Hill Publications, 1955.
- [19] 廖玉麟. 中国动物志. 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 34.
- [20] Riger R M, Lombardi J. Ultrastructure of the coelomic lining in echinoderm podia: significance for concepts in the evolution of muscle and peritoneal cell [J]. **Zoomorphology**, 1987, 107:191-208.
- [21] 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** (Woods Hole Mass), 1965, 128:1-23.

(本文编辑:张培新)