

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200708001

http://www.yykxjz.cn/

纪锦霖, 孟少东, 王轶南, 丁君, 李强. 中间球海胆体腔细胞损失后的恢复规律及恢复期中轴器观察. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 109–116

JI J L, MENG S D, WANG Y N, DING J, LI Q. Recovery pattern of coelomocytes after loss in *Strongylocentrotus intermedius* and observation of axial organ during recovery phase. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 109–116

中间球海胆体腔细胞损失后的恢复规律 及恢复期中轴器观察*

纪锦霖^{1,2} 孟少东^{1,2} 王轶南^{1,2} 丁君¹ 李强²

(1. 大连海洋大学 农业农村部北方海水养殖重点实验室 辽宁 大连 116023;

2. 盐城工学院 水生动物免疫与疾病研究所 江苏 盐城 224051)

摘要 本研究通过人工抽离中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)体质量 10%的体腔液诱导体腔细胞的修复更新, 分组测定 6、12、18 和 24 h 后海胆围脏腔内的体腔细胞密度, 分析体腔细胞的修复规律; 同时, 取各时间点海胆的中轴器进行组织学观察, 并利用鼠抗人 Ki-67(细胞增殖抗原)单克隆抗体检测中轴器内的细胞增殖信号。结果显示, 人工抽离体腔液后 6 h, 体腔细胞密度与初始密度相比明显偏低; 12 h 后逐步升高, 密度略低于初始密度, 恢复度为(92.78±29.40)%; 18 h 后已明显高于初始密度, 恢复度为(137.08±32.40)%, 显著高于 6 h 和 12 h 的恢复度($P<0.05$), 随后, 体腔细胞密度逐渐降低。海胆损失体腔液后, 中轴器表现为内部组织消减、空腔化, 外壁上皮细胞层崩解、脱离, 凸起结构空泡化等变化, 18 h 后内部疏松组织略有增加, 24 h 后中央腔内出现明显的新生组织。利用 Ki-67 单克隆抗体检测发现, 正常海胆中轴器内具有一定的细胞增殖信号, 该信号在损失体腔细胞 18 h 后明显增强。结果表明, 损失体腔细胞后, 中间球海胆可启动快速恢复机制, 而海胆的中轴器发生明显的组织结构变化, 组织内的细胞增殖活动也明显增强。研究结果可为海胆体腔细胞的造血组织与发生机制研究提供依据。

关键词 中间球海胆; 体腔细胞; 恢复规律; 中轴器; 造血组织

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0109-08

海胆与海参、海星等同属棘皮动物门(Echinodermata), 是一类营底栖生活的海洋无脊椎动物, 也是生物学研究中的一种模式生物。由于棘皮动物处于无脊椎动物向脊椎动物分支进化的特殊阶段, 在生物进化上占据独特地位, 海胆的免疫学研究可为比较免疫学提供重要资料(Smith *et al*, 2010)。有关紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的基因组测序

结果显示, 紫球海胆有近 70%的基因与人类相似, 果蝇和线虫等其他模式生物相比, 海胆在进化关系上与人类更接近, 使得其在比较免疫学研究中的地位愈益显著(Materna *et al*, 2006; Rast *et al*, 2006)。海胆的石灰质外壳中充满体腔液, 其由变形吞噬细胞、色素细胞、纤毛游走细胞、无色球形细胞等多种体腔细胞与细胞外液组成。海胆的体腔细胞类似于一般无脊椎

* 国家自然科学基金(31402275)和盐城工学院人才引进项目(XJ201726)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31402275), and Talent Introduction Project of Yancheng Institute of Technology (XJ201726)].
纪锦霖, E-mail: 840048695@qq.com

① 通讯作者: 王轶南, 副研究员, E-mail: 16693762@qq.com

收稿日期: 2020-07-08, 收修改稿日期: 2020-08-13

动物中所述的血细胞,不仅具有营养输送、气体交换等生理功能,还在免疫防御中承担重要角色(de Faria *et al.*, 2008)。海胆只存在非特异性免疫,其免疫应答是由体腔中的体腔细胞和多种体液免疫因子共同介导的。体腔细胞通过吞噬、细胞杀伤、趋化修复等发挥细胞免疫功能,还通过合成与分泌凝集素、穿孔素、溶酶体酶等多种免疫因子广泛参与机体的体液免疫(Deveci *et al.*, 2015)。

血细胞的来源与发生机制一直是无脊椎动物免疫基础研究的焦点问题之一,探明血细胞的增殖来源与造血过程可为深入研究机体的免疫系统和免疫机制提供依据(Jia *et al.*, 2016)。目前,对于无脊椎动物造血作用的相关了解多集中于节肢动物,对其他门类的研究比较匮乏(Noonin *et al.*, 2012)。Grigorian 等(2013)研究显示,昆虫和其他节肢动物具有明确的造血器官,其中,未成熟的血细胞前体(前血细胞)以及分化成熟的血细胞分别分布于造血器官的不同区域,而不同节肢动物造血器官的位置与内部结构差异较大。与其他动物的血细胞一样,海胆的体腔细胞也具有修复与更新机制,以维持机体稳定。目前,针对海胆体腔细胞的来源仅有一些推测,有观点认为,海胆体腔细胞具有分裂增殖能力,而另一种观点则认为,海胆体腔细胞来源于腹膜上皮和中轴器等造血组织,其中,中轴器是最主要的来源部位(da Silva, 2013)。中轴器(轴腺)位于海胆口咽部与反口面筛板连线的中轴区域,外呈细长状,内具复杂的可收缩结构与腔隙,腺体特征显著,被认为是海胆围脏腔、水管系统及血系统的交汇组织(Millott *et al.*, 1968)。早期研究对海胆中轴器的功能判断不一,包括排泄、生产色素、循环以及免疫、产生体腔细胞等多种功能,然而均未得到证实(Millott, 1966; Millott *et al.*, 1968; Welsch *et al.*, 1987; Ziegler *et al.*, 2009)。

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*),又称虾夷马粪海胆,于1989年自日本引入中国,其味道鲜美,营养价值高,还具有极高的药用价值,为我国黄渤海区域重要的经济物种(Chang, 2008; 张伟杰等, 2010)。作者前期以抗中间球海胆体腔细胞单克隆抗体为工具,定位显示,海胆中轴器中含有大量体腔细胞,确定中轴器至少是中间球海胆体腔细胞的储藏器官(Wang *et al.*, 2018)。为了进一步研究中间球海胆体腔细胞的来源,本研究通过人工抽取体腔液的方法刺激体腔细胞的补充更新,进而观察分析体腔细胞的恢复规律,观察中轴器组织结构及细胞增殖信号的变化,以期揭示海胆体腔细胞的发生机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 海胆

中间球海胆[2龄, (50±10) g]购自辽宁省大连旅顺龙王塘海胆养殖场,于农业农村部北方海水增养殖重点实验室活体培养室养殖,实验前驯养14 d。养殖槽水体为3 m³,水深约为1.2 m,水温为20℃,保持充氧,每2 d投喂海带1次、更换1/3海水,并吸底清除排泄物。

1.2 体腔液安全抽取量的确定

取3枚海胆于解剖盘中静置沥水,待重量趋于稳定后称重。使用手术剪沿围口膜外缘剪开,使用移液枪吸取全部体腔液,称重、计算体腔液与海胆体重的质量比。取9枚海胆,分为3组,使用无菌注射器自围口膜穿刺,分别抽取海胆体质量5%、10%和15%的体腔液,之后,正常养殖并密切观察14 d。抽取体腔液后,海胆仍能维持正常状态并继续存活的抽取量视为安全抽取量。

1.3 体腔细胞的恢复规律

取28枚海胆,按1.2确定的最大安全抽取量,使用预装有CMFSW-EI缓冲液(449 mmol/L NaCl, 33 mmol/L Na₂SO₄, 9 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L NaHCO₃, 30 mmol/L EDTA, 50 mmol/L imidazole, pH 7.4)(Brockton *et al.*, 2008)的注射器自围口膜穿刺、抽取海胆体腔液,使体腔液与缓冲液体积比为1:1,并及时混匀。CMFSW-EI缓冲液具有抗凝集、维持细胞形态的作用。采用血球计数板显微镜下计数,计算每个海胆的初始体腔细胞密度,并进行标记。将抽取过体腔液的海胆放回水槽正常养殖,6、12、18和24 h后分别取7枚海胆,各抽取0.5 mL体腔液,并计算体腔细胞密度。根据每个海胆的初始体腔细胞密度与取样时体腔细胞密度,计算各组体腔细胞密度均值,进行独立样本 t 检验,以下列公式计算体腔细胞恢复度:

$$\text{恢复度} = \frac{\text{取样时间点体腔细胞密度}}{\text{初始体腔细胞密度}} \times 100\%$$

统计各组恢复度均值,并通过单因子方差分析(one-way ANOVA)中的Duncan方法进行多重比较。各组海胆在测定体腔细胞密度后,继续用作后续分析的样品。

1.4 中轴器组织学观察

取正常海胆3枚,并从1.3各组中分别选取3枚海胆,自围口膜外缘向反口面方向剪开石灰质外壳,至约1 cm处转为环向剪开,将海胆分为2部分,取

下中轴器。中轴器使用 PBS 清洗 3 次后放入波恩氏液固定, 24 h 后流水冲洗 12 h, 随后, 70%酒精冲洗。参考赵彦花等(2019)的方法, 经 70%~100%梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋及切片后, 采用 HE 染色试剂盒(Solarbio)染色。使用显微镜(Leica DM2500, 德国)观察拍照。

1.5 中轴器内细胞增殖信号检测

取正常海胆 3 枚, 并从 1.3 各组中分别选取 3 枚海胆, 按 1.4 中描述的方法解剖分离中轴器, 经冰冻包埋剂 OCT (Sakura)包埋后置于 -20°C 冰箱冷冻。使用 Leica CM1900 冰冻切片机制片, 经冰冻丙酮固定后滴加鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体(Sigma), 37°C 孵育 45 min。PBS 洗涤 3 次后滴加 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(Sigma), 37°C 孵育 45 min。PBS 洗涤 3 次, 滴加 actin 染色剂 Alexa Fluor[®] 555 phalloidin (Sigma)室温染色 20 min, PBS 洗涤 3 次, 甘油封片, 使用显微镜(Leica DM2500, 德国)观察、拍照。阴性对照使用 PBS 替代 Ki-67 单克隆抗体, 其他步骤同上。

2 结果

2.1 海胆体腔液的安全抽取量

通过统计发现, 正常中间球海胆体腔液占海胆总体质量的(26.24 ± 1.29)%。抽取 5%体质量的体腔液后 14 d 内, 海胆摄食正常, 管足完全伸出、附着于笼壁上, 全部存活; 抽取 10%体质量的体腔液后 14 d 内, 海胆摄食正常, 可伸出管足附着于笼壁上, 全部存活; 抽取 15%体质量的体腔液后, 海胆基本无摄食, 管足伸展状态逐渐变差并失去吸附、运动能力, 5 d 后全部死亡。因此, 海胆体腔液安全抽取量定为体质量的 10%以内, 约为总体腔液的 36%~40%。

2.2 体腔细胞的恢复规律

正常状态下, 中间球海胆体腔细胞密度为(10.13 ± 3.08) $\times 10^6$ cells/mL ($N=28$), 个体差异较大, 最大和最小测定密度分别为 15.68×10^6 和 5.18×10^6 cells/mL。为保证数据统计的准确性及可靠性, 以每个海胆的初始体腔细胞密度与取样时体腔细胞密度为基础, 分析体腔细胞的恢复规律(图 1、图 2)。人工抽取体腔液 6 h 后, 海胆体腔细胞密度为(5.70 ± 1.43) $\times 10^6$ cells/mL, 低于初始密度[(8.30 ± 3.00) $\times 10^6$ cells/mL], 但差异不显著($P>0.05$)。6 h 后恢复度为(74.94 ± 29.42)%, 但其中有 28.6%的个体恢复度略高于 100%。

人工抽取体腔液 12 h 后, 体腔细胞密度为($11.41\pm$

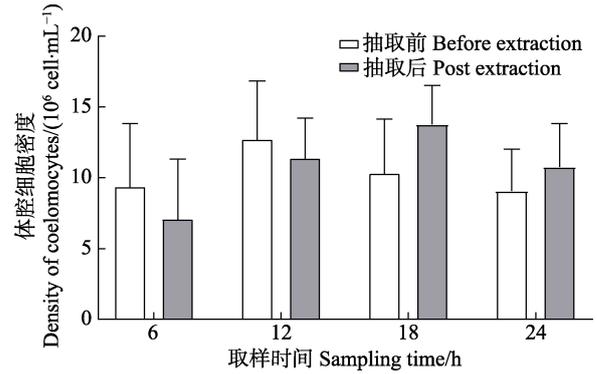


图 1 各组海胆体腔细胞密度变化

Fig.1 Variety of coelomocyte density in each group

各组海胆体腔细胞密度(抽取前与抽取后相比)差异均不显著($P>0.05$)

The differences of the coelomocytes density in each groups (before extraction vs post extraction) were not significant ($P>0.05$)

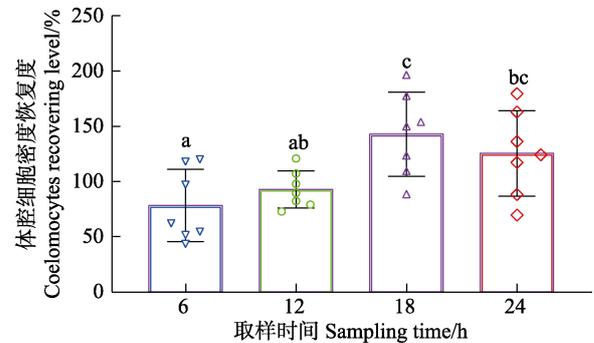


图 2 中间球海胆体腔细胞恢复情况

Fig.2 Recovering of coelomocytes in *S. intermedius*

不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)

Different letters showing significant differences ($P<0.05$)

2.18) $\times 10^6$ cells/mL, 略低于初始密度[(12.75 ± 2.64) $\times 10^6$ cells/mL], 但差异不显著($P>0.05$)。12 h 后体腔细胞恢复度为(92.78 ± 29.40)%, 其中, 42.9%的个体接近甚至超过初始水平, 57.1%的个体低于初始水平。

人工抽取体腔液 18 h 后, 体腔细胞密度为(14.00 ± 2.15) $\times 10^6$ cells/mL, 高于初始密度[(11.04 ± 3.59) $\times 10^6$ cells/mL], 但差异不显著($P>0.05$)。18 h 后, 体腔细胞恢复度为(137.08 ± 32.40)%, 恢复度高于 150%的海胆有 42.9%, 与初始水平持平的个体为 28.6%。

人工抽取体腔液 24 h 后, 体腔细胞密度为(10.78 ± 2.08) $\times 10^6$ cells/mL, 高于初始密度[(8.91 ± 2.44) $\times 10^6$ cells/mL], 但差异不显著($P>0.05$)。24 h 后, 体腔细胞恢复度为(125.41 ± 29.24)%, 其中, 恢复度高于 150%的海胆有 28.6%, 其余个体大多超过初始水平。

恢复度随时间的延长逐渐升高, 18 h 达到高峰,

随后降低,其中,18 h 组体腔细胞恢复度显著高于6 h 和12 h 组($P<0.05$);24 h 组恢复度显著高于6 h 组($P<0.05$),但与12 h 和18 h 组相比无显著差异($P>0.05$)。

2.3 中轴器组织学观察

中间球海胆中轴器为细长的红色囊状组织,长为3~6 mm,解剖后常附于亚氏提灯(口器)(图3A)或

肛门附近(图3B、图3C)。石蜡切片观察发现,正常中间球海胆中轴器外层为相对致密的结缔组织,中央为非规则形状的空腔即中央腔,中央腔外缘组织较为疏松,充满复杂的腔隙(图4N1);尖端部位组织致密、无中央腔(图4N2);一些部位的外壁上皮细胞层平整严密(图4N1、图4N3),有些部位的外壁上皮细胞层向围脏腔弥散或凸起,形成内具稀疏组织的褶皱或泡状结构(图4N1、图4N4)。

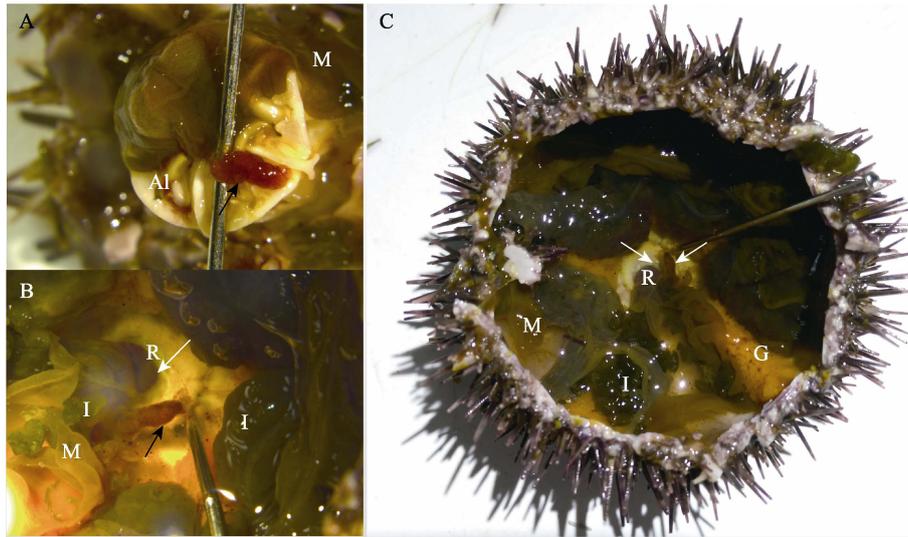


图3 中间球海胆中轴器

Fig 3. Axial organ of *S. intermedius*

A: 中轴器附于亚氏提灯(口器)上; B、C: 中轴器附于肛门附近
Al: 亚氏提灯/口器; M: 系膜; R: 直肠; I: 肠道; G: 性腺;
黑色箭头示中轴器; 白色箭头指示肛门位置

The axial organ attached to Aristotle's lantern (A) or anus (B, C)
Al: Aristotle's lantern; M: Mesentery; R: Rectum; I: Intestine; G: Gonad;
The black arrows indicating axial organ; the white arrows indicating the position of anus

损失体腔细胞6 h 后,海胆的中轴器明显空腔化,其内部疏松组织大量消减甚至缺失,部分区域仅剩外部致密组织与异常扩大的中央腔(图4R1);外壁上皮细胞出现崩解现象(图4R1),向体腔伸出的结构也呈现空泡化,内部细胞基本消失(图4R6)。12 h 后,中轴器也表现出明显的空腔化特征,外壁上皮细胞层出现崩解、脱离,凸起结构空泡化(图4R2)。18 h 后,中轴器仍表现为空腔化,且尖端部位也出现大量空腔,外壁上皮细胞层凸起空泡化甚至大片脱离,但其内部疏松组织略有增加(图4R3)。24 h 后,中轴器外壁上皮细胞层大面积脱落,器官略呈现皱缩状态,但内部出现较多新生组织,中央腔空隙明显减少(图4R4),靠近致密层邻近的腔隙内也出现新生组织(图4R8)。此外,在6 h 后中轴器中观察到由中央腔经外部致密区向外部延伸的通道(图4R5),而外壁上皮细胞层与

下层结缔组织形成的陷窝部位有细胞自中轴器向外迁徙(图4R7)。

2.4 中轴器内细胞增殖信号观察

通过间接免疫荧光检测发现,各海胆的中轴器与鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体均呈阳性反应,但同一时间点不同个体的样品之间存在一定差异。正常海胆中轴器的 Ki-67 信号较弱(图5A1);抽取体腔液6 h、12 h 后大部分样品的阳性信号与对照无明显差异;抽取体腔液18 h (图5B1)和24 h 后,样品中 Ki-67 信号明显增强,荧光信号呈点状、均匀分布,但2组之间无明显差异。海胆中轴器与 PBS 反应均呈阴性(图5C1)。

3 讨论

正常状态下,海胆体腔细胞的自我更新比较缓

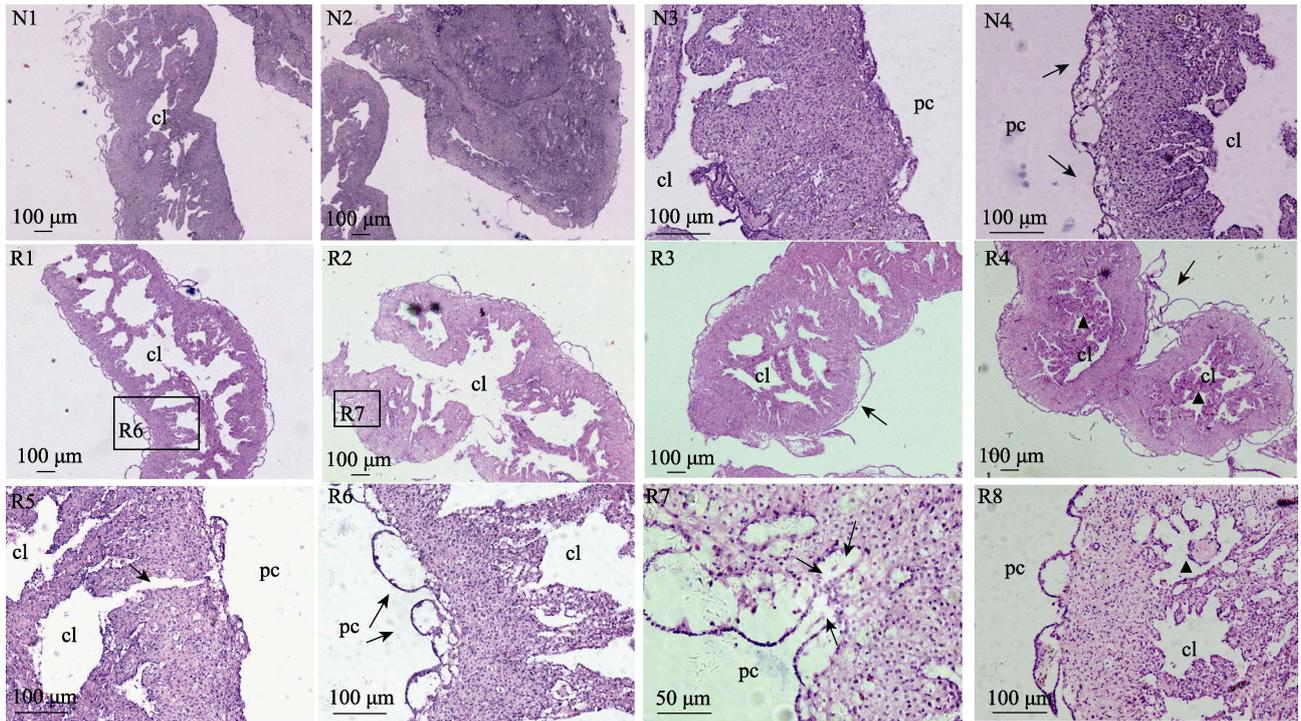


图 4 体腔细胞修复期海胆中轴器组织结构

Fig.4 Tissue observation of axial organ in coelomocyte recovering stage

N1~N4: 正常中间球海胆中轴器组织切片, 其中, N1 为中段部位, N2 示尖端部位, N3、N4 示中轴器外层组织结构细节, 其外壁上皮细胞层呈现不同类型; R1~R4 分别为抽取体腔液后 6、12、18 和 24 h 的海胆中轴器整体结构, 箭头示外壁上皮细胞层空泡化、崩解、脱落, R4 中小三角示中央腔内的新生组织; R5~R6: 6 h 后中轴器组织结构细节, R5 中箭头指示中央腔向外延伸的通道, R6 中箭头指示外壁上皮细胞凸起空泡化; R7: 12 h 后中轴器, 箭头示中轴器向围脏腔释放细胞; R8: 24 h 后中轴器, 三角示中轴器腔隙中的新生组织。cl: 中央腔; pc: 围脏腔

N1~N4: Histology of axial organ from normal *S. intermedius*, in which N1 showing middle area, and N2 showing the top end, N3~N4 showing exterior zone details in axial organ with different types of outer wall epidermal layer; R1~R4 indicating the whole structure of axial organs from uchins at 6, 12, 18 and 24 h post extraction, arrows here indicating vacuolation, disintegration and detachment of outer wall epidermal layer, the triangle indicating new tissue in central lumen; R5~R6: Structure detail of axial organs at 6 h, the arrow in R5 indicating the channel extended from central lumen to outer space, the arrow in R6 indicating vacuolation in bulge of epidermal layer; R7 from axial organ at 12 h post extraction, the arrow here indicating coelomocytes released from axial organ to perivisceral coelom; R8 from axial organ at 24 h post extraction, the triangle indicating new tissue in cavity of axial organ. cl: Central lumen; pc: Perivisceral coelom

慢, 为研究海胆体腔细胞的组织来源及发生机制, 本研究通过人工抽取体腔液的方法刺激体腔细胞的补充更新。经测定, 2 龄海胆体腔液质量占总体质量的 $(26.24 \pm 1.29)\%$, 与同为棘皮动物的刺参 $[(25.24 \pm 2.91)\% \sim (30.98 \pm 1.86)\%]$ 相近(王印庚等, 2010)。海胆体腔液的安全抽取量为体质量的 10%, 约为总体腔液的 36%~40%, 远高于刺参体腔液的安全抽取量(体质量 1.5% 以内)(王印庚等, 2010), 这可能与物种间的组织结构差异较大有关。

本研究发现, 海胆在人工抽取体腔液后 6 h, 体腔细胞密度明显低于初始值, 其原因可能是由于体腔液容积的恢复速度要快于体腔细胞的恢复速度, 这与刺参吐脏后体腔液容积快速恢复(吐脏后 2 h)结果一

致(Li *et al.*, 2018)。在人工抽取体腔液后 12 h, 海胆体腔细胞密度已恢复至原有水平, 18 h 时达到高峰, 24 h 时又恢复至原有水平。由此可见, 海胆在损失体腔细胞后, 机体会启动快速的补充机制, 体腔中迅速聚集大量甚至过量的体腔细胞, 随后又通过某种负反馈调节机制将体腔细胞密度降低到正常水平。这一结果与王印庚等(2010)对刺参体腔液穿刺抽取后体腔细胞恢复过程研究不同, 刺参在抽取少量(体质量的 1.5%)体腔液后总细胞浓度恢复时间为 4 d; 但与 Li 等(2018)的研究中刺参吐脏后体腔细胞的恢复规律比较一致, 体腔细胞数量在吐脏后 6 h 时与吐脏前已无显著差异。本研究中, 海胆体腔液的抽取量较大, 约占体腔液总量的 40%, 有效刺激了体腔细胞的快速修复。

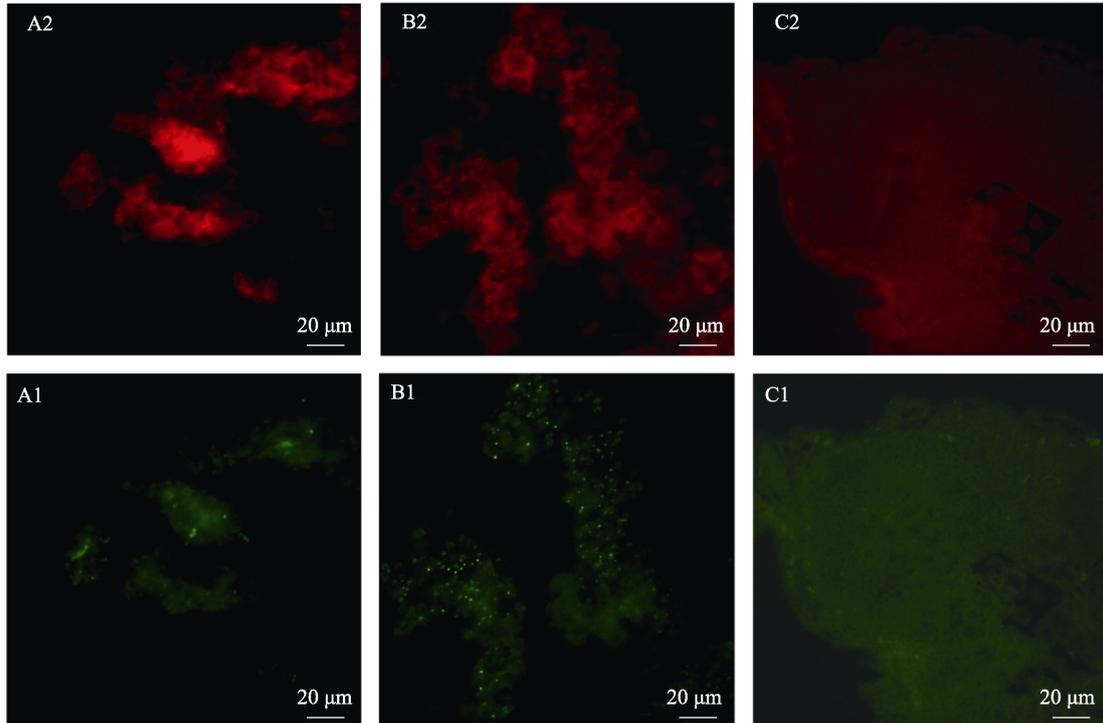


图 5 中轴器内细胞增殖信号检测

Fig.5 Detection of cell production signal in axial

A1: 正常海胆中轴器与 Ki-67 抗体反应结果; B1: 抽取体腔液后 18 h 的海胆中轴器与 Ki-67 抗体反应结果;

C1 为阴性对照。A2、B2 和 C2 分别为 A1、B1 和 C1 同视野 Actin 染色对照

A1 showing the reaction between normal urchin axial organ and antibody of Ki-67; B1 showing the reaction between axial organ post 18h and antibody of Ki-67; C1 showing the negative control.

A2, B2 and C2 were the same field of A1, B1 and C1, where actin was stained

本研究发现, 正常中间球海胆中轴器外层为相对致密的结缔组织, 中央为非规则形状的中央腔, 中央腔外缘组织较为疏松, 充满复杂的腔隙, 其与 *Diadema antillarum* 及 *Paracentrotus lividus* 等海胆的中轴器组织结构相似(Millott *et al.*, 1968; Welsch *et al.*, 1987), 这些特殊结构可能与中轴器的造血功能密切相关。与此相似, 甲壳动物的造血组织由结缔组织包围, 其内也存在大量微管、腔隙网络等结构(Hose *et al.*, 1968; Mats *et al.*, 2000)。本研究发现, 中间球海胆损失体腔细胞后, 中轴器明显空腔化, 其内部疏松组织大量消减甚至缺失, 外壁上皮细胞出现崩解现象, 向体腔伸出的结构也呈现空泡化。分析可能是由于中轴器内储存的体腔细胞大量释放到体腔中, 中轴器的中央内腔扩大、外围组织皱缩, 进而使得表皮细胞层崩解、脱落。24 h 后, 中轴器内部出现明显的新生组织, 说明此时中轴器已开始积极修复自身的细胞损失与组织损伤。此外, 本研究还发现, 中间球海胆损失体腔细胞后, 中轴器具有由中央腔向外部延伸的通道, 而外壁上皮细胞层与下层结缔组织形成的陷窝部位

有细胞自中轴器向外迁徙, 推测与中轴器向围脏腔释放体腔细胞有关。Millott 等(1968)研究认为, 海胆中轴器具有生产和外泌功能, 可将分泌物释放进腔隙陷窝、中央腔、微管或直接从器官的外表面进入围脏腔。因此, 中轴器内存储的体腔细胞也可能通过一些通道及组织表面的直接扩散释放至体腔内, 或通过腔隙释放至中央腔内, 再经由未知的通道进入体腔。关于体腔细胞的释放途径和释放机制还有待深入研究。

Ki-67 蛋白是细胞周期相关的一种核蛋白, 主要表达于细胞增殖分裂的各个时期(G1、S、G2 和 M 期), 但在静息的细胞(G0 期)中不表达, 常用于检测肿瘤细胞的生长指数。此外, Ki-67 蛋白也可用于其他细胞的增殖检测, Della Noce 等(2019)曾利用 Ki-67 细胞增殖蛋白抗体对无脊椎动物扁虱(*Rhipicephalus microplus*)胚性细胞系的细胞增殖情况进行相关研究。本研究通过间接免疫荧光检测发现, 鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体可与正常海胆中轴器反应, 但信号较弱, 提示正常海胆中轴器中存在低水平的细胞增殖, 以对体腔细胞的正常消耗进行补充, 维持机体平衡。抽取

体腔液 18 h 和 24 h 后, 中轴器中 Ki-67 信号明显增强, 表明在大量损失体腔细胞后, 中轴器可能启动了积极的造血程序, 细胞增殖活跃。

综上所述, 本研究确定了中间球海胆体腔液的最大安全抽取量为体质量的 10%, 损失体腔细胞后, 机会启动快速恢复机制; 中轴器在体腔细胞大量损失后组织结构发生明显变化, 组织内细胞增殖活动明显增强。研究结果为海胆体腔细胞的造血组织与发生机制研究提供了科学依据。

参 考 文 献

- BROCKTON V, HENSON J H, RAFTOS D A, *et al.* Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin—Unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(3): 339–348
- CHANG Y Q. Aquaculture of edible Echinoderms in China. *Global Aquaculture Advocate*, 2008, 11(3): 38–39
- DA SILVA J R M C. Immunology in sea urchins. In: LAWRENCE J M (ed). *Sea urchins: Biology and ecology*. (3rd ed). London: Elsevier, 2013, 187–194
- DE FARIA M T, DA SILVA J R M C. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 98: 58–62
- DELLA NOCE B, DE CARVALHO UHL M V, MACHADO J, *et al.* Carbohydrate metabolic compensation coupled to high tolerance to oxidative stress in ticks. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 4753
- DEVECİ R, ŞENER E, İZZETOĞLU S. Morphological and ultrastructural characterization of sea urchin immune cells. *Journal of Morphology*, 2015, 276(5): 583–588
- GRIGORIAN M, HARTENSTEIN V. Hematopoiesis and hematopoietic organs in Arthropods. *Development Genes and Evolution*, 2013, 223(1/2): 103–115
- HOSE J E, MARTIN G G, TIU S, *et al.* Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Biology Bulletin*, 1992, 183(2): 185–199
- JIA Z H, KAVUNGA S, JIANG S, *et al.* The characterization of hematopoietic tissue in adult Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 60: 12–22
- LI Q, REN Y, LIANG C L, *et al.* Regeneration of coelomocytes after evisceration in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 76: 266–271
- MATERNA S C, BERNEY K, CAMERON R A. The *S. purpuratus* genome: A comparative perspective. *Developmental Biology*, 2006, 300(1): 485–495
- MATS W J, PIA K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 2000, 191(1/2/3): 45–52
- MILLOTT N, VEVERS H G. The morphology and histochemistry of the echinoid axial organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1968, 253(784): 201–230
- MILLOTT P N. A possible function for the axial organ of echinoids. *Nature*, 1966(209), 594–596
- NOONIN C, LIN X, JIRAVANICHPAISAL P, *et al.* Invertebrate hematopoiesis: An anterior proliferation centre as a link between the hematopoietic tissue and the brain. *Stem Cells and Development*, 2012, 21(17): 3173–3186
- RAST J P, SMITH L C, LOZA-COLL M, *et al.* Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science*, 2006, 314(5801): 952–956
- SMITH L C, GHOSH J, BUCKLEY K M, *et al.* Echinoderm immunity. In: SÖDERHÄLL K (eds). *Invertebrate immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Boston, MA: Springer, 2010, 708
- WANG Y G, LIAO M J, HAO Z K, *et al.* Coelomocyte resume of sea cucumber *Apostichopus japonicus* after puncturable extraction of the coelomic fluid. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(5): 52–58 [王印庚, 廖梅杰, 郝志凯, 等. 刺参体腔液穿刺抽取后细胞恢复过程的初步研究. *渔业科学进展*, 2010, 31(5): 52–58]
- WANG Y N, MENG S D, ZHANG J L, *et al.* Production, characterization and application of monoclonal antibodies to the coelomocytes of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 75: 301–307
- WELSCH U, REHKÄMPER G. Podocytes in the axial organ of echinoderms. *Journal of Zoology*, 1987, 213(1): 45–50
- ZHANG W J, CHANG Y Q, ZHAO C, *et al.* Effects of phenotypic traits on gonad traits in sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(3): 49–55 [张伟杰, 常亚青, 赵冲, 等. 虾夷马粪海胆表型性状对性腺性状的影响效果分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(3): 49–55]
- ZHAO Y H, OU Y J, LI J E, *et al.* Histology and distribution of mucous cells in digestive system of *Bahaba flavolabiata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 80–86 [赵彦花, 区又君, 李加儿, 等. 黄唇鱼消化系统组织结构及黏液细胞分布特征. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 80–86]
- ZIEGLER A, FABER C, BARTOLOMAEUS T. Comparative morphology of the axial complex and interdependence of internal organ systems in sea urchins (Echinodermata: Echinoidea). *Frontiers in Zoology*, 2009, 6(1): 10

Recovery Pattern of Coelomocytes after Loss in *Strongylocentrotus intermedius* and Observation of Axial Organ during Recovery Phase

JI Jinlin^{1,2}, MENG Shaodong^{1,2}, WANG Yinan^{1,2}^①, DING Jun¹, LI Qiang²

(1. Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China; 2. Research Center of Aquatic Animal Immunity and Disease, Yancheng Institute of Technology, Yancheng, Jiangsu 224051, China)

Abstract Similar to hemocytes in other species, coelomocytes of sea urchins play an important role in the immune system. A verification of the recovery pattern and origin of coelomocytes would be vital in understanding its immune mechanism. Axial organ is a glandular organ that has been thought to be the hemopoietic tissue of sea urchin. Using monoclonal antibodies against coelomocytes, we demonstrated in a previous study that axial organ could serve as a storage tissue of coelomocytes. We further investigated the recovery pattern of coelomocytes in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* and the changes in the axial organ during the recovery phase. Coelomocyte density was examined at 6 h, 12 h, 18 h, and 24 h after manual extraction of 10% body weight of celomic fluid. Histology of the axial organ was observed, and cell proliferation activity was detected with a monoclonal antibody against Ki-67 (cell proliferation antigen). Results showed that the average coelomocyte density at 6 h was significantly lower than that before extraction; it gradually decreased at 12 h, with a density slightly lower than the initial level, with a recovery value of (92.78±29.40)%. Average coelomocyte was significantly higher than the initial level at 18 h, with a recovery value of (137.08±32.40)%, and was significantly higher than that at 6 h and 12 h ($P<0.05$). Subsequently, the coelomocyte density gradually decreased. The inter-tissue of the axial organ declined and cavitation occurred after coelomocytes were lost. The outer epithelial layer became loose and broke off, and vacuolation was observed in the bulges of the epithelial layer. The inter-tissue increased at 18 h, and newborn tissue appeared clearly at 24 h. Using the Ki-67 antibody, we found a cell production signal in the axial organ from the normal sea urchin and the signal was significantly enhanced after 18 h. Our results indicated that the restoring mechanism of coelomocytes could initiate rapidly after coelomocyte loss, while histological changes and cell production activity enhancement may occur in the axial organ. The present study provides valuable references for further research on the origin and ontogenesis of coelomocytes.

Key words *Strongylocentrotus intermedius*; Coelomocyte; Recovering pattern; Axial organ; Hemopoietic tissue

① Corresponding author: WANG Yinan, E-mail: 16693762@qq.com