

# 蚯蚓再生研究进展

肖能文<sup>1,2</sup>, 戈峰<sup>2</sup>, 吴晓莆<sup>1</sup>, 李俊生<sup>1</sup>, 罗建武<sup>1</sup>

(1. 中国环境科学研究院, 北京 100012; 2. 中国科学院动物研究所/农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:** 蚯蚓是土壤中的主要动物类群, 它们可促进植物残枝落叶的降解、有机物质的分解和矿化等复杂过程, 在陆地生态系统中具有重要的功能。同时, 蚯蚓由于其快速和不断更新的能力被认为是研究再生的最佳材料, 被当成研究发育、细胞生长分化和模式形成的模型。蚯蚓再生研究始于 19 世纪末, 研究内容从生态学逐渐发展到分子生物学水平。综述了蚯蚓再生研究的历史; 探讨了蚯蚓再生生物学的研究现状; 分析了环境对蚯蚓再生的影响; 并进一步分析了蚯蚓再生的机理。

**关键词:** 蚯蚓; 再生; 生物学; 机理

中图分类号: S899.8

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2009)10-2587-04

## Research Progress about Regeneration of Earthworm

XIAO Neng-wen<sup>1,2</sup>, GE Feng<sup>2</sup>, WU Xiao-pu<sup>1</sup>, LI Jun-sheng<sup>1</sup>, LUO Jian-wu<sup>1</sup>

(1. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** As the main soil fauna, earthworm can improve the degradation of deciduous plants, and promote the complex process of organic matter decomposition and mineralization, which played an important role in terrestrial ecosystem. Earthworm was considered the best material of regeneration research because of the rapid and ceaseless renewal capacity. It also was considered the model of development research, cell differentiation and pattern formation. The history of regeneration research began at the end of 19th century. The research expanded from biology, ecology to molecular biology. In this paper, we summarized the history of earthworm regeneration research, discussed the research status of earthworm regeneration biology, analyzed the effect of environment on the earthworm regeneration capacity, and further analyzed the mechanism of earthworm regeneration.

**Key words:** earthworm; regeneration; biology; mechanism

蚯蚓属于环节动物门 (Anelida), 寡毛纲 (Oligochaeta) 动物, 由于其快速和不断更新的能力被认为是研究再生的最佳材料<sup>[1,2]</sup>。蚯蚓作为再生材料的优点主要有: ①在系统发育中分类地位比较高, 有封闭的血液循环系统和真体腔, 是能整体再生的最高等的动物类群; ②分节结构便于分析再生的模式形成; ③不像涡虫、水螅以大量的干细胞来进行再生, 环节动物主要靠去分化和细胞分裂形成再生结构, 与脊椎动物相似, 因此更适于作为研究脊椎动物再生的试验材料。

形态学、发育学和神经电生理学等多方面证据

认为再生和胚胎发育过程相似<sup>[3]</sup>, 因此再生被当成研究发育、细胞生长分化、模式形成的材料和解释模式形成的理论模型<sup>[4,5]</sup>; 同时再生与肿瘤发生有类似之处<sup>[6]</sup>, 在扁形动物再生过程发现致癌基因蛋白激酶活化导致肿瘤消失, 再生又被当成研究衰老和肿瘤的材料和研究细胞活动的模型。

## 1 蚯蚓再生研究的历史

### 1.1 再生研究的开始时期

从 19 世纪末到 20 世纪 50~60 年代, 研究方向为再生生物学和生态学研究, 研究材料主要是赤子

收稿日期: 2009-06-25

基金项目: 国家自然科学基金国际合作项目 (96-920-13-03); 中国科学院创新工程前沿领域项目 (KSCX-03-IOZ-4)

作者简介: 肖能文 (1973-), 男, 湖南桃江人, 副研究员, 博士, 研究方向为生态毒理学和土壤动物学, (电话) 13521883001

(电子信箱) xiaonw@craes.org.cn; 通讯作者: 戈峰, 研究员, 博士, 研究方向为昆虫生态学和动物毒理学, (电子信箱) gef@ioz.ac.cn。

爱胜蚓(*Eisenia fetida*), 研究内容主要集中在蚯蚓各体节的再生能力, 温度、湿度等外界条件和化学物质对再生的影响。代表人物有 Moment<sup>[7-9]</sup>, Gates<sup>[10,11]</sup>, Liebmann<sup>[12-14]</sup>和 Jamieson<sup>[15]</sup>等, 主要的观点有: 再生的体节数基本不变, 各个体节的再生能力不同; 外界环境对再生有明显影响; 幼蚓和成蚓再生能力不同。

## 1.2 再生研究的发展阶段

从20世纪50年代到80年代末, 研究主要集中在蚯蚓再生过程超微结构的变化和蚯蚓神经电生理上。代表人物有 Drewes<sup>[3]</sup>, Burke<sup>[16]</sup>, Edward<sup>[17]</sup>等。主要观点有: 再生中芽基来源于表皮细胞的去分化; 化学物质对再生的影响; 蚯蚓脑在再生中有重要的作用。

从20世纪80年代到现在, 对蚯蚓的研究材料主要为爱胜蚓(*E. fetida*)和日本线蚓(*Enchyraeus Japonensis*), 其研究主要集中在再生的分子水平上, 在此期间的代表人物主要有 Myohara 等<sup>[2]</sup>。

## 2 蚯蚓再生的生物学研究

### 2.1 蚯蚓再生过程及超微结构变化

蚯蚓的再生过程主要表现为当蚯蚓被切成两段时, 它断面上的肌肉组织立即形成新的细胞团, 同时白血球聚集在切面上, 形成栓塞, 使伤口迅速闭合。位于体腔中隔里的原生细胞迅速迁移到切面上来与自己溶解的肌肉细胞一起, 在切面上形成结节状的再生芽。与此同时, 体内消化道、神经系统、血管等组织的细胞, 通过大量的有丝分裂, 迅速地再生芽里生长。早期的研究主要集中在蚯蚓再生体节数和各体段的再生能力的差异上。蚯蚓从茧中孵化后包含了所有的体节数。蚯蚓再生过程是切断当天部分即开始愈合, 并形成芽基(Blastema), 接着细胞大量增加, 5~7 d后分化形成明显的头或尾芽(Head or tail bud), 12~16 d各体节明显, 以后各体节在长度和直径上增大, 但体节数目不增加。之后各体节迅速生长, 切断后6~7周, 体节生长基本完成, 再生体节与原来体节难以区分<sup>[18,19]</sup>。

蚯蚓在再生过程中各细胞器将发生显著的变化。齐莉萍等<sup>[20]</sup>用透射电镜观察, 从60/61体节剪切蚯蚓肌肉再生的形态变化, 发现剪切后伤口处的受损细胞呈降解状态并被转移到伤口面的吞噬细胞所吞噬, 伤口处的其他未受损的细胞去分化, 并增殖形成芽基, 芽基细胞再次分化, 成肌细胞合成肌丝, 最终形成肌肉组织<sup>[20]</sup>。Burke<sup>[16]</sup>从蚯蚓头部第8体节切断, 用<sup>3</sup>H标记胸腺嘧啶脱氧核苷, 观察到在剪切后1~3 d, 从表皮细胞受伤部位临近体节迁

移到受伤部位的细胞数目明显增加, 但表皮基细胞和腺细胞不直接参与受伤部位的表皮形成, 3 d后, 体细胞和基细胞的DNA合成率明显下降, 到4~5 d受伤部位表皮标记率急剧上升, 到6~7 d再次下降, 而伤口相邻的2~4体节DNA合成一直保持在受伤后3 d的水平。

### 2.2 各体节的再生能力

蚯蚓各部分的再生能力存在差异。蚯蚓从一定体节切除后, 既能再生头部又能再生尾部。再生尾部时, 赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)再生体节数取决于剩下的身体长度, 从身体前到身体后再生能力逐渐降低<sup>[10,11]</sup>, Moment<sup>[7]</sup>在研究蚯蚓尾部再生时认为, 从50/51切除的蚯蚓比从80/81切除的蚯蚓再生速度快, 尾部切除愈长, 再生速度愈快。白桂芬等<sup>[21]</sup>发现, 蚯蚓可在7~13 d切割的伤口愈合, 然后开始再生; 蚯蚓的切断位置不同, 其再生能力、成活率、成活时间不同, 有头无尾的体段最强, 无头无尾的体段次之, 无头有尾的体段最弱; 各处理组中, 所剩体段越长, 再生能力越强, 成活率越高, 存活时间越长。Liebmann<sup>[12]</sup>认为从头部5节切除, 都能再生头部, 且头部的再生不影响尾部再生。尾部再生从末端到体中部再生能力逐渐增加, 再向前再生能力减弱直到头部不再再生。且后部再生长度明显比头部长。我们的研究表明, 剪切处理后的赤子爱胜蚓体段在10 d左右开始再生, 且从头至尾都有再生能力。但不同体段的蚯蚓再生能力不同, 有头无尾、无头无尾的体段再生速度比无头有尾体段要快, 其中, 无头无尾蚯蚓体段的头部、尾部都可以再生, 但尾部再生的速度显著高于头部, 剪切后所剩蚯蚓体段的多少对蚯蚓存活率有很大影响, 所剩的体节数越多, 蚯蚓体段的存活率越高, 两者呈正相关<sup>[19]</sup>。另外, 赤子爱胜蚓切断的位置不同, 其再生速度不同。其中, 脑部的存在与否, 对再生速度没有显著的影响。但是生殖环存在的处理比切除生殖环的处理再生速度快, 且存活率高<sup>[22]</sup>。Morgan<sup>[23]</sup>在研究海星臂、腔肠动物、甲壳动物、硬骨鱼和其他类群动物再生时发现, 切除部位离头部越远, 再生生长率越小, 称之为“摩尔根再生定律”。

### 2.3 幼蚓和成蚓再生能力的差异

处于生殖阶段的蚯蚓被切断后, 体内营养物质重新分配于再生和生殖过程<sup>[13]</sup>, 导致与幼蚓再生能力不同。性成熟*Eisenia fetida*有明显的生殖环, 生殖能力与幼蚓有较大的差异, 是研究生长与生殖的很好材料。成蚓在再生时生殖环消退并且停止产茧。Liebmann<sup>[12]</sup>认为性成熟状况对蚯蚓再生有影响, 从成蚓25节切除时, 性成熟的蚯蚓不能再生, 1

周内半数死亡,而在生殖环以后 32 节切除,死亡率减小,从生殖环位置愈合后剪切,性成熟对再生的影响愈小。Liebmann<sup>[13,14]</sup>认为头部再生与性成熟和营养无关,蚯蚓再生尾部时再生能力与切除体节数量多少、再生部位的大小和身体位置与再生潜力无关,但尾部再生与性成熟和营养都有关,与体内黄色组织的分布和数量有关。成蚓从不同部位切断后再生和生殖的资源分配策略及相互关系有待进一步了解。

### 3 环境条件和化学物质对蚯蚓再生的影响

蚯蚓是变温动物,体温随着外界环境温度的变化而变化。因此,蚯蚓对环境的依赖一般比恒温动物更为显著,环境温度不仅影响蚯蚓的体温和活动,还影响蚯蚓的新陈代谢、生长发育及繁殖等。另外,土壤的含水量、温度、氧气浓度以及营养等都影响再生速度和再生存活率有影响。Moment<sup>[7,9]</sup>认为温度影响再生速度,25℃条件下再生速度比 20℃和 30℃时都快;氧气浓度对水生蚯蚓有影响,在低浓度时,再生减少,但浓度过高,将导致蚯蚓全部死亡;同时营养水平影响再生速度,饥饿状况下的再生速度比正常营养状况下的再生要慢。我们的前期试验表明,化学试剂处理也对蚯蚓的再生有影响。如柠檬醛对蚯蚓再生有明显影响,但这种作用依不同体段而异,以体段 P7 (从第 7 体节去掉头部的处理)和 P25 作用最显著,而 A25 (从 25 体节去掉尾部的处理)、A90 和 P60 的受柠檬醛影响较小;柠檬醛影响蚯蚓头部再生,而不影响尾部再生;对蚯蚓再生作用的时间为切后 0.5~1.0 d。因此我们认为,柠檬醛干扰蚯蚓再生头部形成而且还影响再生头尾体轴形成。内源视黄酸在蚯蚓头尾轴再生图式形成中有重要作用<sup>[4]</sup>。为了探讨视黄酸对蚯蚓再生的影响,用视黄酸处理了从不同部位剪切的蚯蚓体段,观察其存活率、重量和再生长度的变化。有头无尾的蚯蚓体段存活率受视黄酸影响较小,而无头有尾的处理受视黄酸影响较大;视黄酸处理后 30 d,各处理再生长度和存活率均小于对照组;视黄酸对蚯蚓再生有明显影响,能延迟和干扰再生,影响头部的形成。视黄酸影响蚯蚓再生的作用方式可能是通过干扰前后体轴的形成,从而影响蚯蚓再生图式形成<sup>[5]</sup>。

### 4 再生机理的解释

再生芽基细胞有 3 种来源:干细胞、成神经细胞和去分化再生损伤的部分,像涡虫和水螅,在其

一生中拥有一定数量的干细胞,当受到外界环境的刺激时被激活,这些干细胞可发育成任何一种类型的组织;而像蝶螈、环节动物和斑马鱼等,是通过转化已分化的成熟细胞来进行再生的。

对蚯蚓各部分再生能力的差异有不同的解释。20 世纪中叶主要集中在油细胞控制、体内电压控制和脑控制 3 种理论。Liebmann<sup>[13]</sup>认为再生是由蚯蚓体内的油细胞 (Eleocytic) 的数量控制,性成熟个体体内的油细胞数量不能同时满足再生和生殖时,再生进行而生殖停止;而头部的油细胞有明显的极性,不受性成熟和饥饿的影响,也不影响尾部的再生,尾部油细胞亦有极性,但和头部的再生是相对独立的过程,任何影响油细胞和黄色组织的因素都干扰尾部的再生,性成熟状况和饥饿影响油细胞的聚集而干扰尾部的再生。Moment<sup>[8]</sup>认为蚯蚓再生的长度和再生体节数由体内的电压控制。当越来越多的体节再生在蚯蚓尾部时,蚯蚓的头和尾部的电势差依次增加到最大,电势差作为再生抑制因素,当增加到阈值时,再生停止,体节不再增加。大部分人认为神经系统直接或间接控制着再生。Clark<sup>[24]</sup>认为寡毛纲动物再生需要食道神经节分泌的激素,如果食道神经被切除,再生则受到抑制。蚯蚓尾部的再生需要有完整的脑,脑在尾部再生中起着重要的作用。

#### 4.1 脑在再生中的作用

脑在蚯蚓的再生中起非常重要的作用,Alonso-Bedate<sup>[25]</sup>认为在幼蚓中,有脑存在比去除脑的蚯蚓尾部再生率明显提高,在幼蚓的食道下神经节神经索神经分泌细胞中,能一直分泌刺激因子或再生因子。而在成蚓中,有脑比去除脑的蚯蚓尾部再生存活率明显降低,食道下神经节神经分泌细胞分泌环带索,能一直从食道下神经节或腹神经索释放再生因子。

#### 4.2 分子水平研究各体节的再生能力

不同部位的再生能力差异必需进一步从分子水平学角度进行解释。在脊椎动物和无脊椎动物的再生中,特别是两栖类、鱼类、扁形动物和水螅等,已广泛发现再生过程由某些基因调控,其中同源盒基因 ( $H_{ox}$ ) 广泛存在并表达。例如,*NvHox*、*Hox-4.5*、*Hox-3.6* 和 *Hoxb13* 与 *Hoxc10* 基因仅在蝶螈肢再生的芽基中表达,而正常生长的蝶螈不表达<sup>[26,27]</sup>。无脊椎动物中,在水螅头部形成时 *Cnox-2* 基因表达<sup>[28]</sup>。在扁形动物再生中发现 7 个 *Dthox* 基因表达<sup>[29]</sup>。在棘皮动物神经再生中 *ArHox1* 基因表达<sup>[30]</sup>。Osborne 等<sup>[31]</sup>报道文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 再生中,用视黄酸或者视黄酸拮抗剂处理后,*ParaHox*

基因表达发生改变, 神经系统中 *AmphiGsx* 表达改变, *AmphiXlox* 和 *AmphiCdx* 基因头尾轴向发生改变, 视黄酸能差异地调节文昌鱼 *ParaHox* 基因的表达。在寡毛纲中, 发现 *engrailed*-和 *orthodenticle*-族基因在再生中表达<sup>[32]</sup>。在 *Dugesia tigrina* 中, *Hox* 基因一直在成体内表达, 也许与该物种的再生能力有关<sup>[33]</sup>。但关于 *Eisenia fetida* 再生中基因表达仍不清楚, 但这些发现能给 *E. fetida* 再生分子水平的研究带来某些启示。

#### 参考文献:

- [1] DINSMORE C E. A History of Regeneration Research [D]. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.
- [2] MYOHARA M, YOSHIDA -NORO C, KOBARI F, et al. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: A new material for regeneration study [J]. *Dev Growth Differ*, 2000, 41: 549-555.
- [3] DREWES C D, VINING E P, ZORAN M J. Regeneration of rapid escape reflex pathways in earthworms [J]. *Amer Zool*, 1988, 28: 1077-1089.
- [4] 肖能文, 齐莉萍, 刘向辉, 等. 柠檬醛对赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*) 再生的影响 [J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11 (2): 192-196.
- [5] 肖能文, 戈峰, 刘向辉. 视黄酸对赤子爱胜蚓再生头尾轴形成的影响 [J]. *生态学杂志*, 2005, 24 (8): 913-916.
- [6] KOLATA G. Is tyrosine the key to growth control [J]. *Science*, 1983, 219: 377-378.
- [7] MOMENT G B. The relation of body level, temperature, and nutrition to regeneration growth [J]. *J Morph*, 1943, 73: 108-117.
- [8] MOMENT G B. On the relation between growth in length, the formation of new segments, and electric potential in an Earthworm [J]. *J Exp Zool*, 1949, 112 (1): 1-12.
- [9] MOMENT G B. The relation of body level, temperature and nutrition to regenerative growth [J]. *Physiol Zool*, 1953, 26: 108-117.
- [10] GATES G E. Regeneration in an earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) 1826 I. Anterior regeneration [J]. *Bid Bull*, 1949, 96: 129-139.
- [11] GATES G E. Regeneration in an earthworm *Eisenia foetida* II Posterior regeneration [J]. *Boil Bull*, 1950, 98: 36-45.
- [12] LIEBMAN E. The Coelomocytes of *Lumbricidae* [J]. *J Morph*, 1942, 71 (2): 221-245.
- [13] LIEBMAN E. New light on regeneration of *Eisenia foetida* (sav.) [J]. *J Morph*, 1943, 73: 583-609.
- [14] LIEBMAN E. The correlation between sexual reproduction and regeneration in a series of oligochaeta [J]. *J Exp Zool*, 1946, 91: 373-389.
- [15] JAMIESON B G M. Wound-healing and regeneration [M]. The ultrastructure of the oligochaeta, Academic Press, 1981. 119-147.
- [16] BURKE J M. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta) I histology and <sup>3</sup>H-thymidine radioautography of the epidermis [J]. *J Exp Zool*, 1979, 188: 49-64.
- [17] EDWARDS C A, BOHLEN P J. Biology and ecology of earthworm [D]. Chapman Hall, London, 1996.
- [18] WELCH M F, DREWES C D. Escape reflex development during posterior regeneration in the earthworm, *Eisenia foetida* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1985, 235 (1): 35-44.
- [19] 齐莉萍, 戈峰, 周晓东. 蚯蚓再生能力的研究. [J] *应用与环境生物学报*, 2002, 8 (3): 276-279.
- [20] 齐莉萍, 戈峰, 甘雅玲, 等. 赤子爱胜蚓再生过程中肌细胞超微结构变化的研究 [J]. *动物分类学报*, 2003, 28 (4): 563-567.
- [21] 白桂芬, 赵冰, 祁茹, 等. 常温常压下蚯蚓不同体段的再生实验 [J]. *四川动物*, 2007, 26 (4): 889-891.
- [22] 齐莉萍, 肖能文, 刘向辉, 等. 切断位置对赤子爱胜蚓再生速度的影响 [J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10 (4): 437-441.
- [23] MORGAN T H. Regeneration [D]. New York, Macmillan, 1901. 358-359.
- [24] CLARK R B, CLARK M E. Role of the supra-oesophageal ganglion during the early stages of caudal regeneration in some Errant Polychaetes [J]. *Nature*, 1959, 183: 1834-1835.
- [25] ALONSO-BEDATE M, SEQUEROS E. Suggested regulatory mechanisms for caudal regeneration in *Allolobophora molleri* (Annelida: Oligochaeta) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1985, 81A (2): 225-228.
- [26] WANG K C, HELMS J A, CHANG H Y. Regeneration, repair and remembering identity: The three Rs of Hox gene expression [J]. *Trends in Cell Biology*, 2009, 19 (6): 268-275.
- [27] SIMAN H G, TABIN C J. Analysis of Hox-4.5 and Hox-3.6 expression during newt limb regeneration: Differential regulation of paralogous Hox genes suggest different roles for members of different Hox clusters [J]. *Development*, 1993, 117 (4): 1397-1407.
- [28] SHENK M A, GEE L, STEELE R E, et al. Expression of *Cnox-2*, a HOM/HOX gene, is suppressed during head formation in hydra [J]. *Dev Biol*, 1993, 160 (1): 108-118.
- [29] BAYASCAS J R, CASTILLO E, SALD E. Platyhelminthes have a Hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes [J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 208: 467-473.
- [30] THORNDYKE M C, CHEN W C, BEESLEY P W, et al. Molecular approach to echinoderm regeneration [J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 55 (6): 474-485.
- [31] OSBORNE P W, BENOIT G, LAUDET V, et al. Differential regulation of *ParaHox* genes by retinoic acid in the invertebrate chordate amphioxus (*Branchiostoma floridae*) [J]. *Developmental Biology*, 2009, 327 (1): 252-262.
- [32] BELY A E, WRAY G A. Evolution of regeneration and fission in Annelids: insight from *engrailed*-and *orthodenticle*-class gene expression [J]. *Development*, 2001, 128: 2793-2802.
- [33] BAYASCAS J R, CASTILLO E, MUNOZ-MARMOL A M, et al. Planarian Hox genes: Novel patterns of expression during regeneration [J]. *Development*, 1997, 124: 141-148.

(责任编辑 昌炎新)