

黑疣大壁虎冬季断尾再生过程中的组织变化

刘婷婷^① 江馥利^① 蒙泳成^① 李宏宇^① 王乙淋^① 张念洪^①
覃杨洋^① 黄雅琪^① 黄勇^{①②*}

① 广西中医药大学 南宁 530200; ② 广西壮瑶药重点实验室、壮瑶药协同创新中心, 特色中药民族药广西高校工程
研究中心 南宁 530200

摘要: 解析黑疣大壁虎 (*Gekko reevesii*) 冬季断尾再生过程中细胞和组织形态变化, 有助于了解其断尾再生机制。本研究通过挤压法诱导黑疣大壁虎自截断尾, 分析其断尾后不同时间点 (0 d、0.5 d、1 d、3 d、7 d、10 d、15 d、20 d、30 d、45 d、60 d 和 90 d) 的断尾再生趋势以及影响因素, 利用石蜡切片和冰冻切片分析黑疣大壁虎原尾和断尾再生过程中细胞和组织特征。结果显示, 黑疣大壁虎自截断尾时先由自截位置一侧的皮肤裂开, 然后肌肉抽出, 最后尾椎骨断裂。自截断尾 0 ~ 3 d, 主要特征是尾动脉失血量小, 组织未收缩, 椎骨和脂肪等暴露, 血凝块形成, 围绕伤口部位的外皮塌陷缩小创面。自截断尾 3 ~ 30 d, 主要特征是暴露的脂肪组织、轴向肌肉组织等软组织在自截面收缩, 外皮塌陷, 因缺少肌肉组织使椎间残留物更突出。自截断尾 30 ~ 45 d, 主要特征是渗出物凝块的消失和新形成伤口上皮的暴露, 自截面相对平坦, 椎间突起消失, 生长不明显。45 ~ 90 d, 主要特征是伤口虽已愈合, 大部分黑疣大壁虎断尾后仍没有再生, 但在 60 d 和 90 d 发现各有 2 只黑疣大壁虎的再生尾芽基形成, 平均速度为 0.01 mm/d。温度对断尾前后体重变化幅度无显著性影响 ($B = 0.001$, 95% CI 为 -0.006 ~ 0.004, Wald $\chi^2 = 0.130$, $P = 0.719$)。上述结果表明, 黑疣大壁虎在冬季断尾后基本不再生, 一直处于伤口愈合的阶段, 且愈合速度缓慢。

关键词: 黑疣大壁虎; 断尾再生; 组织特征; 伤口愈合

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2025) 06-859-12

Tissue Characteristics in the Tail Regeneration Process of *Gekko reevesii* During Winter

LIU Ting-Ting^① JIANG Fu-Li^① MENG Yong-Cheng^① LI Hong-Yu^① WANG Yi-Lin^①
ZHANG Nian-Hong^① QIN Yang-Yang^① HUANG Ya-Qi^① HUANG Yong^{①②*}

① Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; ② Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Zhuang and Yao Medicine Collaborative Innovation Center, University Engineering Research Center of Characteristic Traditional Chinese Medicine and

基金项目 广西自然科学基金项目 (No. 2023GXNSFDA026065, 2020GXNSFAA238017), 国家自然科学基金项目 (No. 32460122), 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 202410600032, 202510600012), 广西高校大学生创新创业训练计划项目 (No. S202310600133);

* 通讯作者, E-mail: huangykiz@163.com;

第一作者介绍 刘婷婷, 女, 硕士研究生; 研究方向: 中药 (壮瑶药) 鉴定; E-mail: 1972742323@qq.com。

收稿日期: 2024-07-30, 修回日期: 2025-01-07 DOI: 10.13859/j.cjz.202524173 CSTR: 32109.14.cjz.24173

Ethnomedicine, Guangxi, Nanning 530200, China

Abstract: [Objectives] Studying the changes of cell and tissue morphology in the tail regeneration process of *Gekko reevesii* during winter can help understand the mechanism of tail regeneration in *G. reevesii*. **[Methods]** The squeezing method was employed to induce tail self-amputation of *G. reevesii*, and the tail regeneration trends and influencing factors of *G. reevesii* at different time points (0 d, 0.5 d, 1 d, 3 d, 7 d, 10 d, 15 d, 20 d, 30 d, 45 d, 60 d, and 90 d) after tail self-amputation were analyzed. Then, paraffin and frozen sections were prepared to analyze the characteristics of cells and tissues of the original tail and the regenerating tail in *G. reevesii*, respectively. The generalized linear mix model was adopted to analyze the effects of temperature on weight changes before and after tail regeneration. **[Results]** When *G. reevesii* amputated its tail, the skin on one side of the self-amputation site first cracked, and then the muscles were pulled out. Finally, the tail vertebrae were broken. During days 0 - 3 after tail amputation (Fig. 4), the main characteristics were small blood loss from the tail artery, no tissue contraction, exposure of vertebrae and fat, formation of blood clots, and collapse of the outer skin around the wound site to reduce the wound size. During days 3 - 30 after tail amputation (Fig. 5), the main characteristics were the contraction of exposed soft tissue (e.g. adipose tissue and axial muscle tissue), collapse of the tunica, and greater prominence of the intervertebral remnants due to the lack of muscle tissue. During days 30 - 45 after tail amputation (Fig. 6), the main features were the disappearance of exudate clots and exposure of newly formed wound epithelium, relatively flat self-section, no longer existence of the previously protruding vertebral residue, and not obvious growth. During days 45 - 90 after tail amputation (Fig. 7), although the wound healed, no tail regeneration was observed in most individuals. However, on days 60 and 90, it was found that two individuals formed regenerated tail blastema, with an average regeneration rate of 0.01 mm/d (Fig. 2). Temperature did not affect the weight changes before and after tail amputation ($B = 0.001$, 95% CI -0.006 to 0.004 , Wald $\chi^2 = 0.130$, $P = 0.719$). **[Conclusion]** The above results indicate that after tail amputation of *G. reevesii* in winter, most individuals do not regenerate the tail and only keep wound healing at a low rate.

Key words: *Gekko reevesii*; Tail regeneration; Tissue characteristics; Wound healing

动物界存在广泛的再生现象。再生，即组织和器官损伤或丢失后被新形成的组织和器官替代（Sánchez Alvarado 2000）。如何快速而有效地完成损伤修复，实现多种组织或器官的完美再生是生命科学和医学研究的热点（孟曦男等 2019）。但动物再生的分子细胞调控机制是一个非常复杂的生物学过程，时至今日，人们对这种再生的机制仍知之甚少，这仍需要更多研究（Aztekin et al. 2019）。

断尾再生是蜥蜴类爬行动物中较为常见的一种现象。当蜥蜴在遭遇敌害或受到强烈外界

刺激时会自动断尾，是一种逃避敌害的保护性适应方式（Congdon et al. 1974）。断尾后，经过一段时间就能再生出与原生尾结构类似的尾，如皮肤、肌肉、软骨、神经室管膜和脉管系统等（Fisher et al. 2012）。蜥蜴是唯一保留类似两栖动物美西螈（*Ambystoma mexicanum*）再生能力的羊膜动物，在进化上与人类的亲缘关系比两栖动物更为密切（Jacyniak et al. 2017）。因其具有再生整个结构的能力，因此从发育学研究角度更具吸引力，近年来越来越受到人们关注（Daponte et al. 2021）。

黑疣大壁虎 (*Gekko reevesii*)，隶属爬行纲蜥蜴亚目壁虎科 (Gekkonidae) 壁虎属，是羊膜卵生动物，生活在热带和亚热带地区，主要分布在我国广西、云南、广东和福建等地 (Zhang et al. 2014)。该物种原是大壁虎 *reevesii* 亚种 (*G. gekko reevesii*)，因在形态和分子水平上存在差异，被提升为黑疣大壁虎 (蔡波等 2015)，是中药蛤蚧的基原动物 (国家药典委员会 2020)。由于被大肆捕杀及栖息地被严重破坏，导致国内野生黑疣大壁虎数量缩减，现被列为我国二级重点保护野生动物。

黑疣大壁虎作为蜥蜴类爬行动物，具有较为常见的断尾再生现象，在再生机制的作用下能进行完整的形态再生和功能修复，再生出皮肤、肌肉和骨髓等，并长出新尾 (Congdon et al. 1974)。目前有关黑疣大壁虎断尾再生研究，仅见对其组织形态的报道 (林吕何 1978，毕书增等 1985，陈振昆等 1996)，断尾后仅骨骼不完全再生，其他组织能完全再生，其中皮肤、肌肉、结缔组织，特别是脂肪组织和血管再生力强，神经组织和骨组织再生力则差。与其他蜥蜴不同，壁虎 (包括黑疣大壁虎) 将脊索保留到骨骼成熟期，脊索穿过整个脊柱的中央和椎间盘 (Jacyniak et al. 2017)。黑疣大壁虎断尾后再生速度受温度影响，一般 5~9 月增长速度较快，而冬眠后再生尾增长极其缓慢 (林吕何 1978)。然而，目前对于该物种冬季断尾后的组织和细胞特征变化了解甚少。黑疣大壁虎是壁虎属中体形最大的动物，尾比较长 (11~14 cm)，便于断尾操作，可以通过捏或挤压尾断尾，无需手术截肢即可观察再生过程，对身体其余部分影响最小。因此，对其进行断尾再生研究，有助于进一步了解动物再生的进化适应意义。本研究采用挤压法对黑疣大壁虎进行断尾，利用组织切片与显色技术，对其原尾与再生尾进行石蜡切片与冷冻切片，并通过 H.E 染色和免疫组织化学染色，研究其在冬季断尾再生过程中组织特征和结构变化，为了解黑疣大壁虎的断尾再生分子细胞调控机制提供形态学参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物饲养及样品采集

黑疣大壁虎实验个体由养殖公司提供。本研究通过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审查 (DW20240603-163)，采用非损伤采样方法采集实验样品。

选取健康且未断尾的 36 只黑疣大壁虎，饲养在独立的养殖室。随机选取个体，运用挤压法在距离泄殖腔约 2 cm 处施加压力，诱导其自截断尾，断尾后放回原养殖室，定时观察与测量，记录其尾再生过程。本研究在冬季 (2023 年 12 月 10 日至 2024 年 3 月 12 日) 进行，黑疣大壁虎一般处于冬眠期，因此，在饲养过程中一般不投喂或少喂食物，养殖室需要保持门窗关闭状态。

1.2 原尾取材

将自截断尾后的原尾样品 (0 h，对照组)，放在 4% 多聚甲醛固定液 (北京兰杰柯科技有限公司) 中 1~3 d，固定后转移到 EDTA 脱钙液 (武汉博士德生物工程有限公司) 中 3 d，每隔 1 d 更换新鲜的 EDTA 脱钙液。将处理后的原尾样品分别进行石蜡切片和冰冻切片，并分别进行相应的染色处理，以便观察原尾的组织 and 细胞特征。

1.3 再生尾取材

自截断尾后，分别在 0.5 d、1 d、3 d、7 d、10 d、15 d、20 d、30 d、45 d、60 d 和 90 d 进行第二次断尾，将所得再生尾样品分别放在 4% 多聚甲醛固定液中 1~3 d，然后进行石蜡切片和冰冻切片，以及相应染色处理，观察再生尾样品的组织和细胞特征。

1.4 切片和染色

石蜡切片 将原尾和不同时间点的共 12 只再生尾样品分别依次于 70% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇、100% 乙醇各脱水 1 h，然后在二甲苯中透明 3 次 (1 h/次)，后浸蜡 3 次 (1 h/次)，浸蜡温度约为 60 °C，石蜡包埋，置于冷却台中冷却脱模，在石蜡切片机 (RM2235，德国徕卡) 切片，切片厚度为 10 μm，转移到展片仪

(H11210, 德国徕卡) 中充分展片, 展片温度为 45 °C, 使用载玻片捞片, 让切片充分粘在载玻片上, 烘片, 备用。

H.E 染色 将烘片后的石蜡切片脱蜡至水, 依次使用苏木精染色 5 min、1%氨水溶液返蓝 1~6 s、1%盐酸乙醇分色液 1~3 s、伊红染色 1~10 s, 染色完成后依次使用 70%、80%、90%和 100%的乙醇脱水, 然后使用二甲苯透明, 中性树胶封片, 烘干, 备用。

冰冻切片 将固定完成的原尾和不同时间点的再生尾样品转移到现配的 15%蔗糖溶液中脱水至完全沉底, 再置于现配的 30%蔗糖溶液中脱水至完全沉底, 然后取出, 在冰冻切片机 (M1520, 德国徕卡) 中使用 OCT 包埋剂 (德国徕卡) 包埋后连续切片, 切片厚度为 25 μm , 粘片, -20 °C保存, 备用。

Masson's 三色染色 选完好无破损的冰冻切片, 使用苏木精染色 5 min, 然后流水冲洗 1 min, 盐酸-酒精分色液分色 1~3 s 后蒸馏水冲洗 1 min, 1%氨水溶液返蓝 1~6 s 后蒸馏水冲洗 1 min, 后使用丽春红-酸性品红染色液染色 10 s, 使用 10%磷钼酸染色 10 min, 接着用 0.2%醋酸处理 30 s, 0.04%亮绿染色 1~2 min, 0.2%醋酸处理 30 s, 95%乙醇分色 20 s, 最后无水乙醇脱水, 使用二甲苯透明, 中性树胶封片, 烘干, 备用。

免疫组织化学染色 使用一抗为兔抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), 稀释比例 1:200, 二抗为生物素标记羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司)。挑取冰冻切片的中间切片, 在室温下用 4%多聚甲醛固定 30 min, 使用 PBS 缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司) 浸洗 3 次 (5 min/次), 然后滴加 3%过氧化氢 [重庆川东化工 (集团) 有限公司] 遮光处理 20 min, PBS 缓冲液浸洗 3 次 (5 min/次), 室温下滴加 5%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭液处理 30 min, 甩去水珠, 使用一抗, 于 4 °C冰箱中孵育过夜,

孵育完成后使用 PBS 缓冲液浸洗 3 次 (5 min/次), 然后使用二抗于 37 °C烘箱中孵育 4 h, 接着 PBS 缓冲液浸洗 3 次 (5 min/次), 使用即用型抗生物素蛋白-生物素复合物法 (strept avidin-biotin complex, SABC) (小鼠/兔 IgG) 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司) 于 37 °C烘箱中孵育 30 min, 然后 PBS 缓冲液浸洗 3 次 (5 min/次), 最后使用二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) (武汉博士德生物工程有限公司) 在显微镜下观察到显色后, 使用水溶性封片剂封片, 备用。阴性对照组使用 PBS 缓冲液代替一抗, 操作步骤同上。

1.5 数据统计及分析

分别将自截断尾后 0 d、0.5 d、1 d、3 d、7 d、10 d、15 d、20 d、30 d、45 d、60 d 和 90 d 的再生尾进行观察和拍照, 使用数显游标卡尺 (德力西电气有限公司, 量程 0~150 mm, 精度 0.01 mm) 测量其长度并记录, 每个时间点重复 3 次, 然后计算尾再生平均速度。同时, 记录其生活环境的温度和断尾再生期间的体重变化, 分析温度对断尾再生的影响。每天温度采用温湿度记录仪 (BlueTag TH20, 郑州鲜境电子有限公司) 隔 10 min 自动记录。使用显微镜分别观察 H.E 染色的原尾和再生尾石蜡切片以及 Masson's 三色染色以及免疫组织化学染色的不同时间点再生尾冰冻切片, 并拍照。

利用广义线性模型 (generalized linear models) 分析温度对断尾再生前后体重变化的影响, 以断尾再生前后体重变化幅度为因变量, 温度作为自变量。体重变化幅度数据经检验, 符合正态分布 (Shapiro-Wilk, $P = 0.415$)。统计分析利用 SPSS 22.0 软件完成, 显著性水平设为 0.05。

2 结果

2.1 断尾再生过程

对黑疣大壁虎断尾后的生长过程进行连续观察, 从外观上看, 断尾经历了伤口愈合、间充质椎形成和芽基形成的过程 (图 1)。

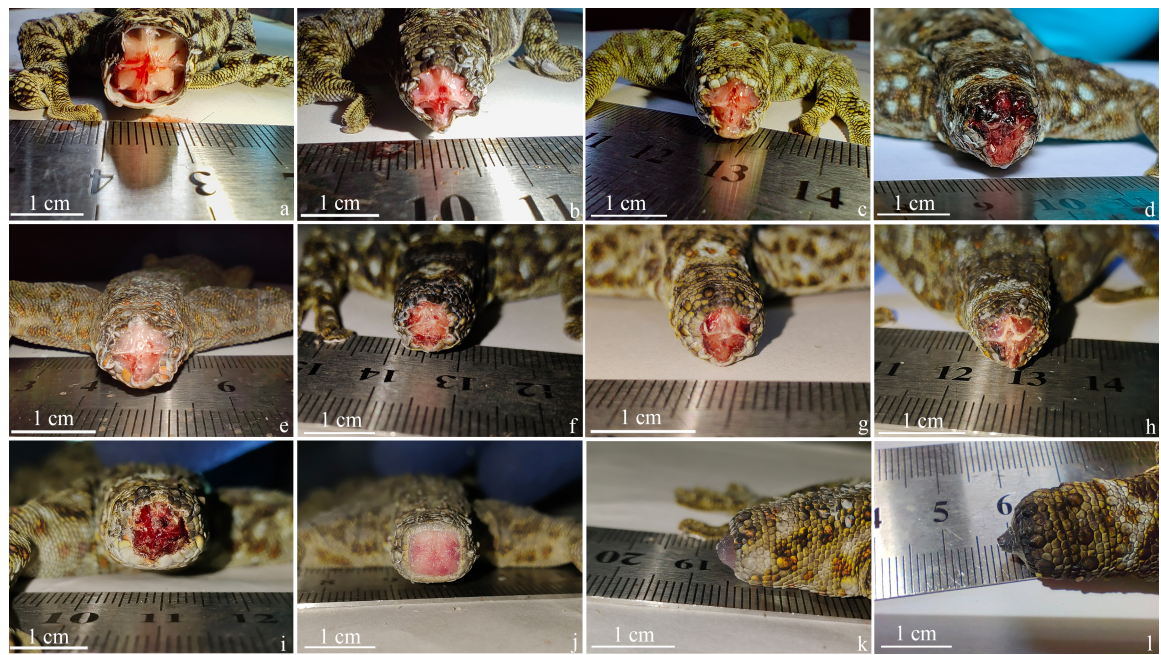


图 1 黑疣大壁虎冬季断尾后解剖特征

Fig. 1 Anatomical structure of *Gekko reevesii* after tail amputation in winter

a. 对照; b. 断尾后 0.5 d; c. 断尾后 1 d; d. 断尾后 3 d; e. 断尾后 7 d; f. 断尾后 10 d; g. 断尾后 15 d; h. 断尾后 20 d; i. 断尾后 30 d; j. 断尾后 45 d; k. 断尾后 60 d; l. 断尾后 90 d.

a. Control; b. Half day after tail amputation; c. One day after tail amputation; d. Three days after tail amputation; e. Seven days after tail amputation; f. Ten days after tail amputation; g. Fifteen days after tail amputation; h. Twenty days after tail amputation; i. Thirty days after tail amputation; j. Forty-five days after tail amputation; k. Sixty days after tail amputation; l. Ninety days after tail amputation.

2.2 断尾再生平均速度

将不同时间点的尾再生长度与再生时间作图并计算回归直线方程（图 2），黑疣大壁虎尾再生的平均速度为 0.01 mm/d，其中 0~60 d 的尾再生平均速度为 0 mm/d，60~90 d 尾再生平均速度缓慢增加。

2.3 原尾组织和细胞特征

黑疣大壁虎原尾形似长鞭，基部往后逐渐变细，尾长约占总体长度 47%，皮肤粗糙，大量不规则的粒状细鳞排列成环状，背侧面和两侧分布有一排大而凸起的颗粒状疣粒，尾部背侧面呈褐色并有 5~7 个灰白色环纹，腹侧面白色而有粉红色斑点（图 3a，b）。

尾横切面为不规则圆形或卵圆形，由表及里主要为皮肤、肌肉组织、脂肪组织和椎骨。由神经棘、神经弓和结缔组织隔膜将尾分成四

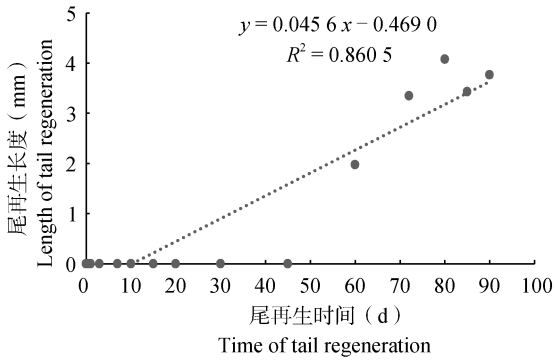


图 2 黑疣大壁虎冬季自截断尾后尾再生的平均生长长度

Fig. 2 Average growth length of the tail of *Gekko reevesii* during the regeneration process in winter

个部分，各部分的脂肪、结缔组织和肌肉等软组织的分布不均匀（图 3c）。肌肉组织为 8 条

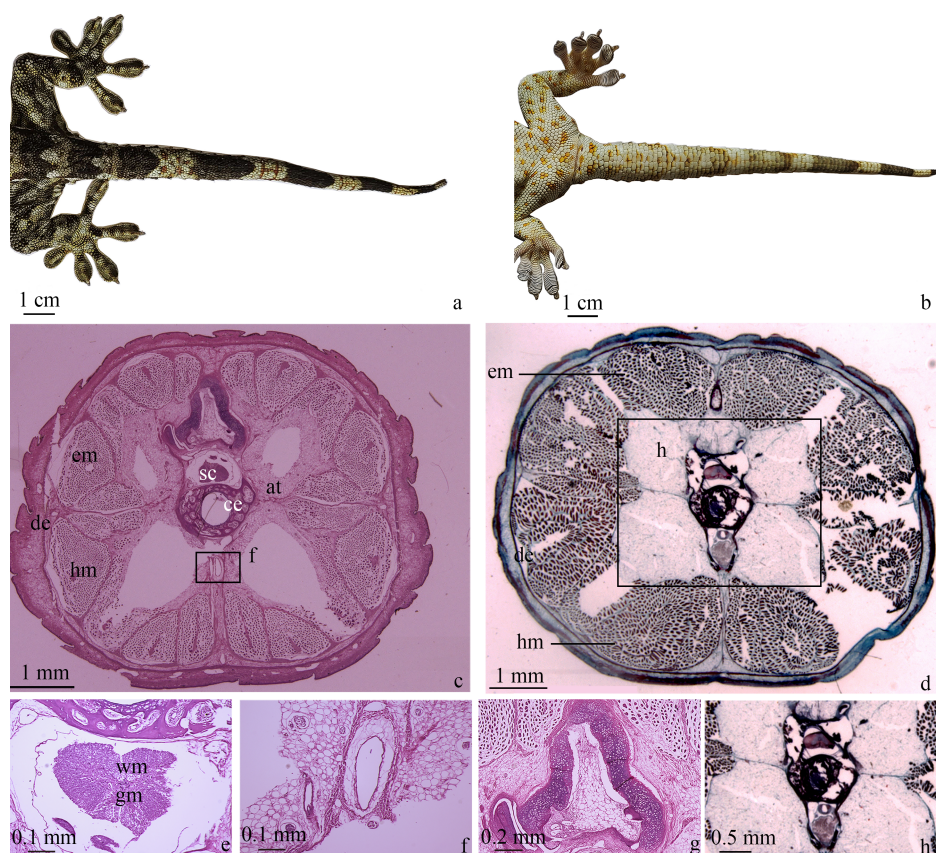


图3 黑疣大壁虎原尾组织特征

Fig. 3 Histological characteristics of the original tail in *Gekko reevesii*

a. 原尾背部; b. 原尾腹部; c. 原尾横切面, H.E 染色; d. 原尾横切面, Masson's 三色染色; e. 棘突, H.E 染色; f. 尾动脉, 图 c 方框的放大图, H.E 染色; g. 尾脊髓, H.E 染色; h. 图 d 方框的放大图, Masson's 三色染色。at. 脂肪组织; ce. 中心椎体; de. 真皮; em. 轴上肌; gm. 灰质; hm. 轴下肌; sc. 脊髓; wm. 白质

a. Dorsal view of the original tail; b. Ventral view of the original tail; c. Transverse section of the original tail with H.E staining; d. Transverse section of the original tail with Masson's trichrome staining; e. Spinous process with H.E staining; f. Tail artery, enlarged view of the box in panel c with H.E staining; g. Spinal cord of the original tail with H.E staining; h. Enlarged view of the box in panel d with Masson's trichrome staining. at. Adipose tissue; ce. Central vertebra; de. Dermis; em. Epaxial musculature; gm. Grey matter; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord; wm. White matter

规则的肌肉束, 从横截面上看被分成四个部分, 围绕着脂肪组织, 脂肪组织包围住最深处的椎骨。脂肪组织内, 许多小血管和神经穿插其中。

原尾骨骼系统含有脊髓、中心椎体和棘突。脊髓由灰质和白质组成, 中心椎体具有可穿过脊索的通道, 尾动脉被包围在中心椎体的神经弓中, 是尾部最大的动脉血管。尾静脉血管壁较薄, 管径大。皮肤分为表皮和真皮, 最外一

层为细鳞包着表皮, 其下是真皮和增厚的真皮, 包含脂肪组织和结缔组织 (图3)。

2.4 断尾再生的组织和细胞特征

2.4.1 断尾后 0 ~ 3 d 的组织学特征

黑疣大壁虎自截断尾时, 先由一侧皮肤裂开, 舌状肌肉束抽出, 最后椎骨断裂, 断后掉下的尾剧烈的扭动, 机体自截面为开放性伤口, 可见暴露的脂肪组织、肌肉组织、椎骨和真皮等, 流出组织液和少量血液 (图4)。断尾皮下有舌状突

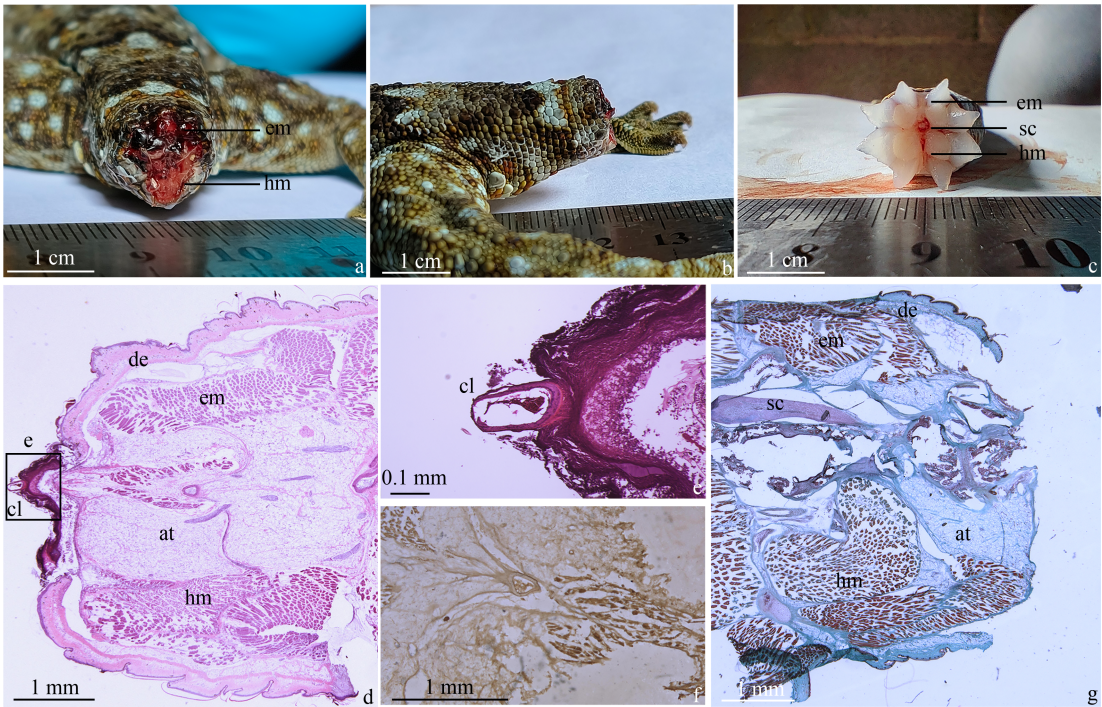


图 4 黑疣大壁虎尾再生阶段（0~3 d）

Fig. 4 Stage (0 - 3 d) of tail regeneration in *Gekko reevesii*

a. 尾自截面的形态图；b. 尾自截面的侧面图；c. 尾自截面前视图；d. 尾纵切面，H.E 染色；e. 尾自截面的伤口凝块，图 d 方框的放大图，H.E 染色；f. 尾纵切面，免疫组织化学染色；g. 尾纵切面，Masson's 三色染色。at. 脂肪组织；cl. 伤口血凝块；de. 真皮；em. 轴上肌；hm. 轴下肌；sc. 脊髓

a. Morphology of self-amputated tail; b. Lateral view of self-amputated tail; c. Front view of self-amputated tail; d. Longitudinal section of self-amputated tail with H.E staining; e. Wound clot, enlarged view of the box in panel d with H.E staining; f. Longitudinal section of self-amputated tail with immunohistochemical staining; g. Longitudinal section of self-amputated tail with Masson's trichrome staining. at. Adipose tissue; cl. Wound blood clot; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord

起的肌肉束，造成自截面脂肪组织周围的肌肉凹陷，这些凹陷随着外皮塌陷而消失。椎骨从自截面突出，在自截面附近脊髓开始碎裂。该阶段血凝块覆盖创面，靠近自截面因肌肉组织缺失导致外皮逐渐塌陷，并使伤口缩小，原先的肌肉组织与脂肪组织交错排列，免疫组化染色结果显示，无与自截面相关的 PCNA 阳性细胞。

2.4.2 断尾后 3 ~ 30 d 的组织学特征 该阶段表现为自截面软组织的收缩，外皮进一步包裹因失去肌肉组织而造成的塌陷，使得椎间残留物突起更加明显，伤口逐渐结痂并形成完全覆盖伤口的凝块，凝块主要由组织液、红细胞、

死细胞和残留的组织等组成。自截面边缘脊髓继续撕裂，并逐渐回缩到神经管中（图 5）。免疫组化染色结果显示，无与自截面相关的 PCNA 阳性细胞。

2.4.3 断尾后 30 ~ 45 d 的组织学特征 该阶段伤口凝块逐渐消失，新形成的再生上皮暴露（图 6），此阶段的生长中自截面相对平坦，椎间突起消失，伤口部位脊髓、脂肪组织、肌肉组织等保持水平一致。该阶段早期血管在伤口视图中肉眼可见，随着时间的推移，伤口上皮加厚，颜色逐渐加深，血管和椎骨逐渐不能以肉眼看见，伤口上皮化逐渐完成，伤口上皮封闭伤口，伤口上皮化过程中自截面脆弱，特别

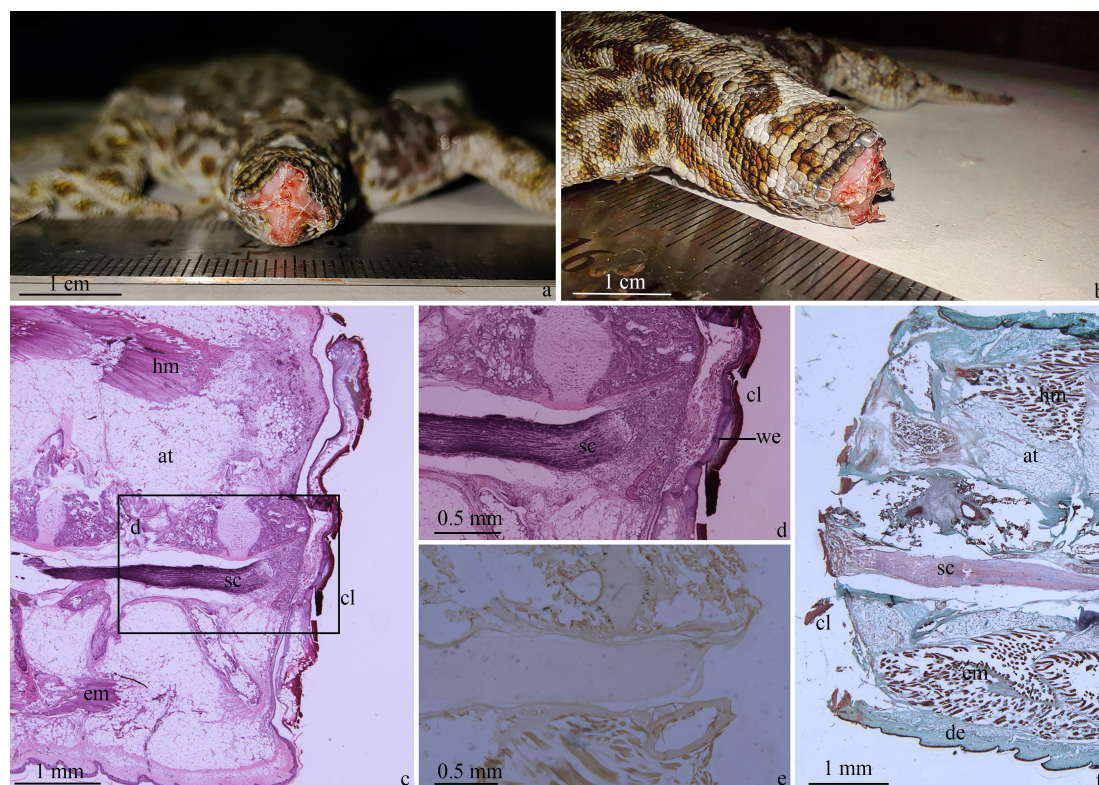


图5 黑疣大壁虎尾再生阶段(3~30 d)

Fig. 5 Stage (3 - 30 d) of tail regeneration in *Gekko reevesii*

a. 尾自截面的形态图; b. 尾自截面侧视图; c. 尾再生过程的纵切面, H.E 染色; d. 图 c 中方框的放大图, H.E 染色; e. 图 c 中方框的放大图, 免疫组织化学染色; f. 尾再生过程的纵切面, Masson's 三色染色。at. 脂肪组织; cl. 伤口血凝块; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; sc. 脊髓; we. 伤口上皮

a. Morphology of the regenerating tail; b. Lateral view of the regenerating tail; c. Longitudinal section of the regenerating tail with H.E staining; d. An enlarged view of the box in panel c with H.E staining; e. An enlarged view of the box in panel c with immunohistochemical staining; f. Longitudinal section of the regenerating tail with Masson's trichrome staining. at. Adipose tissue; cl. Wound blood clot; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord; we. Wound epithelium

是中间椎骨部分极易损伤出血。伤口上皮逐渐浸润皮肤下层, 开始填补因失去肌肉组织而形成的塌陷, 表皮下生长逐渐开始, 连续切片未发现芽基形成。断尾后 45 d 的纵切面显示, 肌肉组织填补了自截后的空隙, 原始表皮覆盖了伤口组织, 伤口凝块已经消失, 伤口暴露面积减少, 新增的表皮组织变得更为明显。在此阶段早期, 伤口上皮中的血管在尾视图中清晰可见。免疫组化染色结果显示, 无与自截面相关的 PCNA 阳性细胞。

2.4.4 断尾后 45 ~ 90 d 的组织学特征 该阶段, 大部分黑疣大壁虎仍未出现再生尾, 但在 60 d 后有个别黑疣大壁虎再生尾出现, 芽基生长(图 7), 新长的再生尾为粉色, 呈拱状从椎骨凸出, 直径小于原尾直径, 随着时间的推移颜色逐渐加深变为黑色, 表皮尚未鳞化, 与原尾鳞状皮肤对比明显。该阶段伤口上皮明显分层且逐渐加厚, 直接连接其下的芽基, 表皮下生长显著, 但未形成真皮, 再生部分主要由毛细血管和芽基细胞组成。原神经系统和肌肉

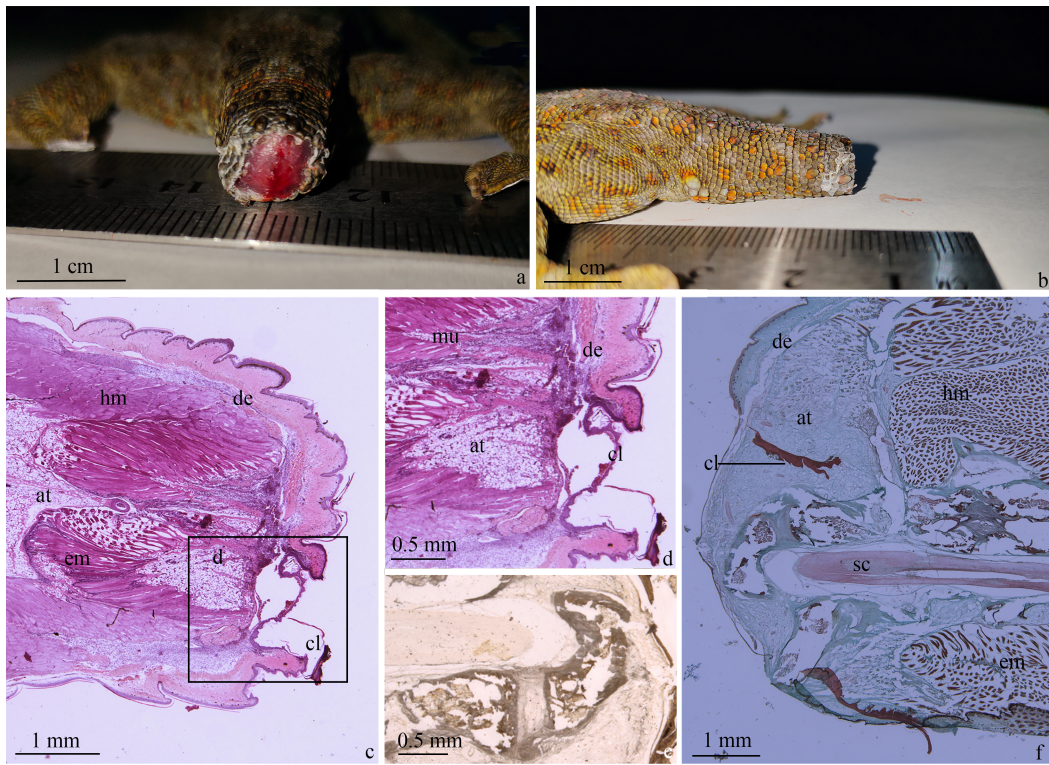


图 6 黑疣大壁虎尾再生阶段（30 ~ 45 d）

Fig. 6 Stage (30 - 45 d) of tail regeneration in *Gekko reevesii*

a. 尾自截面的形态图；b. 尾自截面的侧视图；c. 尾纵切面，H.E 染色；d. 图 c 中方框放大图，H.E 染色；e. 图 c 中方框的放大图，免疫组织化学染色；f. 尾纵切面，Masson's 三色染色。at. 脂肪组织；cl. 伤口血凝块；de. 真皮；em. 轴上肌；hm. 轴下肌；mu. 肌肉；sc. 脊髓

a. Morphology of the regenerating tail; b. Lateral view of the regenerating tail; c. Longitudinal section of the regenerating tail with H.E staining; d. An enlarged view of the box in panel c with H.E staining; e. An enlarged view of the box in panel c with immunohistochemical staining; f. Longitudinal section of the regenerating tail with Masson's trichrome staining. at. Adipose tissue; cl. Wound blood clot; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; mu. Muscle; sc. Spinal cord

组织开始分化，成肌细胞聚集在芽基近端，呈近至远端的梯度分化。

2.5 温度和体重变化

实验期间环境平均温度为 $(16.7 \pm 5.0) ^\circ\text{C}$ ，最高为 $26.9 ^\circ\text{C}$ ，最低为 $8.3 ^\circ\text{C}$ ，极差为 $18.6 ^\circ\text{C}$ 。黑疣大壁虎在断尾后，大部分个体的体重在下降，断尾前后体重下降变化为 $0.07\% \sim 23.3\%$ （图 8）。广义线性模型的结果表明，温度对断尾前后体重变化幅度无显著的影响（ $B = 0.001$ ，95% CI 为 $-0.006 \sim 0.004$ ，Wald $\chi^2 = 0.130$ ， $P = 0.719$ ）。

3 讨论

3.1 黑疣大壁虎在冬季断尾后基本不再生

断尾再生过程一般包括伤口愈合、再生芽基形成、芽基生长和再生尾分化四个阶段（吾玛尔·阿布力孜 2000）。其中，断尾伤口愈合后芽基的形成是断尾再生的主要标志。本研究结果表明，除 4 只个体外，余下 32 只黑疣大壁虎在冬季断尾后，再生过程以伤口愈合为主，外部形态上没有再生芽基形成。断尾后的 H.E 染色和免疫组织化学染色的结果均表明，黑疣大

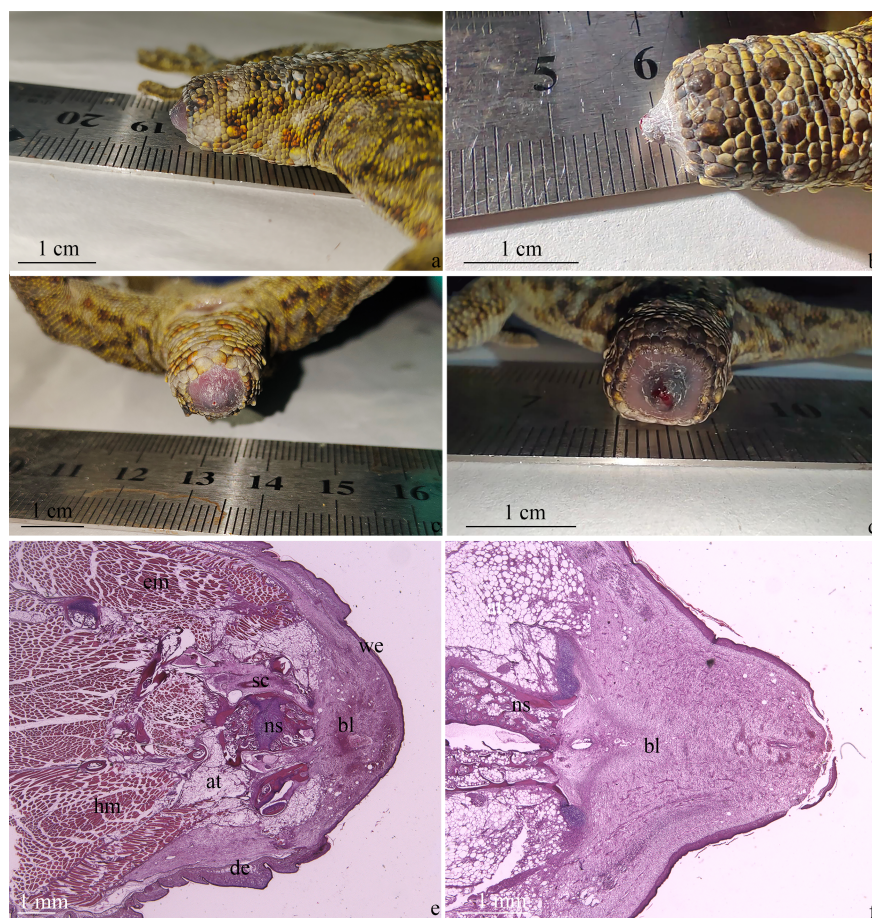


图 7 黑疣大壁虎尾再生阶段 (45 ~ 90 d)

Fig. 7 Stage (45 - 90 d) of tail regeneration in *Gekko reevesii*

a. 尾自截面 60 d 侧视图; b. 尾自截面 60 d 形态图; c. 尾自截面 90 d 侧视图; d. 尾自截面 90 d 形态图; e. 60 d 尾纵切面, H.E 染色; f. 90 d 尾纵切面, H.E 染色。at. 脂肪组织; bl. 芽基; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; ns. 神经棘; sc. 脊髓; we. 伤口上皮

a. Lateral view of the regenerating tail on day 60; b. Morphology of the regenerating tail on day 60; c. Lateral view of the regenerating tail on day 90; d. Morphology of the regenerating tail on day 90; e. Longitudinal section of the regenerating tail with H.E staining on day 60; f. Longitudinal section of the regenerating tail with H.E staining on day 90. at. Adipose tissue; bl. Blastema; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; ns. Neural spine; sc. Spinal cord; we. Wound epithelium

壁虎冬季断尾后, 再生芽基的细胞或组织也没有形成。

黑疣大壁虎自截断尾的主要形态基础是尾椎的椎体中央有横生未钙化的软骨盘(带)或称为断层, 容易断折, 其原因是尾前端(尾基部后 2 cm 左右)的尾基部尤其背部皮肤最薄(毕书增等 1985), 其次该位置的皮肤、尾椎、尾肌刚好能形成了“断面”, 往前(靠近泄殖腔)位置的尾椎形态已发生了改变, 形成了钙

化, 即使断尾, 也难以再生。往后(靠近尾尖)位置的尾椎能各自形成了若干“断面”, 任一位置断尾, 都可以再生。

黑疣大壁虎在挤压断尾后, 各种组织的开放性伤口, 如肌肉、脂肪组织、脊髓、椎骨等在自截面暴露。尾在与机体分离后, 因脊髓受刺激或断裂的反应, 尾肌强烈收缩导致原生尾的断下尾部仍能做弹跳或猛烈扭动 1 ~ 4 min。断尾时有 8 条肌束纵贯在尾椎

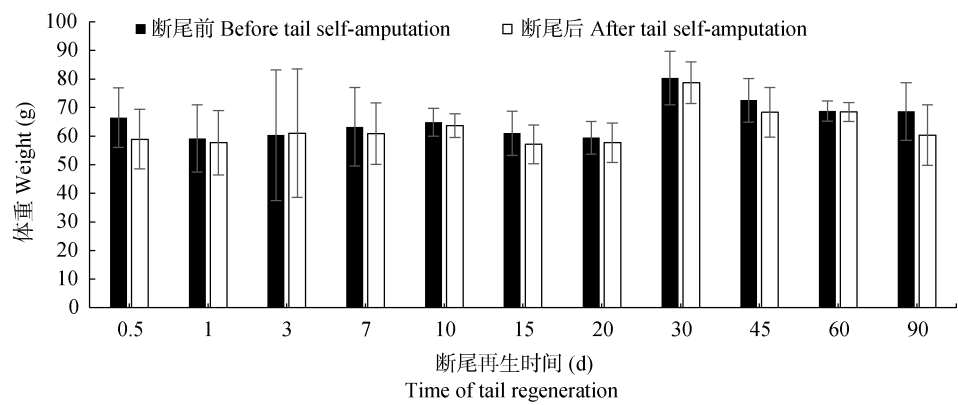


图 8 黑疣大壁虎断尾前后的体重变化（平均值 ± 标准差）

Fig. 8 Body weight changes of *Gekko reevesii* before and after tail amputation (Mean ± SD)

骨肌肉周围，然后从前节肌肉内抽出，这些突出的肌肉，与原尾自截面中的凹陷相对应。其次，在原尾自截面，神经组织（如中枢、神经弓、神经棘等）暴露并突出，脊髓在断裂后回缩到神经管中，并且可以观察到有少量血液从自截面或者断裂的尾动脉流出，之后血液开始凝块并堵塞原尾自截面。最后原尾自截面的凹陷随着血液凝块和外表皮在伤口部位周围塌陷而迅速消失，紧包住伤口并形成新的覆盖物，导致了椎间残留物更突出，逐渐开始了伤口愈合。

3.2 黑疣大壁虎冬季断尾再生的影响因素

通过对黑疣大壁虎在冬季断尾再生过程进行测量和研究，发现其在冬季断尾后尾再生速度基本为 0 mm/d，即没有再生尾长出，也不形成再生芽基。这可能是跟冬季的温度以及不摄食有关。一般来说，蜥蜴尾再生的生长速度受多种因素影响，与温度、营养等外界因素密切相关，温度高、营养丰富的蜥蜴尾再生的生长速度相对较快（董丙君 2009）。反之，则生长速度较慢或者不增长。每年 11 月至翌年 3 月底，气温低于 18 °C 时，黑疣大壁虎进入冬眠期，此时少进食或者不进食，活动量明显减少（张月云 2012）。本研究中，黑疣大壁虎在冬季是室内密封养殖，在实验期间，养殖室内的平均温度是 16.7 °C（7.5 ~ 26.9 °C），平均相对湿度 83.2%（46.5% ~ 97.0%）。可见，黑疣大壁虎大

部分时间处于冬眠状态。尾部作为蜥蜴类的主要贮能部位之一，影响其觅食、越冬等活动（Bateman et al. 2009）。断尾后不仅切断了尾部对生殖器官的能量供应，反而需要身体其他部位的能量供给断尾再生。断尾后 0.5 d 内，黑疣大壁虎的体重平均下降了 7.5 g，平均降幅达 11.6%。本研究未发现温度对黑疣大壁虎断尾前后体重变化有显著性影响，这可能是由于黑疣大壁虎在冬季的低温区间内靠消耗冬眠前体内贮存的能量维持生命，为了保证冬眠期间的生存，其减少了自身能量的消耗，很多生理特征指标，如体温、代谢水平、心率和呼吸频率等大幅度降低，像断尾再生这种高耗能的修复过程可能会被强烈抑制或推迟，从而减缓了尾再生速度，甚至不再生。因此，无论温度如何小幅波动，再生的进程和相关的体重变化都可能处于一个几乎“停滞”的状态。林吕何（1978）曾报道，在寒冷季节只要增高温度，达到 25 °C 左右，并供给饲料，黑疣大壁虎断尾后仍能增长。温度可能仍是影响黑疣大壁虎冬季断尾再生的重要因素之一。

3.3 黑疣大壁虎冬季断尾再生存在个体差异

黑疣大壁虎在冬季断尾再生过程与其他蜥蜴类爬行动物再生过程类似，如无蹼壁虎（*G. swinhonis*）在冬季断尾后只结痂封闭伤口，不能形成再生芽基，只保持愈合时的形态（陈绍军 1995）。崇安地蜥（*Platyplacopus sylvaticus*）

在冬眠期间断尾后一直未看到结痂现象,即没有形成再生芽基(唐鑫生等 2005)。黑疣大壁虎在冬季断尾 60 d 和 90 d 后分别有 2 只个体长出芽基,即处于再生芽基形成阶段。断尾 60 d 再生出芽基长度分别为 2.07 mm 和 3.85 mm、90 d 再生出芽基长度分别为 3.83 mm 和 3.14 mm。再生尾的增长可能与个体有直接关系。本研究中,断尾 60 d 后长出芽基的黑疣大壁虎断尾前体重 73.83 g, 60 d 后体重为 72.84 g,可见,在冬季其体重基本没有变化或减轻情况下,此个体在低温下仍然能靠体内营养供给再生长出尾。虽然后续生长比较缓慢,但在 H.E 染色可以看到,芽基细胞已经在形成,并开始分化。另外 2 只黑疣大壁虎虽然断尾 60 d 后相比断尾前体重减轻幅度不大(分别 3%和 8%),但没有长出芽基。2 只个体于 90 d 后长出了芽基,此时已经是第二年的 3 月份,可能是温度上升影响。可见,黑疣大壁虎冬季断尾再生存在个体差异,然而这种差异机制仍不清楚。

综上所述,除极个别个体外,黑疣大壁虎在冬季断尾后不再再生,一直处于伤口愈合的阶段,即尾部伤口表面被血凝块覆盖,血凝块封闭了残端的椎骨和肌肉,结痂封闭伤口,截面没有形成再生芽基或组织,只保持愈合的形态。影响黑疣大壁虎冬季断尾不再生的因素和机制尚不明确,温度可能是重要影响因素之一。

参 考 文 献

- Aztekin C, Hiscock T W, Marioni J C, et al. 2019. Identification of a regeneration-organizing cell in the *Xenopus* tail. *Science*, 364(6441): 653–658.
- Bateman P W, Fleming P A. 2009. To cut a long tail short: a review of lizard caudal autotomy studies carried out over the last 20 years. *Journal of Zoology*, 277(1): 1–14.
- Congdon J D, Vitt L J, King W W. 1974. Geckos: adaptive significance and energetics of tail autotomy. *Science*, 184(4144): 1379–1380.
- Daponte V, Tylzanowski P, Forlino A. 2021. Appendage regeneration in vertebrates: what makes this possible? *Cells*, 10(2): 242.
- Fisher R E, Geiger L A, Stroik L K, et al. 2012. A histological comparison of the original and regenerated tail in the green anole, *Anolis carolinensis*. *Anatomical Record*, 295(10): 1609–1619.
- Jacyniak K, McDonald R P, Vickaryous M K. 2017. Tail regeneration and other phenomena of wound healing and tissue restoration in lizards. *The Journal of Experimental Biology*, 220(16): 2858–2869.
- Sánchez Alvarado A. 2000. Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays*, 22(6): 578–590.
- Zhang Y Y, Chen C T, Li L, et al. 2014. Insights from ecological niche modeling on the taxonomic distinction and niche differentiation between the black-spotted and red-spotted tokay geckoes (*Gekko gecko*). *Ecology and Evolution*, 4(17): 3383–3394.
- 毕书增, 沈琰, 尹通保, 等. 1985. 蛤蚧原生尾和再生尾解剖学、组织学和组织化学的比较研究. *中药材*, 8(1): 7–11.
- 蔡波, 王跃招, 陈跃英, 等. 2015. 中国爬行纲动物分类厘定. *生物多样性*, 23(3): 365–382.
- 陈绍军. 1995. 无蹼壁虎耐性与断尾再生试验. *中药材*, 18(3): 117–118.
- 陈振昆, 丁光. 1996. 大壁虎尾部及断尾的解剖学研究. *云南农业大学学报*, 11(2): 68–71.
- 董丙君. 2009. 蜥蜴断尾及再生研究. *生物学通报*, 44(1): 24–25.
- 国家药典委员会. 2020. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版, 85–86.
- 林吕何. 1978. 蛤蚧的尾及其再生研究. *动物学杂志*, 13(2): 24–27.
- 孟曦男, 许静秀, 徐素宏. 2019. 组织器官损伤修复和再生研究进展. *中国细胞生物学学报*, 41(9): 1680–1689.
- 唐鑫生, 王洁平. 2005. 崇安地蜥断尾再生与产卵行为初报. *四川动物*, 24(3): 366–369.
- 吾玛尔·阿布力孜. 2000. 快步麻蜥断尾及其再生的实验研究. *干旱区研究*, 17(2): 61–64.
- 张月云, 李晓玲, 黄勇, 等. 2012. 蛤蚧人工养殖技术研究进展. *中药材*, 35(8): 1350–1354.