

## 禁食对大鳞副泥鳅形态学及各型白细胞百分比的影响

张志强, 张琼文, 孙思琪, 王淑荷, 王嘉丰, 张云龙

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 为探究大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 对饥饿胁迫的响应, 测定了自由取食组、禁食 3 d 组、7 d、21 d 和 28 d 组其体重与体长的比值 (重长比)、比肝重和比脾重指数、各型白细胞的百分比及嗜中性粒细胞与淋巴细胞 (N/L) 的比值的变化。重长比随饥饿时间延长呈下降趋势, 但组间差异不显著 ( $P>0.05$ ); 比脾重无组间差异 ( $P>0.05$ ), 比肝重在禁食 21 d 后显著下降 ( $P<0.05$ )。单核细胞的百分比自由取食组显著高于禁食 21 d 组 ( $P<0.05$ ); 嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比自由取食组与其他组间均无显著差异, 但嗜中性粒细胞的百分比禁食 21 d 组显著高于禁食 21 d、7 d 和 28 d 组 ( $P<0.05$ ), 淋巴细胞的百分比禁食 21 d 组显著低于禁食 7 d 和 28 d 组 ( $P<0.05$ )。N/L 的比值自由取食组与其他组间均无显著差异, 但禁食 21 d 组显著高于禁食 7 d 和 28 d 组 ( $P<0.05$ )。结果表明, 大鳞副泥鳅通过降低的重长比和比肝重来响应禁食的影响, 各型白细胞的百分比和 N/L 的比值的变化趋势多样, 这可能与各自的生理功能有关。

**关键词:** 肝脏; 脾脏; 单核细胞; 嗜中性粒细胞; 淋巴细胞; 禁食

中图分类号: S966.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0621-05

### The effect of fasting on morphology and percentages of different subtypes of leukocytes in *Paramisgurnus dabryanus*

ZHANG Zhiqiang, ZHANG Qiongwen, SUN Siqi, WANG Shuhe, WANG Jiafeng, ZHANG Yunlong

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** To explore the responsiveness to starvation threatens in *Paramisgurnus dabryanus*, the changes of the ratio of body mass to body length, the index of relative liver and spleen wet mass, percentages of different subtypes of leukocyte, and the ratio of neutrophils to lymphocytes (N/L) were measured from feeding group (Fe), fasting groups for three days (Fa3d), one week (Fa7d), three weeks (Fa21d) and four weeks (Fa28 d). The ratio of body mass to body length showed a reduction tendency with prolonged fasting time, but no significant difference between groups was found ( $P > 0.05$ ). The index of relative spleen wet mass did not differ among groups ( $P > 0.05$ ), but the index of relative liver wet mass was significantly declined in group Fa21d ( $P < 0.05$ ). The percentage of monocytes was significantly greater in group Fe than group Fa21d. The percentage of neutrophils or lymphocytes in group Fe was similar to that of other groups ( $P > 0.05$ ). The percentage of neutrophils was higher in group Fa21d than in group Fa3d, Fa7d, or Fa28d ( $P < 0.05$ ); the percentage of lymphocytes was significantly lower in group Fa21d than in group Fa7d or Fa28d ( $P < 0.05$ ). The ratio of N/L in group Fe was similar to that of any other group, which was higher in group Fa21d than in group Fa7d or Fa28 d. These results indicated that *Paramisgurnus dabryanus* responds to fasting through reducing the ratio of body mass to body length and declining the relative liver wet mass. The changing tendencies of percentages of different subtypes of leukocyte, as well as the ratio of N/L were various, which may correlate with their specific physiological functions.

**Key words:** liver; spleen; monocytes; neutrophils; lymphocytes; fasting

外部形态特征及内脏器官大小的变化能较好地反映低等脊椎动物的饥饿状态<sup>[1-3]</sup>。在某些特殊的生

理状况和特定的生活史阶段, 鱼类能耐受长时间的饥饿, 一旦食物供应恢复正常, 又表现出较高的个

收稿日期: 2018-01-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31170379), 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2017A130) 和 2016 年安徽农业大学校级大学生创新训练计划项目 (XJDC2016075) 共同资助。

共同第一作者简介: 张志强, 博士, 教授。E-mail: zzq-003@163.com; 张琼文, 本科生。E-mail: 1433241512@qq.com

体生长速度,具有可塑性<sup>[4-5]</sup>。除外部形态特征和内脏器官大小的可塑性变化外,血液指标也能反映鱼类的正常生理状态,用于评价其健康状况或营养水平<sup>[6-7]</sup>。经稍作改进后,用于计数高等脊椎动物各型白细胞数量的方法也适用于鱼类研究,并且具有用血量少、操作方便等优点<sup>[8]</sup>。研究表明,各型白细胞占白细胞总量的百分比,可从不同侧面反应脊椎动物天然免疫、细胞介导的免疫和体液免疫能力的高低<sup>[9-10]</sup>。例如,嗜碱性粒细胞与天然免疫有关,而淋巴细胞则主要起防御功能,被激活后主要参与体液免疫应答<sup>[9]</sup>。此外,嗜中性粒细胞与淋巴细胞(the ratio of neutrophils to lymphocytes, N/L)的比值与脊椎动物的应激状态有关,强应激时其比值显著升高<sup>[9]</sup>。由于自然环境条件下食物资源分布不均匀或养殖过程中投喂不及时,饥饿是鱼类经常面临的环境胁迫之一,但已有研究多集中于饥饿对鱼体的形态学、生化组成、能量代谢、组织学和分子生物学等方面的影响<sup>[11-12]</sup>,以及血液生理和生化指标的测定<sup>[13-14]</sup>,对各型白细胞的变化研究较少<sup>[8]</sup>。研究发现,禁食和再投喂过程中,厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)幼鱼的非特异性免疫水平维持稳定<sup>[15]</sup>。

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)在我国广泛分布,是适于人工养殖的经济鱼类,生长速度较快,具有很强的耐饥饿能力。目前,关于饥饿对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和大鳞副泥鳅红细胞和白细胞形态学特征的影响已有报道<sup>[16-17]</sup>,但尚无与各型白细胞数量动态有关的研究。通过禁食处理,监测大鳞副泥鳅形态学参数、各型白细胞的百分比,以及N/L比值的变化情况,可从整体、器官和血液学水平阐明大鳞副泥鳅对饥饿胁迫的适应机制,为大鳞副泥鳅的健康养殖提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

2016年7月中下旬于安徽省合肥市肥东县店埠镇(32°52'26"N, 117°30'07"E)捕捉成体大鳞副泥鳅,于捕获次日运输至合肥市安徽农业大学动物科技学院动物生理生态学实验室。选取健康、活泼的大鳞副泥鳅用于试验,试验鱼的规格为全长(14.5±0.7)cm、体重(13.283±1.581)g,暂养于塑料箱(长×宽×高=90cm×40cm×50cm)内,空调控温,水温保持为(22±1)℃,每日8:00时开灯,20:00时关灯。早晚2次投喂泥鳅专用全价配合饲料(粗蛋白>30%),每次投喂至表观饱食,每3d换1次曝气24h以上的自来水、清理食物残渣,室内暂养

10d后,将动物分养于5个容积为15L的塑料箱(长×宽×高=40cm×27.5cm×20cm)内,雌、雄鱼随机分箱,每箱8尾。

### 1.2 试验分组

随机选取一箱作为自由取食组。之后,剩余箱均做禁食处理,在禁食后3、7、21和28d,每个时间节点随机选取一箱个体处死取材,分别作为禁食3d组、禁食7d组、禁食21d组和禁食28d组。每3d清理1次箱体、换水1次。空调控温,水温保持为(22±1)℃。

### 1.3 取材

用JA2003N电子天平(上海菁海仪器有限公司,精度0.001g)称量动物的体重,直尺测量体长(精度0.1cm)后,断头处死动物,制作血涂片。解剖动物,称量肝脏和脾脏的湿重(精度0.001g)。重长比( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) = 体重(g) × 100/体全长(cm);比肝重(%) = 肝脏湿重(g) × 100/体重(g);比脾重(%) = 脾脏湿重(g) × 100/体重(g)。

### 1.4 血涂片的制作

按照产品说明书,用快速瑞氏-姬萨姆染色法制作血涂片(南京建成生物工程有限公司,型号:D010),每只动物制片2张。在血涂片上先后滴加试剂I和试剂II,试剂I覆盖血膜后染色约60s,将试剂II与试剂I手动轻摇充分混匀,染色约6min。自来水充分冲洗血涂片后,用蒸馏水再洗约30s,42℃烘干后,中性树胶封片,镜检。每张血涂片在400倍光学显微镜下用智能血球分类计数器(姜堰市天力医疗器械有限公司,型号:TL-2000A)共计数100个嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞,取两张涂片的平均值计算各型白细胞占白细胞总数的百分比。

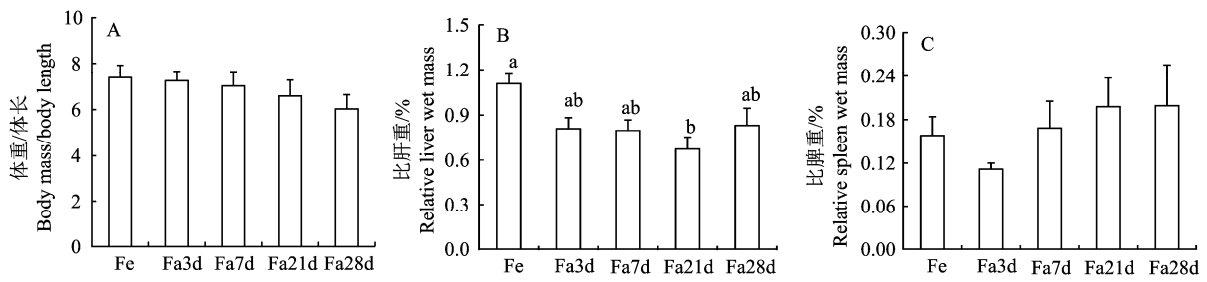
### 1.5 统计分析

用SPSS 17.0 for windows 进行数据处理。用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较重长比、比肝重、比脾重、各型白细胞的百分比及N/L的比值的组间差异。文中数值均以平均值 ± 标准误(Mean ± SE)表示,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 禁食对大鳞副泥鳅形态学参数的影响

重长比随禁食时间呈逐渐下降趋势,但组间差异不显著( $F_{4,35}=0.918, P > 0.05$ ,图1A)。比肝重自由取食组显著高于禁食21d组( $F_{4,35}=3.852, P < 0.05$ ,图1B);比脾重禁食3d后下降,此后逐渐上升,但无明显组间差异( $F_{4,35}=0.956, P > 0.05$ ,图1C)。



Fe. 自由取食组; Fa3 d. 禁食 3 d 组; Fa7 d. 禁食 7 d 组; Fa 21 d. 禁食 21 d 组; Fa28 d. 禁食 28 d 组。柱上不同小写字母代表组间差异显著 ( $a>b$ )。下同

Fe. Feeding group; Fa3 d. Fasting for three days; Fa7 d. Fasting for 7 days; Fa 21 d. Fasting for 21 days; Fa 28 d. Fasting for 28 days. Different lowercase letters above the columns represent significant differences among groups ( $a>b$ ). The same below

图 1 禁食对大鳞副泥鳅体重与体长的比值 (A)、比肝重 (B) 和比脾重 (C) 指数的影响

Figure 1 Effects of fasting on the ratio of body mass to body length (A), and the index of relative liver (B) and spleen (C) wet mass in *Paramisgurnus dabryanus*

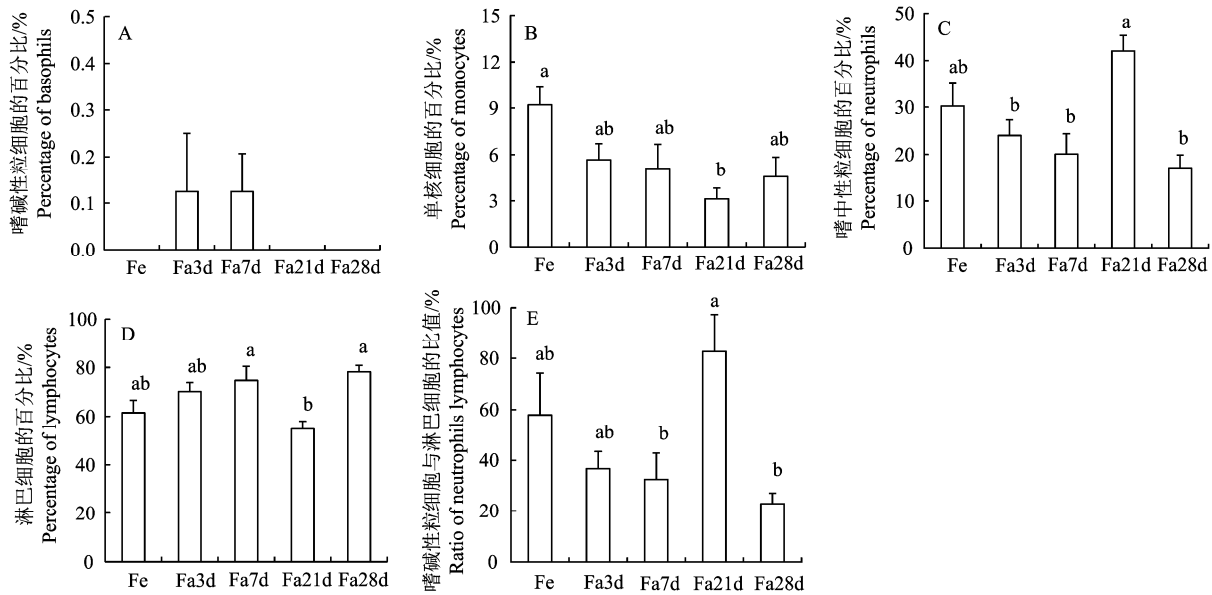


图 2 禁食对大鳞副泥鳅各型白细胞的百分比及 N/L 的比值的影响

Figure 2 Effects of fasting on percentages of different subtypes of leukocyte and the ratio of neutrophils to lymphocytes (N/L) in *Paramisgurnus dabryanus*

## 2.2 禁食对大鳞副泥鳅各型白细胞的百分比及 N/L 比值的影响

血液中未检出嗜酸性粒细胞, 嗜碱性粒细胞仅见于禁食 3 d 和 7 d 组, 但含量很低, 且无组间差异 ( $F_{4,35} = 1.050, P > 0.05$ , 图 2A)。单核细胞的百分比 ( $F_{4,35} = 3.700, P < 0.05$ , 图 2B) 自由取食组显著高于禁食 21 d 组, 但与其他组间无显著差异。嗜中性粒细胞的百分比自由取食组与其他组间无差异, 但禁食 21 d 组显著高于禁食 3 d、7 d 和 28 d 组 ( $F_{4,35} = 6.678, P < 0.05$ , 图 2C); 淋巴细胞的百分比自由取食组与其他组间无差异, 但禁食 7 d 和 28 d 组显著高于禁食 21 d 组 ( $F_{4,35} = 5.223, P < 0.05$ , 图 2D); N/L 的比值自由取食组与其他组间无差异, 但禁食 21 d 组显著高于禁食 7 d 和 28 d 组 ( $F_{4,35} =$

4.388,  $P < 0.05$ , 图 2E)。

## 3 讨论与结论

禁食不影响大鳞副泥鳅的脾脏湿重和嗜碱性粒细胞的百分比, 但随着禁食时间的延长, 其重长比呈递减趋势, 肝脏湿重显著下降, 单核细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比也发生了适应性改变。

### 3.1 大鳞副泥鳅重长比及器官湿重对禁食的响应

研究表明, 经饥饿处理后, 大鳞副泥鳅的体重、体长和肝脏湿重在饥饿后第 15 天表现出下降趋势, 但饥饿 20 d 后小幅回升<sup>[17]</sup>。本研究发现, 大鳞副泥鳅的重长比随禁食时间延长而下降, 比肝重则在禁食 21 d 组显著低于自由取食组。相对于食物资源短

缺的冬季和春季, 28 d 的禁食处理时间较短, 重长比维持相对稳定有利于大鳞副泥鳅节约能量, 提高其存活能力, 保持对变化的环境条件的敏感性。器官水平上, 肝脏是鱼体内重要的贮能器官。在经饥饿处理 28 d 后再重喂食 7 d 的时间内, 大鳞副泥鳅在饥饿 14 d 后肝糖原的数目显著下降, 重喂食后又有所恢复<sup>[18]</sup>。本研究发现, 大鳞副泥鳅的比肝重在禁食后呈降低趋势, 禁食 21 d 时达到最低值, 说明肝脏对饥饿刺激较敏感, 可通过动用其贮存的能量来应对饥饿胁迫。

脾脏是一种重要的免疫器官, 其大小被认为可近似地反映脊椎动物的免疫功能, 尤其是关于鸟类的研究<sup>[19]</sup>, 但对鱼类的研究很少<sup>[20]</sup>。手术去除虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的脾脏后, 用冷水性细菌感染具有较大脾脏及切除脾脏后的虹鳟, 两者的存活能力无明显差异, 但切除脾脏组的脾脏指数与其死亡时间呈正相关关系, 说明比脾重可以作为反映鱼类免疫状况的一个间接指标<sup>[20]</sup>。大鳞副泥鳅的比脾重并不随禁食时间的延长而降低, 而是表现出先降再升的波动式变化, 说明脾脏大小受饥饿胁迫的影响, 并随饥饿时间延长表现出了一定程度的适应性。

### 3.2 大鳞副泥鳅各型白细胞的百分比对禁食响应

嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞占白细胞总数的百分比, 常用来指示鱼类、两栖动物、爬行动物和鸟类的健康情况, N/L 的比值与动物的应激状态有关, 但受环境条件的影响较大<sup>[9-10]</sup>。禁食条件下, 大鳞副泥鳅单核细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比及 N/L 比值的趋势不同, 这可能与各自的功能有关。

单核细胞主要执行吞噬病毒和抗击病原体入侵的功能<sup>[21]</sup>, 大鳞副泥鳅单核细胞的百分比在禁食 21 d 后显著下降, 说明禁食使血液的吞噬能力下降。禁食 21 d 时, 大鳞副泥鳅嗜中性粒细胞的百分比高于禁食 3 d、7 d 和 28 d 组, 但与自由取食组无差异, 这可能与由饥饿导致的感染程度加剧有关, 在相对较长时间的饥饿条件下嗜中性粒细胞数量的增加有助于消灭胞外的病原菌, 使机体处于相对健康的状态<sup>[21]</sup>, 但更长的禁食时间则导致嗜中性粒细胞数量下降, 继而可能损害机体的健康。与嗜中性粒细胞的变化趋势不同, 大鳞副泥鳅血液中淋巴细胞的百分比禁食 21 d 时显著低于禁食 7 d 和 28 d 组。淋巴细胞主要执行防御功能, 被激活后与体液免疫有关<sup>[21]</sup>。对大鳞副泥鳅而言, 7 d 内的禁食时间可诱导淋巴细胞数量的增加, 但 21 d 的禁食时间则抑制

淋巴细胞的数量, 而 28 d 的禁食时间又可再次刺激淋巴细胞的增殖。嗜中性粒细胞和淋巴细胞可能是大鳞副泥鳅对抗饥饿胁迫的主要细胞类型, 其数量的动态变化有利于启动抗感染过程、提高机体的防御能力。

高 N/L 的比值意味着高含量的糖皮质激素水平, 这与糖皮质激素可以使嗜中性粒细胞的数量增加, 但使淋巴细胞数量减少的生理机制有关<sup>[9]</sup>。大鳞副泥鳅血液中 N/L 的比值禁食 21 d 组显著高于禁食 7 d 和 28 d 组, 说明 21 d 的禁食时间对大鳞副泥鳅的生存有较大的影响, 血液中应激激素的含量的适应性改变有利于应对饥饿胁迫、节约能量, 并保持对变化的环境条件的预判反应能力。

总之, 作为一种环境压力, 28 d 的禁食处理并不导致指示大鳞副泥鳅的身体状态的整体指标下降, 但会损害机体的抗感染能力, 降低其防御机能, 这是大鳞副泥鳅适应饥饿胁迫的主要策略之一。

### 参考文献:

- [1] 钱周兴, 徐永清, 方一峰. 饥饿对鱼类的影响[J]. 生物学通报, 2006, 41(6): 9-11.
- [2] 张莹, 高慧清, 王志, 等. 中华蟾蜍体重及脏器大小对禁食和重喂食处理的响应[J]. 动物学杂志, 2017, 52(2): 294-303.
- [3] ZALDÚA N, NAYA D E. Digestive flexibility during fasting in fish: A review[J]. Comp Biochem Physiol A, 2014, 169: 7-14.
- [4] 王永生. 鱼类补偿性生长研究[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(3): 57-61.
- [5] ALI M, NICIEZA A, WOOTTON R J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression[J]. Fish Fisheries, 2003, 4(2): 147-190.
- [6] 张文超, 梁桂英, 阳会军, 等. 饲料中添加甜菜碱对军曹鱼生长、体营养成分和血清生化指标的影响[J]. 南方水产科学, 2012, 8(3): 1-9.
- [7] 王国霞, 刘群芳, 黄文庆, 等. 复合酶制剂对黄颡鱼生长性能、血清生化和免疫指标的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(6): 84-89.
- [8] 徐嘉雯, 龙天澄, 宁曦, 等. 鱼类血液白细胞的分类计数[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2016, 34(1): 23-26.
- [9] DAVIS A K, MANEY D L, MAERZ J C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists[J]. Funct Ecol, 2008, 22(5): 760-772.
- [10] 张志强. 动物生态学研究免疫学参数的选择及其优缺点分析[J]. 四川动物, 2015, 34(1): 145-148.
- [11] 谢小军, 邓利, 张波. 饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 181-188.
- [12] 宋国, 彭士明, 孙鹏, 等. 饥饿与再投喂及投喂频率对条石鲷幼鱼生长和消化酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1269-1277.

- [13] 钱云霞, 陈惠群, 孙江飞. 饥饿对养殖鲈鱼血液生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 133-137.
- [14] 刘迎隆, 麦康森, 徐玮, 等. 摄食不同淀粉含量饲料对军曹鱼血清生化指标的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 46-51.
- [15] 李芹, 唐洪玉, 郑永华, 等. 禁食后再投喂对厚颌鲂幼鱼生化及非特异性免疫指标的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(2): 49-57.
- [16] 黄辨非, 童响波, 罗静波. 饥饿对泥鳅某些血液指标的影响[J]. 淡水渔业, 2006, 36(6): 33-35.
- [17] 程玮玮. 饥饿对大鳞副泥鳅形态性状的影响[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(21): 110-111.
- [18] 王萍, 杜启艳, 南平, 等. 饥饿对大鳞副泥鳅不同组织糖原、ACP 和 ALP 的影响[J]. 四川动物, 2008, 27(5): 862-863.
- [19] MØLLER A P, ERRITZØE J. Climate, body condition and spleen size in birds[J]. *Oecologia*, 2003, 137(4): 621-626.
- [20] WIENS G D, MARANCIK D P, ZWOLLO P, et al. Reduction of rainbow trout spleen size by splenectomy does not alter resistance against bacterial cold water disease[J]. *Develop Comp Immunol*, 2015, 49(1): 31-37.
- [21] 周玉, 郭文场, 杨振国. 鱼类血细胞的研究进展[J]. 动物学杂志, 2001, 36(6): 55-57.