

滑鼠蛇出生至 50 日龄身体大小和免疫功能的变化

张志强¹, 陈可为², 彭兵龙¹, 张昊滨¹, 杨会会², 刘溯源¹, 王锡飞¹, 姚利¹, 徐小良³

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036;

3. 安徽省池州市龙井山蛇类驯养专业合作社, 池州 247121)

摘要: 为探究滑鼠蛇 (*Ptyas mucosus*) 生后发育不同阶段身体大小和免疫功能的变化, 在室温为 (30±1) °C、相对湿度为 70%~75%条件下, 监测了 3、10、20、30、40 和 50 日龄滑鼠蛇身体大小及各型白细胞的百分比、嗜中性粒细胞与淋巴细胞的比值 (N/L) 和血清杀菌能力的变化。体重、体全长、重长比和尺度化的质量指数 3 至 20 日龄增长缓慢, 之后陡增, 50 日龄最高 ($P<0.05$); 淋巴细胞和嗜中性粒细胞的百分比居前两位, 但两者的百分比、N/L 的比值和血清杀菌能力均无组间差异 ($P>0.05$); 嗜碱性粒细胞的百分比 10 日龄组与 3 日龄组接近, 但高于其他日龄组 ($P<0.05$); 50 日龄内, 滑鼠蛇的身体大小开口前增长缓慢, 开口后增加迅速, 蜕皮后嗜碱性粒细胞的百分比显著提升, 建议可根据体重和嗜碱性粒细胞百分比的变化来预判蛇场内幼蛇的健康状态。

关键词: 滑鼠蛇; 胚后发育; 体重; 淋巴细胞; 嗜碱性粒细胞

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)04-0618-05

Variations of body size and immune functions in the oriental rat-snake (*Ptyas mucosus*) from birth to 50 days of postembryonal period

ZHANG Zhiqiang¹, CHEN Kewei², PENG Binglong¹, ZHANG Haobin¹,
YANG Huihui², LIU Suyuan¹, WANG Xifei¹, YAO Li¹, XU Xiaoliang³

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

3. Longjingshan Snake Domestication Specialized Cooperative in Chizhou City Anhui Province, Chizhou 247121)

Abstract: To explore the variations of body size and immune functions for different postembryonal periods in oriental rat-snakes (*Ptyas mucosus*), the body size, percentages of different subtypes of leukocyte, the ratio of neutrophils to lymphocytes (N/L), and serum bactericidal capacity in 3, 10, 20, 30, 40 and 50 days of postembryonal period were measured at (30±1) °C room temperature and 70%-75% relative humidity. Body mass, body length, the ratio of body mass to body length and scaled mass index were slowly increased from 3 to 20 days of age, then increased rapidly, and reached the highest at 50 days old ($P<0.05$). Percentage of lymphocytes and neutrophils ranked the top two, but there was no difference for percentages of both leukocytes, the ratio of N/L, and serum bactericidal capacity ($P>0.05$); Percentage of basophils in the 10 day age group was close to that of 3 day age group, but significantly higher than the 20, 30, 40 and 50 day age groups ($P<0.05$). In the 50 days of age, the body size of the snake grew slowly before starter feeding, but increases rapidly after starter feeding. Percentage of basophils changed significantly after sloughing. It is suggested that the healthy status of postembryonic snakes can be evaluated by the variations of body mass and percentage of basophils in the snake farming.

Key words: *Ptyas mucosus*; postembryonic development; body mass; lymphocytes; basophils

蛇类普遍有耐受极端环境条件的能力, 是研究表型可塑性 (phenotypic plasticity) 理论的理想动物

类群之一^[1-2], 但对其个体发育过程血液学参数和免疫功能的变化, 仍所知甚少^[3]。与两栖动物变态发

收稿日期: 2018-09-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170379) 和 2017 年安徽农业大学校级大学生创新创业训练计划项目 (XJDC2017388) 共同资助。

共同第一作者简介: 张志强, 博士, 教授。E-mail: zhangzq@ahau.edu.cn; 陈可为, 本科生。E-mail: 389284799@qq.com

育不同^[4-5], 蛇类直接发育, 出壳、蜕皮和开口时间是制约其存活和规模化养殖的关键生活史阶段^[6]。生产实践上, 常用体重、体全长等指标监测蛇类的生长发育状况^[3,7-10], 较少应用重长比和尺度化的质量指数 (scaled mass index, SMI) 等指标^[3,11], 但 SMI 能较全面地反映体重、体全长的综合效应, 是衡量羊膜动物营养、生理和能量平衡状态的新指标之一^[11]。此外, 血液学参数的变化能从多个侧面反映蛇类的健康状态, 为其疾病诊疗提供了基础生物学数据^[3]。爬行动物成体血液中各型白细胞的百分比具有物种特异性^[12-16], 受多种生物 (如性别、年龄等) 和非生物因子 (如季节) 的影响^[12,17-18], 但仍缺乏在严格受控的实验室条件下的研究^[3,12]。孙嘉珞等^[3]发现, 实验室内饲养的王锦蛇 (*Elaphe carinata*) 在出壳后血液中有不同类型的白细胞存在, 20 日龄内单核细胞的百分比呈下降趋势, 而嗜酸性粒细胞的百分比则明显增加。

滑鼠蛇 (*Ptyas mucosus*) 属于游蛇科 (Colubridae) 鼠蛇属动物, 俗名水律蛇等, 是一种适于人工驯养的无毒蛇, 也是营养丰富的绿色食品^[19]。滑鼠蛇出壳后 1~2 个月是制约其养殖成败的关键阶段, 涉及出壳、第一次蜕皮和开口等过程^[8], 但对这些过程身体大小、血液学参数和免疫功能的变化, 仍无报道。本研究以室内孵化的滑鼠蛇幼蛇为研究对象, 对出壳后 3 d、首次完成蜕皮, 以及开口后 10 d、20 d、30 d 和 40 d 幼蛇, 分别测定了重长比、SMI、血液中各型白细胞的百分比和血清杀菌能力变化, 旨在建立滑鼠蛇生后特定生活史阶段与免疫功能建立的对应关系, 丰富爬行动物比较免疫生态学的基础资料, 为滑鼠蛇规模化健康养殖提供基础生物学数据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

2017 年 8 至 9 月在安徽省池州市龙井山蛇类驯养专业合作社进行试验, 滑鼠蛇亲本为蛇场自繁个体。滑鼠蛇卵在蛇房内自然孵化, 地面铺沙土, 电热油汀控温 (30±1) °C, 保持孵化箱内的相对湿度为 70%~75%。每一蛇房内孵出的幼蛇数为 200~300 条。幼蛇出壳后 3 d、第一次蜕皮后 (出壳后 10 d)、开口后 10 d、20 d、30 d 和 40 d, 分别作为 3、10、20、30、40 和 50 日龄组动物, 每组随机选取 8 条幼蛇。在滑鼠蛇第一次蜕皮后, 每天喂食幼蛙, 保证幼蛇处于饱食状态。

1.2 取材和血涂片制作

在每一取材时间点, 用 BSA423S 电子天平 (赛

多利斯科学仪器公司, 精度 0.001g) 称量幼蛇体重, 直尺测量体全长 (精度 0.1 cm)。体重与体全长的比值 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$) = 体重 (g) / 体全长 (cm); 指示身体状态的尺度化的质量指数 (scaled mass index, SMI, g) = $M_i[L_0/L_i]^{b\text{SMA}}$, 式中 M_i 和 L_i 表示每一条蛇的体重和体全长, L_0 表示所有蛇体全长算术平均值; b 表示经体重和体全长做回归方程后得到的幂指数^[11]。

之后, 断头处死幼蛇, 用移液器采集约 20 μL 血液, 制作血涂片两张。用快速瑞姬氏染液 (南京建成生物工程有限公司, 产品编号: D010) 染烘干后的血涂片, 参照孙嘉珞等^[3]描述的方法进行镜检观察, 用白细胞计数仪计数每张血涂片中嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞共计 100 个, 以各型白细胞的数量除以 100 作为各型白细胞占白细胞总数的百分比, 以两张血涂片各型白细胞的平均值表示每条幼蛇各型白细胞占白细胞总数的百分比。

1.3 血清杀菌能力测定

用 TG16-WS 湘仪台式高速离心机在 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下离心血液 20 min, 之后取血清冻存于 -20 °C 的冰箱中, 留测其杀菌能力。因血清溶血等因素, 3、10、20、30、40 和 50 日龄组血清杀菌能力测定的样本数分别为 6、8、5、8、8 和 5, 总计 40 个样本。试剂配制和操作方法同对黑线仓鼠 (*Cricetulus barabensis*) 的研究^[20], 按照 1 份血清样品、20 份非 CO_2 依赖的培养基的比例混匀后, 再将 20 μL 细菌工作液加入, 并再次混匀后在 37 °C 条件下孵育 30 min, 之后取 50 μL 样品均匀涂板, 每个样品做两次重复。杀菌能力 (%) = (1 - 每一样品的菌落数/阴性对照组的平均菌落数) × 100。3 个阴性对照平板的孵育液全部为非 CO_2 依赖的培养基, 都不加血清样品。

1.4 统计分析

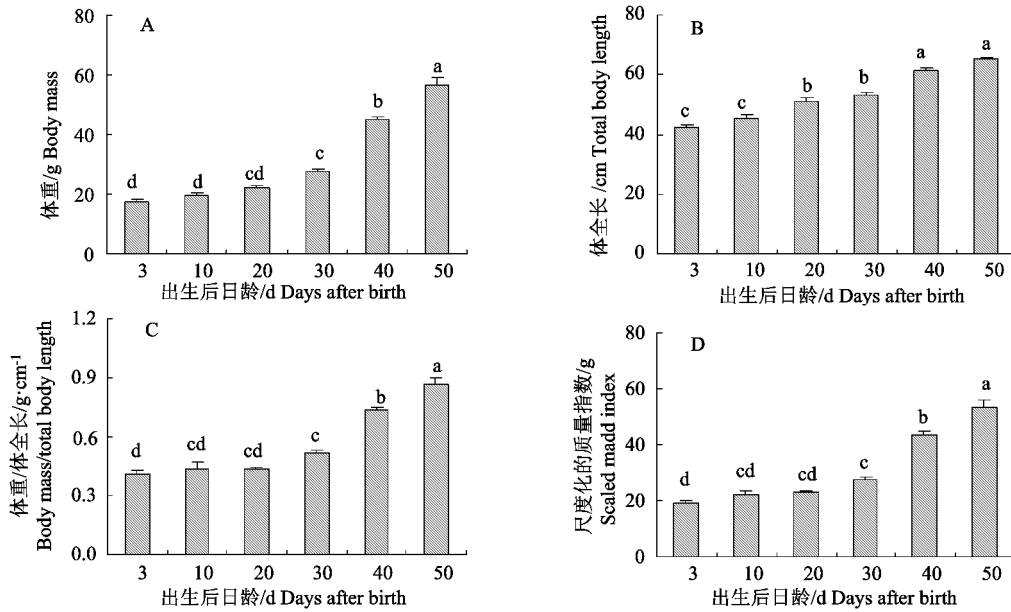
用统计分析软件 SPSS 软件包 (SPSS 17.0 for windows) 对数据进行统计分析处理。用 one sample Kolmogorov-Smirnov test 检验体重、体全长、重长比、SMI、各型白细胞的百分比、N/L 的比值和血清杀菌能力的正态分布情况, 其中体重、SMI 和嗜碱性粒细胞的百分比不符合正态分布。体重和 SMI 经对数转换, 嗜碱性粒细胞的百分比经反正弦转换后, 以日龄作为固定因子, 用单因素方差分析 (one way ANOVA) 统计不同发育阶段上述指标的组间差异。文中数值均以平均值 ± 标准误 (Mean±SE) 表示, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 不同发育阶段滑鼠蛇身体大小的变化

3、10和20日龄组滑鼠蛇的体重缓慢增加，组间差异不显著；30日龄组与20日龄组差异不显著，

但极显著高于3和10日龄组，低于40和50日龄组，50日龄组达最高值 ($F_{5,42}=127.126, P<0.01$ ，图1A)。滑鼠蛇的体全长40和50日龄组最高，20和30日龄组其次，3和10日龄组最低，且组间差异极显著 ($F_{5,42}=72.630, P<0.01$ ，图1B)。重长比

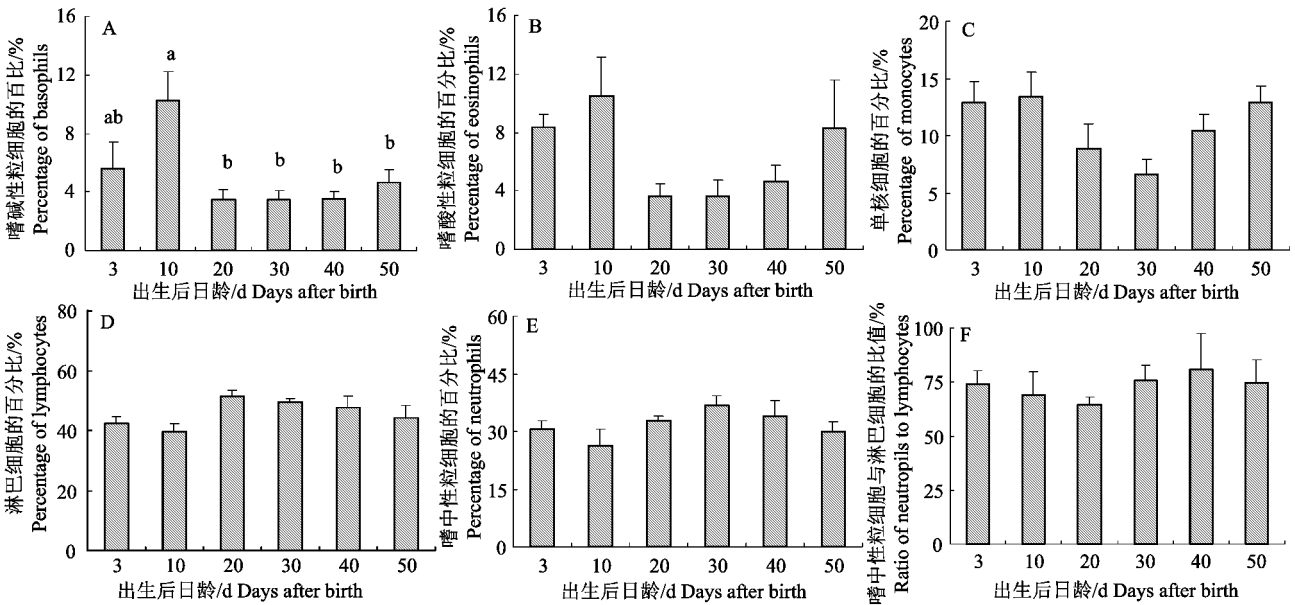


柱上不同字母代表组间差异显著 (a>b>c>d)

The different letters above the columns represent significant group differences (a>b>c>d)

图1 滑鼠蛇生后3至50日龄体重、体全长、重长比和尺度化的质量指数的变化

Figure 1 Changes of body mass, total body length, the ratio of body mass to total body length, and scaled mass index in *Ptyas mucosus* from 3 to 50 days of postembryonic period



柱上不同字母代表组间差异显著 (a>b)

The different letters above the columns represent significant group differences (a>b)

图2 滑鼠蛇生后3至50日龄嗜碱性粒细胞(A)、嗜酸性粒细胞(B)、单核细胞(C)、淋巴细胞(D)和嗜中性粒细胞(E)的百分比及嗜中性粒细胞与淋巴细胞的比值(F)的变化

Figure 2 Changes of percentages of basophils (A), eosinophils (B), monocytes (B), lymphocytes (D), and neutrophils (E), as well as the ratio of neutrophils to lymphocytes (F) in *Ptyas mucosus* from 3 to 50 days of postembryonic period.

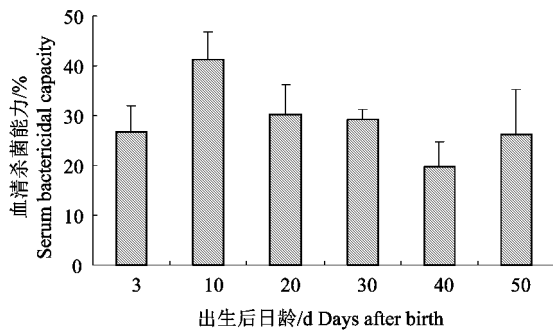


图 3 滑鼠蛇生后 3 至 50 日龄血清杀菌能力的变化

Figure 3 Changes of serum bactericidal capacity in *Ptyas mucosus* from 3 to 50 days of postembryonic period

($F_{5,42}=67.716, P<0.01$, 图 1C)和 SMI($F_{5,42}=106.190, P<0.01$, 图 1D) 前 20 d 均缓慢增加, 3、10 和 20 日龄组的组间差异不显著, 从 30 日龄组开始快速增加, 极显著高于 3 日龄组, 但明显低于 40 和 50 日龄组。

2.2 不同发育阶段滑鼠蛇各型白细胞百分比变化

嗜碱性粒细胞的百分比从生后 3 至 10 d 递增, 此后显著下降, 10 日龄组极显著高于 20、30、40 和 50 日龄组, 3 日龄组与其他日龄组均无显著差异 ($F_{5,42}=4.680, P<0.01$, 图 2A)。嗜酸性粒细胞 ($F_{5,42}=2.311, P>0.05$, 图 2B) 和单核细胞的百分比 ($F_{5,42}=2.346, P>0.05$, 图 2C) 的变化趋势相似, 3 至 10 日龄稍有增加, 20 和 30 日龄下降, 40 和 50 日龄又有所增加, 但无明显的组间差异。淋巴细胞的百分比占比最高, 嗜中性粒细胞其次; 淋巴细胞 ($F_{5,42}=2.272, P>0.05$, 图 2D) 和嗜中性粒细胞的百分比 ($F_{5,42}=1.480, P>0.05$, 图 2E) 分别在 20 和 30 日龄组较高, 均在 10 日龄组较低, 但组间差异均不显著。N/L 的比值 40 日龄组较高, 3 日龄组其次, 20 日龄组最低, 但组间差异不显著 ($F_{5,42}=0.313, P>0.05$, 图 2F)。

2.3 不同发育阶段滑鼠蛇血清杀菌能力的变化

血清杀菌能力 10 日龄组最高, 40 日龄组最低, 但无明显的组间差异 ($F_{5,34}=2.012, P>0.05$, 图 3)。

3 讨论与结论

滑鼠蛇的体重、重长比和 SMI 开口前增长缓慢, 开口后快速增加, 首次蜕皮后血液中嗜碱性粒细胞的百分比变化明显。在蛇场内稳定的环境条件下, 建议可根据体重来预判生后发育关键时间节点幼蛇的健康状态, 各型白细胞百分比的变化可作为辅助判断指标。

与体重、体全长等测定指标不同, 重长比同时

考虑了体重、体全长的联合效应, 而 SMI 更是考虑了体重、体全长之间的异速增长关系, 可以更为全面地反映羊膜动物的健康水平^[11]。然而, 蛇类是终生生长、无四肢 (或仅有残存后肢) 的脊椎动物, 随发育进程的推进, 体全长不断延长, 体重持续增加^[3, 7-10]。50 日龄内的滑鼠蛇, 其体重、重长比和 SMI 在出壳后的 3 日龄、完成第一次蜕皮的 10 日龄和初次开口摄食的 20 日龄期间增速较慢, 但在主动摄食的 30 日龄后快速增加。因此, 从简单实用、便于测量的角度考虑, 只用体重的变化也能反映幼蛇的健康状态。滑鼠蛇的体全长在开口后显著增长, 这与王锦蛇幼蛇相似, 后者的体长也在开口后明显延长^[3], 说明蛇场内稳定的饲养环境有助于滑鼠蛇的快速生长。

爬行动物血液中各型白细胞的数量动态受多种因素影响^[12-18]。然而, 由于难以在室内驯养繁育野生蛇类, 关于蛇类不同发育阶段血液学的基础生物学数据很缺乏, 限制了对蛇类营养和生理状态的理解^[3]。生后发育 50 d 内, 滑鼠蛇血液中淋巴细胞和嗜中性粒细胞的百分比居于前两位, 嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的百分比最低; 与此不同, 生后发育 30 d 内, 王锦蛇淋巴细胞的百分比最高, 嗜酸性粒细胞的百分比其次, 嗜中性粒细胞的百分比最低^[3]。此外, 滑鼠蛇单核细胞和嗜酸性粒细胞的百分比的变化趋势相似, 嗜碱性粒细胞的百分比 10 日龄组最高, 显著高于 20、30、40 和 50 日龄组; 而王锦蛇生后发育的 30 d 内, 嗜酸性粒细胞的百分比 20 日龄组显著高于出生组, 但单核细胞的百分比则在出生时数量较多, 嗜碱性粒细胞的百分比未见明显差异^[3]。滑鼠蛇和王锦蛇都是适于人工养殖的无毒蛇, 两种蛇都在出壳后就已发育出完善的各型白细胞, 且都以淋巴细胞的百分比占比为最高, 但其他类型白细胞的变化模式不同, 甚至相反, 提示蛇类各型白细胞的建立过程既有共性, 也有物种特异性。成体王锦蛇嗜碱性粒细胞的百分比显著低于幼蛇^[3, 21], 说明幼蛇对外界刺激的反应能力较强。滑鼠蛇嗜碱性粒细胞的百分比蜕皮时显著升高, 之后明显下降, 说明嗜碱性粒细胞可能参与蜕皮的生物学调节过程。开口后, 王锦蛇自然状态下喜食鼠类等动物, 实验室内则以鸡蛋液灌饲为主, 而滑鼠蛇自然状态下喜食蛙类等动物, 实验室内则以幼蛙为主食, 不同的食性也可能是影响两种蛇血液中各型白细胞的百分比变化的主要因素之一。血清杀菌能力能反映动物体的天然免疫能力^[20], 滑鼠蛇的血清杀菌能力随发育进程呈波浪状变化, 但组间差异不显

著,说明滑鼠蛇在胚后发育初期就已具有一定水平的天然免疫能力。

总之,在蛇场内稳定的环境条件下,体重的变化可以作为判断滑鼠蛇幼蛇健康状态的一个有用指标,滑鼠蛇第一次蜕皮后嗜碱性粒细胞的百分比变化明显,但其他类型白细胞的百分比无明显变化,若能从活体尾腹静脉处采集微量血液,可借助嗜碱性粒细胞和其他类型白细胞百分比的变化来判断滑鼠蛇幼蛇的身体状况,对其他养殖和野生蛇类研究也有一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] SECOR S M, DIAMOND J. A vertebrate model of extreme physiological regulation[J]. *Nature*,1998, 395(6703): 659-662.
- [2] CASTOE TA, de KONING AP, HALL KT, et al. The Burmese python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes [J]. *PNAS*, 2013, 110(51): 20645-20650.
- [3] 孙嘉璐,高慧清,连丽燕,等. 王锦蛇出生至1月龄白细胞百分比的变化模式及其适应意义 [J]. *生态学杂志*, 2017, 36(8): 2246-2251.
- [4] 高慧清,张琼文,孙思琪,等. 变态期花背蟾蜍蝌蚪对植物血凝素的反应模式及其生态学意义 [J]. *生态学杂志*, 2017, 36(9): 2542-2548.
- [5] 连丽燕,高慧清,孙嘉璐,等. 变态前后花背蟾蜍蝌蚪消化器官大小及各型白细胞百分比的适应性变化 [J]. *生态学杂志*, 2018, 37(4): 1204-1210.
- [6] 劳伯勋,邹兴淮,温爱国. *中国养蛇学*[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,2011.
- [7] 黄松,黄接棠. 尖吻蝾的人工繁育 [J]. *动物学报*, 2003, 49(6): 854-857.
- [8] 陈祖发. 滑鼠蛇的人工孵化及幼蛇的饲养 [J]. *蛇志*, 2005, 17(1): 20-22.
- [9] 刘军,钟福生,黄鹤. 王锦蛇幼蛇的饲养与子一代的繁育试验[J]. *经济动物学报*, 2005, 9(1): 39-42.
- [10] 成钢,曾婷婷,田李果,等. 几种常见观赏蛇人工养殖条件下生长与繁殖特性比较研究 [J]. *生态科学*, 2016, 35(2): 98-103.
- [11] PEIG J, GREEN A J. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method [J]. *Oikos*, 2009, 118(12): 1883-1891.
- [12] 张志强. 动物生态学研究中选择免疫学参数的优缺点分析 [J]. *四川动物*, 2015, 34(1): 145-148.
- [13] 吴孝兵,张盛周,吴海龙,等. 16种爬行动物血细胞形态学参数研究 [J]. *动物学杂志*, 1998, 33(1): 29-32.
- [14] 李殿伟,张志影,李淑兰,等. 黑龙江省产10种蛇类血细胞的比较研究 [J]. *四川动物*, 2007, 26(2): 401-403.
- [15] VASARUCHAPONG T, DISARAPONG P, CHULASUGANDHA P, et al. Comparative studies on hematological and plasma biochemical parameters in different types of venomous snakes in Thailand[J]. *Comp Clin Pathol*, 2014, 23(4): 955-959.
- [16] MULIYA S K, BHAT M N. Hematology and serum biochemistry of Indian spectacled cobra (*Naja naja*) and Indian rat snake (*ptyas mucosa*)[J]. *Vet World*, 2016, 9(8): 909-914.
- [17] 李丕鹏,陆宇燕. 爬行动物血细胞研究进展(二)[J]. *烟台师范学院学报(自然科学版)*, 1999, 15(4): 310-314.
- [18] ARIKAN H, CICEK K. Haematology of amphibians and reptiles: a review[J]. *North-West J Zool*, 2014, 10(1): 190-209.
- [19] 赵晓华,严若谷,李其斌. 养殖与野生滑鼠蛇蛇肉营养成分比较分析 [J]. *蛇志*, 2013, 25(1): 13-14.
- [20] ZHANG Z Q, ZHAO Z J. Correlations between phytohemagglutinin response and leukocyte profile, and bactericidal capacity in a wild rodent[J]. *Integr Zool*, 2015, 10(3): 302-310.
- [21] 张冰,陆宇燕,陶睿,等. 养殖条件下3种锦蛇血细胞比较研究 [J]. *四川动物*, 2015, 34(1): 62-68.