

中华蟾蜍足垫部位对植物血凝素的反应 及其组织学和血液学变化

彭兵龙^① 张昊滨^① 陈可为^② 杨会会^② 连丽燕^① 汪寅^① 张志强^{①*}

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

摘要: 为探究中华蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 对植物血凝素 (PHA-P) 反应的最适浓度及足垫部位皮肤组织学和血液学的变化, 比较了在足垫部位注射 1.0、2.5 和 5.0 g/L 植物血凝素条件下的 PHA-P 反应, 以及最适注射浓度条件下 PHA-P 反应高峰期时足垫部位皮肤组织和循环血中各型白细胞的百分比, 血液中血清杀菌能力的变化。结果表明, 中华蟾蜍对 PHA-P 的反应无性别差异 ($P > 0.05$), 最适注射浓度为 2.5 g/L, 注射后 12 h 达反应峰值; 注射 PHA-P 或生理盐水的左足与注射生理盐水或不注射任何物质的右足皮肤组织相比, 各型白细胞的百分比均无显著差异 ($P > 0.05$), 但循环血中淋巴细胞的百分比升高 ($P < 0.05$), 嗜酸性粒细胞的百分比下降 ($P < 0.05$), 血清杀菌能力无明显变化 ($P > 0.05$)。2.5 g/L 的注射浓度适用于中华蟾蜍, 反应高峰期与足垫部位皮肤组织中各型白细胞的动态无关, 但循环血中淋巴细胞被激活、嗜酸性粒细胞功能弱化, 这可能是导致中华蟾蜍 PHA-P 反应的主要原因。

关键词: 中华蟾蜍; 足垫; 血清杀菌能力; 淋巴细胞; 嗜酸性粒细胞

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 01-87-12

Responsiveness to Phytohemagglutinin-P of Footpad and Changes in Histology and Hematology in Asiatic Toads (*Bufo gargarizans*)

PENG Bing-Long^① ZHANG Hao-Bin^① CHEN Ke-Wei^② YANG Hui-Hui^② LIAN Li-Yan^①
WANG Yin^① ZHANG Zhi-Qiang^{①*}

① *College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;* ② *School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China*

Abstract: To explore the optimal injection concentration and the changes of footpad skin histology and hematology of Asiatic toads (*Bufo gargarizans*) after injection of phytohemagglutinin-P (PHA-P), individuals were injected at footpad with PHA-P at three concentrations (1.0 g/L, 2.5 g/L and 5.0 g/L). The

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31170379), 2017 年安徽农业大学省级大学生创新创业训练计划创新训练计划项目 (No. 201710364023);

* 通讯作者, E-mail: zq-003@163.com;

第一作者介绍 彭兵龙, 男, 本科生; 研究方向: 水产养殖学; E-mail: pengbinglong@outlook.com。

收稿日期: 2018-04-28, 修回日期: 2018-08-29 DOI: 10.13859/j.cjz.201901011

responsiveness to PHA-P in Asiatic toads exposed to different injection concentrations was tested and the optimal injection concentration was selected. Under the condition of the optimal PHA-P injection concentration, variations of different subtypes of leukocytes in the skin tissues of footpad position and circulation blood, as well as serum bactericidal capacity were measured when the PHA-P response reached the peak. All statistical analyses were performed using SPSS software packages (SPSS 17.0 for windows). One or two way ANOVA, or a repeated measurement one way ANOVA, or independent sample *t* test was used to compare the differences of body mass or percentage of different subtypes of leukocytes from skin tissues and circulation blood, or serum bactericidal capacity, or the responsiveness to PHA-P solutions among six time points. Results were presented as means \pm standard error, and $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. The results were as follows: PHA-P response did not display significant sex difference ($P > 0.05$, Fig. 2); The optimal PHA-P injection concentration was 2.5 g/L with the peak at 12 h after injection (Fig. 2). No significant group differences were observed for different subtypes of leukocytes from skin tissue with injected PHA-P or saline (or without any solution) at footpad positions ($P > 0.05$, Fig. 5); At peak time, percentage of lymphocytes was increased ($P < 0.05$, Fig. 7), but percentage of eosinophils was reduced ($P < 0.05$, Fig. 7) in circulation blood, and no significant difference was found for serum bactericidal capacity (Fig. 8). The optimal 2.5 g/L PHA-P concentration was appropriate for Asiatic toads. The peak of PHA-P response was not correlated with the dynamic changes of any subtype of leukocyte in the footpad skin tissues, but abundant lymphocytes might be activated, and the function of eosinophils might be attenuated in circulation blood, which may be regarded as the main factors causing Asiatic toads' responsiveness to PHA-P solution.

Key words: *Bufo gargarizans*; Footpad; Serum bactericidal capacity; Lymphocytes; Eosinophils

植物血凝素 (phytohemagglutinin-P, PHA-P) 是一种从红肾豆 (*Phaseolus vulgaris*) 中提取出来的有丝分裂原 (Goto et al. 1978), 包含 PHA-L 和 PHA-E 两种组分, 前一组分具有促进淋巴细胞增殖的功能, 后一组分起凝血作用 (Leavitt et al. 1977), 总体上主要起促炎症反应的作用, 常在免疫生态学 (immunological ecology) 研究中作为监测爬行类 (Finger et al. 2013)、鸟类 (Martin et al. 2006, Břikovet al. 2015) 和哺乳类 (de Bellocq et al. 2006, Turmelle et al. 2010, Xu et al. 2010, Merlo et al. 2014a, b, Zhang et al. 2015, 张志强等 2015, Břikovet al. 2016) 健康状态的一个参数来使用, 但反应模式和机制复杂而多变 (Boughton et al. 2011, Demas et al. 2011, Brock et al. 2014, 张志强 2015)。两栖动物变态发育, 成体免疫系统的组成与哺乳动物相似 (Rollins-Smith et al. 2012)。

变态发育过程中, 花背蟾蜍 (*Pseudepidalea raddei*) 37 期蝌蚪对植物血凝素 (PHA-P) 的反应高峰值显著高于 46 期蝌蚪 (高慧清等 2017); 此外, 蝌蚪对植物血凝素 (PHA-P) 的反应高峰值和反应模式也受环境干扰物浓度 (Gilbertson et al. 2003)、河水干涸程度 (Gervasi et al. 2008) 和食物蛋白含量 (Venesky et al. 2012) 等外界环境条件的影响。成体两栖动物对植物血凝素 (PHA-P) 的反应无性别 (Brown et al. 2011, Zhang et al. 2017) 或年龄 (Clulow et al. 2015) 差异, 但反应模式和机制在物种间差异性较大 (Brown et al. 2011, Fites et al. 2014, Clulow et al. 2015, Jossierand et al. 2015)。

中华蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 是我国的广布种。成体中华蟾蜍对植物血凝素 (PHA-P) 的反应无性别差异, 但反应模式与花背蟾蜍和

黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculatus*) 不同 (Zhang et al. 2017)。本研究采用不同浓度梯度的植物血凝素 (PHA-P) 溶液, 分别测定了注射前 (0 h) 和注射后 6、12、24、48、72 h 后中华蟾蜍足垫部位皮肤组织的增厚程度, 筛选出了植物血凝素 (PHA-P) 的最适注射浓度, 并测定了最适注射浓度条件下反应高峰期时足垫部位皮肤组织和血液中各型白细胞的百分比, 以及循环血中血清杀菌能力的变化, 旨在确定中华蟾蜍对植物血凝素 (PHA-P) 反应的最适注射浓度, 揭示植物血凝素 (PHA-P) 刺激与中华蟾蜍足垫部位皮肤和血液中各型白细胞动态及天然免疫能力之间的关系, 为两栖动物免疫生态学研究筛选合适的免疫学指标提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雌、雄成体中华蟾蜍于 2017 年 6 月上旬捕自安徽省定远县永康镇青山乡 (32°33'2"N, 117°26'25"E), 暂养于塑料箱 (长 × 宽 × 高 = 70.8 cm × 49.6 cm × 38.3 cm) 内, 空调控温 (23 ± 1) °C, 自然光照。塑料箱内不定期喷洒曝气 24 h 以上的自来水, 保持箱体处于湿润状态, 以黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 喂食, 每 3 d 清理一次箱体。室内暂养 10 d 后, 开始正式实验。每个塑料盒内 (长 × 宽 × 高 = 25.5 cm × 17.6 cm × 11.5 cm) 放置一只中华蟾蜍, 其他实验条件同上。实验前, 用 DJ5001 电子天平 (福州华志科学仪器有限公司, 精度 0.1 g) 称量动物体重, 实验进行期间动物可自由取食。

1.2 植物血凝素 (PHA-P) 最适注射浓度的确定

取雄性中华蟾蜍成体 24 只, 随机等分为 3 组, 每组 8 只蟾蜍, 同一组每只蟾蜍的一侧足垫部位注射用灭菌后的 0.7% 生理盐水配制的 1.0、2.5 或 5.0 g/L 的植物血凝素 (PHA-P) 溶液 100 μl, 对侧足垫部位注射等量的生理盐水溶液。按照 Zhang 等 (2017) 描述的方法, 预

先用 70% 酒精消毒待测足垫部位, 测定注射前 (0 h) 和注射后 6、12、24、48、72 h 的足垫部位厚度 (瑞士 Tesa 数显卡尺, Shopcal, 150 mm, ± 0.01 mm), 每个时间点每只蟾蜍测定 6 次, 取其平均值。用注射前后足垫部位皮肤组织增厚的百分比表示中华蟾蜍注射某一浓度植物血凝素后某一时间点的反应, 即 PHA-P 反应 (%) = [注射 PHA-P 足垫部位的厚度 (mm) - 注射生理盐水足垫部位的厚度 (mm)] × 100 / 注射等量生理盐水足垫部位的厚度 (mm)。比较注射 1.0、2.5 和 5.0 g/L 浓度植物血凝素条件下中华蟾蜍对植物血凝素 (PHA-P) 反应出现的时间和反应峰值, 选择峰值高、峰值出现时间早且用量经济组的注射浓度作为对植物血凝素 (PHA-P) 反应的最适注射浓度 (高慧清等 2017)。

1.3 足垫部位皮肤组织和血液中各型白细胞百分比的测定

1.3.1 中华蟾蜍对最适浓度植物血凝素 (PHA-P) 或生理盐水的反应 为确定中华蟾蜍足垫部位皮肤组织对植物血凝素 (PHA-P) 反应的组织学和血液学变化, 另取成体中华蟾蜍 30 只, 等分为 3 组, 每组雌、雄各半, 即每组雌雄各 5 只。其中, 第一组一侧足垫部位注射前一实验确定的最适浓度的植物血凝素 (PHA-P) 溶液, 对侧足垫部位注射等量的生理盐水, 此组简称为 PHAsaline 组; 第二组一侧足垫部位注射最适浓度的植物血凝素 (PHA-P) 溶液, 对侧足垫部位不注射任何物质, 简称为 PHA-P 组; 第三组一侧足垫部位注射生理盐水, 对侧足垫部位不注射任何物质, 简称为 Saline 组。注射剂量同前一节为 100 μl。同样测定注射前 (0 h) 和注射后 6、12、24、48、72 h 的足垫部位的厚度, 并按照前一节的公式计算每个时间点每组的 PHA-P 反应或生理盐水反应程度, 确定每一组最适植物血凝素 (PHA-P) 浓度或生理盐水的反应峰值。

1.3.2 中华蟾蜍足垫部位皮肤组织和血液中各型白细胞百分比的测定 另取成体中华蟾蜍

30 只, 重复 1.3.1 节实验, 在达到反应峰值后, 用双毁髓法处死动物, 用皮肤组织钻孔器(上海医疗器械有限公司手术器械厂, 直径 3.5 mm) 钻取实验蟾蜍左、右足足垫部位的皮肤组织, 迅速投入中性福尔马林溶液, 固定 48 h 后, 常规脱水透明, 石蜡包埋, 切片 (4~5 μm 厚), 苏木精-伊红染色, 中性树胶封片。高倍镜下, 鉴定和观察皮肤组织血管周围各型白细胞, 计数每张切片上的白细胞总数, 并根据细胞核的位置、大小和染色情况, 以及细胞质的着色和有无颗粒情况, 区分嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞, 计算各种类型白细胞占白细胞总数的百分比。每只蟾蜍计数 3 张切片, 取 3 张切片的平均值表示每只蟾蜍足垫部位皮肤组织中各型白细胞的百分比。因足垫部位皮肤组织结构不完整或包埋过程中组织块丢失, PHAsaline 组注射植物血凝素 (PHA-P) 的足垫部位皮肤组织样本数为 4 雄 4 雌, 对侧注射生理盐水的足垫部位皮肤组织样本数为 5 雄 3 雌; PHA-P 组注射植物血凝素 (PHA-P) 足垫部位的皮肤组织样本数为 4 雄 5 雌, 对侧未注射任何物质的足垫部位皮肤组织样本数为 5 雄 1 雌; Saline 组注射生理盐水的足垫部位皮肤组织样本数为 3 雄 4 雌, 对侧未注射任何物质的足垫部位皮肤组织样本数为 4 雄 5 雌。

从心动脉干处采集血液, 每只蟾蜍制作血涂片两张, 用快速瑞氏吉姆萨染液(南京建成生物工程有限公司, 产品编号: D010) 处理血涂片, 参照孙嘉璐等(2017)和连丽燕等(2018)描述的方法, 鉴别和计数嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的百分比, 即每张血涂片计数 100 个白细胞, 每只蟾蜍计数 2 张血涂片, 取 2 张血涂片的平均值表示每只蟾蜍血液中各型白细胞的百分比。

1.4 血清杀菌能力测定

采用 TG16-WS 湘仪台式高速离心机 4 000 r/min 离心血液 20 min 后, 取血清, -20 $^{\circ}\text{C}$

冻存, 参照 Zhang 等(2015)的方法测定血清杀菌能力。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 干粉 (ATCC#8739) 购自广东省微生物菌种保藏中心, 非 CO_2 依赖的培养基 (Invitrogen, Gibco media#18045) 购自 Sigma 公司。用 1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 将大肠杆菌干粉制成细菌液, 激活后稀释成细菌工作液; 同时, 将 2.34 mg L-谷氨酸盐与非 CO_2 依赖的培养基 200 μl 混匀后, 用其按照 20:1 的体积比稀释血清, 并将 20 μl 细菌工作液加入其中混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 取 50 μl 孵育后的样品均匀涂布到胰蛋白酶大豆琼脂糖平板上, 做 2 个重复。阴性对照组的孵育液全部为培养基, 不加血清样品, 每次测定设置 3 个阴性对照平板。平板倒置, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱里孵育 24 h 后, 对每一平板产生的菌落数进行计数, 阴性对照组的菌落数范围为 2 304 ~ 2 453 个/平板。杀菌能力 (%) = $[1 - (\text{每一样品的菌落数} / \text{阴性对照组的平均菌落数})] \times 100$ 。

1.5 统计分析

用统计分析软件 SPSS (SPSS 17.0 for windows) 对数据进行统计分析处理。以植物血凝素 (PHA-P) 溶液浓度作为组间因子, 注射前 (0 h) 和注射后 6、12、24、48、72 h 等时间点为组内因子, 用重复测量方差分析 (repeated measurement ANOVA) 比较不同浓度组 (1.0、2.5 和 5.0 g/L) 植物血凝素 (PHA-P) 反应的组间差异, 以及同一浓度组内不同时间点之间的差异。以单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较注射前 (0 h) 中华蟾蜍不同浓度组、最适注射浓度条件下 PHAsaline 组、PHA-P 组和 Saline 组体重的组间差异, 以及不同浓度组植物血凝素 (PHA-P) 反应峰值的组间差异。用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 比较不同处理组注射前 (0 h) 和注射后 72 h 体重、注射后反应高峰时血液中各型白细胞百分比和血清杀菌能力的性别和组间差异; 用独立样本 *t* 检验 (independent sample *t*

test) 比较不同浓度组组内, 以及 PHAsaline 组、PHA-P 组和 Saline 组组内注射前 (0 h) 和注射后 72 h 的体重的差异, 以及注射后反应高峰时 PHAsaline 组、PHA-P 组和 Saline 组组内左、右足足垫部位皮肤组织内各型白细胞百分比的差异。文中数据均以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 不同浓度组体重和对 PHA-P 的反应

不同浓度组注射前 (0 h) 的体重无组间差异 ($F_{2, 21} = 0.082, P > 0.05$); 1.0 g/L 组 ($t = 0.271, df = 14, P > 0.05$)、2.5 g/L 组 ($t = -0.490, df = 14, P > 0.05$) 和 5.0 g/L 组 ($t = -0.752, df = 14, P > 0.05$) 组内注射后 72 h 与 0 h 的体重均无显著差异 (图 1)。

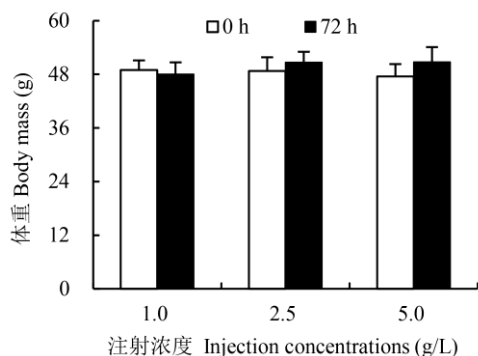


图 1 不同植物血凝素注射剂量组体重比较

Fig. 1 Comparisons of body mass among different phytohemagglutinin-P injection dose groups

不同浓度组的植物血凝素 (PHA-P) 反应组间差异显著 ($F_{2, 21} = 4.146, P < 0.05$); 进一步的单因素方差分析结果表明, 1.0 g/L 组注射后 6 h 显著高于 0 h, 并在 12 h 后达到高蜂值, 6 h 和 12 h 显著高于 0 h 和 72 h ($F_{5, 42} = 7.918, P < 0.001$); 2.5 g/L 组注射后 6 h 显著高于 0 h ($F_{5, 42} = 9.433, P < 0.001$), 也在 12 h 后达到高蜂值, 此后下降, 但与其他时间点差异不显著; 5.0 g/L 组在注射后 6 h 达反应峰, 12 h 和 24 h 后有所下降, 但与 6 h 差异不显著, 6 h

显著高于 0、48 和 72 h ($F_{5, 42} = 13.584, P < 0.001$) (图 2)。1.0、2.5 和 5.0 g/L 组的植物血凝素 (PHA-P) 反应高蜂值无显著的组间差异 ($F_{2, 21} = 1.345, P > 0.05$) (图 2)。

2.2 足垫部位对 PHA-P 反应的组织学变化

双因素方差分析结果表明, 注射 2.5 g/L 植物血凝素 (PHA-P) 溶液或 0.7% 生理盐水情况下, PHAsaline 组、PHA-P 组和 Saline 组注射前 (0 h) 和注射后 72 h 的体重既无性别差异 ($F_{1, 24} = 0.038, P > 0.05$), 也无组别差异 ($F_{2, 24} = 0.012, P > 0.05$), 性别和组别也无交互作用 ($F_{2, 24} = 0.209, P > 0.05$)。注射前 (0 h) 和注射后 72 h 的体重, PHAsaline 组 ($t = -0.367, df = 18, P > 0.05$)、PHA-P 组 ($t = -0.6178, df = 18, P > 0.05$) 和 Saline 组 ($t = -0.444, df = 18, P > 0.05$) 均无显著差异 (图 3)。

双因素重复测量方差分析结果表明, PHAsaline 组、PHA-P 组和 Saline 组对植物血凝素 (PHA-P) 的反应无性别差异 ($F_{1, 24} = 0.000, P > 0.05$), 但有显著的组间差异 ($F_{2, 24} = 14.596, P < 0.001$), 性别和组别无交互作用 ($F_{1, 24} = 0.940, P > 0.05$); 单因素重复测量方差分析结果表明, PHAsaline 组注射后 6 h 和 12 h 后达到峰, 6 h 和 12 h 显著高于 0 h ($F_{5, 45} = 5.957, P < 0.001$), 12 h 后呈波浪状下降, 但 12 h 与其他时间点之间无显著差异; PHA-P 组从 0 h 至注射后 12 h 持续升高, 至 12 h 达到峰, 此后下降, 12 h 显著高于 0 h 和 72 h ($F_{5, 45} = 7.060, P < 0.001$), 其他时间点间差异不显著; Saline 组在注射后 6 h 有升高, 此后平稳下降, 但所有时间点间的差异均不显著 ($F_{5, 45} = 1.864, P > 0.05$) (图 4)。

独立样本 t 检验结果表明, PHAsaline、PHA-P 组和 Saline 组左、右足足垫部位皮肤组织中各型白细胞的百分比均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5、6)。

2.3 对 PHA-P 反应的血液学变化

双因素方差分析结果表明, PHAsaline 组、

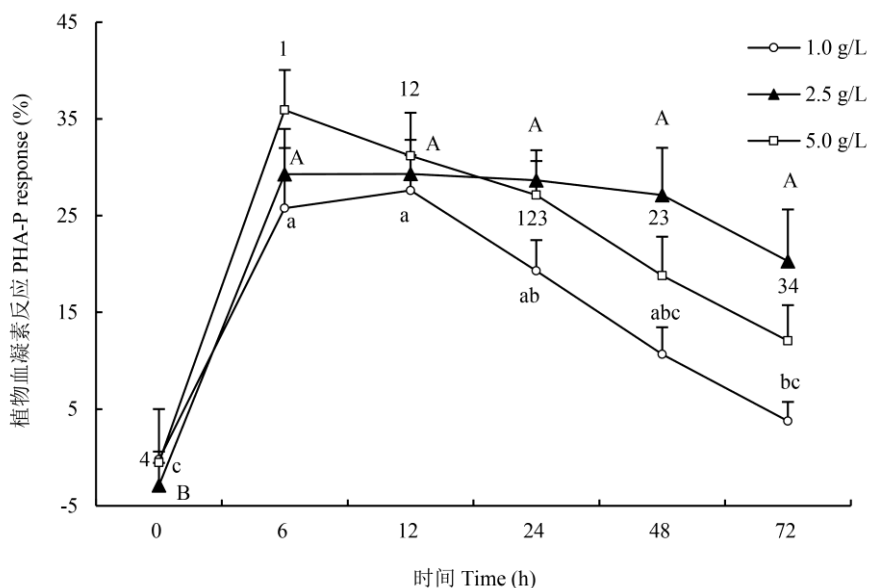


图 2 不同注射剂量组对植物血凝素的反应比较

Fig. 2 Comparisons of phytohemagglutinin-P (PHA-P) response among different injection dose groups

不同的大写字母、小写字母或数字代表同一剂量组内不同时间点之间的差异显著 ($P < 0.05$, $A > B$, $a > b > c$, $1 > 2 > 3 > 4$)。

Different capital letters, lowercase letters or numbers indicate significant differences among different time points for the same dose group ($P < 0.05$, $A > B$, $a > b > c$, $1 > 2 > 3 > 4$).

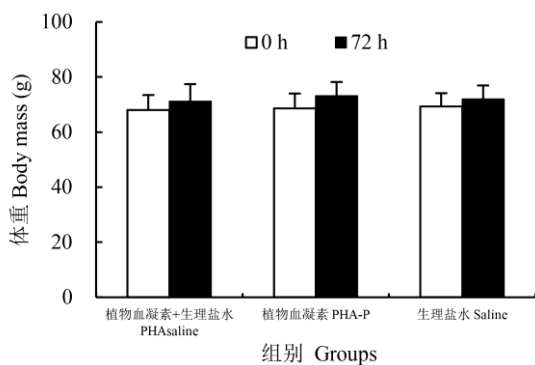


图 3 注射 2.5 g/L 植物血凝素 (PHA-P) 溶液或 0.7% 生理盐水条件下同一组内雌、雄蟾合并后体重的组间比较

Fig. 3 Comparisons of body mass among different groups treated with 2.5 g/L phytohemagglutinin-P solution or 0.7% saline solution in male and female toads from the same group

PHA-P 组和 Saline 组血液中单核细胞 ($F_{1, 24} = 0.000$, $P > 0.05$)、淋巴细胞 ($F_{1, 24} = 0.357$, $P > 0.05$)、嗜中性粒细胞 ($F_{1, 24} = 0.756$, $P > 0.05$)、

嗜酸性粒细胞 ($F_{1, 24} = 1.146$, $P > 0.05$) 和嗜碱性粒细胞 ($F_{1, 24} = 0.081$, $P > 0.05$) 的百分比均无性别差异; 单核细胞 ($F_{2, 24} = 0.797$, $P > 0.05$)、嗜中性粒细胞 ($F_{2, 24} = 0.947$, $P > 0.05$) 和嗜碱性粒细胞 ($F_{2, 24} = 1.184$, $P > 0.05$) 的百分比无组间差异, PHAsaline 组和 PHA-P 组淋巴细胞 ($F_{2, 24} = 5.651$, $P < 0.05$) 的百分比显著高于 Saline 组, 但 Saline 组嗜酸性粒细胞 ($F_{2, 24} = 5.753$, $P < 0.01$) 的百分比高于 PHA-P 组; 性别和组别对单核细胞 ($F_{2, 24} = 0.168$, $P > 0.05$)、淋巴细胞 ($F_{2, 24} = 0.464$, $P > 0.05$)、嗜中性粒细胞 ($F_{2, 24} = 1.588$, $P > 0.05$)、嗜酸性粒细胞 ($F_{2, 24} = 0.740$, $P > 0.05$) 和嗜碱性粒细胞 ($F_{2, 24} = 1.213$, $P > 0.05$) 的百分比均无交互作用 (图 7)。

双因素方差分析结果表明, 循环血中血清杀菌能力 ($F_{1, 17} = 1.789$, $P > 0.05$) 无性别差异, 也无组间差异 ($F_{2, 17} = 2.807$, $P > 0.05$), 性别和组别 ($F_{2, 17} = 0.016$, $P > 0.05$) 也无交互作用。

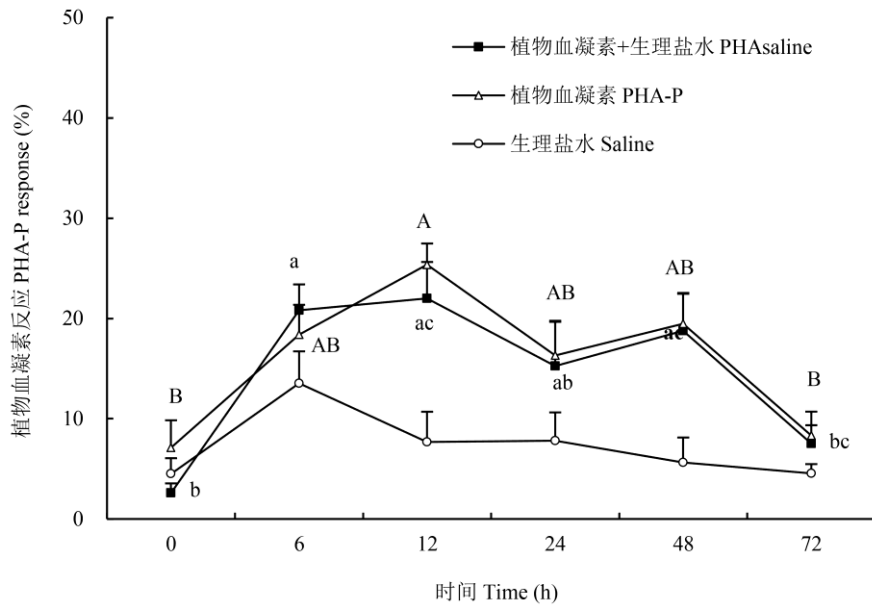


图 4 中华蟾蜍对 100 μl 浓度为 2.5 g/L 的植物血凝素和等量的浓度为 0.7% 的生理盐水的反应的比较

Fig. 4 Comparisons of responsiveness to 2.5 g/L phytohemagglutinin-P (PHA-P) solutions and 0.7% saline solutions among different groups under the condition of the same 100 μl injection dose

不同的大写字母或小写字母代表同一组内不同时间点之间的差异显著 ($P < 0.05$, $A > B$, $a > b$)。

Different capital or lowercase letters indicate significant differences among different time points for the same group ($P < 0.05$, $A > B$, $a > b$).

互作用 (图 8)。

3 讨论

中华蟾蜍对不同浓度组植物血凝素 (PHA-P) 溶液的反应不同, 2.5 g/L 为最适注射浓度; PHAsaline 组和 PHA-P 组的中华蟾蜍植物血凝素 (PHA-P) 反应达峰值时, 足垫部位皮肤组织中各型白细胞的百分比和血液中血清的杀菌能力均无明显变化, 但血液中嗜酸性粒细胞的百分比下降, 淋巴细胞的百分比升高, 这可能是导致中华蟾蜍植物血凝素 (PHA-P) 反应的主要原因。

3.1 PHA-P 测定部位、时间点和最适注射浓度的选择

两栖动物可供注射植物血凝素 (PHA-P) 的身体部位随物种而变化, 与体型大小有关。无尾目中, 大体型的甘蔗蟾蜍 (*Rhinella marina*) 以趾蹼 (Brown et al. 2011)、体型中等大小的中华蟾蜍等以足部 (Zhang et al. 2017)、幼体和

小体型物种以小腿 (Clulow et al. 2015, Jossierand et al. 2015)、变态发育期的蝌蚪以大腿根部 (Gervasi et al. 2008) 或尾部 (Venisky et al. 2012, 高慧清等 2017) 等作为注射部位。中华蟾蜍用于注射植物血凝素 (PHA-P) 的足垫部位, 左右两侧的厚度常不一致, 但对不同浓度的植物血凝素 (PHA-P) 溶液均有较强的反应; 在最适注射浓度条件下, PHAsaline 组和 PHA-P 组对植物血凝素 (PHA-P) 的反应相似, 均在注射后 12 h 内达到反应高值, 至 48 h 后又有一小幅回升, 这可能与测量时选择的足垫部位有关, 也可能与选用的计算公式有关 (Brown et al. 2011, Zhang et al. 2017)。为简化处理步骤、避免对动物造成较长时间的应激, 在进行植物血凝素 (PHA-P) 反应实验时, 可只在一侧足垫部位注射植物血凝素 (PHA-P) 溶液, 对侧足不注射任何物质。

成体两栖动物对植物血凝素 (PHA-P) 的反应峰值可出现在注射后 6、12 或 24 h, 常以

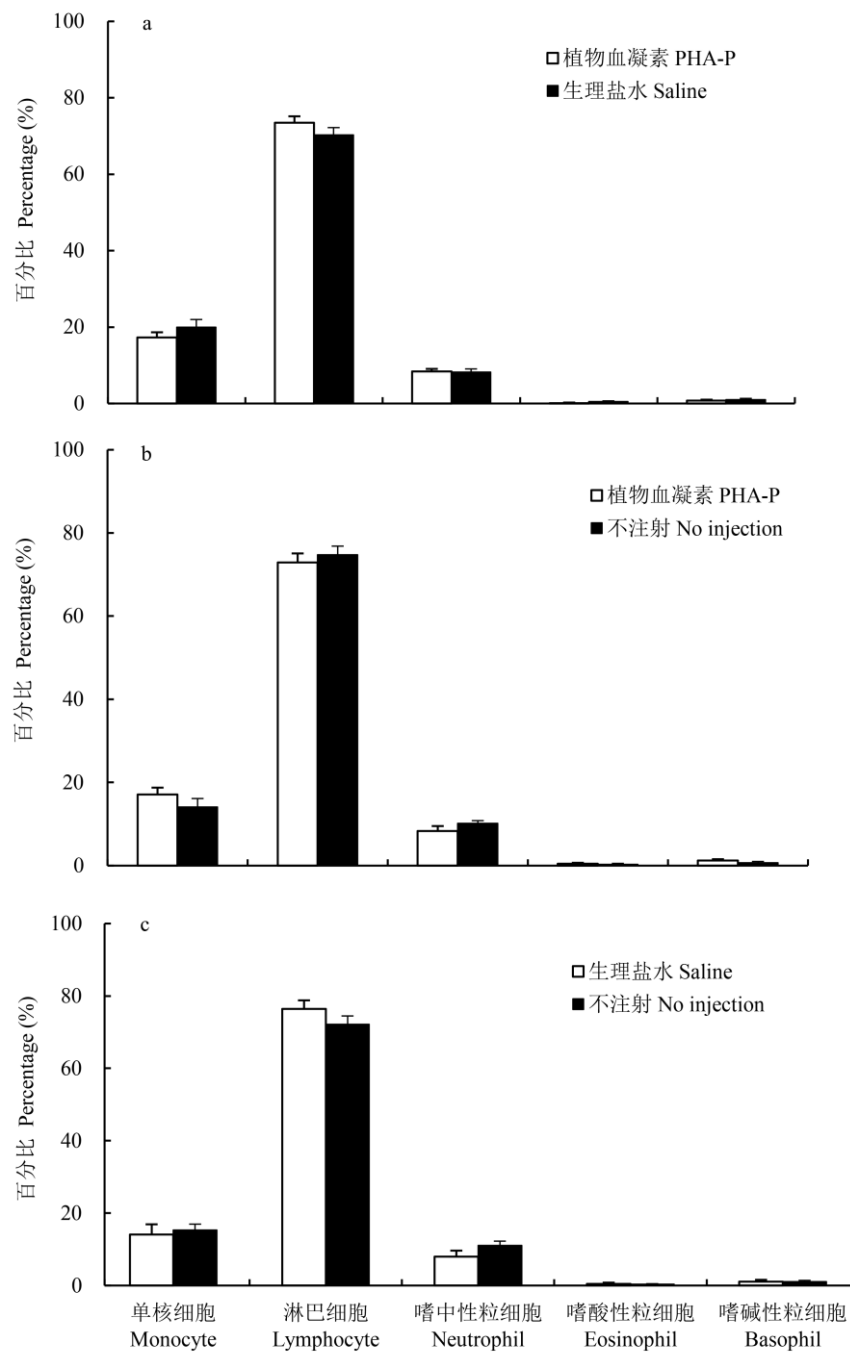


图 5 不同处理组足垫部位皮肤组织中各型白细胞的百分比的比较

Fig. 5 Comparisons of different subtypes of leukocytes in the footpad skin tissues among different groups

a. 植物血凝素-生理盐水组; b. 植物血凝素组; c. 生理盐水组。

a. PHA saline group; b. PHA-P group; c. Saline group.

注射后 6、12、24、48 和 72 h 作为测量时间点 (Brown et al. 2011, Fites et al. 2014, Clulow et

al. 2015, Zhang et al. 2017), 而幼体或蝌蚪则以更为紧凑的 3 h 作为测量时间间隔 (高慧清

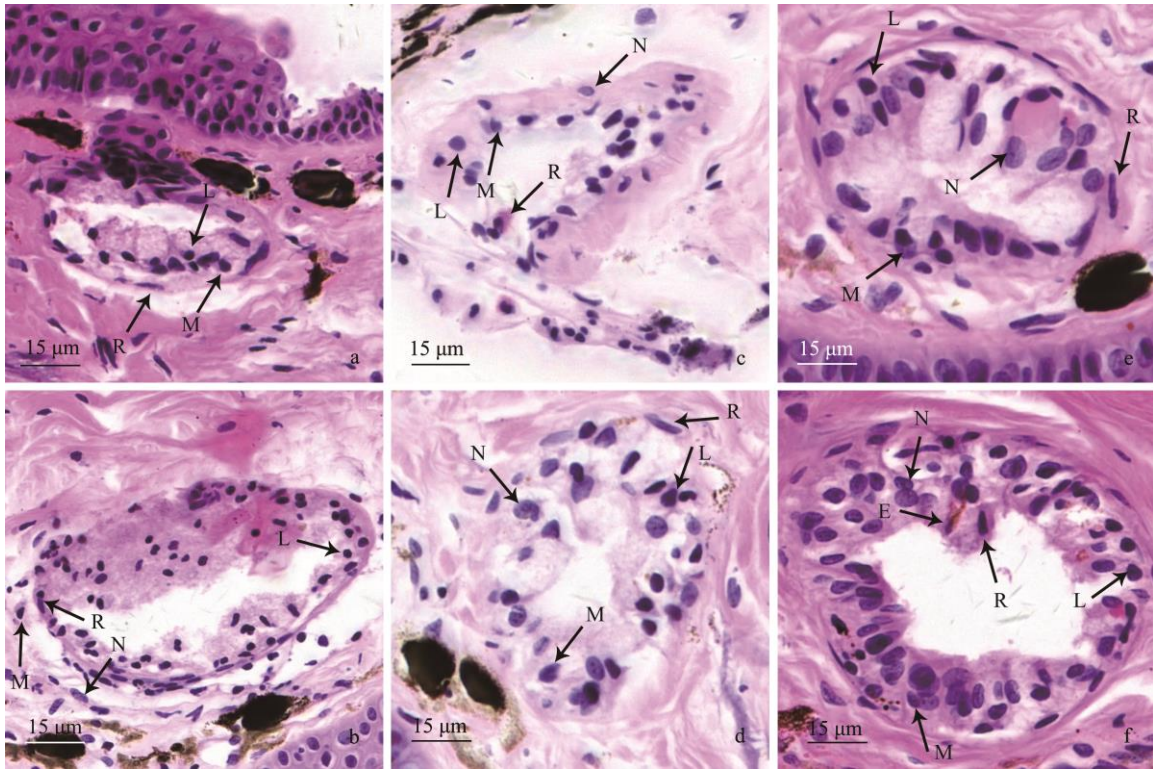


图 6 同一组内左、右足足垫部位皮肤组织切片

Fig. 6 The histological sections of skin tissues of the left and right footpad positions in the same group

a. PHAsaline 组, 注射 PHA-P; b. PHAsaline 组, 注射 Saline; c. PHA-P 组, 注射 PHA-P; d. PHA-P 组, 未注射任何物质; e. Saline 组, 注射生理盐水; f. Saline 组, 未注射任何物质。放大倍数 400 ×。

a. PHAsaline group, PHA-P injection; b. PHAsaline group, saline injection; c. PHA-P group, PHA-P injection; d. PHA-P group, no injection; e. Saline group, saline injection; f. Saline group, no injection. Magnification, 400 ×。

R. 红细胞; L. 淋巴细胞; M. 单核细胞; N. 嗜中性粒细胞; E. 嗜酸性粒细胞。

R. Red blood cell; L. Lymphocyte; M. Monocyte; N. Neutrophil; E. Eosinophil.

等 2017)。用于本研究的中华蟾蜍均为成体，故以注射后 6 的倍数作为测量时间点。成体中华蟾蜍在注射浓度为 5.0 g/L 的条件下，植物血凝素 (PHA-P) 反应在注射后 6 h 即显著升高，12 h 后稍有下降，而在 2.5 g/L 浓度条件下注射后 6 h 和 12 h 后均保持较高的峰值，并在 12 h 达到最高值，且其峰值与 5.0 g/L 的峰值无明显差异。因此，从节约试剂的角度考虑，2.5 g/L 可以作为成体中华蟾蜍植物血凝素 (PHA-P) 的最适注射浓度，注射剂量为 100 μl。对其他体型大小与中华蟾蜍接近的两栖动物，建议可参考使用上述注射浓度和注射剂量。

3.2 PHA-P 反应与足垫部位皮肤组织和血液的关系

中华蟾蜍植物血凝素 (PHA-P) 反应达峰值时，足垫部位皮肤组织中各型白细胞的百分比和血液中的血清杀菌能力均无明显变化，但血液中淋巴细胞的百分比升高，嗜酸性粒细胞的百分比下降，这可能是引起植物血凝素 (PHA-P) 反应的主要原因。植物血凝素 (PHA-P) 刺激是一种整合性的免疫反应，可激发小型哺乳动物和鸟类的天然免疫、细胞介导的免疫和体液免疫反应 (Brock et al. 2014)。经植物血凝素 (PHA-P) 处理后，美洲皱唇蛙

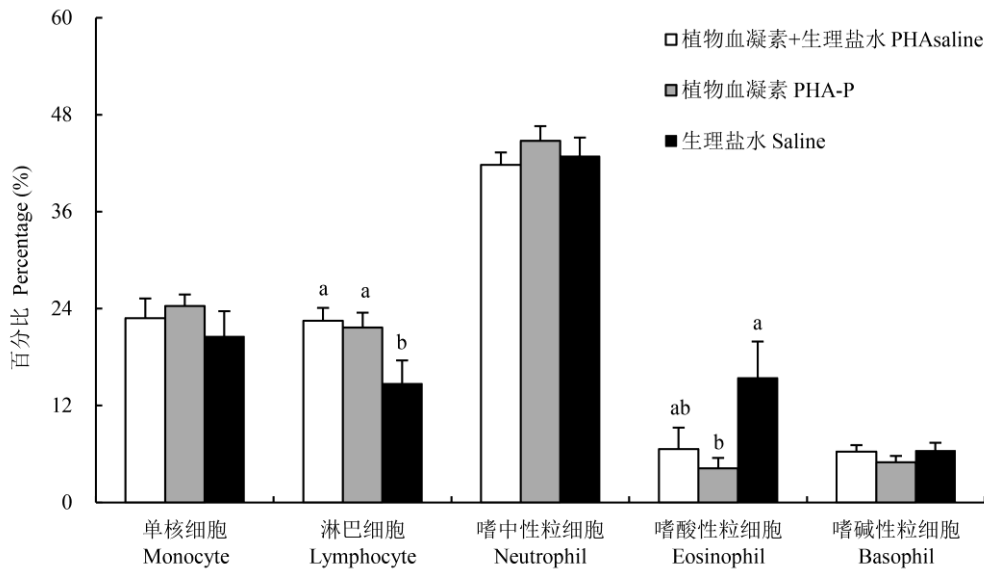


图 7 同一组内雌、雄蟾合并后血液中各型白细胞百分比的组间比较

Fig. 7 Comparisons of different subtypes of leukocytes in circulation blood of male and female toads among different groups

不同的小写字母代表组间差异显著 ($P < 0.05$, $a > b$)。Different lowercase letters indicate significant group differences ($P < 0.05$, $a > b$).

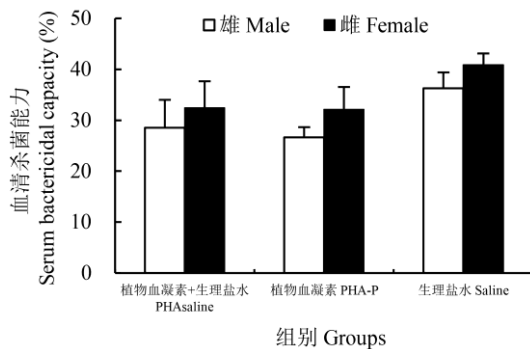


图 8 不同处理组血清杀菌能力的比较

Fig. 8 Comparisons of serum bactericidal capacity in circulation blood among different groups

(*Tadarida brasiliensis*)各型白细胞的数量均升高,淋巴细胞和嗜中性粒细胞的数量显著负相关,前者的高峰值出现于注射后 12 h,后者出现于注射后 24 h (Turmelle et al. 2010);黑线仓鼠 (*Cricetulus barabensis*)的植物血凝素 (PHA-P)反应高峰值出现于注射后 6 h,与外周血中嗜中性粒细胞的百分比和血清杀菌能力正相关 (Zhang et al. 2015),但在对南美地区蓝带鼠 (*Ctenomys talarum*)的研究发现,植物血

凝素 (PHA-P)反应与各型白细胞的百分比均无相关关系 (Merlo et al. 2014a, b)。鸟类中,初次注射植物血凝素 (PHA-P)主要诱发天然免疫,再次注射则将激发体液免疫,这与体液免疫具有记忆能力有关 (Vinkler et al. 2012, Břikov et al. 2015)。两栖动物中,注射植物血凝素 (PHA-P)的部位随物种体型大小而变化。经植物血凝素 (PHA-P)注射后 24 h,甘蔗蟾蜍蹼部皮肤组织中的嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的变化先于植物血凝素 (PHA-P)反应,在 12 h 之前显著增加,随后淋巴细胞在 24 h 时明显增多 (Brown et al. 2011)。注射植物血凝素 (PHA-P)的条纹沼蛙 (*Limnodynastes peronii*)和绿纹树蛙 (*Litoria aurea*)小腿部位皮肤组织中的嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞的百分比都高于注射磷酸盐缓冲液 (PBS)的对侧部位,条纹沼蛙嗜酸性粒细胞比例在注射植物血凝素 (PHA-P)的部位高于注射磷酸盐缓冲液 (PBS)的部位,但绿纹树蛙未见差异 (Clulow et al. 2015)。无斑雨蛙 (*Hyla arborea*)对植物血凝素 (PHA-P)

的反应高数值出现于注射后 14 h, 白细胞的总数在注射后显著升高, 说明植物血凝素 (PHA-P) 可在野外用于指示两栖动物的促炎症反应能力 (Josserand et al. 2015)。

中华蟾蜍对植物血凝素 (PHA-P) 的反应无性别差异, 反应高数值不与足垫皮肤组织任一类型的白细胞及血清杀菌能力相关, 但与血液中淋巴细胞和嗜酸性粒细胞的百分比有关。经外源注射植物血凝素 (PHA-P) 后引起的肿胀反应, 与巨噬细胞和淋巴细胞的浸润和增殖有关, 虽然并不完全等同于更高的免疫功能 (Martin et al. 2006, Vinkler et al. 2011, 2012), 但可作为反映动物体健康状态的一个近似指标 (Břiková et al. 2016)。若在测定植物血凝素 (PHA-P) 反应这一指标的同时, 也能监测天然免疫和体液免疫功能的变化, 将会更为全面地反映中华蟾蜍等两栖动物对环境条件的适应能力。

参 考 文 献

- Břiková B, Albrecht T, Chudíčková M, et al. 2016. Application of Concanavalin A during immune responsiveness skin-swelling tests facilitates measurement interpretation in mammalian ecology. *Ecology and Evolution*, 6(13): 4551–4564.
- Břiková B, Vinklerová J, Vinkler M. 2015. The relationship between health and cell-mediated immunity measured in ecology: Phytohaemagglutinin skin-swelling test mirrors blood cellular composition. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(10): 767–777.
- Boughton R K, Joop G, Armitage S A O. 2011. Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists. *Functional Ecology*, 25(1): 81–100.
- Brock P M, Murdock C C, Martin L B. 2014. The history of ecoimmunology and its integration with disease ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 54(3): 353–362.
- Brown G P, Shilton C M, Shine R. 2011. Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(4): 341–348.
- Clulow S, Harris M, Mahony M J. 2015. Optimization, validation and efficacy of the phytohaemagglutinin inflammation assay for use in ecoimmunological studies of amphibians. *Conservation Physiology*, 3(1): cov042.
- de Bellocq J G, Krasnov B R, Khokhlova I S, et al. 2006. Temporal dynamics of a T-cell mediated immune responses in desert rodents. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, 145(4): 554–559.
- Demas G E, Zysling D A, Beechler B R, et al. 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *Journal of Animal Ecology*, 80(4): 710–730.
- Finger J W, Amanda A L, Thomson P C, et al. 2013. Using phytohaemagglutinin to determine immune responsiveness in saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Australia Journal of Zoology*, 61(4): 301–311.
- Fites J S, Reinert L K, Chappell T M, et al. 2014. Inhibition of local immune responses by the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Infection and Immunity*, 82(11): 4698–4706.
- Gervasi S S, Fougopoulos J. 2008. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, 22(1): 100–108.
- Gilbertson M K, Haffner G D, Drouillard K G, et al. 2003. Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1): 101–110.
- Goto N, Kodama H, Okada K, et al. 1978. Suppression of phytohemagglutinin skin response in thymectomized chickens. *Poultry Science*, 57(1): 246–250.
- Josserand R, Tröjanowski M, Grolet O, et al. 2015. A phytohaemagglutinin challenge test to assess immune responsiveness of European tree frog *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia*, 36(2): 111–118.
- Leavitt R D, Felsted R L, Bachur N R. 1977. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *Journal of Biological Chemistry*, 252(9): 2961–2966.
- Martin L B, Han P, Lewittes J, et al. 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology*, 20(1): 1–10.

- Ecology, 20(2): 290–299.
- Merlo J L, Cutrera A P, Luna F, et al. 2014a. PHA-induced inflammation is not energetically costly in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos). *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, 175(9): 90–95.
- Merlo J L, Cutrera A P, Zenuto R R. 2014b. Inflammation in response to phytohemagglutinin injection in the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): implications for the estimation of immunocompetence in natural populations of wild rodents. *Canadian Journal of Zoology*, 92(8): 689–697.
- Rollins-Smith L A, Woodhams D C. 2012. Amphibian Immunity: Staying in Tune with the Environment// Demas G E, Nelson R J. *Ecoimmunology*. New York: Oxford University Press, 92–143.
- Turmelle A S, Ellison J A, Mendonca M T, et al. 2010. Histological assessment of cellular immune response to the phytohemagglutinin skin test in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 180(8): 1155–1164.
- Venesky M D, Wilcoxon T E, Rensel M A, et al. 2012. Dietary protein restriction impairs growth, immunity, and disease resistance in southern leopard frog tadpoles. *Oecologia*, 169(1): 23–31.
- Vinkler M, Albrecht T. 2011. Handling immunocompetence' in ecological studies: do we operate with confused terms? *Journal of Avian Biology*, 42(6): 490–493.
- Vinkler M, Schnitzer J, Munclinger P, et al. 2012. Phytohaemagglutinin skin-swelling test in scarlet rosefinch males: low-quality birds respond more strongly. *Animal Behaviour*, 83(1): 17–23.
- Xu D L, Wang D H. 2010. Fasting suppresses T cell-mediated immunity in female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, 155(1): 25–33.
- Zhang Z Q, Jin C C, Qu K S, et al. 2017. Immune responsiveness to phytohemagglutinin displays species but not sex differences in three anuran species. *PeerJ*, 5: e3181.
- Zhang Z Q, Zhao Z J. 2015. Correlations between phytohemagglutinin response and leukocyte profile, and bactericidal capacity in a wild rodent. *Integrative Zoology*, 10(3): 302–310.
- 高慧清, 张琼文, 孙思琪, 等. 2017. 变态期花背蟾蝌蚪对植物血凝素的反应模式及其生态学意义. *生态学杂志*, 36(9): 2542–2548.
- 连丽燕, 高慧清, 孙嘉璐, 等. 2018. 变态前后花背蟾蝌蚪消化器官大小及各型白细胞百分比的适应性变化. *生态学杂志*, 37(4): 1204–1210.
- 孙嘉璐, 高慧清, 连丽燕, 等. 2017. 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. *生态学杂志*, 36(8): 2246–2251.
- 张志强. 2015. 动物生态学研究中选择免疫学参数的选择及其优缺点分析. *四川动物*, 34(1): 145–148.
- 张志强, 黄淑丽, 赵志军. 2015. 不同繁殖状态雌性黑线仓鼠对植物血凝素的反应模式. *兽类学报*, 35(1): 74–79.