

龟鳖类血液学研究概述

王军萍

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘要: 龟鳖类血液学的研究涉及生理生态、系统进化、遗传、生物化学、病理学等相关领域,目前已测定了不少种类的血液生理和血液化学指标及这些指标因性别、季节、温度、盐度、潜水等因素的变化。但研究结果不尽相同,特别是白细胞分类、血清酶活性、生化指标的调节机制等还需要进一步研究

关键词: 龟鳖类; 血液学; 血液化学

中图分类号: Q461 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2001)02-47-05

General Situation of Chelonia Hematology and Blood Chemistry Research

WANG Jun-Ping

(College of Life Sciences, Hebei University Baoding 071002, China)

Key words: Chelonia; Hematology; Blood Chemistry

血液是循环流动的液体组织,它在整个机体的生命活动中起着非常重要的作用。一方面营养物质和代谢产物都要通过血液来运输,另一方面在机体内稳态的维持中发挥作用,并参与机体的免疫反应。血液学和比较血液学的研究可以用来说明系统关系、生理适应、健康状况、疾病的辅助诊断和估计环境污染的影响^[1]。爬行动物是在陆地繁殖的变温羊膜动物,在脊椎动物进化中有承上启下的作用。对爬行动物血液学的研究最早可以追溯到19世纪40年代^[2]。其中龟鳖目又是爬行动物中较古老而特化的类群。不同的学者从不同的角度对龟鳖类的血液学进行了多方面研究。而且近10年来,龟鳖类的养殖在我国发展很快,为适应这一形势,本文主要对龟鳖类血细胞和血液化学的研究情况进行简要概述。

1 血液的有形成分——血细胞

1.1 红细胞、比容和血红蛋白 龟鳖类的红细胞椭圆形,有核。成熟红细胞除质膜下有微管外,没有其它细胞器。在正常情况下,血液中也有少数幼稚形红细胞,含有少量线粒体、粗面内质网和溶酶体样小体等细胞器^[3]。红细胞的主要功能是运输氧和二氧化碳。人和脊椎动物的红细胞也与免疫反应有关,有吞噬作用,并可激活其它免疫反应系统^[4]。龟鳖类红细胞是否也有

类似反应尚未见报道

已测定的龟鳖类红细胞的数目(RCC)为 $154\ 166 \sim 980\ 000\ \text{cells}/\text{mm}^3$,大小为 $(16.9 \sim 21.5)\ \mu\text{m} \times (10.2 \sim 13.2)\ \mu\text{m}$,比容(PCV)20%~35%,血红蛋白(Hb) $6\ \text{g}/100\ \text{ml} \sim 12\ \text{g}/100\ \text{ml}$ ^[5]。除动物种类不同外,年龄、大小、性别、季节、健康状况、环境和食物都可能影响龟鳖类RCC、PCV和Hb值^[6]。绿海龟(*Chelonia mydas*)随年龄增长,PCV和Hb明显增加^[8]。背甲长者PCV较高、红细胞较大而圆、数目少^[9]。成年雄绿海龟的Hb、PCV、RCC在夏季和冬季有显著的差别^[10]。成年黑海拟水龟(*Mauremys caspica leprosa*)的RCC、PCV和Hb浓度有季节变化,而平均血细胞体积(MCV)、平均血细胞血红蛋白(MCH)和平均血细胞血红蛋白浓度(MCHC)季节差异不显著。红细胞直径不变,但胞核在秋季显著变小。这些季节性变化可能和性周期有关^[11]。雄性卡罗林那箱龟(*Terrapene carolina*)的RCC显著高于雌性^[12]。中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)RCC雄性高于雌性^[13]。然而也有实验结果是成年绿海龟PCV、RCC、Hb雌雄间无差别^[8]。海龟的血红蛋白非常独特,其结构特点更有利

第一作者简介 王军萍,女,35岁,博士,讲师;研究方向:基础动物学;

收稿日期:2000-01-24;修回日期:2000-10-30

于氧的运输和向组织释放而不利于储存。绿海龟的血红蛋白有负温度效应,作者推测这可能与一些种群的长距离洄游能力有关^[14]。Petruzzellir^[15]测定了蠓龟(*Caretta caretta*)血红蛋白 α 链和 β 链的氨基酸顺序,与人的血红蛋白相比,在 α_1 和 β_1 及 α_2 和 β_2 接触点的几个氨基酸残基有差别,并研究了在不同温度、氢离子浓度、有机磷浓度下的功能特点。锦龟(*Chrysemys picta bellis*)红细胞中具有两种血红蛋白成分:HbA和HbD,它们含有相同的 β 亚单位。除龟外,这种形式只在鸟类中发现过^[16]。龟的部分血红蛋白以甲基血红蛋白的形式存在^[17]。

1.2 白细胞 一般脊椎动物的白细胞可分为有粒白细胞和无粒白细胞两类,前者包括嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞,后者包括淋巴细胞和单核细胞。爬行动物的粒细胞有自己的特点,其嗜中性粒细胞也称为嗜异性粒细胞、假嗜酸性粒细胞或特殊颗粒白细胞,此外还有特有的嗜天青粒细胞。但关于嗜天青粒细胞的有无,及其与其它血细胞的关系尚有不同的看法^[18,19]。有人根据在有些爬行动物的嗜中性粒细胞胞质中也含有嗜天青颗粒,分析嗜天青粒细胞可能是一种未成熟的嗜中性粒细胞^[2]。但从血细胞的发生上来看,嗜中性粒细胞中嗜天青颗粒的出现是在早幼粒细胞阶段^[20],这种细胞出现在骨髓中。外周血中出现7%~18%的嗜天青粒细胞,分叶核又常见^[18],可见它不是一种幼稚形的细胞。所以我们认为爬行动物的嗜天青粒细胞和嗜中性粒细胞不是同一种细胞。这可能正反应了爬行动物自身的特殊性。要获得直接的证据,需要实验方法的改进。

各种粒细胞的细微结构、大小、数量因种类不同而有差异,其中嗜碱性粒细胞差异大小可能与其进化位置有关,亲缘关系越远,差异越大^[2,21]。

白细胞的数目变化很大,受许多因素影响。除种间的差别外,还有季节、性别、营养和健康状况等。①季节变化:成年雄绿海龟的白细胞数目在夏季高于冬季^[22],这种变化可能源于温度的影响。鳖白细胞以春季最多,约为冬眠期的两倍^[13],其意义在于适应防御因气温升高而日益增加的微生物的侵袭。Garcia等^[23]研究了黑海拟水龟外周血有粒白细胞体外活动的季节变化。包括吞噬过程的各个方面,组织吸附能力、自发运动和趋化性、附着和摄取外来细胞或惰性颗粒、消化吞噬物的能力。实验在春、夏、秋、冬四季,37℃体外进行。结果附着指数秋季高、冬季低。自发运动不受季节影响,但趋化性在冬季显著增加,秋季降低。在夏季和秋季,每100个颗粒细胞吸附和吞噬外来细胞和惰性颗

粒的数目更高,而冬季和春季则较低。消化能力在夏季大大降低。通过与人类有粒白细胞的比较表明这些动物的细胞具有足够的吞噬反应能力。②性别变化:一般雄性高于雌性^[15,24],有些无差别^[8]。③营养状况:在养殖条件下,由于胁迫或营养的关系,可能会引起白细胞数目的提高^[8]。对中华鳖、乌龟(*Chinemys reevesii*)和丽龟(*Lepidochelys kepmmi*)白细胞的细胞化学反应进行了研究,结果不尽相同^[2,3,25]。

1.3 血栓细胞 主要参与凝血和止血过程,其功能类似哺乳动物的血小板。血栓细胞小,卵圆形,核较长,中位。细胞质一薄层围绕在核周围。胞质几乎不着色,在血涂片中难以看清。血栓细胞易碎,在血涂片中胞质常丢失,核多个聚集在一起^[8,13]。电镜下观察,质膜下有环状微管,胞质中含有管道系统、线粒体、核糖体、粗面内质网、糖元颗粒和致密颗粒等^[3]。

血栓细胞的大小和数目变化很大。但也有的作者没有观察到血栓细胞,认为可能存在其它的凝血机制^[26],原因不清楚。另外,由于血栓细胞在血涂片上的分布并不均匀,而且与小淋巴细胞不易区分。因此其观察和计数的方法迫切需要改进。Jose用单克隆抗体技术对虹鳟的血栓细胞进行标记^[27],可为借鉴。

2 血液化学

血浆占血液体积的60%~80%,pH为7.2~7.8^[17]。血液的正常化学成分反应了其物质代谢的特点和机体的平衡状态。

2.1 电解质 血浆总渗透压主要来源于电解质,一般海龟较高,淡水种类较低。 Na^+ 是主要的阳离子, Cl^- 和 HCO_3^- 是主要的阴离子(占阴离子80%~90%),三者构成血浆渗透压的85%以上^[17]。龟鳖类的重碳酸盐的浓度很高,远远高于鱼、蛙和蛇,这意味着其血液有更强的缓冲能力^[28]。血浆酸碱平衡和电解质平衡的影响因素有很多。①温度:龟鳖类是变温动物,体温对电解质平衡有重要影响。在黄腹彩龟(*Pseudemys scripta*)及体外血浆样本,温度升高, CO_2 升高,导致pH降低。在冬季蛰伏期酸碱性的改变也可能是温度的原因。刺鳖(*Trionyx spinifera*)在冬季血浆钠可能会丧失一半,因为咽壁绒毛的钠主动运输被低温所抑制^[17]。黑海拟水龟血浆渗透压、钙、镁含量秋季显著高于夏季,磷含量秋季显著降低,钠、钾没有明显的季节变化^[11],但美国Canaveral水域蠓龟血浆渗透压、钠、钾值在温暖月份升高^[29]。人工孵化出的幼龟在-2.5℃12小时血浆钾有少许升高,但不改变血液pH、酸碱平衡、渗透压或其它血浆离子^[30]。②盐度:龟鳖类可以忍受很宽的盐度范

围,绿海龟和蠵龟也可以在淡水中生活。维持渗透压的主要器官是肾脏,其次还有一些辅助器官,如刺鳖咽壁特化的细胞可以从淡水(5 mOs/L)中吸收钠,而在海洋中生活的动物则由盐腺排除多余盐分。③潜水:是龟鳖类行为特点之一。潜水时,处于氧缺乏状态,因此它们对缺氧的耐受力远高于其它四足动物。潜水期间血液成分会发生大幅度变动,此时能量主要来源于糖酵解或其它无氧途径。乳酸盐水平升高,pH降低可至6.8。Ultsch研究了北美几种淡水龟鳖在潜水时血浆成分的变化(10℃),在水下100天时,刺鳖和非洲侧颈龟(*Sternotherus odoratus*)血浆 Na^+ 、 HCO_3^- 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度分别降低8%和25%、23%和25%、16%和29%、12%和49%、12%和38%。 K^+ 浓度分别升高51%和23%,乳酸盐浓度分别升高396%和444%^[31]。

2.2 有机成分 血糖是易变的一项血液学参数,低者33 mg/100 ml,高者可达143.7 mg/100 ml^[11,17]。一般龟鳖类血糖水平与蛙、蛇较接近,而比鱼类低^[28]。温度、潜水、季节、摄食、饥饿等均可导致血糖水平的波动。血糖的调节机制所知甚少,观察发现中华鳖的胰岛不发达^[32]。

游离氨基酸包括组成蛋白质的常见19种氨基酸和鸟氨酸、瓜氨酸、 α -氨基丁酸等,天门冬氨酸很少能检测到。我们在中华鳖血清中没有检出^[33],但陈瑞等在山瑞鳖(*Trionyx steindachneri*)血清冻干干粉中检测得到天门冬氨酸含量较高,为8.29 mg/100 mg^[34],原因不清楚。氨基酸水平也受温度等因素的影响,在低温冷冻期间,管龟(*Trachemys scripta*)血液中总游离氨基酸含量显著升高,可能增强动物的抗冻能力^[35]。

氨、尿酸和尿素是蛋白质代谢的产物,氨在血液中仅存微量,尿酸水平较低1~9 mg/100 ml,尿素浓度较高22~96 mg/100 ml。龟的尿素氮和尿酸的含量也较蛇和蛙低^[28]。幼绿海龟血浆尿酸雌雄间有显著差异^[22]。

山瑞鳖血清甘油三酯和胆固醇的含量显著低于人^[34],龟的胆固醇含量明显低于蛇和蛙^[28]。幼绿海龟血浆胆固醇在雌雄间有显著差异^[24],但中华鳖幼鳖血清脂类成分间无显著的性别差异^[36]。

血浆蛋白质占3%~7%,其种类很多。Yin^[37]从10种龟鳖血浆或血清中提纯了白蛋白,测定了等电点、分子量、电泳运动性、消光系数。白蛋白约占总血浆蛋白的23%,等电点在4.8~5.4,分子量69 000~71 500。在pH 8.3凝胶电泳运动性与人的白蛋白对比,只有中华鳖的泳动较快,其余均比人白蛋白泳动慢。消光系数都很低,在4.0~5.9之间,不同的龟以上物理特性彼此相似并与人的白蛋白相似。鳖属(*Trionyx*)血浆白蛋白

氨基酸组成与其它属差异最大。蠵龟属(*Chelydra*)与其它相似。陆龟属(*Geochelone*)与*Batagurine*属之间差异最小,另外几属为锦龟属(*Chrysemys*)、水龟属(*Clemmys*)、箱龟属(*Terrapene*)、龟属(*Chinemys*)、拟水龟属(*Mauremys*)、丽龟属(*Lepidochelys*)。鄂末远等^[38]采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,对我国乌龟、平胸龟(*Platysternon megacephalum*)、黄缘闭壳龟(*Cistoclemmys flavomarginata*)和四眼斑水龟(*Clemmys quadriocellata*)的血清蛋白进行了比较分析。结果这4种龟的血清白蛋白区带较其它动物有些不同,其电泳迁移过程出现不连续的断裂现象,说明不是单一的一种蛋白质。从其电泳行为可以看出科属之间的差别程度。Osada等^[39]和Iwai等^[40]提纯了绿海龟血浆中 α -巨球蛋白和卵巨球蛋白,结果 α -巨球蛋白的浓度为4 mg/ml,卵白中卵巨球蛋白的浓度为0.4 mg/ml,这两种蛋白质的分子量和氨基酸组成相似。与甲胺或蛋白酶作用后构象发生变化。

血清中具有多种酶,对血清同工酶的研究和比较可以用来确定不同种类或地理群之间的遗传差异程度,说明物种的亲缘关系,同时血清酶活性的测定可以揭示某些组织器官的功能状态。Braddon等^[41]用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳和特殊酶染色对5种海龟血样的12种酶进行了分析,确定了4种酶:乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶、肽酶和一种酯酶的等位基因频率和多态性位点数目。其它酶都是单态的,只有蠵龟和绿海龟表现显著的多态性。司马明忠等^[42]用平板扩散法测定了中华鳖和小白鼠正常血清溶菌酶,并进行了比较,中华鳖血清溶菌酶活力稍低于小白鼠,但两者均在100 U/ml以上,没有发现与个体大小、年龄及性别的联系。山瑞鳖^[34]、缅甸陆龟(*Indotestudo elongata*)^[43]和中华鳖^[36]血清中肌酸激酶及其同工酶的活性都很高,可达人的30倍左右,这一点值得重视。

综上所述,可见龟鳖类血细胞和血液化学的研究涉及生理生态、系统进化、遗传、生物化学、病理学等许多相关领域,随着研究的深入,必将为龟鳖类的利用和保护提供更多有益的资料。

致谢 本文承蒙李德尚教授和郭向荣教授审阅,衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] Ellis, A. E. The leucocytes of fish. *J. Fish Biol.*, 1979, 11:453~491.
- [2] 李丕鹏. 中国龟鳖类血细胞及其发生研究. *四川动物*, 1997, 15(增刊):105~114.
- [3] 李丕鹏, 朱洪文. 水龟有粒白细胞的荧光和电镜细胞

- 化学研究. 南京大学学报, 1991, 27: 520 ~ 523.
- [4] 陈思义, 张德成, 陈国强等. 恒河猴红细胞免疫功能的研究. 动物学报, 1993, 39(2): 185 ~ 188.
- [5] Duguy, R. Numbers of blood cells and their variation. In: C. Gans, T. S. Parsons eds. *Biology of the Reptilia*, Vol. 3. New York: Academic Press, 1970. 93 ~ 109.
- [6] 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. 动物学杂志, 1999, 33(1): 29 ~ 31.
- [7] Frari, W. Turtle red blood cell packed volumes, sizes and numbers. *Herpetologica*, 1977, 33: 167 ~ 190.
- [8] Fern, E. W., G. K. Ebanks. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetologica*, 1984, 40(3): 331 ~ 336.
- [9] Frari, W. Sea turtle red blood cell parameters correlated with carapace lengths. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1977, 56A: 467 ~ 472.
- [10] Bashtar, A. R., M. E. S. Some aspects of the hematology of the tortoise *Testudo kleinmanni* Lortet. and the turtle *Chelonia mydas* Linnaeus. MS Thesis. Cario: Cairo University, 1979.
- [11] Pages, T., V. I. Peinado, G. Viscor. Seasonal changes in hematology and blood chemistry of freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992, 103A(2): 275 ~ 278.
- [12] Altland, P. D., E. C. Thompson. Some factors affecting blood formation in turtles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, 99: 456 ~ 459.
- [13] 程备久, 蒋立科, 宋祥芬等. 鳖血细胞数量的季节变化及形态结构研究. 应用生态学报, 1996, 7(4): 411 ~ 416.
- [14] Friedman, J. M., S. R. Simon, T. W. Scott. Structure and function in sea turtle hemoglobins. *Copeia*, 1985(3): 679 ~ 693.
- [15] Petruzzelli, R., G. Aureli, A. Lania *et al.* Diving behaviour and hemoglobin function: the primary structure of the α and β chains of the sea turtle (*Caretta caretta*) and its functional implications. *Biochemical Journal*, 1996, 316(3): 959 ~ 965.
- [16] Ruecknagel, K. P., G. Braunitzer. The primary structure of the major and minor hemoglobin component of adult western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1988, 369(2): 123 ~ 131.
- [17] Dessauer, C. H. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. In: C. Gans, T. S. Parsons eds. *Biology of the Reptilia*, Vol. 3. New York: Academic Press, 1970. 1 ~ 71.
- [18] 王石泉. 鳖外周血细胞显微形态及细胞化学. 动物学杂志, 1995, 30(1): 16 ~ 18.
- [19] Saint gironns, M. C. Morphology of the circulating blood cells. In: C. Gans, T. S. Parsons eds. *Biology of the Reptilia*, Vol. 3. New York: Academic Press, 1970. 73 ~ 91.
- [20] 陈文杰主编. 血液分子细胞生物学. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [21] 李丕鹏, 朱洪文. 龟鳖类嗜碱性粒细胞的显微和超微结构. 动物学报, 1990, 36: 210 ~ 211.
- [22] Bolten, A. B., K. A. Bjorndal. Blood profiles for wild population of green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahama: Size-specific and sex-specific relationships. *Journal of Wildlife Diseases*, 1992, 28(3): 407 ~ 413.
- [23] Garcia, S., M. D. L. Fuente. Seasonal variation in the activity *in vitro* of peripheral blood granulocytes in the turtle *Mauremys caspica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, 100A(3): 697 ~ 720.
- [24] 喻维新. 乌龟血液成分的初步检测. 动物学报, 1983, 29(2): 193 ~ 194.
- [25] Cannon, M. S. The morphology and cytochemistry of the blood leukocytes of Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). *Canadian Journal of Zoology*, 1992, 70(7): 1336 ~ 1340.
- [26] 蒋立科, 宋祥芬, 齐跃敏等. 鳖血细胞结构及功能的初步研究. 动物学报, 1996, 42(3): 327 ~ 329.
- [27] Jose, R. K. Jr, Chihaya Nakayasu Juan Carlos Rodriguees souza, and Nobuaki Okamoto. Characterization of a monoclonal antibody specific to rainbow trout thrombocytes. *J. Experimental Zoology*, 1999, 284: 309 ~ 316.
- [28] 卢宗藩主编. 家畜及实验动物生理生化参数. 北京: 农业出版社, 1983.
- [29] Lutz, P. L., C. A. Dunbar. Variation in the blood chemistry of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Fish Bull.*, 1987, 85(1): 37 ~ 44.
- [30] Storey, K. B., D. G. McDonald, J. G. Duman *et al.* Blood chemistry and ice nucleating activity in hatching painted turtles. *Cryo. Letters*, 1991, 12(6): 351 ~ 358.
- [31] Ultsch, G. R., J. S. Nasser. Plasmas ion balance of north American freshwater turtles during prolonged submergence in normoxic water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990, 97A(4): 505 ~ 512.
- [32] 王文, 杜开和. 中华鳖消化系统的组织学研究. 南京师范大学学报(自然科学版), 1996, 19(2): 52 ~ 56.
- [33] 王军萍, 韩希福. 中华鳖血清游离氨基酸含量的分析. 河北大学学报, 1998, 18(2): 198.
- [34] 陈瑞, 黄如彬, 杨争光等. 鳖血生化指标、氨基酸和矿物元素含量的测定. 动物学杂志, 1999, 34(4): 29 ~ 31.
- [35] Churchill, T. A., K. B. Storey. Responses to freezing exposure of hatching turtles *Trachemys scripta elegans*: Factors influencing the development of freeze tolerance by reptiles. *Journal of Experimental Biology*, 1992, 167: 221 ~ 233.
- [36] 王军萍, 韩希福. 中华鳖血液生物化学指标的研究. 中

- 国水产科学, 2000, 7(4): 119 ~ 121.
- [37] Yin, F. Y., M. Frair, S. H. Mao. Physical and chemical properties of some turtle blood albumins with taxonomic implication. *Comp. Biol. Physiol.*, 1989, 93B(2): 283 ~ 289.
- [38] 鄂未远, 赵尔宓. 我国四种龟类血清蛋白的比较分析. *两栖爬行动物学报*, 1984, 3(4): 1 ~ 3.
- [39] Osada, T., T. Sasaka, A. Ikai. Purification and characterization of alpha-macroglobulin and ovomacroglobulin of the green turtle (*Chelonia mydas japonica*). *J. Biochem. Tokyo*, 1988, 103(2): 212 ~ 217.
- [40] Ikai, A., T. Osada, M. Nishigai. Conformational changes of alpha-macroglobulin and ovomacroglobulin from the green turtle (*Chelonia mydas japonica*). *J. Biochem. Tokyo*, 1988, 103(2): 218 ~ 224.
- [41] Braddon, G. S., T. Inabnett. Analysis of genetic variance of sea turtle common in the Southeast U.S. and Caribbean, using RAG-IFE coupled with specific enzyme staining. In: H. E. Kumpf ed. *Proceedings of the Stock Identification Workshop*. Florida, 1987. 180 ~ 181.
- [42] 司马忠明, 刘明河. 中华鳖和小白鼠正常血清溶菌酶的初步测定和比较. *生物技术*, 1996, 6(4): 26 ~ 27.
- [43] 张润, 唐家传, 吴昆华等. 龟的影像学和血液学研究. *动物学杂志*, 1999, 34(3): 34 ~ 37.