

壳聚糖对急性氨氮胁迫下中华鳖稚鳖非特异性免疫反应的影响*

宋超^{1,2} 牛翠娟^{1**} 陈欣然¹

1. 北京师范大学生命科学院, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 北京 100875

2. 北京市辐射安全技术中心, 北京 100089

摘要 本研究旨在探讨壳聚糖对急性氨氮胁迫下中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 稚鳖非特异性免疫功能的影响。实验共设 5 组, 实验组中华鳖分别腹腔注射 0 mg/ml (C0 组)、1 mg/ml (C1 组)、5 mg/ml (C2 组)、50 mg/ml (C3 组) 壳聚糖溶液 0.1 ml, 并饲养于总氨氮浓度 (TAN) 为 110 mg/L 的水环境中; 对照组注射等量生理盐水溶液并饲养于新鲜晾晒自来水中。注射 7 d 后观测外周血和脾脏中淋巴细胞 ANAE 阳性率、血清旁路途径溶血活性、血清溶菌活性。与对照组相比, C0 组外周血 T 淋巴细胞 ANAE 阳性率和血清旁路途径溶血活性均有显著提高, 脾脏 T 淋巴细胞和血清溶菌活性没有显著变化。与 C0 组相比, 注射壳聚糖各组外周血 T 淋巴细胞 ANAE 阳性率和血清溶血活性均有不同程度的显著下降, 并且恢复到接近对照组的水平 ($P > 0.05$), 只有 C3 组溶血活性显著低于对照组; 注射壳聚糖对脾脏中 T 淋巴细胞 ANAE 活性没有显著影响。C2 组溶菌活性显著高于其他组, 其他各组间差异不显著。表明壳聚糖对氨氮胁迫导致的免疫应激反应有一定的拮抗作用, 其作用强度因壳聚糖浓度和免疫指标不同而异 [动物学报 53 (2): 270–277, 2007]。

关键词 中华鳖 壳聚糖 氨氮胁迫 ANAE 阳性率 血清旁路途径溶血活性 溶菌活性

The effect of chitosan on some non-specific immune indices of the juvenile soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis**

SONG Chao^{1,2}, NIU Cui-Juan^{1**} CHEN Xin-Ran¹

1. Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

2. Beijing Radiation Safety Technology Center, Beijing 100089, China

Abstract This study was conducted to investigate the effect of chitosan on non-specific immune function in juvenile soft-shelled turtles under acute ammonia stress. Turtles were divided into five groups. Turtles in the treatment groups were injected with 0 mg/ml (C0 group), 1mg/ml (C1 group), 5 mg/ml (C2 group), or 50 mg/ml (C3 group) chitosan solution 0.1 ml, and exposed to ammonia stress with 110 mg/L total ammonia nitrogen (TAN) in their aquaria. The control group was injected with the same volume of physiological salt solution and reared in fresh water. After 7 days, we measured α -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity in peripheral blood and spleen, hemolytic activity and bacteriolytic activity. C0 group showed higher ANAE positivity in blood and hemolytic activity than the control, but showed no significant difference in bacteriolytic and ANAE activity in spleen. ANAE positivity in blood and hemolytic activity decreased after injecting with chitosan in the ammonia-stressed groups and resumed to the control level ($P > 0.05$). Only the C3 group showed significantly lower hemolytic activity than the control. The injection of chitosan induced no significant change in ANAE positivity in spleen. Bacteriolytic activity in the C2 group was higher than in the other groups. In conclusion, chitosan could restore the stress responses induced by ammonia exposure. The degree of this effect depended on the concentration of chitosan solution and the immune indices tested [Acta Zoologica Sinica 53 (2): 270–277, 2007].

2006-10-20 收稿, 2007-01-10 接受

* 国家自然科学基金资助 (No.30271014) [This research was funded by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No.30271014)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: cjniu@bnu.edu.cn

© 2007 动物学报 Acta Zoologica Sinica

Key words Soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*, Chitosan, Ammonia exposure, ANAE positivity, Alternative complement pathway hemolytic activity, Bacteriolytic activity

氨氮是水域生态系统及水产养殖系统中一种常见的污染因子,主要以离子态氨(NH_4^+)和非离子态氨(NH_3 , UIA-N)两种形式存在,在总氨氮(TAN)浓度一定的情况下,水体中非离子氨和离子态氨维持一种动态的平衡,该平衡主要受pH和温度的影响,温度越高,pH越高,非离子氨浓度越高。通常所说的氨中毒主要是由非离子氨引起的。目前有关氨胁迫的研究主要集中于水生鳃呼吸、氨排泄动物。氨胁迫可以分为急性和慢性两种,急性氨中毒会导致鱼类呼吸道上皮损伤,中枢神经系统紊乱等,严重的急性氨中毒会导致动物发生痉挛甚至死亡(Randall and Tsui, 2002);长期的氨暴露往往导致动物生长率下降、摄食率降低(Person-Le et al., 2003)、免疫功能下降(Chen et al., 2004)等。

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)是一种古老的、次生性水生爬行动物,具有重要的研究价值和经济价值。养鳖大多采取高密度、全封闭的温室养殖模式,水交换差,而中华鳖生长需要摄食高蛋白饲料,残饵和排泄物往往导致鳖场水质中氨氮严重超标(总氨氮量常在50–80 mg/L)。有关环境氨胁迫对中华鳖免疫功能影响的研究报道很少,且多集中在慢性胁迫方面(陈欣然等, 2005; 陈欣然等, 2006; 蒲丽君等, 2006)。

壳聚糖是自然界中存在的一种碱性多糖,其分子内存在大量的游离氨基和羟基,是一种天然的阳离子聚合物。壳聚糖无毒,无免疫抗原反应,具有良好的生物相容性和稳定性。目前,壳聚糖作为一种免疫刺激剂的研究已经涉及多种鱼类(Anderson and Siwicki, 1994; Anderson et al., 1995; Siwicki et al., 1994)。免疫刺激剂的免疫刺激效果与免疫刺激剂的种类、剂量、时效性、动物种类、动物的生理状况等很多因素有关。免疫刺激剂通过刺激鱼类的非特异性免疫系统发挥作用,机体产生免疫反应的最高峰多出现在施用后一周前后。罗非鱼(tilapia, *Oreochromis niloticus*)腹腔注射0.1 mg/g体重的蛋白质多糖制剂PS-K(Protein-bound polysaccharide preparation)后,增强了对迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 的抵抗力,且最强的免疫刺激作用出现在注射一周后(Kyung and Hyun, 1996)。Figueras et al. (1997)的研究表明,100 g

的大菱鲆(turbot, *Scophthalmus maximus*)腹腔注射葡聚糖,0.5 mg/尾为最优剂量。大菱鲆腹腔注射葡聚糖溶液后7 d, O_2^- 的产量和血清溶菌酶浓度都显著高于注射后14 d和21 d(Santarém et al., 1997)。有关免疫刺激剂对爬行类影响的研究还很少见,尚未见有关对龟鳖类施用壳聚糖的作用效果研究。

陈欣然等(2005)在对中华鳖稚鳖的研究中已经证实暴露在低于30 mg TAN/L (2.07 mg UIA-N/L)中21 d,对中华鳖生长及免疫指标没有显著影响。中华鳖饲养于1.49 mg UIA-N/L, 2.61 mg UIA-N/L和4.14 mg UIA-N/L的环境中84 d,其非特异性免疫指标如血清溶血活性、血清杀菌活性、血清溶菌活性和脾脏系数没有显著变化;但中华鳖血液和脾脏淋巴细胞ANAE阳性率显著下降(陈欣然等, 2006)。蒲丽君等(2006)的研究表明,在总氨氮浓度32.4、57.6、83.5 mg TAN/L的水环境中饲养中华鳖,短期胁迫和长期胁迫对中华鳖的多项生理指标(血氨含量、谷氨酰胺合成酶活性、谷氨酸脱氢酶活性、血浆中皮质酮含量)都无显著影响。本研究在实验室条件下观测注射不同浓度壳聚糖溶液后,处于高浓度氨氮胁迫环境下的中华鳖稚鳖的淋巴细胞 α -醋酸奈酯酶(α -naphthyl acetate esterase, ANAE)阳性率、血清溶血活性、溶菌活性的变化,初步评价壳聚糖对急性氨氮胁迫下中华鳖非特异性免疫功能的影响。实验将水环境中的氨浓度继续提高到110 mg TAN/L(约5.5 mg UIA-N/L),观测急性(7 d)、高浓度氨暴露条件下,腹腔注射不同浓度壳聚糖溶液对中华鳖稚鳖非特异性免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与处理

中华鳖稚鳖(21.0 ± 5.0 g, Mean \pm SD)购自北京丰台养殖场,饲养于80 cm \times 40 cm \times 30 cm的玻璃水族箱中,自然光照。喂以中华鳖稚鳖饲料,每日下午投喂一次,饲料选用北京佳伟生物技术公司生产的中华鳖饲料,其营养成分和能值见周显青等(1998)。饲料用温水和成团,再搓成约1 cm的长条投喂,在水池中设多个投喂点,以保证每只鳖都能吃到食物。投饲量以使动物达到饱足并有少量

剩余为准。投喂 1 h 后, 吸出剩余饲料, 水温控制在 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。每次换水用等温的晾晒的新鲜自来水。在此条件下驯化两周后开始实验。

将 40 只健康稚鳖分成 5 组, 分别饲养于 5 个水族箱内, 每组 8 只。其中一组设为对照组, 用晾晒的新鲜自来水饲养, 腹腔注射消毒生理盐水溶液。其余 4 组均在总氨氮浓度为 110 mg TAN/L 的氨氮胁迫环境下饲养, 其中一组腹腔注射消毒生理

盐水溶液, 作为氨氮胁迫下对照组 (C0 组); 另外 3 组分别腹腔注射含不同浓度壳聚糖的消毒生理盐水溶液 (分组和每组注射壳聚糖的具体浓度情况见表 1), 壳聚糖标准品由中国科学院动物研究所北京中科天鹤生物技术有限公司提供。实验过程中每天换水后添加适量的 NH_4Cl , 换水前后测量饲养水质 pH, 保持总氨氮浓度和 pH 稳定 (水质情况见表 2)。

表 1 中华鳖分组

Table 1 The grouping of soft-shelled turtles

	组别 Groups				
	对照组 Control	C0	C1	C2	C3
注射物 Injections	0.85% 生理盐水 0.85% Physiological saline	0.85% 生理盐水 0.85% Physiological saline	壳聚糖生理盐水溶液 Chitosan physiological saline solution	壳聚糖生理盐水溶液 Chitosan physiological saline solution	壳聚糖生理盐水溶液 Chitosan physiological saline solution
注射壳聚糖浓度 Concentration of chitosan	0 mg/ml	0 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	50 mg/ml
饲养条件 Rearing condition	脱氯自来水 Dechlorination tap water	110 mg/L 氨氮溶液 110 mg TAN/L solution	110 mg/L 氨氮溶液 110 mg TAN/L solution	110 mg/L 氨氮溶液 110 mg TAN/L solution	110 mg/L 氨氮溶液 110 mg TAN/L solution

表 2 氨胁迫期间各组水质情况 (平均值 \pm 标准差)

Table 2 The parameters of aquarium water during the ammonia exposure experiments (Mean \pm SD)

指标 Parameters	组别 Groups				
	对照组 Control	C0	C1	C2	C3
总氨氮 TAN (mg/L)	15.32 \pm 0.40	102.87 \pm 1.03	103.81 \pm 1.07	104.17 \pm 1.41	103.32 \pm 1.91
非离子氨 UIA-N (mg/L)	0.81 \pm 0.02	5.39 \pm 0.25	5.58 \pm 0.13	5.47 \pm 0.09	5.47 \pm 0.23
pH	7.87 \pm 0.07	7.73 \pm 0.16	7.72 \pm 0.11	7.77 \pm 0.10	7.76 \pm 0.12
温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	28.00 \pm 0.17	28.30 \pm 0.19	28.23 \pm 0.34	27.91 \pm 0.25	28.00 \pm 0.22

注射 7 d 后, 将全部鳖迅速断颈处死, 取颈动脉血, 得到约 1 ml 血液。部分血液在 4°C 条件下离心得到血清; 其余血液收集于事先加入肝素的试管中, 得抗凝血; 解剖取脾脏组织。抗凝血和脾脏组织样品立即用于外周血和脾脏 T 淋巴细胞 ANAE 阳性率的检测; 血清储存于 -80°C 冰箱中, 用于血清补体旁路途径溶血活性和血清溶菌活性的检测。

1.2 外周血和脾脏 T 淋巴细胞 ANAE 阳性率的测定

预先配制 0.85% 的生理盐水溶液, 甲醛 - 丙酮固定液, 1% 的甲基绿醋酸缓冲液, 置于 4°C 冰箱中备用, 新鲜配制的 ANAE 温育液, 配制方法参

照张奇亚等 (1999)。

将脾脏组织分别置于适量的生理盐水中剪碎或磨碎, 静置 2 - 3 min, 待组织碎块沉降后, 得到细胞悬液。在 10 ml 离心管中加入约 500 μl 淋巴细胞分离液, 分别取等量细胞悬液、新鲜抗凝血, 用滴管沿管壁将其缓慢叠加于分层液面上, 保持清楚的界面。

加入抗凝血的离心管 700 r/min 水平离心 5 min, 可见试管内液体分为三层: 上层为淡黄色的血浆, 下层主要为红细胞和粒细胞, 中层为淋巴分离液。在上中层界面处有一白色云雾层狭窄带, 主要为淋巴细胞和少量单核细胞及血小板。加入脾脏

细胞悬液的离心管水平离心后, 亦可见类似分层。吸取云雾层细胞, 置入另一离心管, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃去大部分上清, 剩余少量上清, 将细胞吹匀后涂片。

将细胞涂片在事先 4℃ 预冷的丙酮 - 甲醛固定液中固定 1 min; 用蒸馏水冲洗后, 室温下置于温育液中 30 min, 转置冰箱中 4℃ 过夜, 之后将细胞涂片以水冲洗, 晾干; 再用 1% 的甲基绿醋酸缓冲液复染 20 min, 水洗, 晾干; 二甲苯透明。最后做镜检, 油镜下观察。

计数至少 200 个淋巴细胞, 凡胞浆中有深红色斑块的记为 ANAE 阳性细胞, 没有的为 ANAE 阴性细胞, 统计 ANAE 阳性细胞所占百分比。

1.3 血清旁路补体途径 (ACP) 溶血活性的测定

参照 Sunyer and Tort (1995) 的测定方法, 将体积为 25 μl 兔红细胞悬浮液加入到 100 μl 用 Mg^{2+} EGTA-GVB 工作液 (pH 7.3, 含 10 mmol/L Mg^{2+} , 10 mmol/L EGTA, 0.1% 白明胶的巴比妥缓冲盐溶液) 系列稀释的血清中作为实验管, 25 μl 1% RaRBC 和 25 μl 血清分别加入 100 μl Mg^{2+} EGTA-GVB 工作液作为对照, 25 μl 1% RaRBC 加在 1 100 μl 蒸馏水中作为 100% 溶血。将此三种混合液于 Eppendorf 管内室温孵育 1 h, 其间几次温和震荡摇匀。温浴结束后用 1 ml 冷 EDTA-GVB (用巴比妥缓冲盐溶液配制, pH 7.3, 含 20 mmol/L EDTA, 0.1% 白明胶) 终止反应。2 500 r/min, 4℃ 离心 5 min。取上清液于 414 nm 波长下测量对照管和血清系列稀释管的吸光值 (Abs_{414})。溶血活性以 ACH50 滴度表示, 代表导致 50% 兔红细胞溶血的所需的血清稀释度。通过制备工作曲线得出 ACH50 滴度的值。Y 值 (在各稀释样品中 RaRBC 溶血的百分比), 通过下式表示:

$$Y = \{ \text{Abs}_{414} (A) - [\text{Abs}_{414} (B) + \text{Abs}_{414} (C)] \} / [\text{Abs}_{414} (D) - \text{Abs}_{414} (B)]$$

其中: A 表示检测稀释物的上清, B 表示含有兔红细胞而不含血清的缓冲液, C 表示不包含兔红细胞的血清稀释物, D 表示 100% 溶血。

Y 值通过 Van Krogh 转换, $Y/(1-Y)$ 和相应血清稀释度用 log-log 坐标来描绘, 从图中读出 50% 所需血清的体积, 再计算出 ACH50 值。血清稀释物的结果大于 90% 或小于 15% 在计算时忽略。本实验主要反映旁路补体途径的溶血功能, 与 C_5 、B 因子、P 因子、D 因子及 $\text{C}_5 - \text{C}_6$ 各组分量及活性

均有关系。

1.4 血清溶菌活性的测定

参照 Zhou et al. (2004) 的方法, 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) 冻干粉为底物, 将底物用 0.1 mol/L、pH 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成底物值 ($\text{OD}_{570\text{nm}} = 0.3 - 0.5$) 的悬液。取 3 ml 该悬液于试管内并置于冰浴中, 再加入 50 μl 待测血清, 混合, 测 A_0 值。然后将试液移入 37℃ 温浴 30 min, 取出后立刻置于冰浴内 10 min, 以终止反应, 测其 A 值。溶菌活力计算公式为: $U_L = (A_0 - A) / A$ 。

1.5 数据分析

应用统计软件 SPSS for Windows 11.5 进行统计分析。各组数据均用平均值 \pm 标准误表示, 用 One-way ANOVA 检验差异显著性, $P < 0.05$ 为存在显著差异, $P < 0.01$ 为差异极为显著。氨基胁迫对照组 (C0 组) 和对照组应用独立样本 t 检验进行比较。

2 结 果

2.1 α -酸性醋酸萘脂酶阳性率 (ANAE) 的变化

ANAE 细胞涂片照片示例见图 1: A、B。各组中华鳖血液和脾脏中淋巴细胞 ANAE 阳性率检测结果见图 2、图 3。

如图 2 所示, 各组血液淋巴细胞 ANAE 阳性率间存在显著差异 ($P = 0.010$)。LSD 多重比较的统计结果为: 氨基胁迫对照组 (C0 组) 血液淋巴细胞 ANAE 阳性率显著高于 3 个实验组 (C1 组, $P = 0.001$; C2 组, $P = 0.004$; C3 组, $P = 0.034$)。对照组和 3 个实验组间均无显著差异 (C1 组, $P = 0.293$; C2 组, $P = 0.641$; C3 组, $P = 0.701$)。3 个实验组两两间也无显著差异 ($P_{\text{C1-C2}} = 0.554$; $P_{\text{C1-C3}} = 0.154$; $P_{\text{C2-C3}} = 0.397$)。

氨基胁迫对照组 (C0 组) 和对照组应用独立样本 t 检验进行统计, 结果表明两组间存在显著差异 ($P = 0.033 < 0.05$)。

如图 3 所示, 各组中华鳖脾脏淋巴细胞 ANAE 阳性率间无显著差异 ($P = 0.566$)。LSD 法对各组进行多重比较结果为: 各组中华鳖脾脏中淋巴细胞 ANAE 阳性率均无显著差异 ($P_{\text{control-C0}} = 0.875$; $P_{\text{control-C1}} = 0.290$; $P_{\text{control-C2}} = 0.297$; $P_{\text{control-C3}} = 0.496$; $P_{\text{C0-C1}} = 0.192$; $P_{\text{C0-C2}} = 0.198$; $P_{\text{C0-C3}} = 0.367$; $P_{\text{C1-C2}} = 0.986$; $P_{\text{C1-C3}} = 0.678$; $P_{\text{C2-C3}} = 0.691$)。

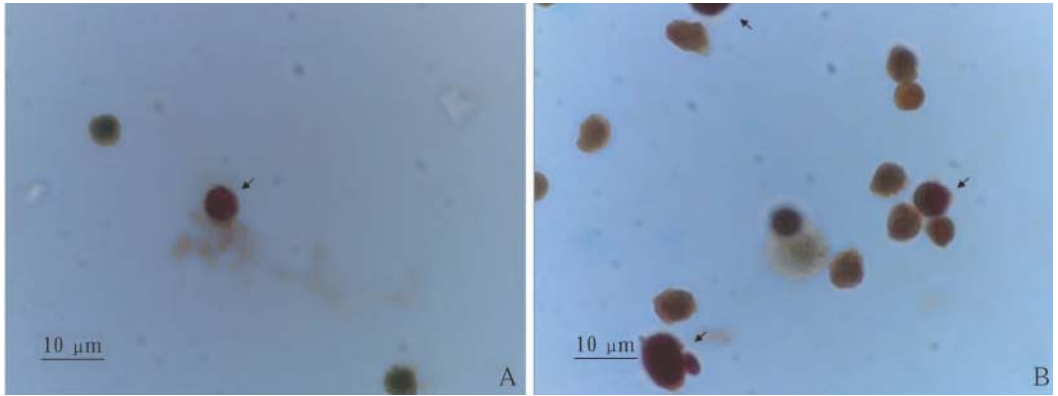


图1 ANAE 细胞涂片

A 和 B 中箭头标示的细胞为 ANAE 阳性淋巴细胞，未标示箭头的细胞为 ANAE 阴性淋巴细胞。100 × 油镜下拍摄，比例尺示 10 μm。

Fig.1 ANAE smears

The ANAE positive lymphocytes (arrowhead) and the ANAE negative lymphocytes (no arrowhead) were showed in A and B. The figures were taken under microscope at 100 ×, the scale bars show 10 μm in length.

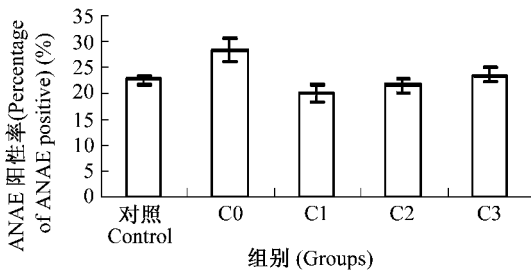


图2 各组中华鳖血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率
纵坐标的数值均为各组的平均值 ± 标准误。

Fig.2 The percentage of ANAE positive lymphocytes in hepanized blood of soft-shelled turtles

Values are Means ± SE for each group.

应用独立样本 t 检验统计对对照组和 C0 组，结果表明两组间无显著差异 ($P > 0.869$)。

2.2 血清旁路补体途径 (ACP) 溶血活性的变化

各组中华鳖血清旁路补体途径溶血活性 (ACH50) 检测结果如图 4 所示。C0 组 ACH50 值显著高于 3 个实验组 ($P_{C0-C1} = 0.000$; $P_{C0-C2} = 0.000$; $P_{C0-C3} = 0.000$); 对照组、C1 组和 C2 组两两间没有显著差异 ($P_{control-C1} = 0.202$; $P_{control-C2} = 0.172$; $P_{C1-C2} = 0.960$); C3 组 ACH50 值显著低于其它各组 ($P_{control-C3} = 0.000$; $P_{C0-C3} = 0.000$; $P_{C1-C3} = 0.003$; $P_{C2-C3} = 0.002$)。

用独立样本 t 检验统计分析 C0 组和对照组，结果显示两组间存在显著差异 ($P_{control-C0} = 0.001$)。

2.3 血清溶菌活性 U_L 的变化

各组中华鳖血清溶菌活性检测结果如图 5 所

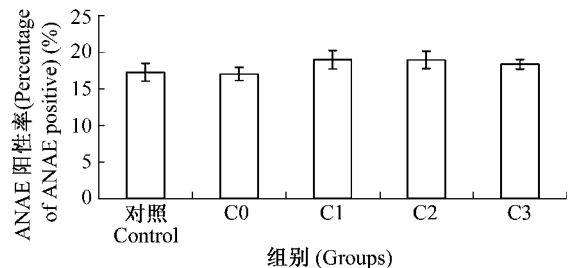


图3 各组中华鳖脾脏淋巴细胞 ANAE 阳性率
纵坐标的数值为各组的平均值 ± 标准误。

Fig.3 The percentage of ANAE positive lymphocytes in spleen of soft-shelled turtles

Values are Means ± SE for each group.

示。与对照组相比，C2 组 ($P_{control-C2} = 0.035$) 显著提高了血清的溶菌活性，C1 组和 C3 组与对照组间没有显著差异 ($P_{control-C1} = 0.228$; $P_{control-C3} = 0.536$); 各组与 C0 组间没有显著差异 ($P_{control-C0} = 0.610$; $P_{C0-C1} = 0.076$; $P_{C0-C2} = 0.086$; $P_{C0-C3} = 0.237$); C2 组中华鳖的溶菌活性显著高于 C1 组和 C3 组 ($P_{C1-C2} = 0.001$; $P_{C2-C3} = 0.006$), C1 组和 C3 组间无显著差异 ($P_{C1-C3} = 0.519$)。

用独立样本 t 检验统计分析 C0 组和对照组，两组间没有显著差异 ($P = 0.619$)。

3 讨论

3.1 壳聚糖对氨基胁迫下中华鳖血液和脾脏淋巴细胞 ANAE 阳性率的影响

本研究中采用酸性 ANAE 阳性率作为一项细胞

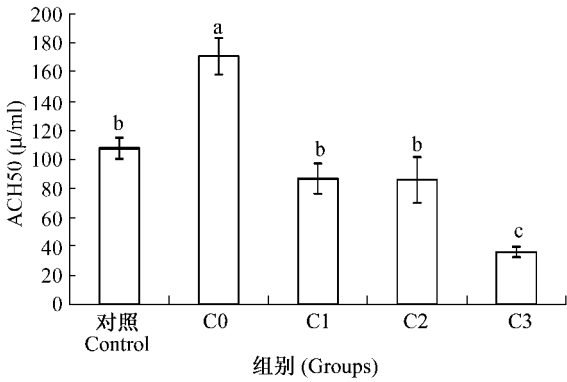


图 4 各组中华鳖血清旁路补体途径溶血活性 (ACH50)

纵坐标的数值为各组的平均值 \pm 标准误, 不同字母代表组间有极显著差异 ($P < 0.01$)。

Fig.4 Serum hemolytic activity (ACH50) of the soft-shelled turtles

Values are Means \pm SE for each group. Different letters denote statistically extreme significant differences ($P < 0.01$) among groups.

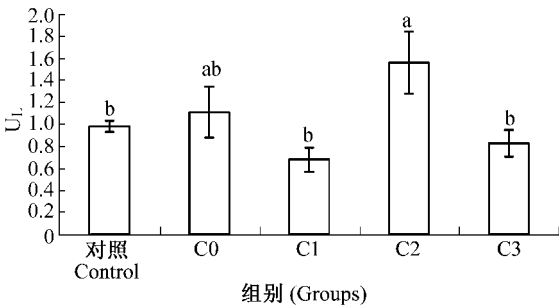


图 5 各组中华鳖血清溶菌活性

纵坐标的数值均为各组的平均值 \pm 标准误, 不同字母代表组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig.5 Serum bacteriolytic activity of the soft-shelled turtles

Values are Means \pm SE for each group. Different letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$) among groups.

免疫指标。ANAE 是水解脂肪族脂类和芳香族脂类的酶, 它在酸性条件下, 能使底物 α -酸性奈脂水解出 α -奈酚, α -奈酚与偶氮副品红偶联, 通过化学作用生成不溶性的红色沉淀物, 沉积在 T 淋巴细胞胞浆内脂酶所在的部位, 经甲基绿复染, ANAE 阳性细胞胞浆内有红色斑点或斑块, 而阴性细胞则呈现绿色或浅绿色。本研究中使用淋巴细胞分离液分离得到淋巴细胞, 再通过上述方法鉴别 ANAE 阳性细胞所占百分比。

ANAE 是一种溶菌酶, Zicca et al. (1981) 报道这种酶存在于溶酶体的膜中, 也有报导 ANAE 存在

于溶酶体的内含物中 (Asti et al., 1999)。胸腺细胞在胸腺中成熟后, 形成 T 淋巴细胞, 因 ANAE 只存在于 T 淋巴细胞中, 不存在于 B 淋巴细胞中, 所以 α -酸性醋酸奈脂酶可用于鉴别组织中和外周血中的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞 (Knowles et al., 1978; Mueller et al., 1981; Paul et al., 1979; Higgy et al., 1977; Mueller et al., 1975)。抗原酯键的打开是由 ANAE 催化的 (Kass, 1979), 能导致抗原分解和抗原片段与 MHC 分子的结合, 再递呈到淋巴细胞。成年人近 90% 的 T 细胞为 ANAE 阳性细胞, 通过与正常值进行比较, 淋巴细胞 ANAE 阳性率可以作为鉴别免疫缺乏症的一项指标。ANAE 活性还和淋巴细胞对有丝分裂原的敏感性有关, 体外对有丝分裂原不敏感的淋巴细胞也不具有 ANAE 活性。青少年风湿性关节炎患者 ANAE 阳性细胞增多可能反应出辅助性 T 淋巴细胞功能的增强, 正是由于体内辅助性 T 淋巴细胞持续刺激下产生过量免疫球蛋白, 导致机体出现超敏反应 (Wada, 1981)。

氨氮胁迫下中华鳖血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率有显著提高, 表明短期的氨氮胁迫使血液淋巴细胞中 T 细胞比例上升, 中华鳖处于应激状态。注射壳聚糖能够使中华鳖血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率恢复到正常水平。虽然注射不同浓度壳聚糖各组间无显著差异, 但随着注射浓度的增加, 血液中淋巴细胞的 ANAE 阳性率越来越接近正常水平, 说明壳聚糖浓度对血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率存在一定影响, 壳聚糖对氨氮胁迫导致的免疫增强反应有拮抗作用, 壳聚糖有助于减弱中华鳖的应激反应。

急性氨氮胁迫和慢性氨氮胁迫对中华鳖血液和脾脏中淋巴细胞 ANAE 阳性率的影响不同。陈欣然等 (2006) 将鳖 (体重 90.5 ± 20.5 g) 饲养于非离子氨浓度分别为 1.49 mg/L、2.61 mg/L 和 4.14 mg/L 的环境中 84 d 后, 鳖血液和脾脏淋巴细胞 ANAE 阳性率与对照组相比均显著下降, 表明长期较低浓度的氨氮胁迫对中华鳖的淋巴细胞有一定的影响, 抑制了淋巴细胞 ANAE 的活性。本研究中 C0 组非离子氨浓度为 5.39 mg/L, 与对照组相比, 中华鳖血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率显著升高, 脾脏中淋巴细胞 ANAE 阳性率无显著变化。急性氨氮胁迫下, 高浓度的非离子氨刺激中华鳖的免疫系统做出应激反应, 帮助机体抵御外界的不良刺激, 表现为血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率、血清溶菌活性和旁路途径溶血活性都显著升高。

在本研究中, 氨氮胁迫对提高中华鳖脾脏中淋

巴细胞 ANAE 阳性率无显著作用。注射壳聚糖后, 中华鳖脾脏中淋巴细胞 ANAE 阳性率虽略有增高, 但没有显著差异。急性高浓度氨氮胁迫下中华鳖淋巴细胞 ANAE 阳性率在血液中和脾脏中的变化规律存在明显差异, 是血液对氨氮胁迫更为敏感的反映。

3.2 壳聚糖对氨氮胁迫下中华鳖血清旁途径溶血活性的影响

血清补体活性已经被证实是一项重要的非特异性防御指标, 保护鱼类抵御细菌、霉菌、病毒和寄生虫的感染 (Sunyer and Tort., 1995; Tort et al., 1996; Muller-Eberhard, 1998)。血清中 C3 补体是旁途径溶血的关键因子, 旁途径溶血和血清中 C3 补体的含量有关。

通过数据分析可以看出, 氨氮胁迫对提高中华鳖血清旁途径溶血活性有显著的作用。注射壳聚糖溶液后, 中华鳖血清的 ACH50 值均有较大幅度的下降: 注射较低浓度壳聚糖 (1 mg/ml 和 5 mg/ml) 能够使中华鳖血清 ACH50 值降低到接近正常水平; 但是注射高浓度壳聚糖 (50 mg/ml) 后, 中华鳖血清 ACH50 值下降到远远低于正常水平。说明壳聚糖溶液对氨氮胁迫导致的免疫应激反应有一定的拮抗作用, 但浓度过高会导致过度的抑制。

3.3 壳聚糖对氨氮胁迫下中华鳖血清溶菌活性的影响

溶菌活性主要反映溶菌酶的活性。溶菌酶是由单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞分泌的具有溶解细菌细胞壁的酶 (Grinde, 1989), 血清中的溶菌酶可能是导致溶菌过程的一个因素。壳聚糖是一种碱性的多糖, 分子中含有活性的氨基和羟基, 具有较强的生物活性, 可能通过对上述细胞的刺激, 使其分泌能力增强, 从而提高血清中的溶菌酶水平。

氨氮胁迫对中华鳖血清溶菌活性没有显著影响。注射壳聚糖后, 浓度不同会导致不同的结果: 低浓度 (1 mg/ml) 和高浓度 (50 mg/ml) 会微弱地降低血清的溶菌能力, 数据没有显示出显著差异; 适当浓度 (5 mg/ml) 会显著提高血清的溶菌活性。

通过血液和脾脏淋巴细胞 ANAE 阳性率, 血清旁途径溶血活性和溶菌活性三个免疫指标的结果来看, 注射较低浓度的壳聚糖溶液 (1 mg/ml, 5 mg/ml) 对氨氮胁迫下中华鳖无不良影响, 对氨氮胁迫造成的血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率升高和血清旁途径补体溶血活性提高有拮抗作用, 使该两项指标下降到空白对照的水平; 5 mg/ml 显著提高了血

清的溶菌活性 (氨氮胁迫没有造成溶菌活性的提高)。而高浓度的壳聚糖溶液 (50 mg/ml) 影响较为复杂, 虽然也减弱了氨氮胁迫造成的血液中淋巴细胞 ANAE 阳性率升高, 却使血清溶血活性有显著降低, 低于空白对照水平, 显示出过度抑制。综合考虑以上结果, 5 mg/ml 壳聚糖溶液作为注射用免疫增强剂较为适合。

参考文献 (References)

- Anderson DP, Siwicki AK, 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *Prog. Fish Cult.* 56: 258 – 261.
- Anderson DP, Siwicki AK, Rumsey GL, 1995. Injection or immersion delivery of selected immunostimulants to trout demonstrate enhancement of nonspecific defense mechanisms and protective immunity. In: Shariff M, Subasighe RP, Arthur JR ed. *Diseases in Asian Aquaculture*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines 11: 413 – 426.
- Asti RN, Kurtdele N, Ozen A, 1999. Light and electron microscopic studies on alpha naphthyl acetate esterase activity of peripheral blood T lymphocytes in chicken. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 106: 397 – 399.
- Chen W, Hsiao I, Chen JC, 2004. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 17: 193 – 202.
- Chen XR, Niu CJ, Pu LJ, Jing RZ, 2005. Effects of chronic ammonia exposure on growth and partial haematological indicators of juvenile Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Herpetologica Sinica* 10: 221 – 231 (In Chinese).
- Chen XR, Niu CJ, Pu LJ, 2006. Effects of chronic ammonia exposure on growth and non-specific immune responses of juvenile soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Acta Zool. Sinica* 52 (5): 885 – 891.
- Figueras A, Santarém M, Nova B, 1997. *In vitro* immunosuppression of turbot (*Scophthalmus maximus*) leucocytes by high doses of β -glucans with/without vaccine. *Fish Pathol.* 32: 153 – 157.
- Grinde B, 1989. Lysozyme from rainbow trout *Salmo gairdneri* as antibacterial agent against fish pathogens. *J. Fish. Dis.* 12: 95 – 104.
- Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FG, 1977. Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scand. J. Haematol.* 18: 437 – 448.
- Kass L, 1979. Cytochemistry of esterases. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 10: 205 – 223.
- Knowles DM, Hoffman T, Ferrarini M, Kunkel HG, 1978. The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T cell marker. *Cell. Immun.* 35: 112 – 123.
- Kyung HP, Hyun DJ, 1996. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. *Aquaculture* 143: 135 – 43.
- Mueller J, Brundel RG, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H, 1975. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* 5: 270 – 274.
- Mueller J, Keller HU, Hagmann JD, Comidey RJ, Ruchti C, Cottier H, 1981. Nonspecific esterase in human lymphocytes. *Int. Arch. Allergy. Appl.* 64: 410 – 421.
- Muller-Eberhard HJ, 1998. Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 321 – 347.
- Paul PS, Senogles DR, Muscoplat CC, Johnson DW, 1979. Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 35: 306 – 316.
- Person-Le R, Lamers A, Le-Roux A, Sèvre A, Boeuf G, Mayer-Gostan N, 2003. Long-term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters. *J. Fish Biol.* 62: 879 – 894.

- Pu LJ, Niu CJ, Chen XR, 2006. Effects of chronic ammonia exposure on plasma total ammonia nitrogen, corticosterone and ammonia metabolism related enzyme activity of juvenile soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Acta Zool. Sinica* 52 (5): 878 – 884 (In Chinese).
- Randall DJ, Tsui T, 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* 45: 17 – 23.
- Santarém M, Novoa B, Figueras A, 1997. Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Septhalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 7: 429 – 437.
- Siwicki AK, Anderson DP, Rumsey GL, 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41: 125 – 139.
- Sunyer JO, Tort L, 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *J. Verter. Immunol. Immunopathol.* 45: 333 – 345.
- Tort L, Gomez E, Montero D, Sunyer JO, 1996. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquacult. Int.* 4: 31 – 41.
- Wada N, Prieur AM, Griscelli C, 1981. Nonspecific alpha-naphthyl acetate esterase activity of T-lymphocytes: study in healthy newborns and children, in immune deficiencies and juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatric Research* 15: 1 266 – 1 270.
- Zhang QY, Li ZQ, Luo XC, 1999. Distribution of two different lymphocytes in immune tissues from soft-shelled turtle, pig frog and silver carp. *Acta Hydrobiologica Sinica* 23: 382 – 384 (In Chinese).
- Zhou XQ, Niu CJ, Li QF, 1998. The effects of light intensity on daily food consumption and specific growth rate of the juvenile soft-shelled turtle *Trionyx sinensis*. *Acta Zool. Sinica* 44: 157 – 161 (In Chinese).
- Zhou XQ, Niu CJ, Sun RY, 2004. The effects of vitamin E on antiacid stress ability in juvenile soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 137: 299 – 305.
- Zicca A, Leprini A, Codoni A, Franzi AT, Ferrarini M, Grossi CE, 1981. Ultrastructural localization of alpha naphthyl acid esterase in human TM lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 105: 40 – 46.
- 陈欣然, 牛翠娟, 蒲丽君, 井润贞, 2005. 慢性氨氮胁迫对中华鳖幼鳖生长及血液学指标的影响. 见: 周开亚, 计翔. 两栖爬行动物学研究 (第 10 辑). 吉林: 吉林人民出版社, 221 – 231.
- 蒲丽君, 牛翠娟, 陈欣然, 2006. 慢性氨暴露对中华鳖幼鳖血浆总氨氮、皮质酮浓度及组织氨代谢酶活性的影响. *动物学报* 52 (5): 878 – 884.
- 张奇亚, 李正秋, 罗晓春, 1999. 鳖、蛙及鲢免疫组织中两种不同淋巴细胞的分布. *水生生物学报* 23: 382 – 384.
- 周显青, 牛翠娟, 李庆芬, 1998. 光照强度对中华鳖稚鳖摄食和生长的影响. *动物学报* 44: 157 – 161.