



龟鳖的防病机制

Disease - preventing mechanism of Testudine and Trionyx

简纪常

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

Jian Jichang

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuxi 214081)

关键词 龟鳖, 防病机制, 免疫

Key words Testudine and Trionyx, Prevent - disease mechanism, Immunization

脊椎动物防止病原微生物入侵的防病机制可分为非特异性防病和特异性防病机制两大类。前者是先天的, 只能清除一般的异物, 而后者则是后天形成的, 有目的地清除异物, 使机体获得更强的保护能力。目前, 龟鳖尤其是中华鳖的养殖发展非常迅速, 但其疾病亦愈来愈多, 病害已威胁着中华鳖养殖的健康发展, 为更好地防治龟鳖疾病, 全面了解其防病机制是很有必要的。

1 非特异性防病机制

非特异性防病机制是指动物机体用以抵御病原微生物的内因性屏障, 它发挥作用快, 作用范围广, 起着第一道防线的作用。

1.1 体被的保护性屏障

中华鳖 (*Amysda seninsis*) 的背甲和腹甲借助于软骨连成一块整体, 甲板外被有革质皮, 骨化的背甲和腹甲以及革质皮, 使中华鳖的背、腹部可承受一定的压力, 对抵御外伤和有害物质的入侵起着消极的保护作用。体表其它部位被有棕黑色的角化外皮, 形成一层极厚的保护屏障, 可抵御病原微生物的入侵。

1.2 炎症反应

无论是创伤或病原微生物引起的伤害, 都能在损伤的局部表现为炎症反应。如鳖的互咬, 腹甲与粗糙地面之间的擦伤, 人工损伤以及运输途中的意外损伤等, 这些损伤部位在病原微生物的侵袭下往往发生炎症。白细胞释放一些趋化因子, 把各种类型的吞噬细胞和淋巴细胞引到炎症部位, 而炎症又为这些吞噬细胞提供良好的活动条件, 并积累多量的体液防御因素。吞噬细胞吞噬病原体, 并在体液防御因素的参与下, 共同杀死病原微生物, 阻止病原微生物经组织间隙向机体的其它部位扩散, 达到保护机体之目的。

2 特异性防病机制

特异性防病机制也可称为特异性免疫应答, 它具有严格的特异性和针对性。主要表现为细胞免疫和体液免疫两大类, 它们相互协调, 发挥免疫作用。

2.1 参与免疫应答的主要淋巴器官

收稿日期: 1997 - 01 - 12

2.1.1 胸腺 龟鳖的胸腺是一个主要的淋巴器官,位于颈下部两侧,形状扁平而不规则。陈秋生^[1]、Zapata 和 Fernandez^[32]分别对中华鳖和鳄龟(*Chelydra serpentina*)的胸腺结构进行过研究,它们的结构基本相同。胸腺表面覆盖有纤维性被膜,被膜伸入实质形成小梁,小梁把实质分成许多胸腺小叶,每一小叶又由周缘的皮质和中央的髓质构成。胸腺的实质主要由中、小淋巴细胞组成,酸性非特异性脂酶(ANAE)阳性细胞占优势,主要分布于皮质-髓质交界处和血管周围,而嗜派若宁阳性细胞较少。因而认为胸腺可能以T淋巴细胞为主,B淋巴细胞很少。龟鳖的胸腺可能对T淋巴细胞的成熟起着一种选择和诱导的作用,成熟的T细胞参与细胞免疫,也就是说胸腺主要参与细胞免疫。胸腺的结构受环境温度的影响,冬季胸腺极度萎缩,但在春季,淋巴细胞又逐渐增加,到夏、秋两季时,淋巴细胞最发达。

2.1.2 脾脏 龟鳖脾脏的组织结构与哺乳类的脾脏有异同点。脾脏实质由白髓和红髓组成,红髓由弥散性的脾索和脾窦组成,脾窦衬以网状细胞,脾窦充满红细胞,而白髓的结构却有很大差异,龟鳖的脾脏白髓由动脉周围淋巴鞘(PALS)和髓球周围淋巴鞘(PELS)组成,中华鳖的脾脏缺乏淋巴小结和边缘区,也不存在生发中心。

用抗原刺激龟和鳖,其脾脏有明显的增生反应。鳄龟白髓产生大量淋巴母细胞滤泡^[4],锦龟(*Chrysemys scripta elegans*)的PALS和PELS中的淋巴细胞发生母细胞化,嗜派若宁阳性细胞反应强烈^[16],中华鳖的PALS内嗜派若宁阳性细胞出现早,数量多且减少缓慢,而PELS中的嗜派若宁阳性细胞出现晚,数量少而且减少快,浆细胞又常常出现在PALS的边缘^[2]。因而认为龟鳖的脾脏主要参与机体的体液免疫。PALS是非胸腺依赖的B细胞居留区,而PELS是胸腺依赖的T细胞居留区。脾脏的组织结构也受环境温度的影响,冬季脾脏萎缩,春、夏两季脾脏的淋巴组织增加,到秋季,脾脏的结构达到最为完善。

2.1.3 其它淋巴组织 龟鳖从咽到直肠的整个消化道中有大量的淋巴组织分布,淋巴样集结最主要的分布部位是回肠、回肠-盲肠连接处、结肠和泄殖腔。从龟鳖肠淋巴组织的位置来看,这些淋巴样集结可能是哺乳类肠淋巴集结和盲肠以及鸟类腔上囊的前身。肠淋巴组织中的细胞成份主要有淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞等^[6,23,31]。拟龟(*Pseudemys scripta*)的膀胱上皮层下分布着淋巴样小结和弥散性淋巴组织^[17],鳄龟的肺和肾脏中也有淋巴组织分布^[6,24]。所有这些淋巴组织都参与局部免疫,形成局部的免疫屏障。

2.2 细胞免疫

细胞免疫是指T细胞在受到病原微生物等抗原或有丝分裂原的刺激后分化、增殖、转化为致敏淋巴细胞所表现出来的特异免疫应答。常见的细胞免疫有迟发性过敏反应、移植排斥反应以及细胞内寄生的病原体的防御免疫应答。龟鳖具有较强的细胞免疫,但研究得最多的是移植物的排斥反应。

Yntema^[28]把锦龟和佛罗里达鳖(*Trionyx ferox*)的原节、外胚层、神经板和神经管等组织分别单侧同位移植到8~9期的鳄龟胚胎上,锦龟的组织被接受或者部分排斥,而佛罗里达鳖的组织却被完全排斥,这种差异与它们的遗传距离有关。因为鳄龟和锦龟同属于龟科,而佛罗里达鳖则属于鳖科。这表明在龟鳖目中已经存在了主要组织相容性复合物(MHC)^[29]。成年鳄龟的脾脏细胞能诱导稚龟脾脏产生移植排斥宿主反应(GVHR)^[24],3~4月龄的鳄龟脾脏肿大,而大于4月龄或成年鳄龟的脾脏不肿大,这证明稚龟的免疫成熟期需要3~4个月^[7,10]。

2.3 体液免疫

龟鳖接触抗原后,B细胞活化、增殖、分化为浆细胞,产生抗体,抗体与抗原接触后发生抗原抗体反应,引起体液免疫应答。浆细胞分泌的抗体进入体液后分布到机体的各个部位,发挥其生物学效应即中和毒素和阻止病毒吸附于易感细胞表面、抑制病原体的生长以及免疫调理作用。

2.3.1 抗体的合成 Maung^[20]发现陆龟(*Testudo graeca ibera*)能产生抗布氏杆菌的凝集素,滴度达到1:240,但无2次免疫反应。Ambrosius和Lehmann^[3]用热失活的正常猪血清(NPS)免疫海龟,产生滴度为1:16的凝集素,2次免疫反应更快,产生更高滴度的抗体。而用绵羊红细胞初次免疫西瓜龟(*T. horsfieldii*)后,可检测到凝集素和溶血素,到30d时,溶血素滴度最高为1:320,凝集素滴度最高为1:160。作者用嗜水性单胞杆菌免疫中华鳖,20d后,抗体滴度为1:8,30d后,抗体滴度为1:64,但此后,抗体滴度未进一步升高,再次免疫后,也未见抗体水平的提高,冬天未检测到特异性的抗体。Chartrand等^[11]发现鳄龟卵黄中有抗体存在,且滴度较高。作者用兔抗鳖IgM血清与鳖卵黄提取液进行免疫沉淀反应时,发现沉淀

带非常清楚,这表明中华鳖卵黄中可能有免疫球蛋白存在,还有待进一步研究。卵黄抗体为稚龟鳖提供了生存保障。

2.3.2 抗体的理化特性 Chartrand 等^[11]用马红细胞或布氏杆菌免疫鳄鱼,可产生 2 种抗体即 19s 的 IgM 样抗体和低分子量的 5.7s 抗体。后者不同于 IgG,其重链的分子量为 38 000,比 IgG 分子量的小,但它有抗体的活性,能结合补体,甚至可转移到卵。IgM 样抗体的结构式为 $(L_2/H_2)_5$,而 5.7s 抗体的结构式为 L_2/H_2 ,称之为 IgN^[22]。IgN 和肺鱼的免疫球蛋白(Ig)特性相似,如重链分子量为 38 000 和轻链分子量为 22 500^[24]。

Leslie 和 Clem^[18]用 DNP₅₀-BCG 免疫拟龟,发现 3 种抗 DNP 的抗体:①分子量(MW)为 850 000,17s 的抗体;②MW 为 180 000,7.5s 的抗体;③MW 为 120 000,5.7s 的抗体。17s 抗体是 5 聚体,相似于 IgM,5.7s 抗体是 7.5s 抗体的片段。Coe^[14]用不同抗原免疫锦龟,免疫电泳检测到 4 种沉淀线。Ig1 是 19s 的抗体,Ig2 是 7s 的抗体,都对 2-巯基乙醇(2-ME)敏感,且出现在免疫反应的早期,Ig3 和 Ig4 都是 7s 的抗体,对 2-ME 不敏感。Grey^[15]用 KLH 和 BSA 免疫锦龟,第 1 个月,合成 18.5s 的高分子量抗体,1 个月后,则合成低分子量的 7s 抗体。这 2 抗体都对 2-ME 敏感,可能就是 Coe 发现的 Ig1 和 Ig2。

Maung^[20]发现陆龟的抗体是泳动慢的 γ -球蛋白,可转移到卵中,陆龟对猪血清的反应受到 γ -球蛋白的影响,这些表明龟的抗体是属于血清的 γ -球蛋白。鳄龟的 5.8s 的 Ig 的 C 区缺失 C₂ 或缺少一半的 Fc 段氨基酸末端或在重链排列上有间隔,只含有 110-120 个氨基酸,比哺乳类 IgG 的含量少^[14]。但这并不影响 Ig 的抗原性以及补体结合或转移到卵中的生物学功能。龟的 Ig 韧性较差,与抗原的结合能力也差^[30],鲤鱼 Igs 的韧性又比龟的差,可见在免疫系统的种系进化上,抗体是朝着韧性更好的方向进化。对陆龟的 Igs 的种类分析时,没有发现 IgA^[26],但 Portis 和 Coe^[25]以及 Wang 和 Fudenberg^[27]等发现其胆汁分泌的 Ig 主要是 IgM 样蛋白,并认为龟的高分子量抗体可能有 IgA 样的分泌功能。

综上所述,龟鳖具有较强的体液免疫反应,与哺乳类的体液免疫反应相比较,既有相似性又有不同点。龟鳖对多种抗原的刺激都能产生较好的特异性抗体,随着抗原种类及剂量、免疫途径等的不同,龟鳖所产生的抗体效价有所不同。有时可检测到 2 次免疫反应,有时测定不到,这与选择的抗原、免疫途径和饲养的环境条件等不同有关。龟鳖的体液免疫反应与哺乳类的体液免疫反应主要的不同点在于:龟鳖在免疫后期,合成的低分子量抗体对 2-ME 不敏感,抗体类型转换的时间较长;哺乳动物的抗体亲和力随着免疫时间的延长由低向高转移,而龟鳖抗体的亲和力是保持不变,不能从低向高转移。这些表明龟鳖具有独特的免疫机制。

2.4 影响免疫应答的因素

影响龟鳖免疫应答的因素有营养状况、外界环境、年龄、抗原种类以及佐剂等等。下面着重讨论营养状况和环境温度两个因素。

2.4.1 营养状况 营养不良可引起龟鳖胸腺退化,脾脏萎缩,导致龟鳖的细胞免疫和体液免疫严重缺乏。在营养不良状态下,鳄鱼不能获得足够的营养物质,因而抑制迅速分裂细胞的新陈代谢,抑制细胞产物如抗体等的合成。龟鳖的易感性,起始于营养不良,如果改善饲养条件,可提高龟鳖的抵抗能力,使患病率下降,这说明营养、免疫和易感染疾病三者之间有着密切的关系^[9]。

2.4.2 环境温度 龟和鳖是变温爬行动物,其胸腺和脾脏等主要淋巴器官的形态结构也随着季节的变化而变化,免疫反应有温度的依赖性,至少表现在 GVHR、同种移植排斥反应和抗体的合成上。Tulipan^[25]发现鳄鱼 30℃ 时比 20℃ 时的 GVHR 更强烈,20℃ 时可产生免疫抑制。Borysenko^[7,8]发现鳄鱼 30℃ 时比 25℃ 时的同种移植排斥反应快,而在 10℃ 时既无同种移植反应,也无异种移植反应。这些说明低温能抑制排斥反应。Maung^[20]用抗原免疫陆龟,夏天反应好,秋天反应差,10℃ 时受到抑制。中华鳖的体液免疫反应也受到环境温度的影响,夏季抗体形成良好,一定时间内,滴度可稳步上升,但冬季则检测不到特异性的抗体。龟鳖的抗体合成可能有一个最适温度范围即 25~30℃,在此范围内,龟鳖可在最短时间内产生高效价的抗体。

本文承吴婷婷、夏德全两位研究员审阅并提出修改意见,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈秋生. 中华鳖胸腺的显微和亚显微结构研究. 南京农业大学学报, 1991, 18(3): 81~87
- [2] 简纪常. 中华鳖脾脏在 HRP 刺激下形态结构的变化. 中国水产科学, 1996, 3(1): 21~26
- [3] Ambrosius H., R. Lehmtan. Poikilotherme wirbeltiere als versuchstiere beim studium des wirkungsmechanismus immunologischer adjuvaten. Acta Biol. Med. Germ., 1964, 12: 615~618
- [4] Borysenko M. Changes in spleen histology in response to antigenic stimulation in the snapping turtle. J. Morph., 1976a, 149: 223~242
- [5] Borysenko M. Ultrastructural analysis of normal and immunized spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. J. Morph., 1976b, 149: 243~264
- [6] Borysenko M., E L Cooper. Lymphoid tissue in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. J. Morph., 1972, 138: 487~498
- [7] Borysenko M. Skin allograft and xenograft rejection in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. J. Exp. Zool., 1969a, 170: 342~358
- [8] Borysenko M. The maturation of the capacity to reject skin allografts and xenografts in the snapping turtles, *Chelydra serpentina*. J. Exp. Zool., 1969b, 170: 359~364
- [9] Borysenko M., S Lewis. The effect of malnutrition on immunocompetence and whole body resistance to infection in *Chelydra serpentina*. Dev. and Comp. Immunol., 1979, 3: 89~100
- [10] Borysenko M., Tulipan P. The graft - versus - host reaction in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Transplantation, 1973, 16: 496~504
- [11] Chartrand S L., et al. The evolution of the immune response. XI. The immunoglobulins of the turtle. Molecular requirements for biologic activity of the 5.7s immunoglobulin. J. Immunol., 1971, 107: 1~11
- [12] Coe J E. Immune response in the turtle, *Chrysemys picta*. Immunol., 1972, 23: 45~52
- [13] Fiebig H., Ambrosius H. Cell surface immunoglobulin of lymphocytes in lower vertebrates. In the Phylogeny of Thymus and Bone Marrow - bursa Cells. North - Holland, Amsterdam, pp. 1976, 195~203
- [14] Formmel D., et al. Significance of carbohydrate composition in immunoglobulin evolution. Immunochemistry, 1971, 8: 573~577
- [15] Grey H M. Phylogeny of the immune response. Studies on some physical, chemical and serological characteristics of antibody production in turtle. J. Immunol, 1963, 91: 819~825
- [16] Kroese F., et al. The architecture of the spleen of the red - eared slider, *Chrysemys scripta*, elegans (Reptilia, Testudines). J. Morph, 1982, 73: 279~284
- [17] LeFevre M E., et al. Lymphoid cells in the turtle bladder. Anat. Rec., 1973, 176: 111~120
- [18] Leslie G A., Clem L W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VI. 17s, 7.5s and 5.7s anti - DNP of the turtle, *Pseudemys scripta*. J. Immunol, 1972, 108: 1656~1664
- [19] Marchalonis J J., Cone R E. The phylogeny emergence of vertebrate immunity. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci, 1973, 51: 461~488
- [20] Maung H T. Immunity in the tortoise, *Testudo ibera*. J. Pathol. Bacteriol., 1963, 85: 51~66
- [21] Merz D C., et al. Aspects of vertebrate immunoglobulin evolution. Constancy in light chain electrophoretic behavior. Immunochemistry., 1975, 12: 499~504
- [22] Portis J C., Coe J E. IgM, the secretory immunoglobulin of reptiles and amphibians. Nature, Lond., 1975, 258: 547~548
- [23] Solas M T., A Zapata. Gut - associated lymphoid tissue in reptiles; Intraepithelial cells. Deve. and Comp. Immunol., 1980, 4: 87~99
- [24] Sidky Y., R Auerbach. Tissue culture analysis of immunological capacity of Snapping turtles. J. Exp. Zool., 1968, 167: 187~196
- [25] Tulipan P., M Borysenko. The graft - versus - host reaction in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Transplantation, 1973, 16: 496~504

- [26] Vaerman J P., et al. Structural data on chicken IgA and failure to identify the IgA of the tortoise. In Immunologic Phylogeny. Adv. Exp. Med. Biol., 1975, 64:185~195
- [27] Wang A C., Fudenberg H H. IgA and evolution of immunoglobulins. J. Immunogenetics, 1974, 1:3~31
- [28] Yntema C L. Survival of xenografts of embryonic pigment and carapace rudment in embryos of *Chelydra serpentina*. J. Morph., 1970, 132:353~360
- [29] Yntema C L., M Borysenko. Survival of embryonic limb bud transplant in snapping turtles. Experimentia, 1971, 27: 567~569
- [30] Zagzyanski Y A. Phylogenesis of the general structure of immunoglobulins rigidity of 7s and restricted flexibility of 17s immunoglobulins of the tortoise, *Testudo horsfieldi*. Fed. Europ. Biochem. Soc. Let., 1973, 35:309~312
- [31] Zapata A., et al. Gut - associated lymphoid tissue(GALT)in reptilia: Structure of mucosa accumulation. Deve. and Comp. Immunol., 1979, 3:477~487
- [32] Zapata A., Fernandez. J. The thymus of reptiles: A structural study in *Lacerta hispanica* and *Elaphe scalaris*. Dev. Comp. Immunol., 1984, 8:83~86