

鳖的体重、年龄及营养状况 对中华鳖免疫应答的影响

杨先乐

(农业部水产增养殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 200090)

周剑光 艾晓辉 柯福恩

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

摘 要 探讨了鳖的体重、年龄及营养状况对其免疫应答的影响。研究表明, II 龄鳖对 T₃ 菌苗的免疫应答随着体重的增加而增强, 尤其在 40g 以下时更为明显; 而 I 龄鳖体重的增加对其免疫应答影响不大, 一般在较低或中等的水平上波动; 同等体重的 II 龄鳖比 I 龄鳖的免疫应答反应要强。此外, 在营养状况不良的情况下, 鳖的免疫应答也会受到一定的抑制。

关键词 中华鳖, 免疫应答, 年龄, 体重, 营养

随着中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 养殖面积和养殖强度增大, 其病害已日趋严重, 有些疾病, 药物防治较难凑效[张奇亚等 1996], 因此免疫学防治已成为一条有效地控制病害发生的途径[杨巨 1990, 杨先乐等 1995]。为了给免疫学防治指示方向, 提供最佳的免疫方案, 探讨影响中华鳖免疫应答的因素已是一个不容忽视的问题。

中华鳖是水生性爬行动物, 它们的免疫应答跟鱼类一样, 也受到免疫原的质和量、水温、光照、水质等环境因素的影响(杨先乐等 1998); 除此之外, 鳖机体本身, 如体重、年龄及营养状况等对其免疫应答的影响如何, 目前国内外鲜有报道。鉴此我们进行了研究。

1 材料和方法

1.1 免疫原

中华鳖红底板、红脖子病致病菌 T₃ 菌株(嗜水气单胞菌, *Aeromonas hydrophila*)[杨先乐等 1999] 经扩大培养后, 用 0.4% 的甲醛溶液, 28℃ 灭活 48h, 进行安全性检验后分装, 于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 中华鳖的免疫及其免疫应答的测定

试验在 1.2m×1.0m×0.8m 的小水泥池中进行, 试验期间水温为 25~30℃, 试验用鳖均为 50~100g 的健康 I 龄或 II 龄鳖。用含菌量为 60×10⁸ cfu/mL 的 T₃ 菌苗以后腿肌肉注射的方式接种, 每只 0.3mL。免疫 30d 后, 一部分断头取血, 采用红细胞间接凝集试验测定其血清

国家自然科学基金资助项目(中华鳖免疫应答规律的研究), 39570565 号和农业部“九五”重点科研资助项目(中华鳖传染疾病防治技术的研究), 渔 95-A-96-03-04 号。

收稿日期: 1997-12-30

© 杨先乐, 艾晓辉, 周剑光等. 1998. 影响中华鳖免疫应答因素的探讨——免疫原及环境条件. <http://www.>

间接凝集抗体效价(能使致敏红细胞产生 2^+ 以上凝集的最高血清稀释度的倒数)[杨先乐等 1999]; 另一部分用含菌量 $3 \times 10^8 \text{cfu/mL}$ 的 T_3 注射攻击, 测定其免疫保护率

$$\text{免疫保护率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{免疫组死亡率}}{\text{对照组死亡率}}\right) \times 100$$

1.3 鳖机体对中华鳖免疫应答的影响

按以下条件设计各免疫试验, 并同时设立相应条件下注射生理盐水的对照组, 30d 以后测定它们的免疫应答水平, 对其免疫保护率和血清凝集抗体效价进行统计学分析, 并通过 t 检验或 F 检验确定某特定的 2 组间或整个试验各组间的差异, 探讨其机体状况对免疫应答的影响。(1)从 1994 年至 1997 年免疫不同平均体重的 II 龄鳖若干组; (2)从 1994 年至 1997 年免疫不同平均体重 I 龄鳖若干组; (3)1997 年免疫平均体重基本相近的 I 龄和 II 龄鳖各 1 组; (4)1997 年将体重基本相近的 II 龄鳖免疫后分成 3 组: 其中 2 组置于良好的光照条件下(1 500 ~ 10 000 lx), 一组正常投饲, 另一组每隔 3 天投饲一次, 使其处于营养不良的饥饿状态; 另一组在无日照的条件下(15 lx 以下)正常投饲。

2 结果

2.1 鳖的体重与其免疫应答的关系

当 II 龄鳖平均体重在 20g 以下时, 鳖对 T_3 菌苗的免疫应答水平较低, 免疫保护率仅 $37.5 \pm 17.6(2)\%$, 血清间接凝集抗体效价为 $117.4 \pm 15.1(2)$; 而当平均体重为 20 ~ 30g 时, 免疫保护率和血清间接凝集抗体效价均明显提高, 分别达到 $67.2 \pm 7.5(3)\%$ 和 $1276.4 \pm 477.6(3)$, 与 20g 以下时相比, 二者有比较显著的差异(t 检验, 分别为 $0.2 > P > 0.1$ 和 $0.1 > P > 0.05$)。随着平均体重的增加, 免疫应答的水平也逐渐增强, 当鳖平均体重在 40 ~ 50g 时, 它们免疫保护率和血清间接凝集抗体效价分别达到 $88.3 \pm 16.2(5)\%$ 和 $1969.8 \pm 875.1(5)$, 为较高水平; 鳖平均体重进一步增加, 虽然免疫应答有所增强, 但不明显, 经 F 检验平均体重为 50 ~ 100g 和 100g 以上组与平均体重为 40 ~ 50g 的组之间, 免疫保护率和血清间接凝集抗体效价的差异已不再显著($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 II 龄中华鳖的体重与免疫应答的关系

Tab. 1 The relationship between the weight and immune response of 2 years old *T. sinensis*

编号	平均体重 (g)	各组试验鳖只数 (免疫组/对照组)	免疫保护率 (%)	血清间接凝集抗体效价	
				免疫组	对照组
1	20 以下	8 10 / 8 10	$37.5 \pm 17.6(2)^*$	$117.4 \pm 15.1(2)$	$11.0 \pm 1.4(2)$
2	20 ~ 30	7 7, 9/7, 7, 9	$67.2 \pm 7.5(3)$	$1276.4 \pm 477.6(3)$	$10.6 \pm 1.2(3)$
3	30 ~ 40	5, 5, 12, 7/5, 5, 12, 7	$74.2 \pm 21.1(4)$	$2144.0 \pm 367.7(4)$	$14.8 \pm 6.0(4)$
4	40 ~ 50	8, 10, 6, 5, 5/8, 10, 7, 5, 12	$88.3 \pm 16.2(5)$	$1969.8 \pm 875.1(5)$	$17.1 \pm 7.6(5)$
5	50 ~ 100	6, 6, 8/6, 8, 8	$91.6 \pm 14.4(3)$	$2178.3 \pm 776.2(3)$	$13.4 \pm 4.7(3)$
6	100 以上	6, 6, 8, 8/7, 6, 15, 15	$91.7 \pm 16.7(4)$	$2321.8 \pm 1085.5(4)$	$7.3 \pm 2.8(4)$
t 检验	1 与 2 之间	$0.2 > P > 0.1^{**}$	$0.1 > P > 0.05^{**}$	$P > 0.9$	
	1 与 3 之间	$0.2 > P > 0.1^{**}$	$P < 0.01^{***}$	$P > 0.9$	
F 检验	4, 5, 6 之间	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	

注: * 平均数 ± 标准差(试验组数), ** 有比较显著的差异, *** 有非常显著的差异。

当 I 龄鳖的体重在 $13.2 \pm 6.5\text{g}$ 时, 其免疫应答基本上不发生, 免疫保护率为 0, 血清间接

凝集抗体效价与对照组相比没有显著的区别(t 检验, $0.8 > P > 0.7$); 随着鳖体重的增加, 免疫应答有所增强, 但体重对其免疫应答的影响不大, 免疫保护率和血清间接凝集抗体效价仍在较低或中等水平的范围内波动。对平均体重 20 g 以上的各组间间接凝集抗体效价进行 F 检验, $P > 0.05$, 没有明显的区别(表 2)。

表 2 不同体重的 I 龄中华鳖对 T_3 疫苗的免疫应答反应

Tab. 2 The immune responses of the different weight of 1 year old *T. sinensis* to bacteria T_3

编号	平均体重 (g)	各组试验鳖只数 (免疫组/对照组)	免疫保护率 (%)	血清间接凝集抗体效价*	
				免疫组	对照组
1	13.2±6.5	6/6	0	24.0±11.3(2)	12.0±5.7(2)
2	28.5±11.7	6/7	66.7	448.0±142(2)	10.0±9.2(2)
3	40.3±10.5	5.6, 10/4, 6, 13	55.6±7.9(3)**	424.0±167.3(12)	13.0±7.9(12)
4	56.0±14.5	8/9	50.0	320.0±0(2)	12.0±5.6(2)
5	66.1±31.0	8/8	75.0	421.3±187.0(5)	10.7±4.6(6)
F 检验 (2, 3, 4, 5 之间)			—	$P > 0.05$	$P > 0.05$

注: * 平均数±标准差(测定次数), ** 平均数±标准差(试验组数)。

2.2 鳖的年龄与免疫应答的关系

平均体重分别为 $34.4 \pm 11.9(12)$ g 的 I 龄鳖与 $41.3 \pm 6.3(6)$ g 的 II 龄鳖对 T_3 疫苗免疫应答的结果表明, 它们的免疫保护率与血清间接凝集抗体效价有较大的差异, I 龄鳖对 T_3 疫苗的免疫保护率只有 66.7%, 而 II 龄鳖可达成 100%; 血清间接凝集抗体效价前者为 $832.0 \pm 192.0(2)$, 而后者却可达到 $2150.4 \pm 841.2(5)$, 经 t 检验, 二者有比较显著的差异 ($0.2 > P > 0.1$) (图 1)。

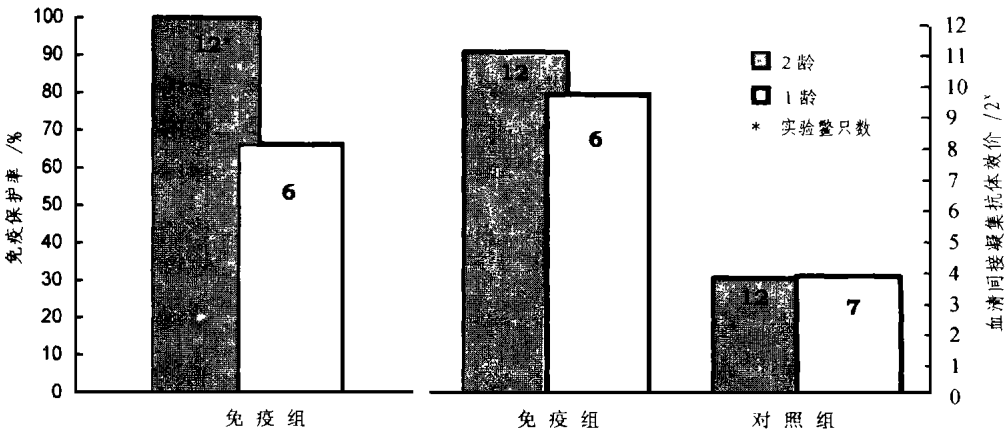


图 1 中华鳖的年龄与免疫应答的关系

Fig. 1 The relationship between the age and immune response of *T. sinensis*

2.3 营养状况对鳖免疫应答的影响

用 T_3 疫苗免疫后, 处于营养不良饥饿状况下的鳖 [体重 $152.9 \pm 13.5(7)$, 即平均体重±标准差(检验只数)] 免疫保护率只有 66.7%, 血清间接凝集抗体效价仅为 $360.0 \pm 174.4(4)$ 而

免疫后处在正常状况下的蟹 [体重 $159.4 \pm 58.1(8)$] 免疫保护率达 100%，血清间接凝集抗体效价达 $1760.0 \pm 831.4(4)$ ，和前者相比有显著的差异 (t 检验, $P < 0.05$)；如果蟹 [体重 $137.1 \pm 17.2(5)$] 处在无光照的情况下，尽管正常投饲，它的免疫保护率和血清间接凝集抗体效价均较低，分别只有 33.3% 和 $120.0 \pm 40.0(4)$ ，其血清间接凝集抗体效价与处于饥饿状态下的免疫组相比，也有比较显著的差异 ($0.1 > P > 0.05$) (图 2)。

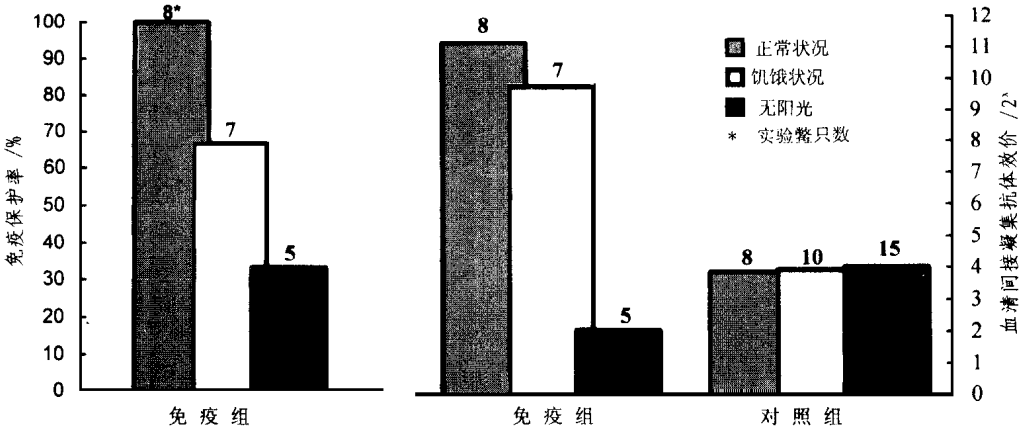


图 2 中华鳖的营养状况对其免疫应答的影响

Fig. 2 The influence of nutrition to the immune response of *T. sinensis*

3 讨论

影响鱼类等水生动物免疫应答的因素，除了免疫原和环境方面的因素外，其机体本身也是一个重要方面 [Dorson 1984]，其中包括机体的年龄和体重、营养状况、生理状态以及性别、群体效应等。关于鱼类的年龄和体重与其免疫应答的关系，目前还存在着不同的观点。Dorson [1974]、Khalifa 和 Post [1976] 分别用二硝基苯—血凝素、传染性胰脏坏死病疫苗以及嗜水气单胞菌苗免疫 1 月龄 0.15g、15 日龄以及 3 周龄 0.3g 的硬头鳊，均能得到相应的应答，他们认为鱼的年龄与大小对免疫应答是同等重要的。Manning 等 [1982] 对硬头鳊和鲤的研究证明，14 日龄前的硬头鳊对任何免疫原均不会产生相应的应答，抗体要在 21 日龄时才会出现，而鲤需 8 周龄时才对各种抗原产生应答；Tatner 和 Home [1983] 发现硬头鳊对弧菌病的免疫保护率随着周龄的增加而加强；因此，他们认为鱼类的年龄相对体重而言，对其免疫应答的影响较为重要。但 Johnson 等 [1982] 持相反意见，认为影响免疫应答的主要因素是鱼体的大小而不是年龄，他们的试验揭示，硬头鳊等 6 种鱼类的体重小于 0.5g 时不会对耶尔森氏菌苗与鳃弧菌苗产生应答，而只有当它们在 1~2.5g 时才会有相应的应答反应。从我们的试验可以看出，II 龄鳖的免疫应答反应随着体重的增加更增强，尤其在 40g 以下时，体重对其免疫应答的影响更大；而 I 龄鳖，免疫应答或许不发生或许水平较低，体重与免疫应答之间的关系不明显，有时体重增加后，其免疫应答反而下降；体重相近而不同年龄的鳖免疫应答反应则进一步表明，鳖的年龄对免疫应答的影响比体重更重要。由此我们认为：(1) I 龄鳖 (指孵化后到当年年底的鳖，而来年则称为 II 龄鳖) 处于免疫系统的形成和发育阶段，它们形成和发育的程度不完全与体重同步，而与个体的差异与外界环境有较大的关系，有的稍快，有的稍慢。因此它们对外界免疫原的反应就有强弱；而 II 龄鳖免疫系统的发育大部分都趋于成熟，尤其是体重较大时，因

此,它们对外界免疫原都呈现出较强的应答反应。如果鳖进入 II 龄后,其体重仍较小(如在 20g 以下),则其生长是欠佳的[姚光贵 1986],因而免疫系统的发育也会相应受到限制,它们对外界免疫原的应答反应有时则呈现较弱的现象。(2)鳖的免疫系统的发育有一个时间过程,这个过程同时受着鳖的年龄与体重的影响,进而它又影响鳖的免疫应答反应。关于它们之间相互联系、相互影响以至相互制约的关系,还有待于进一步的研究。

从本试验还可以看出,除了鳖的年龄与大小之外,营养状况也是影响鳖免疫应答的一个较重要的因素,这和鱼类颇为相似[Dorson 1984]。鳖处于不良的营养状况下,免疫器官的发育、成熟和新陈代谢、免疫球蛋白合成和释放、病原体的捕获和吞噬等,都会受到一定程度的抑制,从而导致了鳖免疫应答水平的下降。另一方面由于鳖的肝能贮藏大量的脂肪体和其它营养物质,可供食物缺乏时使用,所以尽管在食物匮乏时,它们免疫应答水平下降幅度也不十分显著。本试验也证明了在缺乏食物和光照的情况下,光照的缺乏比食物的缺乏对免疫应答影响更大。

长江水产研究所周瑞琼,岳阳农校学生李敏、张沙、毛爱民等参加部分工作,谨此致谢。

参 考 文 献

- 姚兆贵(译). 1986. 甲鱼——习性和新的养殖法. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1~66
- 杨 巨. 1990. 甲鱼嗜水气单胞菌灭活菌苗的研究. 水产科技情报, (4): 111~113
- 杨先乐, 贺 路, 柯福恩. 1995. 鳖病研究的现状及其展望. 中国水产科学, 2(4): 78~85
- 杨先乐, 贺 路, 艾晓辉等. 1999. 间接红细胞凝聚反应检测中华鳖血清抗体方法的建立. 水产学报, 23(1): 53~60
- 杨先乐, 柯福恩, 周剑光等. 1998. 中华鳖嗜水气单胞菌致病力的研究. 中国水产科学, 6(1): 117~121
- 张奇亚, 李正秋, 江育林等. 1996. 中华鳖病毒病原的研究. 科学通报, 41(21): 1987~1990
- Dorson M. 1974. Production d' anticorps Precipitants anti-dinitrophenol chez Les alevins de truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri*) immunises a L' age d' un mois. C. R. Acad Sc Paris, t. 278: 3151~3152
- Dorson M. 1984. Applied immunology of fish. In: Symposium on Fish Vaccination (De Kinkelin P. Ed), Paris: O. I. E. Press, 39~74
- Khalifa K A, Post G. 1976. Immune response of advanced rainbow trout fry to *Aeromonas*. Liquefaciens. Prog Fish Cult, 38(2): 66~68
- Manning M J, Grace M F, Secombes C J. 1982. Developmental aspects of immunity and tolerance in fish. In: Microbial Diseases of Fish (Roberts R J. Ed). New York: Academic Press, 31~46
- Johnson K A, Flynn J K, Amend D F. 1982. Onset of immunity in Salmonid fry vaccinated by direct immersion in *vibrio anguillarum* and *Yersinia nuckeri* bacterins. J Fish Dis, 5: 197~205
- Tatner M F, Horne M T. 1983. Susceptibility and immunity to *vibrio anguillarum* in post-hatching Rainbow trout fry, *Salmo gairdneri* Richardson 1836. Devel Com Immun, 7(3): 462~465

INFLUENCE OF AGE, SIZE AND NUTRITION OF *TRIONYX SINENSIS* ON THE IMMUNE RESPONSE

YANG Xian-Le

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, 200090)

ZHOU Jian-Guang, AI Xiao-Hui, KE Fu-En

(Yangtze River Fisheries Institute, Shashi 434000)

ABSTRACT It was approached that the immune response of soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*, was influenced by its age, size and nutrition. The response of 2 years old turtle against bacteria T₃ was enhanced with the size increasing, especially when the weight was below 40g. In contrast, this phenomenon was not found in 1 year old turtle and its response was fluctuated on a lower or medium level. At the same weight the immune response of 2 years old turtle against T₃ was much stronger than that of 1 year turtle. However, the response was weakened at a certain degree in the undernourishment.

KEYWORDS *Trionyx sinensis*, Immune response, Age, Weight, Nutrition