

四眼斑龟的血细胞形态及血液检验分析*

傅丽容 洪美玲 史海涛** 王秀南

(海南师范学院生物学系 海口 571158)

摘要: 研究了四眼斑龟(*Sacalia quadriocellata*)的血细胞形态学特征,对不同季节四眼斑龟血细胞数量和形态大小进行分析,结果表明,在繁殖期红细胞数为 $(46.50 \pm 5.64) \times 10^{10}/L$,是非繁殖期 $(23.24 \pm 2.16) \times 10^{10}/L$ 的两倍($P < 0.01, n = 8$);白细胞数为 $(2.43 \pm 0.36) \times 10^{10}/L$,与非繁殖期的没有显著差异。血细胞形态随季节而变化,温度升高,血细胞体积增大,且凝血时间缩短。

关键词: 四眼斑龟;红细胞;白细胞

中图分类号: Q427, Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)06-73-04

Morphology and Quantification of Blood Cells in Four-eye Spotted Turtles

FU Li-Rong HONG Mei-Ling SHI Hai-Tao WANG Xiu-Nan

(Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: In this paper, the size, morphological features and quantity of blood cells in Four-eye Spotted Turtles in different seasons were studied. The results showed that the number of erythrocyte in breeding period was $(46.50 \pm 5.64) \times 10^{10}/L$, twice as much as that in unbreeding period. The total amount of leucocyte in breeding season was $(2.43 \pm 0.36) \times 10^{10}/L$, not different from that in unbreeding season. The size of blood cells changed with seasonal variation. As temperature rose, the volume of blood cells increased, while and the time for blood conglotation decreased.

Key words: Four-eye Spotted Turtle (*Sacalia quadriocellata*); Erythrocyte; Leucocyte

血细胞是动物体对自身生理状态变化和对外界环境因子刺激非常敏感的细胞,在气体运输、机体免疫和凝血中起着重要的作用。以往关于龟鳖类血细胞数量和形态结构研究较多^[1-5],而关于四眼斑龟(*Sacalia quadriocellata*)的血象研究还未见报道。自1999年起,史海涛等对四眼斑龟的活动规律、食性、栖息地选择和种群密度、繁殖生态等方面进行了研究^[6],发现无论是在野外还是人工饲养四眼斑龟很容易染病,所以本文通过对四眼斑龟不同季节、不同生理周期血细胞数量的变化及形态结构特征的研究,了解四眼斑龟的生理特性,为比较生理学提供基础资料,并且为四眼斑龟的人工饲养、疾病防治,开发利用提供理论依据。

1 材料与方 法

四眼斑龟 12 只,体重在 162 ~ 283 g 之间。均来自海

南琼中县湾岭地区龟贸易商。于 2002 年 1、3、8 月份,各进行一次血液检测,每次实验用龟 4 只,雌雄对半。

1.1 凝血时间 从心脏取新鲜血放置于表面皿,开始记录时间,用毛细管不断挑血滴,直到出现血丝即按下秒表。

1.2 血细胞涂片 从心脏取微量新鲜血制作血涂片,用常规 Wright 染色;在显微镜(OLYMPUS BX-20)油镜下观察,计数白细胞至少 200 个,计算各种白细胞所占的百分比,并进行显微摄影。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30260019);

** 通讯作者;

第一作者介绍 傅丽容,女,40岁,高级实验师;从事动物生理学研究。

收稿日期:2004-02-09,修回日期:2004-09-16

1.3 血细胞计数 用医疗护理技术常规检验方法计数红、白细胞。

以上所得数据结果均采用平均值和标准方差进行实验分析。

2 结果

2.1 光镜下血细胞的形态结构观察(图版I, 见图版页)

2.1.1 红细胞(A, 图版 I:1) 成熟红细胞胞体长椭圆形, 表面光滑与鳖红细胞类似^[2]。胞核一个, 核近圆形, 中位, 致密染色体团块染成红色。其长径为 20.3 ~ 27.4 μm, 短径 11.7 ~ 19.5 μm。未成熟红细胞呈圆形, 核较大且圆, 胞质红色, 偶见分裂期的红细胞。

2.1.2 白细胞 数量较红细胞少, 个体较红细胞大, 根据细胞质有无染色颗粒分为有粒白细胞和无粒白细胞。在有粒白细胞中, 根据染色反应不同及大小不等的各种颗粒, 可分为嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。无粒白细胞包括单核细胞、淋巴细胞及血栓细胞。

(1)嗜中性粒细胞(B, 图版 I:2): 细胞大小约为 15.34 μm, 细胞圆形。胞核小而圆, 被挤至细胞边缘, 染色质着色深浅不均。胞质颗粒形态多样, 以杆状居多, 染色多为橙红色, 颗粒大小差别很大, 排列无规则。

(2)嗜酸性粒细胞(C, 图版 I:3): 细胞大小约为 12.51 μm, 胞体圆形或椭圆形。核居边缘, 椭圆形。颗粒略圆形, 染色后呈深褐色, 均匀分布于细胞质中。

(3)嗜碱性粒细胞(D, 图版 I:4): 细胞圆形, 边缘呈锯齿状, 细胞大小为 12.30 μm。胞体被深紫色颗粒所覆盖, 颗粒中等大小、圆形、分布不均。胞核不易观察到。

(4)单核细胞(E, 图版 I:5): 细胞圆形, 细胞大小为 13.51 μm。核肾形或不规则的马蹄形, 稍偏位或位于一侧, 占整个细胞的 1/3 ~ 1/2, 胞质浅红色。

(5)淋巴细胞(F, 图版 I:6): 细胞圆形或不规则形, 胞质稀少, 染色呈深蓝色, 着色均匀。胞核大, 中位、偏位皆存。

(6)血栓细胞(G, 图版 I:7): 细胞椭圆形、圆形或不规则形, 长径约为 8.87 μm, 短径约为 6.44 μm。胞核椭圆形或圆形, 中位, 呈红色, 胞质几乎不着色。很少观察到血栓细胞聚集现象。

2.2 不同季节血细胞数量和种类的变化 四眼斑龟血细胞数量随繁殖周期而变化, 繁殖期红细胞数 $(46.50 \pm 5.64) \times 10^{10}/L$ 是非繁殖期 $(23.24 \pm 2.16) \times 10^{10}/L$ 的二倍 ($P < 0.01, n = 8$)。在白细胞中可观察到嗜中性粒、嗜酸性粒、嗜碱性粒、单核、淋巴和血栓 6 种细胞, 繁殖期雌雄个体白细胞数变化不同, 雄性个体白细胞总数

没有季节变化趋势, 嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、血栓细胞均高于雌性 ($P < 0.01, n = 8$); 3 月份雌性个体白细胞总数减少 ($P < 0.05, n = 8$), 而淋巴、嗜中性粒细胞明显增加 ($P < 0.01, n = 8$) (表 1)。

在三次血液检测中, 都能观察到 6 种白细胞, 数量最多的是血栓细胞, 其次是嗜中性粒细胞。各种白细胞所占比例为血栓细胞 41% > 嗜中性粒细胞 17% > 嗜碱性粒细胞 15% > 嗜酸性粒细胞 10% > 淋巴细胞 7% > 单核细胞 6% (表 1)。

表 1 四眼斑龟血细胞数量和种类的季节变化

项目	性别	血细胞数量 ($\times 10^9/L$)		
		1 月	3 月	8 月
红细胞 ($\times 10^{10}/L$)	♂	56.25 ± 9.90 ^a	42.88 ± 12.20 ^a	21.08 ± 6.34 ^b
	♀	43.88 ± 6.89 ^a	43.00 ± 4.60 ^a	25.39 ± 0.25 ^b
白细胞 ($\times 10^{10}/L$)	♂	2.34 ± 1.59	2.69 ± 1.52	2.72 ± 1.08
	♀	2.80 ± 1.13	1.89 ± 0.11	2.39 ± 0.35
血栓细胞	♂	9.62 ± 6.13	8.42 ± 4.58	12.94 ± 2.61
	♀	15.17 ± 8.73	6.63 ± 4.38	9.11 ± 1.10
嗜中性 粒细胞	♂	5.08 ± 3.01	3.95 ± 1.25	3.78 ± 2.52
	♀	3.12 ± 0.81 ^b	5.68 ± 5.48 ^a	3.66 ± 0.04 ^b
嗜碱性 粒细胞	♂	2.86 ± 1.85	6.10 ± 5.48	4.90 ± 2.30
	♀	3.24 ± 2.68	2.86 ± 0.63	4.61 ± 4.11
嗜酸性 粒细胞	♂	2.95 ± 2.45	2.42 ± 0.64	1.77 ± 1.06
	♀	3.60 ± 0.00	0.64 ± 0.27	3.21 ± 0.82
淋巴细胞	♂	1.76 ± 1.32	3.29 ± 2.53	2.45 ± 2.56
	♀	1.75 ± 0.57 ^b	7.00 ± 0.51 ^a	2.00 ± 0.50 ^b
单核细胞	♂	1.32 ± 1.44	2.76 ± 1.95	1.37 ± 0.21
	♀	1.17 ± 0.39	2.05 ± 0.79	1.36 ± 0.34

同一横行中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著

2.3 不同季节血细胞形态的变化 四眼斑龟血细胞形态在不同的温度下有一定的变化(表 2), 高温季节(8 月)的红细胞呈碟形, 长径和短径明显加大, 胞形胀满, 内容物多; 而低温季节(1 月和 3 月)的细胞拉长, 体积缩小。除了嗜中性粒细胞外, 其余的白细胞形态变化与红细胞的相似, 随气温升高体积增大。就嗜中性粒细胞的大小而言, 存在雌雄差异, 3 月份雌龟明显大于雄龟; 而在 8 月恰好相反。

2.4 凝血时间 12 只龟的凝血时间从 3 min 18 s 至 32 min 20 s 不等, 夏季凝血时间为 4 min 43 s ± 1 min 43 s, 春季为 6 min 52 s ± 2 min 7 s, 秋季 5 min 14 s ± 50 s, 冬季 18 min 53 s ± 9 min 40 s。凝血时间随季节变化而变化, 冬季凝血时间明显延长 ($P < 0.05, n = 4$)。雄性个体凝血时间 7 min 52 s ± 3 min 12 s; 雌性为 9 min 59 s ± 8 min 23 s ($P > 0.05, n = 8$), 差异不显著。另外, 凝血时间与血栓细胞的大小也存在一定的关系, 血栓细胞增大, 凝血时间缩短。

表2 血细胞形态学参数

项目	性别	长径(μm)			短径(μm)		
		1月份	3月份	8月份	1月份	3月份	8月份
红细胞	♂	22.51 ± 0.18 ^b	20.32 ± 0.26 ^b	27.35 ± 0.66 ^a	11.75 ± 0.00 ^b	12.61 ± 1.06 ^b	19.53 ± 1.99 ^a
	♀	21.13 ± 0.35 ^b	20.82 ± 0.26 ^b	24.19 ± 0.62 ^a	11.69 ± 0.27 ^b	14.04 ± 0.71 ^b	15.72 ± 0.66 ^a
血栓细胞	♂	7.69 ± 0.08 ^b	8.18 ± 0.25 ^b	10.94 ± 1.33 ^a	5.63 ± 0.18 ^b	5.75 ± 0.00 ^b	7.66 ± 1.55 ^a
	♀	8.69 ± 1.33 ^b	7.38 ± 1.06 ^b	10.32 ± 0.45 ^a	5.94 ± 0.08 ^b	6.13 ± 0.71 ^b	7.51 ± 0.88 ^a
嗜中性粒细胞	♂	15.63 ± 0.88	15.00 ± 0.00	15.32 ± 2.65	—	—	—
	♀	15.75 ± 0.00 ^b	17.19 ± 1.33 ^a	18.13 ± 0.45 ^a	—	—	—
嗜碱性粒细胞	♂	9.68 ± 0.45 ^b	10.18 ± 0.25 ^b	15.75 ± 0.77 ^a	—	—	—
	♀	10.82 ± 0.26 ^b	10.00 ± 0.71 ^b	17.35 ± 3.32 ^a	—	—	—
嗜酸性粒细胞	♂	10.94 ± 0.08 ^b	10.39 ± 0.07 ^b	17.97 ± 2.87 ^a	10.38 ± 0.35	—	—
	♀	11.07 ± 0.26 ^b	10.50 ± 0.71 ^b	18.28 ± 0.66 ^a	10.57 ± 0.46	—	—
淋巴细胞	♂	9.55 ± 0.99 ^b	7.94 ± 1.50 ^b	11.32 ± 2.57 ^a	6.40 ± 1.03 ^b	6.62 ± 0.18 ^b	9.75 ± 0.35 ^a
	♀	9.32 ± 0.62 ^b	8.87 ± 0.01 ^b	11.41 ± 5.08 ^a	7.38 ± 1.41	8.31 ± 0.78	9.97 ± 1.24 ^a
单核细胞	♂	14.57 ± 3.44 ^b	11.91 ± 0.13 ^b	15.78 ± 2.43 ^a	—	—	—
	♀	12.50 ± 1.41 ^b	11.62 ± 1.05 ^b	14.69 ± 0.88 ^a	—	—	—

①同一横行中相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著;

②表中横线表示该细胞为圆形,无长短之分

3 讨论

3.1 红细胞数量和形态变化 爬行类红细胞的大小为15.0~21.5 μm ,比哺乳动物红细胞大,且有核,其中龟鳖类的红细胞较其它爬行类的大^[7]。红细胞体积存在种间差异,四眼斑龟红细胞长、短径大于中华鳖、乌龟、黄缘盒龟^[1-5],与陆龟^[8]接近;陆龟体重达3000 g,四眼斑龟体重只有它的1/10,表明单位红细胞血红蛋白的载氧和二氧化碳总量大,可能与适应长时间水底栖息生活有关。另外,夏季随着活动量的增加,红细胞通过增大体积来提高携氧量,满足生理需求。四眼斑龟红细胞数不存在雌雄差异,也没有随季节变化的特点,这与中华鳖明显不同^[1];但在产卵期明显增加,可能是龟能量消耗较大,活动量增加,代谢速度加快,对 O_2 的需要量和 CO_2 排出量增加,相应的红细胞数增加,以满足生理机能的需要。

3.2 白细胞数量与形态变化 白细胞在参与机体的特异和非特异防御机制中起重要作用,特别是淋巴细胞和嗜中性粒细胞、单核细胞。雌性龟在产卵期能量消耗大,产卵后体质弱,嗜中性粒细胞、淋巴细胞数增加,提高机体的防御免疫功能^[9],说明四眼斑龟血细胞的数量和种类变化是其生理适应的需要。据文献报道^[1],中华鳖白细胞数量存在季节变化,在夏季,为了防御因气温升高而日益增加的微生物的侵袭,白细胞数量增加,而四眼斑龟未出现这种变化,可能是因为海南属亚热带气候,四季温差变化不明显并且四眼斑龟

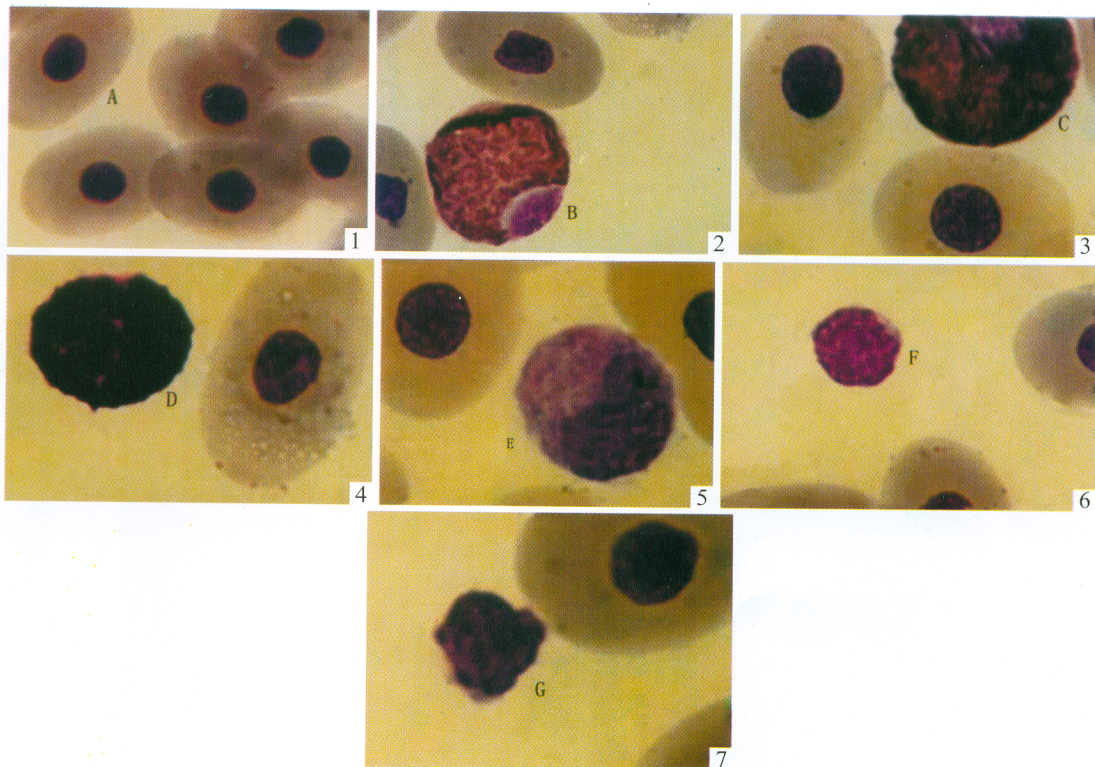
营较强的水栖生活,因此对外界温度变化不敏感,白细胞的数量不增加,从而造成夏季四眼斑龟防御机制没有相应地增强,容易染病。

3.3 血栓细胞与凝血机制 四眼斑龟血栓细胞数占白细胞分类计数的41%,长径(8.87 ± 0.75) μm ,短径(6.44 ± 0.66) μm ,凝血时间8 min 56 s ± 3 min 35 s,大小与鳖血栓细胞相近^[10];鳖血栓细胞占白细胞分类计数的12%~28%,而四眼斑龟凝血时间却明显长于鳖的^[11],在鳖中是否存在另一种凝血机制,有待进一步研究。血栓细胞主要参与机体的凝血机制,凝血时间存在季节性变化可能与温度有关,温度高,凝血时间短;相反,凝血时间延长,可能有两个方面原因:一是在血管外,较高的气温将有利于各种凝血因子的产生;二是温度升高,血栓细胞体积增大,它的表面积也越大,有利于吸附血浆中的各种凝血因子。关于龟鳖的凝血机制,各种文献说法不一,有的认为靠血栓细胞粘附使血液凝固^[2];有的认为鳖中没有血栓细胞,存在另一种凝血机制。对于四眼斑龟血栓细胞检测发现,各龟的血栓细胞数没有显著的差异,但凝血时间有的相差10倍,说明凝血过程除了血栓细胞的参与,还涉及到复杂的凝血因子。

致谢 海南医学院血液检验科陈小丹教授,海南师范学院生物系王力军、马文辉老师,本科生王志伟、郭运军、蒙剑云、曾祥裕等协助本研究的实验工作,在此一并致以诚挚的谢意!

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 王军萍, 郭明申, 韩希福. 中华鳖血细胞显微和超微结构的观察. 中国水产科学, 1999, 6(4): 106 ~ 108.
- [3] 罗曼, 蒋立科, 甘雅玲等. 黄缘盒龟血细胞亚显微结构的电镜观察分析. 动物学杂志, 2001, 36(5): 9 ~ 13.
- [4] 曹伏君, 李长玲, 刘楚吾等. 乌龟外周血细胞的显微和超微结构. 水生生物学报, 2001, 25(3): 261 ~ 267.
- [5] 喻维新. 乌龟血液成分的初步检测. 动物学报, 1983, 29(2): 193 ~ 194.
- [6] 史海涛, 符有利, 汪继超. 四眼斑水龟之谜. 人与生物圈, 2002 (6): 33 ~ 39.
- [7] 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, 1998, 33(1): 29 ~ 31.
- [8] 张润, 唐家传, 吴昆华等. 龟的影象学和血液学研究. 动物学杂志, 1999, 34(3): 34 ~ 37.
- [9] 潘连德, 邹玉蓉. 中华鳖嗜中性粒细胞吞噬功能的研究. 中国水产科学, 2000, 7(2): 32 ~ 36.
- [10] 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.
- [11] 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.



1. 红细胞(A) $\times 1000$; 2. 嗜中性粒细胞(B) $\times 1000$; 3. 嗜酸性粒细胞(C) $\times 1000$; 4. 嗜碱性粒细胞(D) $\times 1000$; 5. 单核细胞(E) $\times 1000$; 6. 淋巴细胞(F) $\times 1000$; 7. 血栓细胞(G) $\times 1000$