

两栖动物嗜中性粒细胞与淋巴细胞的百分比及两者比值和应激反应的关系研究进展

周丽芹 赵雪倩 许梅 高思艺 李晓彤
倪璇 刘莹莹 张志强*

安徽农业大学动物科技学院, 水产动物健康养殖工程技术研究中心 合肥 230036

摘要: 两栖动物血液中的白细胞数量与其健康状态有关, 嗜中性粒细胞与淋巴细胞的比值被认为是指示其应激水平的替代指标。本文概述了两栖动物常用的采血部位、采血方法和注意事项, 总结了物种、发育阶段、城市化、环境污染物、温度和病原微生物等因素对两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比及两者比值的影响, 以及两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞比值与应激反应能力的关系。结合两栖动物的生活史特征, 认为至少在下述三方面急需开展工作: 1) 优化和标准化两栖动物蝌蚪、幼体和成体的活体采血技术, 使之适用于野外研究; 2) 清楚界定单一因素与两栖动物蝌蚪、幼体和成体血液中嗜中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比及两者比值的比例, 并阐明多种因素复合作用下短期内或较长时期其健康状态与这些指标的关系; 3) 从免疫学观点出发, 澄清两栖动物水陆转换关键生活史阶段免疫系统内部各组分之间、免疫功能与其他耗能的生理活动之间是否存在权衡关系, 为预估种群未来命运贡献新思路。两栖动物血液中嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比及两者的比值受多种因素影响, 但目前的研究仍聚焦于单一因素的种内比较, 若推广至多因素背景下或物种间的比较研究, 建议仍需与其他生理指标配合使用, 谨慎解释其生态学意义。

关键词: 两栖动物; 采血方法; 嗜中性粒细胞; 淋巴细胞; 应激; 生理权衡

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 02-295-12

基金项目 安徽农业大学 2022 年省级大学生创新创业训练计划项目 (No. S202210364040, S202210364041, S202210364044), 2024 年国家级大学生 (研究生) 创新创业训练计划项目 (No. 202410364021), 2023 年度省级研究生创新创业实践项目 (No. 2023cxcysj044), 2022 年安徽省新时代育人质量工程项目 (研究生教育) 省级特色学位点建设项目-水产, 安徽农业大学 2023 年度校级质量工程动物学教学创新团队项目 (No. 2023aujxtd004);

* 通讯作者, E-mail: zsq-003@163.com;

第一作者介绍 周丽芹, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生理生态学和免疫生态学; E-mail: zhouliaqin@stu.ahau.edu.cn.

收稿日期: 2024-03-08, 修回日期: 2024-10-12 DOI: 10.13859/j.cjz.202524050 CSTR: 32109.14.cjz.24050

Research Progress on Percentage of Neutrophils and Lymphocytes and the Relationship Between Their Ratio and Stress Response in Amphibian Species

ZHOU Li-Qin ZHAO Xue-Qian XU Mei GAO Si-Yi LI Xiao-Tong
NI Xuan LIU Ying-Ying ZHANG Zhi-Qiang*

*Engineering Technology Research Center of Healthy Aquaculture, College of Animal Science and
Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China*

Abstract: The number of leukocytes in the circulating blood of amphibians is related to their health status, and the ratio of neutrophils to lymphocytes (N/L ratio) can be considered as a surrogate indicator of their stress level. In this paper, we reviewed the common blood sampling positions, methods and precautions for blood sampling in amphibians, summarized the effects of multiple factors including species, developmental stage, urbanization, environmental pollutants, temperature and disease on the percentages of neutrophils and lymphocytes and the N/L ratio, and the relationship between the N/L ratio and stress response capacity in amphibians. Combined with amphibian's life history characteristics, at least three further areas of work should be urgently carried out: 1) Optimization and standardization of blood sampling technique for the tadpoles, juvenile and adult amphibians, and making it suitable for amphibian research in the field; 2) It is optimal to clearly define the relationship between a single factor and the percentage of neutrophils, the percentage of lymphocytes, and their ratio in the blood of tadpoles, juvenile and adult amphibians; Meanwhile, it is also important to clarify the relationship between the health status of amphibian and these above-mentioned indicators in the short term or for a longer period under the combination of multiple factors; 3) From the immunological point of view, to clarify whether there is a trade-off relationship between different components of the immune system and between immune function and other energy-consuming physiological activities for some key life history stages from aquatic to terrestrial phase transitions, and to provide a novel idea for estimating the future fate of amphibian population. The percentage of neutrophils and lymphocytes, as well as their ratio in amphibian blood is affected by many factors, and current studies focus on intraspecific comparisons under the condition of a single factor. It is necessary to cooperate with other physiological indicators, and to interpret their ecological significances carefully if these indicators will be applied under the conditions of multiple factors or for interspecific comparative studies.

Key words: Amphibians; Method of blood sampling collection; Neutrophils; Lymphocytes; Stress; Physiological trade-off

脊椎动物中, 活体采血技术多见于鸟类和哺乳类等内温动物, 较少应用于外温动物, 尤其是两栖动物; 两栖动物中, 血液指标的变化可辅助用于疾病诊疗或作为判断其健康状态的

辅助指标 (Campbell et al. 2007, 2022, Isaak Delgado et al. 2023), 可推广用于物种的保护生理学 (conservation physiology) 研究 (Park et al. 2023)。血液学参数中, 脊椎动物的白细胞分为

有粒白细胞和无粒白细胞,前者通常包括嗜中性粒细胞(或嗜异性粒细胞,见于鸟类和爬行类)、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞,后者包括单核细胞和淋巴细胞(Campbell et al. 2007, Davis et al. 2008)。各型白细胞的数量动态与脊椎动物免疫系统的不同组分有关,是指示其健康状态的有效指标,嗜中(或异)性粒细胞与淋巴细胞的比值(ratio of neutrophils or herterophils to lymphocytes, N/L 或 H/L)可作为应激水平的替代者(Davis et al. 2008, 张志强 2015, Davis et al. 2018),多见于免疫生态学(immunological ecology)研究(Gomes et al. 2022, Assis et al. 2023)。

然而,受限于活体采血技术的匮乏,以及一些研究的背景描述模糊,与两栖动物白细胞数量动态和 N/L 比值变化范围有关的文献较少(Davis 2009a)。Davis (2009a)曾建立网址为 <http://wildlifehematology.uga.edu> 的网站,较为系统地整理了 2021 年 4 月以前发表的与两栖动物等脊椎动物各型白细胞数量和 N/L (或 H/L) 有关的英文文章,并对在动物生态学研究如何以 N/L (或 H/L) 来度量脊椎动物的应激水平进行了分析(Davis et al. 2008, 2018)。国内对无尾目(Anura)(潘玉芝 1956)、有尾目(Caudata)(李丕鹏等 1989)和无足(或蚓螈)目(Apoda 或 Gymnophiona)(李桂芬等 2009)动物的白细胞组成及其数量动态也有报道,但局限于单一物种的静态研究。随着对两栖动物免疫系统研究的深入(Jiang et al. 2021, Douglas et al. 2023, Ruiz et al. 2023),以及免疫生态学和保护生理学等新兴交叉学科的迅猛发展(Brock et al. 2014, Assis et al. 2023),关于在动物生态学研究如何在生态学背景下使用这些参数来指示动物体的健康状态(张志强等 2005, 张志强 2015, 刁迎珠等 2022),才在最近几年逐渐引起了重视(连丽燕等 2018, 张志强等 2022, 刁迎珠等 2023, 伍亮等 2023a, 裴鑫怡等 2024, 张志强等 2024)。本文概述了两栖动物的采血部位、采血方法和注意事项,

总结了物种、发育阶段、城市化、环境污染物、温度和病原微生物等因素与嗜中性粒细胞的百分比和淋巴细胞的百分比的关系及 N/L 与应激反应的关系,以及 N/L 比值的生态学意义,并对未来的研究方向提出了建议。

1 两栖动物的采血方法和注意事项

两栖动物中,血液学参数的变化与其营养、健康状况和对环境的适应性有关(Costantini 2022),也可辅助用于疾病诊疗和愈后判断(Campbell et al. 2007, 2022),但采血部位、采血量、采血工具、注意事项和适用类群随物种和特定生活史阶段而变化(表 1)。

物种、季节和健康状态等许多因子都影响两栖动物的血量。蚓螈目动物血量约占其体重的 25%,有尾目和无尾目血量均约占其体重的 10%(Arikan et al. 2014);许多水生两栖动物处于 13%和 25%之间,而大多数陆生两栖动物处于 7%和 10%之间(Wright 2001, Campbell et al. 2007)。一般认为,一次采血量低于两栖动物体重的 1%是合适的,不会对其造成实质性伤害(Campbell et al. 2007),而制作一张血涂片所需血量为 10 μ l 左右(最低为 3 μ l)。采集两栖动物血液的方法可分为低损伤性、损伤性和致死性三种,对应的采血部位分别为腹静脉、尾和后腿根部、心和心动脉干,可采集的血量随损伤程度呈递增趋势(表 1)。

心穿刺和心动脉干采血,均需要预先麻醉动物,可使用三卡因间氨基苯酸乙脂甲磺酸盐(tricainemethanesulfonate, 即 MS222)(Campbell et al. 2007)或苯佐卡因(Weerathunga et al. 2020),以防止其移动,避免伤到心和大的血管。心穿刺时,将麻醉好的动物腹面朝上,肉眼观察心跳情况,待其收缩和舒张时,用多普勒探针(Doppler probe)或探照的方式或置于胃内的小直径冷光源内窥镜找寻和定位心位置,以带有 25 G 针头的一次性注射器采集血液(Wright 2001)。心动脉干采血时,先麻醉、固定动物,解剖打开围心腔,

表 1 两栖动物低损伤性、损伤性和致死性采血方法比较

Table 1 Comparisons of blood sampling methods with low injury, injury and lethality in amphibians

采血方法 Blood sampling methods	采血部位 Blood sampling sites	采血量 Blood sampling quantity	采血工具 Blood sampling tools	注意事项 Matter needing attention	特定的生活史阶段 Specific life history phase	参考文献 References
低损伤性采血方法 Blood sampling methods with low injury	腹静脉 Abdominal vein	10 ~ 50 μ l	多普勒探针、一次性注射器、微收集管或微 红细胞压积管、载玻片、一次性手套、护目 镜等 Doppler probes, disposable syringes, microcollection tubes or microhematocrit tubes, slides, disposable gloves, goggles, etc.	避免混入体液或伤到采样者的皮肤 Avoid mixing body fluids or damaging the skin of samplers	大多数有尾目和无尾目亚成 体、成体动物 Most sub-adult or adult animals in Caudata and Anura	Campbell et al. 2007, Forzán et al. 2012
损伤性采血方法 Blood sampling methods with injury	尾 Tail	1 或 2 滴, 10 ~ 50 μ l One or two drops, 10 - 50 μ l	剪刀、离心管、一次性手套、载玻片等 Scissors, centrifuge tubes, disposable gloves, slides, etc.	按摩被剪断的尾上部, 促进血液流出; 避免混入体液 Promoting blood flow by massaging the upper art of cut tail; avoid mixing body fluids	尾部粗壮的蝌蚪 The tadpole with a stronger tail	连丽燕等 2018
致死性采血方法 Blood sampling methods with lethality	后腿根部 Hind thigh	1 或 2 滴, 30 ~ 80 μ l One or two drops, 30 - 80 μ l	剪刀、离心管、一次性手套、载玻片等 Scissors, centrifuge tubes, disposable gloves, slides, etc.	避免混入体液 Avoid mixing body fluids	尾部完全消失的幼体 The larvae with a completely absent tail	伍亮等 2023a, 张志强等 2024
致死性采血方法 Blood sampling methods with lethality	心和主动脉干 Heart and cardiac artery trunk	70 ~ 80 μ l 至 1 ~ 3 ml From 70 - 80 μ l to 1 - 3 ml	剪刀、多普勒探针或内窥镜、一次性手套、 一次性注射器、玻璃分针等 Scissors, Doppler probes or endoscope, disposable gloves, disposable syringes, glass dissecting tool, etc.	预先麻醉、固定动物; 准确定位心位置; 选择大小合适的工具 Pre-anesthetize and fix the animals; accurately locate the heart; select the right size tool	大多数有尾目和无尾目亚成 体、成体动物 Most sub-adult or adult animals in Caudata and Anura	Campbell et al. 2007, 李卫国等 1995, 熊建利等 2016, Campbell et al. 2022

充分暴露心后, 对于小型有尾目动物, 可剪断动脉干, 并在动脉干剪断处滴加抗凝剂, 以毛细管吸取从动脉干中流出的血液, 至停止流出为止, 此方法可采集到 70 ~ 80 μl 山溪鲵 (*Batrachuperus pinchonii*) 血液 (熊建利等 2016), 对于个体较大的青蛙或蟾蜍, 可将动脉干提起或用玻璃分针挑起, 然后将一次性注射器向心刺入动脉干, 缓慢抽取, 可采血 1 ~ 3 ml (李卫国等 1995)。

2 两栖动物白细胞数量动态的共性和特异性

两栖动物白细胞分型主要涉及嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞 (金晨晨 2014), 有的研究还包含了血栓细胞 (Weerathunga et al. 2020)。研究表明, 淋巴细胞是大多数两栖动物血液中占比最高的白细胞类型, 其次为嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞 (Davis 2009a)。

2009 年, Davis 创建 The Wildlife Leukocytes Website 网站 (<http://wildlifehematology.uga.edu>), 收集、整理了两栖动物、爬行动物和非家养鸟类的白细胞数量信息, 原因在于这些物种的红细胞都有细胞核, 难以进行自动计数 (Davis 2009a); 该网站中, 最近一次与两栖动物白细胞有关的信息更新于 2021 年 4 月 5 日, 最新的一篇文献发表于 2019 年。该网站显示, 若以系统发育关系对两栖动物血液中淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞的百分比的平均值和标准差进行分类, 无尾目和有尾目均以淋巴细胞的占比为最高, 超过 60%, 嗜中性粒细胞的占比为 17.9% ~ 25.8%, 居于第二位, 嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞的占比均不足 10%; 无足目中, 也以淋巴细胞的占比为最高, 约为 45.8%, 嗜酸性粒细胞的占比其次, 约为 25.8%, 嗜中性粒细胞的占比约为 13.7%。这些背景清楚的研究, 统筹考虑了性别、季节和年龄等因素的影响; 此外, 以上计算方法, 均未包括 N/L

大于 1 的情况 (个体被取样前处于繁殖状态或被运输状态)。此后, 也有一些关于无尾目动物的研究符合上述的一般规律 (Fathinia et al. 2020, Franco-Belussi et al. 2022)。

3 影响两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞百分比的因素

脊椎动物中, 血液中嗜中 (或嗜异) 性粒细胞的数量增加与一定程度的感染有关, 而淋巴细胞则主要起防御功能, 激活后与体液免疫功能有关 (Davis et al. 2008, Ruiz et al. 2023)。两栖动物嗜中性粒细胞的百分比和淋巴细胞的百分比易受发育阶段、城市化、环境污染物、温度 (季节、冬眠) 和病原微生物等因素的影响。此外, 水位 (伍亮等 2023a)、海拔 (Xiong et al. 2018) 和运输 (Santos et al. 2021) 等因素也会影响两者的数量动态。

3.1 发育阶段与两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞百分比的关系

关于两栖动物变态前后不同发育阶段免疫功能的比较研究, 测定指标集中于对植物血凝素的反应模式和反应峰值 (张志强等 2020, 伍亮等 2023b), 以及血液中各型白细胞百分比的动态改变 (Davis 2009b) 等方面。牛蛙 (*Lithobates catesbeiana*)、杜波依斯树蛙 (*Polypedates teraiensis*)、印度树蛙 (*P. maculatus*) 和西姆斯跳树蛙 (*Chirixalus simus*) 等无尾两栖类动物血液中的各型白细胞, 变态前后均以淋巴细胞的占比为最高, 嗜中性粒细胞其次, 且都在发育早期即达到峰值 (Davis 2009b, Das et al. 2012, 2015a, 2015b), 而饰纹姬蛙 (*Microhyla fissipes*) 淋巴细胞的占比随发育阶段推进而降低, 其嗜中性粒细胞的占比则趋于增加 (Hota et al. 2013)。

花背蟾蜍 (*Pseudepidalea raddei*) 变态前后均以淋巴细胞的占比为最高, 这与牛蛙 (Davis 2009b)、斑腿泛树蛙 (*Polypedates megacephalus*)、喜马拉雅树蛙 (*P. maculatus*) 和西姆斯跳树蛙相似 (Das et al. 2012, 2015a,

2015b), 但花背蟾蜍淋巴细胞的百分比并不随发育阶段而变化(连丽燕等 2018), 而牛蛙等则随发育阶段的推进而下降(Davis 2009b)。此外, 花背蟾蜍嗜中性粒细胞的占比随发育阶段的推进而逐渐升高, 并在登陆前的 45 期达到峰值, 之后稍下降, 这与饰纹姬蛙相似(Hota et al. 2013), 但不同于牛蛙和西姆斯跳树蛙(Davis 2009b, Das et al. 2015b), 可能与登陆前抗感染能力的提高有关(连丽燕等 2018)。

3.2 城市化对两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞百分比的影响

两栖动物是环境变化的重要指示生物之一, 与其他脊椎动物相比, 其更易受到城市化的影响。原因如下: 1) 它们的皮肤具有高渗透性, 无论是在水生阶段还是陆生阶段, 其皮肤均对毒性物质较为敏感; 2) 城市景观影响两栖动物的扩散能力; 3) 适宜繁殖的栖息地稀缺可能会削减两栖动物的繁殖机会, 从而导致可被利用的栖息地质量较差, 或者具有较低的适配性; 4) 多种多样的应激物, 如城区的噪声、光污染或增温, 可能通过干扰声音信号传递或抑制免疫应答而具有行为学的和生态学的不良后果(Iglesias-Carrasco et al. 2017)。城市化导致两栖动物的栖息地面积缩减, 但人类活动增加、噪声等污染程度加剧是否会抑制两栖动物的免疫功能, 仍有争议(Garcia Neto et al. 2020, Franco-Belussi et al. 2022, Franco-Belussi et al. 2024, Romanova et al. 2024)。

与栖息于自然环境中的个体相比, 栖息于巴西东北部马拉尼昂州城区的委内瑞拉长鼻树蛙(*Scinax x-signatus*)和居维尔泡蟾(*Physalaemus cuvieri*), 前者淋巴细胞的占比稍低, 但嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞的占比都偏高, 后者淋巴细胞和嗜碱性粒细胞的占比均较高, 但嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞的占比偏低, 说明不同物种对变化的环境条件反应各异(Garcia Neto et al. 2020)。Franco-Belussi 等

(2024) 比较了巴西中部某一城区和郊区波迪奇皮努斯细趾蟾(*Leptodactylus podicipinus*) 每张血涂片上每 100 个白细胞中淋巴细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞、血栓细胞和嗜酸性粒细胞百分比的差异, 主成分分析结果表明, 城区种群白细胞谱与嗜中性粒细胞和单核细胞的波动有关, 而郊区种群白细胞谱只与嗜中性粒细胞的波动有关, 来自城区和郊区的老年个体的嗜中性粒细胞均占比很高, 且来自城区的年轻个体也有高比例的嗜中性粒细胞占比。

3.3 环境污染物对两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞百分比的影响

以动物血液学参数的变化来揭示环境污染物, 尤其是农田生态系统中不同管理模式(Salinas et al. 2024)、农药(Robinson et al. 2021)和重金属(de Albuquerque et al. 2024)对蝌蚪关键生活史阶段免疫功能的影响, 以及微塑料污染对两栖动物健康状态的影响, 成为日益受到重视的新研究领域(刁迎珠等 2022)。以黑斑侧褶蛙(*Pelophylax nigromaculatus*) 37 期蝌蚪为研究对象, 以清水组为对照组, 将 37 期蝌蚪暴露于 50、200 和 1 000 nm 粒径低、中和高浓度荧光聚苯乙烯微球溶液 7 d, 之后分别移至清水中饲养 7 d 或 14 d, 发现清水组嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比均不随处理天数的变化而变化, 低、中和高浓度组嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比均随浓度及暴露和清除时间而变化, 但无统一的规律(刁迎珠 2022)。此外, 农药也导致北美豹蛙(*Lithobates pipiens*) 血液中嗜中性粒细胞数量的升高(Shutler et al. 2011)。

3.4 温度(季节、冬眠)对两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞百分比的影响

与哺乳动物不同, 两栖动物的体温会随季节变化。处于自然冬眠期或面临低温胁迫时, 会抑制其体内病原体的生长, 免疫系统的功能趋于钝化(Zapata et al. 1992, Maniero et al. 1997, Raffel et al. 2006, 金晨晨 2014, 李诺等

2023)。气候变暖背景下, 极端高温会强烈影响两栖动物免疫系统的功能 (Bakewell et al. 2021, Rollins-Smith et al. 2023)。研究表明, 绿红东美螈 (*Notophthalmus viridescens*) 的免疫功能在较长期的低温条件下会先下降, 直至降至完全稳定为止; 而短期低温暴露条件下, 免疫学参数的改变会滞后于温度变化, 具有迟滞效应 (Raffel et al. 2006)。周贤君等 (2010) 发现, 牛蛙夏季的白细胞数量明显下降, 这可能与细菌和病毒数较少有关, 冬季白细胞数量增多可能与冬眠状态的维持有关。金晨晨 (2014) 对雌、雄中华蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 成体的研究发现, 各型白细胞的占比均无性别差异, 嗜中性粒细胞的百分比秋季最高, 夏季最低, 淋巴细胞的百分比冬季最高, 秋季最低。Barriga-Vallejo 等 (2015) 对溪畔钝口螈 (*Ambystoma rivulare*) 的研究发现, 从 10 月至来年 5 月 (4 月份未测定), 各型白细胞的百分比均随月份而变化, 淋巴细胞的百分比 10 月和 11 月维持较高的比例, 11 月开始下降, 至 2 月降至最低, 而嗜中性粒细胞的百分比 12 月最高, 之后下降。21 ~ 27 °C 条件下, 水温对黑斑侧褶蛙变态后幼蛙血液中淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞的百分比均无明显影响 (张志强等 2022), 在 23 ~ 29 °C 条件下, 中华蟾蜍变态后幼蟾嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比无明显变化, 但会促进嗜酸性粒细胞增殖, 抑制嗜碱性粒细胞和单核细胞增殖 (张志强等 2024)。增温和升高水体的二氧化碳浓度会降低沙漏树蛙 (*Polypedates cruciger*) 46 期幼蛙白细胞总数和血栓细胞数量, 32 °C 组淋巴细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞的占比增加, 而升高二氧化碳浓度组淋巴细胞的百分比和溶菌酶的活性增加 (Weerathunga et al. 2020)。

3.5 病原微生物对两栖动物嗜中性粒细胞和淋巴细胞百分比的影响

疾病, 尤其是传染病, 如壶菌病 (chytridiomycosis) 在全球范围内的暴发, 被

认为是导致两栖动物种群衰退或灭绝的主要因素之一 (Rollins-Smith 2020), 但关于壶菌病与嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比的关系, 以及各型白细胞的百分比与其他疾病诊疗的关系, 尚无研究 (Bienentreu et al. 2020)。

临床上, 嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比与疾病诊疗和愈后判断有关, 嗜中性粒细胞数量增加, 可能意味着发生了炎症反应 (Campbell et al. 2022), 而 B 淋巴细胞在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 感染细菌时起吞噬功能, 其数量随细菌感染强度增加而增加 (Li et al. 2006)。然而, 寄生虫感染常也会导致高加索合跗蟾 (*Pelodytes caucasicus*) 嗜酸性粒细胞数量增加 (Arikan et al. 2014), 但血液中的寄生虫不影响阿根廷科多巴树蛙 (*Boana cordobae*) 的白细胞数量动态 (Pollo et al. 2023); 若被螨虫寄生, 摔跤手青蛙 (*Leptodactylus luctator*) 淋巴细胞和单核细胞的占比会升高 (Bilhalva et al. 2023)。鉴于病毒性疾病常导致两栖动物死亡, 与之有关的研究更少。用青蛙病毒 3 型 (FV-3) 感染热带爪蟾 (*X. tropicalis*), 发现其白细胞总数减少, 嗜中性粒细胞的数量和占比增加, 嗜碱性粒细胞比例降低, 淋巴细胞占比先下降后上升, 嗜酸性粒细胞和单核细胞无明显变化 (Forzán et al. 2016); 被虹彩病毒感染后, 非洲爪蟾的 T 细胞, 特别是 CD8 细胞异常增殖, 可能会导致淋巴细胞增多症 (Morales et al. 2007)。

4 N/L 与应激反应的关系及其生态学意义

4.1 N/L 的正常值波动范围

据 The Wildlife Leukocytes Website 网站统计, 2021 年 4 月 5 日以前, 除个别物种因处于繁殖状态或经历运输过程而导致 N/L 超过 1 外, 绝大多数物种 N/L 值围绕 0.3 这一数值呈正态分布; 去除大于 1 的数值后, 两栖动物 N/L 的平均值为 0.34, 正常值范围为 0.01 ~ 0.67 (Davis 2009a)。N/L 测定具有需血量少 (低至 3 μ l)、计数准确等优点, 不但适用于两栖动物

成体研究，也可用于变态前后的蝌蚪研究 (Davis et al. 2018)。

4.2 N/L 与皮质醇含量的关系

当两栖动物面对应激刺激时，血液中糖皮质激素（或皮质醇）水平会升高，这可能与循环血中嗜中性粒细胞数量的升高以及淋巴细胞数量的下降有关，即 N/L 增加，如美洲南方豹蛙 (*Lithobates sphenoccephalus*)、暗斑钝口螈 (*A. opacum*) 和鼃钝口螈 (*A. talpoideum*) 等 (Davis et al. 2010, 2011)。在这个意义上，两栖动物中 N/L 可作为指示其应激反应能力的有效指标。然而，与血浆（或血清）皮质醇含量相比，N/L 虽然在瞬时也能发生改变，但通常需时更长，两者之间并未表现出明显的相关关系 (Davis et al. 2018)。这种差异产生的原因可能与应激反应的本质有关，也可能与白细胞和皮质醇在应激反应期间所扮演的角色有关。对于 N/L 和皮质醇含量究竟哪一个指标最适合代表两栖动物的应激水平，仍有争论 (Davis et al. 2018)。急性应激条件下，皮质醇水平可以在数分钟内升高，并在 1 或 2 h 内恢复至基底水平，而 N/L 至少在 30 至 60 min 内或更长的时间内都会维持在较低的水平；在慢性应激条件下，反复被应激处理或暴露于慢性环境应激中的动物，其皮质醇含量下降，这通常（但不总是）会导致低的基底水平，且对急性应激的反应趋于减弱，但在相同的条件下，N/L 却可保持较高的水平 (Davis et al. 2018)。综上所述，本文建议在急性应激条件下，使用血浆（或血清）皮质醇含量来度量两栖动物的应激反应，而在慢性应激条件下，选择 N/L 作为指示应激反应的指标。

4.3 其他影响 N/L 的因素

最近，关于两栖动物 N/L 的研究，涉及到的因素包括发育阶段、季节、温度、水位和新型污染物等。28、38、42、44、45 和 46 期的野生花背蟾蜍，其 N/L 并不随发育阶段而变化 (连丽燕等 2018)。金晨晨 (2014) 发现，雌、

雄成体中华蟾蜍的 N/L 均在秋季最高，夏季最低。在水温为 21 ~ 27 °C 条件下，增温可加速黑斑侧褶蛙 37 期蝌蚪的变态过程，但对 46 期幼蛙的 N/L 无明显影响 (张志强等 2022)，而在水温为 26 °C、28 °C 和 30 °C 条件下，26 °C 组的 N/L 显著高于 30 °C 组，但 28 °C 组与 26 °C 组和 30 °C 组均无组间差异 (裴鑫怡等 2024)。在水温为 23 °C、25 °C、27 °C 和 29 °C 条件下，中华蟾蜍变态后幼蟾的 N/L 也未见明显的组间差异，说明水温不影响其应激反应能力 (张志强等 2024)。然而，当面临水位下降风险时，中华蟾蜍变态后幼蟾的 N/L 在快速干涸组和中速干涸组却显著高于慢速干涸组和对照组 (伍亮 2023)，变态后黑斑侧褶蛙幼蛙的 N/L 快速干涸组显著高于其他水位处理组 (伍亮等 2023a)。对黑斑侧褶蛙 37 期蝌蚪进行 50 nm、200 nm 和 1 000 nm 粒径，以及清水组、低浓度组、中浓度组和高浓度组荧光标记聚苯乙烯微球溶液组合处理后，连续测定了暴露 7 d (7 d 时)、清水清除 7 d (14 d 时) 和 14 d (21 d 时) 的 N/L，发现清水组 N/L 不随处理天数而变化，其他浓度组都从 7 d 时至 21 d 时显著增加；50 nm 和 1 000 nm 21 d 时清水组最低，200 nm 暴露 7 d 时高浓度组最低，21 d 时清水组最低 (刁迎珠 2022, 刁迎珠等 2023)。

4.4 N/L 的生态学意义

低损伤性采血技术在野生两栖动物研究中的应用为通过血液指标来研究两栖动物的健康状况打开了一扇大门。以 N/L 作为应激水平的替代者，通过一滴血就可以方便快捷地估测出两栖动物的应激水平。不良环境条件下，两栖动物的应激水平应升高，与之相关的免疫功能应趋于弱化，但两者之间的关系尚不明确 (Costantini 2022)。若将 N/L 与两栖动物免疫系统的不同组分相联系，将为解决关键生活史阶段生长和存活、免疫和繁殖之间的关系提供新的视角，为深入理解病原微生物对两栖动物的作用机制和种群衰退贡献新的技术手段。

5 展望

血液中嗜中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比和 N/L，可从天然免疫、体液免疫和应激水平等不同角度反映两栖动物的健康状态，建议至少应在如下三个方面加强研究。

5.1 两栖动物活体采血技术优化和程序标准化

目前，背景清楚、可用于比较研究的两栖动物的血液学数据仍严重缺乏。因此，采血前建议根据两栖动物的分类地位、测定指标、所需血量和生活史阶段等因素，灵活使用各项采血技术（表 1）；同时，有必要交代清楚受试物种的采样（或试验）地点、体重、体长、年龄和性别等信息，为未来构建数据库提供基础资料。适用于两栖动物的采血技术可根据实际情况加以优化，在满足动物福利的前提下，逐步形成标准化的操作程序，保证客观性和可重复性，便于物种间进行比较研究。

5.2 多因素作用下嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比及 N/L 与两栖动物健康的关系

生理学区衡是理解生活史进化过程的核心内容之一，在总能量有限的情况下，多种相互竞争的、耗能的生理学活动之间可能会存在权衡关系，如免疫和繁殖（Stearns 1992, Wikelski et al. 2001）。变态发育、从水生至陆生的生活史特征，使两栖动物成为研究生活史生命跨度特定阶段的生理学区衡机制的理想动物类群，如变态前后免疫功能可塑性与存活、繁殖和衰老的关系，均已成为热点研究领域；此外，关于内、外环境因素对蝌蚪的影响研究，多集中于形态表型的可塑性变化方面，对其生理特征仍缺乏了解。将嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比及 N/L 引入两栖动物生态学研究，突破了以往研究只关注特定生活史阶段形态表型变化的局限性，为揭示两栖动物的生理适应性提供了新思路（裴鑫怡等 2024, 张志强等 2024）。然而，目前的研究仍多局限于单一因素对嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比及 N/L 的影响方面，未来做双因素或多因素交互作用处理时，

建议与血浆（或血清）杀菌能力（可稳定反映动物体的天然免疫能力）等免疫学指标相配合，以清楚界定各动态的生态学意义。

5.3 嗜中性粒细胞和淋巴细胞的百分比及 N/L 与两栖动物种群衰退的关系

随着人类活动加强，气候变暖、壶菌病流行、紫外线辐射增强和微塑料污染日益严重，两栖动物的生存和繁殖正面临着前所未有的挑战。免疫指标的变化可反映两栖动物的健康状态，进而可以在免疫功能与种群衰退之间建立联系，为解决种群动态波动的生理机制这一生态学难题提供了一个新思路（Carey et al. 1999）。基于采血技术优化和免疫学技术的进步，利用微量血液就可测定两栖动物各型白细胞的百分比和 N/L，若与血清（或血浆）杀菌能力和抗原抗体反应相结合，可全方位分析免疫系统不同组分与应激和健康状态的关系。然而，关于免疫功能与两栖动物种群衰退的关系，目前仍缺少实验例证。值得注意的是，各型白细胞的百分比只能部分反映免疫系统某一组分的功能，关于 N/L 与应激反应能力的关系，在实际使用时仍需谨慎解释其生态学意义。

参 考 文 献

- Arikan H, Çiçek K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology*, 10(1): 190–209.
- Assis V R, Robert J, Titon S C M. 2023. Introduction to the special issue Amphibian immunity: stress, disease and ecoimmunology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 378(1882): 20220117.
- Bakewell L, Kelehear C, Graham S P. 2021. Impacts of temperature on immune performance in a desert anuran (*Anaxyrus punctatus*). *Journal of Zoology*, 315(1): 49–57.
- Barriga-Vallejo C, Hernández-Gallegos O, Von Herbing I H, et al. 2015. Assessing population health of the toluca axolotl *Ambystoma rivulare* (Taylor, 1940) from México, using leukocyte profiles. *Herpetological Conservation and Biology*, 10(2): 592–601.
- Bienentreu J F, Lesbarrères D. 2020. Amphibian disease ecology: are we just scratching the surface? *Herpetologica*, 76(2): 153–166.

- Bilhalva L C, de Almeida B A, Colombo P, et al. 2023. Hematologic variables of free-living *Leptodactylus luctator* with and without hemoparasites and thrombidiform mites in southern Brazil. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 38: 100834.
- Brock P M, Murdock C C, Martin L B. 2014. The history of ecoimmunology and its integration with disease ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 54(3): 353–362.
- Campbell T W, Ellis C K. 2007. *Hematology of Amphibians // Campbell T W, Ellis C K. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Campbell T W, Grant K R. 2022. *Evaluation and Interpretation of the Peripheral Blood and Bone Marrow of Amphibians*. 5th ed. New York: John Wiley and Sons, 433–442.
- Carey C, Cohen N, Rollins-Smith L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(6): 459–472.
- Costantini D. 2022. A meta-analysis of impacts of immune response and infection on oxidative status in vertebrates. *Conservation Physiology*, 10(1): coac018.
- Das M, Mahapatra P K. 2012. Blood cell profiles of the tadpoles of the Dubois's tree frog, *Polypedates teraiensis* Dubois, 1986 (*Anura*: Rhacophoridae). *The Scientific World Journal*, 2012: 701746.
- Das M, Mahapatra P K. 2015a. Blood cell profile of the Indian tree frog *Polypedates maculatus* (GRAY, 1830), during larval development until metamorphosis. *Herpetozoa*, 27(3/4): 123–135.
- Das M, Mahapatra P K. 2015b. Blood cell profile of the tadpoles of *Chirixalus simus* (*Anura*: Rhacophoridae) during development and metamorphosis. *Russian Journal of Herpetology*, 23(2): 83–92.
- Davis A K. 2009a. The Wildlife Leukocytes Webpage: The ecologist's source for information about leukocytes of non-mammalian wildlife species. [EB/OL]. [2021-04-05]. <http://wildlifehematology.uga.edu>.
- Davis A K. 2009b. Metamorphosis-related changes in leukocyte profiles of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Comparative Clinical Pathology*, 18(2): 181–186.
- Davis A K, Maerz J C. 2010. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. *International Journal of Zoology*, 2010: 735937.
- Davis A K, Maerz J C. 2011. Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. *Journal of Herpetology*, 45(1): 40–44.
- Davis A K, Maney D L. 2018. The use of glucocorticoid hormones or leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: what's the difference? *Methods in Ecology and Evolution*, 9(6): 1556–1568.
- Davis A K, Maney D L, Maerz J C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5): 760–772.
- de Albuquerque V J, Folador A, Müller C, et al. 2024. How do different concentrations of aluminum and zinc affect the survival, body size, morphology and immune system of *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) tadpole? *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 87(8): 342–356.
- Douglas A J, Katzenback B A. 2023. The wood frog (*Rana sylvatica*): an emerging comparative model for anuran immunity and host-ranavirus interactions. *Developmental & Comparative Immunology*, 147: 104733.
- Fathinia B, Minaei T, Javanbakht H, et al. 2020. Hematology of the levant green frog, *Pelophylax bedriagae* (*Amphibia*: Ranidae) in southern Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 16(2): 155–170.
- Forzán M J, Smith T G, Vanderstichel R V, et al. 2016. Hematologic reference intervals for *Rana sylvatica* (*Lithobates sylvaticus*) and effect of Infection with Frog Virus 3 (*Ranavirus* sp., Iridoviridae). *Veterinary Clinical Pathology*, 45(3): 430–443.
- Forzán M J, Vanderstichel R V, Ogbuah C T, et al. 2012. Blood collection from the facial (maxillary)/musculo-cutaneous vein in true frogs (family Ranidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1): 176–180.
- Franco-Belussi L, de Oliveira Júnior J G, Goldberg J, et al. 2024. Multiple morphophysiological responses of a tropical frog to urbanization conform to the pace-of-life syndrome. *Conservation Physiology*, 12(1): coad106.
- Franco-Belussi L, Provete D B, Leão T R F, et al. 2022.

- Hematological parameters of a Neotropical wild frog population, with a phylogenetic perspective on blood cell composition in Anura. *Current Zoology*, 68(3): 361–369.
- Garcia Neto P G, Nowakowski A J, da Silva A F C, et al. 2020. Leukocyte profiles of two neotropical anuran species affected by anthropogenic habitat alteration. *Animal Conservation*, 23(5): 524–532.
- Gomes F R, Madelaire C B, Moretti E H, et al. 2022. Immunoendocrinology and ecoimmunology in Brazilian anurans. *Integrative and Comparative Biology*, 62(6): 1654–1670.
- Hota J, Das M, Mahapatra P K. 2013. Blood cell profile of the developing tadpoles and adults of the ornate frog, *Microhyla ornata*(Anura: Microhylidae). *International Journal of Zoology*, 2013: 716183.
- Iglesias-Carrasco M, Martín J, Cabido C. 2017. Urban habitats can affect body size and body condition but not immune response in amphibians. *Urban Ecosystems*, 20(6): 1331–1338.
- Isaak Delgado A B, Zavala-Norzagaray A A, Espinoza-Romo B A, et al. 2023. Hematologic parameters and the effect of hemoparasites of wild anurans in Northern *Sinaloa, Mexico*. *Veterinary Clinical Pathology*, 52(3): 386–395.
- Jiang N, Fan Y D, Zhou Y, et al. 2021. The immune system and the antiviral responses in Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*. *Frontiers in Immunology*, 12: 718627.
- Li J, Barreda D R, Zhang Y A, et al. 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 7(10): 1116–1124.
- Maniero G D, Carey C. 1997. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *Journal of Comparative Physiology B*, 167(4): 256–263.
- Morales H D, Robert J. 2007. Characterization of primary and memory CD8 T-cell responses against ranavirus (FV3) in *Xenopus laevis*. *Journal of Virology*, 81(5): 2240–2248.
- Park J K, Do Y. 2023. Current state of conservation physiology for amphibians: major research topics and physiological parameters. *Animals*, 13(20): 3162.
- Pollo F, Salinas Z, Baraquet M, et al. 2023. Hemoparasites do not affect life-history traits and cellular immune response in treefrog hosts *Boana cordobae*. *Animals*, 13(22): 3566.
- Raffel T R, Rohr J R, Kiesecker J M, et al. 2006. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology*, 20(5): 819–828.
- Robinson S A, Chlebak R J, Young S D, et al. 2021. Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*. *Environmental Pollution*, 284: 117149.
- Rollins-Smith L A. 2020. Global amphibian declines, disease, and the ongoing battle between *Batrachochytrium* fungi and the immune system. *Herpetologica*, 76(2): 178–188.
- Rollins-Smith L A, Le Sage E H. 2023. Heat stress and amphibian immunity in a time of climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 378(1882): 20220132.
- Romanova E B, Lukonina S A, Ryabinina E S, et al. 2024. Ecological and physiological analysis of immune responses of *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) in anthropogenically transformed territories. *Biology Bulletin*, 50(10): 2719–2729.
- Ruiz V L, Robert J. 2023. The amphibian immune system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 378(1882): 20220123.
- Salinas Z A, Babini M S, de Lourdes Bionda C, et al. 2024. Agroecosystems under conventional and organic management: hematological analysis of anuran for environmental health assessment. *Environmental Advances*, 15: 100508.
- Santos B D D, Alves A X, Santos N N D, et al. 2021. Transport stress in bullfrog: Hematological and plasma biochemical responses. *Aquaculture Reports*, 19: 100583.
- Shutler D, Marcogliese D J. 2011. Leukocyte profiles of northern leopard frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. *Copeia*, 2011(2): 301–307.
- Stearns S C. 1992. *The Evolution of Life Histories*. London: Oxford University Press.
- Weerathunga W A M T, Rajapaksa G. 2020. The impact of elevated temperature and CO₂ on growth, physiological and immune responses of *Polypedates cruciger* (common hourglass tree frog). *Frontiers in Zoology*, 17: 3.

- Wikelski M, Ricklefs R E. 2001. The physiology of life histories. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(9): 479–481.
- Wright K. 2001. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry* // Wright K, Whitaker B. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar, Florida: Kreiger Publishing, 128–146.
- Xiong J L, Zhang Y A, Chen W G, et al. 2018. Some haematological parameters of wild caught warty toothed toad *Oreolalax rugosus* (Liu, 1943) (Anura: Megophryidae). *Acta Zoologica Bulgarica*, 70(1): 69–74.
- Zapata A G, Varas A, Torroba M. 1992. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunology Today*, 13(4): 142–147.
- 刁迎珠. 2022. 聚苯乙烯对蝌蚪形态表型、小肠组织学和免疫功能的影响. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文.
- 刁迎珠, 裴鑫怡, 王萍, 等. 2023. 荧光聚苯乙烯微球对蝌蚪应激水平和免疫功能的影响. *生态学杂志*, 42(5): 1142–1149.
- 刁迎珠, 伍亮, 李雅琦, 等. 2022. 微塑料与蝌蚪健康的关系研究进展. *四川动物*, 41(3): 333–339.
- 金晨晨. 2014. 中华蟾蜍免疫功能的性别和季节差异. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文.
- 李桂芬, 蒙绍权, 李涛, 等. 2009. 版纳鱼鲷外周血细胞观察. *动物学杂志*, 44(2): 102–107.
- 李诺, 伍亮, 张志强. 2023. 低温对黑斑侧褶蛙变态和植物血凝素反应的影响. *水产养殖*, 44(5): 41–43.
- 李丕鹏, 何国湘, 张育辉, 等. 1989. 大鲵的血液学观察. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 17(3): 50–53.
- 李卫国, 王坤英. 1995. 蛙类采血的一种新方法. *动物学杂志*, 30(1): 42–43.
- 连丽燕, 高慧清, 孙嘉璐, 等. 2018. 变态前后花背蟾蜍蝌蚪消化器官大小及各型白细胞百分比的适应性变化. *生态学杂志*, 37(4): 1204–1210.
- 潘玉芝. 1956. 青蛙 (*Rana nigromaculata*) 血液的组织学研究. *北京大学学报: 自然科学*, (1): 89–96, 117–121.
- 裴鑫怡, 王萍, 彭秀娟, 等. 2024. 增温对黑斑侧褶蛙蝌蚪形态表型和生理特征的影响. *水生态学杂志*, 45(3): 165–171.
- 伍亮. 2023. 水位对两种两栖动物变态时长、形态表型和免疫功能的影响. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文.
- 伍亮, 李龙萱, 高歌, 等. 2023a. 水位对黑斑侧褶蛙蝌蚪形态表型、白细胞数量和应激反应的影响. *动物学杂志*, 58(1): 117–125.
- 伍亮, 王月妍, 李文慧, 等. 2023b. 泽陆蛙变态前后身体和器官大小及 PHA-P 反应的变化. *安徽农业大学学报*, 50(5): 817–822.
- 熊建利, 刘秀英, 张亚男, 等. 2016. 一种采集小型有尾两栖动物血液的方法. CN105943062A. 2016-09-21.
- 张志强. 2015. 动物生态学研究中选择免疫学参数及其优缺点分析. *四川动物*, 34(1): 145–148.
- 张志强, 彭秀娟, 裴鑫怡, 等. 2024. 增温影响中华蟾蜍蝌蚪表型可塑性的生理代价. *生态学报*, 44(8): 3329–3336.
- 张志强, 王德华. 2005. 免疫能力与动物种群调节和生活史权衡的关系. *应用生态学报*, 16(7): 1375–1379.
- 张志强, 王泽洋, 许洋溢, 等. 2020. 黑斑侧褶蛙变态前后身体大小的变化及对植物血凝素的反应模式. *安徽农业大学学报*, 47(4): 519–523.
- 张志强, 杨雨晴, 陈利, 等. 2022. 水温升高对黑斑侧褶蛙蝌蚪变态时长和血液参数的影响. *安徽农业大学学报*, 49(2): 254–258.
- 周贤君, 代应贵, 王开功, 等. 2010. 不同季节牛蛙血细胞变化的研究. *贵州农业科学*, 38(7): 129–131.