

文章编号: 1674 - 5566(2012)06 - 0989 - 07

养殖菱斑龟肝病组织病理研究

雷 洁, 王伟喆, 潘连德

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 研究海口市泓旺农业养殖有限公司特种龟鳖养殖场养殖菱斑龟种龟发病的病例(4个), 采用病理解剖和组织切片 H. E 染色, 进行组织病理学研究。病理解剖显示, 4只病龟的肝脏为病变最严重器官, 出现色深及表面分布白色斑块的病理解剖症状; 血涂片显示外周血液中的总白细胞比例及嗜酸性粒细胞比例明显增高; 组织切片中可见肝组织病变最严重并具一致性, 病龟 C、D 肝实质细胞普遍出现颗粒变性、以嗜酸性粒细胞为主的肝组织炎性细胞浸润, 血铁黄质沉积, 病龟 B 肝静脉扩张、分支血液回流受阻, 肝窦间隙扩张淤血, 部分肝细胞转化为空泡变性, 病龟 A 肝实质细胞坏死、肝细胞索消失。4只病龟肝脏表面还出现局部纤维化坏死, 眼睑组织静脉周围也出现嗜酸性粒细胞为主的炎性细胞浸润。根据病理解剖和组织病理检验结果, 并结合对本场菱斑龟养殖情况的调查, 认为该病为肝病, 并伴有眼症状, 其他器官组织病变属肝病的相伴症状。病龟由于肝功能逐渐衰竭而致死。

研究亮点: 菱斑龟作为国外引进的名贵品种, 且人工养殖和人工繁育在国内刚刚起步, 市场前景广阔。本文首次报道菱斑龟肝等主要器官和组织病理研究, 阐述菱斑龟外周血及肝、眼睑组织中出现的嗜酸性粒细胞增多的典型炎症现象, 确定了菱斑龟肝病和眼症状的病理诊断。

关键词: 菱斑龟; 肝病; 组织病理

中图分类号: S 947. 1

文献标志码: A

菱斑龟 (*Malaclemys terrapin*), 又名泥龟、钻纹龟、钻石龟, 属于爬行动物纲、龟科、菱斑龟属, 本属仅存 1 种 7 个亚种, 原分布于美国, 是北美龟类中唯一可生活于含盐水域的种类^[1]。菱斑龟外形漂亮且易与人亲近, 因此吸引了众多龟鳖爱好者的注意, 目前已经成为中国常见的一种中档宠物龟品种。

龟的肝脏位于体腔中部、心脏后面、不完全分叶, 胆囊附于左侧一叶的尾端, 基本结构与其他脊椎动物类似, 但肝小叶分布较少^[2]。关于爬行动物肝病见有肝脂质沉积症、肿瘤、肝炎的报道^[3-5]。将爬行动物的肝病分为急性和慢性、炎症(肝炎)和退化(肝功能障碍)不同类型^[6]。其中, 急性肝炎在爬行动物中并不常见, 急性肝功能紊乱更少见^[6]。对爬行动物肝病的诊断手段

有询问病史、体检、化验(血象、血液生理生化、酶、胆汁酸、胆绿素)、成像诊断(X光、CT、MRI 和内窥镜)、组织病理观察、细菌病毒培养等。病史、体检及微生物培养对确定病因是必要的。就化验方法来说, 血象和血清生化数值的影响因素多、变化大^[7], 酶类化验的特异性低、变化水平微小^[7-8], 胆汁酸在爬行动物医学中的运用还未得到令人信服的证据^[9], 目前也没有化验龟类胆绿素的技术^[2]。X光、超声波、内窥镜等成像诊断只能用于评估肝宏观上的变化, CT、MRI 有优秀的软组织分辨力, 但是成本昂贵, 与组织病理结合的成果很少。目前爬行动物肝病最可靠的诊断方法是组织病理观察, 因为爬行动物发生肝病时都会在肝实质细胞或者是肝脉管系统中反映出来^[2]。因此本试验的重点就是对病龟组织病

收稿日期: 2012-03-12 修回日期: 2012-05-21

基金项目: 国家自然科学基金(39970582); 上海市教育委员会重点项目(07zz135); 上海市重点学科建设项目(Y1101); 上海市高校知识服务平台项目(zF1206)

作者简介: 雷洁(1982—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水族宠物临床兽医学。E-mail: 17946372@qq.com

通讯作者: 潘连德, E-mail: ldpan@shou.edu.cn

理进行观察和研究。

1 材料与方法

1.1 病料来源

病料来自海南海口市泓旺农业养殖有限公司特种龟鳖养殖场。2011 年养殖场的菱斑龟种龟池中陆续出现有停食、反应迟钝、呼吸困难、眼紧闭有白色分泌物症状的病龟,并且有死亡现象。本试验在此池中随机挑选了 4 只有典型症状的病龟,3~4 龄,均为雌性,分别为病龟 A(780 g)、病龟 B(530 g)、病龟 C(560 g)、病龟 D(720 g)。活体包装,空运至上海海洋大学水族宠物医学实验室进行检验和分析。

1.2 血涂片制作和血象观察

对病龟进行尾静脉采血,制作血涂片,每只龟制作 3~5 片,瑞氏-吉姆萨染液染色、读片、计数及统计比较,得到血象变化数据。白细胞分类计数,在每张血涂片随机选取染色效果好,细胞无重叠,物镜 40 倍视野中细胞数为 200~300 的 5 个区域计数,分别对红细胞、血小板、白细胞进行分类计数,统计结果,计算白细胞比例(白细胞中白细胞的比例)及白细胞分类比例(白细胞总数中嗜酸性粒细胞、异嗜白细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞、淋巴细胞等各种白细胞的比例)。

1.3 病理解剖与临床症状

进行病理解剖观察,根据病理解剖结果进一步确定此种病程发展的典型症状,并为正确选择石蜡切片的病料提供依据。

1.4 石蜡切片制作与组织病理观察

参考病理解剖结果,选择典型症状的病理组织块,福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚度 5 μm ,H. E 染色,Nikon (EclipSE 80i)显微镜观察、Nikon (DS-Ri1)采集照片。

2 试验结果

2.1 病龟体检及病理解剖特征

通过体检,发现病龟精神萎靡,已完全停食,呼吸困难,病情最严重的病龟 A 不呼吸时头颈无力垂下。4 只病龟眼睛较凹陷,眼睑紧闭,眼里充满白色分泌物(图版 I-1),尿液呈黄绿色,体表其他部位没有发现异常现象。

打开病龟腹甲,观察内部器官(图版 I-2),其中肝脏病变最严重,色深,质地较韧,有淤血的

表面病灶,切开后有少量血液流出,病龟肝脏表面还局部分布不规则条状和块状的白色斑纹(图版 I-3),胆囊内充满胆汁,体积较大,肺部有淤血(图版 I-4),其他器官未见异常。

2.2 血涂片观察及血象分析

血涂片观察发现炎性细胞增多,其中嗜酸性粒细胞数量最多、体积大,而且核型多变,分叶现象明显且有双核出现。

血涂片白细胞分类计数分析结果见表 1。通过与参考值^[10-16]比较可以发现最明显的特点是嗜酸性粒细胞数量比例偏高,而且总白细胞比例也偏高。证实外周血液中的炎性细胞大增,炎症明显,与组织病理观察到的结果一致。

表 1 试验菱斑龟血象数据及参考值
Tab. 1 The hemogram values of cases and reference range values

项目	病龟 A	病龟 B	病龟 C	病龟 D	参考值
总白细胞比例/%	2.07	1.95	3.06	2.28	1~2
白细胞分类比例/%					
嗜酸性粒细胞	55.17	49.09	51.95	66.67	6~20
异嗜白细胞	13.63	16.86	10.45	7.55	6~40
单核细胞	9.61	8.33	6.37	1.47	0~10
淋巴细胞	20.49	27.94	17.51	23.5	15~80
嗜碱性粒细胞	3.43	2.65	7.27	1.47	0~40

2.3 病理切片观察

2.3.1 菱斑龟肝组织病理变化

根据对试验中随机采样的 4 只病龟进行病理解剖及组织病理研究,发现肝是病变最严重的器官,且病理变化明显、临床症状典型。

颗粒变性、炎性细胞浸润阶段(病龟 C、D):主要表现为肝实质细胞出现颗粒变性,血铁黄质沉积,大量炎性细胞贴壁、游出浸润肝组织,其中主要为嗜酸性粒细胞(图版 II-1),与外周血液中炎性细胞大增,炎症明显的结果一致。

肝淤血阶段(病龟 B):细胞肿胀使肝门静脉及其分支血液回流受阻,肝门静脉及肝组织间隙扩张,肝淤血严重,炎性细胞浸润和血铁黄质沉积更加严重(图版 II-2),肝功能受损,影响到了肺、肾、眼的功能,使得出现呼吸困难、胆绿素尿、眼紧闭及大量分泌物。

肝组织空泡变性、实质细胞坏死、肝细胞索消失阶段(病龟 A、B):肝实质细胞部分区域转化为空泡变性(图版 II-3),细胞界限不清晰,细胞溶解坏死、肝组织基本结构模糊,仅可见汇管区

(图版 II - 4),由于长期停食,身体状况严重恶化,四肢无力、反应迟钝,肝实质细胞大面积坏死,肝功能衰竭,最后死亡。

病理解剖中病龟肝脏表面局部分布的不规则条状或块状的白色斑纹在组织中显示为纤维化坏死。肝外膜局部增厚,靠近外膜的肝组织炎性细胞大量浸润(图版 II - 5),局部外层肝实质细胞发生纤维化坏死,坏死由外向内延展,因此这部分肝边缘部分呈不连续的层状纤维结构,而且有逐层脱落的迹象(图版 II - 6)。在病龟 B 和 C 的肝脏组织中还发现肝静脉中凝固和血细胞变性,偶见间质内含有血细胞或炎性细胞(图版 II - 7,8)。

2.3.2 眼睑组织病理变化

病龟的眼睑部分组织切片显示,内眼睑分泌上皮有部分分泌细胞坏死并脱落,分泌上皮基膜以下的静脉周围明显有炎性细胞浸润,与肝组织炎症特点一致,主要是嗜酸性粒细胞(图版 II - 9)。

2.3.3 其他组织病理变化

肺组织切片显示 4 只病龟肺泡均有程度不一的淤血现象,病龟 A、B 的肺组织中发现出血点,导致肺泡腔内出现血细胞(图版 II - 10),可以判定肺泡出血。

4 只病龟的肾组织切片显示部分肾小囊内有少量红细胞及炎性细胞,个别肾小囊壁上皮细胞增生,部分肾小球体积萎缩(图版 II - 11),还在病龟 A、D 的切片中发现部分肾小管细胞界限消失或细胞坏死(图版 II - 12)。

在脾、心房、心室、胃及肠道组织中未发现明显病理变化。

综合以上组织病理研究结果,样本中肝组织的病变最严重、最具有一致性。4 只病龟的肝组织都具有相同类型的病变,并且遍布整个肝脏。而眼睑、肺脏、肾脏局部病变,且变性程度不严重。循环系统、生殖系统、消化系统(胃肠)等组织病理变化不明显。

3 讨论

3.1 菱斑龟肝病和继发眼症状的确定

本试验中病龟的一个主要外部症状位于眼部,但根据与龟眼炎描述的比较,本病例与眼炎病例有着外部症状和血象上的区别^[17],而且眼部

的炎症并不严重,所以笔者认为这是由于肝病病变导致的并发症而并非眼炎。根据中医及现代医学中提到的理论,眼与肝关系密切,若肝脏发生疾病就有可能影响到眼,使后者出现某些症状^[18]。根据试验中眼部和肝组织中同时出现大量嗜酸性粒细胞的现象,就是肝脏病变继发眼部病变的组织病理证据。

根据对本试验中 4 只病龟尸检和组织切片的观察,证实该病的主要病灶为肝脏。组织病理特征显示与 DIVERS 的描述有相同表现,表明肝细胞功能有损伤^[19],多例哺乳动物、爬行动物和鱼类肝病研究发现在晚期病例中都有肝脏出现大范围溶解坏死现象^[20-22]。同时,病龟的肝脏表面有局部纤维化坏死的现象,肝纤维化是肝细胞坏死和炎性刺激后,肝脏内以胶原纤维为主的细胞外基质弥漫性过度增生、沉积的过程,是肝细胞损伤后的修复机制^[23]。另外,4 只病龟的尿液都为黄绿色,黄绿色尿液是其中含有胆绿素的表现,说明肝损伤严重和胆汁停产^[24]。而且,眼部、肾脏和肺部的病变程度并不严重,且分布不广泛,而其他器官没有发现明显的病理变化。

3.2 菱斑龟肝病的病理特征

本试验中菱斑龟的肝脏组织病理特征与已有报道的爬行动物及鱼类病例有着较大的不同。龟分枝杆菌感染的特征有,肝中主要出现结核样肉芽肿,皮下组织内的淋巴细胞浸润及纤维组织增生、充血^[25]。乌龟肝和脾受 X 射线辐射后出现肝细胞以核固缩为特征的凋亡,以及中央静脉血管阻塞^[26]。在对绿鬣蜥的胆管假癌性增生的报道中,病患的大量肝小叶内胆管被弥散的纤维结缔组织所分隔,肝实质细胞大大减少^[27]。南方鲇幼鱼细菌性败血症的研究发现病鱼肝组织坏死,肝细胞排列紊乱,部分肝细胞破裂溶解,肝静脉血管壁模糊等现象^[28]。

施氏鲟幼鱼肝性脑病的组织病理学研究表现出与本病例有一定相似性,肝组织也以颗粒变性为主,肝静脉为中心成局灶性变性,但肝组织炎性细胞浸润不明显^[22]。另外,感染腺病毒蟒的肝脏中也出现肝细胞坏死和血铁黄质沉积,伴肝细胞核大小不均,但窦状隙中炎性细胞以巨噬细胞为主,同时在肝实质细胞、库普弗细胞及偶尔在内皮细胞中发现大嗜碱性核内包涵体^[29]。潘连德^[30]曾报道过养殖中华鳖非寄生性肝病病例

组织病理研究,病例表现出肝组织中毒、慢性代谢性疾病特征,与本病例有相似性,肝为主要病灶,且也有肝细胞变性和淤血现象。因此综合病理表现,认为本病例也为慢性代谢性肝病。

根据血象研究数据,发现最大特点就是嗜酸性粒细胞异常多。而嗜酸性粒细胞增多通常是在原生动物和寄生虫感染的情况下^[6],以及免疫系统受刺激时^[31]。但是根据身体检查、尸体解剖和组织切片观察,并没有发现有寄生虫或虫卵的出现,因此基本可以排除寄生虫感染的可能性。

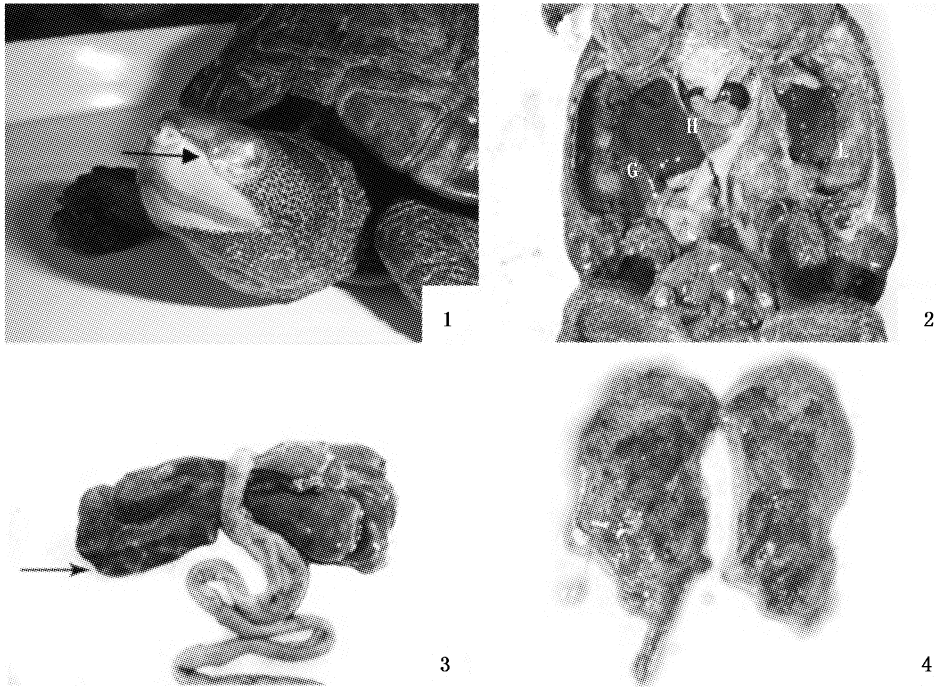
患此种病症的龟多数为种龟,此病病程较长,前期临床症状不明显而不易诊断,同时因为龟的特殊耐受性使得很难在疾病初期发现病龟,导致死亡率高,从而造成巨大的经济损失。因此最重要的预防措施是对养殖池中的所有龟定期进行排查,争取在龟处于疾病初期时就开始治疗,另外还可以定期使用保肝健脾的中药制剂,防患于未然。

感谢海南省海口市泓旺农业养殖有限公司特种龟鳖养殖场陈如江先生提供实验材料。

参考文献:

- [1] 周婷. 龟鳖分类图鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2004.
- [2] STUART M, ROGER W, JEAN M. Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles [M]. Denmark: Blackwell Publishing Ltd, 2004.
- [3] JACKSON O F. Reptiles part one chelonians [M]// BEYNON P H, COOPER J E. 2nd ed. Manual of exotic pets, Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association, 1991.
- [4] FRYE F L. Biomedical and surgical aspect of captive reptile husbandry [M]. 2nd ed. Melbourne, Fla, Krieger Publishing, 1991.
- [5] VEGAD J L. Textbook of veterinary general pathology [M]. India, Vikas, Jabalpur; International Book Distributors, 1995.
- [6] MADER D R. Reptile Medicine and Surgery [M]. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2006.
- [7] RAMSAY E C, DOTSON T K. Tissue and serum enzyme activities in the yellow rat snake (Elaphe obsoleta quadrivittata) [J]. American Journal of Veterinary Research, 1995, 56: 423.
- [8] WAGNER R A, WETZEL R. Tissue and plasma enzyme activities in juvenile green iguanas [J]. American Journal of Veterinary Research, 1999, 60 (2): 201 - 203.
- [9] SKOCZYLA R. Physiology of the digestive tract [M]// Biology of the Reptilia, vol 8. physiology B, London: Academic Press, 1978.
- [10] FRYE F L. Reptile clinician's handbook [M]. Malabar, Fla: Krieger Publishing, 1994.
- [11] JACKSON E R. Evaluation of the reptile patient [M]// KOLLIAS G V. Exotic animals, New York: Churchill Livingstone, 1988.
- [12] SYPIK J, BORYSENKO M. Reptiles [M]// ROWLEY A F, RATCLIFFE N A. Vertebrate blood cells. Britain, Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- [13] DUGUY R. Numbers of blood cells and their variations [R]// GANS C, PARSONS T C. Biology of the reptilian. Vol. 3. New York: Academic Press, 1970.
- [14] TAYLOR K W, KAPLAN H M, HIRANO T. Electron microscope study of turtle blood cells [J]. Cytologia, 1963, 28: 248 - 256.
- [15] OTIS V S. Hemocytological and serum chemistry parameters of the African puff adder (Bitis arietans) [J]. Herpetologica, 1973, 29: 110 - 116.
- [16] WALLACH J D, BOEVER W J. Diseases of exotic animals, medical and surgical management [M]. Philadelphia: WB Saunders, 1983.
- [17] 陈晨,潘连德. 宠物龟眼炎的病原鉴定及临床药物治疗的研究 [J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(2): 244 - 251.
- [18] 王幼生,余杨桂. 肝与眼关系的现代研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 1996, 6 (2): 125 - 127.
- [19] DIVERS S J, COOPER J E. Reptile Hepatic Lipidosis [J]. Semin Avian Exotic Pet Med, 2000, 9 (3): 153 - 164.
- [20] 伍喜林. 动物脂肪肝与营养 [J]. 饲料与畜牧, 1994 (1): 17 - 20.
- [21] 姜礼燻. 鱼类肝病的组织病理学研究 [J]. 淡水渔业, 1989(5): 13 - 14, 43.
- [22] 潘连德,孙玉华,陈辉,等. 施氏鲟幼鱼肝性脑病组织病理学与细胞病理学研究 [J]. 水产学报, 2000, 24 (1): 56 - 60.
- [23] 姚树坤,殷飞. 肝纤维化的早期诊断 [J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8 (6): 681 - 683.
- [24] DIVERS S I. Reptilian liver and gastro-intestinal testing [R]// FUDGE A M. Laboratory medicine, avian and exotic pets, Philadelphia: WB Saunders, 1999.
- [25] 黄福新,扈庆华. 龟分枝杆菌感染的组织病理特征及分离菌株的超微结构研究 [J]. 中国热带医学, 2004, 4(2): 158 - 159.
- [26] 李贵生,刘加根,张秀萍,等. 乌龟肝和脾受 X 射线辐射后组织病理学变化 [J]. 暨南大学学报, 2008, 29(5): 528 - 532.
- [27] WILSON G H, BROWN C A, STEDMAN N. Pseudo-carcinomatous Biliary Hyperplasia in two Green Iguanas, Iguana iguana [J]. Journal of Herpetological Medicine and Surgery, 2004, 14 (4): 12 - 18.
- [28] 朱成科,周晓扬,张其中. 南方鲂幼鱼细菌性败血症病原

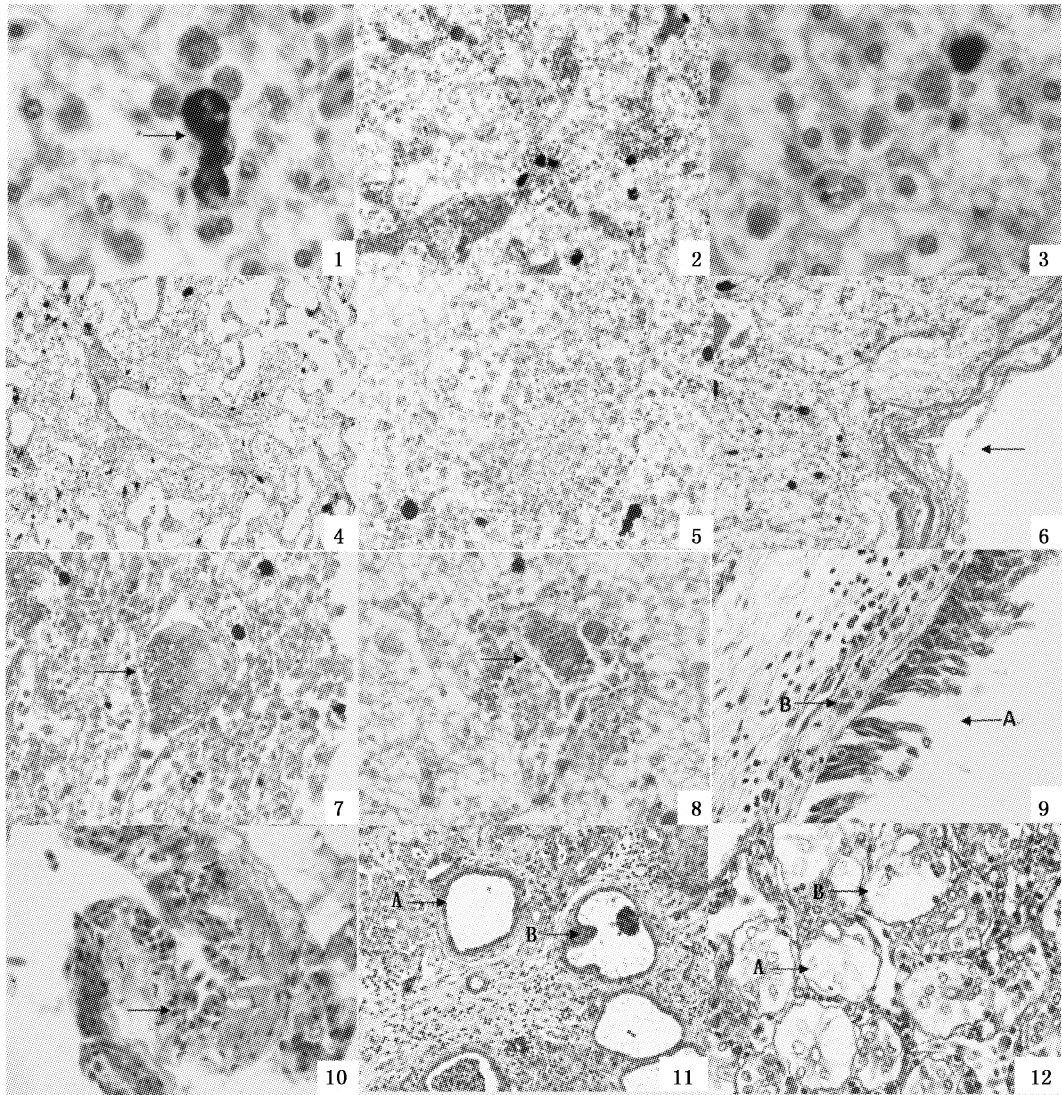
- 与组织病理 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 360 - 370.
- [29] PERKINS E L, CAMPAGNOLI R P, HARMON B G, et al. Detection and confirmation of reptilian adenovirus infection by in situ hybridization [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, 13: 365 - 368.
- [30] 潘连德. 中华鳖非寄生性肝病组织病理研究 [J]. *水产学报*, 1998, 22(2): 129 - 135.
- [31] MEAD K F, BORYSENKO M. Surface immunoglobulins on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1984, 8: 109 - 120.



图版 I 病龟的病理解剖

Plate I Pathological anatomy of cases

1. 眼部症状, 示白色分泌物(箭头); 2. 打开腹甲后的体腔, 其他器官未见异常(H, 心脏; G, 胆囊; L, 肝); 3. 肝脏及消化道, 肝表面分布白色斑块(箭头); 4. 肺脏淤血。



图版 II 病龟的组织切片

Plate II Histopathological sections of cases

1. 肝实质细胞颗粒变性, 炎性细胞大量浸润, 血铁黄质沉积(箭头), 物镜 $\times 100$; 2. 肝组织窦间隙充血扩张, 物镜 $\times 20$; 3. 肝实质细胞空泡变性, 物镜 $\times 40$; 4. 肝实质细胞坏死, 物镜 $\times 20$; 5. 肝组织中遍布炎性细胞, 主要为嗜酸性粒细胞, 物镜 $\times 10$; 6. 肝组织局部纤维化坏死区域(箭头), 物镜 $\times 10$; 7-8. 肝组织静脉管中的凝固和血细胞变性(箭头), 物镜 $\times 20$; 9. 眼睑组织分泌上皮细胞部分坏死脱落(箭头 A), 基膜以下的微静脉周围炎性细胞游出(箭头 B), 物镜 $\times 40$; 10. 肺泡壁出血点(箭头), 物镜 $\times 40$; 11. 肾脏组织肾小球萎缩(箭头 A), 肾小囊上皮增生(箭头 B), 物镜 $\times 20$; 12. 肾小管壁细胞界限消失、成为合胞体(箭头 A), 细胞溶解坏死(箭头 B), 物镜 $\times 40$ 。1-12 均为 H. E 染色。

Histopathological study of hepatopathy in four diamondback terrapins (*Malaclemys terrapin*)

LEI Jie, WANG Wei-zhe, PAN Lian-de

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources of Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Four diagnostically challenging cases of unknown hepatopathy in four female diamondback terrapins (*Malaclemys terrapin*) are reviewed and important differential diagnoses discussed. The methods are necropsy, blood smear and histopathological section. At necropsy, the livers were dark, atrophied, and the capsule fibrotic. Abnormalities noted in the hemogram are eosinophilia. The number of leukocytes and eosinophils was significantly higher than normal ranges for healthy reptiles. The pathological changes of livers are the most serious and have consistency. Granular degeneration and vacuolar degeneration happened in most hepatic parenchyma cells, and seriously even necrosis. The hepatic veins lined by inflammatory cells and hepatic congestion. At the end, the most hepatic parenchyma cells were necrosis except the portal area. The lesions in eyelids, lung and kidney are mild and not enough to threaten life, and were complications. The lesion in the four terrapins was diagnosed on these results as a hepatopathy, and the terrapins died of liver failure. There is no evidence to prove that is a parasite infection.

Key words: diamondback terrapin; hepatopathy; histopathology