

# 母体密度应激与球虫感染对子代根田鼠免疫力的影响

张鑫<sup>1 4</sup> 杨彦宾<sup>1 4</sup> 堵守杨<sup>1</sup> 曹伊凡<sup>1 2 3</sup> 周华坤<sup>1 5</sup> 边疆晖<sup>1 2 3\*</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) (2 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001)

(3 青海省动物生态基因组学重点实验室, 西宁 810001) (4 中国科学院大学, 北京 100049)

(5 青海省寒区恢复生态学重点实验室, 西宁 810001)

**摘要:** 免疫功能是影响动物个体适合度的重要因素之一, 也是防御病原体入侵的重要途径, 对动物的生存至关重要。种群密度与寄生虫感染都能影响动物的免疫功能。本实验通过 2×2 析因实验设计, 测定了母体密度应激+球虫感染、母体密度应激+未球虫感染、未母体密度应激+球虫感染、未母体密度应激+未球虫感染 4 个处理对根田鼠子代粪便皮质酮、球虫感染率、白细胞总数、各型白细胞的百分比、淋巴细胞亚型计数 (CD4, CD8 计数) 等指标。结果表明, 高密度母体应激处理可显著降低 CD4 数量、CD4/CD8 比例、淋巴细胞数、嗜酸性粒细胞数、白细胞数, 母体密度应激与球虫的耦合可使上述免疫指标进一步降低, 说明母体密度应激和球虫感染对于根田鼠的免疫具有负的叠加效应。

**关键词:** 根田鼠; 母体应激; 球虫; 淋巴细胞亚型

中图分类号: Q494

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2018) 01-0056-10

## Effects of maternal density stress and coccidiosis infection on immunity in root vole offsprings

ZHANG Xin<sup>1 4</sup>, YANG Yanbin<sup>1 4</sup>, DU Shouyang<sup>1</sup>, CAO Yifan<sup>1 2 3</sup>, ZHOU Huakun<sup>1 5</sup>, BIAN Jianghui<sup>1 2 3\*</sup>

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China)

(2 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China)

(3 Qinghai Key Laboratory of Animal Ecological Genomics, Xining 810001, China)

(4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(5 Key Laboratory of Restoration Ecology for Cold Regions in Qinghai Province, Xining 810001, China)

**Abstract:** The immune function is one of the most important factors to influence animals fitness. As it is a crucial way to defend against bacterial pathogens such as viruses, the immune system plays a key role in animal's survival. Both population density and parasitization are known to deteriorate individuals' immune function. This experiment using 2×2 factorial experiment design to measure the indexes of four treatments (maternal density stress + coccidian infection, not maternal density stress + not coccidian infection, maternal density stress + not coccidian infection, not maternal density stress + coccidian infection), including the fecal corticosterone metabolite (FCM), coccidian infection rate, blood parameters, lymphocyte subsets counts (CD4, CD8 counts). The results show that the density-induced maternal stress can significantly reduce the number of CD4, rate of CD4/CD8, Lymphocytes, Eosinophils, white cell. The effects were further deteriorated when maternally stressed offspring infected with coccidian. Our results showed that the interaction of density-induced maternal stress and coccidian infection has negatively synergistic effect on the immune of root vole.

**Key words:** Coccidian; Lymphocyte subsets; Maternal stress; Root voles

种群作为一个开放系统, 影响其统计参数的因子众多, 且各因子之间存在复杂的相互作用, 单一因子无法完全解释种群波动机理。因此, 多种因子耦合作用下, 探讨种群波动机理, 阐明其生态学过

基金项目: 国家自然科学基金 (31570421); 国家重点研发计划项目 (2016YFC0501902)

作者简介: 张鑫 (1993 -), 男, 硕士研究生, 主要从事动物生态学研究。

收稿日期: 2017-04-13; 修回日期: 2017-08-24

\* 通讯作者, Correspondence author, E-mail: bjh@nwipb.cas.cn

程及生理学效应,是种群生态学领域主要发展趋势 (Ostfeld, 2008)。动物的免疫功能有防御病毒、细菌和真菌等病原体侵害有机体的作用 (Sheldon and Verhulst, 1996; Owens and Wilson, 1999),也是影响种群波动的一个潜在因子 (Lochmiller and Dabbert, 1993; Sinclair and Lochmiller, 2000)。动物的免疫功能是其防御有害因子侵害机体的重要保证。研究野生动物免疫能力的变化及影响因素,有助于了解动物对自然环境的适应能力 (张志强和王德华, 2005)。

对实验动物的研究表明,应激或母体应激可降低个体 (Crino *et al.*, 2013; Thomason *et al.*, 2013) 或子代的免疫功能 (Sobrian *et al.*, 1992; Kay *et al.*, 1998; Llorente *et al.*, 2002; Götz and Stefanski, 2007)。对野生小哺乳动物的研究结果也表明,密度引起的母体应激可降低子代免疫力 (吴雁等, 2008)。另一方面,寄生物可通过影响宿主的糖皮质激素 (Glucocorticoid) 水平,直接或间接地抑制免疫系统的功能 (Boonstra, 2004)。驱除肠道寄生物可降低个体应激激素—糖皮质激素水平,改变其宿主的应激生理 (Pedersen and Greives, 2008)。

在小哺乳动物种群波动过程中,由于寄生物在宿主种群中的密度制约作用 (Stanton *et al.*, 1992; Seville *et al.*, 1996; 聂绪恒等, 2014),高峰期及衰减初期的高密度不仅可引起母体应激效应,而且母体应激子代还面临较高的寄生物感染概率。因而,母体密度应激和寄生物感染对小哺乳动物种群的免疫力存在耦合作用。研究二者对其子代免疫力的效应,对认识小哺乳动物个体生活史特征及揭示其种群波动机理有重要的意义。

在根田鼠 (*Microtus oeconomus*) 种群中,球虫是其肠道内主要的寄生虫,在其种群中的感染率可达到 45%,而线虫和绦虫的感染率及感染强度极低,感染率为 4% 和 2% (聂绪恒等, 2014; Du *et al.*, 2016),此外,球虫感染率与根田鼠种群密度呈密度制约关系 (聂绪恒等, 2014)。球虫可破坏宿主对养分的吸收,导致宿主消瘦、营养不良,并可降低宿主种群繁殖 (杨彦宾等, 2015) 和越冬存活 (Fuller and Blaustein, 1996)。因此,本研究以根田鼠为对象,测定了母体密度应激和球虫感染对子代根田鼠 T 淋巴细胞中的 CD4 (辅助诱导

淋巴细胞)、CD8 (抑制杀伤淋巴细胞) 细胞数,白细胞总数和各型白细胞百分比的影响。

CD4 细胞和 CD8 细胞是个体建立免疫应答的重要组成部分 (Yun *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2006; Lemus *et al.*, 2010), CD4 细胞分泌相应的活性物质,如细胞因子 (cytokines)、干扰素 (interferon)、白细胞介素 - 6 (interleukin - 6) 等 (Berndt *et al.*, 2006), CD8 细胞识别特定抗原,并表达构成最常见的记忆细胞 (Straube and Herrmann, 2001; Martínez-Padilla and Millán, 2007)。淋巴细胞亚群的数量变化可以有效评估个体细胞介导的免疫应答 (Okamura *et al.*, 2004; Westneat *et al.*, 2004; Davidson *et al.*, 2008)。在野生动物物种中 T 淋巴细胞亚群的研究少见。Waters 等 (2000) 对白尾鹿 (*Odocoileus virginianus*) 的研究和 Pillet 等 (2002) 对海豹类动物的研究,探讨了病原微生物对宿主淋巴细胞亚型的影响。淋巴细胞亚型分析在家禽中有着丰富的研究,CD4、CD5 和 CD8 在激活免疫及抵抗细菌感染方面有重要作用 (Berndt and Methner, 2001; Davidson *et al.*, 2008)。Lemus 等 (2010) 首次在野生鸟类茶隼 (*Falco tinnunculus*) 中进行了淋巴细胞亚型的研究。目前,关于野外小哺乳动物的淋巴细胞亚型分类,尚未有研究报道。血液学测量主要指通过血液中细胞种类、数量和成分的变化来估测动物体的免疫功能 (Davis *et al.*, 2008; Demas *et al.*, 2011; 张志强, 2015)。动物生态学研究,尤以白细胞计数最为普遍 (张志强, 2015); 白细胞总数能间接地反映动物的免疫功能 (Savino and Dardenne, 2000; Calder and Kew, 2002; Smith and Hunt, 2004; 徐德立和王德华, 2015)。

本研究首先于 2015 年 5 月建立亲本种群,并获得母体密度应激及未母体密度应激的 F1 代个体,并在 2015 年 10 月初的繁殖末期,用这些 F1 代个体建立子代种群,并进行相应的球虫感染处理,于 2015 年 11 月底,进行了淋巴细胞亚型的分类计数。本研究的目的是检验母体密度应激与寄生物感染可降低个体免疫力的假设,并为探讨小哺乳动物在自然状态下的种群调节机制提供理论依据。

## 1 研究方法

### 1.1 野外围栏设置

本研究在中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站地区的野外围栏内进行。该定位站地处北纬  $37^{\circ}29' - 37^{\circ}45'$ ，东经  $101^{\circ}12' - 101^{\circ}23'$ ，位于祁连山东段冷龙岭南麓，大通河河谷西北部，地形开阔，海拔 3 200 - 3 600 m (聂绪恒等, 2014)。围栏样地海拔 3 200 m 左右，周围被低山环绕，山势平缓。采用镀锌钢板建立 30 m  $\times$  50 m 围栏，钢板埋入地下 0.5 m，地上部分高 1.5 m，钢板之间用 L45  $\times$  L45 角钢固定。地上部分钢板的高度可以阻止哺乳动物捕食者的进入，地下部分钢板的深度可以阻止地下动物进入破坏草地。为了躲避鸟类捕食者，在围栏上方铺设了 3 cm  $\times$  3 cm 的铁丝格网。实验开始前，将围栏内留居的根田鼠和非靶动物捕尽，以连续 3 d 捕获不到根田鼠作为清理干净围栏的标准。

## 1.2 实验方法

本研究于 2015 年 5 月建立亲本种群。建群者全部来自实验室饲养的新生代性成熟个体。所有围栏的亲本个体的体重无显著性差异 ( $F_{7, 280} = 0.192, P = 0.987$ )，建立亲本种群前，所有建群者实验个体放入围栏前均灌胃驱虫药物，以保证建立亲本种群的个体全部无球虫感染。每个诱捕期给所有实验动物口服伊维菌素片悬浮剂和地克珠利溶液，每只根田鼠用混合药液 0.1 mL，其中包含地克珠利溶液  $6.25 \times 10^{-4}$  mL，伊维菌素片悬浮剂 2 mg。由于根田鼠在不同栖息地间及年内不同季节的种群数量均相差 3 倍以上 (姜永进等, 1991)，且考虑到建群者在放入围栏初期可能意外死亡，故将高密度和低密度种群的数量差异设置为 5 倍。

对建群者实验个体用耳标法和剪趾法双重标志后，放入围栏以建立高密度和低密度亲本种群。高密度处理的 4 个围栏中，每个围栏随机放入 30 对异性个体，低密度处理为 4 个围栏中每围栏随机放入 6 对异性个体。上述密度相当于研究地区根田鼠自然种群的高密度和中等密度水平 (姜永进等, 1991)。建群者在围栏适应 2 周后，每隔一周标记重捕一次。具体方法：以 5 m  $\times$  5 m 的间隔设置笼站 (Bian *et al.*, 2011, 2015)，每个笼站放置 1 个小型木质的自制活捕笼，活捕笼顶部用木板遮挡，以防气温过高或淋雨造成进入笼内的根田鼠死亡。整个研究期间活捕笼都在围栏中的固定位置。标志重捕时，在每个活捕笼内放少量胡萝卜块作为诱

饵，每天 06: 00 - 12: 00 和 14: 30 - 20: 30 关闭活捕笼，其余时间开放活捕笼，以防温度过低或过高而导致重捕个体死亡。每诱捕期持续 3 - 4 d，每天查笼 4 - 6 次。标志重捕的间隔期活捕笼保持开放，动物可以自由进出。在每个诱捕期，将首次捕获到的约 30 日龄的新生个体带回实验室饲养，单只或者同性配对饲养，以备建立子代种群。

2015 年 10 月建立子代种群。采用 2  $\times$  2 析因实验设计，以母体密度应激子代和球虫感染作为 2 个实验因素，共有 4 个处理：母体密度应激 + 球虫感染 (MS + P+)、未母体密度应激 + 球虫感染 (MS - P+)、母体密度应激 + 未球虫感染 (MS + P-)、未母体密度应激 + 未球虫感染 (MS - P-)。母体密度应激子代为来自高密度亲本种群 F1 代个体，未母体密度应激子代为来自低密度亲本种群 F1 代个体。每个处理设置 2 个重复。各处理间个体的体重无显著差异 ( $F_{7, 232} = 0.153; P = 0.993$ )。在建立子代种群前，实验个体随机分为 4 组，进行相应球虫感染或球虫驱除处理，随后放入相应的处理围栏。4 个处理的每个围栏均放入 15 对异性个体。球虫感染组采用灌胃法在每个诱捕期感染球虫 1 次。未感染组每诱捕期灌胃 1 次驱虫剂，方法同亲本种群。

## 1.3 标志重捕及取样处理

子代种群建群者在围栏适应 2 周后，进行标志重捕，每月标志重捕一次，方法同亲本种群。粪便样品装于聚乙烯袋中 (Ocaido *et al.*, 1999)，并在样品袋上记录围栏号、耳标号、性别、年龄 (成体和幼体) 及收集日期。粪便样品带回实验室测定皮质酮含量和球虫的感染参数 (感染率和感染强度)。诱捕前对诱捕笼进行清扫，以避免残留粪便及其它杂物对结果的影响。同一诱捕期相同个体取样一次，以避免数据假重复 (Hurlbert, 1984)。为了排除皮质酮日分泌节律的干扰，每天取样时间固定在上午第一次查笼期间，约为 09: 00，其余时间收集的粪便用于测定根田鼠肠道球虫参数。测定皮质酮的样品随即放入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻保存，测定球虫感染参数的粪样随即放入  $4^{\circ}\text{C}$  冷藏柜中保存。

## 1.4 皮质酮含量检测

目前，对糖皮质激素 (GCs) 的测定最为常用的方法是血浆检测和粪便检测。血浆检测法优点是

短时间内能够反映机体 GCs 含量的变化, 缺点在于采血操作本身可对动物造成应激, 很容易干扰检测结果。相比血浆检测法, 粪便检测法具有非损伤性, 可以长期重复监测的特点。因此本研究采用荧光法测定粪便皮质酮含量 (熊忠和索有瑞, 1998; Bian *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012), 且该方法的有效性已在根田鼠中得到证实 (何慧等, 2013)。样品带回实验室后, 将粪便冷冻干燥 14 - 18 h (Sheriff *et al.*, 2009), 干燥后的粪便研磨使其均质化; 取 0.1 g 粪便, 加入 0.5 mL 浓度为 0.04 mol/L 的 NaOH 溶液, 振荡 30 s, 后加入 5 mL 二氯甲烷, 超声波振荡 15 min (Pihl and Hau, 2003), 3 000 r/min 离心 15 min, 移去水相和固相 (可用吸管吸去, 下同); 取 1 mL 溶液, 加二氯甲烷, 稀释至 4 mL, 后加入 4 mL 硫酸乙醇 (7:3) (须现配现用), 振荡 2 min, 静置 30 min, 弃上层二氯甲烷, 静置 30 min; 检测: 使用荧光分光光度计 (日本岛津公司生产, RF-540), 在  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 470 \text{ nm}/520 \text{ nm}$ , 狭缝 10 nm/20 nm, 高灵敏度条件下检测 (熊忠和索有瑞, 1998)。

### 1.5 球虫的测定

粪便球虫计数采用改良的麦克马斯特法 (Wetzel, 1951)。样品带回实验室后, 用电子天平称约 0.5 g 的粪样 (精确至 0.001 g) (Laakkonen *et al.*, 1998; Vadlejch *et al.*, 2011), 加 15 mL 的 2.5%  $\text{K}_2\text{CrO}_7$  研磨, 依次通过 40 目铜筛和 100 目的尼龙网筛后, 26°C 培养 48 h 使其孢子化, 当孢子化率达 85% 以上时, 把含有孢子化的 2.5%  $\text{K}_2\text{CrO}_7$  液体用水冲洗到 45 mL 的离心管中, 1 500 r/min 离心 5 min, 倾倒入离心液, 在沉淀中加入 7 mL 的饱和盐水 (Vadlejch *et al.*, 2011), 采用饱和盐水漂浮法, 显微镜下观察漂浮液以检测卵囊 (Ocaido *et al.*, 1999; Gillespie, 2006)。根据孢子化卵囊的外部形态和内部结构进行分类。球虫卵识别到种, 绦虫卵和线虫卵则识别到属, 并计算其感染率和感染强度。

感染率 = 围栏种群感染个体数 / 围栏种群的总个体数, 感染强度为每克粪便中的卵囊数 (Bush *et al.*, 1997)。在卵囊的检测过程中, 为了减少误差, 实验过程由同一个人完成。

### 1.6 白细胞总数和各型白细胞百分比的测定

2015 年 11 月底, 在野外围栏中进行诱捕, 记

录剪趾号和耳标号, 就地利用内径为 0.3 mm 的玻璃点样毛细管 (华西医科大学仪器厂) 按照眼眶静脉丛取血法, 取血 3 滴 (第一滴舍弃) 放入 EDTA-K 抗凝的 1.5 mL 离心管中, 所有动物总体取血时间控制在 1 - 2 h。血液样品放于冰盒中, 两小时内带回实验室, 混匀后制作血涂片, 进行白细胞分类计数。白细胞计数方法: 取小试管 1 支, 加入白细胞稀释液 0.38 mL, 用微量吸管准确吸取外周血 20  $\mu\text{L}$ 。擦去管尖外部余血, 立即将吸管插入盛有稀释液的试管底部, 轻轻将血放出, 并吸取上清液漱洗吸管 2 - 3 次, 注意每次不能冲浑稀释液, 最后用手振摇试管混匀。将计数板和盖玻片擦净, 盖片盖在计数池上, 用毛细滴管或玻璃棒取已混匀的细胞悬液 1 滴, 充入计数池与盖玻片间的缝隙中, 静置 2 - 3 min, 待白细胞下沉后, 用低倍显微镜依次计数四角的 4 个大格内的白细胞数。对于压线的白细胞, 采取数上不数下、数左不数右 (左、上计入, 右、下弃去) 的原则, 保证计数域的一致性, 使计数准确。白细胞数量计算公式: (4 个大格总白细胞数 / 4)  $\times 2 \times 10^8$  ( $10^8$  cells/L)。

使用瑞氏染色法 (试剂来源于南京建成生物工程公司) 检测淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的数量, 即取 3  $\mu\text{L}$  血滴于载玻片上, 用另一载玻片轻推将血膜均匀涂满载玻片, 待血膜干燥后, 滴加适量吉姆萨染色液 1 覆盖血膜, 60 - 90 s 后滴加适量吉姆萨染色液 2, 混合均匀, 染色 6 - 8 min 后, 用清水冲洗多余液体, 自然干燥保存。镜检时采用油镜, 取一滴香波油至载有血膜的载玻片上, 移动视野, 分类计数淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞共 100 个白细胞, 计算各种细胞的百分比, 乘以白细胞总数, 得到最终各种细胞的数量 ( $10^8$  cells/L)。

### 1.7 淋巴细胞亚型计数

11 月底在野外围栏诱捕根田鼠, 记录剪趾号、耳标号后, 立即眼眶静脉丛取血 50 - 100  $\mu\text{L}$ , 放入 EDTA-K 抗凝的 1.5 mL 离心管中, 每个围栏取 6 只。取血后冰上 0°C - 4°C 保存, 于当天返回实验室, 在 6 h 内进行处理, 使用流式细胞仪计数 (FlowSight 多维全景流式细胞仪)。本实验采用小鼠的抗体, 使用联合 CD45 的四色方案 CD45 / CD3 / CD4 / CD8 检测 CD4 + T 细胞和 CD8 + T 细胞。

将根田鼠血液样品进行红细胞破碎,采用全血溶血法以便尽可能回收所有白细胞。打开流式细胞仪后,使用单阳性样本作补偿调节,修正串色,采用488 nm和642 nm激光器检测,利用INSPTRE软件进行样本获取计数,得到文件后,利用IDEAS软件进行分析。

### 1.8 数据统计分析

采用广义线性混合模型 (Generalized Linear Mixed Model, GLMM) (Schabenberger, 2005; Bolker *et al.*, 2009) 统计分析数据。在该模型中,皮质酮含量、球虫感染率、白细胞总数、各型白细胞的百分比、CD4和CD8作为因变量,处理和性别作为自变量,诱捕期作为重复测量变量,围栏作为随机变量。运用SPSS软件进行统计分析,如果处理效应显著,采用Bonferroni方法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著与否的标准。

## 2 结果

### 2.1 各处理种群粪便皮质酮含量

粪便皮质酮含量在处理组间存在显著差异 ( $F_{3,107} = 5.345$ ,  $P = 0.002$ , 图1)。其中,MS+P+组的粪便皮质酮含量最高,MS-P-组最低。多重分析结果表明,MS+P+组粪便皮质酮含量显著高于MS+P-组 ( $P < 0.001$ )、MS-P+组 ( $P < 0.001$ )和MS-P-组 ( $P < 0.001$ )。表明来自亲本高密度种群子代为母体密度应激子代;同时,球虫感染可使个体处于应激状态。

### 2.2 各处理组种群的球虫感染率

不同处理组的球虫感染率有显著差异 ( $F_{3,24} = 17.585$ ,  $P < 0.001$ , 图2)。球虫感染组的球虫感染率 (MS+P+组和MS-P+组)均显著高于球虫未感染组 (MS+P-组和MS-P-组)。其中MS+P+组高于MS+P-组 ( $P = 0.01$ ),MS-P+组高于MS-P-组 ( $P < 0.001$ )。

### 2.3 各处理种群血象参数

除嗜碱性粒细胞外,其他细胞数在处理间存在显著差异 (淋巴细胞:  $F_{3,112} = 28.990$ ,  $P < 0.001$ ; 单核细胞:  $F_{3,112} = 3.937$ ,  $P = 0.01$ ; 嗜酸性粒细胞:  $F_{3,112} = 7.911$ ,  $P < 0.001$ ; 中性粒细胞:  $F_{3,112} = 3.904$ ,  $P = 0.011$ ; 嗜碱性粒细胞:  $F_{3,112} = 1.643$ ,  $P = 0.183$ ; 白细胞总数:  $F_{3,112} = 30.246$ ,  $P < 0.001$ ) (表1)。MS-P-组的血象参

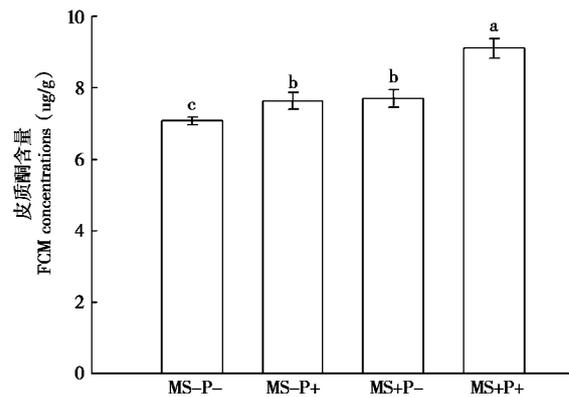


图1 根田鼠各处理组粪便皮质酮含量。图中MS+代表母体密度应激,P+代表感染球虫。MS+P+:母体密度应激+球虫感染;MS-P-:未母体密度应激+未球虫感染;MS+P-:母体密度应激+未球虫感染;MS-P+:未母体密度应激+球虫感染。图中不同的小写字母表示显著性差异,相同的小写字母表示差异不显著,显著水平为0.05

Fig. 1 The faecal corticosterone metabolites (FCM) concentrations from four treatment groups of root voles. MS+, maternal density stress; P+, coccidian infection. MS+P+, maternal density stress + coccidian infection; MS-P-, not maternal density stress + not coccidian infection; MS+P-, maternal density stress + not coccidian infection; MS-P+, not maternal density stress + coccidian infection. Different lowercase letters represent significant differences, the same lowercase letters represent no significant differences. Significance level is  $P < 0.05$

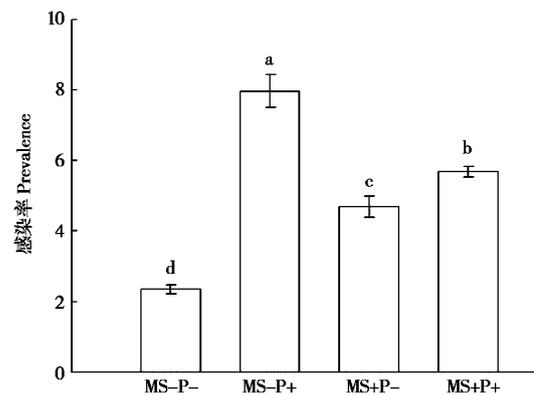


图2 根田鼠各处理组球虫感染率。图中MS+代表母体密度应激,P+代表感染球虫。MS+P+:母体密度应激+球虫感染;MS-P-:未母体密度应激+未球虫感染;MS+P-:母体密度应激+未球虫感染;MS-P+:未母体密度应激+球虫感染。图中不同的小写字母表示显著性差异,相同的小写字母表示差异不显著,显著水平为0.05

Fig. 2 The prevalence of four treatment group of root voles. MS+, maternal density stress; P+, coccidian infection. MS+P+, maternal density stress + coccidian infection; MS-P-, not maternal density stress + not coccidian infection; MS+P-, maternal density stress + not coccidian infection; MS-P+, not maternal density stress + coccidian infection. Different lowercase letters represent significant differences, the same lowercase letters represent no significant differences. Significance level is  $P < 0.05$

数值最高, 而 MS + P + 组则最低, 二者有显著差异 ( $P < 0.05$ ); MS + P - 中的淋巴细胞和白细胞数量显著高于 MS + P + 组 ( $P < 0.05$ ); MS - P - 组的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞及白细胞数量均显著高于 MS + P - 组 ( $P < 0.05$ )。即母体密度应激显著降低了个体血象参数, 而球虫感染则进一步降低了该效应。

#### 2.4 CD4、CD8 细胞数量分析

各处理种群的 CD4 细胞数有显著差异 ( $F_{3,31} = 3.074, P = 0.042$ ) (图 3A)。其中, MS - P - 组显著高于 MS + P + 组 ( $P < 0.001$ ) 和 MS + P - 组 ( $P < 0.001$ )。此外, CD4/CD8 值在处理组间也有显著差异 ( $F_{3,31} = 3.561, P = 0.025$ ) (图 3C), MS + P + 组显著低于 MS - P - 组 ( $P = 0.003$ )。CD8 细胞各处理组间无显著变化 ( $F_{3,31} = 1.869, P = 0.155$ ) (图 3B)。

表 1 根田鼠血液学参数统计

Table 1 Hematology characteristics [mean  $\pm$  SE ( $n$ )] of root voles

参数 Parameters ( $\times 10^9$ )	MS - P -	MS - P +	MS + P -	MS + P +
淋巴细胞 Lymphocytes	7.69 $\pm$ 0.23(30) <sup>a</sup>	6.97 $\pm$ 0.23(30) <sup>ab</sup>	6.31 $\pm$ 0.23(30) <sup>b</sup>	4.77 $\pm$ 0.23(30) <sup>c</sup>
单核细胞 Monocytes	0.15 $\pm$ 0.02(30) <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.02(30) <sup>ab</sup>	0.10 $\pm$ 0.02(30) <sup>ab</sup>	0.06 $\pm$ 0.02(30) <sup>b</sup>
嗜酸性粒细胞 Eosinophils	0.15 $\pm$ 0.02(30) <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.02(30) <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.02(30) <sup>b</sup>	0.04 $\pm$ 0.02(30) <sup>b</sup>
中性粒细胞 Neutrophils	0.91 $\pm$ 0.06(30) <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.06(30) <sup>ab</sup>	0.84 $\pm$ 0.06(30) <sup>ab</sup>	0.65 $\pm$ 0.06(30) <sup>b</sup>
嗜碱性粒细胞 Basophils	0.09 $\pm$ 0.02(30)	0.13 $\pm$ 0.02(30)	0.14 $\pm$ 0.02(30)	0.08 $\pm$ 0.002(30)
白细胞 White cell	8.98 $\pm$ 0.26(30) <sup>a</sup>	7.98 $\pm$ 0.26(30) <sup>ab</sup>	7.47 $\pm$ 0.25(30) <sup>b</sup>	5.60 $\pm$ 0.26(30) <sup>c</sup>

表中数据为平均值  $\pm$  标准误。MS + 代表母体密度应激, P + 代表感染球虫。MS + P + : 母体密度应激 + 球虫感染; MS - P - : 未母体密度应激 + 未球虫感染; MS + P - : 母体密度应激 + 未球虫感染; MS - P + : 未母体密度应激 + 球虫感染。同一行不同字母上标表示差异显著, 显著水平为 0.05

The data in the table is the average  $\pm$  standard error. MS + ,maternal density stress; P + ,coccidian infection. MS + P + ,maternal density stress + coccidian infection; MS - P - ,not maternal density stress + not coccidian infection; MS + P - ,maternal density stress + not coccidian infection; MS - P + ,not maternal density stress + coccidian infection. Different lowercase letters represent significant differences ,the same lowercase letters represent no significant differences. Significance level is  $P < 0.05$

### 3 讨论

本研究中, 母体密度应激子代较未母体密度应激子代的 CD4 数量, 以及淋巴细胞、白细胞及嗜酸性粒细胞的数量显著降低, 表明母体密度应激子代的细胞固有免疫功能受损; 其次, 球虫感染处理较未球虫感染处理显著降低了淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和白细胞数, 但未发现球虫感染对 CD4 数量的影响, 表明球虫仅参与了对根田鼠固有免疫的影响; 再次, 母体密度应激与球虫感染的耦合使子代的各项免疫指标最低, 说明母体密度应激和球虫感染的叠加使得根田鼠免疫功能进一步被降低。

在本研究中, 母体密度应激及球虫感染使子代的粪便皮质酮含量升高, 而 MS+P+ 组的粪便皮质酮水平最高。大量研究表明, 母体应激可以通过母体分泌的糖皮质激素进入胎儿大脑 (Johnson *et al.*, 1992), 使子代 HPA 轴的负反馈功能减弱 (Welberg and Seckl, 2001; Emack *et al.*, 2008),

导致母体对 HPA 轴的程序化 (Love *et al.*, 2013), 且可降低子代免疫力 (Demas *et al.*, 2011)。本研究结果与此一致。此外, 球虫感染也可以通过影响宿主的应激激素—糖皮质激素水平, 改变宿主的应激生理 (Black, 1994; Pedersen and Greives 2008), 来改变宿主的免疫力。因此, 母体密度应激与球虫感染对根田鼠免疫力的负的叠加效应可能与 HPA 轴负反馈功能降低有关。

从淋巴细胞亚型分类参数来看, 母体密度应激和母体密度应激与球虫感染的耦合显著降低了根田鼠的 CD4 细胞数。CD4 细胞数与免疫缺陷有关 (Shearer *et al.*, 2007), 低水平的 CD4 细胞数导致个体在受到寄生物或病毒感染时不能有效建立免疫应答, 从而影响个体的抗感染水平 (Maeda *et al.*, 1999)。关于球虫感染引发的 CD4 细胞数变化, 常见于家禽的研究 (Yun *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2006)。Lemus 等 (2010) 首次在茶隼的研究中发现感染了寄生物的鸟类的 CD4 细胞数显著上升,

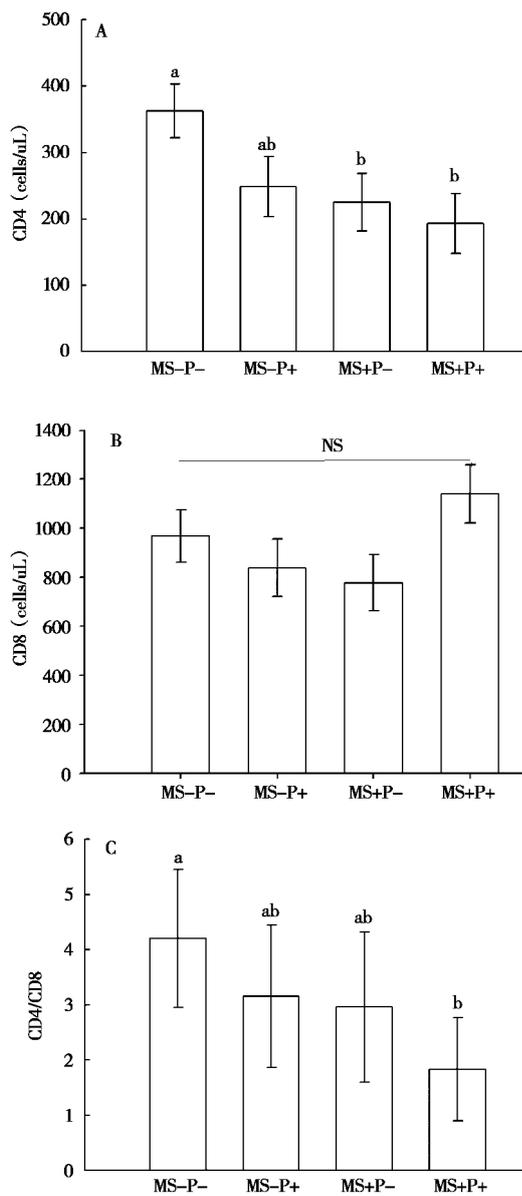


图3 A为根田鼠各处理组CD4细胞数, B为各处理组CD8细胞数, C为各处理组CD4/CD8比值. 图中MS+代表母体密度应激, P+代表感染球虫. MS+P+: 母体密度应激+球虫感染; MS-P-: 未母体密度应激+未球虫感染; MS+P-: 母体密度应激+未球虫感染; MS-P+: 未母体密度应激+球虫感染. 图中不同的小写字母表示显著性差异, 相同的小写字母表示差异不显著, 显著水平为0.05

Fig. 3 A shows the quantity of CD4 in four treatment group of root voles. B shows the quantity of CD8 in four treatment group of root voles. C shows the rate of CD4/CD8 in four treatment group of root voles. MS+, maternal density stress; P+, coccidian infection; MS+P+, maternal density stress + coccidian infection; MS-P-, not maternal density stress + not coccidian infection; MS+P-, maternal density stress + not coccidian infection; MS-P+, not maternal density stress + coccidian infection. Different lowercase letters represent significant differences, the same lowercase letters represent no significant differences. Significance level is  $P < 0.05$

认为这是由于淋巴细胞亚型中CD4细胞与直接杀伤或吞噬病原体有关, 其他在小肠绒毛感染的病原体, 如沙门氏菌, 也引起CD4数的增加 (Methner *et al.*, 1995; Noujaim *et al.*, 2008), 所以感染了寄生物的茶隼CD4显著升高. 本研究未发现球虫感染对CD4细胞数量的显著影响. CD4/CD8值的异常则反映了免疫功能的紊乱. 在本研究中, 母体密度应激和球虫的耦合较对照组 (MS+P+和MS-P-) 显著降低了该比值, 反映了母体密度应激和球虫感染的耦合作用可能使根田鼠的获得性免疫 (适应性免疫) 功能受损.

虽然未发现不同处理在CD8细胞数上的显著差异, 但Lemus等 (2010) 对茶隼感染球虫的研究表明, 在野外条件下, 当宿主存在被同一种寄生物反复感染时, 宿主对寄生物产生了一定的适应性. 因此, 本研究CD8数量未有显著变化, 其原因可能是, 在野外围栏条件模拟的自然生境中, 存在球虫反复感染根田鼠, 记忆细胞保持在一定的稳定水平.

淋巴细胞亚型的分类计数在实验室水平上已经被广泛应用. 但是由于血细胞需要在限定时间内保存、运输, 而大型实验仪器、精密实验材料难以接近野外样地, 因此, 野生生物在自然状态下的淋巴细胞亚型分类计数工作很难进行, 此类工作仅见鸟类中的研究报告 (Lemus *et al.*, 2010). 由于西宁市至海北州门源县的动车列车单程仅需42 min, 可保证采样当天往返实验样地与实验室, 因此, 我们能够在野外条件下顺利进行淋巴细胞亚型分类与计数. 由于首次在野外根田鼠进行淋巴细胞亚型分类计数, 所使用抗体为小鼠抗体, 染色效果显示, CD45、CD4、CD8染色效果较好, CD3染色效果不佳, 利用小鼠抗体对根田鼠的染色效果虽然存在一些问题, 但各处理组之间有显著差异, 可以进行相关分析.

在本研究中, 母体密度应激降低了大部分血象参数. Götze和Stefanski (2007) 以及Llorente (2002) 对大鼠的研究表明, 母体社群应激显著降低子代的白细胞数量. Boonstra等对北极黄鼠 (*Spermophilus parryi*) 的研究发现, 在交配期, 成年雄鼠会表现出适应性的应激反应; 在免疫能力方面, 参与繁殖的成年雄鼠, 红细胞比容最低且白细胞数量最少, 嗜酸性粒细胞的数量最多且对外部抗

原攻击的反应能力最弱 (Boonstra *et al.*, 2001; 张志强和王德华, 2005)。本研究中球虫感染反而降低了嗜酸性粒细胞, 可能是非适应性的减少。一般来说, 天然免疫应答是非特异性的、先天就有的应答, 是防御病原体的第一道防线, 包括嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞等类型的吞噬细胞, 由嗜碱性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞所产生的炎症介质, 以及自然杀伤细胞等 (Demas *et al.*, 2011; 张志强, 2015)。虽然单一的球虫感染仅降低了嗜酸性粒细胞, 但母体密度应激和球虫感染的耦合则显著降低嗜碱性粒细胞之外的各项血象参数, 而白细胞数量的减少表明个体的天然免疫能力降低。因此, 母体密度应激与球虫感染耦合效应可降低个体的天然免疫功能。

吴雁等 (2008) 发现, 母体密度应激可降低子代免疫力; Bian 等 (2015) 发现, 母体密度应激子代的越冬存活率降低。因此, 母体密度应激与球虫感染间对免疫功能负的叠加, 可能进一步降低子代的越冬存活率, 进而影响种群来年繁殖基数和种群波动幅度甚至是波动轨迹。因此, 母体密度应激与球虫对子代免疫力的耦合效应可能在种群调节过程中有重要作用。

致谢: 感谢青海海北高寒草地生态系统国家野外科学观测研究站的大力支持, 以及朱亚辉和张建民对野外工作的帮助, 特此致谢。

#### 参考文献:

- Berndt A, Methner U. 2001. Gamma delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non attenuated *Salmonella typhimurium* strains. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **78**: 143 - 161.
- Berndt A, Pieper J, Methner U. 2006. Circulating  $\gamma\delta$  T Cells in Response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Exposure in Chickens. *Infection and Immunity*, **74** (7): 3967 - 3978.
- Bian J H, Du S Y, Wu Y, Cao Y F, Nie X H, He H, You Z B. 2015. Maternal effects and population regulation: maternal density-induced reproduction suppression impairs offspring capacity in response to immediate environment in root voles *Microtus oeconomus*. *Journal of Animal Ecology*, **84** (2): 326 - 336.
- Bian J H, Wu Y, Getz L L, Cao Y F, Chen F, Yang L. 2011. Does maternal stress influence winter survival of offspring in root voles *Microtus oeconomus*? A field experiment. *Oikos*, **120** (1): 47 - 56.
- Bian J H, Wu Y, Liu J K. 2005. Breeding behavior under temporal risk of predation in male root voles (*Microtus oeconomus*). *Journal of Mammalogy*, **86** (5): 953 - 960.
- Black P H. 1994. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38** (1): 1 - 6.
- Bolker B M, Brooks M E, Clark C J, Geange S W, Poulsen J R, Stevens M H H, White J S S. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **24** (3): 127 - 135.
- Boonstra R, Carolyn J M, Karels T J. 2001. Reproduction at all costs: The adaptive stress response of male arctic ground squirrels. *Ecology*, **82** (7): 1930 - 1946.
- Boonstra R. 2004. Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals. *Integrative and Comparative Biology*, **44** (2): 95 - 108.
- Bush A O, Lafferty K D, Lotz J M, Shostak A W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *The Journal of Parasitology*, **83** (4): 575 - 583.
- Calder P C, Kew S. 2002. The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, **88**: S165 - 176.
- Chen F, Du S, Bian J, You Z B, Wu Y. 2012. Chronic hypoxia exposure during pregnancy is associated with a decreased active nursing activity in mother and an abnormal birth weight and postnatal growth in offspring of rats. *Hormones and Behavior*, **61** (4): 504 - 511.
- Crino O L, Johnson E, Blickley J L, Patricelli G L, Breuner C W. 2013. Effects of experimentally elevated traffic noise on nestling white-crowned sparrow stress physiology, immune function and life history. *Journal of Experimental Biology*, **216** (11): 2055 - 2062.
- Davidson F, Kaspers B, Schat K A. 2008. *Avian Immunology*. Academic Press, Elsevier Ltd. London.
- 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.
- Demas G E, Adamo S A, French S S. 2011. Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: implications for host defence. *Functional Ecology*, **25** (1): 29 - 39.
- Du S Y, Cao Y F, Nie X H, Wu Y, Bian J H. 2016. The synergistic effect of density stress during the maternal period and adulthood on immune traits of root vole (*Microtus oeconomus*) individuals - a field experiment. *Oecologia*, **181** (2): 335 - 346.
- Emack J, Kostaki A, Walker C D, Matthews S G. 2008. Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal function in juvenile offspring. *Hormones and Behavior*, **54**: 514 - 520.
- Fuller C A, Blaustein A R. 1996. Effects of the parasite eimeria arizonensis on survival of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Ecology*, **77**: 2196 - 2202.
- Gillespie T, Chapman C A. 2006. Prediction of parasite infection dynamics in primate metapopulations based on attributes of forest fragmentation. *Conservation Biology*, **20** (2): 441 - 448.

- Götz A , Wittlinger S , Stefanski V. 2007. Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events. *Journal of Neuroimmunology* , **185** ( 1 ) : 95 – 102.
- He H , Cao Y F , Chen L L , Du S Y , Nie X H , Bian J H. 2013. The utility of detecting corticosterone levels in feces of root vole (*Microtus oeconomus*). *Acta Theriologica Sinica* , **33** ( 3 ) : 164 – 171. ( in Chinese)
- Hong Y H , Lillehoj H S , Lillehoj E P , Lee S H. 2006. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , **114** ( 3 ) : 259 – 272.
- Hurlbert S H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* , **54** ( 2 ) : 187 – 211.
- Jiang Y J , Wei S W , Wang Z W , Zheng S W , Cui R X , Sun R Y. 1991. Productivity investigation of the root vole (*Microtus oeconomus*) population in the Haibei alpine bushland (*Potentilla fruticosa*) I. Population dynamics. *Acta Theriologica Sinica* , **11** ( 4 ) : 270 – 278. ( in Chinese)
- Johnson E O , Kamilaris T C , Chrousos G P , Gold P W. 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* , **16** ( 2 ) : 115 – 130.
- Kay G , Tarcic N , Poltyrev T , Weinstock M. 1998. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiology & Behavior* , **63** ( 3 ) : 397 – 402.
- Laakkonen J , Oksanen A , Soveri T , Henttonen H. 1998. Dynamics of intestinal coccidia in peak density *Microtus agrestis* , *Microtus oeconomus* and *Clethrionomus glareolus* populations in Finland. *Ecography* , **21** ( 2 ) : 135 – 139.
- Lemus J A , Vergara P , Fargallo J A. 2010. Response of circulating T-lymphocytes to a coccidian infection: insights from a parasitization vaccination experiment. *Functional Ecology* , **24** ( 3 ) : 638 – 645.
- Llorente E , Brito M L , Machado P , Gonzalez M C. 2002. Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. *Journal of Physiology and Biochemistry* , **58** ( 3 ) : 143 – 149 .
- Lochmiller R L , Dabbert C B. 1993. Immunocompetence , environmental stress , and the regulation of animal populations. *Trends Comp Biochem Physiol* , **1** : 823 – 855.
- Love O P , McGowan P O , Sheriff M J . 2013. Maternal adversity and ecological stressors in natural populations: the role of stress axis programming in individuals , with implications for populations and communities. *Functional Ecology* , **27** ( 1 ) : 81 – 92.
- Maeda N , Sekigawa I , Lida N , Matsumoto M , Hashimoto H , Hirose S. 1999. Relationship between CD4 + /CD8 + T cell ratio and T cell activation in Systemic Lupus Erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology* , **28** ( 3 ) : 166 – 170.
- Martínez - Padilla J , Millán J. 2007. Prevalence and intensity of intestinal parasitization in a wild population of nestling Eurasian kestrels *Falco tinnunculus*. *Ardeola* , **54** ( 1 ) : 109 – 115.
- Methner U , Al Shabibi S , Meyer H. 1995. Experimental oral infection of specific pathogen free laying hens and cocks with *Salmonella enteritidis* strains. *Journal of Veterinary Medicine B* , **42** : 459 – 469.
- Nie X H , Cao Y F , Du S Y , He H , Bian J H. 2014. Intestinal parasites prevalence in root voles (*Microtus oeconomus*) from field enclosures. *Acta Theriologica Sinica* , **34** ( 2 ) : 172 – 180. ( in Chinese)
- Noujaim J C , Andreatti - Filho R L , Lima E T , Okamoto A S , Amorim R L , Neto R T. 2008. Detection of T lymphocytes in intestine of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Poultry Scienc* , **87** : 927 – 933.
- Ocaido M , Siefert L , Baranga J. 1999. Seasonal changes of impal (*Aepyceros melampus* , Lichtenstein , 1812 ) faecalhelminth egg counts through a one-year period. *African Journal of Ecology* , **37** ( 3 ) : 327 – 333.
- Okamura M , Lillehoj H S , Raybourne R B , Babu U S , Heckert R A. 2004. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella enteritidis* vaccine: lymphocyte proliferation , T-cell changes and interleukin6 ( IL6 ) , IL1 , IL2 , and IFN gamma production. *Comparative Immunology , Microbiology & Infectious Diseases* , **27** : 255 – 272.
- Ostfeld R S. 2008. Parasites as weapons of mouse destruction. *Journal of Animal Ecology* , **77** ( 2 ) : 201 – 204.
- Owens I P F , Wilson K. 1999. Most challenge techniques will be viewed with caution by field biologists. *Ecology* , **11** : 317 – 321.
- Pedersen A B , Greives T J. 2008. The interaction of parasites and resources cause crashes in a wild mouse population. *Journal of Animal Ecology* , **77** ( 2 ) : 370 – 377.
- Pihl L , Hau J. 2003. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. *Laboratory Animals* , **37** ( 2 ) : 166 – 171.
- Pillet S , Fournier M , Measures L N , Bouquegneau J M , Cyr D G. 2002. Presence and regulation of metallothioneins in peripheral blood leukocytes of grey seals. *Toxicology and Applied Pharmacology* , **185** : 207 – 217.
- Savino W , Dardenne M. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Reviews* , **21** : 412 – 443.
- Schabenberger O. 2005. Introducing the GLIMMIX procedure for generalized linear mixed models. *SUGI 30 Proceedings* , 196 – 30.
- Seville R S , Stanton N L , Gerow K. 1996. Stable parasite guilds: Coccidia in spermophiline rodents. *Oikos* , **75** ( 3 ) : 365 – 372.
- Shearer W T , Pahwa S , Read J S , Chen J , Wijayawardana S R , Palumbo P , Abrams E J , Nesheim S R , Yin W , Thompson B , Easley K A. 2007. CD4/CD8 T - cell ratio predicts HIV infection in infants: the National Heart Lung and Blood Institute P2C2 study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , **120** : 1449 – 1456.
- Sheldon B C , Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade - offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* , **11** ( 8 ) : 317 – 321.
- Sheriff M J , Krebs C J , Boonstra R. 2009. The sensitive hare: suble-

- thal effects of predator stress on reproduction in snowshoe hares. *Journal of Animal Ecology*, **78** (6): 1249–1258.
- Sinclair J A, Lochmiller R L. 2000. The winter immunoenhancement hypothesis: associations among immunity density and survival in prairie vole (*Microtus ochrogaster*) populations. *Canadian Journal of Zoology*, **78** (2): 254–264.
- Smith K G, Hunt J L. 2004. On the use of spleen mass as a measure of avian immune system strength. *Oecologia*, **138**: 28–31.
- Sobrian S K, Vaughn V T, Bloch E F, Burton L E. 1992. Influence of prenatal maternal stress on the immunocompetence of the offspring. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **43** (2): 537–547.
- Stanton N L, Shults L M, Parker M, Seville R S. 1992. Coccidian assemblages in the Wyoming ground squirrel, *Spermophilus elegans elegans*. *The Journal of Parasitology*, **43** (2): 537–547.
- Straube F, Herrmann T. 2001. Differential modulation of CD8- $\beta$  by rat  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells after activation. *Immunology*, **104** (3): 252–258.
- Thomason C A, Hedrick-Hopper T L, Derting T L. 2013. Social and nutritional stressors: agents for altered immune function in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Canadian Journal of Zoology*, **91** (5): 313–320.
- Vadlejch J, Petrl M, Zaichenko I, adková Z, Jankovská I, Langrová I, Moravec M. 2011. Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitology Research*, **109** (5): 1387–1394.
- Waters W R, Palmer M V, Pesch B A, Olsen S C, Wannemuehler M J, Whipple D L. 2000. MHC class II restricted, CD4 (+) T-cell proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis* infected white tailed deer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **76**: 215–229.
- Welberg L A, Seckl J R. 2001. Prenatal Stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *Journal of Neuroendocrinology*, **13** (2): 113–128.
- Westneat D F, Weiskittle J, Edenfield R, Kinnard T B, Poston J P. 2004. Correlates of cell-mediated immunity in nestling house sparrows. *Oecologia*, **141**: 17–23.
- Wetzel R. 1951. Verbesserte McMaster-Kammer zur Auszählen von Wurmeiera. *Tierärztliche Umschau*, **6** (11/12): 209–210.
- Wu Y, Bian J H, Cao Y F. 2008. Maternal social stress affects immunocompetence of offspring in root voles (*Microtus oeconomus*): a field experiment. *Acta Theriologica Sinica*, **28** (3): 250–259. (in Chinese)
- Xiong Z, Suo Y R. 1998. Spectrofluorometric determination of corticosterone in plasma and tissue. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **18** (2): 237–239. (in Chinese).
- Xu D L, Wang D H. 2015. Effect of fasting duration on immune function in female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Acta Theriologica Sinica*, **35** (4): 369–378. (in Chinese)
- Yang Y B, Du Y, Cao Y F, Du S Y, Bian J H. 2015. Effects of co-cidian parasites on reproduction in plateau pika. *Acta Theriologica Sinica*, **35** (3): 237–239. (in Chinese).
- Yun C H, Lillehoj H S, Lillehoj E P. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental & Comparative Immunology*, **24** (2): 303–324.
- Zang Z Q, Wang D H. 2005. Animal immunocompetence and its effect on population regulation and life history trade-off. *Chinese Journal of Applied Ecology*, **16** (7): 1375–1379. (in Chinese)
- Zhang Z Q. 2015. Selection and Assessment of Immunological Parameters in Animal Ecology Research. *Sichuan Journal of Zoology*, **34** (1): 145–148. (in Chinese)
- 何慧, 曹伊凡, 陈黎林, 堵守杨, 聂绪恒, 边疆晖. 2013. 根田鼠 FCM 的检测效能. *兽类学报*, **33** (002): 164–171.
- 姜永进, 魏善武, 王祖望, 郑生武, 崔瑞贤, 孙儒泳. 1991. 海北高寒草甸金露梅灌丛根田鼠种群生产力的研究 I. 种群动态. *兽类学报*, **11** (4): 270–278.
- 聂绪恒, 曹伊凡, 堵守杨, 何慧, 边疆晖. 2014. 野外围栏条件下根田鼠肠道球虫感染率的研究. *兽类学报*, **34** (2): 172–180.
- 吴雁, 边疆晖, 曹伊凡. 2008. 围栏条件下母体社群应激对根田鼠子代免疫力的影响. *兽类学报*, **28** (3): 250–259.
- 熊忠, 索有瑞. 1998. 血浆和组织中皮质酮的荧光测定法. *光谱学与光谱分析*, **18** (2): 237–239.
- 徐德立, 王德华. 2015. 禁食时间对雌性长爪沙鼠免疫功能的影响. *兽类学报*, **35** (4): 369–378.
- 杨彦宾, 杜寅, 曹伊凡, 堵守杨, 边疆晖. 2015. 艾美尔球虫对高原鼠兔繁殖的影响. *兽类学报*, **35** (3): 312–320.
- 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. 2015. 动物生态学研究免疫学参数的选择及其优缺点分析. *四川动物*, **34** (1): 145–148.