

草虾感染草虾杆状病毒(MBV)后 肝胰腺上皮细胞病理变化的电镜观察

陈细法^{*1} 吴定虎^{*2} 黄槐^{*2} 陈平^{*1}

(^{*1} 厦门大学, 361005)

(^{*2} 厦门市水产研究所, 361005)

提 要 本文用改良的电镜固定液和新包埋剂制备超薄切片,在电镜下观察健康和感染 MBV 的肝胰腺上皮细胞的超微病理变化,结果发现感染细胞的核质中有1个或多个包涵体和大量病毒粒子。随着包涵体和 MBV 粒子增多,核染色质凝聚,核膜局部扩张,部份破裂,甚至完全消失,直至整个核崩解,使得 MBV 和包涵体游离出来。胞质水肿,内质网髓鞘样变性,滑面内质网增生,脂滴增多,线粒体绒团样变性和并发细菌混合感染。作者认为核内包涵体和病毒大量存在,并引起严重病变,可用于诊断草虾病毒病的特征性指标之一,而细菌混合感染是重要的辅助诊断指标之一。肝胰腺脂肪代谢障碍有可能影响病后草虾的正常生长。

关键词 草虾,草虾杆状病毒,细胞病理变化

对虾养殖业在亚洲发展迅速,具有较高的经济效益。我国养虾业已有20多年历史,基本上形成了幼苗培育、成虾养殖、饵料生产、加工贮藏和出口销售一整套研究、生产和销售体系。然而,近年来世界主要养殖地区的虾池老化、环境污染、赤潮频繁、生态失衡、疫区扩大、疾病频发、投入增加,使得养虾业面临新的挑战,尤其是暴发性流行病带给养虾业灾难性的后果,因此病毒性疾病的防治已成为近两年来世界养虾业关注的焦点。对虾病毒病的研究始于1974年[Couch,1974],其后发表了不少有关论著[Lightner 等,1985;陈秀男,1990;廖一久,1989;Brock,1991;Chen 等,1986],但对细胞超微病理研究不太多[Chen 等,1989;Liao 等,1989;Fegan 等,1991],国内未见有类似的研究报道。本文着重观察感染草虾杆状病毒(MBV)的肝胰腺上皮细胞的超微病理变化及其在病毒性疾病诊断上的意义。

一、材料与方法

1. 染毒细胞的选择 采集患病和濒死草虾(*Penaeus monodon* Fabricicius),取其肝胰腺制备超薄切片,在 JEM120 EX 和 JEM-100CX II 透射电镜下寻找感染草虾杆状病毒的上皮细胞,拍摄其超微病理变化。无 MBV 感染的健康草虾的肝胰腺相应上皮细胞作对照比较。

2. 电镜超薄切片制备 把肝胰腺切片1 mm³的小块,在常温下用多聚甲醛和戊二醛混合液固定2小时,pH 7.2,1% OsO₄(内含1%氧化剂)固定1小时以上。用系列酒精-丙酮脱水,

Spurr 或者环氧树脂 618 包埋液浸透和包埋,在 40-80℃ 递增温度下固化 3 天。用 AO 或 LKB8800 型超薄切片机切得 500-800 Å 的超薄切片,用铀盐和铅盐双染色后,电镜下拍片[陈细法,1979]。

二、结 果

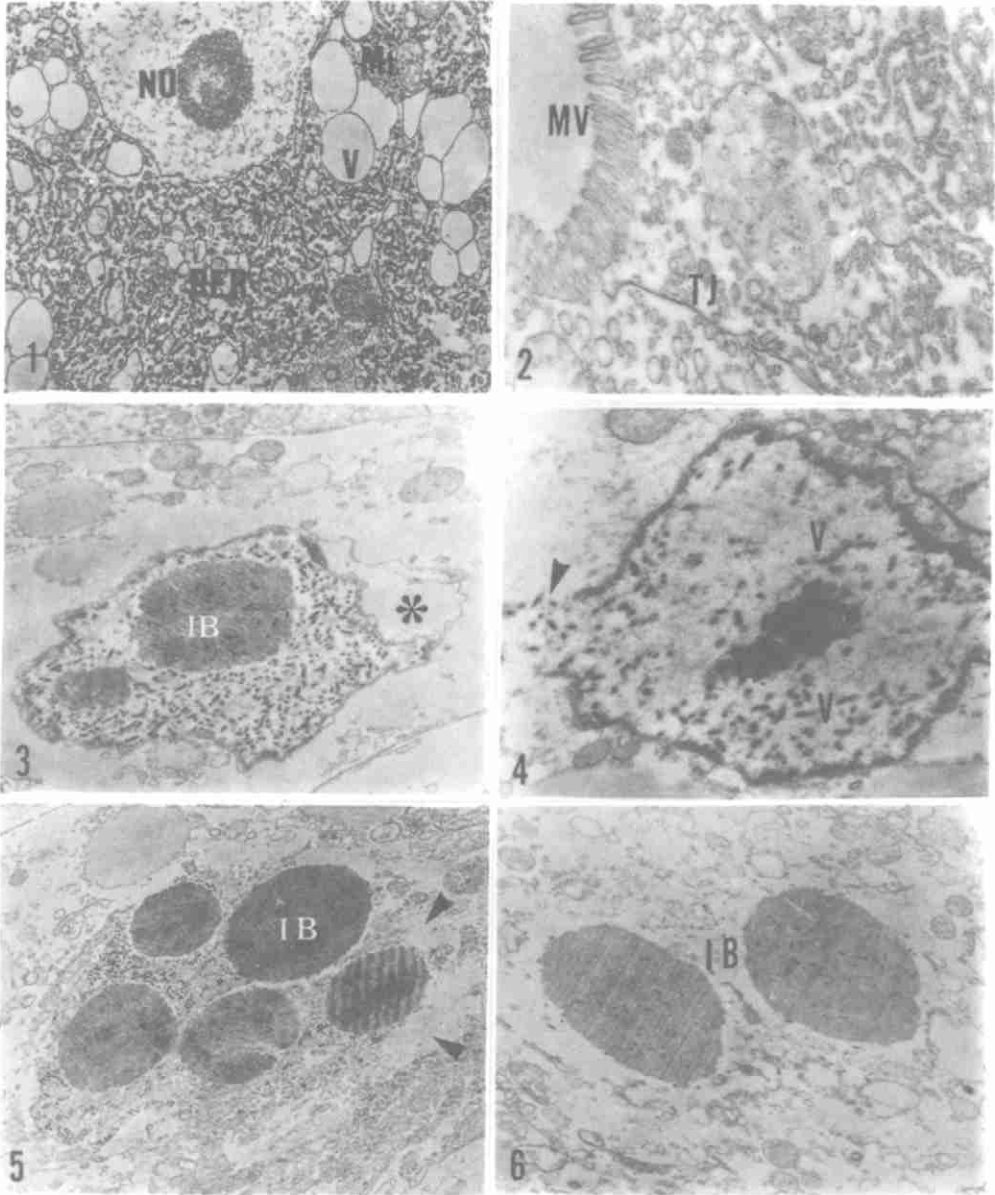
1. 正常肝胰腺上皮细胞的超微结构 在电镜下,肝胰腺管上皮细胞是单层低柱状上皮,底部有基底膜与周围结缔组织隔开,基底膜平滑而连续。上皮细胞核卵圆形,位于细胞体下方 1/3 处。细胞核质均匀细密,异染色质不多见。核仁明显,多为团块形。胞质内细胞器排列有序,糙面内质网、核糖体和线粒体丰富,常见囊泡。脂滴和其他分泌颗粒不多见(图版 I, 1)。上皮细胞的游离端有排列整齐、长短一致、粗细均匀的微绒毛,表面覆盖一薄层均质非细胞结构的外衣。两上皮细胞之间的连接复合体各组份清晰可辨(图版 I, 2)。这种观察结果与陈宽智[1988]描述的相似。

2. 细胞核超微结构病理变化 MBV 感染肝胰腺上皮细胞核引起的超微病理变化具有特征性。在均匀细颗粒状的核质中,散在着团块状的病毒发生基质,基质周围分布着大量的核衣壳、囊膜材料和组装完整的病毒粒子。多数情况下,可见核质中有 1 个到多个球形 MBV 包涵体和大量病毒粒子。由于包涵体和病毒粒子存在,使得细胞核增大 3-4 倍,这时的核质变得不均质,部分核膜扩张成囊状(图版 I, 3)有的核周间隙充满中等电子密度的物质,核内膜上附着一圈浓密染色质,核质严重水肿,使得电子密度明显降低,局部核膜破裂,MBV 粒子由此溢出(图版 I, 4)。当 MBV 严重感染时,核内包涵体不仅数量多,而且体积急剧增大,核膜绝大部分破裂,核质崩解(图版 I, 5),MBV 粒子及包涵体游离到胞质中,进而细胞解体,包涵体随之游离到细胞间隙中(图 I, 5 和 6)。附近上皮细胞也不同程度感染上 MBV,但未见结缔组织细胞中有 MBV 粒子存在。

3. 胞质细胞器和内容物的超微病理变化 虽然目前国内外尚未找到 MBV 感染后胞质中细胞器带有特征性的病变,但是某些重要细胞器的病变具有普遍性。MBV 感染初期,胞质局部水肿,使得细胞器分布不均,水肿区域内空无细胞器,仅残存低电子密度的细胞基质(图版 I, 7),进而部份糙面内质网脱颗粒,排列有序的片层状结构变得紊乱,且有髓鞘样变性趋向(图版 I, 8)。滑面内质网明显增生,占据一大区域,增生区域内几乎无其他细胞器存在(图版 I, 9)。线粒体由长形、卵圆形变成多种形态,不仅体积增大,成为巨线粒体,有的分枝成树状(图版 I, 10),有的水肿,密度降低,嵴断裂,部份消失,成为无结构的空白区,有的嵴变性,高密度团块沉积,成为绒团样变性(图版 I, 11)。

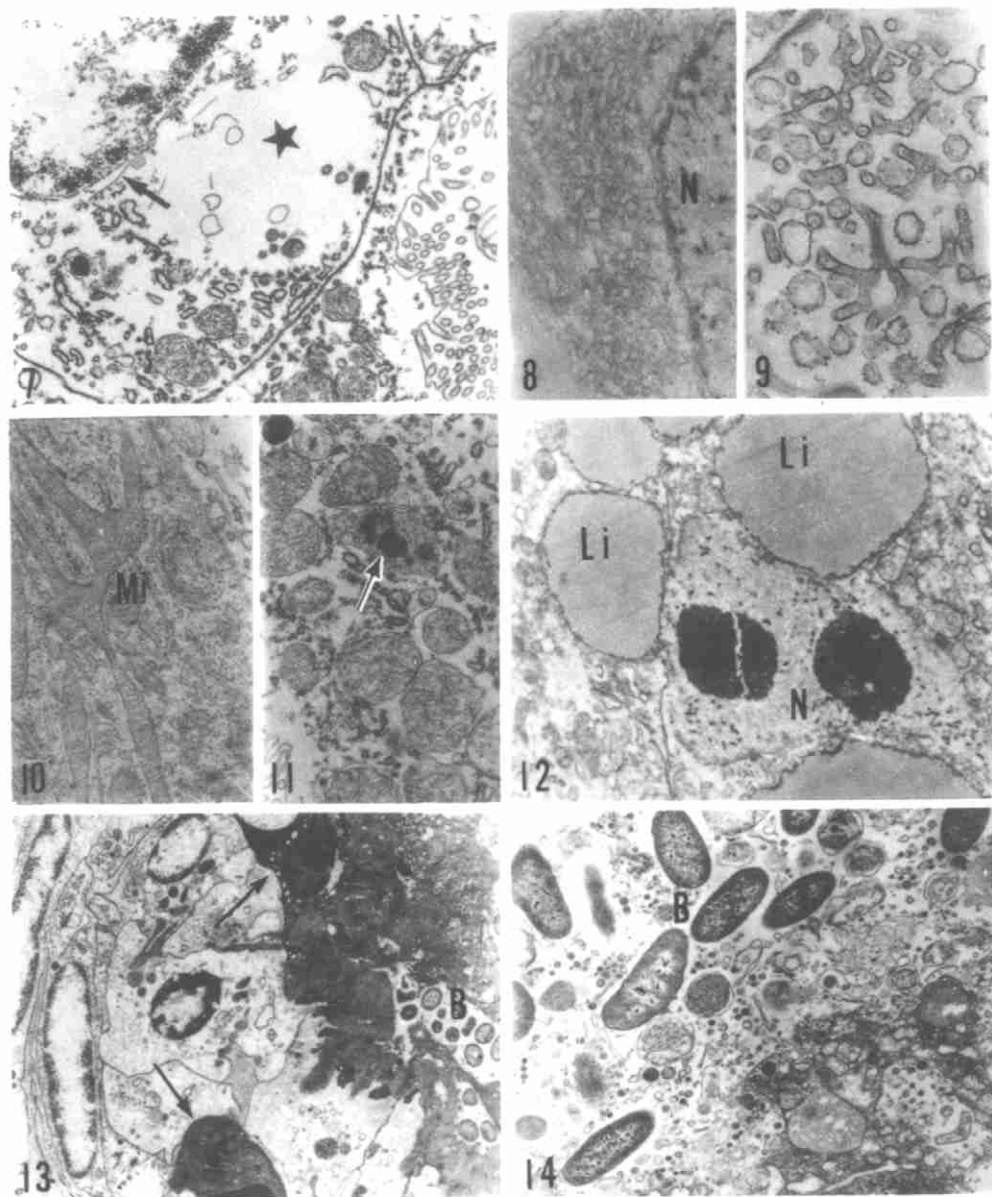
在胞质细胞器变化的同时,胞质代谢产物也发生变化,最常见的是脂滴积聚,脂滴体积大小变化颇大,常把细胞核挤压变形(图版 I, 12),不仅使整个细胞体积增大,而且呈现泡沫状。

4. MBV 与细菌混合感染 在 MBV 感染的肝胰腺管腔中、上皮细胞之间和上皮细胞崩解区域内,有大量杆状细菌存在,这时管腔中有大量均质渗出物和细胞碎片堆积,附近上皮细胞间隙中有血细胞浸润和吞噬细胞游走(图版 I, 13)。有些细菌侵入细胞质中,造成胞质局部固缩和溶解,分不出其中细胞器的成份,严重感染时,整个细胞甚至一大片细胞崩解,留下一群结构模糊的细胞团(图版 I, 14),使得腺管塌陷,管腔阻塞,失去正常肝胰腺管形态结构特点。



图版 I plate I

1. 草虾正常肝胰腺细胞各种细胞器, 如细胞核, 核仁(NU), 糙面内质网(RER), 线粒体(Mi), 核糖体和空泡(V)排列有序, 10000 \times ; 2. 正常肝胰腺细胞游离端微绒毛(MV)刚直挺拔, 整齐划一, 细胞间连接复合体(TJ)各组份清晰可辨, 15000 \times ; 3. 细胞核内有两个包涵体和大量病毒粒子, 核膜局部扩张成泡状(*), 7000 \times ; 4. 细胞核质散在病毒粒子, 大部分核周间隙充满中等电子密度物质, 小段核膜破裂(\blacktriangleright), 病毒粒子游离出来, 15000 \times ; 5. 细胞核中有游离的MBV粒子和5个病毒包涵体, 核膜消失, 部分核质崩解(\blacktriangleright), 4500 \times ; 6. 细胞核完全崩解消失, 两个包涵体(IB)游离于胞质中, 胞质多数细胞器变性坏死, 10000 \times 。



图版 I plate I

7. 细胞质轻度水肿(★),核膜稍有扩张(→),12000×;8. 胞质中内质网排列紊乱,有髓鞘样变性的趋向,右侧是草虾肝胰上皮细胞核(N),45000×;9. 胞质中滑面内质网增生区,20000×;10. 胞质中异型分枝的巨线粒体(Mi),10000×;11. 线粒体基质中沉着高电子密度的物质(→),是一种绒团样变性,15000×;12. 胞质中积聚着各种大小体积的脂滴颗粒(Li),把含有MBV粒子和包涵体的细胞核(N)挤压变形,8000×;13. MBV和细菌混合感染,肝胰腺管腔中堆积大量细菌(B)和崩解的细胞碎片,附近有血细胞浸润(→),4500×;14. 细菌(B)侵入肝胰腺上皮细胞质中,使得整个细胞固缩,有的崩解,10000×。

三、讨 论

本文观察了 MBV 感染的草虾肝胰腺上皮细胞,发现细胞核内有 MBV 粒子和包涵体。随着 MBV 和包涵体数量增多及包涵体体积增大,细胞病变也加剧,出现染色质凝集,分布不均,核膜部份扩张和破裂,甚至消失,核质崩溃,MBV 和包涵体游离到胞质中和细胞间隙内,殃及周围腺管和上皮细胞,这些观察结果与 Egusa 等[1988]和 Chen 等[1989,1989]的有关报道类似。作者认为,胞核这些病理变化,特别是检出 MBV 和包涵体,通过结合患病草虾群体症候[陈细法等,1993]和死亡率,可以作为诊断草虾病毒性疾病的重要依据,也可以判别患病程度和预后。

应该指出,本文作者也在健康草虾的肝胰腺上皮细胞中检测到少量 MBV 和包涵体。但是,这些包涵体不仅个数少,而且体积较小,感染细胞数也不多(多数是单个),没有发现成片感染坏死区,也难见到核内病毒发生基质,这似乎提示着肝胰腺管个别上皮细胞的破坏是可以代偿的,不足以严重影响肝胰腺的正常生理功能。由此可见,含 MBV 的草虾个体不一定患病,只有当 MBV 感染变得严重,腺管大面积破坏或者并发细菌感染,干扰和破坏草虾的消化和吸收功能时,才有可能暴发流行性病毒病。当然,诱发 MBV 快速增殖,并造成大面积破坏和细菌混合感染的原因相当复杂,既有虾体内的因素,也有养殖环境恶化的诱因,这已超出本文研究范围。

MBV 与细菌混合感染是本文作者感兴趣的另一个问题。在部分健康对照组的草虾肝胰腺上皮细胞也检测到 MBV 及包涵体,但未见细菌混合感染,更未见血细胞浸润现象。由此可见,MBV 和细菌混合感染不失为一个有价值的诊断草虾病毒病的辅助性指标。但是,细菌混合感染不是病毒感染特征性病变,有作者[Egusa 等,1988;Chen,1986;Wendy 等,1992]认为,对患败血症或者菌毒症的对虾,更容易观察到细菌并发病和血细胞浸润,也是造成对虾大量死亡的重要原因。当然,根据本文作者的观察,无法判断细菌是原发或是继发病原。

本研究所发现的胞质细胞器及内容物的变化,虽然具有普遍性,但不具有特异性。从大量滑面内质网增生,占据某一区域,脂肪滴不仅数量多,而且体积大,提示着 MBV 感染的上皮细胞发生脂肪代谢障碍[钟慈声等,1984],使得劫后余生的草虾肝胰腺发生脂肪病变,影响个体生长。

参 考 文 献

- [1] 陈细法,1979.电子显微镜医学生物学标本快速制备法.中华物理医学杂志,1(2):26-28.
- [2] 陈细法等,1993.对虾病毒性疾病的群体症候与病理变化.中国水产,213(8):32-33,214(9):30-31.
- [3] 陈秀男,1990.草虾繁殖场去除杆状病毒感染之方法,养鱼世界,(3):45-49.
- [4] 陈宽智,1988.东方对虾消化系统解剖和组织学研究.山东海洋学院学报,18(1):43-51.
- [5] 钟慈声等,1984年.细胞和组织的超微结构,14-33.人民卫生出版社(京).
- [6] 廖一久等,1989.虾病防治专辑,1-50,台湾省水产试验所,台北.
- [7] Brock, J. A., 1991. An overview of disease of cultured crustaceans in the Asia-Pacific region. 347-395. NACA, Bangkok, Thailand.
- [8] Couch, J. A., 1974. Free and occluded virus similar to Baculovirus in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature*, 247

- 229-231.
- [9] Chen, S. N. *et al.*, 1989, Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in cultured shrimp in Taiwan. *Fish Pathology*, **24**(4):189-195.
- [10] ———, 1989. Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in the giant tiger prawn and the red tail prawn. *Fish Pathology*, **24**(2):89-100.
- [11] Chen, T. J., 1986. *Reports on Fish Disease Research*(V ■), 75-86. Council of Agriculture, Taipei.
- [12] Egusa, S. Y. *et al.*, 1988. Histopathology of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Fish Pathology*, **23**(1):59-65.
- [13] Fegan, D. F. *et al.*, 1991. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in southern Thailand. *Aquaculture*, **96**:205-217.
- [14] Lightner, D. V. *et al.*, 1985. Recent advances in penaeid virus disease investigations. *J. World Maric. Soc.*, **16**:267-274.
- [15] Liao, I. C. *et al.*, 1989. Extension Handbook on Prawn Disease Prevention. Keelung, Taiwan.
- [16] Wendy, F. *et al.*, 1992, Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. 195-205. The Oceanic Institute, Honolulu.

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION ON CYTOPATHOLOGIC CHANGES IN HEPATOPANCREA EPITHELLAL CELLS INFECTED BY MBV (*PENAEUS MONODON* LACULOVIRUS)

Chen Xifa^{*1}, Wu Dinghu^{*2}, Huang Huai^{*2} and Chen Ping^{*1}

(*₁ Xiamen University, 361005)

(*₂ Fishery Institute of Xiamen, 361005)

ABSTRACT The ultrathin sections manufactured by improved fixative for biological samples of electron microscope and new embedding media were used to study the ultrastructure changes of the normal and MBV-infected epithelial cells of the hepatopancreas under JEM-1200. The results indicated there was one or more intranuclear inclusion bodies and a great number of virions in the karyoplasm of the infected cells. As the number of inclusion bodies and virions increased, the unclear chromatin agglutinated and the nucleolar migrated, the nuclear membrane partially dilated, disrupted or even completely disappeared. At last, the whole nucleus would disintegrate and drift the inclusion bodies out of the nucleus. In this periods, the oedema and necrosis of cell plasmas, the myeloid deterioration of endoplasmic reticulum, the hyperplasia of agranular endoplasmic reticulum and lipid droplets, the down-wass-like deterioration of mitochondrias and the secondary bacterial mixed infections also be found in the studies. The authors consider that the large number of intranuclear inclusion bodies and MBV (existed in the karyopalsm), which caused the severe cytopathologic changes, could serve as one of the characteristic indication in diagnosing the

viral disease of *P. monodons*. The bacterial mixed infection is one of the important auxiliary diagnostic indication. The lipoidosis and pathologic changes of mitochondrias in epithelial cells of the hepatopancrea may have effects on the normal growth of the surviving *P. monodons*.

KEYWORDS shrimp, cytopathologic change, *Penaeus monodon* baculovirus