

中华鳖非寄生性肝病组织病理研究

潘连德

(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘 要 运用病理解剖、显微与亚显微组织病理学研究方法,详细研究了温室养殖中华鳖非寄生性肝病的组织病理学特征,结果表明,肝脏是该病最严重的病灶,按病程发展的病理变化和典型临床症状,划分为 I ~ IV 时期。病鳖表现出肝损害所致的组织炎症反应、肝细胞水样变性和脂肪变性、肝性水肿和血肿、肝细胞坏死、肝组织硬变和腹水等病理特征。随着病程的发展,肝脏由功能不全到功能衰竭,直至病鳖死亡。文中还探讨了该病的致病原因和防治措施。

关键词 中华鳖,非寄生性肝病,组织病理学

自 1996 年 11 月起,我国中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 主产区的江、浙、沪、闽、粤等地相继发生了被称为“腮腺炎”、“腹水病”、“肥胖病”、“养殖综合症”的疾病,典型的临床症状为:停食、活动迟缓、四肢和脖颈肿大且不能伸缩、体腔腹水、肝脏肿大。日死亡率在 2% ~ 8%,严重场、池达 20%,患病率 100%。病鳖为养殖期 5 个月以上的规格在 10g/只 ~ 500g/只的幼鳖和成鳖,损失严重。1997 年 4 月我们对这次鳖病进行了诊断、防治方面的系统研究。查明了致病原因,并诊断为“中华鳖非寄生性肝病”(潘连德 1998)。

有关养殖鱼类肝损害 [Ferguson 1989, Roberts 1978, Ribelin 1975]、肝脏脂肪变性 [Lin 等 1990, 朱雅珠等 1992, 殷源洪等 1990]、肝病 [姜礼燧 1989]、肝癌 [姜礼燧和曹萃禾 1988, 张永嘉 1990] 的研究,饵料中添加极低剂量的化学物质或黄曲霉素 B₁ 导致鲑科某些鱼类患肝变性和肿瘤 [Stanton 1965] 的研究,中华鳖肿瘤的危害 [Liu 和 Mai 1984] 的研究已见报道。关于中华鳖传染病、寄生虫病研究报道较多,并见有这些疾病对肝脏损害的一些病理研究。台湾、日本过去流行的鳖腮腺炎病 [川崎义一 1987] 与非寄生性肝病有相似的临床症状。对日本鳖 (*Amyda japonica*) 的脂质代谢异常疾病 [福田博业和木村正雄 1960, 1961, 福田博业和黑木扬 1960, 1961] 系统研究和中华鳖“蜡样症”的组织病理学和组织化学研究 [延东真等 1977] 结果为非寄生性疾病病理和临床症状研究奠定基础,而中华鳖、日本鳖以及其它水产养殖动物的非寄生性肝病研究均未见报道。本文报道了中华鳖非寄生性肝病肝组织、细胞的显微与亚显微病理研究结果,以及对该病病因、危害和防治措施的探讨,为温室养殖中华鳖非寄生性肝病的诊断和预防提供依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源

江苏省吴江市某温室养鳖场 96 年放养稚鳖 15 万只, 97 年 3 月发病,同池并发腐皮病。

收稿日期: 1997-09-20

(1) 潘连德, 1998. 温室养殖中华鳖非寄生性肝病的诊断研究.

经过对该场实地调查和现场解剖结果,选取临床症状不同的病鳖 20 只和正常鳖 4 只作组织病理研究。

1.2 病理解剖

进行病理比较解剖观察研究,根据病理解剖结果进一步确定该病的病程发展的典型症状,并为正确选择石蜡切片和电镜切片的病料提供依据。

1.3 石蜡切片制作与观察

参考病理解剖结果,选择典型症状的病理组织块, Bouin 氏液固定,常规石蜡包埋,切片厚度 5~6 μm , H. E. 染色, Olympus (BH-2) 显微镜观察、拍片。

1.4 电镜切片制作与观察

在摘取制作石蜡切片组织块时,同步留取电镜切片组织块,切成 1~2mm³小块,2.5%戊二醛溶液前固定,0.1mol 磷酸缓冲液洗 3 次,1%锇酸后固定,0.1mol 磷酸缓冲液洗 3 次,酒精梯度脱水,90%酒精+丙酮(1:1)浸透,丙酮+包埋剂(ERL 10mL、GER 6mL、NHA 26mL、GNA 0.4mL)(1:1)再浸透,包埋剂包埋,模板固定,60℃烘干,LKB-8800 超薄切片机制片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,JEM100-X II 透射电镜观察、拍片。

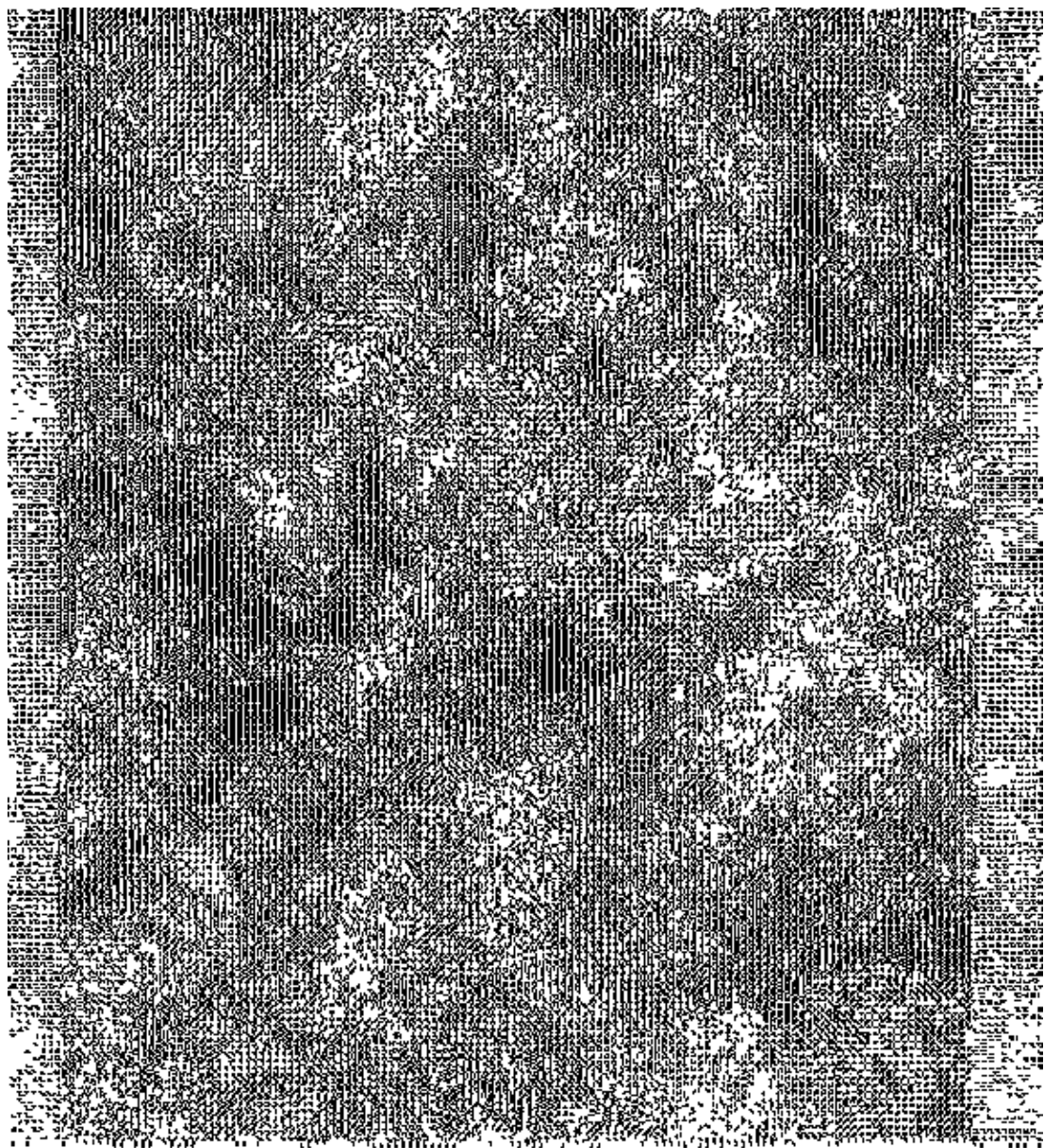
2 结果

通过对各地温室养殖患病中华鳖的现场调查,并对大量的病鳖和濒死鳖临床解剖,然后做显微与亚显微组织病理研究,结果表明,肝脏是该病最严重的病变组织和器官,且病理变化明显、临床症状典型。按该病病程发展划分为 I~IV 时期:

I 期:肝静脉及其分支血管扩张、肝细胞脂滴积累。解剖见肝脏有红色淤血点、斑、块等病灶。显微观察,肝小叶、汇管区、肝细胞索基本正常,白细胞在中央静脉贴壁,窦状隙扩张(图版 I-1),肝门静脉略膨胀,内积血液红细胞减少,白细胞数量增加(图版 I-2)。电镜观察,肝细胞结构正常,内有大量脂滴和空泡,线粒体和内质网发达,有少量血细胞在肝组织中(图版 I-3);

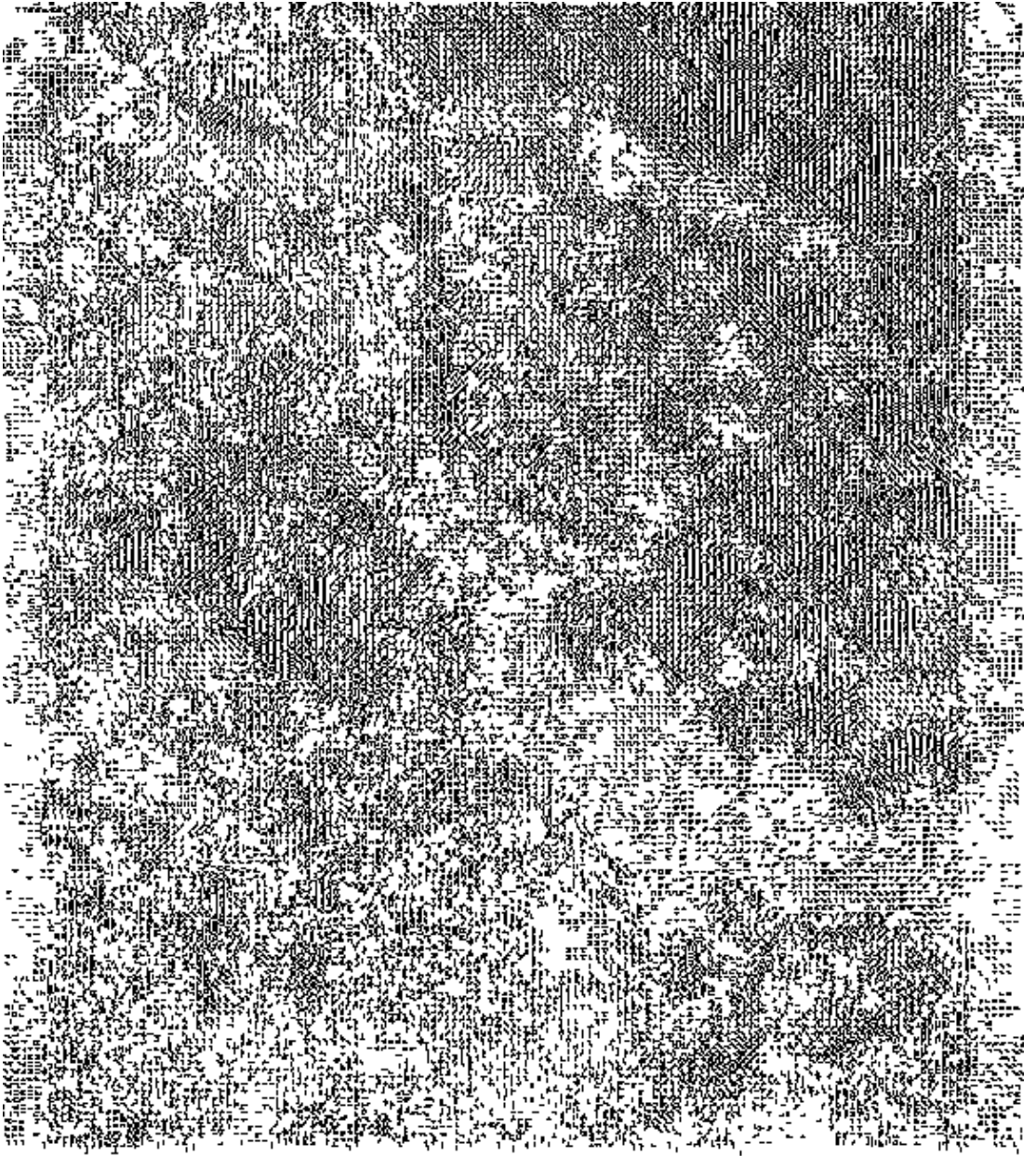
II 期:肝组织白细胞浸润并淤血。解剖见肝脏变红色、红紫色,体积正常。显微观察,肝门静脉膨胀,内积血液红细胞较少,白细胞增多并占绝大部分(图版 I-4),白细胞贴壁、游出、聚集(图版 I-5)等浸润明显。电镜观察,肝细胞内脂滴增多增大、连片,核仁变形、核靠边,线粒体及其嵴体积膨胀(图版 I-6,7),白细胞浸润数量剧增,嗜中性粒细胞个体大、数量多,且核型多变(图版 I-8),溶酶体、合胞体增多(图版 I-9);

III 期:肝血肿、肝组织变性。解剖见肝脏紫色、褐色,肝脏(右叶)体积增大 2~4 倍,充血腔,质地柔软,刀切有淤血流出。显微观察,游出炎性细胞大量浸润肝组织,充满白细胞的肝静脉管继续膨大、管壁破裂,大量血流出,与游走的炎性细胞、以及扩张的窦状隙、门静脉及其分支充塞整个肝组织,各种细胞混杂一体。伴有渗出性出血(图版 II-5);肝细胞空泡化,细胞质淡染,肝组织基本结构模糊,表现严重血肿(图版 II-1)。所见肝细胞很少,肝细胞膜不清,白细胞聚集(图版 II-2)。电镜观察,脂滴被大而多的空泡所取代,内质网扩张而呈囊泡状,线粒体膜破裂、嵴溶解(图版 II-3),合胞体增多,炎性细胞浸润肝细胞内外、遍及肝组织(图版 II-4)。



图版 I Plate I

1. 肝小叶、门静脉、窦状隙, H. E. 染色。× 160; 2. 电镜下肝静脉血细胞。× 2 900; 3. 电镜下肝细胞内脂滴和空泡。× 2 900; 4. 肝静脉中血细胞, H. E. 染色。× 160; 5. 肝组织炎性细胞游走、聚集, H. E. 染色。× 160; 6. 电镜下肝细胞内大量脂滴。× 3 600; 7. 电镜下白细胞浸润肝细胞。× 2 900; 8. 电镜下浸润的嗜中性粒细胞。× 10 000; 9. 电镜下合胞体、溶酶体。× 2 900;



图版 II Plate II

1. 血肿肝组织, H. E. 染色。× 800; 2. 肝组织炎性细胞聚集, H. E. 染色。× 400; 3. 电镜下肝细胞核外膜皱缩、线粒体破裂。× 2 900; 4. 电镜下白细胞浸润肝细胞。× 3 600; 5. 肝组织渗出性出血, H. E. 染色。× 400; 6. 肝小叶间静脉膨胀、破裂, H. E. 染色。× 160; 7. 血肿肝组织, H. E. 染色。× 800; 8. 肝细胞空泡化、线粒体和内质网破碎。× 2 900; 9. 肝细胞核膜皱缩、核仁溶解。× 19 000;

IV期: 肝硬变、水肿、肝细胞坏死。病鳖体胖厚, 四肢和颈部肿大而伸缩困难。解剖见肝脏颜色转淡粉色且表面散布白色粒状腊脂, 质地硬, 刀切有积水流出。体腔内有大量血样腹水或尿样腹水或水样腹水, 濒危病鳖肝性水肿、体腔和肢体腹水严重, 并逸出恶味。显微观察, 炎性细胞大量聚集, 静脉破裂, 淤血流出、肝细胞坏死(图版 II-6), 肝组织被这些炎性细胞、扩张的

窦状隙以及积满血液的门静脉及其分支分隔为束状、团状(图版 II-7), 结缔组织纤维变性。电镜观察, 肝细胞内布满空泡, 细胞核膨大, 线粒体溶解(图版 II-8), 膜裂解、核仁溶解(图版 II-9)。

综上所述, 中华鳖非寄生性肝病的组织病理和临床症状变化过程为: 肝脏负担过重和肝中毒并造成严重肝损害→肝组织脂肪变性和炎性细胞浸润的炎症反应→肝脂肪变性和水样变性使肝组织、细胞膨胀→肝门静脉及其分支血液回流受阻、窦状隙扩张而淤血、血肿→肝细胞变性、坏死和空泡化→结缔组织增生、纤维变性形成肝硬变→肝性水肿→水肿液自肝被膜渗出滴入腹腔形成腹水→腹水渗透四肢和颈部导致全身性水肿。

3 讨论

3.1 肝组织病理变化的特征和病程发展的规律性

组织病理结果表明, 该病为肝组织中毒性、慢性代谢性疾病特点。患病鳖的肝脏是主要的病灶, 病理解剖和组织病理显微观察未发现其他器官、组织发生病变。当疾病发展到后期方表现出外部临床症状: 停食、腹水、四肢和颈部水肿、活动缓慢的濒危状态。由于病程较长, 前期临床症状不明显而不易发现, 早期诊断困难。

研究证实该病的病灶症状明显, 病程发展规律性强。中华鳖的肝脏由初期的仅有少量的淤血点, 发展到淤血斑块、全部肝脏变为紫色或褐色, 反映了肝脏淤血不断加重的典型症状; 肝脏的体积与颜色的变化是同步的, 因脂肪变性和淤血肿胀到 2~4 倍, 并挤压内脏器官; 血肿症状严重; 继续恶化为肝硬化、肝性水肿等疾病的典型经过和结局。肝脏由功能不全, 发展到功能衰竭, 直至死亡。大量组织病理的显微和亚显微观察结果有力支持了这一结论。该病病理变化同陆上动物中毒性肝病有相似之处[伍喜林 1994]。初期肝细胞的脂肪变性病理同日本鳖脂质代谢异常病[福田博业和木村正雄 1961]具有相同点, 同团头鲂[朱雅珠等 1992]、虹鳟[殷源洪等 1990]的脂肪肝病和鲤、罗非鱼肝病[姜礼燾 1989]组织病理也有共性。中华鳖蜡样症[延东真等 1977]同该病晚期症状相似。

3.2 致病原因和病理机制分析

长期中毒性肝损害是致病原因: 病鳖的组织病理显微与亚显微观察结果表明, 温室养殖中华鳖非寄生性肝病的致病原因是强度摄取食物造成肝负担过重和长期接受药物、毒物所致中毒性肝损伤, 而引起脂肪变性、水样变性, 造成肝组织坏死、肝性血肿和水肿, 最后肝硬化、肝性腹水, 与人类[叶维法和钟振义 1996]和动物[伍喜林 1994, 朱雅珠等 1992]药源性、食源性肝损伤引起肝病而致死病因与病理相似。

病理机制分析: 温室养殖中华鳖强化摄食使肝脏负担过重而体积增大和药物、毒物使肝中毒一并造成严重肝损害, 引起肝组织炎性细胞游走的炎症反应, 脂质代谢异常使肝细胞脂肪变性, 毒物使细胞坏死致水样变性, 严重的脂肪变性和水样变性使肝细胞膨胀压迫静脉使血液回流受阻, 肝门静脉及其分支而淤血、窦状隙扩张, 造成严重血肿和出血, 肿块膨胀, 再压迫肝细胞而加剧变性、坏死和空泡化, 结缔组织增生并纤维化形成肝硬变, 发生肝性水肿, 水肿液自肝被膜渗出滴入腹腔形成腹水, 而后渗透四肢和颈部导致全身性水肿。

3.3 中华鳖的非特异性细胞免疫水平

组织病理研究发现,中华鳖血液的细胞组成随着疾病的发展而剧烈改变,具有免疫功能的白细胞受到细胞因子的激活后,数量增加快、种类多、功能活跃。肝组织中大量的游走白细胞在病变、坏死组织处聚集的现象很普遍,尤其是嗜中性粒细胞的数量多、个体大,且核大而变形复杂,在细胞免疫中发挥主要作用。电镜观察可见,大量个体较小的白细胞浸润较大的肝细胞内吞噬坏死的细胞器及其碎片。粒细胞和巨噬细胞分泌的溶酶体及其合胞体数量大、消化机能强。严重血肿的病灶可见各种各样的白细胞、淋巴细胞遍布肝组织,渗出和漏出的红细胞较少(潘连德 1997)。有关中华鳖肝组织中白细胞和淋巴细胞的演变机制和免疫功能问题,有待进一步研究。

3.4 中华鳖非寄生性肝病的危害性

患病初期因肝组织脂肪变性、水样变性,而肝功能不全,表现食欲下降、消化机能减弱、饵料利用率降低,生长缓慢或停滞。后期肝性血肿、肝性腹水、肝硬化,使肝功能衰竭,表现停止摄食、生命垂危,无法治愈。由于肝脏的解毒、消化、合成功能不全,使中华鳖抗病力与免疫力下降,腐皮病、白板病、红脖子病等细菌性和纤毛虫等寄生虫病继发。此时,应准确区分原发性和继发性疾病,做到准确诊断和有效治疗。患肝病继发或并发其它疾病时,进行药物治疗一方面会加剧肝损伤,使肝病恶化,患病严重者大量死亡,也因肝功能不全,使药物的体内药效降低,很难取得理想效果。

3.5 中华鳖非寄生性肝病防治的可行性

根据温室养殖中华鳖非寄生性肝病病理特点和致病原因,必须执行有效的预防措施,注重疾病早期诊断、早期治疗,患病初期(Ⅲ期以前)及时消除致病因素并采取药物治疗有效,否则疾病进入晚期(Ⅱ期以后)就无法可医。

建议从下面几个方面采取预防措施:合理用药,避免药物性肝损害。合理使用添加剂和饲料原粮,避免肝中毒和脂质代谢紊乱等食源性肝损害。饵料的不全价[曹俊明等 1997]、添加剂不合适乃至含有毒物,是造成肝损害的主要原因。不使用变质油脂、霉变原粮和不合适的添加剂(药物添加剂和 V_E),是行之有效的预防非寄生性肝病的方法。以往对海水鱼类肝脂肪变性和绿肝研究认为,合理添加 V_E 和胆碱,有利于肝功能恢复,但 V_E 过量添加会导致性早熟,还有损害作用[孟庆显 1995];强化投饲,过度摄食,肝负担过重。肝体积、重量增大,而防御能力下降,成为病因的易感器官,这就是单方面的追求快速生长的不良后果;使用保肝、健脾、解毒等功效的中药添加剂,可提高中华鳖的非特异性免疫水平,预防非寄生性肝病效果好。同时运用对肝损害较小的抗微生物药物(抗生素、化学合成药物),控制继发感染的病原菌,可取得温室养殖中华鳖疾病防治的理想效果。

本项目得到上海市教育委员会重点学科基金部分资助。研究工作得到江苏省吴江市龙鑫集团公司董事长黄伟林,上海水产批发商陈如江,福建省涵江市商检局特种水产研究所所长翁国柱,上海水产大学电镜室周孝康、张敏等同行各方面的支持和帮助,在此诚挚致谢。

(2)潘连德. 1997. 中华鳖肝组织炎症性细胞的浸润及其结构研究.

参 考 文 献

- 叶维法, 钟振义. 1996. 肝炎学大典. 天津: 天津科学技术出版社. 1243~1377.
- 伍喜林. 1994. 动物脂肪肝与营养. 饲料与畜牧, (1): 17~20.
- 朱雅珠, 杨国华, 刘玉良. 1992. 团头鲂的脂肪肝及防治研究. 水产科技情报, 19(1): 1~5.
- 张永嘉. 1990. 尼罗罗非鱼肝癌的病理组织学研究. 水产学报, 14(3): 256~259.
- 孟庆显. 1995. 水产动物疾病学. 北京: 农业出版社. 144~149.
- 姜礼燧, 曹萃禾. 1988. 中华鲟肝脏癌变的环境污染因初探. 水产科技情报, (4): 7~8.
- 姜礼燧. 1989. 鱼类肝病的组织病理学研究. 淡水渔业, (5): 13~14, 43.
- 殷源洪, 杨琛, 刘静雯等. 1990. 虹鳟肝脂肪变性病理学的初步研究. 鲑鳟渔业, (2): 12~16.
- 曹俊明, 林鼎, 劳彩玲等. 1997. 饲料中添加大豆磷脂对草鱼肝胰脏脂质脂肪酸组成的影响. 水产学报, 21(1): 32~38.
- 川崎义一, 1987. スッポン养殖讲座⑨. 养殖, 24(5): 65~69.
- 延东真, 宫崎照雄, 田三郎他. 1977. スッポンのセロイド症について—I 自然发症例について. 鱼病研究, 12(2): 141~145.
- 福田博业. 1960. 养殖スッポンに発生した脂质代谢异常について—I. 日本水产学会志, 26(11): 1114~1117.
- 福田博业, 木村正雄. 1960. 养殖スッポンに発生した脂质代谢异常について—II. 日本水产学会志, 26(11): 1118~1122.
- 福田博业, 黑木扬. 1960. 养殖スッポンに発生した脂质代谢异常について—III. 日本水产学会志, 26(11): 1123~1127.
- 福田博业, 木村正雄. 1961. 养殖スッポンに発生した脂质代谢异常について—IV. 日本水产学会志, 27(5): 413~416.
- Ferguson H W. 1989. Systemic pathology of fish. Manufactured in the United States of America. 146~157.
- Lin D, Mao Y Q, Cai F S. 1990. Nutritional lipid liver disease of grass carp *Ctenophoreyngodon idles*(C et V). Chin J Ocean Limnol, 8: 363~374.
- Liu K C, Mai L M. 1984. Histopathological nature of the tumors growth of reared soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*. COA fish SRT. 1: 94~99.
- Ribelin W E. 1975. The Pathology of fish. Wisconsin Press. 585~693.
- Roberts R J. 1978. Pathology of fish. London. 550~584.
- Stanton M F. 1965. Diethylnitrosamin—induced hepatic degeneration and neoplasms in the aquarium fish. J Nat Cancer Inst, 34: 117.

HISTOPATHOLOGICAL STUDIES ON NON-PARASITICAL HEPATOSIS OF SHELLED TURTLE *TRIONYX SINENSIS*

PAN Lian-De

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT In this report, the histopathology on non-parasitical hepatitis of shelled turtle, *Trionyx sinensis* which was farmed in hot-houses was studied. The results showed that the liver of turtles was the most serious focus, and its functions were damaged seriously. The typical clinical symptom and pathological process appeared in the following four stages. The invalid (ill turtle) manifested symptoms complice: fatty degeneration and leukocyte of infiltration in the hepatic tissue, to aquatic degeneration, to hepatic aquatic swelling and hematoma, to hepatocyte die, to hepatic stiff and ascetic fluid. Hepatic function changed from insufficiency to exhaustion with pathological changes. Pathogens and method of treatment and control on non-parasitical hepatitis were also inquired in the report.

KEYWORDS *Trionyx sinensis*, Non-parasitical hepatitis, Histopathology