

文章编号: 1000- 0615(2002)03- 0265- 05

“红肉病”文蛤中发现的一种球形病毒的 形态发生与细胞病理学

任素莲, 王德秀, 绳秀珍, 宋微波
(青岛海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 在患“红肉病”文蛤的消化盲囊上皮细胞中发现了一种球形病毒及其发生基质。病毒粒子呈球形, 无囊膜, 直径约 50~ 80nm, 在细胞质内形成多泡状的包涵体并进行病毒粒子的装配。受感染的细胞具有明显的病理变化, 主要表现为核固缩或肿胀并出现核空泡, 内质网膨胀、大部分转化泡状, 线粒体溶解或固缩, 溶酶体数量增多等。

关键词: 文蛤; 消化盲囊; 球形病毒; 形态发生; 细胞病理学

中图分类号: S944 文献标识码: A

Cytopathology and morphogenesis of a spherical virus found in the *Meretrix meretrix* suffering from“red muscle disease”(RMD)

REN Su-lian, WANG De-xiu, SHENG Xi-zhen, SONG Wei-bo
(The Key Laboratory of Mariculture, certificated by the Ministry of Education,
Qingdao Ocean University, Qingdao 266003, China)

Abstract: From June to July 2000, specimens of *Meretrix meretrix* Linnaeus suffering from the “red muscle disease”(RMD) were collected from Qinhuangdao District of Hebei Province, China. Abundant virus particles and their virogenic stroma were observed in the cytoplasm of the epithelium of digestive diverticula. The spherical-shaped virions with the size of 50~ 80nm in diameter lack capsula. The inclusion bodies forming in the cytoplasm are multivesicular which assemble virus particles. In the infected cells with virus, the cellular organelles presented obvious pathological changes, e. g. the endoplasmic reticulum swelling and mostly turning into vesicles, the mitochondria dissolving or condensing, the nuclear membrane expanding, dissolving and forming nuclear vesicles, and the number of lysosome increasing.

Key words: *Meretrix meretrix*; digestive diverticula; spherical virus; morphogenesis; cytopathology

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)是一种重要的浅海滩涂养殖贝类,但随着国内养殖规模的不断扩大,文蛤疾病也呈上升趋势。在河北秦皇岛一些养殖场常常发生文蛤患“红肉病”的现象,严重影响了文蛤的商品价值。其主要症状表现为摄食率下降,运动能力迟缓,软体部为淡红色或桔红色。此病症多发生在 3~ 4 龄的高龄贝,有死亡现象。笔者在对患病文蛤超微结构研究中,发现消化盲囊上皮细胞

收稿日期: 2001-07-31

资助项目:“教育部重点基金”、“高等学校骨干教师资助计划”及“长江学者奖励计划”

作者简介:任素莲(1964-),女,山东寿光人,副教授,博士生,主要从事水产养殖动物组织学、组织病理学与发育生物学方面的研究。

E-mail: skren@mail.ouqd.edu.cn

感染有一种球形病毒。作为系列报道的一部分,本文主要报道了该病毒的形态、发生以及感染宿主细胞而造成的细胞病理学变化。

1 材料与方法

病贝标本于2000年6-7月取自河北省秦皇岛市抚宁文蛤养殖场,为3龄贝,壳高约5~6cm;健康贝取自山东省莱州一文蛤养殖场,壳高约5cm。

解剖病贝个体,取部分消化盲囊、鳃、外套膜、性腺等(组织块大小为 1mm^3),用2.5%戊二醛及1%锇酸双固定,梯度乙醇脱水,Epon812环氧树脂包埋,LKB超薄切片机制片,醋酸铀、柠檬酸铅双重染色,日立H-7000型透射电镜下观察。

固定正常贝消化盲囊、鳃、外套膜及性腺组织,以作对比观察。

2 实验结果

2.1 球形病毒的形态结构与发生

患病文蛤消化盲囊的上皮细胞质中存在大量的病毒粒子以及它们的包涵体(图版-1, 2, IB)。该病毒粒子为圆球形,直径约50~80nm,无囊膜,核心与核衣壳之间无明显的界限(图版-3, V)。包涵体为球形、椭球形、肾形及不规则形态,一般位于细胞核附近,为单层或双层膜组成的多泡小体(图版-1, 2, 4, IB),小泡之间填充中等电子密度的物质,小泡内没有或仅含有少量的病毒粒子,而大量的病毒粒子散布于包涵体的周围。在包涵体的一些周边部位,电子密度较高,为病毒发生基质(图版-4, 5, VS),病毒粒子在此包装、形成(图版-5, V)。由于发生的部位不同,刚形成的病毒粒子的电子密度稍有差异(图版-5, 箭头所示)。细胞质内可观察到由为双层膜或多层膜泡包裹大量病毒粒子形成的“封入体”(图版-6, CB)。

病贝鳃、外套膜、性腺以及正常贝消化盲囊、鳃、外套膜、性腺等各组织中均未观察到该病毒粒子存在(图版-7)。

2.2 病毒粒子感染引起的细胞病理学变化

消化盲囊正常上皮细胞的线粒体外膜明显,内嵴清晰(图版-7, M);粗面内质网呈叠层排列,两端有少量潴泡(图版-7, RER);溶酶体较小,外膜清晰,内部充满了均匀的、中等电子密度物质(图版-7, L)。感染病毒粒子的上皮细胞呈现明显的病理变化,主要表现为细胞质内溶酶体数量增加,内含物电子密度增大(图版-2, L)。部分溶酶体吞噬了退化的细胞器或病原体成为个体较大的次级溶酶体,其附近通常有病毒包涵体存在(图版-6, SL),有些溶酶体包膜外突形成单层膜泡(图版-1, L)。线粒体固缩变小、边缘模糊,或嵴退化,内部泡状化,有些线粒体形状发生变化(图版-2, M)。内质网水肿、膨大形成大量的潴泡(图版-2, RER),局部可见内质网愈合电子密度较高的结构(图版-1, 双箭头所示)。细胞核肿胀或固缩,部分核膜溶解(图版-6, NM),核内染色质固缩并出现泡状结构(图版-1, 8, NV)。图版1所示核泡个体较大(直径约 $1.6\mu\text{m}$),膜结构致密,内部出现电子密度疏松物质,局部较致密;图版-8核泡个体较小,膜结构疏松。另外,还可以观察到核外膜扩张、核纤层内凹并包裹内质网潴泡的现象(图版-9, 箭头所示)。与此同时,细胞质内出现双层(图版-8, DMV)及单层膜泡结构(图版-2, SMV)。

3 讨论

目前国内外已报道的海洋贝类球状病毒有疱疹病毒(Herpesviridae)^[1-3]、虹彩病毒(Iridoviridae)^[4,5]、反转录病毒(Retroviridae)^[6]、呼肠弧病毒(Reoviridae)^[7]及乳多空病毒(Papoviridae)^[8]等。这些病毒大多为二十面体,仅呼肠弧病毒与乳多空病毒无囊膜包裹^[7-9]。前者大小约79

(± 0.666) nm, 内部有一个致密的核心结构, 在细胞质内装配^[7]; 后者大小约 60nm, 在细胞核内装配、成熟^[8]。另外, 在皱纹盘鲍^[10,11]与牡蛎^[12]中也观察到具囊膜的球形病毒粒子或病毒样颗粒存在。本研究结果表明, 存在于文蛤消化盲囊上皮细胞中的病毒颗粒为球形, 直径 50~80nm, 在细胞质内发生, 无囊膜与明显的核心, 其大小、装配部位与呼肠弧病毒类似, 但结构有差异。该病毒粒子的分类地位以及核酸类型等尚需进一步研究。

有关贝类病毒发生机理方面的研究极少^[5,10]。迄今已知皱纹盘鲍中球形病毒的发生基质为“封入体”膜状结构的致密区^[10], 而牡蛎缘膜病毒病(OVVD)病毒粒子在包涵体的边缘装配、形成^[5]。本研究结果显示, 文蛤消化盲囊上皮细胞中所发现的病毒粒子在胞质内增殖, 包涵体是其发生的场所。在包涵体附近通常有次级溶酶体存在, 有些溶酶体与包涵体相连, 可观察到溶酶体形成膜泡及形成一些包含中等电子密度物质的结构, 这些结构与病毒发生基质十分相似。因此, 溶酶体很可能是病毒发生的载体, 这与中国对虾杆状病毒发生基质的形成过程类似^[13]。

本观察显示, 病毒粒子及包涵体通常位于核附近, 但在宿主细胞核内未发现病毒粒子以及包涵体存在。因此宿主细胞核与病毒发生的关系有待于进一步的研究。

类立克次体与病毒是贝类两大类常见的病原微生物^[14]。作者在患“红肉病”文蛤消化盲囊上皮中已发现有类立克次体与球形病毒共同感染, 但未见二者感染同一宿主细胞的现象。受感染的宿主细胞皆呈现出明显的病理变化特征^[15], 造成细胞器严重破坏甚至整个宿主细胞全部崩解坏死。因此类立克次体和该球形病毒可能是引起文蛤“红肉病”的主要病原体, 但其致病性需要大量的研究结果来支持。

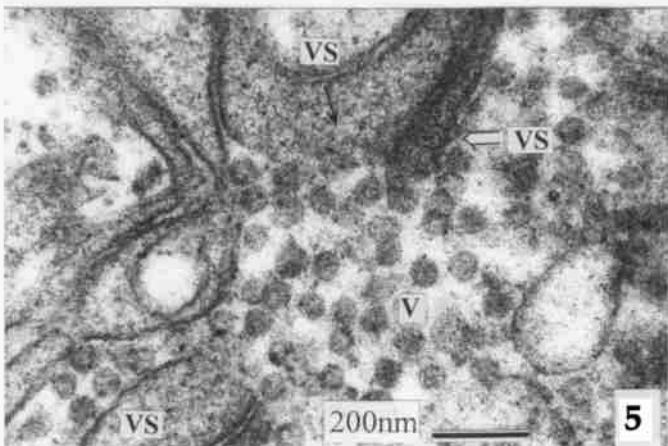
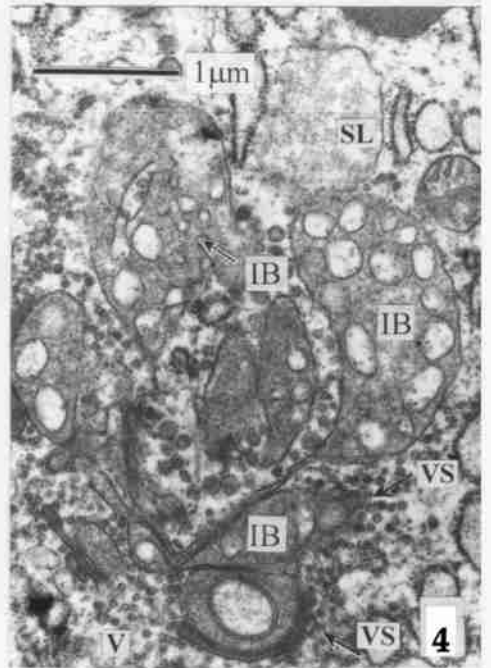
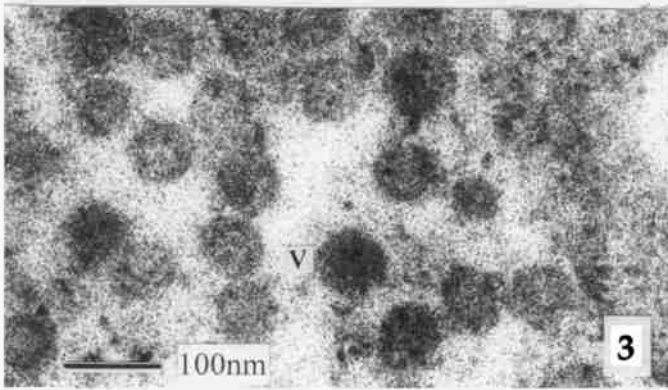
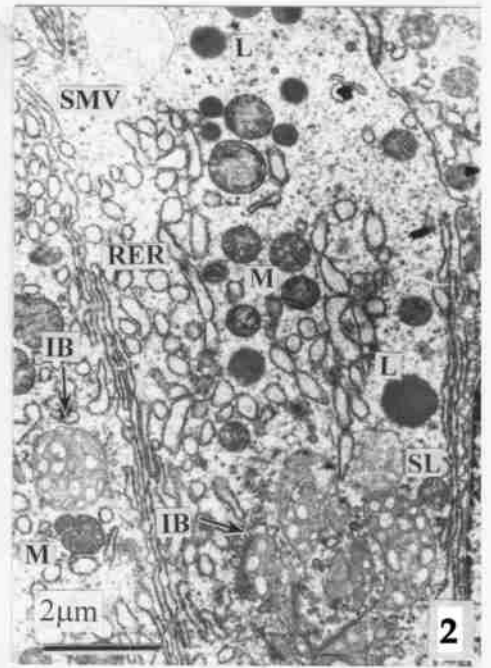
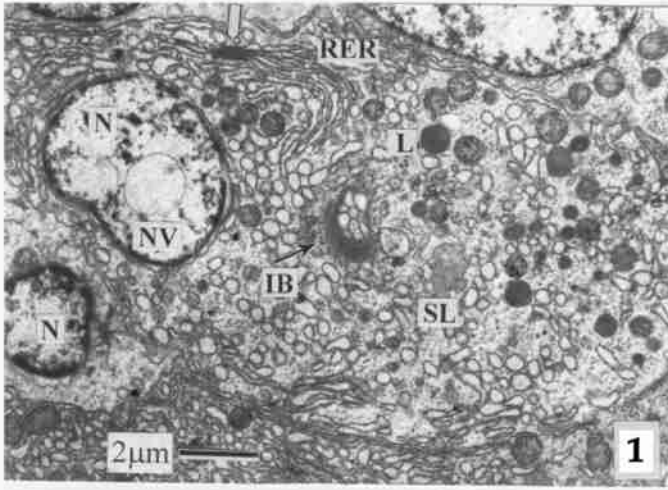
青岛海洋大学水产学院病害研究室孟庆显、俞开康、战文斌和周丽老师提供了部分参考资料, 测试中心电镜室刘晓云和姜明老师在电镜制样及观察过程中给予了极大帮助, 在此致以衷心感谢!

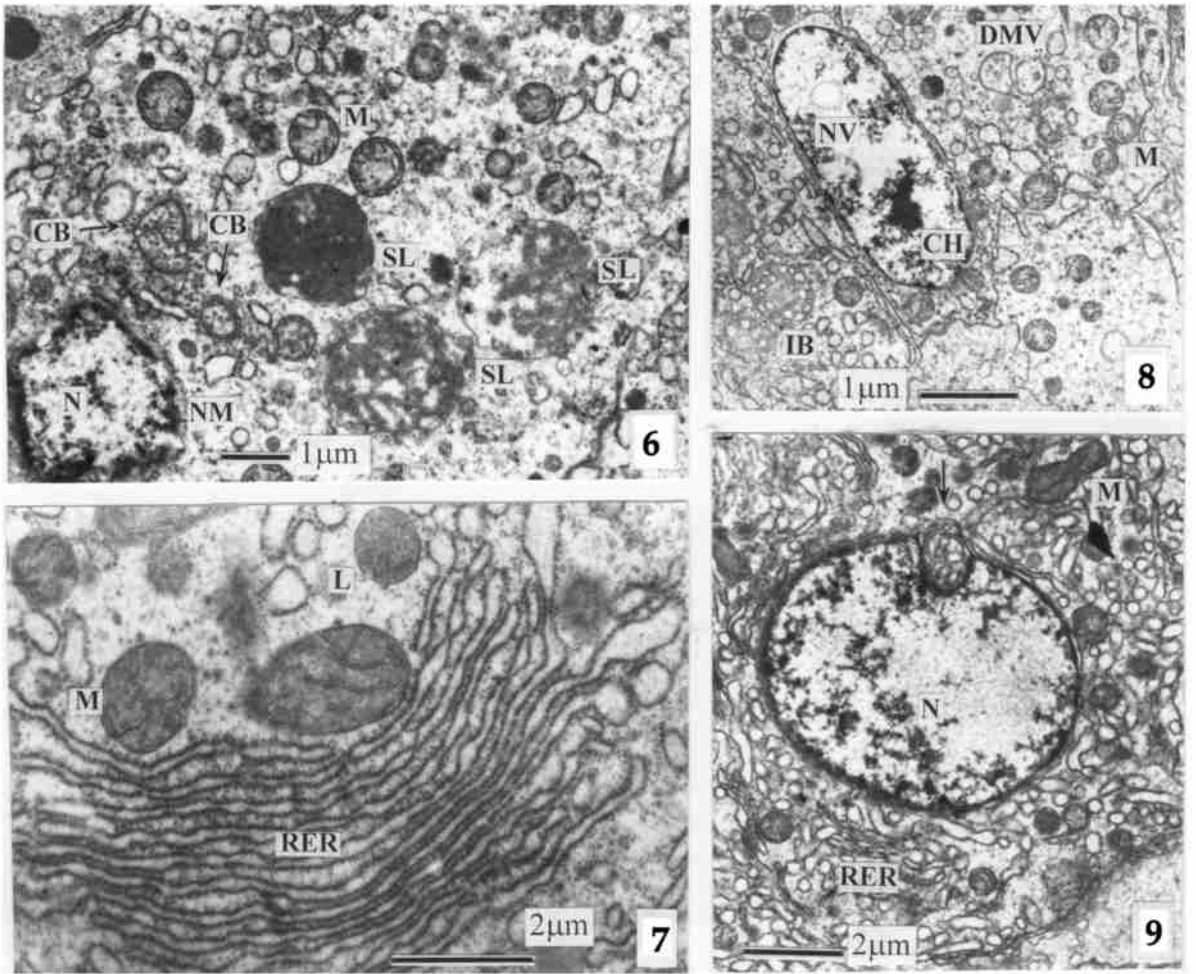
参考文献:

- [1] Farley C A, Banfield W G. Oyster herpes-type virus[J]. Science, 1972, 178: 759- 760.
- [2] Jiang Y J, Gao Y M, Shi X M. A new pathobgen-hepesvirus found in the bay scallop (*Argopecten irradians*)[J]. J Shandong Agri Univ (Natural Science), 1997, 28(Suppl): 26 - 28. [姜静颖, 高悦勉, 史晓明. 海湾扇贝体内发现一种新病毒—疱疹病毒[J]. 山东农业大学学报, 1997, 28(增刊): 26 - 28.]
- [3] Comps M, Cochennee N. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L.[J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62(2): 201 - 203.
- [4] Elston R. Viruslike particles associated with lesions in larval Pacific oysters(*Crassostrea gigas*)[J]. J Invertebr Pathol, 1979, 33: 71 - 74.
- [5] Elston R A, Wilkinson M T. Pathology, management and diagnosis of oyster velar viruse (OVVD)[J]. Aquaculture, 1985, 48: 189 - 210.
- [6] Oprandy J J, Chang P W, Pronovost A D, et al. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria* [J]. J Invertebr Pathol, 1981, 38: 45 - 51.
- [7] Meyers T R. A reo- like virus isolated from juvenile American oyster(*Crassostrea virginica*)[J]. J Gen Virol, 1979, 43: 203 - 212.
- [8] Norton J H, Shephered M A, Prior H C. Papovavirus-like infection of the golden-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima* from the Torres Strait, Australia[J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 198 - 200.
- [9] Guan H S, Tong S L, Wang W X, et al. Studies on immunity, cell cultivation and disease of marine animals[M]. Jinan: Science and Technology Press of Shandong, 1999. 122 - 129. [管华诗, 董寰亮, 王文兴, 等. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 122 - 129.]
- [10] Wang B, Li X, Gao C Z. Infection of spherical viruses from *haliotics discusshamaei* Ino. Virologica Sinica, 1997, 12(4): 360 - 363. [王斌, 李霞, 高船舶. 皱纹盘鲍一种球形病毒的感染与发生[J]. 中国病毒学报, 1997, 12(4): 360 - 363.]
- [11] Li X, Wang B, Liu S F. The infection to a few kinds of shellfish inshore by a kinds of virus[J]. J Dalian Fish Univ, 2000, 15(2): 86 - 91. [李霞, 王斌, 刘淑范, 等. 一种球状病毒对近海几种贝类的感染[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(2): 86 - 91.]
- [12] Shen M S, Luo X W, Su W J. Finding of virus-like particles in *Sacostrea* sp. J Xiamen Univ(Nature Science), 2000, 39(4): 526 - 529. [沈明山, 罗新文, 苏文金. 存在于牡蛎肝胰腺的病毒样颗粒的发现[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(4): 526 - 529.]
- [13] Ru S G, Li Y Q, Jiang M, et al. Studies on the assembly of baculovirus and forming process of inclusion body in *Peanaus chinensis*[J]. J

Ocean Univ Qingdao, 1996, 26(4): 487 - 493. [汝少国, 李永棋, 姜明, 等. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)杆状病毒的装配和包涵体形成过程研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1996, 26(4): 487 - 493.]

- [14] Wu X Z, Pan J P, Jiang J B. Advances in studies on shellfish disease I. On microbial disease of shellfish[J]. Mar Sci Bull, 1995, 14(2): 82 - 91. [吴信忠, 潘金培, 江静波. 贝类病害学研究进展 I. 贝类微生物病理学研究[J]. 海洋通报, 1995, 14(2): 82 - 90.]
- [15] Ren S L, Wang D X, Song W B. On ultrastructure and cytopathology of the rickettsia-like organisms parasitized in the *Meretrix meretrix* suffering from "red muscle disease"[J]. J Fish China, 2002, 26(1): 79- 84. [任素莲, 王德秀, 宁微波. "红肉病"文蛤中寄生类立克次体的超微结构与细胞病理学[J]. 水产学报, 2002, 26(1): 79- 84.]





图版说明 Explanation of Plate

1. 被病毒感染的上皮细胞, 单箭头示细胞质包涵体; 2. 细胞质内病毒包涵体; 3. 病毒粒子的形态、结构; 4. 病毒包涵体的形态、结构; 5. 包涵体边缘示病毒粒子的形成; 6. “封入体”与次级溶酶体; 7. 正常消化盲囊上皮细胞内的线粒体、内质网、溶酶体; 8. 感染细胞的细胞核, 示核泡; 9. 突向核内部的内质网潴泡;

N: 细胞核; NM: 核膜; NV: 核泡; IB: 包涵体; VS: 病毒发生基质; V: 病毒粒子; DMV: 双层膜泡; SMV: 单层膜泡; L: 溶酶体; SL: 次级溶酶体; M: 线粒体; RER: 粗面内质网; CH: 染色质; CB: 封入体

1. The infected epithelia with virus, single arrow showing inclusion body in the cytoplasm, Bar= 2μm; 2. The cytoplasmic inclusion bodies, Bar= 2μm; 3. The ultrastructure and shape of virion, Bar= 100nm; 4. The structure and shape of viral inclusion bodies, Bar= 1μm; 5. The formation of virus on the periphery of the inclusion body (arrow), Bar= 200nm; 6. The “closed body” and secondary lysosomes, Bar= 1μm; 7. The normal structure of mitochondria, endoplasmic reticulum and lysosome, Bar= 2μm; 8. The nucleus of infected cell showing nuclear vesicle, Bar= 2μm; 9. The endoplasmic reticulum vesicles extended to the inner of nucleus, Bar= 2μm

N: nucleus; NM: nuclear membrane; NV: nuclear vesicle; IB: inclusion body; VS: virogenic stroma; V: virion; DMV: double-membrane vesicle; SMV: single-membrane vesicle; L: lysosome; SL: secondary lysosome; M: mitochondria; RER: rough endoplasmic reticulum; CH: chromatin; CB: closed body