

文章编号: 1000- 0615(2003)05- 0462- 06

## “红肉病”文蛤的组织病理学

任素莲, 张艳艳, 邱红, 宋微波  
(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 山东 266003)

**摘要:** 利用组织学和组织化学方法, 在光镜水平下研究了患“红肉病”文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)的组织病理学变化特征。结果显示, 患病文蛤的病理学变化主要表现为组织结构紊乱, 上皮膨大、脱落, 鳃、外套膜、消化盲囊等组织发现异常结构及寄生物, 如嗜碱性的包涵体、嗜酸性颗粒及寄生性原生动植物等。另外, 组织化学研究结果显示, 病蛤在糖含量、磷酸酶活性等方面也有明显变化, 表现为消化盲囊、肠等部位吸收细胞内糖含量增加。消化盲囊、消化管各处酸性磷酸酶(ACP)活性减弱, 碱性磷酸酶活性(AKP)增强。鳃组织 ACP 活性增强, AKP 活性减弱等。

**关键词:** 文蛤; 红肉病; 组织化学; 组织病理学

中图分类号: S944 文献标识码: A

## On histopathology of the *Meretrix meretrix* Linnaeus suffering from the red muscles disease

REN Su-lian, ZHANG Yan-yan, QIU Hong, SONG Wei-bo

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The histopathology of the *Meretrix meretrix* Linnaeus suffering from red muscles disease was studied by histological and histochemical staining methods. The main characters of diseased clam are that the histological structures were irregularly changed, the epithelial cells swelled and detached. Some abnormal structures were observed in tissues of gills, mantles, digestive diverticulum, etc., e. g. strong basophilic granules, acidophilic granules and protozoan. Histochemical studies, on the other hand, indicate that amount of amylose and activity of phosphatase appear obvious changes, e. g. the content of amylose increases in the absorptive cells of digestive diverticulum and intestine. The activity of alkaline phosphatase (AKP) increases and the acid phosphatase (ACP) decreases in the tissue of digestive diverticulum and digestive tract, while in the gill tissues, the activity of ACP increases and AKP decreases.

**Key words:** *Meretrix meretrix* Linnaeus; red muscles disease(RMD); histochemistry; histopathology

近几年来, 河北秦皇岛地区一些文蛤养殖场养殖文蛤连续发生红肉现象, 严重影响了文蛤的商品价值, 甚至导致部分文蛤死亡。其症状主要表现为摄食率下降, 运动能力迟缓, 软体部为淡红色或桔红色等, 被俗称为“红肉病”。到目前为止, 在患病贝体内已发现类立克次体、病毒等原核生物的寄生

收稿日期: 2002-10-14

资助项目: “长江学者奖励计划”及海水养殖教育部重点实验室开放课题联合资助(贝类病害病理学研究)

作者简介: 任素莲(1964-), 女, 山东寿光人, 副教授, 博士研究生。主要研究方向为水产动物组织病理学与发育生物学。E-mail:

rsren@mail.ouc.edu.cn

与感染<sup>[1-3]</sup>。作为系列研究的一部分,本文报道了患病文蛤组织病理学研究工作的部分结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

患病文蛤 2002 年 5 月 8 日取自河北秦皇岛市抚宁文蛤养殖场。作为病理组织学研究的对照,健康文蛤购于青岛农贸市场,产地为山东莱州。两者壳高均在 2.6~3.0cm 之间。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 形态学观察

活体解剖文蛤,比较观察患病文蛤与健康文蛤的外部形态特征。

#### 1.2.2 组织学切片制备及观察

活体解剖文蛤,分别取患病文蛤与健康文蛤外套膜、鳃、消化盲囊、足、闭壳肌等组织, Bouin 氏液固定,石蜡包埋切片(切片厚度 5 $\mu$ m), H-E 染色, OLYMPUS 显微镜下观察、拍照。

#### 1.2.3 组织化学切片制备及观察

取患病文蛤与健康文蛤外套膜、鳃、消化盲囊、足、闭壳肌等组织,分别用 Bouin 氏液、Carony 氏液及 80% 冷丙酮(4 $^{\circ}$ C)固定,石蜡包埋切片,高碘酸席夫氏(PAS)反应显示多糖类(对照片用醋酸酐-吡啶处理 12h),甲基绿-派洛宁法显示 DNA、RNA, Gomori 钙-钴法显示碱性磷酸酶(对照片去除底物,蒸馏水代替), Gomori 硝酸铅法显示酸性磷酸酶(对照片去除底物,蒸馏水代替)等<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 病理症状

患病文蛤主要表现为运动迟缓,摄食率降低,闭壳肌开合无力。贝壳外表面手感粗糙,部分发生凹陷现象。软体部为淡红色,严重者呈桔红色,表面粘液增多。消化盲囊、外套膜、性腺等有不同程度的萎缩,鳃轻度糜烂,肠肿胀及粘连等。

### 2.2 组织学研究

与健康文蛤比较,患病文蛤消化盲囊、鳃、外套膜、性腺等器官组织都表现出明显的病理学变化。

#### 2.2.1 消化盲囊

消化盲囊由腺泡与导管组成。健康文蛤腺上皮排列整齐,分泌细胞(嗜碱性细胞)与吸收细胞(嗜酸性细胞)形态清晰,界限分明,腺腔内无异物(图版-1);患病文蛤腺上皮排列紊乱,细胞呈水肿状,嗜碱性增强,核萎缩或膨胀;部分细胞脱落到腺腔内,严重者溃散溶解(图版-2)。腺上皮、腺导管及结缔组织细胞质内发现许多圆形、椭圆形强嗜碱性颗粒,直径约 8~13 $\mu$ m(图版-2,3,箭头)。该颗粒 PAS 反应阴性,甲基绿-派洛宁染色呈紫红色,证明其含有丰富的 RNA。

#### 2.2.2 鳃

健康文蛤鳃丝排列整齐,鳃腔内无异物(图版-4)。患病文蛤鳃丝排列紊乱,上皮细胞变形、脱落(图版-5,EP)。上皮结缔组织细胞质内发现含有大量浅褐色不规则颗粒,大小不一(图版-5,6,箭头)。含有此种颗粒的细胞核通常不规则、深染并挤向边缘(图版-6,N)。该物质 PAS 反应呈玫瑰红色,甲基绿-派洛宁染色为阴性,仍呈淡褐色,具有弱 ACP 酶活性。在患病文蛤外套膜、消化盲囊、消化道等组织细胞内亦发现少量此种颗粒。

鳃组织内发现大量原生动植物,大部分存在于鳃腔内,通常 4~5 个聚集在一起,切面为圆形或椭圆形,径约 24 $\mu$ m $\times$ 34 $\mu$ m~40 $\mu$ m $\times$ 56 $\mu$ m,外周缘呈锯齿状,核为马蹄形(图版-7,箭头),少部分外周缘已

与近腔端鳃上皮愈合,开始破坏上皮组织。鳃丝近腔端上皮组织内有大量强嗜碱性团块状增生物(图版-8,箭头),PAS反应较弱,甲基绿-派洛宁染色呈紫红色,证明其含有丰富的RNA及少量多糖。

### 2.2.3 外套膜

外套膜由上皮细胞、结缔组织及肌纤维组成。健康文蛤上皮细胞排列整齐,粘液细胞弱嗜碱性(图版-9)。患病文蛤上皮排列紊乱,粘液细胞增多、嗜碱性增强(图版-10),结缔组织细胞质中含有大量嗜酸性颗粒,圆形,大小不一,最大直径约 $9\mu\text{m}$ (图版-10,11,箭头),PAS反应呈紫红色。在H-E染色中少部分颗粒呈现出既嗜酸性又嗜碱性的双重染色特征。

### 2.2.4 性腺

文蛤性腺由大量生殖滤泡组成。健康文蛤生殖滤泡呈囊状,内部充满了不同发育期的卵母细胞(图版-12,GG);患病文蛤生殖腺萎缩,滤泡不规则,生殖细胞退化(图版-13,GG)。

### 2.2.5 肠

健康文蛤肠组织由规则排列的纤毛柱状上皮、肌肉层及结缔组织组成(图版-14)。患病文蛤肠上皮肿胀,纤毛脱落,肌肉紊乱,结缔组织增生等;严重者肠上皮出现大面积的脱落溃散现象(图版-15,EP)。

### 2.2.6 足及闭壳肌等

足由柱状上皮细胞、肌纤维及粘液细胞组成。健康文蛤上皮排列整齐,肌纤维排列紧密而规则(图版-16);患病文蛤上皮排列紊乱,粘液细胞增多,肌纤维溶解(图版-17)。与健康文蛤比较,患病文蛤闭壳肌肌组织排列疏松、结缔组织增生等。

## 2.3 组织化学研究

患病文蛤组织化学变化也十分明显,主要表现在糖含量及酶活性等方面。患病文蛤消化盲囊吸收细胞、肠、外套膜各处PAS反应较健康文蛤明显,表明患病文蛤这些部位的糖类含量增多(图版-18,19,箭头);消化盲囊、消化道各处酸性磷酸酶(ACP)活性减弱(图版-20,21,箭头),碱性磷酸酶活性(AKP)增强(图版-22,23,箭头);外套膜、足粘液细胞具有强ACP活性。鳃组织ACP活性增强,AKP活性较弱。另外,甲基绿-派洛宁染色法显示,在患病文蛤消化盲囊、鳃、外套膜等组织中发现一些紫红色块状颗粒,表明这些部位存在一些RNA增生物(图版-24,箭头)。

## 3 讨论

与健康文蛤相比较,患病文蛤鳃上皮结缔组织内发现大量大小不一、形态不规则的淡褐色(H-E染色)块状颗粒。此种颗粒在消化盲囊、外套膜等组织中也有少量存在。王文兴等<sup>[5]</sup>在海湾扇贝消化盲囊上皮细胞中报道过一种淡褐色(H-E染色)颗粒,认为是衣原体样原核生物形成的包涵体。本观察结果显示,存在于患病文蛤中的淡褐色颗粒在甲基绿-派洛宁显色反应中为阴性(仍呈淡褐色),PAS反应则呈玫瑰红色并具有弱ACP活性,表明该颗粒的主要成分为多糖类。因此,作者认为,患病文蛤中的淡褐色颗粒可能不属于衣原体等原核生物一类,相关研究正在进行中。

与上述鳃上皮结缔组织内所见颗粒不同,患病文蛤消化盲囊腺泡及导管上皮细胞中另发现有许多圆形或椭圆形强嗜碱性颗粒。其形态、大小等符合类立克次体包涵体的特征<sup>[1,6-9]</sup>。因此该颗粒可能为类立克次体包涵体。而发现于外套膜结缔组织细胞中的嗜酸性颗粒主要成分为糖类(PAS反应阳性),其性质尚不清楚。

在部分患病文蛤鳃切片中同时发现大量车轮虫样原生动(隶属纤毛门缘毛目)<sup>[10]</sup>,主要存在于鳃腔内,少量有侵染组织细胞的现象,估计该纤毛虫虽然对鳃组织有一定破坏作用,但仅发现于少部分患病个体的鳃组织中,因此该纤毛虫与文蛤“红肉病”无关。

ACP与AKP是动物体内两种重要的水解酶。ACP是溶酶体的标志酶,与细胞内消化有关<sup>[11]</sup>,而AKP则参与物质的转运,与跨膜运输有关<sup>[12]</sup>。酶活性的异常改变,是组织病理变化的特征之一<sup>[13]</sup>。

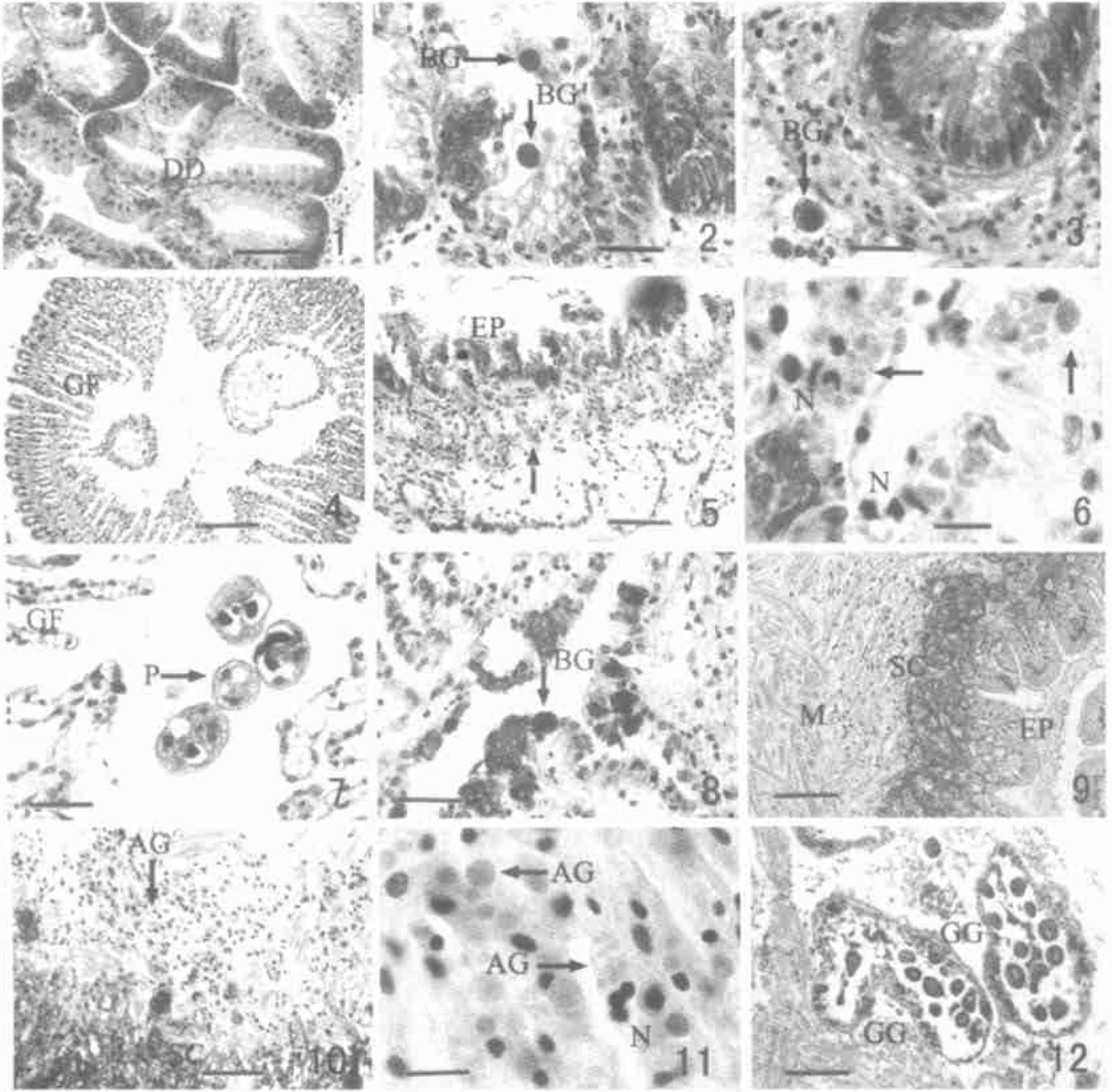
患病文蛤在消化盲囊吸收细胞、小肠上皮等部位 ACP 活性明显减弱,而 AKP 活性增加。因此,患病文蛤可能出现消化机能降低且代谢机能紊乱的现象,最终可能导致病贝各组织器官的广泛受损。另外,在鳃、外套膜、足等部位粘液细胞中也检测到较强的 ACP 酶活性,有文献报道,这可能与病贝自身的防护免疫作用有关<sup>[14]</sup>。

文蛤“红肉病”通常初发于 3~4 龄贝,发病时间多为高温季节(7~9 月)<sup>[11]</sup>,本工作涉及到的病贝为 1~2 龄且发病时间为 5 月份。此点显示,该病有发病时间提前的趋势。电镜观察“红肉病”文蛤中感染有类立克次体及病毒<sup>[1-3]</sup>。根据目前的资料可以初步判断,类立克次体及病毒是导致养殖文蛤发生“红肉病”的主要病原体。

水产养殖基础实验室绳秀珍老师、原生动物研究室马洪刚老师在实验过程中给予一定帮助,在此致以衷心感谢!

### 参考文献:

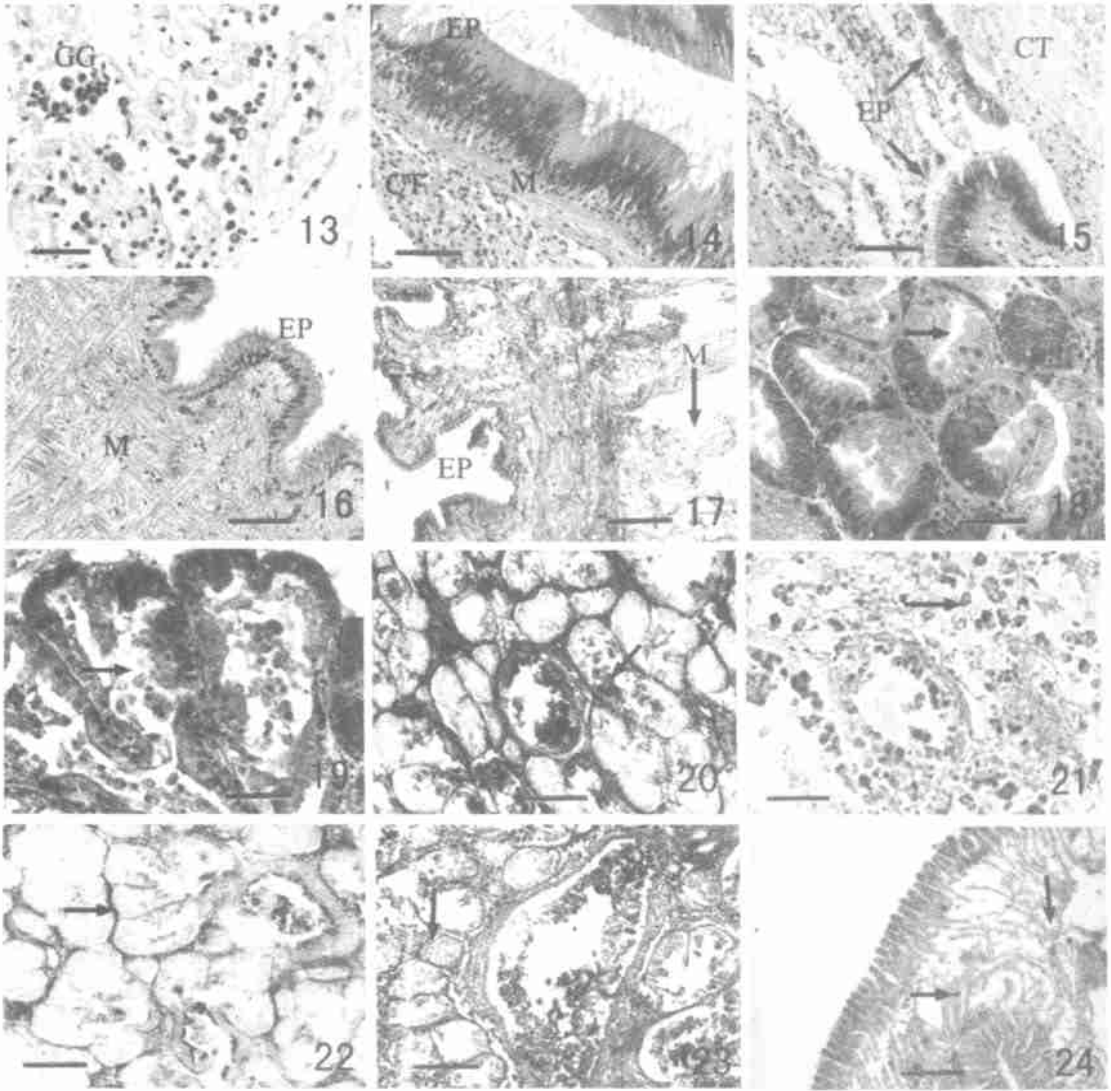
- [ 1 ] Ren S L, Wang D X, Song W B. On ultrastructure and cytopathology of the Rickettsia-like organisms parasitized in the *Meretrix meretrix* Linnaeus suffering from “red muscle disease” [J]. J Fish China, 2002, 26(1): 79 - 82. [任素莲, 王德秀, 宋微波. “红肉病”文蛤中寄生类立克次体的超微结构与细胞病理学[J]. 水产学报, 2002, 26(1): 79- 82.]
- [ 2 ] Ren S L, Wang D X, Song W B, et al. Cytopathology and morphogenesis of a spherical virus found in the *Meretrix meretrix* Linnaeus suffering from “red muscle disease” (RMD) [J]. J Fish China, 2002, 26(3): 265 - 269. [任素莲, 王德秀, 宋微波, 等. “红肉病”文蛤一种球形病毒的形态发生与细胞病理学[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 265- 269.]
- [ 3 ] Ren S L, Sheng X Z, Song W B, et al. Three virus-like particles found in the “red muscle disease” (RMD) of the marine mollusc, *Meretrix meretrix* Linnaeus [J]. J Ocean Univ Qingdao, 2002, 32(4): 557 - 561. [任素莲, 绳秀珍, 宋微波, 等. “红肉病”文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 中发现的 3 种病毒样颗粒[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(4): 557- 561.]
- [ 4 ] Rui N S, Du M Q, Chen H M, et al. Tissue techniques [M]. Beijing: Higher Education Press, 1980. 225- 274. [芮菊生, 杜懋琴, 陈海明, 等. 组织切片技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1980. 225- 274.]
- [ 5 ] Wang W X, Luo W T. Pathological research on Chlamydia-like organisms in the hepatopancreatic gland of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) [J]. Mari Sci, 1998, 3: 23- 25. [王文兴, 罗万涛. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究[J]. 海洋科学, 1998, 3: 23- 25.]
- [ 6 ] Wu X Z, Pan J P. Studies on the Rickettsia-like organism disease of tropical marine pearl oyster—the morphogenesis and ultrastructure of RLO inclusion, an agent for *Pinctada maxima* [J]. Oceanol et Limnol, 1999, 30(1): 73- 80. [吴信忠, 潘金培. 热带海洋珍珠贝类立克次体病的研究——大珠母贝病原类立克次体体包涵体的组织学及超微结构研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 73- 80.]
- [ 7 ] Wu X Z, Pan J P. Studies on the Rickettsia-like organism diseases of tropical marine pearl oyster, *Pinctada maxima* and *P. fucata* IV. on histopathology of RLO disease [J]. Acta Oceanol Sini, 1999, 21(2): 93- 98. [吴信忠, 潘金培. 热带海洋珍珠贝类立克次体病的研究 IV. 组织细胞病理学研究[J]. 海洋学报, 1999, 21(2): 93- 98.]
- [ 8 ] Wen C M, Kou G H, Chen S N. Rickettsiaceae-like microorganisms in the gill and digestive gland of the hard clam, *Meretrix lusoria* rooding [J]. J Invertebr Pathol, 1994, 64: 138- 142.
- [ 9 ] Morrison C, Shum G. Rickettsias in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) [J]. J Fish Dis, 1983, 6: 537- 541.
- [ 10 ] Song W B. Progress in protozoology [M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1999. 211- 268. [宋微波. 原生动物学专论[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999. 211- 268.]
- [ 11 ] Zhai Z H, Ding M X. The cell biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1995. 47- 49. [翟中和, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 47- 49.]
- [ 12 ] Babula A, Skowron D. Histological and histochemical studies of the digestive of the slug *Deroceras reticulatus* [J]. Sci Biolog, 1985, 26: 65- 71.
- [ 13 ] Shao J Z, Xiang L X, Li Y N, et al. Histopathological studies on the plague disease of *Hyriopsis aumingii* Lea [J]. J Fish China, 1995, 19(1): 1- 7. [邵健忠, 项黎新, 李亚南, 等. 三角帆蚌瘟病的组织病理学研究[J]. 水产学报, 1995, 19(1): 1- 7.]
- [ 14 ] Sun H S, Li G Y. The activities and their electron microscopic cytochemistry study of AKP and ACP in haemolymph of *Chlamys farreri* [J]. J Fish Sci China, 1999, 6(4): 6- 9. [孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中 ACP 和 AKP 活性及其电镜细胞化学研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 6- 9.]



### 图版说明 Explanation of Plate

1. 健康文蛤消化盲囊的结构; 2. 患病文蛤消化盲囊结构, 箭头示嗜碱性包涵体; 3. 腺上皮细胞质内的嗜碱性颗粒; 4. 健康文蛤鳃组织的结构; 5. 患病文蛤鳃组织结构, 箭头示结缔组织中的异常结构; 6. 放大的异常结构; 7. 患病文蛤鳃腔中的纤毛虫; 8. 患病文蛤鳃上皮中的嗜碱性颗粒; 9. 健康文蛤外套膜组织; 10. 患病文蛤外套膜, 箭头示结缔组织细胞中的嗜酸性颗粒; 11. 嗜酸性颗粒放大图; 12. 健康文蛤性腺

1. The structure of digestive diverticulum of the normal clam. Bar= 50 $\mu$ m; 2. The structure of digestive diverticulum of diseased clam, arrows indicate the basophilic inclusion bodies. Bar= 25 $\mu$ m; 3. The basophilic granules in the cell of digestive diverticulum. Bar= 25 $\mu$ m; 4. The structure of gill of normal clam. Bar= 100 $\mu$ m; 5. The gill of diseased clam, arrow indicated the abnormal structure in the connective tissue. Bar= 50 $\mu$ m; 6. The magnified image of the abnormal structure. Bar= 10 $\mu$ m; 7. The protozoa in the gill's cavity of diseased clam. Bar= 25 $\mu$ m; 8. To show the basophilic granules appeared in the gill of diseased clam. Bar= 25 $\mu$ m; 9. The mantle tissue of normal clam. Bar= 50 $\mu$ m; 10. The mantle structure of diseased clam, arrow indicated the acidophilic granules in the cell of connective tissue. Bar= 100 $\mu$ m; 11. To show the magnified image of the acidophilic granules. Bar= 10 $\mu$ m; 12. The sexual gland of normal clam. Bar= 100 $\mu$ m



### 图版说明 Explanation of Plate

13. 患病文蛤退化的性腺; 14. 健康文蛤肠结构; 15. 患病文蛤肠结构; 16. 健康文蛤足结构; 17. 患病文蛤足结构; 18. 健康文蛤消化盲囊的 PAS 反应; 19. 患病文蛤消化盲囊的 PAS 反应; 20. 健康文蛤消化盲囊的酸性磷酸酶活性; 21. 患病文蛤消化盲囊的酸性磷酸酶活性; 22. 健康文蛤消化盲囊的碱性磷酸酶活性; 23. 患病文蛤消化盲囊的碱性磷酸酶活性; 24. 患病文蛤鳃组织中的 RNA 增生物

13. The degenerated sexual gland of the diseased clam. Bar= 25 $\mu$ m; 14. Structure of intestine of normal clam. Bar= 50 $\mu$ m; 15. Structure of intestine of diseased clam. Bar= 50 $\mu$ m; 16. The foot structure of normal clam. Bar= 50 $\mu$ m; 17. The foot structure of diseased clam. Bar= 100 $\mu$ m; 18. The reaction of PAS in the digestive diverticulum of normal clam. Bar= 25 $\mu$ m; 19. The reaction of PAS in the digestive diverticulum of diseased clam. Bar= 25 $\mu$ m; 20. The ACP activity in the digestive diverticulum of normal clam. Bar= 100 $\mu$ m; 21. The ACP activity in the digestive diverticulum of diseased clam. Bar= 25 $\mu$ m; 22. The ACP activity in the digestive diverticulum of normal clam. Bar= 100 $\mu$ m; 23. The AKP activity in the digestive diverticulum of diseased clam. Bar= 100 $\mu$ m; 24. The RNA hyperplasia in the gill tissue. Bar= 50 $\mu$ m

AG: 嗜酸性颗粒(acidophilic granule); BG: 嗜碱性颗粒(basophilic granule); CT: 结缔组织(connective tissue); DD: 消化盲囊(digestive diverticula); EP: 上皮细胞(epithelia); GG: 生殖腺(germinal gland); GF: 鳃丝(gill filament); MS: 肌肉(muscle); N: 核(nucleus); P: 原生动物(Protozoa); SC: 粘液细胞(mucous cell)