

云纹石斑鱼淋巴囊肿病病变过程的超微研究*

张永嘉 郭青 吴泽阳

(湛江水产学院养殖系, 湛江 524025)

提要 于1989—1990年, 对海水网箱养殖的云纹石斑鱼自然感染和人工感染的淋巴囊肿病进行电镜观察。观察结果表明, 自然感染和人工感染的淋巴囊肿细胞之间并无区别, 它们均含有许多包涵体和病毒颗粒; 主要描述用患淋巴囊肿病病鱼的皮肤结节匀浆对实验鱼作皮下注射而感染的淋巴囊肿病的超微病理过程, 包括病毒颗粒在成纤维细胞胞膜上的附着和成纤维细胞及其内含物的形态变化等过程; 此外, 病鱼心脏、肝脏、脾脏、肾脏和肠上皮也有不同程度的病理变化。

关键词 云纹石斑鱼 淋巴囊肿病 超微病理

鱼淋巴囊肿病是由虹色病毒科(Iridoviridae), 胞病毒属(*Cystivirus*)的种类感染而致的一种传染病。该病发病快、流行广。国外曾报告包括海水、淡水和半咸淡水在内的9科42目125种鱼类患罹淋巴囊肿病。国内已在云纹石斑鱼、紫红笛鲷等海水网箱养殖鱼类发现该病(张永嘉等, 1992)。目前有关该病的研究多集中于病毒的形态、分类及各种鱼感染发病情况的报道(Chao, 1988; Papena et al. 1987; Yamamoto et al., 1985; Roberts, 1982), 至于该病对各器官、细胞的病变过程的研究并不多见。本研究对人工感染后发病的云纹石斑鱼各阶段的组织、细胞作超微病理观察, 以期提示淋巴囊肿病在亚细胞水平上的发生和发展过程。

1 材料和方法

1.1 实验鱼及人工感染

本研究所用的自然发病的云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)采自广东省华南养殖场, 用作对照及人工感染的健康鱼来自湛江市特呈岛养鱼场, 人工感染实验于1989年10月20日—1990年7月20日在特呈岛养鱼场完成。人工感染前, 先从自然发病鱼体表切取黑色结节制备匀浆, 加入生理盐水使成20%的悬浮液(pH=7.2), 置冰壶内备用。供人工感染用鱼共10尾, 平均体长为13cm, 平均体重为32g, 每尾鱼注射上述悬浮液的量为0.5ml, 在背鳍基部作皮下注射完毕即放于专用网箱内养殖观察疾病发生过程, 并定期取样作研究用。用作对照的健康鱼养于另一网箱。

1.2 电镜材料制备

* 广东省科委资助项目, 2161号。张永嘉, 男, 出生于1956年5月, 副教授。

收稿日期: 1995年3月15日, 接受日期: 1997年3月14日。

于注射后第 1, 3, 7, 14, 21d 和第 1, 2, 5 个月时分别去头杀死 1 尾实验鱼作研究用。从注射部位以及心、肝、脾、肾和肠切取小块组织, 固定于 2.5% 戊二醛与预冷磷酸缓冲液配成的固定液内并保存在冰壶内。次日再用 1% 缓冲锇酸重固定 1h, 然后经酒精逐级脱水, 环氧树脂 618 浸透、包埋, 用 LKB-V 超薄切片机切成 60—70nm 厚的超薄片。切片用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, 在 JEM 100-CX 11 透射电镜观察并拍照(工作电压为 80kV)。

2 结果

2.1 病鱼发病情况

人工感染注射后 7d, 在实验鱼体表未发现肉眼可见的结节状病灶。在注射后第 8—20 天陆续可见注射部位附近或鳍条上有针孔大黑点, 此后黑点逐步扩大成特征性的结节状病灶。病灶在体表凸起, 在 1—2 个月时, 病灶中央出现白色粟状颗粒, 并有破溃现象。这些粟状颗粒即是巨型的淋巴囊肿细胞, 最大者直径达 500 μ m。5 个月后虽有结节自动脱落, 但疾病无痊愈迹象。

2.2 电镜观察结果

在电镜下观察比较发现: 自然发病与人工感染发病的样本结构完全一致, 以下主要是人工感染病鱼有关器官和组织的电镜观察结果。

2.2.1 淋巴囊肿细胞 细胞核呈空泡状, 核膜明显; 核膜上没有异染色质附着; 异染色质呈浓缩块状, 分布于核内各处; 常染色质遍布核质; 核仁为疏松的椭圆形或不规则形(图版 I: 1)。

胞质内可见大量的包涵体和病毒颗粒, 包涵体由电子致密颗粒聚集而成, 颗粒相连形成许多形状、大小不同的网眼, 其中含有数量不等的病毒颗粒或一些中等电子致密的粗颗粒; 病毒颗粒大多分布在包涵体外, 但在远离胞核的胞质中, 病毒颗粒逐渐减少; 病毒颗粒外包囊膜, 囊膜厚约 50—75nm。胞质内还可见一些崩坏的线粒体和内质网(图版 I: 2)。

淋巴囊肿细胞最外缘为透明囊壁。在电镜下可见, 内层为电子透明均质层, 其中很少甚至没有病毒颗粒; 外层具有许多胶原纤维和少量成纤维细胞, 内外层之间有胞膜为界(图版 I: 3)。

2.2.2 皮肤 表皮细胞具有形状不甚规则的核, 染色质边集于核膜内层, 形成较大的高电子密度的染色质团块。胞质内有较丰富的核蛋白体和相当数量的微丝形成的张力纤维束; 在靠近细胞膜处的胞质, 常常可见许多微管, 有些整齐地排在膜内侧; 微管直径为 25nm, 壁厚 5nm, 细胞间有较大空隙(图版 I: 4)。

真皮层中的成纤维细胞呈长梭状, 核大且有较多的异染色质; 内质网丰富, 常扩张成囊泡状, 胞质内有成束的微丝束; 细胞膜上可见病毒颗粒附着, 附着点的胞膜电子密度较大(图版 I: 5)。有时还可见成纤维细胞核的异染色质呈海绵状分布, 异常发达, 胞质一端的内质网聚集呈靶环状。有些成纤维细胞变圆并肿大, 胞核也相应变圆变大, 但核质比仍较小, 胞核具有丰富的异染色质, 也呈疏松的海绵状分布; 胞质形成明显的核周区和外周区, 两区之间有张力原纤维连合形成的分界线。核周区含有许多微管状结构, 并有少量的线粒体和膨大的内质网, 内质网形成连通的管环绕在核外; 外周区含有

较多的线粒体和形成张力原纤维的微丝, 还有相当数量的微管和胶原纤维。在胞质内尚未发现有病毒颗粒或包涵体存在; 胞膜肿胀, 厚 $20\mu\text{m}$ 左右(图版 I: 6)。

在靠近囊肿细胞附近可看到许多巨噬细胞和淋巴细胞, 巨噬细胞有丰富的线粒体和溶酶体, 有些溶酶体显示出棒状结构, 还可见到巨噬细胞的突起与淋巴细胞的突起接触, 发生膜融合和物质交换的现象(图版 I: 7)。

2.2.3 心脏 在光镜下, 淋巴囊肿病病鱼的心脏显示出心肌炎病变。在电镜下, 心肌纤维结构紊乱, 线粒体空泡化, 肌质网扩张(图版 II: 1)。

2.2.4 肝脏 在人工感染病毒 48h 的病鱼的肝细胞内, 可见滑面内质网囊泡增加, 并含有中等电子密度的内含物和病毒样结构。线粒体巨型化, 并有嵴损坏和丧失的现象; 粗面内质网呈指纹状排列, 环绕在线粒体四周(图版 II: 2); 细胞核的核膜有轻微肿胀, 核孔明显, 核周隙扩张; 核内异染色质异常丰富并浓缩成团, 分布于核内各处; 常染色质呈伸展状, 可见到染色质间颗粒出现(图版 II: 3)。肝内有许多浆细胞浸润, 浆细胞核中的异染色质浓缩成致密团块偏于一旁; 核膜上的核孔扩张, 大部分核膜的核内膜与核外膜完全分离, 形成囊状扩张的核周隙, 囊内有中等电子密度的疏松物质; 胞质内的粗面内质网十分发达, 成为宽大的圆泡状网池, 池内含有中等电子密度的物质, 网池外侧附有许多核蛋白体(图版 II: 4)。

自然发病的鱼其肝细胞内糖原极少, 胞质内基质大量溶解。线粒体失去部分嵴并有粗面内质网围绕其外, 滑面内质网极少见(图版 II: 5)。枯否氏细胞的核膜稍有肿胀, 核孔明显扩张, 异染色质丰富, 有明显的核仁; 胞质内基质溶解, 线粒体的嵴崩解(图版 II: 6)。在病鱼的肝内还可看到较多的游离的小淋巴细胞和巨噬细胞, 这些细胞均伸出突起; 在两类细胞的突起相互接触处, 失去细胞膜, 并有颗粒状物质来往于该处(图版 II: 7)。

2.2.5 脾脏 脾脏内可见许多的淋巴细胞和巨噬细胞。淋巴细胞在不同发生时期形态不同, 成熟的淋巴细胞的直径约在 $5.2\mu\text{m}$, 具有近圆形的核, 核内有浓缩的异染色质团块; 胞核外有一圈清亮的胞质, 内含许多中等电子密度的小颗粒和少量的细胞器。巨噬细胞在脾内很普遍, 其胞核有浓密的异染色质附于核膜上, 胞质内有大小不一的各种溶酶体和吞噬体, 还有形成囊泡的高尔基体和少量的线粒体、内质网(图版 III: 1)。

2.2.6 肾脏 肾小管上皮的游离端微绒毛紊乱、脱落。胞质内有许多溶酶体和线粒体, 线粒体含有较大电子密度的基质; 位于上皮细胞基底端的线粒体, 其周围有粗面内质网包绕; 胞质内还有一些大小不一的滑面内质网囊泡和多泡体(图版 III: 2)。

肾间组织的细胞主要是淋巴样细胞和其它各发生时期的血细胞。淋巴细胞和多形核细胞大量增生, 多形核细胞具有致密的染色质团块, 胞质有许多突起, 内有细密电子致密颗粒和少量线粒体; 淋巴细胞具有深陷的胞核, 染色质浓密, 外有一圈胞质, 胞质内细胞器极少, 也极少伸出突起(图版 III: 3)。

2.2.7 肠 仅个别肠上皮细胞出现坏死现象。坏死的细胞微绒毛长短、形态和方向不规整; 有一层细胞外衣, 近腔面细胞顶上有电子致密小体和排列成层的张力原纤维; 胞质内充满了形态、大小不一的有膜包围的类似多泡体的小体。有些小体含有大小比较一致的髓样结构的颗粒; 有些则含有中等电子密度基质和一些有膜的空泡; 还有一些是电

子透明物质的小体,这类小体更像是细胞基质溶解后留下的空腔。(图版 III:4)

3 讨论与结语

3.1 病毒对易感(靶)细胞的损伤

本研究表明,淋巴囊肿细胞的形成与成纤维细胞被病毒侵袭有关。在电镜下,可看到病毒颗粒附着在有胞膜受体的成纤维细胞膜上,该病毒似乎已脱去囊膜,正以融入的方式进入宿主细胞。病毒基因以细胞内非整合形式或染色体整合的形式存在一段时间,这时的细胞即会出现核异染色质浓缩,常染色质伸展,核仁结构异常,内质网靶环状变化,细胞质分层,张力原纤维分布异常,胞膜增厚,细胞变圆变大等一系列变化。这些变化类似于细胞瘤变时产生的特征性变化,故该病毒对易感细胞的损伤很可能是由于病毒干扰细胞 DNA, RNA 代谢,造成遗传失控所致。成纤维细胞变圆变大后不久即有成熟的病毒颗粒出现,还可见细胞器崩解坏死,内质网异常膨大等。胞膜的囊壁化可能有阻止其它病毒再进入该细胞的作用,而成熟的淋巴囊肿细胞则可通过胞膜囊壁将病毒颗粒向体外及体内真皮层释放,感染自身的其它成纤维细胞及其它鱼类。当鱼体表大量出现淋巴囊肿细胞时,会影响鱼食欲和运动,淋巴囊肿细胞中的病毒颗粒向体外释放时,还可造成体表开放性溃疡。

3.2 病毒对非易感细胞的损伤和病鱼的死亡

本研究表明,在心、肝、脾、肾这些器官尚未发现囊肿细胞及病毒颗粒,但病毒基因组可在染色体里以整合的形式或在细胞里以非整合的形式存在及传递的过程中损伤这些非易感细胞,引起不同程度的病变。例如,在电镜下,心肌线粒体空泡化,肌质网扩张;肝、肾细胞均表现出线粒体巨型化,嵴损坏消失,内质网大量增加、结构异常;肝细胞核染色质异常浓缩和染色质间颗粒出现,核膜扩张,核孔变化异常等现象。这与国外报道淋巴囊肿病毒侵袭鱼体表、肠壁、肝、脾等内脏器官均可形成特征性的囊肿细胞(Roberts, 1982)的结果近似。

在心脏、肝脏、肾脏这些主要器官所表现出来的病变,能导致云纹石斑鱼苗种的死亡,这与光镜的研究结果是一致的(张永嘉, 1992)。

参 考 文 献

- 张永嘉, 1992, 海洋学报, 14(6):97—106。
张永嘉、吴泽阳, 1992, 湛江水产学院学报, 12(2):7—15。
Chao, T. M., 1988, *J. Pri. Ind.*, 16(1):86—90。
Paperna, I. et al., 1987, *J. Fish Diseases*, 10:433—437。
Roberts, R. J., 1982, *Microbial Diseases of Fish: Virus Diseases of Warm Water Fish (C. Agius)*, Academic Press (London), pp.120—121。
Yamamoto, T. et al., 1985, *Fish Pathology*, 29:361—372。

ULTRASTRUCTURAL HISTOPATHOLOGICAL STUDY
ON LYMPHOCYSTIS OF KELP BASS,
EPINETHELUS MOARA

Zhang Yongjia, Guo Qing, Wu Zeyang

(Department of Aquaculture, Zhanjiang Fisheries College, Zhanjiang 524025)

Abstract Lymphocystis is an infectious viral disease found worldwide in wild and cultured marine, brackish and freshwater fishes. After infection of test kelp bass by subcutaneous injection with skin nodule homogenate of spontaneously infected lymphocystis disease of kelp bass (*Epinethelus moara*) cultured in marine net cages in Guangdong, from 1990 to 1992, the histopathological changes were studied under electron microscope. The results were as follow:

The ultrastructural histopathological changes of experimentally infected kelp bass were the same as those of spontaneously infected lymphocystis. In the cytoplasm of the cells of skin nodules, lymphocystis cells, there were numerous inclusions that distributed in the form of network of inclusions showing condensed electron dense and coarse granular appearance. The inside and outside of the meshes were closely packed with virus particles. The virus particle attached at first to the surface of the fibroblast cells in the derma, then entered the cells, changed the cells morphology and structure, finally formed the lymphocystis cells. Rupture of the lymphocystis cells on the body surface caused large open ulcerating wound.

Although lymphocystis cells and virus particles were not discovered in the liver, spleen, kidney, heart and intestine of the diseased fish, the ultramicroscopic cell structures of those organs changed in various degrees, i.e. mitochondria had disordered cristae, abundant, endoplasmic reticula enlarged and developed into vesicae, which demonstrated that their function had already been seriously impaired and abnormal fish metabolism could result in final death of the diseased kelp bass.

Key words *Epinethelus moara* Lymphocystis Ultrastructural histopathology