

# 草鱼出血病两种病原病毒的 细胞病理学观察

毛树坚 杭 绮 陈汉民

(杭州大学生物研究所)

张念慈 杨广智

(浙江省淡水水产研究所, 湖州市)

**提要** 用电子显微镜观察草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.) 出血病的病理切片, 在病变细胞中发现有两种病毒颗粒, 一种是呼肠孤病毒, 以前已有报道; 另一种为直径仅 20—30nm 的小病毒颗粒, 系首次在鱼类细胞中发现。两种病毒主要侵染病鱼血管及微血管内皮细胞。内皮细胞受损而至解体, 红细胞弥散细胞间隙, 导致出血症状。此外还侵染肾上皮细胞、肾间质细胞、肠上皮细胞以及脾网状细胞、嗜酸性白细胞等。根据小病毒颗粒的形态及核酸分析, 拟初步鉴别为小 RNA 病毒科病毒。

草鱼出血病 (Hemorrhage of Grass Carp) 是危害草鱼养殖最为严重的一种鱼病, 常造成当年稚鱼 (生产上称“夏花”) 和 1 足龄幼鱼的大量死亡, 死亡率一般在 50—70%, 个别病情严重的鱼池可高达 90% 以上。在 1978—1980 年间, 认为鱼病是由疱疹病毒引起的<sup>[1,2]</sup>, 以后陈燕燊等分离出一种病原病毒, 定名为草鱼呼肠孤病毒 (*Reovirus of Grass Carp*)<sup>[3]</sup>。对草鱼出血病病原病毒所致细胞病变效应的研究, 目前仅见光学显微镜的组织病理观察报告<sup>[4]</sup>。

作者等在对草鱼出血病病理切片的电镜观察中发现病变细胞中有两种病毒颗粒, 经过对病毒的分离提纯, 确实获得两种病原病毒。一种是呼肠孤病毒 (*Reovirus*); 另一种拟初步鉴别为小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) 病毒。本文着重报告两种病毒的细胞病理学。

## 一、材料与方 法

### 1. 试验鱼

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.) 由浙江省淡水水产研究所、杭州市水产研究所提供, 是池塘养殖的当年或隔年 1 足龄的草鱼, 长约 6—8cm 或 10—13cm。自养殖池捕出健康鱼暂养在水泥池内 (一周以上), 备用。

### 2. 人工感染病毒

(1) 病毒液制备: 取有草鱼出血病典型症状的濒死病鱼脏器 (肝、肾、脾、肠), 捣成匀浆, 加入 10 倍量鱼用生理盐水, 过滤, 即为病毒液。

(2) 试验鱼任意分成两组,一为人工感染病毒组,一为对照组。感染病毒组每尾以 0.5ml 病毒液注射于其腹腔;对照组每尾以 0.5ml 生理盐水同样作腹腔注射。

(3) 人工感染病毒组与对照组鱼分别饲养于水温为 25—30℃ 水泥池,投以青草饲料。

(4) 感染病毒鱼一般在 5 天后陆续出现出血病症状。对照鱼在同样条件下不发病。

分别取对照组与病鱼的肾、脾、肝、血管、肌肉、肠道等组织作超薄切片。以 2.5% 戊二醛液固定 5 小时,1% 锇酸重固定 1 小时,以 Epon 812 包埋, LKB-V 型切片机切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色后 H-300 H-600 电子显微镜观察。

## 二、观察结果

### 1. 肾

(1) 在肾脏上皮细胞中有两种病毒颗粒:一种大病毒颗粒,直径 80—100nm,分散在细胞质中或被包围在囊泡中(图版 I:1)。宿主细胞内结构紊乱,线粒体变态,嵴的排列乱或肿胀,内质网不规则。另一种小病毒颗粒,直径 20—30nm,分散于细胞质中,也有的密集成一定区域(图版 I:2)。宿主细胞的线粒体常损伤成空泡,内质网肿胀。在细胞中看到类似内质网的膜上有比病毒颗粒稍小的非核糖体颗粒物质,在其周围的细胞质中分散着病毒颗粒,这些图象表明病毒颗粒从膜上合成,然后走向细胞质中完成病毒颗粒的装配。作者等应用 [<sup>3</sup>H]-Urd 放射自显影术的另一研究中,证实在该处有病毒 RNA 的合成,细节将另文报道。

(2) 在血管与微血管的内皮细胞中见到大病毒颗粒,直径 80—100nm,受感染细胞内结构受损破坏,有的正在解体。病毒的双层衣壳清晰可见(图版 I:3)。

(3) 肾间质中可见到大病毒和小病毒颗粒,同时也见到大量破碎的细胞和红细胞。

### 2. 脾

(1) 脾中见到各种白细胞、红细胞及网状细胞。红细胞中不见任何病毒颗粒。嗜酸性白细胞中有小病毒颗粒,密集成堆,数量甚多,在 100KX 放大下可见六角形图象,中心有致密部分(图版 I:4)。被病毒侵染的白细胞结构受损,产生空泡,也见到不少解体的嗜酸性白细胞,病毒随细胞解体而弥散(图版 I:5)。

(2) 网状细胞具吞噬能力,病毒在吞噬细胞中被扁平膜囊所包围,形成吞噬溶酶体。其外还可被更大的膜囊所包围,由于被层层包围,最后导致板层结构的产生。板层结构在受病毒侵染的细胞中常可见到。

### 3. 血管

内皮细胞与周细胞中有小病毒颗粒,直径 20—30nm,病毒颗粒常聚集在局部区域,病毒区常有微管穿行(图版 I:6)。也有弥散于细胞质的病毒颗粒,伴有很多小囊泡,是胞饮泡。

### 4. 肠

肠上皮细胞中有小病毒颗粒与大病毒颗粒。受感染细胞内的结构被破坏,直到解体。少数小病毒颗粒被囊泡包围,多数分散于细胞质,直径 20—30nm。大病毒颗粒直径约 80nm,聚集成堆,常被包围在囊膜中。

### 5. 肝与肌肉

肝细胞或肌细胞中都不见病毒颗粒。

## 三、讨 论

郑德崇等<sup>[4]</sup>报道了草鱼出血病组织病理的光镜研究, 发现各器官组织中有毛细血管扩张充血、红细胞浸润、组织坏死等病变。我们发现大小两种病毒存在于肾间质细胞、上皮细胞和血管微血管的内皮细胞中。尤以内皮细胞的受侵染最严重, 细胞结构受损伤直至细胞解体。内皮细胞的损伤, 使血液渗漏到组织细胞间隙, 引起病鱼广泛的组织出血。同时, 由于内皮细胞解体, 病毒扩散到血液, 随之也渗入组织细胞间隙。肾的间质细胞、脾的网状细胞及血管的周细胞都具有一定的吞噬能力, 能够吞噬扩散的病毒颗粒以及因病毒侵染而破损的宿主细胞。因此在电镜中比较容易在此三种细胞中发现病毒颗粒。但是在嗜酸性颗粒白细胞和脾的吞噬细胞中仅见到小病毒颗粒。在各种组织细胞中所观察到的小病毒颗粒的数量及其致病病变细胞的数量, 均比大病毒颗粒更多和更为广泛和严重。

作者等在另一研究中, 从病鱼组织匀浆中分离得到两种病毒: 大病毒颗粒直径 80—100nm, 双层衣壳, 无囊膜。小病毒颗粒直径仅 20—30nm, 无囊膜。都与超薄切片中所见的两种病毒颗粒一致。最近作者等又分析了小病毒颗粒的核酸, 证实是单股 RNA, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示两条区带。因此拟初步鉴别为小 RNA 病毒科病毒(另文报道)。

将分离到的两种病毒分别注射入当年和 1 足龄健康草鱼时, 都能导致发生典型的出血病, 但是两种病毒致病后出现的症状不同。大病毒颗粒以肠道出血为主, 小病毒颗粒以肌肉出血为主。

对呼肠孤病毒的病原性, 以往偏重于人和哺乳动物的研究, 一般认为不明显致病; 但对幼龄动物也可导致呼吸道疾病, 在乳鼠中发现引起肝炎、脑炎、脑脊髓炎等疾病<sup>[1,9,11]</sup>。至于其出血病症状仅见于白尾鹿 (*Odocoileus virginianus*) 流行性出血病的报道, 是由呼肠孤病毒科环状病毒属 (*Orbivirus*) 病毒的感染所致<sup>[5,12]</sup>。在鱼类中有呼肠孤病毒引起鱒鱼传染性胰腺坏死病的报道<sup>[13]</sup>。小 RNA 病毒科是极繁杂的一类病毒, 以往主要研究牛、马鼻病毒和口蹄疫病毒、猪水疱病毒、鸭肝炎病毒等, 近年有关于鸟肾炎病毒、蜜蜂小 RNA 病毒及草蛾 (*Lymantric ninayi*) 幼虫小 RNA 病毒等的研究<sup>[6,8,10]</sup>。对鱼类的感染致病和作为草鱼出血病的病原病毒, 以前均未见报道。

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒组, 1978. 草鱼出血病病原的研究. 水生生物学集刊 6:321—330.
- [2] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒组等, 1980. 草鱼出血病病原研究 II 电镜观察. 水生生物学集刊 7:75—79.
- [3] 陈燕桑、江育林, 1983. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特征的研究. 科学通报 18:1138—1140.
- [4] 郑德崇、黄琪琰等, 1986. 草鱼出血病的组织病理研究. 水产学报 10:151—159.
- [5] Gibbs, E. P. J., et al, 1977. Infection of British deer and farm animals with epizootic hemorrhagic disease of deer virus. *J. Comp. Pathol.* 87: 335—343.
- [6] Imada, T., 1885. Pathogenicity of newly isolated Picornavirus (Avian nephritis virus) for chicken. *JPN Agric. Res. Q.* 19: 137—144.
- [7] Luedke, A. J. et al., 1972. Buletongue virus in goats. *Amer. J. Vet. Res.* 33: 1739—1746.
- [8] Lommel, S. A., et al., 1985. Characterization of nucleic acid associated with Arkansas bee virus. *Intervio-*

- logy 23: 199—207.
- [9] Martin, M. L., et al., 1975. Ultrastructure of infantial gastroenteritis virus. *Virology* 68: 146—158.
- [10] Pullin, J. S. K., et al., 1984. Characterization of a small RNA-containing virus in field-collected larvae of the tussock moth, *Lymantria ninayi*, from Papua New Guinea. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 504—507.
- [11] Ramig, R. F. & Fields, B. N., 1977. Reovirus. In *The molecular biology of animal virus*, Vol. 1, Ed by D. P. Nayak, Marcel Dekker, Inc, New York, 411—412.
- [12] Tsai, K. S., et al., 1973. Pathogenesis of epizootic hemorrhagic disease of deer: An electron microscope study. *Amer. J. Pathol.* 10: 379—400.
- [13] Wolf, K., 1976. Fish viral disease in North America, 1971—1975, and recent research of the eastern fish disease laboratory. *USA Fish Pathol.* 10: 135—154.

## STUDY ON CYTOPATHOLOGY OF TWO PATHOGENIC VIRUSES OF HEMORRHAGE IN GRASS CARP, *CTENOPHARYNOGODON IDELLUS*

Mao Shujian, Hang Qi, Chen Hanmin

(*Biological Research Institute, Hangzhou University*)

Zhang Nianci and Yang Guangzhi

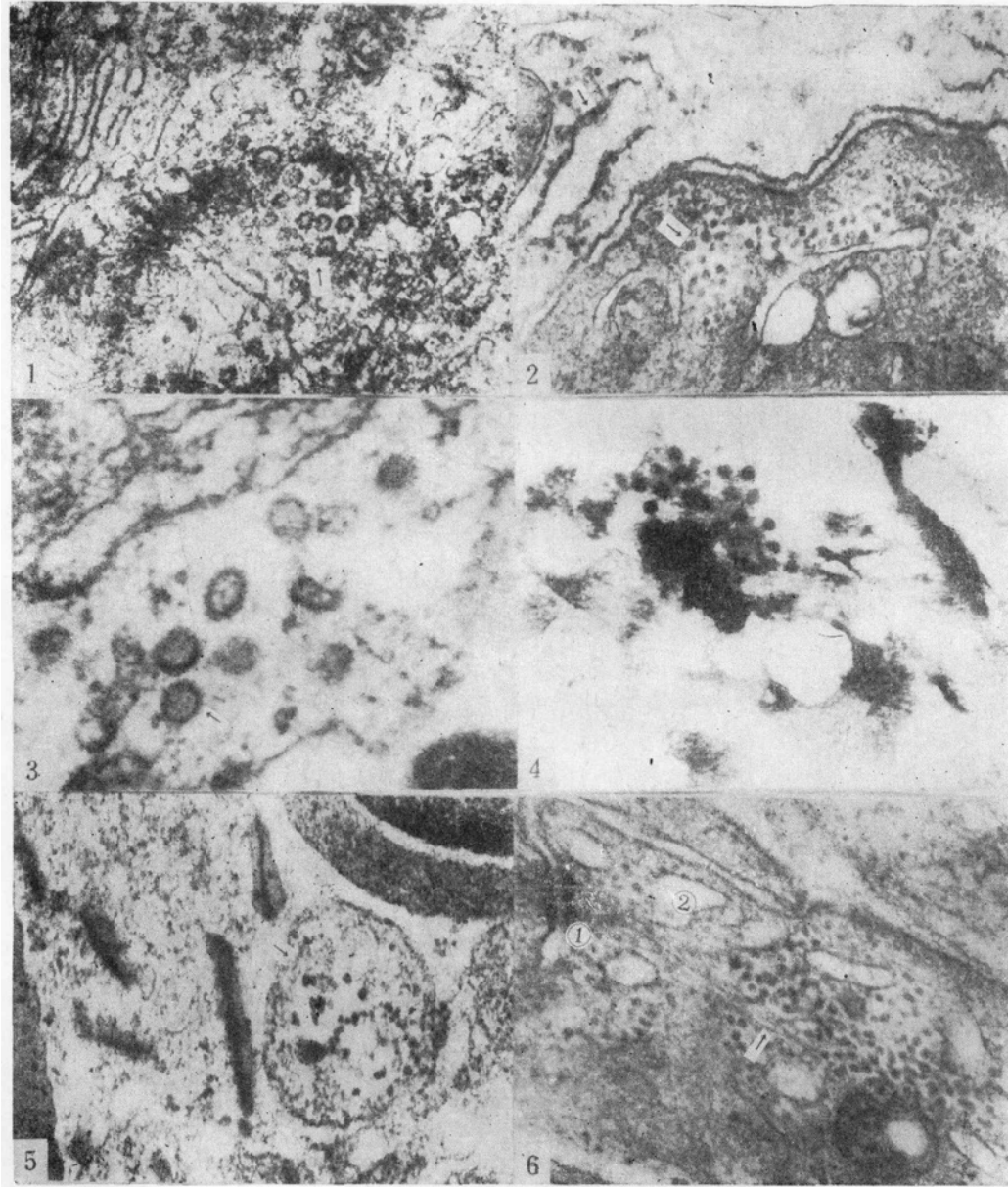
(*Fresh water Fisheries Institute of Zhejiang Province, Huzhou*)

### ABSTRACT

Hemorrhage of Grass Carp is very disadvantageous to fisheries products, causing a mortality of 50—70% for 1 year old juvenile fish. The pathogen of hemorrhage of Grass Carp was studied in the early fifties. During 1978—1984, the Reovirus was isolated, which was named Grass Carp Reovirus (GCR).

Observation under electron microscope of the tissues of kidney, spleen, liver, blood vessel, intestine and muscle of disease fish shows that there were two kinds of virosome in the pathological cells. The diameter of one particle was 80—100 nm and the other 20—30 nm. The main pathological (infested) cells contained endothelial cell of capillaries, reticuloendothelial cell, eosinophil leucocyte, pericyte and interstitial cell as well as other epithelioid cells. Since the endothelial cell of capillaries were damaged and lysed, hemorrhagic symptoms appeared in the tissue.

According to the testing of viruses which were isolated and purified, the bigger one belonged to Reovirus while the other was temporarily defined as Picornaviridae.



1. 肾上皮细胞中的呼肠孤病毒被包围在囊泡中(箭头), 40KX; 2. 肾上皮细胞中小病毒颗粒聚集一小区(箭头), 左上角箭头所指是病毒颗粒正在从膜上合成, 并从膜上走向细胞质中进一步装配, 50KX; 3. 微血管内皮细胞中的呼肠孤病毒(箭头), 宿主细胞濒于解体, 右下角是一红细胞的一角, 50KX; 4. 脾中嗜酸性颗粒白细胞中的小病毒颗粒, 50KX; 5. 解体的嗜酸性颗粒白细胞, 小病毒颗粒还包围在囊泡中, 右上角为红细胞的一部分, 50KX; 6. 血管内皮细胞(内有①粘连带, ②胞饮泡等结构, 箭头所指为微管)中的小病毒颗粒, 聚集在一小区, 50KX。