

# 尼罗罗非鱼溃烂病的病理研究\*

蔡完其 黄琪琰

(上海水产大学)

**提要** 本文报道了尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 越冬期间由嗜水产气单孢菌嗜水亚种 (*Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*) 引起的溃烂病的病理研究结果。

组织病理变化主要表现为变质性炎症。病灶部位皮肤炎性水肿、坏死、脱落。骨骼肌肌核肿大、移行、乃至坏死;肌纤维肿胀及坏死。肝细胞颗粒变性、脂肪变性。肾近曲小管上皮细胞颗粒变性,胞浆内充满玻璃样小滴,使细胞界限不清,但胞核仍存在。病灶部位骨骼肌的愈合,是通过形成肉芽组织及再生进行修补,而表皮的愈合则是借助再生予以修补。与健康鱼相比,病鱼的生化病理变化主要表现为白肌的乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、甘油-3-磷酸脱氢酶( $\alpha$ -GPDH)等同工酶的活性与含量均有显著变化,谱带减少,活性减弱或消失。肌蛋白量显著减少。

**主题词** 尼罗罗非鱼,溃烂病,病理,变质性炎症,愈合,电泳,同工酶,肌蛋白

尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)又称尼罗丽鲷,属鲈形目、丽鱼科、罗非鱼属。它是一种原产于非洲的广盐性鱼类,具有适应性强、繁殖力高、食性广杂、抗病力强及肉味鲜美等特点。当前,由于进行高密度的强化养殖,尤其在越冬期间,放养密度大,换水少,水质差,再加上温度不易控制,温差大等,使鱼体抗病力显著降低,容易感染由嗜水产气单孢菌嗜水亚种(*Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*)而引起溃烂病<sup>(1)</sup>。该病从尼罗罗非鱼进越冬棚开始,可一直延续至次年,甚至在次年4—5月还会出现发病高峰。无论鱼种还是亲鱼都能遭受严重危害,引起大量死亡。例如,上海市嘉定县封浜机械化养鱼场,1981年仅因溃烂病而死亡的鱼种就有3万尾左右,亲鱼发病率达80%,死亡率约11%,使该场生产遭受巨大损失。1982年以来,我们对该病的组织病理和生化病理进行了研究。现报道如下。

## 材料与方 法

1. 试验鱼来源:上海市嘉定县封浜机械化养鱼场及县水产养殖场。
2. 病理组织切片制备:由全长15—25厘米、体重100—250克的12尾不同程度的病鱼取皮肤与骨骼肌的溃烂病灶,肝、肾及肠等脏器的组织块,用Helly氏溶液或葡翁氏

\* 研究过程中,承第二军医大学病理教研室张璞老师热忱帮助,本院张敏、周平凡同志协助摄影,上海第一医科大学费正同志协助扫描,特此致谢。

(1) 孙其煊,黄琪琰,蔡完其。尼罗罗非鱼溃烂病的病原研究和防治试验(手稿)

溶液固定。石蜡切片,厚度为5—6微米。苏木素—伊红染色(H-E)。肝组织还用10%福尔马林固定,冰冻切片,苏丹 III 染色以显示脂肪。另取5尾相似大小健康鱼作对照研究。

### 3. 生化病理变化测定

(1) 材料 取自二龄、全长约20厘米、体重175—200克的32尾病鱼,其病灶数量从4块到31块、平均16块。病灶部位真皮已烂掉。取其不带病灶的背部白肌,同时从大小相似的32尾健康鱼的背部取下白肌作为对照。

(2) 方法 用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定了乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)和甘油-3-磷酸脱氢酶( $\alpha$ -GPDH)等的同工酶及肌蛋白。

电泳用瑞典LKB公司的电泳仪进行。4%聚丙烯酰胺凝胶,Tris-citrate缓冲系统。称0.2—0.3克白肌,按3:1比例(体积/重量)加入辅酶I液,匀浆。低温离心20分钟(16,000转/分,4°C)。取上清液,4°C保存。上清液与溴酚兰蔗糖液混合后点样。每个点样孔点样10 $\mu$ l。每块点样板20孔。每样品重复点二孔。电泳经过予电泳(电流50mA,30分钟)、前电泳(电流25mA,10分钟)及正式电泳(电压275V,同工酶90分钟,肌蛋白50分钟)。乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)染色2小时,甘油-3-磷酸脱氢酶( $\alpha$ -GPDH)染色3小时,肌蛋白染色40分钟。电泳结果用CS-910型岛津双波薄层层析扫描仪扫描、积分,进行定量分析。

## 结 果

### 1. 临床症状

发病初期体表病灶部位充血,周围鳞片松动竖起并逐渐脱落。病灶逐渐烂成血红的块状凹陷(图1),严重时深及骨骼。患部无特定部位,可分布于头部、鳃盖、鳍条及躯干等。在患病严重的鱼体上,病灶多达50余个。

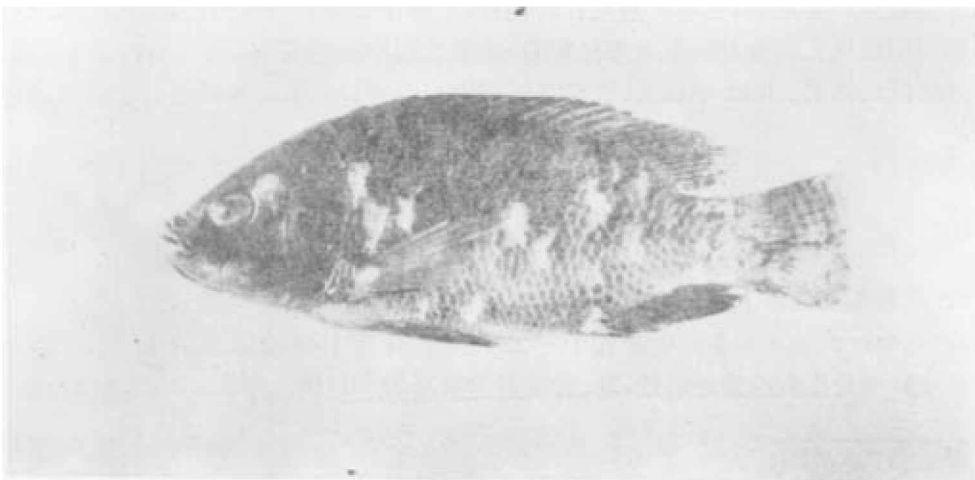


图1 患溃烂病的尼罗罗非鱼  
Fig1 The fish suffering from derma-ulcer

病鱼的内脏也发生病变。健康鱼的肝为肉红色,胆淡绿透明;而病鱼的肝呈褐色,胆墨绿色并肿大,其体积约为健康鱼的一倍左右。

### 2. 组织病理变化

组织病理变化主要表现为变质性炎症。

#### (1) 体表病灶

患病初期,表皮的上皮细胞炎性水肿、坏死、脱落,真皮由于血管的充血与出血,淋巴细胞及嗜中性白细胞的大量浸润,使疏松结缔组织排列更为疏松。真皮的致密结缔组织的胶原纤维肿大,纤维母细胞的核肿大变圆(图2)。

骨骼肌的肌核肿大,肌纤维肿胀,多角形的肌束变圆,肌束膜紧贴肌纤维(图3)。

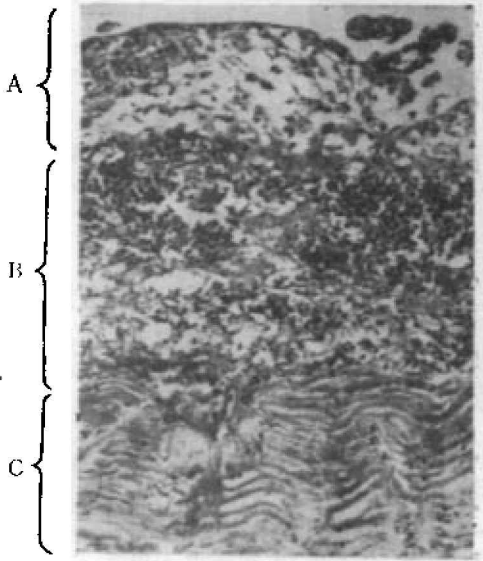


图2 患病初期皮肤横切面。H—E, ×504

Fig. 2 Transverse section of skin on early stage of derma-ulcer

A. 表皮 B. 疏松结缔组织 C. 致密结缔组织

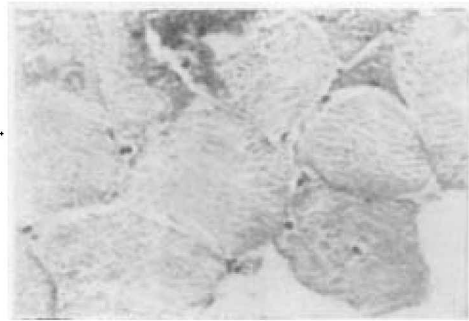


图3 患病初期骨骼肌肌束肿胀变圆,肌核肿大。H—E, ×1008

Fig. 3 The swelling and rounding of skeletal muscle bundles on early stage of derma-ulcer

病情进一步发展时,病灶部位皮肤坏死脱落。肌肉外表层充血、出血,淋巴细胞与嗜中性白细胞充斥,并侵入肌束间。表层肌纤维开始出现坏死。坏死是从肌束的外层向内层逐渐延伸。肌核肿大,并向肌束中间部位移行(图4)。严重病灶部位肌核消失,坏死的肌束中充满了嗜中性白细胞(图5,6)。溃烂肌肉向四周蔓延,被蔓延部分淋巴细胞及嗜中性白细胞大量浸润。

在良好的环境与饲养条件下,或经过药物治疗,病灶可逐渐愈合。愈合的方式主要有两种。一是形成肉芽组织(图7),它由纤维母细胞、新生的毛细血管、多核巨嗜细胞(图8)及嗜中性白细胞等炎症细胞构成,进而逐渐转变成血管稀少的、主要由胶原纤维组成的纤维瘢痕(图9)。二是再生,形成肌母细胞,核圆形,胞浆经H. E. 染色呈紫色(图10)。表皮是通过上皮细胞与细胞分裂进行再生,再生的表皮覆盖在肉芽组织上(图7)。

#### (2) 脏器

肝细胞呈颗粒变性(图11)和脂肪变性(图12)。胞浆充满脂滴,在石蜡切片制作过程

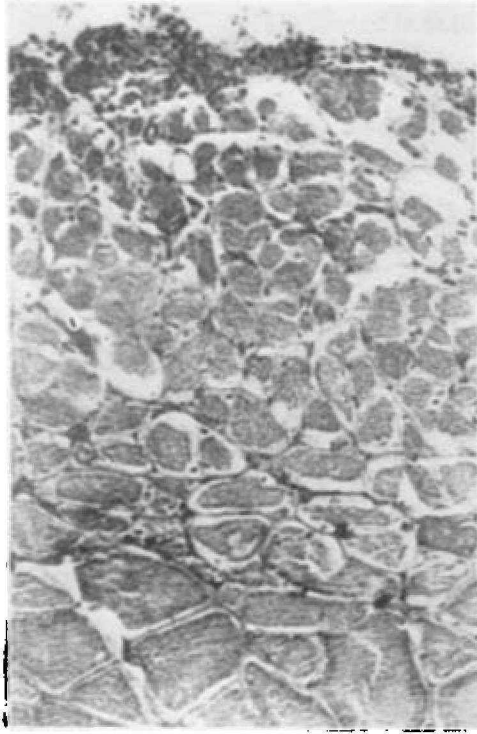


图4 皮肤坏死脱落。骨骼肌外层出血,炎症细胞充斥,表层肌纤维开始出现坏死,肌核向肌束中间部位移行。H—E,  $\times 252$

Fig. 4 Necrosis and falling away of skin. Outside layers of skeletal muscles hemorrhaged, infiltrated by inflammatory cells. Outside of muscle fibres appeared necrosis, nucleus moved to the center of muscle bundles

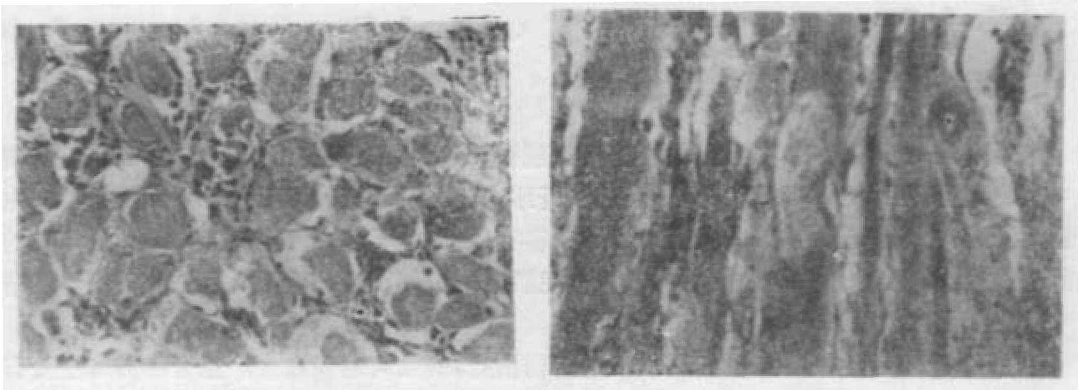


图5 坏死的骨骼肌肌束。箭头示死肌束中充满了嗜中性白细胞。H—E,  $\times 504$

Fig. 5 The starting necrosising skeletal muscle bundles. The arrow points the neutrophilic leucocytes fulling in muscle bundles

图6 坏死骨骼肌纵切面。H—E,  $\times 1008$

Fig. 6 Sagittal section of necrosised skeletal muscle.

中,脂滴被溶去,留下空泡,胞核被挤在一边。苏丹 III 染色的肝细胞胞浆内的脂质呈红

色小滴。

肾近曲小管的上皮细胞颗粒变性,上皮细胞肿胀,肾近曲小管的管腔变小,游离端刷状缘消失(图 13)。在肾近曲小管上皮细胞的肌浆内,有许多玻璃样小滴,使上皮细胞界

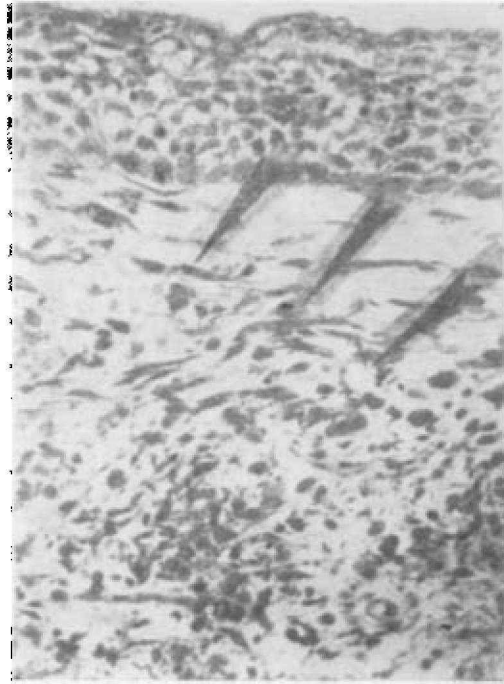


图 7 肉芽组织(A-纤维母细胞, B-嗜中性白细胞, C-毛细血管)与再生的表皮。H—E,  $\times 1008$

Fig. 7 Granulative tissue (A-fibroblasts, B-neutrophilic leucocytes, C-microblood vessel) and regenerated epidermis

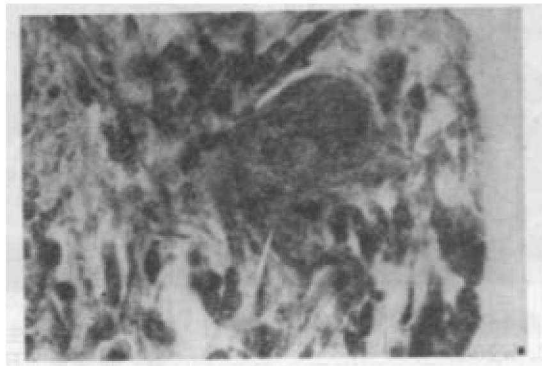


图 8 多核巨噬细胞。H—E,  $\times 2520$

Fig. 8 Polynucleo-macrophages

限不清，但胞核仍存在。肾间质充血，淋巴细胞和嗜中性白细胞等炎症细胞浸润（图版14）。

未发现肠有病变现象。

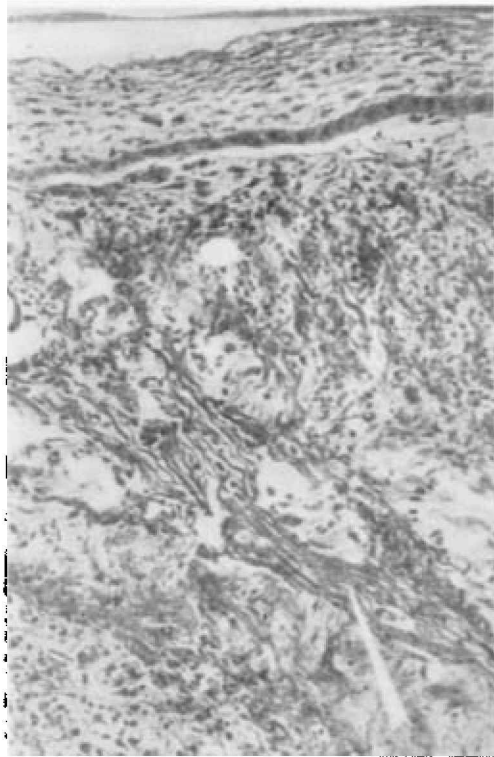


图9 纤维瘢痕开始形成。H—E, × 252  
 Fig. 9 Beginning formation of fibroscars

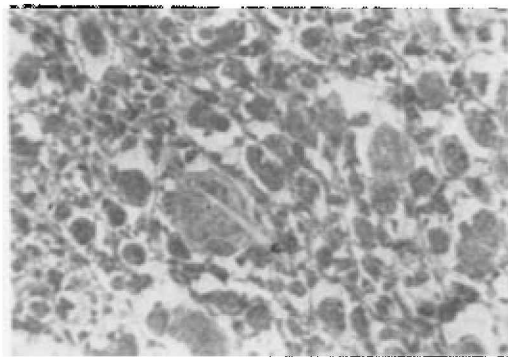


图10 坏死骨骼肌再生形成的肌母细胞。  
 H—E, × 1008  
 Fig. 10 Fibrocytes formed by re-  
 generation of necrosing skeletal muscles

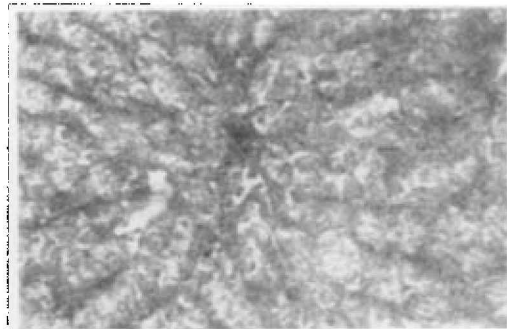


图11 肝细胞颗粒变性。肝小叶中央静  
 脉扩张淤血。H—E, × 1008  
 Fig. 11 Cloudy swelling of liver cells.  
 Expansion and congestion of central veins  
 of liver lobules

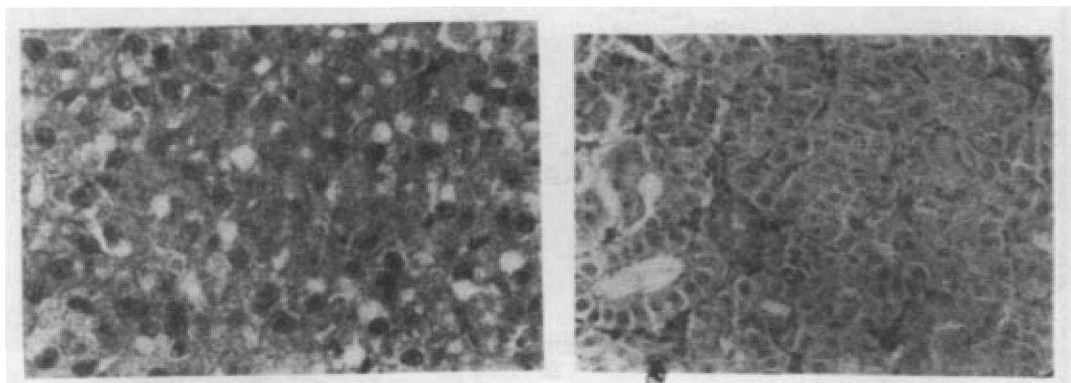


图 12 肝细胞脂肪变性。H—E, ×1008

Fig. 12 Fatty degeneration of liver cells

图 13 肾近曲小管上皮细胞颗粒变性。H—E, ×1008

Fig. 13 Cloudy swelling of epithelial cells of proximal convoluted

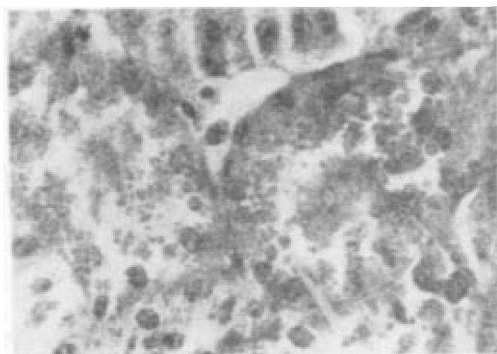


图 14 肾近曲小管上皮细胞玻璃样小滴变。H—E, ×2520

Fig. 14 Glassy degeneration of epithelial of proximal convoluted tubules of kidney.

### 3. 生化病理变化

在同工酶与肌蛋白电泳谱型及强弱上,病鱼较之健康鱼有显著变化。

#### (1) 乳酸脱氢酶

健康鱼乳酸脱氢酶有三条清晰的谱带,它们是: 同质四聚体(homotetramer)的  $B_4$  快速带,为 Ldh-B 基因所控制; 同质四聚体的  $A_4$  慢速带,为 Ldh-A 基因所控制; 异质四聚体(heterotetramer)的中速带  $A_2B_2$ 。三条谱带中以  $A_4$  最强。此图谱与 McAndrew (1983)、杨兴琪(1984)等的结果一致。

病鱼的乳酸脱氢酶  $A_4$  谱带减弱,而  $B_4$  与  $A_2B_2$  消失(图 15)。健康鱼与病鱼乳酸脱氢酶的相对活性变化如表 1。

#### (2) 苹果酸脱氢酶

健康鱼的苹果酸脱氢酶有三条清晰的谱带,即同质二聚体(homodimer)的  $B_2$  快速带,  $A_2$  慢速带,及异质二聚体(heterodimer)的 AB 带。与 McAndrew (1983)、杨兴琪(1984)等一致。

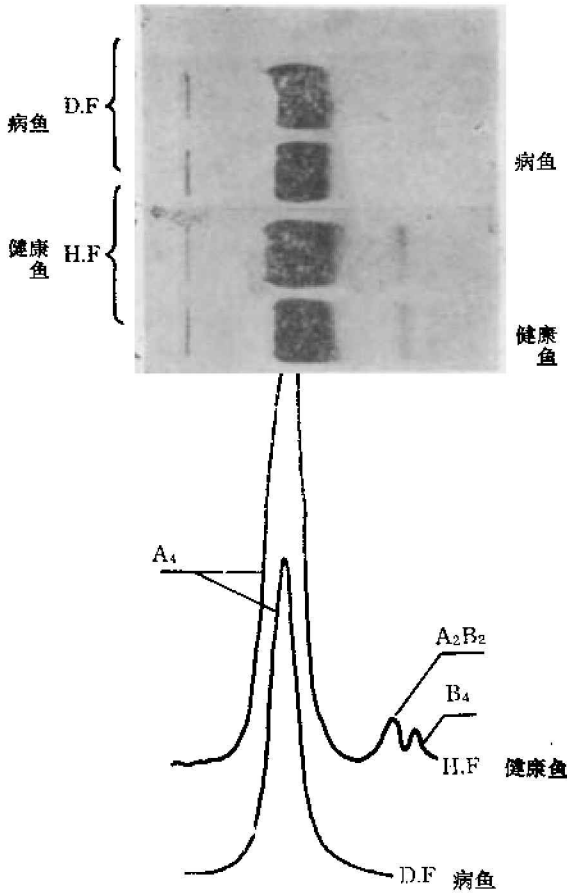


图 15 健康鱼与病鱼的乳酸脱氢酶电泳图谱与扫描图

Fig. 15 Electrophoretic pattern and scanning of LDH of healthy (H.F.) and diseased fish(D.F.).

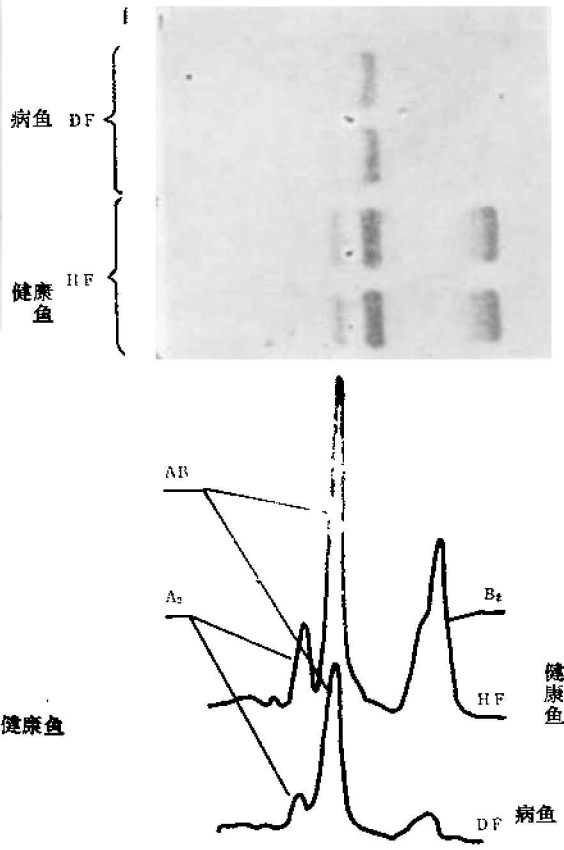


图 16 健康鱼与病鱼的苹果酸脱氢酶电泳图谱与扫描图

Fig. 16 Electrophoretic pattern and scanning of LDH of healthy (H.F.) and diseased fish(D.F.).

表 1 健康鱼与病鱼乳酸脱氢酶的相对活性(%)

Fig. 1 Relative activity of LDH of healthy and diseased fish(%)

	谱带 Band			总和 Total
	A <sub>4</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	B <sub>4</sub>	
健康鱼 Healthy fish	96.0	2.4	1.6	100
病鱼 Diseased fish	47.0	0	0	47.0
病鱼/健康鱼(%) Diseased fish/healthy fish (%)	49.0	0	0	47.0

病鱼的 B<sub>2</sub> 带几乎消失或完全消失, A<sub>4</sub> 与 AB 带比健康鱼的大大减弱(图 16)。健康鱼与病鱼的苹果酸脱氢酶的相对活性变化见表 2。



表2 健康鱼与病鱼苹果酸脱氢酶的相对活性(%)

Fig. 2 Relative activity of MDH of healthy and diseased fish(%)

	谱带 Band			总和 Total
	A <sub>2</sub>	AB	B <sub>2</sub>	
健康鱼 Healthy fish	11.6	44.9	43.5	100
病鱼 Diseased fish	4.9	28.1	0	33.0
病鱼/健康鱼(%) Diseased fish/ healthy fish(%)	33.6	62.6	0	33.0

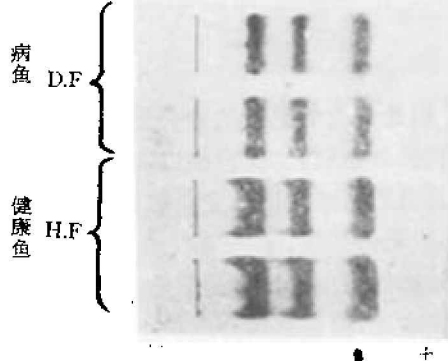
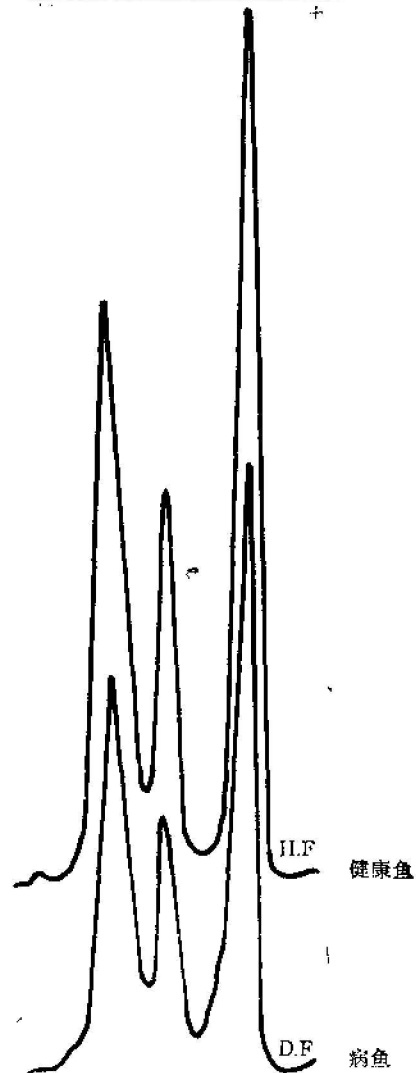


表3 健康鱼与病鱼肌蛋白相对量(%)

Fig. 3 Relative amount of muscle protein of healthy and diseased fish(%)

	谱带 Band			总和 Total
	I	II	III	
健康鱼 Healthy fish	22.0	7.8	70.0	100
病鱼 Diseased fish	5.0	2.8	28.2	36.0
病鱼/健康鱼(%) Diseased fish/he althy fish(%)	22.7	35.9	40.3	36.0



(3) 甘油-3-磷酸脱氢酶  
甘油-3-磷酸脱氢酶在健康鱼只有一条谱带,但在病鱼消失(图 17)。

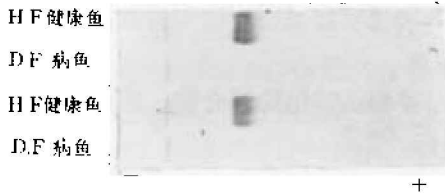


图 17 健康鱼与病鱼的甘油-3-磷酸脱氢酶电泳图谱

Fig. 17 Electrophoretic pattern and scanning of  $\alpha$ -GPDH of healthy(H.F.)and diseased fish(D.F.)

(4) 肌蛋白

健康鱼和病鱼的主要谱带均为三条(图 18)。二者明显不同的是,健康鱼三条谱带染色深且粗,而病鱼的淡而细。健康鱼与病鱼肌蛋白各谱带的相对量如表 3。

图 18 健康鱼与病鱼的肌蛋白电泳图谱与扫描图

Fig. 18 Electrophoretic pattern and scanning of white muscle protein of healthy and diseased fish

## 讨 论

1. 病灶部位骨骼肌的愈合是通过肉芽组织及再生进行修补。肉芽组织的作用是:①填补缺损的骨骼肌;②保护伤口,吸收和消除异物及坏死组织,为伤口愈合创造有利条件。再生则是当肌纤维膜尚未完全破坏时,坏死灶被巨噬细胞吸收后,残存的肌细胞核分裂、增殖,形成肌母细胞。

病灶部位表皮的愈合是借助再生予以修补。病灶边缘上皮组织的基底细胞迅速增生,互连接成片,覆盖在肉芽组织上。这与 Mulcahy (1971)所报道的鳟鱼溃疡性皮肤病坏死的愈合过程基本一致。

2. 根据健康鱼和病鱼同工酶与肌蛋白电泳图谱,分析讨论如下:

乳酸脱氢酶是一种糖酵解酶,控制丙酮酸盐与乳酸盐的互相转变。 $A_4$ 、 $B_4$ 两种多肽在这一功能中起有不同作用。一般认为, $A_4$ 对缺少乳酸的抵抗力较强,主要存在于嫌气性呼吸期相对较长的组织如肌肉中,可进行无氧酵解。 $B_4$ 则对缺少乳酸特别敏感,在氧气供应充分的组织中(如心、脑)占优势,它与丙酮酸的亲和力较大,能在低浓度下把丙酮酸转化为乳酸,也能防止乳酸的有害积累(Whitt 1970),因而有利于呼吸作用的进行,需氧呼吸尤其需要 $B_4$ 。病鱼 $B_4$ 与 $A_2B_2$ 的几乎消失或完全消失,表明病鱼因体力衰弱而影响了呼吸能力,致使对低氧环境的适应能力较差。而病鱼仍然保持较强的 $A_4$ ,则可能是在呼吸能力变差的情况下,维持嫌气呼吸的一种适应。这些结果与需要充分氧气供应的 $B_4$ 、 $A_2B_2$ 的几乎消失一致。

苹果酸脱氢酶的细胞质型(S-Mdh)与线粒体型(m-Mdh)在氨基酸组成及功能上是互有区别的。m-Mdh只能在线粒体中使苹果酸脱氢酶产生草酰乙酸和辅酶II,S-Mdh只能在细胞浆中利用酵解所产生的辅酶II催化草酰乙酸而还原成苹果酸脱氢酶。在柠檬酸的循环过程中,还原的线粒体型苹果酸再进入线粒体内开始新的氧化反应,以不断促进能的产生。本研究测定的肌肉中的苹果酸脱氢酶是S-Mdh型,它在健康鱼主要有三条谱带,但病鱼的S-Mdh $B_2$ 几乎消失, $A_2$ 与AB也明显减弱,这与病鱼能量代谢大大削弱有关。

甘油-3-磷酸脱氢酶是甘油-3-磷酸与二羟丙酮酸相互转化的媒介物。病鱼肌肉中该酶的消失,表明病鱼丧失了这一功能。

健康鱼与病鱼肌蛋白的电泳图谱和相对量的不同,表明不仅病鱼的病灶的组织发生了严重的病变,病灶以外的白肌的蛋白质也起了很大的生化变化。

在医学上,有关同工酶的临床诊断应用的报道日渐增多,但在鱼类疾病方面的诊断应用,尚欠报道。本研究是在这一方面的初步尝试。研究中的各次测定,均经过重复,结果完全一致,这表明电泳分析结果作为生化病理研究的判据是可靠的。又对在 $-25^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存了一年的样品进行测定,结果与冰冻保存不久的标本的测定结果完全一致,这表明所测同工酶与肌蛋白在上述低温条件下保持稳定,因而进一步证明,只要样品保存得当,就可供作较长时间使用。根据以上结果,我们认为,同工酶与肌蛋白的电泳分析对于鱼类疾病的深入研究具有理论意义和实践价值。

## 参 考 文 献

- [1] 中山医学院主编,1983. 病理学. 人民卫生出版社.
- [2] 方丁等,1982. 同工酶在医学上的应用. 人民出版社.
- [3] 王有琪主编,1980. 组织学. 人民卫生出版社.
- [4] 武汉医学院主编,1983. 病理学(病理解剖学分册). 人民卫生出版社.
- [5] 杨兴琪、邓初夏、陈宏溪,1984. 几种罗非性乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶同工酶的电泳研究. 遗传学报,11(2): 123-140
- [6] 秉志,1983. 鲤鱼组织. 科学出版社.
- [7] 日比谷京,1982. 鱼类组织图说—正常组织与病理组织. 株式会社、讲谈社.
- [8] 江草周三等,1979. 鱼的病理组织学. 东京大学出版社.
- [9] McAndrew, B. J. & K. C. Majumdar, 1983. Tilapia stock identification using electrophoretic markers. *Aquaculture*, 30: 249-261.
- [10] Mulcahy, M. F., 1971. Serum protein changes associated with ulcerative dermal necrosis(UDN) in the trout *Salmo trutta*. *L. J. Fish Biol.*, 3(2): 199-210.
- [11] Whitt, G. S., 1970. Development genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.*, 175: 1-36.

## A STUDY ON PATHOLOGY OF DERMA-ULCER OF *TILAPIA NILOTICA*

Cai Wanqi and Huang Qiyan

(Shanghai Fisheries University)

**ABSTRACT** This paper reports the research results of pathology of derma-ulcer caused by *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* during the overwintering season of *Tilapia nilotica*

The histopathological changes were characterized by the alternative inflammation. In ulcerated focus, the skin was inflammatory oedema, necrosis and finally fell away; nucleus of skeletal muscles swelled, moved to the center, and finally necrosised; muscles fibres swelled and necrosised. Liver cells cloudy swelled and fat degenerated. The epithelial cells in the proximal convoluted tubules of the kidney cloudy swelled, glassy degenerated boundary lines of cells became unclear, but the nucleus still remained. The healing of skeletal muscles in focus was mended through the formation of granulative tissue and regeneration. The healing of epidermis was mended by regeneration.

The biochemi-pathological changes were characterized by the significant changes of the activities and contents of LDH, MDH and  $\alpha$ -GPDH of white muscle of diseased fish. Number of bands of electropherograms decreased, activities decreased or disappeared completely. The contents of muscle protein also decreased significantly.

**KEY WORDS** *Tilapia nilotica*, Derma-ulcer, Pathology, Alternative inflammation, Healing, Electrophoresis, Enzyme, Protein