

施氏鲟幼鱼肝性脑病组织病理学与细胞病理学研究

潘连德 孙玉华

(上海水产大学渔业学院, 200090)

陈辉

(中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心, 214081)

许平

(黑龙江省国营农场总局施氏鲟养殖放流试验站, 156429)

摘要 通过对患病和健康施氏鲟(*Acipenser schrenckii* Brandt) 进行的比较解剖、组织病理学与细胞病理学、流行病学研究结果表明, 患病施氏鲟无明显的外部症状, 临床解剖所见肝脏病变严重: 肝淤血、坏死、糜烂。肝组织脂肪变性、水样变性明显, 肝细胞核浓缩或淡染、变形、核仁裂解, 内质网扩张, 线粒体嵴融解、崩解, 胞浆内大量脂滴和液泡并将细胞器排挤成团。脑组织水样变性致液化性坏死, 脑细胞胞浆呈液化泡状, 核变形、浓缩, 细胞膜融解。肾组织发生局灶性病变, 病变肾细胞胞浆内有脂滴和液泡, 核变形、融解, 线粒体嵴融解、崩解。其它器官、组织、细胞未见病变。研究认为肝组织为原发性、中毒性坏死, 脑组织病变与肝组织病变有依赖性, 脑坏死为继发性液化性坏死, 肾脏病变亦为继发性局灶性病变。因脑坏死而致鲟鱼死亡。文中还探讨了致病原因和机理以及危害性。

关键词 施氏鲟幼鱼, 肝性脑病, 细胞病理学, 组织病理学

Histopathological and cytopathological study on hepatic encephalopathy of amur sturgeon *Acipenser schrenckii* larvae

Pan Liande Sun Yuhua

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

Chen Hui

(Freshwater Fisheries Research Center Chinese Academy of Fisheries Science, 214081)

Xue Ping

(Station of Amur Sturgeon Aquatics and Graze Bureau State Farm of Heilongjiang Province, 156429)

ABSTRACT Through comparative anatomic, histopathologic, cytopathologic and epideminologic studies on the ill (14 Ind.) and normal (1 Ind.) farmed amour sturgeon, *Acipenser schrenckii*. No pathogenic microorganism was found. Outer symptom of earlier ill amour sturgeon was not obvious. Through anatomy hepatic tissue degeneration was severely found. hepatic tissue was lipid degeneration, watery degeneration and focal necrosis. Hepatic function changed from unusual to deterioration. The illness of encephalic liquefaction necrosis depend on the illness of hepatic tissue, encephalic cell was watery degeneration and necrosis, other organs tissues and cells was not found to be degeneration. Hepatic tissue degeneration was first, toxicopathy. encephalic liquefaction necrosis was secondary disease. The toxin that caused hepatic tissue degeneration came

from the food. The cause of the illness and mechanism were also studied.

KEYWORDS *Acipenser schrenckii*, hepatic encephalopathy, histopathology, cytopathology

自 1997 年底,各地温室试养的鲟鱼幼鱼患一种严重疾病并大量死亡,损失惨重。患病鲟鱼体色、形态正常,患病初始阶段有跳跃、乱窜等极度兴奋行为,散游或独游或分散水中,食量减少;后期处于昏迷、昏睡状态,停食,不日死亡,导致施氏鲟(*Acipenser schrenckii* Brandt)幼鱼集约化培育失败。北京、山东、辽宁等地饲养的施氏鲟、俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedti* Brandt)、杂交鲟也发生了同类疾病。疾病发生集中在体重 15~25g、体长 15~20cm 的人工转食阶段的鲟鱼幼鱼。曾用呋喃唑酮、土霉素、诺氟沙星、漂白粉等药物治疗无效。经文献检索,未见有关报道。我们对黑龙江省国营农场总局施氏鲟养殖放流试验站进行的温室养殖施氏鲟的患病鲟鱼进行了诊断与防治研究,根据疾病检验和病理分析结果,诊断为“施氏鲟肝性脑病”。本文报道了本病的组织病理学和细胞病理学研究结果,以及致病原因、机理和危害性的探讨,作为温室养殖施氏鲟疾病检验与诊断以及防治的病理学依据。

1 材料与方法

1.1 试验鲟鱼

试验用施氏鲟于 1997 年 11 月~1998 年 2 月分批采自黑龙江省国营农场总局施氏鲟养殖放流试验站温室养殖车间,共 15 尾,其中健康鱼(体重 100g,体长 32cm)1 尾,养殖期为 15 个月;患病鱼(体重 15~25g,体长 15~20cm)14 尾(死鱼 6 尾,濒死鱼 4 尾,活力较好鱼 4 尾),养殖期为 6~8 个月。尼龙袋充氧运输至上海,无死亡。

1.2 病理解剖

将所采样品按正常和活泼、濒死、死亡分类后,实验室进行病理比较解剖观察,以初步确定疾病病程发展的典型临床症状,同时选择制作石蜡切片和电镜切片的病料。按照从眼观到显微,从显微到亚显微的不同层次进行组织病理学研究。

1.3 组织切片制作与观察

参考病理解剖结果,选取病鱼的鳃、肝脏、肾脏、脾脏、脑、背动脉血管、幽门盲囊、肠管等组织块, Bouin's 液固定,常规石蜡包埋,切片厚度 6 μ m,分别进行 H.E 染色、Giemsa 染色、PAS 反应等组织化学染色,中性树脂封片, Olympus (BH-2) 显微镜观察、拍片。

1.4 电镜切片制作与观察

在摘取制作石蜡切片组织块时,同步留取电镜切片组织块,切成 1~2mm³ 小块, 2.5% 戊二醛溶液前固定, 0.1mol 磷酸缓冲液洗 3 次, 1% 锇酸后固定, 0.1mol 磷酸缓冲液洗 3 次, 酒精梯度脱水, 90% 酒精+ 丙酮(1:1) 浸透, 丙酮+ 包埋剂(ERL 10mL、GER 6mL、NHA 26mL、GNA 0.4mL)(1:1) 再浸透, 包埋剂包埋, 模板固定, 60℃ 烘干, LKB-8800 超薄切片机切片, 醋酸铀-柠檬酸铅双重染色, JEM100-X II 透射电镜观察、拍片。

2. 结果

2.1 病理解剖症状

施氏鲟体色正常,体表及其粘液正常,偶有头部前端和吻部的腹面表皮脱落、背面粉红,或胸鳍基部、口周围有一增生物,或肛门红且稍外突的个体。肝脏紫色或褐色或灰色,严重者肝糜烂,胆囊正

常。肝病变较轻者(活力较好者)脑形状正常可辨,眼观无异常,解剖针可挑起脑;肝病变严重者(濒死、死亡者)脑糜烂、破碎,难辨结构,针拨动呈豆腐脑状,解剖针不能挑起脑,颜色呈乳白色。肠内无食物,肠管壁、肾脏、脾脏、鳃、背动脉血管、心脏等组织感观未见病变,体腔未见异常结构。

2.2 组织病理变化

肝组织病变:H. E 染色显示,患病的较正常的(图版 I - 1) 鲟鱼肝组织颗粒变性明显(图版 I - 2),空泡化(图版 I - 3)为脂肪变性或水样变性,坏死(图版 I - 4),肝静脉管壁增厚并纤维化(图版 I - 5),肝静脉淤血,肝组织以中央静脉为中心呈局灶性病变,破裂性出血(图版 I - 3)。Giemsa 染色未见粒细胞浸润,但在肝静脉和静脉窦内有大量粒细胞。

脑组织病变:H. E 染色显示,脑组织中有大量包含均质液态物质的空泡(图版 I - 6)呈液化性坏死(图版 I - 7, 8)。脑髓质部组织坏死、结构模糊(图版 I - 9),灰质部空泡化,空泡为脂肪变性或水样变性。

肾脏组织病变:H. E 染色显示,较肝、脑轻微,可见肾组织炎性细胞浸润(图版 I - 10),肾细胞界限模糊、颗粒变性明显。

幽门盲囊局部组织坏死致破裂(图版 I - 11)。

Giemsa 染色未见炎性细胞浸润肝、脑病变和坏死组织。

组织病理研究发现患病样本全部具有不同程度的肝组织病变,脑组织、肾组织发生病变样本的肝组织的病变十分明显。未见单纯性的脑、肾组织病变。肠管壁、脾脏、鳃、背动脉血管、心脏等组织病理变化不明显。

2.3 细胞病理变化

肝细胞病变:电镜观察,肝细胞胞浆内呈现脂滴过多积累(图版 II - 1)、脂滴和空泡(图版 II - 2)大而多、空泡化(图版 II - 3)等病变,内质网和线粒体等胞器被脂滴和空泡挤到细胞边缘或堆积(图版 II - 1, 2, 3, 4),线粒体嵴融解、崩解(图版 II - 4),核淡染、核仁分裂为多个、核外膜皱裂、内质网(图版 II - 5)和高尔基体膨大(图版 II - 6)。肝静脉管内也有空泡且白细胞多、红细胞少(图版 II - 7),肝细胞内有合胞体(图版 II - 8)。

脑细胞病变:脑细胞病变严重,细胞内类脂滴多、液泡多、核变形、核膜溶解、线粒体嵴融解、崩解(图版 III - 5, 6, 7, 8),脑细胞胞浆内大量空泡、脂滴将线粒体、内质网等胞器排挤堆积或挤到边缘(图版 III - 5, 6)。

幽门盲囊细胞病变:病变幽门盲囊细胞较正常的(图版 III - 1)发现有少数空泡和脂滴(图版 III - 2, 3),核变形、融解(图版 III - 3, 4),线粒体嵴融解、崩解(图版 III - 2, 3, 4)。

2.4 组织中病原生物检查

肝、脾、肾、脑等组织切片 Giemsa 染色检查,未见细菌及其菌团。PAS 反应未见真菌菌体。电镜检查细胞内未见病毒颗粒及病毒包涵体。

3 讨论

3.1 肝组织、脑组织病变严重,脑坏死是致死原因

患病鲟鱼病理解剖所见初期器官病变仅发生在肝脏,肝组织病变前期以颗粒变性为主,脂肪变性为次,后期为脂肪变性与水样变性并存,过渡到水样变性,肝静脉管壁增厚且纤维化,最后达到坏死,为典型中毒性肝炎的特征。组织病理所见肝坏死的程度尚未达到肝水肿、硬化导致肝功能衰竭的最后阶段,由此判断为非致死原因。病理解剖和组织病理观察所见肝组织病变由轻到重的经过比较明

显。随肝病变、坏死变化,脑也相应遭到破坏致液化性坏死,脑的功能相应由功能不全(异常兴奋状态),发展到功能衰竭(异常抑制状态),由此判断为致死原因。肾小区域性坏死,对功能的影响较肝、脑轻。该病的病理规律与养殖鲟鱼患非寄生性疾病首例报道的养殖高首鲟(*A. transmontanus*)发生心外膜脂肪织炎的肝脂肪变性相似^[1],但无心外膜脂肪病变,该作者推测饲料中的氧化脂肪是致病原因;与水域污染^[2-3]和杀虫剂、化工产品、废水^[4]对鲟鱼幼鱼器官组织的影响研究结果比较,也有共同的毒理组织学变化。与俄罗斯鲟、闪光鲟(*A. stellatus Pallas*)、欧洲鳊(*Huso huso L.*)和裸腹鲟(*A. nudlventris Lovetizky*)等养殖种类,肌肉和肝脏组织病理学研究^[5,6],肝脏肿瘤研究结果^[7],差异较多。

3.2 肝和脑组织细胞表现为中毒性病变

组织病理观察所见组织变性以颗粒变性为主,并以肝静脉为中心成局灶性变性、坏死非常明显,表明毒物是经血液输入肝组织的并具有强烈毒性,与虹鳟^[8]和其它养殖鱼类^[9]中毒性疾病的肝病变相似;细胞内有大量的个体较大的脂滴而与草鱼营养性脂肪肝^[10]的病理变化不同,初期与虹鳟肝脂肪变性^[11]相似。临床病理解剖虽未见有绿肝症状,但肝组织病变与鲤鱼绿肝症^[12]病变相似。电镜下观察所见肝、脑细胞水样变性较明显,其次为脂肪变性,细胞器病变、崩解,表明细胞器的生物功能严重受损。电镜观察肝静脉中有大量的白细胞,并运至肝组织的病灶,但肝组织炎性细胞浸润不明显,不及高首鲟患心外膜脂肪织炎^[1]组织的炎症反应强烈,这可能与毒物的性质有关。

3.3 肝组织病变及与脑组织和肾组织病变的关系

对大量的鲟鱼临床解剖和组织病理观察结果分析,鲟鱼的肝组织首先发生损伤、病变,表现出少量的组织淤血、血管中粒细胞数量增多,解剖见肝脏表面有红点或红斑,此时临床表现正常,同批的鲟鱼脑和肾组织正常;继续发展肝组织淤血严重或水肿,颜色为深红或紫色,有的肿大,有的体积正常,也有的肝脏灰色或淡色,有糜烂和坏死症状。此时,脑组织液化性坏死肾组织局灶性坏死。因此,认为肝组织病变为原发性,脑组织病变为继发性并与肝病变有依赖性(即肝性脑病),肾组织病变亦为继发性且与肝病变也有依赖性。

毒物在致肝组织病变至坏死后,肝组织一方面本身受到严重伤害,另一方面毒物在肝功能不全时未被解毒并同体内其它代谢物一道进入血液,运至脑组织使其中毒至液化性坏死。初期组织病变轻微,临床症状为兴奋反应:惊厥、乱窜、狂游、跳跃;而到后期病变严重,脑形态结构模糊,空泡化、脂滴多,直到液化性坏死,临床症状为抑制反应:反应迟钝、缓游、沉底、昏迷,直至死亡。综合以上病理特征和临床症状基本符合动物肝性脑病的临床症状和病理变化。

3.4 致肝、脑病变的原因分析

致鱼类肝损害物质来源广泛,种类繁多,往往是多种因素的协同作用的结果。已见诸多有关饲料及其有毒成分^[1,9-11]、药物^[14]、添加剂^[8]和水污染^[23]等毒害物质对养殖鱼类的危害。结合流行病学和养殖工艺分析,认为施氏鲟中毒性肝坏死的毒物主要由饵料的有毒成分和药物的作用。目前人工养殖施氏鲟在稚鱼期,完全以投喂水蚯蚓为食时间较长,直到转食完成。这些水蚯蚓来自污染严重的排污沟渠,体内富集大量的毒害物质(如有机磷、有机氯、重金属、酚等),估计这是最重要的因素;另外,防病药物的大量投喂,水中有毒物质的积累,也是不可低估的毒害来源。致肝、脑被损害的物质是什麽以及致病机制,目前还不清楚。

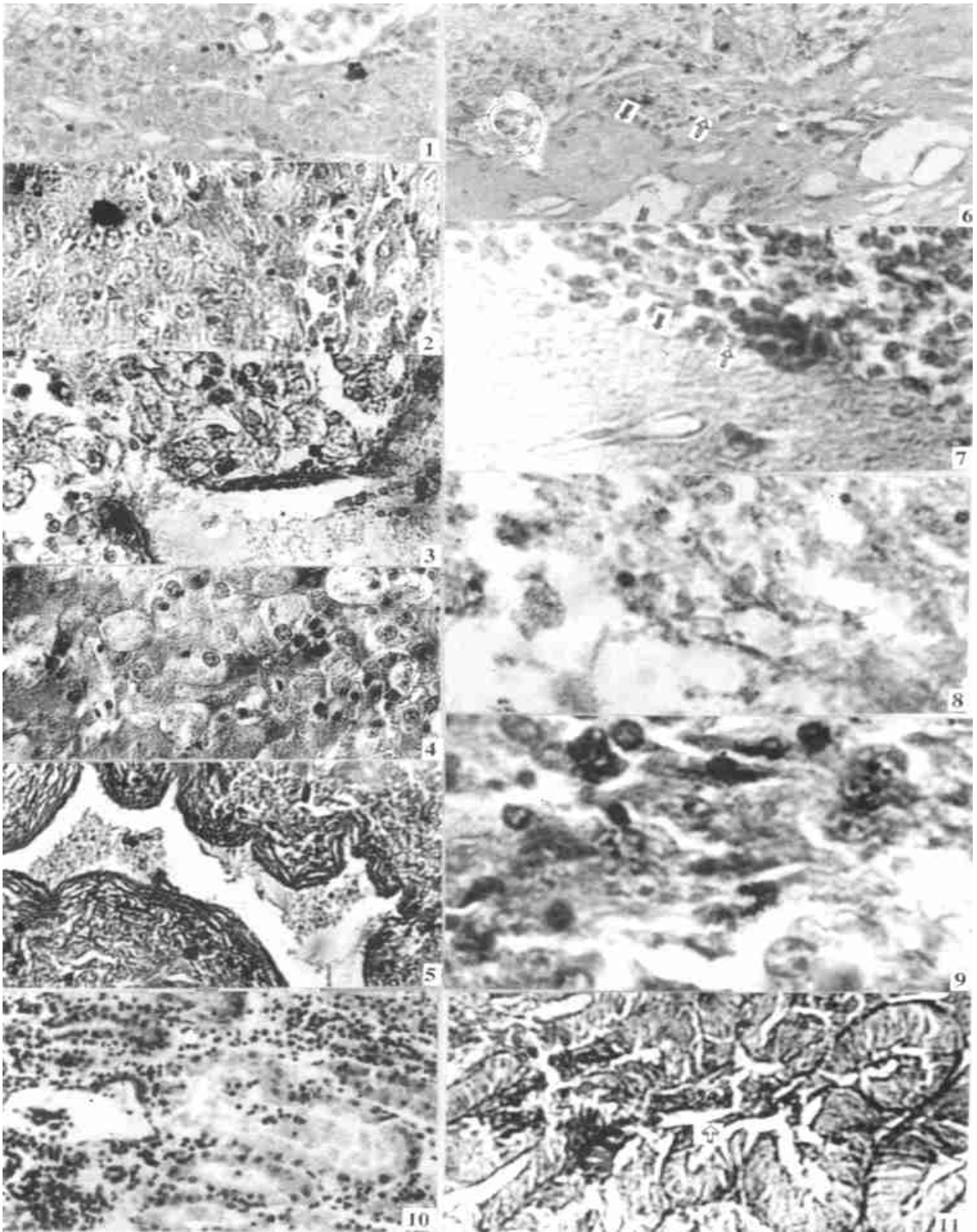
研究认为鲟鱼肝受损伤后,使脑中毒、病变、坏死,即肝性液化性脑坏死并导致鲟鱼死亡。在养殖动物中较常见的肝性综合症有肝肾综合症、肝脾综合症,而肝心综合症和肝性脑病较少见。而致肝性脑病的原因和病理机制,医学、兽医学对人、动物肝性脑病研究尚未得到明确答案。鱼类肝性脑病为首次发现,相关问题有待进一步研究。

3.5 施氏鲟肝性脑病的危害性

养殖技术、工艺方面一旦存在肝损害因素,发生肝损害性肝病、以及肝性综合症等非寄生性疾病是大规模和全面性的,能够免于—死的极少,虽然这样的疾病无传染性,但就高度集约化养殖而言,它的危害与后果要远远地超过传染性疾病。某场1997年养殖施氏鲟5000尾,发生本病后全部死亡;某场养殖俄罗斯鲟3000尾,发生本病死亡84%,从目前鲟鱼在我国的试养阶段看,非寄生性疾病的危害性应引起重视。

参 考 文 献

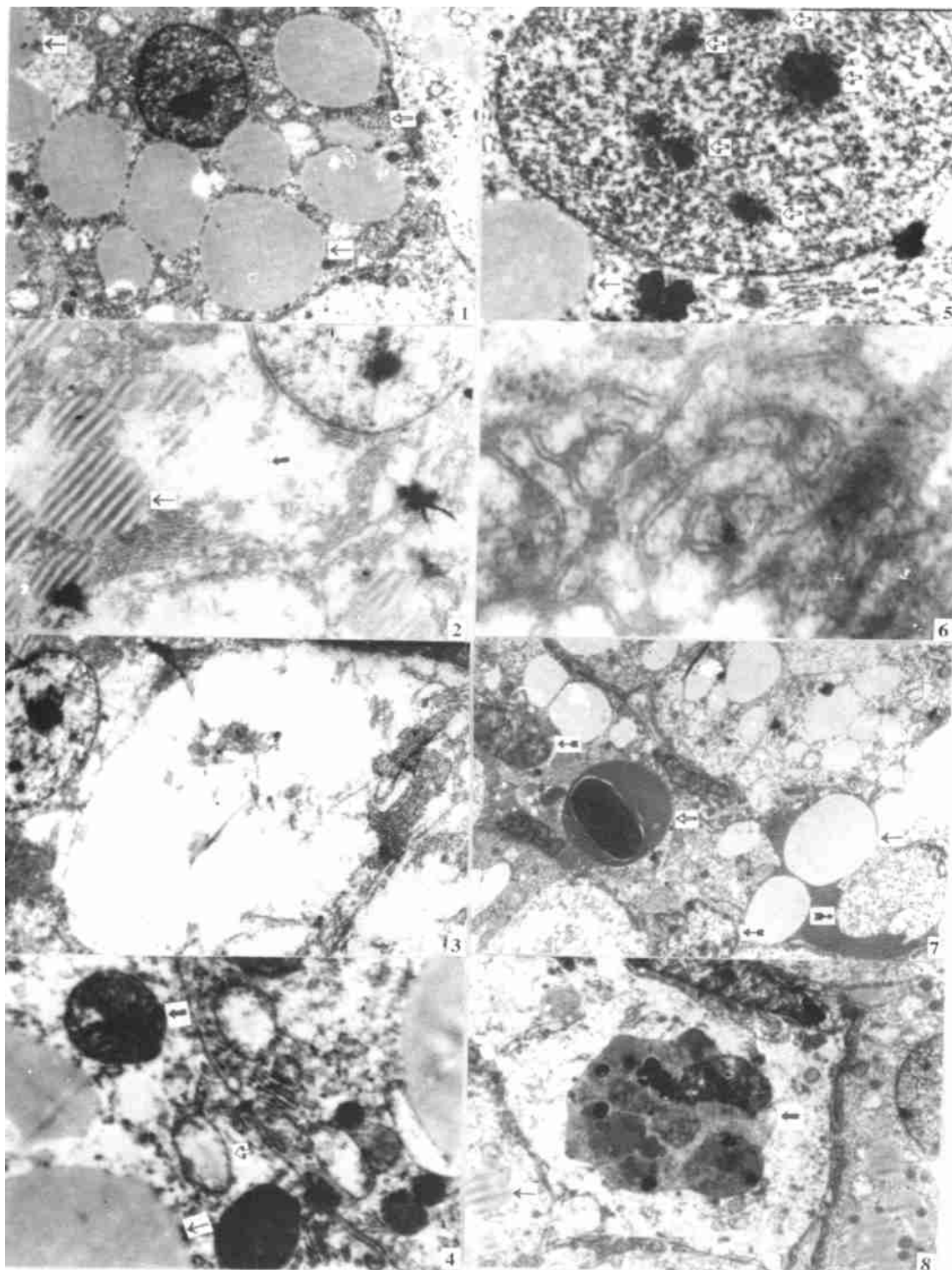
- 1 Franco C, Gianluca B, Ivo Z, et al. Spontaneous steatitis of epicardial fat in farmed white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*, 1997, 158: 167~ 177
- 2 姜礼燧,曹翠禾.中华鲟肝脏癌变的环境诱因初探. *水产科技情报*, 1988, 132(4): 7~ 8
- 3 Rousseau C G, Branchaud A, Spear P A. Evaluation of liver histopathology and EROD activity in St. Lawrence lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in comparison with a reference population. *Environ Toxicol Chem*, 1995, 14(5): 843~ 849
- 4 Алгунев Ю В. Морфофункциональное состояние мышечной ткани и печени молды русского осетра и беруги в экспериментах по хронической интоксикации. *Вопросы Ихтиологии*. 1994, 34(1): 135~ 138
- 5 Наточин Ю В, Лукьяненко В И, Шехматова Е И. Двадцатилетний мониторинг (70 – 90 годы) физико – химических параметров сыворотки крови у русского осетра. *Вопросы Ихтиологии*, 1995, 35(2): 253~ 257
- 6 Алгунев Ю В, Романов А А, Шевелева И И. Гистопатология поперечнополосатой мышечной ткани и печени каппийских осетровых. *Вопросы Ихтиологии*, 1992, 32(2): 157~ 171
- 7 Романов А А, Алгунев Ю В. Новобразования в полых железах и печени осетровых рыб (*Acipenseridae*) Каспийского моря. *Вопросы Ихтиологии*. 1990, 30(6): 1040~ 1044
- 8 Moccia R D, Hung S S Q, Slinger S J, et al. Effect of oxidized fish oil, Vitamin E and ethoxyquin on the histopathology and hematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis*, 1984, 7: 269~ 282
- 9 Stauton M F. Diethylnitrosamine – induced hepatic degeneration and neoplasms in the aquarium fish. *J Nat, Can Cer Inst*. 1965, 34: 117
- 10 Lin D, Mao Y Q, Cai F S. Nutritional lipid liver disease of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* (C et V). *Chin J Oceanol Limnol*, 1990, 8(4): 363~ 374
- 11 Smith C E. The prevention of liver lipid degeneration (ceroidosis) and microcytic anemia in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson fed rancid diets: a preliminary report. *J Fish Dis*, 1979, 2: 429~ 437
- 12 李文宽,丁 翔,闻秀荣等.建鲤绿肝症组织病理学研究. *中国水产科学*, 1997, 4(5): 104~ 107
- 13 Takashima F, Takashi H, Takeshi W. Lipid content of hepatoma in rainbow trout. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1973, 39(4): 335~ 341
- 14 Ferguson H W. Systemic pathology of fish. Manufactured in the United States of America. 146~ 157



图版I 施氏鲟肝、脑、肾等组织光镜观察。H. E. 染色。

Plate I Observation of diseased sturgeon hepatic, encephalic, kidney tissue under light microscope. H. E. stain.

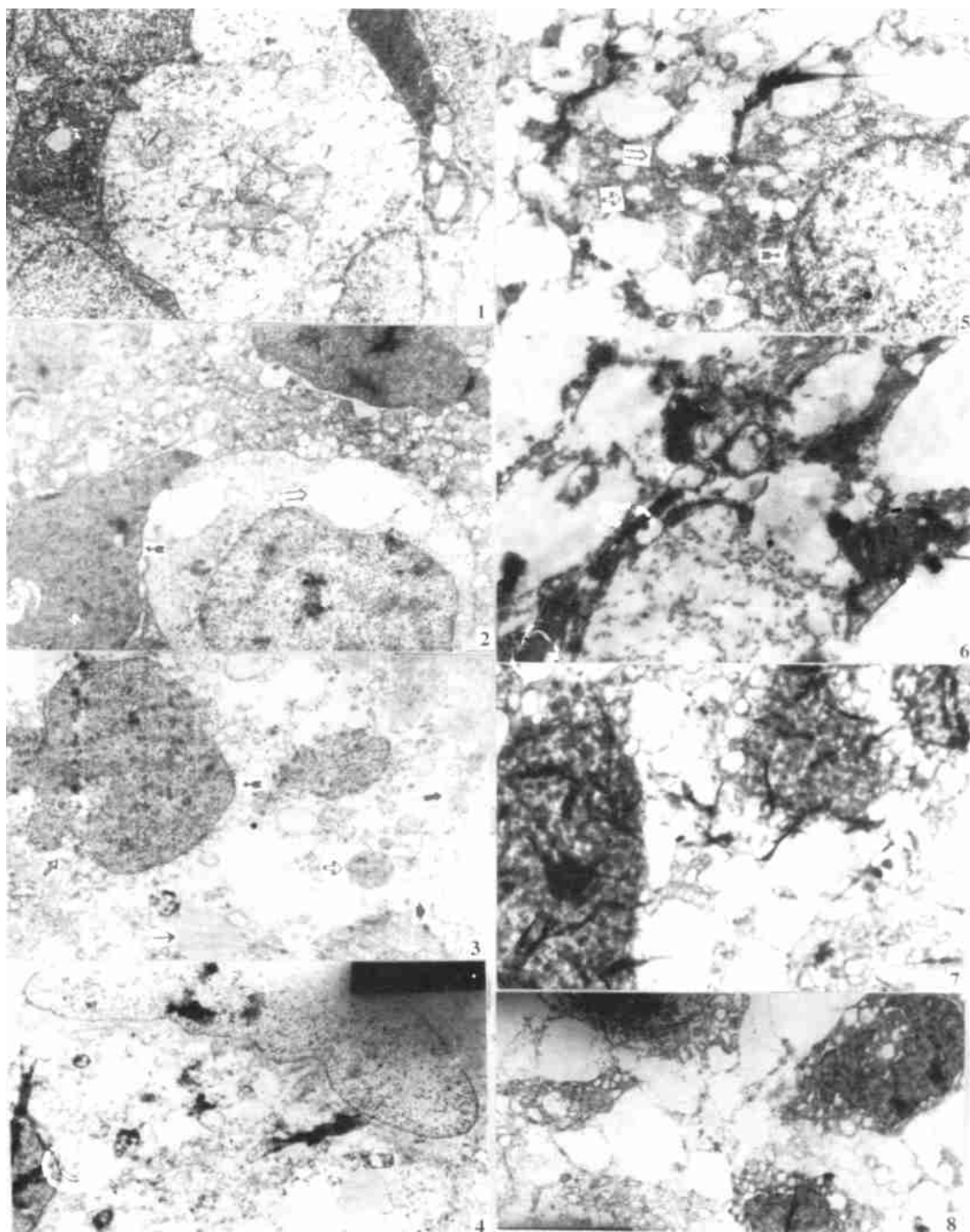
1. 正常肝组织的肝小叶、门静脉、肝细胞索, $\times 268$
2. 肝组织脂肪变性 $\times 400$
3. 肝组织坏死, 肝静脉管破裂出血 $\times 400$
4. 肝组织坏死 $\times 400$
5. 静脉管壁增厚呈纤维状 $\times 200$
6. 正常脑组织的灰质(\blacktriangleright)和髓质(\Rightarrow) $\times 268$
7. 病变脑组织的灰质(\blacktriangleright)和髓质(\Rightarrow) $\times 536$
8. 脑灰质部液化性坏死 $\times 1072$
9. 脑髓质部液化性坏死 $\times 1072$
10. 发炎的肾组织 $\times 400$
11. 幽门盲囊组织局部病变(\Leftarrow) $\times 200$



图版 II 施氏鲟肝组织、细胞电镜观察

Plate II Observation of diseased sturgeon hepatic tissue and cell under electron microscope.

- 1. 肝细胞内脂肪滴(↖)和胞浆内嗜染颗粒(⇔) × 3 600
- 2. 肝细胞内大量脂肪滴(↖)和空泡(➡) × 4 800
- 3. 肝细胞胞浆内水样空泡 × 4 800
- 4. 线粒体嵴溶解(➡)、崩解(⇔)、脂滴(↖) × 10 000
- 5. 核仁裂解(⇔)、内质网扩张(➡)、脂滴(↖) × 7 200
- 6. 高尔基体扩张 × 5 800
- 7. 肝静脉中白细胞(→)多和红细胞(⇔)少 × 1 900
- 8. 坏死肝细胞内有合胞体(➡) × 3 600



图版 III 施氏鲟幽门盲囊、脑组织细胞电镜观察

Plate III Observation of diseased sturgeon encephalic, pyloric cecum tissue and cell under electron microscope.

1. 正常幽门盲囊组织细胞×4 800 2. 幽门盲囊细胞核变形(→), 胞浆内有空泡(⇨) 3. 幽门盲囊细胞核变形(→), 核膜破裂(⇨), 线粒体嵴溶解(⇨), 崩解(→), 脂滴(↖)小而少, 内质网溶解(→) 4. 病变坏死幽门盲囊组织细胞×4 800 5. 脑细胞核变形(→), 线粒体崩解(⇨), 浆液状空泡(⇨)大而多×4 800 6. 脑组织细胞液化性坏死×10 000 7. 8. 脑组织细胞液化性坏死×3 600