

文章编号: 1000- 0615(2002)01- 0079- 06

“红肉病”文蛤中寄生类立克次体的 超微结构与细胞病理学

任素莲, 王德秀, 宋微波

(青岛海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:报道了患“红肉病”文蛤的消化盲囊上皮中所发现的类立克次体以及所引起的受感染细胞的病理学变化。该病原包涵体呈球形或椭圆形,有强嗜碱性和嗜酸性两种。电镜下观察到上皮细胞内充满了大量的类立克次体,其形态结构及大小表现了极大的多样性。受感染的细胞具有明显的病理学变化:内质网膨大为潴泡状,核糖体脱落;线粒体溶解或固缩;核膜肿胀,染色质固缩并出现液泡结构。高度感染时,细胞核与大部分的细胞器消失。在上皮细胞中,观察到类立克次体以二分裂和出芽方式进行繁殖。

关键词:文蛤;消化盲囊;类立克次体;超微结构;细胞病理学

中图分类号:Q248 文献标识码:A

On ultrastructure and cytopathology of the rickettsia-like organisms parasitized in the *Meretrix meretrix* Linnaeus suffering from “red muscle disease”

REN Su-lian, WANG De-xiu, SONG Wei-bo

(The Key Laboratory of Mariculture Certificated by the Ministry of Education, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: From June to July 2000, specimens of *Meretrix meretrix* Linnaeus which suffered from the “red muscle disease” (RMD) were collected from Qinhuangdao district of Hebei province. The rickettsia-like organisms (RLO) were found and observed in the digestive diverticula. There are two types of RLO inclusion bodies, one is basophilia and another is acidophilia, both of which observed are circularity or olivary shapes. By the electron microscope, the epithelial cells were filled with RLO, of which the shapes and sizes are different. The infected cells with RLO presented a series obvious pathological changes. The endoplasmic reticulum swollen and mostly turned into vesicles, the ribosomes degenerated. The mitochondria dissolved or condensed. The nucleus underwent a series of changes including the chromatin condensing, nuclear membrane swelling and forming nuclear vesicles. At last, the nucleus and most of cellular organelles disappeared. The RLO in binary fission and budding in the cytoplasm were observed.

Key words: *Meretrix meretrix*; digestive diverticula; rickettsia-like organisms (RLO); ultrastructure; cytopathology

收稿日期: 2001-06-25

基金项目: “教育部重点基金”、“高等学校骨干教师资助计划”及“长江学者奖励计划”联合资助。

作者简介: 任素莲(1964-), 女, 山东寿光人, 副教授, 博士生, 主要从事水产养殖动物的组织学、组织病理学与发育生物学方面的研究。E-mail: shen@mail.ouqd.edu.cn

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)肉味鲜美,是一种重要的海产经济双壳贝类。但随着养殖集约化程度的不断提高,文蛤的病害也常有发生,有时甚至会导致死亡。关于文蛤病害及死亡的原因,一般认为是由细菌、有害藻类等生物性因素以及海洋污染等非生物性因素造成的^[1-4]。2000年6-7月,我们对河北省秦皇岛一养殖场中患“红肉病”文蛤进行了组织学及病理学研究,结果发现在消化盲囊中存在大量寄生的类立克次体。作为系列研究的第一部分,本文主要报道了文蛤中所发现的类立克次体的形态、结构以及细胞病理学特征,以期为贝类病害的研究提供基础性资料。

1 材料与方 法

1.2 材料来源

文蛤标本于2000年6-7月取自河北省秦皇岛市抚宁文蛤养殖场,为3龄贝,壳高5~6cm。

1.2 研究方法

解剖病贝个体,取鳃、外套膜、消化盲囊、性腺、足等部位。部分样品用Bouin氏液固定,石蜡包埋切片,H.E染色,用作光镜下组织学观察;另一部分样品用2.5%的戊二醛及1%锇酸双固定,梯度乙醇脱水,Epon812环氧树脂包埋,LKB超薄切片,醋酸铀柠檬酸铅双重染色,日立H-7000型透射电镜下观察。

解剖并固定正常贝各部分组织,以作对比观察。

2 实验结果

2.1 患病文蛤主要症状

患病文蛤运动能力迟缓,摄食率下降;解剖发现,病贝表面粘液增多,呈水肿状,软体部为淡红或桔红色,故常被称为“红肉病”。在秦皇岛地区,此病多发生在3~4龄的高龄贝,有死亡现象。

2.2 组织学观察

病贝消化盲囊上皮细胞发生崩解、脱落,脱落的上皮细胞呈溶解性空洞状。上皮细胞及结缔组织内发现有两种类型的类立克次体(Rickettsia-like organism, RLO)包涵体,形态皆为圆形或椭圆形,大小约(9~10) μm ×(10~13) μm ,外被单层薄膜,界限清晰。其中一种包涵体均质、细密、嗜酸性,H.E染色为浅红色;另一种则呈强嗜碱性,H.E染色为深兰色,内部充满了大小均一、电子密度较高的粗颗粒(图版-1,IB)。在病贝鳃、外套膜、性腺等其他部位未见包涵体存在。

健康贝消化盲囊上皮细胞则排列整齐、规则,未发现有RLO包涵体存在(图版-2)。

2.3 超微结构观察

2.3.1 类立克次体的形态结构

上皮细胞内充满了寄生的RLO病原微生物(图版-3)。它们形态多样:呈球状、椭球状、哑铃形、马蹄形以及不规则形态等,大小约在0.2~0.7 μm 之间(图版-4)。这些RLO具有完整、清晰的细胞膜,但结构略有差异。一些细胞的细胞膜呈现夹膜样的蓬松结构;另外一些细胞的拟核内充满了均匀的、电子密度较高的物质;少数拟核内含1~2个电子密度较高的球形小颗粒(图版-4)。

电镜下可观察到若干处于分裂期的细胞(图版-5,箭头所示)以及正以出芽方式繁殖的类立克次体(图版-4,箭头所示)。

2.3.2 RLO造成的细胞病理学变化

RLO主要发现在消化盲囊的上皮细胞以及结缔组织细胞中。正常消化盲囊上皮细胞结构清晰,线粒体外膜明显,内嵴清晰(图版-6,M);粗面内质网呈叠层排列,两端有少量潴泡(图版-6,RER);溶酶体较小,外膜清晰,内部充满了均匀的物质(图版-6,L)。受感染的细胞呈现明显的病理变化:线粒体出现外膜溶解、嵴减少、内部空泡化的现象(图版-7,M);内质网呈潴泡状,核糖体脱落,减少(图版-7,

RER); 细胞质内溶酶体的数量增多并吞噬异物形成体积较大的次级溶酶体(图版-7, SL); 核内染色质固缩(图版-8, CH)、出现核内空泡(图版-8, NV)及核膜膨大、溶解的现象(图版-9, 箭头所示)。严重感染时上皮细胞发生溶解性坏死, 细胞内充满了分散的 RLO 个体。微绒毛基部被破坏, 大部分线粒体、内质网以及细胞核等细胞器溶解、消失, 仅残余少量处于溶解和退化状态的线粒体、内质网潴泡等。绝大多数次级溶酶体崩溃、消失, 少数形成残体(后溶酶体), 有的残体内还含有类似类立克次体的结构(图版-10, PL)。

3 讨论

RLO 是一类寄生于细胞质中的原核生物, 具有多态性, 以二分裂和出芽等方式进行繁殖, 生活史中具有明显的颗粒期(小细胞期)和颗粒前期(大细胞期)^[5-7]。姜明等曾发现寄生在真鲷肠上皮中的 RLO 分为增殖型和繁殖型两种, 前者个体较大, 呈多态性, 是上皮细胞破坏和病变的主要病原; 而后者个体小, 电子密度高, 以出芽方式繁殖形成, 是胞外传播和二次感染的主要途径^[8]。本研究显示, 文蛤消化盲囊中寄生的 RLO 具有典型的多态性以及二分裂和出芽繁殖的现象。因此分析这些多形态的、个体较大的 RLO 很可能属于繁殖期类型。

国内关于 RLO 寄生于海洋贝类的报道已较多, 但其致病性却意见不一。有文献认为 RLO 的感染与贝类的死亡密切相关^[6,9-13]; 相反意见则认为 RLO 对宿主细胞无损害或仅引起轻微的病理变化^[14-16]。本研究结果显示: 轻微感染者宿主细胞的细胞核、细胞器等仅发生轻微的病理学变化, 而严重感染者宿主细胞破坏严重, 细胞坏死, 生理机能丧失。因此, RLO 的侵染对文蛤造成的危害可能与感染的程度有关。轻微感染通常不会形成明显损害, 严重感染时则会引起宿主病理损伤以至死亡。

RLO 在宿主内寄生时能形成包涵体。包涵体的形态、大小、结构与性质通常认为与寄生的部位、发育时期有关^[9-12,14-16]。我们在文蛤消化盲囊中发现了两种包涵体, 二者结构不同可能与发育的不同时期有关。

在对文蛤不同组织的光学观察中, 未发现鳃、外套膜、肾、性腺中 RLO 包涵体寄生的现象。电镜观察结果显示: RLO 主要感染消化盲囊上皮的吸收细胞(具微绒毛细胞), 具有嗜细胞特性。

据报道, 海洋弧菌的感染也可能是造成文蛤疾病或死亡的重要原因^[1-4]。通过实验观察, 在患“红肉病”文蛤消化盲囊中不仅发现了大量的 RLO, 同时也发现了感染的病毒粒子, 但未见到二者共存于同一宿主细胞内的现象。这种由多种病原交叉感染的现象可能表明当贝类自身的免疫机能下降时, 往往会伴有继发性侵染的发生。因此有理由推断, 引起贝类某种疾病的发生或死亡的原因, 常常是多种因素综合影响的结果, 当然这个推测有赖于感染实验及深入研究结果的支持。

真诚感谢青岛海洋大学测试中心电镜室姜明、刘晓云老师在电镜制备中所给予的帮助。

参考文献:

- [1] Tan X F. On disease prevention and cure techniques of the *Meretrix meretrix* cultivated in the shrimp pond[J]. China Fisheries, 1998, 6: 42- 42. [谭秀凤. 虾池养殖文蛤病害防治技术[J]. 中国水产, 1998, 6: 42- 42.]
- [2] Yu Z H. Lecture on multiplication techniques of *Meretrix meretrix*: study and technology of prevention and cure on clam's disease caused by *Vibrio alginolyticus* [J]. J Aquaculture, 1998, 1: 30- 31. [于志华. 文蛤增殖技术讲座: 文蛤氟尼斯弧菌病的研究与防治技术[J]. 水产养殖, 1998, 1: 30- 31.]
- [3] Zheng G X, Li H, Yang X F, et al. Characteristics of *Vibrio* isolated from diseased clam (*Meretrix meretrix*) and histopathological observation on diseased clam by electron microscope[J]. J Fish China, 1991, 15(2): 85- 95. [郑国兴, 李何, 杨秀芳等. 文蛤病原菌(洛藻弧菌)的分离性状与病文蛤组织的电镜观察[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 85- 95.]
- [4] Liu J Y, Chen Z H, Yan B, et al. A report of the clam's disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Microbiol, 1996, 16(4): 1- 5. [刘军义, 陈振鸿, 阎冰等. 文蛤副溶血弧菌病的研究[J]. 微生物学报, 1996, 16(4): 1- 5.]
- [5] Huang X L. Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1998. 39. [黄秀梨. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 39.]

- [6] Wu X Z, Pan J P, Jiang J B. Advances in studies on shellfish diseases I. On microbial diseases of shellfish[J]. Mar Sci Bull, 1995, 14(2): 82-91. [吴信忠, 潘金培, 江静波. 贝类病害学研究进展 I. 贝类微生物学研究[J]. 海洋通报, 1995, 14(2): 82-91.]
- [7] Wang Y T, Xiang J H. Studies on causation of the mass mortality of *Chlamys fareri*[J]. Oceanol et Limnol Sin, 1999, 30(6): 771-774. [王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡原因的探讨[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 771-774.]
- [8] Jiang M, Fan R Q, Ru S G, et al. Preliminary study on the ultrastructure and cell pathology of Rickettsia-like organism in intestine epithelial tissue of *Pagrosomus major*[J]. J Ocean Univ Qingdao. 2000, 30(2): 129-134. [姜明, 范瑞青, 汝少国, 等. 真鲷(*Pagrosomus major*)肠上皮组织中类立克次体的超微形态结构与细胞病理学的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 129-134.]
- [9] Gulka G, Chang P W, Marti K A. Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*[J]. J Fish Dis, 1983, 6: 355-364.
- [10] Norton J H, Shepherd M A, Abdou-Naguit M R, et al. Mortalities in the giant clam *Hippopus hippopus* associated with Rickettsiales-like organisms[J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 201-209.
- [11] 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.
- [12] Wu X Z, Pan J P. Studies on the Rickettsia-like organism diseases of tropical marine pearl oyster—the morphology, morphogenesis and ultrastructure of RLO inclusions, an agent for *Pinctada maxima*[J]. Oceanol et Limnol Sin, 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.]
- [13] 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 histocytopathology 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.]
- [14] Elston R. Occurrence of branchial rickettsialeslike infection in two bivalve molluscs, *Tapes japonica* and *Patinopecten yezoensis*, with comments on their significance[J]. J Fish Dis, 1986, 9: 69-71.
- [15] Morrison C, Sh G. Rickettsias in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck)[J]. J Fish Dis, 1983, 6: 537-541.
- [16] Renault T, Cochermeac N. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. J Invertebr Pathol, 1994, 64: 160-162.

下期论文摘要

胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查

王秀华¹, 王崇明¹, 李筠², 王祥红², 郑桂丽², 胡晓钟³, 龚俊³, 宋微波³

(1. 黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

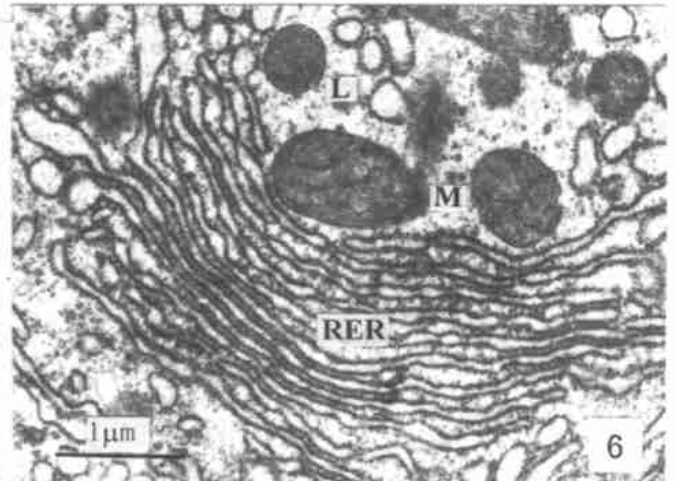
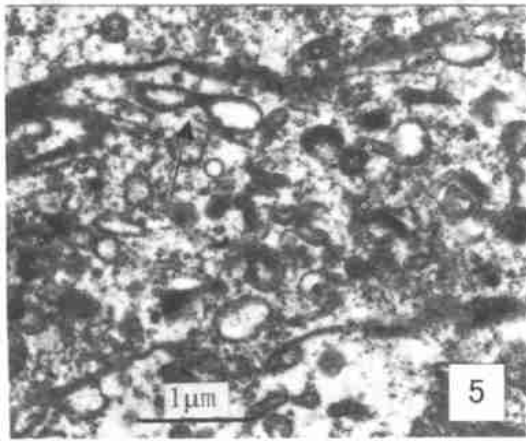
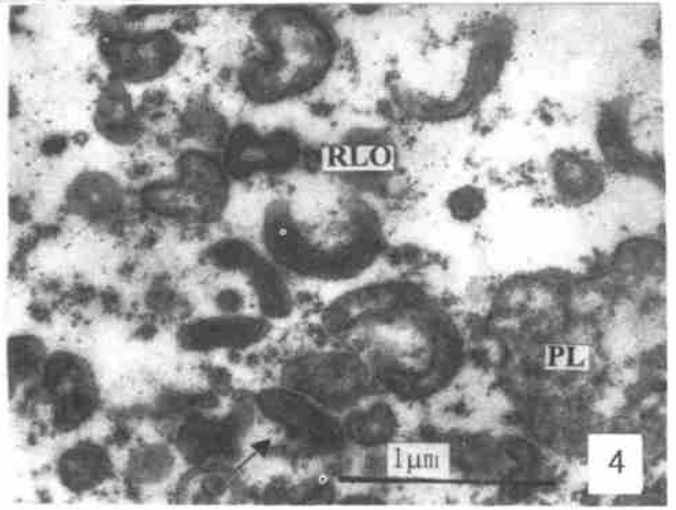
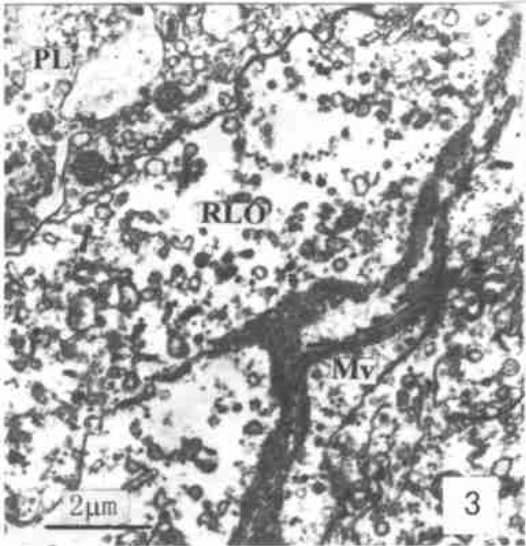
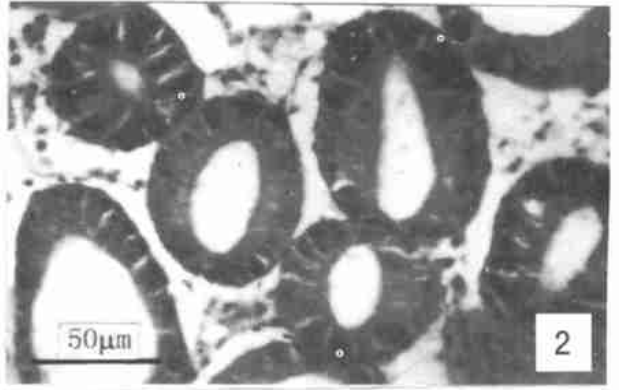
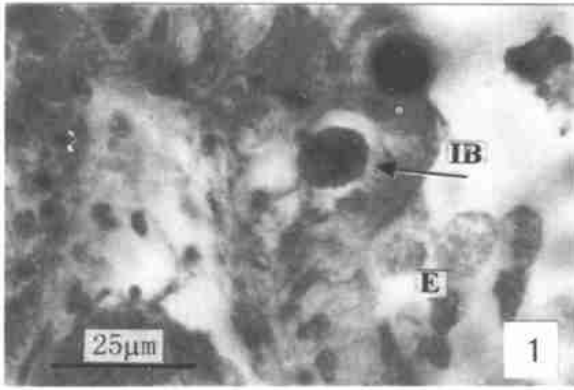
3. 青岛海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

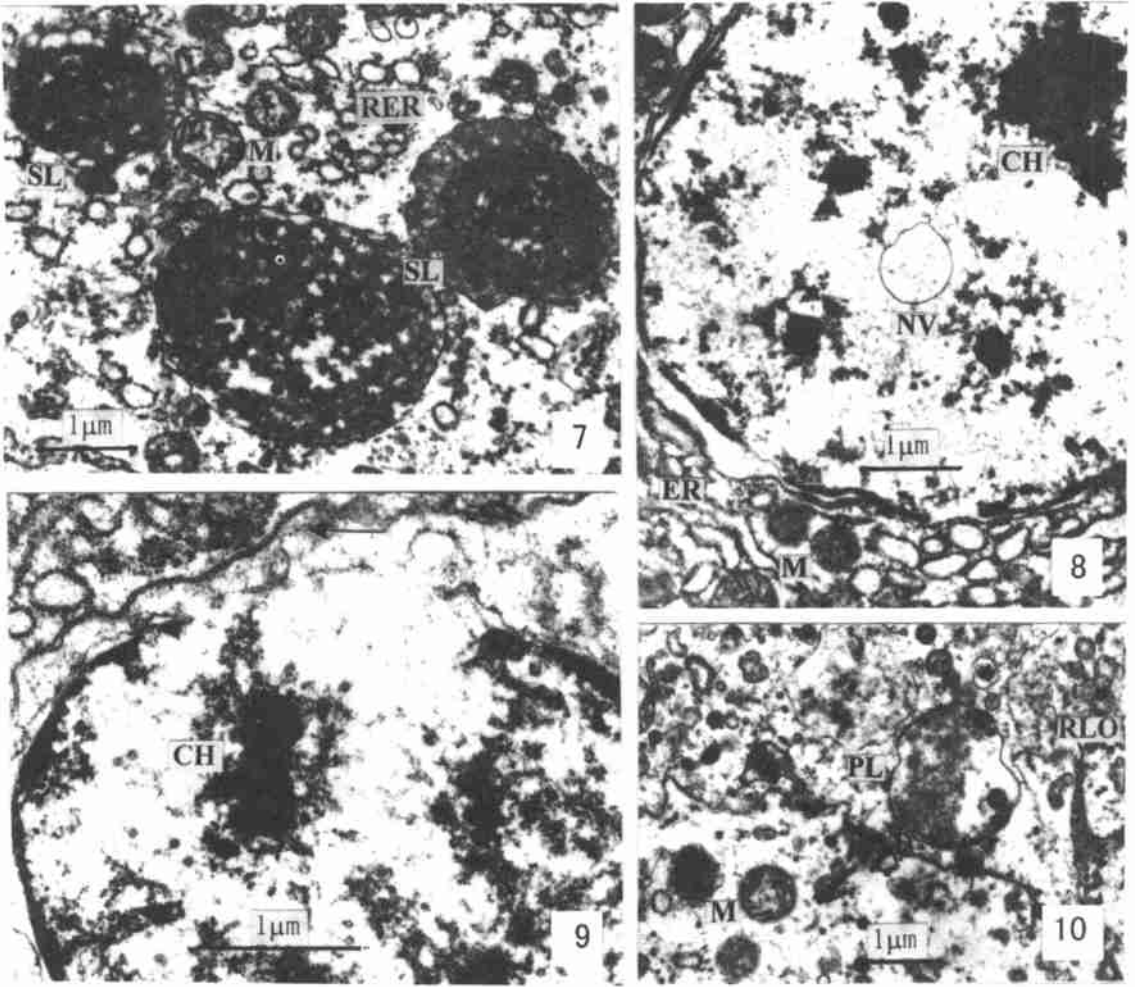
摘要: 2000年1月-12月, 跟踪调查了胶州湾养殖栉孔扇贝大规模死亡情况, 对养殖海域环境因子进行了测定, 并对大规模死亡期间发病栉孔扇贝进行了病理学观察。调查结果显示, 胶州湾养殖栉孔扇贝大规模死亡呈暴发性并集中在7月下旬的高水温期。发病高峰期在7月21日至7月27日, 最高时点患病率达14.5%, 7月份的月死亡率为58.0%。至8月3日累积死亡率达90.0%, 患病贝死亡率接近100%。发病期扇贝壳高平均为 $5.0 \pm 0.9 \text{ cm}$, 养殖栉孔扇贝半数死亡时间在7月23日。通过对水环境因子、病原性生物因子的调查分析及病理学观察表明, 栉孔扇贝的大规模死亡可能是由生物性因子(病毒)所致, 而与环境中理化因子可能无直接的相关关系。

关键词: 栉孔扇贝; 流行病学; 胶州湾

任素莲等：“红肉病”文蛤中寄生类立克次体的超微结构与细胞病理学

图版





图版说明 Explanation of Plate

1. 文蛤病变的消化盲囊结构, 示脱落的上皮细胞与RLO包涵体; 2. 正常文蛤消化盲囊的结构; 3. 类立克次体严重感染的上皮细胞; 4. 细胞质内多形态的类立克次体, 箭头示正在出芽繁殖的RLO; 5. 正在以二分裂进行繁殖的类立克次体; 6. 正常消化盲囊的上皮细胞, 示线粒体、内质网、溶酶体; 7. RLO感染后上皮细胞, 示次级溶酶体、线粒体与内质网; 8. RLO感染后细胞核内发生染色质浓缩、液泡出现; 9. RLO感染后膨胀的细胞膜; 10. 严重感染时细胞质内的后溶酶体。

E: 上皮细胞; IB: 包涵体; Mv: 微绒毛; RLO: 类立克次体; N: 细胞核; M: 线粒体; RER: 粗面内质网; L: 初级溶酶体; SL: 次级溶酶体; PL: 后溶酶体; NV: 核泡; CH: 染色质

1. The digestive diverticula's structure of *Meretrix meretrix*, showing the shed epithelium and RLO inclusion body; 2. The structure of digestive diverticula of normal *Meretrix meretrix*, light microscopy; 3. The infected epithelium with RLO; 4. The polymorphic RLO in cytoplasm. A row indicated RLO in budding; 5. To show RLO in binary fission; 6. The Epithelia of normal digestive diverticula, showing mitochondria, endoplasmic reticulum and lysosome; 7. The infected epithelia with RLO, showing the secondary lysosome, mitochondria and endoplasmic reticulum; 8. To show condensed chromosome with vacuole appeared in the nucleus; 9. The swelled membrane infected with RLO; 10. The post-lysosome of cytoplasm infected serious with RLO.

E: epithelia; IB: inclusion body; Mv: microvilli; RLO: reckettsia-like organism; N: nucleus; M: mitochondria; RER: rough endoplasmic reticulum; L: lysosome; SL: secondary lysosome; PL: post lysosome; NV: nuclear vesicle; CH: chromatin