

文章编号:1000-0615(2006)01-0108-05

凡纳滨对虾白斑综合征血液病理研究

冯守明¹, 杨先乐², 李军¹, 王蓉¹, 赵燕超¹

(1. 天津市水产研究所, 天津 300221;

2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:对自然发病、投喂和注射感染的凡纳滨对虾白斑综合征(white spot syndrome, WSS)血液病理进行研究, 结果发现:不同感染方式患病对虾的血液病理变化相似, 表现为:1. 患病对虾血细胞总数、透明细胞数量极显著减少, 小颗粒细胞、大颗粒细胞极显著增加。2. 显微病理变化主要表现为血涂片中血细胞明显减少且分布不均匀, 破损或解体的细胞增多, 呈典型的溶血状态。3. 超微病理变化表现为, 大部分血细胞坏死, 少数血细胞呈不典型的凋亡。患病对虾的血细胞核中可见大量白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)粒子。病理变化表明血细胞是 WSSV 的主要靶细胞。

关键词:凡纳滨对虾; 血液病理; 白斑综合征

中图分类号: S941 **文献标识码:** A

Haemolymph pathological research on white spot syndrome(WSS) of *Litopenaeus vannamei*

FENG Shou-ming¹, YANG Xian-le², LI Jun¹, WANG Rong¹, ZHAO Yan-chao¹

(1. Tianjin Fishery Institute, Tianjin 300221, China;

2. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The results of pathological research in haemolymph on WSS of *Litopenaeus vannamei* are as follows: pathological changes in WSS are evident and similar among diseased shrimps by different infecting manner. First, total haemocyte count in diseased shrimps is lower heavily than that in healthy shrimps. The percentage of the hyaline cell in diseased shrimps is lower heavily than in healthy shrimps. The percentages of small and large granule haemocytes of diseased shrimps are all higher heavily than those in healthy shrimps. Second, the main micro-pathological changes of haemocyte showed that there was an abnormal distribution of hemocytes in haemolymph smear from diseased shrimps. Broken and disintegrated cells can often be seen in the haemolymph smear. Third, the ultra-micro-pathological changes showed that there were necrotic changes in every kind of haemocytes, and there were atypical apoptosis phenomena in certain hemocytes; There were also many WSSV in certain hemocyte nucleus. All above showed that hemocyte cell was the main target cell of WSSV.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; haemolymph pathology; white spot syndrome(WSS)

血液病理研究是病理学研究的主要内容之一,它是疾病发生机理、病原学及防治方法研究的理论基础。有关对虾白斑综合征(WSS)血液病理

的研究报道较少, van de Brank 等^[1]对斑节对虾白斑综合征的血液病理进行了研究;陈平等^[2]电镜观察了中国对虾、日本对虾、长毛对虾、斑节对虾

收稿日期:2004-09-20

资助项目:农业部丰收计划项目(200031231101)

作者简介:冯守明(1965-),男,副研究员,硕士,主要从事水产动物疾病学研究, Tel: 022-88251062, E-mail: smfeng65@eyou.com

的健康虾和白斑综合征病虾的血细胞,对健康血细胞的亚显微结构进行了详细的描述,简述了血细胞超微病理变化;张吕平等^[3]对人工感染白斑综合征的斑节对虾血淋巴的有形成分进行测定,在光学显微镜下描述了病虾和健康虾血细胞的形态区别。迄今为止,未见凡纳滨对虾白斑综合征血细胞显微、超微病理、病虾血细胞总数、分类计数及与健康虾比较的研究报道。本文针对上述内容进行研究,以期为该疾病的诊断和防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 取自半咸水养殖池,盐度 4.5,体长(10.1 ± 0.6) cm。PCR 检测对虾的胃、肝胰腺、上皮及池中枝角类、桡足类均为 WSSV 阴性,养殖池水化学指标符合渔业水质标准。自然发生白斑综合征的凡纳滨对虾采自半咸水养殖池,盐度 3.5,体长(6.2 ± 0.5) cm,症状明显,PCR 检测为 WSSV 强阳性。电镜标本现场采集固定。

1.2 实验方法

人工感染病料制备 取自然发生白斑综合征病虾头部,加入 2% 无菌生理盐水研碎,离心 10 min(4 °C, 4 000 r · min⁻¹),取上清液离心 20 min(4 °C, 15 000 r · min⁻¹),上清液用 0.45 μm 滤膜过滤,收集滤液用于注射感染^[4]。投喂感染病料为自然发病对虾头部。

注射感染 取健康对虾 20 尾,分成 2 组(试验组和对照组),每组 10 尾,水族箱中养殖,盐度与健康对虾自然养殖池相同(人工海水稀释)。投喂人工配合饵料,适量换水,不间断充气。暂养 6 h 后,试验组每尾对虾肌肉注射病料 0.1 mL,对照组每尾注射 2% 无菌生理盐水 0.1 mL^[4],对症状明显濒死的对虾及时取材,试验结束时对照组对虾同样方法取材。

投喂感染 试验组投喂自然发病对虾头部,对照组投喂人工配合饵料,每天 3 次,每天换水 1 次,不间断充气。病虾取材方法与注射感染同。

血涂片制作、染色及观察 抗凝剂湿润的注射器从对虾心脏中抽取血淋巴,推片,自然干燥,甲醇固定 3 min,8% 姬姆萨液染色 25 min,酸酒精分色,自来水漂洗^[5],干燥后用奥林帕斯 BH-2 光

学显微镜观察,照相。

血细胞总数计数 用 100 μL 微量注射器抽取 80 μL 抗凝剂^[6],然后,从对虾心脏中抽取血淋巴至 100 μL(稀释倍数为 5 倍),立即将注射器中的混合物注到血球计数板上,按照人白细胞的计数方法^[7]计数血细胞总数。

血细胞分类计数 光学显微镜油镜(×1000)观察每尾对虾血涂片,连续观察 200 个血细胞,记录各类血细胞的所占百分含量。

血细胞超微病理观察 血淋巴离心电镜样品制备方法为,用装有注射器 3 mL 抗凝剂从对虾围心腔中抽取 2 mL 血淋巴,4 °C 条件下离心管中静置 1 h 后,离心 8 min(4 °C, 1 500 r · min⁻¹),二甲酸钠缓冲溶液洗沉淀,戊二醛和四氧化锇双固定^[2,6]。心脏电镜样品制备方法为,将适量戊二醛注射到围心腔中,解剖对虾取出心脏,戊二醛和四氧化锇双固定^[2,6]。将固定样本分别用 Epon812 渗透包埋,Leica 超薄切片机切片(800 Å),醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色^[8],日本电子 100CX 透射电镜观察,照相。

2 结果

2.1 人工感染试验

试验结束后,试验组对虾的白斑综合征发病率为 100%,病虾白斑综合征症状明显,随机抽取一尾试验组和对照组对虾进行 PCR 白斑综合征病毒检测,试验组为强阳性,对照组为阴性。

2.2 对虾血细胞计数及比较结果

不同感染方式凡纳滨对虾白斑综合征病虾和对照虾血细胞数量计数及比较结果见表 1。

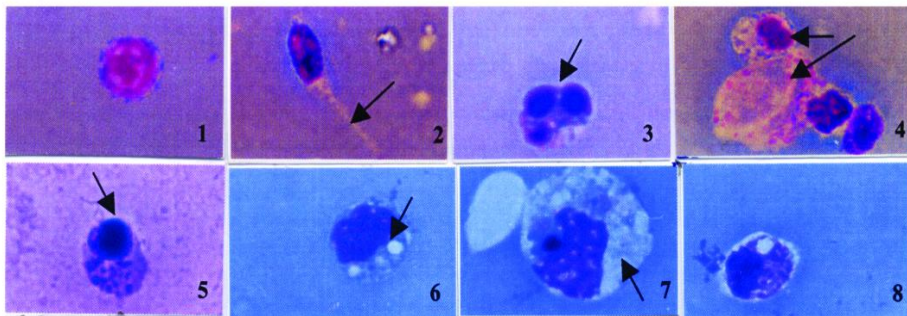
2.3 血细胞病理的光镜观察结果

血细胞显微病理变化不因感染方式的不同而呈明显的不同,主要显微病理变化为,血涂片中血细胞明显减少,且分布不均匀,多集中在血涂片的尾部和边缘,正常血细胞减少,病变、破损或解体的细胞增多,呈典型的溶血状态,透明细胞明显减少,粒细胞明显增多。病变透明细胞胞质中出现空泡,梭形细胞增多,伸出长伪足(图版 1-2);病变小颗粒细胞胞质空泡化(图版 1-6,8),细胞核固缩或破碎,染色加深(图版 1-3,5);病变大颗粒细胞核变形、破碎,细胞质变得稀薄且出现大量空泡,部分大颗粒细胞解体,胞浆溢出(图版 1-4,7)。

表 1 凡纳滨对虾白斑综合征病虾和对照虾血细胞数量测定结果

Tab. 1 The results of hamocyte count of healthy and infected WSSV *Litopenaeus vannamei*

项目 items	感染方式 infection manner	对照虾 control shrimp	试验虾 experimental shrimp	t 值 t value	t 检验结果 t check
血细胞总数 (cell/ mL) (M ±SD) total hemocyte count	注射 injection	10215 ±957	1244 ±169	9.17	极显著 (HSD)
	投喂 feeding	10558 ±872	1293 ±331	34.41	极显著 (HSD)
	自然发病 nature	10599 ±866	1279 ±186	33.25	极显著 (HSD)
透明细胞 (%) (M ±SD) hyaline hemocyte	投喂 feeding	69.9 ±4.7	45.4 ±2.9	13.32	极显著 (HSD)
	注射 injection	65.8 ±3.0	36.1 ±2.2	25.12	极显著 (HSD)
	自然发病 nature	71.8 ±3.7	43.6 ±3.4	17.88	极显著 (HSD)
小颗粒细胞 (%) (M ±SD) small granule hemocyte	投喂 feeding	23.3 ±1.4	34.4 ±1.6	16.36	极显著 (HSD)
	注射 injection	29.2 ±1.3	35.8 ±1.4	11.07	极显著 (HSD)
	自然发病 nature	25.1 ±1.6	35.1 ±2.3	12.1	极显著 (HSD)
大颗粒细胞 (%) (M ±SD) large granule hemocyte	投喂 feeding	6.8 ±0.6	20.2 ±1.8	24.45	极显著 (HSD)
	注射 injection	5.0 ±0.3	28.1 ±1.3	56.75	极显著 (HSD)
	自然发病 nature	3.1 ±0.3	21.4 ±1.5	38.32	极显著 (HSD)

Notes: $df = 18$, $t_{0.05} = 2.101$, $t_{0.01} = 2.878$ 

图版 Plate

1. 正常透明细胞, $\times 1000$; 2. 透明细胞, 梭形具伪足(箭头), $\times 1000$; 3. 小颗粒细胞核破裂(箭头), $\times 1000$; 4. 大颗粒细胞溶解(长箭头), 小颗粒细胞(短箭头), $\times 1000$; 5. 小颗粒细胞核固缩(箭头), $\times 1000$; 6. 小颗粒细胞空泡化变性(箭头), $\times 1000$; 7. 大颗粒细胞胞质空泡化变性(箭头), $\times 1000$; 8. 小颗粒细胞, $\times 1000$

1. normal hyaline hemocyte, $\times 1000$; 2. hyaline hemocyte, shuttle shape and pseudopodium (arrow), $\times 1000$; 3. broken nucleus (arrow) in small granule hemocyte, $\times 1000$; 4. disintegrated large granule hemocyte (long arrow), small granule hemocyte (short arrow), $\times 1000$; 5. pyknosis (arrow) in small granule hemocyte, $\times 1000$; 6. bubbles (arrow) in denaturalized small granule hemocyte, $\times 1000$; 7. bubbles (arrow) in denaturalized large granule hemocyte, $\times 1000$; 8. small granule hemocyte, $\times 1000$

2.4 血细胞病理的电镜观察结果

电镜观察对虾血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞 3 种, 大多数的透明细胞的胞膜表面光滑, 细胞质中细胞器稀少, 空泡较多, 胞质中存在少量高电子密度的颗粒, 多数由单层膜包裹, 包膜与内涵物间有空晕隔开, 形成包被小泡(图版 - 1, 2)。小颗粒细胞膜不光滑, 细胞质中有较多的线粒体、内质网等细胞器和少量空泡, 胞质中可见较多大颗粒, 无包膜的颗粒多, 包被小泡少(图版 - 3)。大颗粒细胞是 3 种血细胞中体积最大的细胞, 胞质中含有大量无空晕大颗粒, 未见包被小泡, 且有大量的线粒体、内质网等细胞器

和少量空泡(图版 - 1, 4)。

不同感染方式患病对虾的超微病理变化相似, 主要表现为: 大部分血细胞为典型坏死, 坏死血细胞无选择性, 3 种血细胞都出现坏死, 且超微病理变化相似, 表现为: 核内染色质溶解, 核膜溶解, 核固缩(图版 - 6, 9), 部分细胞核边移(图版 - 6, 8); 胞浆水肿, 胞质中的细胞器变性、坏死、溶解(图版 - 6, 8), 内质网首先呈囊性扩张, 随后膜溶解, 线粒体坏死、部分溶解, 细胞膜破裂, 胞浆溢出(图版 - 9)。少数血细胞呈不典型的凋亡, 表现为核固缩呈高电子密度, 胞浆轻度浓缩变暗, 细胞器变性, 形状尚存(图版 - 5)。少数血

细胞已经溶解,线粒体等细胞器也已经溶解,裸露的核中可见大量 WSSV 粒子(图版 - 7),病毒粒子短杆状,两端盾圆,双层囊膜,内有核衣壳及高电子密度的髓核,与已有的 WSSV 报道资料相同(图版 - 10)。

3 讨论与结语

本文血液病理观察结果表明,白斑综合征凡纳滨对虾病虾血淋巴中的血细胞显微、超微病理变化严重,一些血细胞中可见大量 WSSV 存在。有关对虾白斑综合征血液病理的研究报道较少,张吕平等^[3]对斑节对虾白斑综合征血淋巴中血细胞的显微病理变化进行了观察、描述。本研究关于血液组织中的血细胞超微病理观察结果与多数学者对患病对虾其它组织间感染病毒血细胞超微病理变化描述相似,黄^[9]研究中国对虾暴发性流行病超微病理时发现,病虾肝胰脏组织间的血细胞肿大,逐渐溃散,只剩下膨大的细胞核,核中可见大量 WSSV,认为血细胞是 WSSV 的主要靶细胞;王云祥等^[7]电镜观察患对虾暴发性流行病患病的中国对虾肝胰脏等组织间血细胞超微病理变化,得出了与黄等的相似结论。根据本文及以前学者的研究结果,笔者认为,凡纳滨对虾血细胞是 WSSV 的主要靶细胞之一。

本文血细胞分类计数结果(表 1)表明,不同感染方式凡纳滨对虾白斑综合征病虾的小颗粒和大颗粒细胞都极显著增加,该结果与一些学者对其它对虾品种的研究结果相似。张吕平等^[3]研究斑节对虾白斑综合征患病对虾血液病理发现,血涂片中血细胞数量相对减少,颗粒细胞相对增多;陈平等^[2]对自然发生白斑综合征的中国对虾、日本对虾、长毛对虾和斑节对虾的血细胞进行超微观察,发现在病毒感染的组织中小颗粒细胞数量明显增多。那么是什么原因导致这一病理变化的呢?国外学者认为,小颗粒细胞可以通过吞噬作用参与对虾机体的非特异性免疫^[10]。大颗粒细胞内有大量高电子密度的颗粒,里面含有大量凝血酶原、酚氧化酶原,在受伤或异物刺激情况下,其被称为“暴发性细胞(explosive cell)”,具有哺乳动物血小板的作用,其通过细胞破裂释放出凝血酶原,迅速变成凝血酶,与血液中的纤维蛋白原作用形成纤维蛋白凝块,导致其相对数量可迅速代偿性增加^[11]。国内学者认为,颗粒细胞内有大量

高电子密度的颗粒,当病原等异物侵入时可以通过胞吐作用释放到胞体外,参与机体的非特异性免疫^[12,13]。因此,综上所述,小颗粒和大颗粒细胞在非特异性免疫及生理防御等方面的积极作用可能是导致白斑综合征病虾体内该二种细胞的相对百分含量明显高于健康虾的主要原因之一。

本文对虾血细胞总数的计数结果(表 1)表明,不同来源的白斑综合征患病对虾的血细胞总数极显著减少。一些学者认为,导致这一病理变化的原因在于,当 WSSV 感染对虾后,出于机体抵抗外来病原的需要,血细胞会聚集在 WSSV 密集处^[1],或聚集在其它靶细胞周围^[7],从而导致参与体循环的血细胞数量减少。另外,笔者认为,由于血细胞是 WSSV 主要靶细胞之一,WSSV 的寄生可以造成血细胞坏死、溶血等一系列病理变化,进而导致血细胞总数急剧减少,血细胞数量的降低反过来加剧了对虾免疫机能的下降,导致其它组织细胞更易被 WSSV 感染,使对虾整体机能下降,最后死亡。

参考文献:

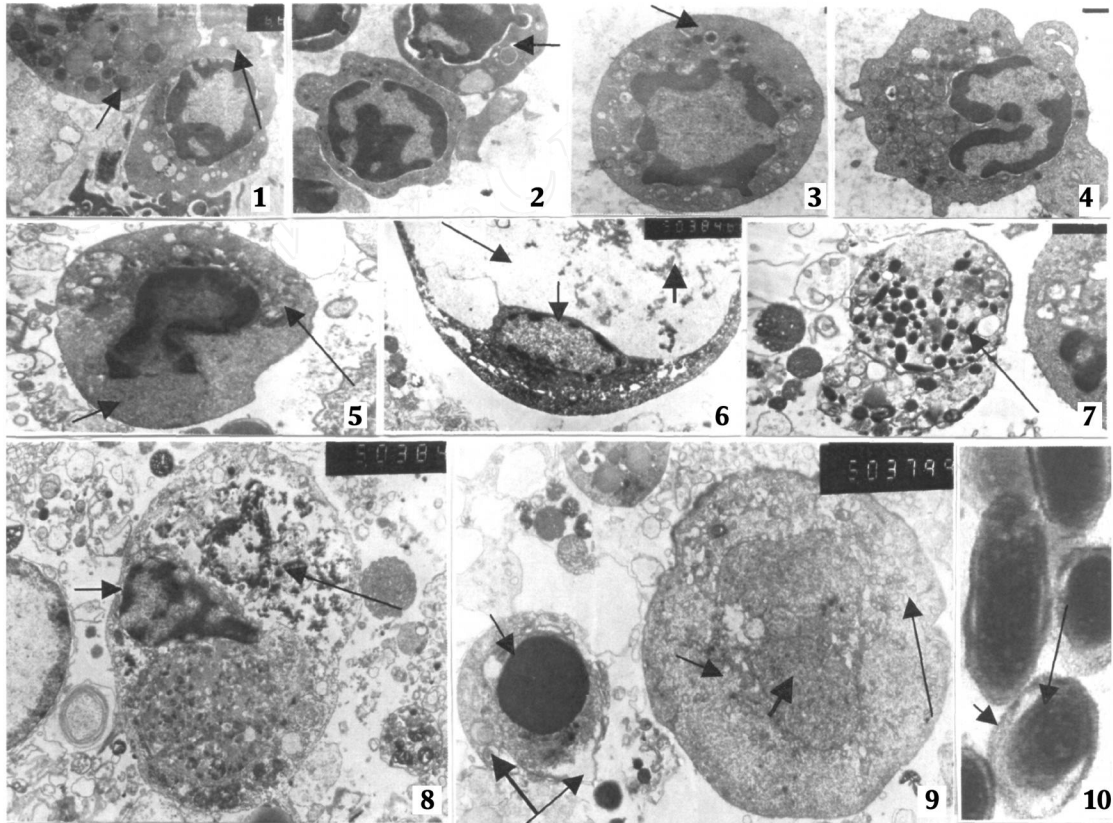
- [1] van de Brank C B, Botterblom M H, Huisman E A, et al. Preliminary study on hamocytic responses to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Dis Aquat Organ, 2002, 51 (2): 149 - 155.
- [2] 陈平,黄槐,池信才,等. 四种对虾血细胞组成及超微结构[J]. 水生生物学报,1998,22(2):158 - 161.
- [3] 张吕平,胡超群,吴灶和. 实验感染白斑杆状病毒(WSBV)的斑节对虾血液病理研究[J]. 热带海洋,2000,19(3):1 - 9.
- [4] 国家质量检验检疫总局. 世界动物卫生组织水产动物疾病检验手册(第三版)[S]. 北京:中国农业出版社,2000. 159 - 210.
- [5] 甘肃省卫生局. 临床医学检验手册(第二版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1981. 7 - 36.
- [6] 蒋琼,王雷,罗日祥. 中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选[J]. 水产学报,2001,25(4):259 - 362.
- [7] 王云祥,孙金生,李秀梅,等. 1994年天津地区养殖对虾暴发性流行病的调查研究[A]. 第三届全国人工养殖对虾疾病防治和环境管理学术研讨会论文集[C]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1996. 68 - 75.
- [8] 张丰德,王秀玲. 现代生物学技术(第二版)[M]. 天津:南开大学出版社,2001. 52 - 78.
- [9] 黄^[9],宋晓玲,于佳,等. 杆状病毒性的皮下造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理[J]. 海洋水产研究,1995,16(1):1 - 6.
- [10] Bahene E, Mialhe E. Knowledge and research prospects in

marine mollusa and crustacean immunology [J]. Aquac, 1995, 132:17 - 32.

[11] 陈南生,李新正,刘恒,等. 对虾生物学[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1992. 31 - 35.

[12] 李光友,王青. 中国对虾血细胞及免疫研究[J]. 海洋与湖沼,1995,26(6):591 - 597.

[13] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学,1995,4:1 - 3.



图版 Plate

1. 透明细胞, 包被小泡(长箭头), 大颗粒细胞, 示无包被大颗粒(短箭头), ×9 900; 2. 透明细胞, 包被小泡(箭头), ×7 500; 3. 小颗粒细胞, 包被小泡(箭头), ×9 900; 4. 大颗粒细胞, ×9 900; 5. 不典型凋亡, 胞浆轻度浓缩(短箭头), 细胞器变性(长箭头), ×7 500; 6. 坏死细胞核边移, 核中央染色质溶解(细短箭头), 胞浆水肿(长箭头), 细胞器溶解(粗短箭头), ×7 500; 7. 坏死细胞, 细胞解体, 裸露的核内大量病毒粒子(箭头), ×9 900; 8. 细胞坏死, 核变形边移(短箭头), 线粒体坏死(细长箭头), ×7 500; 9. (左)核固缩(细短箭头), 线粒体破裂、坏死(粗短箭头), 细胞膜破裂, 胞浆溢出, 颗粒释放(长箭头), (右)细胞坏死, 核崩解(细短箭头), 染色质溶解(粗短箭头), 内质网囊性扩张(长箭头), ×7 500; 10. WSSV 超微结构, 病毒形态, 双层囊膜(短箭头), 核衣壳(长箭头), ×100 000

1. normal hyaline haemocyte, showing the invested small particles (long arrow); normal large granule haemocyte, showing the large particles without peridium(short arrow), ×9 900; 2. normal hyaline haemocyte, showing the invested small particles (arrow), ×7 500; 3. small granule haemocyte, showing the invested small particles (arrow), ×9 900; 4. large granule haemocyte, ×9 900; 5. atypical apoptosis haemocyte, condensed cytoplasm (short arrow), organoid denaturation(long arrow), ×7 500; 6. a margined nucleus, chromatin dissolution (thin short arrow) in a necrotic haemocyte, cytoplasm hydrops(long arrow), broken organoid(short arrow), ×7 500; 7. necrotic and disintegrated haemocytes, a large number of WSSV in naked nucleus (arrow), ×9 900; 8. necrotic haemocyte, disintegrated and margined nucleus (short arrow), necrotic plastosome (long arrow), ×7 500; 9. (left) pyknosis (thin short arrow), necrotic and broken plastosome (thick short arrow), broken cell membrane and cytoplasm overflow and particles disengagement(long arrow); (right) necrotic haemocyte, broken nucleus (thin short arrow), chromatin dissolution (thick short arrow), endoplasmic reticulum expande(long arrow), ×7 500; 10. the ultrastructure of WSSV, showing the double-member (short arrow), karyo-theer of WSSV, ×100 000