

三角帆蚌瘟病的组织病理研究

邵健忠 项黎新 李亚南 张明洲 毛树坚

(杭州大学生物研究所, 310012)

提 要 对健康及患瘟病三角帆蚌的13种脏器组织作了系统的形态结构观察和组织化学分析,结果表明,三角帆蚌瘟病的组织病理变化主要集中在病蚌的肝脏、胃和直肠等组织。病毒侵袭蚌体后,肝脏的吸收细胞、未成熟细胞以及胃、直肠的纤毛上皮细胞内出现病毒包涵体,DNA和RNA等正常代谢受到抑制,AKP和ACP酶的活性和分布发生异常,细胞内消化作用受阻,最后病变细胞解体,导致肝脏、胃和直肠等的广泛受损。病蚌因消化系统坏死和消化功能丧失而死亡。还就正常三角帆蚌消化系统的结构与功能作了探讨。

关键词 三角帆蚌瘟病,嵌砂样病毒,贝类组织病理,三角帆蚌

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)瘟病是目前我国贝类养殖和育珠生产中危害最为严重的传染性蚌病。国内自70年代末开始其病原的研究。倪达书等[1982]曾报道该病是由斑点气单胞菌的一个变种所引起;张治国等[1986]和沈志荣等[1986]确认为病毒性蚌病;1987年分离到病原病毒,经理化性质等初步鉴别,认为具有嵌砂样病毒(Arenavirus)的特征,暂定名为三角帆蚌瘟病病毒(*Hyriopsis cumingii* plague Virus, HcPV)[张治国等,1987]。最近,邵健忠等[1993a,1993b]报道了HcPV的精细结构与基因组及多肽的研究;并发现瘟病的性质与消化系统代谢紊乱有关。为了进一步探讨三角帆蚌瘟病的发病机理,本文报道其组织病理研究结果。

1 材料与方法

1.1 健康蚌

2—3龄健康三角帆蚌100余只,取自浙江省德清县水产养殖公司蚌养殖基地,蚌体长10—17 cm。实验前置水族箱,25℃人工饲养30天以上,经检查确证无病后供作对照和人工感染试验用。

1.2 自然发病蚌

取自德清地区疫点已植片或未植片的2—3龄发病育珠蚌,濒死前解剖观察,确认具有典型瘟病症状后取样。

1.3 人工感染病蚌

按邵健忠等[1993a]报道的蔗糖密度梯度离心法从自然发病的病蚌组织分离三角帆蚌瘟病病毒(HcPV);然后采用 Reed-Muench 法测定其对蚌体的半数致死剂量 LD_{50} ,并以 $100LD_{50}$ 的量从斧足与内脏团交接处注射健康蚌。感染后维持水温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,在发病早期及后期显症后分别取样。

1.4 病理组织切片法

选用自然发病和人工感染发病的病蚌各7只,健康对照蚌4只,分别取小块外套膜、生殖腺、鳃、心室、心房、闭壳肌、斧足、肾、食道、胃、肝脏、肠道和直肠等13种脏器组织,用 Zenker 氏液固定,按常规法制成 $5-6\text{ }\mu\text{m}$ 厚的石蜡切片,苏木精-伊红(H. E.)染色,Nikon 万能显微镜观察并照相。

1.5 组织化学法

以上健康蚌和病蚌的13种脏器组织,分别用冷丙酮或 Zenker 氏液固定,石蜡包埋切片,Gomori 氏钙-钴法显示碱性磷酸酶(AKP)[Bancroft 等,1982;郑德崇等,1986]、MeDendel 氏改良法显示酸性磷酸酶(ACP)[Culling,1963]、Mann 氏伊红-甲基蓝染色法显示病毒包涵体、汞-溴酚蓝(Hg-BPB)染色法和蛋白酶消化法显示酶原和蛋白质颗粒、过碘酸-Schiff 试剂(PAS)反应和糖苷酶消化法显示糖原和杯状细胞[芮菊生等,1980;Bergmeyer,1983]、Feulgen 反应及 DNase 消化法显示 DNA、Brachet 反应及 RNase 消化法显示 RNA[Kiernan,1990;Sambrook,1989]。

2 结果

2.1 临床症状

三角帆蚌瘟病主要发生于二龄以上已植片或未植片的育珠蚌。病蚌症状表现为闭壳肌收缩无力,贝壳不能紧闭,对外界刺激反应迟钝,斧足紧缩不伸展。进水孔和排水孔纤毛收缩,滤过作用降低,滤食和排粪减少,直至完全停止。

打开贝壳后可见肝脏由原来的暗绿色变为棕黄色或深褐色,并呈糜烂状。肠道壁轻度肿胀,肠内无食物。胃部幽门盲囊内晶杆体萎缩或消失。人工感染的病蚌在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温下,一般两周左右出现瘟病症状,20天后陆续死亡。

2.2 脏器的组织病理变化

通过对健康蚌和病蚌13种脏器组织的系统切片观察,显示三角帆蚌瘟病的组织病理变化主要集中在消化系统的肝脏、胃、肠道和直肠等组织,其它脏器未见明显的异常变化。

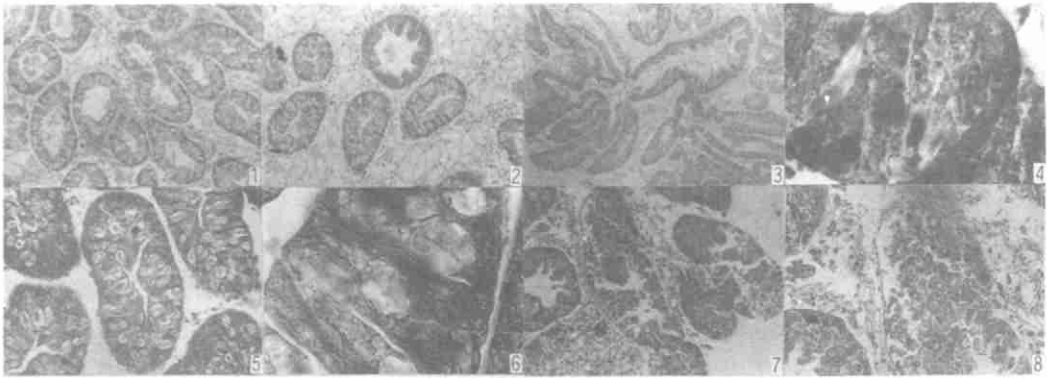
2.2.1 肝脏的组织与组织病理观察

2.2.1.1 对照组正常三角帆蚌肝脏的组织与细胞结构

三角帆蚌的肝脏又称消化盲囊,是蚌体最主要的消化器官。组织切片显示它由众多分支的

小盲管组成,按结构和功能可区分为肝总管和肝小管两部份。肝小管是其最主要的结构和功能单位,中央为空腔,管壁由吸收细胞、分泌细胞和未成熟细胞等数种单层细胞构成。吸收细胞数量多,是构成肝小管的主要细胞,呈长柱形,体积较大。靠腔面一侧的细胞质中有1至数个圆形的消化泡结构,占据了胞质的大部分,呈球形的细胞核被挤于细胞的基底部,核内可见一较大的核仁。分泌细胞以圆锥形为主,数量较少,其胞体的主要部分位于肝小管基部,夹杂在柱状吸收细胞之间。细胞质染色深,呈较强的嗜碱性,细胞核体积大,呈球形,核内染色质致密,核仁大而清晰。该细胞的 Feulgen 和 Brachet 等反应强烈,表明其处于活跃的代谢状态。未成熟细胞分布于吸收细胞间,形态与吸收细胞相似,但胞体较狭小,胞内无明显的消化泡,可认为是一种尚未分化的幼稚型吸收细胞。

分支的肝小管常3—5支汇合在一起,共同开口于肝总管。肝总管具有导管样结构,由单层柱状纤毛上皮细胞组成,腔面多褶皱,有丰富的纤毛覆盖。肝总管也有反复分枝,汇合后开口于胃腔中。肝小管和肝总管外由单层扁平上皮细胞包围,管间由结缔组织和脂肪组织包囊与分隔,并有丰富的血管分布(图版1, 1—3)。



图版1说明 Explanation of plate 1

1. 正常三角帆蚌肝脏中的部分肝小管横切面($\times 200$); 2. 正常三角帆蚌肝脏肝小管和肝总管横切面,右上为肝总管($\times 200$); 3. 正常三角帆蚌肝脏的肝小管和肝总管,示分支的肝小管汇合后开口于肝总管中($\times 100$); 4. 病蚌病变早期肝小管中未成熟细胞内出现的嗜酸性病毒包涵体($\times 2000$); 5. 病蚌肝小管横切面,示病变早期吸收细胞内吞噬物积聚,细胞肿胀,肝小管腔变得狭小($\times 400$); 6. 病蚌肝小管局部放大,示吸收细胞内消化泡扩张,吞噬物积聚,中央两吸收细胞间分布一圆锥形的分泌细胞($\times 2000$); 7、8. 病蚌病变后期肝小管解体,肝组织广泛受损($\times 400$)。

2.2.1.2 肝脏的组织病理变化

肝脏的病理症状最为明显,病变早期,吸收细胞数量增加,细胞内消化泡扩张,细胞呈高度的水泡样肿胀,肝小管腔变得狭小。扩张的消化泡内密集了大量无定形的黄棕色内含物,有些积聚成致密的团块状,有些呈不规则的结晶或颗粒状。这些内含物分别用 α 或 β -葡糖苷酶(Sigma产品,300 U/ml,作用液0.1 mol/L NaAc-HAc,pH 6.8或5.0,37 $^{\circ}$ C 2hr)和胰蛋白酶(Sigma产品,0.5 mg/ml,作用液PBS,pH 7.8,37 $^{\circ}$ C 1hr)处理,未见明显变化,用PAS和Hg-BPB染色呈阴性,表明其不具备典型的糖原、酶原和粘蛋白等的性质,提示不是细胞自身的正常分泌物,而是吞噬物变性积聚所致。Mann氏染色法进一步显示吸收细胞和未成熟细胞的胞浆中存在大量嗜酸性病毒包涵体。包涵体呈圆形或卵圆形,直径6—10 μ m,由大量细小的颗粒状物密集而成,周缘较光滑,与周围的胞浆存在较明显的界线。组织化学反应结果显示,包

涵体的 Feulgen 和 PAS 染色呈阴性,对 DNase I 或 DNase II (Sigma 产品,0.1 mg/ml,作用液为 0.005 mol/L $MgCl_2$,0.01 mol/L NaAc,pH 5.0,37 C 2hr)和两种葡萄糖苷酶均不敏感,而 Brachet 和 Hg-BPB 染色呈强阳性,经 RNase A (Sigma 产品,0.1 mg/ml,作用液 0.015 mol/L NaCl,0.01 mol/L Tris-HCl,pH 7.5,37 C 2hr)和胰蛋白酶作用后染色程度大大下降,说明包涵体是一种以 RNA 和蛋白质为主的核糖核蛋白结构,是病毒复制或装配的主要场所。在包涵体丰富的病理细胞中,可见细胞自身的 DNA 和 RNA 显色反应明显减弱,提示病毒在增殖过程中对宿主细胞的正常代谢是有明显抑制作用的。

病变后期,吸收细胞等大量解体,肝小管破裂,肝总管内部分纤毛上皮细胞也受到破坏。管间结缔组织中胶原纤维变得稀疏、断裂。脂肪细胞大量溶解,部分血管破碎,肝组织广泛受损(图版 I,4-8)。

2.2.2 胃的组织与组织病理观察

2.2.2.1 对照组正常三角帆蚌胃的组织与细胞结构

三角帆蚌胃的组织结构主要包括单层柱状纤毛上皮细胞构成的上皮和其下结缔组织两部分。胃上皮比肠道上皮略厚,约 60 μm ,局部区域有褶皱并加厚,可达 150 μm 。腔面一侧的细胞游离面有大量长 10-15 μm 的纤毛覆盖,其下有一排染色较深的基体以及长 30 μm 左右的圆锥形纤毛小根,从基体伸出并向下延伸入细胞质中。上皮细胞的核呈椭圆形,位于细胞的基底部,细胞间夹有少量近白色透明的杯状细胞,有些在顶端开口分泌出粘液而呈空泡状。杯状细胞可用 PAS 反应显色,具有典型的粘液细胞的特征。上皮细胞基底可见上皮所贴靠的基膜。基膜下是丰富的结缔组织,内含胶原纤维、成纤维细胞、变形细胞和各类球状颗粒细胞,并有丰富的血管分布。多数血管仅由单层扁平内皮细胞构成,内含变形细胞和球状颗粒细胞,其形态等特征与结缔组织中的同类细胞相一致。变形细胞体积较大,形态多变,胞浆内有粗大的颗粒和吞噬泡结构,可见伪足状突起伸出,细胞核偏靠一侧胞膜,有较高的 ACP 酶的活性。球状颗粒细胞大小不均一,小球状细胞呈现较强的嗜碱性,只有少量细胞质包围在核的周围。大球状细胞胞浆丰富,其中挤满了 PAS 染色阳性的嗜伊红颗粒,表明是丰富的粘液泡结构,具有分泌细胞的特征。这些结果与刘小明等[1991]对外套膜结缔组织所作的观察结果是相一致的,提示结缔组织细胞与血细胞之间存在着一定的同源性。结缔组织下可见少量不连续的环肌和丰富的脂肪组织层,通过脂肪组织与周围的肝小管相连(图版 II,1-5)。

2.2.2.2 胃的组织病理变化

胃的病理变化也非常明显。病变早期,上皮细胞腔面一侧的胞浆中出现病毒包涵体,细胞发生肿胀,严重者胞浆向胃腔膨胀外逸而鼓出细胞外,形似“出芽”状。组织化学反应结果显示,胃上皮细胞中 AKP 酶的活性较高,且集中分布在基膜处而区别于肠道等分布于腔面纤毛层下。病理状态下,AKP 酶的显色反应异常加剧,活性大幅度增高,并向结缔组织扩散,这是胃组织病变早期最明显的病理特征之一,其意义值得作进一步深入探索。病变后期,胃上皮与结缔组织剥离,上皮细胞出现空洞,纤毛层脱落,上皮和结缔组织中有大量变形的吞噬细胞浸润和积聚,最后细胞解体,上皮破裂。同时胶原纤维萎缩或断裂,结缔组织呈破网状,部分脂肪细胞解体,脂肪组织出现空洞(图版 II,6-11)。

2.2.3 直肠的组织与组织病理观察

2.2.3.1 对照组正常三角帆蚌直肠的组织与细胞结构

三角帆蚌的直肠位于蚌体背面,穿越围心腔和心室,其形态结构除直肠上皮、上皮下结缔

组织和脂肪组织外,在围心腔和心室的游离面还包有一层外膜。外膜下也分布有结缔组织和脂肪组织。直肠上皮由单层柱状纤毛上皮细胞组成,其间掺夹了大量杯状细胞。腹侧上皮向肠腔凸起,形成肠嵴。直肠外膜由单层矮柱状纤毛上皮细胞组成,其中也分布有大量分泌型细胞。外膜上皮细胞表面丰富的纤毛层游离于围心腔和心室中,随着纤毛的摆动,促进蚌体的血液循环。外膜结缔组织和脂肪组织与上皮结缔组织和脂肪组织间常以1至数层不发达的环肌相隔(图版 I, 12—13)。

2.2.3.2 直肠的组织病理变化

直肠的病理变化与胃相似,主要表现在上皮组织的损伤和坏死。如病变早期上皮细胞内形成病毒包涵体,纤毛层萎缩并脱落,病理细胞内 DNA 和 RNA 等显色反应降低,AKP 酶的活性下降,最后细胞出现空洞,上皮解体(图版 I, 14)。

2.2.4 肠道和食道的组织与组织病理观察

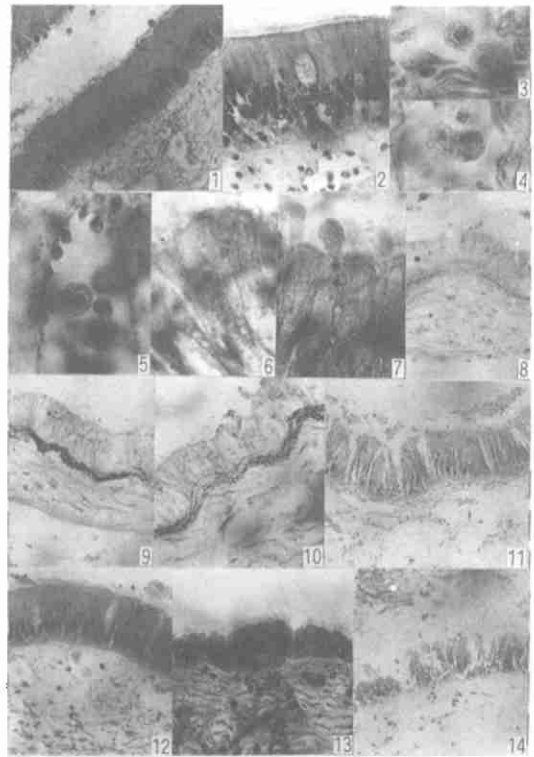
肠道是三角帆蚌消化道最细长的部分,在内脏团内蟠曲约2圈。肠道的组织形态结构与胃组织基本一致,但其周围被生殖腺包围,肠上皮下的结缔和脂肪组织主要与生殖腺相连。食道则很短,但管壁较厚,其纤毛上皮细胞的排列也不很规则,类似于假复层柱状上皮。食道中未见粘液腺等结构,仅见少量杯状分泌细胞。

肠道和食道的组织病理变化程度小,病变早期细胞损伤不明显,病变后期肠道部分上皮细胞轻度肿胀,细胞中可观察到少量包涵体。

3 讨论

三角帆蚌消化系统的组织和细胞结构表明其消化作用存在细胞内消化和细胞外消化两条途径,分别在肝脏和胃中进行。食物首先经蚌体的滤过作用而被选择性地摄入,然后在胃腔中

得到进一步分离,达到吞噬程度的小食物微粒通过开口于胃腔的肝总管分送到肝小管内,由吸收细胞吞噬后营细胞内消化。而没有达到吞噬程度的较大微粒则留在胃中,通过幽门盲囊内晶杆体溶解所释放的酶类营细胞外消化,同时肝小管中的分泌细胞也可能产生一些消化酶,由肝



图版 I 说明 Explanation of plate I

1. 正常三角帆蚌胃横切面,示胃上皮和结缔组织($\times 400$); 2. 正常三角帆蚌胃的纤毛柱状上皮细胞,其中有少量杯状细胞分布($\times 800$); 3,4. 正常三角帆蚌胃结缔组织中的球状颗粒细胞和变形细胞($\times 2000$); 5. 正常三角帆蚌胃结缔组织血管内的球状颗粒细胞和变形细胞,其形态特征与结缔组织中的同类细胞相一致($\times 2000$); 6. 病蚌胃上皮细胞中的病毒包涵体,细胞出现空洞($\times 2000$); 7. 病蚌胃上皮细胞发生肿胀,部分细胞的胞浆似“出芽”状鼓出胞外($\times 2000$); 8. 正常三角帆蚌胃上皮细胞的 AKP 显色,酶分布在基膜处($\times 800$); 9,10. 病蚌胃上皮组织的 AKP 显色,酶活性异常增加($\times 800$); 11. 病蚌病变后期胃上皮细胞解体,上皮和结缔组织广泛受损($\times 400$); 12. 正常三角帆蚌直肠上皮和结缔组织,上皮内有大量杯状细胞分布($\times 800$); 13. 正常三角帆蚌直肠外膜矮柱状上皮细胞,在心室游离面有丰富的纤毛覆盖($\times 800$); 14. 病蚌病变后期直肠上皮和结缔组织解体($\times 400$)。

总管输出后参与细胞外消化。因此,胃特别是肠道除了将不能利用的食物排出蚌体外,其上皮细胞还可能担负部分吸收功能。此外,肝脏和肠道等组织中存在的变形细胞也可能穿越于组织间,参与猎获食物,行使部分细胞内消化作用。

三角帆蚌瘟病的组织病理变化主要表现为肝脏的肝小管和胃、直肠等消化道上皮的损伤。HcPV 通过侵染肝脏的吸收细胞、未成熟细胞和消化道的纤毛上皮细胞,一方面在细胞质内复制增殖,形成大量具有核糖核蛋白性质的胞质型病毒包涵体,并引起裂解性细胞病变,从而直接造成宿主细胞形态结构的损伤,导致组织坏死。另一方面还使宿主细胞的正常代谢受到抑制或发生异常,功能出现障碍,也可加速组织的变性和坏死。如肝脏吸收细胞的细胞内消化作用受阻,吞噬物大量积聚而导致消化泡扩张,细胞肿胀,很可能加速细胞解体,消化管破裂,而其中消化酶随之释放,又可能进一步导致周围结缔组织等的自溶,造成肝组织广泛受损。同时胃和肠道组织中 AKP 酶等的异常变化,也可造成消化道正常的物质吸收和转运功能出现紊乱,甚至失去其应有的机能,加速病蚌的死亡。

张治国等[1987]曾在三角帆蚌瘟病的电镜研究中初步观察到病蚌的肝脏和肠上皮细胞中有侵染的病毒颗粒,病毒积聚在胞浆和内质网中,使细胞呈现高度的空泡化变性。邵健忠等[1993a,1993b]曾从该两种组织中分离出瘟病病毒,并发现其中同工酶谱的表型存在明显的病变。张元培等[1993]则在肝脏中观察到嗜酸性病毒包涵体,并认为病毒是通过蓝藻介导侵染消化道的。这些结果从不同角度反映出三角帆蚌瘟病与消化系统的异常变化有关,与本文的报道结果是相符合的。因此可以认为三角帆蚌瘟病是一种病毒性消化器官坏死病。该结果可以为生产上开展三角帆蚌瘟病的防治提供重要依据。

作者中的张明洲现在浙江农业大学环境科学系。工作中得到浙江省德清县珍珠研究所沈志荣、李欣扬和吴碧文同志的大力支持和帮助,并由吴碧文同志协助病蚌和毒株的收集工作,特此一并致谢。

浙江省自然科学基金资助的部分工作。

参考文献

- [1] 刘小明, 1991. 河蚌结缔组织细胞发生及发育观察. 水产学报, 15(2):124-129.
- [2] 沈志荣等, 1986. 三角帆蚌疾病病因的探讨. 科技通报, 2:37-40.
- [3] 邵健忠等, 1993a. 三角帆蚌瘟病病毒的精细结构与基因组及多肽的研究. 病毒学报, 9(2):160-166.
- [4] ——, 1993b. 三角帆蚌十六种同工酶系统的表型及其在瘟病蚌中的病理变化. 水产学报, 17(3):199-208.
- [5] 芮菊生等, 1980. 组织切片技术, 134-261. 人民教育出版社(京).
- [6] 张治国等, 1986. 三角帆蚌瘟病的研究, 1. 一种新的病毒病. 微生物学报, 26(4):308-312.
- [7] ——, 1987. 三角帆蚌瘟病的研究, 1. 三角帆蚌瘟病的病原——一种嵌砂样病毒. 微生物学报, 27(2):116-120.
- [8] 张元培等, 1993. 三角帆蚌病毒性蚌瘟病原媒介藻筛选的初步研究. 浙江水产学院学报, 12(1):72-76.
- [9] 郑德崇等, 1986. 草鱼出血病的组织病理研究. 水产学报, 10(2):151-159.
- [10] 倪达书等, 1982. 三角帆蚌疾病的初步研究. 淡水渔业, 5:41-42.
- [11] Bergmeyer, H. U. (ed.), 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*, Third English Edition, Vol. IV, 208-240. Verlag Chemie Press, Germany.
- [12] Bancroft, J. D. et al., (ed.), 1982. *Theory and Practice of Histological Techniques*, Second Edition, 379-405, Churchill Livingstone Inc., London.
- [13] Culling, C. F. A. (ed.), 1963. *Handbook of histopathological techniques*, Second Edition, 269-288. Whitefriars Press, London.
- [14] Kiernan, J. A. (ed.), 1990. *Histological and histochemical Methods Theory and Practice*, Second Edition, 131-

141, Pergamon Press, Oxford.

- [15] Sambrook, J. *et al.*, (ed.), 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, book 1, 5. 81—5. 83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

HISTOPATHOLOGICAL STUDIES ON THE PLAGUE DISEASE OF *HYRIOPSIS CUMINGII* LEA

Shao Jianzhong, Xiang Lixin, Li Yanan, Zhang Minzhou and Mao Shujian

(*Biological Institute of Hangzhou University*, 310012)

ABSTRACT The morphological and histochemical characteristics and differences of thirteen tissues between the healthy and plague diseased mussels of *Hyriopsis cumingii* Lea were systematically studied and compared in this paper. The results showed that the histopathological changes of the plague diseased mussels were mainly occurred in the tissues of liver, gaster, intestine and intestinum rectum. After being infected by the virus, great numbers of acidophilic viral inclusive bodies were formed in the cytoplasm of absorptive cells and undifferentiated absorptive cells of liver, ciliated epithelial cells of gaster, intestine and intestinum rectum respectively. And in these pathological cells, the synthesis of cellular DNA and RNA were inhibited, the activities and distributions of alkaline phosphatase (AKP) and acid phosphatase (ACP) became obviously abnormal, and the intracellular digestion of the liver absorptive cells was blocked. Finally, the cells were degenerated and lysed, the tissues of liver, gaster, intestine and intestinum rectum were extensively damaged. The necrosis of the digestive system accelerated the death of the plague diseased mussels. Meanwhile, the morphological structures and functions of the healthy *Hyriopsis cumingii* Lea were also discussed.

KEYWORDS plague disease of *Hyriopsis cumingii* Lea, Arenavirus, mussel histopathology, *Hyriopsis cumingii* Lea