

一种真鲷球形病毒的形态及细胞病理学电子显微镜观察

姜 明 范瑞青

(青岛海洋大学测试中心, 266003)

汝少国 李永祺 刘 云

(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

摘 要 对 1995 年青岛地区患病真鲷肝脏、肠上皮组织、肾脏、鳃等组织进行电镜观察, 发现一种球形病毒, 该病毒具有囊膜, 直径为 80~ 100nm, 在核和细胞质中均形成不规则形态包涵体; 细胞病理变化表现为核内染色质变性, 核膜水肿变形且部分溶解, 内质网膨胀, 胞质内有大量游离核糖体分布, 线粒体外膜及内嵴变形且有少量溶解。

关键词 真鲷, 病毒包涵体, 球形病毒, 超微结构

Electron microscope obseration on the morphology of a sphereovirus and cell pathology of *Pagrosomus major*

Jiang Ming, Fan Ruiqing

(Test Centre, Ocean University of Qingdao, 266003)

Ru Shaoguo, Li Yongqi, Liu Yun

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT The report made use of the electron microscopy technology to examine the sick *Pagrosomus Major* at Qingdao in 1995 expounded, a lot of sphereovirus particles which were found in the cytonucleus and cytoplasm of tissues of hepar, gut, kidney and grill. Study result showed: the sphereovirus had an irregular inclusion body in cytonucleus and cytoplasm at all, whose diameter was between about 80– 100nm. The virus particles had a middle density nucleus with an envelope. In diseased cells, nuclear chromatin changed and formed virus inclusion body, and part of the nuclear envelope was dissolved and distributed a lot of ribosome's over the cytoplasm, part of the outer membrane and crest of mitochondrion were out of shape and dissolved.

KEYWORDS *Pagrosomus major*, virus inclusion body, sphereovirus, ultrastructure

随着海洋经济鱼类近海养殖的不断扩大, 鱼类养殖品种、养殖面积及密度日益增加, 我国已迎来海水养殖业的第四次浪潮——海洋鱼类养殖, 它是继对虾养殖之后养殖业新的经济增长点。但不容忽视的是, 由于种质退化、近海环境污染及病害频繁发生等原因, 海洋鱼类养殖的发展受到了巨大威胁, 为此, 海洋鱼类病害的研究已成为世界关注的焦点。目前我国关于鱼病的研究和综合防治主要集中于淡水鱼类, 并有大量有关草鱼出血病毒、呼肠孤病毒及弹状病毒等论文发表^[1~4]; 而对养殖海洋鱼类病害的研究尚处于起步阶段, 相关研究的报道较少, 常建波等^[5]报道真鲷病毒病主要有淋巴囊肿病、虹彩病

国家攀登计划 B 资助项目(有机污染及环境胁迫对鱼虾贝的生物学基础研究), PDB671 号和国家自然科学基金资助项目(环境胁迫条件下鱼鳃细胞 Na⁺/K⁺-ATP 酶抗体标记研究), 3987058 号。

第一作者简介: 姜 明, 男, 1959 年 2 月生, 高级工程师。Tel: 0532-2032322, 2032447

收稿日期: 1998-04-10

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

毒病和淋巴性白血病等,薛良义等^[1]对网箱养殖鲈鱼的两种球形病毒进行了报道。作者在养殖真鲷体内检测出的病毒为球状,直径为 80~100nm,形态结构明显不同于上述病毒,其分类地位目前尚不清楚,为今后研究方便,暂称为真鲷球形病毒。

1 材料与方 法

1.1 材 料

真鲷(*Pagrosomus major*)^[6]样品 1995 年 5 月采集于青岛渔业公司养殖厂,为患病上浮水面且濒死的个体,样品数为 5 尾,体长 9~12cm,活体解剖,取病变肝脏、肾脏、肠上皮组织及鳃等组织作为电子显微镜检测材料。

1.2 方 法

将被检测材料取成约 0.5mm³小块,用 2.5% 的戊二醛溶液前固定 2 小时,1% 的锇酸溶液后固定 1h;梯度乙醇脱水;Epon-812 包埋;经 LKB 超薄切片机切片;常规电镜超薄切片染色;用日立 H-7000 型透射电镜观察并摄影。

2 结 果 与 分 析

2.1 患病真鲷的病状

患病真鲷体表症状较明显,体表颜色轻微减退,胸鳍和腹鳍外缘变红,皮下可见少量的出血点,眼轻度外突,游泳速度缓慢且身体侧翻,部分濒死真鲷腹部严重上翻。

2.2 病灶组织

对数十尾体长 9~12cm 的患病真鲷解剖探察可见,体内脏器均出现不同程度的病理变化,以肝脏、肾脏、肠、鳃等组织较为严重^[7,8],均可见数量不同的出血点;鳃组织灰白,鳃丝部位有出血点,局部鳃丝有轻度溃烂;肝脏轻微肿大,颜色减退;肠组织的小肠、大肠及直肠均明显水肿,空瘪无物,可见分布不均的出血点;肾脏组织呈现轻微水肿等。因此,认定导致其患病乃至死亡的主要病变脏器为肝脏、肾脏、肠上皮组织及鳃组织。

2.3 细胞超微结构

2.3.1 球形病毒及其发生基质的超微形态

经透射电镜(TEM)检测患病真鲷肝脏、肾脏、肠上皮组织及鳃组织,在上述组织细胞核和胞质中均发现一种球形病毒及其发生基质。病毒为球状,直径 80~100nm,具有明确的囊膜,其核心呈中等电子密度。在核内,病毒形成球形(图版 I-1,5)或不规则形态(图版 I-4,8,图版 II-3,6,7)的包涵体,在其中可见已装配完成和正在装配的病毒粒子(图版 I-2,6,8,图版 II-3,7,8),同时,在肠上皮组织细胞内观察到核破裂解体时,病毒粒子由核进入胞质并形成新的感染源(图版 II-4);胞质中,病毒在胞浆中形成不规则形态的发生基质(图版 I-7,图版 II-2),其中可见装配中的球形病毒粒子和装配完成的病毒粒子;装配完成的病毒粒子随时扩散于胞浆中并形成再次感染。肠上皮组织细胞胞质中观察到聚集成群的病毒粒子存在(图版 II-1)。因此,初步推断该病毒具有较强的致病性和感染性。

2.3.2 细胞核的超微病理变化

观察结果显示,肝脏、肾脏、肠上皮组织和鳃组织细胞核普遍因真鲷球形病毒侵染而发生明显的病理变化,作为病毒侵染的主要靶细胞器,由于其在肝脏、肾脏、肠上皮组织及鳃组织的细胞核中均形成发生基质并进行病毒粒子的装配,从而导致上述脏器组织细胞的核出现变形,核体肿胀,染色质严重破坏

乃至解体。病变肝细胞核明显变形,部分细胞核膨胀,核内染色质被严重破坏而变性,相当数量的核膜轻微水肿,局部核膜溶解(图版 I 1, 2, 3, 4)。肾近曲小管上皮细胞核及肾小球足细胞中,核体膨大,核内染色质大量被破坏,代之以病毒包涵体充满其中,核膜部分溶解(图版 I 5, 6, 7, 8)。肠上皮组织由于病毒发生基质的形成和病毒粒子的装配,导致核体变形,染色质轻度变性,核膜变形且局部溶解(图版 II 1, 2, 3, 4)。鳃组织中的扁平细胞和泌氯细胞是病毒侵染的主要细胞,其细胞核的病理变化表现为核体形态畸变,核膜明显水肿,部分溶解严重,核内染色质几乎完全被破坏(图版 II 5, 6, 7, 8)。

2.3.3 细胞器的超微病理变化

真鲷球形病毒在肝脏、肾脏、肠上皮组织和鳃组织细胞质中分布并在部分组织的胞质中形成发生基质,导致细胞超微结构呈现出显著的病理变化,线粒体、粗面内质网、脂肪粒等出现明显的病变特征。病变肝细胞中,大量线粒体外膜和内嵴均呈溶解状态,结构模糊不清;粗面内质网膨胀且部分呈小池状,核糖体脱落游离于细胞质中(图版 I 2);脂肪颗粒的电子密度明显改变,出现空白区和高密度凝聚区,呈脂肪变性特征(图版 I 3)。肾脏近曲小管上皮细胞和肾小球上皮细胞层的足细胞^[7]中部分线粒体变形且内嵴和外膜均有不同程度的溶解;溶酶体数量增多(图版 I 7);粗面内质网变形,核糖体脱落并游离分布于胞质中(图版 I 5, 6, 7, 8)。肠上皮组织细胞内细胞器病理变化表现为,线粒体有轻微膨胀,内嵴有明显的溶解现象,粗面内质网水肿,核糖体脱落,游离于细胞质中(图版 II 1, 2)。鳃上皮组织病变的扁平细胞和泌氯细胞胞质中均呈现线粒体变形,外膜及内嵴局部溶解,部分线粒体内可见少量高电子密度颗粒沉积于内嵴间,内质网膨胀且有少量溶解(图版 II 5, 6, 7)。

3 讨论

3.1 病毒结构及其分类地位

我国海洋鱼类病毒病及病毒病原体研究起步较晚,报道的病毒病原体类型较少。目前,已报道的真鲷病毒主要包括鱼淋巴囊肿病毒(*Lymphocystic virus of fish*, 简称 LD)和一种未定种的虹彩病毒科病毒,形态上均为多面体结构,大小为 130~330nm,表明以往引起真鲷病毒病流行的主要病原体为虹彩病毒^[5]。近几年随着真鲷规模化养殖的推广,其病害的发生率和死亡率急剧升高,病状亦日趋复杂,作者于 1995 年在真鲷幼体鳃、肝脏、肠和肾脏中检出一种球形病毒,其形态为球状,直径为 80~100nm,核心呈中等电子密度,具有囊膜,在核内和胞质中均形成包涵体并进行装配增殖,超微形态上与上述报道明显不同,与 Oh 等^[9,10]在鲑鱼体内检出的病毒直径(80nm)相类似,但其报道的病毒为二十面体形态,而且病毒核心电子密度较高,与我们观察到的病毒形态有差异,而与 H Granzow 等^[11]在鱼类培养细胞中检出并报道的致病病毒 IPNV(直径为 50~60nm)明显不同,因此,作者认为,此次在真鲷肝脏、肾脏、肠上皮组织及鳃组织中检测出的病毒为新的病毒病原体,为研究方便暂定其为真鲷球形病毒(*Pagrosomus major sphaerovirus*, PMSV),其分类地位尚不清楚,有待进一步研究和探讨。

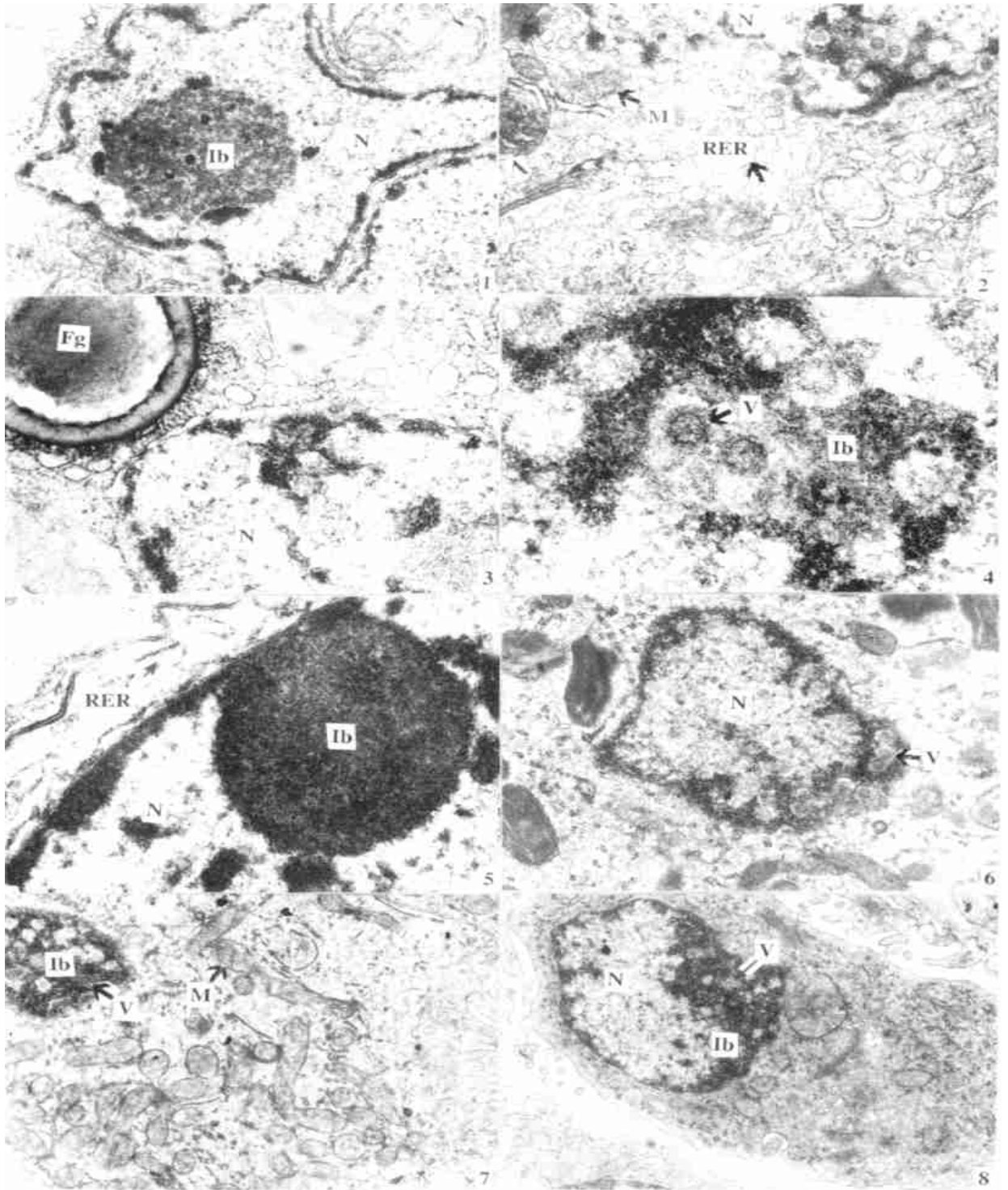
3.2 病毒致病性及病理变化

真鲷作为我国近海养殖的主要经济鱼类,具有极高的经济价值,因此,研究真鲷病毒病原体及其病理学特征,对于真鲷养殖健康发展和病害综合防治具有重要意义。新的真鲷病毒病原体的发现,表明真鲷病毒病原体日趋多样化和复杂化,必须引起足够的重视。真鲷球形病毒对真鲷的各组织器官均具有侵染性,在核内及胞质中均形成包涵体并进行病毒粒子装配。由观察结果分析,病毒以细胞核作为侵染及增殖的主要场所,病毒粒子主要分布于近核膜区域。胞质中,病毒在胞浆内形成包涵体并进行病毒粒子装配,不直接破坏线粒体、内质网等细胞器,但导致了细胞器的严重破坏,因此,推断胞浆亦是病毒装配增殖的重要场所。该病毒在形态结构、病理变化及致病性等方面与目前报道的虹彩病毒和鱼类呼肠孤病毒明显不同,主要以肝脏、鳃、肠上皮组织和肾脏为主要侵染器官并导致上述组织器官均呈现出明显的病理变化,解剖结果显示,上述器官均有出血点,肝脏和肾脏肿大,肠上皮组织明显水肿;超微结构

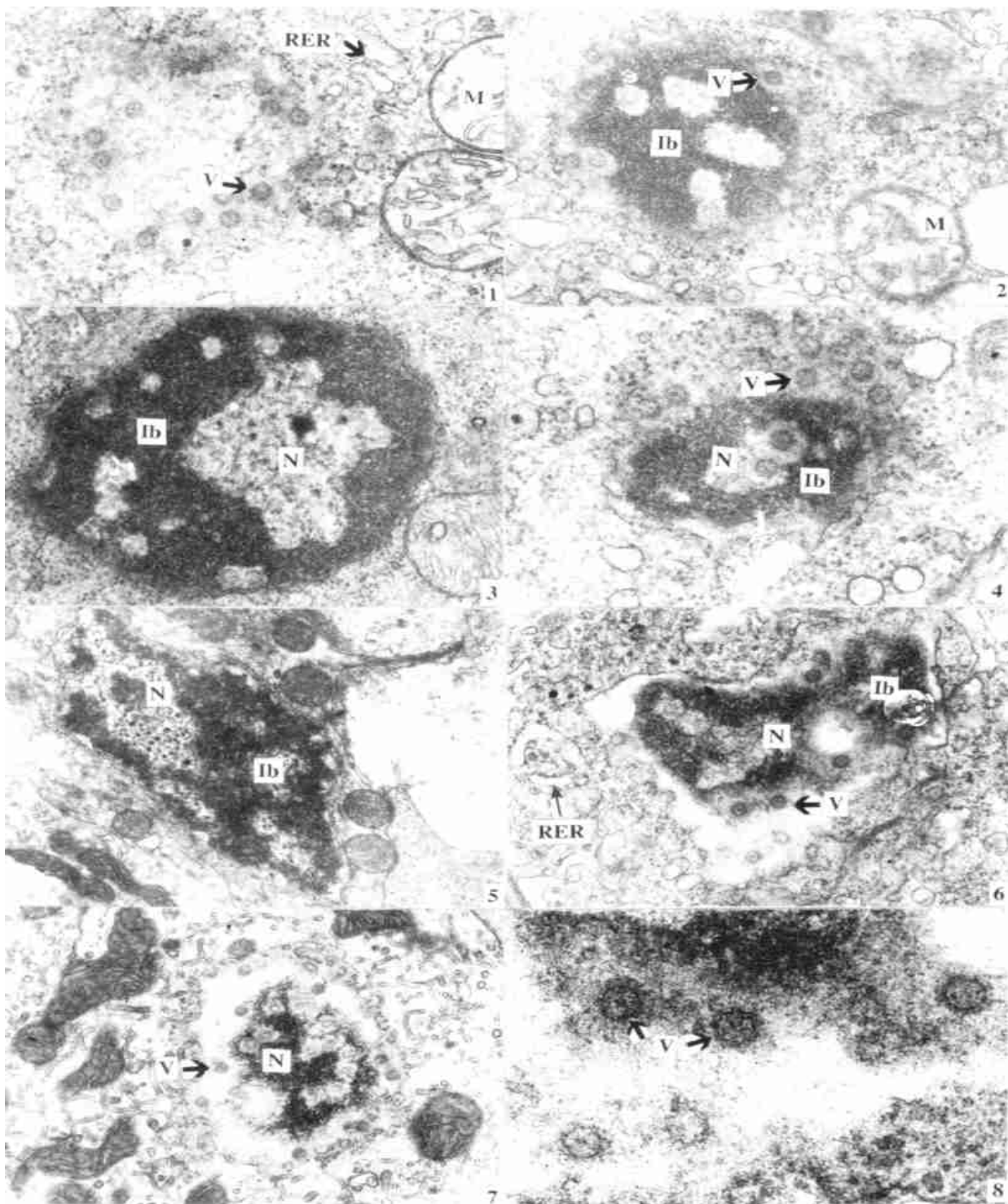
观察表明,病变组织器官细胞中,核、线粒体、粗面内质网及脂肪颗粒等细胞器出现明显变形和溶解,部分细胞器解体;据此认为,真鲷球形病毒对真鲷的各器官组织均具有较强的侵染性和致病性,呈现多种器官并发感染的特征,真鲷球形病毒是否是造成 1995 年养殖真鲷病害发生及致死的主要病原体,将有待于进一步的病原性研究证实。

参 考 文 献

- 1 薛良义,王国良,徐兴林等.海水网箱养殖鲈鱼的一种病毒性疾病.黄渤海海洋,1998,16(1): 28~ 31
- 2 陈燕焱,江育林.草鱼出血病毒形态结构及其理化特性的研究.科学通报,1983,18: 1138~ 1140
- 3 毛树坚,杭 绮,陈汉民等.草鱼出血病两种病原病毒的细胞病理学观察.海洋与湖沼,1988,19(5): 435~ 438
- 4 毛树坚,邵建忠,杭绮等.草鱼出血病的病原研究.水产学报,1989,13(1): 1~ 4
- 5 常建波,杨建敏.真鲷疾病的诊断及防治.国外水产,1995,(3): 1~ 7
- 6 张春林,成庆太,郑葆珊等.黄渤海鱼类调查报告.北京:科学出版社:1955,148
- 7 王义强,黄世蕉等.鱼类生理学.上海:上海科学技术出版社,1990,114~ 192
- 8 郑国 . 细胞生物学.北京:高等教育出版社.1984: 8~ 13, 67~ 249
- 9 Oh M J, Yoshimizu M, Kimura T, et al. A New Virus Isolated from Salmonid Fish. Fish Pathology, 1995, 30(1): 23~ 32
- 10 Oh M J, Yoshimizu M, Ueda H, et al. Histopathology of the new virus infection with abnormal swimming in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Fish Pathology, 1995, 30(3): 201~ 208
- 11 Granzow H, Weiland F, Fichtner D, et al. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. J Fish Dis, 1997, 20: 1~ 10



1. 肝细胞中的病毒包涵体(Ib) × 11 400; 2. 肝细胞内的病变的细胞器和球形病毒(V), RER- 粗面内质网, M- 线粒体 × 13 000; 3. 病变细胞内变性的脂肪颗粒和含有球形病毒的核(N), Fg- 脂肪颗粒, 核膜溶解(→) × 24 000; 4. 球形病毒的放大 × 51 000; 5. 肾近曲小管上皮细胞中核内的病毒包涵体(Ib), RER- 粗面内质网, N- 核 × 27 000; 6. 核内的球形病毒及核膜的溶解(→) × 11 500; 7. 肾近曲小管上皮细胞质中的病毒包涵体(Ib)和球形病毒(V), M- 线粒体, × 10 400. 8. 肾小球足细胞核内的球形病毒(V)和病毒包涵体(Ib) × 10 400.



1. 肠上皮组织细胞中的球形病毒(V) × 25 500; 2. 胞质中的病毒包涵体(Ib)和球形病毒(V) × 20 000; 3. 核内病毒包涵体及装配中的球形病毒 × 24 000; 4. 核内和进入胞质的球形病毒 × 30 000; 5. 鳃细胞核内的病毒包涵体(Ib) × 11 000; 6. 核内病毒包涵体和球形病毒粒子, V- 球形病毒, RER- 粗面内质网 × 22 000; 7. 鳃泌氯细胞中的病毒包涵体(Ib)和球形病毒(V) × 16 500. 8. 球形病毒的放大, V- 病毒粒子 × 64 000;