

刀额新对虾原代淋巴细胞培养及其感染 白斑综合征病毒(WSSV)的病理特征

国子娟^{1,2}, 王印庚^{1*}, 荣小军¹, 廖梅杰¹, 郭华荣³, 韩 倩³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

3. 中国海洋大学生命学院,山东 青岛 266003)

摘要:为深入了解对虾白斑综合征病毒(WSSV)的致病机理和体外培养的对虾细胞对 WSSV 的敏感性,实验以 $1.5 \times L-15$ 培养基培养刀额新对虾原代淋巴细胞,待细胞形成单层后接种 WSSV,通过倒置显微镜、荧光显微镜、透射电子显微镜观察接种病毒后细胞的病理变化。结果显示,使用 $1.5 \times L-15$ 培养基培养对虾淋巴组织,3 h 后可观察到有细胞迁出,并能迅速形成单层,36 h 后细胞的迁出汇合率可达 80%,且能存活 20 d 以上。接种 WSSV 24 h 后,出现病变的细胞变圆、漂浮,细胞之间的网状结构消失,最后细胞破碎、溶解;接种 WSSV 48 h 后 Hoechst 33342 染色结果显示,感染的细胞核深染,且变形、膨大;电镜下,细胞核内含大量成簇分布的杆状病毒,细胞器被挤向细胞边缘,细胞膜轮廓模糊。研究表明,纯化的病毒粒子接种体外培养的淋巴细胞,能够使其产生明显病理变化,证明了 WSSV 对体外培养的淋巴细胞具有感染力,并且可在淋巴细胞中增殖。

关键词:刀额新对虾;白斑综合征病毒(WSSV);淋巴组织;原代细胞培养;感染;病理

中图分类号:S 941.41

文献标志码:A

随着我国改革开放,对虾养殖业在 20 世纪 80 年代得到了快速发展,成为我国沿海农村经济的支柱产业之一。但是,随着养殖规模的不断扩大和生态环境的恶化,20 世纪 90 年代对虾病害问题日趋严重,给对虾养殖业带来巨大的经济损失^[1]。对虾病原种类繁多,其中危害最为严重的是对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV),该病毒致病性强、传播迅速、死亡率高、地域分布和宿主范围广泛,成为制约对虾养殖业发展的主要限制性因素^[2-3]。自 1993 年对虾病毒病暴发以来,诸多学者对 WSSV 流行特征、病原学、病理学、致病机制、快速检测方法等进行了大量的研究,取得明显的研究进展^[4-9]。但迄今为止,WSSV 的传播机理尚未完全研究清楚,现有技术还不能全面有效地控制对虾白斑综合征

的疫情^[10]。目前已有关于疫苗^[5]、中草药^[11]、免疫增强剂^[12]、消毒剂和化学药物^[13]等防治 WSSV 的报道,但并未取得理想的防治效果。

中草药在我国畜牧、水产方面的应用历史悠久。它不仅具有成本低、加工方便、抗药性不显著、药物残留和副作用小等优点,并且具有补充营养、提高机体的免疫机能、抗菌、抑制病毒等多重功能,在水产养殖动物病害防治中的作用越来越受到重视^[14-15]。中草药对于对虾白斑综合征病毒^[11]、虹彩病毒^[16]、呼肠孤病毒^[17]、鲤(*Cyprinus carpio*)疱疹病毒^[18]等的防治取得了良好的治疗效果。但中草药的筛选方法多限于生物实验法,该方法需要损耗大量的活体实验动物,且研究周期较长。

以细胞培养为载体来研究病毒及筛选抗病毒

收稿日期:2013-12-09

修回日期:2014-01-19

资助项目:“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD17B03)

通信作者:王印庚,E-mail:wangyg@ysfri.ac.cn

药物,不仅可以有效避免实验动物个体差异造成的误差,减少活体动物的损耗,还能准确迅速地获得实验结果^[19]。对虾的细胞培养,是研究对虾不同学科和领域的重要工具之一^[20]。1986 年,Chen 等^[21]首次成功进行了斑节对虾(*Penaeus monodon*)卵巢组织的原代培养。此后,对虾细胞培养的研究开始活跃起来。但由于尚未研究出适宜对虾细胞体外培养的培养基,迄今为止,对虾原代细胞的传代问题仍未解决。国内外学者相继开展了使用细胞培养进行对虾病毒的研究^[22-23],但关于对虾细胞接种 WSSV 后病理变化的深入研究未见报道。本实验经过大量尝试得出以 1.5 × L-15 培养基可培养出形态稳定的刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*,又名基围虾)淋巴细胞,迁出的细胞能快速形成单层,并维持 20 d 以上,进而以体外培养的原代淋巴细胞为基础,研究感染 WSSV 后细胞的病理变化(cytopathic effect, CPE)。本研究可为以对虾原代细胞为载体开展抗 WSSV 中草药的快速筛选提供实验基础。

1 材料与方

1.1 实验材料

实验动物 健康的刀额新对虾,购自青岛市某对虾养殖厂,体长 10 ~ 15 cm,体质量 10 ~ 20 g,在消毒海水中(温度 18 ℃,盐度 28)暂养 5 h后,转移至煮沸且加有双抗(1 200 IU/mL 青霉素钠和 1 200 μg/mL 硫酸链霉素)的海水中暂养 12 ~ 16 h。

参照 OIE 检测白斑综合征病毒(WSSV)的常规 PCR 方法^[24],确定 WSSV 为阳性的刀额新对虾采集于江苏某养殖公司,选取头胸甲壳上有明显白斑的对虾,于 -80 ℃冰箱中保存备用。

1.2 实验方法

虾肌提取液(SME)的制备 刀额新对虾去其头胸甲、尾、肠,称重,于烧杯中剪碎,匀浆器将肌肉打成浆状,加入 2.4% NaCl 溶液,60 ℃水浴 1 h,转移至离心管中,4 ℃,6 000 r/min 离心 20 min,取上清液,4 ℃,9 000 r/min 离心 20 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌,-20 ℃储存备用。

培养基的配制 参考 Han 等^[25]的方法配制 1.5 × L-15 基础培养基(表 1),0.22 μm 滤膜过滤灭菌,-4 ℃冷藏或 -20 ℃冷冻保存。

表 1 基础培养基的配方
Tab. 1 Composition of the basal medium

成分 composition	含量 content
Leibovitz's L-15	13.7 g
ddH ₂ O	750 mL
NaCl(5 g/L)	3.75 g
NaHCO ₃ (1 g/L)	0.75 g
葡萄糖 glucose(2 g/L)	1.5 g

表 2 完全培养基的配方
Tab. 2 Composition of the complete medium

成分 composition	含量 content
基础培养基 basal medium	75 %
胎牛血清 fetal bovine serum, FBS	15 %
虾肌提取液 shrimp muscle extracts, SME	10 %
双抗(10 mg/mL) penicillin/streptomycin	100 μg/mL
表皮生长因子(100 ng/μL) epidermal growth factor, EGF	20 ng/mL
碱性成纤维生长因子(20 ng/μL) basic fibroblast growth factor, bFGF	10 ng/mL

细胞培养 将暂养 12 h 的刀额新对虾于 70% 的酒精中浸泡 30 s,用酒精棉球对虾体擦拭消毒。无菌条件下,解剖头胸甲取出对虾类淋巴器官,在加有双抗的基础培养基中剪碎组织(约 1 mm³),干贴于 6 孔培养板中,3 h 后从培养皿的一侧加入 2 mL 的完全培养基(表 2)。将培养板置于培养箱中(3% CO₂, 26 ℃)密闭培养,定时在倒置显微镜下观察、拍照。

病毒悬液的制备 检测 WSSV 为阳性的对虾,取其头胸部去除头胸甲和肝胰腺称重,参照姜有声等^[26]的病毒提纯方法,加入少许 25% 的蔗糖(W/V),冰浴研磨匀浆 3 ~ 5 min,匀浆液 3 000 r/min,4 ℃,离心 15 min;上清液 5 000 r/min,4 ℃,离心 15 min;取上清液 8 000 r/min,4 ℃,离心 10 min;上清液 25 000 r/min,4 ℃,离心 1.5 h;沉淀物经 25% 的蔗糖溶液重悬后作为病毒粗提液,然后铺于蔗糖密度梯度上层,蔗糖密度依次为 30%、40%、50%、60%,25 000 r/min 离心,4 ℃,2 h;取 40% ~ 50% 之间的乳白色条带,25 000 r/min,

4 ℃,离心 1 h 去除蔗糖;PBS 缓冲液 (NaCl 8.0 g/L,KCl 0.2 g/L,KH₂PO₄ 0.2 g/L,Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.0 g/L,pH 7.2) 重悬沉淀物,得到纯化的病毒悬液,-80 ℃ 保存,使用时经 0.44 μm 的滤膜过滤。

病毒感染 待对虾淋巴组织迁出的细胞形成单层后 (24 ~ 36 h),弃去培养基,每孔加入 500 μL 的病毒悬液,使 WSSV 与淋巴细胞吸附 30 min 后,补加培养基至 2 mL,对照组加基础培养基吸附,倒置显微镜下定期观察细胞的形态变化。

细胞固定 弃去培养基,PBS 缓冲液冲洗,加 200 μL 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,1 min 后终止消化,将细胞转移至离心管中,1 500 r/min,4 ℃,离心 10 min 收集细胞,弃上清液,沿管壁缓慢加入 2.5% 戊二醛固定液,于 4 ℃ 保存,进行超

薄片、电镜观察。
细胞染色 弃去培养基,每孔加入 100 μL Hoechst 33342 染色液 (5 μg/mL),染色 15 min 后弃去染色液,PBS 冲洗 3 ~ 5 次,每次 5 min,于荧光倒置显微镜下观察细胞核的变化。

2 结果

2.1 对虾细胞的原代培养

对虾淋巴组织干贴 3 h 后,即可观察到亮圆细胞从组织块中迁出,24 h 后迁出汇合率达 70%,36 h 后达 80% 以上 (图 1-B),3 d 时淋巴细胞生长状态良好,光镜下可观察到大量的成纤维细胞贴壁生长,逐渐形成网状结构 (图 1-D),16 d 时淋巴细胞开始出现亮圆颗粒,少量细胞变圆漂浮,20 d 后大量细胞破裂、漂浮。

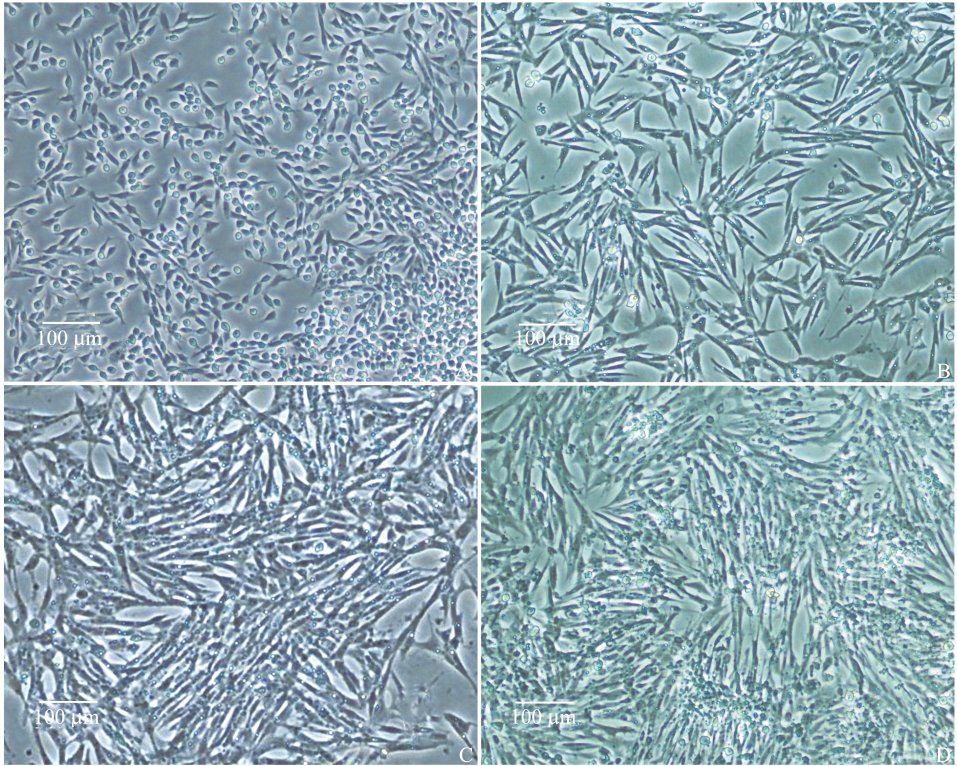


图 1 刀额新对虾淋巴组织原代细胞的光镜图片
A,B,C,D 分别表示对虾淋巴组织原代细胞生长 12、24、48 和 72 h
Fig. 1 Micrographs of the primary cell cultures of the lymphoid organs of *M. ensis*
A,B,C,D showed the migration and growth of primary shrimp cells from the explants of lymphoid organs at 12,24,48 and 72 h after seeding

2.2 病毒粒子的负染

纯化的 WSSV 负染后,在透射电子显微镜下观察发现,病毒的核衣壳呈杆状结构,一端钝圆,

一端稍平 (图 2-A)。完整的病毒粒子外观呈椭圆形,病毒的囊膜从外端向外延伸形成尾状结构 (图 2-B)。病毒的负染特征与典型的 WSSV 形

态特点一致。

2.3 感染 WSSV 后的淋巴细胞

感染 WSSV 24 h 后的淋巴细胞开始出现病理变化,细胞停止延伸,出现亮圆颗粒(图版-6);感染 48 h 后贴壁的细胞逐渐漂浮,亮圆颗粒的数量增多,细胞之间的网状结构消失(图版-7);最后细胞破碎、溶解(图版-8)。

2.4 感染病毒后淋巴细胞的电镜切片

感染病毒的细胞核内含有大量杆状核衣壳,并且成簇分布,形态大小与报道的 WSSV 一致。WSSV 感染细胞后的病理变化主要表现为:细胞核膨大、变形,染色质及核仁解体,由于细胞核增大,细胞质被挤向细胞的边缘,细胞膜轮廓模糊(图 3)。

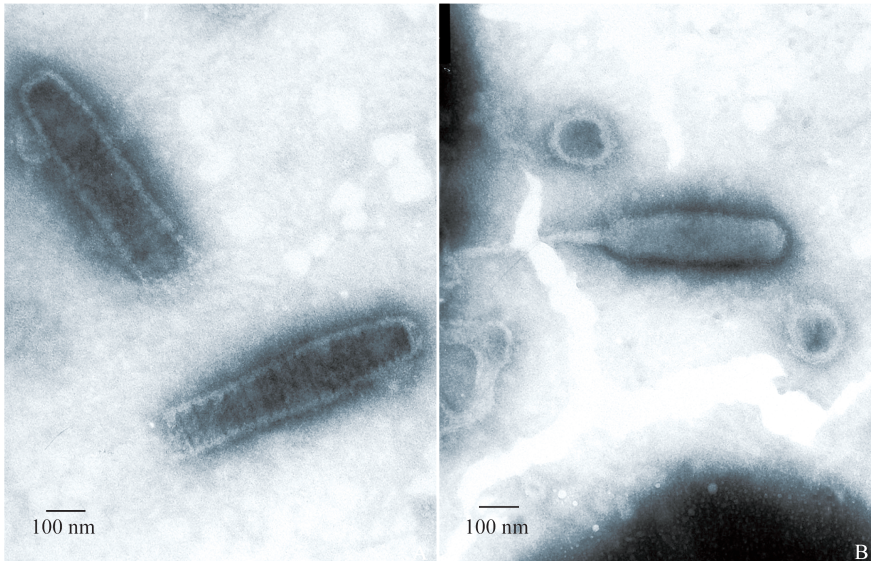


图 2 纯化的 WSSV 经负染后的电镜图片

A. 病毒核衣壳; B. 完整的病毒粒子

Fig. 2 Transmission electron microscope images of purified virus after negative staining

A. nucleocapsid of WSSV; B. intact virions

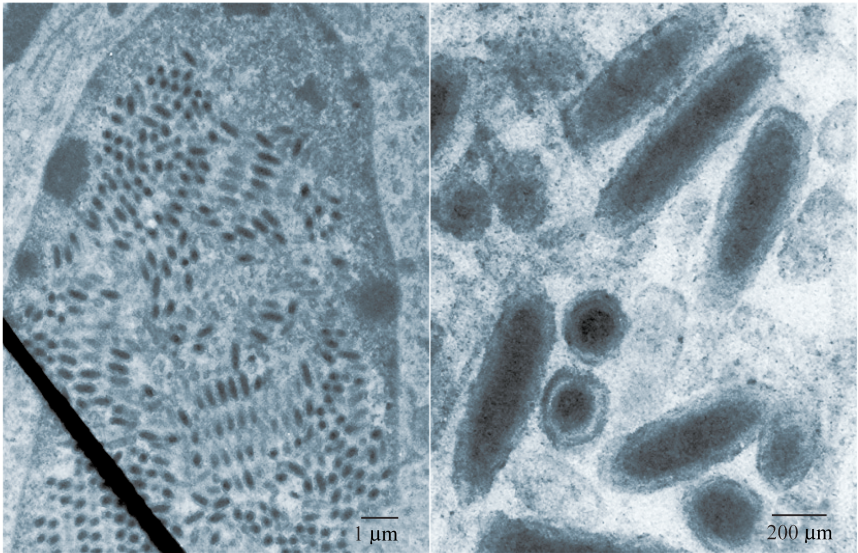


图 3 淋巴细胞感染病毒后的超微病理切片

Fig. 3 Transmission electron microscope images of the primary cell monolayers after WSSV inoculation

2.5 感染病毒后淋巴细胞的荧光染色观察

荧光显微镜下观察,WSSV 感染的细胞核较

正常细胞核深染,且细胞核的大小和形态发生变化,多呈半圆形、月牙形、杆状(图 4)。

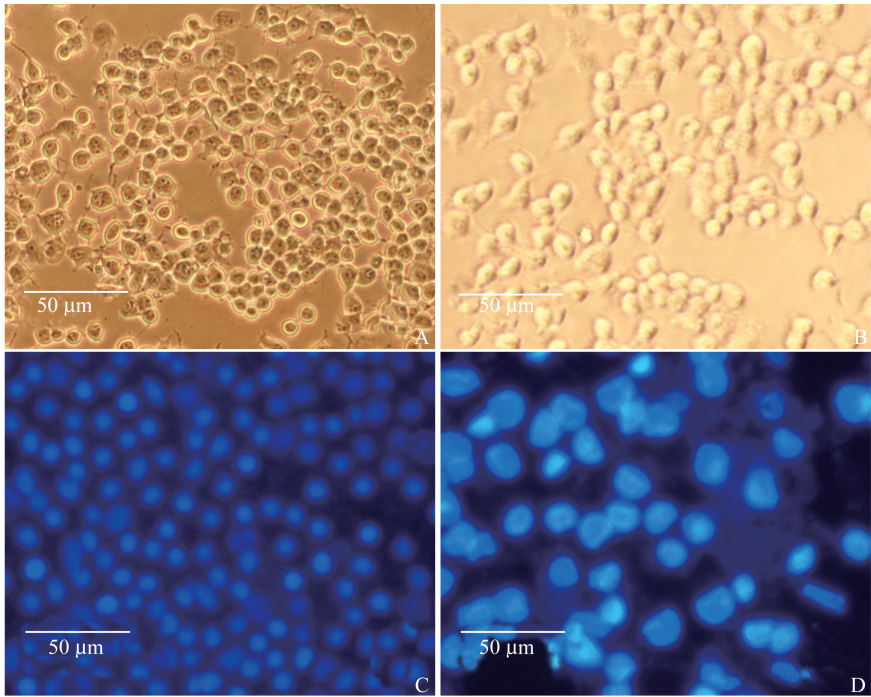


图 4 经 Hoechst 33342 染色的淋巴细胞的荧光显微镜照片

A,B 分别表示 Hoechst 33342 处理后的对照组和 WSSV 感染组细胞的光镜图片;C,D 分别表示 Hoechst 33342 处理后的对照组和 WSSV 感染组细胞的荧光图片

Fig.4 Fluorescence micrographs of the primary shrimp cell dyed by Hoechst 33342

A,B showed micrographs of the control group and the WSSV infected cells treated by Hoechst 33342; C, D showed fluorescence micrographs of the control group and the WSSV infected cells treated by Hoechst 33342

3 讨论

WSSV 是全球对虾养殖业危害最严重的病原之一,其分布广,发病率高,危害严重,过去 20 年中,该病原已蔓延至整个对虾养殖区域并且造成 70 多亿美元的损失。目前,深入研究 WSSV 的致病机制及传播机理,探索全面有效的抗病毒药物尤为重要。以细胞培养为载体筛选药物是防控病毒的有效措施。本实验以 WSSV 接种体外培养的原代淋巴细胞,观察细胞的病理变化,并将以此为依据判断药物的抗病毒效果,进而筛选有效的抗 WSSV 中草药。

在分离纯化病毒方面,国内外学者多数是以密度梯度介质中的超速离心为基础^[27-28]。本实验依据姜有声等^[26]蔗糖密度梯度离心纯化方法并加以改进来提纯病毒,结果表明,40% 与 50% 蔗糖浓度可得到完整的病毒粒子(图 2),提纯过程中用 25% 的蔗糖取代 PBS 缓冲液作为组织匀

浆液,能很好地保护病毒的囊膜不被破坏,获得大量纯度较高的完整病毒粒子。其原因可能是由于 25% 的蔗糖溶液包被病毒粒子,为其超速离心过程提供了很好的液体环境,减小了高转速下各病毒粒子之间的摩擦,从而较易获得完整的病毒粒子。

对虾细胞的体外培养研究最早始于 1986 年,我国台湾学者 Chen 等^[21]在国际上首次成功启动了斑节对虾卵巢细胞的原代培养。随后,相继有学者开展了对虾淋巴细胞^[29-31]、胚胎组织^[32]、肌肉组织^[33]等的研究,并取得了一定的研究成果。虽然国内外很多学者对对虾组织的培养做了大量的尝试,但都未从根本上解决对虾组织体外培养长期存活和大量增殖的难题。其主要原因是目前没有专门适用于对虾细胞培养的培养基,多数沿用哺乳动物或昆虫的细胞培养基,其中,以 L-15 和 M199 使用最为广泛^[34]。本实验采用 1.5 × L-15 培养基添加 SME、FBS、EGF、bFGF 培养刀额

新对虾淋巴细胞,组织干贴 3 h 以后可观察到有细胞从组织块中迁出,36 h 后细胞的迁出汇合率可达 80%,且单层细胞能维持 20 d,足以进行病毒感染实验。Jose 等^[35]报道了使用改良的 $2 \times L-15$ 培养基培养出淋巴细胞,但本实验在配制 $2 \times L-15$ 时发现培养基较难溶解,且对比 $1.5 \times L-15$ 培养基培养效果发现细胞的生长状态及存活时间并无差异。与 Han 等^[25]报道的培养基配方相比,本实验采用的 $1.5 \times L-15$ 培养基中未添加牛磺酸与脯氨酸,但细胞生长良好,改良的培养基可节约研究成本,提高培养基的配制效率。

在应用方面,以体外培养的细胞为载体来增殖病毒,进行病毒病理学研究具有非常重要的意义。国内外通过细胞培养开展对虾病毒的研究最早始于对虾白斑杆状病毒(WSBV),Chen 等^[22]以黄头病毒(YHV)和 WSBV 感染斑节对虾类淋巴细胞,5~7 d 出现明显的病理变化,电子显微镜下观察,细胞核与细胞质中分布有大量的病毒粒子。李钊等^[23]研究结果显示,来源于对虾的 WSBV 可感染体外培养的野生螯虾(*Cambarus clarkii*)原代血淋巴细胞,并在其中增殖。尽管对虾细胞培养采用的组织多种多样,但淋巴组织较其他组织更容易培养,且有报道指出,淋巴组织是 WSSV、MBV 等多种对虾病毒感染的敏感组织^[25,36]。因此,可以通过培养淋巴细胞来研究对虾病毒的吸附、增殖和凋亡,以此来探索病毒的发病机理、传播途径、病毒与宿主之间的相互作用。本实验中以纯化的 WSSV 感染体外培养的淋巴细胞,倒置显微镜下观察,细胞出现明显的病理变化,表现为纤维状的细胞停止延伸,细胞逐渐变圆漂浮,直至细胞破碎溶解。

Hoechst 33342 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,常用于细胞凋亡检测,经该染料染色后的细胞核在紫外光下发出淡蓝色荧光,凋亡的细胞由于细胞膜通透性增加,细胞核深染。本实验中选用 Hoechst 33342 浸染细胞,主要是因为该染料可以直接原位染色,避免了细胞固定和爬片过程中消化液对细胞造成的损伤,且染色方便,操作简单。感染 WSSV 出现病变的细胞经 Hoechst 33342 染色后,其细胞核较正常细胞深染,且核变形、膨大。透射电镜下,发现出现病变的细胞核内含有大量的病毒粒子,且成簇分布,病毒形态、大小与 Wang 等^[37]观察的组织内 WSSV 病毒粒子

特征一致。

综上所述,纯化的 WSSV 病毒粒子对体外培养的对虾淋巴细胞具有感染力,能够在淋巴细胞中增殖,被感染的淋巴细胞会产生明显的病理变化,证明了今后可通过观察淋巴细胞的病理变化判断中草药的抗病毒效果,进而筛选抗 WSSV 的单方或复方中草药,为防治对虾白斑综合征提供实验基础。

感谢青岛大学医学院的谭金山、侯颖一老师对本实验中电镜切片的制作所提供的大力支持与帮助。

参考文献:

- [1] Lin R G. Effect of aquacultural environment on the shrimp growth and the pathogen transmission [J]. *Marine Science*, 2001, 25(7): 11-14. [林荣根. 养殖环境对对虾生长及病原体传播的影响. 海洋科学, 2001, 25(7): 11-14.]
- [2] Xu W J, Sheng X Z, Shi H, et al. Artificial infection for *Portunus trituberculatus* by WSSV and histopathological observation [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(1): 33-39. [许文军, 绳秀珍, 施慧, 等. 白斑综合征病毒感染梭子蟹试验及组织病理学观察. 上海水产大学学报, 2007, 16(1): 33-39.]
- [3] Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996: 304.
- [4] Li Q, Liu Q H. Primary culture of *Penaeus chinensis* hemocytes and its interaction with QDs-labeled VP37p [J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2012, 33(4): 49-52. [李倩, 刘庆慧. 中国对虾血淋巴细胞的原代培养及其与量子点标记的 VP37p 的作用. 动物医学进展, 2012, 33(4): 49-52.]
- [5] Chen W B, Hou L, Liu Q H. Advance in WSSV subunit vaccine [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(12): 73-76. [陈文博, 侯林, 刘庆慧. 对虾白斑综合征病毒亚单位疫苗研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(12): 73-76.]
- [6] Lei Z W, Huang J, Kou Y T, et al. Review on research of molecular epidemiology of white spot syndrome (WSS) in prawn [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3): 260-264. [雷质文, 黄健, 寇运同, 等. 对虾白斑综合征(WSS)的分子

- 流行病学研究进展. 中国水产科学, 2002, 9(3): 260 - 264.]
- [7] Lei Z W, Huang J, Mo Z L. Pathology test for *Procambarus clarkii* infected WSSV by deliberate [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2002, 32(10): 23 - 25. [雷质文, 黄健, 莫照兰. 人工感染白斑综合征病毒的克氏原螯虾的病理学试验. 中国兽医科技, 2002, 32(10): 23 - 25.]
- [8] Mo Z L, Lei Z W, Yang B, *et al.* Artificial infection of crayfish with WSSV of penaeid shrimp and its detection [J]. Marine Sciences, 2002, 26(3): 43 - 46. [莫照兰, 雷质文, 杨冰, 等. 对虾 WSSV 人工感染螯虾及其检测. 海洋科学, 2002, 26(3): 43 - 46.]
- [9] Feng H, Zhang G P, Guo J Q, *et al.* Establishment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Veterinary Science in China, 2011, 41(7): 707 - 711. [冯华, 张改平, 郭军庆, 等. 对虾白斑综合征病毒 LAMP 检测方法的建立. 中国兽医科学, 2011, 41(7): 707 - 711.]
- [10] Yan D C. A review: Prevention and cure of shrimp white spot syndrome virus [J]. Fisheries Science, 2006, 25(4): 202 - 204. [闫冬春. 防治对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 的主要措施. 水产科学, 2006, 25(4): 202 - 204.]
- [11] Guo Z X, Li Z J, Guan S Y, *et al.* Screening of the herbal Chinese medicine for shite spot syndrome virus (WSSV) disinfection and the effect of the guava leaf water-extract on the infectivity of WSSV [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(21): 129 - 131. [郭志勋, 李卓佳, 管淑玉, 等. 抗对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 中草药的筛选及番石榴叶水提取物对 WSSV 致病性的影响. 广东农业科学, 2011, 38(21): 129 - 131.]
- [12] Takahashi Y, Kondo M, Itami T, *et al.* Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(6): 555 - 558.
- [13] Xu Y X, Xu Z R, Lu X M. Research progress for shrimp white spot syndrome virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2002, 32(1): 12 - 14. [许雅香, 许梓荣, 鲁兴萌. 对虾白斑综合征研究进展. 中国兽医科技, 2002, 32(1): 12 - 14.]
- [14] Li M, Dong X H. Effects of compound Chinese herbal medicines on growth and immunity of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(6): 68 - 72. [李明, 董晓慧. 复合中草药制剂对凡纳滨对虾生长和免疫指标的影响. 淡水渔业, 2008, 38(6): 68 - 72.]
- [15] Yang Q H, Guo Z X, Lin H Z, *et al.* Effects of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) WSSV ability in different strategy of concentration of Chinese herb compounds and feed [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2011, 2(2): 142 - 145. [杨清华, 郭志勋, 林黑着, 等. 复方中草药添加浓度和投喂策略对凡纳滨对虾抗 WSSV 能力的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2011, 2(上): 142 - 145.]
- [16] Wang D J, Wang L C, Tang Y X, *et al.* Research for prophylaxis and treatment of *Paralichthys olivaceus* hydatoncus by Chinese herb compounds [J]. Shandong Fisheries, 2003, 20(10): 20 - 21. [王大健, 王立超, 唐永新, 等. 利用中草药制剂防治牙鲆淋巴囊肿病的研究. 齐鲁渔业, 2003, 20(10): 20 - 21.]
- [17] Yuan L C. New technique for prophylaxis and treatment grass carp bleeding disease by Chinese herb compounds [J]. China Fisheries, 2000, (11): 79. [袁良萃. 中草药防治草鱼出血病新技术. 中国水产, 2000(11): 79.]
- [18] He W H. Prophylaxis and treatment for carp pox [J]. China Fisheries, 1996(4): 24. [何文辉. 鲤鱼痘疮病的防治. 中国水产, 1996(4): 24.]
- [19] Tapay L M, Lu Y, Brock J A, *et al.* Transformation of primary cultures of shrimp (*Penaeus stylirostris*) lymphoid (Oka) organ with Simian virus-40 (T) antigen [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1995, 209(1): 73 - 78.
- [20] Feng S Y, Huang J, Zhang S C. Status quo of research on penaeid shrimp cell cultures [J]. Marine Fisheries Research, 2003, 24(1): 64 - 68. [冯书营, 黄健, 张士瑾. 对虾细胞培养的研究现状. 海洋水产研究, 2003, 24(1): 64 - 68.]
- [21] Chen S N, Chi S C, Kou G H, *et al.* Cell culture from tissue of grass prawn, *Penaeus monodom* [J]. Fish Pathology, 1986, 21(3): 161 - 166.
- [22] Chen S N, Wang C S. Establishment of cell culture systems from penaeid shrimp and their susceptibility to white spot disease and yellow head viruses [J]. Methods in Cell Science, 1999, 21(4): 199 - 206.

- [23] Li F, Yang F. Proliferation of white spot bacilliform virus in the primary cell culture from haemocytes of crayfish *Cambarus Clarkii* [J]. High Technology Letters, 2002, 12(12): 74 – 77. [李钊, 杨丰. 对虾白斑杆状病毒对螯虾血淋巴原代细胞的感染. 高技术通讯, 2002, 12(12): 74 – 77.]
- [24] OIE Committee of Ichthyologist. Diagnostic handbook for aquatic animal disease [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 220 – 225. [世界动物卫生组织(OIE)鱼类专家委员会组织. 水生动物疾病诊断手册. 国家质量监督检验检疫总局, 译. 北京: 中国农业出版社, 2001: 220 – 225.]
- [25] Han Q, Li P T, Lu X B, *et al.* Improved primary cell culture and subculture of lymphoid organs of the greasyback shrimp *Metapenaeus ensis* [J]. Aquaculture, 2013, 410 – 411: 101 – 113.
- [26] Jiang Y S, Zhan W B, Cheng S F, *et al.* A method of white spot syndrome virus (WSSV) purification [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(3): 372 – 375. [姜有声, 战文斌, 程顺峰, 等. 一种改进的对虾白斑综合征病毒提纯方法. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 372 – 375.]
- [27] Wang C H, Lo C F, Leu J H, *et al.* Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 23(3): 239 – 242.
- [28] Shi T, Kong J, Bao Z M, *et al.* Studies of purification and ultrastructure of a baculoviral pathogen in *Penaeus chinensis* [J]. Acta Oceanologica Sinica, 1998, 20(2): 60 – 64. [石拓, 孔杰, 包振民, 等. 从中国对虾分离纯化的一种杆状病毒及其超微结构的研究. 海洋学报, 1998, 20(2): 60 – 64.]
- [29] Hsu Y L, Yang Y H, Chen Y C, *et al.* Development of an *in vitro* subculture system for the oka organ (lymphoid tissue) of *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 1995, 136(1 – 2): 43 – 55.
- [30] Tong S L, Miao H Z. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues [J]. Aquaculture, 1996, 147(3 – 4): 151 – 157.
- [31] Itami T, Maeda M, Kondo M, *et al.* Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* [J]. Methods in Cell Science, 1999, 21(4): 237 – 244.
- [32] Fan T J, Wang X F. *In vitro* culture of embryonic cells from the shrimp *Penaeus chinensis* [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 267(2): 175 – 184.
- [33] Zhang X H, Wang L H, Xu H S. Progress in cell culture of penaeid shrimp and its potential application [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 1996, 2: 78 – 82. [张晓华, 王立华, 徐怀恕. 对虾组织培养研究进展及其开发应用的潜在价值. 海洋湖沼通报, 1996, 2: 78 – 82.]
- [34] Toullec J Y. Crustacean primary cell culture: A technical approach [J]. Methods in Cell Science, 1999, 21(4): 193 – 198.
- [35] Jose S, Jayesh P, Sudheer N S, *et al.* Lymphoid organ cell culture system from *Penaeus monodon* (Fabricius) as a platform for white spot syndrome virus and shrimp immune-related gene expression [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(5): 321 – 334.
- [36] Luo P, Qiu D Q. Cell culture from hemolymph and lymphoid Tissues of Shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Marine Science Bulletin, 2005, 24(1): 27 – 30. [罗鹏, 邱德全. 凡纳滨对虾血淋巴、类淋巴细胞培养[J]. 海洋通报, 2005, 24(1): 27 – 30.]
- [37] Wang Y G, Hassan M D, Shariff M, *et al.* Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 39(1): 1 – 11.

The primary culture of the cell from lymphoid organ of *Metapenaeus ensis* and the infected features with white spot syndrome virus(WSSV)

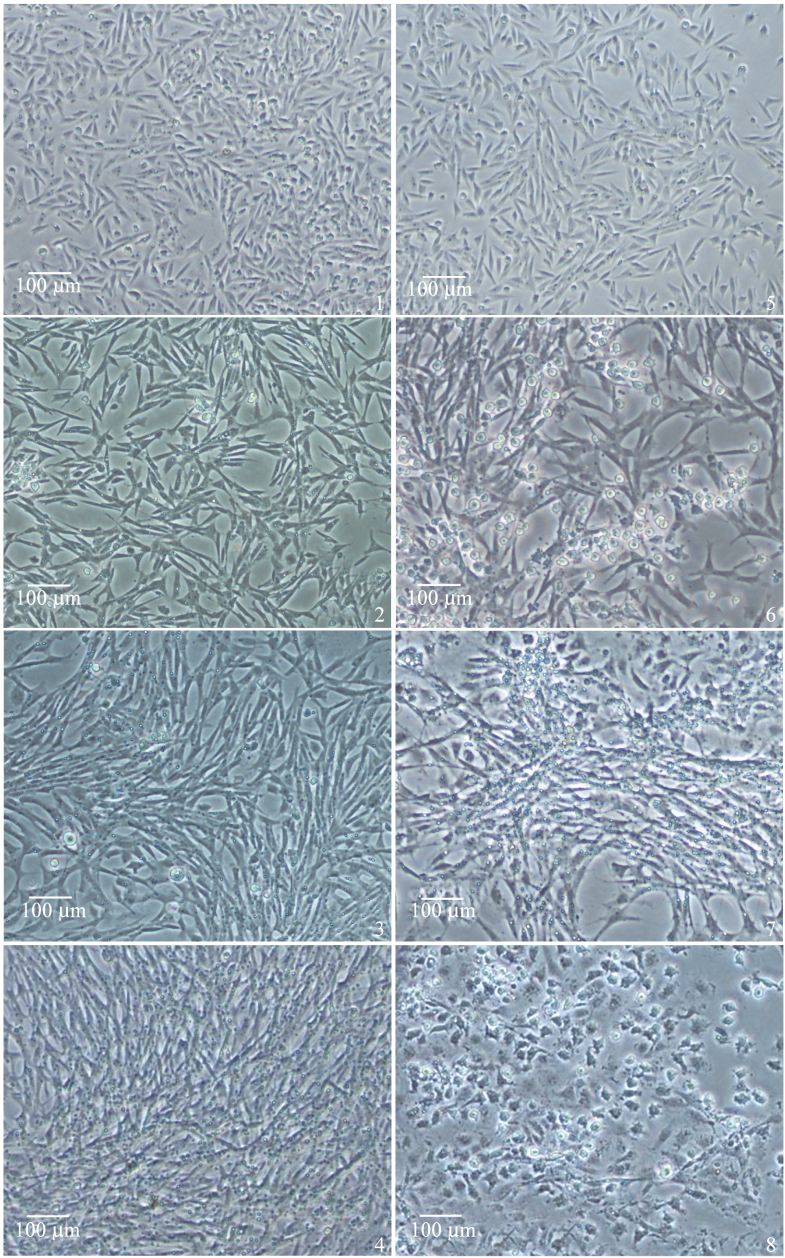
GUO Zijuan^{1,2}, WANG Yingeng^{1*}, RONG Xiaojun¹, LIAO Meijie¹, GUO Huarong³, HAN Qian³

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Ocean University of Shanghai, Shanghai 201306, China;
3. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: White spot syndrome virus(WSSV) caused serious disease and economic losses in the world, becoming a limiting factor in sustainable development of shrimp industry. Shrimp cell culture is a simple and rapid tool to study the pathogenic mechanism of the virus and to determine the viral susceptibility to the cells. In this research, primary culture cell from lymphoid organ of greasyback shrimp(*Metapenaeus ensis*) has been established by using an improved 1.5 × L-15 cell culture medium. The cell cytopathic effects (CPE) were observed, as the primary cell monolayer inoculated with WSSV. The results showed that the migration of lymphoid cells from the explants was initiated at 3 h after seeding, and a 80% confluent cell monolayer was formed within 24 – 36 h and remained viable for over 20 days. Within 24 h post inoculation, apparent CPE was observed in the primary culture cells. The infected cells initially exhibited shrinkage or became aggregated, while the network structure between the cells disappeared. Finally, the most infected cells rounded up and then detached from the culture dishes. Under fluorescence microscope, Hoechst 33342 staining showed that the nuclei of lymphoid cell enlarged and deformed with a deeper color, 48 h after inoculation with WSSV. Under electron microscope, a large number of clustered viral particles were founded in the affected nuclei, while the organelles were pushed to the cell edge, and the outlines of the cell membranes were vague. The study illustrated that the cultured lymphoid cells had apparent CPE as inoculated with WSSV. This phenomenon proved that WSSV could infect and multiply within the primary culture cells.

Key words: *Metapenaeus ensis*; white spot syndrome virus; lymphoid organs; primary cell culture; infection; pathology

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn



图版 刀额新对虾淋巴细胞接种 WSSV 后细胞病变的光镜图片

1 ~ 4. 基础培养基吸附 0、24、48 和 96 h 后的细胞；5 ~ 8. WSSV 吸附 0、24、48 和 96 h 后的细胞

Plate Micrographs of the cytopathic effects (CPE) in the primary shrimp cell cultures after inoculation of WSSV

1 – 4. the primary cell monolayers after the basal medium treatment for 0, 24, 48 and 96 h, respectively; 5 – 8. the primary cell monolayers after WSSV infection for 0, 24, 48 and 96 h, respectively