

牡蛎疱疹病毒对魁蚶的致病性

汪清晨^{1,2}, 白昌明^{2,3}, 张天文⁴, 王崇明^{2,3*}, 邱兆星⁴, 黄 健^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116000;

2. 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

4. 山东省海洋生物研究院底栖生物研究中心, 山东 青岛 266104)

摘要: 为探明牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)对魁蚶的致病性, 本研究使用发病魁蚶组织制作病毒悬液进行感染实验。感染实验分为空白组、阴性悬液注射组和病毒悬液注射组, 并使用实时定量PCR法对感染后魁蚶体内病毒的时空分布进行检测。实验结果显示, 空白组和阴性悬液组魁蚶感染后未检测到病毒粒子, 病毒悬液注射组魁蚶经人工感染后, 各部位病毒含量均呈先上升再下降随后又上升的趋势, 最终达到 10^6 拷贝/ng DNA左右。通过电镜观察, 在感染魁蚶的鳃、肝胰腺、外套膜中出现染色质边缘化甚至消失, 细胞核肿胀、溶解, 核仁消失, 核膜扩张、不清晰, 线粒体肿大, 脊崩解, 核糖体脱落等一系列细胞病理变化。在其细胞核和细胞质中均能发现大量直径为90~110 nm球形病毒粒子, 该病毒粒子具囊膜, 囊膜内可见均匀高电子密度的核衣壳, 与自然发病魁蚶负染电镜中的病毒粒子形态相同。研究结果表明, OsHV-1可以感染魁蚶并与魁蚶大规模死亡有直接相关关系; 魁蚶感染OsHV-1后机体产生应激反应, 对OsHV-1有一定抑制作用, 但其作用机制还有待进一步实验验证。

关键词: 牡蛎疱疹病毒; 魁蚶; 致病性; 实时定量PCR; 电镜

中图分类号: S 944.3

文献标志码: A

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)又称大毛蛤、赤贝、血贝, 隶属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、翼形亚纲(Pteriomorpha)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae)、蚶属(*Scapharca*)。主要分布于西太平洋日本、韩国、中国沿海及俄罗斯东南部沿海。在中国, 北起鸭绿江, 南至广西均有分布, 其中以辽宁、山东资源最为丰富。多栖息在3~50 m水深处, 是一种营埋栖生活的冷水性大型双壳贝类。魁蚶是一种优质的高蛋白、低脂肪食品, 其营养价值高, 味道鲜美, 具有良好的市场前景和开发利用价值^[1]。

早在20世纪70年代就有关于牡蛎感染疱疹样病毒(Herpes-type virus)的报道^[2]。1991年, 法国^[3]和

新西兰^[4]分别出现长牡蛎幼虫和稚贝的大规模死亡事件。随后类似的双壳贝类幼虫和稚贝大规模死亡事件又相继在澳大利亚^[5]、美国^[6]、西班牙^[7]、墨西哥^[8]、意大利^[9]等多个国家出现。该病毒可感染并致死多种双壳贝类, 包括牡蛎属(*Ostrea*)、扇贝属(*Pecten*)、蛤仔属(*Ruditapes*)以及蚶属等。给全球贝类养殖产业造成巨大经济损失。2012—2015年间, 辽宁、山东沿海多地发生魁蚶大规模死亡事件, 本实验室从发病魁蚶体内分离出一种球形病毒, 通过测序比对, 证明其为牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1)^[10]。通过感染实验, 进一步研究牡蛎疱疹病毒对魁蚶的感染特性及致病性。

收稿日期: 2015-12-03 修回日期: 2016-01-16

资助项目: 国家自然科学基金(31502208); 国家海洋公益性行业科研专项(201205023); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48); 山东省泰山学者建设工程专项; 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划(2015ASKJ01)

通信作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 发病魁蚶的检测

2013年4月大连庄河大王岛一育苗场魁蚶种贝发生大批死亡,根据其发病情况,疑似OsHV-1感染所致。本研究取40只发病魁蚶的外套膜提取DNA,分别用常规PCR法和实时定量PCR法对OsHV-1进行检测。常规PCR法使用的引物为C2/C6(C2, 5'-CTCTTTACCATGAAGATACCCAC C-3'; C6, 5'-GTGCACGGCTTACCATTTTT-3'),反应条件参考Renault等^[1]方法。实时定量PCR法使用的引物为BF/B4(BF, 5'-GTCGCATCTTTGGA TTTAACAA-3'; B4, 5'-ACTGGGATCCGAC TGACAAC-3'),探针为BP(BP, 6FAM-ATCGGGGGGGGGGGTTTTTTTTTTATCG-BHQ-1),反应体系为20 μ L,使用美国Bio-Rad的CFX Connect进行扩增。体系配制:DNA模板1 μ L;罗氏FastStart Essential DNA Probe Master 10 μ L;上游引物1 μ L;下游引物1 μ L;DEPC水7 μ L。反应条件参考Martenot等^[12]方法。总反应时间为50 min左右。

1.2 OsHV-1对魁蚶的感染实验

实验材料与条件 2014年9月于山东省日照采集300只魁蚶成贝用于感染实验,平均壳长(6.7 $\pm$ 0.4) cm,平均壳高(4.6 $\pm$ 0.3) cm,平均体质量(125 $\pm$ 23) g。随机选择30只个体进行OsHV-1的检测,检测结果均为阴性。

实验在山东省青岛市黄海水产研究所海水试验基地进行。实验用海水为天然海水,海水盐度为32,水温为18~21 $^{\circ}$ C,海水经沙滤及暗沉淀后备用,实验用水箱容积为50 L,24 h充气,每日换水一次,换水量为30%。按每箱1 mL浓缩小球藻(10^9 个/mL)进行投喂,每日投喂1次。

人工注射感染 取半只PCR扩增为阳性的发病魁蚶,在冰浴下剪碎称重,按每0.1 g组织加入1 mL灭菌海水,于FHX-1高速匀浆器以5000 r/min冰浴匀浆1 min,将匀浆液以1000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心15 min,弃沉淀,将上清液经0.22 μ m孔径滤膜过滤,过滤后液体即为病毒粗提液。对病毒悬液进行实时定量PCR,确定其病毒拷贝数为 5.37×10^6 拷贝/ μ L。采取同样的方法取半只健康魁蚶制备阴性悬液。

取健康魁蚶进行实验分组,分别为空白组、

阴性悬液注射组、病毒悬液注射组,每组30只,设3个平行。注射前用MgCl₂(70g/L, W/V)浸泡2 h进行麻醉处理,注射剂量为200 μ L。分别在注射24、48、60、72、84、96、132和144 h时取样进行实时定量PCR检测,为消除个体差异,每次取10只贝的相同部位使用液氮研磨混匀后提取DNA,并收集魁蚶的鳃、肝胰腺、外套膜等组织,固定后进行组织病理及超微细胞病理观察。

1.3 感染魁蚶组织病理及超微细胞病理观察

组织病理切片制备 取感染魁蚶的鳃、肝胰腺、外套膜切成3 mm³左右的小块,经40%中性缓冲甲醛液固定24 h左右,转入70%的乙醇中保存。保存的样本经乙醇梯度脱水后,使用二甲苯浸泡进行透明处理,然后经过浸蜡、包埋后,用石蜡切片机(Leica RM2145, Leica Biosystems, 德国)进行切片,厚度5 μ m,最后经常规苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin staining)染色后,光镜(Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments Inc., 日本)下观察。

电镜样品制备 取感染魁蚶的鳃、肝胰腺、外套膜切成1 mm³左右的小块,先用2.5%戊二醛固定,经0.1 M磷酸缓冲液浸洗,再以1%锇酸固定,丙酮梯度脱水,EPON812环氧树脂包埋,铅铀双重染色,日本JEM-1200EX型透射电镜观察。

负染样品制备 用毛细吸管取少量病毒悬液滴于带有支持膜的铜网上,放置5 min,用滤纸从液珠边缘吸去多余液体,滴加2%磷钨酸负染5 min,而后即用滤纸吸去染液,待干燥后,使用日本JEM-1200EX型透射电镜观察。

2 结果

2.1 发病魁蚶症状及检测结果

发病魁蚶的典型症状为反应迟缓,受到刺激后闭壳缓慢,闭壳肌收缩无力;摄食量减少,甚至不摄食;外套膜收缩,边缘呈红褐色;外套腔粘液增多;血窦萎缩,血液含量明显减少。

为确保检测的准确性和灵敏性,本研究分别使用常规PCR法和实时定量PCR法对发病魁蚶进行OsHV-1检测。常规PCR法的检出率为80%,实时定量PCR法的检出率为100%。

2.2 OsHV-1对魁蚶的致病性

感染实验过程中,病毒悬液注射组在攻毒的第2天,魁蚶就出现摄食量减少的情况。攻毒后第3天,病毒悬液注射组的部分魁蚶出现反应迟钝,受到刺激闭壳缓慢,闭壳肌收缩无力。攻毒后第4天,病毒悬液注射组魁蚶出现个别死亡现象。水箱中海水变浑,表层有大量泡沫。而阴性悬液注射组和空白组水箱中海水为澄清透明,表层无泡沫。

本实验对感染实验中不同时间,不同部位OsHV-1的含量进行实时定量PCR检测。结果显示,在魁蚶体内OsHV-1含量整体呈先上升,再下降,随后又上升,最终各部位病毒拷贝数趋近的趋势。其中斧足中的病毒含量于攻毒60 h时最先达到峰值 9.15×10^4 拷贝/ng DNA,血淋巴细胞中病毒含量紧随其后,于攻毒72 h达到峰值 1.85×10^5 拷贝/ng DNA。其他部位病毒含量均在攻毒84 h时达到峰值;在攻毒72和84 h时,斧足和血淋巴细胞中病毒含量分别急剧下降至 1.25×10^3 和 8.03×10^2 拷贝/ng DNA;其他部位在攻毒96 h时病毒含量也都略有降低;最后在攻毒144 h时,各部位的病毒含量都趋近于 10^6 拷贝/ng

DNA(图1)。

2.3 感染魁蚶组织病理观察

分别取健康魁蚶和感染OsHV-1魁蚶肝胰腺组织,固定后进行组织病理观察。正常魁蚶的肝胰腺为复管状腺体,由无纤毛的吸收上皮细胞构成,结构完整、规则,其间散布有嗜碱性分泌细胞,吸收上皮细胞体积一般较大,成柱状,细胞核位于底部(图2-a)。感染魁蚶的肝胰腺吸收细胞破碎,细胞内含物及整个细胞脱落至消化管腔中,腺管崩解,腺管边界模糊不清(图2-b)。感染魁蚶肝胰腺皮下结缔组织中的成纤维细胞还出现细胞核固缩,染色质边缘化的现象(图2-c, d)。

2.4 感染魁蚶电镜观察

用发病魁蚶制备的病毒悬液进行负染电镜观察,发现直径为90~110 nm的病毒粒子,病毒近似球形,具囊膜,囊膜内可见均匀高电子密度的核衣壳(图3-a)。对感染魁蚶的外套膜、肝胰腺以及鳃组织进行超薄切片观察,在外套膜肌间神经束(图3-b)和肝胰腺细胞核中(图3-d)均发现球形病毒粒子,与负染中观察到的病毒粒子形态相同。此外,感染魁蚶各组织中均出现细胞核

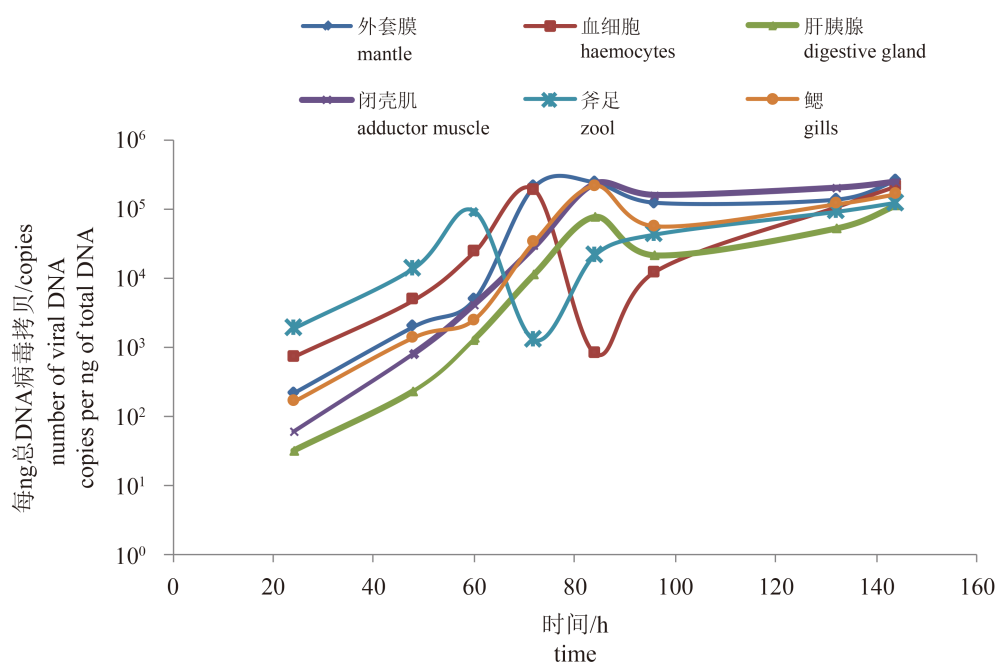


图1 魁蚶感染OsHV-1后不同部位的病毒含量

Fig. 1 Kinetics of virus DNA detection in different tissues of *Scapharca broughtonii* after OsHV-1 infection

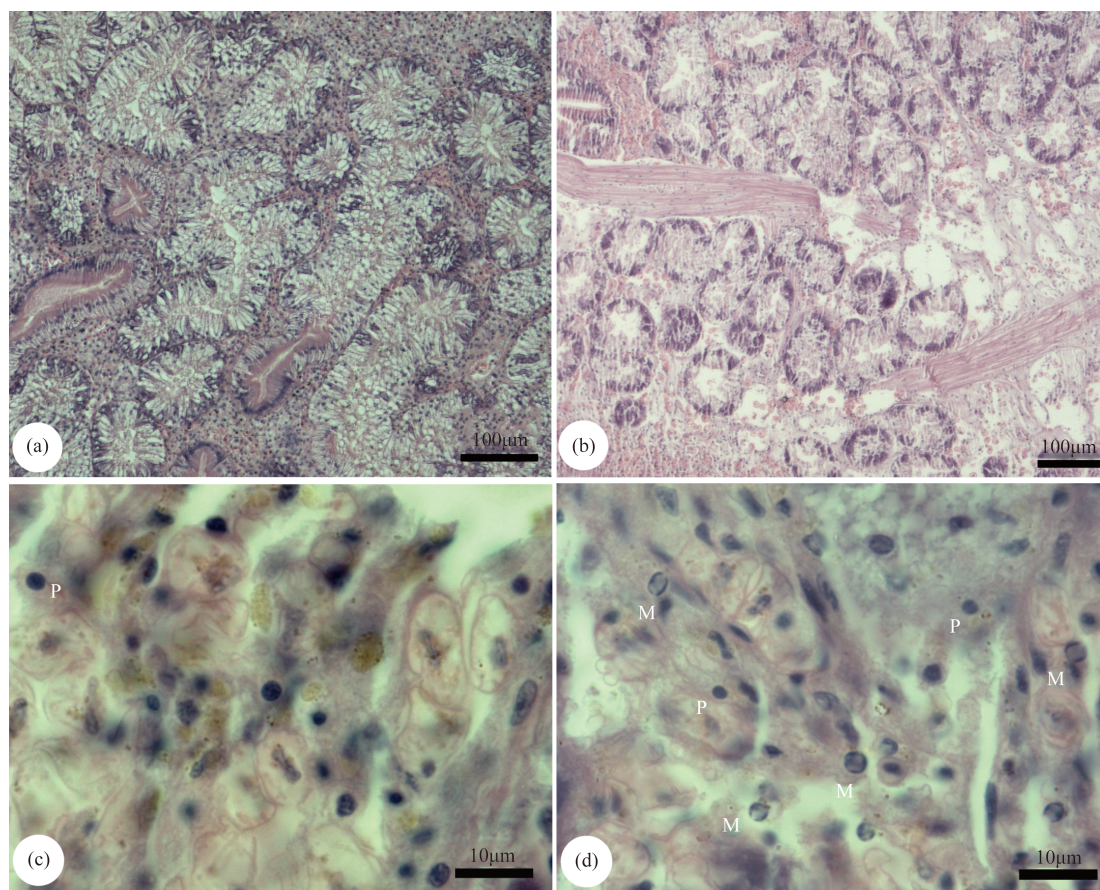


图2 魁蚶感染OsHV-1后的显微图片

(a) 正常魁蚶肝胰腺的腺管; (b) 感染魁蚶肝胰腺的腺管; (c) 感染魁蚶细胞核固缩; (d) 感染魁蚶消化腺中染色质边缘化; M. 染色质边缘化; P. 核固缩

Fig. 2 Photomicrographs of OsHV-1 infected tissues from *Scapharca broughtonii*.

(a) various degrees of vacuolization observed in normal digestive tubules of *S. broughtonii*; (b) various degrees of vacuolization observed in infected digestive tubules of infected *S. broughtonii*; (c) karyopyknosis in infected *S. broughtonii*; (d) abnormal nuclear features in the digestive gland of a *S. broughtonii* infected with OsHV-1; M. nuclear margination; P. Pycnosis

肿胀、溶解, 核仁消失, 核膜扩张、不清晰; 出现空泡, 甚至整个细胞解体现象(图3-c, d)。

3 讨论

3.1 OsHV-1的致病性

本研究以自然发病魁蚶组织制备病毒悬液感染健康魁蚶, 通过对自然发病魁蚶与人工感染魁蚶的表观症状观察、人工感染魁蚶的OsHV-1检测以及超微细胞病理学观察证实OsHV-1对魁蚶的致病性。对感染魁蚶表观症状的观察结果表明, 自然发病魁蚶和实验感染魁蚶发病症状基本一致。对自然发病魁蚶和人工感染魁蚶进行分子生物学检测, 结果显示其OsHV-1均为阳性, 并且人工感染后魁蚶组织中病毒拷贝数达到 10^6 拷贝/ng DNA左右, 这表明OsHV-1可以感染

魁蚶, 并在其体内复制增殖。此外, 在对自然发病魁蚶的组织悬液和人工感染魁蚶的组织切片电镜观察中均发现大量直径为90~110 nm的病毒粒子, 病毒形态及被感染魁蚶组织和细胞病理特征均符合柯赫氏法则, 说明OsHV-1可以感染魁蚶并与魁蚶大规模死亡有着直接的相关关系。

3.2 魁蚶感染OsHV-1后病毒的时空分布

从魁蚶感染OsHV-1后病毒的时空分布可以看出, 在感染OsHV-1后, 斧足中的病毒含量在攻毒60 h的时候就最先达到了峰值, 然后血淋巴细胞中的病毒含量紧随其后于攻毒72 h后达到峰值, 继而其他组织中的病毒含量也迅速达到峰值。这种现象可能与我们攻毒方式为注射攻毒有关, 病毒粒子越过宿主自身的屏障进入到宿

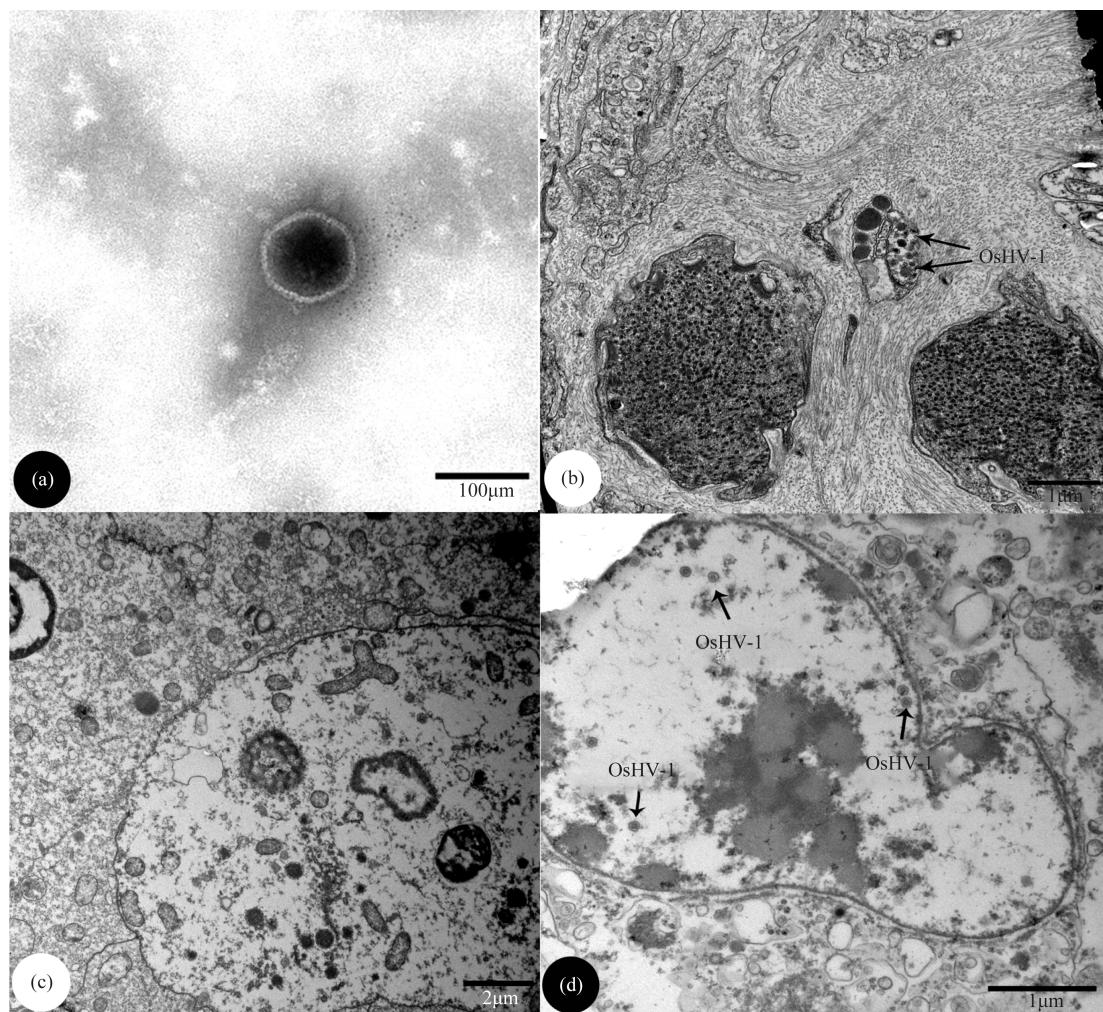


图3 魁蚶感染OsHV-1后组织电镜图片

(a) 魁蚶感染OsHV-1后液负染结果；(b) 感染魁蚶外套膜肌间神经束中可见病毒粒子；(c) 感染魁蚶细胞核；(d) 感染魁蚶肝胰腺细胞核中可见大量病毒粒子以及未装配的病毒核衣壳

Fig. 3 Transmission electron micrographs of OsHV-1 infected tissues from *S. broughtonii*.

(a) the negative staining electron microscopy results of *S. broughtonii* tissue infection with OsHV-1; (b) virus particles can be seen in mantle muscle nerve tract of infection *S. broughtonii*; (c) the infection *S. broughtonii* nuclear; (d) in the digestive gland nucleus of infection *S. broughtonii* a large number of virus particles and unassembly virus nucleocapsid can be seen

主体内^[13]，由于应用斧足注射，所以最先在斧足进行复制增殖，并且因为魁蚶是开放式循环，增殖的病毒很容易就进入到血淋巴中并随血淋巴循环快速到达全身各个组织器官而造成感染。此外，斧足中和血液中的病毒含量都在达到峰值后有明显下降趋势，但持续时间不长，病毒含量随即继续增加，这一结果与Schikorski等^[14]使用OsHV-1感染牡蛎的结果具有相同的趋势。对此现象，作者推测有2种可能：①可能是魁蚶血细胞的吞噬作用。当魁蚶受到大量增殖病毒粒子的刺激后，血细胞发挥其吞噬作用消

灭外来异物，但是血细胞吞噬外来异物的速率大小取决于细胞表面特征^[15]，后期病毒粒子可能通过改变其表面形态来抑制吞噬作用从而达到进一步复制增殖的目的；②可能是魁蚶分泌的某些免疫因子(如抗菌肽，多糖等)。魁蚶对体内大量增殖的病毒粒子产生应激反应，分泌某些免疫因子抑制或者杀灭病毒，如已报道部分抗菌肽对疱疹病毒有杀伤作用^[16]，并且贝类体内的硫酸多糖可以抑制疱疹病毒的复制^[17]，然而这些免疫因子的作用能力有限，只能对病毒的复制增殖起到一定的抑制作用。

参考文献:

- [1] 王颖, 吴志宏, 李红艳, 等. 不同地理群体魁蚶的营养成分比较研究[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 248–252.
Wang Y, Wu Z H, Li H Y, *et al.* Comparison of nutrient composition in *Anadara uropygimelana* from different areas [J]. Food Science, 2013, 34(3): 248–252 (in Chinese).
- [2] Austin Farley C, Banfield W G, Kasnic G J, *et al.* Oyster herpes-type virus [J]. Science, 1972, 178(4062): 759–760.
- [3] Nicolas J L, Comps M, Cochennec N. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas* [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 1992, 12(1): 11–13.
- [4] Hine P M, Wesney B, Hay B E. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1992, 12(2): 135–142.
- [5] Hine P M, Thorne T. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1997, 29(3): 189–196.
- [6] Friedman C S, Estes R M, Stokes N A, *et al.* Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2005, 63(1): 33–41.
- [7] Da Silva P, Tristan R, Fuentes J, *et al.* Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain) [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2008, 78(3): 181–188.
- [8] Vásquez-Yeomans R, García-Ortega M, Cáceres-Martínez J. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2010, 89(2): 137–144.
- [9] Dundon W G, Arzul I, Omnes E, *et al.* Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy [J]. Aquaculture, 2011, 314(1–4): 49–52.
- [10] Xia J Y, Bai C M, Wang C M, *et al.* Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus-1 associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks [J]. Virology Journal, 2015, 12110.
- [11] Renault T, Arzul I. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR [J]. Journal of Fish Diseases, 2001, 24(3): 161–167.
- [12] Martenot C, Oden E, Travaillé E, *et al.* Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 170(1–2): 86–89.
- [13] Schikorski D, Faury N, Pepin J F, *et al.* Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples [J]. Veterinary Research, 2011, 155(1): 28–34.
- [14] Schikorski D, Renault T, Saulnier D, *et al.* Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility [J]. Veterinary Research, 2011, 4227.
- [15] 孙敬锋, 吴信忠. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(5): 601–607.
Sun J F, Wu X Z. The progress of studies on molluscan hemocyte and its immunological function [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(5): 601–607 (in Chinese).
- [16] Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, *et al.* The roles of antimicrobial peptides in innate host defense [J]. Current Pharmaceutical Design, 2009, 15(21): 2377–2392.
- [17] 于囡, 刘赛, 韩建建, 等. 扇贝糖胺聚糖对 I 型单纯疱疹病毒的抑制作用 [J]. 青岛大学医学院学报, 2008, 44(2): 111–113.
Yu N, Liu S, Han J J, *et al.* The depressive effect of glycosaminoglycan from scallop on Type-I herpes simplex virus [J]. Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis, 2008, 44(2): 111–113 (in Chinese).

Pathogenicity of Ostreid herpesvirus-1 to *Scapharca broughtonii*

WANG Qingchen^{1,2}, BAI Changming^{2,3}, ZHANG Tianwen⁴, WANG Chongming^{2,3*},
QIU Zhaoxing⁴, HUANG Jie^{2,3}

(1. Aquatic and Life College, Dalian Ocean University, Dalian 116000, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

4. Benthic Biology Research Centre, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China)

Abstract: To better understand the pathogenesis of the Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1) to blood clam, experimental infection was conducted by injecting filtered tissue homogenate into the gastropod of each clam. Experimental clams were randomly allocated into 3 groups: blank control group, negative control group, OsHV-1 infected group. After the experiment, the temporal distribution patterns of OsHV-1 infection loads in six different tissues were assayed with quantitative PCR (qPCR). No virus was detected in clams injected with sea water and the negative control tissue homogenate. While virus DNA were detected in animals injected with tissue homogenate prepared from naturally infected clams. The virus DNA loads in tissues fluctuated first, and then reached about 10^6 copies viral DNA per ng of total DNA. Pathological changes including lysed connective tissue, dilation of the digestive tubules, eosinophilic inclusion bodies, nuclear chromatin margination and pyknosis were found in affected animals. Transmission electron microscopy (TEM) revealed herpes-like viral particles within the connective tissue of the mantle. These viral particles were about 90-110 nm in diameter with an electron-dense nucleoid packaged in capsid, which resembled those found in naturally infected clams. Overall, this work demonstrated the pathogenesis of OsHV-1 to blood clams and closely associated with the mass mortality of them. Additionally, our work also indicated the stress reaction after injecting OsHV-1 might play a role in the suppression of OsHV-1 replication, while the mechanisms need to be further studied.

Key words: OsHV-1; *Scapharca broughtonii*; pathogenicity; qPCR; electron microscope

Corresponding author: WANG Chongming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31502208); National Special Research Fund for Non-Profit Marine Sector (201205023); China Agriculture Research System (CARS-48); Construction Programme for Taishan Scholarship of Shandong Province of China; Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ01)