

文章编号:1005-8737(2001)04-0032-04

## 患颤抖病中华绒螯蟹体内类立克次体 侵染的光镜和电镜观察

王 文<sup>1</sup>, 顾志峰<sup>1</sup>, 朱宁宁<sup>1</sup>, 李正荣<sup>1</sup>, 杜开和<sup>1</sup>, 徐在宽<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097;

2. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

**摘 要:**对江苏和安徽地区患颤抖病的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)各器官和组织进行光镜和电镜观察。结果表明,类立克次体(Rickettsia-like Organisms, RLOs)广泛寄生于病蟹各器官和组织中。它们特异性地寄生于病蟹各器官的肌肉和结缔组织以及血细胞中,血淋巴中的小颗粒细胞是类立克次体的主要繁殖场所和传播载体。类立克次体对病蟹机体的结缔组织的广泛侵入,以及对胸神经节及神经与肌肉的接头—运动终板的侵染正是颤抖病症状(不食、肌无力、肢体阵发性颤抖)的病理结构基础。本研究旨在探讨RLOs与中华绒螯蟹颤抖病的关系,从而为建立有效的防治措施奠定理论基础。

**关键词:**中华绒螯蟹;颤抖病;类立克次体

**中图分类号:**S945

**文献标识码:**A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)颤抖病是近年来阻碍我国养蟹业发展的难题之一,目前的研究结果将其病因分为4类:1)病原体是病毒<sup>[1-5]</sup>;2)病原体是细菌<sup>[6-7]</sup>;3)可以排除病毒、细菌及寄生虫等病原微生物的致病性,养殖水体生态环境恶化是引起颤抖病的主要原因<sup>[8]</sup>;4)病毒、细菌等病原微生物以及环境等因素都起作用<sup>[9-12]</sup>。自1999年以来,我们开展了颤抖病的病原学和病理学研究,在江苏省淮阴地区的泗洪、洪泽、金湖、淮安等地的患颤抖病蟹体内发现了一种介于细菌和病毒之间的微生物—类立克次体RLOs<sup>[13]</sup>。2000年颤抖病流行高峰期,在该地区以及江苏宜兴、六合、高邮、溧湖和安徽天长、来安等发病区取样,并进行光镜和电镜的观察和研究,旨在进一步探讨RLOs侵染与颤抖病的关系,为颤抖病的防治提供有价值的资料。

收稿日期:2001-03-26

基金项目:江苏省科技厅科技兴海研究项目(BL2000305)

作者简介:王文(1957-),女,研究员,主要从事水生动物细胞生物学研究。E-mail: wenwang@njnu.edu.cn

RLOs是一种介于病毒和细菌之间的微生物,从分类角度来说,它是立克次体目的成员<sup>[14]</sup>,但由于其在立克次体目中的分类地位目前尚未明确,所以称之为类立克次体(Rickettsia-like Organisms, RLOs)。20世纪80年代国外曾有RLO侵染海蟹的报道<sup>[15,16]</sup>。近年来,国外有关RLO侵染鱼、虾、贝类并造成暴发性流行病的报道很多<sup>[17-19]</sup>,国内学者在海产贝类体内也发现了RLOs,并证实RLOs与贝类大面积死亡有关<sup>[20-22]</sup>。患颤抖病的中华绒螯蟹体内RLOs的寄生对研究颤抖病非常有意义,有必要进行深入的研究和探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 蟹样品

**1.1.1 病蟹** 1999年采于江苏洪泽、泗洪、淮安等地12个养殖塘,2000年又新增了江苏六合、宜兴、高邮、溧湖及安徽天长、来安等地,共计23个养殖塘,前后取病蟹共计360只,体重30~100g。

病蟹在发病初期表现为不食,活动少,常伏于水

底不动或上岸不回,第4对步足无力。发病中期,症状更加明显,口吐沫,步足阵发颤抖,不会爬动,翻身不能翻回,遇惊吓时步足颤抖剧烈。发病晚期,病蟹的受惊反应不明显或无,步足无力,仅可见两眼和触角竖立,解剖观察心脏还在跳动。

**1.1.2 正常蟹** 75只均来自从未发生过颤抖病的江苏苏州东山,体重50~75g。

## 1.2 光镜和电镜观察

取正常蟹及病蟹内脏器官和组织,包括鳃、血淋巴、食道、胃、中肠、后肠、中肠腺、肢肌、心肌、胸神经节、生殖腺等。用4%戊二醛前固定,1%四氧化锇后固定,丙酮脱水,Epon812环氧树脂包埋,Reichert-Jung超微切片机制片,半薄切片厚1 $\mu$ m,亚甲蓝染色,Olympus-BH光镜观察、拍照并进行超薄切片定位,超薄切片厚50~80nm,醋酸双氧铀及柠檬酸铅双染色,日立H-600透射电子显微镜观察、拍照。

## 2 结果

### 2.1 光镜观察

**2.1.1 鳃** 正常蟹鳃叶表面平整光滑,内部上皮细胞分布均匀,结构清晰(图版I-1,见附页);病蟹鳃叶与正常蟹鳃叶相比,症状不重时无明显结构差异,但症状重的蟹,尤其是濒临死亡的病蟹的鳃叶表面凹凸不平,有些区域呈现锯齿状,鳃上皮细胞分布不均匀,有些区域呈空泡化(图版I-2箭头所示,见附页)。

**2.1.2 心肌** 不同个体的病蟹心肌受损程度不同,大多与正常蟹心肌无显著差异(图版I-3,见附页),受损严重的病蟹心肌细胞边缘略有膨胀。

**2.1.3 肢肌** 结果与心肌相同。

**2.1.4 消化道** 病蟹的整个消化道上皮未见明显异常(图版I-4~7,见附页),但上皮下的结缔组织细胞常肿胀且空泡化(图版I-6,见附页)。

**2.1.5 中肠腺** 从整体来看,中肠腺上皮细胞及腺管结构在正常蟹与病蟹间差异不大。

**2.1.6 血淋巴** 正常蟹血淋巴液浓稠,极易凝固,血细胞丰富;而病蟹血淋巴液稀薄,不易凝结,血细胞明显减少,濒临死亡的病蟹体内血细胞则更少。病蟹血细胞质内常见到着色略深的包涵体。

**2.1.7 胸神经节** 正常蟹与病蟹的胸神经节的组织结构差异不很大,只是病蟹胸神经节的神经胶质细胞、血细胞及细胞间隙内常有染色深的包涵体样

结构。

**2.1.8 生殖腺** 正常蟹与病蟹的生殖腺上皮组织结构差异不大,只表现在结缔组织血细胞的染色差异上,即病蟹血细胞质内有着色略深的包涵体(图版I-8,9,见附页)。

### 2.2 电镜观察结果

**2.2.1 鳃** 顾志峰等<sup>[23]</sup>曾对正常中华绒螯蟹组织和细胞的超微结构进行了详细研究,未发现RLOs的寄生。而本实验在病鳃的小颗粒血细胞质内常见到RLOs寄生,RLOs呈球状(0.2~0.35 $\mu$ m)或棒状(0.2~0.9 $\mu$ m),其结构为典型的原核细胞,外周是不明显的细胞壁(CW),中间为丝状的DNA核区(图版II-1,见附页)。

**2.2.2 消化道** 有时可见消化道上皮的角质层外即消化官腔内有细菌附着,尤其是在后肠部分。病蟹消化道上皮未见明显异常,但其下的结缔组织(包括消化道的管壁肌肉)中有大量的RLOs寄生。

**2.2.3 血淋巴** 正常蟹血液中血细胞很多,分为3种:大颗粒细胞,小颗粒细胞和无颗粒细胞。RLOs寄生于血细胞中的小颗粒细胞中并在其胞内的空泡中大量增殖(图版II-2,见附页),增殖时形态多变,常呈现出芽、哑铃状、月牙形等不规则形态(图版II-1,见附页)。RLOs大量增殖后,寄主细胞破裂,将RLOs释放出来,因而血浆中也可见游离于细胞外的RLOs。

**2.2.4 中肠腺** 腺管上皮未见RLOs寄生,但腺管间的结缔组织中有RLOs侵入。

**2.2.5 肢肌** 肢肌的肌纤维的基膜内和肌浆网中以及血管和血细胞中均有RLOs寄生(图版II-3,见附页),并且在神经末端与肌肉细胞的连接处一运动终板部位也有成团的RLOs侵入(图版II-4,见附页)。

**2.2.6 心肌** 心肌RLOs的分布情况与肢肌相似。

**2.2.7 胸神经节** 胸神经节中的神经胶质细胞<sup>[24]</sup>、血细胞及细胞间隙中有大量RLOs侵染。

**2.2.8 生殖腺** RLOs主要分布在精巢及卵巢的结缔组织中的血细胞和细胞间隙中。

**2.2.9 正常蟹体内组织** 在正常蟹体内各器官和组织中均未发现RLOs。

## 3 讨论

### 3.1 RLOs的侵染特点与颤抖病症状的关系

颤抖病蟹体内RLOs的寄生既具有侵染的广泛

性,即它们的侵染遍布蟹体所有器官,又具有严格的组织特异性,即它们只侵染与肌肉和结缔组织有关的组织和细胞,而不侵染上皮等组织。这一特点又与颤抖病的肌无力和步足阵发性颤抖症状有密切关系。首先,肌肉组织是RLOs主要寄生地,大量的RLOs侵染于肌浆网这一肌细胞的Ca<sup>2+</sup>库,即动能库中(图版II-3,见附页),势必削弱肌肉的收缩功能,因而心肌、肢肌、消化道管壁的肌肉功能都受到损伤,所以造成体质虚弱,肢体无力、不食等症状。此外,RLOs还侵染胸神经结的神经胶质细胞和结缔组织以及神经细胞末端与肌肉细胞的连接处—运动终板(图版II-2,见附页),这必然导致神经传导的异常。胸神经结是支配中华绒螯蟹步足的神经指挥中心<sup>[25]</sup>,RLOs对该组织的侵入表明颤抖病蟹不仅外周神经系统受破坏,而且中枢神经系统也受损伤,因而可以推断RLOs的侵染是造成病蟹肌无力和步足颤抖等症状的重要原因。

### 3.2 RLOs对水产动物的危害

有关RLOs引起蟹类疾病的报道很少,而且都是有关海蟹体内的RLOs<sup>[15,16]</sup>。从整个水产动物来看,有关RLOs引起水生动物疾病的报道国外从20世纪80年代开始逐渐增多,该微生物对水产养殖业的危害性也越来越严重,尤其是鱼、虾、贝类等经济水生动物<sup>[17-19]</sup>。近年来,吴信忠<sup>[20,21]</sup>、王运涛等<sup>[22]</sup>在我国海产贝类大规模暴发流行病的贝类机体中发现有RLOs的寄生,顾志峰等<sup>[13]</sup>在内陆河蟹体内发现了RLOs,这些都表明我国水生动物体内除细菌、病毒、孢子等常见病原微生物外,也有不常为人们所知的病原体—RLOs。由于RLOs是介于病毒和细菌之间的微生物,体积较小,光镜下不易发现,而且在其感染初期,寄主组织的外观及光镜下的显微结构无明显异常,需借助电镜才能准确判断。此外,该病原体的侵染具严格的组织特异性,它们侵染的部位比较深层,而且它们和病毒一样,是一群依赖活细胞寄生和繁殖的微生物,这些都给该病原体的发现带来一定难度。因而有必要开展这方面的研究和宣传工作,正确指导养殖者进行水生动物疾病防治工作,避免盲目用药。

### 参考文献:

- [1] 陆宏达, 范丽萍, 薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒及其组织病理学[J]. 水产学报, 1999, 23(1): 61-68.
- [2] 何介华, 贺路, 曾令兵, 等. 河蟹颤抖病原的初步研究[J]. 淡水渔业, 1999, 29(3): 10-11.
- [3] 陈辉, 薛仁宇, 贡成良. 中华绒螯蟹1种球状病毒颗粒的电镜观察[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 114-115.
- [4] 孙学强, 郭爱珍, 陆承平. 中华绒螯蟹颤抖病的人工复制实验[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(1): 74-76.
- [5] 薛仁宇, 魏育红, 贡成良, 等. 中华绒螯蟹一种病原特性初步研究[J]. 水利渔业, 2000, 20(6): 16-18.
- [6] 杨先乐, 蔡完其. 河蟹“抖抖病”流行情况初步调查[J]. 水产科技情报, 1998, 25(6): 278-279.
- [7] 魏泽能. 河蟹颤抖病的流行病学调查[J]. 淡水渔业, 1999, 29(7): 16-17.
- [8] 潘连德. 养殖河蟹“抖抖病”的病原检验与病理学初步研究[J]. 水产科技情报, 1998, 25(6): 273-277.
- [9] 黄琪瑛. 河蟹颤抖病的研究现状(上、下)[J]. 科学养鱼, 2000, 5-6.
- [10] 薛仁宇, 魏育红, 朱越雄, 等. 中华绒螯蟹颤抖病的研究现状[J]. 内陆水产, 2000, 7: 41.
- [11] 沈锦玉, 尹文林, 钱冬, 等. 中华绒螯蟹腹水病及抖抖病并发病病原的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 89-92.
- [12] 周宏, 杨万喜. 中华绒螯蟹颤抖病的研究进展[J]. 水产科学, 2000, 19(4): 28-29.
- [13] 顾志峰, 王文, 杜开河, 等. 中华绒螯蟹“颤抖病”病原病理学初步研究[J]. 湖泊科学, 2000, 12(4): 367-372.
- [14] 喻树荣, 陈香蕊. 立克次体与立克次体病[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999, 142-53.
- [15] Bonami J R, Pappalardo R. Rickettsial infection in marine crustacea[J]. Experientia, 1980, 36: 180-181.
- [16] Johnson P T. A rickettsia of the blue king crab, *Paralithodes platypus* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1984, 44: 112-113.
- [17] Bower S M, Meyer G R, Boutilier J A. Stained prawn disease (SPD) of *Pandalus platyceros* in British Columbia, Canada, caused by a rickettsial infection [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 24: 41-54.
- [18] Drobne D, Trus J, Nidari N, et al. Morphological description of bacterial infection of digestive glands in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 73: 113-119.
- [19] Romero X, Turnbull J F, Jiménez R. Ultrastructure and cytopathology of a rickettsia-like organism causing systemic infection in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Crustacea: Decapoda), in Ecuador [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2000, 76(2): 95-104.
- [20] 吴信忠, 潘金塔. 热带海洋珍珠贝类立克次体病研究 V. 超微病理学及致病机理研究[J]. 海洋学报, 1999, 21(3): 113-118.
- [21] Wu Xinzong, Pan Jinpei. Studies on Rickettsia-like Organism Disease of the tropical marine pearl oyster I: The fine structure and morphogenesis of *Pinctuda maxima* pathogen rickettsia-like organism [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 73(2): 162-172.
- [22] 王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与

- 湖沼, 1999, 30(6):770-774.
- [23] 顾志峰, 王文, 杜开河, 等. 中华绒螯蟹的组织 and 超微结构研究[J]. 湖泊科学, 2000, 12(2):182-184.
- [24] 赵云龙, 李红, 王群, 等. 中华绒螯蟹神经细胞和胶质细胞的光镜及电镜观察[J]. 动物学研究 1999, 20(6):411-414.
- [25] 徐兴川, 朱振东. 湖泊养蟹[M]. 北京: 中国农业出版社. 1998. 25-27.

## Histopathology and ultrapathology of rickettsia-like organisms in *Eriocheir sinensis* with tremor disease

WANG Wen<sup>1</sup>, GU Zhi-feng<sup>1</sup>, ZHU Ning-ning<sup>1</sup>, LI Zheng-rong<sup>1</sup>, DU Kai-he<sup>1</sup>, XU Zai-kuan<sup>2</sup>

(1. College of Biological Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Jiangsu Fresh-water Fisheries Research Institute, Nanjing 210017, China)

**Abstract:** The Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, with tremor disease were collected from Jiangsu and Anhui Provinces. Using electronic microscope and light microscope, the crab tissues and organs were observed and the results show that the rickettsia-like organisms (RLOs) widely parasitize in all organs and tissues of the crabs. RLOs specially invade muscles, connective tissues, connections between nerve and muscle cells and hematocyte, and the hematocyte is a main place for their propagation and transmission. All these facts are the pathological bases associated with the disorders of the disease, i. e. indigestion, weakness and periopods paroxysmal tremor. The purpose of this study is to research the relationship between RLOs invasion and the tremor disease of crab so that a good control measure can be developed.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; tremor disease; rickettsia-like organisms (RLOs)

### 欢迎订阅 2002 年《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊, 已经正式编入《中国学术期刊(光盘版)》, 并加入“ChinaInfo(中国信息)网络资源系统(电子期刊)”及“中国期刊网”。主要刊载水产科学基础研究、生物技术、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产品保鲜与加工、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器的学术论文、综述和学术动态等文稿。它的主要服务对象是水产科学研究、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业, 为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

本刊是季刊, 大 16 开, 每期 96 页, 国内外公开发行。国内定价 14.00 元/期, 全年 56.00 元/期(含邮费)。本刊邮发代号: 18—250, 国内统一刊号: CN11—3021/S, 国际标准刊号: ISSN1005—8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮局办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期刊, 请直接向编辑部订阅。

地址: 北京市丰台区青塔村 150 号

邮政编码: 100039

电话: 010-68673921, 68673931

E. mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net