

牙鲆淋巴囊肿病的病理和病原分离

宋晓玲, 黄 健, 杨 冰, 史成银, 张立敬

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:应用常规显微和亚显微技术观察和分析患淋巴囊肿病养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的病理学变化,利用差速离心和蔗糖密度梯度离心技术分离其病原——淋巴囊肿病毒,并利用牙鲆鳃组织细胞系 FG-9307 为感染基质,观察淋巴囊肿病毒引起的细胞病理变化。结果表明,患病牙鲆的囊肿组织是一些淋巴囊肿细胞的集合体,这些囊肿细胞排列紧密,直径为 10~100 μm ,细胞近圆形,细胞质内散布有大量的嗜碱性包涵体,且多数集中在细胞的边缘部分;囊肿细胞内含有大量病毒粒子,其衣壳外形呈六角或五角形,直径为 150~230 nm,大多数病毒粒子中央有一致密的核,核外周包围着一双层核衣壳,核衣壳的表面可见一圈把手样亚单位。以患病牙鲆囊肿物制备的上清液接种细胞,7 d 内未见细胞异常,经盲传 2~3 代后,细胞出现较明显的细胞病变效应。

关键词:牙鲆;淋巴囊肿病;病理;病原分离

中图分类号:S941.8

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)02-0117-04

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肉质鲜美,生长快,是我国北方工厂化养殖的主要鱼种^[13]。但随着养殖密度增加以及养殖品种退化,病害现象频繁发生。目前报道多集中于养殖牙鲆的病毒性、细菌性、寄生虫病等^[13],而淋巴囊肿病由于其发病快、病程短、传染力强,已成为养殖牙鲆的主要病毒性疾病^[11]。其患病主要表现为:体表皮肤、鳍基部、上下颌及肛门等处有淋巴样囊肿,且囊肿数量随着病程的发展而增加^[9]。本研究运用差速离心和蔗糖密度梯度离心技术分离病原,并对牙鲆淋巴囊肿病的主要病理学特性进行分析,以期为该病的流行、病理学研究以及快速检测与控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病鱼 患病牙鲆采自山东荣成水产养殖场,全长 18~21 cm,体重 200~250 g,1 龄鱼,共 10 尾。

1.1.2 细胞系与培养基 牙鲆鳃组织细胞系 FG-9307 由青岛海洋大学生命学院童裴亮教授赠

赠,在添加了 15% 灭活小牛血清及青霉素(100 IU/mL)、硫酸链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)的 Eagle's MEM 基础培养基(购自 LIFE TECHNOLOGIES 公司)中传代培养^[7]。

1.2 病鱼处理

病鱼活体运输带回实验室,观察其外观病理症状,取部分体表囊肿固定于 Davidson's AFA 固定液中。组织切片,苏木素-伊红染色,石蜡封片,观察其显微病理变化。另一部分体表囊肿固定于多聚甲醛/戊二醛电镜固定液中,系列乙醇脱水,EPON 812 渗透包埋,Ultracut-E 型超薄切片机制片,经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后,电镜制片,染色,封片,于 JEM-1200EX 电子显微镜下观察并纪录亚显微病理结果。余下的体表囊肿存于 -20 $^{\circ}\text{C}$,用于病原分离。

1.3 病原分离

取囊肿病灶于 10 倍体积的 TEN 缓冲液(Tris-HCl, 0.05 mol/L; EDTA, 0.01 mol/L; NaCl, 0.15 mol/L)中,冰浴匀浆,匀浆液经反复冻融后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 g 离心 20 min,上清 25 000 g 离心 1.5 h 收集沉淀, TEN 重悬沉淀并置于 30%~60% (质量分数)蔗糖密度梯度液上方,45 000 g 离心 4 h,回收蔗糖梯度中的各个条带,以 TEN 稀释并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 25 000

收稿日期:2002-09-19.

基金项目:国家高新技术研究发展计划资助项目(2001AA622060).

作者简介:宋晓玲(1962-),女,副研究员,主要从事水产养殖动物疾病学研究。

g 离心 1.5 h 去除蔗糖, TEN 重悬沉淀。将少量重悬液滴加到载玻片上, 然后将覆有 Formvar 碳膜的铜网反扣在重悬液上, 5 min 后, 取下铜网, 晾干。滴加 5% 的磷钨酸负染 5 min, 用滤纸吸去多余的染液, 室温风干, 于 JEM-1200EX 电镜下观察每条带的组成并记录。

1.4 细胞的感染

经反复冻融并去除细胞碎片的囊肿病料上清(同病原的分离), 用直径 0.45 μm 的微孔滤膜除菌过滤并接种于生长良好的牙鲆鳃组织细胞系 FC-9307 单层细胞上, 22 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h 后, 倾去囊肿病料上清, 并用 2 mL 含 5% 小牛血清的 Eagle's MEM 基础培养基清洗培养物 2 次, 相同条件下 PBS 吸附做阴性对照, 加入 6 mL 含 15% 小牛血清、青霉素(100

IU/mL)、硫酸链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$) 的 Eagle's MEM 基础培养基, 22 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, Olympus 倒置显微镜下观察并纪录细胞病变结果。

2 结果

2.1 病理变化

2.1.1 外观及解剖病理 患淋巴囊肿病的牙鲆体表皮、鳍、鳃有多处结节样囊肿, 以背鳍、腹鳍基部最为严重; 这些病变单个或成群, 类似于珍珠样, 或融合而成桑椹样; 囊肿组织呈淡奶油色、灰色或灰黄色, 有时带有出血灶; 囊肿的质地柔软, 严重者有溃烂现象发生(见图 1)。体表、鳃、颌部及肛门等多处有出血点, 腹腔内各器官, 如肝脏、脾脏、胃及肠道未见明显异常, 腹腔外肾脏也未见明显异常。

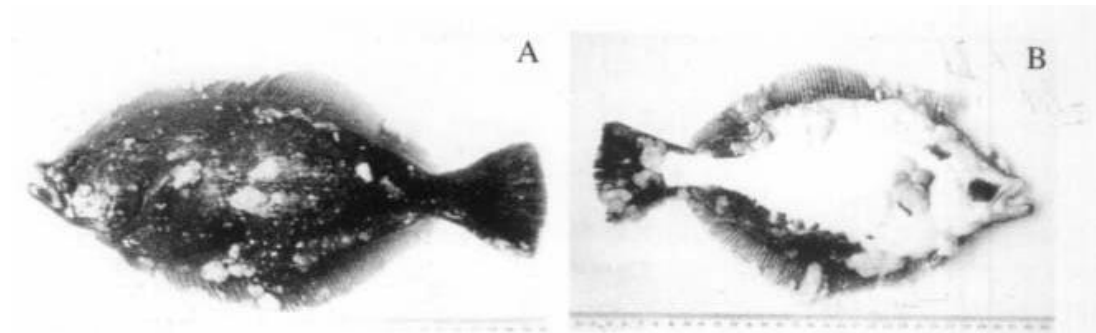


图 1 患淋巴囊肿病牙鲆的外观症状(A: 背面观; B: 腹面观)

Fig. 1 Lymphocystis disease in flounder *Paralichthys olivaceus* (A: dorsal; B: ventral)

2.1.2 显微组织病理 患病牙鲆的囊肿组织是一些淋巴囊肿细胞的集合体。这些囊肿细胞排列紧密, 大小不一, 直径多在 10 ~ 100 μm , 最大的可达 1 mm, 细胞近圆形。核仁粗大, 位于细胞核的中央位置, 而细胞核偏离中心位置; 细胞质内散布有大量的嗜碱性、大小不一的包涵体, 这种包涵体呈楔状、块状, 或数个成链圈状排列, 且大多集中在细胞的边缘部分。低倍镜下, 囊肿细胞外有一层排列紧密的、嗜酸性的包裹。

2.1.3 亚显微组织病理 囊肿细胞含有大量的病毒粒子。病毒粒子的衣壳外形呈六角或五角形, 直径为 150 ~ 230 nm, 大多数病毒粒子中央有一致密的核, 清楚显示出核髓和衣壳的层次, 有的病毒粒子呈均质状, 难以区分髓质和衣壳, 也有个别病毒粒子核髓中空, 甚至衣壳脱落(图 2-A)。核的外周包

围着一双层核衣壳, 核衣壳的表面可见一圈把手样亚单位(图 2-B)。

2.1.4 细胞病理 以患病牙鲆囊肿物制备的上清液接种牙鲆鳃细胞 FC-9307, 7 d 内未见细胞异常, 经盲传 2 ~ 3 代后, 细胞上出现较明显的病理变化。其病变主要特征先是细胞因缩, 呈牵丝状, 然后细胞聚融合坏死, 脱落并形成空斑, 最终随着空斑逐渐变多并扩大, 整个细胞单层被破坏(图 3)。将有典型细胞病变效应的细胞上清过滤后再接种新的细胞, 同一形态的细胞病变效应能重复出现。

2.2 病原分离

囊肿病灶组织经研磨匀浆、差速离心和蔗糖密度梯度分离, 离心管可辨有 2 条主要条带, 1 条位于 30% 蔗糖区域, 呈乳白色; 另 1 条位于 50% ~ 55% 蔗糖区域, 淡褐色。经负染透射电镜观察确认, 位于

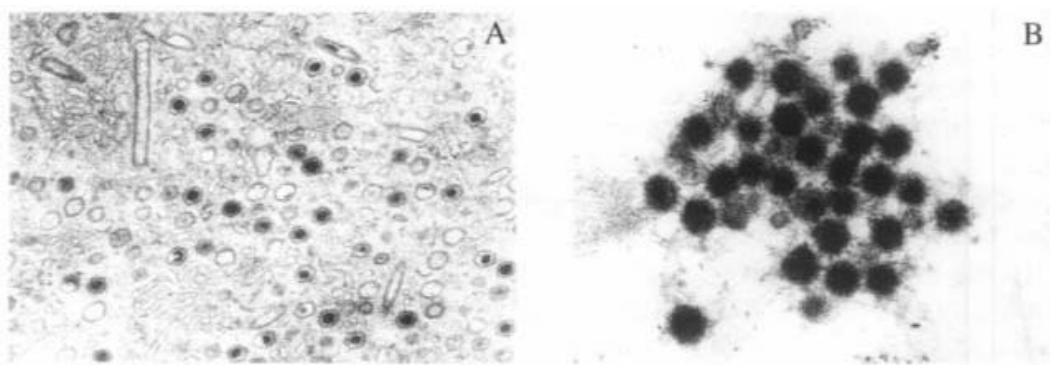


图2 牙鲆囊肿组织病理切片示细胞质中的淋巴囊肿病毒

Fig.2 Lymphocystis virus in a section of infected tissue of flounder *Paralichthys olivaceus*

(A: 散落在细胞质中的病毒粒子, $\times 10\ 000$; B: 聚集成团的病毒粒子, $\times 17\ 000$)

(A: Dispersive virions in cytoplasm, $\times 10\ 000$; B: Collective virions, $\times 17\ 000$)

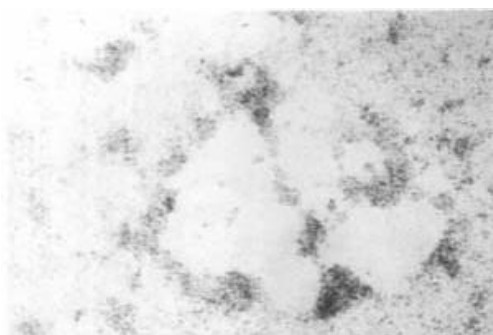


图3 牙鲆淋巴囊肿物在FG-9307细胞单层上形成的空斑

Fig.3 Plaque formed in monolayer of FG-9307 cells infected by lymphocystis virus

30%的条带由大量病毒粒子和少量杂质组成,位于50%~55%蔗糖区域的条带杂质过多,难以观察。

3 讨论

(1)淋巴囊肿病最早发生于1874年,并在1962年借助电子显微镜观察到病毒的基本形态,是最早发现的鱼类病毒病^[9]。据报道,至少有42科125种以上的鱼已发现患淋巴囊肿病,发病鱼体长多为20~30 cm,体重多为100~160 g^[11]。我国人工养殖的真鲷(*Pagrosomus major*)、鲈(*Lateolabrax japonicus*)、云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)、石斑(*Kareius bicoloratus*)等都有过患淋巴囊肿病的报道。典型的病症为在病鱼头、躯干、尾、鳍等处表皮散发小水泡样异物,甚至形成块状囊肿^[10,12]。本文报道的患淋

巴囊肿病的养殖牙鲆外部病症与文献报道的病症相近。病毒性淋巴囊肿是一种良性肿瘤样疾病,患病鱼大多会不治自愈,死亡率低;但患病鱼生长缓慢,且由于外观异样而严重影响其商品价值。

(2)文献报道的淋巴囊肿病毒的病毒粒子大多在130~260 nm^[10,12],本研究从养殖牙鲆分离到的淋巴囊肿病毒直径在150~230 nm,基本与有关文献吻合。病毒粒子大小的差异除与鱼种的不同有关外,还可能由于超薄切片或负染的制备方法差异所造成。另外由于病毒粒子是含有3个不同对称轴的20面体,因而病毒粒子不同方向和不同程度的切面造成了病毒颗粒切面形状的差异。

(3)借助高速研磨匀浆、差速离心和蔗糖密度梯度离心,可由囊肿病料组织中直接分离淋巴囊肿病原——淋巴囊肿病毒。但纯化的病毒液中仍含有较大量的组织细胞杂质,而且与超薄电镜切片观察到的大量病毒粒子相比较,从一定组织中分离到的病毒粒子偏少,也就是说有大量病毒粒子在分离过程中损失掉了。Berthisume^[1]曾报道淋巴囊肿病毒不易分离纯化和体外培养,并认为这会对该病毒的进一步研究带来困难。因此需进一步改进分离方法,从而获得更为纯净、得率更高的病毒粒子。

利用体外细胞培养物增殖和纯化病毒是一种更为可行的方法。Midlige等^[3]曾报道将鱼的淋巴囊肿做成乳剂后接种于鱼类细胞培养物上,23~25℃培养,并检查BF-2细胞感染淋巴囊肿病毒后的间隔变化,结果显示,到第15天才开始发现病毒。Perez-Prieto^[5]报道淋巴囊肿病毒对真鲷细胞系

SAF 的感染,结果显示 LDV 可在单层培养细胞快速增殖。本实验将淋巴囊肿病毒接种于牙鲆鳃细胞系,可观察到缓慢的细胞病理变化。与大多数的报道一致,即淋巴囊肿病毒可在离体细胞中培养,但增殖滴度有限。还有报道称在体外培养细胞中增殖产生的病毒粒子往往会出现结构不完整现象^[2]。

(4) 由于淋巴囊肿病的病变十分特殊,淋巴囊肿病可由外表直接观察病鱼皮肤或鳍表面是否有单个或成簇生长的囊肿异物,从而判断其是否患病。也可由更可靠的常规组织病理检查确定,即囊肿组织特有的巨大细胞,细胞内扩大的核、细胞质内聚团的嗜碱性内含物^[8]。除外观检查和组织病理技术用于鉴定淋巴囊肿病外,血清检测技术也应用于淋巴囊肿病的检测,如 ELISA 检测日本比目鱼淋巴囊肿病^[4]。1997 年, Tidona^[6]报道了淋巴囊肿病毒的基因组全序列(DNA 全长为 102 653 bp),为淋巴囊肿病毒的分子生物学鉴定等研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Berthiaume L, Alain R, Robin J. Morphology and ultrastructure of lymphocystis disease virus, a fish iridovirus, grown in tissue culture[J]. Virology, 1984, 135(1): 10-19.
- [2] Bowden R A, Oestmann D J, Lewis D H, et al. Lymphocystis in red drum[J]. J Aqu Ani Health, 1995, 7(3): 231-235.
- [3] Midlge F H Jr, Malsberger R G. In vitro morphology and maturation of lymphocystis virus[J]. Virology, 1968, 2: 830-835.
- [4] Nishida H, Yoshimizu M, Ezura Y. Detection of antibody against lymphocystis disease virus in Japanese flounder by enzyme linked immunosorbent assay[J]. Fish Pathology, 1998, 33(4): 207-211.
- [5] Perez-Prieto S L, Rodriguez-Saint-Jean S, Garcia-Rosado E, et al. Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream[J]. Dis Aqu Org, 1999, 35(2): 149-153.
- [6] Tidona C A, Darai G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus[J]. Virology, 1997, 230(2): 207-216.
- [7] Tong S L, Li H, Miao H Z. The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the gill of flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Aqu, 1997, 156: 327-333.
- [8] Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases[M]. Ithaca: Cornell University, 1988. 268-291.
- [9] 孟庆显, 俞开康. 海水养殖动物病害学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [10] 薛良义, 王国良, 徐兴林, 等. 海水网箱养殖鲈鱼淋巴囊肿病的初步研究[J]. 海洋科学, 1998(2): 54-56.
- [11] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [12] 张永嘉, 郭青, 吴泽阳. 云纹石斑鱼淋巴囊肿病病变过程的超微研究[J]. 海洋与湖泊, 1997, 28(4): 406-411.
- [13] 周丽, 宫庆礼, 俞开康. 牙鲆的疾病[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(2): 173-180.

Pathology of lymphocystis disease of flounder *Paralichthys olivaceus* and isolation of its pathogen

SONG Xiao-ling, HUANG Jie, YANG Bing, SHI Chen-yin, ZHANG Li-jing

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The diseased flounders *Paralichthys olivaceus* with typical lymphocystis symptom were collected from a flounder farm in Rongcheng, Shandong Province. The pathologic and histopathologic changes of the fish and the morphology of the virus particles were observed under optic and electronic microscope. The results show that the cyst tissues of the infected flounder are actually constituted by the aggregation of many lymphocystis cells in tight order and the size of the lymphocystis cells ranges from 10 to 100 μm in diameter, nearly round-shaped. The basophilic inclusion bodies exist in the cytoplasm of the lymphocystis cell and most of them are located on the edge of the cytoplasm. The shape of the viruses are hexagon or pentagon with knoblike subunits on its capsid. Most of the virus particles are 150-230 nm in diameter. The lymphocystis virus was isolated by inoculating the FG-9307 with tissue homogeneous from infected fish, and after second and third blind passage, the virus became to adapt to growing on the cell and the plaque formed at day 7 after the infection. The virus was purified with differential centrifugation followed by sucrose density gradient centrifugation, and most of the viruses presented in a layer with 30% of sucrose concentration.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; lymphocystis disease; pathology; pathogen isolation