

## 神经坏死症病毒对长编鲆仔鱼的感染 及在体内的传播

宋振荣

(集美大学水产学院,福建厦门 361021)

**摘要:**以长编鲆(*Pseudocaranx dentex*)孵化仔鱼为材料,通过神经坏死病毒(Nervous Necrosis Virus, NNV)浸浴感染实验,明确病毒浓度越高,供试鱼被病毒感染的时间越早,病毒检出率越高;运用细胞组织病理学和酶联免疫(Enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)的原理和方法,了解了神经坏死病毒的侵入、感染和在神经组织中的扩散方式;利用ELISA技术,结合电子显微镜对NNV感染细胞进行超显微观察,确认育苗水环境中神经坏死病毒可水平感染供试鱼皮肤上皮的基底细胞;病毒感染细胞发生细胞质内质网膨胀、细胞核变性、细胞小器官数减少等病理变化;病毒感染细胞质中病毒粒子有散布、类结晶和二者兼有3种存在形式。本研究成果可为了解海水鱼类人工育苗的病毒性神经坏死症感染途径、传播和预防病毒性神经坏死症的发生提供科学依据。

**关键词:**长编鲆,神经坏死病毒,感染途径,细胞组织病理  
**中图分类号:**S941.41 **文献标识码:**A

**文章编号:**1005-8737-(2003)06-0462-07

海水鱼类病毒性神经坏死症(Viral nervous necrosis, VNN)最早发生在日本的条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)人工种苗<sup>[1]</sup>,其后在4目9科20多种海水鱼类种苗中发生类似疾病<sup>[1-10]</sup>。该疾病发生在人工种苗生产期间,疾病传播速度快、患病鱼死亡率极高,是海水鱼类种苗生产中一个危害极大的病毒性疾病,已成为多种海水鱼类种苗生产的瓶颈。

被神经坏死病毒(Nervous necrosis virus, NNV)感染的海水鱼类,主要病症表现为中枢神经细胞组织大量坏死,从而引起患病鱼的大量死亡。有关NNV的侵入和感染研究,宋振荣等<sup>[2]</sup>报道了利用酶联免疫吸附测定原理检查病毒浸浴感染试验鱼的组织病理变化,并发现被NNV感染的海水鱼类皮肤上皮的基底细胞有NNV抗原存在;Nguyen<sup>[3]</sup>报道了有关长编鲆皮肤上皮有NNV存在。宋振荣等<sup>[4]</sup>报道了鲷种苗生产过程中发生病毒性神经坏死症为

VNN的新病例。

本研究利用酶联免疫吸附(ELISA)测定原理结合电子显微镜超显微观察,进一步确认NNV的感染和传播,了解NNV感染细胞的病理变化、NNV的复制及其存在形式,以期有效抑制VNN疾病的发生提供重要依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验鱼

经性腺检测VNN阴性的长编鲆(*Pseudocaranx dentex*)亲鱼培育的人工孵化仔鱼(2日龄)。

#### 1.2 病毒的提纯

将保存于-80℃患VNN的长编鲆病仔鱼80g(总体重,数万尾),加160mL 0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(加1 mmol/L EDTA和2 mmol/L 2-巯基乙醇)匀浆5 min(室温)后,添加氯仿至25%,再匀浆3 min(室温)、离心(8 kg, 15 min, 4℃)、收取上清液超速离心(100 kg, 2.5 h, 4℃)、将沉淀物用TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.2)搅混后置4℃冰柜过夜。第3次离心(8 kg, 15 min, 4℃)除去沉淀物后,上清液以10%~40%蔗糖勾

收稿日期:2003-03-24; 修订日期:2003-08-11.

基金项目:国家教委博士科研启动基金资助(教外司留98-679号).

作者简介:宋振荣(1954-),男,博士,副教授,主要从事水产动物种苗、养殖技术及其病害防治研究. Tel: 0592-6182746, E-mail: zrsong@jmu.edu.cn

配离心(80 kg, 2 h, 15 °C), 回收纯化病毒悬液; 添加5倍量的TE缓冲液超速离心(100 kg, 2.5 h, 4 °C)、沉淀物添加少量TE缓冲液, 使纯化病毒悬液后再经30%~40%氯化铯匀配离心(210 kg, 16 h, 16 °C)、回收病毒悬液, 添加5倍量的TE缓冲液超速离心(100 kg, 2.5 h, 4 °C)、沉淀物添加少量TE缓冲液, 使纯化病毒悬液后于保存-80 °C。

### 1.3 抗体及其制备

将纯化病毒悬液(1.5 mL)注入兔子背部皮下组织, 2周后重复进行等量皮下注射1次, 再2周后, 进行等量兔子耳静脉注射, 12 d后进行全量采血, 通过分离的血清作为第一抗体。第二抗体为市购的酶标记抗兔子血清的山羊血清。

### 1.4 病毒浸浴感染

在1 L培育海水中放入800尾长鳍鲷孵化仔鱼, 加入5 mg的卡拉霉素, 无投饵、静置于20 °C水温中培养。以纯化的病毒悬液浓度为1 ng/mL和10 ng/mL, 分2组进行浸浴攻毒实验, 在病毒悬液加入后12、24、32、40、44、48、60、72、84、108、132 h, 从各组分别取出50尾实验鱼, 以3%多聚福尔马林与1%戊二醛混合液固定。

### 1.5 酶联免疫组织法及病毒检出率

将已固定的实验鱼, 进行常规的石蜡包埋和连续切片。石蜡切片经脱蜡、复水后, 以含0.3%过氧化氢的甲醇处理20 min, 水洗后再用0.5%高碘素酸处理10 min, 进行内因性的过氧化酶阻止反应; 然后用3%的动物胶(TBS缓冲液, pH 7.5)处理30 min, 进行封阻反应; 用含0.05% Tween 20的TBS(TTBS)洗净, 以1/2 000浓度的第一抗体处理1 h, TTBS洗净后, 以1/3 000 GAR~HRP(酶标记抗兔子血清的山羊血清, 市购)进行第二抗体反应; TTBS洗净后用新鲜配制DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(3,3-二氨基联苯胺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液染色, 水洗后用1%甲基绿进行细胞核染色; 脱水、封片观察。

分别在攻毒12、24、28、32、36、40、44、48、60、72 h后, 对1 ng/mL和10 ng/mL实验组取样(50尾), 光镜检查运用酶联免疫组织病理方法处理各时间取样的实验鱼石蜡连续切片, 以发生抗原抗体特异反应的实验鱼作为被病毒感染鱼数除以实验鱼取样总数, 计算不同浓度及不同感染时间实验鱼的病毒检出率。

### 1.6 细胞组织超薄切片与观察

将供试鱼用2%多聚福尔马林与2.5%戊二醛

混合液(0.1 mol/L二甲砷酸缓冲液, pH 7.3)固定后, 采用常规的电子显微镜制片方法, 1% 锇酸后固定1 h、经脱水后用Spurr树脂包埋; 利用树脂切片机进行材料的超薄切片、超薄树脂切片经醋酸铀(饱和溶液)-柠檬酸铅(Reynolds法配制)二重染色, 利用电子显微镜观察细胞组织的病理变化。

## 2 结果

### 2.1 病毒的感染浓度与感染率

1) 最早发现患病鱼的中枢神经组织被病毒侵入的时间在浸浴攻毒12~24 h 10 ng/mL实验组; 1 ng/mL组最早发现患病鱼是在浸浴攻毒28~36 h内(见图1)。

2) 病毒浓度与供试鱼的病毒检出率成正比, 10 ng/mL组在浸浴攻毒40 h后, 病毒感染率达90%以上; 而1 ng/mL组各感染时间的病毒检出率均比10 ng/mL组低, 在浸浴攻毒48 h后, 病毒感染率在10%以内(见图1)。

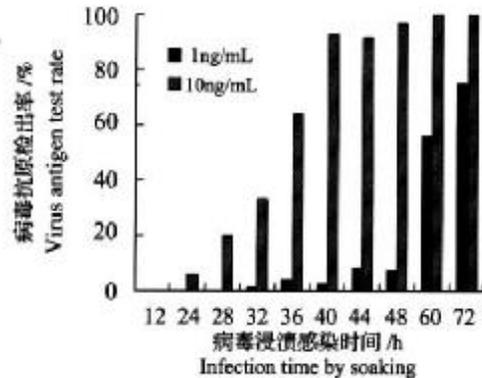


图1 不同浸浴感染时间病毒的检出率

Fig. 1 Detectable rate of virus in soaking infection

### 2.2 病毒在皮肤上皮组织的检出

通过ELISA法对实验鱼的石蜡连续切片进行大量观察, 发现患病鱼的皮肤上皮组织可检测出抗原(图版I-1); 通过电子显微镜检查, 确认患病鱼的皮肤上皮组织的基底细胞存在大量的病毒粒子(图版I-2)。

### 2.3 病毒在中枢神经组织中的传播

通过酶联免疫组织法对实验鱼石蜡连续切片进行的大量观察, 攻毒24 h的患病鱼脊髓首先检测出少量的抗原(图版I-3); 随着感染时间的推移, 攻

毒 40 h 的患病鱼脊髓可见多数神经细胞被病毒感染(图版 I-4);攻毒 72 h 的患病鱼脊髓已可观察到大量的神经细胞被病毒感染、神经细胞死亡并形成空泡状的组织结构(图版 I-5)。从患病鱼脑部亦可见,NNV 感染细胞随着病毒感染时间的推移而逐渐增多的现象(图版 I-6,7)。

#### 2.4 病毒感染细胞的病理变化

被 NNV 感染的神经细胞,细胞核变形、核质浓缩,细胞小器官数量减少(图版 II)。

#### 2.5 病毒的复制及其形式

通过电子显微镜观察,发现被 NNV 感染细胞质中的粗面内质网出现膨大现象(图版 II-1);在细胞质中的极度膨胀粗面内质网腔内,可见少量复制的病毒粒子及空衣壳的存在(图版 II-2);大量病毒粒子存在的内质网形成连片现象(图版 II-3)。

通过观察,发现 NNV 在神经细胞的复制现象有 3 种类型:病毒粒子较均质地散布在被感染细胞质中(图版 I-8)、病毒粒子在被感染细胞质中形成类结晶结构排列、前两种类型病毒粒子的复制形式同时出现在同一细胞质中(图版 I-9)。

### 3 讨论

#### 3.1 病毒的感染与感染率

由图 1 可见病毒浓度 10 ng/mL 组的实验鱼早于 1 ng/mL 组被病毒感染,攻毒后同一时间的感染率也较高,10 ng/mL 组的实验鱼在攻毒感染 40 h 后,病毒检出率就达到 90% 以上;而 1 ng/mL 组在浸浴攻毒 48 h 后,实验鱼的病毒感染率只在 10% 以内。可以认为,在水平感染初期,病毒的浓度越高,鱼的感染率也越高,病症也越严重。因此利用杀毒药物(聚维酮碘、溴氯海因等)对培育水体进行消毒处理和加大换水量,及时地清除病患鱼,降低病毒感染机会,有利于减少病毒的感染和防止 VNN 的发生。

#### 3.2 病毒的侵入途径

Munday 等<sup>[5]</sup>认为,尖吻鲈(*Lates calcarifer*)的 NNV 感染是由末梢神经进入中枢神经系统的;Nguyen 等<sup>[3]</sup>在长须鲷自然发病鱼皮肤上发现病毒抗原,认为上皮组织细胞存在病毒可能为全身感染的结果,或是鱼体早期发育阶段具有病毒的感受性,

该病毒具较强的向神经性,可通过与上皮组织相连的感觉神经或运动神经感染脊髓。本研究结果表明:长须鲷的人工病毒感染实验初期,虽然感染率低,但可从供试鱼皮肤上皮组织持续地发现病毒抗原的存在,这在条石鲷自然发病的研究中也发现有类似现象<sup>[2]</sup>。

从上皮组织结构来看,随着分泌细胞的发育,表皮层会产生开口部,此处很容易成为病毒侵入的门户。另外孵化鱼皮肤层很薄,局部只有 2~3 层细胞结构,病毒可透过皮肤层到达神经组织。病毒的侵入部位是不固定的,在病毒感染初期,鱼脊髓和脑部可同时发现多处病毒感染现象。可以认为,在水平交叉感染中,病毒可由水环境经皮肤侵入鱼的神经组织。笔者在其他 6 种海水鱼的 VNN 研究中,均在患病鱼的皮肤上皮、心血管上皮、咽喉上皮细胞组织中发现 NNV 感染的现象,尤其是患重病鱼体(待发表)。

#### 3.3 病毒在中枢神经组织中的传播

有关 NNV 在组织内的传播,Nguyen 等<sup>[3]</sup>根据对长须鲷的人工病毒感染实验结果,认为病毒是先感染脊髓,增殖后再传播到脑和视网膜。

本研究结果表明,病毒感染初期,在病鱼的脊髓和脑部可同时发现多处病毒感染现象(见图版 I-3,6),与 Nguyen 等的研究结果不同。从实验结果来看,随着感染时间的推移,染病鱼的中枢神经组织的病理变化越来越严重,可认为是少量病毒侵入神经细胞后,造成个别被感染神经细胞的坏死,其放散的病毒粒子进一步感染周围的细胞组织(图版 I-4,5,7),由于大量的中枢神经组织细胞的坏死,从而导致感染 NNV 鱼的死亡。

#### 3.4 神经坏死病毒复制的场所

正常的内质网是扁平盘状,在组织切片中表现为平行的膜状结构,其基本功能是进行细胞蛋白的合成、能量转换、物质代谢和细胞内物质运输等,因此被誉为蛋白的加工场<sup>[6-7]</sup>。由图版 II-1 可见,在病毒感染的神经细胞质中的部分内质网异常膨大,这种现象是这些内质网功能亢进的表现,而这种现象的原因可以认为是 NNV 核酸影响的结果。有关病毒的复制场所,根据病毒的种类不同,有的在细胞核内,有的在细胞质中进行复制。根据图版 II-

2, NNV 是在细胞质中膨大的粗面内质网内进行组合与复制。该图版还显示了 NNV 粒子组合的不同形态, 具病毒核酸的完整病毒粒子; 还可见到病毒核酸少或无(病毒粒子中心电子密度低)的六角形空衣壳。

### 3.5 神经坏死病毒的复制形式

有关病毒的释放类型, 一般认为由于被感染细胞的坏死、崩解而释出病毒(不具囊膜的病毒)和出芽形式(具囊膜的病毒)。NNV 是不具有囊膜的病毒, 从图版 I-8,9 可以见到 NNV 在细胞质中有散布状、类结晶状和两者均有等 3 种类型。一般认为病毒类结晶结构是衣壳大量集聚的结果, 而散布状的复制形式则说明衣壳在细胞质中是均匀分布, 如何解释这种差别, 尚需进一步的研究。在笔者针对 7 种海水鱼类的神经坏死病毒症的研究中, 推测这与被感染细胞的成熟度有关, 呈现被病毒感染的年轻细胞以类结晶结构为多, 有关该病毒的复制机制还有待进一步的研究。

### 3.6 VNN 的防治措施

针对 VNN 症的防治, 日本的有元操等<sup>[8]</sup>通过对长鳍鲷亲鱼繁殖期性腺的 NNV 检查, 排除具 NNV 抗原的亲鱼, 减少了病毒垂直感染机会, 降低了 VNN 的发病率(但也有个别的病例发生, 可能是交叉感染所致)。笔者认为, 尽可能地降低水环境中的病毒浓度是减少 VNN 发病的一个关键问题。VNN 一般发生在自身免疫能力不强的海水鱼类幼仔鱼期, 因此, 在海水鱼类育苗期间应尽量地清除育苗池底的残饵、粪便、病死鱼等污物, 保证培育水体的清洁, 减少病原体的浓度和发病率。另外, 消毒海

水的使用也是防病的一个主要措施。

### 参考文献:

- [1] Yoshikoshi K, Inoue K. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese Parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck and Schlegel) [J]. *Fish Dis*, 1990, 13, 69-77.
- [2] 宋振荣, 金井欣也, 吉越一马. 海水仔幼鱼病毒性神经坏死症的病理组织研究[A]. 日本鱼病学会春季大会论文集[C]. 熊本, 1995. 21.
- [3] Nguyen H D, Nakai T, Muroga K. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae [J]. *Dis Aquat Org*, 1996, 24, 99-105.
- [4] 宋振荣, 金井欣也, 吉越一马, 等. 鲷的种苗生产过程中发生病毒性神经坏死症[J]. *水产增殖*, 1997, 45, 2, 241-246.
- [5] Munday B L, Langdon J S, Hyatt A, et al. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch (1992) [J]. *Aqu*, 1992, 103, 197-211.
- [6] Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, et al. *Watson Molecular biology of the cell* [M]. KYOIKUSHA, 1989, 433-451.
- [7] 殷震, 刘景华. *动物病毒学* [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 48-66.
- [8] 有元操, 丸山敬悟, 古泽岩. 长鳍鲷的病毒性神经坏死症的发生状况[J]. *鱼病研究*, 1994, 29, 19-24.
- [9] Arimoto M, Mori K, Nakai T, et al. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider) [J]. *Fish Dis*, 1993, 16, 461-469.
- [10] Arimoto M, Mushiike K, Mizuta Y, et al. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Fish Dis*, 1992, 27, 191-195.

## Intercross infection and spread of nervous necrosis virus in *Pseudocaranx dentex*

SONG Zhen-rong

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The nervous necrosis virus (NNV) suspension was obtained by purification from the diseased *Pseudocaranx dentex* with viral nervous necrosis (VNN). The experimental fish were VNN-negative 2-day-old larvae. The first antibody was got from the rabbit injected with the purified NNV suspension, and the second antibody was goat serum with enzyme-marked anti-rabbit serum. The results of soaking infection experiment confirmed that the higher the virus density was, the earlier the fish was infected and the higher the virus antigen test rate was, too. By applying the principle and the method of cellular and tissue-pathology and ELISA, the ways by which NNV took to invade, infect and spread in nervous tissues were researched that in terms of horizontal transmission and cross infection, NNV can invade nervous tissues through fish skin from the environmental water, and the fish could be mutually infected with NNV in the basal epithelial cells of the skin through breeding water. The infected cells swelled in cytoplasm and endoplasm net, the endoplast denatured, and the numbers of small organs in cells reduced. There were three existing forms of virus particles in cytoplasm, which were scattering, crystal-like and both. The purpose of this study is to provide scientific bases for fry breeding researchers to understand the infecting and spreading ways of VNN so that the controlling precaution could be made.

**Key words:** *Pseudocaranx dentex*; nervous necrosis virus; infecting way; cellular and tissue-pathology

### 图版 I 说明

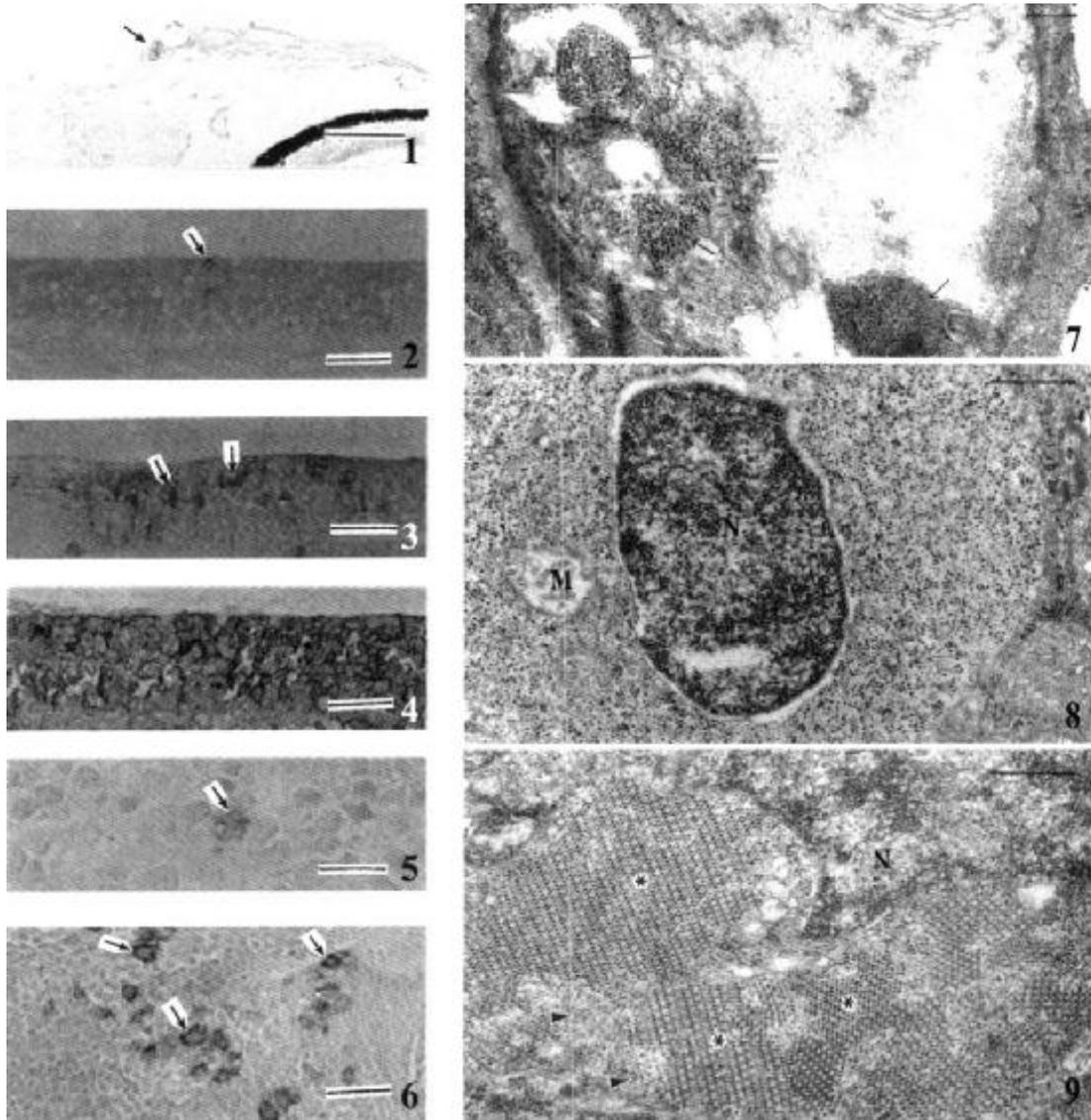
1. “↑”示患病鱼皮肤上 NNV。Bar = 12.5 μm。
2. “↑”示患病鱼皮肤上皮基底细胞 NNV 粒子的检出;Bl:基底膜;Se:分泌细胞;Su:表皮细胞。Bar = 0.5 μm。
3. 病毒浸渍感染(10 ng/mL)24 h 脊髓少数细胞被感染。Bar = 12.5 μm。
4. 病毒浸渍感染(10 ng/mL)40 h 脊髓多数细胞被感染。Bar = 12.5 μm。
5. 病毒浸渍感染(10 ng/mL)72 h 脊髓大量细胞被感染;出现死亡细胞组织呈空泡状。Bar = 12.5 μm。
6. 病毒浸渍感染(10 ng/mL)40 h 脑少数细胞被感染。Bar = 5 μm。
7. 病毒浸渍感染(10 ng/mL)60 h 脑多数细胞被感染。Bar = 12.5 μm。
8. NNV 复制呈均质状散布在细胞质中;N:细胞核;M:线粒体。Bar = 0.5 μm。
9. NNV 复制具有类结晶和散布状 2 种类型,“↑”示散布状病毒粒子;“\*”示类结晶状排列病毒。Bar = 0.5 μm。

### Explanation of Plate I

1. “↑” denote NNV on the fish skin suffering from disease. Bar = 12.5 μm.
2. “↑” the test result of basal epithelial cells NNV particle on the skin of fish suffering from disease. Bl; Basilar membrane. Se; Secrete cell. Su; Surface cell. Bar = 0.5 μm.
3. Minor cells in the spinal cord infected after 24 hours of virus soaking infection (10 ng/mL). Bar = 12.5 μm.
4. Majority cells in the spinal cord infected after 40 hours of virus soaking infection (10 ng/mL). Bar = 12.5 μm.
5. Large number of cells in the spinal cord infected after 72 hours of virus soaking infection (10 ng/mL). Dead cell tissue presenting the shape of empty bubble. Bar = 12.5 μm.
6. Minor cells in the brain infected after 40 hours of virus soaking infection (10 ng/mL). Bar = 5 μm.
7. Majority cells in the brain infected after 60 hours of virus soaking infection (10 ng/mL). Bar = 12.5 μm.
8. Reproduction of NNV presented in the shape of even which spread in the cytoplasm. N; endoplast; M; mitochondrion. Bar = 0.5 μm.
9. The reproduction of NNV has two types, one is in the shape of crystal and the other is in the shape of scatter. “→” indicates viral particles in the shape of scatter. “\*” indicates the order virus in the shape of crystal. Bar = 0.5 μm.

宋振荣等：神经坏死症病毒对长须鲈仔鱼的感染及在体内的传播

SONG Zhen-rong et al: Intercross infection and spread of nervous necrosis virus in *Pseudocaranx dentex*

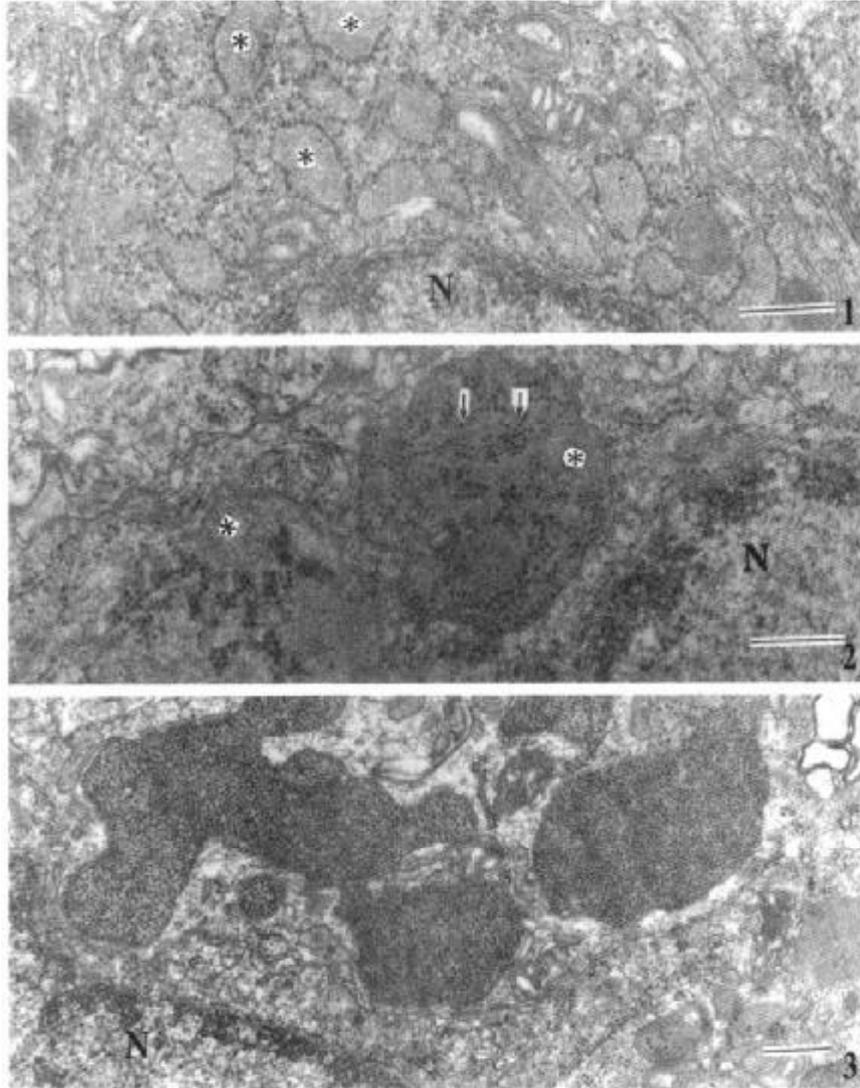


图版 I Plate I

(图版 I 说明见文尾。Explanation of Plate I at the end of the text)

宋振荣:神经坏死症病毒对长须鲈仔鱼的感染及在体内的传播

SONG Zhen-reng: Intercross infection and spread of nervous necrosis virus in *Pseudocaranx dentex*



### 图版 II

1. “\*”示被病毒感染细胞质中出现大量的膨大粗面内质网。Bar = 0.5  $\mu\text{m}$ 。
2. 膨大的粗面内质网腔内可见少量正在复制的病毒粒子;“↑”示病毒粒子;“\*”示膨大的内质网腔。Bar = 0.5  $\mu\text{m}$ 。
3. “↑”示膨大内质网腔内可见大量病毒粒子存在的现象;该细胞核变形;N;细胞核。Bar = 1  $\mu\text{m}$ 。

### Plate II

1. “\*” indicating large amount of inflated rough endoplasm net in the cytoplasm infected by the virus. Bar = 0.5  $\mu\text{m}$ .
2. Small number of viral particles which were reproducing could be seen in the inflated rough endoplasm net, “↑” indicating the viral particles and “\*” indicating the inflated rough endoplasm net. Bar = 0.5  $\mu\text{m}$ .
3. “↑” indicating the existent sign of a large number of viral particles in the inflated endoplasm net. This endoplast had changed its shape. N; endoplast. Bar = 1  $\mu\text{m}$ .