

军曹鱼淋巴囊肿的病理学研究

常藕琴, 石存斌, 马红, 潘厚军, 余德光, 吴淑勤

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要:应用病理组织学和电镜方法, 对患疑似淋巴囊肿病的军曹鱼(*Rachycentron canadum*)的各器官进行观察。结果表明, 患病军曹鱼的皮肤囊肿组织由一些淋巴囊肿细胞集合体组成, 这些囊肿细胞排列紧密, 直径为 10 ~ 150 μm , 细胞呈圆形、锥形不规则状; 细胞外有一层厚的囊膜; 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; 电镜观察到囊肿细胞质中有大量二十面体的病毒粒子, 病毒颗粒直径 220 nm。据此确认该病为病毒性淋巴囊肿病。其他器官主要组织病理学变化有: 在心脏、肝脏、脾脏和头肾中也存在囊肿细胞, 心肌纤维水肿; 肾间质淋巴细胞增生, 巨噬中心出现, 肾小管上皮细胞变性和坏死; 脾淋巴细胞增生, 脾髓质出血; 肝脂肪变性; 鳃上皮肿胀。根据观察结果可以认为, 该病毒不仅损伤鱼的皮肤, 致使病鱼外观异样而严重影响其商品价值, 而且对鱼的内脏和免疫器官也造成严重的致命损伤。[中国水产科学, 2006, 13(6): 973 - 979]

关键词:军曹鱼; 淋巴囊肿病; 组织病理学

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

文章编号: 1005 - 8737 - (2006) 06 - 0973 - 07

军曹鱼(*Rachycentron canadum*), 属于鲈形目(Perciformes)、军曹鱼科(Rachycentridae)、军曹鱼属(*Rachycentron Kaup*), 亦称海鲷, 俗称海戾鱼、海鲤等, 主要分布于大西洋、印度洋和太平洋(东太平洋除外)等热带亚热带水域, 中国沿海亦有分布。由于其富含蛋白质和不饱和脂肪酸, 肉质细嫩, 味道鲜美, 且生长速度较快, 因而近年来在部分沿海地区的养殖发展迅速。

淋巴囊肿病(Lymphocystis disease)是最早发现的鱼类病毒病^[1], 尤其在海水鱼中常见。近几年, 中国养殖的真鲷(*Pagrosomus major*)、石斑鱼(*Epinephelus moara*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)等名贵鱼种已报道发生淋巴囊肿病^[2-6]。但主要集中于对病毒形态等方面的研究, 对各器官病理变化的研究尚为鲜见。2005年8月, 广东省海水网箱养殖的军曹鱼暴发类似的淋巴囊肿病, 个别网箱的感染率在80%以上, 死亡率近30%, 患病鱼价值大幅下跌, 造成了较大的经济损失。本研究从病理学角度, 对发病鱼的皮肤肿块、鳃、肝脏、肠道、心脏和脑等组织进行病理组织、细胞超微病变和病毒形态观察, 对其进行系统研究, 旨在

军曹鱼淋巴囊肿病的临床诊断、病理学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

患病军曹鱼于2005年10月取自广东省湛江海水网箱养殖场, 病鱼2~2.5月龄, 全长18~23 cm, 体质量100 g左右。

1.2 方法

1.2.1 显微病理材料制备 将发病军曹鱼皮肤和鳍肿块、鳃、肝脏、肠道、心脏、肾脏和脑等组织, 用bouin's液固定24 h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。RM-2145型Leica轮转式切片机连续切片, 厚度为3~5 μm , HE常规染色法和PAS染色, 显微镜观察。

1.2.2 电镜材料制备 取发病军曹鱼皮肤肿块、肝脏、脾脏、心脏和脑等组织固定于2.5%戊二醛, 1%锇酸后固定, 系列乙醇脱水, Epon812树脂包埋后, 进行常规超薄切片, 醋酸铀柠檬酸铅双染色, JE1200EX透射电镜观察亚显微病理变化及病毒粒子。

收稿日期: 2006-01-18; 修订日期: 2006-04-25。

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2005AA603620)。

作者简介: 常藕琴, 女(1973-), 助理研究员, 硕士, 研究方向: 动物病理学。

通讯作者: 吴淑勤, Tel: 020-81616813; E-mail: wushuqin001@21cn.com

2 结果

2.1 临床病变

从2005年8月起,广东省湛江市海水网箱养殖场的军曹鱼相继发病。患病军曹鱼呈现群发状,游动基本正常,摄食减少,头、鳍、鳃盖和躯干部皮肤、口、眼及鳃上有单个或成群的珠状囊肿物,或这些珠

状囊肿聚集成团块,呈乳头状或疣状肿物,小如珍珠,大如菜花状,颜色为乳白色或淡灰色,有的肿物呈红色,可看到增生的血管(图1-A、C)。

剖检严重病例发现,在腹腔被膜、心脏、肝脏表面或被膜有小珠状肿物;鳃暗红色,轻微肿胀,部分有小的珠状肿物;肝脏呈白色,局部淤血;脾脏、肾脏肿大;其他部位无明显眼观病变。

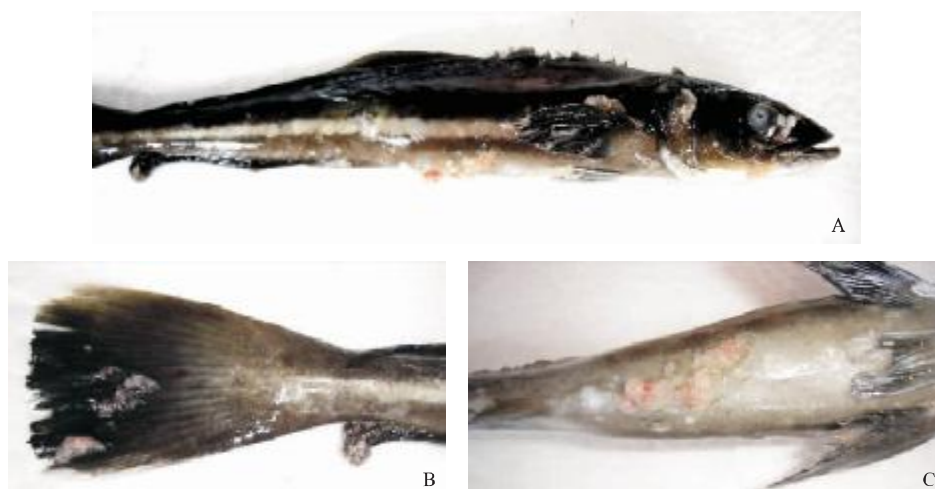


图1 军曹鱼淋巴囊肿病外观

A: 鳃盖、胸鳍、背鳍和眼周边的块状乳白色肿物; B: 尾鳍和臀鳍的珠状和团块状肿物; C: 腹部皮肤红色肿物。

Fig. 1 Symptom of lymphocystis disease on *Rachycentron canadum*

A: White phyma on operculum, pectoral fin, peripheral of eye. B: Pearl-like and lump-like phyma on tail fin and anal fin. C: Red phyma on derma of abdomen.

2.2 显微病理变化

病鱼皮肤、鳍、肝脏、脾脏、心脏、食道壁都有大小不一、圆形或不规则状、细胞质和细胞核明显增大的囊肿细胞出现,其中皮肤囊肿最严重。病变明显的是皮肤和鳍的乳头状肿物;其次为肝脏、肾脏、脾脏、脑、鳃和心脏,都有明显的损伤。

2.2.1 鳍和躯干部皮肤 有些病例表皮基本正常,表皮层的细胞排列整齐,但基底细胞下层的真皮层中有大量囊肿细胞聚集而形成的囊肿细胞集合体,成熟程度相近的囊肿细胞聚集成一个集合体(图版 I-1);有些病例在表皮层有囊肿细胞集合体(图版 I-2),表皮层与真皮层分界不明显,严重者,表皮的最外层细胞肿大,有细胞囊肿化的趋势(图版 I-3);严重病例表皮层细胞变性、坏死脱落,局部有炎性细胞浸润,其下层是囊肿细胞集合体。有些囊肿细胞排列紧密,大小不一;有些囊肿细胞之间有结缔组织、纤维细胞和大量血管增生(图版 I-4)。

病变组织中囊肿细胞处于各种发展阶段,由皮肤的浅层向深层逐步延续,浅层个体较小,深层个体逐渐增大,大的直径为 $100 \sim 150 \mu\text{m}$,小的直径为 $10 \mu\text{m}$,由于细胞聚集而相互挤压,细胞形状各异,呈圆形、三棱形或不规则形。

在逐步增大的过程中,囊肿细胞的胞质和胞核都在发生显著的变化。小的囊肿细胞个体较小,细胞核增大,位于细胞中央,核仁不明显;细胞质变化不明显。随着细胞不断增大,细胞核开始有空泡出现,核仁逐步明显;细胞质中开始有索状的包涵体出现;细胞最外层的囊膜逐步明显(图版 I-5)。

大的成熟囊肿细胞分为3层,细胞最外层是嗜碱性囊膜层,呈透明状,PAS染色呈阳性(图版 I-6);中间层是细胞质,嗜酸性,细胞质的周边散布有大量的索状、网状或不规则状的嗜碱性包涵体,中间是嗜酸性的胞质,染色均质,其间有许多空泡形成;细胞核位于中心或偏离中央,染色质呈浓缩团块状,分布于

核周边,有些细胞核中间有许多空泡,核仁粗大,位于细胞核的中央位置(图版 I -4)。

2.2.2 心脏 病鱼的心肌细胞水泡变性,心肌纤维水肿,排列紊乱,部分心肌窦皮细胞肿胀。局部有炎性细胞浸润在变性心肌纤维之间,呈局灶性心肌炎。严重病例在心室、心房肌中有囊肿细胞出现(图版 I -7)。

2.2.3 肾脏 肾小管上皮细胞水泡变性,严重者上皮细胞胞膜破裂,内容物流出,上皮细胞排列紊乱,更严重者,上皮细胞变性坏死,只留下肾小管轮廓;肾间质淋巴细胞和巨噬细胞增多,病变严重处,形成巨噬细胞吞噬中心(图版 I -8、9)。

2.2.4 脾脏 脾脏淋巴细胞和巨噬细胞增多,严重者有大量的黑色巨噬中心形成,可能是巨噬细胞吞噬变性坏死的细胞形成;脾髓质出血。严重病例,脾脏有坏死灶形成。有些病例脾脏中有囊肿细胞出现(图版 I -10)。

2.2.5 脑 脑皮质微血管周围间隙增宽,胶质细胞围在血管周围,形成血管套;小胶质细胞增生,包围及吞噬变性坏死的神经细胞,形成吞噬现象;脑髓质的神经纤维水肿,严重者神经纤维束之间有大量的空泡形成,呈海绵状。

2.2.6 鳃 鳃小片上皮细胞肿胀、变性、增生、脱落,严重者,鳃小片发生粘连,有的病例在鳃丝之间有脱落的囊肿细胞出现(图版 I -11、12)。

2.2.7 肝脏 大部分病例肝细胞明显的脂肪变性,肝细胞中有明显的边缘光滑的大脂滴,把细胞核挤到一边,严重者,脂滴聚集、扩张或融合,脂肪变性细胞周围有散在的水泡变性细胞,严重者肝细胞呈散在坏死;局部肝窦和中央静脉淤血,在肝细胞索和血管周围有淋巴细胞浸润(图版 I -13);有的病灶肝窦扩张和血管增生,中央静脉周围有吞噬细胞,吞噬变性坏死的细胞。严重病例,在肝细胞中有囊肿细胞(图版 I -14)。

2.2.8 肠道 肠上皮细胞出现坏死、脱落,固有层有大量炎性细胞浸润,坏死的细胞微绒毛长短、形态和方向不规则。

2.2.9 头肾 严重病例头肾中也有囊肿细胞出现(图版 I -15)。

2.3 超微病理变化

电子显微镜下观察,皮肤囊肿细胞观察到大量六角形二十面体病毒粒子,其他器官未见病毒粒子。

2.3.1 皮肤囊肿细胞 囊肿细胞浆内可见大量的

包涵体和病毒颗粒,包涵体呈不规则状,由许多形状、大小不同的网眼组成,网眼中含有数量不等的病毒颗粒或一些中等电子致密的颗粒(图版 II -1、3),这些致密颗粒可能是还未成熟或未装备的前期病毒。病毒颗粒大多分布在包涵体外,病毒粒子呈六角形,二十面对称,有包膜,完整病毒粒子直径约为 220 nm,大量毒粒堆积排列(图版 II -2)。大多数病毒粒子核髓和衣壳清晰,结构比较完整;有些病毒粒子只有衣壳,核髓中空;少量病毒粒子正在装配;有极少数病毒只有不完整的衣壳(图版 II -3)。

2.3.2 其他器官 电镜观察到心肌纤维病变较为严重,肌纤维呈空泡状,排列紊乱,线粒体肿胀破裂。肝细胞中有大量的边缘光滑的大脂肪滴,细胞核被挤压到一侧。脾脏中淋巴细胞和巨噬细胞较多。

3 讨论

鱼类淋巴囊肿病是由虹彩病毒科(Iridoviridae)淋巴囊肿病毒(Lymphocystis virus)引起^[8],这种病毒是一种典型的皮肤和浅表性的病毒^[9],主要症状为病鱼头、躯干、尾、鳍等处表皮上有散在的单个或成群的珠状肿物,大多数发生在血管周围,严重病例在肌肉、腹膜、心包、咽、肠壁、卵巢、脾和肝等的膜上也出现囊肿^[12]。

此次在湛江发生的患病军曹鱼,经临床观察、病理解剖、显微镜观察研究,患病鱼外部特征头、鳍、鳃盖和躯干部皮肤、口、眼及鳃上有单个或成群的珠状囊肿物,严重病例在腹腔被膜、心脏、肝脏表面或被膜有小珠状肿物,与文献报道的病症相近^[8-9,12]。头、鳍、鳃盖和躯干部皮肤囊肿物的病理组织学观察发现囊肿细胞有厚的透明膜,PAS 染色呈阳性反应,胞质中有索状、网状或不规则状的嗜碱性包涵体,细胞核较大,其内呈空泡状,染色体分布在核膜周边,与张永嘉^[2,7]、Ken Wolf^[9]、Le Deuff^[10]、Roberts^[11]和黄琪琰^[12]等的报道一致。电镜观察囊肿细胞质中有大量呈六角形,二十面体对称,有包膜,大量堆积的病毒粒子,主要在细胞浆内装配,与资料报道淋巴囊肿病毒粒子形态特征一致^[6,8,13],同时囊肿细胞中有大量包涵体,在包涵体中有病毒粒子或高密度的尚未成熟的病毒,诊断该病是淋巴囊肿病(Lymphocystis disease 简称 LD)。

Gibson-Kueh S^[14]报道在心脏、肝脏和脑中发现囊肿细胞。本研究也发现囊肿细胞出现在心脏、肝脏、脾脏、头肾、咽,说明该病毒不仅损伤皮肤,造成

病鱼外观异样而严重影响其商品价值,经济损失巨大,而且对内脏和免疫器官也造成严重损伤。可能是因为病毒主要存在于囊肿细胞,而由于电镜切片面窄,没有切到囊肿细胞。这些组织中在电镜下没有观察到病毒粒子。

淋巴囊肿病毒同时引起鳃、心脏、肾脏、脾脏、肝脏、肠道和脑等器官病变而致内脏器官功能衰竭,是造成死亡的主要原因。鳃上皮细胞肿胀、增生、黏连,造成排泄和呼吸障碍,加速对其他器官的损伤。肠道损伤使消化和吸收受到影响,引起机体的营养不良,身体消瘦,最终致使机体代谢障碍。心肌纤维水泡变性,断裂,电镜下大量线粒体肿胀、破裂,心肌收缩力减弱,引起心脏功能衰竭;肾小管上皮细胞水泡变性,坏死,使排泄受阻,造成肾功能衰竭;心脏和肾脏功能衰竭,是造成患鱼死亡的主要原因。肝脏主要病变为肝细胞大面积的脂肪变性和散在的水泡变性,由于肝脏大面积的脂肪变性,最终使肝代谢受到阻碍,引起肝功能障碍,是病鱼死亡的又一个因素。同时对免疫器官脾脏、头肾和肾间质造成损伤和巨噬中心的形成,严重病例引起脾脏和肾脏的坏死,使免疫功能降低。

一般认为,病毒感染引起肝脏水泡变性,而脂肪变性与细菌毒素、化学物中毒和饥饿等因素有关^[15]。本研究发现肝脏病变主要为脂肪变性和散在的水泡变性,电镜下看到大量的脂肪滴,与张永嘉^[2]报道肝细胞线粒体肿胀和嵴的损坏不一致,可能与发病鱼采食受到影响,而引起饥饿等因素有关,是否感染淋巴囊肿病毒直接造成肝脏脂肪变性有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 张永嘉,郭青,吴泽阳.云纹石斑鱼淋巴囊肿病变过程的超微研究[J].海洋与湖沼,1997,28(4):406-410.
- [3] 徐洪涛,朴春爱,姜忠良,等.养殖牙鲆淋巴囊肿病原的研究[J].病毒学报,2000,16(3):223-226.
- [4] 宋晓玲,黄捷,杨冰,等.牙鲆淋巴囊肿病的病理和病原分离[J].中国水产科学,2003,10(2):117-120.
- [5] 曲凌云,张进兴,孙修勤.养殖牙鲆淋巴囊肿病流行状况与组织病理学研究[J].黄渤海海洋,1999,17(2):43-46.
- [6] 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.
- [7] 张永嘉,吴泽阳.海水鱼淋巴囊肿病的初步研究[J].鱼类病理研究,1992,14(4):7-8.
- [8] Wolf K, Gravel M, Malsberger R G. Lymphocystis virus, Isolation and Propagation in Centrarchid Fish Cell Lines[J]. Science, 1966,151:1 004-1 005.
- [9] Ken Wolf. Fish viruses and fish viral diseases[M]. New York: Cornell University Press. 1988.
- [10] Le Deuff R M, Renault T. Lymphocystis outbreaks in farmed sea bream, *Sparus aurata*, first report on french mediterranean coast [J]. Fish Pathol, 1993, 13(4):130-133.
- [11] Roberts R J. Fish Pathology[M]. Aberdeen: Great Britain at the University Press. 1978.
- [12] 黄琪琰.水产动物疾病学[M].上海:上海科学技术出版社,1993.
- [13] Murphy F A, Fanquet C M, Bishop D H L, et al. Virustaxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [C]. Arch Virol, 1995, Suppl(10):208-239.
- [14] Gibson-Kueh S, Netto P, Ngoh-Lim G H, et al. The Pathology of Systemic Iridoviral Disease in Fish[J]. J Comp Path, 2003, 129: 111-119.
- [15] 武忠弼.病理学(第四版)[M].北京:人民卫生出版社,1995.
- [16] 郑凤荣,孙修勤,刘洪展,等.牙鲆淋巴囊肿病毒核酸疫苗的安全性研究[J].高技术通讯,2006,16(1):106-110.

Histopathological study on lymphocystis disease of *Rachycentron canadum*

CHANG Ou-qin, SHI Cun-bin, MA Hong, PAN Hou-jun, YU De-guang, WU Shu-qin

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technique, Guangzhou 510380, China)

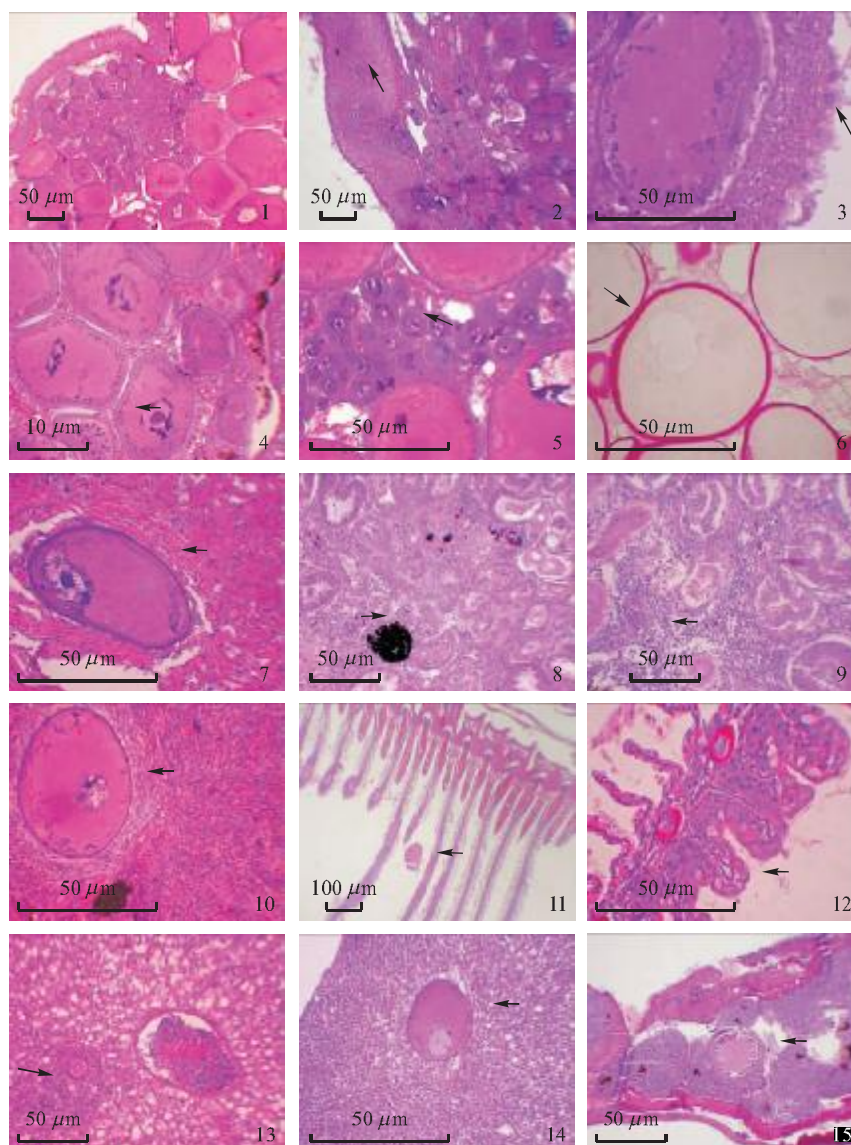
Abstract: The cage-culture of cobia, *Rachycentron canadum*, was developed rapidly in southern China in recent years. In 2005, a similar lymphocystis disease of cage-cultured cobia broke out in Guangdong Province, China, and papilloma-like tissues appeared in the body and fin of diseased fish. In order to diagnose the disease of *Rachycentron canadum* suspected of lymphocystis disease, the histopathologic changes in the fish and the morphology of the virus particles were observed under optic and electronic microscope. The results showed that the papilloma tissues in the derm of the *Rachycentron canadum* were actually constituted by many lymphocystis cells which aggregated tightly. The size of the lymphocystis cells varied and ranged from 10 to 150 μm in diameter. Infected cells were round, cone-shaped or anomalous. A thick enveloped membrane layed in outside of lymphocystis cell. A lot of basophilic inclusion bodies existed in the lymphocystis cell and most of them were located on the edge of the cytoplasm. Under electronic microscope, there were a lot of particles icosahedron-shaped in the cytoplasm of infected cells and the size of the viruses was approximately 220 nm in diameter. In addition, swollen lymphocystis cells were observed in heart, liver, spleen and head kidney under optic microscope. According to the results above, the disease was diagnosed as lymphocystis disease. The main histopathologic changes of the other organs under optic microscope show that the damage to heart presents as cardiac cell vacuolar degeneration and swelling of cardiac muscle fiber; lymphocytosis and melanin-macrophage centers present in interrenal tissue and spleen; denaturalization and necrosis emerge in renal tubule epithelial cell; livers shows fatty degeneration of hepatocyte; and the gill lamellar epithelial cells are swollen. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 973–979]

Key words: *Rachycentron canadum*; lymphocystis disease; histopathology

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com

常藕琴等:军曹鱼淋巴囊肿的病理学研究

CHANG Ou-qin et al: Histopathological study on lymphocystis disease of *Rachycentron canadum*



图版 I 淋巴囊肿的组织病理切片

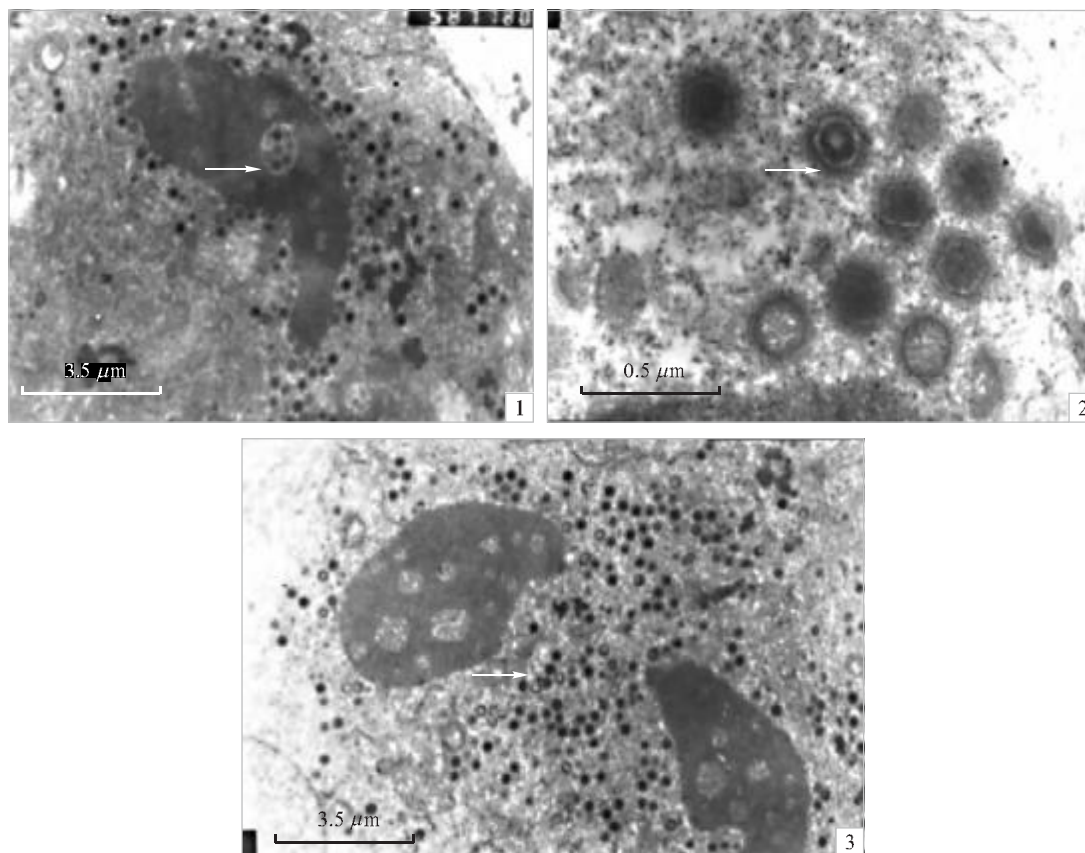
1:真皮层中形成囊肿细胞的集合体(*),HE;2:表皮层囊肿细胞集合体(→),HE;3:表皮最外层囊肿细胞(→),HE;4:囊肿细胞间有结缔组织、纤维细胞和大量血管(*)增生和大囊肿细胞的包涵体(→),HE;5:小囊肿细胞(→),HE;6:囊膜(→)PAS染色呈阳性,HE;7:心肌细胞肿胀和心肌中的囊肿细胞(→),HE;8:肾间质中的巨噬中心(→)和坏死灶,HE;9:肾间质淋巴细胞增生(→),HE;10:脾脏中的囊肿细胞(→)和巨噬中心,HE;11:鳃丝间的囊肿细胞(→),HE;12:鳃丝上皮肿胀(→),HE;13:肝细胞脂肪变性和淋巴细胞浸润(→),HE;14:肝脏中的囊肿细胞(→),HE;15:头肾中的囊肿细胞(→),HE.

Plate I Histopathological sections of lymphocystis disease

1:Lymphocyst aggregation(*) in derma. 2:Lymphocyst(arrow) aggregation in epidermis. 3:Lymphocyst(arrow) in extreme layer of epidermis. 4:Hyperplasia of connective tissue, fibrocyte, blood vessel(*) between lymphocyst and inclusion bodies(arrow). 5:Small lymphocyst(arrow). 6:Positive on PAS of cyst membrane(arrow). 7:Tumefaction of cardiac muscle cell, lymphocyst(arrow) in cardiac muscle cell. 8:Melanin-macrophage centers(arrow) in interrenal tissue, necrosis focus. 9:Lymphocytosis(arrow) of interrenal tissue. 10: Melanin-macrophage centers and lymphocyst(arrow) in spleen. 11:Lymphocyst(arrow) between gill filamen. 12:Gill lamellar epithelial cell swelling(arrow). 13:fatty degeneration of hepatocyte and Lymphocyte infiltration(arrow). 14:Lymphocyst(arrow) in liver. 15:Lymphocyst(arrow) in head kidney.

常藕琴等:军曹鱼淋巴囊肿的病理学研究

CHANG Ou-qin et al: Histopathological study on lymphocystis disease of *Rachycentron canadum*



图版 II 淋巴囊肿的电镜切片

1:包涵体及其中的病毒粒子(→);2:囊肿细胞中病毒粒子形态(→),病毒囊膜厚而清晰;3:包涵体及周围的病毒粒子(→).

Plate II Electronic microscope sections of lymphocystis disease

1:Inclusion bodies and virion in inclusion bodies(→). 2:Virion form in lymphocyst(→), its envelope is thick and clear. 3:Inclusion bodies and virion around inclusion bodies(→).