

171-177

21237(23)

第12卷第2期
1997年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 12 No. 2
Jun. 1997

两种病毒侵染中国对虾后细胞超微病理学变化与免疫标记

黄灿华 石正丽 张立人

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

王斌 李华

(大连水产学院养殖系, 大连 116024)

S945.29

A 提要 应用电子显微技术研究人工感染的中国对虾病毒病原及其宿主细胞超微病理学变化。结果显示病虾体内存在球状与杆状两种病毒病原, 有时在同一病虾组织的同一细胞中可见两种病毒同时侵染现象, 该现象提示存在复合感染的可能。利用胶体金免疫标记技术对感染病虾细胞质中出现的球状病毒作定位标记, 初步结果表明已分离提纯的球状病毒与感染病虾细胞质中观察到的病毒粒子性质基本相同。病毒侵染后, 细胞内主要的细胞器如线粒体、内质网、核糖体均发生了显著变化; 侵染后期, 可见溶酶体及多种膜性结构大量增生、细胞核被一些微管样结构包裹等特殊变化的发生。

关键词 中国对虾, 病毒病原, 感染试验, 细胞病变, 免疫标记

中国对虾(*Penaeus chinensis*)肉质鲜美, 营养丰富, 是一种高级食品。我国沿海一带人工养殖对虾经济效益十分显著, 同时为国家创收大量外汇。近几年来由于海洋生态环境不断恶化等原因, 对虾病毒病暴发性大流行时有发生, 给国家和广大虾农造成了巨大的经济损失。

1989年张立人等发现人工养殖的中国对虾仔虾和成虾有病毒病原的隐性感染现象^[1], 在国内首先开展了对虾病毒病害及防治的研究工作。1993~1994年是我国养虾业损失最为惨重的两年, 许多学者报道在发病的中国对虾体内观察到球状病毒、肝胰腺细小病毒、无包涵体杆状病毒等病毒病原^[2-4], 病毒的提纯和理化性质也有报道^[5,6], 但病毒的分类地位的确立, 在许多方面还有待完善。本研究应用电子显微技术、胶体金免疫标记技术, 对人工感染病虾体内出现的球状病毒作了定位标记, 并观察与分析了两种病毒侵染中国对虾后宿主细胞器的超微病理学变化, 现将有关结果报告如下:

材料和方法

1 材料

- 1.1 感染用病虾材料 采自辽宁大连人工对虾养殖场典型发病的中国对虾, 置冰箱冷冻保存。
- 1.2 正常对虾 采自大连旅顺市封闭养虾场生命活力强的中国对虾。
- 1.3 球状病毒抗血清(一抗) 本室提供, 从河北乐亭分离的球状病毒免疫家兔制备而成。
- 1.4 羊抗兔胶体金(IgG)(二抗) 10 nm, 北京大学丁明孝教授惠赠。

• 收稿日期: 1996-08-19, 修回日期: 1996-10-11

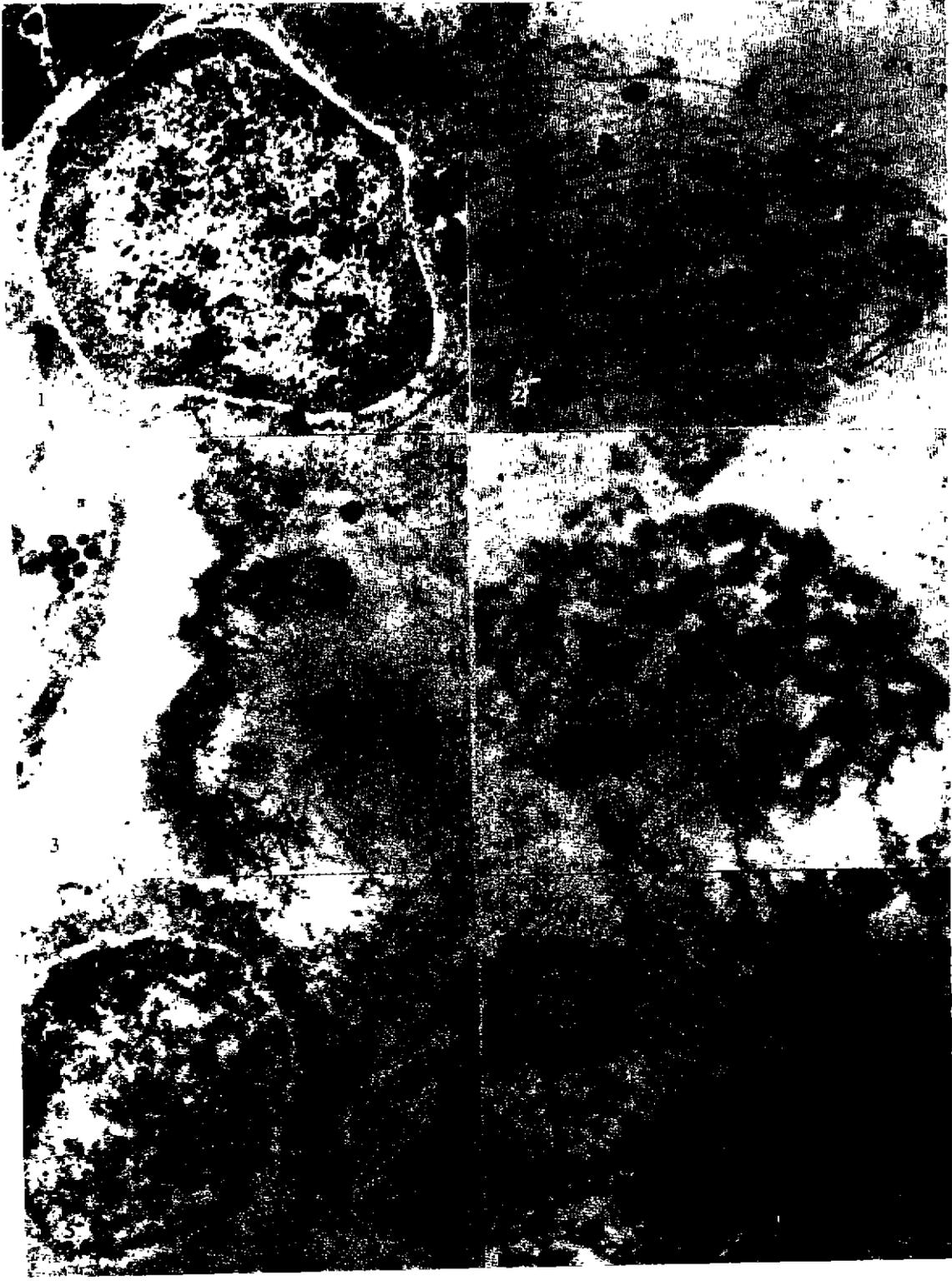




图1 病虾中肠细胞核内充满密集的杆状病毒粒子($\times 9000$)

图2 病虾中肠上皮细胞质中大量散在的球状病毒($\times 49000$)

图3 球状与杆状病毒侵染同一中肠上皮细胞($\times 52000$)

图4 球状病毒散在的区域附着密集的胶体金颗粒($\times 49800$)

图5 对照组 I 有少量标记的金颗粒($\times 48000$)

图6 对照组 II 基本没有胶体金颗粒附着($\times 24000$)

图7 正常对虾中肠上皮细胞的一般结构($\times 12000$)

图8 病虾细胞中大量坏死的线粒体($\times 22500$)

图9 指纹样排列的内质网(RER)($\times 12000$)

图10 侵染后期,溶酶体数目明显增加($\times 12000$)

图11,12 大量增生的膜性结构($\times 16000$, $\times 12000$)

图13 细胞核被微管样结构分割成块($\times 16000$)

Fig. 1. Baculovirus densely crammed in the nucleus of midgut epidermal cell of diseased shrimps(9000 \times)

Fig. 2. Large amount of spherical viruses scattered in the cytoplasm of midgut epidermal cell of diseased shrimps(49000 \times)

Fig. 3. The same epidermal cell infected by spherical & bacular viruses (52000 \times)

Fig. 4. Immunogold colloid densely labelled in spherical viruses scattering area(49800 \times)

Fig. 5. A small amount of immunogold colloid existed in control (I) (48000 \times)

Fig. 6. No immunogold colloid existed in control (II) (24000 \times)

Fig. 7. The ordinary structure of midgut epidermal cell of normal shrimp (12000 \times)

Fig. 8. Many denatured and uecrosis mitochondrias in the cell of diseased shrimp (25000 \times)

Fig. 9. Finger print typed RER(12000 \times)

Fig. 10. The number of lysosomes apparently increased in late infection(12000 \times)

Fig. 11,12. Various membrane structure proliferated(16000 \times , 12000 \times)

Fig. 13. Some uclei were wrapped up by microtubule structures(16000 \times)

电镜下,观察病虾组织的超薄切片,可见胃、中肠上皮细胞核内充满大量的杆状病毒粒子,病毒粒子具囊膜,大小约 $80 \times 110 \sim 280 \times 300$ nm。有时可见同一套膜内包裹两个病毒核衣壳(图1)。另外,在病虾肝胰腺、中肠等组织上皮细胞的细胞质纤维样结构区域,可见大量散在的球状病毒颗粒,病毒粒子的直径约 $35 \sim 40$ nm(图2)。有时在同一病虾组织的同一细胞结构中可见到两种病毒病原侵染的情况(图3)。

3 胶体金免疫标记

在电镜下可看到病虾组织的细胞质中,球状病毒散在的区域密集地附着胶体金颗粒(图4)。对照组 I 细胞质中有少量标记的胶体金颗粒(图5)。对照组 II 基本上不被胶体金标记(图6)。

4 病变细胞的超微结构

正常对虾中肠上皮细胞结构完整,胞内主要细胞器如线粒体、内质网未发现明显的病变,溶酶体、板层体均正常。细胞核双层核膜结构完整,核质细密、核仁清晰。然而病毒侵染后,宿主中肠上皮细胞发生了显著的病变:线粒体大量坏死,嵴断裂、脱落,内外膜破裂或彼此分离(图8)。粗面内质网增生,呈指纹样结构(图9)。特别值得一提的是,在病毒侵染晚期,细胞内溶酶体数目明显增多,大量吞噬丧失功能的细胞器,有时成为单层膜所包围的吞噬膜状结构的吞噬小泡^[7]。图10清晰地显示了不同形成状态的溶酶体。伴随溶酶体的自体吞噬作用,细胞内发现多种膜性结构,有的膜性结构呈植物细胞中“叶绿体片层”样排列,外面有单层膜包裹;

也有的呈“板层样或指纹样”排列(图 11, 12)。病变细胞的细胞核出现一种有趣的现象, 它被微管样结构分割成块, 或呈囊状包裹(图 13)。

讨 论

1 张立人^[8]、陈棣华^[2]等报道过不同地区病虾体内存在杆状与球状两种病毒病原, 本实验发现这两类病毒不仅在同一病虾组织, 甚至在同一细胞中反复出现, 它们之间是否存在一种彼此增效或相互制约的复合感染呢? Krol 曾在万氏对虾体内发现 BP 与 REO 之间存在复合感染现象^[9], 我们认为对中国对虾体内出现的这两类病毒之间的相互关系很有必要作进一步的研究, 以便对其致病机理有更深入的了解。

2 胶体金免疫标记技术将免疫学标记与电镜观察融合起来, 能在超微水平上准确显示抗原所在的位置^[10]。我们利用这项技术标记感染细胞质中出现的球状病毒, 初步结果表明它与分离到的球状病毒性质基本一致。实验组在球状病毒密集的区域有些散在的金颗粒, 是否因为这里存在尚未参与装配的病毒抗原需进一步加以证实。对照组 I 中少量标记的金颗粒, 可能是由于制备一抗的病毒悬液中混有少量组织抗原引起的非特异性吸附, 对照组 II 基本上没有胶体金颗粒附着, 说明标记的本底符合要求。尽管我们获得的只是初步的标记结果, 但这是一个颇有意义的尝试, 它将为某些存在争议的对虾病原提供科学的证据。

3 线粒体是细胞内能量供给的主要场所, 而粗面内质网和核糖体则直接参与病毒蛋白的合成, 它们是细胞内非常敏感的细胞器, 病毒侵染后往往发生显著的病理变化^[11, 12]。侵染初期线粒体数目增多, 粗面内质网呈同心圆状排列, 这与病毒在细胞内增殖需大量能量及病毒蛋白的高效率合成是相适应的。病毒侵染晚期线粒体大量坏死、空泡化, 表明线粒体能量代谢功能逐渐衰退与丧失, 细胞自身处于瘫痪与崩溃状态。大量退化、坏死的细胞器与溶酶体结合在细胞内进行自体吞噬。残存的膜性结构可能是由于溶酶体消化不全所致^[13, 14]。病变细胞核出现被微管样结构包裹的现象, 这究竟是由于病毒侵染还是其它原因引起的仍需进一步加以研究。

参 考 文 献

- 1 张立人, 张建红, 陈棣华等. 中国对虾病毒病原在体内发生的电镜观察. 电子显微学报, 1991, (4): 351
- 2 陈棣华, 张建红, 高学兴等. 中国对虾一种球状病毒的分离提纯与检测. 中国病毒学, 1994, 9(2): 170
- 3 Lightener D V, Redman R M. A pavo-like disease of penaeid shrimp. J Invertebr Pathol, 1985, 45: 47~53
- 4 张建红, 陈棣华, 高学兴等. 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生. 中国病毒学, 1994, 9(4): 362
- 5 肖连春, 石正丽, 高玮等. 中国对虾一种球状病毒的分离提纯及核酸蛋白特性的研究. 中国病毒学, 1995, 10(4): 356
- 6 黄健, 于佳, 宋晓玲等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学的研究. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 11
- 7 张立人主编. 中国昆虫病毒电子显微镜图谱. 北京: 科学出版社, 1988
- 8 张立人, 张建红, 陈棣华等. 东方对虾杆状病毒在宿主细胞内的装配. 电子显微学报, 1994, (5): 354
- 9 Krol R M. Reo-like virus in white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) co-occurrence with baculovirus penaei in experiment infection. Dis Aquat Org 1990, (8): 45~49
- 10 Faulk W P, Taylor G M. An immunocolloid method for electron microscope. Immunocytochemistry, 1971, 8: 1081

- 11 Tanada Y, Hess R T. 1984, The cytopathology of baculovirus infections in insects. In: R C King *et al* eds, *Insects Ultrastructure*. New York: Vol 2, Blenum, 517~556
- 12 Zhang Liren. 1985. In: *Recent Development of Electron Microscopy*, Edited by Komiyama Painting C L.
- 13 Han S S, Holmstedt J O V. *Cell Biology*. New York: Mc. Graw Hill Book Co. 1979. 12~16
- 14 钟慈声主编 细胞和组织的超微结构. 北京:人民卫生出版社, 1984, 21~24

Cytopathic Changes of *Penaeus chinensis* Infected by Two Kinds of Viruses and Immunogold Labelling

Huang Canhua Shi Zhengli Zhang Liren

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Wang Bing Li Hua

(Da Lian Fisheries Institution, Da Lian 116024)

With electron microscopy techniques the major virus pathogens of artificially infected *Penaeus chinensis* were studied. It showed that there are two kinds of virus pathogens in diseased shrimps: spherical virus and baculovirus. Sometimes they were co-existing in the same tissue or even in the same cell. It suggested that a mixed infection maybe occurred. Using immunogold labelling method to label the spherical viruses appearing in the cytoplasm of diseased shrimp, preliminary results showed that the purified spherical viruses were the same as those observed in the infected cells. During the infection, prominent changes took place in main cell organelles of the host cell, such as mitochondrias, endoplasmic reticulum, and ribosome. Especially in late infection, a lot of lysosomes and various multilayered membrane structures were found, some nuclei were wrapped up by some microtubule structures.

Key words *Penaeus chinensis*, Virus pathogen, Artificial infection test, Cytopathologic changes, Immunogold labelling