

# 应用光镜和电镜对病虾组织细胞病理变化的观察与分析\*

黄灿华 张建红 高玮 石正丽

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

S945.2

A

**摘要** 应用光镜和电子显微镜技术比较研究正常与发病的中国对虾 7 种组织细胞病理变化, 结果显示, 病毒侵染后, 对虾组织病理变化主要集中在消化系统的肝胰腺、中肠、胃等组织。在光镜下, 可见消化道内壁上皮组织广泛受损, 细胞大量坏死或空泡化; 电镜下可见主要的细胞器如线粒体嵴大量断裂、粗面内质网严重扩张、溶酶体增生, 病变细胞内出现大量变性的膜性结构等。观察结果为弄清对虾病毒引起的病症及致病机理打下基础。

**关键词** 中国对虾, 光学显微镜, 电子显微镜, 组织细胞病理变化

~~病毒学~~ 光镜, 电镜

近几年来, 对虾暴发性流行病病害严重困扰着我国沿海对虾养殖业的发展。早在 80 年代后期, 国内学者便开始了养殖对虾病毒病原的研究工作<sup>[1]</sup>, 现已弄清 1993~1994 年对虾暴发性流行病发生的主要病原因子是病毒<sup>[2~4]</sup>。国内外不少报道描述了病毒侵染后对虾出现甲壳白斑, 肝胰腺白浊、肿大, 体色发红等典型流行病学症状, 但这些引起的病症往往还与养殖对虾复杂的环境因素相关。要弄清对虾病毒引起的病症及其致病机理, 仍需从对虾内部组织、细胞的病理变化上加以分析。作者对患病毒性疾病的中国对虾组织细胞病理变化进行了大量的观察与研究, 现将有关结果报道如下:

## 材料与方 法

### 1 材 料

正常虾采自辽宁大连沿海人工养殖的中国对虾, 经当地对虾养殖人员确认为无病虾后, 带回实验室人工饲养 4~5 d, 用作对照及作人工感染试验之用。病虾部分采自河北乐亭人工养殖场自然发病的中国对虾, 另一部分是人工感染对虾无包涵体杆状病毒后典型发病的中国对虾。

### 2 方 法

**2.1 光镜组织切片的制备** 取典型病虾与正常虾的鳃、胃、中肠、肝胰腺、腹部肌肉、生殖腺、心脏等 7 种组织, 分别用鲍旺氏(Bouin's)固定液固定, 按常规方法切成 5~6 μm 厚的石蜡切片。经苏木精-伊红(H&E)染色, 在光镜下观察并拍照。

**2.2 电镜超薄切片的制备** 取典型病虾与健康虾上述相应的 7 种组织迅速切成 1 mm<sup>3</sup> 的小块, 立即投入 2.5% 戊二醛-3% 多聚甲醛溶液中预固定, 1~2 h 后取出用 pH 7.0, 0.1 mol/L 的 PBS 净洗组织, 然后用 1% 的 OsO<sub>4</sub> 溶液后固定 1 h, 系列梯度乙醇脱水, Epon 812 包埋, 60~65 °C 下聚合 2~3 d。包埋块在 LKB-2128

收稿日期: 1997-01-24, 修回日期: 1997-02-28

\* 国家“八五”攻关资助项目。

型超薄切片机上切制。常规醋酸铀、枸橼酸铅双染色,样品在日立H-7000FA型透射电镜下观察,并摄相与分析。

## 结 果

利用光镜与电镜对比观察典型病虾与正常虾的7种组织,结果显示病理变化主要集中在消化系统的肝胰腺、中肠、胃等组织中,其它组织未见显著病变。

### 1 光镜显微病理

**1.1 正常虾肝胰腺与中肠组织的形态结构** 肝胰腺是对虾最主要的消化器官,结构上主要分为肝总管与肝小管。肝小管是肝胰腺结构与功能的基本单位,管壁由单层柱状上皮细胞组成,在功能上分为吸收细胞与分泌细胞两大类,两种细胞均呈柱状,成熟的分泌细胞中央有一大液泡为鉴别特征,细胞核常受液泡挤压位置不定;吸收细胞的细胞核位于细胞中央,细胞质中存在许多储藏颗粒。正常对虾肝小管外壁由单层扁平细胞包围;各肝小管之间有结缔组织与脂肪组织包裹与分隔,并伴有血管分布<sup>[5]</sup>(图1)。中肠是对虾肠道中与消化、吸收密切相关的部位,中肠外壁无几丁质覆盖是其明显特征,中肠外壁由单层上皮组织包裹,外表皮之下是肌肉层分布。环肌层连续分布,纵肌层成束分散,排列于横肌远腔侧。中肠内壁为高柱状上皮组织,具纤毛刷状缘,肠内壁向肠腔突起许多皱褶构成肠嵴。肌肉层与肠内壁之间有大量结缔组织与脂肪组织填充<sup>[6]</sup>(图2)。

**1.2 肝胰腺的组织病理学变化** 病虾肝胰腺的病理变化最为明显,光镜下可见肝胰腺组织广泛受损,吸收与分泌细胞大量解体、空泡化。肝小管管腔扩大或破裂,肝小管之间结缔组织缺失、脂肪细胞大量溶解,血管破碎。上皮细胞核明显胀大、着色深,细胞质部分着色浅。组织切片中常可看到大量坏死的细胞核、残余的组织散落在肝小管间隙或管腔中(图3、4)。

**1.3 中肠组织病理变化** 中肠组织病变主要表现为肠内壁高型柱状上皮组织严重损伤和坏死,上皮细胞大量萎缩、脱落;高型柱状上皮组织与结缔组织相剥离,肠腔中常可见到崩落的上皮组织块、坏死的上皮细胞与食物残渣混杂。与正常虾中肠组织显微结构相比,病虾中肠外壁下结缔组织、脂肪组织排列散乱,组织间存在大量裂隙,细胞核不同程度胀大(图5)。

**1.4 胃组织病理学变化** 对虾胃组织除有几丁质外壁之外,其余组织结构与中肠组织相似。胃组织病变也主要表现为胃内壁上皮组织大量坏死、脱落,胃肌肉组织断裂成破网状,并与胃腔室剥离(图6)。

### 2 电镜观察的超微病理变化

**2.1 正常对虾细胞的超微结构** 电镜下,正常对虾中肠上皮细胞结构完整,胞内线粒体丰富。线粒体双层膜清晰,内膜向内折叠成嵴。中肠内壁高型柱状上皮细胞彼此间连接紧密,细胞端微绒毛排列有序(图7、8)。

**2.2 病虾细胞的超微病理** 电镜下病虾肝胰腺上皮细胞内细胞器病变明显。线粒体呈类空泡状,嵴大多断裂、脱落,核糖体外溢;粗面内质网(Rer)严重扩张,内质网膜上核糖体颗粒大量脱落;细胞内溶酶体、高尔基复合体显著增多<sup>[7]</sup>。细胞器的大量损伤、坏死使细胞质中呈现大片空洞(图9)。

病变的中肠组织肠内壁上皮细胞之间连接复合体受到严重破坏,细胞之间界限模糊不清,出现大量的裂隙和空泡。细胞端部微绒毛大多断裂,排列紊乱(图10)。



1. 正常中国对虾肝胰腺组织纵切。肝小管(H)结构完整,管壁由柱状上皮细胞(E)组成。
2. 正常虾中肠组织横切高柱状上皮组织(H)具刷状缘,结缔组织(C)分布于肠内壁上皮组织与肌肉组织之间。(LM)为纵肌,(I)为组织间隙。
3. 4. 病虾肝胰腺组织。肝小管(H),管壁上皮细胞(E)广泛受损,形成许多空洞。肝小管间隙(I)之间结缔组织缺失,脂肪细胞大量溶解。管腔(C),肝管间隙(I)中散在大量坏死的细胞核(N)和残余组织(T)。×250
5. 病虾中肠组织。肠腔(L)中散在大量坏死的细胞(C),脱落的高柱状上皮组织(H),(CM)为横肌。×225
6. 病虾胃组织。胃内壁上皮组织大片坏死,胃肌(M)与腔室剥离。(G)为几丁质外膜。×150
1. Longitudinal section of hepatopancreas tissue of normal shrimp (*Penaeus chinensis*), showing intact structure of hepatopancreatic tubules, they mainly consisted of columnar epithelium cells. ×250

2. Cross section of midgut tissue of normal shrimp, showing high columnar epithelium cells (H) with brush border. Connected tissues lied between inner surface of gut tract and muscle tissues. (LM); longitudinal muscles; (I) tissue gap.  $\times 225$
- 3, 4. Hepatopancreas tissue of diseased shrimp, showing disrupted and vacuolated hepatopancreatic tubules epithelium cells (H), incomplete connected tissues in the gap of the hepatopancreatic tubules (I). There scattered large amount of necrotic nuclei (N), remnant tissues (T) in the gap.  $\times 250$
5. Midgut tissue of diseased shrimp, showing necrotic cells, disrupted high columnar epithelium tissues (H), striated muscle (CM).  $\times 225$
6. Stomach tissue of diseased shrimp. The inner epithelium cell of stomach was greatly destroyed. Muscles (M) came off from stomach cavity. (G) chitin outer membrane.  $\times 150$

病虾胃内壁上皮组织中很少有完整的细胞结构。病变的细胞核中核质明显边集,核膜扩张,细胞质中细胞器大量坏死,线粒体嵴断裂,内部结构模糊不清(图11)。

此外病虾细胞中普遍存在大量髓鞘样变性或其它形式的膜性结构(图12)。

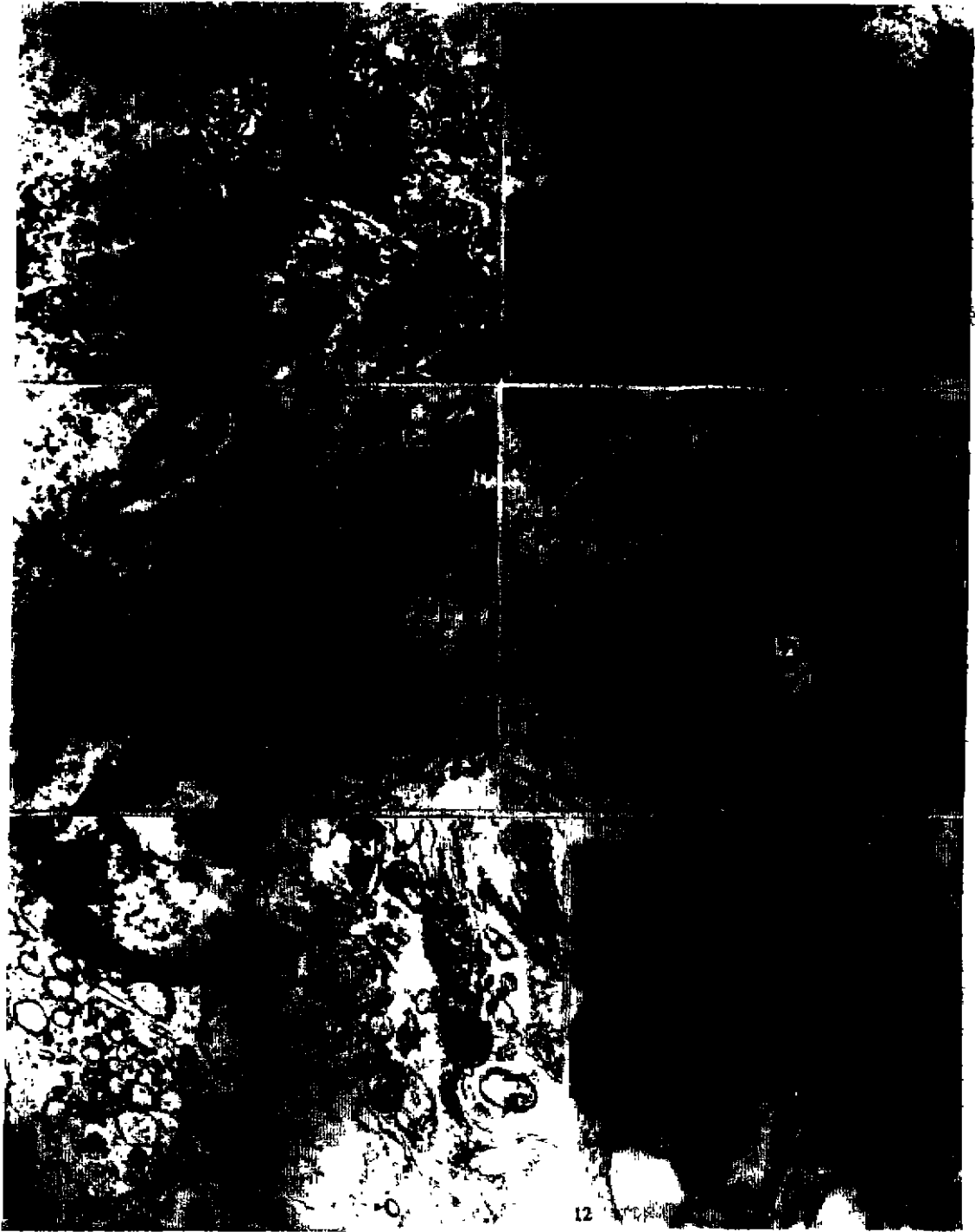
## 讨 论

1 当病毒侵染对虾消化道内壁上皮细胞后,病毒基因组首先占据宿主细胞核,逐步而快速地完成“主导者”,打乱宿主细胞的一切正常生命活动,并利用宿主细胞的酶及能量合成系统完成病毒自身的复制,其后果必然导致细胞瓦解性病变,同时宿主细胞生理功能发生障碍直接导致了组织坏死;另一方面细胞瓦解后胞内诸多消化酶随之释放,加速了周围细胞坏死性病变和组织自溶。我们解剖病虾时观察到肝胰腺白浊、糜烂,显微病理显示肝小管大量崩解、空泡化,可能由于肝胰腺组织中酶类特别丰富,这些酶类的释放加速了对周围的管壁上皮细胞乃至肝小管之间的结缔组织、脂肪组织坏死性病变。当然上述分析是否确切仍需通过酶学和细胞化学等手段进一步加以证实。

2 线粒体是细胞能量供给的场所,而内质网和核糖体直接参与细胞内蛋白质的合成。细胞内能量供给中断,蛋白质合成受阻,破坏了胞内细胞器之间及细胞器与整个细胞之间正常的协调。大量变性的膜性结构可能是溶酶体对丧失功能的细胞器的不完全消化产物。细胞是机体正常生命活动的基本单位,细胞之间密切协作才能保证机体生命活动有条不紊地进行。病毒侵染后宿主细胞正常生理功能的丧失必然导致组织器官的大片坏死。同时,据有关报道描述病毒侵染后病虾甲壳出现白斑,体色发红等典型流行病学特征<sup>[8]</sup>,这些体表症状的出现除病毒侵染直接造成病变的因素之外,还有可能是病毒侵染后,虾体受到其它病原因子的继发感染所致。因此只有将对虾体表病症与其组织、细胞的病理变化或其它手段结合起来,才能更加准确地为开展对虾病毒性疾病的预防与诊断提供科学的依据。

3 在无脊椎动物病毒中,特别是某些昆虫病毒所形成的包涵体在电镜下看到的是具备蛋白质结晶性质的有形实体,其中包被着装配成熟的病毒粒子<sup>[9]</sup>。然而我们在电镜下看到病虾细胞核内充满的是大量无包涵体杆状病毒粒子<sup>[10]</sup>,在病毒形态发生时,这个区域往往是病毒组份合成与装配最为活跃的场所,常被称为“病毒工厂的病毒装配车间”。在对虾显微病理中可看到病变细胞核明显胀大,经苏木精-伊红(H&E)染色后着色较深,这与超微病理学中的所谓“病毒包涵体”概念不能等同。

致谢 本研究承蒙张立人教授指导,特此致谢。



7. 正常对虾中肠上皮细胞一般结构;细胞核(N),双层核膜结构清晰,核内染色质随机分布。线粒体(Mi)双层膜,内膜向内

- 折叠成嵴,结构完整。×1200
8. 正常虾中肠内壁高型柱状上皮细胞。上皮细胞之间连接复合体(T<sub>j</sub>)。细胞端部微绒毛(V<sub>i</sub>)排列有序。×1250
9. 病虾肝胰腺上皮细胞。粗面内质网(Rer)扩张,线粒体嵴断裂、空泡化,溶酶体(Ly),高尔基复合体(Go)增多,细胞质中出现大片空洞(V)。×1200
10. 病虾中肠内壁高柱状上皮细胞。上皮细胞之间连接松散,出现大量裂隙(I),细胞端部微绒毛(V<sub>i</sub>)断裂,排列紊乱。×1250
11. 病虾胃内壁上皮细胞。细胞结构残缺,核膜(Nm)扩张,线粒体(Mi)嵴断裂,内部结构模糊不清。×1200
12. 病虾细胞内出现大量髓鞘样变性或其它形式的膜性结构。×1750
7. The ordinary structure of midgut epidermal cell of normal shrimp, showing distinct structure of double layer nuclear membrane, and random distribution of chromatin. Nucleus(N), Mitochondrias (Mi) kept intact structure, double layer membrane, its inner membrane folded as cristae. ×1200
8. High columnar epithelium cell of normal shrimp's midgut tract, showing junction complex of epithelial cells (T<sub>j</sub>), orderly arranged microvilli(V<sub>i</sub>). ×1250
9. Hepatopancreatic epithelial cells of diseased shrimp, showing expanded row endoplasmic reticulum (Rer). The number of lysosomes (Ly)and Golgi(Go)apparently increased. Many cavities(V)appeared in the cytoplasm. ×1200
- 10 High columnar epithelium cell of diseased shrimp's midgut tract, showing loose epithelial cell complex and many crevice(I); broken and disarranged microvilli(V<sub>i</sub>). ×1250
11. Inner tract epithelial cell of diseased shrimp's stomach, showing incomplete cell structure, expanded nuclear membrane, broken mitochondria cristae. ×1200
12. Many myloid bodies and some other membrane structures proliferated. ×1750

### 参 考 文 献

- 1 张立人,张建红,陈捷华等. 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, 10(4):351~352
- 2 张建红,陈捷华,肖莲春等. 中国对虾非包膜体杆状病毒在体内的感染与发生. 中国病毒学, 1994, 9(4):362~366
- 3 黄捷,宋晓玲,于佳等. 杆状病毒的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究, 1995, 16(1):1~10
- 4 彭宝珍,沈菊英,龚祖坝等. 急性致死性对虾病的杆状病毒病原的研究. 病毒学报, 1995, 11(2):151~157
- 5 陈宽智,鲍鹰,何伟宏. 东方对虾消化系统解剖和组织学的研究. 山东海洋学院学报, 1988, 18(1), 44~53
- 6 Dall. W. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *metapenseus bennettiae* (Crustacea, Decapoda, penaeidae). Australia J Zool, 1967, 15:699~714
- 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 刘瑞玉,曹登富,胡超群等. 对虾暴发性流行病及其防治的研究进展. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集, 1997. 183~186
- 9 杨复华编著. 病毒学. 长沙:湖南科学技术出版社, 1991. 361~362
- 10 黄灿华,石正丽,张立人. 两种病毒侵染中国对虾后宿主细胞超微病理学变化与免疫标记. 中国病毒学, 1996, 12(2):171~177

## Observation and Analysis of Histo- and Cyto-pathological Changes of Diseased Shrimp with Light and Electron Microscopy

Huang Canhua Zhang Jianhong · Gao Wei Shi Zhengli

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

With light and electron microscopy techniques, the pathological changes of seven tissues of *Penaeid chinensis* were studied. The major pathological changes mainly took place in the tissues of digestive system: hepatopancreas, midgut and stomach etc. Under light microscope, it was found that the epithelia of inner digestive tract were widely damaged, most epithelial cells were necrotic or vaculated. While under electron microscope, apparent pathological changes of main organelles could be observed in diseased shrimps. For example, most cristae of mitochondrias broken, rough endoplasmic reticulum greatly expanded, lysosomes and various multilayered membrane structures proliferated etc.

**Key words** *Penaeid chinensis*, Light microscope, Electron microscope, Histo- and cyto-pathological changes