

养殖海湾扇贝弧菌病的超微病理和组织化学观察

邓欢¹ 周遵春¹ 徐晓红¹ 刘畅²

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省应用海洋生物技术开放实验室, 大连 116023; 2. 中国医科大学 89 期七年制 6 班, 沈阳 110001)

ULTRAPATHOLOGY AND HISTOCHEMISTRY OBSERVATION ON VIBRIOSIS OF CULTURED BAY SCALLOP *ARGOPECTEN IRRADIANS*

DENG Huan¹, ZHOU Zun-Chun¹, XU Xiao-Hong¹ and LIU Chang²

(1. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Dalian 116023;

2. Class 6, Seven-year system 89k, China Medical University, Shenyang 110001)

关键词: 海湾扇贝; 弧菌病; 超微病理; 组织化学

Key words: *Argopecten irradians*; Vibriosis; Ultrathology; Histochemistry

中图分类号: S944.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)01-0152-05

海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 自 20 世纪 80 年代初引进我国后, 由于具有生长快、养殖周期短等优势, 很快成为我国北方地区重要的人工养殖的经济品种之一, 并在当地的水产业收入中占有举足轻重的地位。但短时间内无限制的过快发展, 集约化养殖密度的迅速加大, 养殖病害问题最终成为限制该产业发展的巨大障碍。因此, 研究和解决海湾扇贝养殖的病害问题已为国内外诸多学者所关注^[1-5]。有关应用组织病理学和组织化学研究手段探索水生生物病害的发病机理国内外已有大量报道^[6-14]。但通过超微病理和组织化学方法对养殖海湾扇贝弧菌病的不同组织器官进行系统研究方面的文献较欠缺。

本文是用引起养殖海湾扇贝群体发生流行病的哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)^[2] 感染健康的海湾扇贝, 观察受感染扇贝体内各器官组织的超微病理和组织化学变化, 同时与健康个体进行比较, 以期对养殖海湾扇贝弧菌病的诊断、发病机理和死亡过程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 健康海湾扇贝取自大连开发区大李家非发病区的一养殖场, 室内培养一周后备用。病原菌是 1996 年 9 月初发生于大连近海的海湾扇贝流行病的病原菌哈氏弧菌。

1.2 人工感染 将保存的哈氏弧菌经培养后制成菌悬液, 离心 (3000 r/min) 8 min 后弃上液、用无菌生理盐水将菌稀释到适当浓度 ($n = 10^7$ mL), 取经暂养的健康扇贝, 用制好的菌悬液进行闭壳肌注射 (0.1 mL/个体), 分别于注射后 12、24 h 取样解剖固定。

1.3 样品处理 注射后不同时间取样, 用于电镜观察的标本 (心脏、消化盲囊、鳃、肌肉) 固定于 2.5% 戊二醛, 后固定于 1% 锇酸溶液, Epon812 环氧树脂包埋, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色, JEM-200EX 透射电镜观察, 摄像; 用于光镜组织化学研究的标本 (心脏、肾、鳃、) 固定于 10% 中性福尔马林和 Carnoy 氏液, 石蜡切片厚度为 8 μ m。高碘酸-Schiff (PAS) 法测多糖。组织化学法主要按 Lillie^[15]。

2 结果

2.1 病贝症状

发病现场观察病变的扇贝主要外观特征是: 外套膜不同程度地收缩, 重者成片脱落; 鳃丝颜色逐渐加深最终呈橘红色糜烂状; 肠管空, 部分个体消化盲囊肿胀。回接实验病变个体表现出的症状与发病现场观察结果一致。

2.2 超微病理观察

研究中对健康海湾扇贝和患病海湾扇贝的心脏、鳃、消化盲囊、肌肉器官组织进行了对比观察。结果显示, 患病海

湾扇贝各组织均有不同程度的炎症反应和病变。健康贝心脏、鳃、消化盲囊和肌肉组织细胞内具有丰富且清晰可见的各种细胞器,核质均匀分布(图版 1、3、6、9)。病贝心脏细胞肿胀,细胞核收缩变形,核膜分离,核染色质分布异常、趋边,核仁消失,线粒体嵴断裂减少,内质网变性、核糖体脱落,细胞器退化或破碎,胞浆内出现同心圆排列的板层状髓样小体(图版 :4);在包囊中心区,是电子致密的非结构团块,外围可见到有显然已趋于死亡的透明细胞群(图版 :2);病变鳃组织中的部分细胞呈溶解状态,胞内细胞器几乎全部呈空泡状或崩解(图版 :5);病变严重的消化盲囊细胞破裂、质膜和核膜均消失,线粒体坏死,溶酶体增多及脂肪滴变性,核严重收缩、核内染色质物质浓缩聚集成团块(图版 :7);核固缩、核膜分离,核质边集,细胞间界限模糊不清(图版 :8);病变肌肉细胞萎缩变形,核质不丰富,细胞器消失,胞浆分布不均(图版 :10)。

2.3 光镜组织化学

PAS测多糖类。健康的的心脏血细胞的胞质中皆呈阳性反应,核物质呈均匀分布(图版 :1);感染后不同时间固定的心脏血细胞病变显然不同,感染后 12h固定的病变心脏血细胞呈弱阳性,核物质分布不均,大概源于部分解体的心脏血细胞(图版 :2);感染后 24h固定的心脏血细胞显然比感染后 12h固定的心脏血细胞病变严重,不仅非结构的 DNA 物质数量骤增,大概源于更多的解体细胞,且心包膜中具有包囊形成(图版 :3)。健康的肾细胞与感染后 12h和 24h的肾细胞比较,健康肾细胞 PAS 阳性(图版 :4),感染后 12h的肾细胞 PAS弱阳性(图版 :5),感染后 24h的肾细胞 PAS呈极弱的阳性(图版 :6)。健康的鳃细胞与感染后 24h的鳃细胞比较,健康的鳃细胞 PAS呈较强的阳性,感染后 24h的鳃细胞 PAS呈很弱的阳性。

3 讨 论

超微病理观察发现,该病的病理变化特点是全身各主要组织器官发生广泛性的细胞变性、坏死,细胞核固缩,细胞器破裂或崩解,尤以心脏、消化腺等细胞破坏最为严重。同时组织化学观察中 PAS染色表明,随着扇贝被感染时间的延长,被感染贝组织细胞内非结构 DNA 数量的增多显然也来自部分解体的细胞。在患病贝大部分组织器官细胞中,均可见到大量线粒体变性或消失。线粒体是能量的供应场所,它产生 ATP,供给细胞健康活动,它的变性坏死必将导致机体组织的健康生理功能紊乱,进一步加速了细胞的死亡。同时,在鳃及消化盲囊病变的组织细胞中均可见到数量增多的溶酶体和残存的溶酶体。溶酶体具有消化和溶解外物的功能,是细胞内的消化系统,其内含有高浓度的水解酶如酸性磷酸酶、核酸酶、组织蛋白酶等。在吞噬大量细菌及溶解的细胞残片

后,溶酶体最终会溶解破裂,释放出其中的消化酶,这些消化酶对细胞会产生极大的毒害作用,从而损伤细胞的健康生理功能直至造成细胞的死亡。外观病变扇贝特征表现为心脏由无色透明变成乳黄色浑浊,肾和消化盲囊肿大、充血等。这些重要器官组织严重的病理变化可能导致了全身各器官功能衰竭而最终致死。

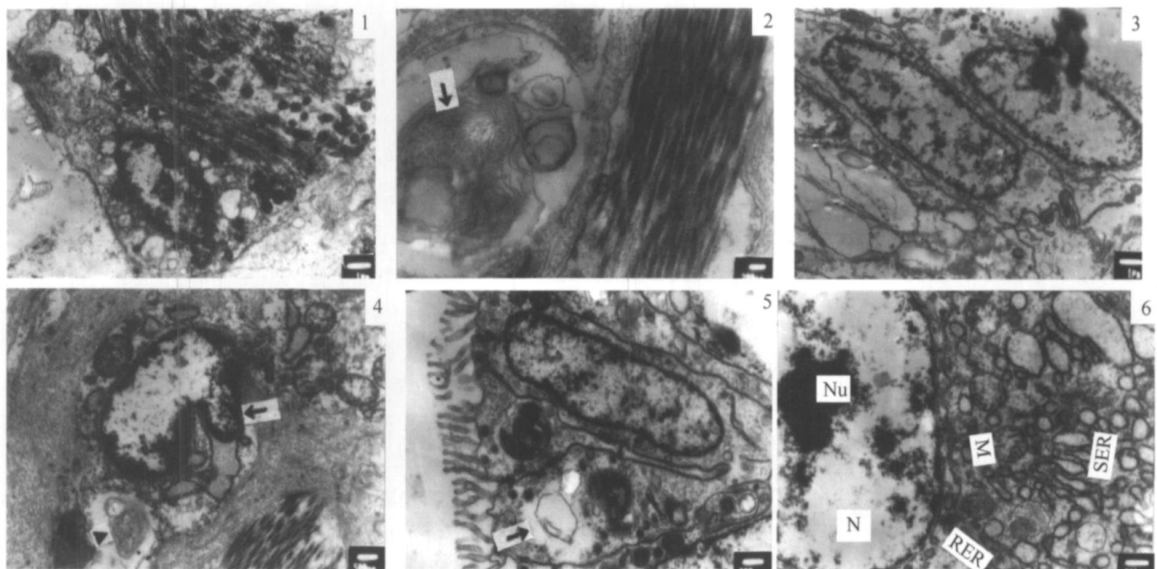
组织化学研究结果显示,病变器官组织的细胞中的多糖类含量明显少于相应的健康器官组织细胞。这一现象表明了这些细胞趋于衰亡。对于棘皮动物,吞噬和包掩作用是抵御外来病原体的基本细胞防御机制。心包膜中包囊的形成是一种有效的防御手段。包囊杀死入侵病原菌的可能机制是:被包围在包囊内的细菌因窒息、代谢废物的积累或由于醌等抗微生物物质的作用而死亡^[13,14];构成包囊的细胞之间形成致密的纤维状连接,这显然起到防止被包围的入侵物逃逸的作用^[10]。在养殖生产中,不良的生态环境及不完善的养殖技术均可导致哈氏弧菌大量繁衍,受哈氏弧菌感染的养殖群体免疫力下降,从而使贝类等低等动物仅具有的包掩作用和吞噬等初级免疫能力丧失,易受病原菌的入侵。入侵病原菌侵染血淋巴细胞,并随开放式血液循环系统进入各组织,进一步感染体内其他组织或器官,促使对病原体敏感组织(心脏、肾等)逐渐发生病变。

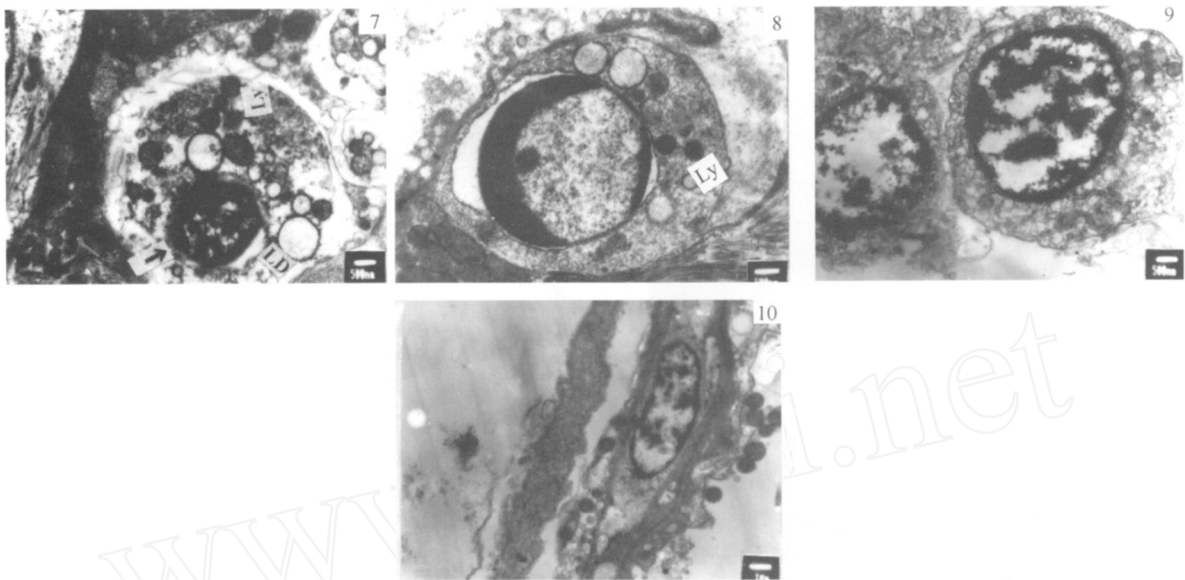
超微观察已感染发病的扇贝各组织中均未发现入侵的细菌,因本实验选取的是病症明显但仍具有一定活力的扇贝,其感染的时间可能较短,细菌在体内还没有大量繁殖,这一结果与 Anderson^[16]认为大量细菌繁殖可能仅在体内环境遭到完全破坏、已接近死亡的对虾中发生结论相吻合。

参考文献:

- [1] Zhang X H, Liao S A, Li Y, et al Studies on pathogenic Bacteria (*Vibrio natriegen*) of *Argopecten irradians* Lam arck [J]. *Ocean Univ Qingdao*, 1998, 28(3): 426—432 [张晓华,廖绍安,李筠,等. 海湾扇贝病原菌(漂流弧菌)的研究. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(3): 426—432]
- [2] Deng H, Chen Q, Liu Q S, et al Vibriosis of bay scallop *Argopecten irradians* cultured [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003, 9(5): 517—521 [邓欢,陈倩,刘权恕,等. 养殖海湾扇贝弧菌病的研究. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 517—521]
- [3] Xiang F T, Wang Y Z Investigation on growth and death of bay scallop [J]. *Qilu Fisheries*, 1986, 4(3): 23—26 [项福亭,王玉忠. 海湾扇贝生长与死亡情况的调查. 齐鲁渔业, 1986, 4(3): 23—26]
- [4] Yu R H, Wang R C Study on the causes of *Argopecten irradians* death [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1989, 11(3): 71—73 [于瑞海,王如才. 海湾扇贝死亡原因探讨. 海洋湖沼通报, 1989, 11(3): 71—73]
- [5] Riquelme C, et al Bacteriology of the scallop *Argopecten purpur*

- tus* (Lamarck 1819) cultured in Chile [J]. *Aquaculture*, 1995, **138**(1—4): 49—60
- [6] Wang W X, Luo W T, Xue Q G, *et al* Phthological research on Chlamydia-like organisms in the hepatopancreatic gland of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) [J]. *Marine Sciences*, 1998, **4**(3): 23—25 [王文兴, 罗挽涛, 薛清刚, 等. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究. 海洋科学, 1998, **4**(3): 23—25]
- [7] Tao B H, Hu C Q, Ren C H. Studies on pathogenicity of vibriosis to shrimp *penaeus monodon* [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2001, **20**(3): 47—52 [陶保华, 胡超群, 任春华. 斑节对虾弧菌病的病理学研究. 热带海洋学报, 2001, **20**(3): 47—52]
- [8] Li X, Wang B, Liu S F, *et al* Studies on pathogeny and histopathology of “crack shell disease” of *Haliotis discus hannii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, **22**(1): 61—66 [李霞, 王斌, 刘淑范, 等. 皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究. 水产学报, 1998, **22**(1): 61—66]
- [9] Fang M, Jin W Z, Song L S, *et al* Histopathological study on “appendage shivering disease” of *eriocheir sinensis* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, **34**(3): 322—328 [方敏, 金卫中, 宋林生, 等. 中华绒螯蟹颤抖病组织病理学研究. 海洋与湖沼, 2003, **34**(3): 322—328]
- [10] Deng H, Chen Q, Liu W D, *et al* Ultrastructural and histochemical observations on capsulation of hemocytes in Chinese shrimp *penaeus chinensis* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 1999, **5**(3): 296—299 [邓欢, 陈倩, 刘卫东, 等. 中国对虾血细胞包掩作用的超微结构和组织化学观察. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(3): 296—299]
- [11] Jiravanichpaisal P, Miyazaki T, Limsuwan C, *et al* Comparative histopathology of vibriosis in black tiger prawn *Penaeus monodon* [A]. *Diseases in Asian Aquaculture* [C]. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 1995, 123—130
- [12] Egusa S, Takahashi Y, Itami T, *et al* Histopathology of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate [J]. *Fish Pathol*, 1988, **23**(1): 59—65
- [13] Lighter D V, Redmen R. Histochemical demonstration of melanin in cellular inflammatory process of penaeid shrimp [J]. *J. Invert Pathol*, 1977, **30**(3): 298—302
- [14] Kroll R M, Hawkins W E, Vogelbein W K, *et al* Histopathology and ultrastructure of the hemocytic response to an acid-fast bacterial infection in cultured *Penaeus vannamei* [J]. *J. Aquatic Animal Health*, 1989, **1**(1): 37—42
- [15] Lillie R D, Fullmer H M. Histopathologic techic and practical histochemistry [M]. New York McGraw-Hill 1976, 1—890
- [16] Anderson I G, Shamsudin M N, Shariff M, *et al* Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, culture in Malaysian brackishwater ponds [J]. *Asian fish Sci*, 1988, **2**(1): 93—108





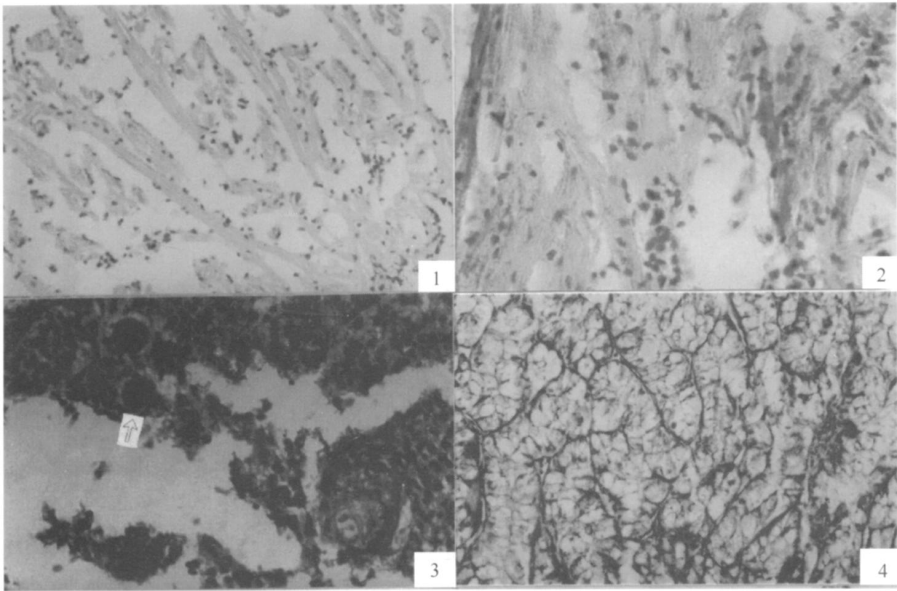
图版 Plate

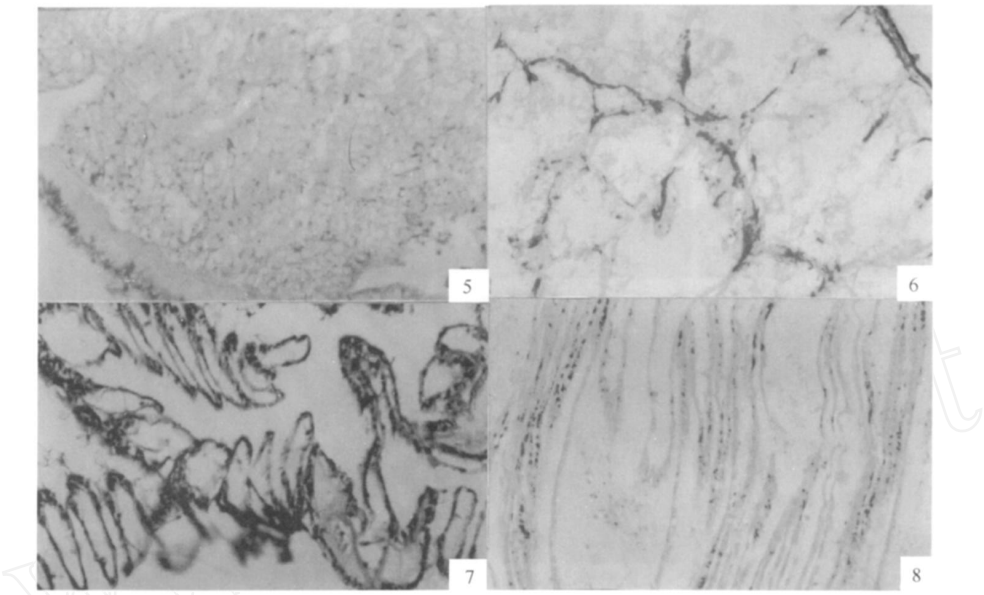
1. 健康贝心脏细胞, $\times 6000$; 2. 患病贝心脏细胞, 示包囊中电子致密的中心区, $\times 20000$; 3. 健康贝鳃细胞, $\times 6000$; 4. 病贝心脏细胞, 示细胞核收缩变形, 示胞质中髓鞘样小体, $\times 10000$; 5. 病贝鳃细胞, 示胞质内已溶解的细胞器呈空泡状, $\times 10000$; 6. 健康贝消化盲囊细胞, 胞质内含有丰富的细胞器, $\times 12000$; 7. 多个近乎崩解的消化盲囊细胞, 示核收缩、核质聚集成团块, $\times 10000$; 8. 病变消化盲囊细胞, 示核固缩、核膜分离、核质趋边, $\times 12000$; 9. 健康贝肌肉细胞, $\times 10000$; 10. 病变的肌肉细胞, 核膜消失, 细胞器退化, 胞质趋边, $\times 5000$

1. Heart cell of healthy bay scallop, $\times 6000$; 2. Heart cell of diseased bay scallop, the capsule with electron density centre (arrow, $\times 20000$); 3. Gill cell of healthy bay scallop, $\times 6000$; 4. Heart cell of diseased bay scallop, nuclear condensation and distortion (arrow), myelin in the cytoplasm (triangle, $\times 10000$); 5. Gill cell of diseased bay scallop, vacuole structure in the cytoplasm (arrow, $\times 10000$); 6. Digestive diverticula cell of healthy bay scallop, each kind of organelles discernible clearly in normal cell of tissue, mitochondrion (arrow, $\times 12000$); 7. Almost disaggregating digestive diverticula cell and chromatin concentrated to block (arrow, $\times 10000$); 8. Digestive diverticula cell of diseased bay scallop, karyopyknosis, karyotheca separation and karyoplasm margination (arrow, $\times 12000$); 9. Muscle cell of healthy bay scallop, $\times 10000$; 10. Diseased muscle cell with karyotheca vanishing, organelles degenerating and cytoplasm margination

N: 细胞核; Nu: 核仁; M: 线粒体; Ly: 溶酶体; RER: 粗面内质网; SER: 滑面内质网; LD: 脂滴

N: nucleus; Nu: nucleoli; M: mitochondrion; Ly: lysosome; RER: rough endoplasmic reticulum; SER: smooth endoplasmic reticulum; LD: Lipid





图版 Plate

1. 海湾扇贝健康心脏, PAS示多糖, $\times 200$; 2. 心脏, 注菌后 12h 固定, PAS示多糖, $\times 200$; 3. 心包膜中的包囊形成, 示包囊, 注菌后 24h 固定, $\times 200$; 4. 肾, 健康, PAS示多糖, $\times 200$; 5. 肾, 注菌后 12h 固定, PAS示多糖, $\times 200$; 6. 肾, 注菌后 24h 固定, PAS示多糖, $\times 200$; 7. 鳃, 健康, PAS示多糖, $\times 200$; 8. 鳃, 注菌后 24h 固定, PAS示多糖, $\times 200$
1. Heart of healthy bay scallop. PAS, Polysaccharide, $\times 200$; 2. Heart, fixed 12h after injecting *Vibrio harveyi*, $\times 200$; 3. Cyst formed in the heart envelope, cyst (arrow), fixed 24h after injecting *Vibrio harveyi*, $\times 200$; 4. Normal kidney, $\times 200$; 5. Kidney, fixed 12h after injecting *Vibrio harveyi*, $\times 200$; 6. Kidney, fixed 24h after injecting *Vibrio harveyi*, $\times 200$; 7. Normal gill, $\times 200$; 8. Fixed 24h after injecting *Vibrio harveyi*, $\times 200$