

研究简报

胭脂鱼弹状病毒对鲤科鱼类感染性的测定

阮红梅 李正秋 张奇亚

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

DETECTION OF THE SENSITIVITY OF EIGHT CARPS TO CHINESE SUCKER RHABDOVIRUS

RUAN Hongmei, LI Zhengqiu and ZHANG Qiyu

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 弹状病毒; 鲤科鱼; 细胞培养; 组织病理

Key words: Rhabdovirus; Carps (cyprinidae); Cell culture; Histopathology

中图分类号: S941.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)05-0555-05

已报道的鱼类弹状病毒有十几种^[1~4], 包括胭脂鱼弹状病毒 (Chinese Sucker Rhabdovirus, CSRV)、病毒性出血败血症病毒 (Viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV)、传染性造血器官坏死病病毒 (Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 等。CSRV 是近年从患致死性出血综合症的胭脂鱼中新分离到的一种病毒病原, 其毒力较强, 能在胞质中形成包涵体, 能很快导致包括草鱼卵巢细胞 (*Ctenopharyngodon idellus* Ovaries, OO) 等在内的鲤科鱼细胞产生典型的病变, 并使胭脂鱼发病、死亡^[5,6]。为了了解 CSRV 的宿主范围, 对鲤科八种鱼: 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes)、鲫 (*Carassius auratus* Linnaeus)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix* Cuvier et Valenciennes)、鳙 (*Aristichthys nobilis* Richardson)、鲤 (*Cyprinus carpio* Linnaeus)、斑马鱼 (*Brachydanio rerio* Haimlton Buchanan) 以及稀有鲫 (*Gobiocypris rarus* Ye et Fu) 进行了 CSRV 人工感染, 并辅以细胞培养、组织病理分析等方法, 初步测定 CSRV 对稀有鲫有感染性。

1 材料与方法

1.1 材料鱼 草鱼、鲫、团头鲂、鲢、鳙和鲤均来自本所关桥养殖场, 稀有鲫、斑马鱼则分别由本所王剑伟博士、贾方军博士惠赠, 其中, 除鲤为 1 龄外, 其它均为 3—5 月龄鱼, 饲养于本室鱼池中备用, 养殖水温为 28—30℃。

收稿日期: 2002-02-25; 修订日期: 2002-05-10

基金项目: 中国科学院生命科学与技术特别支持费 (STZ-0013); 中国科学院创新项目 (220313); 淡水生态与生物技术国家重点实验室基金 (1999FB12) 资助

作者简介: 阮红梅 (1973—), 女, 云南省昆明市人; 在读研究生; 主要从事水生动物病毒学研究

通讯作者: 张奇亚

- 1.2 CSRV 悬液** 用常规方法^[5], 制备 TCID₅₀为 10^{5.8}的 CSRV 细胞悬液, 存于- 20℃, 备用。
- 1.3 鱼的人工感染及通过细胞培养检测** 实验组鱼腹腔注射 CSRV 悬液; 对照组鱼腹腔注射 PBS, 注射剂量因鱼而定(表 1)。注射后 16d 内, 逐日观察并记录鱼的表症情况。取第 8d(各 2 尾)、第 16d 不同鱼的内脏组织, 分别制备成组织匀浆滤液^[5], 接种于已长成单层的 CO 细胞中, 25℃条件下培养 7d, 逐日观察 CO 细胞病变情况。
- 1.4 组织病理观察** 分别取健康或人工感染了 CSRV 悬液后不同时间段的稀有 鲫肝、肠、心、肾、鳃等组织, 剪成小块, 用 Bouin's 液固定, 常规石蜡包埋、切片, 厚度 5μm, 脱蜡, HE 染色, 封片, 显微观察组织病理变化。

表 1 鲤科鱼的人工感染
Tab. 1 Groups of fishes by artificial infection of CSRV

实验鱼 Fish	实验组尾数 No. of test	对照组尾数 No. of control	鱼平均体长(cm) Average length	注射剂量(mL) Injection dose
草鱼 Grass carp	24	20	5.5	0.2
鲫 Crucian carp	22	20	5.0	0.2
团头鲂 Bluntnose black bream	15	10	5.5	0.2
鲢 Silver carp	14	10	5.5	0.2
鳙 Bighead carp	9	6	5.5	0.2
鲤 Common carp	9	6	6.0	0.2
斑马鱼 Zebra danio	15	15	2.6	0.1
稀有 鲫 Rare minnow	24	20	2.8	0.1

- 2 结果**
- 2.1 感染鱼发病及细胞病变情况**
- 实验组及对照组的草鱼、鲫、团头鲂、鲢、鳙、鲤及斑马鱼, 均未出现可察的体表病症; 其组织匀浆液接种到敏感的 CO 细胞后, 也都未能使细胞产生病变。而稀有 鲫对照组在第 12d, 有 1 尾意外死亡(表 2), 其体表及内脏无异常, 组织匀浆液也未使 CO 细胞发生病变; 实验组在注射 CSRV 3d 后, 部分稀有 鲫肌肉、鳍基部有点状或块状出血, 体色发黑, 进食少, 游动缓慢, 发病鱼一般 1—2d 内死亡, 濒死鱼解剖后, 可见其肝、肠等内脏苍白或泛黄, 有的肝有细小的点状出血。在供试的 24 尾鱼中, 仅 8d 累积死亡率已达 34%, 但继续观察至 16d, 死亡率无变化。感染的稀有 鲫, 无论是否有症状, 其组织匀浆液接种到 CO 细胞后均能在 1—2d 后使细胞产生病变。
- 2.2 组织病理变化**
- 对正常和感染了 CSRV 的稀有 鲫肝、肠、心、肾及鳃组织切片观察结果如下:
- 肝** 正常鱼肝组织细胞排列紧密、均匀, 核大而圆, 一般位于中央(图 1: A)。而感染鱼组织中, 细胞间隙稀疏, 细胞肥大并空泡化, 有的细胞核浓缩或消失(图 1: B)。
- 肠** 正常鱼切片中, 黏膜层等其它各层结构完好, 结构清晰, 细胞排列有序(图 1: C)。而在感染的

表 2 人工感染 CSRV 后稀有 鲫发病和死亡的结果

Tab. 2 The data about disease and death of rare minnow by artificial infection of CSRV

分组 Groups	对照组 Control	实验组 Test
试验鱼尾数 No. of fish	20	24
注射后开始死亡的时间(d) Time from injection to death	0	4
注射 8d 后累计死亡尾数 No. dead fish after 8d	0	7
注射 16d 后累计死亡尾数 No. dead fish after 16d	1	7
死亡率(%) Mortality	5%	34%

鱼肠中, 初期表现为黏膜层上皮细胞脱落, 肠绒毛开始断裂; 随后, 脱落的肠绒毛和坏死的组织解体, 充满整个肠腔(图 1: D)。

心 正常鱼心脏切片中, 心肌纤维成束、整齐排列(图 1: E)。而病鱼的心肌纤维早期肿胀, 随病情发展, 肌纤维断裂, 排列紊乱, 心脏严重缺血, 细胞核固缩、消失(图 1: F)。

肾 在健康鱼肾组织切片中, 实质部分可见结构清晰的肾小体、肾小管, 之间充满具造血功能的肾间质组织细胞(图 1: G)。而 CSRV 感染的肾组织萎缩, 肾小体囊腔扩大, 肾间质组织中的细胞稀疏, 数量减少(图 1: H)。

鳃 正常鱼的鳃小片呈细板条状, 平行互生于鳃丝两侧(图 1: I)。而患病鱼鳃小片肿胀、黏连等, 部分细胞和组织崩解(图 1: J)。

3 讨论

鱼类病毒的常规检测方法有: 细胞培养、电镜观察、免疫检测、生化及分子生物学分析等。细胞培养检测特别适应于某些毒力高、裂解性强的病毒(如弹状病毒)等。Evensen 等^[7]在对 VHSV 感染鲑鱼进行早期检测时也指出, 病毒的细胞培养较免疫组化检测更敏感。CSRV 和 VHSV 类似, 同属鱼类弹状病毒, 且 CSRV 能在 CO 细胞胞质内形成包涵体, 并使 CO 细胞很快产生病变。因此, 当接种了 CSRV 的鱼未表现病症, 则通过其组织匀浆液接种 CO 细胞来进一步检测病毒是否在鱼体中扩增。从草鱼、鲫、团头鲂、鲢、鳙、鲤及斑马鱼的发病情况及细胞培养测定结果说明, 这七种鱼对 CSRV 不够敏感。而部分稀有 鲫在注射 CSRV 后, 发病或死亡, 且发病与未发病稀有 鲫的组织匀浆液接种细胞后, 均能使细胞病变, 表明 CSRV 能在稀有 鲫体内扩增。稀有 鲫作为一种模式鱼^[8], 已用于其它鱼类病毒, 如草鱼出血病病毒(Grass Carp Hemorrhage Virus, GCHV)的生化检测及感染实验^[9]。

稀有 鲫的组织病理变化结果显示: 感染初期, 稀有 鲫的肝、肠、心脏开始发生局部病变; 随感染时间延长, 病变程度加深、面积扩大, 且肾、鳃也随之出现病变。近年来, 本研究室对分离到的蛙病毒(RGV)、鳖病毒(TSV)、鳊鱼病毒(SCV)也做了相应的组织病理学研究^[10~12], CSRV 引起的病理变化与之相似之处在于: 病毒感染后, 都能引起宿主动物的重要功能器官病变和功能衰竭, 导致宿主动物最终死亡。但不同病毒病的组织病理也存在差异, 如在 CSRV 感染的病变组织中, 出现细胞核萎缩或消失的现象, 而没有明显的坏死灶。这是否与弹状病毒可诱导细胞凋亡^[13]、同时通过包涵体在短时间内大量释放病毒有关? 还待进一步研究。

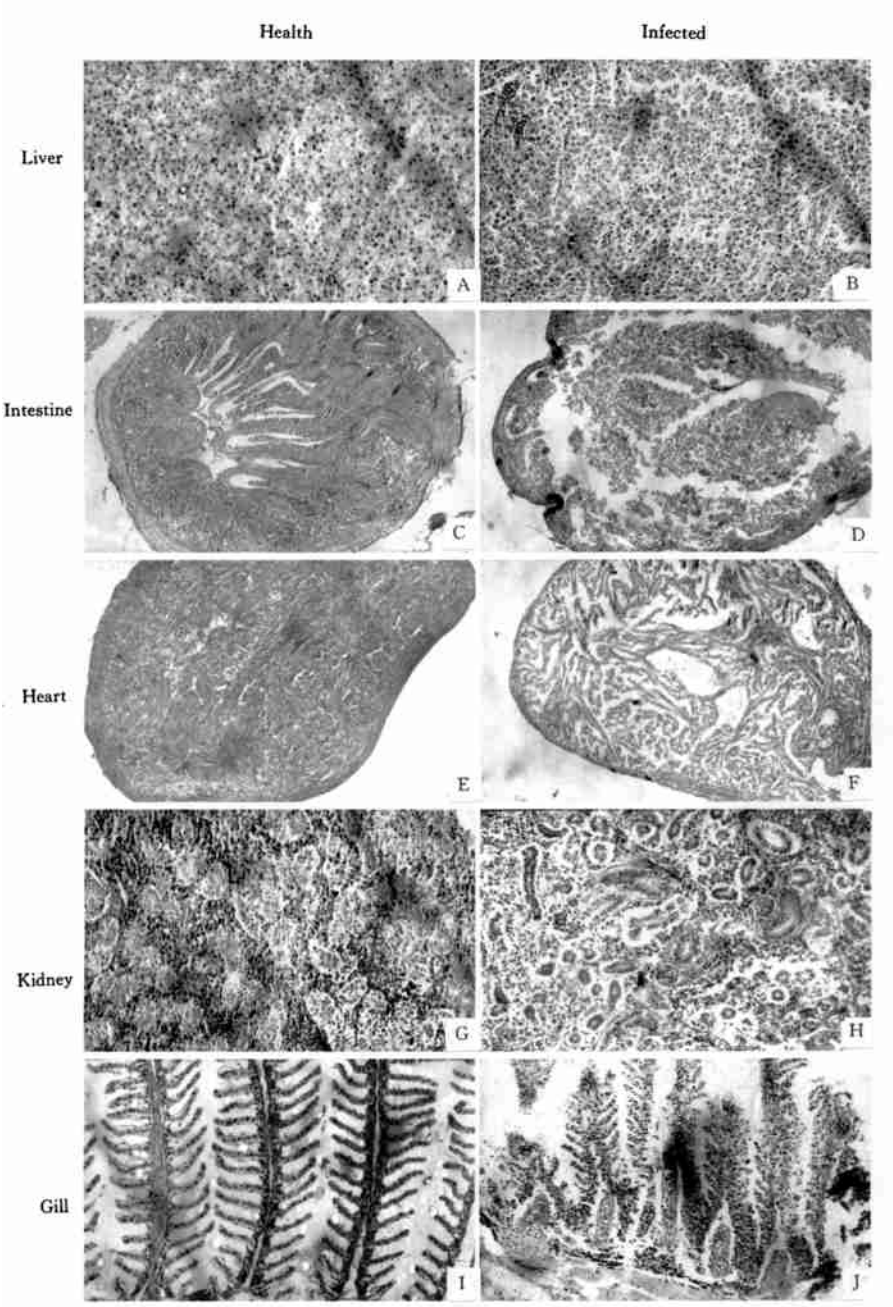


图 1 正常(左边)稀有 鲫 A. 肝, C. 肠, E. 心, G. 肾, I. 鳃, 和感染(右边)稀有 鲫 B. 肝, D. 肠, F. 心, H. 肾, J. 鳃, 组织切片的显微照片(A, B, G, H, I, J: 80×; C, D, E, F: 40×)

Fig. 1 Microscopical photographs of histological sections from A. liver, C. intestine, E. heart, G. kidney and I. gill of health rare minnow(left), and from B. liver, D. intestine, F. heart, H. kidney and J. gill of infected rare minnow(right) . (A, B, G, H, I, J: 80×; C, D, E, F: 40×)

参考文献:

- [1] Wunner WH, Calisher CH, Dietzgen RG, et al. The Rhabdoviridae [A]. In Virus Taxonomy. Six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [C]. New York: Springer Verlag, 1995, 275—288
- [2] Granoff A, Webster RG. Encyclopedia of Virology [M]. New York: Academic press, 1999, 558—568, 154—1544
- [3] Frederichs GN. Rhabdoviruses of fish [M]. In: Ahne W, Kurstak E, eds. In: Virus of lower vertebrates. New York: Springer Verlag, 1989, 317—332
- [4] 殷震. 动物病毒学(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1997, 777—809
- [5] Zhang Q Y, Li ZH Q, Gui J F. Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* [J]. *Dis Aquat Org*, 2000, **42**: 1—9
- [6] 张奇亚, 李正秋. 胭脂鱼弹状病毒包涵体在培养细胞中的形成[J]. 中国兽医学报, 2001, **21**(1): 38—41
- [7] Evenson Q, Meier W, Wahli T, et al. Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Dis Aquat Org*, 1994, **20**: 101—109
- [8] 常剑波, 王剑伟, 曹文宣. 稀有 鲫胚胎发育研究[J]. 水生生物学报, 1995, **19**: 97—103
- [9] 王铁辉, 刘沛森, 陈宏溪, 等. 稀有 鲫对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究[J]. 水生生物学报, 1994, **18**(2): 144—149
- [10] 张奇亚. 特种水产动物病毒病的研究[D]. 中国科学院理学博士学位论文, 1997, 51—75
- [11] 张奇亚, 李正秋. 中华鳖病毒病的组织病理研究[J]. 水生生物学报, 1997, **21**(4): 375—379
- [12] 张奇亚, 李正秋. 鳊鱼病毒病原的检出及组织病理分析[J]. 水生生物学报, 1999, **23**(2): 151—154
- [13] Björklund HV, Johansson TR, Rinne A. Rhabdovirus induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor[J]. *J Virol*, 1997, **71**: 5658—5662