

锯缘青蟹呼肠孤病毒感染的组织病理和超微病理观察

熊娟^{1,2} 陈吉刚² 杨季芳² 陈孝煊¹

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100

摘要 运用石蜡切片及超薄切片技术,对感染呼肠孤病毒的锯缘青蟹组织进行组织病理和超微观察。石蜡切片结果显示:SsRV的侵染导致青蟹的肝胰腺、鳃、肠、心、胃和肌肉组织中产生明显组织病理变化,其中以肝胰腺、鳃组织和肠组织的病理变化最为明显,主要包括肝胰腺基底膜破损、肝细胞坏死,鳃腔堵塞,肠上皮细胞脱落,心肌与足肌纤维排列紊乱、断裂等病理变化。超薄切片结果显示:SsRV在肝胰腺、鳃、肠、心等组织广泛分布,说明SsRV组织嗜性广泛;SsRV可导致靶器官细胞核染色质凝集、电子密度增高、髓样小体和溶酶体产生、线粒体组织结构破坏和粗面内质网扩张变形等明显细胞病理学变化。

关键词 锯缘青蟹; 呼肠孤病毒; 组织病理; 超微病理

中图分类号 S 945 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0640-06

水生呼肠孤病毒为感染水生生物的一类呼肠孤病毒,它是近年来水产学研究较为活跃的一个领域。在全球范围内的鱼类、贝类、甲壳类等水生生物中已分离出40余株水生呼肠孤病毒^[1-2]。有些水生呼肠孤病毒可引起宿主严重的疾病,如草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)^[2]。Mari等^[3-4]首次从地中海螃蟹中分离出呼肠孤病毒P和W2,其后国内外学者又从河蟹和青蟹中分离出多株呼肠孤病毒^[5-8]。2004年以来,一种暂命名为“清水病”的青蟹疾病在浙江省三门湾及临近地区暴发与流行。疾病流行期间,陈吉刚等^[9]通过电镜观察,在患病青蟹的心肌、鳃、胃和肠道组织细胞中发现了大量的呼肠孤样病毒粒子(*Scylla serrata* reovirus, SsRV),并利用单引物扩增技术获得该病毒部分核酸序列^[10]。笔者对该患病的锯缘青蟹的组织病理及超微病理进行深入观察,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

患病锯缘青蟹于2009年11月采自浙江省三门县某养殖场;健康蟹采自同一地区某健康青蟹养殖场,并经逆转录环介导等温扩增技术检测确认不携带SsRV病毒后作为阴性对照。

1.2 光镜样品制备及观察

活体解剖锯缘青蟹,分别取患病青蟹和健康青蟹肝胰腺、鳃、后肠、心肌、足肌和胃组织,预冷戊二醛溶液固定,常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红(H. E)染色,中性树脂封片,在Olympus BX51显微镜下观察。

1.3 电镜样品制备及观察

超薄切片制作按陈吉刚等^[9]报道的方法进行,即将组织于活体状态迅速取下,分割成小于1 mm的小块,经戊二醛-锇酸双固定,乙醇脱水,环氧树脂Epon812包埋,LKB超薄切片机超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染法染色,JEM1011透射电镜观察。

2 结果与分析

2.1 石蜡切片观察

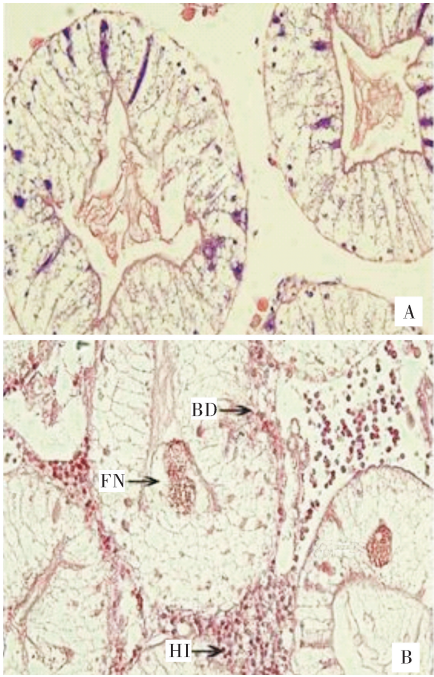
1)肝胰腺。由图1-A可以看出,健康青蟹肝胰腺组织由众多分支的肝小管构成,每一个肝小管都是由位于基膜上的单层柱状上皮细胞构成,中间有明显的十字形管腔,内有流动的血液淋巴。患病青蟹的基底膜破损,大量血细胞浸润,肝小管管腔收缩,腔内血淋巴减少,部分肝细胞发生坏死,出现深染的明显病灶区域(图1-B)。

收稿日期: 2010-12-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800856)和宁波市重大科技攻关项目(2007C11002)

熊娟,硕士研究生,研究方向: 水产病害防控. E-mail: xiongjuan110112119@163.com

通讯作者: 陈吉刚,副教授,研究方向: 水产病害防控. E-mail: genomic@163.com



A: 正常的肝胰脏 Normal hepatopancreas(HE×400); B: 病变的肝胰脏 Hepatopancreas with pathological changes(HE×400); HI 示肝小管间有血淋巴细胞浸润;BD 示基底膜破损;FN 示肝胰脏细胞出现局灶性坏死。HI indicates infiltration of hemocytes between hepatic ducts; BD indicates damaged basal membrane; FN indicates focalnecrosis of the hepatopancreas cells.

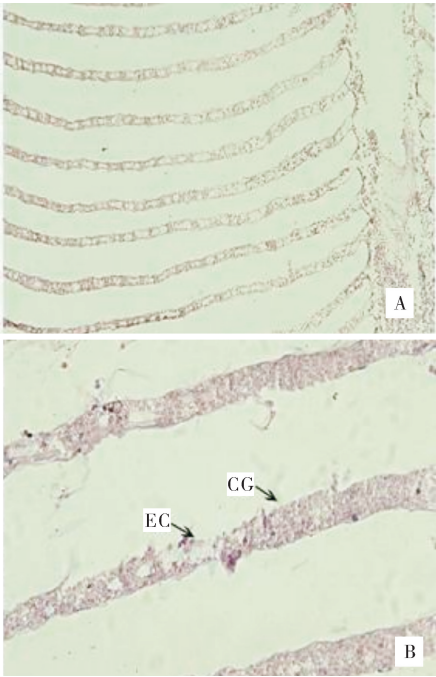
图 1 患病锯缘青蟹肝组织病变

Fig.1 Pathological changes of hepatopancreal tissues of diseased crabs

2)鳃。健康青蟹的鳃组织由多根鳃条组成,每根鳃条又由一根扁平的鳃轴及其两边水平的鳃丝构成。鳃丝外层是坚固的角质层,里层是上皮细胞层及其围成的鳃腔,结缔组织细胞向鳃腔内突出,形成小隔,将鳃腔分成许多通道(图 2-A)。病蟹鳃丝的角质层部分脱落,鳃腔内结缔组织减少,小隔间隙不清,血细胞大量浸润鳃腔(图 2-B)。

3)肠。健康青蟹肠组织由内至外由上皮细胞层、肌肉层及结缔组织层组成。上皮细胞呈柱状,形成皱褶突入肠腔内;基膜明显,紧连上皮细胞。肌肉层由环形横纹肌构成,其外是疏松的结缔组织层(图 3-A)。患病青蟹肠上皮细胞肿大、脱落进入肠腔,基膜消失,大量血淋巴浸润肌肉层,横纹肌断裂崩溃(图 3-B)。

4)心肌。健康的青蟹心肌分为内膜、中膜和外膜 3 层。心肌外膜由较厚的结缔组织构成,富有血管。心肌属于横纹肌,有明显的 Z 线和 M 线,肌纤维排列整齐但松散(图 4-A),细胞之间也会相互伸出突起形成连接,但间隙较宽,不如动物心肌细胞间



A: 正常的鳃丝 Normal gill filaments(HE×100); B: 病变的鳃丝 Gill filaments with pathological changes (HE×400); EC 示变性脱落的鳃丝细胞; CG 示堵塞的鳃腔。EC indicates exfoliative cells of gill filaments; CG indicates clogging gill cavity.

图 2 患病青蟹鳃组织病变

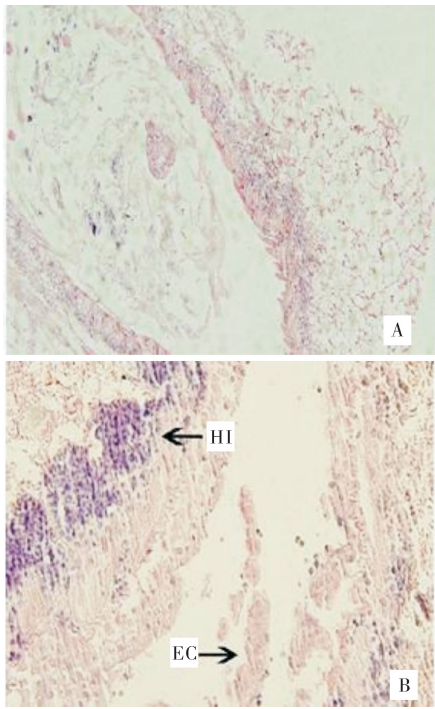
Fig.2 Pathological changes of gill tissues of diseased crab

的闰盘发达,故甲壳动物的心肌不像哺乳动物的心肌那样搏动有力。患病青蟹的心肌纤维呈现断裂溶解现象(图 4-B),同时有大量血淋巴细胞浸润在心肌纤维之间,导致机体无法正常供血。

5)肌肉。青蟹肌肉属横纹肌,肌纤维呈长筒状,排列紧密而规则,明暗带清晰(图 5-A)。病蟹的肌纤维排列紊乱、断裂,甚至出现溶解,体液大量灌注于细胞之间(图 5-B)。

6)胃。健康青蟹的胃结构复杂,可分为贲门胃和幽门胃。贲门胃膨大成囊状,上皮细胞立方状或单层柱状,上皮表面覆盖物由内层的胶原蛋白和外层的弹性蛋白构成(图 6-A)。外膜薄,特别在靠近食道的胃壁最薄,上皮细胞表面有几丁质层覆盖。

在贲门胃后部,几丁质层钙化形成胃磨。幽门胃腹壁每一侧加厚成两个半球形,称幽门垂。上皮细胞分泌物层厚,近贲门胃处分泌物形成特殊的栅状结构。病蟹胃空无食物,鼓胀充气,贲门胃的上皮细胞部分崩溃脱落(图 6-B)。



A: 正常的肠 The normal intestine(HE×100); B: 病变的肠 Intestine with pathological changes(HE×400); EC 示脱落的肠道上皮细胞; HI 示结缔组织内有血淋巴细胞浸润。EC indicates exfoliative cells of epithelium; HI indicates infiltration of hemocytes in connective tissue.

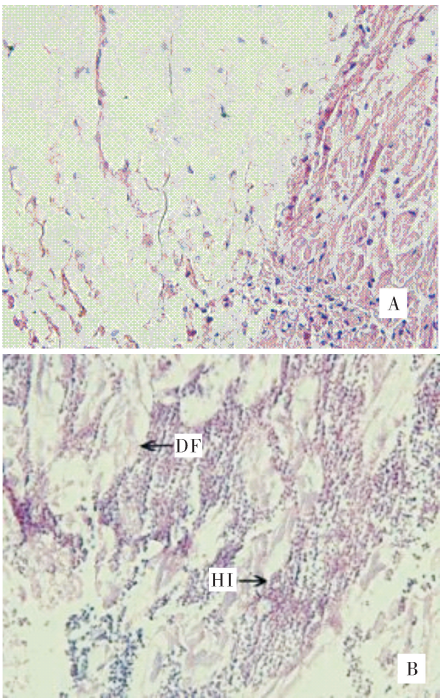
图 3 患病青蟹肠组织病变

Fig.3 Pathological changes of intestine tissues of diseased crabs

2.2 超薄切片观察

超薄切片电镜观察显示,病蟹的肝胰腺、鳃、肠、心、肌肉和胃组织中均可观察到病毒颗粒,病毒粒子主要存在于细胞浆中,而在细胞核内未观察到病毒粒子的存在,其在肝胰腺和鳃组织中数量最多,且可在核膜外周围形成结晶状包涵体。病毒粒子呈二十面体对称,大小为 70 nm 左右,表面可见明显刺突。成熟病毒粒子可见衣壳和衣壳包裹的 35 nm 左右的高电子密度核心,未成熟病毒粒子病毒缺乏外壳结构或核心(图 7-1)。病毒核酸在细胞核中复制并转移到粗面内质网上进行翻译,最后在包涵体中装配成熟后释放到胞浆中(图 7-2),导致细胞质及细胞器产生明显病变,整个细胞呈现坏死状态。细胞膜崩解破坏后,病毒粒子释放到细胞外,侵染其他细胞或组织(图 7-3)。

1)肝胰腺组织。与健康青蟹相比,病蟹肝胰腺感染细胞的细胞核内电子密度增加,染色质高度浓缩凝集,并向细胞核膜内侧聚集,核膜皱缩,表明此



A: 正常的心脏 Normal heart(HE×400); B: 病变的心脏 Heart with pathological changes(HE×400); DF 示心肌纤维排列紊乱、断裂、轻度水肿和变性; HI 示心肌纤维周围有大量血淋巴细胞浸润。DF indicates derangement, fragmentation, slight edema and degeneration of myocardium; HI indicates hemocytes infiltrating.

图 4 患病锯缘青蟹心组织病变

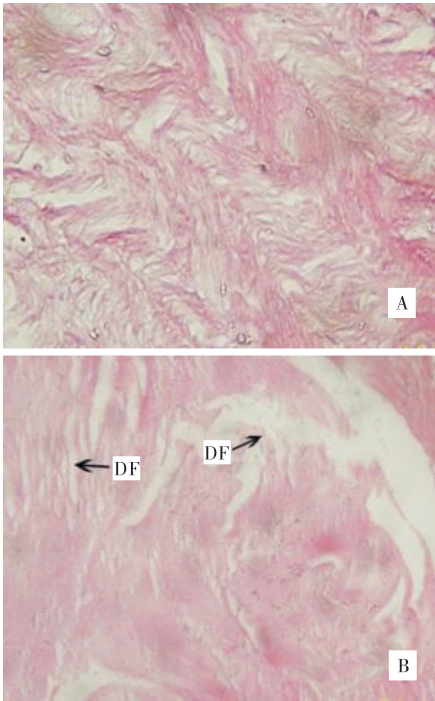
Fig.4 Pathological changes of heart tissue of diseased crabs

时病毒核酸正在大量复制,并向核外转移。细胞质中粗面内质网肥大增生,肝糖原聚集呈储蓄状态,表明病毒蛋白质正在大量合成(图 7-4)。

2)鳃组织。鳃细胞中存在大量病毒包涵体,导致细胞核中染色体周边化,靠近包涵体的核孔堵塞。线粒体肿大变形,溶酶体大量产生(图 7-5)。

3)肠组织。病毒大量寄生在肠细胞中,病毒感染后的病理现象除与在肝胰腺中的表现类似外,肠细胞胞浆中脂滴量增加,同时胞浆中可观察到大量装配成熟的病毒粒子(图 7-6)。细胞核中染色质聚集在核仁附近,线粒体结构严重受损,甚至内嵴消失,整体呈现空泡化。胞浆中可见大量粗面内质网扩张变性,整个细胞可能处于病毒装配后期(图 7-7)。

4)心肌组织。同样在病毒感染的心肌细胞中也可检测到病毒粒子。受到病毒侵染的心肌原纤维排列紊乱,横纹模糊,胞浆中出现空泡状组织(图 7-8)。同时发现病毒侵染后的心肌细胞中的线粒体大量产生,并且肥大变形,这可能与病毒大量增殖装



A: 正常的肌肉 Normal muscle(HE×400); B: 病变的肌肉 Muscle with pathological changes(HE×400); DF 示肌纤维紊乱、断裂。DF indicates muscular fibers derangement, fragmentation.

图 5 患病锯缘青蟹肌肉组织病变
Fig. 5 Pathological changes of muscle tissues of diseased crabs

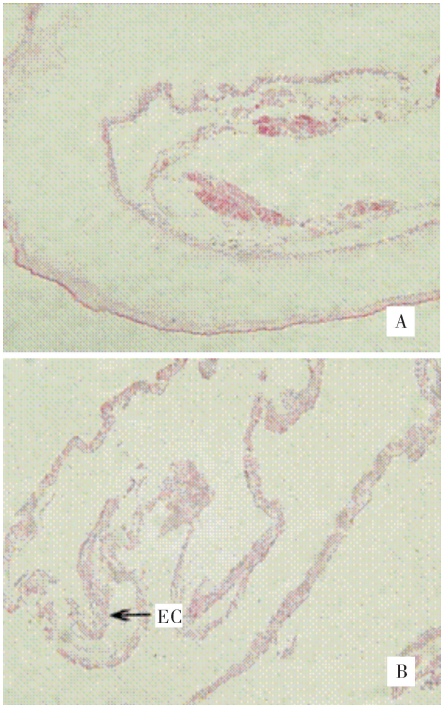
配有关,是器官功能负荷增加引起的适应性肥大。病毒成熟后,线粒体结构崩解,内嵴消失,不能为心肌搏动提供足够的能量。

5)胃组织。胃细胞中也出现相同病毒粒子,核膜通透性增大导致细胞核肿大变形,微丝束成同心板层状结构,髓样小体在胞浆中出现,髓样小体增多常是病毒感染靶细胞的最重要病变特征,同时粗面内质网肿胀增多(图 7-9)。

3 讨 论

本研究中,石蜡切片观察发现青蟹各组织均可见不同病变症状,其中以肝胰腺、鳃组织和肠组织的病理变化最为明显,主要包括肝胰腺基底膜破损、肝细胞坏死、鳃丝角质层脱落、肠上皮细胞肿大、肠基膜消失和肠横纹肌断裂崩溃等病理学变化。由于病毒在组织细胞内大量繁殖,导致细胞崩解,失去基本的组织功能,这一系列组织病理变化与电子显微镜观察到的大量病毒进行增殖以及装配相吻合,Weng 等^[8]也观察到与本文结果基本相似的病理变化。

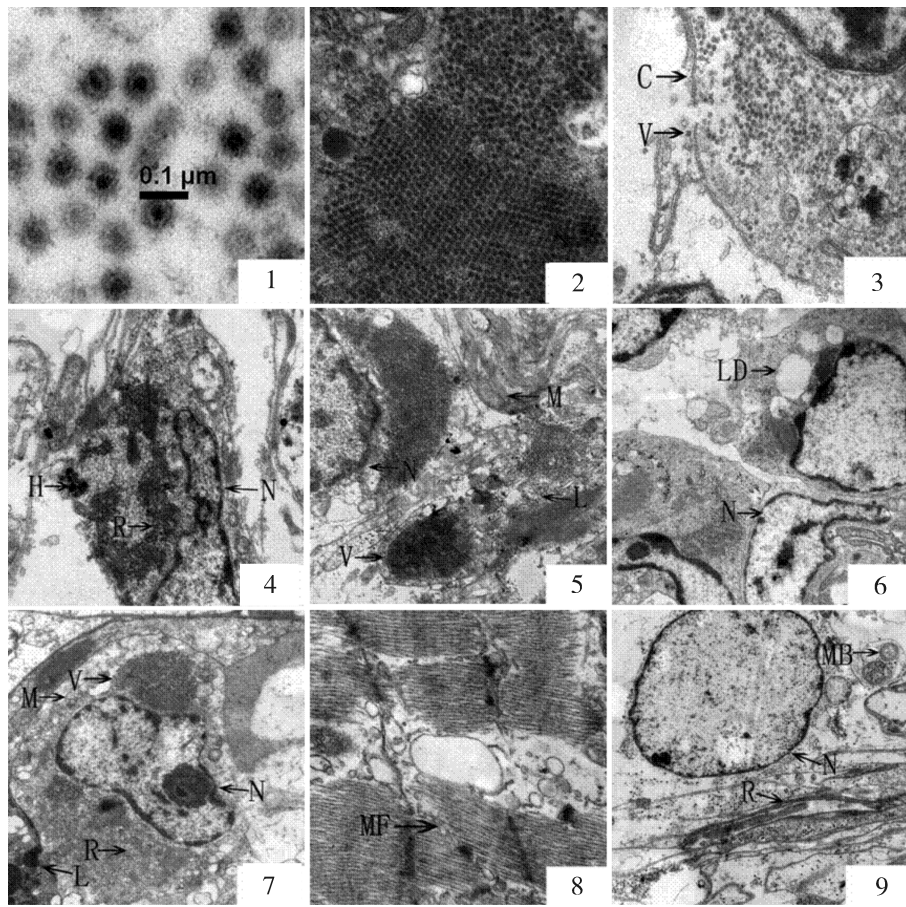
超薄切片观察表明,在检测的青蟹各组织细胞



A: 正常的贲门胃 The nomal cardiac stomach(HE×400); B: 病变的贲门胃 Cardiac stomach with pathological changes(HE×400); EC 示上皮细胞脱落。EC indicates exfoliative cells of epithelium.

图 6 患病锯缘青蟹胃组织病变
Fig. 6 Pathological changes of stomach tissue of the ill mud crab

中均可观察到病毒粒子,由于病毒依靠寄主细胞进行增殖,病毒的繁殖导致细胞发生了一系列的细胞病理学变化,包括在感染初期可见细胞核肿大、染色质凝集、胞浆中粗面内质网扩张变性、线粒体肥大和髓样小体产生。节肢动物细胞中的线粒体内嵴较短,但在感染病毒后,线粒体肥大变形,内嵴肿胀,也是适应病毒增殖的表现^[11]。同时,感染细胞对外界侵入的病原体会进行细胞免疫,初级溶酶体和吞噬体大量融合。随着感染的进一步深入,病毒颗粒完成大批量的复制和组装,整个寄主细胞也进入坏死阶段,细胞膜崩解释放出成熟病毒粒子,继续感染其他细胞或组织,细胞器大量损坏,尤其是线粒体内嵴崩解,部分只剩下外膜维系的基本形态,呈空泡状,直接影响机体的生命活动。心肌纤维中,线粒体病变崩解消失,不能足量甚至不能提供心肌纤维终生不断地进行收缩舒张运动的 ATP 能量需要,最终导致心律衰竭,血淋巴液循环障碍。鳃组织细胞内线粒体病变,鳃叶的上皮细胞坏死成一片无结构物质,直接影响气体交换^[12]。与呼吸有关的心脏和鳃功能的丧失可能是导致病蟹死亡的主要原因^[13]。



C:细胞膜 Cellmembrane; H:肝糖原 Hepatic glycogen; L:溶酶体 Lysosomes; LD:脂滴 Lipid droplet; M:线粒体 Mitochondria; MB:髓样小体 Myelinbody; MF:肌原纤维 Myofibril; N:细胞核 Nucleolus; R:粗面内质网 Rough endoplasmic reticulum; V:病毒 Virus.

1. 胃细胞中成熟病毒颗粒 Showing ripe virus in stomach cell(HE×200 000);

2. 鳃细胞中病毒包涵体释放成熟病毒 Showing viral inclusion bodie release the ripe virus in gill cell (HE×80 000);

3. 成熟病毒粒子从破损肝细胞膜释放出 Showing the ripe virus released from damaged hepatopancreas cell membrane (HE×30 000);

4. 肝组织细胞:示染色质浓缩,核膜皱缩,粗面内质网肥大增生,肝糖原聚集 Hepatopancreas cell;showing chromatin condensation,shrunked membrane,rough endoplasmic reticulum hypertrophy,glycogen accumulation (HE×20 000);

5. 鳃组织细胞:示靠近包涵体的核孔堵塞,线粒体肿大变形,溶酶体中出现成熟病毒颗粒 Gill cell;showing the blocked nuclear pore near viral inclusion bodies,mitochondrial swelling deformation,the mature virus particles in lysosomes (HE×15 000);

6. 肠细胞:示胞浆中出现大量脂滴,细胞核变形 Intestinal cell;showing a large number of lipid droplets in the cytoplasm and nucleus deformation(HE×12 000);

7. 肠细胞:示染色质聚集在核仁附近,线粒体空泡化,粗面内质网扩张变性 Intestinal cell;showing aggregate chromatin near the nucleoli,vacuolization of mitochondria,rough endoplasmic reticulum dilated degeneration(HE×12 000);

8. 心肌细胞:示肌原纤维排列紊乱断裂,横纹模糊,胞浆中出现空泡状组织 Myocardial fiber;showing myofibril derangement,fragmentation,transverse vague,vacuole-like organization in cytoplasm(HE×25 000);

9. 胃组织细胞中细胞核肿大变形,髓样小体出现,粗面内质网增多 Stomach cell;showing hypertrophy and deformation of nucleus,myelinbody and increased rough endoplasmic reticulum(HE×10 000).

图 7 患病锯缘青蟹组织病变

Fig. 7 Pathological changes of tissue of the ill mud crab

参 考 文 献

[1] ATTOUI H, FANG Q, JAAFAR F M, et al. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of golden shiner reovirus, grass carp reovirus, striped bass reovirus and golden ide reovirus (genus *Aquareovirus*, family Reoviridae)[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(8):1941-1951.

[2] RANGEL A A, ROCKEMANN D D, HETRICK F M, et al. Identification of grass carp haemorrhage virus as a new eno-group of aquareovirus[J]. *Journal of General Virology*, 1999, 80:2399-2402.

[3] MARI J, BONAMI J R. Aparvo-like virus from the crab *Carcinus mediterraneus*: pathological aspects, ultrastructure of the agent, and first biochemical characterization[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1988, 51(2):145-156.

[4] MARI J, BONAMI J R. W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*: a reovirus disease[J]. *Journal of General Virology*, 1988, 69:561-571.

[5] 张叔勇, 张建红, 黄灿华, 等. 中华绒螯蟹二株呼肠孤病毒的初

步研究[J]. *中国病毒学*, 2002, 17(4):263-265.

[6] 宋振荣, 倪子绵, 霍振华, 等. 锯缘青蟹肌肉组织坏死的病理研究[J]. *集美大学学报:自然科学版*, 2003, 8(4):301-304.

[7] ZHANG S, SHI Z, ZHANG J, et al. Purification and characterization of a new reovirus from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27:687-692.

[8] WENG S P, GUO Z X, SUN J J. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30:133-139.

[9] 陈吉刚, 杨季芳, 王海丽, 等. 养殖锯缘青蟹呼肠孤病毒粒子的电镜观察[J]. *海洋学研究*, 2008, 26(4):93-96.

[10] CHEN J G, XIONG J, YANG J F, et al. Nucleotide sequences of four RNA segments of a reovirus isolated from the mud crab *Scylla serrata* provide evidence that this virus belongs to a new genus in the family Reoviridae[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(3):523-528.

[11] 李国荣, 魏香, 王坤. 锯齿溪蟹 (*Potamon denticulatus*) 心肌细胞的超微结构观察[J]. *海洋湖沼通报*, 1998(3):39-42.

[12] 陆宏达, 金利华. 中华绒螯蟹细菌性病原的分离和鉴定[J]. *水产学报*, 1999, 23(4):381-386.

[13] 方敏, 金卫中, 宋林生, 等. 中华绒螯蟹颤抖病组织病理学研究[J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(3):322-328.

Histopathology and ultrastructural pathology
of *Scylla serrata* infected by reovirus

XIONG Juan^{1,2} CHEN Ji-gang² YANG Ji-fang² CHEN Xiao-xuan¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Biological & Enviromental Science, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

Abstract Histopathology and ultrastructural pathology of *Scylla Serrata* infected by reovirus were observed by paraffin section and ultrathin section technique. The results of histopathology examination showed that the main histopathological changes found in hepatopancreas, gills, intestin canal, heart, stomach and muscle tissues. Among them, hepatopancreas, gill and intestine were the main target tissues with the most obvious pathological changes, which included damaged basal membrane of hepatopancreas, hepatocyte necrosis, clogging gill cavity, shedding epithelium of intestine, muscular fibers derangement, and fragmentation. The results of ultrastructural pathology examination showed that SsRV widely distributed in liver, pancreas, gills, heart tissue and could reproduce in these organs. Therefore, SsRV virus apparently could infect a variety of target organs. Moreover, SsRV infection caused a series of pathological changes in the target tissue cells, such as the condensation of nuclear chromatin, the increasing of electron density, the formation of myelin bodies and lysosome, the destruction of mitochondrial structure and the expansion and distortion of rough endoplasmic reticulum.

Key words *Scylla serrata*; reovirus; histopathology; ultrastructural pathology

(责任编辑:边书京)