第17卷第4期
1993年12月

水生生物学报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol. 17, No. 3
Dec., 1993

草鱼出血病病毒人工感染稀有鮈鲫出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察*

王铁辉 陈宏溪 刘沛霖 刘汉勤 郭 文 易泳兰

(中国科学院水生生物研究所,武汉,430072)

提 要

用电子显微镜观察了稀有鮈鲫出血病(Hemorrhage of Gobiocypris rarus)鱼的病理切片及对照鱼的超薄切片。在对照鱼的鳃、肠道、肾脏、脾脏、肌肉和肝脏中没有见到任何病毒颗粒。在病鱼鳃血管内皮细胞质中观察到聚集的直径70nm左右的GCHV颗粒,说明鳃是GCHV侵袭的主要器官之一,并讨论了鳃对GCHV敏感在GCHV传播中的意义。还在病鱼肠道,肾脏中观察到成片的病毒颗粒,它们也是GCHV侵袭的主要组织。在病鱼脾脏的电子密度低的细胞质中观察到散在的病毒颗粒,很少见到病毒聚集体;脾脏中的病毒可能是脾脏的吞噬细胞吞噬而来。作者认为在病鱼组织中观察到的大小不同的病毒颗粒是处于不同成熟阶段的GCHV。

关键词 稀有鮈鲫,出血病,草鱼出血病病毒,超薄切片,电镜观察,细胞病理

草鱼出血病病毒(Grass carp hemorrhagic virus, GCHV)是草鱼出血病的病原,造成当年草鱼种的大批死亡[1,2];它不仅感染草鱼,也能感染青鱼、罗汉鱼[1]及稀有鮈鲫[3],发生出血病,还能在鲢鱼、布氏餐条鱼体内繁殖[4];其中人工感染稀有鮈鲫所致出血病死亡率高达100%,因为稀有鮈鲫是一种理想的实验材料鱼,王铁辉等提出用其作为草鱼抗出血病育种研究的模型[3]。目前关于GCHV所致出血病的细胞病理观察仅见于草鱼的某些器官组织[2,5,6,7],本文报道GCHV所致稀有鮈鲫出血病病鱼的主要器官组织的细胞病理观察。

材料与方法

材料鱼及病毒来源 稀有鮈鲫为4—6月龄鱼,草鱼出血病病毒为GCHV-861株[8]。

感染方法 GCHV-861株感染草鱼种后的病鱼组织匀浆(1∶100稀释)高渗浸泡感染稀有鮈鲫,28℃水温饲养观察,另设对照[8]。

超薄切片和电镜观察 取人工感染GCHV后发病的稀有鮈鲫病鱼及正常稀有鮈鲫

* 淡水生态与生物技术国家重点实验室课题。
本所电镜室协助样品包埋和超薄切片,武汉大学分析测试中心钟桂荣、边书民老师协助电镜观察和照相,谨此致谢。
1992年4月8日收到。

的肠道、肾脏、脾脏、肝胰脏、鳃及肌肉，经戊二醛、锇酸固定，Epon 812 包埋，LKB 切片机超薄切片，醋酸铀、柠檬酸铅染色，JEOL. JEM-100CX II 电镜观察。

观察结果

在正常稀有鮈鲫的鳃、肠道、肾脏、脾脏、肌肉的肝脏中均未见到任何病毒颗粒。稀有鮈鲫出血病病鱼各器官组织的病理观察结果分述如下。

鳃 鳃组织中主要有鳃上皮细胞、柱细胞、氯细胞、粘细胞和红细胞等。在人工感染 GCHV 所致出血病病鱼的鳃上皮细胞中可见成片的病毒颗粒[图版 I：1]，有膜或无膜包围，直径 70nm 左右，病毒双层衣壳可见，病毒核心 40nm 左右；有时见到直径 80nm 左右的病毒空壳，在其周围常有许多管状物质[图版 I：2]；在其它细胞中未见病毒颗粒，可见红细胞游离于血管之外。

肠道 在肠道中观察到大小为 70nm 左右的病毒颗粒[图版 I：3,4]，有一直径 40nm 左右的病毒核心，有或无膜包围，成片或单个存在，还看到直径 40nm 左右的病毒粒子，病毒常与一种电子密度低的胶原纤维及微管和膜状结构同时存在[图版 I：3]。感染细胞结构损坏。

肾脏 在肾脏造血组织细胞质中观察到成片的病毒颗粒，有或无膜包围[图版 I：5，6]，直径 40nm 左右，没有在细胞核中观察到任何病毒颗粒；在红细胞和肾小体上皮细胞中未见病毒颗粒。在感染细胞中可见线粒体肿大[图版 II：7,8]，细胞器变形，细胞解体。

脾脏 脾脏由电子密度高的脾细胞、电子密度中等或很低的其它成份复杂的细胞组成。在脾细胞中未见病毒颗粒；在电子密度很低或中等的细胞质中见到散在的病毒颗粒[图版 II：9]，直径 70—80nm，很少见到病毒聚集体。

肌肉 在肌细胞中未见病毒颗粒，但可见线粒体肿大[图版 II：11]，在毛细血管内皮细胞中有许多小泡[图版 II：12,13]，大小为 60—80nm，根据其形态结构不象是病毒颗粒，有红细胞游离于肌细胞之间。

肝脏 在肝脏组织细胞中没有见到病毒颗粒。感染鱼肝细胞为脂泡充满，肝细胞之间的间隙较正常鱼的大[图版 II：10]。

讨 论

呼肠孤病毒增殖的最主要特征是在细胞质中进行复制、生物合成及装配的全过程。与 DNA 病毒不同，这类 RNA 病毒增殖的任何阶段都不在细胞核内进行[9]。在作者的超薄切片观察中，仅在细胞质中看到病毒颗粒，没有在细胞核中看到任何病毒颗粒，与前人的工作一致[10,7]。从稀有鮈鲫出血病病鱼组织分离纯化的病毒颗粒具有呼肠孤病毒的典型形态结构，生化分析证明 GCHV 是一种具有十一个片段的双链 RNA 病毒，所以 GCHV 是一种呼肠孤病毒。

中国科学院水生生物研究所等(1980)[2]在草鱼出血病病鱼肾脏中观察到了病毒颗粒，丁清泉等在病鱼肠道和肾脏中观察到病毒颗粒，而在肝脏、脾脏、肌肉及鳃中没有发现

病毒颗粒[7]。作者首次在病鱼鳃血管内皮细胞中观察到成片的病毒颗粒，说明鳃对GCHV是敏感的，也预示着鳃在GCHV传播途径中有重要作用。鱼类病毒是介水传播的，鱼体与水环境交换最频繁的是鳃，可以推想，GCHV感染鱼鳃血管内皮细胞后，在其中扩增，释放到血液中，从而感染鱼体肾脏、肠道等敏感组织，导致出血病的发生。

作者在病鱼鳃、肠道和肾脏中观察到成片的病毒颗粒，说明鳃、肠道和肾脏是GCHV侵袭的主要器官，这符合呼肠孤病毒对宿主组织的嗜性。脾脏是一种免疫组织，其间有大量的具有吞噬能力的细胞，清除外来异物，在脾脏中观察到的散在的病毒颗粒可能是细胞吞噬作用的结果。

作者在肠道和肾脏中观察到大小不同的两种病毒颗粒，一种为直径70nm左右，具双层衣壳，有一直径40nm左右核心的圆形病毒颗粒，核心的电子密度深；另一种直径40nm左右的电子密度深的病毒颗粒，这种颗粒一般存在于电子密度深的基质中，有或无膜包围[图版Ⅰ：7,9,10]，这可能就是所谓的病毒发生基质。还在鳃中看到一种直径70—80nm无核心的空壳[图版Ⅰ：4]。作者认为，以上颗粒是处于病毒成熟过程的不同阶段，直径70nm，具有核心和双层衣壳的为完整的病毒颗粒，直径40nm的为病毒核心，直径70—80nm的空壳为未包装病毒核酸的病毒外衣壳，处于病毒发生的不同阶段。我们在同一群病毒颗粒中也发现其大小略有不同，这可能是由于机械切片造成，当切片刀从球形样品不同方向切割时，就会产生直径比球小的截面。

毛树坚等从病鱼组织中观察到大小不同的两种病毒颗粒，认为直径80nm的病毒颗粒为呼肠孤病毒，直径24nm的小颗粒为小RNA病毒，并认为呼肠孤病毒主要引起肠道出血，而小RNA病毒主要引起肌肉出血[7,8]。作者在稀有鮈鲫出血病病鱼组织中没有观察到直径24nm左右的病毒颗粒，而仅看到与呼肠孤病毒核心相当大小的较大的病毒颗粒(40nm左右)，并认为它就是呼肠孤病毒的核心。用GCHV人工感染草鱼主要表现为肠道出血型，有时也表现为肠道出血型或混合型；人工感染稀有鮈鲫也主要表现为肌肉出血[1]，所以，关于病原病毒与病鱼症状的关系需进一步研究。毛树坚等在血管内皮细胞与周细胞中观察到小病毒颗粒，我们仅在鳃血管内皮细胞中发现有呼肠孤病毒，在肌肉和肾脏等的毛细血管内皮细胞中没有观察到病毒颗粒，而看到了直径60—80nm的小泡，其形态结构显然不是病毒颗粒，而可能是胞饮泡。

我们在肌细胞和肝脏中没有见到病毒颗粒，这与丁清泉等和毛树坚等的报道一致[6,7]，但我们在肌细胞中观察到线粒体肿大，有大量的红细胞游离于血管之外的肌细胞之间，从而表现肌肉出血症状。病鱼肝细胞中脂泡[11]特别发达[图版Ⅱ：10]，细胞之间的间隙增大，这些形态学变化可能是GCHV所致肝功能失调的结果。关于GCHV所致肝功能失调还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒学组。草鱼出血病病原的研究。水生生物学集刊，1978，6(3)：321—330。

[2] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒学组等。草鱼出血病病原的研究Ⅱ。电镜观察。水生生物学集刊，1980，7(1)，75—80。

[3] 王铁辉等。稀有鮈鲫对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究。水生生物学报。1994，待刊。

[4] 丁清泉等。草鱼出血病病毒对其它鱼的感染性研究。中国病毒学，1991，6(4)：371—373。

[5] 毛树坚等。草鱼出血病病原的研究。水产学报,1989,13(1):1—4。
[6] 毛树坚等。草鱼出血病两种病原病毒的细胞病理学观察。海洋与湖沼,1988,19(5):435—438。
[7] 丁清泉等。草鱼出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察及感染力的比较。水产学报,1990,14(1):66—69。
[8] 王铁辉等。草鱼出血病病毒高渗浸泡感染稀有鮈鲴的研究。当代微生物研究进展 武汉大学出版社,1993。中国病毒学,1993,待刊。
[9] Joklik, W. K.. Reproduction of Reoviridae, in "Comprehensive Virology", 278—334. Plenum Press, New York & London. 1974.
[10] 邓初夏等。几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤病毒敏感性的研究。水生生物学报,1985,9(4):351—358。
[11] 秉志。鲤鱼组织。北京,科学出版社,1983。

OBSERVATIONS ON THE ULTRA-THIN SECTIONS OF THE MAIN ORGANS AND TISSUES OF HEMORRHAGIC *GOBIOCYPRIS RARUS* ARTIFICIALLY INFECTED BY GRASS CARP HEMORRHAGIC VIRUS (GCHV)

Wang Tiehui, Chen Hongxi, Liu Peilin, Liu Hanqin, Guo Wen and Yi Yonglan
(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan* 430072)

Abstract

Hemorrhage of *Gobiocypris rarus* was induced by artificial infection of Grass carp hemorrhagic virus (GCHV). The ultra-thin sections of the tissues of the control and diseased fish were studied under electron microscope. No virions were discovered in the tissues of the control. The discovery of the aggregated GCHV particles in the endothelial cell cytoplasm of gill blood vessel indicated that the gill is one of the main organs infected by GCHV and this organ may take an important part in the spread and infection of GCHV. The aggregates of GCHV particles present in the cytoplasm of intestine and kidney cells suggested that the intestine and kidney are the other main organs of GCHV infection. In the spleen of the diseased fish, single virions were discovered in the cytoplasm of the cells with low electron density, and virion aggregates were rarely observed. These virions may come from the phagocytosis of phagocyte. We hold the view that the two kinds of viral particles, 40nm and 70nm in diameter respectively, represent different developmental stages of the GCHV.

Key words Gobiocypris rarus, Hemorrhage, Grass carp hemorrhagic virus (GCHV), Ultra-thin section, Electron microscopic obserrvation, Cellular pathology