

文章编号:1000-0615(2001)02-0141-07

## 斑节对虾杆状病毒在感染对虾中肠腺中的分布

李贵生<sup>1,2</sup>, 何建国<sup>1</sup>, 吴冰<sup>2</sup>, 江静波<sup>1</sup>

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 暨南大学生物工程学系, 广东 广州 510632)

**摘要:**利用组织切片法研究了斑节对虾杆状病毒(MBV)在养殖早期斑节对虾及养成期斑节对虾中肠腺各部位的分布特点。斑节对虾的中肠腺可分为头部、亚头部、中部、亚尾部和尾部等 5 个部分,其上皮细胞包括 E 细胞、F 细胞、B 细胞和 R 细胞等 4 种类型。头部和尾部均以 E 细胞为主,亚头部、中部和亚尾部均以 R 细胞为主。在感染度较轻的样本中,MBV 一般只感染 F 细胞、R 细胞和 B 细胞。感染度较重时,E 细胞也同时受累。在养殖早期虾和养成期虾中,MBV 相对感染度在中肠腺各部分的分布均以中部最高,而且以中部的中间最高,离中部越远,相对感染度越低。

**关键词:**斑节对虾;斑节对虾杆状病毒;中肠腺

**中图分类号:**S945.4

**文献标识码:**A

### Distribution of *Penaeus monodon* baculovirus in mid-gut gland of *Penaeus monodon*

LI Gui-sheng<sup>1,2</sup>, HE Jian-guo<sup>1</sup>, WU Bing<sup>2</sup>, JIANG Jing-bo<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275 China;

2. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632 China)

**Abstract:** The distribution of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in different parts of mid-gut gland in juvenile and adult shrimp *Penaeus monodon* was studied by light microscopy. The mid-gut gland of *Penaeus monodon* can be divided into five parts including head part, subhead part, mid part, subtail part and tail part. The cells of mid-gut gland can be divided into E cell, R cell, B cell and F cell. The E cell was the main cells of the head part and the tail part. R cell was the main cells of the subhead part, the mid part and the subtail part. In the cases that infected lightly with MBV, only R cell, B cell and F cell were infected. In the cases that infected severely with MBV, besides R cell, B cell and F cell, E cell also was infected. Both juvenile and adult *P. monodon*, MBV distributed mainly in the mid part of mid-gut gland and especially in the middle of mid part. The farther apart from the mid part, the lower the MBV infection rate was.

**Key words:** *Penaeus monodon*; *Penaeus monodon* baculovirus; mid-gut gland

斑节对虾(*Penaeus monodon*)具有个体大、生长快、肉质好等优点,是我国南方和台湾省养殖的主要虾种。近年来,由于虾病的流行,特别是病毒病的爆发流行,给斑节对虾的养殖带来了灾难性的后果。流行病学调查揭示,斑节对虾杆状病毒(*Penaeus monodon* baculovirus, MBV)是近年来引起斑节对虾大量死亡的主要病原体之一<sup>[1]</sup>。MBV 在宿主中的感染部位是中肠腺和前中肠的上皮细胞核<sup>[2]</sup>,可致感染细

收稿日期:2000-05-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670577)

第一作者:李贵生(1954-),男,广东始兴人,博士,副教授,主要从事水生经济动物病害学的研究。Tel:020-85560151

胞出现一系列的病理变化,如细胞核肿胀,核仁边移,核膜扩张成囊状,核内出现一个至多个圆形的嗜伊红包涵体等<sup>[3]</sup>。中肠腺是十足类甲壳动物较大的器官,其上皮细胞具有分泌消化液、吸收和贮存营养物质的功能,是食物消化、吸收的主要场所<sup>[4]</sup>。由于病毒大量损害中肠腺的实质细胞,严重影响中肠腺的消化和吸收功能,致使病虾出现厌食、空胃,常于发病后4~5天死亡。经研究,MBV在斑节对虾中的感染率非常高,有些虾池已达100%<sup>[11]</sup>,因此,目前在MBV病的调查中,MBV感染度更能反映病情的轻重和决定病程的预后。MBV在中肠腺各部位分布特点的研究,有利于了解其致病机理及探讨其传播途径,并为更好地选择取样部位打下基础。鉴于此,我们分别对不同大小的两组对虾的中肠腺进行了MBV分布的比较研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

养殖早期虾 1995年8月取自廉江市龙营围对虾养殖场,体长为3.8~5.5cm的斑节对虾。

养成期虾 1995年10月购自广州市市场,体长为8.2~11.1cm的斑节对虾。

### 1.2 实验方法

养殖早期虾和养成期虾分别取10尾,活体解剖出中肠腺,用Bouin's液固定,经乙醇系列脱水及二甲苯透明后石蜡包埋,然后经石蜡切片机连续横切片,切片厚约6 $\mu$ m,HE染色,中性树胶封片,用Olympus显微镜观察。另取5尾养成期虾,解剖出中肠腺,按上述方法经固定、脱水、透明及石蜡包埋后在石蜡切片机中进行连续纵切片,染色封片后保存备用。

### 1.3 分析方法

中肠腺面向对虾头部的一端称头端,面向对虾尾部的一端称尾端。将从头端至尾端的连续横切片平均地分成头部、亚头部、中部、亚尾部和尾部5个部分(图版-1)。

#### 1.3.1 中肠腺各部分每个高倍视野下平均细胞数的计算

养殖早期虾和养成期虾各取5个中肠腺连续横切片的样本,每个样本每部分选2张(养殖早期虾)或3张(养成期虾)玻片进行观察,每张玻片选3个切片在高倍镜(10 $\times$ 45)下进行细胞计数,每个切片取不同平面(上、中、下或外侧、近内侧、内侧)计算3个高倍视野的细胞数并求出其平均数,最后求出5个样本的每一部分中每个高倍视野下的总平均细胞数,以此作为各部分每个高倍视野下的标准细胞数。

#### 1.3.2 中肠腺各部分每个高倍视野下平均MBV感染细胞数及MBV感染度的计算

MBV感染细胞的判断标准是以中肠腺细胞中出现MBV嗜酸性包涵体或嗜酸性膨大核作为阳性细胞。由于其特征明显,故计算方便。针对各部分,分别计算出平均每个高倍视野下的MBV感染细胞数,然后根据各部分每个高倍视野下的标准细胞数计算出MBV感染度。其计算公式如下:ID(%) = Ps/Ts  $\times$  100%。式中:ID为MBV感染度;Ps为平均每个高倍视野下的MBV感染细胞数;Ts为平均每个高倍视野下的中肠腺细胞数(各部分每个高倍视野下的标准细胞数)。由于每个样本及每一部分MBV感染度相差甚大,故将各部分的MBV感染度除以该样本的平均MBV感染度,得出各部分MBV的相对感染度,然后进行比较。结果应用SPSS 10.0统计软件包进行处理和分析。

#### 1.3.3 4种类型上皮细胞在中肠腺各部分中分布的比较

斑节对虾中肠腺上皮细胞有4种类型,即E细胞、R细胞、B细胞和F细胞<sup>[5]</sup>,根据它们的特征可以在高倍镜下加以区别。选5个养成期虾中肠腺的连续横切片样本,每个样本每部分均选取3张玻片,每张玻片均选取3个切片,应用逐渐移动和部分重叠法,在高倍视野下计算出每一切片中每种类型上皮细胞的数目,然后应用SPSS 10.0统计软件包进行处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 斑节对虾中肠腺的结构

养殖早期虾(体长 3.8~5.5cm)中肠腺长约 0.7~1.2cm,养成期虾(体长 8.2~11.1cm)中肠腺长约 1.8~2.2cm。光镜下可见中肠腺由许多管状腺组成,管壁内紧密地排列着不同功能的上皮细胞,管中央为管腔(图版 - 2)。上皮细胞有 4 种类型,它们是:胚细胞(E 细胞)、纤维细胞(F 细胞)、分泌细胞(B 细胞)和吸收细胞(R 细胞)。E 细胞分布于腺小管的盲端,细胞排列紧密,细胞质染色较深,细胞核圆形或椭圆形,核仁 1~2 个,为分化程度低的增生细胞;F 细胞胞质明显嗜碱性,内含纤维状物质,细胞核和核仁相对较大;B 细胞内含 1~2 个大液泡,位于细胞顶端,细胞核常被挤压至细胞基部;R 细胞细胞核位于细胞中央,胞质中含有颗粒状物质。

### 2.2 各种类型细胞在中肠腺各部分中所占的比重

中肠腺各部分参与统计的细胞总数如下:头部 19244,亚头部 10496,中部 19008,亚尾部 8874,尾部 23341。头部与尾部均以 E 细胞为主(图 1),而且 E 细胞在各部分分布的差别非常显著( $P < 0.01$ )。亚头部、中部及亚尾部均以 R 细胞为主。R 细胞在各部分分布的差别也非常显著( $P < 0.01$ )。B 细胞以亚尾部所占的比例最大,但其中部无明显差别( $P > 0.05$ ),此外,B 细胞在头部与尾部的分布也无明显差别( $P > 0.05$ )。F 细胞则以中部所占的比例最大,与其余各部分均有极其明显的差别( $P < 0.01$ ),但其在头部与尾部的分布及在亚头部与亚尾部的分布均无明显的差别(均为  $P > 0.05$ )。此外,中部每个横切面可分中间部分和外周部分,在中部的中央部分,各种细胞的分布为中间:R 细胞 46.07%,B 细胞 38.65%,F 细胞 15.28%;外周:R 细胞 92.19%,F 细胞 7.81%(未发现 E 细胞)。

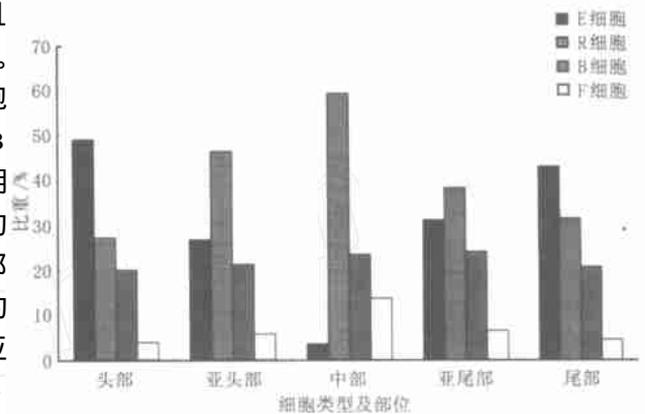


图 1 4 种细胞在斑节对虾中肠腺各部分中所占的比重

Fig. 1 Proportion of four kinds of cells in five parts of mid-gut gland of *P. monodon*

### 2.3 MBV 感染中肠腺的病理变化

MBV 感染的中肠腺出现明显的变化,腺小管排列紊乱(图版 - 3),细胞核中可出现 1 个至多个圆形的嗜伊红包涵体(图版 - 4,5)。在严重感染的腺小管中,可见含有多个包涵体的坏死细胞脱落至管腔中(图版 - 6);有些受染的腺小管则管腔缩小、管壁塌陷(图版 - 7),并可见到 MBV 自中央腺管向周围腺管扩散的现象。在有些切片中,可见到 MBV 与对虾肝胰腺细小样病毒(HPV)同时存在(图版 - 8)。HPV 为单个、圆形或卵圆形的嗜碱性核内包涵体<sup>[6]</sup>。

### 2.4 MBV 在受染养殖早期虾中肠腺各部分的分布

在所观察的样本中,中肠腺平均 MBV 感染度差别很大,最轻的样本为 0.656%,最重为 22.355%(表 1)。在中肠腺的各个部分中,MBV 相对感染度最重的是中部,其次是亚尾部和亚头部(图 2)。中部 MBV 相对感染度和其余各部位的 MBV 相对感染度之间有极显著的差异( $P < 0.01$ ),亚尾部也明显高于亚头部( $P < 0.05$ )。头部和尾部比较则无显著差别( $P > 0.10$ ),但它们与亚头部和亚尾部相比均有极显著的差异( $P < 0.01$ )。

表 1 养殖早期虾中肠腺的平均 MBV 感染度

Tab.1 Average infection severity grade of MBV of mid-gut gland in early juvenile *P. monodon*

样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均数X	标准差 SD
体长(cm)	3.8	4.5	4.5	4.6	4.6	4.7	4.9	5.0	5.3	5.5	4.7	0.5
平均 MBV 感染度 (%)	0.675	6.184	15.746	1.126	0.656	1.091	0.998	22.355	0.844	5.391	5.507	7.577

2.5 MBV 在受染养成期虾中肠腺各部分的分布

MBV 感染情况与养殖早期虾相似,但受累的中肠腺细胞较少,病变较轻(表 2)。在中肠腺的各个部分中,MBV 相对感染度也以中部最重,与其余各部分均有极显著的差异( $P < 0.01$ ),其次是亚尾部和亚头部。头部和尾部 MBV 相对感染度最轻(图 3)。另外,养殖早期虾平均 MBV 感染度虽然高于养成期虾,但经统计学处理,两者并无显著性差别( $P > 0.50$ )。不过,养成期虾 MBV 感染度均在 10% 以下,而养殖早期虾 MBV 感染度超过 10% 的就有两尾,有一尾竟高达 22.355%。

对中肠腺中部的进一步研究表明,中部的中间部分 MBV 相对感染度显著高于外周部分( $P < 0.01$ ) (图 4)。

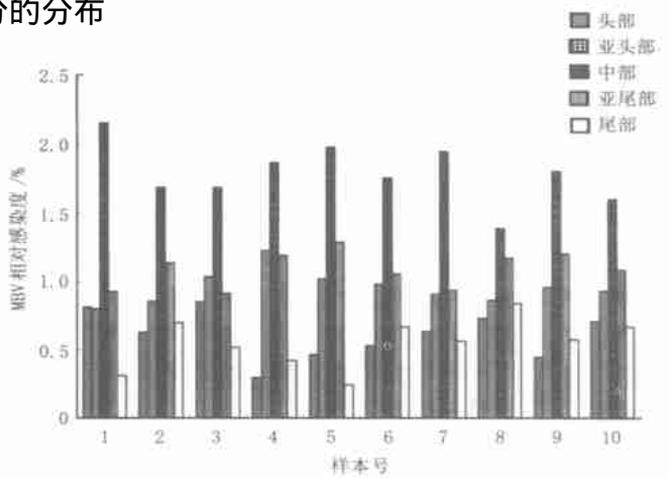


图 2 养殖早期斑节对虾中肠腺各部分 MBV 的相对感染度  
Fig.2 Relative infection severity grade of MBV in different parts of mid-gut gland in early juvenile *P. monodon*

表 2 养成期虾中肠腺的平均 MBV 感染度

Tab.2 Average infection severity grade of MBV of mid-gut gland in cultivated *P. monodon*

样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均数 X	标准差 SD
体长(cm)	9.4	9.0	9.5	9.2	10.5	10.5	11.1	9.4	10.1	10.2	9.9	0.7
平均 MBV 感染度 (%)	0.169	1.728	6.295	0.862	9.578	0.333	8.100	5.471	1.349	5.738	3.962	3.473

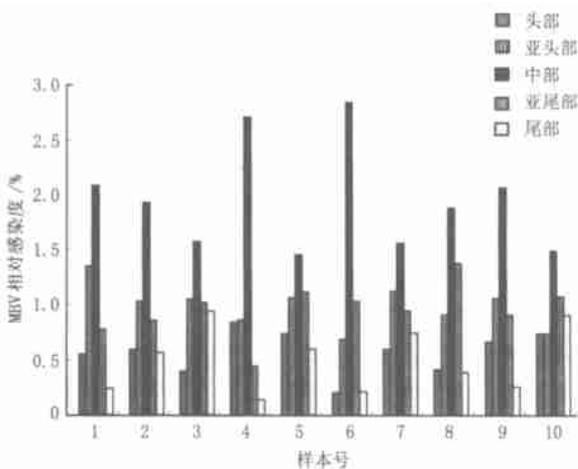


图 3 养成期斑节对虾中肠腺各部分 MBV 的相对感染度

Fig.3 Relative infection severity grade of MBV in different parts of mid-gut gland in cultivated *P. monodon*

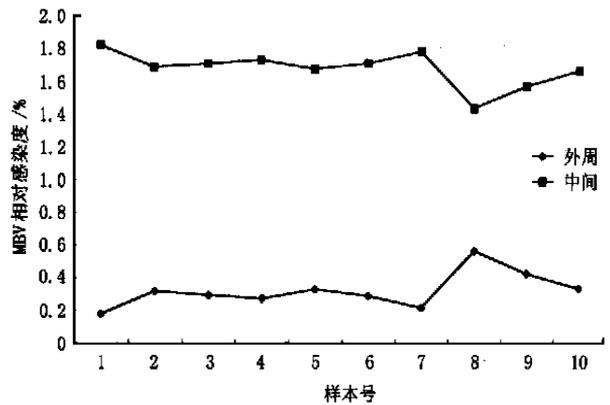


图 4 养成期斑节对虾中肠腺中部中间部分与外周部分 MBV 的相对感染度

Fig.4 Relative infection severity grade of MBV in outside and inside of mid part of mid-gut gland in cultivated *P. monodon*

### 3 讨论

#### 3.1 对虾中肠腺上皮细胞的分化途径和功能

中肠腺具有不同类型的上皮细胞,但其细胞分型的标准和类型仍有争议<sup>[7-9]</sup>。尽管学者们都一致认为 R 细胞、F 细胞和 B 细胞均由 E 细胞分化而来,但其分化途径仍未明。Hirsch 和 Jacobs 认为其分化途径为:R E F B<sup>[10]</sup>;Vogt 提出 R 细胞、F 细胞和 B 细胞均由 E 细胞直接分化而来<sup>[11]</sup>;Caceci 等则认为其分化途径是:E R F B<sup>[12]</sup>。我们在观察单条腺小管的纵切面时发现,顶端的 E 细胞逐渐移行为 F 细胞和 R 细胞,离顶端较远的地方才出现 B 细胞。而在中部横切面的外周部分也只含 R 细胞和 F 细胞。F 细胞与 R 和 B 细胞的差别较大,且 F 细胞在各部分中所占的比例均较少,数量也较接近。这些现象是否提示其分化途径为:F E R B,值得进一步探讨。

中肠腺 4 种上皮细胞的功能各异。E 细胞作为分化程度低的增生细胞,其功能主要是通过有丝分裂和分化形成其他类型的中肠腺细胞,而在消化、吸收和分泌等方面并不起作用<sup>[13]</sup>。F 细胞具有合成糖原的功能,但不具分泌作用<sup>[4]</sup>。B 细胞具分泌功能<sup>[12]</sup>。R 细胞的功能主要是吸收和储存营养物质<sup>[4]</sup>。研究表明,MBV 可感染 4 种类型的中肠腺细胞,但主要感染 R 细胞,其次是 F 细胞<sup>[5]</sup>。此 2 种细胞为中肠腺的主要功能细胞,MBV 的感染特性与其致病性有关。

#### 3.2 MBV 在中肠腺各部位的分布特点

MBV 在感染对虾中肠腺各类细胞中的分布已有报道<sup>[5,13]</sup>,但在不同部位的分布却未见报道。鉴于未见有描述中肠腺分部的文章,我们根据其结构特点,把中肠腺划分为 5 个部分,即头部、亚头部、中部、亚尾部和尾部,这样有利于研究 MBV 的分布特点。研究结果揭示,MBV 感染度以中部最重,而且以中部的中间部位最重,离中部越远,感染度越轻。养殖早期虾与养成期虾的分布趋势基本一致,前者更为突出些。我们在大量的切片检查中也发现,严重感染的对虾中肠腺在边缘部分即可发现大量的 MBV 包涵体,并且 MBV 可侵入 E 细胞。在轻度感染的中肠腺中,包涵体一般只在中部附近发现,而且 MBV 包涵体随中肠腺管的走向而分布,MBV 一般只感染 F 细胞、R 细胞和 B 细胞,不感染 E 细胞。根据这一研究结果,我们在切片时应选中部为佳。

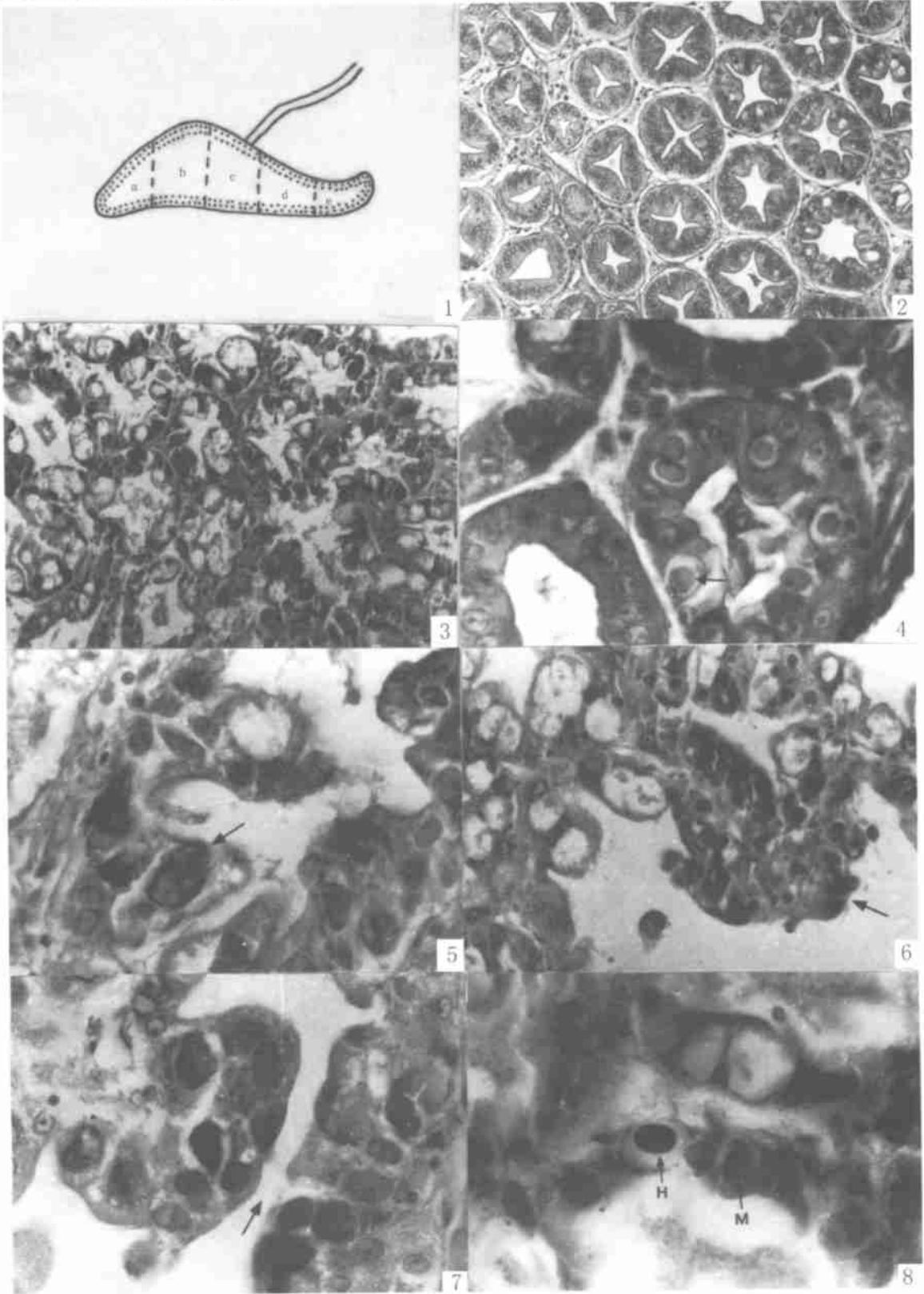
#### 3.3 MBV 感染途径的探讨

对虾病毒感染途径研究较多和较彻底的当属对虾杆状病毒(*Baculovirus penaeid*, BP)。Bruce 等应用核酸探针技术证明 BP 不感染对虾的生殖系统,BP 不经卵传递,其传播方式为水平传播,即通过同类相残,摄入含 BP 的粪便或含 BP 的疫水而使健康虾受染<sup>[14]</sup>。Fegan 等在斑节对虾卵母细胞、受精卵和无节幼体中均未找到 MBV 包涵体和病毒粒子<sup>[15]</sup>。何建国等应用核酸探针技术检测了斑节对虾亲虾的生殖腺,未检出 MBV,但在斑节对虾各生长阶段即从受精卵到仔虾均检出 MBV,并在投入虾池 30 min 后捞起的卤虫中检出 MBV,提示卤虫可能是 MBV 的传播媒介<sup>[16]</sup>。本研究发现,MBV 感染细胞主要集中在中肠腺的中部附近,即中肠腺总管所在部位,且具有沿中肠腺总管走向分布的趋势。在感染严重的虾样中,MBV 广泛分布于整个中肠腺中。从各类细胞的分布特点可看出,中部及中部的中间部位均以 R 细胞为主,F 细胞所占的比重也比较高,而这两种细胞均为 MBV 感染的主要细胞。因此,MBV 到达中肠腺可能存在两种途径,即由中肠到中肠腺总管,然后由中央的中肠腺管逐渐向远端的中肠腺管扩散的途径和经血源播散途径。

#### 参考文献:

- [1] 何建国,苗素英,江静波,等.斑节对虾杆状病毒及其检查方法的比较研究[J].中山大学学报(自然科学版),1993,32(增刊):234-240.
- [2] Lightner D V, Redman R M. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*[J]. J Invertebr Pathol, 1981,38: 299-302.

- [3] 何建国, 苗素英, 江静波, 等. 斑节对虾杆状病毒流行病学的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1993, 32(增刊): 241 - 246.
- [4] 邱高峰. 日本沼虾中肠腺细胞的超微结构研究[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 233 - 239.
- [5] 李贵生, 何建国, 江静波. 斑节对虾杆状病毒(MBV)与肝胰腺细小样病毒(HPV)在斑节对虾肝胰腺各种类型细胞中的分布[A]. 中国动物科学研究[C], 北京:中国林业出版社, 1999. 752 - 754.
- [6] Lightner D V, Redman R M. A Parvo-like virus disease of penaeid shrimp[J]. J Invertebr Pathol, 1985, 45: 47 - 53.
- [7] Van Weel P B. "hepatopancreas"? [J]. Comp Biochem Physiol, 1974, 407: 1 - 9.
- [8] Dall W. The function anatomy of the digestive tract of a shrimp, *Metapenaeus bennettiae* Racek and dall (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) [J]. Austra J Zool, 1967, 15: 699 - 714.
- [9] Al-Mohanna S Y, Nott J A, Lane D J W. M-" midgut " cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* de Hanna, 1844 (Crustacea, Decapoda) [J]. Crustaceana, 1985, 48:260 - 268.
- [10] Hirsch G C, Jacobs W. Der arbeitsrhythmus der mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*, . Teil : wachstum als primärer faktor des rhythmus eines polyphasischen organigen sekretionssystems[J]. Zeitschr Vergl Physiol, 1930, 12: 524 - 557.
- [11] Vogt G. Histologie und cytologie der mitteldarmdrüse von *Penaeus monodon* (Decapoda) [J]. Zoologischer Anzeiger, 1985, 215: 61 - 80.
- [12] Caceci T, Neck K, Lewis D H, et al. Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) [J]. J Mar Biol Assoc U K, 1988, 68: 323 - 337.
- [13] Vogt G. Transformation of anterior midgut and hepatopancreas cells by monodon baculovirus (MBV) in *Penaeus monodon* postlarvae [J]. Aquac, 1992, 107: 239 - 248.
- [14] Bruce L D, Redman R M, Lightner D V. Application of gene probes to determine target organs of a penaeid shrimp baculovirus using in situ hybridization[J]. Aquac, 1994, 120: 45 - 51.
- [15] Fegan D F, Flegel T W, Sriurairatana S, et al. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand[J]. Aquac, 1991, 96: 205 - 217.
- [16] 何建国, 邓敏, 龙紫新, 等. 斑节对虾杆状病毒(MBV) PCR 和核酸探针检测方法的建立与应用[J]. 中山大学学报论丛, 1996, (增刊): 158 - 163.



1. 中肠腺分部,a:头部;b:亚头部;c:中部;d:亚尾部;e:尾部; 2. 正常中肠腺的结构,  $\times 163$ ; 3. MBV 感染的中肠腺示肠管结构紊乱,  $\times 600$ ; 4. MBV 感染中肠腺示核内单个包涵体( $\rightarrow$ ),  $\times 660$ ; 5. MBV 感染中肠腺示核内多个包涵体( $\rightarrow$ ),  $\times 660$ ; 6. MBV 感染中肠腺示大片细胞坏死脱落于管腔内( $\rightarrow$ ),  $\times 660$ ; 7. MBV 感染中肠腺示管腔狭窄( $\rightarrow$ ),  $\times 660$ ; 8. MBV 感染中肠腺 MBV(M $\rightarrow$ )与 HPV(H $\rightarrow$ )合并感染,  $\times 660$ ;