

文章编号: 1000- 0615(2005)04- 0519- 05

赤点石斑鱼病毒性神经坏死症的组织病理和电镜观察

林 鑫^{1,2}, 黄剑南^{1,3}, 翁少萍¹, 王云新²

刘付永忠², 张海发², 何建国¹

(1. 中山大学生命科学院生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 广东省大亚湾水产试验中心, 广东 惠州 526107;

3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 用逆转录- 聚合酶链式反应(RT-PCR)检测患病赤点石斑鱼苗, 呈 Beta 诺达病毒阳性。光学显微镜下观察到病鱼的脑、视网膜、脊髓有空泡。在脑部, 空泡主要分布在端脑、间脑和小脑。受感染的细胞明显收缩、致密变化和嗜碱性。包涵体常为圆形, 大小不一。透射电镜下, 在感染细胞的细胞质可观察到含有病毒粒子的致密体。病毒粒子呈等面体, 无外膜, 直径为 25~ 28 nm, 随机分布在细胞质或在致密体内排列成晶格状。致密体大小不一。偶尔观察到较大致密体的外膜已破裂, 病毒粒子被释放到细胞质。

关键词: 赤点石斑鱼; Beta 诺达病毒; 病毒性神经坏死症

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

Histopathological examination and electron microscopy observation of viral nervous necrosis in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*

LIN Li^{1,2}, HUANG Jian-nan^{1,3}, WENG Shao-ping¹, WANG Yun-xin²

LIUFU Yong-zhong², ZHANG Hai-fa², HE Jian-guo¹

(1. State Key Laboratory for Biocontrol, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Guang Dong Dayawan Fisheries Development Center, Huizhou 526107, China;

3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: A specific band of *Betanodavirus* RNA2 was detected from red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) larvae by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Under light microscopy, the brain, retina, and spinal cord of affected fish showed conspicuous vacuolation. In the brains, vacuoles were mainly apparent in the telencephalon, the diencephalon and the cerebellum. Affected cells were pyknosis accompanying marked shrinkage and basophilia. Inclusion bodies were usually round and different in size. Transmission electron microscopy revealed affected cells containing dense bodies filled with numerous viral particles in the cytoplasm. Virions were 25- 28 nm in diameter, icosahedral and non-enveloped. Virions were distributed randomly in the cytoplasm or arranged in crystalline arrays in the dense bodies. The sizes of dense bodies were different. Occasionally, the unit membrane surrounding the larger bodies had ruptured, allowing the viral particles to escape into the cytoplasm.

Key words: *Epinephelus akaara*; *Betanodavirus*; viral nervous necrosis(VNN)

神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV)是迄今为止所发现的最小的鱼类病毒, 直径只有 25~ 34 nm, 无外膜。核酸为单一正链 RNA, 2 分节,

由 RNA1 和 RNA 2 组成。核酸的 3' 端无多聚腺嘌呤结构 (Poly A)。分类上属于诺达病毒科 (Nodaviridae), Beta 诺达病毒属 (*Betanodavirus*)。

收稿日期: 2004-03-09

资助项目: 科技部海洋“863”计划资助项目(2001AA621010); 中国国家留学基金和德国学术交流中心(DAAD)奖学金资助

作者简介: 林 鑫(1970-), 男, 广东廉江人, 博士, 主要从事动物疾病分子生物学研究。E-mail: linlidaad@yahoo.com.hk

通讯作者: 何建国, Tel: 020- 84110976, E-mail: lsirc05@zsu.edu.cn

由于 Beta 诺达病毒属的种类只感染鱼类,故又称鱼类诺达病毒(piscine nodavirus)。

神经坏死病毒主要感染鱼类的神经系统和视网膜,导致神经系统和视网膜神经细胞的空泡化坏死,所致的疾病称为病毒性神经坏死症(viral nervous necrosis, VNN)或者脑脊髓炎(encephalomyelitis)、脑-视网膜空泡病(vacuolating encephalopathy and retinopathy, VER)^[1]。病毒性神经坏死症的研究历史可追溯到上世纪80年代中期。1985年前后,在澳大利亚、东南亚、日本和加勒比海地区的多种海水鱼类种苗培育中暴发了一种新的疾病。患病鱼苗食欲差,体色灰白或者偏黑,通常浮在水面,间或作突发性的螺旋游动。组织切片观察可见脑部有空泡化病变。鱼苗的死亡率可高达90%以上。起初,人们推测此病是由于饲料中缺乏高度不饱和脂肪酸或者水中氨氮过高所致^[1]。直到1990年,Yoshikoshi和Inoue^[2]在空泡化的条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)脑部观察到大量的病毒粒子,同年,Glazebrook等^[3]在尖吻鲈(*Lates calcarifer*)的脑和视网膜上也观察到大量的空泡和病毒粒子,至此,基本上确定了病因为病毒感染。近十几年来,神经坏死病毒的流行和危害有愈演愈烈的趋势,到目前为止,已波及亚洲、澳洲、欧洲和北美洲10多个国家和地区6目17科30多种重要经济鱼类的种苗培育,甚至少数鱼类的成鱼养殖,严重影响了鱼类养殖业的发展。

病毒性神经坏死症已成为国际上鱼病研究的热点之一,各国学者展开了大量研究,主要有组织病理观察、病毒核酸的全序列测定与功能分析、病毒的分类和基因型分析、病毒敏感细胞株的建立和细胞生物学研究、重组疫苗研制和免疫防治研究以及各种检测方法的建立和流行病学调查等^[4-13]。我国大陆鱼类神经坏死病毒的研究起步较晚。2001年我们首次报道了广东省大亚湾石斑鱼病毒性神经坏死症^[14]。鉴于国内还没有详细的组织病理和电镜研究报告,今将我们的研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

赤点石斑鱼苗为2000年广东省大亚湾水产试验中心所生产。采集垂死的患病鱼苗,全长为

1.5~2.0 cm,日龄为20~30 d。用10%甲醛或2.5%戊二醛固定,分别用于组织切片和透射电子显微镜观察。在-80℃直接冻存部分样品,作病毒核酸检测。

1.2 病毒核酸的RT-PCR检测

取患病和健康鱼苗的头部(包括眼睛),采用TRIZOL(Life Technologies)RNA抽提试剂盒,按照使用说明进行RNA抽提。用下列引物进行RT-PCR检测,下游引物R3(5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'),上游引物F2(5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3')。先将提纯的RNA在沸水中煮5 min,然后置于冰上5 min。取1 μL上述RNA,加入事先配制好的逆转录反应液中,每一反应液含有(5× First strand buffer 2 μL, 0.1 mol·L⁻¹ DDT 1 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP mixture 4 μL, R3引物(20 pmol) 0.5 μL, 核酸酶抑制剂(Life Technologies) 0.1 μL, SUPERSCRIPT™ 逆转录酶(Life Technologies) 0.2 μL, 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的蒸馏水1.2 μL),在42℃中反应30 min, 99℃中10 min 灭活逆转录酶, 4℃中保持。然后向上述逆转录反应产物中加入PCR反应液(10× Ex buffer 5 μL, F2引物(20 pmol) 0.5 μL, EXTAq DNA聚合酶(Takara) 0.5 μL, DEPC处理过的蒸馏水34 μL),先95℃, 2 min, 然后25个循环,循环条件为95℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 40 s, 最后在72℃ 5 min, 4℃保持。RT-PCR在PE-9700 PCR仪中进行。反应产物在1.5%琼脂糖胶中电泳,溴化乙锭染色,拍片。

1.3 组织切片

经过RT-PCR检测阳性的患病鱼苗经过透蜡固定后,进行组织切片,然后将切片进行脱蜡与复水:标本先在纯二甲苯中处理2次,每次5 min;然后依次在100%、90%和70%酒精中各处理2 min,最后在蒸馏水中复水两次,每次1 min。染色:切片先在苏木精中染色10~15 min,然后在蒸馏水中洗3次,每次3 s,并置于弱流水中洗10~20 min。进行H.E染色3 min,蒸馏水中洗3次,每次3 s。脱水与封片:将经过染色后的片子,进行下列脱水处理:90%酒精(30 s), 95%酒精(30 s), 100%酒精(2 min)共处理2次,纯二甲苯(2 min)共处理3次。封片,光学显微镜观察,拍片。

1.4 透射电镜切片

RT-PCR阳性的患病鱼苗经过2.5%戊二醛

固定后, 先进行 1% 锇酸($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲次磷酸盐缓冲液配制, pH 值为 7.3) 固定 3 h, 蒸馏水浸泡 10 min; 分别依次在 50%、70% 和 90% 酒精中脱水 20 min, 然后在 100% 酒精处理 4 次, 每次 10 min。用树脂酒精包埋液(比例为 1:1) 处理 30 min, 然后用树脂酒精包埋液(比例为 3:1) 处理 60 min, 最后用纯树脂包埋 3d, 至此, 标本可用于电镜切片。切片厚度为 $0.5 \mu\text{m}$ 。切片用醋酸铀和柠檬酸铅进行染色, 然后在 Toshiba-7500 电子显微镜下观察, 拍片。

2 结果

2.1 患病鱼苗的外观症状

鱼苗体色较黑, 消瘦, 体部弯曲, 鳃肿大; 视力退化, 不受惊吓; 运动失去平衡, 浮在水面, 间或作急剧旋转游动, 最后沉于池底而死亡。

2.2 病毒核酸的 RT-PCR 检测

通过 RT-PCR 反应, 患病鱼苗样品可以扩增出一段大小约为 430 bp 的特异性片段, 而健康鱼苗样品没有扩增出特异片段。RT-PCR 的引物是根据拟态神经坏死病毒的 RNA2 所编码的外壳蛋白基因片段设计而成, 对病毒核酸有特异性扩增反应(图 1)。

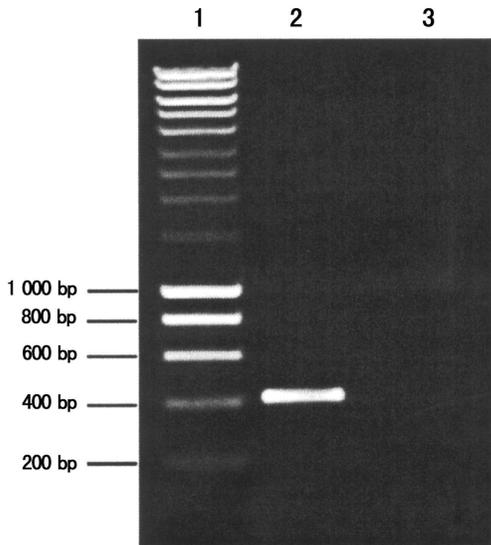


图 1 赤点石斑鱼苗的 RT-PCR 检测

Fig. 1 RT-PCR detection of red-spotted grouper larvae
1. 示 Smartladder 标准分子量; 2. 示患病石斑鱼苗的特异性扩增片段 430bp; 3. 示健康石斑鱼的检测结果, 没有特异片段
1. shows Smartladder DNA MW standard marker; 2. shows specific band of 430bp from infected grouper larvae; 3. shows no specific band from healthy grouper larvae

2.3 组织病理观察

病鱼的脑部可见明显空泡, 主要存在于端脑、间脑、小脑和延脑, 总的来说, 前脑比后脑的空泡化更严重。病鱼的脊髓和骨髓也表现出明显的空泡, 特别是和鳃相近的骨髓部分, 空泡比较严重。视网膜也有空泡, 在严重感染时, 眼室中可见从视网膜上脱落的受感染细胞。肠的上皮层也观察到空泡。其它器官, 包括鳃、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胰脏、皮肤和肌肉等在光学显微镜下没有看见明显的空泡。很多神经元核周体细胞质具有大空泡, 感染细胞表现出明显的收缩、致密变化和嗜碱性, 脑神经细胞降解, 在较高分辨倍数下, 在神经细胞的细胞质中可见嗜碱性的包涵体(图 2)。

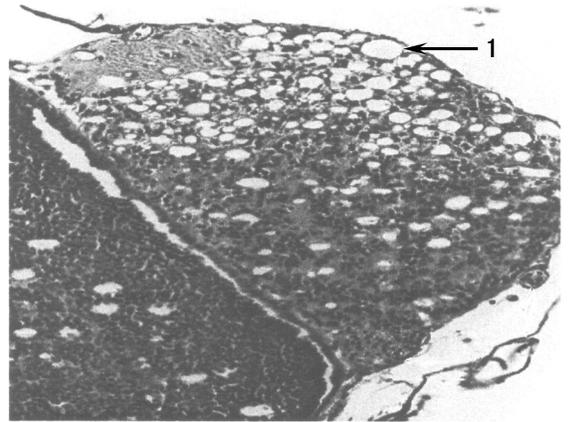


图 2 患病幼鱼的脑部组织切片(H. E 染色)

Fig. 2 The brain of red-spotted grouper larvae with *Betanodavirus* infection

箭头 1 示空泡 arrow 1 shows vacuole

2.4 透射电镜观察

在脑和视网膜的细胞质上可以观察到 25~28 nm 的病毒粒子。病毒为等面体, 无外膜。病毒随机分布在细胞质中或者包在膜性结构内, 排列成晶格状, 形成电子密度较大的致密体。这些致密体大小不一, 所含的病毒颗粒数也不一样。偶尔可以观察到较大的致密体外膜已经破裂, 病毒样粒子释放到细胞质中。感染细胞出现两种明显的降解性病变, 细胞致密变化和细胞溶解。细胞溶解比细胞致密变化更为严重, 因而形成了空泡。病毒粒子成熟后, 感染细胞向细胞间隙释放病毒粒子, 感染细胞明显变小, 从而导致细胞之间产生更大的空隙和空泡。线粒体内嵴出现降解, 只见到残留的膜(图 3 和图 4)。

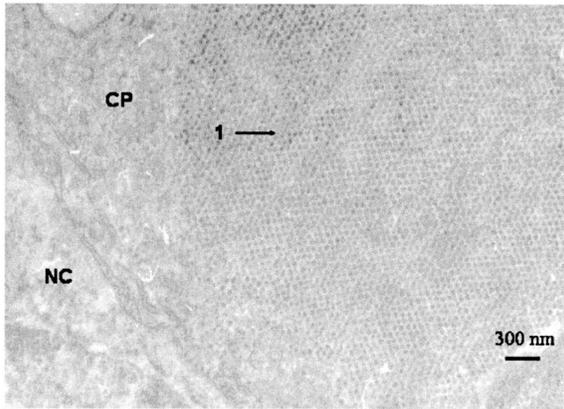


图3 患病鱼苗视网膜细胞透射电镜照片

Fig. 3 Transmission electronmicrograph of the retina cell

of red-spotted grouper larva with *Betanodavirus* infection

CP 示细胞质; NC 示细胞核; 箭头 1 示病毒粒子

CP means cytoplasm; NC means cell nucleus; arrow 1 shows viral particle

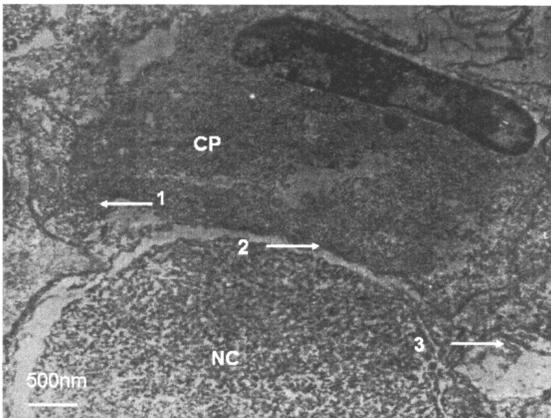


图4 患病鱼苗视网膜细胞透射电镜照片

Fig. 4 Transmission electronmicrograph of the retina cell

of red-spotted grouper larva with *Betanodavirus* infection

CP 示细胞质; NC 示细胞核; 箭头 1 示致密体; 箭头 2 示核膜; 箭头 3 示退化的线粒体

CP means cytoplasm; NC means cell nucleus; arrow 1 shows dense body; arrow 2 shows nucleic membrane; arrow 3 shows degenerative mitochondria

3 讨论

病毒性神经坏死症的外观症状和组织病理变化比较一致,如脑部、脊髓、骨髓和视网膜有严重的空泡化坏死,从而导致鱼苗弯曲,运动失去平衡、鳃肿大和视力退化。在肠道上皮也发现空泡。Munday 等^[15]在正常和患病的尖纹鲈 (*Late calcarifur*) 鱼苗肠道上皮中也观察到空泡,空泡对

油红 O (oil red O) 染色显阳性,表明在空泡上存在脂质,认为可能和肠道的消化吸收有关,和脑部的空泡化坏死不同。我们采用免疫荧光法检测,和脑部相比,肠道上皮病毒呈弱阳性反应;另外,我们也观察到,患病鱼苗还具有一定的摄食能力,肠道有食物。因此可以推测我们所观察到的肠上皮空泡可能也是脂肪颗粒,这需要进一步实验证实。

在透射电镜下可以观察到病毒粒子和宿主细胞膜性结构关联密切。病毒包裹在膜性结构内,形成电子密度较大的致密体;有些膜已经破裂,并释放出病毒粒子,这表明神经坏死病毒的繁殖和细胞的膜性结构有关。研究表明,很多病毒的感染都存在这种膜性结构,外膜可以帮助病毒抵抗宿主的防御攻击,对病毒自身的繁殖有利。另外,线粒体出现降解,线粒体、内质网膜上可以观察到病毒粒子的分布,表明病毒破坏宿主细胞的内膜系统,导致细胞的坏死和裂解。神经坏死病毒具有嗜神经细胞的特性,导致神经细胞组织的空泡化坏死,对其致病的机理还不清楚。Guo 等^[16]采用巨石斑神经坏死病毒 (GGNNV) 感染花鲈细胞株 (sea bass cell line),对其致病的分子机制进行研究。研究表明病毒的外壳蛋白(不是聚合酶蛋白)通过细胞的半胱天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 途径,诱导细胞凋亡。这一结果阐明了病毒导致体外细胞空泡化坏死的分子机制,但是病毒在鱼体内的感染是否具有同样的细胞凋亡机制,需要进一步探讨。

值得注意的是,仅从外观症状来判断病毒性神经坏死症是不可靠的。作为病毒性神经坏死症的确诊,至少要检测到病毒核酸(比如采用 RT-PCR 法)、在组织病理上观察到明显的空泡病变和电子显微镜下观察到病毒粒子。

根据 Chi 等^[4]报道,神经坏死病毒似乎没有严格的鱼类宿主特异性,病毒基因型的分布主要和水温有关,此病已经对台湾淡水养殖的鲇 (*Parasilurus asotus*) 造成了危害,表明此病毒的危害不仅限于海洋鱼类,也有向淡水养殖鱼类蔓延的趋势。因此,开展病毒性神经坏死症的深入研究,包括流行途径调查、病毒在野生和养殖鱼类的分布、重组疫苗的研制和使用等,是我国水产疾病研究的当务之急,将对预防此病在我国养殖鱼类中蔓延具有深远意义。

参考文献:

- [1] Munday B L, Kwang J, Moody N. *Betnodavirus* infections of teleost fish: a review[J]. J Fish Dis, 2002, 25: 127- 142.
- [2] Yoshikoshi K, Inoue K. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel)[J]. J Fish Dis, 1990, 13: 69- 77.
- [3] Glazebrook J S, Heasman M P, de Beer S W. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch)[J]. J Fish Dis, 1990, 13: 245- 249.
- [4] Chi S C, Shieh J R, Lin S J. Genetic and antigenic analysis of *Betnodaviruses* isolated from aquatic organisms in Taiwan[J]. Dis Aquat Org, 2003, 55: 221- 228.
- [5] Mori K, Nakai T, Muroga K, et al. Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis[J]. Virology, 1992, 187: 368- 371.
- [6] Nishizawa T, Mori K, Nakai T, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)[J]. Dis Aquat Org, 1994, 18: 103- 107.
- [7] Nishizawa T, Mori K, Furuhashi M, et al. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of nervous necrosis in marine fish[J]. J Gen Virol, 1995, 76: 1563- 1569.
- [8] Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1633- 1636.
- [9] Tan C, Huang B, Chang S F, et al. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauwina*) nervous necrosis virus, Singapore strain[J]. J Gen Virol, 2001, 82: 647- 653.
- [10] Frerichs G N, Rodger H D, Peric Z. Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. J Gen Virol, 1996, 77: 2067- 2071.
- [11] Iwamoto T, Mori K, Arimoto M, et al. High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses[J]. Dis Aquat Org, 1999, 39: 37- 47.
- [12] Watanabe K, Nishizawa T, Yoshimizu M. Selection of brookstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus[J]. Dis Aquat Org, 2000, 41: 219- 223.
- [13] Nguyen H D, Mushiaki K, Nakai T, et al. Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack[J]. Dis Aquat Org, 1997, 28: 87- 91.
- [14] Lin L, He J G, Mori K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in China[J]. Fish Pathology, 2001, 36: 186- 188.
- [15] Munday B L, Langdon J S, Hyatt A, et al. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch[J]. Aquac, 1992, 103: 197- 211.
- [16] Guo Y X, Wie T, Dallmann K, et al. Induction of caspase-dependent apoptosis by *Betnodaviruses* GGNNV and demonstration of protein α as an apoptosis inducer [J]. Virology, 2003, 308: 74- 82.

欢迎订阅 2006 年度《南方水产》

《南方水产》是由中国水产科学研究院南海水产研究所主办, 国内外公开发行的综合类水产科技期刊。主要报道渔业资源、捕捞技术、渔业设施、渔业环境保护、水产养殖与增殖、渔业生物病害、水产品加工与综合利用以及水产基础研究等方面的论文、研究简报、综述等。《南方水产》立足南方, 面向全国, 突出学术性、地域性、实用性、可读性, 重点报道国内外渔业科研、生产的新技术、新成果及新动向。

《南方水产》为双月刊, 80 页, 大 16K, 双月出版。邮发代号 46- 65, 每期定价 8 元, 全年 6 期 48 元(含邮费)。读者可到当地邮局订阅, 也可将款汇至《南方水产》编辑部订阅或补订。

编辑部地址: 广州市新港西路 231 号 邮编: 510300

电话: 020- 84458694 传真: 020- 84451442

E-mail: nfsc@vip. 163. com