

# 中国对虾淋巴组织培养中的病毒 及病理观察

苗宏志 童裳亮 徐斌<sup>1</sup> 姜明<sup>2</sup> 刘晓云<sup>2</sup>

(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

(青岛海洋大学水产学院, 266003)<sup>1</sup>

(青岛海洋大学测试中心, 266003)<sup>2</sup>

**摘要** 通过对中国对虾的淋巴器官和经过培养的养殖、海捕中国对虾的淋巴组织细胞进行电镜观察, 均发现在细胞内存在一种形状为球形, 有囊膜, 平均直径为 136nm 的病毒, 病毒分布于细胞质内, 或成团存在, 似为一种虹彩病毒; 在养殖对虾淋巴器官及培养过的组织细胞中还发现另一种病毒, 病毒粒子为正二十面体, 无囊膜, 平均直径为 33nm, 分布于细胞质中, 似为一种小 RNA 病毒。在体外培养淋巴组织过程中, 病毒在细胞内没有明显增殖迹象。感染病毒的细胞呈现细胞核固缩, 细胞质空泡化, 线粒体内嵴模糊, 粗面内质网水肿等一系列病理变化。对淋巴组织切片进行光镜观察, 发现淋巴器官组织部分坏死, 有些细胞核肿大, 苏木精深染, 严重的细胞核结构已经被破坏。

**关键词** 中国对虾, 淋巴组织培养, 虹彩病毒, 小 RNA 病毒

从 1993 年起, 我们一直进行对虾的组织培养研究, 并已取得重要进展[ Tong 和 Miao 1996]。在实验中发现, 无论人工养殖的还是海捕的对虾, 表面看来很健康, 但有些个体其淋巴器官却有些水肿现象。在组织培养过程中, 发现有些淋巴器官的迁出细胞出现空泡。由此推断, 外表健康的对虾也可能有病毒感染。为此, 我们对健康对虾的淋巴器官进行组织病理学切片, 并对淋巴器官及体外培养的淋巴组织细胞进行电镜观察。结果发现, 养殖和海捕对虾的健康个体其淋巴组织及人工培养的细胞都不同程度地受病毒感染。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

所用对虾为中国对虾(*Penaeus chinensis*)。于 1995、1996 年的 9~10 月采自青岛地区对虾养殖场或市售海捕活对虾。养殖对虾体长 9~10cm, 海捕对虾 15~20cm。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 淋巴组织的组织培养

组织培养方法按 Tong 和 Miao[ 1996] 方法进行。将对虾放于 5% 的次氯酸钠中消毒 1~2

分钟,再用 70% 的酒精进一步对体表消毒,在无菌条件下摘取淋巴器官,放入自制对虾细胞培养基(Medium of Penaeid Shrimp, MPS)。培养基内含青霉素 200IU/mL 和链霉素 200 μg/mL。将组织剪碎成 1mm<sup>3</sup> 左右的碎块,置入 25cm<sup>2</sup> 进口塑料细胞培养瓶内,并加入 MPS 生长培养基,在 25℃ 培养箱中培养。每 4~5 天换一次培养液,每天观察细胞生长状况。

### 1.2.2 培养细胞超薄切片的制备

用细胞刮刀将培养的对虾淋巴组织细胞刮下,连同培养液一起注入离心管中,用 1000 r/min 离心分离细胞 10 分钟,再用 PBS (pH7.2) 洗三次。所得细胞用 4℃ 的 2% 戊二醛固定 2 次,每次 50 分钟。用 2.5% 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 漂洗三次后再用锇酸固定、梯度乙醇脱水、Epon812 树脂包埋、超薄切片、醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,样品在日立 H-7000 型透射电镜下观察。

### 1.2.3 淋巴器官的组织切片与超薄切片

将同一尾养殖对虾的一侧淋巴器官切成 1mm<sup>3</sup> 左右的小块,用 4℃ 的 2.5% 戊二醛固定 1 小时,一部分组织进行常规组织切片, H. E 染色。另一部分组织按 1.2.2 的方法制备超薄切片。该对虾的另一侧淋巴器官摘下作组织培养用。

## 2 结果

### 2.1 对虾健康情况与组织培养结果

所用对虾从表面上看均健康,甲壳上未发现许多病虾所特有的白色斑点。肝胰腺、心脏未发现异常,但有些个体的淋巴器官肿大。

体外培养的淋巴细胞在 3 天内形成单层。细胞为成纤维样贴壁细胞,但养殖对虾的淋巴细胞远不如海捕虾健康,培养 1 周左右细胞便开始出现空泡。而海捕虾的淋巴细胞能存活 40 多天,很少出现空泡。

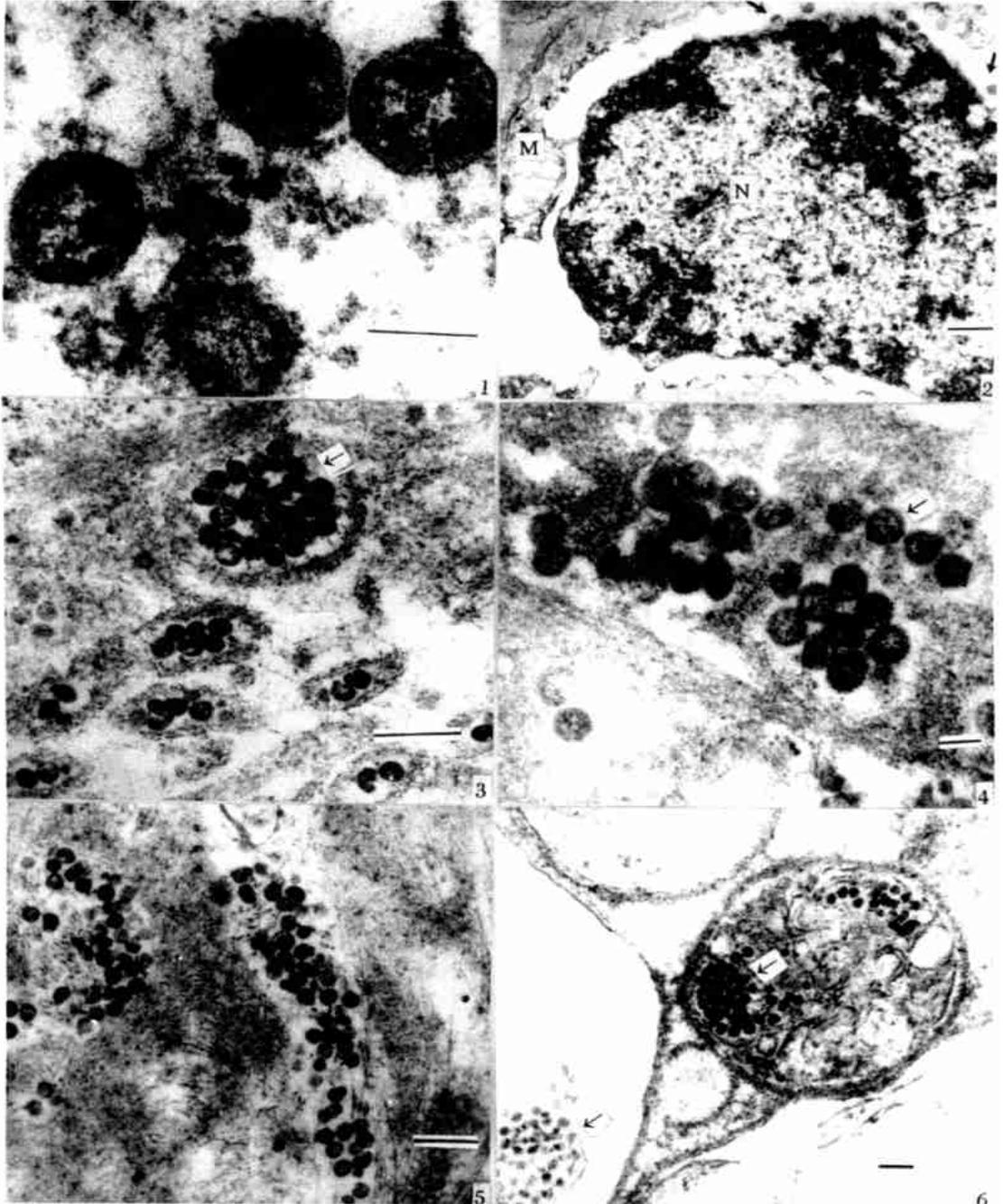
### 2.2 电镜、光镜检查

在淋巴器官及体外培养的养殖对虾、海捕对虾的淋巴组织细胞中,均发现有一种较大的球形病毒。病毒粒子有囊膜,平均直径为 136nm (图版 I-1),成熟的病毒粒子大量堆积于细胞质中,在细胞核核膜内也发现了少数病毒粒子,并引起细胞核膜肿胀 (图版 I-2)。根据病毒形态、结构、繁殖区域等的观察和有关文献报道 [Lightner 和 Redman 1993, Lightner 1996, 高玮等 1996],我们认为此病毒可能是一种虹彩病毒 (Iridovirus)。

将养殖虾淋巴器官与其被培养的组织细胞相比较,发现这种病毒的成熟粒子和可疑的病毒增殖区域没有增加,甚至略微减少。图版 I-3 和图版 I-4 示养殖对虾淋巴器官及经过培养的淋巴组织细胞中的病毒,但不说明病毒的多寡。体外培养的养殖对虾淋巴组织细胞与海捕虾淋巴组织细胞相比较,养殖虾细胞内的病毒粒子多于海捕虾。图版 I-5 示海捕虾淋巴组织细胞中的这种病毒。

在养殖对虾淋巴细胞中,还发现一种小的球形病毒,形状为正二十面体,无囊膜,平均直径 33nm 左右。病毒在胞浆内及一种双层膜结构中大量繁殖或成熟,这种双层膜结构的电子密度与溶酶体相似,可能来源于溶酶体 (图版 I-6, II-1)。细胞质中有些形状为半圆形,电子密度较大、染色深的区域可能是病毒包涵体 (图版 II-2)。在细胞核内未发现该病毒。根

据病毒的形态、结构和感染区域等, 推测其为一种小 RNA 病毒(Picornavirus)。该病毒在培养的淋巴细胞中也没有繁殖的迹象。海捕对虾淋巴细胞中没有这种病毒。



图版 I Plate I

1. 中国对虾淋巴组织内的病毒粒子呈球形, 有囊膜, 平均直径为 136nm。标尺: 100nm。 2. 养殖对虾淋巴组织细胞的细胞核膜内有病毒粒子(箭头)。M: 线粒体, N: 细胞核, 核膜出现水肿。标尺: 500nm。 3. 对虾淋巴组织中成团存在的病毒粒子(箭头)。标尺: 500nm。 4. 体外培养的养殖对虾淋巴细胞质中的病毒粒子(箭头)。标尺: 100nm。 5. 体外培养的海捕对虾淋巴细胞中的病毒粒子。标尺: 500nm。 6. 养殖对虾淋巴细胞浆及溶酶体样结构中的无囊膜小病毒粒子(箭头), 直径 33nm, 正二十面体, 标尺: 100nm。

感染这两种病毒的细胞，都不同程度地呈现细胞病变。表现为细胞核膜肿胀，染色质板块化(图版 II-3)，线粒体内嵴模糊，粗面内质网水肿。光镜下观察，发现有些细胞的细胞核明显肿大，细胞空泡化，淋巴组织的纤维结缔组织瓦解，组织结构显得松散、紊乱(图版 II-4)，正常对虾组织参照 Bell 等[1988]。

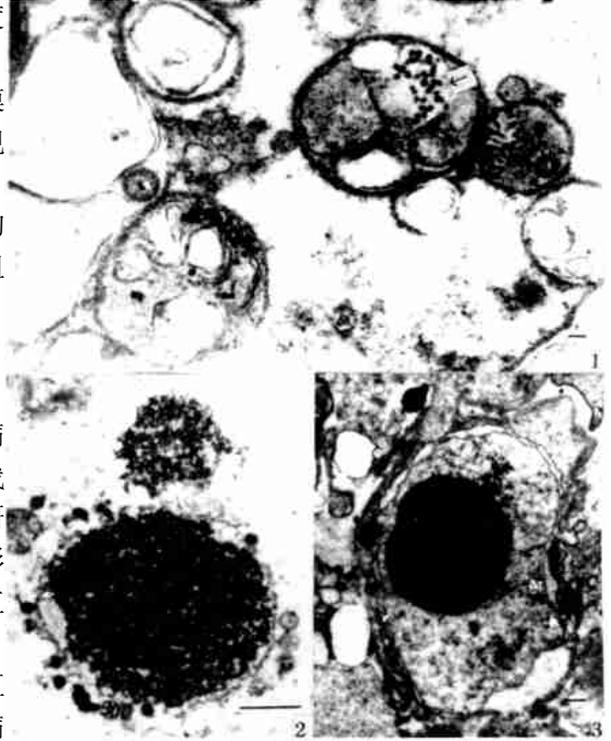
### 3 讨论

目前造成我国养殖对虾严重死亡的病毒主要是杆状病毒[高玮等 1996]，但在我们所用的对虾材料中未见此类病毒。本研究在中国对虾淋巴组织中发现了两种球形病毒。一种病毒粒子大，有囊膜，平均直径为 136nm，主要在细胞质中繁殖和成熟，与 Lightner 和 Redman[1993] 报道的对虾虹彩病毒相似。虹彩病毒是胞浆型 DNA 病毒，与痘病毒相似，而与其他 DNA 病毒不同，病毒主要在胞浆内增殖，形状为正二十面体，大小在 130~200nm 左右[殷震和刘景华 1997]，甲壳类动物、鱼类等都可感染这种病毒。鱼类感染虹彩病毒后，引起淋巴囊肿等病变，但对寄主没有致命的危害[Bergoin 等 1984, Richards 1977]。

小 RNA 病毒是一种小球形病毒，直径为 20~40nm，无囊膜，正二十面体结构，胞浆内增殖或成熟[殷震和刘景华 1997]。本文提到的小球形病毒与此相似，形状为正二十面体，大小为 33nm，无囊膜，病毒分布在细胞质中。在养殖的对虾淋巴细胞中还发现有该病毒的包涵体样结构。

病毒在体外培养的对虾淋巴细胞中没有明显的增殖现象，这有可能与细胞在体外培养时很少分裂有关。另外，细胞培养的条件，包括温度、pH 值等，可能不适于病毒的增殖。这方面的研究还有待进一步进行。本研究还发现，病毒在细胞质内的繁殖和大量堆积，造成细胞核肿大、核固缩、细胞器病变，导致淋巴组织松散、紊乱，淋巴器官肿大；推测病毒感染也可能会影响对虾细胞在体外培养时的生长与分裂。

美国亚利桑那大学 Lightner 博士曾协助我们进行病毒鉴定，周建玲女士也为此研究提供重要帮助，在此一并致谢。



图版 II Plate II

1. 体外培养的养殖对虾淋巴组织细胞溶酶体样结构中的无囊膜病毒粒子。直径 33nm，正二十面体。标尺:100nm。
2. 养殖对虾淋巴细胞质中的包涵体。标尺:500nm。
3. 感染病毒的养殖对虾淋巴细胞的核固缩。标尺:500nm。

## 参 考 文 献

- 高 玮, 张立人, 陈棣华. 1996. 对虾病毒病害的研究进展. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛海洋大学出版社. 111~118
- 殷 震, 刘景华(主编). 1997. 动物病毒学. 北京: 科学出版社. 1095~1103
- Bell T A, Lightner D V (eds). 1988. A handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Allen Press Inc. Lawrence, Kansas, U. S. A. 70~73
- Bergoin M, Mialhe E, Quiot J M. 1984. A chloridovirus (Iridoviridae) infection in populations of the planktonic crustacean *Daphnia magna* (Cladocera) from salt-marshes. C R Hebd. Seances Acad Sci III. Paris. 298(6): 139~142
- Lightner D V. 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 15(2): 579~601
- Lightner D V, Redman R M. 1993. A putative iridovirus from the penaeid shrimp *Protrachypene precipua* Burkenroad (Crustacea: Decapoda). J Invert Pathol. 62(1): 107~109
- Richards R. 1977. Diseases of aquarium fish. 2, skin diseases. Vet Rec. 101(7): 132~135
- Tong S L, Miao H Z. 1996. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues. Aquaculture. 147: 151~157

## VIRAL AND PATHOLOGICAL OBSERVATION IN CULTURED LYMPHOID TISSUES OF SHRIMP *PENAEUS CHINENSIS*

MIAO Hong-Zhi, TONG Shan-g-Liang, XU Bin<sup>1</sup>, JIANG Ming<sup>2</sup>, LIU Xiao-Yun<sup>2</sup>  
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003)  
(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, 266003)<sup>1</sup>  
(Test Center, Ocean University of Qingdao, 266003)<sup>2</sup>

**ABSTRACT** The lymphatic organ of shrimp *Penaeus chinensis* and the cultured lymphatic tissues from farmed and wild shrimps were examined under the transmission electronic microscope (TEM). The particles with envelope, which are icosahedron in shape and 136 nm in diameter, were found in the cytoplasm in all samples. It seemed to be the Iridovirus. Another virus was found in the cytoplasm of lymphatic tissue of farmed shrimp. The particles were icosahedron, 33 nm in diameter and without envelope, which seemed to be the Picornavirus. No significant replication of the viruses was found in the cultured cells. Pathological changes, including karyorrhexis, nuclear hypertrophy, cytoplasm vacuolization, tissues necrosis of lymphatic organ were also observed.

**KEYWORDS** *Penaeus chinensis*, Tissue culture, Iridovirus, Picornavirus