

# 鳃弧菌感染牙鲆的组织学和免疫组织化学观察

夏永娟<sup>1</sup> 黄威权<sup>1</sup> 姜国良<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 第四军医大学组织学与胚胎学教研室 西安 710032)

(<sup>2</sup> 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

**摘要** 利用免疫组织化学 ABC 法及组织学 HE 染色技术对鳃弧菌人工感染后的牙鲆肝组织及胃肠道进行了组织病理学及细菌的定位研究。结果显示,感染后肝细胞肿胀,空泡化现象严重,肝窦扩张,肝组织内可见阳性反应的细菌呈堆状存在;胃黏膜褶皱变矮,胃壁变薄,黏膜层内可见阳性反应的细菌;肠绒毛细胞出现破损,肠腔内有大量细胞碎片,肠腔内也可见阳性反应的细菌。提示:鳃弧菌可直接侵入组织细胞破坏组织结构,进而使鱼体出现死亡。

**关键词** 牙鲆鳃弧菌病,组织病理学,免疫组织化学

鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是养殖鱼类的主要细菌性病原体,可通过受损伤的皮肤及伤口感染鱼体,发病快,死亡率高。目前,国内外有关此病的研究多限于病原微生物学方面,所涉及的鱼种主要有鳊、虹鳟、大马哈鱼、真鲷、香鲷等<sup>[1]</sup>。本文从组织细胞学水平探讨牙鲆鳃弧菌病的组织病理变化并且定位细菌侵入的部位,为弧菌性鱼病的诊断及防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物

牙鲆:20尾,3月龄,体长5cm左右,体重4.7±2g。购自山东威海海珍品公司。实验时间:1999年3月28日至1999年5月10日。养殖条件:新鲜海水臭氧消毒后备用,水族箱水体量为30cm×30cm×10cm。自动增氧机使氧气保持充分,温度20.0±1.0℃。实验期间鱼不进食。暂养1周无任何异常后使用。

### 1.2 菌株

鳃弧菌 *V.anguillarum* 标准菌株(ATCC 19019)由青岛海洋大学海洋生命学院提供,菌株经2216E培养基培养24h后,无菌生理盐水洗下,以1×10<sup>8</sup>个/ml腹腔注射法接种鱼体。

### 1.3 试剂

鼠抗鳃弧菌单克隆抗体由本教研室自制(已经鉴定);ABC试剂盒为武汉博士德公司产品。

### 1.4 蜡块制备

鱼体接种细菌2d后有明显症状时,分别取肝脏及胃肠道,切成小块,入Bouin液固定24h以上,分别入100%、95%、90%、80%、70%的乙醇脱水,石蜡包

埋,用Reichert-Jung(英国产)切片机制成4μm厚的切片,将切片贴在预先涂有铬矾明胶的载玻片上,37℃温箱中烘干备用。

### 1.5 免疫组化 ABC 法染色程序

石蜡切片经二甲苯脱蜡15min。加入100%的乙醇2次,每次5min。0.3%甲醇-双氧水孵育30min去除内源性过氧化物酶,0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.4)洗涤5min;滴加正常羊血清(1:200稀释)室温下封闭背景30min;弃去封闭血清,加鼠抗鳃弧菌单克隆抗体(1:200稀释),4℃冰箱孵育过夜;PBS洗涤3次,每次5min,加生物素化的羊抗鼠IgG抗体(1:200稀释),室温下孵育1h;PBS洗涤3次,每次5min,加ABC复合物(1:100稀释),室温下孵育30min;PBS洗涤4次,每次5min,DAB显色。Olympus显微镜观察并拍照。用正常鼠血清取代第1抗体进行孵育作对照试验。

### 1.6 HE 染色

常规HE染色,Olympus显微镜观察并拍照。

## 2 结果

### 2.1 病理解剖

人工感染24h内无肉眼可见症状,48h以后可见,体色加深,体表发炎,口腔、下颌及腹部有出血点,肛门红肿。解剖后发现,肝、肾肿大,肝呈土黄色,胃肠道肿胀,内有黄色黏液,腹腔内有腹水。

国家863计划资助项目819-06-02号。

收稿日期:1999-11-26;修回日期:2000-06-01

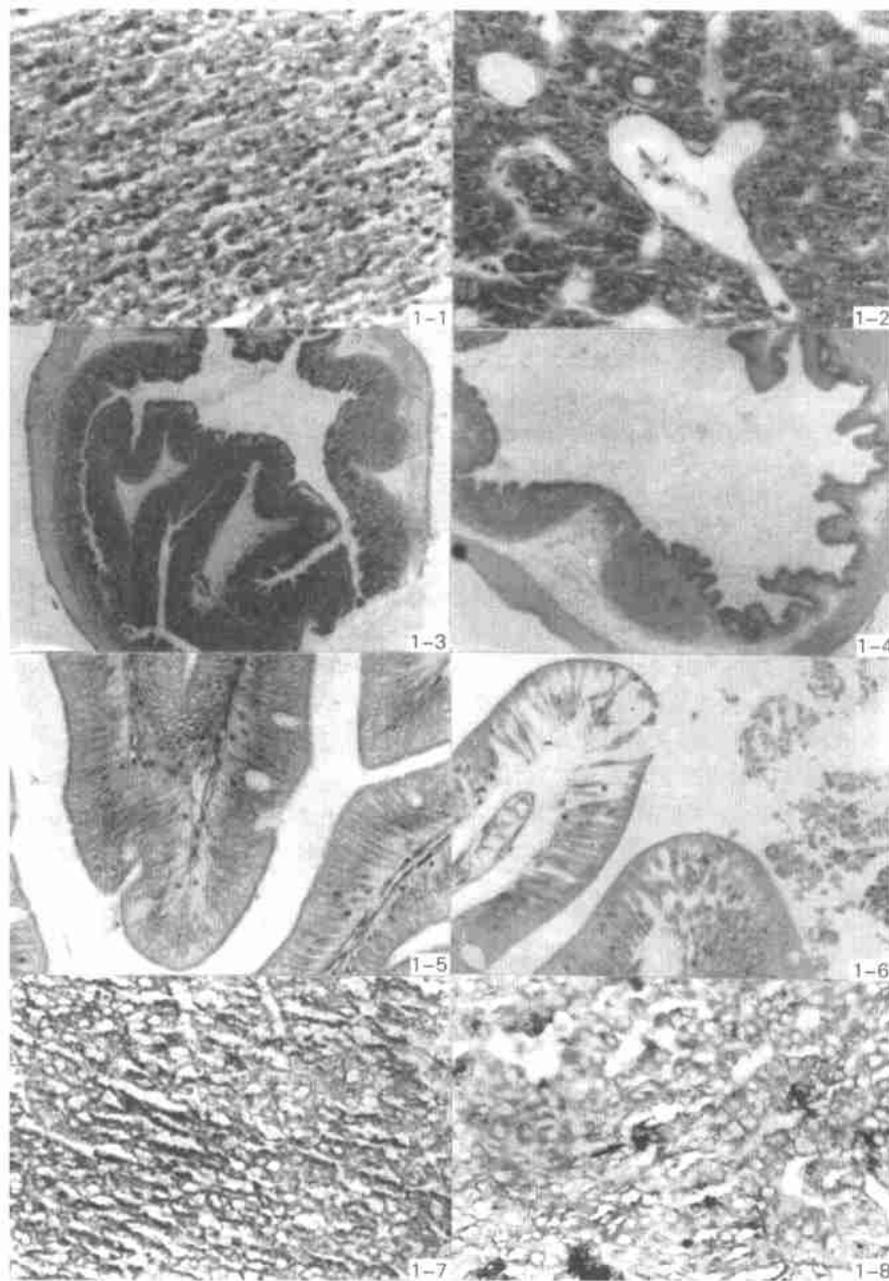


图1 牙鲆鳃弧菌病的组织病理学

Fig.1 Histopathological figure of flounder infected by *Vibrio anguillarum*

1-1 正常肝组织 HE 染色结果 × 400; 1-2 感染后的肝组织 HE 染色结果 肝细胞肿胀, 肝窦扩张, × 400; 1-3 正常胃组织 HE 染色结果 可见胃黏膜褶发达, × 200; 1-4 感染后的胃组织 HE 染色结果 可见胃黏膜褶减弱, 胃壁变薄, × 400; 1-5 正常肠绒毛的结构 HE 染色, × 400; 1-6 感染后的肠绒毛结构 可见细胞破裂, 肠腔内有许多细胞碎片, HE 染色 × 400; 1-7 正常肝组织免疫组化染色结果, × 400; 1-8 感染后的肝组织免疫组化染色结果 棕色阳性反应物呈小堆状存在(→), × 400。

1-1 HE staining results of normal liver, × 400; 1-2 HE staining results of infected liver, hepatocytes were inflated and sinusoids were enlarged, × 400; 1-3 HE staining results of normal stomach, mucosa folds were flourished, × 200; 1-4 HE staining results of infected stomach, mucosa folds became weaken, stomach wall became thinner, × 400; 1-5 Structure of normal intestinal villi. HE × 400; 1-6 HE staining results of infected intestinal villi, cells broken and intestinal lumen was filled with cell fragments, × 400; 1-7 Immunohistochemical results of normal liver, × 400; 1-8 Immunohistochemical results of infected liver, positive bacterial clumps were detected(→), × 400.

## 2.2 组织病理学

牙鲆的肝脏没有肝小叶结构,细胞呈索状排列,细胞索间有窦状隙(肝窦),肝板清晰,肝细胞排列紧密。同正常对照组相比,人工感染后的牙鲆肝实质结构破坏明显,肝细胞肿胀,体积增大约2~3倍,肝细胞空泡化现象严重,肝窦扩张,肝窦中枯否氏细胞增多(图1-1,1-2)。牙鲆的胃组织有黏膜层和肌层构成,感染后胃黏膜未见脱落,只是胃壁变薄,胃黏膜褶变矮(图1-3,1-4),胃腔扩大(可能由于胃内充盈黏液所致)。肠道由黏膜层、黏膜下层和肌层组成,病变后黏膜出现脱落现象,肠绒毛顶端细胞有破损脱落现象,肠腔内可见大量组织碎片(图1-5,1-6)。

## 2.3 免疫组织化学

鳃弧菌感染后的牙鲆肝脏及胃肠道均可见阳性反应物单个或成堆存在,反应物呈深棕色,短杆状,稍弯,两端圆形,与鳃弧菌菌体形态一致;菌体周围深染,中央未着色,说明所用单抗针对的是细菌的表面抗原(图1-8)。肝组织中阳性反应物主要分布在肝窦周围,其他区域也有不同程度的分布。胃肠道中阳性反应物主要分布在黏膜层,脱落的肠绒毛碎片中阳性反应物较多。正常肝组织及胃肠道未见阳性反应物(图1-7)。对照试验呈阴性反应。

## 3 讨论

鳃弧菌鱼病的研究,以往多集中在病原微生物方面,主要是对细菌进行分离、鉴定及再感染试验等<sup>4,5</sup>。本文从解剖学及组织学的角度出发,对人工感染的牙鲆鳃弧菌病进行了病理组织学研究。结果发现:肝脏及胃肠道皆有明显病理改变,肝细胞肿胀,体积明显增大,肝窦隙扩大;胃黏膜褶减弱;肠绒毛黏膜层细胞

出现破裂,肠腔内有大量细胞碎片。这些结果说明鳃弧菌可能通过损害组织细胞而引起牙鲆死亡。

免疫组织化学技术是利用抗原抗体反应在微观世界原位地确定组织及细胞结构化学成分的特点,其特点是:定性可靠,定位准确,定量可能<sup>1</sup>。目前,对鳃弧菌鱼病的检测,除了传统的细菌分离鉴定外,国外也有学者利用点杂交、核酸探针等新技术。1999年,Ciuchini P<sup>3</sup>等利用免疫组织化学技术对鳃弧菌感染后的小鼠和猪的各种组织进行了研究,取得了良好效果,说明此方法完全可用于细菌性鱼病的研究。本试验利用作者自制的特异性的抗鳃弧菌单克隆抗体对鳃弧菌人工感染后的牙鲆肝脏及胃肠道进行了细菌定位研究,结果显示,肝脏及胃肠道皆有阳性反应的菌成堆存在,其中肝脏及肠黏膜中阳性反应的细菌最多,胃黏膜中相对较少。以上结果说明受累器官的细胞肿胀或受损是由于细菌在组织细胞内大量繁殖的结果。

本实验首次探索利用免疫组织化学技术检测鳃弧菌,证明完全可行。鳃弧菌感染牙鲆后,其各种组织器官都有可能发生病理改变,具体的病理生理学研究有待进一步深入。

### 参考文献

- 1 刘彦仿. 免疫组织化学. 北京:人民卫生出版社出版, 1990, 1~3
- 2 黄琪琰. 水生动物疾病学. 上海:上海科学技术出版社, 1996, 126~128
- 3 Ciuchini F., Adone R., Piccininno G. et al. . *Zentmlbl Vete nna rned*, 1999, **46**(4): 271~277
- 4 Pedersen K., Kuhn I., Seppanen J. et al. . *J. Appl. Microbiol.*, 1999, **86**(2): 337~347
- 5 Westerdahl A., Olsson J.C., Conway P.L. et al. . *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.*, 1997, **41**(4): 403~409

# HISTOPATHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF FLOUNDER INFECTED BY *Vibrio anguillarum*

XIA Yongjuan<sup>1</sup> HUANG Weiquan<sup>1</sup> JIANG Guoliang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Department of Histology and Embryology, Fourth Military Medical University, Xian, 710032)

(<sup>2</sup> College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, 266003)

Received: Nov. 26, 1999

Key Words: *Vibrio anguillarum* of flounder, Histopathology, Immunohistochemistry

## Abstract

Liver and gastrointestinal tract of flounder infected by *Vibrio anguillarum* was studied using immunohistochemical ABC method and HE staining. The results showed that hepatocytes were inflated, sinusoids were enlarged, stomach mucosa folds

were weaken, stomach wall became thinner, intestinal villi cells were broken and intestinal lumen was filled with cell fragments. Immunoreactive positive bacterium clumps were detected in liver, stomach mucosa and intestinal lumen. These results indicated that *V.anguillarum* can directly invade tissues and cells to destroy their structure and last make fishes dead.

( 本文编辑 :张培新)