

## 迟缓爱德华氏菌对牙鲆免疫器官的影响\*

刘 云 姜 明 姜国良 杨 栋 张士瑾

(青岛海洋大学 266003)

**提要** 当经口腔灌注大量迟缓爱德华氏菌后,牙鲆的头肾和脾脏内的免疫细胞活性增强,表现为单核细胞数量增加,颗粒细胞内产生大量的颗粒以及颗粒吞噬作用的增强。研究结果还表明,病菌也会对免疫器官产生损害,可造成细胞水肿,膜性结构破坏及细胞坏死。本文详细观察了牙鲆肾、脾、肝、肠及血液的显微结构和肾、脾、肝的超微结构的变化,研究结果对疫苗的应用提供了良好的细胞学基础。

**关键词** 迟缓爱德华氏菌,牙鲆,免疫器官

随着鱼类人工养殖规模的不断扩大,鱼类病害也逐渐增多。据 Plumb J. A. 1994 年报道,迟缓爱德华氏菌病(*Edwardsiella ictaluri*)是流行于淡水和海水鱼类的一种常见细菌病。有关鳗鲡的迟缓爱德华氏菌病病原学和组织病理学研究已见郭琼林等 1995 年,韩先朴等 1995 年的报道,而海水鱼类牙鲆的迟缓爱德华氏菌病是由 Yasunaga 等于 1982 年首次报道,主要表现为腹水,肝、肾出血、肥大,现在这种病已经成为海水

人工养殖牙鲆的危害较重的三大疾病之一<sup>[1]</sup>。据李亚南等 1995 年报道,由于鱼病的产生是鱼体本身免疫机能受抑制的结果,因此研究病菌与鱼体免疫之间的关系,疫苗与鱼体免疫之间的关系极具理论和应用价

\* 国家重点基础研究发展规划(973)项目课题 G1999012006 号;国家海洋 863 项目 819-02-06 号。

收稿日期:2000-06-28;修回日期:2000-07-18

值,然而这方面的报道尚不多。作者利用光学显微与电子显微镜技术研究了迟缓爱德华氏菌对牙鲆 (*Pamlichthys olivaceus*) 免疫器官的影响和病理学变化,并将研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验鱼

牙鲆幼鱼购于山东威海海珍品养殖公司,平均体长 15 cm,每次购得的幼鱼都置于 9 L 水族箱暂养 1 周左右,换水,水温控制在  $21 \pm 1$  °C,充氧并用颗粒饵料饲喂。正式实验时停止饲喂。

### 1.2 迟缓爱德华氏菌

迟缓爱德华氏菌来自天津动植物所。将迟缓爱德华氏菌活化、复壮、分离转接淡水的 2216 E 斜面,  $25 \sim 27$  °C 培养 48 h 后,用无颗粒生理盐水洗下菌苔,配成  $5.5 \times 10^8$  CFU/ml 悬液,口灌 0.1 ml, 24 h 后取材,同时设置对照组。

从腹水明显的病鱼中分离病菌,进行特征鉴定检验,同时在  $-20$  °C 冷冻干燥保存。

光镜样品取材包括肾、肝、脾和肠等器官组织,用 Bouin 氏液固定、脱水、石蜡包埋,切片  $7 \mu\text{m}$ , Harris 苏木精-曙红 (H.E) 染色;同时取血液样品,空气干燥,瑞氏染色,欧林巴斯显微镜观察摄影;电镜样品取头肾、脾和肝切成  $0.5 \text{ mm}^3$  小块,用 2.5% 戊二醛预固定和 1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水, Epon 812 包埋, LKB 超薄切片机切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,日立-7000 型透射电镜观察及摄影。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的特征

革兰氏阴性杆菌,菌体直、单个。  $25 \sim 28$  °C 培养 24 h 菌体  $(0.6 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (0.8 \sim 2.4) \mu\text{m}$ , 多数为  $(0.7 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (1.1 \sim 1.4) \mu\text{m}$ , 随培养时间延长菌体缩短。长时间培养菌体会有很多呈球形。具有周鞭毛,可运动,无荚膜,无芽孢。在普通培养基上  $25 \sim 28$  °C 培养 48 h 菌落直径为 0.5 mm 左右,正圆形灰白色透明隆起,周缘光滑。能在 SS 培养基上生长。

### 2.2 主要免疫器官及组织的显微结构的变化

2.2.1 肾 牙鲆的肾由头肾和中肾组成,头肾为淋巴样组织,中肾为泌尿组织,感染迟缓爱德华氏菌后,肾间质内的造血组织明显增多,肾间质呈现条索状(图 1-1);肾小体血管球充血、变形,甚至解

体;血球囊增宽;肾小管特别是近曲小管上皮细胞坏死,细胞间隙不清,细胞质内出现空泡,肾小管与周围间质组织分离,有的已经完全解体成碎片,夹杂于间质组织之中(图 1-2)。

2.2.2 脾 脾的脾索呈现萎缩的条索状,脾髓内充满了红细胞,白髓萎缩(图 1-3)。

2.2.3 肝 牙鲆的肝实质组织变化明显。正常的肝组织肝板清晰,肝细胞多角形,排列紧密(图 1-4)。感染后,肝组织以中央静脉为中心呈灶性病变,细胞索间隙增大,肝窦中枯否氏细胞增多(图 1-5),血管亦发生扩张和空泡化。

2.2.4 肠 肠的变化不大,只是表现在肠黏膜上的黏液细胞膨胀(图 1-6),除此之外,未见异常。

2.2.5 血液 感染后,血液中的白细胞数量上变化较大,淋巴细胞由 67.6% 降低到 53.2%,而单核细胞的数量却从 21.2% 增加到 38.2%, T 检验差异显著 ( $P < 0.001$ ),粒细胞的数量变化不显著。

### 2.3 主要免疫器官的超微结构变化

2.3.1 头肾 头肾内细胞变化主要表现为(1)单核细胞的细胞质空泡化(图 1-7);(2)颗粒细胞的小型颗粒异常增多,大型颗粒由单位膜包围,内质不均匀,有的有内含物,有的已经空泡化(图 1-8、1-9);(3)颗粒细胞的细胞核异质化降低,核膜部分溶解(图 1-8、1-9);(4)髓样体颗粒增多(图 1-10)。

2.3.2 脾 红细胞的核膜肿胀,颗粒细胞溶解,大量颗粒散在间质之中(图 2-1);巨噬细胞细胞质内空泡化并有吞噬红细胞的现象(图 2-2);部分颗粒细胞的细胞核的染色质在核浆内散乱分布;核膜部分溶解,有的整个核裂解(图 2-3)。线粒体数量减少,内嵴肿大,局部断裂、空泡化;内质网变形,膜上颗粒脱落,严重时膨胀成泡状。

颗粒细胞的颗粒变化更加多样化:有包裹细胞碎片的电子密度极高的大型颗粒(图 2-1、2-3),有在均质颗粒内具有较高电子密度芯的中型颗粒,有无单位膜包围的低密度小型颗粒(图 2-4),大量细小颗粒(图 2-3)以及空泡化的颗粒(图 2-4)。

2.3.3 肝 肝细胞间分界不清晰,只在肝细胞与肝细胞间接近血窦处,可见到桥粒结构,肝细胞的细胞核多数表现为染色质散乱,有空泡,核仁消失,部分核膜溶解、变形;肝细胞质内有多个灶性坏死病灶,大量线粒体肿胀成圆形,内嵴变形、溶解以至消失,严重者整个线粒体呈空泡化(图 2-5);脂滴较多,部分内

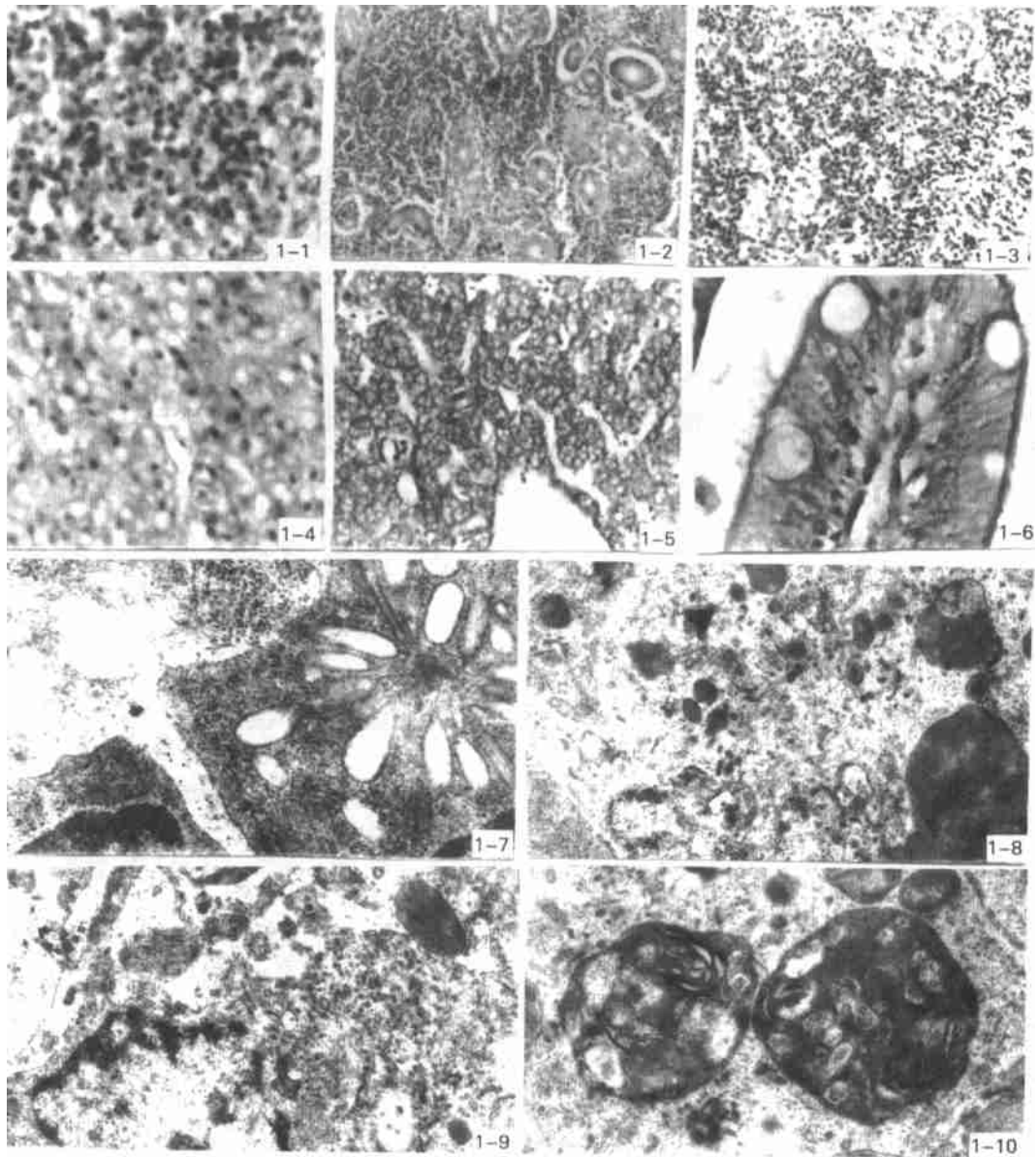


图1 迟缓爱德华氏菌对牙鲆免疫器官的影响

1-1 感染后牙鲆的头肾×250;1-2 感染后牙鲆的中肾,示血管球变形,血球囊增宽,近曲小管解体×125;1-3 感染后牙鲆的脾,示红髓和白髓×250;1-4 正常牙鲆的肝×500;1-5 感染后牙鲆的肝,示静脉扩张,肝细胞索状分布×250;1-6 感染后牙鲆的肠,示膨胀的黏液细胞×250;1-7 感染后的头肾内的单核细胞,示空泡×22 000;1-8 感染后的头肾内的颗粒细胞,示细胞核部分溶解,小型颗粒增多,大型颗粒空泡化×9 900;1-9 感染后头肾内的颗粒细胞,示细胞核膜溶解,颗粒不均匀×9 900;1-10 感染后的头肾内的颗粒细胞,示髓样颗粒×13 400。

Fig.1 Effect of injection of *Edunksiella tarda* on the immune organ of Bastard halibut (*Pamlichthys olivaceus*)

1-1 The head kidney of *Pamlichthys olivaceus* after infection×250; 1-2 The kidney of *Pamlichthys olivaceus* after infection, showing glomus deformed, vascular sac enlarged and proximal convoluted tubule dissolved×125;1-3 The spleen of *P. olivaceus* after infection, showing red pulp and white pulp×250; 1-4 The normal liver of *P. olivaceus*×500;1-5 The liver of *P. olivaceus* after infection, showing vein enlarged, liver cells distributed in strip×250;1-6 The gut of *P. olivaceus* after infection, showing swollen mucous gland×250; 1-7 The head kidney of *P. olivaceus* after infection, showing vesicular monocytes×22 000; 1-8 The head kidney of *P. olivaceus* after infection, showing granulocytes' nucleus dissolved partially, small granule increased and large vesicular granule×9 900; 1-9 The head kidney of *P. olivaceus* after infection, showing granulocytes' nuclear membrane dissolved and uneven granules×9 900;1-10 The head kidney of *P. olivaceus* after infection, showing marrowlike granulocytes×13 400

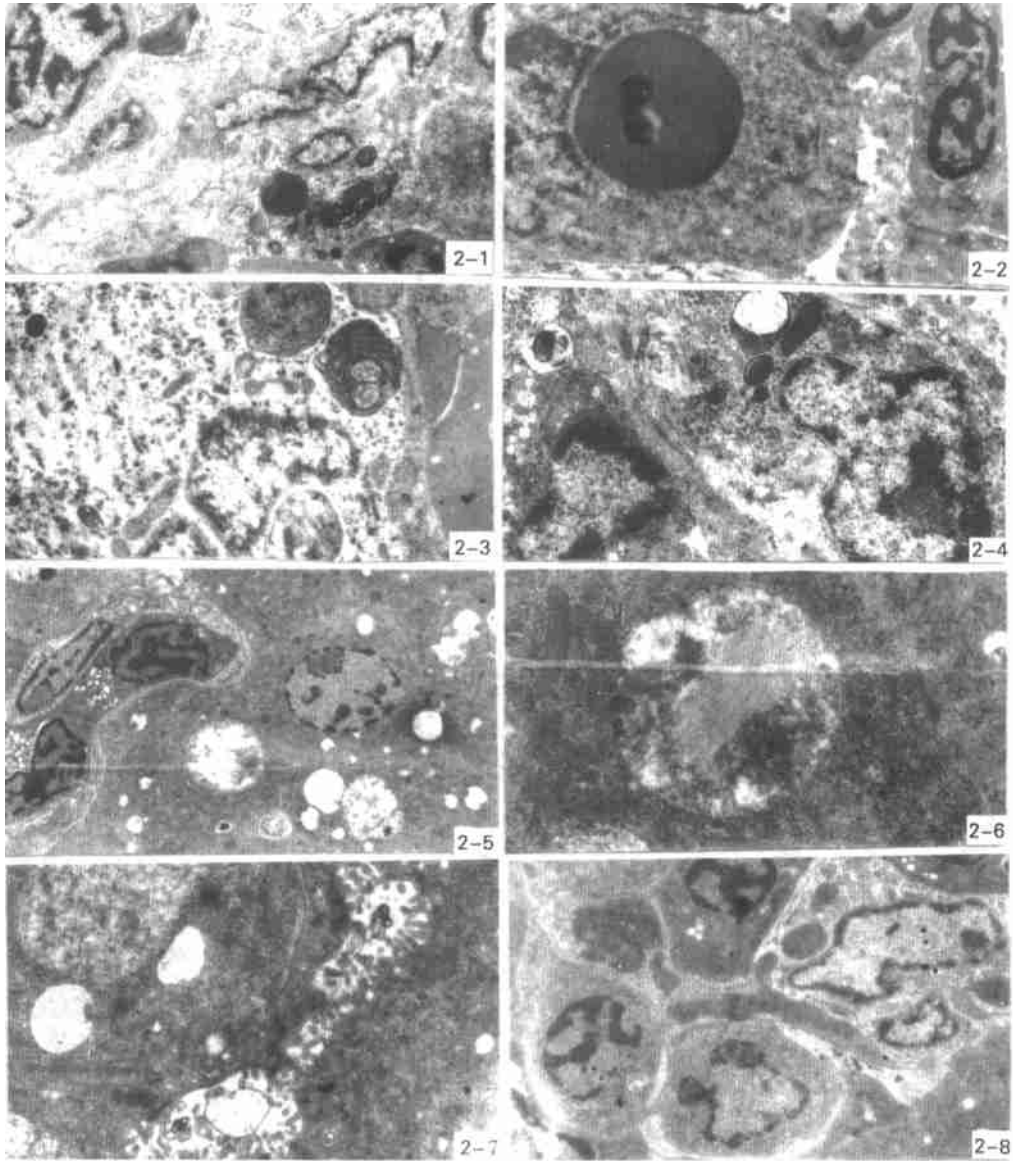


图2 迟缓爱德华氏菌对牙鲆免疫器官的影响

2-1 感染后的脾,示红细胞和粒细胞×5 500;2-2 感染后的脾,示巨噬细胞吞噬红细胞×6 600;2-3 感染后牙鲆的脾,示细胞核溶解,线粒体肿大×7 700;2-4 感染后牙鲆的脾,示空泡化颗粒及密度较高颗粒×8 800;2-5 感染后牙鲆的肝×3 300;2-6 感染后牙鲆的肝,示包含絮状物的次级溶酶体×9 900;2-7 感染后牙鲆的肝血窦,示断裂的指状微绒毛、髓样小体及桥粒×7 700;2-8 感染后牙鲆的肝血窦内的免疫细胞,示淋巴细胞和粒细胞×5 500。

Fig.2 Effect of injection of *Edwardsiella tarda* on the immune organ of Bastard halibut (*Pamlichthys olivaceus*)

2-1 The spleen of *Pamlichthys olivaceus* after infection, showing erythrocytes and granulocytes × 5 500; 2-2 The spleen of *P. olivaceus* after infection, showing macrophage was swallowing erythrocyte × 6 600; 2-3 The spleen of *P. olivaceus* after infection, showing nucleus dissolved and mitochondria swollen × 7 700; 2-4 The spleen of *P. olivaceus* after infection, showing vesicular granules and high density granules × 8 800; 2-5 The liver of *P. olivaceus* after infection × 3 300; 2-6 The liver of *P. olivaceus* after infection, showing waddinglike secondary lysosome × 9 900; 2-7 The liver hepatic sinusoid of *P. olivaceus* after infection, showing broken fingerlike villus, marrowlike little body and desmosome × 7 700; 2-8 The liver hepatic sinusoid of *P. olivaceus* after infection, showing lymphocytes and granulocytes × 5 500

质网扩张, 膨胀成小的空泡; 溶酶体极度膨胀成大圆形, 包含颗粒内含物或絮状物, 次级溶酶体增多 (图 2-6); 肝脏中肝细胞的基浆电子密度变淡。肝血窦的内皮细胞消失, 肝细胞指状微绒毛缩短、断裂, 部分溶解; 有的血窦中还可以见到髓样小体 (图 2-7)。

肝血窦内的免疫细胞也有变化: 淋巴细胞、单核细胞的内嵴断裂, 线粒体肿胀成圆形, 严重者已经空泡化; 颗粒细胞内的线粒体嵴断裂、膨胀, 内质网溶解, 核糖体脱落且部分游离核糖体消失, 颗粒细胞均质, 有少数颗粒内有极细颗粒内含物 (图 2-8)。

### 3 讨论

鱼类在抵抗病原菌的侵袭时, 机体自身存在着非特异性防御系统和特异性防御系统。据安得森, D. P. 1984 年报道, 一旦病原菌侵入鱼体, 就会出现 3 种结果, 一是病原菌不断增殖, 鱼死亡; 二是鱼体的防御机能消除了病原菌; 三是病原菌和鱼体之间保持平衡, 成为带菌状态。据 Hari Suprpto 等 1995 年报道, 迟缓爱德华氏菌细胞外产物及菌体成分均含有毒素, 牙鲆迟缓爱德华氏菌的靶器官主要是肝脏和肾脏<sup>[2]</sup>。迟缓爱德华氏菌侵入后, 释放其胞外和胞内毒素, 刺激肠黏膜分泌大量黏液, 黏液中的蛋白水解酶等物质可以杀灭病菌, 病菌进入血液循环后, 血液中的单核细胞剧增, 可在病灶处迅速发挥吞噬作用, 免疫器官如脾脏和肾脏的造血组织增生, 特别是颗粒细胞的变化较大, 一方面有大量的小型颗粒产生, 另一方面大型颗粒细胞的吞噬功能增强, 常出现吞噬小体和自噬小

体。但是, 病原菌在刺激鱼体防御机能功能增强的同时, 免疫功能受到了抑制, 如血液中的淋巴细胞数量急剧下降; 免疫器官实质结构也在改变, 主要表现为肾间质及脾索呈现条索状, 细胞间隙扩大和部分细胞解体等; 同时, 超微结构研究的结果也显示, 头肾、脾脏和肝脏内的单核细胞的细胞质空泡化; 颗粒细胞的核膜部分溶解, 所有免疫细胞内大量线粒体已经肿胀, 内嵴变形或溶解等, 部分内质网扩张, 膨胀成小的空泡; 溶酶体极度膨胀成大圆形, 内质网、溶酶体和指状微绒毛等断裂、水肿或溶解等, 因而许多正常的生化反应不能进行, 血液病理学研究的结果如血清总蛋白、胆固醇含量降低以及谷丙转氨酶、谷草转氨酶活力的增强等也证明了这一点 (另文)。所以, 当口灌 0.1 ml 迟缓爱德华氏菌 24 h 后, 病原菌在鱼体内不断增殖并侵入鱼体肾和肝等部位, 从而影响肝、肾行使正常功能, 最终导致鱼病的发生, 本项研究结果与 Rashid, M. M. 等<sup>[1]</sup>所做病原入侵的组织定位结果相印证。根据以上结果作者进一步推测, 迟缓爱德华氏菌的致病原将导致对鱼类免疫器官的损害, 而其免疫原可以促进免疫细胞的活性增加, 关于这一点, 作者还将在研究疫苗免疫的过程中进一步进行验证。

### 参考文献

- 1 池上裕治. 养殖, 1996, 33(11): 74 ~ 75
- 2 Rashid M. M., Nakai T., Muroga K. et al. Fish Sci., 1997, 63(3): 384 ~ 387

## EFFECT OF INJECTION OF *Edwardsiella tarda* ON THE IMMUNE ORGAN OF BASTARD HALIBUT (*Paralichthys olivaceus*)

LIU Yun JIANG Mng JIANG Guoliang YANG Dong ZHANG Shi-cui  
(Ocean University of Qingdao, 266003)

Received: Jun., 28, 2000

Key Words: *Edwardsiella tarda*, Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*), Immune organ

### Abstract

After Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) was poured in *Edwardsiella tarda* through mouth, the immunocyte's immunocompetent of pronephros and spleen increased because the number of monocytes added and large granule's inchoordination strengthened, also many small granules produced in granulocytes. But the bacteria can also damage the immune cell, such as cell hydrops, membrane structure destruction and cell necrosis. The structure of pronephros, spleen, liver, gut and blood and ultrastructure of pronephros, spleen and liver were described. The results will provide good cell morphology basis when using vaccine. (本文编辑:刘珊珊)