

# 中国对虾淋巴组织培养细胞中立克次氏体增殖的形态学研究\*

## STUDY ON THE MORPHOLOGY OF THE GENERATION OF THE RICKETTSIALES IN CULTURED LYMPHOID TISSUES OF SHRIMP *Penaeus chinensis*

汪 岷<sup>1</sup> 姜 明<sup>2</sup> 樊廷俊<sup>1</sup> 刘晓云<sup>2</sup> 汪晓峰<sup>1</sup> 徐怀恕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 青岛海洋大学生命学院 266003)

(<sup>2</sup> 青岛海洋大学测试中心 266003)

**关键词** 中国对虾,立克次氏体,淋巴组织,组织培养

自 1996 年以来,引发对虾病害发生和流行的病原体日趋复杂,病毒、原核生物的混合型感染成为病害的主要特点。立克次氏体是一种原核生物,是导致对虾发病的重要病原体之一。目前关于对虾立克次氏体病原的研究国内外系统报道的较少,现有报告主

要是自然发病的对虾个体的病灶组织病原体的检测

---

\* 国家“863”课题资助项目 819-04-04 号;联合国教科文组织资助项目 UNESCO 861.359.8 号。

收稿日期:2000-01-14;修回日期:2000-01-21

以及病理学的研究<sup>[1]</sup>。在对虾细胞培养环境条件下,立克次氏体的增殖方式及致病性等方面的研究尚未见报道。作者在细胞培养条件下,系统地研究了立克次氏体的形态、病理及其增殖规律。本文报道中国对虾淋巴组织培养细胞中立克次氏体增殖的形态学研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用对虾为中国对虾 (*Penaeus chinensis*),于1999年的9~10月采自青岛地区对虾养殖场活对虾。养殖对虾体长为10~11 cm。

### 1.2 方法

1.2.1 淋巴组织的组织培养 将对虾放于消毒海水(其中含有青霉素1 000 IU/ml,链霉素1 000 μg/ml)中过夜,再用70%的酒精浸泡20~30 s,进一步消毒体表,在无菌条件下摘取淋巴器官,放入自制的对虾培养基(Medium of Penaeid Shrimp, MPS)。培养基内含有青霉素200 IU/ml,链霉素200 μg/ml。将组织剪碎成1 mm<sup>3</sup>左右的碎块,放入25 cm<sup>2</sup>进口塑料培养瓶中,加入MPS生长培养基(含20%小牛血清)5 ml,在21℃培养箱中培养。每3~4 d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 用培养液将培养瓶内贴壁生长的对虾淋巴组织细胞洗3次,用细胞刮刀将培养的细胞刮下,放入4℃的2.5%戊二醛固定。用2.5%磷酸盐缓冲液(pH 7.0)漂洗3次后再用1%锇酸溶液固定、梯度乙醇脱水、Epon812树脂包埋、LKB超薄切片、醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,样品在日立H-7000型透射电镜下观察并摄影。

## 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,肝胰腺、心脏未发现异常,但有些个体的淋巴器官肿大。体外对虾淋巴器官培养细胞为成纤维样贴壁细胞,在培养3 d后细胞内出现颗粒,并逐渐增多,培养液未见混浊。培养2周左右,部分细胞脱落。

### 2.2 电镜检查

培养2周左右,将仍然贴壁的细胞刮下,进行超薄切片和透射电镜观察。研究表明,大量立克次氏体

布满培养细胞的细胞质(图1-1),大小约0.2~0.9 μm,细胞核内未发现立克次氏体(图1-2),表明立克次氏体主要在细胞质内增殖。同时,我们还观察到立克次氏体的增殖方式,有的进行典型的二分裂,在个体中央横裂成两个相等大小的子代(图1-3),也可不对称地在偏于一端处分裂(图1-4),有时延长的立克次氏体可出现多个分裂点(图1-4);有的立克次氏体呈典型的出芽生殖(图1-2),以出芽方式进行增殖的立克次氏体形成小球形的个体,直径0.1 μm左右,电子密度较高。立克次氏体一般在包涵体内增殖,包涵体周围包有一层膜,内部有大量不同形态、大小和电子密度的立克次氏体(图1-1)。在包涵体之外,也可观察到许多散在的立克次氏体(图1-5)。从立克次氏体增殖的形态学研究表明,立克次氏体在培养细胞内增殖的规模大且速度快,大量增殖的立克次氏体充满细胞质,对细胞结构造成了不同程度的损害,表现为细胞膨大或变形,细胞器溶解(图1-6)。

## 3 讨论

立克次氏体在对虾淋巴组织培养细胞中增殖的方式,主要有2种,一种是典型的二分裂增殖,一种是出芽增殖。以二分裂方式进行的增殖形成较大的个体,以出芽方式进行的增殖则形成电子密度较高的小球形个体。两种个体在感染能力等方面是否有差别,还有待于进一步的研究。

某些立克次氏体可以在细胞核内繁殖,但本文未在细胞核内发现立克次氏体,而在细胞质内发现大量立克次氏体,作者认为对虾立克次氏体不易通过核膜或者是细胞质较细胞核更利于立克次氏体繁殖。在细胞质内我们观察到大量包涵体,包涵体的膜可能是细胞膜,是立克次氏体进入细胞时,由于细胞胞饮作用而形而增大,机理还不清楚。立克次氏体在培养细胞中以散在的和包涵体的方式存在,其形态较组织内的立克次氏体形态更为多样。

立克次氏体感染细胞,造成培养细胞的病变及死亡,表明立克次氏体具有一定的感染能力及致病性,可以导致细胞死亡。立克次氏体在培养细胞中快速和大面积感染的机理有待于深入研究。

上述研究结果表明,我们在实验室环境下实现了研究立克次氏体及其增殖方式的可能性,为我们进一步研究立克次氏体的增殖规律及致病途径提供了有

效的研究条件,对深入开展对虾病害综合防治具有重要意义。

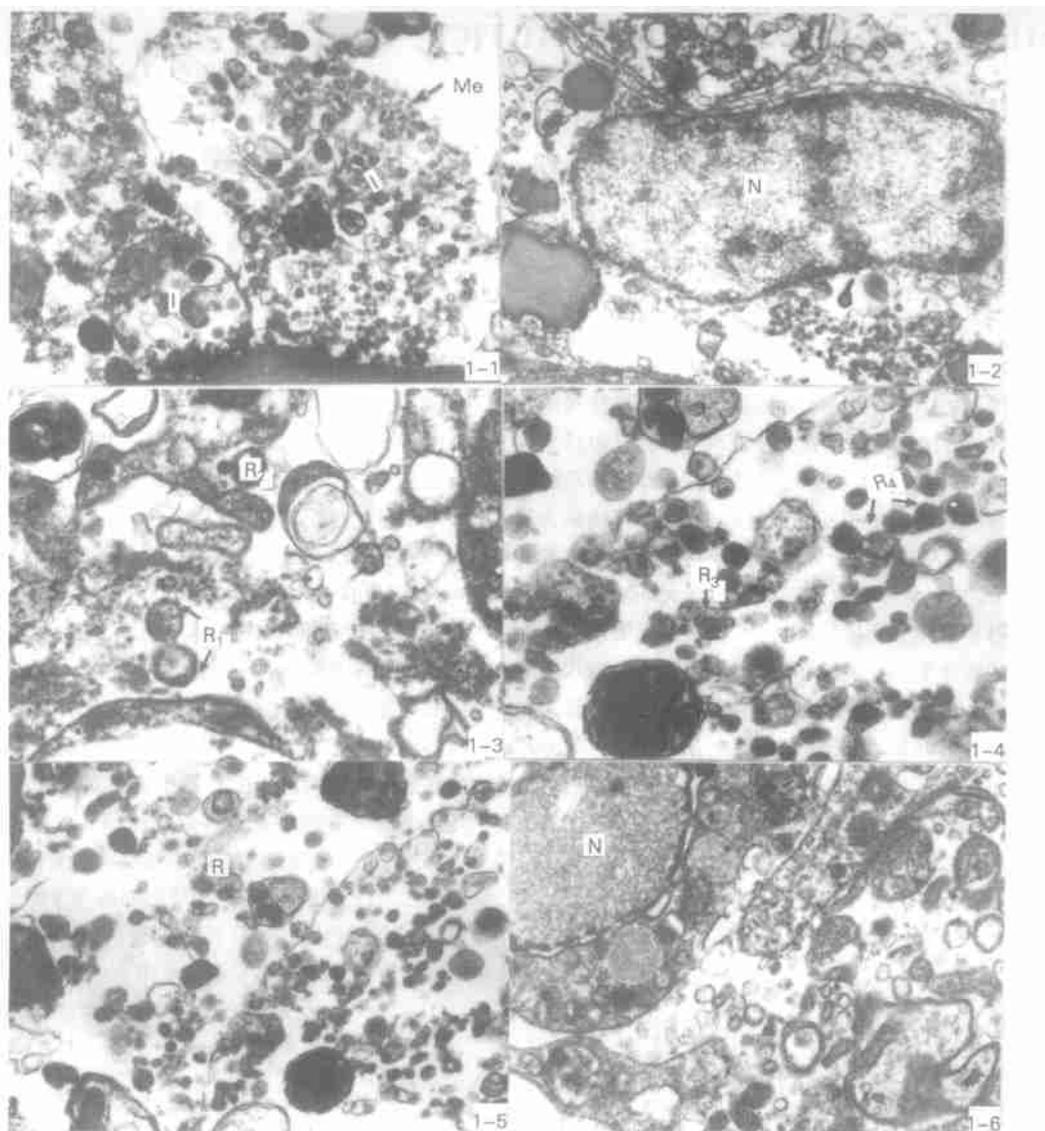


图1 中国对虾淋巴组织培养细胞中的立克次氏体及感染立克次氏体细胞的细胞核电镜照片

1-1 电镜观察下的中国对虾淋巴组织培养细胞的细胞质中大量立克次氏体(R)及其包涵体(I),Me包涵体的膜( $\times 13\ 000$ );1-2 在细胞核(N)内未观察到立克次氏体( $\times 8\ 800$ );1-3 在个体中间正在进行二分裂的立克次氏体(R)和正在进行出芽生殖的立克次氏体(R)( $\times 18\ 000$ );1-4 在个体一端正在进行二分裂的立克次氏体(R)和具有多个分裂点的立克次氏体(R)( $\times 33\ 000$ );1-5 包涵体外散在的立克次氏体(R)( $\times 19\ 500$ );1-6 感染立克次氏体细胞的细胞核(N)变化( $\times 12\ 500$ )。

#### 主要参考文献

1 Loy JK. *et al.*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1996, 8(3):324~31

(本文编辑:刘珊珊)