

研究论文与报告

中国对虾肝胰腺细小病毒感染的免疫 病理学研究*

薛清刚 钱鸣亮[†] 罗挽涛 宋庆云 杨虹 王文兴

(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266003)

[†](湛江海洋大学水产学院养殖系 湛江 524000)

提要 于1992—1993年,用兔抗对虾肝胰腺细小病毒 IgG 和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 建立免疫组织病理检测技术,并用来自肝胰腺细小病毒感染的中国对虾肝胰腺组织作病理学分析。该方法利用抗原-抗体之间特异性结合的特点,首先令兔抗肝胰腺细小病毒抗体与相应的病毒成分结合,然后以酶标记的羊抗兔免疫球蛋白抗体与已结合到病毒上的抗体作用,并通过酶显色反应,揭示病毒和相应病变结构的存在。结果显示,免疫酶染色技术将病毒包涵体和因病毒感染而肿胀的细胞核染成金黄至棕色;病毒可游离存在于细胞核腔和核膜内面;完整的包涵体常脱落到肝胰腺管腔内。从而提示,中国对虾肝胰腺细小病毒多以脱落包涵体的形式造成水平传播;从细胞病理角度,细胞病变应分为细胞核肿胀的早期、包涵体形成的中期和细胞破裂释放包涵体的后期三个阶段。研究结果从一个侧面证实了肝胰腺细小病毒的致病性特征。

关键词 免疫酶染色 肝胰腺细小病毒 中国对虾 免疫病理学

学科分类号 S945.1

对虾肝胰腺细小病毒是多种对虾的重要病毒性病原体之一,常规组织病理分析的结果证实,其致病特点是在感染的幼虾或成虾的肝胰腺上皮细胞内形成核内包涵体(薛清刚等,1992a,b; Lightner *et al*, 1985, 1987)。该病毒最初正式报道时因缺少对一些基本特性的了解而暂时称为肝胰腺细小样病毒(Hepatopancreatic Parvo-like Virus, HPV, Lightner *et al*, 1985)。作者等近期的研究已证实,该病毒确属细小病毒科(薛清刚等,1996)。然而,以往的一些分析都是基于组织切片结合常规染色(如H.E染色)和电子显微镜观察。由于这些方法在敏感性或特异性方面存在的缺陷,使深入认识病毒感染的发生机制、传播方式等在一定程度上受到了限制。基于以上原因,本研究在建立特异性免疫组织病理学检测技术的基础上,对肝胰腺细小病毒感染的中国对虾肝胰腺组织进行分析,以期在病理学上对病毒感染有更深入的了解。

*国家自然科学基金资助项目,39000083号;另受国家攀登计划B,PDB-6-6-2部分资助。薛清刚,男,出生于1962年1月,博士,研究员,Fax:0086-0532-2879562

收稿日期:1995-08-21, 收修改稿日期:1997-05-29

1 材料和方法

试验于 1992 年 10 月—1993 年 5 月进行。

1.1 试剂

本试验中所用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(以下简称 HRP-IgG)购自卫生部上海生物制品研究所,特异性效价 1:2 000。

1.2 兔抗对虾肝胰腺细小病毒特异性 IgG(简称 PV-IgG)的制备

制备方法见薛清刚等(1995),试验中所使用的 IgG 浓度为 0.1g/L(以蛋白质计)。

1.3 组织切片

中国对虾(*Penaeus chinensis*)于 1992 年 9 月采集于青岛市沙子口镇对虾养殖场。将病虾头胸部用 Davidson 固定液固定 24h 以上,取肝胰腺按常规乙醇逐级脱水、浸蜡、石蜡包埋,切成 5—7 μ m 薄片。一部分切片作常规苏木素-伊红(H.E)染色,另一部分进行免疫酶染色。

1.4 组织切片的免疫酶染色过程

综合参照刘彦仿(1990)和杨景山(1990)等的方法。基本过程为:石蜡切片经二甲苯脱蜡、逐级乙醇入水后,在室温下用 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.4)(以下简称 PBS)漂洗 5min。切片上加甲醇配制的 0.5% H₂O₂溶液作用 30min,以封闭内源性过氧化物酶。用 PBS 漂洗 2—3 次,每次 10min。滴加 3% 牛血清白蛋白(PBS 溶解,以下简称 BSA-PBS)使之完全覆盖切片,并在室温下作用 30min。吸掉 BSA-PBS,在切片未干时滴加适当稀释的 PV-IgG,放湿盒内置 4℃ 温育过夜。用含 0.02% Tween-20 的 PBS(以下简称 T-PBS)洗片 3 次,每次 5min。滴加用 BSA-PBS 稀释的 HRP-IgG,置湿盒内室温下温育 60min。用 T-PBS 洗片 2 次,每次 5min,换用 0.05mol/L Tris-HCl(pH = 7.6)(以下简称 TB)漂洗 2 次,每次 2min。滴加新鲜配制的 3,3-二氨基联苯胺(DAB),在显微镜下观察显色过程,至特异性着色部位与背景达到反差最大时(室温下一般为 15—30min),用 TB 漂洗,然后用自来水小心冲洗。最后用伊红衬染 0.5—1.0min,或直接常规脱水、透明、封固。OLYMPUS BH 光学显微镜下观察。正式试验中所选用的两种抗体的滴度均是通过预试验选择确定的。

2 结果

2.1 免疫酶染色的典型表现

肝胰腺细小病毒感染的中国对虾肝胰腺组织经免疫酶染色后的结果,示于图版 I: 1。可以看出,有病毒包涵体的肝小管上皮细胞的细胞核及其内部的包涵体,被染成金黄色或棕褐色;而用伊红衬染的细胞质呈微红色,未衬染者则几乎透明无色。病毒包涵体和含包涵体的细胞核与细胞质之间存在明显的颜色反差。相反,无病毒感染的细胞核并不出现类似着色现象。

2.2 包涵体外游离存在的病毒

观察表明,除细胞核因包涵体的存在而肿大以及包涵体本身被特异性染色外,整个细胞核腔隙都有特异性着色(图版 I: 2)。核内腔隙无着色物质者,则显示有核膜的特异性着色,使核膜显得厚而内面不光滑(图版 I: 3)。这些都与图版 I: 4 中用常规 H.E 染色所显示的典型包涵体及其宿主细胞的特征有明显不同。由于切片中已显示正常细胞核的核质及

核膜均不能被特异性染色,所以,可以肯定这些包涵体以外的着色是由游离病毒的存在所致。比较不同部位的染色强度,可以看出均质状的包涵体内部较核腔或核膜着色浅,说明包涵体内物质比游离成分的抗原性弱。这提示,病毒包涵体的基本构成除病毒颗粒外还有一些不属于病毒结构的基质。另外,有些肿大的细胞核也显示着色,着色处与边界清楚的圆形或椭圆形包涵体不同,其形态不规则,表面有细丝状结构与核膜联结(图版 I: 3)。这种病变细胞在 H.E 染色的切片中只是表现为细胞核增大,为此,往往被认为是核仁肿胀而难以作出病毒感染的判断。

2.3 病毒包涵体的脱落与释放

肝胰腺细小病毒包涵体从感染的宿主细胞内脱落和释放的过程示于图版 I: 5—7。从图版 I: 5 中可以看出,包涵体正在向肝胰腺小管内脱落。脱落部位的肝胰腺小管内膜已不连续,病变细胞的细胞质消失,但包涵体尚在核内,只是已紧贴管腔处的核膜。图版 I: 6 中显示的包涵体已脱离宿主细胞,开始离开管壁,并已从核内游离出来。而在图版 I: 7 中,包涵体已完全游离在肝胰腺小管管腔中。在整个脱落与释放过程中,包涵体始终以完整的形式存在。

3 讨论与结语

本研究首先涉及了将免疫病理学技术引入对虾病理学领域,其次是用建立的方法揭示了一些常规方法难以确定的中国对虾肝胰腺细小病毒感染的病理学特征。综合分析由此得到的结果,可以得到几个方面的启示。

3.1 关于免疫酶染色技术及其在本研究中的意义

在现代组织学和病理学研究中,免疫酶染色法是最常用的免疫组织化学和免疫病理学技术之一。它以抗原与抗体的特异性结合反应为基础,利用某些特定酶标记的抗体以及标记酶与底物的产色反应作为指示,能够特异而敏感地检测组织和细胞内的特定物质(刘彦仿,1990)。由于对虾乃至整个海洋无脊椎动物的病理学研究起步较晚,所以,至今还未见到应用该技术进行有关的病理学研究的报告。从本文结果看,应用该技术对肝胰腺细小病毒感染的中国对虾肝胰腺组织进行病理学研究,具明显的优点。首先,由于方法的敏感性高,所以,不仅可以确定一些已存在病毒感染却未形成包涵体的细胞,而且能够简便而清楚地显示在细胞核内游离存在的病毒。其次,本方法的特异性是肯定的,因此,一方面可以对一些形态相似的细胞内非包涵体结构进行准确鉴别,另一方面又能够对游离于细胞外的病毒包涵体作出肯定判断,这在常规组织病理学检查时是难以做到的。为此,所有由此得到的结果,为深入认识肝胰腺细小病毒感染的发生机制和病毒的传播方式等提供了基础。

自肝胰腺细小病毒被发现以来,对于确定病毒属于对虾病原体具有关键意义的致病性问题,一直缺少有说明力的研究结果(Lightner, 1993)。本项研究所用抗体是以鉴定证实的肝胰腺细小病毒为抗原制备而成的,这种抗体能与肝胰腺上皮细胞内的病变发生特异性结合反应,说明细胞核内病变是由该病毒引起。从而,从一个侧面证实了肝胰腺细小病毒具有致病性特征。

3.2 关于病毒的传播方式

由于肝胰腺细小病毒是寄生在对虾的消化腺内,所以,以往曾提出其通过消化道传播

的可能性(薛清刚等, 1992a)。本研究中所观察到的一些现象, 为判断病毒的传播方式提供了可靠依据。首先, 从结果可以得到这样的提示, 即病毒包涵体往往是以完整的形式从宿主细胞内脱落的。其基本释放过程为: 首先是细胞破裂, 局部肝胰腺小管内膜被破坏, 而含有包涵体的细胞核开始裸露; 接着, 核膜破坏, 包涵体被释放出来; 最后, 包涵体完全游离地存在于患病中国对虾的肝胰腺小管内。由于作为对虾消化腺的肝胰腺是与消化道相通的, 所以, 病毒很容易随肝胰腺分泌物被排入消化道, 并进而排出体外, 从而造成病毒在不同虾体之间的水平传播。至于病毒包涵体是先在肝胰腺小管被解体后再排出游离病毒, 还是整个病毒包涵体被直接排到消化道, 目前尚未确定。染片中经常见到一些特异性着色的小管腔内容物, 提示病毒包涵体解体、病毒游离的可能性大。当然, 在核膜破裂释放包涵体的过程中, 一些原先游离存在于细胞核内的病毒颗粒也会被释放到肝胰腺小管腔内。

3.3 关于肝胰腺上皮细胞的病变分期

现有文献基本上都将肝胰腺细小病毒感染所造成的病理变化描述为细胞核内有嗜碱性或微嗜酸性的包涵体、包涵体内含大量病毒颗粒以及因包涵体存在而造成细胞核肿大和超微病理水平的细胞器改变等(薛清刚等, 1992a,b; Lightner *et al*, 1985)。从本研究所揭示的一些现象看, 这实际上只是整个细胞病变过程的中间一个阶段, 除此之外, 还应有早期和晚期两个阶段。换言之, 肝胰腺细小病毒感染的细胞病变应该分为3期。早期(I期)细胞病变是肝胰腺上皮细胞核内有病毒感染, 但无包涵体存在, 在组织细胞水平表现为核肿大, 免疫酶染色时则显示肿大的细胞核内有特异性着色; 中期(II期)细胞病变的特征是细胞核内有典型包涵体, 但细胞形态结构仍然完整; 而到后期(III期)病变时, 特征性表现为宿主细胞坏死, 从而进入如本文所显示的包涵体脱落阶段。

参 考 文 献

- 刘彦仿, 1990. 免疫组织化学. 北京: 人民卫生出版社. 62—70
- 杨景山, 1990. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社. 98—114
- 薛清刚 王文兴, 1992a. 对虾疾病的病理与诊治. 青岛: 青岛海洋大学出版社. 60—63
- 薛清刚 王文兴, 1992b. 对虾病毒与对虾病毒病的研究进展. 鱼类病害研究, 14(2): 16—21
- 薛清刚等, 1995. 反向间接血凝法检测对虾肝胰腺细小病毒的方法学研究. 水产学报, 19(3): 210—215
- 薛清刚 官云浩 王文兴, 1996. 中国对虾肝胰腺细小病毒的纯化与鉴定. 海洋与湖沼, 27(3): 306—313
- Lightner D V, Redman, 1985. A Parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *J Invert Pathol*, 45: 47—53
- Lightner D V, Hedrick R P, Fryer J L *et al*, 1987. A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *Fish Pathol*, 22: 127—140
- Lightner D V, 1993. CRC Handbook of Mariculture, 2nd Edition, Volume I, Crustacean Aquaculture. In: McVey J P ed. Boca Raton, Florida: CRC press Inc. 393—486

AN IMMUNE PATHOLOGICAL STUDY ON THE HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS INFECTION OF *PENAEUS CHINENSIS*

XUE Qing-gang, QIAN Ming-liang[†], LUO Wan-tao,
SONG Qing-yun, YANG Hong, WANG Wen-xing

(First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266003)

[†](Department of Aquaculture of Fishery College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, 524000)

Abstract During 1992—1993, hepatopancreatic parvovirus (HPV) infected hepatopancreas of *Penaeus chinensis* was histopathologically studied using the method of immune enzyme staining. With the rabbit anti-hepatopancreatic parvovirus IgG (PV-IgG) which was prepared in laboratory by immunizing rabbits with purified HPV and commercially available horseradish peroxidase labeled sheep anti-rabbit IgG (HRP-IgG), an indirect immune enzyme staining procedure for detecting the hepatopancreatic parvovirus in a section of *Penaeus chinensis* hepatopancreas was established. The hepatopancreas from the diseased *Penaeus chinensis* was fixed in Davison's solution and paraffin sections of about 5 μ m were routinely prepared. After treatment with 0.5% H₂O₂ and 3% bovine serum albumin, the section was incubated with PV-IgG at 4 $^{\circ}$ C overnight and, following washing with PBS, incubated with HRP-IgG for 60min at room temperature. Following coloration with 3'-diaminobenzidine (DAB), the samples were examined under light microscope. With this procedure, the nuclei of hepatopancreatic epithelium of *Penaeus chinensis* that were infected by the hepatopancreatic parvovirus were stained to be yellow or brown in color. Both virus inclusion body (Plate I:1, IB \rightarrow) and some inclusion body free but enlarged nuclei (Plate I:3, N \rightarrow) can be specifically stained. The cytoplasm of the host cell and the nuclei of non-infected epithelium were not stained. Besides the inclusion body, the cavity (Plate I:2, VS \rightarrow) between nucleus membrane and inclusion body and the membrane (Plate I:3, NM \rightarrow) of the inclusion body-containing nuclei were stained strongly, indicating that some virus particles exit freely in the host nucleus. The virus inclusion bodies can leave the host cell (Plate I: 5—6, IB \rightarrow) and drop into hepatopancreatic tubes (Plate I: 7, IB \rightarrow); this indicates horizontal transmission through the digestive system. The cytopathological changes of the infected cells are divided into 3 phases. In Phase I (early cytopathological stage), the nuclei are infected with no inclusion body observed. Phase II (middle stage) is characterized by the existence of typical inclusion bodies in the nuclei but the host cell is still complete. In Phase III (late stage), the epithelium is destroyed and the inclusion body detached. Since the specificity of the PV-IgG is ensured by the antigen purity and absorption with the hepatopancreatic tissue, the pathogenicity of hepatopancreatic parvovirus can be verified by the

procedure presented in this paper.

Key words Immune enzyme staining Hepatopancreatic parvovirus *Peneaus chinensis* Immune pathology

Subject classification number S945.1

刊物简介

《海洋与湖沼》学报简介

BRIEF INTRODUCTION OF THE OCEANOLOGIA ET LIMNOLOGIA SINICA

《海洋与湖沼》学报遵循科学技术要面向经济建设的宗旨,倡导不同学术观点的争鸣,开展国内外学术交流,以繁荣学术、提高研究水平;报道最新科研成果,为促进科学技术的发展和加速社会主义现代化建设服务;发挥老科学家的指导作用、中年科技人员的骨干作用,热情扶植青年学者,以利于科技人才的尽快成长,从而不断壮大科技力量。《海洋与湖沼》学报,系海洋湖沼科技领域综合性的学术刊物,以报道基础研究、应用基础研究论文为主,同时重视应用研究、开发研究成果的发表;论文涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、简报、综述、学术争鸣、学术简讯、科学家简介、书评等栏目。对于发明创造和同国计民生有重大关系的研究成果、带有崭新学术观点的论文和学术争鸣,特别是青年学者的优秀论文,将予以优先刊登。

《海洋与湖沼》学报于1957年创刊,第一任主编为中科院院士、第三世界科学院院士曾呈奎教授,第二任主编为著名海洋生物学家刘瑞玉教授,现任主编为中科院院士秦蕴珊教授。由于刊物一向注重高水平、高质量,为学术交流、国家建设、人才成长作出引人注目的贡献,因而在国内外均享有较高声誉。1988—1993年获省部级以上优秀科技期刊奖7项,最高为国家二等奖。

本刊编辑部

Editorial Office, Oceanologia et Limnologia Sinica