

白斑综合征病毒浙江分离株在动物模型 克氏原螯虾组织中的分布

魏克强 *

(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

摘要 应用对虾白斑综合征病毒浙江分离株(WSSV-ZJ)人工口服感染实验动物模型克氏原螯虾,研究其在消化道组织和血淋巴细胞内分布及病理变化的特点。结果显示,在受感染濒死螯虾的胃、中肠和循环血淋巴中观察到大量病毒粒子,是病毒侵染的主要靶组织;此外,在肝胰腺组织的细胞中观察到少量病毒粒子。该病毒主要侵染结缔组织细胞、上皮细胞和循环血淋巴细胞等敏感细胞的细胞核。电镜和光镜观察及应用原位杂交检测表明,浙江株病毒粒子在螯虾体内的形态大小、分布特点和靶细胞组织的病理与其他地理株相似或相同。

关键词 白斑综合征病毒; 克氏原螯虾; 细胞病变; 原位杂交

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是线形病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(*Whispovirus*)的水生甲壳类动物病毒^[1],感染性强、地域分布广、流行范围大,是对全球对虾养殖业危害最大的病原之一^[2]。自1993年首次暴发性流行以来,人们对病毒感染及复制的机制知之甚少,目前还不能有效地控制疫情。细胞培养是病毒研究的重要手段,但迄今为止对虾病毒的研究却严重受制于缺乏适宜的细胞系。尽管在对虾细胞培养方面进行了大量尝试,目前仍处于原代培养水平^[3]。研究表明,WSSV在淡水克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)体内增殖和感染的特性与对虾极其相似,被广泛用作病毒增殖、药物筛选和免疫反应等方面的实验动物模型^[4-9],这为远离海洋的实验室进行相关病毒的研究提供了极大的便利。试验发现,不同时间不同地域获得的病毒株感染螯虾存在一定的差异^[10-12],本试验以2001年分离获得的野生毒株浙江株(WSSV-ZJ)为材料,研究其在螯虾体内组织分布及其病理变化的特点,为阐明病毒的致病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 病毒

白斑综合征病毒浙江株(WSSV-ZJ)系2001年从浙江省宁波地区典型感染WSSV的中国对虾(*Penaeus chinensis*)组织中分离的野生毒株,由浙江大学教育

部动物分子营养学重点实验室鉴定、保存。

1.2 试验动物

健康活泼、螯肢完整的克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)购自农贸市场,体重(23.0 ± 0.2) g,饲养于水产实验室。

1.3 感染实验

取试验螯虾40尾(实验前取血淋巴经PCR检测无WSSV感染),分为感染和对照2个组,每组20尾,饲养于250 L玻璃水族箱内,每箱10尾。水温22~24 °C,24 h连续充气,感染前饥饿48 h。将冰冻感染WSSV-ZJ株的中国对虾头部组织切成均匀的碎块,以2%的比例投喂感染组,连续投喂2天,每天2次,对照组投喂颗粒饵料。观察螯虾的临床症状、病程发展情况及死亡率。

1.4 样品采集

试验结束后,解剖取得感染组濒死虾和对照存活虾的胃、中肠及肝胰腺组织,一部分用Davidson's AFA液固定,分别用于HE染色光镜观察和原位杂交检测;另一部分上述组织及血淋巴以2.5%戊二醛固定制备电镜样品。

1.5 组织切片制备

将样品置于组织脱水机(Leica TP1020)中进行乙醇系列脱水及二甲苯透明,在组织包埋机(Leica EG1160)上进行石蜡包埋。用石蜡切片(Leica

收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-06-27

*通讯作者: Tel: 0351-7019659, E-mail: kqwei88@sohu.com

RM2135)进行连续切片,厚约6 μm ,用毛笔将切片移至展片机(Leica HI1210)内展片和沾片,再置于染色机(Leica Autostainbr XL)内HE染色,中性树胶封片,在Leica Qwin图像分析仪上观察拍照。

1.6 原位杂交检测

组织样品以Davidson's AFA固定液固定24 h后置于70%酒精中,制成5 μm 的石蜡切片,展片于用500 $\mu\text{l/ml}$ 多聚赖氨酸预包的载玻片上。组织切片经脱蜡、复水和蛋白酶K溶液(0.1 mg/ml)消化,在42 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中预杂交30 min,湿盒内加变性DIG标记WSSV特异性核酸探针(大小547 bp,浓度30~50 ng/ml,按雷质文等的方法制备^[13]),40~42 $^{\circ}\text{C}$ 下杂交16~18 h,用2 \times SSC、1 \times SSC、0.5 \times SSC、缓冲液I漂洗组织切片,加碱性磷酸酶联抗DIG抗体(购自Boehringer Mannheim),用缓冲液I、缓冲液III漂洗玻片,加NBT、X-磷酸盐,黑暗中显色,组织切片依次通过蒸馏水,0.5% Bismark Brown Y、95%酒精、纯酒精、二甲苯,中性树胶封片,Leica Qwin图像分析仪上观察拍照。

1.7 电镜样品制备

取胃、中肠及肝胰腺等组织迅速切成1 mm³小块(血淋巴经4 000 r/min离心),经2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,以柠檬酸铅和醋酸铀双重染色,在JEM-1200EX型透射电镜(日本JEOL公司)下观察拍照。

2 结果

2.1 感染的临床症状

投喂感染第3天试验组螯虾开始死亡,第5~6天出现发病高峰,第8天死亡率可达100%,而对对照组存活率为100%。发病螯虾呈现明显的临床症状:(1)对外界的刺激反应迟钝,停止摄食,行动迟缓,腹节卷曲,螯肢无力;(2)濒死虾甲壳易与其下的表皮分离,血液颜色微红,血淋巴稀薄且不易凝固;肝胰腺颜色淡黄,普遍存在空胃现象。

2.2 组织病理观察

对照组螯虾的胃、中肠和肝胰腺组织经HE染色,细胞核呈蓝色,细胞质呈红色,细胞形态清晰,组织结构完整(图1-1,图1-3,图1-5)。病毒感染濒死螯虾胃(图1-2)、中肠(图1-4)组织的上皮细胞和结缔组织细胞呈现典型的病变特征,核肿大呈球形或短椭圆形,嗜伊红深染;肝胰腺组织的细胞,核内染色质、核仁消失;细胞膜、细胞

形态模糊不清,结缔组织糜烂,只剩少量核及细胞残屑,坏死上皮及肌束间均有肿大的离散细胞核(图1-6)。

2.3 原位杂交结果

感染WSSV-ZJ株濒死螯虾的胃、中肠和肝胰腺组织的上皮细胞和结缔组织细胞均可见明显的阳性杂交信号(图2-2,图2-4,图2-6),对照组螯虾的组织细胞均呈阴性杂交反应(图2-1,图2-3,图2-5)。

2.4 超微病理变化

在病毒感染的组织超薄切片中,完整病毒粒子的纵切面呈长椭圆形,横切面为圆形,中间浓染部分是核蛋白构成的髓核,外面包裹一层染色稍浅的蛋白质衣壳,共同组成核衣壳,最外层是脂双层囊膜,病毒粒子大小约(182~318) nm \times 90 nm,双层囊膜厚约14 nm(图3-1,图3-2)。密集的杆状病毒粒子在细胞核内可形成局部晶格状排列,但不形成核型多角体或颗粒体类包埋体(图3-1),并可见一端具有“乳头状突起”的病毒粒子和正在装配囊膜的空衣壳(图3-2)。宿主细胞的特征性超微病理变化是细胞核肿胀,充满大量的病毒粒子,染色质边移乃至消失,核膜难以辨认,细胞质结构逐渐溃散(图3-3,图3-4,图3-10);线粒体大量坏死,嵴断裂、脱落,内外膜破裂或彼此分离(图3-5,图3-7),粗面内质网增生、断裂、严重扩张,或呈指纹样结构(图3-6,图3-8)。对照组螯虾的细胞结构和形态完整,未见有杆状病毒粒子(图3-9)。

3 讨论

流行病学调查证实,通过食物链和自相残食进入宿主消化道是WSSV的主要感染和传播途径^[14],这与消化道具有上皮组织和疏松结缔组织而且在这两种组织中又都含有对病毒特别敏感的上皮细胞、疏松结缔组织细胞和血细胞有关,并且,胃、肠的内表面与外环境中游离病毒或病毒寄主接触,感染的机率很大。本试验结果表明,口服感染WSSV-ZJ对螯虾消化系统的胃、中肠和肝胰腺等具有很强的组织嗜性,与射阳株^[10]、宁波株与深圳株^[15]的感染结果相同;应用相同的病毒核酸探针进行原位杂交显示,浙江株与青岛株感染螯虾靶组织的敏感细胞也完全相同^[16,17]。

但是以我国不同流行时间不同流行地区的病毒分离株感染克氏原螯虾也存在一定的差异^[10,11,18]。

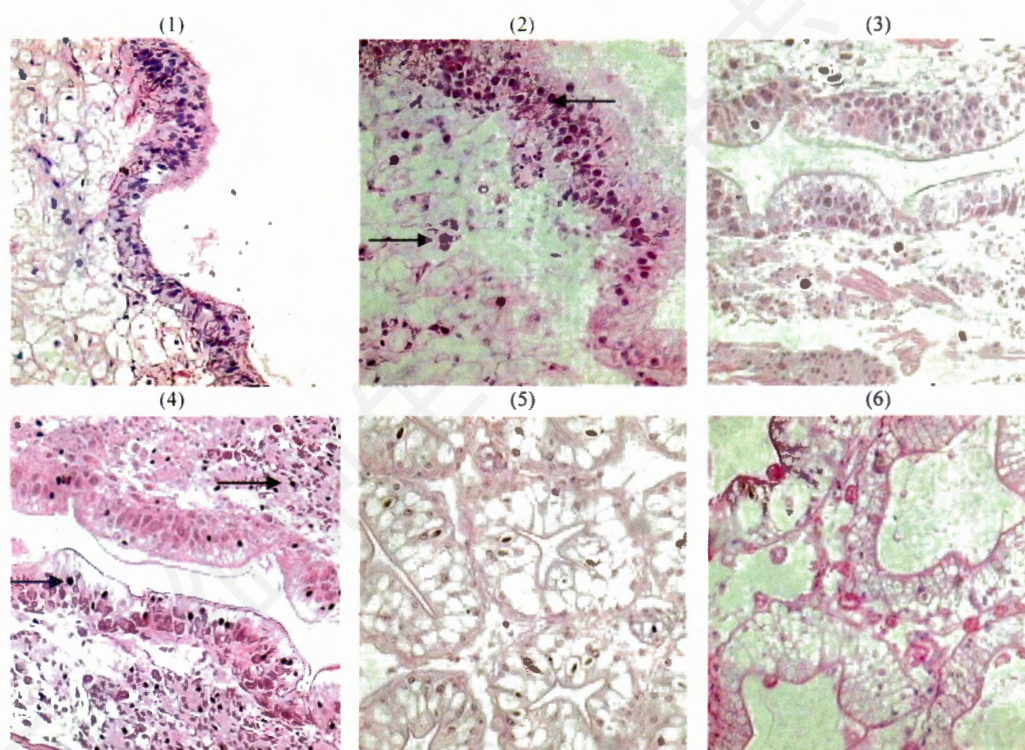


图1 组织病理观察结果

1: 对照组胃的正常组织细胞(200×); 2: 感染组胃的上皮和结缔组织严重感染, 细胞核肿大, 深染呈紫红色(箭头所示)(200×); 3: 对照组正常的中肠组织细胞(200×); 4: 感染组中肠的上皮和结缔组织细胞, 细胞核肿大, 深染呈紫红色(箭头所示)(200×); 5: 对照组肝胰腺的上皮细胞和肝小管(200×); 6: 感染组肝胰腺组织细胞, 核内染色质、核仁消失, 细胞形态模糊不清, 组织结构松散, 结缔组织糜烂, 表皮细胞脱落(200×)。

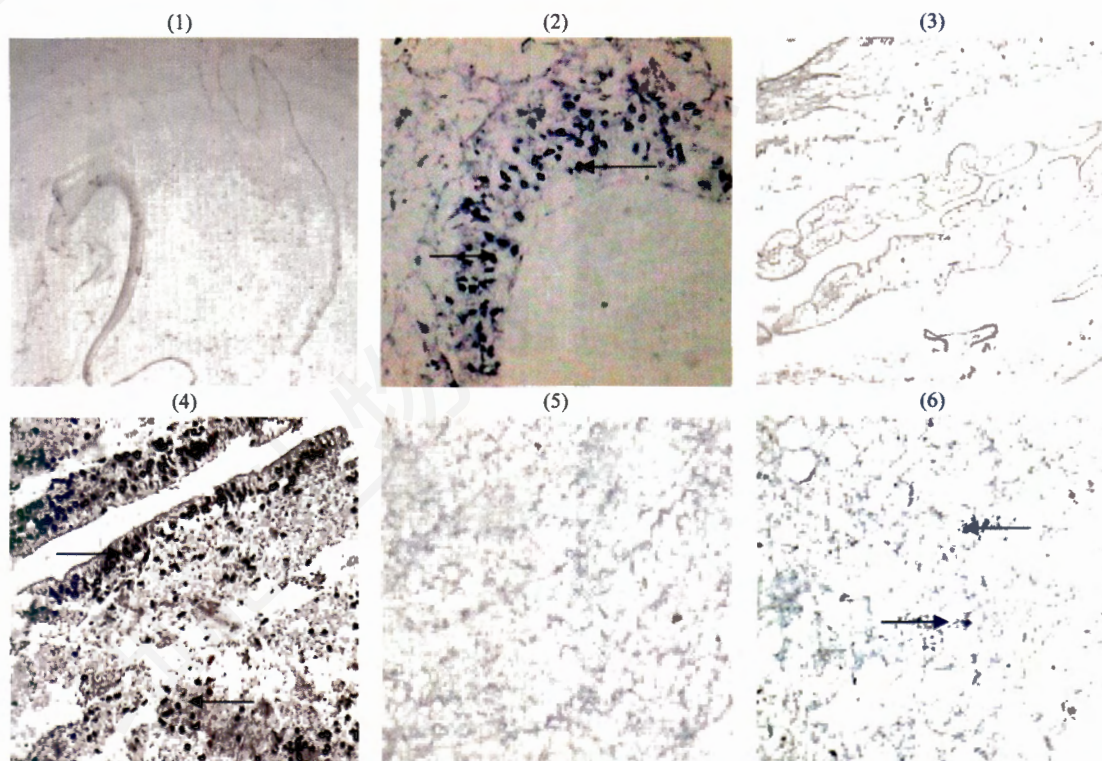


图2 原位杂交结果

1: 对照组胃的组织细胞呈阴性反应(200×); 2: 感染组胃组织的上皮细胞和结缔组织细胞呈阳性反应(箭头所示)(200×); 3: 对照组中肠的组织细胞呈阴性反应(100×); 4: 感染组中肠的上皮细胞和结缔组织细胞呈阳性反应(箭头所示)(200×); 5: 对照组肝胰腺的组织细胞呈阴性反应(200×); 6: 感染组肝胰腺的上皮细胞和结缔组织呈阳性反应(箭头所示)(200×)。

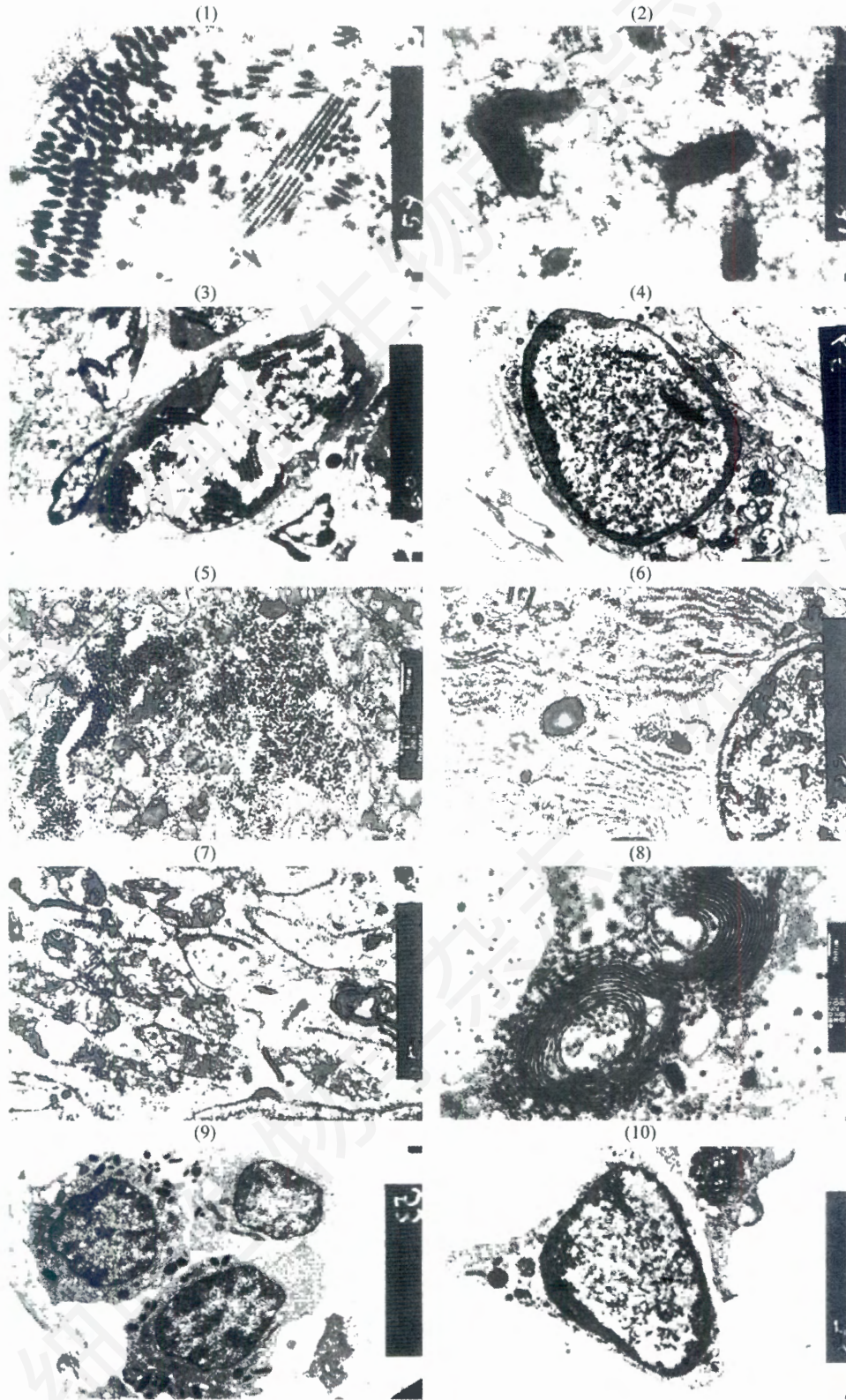


图3 透射电镜观察结果

1: 感染组胃组织细胞核中病毒粒子有规则地聚集成病毒簇及形成长晶格状物(20 000×); 2: 感染组濒死虾中肠组织细胞核中病毒粒子呈乳头状突起和正在装配囊膜的衣壳(80 000×); 3: 感染组胃组织细胞严重感染, 核肿胀, 染色质消失, 细胞质崩溃(6 000×); 4: 感染组肠组织细胞, 核肿胀, 染色质消失, 细胞质崩溃(6 000×); 5: 感染组胃上皮细胞线粒体破坏, 膜破裂, 嵴断裂, 出现空泡(12 000×); 6: 感染组胃上皮细胞内质网(RER)破坏, 发生肿胀、变形、断裂(8 000×); 7: 感染组中肠上皮细胞线粒体破坏, 膜破裂, 嵴断裂, 出现空泡(15 000×); 8: 感染组中肠上皮细胞呈指纹样排列的内质网(RER)(20 000×); 9: 对照组血淋巴细胞正常结构(5 000×); 10: 感染组血淋巴细胞核肿胀, 充满大量的病毒粒子, 染色质消失, 细胞质崩溃(6 000×)。

核酸探针斑点杂交检测表明, 20 世纪 90 年代初分离的青岛株在口服感染螯虾的中后期, 在胃上皮和肝胰腺组织中始终都未能检测到 WSSV, 而在卵巢组织有病毒分布^[18]; 1999 年获得的射阳株口服感染螯虾, 病毒在胃上皮有分布而在卵巢组织没有分布^[10]。电镜观察显示, 广东分离株不在螯虾的血淋巴细胞核中复制, 仅存在于细胞质中^[11], 而浙江株能够感染血淋巴的细胞核并在其中复制。

研究表明, 来源于世界不同地域不同宿主的 WSSV 分离株在基因组的大小^[19]、SDS-PAGE 图谱^[20]、RFLP 图谱^[21]和致病力^[12]等方面并不完全相同, 虽然我国沿海不同海域及不同种类对虾暴发性流行病的病毒具有高度的同源性^[22], 但在不同的流行时间和不同的流行地区分离的病毒株很可能存在一些细微的差异, 以致在螯虾体内的分布出现上述差异。目前 WSSV 在宿主体内感染和扩散的确切机制还不清楚, 这有待于进一步从分子和细胞水平揭示其机制, 建立适宜对虾病毒的细胞系是急需解决的难题。

参考文献 (References)

- [1] Namikoshi A *et al.* *Aquaculture*, 2004, **229**: 25
- [2] 雷质文等. *海洋与湖泊*, 2002, **33**: 250
- [3] 李 钊等. *高技术通讯*, 2002, (12): 74
- [4] Huang C *et al.* *Virus Res*, 2001, **76**: 115
- [5] 魏 静等. *南京农业大学学报*, 1998, **21**: 78
- [6] Maeda M *et al.* *Acta Virol*, 2000, **44**: 371
- [7] 魏克强等. *实验生物学报*, 2005, **38**: 190
- [8] Li HX *et al.* *J Fish Dis*, 2005, **28**: 285
- [9] Yi G *et al.* *J Gen Virol*, 2003, **84**: 2545
- [10] 朱建中等. *南京农业大学学报*, 2002, **25**: 75
- [11] Shi Z *et al.* *J Fish Dis*, 2005, **28**: 151
- [12] Wang Q *et al.* *Aquaculture*, 1999, **170**: 179
- [13] 雷质文等. *青岛海洋大学学报*, 2001, **31**: 201
- [14] 刘昌彬等. *山东大学学报(自然科学版)*, 2002, **37**: 84
- [15] 黄灿华等. *病毒学报*, 2000, **16**: 242
- [16] 莫照兰等. *海洋科学*, 2002, **26**: 43
- [17] 雷质文等. *中国预防兽医学报*, 2002, **24**: 227
- [18] 朱建中等. *中国病毒学*, 2001, **16**: 92
- [19] Chen LL *et al.* *Virology*, 2002, **293**: 44
- [20] Wang Q *et al.* *Arch Virol*, 2000, **145**: 263
- [21] Nadala ECB Jr *et al.* *Dis Aquat Organ*, 1998, **33**: 231
- [22] Chang PS *et al.* *Aquaculture*, 1998, **164**: 233

The Distribution of White Spot Syndrome Virus Zhejiang Strain in Tissue Cells of *Procambarus clarkii*

Ke-Qiang Wei*

(School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract With white spot syndrome virus (WSSV-ZJ) isolated from diseased shrimp *Penaeus chinensis* in Zhejiang province, an alternative experimental host, *Procambarus clarkii*, was selected to be artificially infected and the distribution of virus and cytopathic changes of crayfish were studied. The result showed that a large number of virion was detected in stomach, midgut and circulatory blood cell, and a few in hepatopancreas. The virion invaded the nucleus of loose connective cells, epithelial cells and hemolymph cells of dead or diseased crayfish. The shape of virion and their morphogenesis, the distribution of virion and the major pathological change in host cells were quite similar or identical to the other WSSV isolate by observation under light and electron microscopes and detection using hybridization *in situ*.

Key words white spot syndrome virus; *Procambarus clarkii*; cytopathologic changes; *in situ* hybridization

Received: April 20, 2006 Accepted: June 27, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-351-7019659, E-mail: kqwei88@sohu.com