

# 香鱼嗜水气单胞菌染病后主要靶器官组织病理学观察

李明云<sup>1</sup>, 张呈念<sup>1,2</sup>, 苗亮<sup>1</sup>, 王成义<sup>1</sup>, 陈炯<sup>1</sup>, 史雨红<sup>1</sup>

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 温州科技职业学院, 浙江 温州 325006)

**摘要:** 从患病香鱼的体腔液中分离获得嗜水气单胞菌病原, 用培养稀释的菌液, 经腹腔注射人工感染健康香鱼, 出现典型出血症后, 进行相关的组织病理变化的观察。组织病理显示: 脾、肝、肠是细菌侵染重要的靶器官; 且脾、肝、肠的变化主要表现为广泛的组织细胞变性、坏死, 大量单核细胞、浆细胞等免疫细胞增生。病理超微切片观察显示: 在患病香鱼脾脏组织中发现大量长 $2\ \mu\text{m}$ 、宽 $0.5\ \mu\text{m}$ 左右的细菌, 脾脏细胞损伤主要表现为线粒体嵴消失、溶酶体增多, 细胞间隙增大, 细胞内出现空泡; 肝脏主要表现为脂肪变性, 溶酶体增多, 线粒体嵴断裂、肝糖原颗粒减少; 患病香鱼肠道细胞间隙变大, 核蛋白体大量或全部脱落, 线粒体膜破损, 嵴断裂成髓样病变, 形成髓样小体。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; 香鱼; 组织病理

中图分类号: S943

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2011) 03-0001-04

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)属鲑形目, 香鱼科, 香鱼属, 是我国重要的小型名贵经济鱼类。其肉质细嫩多油, 清香无腥, 具有特殊的风味。在日本香鱼是重要的淡水养殖品种, 被称为“淡水鱼之王”<sup>[1]</sup>。20世纪80年代以来, 由于江河水利设施日益增多, 工业废水污染、过度捕捞、溪流挖沙以及溪流入口采捕鳗苗等原因, 香鱼资源日趋减少。人工规模化养殖成功后, 满足了市场的需求。但随着养殖规模的扩大, 香鱼病害日益严重。陈百尧等<sup>[2]</sup>对江苏省石梁河水库网箱养殖香鱼的出血症进行了调查, 但未对引起香鱼出血症的病原、病理进行详细的研究。2007年以来宁波等地的香鱼养殖场同样流行了爆发性出血症, 其流行病学特征、症状等均与江苏省石梁河水库网箱养殖香鱼的出血病相似。笔者从患病香鱼体液中分离得到一株强致病性菌株, 经过鉴定为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)<sup>[3]</sup>。患病香鱼具有体色发黑, 眼睛充血外凸, 口腔上下壁和鳍基部充血, 肛门红肿外凸, 剖检可见其均出现不同程度的腹面点状出血, 腹

部膨胀并有腹水, 肝脏无血色且肿胀, 肠系有不同程度糜烂, 脾脏发黑等特征。Kobayashi等<sup>[4]</sup>曾报道一种假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)引起的香鱼出血症的组织病理学变化, 但迄今尚未见有关香鱼嗜水气单胞菌出血症患病后相关组织细胞学变化的研究报道。为进一步分析该病对香鱼相关组织的病理变化以及致病机理, 笔者对香鱼进行人工侵染嗜水气单胞菌以引发香鱼产生出血症, 进而对香鱼进行组织切片的显微和亚显微观察, 以期能为香鱼出血症的病理学研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验鱼取自于宁波鳧溪香鱼养殖场, 选取健康香鱼40尾, 规格为体长 $(14.6\pm 1.2)\ \text{cm}$ , 体重 $(30.5\pm 3.5)\ \text{g}$ ; 水族箱中暂养7 d。试验用嗜水气单胞菌菌株由笔者所在实验室从宁波鳧溪香鱼养殖场患细菌性败血症的香鱼体腔液分离得到。

## 1.2 方法

### 1.2.1 人工侵染

将嗜水气单胞菌接种到 RS 琼脂培养基中, 保持 28℃ 培养过夜, 用无菌生理盐水稀释成浓度约为  $1.1 \times 10^6$  cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 从腹腔以每尾 0.2 mL 的量进行注射, 实施人工感染试验. 对照组注射同等剂量的灭菌生理盐水. 将 2 组香鱼分别置于不同的水族箱中, 水温 (21±1)℃, 早晚换水、喂食各 1 次, 待出现明显出血症状时, 每组取样 5 尾.

### 1.2.2 光镜与电镜样品制备及观察

活体解剖香鱼, 分别取健康香鱼与染病香鱼的鳃、肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肠等组织, Bouin 氏液固定, 石蜡包埋切片, H.E 染色. OLYMPUS 显微镜下观察拍照保存.

取健康香鱼和染病鱼脾脏、肝脏、肠道组织分别在 2.5% 戊二醛溶液中固定 24 h, 用原液换洗 1 次, 再用 2% 锇酸固定 2 h, pH 7.2~7.4 磷酸缓冲液洗 2 次, 每次 15 min. 用梯度丙酮进行脱水, 每次 15 min. 55~60℃ 下环氧树脂 (Epon812) 包埋 72 h, LKB-V 型超薄切片机切片, 厚度为 40~50 nm, 经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色 (醋酸双氧铀 30 min, 柠檬酸铅 30 min), 日立 H-300 透射电镜观察及拍照.

## 2 结果

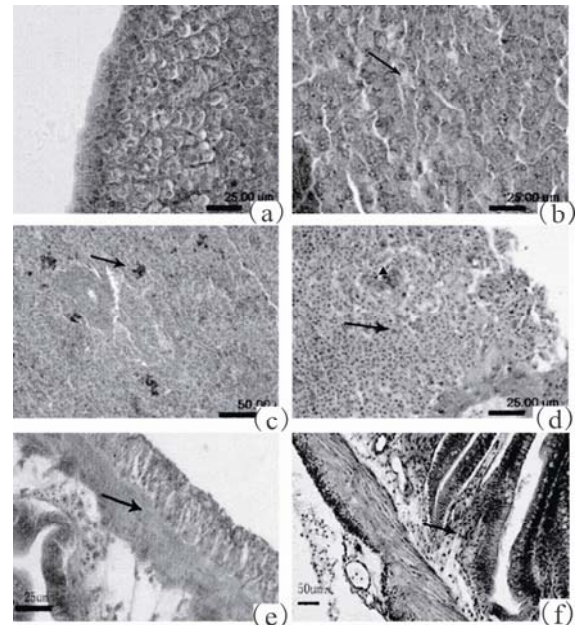
### 2.1 染病香鱼组织的显微结构变化

**肝脏:** 健康香鱼肝细胞呈多角状, 排列均匀有规则 (图 1(a)). 病鱼肝组织主要表现为脂肪变性, 肝细胞排列紊乱、稀疏, 细胞肿大, 细胞间质增生, 胞浆内出现空泡 (图 1(b)), 肝组织局部出现炎症充血, 一些区域的细胞崩解、坏死组织脱落形成坏死灶. 血管和血窦中有大量单核细胞、淋巴细胞增多.

**脾脏:** 健康香鱼脾脏内有脾髓, 富含淋巴细胞, 红细胞及结缔组织的原纤维. 病鱼脾肿大, 红髓与白髓分界不清. 脾髓内充满红细胞, 髓窦内含铁血黄素大量沉积, 被 H.E 染成棕黄色 (图 1(c)). 间质小动脉管壁水肿增厚, 中央动脉管壁的内皮细胞肿大, 有不同程度的空泡变性, 管内充满红细胞, 并有大量单核细胞、浆细胞出现, 经 H.E 染色, 核深染呈紫色 (图 1(d)).

**肠道:** 健康香鱼肠道组织粘膜皱襞多, 柱状上层细胞排列紧密, 肌层平整, 肠外膜完整 (图 1(e)).

病鱼肠外膜结构破损, 肌层平滑肌不完整, 内环外纵结构不明显; 固有层和粘膜下层水肿并充血, 有多处出血灶, 引起大量炎症细胞浸润, 淋巴细胞大量出现 (图 1(f)), 致使这两层组织疏松, 增厚明显; 肠粘膜褶皱萎缩, 排列疏松、杂乱, 粘膜上皮内杯状细胞大量出现, 淋巴组织发达.



图中↑及▲指向对应变化的显微结构

图 1 香鱼组织的显微结构

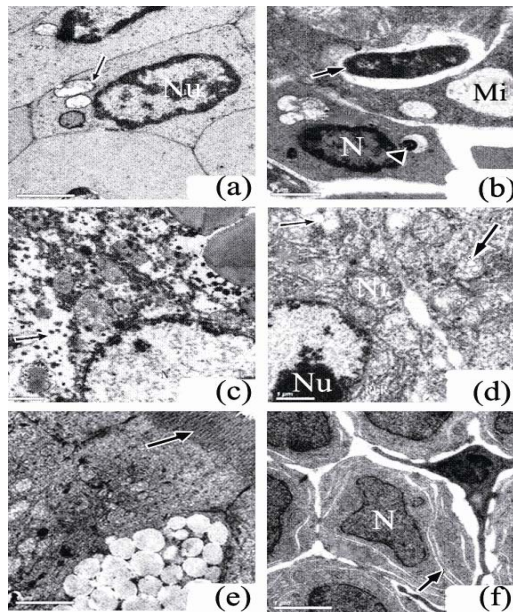
### 2.2 染病香鱼组织的超微结构变化

**脾脏:** 健康香鱼脾脏组织细胞核核型规则, 结构完整, 细胞排列紧密 (图 2(a)). 患病香鱼脾脏细胞可以清晰地观察到长 2 μm、宽 0.5 μm 左右的细菌, 随机分布在细胞质中或者包在膜性结构内, 形成电子密度较大的致密体, 核染色质分布异常, 各种细胞器与内含物逐渐减少甚至消失. 细胞内出现脂肪颗粒, 形成空泡. 线粒体肿胀, 内嵴出现降解, 只见到残留的膜 (图 2(b)).

**肝脏:** 健康香鱼肝脏组织细胞排列紧密, 细胞核圆形, 核膜清晰, 线粒体、糖原、内质网含量丰富, 线粒体嵴完整 (图 2(c)). 患病香鱼肝组织发生了弥散病变, 出现大片自溶性坏死, 但未发现细菌存在; 其细胞核固缩, 核浆电子密度降低, 核膜不完整, 部分核已溶解, 核内脂类物质沉积, 细胞间隙增大 (图 2(d)).

**肠道:** 健康香鱼肠道组织细胞核圆形, 核膜清晰, 核仁明显, 内质网非常发达, 线粒体为圆杆状,

线粒体嵴清晰, 含量丰富, 微绒毛排列紧密(图2(e)). 患病香鱼肠道细胞间隙变大(图2(f)), 细胞核固缩, 粗面内质网明显扩张或破裂, 核蛋白体大量或全部脱落; 滑面内质网扩张、破裂; 线粒体膜破损, 嵴断裂成髓样病变, 形成髓样小体, 细胞内未发现细菌.



图中N为细胞核, Nu为核仁, Mi为线粒体. ↑及▲指  
向对应变化的超微结构

图2 香鱼组织的超微结构

### 3 讨论

香鱼出血症一般在7月高温季节发生, 每次流行给养殖户带来巨大的经济损失. 从病变组织石蜡切片观察结果可知, 香鱼脾脏、肝脏、肠组织是细菌重要的靶器官, 细菌入侵使这些组织出现肿胀、溶解坏死等炎症表现, 致使鱼体免疫力下降, 营养吸收代谢功能减弱. 当感染发生后, 随着病情的发展, 细菌毒力因子进入血液并随血液到达鱼身各处, 引起各组织中小静脉和毛细血管内皮肿胀、脱落、红细胞碎裂、溶解, 引起溶血, 导致病鱼多发性出血灶的出现, 破坏整个循环系统, 随即危害呼吸系统, 最后因呼吸系统破坏使鱼窒息而死<sup>[5]</sup>.

Kobayashi 等报道一种假单胞菌引起的香鱼出血症病理变化, 其中脾脏、肾脏、肝脏组织发生了明显的水肿、充血、血纤维沉积, 而肠道、鳃组织受到假单胞菌侵染的影响不明显. 香鱼出血症病

理特征与前者的出血症病理学特征在脾脏、肝脏相似, 但在肠道与鳃也同样发生了明显的病理变化, 这一点有别于前者的病理学特征. 说明嗜水气单胞菌引起的出血症不仅使香鱼的免疫系统遭到破坏, 也使其呼吸系统、消化系统功能减弱或丧失. 笔者在鱼鳃病变观察中同样发现: 病鱼鳃表面纤毛破损, 鳃小片结构崩解形成空泡, 造成病鱼严重的呼吸系统障碍. 脾脏是机体免疫器官, 病鱼脾脏出血明显, 机体免疫能力减弱. 由于脾脏受损, 机体发生补偿性病理变化, 病鱼脾脏中出现大量的淋巴细胞、浆细胞, 发生炎症反应, 以增强机体的抵抗力. 鳃上皮细胞增生, 粘液分泌亢进, 大量粘液的产生可以覆盖在鳃片上起保护作用. 不仅如此, 肠道黏膜表面的隐窝和上皮内出现大量杯状细胞, 这些杯状细胞主要功能是分泌粘蛋白, 这些蛋白覆盖在粘膜表面不仅可以保护其不被细菌侵染, 而且可以分泌溶菌酶起到杀菌的作用.

在病理观察中发现病变组织的共同特征为不同程度的水变性和脂肪变性. 患病香鱼脾脏细胞间隙或细胞内出现大量细菌菌体, 再次印证了脾脏组织是细菌主要侵袭对象. 脾脏细胞线粒体嵴断裂消失、溶酶体大量增加、细胞内出现空泡等表明脾脏已经发生了严重的病理变化. 病鱼肝细胞发生广泛的脂肪变性, 致使细胞内脂肪滴大量蓄积, 从而严重破坏细胞器的正常结构, 影响肝脏正常消化、合成、储存及解毒等正常功能. 肠道是营养物质的消化与吸收的场所, 肠道细胞间隙变大, 内质网广泛性肿胀, 线粒体嵴溶解消失及出现致密核心、无定形电子密度颗粒和髓鞘样结构等超微病理变化. 线粒体对细胞内水、电解质、pH 等变化尤为敏感, 其结构模糊、空泡化可能是缺氧或病原毒素长时间积累导致的结果. 目前报道的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、鲫(*Carassius auratus*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)等<sup>[6-12]</sup>水产动物细菌感染或细菌胞外产物、病毒性感染都可观察到相似的细胞病变, 这类病变的发生机理及在疾病的发生与发展过程中的意义有待进一步研究.

#### 参考文献:

- [1] 李星云. 香鱼健康养殖实用新技术[M]. 北京: 海洋出

- 版社, 2009:1-8.
- [2] 陈百尧, 唐兴本, 伏光辉. 内陆水库网箱养殖香鱼出血病的防治研究[J]. 江西水产科技, 2007(1):27-29.
- [3] 张呈念, 史雨红, 李祥云, 等. 一株引起香鱼出血症的嗜水气单胞菌的鉴定[J]. 水产科学, 2009, 28(7): 370-374.
- [4] Kobayashi T, Imai M, Ishitaka Y, et al. Histopathological studies of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*[J]. Journal of Fish Diseases, 2004, 27:451-457.
- [5] 陆宏达, 金丽华. 嗜水气单胞菌败血症的研究[J]. 水产学报, 1996(3):223-230.
- [6] 陆宏达, 范丽萍, 薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J]. 水产学报, 1999, 23(1):60-66.
- [7] 袁莉民, 李恕, 丛宁. 鲫鱼暴发性流行病肝心组织的超微病理变化[J]. 江苏农学院学报, 1994, 15(3):70-73.
- [8] 郭琼林, 陈燕, 韩先朴. 鳊出血性开口病的病理学研究[J]. 水生生物学报, 1997, 21(4):327-333.
- [9] 张奇亚, 李正秋. 鳊鱼病毒病原的检出及组织病理分析[J]. 水生生物学报, 1999, 23(2):151-154.
- [10] 金珊, 蔡完其, 於宏, 等. 大黄鱼溶藻弧菌病细胞病理变化的初步研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(2):59-62.
- [11] 金珊, 郑天伦, 王国良, 等. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(5):439-441.
- [12] Haney D C, Hursh D A, Mix M C, et al. Physiological and hematological changes in chum salmon artificially infected with erythrocytic necrosis virus[J]. Aquat Anim Health. 1992(4):48-57.

## Histopathological Changes in Main Target Organs of AYU (*Plecoglossus altivelis*) Infected with *Aeromonas hydrophila*

LI Ming-yun<sup>1</sup>, ZHANG Cheng-nian<sup>1,2</sup>, MIAO Liang<sup>1</sup>, WANG Cheng-yi<sup>1</sup>, CHEN Jiong<sup>1</sup>, SHI Yu-hong<sup>1</sup>

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Wenzhou Vocational College of Science & Technology, Wenzhou 325006, China)

**Abstract:** In this paper studies are conducted on the pathological changes of blood and related organizations of *Plecoglossus altivelis* artificially injected with *Aeromonas hydrophila*, which was first separated from the coelomic fluid of the sicken *Plecoglossus altivelis* and then diluted followed by being cultivated. Pathological changes of *Plecoglossus altivelis* tissues (gill, liver, spleen, kidney, heart & intestine) were observed, finding that the liver, spleen, intestine are the major organelles which are easily infected. Histopathological changes of liver, spleen, intestine are characterized by extensive cellular degeneration, necrosis, and large number of immune cells such as monocytes and plasma cells proliferation. The findings in ultra-structure are as follows: a kind of bacterium whose length was about 2  $\mu\text{m}$  and breadth was 0.5  $\mu\text{m}$  is identified in spleen. The changes of spleen are characterized by the disappearance of mitochondria ridge, the increase number of lysosome, and the enlargement the intercellular gaps. The pathological changes are also significant in liver and characterized by a series of indicators such as the denaturation of fat, the increase of lysosomes, the rupture of mitochondria ridge, and the decrease of glycogen. And results arising from the pathological changes can be described as follows: the intestinal cell gap of the infected AYU becomes larger, and the nuclein of it mostly or absolutely sheds; the mitochondrial membrane is damaged; the marrow is broken into the medullary and formed medullary corpuscles.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; *Plecoglossus altivelis*; histopathology

(责任编辑 贺赛龙)