

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.02.010

维氏气单胞菌感染胭脂鱼的 组织病理学研究

李芳, 刘小红, 黄静, 张耀光, 王志坚

西南大学 水产学院/淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室/水产科学重庆市重点实验室, 重庆 400715

摘要: 为研究维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)感染胭脂鱼的组织病理特征, 通过人工感染获得胭脂鱼肾(中肾、头肾)、脾脏、肝脏和肠道病理组织, 结合组织学、组织化学以及透射电镜技术对组织样本进行观察, 结果显示: 维氏气单胞菌感染后, 组织显微结构层面出现了出血、溶血、肝细胞空泡化、黑色素巨噬细胞中心(MMC)响应和淋巴细胞浸润等现象; 超微结构层面显示: 中肾肾小球过滤装置变形, 头肾中巨噬细胞功能活跃, 脾脏网状细胞和内皮细胞肿胀坏死, 肝脏糖原消失, 线粒体肿胀以及狄氏间隙结构遭到破坏; 肠道组化染色结果显示: 虽然肠道组织损伤严重, 但其黏液细胞类型和数量并未发生显著变化。

关键词: 维氏气单胞菌; 胭脂鱼; 黑色素巨噬细胞中心;

黏液细胞

中图分类号: Q95-3

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2023)02-0086-10

Histopathology of Chinese Sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) Infected with Virulent *Aeromonas veronii*

LI Fang, LIU Xiaohong, HUANG Jing,
ZHANG Yaoguang, WANG ZhijianCollege of Fisheries, Southwest University / Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development,
Ministry of Education / Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to study the hispathological characteristics of *Aeromonas veronii* (vAv) infected Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*), the pathological tissues of trunk kidney, head kidney, spleen, liver and intestine of vAv infected Chinese sucker were observed by histology, histochemistry and TEM technique. The results of histopathological examination revealed that the phenomena of hemorrhage, hemolysis, hepatocytes vacuolation, MMCs response and lymphocyte infiltration were observed in the microstructure of

收稿日期: 2021-07-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(32202971); 重庆市科技局技术创新与应用发展项目(4322200073)。

作者简介: 李芳, 讲师, 主要从事鱼类资源保护与利用的研究。

通信作者: 王志坚, 教授。

tissues. The ultrastructure level showed the malformation of glomerulus filtration device in trunk kidney, macrophages activated in head kidney, reticular cells and endothelial cells edema necrosis in spleen, the disappearing of glycogen, mitochondria swelling and the degeneration of the diss space in liver. The results of intestinal histochemical staining showed that although the intestinal tissue was seriously damaged, the type and number of mucus cells did not change significantly.

Key words: *Aeromonas veronii*; *Myxocyprinus asiaticus*; melano-macrophage centre (MMC); mucus cell

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)为革兰氏阴性菌,广泛分布于各种水生环境中,可导致鱼类发生细菌性败血症(motile aeromonas septicaemia, MAS). 据报道,维氏气单胞菌感染翘嘴鲌(*Culter alburnus*)^[1]、虹鳟(*Oncorhynchus mikiss*)^[2]、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[3]、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)^[4]、杂交鲟(*Acipenser baerii* ♀ × *Acipenser schrenckii* ♂)^[5]、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)^[6]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[7]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)^[8]等水产动物,可直接导致宿主发病或死亡.

根据病症, MAS 大致分为两种类型:急性出血型败血症,表现为出血、弥散性坏死和组织水肿^[9-10];慢性溃疡型综合症,以真皮溃疡形成为典型特征^[11-12]. 病症表现往往与致病菌携带的毒力因子密切相关,而维氏气单胞菌的毒力因子主要有溶血素 HlyA, 气溶素 AerA, 热不稳定型细胞兴奋性肠毒素 Alt, 热稳定型细胞肠毒素 Ast, 极性鞭毛蛋白 FlaA, 侧鞭毛蛋白 LafA, 丝氨酸蛋白酶 AspA, 细菌 3 型分泌系统内膜成分 AscV 和 AexT, 纤毛蛋白 BfpA 和 BfpG, $\sigma 54$ 依赖性转录因子 VasH, 志贺样病毒 Stx-1 和 Stx-2, 外膜蛋白 OmpA 和脂肪酶 Lip 等^[13-16].

胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)是亚口鱼科鱼类在亚洲分布的唯一单型属、种,其体型别致,颜色艳丽,具有“亚洲美人鱼”的美称,极具研究和观赏价值. 近年来,由于胭脂鱼野外资源骤减,已被列为我国二级保护动物^[17]. 虽然胭脂鱼人工繁殖已经成功,但养殖过程中病害频发成为限制其健康养殖的重要因素. 据报道,维氏气单胞菌感染可造成胭脂鱼严重患病,进而导致巨大的经济损失^[18],但至今有关胭脂鱼感染维氏气单胞菌的组织病理研究还未见报道.

我们已在患病胭脂鱼组织中成功分离到 1 株强致病性维氏气单胞菌 BBAv1^[19],该菌株将被运用于本研究的人工感染实验中. 通过观察 *A. veronii* 感染后胭脂鱼肾(中肾、头肾)、脾脏和肝脏的显微和超微结构变化,组化染色观察肠道在感染前后黏液细胞数量和类型变化,结合黑色素巨噬细胞中心(Melano-macrophage centres, MMC)在组织中的变化情况来评价各组织病理损伤程度以及在抗 *A. veronii* 感染中的免疫功能发挥状况,以此为胭脂鱼感染 *A. veronii* 的组织病理学和抗菌免疫反应研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 人工感染实验鱼

实验所用胭脂鱼(体质量为 20.20 ± 1.92 g, 全长为 126.80 ± 3.90 mm)购买自眉山市东坡区一养殖场. 实验鱼养殖于室内循环水系统中,水温控制在 28 ± 0.50 °C,溶氧 7.00 ± 0.50 mg/L,光周期为 12L : 12D. 在每天的 9:00 和 17:00 分别投喂 1 次商品饲料,每次投喂量为鱼体质量的 1%,投喂 2 h 后用虹吸吸走粪便和残饵,同时换水 1/4. 暂养 2 周后选择体表无伤、状态良好的个体开始感染实验. 将保存于 -80 °C 的维氏气单胞菌毒力菌株 BBAv1 进行菌体复苏,后利用分光光度法和菌落计数法测定并调节菌液浓度为 2.0×10^8 cfu/mL(即 24 h 的半致死浓度)^[19]. 实验组随机选取 20 尾胭脂鱼作为攻毒对象,腹腔注射 200 μ L 菌液;对照组随机选取 20 尾胭脂鱼注射相同剂量的无菌 PBS(磷酸盐缓冲溶液). 注射完成后,实验组和对照组 10 尾/组分别养殖于独立的循环水系统中等待取材,期间记录实验鱼发病时间和死亡情况.

1.2 取材

注射感染后,选取 5 尾处于濒死状态(沉于缸底,呼吸缓慢,失去刺激反应能力)的胭脂鱼,用 MS-222

(100 mg/L)麻醉后进行解剖取材。将取出的肾(中肾、头肾)、脾脏、肝脏和肠道(按长度等分为前肠、中肠和后肠)用波恩氏液固定,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后,进行常规石蜡切片,厚度为 5 μm ,HE 染色后,在 Nikon DXM1200 显微镜下拍照。与此同时,另取一部分肠道用卡诺氏液固定,后用于 AB-PAS 染色。

为了观察组织亚显微结构层面的病理变化,将中肾、头肾、脾脏和肝脏用预冷于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 2.5%戊二醛固定,固定好的样本经 0.1 mol/L(pH 值为 7.4)磷酸缓冲液漂洗 3 次,后经 1%四氧化锇固定 2 h,经梯度酒精脱水,丙酮置换,环氧树脂浸透、包埋后,制成 60 nm 的超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅染色后,用 H-7500 型电镜观察,Gatan-780 CCD 拍照。

1.3 组织病理特征定量与半定量描述

用于组织显微结构观察的每个样本取 5 张切片,每张切片随机选取 10 个视野(每个视野面积为 $400\times 300\text{ }\mu\text{m}^2$)进行观察,即每个样本均进行 50 个视野的观察。使用 Image-Pro Plus 6.0 图像测量软件,对各组织观察视野中所含 MMC 分别进行计数和面积测量,并计算单位面积中 MMC 所占比值^[20]。另外,根据 Sun 等^[21]的方法对各组织病理程度进行评估,即根据某一病理现象在所观察切片视野中出现的频率高低,将病理程度划分为无病理现象(—,0%),轻度(+, $\leq 25\%$),中度(++, $25\%\sim 50\%$)和重度(+++, $\geq 50\%$)。

1.4 数据统计与分析

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用 SPSS 19.0(IBM, Chicago, USA)软件对所得数据进行单因素方差分析(One-way analysis of variance, ANOVA)和独立样本 t 检验, $p<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 死亡率统计

实验组在维氏气单胞菌注射后 6 h 开始陆续发病,统计至感染后 24 h,实验组死亡率为 48.66%,显著高于对照组($p<0.05$),且实验组死亡大多发生在感染后 14~24 h 之间。

2.2 组织 MMC 响应情况

未受感染时,脾脏中单个 MMC 面积最大($p<0.05$),中肾中 MMC 数量最多,相对面积最大($p<0.05$)(表 1)。维氏气单胞菌感染后,各组织中 MMC 变化明显,表现为中肾、头肾、脾脏和肝脏中的单个 MMC 面积分别增大了 1.25, 1.20, 1.13 和 1.20 倍;中肾、头肾和脾脏中 MMC 数量分别增加了 1.76, 1.73 和 2.20 倍;中肾、头肾和脾脏中 MMC 占比分别增大了 2.12, 2.96 和 3.92 倍。总体来看,中肾、头肾和脾脏中 MMC 各指标变化趋势基本一致,而肝脏在感染前后其 MMC 数量和占比均未发生显著变化。值得一提的是,脾脏中 MMC 数量和占比在感染前后变化最大。

表 1 维氏气单胞菌感染对胭脂鱼中肾、头肾、脾脏和肝脏 MMC 指标的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

MMC 指标	组别	中肾	头肾	脾脏	肝脏
单个 MMC 面积/ μm^2	对照组	148.12 $\pm$ 1.97Bb	149.17 $\pm$ 0.58Ba	180.4 $\pm$ 9.78Aa	125.27 $\pm$ 11.41Ba
	感染组	185.89 $\pm$ 6.67Aa	179.71 $\pm$ 8.83Aa	204.62 $\pm$ 8.00Aa	150.83 $\pm$ 11.05Ba
单位面积 MMC 数量/ μm^2	对照组	6.24E-06 $\pm$ 5.26E-08Ab	6.15E-06 $\pm$ 1.04E-07Ab	3.67E-06 $\pm$ 3.27E-08Bb	1.69E-06 $\pm$ 2.34E-08Ca
	感染组	1.10E-05 $\pm$ 2.91E-08Aa	1.07E-05 $\pm$ 4.73E-08Aa	8.08E-06 $\pm$ 1.54E-08Ba	1.66E-06 $\pm$ 1.52E-08Ca
MMC 组织占比	对照组	9.76E-04 $\pm$ 1.12E-05Ab	9.12E-04 $\pm$ 4.37E-06Bb	3.93E-04 $\pm$ 1.73E-06Cb	3.18E-04 $\pm$ 6.08E-06Da
	感染组	2.07E-03 $\pm$ 3.85E-05Ba	2.70E-03 $\pm$ 8.43E-05Aa	1.54E-03 $\pm$ 5.89E-05Ca	3.46E-04 $\pm$ 1.93E-05Da

注: E 表示以 10 为底的指数。相同组织小写字母不同表示 $p<0.05$,不同组织大写字母不同表示 $p<0.05$,差异有统计学意义。

2.3 组织病理程度评价

维氏气单胞菌感染后, 胭脂鱼各组织出现了一系列相同的病理特征(表 2), 如组织出血、溶血, 内皮细胞损伤, 组织坏死以及淋巴细胞浸润等. 同时, 一些特殊的病理特征也出现在不同的组织中, 如 MMC 响应仅出现在中肾、头肾、脾脏和中肠组织中, 细胞空泡化仅出现在肝脏组织中.

表 2 维氏气单胞菌感染后, 胭脂鱼中肾、头肾、脾脏、肝脏和肠道病理程度评价 (n=5)

组织	组别	内皮细胞损伤	出血	溶血	淋巴细胞浸润	MMC 响应	组织坏死	细胞空泡化
中肾	对照组	—	—	—	—	—	—	—
	感染组	+	+	+	+	++	+	—
头肾	对照组	—	—	—	—	—	—	—
	感染组	+	+	+	+	++	+	—
脾脏	对照组	—	—	—	—	—	—	—
	感染组	+	+	+	+	++	+	—
肝脏	对照组	—	—	—	—	—	—	—
	感染组	+	+	+	+	—	+	+++
前肠	对照组	—	—	—	—	—	—	—
	感染组	+	+	+	++	—	+	—
中肠	对照组	—	—	—	—	—	—	—
	感染组	+	++	++	+	+	+	—
后肠	对照组	—	—	—	—	—	—	—
	感染组	+	++	++	+	—	+	—

注: —表示无此病理现象, +表示轻度, ++表示中度, +++表示重度; MMC 表示黑色素巨噬细胞中心.

2.4 维氏气单胞菌感染对肾、脾、肝和肠组织结构的影响

2.4.1 中肾

胭脂鱼中肾组织包含了肾小管、肾小球以及排泄管等结构, 这些结构之外为肾间质, 肾间质主要包含了一些拟淋巴组织, 其间可见淋巴细胞、粒细胞、巨噬细胞等, MMC 在 HE 染色下呈棕黄色至棕褐色, 形态并不规则(图 1a). 维氏气单胞菌感染后, 肾小球肿胀变形, 肾间质大量出血并伴随着溶血, 局部组织坏死, 大量淋巴细胞和 MMC 浸润组织(图 1b).

2.4.2 头肾

头肾组织包含了大量的红细胞、淋巴细胞、粒细胞和巨噬细胞, 且组织局部可观察到粒细胞和淋巴细胞的聚集区(图 1c). 维氏气单胞菌感染后, 头肾组织发生急性出血, 且出血部位被大量淋巴细胞浸润, 同时可见局部组织坏死(图 1d).

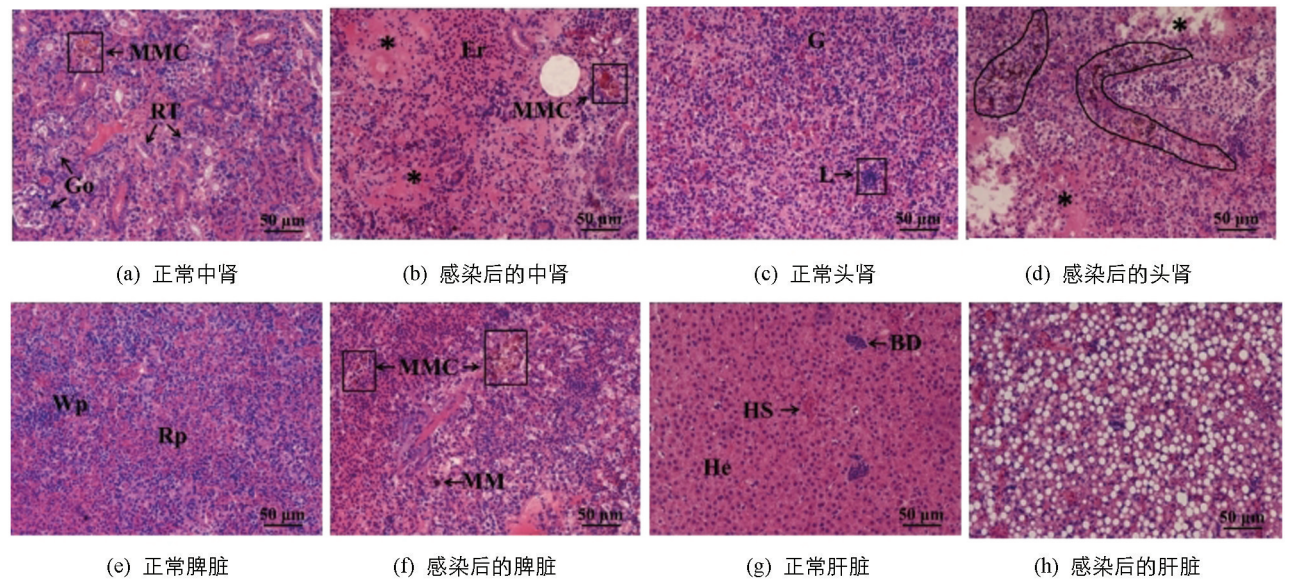
2.4.3 脾脏

胭脂鱼脾脏可分为明显的红髓和白髓, 红髓主要由各个发育阶段的红细胞组成, 白髓主要包含了淋巴细胞、粒细胞和巨噬细胞, 组织中 MMC 多见于椭圆体和血管周围(图 1e). 维氏气单胞菌感染后, 脾脏出现出血、溶血和组织坏死现象, 与此同时, 红细胞退化变性也被观察到, 主要表现为胞质浅染呈淡红色(图 1f).

2.4.4 肝脏

胭脂鱼肝脏细胞可分为两种: 明细胞和暗细胞, 组织中可见肝血窦和胆小管等结构, 组织部分区域有

些许小空泡($5.68\pm0.13\text{ }\mu\text{m}$)(图 1g). 维氏气单胞菌感染后, 肝细胞核发生固缩, 组织局部血细胞凝集, 大片肝组织严重空泡化($8.07\pm0.12\text{ }\mu\text{m}$)(图 1h).



a 图中 RT 为肾小管, MMC 为黑色素巨噬细胞中心, Go 为肾小球; b 图中 Er 为大量红细胞, * 为溶血现象; c 图中 L 为淋巴细胞, G 为粒细胞; d 图中 * 为溶血现象, 曲线图包围为血铁黄素沉积; e 图中 Rp 为红髓, Wp 为白髓; f 图中 MM 为感染后脾脏组织中的黑色素巨噬细胞, MMC 为黑色素巨噬细胞中心; g 图中 He 为肝细胞, BD 为胆小管, HS 肝血窦; h 图中显示肝细胞严重空泡化.

图 1 维氏气单胞菌感染前、后胭脂鱼肾、脾、肝的组织结构

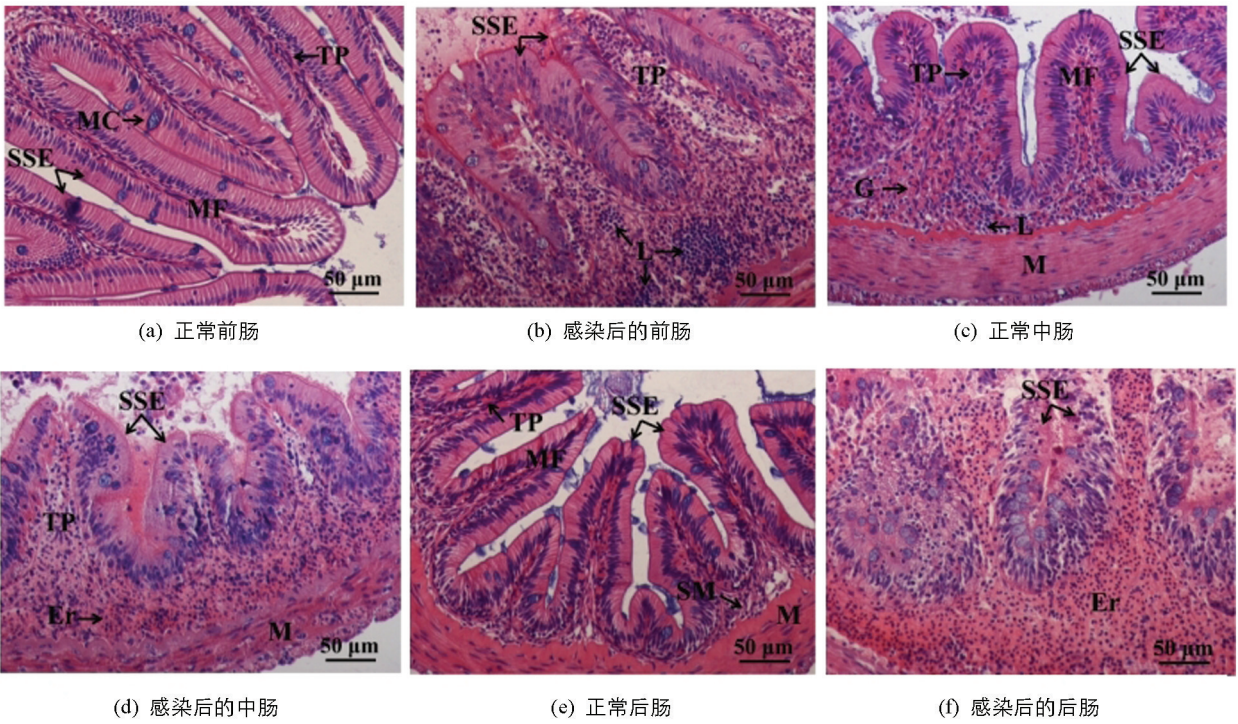
2.4.5 肠道

胭脂鱼肠道可大致分为前肠、中肠和后肠, 结构相似, 均由粘膜层、粘膜下层、肌肉层和浆膜层组成, 粘膜层可被进一步划分为粘膜上层和固有层. 显然, 胭脂鱼前肠粘膜层最高($196.81\pm5.37\text{ }\mu\text{m}$), 中肠($129.75\pm8.98\text{ }\mu\text{m}$)和后肠($126.23\pm9.11\text{ }\mu\text{m}$)次之. 维氏气单胞菌感染后, 肠道各部粘膜上层肿胀、坏死, 固有层和粘膜下层大量出血, 淋巴细胞聚集于粘膜下层. 与此同时, 肌肉层细胞肿胀或部分纤维化, 浆膜层发生水肿(图 2). 另外, 肠道 AB-PAS 染色显示胭脂鱼肠道中包含 4 种类型的黏液细胞(图 3): I 型(红色, 中性), II 型(蓝色, 酸性), III 型(紫红色, 中性偏酸性)和 IV 型(蓝紫色, 酸性偏中性). 从黏液细胞类型来看, 前肠和后肠以 II 型黏液细胞为主, 中肠以 I 型黏液细胞为主. 从黏液细胞数量来看, 中肠黏液细胞最多, 前肠和后肠次之. 维氏气单胞菌感染前后, 中肠黏液细胞类型和数量均未发生显著变化, 而前肠 III 型和后肠 IV 型黏液细胞数量变化有统计学意义(表 3).

表 3 维氏气单胞菌感染对胭脂鱼前肠、中肠和后肠中黏液细胞的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

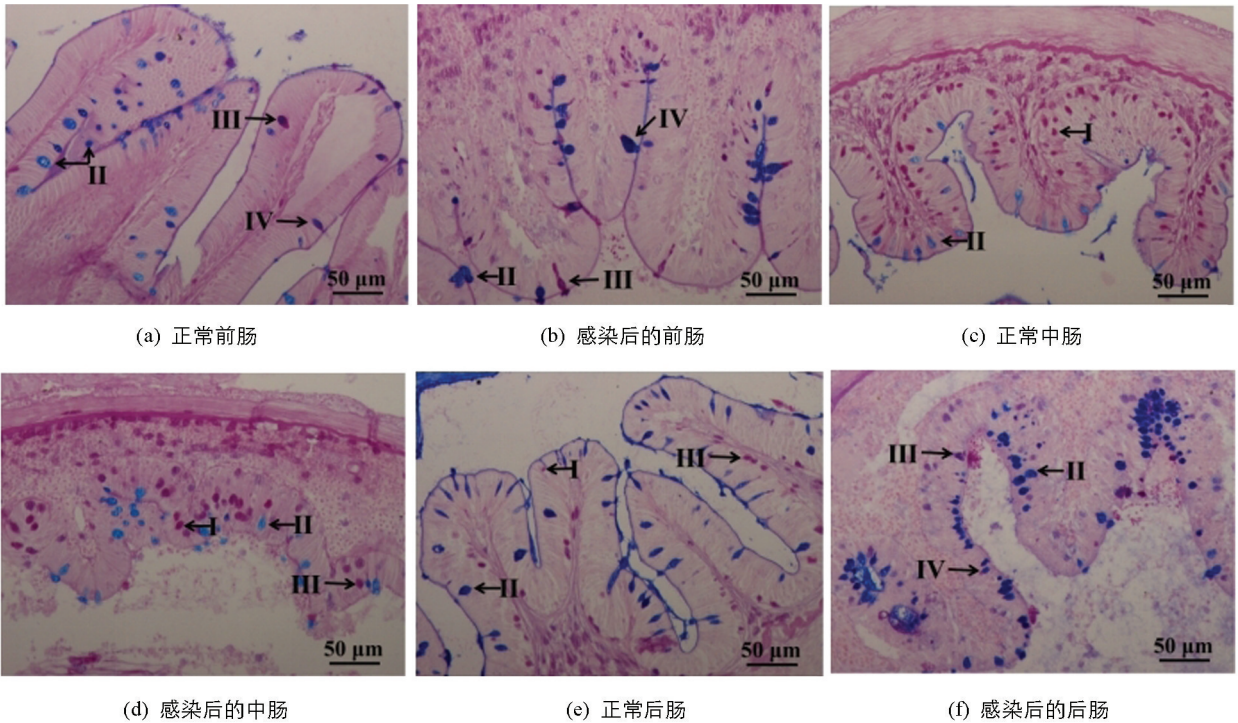
肠道	组别	I 型黏液细胞	II 型黏液细胞	III 型黏液细胞	IV 型黏液细胞	黏液细胞总数
前肠	对照组	$1.16\pm0.20\text{Bb}$	$3.46\pm0.43\text{ABa}$	$2.10\pm0.11\text{Ab}$	$1.76\pm0.35\text{Ab}$	$8.48\pm0.80\text{AB}$
	实验组	$0.93\pm0.08\text{Bc}$	$3.86\pm0.14\text{ABa}$	$0.96\pm0.24\text{Ac}^*$	$1.63\pm0.17\text{Ab}$	$7.38\pm0.32\text{A}$
中肠	对照组	$4.96\pm0.40\text{Aa}$	$2.20\pm0.15\text{Bb}$	$1.90\pm0.23\text{Ac}$	$0.70\pm0.05\text{Bd}$	$9.76\pm0.55\text{A}$
	实验组	$3.93\pm0.08\text{Aa}$	$2.30\pm0.65\text{Bb}$	$1.33\pm0.29\text{Abc}$	$0.83\pm0.14\text{Bc}$	$8.39\pm0.95\text{A}$
后肠	对照组	$0.46\pm0.08\text{Bb}$	$4.53\pm0.49\text{Aa}$	$0.96\pm0.17\text{Bb}$	$0.80\pm0.15\text{Bb}$	$6.75\pm0.76\text{B}$
	实验组	$0.40\pm0.05\text{Cc}$	$5.36\pm0.63\text{Aa}$	$1.23\pm0.17\text{Abc}$	$2.30\pm0.28\text{Ab}^*$	$9.29\pm1.01\text{A}$

注: 相同组织相同组别中不同类型黏液细胞小写字母不同表示 $p<0.05$, 不同组织相同组别中同种类型黏液细胞大写字母不同表示 $p<0.05$, 相同组织不同组别中同种类型黏液细胞带有 * 表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.



a 图中 MF 为粘膜层, TP 为固有层, MC 为黏液细胞, SSE 为复层扁平上皮; b 图中 SSE 为肿胀的复层扁平上皮, TP 为固有层, L 为浸润粘膜下层的淋巴细胞; c 图中 G 为粒细胞, L 为淋巴细胞, M 为肌肉层; d 图中 Er 为粘膜下层中的大量红细胞, SSE 为肿胀的复层扁平上皮, TP 为固有层; e 图中 SSE 为复层扁平上皮, MF 为粘膜层, TP 为固有层, SM 为粘膜下层, M 为肌肉层; f 图中 SSE 为坏死的复层扁平上皮, TP 为出血的固有层, SM 为粘膜下层。

图 2 维氏气单胞菌感染前、后胭脂鱼肠道的组织结构



4 种类型的黏液细胞: I 型(红色, 中性), II 型(蓝色, 酸性), III 型(紫红色, 中性偏酸性)和 IV 型(蓝紫色, 酸性偏中性)。

图 3 维氏气单胞菌感染前、后胭脂鱼肠道中的黏液细胞

2.5 维氏气单胞菌感染对肾、脾和肝超微结构的影响

2.5.1 中肾

肾小球中的内皮细胞紧贴系膜细胞基膜内侧进行胞质延伸,并在远端形成了许多微窗孔,足细胞胞质也黏贴在系膜细胞基膜外侧,其胞质形成了许多不规则的指状突起(称为足突),上述结构形成了肾小球过滤装置(内皮细胞胞质微窗孔-系膜细胞基膜-足细胞胞质足突)(图 4a). 维氏气单胞菌感染后,系膜细胞基膜肿胀,内皮细胞形成的微窗孔消失,足细胞大量增生,足突大量融合,导致肾小球过滤装置结构严重变形(图 4b).

2.5.2 头肾

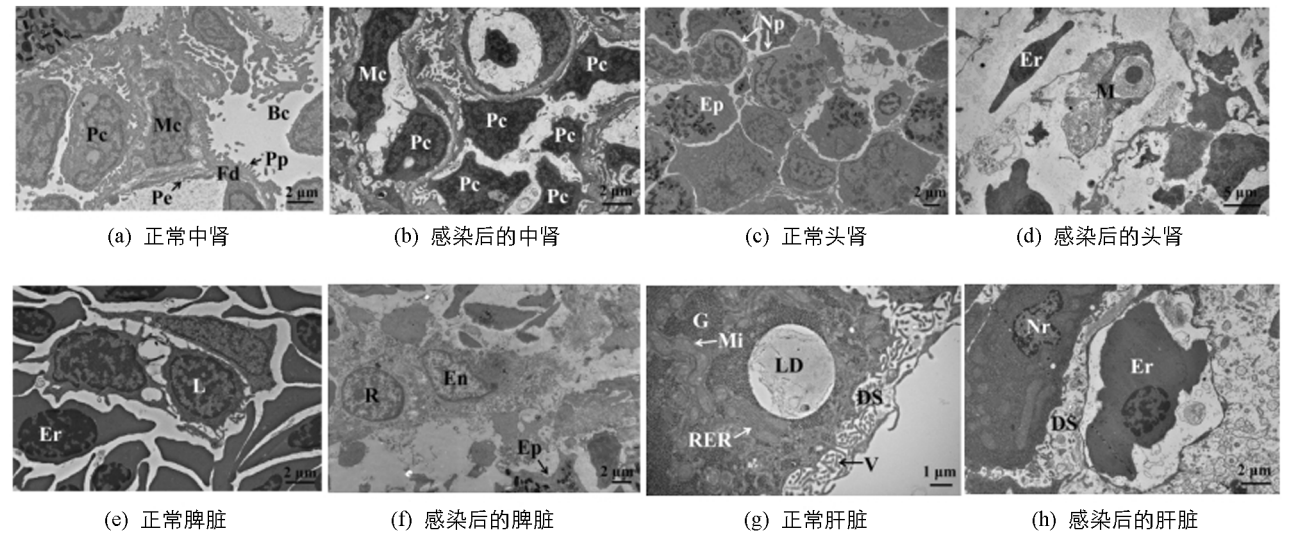
大量饱含颗粒物质的中性粒细胞(含低电子密度的较大圆形颗粒)和嗜酸性粒细胞(含高电子密度的不规则颗粒)分散于头肾组织中(图 4c). 维氏气单胞菌感染后,内皮细胞严重坏死,细胞间隙增大,水肿明显,巨噬细胞功能活跃,表现为内含较大的吞噬泡(图 4d).

2.5.3 脾脏

脾脏中可见形态完好的红细胞、网状细胞和内皮细胞(图 4e). 维氏气单胞菌感染后,网状细胞和内皮细胞肿胀坏死,组织中出现了大量的嗜酸性粒细胞(图 4f).

2.5.4 肝脏

肝细胞中可见大量的线粒体、糖原、粗面内质网、脂滴以及狄氏间隙中大量的肝细胞胞质形成的微绒毛(图 4g). 维氏气单胞菌感染后,肝细胞中糖原消失,线粒体肿胀,髓样小体增多,狄氏间隙遭到严重破坏,表现为微绒毛大量消失(图 4h).



a 图中 Mc 为系膜细胞, Pe 为内皮细胞, Pc 为足细胞, Pp 为足细胞足突, Fd 为肾小球过滤装置, Bc 为肾小囊; b 图中 Pc 为增生的足细胞; c 图中 Np 为包含颗粒物质的中性粒细胞, Ep 为嗜酸性粒细胞; d 图中有含大型吞噬泡的巨噬细胞; e 图中 Er 为红细胞, L 为淋巴细胞; f 图中 En 为肿胀坏死的内皮细胞, R 为网状细胞, Ep 为增多的嗜酸性粒细胞; g 图中 Mi 为线粒体, G 为糖原, RER 为粗面内质网, LD 为脂滴, DS 为狄氏间隙, V 为肝细胞微绒毛; h 图中 DS 为遭到破坏的狄氏间隙.

图 4 维氏气单胞菌感染前、后胭脂鱼肾、脾、肝的超微结构

3 结论

3.1 维氏气单胞菌感染的组织病理特征

众多研究表明,维氏气单胞菌感染将造成宿主产生一系列明显的临床病症,如体表溃疡、皮肤发红、鳍条腐烂、内脏充血等,组织病理变化则主要为细胞坏死、空泡化、组织局部溶血、炎症细胞浸润等^[1, 5-6]. 总体而言,维氏气单胞菌感染造成的病理特征基本相似,只是随着感染剂量和时间以及毒力因子数量的增加,组织病理严重程度也随之增加^[2-4, 7].

3.2 组织中 MMC 的作用

鱼类组织中的黑色素巨噬细胞中心(MMC)不仅含有黑色素巨噬细胞(MM),还含有一定量的淋巴细胞^[19],因此与哺乳类的脾脏生发中心(splenic germinal centre, SGC)功能相似,对于浆细胞和记忆 B 细胞的增殖至关重要^[22]。研究发现 MMC 变化往往与感染性疾病、慢性炎症、红细胞代谢和组织损伤密切相关^[23-24]。与之类似,本研究中维氏气单胞菌感染导致胭脂鱼肾脏、脾脏组织中 MMC 大小、数量均发生显著变化,因此我们可以推测 MMC 在抗菌感染中可能发挥着重要作用。与此同时,我们也观察到感染前后肝脏中 MMC 变化不明显,而这可能与肝脏中巨噬细胞迁移速度较慢有关^[25]。另外,由于脾脏中 MMC 在感染前后变化程度最大,因此我们也认为脾脏中的 MMC 可以作为评价机体生理状态的敏感标记^[26]。

3.3 病理现象背后的意义

中肾内肾小球和肾小管等结构和组织的完好对于其功能发挥至关重要。已有研究指出肾小球中的足细胞非常敏感,是诸多有毒物质的靶细胞^[27]。本研究中维氏气单胞菌感染使得足细胞增生、足突大量融合,这可能是细菌毒力因子作用的结果。另外,肾小球滤过装置变形在一定程度上意味着中肾对原尿的过滤功能会受损,但本研究中并未发现肾小管发生明显变化,这可能与肾小管较强的自我修复能力有关^[28-29]。同样,本研究发现 MMC 在中肾组织中较为常见,且在细菌感染前后变化明显,据 MMC 所具备的免疫功能推测胭脂鱼中肾是具备一定免疫功能的,这在中肾转录组研究中得到证实^[30]。

鱼类头肾不仅是重要的免疫器官,同时也是造血和内分泌调节器官^[31]。本研究中维氏气单胞菌感染造成头肾组织结构严重损伤,这无疑会影响其正常功能的发挥。鱼类脾脏在造血、B 细胞分化和抗体生成等方面发挥着重要作用^[32]。本研究发现维氏气单胞菌感染后脾脏中淋巴细胞、MMC 和粒细胞大量浸润组织,从组织学上也反映出特异性免疫反应和非特异性免疫反应都参与了机体的抗菌活动。

环境污染物如镉、锌、铜、氟等均可导致实验对象肝脏空泡化^[33-35]。本研究中维氏气单胞菌感染也导致了胭脂鱼肝脏空泡化,这说明肝脏空泡化可能是肝脏应激的一个普遍现象。另外,研究发现肝细胞中糖原消失、线粒体肿胀,这似乎说明肝脏糖代谢发生了紊乱;而肝脏狄氏间隙结构遭到严重破坏则可能是导致肝细胞损伤甚至坏死的主要原因^[36]。

黏液细胞中含有的水解酶、免疫球蛋白和溶菌酶等物质对于其消化吸收以及免疫功能的发挥非常重要,根据其内含物质的不同,黏液细胞可大致分为 4 种类型^[37]。本研究发现 II 型黏液细胞在前肠和后肠中占据主要优势,这可能与其消化吸收和杀菌作用有关^[38],而中肠中 I 型黏液细胞数量最多,可能主要起到润滑肠道的作用。但总体而言,维氏气单胞菌感染前后仅胭脂鱼前肠 III 型和后肠 IV 型黏液细胞数量发生了显著变化,这可能是因为黏液细胞的产生是一个为时较长的过程,或者维氏气单胞菌感染造成了肠道严重损伤以至于产生黏液细胞的功能受损,而本研究发现胭脂鱼肠道在细菌感染后损伤严重,因此我们更倾向于第二种解释。

对致病菌而言,其毒力表现与之携带的毒力因子类型和数量密切相关^[39]。本研究使用的毒力菌株 BBAv1^[7]携带的 AerA 和 HlyA 是导致宿主组织出血的关键毒力因子^[40],而 AerA, Alt, HlyA 和 Ast 则与肠炎密切相关^[41]。总而言之,本研究诸多病理现象出现的原因均可由该菌株携带的毒力因子来解释。

参考文献:

- [1] 韩璐璐,杨成年,李芳,等.翘嘴鲌源维氏气单胞菌的分离鉴定及组织病理观察[J].渔业科学进展,2022,43(6):1-12.
- [2] 王兴丽,汪开毓,陈德芳,等.一株虹鳟源维氏气单胞菌的分离鉴定及组织病理学观察[J].中国预防兽医学报,2016,38(11):879-883.
- [3] 韩语,潘纪汶,王昕,等.泥鳅维氏气单胞菌的毒力基因与耐药特性分析[J].水产科学,2022,41(4):564-572.
- [4] 邓汝森,张建州,张浩权,等.鳊源维氏气单胞菌的分离鉴定及毒力基因分析[J].动物医学进展,2022,43(2):35-40.

- [5] 杨成年, 李芳, 朱成科, 等. 杂交鲟出血病病原的分离鉴定与组织病理学观察 [J]. 浙江农业学报, 2021, 33(12): 2275-2285.
- [6] 田浪, 温贵兰, 张升波, 等. 斑点叉尾鮰源致病性维氏气单胞菌的分离与生物学特性鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(11): 3203-3210.
- [7] 朱成科, 向桢, 叶华, 等. 黄颡鱼致病性维氏气单胞菌的分离鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(5): 37-42.
- [8] 蒋国民, 李金龙, 刘丽, 等. 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)细菌性病原分离鉴定及血清免疫因子变化研究 [J]. 水产学报, 2022, 46(3): 1-9.
- [9] BANU; AYDIN Y. Pathological Findings of Experimental *Aeromonas hydrophila* Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2011, 58(1): 47-54.
- [10] ANYANWU M U, CHAH K F, SHOYINKA V S. Evaluation of Pathogenicity of Motile *Aeromonas* Species in African Catfish [J]. International Journal Fishery Aquatic Study, 2015, 2(3): 93-98.
- [11] SKWOR T, SHINKO J, AUGUSTYNIAK A, et al. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* Predominate among Potentially Pathogenic Ciprofloxacin- and Tetracycline-Resistant *Aeromonas* Isolates from Lake Erie [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 841-848.
- [12] ZHANG D H, XU D H, SHOEMAKER C. Experimental Induction of Motile *Aeromonas* Septicemia in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) by Waterborne Challenge with Virulent *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture Reports, 2016, (3): 18-23.
- [13] CHOPRA A K, GRAF J, HORNEMAN A J, et al. VirulenceFactor-Activity Relationships (VFAR) with Specific Emphasis on *Aeromonas* Species (spp.) [J]. Journal of Water and Health, 2009, 7(Suppl 1): S29-S54.
- [14] FARFÁN M, MIÑANA-GALBIS D, FUSTÉ M C, et al. Divergent Evolution and Purifying Selection of the *flaA* Gene Sequences in *Aeromonas* [J]. Biology Direct, 2009, (4): 23.
- [15] ARAVENA-ROMÁN M, INGLIS T J J, RILEY T V, et al. Distribution of 13 Virulence Genes among Clinical and Environmental *Aeromonas* spp. in Western Australia [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2014, 33(11): 1889-1895.
- [16] 高智玲, 纪雪, 郭学军, 等. 嗜水气单胞菌双重荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(12): 1126-1130.
- [17] 张春光, 赵亚辉, 康景贵. 我国胭脂鱼资源现状及其资源恢复途径的探讨 [J]. 自然资源学报, 2000, 15(2): 155-159.
- [18] 黄文明, 王利, 冀国桢, 等. 胭脂鱼维氏气单胞菌和中间气单胞菌的鉴定及药物敏感性 [J]. 水产科学, 2013, 32(4): 210-214.
- [19] LI F, WU D, GU H R, et al. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veroniica* cause motile *Aeromonas septicaemia* in the Cultured Chinese Sucker, *Myxocyprinus asiaticus* [J]. Aquaculture Research, 2019, 50(5): 1515-1526.
- [20] QUALHATO G, DE SABÓIA-MORAIS S M T, SILVA L D, et al. Melanomacrophage Response and Hepatic Histopathologic Biomarkers in the Guppy *Poecilia reticulata* Exposed to Iron Oxide (Maghemite) Nanoparticles [J]. Aquatic Toxicology, 2018, 198: 63-72.
- [21] SUN Y L, LI Y W, RAO J D, et al. Effects of Inorganic Mercury Exposure on Histological Structure, Antioxidant Status and Immune Response of Immune Organs in Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Journal of Applied Toxicology: JAT, 2018, 38(6): 843-854.
- [22] DAVIES L C, JENKINS S J, ALLEN J E, et al. Tissue-Resident Macrophages [J]. Nature Immunology, 2013, 14(10): 986-995.
- [23] SURESH N. Effect of Cadmium Chloride on Liver, Spleen and Kidney Melano Macrophage Centres in Tilapia Mossambica [J]. Journal of Environmental Biology, 2009, 30(4): 505-508.
- [24] VIGANÒ L, BENFENATI E, BOTTERO S, et al. Endocrine Modulation, Inhibition of Ovarian Development and Hepatic Alterations in Rainbow Trout Exposed to Polluted River Water [J]. Environmental Pollution, 2010, 158(12): 3675-3683.

- [25] ZIEGENFUSS M C, WOLKE R E. The Use of Fluorescent Microspheres in the Study of Piscine Macrophage Aggregate Kinetics [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1991, 15(3): 165-171.
- [26] EVANS D, NOWAK B. Effect of Ranching Time on Melanomacrophage Centres in Anterior Kidney and Spleen of Southern Bluefin Tuna, *Thunnus maccoyii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 358-364.
- [27] PETERMANN A, FLOEGE J. Podocyte Damage Resulting in Podocyturia: a Potential Diagnostic Marker to Assess Glomerular Disease Activity [J]. Nephron Clinical Practice, 2007, 106(2): c61-c66.
- [28] KIMURA T, TAKABATAKE Y, TAKAHASHI A, et al. Autophagy Protects the Proximal Tubule from Degeneration and Acute Ischemic Injury [J]. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 2011, 22(5): 902-913.
- [29] JIANG Y L, FENG S S, ZHANG S H, et al. Transcriptome Signatures in Common Carp Spleen in Response to *Aeromonas hydrophila* Infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 57: 41-48.
- [30] SONG X H, HU X L, SUN B Y, et al. A Transcriptome Analysis Focusing on Inflammation-Related Genes of Grass Carp Intestines Following Infection with *Aeromonas hydrophila* [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40777.
- [31] 罗辉, 杨月静, 向梦斌, 等. 齐口裂腹鱼感染嗜水气单胞菌后血液生化指标与组织病理学研究 [J]. 淡水渔业, 2017, 47(4): 44-50.
- [32] 藏林. 红鳍东方鲀肝脏和脾脏的转录组比较分析及 IL-2、IFN- γ 的重组制备 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2019.
- [33] 陈剑杰, 曹谨玲, 罗永巨. 氟对草鱼肝脏组织显微和超微结构的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(12): 108-111.
- [34] 黄超. 水体铜和锌暴露对矛尾复虾虎鱼肝脏脂代谢的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [35] 刘小红. 水体镉暴露对稀有鮕鲫肝脏毒性及脂代谢影响的初步研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [36] DIETZEL E, WESSLING J, FLOEHR J, et al. Fetuin-B, a Liver-Derived Plasma Protein is Essential for Fertilization [J]. Developmental Cell, 2013, 25(1): 106-112.
- [37] 刘亚秋, 李芳, 赵健蓉, 等. 大鳞副泥鳅仔稚鱼消化道黏液细胞分布及发育 [J]. 动物学杂志, 2016, 51(4): 623-632.
- [38] LOBB C J. Secretory Immunity Induced in Catfish, *Ictalurus punctatus*, Following Bath Immunization [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1987, 11(4): 727-738.
- [39] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 82-85.
- [40] WANG G H, CLARK C G, LIU C Y, et al. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(3): 1048-1054.
- [41] JANDA J M, ABBOTT S L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(1): 35-73.

责任编辑 周仁惠