

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202001018

瓦氏黄颡鱼多子小瓜虫病的组织病理学观察*

贺 扬^{1,2}, 樊 威³, 陈 杰¹, 廖碧华¹, 覃川杰^{1,2}, 王 均^{1,2**}

(1. 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室, 四川 内江 641000;

2. 内江师范学院 生命科学学院, 四川 内江 641000;

3. 四川省内江市农业科学院 水产研究所, 四川 内江 641000)

摘要:【目的】探讨多子小瓜虫对瓦氏黄颡鱼的致病机理。【方法】对6尾小瓜虫感染的自然发病的瓦氏黄颡鱼的皮肤、鳃、胃肠道、肝、脾、肾和心进行石蜡切片制备、常规HE染色和爱先蓝-糖原染色(AB-PAS),并对各组织脏器进行病理损伤观察。【结果】多子小瓜虫感染后,鱼体主要表现为消瘦,皮肤出现小白点,严重时可见皮肤破溃;皮肤黏液涂片和鳃丝压片可见虫体。病理学观察各组织脏器病理变化显示:多子小瓜虫对胃肠道、肝、脾、肾和心影响较小,且未见虫体寄生;但可引起鳃和皮肤严重病变,并大量寄生于鳃和皮肤。多子小瓜虫可寄生于鳃的鳃丝、鳃耙和鳃弓,引起其结构紊乱,鳃小片、鳃耙和鳃弓上皮细胞坏死脱落,鳃耙和鳃弓上的味蕾细胞消失或被增生的细胞掩盖,且感染后黏液细胞尤其以V型黏液细胞明显增多。多子小瓜虫寄生于皮肤,可引起寄生部位或隆起或溃烂,表皮层黏液细胞和棒状细胞增生、坏死,真皮的致密层向表皮层隆起,形成“乳头样”结构,肌纤维颗粒变性、严重时出现坏死溶解,肌间隙炎性细胞浸润。【结论】多子小瓜虫主要损伤瓦氏黄颡鱼的皮肤和鳃,导致鱼体食欲丧失,渗透失调,最终破坏机体内环境,引起鱼体死亡。

关键词: 瓦氏黄颡鱼; 多子小瓜虫; 鳃; 皮肤; 组织病理

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X(2020)06-1016-07

Histopathological Observation of *Pelteobagrus vachelli* Infected with *Ichthyophthirius multifiliis*

HE Yang^{1,2}, FAN Wei³, CHEN Jie¹, LIAO Bihua¹, QIN Chuanjie^{1,2}, WANG Jun^{1,2}

(1. Conservation and Utilization of Fishes Resources in the Upper Reaches of the Yangtze River, Key Laboratory of Sichuan Province, Neijiang 641000, China; 2. College of Life Science, Neijiang Normal University, Neijiang 641000, China; 3. Institute of Fisheries, Neijiang Academy of Agricultural Sciences in Sichuan Province, Neijiang 641000, China)

Abstract: [Purpose] To explore the pathogenic mechanism of *Ichthyophthirius multifiliis*. [Method] The skin, gill, gastrointestinal tract, liver, spleen, kidney and heart from infected *Pelteobagrus vachelli* were sampled from nature diseased fish and stained by HE and AB-PAS to observe the histopathological changes. [Results] *I. multifiliis* did slight damage to digestive tract, liver, spleen, kidney and heart, and no parasite was only observed in these organs. However, *I. multifiliis* contributed to severe damage to gill and skin, *I. multifiliis* was observed in skin and gill. *I. multifiliis*

收稿日期: 2020-01-11

修回日期: 2020-08-15

网络首发时间: 2020-11-12 15:35:14

*基金项目: 四川省科技计划应用基础研究项目(2018JY0286); 内江师范学院大学生创新创业孵化项目(X2018024)。

作者简介: 贺扬(1987—), 女, 四川内江人, 博士, 副教授, 主要从事水生生物疾病与病理研究。

E-mail: he_yang_yang@126.com

**通信作者 Corresponding author: 王均(1986—), 男, 四川成都人, 博士, 副教授, 主要从事水生生物疾病与免疫研究。E-mail: wangjunzl@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20201112.1431.001.html>



infection caused gill filament, branchial arch and gill raker confusion and necrosis, taste bud disappearance or was covered, and proliferation of type V cellula mucipara. *I. multifiliis* infection caused skin bulge or ulcer, proliferation and necrosis of cellula mucipara and club cells in epidermis, and bulge of dermis to form nipple like structure. Muscle fiber showed granular degeneration, and more severely lysis, inflammatory cells infiltration. [Conclusion] Skin and gill were the most damaged organ caused by *I. multifiliis*, which lead to loss balance of internal environment to death.

Keywords: *Pelteobagrus vachelli*; *Ichthyophthirius multifiliis*; gill; skin; histopathology

瓦氏黄颡鱼 (*Pelteobagrus vachelli*) 属鲇形目 (Siluriformes) 鲇科 (Bagridae) 黄颡鱼属 (*Pelteobagrus*), 主要分布于长江的干支流及长期与长江相通的湖泊和溪流。瓦氏黄颡鱼肉质细嫩, 味道鲜美, 无肌间刺, 营养成分丰富, 是中国淡水优质经济型鱼类之一^[1]。据 2019《中国渔业统计年鉴》统计显示: 全国黄颡鱼的总产量达到 50 万 t。

小瓜虫病是瓦氏黄颡鱼养殖过程中极易感染的一种寄生虫性疾病。该病爆发于每年 3—6 月和 9—11 月, 发病水温 15~27℃。发病初期, 病鱼上浮, 离群独游, 摄食减弱; 发病后期, 病鱼运动失调, 呼吸受阻, 肉眼可见体表、鳃和鳍等多处遍布白点。该病是鱼类常见的寄生虫性疾病, 死亡率可高达 100%^[2]。引起该病的病原为多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*), 其对几乎所有的淡水鱼类均有易感性, 对无鳞鱼和鳞片不发达的鱼类危害尤为严重。病鱼死亡率极高, 严重时可在 2~3 d 内造成全群死亡, 被认为是鱼类的“癌症”。多子小瓜虫的防治方法主要有物理加温、化学治疗和生物疫苗防治等, 但效果均不理想^[3]。

2018 年 4 月, 在长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室养殖池塘 (气温 18~24℃) 饲养的瓦氏黄颡鱼 (150~200 g/尾) 发生疾病。病鱼表现为不食, 离群独游, 沿池壁边缘游动, 肉眼观察可见全身布满白点。病鱼鳃丝压片, 光学显微镜观察发现: 鳃丝内大量寄生虫, 虫体呈圆形, 可见清晰的马蹄形核; 无菌接种未发现优势菌落, 确诊该病的病原为多子小瓜虫。本研究就患小瓜虫病的瓦氏黄颡鱼进行系统的组织病理学观察, 讨论分析其致病机理, 为该病的防控策略研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病料样本和主要试剂

患小瓜虫病和健康的瓦氏黄颡鱼各 6 尾, 体

质量 50~100 g, 由长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室提供。石蜡、酒精、二甲苯、甲苯、伊红和苏木素等均购于成都市科隆化学品有限公司; 爱先蓝-糖原染液 (AB-PAS) 购于南京建成生物工程研究所 (批号: D033-1)。

1.2 症状观察与采样

对采集的患病瓦氏黄颡鱼进行临床症状和解剖症状观察。选取遍布小白点的瓦氏黄颡鱼 6 尾, 用 0.1 g/L MS-222 麻醉致死, 用眼科剪采集有小白点的鳃, 用玻片刮取体表黏液, 分别用于鳃丝压片和黏液刮片观察; 剖开鱼体腹腔和胸腔观察消化道、肝、脾、肾和心病变。

1.3 石蜡切片制作

取患病瓦氏黄颡鱼的鳃、皮肤、胃肠道、肝、脾、肾和心组织, 用生理盐水清洗后, 及时放入 4% 预冷的多聚甲醛固定液中。组织经固定 48~72 h 后, 修整边缘; 经过梯度乙醇脱水、甲苯透明和浸蜡后, 使用石蜡对组织进行包埋。制备的石蜡包埋块用 Leica 轮转式切片机进行切片 (厚度 3 μm), 45℃ 水温捞片, 50℃ 展片, 70℃ 烤片。20~30 min 后取出, 置于切片盒中, 保存备用。每个石蜡组织块制备 2 块切片, 分别用于苏木素伊红染色 (HE) 和 AB-PAS 染色。

1.4 HE 染色

参照王德田等^[4]配制 Harris 苏木精染液、沉淀酸化伊红 Y 乙醇液、分化液 (1% 盐酸酒精) 和返蓝液 (0.5% 氨水)。按照常规 HE 染色步骤, 使用二甲苯对石蜡切片进行脱蜡, 梯度酒精复水, 经自来水冲洗后进行染色, 具体为: 苏木精染液 10 min→自来水冲洗→1% 盐酸酒精分化 3~5 s→自来水冲洗→0.5% 氨水返蓝 5 s→自来水冲洗→伊红 3 min→自来水冲洗。染色结束后, 经梯度酒精脱水、二甲苯透明, 使用中性树胶进行封片。

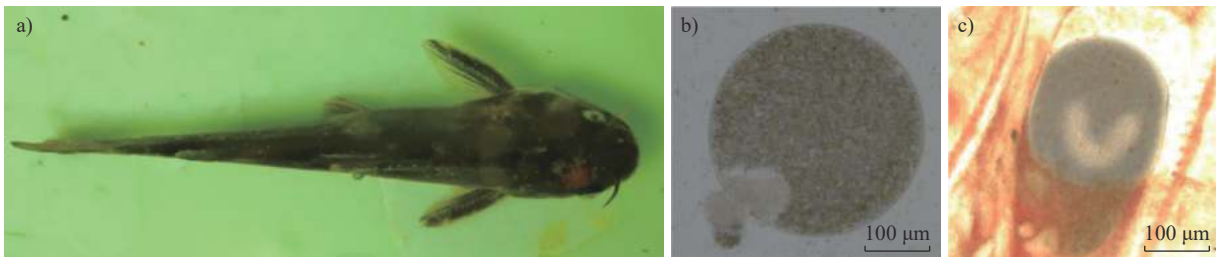
1.5 AB-PAS 染色

参照南京建成科技有限公司爱先蓝-糖原染

液说明书进行 AB-PAS 染色。简要步骤为：石蜡切片常规脱蜡至水；爱先蓝染液染色 10~20 min，水洗 30 s；高碘酸染液染色 10 min；水洗 2~3 min；雪夫试剂染色 3~5 min；水洗 5 min；苏木素复染 20~30 s；常规酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

1.6 显微镜观察

干燥后的封片使用光学显微镜在 (OLMPUS)×4、×10 和×40 倍物镜及×10 倍目镜下观察小瓜虫的分布和各组织的病理变化，Motic BA 400 采集图片用于病理结果分析。



注：a) 患病瓦氏黄颡鱼消瘦，皮肤遍布小白点，头部皮肤溃烂；b) 皮肤黏液涂片中的小瓜虫；c) 鳃丝压片中的小瓜虫。

Note: a) Infected *P. vachelli* exhibited emaciated with white dots throughout the skin, and the head showed ulcer; b) *I. multifiliis* observed in skin mucus smear; c) *I. multifiliis* observed in gill fillet.

图 1 瓦氏黄颡鱼小瓜虫病的诊断

Fig. 1 Diagnosis of *P. vachelli* infected by *I. multifiliis*

2.2 组织病理观察

鱼体受感染后，主要以皮肤和鳃病变最严重，表现为增生和坏死；心、脾、肾和肝水肿，并伴有一定程度的充血和出血；消化道中，胃的损伤较小，前肠以水肿为主，后肠以充血和出血为主。小瓜虫主要寄生于病鱼的鳃和皮肤，其他脏器未见虫体。

2.2.1 鳃的病理变化

(1) 鳃丝

健康瓦氏黄颡鱼的鳃颜色鲜红，鳃丝干净，无污物附着。显微镜下鳃丝分布整齐，鳃小片粗细均匀，大小正常，呼吸上皮均匀围绕在鳃小片外层 (图 2a、b)。AB-PAS 染色可见鳃丝黏液细胞较少，散在分布于鳃小片和鳃小片基部，以 IV 红色球状黏液细胞和 V 蓝色球状黏液细胞为主 (图 2e、f)。感染后，鳃丝表现出明显的充血、出血症状，鳃丝末端膨大，鳃小片异常弯曲；病变严重时，整个鳃丝坏死，坏死细胞和红细胞游离于鳃小片间，导致鳃小片结构不清。小瓜虫可见于鳃小片基部和游离的鳃丝间 (图 2c、

2 结果与分析

2.1 病鱼大体症状

正常鱼体反应敏锐，皮肤光滑，颜色青黄。患病后鱼体反应迟钝，颜色偏黄、不均匀，皮肤凹凸不平，全身皮肤、鳍和鳃等部位遍布白色小点。有时可见皮肤破损，破损处充血和发红，尚未见水霉寄生 (图 1a)。刮取体表“白点”和鳃丝压片，显微镜下观察可见圆形和卵圆形虫体 (图 1b、c)。剖检可见鱼体胃肠道内无食糜，内脏器官肿胀发白。

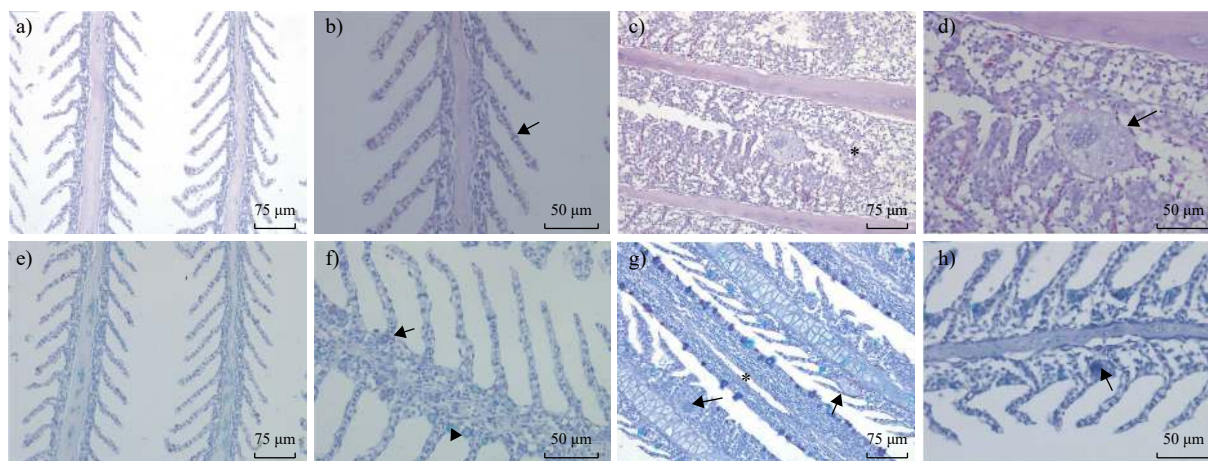
d)。AB-PAS 染色后，鳃丝黏液细胞大量增多，尤其在鳃丝末端和坏死的鳃丝表面。黏液细胞主要为 V 型、IV 型和 II 型 (图 2g、h)。

(2) 鳃耙

小瓜虫感染后，鳃耙呈现出明显的病理变化。正常鳃耙为表层未角化复层上皮，黏液细胞单层或双层排列于表层，棒状细胞分布于表皮下；味蕾散在分布 (图 3a、b)。AB-PAS 染色观察正常鳃耙显示：鳃耙的黏液细胞以 V 型蓝色球状为主，间或夹杂 IV 型红色球状 (图 3e、f)。感染后，小瓜虫可见于鳃耙的表皮层和表皮下层。鳃耙的表皮完整性受损，黏液细胞大量增多，棒状细胞减少，甚至消失 (图 3c、d)。AB-PAS 染色显示：增生的黏液细胞多为 V 型和 II 型黏液细胞，聚集在小瓜虫周围 (图 3g、h)。

(3) 鳃弓

正常瓦氏黄颡鱼鳃弓被覆复层上皮，鳃弓末端有味蕾分布，表层均匀的分布 1 层 V 型黏液细胞 (图 4a、b、e 和 f)。小瓜虫可寄生于鳃弓的复层上皮，感染后鳃弓结构紊乱，复层坏死上皮脱

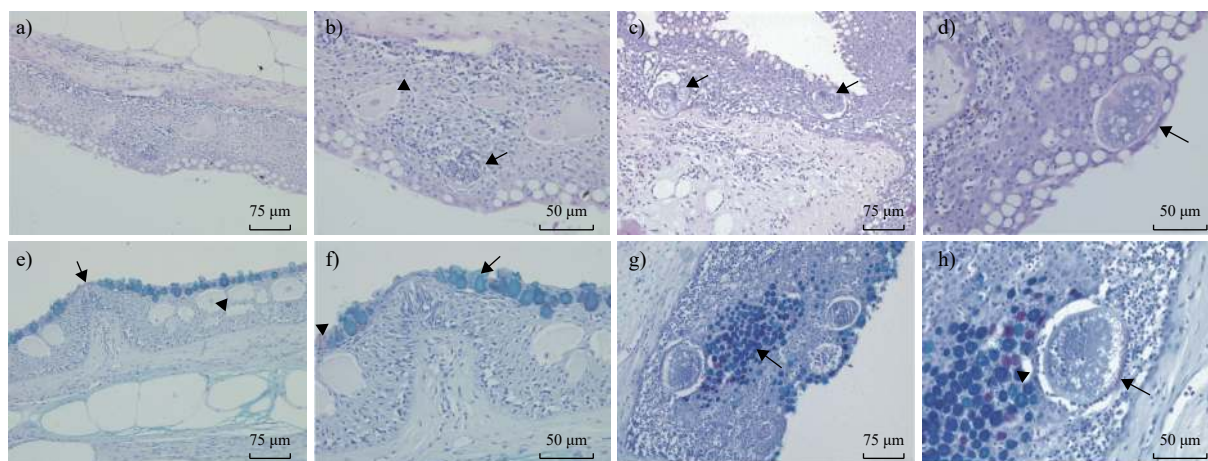


注: a) 健康瓦氏黄颡鱼鳃丝, HE; b) 健康瓦氏黄颡鱼鳃小片 (→), HE; c) 感染后鳃丝紊乱、鳃小片坏死脱落 (*), HE; d) 游离于鳃丝间的小瓜虫 (→), HE; e) 健康瓦氏黄颡鱼鳃丝, AB-PAS; f) 健康瓦氏黄颡鱼鳃小片 IV 型 (→) 和 V 型 (▲) 黏液细胞, AB-PAS; g) 感染后黏液细胞增多, 且大量聚集于坏死鳃丝 (*) 表面, 小瓜虫位于鳃小片基部 (→), AB-PAS; h) 鳃小片基部小瓜虫 (→), AB-PAS。

Note: a) gill filament from healthy *P. vachelli*, HE; b) tablet of gill from healthy *P. vachelli* (→), HE; c) gill filament confusion and tablet of gill necrosis (*) from *I. multifiliis* infected *P. vachelli*, HE; d) free *I. multifiliis* (→) between gill filament, HE; e) gill filament from healthy *P. vachelli*, AB-PAS; f) type IV (→) and type V (▲) cellula mucipara in tablet of gill from healthy *P. vachelli*, AB-PAS; g) cellula mucipara increasing in the surface of necrotic gill filaments (*), *I. multifiliis* situated at the base of tablet of gill (→); AB-PAS; h) *I. multifiliis* situated at the base of tablet of gill (→), AB-PAS.

图 2 小瓜虫感染后瓦氏黄颡鱼鳃丝的病理变化

Fig. 2 Histopathological change of gill filament of *P. vachelli* infected by *I. multifiliis*



注: a) 健康瓦氏黄颡鱼鳃耙, HE; b) 健康瓦氏黄颡鱼鳃耙味蕾 (→) 和棒状细胞 (▲), HE; c) 感染后鳃耙紊乱、小瓜虫寄生于鳃耙内 (→), HE; d) 位于鳃耙复层上皮层的小瓜虫 (→), HE; e) 健康瓦氏黄颡鱼鳃耙味蕾 (→) 和棒状细胞 (▲), AB-PAS; f) 健康瓦氏黄颡鱼鳃耙 VI 型 (→) 和 V 型黏液细胞 (▲), AB-PAS; g) 感染后中间层黏液细胞数量增多 (→); h) 小瓜虫 (→) 周围大量 V 型黏液细胞 (▲), AB-PAS。

Note: a) gill raker from healthy *P. vachelli*, HE; b) taste bud (→) and club cells (▲) in gill raker from healthy *P. vachelli*, HE; c) gill raker disordered and *I. multifiliis* situated in gill raker from *I. multifiliis* infected *P. vachelli*, HE; d) *I. multifiliis* (→) in the stratified epithelium of gill raker, HE; e) gill raker from healthy *P. vachelli*, showing taste bud (→) and club cells (▲), AB-PAS; f) type IV (→) and type V (▲), cellula mucipara in gill raker from healthy *P. vachelli*, AB-PAS; g) cellula mucipara increasing in the middle layer of gill raker (→), AB-PAS; h) *I. multifiliis* (→) surrounded by abundant type V cellula mucipara (▲), AB-PAS.

图 3 小瓜虫感染后瓦氏黄颡鱼鳃耙的病理变化

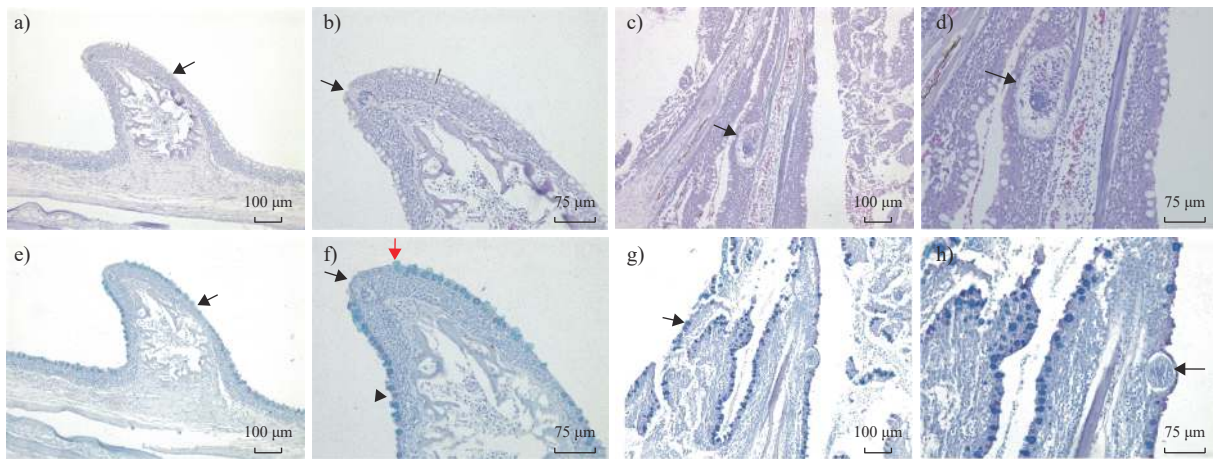
Fig. 3 Histopathological change of gill raker of *P. vachelli* infected by *I. multifiliis*

落, 黏液细胞大量增生, 味蕾消失 (图 4c、d、g 和 h)。

2.2.2 皮肤和肌肉的病理变化

健康鱼体皮肤由表皮和真皮组成, 真皮下为肌肉组织 (图 5a、e)。表皮的最外层为未角化的复层上皮细胞, 中间层为数量不等的棒状细胞和

V 型黏液细胞等, 基底层为单层立方细胞; 基底层的下方为真皮的色素细胞层, 其下为致密结缔组织 (图 5b、f)。感染后, 虫体多见于表皮的中层和基底层, 虫体周围有扁平细胞包裹, 寄生部位皮肤或隆起或溃烂。皮肤隆起时主要表现为: 表皮层上皮细胞形状钝圆狭长、游离面出现



注: a) 健康瓦氏黄颡鱼鳃弓(→), HE; b) 健康瓦氏黄颡鱼鳃弓味蕾(→), HE; c) 感染后鳃弓上皮细胞脱落、小瓜虫寄生于鳃弓上皮内(→), HE; d) 位于鳃弓上皮层的小瓜虫(→), HE; e) 健康瓦氏黄颡鱼鳃弓(→), AB-PAS; f) 健康瓦氏黄颡鱼鳃弓味蕾(→)、VI型(▲)和V型黏液细胞(→), AB-PAS; g) 感染后V型黏液细胞数量增多(→), AB-PAS; h) 位于鳃弓上皮层的小瓜虫(→), AB-PAS。

Note: a) branchial arch from healthy *P. vachelli* (→), HE; b) taste bud (→) in branchial arch from healthy *P. vachelli*, HE; c) branchial arch disordered and *I. multifiliis* situated in epithelium of branchial arch (→) from *I. multifiliis* infected *P. vachelli*, HE; d) *I. multifiliis* (→) in the epithelium of branchial arch, HE; e) branchial arch from healthy *P. vachelli* (→), AB-PAS; f) taste bud (→), type IV (▲) and type V (→) cellula mucipara in branchial arch from healthy *P. vachelli*, AB-PAS; g) cellula mucipara increasing in branchial arch (→), AB-PAS; h) *I. multifiliis* (→) situated in branchial arch, AB-PAS.

图 4 小瓜虫感染后瓦氏黄颡鱼鳃弓的病理变化

Fig. 4 Histopathological change of branchial arch of *P. vachelli* infected by *I. multifiliis*

微小突起;中间层棒状细胞层数增多;基底细胞层数增多,排列紊乱。真皮的致密层疏松,向表皮层隆起,形成“乳头样”结构(图 5c)。虫体寄生严重时,皮肤出现溃烂,根据溃烂的深浅,分别表现为:表皮层上皮细胞连续性消失,中间层变薄,棒状细胞破裂溶解,基底细胞坏死溶解(图 5d)。AB-PAS 染色观察黏液细胞结果显示:感染小瓜虫后,V型黏液细胞数量增加(图 5g)。严重时,表皮层、真皮层和色素层消失,骨骼肌裸露,肌纤维坏死溶解(图 5h)。健康肌纤维纹理清晰、细胞核位于肌纤维外层(图 5i)。感染后,肌间隙增宽,大量炎性细胞浸润,肌细胞颗粒变性(图 5j)。AB-PAS 染色后,坏死肌纤维呈红色,与正常肌纤维交错排列,形成红白相间的“条纹样”结构(图 5k、l)。

2.2.3 其他内脏器官病理变化

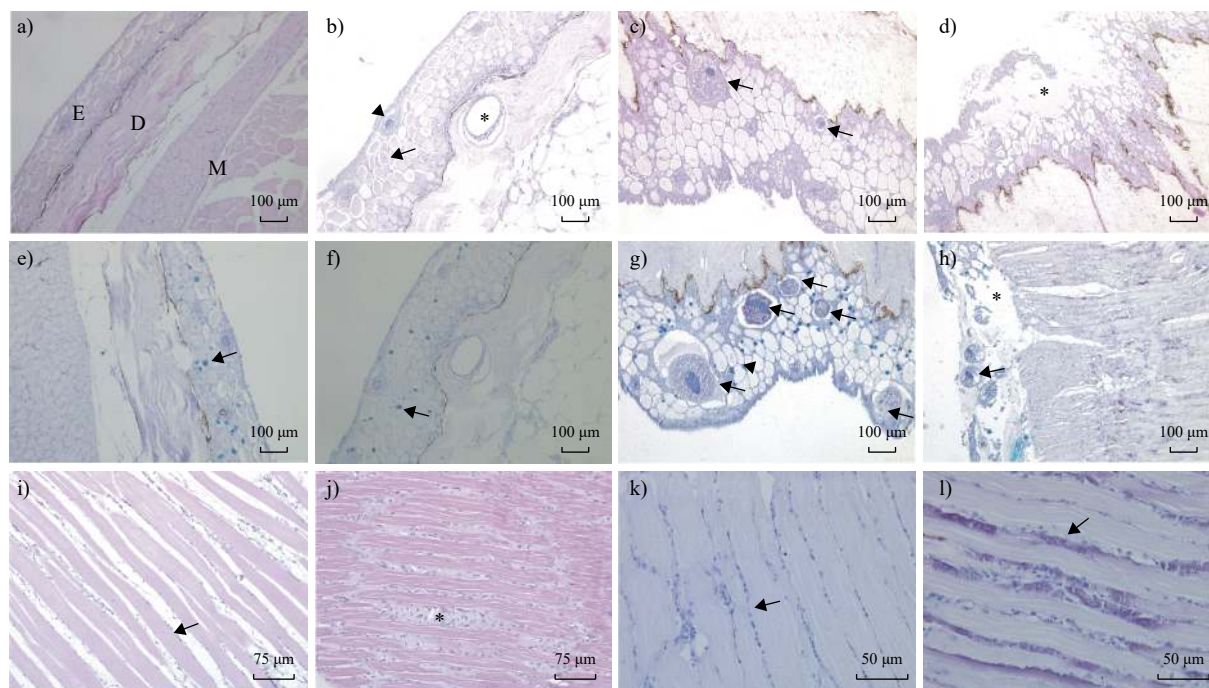
在患病鱼的消化道、肝、脾、肾和心中均未观察到小瓜虫寄生。各组织脏器主要表现为水肿和淤血。其中,胃受影响最小,未见明显病理损伤;肠道主要表现为固有层和粘膜下层水肿;肝脏表现为肝血窦瘀血;肝细胞气球样变,严重时肝细胞破裂溶解;肾脏的肾小管上皮细胞颗粒变性,空泡变性,严重时细胞坏死脱落于管腔;肾小球毛细血管内皮细胞空泡变性,肾小囊狭窄,肾间质细胞排列疏松;心包膜水肿增厚,毛细血

管淤血和出血;致密层肌纤维间隙增宽;疏松层肌纤维空泡变性,严重时肌纤维溶解,在肌间隙间可见中性粒细胞浸润;脾脏主要病变为瘀血和出血,网状细胞出现空泡变性。

3 讨论

3.1 小瓜虫对鳃的影响

鳃由鳃耙、鳃弓和鳃丝三部分组成。本研究观察发现小瓜虫可寄生于鳃弓、鳃耙和鳃丝。寄生在鳃丝的小瓜虫主要引起鳃丝黏液细胞增生,鳃小片呼吸上皮浮离,基部复层上皮细胞增生甚至整个鳃丝坏死,表明鳃的呼吸、渗透以及代谢等调节功能遭到了严重破坏,这与对金鱼^[5]、圆口铜鱼^[6]和翘嘴鲇^[7]的研究结果相符。而寄生于鳃弓的小瓜虫,主要引起鳃弓复层上皮细胞和黏液细胞增生,严重时破坏鳃弓复层上皮。鳃弓具有味蕾,可甄别食物,感知食物味道,决定食物吞咽^[8],因此推测小瓜虫的入侵可能影响了鱼体的食欲,导致鱼体摄食减少,从而引起胃肠道空虚。鳃弓还具有氧传感器和 5-羟色胺细胞,可感知氧的浓度,调整鳃丝通气量和血流量^[9-10];鳃弓受损后,氧感知能力下降,可能加剧鱼体的血氧交换障碍。OLSEN 等^[11]研究发现:虹鳟的鳃丝具有免疫功能,鳃丝中 CD8⁺细胞、MHCII 细胞、免疫球蛋白 IgT 和 IgM 以及补体因子 C3 等都参



注: a) 健康瓦氏黄颡鱼体侧皮肤, 外层为表皮(E), 内层为真皮(D), 皮下为肌肉层(M), HE; b) 健康瓦氏黄颡鱼体侧皮肤, 示侧线(*), 感觉神经(▲), 棒状细胞(→), HE; c) 感染后皮肤隆起, 表皮增厚, 真皮隆起, 小瓜虫寄生于表皮基层(→), HE; d) 感染后皮肤溃烂, 表皮完整性受损, 表皮细胞、棒状细胞坏死脱落(*), HE; e) 健康瓦氏黄颡鱼体侧皮肤, V型黏液细胞(→)散在分布于表皮的中层, AB-PAS; f) 健康瓦氏黄颡鱼体侧皮肤, 示V型黏液细胞(→), AB-PAS; g) 感染后小瓜虫寄生于皮肤的表皮层(→), 表皮中间层V型黏液细胞数量增多(▲), AB-PAS; h) 感染后小瓜虫(→)寄生部位皮肤破溃, 表皮完整性受损(*), 肌肉裸露, AB-PAS; i) 健康肌纤维(→), HE; j) 感染后受累肌纤维坏死, 溶解, 肌间隙炎性细胞浸润(*), HE; k) 健康肌纤维着色浅(→), AB-PAS; l) 感染后受累肌纤维局部坏死, 溶解, 呈紫红色(→), AB-PAS。

Note: a) skin of body side from healthy *P. vachelli*, epidermis (E), dermis (D), muscle (M), HE; b) skin of body side from healthy *P. vachelli*, showing lateral line (*), sensory nerve (▲) and club cell (→), HE; c) bulge of infected skin, showing epidermis thickening, dermis swelling, and *I. multifiliis* (→) situated at base of epidermis, HE; d) skin damage after infection, showing epidermis broken, surface cells and club cell necrosis (*), HE; e) skin of body side from healthy *P. vachelli*, showing type V cellula mucipara (→) scattered in middle layer of epidermis, AB-PAS; f) type V (→) cellula mucipara in epidermis from healthy *P. vachelli*, AB-PAS; g) *I. multifiliis* situated in epidermis (→) and type V cellula mucipara increased in middle layer of epidermis (▲), AB-PAS; h) *I. multifiliis* (→) situated in skin and broke the integrity of epidermis (*), contributing to the explosion of muscle, AB-PAS; i) healthy myofiber (→), HE; j) infected myofiber showed necrosis, lysis, and inflammatory cells infiltration (*), HE; k) light stained myofiber (→), AB-PAS; l) infected myofiber exhibited necrosis and lysis with purple color (→), AB-PAS.

图5 小瓜虫感染后瓦氏黄颡鱼皮肤和肌肉的病理变化

Fig. 5 Histopathological change of skin and muscle of *P. vachelli* infected by *I. multifiliis*

与了小瓜虫的免疫。虽然在组织学上, 鳃弓的复层上皮中也含有丰富的黏液细胞、淋巴细胞以及嗜酸性细胞, 可黏附水中沉淀物和病原^[12], 但目前尚无证据表明鳃弓具有免疫作用。本研究发现感染小瓜虫后鳃弓中的黏液细胞数量和种类均出现了增加, 且聚集于小瓜虫周围, 这些黏液细胞与小瓜虫免疫的关系有待进一步研究。

3.2 小瓜虫对皮肤影响

鱼类皮肤可通过先天性免疫和获得性免疫在小瓜虫的感染和免疫中发挥重要作用^[13]。陈达丽等^[14]观察长吻鮠皮肤内的小瓜虫的寄生部位发现: 虫体可寄生于表皮、真皮甚至肌层; 而本研究观察患病瓦氏黄颡鱼的皮肤小瓜虫寄生部位发现: 虫体仅寄生于表皮, 而在真皮层和肌层未见

虫体。这可能与感染的时期有关, 也可能与鱼的品种相关。虽然感染后虫体的位置略有差异, 但皮肤的病理变化基本相似, 表现为: 表皮完整性受损、上层扁平细胞变为立方体或长方形, 游离面出现微小突起。

棒状细胞和黏液细胞均主要位于表皮的中层和外层, 组织学上可通过 AB-PAS 进行区别, 黏液细胞为 PAS 阳性, 而棒状细胞为 PAS 阴性。本研究中, 感染小瓜虫后, 瓦氏黄颡鱼的棒状细胞出现明显的增生。棒状细胞在遇到危险或遭受捕食者袭击时可发出一种化学物质, 具有警示作用。同时, 棒状细胞也是一种免疫细胞, 保护表皮免受病原和寄生虫的感染^[15]。本研究中, 感染小瓜虫后棒状细胞的大量增生可能与警示或

免疫应激有关。

鱼类黏液细胞是上皮细胞中普遍存在的单细胞腺体。皮肤中的黏液细胞具有免疫、机械屏障、化学屏障和润滑等作用。黄颡鱼皮肤中具有 5 种类型的黏液细胞, 分别为: I 型蓝色棒状、II 型紫色杯状、III 型蓝色梭状、IV 红色球状和 V 型蓝色球状。其中, 体侧黏液细胞以 III、IV 和 V 型为主^[16]。本研究发现: 感染小瓜虫后, 黏液细胞以 V 型蓝色球状为主, 并伴有少量 IV 红色球状。AB 中含有带正电荷的分子可将酸性物质染为蓝色, 因此推测 V 型杯状细胞中主要为酸性黏多糖; 而 PAS 为强氧化剂, 可将含糖物质氧化成醛, 醛与 Schiff 试剂中的亚硫酸品红结合, 生成红色, 推测 IV 型黏液细胞中主要含有中性黏多糖。酸性黏液提取物可有效防止病原入侵, 为体表提供免疫功能^[17]。小瓜虫感染后, 黏液细胞的酸性黏多糖是否具有抵御小瓜虫和周围环境中的有害微生物入侵的功能有待进一步研究。

3.3 小瓜虫对瓦氏黄颡鱼的致病机制

本研究中, 小瓜虫虽然局限寄生于皮肤和鳃, 未见于其他组织脏器, 但造成的损伤是全身性的。鳃是鱼体交换气体、排出含氮排泄物、调节酸碱和渗透压的重要器官^[18]; 皮肤具有调节渗透压、维持机体稳态和免疫等功能。小瓜虫对瓦氏黄颡鱼的鳃和皮肤造成的严重的损伤, 造成了机体缺氧和体液大量流失, 环境中的水进入体内, 引起肝和肾组织肿胀, 进一步引起血液循环障碍、心脏和脾脏出血, 最终导致全身内环境改变而引起鱼体死亡。

4 结论

小瓜虫主要寄生于瓦氏黄颡鱼的皮肤和鳃, 造成皮肤和鳃的严重损伤, 导致机体内环境失衡引起全身各组织器官损伤, 造成鱼体死亡。

[参考文献]

- [1] 杨雨生, 徐家欢, 张红霞, 等. 黄颡鱼免疫增强剂的研究现状和进展[J]. 水产科技情报, 2018, 45(6): 331. DOI: 10.16446/j.cnki.1001-1994.2018.06.009.
- [2] 邓永强, 汪开毓, 黄小丽, 等. 鱼类小瓜虫病的研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2005, 20(2): 149. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9957.2005.02.014.
- [3] 陈丽达. 淡水鱼小瓜虫病的病原、病理及药物和免疫预防研究[D]. 重庆: 西南师范大学, 2004.
- [4] 王德田, 董建强. 实用现代病理学技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012.
- [5] 雷曼红. 多子小瓜虫形态发育及其感染金鱼的动态组织病理研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2005.
- [6] 张其中, 陈达丽. 患小瓜虫病圆口铜鱼的组织病理学观察[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2005, 30(6): 1112. DOI: 10.3969/j.issn.1000-5471.2005.06.036.
- [7] 王哲, 刘春雷, 顾泽茂, 等. 多子小瓜虫的形态发生及其寄生导致翘嘴鲃鳃组织病理变化[J]. 水生生物学报, 2016, 40(5): 935. DOI: 10.7541/2016.121.
- [8] RAI A K, SRIVASTAVA N, KUMARI U, et al. Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the epidermis of the head skin of Indian major carp, *Labeo Rohita*[J]. Tissue and Cell, 2012, 44(6): 409. DOI: 10.1016/j.tice.2012.08.004.
- [9] MILSOM W K, BRILL R W. Oxygen sensitive afferent information arising from the first gill arch of yellowfin tuna[J]. Respiration Physiology, 1986, 66(2): 200. DOI: 10.1016/0034-5687(86)90072-1.
- [10] 陈侨兰, 杨淦, 赵柳兰, 等. 大口黑鲈鳃黏液细胞的组织化学特征及 5-Ht 免疫反应阳性细胞的分布[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(3): 242. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.03.008.
- [11] OLSEN M M, KANIA P W, HEINECKE R D, et al. Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius multifiliis* infections: molecular and immunohistochemical studies[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 859. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.01.010.
- [12] AMIN N, ANNEMIE D, FRANK P, et al. Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 55(2): 101. DOI: 10.3354/dao055101.
- [13] MOREIRA G S A, SHOEMAKER C A, ZHANG D, et al. Expression of immune genes in skin of channel catfish immunized with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. Parasite Immunology, 2017, 39(1): e12397. DOI: 10.1111/pim.12397.
- [14] 陈达丽, 张其中, 王志坚, 等. 长吻鮠幼鱼小瓜虫病的组织学观察[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2004, 29(2): 278. DOI: 10.3969/j.issn.1000-5471.2004.02.029.
- [15] HALBGEWACHS C F, MARCHANT T A, KUSCH R C, et al. Epidermal club cells and the innate immune system of minnows[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2010, 98(4): 891. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2009.01328.x.
- [16] 柏世军. 黄颡鱼皮肤黏液细胞研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [17] SUBRAMANIAN S, ROSS N W, MACKINNON S L. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(1): 85. DOI: 10.1016/j.cbpb.2008.01.011.
- [18] ROBERTS R J. Fish Pathology[M]. 4th ed. New Jersey: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2012.

责任编辑: 何馨成