DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.001
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)06-0467-03

专家论坛

疟原虫和蚊相互关系研究进展

Advances in the studies of the relationship between *Plasmodium* and mosquitoes

黄复生 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

疟疾是一种以按蚊为媒介的重要虫媒病,也是当今全球最重要的寄生虫病,虽然经过一个多世纪的国际合作,努力旨在控制该危害性极大的虫媒病,但每年疟疾患者依然高达500多万,死亡数达270多万[1]。

疟原虫是一种复杂的多阶段发育生物,有5 000个基因,已经在蚊体和脊椎动物体内共演化500多万年。2002年10月欧美数国花费数亿美元、同时在"Science"和"Nature"发表大量有关冈比亚按蚊[1]、恶性疟原虫[2]基因组测序工作完成的论著,这些研究工作一方面说明疟疾对人类的危害性、重要性;另一方面说明疟疾研究的难度,疟疾很多基础性问题没有解决,很难取得突破性进展。至此疟原虫生活史中所有宿主基因组图谱全部完成,这标志着人类战胜疟疾的后基因组时代开始[3]。基因组测序工作的完成使我们可以探讨疟原虫怎样利用基因不同的表达形成生活史的不同时期,以适应不同宿主的不同环境。随着获得疟疾生活史的所有遗传信息越来越多,这将有助于鉴定影响疟疾的传播、致病、药物等新的基因和途径,也提供人类认识疟原虫和宿主、疟原虫和媒介相互复杂关系新的机会,它将为药物包括杀虫剂发展提供新的靶子、疫苗发展提供新靶位、阻断疟疾传播提供新的方法,所以深入了解疟原虫生活史中所有生物学特征及其相互关系是非常重要的[4,5]。现将近年有关疟原虫和蚊相互关系研究进展简述如下。

1 黑化包被反应是所有昆虫的一种重要的防御机制

昆虫对感染产生体液和细胞免疫反应,诱导一系列抗菌肽产生、活化增殖及血细胞的分化。这种活化反应系统与人类的先天性免疫相关。果蝇的两个不同的类NF-B信号通路介导体液和细胞免疫反应,肽聚糖在免疫中发挥重要的作用,这些模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)经由两个主要信号通路传递信号,imd/Relish通路复杂一些,主要负责体液免疫反应;Toll/Dif通路主要活化血细胞和诱导抗菌肽[6]。

图1主要显示疟原虫进入蚊体的发育及免疫反应过程。对于阻断疟疾传播来说,疟原虫在蚊体发育的复杂性给我们提供了几个重要的干预点,即蚊中肠腔、中肠上皮细胞、血淋巴,疟原虫子胞子在到达唾液腺前面对不利环境,数量大量减少。我们发现,大劣按蚊能黑化包被大多数约氏疟原虫卵囊,抑制其在体内的发育,恶性疟原虫极少黑化[7,8]。与其它普通昆虫一样,按蚊缺乏特异性T、B细胞介导的免疫,主要依赖细胞吞噬、结节形成、包被等细胞免疫反应和抗菌肽、NO和前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)级联反应组成的体液免疫反应,抵御和杀灭入侵的病原体。果蝇是昆虫免疫研究很好的模型,但与按蚊在抗原虫、丝虫等免疫防御反应方面有明显差异,冈比亚按蚊可产生不同的免疫因子谱[9]。对于不同种疟原虫感染,按蚊产生的免疫反应亦不同。如冈比亚按蚊蚊胃对伯氏和恶性疟原虫的防御反应存在差异[10]。因此,诱导按蚊产生适宜免疫反应首先必须识别和区分不同入侵病原体。

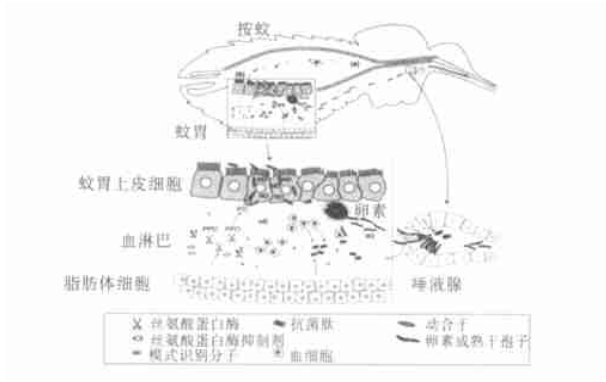


图1 疟原虫在按蚊体内发育过程和按蚊对疟原虫防御反应

黑化包被反应是PPO级联反应介导,它主要由识别/结合蛋白、PPO和丝氨酸蛋白酶(serine proteases, SP)组成。目前,多种普通昆虫的病原体识别/结合蛋白、PPO活化酶(prophenoloxidase-activating enzyme, PPAE)和PPO相继纯化成功[9~11]。

疟疾传播媒介按蚊的个体小,材料来源困难,直接分离、纯化PPO级联反应的主要成分非常困难,因此,cDNA同源克隆成为研究蚊PPO级联反应的重要手段。至今,多种PPO和SP已从蚊体内克隆成功[12,13],同源分析显示,SP Sp14D1可能是冈比亚按蚊的PPAE,Sp14D1不但与黑化包被特性定量位点Pen3关联,而且还在抗性株冈比亚按蚊的血淋巴中特异表达[14]。因此,按蚊黑化包被疟原虫反应与PPO级联反应有关。按蚊黑化包被疟原虫是一种多基因控制的表型。采用RFLP、RAPD和微

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271163, 30200237, 30300292)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271163, 30200237, 30300292)
作者简介:黄复生(1949-),男,湖北省汉川市人,教授,博士生导师,主要从事疟疾及其媒介方面的研究。电话:(023)68752244, E-mail: fushengh@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-11-17;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

卫星(microsatellite loci)作为分子标记,已确定抗性株冈比亚按蚊黑化包被疟原虫的控制基因位于3个特性定量位点(QTL)上,即一个主要和两种次要QTL,分别为Pen1、Pen2和Pen3,其中只有Pen3与Sp14D1基因关联;对黑化包被CM-sephadex磁珠期间抗性株和易感株冈比亚按蚊血淋巴差异蛋白带的分析发现,抗性株按蚊黑化包被疟原虫可能与其12种特异血淋巴蛋白的表达有关[14]。因此,除PPO级联反应外,血淋巴中还存在多种其它黑化包被相关因子。

昆虫识别病原体是引起免疫反应的第1步,即宿主通过不同PRR和相应病原体的相关成分(pathgen-associated molecular pattern, PAMP)识别结合以区分不同的病原体,从而启动相应的先天性免疫反应。目前,普通昆虫识别病原体机制的研究发展迅速。已知酵母、RNA病毒、真菌、以及革兰阴性菌和阳性菌PAMP分别为甘露糖、双链RNA、β-1,-3葡聚糖、LPS、肽聚糖,而且已分离和鉴定了革兰阴性菌、阳性菌、真菌特征性分子的识别结合蛋白:LPS识别结合蛋白、肽聚糖识别结合蛋白[11]、β-1,-3葡聚糖以及凝集素和hemolin[11]。Yu等[15]从烟草天蛾血浆中分离到能结合细菌或真菌表面多糖的4种模式识别蛋白,其中一个特征是这些蛋白可结合多个配体(不同细菌多糖),每种识别蛋白可引发不同免疫反应。从烟草天蛾纯化的19× 10^3 脂多糖-葡聚糖结合蛋白(PGRP)可激活PPO级联,免疫攻击可引起PGRP mRNA表达上调。从果蝇中分离到12种PGRP基因。在几种昆虫中分离到的各种结合蛋白均参与PO级联反应。

2 按蚊识别、激活抗疟原虫先天性免疫反应

按蚊抗疟原虫免疫大约在感染后24 h启动,此时动合子开始穿越蚊胃上皮细胞,表现为蚊胃及蚊胃外组织的免疫因子转录上调,随后却逐渐下降,并趋于正常,感染后10~25 d,子孢子进入血淋巴和侵入唾液腺期间,又可诱导局部和系统免疫反应;上述两个时段诱导的免疫因子也不尽相同;因此认为按蚊识别疟原虫可能发生在动合子穿越蚊胃、子孢子释放入血淋巴和侵入唾液腺时期。已知动合子和子孢子的主要表面蛋白存在明显差异,最近的研究表明,卵囊、血淋巴和唾液腺子孢子的主要表膜蛋白均为CSP和TRAP[11],认为按蚊可能拥有两套不同的识别机制,分别识别动合子和子孢子,启动相应的防御反应。

伯氏疟原虫感染冈比亚按蚊后,其中肠GNBP mRNA水平局部升高。这些模式识别蛋白结合病原体后是如何引起保护性反应的尚不清楚。Yu等[15]推测GRP或IML结合到细菌表面后,引起构象改变,从而引起模式识别蛋白和某些血浆蛋白发生新的相互作用。蛋白质-蛋白质间的相互作用引起蛋白酶原的自身活化。昆虫可识别细菌和真菌蛋白,但昆虫识别寄生虫如原虫和线虫等分子机制仍然是了解很少的领域,无疑将成为未来研究的目标。

通过差减分析或同源克隆已获得了两种可能与识别疟原虫有关的分子GNBP[16]和αTEP1[13],而分析冈比亚按蚊全基因组序列发现按蚊可能有6种侯选识别蛋白基因家族,包括PGRPs、TEPs、GNBP、SCR、C-type lectins和galectins[13]。目前人们了解按蚊识别疟原虫机制非常有限。究其原因,可能与疟原虫生活史的多时期性,每个时期含不同的PAMP,以及难以获得足够纯的蚊期疟原虫有关;另外,蚊虫个体小,血淋巴量少(0.8 μl/只),更是限制了识别结合蛋白的双维电泳/质谱和纯化分析。阻断疟原虫在按蚊体内发育的有几个重要的干预点,如雌雄配子体在中肠的融合、动合子穿过围食膜和子孢子迁移至唾液腺。利用培养细胞尤其是利用按蚊和埃及伊蚊的多种细胞系来研究昆虫的先天性免疫反应刚刚起步,研究表明冈比亚按蚊体内免疫活性细胞系可表达各种防御因子包括PPO[17]。鸡疟原虫在冈比亚按蚊、斯氏按蚊、埃及伊蚊3种蚊体内同样能产生配子。而伯氏疟原虫配子很少在埃及伊蚊中产生,雄配子形成几乎完全被抑制。动合子形成的效率很低,只有1/100 000~1/500。伯氏疟原虫动合子在埃及伊蚊蚊胃腔中存活力低,不能侵入蚊胃上皮细胞。培养成熟的动合子直接注入到斯氏按蚊血腔可产生唾液腺子胞子,但在埃及伊蚊不行,这说明,埃及伊蚊蚊胃上皮细胞种特异的不相容性。这些结果显示,在疟原虫发育期间,蚊对疟原虫的易感性是从多个步骤调控的,在分子水平认识将有助于发展合理防治策略[18]。

子孢子附着和侵入蚊唾液腺受体研究进展缓慢,蚊胃和唾液腺噬菌体显示肽文库[19]结果鉴定表明:唾液腺远端叶和蚊胃血腔端肽(SM)1能有力抑制子孢子侵入蚊唾液腺和卵囊的形成。转基因按蚊表达并分泌这种肽到胃腔,蚊吸感染血后,明显抑制卵囊形成。这些发现与(SM)1导致位于动合子和子孢子未知受体竞争性阻断相一致[20]。

3 疟原虫能逃避或抑制黑化包被反应

抑制免疫反应已使几种寄生虫和昆虫的拟寄生物产生进化。这些拟寄生物注射多DNA病毒或蛋白质到昆虫宿主体内,可以关闭昆虫免疫系统[21]。*Asobara tabida*和*Asobara citri*是黑腹果蝇幼虫的2种内寄生小茧蜂,*As. tabida*的卵通过附着宿主组织而逃避包被;而无附着特性*As. citri*的卵影响宿主的包被能力、血淋巴PO活性、循环血细胞的数量,其逃避免疫反应作用主要通过对造血器官前叶的严重破坏完成的,这是首次报道Asobara属的免疫抑制能力;也说明,种系亲源关系很近的拟寄生物在逃避免疫能力进化上的多样性[22]。

疟原虫可能面对越来越大由进化压力产生抗性反应,以逃避或抑制蚊的免疫反应。在疟原虫-蚊相互关系中,疟原虫晚期动合子和早期卵囊期间,感染蚊的免疫反应能力下降[23],在这个期间,疟原虫对蚊包被免疫反应最易感。现在还不清楚:这种现象是否是疟原虫主动抑制的结果,如果是这样,那么任何由遗传操作增加蚊免疫反应能力将可由蚊抑制免疫反应能力所代偿,以减少免疫反应效率。

4 转基因蚊研究的进展与困难

虽然美德两国的科学家将一种抗性基因植入能传播疟疾的蚊子身上,这种转基因蚊子在实验室老鼠身上传播疟疾的可能性比普通蚊子下降了80%[20]。但很多问题没有解决,例如自然界感染疟原虫的按蚊种群要受先天性免疫有关的等位基

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因的影响, 按蚊一氧化氮合酶多态性使得遗传防治更为复杂和困难[24]。

即使我们有这些编码抗所有疟原虫基因型的基因或人工分子, 蚊能稳定的转染这些基因, 但并不意味着在控制程序上遗传学操作的成功。例如, 在什么情况下, 使得转位子推动编码抗性基因在自然种群蚊产生; 这些基因如何在自然状况下有效; 这些基因可能的扩散如何影响传播或流行; 在这些抗性蚊的周围, 疟原虫能发育进化吗; 虽然这些问题被忽略, 但昆虫免疫的进化生态学、疟原虫和蚊相互关系的研究将给予初步的回答。按蚊免疫反应与疟原虫不感染有关, 某些抗性蚊通过特异性防御机制能杀死疟原虫。果蝇和按蚊基因组测序完成提供了一个详细、可比较洞察免疫基因信息系统, 将揭开蚊杀死疟原虫复杂的机制[25]。

关键词: 疟原虫; 蚊; 相互关系
中图法分类号: R382.31; R384.1　　文献标识码: A

参考文献:

[1] Holt R A, Subramanian G M, Halpern A, *et al*. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*[J]. Science, 2002, 298(5591): 129—148.

[2] Gardner M J, Hall N, Fung E, *et al*. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Nature, 2002, 419(6906): 498—511.

[3] Gregorio E D, Lemaitre B. The mosquito genome: The post-genomic era opens[J]. Nature, 2002, 419(6906): 496—497.

[4] Florens L, Michael P W, Daale-Raine J, *et al*. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle[J]. Nature, 2002, 419(6906): 520—526.

[5] Kirkwood M L. The mosquito genome: perspectives and possibilities[J]. Trends Parasit, 2003, 19(3): 103—105.

[6] Leulier F, Vidal S, Saigo K, *et al*. Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in Drosophila adults[J]. Curr Biol, 2002, 12(11): 996—1000.

[7] Huang F S, Wang X X. The effect of hemocytes on normal and degenerated oocysts of *Plasmodium yoelii* in mosquitoes and melanization of oocysts[J]. J Med Coll PLA, 1994, 9(2): 120—121.

[8] 黄复生, 王兴相. 大劣按蚊血细胞对约氏疟原虫卵囊黑化的作用[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1995, 8(4): 284—285.

[9] Dimopoulos G, Christophides G K, Meister S, *et al*. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: Responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(13): 8814—8819.

[10] Tahar R, Boudin C, Thiery I, *et al*. Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. EMBO J, 2002, 21(24): 6673—6680.

[11] Matuschewski K, Ross J, Brown S M, *et al*. Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage[J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 41948—41953.

[12] Yu X Q, Kanost M R. Binding of hemolin to microbial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid: an immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern recognition receptor[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(7): 1822—1834.

[13] Ievashina E A, Moita L F, Blandin S, *et al*. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Cell, 2001, 104(5): 709—718.

[14] Christophides G, Zdobnov K E, Barillas-Mury C. *et al*. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*[J]. Science, 2002, 298(5591): 159—165.

[15] Yu X Q, Zhu Y F, Ma C. *et al*. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta plasma*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1287—1293.

[16] Dimopoulos G, Muller H M, Levashina E A, *et al*. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito[J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(1): 79—88.

[17] Fallon A M. Sun D. Exploration of mosquito immunity using cells in culture[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(3): 263—278.

[18] Alavi Y, Arai M, Mendoza J, *et al*. The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes* aegypti[J]. Int J Parasit, 2003, 33(9): 933—943.

[19] Ghosh A K, Ribolla P E M, Jacobs-Lorena M, *et al*. Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(23): 13278—13281.

[20] Ito J, Ghosh A, Moreira L A. *et al*. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite[J]. Nature, 2002, 417(6887): 452—455.

[21] Rizki R M, Rizki T M. Parasitoid virus-like particles destroy Drosophila cellular immunity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(21): 8388—8392.

[22] Moreau S J M, Eslin P, Giordanengo P, *et al*. Comparative study of the strategies evolved by two parasitoids of the genus Asobara to avoid the immune response of the host, *Drosophila melanogaster*[J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27(4): 273—282.

[23] Böete C, Paul R E L, Koella J C. Reduced efficacy of the immune melanisation response in mosquitoes infected by malaria parasites[J]. Parasitology, 2002, 125(2): 93—98.

[24] Luckhart S, Li K Y, Dunton R, *et al*. *Anopheles gambiae* immune gene variants associated with natural Plasmodium infection[J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 128(1): 83—86.

[25] Dimopoulos G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions[J]. Cell Microbiol, 2003, 5(1): 3—14.

（编辑　冯崇英）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net