DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.006
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)06-0479-03

论著

吸血和约氏疟原虫感染对 AdPPOs 基因家族转录水平的影响

郝宏兴,黄复生,徐文岳,段建华,况明书 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察血餐和约氏疟原虫感染对AdPPO1、AdPPO2和AdPPO3基因转录水平的影响。方法 同批3~5 d龄大劣按蚊分为不吸血组(N)、吸正常血组(NB)和吸感染血组(IB),在血餐后24 h分别制备各组蚊总RNA,所有样品进行RT-PCR后,各吸取10 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析系统扫描并读取数据,并对所得数据进行统计学处理。结果 与不吸血组比较,吸血组和感染组AdPPO1的转录水平显著下降($P<0.05$),但吸血组和感染组间没有显著性差异($P>0.05$)。吸血组AdPPO2的转录则明显上调($P<0.05$),但与感染组间没有显著性差异($P>0.05$);AdPPO3基因的转录水平在3组间均没有显著性差别($P>0.05$)。结论 血餐明显抑制AdPPO1基因的转录,但明显上调AdPPO2基因的转录水平;约氏疟原虫感染后24 h,AdPPO1,AdPPO2和AdPPO3基因的转录水平均不受影响。

关键词:大劣按蚊;约氏疟原虫;前酚氧化酶
中图法分类号:R382.31;R384.1;R394-33 文献标识码:A

Effects of blood-feeding and *Plasmodium yoelii* infection on the transcript abundance of AdPPOs gene family from *Anopheles dirus*

HAO Hong-xing, HUANG Fu-sheng, XU Wen-yue, DUAN Jian-hua, KUANG Ming-shu (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of blood-feeding and *Plasmodium yoelii* infection on the transcript abundance of AdPPO1, AdPPO2, and AdPPO3 from *Anopheles dirus*. Methods *Anopheles dirus* mosquitoes of 3-5 d old were divided into non-blood-feeding group (N), normal blood-feeding group (NB) and *Plasmodium yoelii*-infected blood-feeding group (IB). Total RNA from mosquitoes of each group was prepared at 24 h after blood-feeding. All samples were analyzed by RT-PCR, and the same volume (10 μl) of the PCR products was used for agarose gel electrophoresis. The data obtained were analyzed statistically. Results The transcript abundance of AdPPO1 in groups NB and IB was statistically lower than that in group N ($P<0.05$). There was no significant difference between group NB and IB ($P>0.05$). The transcript abundance of AdPPO 2 in group NB was obviously higher than that in group N ($P<0.05$), but no difference was found between groups NB and IB ($P>0.05$). There was no significant difference in the transcript abundance of AdPPO3 between the three groups ($P>0.05$). Conclusion Blood-feeding can inhibit the transcript of AdPPO1, but obviously up-regulate the transcript abudance of AdPPO2. However, at 24 h after *Plasmodium yoilii* infection, blood-feeding has no effect on the transcript abundance of AdPPO1, AdPPO2, and AdPPO3.

Key words: *Anopheles dirus*; *Plasmodium yoelii*; prophenoloxidase

研究按蚊抗疟原虫感染的分子机制是实现遗传改造蚊媒防治疟疾新策略的前提和基础。不同的蚊种对不同的疟原虫易感性不同,不易感蚊可以黑化包被侵入其体内的疟原虫从而阻止感染的发生[1,2]。黑化包被反应是昆虫最主要的免疫防御反应之一,是最终决定病原体感染是否成功的主要机制,而前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)在其中起关键的作用[3]。已从冈比亚按蚊克隆出6种PPO基因,它们在黑化包被疟原虫中的作用不尽相同[4]。

大劣按蚊-约氏疟原虫模型是研究按蚊抵抗疟原虫感染机制较好的模型[5]。为此,我们在首次克隆获得3种大劣按蚊PPO基因(AdPPO)的基础上,以核糖

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200237)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200237)
作者简介:郝宏兴(1967-),男,山西省平定县人,博士,讲师,主要从事蚊与疟原虫相互关系的分子生物学及免疫学方面的研究。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期:2003-06-24;修回日期:2003-09-05

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

体蛋白 S7 基因为内参照，通过半定量 RT-PCR 技术研究了血餐和感染约氏疟原虫对它们转录水平的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 大劣按蚊与约氏疟原虫 大劣按蚊由本室养蚊室常规饲养于 26～27 ℃，相对湿度 70%～80% 的恒温室内。约氏疟原虫（*Plasmodium yoelii*）BY265 株，保种于昆明株小鼠体内，每周血传 1 次，每 5 周蚊传 1 次。

1.1.2 主要试剂 Trizole RNA 抽提试剂盒、*Taq* 酶、Oligo（dT）（上海申友公司），RNase 抑制剂、MMLV 反转录酶（Promega 公司）。AdPPO1，AdPPO2 和 AdPPO3 基因的引物序列为 AdPPO1-P1：5′-CTACTCCTGTCGCTATCCC-3′；AdPPO1-P2：5′-ATCGTCGTGGTCAAATCTC-3′；AdPPO2-P1：5′-GCGTACTTCCCGAAGATGATCCG-3′；AdPPO2-P2：5′-ATGTTGTGCAGGCTGCCGTACAG-3′；AdPPO3-P1：5′-TGCGTCCGCTCACGAGTCTG-3′；AdPPO3-P2：5′-CCCACCACACCGTATCCCTCC-3′。以上引物由上海申友生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 蚊虫饲血和感染 同批大劣按蚊在羽化后 3～5 d 分为 3 组，一组饲以 10% 蔗糖水（N）、一组饲以正常小鼠血（NB），一组饲以约氏疟原虫感染鼠血（IB）。吸血或感染 24 h 后各组分别取 15 只蚊用于实验。

保留感染组蚊虫用于检查蚊虫感染率、感染度及卵囊黑化情况。

1.2.2 RNA 提取和 RT-PCR 按 Trizole 试剂盒说明进行各组蚊虫总 RNA 的制备，检查所得总 RNA 的完整性和纯度（A_{260}/A_{280}）后，立即进行逆转录反应合成 cDNA 第一链。反应总体积为 20 μl，含 2 μg 总 RNA，0.5 μg Oligo（dT）15，MMLV 反转录酶（200 U）；37 ℃孵育 2 h 后，95 ℃ 灭活 5 min。

逆转录后所有样本同时进行 PCR 扩增。PCR 总体积为 25 μl，含 1 μl 逆转录产物，2.5 μl 10× Buffer，1.5 U *Taq* 酶，1 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTPs，上、下游引物浓度均为 0.4 μmol/L。反应条件为 94 ℃预变性 3 min 后；94 ℃变性 1 min，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 28 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min。

1.2.3 凝胶图像分析系统分析 PCR 产物 PCR 结束后，精确吸取 10 μl PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳，然后用凝胶图像分析系统扫描并读取数据。

1.3 统计学方法

实验结果采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 约氏疟原虫对大劣按蚊感染情况

感染组大劣按蚊在血餐后 5 d 胃壁上开始形成卵囊，此时卵囊个体较小，数量不多，第 7 天蚊胃感染率为 61.1%（11/18），说明约氏疟原虫可感染大劣按蚊。

2.2 大劣按蚊总 RNA 提取、RT-PCR 扩增

取蚊 15 只去头后直接在 Trizole 里匀浆，冰上操作，所制备的蚊总 RNA 纯度和完整性均可达到实验要求。一般得率在 2～3 μg 总 RNA/蚊。用所设计的 AdPPOs 特异引物和 S7 特异性引物进行 RT-PCR，所得产物均为单一的条带，其分子量大小与以阳性质粒为模板的阳性对照完全一致。

2.3 大劣按蚊 PPO 基因扩增产物的半定量分析

从图 1 可见，与不吸血组比较，大劣按蚊吸血以及感染疟原虫后 24 h，AdPPO1 的转录水平显著下降（$P<0.05$），但是，正常血组与感染组之间 mRNA 的转录水平没有显著差异（$P>0.05$）。吸血可使大劣按蚊 AdPPO2 的 mRNA 转录水平上调（$P<0.05$），但感染约氏疟原虫并不能使该基因的转录水平升高（$P>0.05$）（图 2）。AdPPO3 mRNA 的转录则不受吸血和感染的影响，不吸血组、正常血餐组分别与感染组之间 RT-PCR 产物的信号强度没有明显差异（$P>0.05$）（图 3）。

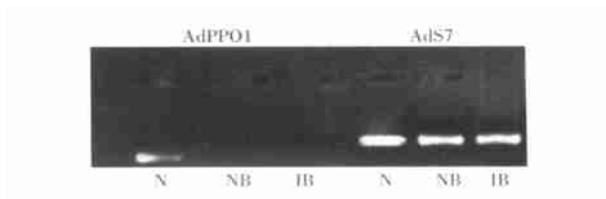


图 1 吸血和约氏感染疟原虫对 **AdPPO1** 转录水平的影响

Fig 1 Effects of normal and infected blood on the transcript level of AdPPO1

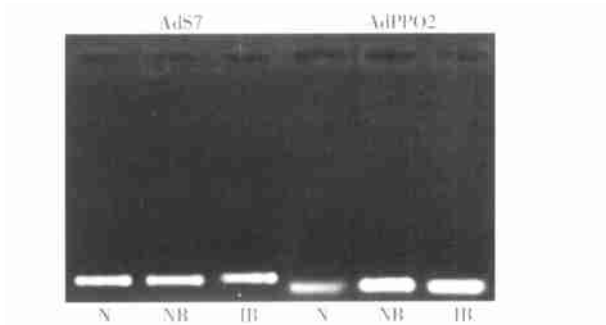


图 2 吸血和约氏感染疟原虫对 **AdPPO2** 转录水平的影响

Fig 2 Effects of normal and infected blood on the transcript level of AdPPO2

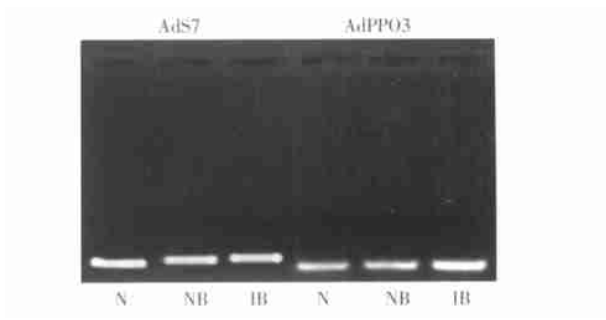


图 3 吸血和约氏感染疟原虫对 **AdPPO3** 转录水平的影响

Fig 3 Effects of normal and infected blood on the transcript level of AdPPO3

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

3　讨论

PPO 参与昆虫角皮色素沉着、伤口愈合、血液凝集和抗感染等多种生理及免疫防御反应, 同时, PPO 反应在昆虫体内也受到精细的调控以防止对自身的损害, 然而, PPO 产生、激活和调控的分子机制仍不甚清楚[3], 有关疟原虫感染对按蚊 PPO 转录影响的研究报道更少。

Muller 等[4] 研究发现, 吸血可以诱导主要在胚胎和/或幼虫期转录的 PPO, 即冈比亚按蚊 PPO1-PPO4 的转录水平上调, 但是, 血餐后 24 h 冈比亚按蚊 PPO5 的转录明显降低, 转录水平不受血餐影响的是 PPO6。本研究表明, 吸正常小鼠血可以显著降低 AdPPO1 的转录水平, 吸血后转录明显增加的是 AdPPO2, 而 AdPPO3 的转录与吸血没有明显关系。序列相似性检索结果提示, AdPPO1, AdPPO2 和 AdPPO3 分别是冈比亚按蚊 PPO5、PPO2 和 PPO6 的同源基因, 因此, 大劣按蚊 PPO 转录水平受血餐的影响与冈比亚按蚊 PPO 的情况一致。

昆虫对侵入体内的病原体的识别和免疫反应的触发一般在 24 h 内即可完成。使用加热杀死的革兰阳性和阴性细菌混合物刺激冈比亚按蚊的培养细胞, 24 h 以后, 其防御素(defensin)和革兰阴性细菌结合蛋白(Gram-negative bacteria-binding protein, GNBP)的表达水平显著升高。但是, 除了 PPO5 的表达没有明显变化外, 其它 PPO 基因的表达都受到轻度的抑制[4]。到目前为止, 从斯氏按蚊只克隆到了一种 PPO, 序列相似性分析提示, 它与冈比亚按蚊 PPO6 可能是同源基因, 对斯氏按蚊 PPO 的研究表明, 在吸血、细菌和伯氏疟原虫感染后其 mRNA 表达水平也没有发生变化, 而 PO 的活性在感染疟原虫后有明显增强[6]。本研究表明, 感染约氏疟原虫后 24 h, AdPPO1, AdPPO2 和 AdPPO3 的 mRNA 表达水平没有显著变化。

PPO 基因的表达在细菌或疟原虫感染后没有显著增强可能有以下几方面的原因: ①可能检测的 PPO 基因均没有参与黑化包被反应, 即还可能存在其它的 PPO 家族成员没有被发现, 如, 少见研究冈比亚按蚊 PPO7-PPO9 与病原虫感染关系的报道, 因此, 不知它们是否参与了冈比亚按蚊抗性株对疟原虫的黑化包被反应。②PPO 级联反应的产物对昆虫本身也具有毒性, PPO 的转录、翻译和翻译后等环节都受到严格的调控。如, PPO 产生后很快即被蛋白分解反应激活而参与黑色素的形成, 因此, 不容易在 mRNA 水平检测到 PPO 表达的明显升高[7]。这种翻译后水平的调节可以解释为什么斯氏按蚊 PPO 在感染细菌或伯氏疟原虫后 mRNA 的转录水平没有升高, 而血淋巴中 PO 活性却明显增强。③黑化包被疟原虫反应可能并不需要 PPO 表达水平的上调, 而只在病原体被识别后触发蛋白水解反应被活化为 PO 直接参与形成黑色素的反应。电镜观察发现, 位于基底膜下的食蟹猴疟原虫动合子的黑化是从靠近血淋巴面的顶端开始的, 提示黑色素可以从血淋巴扩散越过基底层并沉积于疟原虫周围。因此, 疟原虫的黑化包被是一种 PPO 级联反应产物在局部空间上的聚集、沉淀, 而不一定是基因表达上调的结果[2]。

上述研究结果提示, 各种 PPO 基因在按蚊对血餐的消化和对病原体的免疫防御反应, 如对疟原虫的黑化包被反应中作用各不相同。有关这方面的进一步研究可以增加人们对昆虫 PPO 级联反应和免疫防御机制的认识, 为疟疾的防治提供有益的线索。

参考文献:

[1] Collins F H, Sskai R K, Vernick K D, *et al*. Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*[J]. Science, 1986, 234(4776): 607－610.

[2] Paskewitz S M, Brown M R, Lea A O, *et al*. Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*[J]. J Parasitol, 1998, 74(3): 432－439.

[3] Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. Curr Opin Immunol, 1998, 10(1): 23－28.

[4] Muller H M, Dimopoulos G, Blass C, *et al*. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11727－11735.

[5] 郝宏兴, 邱宗文, 段建华, 等. 大劣按蚊 AdPPO2、AdPPO3 基因 cDNA 克隆与组织定位[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(6): 470－472.

[6] Cui L, Luckhart S, Rosenberg R. Molecular characterization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria mosquito *Anopheles stephensi*[J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(2): 127－137.

[7] Dimopoulos G, Müller 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.

（编辑　刘洪娥）

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