DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.008
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
486 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0486-04

约氏疟原虫感染诱导大劣按蚊 AdSP1 和 AdSP3 的转录

徐文岳,黄复生,夏丽莎,段建华 (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 观察丝氨酸蛋白酶 AdSP1 和 AdSP3 在大劣按蚊主要组织中的表达,分析血餐和约氏疟原虫感染对大劣按蚊血细胞 AdSP1 和 AdSP3 转录的影响。方法 离心收集血细胞,解剖分离大劣按蚊蚊胃和唾液腺,提取相应的总 RNA,RT-PCR 扩增;然后将同批 3~5 d 龄大劣按蚊分为正常组(N)、吸正常血组(B)和感染约氏疟原虫组(I),分别在血餐后 1、2、3、4、7 d 和 11 d 收集 3 组各 50 只雌大劣按蚊血细胞和提取总 RNA,以 Ads7 为内参照,进行半定量 RT-PCR 分析。结果 丝氨酸蛋白酶 AdSP1 和 AdSP3 在大劣按蚊血细胞和唾液腺中表达,不在蚊胃表达;吸血和约氏疟原虫感染后,大劣按蚊血细胞中 AdSP1 和 AdSP3 的转录上调,尤以约氏疟原虫黑化期间明显。结论 AdSP1 和 AdSP3 可能参与大劣按蚊对约氏疟原虫的黑化反应,并可能是大劣按蚊的 PPAE。

关键词:大劣按蚊;约氏疟原虫;丝氨酸蛋白酶;RT-PCR
中图法分类号:R382.31;R384.1;R394.3 文献标识码:A

Enhanced transcript abundance of AdsP1 and AdsP3 from *Anopheles dirus* haemocytes after *Plasmodium yoelii* infection

XU Wen-yue, HUANG Fu-sheng, XIA Li-sha, DUAN Jian-hua (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression patterns of serine proteases Adsp1 and Adsp3 in the main tissue of *Anopheles dirus* and the effects of blood-feeding and *Plasmodium* infection on the transcript abundance of Adsp1 and Adsp3 from *Anopheles dirus* haemocytes. **Methods** Haemocytes were collected by centrifugation. The midguts and salivary glands were dissected from 50 adult female *Anopheles dirus* of 3—5 d old for the extraction of total RNA for amplification by RT-PCR. *Anopheles dirus* of 3—5 d old were divided into normal group (N), blood-feeding group (B), and *Plasmodium yoelii* infection group (I). Haemocytes of 50 adult female *Anopheles dirus* from each group after blood-feeding were also collected, and the total RNA was isolated at 1, 2, 3, 4, 7, and 11 d, respectively. Then, the same volume (10 μl) of total RNA was analyzed by semi-quantitative RT-PCR with Ads7 as the internal control. Agarose gel analysis was performed on PCR products from each group. **Results** Expression of both Adsp1 and Adsp3 mRNA was found in the haemocytes and salivary glands, but not in the midguts. Semi-quantitative RT-PCR indicated that transcript abundance of AdsP1 and AdsP3 from *Anopheles dirus* haemocytes was enhanced after blood-feeding and *Plasmodium yoelii* infection, especially during melanotic encapsulation of *Plasmodium yoelii*. **Conclusion** AdsP1 and AdsP3 may be involved in the melanotic encapsulation response of *Plasmodium yoelii* by *Anopheles dirus*, and may be the prophenoloxidase activating enzyme of *Anopheles dirus*.

Key words: *Anopheles dirus*; *Plasmodium yoelii*; serine protease; RT-PCR

已知丝氨酸蛋白酶(serine protease, SP)不仅参与调节哺乳动物的凝血和补体激活等免疫反应,而且还参与调节昆虫血淋巴凝结、抗菌肽合成和黑化包裹等固有免疫反应。黑化包裹反应是按蚊抵御疟原虫感染的最主要免疫机制。目前认为,按蚊黑化包被反应是由前酚氧化酶级联反应(prophenoloxidase cascade)介导的,含识别/结合蛋白、前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)和前酚氧化酶激活酶(prophenoloxidase-activating enzyme, PPAE)主要组成成份。其中,PPAE(一种激活 PPO 的丝氨酸蛋白酶)可能是调节前酚氧化酶级联反

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:徐文岳(1972—),男,浙江省宁波市人,博士研究生,讲师,主要从事蚊抗疟原虫感染免疫方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68752243
通信作者:张锡林,电话:(023)68752243,E-mail:jsczxl@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-06-25;修回日期:2004-01-22

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

应活性的关键环节。本研究分析了已克隆的两种丝氨酸蛋白酶 AdSP1 和 AdSP3 在大劣按蚊主要组织的表达, 以及约氏疟原虫感染对血细胞中 AdSP1 和 AdSP3 转录的影响, 初步探讨它们在大劣按蚊黑化包被约氏疟原虫中的作用。

1　材料和方法

1.1　供试蚊虫和疟原虫

约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)BY265, 每周用昆明株小鼠血传 1 次, 每 5 周内蚊传 1 次; 昆明株小鼠由本校实验动物中心提供, 体质量 16~20 g; 大劣按蚊(*Anopheles dirus*)为本室长期饲养蚊种, 置于 26~27 ℃, 相对湿度 70%~80%的养蚊室中常规饲养。

1.2　试剂

Tripure™ RNA 提取试剂盒购自 BOEHRINGER MANNHEIM, Olig(dT)15、RNase 抑制剂、二乙基焦碳酸酯(DEPC)、MMLV 反转录酶等 RT-PCR 试剂, ExTag 购自 TakaRa; PCR Marker 购自上海华美生物工程有限公司。

根据已知的 AdS7(AF369932)、AdSP1(AF369387)和 AdSP3(AY033140)部分 cDNA 序列设计相应的特异引物对。S7A: 5′-GCTGCTAGAACTCAACATCACC-3′; S7B: 5′-AGAAAAAGTTACGACCTTGTGC-3′; AdSP1A: 5′-CTCACTGCGCCGTAGACAAACC-3′; AdSP1B: 5′-GACATACACCGAACCGCAAGC-3′; AdSP3A: 5′-CAACAAGAGGCTGGATGAAGG-3′; AdSP3B: 5′-TGCTGCTGGATGTTCTCG-3′。上述引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.3　蚊媒分组

将 3~5 d 龄雌大劣按蚊约 900 只分成 3 组。①正常组: 按常规饲养, 不吸血。②吸正常血组: 吸食正常小鼠血约 3 h, 吸血后移出饱血雌蚊, 常规饲养; ③感染组: 正常小鼠按常规腹腔接种含约氏疟原虫鼠血, 3 d 后, 选择有 10%~15%原虫血症, 内含约 3%配子体的小鼠为供血鼠, 供大劣按蚊移血 3 h, 吸血后吸出饱血雌蚊, 常规饲养。

上述 3 组蚊均置于 23~24 ℃, 相对湿度 70%~80%的养蚊室中饲养, 血餐当日为 0 d。

1.4　样本的收集

离心法收集血淋巴[11]。冷冻麻醉雌大劣按蚊后, 在解剖显微镜下用解剖针撕开腹部后两节, 将蚊虫置于冰预冷、管盖和管底部已用 18 号针头在打了孔的 0.5 ml EP 管中, 每管 25 只雌大劣按蚊, 然后将 0.5 ml EP 管放入含 100 μl Tripure™ 的 1.5 ml EP 管中, 4 ℃ 375× *g* 离心 10 min。

在解剖镜下, 常规解剖 3~5 d 龄雌大劣按蚊, 取出蚊胃和唾液腺, 立即置于 1 ml 0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)中, 12 000 × *g* 离心 5 min, 沉淀重复洗涤 2 次后, 用于提取总 RNA。

1.5　RT-PCR

50 只 3~5 d 龄正常雌大劣按蚊血细胞, 蚊胃和唾液腺总 RNA 为模板, 以 AdSP1A 和 AdSP1B 为引物 RT-PCR 扩增 AdSP1, 以 AdSP3A 和 AdSP3B 为引物用 RT-PCR 扩增 AdSP3。逆转录总体积为 20 μl, 含 800 ng 总 RNA, 0.5 μg olig(dT)15, MMLV 反转录酶(200 U), 37 ℃ 1 h 逆转录; 70 ℃ 10 min。PCR 总体积为 25 μl, 含 3 μl 逆转录产物, 2.5 μl 1× buffer, 1.25 U ExTaq 酶, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 200 μmol/L dNTPs, 两条引物均为 0.1 μmol/L。94 ℃预变性 3 min 后; 94 ℃变性 1 min, 58 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 5 min。

以 Ads7 为内参照, 半定量 RT-PCR 分析吸血和约氏疟原虫感染后大劣按蚊血细胞中 AdSP1 和 AdSP3 的转录情况。首先, 以逆转录 3~5 d 龄正常雌大劣按蚊血细胞总 RNA 获得的 cDNA 为模板, 分别特异扩增 AdS7, AdSP1 和 AdSP3, 确定 PCR 产物微弱但又不处于饱和状态下的起始 cDNA 用量, PCR 循环数和凝胶电泳加样量; 然后, 逆转录血餐后 1、2、3、4、7 和 11 d 时 3 组各 50 只雌大劣按蚊血细胞总 RNA, 获得相应的 cDNA, 从每个样本取等体积(3 μl)的 cDNA 为模板, 同时扩增 AdS7, AdSP1 和 AdSP3。期间, 所有样本同时进行 PCR 扩增。最后, 并各取 10 μl PCR 扩增产物在同一块琼脂糖中进行电泳。

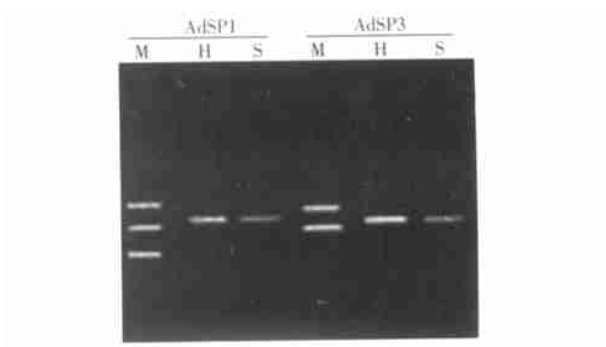
1.6　大劣按蚊蚊胃感染率及其卵囊黑化情况

收集感染组雌大劣按蚊血淋巴的同时解剖蚊胃, 观察血餐后 7 d 约氏疟原虫卵囊的数量和黑化情况, 计算感染率(有卵囊蚊总数/解剖蚊总数)和感染度(卵囊总数/有卵囊蚊总数)。

2　结果

2.1　RT-PCR 检测 AdSP1 和 AdSP3 在大劣按蚊重要免疫组织中的表达

以 50 只雌大劣按蚊血细胞、蚊胃和唾液腺的总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增 AdSP1 和 AdSP3, 发现血细胞和唾液腺都能特异地扩增出 AdSP1 和 AdSP3, 但是蚊胃组织表现为非特异扩增(图 1)。



M: Midguts; H: Haemocytes; S: Salivary glands

图 1　RT-PCR 扩增大劣按蚊主要组织中 AdSP1 和 AdSP3 结果

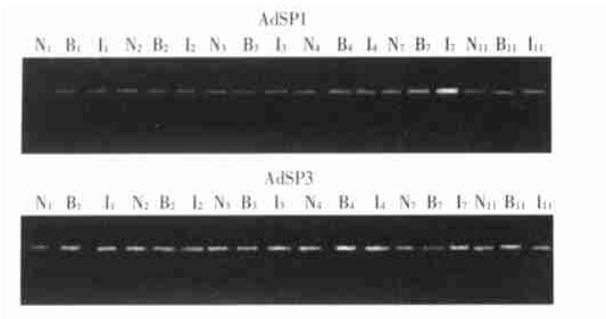
Fig 1　PCR amplification of AdsP1 and AdsP3 from the main tissues of *Anopheles dirus*

2.2　半定量 RT-PCR 分析吸血和约氏疟原虫感染对大劣按蚊血细胞 AdSP1 和 AdSP3 转录的影响

血餐后 1 d, 吸血组和约氏疟原虫感染组的 AdSP1 和 AdSP3 基因的转录水平明显高于不吸血组, 血餐后 2 d 和 3 d, 吸血组和约氏疟原虫感染组的 AdSP1 和 AdSP3 基因的转录处于相对恒定的水平, 但是, 血餐后 4 d, 约氏疟原虫感染组 AdSP3 基因

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

的转录处于高峰水平，血餐后 7 d 时的转录水平也相对较高；AdSP1 基因的转录的高峰出现在血餐后 7 d。与血餐后 7 d 相比，血餐后 11 d 的 AdSP1 和 AdSP3 基因的转录水平相对偏低（图 2）。



N：Non-blood-feeding group；B：Normal blood-feeding group；
I：*Plasmodium yoelii* infection group

图 2 半定量 **RT-PCR** 分析吸血和约氏疟原虫感染对大劣按蚊血细胞中 **AdSP1** 和 **AdSP3** 基因转录的影响

Fig 2 Effects of blood-feeding and *Plasmodium yoelii* infection on the transcription abundance of AdsP1and AdsP3 in *Anopheles dirus* haemocytes detected by semi-quantitative RT-PCR

2.3 光镜观察大劣按蚊蚊胃感染率、感染度和黑化情况

感染约氏疟原虫血餐后 7 d，解剖 20 只感染组雌大劣按蚊蚊胃，发现其感染率和感染度大约分别为 30% 和 40%，镜检发现个别约氏疟原虫卵囊出现了部分黑化（图 3）。



A：Normal oocysts；B：Partially melanized oocysts

图 3 吸血感染后 **7 d** 约氏疟原虫卵囊出现部分黑化

Fig 3 Partially melanized oocysts of *Anopheles dirus* at 7 d after *Plasmodium yoelii* infection

3 讨论

由于按蚊的个体小，材料来源困难，直接分离、纯化按蚊抗疟原虫免疫相关基因非常困难，因此，有关按蚊抗疟原虫免疫的研究，目前通常首先通过 cDNA 同源克隆获得相关基因，然后采用半定量 RT-PCR 比较、分析感染疟原虫前后转录水平变化，探讨其在按蚊抗疟原虫免疫中的作用。

S7 是组成核糖体小亚基的一种蛋白，参与真核生物蛋白质的合成，它在真核生物细胞中呈组成性表达，合成量很少受时间、空间和感染等因素的影响，S7 已作为一种分子参照，应用于冈比亚按蚊抗感染免疫的研究[2~4]。

张敬如等[5]报道吸血和约氏疟原虫感染并不影响大劣按蚊血细胞中的 Ads7 的转录；RT-PCR 分析正常大劣按蚊主要组织中 AdSP1 和 AdSP3 的表达发现，AdSP1 和 AdSP3 在血细胞和唾液腺中表达，但是均不在蚊胃中表达，这与前酚氧化酶激活酶主要在血细胞中合成的报道是一致的[6]，关于唾液腺中 PPAE 样丝氨酸蛋白酶的功能目前还不清楚。因此，本实验采用 Ads7 为内参照，用半定量 RT-PCR 仅分析了吸血和约氏疟原虫感染对大劣按蚊血细胞 AdSP1 和 AdSP3 转录的影响。

研究表明，按蚊抗疟原虫的有效免疫反应出现在血餐后 1 d，此时疟原虫动合子开始穿越蚊胃上皮，不但诱导蚊胃细胞局部防御素（defensin）、革兰阴性菌结合蛋白（Gram-negative bacteria-binding protein，GNBP）、丝氨酸蛋白酶样分子 ISPL5（immune-related serine protease-like sequence 5）和 ISP13（immune-related serine protease 13）、半乳糖特异的凝集素样分子（putative galactose lectin）、IGALE20（infection-responsive galactose lectin）[7]、一氧化氮合成酶（nitric oxide synthase，NOS）[8] 和 ICHIT（a chitinase-like domain-containing protein）基因的转录上调，而且诱导蚊胃外组织丝氨酸蛋白酶样分子 ISPL5、防御素和革兰阴性菌结合蛋白的转录上调。这与血餐后 1 d 时吸血和约氏疟原虫感染组的 AdSP1 和 AdSP3 基因的转录水平相对正常组高的结果一致。

黄复生等[9]发现，光镜下最早可在血餐后 7 d 观察到约氏疟原虫卵囊的部分黑化，本实验同样显示血餐后 7 d 个别约氏疟原虫卵囊的出现部分黑化，而半定量 RT-PCR 结果显示大劣按蚊血细胞中 AdSP3 和 AdSP1 基因转录相继在血餐后 4 d、7 d 达到高峰，因此提示 AdSP1 和 AdSP3 可能参与大劣按蚊对约氏疟原虫的黑化反应，并可能是大劣按蚊的 PPAE。然而，最后确定 AdSP1 和 AdSP3 是否真正参与按蚊的黑化反应需要 RNA 干扰等功能实验证实。随着 RNA 干扰技术的发展，尤其是最近 RNA 干扰技术在体特异沉默了冈比亚按蚊防御素等 20 个基因，为从反求遗传学角度筛选出真正参与按蚊黑化包裹疟原虫的丝氨酸蛋白酶提供了技术支持[10]，目前我们正在准备进行这方面的研究。

参考文献：

[1] Sidjanski S, Mathews G V, Vanderberg J P. Electrophoretic seperation and identification of phenol oxidase in haeolymph and midgut of adult *Anopheles Stephensi* mosquitoes[J]. J Parasitol, 1997, 83(4): 686—691.

[2] Müller H M, Dimopoulos G, Blass C, *et al*. A hemocyte-like cell line es-

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

tablished from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11727－11735.

[3] Oduol F, Xu J, Niaré O, *et al*. Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(21): 11397－11402.

[4] Gorman M J, Andreeva O V, Paskewitz S M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30(1): 35－46.

[5] 张敬如, 徐文岳, 黄复生, 等. 吸血和约氏疟原虫感染对大劣按蚊血细胞中 rpS7 转录的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(10): 862－863.

[6] Jiang H, Wang Y, Kanost M R. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, Manduca sexta: A bacteria-inducible protein similar to Drosophila easter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(21): 12220－12225.

[7] Dimopoulos G, Richman A, Müller H M, *et al*. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(21): 11508－11513.

[8] Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, *et al*. The mosquitoe *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide [J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1998, 95(10): 5700－5705.

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

[10] Blandin S, Moita L F, Kocher T, *et al*. Reverse genetics in mosquitoes *Anopheles gambiae*: targeted disruption of defense gene[J]. EMBO, 2002, 3(9): 852－856.

（编辑　薛国文）

文章编号: 1000-5404(2004)06-0489-02

个案与短篇

固定性斜视的手术治疗初探

Surgical therapy for fixed strabismus

江文珊, 阴正勤　（第三军医大学西南医院全军眼科中心, 重庆 400038）

固定性斜视是临床上一类罕见的疾病, 是由于某一条或多条眼外肌为纤维组织所代替, 致使眼球固定于某一特定位置, 不能向其它方向转动。眼球多固定于内转或内下转的位置, 被动转动试验有极大抗力。多数为先天性, 是由于先天性肌纤维化引起, 也可见于后天性。后天性固定性斜视多见于 40 岁以后的中、老年人, 多为渐进性, 多见于高度近视眼固视不良者。固定性斜视的斜视角很大, 多数大于 45°, 眼球常被固定在极度内转或外转位上, 不能向其它方向运动, 严重影响患者的外观及视功能。由于伴有眼外肌的纤维化, 行常规的斜视手术无法矫正其斜视度或矫治效果很差。我们对 3 例固定性内下斜视患者采用内直肌断腱＋外直肌与上直肌部分联结术的方法治疗, 均取得了满意效果, 现报告如下。

病例 1: 女, 62 岁。因“右眼内斜逐渐加重 2 年”入院, 有高度近视史。入院检查: 右眼: 裸眼视力: 数指/20 cm, －20.00DS 矫正至 0.1。左眼裸眼视力 0.02, －20.00DS 矫正至 0.2。双眼角膜透明, 晶体混浊(＋＋), 高度近视性眼底, 后极部视网膜见大片脉络膜萎缩斑。弧行视野计行斜视度检查: 左眼正位, 右眼内斜 55°, L/R 10°。右眼固定于内下转位, 内转亢进(＋2)、下转亢进(＋1), 上转、外转均不能过中线。牵拉试验示右眼外转、上转均有极大抗力。诊断为: 右眼固定性内斜视, 双眼高度近视。于局麻下行右眼内直肌断腱＋外直肌与上直肌部分联结术, 同时作固定缝线将眼球固定在外上转位, 术后 7 d 拆除固定缝线。出院时左眼正位, 右眼外斜约 15°, L/R 5°。右眼运动: 外转, 下转正常, 内转－2, 上转能过中线。术后半年复查: 左眼正位, 右眼外斜约 5°, L/R 5°。

病例 2: 女, 54 岁。因“右眼内斜逐渐加重 3 年”入院, 有高度近视史。入院检查: 右眼极度内下转位, 不能窥见瞳孔, 故视力检查只有光感。左眼裸眼视力 0.1, －24.00 DS 矫正至 0.2。左眼角膜透明, 晶体混浊(＋＋), 高度近视性眼底, 后极部视网膜见大片脉络膜萎缩斑。右眼底无法窥见。33 cm 角膜映光法检查: 左眼正位, 右眼内斜＞ 45°, 右眼低位, 但无法测出度数。右眼固定于极度内下转位, 内转亢进(＋3)、下转亢进(＋2), 上转、外转均不能过中线。牵位试验示右眼外转、上转均有极大抗力。诊断为: 右眼固定性内斜视, 双眼高度近视。采用同一方法行手术矫正。出院时右眼裸眼视力: 光感, －20.00 DS 矫正至数指/40 cm。左眼正位, 右眼外斜约 15°, L/R 5°。右眼运动: 外转, 下转正常, 内转－2, 上转能过中线。眼 B 超检查示: 右眼轴长 29.23 mm, 左眼轴长 26.39 mm。双眼后巩膜葡萄肿。术后 3 个月复查: 左眼正位, 右眼下斜 10°。因外观明显改善, 未再行下直肌手术矫正垂直斜视。

病例 3:, 女, 21 岁。因“自幼左眼内斜, 不能外转”入院。入院检查: 右眼: 裸眼视力: 0.1, －5.00 DS 矫正至 0.7。左眼裸眼视力 0.02, 矫正无提高。双眼前节及眼底检查未见异常。33 cm 角膜映光法检查: 右眼正位, 左眼内斜＞ 45°, R/L 30°。左眼固定于内下转位, 内转亢进(＋2)、下转亢进(＋2), 不能上转及外转。牵拉试验示左眼外转、上转均有极大抗力。诊断为: 左眼固定性内斜视, 双眼弱视, 右眼屈光不正。于左眼行同样手术。出院时右眼正位, 左眼外斜约 15°, R/L 15°。眼运动: 左眼外转－1, 下转正常, 内转－2, 上转－2。半年后复查: 右眼正位, 左眼下斜 15°。因外观明显改善, 也未再行下直肌手术。

（下转 493 页）

作者简介: 江文珊(1972－), 女, 重庆市人, 博士, 医师, 主要从事眼底病、斜弱视及小儿眼科方面的研究。电话: (023)68754402
通信作者: 阴正勤, 电话: (023)68754401
收稿日期: 2003-07-19; 修回日期: 2003-11-12

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