DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.011
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
494 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0494-04

大劣按蚊差异表达蛋白与约氏疟原虫卵囊黑化关系的研究

杨 松,黄复生,段建华,况明书,王 英 (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 探讨大劣按蚊差异表达蛋白与约氏疟原虫卵囊黑化的相互关系。方法 将雌大劣按蚊成蚊分为吸糖水组、正常小白鼠血组和约氏疟原虫感染血组,以挤压法收集各组的血淋巴,解剖中肠并利用超声波提取其蛋白,继而对血淋巴和中肠蛋白进行SDS-PAGE分离,Western blot检测丝氨酸蛋白酶和前酚氧化酶的表达差异,并利用免疫组织化学进行血细胞丝氨酸蛋白酶与前酚氧化酶的定位检测。结果 SDS-PAGE显示吸糖水大劣按蚊有34条蛋白带,而吸正常小鼠血和吸感染血蚊血淋巴有35条蛋白带,而且在分子量约160×10³和66×10³的蛋白差异带显著,吸正常血及感染血后表达增强。吸糖水和吸正常小白鼠血组血淋巴丝氨酸蛋白酶呈现2条带,分子量分别约160×10³和150×10³,3组蚊血淋巴前酚氧化酶呈现1条带,分子量约66×10³,吸正常小鼠血和吸感染血组蚊1 d后血淋巴丝氨酸蛋白酶和前酚氧化酶表达均显著上调,尤其疟原虫感染后表达最强。感染1 d后中肠前酚氧化酶带型明显增宽。免疫酶化学显示,丝氨酸蛋白酶和前酚氧化酶在血细胞内均呈颗粒状分布,血细胞外血淋巴液内有少许散在颗粒分布。结论 约氏疟原虫卵囊黑化期间,大劣按蚊血淋巴丝氨酸蛋白酶和前酚氧化酶表达增强,提示二者可能参与了卵囊黑化包裹反应。

关键词:大劣按蚊;约氏疟原虫;黑化;Western印迹;免疫组织化学
中图法分类号:Q55;R382.31;R384.1 文献标识码:A

Relationship of differentially expressed proteins in *Anopheles dirus* with *Plasmodium yeolii* oocyst melanization

YANG Song, HUANG Fu-sheng, DUAN Jian-hua, KUANG Ming-shu, Wang Ying (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship of the differentially expressed proteins in *Anopheles dirus* with the melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts. Methods *Anopheles dirus* adult females were divided into sucrose solution-feeding group (S), normal mouse blood-feeding group (NB), and *Plasmodium yoelii* infected blood-feeding group (IB), respectively. The hemolymph of *Anopheles dirus* in each group was collected by expulsion method. Tissues of the midguts of the *Anopheles dirus* from the three groups were collected and crushed by ultrasonic wave for protein extraction. The hemolymph and the midgut proteins were isolated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDA-PAGE). The differentially expressed serine protease (SP) and the prophenoloxidase (PPO) were identified by Western blotting. Location of SP and PPO in the hemocytes was identified by immunohistochemical method. Results SDS-PAGE revealed that there were 34 protein bands in mosquitoes in group S, 35 bands in NB and IB, respectively. The notably differential bands with molecular weight of about 160×10^3 and 66×10^3 were found. The two bands were up-regulated after normal blood-feeding and *Plasmodium* infection. There were 2 SP bands with molecular weight of 160×10^3 and 150×10^3 in S-feeding and NB-feeding mosquitoes. A single PPO band with molecular of about 66×10^3 was shown in the three groups. Enhanced expression levels of SP and PPO in the hemolymph of *Anopheles dirus* infected with *Plasmodium yoelii* were found at 1 d after feeding with normal mouse blood and *Plasmodium* infected blood. The strongest expression of the two enzymes was found in IB, but increased content of PPO in the midgut was found at 1 d after infection. Immunohistochemistry revealed that both SP and PPO were distributed as brown granules in the hemocytes, and a few particles were scattered in the hemolymph outside the hemocytes. Conclusion The enhanced expression levels of SP and PPO in the hemolymph of *Anopheles dirus* during the melanization of *Plasmodium yoelii* oocyst suggest that the two proteinases may be involved in the melanotic encapsulation of *Plasmodium yoelii* oocysts.

Key words: *Anopheles dirus*; *Plasmodium yoelii*; melanization; Western blotting; immunohistochemistry

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300292)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300292)

作者简介:杨 松(1970-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事疟疾、肾综合征出血热的分子流行病学和防治方面研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244

收稿日期:2003-10-30;修回日期:2003-12-18

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

疟疾仍是当今全球危害性极大和最重要的寄生虫病, 每年罹患疟疾者依然高达 5 亿多, 死亡数达 270 多万[1], 尤以恶性疟对公共卫生和经济的影响最大, 并再一次成为全球发展的优先考虑问题。随着抗疟药和灭蚊剂抗性的出现, 疟原虫在蚊体内发育差异的分子识别的基础性研究成为热点, 并可能成为根除疟疾新策略[2]。

与其它昆虫一样, 按蚊缺乏抗体介导的特异性免疫, 它主要通过蚊中肠细胞的裂解作用、黑化包裹反应的激活、氮氧化物和抗菌肽的产生等先天性免疫反应抑制蚊体内疟原虫的发育。但是氮氧化物和抗菌肽只能一定程度上调节按蚊体内的疟原虫感染率, 而黑化包被反应能完全抑制疟原虫感染, 是按蚊抵御疟原虫感染免疫的最重要免疫机制[3], 目前对识别和前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)黑化通路的分子机制的了解还较肤浅[4]。Gorman 等[5] 认为 SP 可能是按蚊体内的一种识别蛋白, 其与疟原虫表面发生相互作用而诱导免疫反应。他们发现整个蚊期有 5 种具有免疫功能的 SP 表达, 其中 SP22D 含有 2 个几丁质结合功能域、1 个粘液素样功能域、2 个 LDL 受体功能域和 2 个清道夫受体富半胱氨酸结构域, 已知 LDL 受体功能域可结合脊椎动物体内子孢子主要表面蛋白质。而 PO 是以酶原形式 PPO 存在于按蚊体内, 通过羟化单酚氧化酶(MPO)和氧化双酚氧化酶(DPO)而产生大量的醌类中间产物。黑化包被反应不但是抗性株冈比亚按蚊的主要表型, 而且也是约氏疟原虫不能在大劣按蚊体内发育成熟的主要表型。黄复生等[6] 发现, 约氏疟原虫卵囊黑化是疟原虫不能在大劣按蚊体内发育成熟的主要原因, 表现为大多数约氏疟原虫卵囊有黑色素颗沉着, 不能发育成熟。徐文岳等[7] 通过 PO 酶活性检测提示大劣按蚊血淋巴酚氧化酶可能在大劣按蚊对黑化约氏疟原虫卵囊中发挥重要作用。本研究利用大劣按蚊/约氏疟原虫模型, 通过大劣按蚊差异蛋白分离和鉴定分析, 进一步探讨 PPO 级联与大劣按蚊黑化包被约氏疟原虫的相互关系。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　按蚊和疟原虫感染　　大劣按蚊我室常规饲养, 选择 3 ~ 5 d 龄雌大劣按蚊为实验对象, 分别吸糖水(S)和小白鼠血(NB)。正常昆明株小鼠 6 只, 雌雄不拘(本校实验动物中心提供, 体质量 16 ~ 20 g)按常规腹腔接种约氏疟原虫 BY265 株, 3 d 后, 选择有 10% ~ 20% 原虫血症的感染小白鼠供 3 ~ 5 d 龄雌蚊吸饲 3 h(IB), 扣出饱血雌蚊继续糖水喂养。3 组蚊均在 22 ~ 24 ℃, 相对湿度 70% ~ 80% 的养蚊室饲养。

1.1.2　主要试剂和材料　　标准蛋白(北京中山), 十二烷基硫酸钠、甘氨酸、丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺(Biomol), β 巯基乙醇(华美)和四甲基乙二胺(Promega), 蛋白酶抑制剂(Boehringer Mannhein), 冈比亚按蚊抗大鼠 SP 多克隆抗体血清(欧洲分子生物学中心 Kafatos 实验室 Alberto Danielli 教授惠赠), 兔抗烟草天蛾 PPO 多克隆抗体(美国蒋浩波博士惠赠), 辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白、辣根过氧化物酶标记的羊抗大鼠 IgG(H+L)和免疫组化染色试剂盒(HistostainTM-Plus Kits)(北京中山), 多聚赖氨酸(Sigma), Western 免疫印迹试剂盒(武汉博士德), 二氨基联苯胺(DAB, 北京鼎国)。

1.1.3　主要仪器　　JY92-Ⅱ型超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科器研究所), BIO-RAD POWER/PAC1000 电泳仪和电转仪(美国), 台式高速离心机(TGL-16G 型, 上海), Olympus 多功能显微镜(日本)等。

1.2　方法

1.2.1　蚊血淋巴采集及处理　　将 3 组雌蚊(各取 70 只)冷冻麻醉后, 剪去口器, 挤压蚊胸, 取第 1 滴清亮的液体即为血淋巴。为防止血淋巴蛋白在收集过程中被降解, 在冰浴上采集血淋巴, 立即与 10 μl 2× SDS-PAGE 样品缓冲液和 10 μl 蛋白酶混合抑制剂(1 mol/L 乙二胺四乙酸、苯甲基磺酰氟、苯硫脲、亮肽素和抑胰肽酶)混合, 样品立刻进行电泳分析。

1.2.2　蚊中肠的采集及蛋白抽提　　牵拉法分别收集蚊中肠。具体为将感染前后雌蚊(各取 69 只)冷冻麻醉后, 剪去头部, 从蚊腹部末端将中肠拉出, 弃去马氏管和前肠, 将中肠放入 1.5 ml 含冷冻的 PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)缓冲液的 Eppendorf 管内漂洗 1 次, ddH_2O 洗 3 次去除离子, 然后各加 110 μl 组织裂解液(8 mol/L 尿素+4% CHAPS+40 mmol/L Tris-base)和 10 μl 50% 蛋白酶混合抑制剂(1 mol/L 的乙二胺四乙酸、苯甲基磺酰氟、苯硫脲、亮肽素和抑胰肽酶), 超声波粉碎 5 min 提取组织蛋白, 15 000 r/min 离心 30 min, 移上清于 0.5 ml Eppendorf 管中, -70 ℃ 保存备用。

1.2.3　SDS-PAGE　　分别采用 7.5%(Sp 检测)和 12.5% 分离胶(PPO 检测), 5% 浓缩胶。3 组样品及分子量标准蛋白上样量均为 20 μl。起始电压 60 V, 待样品前沿到分离胶后将电压调至 110 V, 当溴酚蓝达凝胶底部时停止电泳, 按文献[8] 进行考马斯亮蓝染色等操作。

1.2.4　Western 印迹　　电泳结束后进行蛋白质电转移, 使用 NC 膜, 电转移条件为 400 mA× 2 h, 电转完毕后用 0.4% 丽春红染色 1 min, dH_2O 脱色, 剪下蛋白质标准带, 换氨基黑染色 5 min, 10% 乙酸脱色, 风干保存。将转移后 NC 膜浸入 2% 脱脂奶粉封闭, 37 ℃ 1 h, PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗膜 5 min×3, 然后加大鼠抗冈比亚按蚊 SP22D 抗体(1∶3 000)稀释液 30 ml, 4 ℃过夜。PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗膜 10 min× 3, 加山羊抗大鼠 IgG(H+L)(1∶5 000) 稀释液 30 ml, 37 ℃× 1 h, PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗膜 10 min×3, 加二氨基联苯胺(DAB)液 100 ml (DAB 50 mg+ H_2O_2 100 μl+ PBS 100 ml)显色, dH_2O 终止显色, 结果进行扫描。

1.2.5　大劣按蚊血细胞免疫酶化学检测　　参照试剂盒说明并略加改变后进行, 具体为: 多孔玻片孔内滴加约 5 μl 0.01% 多聚赖氨酸, 涂开, 自然干燥; 分别取 1 ~ 5 只蚊血细胞涂片, 干燥后浸于 4% 多聚甲醛室温固定 20 min; 3% 过氧化氢孵育 5 ~ 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; dH_2O 淋洗, PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)浸泡 5 min; 2% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 倾去封闭液, 勿冲洗; 滴加适当比例稀释的一抗[1∶2 000 烟草天蛾抗家兔 PPO; 1∶(1 500 ~ 3 000) 冈比亚按蚊抗大鼠 SP22D], 37 ℃孵育 1 h; PBS 淋洗, 3 min×3; 滴加黄色液体(通用型 S-P 9000 生物素标记羊抗兔、大

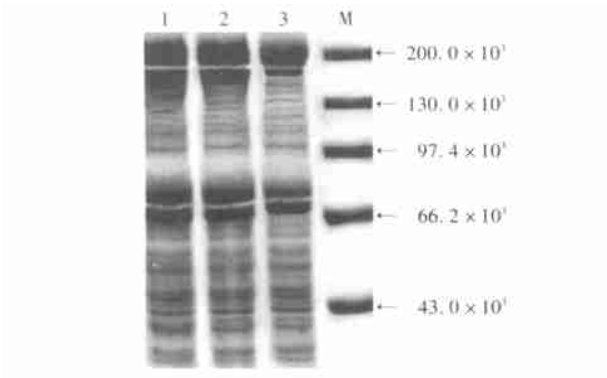
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

鼠、小鼠和豚鼠 IgG)，室温或 37 ℃孵育 10 min；PBS 淋洗，3 min×3；滴加橙色液体，室温或 37 ℃孵育 10 min；37℃孵育 10 min；DAB 显色；dH_2O 淋洗，封片，显微镜下观察，拍照，存档。

2 结果

2.1 大劣按蚊血淋巴蛋白 SDS-PAGE 分析

对 S、NB 和 IB 组大劣按蚊血淋巴 SDS-PAGE 后分别可见 34、35 和 35 条蛋白带(图 1)，约 160×10^3 和 66×10^3 分子量蛋白带差异非常明显(箭头示差异蛋白带)。



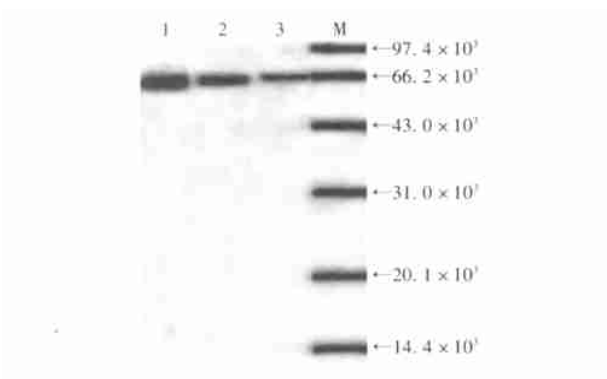
M: Marker; 1: Sucrose feeding; 2: Normal mouse blood feeding; 3: Infected blood feeding (1 d)

图 1 大劣按蚊血淋巴蛋白带(SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色)

Fig 1 Protein bands of the hemolymph from *Anopheles dirus* (SDS-PAGE, Coomassie brilliant blue staining)

2.2 大劣按蚊血淋巴 SP 和 PPO 的 Western 印迹

对 S、NB 和 IB 组大劣按蚊血淋巴蛋白 SDS-PAGE 后进行 Western 印迹发现 1 条 PPO 带，分子量均约为 66×10^3，感染后血淋巴 PPO 带明显增强、增宽，且随着感染天数延长，中 PPO 带也逐渐增宽(图 2)。

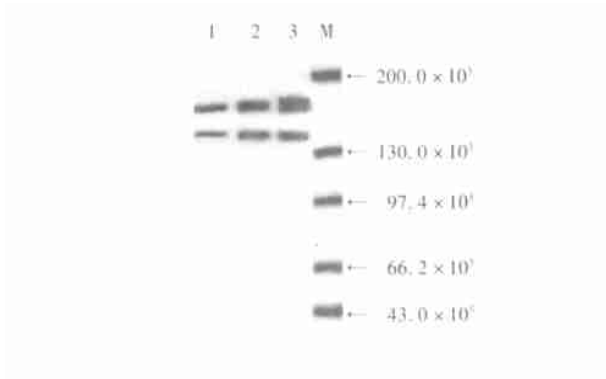


M: Marker; 1: S-feeding mosquitoes; 2: NB-feeding mosquitoes; 3: At 1 d after infection

图 2 吸糖水、正常小鼠血和感染血大劣按蚊血淋巴 PPO 的 SDS-PAGE 后的 Western 印迹图

Fig 2 Western blot after SDS-PAGE of PPO in the hemolymph of *Anopheles dirus* adult females after different blood feeding

S 组、NB 组和 IB 大劣按蚊血淋巴 Western 印迹发现 2 条 SP 蛋白带，分子量分别约为 160×10^3 和 150×10^3，吸血及感染后带型明显增强、增宽，尤其是感染后 SP 表达最强(图 3)。



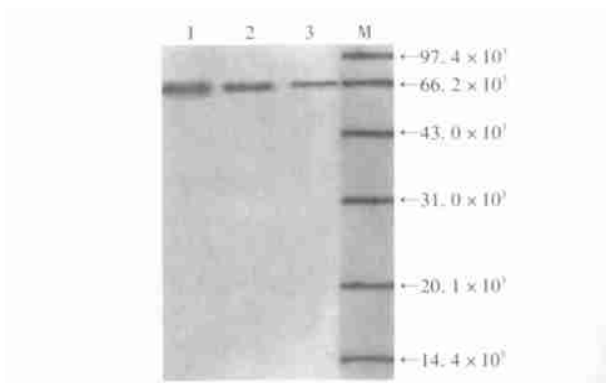
M: Marker; 1: Sucrose feeding; 2: Normal mouse blood feeding; 3: Infected blood feeding (1 d)

图 3 吸糖水、吸正常小鼠血和吸感染血组大劣按蚊血淋巴 SP 的 SDS-PAGE 后的 Western 印迹图

Fig 3 Western blotting after SDS-PAGE of SP in the hemolymph of *Anopheles dirus* adult females after different blood feeding

2.3 大劣按蚊中肠 PPO 的 Western 印迹

吸感染血组第 1、2 和 3 d 后，大劣按蚊中肠 SDS-PAGE 后进行 Western 印迹发现 1 条 PPO 带，分子量均约为 66×10^3，随着感染日数延长，中肠 PPO 带增宽，但是亮度稍减低(图 4)。



M: Marker; 1: At 1 d after infection; 2: At 2 d after infection; 3: At 3 d after infection

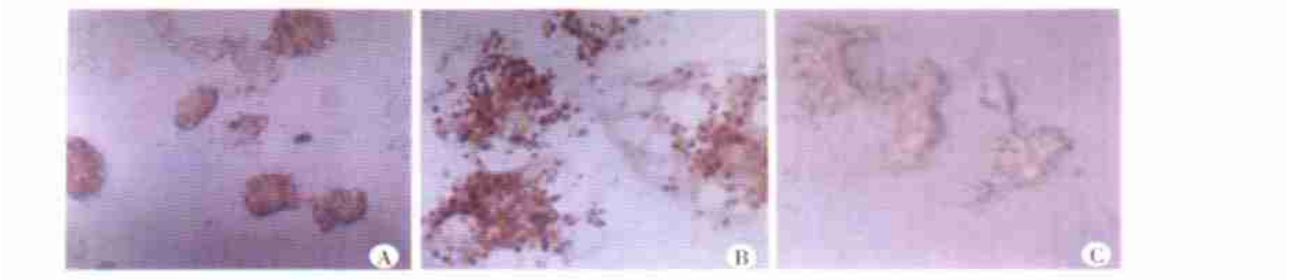
图 4 吸感染血第 1、2 和 3 天大劣按蚊中肠 PPO 的 SDS-PAGE 后的 Western 印迹图

Fig 4 Western blotting after SDS-PAGE of PPO in the midguts of *Anopheles dirus* adult females in IB at 1, 2, and 3 d after infection

2.4 大劣按蚊血淋巴细胞 SP 和 PPO 的免疫酶化学定位

光镜下，SP 和 PPO 在血细胞内均呈棕色颗粒状分布，以颗粒形式散在分布于血细胞外血淋巴液内，而空白和替代组血细胞内无颗粒分布(图 5)。

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



A: Positive (S-P× 400); B: Positive (S-P× 1 000); C: Negative (S-P× 400)

图 5　大劣按蚊血淋巴细胞 SP 和 PPO 的免疫组化定位

Fig 5　Location of SP and PPO in the hemocytes of *Anopheles dirus* by immunohistochemistry

3　讨论

已知大劣按蚊主要通过黑化包被反应抑制约氏疟原虫在其体内发育。1995 年黄复生等[6] 发现, 大劣按蚊感染约氏疟原虫后第 5 天可见退变卵囊, 其周围有血细胞反应, 后者可释放颗粒物质或许还有其它物质, 对包被形成和卵囊黑化起着重要的作用。徐文岳等[7] 利用光镜观察大劣按蚊蚊胃感染率、感染度和黑化比率 7 d 时未发现卵囊黑化, 然而到 11 d 时, 部分卵囊开始出现局部黑化, 表现为卵囊外周或卵囊内有黑色颗粒沉着, 感染率为 69. 2%, 卵囊黑化比率为 38. 5%; d_{15} 时绝大多数卵囊出现部分黑化或完全黑化, 感染率为 58. 3%, 而卵囊的黑化比率达到 58. 3%, PO 酶活性检测发现, 感染约氏疟原虫后, PO 活性明显高于吸糖水组和吸正常血组, 提示大劣按蚊血淋巴酚氧化酶可能在大劣按蚊对黑化约氏疟原虫卵囊中发挥重要作用。

按蚊的黑化反应可能是由可溶性模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 首先诱发, 疟原虫表面分子可能与这些受体结合后激发 SP 级联反应, 最终引起与疟原虫相关蛋白质的交联和卵囊黑化[4]。本研究对不同条件下大劣按蚊血淋巴进行了蛋白分离和分析, 并对 PPO 级联反应中关键蛋白酶——SP 和 PPO 进行了鉴定, SDS-PAGE 发现吸糖水及约氏疟原虫感染后血淋巴蛋白存在明显差异, 部分蛋白带表达增强, 尤其感染后表达最强, 差异蛋白带位于 SP22D 和 PPO 分子量相近处, 经免疫印迹证实为此两种蛋白酶。而且大劣按蚊血淋巴丝氨酸蛋白酶均存在 2 条带, 且分子量不同, 可能是以异二聚体形式结构性表达于血淋巴中。PPO 呈现一条带。免疫酶化学定位发现 SP22D 和 PPO 主要位于血淋巴细胞内, 主要是颗粒细胞和浆细胞, 在血淋巴液内也存在, 而且在中肠细胞内也发现 PPO 的存在。吸血及疟原虫感染后 SP22D 和 PPO 表达增强, 感染后更明显, 与黑化呈一致性变化, 这提示约氏疟原虫入侵大劣按蚊中肠 24 h 内, 大劣按蚊血淋巴蛋白表达呈明显差异, 血淋巴内差异表达的 SP 和 PPO 可能参与了约氏疟原虫卵囊黑化包裹反应。

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, 98(5591): 129－149.

[2] Shahabuddin M, Costero A. Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(3): 231－240.

[3] Lavine M D, Strand M R. Insect hemocytes and their role in immunity[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1295－1309.

[4] Yu X Q, Jiang H B, Wang Y, *et al*. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33(2): 197－208.

[5] Gorman M J, Paskewitz S M. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(3): 257－262.

[6] 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.

[7] 徐文岳, 黄复生, 张锡林, 等. 大劣按蚊酚氧化酶活性与约氏疟原虫卵囊黑化关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(4): 440－442.

[8] 时超美, 黄复生, 况明书, 等. 斯氏按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化的关系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(1): 11－13.

(编辑　冯崇英)

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