DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.012
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
498 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0498-03

大劣按蚊对约氏疟原虫卵囊黑化相关血细胞类型的初步鉴定

杨 松,时超美,周桃莉,黄复生,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 鉴定与抗疟黑化反应相关的大劣按蚊血细胞。方法 采用姬氏染色法初步鉴定大劣按蚊血细胞类型,继而利用免疫细胞化学技术检测大劣按蚊血细胞内前酚氧化酶和丝氨酸蛋白酶。结果 颗粒细胞和浆细胞为大劣按蚊主要血细胞,前酚氧化酶和丝氨酸蛋白酶也主要分布于颗粒细胞和浆细胞内,其中颗粒细胞最常见。结论 抗疟黑化相关性血细胞可能主要为颗粒细胞和浆细胞。

关键词:大劣按蚊;血细胞;黑化;免疫细胞化学
中图法分类号:R382.31;R384.1;R446.113 文献标识码:A

Preliminary identification of *Anopheles dirus* hemocytes related with anti-malaria melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts

YANG Song, SHI Chao-mei, ZHOU Tao-li, HUANG Fu-sheng, KUANG Ming-shu, WANG Ying (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the hemocytes related with anti-malaria melanization response. Methods The types of hemocytes were identified preliminarily by Giemsa's staining, and then both prophenoloxidase (PPO) and serine protease (SP) were detected by immunocytochemical technique. Results The hemocytes were mainly granular cells and plasmatocytes in which Sp22D and PPO were distributed. Conclusion Hemocytes related with anti-malaria melanization may mainly be granular cells and plasmocytes.

Key words: *Anopheles dirus*; hemocyte; melanization; immunocytochemistry

昆虫先天性免疫系统分为体液性和细胞性防御反应,体液性防御反应包括抗菌肽,血淋巴黑化和凝固的级联,氧和氮活性中间产物。细胞性防御反应指的是血细胞介导的反应如吞噬作用和包裹。昆虫血细胞可识别许多外源性靶物质,也能识别自己。体液性和细胞表面受体均参与了识别机制,当外源物质识别这些细胞后,通过信号因子和效应分子进行细胞防御反应的调节,控制细胞粘附和细胞毒性作用[1]。黑化包裹是按蚊的一种特异的抗疟机制,某些关键成分来源于血淋巴[2]。按蚊细胞系经免疫刺激后可以产生防御素或抗菌肽、前酚氧化酶等活性成分[3],目前少见有关大劣按蚊血细胞免疫功能方面的研究,本研究旨在初步探讨与大劣按蚊免疫黑化通路中前酚氧化酶级联成分相关的细胞类型,进一步阐明疟原虫卵囊黑化过程中发生功能变化的体液和/或细胞机制之间的相互关系,为蚊媒控制疟疾奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 按蚊和疟原虫感染 大劣按蚊为我室常规饲养,选择3~5 d龄雌蚊为实验对象,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龄雌蚊吸血3 h(IB),取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 免疫组化染色试剂盒(HistostainTM-Plus Kits)(北京中山),多聚赖氨酸和3-氨基-9-乙基卡唑(3-amino-9-ethylcarbozole, AEC)(Sigma),多聚甲醛(北京化学试剂公司),二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)和多孔载玻片(北京鼎国),甘油(北京红星华工厂),甲醇(上海振兴华工厂),冈比亚按蚊抗大鼠SP22D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)等。

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的研究,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

1.1.3　主要仪器　　Olympus 多功能显微镜(日本)。

1.2　方法

1.2.1　蚊血淋巴采集　　将 3 组雌蚊(各取 5 只)冷冻麻醉后, 剪去口器, 挤压蚊胸部, 取第 1 滴清亮的液体即为血淋巴, 分别滴加在多孔载玻片上。

1.2.2　姬氏染色显示大劣按蚊血细胞类型　　染色方法: 将 1 只大劣按蚊血淋巴滴在洁净的载玻片上, 待血淋巴自然干燥, 甲醇固定, 姬氏染液覆盖样品 30 min, 然后用 PBS 冲洗, 晾干后光镜下观察。

1.2.3　大劣按蚊血细胞 PPO 和 Sp22D 的免疫酶组织化学检测　　单重染色法: 参照试剂盒说明和文献[4]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 只蚊血细胞滴片, 室温静置 10 ~ 15 min 以沉淀细胞; 浸于 4% 多聚甲醛室温固定 20 ~ 30 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; 蒸馏水淋洗, 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 SP-9000 生物素标记羊抗兔、大鼠、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; 用 AEC 显色; 蒸馏水淋洗, 封片, 显微镜下观察, 拍照, 存档。双重染色法: 先进行 PPO 的 DAB 染色, 染色后再加抗冈比亚按蚊 Sp22D 抗体, 方法与步骤同单重染色, 最后进行 Sp22D 的 AEC 染色。

1.2.4　卵囊感染率及黑化率计算　　解剖蚊胃, 观察卵囊形态、大小及黑化情况, 比较感染率(有卵囊蚊数/解剖总蚊数)和黑化比率(出现黑化卵囊蚊数/解剖总蚊数)。

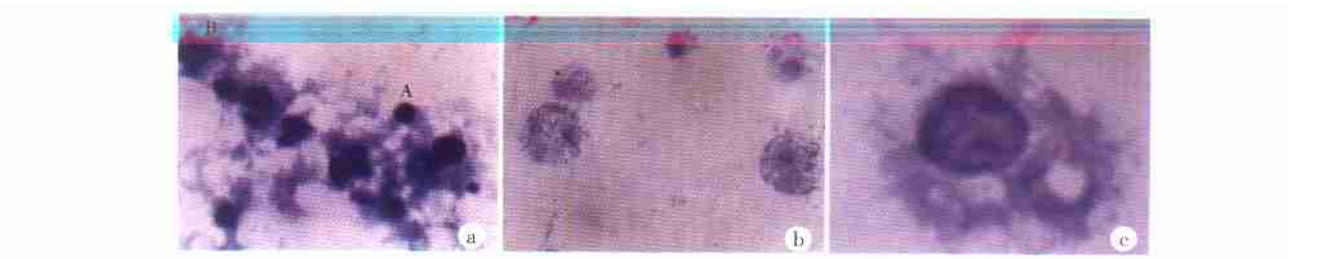
1.3　统计学方法

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　姬氏染色显示大劣按蚊血细胞类型

光镜下大劣按蚊血细胞被染成紫蓝色, 细胞类型主要为颗粒细胞和浆细胞, 其中颗粒细胞最常见(图 1)。



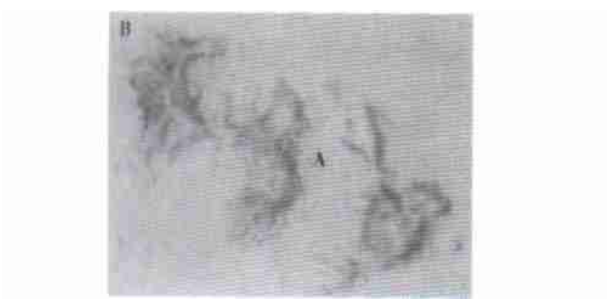
a: (Giemsa staining × 100) A: Granular cells, B: Plasmocyte; b, c: Granular cells (Giemsa staining× 400)

图 1　大劣按蚊血细胞

Fig 1　Hemocytes from *Anopheles dirus*

2.2　大劣按蚊血淋巴细胞 Sp22D 的免疫酶化学定位

通过 AEC 显色, Sp22D 在血细胞内呈红色颗粒状分布。二者均主要为颗粒细胞和浆细胞, 而对照组血细胞内无颗粒分布(图 2、3)。



A: Granular cells; B: Plasmocytes

图 2　AEC 染色 Sp22D/PPO 阴性大劣按蚊血淋巴细胞　(S-P× 400)

Fig 2　Sp22D/PPO-negative hemocytes from *Anopheles dirus* stained with AEC　(S-P× 400)



A: Granular cells; B: Plasmocytes

图 3　Sp22D/PPO 阳性大劣按蚊血淋巴细胞　(S-P× 400)

Fig 3　Sp22D/PPO-positive hemocytes stained with AEC　(S-P× 400)

经过双重免疫细胞化学染色, 光镜× 1000 下观察, Sp22D 和 PPO 同时在一个血细胞内显示为红色和棕色颗粒(图 4)。该方法可对在同一细胞内显示 2 种颜色, 即在同一细胞内检测 2 种蛋白酶抗原。

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



图 4 大劣按蚊血细胞 **Sp22D** 和 **PPO** 的双重免疫酶化学定位(S-P× 1 000)

Fig 4 Double immunolocalization of Sp22D and PPO in the hemocytes from *Anopheles dirus* ((S-P× 1 000)

2.3 大劣按蚊感染率和黑化比率

1~9 d 卵囊无明显黑化,10 d 时,部分卵囊开始出现局部黑化,表现为卵囊壁或卵囊内有少许黑色素颗粒沉着,感染率为 65%,卵囊黑化比率为 35%;15 d 时大多数卵囊出现部分黑化或完全黑化,感染率为 60%,而卵囊的黑化比率达到 55%(表 1)。10 d 和 15 d 感染率无显著差异性($P>0.05$),黑化率间有显著差异($P<0.01$)

表 **1** 大劣按蚊吸血 **10 d** 和 **15 d** 后约氏疟原虫感染率和卵囊黑化比率

Tab 1 Infection rate of *Plasmodium yoelii* and percentage of melanized oocysts in *Anopheles dirus* at 10 and 15 d after blood-feeding, respectively

	10 d after infection	15 d after infection
Infection rate (%)	65(13/20)	60(12/20)
Percentage of melanized oocyst (%)	35(7/20)	55(11/20)$^{\triangle}$

$\triangle$: $P<0.01$, *vs* 10 d after infection

3 讨论

昆虫血细胞起源于中胚叶干细胞,然后分化为具有不同形态学、功能和分子标记物的细胞系[1]。昆虫具有开放的循环系统,一般来说,其中的血细胞(hemocytes, or blood cells)可以自由循环。虽然昆虫血细胞与哺乳动物的白细胞的功能相同,但是决定血细胞类型的分子标记物仅仅开始在黑腹果蝇和其它模式昆虫提到过。虽然目前对血细胞类型和功能的描述术语还缺乏准确性,但基于形态学特征可典型地将血细胞分为粒血胞(granulocytes)和浆血胞(plasmatocytes)[2]。利用按蚊细胞进行昆虫免疫反应的探索研究才刚刚开始,免疫活性蚊细胞系可表达各种防御因子,包括转铁蛋白、溶菌酶、防御素、抗菌肽和前酚氧化酶等。昆虫血细胞可按功能区分如吞噬活性、流动活性(spreading activity)或黑化通路中酶的释放[3]。疟疾媒介冈比亚按蚊细胞系经免疫刺激后,编码防御素和革兰阴性细菌结合蛋白(gram-negative bacteria-binding protein)mRNAs 转录增强[6],Vizioli 等[7] 从冈比亚按蚊及体外培养细胞上清液中均纯化了抗菌肽,并具有抗革兰阴性细菌、革兰阳性细菌、真菌和酵母,这进一步支持按蚊细胞系具有免疫反应的能力。而目前人们普遍接受的蚊细胞还包括原细胞(prohemocytes)、球形细胞(spherulocytes)和类绛细胞(oenocytoids)。我们通过姬氏染色发现,大劣按蚊血细胞主要是颗粒细胞与浆细胞。

进行血细胞的分类和 PPO 级联相关性血细胞鉴定,有利于疟原虫黑化的细胞机制的免疫学研究。本研究经免疫组织化学技术表明前酚氧化酶和丝氨酸蛋白酶主要分布于大劣按蚊颗粒细胞和浆细胞内,而昆虫和按蚊对外界入侵病原体的黑化包裹主要涉及丝氨酸蛋白酶级联成分如前酚氧化酶的参与,这提示抗疟黑化相关性血细胞可能主要为颗粒细胞和浆细胞。

参考文献:

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

[2] 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.

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

[4] 时超美, 黄复生, 段建华, 等. 斯氏按蚊血细胞对约氏疟原虫卵囊黑化的影响[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(1): 16-20.

[5] Gorman M J, Andreeva O V, Paskewitz S M. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity[J]. Gene, 2000, 251(1): 9-17.

[6] 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.

[7] Vizioli J, Bulet P, Charlet M, *et al*. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(1): 75-84.

(编辑 冯崇英)

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