DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.010
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
490 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0490-04

约氏疟原虫感染斯氏按蚊与大劣按蚊前后中肠前酚氧化酶的变化

邱宗文,张锡林,徐文岳,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 比较分析约氏疟原虫感染斯氏按蚊与大劣按蚊前后中肠前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)的分布及其变化,探讨中肠PPO与按蚊抗疟原虫感染免疫防御反应的关系。方法 解剖分离约氏疟原虫感染前和感染后3、5、7、11和15 d斯氏按蚊与大劣按蚊的中肠。利用烟草天蛾PPO抗体分别进行免疫组化染色和免疫印迹分析。结果 斯氏按蚊与大劣按蚊在未感染约氏疟原虫前的中肠循环管道内均已存在PPO,而感染后循环管道内的PPO扩散到中肠组织间隙并聚集成片状、块状或条索状,大劣按蚊中肠PPO的聚集程度大于斯氏按蚊;在感染前和感染后不同时期免疫印迹均可检测到斯氏按蚊与大劣按蚊中肠PPO蛋白带,分子量约为67×10³,感染后的PPO蛋白带型比感染前明显增强,而且大劣按蚊中肠PPO蛋白带型比斯氏按蚊尤为明显。结论 约氏疟原虫感染前按蚊中肠循环管道内存在的PPO可能是经与血淋巴相通的循环管道扩散而来,感染后导致的中肠内PPO不同分布及其变化可能与疟原虫感染按蚊密切相关,并可能具有重要的生理学意义以及与激活按蚊抗疟原虫感染的免疫防御反应相关。

关键词:约氏疟原虫;斯氏按蚊;大劣按蚊;中肠;前酚氧化酶原
中图法分类号:Q554; R382.31; R384.1 文献标识码:A

Changes of prophenoloxidase in the midguts of *Anopheles stephensi* and *Anopheles dirus* before and after infection with *Plasmodium yoelii*

QIU Zong-wen, ZHANG Xi-lin, XU Wen-yue, WANG Ying (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the immune defence reaction against *Plasmodium* infection and the prophenoloxidase (PPO) of the midgut by comparative analysis of the distributions and the changes of PPO in the midgut of *Anopheles stephensi* and *Anopheles dirus* before and after infection with *Plasmodium yoelii*. **Methods** Midguts were dissected out from both *Anopheles stephensi* and *Anopheles dirus* at 3, 5, 7, 11 and 15 d before and after infection with *Plasmodium yoelii*. Immunohistochemistry and Western blotting were performed respectively on the collected midguts using *Manduca Sexta* PPO IgG polyantibody. **Results** PPO in the midguts from both *Anopheles stephensi* and *Anopheles dirus* was mainly located in the circulation conduit of midgut before infection with *Plasmodium yoelii*, but aggregated and distributed at the interspace of midguts as pieced or/and stripped forms after infection. Furthermore, PPO in the midgut of *Anopheles dirus* was more concentrated than that of *Anopheles stephensi*. Western blotting revealed that the PPO band with about molecular weight of 67×10^3 was detected in the midguts of both *Anopheles stephensi* and *Anopheles dirus* before and after *Plasmodium yoelii* infection. There was significant difference before and after infection, and the PPO band was obviously enhanced after infection. PPO bands in the midgut of *Anopheles dirus* were more prominent than those of *Anopheles stephensi*. **Conclusion** PPO in the midgut of *Anopheles* mosquitoes may come from the hemolymph by the circulation conduit before *Plasmodium yoelii* infection. However, the different distributions and changes of PPO in the midguts resulted from the *Anopheles* mosquitoes infected with *Plasmodia* may be closely correlated with *Plasmodia* infection, which may be of important physiological significance and may be involved in the immune defensive reaction against *Plasmodium*.

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

蚊媒传播的疟疾是一种危害严重的热带病,现在每年大约有2~3亿人感染,并有100~200万人因感染而死亡,尤其多见于5岁以下的儿童。尽管为控制疟疾进行了几十年的努力,但结果仍然令人失望。更严重的是疟原虫多药抗性株的出现并迅速扩散[1],以及蚊媒对杀虫剂耐受性的增加[2],目前又缺乏有效的

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:邱宗文(1968-),男,四川省泸县人,硕士研究生,主管技师,主要从事蚊抗疟原虫感染免疫防御反应方面的研究。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:2003-04-22;修回日期:2003-07-28

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

抗疟疫苗, 因此迫切需要发展新的疟疾控制策略。了解疟原虫-蚊媒相互作用的机制是发展有效疟疾媒介控制策略的关键之一。已知黑化包被反应是按蚊抵御疟原虫感染的最重要免疫反应机制, 通过卵囊黑化包被反应可杀死中肠内发育的疟原虫。前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)是介导卵囊黑化包被反应中的一种最关键酶, 主要由血细胞或脂肪体细胞合成, 以酶原形式存在于血淋巴中。由于疟原虫卵囊黑化包被反应的场所位于中肠内, 因此血淋巴中的 PPO 必需扩散到中肠并经激活后才能介导卵囊黑化包被反应。然而, 目前对黑化包被反应的研究主要集中在按蚊血淋巴成份上, 有关中肠内 PPO 与卵囊黑化包被反应关系的研究很少。本实验利用免疫组化染色和免疫印迹试验分析对约氏疟原虫易感的斯氏按蚊与不易感的大劣按蚊在感染前和感染后不同时期中肠内 PPO 的分布及其变化, 探讨中肠内 PPO 与按蚊抗疟原虫感染免疫防御反应的关系, 为发展新的疟疾媒介控制策略提供基础研究资料。

1　材料和方法

1.1　供试疟原虫、蚊媒和动物

约氏疟原虫 BY265 株, 每周用昆明株小鼠血传 1 次, 每 5 周蚊传 1 次; 昆明株小鼠为本校实验动物中心提供, 体质量约 16～20 g, 雌雄不限; 斯氏按蚊 Hor 株和大劣按蚊海南株均为本室长期饲养繁殖的稳定蚊种。

1.2　主要试剂和仪器

烟草天蛾 PPO 兔 IgG 由美国 Oklahoma 州立大学 Dr. Jiang 惠赠; 辣根酶标记羊抗兔 IgG 抗体和二氨基联苯胺(武汉博士德); 硝酸纤维膜(GENE 公司); 十二烷基硫酸钠、甘氨酸、丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺、TEMED、过硫酸胺和标准分子量蛋白(华美公司)。POWER/PAC1000 电泳仪和电转移仪(美国 BIO-RAD)。

1.3　实验方法

1.3.1　实验分组　　蚊虫分两组, 一组为约氏疟原虫易感的斯氏按蚊, 另一组为不易感的大劣按蚊。分别在吸血感染约氏疟原虫前和感染后 3、5、7、11 和 15 d 解剖分离中肠。

1.3.2　标本采集和处理　　乙醚轻麻醉按蚊后, 在无菌生理盐水中解剖分离雌性按蚊中肠 110 只, 并切断中肠前后端的消化管道, 置于 4 ℃的 PBS 中洗涤 2 次。取 10 只蚊中肠置于 4% 多聚甲醛中, 室温固定 4～6 h; 在余下的 100 只中肠中加入 50 μl 悬浮缓冲液, 再加等体积 2× SDS-PAGE 上样缓冲液, －20 ℃保存备用。

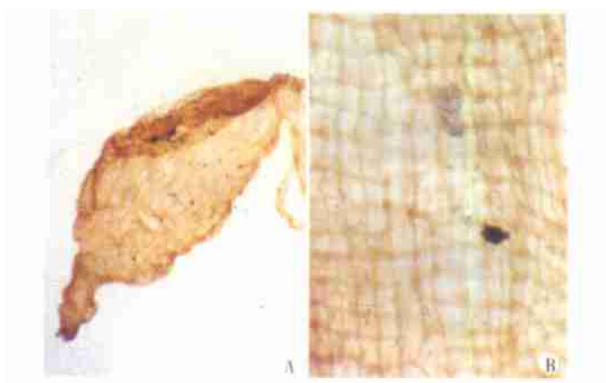
1.3.3　免疫组化染色　　参照文献[3]方法并作适当改进。将已固定好的中肠标本用 PBS 漂洗 3 min× 3 次, 置于 3% H_2O_2-PBS 中室温 30 min, 漂洗后用 2%脱脂奶粉-PBS 37 ℃孵育封闭 1 h, 加入 1∶1 000 烟草天蛾 PPO 抗体(用抗体稀释液稀释) 4 ℃过夜, 洗涤后再加入 1∶600 辣根酶标记羊抗兔 IgG 抗体后 37 ℃孵育 1 h, 最后加入 DAB 显色液并在显微镜下观察染色情况, 当显色适当时用 PBS 冲洗终止显色, 将染色好的中肠标本进行脱水封片观察、保存和照像。

1.3.4　免疫印迹试验　　按照文献[4]方法, 将超声匀浆后的中肠标本煮沸 5 min, 于 12% 聚丙烯酰胺凝胶中进行 SDS-PAGE, 然后电转移到硝酸纤维膜上, 经 2%脱脂乳粉封闭后, 以 1∶2 000 烟草天蛾 PPO 兔 IgG 作为一抗, 1∶600 辣根酶标记羊抗兔 IgG 抗体为二抗进行免疫印迹试验。

2　结果

2.1　免疫组化染色

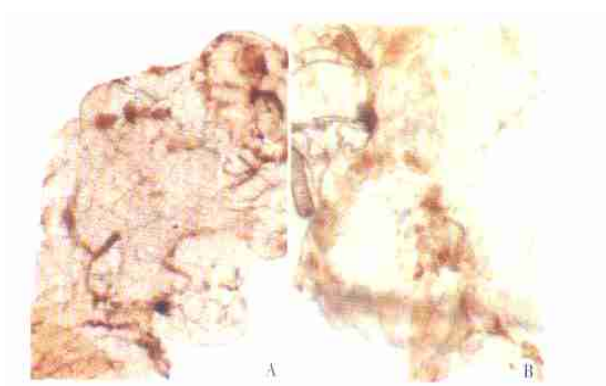
在感染约氏疟原虫前, 斯氏按蚊与大劣按蚊中肠内均已存在 PPO, 并主要分布于中肠内的循环管道中; 而感染后存在于循环管道中的 PPO 扩散到中肠组织间隙, 并聚集成片状、块状或条索状分布于中肠局部组织间隙内。除在感染前后可见明显的 PPO 分布变化与感染后 PPO 呈现特征性聚集外, 感染早期与感染晚期比较未见明显差异。此外, 在约氏疟原虫感染后的同一时间点, 可见大劣按蚊中肠内 PPO 聚集形状的大小、颜色明显大于斯氏按蚊。斯氏按蚊与大劣按蚊在约氏疟原虫感染前和感染后第 3、5 天的免疫组化染色结果见图 1～3。



A: *An. dirus* (S-P× 40); B: *An. stephensi* (S-P× 400)

图 1　感染前 **PPO** 主要分布于蚊中肠内的循环管道中

Fig 1　Prophenoloxidase mainly located in the circulative conduit of midgut tissue before infection with *P. yoelii*

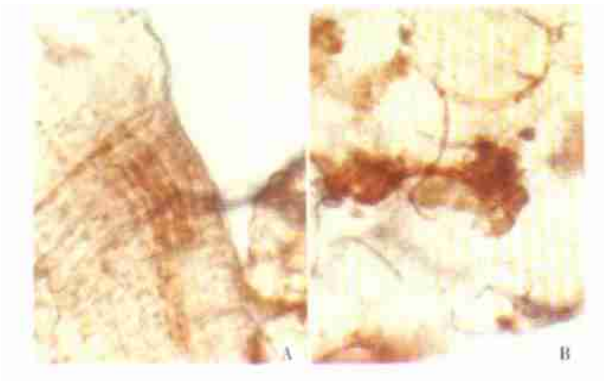


A: *An. dirus* (S-P× 100); B: *An. stephensi* (S-P× 100)

图 2　感染后 **3 d PPO** 聚集于中肠组织间隙成块状或条索状

Fig 2　Prophenoloxidase gathered as mass/piece in the interspace of midgut tissue at 3 d after infection with *P. yoelii*

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



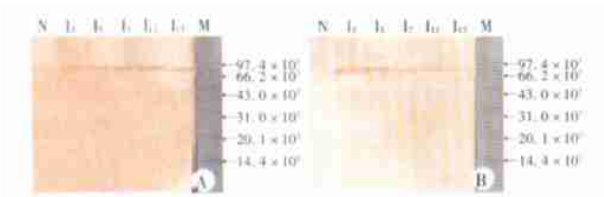
A：*An. dirus*（S-P× 400）；B：*An. stephensi*（S-P× 400）

图 3 感染后 **5 d PPO** 聚集于中肠组织间隙成块状或条索状

Fig 3 Prophenoloxidase gathered as streak/mass and distributed in the interspace of midgut tissue at 5 d after infection with *P. yoelii*

2.2 免疫印迹试验

斯氏按蚊与大劣按蚊在约氏疟原虫感染前和感染后不同时间点的中肠 PPO 免疫印迹试验都为阳性，均呈现一条 67× 10^3 的蛋白带。斯氏按蚊与大劣按蚊在感染前后的 PPO 蛋白带型均可见明显的差异，感染后的 PPO 蛋白带型比感染前明显增强，尤其在感染后第 3、5 天时的 PPO 蛋白带型最明显。经比较斯氏按蚊与大劣按蚊中肠 PPO 的蛋白带型，可见疟原虫感染大劣按蚊后同时间点的中肠 PPO 蛋白带型比斯氏按蚊明显。尤其在感染后第 7、11 和 15 天时，大劣按蚊中肠 PPO 蛋白带型明显比斯氏按蚊增强。随着感染后时间的延长，可见斯氏按蚊中肠 PPO 蛋白带型呈现逐渐减弱的趋势，第 15 天时的 PPO 蛋白带型最弱，而大劣按蚊未呈现该变化趋势。免疫印迹检测到的斯氏按蚊与大劣按蚊中肠 PPO 蛋白带见图 4。



M：Marker；N：Before infection；I_3 ~I_{15}：At 3—15 d after infection

图 4 按蚊中肠 **PPO** 的免疫印迹分析 A：大劣按蚊；B：斯氏按蚊

Fig 4 Immunnoblotting analysis of prophenoloxidase in the midgut of *An. dirus*（A）and *An. stephensi*（B）

3 讨论

黑化包被反应是昆虫最重要的防御机制之一[5]，同时也是按蚊抵御疟原虫感染的最重要免疫机制，而 PPO 是昆虫体内介导黑化包被反应的一种最关键酶。已证实多数约氏原虫卵囊可被大苏按蚊里化包被，而斯氏按蚊则较少包被、并表现出易感性。由于烟草天蛾 PPO IgG 和按蚊 PPO 之间具有较强的交叉反应，利用烟草天蛾 PPO IgG 已成功检测出冈比亚按蚊和大劣按蚊血淋巴 PPO[6,7]，因此我们用烟草天蛾 PPO IgG 检测大劣按蚊与斯氏按蚊中肠内的 PPO。

在约氏疟原虫感染斯氏按蚊与大劣按蚊前，免疫组化染色显示二者中肠内均已有 PPO 存在，并主要分布于中肠循环管道内，免疫印迹也检测到较弱的 PPO 蛋白带，表明在感染前按蚊中肠循环管道内就已存在 PPO。已知按蚊 PPO 主要由血细胞合成并存在于血淋巴中，目前还尚未发现按蚊中肠表达 PPO 的基因，因此按蚊中肠内的 PPO 可能是经与血淋巴相通的循环管道扩散而来。在约氏疟原虫感染斯氏按蚊与大劣按蚊后，可见在感染前主要存在于中肠循环管道内的 PPO 在感染后已扩散到中肠组织间隙中，并聚集成片状、块状或条索状，表明按蚊中肠内 PPO 的不同分布及其变化与约氏疟原虫的入侵密切相关。此外，在相同时间点大劣按蚊中肠内 PPO 的聚集程度大于斯氏按蚊，提示中肠内 PPO 聚集程度的大小可能与约氏疟原虫卵囊黑化包被反应相关。由于 PPO 级联反应的活化产物对昆虫本身也具有毒性，所以 PPO 的活化过程必需受到精密的调控[8]。因此存在于循环管道内的 PPO 可能首先扩散到中肠组织间隙并聚集在效应部位后才进一步激活，这样既可减少因 PPO 的激活造成体内非效应部位的损伤，也可更高效率地利用蚊体内已有的 PPO 而相对减少 PPO 的合成，这也符合昆虫进化的普遍规律。因此在约氏疟原虫感染按蚊前后中肠内 PPO 的不同分布及其变化可能具有重要的生理学及病理生理学意义，并可能与按蚊抵御疟原虫感染的先天性免疫防御反应相关。

另外，免疫印迹检测到斯氏按蚊与大劣按蚊中肠 PPO 的蛋白带型在约氏疟原虫感染后均明显增强，表明感染后可导致中肠内的 PPO 含量显著增加。已知伯氏疟原虫感染冈比亚按蚊后可诱导其体内 PPO 基因的激活和转录，因此按蚊中肠内 PPO 含量的增加很可能与 PPO 表达增强有关。虽然诱导蚊合成 PPO 的速度很快，但仍需一定的时间，如果在病原体入侵按蚊时可在第一时间内首先动用体内已存在的 PPO，并迅速出现在效应部位，则比经诱导合成的 PPO 发挥生物学效应要快。因此推测当约氏疟原虫入侵按蚊后有可能打破蚊体内 PPO 的分布平衡，假如血淋巴中的 PPO 扩散并富集于中肠时即可导致局部组织内的 PPO 含量增高，但有关这方面的证据目前还尚未获得。此外，有研究认为 PPO 介导约氏疟原虫卵囊黑化包被反应可在感染大劣按蚊后第 5 天或更早时间内被激活[9]。我们经免疫印迹检测到约氏疟原虫感染斯氏按蚊与大劣按蚊后中肠 PPO 蛋白带型均在第 3、5 天时最明显，表明在这个时期中肠内 PPO 含量最高，而这个时间正好与激活约氏疟原虫卵囊黑化包被反应的时间相吻

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

合, 提示中肠内 PPO 含量增加可能与约氏疟原虫卵囊黑化包被反应相关。经比较约氏疟原虫感染斯氏按蚊与大劣按蚊后的中肠 PPO 蛋白带型, 显示大劣按蚊中肠内 PPO 含量可持续性的维持在一个较高水平, 提示中肠内 PPO 含量增加并维持较长的时间可能更有助于约氏疟原虫卵囊的黑化包被反应。

综上所述, 按蚊中肠是抗疟原虫感染免疫防御反应的重要效应器官, 也是 PPO 介导疟原虫卵囊黑化包被反应的场所。有关约氏疟原虫感染斯氏按蚊与大劣按蚊前后导致中肠 PPO 的不同分布及其变化, 以及感染后中肠内 PPO 含量增加的详细机制等均尚未阐明, 推测可能与约氏疟原虫入侵按蚊后激活蚊的先天性免疫防御反应相关。

参考文献:

[1] Ridley R G. Malaria: dissecting chloroquine resistance[J]. Curr Biol, 1998, 8(10): 346—349.

[2] Curtis C F. Should DDT continue to be recommended for malaria vector control[J]? Med Vet Entomol, 1994, 8(2): 107—112.

[3] 蔡文琴. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 78—80.

[4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 400—403.

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

[6] Jiang H B, Wang Y, Korochkina S E, *et al*. Molecular cloning of cDNAs for two prophenoloxidase subunits from the malaria vector: *Anopheles gambiae*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1997, 27(7): 693—699.

[7] 徐文岳, 黄复生, 况明书, 等. 约氏疟原虫卵囊黑化期间大劣按蚊血淋巴蛋白的分析[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1098—1100.

[8] Kanost M R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity[J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(4—5): 291—301.

[9] 徐文岳, 黄复生, 段建华, 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.

(编辑　张大春)

(上接 489 页)

讨论

固定性斜视是临床上一类少见的斜视类型, 因斜视度数常常很大, 且有眼球运动受限, 故对患者的外观影响很大。由于其发病机制上有某一条或多条眼外肌的纤维化, 故采用常规的斜视矫正术往往难以奏效。有报道可采用水平肌后退加拮抗肌缩短的方法治疗, 文献[1~3]报道用硅胶管或带蒂骨膜固定眼球的方法治疗。然而我们发现对重度固定性斜视很难进行水平肌后退的手术。术中我们发现 3 例患者的患眼均极度内转, 勾取内直肌后发现内直肌均完全纤维化, 根本无任何弹性, 以斜视勾勾取内直肌后无法将眼球向外侧转动, 故对内直肌进行缝合及后退非常困难, 只能行肌肉断腱术。需注意的是在断腱时应特别小心, 应充分暴露手术野, 在直视下进行, 以免剪破眼球, 特别是后天性固定性斜视患者往往为高度近视眼, 眼轴明显变长, 巩膜壁菲薄, 更增加了手术的难度及风险性, 故剪肌肉时应加倍小心。注意操作仔细, 勿过度提拉勾住肌肉的斜视勾, 分几刀一点一点地剪断内直肌, 剪肌肉时注意不要过低地把剪刀向下压巩膜, 以免剪破眼球。

行内直肌断腱后, 分离暴露出外直肌及上直肌, 以斜视勾将外直肌及上直肌从中央劈开, 向后分开长度约 7~10 mm, 然后将外直肌上半肌束与上直肌颞侧半肌束一起以 3-0 丝线进行结扎, 并将此结向后推至眼球赤道部左右。应注意缝线结扎的松紧度, 线结不能结扎过紧, 以免因结扎过紧而导致供应眼外肌的血流中断, 引起肌肉坏死或眼前段缺血, 也不能过松, 导致线结自行滑动。只须结扎到两束肌肉接触而线结不会滑动为准, 结扎后将此结向后推至眼球赤道部左右, 使眼球在外直肌及上直肌收缩时能转向外上方, 矫正患眼的内下斜位。

为避免术后因组织粘连而导致眼球位置变动, 影响眼位矫正效果, 我们对 3 例患者均行了牵引缝线固定眼球于过矫位。以 3-0 丝线以扁铲针在眼球颞上方角膜缘后 3 mm 穿过结膜和浅层巩膜缝线, 缝针跨度约 2~3 mm, 两端缝线分别从颞上方穹窿结膜进针, 至颞上方眶缘的皮肤面相距约 3 mm 处出针, 两针间垫一橡胶块, 并收紧牵引缝线将眼球拉至外上方过矫位而结扎。术后 7 d 拆除牵引缝线, 拆线后眼位在水平方向上仍过矫约 15°。

术后随访, 3 例患者均取得较好疗效。术后面部外观改善明显, 术后眼位基本正位或患眼轻度低位(≤15°)。眼运动检查: 患眼外转、下转基本正常, 上转均能过中线, 内转减弱(−2)。术后眼球在水平方向上能作 30°范围以上的运动。因残余下斜视度数小, 对外观无明显影响, 3 例患者均未进一步行患眼下直肌手术。

因此, 对于重度固定性内下斜视, 我们建议对患者采用患眼内直肌断腱+外直肌与上直肌部分联结术, 同时作眼球固定缝线的手术方法, 可成功矫治先天性及后天性固定性内下斜视, 可极大改善患者外观, 改善眼球运动状态。若术后仍残余较大度数下斜视, 可二期行下直肌后退术。

关键词: 固定性斜视; 手术治疗
中图法分类号: R777.410.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 钟修梁, 裴唐刚, 权　卫. 眶-球硅连术治疗固定性水平斜视[J]. 中华眼科杂志, 1997, 33(6): 460—461.

[2] 陈偕穗, 张亚琴. 带蒂骨膜固定眼球治疗固定性斜视[J]. 中国斜视与小儿眼科杂志, 1995, 3(3): 124—125.

[3] 裴重刚, 钟修梁, 缪超英. 固定性斜视的诊疗[J]. 中国斜视与小儿眼科杂志, 1998, 6(2): 76—77.

(编辑　汪勤俭)

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