DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.014
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0683-04

论著

斯氏按蚊血淋巴在约氏疟原虫卵囊黑化时差异表达蛋白的SDS-PAGE分析

杨 松,黄复生,况明书,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 初步了解约氏疟原虫感染后的雌斯氏按蚊成蚊吸饲硝喹蔗糖水和蔗糖水后不同时间的血淋巴蛋白差异表达。方法 挤压法分别收集两组雌斯氏按蚊成蚊1~5 d的血淋巴,经SDS-PAGE,考马斯亮蓝和银染显色,Bio-Rad1000凝胶图像分析系统进行扫描和差异蛋白条带的自动化分析。结果 用药第2天少数蚊卵囊开始部分黑化,第5~9天黑化蚊及其黑化卵囊逐渐增多。用药后第3天处理组蚊血淋巴蛋白条带数明显多于对照组,两组间存在较多差异蛋白带,主要集中在(20~40)×10^3、(60~80)×10^3和130×10^3处。银染比考马斯亮蓝染色出现的蛋白条带数多。结论 约氏疟原虫感染的雌斯氏按蚊成蚊吸饲硝喹糖水后其血淋巴蛋白表达有差异,其差异蛋白很可能就是黑化相关蛋白。

关键词:差异蛋白分析;血淋巴;斯氏按蚊;约氏疟原虫;SDS-PAGE
中图法分类号:R382.31;R384.1;R446.1 文献标识码:A

SDS-PAGE analysis of differentially expressed proteins from *Anopheles stephensi* hemolymph produced during the *Plasmodium yoelii* oocysts melanization

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

Abstract: Objective To explore primarily the differentially expressed proteins in the hemolymph from adult female *Anopheles stephensi* (*An. stephensi*) infected with *Plasmodium yoelii* (*P. yoelii*) after being fed with sucrose solution containing nitroquine or not at different time points. **Methods** Hemolymph of 2 groups of adult female *An. stephensi* was collected with the expulsion method from the first day to the fifth day after the feeding. Hemolymph samples were examined with SDS-PAGE. The protein gels were visualized by either Coomassie brilliant blue or silver staining, scanned and automatically analyzed by the BioRad1000 gel image analysis system for differential proteins bands. **Results** On the second day of feeding with nitroquine, a few oocysts were partially melanized. Furthermore, during the period from the fifth day to the ninth day, the number of mosquitoes with malanized oocysts and the number of melanized oocysts gradually increased. The number of hemolymph protein binds in the treatment group was markedly more than that in the control. Many different bands, mainly located at the molecular weight of (20~40)×10^3 and (60~80)×10^3, were visualized in the 2 groups. The number of protein bands stained by the silver staining was more than that by the Coomassie brilliant blue staining. **Conclusion** There are differentially expressed proteins in the hemolymph in *An. stephensi* infected with *P. yoelii* after being fed with sucrose solution containing nitroquine. These differential proteins may be the melanization-engaging proteins.

Key words: differential protein analysis; hemolymph; Anopheles stephensi; *Plasmodium yoelii*; SDS-PAGE

疟疾仍然是全球最具威胁性和最重要的虫媒病,虽经全世界范围几十年的共同努力欲根除该传染病,但是随着抗疟药和灭蚊药抗性的出现,目前还没有有效的、完全根治的措施,于是转向对疟原虫在蚊体内发育差异的分子识别的基础性研究,这可能是根除疟疾的一种合理策略和方法[1,2]。昆虫免疫研究是21世纪昆虫学研究最为活跃的领域之一,同时可作为人类先天性免疫学研究的模型[3]。蚊利用其最主要的先天性黑化免疫反应可部分或完全性抵抗疟原虫感染[4]。国外主要利用冈比亚按蚊抗性株和易感株对Sephadex磁株反应差异为模型进行黑化研究,我们研究表明,斯氏

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200237)
作者简介:杨 松(1970-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事疟原虫、流行性出血热病毒及其媒介生物学与免疫学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期:2002-09-08;修回日期:2002-12-13

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

按蚊(*Anopheles stephensi*)是鼠约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)的易感蚊种,但给感染约氏疟原虫的斯氏按蚊喂饲硝喹抗疟药后则引起卵囊黑化和退变,从而抑制和阻断蚊期卵囊发育[5],本研究利用斯氏按蚊-约氏疟原虫为模型深入探讨疟原虫卵囊黑化机制和进行黑化相关蛋白的差异筛选和鉴定,这对明确蚊媒-疟原虫相互关系和遗传控制媒蚊均有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疟原虫、小鼠和按蚊 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。昆明株小鼠由本校实验动物中心提供,体质量16~20 g。斯氏按蚊Hor株于我室常规饲养。

1.1.2 主要试剂 硝喹(上海医药工业研究院),97.4×10^3磷酸化酶B、66.2×10^3牛血清白蛋白、43.0×10^3兔肌动蛋白、31.0×10^3牛碳酸酐酶、20.1×10^3胰蛋白酶抑制剂、14.4×10^3鸡蛋清溶菌酶等标准分子量蛋白(中国科学院上海生物化学研究所),十二烷基硫酸钠、甘氨酸、丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺(Biomol)、2-β 巯基乙醇(华美)和四甲基乙二胺(Promega)。

1.1.3 主要仪器 BIO-RAD POWER/PAC1000电泳仪及BIO-RAD凝胶扫描仪(美国),转移脱色摇床TS-8型(江苏海门市麒麟医用仪器厂),pH S-3TC精密数显酸度计(浙江象山石浦海天电子仪器厂)等。

1.2 方法

1.2.1 按蚊感染、分组及给药 正常小鼠按常规腹腔接种约氏疟原虫,3 d后,选择有10%~20%原虫血症的小鼠供3~5 d龄雌蚊吸饲3 h,扣出饱血雌蚊50~100只,分成2组。常规饲养,第6天(即用药第1天,D1)分为用药组和对照组,前者喂饲含0.1%硝喹[6]的蔗糖水,后者喂蔗糖水。两组蚊均在24~25 ℃,相对湿度70%~80%的养蚊室饲养。

1.2.2 蚊血淋巴采集及处理 参照Han等[7]的方法。将2组雌蚊(各取25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1× SDS-PAGE样品缓冲液混合,样品立刻进行电泳分析。

1.2.3 SDS-PAGE,考马斯亮蓝和银染 采用12%分离胶,5%浓缩胶。两组样品及标准低分子量蛋白上样量均为15 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,分别行考马斯亮蓝和银染显色,按文献[5,7]进行操作。

1.2.4 凝胶扫描 利用BIO-RAD1000凝胶图像分析系统进行扫描和蛋白条带及分子量分析。

1.2.5 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)。

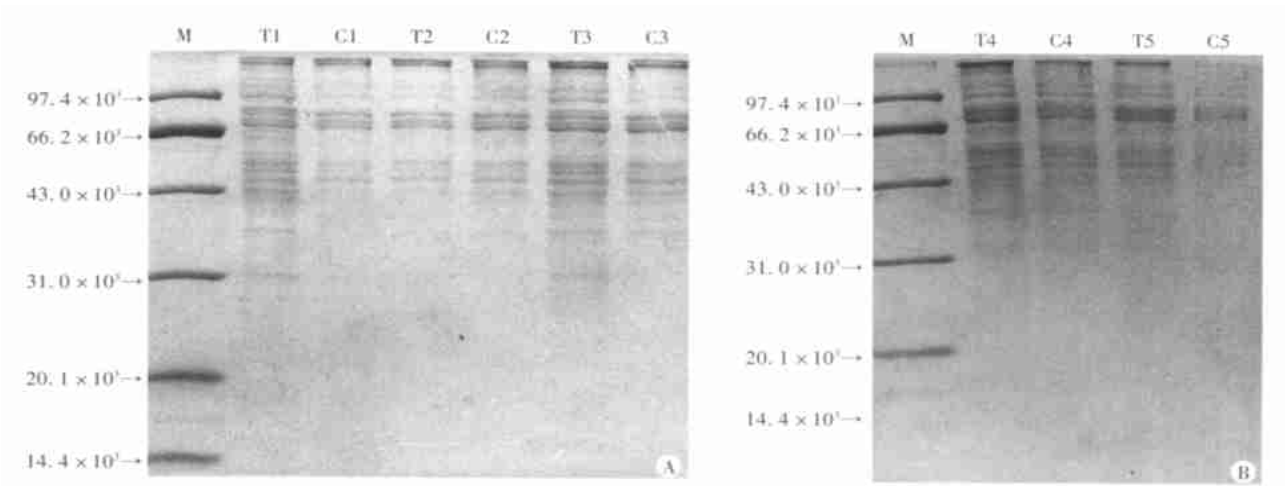
1.3 统计学分析

对感染率、黑化率进行χ^2检验。

2 结果

2.1 考马斯亮蓝染色显示雌斯氏按蚊血淋巴差异表达蛋白带

将第1~5天用药组与对照组各25只蚊血淋巴SDS-PAGE后进行考马斯亮蓝染色,重复2次。第1天均为26条,第2天均呈现28条,而第3天用药组差异蛋白带数最多,相差3~6条,第4和第5天用药组比对照组多1条。第1~5天存在差异分子量蛋白带主要集中于(60~80)×10^3、(20~30)×10^3和130×10^3处。见图1。



A: Administration on D1 to D3; B: Administration on D4 to D5; M: Marker; T: Treatment group; C: Control group

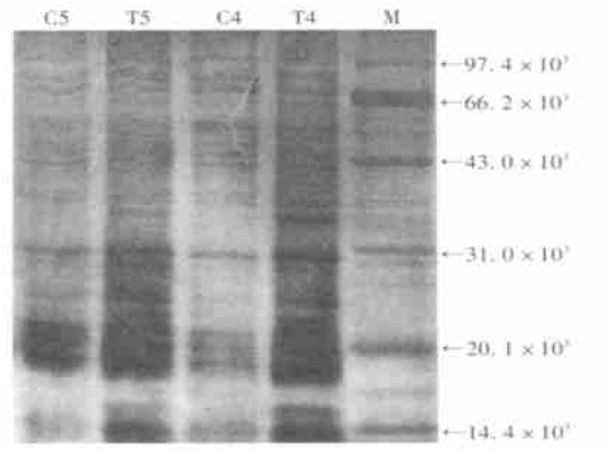
图1 考马斯亮蓝染色显示不同时相点斯氏按蚊血淋巴差异SDS-PAGE蛋白条带

Fig 1 Coomassie brilliant blue staining of differential hemolymph proteins of mosquitoes, *Anopheles stephensi*, by SDS-PAGE between the treatment group and the control group at different time points

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

2.2　银染显示雌斯氏按蚊血淋巴差异表达蛋白带

用药第 4、5 天后处理组与对照组各 25 只蚊血淋巴 SDS-PAGE 后进行银染, 结果示处理组有 37 条蛋白带, 主带 21 条, 次带 16 条; 对照组蚊有 33 条带, 主带 16 条, 次带 17 条, 箭头指向为差异蛋白带, 见图 2。



M: Marker; T: Treatment group; C: Control group

图 2　银染显示用药第 4、5 天处理组与对照组蚊血淋巴差异 SDS-PAGE 蛋白条带

Fig 2　Silver staining of differential hemolymph proteins in *Anopheles stephensi* by SDS-PAGE between treatment group and control group after 4 and 5 days' feeding

2.3　感染率比较

第 1～5 天后用药组蚊与对照组蚊感染率平均分别为 76.3% 和 77.6%, 两组间差异无显著性($\chi^2=0.0037<\chi^2_{0.05(1)}=3.84$, $P>0.05$)。用药后第 2 天极个别蚊 1～2 个卵囊出现部分黑化, 第 3～5 天出现黑化增多, 黑化率约 14.0%, 对照组未发现黑化现象。此期间对照组蚊卵囊为圆形或略呈椭圆形, 而用药组蚊卵囊形态各异, 卵囊皱缩, 囊壁与内容物间隙逐渐加大, 沉积的黑色颗粒增多, 卵囊颜色渐渐变灰黑色, 最后完全被黑色颗粒或团块物质填充即为完全黑化。第 6～9 天, 黑化率分别为 16.7%、28.6%、37.5%、53.0%, 至用药后 10 d, 黑化率达 60.9%, 在同一只蚊胃中可观察到部分和完全黑化卵囊。对照蚊也发现部分黑化卵囊, 但是比率约 3.7%。两组间黑化率有显著差异性, 用药组黑化率明显高于对照组($\chi^2=16.70>\chi^2_{0.01(1)}=6.63$, $P<0.01$)。正常卵囊与部分和完全黑化卵囊分别见图 3 与图 4。



图 3　正常卵囊　(× 100)

Fig 3　Normal oocysts　(× 100)

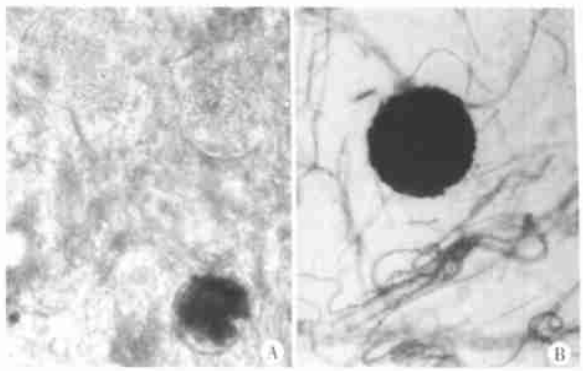


图 4　部分(A)和完全(B)黑化卵囊　(× 400)

Fig 4　Partially(A) and fully(B) melanized oocysts　(× 400)

3　讨论

传疟媒蚊种类很少, 吸血后也仅有极少部分疟原虫经过蚊体内多种屏障(围食膜内腔、围食膜、围食膜外腔、中肠上皮、血腔和唾液腺)后才能完成发育和增殖。蚊体内疟原虫发育与否是由疟原虫与许多蚊体因素间错综复杂的相互作用引起的, 对蚊期疟原虫孢子增殖的影响研究有利于制定合理和有效的疟疾传播和控制策略。疟原虫孢子增殖期可诱导蚊免疫反应基因表达, 但其表达的免疫成分是否释放入血淋巴和影响疟原虫继续发育还不清楚。昆虫黑化机制研究一直是昆虫先天性免疫反应研究热点[2], 目前还未见以斯氏按蚊-约氏疟原虫为模型利用差异蛋白分析技术进行黑化的分子机制研究报道。

本研究发现, 用药第 2 天个别斯氏按蚊卵囊可见黑化, 第 5～9 天出现黑化的蚊数及其黑化卵囊数增多。大多数用药组蚊卵囊皱缩、呈不规则形状、有黑素颗粒沉积, 而对照组蚊仅个别卵囊出现部分黑化。研究发现用药后第 5 天成熟卵囊数量减少, 卵囊内颗粒化, 少数卵囊有黑化现象, 本研究结果与[5,6]相符。本研究继续动态观察用药至第 11 天, 发现用药组蚊卵囊黑素颗粒逐渐增多, 黑化率升高, 并出现完全黑化现象。用药组血淋巴蛋白条带数多于对照组, 尤以用药第 3 天较明显, 用药组比对照组多 3～6 条蛋白带。两组间存在较多差异蛋白带, 分子量主要集中在(60～80)×10^3、(20～40)×10^3 间和 130×10^3 处。经考马斯亮蓝染色的蚊血淋巴蛋白条带数比银染少, 提示银染敏感性高于考马斯亮蓝染色。黑化是由酚氧化酶系统的参与级联反应, 其差异蛋白表达可能主要在用药第 3 天。除了用药差异外, 两组蚊在相同实验条件下饲养、感染, 蚊数、血淋巴及样品缓冲液量均一致。以上

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

提示蚊黑化免疫反应表达的蛋白成分可释放入血淋巴并明显影响蚊体内疟原虫孢子增殖。

斯氏按蚊是约氏疟原虫的易感蚊种，感染约氏疟原虫后 PO 活性无明显变化，喂硝喹后雌斯氏按蚊血淋巴中 PO 活性显著升高，原位杂交也发现用药组 PPO mRNA 表达较强[5]。本研究也观察到应用硝喹后，约氏疟原虫感染的雌斯氏按蚊可发生完全黑化。正常感染时，斯氏按蚊不视约氏疟原虫动合子和卵囊为异物，这可能是长期进化相互适应的结果，而用药后，蜕变的疟原虫动合子和卵囊可能被斯氏按蚊视为异己成分，从而激活按蚊体内 PPO 系统，引起黑化包被反应。SDS-PAGE 分析显示血淋巴中存在较多差异蛋白带，这可能与黑化过程 PPO 级联反应的一系列蛋白酶和蛋白因子如前酚氧化酶活化因子 1、PPO、PO、丝氨酸蛋白酶、多巴色素转化酶、多巴色素异构酶、多巴脱羧酶和多巴胺色素异构酶等变化有关[8,9]。寻找引起疟原虫黑化包被的识别分子是媒介生物学的一个重要目标，而"差异策略"是解决这一问题途径，如基因定位克隆、基因差异显示，但这种基因策略在涉及新的蛋白质参与时难以获得满意结果。感染约氏疟原虫斯氏按蚊吸饲硝喹糖水后其血淋巴蛋白表达有差异，利用二维电泳分析策略具有诸多优点，进一步进行血淋巴差异蛋白分析，找出其多肽差异，根据这些差异蛋白质的氨基酸序列获得 DNA 克隆，深入研究和进行黑化相关蛋白的差异筛选和鉴定，将逐步解开疟原虫卵囊黑化机制。

参考文献：

[1] Shahabuddin M, Fields I, Bulet P, *et al*. *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin[J]. Exp Parasitol, 1998, 89(1): 103—112.

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

[3] Dushay M S, Eldon E D. Drosophila immune responses as models for human immunity[J]. Am J Hum Genet, 1998, 392(6671): 93—97.

[4] Dimopoulos G, Richman A, Muller 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.

[5] 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.

[6] 黄复生，王兴相. 硝喹对约氏疟原虫卵囊和子孢子作用的观察[J]. 第三军医大学学报，1991，13(1)：1—4.

[7] Han Y S, Chun J, Schwartz A, *et al*. Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding[J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(7-8): 553—562.

[8] Kwon T H, Kim M S, Choi H W, *et al*. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia larvae*[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(20): 6188—6196.

[9] Johnson J K, Li J, Christensen B M. Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(11): 1125—1135.

（编辑 王 红）

（上接 682 页）

周围腺病改变。病理诊断为导管内乳头状瘤癌变。术后经过顺利，至今已随访 10 年，肿瘤无转移及复发。

讨论

导管内乳头状瘤是女性常见乳腺良性肿瘤之一，高发年龄为 45～50 岁，主要表现为乳头溢液，发生率为 70%～85%，其中血性及浆液性溢液各约 50%。部分病例可因肿瘤增大或乳管阻塞后积液扩张出现乳晕周围质软包块，包块直径多小于 2 cm。结合典型症状体征及术前乳腺导管造影发现，常可于术前明确导管内乳头状瘤诊断。文献[1,2]报道发生癌变者占导管内乳头状瘤的 10%～11.72%。但对于导管内乳头状瘤癌变患者要在术前确诊较为困难。病程长、血性溢液、包块较大等应怀疑癌变可能。癌变后为低度恶性，不易发生区域淋巴结及远处转移，治疗效果较好。本例首次入院溢液导管造影曾发现主导管下方近分支处管型有破坏，见不规则充盈缺损约 0.5 cm，术前诊断为导管内乳头状瘤。行扩张导管切除术时冰冻及石蜡切片均显示为腺病，未见导管内乳头状瘤，显然不能解释造影所见的管型破坏及充盈缺损。以上未引起术者重视，未进一步寻找原因。虽然术后乳头溢液消失，但消失原因并非切除病变所致，而源于溢液导管的结扎。以上失误终导致 3 年后发现的导管内乳头状瘤癌变。导管内乳头状瘤瘤体常较小，术中肉眼常不能分辨，适当的手术切除范围往往是完整切除导管内乳头状瘤的保证，故对自溢液乳管注入美蓝后染色的导管腺体区域完整切除是手术成功的关键。术后应加强随访，以便及时发现异常并正确处理。

关键词：乳腺；导管内乳头状瘤；癌变；
中图法分类号：R737.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴晓芝，张振华，吴广平，等. 乳腺导管内乳头状瘤癌变的细胞学分析[J]. 中国医科大学学报，2001，30(2)：141.

[2] 曲宏岩，赵龙滨，徐海涛. 乳管内乳头状瘤的诊断及治疗[J]. 实用肿瘤学杂志，2000，14(3)：202.

（编辑 薛国文）

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