DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.044
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1098 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1098-03

约氏疟原虫卵囊黑化期间大劣按蚊血淋巴蛋白的分析

徐文岳,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 初步探讨大劣按蚊(*Anopheles dirus*)黑化包被约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)卵囊相关蛋白。方法 挤压法分别收集血餐后第1、3、4、5天时不吸血组、吸正常血组和感染组的雌大劣按蚊血淋巴,经SDS-PAGE分离后,银染显色。同时,用烟草天蛾(*Manduca Sexta*)前酚氧化酶(Prophenoloxidase, PPO)亚基1 IgG检测正常雌大劣按蚊血淋巴中的PPO。结果 SDS-PAGE发现感染约氏疟原虫后,部分大劣按蚊的血淋巴蛋白带增强,而部分血淋巴蛋白带却减弱,免疫印迹发现大劣按蚊血淋巴PPO有87× 10^3、67× 10^3、63× 10^5 3条蛋白带,而相应分子量的3条蛋白带在约氏疟原虫感染后第4、5天开始增强,其中尤以87× 10^3 的增强最为明显。结论 大劣按蚊在对约氏疟原虫卵囊黑化包被期间诱导合成的某些血淋巴蛋白与前酚氧化酶级联反应主要成分有关联。

关键词:约氏疟原虫;大劣按蚊;血淋巴;黑化;前酚氧化酶
中图法分类号:R382.31;R384.1;R392.1 文献标识码:A

Analysis of haemolymph proteins of *Anopheles dirus* during melanotic encapsulation of oocysts of *Plasmodium yoelii*

XU Wen-yue, HUANG Fu-sheng, KUANG Ming-shu, DUAN Jian-hua (Department of Parasitology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To explore melanotic encapsulation related proteins. Methods Haemolymph peptides pattern in infected-blood-feeding mosquitoes were compared with those of non-blood-feeding and normal-blood-feeding mosquitoes by SDS-PAGE and silver staining at 1, 3, 4 and 5 d after *Plasmodium yoelii* infection, at the same time, haemoymph PPO of female *Anopheles dirus* was also determined by immunoblotting by using *Manduca sexta* PPO1 IgG polyantibody. Results Three protein bands (87.76× 10^3 and 63× 10^3) were found in the haemolymph of *A. dirus*. After infection with *P yoelii* some bands enhanced and some weakened in *A. dirus* haemolymph. 87× 10^3, 67× 10^3, 63× 10^3 bands enhanced at d_4 and d_5 after infection, the 87× 10^3 band was most prominent. Conclusion Some proteins of the haemolymph in *Anopheles dirus* during melanotic eneapsulation of *Plasmodium. yoeli* oocyst induced might be related to the main components of PPO cascade.

Key words *Plasmodium yoelii*; *Anopheles dirus*; haemolymph; melanization; prophenoloxiolase

研究按蚊阻断疟原虫感染的免疫机制是实现基因操纵蚊媒,防止疟疾传播的重要前提。黑化包被反应是按蚊抵御疟原虫感染的最重要免疫机制。研究发现,抗性株和易感株冈比亚按蚊对疟原虫的黑化包被反应非常类似于对注入其血腔内CM-sephadex磁珠(Carboxymethyl-Sephadex beads)的黑化包被反应,而且两者享有共同的遗传学机制[1],因此,目前一般认为,按蚊血淋巴成分可能在黑化包被疟原虫中起主要作用。已知黑化包被反应是约氏疟原虫不能在大劣按蚊体内发育的主要表型,因此,本研究通过分析约氏疟原虫卵囊黑化包被期间的大劣按蚊血淋巴蛋白,初步探讨大劣按蚊黑化包被约氏疟原虫相关蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试蚊媒、疟原虫和小鼠 ①大劣按蚊:为我室长期饲养的稳定株。②约氏疟原虫:BY265株,每周用昆明株小鼠血传1次,每5周内蚊传1次。③小鼠:昆明株小鼠,本校实验动物中心提供,体重16~20 g。

1.1.2 主要试剂 烟草天蛾PPO1兔IgG由美国Oklahoma州立大学Dr. Jiang惠赠,辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG抗体和二氨基联苯胺(武汉博士德生物工程公司);硝酸纤维膜(NC膜)(GENE公司);丙烯酰胺、双叉丙烯酰胺、甘氨酸、TEMED、过硫酸胺和标准分子量蛋白(华美生物工程公司);三羟甲基氨基甲烷购自(上海Sagon)。

1.2 方法

1.2.1 大劣按蚊分组 3~5日龄大劣按蚊,随机分成3组:①不吸血组:按常规饲养;②吸正常血组:吸食正常小鼠血约3 h,饱血后移出雌蚊,常规饲养;③感染组:小鼠按常规腹腔接种约氏疟原虫,3 d后,选择原虫血症达10%~15%、内含约3%配子体的小鼠为供血鼠,供大劣按蚊吸血3 h,饱血后吸出饱血雌蚊,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。

1.2.2 挤压法收集大劣按蚊血淋巴 参照Han[2]的方法。将3组雌大劣按蚊冷冻麻醉后,从喙基底部剪去口器,然后挤压蚊胸部,流出的液体即为血淋巴。为排除脂肪体污染,本实验只选择清亮的液滴;为防止血淋巴蛋白在收集过程中被降解,收集的血淋巴立即置于1×SDS-PAGE点样缓冲液中。每次约25只雌大劣按蚊血淋巴用于PAGE和SDS-PAGE,约40只雌

作者简介:徐文岳(1972-),男,浙江省宁波市人,硕士,助教,主要从事昆虫免疫方面的研究。电话:(023)68752243
收稿日期:2001-05-08;修回日期:2001-07-28

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

大劣按蚊血淋巴用于 Western blot 检测。

1.2.3　SDS-PAGE 和银染　　采用 5% 浓缩胶, 10% 的分离胶。起始电压 60 V, 待样品前缘到分离胶后将电压调至 140 V, 当溴芬兰到达凝胶底部边缘时停止电泳。然后按照《分子克隆》方法进行银染。

1.2.4　Western blot　　两份相同的雌大劣按蚊血淋巴样本 SDS-PAGE 后, 1 份进行考马氏亮蓝染色, 另 1 份在 30 mA 电流条件下, 转移 1 h, 将凝胶上蛋白转移到 NC 膜上, 电转移完后, NC 膜用 5% 的脱脂奶粉封闭过夜; 然后加兔抗烟草天蛾 PPO1 IgG(1∶400), 在 37 ℃下孵育 2 h; 最后加辣根过氧化酶标记羊抗兔 IgG 抗体(1∶400)37 ℃下孵育 2 h, 加底物 DAB 显色后, 用蒸馏水洗涤终止反应。

2　结果

2.1　大劣按蚊卵囊黑化期间血淋巴蛋白表达

不吸血组、吸正常血组和感染约氏疟原虫组第 1、3、4、5 天大劣按蚊血淋巴蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果见图 1。

血餐后不同时间点, 组内的大劣按蚊血淋巴蛋白带型存在明显差异, 不吸血组、吸正常血组和感染约氏疟原虫组之间的血淋巴蛋白带也存在差异。血餐后第 1、3 天, 以正常组和吸正常血组为对照, 感染组中 28× 10^3 和 34× 10^3 的蛋白带增强。而血餐后第 1 天, 感染组还有两条 52× 10^3 和 42× 10^3 蛋白带在感染组中亦增强。第 4 天和第 5 天, 以不吸血组为对照, 吸正常血组和感染约氏疟原虫组 87× 10^3、63× 10^3 和 67× 10^3 蛋白带增强, 其中, 以感染组中 87× 10^3 的增强较为明显。

以不吸血组为对照, 感染组的大劣按蚊血淋巴部分蛋白带却减弱。血餐后第 1 天, 感染组中的 62× 10^3 和 58× 10^3 的蛋白带明显减弱, 几乎难以在本实验中检测到。而血餐后第 3 天, 81× 10^3 和 75× 10^3 的两条蛋白带在感染组中的亦明显减弱。

2.2　Western blotting 检测雌大劣按蚊血淋巴中 PPO

兔抗烟草天蛾 PPO1 IgG 检测到雌大劣按蚊血淋巴中有 87× 10^3、76× 10^3 和 63× 10^3 的蛋白带, 见图 2。

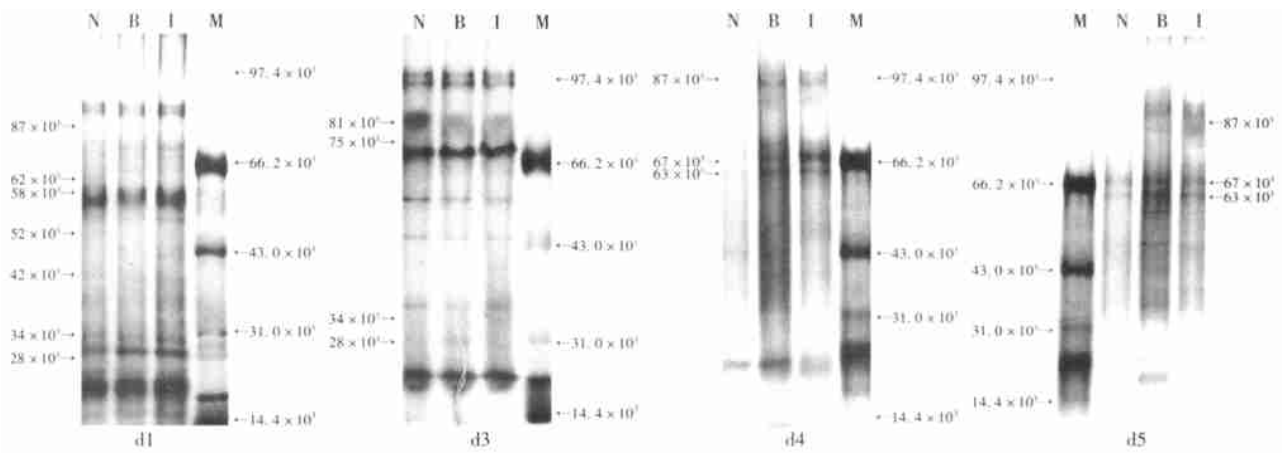


图 1　约氏疟原虫感染后第 1、3、4、5 天雌大劣按蚊血淋巴多肽 SDS-PAGE 电泳

Fig 1　SDS-PAGE of haemolymph polypeptides from adult female *A. dirus* at 1, 3, 4, 5 d after infected with *P yoelii*. Haemolymph from N and B group both are controls

N: No-blood-feeding; B: Normal blood-feeding; I: Infected with *P yoelii*; M: Marker

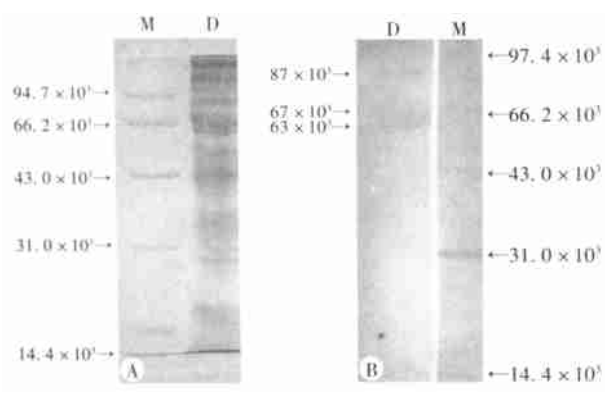


图 2　免疫印迹分析雌大劣按蚊血淋巴中 PPO

Fig 2　Immunoblot analysis of haemlymph PPO from *A. dirus*

A: SDS-PAGE stained by Coomassie blue; B: Western blot; D: *A dirus*; M: Marker

3　讨论

大劣按蚊吸血感染后第 1 天, 28× 10^3、34× 10^3、42× 10^3 和 52× 10^3 4 条蛋白带增强, 这与疟原虫感染后 24 h 冈比亚按蚊多种免疫因子的转录增强相符合[3,4], 表明疟原虫感染后 24 h 是激活按蚊黑化包被等免疫反应的主要时期。其中, 感染组中的 28× 10^3 和 34× 10^3 蛋白带在吸血感染后第 1、3 天持续增强, 而且在分子量上与已报道的昆虫 PPAE(分子量约 30× 10^3 的丝氨酸蛋白酶)[5~7] 较一致; 而 42× 10^3、52× 10^3 蛋白带与冈比亚按蚊 GNBP、家蚕 GNBP(约为 50× 10^3)分子量接近[3]。

烟草天蛾 PPO IgG 和冈比亚按蚊 PPO 之间有较强的交叉反应, Jiang 用烟草天蛾 PPO IgG 已成功检测出冈比亚按蚊血淋巴中 PPO[8]。因此, 本实验也用烟草天蛾 PPO1 IgG 检测雌大劣按蚊血淋巴 PPO。无脊椎动物中的 PPO 通常是以单聚体形式存在, 分子量大约 70× 10^3 ~80× 10^3, 当感染或机械刺激等因素激活 PPO 转变为 PO 后, PO 是以二聚体形式存在, 亚基的分子量大约 60× 10^3 ~70× 10^3[7,8], 因此, 检测到的 63× 10^3、

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

67× 10^3 蛋白带可能是雌大劣按蚊的 PO 亚基；由于收集血淋巴时造成的机械刺激可能部分激活了雌大劣按蚊 PPO，推测 87× 10^3 可能是 PPO 亚基；而吸血感染后第4、5天感染组大劣按蚊血淋巴中增强的 87× 10^3、67× 10^3 和 63× 10^3 蛋白带有可能分别是 PPO 和 PO 亚基，提示此时大劣按蚊 PPO 可能已开始被激活。然而，吸血感染后第1、3天，3组大劣按蚊血淋巴中均未检测到上述多肽，这可能一方面与 Western blotting 的血淋巴量明显大于 SDS-PAGE 电泳的血淋巴量有关，另一方面可能与大劣按蚊 PPO 在吸血感染后第4天该蛋白的合成明显增强有关。

与正常组相比，约氏疟原虫的入侵后，大劣按蚊某些血淋巴蛋白带表现为增强，而部分蛋白带却表现为减弱，如 58× 10^3、62× 10^3。其可能原因是大劣按蚊血淋巴中的识别/结合蛋白与疟原虫成分相结合有关。但是，与不吸血组相比，吸正常血组的 28× 10^3、34× 10^3、87× 10^3、67× 10^3 和 63× 10^3 蛋白的合成也相对增强，这与吸血可激活 PPO 级联反应有关[9]。

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。黄复生等发现，最早可在吸血感染后第7天时，光镜下观察到约氏疟原虫卵囊黑化；根据感染约氏疟原虫后大劣按蚊 PO 酶活性变化的研究结果，认为 PPO 级联反应可能介导了大劣按蚊黑化包被反应，并可能在第5天或更早期被激活[10]；而抗性株冈比亚按蚊体内疟原虫卵囊黑化，电镜下最早可在吸血感染后 16～24 h 时观察到[11]；因此认为，约氏疟原虫卵囊黑化可能出现在感染后1～5 d，而上述差异蛋白可能是约氏疟原虫卵囊黑化相关多肽。

昆虫 PPO 级联反应的激活伴随识别/结合蛋白的消耗，PPAE 和 PPO 等的合成增强，这在一定程度上可解释大劣按蚊卵囊黑化期间血淋巴部分蛋白合成增强和部分蛋白合成减弱的现象；而烟草天蛾 PPO1 IgG 检测雌大劣按蚊血淋巴中 PPO 结果更证明了 PPO 级联反应成分与这些蛋白的合成有关。

参考文献：

[1] Gorman M J, Cornel A J, Collins F H, *et al*. A shared genetic mechanism for melanotic encapsulation of CM-Sephadex Beads and a malaria parasite, Plasmodium cynomolgi B, in the mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Exp Parasitol, 1996, 84(3): 380－386.

[2] 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.

[3] 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): 11 508－11 513.

[4] Dimopulos G, Seeley D, Wolf A, *et al*. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle[J]. EMBO, 1998, 17(21): 6 115－6 123.

[5] Satoh D, Horii, A, Ochiai M, *et al*. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. J Biol Chem, 1999, 274(11): 7 441－7 453.

[6] Jiang H B, Wang Y, Korochkina S E, *et al*. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95 (21): 12 220－12 225.

[7] Kwon T H, Lee S Y, Lee J H, *et al*. Purification and charaterization of prophenoloxidase from the haemolymph of coleopteran insect. Holotrichia diomphilia larvae[J]. Mol Cells, 1997, 7(1): 90－97.

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

[9] Muller H M, Dimopoulos G. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* express six prophenoloxidase genes[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11 727－11 735.

[10] 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.

[11] Paskewitz S M, Brown M R, Lea A O, *et al*. Untrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*[J]. J Parasitol, 1988, 74(3): 432－439.

（编辑 汪勤俭）

（上接1097页）

的发生率也有增多的趋势。DIHD 的病因呈多样性，本组患者涉及的药物有20余种，但大部分是一些临床常用的药物。不同的药物可以导致各种类型的肝功能紊乱，肝损害的临床病理类型也多种多样，几乎包括了从肝实质细胞到胆管细胞损害的各种类型[1,2]，我们对22例患者进行肝穿刺病理活检，主要存在5种病理类型，其中肝细胞损害型最常见，这与文献[1]报道一致。诊断 DIHD 并不困难，只要在临床用药过程中注意观察，及时进行相关检查，一般都能作出正确诊断。在各种肝功能相关临床检验指标中，ALT 是最为普遍而且相当重要的一个指标，本组92例均表现为 ALT 异常。因此当临床使用可疑肝损害药物时，普查 ALT 变化不仅有利于发现亚临床 DIHD，而且也有助于对治疗效果的判断[2]。病理活检对 DIHD 的临床诊断、治疗方案的选择和预后判断等方面有时起了决定性作用[3]。

DIHD 的防治措施中，应该强调重在预防的原则。治疗措施包括立即停用有关或可疑药物、卧床休息、饮食疗法、应用保肝药物、使用特殊解毒剂和人工肝装置清除药物等。尽管大部分药物性肝病的预后良好，但仍有一定的死亡率。所以积极防治 DIHD 是临床用药过程中一个不可忽视的问题。

关键词：肝疾病；肝炎，中毒性
中图法分类号：R575 文献标识码：B

参考文献：

[1] Biour M, Jaillon P. Drug-induced hepatic diseases[J]. Pathol Biol Paris, 1999, 47(9): 928－937.

[2] Amacher D E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the adimistration of drugs[J]. Regul toxicol Pharmacol, 1998, 27 (2): 119－130.

[3] Aithal P G, Day C P. The natural history of histologically proved drug induced liver disease[J]. Gut, 1999, 44(5): 731－735.

（编辑 陈聪连）

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