DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.034
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
440 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0440-03

大劣按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化关系的研究

徐文岳,黄复生,张锡林,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 探讨大劣按蚊血淋巴酚氧化酶(PO)与约氏疟原虫卵囊黑化的关系。方法 以大劣按蚊/约氏疟原虫模型,利用聚丙酰凝胶电泳后的酶底物显色法,比较、分析血餐后5、7、11、15 d时不吸血组、吸正常血组和感染组3组的雌大劣按蚊血淋巴酚氧化酶的单酚氧化酶(MPO)和双酚氧化酶(o-DPO)活性;同时观察感染组约氏疟原虫的感染度及其卵囊黑化比率。结果 感染组的血淋巴MPO和o-DPO酶活性明显高于不吸血组和吸正常血组($P<0.05$);但是随着约氏疟原虫卵囊黑化比率的增高,感染组血淋巴MPO和o-DPO活性逐渐下降。另外,吸正常血组的MPO和o-DPO酶活性明显高于不吸血组($P<0.05$)。结论 吸血和约氏疟原虫的感染均能激活大劣按蚊前酚氧化酶级联反应,而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。

关键词:约氏疟原虫;大劣按蚊;血淋巴;酚氧化酶;黑化
中图法分类号:R382.31;R384.1;R345.4 文献标识码:A

Relationship between hemolymph phenol oxidase and melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts in *Anopheles dirus*

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

Abstract: Objective To explore the relationship between hemolymph phenol oxidase and the melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts in *Anopheles dirus*. Methods *An Anopheles dirus-Plasmodium yœlii* system was used *Anopheles dirus* were divided into 3 groups, that is, non-blood-fedding (N), normal-blood-fedding (B) and infected-blood-fedding (I). The activities of MPO and o-DPO in hemolymph from 3 groups were determined with native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and density scanning at 5, 7, 11 and 15 d after blood feeding. Results Both MPO and o-DPO activity were significantly higher in group I than group N and B ($P<0.05$). But with the melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts, both MPO and o-DPO activity in group I were decreased in comparison with group N, especially on the 15 th day after infected-blood feeding. MPO and o-DPO activity in group B were significantly stronger than those of group N. Conclusion Blood feeding and infection of *Plasmodium yoelii* both can activate the cascade. The heamolymph phenol oxidase may play an important role in the melanization of *Plasmodium yœlii* oocysts in *Anopheles dirus*.

Key words: *Plasmodium yoelii*; *Anopheles dirus*; hemolymph; phenoloxidaese; melanization

大劣按蚊是东南亚疟疾的传播媒介,同时又是我国海南山林和山麓地区疟疾的重要传播媒介,它对人疟原虫易感,但对约氏疟原虫不易感。据我们的观察,其可能机理是大劣按蚊能黑化包被大多数的约氏疟原虫卵囊,而人疟原虫卵囊极少被黑化。类似的黑化包被反应同样存在于其它昆虫,是昆虫的一种重要识别、防御机制。现在认为,黑化包被反应是由前酚氧化酶级联反应(Prophenoloxidase cascade)介导引起的。其中,酚氧化酶(Phenol oxidase, PO)是前酚氧化酶级联反应的关键酶,它具有单酚氧化酶(Monophenol oxidase, MPO)和双酚氧化酶(o-diphenol oxidase, o-DPO)活性[1]。

另外,由于冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)对疟原虫的黑化包被反应非常类似于对注射入蚊血腔内的CM-sephadex磁珠的黑化包被反应[2],因此,目前认为是血淋巴中的酚氧化酶,而不是蚊胃酚氧化酶,在按蚊黑化包被疟原虫中起关键作用。为此,本实验利用大劣按蚊/约氏疟原虫为模型,通过观察约氏疟原虫感染后大劣按蚊血淋巴MPO、o-DPO酶活性的变化,初步探讨大劣按蚊黑化包被约氏疟原虫卵囊的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

约氏疟原虫(*Plasmodium yœlii*)BY265株,每周用昆明株小鼠血传1次,每5周内蚊传1次。昆明株小鼠由本校实验动物中心提供,体重16~20 g。大劣按蚊常规饲养。

L-酪氨酸、多巴胺和MBTH系Sigma产品,PMS和NBT分别购自Fluka公司和上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蚊媒分组 2~3 d龄大劣按蚊约800只,将其随机分成3组:①不吸血组:按常规饲养,不吸血;②吸正常血组:吸食正常小鼠血约3 h,饱食后移出雌蚊,常规饲养;③感染组:按常规腹腔接种约氏疟原虫给正常小鼠,3 d后,选择有10%~15%原虫血症,内含约3%配子体的小鼠为供血鼠,供大劣按蚊吸血3 h,饱食后吸出雌蚊,常规饲养。于血餐后7 d,解剖雌大劣按蚊蚊胃,观察卵囊的感染率和感染度,如分别大于20%、2.0,则进行下一步试验。

上述3组蚊均置于23~24 ℃,相对湿度70%~80%的养蚊室中饲养,血餐当日为d_0。

1.2.2 血淋巴的收集及其处理 参照Sidjanski[3]和Be-

基金项目:全军"九五"科研基金资助项目(98D045)
作者简介:徐文岳(1972—),男,浙江省宁波市人,助教,主要从事蚊-疟原虫相互关系方面的研究。电话:(023)68752243
收稿日期:2000-07-20;修回日期:2001-01-21

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

erntsen[4], 于血餐后 5、7、11、15 d 从每组中分别取 20 只雌大劣按蚊, 冷冻麻醉后, 用吸有预冷的 Aedes 盐水的微量进样器从颈部穿入胸腔, 弃腹部后两节, 灌注蚊体腔, 收集第 1 滴灌注液, 4 ℃ 离心(1 500× g, 离心 5 min), 弃沉淀, 取上清立即电泳。

1.2.3　聚丙酰凝胶电泳(PAGE)　　采用 5% 浓缩胶, 8% 的分离胶, PH 8.3 的 Tris-甘氨酸电极缓冲液。取 100 μl 血淋巴, 加少许溴芬蓝后, 于 10～15 ℃条件下进行恒流电泳, 起始电流为 10 mA, 待样品前缘到分离胶后将电流调至 20 mA, 当溴芬蓝离胶底部边缘 1 cm 时停止电泳。

1.2.4　MPO、o-DPO 酶活性的检测　　MPO 酶活性的检测: 参照 Sidjanski[3] 方法, 但略有改动, 取下凝胶, 用双蒸水简单冲洗后, 置于现配的 15 ml MPO 活性显色液(pH 6.9, 15 ml 0.06 mol/ L PBS 含 7.5 mg PMS, 15 mg NBT, 21 mg L-酪氨酸)室温避光作用 45 min, 根据是否出现紫罗兰条带判断是否有 MPO 活性。

o-DPO 酶活性的测定: 同上处理后, 将凝胶置于现配的 20 ml o-DPO 活性显色液(0.05 mol/ L PBS 16 ml, 4 ml 0.3% MBTH 乙醇溶液)室温避光作用 40 min, 出现紫红色条带表明有 o-DPO 活性。

1.2.5　约氏疟原虫感染率及其卵囊黑化比率　　收集感染组雌大劣按蚊血淋巴的同时, 解剖蚊胃, 观察血餐后 7、11、15 d 约氏疟原虫卵囊的数量和黑化情况, 比较其感染率(有卵囊蚊总数/ 解剖蚊总数)及黑化比率(有黑化卵囊蚊总数/ 解剖蚊总数)。

1.3　统计学分析

采用 χ^2 检验。

2　结果

分别在血餐后 5、7、11、15 d, 检测不吸血组、吸正常血组和感染组的 MPO、o-DPO 酚氧化酶活性, 并用凝胶图像分析系统对 3 组的 MPO、o-DPO 酶活性的显色条带进行分析, 读取 D_λ 值, 见图 1、2。感染组的 MPO 和 o-DPO 活性均明显高于不吸血组、吸正常血组($P<0.05$); 吸正常血组的 MPO 和 o-DPO 活性亦明显高于不吸血组($P<0.05$)。以不吸血组为对照, 感染组血餐后第 5 天的 MPO 和 o-DPO 活性均为最高; 但是, 随着血餐后时间的增加(11、15 d), 尤其到 15 d 时, 感染组的 MPO 和 o-DPO 活性相对偏低。

同时, 观察血餐后不同时相点感染组约氏疟原虫感染率及其卵囊黑化比率的结果。

第 7 天时卵囊已开始形成, 但是未发现卵囊黑化, 然而到 11 d 时, 部分卵囊开始出现局部黑化, 表现为卵囊外周有黑色颗粒沉着, 感染率为 69.2%, 卵囊黑化比率为 38.5%; 15 d 时绝大多数约氏疟原虫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%。

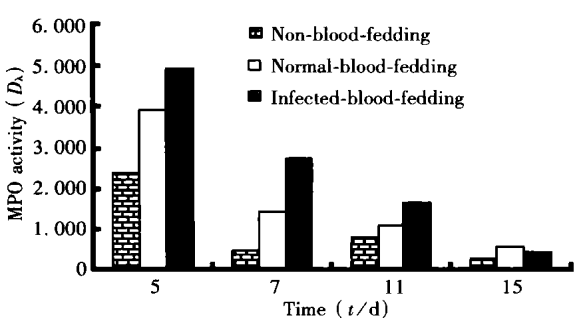


图 1　大劣按蚊血淋巴 MPO 活性的变化

Fig 1　Changes of MPO in haemolymph of *Anopheles dirus*

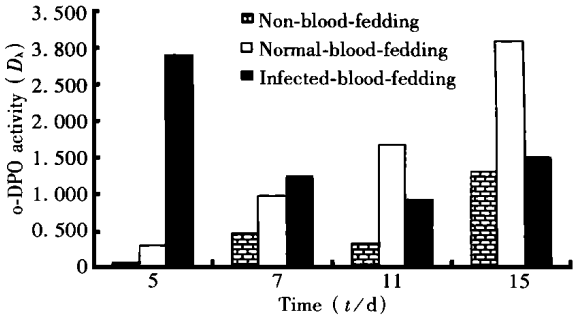


图 2　大劣按蚊血淋巴 o-DPO 活性的变化

Fig 2　Changes of o-DPO activity in haemolymph of *Anopheles dirus*

3　讨论

本实验发现, 感染组的 MPO 和 o-DPO 活性均明显高于不吸血组、吸正常血组, 提示约氏疟原虫能激活按蚊的前酚氧化酶级联反应。血餐后 5 d 感染组的酚氧化酶活性相对较高, 说明卵囊的黑化是前酚氧化酶级联反应激活的结果, 前酚氧化酶级联反应的激活可能发生在血餐后 5 d 或更早。而 11、15 d 感染组的 MPO 和 o-DPO 活性相对偏低, 可能与此时的部分大劣按蚊酚氧化酶参与黑色素的合成有关。总之, 感染组大劣按蚊血淋巴酚氧化酶的活性变化与约氏疟原虫卵囊的黑化密切相关, 提示大劣按蚊血淋巴酚氧化酶可能参与了大劣按蚊对约氏疟原虫的卵囊黑化反应。

本实验还发现吸正常血组的 MPO 和 o-DPO 活性明显高于不吸血组, 说明吸血不仅能刺激按蚊卵巢的发育, 同时还能激活前酚氧化酶级联反应, 这与 Müller 关于 20-hydroxyecdysone 激素和吸血能增强冈比亚按蚊酚氧化酶酶原前酚氧化酶转录的结果是一致的[5]。因此, 前酚氧化酶级联反应不仅是按蚊的一种重要的先天性免疫机制, 而且在按蚊的生理活动中也可能发挥重要作用。

另外, 感染组血淋巴 MPO 酶活性随蚊龄的增长逐渐下降, 这与时超美关于斯氏按蚊酚氧化酶活性随着蚊龄的增长逐渐下降的结果是一致的[6]。而大劣按蚊的 o-DPO 酶活性并没有出现类似现象, 这可能与每次 o-DPO 酶活性的显色时间不太一致有关。

由于对食蟹猴疟原虫(*Plasmodium cynomolgi*)抗性的冈比亚按蚊能通过黑化反应杀死其体内的疟原虫, 而易感株体内的疟原虫却能正常发育[2], 因此黑化包被反应可能是按蚊阻断疟原虫发育的最主要免疫机制, 研究大劣按蚊的黑化包被机制对于蚊媒-疟原虫相互关系的理解和遗传防治蚊媒都具有重要的意义。

参考文献:

[1] Gorman M J, Paskewitz S M. A genetic study of a melanization response to sephdaex beads in plasmodium-refractory and-susceptible strains of *Anopheles gambiae*[J]. Am J Trop Med Hyg, 1997, 56(4): 446—451.

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

[2] Chun J, McMaster J, Han Y, *et al*. Two-dimensional gel analysis of haemolymph proteins from Plasmodium-melanizing and-non-melanizing strains of *Anopheles gambiae*[J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(1): 39—45.

[3] Sidjanski S, Mathews G V, Vanderberg J P. Electrophoretic seperation and identification of phenoloxidase in hemolymph and midgut of adult *Anopheles Stephensi mosquitoes*[J]. J Parasitol, 1997, 83(4): 686—691.

[4] Beemtsen B T, Christensen B M. Dirofilaria immitis: Effect on hemolymph polypeptide synthesis in *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reaction against microfilariae[J]. Exp Parasitol, 1990, 71(4): 406—414.

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

[6] 时超美, 黄复生, 况明书, 等. 斯氏按蚊血淋巴酚氧化酶活性与约氏疟原虫卵囊黑化关系[J]. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 2000, 18(1): 11—13.

(编辑 汪勤俭)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)04-0442-01

先天性成骨不全1例报告

Report of a case of osteogogenesis imperfecta congentia

徐永权, 桂 芹, 孔祥英 (第三军医大学附属西南医院儿科, 重庆 400038)

患儿, 男, 1岁4个月。因反复出现四肢多处自发性骨折入院。患儿于出生后即被发现右小腿中段肿胀, 弯曲变形。经X线检查后, 确诊为右小腿骨折。自1个月开始, 患儿左小腿、双上肢、右大腿先后多处反复出现自发性骨折, 导致现四肢畸形不能站立及行走。父母身体健康, 为姑表兄妹婚配。体格检查: 头颅扁平, 前额宽, 稍前突, 枕骨后突; 巩膜无黄染及蓝染, 角膜透明, 无混浊, 双侧瞳孔等大等圆; 粗测听力正常; 乳牙4颗, 颜色正常, 未见龋齿; 双侧胸廓轻度畸形, 微呈扁平状; 脊椎呈生理弯曲, 无叩压痛, 双上肢及双下肢弯曲畸形, 四肢肌力、肌张力均低下, 感觉无障碍, 各种生理反射正常存在, 病理反射未引出。实验室检查: 血清钙、磷正常。X线检查: 四肢多处陈旧性骨折, 骨痂较大, 四肢长骨弯曲呈"弓"形, 骨干细长, 骨皮质薄, 干骺端明显增大, 双侧腓骨细小, 肋骨弯曲, 变细(以肋骨后端明显)。

讨论

成骨不全症是一种常染色体显性或隐性遗传所致的全身性结缔组织病。是胶原蛋白结构和合成缺陷的典型遗传紊乱。编码大多数组织中的主要结构蛋白(Ⅰ型胶原蛋白)链的基因突变通常导致成骨不全症的发生。病理表现主要为全身皮肌腱、骨骼、软骨、以及其它结缔组织的主要成分发育不良。

本病发病率低, 约1/10 000, 先天性约1/40 000。遗传学分为4型, 各型临床表现各异, 但多发性骨折为最突出的表现。先天性者出生时即可有多处骨折。巩膜蓝染见于显性遗传者(ⅠA、ⅠB)。成牙不全多见于ⅠB和Ⅲ型患儿, 表现为牙易碎, 易发生龋齿, 牙可呈黄棕色、灰黄色或透明的蓝色。X线表现为多处长骨骨折, 骨痂较大, 愈合后畸形。骨皮质变薄。骨干变细长, 干骺端增宽。实验室检查: 血清钙、磷均正常。本例患儿于出生时便出现骨折自1个月后先后发生四肢多处自发性骨折, 巩膜及牙齿正常属先天性ⅣA型。

对本病的诊断主要依据其典型的临床表现及X线检查。Miller等[1]利用CT骨密度测定技术对Ⅰ型成骨不全症进行诊断。认为患儿骨皮质密度和骨小梁密度均较低, 对于诊断不典型的Ⅰ型成骨不全症非常有用。利用电子显微镜成像技术和形态尺度测量技术对成骨不全症患儿的骨质胶原直径进行测量, 发现所有类型的成骨不全症胶原纤维的直径都是减小的[2]。用COLTA1裸等位基因检测技术进行成骨不全症的产前诊断[3], 并可进行产前干预治疗。本病需与软骨发育不全、碱性磷酸酶减少症等鉴别。软骨发育不全X线主要表现为长骨粗短, 据此, 不难与本病鉴别。碱性磷酸酶减少症新生儿型易与本病混淆, 但前者X线主要表现为长骨干骨后端呈锯齿状凹凸不平, 骨化不均匀, 可见未骨化的透亮区, 且血清、白细胞等组织中碱性磷酸酶减低或消失, 尿内大量磷酸乙醇氨可鉴别之。本病预后较差, 先天性者大多成死胎或死于婴儿期, 偶可存活至青春期。

目前尚无特效治疗方法。应加强对患儿的保护措施, 以减少患儿损伤次数, 对已骨折患儿, 要根据其病程, 着眼于功能的改善。近年来, Vieira等[4]报道用生长激素(GH)对Ⅲ、Ⅳ型患儿进行治疗, 取得较好疗效。生长激素可对患儿全身钙代谢产生影响, 可提高Ⅲ型患儿的可交换钙池和Ⅳ型患儿的与骨钙附着有关联的参数。Oreffo等[5]报道可用成骨干细胞及生物物质对患儿骨折进行修复。随着人类基因组计划的完成, 有望对本病进行基因治疗。

关键词: 先天性; 成骨不全
中图法分类号: R681.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] Miller M E, Hangartner T N. Bone density measurements by computed tomography in osteogenesis imperfecta type Ⅰ[J]. Osteoporos Int, 1999, 9(5): 427—432.

[2] Sarathchandra P, Pope F M, Albi S Y. Morphometric analysis of type Ⅰ collagen fibrils in the osteoid of osteogenesis imperfecta[J]. Calcif Tissue Int, 1999, 65(5): 390—395.

[3] Nuytinck L, Sayli B S, Karen W, *et al*. Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta type Ⅰ by COL1A1 null-allele testing[J]. Prenat Diagn, 1999, 19(9): 873—875.

[4] Vieira N E, Marini J C, Hopkins E, *et al*. Effect of growth hormone treatment on calcium kinetics in patients with osteogenesis imperfecta type Ⅲ and Ⅳ[J]. Bone, 1999, 25(4): 501—505.

[5] Oreffo R O, Triffitt J T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics[J]. Bone, 1999, 25(2 Suppl): 5S—9S.

(编辑 薛国文)

作者简介: 徐永权(1973—), 男, 重庆市潼南县人, 医师。电话: (023)68754000-73098

收稿日期: 2000-09-15; 修回日期: 2000-12-29

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