

文章编号:1000-7423(2000)-01-0011-03

斯氏按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化的关系*

叶超美 黄复生 况明书 段建华
(第三军医大学寄生虫学教研室 重庆 400038)

摘要 [目的] 探讨酚氧化酶 (phenol oxidase, PO) 与疟原虫卵囊黑化的关系。[方法] 以斯氏按蚊/约氏疟原虫为模型, 对4组斯氏按蚊(不吸血组、吸正常血组、吸感染血组和硝喹组)血淋巴进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和凝胶图像分析, 检测单酚氧化酶 (monophenol oxidase, MPO) 和二酚氧化酶 (diphenol oxidase, DPO) 活性。[结果] 吸正常血组和不吸血组蚊血淋巴中 MPO 及 o-DPO 活性无明显差异; 与吸正常血组或不吸血组相比, 感染组 MPO 及 o-DPO 活性无明显变化, 但用药组 d₁₀ 则显著增加, d₁₅ 显著降低。[结论] 斯氏按蚊血淋巴中 PO 活性变化与约氏疟原虫卵囊黑化在时间上一致。

关键词: 约氏疟原虫, 斯氏按蚊, 血淋巴, 酚氧化酶, 黑化
中图分类号: R382.319; R384.111 文献编号: A

尽管昆虫体内缺少类似脊椎动物的抗原抗体特性, 但却有识别和杀灭外源性物质的免疫系统^[1], 对侵入其体内的病原及异物具有明显的防御反应。蚊抗寄生虫免疫反应包括血淋巴中的细胞和体液成分, 这种反应对多细胞后生动物和某些原生动寄生虫, 表现为一种黑化包被反应, 它能有效地通过由血细胞和/或蛋白质多酚物质组成的包囊, 隔离或杀死寄生虫^[2]。但在完全适应即易感的昆虫体内, 寄生虫却可逃避或抑制其宿主的防御反应^[3]。

黑化包被反应由酚氧化酶 (phenol oxidase, PO) 介导, 根据其氧化底物的不同, 可分为单酚氧化酶 (monophenol oxidase, MPO) 和二酚氧化酶 (diphenol oxidase, DPO) 两种同工酶, DPO 又有两种同分异构体 (p-DPO 和 o-DPO)。斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*) 血淋巴有 MPO 和 o-DPO 活性^[4]。本实验以斯氏按蚊/约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) 为模型, 观察疟原虫在其易感蚊媒体内进行发育或退变时 PO 的活性变化, 探讨 PO 与疟原虫卵囊黑化的关系。

材料与方 法

1 材 料

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。昆明株小鼠由本校实验动物中心提供, 体重 16~20 g。斯氏按蚊 Hor 株常规饲养。硝喹 (nitroquine, CI-679) 由上海医药工业研究院合成, L-酪氨酸、多巴胺和 MBTH 系 Sigma 产品, PMS 和 NBT 分别购自 Fluka 公司和上海前进试剂厂。

2 方 法

2.1 蚊媒分组及给药 将 3~5 日龄雌性斯氏按蚊分成 4 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 2 h, 饱血后移出雌蚊, 常规饲养; ③吸感染血组: 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, 供斯氏按蚊吸血约 2 h, 饱血后移出雌蚊, 常规饲养; ④硝喹组: 感染方法同 ③, 感染后 d₆ 开始饲以含 0.1% 硝喹的蔗糖水^[5], 每两天更换 1 次, d₁₂ 停药, 后按常规饲养。

上述 4 组蚊均置于 24℃~25℃, 相对湿度 70%~80% 的养蚊室中饲养, 血餐当日为 d₀。

2.2 样本采集及处理 参照 Beerntsen^[6] 和 Sidjanski^[4], 于吸血后 d₅、d₁₀ 和 d₁₅, 分别将每组各 25 只蚊虫冷冻麻醉, 用吸有预冷 *Aedes* 盐水^[7] 的微量进样器从颈部斜穿入胸腔, 弃腹部后两节, 灌注蚊体腔, 收集第一滴灌注液, 4℃, 1 500 g, 离心 5 min, 弃沉淀, 取上清立即电泳。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 采用 5% 浓缩胶, 7.5% 分离胶, pH8.3 的 Tris-甘氨酸电极缓冲液, 于 10℃~15℃ 条件下进行, 起始电压 110V, 待样品到分离胶后将电压调至 240V, 恒压维持 4.5 h。

2.4 显色 MPO 活性的显色液为 0.067 mol/L PBS 10 ml, pH 6.9, 含 PMS 5 mg, NBT 10 mg, L-酪氨酸 18 mg。o-DPO 活性的显色液为 0.05 mol/L PBS 8 ml, pH 6.8, 0.3% MBTH 乙醇溶液 2 ml, 含多巴胺 19 mg。MPO 活性和 o-DPO 活性的显色方法均参照 Sidjanski^[4] 进行。前者利用电子转移显色法, 后者利用化学反应显色法, 两者均将电泳后的凝胶用冷的蒸馏水简单冲洗, 置显色液中室温避光孵育 45

min, 有 MPO 活性则显示出蓝紫色的条带, 有 α -DPO 活性则显示出粉红色的条带。

2.5 扫描 将显色酶带立即用 Bio-Rad 1 000 凝胶图像分析系统进行扫描, 从扫描曲线计算各峰面积, 以峰面积作为酶活性相对值, 比较 MPO 及 α -DPO 活性的差异。

2.6 卵囊感染率及黑化比率 收集血淋巴的同时解剖蚊胃, 观察卵囊数量、形态、大小及黑化情况, 比较其感染率 (有卵囊蚊数/解剖总蚊数) 及黑化比率 (有黑化卵囊蚊数/解剖总蚊数)。

结 果

斯氏按蚊血淋巴 MPO 及 α -DPO 活性的变化见图 1 和图 2 (分别重复 3 次实验的平均值)。经双因素方差分析发现硝喹组 d_{10} MPO 及 α -DPO 活性比 d_5 显著升高, d_{15} 比 d_{10} 显著降低 ($P < 0.05$); 不吸血组、吸正常血组、吸感染血组 MPO 及 α -DPO 活性均逐渐降低, d_{15} 与 d_5 相比其差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。 d_5 4 个组间 MPO 及 α -DPO 活性差异均不显著; d_{10} 硝喹组 MPO 及 α -DPO 活性比其他 3 个组显著升高 ($P < 0.05$), 这 3 个组之间差异不显著; d_{15} 除硝喹组 MPO 活性比吸正常血组显著降低 ($P < 0.05$) 外, 其他组间 MPO 活性及 4 个组间 α -DPO 活性差异也不显著。

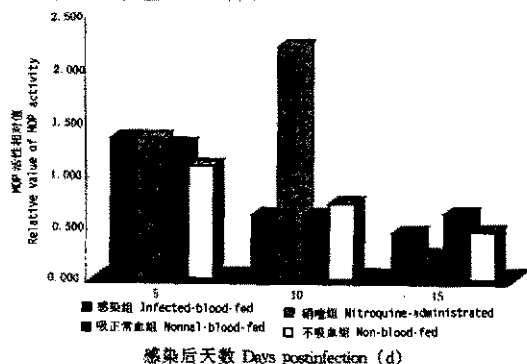


图 1 斯氏按蚊血淋巴 MPO 活性的变化

Fig. 1 Changes in MPO activity in the hemolymph of *Anopheles stephensi*

上述结果表明: 随蚊龄增长 MPO 及 α -DPO 活性逐步下降; 吸正常血组和不吸血组蚊血淋巴中 MPO 及 α -DPO 活性无显著差异, 提示吸血不影响 PO 活性; 与吸正常血组或不吸血组相比, 感染组 MPO 及 α -DPO 活性无显著变化, 但硝喹组 d_{10} 则显著升高, d_{15} 显著降低。

光镜发现感染后 d_{10} 硝喹组、感染组感染率平均分别为 94.7% 和 96.0% ($U = 0.387, P > 0.05$)。与感染组相比, 硝喹组成熟卵囊数量较少, 卵囊内颗粒化, 极少数卵囊可见黑色颗粒沉着; d_{15} 发现硝喹组、感染组感染率平均分别为 90.7% 和

92.0% ($U = 0.290, P > 0.05$)。硝喹组大多数卵囊发生退行性变, 个体变小, 可见胞浆皱缩, 卵囊

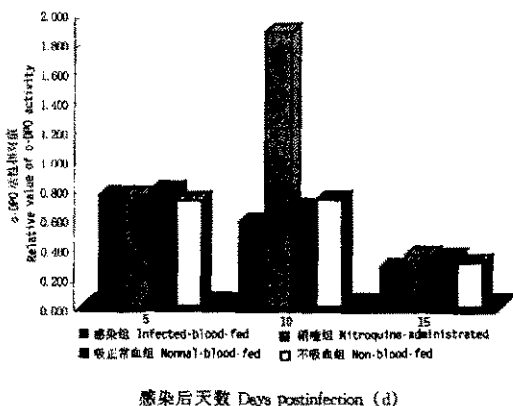


图 2 斯氏按蚊血淋巴 α -DPO 活性的变化

Fig. 2 Changes in α -DPO activity in the hemolymph of *Anopheles stephensi*

壁与内容物之间有较大间隙, 多数卵囊有明显的黑色颗粒沉着, 表现为部分黑化或完全黑化, 黑化比率平均为 60.8%。而感染组成熟卵囊数量较多, 在破裂的卵囊周围可见成堆逸出的子孢子, 黑化比率仅为 4.0%。硝喹组与感染组的同时相感染率之间无差异显著性意义, 黑化比率间差异则有非常显著性意义 ($U = 7.351, P < 0.01$)。

讨 论

PO 在昆虫体内是以无活性的酶原形式——前酚氧化酶 (prophenoloxidase, PPO) 存在, 主要通过特异性丝氨酸蛋白酶的级联反应被激活^[8]。昆虫体内的 PO 构成了细胞与体液防御系统的重要部分, 已证实这种酶至少有两种免疫功能: ①参与黑化包被反应中黑色素的合成; ②作为一种识别系统诱导宿主防御系统中其他成份的产生^[9]。PO 是黑化包被反应中的重要酶, 但有关疟原虫在斯氏按蚊体内进行发育或退变时 PO 活性的变化尚未见报道。

本实验结果表明, 随蚊龄增长, MPO 及 α -DPO 活性逐渐降低, 这与 Li 等^[10]报道的不同日龄埃及伊蚊血淋巴中 PO 活性变化一致, 表明酶活性的变化与蚊龄有关, 酶活性水平能够反映蚊体的机能状态。与不吸血组相比, 吸正常血组与吸感染血组蚊血淋巴中 MPO 及 α -DPO 活性无明显变化, 表明吸血虽可引起蚊生殖系统发生变化 (卵巢发育、卵巢成熟及产卵), 但对血淋巴中 MPO 及 α -DPO 活性无明显影响。斯氏按蚊感染约氏疟原虫后 PO 活性无明显变化, 可能由于斯氏按蚊是约氏疟原虫的易感蚊种, 对疟原虫 (动合子、卵囊和逸出的子孢子) 缺乏识别能力。

硝喹属于喹啉类抗疟药, 能影响约氏疟原虫的生物氧化与能量代谢, 干扰蛋白质及核酸合

成, 不仅对多种疟原虫红内期和组织期的发育有明显的抑制作用, 而且对蚊期卵囊的发育也有抑制和阻断作用^[5]。本实验中, 斯氏按蚊在喂饲硝喹后 d_5 (感染疟原虫后 d_{10}) 血淋巴中 PO 活性明显升高; 同时, 光镜检查发现成熟卵囊数量较少, 卵囊内颗粒化, 且少数卵囊有黑化现象, 这与喂药后 d_7 及 d_9 蚊胃卵囊超微结构的变化一致^[5], 表明硝喹对原虫卵囊的作用与 PO 活性升高有关, 可能由于卵囊退变, 使得蚊体的免疫系统将其视为异己, 导致 PO 活性增加。喂饲硝喹后 d_{10} (感染疟原虫后 d_{15}) 光镜可见多数卵囊发生退变, 有明显的黑色颗粒沉着, 由于黑化包被反应本身要消耗 PO, 因此较同时相的其他 3 个组相比, 硝喹组 PO 活性下降。

目前, 有关丝虫微丝蚴感染蚊体引起的黑化包被反应与 PO 活性关系的研究较多, 一般认为, 血淋巴 PO 活性的变化与抗丝虫黑化包被反应时间相一致^[11]。我们通过疟原虫在其易感蚊媒体内进行正常发育或使用抗孢子增殖药物引起卵囊退变时 PO 活性的动态观察, 也发现血淋巴中 PO 活性的变化与疟原虫卵囊黑化在时间上是一致的, 表明宿主免疫能力与 PO 活性有关。进一步观察 PO 在黑化包被反应中的作用, 探讨卵囊黑化的机制, 对通过媒介控制疟疾的传播具有较重要的意义。

参 考 文 献

[1] Spray FJ, Christensen BM. *Aedes aegypti*: characterization of hemocyte

polypeptide synthesis during wound healing and immune response to inoculated microfilariae. *Exp Parasitol*, 1991, 73:481~488.

[2] Beerntsen BT, Severson DW, Christensen BM. *Aedes aegypti*: Characterization of a hemolymph polypeptide expressed during melanotic encapsulation of filarial worms. *Exp Parasitol*, 1994, 79:312~321.

[3] 黄复生, 王兴相. 蚊血细胞对正常和退变之约氏疟原虫卵囊的反应及其在卵囊黑化中之作用. 第三军医大学学报, 1993, 15:8~10.

[4] Sidjanski S, Mathews GV, Vanderberg JP. Electrophoretic separation and identification of phenol oxidase in hemolymph and midgut of adult *Anopheles Stephensi* mosquitoes. *J Parasitol*, 1997, 83:686~691.

[5] 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. 第三军医大学学报, 1991, 13:1~4.

[6] Beerntsen BT, Christensen EM. *Dirofilaria immitis*: Effect on hemolymph polypeptide synthesis in *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. *Exp Parasitol*, 1990, 71:406~414.

[7] Hayes RO. Determination of a physiological saline for *Aedes aegypti* (L.). *J Econ Entomol*, 1953, 46:624~627.

[8] Gillespie JP, Kanost MR, Trenzsek T. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol*, 1997, 42:611~643.

[9] Ahmad S, Leake CJ, Ketterman AJ. Qualitative differences occur in phenol oxidase activity in anopheles mosquitoes refractory to plasmodium. *Biochem Soc Trans*, 1995, 23:1105.

[10] Li J, Tracy JW, Christensen EM. Relationship of hemolymph phenol oxidase and mosquito age in *Aedes aegypti*. *J Invertebr Pathol*, 1992, 60:188~191.

[11] Guo X, Beerntsen BT, Zhao X, et al. Hemocyte alterations during melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito *Armigeres subulatus*. *J Parasitol*, 1995, 81:200~207.

收稿日期:1998-04-02

(编辑:李雅卿)

RELATIONSHIP BETWEEN HEMOLYMPH PHENOL OXIDASE AND MELANIZATION OF OOCYSTS OF *PLASMODIUM YOELII* IN *ANOPHELES STEPHENSI*

SHI Chao-mei, HUANG Fu-sheng, KUANG Ming-shu, DUAN Jian-hua

(Department of Parasitology, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract [Objective] To explore the relationship between the hemolymph phenol oxidase and melanization of oocysts. [Methods] *Anopheles stephensi*-*Plasmodium yoelii* system was used to determine the activity of monophenol oxidase (MPO) and o-diphenol oxidase (o-DPO) in the hemolymph collected from 4 groups of mosquitoes by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) followed by density scanning. The 4 groups of mosquitoes were: non-blood-fed (N), normal-blood-fed (B), infected-blood-fed (I) and nitroquine-administrated (D), respectively. [Results] No significant difference was found in the activities of MPO and o-DPO between groups N and B. The activities of MPO and o-DPO were not obviously modified in group I, but were significantly increased on day 10 and decreased on day 15 after blood feeding in the group D as compared with those in the groups N and B. [Conclusion] The alteration in the mosquito hemolymph PO activity coincided at each time point with the melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts.

Key Words: *Plasmodium yoelii*, *Anopheles stephensi*, hemolymph, phenol oxidase, melanization.