

家蝇酚氧化酶原系统关键基因的研究进展

李殿香¹, 甄天民², 辛正³, 王丽娟¹, 马淑芳¹, 郭文宗¹, 刘政明¹

1 济南大学医学与生命科学学院, 山东 济南 250022; 2 山东省医学科学院;

3 济南市疾病预防控制中心, 山东 济南 250021

摘要: 家蝇酚氧化酶原系统是家蝇免疫体系重要的组成部分, 在对病原识别和免疫防御中发挥着强有力的作用。目前, 对该系统的关键基因和作用机制还不清楚。为此, 进行了家蝇转录组分析, 得到参与酚氧化酶原系统的酚氧化酶原、酚氧化酶原激活酶、Serpine 型丝氨酸蛋白酶抑制因子及上游的模式识别受体等关键基因的 EST(基因表达序列标签), 现就它们的研究进展予以综述。

关键词: 家蝇; 酚氧化酶原系统; 模式识别受体; 酚氧化酶原激活酶; 丝氨酸蛋白酶抑制剂

中图分类号: R384.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2013)04-0367-03

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2013.04.029

Research advances in key genes in prophenoloxidase-activating system of *Musca domestica*

LI Dian-xiang¹, ZHEN Tian-min², XIN Zheng³, WANG Li-juan¹, MA Shu-fang¹, GUO Wen-zong¹, LIU Zheng-ming¹

1 School of Medicine and Life Science, University of Jinan, Jinan 250022, Shandong Province, China; 2 Shandong Academy of Medical Sciences; 3 Jinan Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250021, Shandong Province, China

Corresponding author: XIN Zheng, Email: xinzheng121@163.com

Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2011CM012) and the Scientific and Technological Developing Project of Shandong Province (No. 2012GGB01172)

Abstract: Prophenoloxidase-activating system is an important part in the immune system of *Musca domestica* and plays an essential role in the pathogen recognition and immune defense. Until now, however, the key genes in the prophenoloxidase-activating system and the system's action mechanism remain unclear. On this occasion, we performed transcriptomic analysis of *M. domestica* to obtain a number of expressed sequence tags of the key genes of prophenoloxidases, prophenoloxidase-activating enzymes, serine proteinase inhibitors (Serpine), and upstream pattern-recognition receptors in the prophenoloxidase-activating system. This article reviews the research advances in the key genes in the prophenoloxidase-activating system of *M. domestica*.

Key words: *Musca domestica*; Prophenoloxidase-activating system; Pattern-recognition receptor; Prophenoloxidase-activating enzyme; Serine proteinase inhibitor

家蝇(*Musca domestica*)是世界性公共卫生害虫, 可以传播伤寒、霍乱等 100 多种疾病^[1], 对人畜危害大, 但其自身却能良好地生存, 可见, 家蝇的免疫机制是非常独特和有效的。与其他昆虫一样, 家蝇缺乏获得性免疫, 对入侵病原的防御完全依靠其先天免疫^[2]。先天免疫反应的启动主要依靠存在于血浆或细胞外的模式识别受体对存在于病原表面的病原相关分子模式的识别, 完成病原识别之后, 便引发血细胞对病原的包被与吞噬、酚氧化酶原(prophenoloxidase-activating system, proPO)系统激活与黑色素合成以及信号转导途径激活与抗菌肽产生等细胞反应和体液反应^[3], 最终杀灭、消除或抑制病原。

proPO 系统是昆虫先天免疫反应中重要的一套免疫机制^[4], 能够对病原入侵做出最快速的免疫应答, 不仅直接影响黑色素

合成, 而且与信号转导途径激活和抗菌肽产生有关^[5], 在宿主先天免疫反应中起非常关键的作用。然而, 在有效抵御病原入侵的免疫反应中, 家蝇 proPO 系统如何被激活及其激活在免疫防御中的功能至今尚不清楚。因此, 综述家蝇 proPO 系统关键基因的类型及其研究进展, 对揭示家蝇乃至其他病媒昆虫独特而有效的免疫机制, 进而有效防治害虫与媒介性传染病具有重要的意义。

1 proPO 系统

随着昆虫 proPO 系统重要组成基因和调控基因的陆续发现, 目前, 有关昆虫 proPO 系统的组成已基本清楚, 主要包括 proPO、酚氧化酶(phenoloxidase, PO)、酚氧化酶原激活酶(proPO-activating enzyme, PAP)和丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine proteinase inhibitor, Serpin)以及丝氨酸蛋白酶同系物(serpine protease homologue, SPH)等多种丝氨酸蛋白酶^[6]。昆虫 proPO 系统的激活就是一个精密调控的丝氨酸蛋白酶级联反应, 在这个级联反应中, 上游的丝氨酸蛋白酶水解下游酶的酶原, 将其

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2011CM012); 山东省科技发展计划项目(2012GGB01172)

作者简介: 李殿香(1963-), 女, 博士, 主要从事动物生化与分子生物学研究。Email: dianxiangli@126.com

通讯作者: 辛正, Email: xinzheng121@163.com

活化,被活化的酶再依次激活下一个酶。PO是 proPO 系统中最后的也是最重要的一个丝氨酸蛋白酶,一般以非活化状态的前体 proPO 形式储存在血细胞中。proPO 一旦被激活便释放到血浆,经限制性蛋白水解作用,形成有活性的 PO。PO 催化酚氧化成苯醌,苯醌再在非酶促条件下聚合形成不溶性的黑色素,黑色素在入侵的病原体或机体损伤处沉积或促血细胞聚集,参与机体黑化和伤口愈合等免疫反应^[7]。自 20 世纪 90 年代,烟草天蛾 (*Manduca sexta*)、家蚕 (*Bombyx mori*) 和果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 proPO 基因序列被报道以来^[8],已在 20 多种昆虫中发现 proPO 基因,而且,昆虫一般含有多个甚至 10 个 proPO 基因^[7],proPO 基因的多样可能与 proPO 系统的功能多样有关。

目前,在家蝇中除了有 PO^[9]和 PO 抑制剂^[10]生化特性的少量报道,也有一条 proPO 基因序列 (GenBank 登录号: AAR84669),但对 proPO 基因作用的分子机制缺乏研究,关于家蝇 proPO 系统的分子组成并不清楚。

2 模式识别受体

昆虫 proPO 系统被病原激活始于模式识别受体对病原相关分子模式的识别与结合^[2]。在无脊椎动物中,已经发现 10 多种模式识别受体^[3,11],而见于文献报道的激活昆虫 proPO 系统的模式识别受体主要是肽聚糖识别蛋白 (peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)、 β -1, 3-葡聚糖识别蛋白 (β -1, 3-glucan recognition proteins, β GRPs) 等几种类型。PGRPs 的结构从昆虫到人都比较保守。现在从家蚕、果蝇、烟草天蛾和哺乳动物中已经克隆出约 40 种 PGRPs 同源基因。有些昆虫的 PGRPs 基因含量丰富、类型多样,如:果蝇有 13 个 PGRPs 基因,编码 19 个 PGRPs,这些蛋白分长型 (PGRP-LA, LB, LC, LD, LE) 和短型 (PGRP-SA, SB, SC, SD),其中,PGRP-LE 就有 proPO 系统引发功能^[12]。据报道,印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) 的 β GRPs 借与细菌或真菌细胞壁上的 β -1, 3-葡聚糖结合成大的复合物,来放大病原识别的信号引发 proPO 系统的激活^[10],而烟草天蛾的一种 β GRP,也能够激活 proPO 系统^[11],但它对病原的特异性如何激活 proPO 系统的机制并不清楚。

在家蝇中,虽然有凝集素促细胞免疫的报道^[13],但 proPO 系统引发模式识别受体 PGRP 或 β GRP 还未见报道,至于不同病原如何引发 proPO 系统的特定反应尚不清楚。

3 proPO 系统的调控因子

proPO 系统激活受激活因子和抑制因子的严密调控。PAP 就是关键的激活因子,而 Serpin 是最重要的抑制因子。

3.1 PAP PAP 直接把 proPO 激活为 PO^[14]。目前,报道的昆虫 PAP 还不多,研究较为清楚的有烟草天蛾^[15]和东北大黑鳃金龟 (*Holotrichia diomphalia* Bates)^[16]。烟草天蛾有 3 种 PAP,它们本身不能有效活化 proPO,必需有 SPH 的参与,活化过程由模式识别受体 β GRP 引发,依次激活酶原 proHP14 及 proHP21,活化的 HP21 再激活酶原 proPAP2 和 proPAP3,在 SPH 的参与下,PAP2 和 PAP3 与活化的 PAP1 一起将 proPO 活化成 PO。东北大黑鳃金龟也有 3 种联合作用的 PAP。家蝇 PAP 现已从家蝇幼虫 cDNA 消减文库中筛选出来^[17],至于家蝇有几种 PAP 及其激活 proPO 的过程还不清楚。

3.2 Serpin Serpin 属于基因超家族,类型多,功能杂^[18],已在多种昆虫中被发现,能有效降低 proPO 系统过度活化而对宿主的伤害^[6,19]。有报道,果蝇 Serpin 基因被干扰掉,黑化反应会加强,而注射该蛋白可削弱黑化反应^[20]。另外,在烟草天蛾血淋巴中发现 3 种直接抑制 PAP 活性的 Serpin 和 2 种抑制 PAP 上游丝氨酸蛋白酶活化的 Serpin。有趣的是,Serpin 不仅抑制 proPO 系统中丝氨酸蛋白酶的活性,还调控信号转导途径,影响抗菌肽的表达^[5,21]。目前,还没有家蝇 Serpin 基因调控 proPO 系统的报道。

4 结语

鉴于昆虫 proPO 系统激活受诸多因子的影响,不同昆虫 proPO 系统的激活机制和免疫功能可能不同。比如,黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 的 proPO 系统激活,能够同时诱导黑化反应和抗菌肽合成^[22],而在清除许多细菌和真菌的过程中,蚊虫的黑化却不是必须的^[23],另外,大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 的黑化对病原刺激敏感,果蝇的黑化更容易被机体损伤来触发^[24]。因此,当从家蝇 proPO 系统中鉴定出可能参与识别入侵病原并激活 proPO 系统的模式识别受体以及组成与调控的关键基因时,或许会发现有着不一样调控机制的家蝇 proPO 系统。

参考文献

- [1] Scott JG, Liu N, Kristensen M, et al. A case for sequencing the genome of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) [J]. J Med Entomol, 2009, 46(2): 175-182.
- [2] Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila* [J]. Nature, 2003, 426: 33-38.
- [3] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 697-743.
- [4] Tang H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila* [J]. Fly (Austin), 2009, 3(1): 105-111.
- [5] Rao XJ, Ling E, Yu XQ. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an in vitro approach [J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(3): 264-271.
- [6] Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, et al. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity [J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(10): 575-583.
- [7] Zhu JY, Yang P, Wu GX. Prophenoloxidase from *Pieris rapae*: gene cloning, activity, and transcription in response to venom/calyx fluid from the endoparasitoid wasp *Cotesia glomerata* [J]. Biomed Biotechnol, 2011, 12(2): 103-115.
- [8] Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, et al. Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 7774-7778.
- [9] Sun SG, Liu WG, Wang JG, et al. Endonuclease activity of phenol oxidase from *Musca domestica* larvae [J]. Biol Bull, 2008, 215(1): 108-114.
- [10] Tsukamoto T, Ichimaru Y, Kanegae N, et al. Identification and isolation of endogenous insect phenoloxidase inhibitors [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 184(1): 86-92.
- [11] Yu XQ, Zhu YF, Ma C, et al. Pattern recognition proteins in

- Manduca sexta* plasma[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1287-1293.
- [12] Leclerc V, Pelte N, Chamy LE, et al. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila* [J]. EMBO Rep, 2006, 7(2): 231-235.
- [13] Cao X, Zhou M, Wang C, et al. *Musca domestica* pupae Lectin improves the immunomodulatory activity of macrophages by activating nuclear factor-Kb[J]. J Med Food, 2012, 15(2): 145-151.
- [14] Jiang HB, Kanost MR. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30(2): 95-105.
- [15] Jiang H, Wang Y, Yu XQ, et al. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33(10): 1049-1060.
- [16] Kim MS, Baek MJ, Lee MH, et al. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae [J]. J Biol Chem, 2002, 277(42): 39999-40004.
- [17] 李殿香, 康翠洁, 张伟, 等. 家蝇幼虫消减文库的构建及差异表达基因的鉴定[J]. 昆虫学报, 2010, 53(6): 601-610.
- [18] Gubb D, Sanz-Parra A, Barcena L, et al. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects [J]. Biochimie, 2010, 92(12): 1749-1759.
- [19] An C, Budd A, Kanost MR, et al. Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(11): 1929-1939.
- [20] Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, et al. A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila* [J]. Dev Cell, 2008, 15(4): 617-626.
- [21] An C, Ragan EJ, Kanost MR. Serpin-1 splicing isoform J inhibits the proSpätzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in *Manduca sexta* [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(1): 135-141.
- [22] Kan H, Kim CH, Kwon HM, et al. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect [J]. J Biol Chem, 2008, 283(37): 25316-25323.
- [23] Schnitger AK, Kafatos FC, Osta MA. The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections [J]. J Biol Chem, 2007, 282(30): 21884-21888.
- [24] Bidla G, Hauling T, Dushay MS, et al. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors [J]. J Innate Immun, 2009, 1(4): 301-308.

收稿日期: 2013-03-08

(上接第 366 页)

2.2.3 3 种沙鼠季节感染率分布 4 种沙鼠从 3 月开始到 11 月均有感染, 其中 5 月感染率最高为 3.5%, 其他依次是 3 月为 2.6%, 4 月为 2.1%, 11 月为 1.7%。

2.2.4 4 种沙鼠不同脏器占位感染率 2006—2012 年 4 种沙鼠有 39 只感染多房棘球蚴, 其中病变位于肺叶占 69.2% (27/39), 位于心胸包膜占 25.5% (8/39), 位于肝脏占 5.1% (2/39), 位于肠系膜占 2.6% (1/39), 显示以胸腔的肺为主要侵害脏器, 未见胸腔、腹腔合并感染, 只有 1 只子午沙鼠病变在肠系膜上。此与有关啮齿动物感染占位脏器报道不同, 囊肿多为单发, 未见多个脏器受累情况。

2.2.5 成幼、雌雄感染分布 4 种沙鼠 39 只感染多房棘球蚴均为成年鼠类, 其中雄性 18 只, 雌性 21 只, 雄雌之比为 1:1.2, 雌性多于雄性。

3 讨论

3.1 多房棘球蚴在动物间的分布、流行趋势及意义 据文献报道, 在新疆西部天山地区伊犁田鼠^[3], 塔城、裕民、额敏、托里 4 个县(市)的小家鼠、赤颊黄鼠感染多房棘球蚴^[4], 在检查野生赤狐 36 只中 11 只自然感染多房棘球蚴, 感染率为 30.6%, 在裕民县郊苇湖地带捕到狼 2 只, 其中 1 只感染多房棘球蚴^[5]。此次调查表明, 在剖检的 4618 只野生动物中仅 4 种优势种中发现有感染, 感染面积分布在阿拉山口口岸的郊区 2 个点、中哈边境一区、二区、玛依勒山区、艾比湖、乌兰达布森区 5 个点, 距阿拉山口口岸 200 余公里的霍尔果斯口岸周边约 420 km², 多房棘球蚴在中哈边境口岸地区的感染已形成广泛的多房棘球蚴自然疫源地。大沙鼠以昼间活动为主, 在新疆北部边境口岸野外荒漠、半荒漠区占整个啮齿动物的 50% 以上。子午沙鼠、怪柳沙鼠、红尾沙鼠也常与大沙鼠混居, 但以夜间活动为主。调查结

果显示, 种群间多房棘球蚴有交叉传播感染、逐年扩大趋势, 这势必对畜牧业的发展及人群造成传播的风险, 为此应加强预防控制措施的研究。

3.2 多房棘球蚴对人类的威胁及传入的流行病学意义 多房棘球蚴遍及北美、欧、亚三大洲的北半球高纬度的寒冷地区或冻土地带。宁夏、新疆、甘肃、内蒙古、青海、西藏及西南的四川等省(自治区)为该病高发流行区, 新疆 1965 年首次发现多房性棘球蚴患者, 主要来自阿勒泰、塔城、伊犁、克拉玛依、哈密等地区^[6]。多房棘球蚴虫卵在自然界环境中有很强的抵抗力, 不易被杀死。狐、野犬、狼、猫等则因捕食鼠类而感染, 食草动物也易感染。在狐、野犬、鼠间生活循环, 故该病是由棘球蚴的幼虫寄生于人、兽体内引起的一种人兽共患自然疫源性疾病, 在我国主要流行于畜牧业较发达的西北地区。已成为我国西部严重危害人类健康的疾病之一。目前口岸铁路、公路的入境通道中每年都要查获多起输入性鼠形动物、死犬、活犬、狐、猫、羊等, 故不能排除借载体将病原传入的可能, 对口岸人群造成潜在威胁。为此, 应加大口岸检疫力度, 防止病原的传入。

参考文献

- [1] 唐家琪. 自然疫源性疾病[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 1129-1145.
- [2] 崔刚, 郑强. 1977—2004 年我国泡型棘球蚴病的文献统计[J]. 地方病通报, 2007, 22(2): 75-77.
- [3] 蒋卫, 郑强, 伊斯拉音, 等. 新疆尼勒克县首次发现伊犁田鼠感染多房棘球蚴[J]. 地方病通报, 2000, 15(1): 36-37.
- [4] 林宇光, 洪凌仙, 杨文川, 等. 新疆塔城地区多房棘球蚴的鼠类宿主考察[J]. 地方病通报, 1993, 18(2): 29-33.
- [5] 王伟, 吴勇, 吴季高. 新疆塔城地区多房棘球蚴调查: 国内狼体多房棘球蚴新记录[J]. 地方病通报, 1989, 4(2): 8-11.
- [6] 石佑恩. 病原生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 386-388.

收稿日期: 2013-03-16