

按蚊抗疟原虫感染的先天性免疫防御反应

邱宗文¹, 张锡林^{2*}

【摘要】在疟原虫-蚊媒相互作用的基础上, 研究按蚊抗疟原虫的先天性免疫防御反应机制, 并最终利用其防御机制限制或杀死移行发育中的疟原虫, 以期实现有成效的疟疾媒介控制策略。

【关键词】疟原虫, 按蚊, 先天性免疫防御

中图分类号: R382.31

文献标识码: A

Innate Immune Defense in Anopheline Mosquitoes against *Plasmodium* Infection

QIU Zong-wen¹, ZHANG Xi-lin^{2*}

(1 Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2 Department of Pathogen Biology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】On the basis of the research on interaction between plasmodium and mosquito vector, the mechanism of innate immune defense responses in anopheline mosquitoes against plasmodium infection has been studied. The innate immune defense may be applied to confine and kill malaria parasites under migration and development, and contribute to an effective control strategy on malaria vectors.

【Key words】*Plasmodium*; *Anopheline mosquito*; Innate immune defense

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30400363)

* Corresponding author, E-mail: jsczxl@mail.tmmu.com.cn

20世纪90年代, WHO提出了基因操纵蚊媒的新策略, 而研究按蚊抗疟原虫感染的先天性免疫机制是实现这一策略的重要途径^[1,2], 也可为疟疾蚊媒控制策略的研究提供新的视野。

1 按蚊抵御疟原虫感染的现象

经遗传选育的两个冈比亚按蚊抗性株, 一个株系可通过黑化包被反应以杀死侵入按蚊胃的疟原虫动合子及早期卵囊, 另一个株系可将侵入胃的动合子溶解。在疟原虫易感蚊株中, 也可见到尚未明白的机制使移行发育的疟原虫明显减少, 如摄入蚊胃的配子体细胞中仅有少部分可发育为动合子, 少部分动合子能穿过胃上皮细胞后继续发育为卵囊, 成熟子孢子从卵囊内释放出来后, 亦仅有少部分子孢子能进入唾液腺^[3]。因此推测, 可能是蚊免疫系统识别了移行发育中的疟

原虫并启动了抗疟原虫感染的防御反应, 从而导致在蚊期发育过程中的疟原虫部分或完全丧失。

2 按蚊先天性免疫防御反应的激活

与烟草天蛾、家蚕和果蝇等普通昆虫一样, 按蚊缺乏特异性 T、B 淋巴细胞介导的获得性免疫, 而主要依靠天然免疫系统识别结合病原体成分后激活并将其入侵的病原体清除或杀死。包括主要依赖细胞包被、吞噬或结节形成等为基础的细胞反应和抗菌肽、NO 或前酚氧化酶级联反应等为基础的体液反应。按蚊能识别和区分不同的病原体并激活其不同的免疫防御反应, 分别用细菌与疟原虫感染冈比亚按蚊时, 可诱导产生不同的免疫因子谱^[4]。Aderem 等^[5]证实按蚊可通过特异性的受体识别病原体后激活细胞的吞噬作用, 大量血细胞也可包被在较大病原体周围, 形成囊包裹病原体进行黑化包被反应并将其杀死, 如疟原虫在不易感按蚊胃内发育过程中的卵囊黑化。

激活宿主抗入侵病原体的免疫防御反应, 首先须要监测到病原体的存在并能区别它是否为异己。现在

基金项目: 国家自然科学基金(No.30400363)

作者单位: 1 第三军医大学附属新桥医院检验科, 重庆 400037;

2 第三军医大学基础部病原生物学教研室, 重庆 400038

* 通讯作者, E-mail: jsczxl@mail.tmmu.com.cn

比较普遍的观点认为：按蚊与普通昆虫识别和区分不同病原体时遵循模式识别理论，即宿主通过相应的模式识别分子识别/结合病原体的相关成分而得以区分不同病原体，从而激活相应的免疫防御反应。免疫识别是通过两个冲突机体（宿主和病原体）基因组编码的产物介导，快速有效的识别机制有助于保护宿主，但逃避识别的机制将有利于病原体生存。

现已清楚按蚊及昆虫先天性免疫系统进化了它的病原体识别机制，能识别病原体生存所必需的保守分子，如肽聚糖、脂多糖、革兰氏阴性菌与阳性菌的磷酸、RNA 病毒的双链 RNA 和酵母细胞壁的甘露聚糖等^[6]，这些分子在进化过程中具有高度的保守性。当按蚊体内相应受体与病原体表面分子结合后，经激活不同的信号转导途径并调控多个效应基因的转录与表达，从而启动相应的免疫防御反应。当血细胞膜上的受体与病原体分子相互作用后，可激活细胞内的信号转导途径并促进细胞的吞噬作用；血淋巴中的一些可溶性受体与病原体相应分子结合后可活化丝氨酸蛋白酶（serine protease, Sp）级联反应，随后可进一步激活前酚氧化酶（prophenoloxidase, PPO）级联反应或促进细胞因子样信号分子的活化及诱导免疫效应基因转录。

疟原虫感染按蚊时可诱导蚊局部上皮细胞或整体上的一组免疫效应基因的转录与表达^[7]。按蚊识别疟原虫可发生在动合子入侵或穿过蚊胃上皮细胞时期。已知疟原虫有效激活按蚊免疫反应是在血餐后 24 h，即动合子开始穿越蚊胃上皮细胞，此时不但能检测到蚊胃局部一氧化氮合酶（NOS）、防御素、革兰氏阴性菌结合蛋白（gram-negative bacteria-binding protein, GNBP）等免疫因子的上调，而且还能检测到蚊胃外组织相关免疫因子的上调^[8]；对于抗性株冈比亚按蚊来说，动合子穿过蚊胃上皮细胞时，能激活按蚊抵御疟原虫感染的特异性免疫防御反应-PPO 级联介导的疟原虫卵囊黑化包被反应；而基因敲除动合子活力相关成分 CTRP（circumsporozoite- and TRAP-related protein, CTRP）后，不但能抑制动合子入侵蚊胃，还能抑制蚊胃局部免疫因子的上调^[9]。因此，按蚊胃组织可能首先识别入侵的动合子并激活免疫防御反应，动合子侵入蚊胃后也可被渗透到蚊胃组织的血淋巴成分进一步识别。此外，孢子从卵囊内释放出来经血腔进入唾液腺期间，可与血淋巴中的血细胞和免疫相关成分直接接触，有可能被宿主识别并激活防御反应，因此仅有少部分孢子能进入唾液腺^[3]。

3 按蚊先天性免疫防御系统的组成

按蚊及昆虫先天性免疫防御系统主要由免疫组织器官、免疫细胞与体液成分构成。免疫组织器官包括血淋巴、胃、唾液腺与角质层上皮组织等。其中血淋巴是最主要的免疫组织，而按蚊胃是一个重要的免疫效应器官，如埃及伊蚊^[7]和冈比亚按蚊^[10]的胃可表达防御素。在疟原虫感染冈比亚按蚊时其唾液腺也可表达防御素^[8]，Brey 等^[11]发现天蚕角质层受损伤时可诱导杀菌肽转录，甚至离损伤较远的脂肪体细胞中也发现转录，表明按蚊及昆虫免疫反应可能涉及几个器官与多种细胞，过去认为角质层细胞的特殊结构只能作为物理屏障阻挡病原体的入侵，很可能也与整个免疫反应密切相关。

目前针对按蚊及昆虫免疫相关细胞研究较多的是脂肪体细胞与血细胞，二者均为较重要的免疫活性细胞，是多种免疫活性肽及其前体物质合成的场所。其中血细胞主要分布于昆虫开放性血腔的循环系统并自由流动，其功能类似于哺乳动物的白细胞，但尚未确定其细胞表面标志物以及缺乏像白细胞样典型的形态学特征。因此，血细胞的分类及其功能的描述均有待进一步确定，只能根据其吞噬活性、播散能力或是否分泌与黑化作用相关的酶等基本功能而大致区分。从无脊椎动物到脊椎动物的进化过程中，直到软骨鱼的出现才有了淋巴样干细胞^[12]，而这些干细胞是产生 T 和 B 淋巴细胞的祖先。因此，昆虫缺少可分化为获得性免疫所必需的特异性 T 和 B 淋巴细胞的淋巴样干细胞，而很可能主要是进化了它的先天性免疫系统。

现已确定与按蚊及昆虫先天性免疫防御反应相关的体液成分主要是免疫活性肽及其前体物质、蛋白酶及其酶原等。如防御素、抗菌肽、杀菌肽、植物凝血素蛋白、几丁质酶、转铁蛋白、革兰氏阴性菌与阳性菌接合蛋白、溶菌酶、NO 合酶、丝氨酸蛋白酶原与前酚氧化酶原等。其中与抗疟原虫感染相关的主要成分是 NO^[13]与前酚氧化酶（phenoloxidase, PO），而其他成分可能参与抗不同病原体感染的防御反应。涉及免疫防御的多种体液成分均可由脂肪体细胞和血细胞合成，但其他组织或细胞可能首先接触入侵的病原体，如疟原虫动合子入侵按蚊胃，损伤角质层表皮上存在的细菌或真菌。因此，其他组织或细胞也可能表达部分免疫活性肽参与防御反应。

此外，尽管与免疫相关的多种体液成分主要经诱导合成，但其前体物质或酶原等也可能存在于正常昆虫体内，并主要分布于开放性血腔内的血淋巴中，含量较低。当病原体入侵时可迅速激活并参与防御反应，如 PPO 级联介导的黑化病原体反应。由于酶促

级联反应是一个逐级放大的过程,因此有助于提高防御反应的效率。PPO 级联介导的黑化反应在按蚊及昆虫中非常普遍^[14],类似于哺乳动物的补体系统,这很可能是昆虫先天性免疫系统进化的结果。

4 按蚊先天性免疫反应的类型

按蚊及昆虫对病原体感染的防御反应主要依赖其先天性免疫系统的识别及其激活,而缺乏类似于哺乳动物获得性免疫的特异性防御反应。因此,昆虫免疫反应不能像哺乳动物那样分为主要由细胞介导的细胞免疫反应、以及主要由抗体介导的体液免疫反应。但是,昆虫免疫反应也主要是由免疫相关细胞与体液成分构成,可相应分为主要由免疫相关细胞直接参与的细胞反应与主要由免疫活性物质介导的体液反应。如主要依赖细胞包被、吞噬或结节形成等为基础的细胞反应,以及依赖抗菌肽、NO 或 PPO 级联反应等为基础的体液反应。

昆虫血细胞可直接参与 3 种细胞防御反应:吞噬作用、包被和结节形成。活化的血细胞可直接吞噬入侵的细菌等微小病原体并将其杀灭;而细胞包被反应主要是针对入侵的较大病原体,大量血细胞包围在病原体周围,并形成囊包裹病原体进行黑化反应;结节形成是由退化的血细胞、外源性物质与黑化残片等构成的一种无定形结构。其中,细胞吞噬是消除入侵病原体所必需的反应,很可能是先天性免疫系统的进化而形成的针对外源性物质入侵的获得性免疫。吞噬作用可能涉及一个复杂的细胞处理过程,通过特异性的受体识别、粘附和吞噬,并激活细胞内的级联反应来破坏吞噬的病原体^[3]。

在按蚊及昆虫抗病原体感染的免疫中,除以细胞反应为基础的防御机制外,与免疫相关的体液成分介导的体液反应也发挥了重要作用。如血淋巴成分识别病原体后迅速出现的凝集反应,不但能有效抑制病原体的扩散,还有助于血细胞吞噬病原体^[15],但这种现象在按蚊抗疟原虫感染的防御反应中尚未观察到。然而,以 PPO 级联反应为基础介导的卵囊黑化反应是按蚊抗疟原虫感染的最主要免疫机制。此外,诱导生成的免疫活性物质也可有效防御侵入的病原体。如 NO、防御素、杀菌肽等,其中已确定 NO 对入侵按蚊胃的疟原虫动合子以及病原微生物等均具有明显的杀伤效应^[7]。体液反应可分为系统防御反应与局部防御反应:系统防御反应主要是通过诱导脂肪体或血细胞表达免疫活性肽及其前体物质等防御因子,并释放到血腔运送到相应组织经激活后即可发挥防御效应;局部防御反应是指与入侵病原体直接接触的上皮组织或细

胞合成防御因子,并且主要与局部防御反应相关。

5 丝氨酸蛋白酶 (Sp) 级联反应

Sp 是介导按蚊及昆虫先天性免疫反应的一种关键酶。包括血淋巴凝集、免疫活性肽的合成和黑化病原体^[16]等,以及体内许多重要生理功能的实现均需要依赖 Sp 的活化并激活特异性的蛋白质。因此,昆虫体内 Sp 的种类众多,是一个巨大的蛋白酶家族,如在黑腹果蝇中就拥有 199 种 Sp 相关基因^[17]。Sp 具有细胞外的功能,通常以小囊状的形式分泌到细胞外,除具有一个潜在的病原体分子识别结合区域外^[18],其 N-末端为催化激活调控区,而 C-末端为催化区。由于 Sp 具有多个亚基,亚基之间的变化可能与免疫相关的信号转导和级联反应的活化相关。

目前,在按蚊中已确定了多种与免疫反应相关的 Sp^[19-21],多数酶经血细胞表达并以酶原形式存在于血淋巴中,识别/结合入侵的病原体分子后即可激活,活化的 Sp 可导致特异性的免疫防御机制的激活,启动并调控蚊的多种防御反应^[22]。如 Sp 与细菌(LPS)或真菌 β -1, 3-半乳糖特异结合后被激活,活化的 Sp 可使凝集酶原裂解形成凝集素,凝集素聚集成凝胶样的凝块捕集并限制病原体的扩散和发展。活化的 Sp 也可进一步激活 PPO 级联反应并黑化病原体,还可利用其细胞外酶的特性使 spatzle 蛋白裂解并形成一个跨膜的通道受体配基,随后激活细胞内信号转导途径调控免疫效应基因的转录并表达免疫活性肽及其前体物质。此外,尽管 Sp 主要以酶原形式存在于血淋巴中,但 Gorman 等^[20]发现 Sp22D 在受到免疫刺激下可在中肠上皮细胞、血细胞和脂肪体细胞中诱导表达,提示 Sp22D 对病原体的识别及激活免疫防御反应中可能具有重要作用。

按蚊及昆虫先天性免疫系统的激活主要依赖于 Sp 级联反应的活化^[23],并受到一些蛋白酶抑制因子的精确调控^[24],当系统性免疫反应不受调控时可导致昆虫死亡。

6 按蚊抗疟原虫感染的特异性免疫防御机制-PPO 级联反应

PPO 级联反应介导的黑化现象在按蚊及昆虫中非常普遍,包括卵壳与几丁质的硬化和色素沉着,以及创伤愈合和包被入侵的病原体等。PPO 激活后转变成具有活性的 PO,可催化酪氨酸羟基化为二羟基苯基丙氨酸,二羟基苯基丙氨酸和多巴胺又可氧化为它们各自的苯醌,这个活性的苯醌可介导蛋白交联和聚合成黑色素层固定病原生物而参与防御反应。

其中疟原虫卵囊黑化是抗性株冈比亚按蚊的最主要表型,也是抗疟原虫感染最主要的特异性免疫防御机制。Paskewitz 等^[25]发现黑化最早出现在动合子面向血淋巴侧,表明黑化反应的关键成分主要存在于血淋巴中,但黑化部位缺乏血细胞提示是体液反应。目前认为血淋巴中的黑化成分也是通过模式识别受体结合到靶表面开始,经激活 Sp 级联反应后进一步活化 PPO 级联反应。

PPO 是介导黑化反应的一种关键酶,根据黑化反应的多种功能提示在昆虫基因组中可能拥有大量的 PPO 基因。其中在冈比亚按蚊中已分离到多个 PPO 基因并已克隆^[26],已证实在按蚊不同发育期均有不同的 PPO 基因表达,但具体是那种或几种 PPO 基因参与了黑化疟原虫的反应及其明确的分子机制尚未阐明。已知大劣按蚊可黑化约氏疟原虫卵囊,在卵囊黑化期间可见大劣按蚊胃内局部 PPO 含量明显增加并长时间维持在较高水平,表明胃内局部 PPO 含量增加与卵囊黑化相关^[27],在吸血感染约氏疟原虫时可诱导大劣按蚊 PPO4 基因转录明显增强^[28],提示 PPO 可经免疫诱导表达并补充到级联反应中促进黑化反应的进行。

此外,PPO 级联介导的黑化反应中生成的一些中间产物如活性苯醌与自由基等,不仅可直接杀伤靶病原体,而且对昆虫也具有毒性,甚至可导致宿主潜在性的无明显特点的致死性黑化。因此,PPO 级联反应也是一个精密的调控过程。

7 免疫活性肽及其前体物质在抗疟原虫感染免疫中的作用

在按蚊及昆虫中,已确定并分离了多种免疫活性肽及其前体物质。如防御素、杀菌肽、转铁蛋白、溶菌酶和 NOS 等。其中,NO 是一种重要的活性物质,经 NOS 催化合成,对多种病原体及疟原虫动合子均具有杀伤效应。伯氏疟原虫感染斯氏按蚊后可诱导胃 NOS 基因转录明显增强,用含有 NOS 抑制因子的饮食喂养按蚊,可使胃内发育的疟原虫数量显著增加,一个诱导编码 NOS 的基因已在斯氏按蚊中克隆。此外,Gakhar 等^[29]发现约氏疟原虫感染斯氏按蚊后可诱导胃合成特异性的多肽限制免疫反应;Coban 等^[30]经诱导疟原虫重组 DNA 表达传播阻滞抗体后可明显降低疟原虫在蚊体内的发育;Gwadz 等^[31]将杀菌肽注入体后可显著减少疟原虫的发育,当用细菌刺激蚊后再感染疟原虫,可降低鸡疟原虫感染埃及伊蚊和伯氏疟原虫感染冈比亚按蚊的平均强度并减少流行。这些免疫活性肽作用的时间

很关键,仅在疟原虫感染按蚊前或感染后立即接种细菌,通过测定卵囊数量提示可降低疟原虫感染强度,当细菌接种按蚊 1~5 d 再感染疟原虫,显示未明显降低平均感染强度,该结果提示动合子可能更容易受到免疫活性肽的影响,而卵囊形成后这些因子的作用可能减弱或失去作用。

虽然按蚊可表达多种免疫活性肽及前体物质,但其抗疟原虫感染免疫反应中的作用及其具体机制尚未阐明。在冈比亚按蚊中已确定 Gambif1 与 Ag-STAT 2 个免疫信号肽分子,当细菌感染时均可作用于脂肪体细胞的核酸并诱导其转录,但 Gambif1 分子对疟原虫感染无反应^[32]。Ag-STAT 分子是 STAT 转录因子家族的一个成员,免疫定位显示 Ag-STAT 可作用于疟原虫感染蚊胃细胞的核酸^[33]。因此,这 2 个信号肽分子很可能与激活蚊先天性免疫系统的信号转导与调控密切相关。由于免疫信号转导途径的活化及其调控是激活先天性免疫反应的关键,如果在该方面的研究取得突破,将有可能找到新的疟疾媒介控制策略并成功阻滞疟原虫的传播。

8 按蚊先天性免疫系统的进化

按蚊能在具有众多病原体的环境中生存,主要是蚊拥有防御病原体入侵的能力,而这个能力应归于它先天性免疫系统。尽管缺乏获得性免疫能力,但蚊进化了它的先天性免疫系统。当病原体感染时能迅速合成多种免疫活性肽及其前体物质,其分子量较小并很容易在体内扩散。此外,也可激活其体内已存在的免疫活性物质的前体并迅速发挥防御效应。因此,按蚊及昆虫利用其先天性免疫系统的进化达到有效识别病原体并将入侵的病原体清除或杀死,从而在合适的环境中生存下来。

9 结语

按蚊抗疟原虫感染的免疫反应与蚊体内疟原虫的增殖之间可能存在一种微妙的平衡调节。如严重的感染可致蚊媒死亡,也可诱导强烈的自然选择并出现抗性蚊媒种群,而过低的感染则不出现疟疾的传播。因此,疟原虫易感株按蚊也很可能由于其先天性免疫防御反应调控体内寄生的疟原虫负荷,使其保持在一定水平并与蚊的易感性相关。研究按蚊抗疟原虫免疫与疟原虫逃避或抑制按蚊防御反应的机制,不但有助于阐明疟原虫与蚊媒相互作用的关系,也是制定有效的疟疾蚊媒控制策略的前提。冈比亚按蚊与恶性疟原虫全基因组图谱^[34,35]的顺利完成,为全面探讨疟原虫与蚊媒相互作用的关系带来了新的机遇。通过

研究按蚊抗疟原虫免疫机制以及寻找免疫抗性基因,是实现 WHO 提出的基因操纵蚊媒新策略的基础。

参 考 文 献

- [1] Meister S, Koutsos AC, Christophides GK. The *Plasmodium* parasite-a; new' challenge for insect innate immunity[J]. Int J Parasitol, 2004, 34: 1473-1482.
- [2] Kim W, Koo H, Richman AM, et al. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*[J]. J Med Entomol, 2004, 41: 447-455.
- [3] Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century[J]. Parasitol Today, 2000, 16: 196-201.
- [4] Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, et al. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99: 8814-8819.
- [5] Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 274: 11727-11735.
- [6] Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition[J]. Cell, 1997, 91: 295-298.
- [7] Lowenberger C A, Kamal S, Chiles J, et al. Mosquito-*Plasmodium* interactions in response to immune activation of the vector [J]. Exp Parasitol, 1999, 91: 59-69.
- [8] Dimopoulos 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 J, 1998, 17: 6115-6123.
- [9] Dessens JT, Beetsma AL, Dimopoulos G, et al. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes[J]. EMBO J, 1999, 18: 6221-6227.
- [10] Richman AM, Dimopoulos G, Seeley D, et al. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes[J]. EMBO J, 1997, 16: 6114-6119.
- [11] Brey PT, Lee W, Yamakawa M, et al. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 1993, 90: 6275-6279.
- [12] Abbas AK, Janeway CA. Immunology: improving on nature in the twenty-first century[J]. Cell, 2000, 100: 129-138.
- [13] Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, et al. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 5700-5705.
- [14] Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000,64: 115-137.
- [15] Iwanaga S, Kawabata SI, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions[J]. J Biochem, 1998, 123: 1-15.
- [16] Jiang H, Kanost MR. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30: 95-105.
- [17] Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, et al. Comparative genomics of the eukaryotes[J]. Science, 2000, 287: 2204-2215.
- [18] Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family[J]. Annu Rev Nutr, 1999, 19: 141-172.
- [19] Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM. SP22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity[J]. Gene, 2000, 251: 9-17.
- [20] Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM: Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30: 35-46.
- [21] Oduol F, Xu J, Niare O, et al. Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97: 11397-11402.
- [22] Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity[J]. Science, 1999,284: 1313-1317.
- [23] Maureen J, Gorman, Susan M, et al. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31: 257-262.
- [24] Hoffmann JA, Reichhart JM. Constitutive activation of Toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*[J]. Science, 1999, 285: 1917-1919.
- [25] Paskewitz SM, Brown MR, Lea AO, et al. Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*[J]. J Parasitol, 1998, 74: 432-439.
- [26] Muller HM, Dimopoulos G, Blass C, et al. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 11727-11735.
- [27] Qiu ZW, Zhang XL, Xu WY. Study on the relationship prophenoloxidase in the midgut of anopheline mosquitoes and melanization in oocysts of *Plasmodium yoelii*[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2003, 16: 321-324. (in Chinese)
(邱宗文, 张锡林, 徐文岳. 按蚊前酚氧化酶原与约氏疟原虫卵原虫卵囊黑化的关系[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16, 16: 321-324.)
- [28] Qiu ZW, Zhang XL, Xu WY, et al. Effects of *Plasmodium yoelii* infection on the transcript abundance of prophenoloxidase from *Anopheles dirus* and intracellular calcium in the oocysts[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2004, 26: 482-485. (in Chinese)
(邱宗文, 张锡林, 徐文岳, 等. 约氏疟原虫感染对大劣按蚊 PPO4 基因转录与卵囊内 Ca²⁺影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26: 482-485.)
- [29] Gakhar SK, Shandilya HK. Midgut specific immune response of vector mosquito *Anopheles stephensi* to malaria parasite *Plasmodium*[J]. Indian J Exp Biol, 2001, 39: 287-290.
- [30] Coban C, Philipp MT, Purcell JE, et al. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in nonhuman primates by a combination of DNA and protein immunizations[J]. Infect Immun, 2004, 72: 253-259.
- [31] Gwadz RW, Kaslow D, Lee JY, et al. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes[J]. Infect Immun, 1989, 57: 2628-2633.
- [32] Barillas-Mury C. Immune factor Gambif1, a new rel family member from the malaria vector, *Anopheles gambiae*[J]. EMBO J, 1996, 15: 4691-4701.
- [33] Barillas-Mury C. *Anopheles gambiae* AgSTAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection[J]. EMBO J, 1999, 18: 959-967.
- [34] Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*[J]. Science, 2002, 298: 129-149.
- [35] Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Nature, 2002, 419: 498-511.

(收稿日期:2005-09-12 编辑:伯韦)