

文章编号: 1000-7423(2003) 02-0084-03

【论著】

约氏疟原虫卵囊黑化与卵囊内游离钙关系的研究

张锡林* 徐文岳 王英 段建华 况明书

【摘要】 目的 研究大劣按蚊蚊胃的约氏疟原虫卵囊黑化时卵囊内 Ca^{2+} 的变化, 探讨疟原虫感染不易感蚊种时卵囊黑化与囊内 Ca^{2+} 的相互关系。方法 以荧光染料 Fluo-3/Am 作卵囊内钙指示剂, 应用共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 观察不同时期约氏疟原虫卵囊内 Ca^{2+} 分布、变化以及检测的实验条件。结果 $3 \mu\text{mol/L}$ Fluo-3/Am 同时加入 $1 \mu\text{l/ml}$ 25% Pluronic F-127 在 37°C 恒温下, 孵育约氏疟原虫卵囊 60 min 即可达到最佳的负载效果。Fluo-3/Am 浓度的提高和孵育时间延长只能增加背景染色, 若降低孵育浓度和缩短孵育时间则难于达到最佳的负载效果。约氏疟原虫成熟卵囊的囊内 Ca^{2+} 为 $(137.15 \pm 7.02) \text{ nmol/L}$, 完全黑化卵囊为 $(18.44 \pm 1.75) \text{ nmol/L}$, 并在囊壁出现明显的钙沉着。

结论 约氏疟原虫卵囊完全黑化时, 囊内 Ca^{2+} 明显减少, 并有外排现象。

【关键词】 约氏疟原虫; 卵囊; 黑化; Ca^{2+} ; 共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM)

中图分类号: R382.31

文献标识码: A

Study on the Relationship between Intracellular Free Calcium and Melanization in Oocysts of *Plasmodium yoelii*

ZHANG Xi-lin, XU Wen-yue, WANG Ying, DUAN Jian-hua, KUANG Ming-shu

(Department of Pathobiology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038)

【Abstract】 Objective To study the change of intracellular free Ca^{2+} in the oocyst when it melanized and to find out the relationship between the melanized oocyst and its intracellular level of free Ca^{2+} in a *Plasmodium*-refractory strain of *Anopheles dirus*. **Methods** The distribution and experimental condition of the intracellular free Ca^{2+} in oocyst of *Plasmodium yoelii* was measured with Ca^{2+} sensitive dye Fluo-3/AM and Pluronic F-127 under confocal laser scanning microscope (CLSM) at different time. **Results** The best load condition was that the oocysts were incubated in $3 \mu\text{mol/ml}$ Fluo-3/AM adding $1 \mu\text{l/ml}$ 25% Pluronic F-127 for 60 min at 37°C . Fluorescent imaging of oocysts was affected by an increase or decrease of the concentration of Fluo-3/AM and incubation time. The distribution of intracellular free Ca^{2+} was heterogeneous in the oocysts. The mean value of Ca^{2+} in the mature oocysts was $(137.15 \pm 7.02) \text{ nmol/L}$ ($\bar{X} \pm S$) but was $(18.44 \pm 1.75) \text{ nmol/L}$ in melanized oocysts with Ca^{2+} sedimentation in the wall of oocyst. **Conclusion** The results suggest that the level of the intracellular free Ca^{2+} in oocyst decreased and excreted during its melanization in a *Plasmodium*-refractory anopheline mosquito species.

【Key words】 *Plasmodium yoelii*, oocyst, melanization, Ca^{2+} , CLSM

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30200237)

疟原虫在媒介蚊体内进行配子生殖和孢子增殖, 最后产生子孢子, 在按蚊再次叮刺宿主时导致感染。不同的蚊种对不同的疟原虫易感性不同, 如斯氏按蚊是约氏疟原虫的易感蚊种, 而大劣按蚊则为不易感蚊种。疟原虫卵囊在不易感蚊种的体内发育过程中将出现黑化 (melanization) 现象^[1]。为进一步了解疟原虫卵囊黑化反应的机制, 本实验以疟原虫侵入、寄生宿主细胞时的胞内外钙平衡机制为基础, 应用共聚焦激光扫描显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 检测疟原虫感染后不同时间卵囊内 Ca^{2+} , 研究约氏疟原虫在不易感蚊种——大劣按蚊体内出现卵囊黑化时, 卵囊内游离 Ca^{2+} 的动态变化, 探讨疟原虫卵囊黑化与 Ca^{2+} 平衡、 Ca^{2+} 信号的关系。

材料与方 法

1 材 料

约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) BY265 株, 保种于昆明小鼠体内, 每周血传 1 次, 每 5 周蚊传 1 次。斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*) Hor 株常规饲养, 在羽化后 3~5 d 吸感染约氏疟原虫的小鼠血, 置 $24^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 、相对湿度 70%~80% 的恒温室内继续饲养。大劣按蚊 (*Anopheles dirus*) 为我室建立的自然交配繁殖种群。常规饲养, 其饲养条件和方法同斯氏按蚊。

2 方 法

斯氏按蚊、大劣按蚊吸感染血后, 饲以 10% 蔗糖水, 在感染后第 5 天、11 天和 15 天时, 分别解剖出蚊胃, 检测疟原虫卵囊, 观察这 3 天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

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30200237)
作者单位: 第三军医大学病原生物学教研室, 重庆 400038
* 联系人, E-mail: jsczxl@mail.tmmu.com.cn

总数)、感染度(卵囊总数/解剖蚊总数)及黑化比率(有黑化卵囊蚊总数/解剖蚊总数)。随后检测黑化与非黑化卵囊内 Ca^{2+} 的数量和动态变化。

3 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fluo-3/Am 负载着色和条件选择

选用 Ca^{2+} 敏荧光染料 Fluo-3 (molecular probes, Sigma), 以乙酰甲氧基 (acetoxymethyl, AM) 酯化形式扩散入细胞。预先配置的贮备液 Fluo-3/AM 以 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 溶于纯净无水的二甲亚砜(DMSO)中, 非离子型的多元醇表面活性剂 Pluronic F-127 以 25% (W/V) 的比例溶于无水 DMSO 中, 牛血清白蛋白(BSA)以 2% 的比例溶于无血清 RPMI 1640 培养液中。将 Fluo-3/AM、Pluronic F-127 贮备液分别用无血清 RPMI 1640 培养液配置成不同的浓度。新鲜分离的蚊胃分别加入终浓度为 1、2、3、4 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3/AM, 不加或加入不同浓度(0.1、0.5、1.0 和 $1.5 \mu\text{l/ml}$) 25% 的 Pluronic F-127, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育, 期间轻轻震动几次, 分别孵育 30、60、90 和 120 min 后, 用无血清的 RPMI 1640 培养液洗涤 2 次, 重悬于 RPMI 1640 培养液中, 用于 CLSM 系统中检测。

4 约氏疟原虫卵囊内 Ca^{2+} 的共聚焦图象观测

Fluo-3/AM 在胞内被酯酶水解成 Fluo-3, 以 488 nm 的氩离子激光激发, 可在 525 nm 处探测到荧光发射。Fluo-3 在结合 Ca^{2+} 后荧光强度增加, 可指示卵囊内游离 Ca^{2+} 的相对变化。使用 Leica 激光共聚焦显微镜(TCS-NT 165211), 在 $40\times$ 物镜下动态观察 Fluo-3 指示的 Ca^{2+} 的时间和空间变化。激光共聚焦显微镜可以观察细胞某层面的 Ca^{2+} 荧光图象。 Ca^{2+} 图象经光电倍增管(PMT)和冷电藕合器件(cCCD)摄像机, 以数字方式输出到计算机, 计算出某一区域 Ca^{2+} 信号的时间变化曲线。采用 IDQ (ion domain quantify) 软件(由 Leica 公司提供)对所选定的区域荧光强度进行数据采集。由该软件提供的窗口可对荧光强度的变化进行实时观测, 也可将数据输入到 microsoft excel 中作进一步分析处理。

结 果

1 约氏疟原虫对大劣按蚊蚊胃感染率和卵囊黑化比率

血餐后 5 d 蚊胃壁开始形成卵囊, 但卵囊数量不多, 个体较小, 感染率为 76.5% (13/17), 卵囊黑化比率为 0。11 d 时, 部分卵囊出现局部黑化, 囊内有黑色颗粒沉着, 感染率为 69.2% (9/13), 卵囊黑化比率为 38.5% (5/13)。15 d 时绝大多数卵囊出现部分黑化

或完全黑化, 感染率和卵囊黑化比率均达 58.3% (7/12), 见图 1。

2 大劣按蚊、斯氏按蚊蚊胃卵囊的 Fluo-3/Am 负载及最终染色条件

应用 $1\sim 6 \mu\text{mol/L}$ 不同浓度 Fluo-3/Am, 37°C 恒温孵育大劣按蚊、斯氏按蚊蚊胃的约氏疟原虫卵囊 30~90 min 不同时间内, 分别观察 Fluo-3 与卵囊内游离钙结合后被激光束激发出的荧光。结果显示 $3 \mu\text{mol/L}$ Fluo-3/Am, 37°C 恒温孵育约氏疟原虫卵囊 60 min 即可达到最佳的负载效果, 孵育浓度进一步提高和孵育时间的再延长只能增加背景染色, 影响图像的清晰度。若降低孵育浓度和缩短孵育时间则难于达到最佳的负载效果。Pluronic F-127 对疟原虫卵囊外排 Fluo-3/AM 具有阻断作用, 不加 Pluronic F-127 的实验组, 随着测定时间延长, 卵囊内 Ca^{2+} 荧光强度逐渐减弱, 背景加深, 不利于结果的观察和比较; 加不同浓度 Pluronic F-127 后, 上述外排现象明显减弱, 并受到 F-127 浓度的依赖性抑制, $1 \mu\text{l/ml}$ 即可达到或接近最大抑制。继续增加 Pluronic F-127 的浓度, 将影响疟原虫卵囊的活性。囊内 Ca^{2+} 的荧光反将减弱。结果表明 $1 \mu\text{l/ml}$ 25% Pluronic F-127 和 Fluo-3/AM 负载约氏疟原虫卵囊, 囊内 Ca^{2+} 荧光着色均匀, 便于结果的观察和比较。

3 大劣按蚊、斯氏按蚊蚊胃卵囊内 Ca^{2+} 的共聚焦图象的检测分析

用 $3 \mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3/AM 的浓度加入 $1 \mu\text{l/ml}$ 25% 的 Pluronic F-127, 37°C 孵育 60 min, 约氏疟原虫卵囊内 Ca^{2+} 显示黄绿色荧光, 在血餐后的不同时期卵囊内 Ca^{2+} 的分布不相同(图 2)。血餐后 5 d 大劣按蚊、斯氏按蚊蚊胃的未成熟卵囊内 Ca^{2+} 呈匀质状分布。 Ca^{2+} 在卵囊内的荧光着色使整个卵囊显示亮绿色的“圆球型”, 而卵囊的囊壁未显荧光。两种蚊囊内 Ca^{2+} 的均值为 $(52.46 \pm 2.57) \text{ nmol/L}$ 。血餐后 7 d, 斯氏按蚊蚊胃和大劣按蚊少数未出现黑化的成熟卵囊, 囊内游离 Ca^{2+} 呈点、块状分布, 散在分布于囊内。囊内 Ca^{2+} 的均值为 $(137.15 \pm 7.02) \text{ nmol/L}$ 。在大劣按蚊蚊胃的部分黑化卵囊内, 囊内游离 Ca^{2+} 聚集成块状或片状, 囊内游离 Ca^{2+} 减少 $(61.05 \pm 5.74) \text{ nmol/L}$; 大劣按蚊蚊胃卵囊完全黑化时, 囊内游离 Ca^{2+} 明显减少 $(18.44 \pm 1.75) \text{ nmol/L}$, 显空泡状, 但囊壁有明显的 Ca^{2+} 沉着。斯氏按蚊未见黑化和部分黑化的卵囊。囊内 Ca^{2+} 水平见表 1。

表 1 不同时期大劣按蚊和斯氏按蚊胃卵囊内 Ca^{2+} 水平
Table 1 Level of the free Ca^{2+} in oocysts of *Plasmodium yoelii* at different time after blood meal of *An. dirus* and *An. stephensi*

标本 Sample	标本例数 No. samples	卵囊内游离钙的均数 (nmol/L) Average level of intracellular free calcium
未成熟卵囊 Immature oocysts	Ad 5 As 5	52.63 ± 3.63 52.29 ± 1.81
成熟卵囊 Mature oocysts	Ad 4 As 7	137.55 ± 8.22 133.75 ± 4.43
部分黑化的卵囊 Partially melanized oocysts	Ad 6 As 0	61.05 ± 5.74 0
黑化的卵囊 Melanized oocysts	Ad 8 As 0	18.44 ± 1.75 0

* Ad 大劣按蚊 *An. dirus* As 斯氏按蚊 *An. stephensi*
P > 0.05

讨 论

按蚊对疟原虫的黑化包被 (melanotic encapsulation) 为蚊的免疫防御反应之一, 主要出现在疟原虫感染不适宜按蚊的情况下。该反应是一种体液黑化反应 (humoral melanization), 由蚊体内的前酚氧化酶级联反应 (prophenoloxidase cascade) 介导引起。在反应过程中, 产生大量的醌类中间产物沉积到入侵的病原体周围形成黑色素, 起到隔离杀死病原体的作用。对疟原虫将抑制卵囊的形成或成熟, 阻断在蚊体内的发育, 即为疟原虫的黑化包被反应^[2]。

前期研究已表明大劣按蚊能黑化包被大多数约氏疟原虫卵囊, 并抑制其发育, 而人疟原虫卵囊极少出现黑化^[3]。随着研究的深入, 希望能直观地了解疟原虫卵囊黑化反应中虫体生理特性的变化, 尤其是在卵囊黑化反应中虫体胞内外 Ca^{2+} 的动态变化和作用。激光共聚焦技术结合离子的荧光标记, 可记录细胞形态和离子动态变化过程。能用于对疟原虫卵囊黑化反应中虫体胞内外 Ca^{2+} 变化的实验观察。

Ca^{2+} 为真核细胞内普遍存在的信号转导分子, 通过 Ca^{2+} 与蛋白质的连接引导细胞的活动, 从而控制许多细胞的功能^[4]。在某一段时间内, 胞内 Ca^{2+} 浓度的升高, 对细胞具有毒性, 将导致细胞的死亡。为维持正常胞内游离 Ca^{2+} 的浓度, 真核细胞已具有在胞内隐蔽 Ca^{2+} 和排出多余胞内 Ca^{2+} 的机制^[5]。然而对胞内寄生原虫如疟原虫、利什曼原虫和弓形虫等其自身适应寄生胞内外不同的 Ca^{2+} 环境以及调节钙平衡功能方面的认识还很不完全。夏氏疟原虫红内期三磷酸肌醇 ($InsP_3$) 对胞内游离 Ca^{2+} 调节作用的研究表明, 疟原虫对红细胞的侵入和胞内发育, 将导致虫体胞内 $InsP_3$ 的增加, 而引起 Ca^{2+} 从氯喹敏感和不敏感钙库的释放。这种胞内钙库依赖 $InsP_3$ 的钙释放, 可能是调节胞内虫体生长和发育的重要因素之一^[6]。在恶性疟

原虫无性期鉴定出位于内质网的钙连接蛋白 (PfERC), 其分子量约 40 kDa, 相当于早先定位于配子体表面的配子体蛋白 (PfS40), PfERC 为钙连接蛋白中的一种, 在疟原虫的蛋白转运中可能起作用^[7]。Marchesini 等用 Ca^{2+} 荧光指示剂 fura-2/Am 标记伯氏疟原虫滋养体检测胞内钙浓度。在存在肌质/内质网 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂时, 胞内游离钙浓度升高。另外滋养体具有储存钙的胞内酸性细胞器。这些酸性小体中均有 V-H⁺-PP 酶和 V-H⁺-ATP 酶, 显示疟原虫存在的酸性体与在锥虫、弓形虫中介绍的酸性体具有相同特征^[8]。本实验结果表明成熟卵囊内的游离钙达到最高量, 随着卵囊黑化的出现, 卵囊内钙量逐渐减少。卵囊完全黑化时, 囊内游离钙达最低点, 且囊壁出现明显的钙沉着。该现象在成熟卵囊、未成熟卵囊和部分黑化卵囊都不存在。推测在卵囊黑化过程中, 可能出现虫体胞内钙释放和囊内钙的外排, 破坏虫体的钙平衡或促进卵囊黑化, 该机制尚待进一步研究。

黑化包被反应是决定按蚊对疟原虫抗性的主要因素之一, 因此研究按蚊黑化包被疟原虫机制可为遗传防制蚊媒提供理论依据, 同时还有助于对疟原虫-蚊媒相互关系的理解。目前, 对黑化包被反应中激发反应的信号通路, 尤其是虫体钙平衡和钙信号转导机制的研究尚少。而该类研究将为抗疟药物、抗虫疫苗的研究寻找到新的靶目标。(图 1, 2 见封三)

参 考 文 献

- [1] Collins FH, Sakai RK, Vernick KD, et al. Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. Science, 1986, 234: 607 - 610.
- [2] Dimopoulos D, Muller HM, Levashina EA, et al. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito [J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13: 79 - 88.
- [3] 徐文岳, 黄复生, 张锡林, 等. 大劣按蚊血淋巴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: 440 - 442.
- [4] David EC. Calcium signaling transduction [J]. Cell, 1995, 80: 259 - 268.
- [5] Garcia CRS. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite [J]. Parasitol Today, 1999, 15: 488 - 491.
- [6] Passos APD, Garcia CRS. Inositol 1,4,5-triphosphate induced Ca^{2+} release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 245: 155 - 160.
- [7] Greca NL, Hibbs AR, Riffkin C, et al. Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1997, 89: 283 - 294.
- [8] Marchesini N, Luo S, Rodrigues CO, et al. Acidocalcisomes and a vacuolar H^+ -pyrophosphatase in malaria parasites [J]. Biochem J, 2000, 347: 243 - 253.

(收稿日期: 2002-01-30 编辑: 庄兆农)

(Continued from outside back cover)

- The prevalence and control of schistosomiasis in marshland of Tongling County JIN Jiang, GAO Chang-sheng (126)
- An investigation on intestinal helminth infections among residents of Harbin City
..... NIU Hong, LIU Yan-lin, YANG Xiao-jie, et al (127)
- Effect of chemotherapeutic regimens on soil-transmitted nematode infections in areas with low endemicity
..... YANG Wei-ping, SHAO Jing-ou, CHEN Ye-jun, et al (128)
- One case of human infection with *Rhabditella axei* in Jiangsu Province
..... SHAO Jing-ou, JIANG Xiao-lan, XU Zhen-gang, et al (68)
- A case of cerebral sparganosis FANG Zheng-ming, LI Yong-long (83)
- A malaria case with more than one ring form of *Plasmodium vivax* within an erythrocyte
..... WANG Xin-cai, DUAN Ai-jun, LIU Run-fang, et al (98)
- A misdiagnosed case of paragonimiasis SONG Li-jie, YAO Gui-ling, ZHANG Li-ping (112)

约氏疟原虫卵囊黑化与卵囊内游离钙关系的研究

Study on the Relationship between Intracellular Free Calcium and Melanization in Oocysts of *Plasmodium yoelii*

(正文见第 84 页 For text, see p. 84)

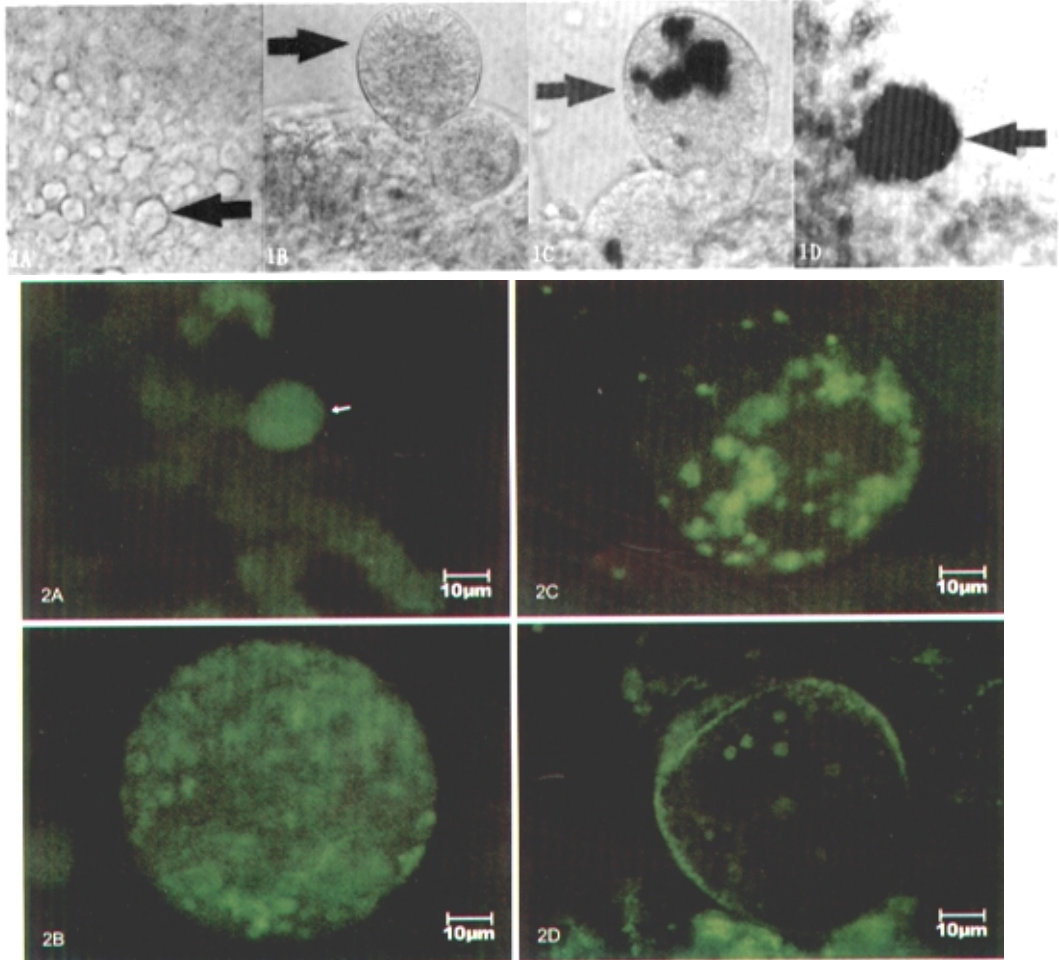


图 1 感染约氏疟原虫 5、7、11 和 15 d 后,蚊胃卵囊的形态(×400) 图 2 感染约氏疟原虫后不同时期蚊胃卵囊内游离 Ca²⁺ 的分布 A 感染后 5 d 的卵囊 B 感染后 7 d 的卵囊 C 感染后 11 d 的部分黑化卵囊 D 感染后 15 d 的完全黑化卵囊

Fig. 1 Morphology of melanized oocyst in the midgut of *An. dirus* and *An. stephensi* in 5, 7, 11 and 15 days after blood meal for infection of *P. yoelii*

Fig. 2 Distribution of intracellular free Ca²⁺ in oocyst at different time after infection by *P. yoelii* in the midgut of *An. dirus* and *An. stephensi*
A Oocyst in 5 days after infection B Oocyst in 7 days after infection C Partially melanized oocyst in 11 days after infection D Melanized oocyst in 15 days after infection