

利用 *Wolbachia* 控制登革热传播的研究进展

张东京 詹希美 郑小英*

【摘要】 沃尔巴克体 (*Wolbachia*) 是一类广泛存在于节肢动物中的革兰阴性共生菌, 该菌对宿主生殖有多种调控能力, 可以诱导细胞质不亲和 (cytoplasmic incompatibility, CI)、孤雌生殖 (parthenogenesis-inducing, PI)、杀雄作用 (male-killing) 和雌性化 (feminizing) 等。近来研究发现 *Wolbachia* 对登革病毒的繁殖和传播有控制作用。该文对近年来 *Wolbachia* 在控制登革热传播过程的应用价值作一综述。

【关键词】 *Wolbachia*; 生物控制; 登革病毒; 登革热

The advancement of researches on using *Wolbachia* to control the epidemic of dengue fever ZHANG Dong-jing, ZHAN Xi-mei, ZHENG Xiao-ying*. Department of Parasitology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

* Corresponding author: ZHENG Xiao-ying, Email: zhengxy@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 *Wolbachia* is a gram-negative endosymbiotic bacterium, which widely exists in arthropods. The bacterium has several effects on controlling host's reproduction, that include inducing cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis-inducing, male-killing and feminizing. The recent researches discovered that *Wolbachia* can control the multiplication and transmission of dengue virus. This review summarized the potential application of *Wolbachia* in controlling the epidemic process of dengue fever.

【Key words】 *Wolbachia*; Biological control; Dengue virus; Dengue fever

登革病毒属于黄病毒科黄病毒属中的一个血清型亚群, 依抗原性不同分为 1、2、3、4 等 4 个血清型, 主要通过埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 和白纹伊蚊 (*A. albopictus*) 等媒介传播, 可引起登革热 (dengue fever, DF)、登革出血热 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 和登革休克综合征 (dengue shock syndrome, DSS)^[1]。登革热严重影响人们的身体健康, 全世界约有 2.5 亿人生活在登革热流行地区, 每年登革热患者大约在 50 万 ~ 100 万^[2]。

由于缺少有效的登革疫苗和抗登革病毒药物, 因此, 目前预防登革热的主要手段还是以控制它的传播媒介 (埃及伊蚊和白纹伊蚊) 来切断传播途径。化学杀虫剂虽能减少蚊虫密度, 但长期大量使用化学杀虫剂灭杀幼蚊和成蚊, 不仅耗资巨大, 还会造成环境污染和生态环境破坏, 同时也会导致蚊虫产生抗药性。因此寻找生物和遗传方法来控制登革病毒媒介已成为当前防制工作的迫切需求^[3-4]。

目前比较有前景的研究是种群替换法。所谓种群替换法, 就是体外将某些外源基因转入到蚊虫体内, 使蚊虫不能再传播蚊媒病毒。这些外源基因包括抗病毒基因, 蚊虫体内的生理或免疫应答基因, 这些基因可以影响蚊虫的生殖能力和抑制登革病毒的

能力, 可以不断地经代传播, 使病毒易感蚊媒的种群逐渐被替换, 从而减少蚊媒病毒的传播。

蚊虫体内共生菌沃尔巴克体 (*Wolbachia*) 是最有潜力的一个转基因载体。以 *Wolbachia* 为基础的生物防制具有非常大的优势, 它不仅可以减少杀虫剂带来的负面效应, 如环境污染问题和对益虫种群的威胁问题, 更重要的是可以随代传播, 节省人工劳动时间和费用。本文对 *Wolbachia* 的分类、对宿主的生殖控制作用以及 *Wolbachia* 对登革病毒的抑制方面的研究进展作一综述。

1 *Wolbachia*

Wolbachia 最早于 1924 年由 Hertig 和 Wolbach 在尖音库蚊的生殖细胞中发现, 12 年后被命名为 *Wolbachia pipientis*, 其分类地位属于变形菌纲 (Proteobacteria) 的 α 亚群, 立克次体目 (Rickettsiaceae), 无形体 (Anaplasmataceae), 沃尔巴克体属 (*Wolbachia*)。 *Wolbachia* 是一类革兰阴性共生菌, 具有母系传播的特征, 在自然界中广泛存在, 主要宿主为节肢动物, 估计有 20% ~ 76% 的节肢动物受到感染^[5]。

1.1 *Wolbachia* 的分类

Wolbachia 属包含有多个超群, 基于 tsZ 和 16S rDNA 为基础的分类可以将 *Wolbachia* 分为 8 个超群, 分别为 A-H 超群。其中 A、B 超群在 600 万年前已分

化出来,两者只存在于节肢动物体内^[6]。C、D 超群与 A、B 超群种间发育体系相似,但核苷酸序列高度变异,且只存在于线虫体内^[7]。E 超群在弹尾目中发现^[8],F 超群在节肢动物如蜘蛛和曼森线虫属(*Mansonella*)中发现^[9]。G 超群^[9]和 H 超群^[10]分别在澳大利亚蜘蛛和白蚁中发现。近来分别在跳蚤^[11]和细薄双瓣线虫^[12]中发现两种新的 *Wolbachia* 菌株,但是这两种新的菌株在分类学中还未定论。

1.2 *Wolbachia* 对宿主的生殖控制

Wolbachia 对宿主的作用主要在生殖调控方面,如诱导细胞质不亲和、孤雌生殖、雌性化和杀雄作用等^[13]。*Wolbachia* 对蚊虫宿主的影响仅仅是细胞质不亲和作用,即精子和卵子之间的细胞质不融合,直接导致宿主的卵不能孵化。细胞质不亲和作用有单向不亲和与双向不亲和两种形式。单向不亲和在未感染雄性与感染雌性蚊虫交配时发生,反之,感染雄性与未感染雌性蚊虫交配则不发生。双向不亲和在感染不同菌系 *Wolbachia* 的雌、雄蚊虫交配时发生。如感染了 A 菌株的雌蚊与感染了 B 菌株的雄蚊交配,或感染了 B 菌株的雌蚊和感染了 A 菌株的雄蚊交配,均会产生细胞质不亲和^[14]。由于 *Wolbachia* 可以垂直传播,因此可以迅速在蚊虫种群中扩散。细胞质不亲和作用的存在可以使蚊虫的种群数量下降,提示可以利用 *Wolbachia* 建立媒介生物控制技术。

1.3 *Wolbachia* 在蚊虫体内的分布

Wolbachia 最先是在尖音库蚊的生殖细胞内发现的,然而在蚊虫的非生殖腺部位也观察到了 *Wolbachia*。宋社吾等^[15]通过透射电镜观察到,在淡色库蚊和骚扰库蚊的卵巢、中肠和胸部肌肉组织中均有 *Wolbachia*。Zouache 等^[16]和 Chen 等^[17]采用荧光定量-PCR 和原位杂交法在白纹伊蚊的脑部、脂肪体、唾液腺、中肠、马氏管、卵巢等处均发现了 *Wolbachia*,且 *Wolbachia* 在卵巢中的密度比其他组织高。

1.4 *Wolbachia* 对蚊虫的影响

Wolbachia 几乎分布在蚊虫体内的各个组织中,但是密度有显著差别,在卵巢中的密度最大,这可能是跟 *Wolbachia* 主要调控宿主生殖能力有关。唾液腺和消化道一般都是蚊虫病毒复制的部位,存在于唾液腺和消化道的 *Wolbachia* 是否会影响病毒在这两个部位的复制尚不清楚。Saridaki 等^[18]在蚊虫的血细胞中发现了 *Wolbachia*,并推测 *Wolbachia* 对

宿主的免疫系统有一定作用。在蚊虫的头部也发现了 *Wolbachia*,是否该共生菌也会影响蚊虫的中枢神经系统,从而改变蚊虫的物理行为等,这些问题都有待进一步研究。

2 利用 *Wolbachia* 控制蚊媒种群

节肢动物可以传播多种疾病,如伊蚊传播登革热,主要引起寒战、发烧,头痛和关节痛,甚至有出血性皮肤病,严重危害人类的健康。自然界有 20%~70% 的节肢动物感染了 *Wolbachia*,*Wolbachia* 在种群替换中有巨大的潜在应用价值。迄今为止,*Wolbachia* 的种群替换控制登革热的方法有 2 种:一是以 *Wolbachia* 为载体,连上另一个能抑制登革病毒的基因;二是利用 *Wolbachia* 本身对宿主的作用,如缩短宿主的寿命、改变宿主的吸血行为和干扰登革病毒的复制等。近来的研究大多集中在 *Wolbachia* 自身对宿主的作用,主要有以下 3 方面。

2.1 缩短蚊媒的寿命

wMelpop 是属于 *Wolbachia* 的 A 超群,其自然宿主为黑腹果蝇。研究发现将 *wMelpop* 转染到非自然宿主时可以引起非自然宿主过早死亡^[19]。*wMelpop* 在非自然宿主的幼虫发育时期是处于静止状态,然而一旦进入到成虫时期,*wMelpop* 马上开始过度增殖,引起组织的损伤,包括脑部、视网膜和肌肉,最终引起死亡。

多数病原微生物在宿主体内必须经历一定的发育和繁殖时间之后才能感染新宿主。例如登革病毒感染埃及伊蚊之后,首先是在蚊体内的中肠繁殖,进而感染其他组织,最后才侵入唾液腺,大约 14~17 d,这段时间称为病毒的外潜伏期(extrinsic incubation period, EIP)。雌蚊寿命必须比外潜伏期更长,才有可能传播病毒。因此,如果将雌蚊的寿命缩短,将它们杀死在 EIP 内,便可以减少传播登革热的机会。

研究发现 *wMelpop* 可以引起其非自然宿主早亡,但在伊蚊体内是否也是如此呢?由于伊蚊并不是 *wMelpop* 的自然宿主,必须先将 *wMelpop* 转染到伊蚊体内。在实验室条件下已可人工将 *wMelpop* 转染到蚊虫体内^[20]。McMeniman 等^[21]通过显微注射法将 *wMelpop* 转移到埃及伊蚊的卵中,抽提存活的雌蚊 DNA,PCR 扩增后,发现全部感染了 *wMelpop*。与未感染 *wMelpop* 的蚊虫比较,感染蚊虫的寿命为 27 d,而未感染蚊虫的寿命则是 61 d。将感染的蚊虫继续传代,发现全部感染 *wMelpop*。Evans 等^[22]和

McMeniman 等^[23]通过显微注射法将 *wMelpop* 成功地转移到埃及伊蚊体内,发现感染 *wMelpop* 的蚊虫比正常的蚊虫寿命缩短了近一半。

由于显微注射法对蚊卵造成的伤害非常大,因此每次实验卵的存活率相对较低,不足 1%。因此 Ruang-areerate 等^[24]从白纹伊蚊(同时感染 *wAlbA* 和 *wAlbB*)中分离出了 *wAlbA*,并成功注射到埃及伊蚊成蚊体内,其存活率相对较高,约 93%。*wMelpop* 转染到蚊虫体内引起蚊虫早亡,并且可以经卵传播,将蚊虫杀死在 EIP 期间,从而可以减少登革热的传播。

2.2 减少蚊媒的吸血成功率

成蚊交配后,雌蚊必须吸血后才能产卵,而这个过程也是传播疾病的过程。因此,减少蚊虫的吸血成功率不但可以减少蚊虫的数量,也可以减少疾病的传播。

Turley 等^[25]发现感染了 *Wolbachia* 的蚊虫,特别是年长的蚊虫,与未感染 *Wolbachia* 的蚊虫相比,吸血成功率较小,感染了 *Wolbachia* 的蚊虫的喙较弯曲,不利于蚊虫在吸血时刺穿皮肤。Moreira 等^[26]也发现,随着感染 *Wolbachia* 的埃及伊蚊寿命增长,他们观察到伊蚊身体晃动程度增加和喙的弯曲度增加,使吸血的成功率和有效率都很低,且感染了 *Wolbachia* 的伊蚊平均唾液容量变小,这些可能与 *Wolbachia* 的过度复制而造成宿主的细胞和组织损伤有关,也有可能 *Wolbachia* 感染了蚊虫的中枢神经系统而导致它们行为的改变有关。Evans 等^[22]发现,与未感染的埃及伊蚊相比,感染 *wMelpop* 的蚊虫活动度和 CO_2 代谢率会明显增加,活动度包括交配、寻食、栖息等。该结果与其他昆虫感染其他病原生物菌的结果恰恰相反,如 Peng 等^[27]在果蝇中发现感染 *Wolbachia* 的果蝇与未感染的果蝇相比,活动度明显下降了。

由于蚊虫是通过吸血传播疾病,因此有效减少蚊虫的吸血成功率,改变蚊虫的物理行为,增加其饥饿度(觅食不到容易饿死)和新陈代谢速度,这都是有效阻止登革热传播的手段。

2.3 干扰蚊媒体内单链 RNA 病毒的复制

在果蝇属中的研究发现感染了 *Wolbachia* 的果蝇可以干扰存在果蝇中的 RNA 病毒的复制,例如果蝇 C 病毒、禽鸟病毒或者蟋蟀麻痹病毒^[28]。Hedges 等^[29]研究发现未携带 *Wolbachia* 的黑腹果蝇在 6 d 后全部死亡,而携带了 *Wolbachia* 的黑腹果蝇则在

14 d 后才全部死亡,并认为可能是由于 *Wolbachia* 的存在干扰了黑腹果蝇体内的 RNA 的复制,从而延迟了死亡。Teixeira 等^[30]也发现相同的结果,并认为 *Wolbachia* 只是对 RNA 病毒起干扰作用,而对 DNA 病毒则无作用。

既然 *Wolbachia* 在果蝇中可以干扰单链 RNA 病毒的复制,那么是否在伊蚊体内也可以干扰登革病毒(登革病毒也是单链 RNA 病毒)的复制呢?为了验证这个问题,Bian 等^[31]将感染了 *Wolbachia* 的埃及伊蚊喂食感染有 DENV-2 的血液,在不同的时间段取蚊虫的中肠、唾液腺和脑,通过 RT-PCR 发现在这些部位的登革病毒拷贝数与对照相比显著降低。Moreira 等^[28]也发现感染了 *Wolbachia* 的埃及伊蚊体吸食感染有 DENV-2 的血液,分别在第 7、14 d 检测病毒,结果阳性率只有 5% 和 8%,而相同情况下未感染 *Wolbachia* 的伊蚊的阳性率为 70% 和 75%。这些说明 *Wolbachia* 可能是通过某种途径来干扰登革病毒在伊蚊体内的复制,有可能增强了蚊虫体内的免疫反应性^[32],或者有可能直接干扰了病毒复制的某一阶段。

Wolbachia 在控制登革热传播时可能不只是通过某个单一途径,若以上 3 种途径综合起来,达到的控制效率可能是最高的。虽然 *Wolbachia* 在实验室中可以干扰登革病毒复制,但是要真正实施在野外放养还必须考虑许多问题。例如,将感染 *wMelpop* 的蚊虫释放到自然界时必须建立起感染的动力学参数模型和了解感染 *wMelpop* 的蚊虫种群数量的影响等^[23]。McGraw 等^[33]甚至还发现将 *wMelpop* 转染到它的非自然宿主拟果蝇体内,*wMelpop* 的密度和毒力会随着拟果蝇的传代而不断减少。而 *wMelpop* 在埃及伊蚊体内是否也会随着传代而密度和毒力减少,若该菌的密度和毒力随着传代而减少,有必要定期向自然界释放感染 *wMelpop* 的蚊虫,而释放的数量和周期还要经过科学的计算。此外 *Wolbachia* 拥有多个菌株,不同菌株诱导的细胞质不亲和强度、对宿主寿命影响、抑制病毒复制的能力不同,因此必须经过严密筛选出合适的菌株,再转染到媒介伊蚊,才可以有效地控制登革热的媒介种群,进而控制登革病毒的传播。

3 展望

Wolbachia 在节肢动物中广泛存在,使其在研究节肢动物所传播的疾病中具有相当大的研究价值。*Wolbachia* 对蚊虫的影响被用于控制蚊虫的种群数

量,从而对常见蚊媒病的传播有控制作用,如按蚊传播的疟疾,伊蚊传播的登革热、基孔肯雅热^[29]和丝虫病^[32]。全世界每年由蚊媒病传播而导致的经济损失相当大,而 *Wolbachia* 在抑制蚊媒病的传播具有非常大的潜在优势,且在抑制登革热传播的研究中已取得了一定的进展,进一步的研究方向应该是从实验室试验向野外实践转化,并且从登革热的媒介控制逐步扩展到到其他蚊媒病控制,从根本上减少蚊媒病的传播。

参 考 文 献

- [1] Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(1):13-22.
- [2] Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions[J]. Annu Rev Entomol, 2008, 53:273-291.
- [3] Franz AW, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(11):4198-4203.
- [4] Olson KE, Higgs S, Gaines PJ, et al. Genetically engineered resistance to dengue-2 virus transmission in mosquitoes[J]. Science, 1996, 272(5263):884-886.
- [5] Mercot H, Poinot D. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents[J]. C R Biol, 2009, 332(2-3):284-297.
- [6] Werren JH, Zhang W, Guo LR. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods[J]. Proc Biol Sci, 1995, 261(1360):55-63.
- [7] Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, et al. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes[J]. Proc Biol Sci, 1998, 265(1413):2407-2413.
- [8] Czarnetzki AB, Tebbe CC. Diversity of bacteria associated with Collembola - a cultivation-independent survey based on PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2004, 49(2):217-227.
- [9] Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders[J]. Curr Microbiol, 2004, 49(3):208-214.
- [10] Bordenstein S, Rosengaus RB. Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera[J]. Curr Microbiol, 2005, 51(6):393-398.
- [11] Gorham CH, Fang QQ, Durden LA. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera) [J]. J Parasitol, 2003, 89(2):283-289.
- [12] Casiraghi M, Bain O, Guerrero R, et al. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution[J]. Int J Parasitol, 2004, 34(2):191-203.
- [13] Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction[J]. Annu Rev Microbiol, 1999, 53:71-102.
- [14] Sinkins SP. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34(7):723-729.
- [15] 宋社吾,赵彤言,董言德,等. *Wolbachia* 在我国蚊虫体内感染组织定位的透射电镜观察和 PCR 检测[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2002,9(1):26-32.
- [16] Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, et al. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the peproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*[J]. PLoS One, 2009, 4(7):e6388.
- [17] Chen WJ, Tsai KH, Cheng SL, et al. Using in situ hybridization to detect endosymbiont *Wolbachia* in dissected tissues of mosquito host[J]. J Med Entomol, 2005, 42(2):120-124.
- [18] Saridaki A, Bourtzis K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals[J]. Curr Opin Microbiol, 2010, 13(1):67-72.
- [19] Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *rosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(20):10792-10796.
- [20] Xi Z, Khoo CC, Dobson SL. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population[J]. Science, 2005, 310(5746):326-328.
- [21] McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, et al. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*[J]. Science, 2009, 323(5910):141-144.
- [22] Evans O, Caragata EP, McMeniman CJ, et al. Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*[J]. J Exp Biol, 2009, 212(Pt 10):1436-1441.
- [23] McMeniman CJ, O'Neill SL. A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(7):e748.
- [24] Ruang-areerate T, Kittayapong P. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: a potential gene driver of dengue vectors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33):12534-12539.
- [25] Turley AP, Moreira LA, O'Neill SL, et al. *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(9):e516.
- [26] Moreira LA, Saig E, Turley AP, et al. Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(12):e568.
- [27] Peng Y, Nielsen JE, Cunningham JP, et al. *Wolbachia* infection alters olfactory-cued locomotion in *Drosophila* spp. [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(13):3943-3948.
- [28] Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe, Jeffery JA, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya and *Plasmodium*[J]. Cell, 2009, 139(7):1268-1278.
- [29] Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, et al. *Wolbachia* and virus protection in insects[J]. Science, 2008, 322(5902):702.
- [30] Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*[J]. PLoS Biol, 2008, 6(12):e2.
- [31] Bian G, Xu Y, Lu P, et al. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(4):e1000833.
- [32] Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, et al. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes[J]. Science, 2009, 326(5949):134-136.
- [33] McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, et al. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(5):2918-2923.

(收稿日期:2011-03-23)

(本文编辑:姬晓云)