蜱雄性附腺分泌物及其功能的研究进展*

周丽峰 杨小龙 郑洪远 刘敬泽**

(河北省动物生理生化与分子生物学重点实验室 河北师范大学生命科学学院 石家庄 050016)

摘 要 交配是蜱类繁殖过程的关键环节,诱发雌蜱发生一系列的生理变化,并最终产卵。蜱雄性附腺分泌物在交配过程中发挥着重要作用,具有保护、活化精子,促进受精、卵巢发育和卵黄发生的功能,并对雌蜱的生殖生理行为等产生影响,如诱导雌蜱快速吸血和加速产卵。本文在简要分析蜱雄性附腺结构和分泌物生化特性基础上,系统阐述了蜱雄性附腺分泌物中各种功能因子的研究现状,着重论述其在精子获能、诱导雌蜱吸血、促进雌蜱卵巢发育和卵黄发生等方面的进展,并对未来研究提出了展望,以期为此领域的研究拓展思路。

关键词 蜱,雄性附腺,功能因子,生殖

Progress in research on the function of the male accessory gland secretion in ticks

ZHOU Li-Feng YANG Xiao-Long ZHENG Hong-Yuan LIU Jing-Ze**

(Key Laboratory of Animal Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Hebei Province, College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract Mating is an important prerequisite for tick reproduction and initiates a cascade of physiological changes in the female that eventually leads to oviposition. The male accessory gland (MAG) plays important roles during mating, including protecting and activating the spermatozoa, promoting fertilization, ovary development and vitellogenesis. It also affects female reproductive physiological activity such as inducing rapid feeding and oviposition etc. The structure and biochemical characteristics of MAG secretion are introduced briefly, and the current state of knowledge regarding its function is systematically reviewed, focusing on those factors associated with the sperm capacitation, female engorgement, ovary development and vitellogenesis. Finally, prospects for future research are outlined.

Key words tick, male accessory gland, functional factors, reproduction

蜱是一类专性吸血的外寄生重要媒介动物,传播多种危害人畜健康的病原体并导致疾病,具有极强繁殖力(Kaufman,2010)。交配在蜱类生殖过程中发挥着至关重要的作用,成功交配是雌蜱能否饱血、产卵的决定因素(Gillott,1988),未交配的硬蜱雌蜱不能饱血、产卵(个别可产少量不可育的卵,孤雌生殖种群除外)。成功交配的雌蜱其生理及行为发生一系列复杂的变化,如快速大量吸血、卵黄发生启动、卵巢迅速发育、排卵、产卵等。调节以上过程的功能物质主要来自于蜱的雄性附腺(male accessory glands,MAG)。MAG 分泌物在交配过程中,随着精子共同转移至雌蜱生殖道,对雌蜱产生诱导作用(Lomas and Kaufman,1999)。此外,MAG 分泌物还具有促进精子发生,保护、活化精子以及诱导精子获能的作用(Shepherd *et al.*,1982a,1982b)。MAG 分泌物在蜱类生殖的多个环节发挥着重要作用。

有关昆虫 MAG 分泌物的功能物质和调节机制研究较深入(Klowden and Chambers,1991;Lung *et al.*,2002;Wolfner,2002)。昆虫 MAG 分泌物具有滋养保护精子,活化进入雌虫生殖道的精子,提高雌虫生育力,降低雌虫再交配力等生物活性,还

* 资助项目:国家自然科学基金(31071979,30970406)、教育部高校博士点新教师基金(20101303120001)、河北省自然科学基金(C2008000156)、河北师范大学重点项目(L2009Z07)。

**通讯作者,E-mail:jzliu21@heinfo.net

收稿日期:2011-07-23,接受日期:2011-09-22

具有一定的抗菌、杀菌作用（Kaulenas，1992；Gillott，2003）。但蜱类此领域的研究十分薄弱，主要集中在 MAG 的形态结构、发育变化、蛋白动态等方面。MAG 分泌物在交配中的作用及对雌蜱的生理影响仅在 3 种蜱中有所报道（Kaufman，2005）。研究雄蜱附腺分泌物的功能物质，不仅可以阐明 MAG 功能因子对蜱类生殖的调控作用，揭示其生殖生物学中的一些问题，还能为寻找新的蜱类防控策略提供依据。本文就雄蜱 MAG 功能因子及其对雌蜱生殖生理和行为影响的研究进行了系统总结，以期为今后的深入研究提供参考。

1 蜱雄性附腺（MAG）结构及其分泌物的生化特性

蜱类分为 3 个科：硬蜱科、软蜱科和纳蜱科。比较解剖发现，不同蜱种其雄性生殖系统结构基本相似，均由两个管状的精巢、成对的输精管、射精管和雄性附腺（MAG）组成（Sonenshine，1991）。MAG 由背中叶、前背叶、后背叶、背侧叶、后侧叶、后复叶组成。其中背中叶和前背叶为单个结构，位于雄蜱生殖系统的中央部分，后背叶、背侧叶、后侧叶、后复叶位于背中叶和前背叶的两侧，为成对结构。

MAG 分泌物成分非常复杂，含有多种无机离子、氨基酸、碳水化合物、脂类、蛋白质、肽类和激素类等（Kaulenas，1992；Park *et al.*，1998）。电泳和色谱分析显示，MAG 所分泌的蛋白（MAGPs）组分有数十种，反映出 MAG 生理功能的多样性和复杂性。目前对于 MAG 功能因子的研究，主要集中在与雄蜱精子发育有关和影响雌蜱繁殖的蛋白或多肽。

2 MAG 分泌物的功能因子

2.1 与精子发育有关的功能因子

蜱类的精子发育包括 2 个阶段：精子发生和精子获能。前者是指形成单倍体精细胞的过程，发生于精巢中；后者是指精细胞延伸，变形为成熟精子的过程，发生于精荚或雌蜱生殖道中（Said *et al.*，1981）。精子在转运至精荚或雌蜱体内的短时间内就发生“脱帽”（顶盖打开）现象，发育成熟，变得活跃，随时准备受精。虽然诱导精子获能的因子和获能的机制尚不明确，但 MAG 分泌物在此过程中发挥着重要的作用（Kaufman，2007）。

Shepherd 等（1982a）对变异革蜱 *Dermacentor variabilis* 和非洲钝缘蜱 *Ornithodoros moubata* 的精原细胞进行体外悬浮培养，滴加饱血雄蜱的 MAG 粗提液，在 24 h 内观察到精原细胞明显的获能现象，甚至 0.01 ~ 0.03 MAG/Drop 的浓度即可引起获能反应（Shepherd *et al.*，1982a）。这种获能因子对热稳定，易被胰岛素降解，以凝胶过滤的方法检测出活性峰的分子量约为 12.5 ku。作者实验室体外培养长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis* 精巢中的精子，滴加雄蜱附腺提取物 3 h 后，精子发生“脱帽”现象。

精荚是由 MAG 分泌的粘多糖和蛋白凝结形成的壳状结构，精液注入其中进行储存和转运（Feldman-Muhsam，1991）。交配塞是雄性在交配完成后用于堵塞雌性生殖道的胶状化合物，从而阻止雌蜱与其他雄性交配。在昆虫中，交配塞由精液凝集而成，果蝇交配塞的主要成分是一种源自射精管的 38 ku 的蛋白（Lung and Wolfner，2001）。蜱类中虽然尚未发现生殖栓的报道，但精荚本身发挥着交配塞的作用。交配过程中，当精荚转运至雌蜱的生殖道时，精荚外翻形成帽状结构，将雌蜱的生殖道口堵塞，且精荚在进入雌蜱生殖道后，就被一层被膜包裹，形成一层保护屏障堵塞雌蜱的生殖道，以防止其它精液的进入，提高自身精子对卵子的占有率（Feldman-Muhsam *et al.*，1973）。在雄蜱转移精子至雌蜱生殖道的过程中，MAG 分泌物发挥的主要功能是形成精荚，滋养保护精子，促进精子贮存，活化精子使精子获能以加速受精等。

2.2 促进雌蜱吸血的功能因子

硬蜱雌蜱一般需要 6 ~ 10 d 的吸血期才能饱血。吸血期包含 3 个阶段：(1) 准备期：1 ~ 2 d，雌蜱寻找吸血附着点，叮咬到宿主体上；(2) 缓慢吸血期：随后的 4 ~ 8 d，雌蜱体重较吸血前增大约 10 倍，交配发生在这个时期；(3) 快速吸血期：交配后 24 ~ 48 h 内，雌蜱快速吸血并饱血脱落，此时体重较吸血前增大约 100 倍（Balashov，1972）。一般雌蜱的产卵量与其吸血量呈正相关关系。

以纯化后的雄配偶素（matrone，来自雄蚊生殖附腺）注射给雌性埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 后，显著增加雌蚊吸血量及消化力，刺激卵巢发育（Klowden，1999，2006）。不同于昆虫的瞬时吸血

(几秒内),蜱的吸血时间长,吸血量大,MAG 分泌物对雌蜱正常饱血及交配后的生殖生理发挥着重要的作用。早期的研究发现硬蜱未交配吸血雌蜱体重只能达到交配饱血雌蜱体重的五分之一(Sonenshine, 1967; Pappas and Oliver, 1971)。Pappas 和 Oliver(1972)发现,与经射线处理或生殖孔被堵塞的雄蜱同时喂养的变异革蜱雌蜱不能正常饱血。我们实验室研究发现,长角血蜱雌蜱在没有雄蜱的情况下喂养,到缓慢吸血期后,体重不再增加,体型大小不变,不脱落,保持这种状态最长可达 20 d。一旦发生交配将在 24 ~48 h 内迅速吸血,体型膨大,饱血脱落。因此,推测在雄蜱精液中存在促进雌蜱快速吸血的功能因子,在交配时传递给雌蜱,促进雌蜱快速饱血。

雄蜱中促进雌蜱快速吸血的功能因子称为饱血因子(engorgement factor, EF)。有关 EF 的研究甚少, Weiss 和 Kaufman(2004)在构建的希伯莱花蜱 *Amblyomma hebraeum* 饱血雄蜱 T/VD cDNA 文库中筛选到与交配相关的基因,其重组蛋白通过活性检测,确认为饱血因子,命名为 recAhEF。recAhEF 由 recAhEFα (16.1 ku) 和 recAhEFβ (11.6 ku)2 条多肽构成,这 2 条多肽必须同时存在时才具有生物活性,给未交配雌蜱注射 recAhEF 能诱导其饱血,促进卵巢发育(但较正常交配饱血的雌蜱体积要小)。Donohue 等(2009)将变异革蜱雄蜱 T/VD 提取物注射到雌蜱,未发现 EF 的效应,T/VD 和 MAG 的混合物可使雌蜱饱血,因此推测 EF 存在于 MAG 中,但 MAG 中有哪些 EF 尚不明确。

2.3　促进雌蜱卵巢发育和卵黄发生的功能因子

雌蜱生殖系统的发育起始于若蜱蜕皮为成蜱的时期,但大多数硬蜱直至吸血前生殖系统仍停留在最初的发育阶段(Kiszewski *et al.*, 2001)。卵黄发生(vitellogenesis)是由外周脂肪体和中心脂肪体合成卵黄原蛋白,释放到血淋巴,由发育中的卵母细胞选择性摄取,加工形成卵黄蛋白为胚胎发育提供营养的过程(Sonenshine, 1991)。雌蜱开始吸血后,卵巢中的卵母细胞胞质开始增多,细胞表面积增大。饱血后 6 ~10 d,卵母细胞开始摄取血淋巴中的卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg),将其加工为卵黄蛋白(vitellin, Vn)并积累。卵黄发生是卵巢发育的关键。

未交配非洲钝缘蜱雌蜱吸血后,经过一个月(正常 10 d 左右)卵巢才开始发育(Connat *et al.*, 1986),但未交配雌蜱吸血后 100 d 的卵巢与饥饿时期的卵巢相似。未交配但吸血后的雌蜱即使 4 ~5 个月后再交配,也能产卵,但产卵量仅为正常雌蜱的 50%。取自非洲钝缘蜱雄蜱体内的精荚匀浆液对雌蜱的卵黄发生具有诱导作用(Sahli *et al.*, 1985; Connat *et al.*, 1986)。帕克钝缘蜱 *Ornithodoros parkeri* 雄蜱组织匀浆液注射于吸血未交配雌蜱,对卵发育和产卵有显著促进作用(Oliver *et al.*, 1984)。

Sahli 等(1985)详细描述了非洲钝缘蜱的精子获能过程,推测卵黄发生刺激因子(vitellogenesis-stimulating factor, VSF)存在的可能。解剖交配后 1 ~48 h 内的雌蜱,取出其体内的前精荚,精团(sperm masses)冲洗后以含有抗生素的培养液孵育,一段时间后离心取上清,生物活性测定表明上清能否诱导卵黄发生。交配 12 ~48 h 后的上清具有明显的 VSF 活性,且交配 12 h 后的上清活性最高。由于此时精荚的外翻过程已经完成,因此,Sahli 等(1985)推测 VSF 来源于雄蜱体内的精荚,交配时转运到雌蜱的生殖道发挥功能。将以上各组实验上清液进行蛋白电泳分析,100 ku 和 200 ku 的 2 种蛋白在交配后 12 h 的上清中含量极为丰富,Sahli 等(1985)认为这 2 种蛋白构成了 VSF。

2.4　MAG 的其他功能因子

昆虫生殖道直接与外界相通,是潜在的微生物滋生场所,对生殖会产生不利影响,为保护进入雌虫体内的精子及受精卵,雄虫通常分泌抗菌类物质随精荚进入雌虫体内。果蝇在交配过程中至少转运了 3 种抗菌肽进入雌虫体内(Lung *et al.*, 2001)。虽然已有确切的证据证实蜱类生殖腺也产生抗菌肽(Johns *et al.*, 1998, 2001),但具体成分尚不明确,是否是精液的组分也有待研究。

昆虫成功交配后,雌虫(双翅目例外)在一段时间内不再交配,表现出对雄虫的主动拒绝(不应性),这种反应是由雄性性腺分泌物引起(Jang, 1995),研究较详尽的有性敏感抑制因子(receptivity-inhibiting substances, RIS)(Kaulenas, 1992; Jang, 1995)和性肽(sex peptide, SP)(Singh *et al.*, 2002; Ram and Wolfner, 2007)。蜱类中已交

配的雌蜱不存在性接受力或性吸引力降低的现象。Lees 和 Beament(1948)在非洲钝缘蜱雌蜱的生殖道中发现多达 12 个精荚。将一只未交配雌蜱与 5 只雄蜱喂养在一起,在 2 h 内雌蜱进行了多次交配,并且交配对象不局限于一只雄蜱。多数的软蜱每进行一次血餐就产一批卵,所以在每次血餐前后都可以进行交配(Connat *et al.*,1986)。非洲钝缘蜱甚至在产卵时也可进行交配(Feldman-Muhsam,1986)。由于硬蜱一生只产一次卵,所以它们可能仅需要一次交配即可。但在硬蜱的贮精囊中发现多个精荚,对于这些精荚是来自一只还是多只雄蜱却不明了,硬蜱科雌蜱也可与不同的雄蜱进行交配(Feldman-Muhsam,1986)。

另外,作者实验室在 MAG 研究过程中发现,MAG 的粗提物具有蛋白酶和蛋白酶抑制剂活性。前者可能与顺利交配有关,后者可能为了抑制雌蜱体内的蛋白水解酶活性,保护精子免受损伤。

3 展望

蜱类 MAG 功能因子的研究已取得一定进展,为后续深入研究奠定了良好基础。但仍有许多问题尚待解决,如天然 MAG 功能因子的分离纯化与鉴定,MAG 功能因子对雌蜱生殖调控作用及其机制,如何利用 MAG 功能因子寻求科学有效的蜱类防控对策等。这些问题的解决,不仅有助于认识蜱类生殖生物学规律,同时也在抗蜱生物制剂研发上表现出潜在的应用价值。

参考文献(References)

Balashov YS, 1972. Bloodsucking Ticks (Ixodoidea)-Vectors of Diseases of Man and Animals. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America. 161—376.

Connat JL, Ducommun J, Diehl PA, Aeschlimann AA, 1986. Some aspects of the control of the gonotrophic cycle in the tick *Ornithodoros moubata* (Ixodoidea, Argasidae)//Sauer JR, Hair JA (eds.). Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks. Chichester: Ellis Horwood. 194—216.

Donohue KV, Khalil S, Ross E, Mitchell RD, Roe RM, Sonenshine DE, 2009. Male engorgement factor: role in stimulating engorgement to repletion in the ixodid tick, *Dermacentor variabilis*. *J. Insect Physiol.*, 55(10): 909—918.

Feldman-Muhsam B, 1986. Observations on the mating behaviour of ticks//Sauer JR, Hair JA (eds.). Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks. Chichester: Ellis Horwood. 217—232.

Feldman-Muhsam B, 1991. The role of *Adlerocystis* sp. in the reproduction of argasid ticks//Schuster R, Murphy PW (eds.). The Acari: Reproduction, Development and Life-history Strategies. London: Chapman & Hall. 179—190.

Feldman-Muhsam B, Borut S, Saliternik-Givant S, Eden C, 1973. On the evacuation of sperm from the spermatophore of the tick, *Ornithodoros savignyi*. *J. Insect Physiol.*, 19(5): 951—962.

Gillott C, 1988. Arthropoda-Insecta//Adiyodi KG, Adiyodi RG(ed.). Reproductive Biology of Invertebrates (Volume Ⅲ). Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons. 319—472.

Gillott C, 2003. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu. Rev. Entomol.*, 48:163—184.

Jang EB, 1995. Effects of mating and accessory gland injections onolfactory-mediated behavior in the female Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *J. Insect Physiol.*, 41(8):705—710.

Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL, 1998. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J. Med. Entomol.*, 35(4):458—464.

Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL, 2001. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(9):857—865.

Kaufman R, 2007. Gluttony and sex in female ixodid ticks: How do they compare to otherblood-sucking arthropods? *J. Insect Physiol.*, 53(3):264—273.

Kaufman R, 2010. Ticks: physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-borne Dis.*, 1:11—22.

Kaufman WR, 2005. Assuring paternity in a promiscuous world: are there lessons for ticks among the insects? *Parasitology*, 129(Suppl): 145—160.

Kaulenas MS, 1992. Insect Accessory Reproductive Structures: Function, Structure, and Development. Springer-Verlag, New York. 224.

Kiszewski AE, Matuschka FR, Spielman A, 2001. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. *Annu. Rev. Entomol.*, 46:167—182.

Klowden MJ, Chambers GM, 1991. Male accessory gland substances activate egg development in nutritionally stressed *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.*, 37(10): 721—726.

Klowden MJ, 1999. The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. *J. Am. Mosquito Contr.*, 15(2):213—220.

Klowden MJ, 2006. Switchover to the mated state by spermathecal activation in female *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J. Insect Physiol.*, 52(7):679—684.

Less AD, Beament JW, 1948. Anegg-waxing organ in ticks. *J. Cell Sci.*, 3:291—331.

Lomas LO, Kaufman WR, 1999. What is the meaning of 'critical weight to female ixodid ticks?: A 'grand unification theory'! //Needham GR, Mitchell R, Horn DJ, Welbourn WC (eds). Acarology IX (Volume 2). Columbus: The Ohio Biological Survey. 481—485.

Lung O, Kuo L, Wolfner MF, 2001. *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *J. Insect Physiol.*, 47(6): 617—622.

Lung O, Tram U, Finnerty CM, Eipper-Mains MA, Kalb JM, Wolfner MF, 2002. The *Drosophila melanogaster* seminal fluid protein Acp62F is a protease inhibitor that is toxic upon ectopic expression. *Genetics.*, 160(1): 211—224.

Lung O, Wolfner MF, 2001. Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(6/7): 543—551.

Oliver JJ, Pound JM, Andrews RH, 1984. Induction of egg maturation and oviposition in the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *J. Parasitol.*, 70(3):337—342.

Pappas PJ, Oliver JJ, 1971. Mating necessary for complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *J. Georgia Entomol. Soc.*, 6:122—124.

Pappas PJ, Oliver JH, 1972. Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea). 2. Analysis of the stimulus for rapid and complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Med. Entomol.*, 9(1):47—50.

Park YI, Ramaswamy SB, Srinivasan A, 1998. Spermatophore formation and regulation of egg maturation and oviposition in female *Heliothis virescens* by the male. *J. Insect Physiol.*, 44(10):903—908.

Ram KR, Wolfner MF, 2007. Sustained post-mating response in *Drosophila melanogaster* requires multiple seminal fluid proteins. *Plos Genet.*, 3(12):2428—2438.

Sahli R, Germond JE, Diehl PA, 1985. *Ornithodoros moubata*: Spermateleosis and secretory activity of the sperm. *Exp. Parasitol.*, 60(3):383—395.

Said AE, Swiderski Z, Aeschlimann AA, Diehl PA, 1981. Fine structure of spermiogenesis in the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae): late stages of differentiation and structure of the mature spermatozoon. *J. Med. Entomol.*, 18(6):464—476.

Shepherd J, Levine S, Hall JD, 1982a. Maturation of tick spermatozoa *in vitro*. *Int. J. Invertebr. Reprod.*, 4(5): 311—321.

Shepherd J, Oliver JH, Hall JD, 1982b. A polypeptide from male accessory glands which triggers maturation of tick spermatozoa. *Int. J. Invertebr. Reprod.*, 5(3):129—137.

Singh SR, Singh BN, Hoenigsberg HF, 2002. Female remating, sperm competition and sexual selection in *Drosophila*. *Genet. Mol. Res.*, 1(3):178—215.

Sonenshine DE, 1967. Feeding time and oviposition of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodidae) as affected by delayed mating. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 60(2): 489—490.

Sonenshine DE, 1991. Biology of Ticks. Vol. 1. Oxford University Press, New York. 305—324.

Weiss BL, Kaufman WR, 2004. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *PNAS*, 101(16):5874—5879.

Wolfner MF, 2002. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, 88(2):85—93.