

DOI:10.13350/j.cjpb.240121

• 综述 •

泡型棘球蚴病的免疫预防现状*

李文桂**,陈雅棠

(重庆医科大学 附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘要】 多房棘球绦虫感染导致的泡型棘球蚴病是一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病,采用疫苗防治该病是当前研究的热点之一。EmII/3、Em14-3-3、EMY162、TSP3、CRT、EmLDH、GluT1 和 TPx 蛋白是几种常见的疫苗候选分子,Em 疫苗的种类有死疫苗、DNA 疫苗、重组抗原、表位肽和载体介导疫苗等。本文将对这方面的研究现状进行综述。

【关键词】 泡型棘球蚴病;多房棘球绦虫;疫苗;综述

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)01-0101-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Jan;19(1):101-106,112.]

The status in the research of immunoprophylaxis of alveolar echinococcosis

LI Wengui, CHEN Yatang (*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*)

【Abstract】 Alveolar echinococcosis, its pathogen agent is *Echinococcus multilocularis*, is one type of zoonosis seriously endangering human health, it recently becomes highlight to control this disease by use of the vaccine. EmII/3, Em14-3-3, EMY162, TSP3, CRT, EmLDH, GluT1 and TPx are many kinds of effective candidate molecules of vaccine, Em vaccines include death vaccine, DNA vaccine, recombinant protein, epitope peptides, vector-based vaccine. The review outlines the status in the research of immunoprophylaxis of alveolar echinococcosis.

【Key words】 alveolar echinococcosis; *Echinococcus multilocularis*; vaccine; review

***泡型棘球蚴病 (alveolar echinococcosis, AE), 即泡球蚴病, 又称多房棘球蚴病 (echinococcosis multilocularis)、泡型包虫病 (alveolar hydatid disease) 或多房包虫病 (multilocular hydatid disease), 是由多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, Em) 的续绦期幼虫寄生在人体肝脏引起的一种严重危害人体健康的人畜共患寄生虫病, 是国家卫健委规划防治的重点寄生虫病之一。AE 主要流行于北半球高纬度地区, 从加拿大北部、美国阿拉斯加州、日本北海道、俄罗斯西伯利亚到法国东部、德国南部、比利时、澳大利亚、列支敦士登、捷克、波兰、奥地利和瑞士等国家。在国内主要流行于宁夏、新疆、青海、甘肃、四川、西藏、内蒙古和黑龙江等 8 省区。

Em 幼虫称泡球蚴 (alveolar hydatid cyst), 为淡黄色或白色的囊状团块, 常由无数大小囊泡相互连接聚集而成。囊泡圆形或椭圆形, 直径为 0.1~0.7 cm, 囊泡内含透明囊液和许多原头蚴, 人体感染时只含胶状物而无原头蚴, 囊泡外壁角皮层很薄且常不完整, 整个泡球蚴与宿主间无纤维组织被膜分隔。泡球蚴多以外生性出芽生殖不断产生新囊泡长入组织, 少数也可由内芽生成隔膜而分离出新囊泡。泡球蚴一般在 1~2 年占据整个肝脏, 呈葡萄状的囊泡群还可向器官表面蔓延至腹腔内, 犹如恶性肿瘤; 泡球蚴还可通过血循环、淋巴等途径转移至肺脑等器官, 危害极大, 被视为最致命的蠕虫感染之一。健康教育是预防 AE 的根本措施, 早期或病灶较为局限的病例首选外科手术, 常采用微创外科、经皮介入治疗、超声引导热消融术或肝移植等, 但术后复发率较高, 同时对人体损伤较大; 不宜手术的病例可采用大剂量、长疗程的化学合成药物如阿苯达唑、

甲苯哒唑、氟苯哒唑、甲苯咪唑、丙硫咪唑、苯硫氨酯、吡喹酮或环孢菌素 A 等进行化疗; 也可采用中药汉防己甲素或免疫调节剂 IFN- γ 等进行治疗, 临床发现这些药物存在一定的毒副作用, 部分患者不能耐受, 同时某些化疗患者可产生耐药性, 这就需要研究更有效的防治措施^[1]。

早期研究表明宿主的腹腔巨噬细胞和肝枯否细胞可杀伤 Em 原头蚴; C57BL/6j 鼠、BALB/c 鼠和 AKR/j 鼠容易感染 Em 原头蚴, 而 C57BL/10 鼠、A/j 鼠和 NMRI 鼠则对 Em 原头蚴具有抵抗力; C57BL/6j 鼠和 AKR/j 鼠感染 Em 原头蚴后产生较弱的迟发性超敏反应, 脾 CD4⁺ T 细胞减少, CD8⁺ T 细胞增多, 脾淋巴细胞增殖较弱, 血清 IgG1、IgG2a 和 IgG3 水平较低; BALB/c 鼠感染 Em 原头蚴后脾 CD4⁺ T 细胞减少, CD8⁺ T 细胞的数目增多, 脾细胞产生低水平的 IL-2 和高水平的 IL-4; A/j 鼠感染 Em 原头蚴后脾细胞增殖反应明显, 可产生高水平的 IL-2 和 IFN- γ , 而 NMRI 鼠感染 Em 原头蚴后肝组织的赖氨酸氧化酶活性增加, 胶原生成增多, 故可抑制 Em 原头蚴的生长^[2-3]。近期研究提示小鼠感染 Em 原头蚴后脾自然杀伤细胞呈抑制型表型, Th1 和 Treg 细胞减少, Th2 和 Th17 细胞增多, 脾 CD4⁺ T 细胞转录因子 T-bet 的 mRNA 表达降低, 而

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 30801052, 30671835, 30500423, 30200239)。

** **【通讯作者(简介)】** 李文桂 (1967-), 男, 湖北郧县人, 博士, 研究员, 主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。E-mail: cqliwengui@163.com

GATA-3 和 LAG3 的 mRNA 表达升高,导致免疫功能失衡,造成 Em 原头节寄生^[4-8];脾脏大量募集 CD8⁺ T 细胞和 Ly-6c 巨噬细胞, Ly-6c^{high} 巨噬细胞向 Ly-6c^{low} 转变,诱导小鼠免疫耐受,利于 Em 原头节寄生;肝区募集 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞,肝枯否细胞由抗炎的 M1 型向抑炎的 M2 型极化,该过程受 circRNA 和 miRNA 调控,并与靶基因形成复杂的 ceRNA 调控网络^[9-11];脾细胞 miRNA 呈现差异性表达,差异表达的 miRNA 主要集中在一些免疫相关的信号通路上,可能在对抗 Em 的免疫应答中起作用^[12]。这些研究说明免疫应答在 Em 的感染过程中呈现 3 个明显阶段,早期表现为 Th1/Th2 混合型应答,中期以 Th2 应答为主,晚期出现 T 细胞耗竭状态,这为研制 Em 疫苗提供了理论依据。

Em 疫苗研究经历了死疫苗、DNA 疫苗、重组抗原、表位肽、载体介导疫苗这几个研究阶段。微生物减毒株是常见的疫苗载体,这些载体介导的疫苗具有灭活疫苗和活疫苗的优势,能主动感染宿主的细胞,协助外源基因有效进入细胞,产生细胞因子和趋化因子,从而诱导长期的免疫应答。本研究拟概述 AE 免疫预防的研制现状。

1 死疫苗

早期用 Em 虫卵、六钩蚴、原头节分泌物或其匀浆接种小鼠后再口服 Em 虫卵进行攻击可产生一定程度的保护力,但抗原大批量供应限制了其广泛应用^[13]。

2 DNA 疫苗

将 Em 原头节的总 RNA 作为模板扩增 EmII/3 和 Em10 基因,序列分析表明 EmII/3 为 Em10 序列的一部分^[14]。通过肌肉注射将 100 μg 的 pCD-EmII/3 接种 BALB/c 鼠,在初次注射后 2 和 4 周加强 2 次,结果显示,血清 IgG、IgG1、IgG2a 和 IgG2b 在第一次注射后 4~7 周升高,在第一次注射后 7 周提升较快;在第一次注射后 7 周显示脾细胞增殖,产生低水平的 IFN-γ,但不产生 IL-4 和 IL-12;随后的保护力实验表明免疫鼠的减蚴率可达 71.17%,脾细胞分泌高水平的 IFN-γ 和 TNF-α,但 IL-4 分泌水平降低,流式细胞仪证实脾 CD4⁺ T 细胞亚群的数目显著增加,脾细胞的凋亡发生率降低,提示 pCD-Em10 可诱导泡球蚴感染小鼠产生一个保护性的免疫反应^[15,16]。

3 重组抗原

常见的重组抗原有 EmII/3、Em14-3-3、EMY162、TSP3、CRT、EmLDH、GluT1 和 TPx 蛋白等,它们都是已经报道的疫苗候选分子。

3.1 EmII/3 将 EmII/3 基因插入 pGEM-11zf 得 pGEM-EmII/3,与 pET32α 重组得 pET32α-EmII/3,将其转化大肠埃希菌 BL21(DE3),筛选培养后经免疫印渍证明 AE 患者血清识别重组菌表达 83 ku 的 EmII/3-TrX 融合蛋白;将 100 μg 重组蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次注射后 2 和 4 周强化 2 次,在初次注射后 6 周显示血清 IgG1 和 IgG2b 抗体提升,脾细胞增殖,产生低水平 IFN-γ,但不产生 IL-4^[17-18]。

3.2 Em14-3-3 蛋白 Em14-3-3 蛋白可与 EGF、TGF-β 和 IGF 等生长因子受体结构域互作,激活 Raf-Ras 介导的 MAP 激酶途径,通过磷酸化 BAD 整合抑制凋亡,是一种凋亡抑制分子,在 Em 增殖分化过程中发挥重要作用^[19]。借助皮下注射将 100 μg 的重组 Em14-3-3 蛋白加 Quil A、MDP 或铝佐剂接种恒河猴 (*Macaca mulatta*),在初次接种后 2 和 4 周加强 2 次,显

现血清 IgG 在第一次接种后 4~12 周升高,在第一次接种后 7 周升高,并可持续至第一次接种后 10 月,以重组蛋白加铝佐剂免疫组的效果最佳^[20]。将 Em14-3-3 蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,再用 Em 原头节攻击可获得 83.28% 的泡球蚴减重率^[21]。

3.3 EMY162 蛋白 Em 原头节、泡球蚴、幼虫和成虫都含有 EMY162 蛋白,序列分析表明它与 Em95 的核苷酸和氨基酸序列分别存在 52.8% 和 31.4% 的同源性,提示 EMY162 属于 Em95 蛋白家族^[22]。将 50 μg 重组 EMY162 蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次接种后 3 和 6 周重复 2 次,在初次接种后 8 周口服 200 个 Em 虫卵进行攻击,在攻击后 4 周发现免疫组的泡球蚴减重率为 74.2%;将重组 EMY162 蛋白皮下注射大白兔可诱导高水平的血清 IgG,效价可达 1:512 000^[23-24]。

霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 和大肠埃希菌肠毒素 B 亚单位 (LTB) 是常用的免疫佐剂。人们制备了 CTB-emy162 和 LTB-emy162 融合蛋白,将它们加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次注射后 1、2 和 3 周加强 3 次,在初次注射后 6 周显示血清 IgG、IgG1、IgG2a 和 IgM 升高;脾细胞增殖并产生高水平的 IFN-γ 和 IL-4;流式细胞仪提示脾 IFN-γ⁺ 和 IL-4⁺ CD4⁺ T 细胞的数目增多;此时腹腔注射 1 000 个 Em 原头节进行攻击,在攻击后 4 月发现免疫组的泡球蚴减重率为 81.6%^[25,26]。

3.4 TSP3 蛋白 四跨膜蛋白 3 (tetraspanin 3, TSP3) 位于 Em 原头节的胚层中,主要参与细胞的增殖、分化、融合和迁移以及信号传导等过程^[27]。将人工合成的 TSP3 基因插入 pCzn1 得 pCzn1-TSP3,转化大肠埃希菌 Arctic Express (DE3) 株,筛选培养后通过 Western 杂交证明重组菌表达 11 ku 的 TSP3 蛋白可被 AE 患者的血清所识别。通过皮下注射将 20 μg 的 TSP3 蛋白加弗氏佐剂接种 BALB/c 鼠,在初次注射后 3 和 6 周重复 2 次,在初次注射后 8 周显示血清 IgG 升高,此时口服 400 个 Em 虫卵进行攻击,在攻击感染后 1 月发现免疫组的泡球蚴减重率为 33.38%^[28,29]。

3.5 CRT 蛋白 钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 是一种钙离子结合蛋白,具有多种生物学功能^[30]。将 1100 bp 的 CRT 基因插入 pGEX-4T-2 得 pGEX-CRT,转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 株,筛选培养后经免疫印渍证明 AE 患者的血清识别重组菌表达 72 kDa 的 CRT 蛋白。借助皮下注射将 25 μg 重组 CRT 蛋白加弗氏佐剂免疫 BALB/c 鼠,在初次注射后 2 和 4 周强化 2 次,在初次注射后 8 周显示血清 IgG 升高,RT-PCR 证实脾细胞 IL-2、IFN-γ、IL-4、IL-5 和 IL-10 的 mRNA 转录增高,此时腹腔注射 2000 个 Em 原头节进行攻击,在攻击后 14 周发现免疫组的泡球蚴减重率为 43.16%^[31,32]。

3.6 EmLDH 蛋白 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 是糖酵解途径的关键酶之一,对 Em 的生存至关重要。以 Em 原头节的总 RNA 为模板扩增 996 bp 的 LDH 基因,将其插入 pET156 得 pET156-LDH,转化大肠埃希菌 Rosetta (DE3) 株,筛选培养后借助 Western blot 证实 AE 患者的血清结合重组菌表达 38 ku 的 LDH 蛋白^[33]。

3.7 GluT1 蛋白 Em 主要从宿主获取葡萄糖作为营养物质,葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GluT1) 含有 12 次跨膜

结构域,是 Em 获取葡萄糖的转运体^[34]。将人工合成的 GluT1 基因插入 pCzn1 得 pCzn1-GluT1,转化大肠埃希菌 Arctic Expre(DE3)株,筛选培养后经 Western 杂交表明重组菌表达 13KDa 的 GluT1 蛋白可被 AE 患者的血清所识别^[35]。

3.8 TPx 蛋白 硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase, TPx)主要保护 Em 免受自身新陈代谢或抵抗宿主免疫细胞产生的双重氧化损伤^[36]。将 Em 原头节的总 RNA 用作模板克隆 582 bp 的 TPx 基因,将其插入 pET28 α 得 pET28-TPx,转化大肠埃希菌 BL21(DE3)株,筛选培养后通过 Western 印迹提示 AE 患者的血清结合重组菌表达 26 ku 的 TPx 蛋白。用 50 μ g 重组 TPx 蛋白加弗氏佐剂皮下注射昆明鼠,在初次注射后 2 和 4 周重复 2 次,在初次注射后 5 周发现血清 IgG 升高,滴度为 1:256 000^[37]。

4 表位肽

免疫细胞通常难于借助其表面受体识别整个蛋白质分子,而仅识别抗原肽上的表位。表位一般只占 5~7 个氨基酸残基或单糖残基大小,最多不超过 20 个氨基酸残基。常见的抗原优势表位肽有 Em95、Em18、肌切蛋白、LAP、GILE 和 ETBM 表位肽等。

4.1 Em95 表位肽 软件预测提示 Em95 蛋白含有 3 个 T 和 B 细胞联合表位。通过皮下注射用 20 μ g 重组 Em95 蛋白加皂素接种 BALB/c 鼠,在初次注射后 2 和 4 周加强 2 次,在初次注射后 6 周口服 3 000 个 Em 虫卵进行攻击,在攻击后 6 周发现免疫组的泡球蚴减重率为 78.5%~82.9%^[38,39]。

4.2 Em18 表位肽 序列分析表明 Em18 蛋白是 Em10 蛋白水解后产生的一个新片段,软件预测显示 Em18 蛋白含有 8 个 B 细胞表位^[40]。

4.3 肌切蛋白表位肽 肌切蛋白(severin)具有钙离子依赖的微小切割活性,参与细胞免疫、分泌和运动的调节;该蛋白具有 12 个磷酸化位点,参与信号传导过程中的磷酸化/去磷酸化,与 Em 的免疫逃避有关。软件预测表明肌切蛋白含有 5 个 T 和 B 细胞联合表位^[41,42]。

4.4 LAP 表位肽 亮氨酸氨肽酶(Leucyl aminopeptidase, LAP)利用高度保守的六聚体结构和双核金属中心选择性从多肽中裂解 N 端氨基酸,在 Em 营养吸收中发挥作用,具有较好的免疫原性^[43]。软件预测提示 LAP 含有 9 个 T 细胞表位和 20 个 B 细胞表位^[44]。借助皮下注射将 50 μ g 重组 LAP 蛋白加弗氏佐剂接种 BALB/c 鼠,在初次接种后 1 和 2 周加强 2 次,在初次接种后 5 周显现血清 IgG 升高,LAP 的 6 个 T 细胞表位肽或 3 个 B 细胞表位肽可刺激脾细胞增殖,ELISPOT 提示 IFN- γ ⁺ 和 IL-4⁺ SFCs 细胞的数目增多^[45,46]。

4.5 GILE 表位肽 由于单个表位的分子量小,导致免疫原性较弱和结构不稳定,推测将各个抗原的表位串联数次可增强重组蛋白的免疫原性和稳定性^[47]。GILE 表位肽含有 EMY162 蛋白和 LAP 蛋白的优势抗原表位,其串联方式为 EMY162₉₅₋₁₀₄-LAP₄₆₄₋₄₇₉-LAP₄₉₅₋₅₁₀-LAP₃₉₆₋₄₁₀-EMY162₁₀₆₋₁₂₁-LAP₅₀₄₋₅₁₈-EMY162₉₅₋₁₀₄112-126;将人工合成的 GILE 基因插入 pCzn1 得 pCzn1-GILE,转化大肠埃希菌 BL21(DE3)株,筛选培养后借助 Western 杂交表明 AE 患者的血清识别重组菌表达 45 ku 的 GILE 蛋白^[48]。

4.6 ETBM 表位肽 ETBM 表位肽含有 EMY162₇₋₁₃、EMY162₃₆₋₄₈、TSP3₃₃₋₄₂ 和 TSP3₈₀₋₉₀ 的表位序列。将人工合成 600 bp 的 ETBM 基因插入 pCzn1 得 pCzn1-ETBM,转化大肠埃希菌 Arctic Express(DE3)株,筛选培养后经免疫印迹提示重组菌表达 26KDa 的 ETBM 蛋白可被 AE 患者的血清所结合;用 50 μ g 重组 ETBM 蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次注射后 2 和 4 周强化 2 次,在初次注射后 6 周显示血清 IgG、IgG1、IgG2a、IgE、IgA 和 IgM 升高;脾细胞增殖并产生高水平的 IFN- γ 和 IL-4;此时腹腔注射 1 000 个 Em 原头节进行攻击,在攻击后 4 月发现免疫组的泡球蚴数目减少和重量降低^[49]。

5 载体介导的疫苗

载体介导的疫苗包括:重组鼠伤寒沙门氏菌(rSt-EmII/3-10/GAPDH)、重组卡介苗(rBCG-Em II /3/Em14-3-3)、重组两歧双歧杆菌(rBb-Em II /3-Em14-3-3)和重组慢病毒(rLV-severin)疫苗等。

5.1 rST 疫苗 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, St)具有粘膜免疫佐剂的作用,可诱导宿主产生粘膜免疫和全身免疫应答,并可有效表达插入的外源基因^[50]。将 EmII/3-10 基因插入 pUR278 得 pVM-EmII/3-10,将其转化 St 减毒株 LT2,筛选培养后经 SDS-PAGE 证明重组菌表达 130 ku 的 β -gal-EmII/3-10 融合蛋白;将 1×10^8 CFU 疫苗皮下注射或 2×10^9 CFU 疫苗口服 C57BL/6j 鼠,在初次接种后 2 和 4 d 加强 2 次,在初次接种后 3 周显示免疫鼠的脾细胞增殖,血清抗体升高;与犬接种比较提示免疫犬的脾细胞增殖弱于免疫鼠,但抗体水平高于免疫鼠^[51]。

3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是糖酵解途径的关键酶之一。将 GAPDH 基因插入 pBS-SK 得 pBS-GAPDH,与 pMMB207 重组得 pMMB207-GAPDH,转化 St 减毒株,筛选培养后通过 SDS-PAGE 证实重组菌表达 37 ku 的 GAPDH 蛋白;将 2×10^{10} CFU 疫苗口服或 5×10^5 CFU 疫苗腹腔注射 BALB/c 鼠,在初次免疫后 3 周强化 1 次,在初次免疫后 5 周口服 1 750 个 Em 虫卵进行攻击,在攻击后 10 周显现口服免疫组和腹腔注射组的减蚴率分别为 65.3%和 79.80%^[52]。

5.2 rBCG 疫苗 卡介苗(*Bacille Calmette-Guerin*, BCG)是一种免疫佐剂,可开发为疫苗载体^[53]。李文桂等^[54-61]以 Em 原头节的总 RNA 为模板克隆 Em II /3 基因,将其插入 pBCG 得 pBCG-Em II /3,电穿孔转化 BCG,筛选培养后经免疫印迹证明 AE 患者血清识别重组菌表达的 65 ku 的 Em II /3 抗原。将 10^6 CFU 疫苗皮下注射或 10^5 CFU 疫苗滴鼻 BALB/c 鼠,显现血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 均在接种后 2~18 周升高,分别在接种后 10、4 和 4 周达最高水平;血清 IgG1 和 IgE 均在接种后 2~18 周显著降低,分别在接种后 4 周和 18 周达最低水平;血清 IgG3 在接种后 10~12 周增加,在接种后 12 周达最高水平;脾 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的数目分别在接种后 2~10 周和 2~18 周升高,分别在接种后 4 和 10 周达最高水平;脾细胞培养上清液的 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4 分别在接种后 2~6 周、2~6 周、2~10 周和 8~10 周升高,分别在接种后 4、4、8 和 10 周达最高水平。在疫苗接种后 8 周腹腔注射 100 个 Em 原头节进行攻击,在攻击感染后 18 周显现免疫组的减蚴率为

63.23%~74.70%，血清 IgG、IgG2a、IgG2a 和 IgE 水平明显升高，IgG1 降低，IgG3 无明显变化；皮下注射组的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群数目显著高于鼻腔内接种组；皮下注射组的脾细胞凋亡发生率显著低于鼻腔内接种组。

将重组 BCG-Em14-3-3 疫苗接种 BALB/c 鼠也可诱导有效的免疫应答，攻击实验可获得 59.41%~82.35% 的减蛔率^[63-68]。将 rBCG-Em II /3 和 rBCG-Em14-3-3 疫苗按 1:1 的浓度比例混匀，组成混合疫苗后接种 BALB/c 鼠同样诱导有效的免疫应答，攻击实验可获得 45.29%~76.47% 的减蛔率^[69-75]。

5.3 rBb-Em II /3-Em14-3-3 疫苗 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacteria bifidum*, Bb) 是一种肠道益生菌，但其细胞壁较厚，难于转染外源 DNA。人们构建了穿梭载体 pRM1 和 pMB2 并摸索了外源 DNA 转化 Bb 的电穿孔条件^[76,77]。由于宿主 MHC 分子的多样性和 Em 抗原结构的复杂性，宿主将针对抗原的多个表位产生免疫反应，使得单一抗原成分诱导宿主产生的保护性免疫应答效果往往较低。杨梅和李文桂等^[78-84]采用序贯 PCR 合成 Em II /3-Em14-3-3 融合基因，将其插入 pGEX-1λT 得 pGEX-Em II /3-Em14-3-3；电穿孔转化 Bb，筛选培养后经免疫印渍证明 AE 患者血清识别重组菌表达的 119 ku 的融合蛋白。为了研究 rBb 疫苗的免疫应答类型及动态变化规律，将 5×10⁶ CFU 疫苗皮下注射或 5×10⁵ CFU 疫苗滴鼻 BALB/c 小鼠，显示血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 均在接种后有不同程度的增高；IgE 在接种后 10~12 周达较高水平；淋巴细胞增殖在接种后 10~14 周达较高水平；CD4⁺ T 细胞的数目均在接种后 4~8 周升高，而 CD8⁺ T 细胞的数目轻微增加；脾细胞培养上清液 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 在接种后 2~6 周之间达较高水平，但以 IFN-γ 和 TNF-α 升高较为明显。为了研究 rBb 免疫抗 Em 原头节攻击的保护性免疫机制，将 5×10⁶ CFU 疫苗皮下注射或 5×10⁵ CFU 疫苗滴鼻 BALB/c 小鼠，在免疫 12 周后用 100 个 Em 原头节进行攻击，在攻击感染后 18 周发现免疫组的减蛔率为 13.56~78.25%，以皮下注射组较为明显；皮下注射组的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平高于滴鼻组，脾细胞增殖，脾 CD4⁺ 亚群显著增加，脾细胞分泌高水平的 IL-12、IFN-γ 和 TNF-α，但 IL-10 水平降低；脾细胞的凋亡发生率降低，以皮下注射组较为显著。

5.4 rLV-severin 疫苗 慢病毒 (Lenivirus, LV) 是一种源自 HIV-1 的载体，可以将携带的外源基因转移给各种细胞和组织，是一种理想的疫苗载体^[85]。将肌切蛋白 (severin) 基因插入慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 得 pCDH-severin，加辅助质粒 psPAX2 和 pSD 共同转染 293 T 细胞，筛选培养后通过免疫荧光提示重组病毒可呈现融合蛋白的分子；将重组病毒与人肝细胞 L02 株共同孵育 72 h，荧光定量 PCR 显示细胞株 severin 表达升高，侵袭和迁移能力增强^[86]。

6 结语

尽管大部分现有 Em 疫苗都可诱导宿主产生一定的保护力，但它们诱导的保护力尚未达到人们所期望的水平，同时这些疫苗还存在下述缺点：由于很难成批供应大量 Em 虫卵、六钩蚴或泡球蚴，因而用其免疫接种在实际工作中受到限制；DNA 疫苗操作简单，能同时诱导体液免疫、T_H 细胞和 CTL 应答，但 DNA 可能整合到宿主细胞的基因组中，有引起原癌基因

活化和抑制基因失活的危险；重组蛋白要经过基因克隆、表达和蛋白纯化等复杂过程，成本高，同时只能诱导体液免疫和 T_H 细胞应答，但不能诱导细胞毒性 T 淋巴细胞应答 (CTL)；尽管表位肽是抗原特异性激活宿主免疫应答的最小单位，可以直接诱导有效的免疫应答，但其免疫原性较弱；重组沙门氏菌苗的表达产物与天然蛋白存在差异，表达水平较低；重组 BCG 疫苗生长缓慢，营养要求高，培养一代需 10 多个小时；转化效率低，外源基因的表达需特殊载体等；重组 Bb 疫苗长期低剂量口服有可能产生免疫耐受现象；慢病毒载体可能具有潜在的致癌和致病性，因此，还需要开发新的疫苗载体，把 Em 疫苗的研究推向一个新的高度。现有研究表明黄热病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、水疱性口炎病毒、牛疱疹病毒 I 型、新城疫病毒、鸡痘病毒和新培斯病毒等病原体都是有效的疫苗载体^[87-93]，构建这些载体介导的 Em 疫苗可能具有极为广阔的开发应用前景。

随着科技的进步，人们对 Em 的基因组学、蛋白质组学、代谢组学、转录组学以及表观遗传学等进行深入探索，从而阐明 Em 蛋白的结构与功能的关系，筛选新的抗原分子，构建多价高效的复合基因疫苗或含有基因佐剂的混合基因疫苗或多表位疫苗；Em 的生活史复杂，不同发育阶段的免疫原性和抗原构成有差异，各阶段都有保护性抗原，不同种株的免疫原性不同，筛选具有种间交叉免疫保护的高度保守性共同抗原，对不同虫种不同阶段的保护性抗原进行鉴定和分离，筛选保护性强的抗原，将其联合制成多价疫苗；关注 Em 的虫株变异与宿主遗传的关系；探索基于类转录激活因子效应的核酸酶 (TALEN) 或基于 CRISPR/cas9 的基因编辑技术用于疫苗研究；探究这些疫苗的免疫原性、转化效率、MHC 限制性以及能否长期在宿主体内表达；研究新型佐剂、疫苗载体和制备融合蛋白，提高疫苗的免疫原性；在宿主体内准确评估新型疫苗分子的保护性免疫机制；摸索纳米微粒技术引入新型疫苗是否可延长免疫应答的时间，诱导记忆性 T 细胞的产生；阐明这些问题有助于开拓载体介导的 Em 疫苗的应用前景。

【参考文献】

- [1] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: advances in the 21 century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [2] Walbaum S, Nahhas SA, Gabrion C, et al. *Echinococcus multilocularis*: in vitro interactions between protoscolices and Kupffer cells[J]. Parasitol Res, 1994, 5(2): 381-387.
- [3] Gottstein B, Wunderlin E, Tanner I. *Echinococcus multilocularis*: parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible (AKR, C57Bl/6J) or resistant (C57Bl/10) to secondary alveolar echinococcosis[J]. Clin Exp Immunol, 1994, 96(2): 245-252.
- [4] 马海长, 吐尔洪江·吐崧, 沙地克·阿帕尔, 等. 多房棘球蚴感染小鼠辅助 Th17、转录因子 RORγδ 及相关细胞因子的实验研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(8): 694-698.
- [5] 李玉鹏, 吐尔洪江·吐崧, 沙地克·阿帕尔, 等. 多房棘球蚴感染 BALB/c 小鼠转录因子 T-bet、GATA-3 mRNA 表达的实验研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(6): 530-534.
- [6] 侯昕伶, 李玲慧, 李亮, 等. 多房棘球蚴感染小鼠脾 CD4⁺ T 细胞亚群及其功能耗竭的变化[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(5): 611-618, 624.

- [7] 李玲慧,王伟,候昕伶,等. 多房棘球蚴感染对小鼠脾自然杀伤T细胞及其亚群的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2021,39(3):311-317.
- [8] 曹得萍,张耀刚,姜博蟠,等. 细粒棘球蚴和多房棘球蚴感染对balb/c小鼠淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国人兽共患病学报,2021,37(5):421-425.
- [9] 章宁,张传山,李智德,等. 多房棘球蚴感染对小鼠肝脾淋巴细胞及其亚群的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2020,38(11):30-35.
- [10] 候娇,温浩,王明坤,等. 多房棘球蚴感染小鼠脾脏巨噬细胞亚群及其极化表型的变化[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2021,39(6):771-778.
- [11] 李艳萍,刘婷丽,李红,等. 多房棘球蚴诱导小鼠枯否细胞极化相关ceRNA调控网络的构建与分析[J]. 畜牧兽医学报,2022,53(12):4410-4418.
- [12] 仲顺虎,孙月,郭小腊,等. 多房棘球蚴感染小鼠脾淋巴细胞中差异表达miRNA的鉴定及其生物信息学分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2022,40(3):288-295.
- [13] Heath DD, Holcman B. Vaccination against *Echinococcus* in perspective[J]. Acta Trop,1997,67(1):37-41.
- [14] 王昌源,陈雅棠,黄爱龙,等. 四川株多房棘球蚴虫 Em10(EmII/3)抗原基因的克隆及序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002,20(6):374-375.
- [15] 王昌源,张洪花,陈雅棠,等. 四川株多房棘球蚴虫 elp 基因核酸疫苗诱导免疫应答的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志,2006,22(5):444-449.
- [16] 李文桂,朱佑明,王鸿. pCD-Em10 对泡球蚴感染小鼠免疫应答的影响[J]. 中国免疫学杂志,2008,24(2):99-103,109.
- [17] 王昌源,陈雅棠,黄爱龙,等. 四川株多房棘球蚴虫 elp 基因融合表达载体的构建及其诱导表达[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,12(4):37-41.
- [18] 王昌源,陈雅棠,余登高,等. 多房棘球蚴虫 ELP 重组蛋白疫苗免疫 BALB/c 小鼠引起的免疫应答[J]. 免疫学杂志,2003,19(4):285-288,292.
- [19] Siles-Lucas M, Merli M, Gottstein B, et al. 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens[J]. Exp Parasitol,2008,119(2):516-523.
- [20] Lampe K, Gottstein B, Becker T, et al. Immunization of rhesus macaques with *Echinococcus multilocularis* recombinant 14-3-3 antigen leads to specific antibody response[J]. Parasitol Res, 2017,116(2):435-439.
- [21] 魏威,王蕾,周培,等. 多房棘球蚴重组抗原 14-3-3 对小鼠继发性泡球蚴病的预防与治疗效果[J]. 中国高原医学与生物学杂志,2020,41(4):252-259.
- [22] Katoh Y, Kouguchi H, Matsumoto J, et al. Characterization of emy162 encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*[J]. Biochim Biophys Acta,2008,1780(1):1-6.
- [23] Kouguchi H, Matsumoto J, Katoh Y, et al. The vaccination potential of EMY162 antigen against *Echinococcus multilocularis* infection [J]. Biochim Biophys Res Commun, 2007,363(4):915-920.
- [24] 冯琳,李润乐,刘川川,等. 多房棘球蚴表面抗原 EMY162 的原核表达及抗体制备[J]. 中国高原医学与生物学杂志,2017,38(4):235-241.
- [25] 周虎,汤锋,庞明泉,等. 多房棘球蚴重组蛋白 CTB-EMY162 的原核表达及分离纯化[J]. 青海医学院学报,2016,37(1):9-15.
- [26] Li RL, Yang QY, Guo L, et al. Immunological features and efficacy of the recombinant subunit vaccine LTB-EMY162 against *Echinococcus multilocularis* metacestode [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2018,doi.org/10.1007/s00253-018-8771-5.
- [27] Dang ZS, Watanabe J, Kajino K, et al. Molecular cloning and characterization of a T24-like protein in *Echinococcus multilocularis*[J]. Mol Biochem Parasitol,2009,168(1):117-119.
- [28] Dang ZS, Yagi K, Oku Y, et al. Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanin as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis[J]. Vaccine,2009,27(39):7339-7345.
- [29] 刁晓艳,周虎,李润乐,等. 多房棘球蚴蛋白 TSP3 的原核表达及分离纯化[J]. 中国高原医学与生物学杂志,2018,39(3):191-196.
- [30] Ferreira V, Molina MC, Valck C, et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts[J]. Mol Immun, 2004,40(17):1279-1291.
- [31] 陈路娟,戚思奇,闫艳,等. 多房棘球蚴钙网蛋白的原核表达及初步鉴定[J]. 中国病原生物学杂志,2022,17(6):653-659.
- [32] Chen LJ, Cheng Z, Xian SQ, et al. Immunization with EmCRT-induced protective immunity against *Echinococcus multilocularis* infection in BALB/c mice[J]. Trop Med Infect Dis, 2022,7:279.
- [33] 何顺伟,李洪清,李晓燕,等. 多房棘球蚴虫 LDH 基因的克隆表达及免疫原性研究[J]. 中国人兽共患病学报,2017,33(11):967-971.
- [34] Kashiide T, KiKuta S, Yamaguchi M, et al. Molecular and functional characterization of glucose transporter genes of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis* [J]. Mol Biochem Parasitol,2018,225(1):7-14.
- [35] 华国勇,郭建琴,李岷,等. 多房棘球蚴虫葡萄糖转运蛋白 1 重组抗原肽构建及原核表达方法建立[J]. 中国高原医学与生物学杂志,2021,42(21):113-119.
- [36] Robinson MW, Hutchinson AT, Dalton JP, et al. Peroxiredoxin: a central player in immune modulation[J]. Parasite Immunol, 2010,32(5):305-313.
- [37] 孙立,林仁勇,房彬彬,等. 多房棘球蚴虫硫氧还蛋白过氧化物酶基因的克隆、表达及其免疫诊断价值初步评价[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(6):634-642.
- [38] 刘献飞,丁剑冰,李玉娇,等. 多房棘球蚴虫 95 抗原 T-B 联合表位分析[J]. 中国病原生物学杂志,2012,7(10):770-772,786.
- [39] Gauci C, Merli M, Muller V, et al. Molecular cloning of a vaccine antigen against infection with the larval stage of *Echinococcus multilocularis* [J]. Infect Immun, 2002,70(7):3969-3972.
- [40] 刘献飞,王红英,周晓涛,等. 多房棘球蚴虫 Em18 基因片段的克隆与生物信息学预测[J]. 中国人兽共患病学报,2013,29(1):23-26.
- [41] Kouguchi H, Matsumoto J, Katoh Y, et al. *Echinococcus multilocularis*: two-dimensional western blotting method for the identification and expression analysis of immunogenic protein in infected dogs[J]. Exp Parasitol,2010,124(2):238-243.
- [42] 王芬,赵明才,胡容,等. 多房棘球蚴虫 severin 蛋白基因的克隆

- 及 T、B 细胞表位预测[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 11(2): 171-177.
- [43] Drinkwater N, Malcolm TR, McGowan S. M17 aminopeptidase diversity function by moderating their macromolecular assemblies and active site environment[J]. Biolchim, 2019, 166(1):38-51.
- [44] 杨宝良, 洛桑达哇, 刘文磊, 等. 多房棘球绦虫亮氨酸氨肽酶抗原表位的生物信息学预测[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2017, 38(4):223-234.
- [45] 王蕾, 杨宝良, 魏威, 等. 多房棘球绦虫亮氨酸氨肽酶的原核表达及酶活性分析[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2020, 41(4):260-265.
- [46] 王蕾, 魏威, 周培, 等. 多房棘球绦虫亮氨酸氨肽酶优势抗原表位的鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(4):292-300.
- [47] Beatriz P, Silva S, Santono RD, et al. Editorial: epitope discovery and synthetic vaccine design[J]. Front Immunol, 2018, 9(3): 826-828.
- [48] 周培, 辛明远, 马敬为, 等. 多房棘球绦虫多表位疫苗 GILE 的设计构建及原核表达[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2022, 43(2):134-141.
- [49] Li RL, Xin MY, Liu KM, et al. Production and evaluation of a novel multi-epitope bivalent vaccine against *Echinococcus multilocularis* metacestode[J]. Int J Peptide Res Ther, 2022, 28:114.
- [50] Darji A, Zurlage S, Garbe AI, et al. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, 27(4):341-349.
- [51] Gottstein B, Muller N, Cryz SJ Jr, et al. Humoral and cellular immune response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain[J]. Parasite Immunol, 1990, 12(2): 163-174.
- [52] Muller-Schollenberger V, Beyer W, Schnitzler P, et al. Immunization with *Salmonella typhimurium* delivered glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with *Echinococcus multilocularis* eggs[J]. Int J Parasitol, 2001, 31(5):1441-1449.
- [53] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, et al. New use of BCG for recombinant vaccines[J]. Nature, 1991, 351(6326):456-460.
- [54] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗构建及其表达[J]. 中国地方病学杂志, 2006, 25(5):490-493.
- [55] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗免疫小鼠后 IgG 及其亚类和 IgE 的动态观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(3):197-199.
- [56] 李文桂, 朱佑明, 王鸿. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em II /3 疫苗免疫小鼠后脾细胞亚群的动态观察[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(6): 641-643.
- [57] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗诱导小鼠脾细胞因子变化的研究[J]. 中国地方病学杂志, 2008, 27(3):276-279.
- [58] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗诱导的保护力观察[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(2):156-158.
- [59] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗诱导小鼠脾细胞亚群变化的研究[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(4):408-410.
- [60] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗促进小鼠脾细胞因子的分泌[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(9): 966-969.
- [61] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗诱导小鼠脾细胞凋亡的研究[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(6): 636-638.
- [62] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 pBCG-Em14-3-3 重组质粒的构建及其在 BCG 中的表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(12):1111-1114.
- [63] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后脾细胞亚群的动态观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(5):347-349.
- [64] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后脾细胞因子的动态观察[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(4):379-381.
- [65] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫和 Em 原头节攻击后诱导小鼠脾细胞亚群变化的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(7):687-689, 702.
- [66] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导 BALB/c 小鼠的保护力观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(8):582-584.
- [67] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗不同接种途径诱导小鼠细胞因子的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2008, 39(1):130-132.
- [68] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠脾细胞凋亡的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(9):862-863, 866.
- [69] 李文桂, 朱佑明, 王鸿. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmII/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后 IgG 及其亚类和 IgE 的动态观察[J]. 中国地方病学杂志, 2009, 28(3):280-282.
- [70] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmII/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后脾细胞亚群的动态观察[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(7):676-678.
- [71] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmII/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后脾细胞因子的动态观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(7):502-505.
- [72] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmII/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠的免疫保护力观察[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3):1276-1279.
- [73] 唐君, 李文桂, 王鸿, 等. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmII/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠脾脏 T 细胞亚群的变化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(6):575-577, 580.
- [74] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmII/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠脾细胞因子的变化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(10):911-913.
- [75] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmII/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗抑制小鼠脾细胞的凋亡[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(4):292-294.
- [76] Rossi M, Brigidi P, Matteuzzi D. An efficient transformation system for *Bifidobacterium* species[J]. Lett Appl Microbiol, 1997, 24(1):33-36.
- [77] Missich R, Sgorbati B, Donald JL, et al. Transfection of *Bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *Escherichia coli*-*Bifidobacteria longum* shuttle vector[J]. Plasmid, 1994, 32(3):208-221.

tetraspanin TSP11 gene in *Echinococcus granulosus* and evaluation Its immunoprotection in model dogs[J]. Front Vet Sci,2021,8:759283.

[49] Bohlul E, Hasanlou F, Taromchi AH, et al. TRAIL-expressing recombinant *Lactococcus lactis* induces apoptosis in human colon adenocarcinoma SW 480 and HCT 116 cells[J]. J appl Mmicro, 2019,126(5):1558-1567.

[50] Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN-γ): exploring its implications in infectious diseases[J]. Biomolecular concepts,2018,9(1):64 - 79.

[51] Zhang F, Li S, Zhu Y, et al. Immunization of mice with egG1Y162-1/2 provides protection against *Echinococcus granulosus* infection in BALB/c mice[J]. Mol Immunol,2018, 94:183-189.

[52] Azizi H, Kazemi B, Bandehpour M, et al. Modulation of the immune response to DNA vaccine encoding gene of 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen b using murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice[J]. Iran J Parasitol, 2016,11(4):480-489.

[53] Hassan H, Al Hadithi TS, Al Sakee HM. Experimental trial with a heat-shocked protoscolex extract as a vaccine candidate for protection against hydatid disease [J]. Turkiye Parazit Derg,2016,40(1):1-8.

[54] Brehm K, Koziol U. *Echinococcus*-host interactions at cellular and molecular levels[J]. Adv Parasitol,2017,95:147-212.

[55] Liu Y, Wang ZR, Pang S, et al. Evaluation of dynamic developmental processes and the molecular basis of the high body fat percentage of different proglottid types of *Moniezia expansa*. Parasit Vectors,2019,12:390.

[56] Zhan JF, Song HY, Wang N, et al. Molecular and functional characterization of inhibitor of apoptosis proteins (IAP, BIRP) in *Echinococcus granulosus*[J]. Front Microbiol,2020,11:729

[57] Zhang ZZ, Guo G, Li J, et al. Dog vaccination with EgM proteins against *Echinococcus granulosus*[J]. Infect Dis Poverty, 2018, 7:61.

[58] Xin Q, Yuan MM, Lv W, et al. Molecular characterization and serodiagnostic potential of *Echinococcus granulosus* hexokinase [J]. Parasit Vectors,2021,14:105.

[59] Lv Y, Chang L, Yang J, et al. Immunogenicity of peptide-based vaccine composed of epitopes from *Echinococcus granulosus* rEg. P29[J]. FASEB J,2023,37(4):e22819.

[60] Lightowers MW, Gasser RB, Hemphill A, et al. Advances in the treatment, diagnosis, control and scientific understanding of taeniid cestode parasite infections over the past 50 years[J]. Int J Parasitol,2021,51:1167-1192.

[61] Du X, Zhu M, Zhang T, et al. The recombinant Eg. P29-mediated miR-126a-5p promotes the differentiation of mouse naive CD4 (+) T cells via DLK1-mediated Notch1 signal pathway[J]. Front Immunol,2022,13:773276

[62] Yasen A, Li W, Aini A, et al. Th1/Th2/Th17 cytokine profile in hepatic cystic echinococcosis patients with different cyst stages [J]. Parasite Immunol,2021,43:e12839.

【收稿日期】 2023-07-25 【修回日期】 2023-10-14

(上接 106 页)

[78] 杨梅,李文桂,朱佑明. 多房棘球绦虫重组 Bb-Em II /3-Em14-3-3 疫苗的构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(10): 1026-1029.

[79] 杨梅,李文桂. 多房棘球绦虫重组 Bb-Em II /3-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠细胞因子变化的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008, 24(8):781-784.

[80] 杨梅,李文桂,朱佑明. 多房棘球绦虫重组 Bb-Em II /3-Em14-3-3 疫苗对小鼠脾细胞凋亡的影响[J]. 中国人兽共患病学报,2008, 24(11):1032-1035.

[81] 杨梅,李文桂,朱佑明. 多房棘球绦虫重组 Bb-Em II /3 疫苗的构建及其表达效率[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(6):652-656.

[82] 杨梅,李文桂,朱佑明. 多房棘球绦虫重组 Bb-Em14-3-3 疫苗的构建及其表达效率[J]. 西安交通大学学报(医学版),2008,29 (2):148-151,159.

[83] 杨梅,李文桂,朱佑明. 多房棘球绦虫重组质粒 pGEX-Em II /3-Em14-3-3 在大肠埃希菌 BL21(DE3)表达效率的研究[J]. 中国病原生物学杂志,2007,2(6):424-427.

[84] 杨梅,李文桂,刘兴超. 多房棘球绦虫重组 Bb-EmII/3-Em14-3-3 疫苗诱导 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞亚群变化的研究[J]. 中华地方病学杂志,2016,35(9):629-632.

[85] Ailor E, Betenbaugh MJ. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells[J]. Curr Opin Biotech, 1999,10(2):142-145.

[86] 王芬,赵明才,胡容,等. 多房棘球绦虫 *severin* 基因过表达慢病毒载体的构建及对入正常肝细胞侵袭、迁移能力的影响[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(3):304-310.

[87] 李文桂,陈雅棠. 重组黄热病疫苗的研制现状[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(1):123-124.

[88] 李文桂,陈雅棠. 重组委内瑞拉脑膜炎病毒疫苗的研制现状[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(2):238-240,245.

[89] 李文桂,陈雅棠. 水疱性口炎病毒介导黄病毒疫苗的研制现状 [J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(10):1234-1236.

[90] 李文桂,陈雅棠. 重组牛疱疹病毒 I 型疫苗的研制现状[J]. 中国病原生物学杂志,2021,16(6):724-727.

[91] 李文桂,陈雅棠. 重组新城疫病毒疫苗研制现状[J]. 生物技术通讯,2019,30(2):275-285.

[92] 李文桂,陈雅棠. 重组鸡痘病毒疫苗的研制现状[J]. 生物技术通讯,2019,30(5):710-721.

[93] 李文桂,陈雅棠. 新培斯病毒介导的病原体疫苗研制现状[J]. 生物技术通讯,2020,31(1):104-111.

【收稿日期】 2023-06-03 【修回日期】 2023-08-20