



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2022.04.004

<http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.04.004>

· 综述与讲座 ·

囊型棘球蚴病的免疫预防现状

李文桂 李用国

[摘要] 囊型棘球蚴病(CE)是一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病,采用疫苗防治该病是当前研究的热点之一。细粒棘球绦虫(Eg)95、EgA31、Eg14-3-3、EgM123、EgG1Y162 和 Egferr 是几种常见的疫苗候选分子,Eg 疫苗的种类包括灭活疫苗、重组抗原疫苗、病毒载体介导疫苗和细菌载体介导疫苗等。本文对这方面的研究现状进行综述。

[关键词] 囊型棘球蚴病; 细粒棘球绦虫; 疫苗; 综述

[中图分类号] R383.3;R392.11 **[文献标识码]** A

包虫病又称棘球蚴病,常分为囊型棘球蚴病(CE)和泡型棘球蚴病(AE)。其中 CE 是由细粒棘球绦虫(Eg)的续绦期幼虫寄生在人体肝、肺等脏器引起的一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病,是国家卫生健康委员会规划防治的重点寄生虫病之一。本病呈全球性分布,主要流行于牧区和半牧区。我国主要流行或散发在西北、华北、东北及西南广大农牧区的 23 个省、市和自治区,以新疆、甘肃、宁夏、青海、西藏、四川西北部和陕西多见。近年普查发现有 100 余万包虫病现症患者,受威胁人口达数千万,包虫病畜超过 4 000 万头,每年新发病畜达 800 余万头,年经济损失超过 10 亿元。该病已经成为西部牧区群众因病致贫、因病返贫的主要原因。随着现代社会的发展及人口流动的增加,宠物犬和经济动物狐狸的养殖数量日益增多,导致包虫病从我国西北部向东南部、由畜牧地区向农业地区蔓延扩散。因此,CE 的防治已成为目前研究的热点领域。

健康教育是预防 CE 的根本措施,外科手术是已发 CE 患者的首选治疗方法,但对人体损伤较大,且手术后复发率较高,可达 7.0%~30.1%;对于早期小棘球蚴或难于手术的患者可采用化疗药物或中药进行治疗。这些化疗药物包括阿苯哒唑、甲苯咪唑、氟苯咪唑、噻苯咪唑、丙硫咪唑、硝唑尼特、甲氟喹、三苯氧胺、苯硫氨酯、吡喹酮或奥芬哒唑等。中药包括白花杜鹃、菖蒲、姜黄、蛇麻子素、阿魏酸、青蒿素、大黄、藏红花、砂生槐生物碱、石蒜、雄黄、肉桂、石榴皮、麝香草酚、香芹酚、野蔷薇提取物、汉防己甲素、槟榔、紫堇、露蜂房、

二十五味铜灰散、铁筷子多糖、聚乙烯吡咯酮-碘、骆驼蓬、消包汤或复方消包片等。临床发现这些药物存在严重的不良反应,部分患者不能耐受,同时患者对某些化疗药物可产生耐药性。因此,需要研究对 CE 更有效的防治措施。

Baron 等^[1]在 1976 年发现巨噬细胞和补体可在体外杀伤 Eg 原头蚴。Deplazes 等^[2]在 1994 年证实感染 Eg 的犬淋巴结细胞增殖,血免疫球蛋白(Ig)G、IgE 和 IgA 水平均升高。Rigano 等^[3]在 1997 年发现 CE 患者外周血单核细胞产生的干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 水平均升高。上述资料均表明宿主在防御 Eg 的感染过程中不仅有非特异性反应参与,而且有辅助性 T 细胞(TH)1、TH2 和体液免疫应答参与,这为研制 Eg 疫苗提供了理论依据。

Eg 疫苗研究已有 70 余年历史,大体上经历了灭活疫苗、分子疫苗、合成肽、DNA 疫苗和载体介导的疫苗这几个研究阶段。病毒和细菌的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 CE 免疫预防的研制现状。

一、灭活疫苗

Turner 等^[4](1936 年)、Movsesijan 等^[5](1968 年)、Herd 等^[6](1975 年)和 Heath 等^[7](1979 年)用 Eg 虫卵、六钩蚴或原头蚴的分泌物及其匀浆接种绵羊或小鼠后再用 Eg 虫卵口服攻击,发现这些动物均可产生不同程度的保护力,但抗原大批量供应限制了其广泛应用。

二、重组抗原疫苗

常见的重组抗原包括 Eg95、EgA31、Eg14-3-3、EgM123、EgG1Y162、Egferr、P29、EgHSP20、EgM4、EgM9、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、转酮醇酶、磷酸丙糖异构酶、硫氧还蛋白过氧化物酶、亲肌蛋白和原肌球蛋白等,它们均为已经报道的疫苗分子。

1. Eg95 抗原

Eg95 抗原的疫苗种类包括重组蛋白、合成肽和 DNA 疫苗等^[8],将它们分别接种于 BALB/c 鼠、山羊和绵羊均可产生有效的保护性免疫应答。Lightowers 等^[9]采用 Eg 天然六钩蚴抗原(23 ~ 25 kDa)的抗血清扫描筛 Eg 六钩蚴 cDNA 文库得到 1 个克隆,命名为 Eg95;将其亚克隆至 pGEX-3 构建 pGEX-Eg95,转染大肠埃希菌后可表达为 Eg95-GST 融合蛋白;将其皮下注射 6 月龄绵羊,Eg 虫卵口服攻击可产生 96% ~ 98% 的减蚴率。刘丹等^[10]将 348 bp 的 Eg95 编码基因经聚合酶链反应(PCR)连接为 3Eg95 串联基因,插入 pET32 α 得 pET32 α -3Eg95,转化 BL21(DE3) 菌,IPTG 诱导表达后经 SDS-PAGE 显示重组菌可表达 56 kDa 的 3Eg95-His 融合蛋白。贾红等^[11]将 3Eg95-His 融合蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在免疫后 2 周和 4 周加强 2 次,在免疫后 6 周发现血清 IgG 和 IFN- γ 水平均升高。李玉娇等^[12]采用生物信息学技术预测 Eg95 抗原存在 7 个 T/B 细胞的抗原表位。兰希等^[13]将 Eg95-1(1-70aa)、Eg95-2(51-106aa)和 Eg95-3(89-153aa)合成肽混合,将混合肽加弗氏佐剂皮下注射绵羊,在初次免疫后 2、4 和 6 周重复 3 次,初次免疫后 10 周提示血清 IgG 水平升高,脾脏细胞增殖。林仁勇等^[14]将 Eg95 基因插入 pCDNA3.1 得 pCD-Eg95;将 100 μ g 的 pCD-Eg95 皮下注射 BALB/c 鼠,在初次免疫后 2、4、6 和 8 周重复 4 次,初次免疫后 2 ~ 10 周显示鼠血清 IgG 和 IgG2a 水平均升高,初次免疫后 10 周显现脾脏细胞明显增殖。

2. EgA31 抗原

Fu 等^[15]采用 Eg 感染的犬血清扫描筛 Eg 六钩蚴 cDNA 文库得到一个克隆,命名为 EgA31;将 50 μ g 的 EgA31-GST 融合蛋白皮下注射 8 月龄犬可诱导有效的免疫应答。李玉娇等^[16]推测 EgA31 存在 4 个 T/B 细胞表位。而赵骁等^[17]推测 EgA31 存在 4 个 T 淋巴细胞(简称 T 细胞)表位、6 个 B 细胞表位和 1 个 T/B 细胞联合表位。张杰等^[18]将 1 362 bp 的 EgA31-EgY162 融合基因插入 pET30 α 后转化大肠埃希菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达后经 SDS-PAGE 分析显示可表达 58 kDa 的 EgA31-EgY162 融合蛋白。

3. Eg14-3-3 抗原

李宗吉等^[19]将 10 μ g 的 Eg14-3-3 融合蛋白加弗氏佐剂皮下注射 ICR 鼠,在初次注射后 2 周和 4 周加强 2 次,初次注射后 4 ~ 10 周发现血清 IgG、IgG1 和 IgG2a 水平均升高;脾脏细胞增殖,分泌高水平 IL-2 和 IFN- γ ;此时腹腔注射 1 500 个 Eg 原头蚴进行攻击,在攻击后 6 个月表明 Eg14-3-3 免疫鼠的包囊抑制率可达 84.47%。王强等^[20]将 10 μ g 融合蛋白加弗氏佐剂皮下注射 ICR 鼠,在初次接种后 2 周和 4 周加强 2 次,在初次接种后 8 周腹腔注射 1 500 个 Eg 原头蚴进行攻击,在攻击后 6 个月显示免疫组的脾脏细胞增殖,脾脏 CD4⁺ T 细胞的数目增加,包囊抑制率可达 85.3%。

4. EgM123 抗原

齐文静等^[21]将 25 μ g 的 EgM123-CTB 蛋白皮下注射 BALB/c 鼠,在初次免疫后的 2 周和 4 周加强 2 次,初次免疫后的 6 周显示血清 IgG 水平升高,滴度可达 1:320 000,肠黏液 sIgA 水平增多;然后将 100 μ g 融合蛋白皮下注射比格犬,在初次注射后的 2 周和 4 周加强 2 次,初次注射后 6 周显示血清 IgG 水平升高,滴度可达 1:64 000。

5. EgG1Y162 抗原

赵商岐等^[22]等发现 EgG1Y162 蛋白具有 3 个 T 细胞表位和 2 个 B 细胞表位。刘晓霞等^[23]将 50 μ g 的 EgG1Y162 蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次免疫后 2、4 和 6 周加强 3 次,初次免疫后 10 周显示血清 IgG 水平升高,滴度可达 1:25 600,脾脏细胞增殖,脾脏细胞的凋亡数目减少。

Zhang 等^[24]将 50 μ g 的 EgG1Y162-1/2 蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次注射后 8 周达较高水准,滴度可达 1:5 120 ~ 1:20 480;脾脏细胞增殖,脾脏 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的数目增加,产生高水平的 IFN- γ ;脾脏细胞凋亡发生率降低;在初次注射后 11 周腹腔注射 1 000 ~ 2 000 个 Eg 原头蚴进行攻击,在攻击后 19 周表明免疫组的 Eg 包囊数目和重量降低,囊重抑制率为 58.10% ~ 64.10%,血清 IgG 水平升高,该血清可在体外杀伤 Eg 原头蚴。

6. Egferr 抗原

对于大多数生物而言,铁是有机体内酶促和生化反应所必须的元素之一,它必须与铁蛋白(Ferr)结合才能发挥运输氧和转运电子的功能。王娅娜等^[25]将 50 μ g 的 Egferr-GST 融合蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次免疫后 2 周和 4 周加强 2 次,初次免疫后 6 周显示血清 IgG 水平升高,此时腹腔注射 3 000 个 Eg 原头蚴进行攻击,在攻击后 6 个月表明免疫组的包囊抑制率可达 86.5%。

三、病毒载体介导疫苗

病毒载体介导的疫苗种类包括牛痘病毒疫苗 (rMVA-Eg95)、羊口疮病毒疫苗 (rORFV-Eg95)、山羊痘病毒疫苗 (rGPV-Eg95) 和狂犬病毒疫苗 (rRABV-Eg95)^[8], 将它们免疫 BALB/c 鼠和绵羊均可对抗 Eg 虫卵或原头节的攻击感染。

高度减毒的牛痘病毒 (MVA) 对人体安全无毒, 有多个非必需区, 可插入外源基因, 是一种疫苗载体。Marsland 等^[26] 构建了 rMVA-Eg95 疫苗; Dutton 等^[27] 将 10^8 PFU 重组病毒滴鼻接种 BALB/c 鼠和绵羊, 在初次滴鼻后 4 周强化 1 次, 在第 1 次滴鼻后 6 周出现血清 IgG 水平升高; 体外实验显示该血清可杀伤 Eg 原头蚴, 小鼠和绵羊血清的杀蚴滴度分别为 1:512 和 1:64。

羊口疮病毒 (ORFV) 是一种嗜皮肤的病毒, 病毒粒子表面包绕多种表面蛋白, 其中 ORF104 和 ORF059 蛋白的编码基因存在多个非必需区, 可插入靶基因, 是一种疫苗载体。Tan 等^[28] 将 Eg95 基因插入 p699 得到 pVU700, 将 F1L 基因插入 pVU700 得到 pVU701, 加入羊口疮病毒的 N22 株转染 LTCs 细胞株, 筛选培养后经免疫杂交表明 Eg95 抗体识别重组病毒表达 33 kDa 的 Eg95-F1L 融合蛋白; 将 10^8 PFU 重组病毒皮下注射绵羊, 在初次注射后 5 周皮下注射重组 Eg95 蛋白加强 1 次, 在第 1 次注射后 7 周显现血清 IgG 水平升高, 滴度可达 1:100 000。

山羊痘病毒 (GPV) 的基因组大小为 150 kb, 删除胸腺激酶编码基因的减毒株是一种理想的疫苗载体。Liu 等^[29] 将 Eg95 基因插入 pLSEG 得到 pLSEG-Eg95, 加入羊痘病毒转染 LTCs 细胞株, 筛选培养经免疫荧光提示重组病毒能够呈现 Eg95 蛋白的分子。

狂犬病毒 (RABV) 的减毒株是一种有效的疫苗载体。许彤等^[30-31] 构建了 rRABV-Eg95 疫苗; 将 $1 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀ 重组病毒肌肉注射 BALB/c 鼠, 在注射后 2 周经 ELISPOT 显示脾脏 IFN- γ ⁺ T 细胞和 IL-4⁺ T 细胞的数目增加; 流式细胞仪检测结果提示脾脏树突状 (DC) 细胞和 B 细胞的数目增多; 在注射后 4 周显现血清的中和抗体和 IgG 水平升高; 在注射后 8 周肌肉注射 100 平均半数致死量 (MLD₅₀) 的 RABV 有毒株进行攻击, 在攻击后 3 周提示免疫组和对照组的存活率分别为 100% (8/8) 和 0% (0/8)。

四、细菌载体介导疫苗

细菌载体介导疫苗种类包括鼠伤寒沙门氏菌疫苗 (rSt-Eg95/Eg95-Ferr/FABP)、卡介苗疫苗 (rBCG-Eg95/EgM123/EgG1Y162)、根瘤农杆菌疫苗 (rAt-Eg95-EgA31)

和两歧双歧杆菌菌苗疫苗 (rBb-Eg95-EgA31)^[8]。

鼠伤寒沙门氏菌 (St) 是一种胞内寄生菌, 可有效表达插入的外源基因。Eg 缺乏脂肪酸结合蛋白 (FABP), 必须从宿主体内摄取, 对 Eg 的生存具有重要意义。Chabalgoity 等^[32] 构建了 rSt-FABP 疫苗; 将 10^6 CFU 疫苗尾静脉注射或 10^9 CFU 疫苗灌胃接种 BALB/c 鼠, 在初次接种后 4~6 周发现灌胃接种组诱导的抗 FABP 抗体水平高于静脉注射, 血清 IgG1、IgG2a 和 IgA 水平均升高; 脾脏细胞增殖, 产生高水平的 IL-2、IFN- γ 和 IL-5 等。王志升等^[33] 构建了 rSt-Eg95-Ferr 疫苗, 将 BALB/c 鼠口服 10^{10} CFU 疫苗, 在初次口服后 2 周强化 1 次, 在初次口服后 6 周出现血清 IgG 升高, 脾脏细胞增殖。

卡介苗 (BCG) 是一种活的减毒结核菌株, 是一种理想的疫苗载体。李文桂等^[34-35] 构建了 rBCG-Eg95 疫苗; 用 rBCG 疫苗接种 BALB/c 鼠 8 周后, 再用 100 个活的细粒棘球蚴给每只鼠腹腔接种进行感染, 在攻击感染半年后剖杀各组小鼠, 发现各组减蚴率为 18.20%~92.46%; 在疫苗免疫后 8 周发现血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平均升高, IgG1、IgG3 和 IgE 水平均降低; 脾脏细胞 CD4⁺ 亚群显著增加, CD8⁺ 亚群轻微升高; 脾脏细胞上清液 IFN- γ 和 TNF- α 水平均升高, IL-2 无变化, IL-4 水平降低; 在疫苗免疫和棘球蚴攻击后发现脾脏 CD4⁺ T 细胞的凋亡降低, 提示该疫苗可诱导小鼠产生一个 Th1 型保护性免疫应答。

何黎等^[36] 以 pET28 α -EgM123 为模板扩增 594bp 的 EgM123 基因, 插入 pMV261 得 pMV261-EgM123, 将其电穿孔转化耻垢分支杆菌, 筛选培养后经免疫印迹表明患者血清识别 30kDa 的 EgM123 蛋白; 将 10^6 CFU 疫苗皮下注射 BALB/c 鼠, 血清 IgG 在注射后 2~8 周升高, 在 8 周达较高水平。

祖力皮也等^[37] 构建了 rBCG-EgG1Y162 疫苗, 李玉娇等^[38-39] 将 10^5 CFU 疫苗皮下或腹腔注射 BALB/c 鼠, 在初次注射后 8~10 周发现血清 IgE、IgG1、IgG2a 和 IgG2b 水平均升高, 此时腹腔注射 1 000 个 Eg 原头蚴进行攻击, 在攻击后 10~12 周显示免疫组囊重抑制率为 78.1%; 血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平均升高, 但血清 IgG1 水平降低; 血清 Tim-3 因子及其配体 Galectin-9 水平均下降; 血清 IL-2 和 IFN- γ 水平均升高, 但 IL-4 水平降低; 流式细胞仪检测结果显示外周血淋巴细胞 Tim-3⁺ 和 CD4⁺ 数目增加, 但 CD8⁺ 细胞的数目减少。

苜蓿 (Medicago sativa) 是一种优良的豆科牧草, Deak 等^[40] 和 Shahin^[41] 分别通过农杆菌转化法将 nptII 基因导入苜蓿, 并获得了可育抗性植株, 这为研制转基因苜蓿提供了可行性。周辉和李文桂^[42] 构建了转 Eg95-

EgA31 融合基因苜蓿疫苗;叶艳菊和李文桂^[43]发现,疫苗免疫及原头节攻击后口服转基因苜蓿接种组小鼠检获包裹重量降低,囊重减少率为 64.1%,脾脏细胞凋亡发生率降低,脾脏 T 细胞增殖水平、CD4⁺ T 细胞亚群百分比和 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高,血清 IgG、IgG2b 和 IgE 水平均升高,脾脏细胞培养上清液 IFN- γ 、IL-12 和 TNF- α 水平均升高,IL-10 水平均降低,表明该疫苗口服接种可抑制脾脏细胞发生凋亡,诱导脾脏 T 细胞增殖,产生 Th1 细胞免疫应答以对抗 Eg 原头节的攻击感染,CD4⁺ T 细胞亚群、IgG、IgG2b 和 IgE 在疫苗诱导的保护力中起重要作用。

双歧杆菌(Bb)的细胞壁厚且复杂,摄取外源 DNA 较为困难。Rossi 等^[44]用电穿孔方法进行外源 DNA 转化 Bb 试验,并摸索出了较好的转化条件。周必英和李文桂等^[45-46]构建了 rBb-Eg95-EgA31 疫苗;在疫苗免疫及原头节攻击后发现皮下注射组、肌肉注射组、鼻腔黏膜接种组和口服免疫组的囊重减少率分别为 45.33%、41.33%、70.67% 和 62.67%;血清 IgG、IgG2a、IgG2b 和 IgG1 水平均升高,IgG3 和 IgE 水平均降低;脾脏 IFN- γ 、IL-12 和 TNF- α 水平均升高,IL-10 水平降低;脾脏淋巴细胞增殖;脾脏 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增加;脾脏细胞的凋亡发生率降低,表明该疫苗免疫可抑制脾脏细胞发生凋亡,诱导脾脏 T 细胞增殖,产生以 Th1 型为主的细胞免疫应答。

五、小结

尽管现有 Eg 疫苗均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 Eg 虫卵或六钩蚴,因而用其免疫接种在实际工作中受到限制;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 Th 细胞应答,但不能诱导细胞毒性 T 细胞应答(CTL);尽管合成肽的化学成分明确,易于大量合成,性质稳定,但其免疫原性较弱,几乎不能诱导宿主产生保护性免疫应答;DNA 疫苗操作简单,能同时诱导体液免疫、Th 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风险;病毒载体的自身蛋白及其双链 RNA 具有免疫佐剂效应,但病毒载体自身具有潜在致癌和致病性,人群普遍具有抗病毒抗体,影响其免疫效果;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;转基因植物疫苗很少被公众认可和接受;重组 Bb 疫苗

长期低剂量口服有可能产生免疫耐受现象。因此,还需要开发新的疫苗载体,把 Eg 疫苗的研究推向一个新的高度。

现有研究表明,单核增多性李斯特菌、枯草芽孢杆菌、乳球菌、牛疱疹病毒 I 型、犬腺病毒 2 型、火鸡疱疹病毒、委内瑞拉马脑炎病、水疱性口炎病毒、黄热病毒、新城疫病毒、鸡痘病毒、流感病毒、Semliki 森林病毒等病原体都是有效的疫苗载体^[47-60],构建这些载体介导的 Eg 疫苗用可能具有极为广阔的开发应用前景。

随着科技的进步,人们将对 Eg 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 Eg 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。Eg 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 Eg 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、主要组织相容性复合体(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 细胞的产生等这些问题均有助于拓展载体介导的 Eg 疫苗的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Baron RW, Tanner CE. The effect of immunosuppression on secondary Echinococcus multilocularis infections in mice [J]. Int J Parasitol, 1976, 6(1): 37-42.
- [2] Deplazes P, Thompson RC, Constantine CC, et al. Primary infection of dogs with Echinococcus granulosus: systemic and local (peyer's patches) immune responses [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 40(2): 171.
- [3] Rigano R, Profumo E, Teggi A, et al. Immunomodulators gene expression in PBMC from patients with Echinococcus granulosus [J]. Immunol Lett, 1976, 56(3): 433.
- [4] Turner EL. The production of artificial immunity in dogs against Echinococcus granulosus [J]. J Parasitol, 1936, 22(1): 14-28.
- [5] Movsesijan M, Sokolic A, Mladenovic Z. Studies on the immunological potentiality of irradiated Echinococcus granulosus forms; immunization experiments in dogs [J]. Br Vet J, 1968, 124(10): 425-432.
- [6] Herd RP, Chappel RJ, Biddell D. Immunization of dogs against Echinococcus granulosus using worm secretory antigens [J]. Int J Parasitol, 1975, 5(4): 395-399.
- [7] Heath DD, Lawrence SB, Yon WK. Cross-protection between the cysts of Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena and T ovis in lambs [J]. Res Vet Sci, 1979, 27(2): 210-212.
- [8] 李文桂. 细粒棘球绦虫 Eg95 疫苗的研制现状 [J]. 国外医学医学地

- 理分册, 2014, 35(1): 1-8.
- [9] Lightowers MW, Lawrence SB, Gauci CG, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen[J]. *Parasite Immunol*, 1996, 18(9): 457-462.
- [10] 刘丹, 贾红, 侯绍华, 等. 细粒棘球蚴 Eg95 基因的串联表达及表达系统优化[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(8): 33-37.
- [11] 贾红, 袁维峰, 李杰, 等. 细粒棘球蚴 Eg95s 重组蛋白串联表达免疫原分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2014, 30(8): 843-847.
- [12] 李玉娇, 王晶, 赵慧, 等. 细粒棘球蚴 Eg95 抗原表位的生物信息学预测[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(10): 892-900.
- [13] 兰希, 王倩, 刘玉梅, 等. 细粒棘球蚴 Eg95 重组表位蛋白的免疫特性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(3): 242-245.
- [14] 林仁勇, 丁剑冰, 卢晓梅, 等. 细粒棘球蚴 Eg95 抗原基因疫苗体外瞬时表达及对小鼠诱导的免疫应答[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2004, 24(4): 204-208.
- [15] Fu YC, Martinez C, Chalar C, et al. A new potent antigen from *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1999, 102(1): 43-52.
- [16] 李玉娇, 杨晶, 赵慧, 等. 细粒棘球蚴 EgA31 重组蛋白的抗原表位分析预测[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012, 30(1): 78-86.
- [17] 赵晓, 张峰波, 王红英, 等. 生物信息分析细粒棘球蚴 EgA31 蛋白 T 细胞及 B 细胞的优势抗原表位[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(7): 1078-1083.
- [18] 张杰, 李玉娇, 张峰波, 等. 细粒棘球蚴多价 EgA31-EgY162 抗原序列优化分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(1): 19-25.
- [19] 李宗吉, 雄英, 孙俊峰, 等. 细粒棘球蚴(中国大陆株)14-3-3 重组蛋白的免疫保护力[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(6): 676-679, 706.
- [20] 王强, 王娅娜, 王程铨, 等. 细粒棘球蚴重组蛋白 14-3-3 和 Eg10 免疫差异的初步研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2014, 51(3): 592-596.
- [21] 齐文静, 何黎, 王甜, 等. 细粒棘球蚴 EgM123 蛋白融合霍乱毒素 B 亚单位疫苗的构建及免疫原性研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(7): 747-754.
- [22] 赵尚岐, 孔慧芳, 周彦霞, 等. 细粒棘球蚴 EgG1Y162 与 CTLA-4IgV-EgG1Y162 蛋白结构预测及表位分析比较[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(5): 546-551.
- [23] 刘晓霞, 马海梅, 朱明, 等. 细粒棘球蚴 egG1Y162 疫苗对小鼠免疫应答的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(3): 226-231.
- [24] Zhang FB, Li SY, Zhu YJ, et al. Immunization of mice with EgG1Y162-1/2 provides protection against *Echinococcus granulosus* infection in BALB/c mice[J]. *Mol Immunol*, 2018, 94(1): 183-189.
- [25] 王娅娜, 王杰, 王淑静, 等. 细粒棘球蚴重组抗原 rEgferitin 诱导宿主抗感染免疫应答的初步研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(10): 882-886.
- [26] Marsland BJ, Tisdall DJ, Heath DD, et al. Construction of a recombinant orf virus that expresses an *Echinococcus granulosus* vaccine antigen from a novel genomic insertion site[J]. *Arch Virol*, 2003, 148(3): 555-562.
- [27] Dutton S, Fleming SB, Ueda N, et al. Delivery of *Echinococcus granulosus* antigen Eg95 to mice and sheep using recombinant Vaccinia virus[J]. *Parasite Immunol*, 2012, 34(2): 312-317.
- [28] Tan JL, Ueda N, Heath D, et al. Development of orf virus as a bifunctional recombinant vaccine: surface display of *Echinococcus granulosus* antigen Eg95 by fusion to membrane structural proteins[J]. *Vaccine*, 2012, 30(2): 398-406.
- [29] Liu FX, Fan XX, Li N, et al. Development of recombinant Goatpox virus expressing *Echinococcus granulosus* Eg95 vaccine antigen[J]. *J Virol Meth*, 2018, 261(1): 28-33.
- [30] 许彤, 刘乐乐, 田莉, 等. 表达细粒棘球蚴 Eg95 蛋白重组狂犬病毒的构建、鉴定与免疫研究[J]. *军事医学*, 2020, 44(5): 379-384.
- [31] Xu T, Liu L, Shi C, et al. A recombinant rabies virus expressing *Echinococcus granulosus* EG95 induces protective immunity in mice[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021. [Epub ahead of print]
- [32] Chabalgoity JA, Harrison JA, Esteves A, et al. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(6): 2402-2412.
- [33] 王志升, 林源, 刘强, 等. 细粒棘球蚴重组 St-Eg95-Egferitin 疫苗构建及生物学特性检测[J]. *西北农业学报*, 2014, 23(1): 44-48.
- [34] 李文桂, 朱佑明. 细粒棘球蚴重组 BCG-Eg95 疫苗的构建及其表达效率研究[J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(5): 494-498.
- [35] 李文桂, 朱佑明. 细粒棘球蚴重组 BCG-Eg95 疫苗诱导的保护力观察[J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(4): 383-385, 389.
- [36] 何黎, 齐文静, 郑雪婷, 等. 细粒棘球蚴 EgM123 重组耻垢分支杆菌在小鼠体内的表达及其免疫应答[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(12): 1314-1318, 1323.
- [37] 祖力皮也·吐尔荪, 德力夏提·依米提, 曹春宝, 等. 细粒棘球蚴重组 BCG-EgG1Y162 菌株的构建和表达[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2013, 31(2): 110-113.
- [38] 李玉娇, 沙桐, 张峰波, 等. 重组 BCG-EgG1Y162 免疫小鼠对细粒棘球蚴感染中 Tim-3 因子表达的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2019, 42(1): 1-5.
- [39] 李玉娇, 赵晓, 沙桐, 等. 细粒棘球蚴重组 BCG-EgG1Y162 免疫保护性的研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2020, 43(7): 848-851, 857.
- [40] Deak M, Donn G, Feher A, et al. Dominant expression of a gene amplification-related herbicide resistance in *Medicago* cell hybrids[J]. *Plant Cell Rep*, 1986, 7(3): 158-161.
- [41] Shahin EA. Transformation of cultivated alfalfa usir; disarmed *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Crop Sci*, 1986, 26(1): 1235-1239.
- [42] 周辉, 李文桂. 细粒棘球蚴转基因植物载体重组 pBI-Eg95-EgA31 质粒构建及鉴定[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(4): 308-311.
- [43] 叶艳菊, 李文桂. 细粒棘球蚴转 Eg95-EgA31 融合基因苜蓿疫苗诱导小鼠免疫应答的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(8): 750-753, 757.
- [44] Rossi M, Brigidi P, Matteuzzi D. An efficient transformation system for *Bifidobacterium* species[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 24(1): 33-36.
- [45] 周必英, 陈雅棠, 李文桂, 等. 细粒棘球蚴重组 Bb-Eg95-EgA31 融和基因疫苗构建及鉴定[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(6): 502-506.
- [46] 周必英, 陈雅棠, 李文桂, 等. 细粒棘球蚴重组 Bb-Eg95-EgA31 融合蛋白诱导小鼠免疫应答[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(3): 232-237.
- [47] 李文桂, 陈雅棠. 重组单核细胞增生性李斯特菌疫苗的研制现状[J]. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(1): 80-86, 附页 3.
- [48] 李文桂, 陈雅棠. 病原体重组枯草芽孢杆菌疫苗的研制现状[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(7): 651-656, 660.
- [49] 李文桂, 陈雅棠. 乳球菌介导的重组寄生虫疫苗的研制现状[J]. *中国地方病学杂志*, 2015, 34(8): 617-620.
- [50] 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.
- [51] 李文桂, 陈雅棠. 重组火鸡疱疹病毒疫苗的研制现状[J]. *热带医学杂志*, 2021, 21(9): 987-1001.
- [52] 李文桂, 陈雅棠. 重组委内瑞拉马脑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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 李文桂, 陈雅棠. 重组黄热病毒疫苗的研制现状[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(1): 123-124, 附页.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 李文桂, 陈雅棠. 重组流感病毒疫苗的研制现状[J]. *国外医学医学地理分册*, 2019, 40(1): 1-6.
- [59] 李文桂, 陈雅棠. 重组 Semliki 森林病毒疫苗的研制现状[J]. *国外医学医学地理分册*, 2019, 40(3): 209-212.
- [60] 李文桂, 陈雅棠. 重组犬腺病毒 2 型疫苗的研制现状[J]. *国外医学医学地理分册*, 2019, 40(4): 339-342, 353.

(收稿日期: 2022-02-09)

(本文编辑: 余晓曼)