文章编号:1000-7423(2010)-01-0026-04

【论著】

细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 蛋白对感染小鼠脾细胞凋亡的抑制作用

周必英[1,2]，陈雅棠[1]，李文桂[1*]，杨梅[1]

【摘要】 **目的** 探讨细粒棘球绦虫(Eg)重组蛋白 Bb-Eg95-EgA31 免疫小鼠被 Eg 原头节攻击感染后小鼠体内生成的棘球蚴囊重减少率及脾细胞凋亡的变化。 **方法** 56 只雌性 BALB/c 小鼠随机均分 7 组，分别为重组蛋白皮下注射组(A 组)、肌肉注射组(B 组)、鼻腔内接种组(C 组)、灌胃组(D 组)、空载体对照组(E 组)、双歧杆菌对照组(F组)和双歧杆菌液体培养基(MRS) 对照组(G 组)。A、B 和 D 组分别以 5×10^6、5×10^6 和 5×10^8 蛋白克隆形成单位(CFU)悬浮于 100 μl MRS 免疫小鼠，C 组以 5×10^5 蛋白克隆形成单位 (CFU)悬浮于 10 μl MRS 免疫小鼠，E 和 F 组分别以空载体[Bb (pGEX-1λT)]和 Bb 5×10^6 CFU 悬浮于 100 μl MRS 皮下注射小鼠，G 组以 100 μl MRS 皮下注射小鼠。8 周后各组均用 Eg 原头节 (50 个/只) 攻击感染，25 周后剖杀小鼠，分离细粒棘球蚴包囊并称重，计算囊重减少率；取脾，分离脾细胞，伴刀豆球蛋白 (ConA)刺激培养，流式细胞仪检测脾细胞的凋亡发生率。 **结果** A、B、C 和 D 组小鼠的棘球蚴囊重分别为(41.0±23.0)mg、(44.0±22.0)mg、(22.0±21.0)mg 和(28.0±16.0)mg，均低于 G 组(75.0±33.0)mg ($P<0.05$，$P<0.01$)，A、B、C 组与 D 组间囊重差异无统计学意义($P>0.05$)；E 组(63.0±30.0)mg、F 组(69.0±22.0)mg 和 G 组间囊重差异无统计学意义($P>0.05$)。未加 ConA 培养的脾细胞凋亡发生率，A(0.14±0.01)、B(0.14±0.01)、C(0.13±0.01)和 D 组(0.14±0.01)均低于 G 组(0.21±0.01) ($P<0.05$)；C 组低于 A、B 和 D 组($P<0.05$)；E 组(0.20±0.01)、F 组(0.20±0.01)和 G 组间差异无统计学意义($P>0.05$)；加 ConA 培养后的脾细胞凋亡发生率，A(0.19±0.01)、B(0.20±0.00)、C(0.17±0.01)和 D 组(0.19±0.01)均显著低于 G 组(0.26±0.01)($P<0.01$)，C 组低于 A 和 B 组($P<0.01$)，C 组低于 D 组($P<0.05$)，D 组低于 B 组($P<0.05$)，A 组与 B 组、D 组间差异无统计学意义($P>0.05$)，E 组(0.25±0.01)、F 组(0.25±0.01)和 G 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠加 ConA 培养的脾细胞凋亡率显著高于相应的未加 ConA 培养组($P<0.01$)。 **结论** Eg 原头节感染可引起小鼠脾细胞凋亡，用 Eg 重组蛋白 Bb-Eg95-EgA31 免疫小鼠在一定程度上可抑制感染鼠脾细胞的凋亡，诱导小鼠产生一定的保护力。

【关键词】 **细粒棘球绦虫；重组蛋白；脾细胞；凋亡**

中图分类号：R383.33 文献标识码：A

Inhibition on Apoptosis of Splenocytes in Infected Mice by Immunization with Recombinant Bb-Eg95-EgA31 Protein of *Echinococcus granulosus*

ZHOU Bi-ying[1,2], CHEN Ya-tang[1], LI Wen-gui[1*], YANG Mei[1]

(**1** ***Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing* 400016, *China*; 2** ***Department of Parasitology, Zunyi Medical College, Zunyi* 563003, *China***)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the weight reduction of hydatid cysts and apoptosis of splenocytes in infected mice by recombinant *Bifidobacteria bifidum* (Bb)-Eg95-EgA31 protein of *Echinococcus granulosus* (Eg) and challenged with Eg protoscoleces. **Methods** 56 female BALB/c mice were randomly divided into 7 groups. Groups A and B were injected subcutaneously and intramuscularly respectively with 5×10^6 colony-forming unit (CFU) recombinant Bb-Eg95-EgA31 protein, group C was immunized intranasally by 5×10^5 CFU protein, group D was vaccinated transgastrically by 5×10^8 CFU protein, groups E and F were injected subcutaneously with 5×10^6 CFU blank vector [Bb (pGEX-1λT)] and Bb respectively, and group G was injected subcutaneously with 100 μl MRS. Mice in all groups were challenged with 50 Eg protoscoleces on the 8th week after vaccination and sacrificed on the 25th week after infection. The weight

基金项目：国家自然科学基金 (No. 30801052、30671835)

作者单位：1 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；
2 贵州省遵义医学院寄生虫学教研室，遵义 563003

* 通讯作者，E-mail：li_wengui@yahoo.com.cn

of hydatid cysts was measured and weight-reduction rate was calculated. Spleens were collected to prepare splenocytes which were cultured under stimulation with concanavalin A (ConA). The apoptotic rate was determined by flow cytometry (FCM). **Results** The average weight of hydatid cysts in groups A [(41.0±23.0)mg], B [(44.0±22.0)mg], C [(22.0±21.0) mg], and D [(28.0±16.0)mg] was lower than that of group G[(75.0±33.0)mg] (P<0.05, P<0.01), and there was no significant difference among groups A, B, C and D (P>0.05); no significant difference was found between group G and groups E[(63.0±30.0)mg], F[(69.0±22.0)mg] (P>0.05). The apoptotic rate of splenocytes cultured with no ConA in groups A(0.14±0.01), B(0.14±0.01), C(0.13±0.01), and D(0.14±0.01)was lower than that of group G(0.21±0.01) (P<0.05); that of group C was lower than groups A, B, and D(P<0.05); there was no significant difference between groups D and A, between groups A and B, and between groups E(0.20±0.01), F(0.20±0.01)and group G. The apoptotic rate of splenocytes cultured with ConA in group A(0.19±0.01), B(0.20±0.00), C(0.17±0.01), and D(0.19±0.01)were lower than that of group G(0.26±0.01)(P<0.01), that of group C was lower than groups A and B(P<0.01), group C was lower than group D (P<0.05), group D was lower than group B(P<0.05); there was no significant difference between groups A and B,and between groups A and D, and between groups E(0.25±0.01), F(0.25±0.01), and group G(P>0.05). The apoptotic rate of splenocytes cultured with ConA was higher than those cultured without ConA (P<0.01). **Conclusions** Apoptosis of splenocytes may be induced by infection of *Echinococcus granulosus* protoscoleces in mice, while the recombinant Bb-Eg95-EgA31 protein may inhibit the apoptosis of splenocytes in mice challenged with Eg, and induce certain protective immunity in the host.

【**Key words**】 *Echinococcus granulosus*; Recombinant protein; Splenocyte; Apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30801052 and 30671835)

* Corresponding author, E-mail: wangzq@zzu.edu.cn

目前，细胞凋亡与寄生虫感染的关系已成为研究热点，有资料证实某些寄生虫感染诱导的细胞凋亡在发病机制中起重要作用[1-3]。有人认为细胞凋亡可阻止寄生虫感染造成的邻近细胞、甚至宿主个体的死亡，对宿主具有保护作用；亦有人认为寄生虫感染可抑制宿主细胞凋亡而达到维持感染和虫荷的目的[4]。

囊型棘球蚴病(cystic echinococcosis, CE)是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)的续绦期幼虫引起的一种呈世界性分布的严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病。我国是囊型棘球蚴病的高发国家之一，疫苗防治是当前研究热点，如 Lightowlers 等[5,6]发现Eg95 重组蛋白疫苗免疫的中间宿主(羊)可获96%～100%的保护力；傅玉才等[7,8]证明 EgA31 蛋白能诱导终宿主(犬)产生特异的免疫应答；Missich 等[9]将重组质粒成功转化到双歧杆菌 (*Bifidobacteria bifidum*, Bb)。本实验在成功构建细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 蛋白的基础上[10,11]，以该蛋白免疫小鼠，再以原头节攻击感染，观察其诱导的保护力及对脾细胞凋亡的影响，为研究该蛋白的保护性免疫机制提供依据。

材料与方法

1 材料

1.1 *蛋白来源* 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 蛋白由本室构建[10,11]。

1.2 *实验动物* 56 只 12～14 周龄雌性 BALB/c 小鼠(SPF 级)，20～25 g，购自重庆医科大学实验动物中心。

1.3 *主要试剂与仪器* 伴刀豆球蛋白 A(ConA)购自美国Sigma 公司，RPMI1640 培养基、胎牛血清(FCS)和青霉素和链霉素购自上海生工生物工程技术服务有限公司，膜联蛋白-V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)试剂盒购自深圳市欣博盛生物科技有限公司。FACsort 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

2 方法

2.1 *实验分组与免疫* 56 只 BALB/c 小鼠随机均分 7 组，分别为重组蛋白皮下注射组(A 组)、肌肉注射组(B 组)、鼻腔内接种组(C 组)、灌胃组(D 组)、空载体对照组(E 组)、Bb 对照组(F 组)和双歧杆菌液体培养基(MRS)对照组(G 组)。其中 A、B、C和D 组为细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 蛋白组，A组以蛋白 5×10^6 克隆形成单位(CFU)悬浮于100 μl MRS 于小鼠背部皮下单次注射，B 组以蛋白 5×10^6 CFU 悬浮于 100 μl MRS 于小鼠后腿股四头肌单次肌肉注射，C 组以蛋白 5×10^5 CFU 悬浮于 10 μl MRS 于小鼠鼻腔粘膜单次接种，D 组以蛋白 5×10^8 CFU 悬浮于 100 μl MRS 于小鼠灌胃；E 和 F 组分别以空载体[Bb(pGEX-1λT)]和 Bb 5×10^6 CFU 悬浮于 100 μl MRS 于小鼠背部皮下单次注射；G 组以 100 μl MRS 于小鼠背部皮下单次注射。

2.2 *攻击感染* 各组小鼠于免疫 8 周后腹腔内注射攻击感染细粒棘球蚴原头节 (50 个/只)，攻击感染25 周后拉颈处死，剖检细粒棘球蚴包囊，并无菌取脾备用。

2.3 *囊重减少率计算* 分离细粒棘球蚴包囊并称重，计算囊重减少率。囊重减少率(%)=(1–免疫组检获细粒

棘球蚴包囊重量/对照组检获细粒棘球蚴包囊重量)×100%。

2.4 脾细胞制备与培养 对所取的脾组织用注射器内芯轻轻捻碎，1 ml 0.85%盐水冲洗，200 目尼龙网过滤，滤液移入 10 ml 离心管；加 4 ml 双蒸水使渗透压降至 0.15%溶解红细胞 10 s，再加 1.34 ml 3.6%盐水恢复等渗；加 0.85%盐水至 10 ml，2 500×*g* 离心 5 min，加入 10 ml 0.85%盐水，混匀，计数脾细胞，用RPMI 1640 培养液（含小牛血清 10%）调整细胞浓度为 5×10⁶/ml，加入青霉素和链霉素（各 100 U/ml），取 1 ml 加入 24 孔细胞培养板，10 μl ConA(10 μg/ml)加入对照孔中，每个标本设 2 孔，37 ℃ 5% CO_2 培养 16～18 h。

2.5 Annexin V-FITC 染色法检测小鼠脾细胞凋亡 收集培养后的脾细胞于 1.5 ml 离心管，用 4 ℃ PBS 洗涤 2 次，2 500 ×*g* 离心 5 min；250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度至 1×10⁶/ml；取 100 μl 细胞悬浮液加入 5 ml 流式细胞管中，加入 Annexin Ⅴ-FITC 5 μl 和 20 μg/ml 碘化丙锭(PI)溶液 10 μl，混匀后室温避光孵育 15 min；在反应管中加 400 μl PBS，用 FACsort 型流式细胞仪记录异硫氰酸荧光素(FITC)标记的凋亡细胞在波长 495 nm 紫外光激发下产生的 525 nm 绿色荧光，以及碘化丙碇（PI）标记的凋亡细胞和坏死细胞在波长 340 nm 的紫外光激发下产生的 620 nm 红色荧光，采用流式细胞仪的通用软件(CellQuest 软件)分析脾细胞凋亡。

3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较用最小显著差(LSD)法。

结 果

1 细粒棘球蚴包囊重量及囊重减少率

细粒棘球蚴包囊重量，A 组[(41.0±23.0) mg]、B 组[(44.0±22.0) mg]、C 组[(22.0±21.0) mg]和 D 组[(28.0±16.0) mg]均低于 G 组[(75.0±33.0) mg](*P*<0.05，*P*<0.01)，A、B、C 组与 D 组间差异无统计学意义(*P*>0.05)；E 组[(63.0±30.0) mg]、F 组[(69.0±22.0) mg]和 G 组间差异无统计学意义(*P*>0.05)。A、B、C 和 D 组囊重减少率分别为 45.3%、41.3%、70.7%和 62.7%(表 1)。

2 Annexin V-FITC 染色法检测小鼠脾细胞凋亡率

未加 ConA 培养后的脾细胞凋亡发生率，A 组(0.14±0.01)、B 组(0.14±0.01)、C 组(0.13±0.01)和 D 组(0.14±0.01)均低于 G 组(0.21±0.01)(*P*<0.05)，C 组低于 A 组和 B 组(*P*<0.05)，C 组低于 D 组(*P*<0.05)，D 组、A 组与 B 组间差异无统计学意义(*P*>0.05)，E 组(0.20±0.01)、F 组(0.20±0.01)与 G 组间差异无统计学意义（*P*>0.05)；加 ConA 培养后的脾细胞凋亡发生率，A 组(0.19±0.01)、B 组(0.20±0.00)、C 组(0.17±0.01)和D 组(0.19±0.01)均显著低于 G 组(0.26±0.01)(*P*<0.01)，C 组低于 A 组和 B 组(*P*<0.01)，C 组低于 D 组(*P*<0.05)，D 组低于 B 组(*P*<0.05)，A 组与 B 组、D 组间差异无统计学意义(*P*>0.05)，E 组(0.25±0.01)、F 组(0.25±0.01)与 G 组间差异无统计学意义(*P*>

表 1 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 蛋白免疫，原头节攻击后小鼠细粒棘球蚴重量的检测($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Detection of hydatid cyst weight in mice immunized with recombinant Bb-Eg95-EgA31 protein and challenged with *Echinococcus granulosus* protoscoleces ($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	细粒棘球蚴包囊重量(mg) Weight of hydatid cyst	囊重减少率 Weight reduction rate (%)
A 组(皮下注射组) Group A(Subcutaneous injection)	41.0±23.0*	45.3
B 组(肌肉注射组) Group B(Intramuscular injection)	44.0±22.0*	41.3
C 组(鼻腔接种组) Group C(Intranasal immunization)	22.0±21.0**	70.7
D 组(口服灌胃组) Group D(Transgastric administration)	28.0±16.0**	62.7
E 组(空载体对照组) Group E(Blank vector control)	63.0±30.0	16.0
F 组(Bb 对照组) Group F(Bb control)	69.0±22.0	8.0
G 组(MRS 对照组) Group G(MRS control)	75.0±33.0	-

注： 与 G 组相比，*P<0.05，**P<0.01。

Note: Compared with group G, *P<0.05, **P<0.01.

表 2 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 蛋白免疫，原头节攻击后小鼠脾细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Apoptotic rate of splenocytes in mice immunized with recombinant Bb-Eg95-EgA31 protein and challenged with *Echinococcus granulosus* protoscoleces ($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	脾细胞凋亡发生率 Apoptotic rate of splenocytes	
	原液培养 Original culture	ConA刺激培养 Cultured with ConA
A组(皮下注射组) Group A(Subcutaneous injection)	0.14±0.01*	0.19±0.01**
B组(肌肉注射组) Group B(Intramuscular injection)	0.14±0.01*	0.20±0.00**
C组(鼻腔接种组) Group C(Intranasal immunization)	0.13±0.01*△	0.17±0.01**△△
D组(口服灌胃组) Group D(Transgastric administration)	0.14±0.01*	0.19±0.01**
E组(空载体对照组) Group E(Blank vector control)	0.20±0.01	0.25±0.01
F组(Bb 对照组) Group F(Bb control)	0.20±0.01	0.25±0.01
G组(MRS 对照组) Group G(MRS control)	0.21±0.01	0.26±0.01

注： 与G组相比，* P<0.05，* P<0.01；与A组比较，△ P<0.05，△△ P<0.01。

Note: Compared with group G, * P<0.05, ** P<0.01; Compared with group A, △ P<0.05, △△ P<0.01.

0.05)。各组小鼠加 ConA 培养的脾细胞凋亡发生率显著高于相应的未加 ConA 培养(P<0.01)(表 2)。

讨　论

囊重减少率是考核棘球蚴病疫苗保护力的重要指标。李文桂等[12]发现细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 蛋白可诱导小鼠产生 18.20%～92.46%的保护力。本研究细粒棘球绦虫重组蛋白 Bb-Eg95-EgA31 可诱导小鼠产生 41.3%～70.7%的囊重减少率，提示该蛋白可诱导小鼠产生一定的保护力，抵抗 Eg 原头节攻击感染。

细胞凋亡是机体细胞在分化与发育过程中受一系列基因调控而发生的主动自发性死亡方式。本研究显示 Eg 原头节感染小鼠脾细胞凋亡发生率为 21%～26%，与李文桂等[13]报道的结果相类似，证实 Eg原头节感染可诱导小鼠脾细胞发生凋亡。推测细粒棘球蚴抗原经抗原呈递细胞(APC)加工处理后，形成多个氨基酸残基组成的抗原肽，并以抗原肽-主要组织相容性复合物 (MHC)的形式表达于 APC 表面，与小鼠脾细胞 TCR/CD3 复合物结合后，诱导胞内 Fas/Apo-1/CD95 及其配体 FasL 表达，从而导致脾细胞凋亡[13]。

重组蛋白 Bb-Eg95-EgA31 免疫后攻击感染原头节，小鼠脾细胞凋亡发生率显著降低，与李文桂等[12]报道重组蛋白 BCG-Eg95 免疫的结果类似，提示重组蛋白 Bb-Eg95-EgA31 可抑制受攻击感染小鼠的脾细胞发生凋亡。推测该重组蛋白免疫小鼠后可激活体内的脾 $CD4^+$ T 细胞，诱导宿主产生干扰素-γ (IFN-γ)、白介素-12 (IL-12)和干扰素-α (TNF-α)等调节细胞凋亡，通过启动一系列凋亡级联反应，抑制由此介导的脾 $CD4^+$ T 细胞凋亡，使小鼠脾 $CD4^+$ T 细胞数目相对增加，从而加强小鼠抗 Eg 原头节感染的保护性免疫反应。

重组蛋白口服或鼻腔内接种是两种非创伤途径，易于被患者接受。本研究结果显示重组蛋白 Bb-Eg95-EgA31 鼻腔内接种和口服的免疫效果优于皮下和肌肉注射，提示鼻腔内接种和口服免疫是两种较好的免疫途径。推测该重组蛋白免疫小鼠后可通过鼻腔和消化道等黏膜途径特异性与位于全身黏膜免疫系统淋巴滤泡上皮的微皱襞细胞结合，诱导小鼠产生局部和系统的黏膜免疫应答。鼻腔内接种的效果优于口服免疫，可能是由于鼻黏膜内无胃酸和消化酶的作用，重组蛋白小剂量接种即可诱导较强的免疫应答，鼻黏膜内免疫操作简单，是一种安全、有效的黏膜免疫途径。

参　考　文　献

[1] Tour BA, Sarthou JL, Aribot G, *et al*. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells[J]. Infect Immun, 1996, 64(3): 744-750.

[2] Li WG, Chen YT, Liu CW. Effects of dihydroartemisinin on apoptosis of spleen cells in rats infected with *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. Chin J Zoonoses, 2003, 19(2): 55-59. (in Chinese)
(李文桂, 陈雅棠, 刘成伟. 双氢青蒿素对卡氏肺孢子虫肺炎大鼠脾细胞凋亡的影响[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(2): 55-59.)

[3] Li FR, Shi YE, Shi DZ, *et al*. $CD4^+$ cells apoptosis and apoptosis-associated gene expression in host infected with alveolar echinococcosis[J]. Chin J Zoonoses, 2003, 19(4): 59-62, 65. (in Chinese)
(李富荣, 石佑恩, 史大中, 等. 泡球蚴感染过程中宿主 $CD4^+$T 细胞凋亡和凋亡相关基因转录水平的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(4): 59-62, 65.)

[4] Wang WS, Li YL. Studies on apoptosis and its induction in *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2000, 18(5): 269-271. (in Chinese)
(王文实, 李雍龙. 日本血吸虫细胞凋亡及其诱导的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(5): 269-271.)

[5] Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, *et al*. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen[J]. Parasit Immunol, 1996, 18(9): 457-462.

[6] Lightowlers MW, Jensen O, Fernandez E, *et al*. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep[J]. Int J Parasitol, 1999, 29(4): 531-534.

[7] 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.

[8] Fu YC, Marchal S, Marchal T, *et al*. Cellular immune response of lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding to a 66kDa protein of *Echinococcus granulosus*[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 74(3-4): 195-208.

[9] 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(2): 208-211.

[10] Zhou BY, Chen YT, Li WG, *et al*. Construction and identification of the recombinant fusion gene vaccine Bb-Eg95-EgA31 of *Echinococcus granulosus*[J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(6): 502-506. (in Chinese)
(周必英, 陈雅棠, 李文桂, 等. 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 融合基因疫苗构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 502-506.)

[11] Zhou BY, Chen YT, Li WG, *et al*. Construction and expression of the recombinant plasmid pGEX-Eg95-EgA31 of *Echinococcus granulosus*[J]. Chin J Pathogen Biol, 2009, 4(5): 350-354. (in Chinese)
(周必英, 陈雅棠, 李文桂, 等. 细粒棘球绦虫重组质粒 pGEX-Eg95-EgA31 的构建及其在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(5): 350-354.)

[12] Li WG, Zhu YM. Protection of the recombinant BCG-Eg95 vaccine of *Echinococcus granulosus* against Eg protoscolexes[J]. Immunol, 2007, 23(4): 383-385, 389. (in Chinese)
(李文桂, 朱佑明. 细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗诱导的保护力 观察[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(4): 383-385, 389.)

[13] Li WG, Zhu YM. The reduced apoptosis of spleen cells in infected mice by immunization with recombinant BCG-Eg95 vaccine against *Echinococcus granulosus*[J]. Chin J Immunol, 2007, 23(12): 1071-1073, 1082. (in Chinese)
(李文桂, 朱佑明. 细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗对感染小鼠脾细胞凋亡的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(12): 1071-1073, 1082.)

(**收稿日期**: 2009-09-04　编辑: 衣凤芸)