

猪囊尾蚴病 DNA 疫苗研究现状

周必英^{1,2}, 陈雅棠¹, 李文桂^{1*}

【摘要】猪囊尾蚴病 DNA 疫苗是近年来出现和发展起来的一种新型疫苗, 不仅可以引起体液免疫, 而且还能诱导高水平的细胞免疫应答, 在猪囊尾蚴病预防方面优势明显。本文就猪囊尾蚴病 DNA 疫苗的研究现状作一综述。

【关键词】猪带绦虫; 猪囊尾蚴病; DNA 疫苗

中图分类号: R532.331

文献标识码: A

Research Status on DNA Vaccine against *Cysticercus cellulosae* Infection

ZHOU Bi-ying^{1,2}, CHEN Ya-tang¹, LI Wen-gui^{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】DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection is a newly emerging vaccine in recent years. It can induce not only humoral immune response, but also a high level cellular immune response. The DNA vaccine displays prominent advantages in the prevention on cysticercosis. This article reviews the current situation on several DNA vaccines.

【Key words】*Taenia solium*; Cysticercosis; DNA vaccine

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30801052, 30671835, 30500423, 30200239)

* Corresponding author, E-mail: Li_wengui@yahoo.com.cn

猪囊尾蚴病由猪带绦虫(*Taenia solium*)的幼虫猪囊尾蚴引起, 是严重危害畜牧业生产和人类健康的人兽共患寄生虫病。该病以发展中国家多见, 主要分布在中非、南非、拉丁美洲和南亚地区。我国约有 200 万~300 万囊尾蚴病患者^[1], 呈全国分布。由于药物治疗存在药物残留和抗药性等问题, 以致有免疫保护作用的疫苗有望成为控制该病流行的有效工具。

研究猪囊尾蚴病疫苗已有 20 余年, 大体上经历了虫体疫苗、重组抗原疫苗、DNA 疫苗、多肽疫苗和重组酵母疫苗等研究阶段。虫体疫苗虽能产生良好的免疫保护作用, 但因难以大批量制备抗原限制了其广泛应用的可能。分子疫苗效果较好, 但其制备过程复杂, 技术难度大, 且成本较高。随后人们构建了 DNA 疫苗、多肽疫苗和重组酵母疫苗, 其中多肽疫苗和重组酵母疫苗诱导的保护力并不理想。而 DNA 疫苗作

为一种新型疫苗已在细菌、病毒和寄生虫等感染性疾病及肿瘤领域的防治中显示出巨大潜力。本文就猪囊尾蚴病 DNA 疫苗及其免疫机制等方面的研究进展作一综述。

1 DNA 疫苗的优点

DNA 疫苗即把外源基因克隆到真核质粒表达载体, 然后将重组的质粒 DNA 直接注射到动物体内, 使外源基因在机体内表达, 产生的抗原可激活机体的免疫系统, 引起免疫反应。与传统疫苗相比, DNA 疫苗具有以下优点: ①能表达经修饰的天然抗原, 具有与天然抗原相同的构象和抗原性; ②激活的免疫反应全面, 在宿主细胞合成的抗原可直接结合 I 类和 II 类组织相容性复合体 (MHC) 分子, 激发机体细胞免疫和体液免疫反应, 包括特异抗体的产生、CD4⁺ 激活和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 产生; ③免疫具有持续性, 一次接种可获得长期免疫力; ④可将编码不同抗原的基因构建在同一质粒中, 或将不同抗原基因的多种重组质粒联合应用, 以增强免疫效果; ⑤无感染病原体的危险; ⑥无需重组抗原的表达和纯化, 制备简单, 成本较低, 易于大规模生产; ⑦质

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30801052, 30671835, 30500423 和 30200239)

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

粒 DNA 可制成干粉样剂型, 便于储藏和运输。

2 DNA 疫苗免疫机制

DNA 疫苗可刺激机体产生特异性的细胞免疫和体液免疫应答, 尤其是特异的 CTL 细胞免疫反应, 其免疫机制目前尚不清楚。DNA 疫苗可激发特异性的 CTL 反应, 即编码目的基因的质粒 DNA 被抗原呈递细胞摄入后, 在抗原呈递细胞内表达抗原物质, 该内源性抗原在被分解成抗原短肽后进入内质网, 与 I 类 MHC 分子结合后至细胞表面, 呈递给 CD8⁺ 的 CTL 细胞毒淋巴细胞, 激活细胞免疫反应。DNA 疫苗可激发 Th 细胞和抗体 (B 细胞) 反应, 即外源蛋白质抗原在进入抗原呈递细胞的吞噬体后, 蛋白质在吞噬体和溶酶体融合后被降解成多肽, 这种具有抗原特异性的多肽和由细胞内质网产生的 MHC II 类分子结合, 形成一个成熟的 MHC II 型抗原复合物, 被 CD4⁺ T 淋巴细胞识别并使其激活, 增殖分化形成效应性 Th 细胞, 激活的 CD4⁺ T 淋巴细胞可辅助 B 淋巴细胞, 或激活 T 杀伤性细胞或通过分泌有关的细胞因子使机体产生免疫反应。其中辅助性 T 淋巴细胞 1 (Th1) 分泌白介素 2 (IL-2)、 γ -干扰素 (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α), 在细胞介导免疫应答中发挥作用, 辅助性 T 淋巴细胞 2 (Th2) 分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13, 在抗体应答中发挥作用, B 细胞活化后, 增殖分化形成浆细胞, 合成并分泌免疫球蛋白, 参与体液免疫应答。由此可见, DNA 疫苗可望全面诱导机体产生 Th 细胞应答、CTL 应答和体液免疫应答。

3 猪囊尾蚴病 DNA 疫苗

3.1 AgB 基因疫苗 Landa 等^[2]从猪囊尾蚴蛋白分离的副肌球蛋白抗原 (又名抗原 B, AgB), 其保守性较强, AgB 的抗体能抑制补体 C1, 能与胶原连接, 能被多种寄生性蠕虫阳性血清识别, 是一种有希望的疫苗分子。柴忠威等^[3]和王庆敏等^[4]成功克隆了 AgB 基因的 cDNA 编码区, 测序结果表明该抗原与澳大利亚株猪囊尾蚴副肌球蛋白的基因序列有较高的同源性。

才学鹏等^[5]通过 RT-PCR 扩增 AgB 编码基因, 并将其克隆入 PV93 真核表达载体, 转染 JM83 细胞, 构建重组质粒 PV93-AgB, 分别将 100 μ g PV93-AgB 作为常规疫苗与 100 μ g PV93-AgB 加转移因子 (transfer factor, TF) 作为增强性 DNA 疫苗, 肌肉注射免疫 2~3 月龄健康猪, 分别于免疫 14 d 和 4 个月后, 口服感染 18 000 个猪带绦虫卵, 3 个月后剖杀, 检测免疫猪抗 AgB 特异性抗体水平, 结果显示, 免疫猪抗 AgB 特异性抗体水平显著升高, 且 DNA 疫苗免疫 14 d

和 4 个月对攻击感染的免疫效果不同, 常规疫苗减蚴率分别为 91.2% 和 93.1%, 增强性 DNA 疫苗减蚴率分别为 99.5% 和 84.9%。

王庆敏等^[6]将 AgB 的 cDNA 插入真核表达质粒载体 pcDNA3, 构建重组质粒 pcDNA3-AgB, 取重组质粒 pcDNA3-AgB 100 μ g, 肌肉注射免疫 4~6 周龄昆明小鼠和 C57BL/c 小鼠 1 次, 1 周后各加强免疫 1 次, 2 周后 C57BL/c 小鼠再加强免疫 1 次, 于末次免疫后 2、3、4、6、8 和 10 周取血分离血清。发现免疫鼠血清 IgG 和 IgG2a 升高; 脾细胞 IL-2 明显升高, 而 IL-4 无显著变化; 脾细胞伴刀豆球蛋白 A 刺激指数明显增高。提示该疫苗可诱导保护性的 Th1 反应。将 1 mg 重组质粒 pcDNA3-AgB 肌肉注射免疫 10 日龄健康仔猪, 两周后每隔 1 周同法加强免疫 2 次, 口服感染 20 000 个猪带绦虫卵, 90 d 剖检, 可获得 80% 保护力, 提示该疫苗诱导的保护力与 Th1 反应有关。

为提高 AgB 核酸疫苗的保护效果, 王庆敏等^[7]用重组质粒 pcDNA3-AgB 和人细胞因子的真核表达质粒 pcDNA3-IL-2 联合免疫小鼠, 发现免疫鼠血清 IgG 和 IgG2a 水平明显增高, 脾细胞明显增殖, 其分泌的 IL-2 水平明显增高; 免疫后的仔猪对攻击感染有 83.4% 保护率, 而重组质粒 pcDNA3-AgB 组为 70%, 提示人的 IL-2 表达质粒是一种很好的免疫佐剂, 能增强核酸疫苗 AgB 在动物体内的细胞免疫和体液免疫, 提高疫苗诱导的保护力。

Guo 等^[8]分别用重组质粒 pcDNA3-AgB 200 μ g 和 1 000 μ g 肌肉注射免疫 3 月龄健康猪, 9 d 后口服感染 20 000 个猪带绦虫卵, 结果显示 1 000 μ g 组于攻击感染第 14 天检测到特异性抗体, 并于第 21 天达到峰值, 外周血单个核淋巴细胞 (PBMC) 明显增殖, 保护率为 92.6%, 而 200 μ g 组保护率仅为 36.6%。提示 DNA 疫苗不同的免疫剂量的免疫保护力不同。

孙树汉等^[9]以重组质粒 pcDNA3-AgB 为基础, 突变其中 AgB cDNA 中的未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (CpG) 序列, 构建 pcDNA3-AgB', 将 pcDNA3-AgB' 和 pcDNA3-AgB 各 50 μ g 分别肌肉注射免疫 4~6 周龄 C57BL/c 小鼠, 1 周后加强免疫 1 次, 于末次免疫后第 2、4、6、8 和 10 周分别取血分离血清, 发现 pcDNA3-AgB 组免疫鼠血清产生高水平的 IgG 和 IgG2a, 表明 pcDNA3-AgB 核酸疫苗所诱导的小鼠免疫反应, 不仅具有其表达产物 AgB 蛋白的抗原作用, 还与 AgB cDNA 中的 CpG 序列的免疫激活作用有关。与 pcDNA3-AgB 核酸疫苗比较, CpG 序列突变的 pcDNA3-AgB' 核酸疫苗诱导产生 IgG 和 IgG2a 水平显著降低。

3.2 cC1 基因疫苗 孙树汉等^[10]以猪囊尾蚴病患者、病猪血清为探针,从猪囊尾蚴 cDNA 文库中筛选出一具有高度特异性和敏感性的人、猪共同抗原 cC1,经免疫学检测证实该抗原不仅可作为猪囊尾蚴病诊断用特异性抗原,而且具有一定免疫保护作用。

吴丹等^[11]将全长 cC1 cDNA 插入真核表达载体 pcDNA3,构建重组质粒 p3-cC1,取其 50 μg 肌肉注射免疫 4~6 周龄昆明小鼠,两周后加强免疫 1 次,于末次免疫后 2、4、6、8 和 10 周取血分离血清,检测出高水平的特异性抗体和 IgG2a。同法免疫 5~10 d 龄仔猪,于末次免疫 1 周后,口服 20 000 个猪带绦虫卵攻击,90 d 后剖检,免疫仔猪获得 73% 的保护率,提示猪囊尾蚴保护性基因疫苗 p3-cC1 能有效诱导仔猪的免疫保护效应^[12]。

为提高基因疫苗 p3-cC1 的保护效果,吴丹等^[13]用 PCR 扩增猪 IL-4 cDNA 和 cC1 cDNA 片段并进行融合,构建了融合表达质粒 pIL-4cC1,以期通过细胞因子基因的共表达提高免疫水平。

吴丹等^[14]将重组质粒 p3-cC1 和猪细胞因子 IL-4 的真核表达质粒 pcDNA-pIL-4 联合免疫 5~10 d 龄仔猪,两周后加强免疫 1 次,于末次免疫后 2、4、6 和 8 周取血,发现免疫鼠可产生高水平的特异性 IgG,再次证实以细胞因子为佐剂的联合免疫可提高机体的抗体应答水平。

吴丹等^[15]将 100 μg 重组质粒 p3-cC1 肌肉注射免疫 4~6 周龄 BALB/c 小鼠,间隔 10 d 加强免疫 2 次,然后取 20 μg 融合蛋白 GST-c1C 加 20 μg 完全福氏佐剂(FCA)背部皮下多点注射加强免疫 1 次,末次免疫后 2 周免疫鼠血清特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 显著升高,脾淋巴细胞明显增殖,脾细胞产生高水平的 IFN-γ 和 IL-4,表明抗原 cC1 以不同的形式(DNA 疫苗或抗原疫苗)免疫动物可诱导不同类型的免疫应答(Th1 型或 Th2 型辅助性淋巴细胞)。

王庆敏等^[16]将 100 μg 的 DNA 疫苗 pcDNA3-cC1 肌肉注射免疫 4~6 周龄 BALB/c 小鼠,两周后加强免疫 1 次,于末次免疫后 2、3、4、6、8 和 10 周取血,发现免疫鼠血清产生高水平的 IgG 和 IgG2a,脾淋巴细胞明显增殖,脾细胞产生高水平的 IL-2,而 IL-4 无显著性变化。将 100 μg DNA 疫苗 pcDNA3-cC1 肌肉注射免疫 1 月龄仔猪,间隔 2 周后,加强免疫 1 次。末次免疫后 1 周口服 20 000 个猪带绦虫卵攻击感染,于攻击感染后 90 d 剖检,仔猪获得 73.3% 保护率,进一步检测显示体内囊尾蚴发生细胞凋亡现象,提示 DNA 疫苗 pcDNA3-cC1 可诱导宿主产生 Th1 细胞保护性免疫应答,且具有诱导寄生生物体细胞凋亡作用。

3.3 45W 基因疫苗 Waterkeyn 等^[17]用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离羊绦虫六钩蚴抗原,切下相对分子质量(M_r)为 47 000~52 000 的蛋白条带免疫羊,可诱导产生 98% 的保护率。Johnson 等^[18]用该蛋白免疫羊制备的特异性抗体探针,筛选羊绦虫六钩蚴文库,获得阳性克隆,命名为 45W 基因,用其在大肠埃希菌中的表达产物 45W-GST 免疫羊,获得 94% 的保护率。

Gauci 等^[19,20]成功克隆猪带绦虫六钩蚴 TSO45W 基因,发现猪带绦虫和羊绦虫(*Taenia ovis*, To)45W 抗原的同源性较高,其中猪带绦虫 TSO45-1A 与羊绦虫 45W 抗原的氨基酸同源性达 61%。TSO45W 基因属多基因家族,至少有 5 个成员组成,每一基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成,可通过交替剪切(alternative splicing)形成 A、B 和 C 等 3 种转录本,其中 B 型转录本的含量比较丰富,而 TSO45W-4B 在同型转录本中同源性较低(80%),但该基因在不同虫株间和不同克隆间高度保守,推测 TSO45W-4B 可能在六钩蚴入侵宿主阶段起重要作用。

王福梅等^[21]研究表明 TSO45W-4B 重组蛋白可诱导猪产生较好的保护力。在此基础上方强等^[22,23]将 TSO45W-4B 基因克隆至真核表达质粒 pcDNA3.1,构建重组质粒 pcDNA3.1/TSO 45W-4B,将其肌肉注射免疫 4 周龄昆明小鼠,证实 TSO45-4B 基因在免疫组注射部位肌纤维细胞中得到高效表达,但未进行 pcDNA3.1/TSO45W-4B 的保护力实验。

3.4 TSOL18 基因疫苗 Harrison 等^[24]将羊绦虫六钩蚴抗原用 SDS-PAGE 分离,切下 M_r 12 000~18 000 的蛋白条带免疫羊,之后用绦虫虫卵的攻击,结果表明对羊产生 98% 的保护力。用 M_r 18 000 特异性抗血清筛选羊绦虫六钩蚴 cDNA 文库,所克隆基因在大肠埃希菌中表达的融合蛋白 GST-18 免疫羊,也可产生 99% 的免疫保护作用。

Gauci 等^[25]用载体 λgt11 构建猪带绦虫六钩蚴 cDNA 文库,用地高辛标记的羊绦虫 To18 cDNA 为探针杂交分析,筛选出阳性克隆 TSOL18,序列分析发现与其他带绦虫宿主保护性抗原具有很高的同源性。

郭爱疆等^[26]在克隆 pGEX-4T-1/TSOL18 的基础上构建了真核表达质粒 pVAX1/TSOL18,转染乳仓鼠肾细胞(BHK-21 细胞),发现其可表达 TSOL18 目的蛋白,表达蛋白能被猪囊尾蚴病阳性血清所识别。将其肌肉注射免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠 3 次,每次间隔 2 周,末次免疫后 10 d 发现免疫鼠产生较高水平的特异性抗体,脾淋巴细胞明显增殖,提示真核表达质粒 pVAX1/TSOL18 可诱导小鼠产生细胞免疫和体液免疫

应答,但未进行其保护力实验。

3.5 TS76 基因疫苗 孟民杰等^[27]将猪囊尾蚴抗原基因 TS76 重组到真核表达质粒 VR1020 中,转染真核表达细胞(Cos7 细胞),显示 TS76 基因能够正确表达猪囊尾蚴抗原蛋白。未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)序列是一些以未甲基化的 CpG 为核心的寡聚脱氧核苷酸,具有强烈的免疫激活功能;阳离子脂质体作为质粒 DNA 的有效包裹材料,不仅可提高转染效率,而且还有良好的免疫佐剂效应。龙章富等^[28]和武梅等^[29]证明阳离子脂质体包裹猪白介素 6(VPIL-6)和 CpG 序列对猪带绦虫 VTS76 基因疫苗具有较强的免疫增强作用,主要是通过产生较高的特异性抗体和 IgG 含量、增强免疫小鼠淋巴细胞增殖反应的刺激作用和免疫小鼠脾淋巴细胞 IL-2 的诱生活性,以及刺激增加免疫细胞的数量而实现的。

3.6 TS21 和 TS11 基因疫苗 巫雪艳等^[30]和沈斌等^[31]分别将猪囊尾蚴抗原基因 TS21 和 TS11 重组到真核表达质粒 VR1020 中,构建重组质粒 VTS21 和 VTS11,分别将 100 μg VTS21 或 VTS11 肌肉注射免疫 2 月龄 BALB/c 小鼠,两周后加强免疫 1 次,于末次免疫后 1、2 和 3 周取血清和脾脏,发现免疫鼠 IgG 和特异性抗体水平均显著升高,脾淋巴细胞明显增殖,脾淋巴细胞产生高水平的 IL-2,免疫鼠淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞的数量显著增加,表明 VTS21 和 VTS11 有较强的免疫原性,可诱导小鼠产生特异性细胞免疫和体液免疫反应,具有成为猪囊尾蚴病 DNA 疫苗的潜力。但对其抗猪囊尾蚴的免疫保护实验尚需作进一步研究。

4 结语

DNA 疫苗是一种新型疫苗,用于猪囊尾蚴病的防治具有广阔的前景。但将 DNA 疫苗发展成为一种理想的猪囊尾蚴病疫苗,需亟待解决以下问题:①从理论上讲,猪囊尾蚴病 DNA 疫苗有可能整合到宿主细胞染色体基因组 DNA 上,使宿主细胞肿瘤抑制基因失活或肿瘤基因活化,产生癌变以及引起宿主免疫系统功能紊乱等方面的潜在危险,其安全性问题应引起人们的注意;②同时还应加强猪囊尾蚴病 DNA 疫苗的免疫保护效果研究。例如,由于猪带绦虫抗原成分复杂,应继续寻找免疫原性更强的候选抗原基因;③由于猪囊尾蚴在宿主体内长期寄生过程中,产生多种免疫逃避机制,人们采用了一些免疫因子如 CpG 免疫激活序列、IL-2、IL-4、IL-6 等细胞因子作为疫苗的免疫增强佐剂,产生了较好的免疫保护效果。但适宜表达载体的选择、最佳免疫途径和剂量的

摸索、保护性免疫机制、以及影响免疫效果的因素等方面仍探索;④开辟新途径、寻找新的有效的候选疫苗抗原基因或通过优化组合新抗原分子以提高免疫保护效果。

随着基因组学、蛋白质组学、基因芯片等分子生物学技术及免疫学的发展,以上问题可望得到逐步阐明,为早日将 DNA 疫苗用于猪囊尾蚴病防治做出贡献。

参 考 文 献

- [1] Yang AG. Epidemiology and control progress in swine cysticercosis [J]. Sichuan Anim Vet Sci, 2001, 28(6): 29-30. (in Chinese) (阳爱国. 猪囊尾蚴病流行及防治进展[J]. 四川畜牧兽医, 2001, 28(6): 29-30.)
- [2] Landa A, Lilette J, Well S. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloro-extraction [J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 60(2): 343-348.
- [3] Chai ZW, Cai XP, Deng GH, et al. Cloning and identification of cysticercus cellulosa AgB gene [J]. Chin J Prev Vet Med, 1999, 21(4): 308-310. (in Chinese) (柴忠威, 才学鹏, 邓国华, 等. 猪囊尾蚴 B 抗原的克隆及鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(4): 308-310.)
- [4] Wang QM, Dai JX, Zhang PW, et al. Cloning of cysticercus cellulosa AgB cDNA coding region [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2000, 18(2): 73-75. (in Chinese) (王庆敏, 戴建新, 张平武, 等. 猪囊尾蚴抗原-B 基因 cDNA 编码区的克隆 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(2): 73-75.)
- [5] Cai XP, Chai ZW, Jing ZZ, et al. Studies on the development of DNA vaccine against cysticercus cellulosa infection and its efficacy [J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 2001, 32(Suppl 2): 105-110.
- [6] Wang QM, Chen RW, Guo YJ, et al. Study on immune protection elicited by cysticercus cellulosa paramyosin (AgB) nucleic acid vaccine [J]. Acad J Sec Milit Med Univ, 2000, 21(6): 504-507. (in Chinese) (王庆敏, 陈蕊雯, 郭瀛军, 等. 猪囊尾蚴副肌球蛋白核酸疫苗的免疫保护性研究 [J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(6): 504-507.)
- [7] Wang QM, Chen RW, Wu D, et al. Immunoregulatory effect of plasmid expressing human interleukin-2 on the immune response of paramyosin nucleic acid vaccine [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2002, 22(6): 622-624. (in Chinese) (王庆敏, 陈蕊雯, 吴丹, 等. 人 IL-2 真核表达质粒对副肌球蛋白核酸的免疫调节作用 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(6): 622-624.)
- [8] Guo AJ, Jin ZZ, Zheng YD, et al. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination [J]. Vaccine, 2007, 25(1): 170-175.
- [9] Sun SH, Guo YJ, Wang QM, et al. Immunostimulatory activity elicited by CpG sequences in cysticercus cellulosa paramyosin cDNA [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19(5): 298-299. (in Chinese) (孙树汉, 郭瀛军, 王庆敏, 等. 猪囊尾蚴副肌球蛋白 cDNA 中 CpG 序列的免疫激活作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(5): 298-299.)
- [10] Sun SH, Wang JX, Chen RW, et al. Molecular cloning of cDNA encoding immunodiagnostic antigens of cysticercosis [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1997, 15(1): 15-20. (in Chinese) (孙树汉, 王俊霞, 陈蕊雯, 等. 囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 分子克隆 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(1): 15-20.)
- [11] Wu D, Guo YJ, Lin Y, et al. Protective immunity induced by DNA vaccine of cysticercus cellulosa antigen [J]. Acad J Sec Milit Med Univ, 2000, 21(6): 508-510. (in Chinese)

- (吴丹, 郭瀛军, 林懿, 等. 猪囊尾蚴抗原 DNA 疫苗诱导的免疫保护反应[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(6): 508-510.)
- [12] Sun SH, Guo YJ, Chen RW, *et al.* Apoptosis of cysticercus cellulosa induced by immunotherapy with DNA vaccine pcDNA3- γ cC1[J]. Acad J Sec Milit Med Univ, 2000, 21(6): 1090-1091. (in Chinese)
(孙树汉, 郭瀛军, 陈蕊雯, 等. 核酸疫苗 pcDNA3- γ cC1 诱导囊尾蚴细胞凋亡的作用[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(6): 1090-1091.)
- [13] Wu D, Guo YJ, Sun SH. Construction of DNA vaccine including a chimeric gene encoding cysticercus cellulosa antigen and porcine interleukin-4[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1999, 17(3): 172-174. (in Chinese)
(吴丹, 郭瀛军, 孙树汉. 猪囊尾蚴抗原与猪白细胞介素-4 基因融合 DNA 疫苗载体的构建[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(3): 172-174.)
- [14] Wu D, Guo YJ, Wang QM, *et al.* Clone of porcine IL-4 cDNA and its application in DNA vaccine of cysticercus cellulosa[J]. Acad J Sec Milit Med Univ, 2002, 23(11): 1192-1194. (in Chinese)
(吴丹, 郭瀛军, 王庆敏, 等. 猪白细胞介素 4 的基因克隆及其在囊尾蚴 DNA 疫苗中的应用[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(11): 1192-1194.)
- [15] Wu D, Wang QM, Chen RW, *et al.* Immune response to combined DNA vaccine and protein vaccine against *T. solium* cysticercosis in mice[J]. Acad J Sec Milit Med Univ, 2004, 25(1): 34-36. (in Chinese)
(吴丹, 王庆敏, 陈蕊雯, 等. 猪囊尾蚴抗原 cC1 DNA 疫苗和蛋白质疫苗联合诱导小鼠免疫应答[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(1): 34-36.)
- [16] Wang QM, Sun SH, Hu ZL, *et al.* Immune response and protection elicited by DNA immunization against *Taenia* cysticercosis[J]. Vaccine, 2003, 21(15): 1672-1680.
- [17] Waterkeyn JG, Lightowlers MW, Coppel R, *et al.* Characterization of the gene family encoding a host-protective antigen of the tapeworm *Taenia ovis*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 73(1-2):123-131.
- [18] Johnson KS, Harrison GB, Lightowlers MW, *et al.* Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen[J]. Nature, 1989, 338(6216): 585-587.
- [19] Gauci CG, Lightowlers MW. Molecular cloning of genes encoding oncosphere proteins reveals conservation of modular protein structure in cestode antigens[J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 127(2): 193-198.
- [20] Gauci CG, Lightowlers MW. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 112(2): 173-181.
- [21] Wang FM, Luo XN, Jing ZZ, *et al.* Study on immunogenicity in pigs elicited by recombinant protein 45W-4B vaccine of *Taenia solium* oncosphere[J]. Chin J Vet Parasitol, 2006, 14(3): 1-5. (in Chinese)
(王福梅, 骆学农, 景志忠, 等. 猪带绦虫六钩蚴 45W-4B 重组蛋白的免疫原性研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 2006, 14(3): 1-5.)
- [22] Fang Q, Sun X, Xia H, *et al.* The construction of the recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/TSO45W-4B containing *Taenia solium* oncosphere stage-specific antigen gene TSO45-4B[J]. J Bengbu Med Coll, 2006, 31(4): 334-335. (in Chinese)
(方强, 孙新, 夏惠, 等. 猪带绦虫六钩蚴期特异性抗原基因真核表达质粒 pcDNA3.1/TSO 45W-4B 的构建[J]. 蚌埠医学院学报, 2006, 31(4): 334-335.)
- [23] Xu SG, Fang Q, Sun X, *et al.* Preparation of rabbit sera of anti-*Taenia solium* oncosphere and *in vivo* expression of recombinant plasmid pcDNA3.1/TSO45W-4B in skeletal muscle of vaccinated mice[J]. J Bengbu Med Coll, 2006, 31(5): 441-444. (in Chinese)
(徐胜贵, 方强, 孙新, 等. 抗猪带绦虫六钩蚴兔血清的制备及重组质粒 pcDNA3.1/TSO 45W-4B 在小鼠骨骼肌的表达[J]. 蚌埠医学院学报, 2006, 31(5): 441-444.)
- [24] Harrison GBL, Heath DD, Dempster RP, *et al.* Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncosphere[J]. Int J Parasitol, 1996, 26(2): 195-204.
- [25] Gauci CG, Flisser A, Lightowlers MW. A *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18kD antigens[J]. Int J Parasitol, 1998, 28(5): 757-760.
- [26] Guo AJ, Cai XP, Fang YX, *et al.* Construction of gene vaccine vector carrying TSOL18 gene of *Taenia solium* oncosphere and its immunogenicity[J]. Acta Vet Zootech Sin, 2008, 39(7): 945-949. (in Chinese)
(郭爱疆, 才学鹏, 房永祥, 等. 猪带绦虫六钩蚴 TSOL18 基因疫苗表达载体的构建及其免疫原性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7): 945-949.)
- [27] Meng MJ, Gao R, Shen B, *et al.* The eukaryotic expression of TS76 antigenic gene of cysticercus cellulosa[J]. J Sichuan Univ (Nat Sci), 2001, 38(2): 247-250. (in Chinese)
(孟民杰, 高荣, 沈斌, 等. 猪带绦虫抗原基因 TS76 真核表达的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2001, 38(2): 247-250.)
- [28] Long ZF, Gao R, Meng MJ, *et al.* The effect of porcine interleukin-6 gene entrapped with cationic liposome on the immune responses of mice inoculated with the antigenic gene vaccine of *Taenia solium*[J]. High Technol Letters, 2003, 13(3): 25-29. (in Chinese)
(龙章富, 高荣, 孟民杰, 等. 脂质体包裹猪白细胞介素 6 基因对猪带绦虫抗原基因免疫小鼠的影响[J]. 高技术通讯, 2003, 13(3): 25-29.)
- [29] Wu M, Gao R, Li JL, *et al.* The effect of CpG sequence and cationic liposome on the immune responses of the antigenic gene vaccine of *Taenia solium*[J]. High Technol Letters, 2002, 12(7): 39-41. (in Chinese)
(武梅, 高荣, 李江凌, 等. CpG 序列及阳离子脂质体对猪带绦虫抗原基因免疫应答的影响[J]. 高技术通讯, 2002, 12(7): 39-41.)
- [30] Wu XY, Gao R, Shen B, *et al.* Immune responses of mice to DNA vaccination with VTS21 of *Taenia solium*[J]. Chin J Vet Sci Technol, 2003, 33(6): 18-22. (in Chinese)
(巫雪艳, 高荣, 沈斌, 等. 猪囊尾蚴 TS21 抗原 DNA 接种小鼠的免疫应答[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(6): 18-22.)
- [31] Shen B, Gao R, Meng MJ, *et al.* Immune responses of mice to DNA vaccination prepared with VTS21 antigen of *Taenia solium* in swine[J]. Chin J Vet Med, 2004, 40(1): 3-6. (in Chinese)
(沈斌, 高荣, 孟民杰, 等. 猪带绦虫 TS11 抗原基因接种小鼠的免疫应答[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(1): 3-6.)

(收稿日期: 2009-03-25 编辑: 杨频)