

# 寄生虫学主要研究进展及发展方向

陈启军\*, 尹继刚

【摘要】 本文综述寄生虫学主要研究进展, 包括寄生虫病诊断技术、致病机制、抗药性、寄生虫免疫逃避、基因组与蛋白组学以及疫苗等。同时对某些领域的发展方向提出观点, 对于寄生虫学研究及教学具有一定参考意义。

【关键词】 寄生虫学; 分子生物学; 进展

中图分类号: R38 文献标识码: A

## Research and Perspectives in Parasitology

CHEN Qi-jun\*, YIN Ji-gang

(Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education; Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China)

【Abstract】 This article reviews the recent achievements in parasitology including new diagnostic techniques, molecular mechanism of parasitic pathogenesis, drug resistance, antigenic variation, parasite genomics and proteomics. The perspective development in the area is also discussed.

【Key words】 Parasitology; Molecular biology; Development

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30625029, No. 30400324)

\* Corresponding author, E-mail: chenqj@jlup.edu.cn

寄生虫包括原虫、蠕虫和外寄生虫, 是引起人类和动物疾病的重要病原<sup>[1]</sup>。有些寄生虫如恶性疟原虫和血吸虫被认为是对人类危害最为严重的病原。然而, 寄生虫学研究在很多方面相对落后于细菌学和病毒学的发展。近年来, 随着国际社会对寄生虫病危害的认识的转变, 对寄生虫学基础研究投资力度逐渐加大。寄生虫学, 尤其是分子寄生虫学的快速发展在一定程度上也推动了生命科学研究的总体发展步伐。越来越多的寄生虫基因组序列被解析, 为寄生虫虫种的鉴定、疾病的遗传学诊断、重要致病机制、新的抗原分子和代谢途径的发现及新的抗寄生虫药物的筛选提供了前所未有的机遇<sup>[2-4]</sup>。本文综述目前分子寄生虫学的主要研究进展并对一些领域的发展方向提出作者的一些观点。

### 1 寄生虫病诊断技术

寄生虫病原检测、鉴定与寄生虫病的诊断技术的

发展历程, 主要经历了以下 3 个阶段。

1.1 形态学方法 寄生虫检测、鉴定及寄生虫病的诊断, 在很长一段时间里主要依据对虫体或虫卵的形态学观察。血液寄生虫多采用固定、染色再进行显微镜观察。肠道寄生虫如各种蠕虫和原虫, 可直接凭借形态观察方法进行诊断。这些方法的特异性较高, 但敏感性往往较低。因为只有当被检材料中的虫体达到一定数量时才能被观察到。其优点是费用低, 不需要非常复杂的仪器设备, 但效率低。随着学科的不断发展和防治工作的深入, 形态学方法已不能适应大规模普查和疾病流行预警工作的需要。该法对形态特征相近的病原的鉴别能力比较差, 也无法区分病原的致病力。

1.2 生物化学和免疫学方法 随着生物化学方法 (如同工酶试验) 和免疫学技术的出现<sup>[5]</sup>, 尤其是各种免疫学技术的发明, 寄生虫病的诊断技术也向更高水平发展。用于寄生虫病诊断的免疫学方法主要有: 凝集试验, 补体结合试验、酶联免疫吸附试验、蛋白质印迹分析和免疫荧光试验等<sup>[6]</sup>。免疫学方法所用的抗原有两种, 一种是从虫体提取的天然抗原 (一般为混合成分)。很多虫体尤其是单细胞原虫 (如弓形虫、巴贝

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30625029, No. 30400324), 国家重点基础研究发展计划 (973) (2007CB513100)

作者单位: 教育部人兽共患病重点实验室, 吉林大学人兽共患病研究所, 长春 130062

\* 通讯作者, E-mail: chenqj@jlup.edu.cn

斯虫、泰勒虫、球虫和隐孢子虫等) 的体外培养技术逐渐成熟<sup>[7]</sup>, 通过培养的虫体制备诊断抗原, 既纯净又是天然抗原, 因而所获得的检测结果也更加可靠。但混合抗原的特异性可能较低, 尤其不能区分种原相近的虫体。如很多蠕虫的糖蛋白的抗原性很接近。另一种诊断用抗原是基因工程重组抗原。随着寄生虫分子生物学研究的不断开展, 寄生虫种特异抗原的基因不断被分离和克隆, 以基因工程方法制备的重组抗原在寄生虫学研究领域逐渐开始被应用。基因工程重组抗原的应用很大程度地提高了免疫学诊断的特异性和可靠性。目前, 基因重组抗原多采用大肠埃希菌表达系统, 其操作简单, 费用低, 蛋白质容易提纯。但该方法存在一些弊端, 如很多蛋白质表达后多形成包涵体, 从包涵体提取的蛋白质都是变性蛋白质。而很多寄生虫蛋白质的功能都取决于蛋白质的三级结构。抗这些蛋白质的抗体多识别蛋白质的结构域 (conformational epitopes)。当用变性或不具有正确结构的蛋白质作为抗原进行免疫学诊断, 所取得的结果往往不能反映对病原的真实免疫反应。此外, 以大肠埃希菌表达的抗原作为诊断性抗原有时会出现假阳性。这主要是由于大肠埃希菌本身的一些蛋白质与表达的重组蛋白质发生相互黏附。一些大肠埃希菌的自身蛋白与有些葡聚糖凝胶等支持物也有很强的黏附作用。在最后对重组蛋白质的洗脱 (elution) 过程中, 有些细菌蛋白质就会与重组蛋白质一起被洗脱下来。由于各种动物包括人的体内都有识别各种细菌成分的抗体, 这些抗体必然会与重组蛋白质中的污染蛋白质发生反应, 进而影响真实的反应结果。目前利用蚕细胞和酵母细胞表达寄生虫抗原的方法逐渐成熟。利用这两种系统制备的抗原不论在结构上还是在纯度方面都优于大肠埃希菌表达的抗原<sup>[8]</sup>。随着各种寄生虫特异性抗原基因的克隆, 重组蛋白质抗原将逐渐取代天然抗原用于寄生虫病的诊断。此外, 寄生虫病诊断的方法学也在发生变化<sup>[5]</sup>。

**1.3 分子生物学及遗传学方法** 寄生虫病的分子生物学诊断方法包括基因探针杂交法和基因扩增法<sup>[9, 10]</sup>。传统的基因探针法是利用基因组中的某一个特异片段, 与待检测的 DNA 样品进行杂交。该方法的特异性很强, 但操作程序很复杂, 而且要求特殊的检测仪器。很少被用于实际临床诊断。随着病原生物的基因组序列不断被测定, 传统的基因探针技术逐渐被基因微点阵 (microarray) 或 DNA 芯片杂交技术所取代。Microarray 可以将一个或几个病原生物的基因组放在一个检测系统中, 该技术不但可以对病原进行准确的鉴定, 还可以比较不同分离株之间的遗传学差异、预

测毒力的强弱、抗药性的有无及强弱等<sup>[11]</sup>。目前, 很多公司都在开发一种便携式病原快速检测仪, 其基本原理就是芯片杂交。该技术非常适合大规模流行病学调查, 但对于经济条件比较落后的地区并不现实。

寄生虫病的分子生物学检测和诊断技术应用最为普遍的方法还是 PCR 扩增法<sup>[10]</sup>。其优点是敏感性和特异性较高。在对 PCR 反应条件进行优化后, 其敏感性可以达到检测到一个单细胞的虫体。根据 PCR 扩增产物的特征, 还可以确定病原的基因型。建立 PCR 诊断方法的关键是确定扩增的目标 (靶) 序列。用于检测寄生虫的靶序列主要有 3 种, 一是单拷贝种特异基因, 如疟原虫的 MSP2、GLUP 基因和弓形虫的 SAG2 等。这些基因为该虫种所特有, 一般不存在交叉扩增的问题。二是种内多拷贝基因或重复序列, 如弓形虫的 B1 基因, 在一个基因组内复制 35 次以上, 是检测弓形虫感染的首选基因<sup>[12]</sup>。三是核糖体 DNA (rDNA)。rDNA 基因在生物进化过程中发生变异的几率较小, 是基因组序列中较稳定的部分之一。此外 rDNA 往往以多拷贝形式存在, 是进行 PCR 扩增较理想的靶序列。然而, 很多生物的 rDNA 序列存在属间保守问题, 有时会造成非特异性扩增。但 rDNA 基因序列之间的间隔序列 (spacer) 在不同种生物之间差异很大, 是进行 PCR 扩增的更为理想的靶序列<sup>[13]</sup>。

目前在常规 PCR 方法的基础上发展起来的荧光定量 PCR 方法已经开始在包括寄生虫病的检测和诊断中应用<sup>[14]</sup>。该方法尤其是 TaqMan 方法较普通荧光定量 PCR 的敏感性和特异性均较高, 其最大的优点是可同时对多个样品进行检测。然而不论常规 PCR 还是荧光定量 PCR, 都对实验操作人员的技术要求很高。除了熟悉仪器的操作程序以外, 还要求熟练掌握很复杂的生物信息学和统计学的方法 (引物设计和结果分析)。此外, 昂贵的仪器设备和试剂也限制了该方法的推广使用。

## 2 寄生虫与宿主的相互作用及致病机制

对寄生虫与宿主之间的相互作用及其致病机制的研究一直是寄生虫学研究领域内的主要研究内容。寄生虫对宿主的致病作用主要表现在以下几个方面。

**2.1 通过对宿主细胞的特异性吸附进而影响重要器官的功能** 血孢子虫的致病作用主要是通过这种方式造成的。能够造成动物和人急性感染的巴贝斯虫、泰勒虫、疟原虫、弓形虫等在不同的发育时期都利用表达虫体 (子孢子、裂殖子) 表面的多种黏附蛋白与宿主细胞表面的受体 (包括多糖和蛋白质) 结合, 从而保证不论虫体在任何一种遗传背景的个体内都可以成功

的繁殖下去。此外,为了逃避宿主脾脏和特异免疫系统的清除作用,巴贝斯虫和恶性疟原虫还利用表达到的红细胞表面膜蛋白与毛细血管内皮细胞上的受体(如 CD31、CD36 和 ICAM-1) 结合,进而黏附在后毛细血管区,既逃避了宿主的免疫清除,又有利于繁殖<sup>[15,16]</sup>。由于大量的虫体在不断消耗宿主细胞的同时,还黏附在宿主的毛细血管内,进而导致血管堵塞和严重的局部炎症反应。恶性疟原虫致病作用的另外一个特点是对孕妇致病作用强。在孕妇体内繁殖的虫体表达一种特殊的膜蛋白,对子宫内皮细胞表面的硫酸软骨素(chondroitin sulfate A, CSA) 具有很强的结合作用<sup>[17]</sup>。弓形虫对胎儿的神经系统具有很强的侵蚀作用,可造成死胎或神经系统发生严重损害的畸形儿<sup>[18]</sup>。寄生在肠黏膜细胞的艾美球虫、隐孢子虫也是通过虫体表达的特异蛋白与宿主上皮细胞相互作用而致病的<sup>[19,20]</sup>。

**2.2 在细胞内寄生、繁殖,导致宿主细胞的大量损失** 很多寄生虫如疟原虫、巴贝斯虫、泰勒虫、弓形虫寄生于宿主细胞内,除了引起上述的病理反应外,随着虫体在细胞内的不断分裂繁殖,导致大量宿主细胞的破坏。疟原虫和巴贝斯虫寄生过程中宿主发生贫血的主要原因之一就是宿主大量的红细胞被虫体裂解。弓形虫寄生在人体的脑神经细胞内,是引起新生儿先天性神经功能不全的主要原因<sup>[18]</sup>。此外,很多细胞外寄生虫如血吸虫、钩虫、血矛线虫等直接消耗(吞噬)宿主红细胞和其他细胞<sup>[21]</sup>。

**2.3 在组织内大量寄生,影响正常的组织功能** 各种肠道寄生的线虫、绦虫,不但对被寄生的器官造成机械性损伤(如线虫性肠梗阻,肠破裂),还严重影响器官的功能甚至威胁生命<sup>[22]</sup>。在组织内寄生的寄生虫幼虫如寄生在人脑组织的囊尾蚴、寄生在肝脏和肺脏的棘球蚴都对宿主造成严重的危害<sup>[23]</sup>。旋毛虫幼虫大量寄生在人和动物的肌细胞内,影响肌组织正常功能<sup>[24]</sup>。

**2.4 诱导免疫病理学反应** 血吸虫的虫卵在患者和动物宿主的肝脏和肠组织内大量聚集后,引起大量的免疫细胞(巨噬细胞和淋巴细胞)在虫卵周围聚集,是造成肝硬化和肉芽肿的主要原因<sup>[25]</sup>。由于虫卵的长期刺激,还可导致肝组织的癌变。在恶性疟患者体内,虫体表达的一种致病因子对 B 淋巴细胞具有很强的亲和力和刺激作用,可引起 B 淋巴细胞的大量分裂扩增。当被疟原虫感染的同时还感染 EB 病毒时(EB 病毒在世界人口中的感染率高达 90%以上),处于潜在感染状态的病毒则被再次激活,进而引起腮腺淋巴瘤<sup>[26]</sup>。此外,寄生性线虫感染后,机体的 IgE 抗体的产生明显增加,IgE 抗体直接与过敏反应有关<sup>[27]</sup>。

**2.5 分泌毒素** 所有寄生虫都分泌对宿主机体有害

的毒素。有些毒素可造成直接的危害,如囊尾蚴体内的液体对人和动物都有很强的毒害作用,可引起人或动物发生休克性死亡。有些毒素的作用比较缓慢,但危害逐渐积累,如血吸虫虫卵分泌的毒素与肝硬化的关系。有些毒素在释放后可引起宿主发生非常明显的生理变化,如巴贝斯虫和疟原虫在从被寄生的红细胞内释放出来时,还将细胞内的毒素释放到血流内,引发机体迅速的毒素反应,主要表现为刺激宿主主体细胞的肿瘤坏死因子(TNF)和干扰素(IFN)分泌增加,造成体温上升,同时使上皮细胞表面的细胞黏附因子表达增加,进一步导致炎症细胞和被虫体寄生的红细胞在局部聚集,引起血管堵塞和器官功能障碍(如脑水肿和肺水肿等)<sup>[15]</sup>。在临床治疗中,减轻(或中和)寄生虫毒素的作用是控制病程发展的主要环节。

人和动物对寄生虫侵袭的反应(尤其是抗寄生虫免疫反应)也是寄生虫学研究的重要内容。其中对寄生虫抗原的特异免疫反应及抗寄生虫感染的保护性免疫机制的研究是建立特异性免疫诊断和研制抗寄生虫病疫苗的重要基础。

### 3 寄生虫的抗药性产生的机制

寄生虫的种原不同,抗药性产生的机制也不同。抗药性的产生有因药物诱导造成的,也有药物选择或筛选出的天然耐药虫株造成的。当前抗药性生物(包括抗药性寄生虫)的产生主要是由于药物诱导造成的。一种药物的开发周期大约在 15 年左右,药物长期使用(尤其是亚剂量)或不规范短期使用,容易诱导虫体发生遗传学的变异<sup>[28,29]</sup>。寄生虫抗药性的机制目前还不完全清楚,一般认为有以下几个方面的原因:①药物的作用靶位发生改变,如抗蠕虫的药物包括苯并咪唑(benzimidazole)对虫体的肌蛋白具有抑制作用,产生抗药性的虫体如血矛线虫的肌纤维中微管蛋白的基因序列发生突变,进而造成药物与微管蛋白的亲合力下降;②抗药基因发生基因复制,进而表达量增加。这种情况主要发生在对多种药物都有抗药性的虫体。长期受药物的作用,使虫体内位于细胞膜上的运输蛋白或细胞内的化合物降解蛋白的基因发生复制,进而导致 mRNA 转录水平和蛋白质表达提高。这种现象在恶性疟原虫和线虫都有发现。避免以上两种抗药性虫体产生的关键因素是使用正确的药物剂量和疗程。这样虫体在没有产生抗药性之前就被药物和机体的免疫系统所清除。开发药效作用快但半衰期短的药物(如青蒿素)也是避免抗药虫体产生的一个很好的办法。③天然抗药虫体。有些寄生虫如疟原虫、锥虫的基因组不稳定,自然条件下就存在不同基因型

的虫体。这些虫体对药物的敏感性也不一定相同。长期使用某种药物的结果是选择了不敏感的基因型。对付这类虫体的唯一方法就是不断开发新的药物和使用复合型的药物。对虫体的遗传变异规律的研究有助于预测抗药性的动态变化。

我国目前在抗寄生虫药物的研究和使用的方面存在的问题主要有 3 方面<sup>[30]</sup>。① 预防性用药比较普遍。主要表现在畜禽的饲料中长期添加抗寄生虫药物。从短期效益上看,使用抗寄生虫药物可以避免寄生虫病的发生,但长期使用必然导致抗药虫株的产生,从而降低药物的使用价值和导致疾病的扩散。另外,大量抗寄生虫药物作为饲料添加剂使用,还造成动物产品中药物污染或残留量过高,既影响产品的质量,又对人体健康构成危害。② 新药的开发周期长,自主知识产权的产品比较少。③ 研究手段落后。应加强寄生虫学基础研究的力度,尽快开展重要寄生虫的基因组学、蛋白质组学及代谢组学的研究是研制和开发出新型抗寄生虫药物的重要基础。

#### 4 寄生虫免疫逃避机制

一般认为有 4 种情况人和动物的机体不能控制侵入体内的病原<sup>[31]</sup>。① 机体的免疫系统发育不全或受到破坏,如 AIDS 患者、化疗期和器官移植患者。② 病原生物在机体内的发育繁殖速度特别快,如弓形虫在猪体内、恶性疟原虫在幼儿体内的繁殖速度都很快,虫体在机体的特异性免疫反应发生作用之前就引起了非常严重的病理反应。③ 病原生物所引起的病理反应对机体的危害迅速。这种现象在某些病毒和细菌感染过程中比较明显,如全身性炭疽、SARS;④ 病原生物具有抗原变异和免疫逃避的功能。抗原变异和免疫逃避是病原生物包括寄生虫在宿主体内存活、繁殖的基础。抗原变异是指病原生物的抗原特征不断发生变化,进而免疫逃避是指病原生物逃避宿主的免疫清除作用<sup>[31]</sup>。

目前了解的寄生虫抗原变异的机制主要有两个方面<sup>[31]</sup>。① 基因序列的突变或改变。一般认为寄生虫在基因复制过程中,DNA 复制酶对错配碱基的识别发生误差,导致基因复制过程中发生基因序列的不同程度的改变。另外一个原因是不同基因型的虫体发生重组,这一现象在具有两性繁殖的虫体更为普遍。来自不同基因型的雌雄配子体在中间宿主或终末宿主体内重组后,子代个体的基因型往往是亲代的杂交体,其表型和抗原性必然发生了变化。还有一种情况是,很多寄生虫(如弓形虫、巴贝斯虫、疟原虫等)的蛋白质序列中,在与受体相结合的功能区的一侧或两

侧,还含有不同长度的重复序列或非保守区。这些重复序列和非保守区的作用虽然不很清楚,但它们确实具有很强的抗原性。机体的免疫反应往往主要是针对这些非功能区,从而使功能区受到了保护(即所谓的烟雾现象)。② 基因表达的调控。有些寄生虫在进化过程中在其基因组内积累了多个编码不同抗原型的基因(多由基因复制及突变形成),即形成变异抗原基因家族。如锥虫属的虫体,其基因组内含有近千个编码表面变异抗原的基因,在每一个虫体的表面只表达其中的一个变异蛋白质。虫体还可以根据机体的免疫应答反应选择不同的基因进行表达,从而保证虫体在宿主体内不断地被繁殖下去。在恶性疟原虫的基因组内含有两个重要的变异抗原基因家族,一个家族(Var 基因家族)含有 60 个左右变异基因,每个虫体在红细胞内的寄生阶段也只表达一个基因。此外,该基因家族的基因序列很不稳定,不论在虫体的有性繁殖过程还是在无性分裂过程中都可以发生序列的突变。另一个家族(Rif 基因家族)含有 150 个左右的基因。这些基因可以在虫体的不同发育阶段表达,其调控机制目前还不很清楚<sup>[32]</sup>。

有些寄生虫对宿主的免疫应答反应具有很强的调节作用。但多数虫体都是通过主动抑制宿主的免疫应答来实现的。蠕虫如血吸虫、旋毛虫、血矛线虫等分泌一些对机体免疫系统具有调节作用的蛋白质成分抑制宿主的特异性免疫应答反应<sup>[33]</sup>。弓形虫、利什曼原虫等直接侵入免疫细胞内,不但能够抑制细胞溶酶体与虫体的融合,还抑制被寄生细胞的凋亡机制,使被寄生的细胞不被其他免疫细胞所识别<sup>[34]</sup>。恶性疟原虫还可通过表达达到被寄生的红细胞表面的蛋白质与树突细胞表面的 CD36 受体结合,在抑制树突细胞成熟过程的同时还激活树突细胞的凋亡过程,进而抑制了树突细胞将抗原提呈给其他免疫细胞<sup>[32]</sup>。除了这些免疫抑制作用外,一些寄生虫还对免疫系统具有非特异性的免疫刺激作用,如锥虫感染的个体血液中 IgM 的含量明显高于非感染个体,但这些 IgM 并不能识别虫体,是没有免疫保护功能的抗体。在恶性疟原虫感染者血液内的球蛋白含量要比非感染者高一倍以上。而这些球蛋白(IgG 和 IgM)并没有免疫保护作用,其原因之一是虫体表达的一种蛋白质对 B 淋巴细胞表面的 IgG 和 IgM 受体具有特殊的亲和力,可刺激 B 淋巴细胞分裂繁殖并分泌没有免疫功能的抗体<sup>[26,32]</sup>。

对寄生虫抗原变异和免疫逃避机制的研究是寄生虫学研究领域的重点研究方向之一。我国寄生虫学在恶性疟原虫、锥虫、巴贝斯虫及血吸虫的抗原变异机制方面的研究都取得了很大的进展。

## 5 寄生虫基因组学与蛋白质组学的研究进展与趋势

大型基因组测序技术的发明和利用使生命科学研究正发生着革命性的变化。基因功能的研究已经开始从单个基因的功能向基因在整个基因组中的变化及与相关基因的关系方向发展。蛋白质组学研究技术的诞生,使基因序列与基因产物的功能分析直接联系在一起。此外比较基因组学通过比较相关生物在基因组水平上的相似性和差异,加快了对生物进化、不同种原生物的致病机制、抗病药物和疫苗的研究进程。

寄生虫基因组和蛋白质组学与其他生物的研究进程基本同步发展<sup>[2,4,35,36]</sup>。其中美丽筒线虫基因组序列的测定及基因组和蛋白质组学的研究也在很大程度上带动了整个生命科学的发展。目前已经完成测序的寄生虫基因组包括恶性疟原虫、约氏疟原虫(*P. yoelii*)、马来丝虫、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、微小隐孢子虫及冈比亚按蚊的基因组全序列。此外对利什曼原虫、弓形虫、贾第虫、阿米巴虫、血吸虫、边缘边虫、鸡艾美球虫、犬新孢子虫、小泰勒虫、人蛔虫、捻转血矛线虫、牛巴贝斯虫及旋毛虫的基因组测序工作也已经取得很大的进展,为寄生虫功能基因组学的研究奠定了重要基础<sup>[2,4,35-37]</sup>。

寄生虫功能基因组学和蛋白质组学研究技术主要包括:①转基因技术。寄生原虫的转基因技术已经基本上成熟,如目前已经建立了可以对弓形虫、疟原虫、利什曼原虫、锥虫、球虫等的基因定点整合技术<sup>[38,39]</sup>。利用该技术,不但可以对虫体基因组中的基因进行敲除,还可以将外源基因进行定点插入。该方法在基因或基因产物的功能分析方面具有很大的应用前景。将目的基因敲除和敲入后观察转基因虫株的表型变化是分析基因或其编码蛋白质功能的非常有效的方法。此外,转基因技术在后基因组时代的基因功能分析中应用比较多的方法是分子标记法(molecular tagging),如将表达荧光素酶(luciferase)或荧光蛋白质的基因定点整合(敲入)到目标基因的上游或下游。通过标记基因表达的时空变化规律及蛋白质的最后分布解析目标蛋白质的功能。另外,基因敲除方法还是制备弱毒虫苗的非常快捷的方法<sup>[40]</sup>。如研究发现,敲除利什曼原虫致病相关基因(或突变),使寄生虫无致病性,但保留免疫原性。②RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术。RNAi技术首先在寄生虫领域得到证实和应用,这一重要发现在2006年被授予诺贝尔医学与生理学奖<sup>[41,42]</sup>。目前该项技术已经在各种生物包括(寄生原虫、线虫和昆虫)的基因功能的分析中得到广泛应用<sup>[42]</sup>。转基因技术多细胞线虫上还没有取得很大突破,但有些线虫却非常容易吸收小

RNA分子(RNAi),这为在整个虫体内研究基因及其表达产物的功能提供了方便。③基因组杂交和定量PCR技术研究基因组表达规律。随着更多寄生虫的基因组序列被测定,以DNA芯片和定量PCR方法进行基因组组成、表达谱及基因组之间同源性及差异性的比较研究将是基因组学研究的重点内容。目前这些技术已经开始从大型的基因组研究中心向普通实验室转移。迅速掌握和运用这些技术是开展高水平分子寄生虫学研究的重要条件。④全细胞蛋白质组学技术。蛋白质组学研究经历了从2D-电泳-质谱(mass spectrometry, 2D-MS)、串联质谱(tandem MS)、表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术(surface-enhanced laser desorption-ionization time-of-flight, SELDI-TOF)到蛋白质芯片技术平台的发展过程,这些技术几乎都已经或正在应用于寄生虫蛋白质组基因组学研究<sup>[43]</sup>。开展寄生虫基因组学和蛋白质组学研究是取得具有自主创新性成果的一个重要方面。我国寄生虫学研究在血吸虫基因组学研究方面已经奠定了很好的基础<sup>[44,45]</sup>,在此基础上进一步加强这方面的研究,必将使我国分子寄生虫学的研究水平提升到一个新的高度。

## 6 寄生虫病疫苗的发展前景

寄生虫病的免疫预防研究起步较晚,目前仍落后于其他病原微生物(如细菌、病毒)疫苗的研究和发展。世界上还没有一个可用于人的寄生虫病疫苗,用于动物的寄生虫病疫苗国内外也只有15种左右。我国用于动物免疫的寄生虫病疫苗只有禽艾美球虫(早熟)弱毒苗、泰勒虫细胞培养苗。20世纪80年代以前,人们对寄生虫病的免疫预防多持谨慎甚至否定态度,认为依靠寄生虫药物完全可以控制寄生虫病的危害<sup>[46]</sup>。然而近年来发现经典的抗寄生虫药对寄生虫病的治疗作用不断减弱,甚至完全无效。很多寄生虫病如血吸虫病、疟疾、弓形虫病、各种蠕虫病没有通过药物治疗得到有效控制。其原因是多方面的,除了上述抗药性问题以外,其药物价格和费用也很难为使用者接受。另外,人们认识到在动物产品(肉、蛋、奶)中残留的药物直接危害人体健康,是一个不容忽视的社会问题。

疫苗是预防传染性疾病流行和最大限度降低其危害性的有力武器,它是20世纪人类最重要的发明之一。疫苗的抗病作用不同于药物,疫苗多在疾病发生之前使用(有些疫苗也可在疾病发生过程中使用,如狂犬病疫苗),更重要的是,疫苗的作用效果具有“记忆性”,使用一次或几次后就可以达到几个月、几年,甚至终生的免疫性保护效果。此外,疫苗可使整个接

种的人群和动物群在短期内获得对一种或几种疾病的抵抗力,是预防和控制传染病大规模流行的有效手段,带来的经济效益也明显大于药物。目前试验的寄生虫病疫苗的类型主要有弱毒苗、分泌抗原苗、基因工程苗、化学合成苗、核酸疫苗。然而,对抗病免疫机制、保护性抗原的确定及免疫增强剂(佐剂)筛选等均为疫苗学研究的基础。

当前寄生虫病疫苗研究存在的一些问题主要表现在以下几个方面:①盲目性大。在没有了解抗虫保护性免疫机制的情况下,盲目地开展免疫试验。不清楚应该制备以体液免疫为主的虫苗还是以细胞免疫为主的虫苗。②虫体抗原特性不清,没有很特异的目标抗原。很多免疫研究还在使用含有宿主成分的混合抗原进行免疫。③缺乏先进的免疫学和疫苗学研究技术和理论。例如很多基因工程重组蛋白质都是从包涵体中提取,所免疫的蛋白质多为变性蛋白质。疫苗成分中缺乏必要的结构功能基因。免疫的结果是抗体效价很高,但免疫保护性却很低。④借鉴国外的研究手段没有选择性。这一点在基因工程疫苗(虫苗)的研究方面尤为突出。很多研究人员还片面的认为基因工程重组疫苗(尤其重组 DNA 质粒)是疫苗的唯一发展方向,任何一种抗原都一定进行基因免疫试验。寄生虫的生物学特性较细菌和病毒复杂很多,这就给疫苗研究带来了很大的困难。在这方面还需要加强对寄生虫生物学和免疫学的基础研究,只有在此基础上才能取得抗寄生虫病疫苗研究的突破。

## 7 结语

准确特异的诊断制剂、不断更新的抗寄生虫药物和对抗性产生机制的认识以及研制出有效的抗寄生虫病疫苗,都是控制寄生虫病危害和提高预防效果的重要保证。寄生虫分子生物学、分子病理学、分子药理学、分子免疫学和功能基因组学研究的开展,将为制定更有效的寄生虫病控制措施提供保证。

当前分子生物学技术日新月异,我国又是寄生虫病危害较为严重的国家之一,寄生虫学的很多研究领域还存在着空白。一些寄生虫在我国的分布及流行规律还不完全清楚并缺乏特异和快速的检测方法。一些重要的寄生虫病如血吸虫病还急需更多的特效药物和虫苗。所有这些都是摆在我国寄生虫学研究人员面前的重要课题,同时也为攻关性研究提供了机遇。

## 参 考 文 献

[1] Wang M. The impact of parasitic zoonoses on human health [C]. Proceedings of the National Conference on Zoonoses, 2006. 29-36. (in Chinese)

- (汪明. 重视人畜共患寄生虫病, 保护人类健康 [C]. 全国人兽共患病学术研讨会论文集, 2006. 29-36.)
- [2] Degraeve WM, Melville S, Ivens A, *et al.* Parasite genome initiatives [J]. *Int J Parasitol*, 2001, 31: 532-536.
- [3] Biron DG, Moura H, Marche L, *et al.* Towards a new conceptual approach to parasite proteomics [J]. *Trends Parasitol*, 2005, 21: 162-168.
- [4] Aboobaker AA, Blaxter ML. Functional genomics for parasitic nematodes and platyhelminths [J]. *Trends Parasitol*, 2004, 20: 178-184.
- [5] Monis PT, Giglio S, Keegan AR, *et al.* Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites [J]. *Trends Parasitol*, 2005, 21: 340-346.
- [6] Long EG, Christie JD. The diagnosis of old and new gastrointestinal parasites [J]. *Clin Lab Med*, 1995, 15: 307-331.
- [7] Visvesvara GS, Garcia LS. Culture of protozoan parasites [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15: 327-328.
- [8] Zhang D, Pan W. Evaluation of the *Pichia pastoris*-expressed *Plasmodium falciparum* merozoite proteins as a combination vaccine against infection with blood-stage parasites [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 6530-6536.
- [9] Prichard R, Tait A. The role of molecular biology in veterinary parasitology [J]. *Vet Parasitol*, 2001, 98: 169-194.
- [10] Gasser RB. PCR-based technology in veterinary parasitology [J]. *Vet Parasitol*, 1999, 3-4: 229-258.
- [11] Ward TSK. Microarray technology in biomedical research [J]. *Hawaii Med J*, 2006, 65 (9): 253-256.
- [12] Switaj K, Master A, Skrzypczak M, *et al.* Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11: 170-176.
- [13] Boyer SL, Flechtner VR, Johansen JR. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18: 1057-1069.
- [14] Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology [J]. *Trends Parasitol*, 2002, 18: 337-342.
- [15] Rasti N, Wahlgren M, Chen Q. Molecular aspects of malaria pathogenesis [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004, 41: 9-26.
- [16] Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage [J]. *Vet Parasitol*, 2006, 138: 22-32.
- [17] Beeson JG, Reeder JC, Rogerson SJ, *et al.* Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria [J]. *Trends Parasitol*, 2001, 17: 331-337.
- [18] Kravetz JD, Feferman DG. Toxoplasmosis in pregnancy [J]. *Am J Med*, 2005, 118 (3): 212-216.
- [19] Klotz C, Marhofer RJ, Selzer PM, *et al.* *Eimeria tenella*: identification of secretory surface proteins from expressed sequence tag [J]. *Exp Parasitol*, 2005, 111: 14-23.
- [20] Thompson RC, Olson ME, Zhu G, *et al.* *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis [J]. *Adv Parasitol*, 2005, 59: 77-158.
- [21] Friedman JF, Kanzaria HK, McGarvey ST. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanism [J]. *Trends Parasitol*, 2005, 21: 386-392.
- [22] Villamiza E, Mendez M, Bonilla E, *et al.* *Ascaris lumbricoides* infection as a cause of intestinal obstruction in children [J]. *J Pediatr Surg*, 1996, 31: 201-204.
- [23] Smego RAJ, Sebanego P. Treatment options for hepatic cystic echinococcosis [J]. *Int J Infect Dis*, 2005, 9 (2): 69-76.
- [24] Capo V, Despommier DD. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9: 47-54.
- [25] Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, *et al.* Immunopathogenesis of schistosomiasis [J]. *Immunol Rev*, 2004, 201: 156-

- 167.
- [26] Donati D, Zhang LP, Chene A, *et al.* Identification of a poly clonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum* [J]. Infect Immun, 2004, 72: 5412-5418.
- [27] Miller HR. Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1996, 54 (1-4): 331-336.
- [28] Watkins BM. Drugs for the control of parasitic disease: current status and development [J]. Trends Parasitol, 2003, 19: 477-478.
- [29] Geary TG, Sangster NC, Thompson DP. Frontiers in anthelmintic pharmacology [J]. Vet Parasitol, 1999, 3-4: 275-295.
- [30] Chen QJ, Chen Y, Du SM. Strategies on infectious disease control [J]. Chin J Bas Sci, 2005, 6: 19-31. (in Chinese) (陈启军, 陈越, 杜生明. 论我国传染病防治战略[J]. 中国基础科学, 2005, 6: 19-31.)
- [31] Craig A, Scherf A. Antigenic Variation [M]. London UK: Academic Press, 2003. 1-16.
- [32] Flick K, Chen Q. Var genes, PfEMP1 and the human host [J]. Mol Biochem Parasitol, 2004, 134: 3-9.
- [33] Hartmann S, Lucius R. Modulation of host responses by nematode cystatins [J]. Int J Parasitol, 2003, 33: 1291-1302.
- [34] Denkers EY. From cells to signaling cascade: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 39: 193-203.
- [35] Ersfeld K. Genomes and genome projects of protozoan parasites [J]. Curr Issu Mol Biol, 2003, 5 (3): 61-74.
- [36] Belli SI, Walker RA, Flowers SA. Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status[J]. Proteomics, 2005, 5 (4): 18-24.
- [37] Gutierrez JA. Genomics: from novel genes to new therapeutics in parasitology [J]. Int J Parasitol, 2000, 30: 247-252.
- [38] Balu B, Adams JH. Advancement in transfection technologies for *Plasmodium* [J]. Int J Parasitol, 2007, 37: 1-10.
- [39] Brindley PJ, Pearce EJ. Genetic manipulation of schistosomes [J]. Int J Parasitol, 2007, 37: 465-473.
- [40] Wray C, Woodward MJ. Biotechnology and veterinary science: production of veterinary sciences [J]. Rev Sci Tech, 1990, 9: 779-794.
- [41] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391 (6669): 806-811.
- [42] Kuwabara PE, Coulson A. RNAi-prospects for a general technique for determining gene function [J]. Parasitol Today, 2000, 16: 347-349.
- [43] Barrett J, Jefferies JR, Brophy PM. Parasite proteomics [J]. Parasitol Today, 2000, 16: 400-403.
- [44] Liu F, Lu J, Hu W, *et al.* New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum* [J]. PLoS Pathog, 2006, 2 (4): e29.
- [45] Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worms of *Schistosoma japonicum* after pairing [J]. Proteomics, 2005, 5: 511-521.
- [46] Vercruyse J, Knox DP, Schetters TPM, *et al.* Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions [J]. Trends Parasitol, 2004, 20: 488-492.

(收稿日期: 2007-07-27 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2007)-04-0348-02

## 【研究简报】

# 华支睾吸虫感染的超声诊断分析

陆冰冰, 苏海庆

**【摘要】** 回顾性分析临床确诊有华支睾吸虫感染的 214 例患者治疗前后的超声表现, 结果感染后的超声表现以胆囊及胆管病变为主, 胆囊内出现的絮状弱回声漂浮物具有特征性, 治疗后该漂浮物消失。绝大多数患者有胆管回声改变, 表现为胆管壁增厚、毛糙, 回声增强, 治疗后恢复较慢。超声对该病的诊断有应用价值。

**【关键词】** 华支睾吸虫病; 胆囊; 超声诊断

中图分类号: R532.23 文献标识码: B

## Ultrasonic Diagnosis of Clonorchiasis sinensis

LU Bing-bing, SU Hai-qing

(Ultrasonography Department of Guangxi Minzu Hospital, Nanning 530001, China)

**【Abstract】** This is to retrospectively review and summarize the ultrasonic images of 214 patients who were diagnosed as clonorchiasis and received treatment. The major changes in ultrasonography were found in gallbladder and hepatic bile duct. Flocculent echos in the gallbladder were the characteristic feature, which disappeared after chemotherapy. The wall of hepatic bile duct became thicker and shaggy in most patients. These changes improved quite slowly after treatment. Ultrasonography is of value in the diagnosis of clonorchiasis sinensis

**【Key words】** Clonorchiasis sinensis; Gallbladder; Ultrasonography

作者单位: 广西民族医院超声科, 南宁 530001