

文章编号: 1000-7423(2009)-01-0031-04

【论著】

日本血吸虫副肌球蛋白合成肽的免疫学鉴定

陶方方^{1,2}, 王慧¹, 孙新娟¹, 刘丰¹, 王勇¹, 苏川¹, 吴海玮¹, 张兆松^{1*}

【摘要】 目的 鉴定日本血吸虫副肌球蛋白合成肽 Sj97-P22。方法 27 只雌性 C57BL/6 小鼠随机均分为合成肽 Sj97-P22 免疫组、无关肽免疫组和 PBS 免疫组, 分别于尾部皮下注射与完全福氏佐剂等体积充分混匀的合成肽 Sj97-P22 (100 μg) 乳化剂、无关肽 (100 μg) 乳化剂和 PBS 乳化剂, 抗原免疫剂量为 100 μg/(只·次), 共免疫 2 次, 间隔 1 周。于免疫后 7~10 d 分离各组小鼠脾单个核细胞, 运用流式细胞技术三色标记法检测其 CD4⁺ T 细胞胞内因子干扰素 γ (IFN-γ) 和白介素 4 (IL-4)。将 Sj97-P22 免疫小鼠或 PBS 免疫小鼠的脾单个核细胞分别与 Sj97-P22、无关肽或 PBS 共培养, 采用 ³H-TdR 掺入法观察细胞增殖效果, 并用 ELISA 法检测细胞培养上清中 IL-2、IFN-γ 和 IL-4 的浓度。**结果** Sj97-P22 免疫组小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞中胞内分泌 IFN-γ 的细胞百分率为 (8.05±0.54)%, 显著高于无关肽免疫组 [(4.74±1.04)%] 和 PBS 免疫组 [(6.51±0.49)%] ($P<0.05$); 而分泌 IL-4 的细胞百分率 [(0.60±0.11)%] 显著低于 PBS 免疫组 [(1.31±0.27)%] ($P<0.05$), 与无关肽免疫组 [(0.84±0.08)%] 间的差异则无统计学意义 ($P>0.05$)。Sj97-P22 可明显刺激 Sj97-P22 免疫小鼠脾单个核细胞增殖, 增殖指数达到 3.12±1.59, 细胞培养上清中 IL-2 和 IFN-γ 浓度分别为 (9.13±1.54) 和 (39.75±9.69) pg/ml, 与无关肽和 PBS 刺激相比显著升高 ($P<0.05$), 而 IL-4 浓度在 3 个刺激物间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Sj97-P22 不能刺激 PBS 免疫鼠脾单个核细胞增殖及培养上清中 IL-2、IFN-γ 及 IL-4 浓度变化。**结论** Sj97-P22 可能是 C57BL/6 小鼠特异的 Th1 型表位。

【关键词】 日本血吸虫; 副肌球蛋白; Th1 型表位; 免疫学鉴定

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Immunological Identification of a Synthetic Peptide from the Paramyosin of *Schistosoma japonicum*

TAO Fang-Fang^{1,2}, WANG Hui¹, SUN Xin-Juan¹, LIU Feng¹, WANG Yong¹,
SU Chuan¹, WU Hai-Wei¹, ZHANG Zhao-Song^{1*}

(1 Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2 Department of Pathogen Biology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To identify the immunologic property of a synthetic peptide Sj97-P22 from paramyosin of *Schistosoma japonicum* (Sj97). **Methods** Twenty-seven female C57BL/6 mice were divided into 3 groups each with 9 mice, Sj97-P22, control peptide and PBS groups, and each mouse was respectively immunized twice (seven days interval) with 100 μg of Sj97-P22, control peptide or PBS, emulsified with equal value of complete Freund's adjuvant. Seven to ten days after the second immunization, the mouse spleen mononuclear cells were isolated for three-color flow cytometry to detect intracellular cytokines IFN-gamma and IL-4. Then the spleen mononuclear cells were co-cultured with Sj97-P22, control peptide or PBS respectively, and the incorporation rate of ³H-thymidine, as well as the levels of IL-2, IFN-gamma and IL-4 in the cultured cell supernatant, were measured. **Results** In CD4⁺ T cells, the percentage of IFN-gamma-producing cells in Sj97-P22 group [(8.05±0.54)%] was significantly higher than that of the control peptide group [(4.74±1.04)%] or PBS group [(6.51±0.49)%] ($P<0.05$), while the proportion of IL-4-producing cells was significantly lower in Sj97-P22 group [(0.60±0.11)%] than that in PBS group [(1.31±0.27)%] ($P<0.05$). Also, compared with control peptide or PBS stimulation, Sj97-P22 was able to effectively stimulate the proliferation with the stimulation index (3.12±1.59) and a higher secretion of IL-2 [(9.13±1.54) pg/ml] and IFN-gamma [(39.75±9.69) pg/ml] of spleen mononuclear cells in Sj97-P22-immunized mice ($P<0.05$). Both Sj97-P22 and control peptide were not effective stimulators to the spleen mononuclear cells from mice of PBS group. **Conclusion** It is highly possible that Sj97-P22 is a Th1-type epitope specific for C57BL/6 mice.

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30571630)

作者单位: 1 南京医科大学病原生物学系, 南京 210029; 2 浙江中医药大学病原生物学教研室, 杭州 310053

* 通讯作者, E-mail: mipa@njmu.edu.cn

[Key words] *Schistosoma japonicum*; Paramyosin; Th1-type epitope; Immunological identification

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30571630)

* Corresponding author, Email: mipa@njmu.edu.cn

在人群和实验动物的血吸虫病发展进程中, CD4⁺ T 细胞的 Th1 或 Th2 型优势应答分别与增强保护力或加重免疫病理损伤强烈相关^[1-4]。因此, 增强以 Th1 型应答为主的免疫反应来增强抗感染保护力及减轻病理反应是研究的热点之一^[5,6]。目前日本血吸虫病疫苗的研制趋于联合多种抗原分子或抗原表位制成有效的混合或多价的鸡尾酒式疫苗, 以期达到协同作用, 提高免疫保护效果^[7,8]。因而获得能够诱导较强 Th1 型应答的表位是构建复合多价疫苗的基础。

副肌球蛋白是 WHO 推荐的 6 个最具潜力的血吸虫病疫苗候选分子之一, 能激发较强的体液免疫和细胞免疫, 诱导的抗感染免疫保护力与其诱导机体 Th1/Th2 型免疫应答优势向 Th1 型偏移的程度及水平成正相关, 并具有一定的抗虫卵肉芽肿及肝纤维化作用^[9-12]。王新军等^[13]用 SYFPEITHI 软件根据 C57BL/6 小鼠表达的 MHC II 类分子基因型, 预测了其 MHC II 类分子与日本血吸虫 (中国大陆株) 副肌球蛋白 (Sj97) 结合的 T 细胞表位, 选取 5 个分值最高的进行免疫学鉴定, 发现 P22 可能是 Sj97 的优势 T 细胞表位。Sj97-P22 是一个包含 15 氨基酸的位于副肌球蛋白分子 313~327 氨基酸的短肽, 根据 SMART 软件的结构预测, 它位于该分子内线性的甲基受体趋化蛋白区 (308~503 氨基酸) 内。本研究从 Sj97-P22 免疫的 C57BL/6 小鼠脾单个核细胞的胞内、胞外因子进一步鉴定 Sj97-P22 的 Th1/Th2 型特性, 为构建诱导较强免疫应答的混合多价疫苗奠定基础。

材料与方法

1 实验动物和主要试剂

6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 (H-2b) 27 只, 体重 16~20 g, 购自南京大学模式动物遗传研究中心。RPMI 1640 和胎牛血清 (FCS) 购自美国 GIBCO 公司, IL-4 受体阻断剂 (mIL-4R-M1) 和蛋白质转运抑制剂购自美国 BD Pharmingen 公司, 小鼠白介素 2、白介素 4 和干扰素 γ ELISA 检测试剂盒 (Ready-set-go! Mouse IL-2、IL-4 和 IFN- γ), 及大鼠抗小鼠单克隆抗体 (Rat anti-mouse CD3-APC、Rat anti-mouse CD8-FITC、IFN- γ -PE 和 IL-4-PE) 购自美国 eBioscience 公司, 弗波脂和离子霉素购自美国 Sigma 公司。

2 方法

2.1 表位肽序列的设计及合成 表位肽 Sj97-P22 (313ITELEDVAERERLKA) 和无关肽 (64VKLVNELTE-FAKTCV) 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 皆为 N 端乙酰化和 C 端氨基化, 纯度 >98%。无关肽来自牛血清白蛋白, 经软件预测为非 T 非 B 表位。

2.2 实验动物分组及免疫 27 只小鼠随机均分为 3 组, 合成肽 Sj97-P22 免疫组、无关 (对照) 肽免疫组及 PBS 免疫组。合成肽 Sj97-P22 免疫组从尾基部皮下注射 100 μ g 合成肽 Sj97-P22 与等体积的完全福氏佐剂 (CFA) 乳化物, 7 d 后以同等剂量加强免疫 1 次; 无关肽免疫组注射 100 μ g 无关肽与等体积 CFA 乳化物; PBS 免疫组注射等体积 PBS 与等体积 CFA 乳化物。

2.3 制备脾单个核细胞悬液 实验鼠于 2 次免疫后 7~10 d, 无菌取脾。经磨碎、200 目尼龙膜过筛和红细胞裂解液 [包括 10 mmol/L KHCO₃、155 mmol/L NH₄Cl 和 0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), pH 7.4] 裂解红细胞。200 目尼龙膜再次过筛后, 得到单个核细胞悬液。用含 10% 胎牛血清的完全 RPMI 1640 培养液调细胞浓度至 2.5 \times 10⁶/ml, 取 10 μ l 细胞悬液, 台盼蓝染色, 计数活细胞。于 96 孔平底培养板中加细胞量 1 \times 10⁵/孔培养。

2.4 流式细胞术检测细胞因子 采用表面分子和胞内分子三色标记脾单个核细胞。取 2 \times 10⁶ 个脾单个核细胞, 加入弗波脂 (终浓度 25 ng/ml)、离子霉素 (终浓度 1 μ g/ml) 和蛋白质转运抑制剂 (终浓度 0.66 μ l/ml), 混匀, 于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 4~6 h。加入 1 ml 预冷的染色缓冲液, 350 \times g 离心 5 min, 弃上清, 加入 200 μ l 预冷的染色缓冲液重悬细胞, 分为 2 管。每管中分别加入 0.2 mg/ml 大鼠抗小鼠 CD3-APC 2.5 μ l 或 0.5 mg/ml 大鼠抗小鼠 CD8-FITC 2 μ l, 室温避光孵育 15 min。使用 1 ml 预冷的染色缓冲液重悬细胞, 涡旋混匀。再次离心弃上清, 加入 500 μ l 破膜/固定液, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。重悬、离心弃上清 2 次。各样本重悬后, 分别加入相应抗体 0.2 mg/ml IFN- γ -PE 0.625 μ l 或 0.2 mg/ml IL-4-PE 2.5 μ l, 于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。离心去上清 2 次, 500 μ l 染色缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪 (FACS Calibur, 美国 Becton Dickinson 公司) 检测各细胞因子。

2.5 细胞增殖实验 在脾单个核细胞悬液中分别加入终浓度为 10 μ g/ml 合成肽 Sj97-P22、无关肽或等体

积 PBS, 每组均设 3 复孔, 于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 培养结束前 12~16 h 加入 ³H-TdR (0.5 μCi/孔)。液闪计数器测定脉冲指数(cpm 值), 计算刺激指数(SI), 计算公式: SI=(实验组 cpm 值-机器本底 cpm 值)/(阴性对照 cpm 值-机器本底 cpm 值)。SI>2 为阳性。

2.6 ELISA 检测细胞因子 脾单个核细胞悬液培养 72 h 后收集上清, 用 ELISA 分别检测 IL-2、IFN-γ 和 IL-4 浓度。其中用于检测 IL-4 的细胞培养上清, 在加入抗原刺激的同时加入 IL-4 受体抗体 (mIL-4R-M1) 20 μg/ml。

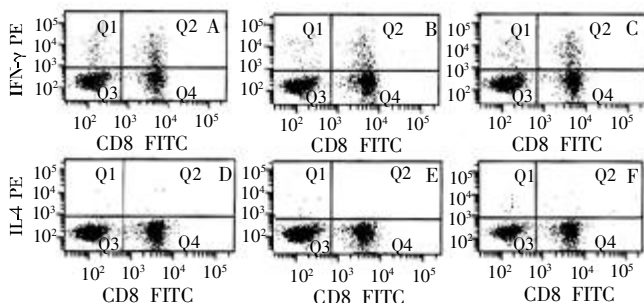
3 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计软件分析实验数据。两组均数间的比较采用 *t* 检验; 3 组及 3 组以上均数比较, 经检验各组方差齐同, 首先采用方差分析, 当方差分析结果 *P*<0.05 时, 采用 *q* 检验进行组间均数的两两比较。

结 果

1 脾单个核细胞中 Th1、Th2 细胞所占比例

流式细胞仪检测结果显示, Sj97-P22 免疫组中分泌 IFN-γ 细胞占 CD4⁺T 细胞总数的百分率分别为 (8.05±0.54) %、(4.74±1.04) %和 (6.51±0.49) %, 而分泌 IL-4 细胞分别占 (0.60±0.11) %、(0.84±0.08) %和 (1.31±0.27) %。可见 Sj97-P22 免疫组 CD4⁺T 细胞中胞内分泌 IFN-γ 的细胞百分率显著高于其余两组(*P*<0.05), 而分泌 IL-4 细胞所占百分率显著低于 PBS 组(*P*<0.05), 并低于无关肽组(*P*>0.05)(图 1)。皆为 3 次独立实验结果。



A, D: Sj97-P22 免疫组, B, E: 无关肽免疫组, C, F: PBS 免疫组。
A, D: Sj97-P22-immunized group; B, E: Control peptide group;
C, F: PBS group.

图 1 免疫组小鼠体内 Th1、Th2 细胞百分率

Fig.1 Percentage of Th1 and Th2 cells in the immunized mice

2 脾单个核细胞增殖试验

使用合成肽 Sj97-P22 刺激经 Sj97-P22 或 PBS 免

疫小鼠的脾单个核细胞, 观察致敏的脾单个核细胞在抗原再次刺激下的胞外应答情况。3 次独立实验的结果表明, Sj97-P22 能有效刺激 Sj97-P22 免疫鼠的脾单个核细胞增殖, SI 值为 3.12±1.59, 而无关肽刺激下的 SI 值为 0.97±0.12。但 Sj97-P22 和无关肽均无法刺激 PBS 免疫鼠的脾单个核细胞有效增殖, SI 值分别为 1.81±0.09 和 1.25±0.28。

3 Sj97-P22 诱导的 Th1 型应答

体外细胞因子检测结果显示, Sj97-P22 刺激后 IL-2 及 IFN-γ 的分泌显著增高 (*P*<0.05), IL-4 分泌则无显著变化 (*P*>0.05); PBS 免疫组脾单个核细胞经 Sj97-P22 及无关肽刺激后, IL-2、IFN-γ 及 IL-4 水平均无显著变化(*P*>0.05)(表 1)。表明 Sj97-P22 可诱导显著的 Th1 型免疫应答。皆为 3 次独立实验结果。

表 1 细胞培养上清中细胞因子的浓度

Table 1 Concentration of cytokines in the supernatant of cell culture

实验组 Group	细胞因子浓度 Concentration of cytokines (pg/ml)		
	IL-2	IFN-γ	IL-4
A 组 Group A	9.13±1.54 [#]	39.75±9.69 [#]	10.76±9.01
B 组 Group B	4.06±1.12	22.66±4.65	7.63±5.38
C 组 Group C	4.08±1.34	23.23±5.48	6.65±3.49
D 组 Group D	4.56±1.97	18.72±5.51	13.04±5.01
E 组 Group E	7.15±1.52	13.64±6.01	11.23±4.95
F 组 Group F	6.07±1.37	14.42±5.87	8.67±4.01

注: A、B 和 C 组为 Sj97-P22 免疫组小鼠单个脾细胞分别加入终浓度为 10 μg/ml 合成肽 Sj97-P22、无关肽或等体积的 PBS 共培养, D、E 和 F 组为 PBS 免疫组小鼠单个脾细胞分别加入终浓度为 10 μg/ml 合成肽 Sj97-P22、无关肽或等体积的 PBS 共培养; * 与 B 组比较, *P*<0.05; # 与 C 组比较, *P*<0.05。

Note: Mice in groups A, B and C were immunized with Sj97-P22 and their primed mononuclear cells were co-cultured with 10 μg/ml Sj97-P22 (group A), control peptide (B) or PBS (C) respectively. Mice in groups D, E and F received PBS and their primed mononuclear cells were co-cultured with 10 μg/ml Sj97-P22 (group D), control peptide (E) or PBS (F) respectively; * Compared with group B, *P*<0.05; # Compared with group C, *P*<0.05.

讨 论

副肌球蛋白主要存在于无脊椎动物肌细胞的粗肌丝中, 具有显著的免疫原性, 是人和家畜多种寄生虫的候选疫苗抗原^[14]。而 Sj97 存在于日本血吸虫各个发育阶段的肌肉组织、肺期童虫的体被基层和体表、以及尾蚴腹吸盘后钻腺分泌颗粒内^[15]。Sj97 与曼氏血吸虫副肌球蛋白(Sm97)的核苷酸序列和氨基酸同源性分别为 91.0%和 96.0%^[16]。

副肌球蛋白的免疫原性研究始于 Lanar 等^[17], 结果表明可诱导明显的抗感染能力。有研究表明, 副肌球蛋白诱导的较强 Th1 型免疫应答, 与抗感染、抗生

殖免疫力及抗肉芽肿、纤维化作用有关。副肌球蛋白是成虫抗原的有效成分, Pearce 等^[9]从成虫抗原获得的天然副肌球蛋白可刺激 T 细胞产生 IFN- γ , 引发保护性 T 细胞反应。Zhou 等^[10]将 Sj97 的全长 cDNA 克隆入表达载体后肌肉注射小鼠, 可诱导产生独特的 IgG2a 和 IgG2b 的免疫反应, 免疫血清可介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒 (ADCC) 效应; 细胞因子检测也显示 IFN- γ 和 IL-2 增多, 表明其可诱导较强的 Th1 型免疫应答。陈家旭等^[11,12]用编码 Sj97 全基因核酸疫苗 (Sj97 DNA) 免疫 C57BL/6 小鼠, 可诱导产生明显的抗攻击感染免疫保护力和抗生殖免疫力, 减虫率达 36.3%, 肝脏虫减卵率达 42.4%, 诱生出以 Th1 型免疫应答为主的 IL-2、IFN- γ 及特异性抗成虫抗原、可溶性虫卵抗原的 IgG2a、IgG2b 亚型及 IgA 抗体, 发现其诱导的抗感染免疫保护力与其诱导机体 Th1/Th2 型免疫应答优势向 Th1 型偏移的程度及水平成正相关; 并进一步研究发现 Sjc97 DNA 疫苗具有一定的抗虫卵肉芽肿及肝纤维化作用。

本研究观察了致敏的脾单个核细胞中 Th1、Th2 细胞百分率, Sj97-P22 免疫鼠脾脏 CD4⁺T 细胞中分泌 IFN- γ 细胞的百分率显著增高, 分泌 IL-4 细胞的百分率显著降低, 说明 Sj97-P22 免疫小鼠体内呈现明显的 Th1 型优势应答; 进而观察致敏的脾单个核细胞在表位抗原再次刺激后的胞外细胞因子分泌情况, 显示 Sj97-P22 免疫鼠不仅脾单个核细胞增殖明显, 而且细胞培养上清中 IL-2、IFN- γ 浓度显著增高, 但 IL-4 浓度无明显变化。Sj97-P22 免疫小鼠体内 Th1、Th2 型细胞胞内及胞外细胞因子分泌水平的变化基本一致, 皆呈现 Th1 型优势应答。本研究结果显示 Sj97-P22 可能为 C57BL/6 小鼠的 Th1 型表位, 为构建混合多价 Th1 型疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Dunne DW, Hagan P, Abath FG. Prospects for immunological control of schistosomiasis[J]. Lancet, 1995, 345(8963): 1488-1491.
- [2] Scott P, Pearce E, Cheever AW, et al. Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease[J]. Immunol Rev, 1989, 112(1): 161-182.
- [3] Shen L, Zhang ZS, Wu HW, et al. IFN-gamma is associated with risk of *Schistosoma japonicum* infection in China[J]. Parasite Immunol, 2003, 25(10): 483-487.
- [4] Shen L, Wu HW, Zhang ZS, et al. Human parasite antigen-specific IFN- γ response in schistosomiasis japonica endemic area [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2000, 18(3): 132-134. (in Chinese)
- [5] 沈蕾, 吴海玮, 张兆松, 等. 日本血吸虫病流行区人群特异抗原诱导 IFN- γ 的应答特征[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(3): 132-134.
- [6] Acosta LP, Waine G, Aligui GD, et al. Immune correlate study on human *Schistosoma japonicum* in a well-defined population in Leyte, Philippines: II. Cellular immune responses to *S. japonicum* recombinant and native antigens[J]. Acta Trop, 2002, 84(2): 137-149.
- [7] Oswald IP, Caspar P, Wynn TA, et al. Failure of P strain mice to respond to vaccination against schistosomiasis correlates with impaired production of IL-12 and up-regulation of Th2 cytokines that inhibit macrophage activation[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(6): 1762-1772.
- [8] McManus DP, Bartley PB. A vaccine against Asian schistosomiasis[J]. Parasitol Int, 2004, 53(2): 163-173.
- [9] Tarrab-Hazdai R, Schechtman D, Arnon R. Synthesis and characterization of a protective peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*[J]. Infect Immun, 1998, 66(9): 4526-4530.
- [10] Pearce EJ, James SL, Hienny S, et al. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(15): 5678-5682.
- [11] Zhou S, Liu S, Song G, et al. Protective immunity induced by the full-length cDNA encoding paramyosin of Chinese *Schistosoma japonicum*[J]. Vaccine, 2000, 18(27): 3196-3204.
- [12] Chen JX, Liu SX, Cao JP, et al. Comparative study on the characteristics of immune response induced by 97kDa DNA and UV-attenuated cercariae vaccines of *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002, 20(5): 257-261. (in Chinese) (陈家旭, 刘述先, 曹建平, 等. 日本血吸虫 97kDa DNA 疫苗与致弱尾蚴疫苗诱导免疫应答特征的比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20(5): 257-261.)
- [13] Chen JX, Liu SX, Cao JP, et al. Anti-schistosomiasis effect induced by full length DNA vaccine coding paramyosin of *Schistosoma japonicum* in C57BL/6 mice[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(2): 81-85. (in Chinese) (陈家旭, 刘述先, 曹建平, 等. 日本血吸虫副肌球蛋白全基因核酸疫苗对小鼠的抗病免疫效应[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(2): 81-85.)
- [14] Wang XJ, Zhang ZS, Wang Y, et al. Identification of T cell epitopes on paramyosin of *Schistosoma japonicum*[J]. J Trop Med, 2004, 4(6): 653-656. (in Chinese) (王新军, 张兆松, 王勇, 等. 日本血吸虫副肌球蛋白 T 细胞表位的预测和鉴定[J]. 热带医学杂志, 2004, 4(6): 653-656.)
- [15] Gobert GN, McManus DP. Update on paramyosin in parasitic worms [J]. Parasitol Int, 2005, 54(2): 101-107.
- [16] Gobert GN, Stenzel DJ, Jones MK, et al. *Schistosoma japonicum*: immunolocalization of paramyosin during development[J]. Parasitology, 1997, 114(1): 45-52.
- [17] Zhou SH, Liu SX, Song GC, et al. Cloning, sequencing and expression of the full-length gene encoding paramyosin of *Schistosoma japonicum* in vivo[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1999, 17(4): 196-199. (in Chinese) (周生华, 刘述先, 宋光承, 等. 日本血吸虫副肌球蛋白全基因克隆、测序及体内表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(4): 196-199.)
- [18] Lanar DE, Pearce EJ, James SL, et al. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice[J]. Science, 1986, 234(4776): 593-596.

(收稿日期: 2008-06-30 编辑: 杨频)