

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0195-05

【论著】

肝片吸虫组织蛋白酶 L 基因的克隆、表达和免疫原性分析

李晓娟, 闻晓波, 冉旭华*, 李树东, 王春仁, 朴范泽

【摘要】 目的 克隆和表达肝片吸虫组织蛋白酶 L 基因 (FhCL), 分析其免疫原性。方法 根据 GenBank 公布的 FhCL 基因序列设计引物, 以肝片吸虫总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增 FhCL 基因编码序列, PCR 产物经 TA 克隆, 通过 EcoR I、Hind III 双酶切和测序鉴定获得重组质粒 pMD18-T/FhCL, 并将其亚克隆入原核表达载体 pET30a(+), 经 PCR, 以及 BamH I、Hind III 双酶切和测序鉴定, 构建原核表达质粒 pET30a(+)-FhCL, 转化大肠埃希菌 (E. coli) BL21 (DE3) pLysS, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达并获得纯化的重组蛋白 FhCL, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定, 以及蛋白质印迹 (Western blotting) 分析该重组蛋白对感染肝片吸虫的山羊血清及免疫的 SD 大鼠血清的免疫反应性。结果 PCR 和 BamH I、Hind III 双酶切均可见约 1 000 bp 的条带, 测序结果显示重组质粒 pET30a(+)-FhCL 构建成功。SDS-PAGE 结果表明, 重组蛋白相对分子质量约为 Mr 42 000 (含 6 个组氨酸标签), 与目的蛋白相符, 以包涵体形式表达。Western blotting 分析结果显示, 纯化的重组蛋白 FhCL 可被感染肝片吸虫的山羊血清和免疫的 SD 大鼠血清识别, 在目的条带 Mr 42 000 处见单一特异性条带, 而阴性对照血清则无反应带。结论 克隆及表达了肝片吸虫组织蛋白酶 L 编码基因, 重组蛋白具有良好的免疫原性。

【关键词】 肝片吸虫; 组织蛋白酶 L 基因; 克隆; 原核表达

中图分类号: R383.29 文献标识码: A

Cloning, Expression and Immunogenicity Analysis of Cathepsin L-like Protease of *Fasciola hepatica*

LI Xiao-juan, WEN Xiao-bo, RAN Xu-hua*, LI Shu-dong, WANG Chun-ren, PIAO Fan-ze

(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Heilongjiang Province, Heilongjiang August-First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

【Abstract】 Objective To clone and express the cathepsin L-like protease gene of *Fasciola hepatica* (FhCL) and investigate the immunogenicity of the recombinant FhCL protein. Methods Specific primers were designed according to the reported FhCL gene in GenBank. Using total RNA from adult worms of *F. hepatica*, FhCL gene was amplified by RT-PCR. The PCR product was cloned into pMD18-T vector and then subcloned into pET30a(+) vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and followed by expression of the protein induced by IPTG. The expression situation of recombinant FhCL was analyzed by SDS-PAGE. Its immunoresponse to the sera of infected goat and the antisera of SD rats against FhCL was examined by Western blotting analysis. Results PCR and double enzyme digestion showed that the FhCL gene fragment was about 1 000 bp in length. The constructed recombinant plasmid pET30a(+)-FhCL was identified by sequencing. The recombinant protein (Mr 42 000) was expressed in the form of inclusion body. The protein was recognized respectively by the sera of infected goat and the sera from rat immunized with FhCL. Conclusion The recombinant plasmid pET30a(+)-FhCL has been constructed, which shows high antigenicity.

【Key words】 *Fasciola hepatica*; Cathepsin L-like protease; Cloning; Prokaryotic expression

* Corresponding author, E-mail: ranxuhua@163.com

肝片吸虫病为人兽共患寄生虫病, 是由肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) 寄生于人和反刍动物肝脏及胆管

引起的急性或慢性肝炎和胆管炎, 并伴发全身性中毒现象和营养障碍等疾病。该病主要分布于欧洲、亚洲及美洲, 其他地区呈散在性分布^[1]。我国内蒙古、宁夏、青海及新疆等省 (市、自治区) 较为严重^[2]。牛、羊肝片吸虫感染率较高, 急性发病可引起幼畜和

作者单位: 黑龙江八一农垦大学预防兽医学省重点实验室, 大庆 163319

* 通讯作者, E-mail: ranxuhua@163.com

绵羊大批死亡,慢性发病可导致动物消瘦和发育障碍,给畜牧业造成巨大经济损失。

肝片吸虫组织蛋白酶 L (FhCL) 最初发现于肝片吸虫成虫的分泌排泄物中,属于半胱氨酸蛋白酶类,该酶对于肝片吸虫免疫入侵宿主组织、逃避免疫、消化食物,以及产卵等方面具有重要作用^[3,4]。Dalton 等^[5]用肝片吸虫组织蛋白酶 L1 免疫小牛,使虫荷降低 53.7%;而用组织蛋白酶 L1 和 L2 混合免疫,结果相似。提示 FhCL 蛋白作为抗肝片吸虫感染的候选疫苗抗原是可行的。国内有关肝片吸虫亚单位疫苗的研究目前尚未见报道。本研究拟构建肝片吸虫组织蛋白酶 L 基因 (FhCL) 原核表达载体,并对表达的重组蛋白进行初步分析。

材料与方法

1 材料

肝片吸虫成虫、载体 pMD18-T 和 pET30a(+),均为本实验室保存。肝片吸虫阳性血清,取自黑龙江省大庆地区自然感染肝片吸虫的放牧山羊 [感染强度为 68 条,每克粪便的虫卵数 (EPG) 为 525]。雌性 SD 大鼠为清洁级,体重为 200 g,购自中国科学院上海实验动物中心。大肠埃希菌 (*E. coli*) OBL21 (DE3) pLysS 株购自美国 Novagen 公司。DNA 聚合酶、DNA 标志物 (DL2000)、RNA 酶抑制剂、T₄ DNA 连接酶、EcoR I、BamH I、Hind III 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。鼠源反转录酶 (revertAid Tm M-MuLV reverse transcriptase) 及预染蛋白质标志物购自美国 Fermentas 公司,胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗大鼠 IgG (HRP-IgG)、兔抗山羊 HRP-IgG 分别购自武汉博士德生物工程有限公司和北京中杉金桥生物技术有限公司。

2 方法

2.1 FhCL 基因的 RT-PCR 扩增 参考 GenBank 中 FhCL 基因的核苷酸序列,采用 Oligo 6.0 软件设计一对引物, P1: 5'-TTAGGATCCATGCGATTGTTTCATATTAG-3' (下划线为 BamH I 酶切位点), P2: 5'-ATAAA GCTTTCACGGAAATCGTGCCAC-3' (下划线为 Hind III 酶切位点)。参照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 说明提取肝片吸虫总 RNA,以其总 RNA 为模板, P1 和 P2 为引物,在反转录酶作用下进行反转录。反应体系为 20 μ l [即总 RNA 4 μ l、P1 和 P2 (均为 25 μ mol/L) 各 1 μ l, 焦炭酸二乙酯 (DEPC) (1:1 000 稀释) 5 μ l], 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 2 min; 再加入 5 \times 反转录缓冲液 4 μ l、10 mmol/L

脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 2 μ l、20 U RNA 酶抑制剂 1 μ l, 以及 1:1 000 稀释的 DEPC 1 μ l, 37 $^{\circ}$ C 5 min; 再加入 200 U 反转录酶 1 μ l, 42 $^{\circ}$ C 2.5 h; 70 $^{\circ}$ C 10 min 灭活反转录酶, 冰浴合成 cDNA。

RT-PCR 扩增 FhCL 基因, 反应体系为 5 \times PCR 缓冲液 5 μ l, 100 μ mol/L dNTP 1.5 μ l, 20 pmol/L 引物 P1、P2 各 0.25 μ l, 模板 cDNA 0.5 μ l, DNA 聚合酶 1.25 U, 加 ddH₂O 至 25 μ l。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用胶回收试剂盒回收纯化目的片段。

2.2 PCR 产物的 T/A 克隆和鉴定 按 pMD18-T 载体试剂盒说明书操作。将纯化的目的片段与 T 载体连接, 转化 *E. coli* 感受态细胞 TG1, 涂布于含苄苄青霉素 (终浓度为 100 μ g/ml) 的 LB 固体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。常规方法提取质粒, EcoR I 与 Hind III 双酶切鉴定目的基因是否插入成功。选择正确插入片段的克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 阳性重组克隆质粒命名为 pMD18-T/FhCL。

2.3 FhCL 基因原核表达质粒的构建与鉴定 将重组质粒 pMD18-T/FhCL 和原核表达载体 pET30a(+) 分别用 BamH I、Hind III 双酶切, 纯化回收双酶切产物, 用 T₄ DNA 连接酶连接, 然后转化 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素 (30 μ g/ml) 的 LB 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。常规方法提取质粒, 经 PCR、双酶切鉴定, 并对阳性克隆进行序列测定, 阳性重组表达质粒命名为 pET30a(+)-FhCL。

2.4 重组蛋白的表达及可溶性分析 将上述阳性重组质粒 pET30a(+)-FhCL 的细菌培养物, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 至吸光度 (A₆₀₀ 值) \approx 1.0 时加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (终浓度为 1.0 mmol/L) 诱导 3 h, 收集菌液留用。取部分菌液经超声裂解, 分别对其上清及沉淀进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 观察重组蛋白表达情况并进行可溶性分析。

2.5 重组蛋白包涵体的制备与纯化 上述留用菌液经离心收集诱导的菌体, 以 1/10 原培养体积的包涵体裂解液 I [含 50 mmol/L Tris·HCl pH 8.0、2 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 1% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 和 200 mg/L 溶菌酶] 重悬沉淀, 冰浴超声裂解细菌至不再黏稠; 4 $^{\circ}$ C 10 000 \times g 离心 10 min, 取沉淀 (包涵体) 以包涵体裂解液 II (含 8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris·HCl pH 8.0、2 mmol/L EDTA 和 2 nmol/L β -巯基乙醇) 溶解, 离心, 收集上清 (重组菌), 取 20 μ l 进行 SDS-PAGE。将凝胶浸泡于经冰浴预冷的 0.25 mol/L KCl 溶液中 5 min, 切下显

色的目的蛋白带，置透析袋中，加 0.5 mol/L Tris-甘氨酸电泳缓冲液，120 V 电泳 1 h，于 PBS (pH 7.4) 4 °C 透析过夜，用聚乙二醇 20000 (PEG20000) 浓缩蛋白，于基因蛋白定量仪 (GeneQuant pro 型, 英国 Biochrom 公司) 检测浓度。

2.6 FhCL 蛋白免疫大鼠血清的制备 取 5 只雌性 SD 大鼠，用 FhCL 蛋白于颈背部多点皮下注射免疫。FhCL 蛋白剂量为 200 μg/只，共免疫 3 次，每次间隔 3 周，第 1 次加入等体积福氏完全佐剂 (乳化)，加强免疫用福氏不完全佐剂，免疫后 2 周心脏采血，制备血清。

2.7 重组蛋白 Western blotting 分析 浓缩的重组蛋白经 SDS-PAGE 后，电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜，用 PBST (含 5% 脱脂奶粉及 0.5% 吐温 20) 于 4 °C 封闭过夜，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min (下同)。分别取感染肝片吸虫的山羊血清及健康山羊血清 (均按 1:50 稀释)，37 °C 孵育 1 h，洗涤 3 次。加入兔抗山羊 HRP-IgG (1:1 000 稀释)；分别取 SD 大鼠免疫前的阴性血清及上述制备的 SD 大鼠免疫血清 (均按 1:200 稀释)，37 °C 孵育 1 h，洗涤 3 次，加入兔抗大鼠 HRP-IgG (1:1 000 稀释)。分别于 37 °C 孵育 1 h，洗涤 3 次。二氨基联苯胺 (DAB)-H₂O₂ 显色，ddH₂O 终止反应。

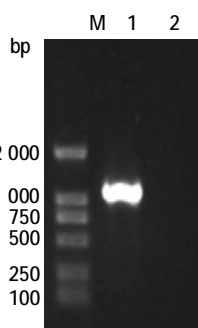
结 果

1 总 RNA 电泳检测及浓度测定

总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳，获 18 S 和 23 S 条带，表明提取的总 RNA 未降解。经测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.856，介于 1.8~2.0 之间，表明提取的总 RNA 纯度较高。

2 RT-PCR 扩增目的基因片段

RT-PCR 扩增出 1 条约 1 000 bp 的片段，与预期一致，阴性对照未扩增出任何条带 (图 1)。



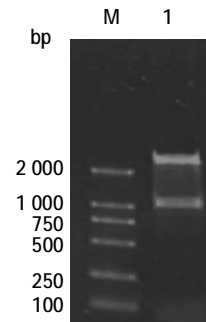
M: DNA 标志物 (DL2000), 1: FhCL 基因的 RT-PCR 产物, 2: 无模板的阴性对照。

M: DNA marker (DL2000), 1: RT-PCR product of FhCL gene, 2: Negative control.

图 1 FhCL 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR product of FhCL gene

3 重组质粒 pMD18-T/FhCL 的鉴定

3.1 双酶切鉴定 重组质粒 DNA 经 EcoR I 与 Hind III 双酶切，以及 1% 琼脂糖凝胶电泳，可见约 1 000 bp 的特异性条带 (图 2)。



M: DNA 标志物 (DL2000), 1: 重组质粒 pMD18-T/FhCL。

M: DNA marker (DL2000), 1: Recombinant plasmid pMD18-T/FhCL.

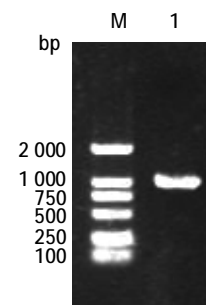
图 2 重组质粒 pMD18-T/FhCL 双酶切鉴定
Fig.2 Identification of pMD18-T/FhCL by restriction endonucleases

3.2 序列分析 测序结果表明，FhCL 基因正确地克隆入 pMD18-T 载体，重组克隆质粒 pMD18-T/FhCL 构建成功。插入目的基因片段长度为 981 bp，编码的蛋白质由 326 个氨基酸组成。

4 重组表达载体 pET30a(+)-FhCL 的鉴定

4.1 PCR 及双酶切鉴定 将酶切后胶回收产物克隆入 pET30a(+) 载体，小量制备的重组质粒 pET30a(+)-FhCL，经 PCR 和 BamH I、Hind III 双酶切鉴定，均可见约 1 000 bp 的条带 (图 3、4)，与目的基因的大小基本相符，证明重组表达质粒构建成功。

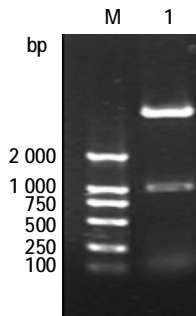
4.2 序列分析 测序结果表明，FhCL 基因正确地克隆入 pET30a(+) 载体，应用 DNASTar 软件将测序结果与 GenBank 公布的肝片吸虫 FhCL 基因核苷酸序列 (登录号为 No. AY519971.1) 比对，其同源性为 97.6%，



M: DNA 标志物 (DL2000), 1: 重组质粒 pET30a(+)-FhCL。

M: DNA marker (DL2000), 1: Recombinant plasmid pET30a(+)-FhCL.

图 3 重组质粒 pET30a(+)-FhCL PCR 鉴定
Fig.3 Identification of pET30a(+)-FhCL by PCR



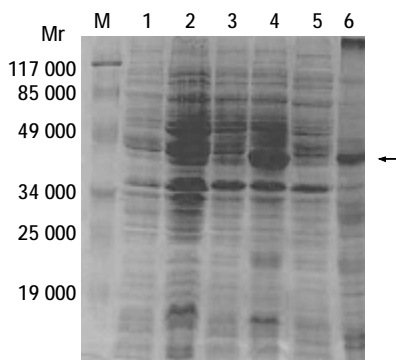
M: DNA 标志物 (DL2000), 1: 重组质粒的双酶切结果。
M: DNA marker DL2000, 1: The recombinant pET30a(+)-FhCL digested by BamH I and HindIII.

图 4 重组质粒 pET30a(+)-FhCL 双酶切鉴定
Fig. 4 Identification of pET30a(+)-FhCL by digestion with BamH I and HindIII

氨基酸序列同源性的 95.4%，且推导表达的蛋白约为 Mr 42 000。证实重组表达质粒 pET30a(+)-FhCL 构建成功，且基因序列和阅读框架均正确。

5 重组蛋白的诱导表达与可溶性分析

将构建的重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3)，SDS-PAGE 结果显示，约在 Mr 42 000 位置出现一表达条带 (图 5, 箭头)，且与目的蛋白相符，而空质粒对照菌无此条带。分离包涵体裂解上清和沉淀进行 SDS-PAGE，结果表明该重组蛋白位于裂解沉淀中，以包涵体的形式表达。



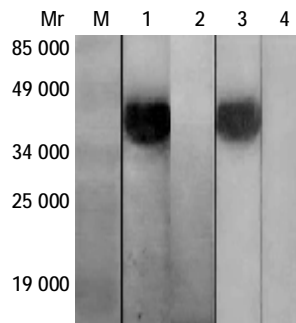
M: 蛋白质标志物, 1: pET30a(+)诱导前, 2: pET30a(+)诱导后 3 h, 3: pET30a(+)-FhCL 诱导前, 4: pET30a(+)-FhCL 诱导后 3 h, 5: 菌体裂解后上清, 6: 菌体裂解后沉淀。
M: Protein marker, 1: pET30a(+) before induction, 2: pET30a(+) after induction, 3: pET30a(+)-FhCL before induction, 4: pET30a(+)-FhCL 3 h after induction, 5: Soluble protein of pET30a(+)-FhCL, 6: Insoluble protein of pET30a(+)-FhCL.

图 5 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein

6 重组蛋白 FhCL 的 Western blotting 分析

纯化后的重组蛋白 FhCL 分别与感染肝片吸虫的山羊血清和免疫后的 SD 大鼠血清作用，在目的条带

处可见单一的特异免疫反应条带，而阴性血清对照则无，表明该重组蛋白具有较好的免疫原性 (图 6)。



M: 蛋白质标志物, 1: 感染山羊血清, 2: 健康山羊血清, 3: FhCL 蛋白免疫 SD 大鼠血清, 4: 免疫前 SD 大鼠血清。
M: Prestained protein marker, 1: Sera of infected goat, 2: Sera of healthy goat, 3: SD rat antisera against FhCL, 4: Sera of healthy SD rat

图 6 重组蛋白 FhCL 的 Western blotting 分析
Fig.6 Western blotting analysis of the recombinant FhCL

讨 论

目前，防治肝片吸虫病尚无有效疫苗可用，主要是药物治疗，但成本高、易产生耐药性，而且药物的残留严重影响畜牧业肉和奶的质量，危及人类健康^[6]。亚单位疫苗因只含病原体的一部分，不致引起动物发病，因此在安全性和纯度方面好于弱毒疫苗和灭活疫苗^[7]。目前，肝片吸虫疫苗研究重点已从虫体匀浆疫苗转向分子疫苗，筛选候选蛋白研制基因工程疫苗已成为研究热点。

肝片吸虫的分泌排泄 (ES) 抗原是主要的保护性抗原，能诱导宿主获得保护性免疫^[8]。ES 抗原是多种抗原组分的混合物，确定 ES 抗原中单一、有效的抗原组分是筛选用于免疫靶抗原的关键。组织蛋白酶是 ES 抗原组分之一，其中大部分为半胱氨酸蛋白酶 (FhCL)，其余为天冬氨酸或丝氨酸蛋白酶。FhCL 在肝片吸虫的每个阶段都有分泌，这对于其适应宿主的寄生生活具有重要作用^[3]，如虫体在组织中移行、吸收营养和产卵，以及通过裂解免疫球蛋白和抑制嗜酸粒细胞对幼虫的吸附以逃避宿主免疫系统。FhCL 在肝片吸虫的诊断与免疫方面具有较好的应用前景^[9,10]，是肝片吸虫疫苗研制的首选抗原^[11]。

Dalton 等^[5]根据不同底物特异性将肝片吸虫成虫组织蛋白酶 L 分为 FhCL1 和 FhCL2 两个亚类，而新脱囊的幼虫主要是 FhCL3 和 FhCL4。研究表明，用杆状病毒表达载体表达的重组蛋白 FhCL3 免疫大鼠，获得了一定的保护力^[11]，利用真核表达载体构建的半胱氨酸蛋白酶 DNA 疫苗免疫雌性 SD 大鼠可使虫荷减少 74%^[12]。此外，还有几种蛋白酶，如脂肪酸结合

蛋白(FABP)、谷胱甘肽转移酶(GST)和血红蛋白(Hb)等,同样具有抗肝片吸虫感染的免疫保护性^[12,13]。

本研究结果表明,将 FhCL 基因插入原核表达载体 pET30a(+),构建重组质粒 pET30a(+)-FhCL,经 IPTG 诱导进行重组蛋白表达,采用电洗脱法获得纯化的重组蛋白,以包涵体形式存在,且与预期大小相符。包涵体可保护重组蛋白免受胞内酶的降解,且通过离心法可获得高纯度的外源蛋白质。免疫原性研究表明,表达的重组蛋白 FhCL 能与感染肝片吸虫的山羊血清反应,而不被健康山羊血清识别,表明其具有较高的敏感性和特异性,免疫反应性良好,提示重组蛋白 FhCL 与天然蛋白 FhCL 具有相似的抗原表位。本研究结果还表明,重组蛋白能识别被其免疫的 SD 大鼠血清,而与免疫前健康大鼠血清无反应,表明重组蛋白 FhCL 能刺激机体产生抗体,是免疫优势抗原,肝片吸虫重组蛋白 FhCL 是有效的抗肝片吸虫感染疫苗候选分子。

本研究成功地表达了肝片吸虫 FhCL 蛋白,重组蛋白 FhCL 可通过电洗脱法纯化,Western blotting 分析证实本研究获得的重组蛋白具有较强的免疫原性,为进一步研究肝片吸虫疫苗候选疫苗提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Gajewska A, Smaga-Kozłowska K, Wisniewski M. Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica* [J]. *Wiad Parazytol*, 2005, 51(2): 115-123.
 [2] Xu HY, Zhu RL, Zhao HK. Advances in study on diagnosis and prevention of fascioliasis hepatica [J]. *Chin J Vet Parasitol*, 2000, 8(4): 49-50. (in Chinese)
 (徐怀英,朱瑞良,赵宏坤.肝片吸虫病诊断与防治研究进展[J].中国兽医寄生虫病,2000,8(4):49-50.)

[3] Berasain P, Carmona C, Frangione B, et al. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced[J]. *Exp Parasitol*, 2000, 94(2): 99-110.
 [4] Smith AM, Dowd AJ, Mc Gonigle S, et al. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, 62(1): 1-8.
 [5] Dalton JP, Mc Gonigle S, Rolph TP, et al. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(12): 5066-5074.
 [6] Gaasenbeek CP, Moll L, Cornelissen JB, et al. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep [J]. *Vet Parasitol*, 2001, 95(1): 37-43.
 [7] Melen RH, Langeveld JP, Schaaper WM, et al. Synthetic peptide vaccines: unexpected fulfillment of discarded hope? [J]. *Biologicals*, 2001, 29(3-4): 233-236.
 [8] Roberts JA, Widjayanti S, Estuningsih E. Acquired resistance of merino sheep against *Fasciola gigantica*[J]. *Parasitol Res*, 1996, 82(8): 743-746.
 [9] Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, et al. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L like protease [J]. *Int J Parasitol*, 2001, 31(7): 728-737.
 [10] Kesik M, Jedlina-Panasiuk L, Kozak-Cieszczyk M, et al. Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1) [J]. *Vaccine*, 2007, 25(18): 3619-3628.
 [11] Reszka N, Cornelissen JB, Harmsen MM, et al. *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis[J]. *Vaccine*, 2005, 23(23): 2987-2993.
 [12] Dalton JP, O' Neill S, Stack C, et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(11): 1173-1181.
 [13] Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, et al. Successful DNA immunization of rats against fasciolosis [J]. *Vaccine*, 2000, 18(26): 2985-2990.

(收稿日期: 2008-12-18 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0199-02

【病例报告】

西藏林芝地区旋毛虫病 2 例

次仁^{1*}, 茶果¹, 丹增西洛¹, 扎西次仁², 土旦尼玛², 巴桑³, 袁松³

中图分类号: R532.14 文献标识码: D

2009 年 2 月,报告西藏林芝地区工布江达县朱拉乡吉木雄村疑似旋毛虫病 2 例,经调查和实验室检查,确诊为旋毛虫病,报告如下。

1 病例

2 例患者来自同一家庭,男 33 岁,女 32 岁,均为藏族农

民。2009 年 2 月初发病,发病前 10 d 曾进食自家屠宰的生猪肉。表现为右上腹为主的阵发性腹痛(隐痛),以及腹胀、腹泻(黏液便每天 2~3 次),2 d 后出现发热、全身肌肉剧烈疼痛和双下肢水肿等。经乡卫生院抗生素治疗,病情未缓解还逐渐加重、伴呼吸困难。2009 年 2 月 12 日转工布江达县人民医院诊治。13 日对 2 例患者进行腓肠肌活检,肌肉压片镜检均查见未成囊旋毛虫幼虫(1~2 条幼虫/低倍视野)(图 1 A、B)。取患者家中剩余(后腿)猪肉压片镜检,查见成囊旋毛虫幼虫(1~2 个幼虫囊包/低倍视野)(图 1 C、D)。用人工消化法收集虫体,查见大量旋毛虫幼虫。

作者单位: 1 西藏林芝地区疾病预防控制中心,林芝 860000;
 2 西藏工布江达县疾病预防控制中心,工布江达 860200;
 3 西藏林芝地区人民医院,林芝 860000

* 通讯作者, E-mail: cirenzjk@yahoo.com.cn