

日本血吸虫 SjC23-Hsp70 DNA 疫苗与 IL-12 对水牛保护性作用的研究

胡平成¹, 夏大^{1,2}, 崔虹艳¹, 张革芳¹, 何永康³, 喻鑫玲³, 孙振球¹

(1. 中南大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 长沙 410078; 2. 湖南省益阳市卫生局, 湖南 益阳 413000;
3. 湖南省血吸虫病防治所, 湖南 岳阳 414000)

[摘要] 目的: 研究日本血吸虫中国大陆株 23 kD 膜蛋白-热休克蛋白 (SjC23-Hsp70) DNA 疫苗联合佐剂白细胞介素 12(IL-12) 质粒 DNA 对水牛的免疫保护作用。方法: 将血吸虫病非流行区 8~10 月龄健康水牛 45 头随机分为 A 组 (SjC23-Hsp70+IL-12)、B 组 (SjC23+IL-12) 和 C 组 (pVAX+IL-12), 每组 15 头。每头牛经肩部肌注免疫 3 次, 每次间隔 28 d。末次免疫后 28 d, 每头牛感染日本血吸虫尾蚴 1000 条。解剖前 2 天及当天分别收集粪便 1 次, 用定量法检测虫卵和毛蚴数。攻击感染后 56 天解剖所有水牛, 经胸主动脉灌注法收集成虫, 计数成虫数, 检测每克肝组织虫卵数。结果: A、B 组与 C 组相比, 分别获得 45.70% 和 26.61% 的减雌率, 44.51% 和 25.84% 的减虫率, 41.10% 和 31.63% 的减粪卵率, 48.11% 和 38.07% 的减毛蚴率及 43.39% 和 31.95% 的减肝卵率。A 组的 5 个率均比 B 组高 ($P < 0.05$)。结论: 用 SjC23-Hsp70 DNA 疫苗和 IL-12 联合免疫水牛可获得明显的免疫保护作用。

[关键词] 日本血吸虫; 23 kD 膜蛋白; 热休克蛋白 70; DNA 疫苗; 白细胞介素 12; 保护性作用

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.08.017

Protective effect of SjC23-Hsp70 DNA vaccine and interleukin-12 on *Schistosoma japonicum* infection in water buffalos

HU Pingcheng¹, XIA Da^{1,2}, CUI Hongyan¹, ZHANG Pingfang¹, HE Yongkang³, YU Xinling³, SUN Zhenqiu¹

(1. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078; 2. Yiyang Health Bureau of Hunan Province, Yiyang Hunan 413000; 3. Hunan Institute of Schistosomiasis, Yueyang Hunan 414000, China)

ABSTRACT

Objective: To determine the immune-protective effect of Japan *Schistosoma* (Chinese mainland strain) 23 kD membrane protein-heat shock protein (SjC23-Hsp70) DNA vaccine plus adjuvant-induced interleukin-12 (IL-12) plasmid DNA on *Schistosoma japonicum* infection in water buffalos.

Methods: Forty-five health water buffalos (8-10 months old) in non-endemic area of schistosomiasis were randomly assigned into group A (SjC23-Hsp70+IL-12, 300 μ g), group B (SjC23+IL-12, 300 μ g) and group C (pVAX+IL-12, 300 μ g), 15 in each group. Each buffalo was immunized by shoulder intramuscular injection for 3 times, at an interval of 28 days. Twenty-eight days after the last immunization, each buffalo was infected with 1000 Japan cercariae of *Schistosoma*. Fecal examinations were conducted 2 days and 1 day before the perfusion, and on the day of

收稿日期 (Date of reception): 2012-06-12

作者简介 (Biography): 胡平成, 硕士, 副教授, 主要从事流行病学与卫生统计学研究。

通信作者 (Corresponding author): 喻鑫玲, Email: xinlingy66@163.com

perfusion. The number of hatching miracidia and eggs per gram feces was recorded. Fifty-six days after the infection, the buffalos were sacrificed and perfused via the descending aorta. The recovered adult worms and eggs in the liver tissue were counted.

Results: We compared group A and B with group C: the estrogen reduction rate was 45.7% and 26.61%; bug reduction rate was 44.51% and 25.84%; the fecal egg reduction rate was 41.1% and 31.63%; the miracidium reduction rate was 48.11% and 38.07%; and the liver egg reduction rate was 43.39% and 31.95%. The above rates in group A were higher than those in group B ($P < 0.05$).

Conclusion: SjC23-Hsp70 DNA vaccine combined with IL-12 may have a significant immunoprotective effect on buffalos.

KEY WORDS

Japan *Schistosoma*; 23 kD membrane protein; heat shock protein 70; DNA vaccine; interleukin-12; protective effect

血吸虫病是世界上最常见的寄生虫病之一, 不仅影响个人健康, 而且影响整个血吸虫病流行区域的经济发展^[1-3]。我国是日本血吸虫病流行最为严重的国家, 约 1 亿人口受到血吸虫病的威胁^[4]。特别是近年来长江洪水泛滥, 血吸虫病有增多和向城市蔓延的趋势。水牛是湖区血吸虫病主要传染源之一, 重复感染机会多, 频繁化疗费用高、效果差, WHO 把血吸虫病疫苗的研究放在优先发展的位置上^[5], 近十年来, 血吸虫病 DNA 疫苗研究日益受到重视, 显示出较好的发展潜力^[6-7]。日本血吸虫 23 膜蛋白 DNA 疫苗 (SjC23) 经小鼠及猪等一系列动物实验已被证实是一种前景较好的疫苗候选分子^[8-13]。Hsp70 家族是 Hsp 家族中最大的一族, 生物学功能十分广泛, 具有分子伴侣作用并参与抗原提呈过程, 可结合多种抗原肽形成 Hsp- 抗原肽复合物, 激活特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和记忆性 T 细胞, 引发细胞免疫反应并有效防止免疫逃避, 因而, 日本血吸虫 Hsp- 抗原肽复合疫苗可增强疫苗的免疫性保护作用, 现已成为抗寄生虫感染中研究的热点之一^[14]。Hedstrom 等^[15]证实曼氏血吸虫的 Hsp70 是感染宿主的一种主要的免疫原。阎玉涛等^[16]用未感染日本血吸虫的东方田鼠的血清免疫筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库时, 发现 7 个具有天然抵抗力蛋白分子基因中有 Hsp70 的基因。因此, 日本血吸虫 Hsp- 抗原肽复合疫苗有可能成为提高疫苗保护率的一个突破点, 而白细胞介素 12 (IL-12) 是决定 Th1 型免疫应答的主要细胞因子, 已用于对多种病原体 (细菌、寄生虫、真菌和病毒) 所致疾病及肿瘤的 DNA 疫苗的研究, 以增强其免疫保护作用^[17-19]。本研究采用 SjC23-Hsp70 DNA 疫苗、SjC23 DNA 疫苗与基因佐剂 IL-12 质粒 DNA, 对水牛血吸虫病的联合免疫保护性作用

进行了对比研究, 为血吸虫 DNA 疫苗研究与应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验现场

选在血吸虫病非流行区湖南省岳阳县筲口镇新安村铁山水库下游的沙港河河畔旁, 草滩面积约 200 m × 200 m, 距岳阳市区约 40 km。新安村居民 708 人, 耕牛 55 头, 无外来渔船民, 历史上无钉螺、亦无血吸虫病流行。

1.2 分 组

45 头健康水牛购自非血吸虫病流行区湖南省邵阳市隆回县, 8~10 月龄, 体质量 (154.8 ± 14.7) kg。水牛于试验开始半月以上进入试点牛棚, 以适应当地环境。以粪便集卵孵化法确定所有水牛无血吸虫病, 并用全剂量阿维菌素作肠道驱虫处理。按体质量大小编号, 用牛角烙编号和挂颈标两种方法标记, 用完全随机化分组方法分成 A 组 (SjC23-Hsp70+IL-12 组)、B 组 (SjC23+IL-12 组)、C 组 (pVAX+IL-12 对照组), 每组 15 头。

1.3 疫苗及制剂

按盲法实验设计, 2 种疫苗及 1 种制剂和 IL-12 质粒 DNA 均由美国哈佛大学公共卫生学院 D.A. Harn 教授制备并提供。2 种疫苗及 1 种制剂由与本实验无关的澳大利亚专家编码, 并同 IL-12 质粒 DNA 一起派专人直接送至现场使用, 实验结束后由澳大利亚专家解码疫苗及制剂。2 种疫苗及 1 种制剂仅编号和颜色标记不同: SjC23-Hsp70 (编号 10, 黄色)、

SjC239(编号40, 红色)、空质粒(编号25, 蓝色), IL-12质粒DNA已标明。原液浓度均为1 mg/mL, 使用前以无菌生理盐水将疫苗、制剂与IL-12质粒DNA混合配制成所需浓度, 即疫苗、制剂与IL-12质粒DNA在混合液中浓度均为300 μ g/mL。

1.4 免疫方法

在草滩上用麻绳将水牛绑定, 免疫方式为肩部肌肉注射, 免疫剂量为1 mL。共免疫3次, 每次间隔28 d, A组第1次免疫SjC23-Hsp70质粒DNA 300 μ g, 第2, 3次免疫均同时注射SjC23-Hsp70和IL-12质粒DNA各300 μ g; B组第1次免疫SjC23质粒DNA 300 μ g, 第2, 3次免疫均同时注射SjC23和IL-12质粒DNA各300 μ g; C组第1次免疫pVAX空白质粒DNA 300 μ g, 第2, 3次免疫均同时注射pVAX空质粒、IL-12质粒DNA各300 μ g。

1.5 攻击感染

600只日本血吸虫阳性钉螺由江苏省血吸虫病防治研究所提供。第3次免疫后28 d, 每头牛经大腿内侧皮肤感染日本血吸虫尾蚴1000条。分3 d按组别顺序随机抽取水牛进行感染, 每天感染15头牛。感染时, 维持室温20~25 $^{\circ}$ C, 将水牛绑定于特制木板上, 大腿内侧皮肤刮毛, 范围约10 cm \times 10 cm, 去氯水洗净, 计时感染30 min。

1.6 粪便毛蚴及虫卵检查

于解剖前2 d及当天, 分别收集每牛粪便标本1次。

1.6.1 毛蚴计数方法

用定量孵化法检测虫卵和毛蚴。称取搅匀的牛粪50 g, 用120孔目、300孔目尼龙绢袋过筛, 500 mL三角烧瓶孵化。孵化2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 24 h后分别观察并收集毛蚴, 每次倒出含毛蚴上层液至1000 mL锥形量筒中, 滴加2~3滴碘液以杀死并染色毛蚴。量筒水满且毛蚴自然沉淀时, 用医院妇产科用吸宫器吸去上层水液。孵化并收集完毕, 将含毛蚴的沉淀移至50 mL塑料刻度离心管中, 定容至5 mL, 混匀, 取0.3 mL涂片3片, 镜下计数毛蚴。沉淀镜检毛蚴数(MPG-1)=3人计数的毛蚴总数 \times 5/0.3/150; 按组别收集上清液混合, 计数毛蚴数得上清液镜检毛蚴数(MPG-2)。总MPG=MPG-1+MPG-2。

1.6.2 粪便未孵化虫卵计数方法

将3次孵化完毕的粪渣按水牛编号以300孔目尼龙绢袋收集于50 mL塑料刻度离心管中, 加10%甲醛15 mL混匀固定5 min, 加乙醚10 mL, 加水至40 mL, 充分摇匀3 min, 静置30 min, 低速离心

(1000 r/min)3 min。离心后弃去含甲醛、乙醚和粪渣的上层, 取沉淀加数滴卢戈氏液染色镜检, 定量计数未孵出的血吸虫卵。若沉淀粪渣过多可重复以上步骤。粪便未孵化虫卵计数方法: 3次粪检孵化后粪渣按编号混合, 称量混合粪渣重量后取5 g稀释至40 mL。镜检计数5 mL中虫卵数(E), 粪卵(EPG)= $E \times 40 / (5 \times \text{混合粪渣重量}) / (5+1) / 150$ 。为减小测量误差, 取3次检查结果的平均值作为该研究对象(水牛)的分析指标(粪卵数或毛蚴数), 对3组的粪卵数和毛蚴数进行假设检验(方差分析)后, 如果有统计学意义, 按如下公式计算综合指标减粪卵率和减毛蚴率。减粪卵率=[(对照组平均每克粪便虫卵数-实验组平均每克粪便虫卵数)/对照组平均每克粪便虫卵数] \times 100%。

1.7 解剖和冲虫

于攻击感染后56 d解剖水牛和冲虫。计数每头水牛所有收集的虫体数和雌虫数, 通过所收集的虫体数和雌虫数来计算其减虫率和减雌虫率, 其计算公式为: 减虫率=[(对照组平均检获虫数-实验组平均检获虫数)/对照组平均检获虫数] \times 100%; 减雌虫率=[(对照组平均检获雌虫数-实验组平均检获雌虫数)/对照组平均检获雌虫数] \times 100%。

1.8 肝组织虫卵检查

于每头牛肝脏左、右肝边缘相同部位取样各约10 g, 剪碎, 用电子分析天平称取左、右肝组织各5 g, 于45 mL 5% KOH中37 $^{\circ}$ C摇动消化3 h, 离心将沉渣定容至4 mL, 取0.4 mL涂片4片镜检计数虫卵数。左肝粪卵数(LEPG)或右肝粪卵数(REPG)=镜检虫卵数 \times 4/0.4/5; 总EPG=(LEPG+REPG)/2。减肝卵率=[(对照组平均每克肝脏虫卵数-实验组平均每克肝脏虫卵数)/对照组平均每克肝脏虫卵数] \times 100%。

1.9 统计学处理

用SPSS17.0统计软件对数据进行统计分析, 多个均数的比较采用完全随机设计的方差分析, 组间均数的比较采用方差分析中两两比较的LSD-*t*法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组检获雌虫数和成虫数的比较与减雌率和减虫率的计算

3组检获雌虫数的比较, 经方差分析有统计学意义($F=86.807$, $P < 0.001$; 表1); 经方差分析两两比较

的 LSD-*t* 法, A, B 和 C 组检获雌虫数两两间差异均有统计学意义 ($P_{AB} < 0.001$, $P_{AC} < 0.001$, $P_{BC} < 0.001$)。与 C 组相比, A, B 组的减雌率分别为 45.70% 和 26.61%, A 组的减雌率高于 B 组。

3 组检获成虫数的比较, 经方差分析有统计学意义 ($F=92.189$, $P < 0.001$; 表 1); 经方差分析两两比较的 LSD-*t* 法, A, B 和 C 组检获雌虫数两两间差异均有统计学意义 ($P_{AB} < 0.001$, $P_{AC} < 0.001$, $P_{BC} < 0.001$)。与 C 组相比, A, B 组的减虫率分别为 44.51%, 25.84%, A 组的减虫率高于 B 组。

表 1 3 组水牛检获雌虫数和成虫数的比较 ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of number of female and number of adults in the 3 groups ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	获雌虫数	成虫数
A 组	112.53 ± 17.89	241.93 ± 39.23
B 组	152.07 ± 24.55	323.33 ± 45.26
C 组	207.20 ± 15.79	436.00 ± 32.37

2.2 3 组粪便虫卵数、毛蚴数的比较与减粪卵率和减毛蚴率的计算

3 组粪便虫卵数的比较, 经方差分析有统计学意义 ($F=42.583$, $P < 0.001$; 表 2); 经方差分析两两比较的 LSD-*t* 法, A, B 和 C 组粪便虫卵数两两间差异均有统计学意义 ($P_{AB} < 0.001$, $P_{AC} < 0.001$, $P_{BC} < 0.001$)。与 C 组相比, A, B 组的减粪卵率分别为 41.10%, 31.63%, A 组的减粪卵率高于 B 组。

3 组粪便毛蚴数的比较, 经方差分析有统计学意义 ($F=45.806$, $P < 0.001$; 表 2); 经方差分析两两比较的 LSD-*t* 法, A, B 和 C 组粪便毛蚴数两两间差异均有统计学意义 ($P_{AB} < 0.001$, $P_{AC} < 0.001$, $P_{BC} < 0.001$)。与 C 组相比, A, B 组的减毛蚴率分别为 48.11%, 38.07%, A 组的减毛蚴率高于 B 组。

表 2 3 组水牛粪便虫卵数与毛蚴数的比较 ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of number of buffalo dung egg and miracidia in the 3 groups ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	虫卵数	毛蚴数
A 组	21.45 ± 4.63	14.53 ± 3.51
B 组	24.90 ± 3.68	17.34 ± 3.33
C 组	36.42 ± 5.47	28.01 ± 5.12

2.3 3 组肝脏虫卵数的比较与减肝卵率的计算

A, B 和 C 组肝组织虫卵数分别为 249.53 ± 59.21, 299.93 ± 54.34, 400.77 ± 90.83, 经方差分析差异有统计学意义 ($F=30.053$, $P < 0.001$), 经方差

分析两两比较的 LSD-*t* 法, A, B 和 C 组肝组织虫卵两两间差异均有统计学意义 ($P_{AB} < 0.001$, $P_{AC} < 0.001$, $P_{BC} < 0.001$)。与 C 组相比, A, B 组的减肝卵率分别为 43.39%, 31.95%, A 组的减肝卵率高于 B 组。

3 讨论

20 世纪 80 年代中期, 根据全球血吸虫病流行情况及防治进展, WHO 提出控制血吸虫病的新策略, 以疾病控制代替以往的传播阻断作为防治目标。防治措施的重点也从中间宿主控制 (灭螺) 为主转移到健康教育与化疗为主^[20-21], 吡喹酮是一种对人体 5 种主要血吸虫病 (曼氏、埃及、湄公、间插与日本血吸虫病) 都非常有效的药物。全球已对 1 亿多例血吸虫感染者及有疫水接触史的可能感染者用吡喹酮进行了治疗, 积累了极为丰富的经验^[22]。然而, 已有证据^[23]表明: 曼氏血吸虫对吡喹酮已产生抗药株, 埃及血吸虫病也出现了用吡喹酮难以治愈的现象。尽管目前还未发现日本血吸虫对吡喹酮敏感性下降的证据, 但是仍需要密切观察日本血吸虫对吡喹酮是否产生抗药性。事实证明以灭螺和吡喹酮大规模化疗为主的防治对策并未根本解决血吸虫病防治问题。

疫苗是控制传染性疾病的有效手段, 20 世纪初就有人设想研制血吸虫疫苗来预防和控制血吸虫病。抗日本血吸虫 DNA 疫苗的动物实验研究^[24]表明: 混和或多价疫苗是未来 DNA 疫苗的发展方向。23 kD 的表面膜分子是第一个从蠕虫的寄生虫中被详细描述的分子。它是第 4 家族 (TM4SF) 成员, 是一个完整的膜蛋白质, 由 4 个疏水跨膜结构域及大小不同的胞外亲水结构域组成。这种 23 kD 蛋白存在于脊椎动物寄生虫的所有阶段, 几乎所有的细胞都具有这种蛋白。因此, 这种蛋白是一个非常好的疫苗靶标^[25-27]。

血吸虫 23 kD 膜蛋白存在于血吸虫尾蚴、童虫、晚期童虫和成虫等各期的表膜上, 单抗 M2 经转移到实验小鼠, 能产生一定的被动免疫保护作用, 重组 Sm23 在小鼠中可以诱导产生 40%~50% 的保护作用, 表明血吸虫 23 kD 膜蛋白为一潜在的疫苗候选抗原^[28]。当 rSj23 与福氏佐剂乳化后免疫注射绵羊证实其具有高度免疫原性, 可获得 51.2%~66.1% 的减虫率^[29-30]。Zhu 等^[31]用 Sjc23 基因克隆入 pcDNA3.1 中, 构建成 Sjc23 的质粒 DNA, 在 C57BL/6 小鼠可诱导产生 26.9% 的减虫率, 与 IL-12 质粒 DNA 一起免疫则可产生 35.4% 的减虫率, 而且发现免疫鼠的 IL-12 和 IFN- γ 水平有明显

升高, 但 IL-4 和 IL-10 则无变化; 表明 Sj23DNA 疫苗可诱导产生明显的细胞免疫反应(Th1)。Western 印迹分析大部分实验鼠可产生抗体, 表明 SjC23DNA 疫苗具有一定的保护作用, 可能与 SjC23 可诱导 T 细胞免疫有关, 也可能还有体液免疫的参与。Zhu 等^[32]用大动物猪作为实验动物, 取得了比在小鼠中更好的免疫保护作用, SjC23 组可产生 29.2% 的减虫率、50.8% 的减雌率和 48.2% 的减卵率, 进一步表明 SjC23 可诱导产生较好的保护作用。

本研究以水牛为研究对象, 在血吸虫病非疫区湖南省岳阳县筲口镇的一个天然优良的水牛养殖基地, 采用融合了 Hsp70 诱导子的日本血吸虫 23 kD 膜蛋白 DNA 疫苗(SjC23-Hsp70)与细胞因子(IL-12 质粒 DNA)分子佐剂的联合免疫对水牛的免疫保护作用进行了观察。与对照组相比, SjC23-Hsp70+IL-12 组和 SjC23+IL-12 组的减雌率、减虫率、减粪卵率、减毛蚴率及减肝卵率分别为 45.70% 和 26.61%, 44.51% 和 25.84%, 41.10% 和 31.63%, 48.11% 和 38.07% 及 43.39% 和 31.95%, 表明多价 SjC23-Hsp70 DNA 疫苗对水牛血吸虫病的保护作用明显高于单价 SjC23 DNA 疫苗; 多价 SjC23-Hsp70+IL-12 DNA 疫苗对水牛血吸虫病可产生与 SjC23+IL-12 DNA 疫苗对猪的同样较为理想的保护作用, 提示 SjC23DNA 疫苗是一种有发展前景的疫苗。

本研究严格按盲法实验设计进行, 避免了主观因素的干扰, 取得了较好的保护性免疫效果, 为研究抗水牛血吸虫病 DNA 疫苗提供了新的科学依据与途径。因水牛个体大, 操作有一定的难度, 本结果仅为初步试验, 其现场应用价值仍有待进一步研究证实。

参考文献

1. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, et al. The global status of schistosomiasis and its control[J]. *Acta Trop*, 2000, 77(1): 41-51.
2. Mascie-Taylor CG, Karim E. The burden of chronic disease[J]. *Science*, 2003, 302(5652): 1921-1922.
3. King CH, Dickman K, Tisch DJ, et al. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta analysis of disability related outcomes in endemic schistosomiasis[J]. *Lancet*, 2005(9470): 365-371.
4. 王陇德. 中国血吸虫病防治历程与展望: 纪念血吸虫病在中国发现一百周年文选[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 287-294.
WANG Longde. Schistosomiasis control in China and prospect: selected papers of commemorate the 100 anniversary of the discovery of schistosomiasis in China[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 287-294.
5. WHO. Report of the World Health Organization Informal Consultation on Schistosomiasis in low transmission areas: control strategies and criteria for elimination[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2001(3): 1-51.
6. 付译节. 血吸虫疫苗研究新进展[J]. *国际生物制品学杂志*, 2007, 30(6): 267-271.
FU Yijie. Recent advances in vaccine of Schistosoma[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2007, 30(6): 267-271.
7. 郑辉, 沈继龙. 血吸虫病DNA疫苗联合免疫研究进展[J]. *国际医学寄生虫病杂志*, 2007, 34(6): 306-310.
ZHENG Hui, SHEN Jilong. Research progress of DNA vaccines of schistosomiasis combined with immune[J]. *International Journal of Medical Parasitic Diseases*, 2007, 34(6): 306-310.
8. 任建功, 朱荫昌, Harn DA, 等. 日本血吸虫中国大陆株23 kDa膜蛋白DNA疫苗诱导小鼠保护性免疫的研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2001, 19(6): 336-339.
REN Jianguo, ZHU Yinchang, Harn DA, et al. Japan China 23 kDa membrane protein induced by DNA Vaccine of Schistosoma on protective immunity in mice[J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2001, 19(6): 336-339.
9. 任建功, 朱荫昌, Harn DA, 等. 日本血吸虫23kDa膜蛋白DNA疫苗保护性免疫及IL-12免疫佐剂作用的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2001, 13(6): 328-332.
REN Jianguo, ZHU Yinchang, Harn DA, et al. Japan 23 kDa membrane protein DNA Vaccine of Schistosoma research on protective immunity and immune adjuvant effect of IL-12[J]. *Journal of Schistosomiasis Control in China*, 2001, 13(6): 328-332.
10. 朱荫昌, 任建功, Harn DA, 等. 日本血吸虫中国大陆株23 kDa膜蛋白核酸疫苗对猪免疫保护性作用的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2002, 14(1): 3-7.
ZHU Yinchang, REN Jianguo, Harn DA, et al. Japan China 23 kDa membrane protein DNA Vaccine of Schistosoma studies on protective immunity in pigs[J]. *Journal of Schistosomiasis Control in China*, 2002, 14(1): 3-7.
11. 任建功, 朱荫昌, Harn DA, 等. 日本血吸虫23 kDa膜蛋白DNA疫苗和蛋白质疫苗联合应用免疫保护作用的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2002, 14(2): 98-101.
REN Jianguo, ZHU Yinchang, Harn DA, et al. Japan 23 kDa membrane protein-DNA and protein vaccines of schistosomiasis study on combined application of immuno-protective effect[J]. *Journal of Schistosomiasis Control in China*, 2002, 14(2): 98-101.
12. 朱荫昌, 任建功, 司进, 等. 日本血吸虫SjC23和SjC23 DNA疫苗联合免疫保护作用的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2002,

- 14(2): 84-87.
- ZHU Yinchang, REN Jianguo, SI Jin, et al. Japan Joint SjC23 and SjC23 DNA Vaccine of Schistosoma research on immuno-protective effect[J]. Journal of Schistosomiasis Control in China, 2002, 14(2): 84-87.
13. Zhu Y, Ren J, Da'dara A. The protective effect of a Schistosoma japonicum Chinese strain 23kDa plasmid DNA vaccine in pigs is enhanced with IL-12[J]. Vaccine, 2004, 23(1): 78-83.
14. 王晓婷, 朱荫昌. 热休克蛋白及其在血吸虫研究中的进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17(3): 234-238.
- WANG Xiaoting, ZHU Yinchang. Advances in research of heat shock protein in Schistosoma[J]. Journal of Schistosomiasis Control in China, 2005, 17(3): 234-238.
15. Hedstrom R, Culpepper J, Harrison RA, et al. A major immunogen in Schistosoma mansoni infections is homologous to the heat-shock protein Hsp70 [J]. Journal of Experimental Medicine, 2005, 195(29): 1430-1435.
16. 阎玉涛, 刘述先, 宋光承, 等. 东方田鼠天然抗体相关的日本血吸虫抗原基因筛选和克隆[J]. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 2001, 19(3): 153-156.
- YAN Yutao, LIU Shuxiao, SONG Guangcheng, et al. Microtus natural antibody related Japan schistosome Antigen gene screening and cloning[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2001, 19(3): 153-156.
17. Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, et al. Cloning and expression of murine IL-12[J]. J Immunol, 1992, 148(11): 3433-3440.
18. Wolf SE, Sieburth D, Sypek J. Interleukin 12: a key modulator of immune function [J]. Stem Cells, 1994, 12(2): 154-168.
19. 朱晓华, 石佑恩, 宁长修, 等. 白细胞介素-12在日本血吸虫脂肪酸结合蛋白诱导小鼠保护性免疫力中的佐剂作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(3): 150-154.
- ZHU Xiaohua, SHI Youen, NING Changxiu, et al. Interleukin-12 in Japan in protective immunity in mice induced by fatty acid-binding protein of Schistosoma adjuvant effect[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2005, 23(3): 150-154.
20. WHO. World Health Organization new strategy on schistosomiasis [J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Health, 1984, 15(4): 469-470.
21. 陈名刚. 世界血吸虫病流行情况及防治进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(2): 81-83.
- CHEN Minggang. World of schistosomiasis epidemic situation and control progress[J]. Journal of Schistosomiasis Control in China, 2002, 14(2): 81-83.
22. 陈名刚. 国外吡喹酮防治血吸虫病的进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(1): 20-28.
- CHEN Minggang. Progress of praziquantel in Schistosomiasis Control in foreign countries[J]. International Journal of medical parasitic diseases, 2006, 33(1): 20-28.
23. 吴月英, 宁安. 血吸虫对吡喹酮抗药性的研究现状[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(1): 81-83.
- WU Yueying, NING An. Present situation of studies on resistance of Schistosoma to praziquantel[J]. Chinese Journal of Animal Disease, 2009, 25(1): 81-83.
24. 闻礼永, 吴观陵. 日本血吸虫候选疫苗研究现状与展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(5): 422-428, 429.
- WEN Liyong, WU Guanling. Japan Research status quo and prospect of candidate vaccine of Schistosoma[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2007, 25(5): 422-428, 429.
25. Wright MD, Henkle KJ, Mitchell GF. An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of Schistosoma mansoni worms that closely resembles a human tumor-associated antigen[J]. J Immunol, 1990, 144(8): 3195-3200.
26. Harn DA, Mitsuyama M, Huguene ED, et al. Schistosoma mansoni: detection by monoclonal antibody of a 22,000-dalton surface membrane antigen which may be blocked by host molecules on lung stage parasites[J]. J Immunol, 1985, 135(3): 2115-2120.
27. Loukas A, Tran M, Pearson MS. Schistosome membrane proteins as vaccines[J]. Int J Parasitol, 2007, 37(3/4): 257-263.
28. Bergquist NR. Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option[J]. Parasitology Today, 1995, 11(2): 191-194.
29. Taylor MG, Huggins MC, Shi F, et al. Production and testing of Schistosoma japonicum candidate vaccine antigens in the natural ovine host[J]. Vaccine, 1998, 16(13): 1290-1298.
30. 施福恢, 吴祥甫, 叶萍, 等. 日本血吸虫(中国大陆株)基因工程疫苗的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1998, 10(增刊): 54-58.
- SHI Fuhui, WU Xiangpu, YE Ping, et al. Japan Schistosoma japonicum (Chinese mainland strain) of genetic engineering vaccines[J]. Journal of Schistosomiasis Control in China, 1998, 10(Supplement): 54-58.
31. Zhu Y, Ren J, Harn DA, et al. Protective immunity induced with 23 kDa membrane protein DNA vaccine of Schistosoma japonicum Chinese strain in infected C57BL/6 mice[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2003, 34(4): 697-701.
32. Zhu Y, Ren J, Da'dara A, et al. The protective effect of a Schistosoma japonicum Chinese strain 23 kDa plasmid DNA vaccine in pigs is enhanced with IL-12[J]. Vaccine, 2004, 23(1): 78-83.

(本文编辑 彭敏宁)