

文章编号: 1000-7423(2012)-05-0357-04

【论著】

细粒棘球绦虫亲肌肉抗原重组蛋白诱导小鼠免疫应答的研究

马锐^{1,2}, 师志云¹, 王娅娜², 李宗吉², 孙俊峰², 赵巍^{1*}

【摘要】 目的 探讨细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg) 亲肌肉抗原重组蛋白诱导 ICR 小鼠产生的免疫应答及其对 Eg 原头节攻击感染的保护性作用。方法 36 只雄性 ICR 小鼠随机分为 A (重组蛋白免疫组)、B (空质粒蛋白免疫组) 和 C (PBS 对照组) 等 3 组, 每组 12 只。3 组小鼠分别经皮下注射重组蛋白 (10 μg/只)、空质粒蛋白 (10 μg/只) 和 PBS (100 μl/只), 第 2 和 4 周同法加强免疫 2 次。末次免疫后 2 周, 每只小鼠腹腔接种细粒棘球绦虫原头节 50 个进行攻击感染。感染后 20 周, 剖杀小鼠, 分离并称重组细粒棘球绦虫组织, 计算囊重减少率。取脾脏, 分离脾细胞, 流式细胞仪检测脾脏 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群百分比。脾细胞体外经脾细胞悬液、Eg 粗抗原 (EgAg) 和伴刀豆球蛋白 A (ConA) 刺激培养 4~5 h 后, 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法) 检测 T 淋巴细胞增殖情况。结果 感染后 20 周, A 组小鼠包囊质量 [(0.019±0.036) g] 明显低于 C 组 [(0.058±0.057) g] ($P<0.05$), 囊重减少率为 69.1%; CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞亚群百分比分别为 (29.7±0.9)% 和 (9.7±0.8)%, 均高于 C 组 [(11.6±1.4)% 和 (7.8±0.2)%] ($P<0.01$ 和 $P<0.05$), CD4⁺/CD8⁺ 比值 (3.061±0.015) 也显著高于 C 组 (1.487±0.106) ($P<0.01$)。未经刺激时, A 组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖水平 (0.237±0.009) 高于 C 组 (0.159±0.005) ($P<0.01$); 用 EgAg 和 ConA 刺激后, A 组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖水平 [(0.283±0.008) 和 (0.325±0.025)] 均高于 C 组 [(0.203±0.002) 和 (0.244±0.006)] ($P<0.01$)。结论 棘球绦虫亲肌肉抗原重组蛋白可诱导免疫小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖, CD4⁺T 细胞亚群在重组蛋白诱导的小鼠抗 Eg 原头节攻击感染的保护性免疫机制中起一定作用。

【关键词】 细粒棘球绦虫; 亲肌肉抗原重组蛋白; 脾细胞; 免疫保护

中图分类号: R383.33

文献标识码: A

Study on Immune Response in ICR Mice by Immunization with Recombinant Myophilin Vaccine against *Echinococcus granulosus*

MA Rui^{1,2}, SHI Zhi-yun¹, WANG Ya-na², LI Zong-ji², SUN Jun-feng², ZHAO Wei^{1*}

(1 Higher Health Vocational and Technical College of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2 Research Center of Medical Science and Technology of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the immune response and the protection in mice induced by the recombinant myophilin protein of *Echinococcus granulosus*. **Methods** Thirty-six male ICR mice of 6–8 weeks old were randomly divided into groups A, B and C each with 12. The mice in the 3 groups were subcutaneously immunized with Eg myophilin protein, blank plasmid protein or PBS, respectively, by 3 times and challenged with protoscoleces of *E. granulosus* 2wk after the last vaccination. Mice were sacrificed 20wk after the infection, the hydatid cysts were collected for measuring the weight reduction. Spleens were obtained and the splenocytes were separated and cultured *in vitro* with EgAg or ConA stimulus for 4–5 h. The subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were measured by FACSort. The proliferation of splenocytes was determined by MTT method with blank plasmid and PBS as control. **Results** The average weight of the hydatid cysts in the immunized group decreased by 69.1% in comparison to the blank plasmid and PBS groups. The CD4⁺ subset [(29.7±0.9)%] and CD8⁺ subset [(9.7±0.8)%] in group A increased significantly than group C, [(11.6±1.4)%] and [(7.8±0.2)%] respectively ($P<0.01$ or <0.05). The ratio of CD4⁺/CD8⁺ subsets in group A (3.061±0.015) was also higher than group C (1.487±0.106) ($P<0.01$). Without stimulation, the proliferation of T lymphocytes in group A (0.237±0.009) was higher than group C (0.159±0.005) ($P<0.01$), with EgAg or ConA stimulus, it was also higher in group A than that of group C

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30260105, 30660176); 宁夏自然科学基金 (No. NZ0540); 宁夏医科大学校级面上项目 (No. ZC2011002)

作者单位: 1 宁夏医科大学高职学院, 银川 750004; 2 宁夏医科大学医学科学技术研究中心, 银川 750004

* 通讯作者, E-mail: zw-6915@163.com

($P < 0.01$). **Conclusion** The recombinant myophilin protein of *E. granulosus* can induce the proliferation of splenocytes and Th1 response in mice, and the CD4⁺ T cells subset may bear a part in the induced protection against the challenge of protoscoleces.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; Recombinant myophilin; Subset of spleen cells; Immunoprotection

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30260105 and 30660176), the Natural Science Fund of Ningxia (No. NZ0540) and the General Program of Ningxia medical university (No. ZC2011002)

* Corresponding author, E-mail: zw-6915@163.com

棘球蚴病 (echinococcosis) 是由棘球属绦虫的幼虫(棘球蚴)寄生而引起的一种严重危害健康的人兽共患寄生虫病,呈全球性分布。宁夏回族自治区是中国棘球蚴病的流行区之一,尤其是中南部山区和台地流行较为严重^[1]。利用疫苗抵御疾病,已成为一种行之有效的办法,主要体现在该疫苗刺激机体产生的免疫应答上。检测免疫应答的强弱主要体现在淋巴细胞上。淋巴细胞包括两个主要亚群:CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞亚群,在寄生虫感染中,两种细胞都可参与宿主保护力和病理变化的形式。Riganò 等^[2]研究发现, *EgAgB* 免疫的棘球蚴病患者 CD4⁺T 细胞亚群升高,并且 *EgAgB* 刺激外周血单核细胞可产生大量 Th2 细胞,发挥体液免疫应答,这一变化在慢性棘球蚴感染患者中尤其明显。Riganò 等^[3]的另一研究证实,有明显症状的泡型棘球蚴病 (alveolar echinococcosis, AE) 患者包囊液和外周血中单核细胞增殖明显降低,CD4⁺T 细胞亚群明显减少,CD8⁺T 细胞亚群显著增多。本研究检测细粒棘球蚴 (*Echinococcus granulosus*) 感染小鼠脾脏 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群水平、CD4⁺/CD8⁺百分比和 T 淋巴细胞增殖等情况,以探讨机体的免疫应答机制。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 36 只清洁级 6~8 周龄雄性 ICR 小鼠,体重(18±2)g,购自宁夏医科大学实验动物中心。
1.2 细粒棘球蚴原头节 从宁夏医科大学附属医院肝胆外科棘球蚴病患者手术摘除的完整包囊中无菌条件下抽取囊液,分离原头节,经 PBS (pH 7.2) 洗涤 3 次后,弃上清,0.5%伊红染色,计数原头节的着色率并观察形态,原头节的存活率>90%,用 PBS 配成 1.5×10⁴ 个原头节/ml 悬液,用于攻击感染 ICR 小鼠。
1.3 主要试剂和仪器 细粒棘球蚴亲肌肉抗原重组蛋白 (rEgmyophilin) 由本室构建^[4,5]。伴刀豆球蛋白 A (ConA) 购自北京华美生物公司,使用前用 RPMI 1640 培养液稀释;藻红蛋白(PE)标记的大鼠抗小鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞亚群单克隆抗体购自北京利文商贸

有限责任公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 和 RPMI 1640 培养基购自美国 Sigma 公司。FACSCalibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品,伯乐酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

2 方法

2.1 动物分组和免疫 将 36 只 ICR 小鼠随机分为 3 组,每组 12 只。A 组为重组蛋白免疫组,在第 0、2 和 4 周各免疫 1 次,共 3 次,第 1 次为基础免疫,注射 rEgmyophilin (10 μg/只) 加等量福氏完全佐剂,以后 2 次为加强免疫,均用 rEgmyophilin (10 μg/只) 加等量福氏不完全佐剂。B 组和 C 组分别为空质粒蛋白免疫组和 PBS 对照组,免疫方案同 A 组,分别注射 rEgmyophilin 空质粒蛋白和 PBS。3 组均采用背部皮下多点注射免疫,每次注射量为 100 μl/只。
2.2 攻击感染 第 3 次免疫后 2 周,3 组小鼠每鼠均用 50 个细粒棘球蚴原头节腹腔内注射进行攻击感染。
2.3 计算囊重减少率 攻击感染 20 周后,剖杀小鼠,切开腹部,仔细分离细粒棘球蚴组织称重,计算囊重减少率。公式为:囊重减少率=(1-免疫组检获细粒棘球蚴质量/对照组检获细粒棘球蚴质量)×100%。
2.4 脾细胞 CD4⁺、CD8⁺T 亚群测定 无菌取各组小鼠的脾组织,匀浆,200 目尼龙网过滤;灭菌双蒸馏水溶解红细胞后,用含 10%灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度至 5×10⁶/ml,分离脾细胞。吸取 1×10⁶/ml 脾细胞至 1.5 ml Ep 管,加入大鼠抗小鼠 CD4⁺或 CD8⁺亚群单抗 50 μl,4℃放置 30 min。用流式细胞仪(523 nm 波长)测定细胞绿色荧光,每次测定 1×10⁵ 个细胞,使用 Mod Fit LT 软件分析 CD4⁺、CD8⁺T 亚群百分比和 CD4⁺/CD8⁺ 比值。
2.5 脾细胞增殖实验和检测 将 5×10⁶/ml 脾细胞 1 ml 加入 24 孔细胞培养板,分别加入 2 ml 脾细胞悬液、1 ml 脾细胞悬液+1 ml *EgAg* (10 mg/L)、1 ml 脾细胞悬液+1 ml ConA (10 mg/L),设 3 个重复,每孔加入 5 g/L MTT 10 μl,37℃ 5% CO₂ 培养 4~5 h;吸弃上清液 200 μl/孔,再加入 DMSO 200 μl,反复吹打使充分溶解。将培养液吸至 96 孔细胞培养板,200 μl/孔,用酶

标仪检测吸光度(A_{600} 值)。

3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,采用单因素方差分析,组间两两比较用 Dunnett- t 法。

结 果

1 棘球蚴囊重减少率

棘球蚴囊重为 0.007~0.115 g,其中 A 组有 2 只小鼠未检获细粒棘球蚴包裹,囊重减少率为 69.1%,包裹重量(0.019±0.036)与 B 组(0.052±0.033)和 C 组(0.058±0.057)相比,差异有统计学意义($P<0.05$);B 组与 C 组相比差异则无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

表 1 rEgmyophilin 免疫攻击小鼠包裹重量和囊重减少率
Table 1 Hydatid cyst weight and weight reduction in mice immunized by rEgmyophilin and challenged by protoscoleces

组别 Group	包裹质量/g Hydatid cyst weight/g	囊重减少率/% Rate of weight reduction/%
A 组 Group A	0.019±0.036 [*]	69.1
B 组 Group B	0.052±0.033	7.2
C 组 Group C	0.058±0.057	

注:与 C 组比较, * $P<0.05$ 。 Note: vs. group C, * $P<0.05$ 。

2 脾细胞 CD4⁺、CD8⁺亚群百分比和 CD4⁺/CD8⁺亚群比值

免疫攻击感染后, A 组小鼠脾细胞 CD4⁺亚群百分比为(29.7±0.9)%,显著高于 B 组(11.7±1.4)%和 C 组(11.6±1.4)%,差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$); B 组与 C 组的相比差异无统计学意义($P>0.05$)。A 组小鼠脾细胞 CD8⁺亚群百分比为(9.7±0.8)%,高于 C 组(7.8±0.2)% ($P<0.05$); B 组(8.8±0.3)%与 C 组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。A 组小鼠脾细胞 CD4⁺/CD8⁺亚群比值(3.061±0.015)显著高于 B 组(1.330±0.187)和 C 组(1.487±0.106)(均 $P<0.01$); B 组与 C 组的相比差异无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。

表 2 rEgmyophilin 免疫攻击后小鼠脾细胞亚群的变化 ($n=12$)
Table 2 Subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte in mice immunized by rEgmyophilin and challenged by protoscoleces ($n=12$)

组别 Group	CD4 ⁺ 亚群百分比 Percent of CD4 ⁺	CD8 ⁺ 亚群百分比 Percent of CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 亚群比值 Value of CD4 ⁺ /CD8 ⁺
A 组 Group A	0.297±0.009 ^{**}	0.097±0.008 [#]	3.061±0.015 [*]
B 组 Group B	0.117±0.014	0.088±0.003	1.330±0.187
C 组 Group C	0.116±0.014	0.078±0.002	1.487±0.106

注:与 B 组和 C 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 C 组比较, # $P<0.05$ 。 Note: vs. group B and group C, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. group C, # $P<0.05$ 。

3 脾细胞增殖的检测

当未作任何刺激物时, A 组小鼠脾 T 淋巴细胞

增殖水平(0.237±0.009)高于 B 组(0.165±0.008)和 C 组(0.159±0.005)($P<0.01$); B 组与 C 组的相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

当用 EgAg 刺激时, A 组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖水平(0.283±0.008)高于 B 组(0.211±0.002)和 C 组(0.203±0.002)($P<0.01$); B 组与 C 组的相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

当用 ConA 刺激时, A 组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖水平(0.325±0.025)高于 B 组(0.248±0.017)和 C 组(0.244±0.006)($P<0.01$); B 组与 C 组的相比差异无统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

表 3 rEgmyophilin 免疫攻击后小鼠脾细胞增殖水平的变化
Table 3 Splenocyte proliferation in mice immunized by rEgmyophilin and challenged by protoscoleces

组别 Group	脾细胞悬液组 Spleen cells suspension	EgAg 刺激组 Stimul with EgAg	ConA 刺激组 Stimul with ConA
A 组 Group A	0.237±0.009 [*]	0.283±0.008 [*]	0.325±0.025 [*]
B 组 Group B	0.165±0.008	0.211±0.003	0.248±0.017
C 组 Group C	0.159±0.005	0.203±0.002	0.244±0.006

注:与 B 组和 C 组比较, * $P<0.01$ 。

Note: vs. group B and group C, * $P<0.01$ 。

讨 论

伴随分子生物学、生物化学和免疫学新技术的发展,利用细粒棘球绦虫卵或原头节中一些具有保护性表位的抗原分子研究有效的细粒棘球绦虫基因工程疫苗已成为国内外研究者的热点。早在 1995 年, Martin 等^[6]克隆出细粒棘球绦虫 Egmyophilin 蛋白,认为该蛋白是引起机体特异性免疫的潜在抗原,并指出 myophilin 蛋白的产生将可用于考核治疗棘球蚴病的效果。1997 年, Martin 等^[7]研究表明, myophilin 蛋白与钙结合蛋白有很高的氨基酸序列同源性,部分 cDNA 序列与多房棘球蚴有着 99% 的同源性,这也为研究该蛋白提供了理论依据。在棘球蚴病的细胞免疫机制中,普遍认为小鼠感染细粒棘球蚴后体内可激活 CD4⁺ T 细胞,同时也使 CD8⁺ T 细胞被激活;活化的 CD4⁺ T 细胞增殖分化,形成效应性 Th 细胞,产生细胞因子,从而增强它们杀伤细粒棘球蚴的作用。但对于亲肌肉蛋白诱导小鼠产生怎样的免疫机制抵抗感染,目前未见相关报道。

T 淋巴细胞按其功能可分为 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞亚群, CD4⁺/CD8⁺亚群比值动态平衡反映了机体免疫调控状态和免疫水平,比值降低或升高标志着机体免疫功能抑制或增强。目前,一些研究表明,感染棘球蚴的小鼠早期以 CD4⁺ T 细胞为主,形成保护性免疫,

晚期逐渐以 CD8⁺ T 细胞为主, 使机体呈免疫抑制状态^[8]。Manfras 等^[9]在慢性感染的泡球蚴病患者中检测到 T 淋巴细胞一直保持增殖, T 细胞受体分型显示, 增加的是 CD8⁺ T 细胞, 而非 CD4⁺ T 淋巴细胞, 提示, 持续的慢性感染, 可使患者的 CD8⁺ T 细胞增殖。

李文桂等^[10]研究测得健康 BALB/c 鼠脾 CD4⁺ T 细胞亚群百分比为 24.11%, CD8⁺ T 细胞亚群百分比为 5.97%。本研究发现, ICR 鼠免疫感染后, CD4⁺ T 细胞亚群百分比为 29.7%, CD8⁺ T 细胞亚群百分比为 9.7%, rEgmyophilin 免疫组 CD4⁺/CD8⁺亚群比值与对照组相比明显升高, 说明细粒棘球蚴感染可明显增加小鼠的 CD4⁺ T 细胞数, 轻微增加 CD8⁺ T 细胞数, 提示 rEgmyophilin 免疫对小鼠感染细粒棘球蚴具有一定的免疫调节作用。

Siles 等^[11]在实验中观察到, 当小鼠缺乏功能性 αβ⁺ CD4⁺ T 细胞亚群时, 体内泡球蚴生长迅速, 且无肉芽肿形成, 脾细胞增殖降低, 提示 CD4⁺ T 细胞在抑制泡球蚴生长过程中起关键作用。临床检测观察发现, 棘球蚴病患者体内 CD4⁺ T 细胞明显减少, CD8⁺ T 细胞显著增高, CD4⁺/CD8⁺亚群比值倒置。当用甲苯咪唑进行治疗, 发现疗程达 1 年的患者体内 CD8⁺ T 细胞继续增高, 疗程达 2 年的患者体内 CD4⁺ T 细胞开始增高, CD8⁺ T 细胞开始下降, CD4⁺/CD8⁺亚群比值升高。而活化的 CD4⁺ T 细胞增殖分化, 形成效应性 Th 细胞, 其中 Th1 细胞分泌 IL-2 和 IFN-γ, 促进 TDTH 和细胞毒性 T 细胞(Tc)的增殖分化和成熟, 在细胞介导的疫苗应答中发挥作用; Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10, 促进 B 细胞的增殖分化和抗体形成, 在抗体介导的体液免疫应答中发挥作用。

本研究还发现, 当不作任何刺激物时, rEgmyophilin 免疫组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖水平远高于空质粒组和 PBS 组; 当用 rEgmyophilin 刺激时, 脾 T 淋巴细胞增殖水平平均高于相应的无抗原刺激组 ($P<0.01$), 推测 rEgmyophilin 可诱导抗原特异性淋巴细胞增殖活化。而且用 ConA 刺激与 rEgmyophilin 刺激相比差异有统计学意义 ($P<0.01$), 考虑天然抗原比重组抗原更容易刺激淋巴细胞的增殖。

综上所述, 在棘球蚴的感染过程中, 机体的免疫应答机制十分复杂, 研究淋巴细胞的作用对研制相关疫苗具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Coordinating Office of the National Survey on the Important Human Parasitic Disease. A national survey on current status of the important parasitic diseases in human population[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(5 Suppl): 332-340. (in Chinese) (全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5 增刊): 332-340.)

[2] Riganò R, Profumo E, Bruschi F, et al. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses[J]. Infect Immun, 2001, 69(1): 288-296.

[3] Riganò R, Buttari B, Profumo E, et al. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response[J]. Infect Immun, 2007, 75(4): 1667-1678.

[4] Ma R, Shi ZY, Yu JJ, et al. Expression, purification and immunogenicity analysis on myophilin recombinant protein of *Echinococcus granulosus* (Chinese mainland strain)[J]. J Ningxia Med Coll, 2008, 30(1): 1-3. (in Chinese) (马锐, 师志云, 于晶晶, 等. 细粒棘球蚴(中国大陆株)亲肌肉抗原重组蛋白的表达、纯化及免疫学鉴定[J]. 宁夏医学院学报, 2008, 30(1): 1-3.)

[5] MA R, Shi ZY, Li ZY, et al. Protective immunity of recombinant Eg myophilin against *Echinococcus granulosus* (Chinese mainland strain) in mice[J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(4): 330-332. (in Chinese) (马锐, 师志云, 李昭宇, 等. 细粒棘球蚴(中国大陆株)亲肌肉抗原重组蛋白的免疫保护性研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(4): 330-332.)

[6] Martin RM, Chilton NB, Lightowers MW, et al. *Echinococcus granulosus* myophilin—relationship with protein homologues containing "calponin-motifs"[J]. Int J Parasitol, 1997, 27(12): 1561-1567.

[7] Martin RM, Csar XF, Gasser RB, et al. Myophilin of *Echinococcus granulosus*: isoforms and phosphorylation by protein kinase C [J]. Parasitology, 1997, 115(Pt2): 205-211.

[8] Yu F, Kang JF, Yi TL, et al. Changes in T cell subpopulation in Kunming mice infected with *Echinococcus granulosus* [J]. J Xinjiang Med Univ, 2005, 28(5): 402-404. (in Chinese) (于飞, 康金凤, 伊藤亮, 等. 细粒棘球蚴感染小鼠 T 淋巴细胞亚群的变化及意义[J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(5): 402-404.)

[9] Manfras BJ, Renter S, Wendland T, et al. Impeded Th1 CD4⁺ memory T cell generation in chronic-persisting liver infection with *Echinococcus multilocularis* [J]. Int Immunol, 2004, 16(1): 43-50.

[10] Tang J, Li WG, Wang H, et al. Changes on subsets of T cells in the spleen of mice by immunization with mixed recombinant BCG-Em II/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine against *Echinococcus multilocularis* [J]. J Chongqing Med Univ, 2007, 32(6): 575-577. (in Chinese) (唐君, 李文桂, 王鸿, 等. 多房棘球蚴混合重组 BCG-Em II/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠脾脏 T 细胞亚群的变化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(6): 575-577.)

[11] Siles LM, Dai WJ, Waldvogel A, et al. *Echinococcus multilocularis* proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an αβ⁺CD4⁺ T-cell-mediated immune responses[J]. Immunology, 2004, 112(3): 481-488.

(收稿日期: 2012-04-16 编辑: 张争艳)