

# 寄生性线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂研究进展

姚菊霞, 付宝权\*

**【提要】** 半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cysteine protease inhibitor, CPI 或 cystatin) 是半胱氨酸蛋白酶可逆性紧密结合的天然抑制剂。寄生性线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂不仅具有独特的半胱氨酸蛋白酶抑制活性, 而且还可以调节宿主免疫反应, 在寄生虫逃避宿主免疫应答, 适应寄生生活中起着重要作用。本文综述了半胱氨酸蛋白酶抑制剂的基本类型、结构特征和作用机制, 以及寄生性线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂的研究进展。

**【关键词】** 寄生性线虫; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 免疫调节

中图分类号: R383.1 文献标识码: A

## Research Progress on Cystatin of Parasitic Nematodes

YAO Ju-xia, FU Bao-quan\*

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology; Key Laboratory of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province; Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**【Abstract】** Cystatins are reversibly tight-binding natural inhibitors of cysteine proteases. Cystatins in parasitic nematodes not only have the unique inhibition activity on cysteine proteases but also modulate the host immune response and have an important role in the immune evasion from host response and the adaptation to parasitism. This article reviews the classification, structure characteristics and function mechanism of cystatins, and the research progress on cystatins in parasitic nematodes.

**【Key words】** Parasitic nematode; Cystatin; Immunomodulation

Supported by the National Science and Technology Support Program (No. 2007BAD40B03)

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

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cysteine protease inhibitor, CPI 或 cystatin) 是半胱氨酸蛋白酶可逆性紧密结合抑制剂, 可特异性抑制木瓜蛋白酶和组织蛋白酶等半胱氨酸蛋白酶类的活性, 在结构和功能上具有进化相似性, 形成一个超家族<sup>[1,2]</sup>。寄生性线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂除了具有独特的半胱氨酸蛋白酶抑制活性之外, 还具有对宿主免疫应答的调节作用, 包括干预抗原提呈过程和 T 细胞应答反应, 调节细胞因子生成, 刺激  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 活化巨噬细胞分泌 NO, 以及潜在的过敏原作用等<sup>[3-5]</sup>。因此寄生性线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂在逃避宿主免疫应答, 适应寄生生活中发挥着重要作用。近年来寄生虫的半胱氨酸蛋白酶抑制剂研究日益受到重视, 本文就半胱氨酸蛋白酶抑制剂的基本类型、结构特征和作用机制, 以及

寄生性线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂的研究进展作一简要综述。

### 1 半胱氨酸蛋白酶抑制剂的类型与结构特征

根据氨基酸序列的同源性、分子大小、二硫键数目, 以及亚细胞定位, 半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族主要分为 3 大家族, 即家族 1 (the stefin), 家族 2 (the cystatin) 和家族 3 (the kininogens)<sup>[1, 2]</sup>。

**1.1 Stefin 家族** Stefin 家族, 也称胱抑蛋白, 蛋白相对分子质量 ( $M_r$ ) 约 11 000, 由约 100 个氨基酸组成, 不含糖基和二硫键, 无信号肽序列, 多为细胞内单体蛋白, 但在细胞外液中也发现有少量 stefin 存在。人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 A 和 B, 以及大鼠半胱氨酸蛋白酶抑制剂  $\alpha$  和  $\beta$  等是该家族的代表。

**1.2 Cystatin 家族** Cystatin 家族, 蛋白  $M_r$  约为 13 000 ~ 14 000, 由 110 ~ 120 个氨基酸组成, 一般不含糖基, 在 C 末端有 2 个链内二硫键; 在 N 末端有信号肽序列, 属分泌性蛋白, 广泛分布于各种生物体液

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (No. 2007BAD40B03)

作者单位: 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046

\* 通讯作者, E-mail: fubaoquan@163.com

中。该家族部分成员含有 SND 基序,是大多具有抑制 C13 蛋白酶家族半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白酶抑制剂的保守序列。鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂及人半胱氨酸蛋白酶抑制剂的 C、D、E、M、S、SA 和 SN 等都属于这个家族。

**1.3 Kininogen 家族** Kininogen 家族,也称激肽原,蛋白约为  $M_r$  60 000~120 000,含有 3 个半胱氨酸蛋白酶抑制剂样(家族 2)结构域,其中 2 个结构域保留了半胱氨酸蛋白酶抑制活性。Kininogen 具有信号肽序列、多个二硫键和糖基,主要存在于血浆及分泌液中。

**1.4 半胱氨酸蛋白酶抑制剂同源分子** 半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族除上述 3 大家族外,还发现了一些具有抑制半胱氨酸蛋白酶活性的半胱氨酸蛋白酶抑制剂类似分子,但它们发挥抑制效应的机制完全不同,被认为是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族的新成员。

## 2 半胱氨酸蛋白酶抑制剂的作用机制

半胱氨酸蛋白酶抑制剂是能与半胱氨酸蛋白酶可逆性紧密结合的抑制剂<sup>[6-8]</sup>,与其靶酶结合形成一个等摩尔数的紧密复合物,从而封闭靶酶的活性中心而起到抑制作用。半胱氨酸蛋白酶抑制剂的 3 个高度保守的功能结构域都参与此相互作用,包括 N 端的 G 残基周围区域、第一个发夹环即 QXVXG 高度保守区域和第二个发夹环即位于 C 端的 PW 保守区域。抑制剂 N 端的 G 残基活性位点直接和蛋白酶底物结合袋 S1、S2 和 S3 位点发生相互作用。这三个结构域共同构成了一个楔形结构,与靶酶的活性部位互补结合,从而有效地发挥抑制效应。

## 3 寄生性线虫的 CPI

寄生性的半胱氨酸蛋白酶抑制剂作为半胱氨酸蛋白酶的天然抑制剂,不仅可以抑制自身的蛋白酶,还可以抑制宿主的半胱氨酸蛋白酶活性,使其免受蛋白酶降解作用,从而逃避宿主的防御机制,有利于寄生虫在宿主体内存活。近年来,从寄生性线虫中陆续发现的半胱氨酸蛋白酶抑制剂都存在蛋白酶抑制剂保守序列,与人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 高度同源,均属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族 2,但是 C 末端只有 1 个链内二硫键。

**3.1 盘尾丝虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 旋盘尾线虫(*Onchocerca volvulus*)寄生在人体皮肤内,可引起盘尾丝虫病,也叫河盲症(river blindness),是感染性失明和重症慢性皮炎的主要病因,蚋(*Simulium*)为其传播媒介。盘尾丝虫的半胱氨酸蛋白酶抑制剂是第一个被

克隆鉴定的寄生虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂。Lustigman 等<sup>[9]</sup>用辐照致弱的盘尾丝虫感染性幼虫免疫黑猩猩制备抗血清,对成虫 cDNA 表达文库进行免疫筛选,分离到一个 cDNA 克隆,将其命名为 Ov7。Ov7 cDNA 克隆是一个部分编码序列,其编码蛋白与半胱氨酸蛋白酶抑制剂具有同源性。Ov7 融合蛋白可以被盘尾丝虫病患者血清特异性识别,但与其他丝虫病患者血清不发生反应。抗 Ov7 融合蛋白特异性抗体能够识别盘尾丝虫 L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub> 期幼虫,及成虫的  $M_r$  17 000 抗原,免疫电镜观察表明此抗原存在于 L<sub>3</sub> 期幼虫和雌虫的皮下组织,表皮基层以及微丝蚴周围的卵壳中。Lustigman 等<sup>[10]</sup>克隆到盘尾丝虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂 onchocystatin 完整的 cDNA 序列,共 736 bp。5' 端具有由 22 个核苷酸组成的线虫保守的 SL 先导序列,其完整 ORF 编码由 162 个氨基酸残基组成的多肽,与其它半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族成员一致性为 12.9%~28.5%。Onchocystatin 具有半胱氨酸蛋白酶抑制剂样结构域以及抑制活性相关的 QVVAG 等保守氨基酸残基,其 N 末端还有信号肽序列,属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族 2,说明 onchocystatin 可能在细胞外对盘尾丝虫半胱氨酸蛋白酶起作用。Onchocystatin 还具有 1 个分子间二硫键,但是二硫键的形成对其生物活性没有影响。谷胱甘肽转移酶(GST)-Ov7 重组蛋白和麦芽糖结合蛋白(MBP)-Ov7 重组蛋白均可抑制牛组织蛋白酶 B 的活性。尽管 onchocystatin 序列中有 1 个潜在的 N-糖基化位点,但在盘尾丝虫成虫 onchocystatin 天然蛋白上没有发现糖基化现象<sup>[9]</sup>。Garraud 等<sup>[11]</sup>鉴定出一种可诱导多克隆,及抗原特异性 IgE 和 IgG4 抗体的丝虫重组蛋白 Ov27,是 Ov7/半胱氨酸蛋白酶抑制剂的相似物,可以刺激宿主细胞白细胞介素 4(IL-4)、IL-5 和 IL-10 的分泌,诱发 Th2 型免疫应答反应。Schonemeyer 等<sup>[12]</sup>的研究表明,重组 onchocystatin(rOv17)能够抑制与人体免疫相关的组织蛋白酶 L 和 S 的活性,而对组织蛋白酶 B 的抑制力较弱。onchocystatin 具有免疫调节活性,是潜在的人 PBMC 免疫调节剂,可以抑制抗原致敏和多克隆诱导的人 PBMC T 细胞增生反应,导致其细胞因子表达发生变化,下调 CD86 和组织相容性白细胞抗原(HLA-DR)的表达,可能是盘尾丝虫致病因子之一。rOv17 可以增强 IFN- $\gamma$  活化鼠巨噬细胞产生 NO 的能力,而且与其酶抑制活性无关,但 NO 对半胱氨酸蛋白酶抑制剂激发的 T 细胞增生没有抑制作用<sup>[13]</sup>。rOv17 可以抑制人 PBMC 细胞增生反应,比秀丽隐杆线虫 rCysele1 和 rCysele2 的抑制效果要更强,可诱导 IL-10 上调,但对 IL-12 无影响<sup>[14]</sup>。

Gregory 等<sup>[15]</sup>报道了盘尾丝虫另外一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,命名为 Ov-CPI-1,而将 onchocystatin 命名为 Ov-CPI-2。Ov-CPI-1 由 127 个氨基酸残基组成,同样具有信号肽序列和 cyatatin 保守结构域,但是缺少 SND 基序。

Ov7 重组抗原免疫小鼠后攻击感染盘尾丝虫,减虫率可达 34%~49%,导致寄生虫存活率显著降低,应用铝佐剂效果较好,但福氏佐剂效果不明显,说明免疫应答是 Th2 型<sup>[16]</sup>,这是首次报道半胱氨酸蛋白酶抑制剂可以诱导产生对盘尾丝虫的保护性免疫。Cho-Ngwa 等<sup>[17]</sup>用慢性盘尾丝虫病患者血清免疫筛选盘尾丝虫 L<sub>3</sub> 和 mL<sub>3</sub> 期幼虫特异性 cDNA 表达文库,获得的阳性克隆中 rOv-CPI-2 是丰度最高的克隆,而且在健康中性粒细胞存在时,抗 rOv-CPI-2 特异性抗体可抑制 91% 的 mL<sub>3</sub> 期幼虫发育为 L<sub>4</sub> 期幼虫,对幼虫还有细胞毒性,抗 rOv-CPI-2 亲细胞抗体 IgG1 和/或 IgG3 在机体保护性免疫力的形成起着作用,此结果支持 Ov-CPI-2 作为疫苗的优势靶标。

在与盘尾丝虫亲缘关系最近的奥软盘尾丝虫雌虫和微丝蚴体表也发现了半胱氨酸蛋白酶抑制剂,而且在微丝蚴排泄分泌物中也可以检测到,该酶抑制剂有助于微丝蚴在其媒介体内的发育,可能与逃避宿主媒介免疫应答有关<sup>[18]</sup>。

**3.2 马来丝虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 马来丝虫也叫马来布鲁线虫(*Brugia malayi*),主要寄生于人体淋巴系统,引起淋巴丝虫病,蚊为传播媒介。Gregory 等<sup>[19]</sup>从蚊源马来丝虫 L<sub>3</sub> 期幼虫分离出一个半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 Bm-CPI-1,另外从马来丝虫 EST 数据库鉴定出一个半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 Bm-CPI-2,均含有保守序列 QVVAG 和 PW 基序。Bm-CPI-1 编码蛋白序列共 127 个氨基酸,是 L<sub>3</sub> 期幼虫特异性高丰度表达基因。Bm-CPI-2 编码蛋白序列共 161 个氨基酸,与 Bm-CPI-1 编码蛋白有 26% 的一致性。Maizels 等<sup>[20]</sup>研究表明,Bm-CPI-1 在蚊体内的 L<sub>2</sub> 晚期幼虫和 L<sub>3</sub> 期幼虫开始表达,但在感染哺乳动物宿主 2 d 内表达终止。Bm-CPI-1 在 L<sub>3</sub> 期幼虫体表和分泌物中均可检测到,尽管缺少其它半胱氨酸蛋白酶抑制剂保守的 Gly 残基,但是已经证明其对木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 B 有抑制作用<sup>[21]</sup>。相反,Bm-CPI-2 在其马来丝虫生活史中连续表达,主要位于虫体表面和分泌物中。Bm-CPI-2 编码蛋白还具有一个保守的 SND 基序,形成其第二个抑制位点,可对人 B 淋巴细胞 II 型抗原提呈途径中起作用的半胱氨酸蛋白酶 C13 家族进行抑制<sup>[21,22]</sup>,因而被认为是丝虫免疫逃避因子之一。Manoury 等<sup>[22]</sup>发现马来丝虫在哺乳动物宿主体内寄生时分泌表达

Bm-CPI-2,可以抑制人 B 淋巴细胞溶酶体的多种半胱氨酸蛋白酶活性,通过抑制 C1 木瓜蛋白酶样家族和 C13 家族的半胱氨酸蛋白酶对底物的水解,阻止溶酶体组分对破伤风毒素抗原的处理。Bm-CPI-2 还可以抑制破伤风毒素抗原 T 细胞表位的抗原提呈作用,首次证明,寄生性蠕虫可以直接干预宿主的抗原加工和递呈途径,从而抑制宿主对丝虫入侵的免疫应答反应。Murray 等<sup>[23]</sup>通过定点诱导突变证实,Asn77 是天冬酰胺基内肽酶抑制作用的关键位点,但对木瓜蛋白酶样蛋白的抑制活性影响很小。与秀丽隐杆线虫的两个同源蛋白 Ce-CPI-1 和 Ce-CPI-2 相比,尽管 Ce-CPI-1 和 Ce-CPI-2 的木瓜蛋白酶抑制位点完整,但无 C13 家族半胱氨酸蛋白酶抑制位点,Ce-CPI-1 和 Ce-CPI-2 重组蛋白可以抑制组织蛋白酶 S 活性,但均不能抑制 C13 家族的半胱氨酸蛋白酶活性。表明马来丝虫 Bm-CPI-2 进化为具有抑制仅存在于哺乳动物的重要蛋白酶的能力。

Gregory 等<sup>[15]</sup>从马来丝虫基因组序列中的鉴定出第三种半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Bm-CPI-3), Bm-CPI-3 由 115 个氨基酸残基组成。与 Bm-CPI-1 一样,Bm-CPI-3 主要在 L<sub>3</sub> 期幼虫表达,也缺少 N-末端保守的 Gly 残基,而且其半胱氨酸蛋白酶抑制剂保守序列 QXVXG 变为 LVVQS,此蛋白的半胱氨酸蛋白酶抑制活性未被证实。马来丝虫这 3 种半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因组序列均包含 3 个内含子和 4 个外显子,而且内含子位置非常保守。

**3.3 棉鼠丝虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 棉鼠丝虫 (*Litomosoides sigmodontis*) 是寄生于啮齿类动物的一种丝虫,因为是惟一可在实验室小鼠完成其生活史的丝虫,所以被用作丝虫病研究的重要动物模型。Allen 等<sup>[24]</sup>在棉鼠丝虫感染性幼虫期表达序列标签 (EST) 分析中发现一条与马来丝虫 Bm-CPI-2 同源的 EST 序列,随后 Pfaff 等<sup>[25]</sup>从棉鼠丝虫 L<sub>3</sub> 期幼虫克隆到半胱氨酸酶抑制剂 (Ls-cystatin),由 148 个氨基酸残基组成,与 Ov-CPI-2 的结构极为相似,与其它丝虫半胱氨酸酶抑制剂的一致性约 60%。该基因在感染性 L<sub>3</sub> 期幼虫、微丝蚴和成虫中均有表达,天然蛋白为 M<sub>r</sub> 14 000 和 M<sub>r</sub> 15 000 两条带。表达的重组 Ls-cystatin 注入小鼠腹腔后,小鼠 α 肿瘤坏死因子 (TNF-α) 转录上调,而且抗原特异性脾细胞增殖减少,但是抗体应答正常。在 BALB/c 小鼠免疫试验中,成虫回收率没有产生保护性免疫,但是微丝蚴感染数量降低。表明半胱氨酸蛋白酶抑制剂在丝虫感染过程中可作为免疫调节分子,对该分子的中和反应可引起保护性免疫应答。

**3.4 魏氏棘唇线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 魏氏棘

唇线虫(*Acanthocheilonema viteae*)是寄生于啮齿类动物的一种丝虫。Hartmann 等<sup>[26]</sup>从魏氏棘唇线虫分离鉴定了一种蛋白  $M_r$  17 000 的抗原 (Av17), 其氨基酸序列与半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族 2 同源。Av17 由 157 个氨基酸残基组成, N 末端具有信号肽序列, 其基因组序列由 4 个外显子和 3 个内含子组成<sup>[27]</sup>。魏氏棘唇线虫成虫分泌物可以显著抑制小鼠和沙鼠有丝分裂原诱导的 T 细胞增生反应, 而 Av17 的抑制活性占其 45.5%。在大肠埃希菌系统表达的 rAv17 重组蛋白具有半胱氨酸蛋白酶抑制活性, 而且可以诱导下调鼠 T 细胞对有丝分裂原及特异性抗原的应答反应, 但对 IL-10 有上调作用<sup>[26]</sup>。与盘尾丝虫相似, rAv17 重组蛋白可以上调 IFN- $\gamma$  活化鼠巨噬细胞产生 NO<sup>[13]</sup>, 也可以抑制刀豆球蛋白 A (Con A) 刺激鼠脾细胞增生反应, 并且诱导 IL-10 上调<sup>[14,28]</sup>。在啮齿动物模型研究表明, 魏氏棘唇线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂可以作为潜在的过敏原<sup>[29]</sup>, 在鸡卵清蛋白诱导的过敏性空气途径反应性鼠体模型中, 可以抑制 Th2 相关的炎症反应和继发的哮喘性疾病<sup>[30]</sup>。魏氏棘唇线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂可能是免疫调节的效应分子之一。

**3.5 旋毛虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*) 是一种人兽共患寄生性线虫, 成虫寄生于宿主小肠, 幼虫寄生于同一宿主的肌细胞内。付宝权等<sup>[31]</sup>通过免疫筛选旋毛虫新生幼虫 cDNA 文库获得了 p46 抗原基因, 序列分析发现该基因编码蛋白具有 3 个类似于半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域, 但与其他线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂蛋白结构有很大差异, 在高保守区域氨基酸发生变异, 推测该抗原可能已失去半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白的功能, 但具有很好的抗原性, 可被旋毛虫感染动物血清识别<sup>[32,33]</sup>。Robinson 等<sup>[34]</sup>在旋毛虫蛋白组学分析中, 鉴定出一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂样分泌蛋白, 命名为多半胱氨酸蛋白酶抑制剂样结构域蛋白 1 (MCD-1)。MCD-1 由 406 个氨基酸残基组成, 与 p46 抗原相同, 具有 3 个重复的半胱氨酸蛋白酶抑制剂样结构域, 可能由同一半胱氨酸蛋白酶抑制剂祖先基因经过复制产生。MCD-1 主要在细胞内寄生期表达, 而以成虫期表达量最高, 旋毛虫分泌的 MCD-1 有高分子量和低分子量的异构形式。与 GST 融合表达的 MCD-1 重组蛋白在体外不能抑制木瓜蛋白酶活性, 表明这是非抑制性半胱氨酸蛋白酶抑制剂相关蛋白的一个新成员。在 HeLa 细胞分泌表达的 MCD-1 重组蛋白具有 pH 依赖性加工作用, 导致单一半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域的释放。姚菊霞等<sup>[35]</sup>克隆到旋毛虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 TsCystatin1, 编码由 221 个氨基酸残基组成的多肽。

TsCystatin1 具有信号肽序列及半胱氨酸蛋白酶抑制剂的保守序列 QVVAG, 结构域分析表明该蛋白具有一个半胱氨酸蛋白酶抑制剂样结构域, 属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族 2, 与其它线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂的同源性较高。TsCystatin1C 末端具有 3 处 N-糖基化位点以及 4 个链内二硫键所需的半胱氨酸残基。

**3.6 广州管圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 成虫寄生于鼠类肺部血管, 幼虫偶尔寄生于人体, 可引起广州管圆线虫病, 主要危害神经系统。He 等<sup>[36]</sup>对广州管圆线虫 L<sub>4</sub> 期幼虫 cDNA 文库进行测序分析, 从中鉴定到半胱氨酸蛋白酶抑制剂的 cDNA 序列, 其重组蛋白可以与广州管圆线虫病患者血清发生反应。免疫小鼠后可以诱导机体引起抗体应答, 产生部分保护性免疫力。Liu 等<sup>[37]</sup>对广州管圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (AcCystatin) 进一步进行克隆鉴定, 发现 AcCystatin 由 120 个氨基酸残基组成, 理论蛋白  $M_r$  14 000, 具有 cyatatin 保守性基序, 但是缺少信号肽序列。该基因在 L<sub>3</sub> 和 L<sub>4</sub> 期幼虫, 及成虫期均有表达。AcCystatin 重组蛋白具有对组织蛋白酶 B 的抑制活性, 而且能够显著上调 INF- $\gamma$  激活的巨噬细胞产生 NO 的水平。AcCystatin 重组蛋白可以与广州管圆线虫感染小鼠血清反应, 但与大鼠血清不反应。潘智华等<sup>[38]</sup>也证实了广州管圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因在大肠埃希菌系统表达产物可诱导小鼠产生一定水平的保护性免疫力。

**3.7 简单异尖线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 简单异尖线虫 (*Anisakis simplex*) 成虫寄生于鲸、海豚等海生哺乳动物的胃内, 幼虫寄生于某些海栖鱼类。感染性 L<sub>3</sub> 期幼虫寄生于人体肠道上皮细胞可引起异尖线虫病。Moneo 等<sup>[39]</sup>从简单异尖线虫排泄分泌 (ES) 产物中分离到一种蛋白  $M_r$  9 000 的热稳定过敏原 Ani s 4, 可以被简单异尖线虫感染阳性患者血清中的 IgE 所识别。Rodriguez-Mahillo 等<sup>[40]</sup>进一步对此过敏原进行克隆鉴定, 认为是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 由 115 个氨基酸残基组成, 具有信号肽序列, 以及半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族高度保守序列, 但 C 末端的 PW 基序变为 KW。在原核系统表达的 Ani s 4 重组蛋白不但可以抑制木瓜蛋白酶对底物的水解作用, 而且具有与天然蛋白相同的 IgE 表位, 是一种生物活性过敏原, 能激活异尖线虫过敏症患者的嗜碱性粒细胞。Ani s 4 是首次报道的能够作为人体过敏原的线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂。

**3.8 捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 捻转血矛线虫 (*Haemonchus contortus*) 是反刍动物消化道寄生的吸血性线虫, 尤其对绵羊和山羊危害严重。New-

lands等<sup>[41]</sup>通过免疫筛选 cDNA 表达文库获得了捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂 cDNA, 命名为 Cys-1, 该 cDNA 序列编码 122 个氨基酸, 与其他线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂具有显著相似性, 但是缺少 N-末端的信号肽序列。在大肠埃希菌系统表达的重组蛋白为可溶性表达, 且具有生物活性, 能抑制哺乳动物组织蛋白酶 B 和捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶。免疫定位研究显示该蛋白主要在捻转血矛线虫肠细胞的细胞质中表达。Shompole 等<sup>[42]</sup>用抗蠕虫药物芬苯达唑对捻转血矛线虫处理后, 发现原来位于肠细胞基位蛋白区的 Cys-1 变为在细胞质内弥散性分布, 推测 Cys-1 可能是寄生虫的致病因子之一。

**3.9 巴西日圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 巴西日圆线虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)是寄生于鼠肠道的一种线虫, 也叫巴西鼠钩虫。Dainichi 等<sup>[43]</sup>从巴西日圆线虫成虫排泄分泌物中鉴定出一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 将其命名为 Nippocystatin(NbCys), 采用 RT-PCR 法克隆到 NbCys 的 cDNA, 其开放阅读框编码蛋白, 由 144 个氨基酸残基组成, 具有半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族高度保守序列, 与其它线虫寄生性半胱氨酸蛋白酶抑制剂的一致性在 30%~50%, 且含有一个疏水性的信号肽。NbCys 在感染性 L<sub>3</sub> 期幼虫和成虫均有表达, 其天然成熟分泌蛋白 M<sub>r</sub> 为 14 000。NbCys 重组蛋白可以强烈抑制组织蛋白酶 L 和组织蛋白酶 B 的活性, 其成虫 ES 产物也有此抑制活性。随后 Dainichi 等<sup>[44]</sup>对 Nippocystatin 的功能进行了研究, 用 Nippocystatin 重组蛋白免疫小鼠可以调节宿主抗原提呈细胞对抗原的处理, 从而抑制抗原特异性免疫应答反应, 巴西日圆线虫可能利用此蛋白酶抑制剂逃避宿主防御系统。

**3.10 斯坦诺线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂** 斯坦诺线虫(*Steinernema carpocapsae*)是一种对昆虫致病的线虫, 已经被用于生产昆虫商品化杀虫剂。Hao 等<sup>[45]</sup>应用抑制消杂交技术从斯坦诺线虫鉴定到一个编码半胱氨酸蛋白酶抑制剂的 cDNA 分子。该 cDNA 的 ORF 编码由 139 个氨基酸残基组成的蛋白 (Sc-cys), 具有半胱氨酸蛋白酶抑制剂的保守基序。Sc-cys 基因具有 3 个外显子和两个内含子, 在昆虫血淋巴诱导后该基因表达水平上调显著。

#### 4 展望

半胱氨酸蛋白酶抑制剂在寄生性线虫中广泛存在, 在逃避宿主免疫应答和适应寄生生活中发挥着重要作用。目前, 半胱氨酸蛋白酶抑制剂的结构和功能已基本清楚, 作为免疫调节剂在抗寄生虫感染中具有

较好的应用前景, 但其免疫调节作用的分子机制尚不清楚, 有待进一步研究。最新研究表明, 寄生性线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂重组蛋白不仅具有免疫原性, 有望用于免疫诊断, 而且在免疫小鼠后可产生一定的免疫保护作用, 可作为寄生性线虫的疫苗候选分子。

#### 参考文献

- [1] Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cyteine proteinases[J]. FEBS Lett, 1991, 285(2): 213-219.
- [2] Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins [J]. Biochem Soc Symp, 2003, (70): 179-199.
- [3] Vray S, Hartmann S, Hoebcke J. Immunomodulatory properties of cystatins[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(9): 1503-1512.
- [4] Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins[J]. Int J Parasitol, 2003, 33(11): 1291-1302.
- [5] Klotz C, Ziegler T, Danilowicz-luebert E, et al. Cystatins of parasitic organisms[J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 712: 208-221.
- [6] Bode W, Engh R, Musil D, et al. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases [J]. EMBO J, 1988, 7 (8): 2593-2599.
- [7] Stubbs MT, Laber B, Bode W, et al. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction[J]. EMBO J, 1990, 9(6): 1939-1947.
- [8] Bjork I, Brieditis I, Abrahamson M. Probing the functional role of the N-terminal region of cystatins by equilibrium and kinetic studies of the binding of Gly-11 variants of recombinant human cystatin C to target proteinases[J]. Biochem J, 1995, 306(2): 513-518.
- [9] Lustigman S, Brotman B, Huima T, et al. Characterization of an *Onchocerca volvulus* cDNA clone encoding a genus specific antigen present in infective larvae and adult worms[J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 45(1): 65-75.
- [10] Lustigman S, Brotman B, Huima T, et al. Molecular cloning and characterization of onchocystatin, a cysteine proteinase inhibitor of *Onchocerca volvulus* [J]. J Bio Chem, 1992, 267(24): 17339-17346.
- [11] Garraud O, Nkenfou C, Bradley JE, et al. Identification of recombinant filarial proteins capable of inducing polyclonal and antigen-specific IgE and IgG4 antibodies[J]. J Immunol, 1995, 155 (3): 1316-1325.
- [12] Schonemeyer A, Lucius R, Sonnenburg B, et al. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus* [J]. J Immunol, 2001, 167(6): 3207-3215.
- [13] Hartmann S, Schonemeyer A, Sonnenburg B, et al. Cystatins of filarial nematodes up-regulate the nitric oxide production of interferon-gamma-activated murine macrophages [J]. Parasit Immunol, 2002, 24(5): 253-262.
- [14] Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, et al. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin [J]. Infect Immun, 2003, 71(5): 2422-2429.
- [15] Gregory WF, Maizels RM. Cystatins from filarial parasites: evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(6-7): 1389-1398.
- [16] Abraham D, Leon O, Leon S, et al. Development of a recombinant antigen vaccine against infection with the filarial worm *Onchocerca volvulus* [J]. Infect Immun, 2001, 69(1): 262-270.
- [17] Cho-Ngwa F, Liu J, Lustigman S. The *Onchocerca volvulus* cysteine proteinase inhibitor, Ov-CPI-2, is a target of protective antibody response that increases with age [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(8): e800.

- [18] Kläger SL, Hagen HE, Bradley JE. Effects of an *Onchocerca*-derived cysteine protease inhibitor on microfilariae in their simuliid vector[J]. Parasitology, 1999, 118(Pt 3): 305-310.
- [19] Gregory WF, Blaxter ML, Maizels RM. Differentially expressed, abundant trans-spliced cDNAs from larval *Brugia malayi*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1997, 87(1): 85-95.
- [20] Maizels RM, Blaxter ML, Scott AL. Immunological genomics of *Brugia malayi*: filarial genes implicated in immune evasion and protective immunity[J]. Parasit Immunol, 2001, 23(7): 327-344.
- [21] Maizels RM, Gomez-Escobar N, Gregory WF, et al. Immune evasion genes from filarial nematodes[J]. Int J Parasitol, 2001, 31(9): 889-898.
- [22] Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, et al. Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing [J]. Curr Biol, 2001, 11(6): 447-451.
- [23] Murray J, Manoury B, Balic A, et al. Bm-CPI-2, a cystatin from *Brugia malayi* nematode parasites, differs from *Caenorhabditis elegans* cystatins in a specific site mediating inhibition of the antigen-processing enzyme AEP [J]. Mol Biochem Parasitol, 2005, 139(2): 197-203.
- [24] Allen JE, Daub J, Guiliano D, et al. Analysis of genes expressed at the infective larval stage validates utility of *Litomosoides sigmodontis* as a murine model for filarial vaccine development [J]. Infect Immun, 2000, 68(9): 5454-5458.
- [25] Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT, et al. *Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(2): 171-178.
- [26] Hartmann S, Kyewski B, Sonnenburg B, et al. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(9): 2253-2260.
- [27] Pillai S, Kalinna BH, Liebau E, et al. Studies on *Acanthocheilone-ma viteae* cystatin: genomic organization, promoter studies and expression in *Caenorhabditis elegans*[J]. Filaria J, 2005, 4: 9
- [28] Figueiredo AS, Höfer T, Klotz C, et al. Modelling and simulating interleukin-10 production and regulation by macrophages after stimulation with an immunomodulator of parasitic nematodes [J]. FEBS J, 2009, 276(13): 3454-3469.
- [29] Hartmann S, Sollwedel A, Hoffmann A, et al. Characterization of IgE responses in a rodent model of filariasis and the allergenic potential of filarial antigens using an *in vitro* assay[J]. Parasite Immunol, 2003, 25(1): 9-16.
- [30] Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, et al. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages[J]. J Immunol, 2008, 180(6): 4265-4272.
- [31] Fu BQ, Wu XP, Liu MY, et al. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding (p46000) antigen from newborn larvae of *Trichinella spiralis*[J]. Chin J Vet, 2005, 25(1): 37-39. (in Chinese)  
(付宝权, 吴秀萍, 刘明远, 等. 旋毛虫新生幼虫 p46000 抗原基因的克隆及序列分析[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(1): 37-39.)
- [32] Sugane K, Matsuura T. Molecular analysis of the gene encoding an antigenic polypeptide of *Trichinella spiralis* infective larvae[J]. J Helminthol, 1990, 64(1): 1-8.
- [33] Yuan LH, Fu BQ, Liu MY, et al. Expression and antigenicity analysis of p46000 antigen from newborn larvae of *Trichinella spiralis*[J]. Chin J Parasitology Parasit Dis, 2005, 33(1): 32-36.  
(原丽红, 付宝权, 刘明远, 等. 旋毛虫新生幼虫 p46000 抗原基因的克隆及序列分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(1): 32-36.)
- [34] Robinson MW, Massie DH, Connolly B. Secretion and processing of a novel multi-domain cystatin-like protein by intracellular stages of *Trichinella spiralis* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2007, 151(1): 9-17.
- [35] Yao JX, Li WH, Gai WY, et al. Cloning and sequence analysis of a cystatin gene TsCystatin1 from *Trichinella spiralis*[J]. Chin Vet Sci, 2011, 41(6): 569-574. (in Chinese)  
(姚菊霞, 李文卉, 盖文燕, 等. 旋毛虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 TsCystatin1 的克隆及序列分析 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(6): 569-574.)
- [36] He H, Cheng M, Yang X, et al. Preliminary molecular characterization of the human pathogen *Angiostrongylus cantonensis* [J]. BMC Mol Biol, 2009, 10: 97.
- [37] Liu YH, Han YP, Li ZY, et al. Molecular cloning and characterization of cystatin, a cysteine protease inhibitor, from *Angiostrongylus cantonensis*[J]. Parasitol Res, 2010, 107(4): 915-922.
- [38] Pan ZH, He A, Cheng M, et al. Cloning, expression and immunoprotection efficacy of the cystatin gene of *Angiostrongylus cantonensis*[J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(6): 534-538. (in Chinese)  
(潘智华, 何嵩, 程梅, 等. 广州管圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆表达及免疫保护作用研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 534-538.)
- [39] Moneo I, Caballero ML, González-Muñoz M, et al. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*[J]. Parasitol Res, 2005, 96(5): 285-289.
- [40] Rodríguez-Mahillo AI, Gonzalez-Munoz M, Gomez-Aguado F, et al. Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor[J]. Int J Parasitol, 2007, 37(8-9): 907-917.
- [41] Newlands GF, Skuce PJ, Knox DP, et al. Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of *Haemonchus contortus*[J]. Parasitology, 2001, 122(3): 371-378.
- [42] Shompole S, Yao C, Cheng X, et al. Distinct characteristics of two intestinal protein compartments discriminated by using fenbendazole and a benzimidazole resistant isolate of *Haemonchus contortus*[J]. Exp Parasitol, 2002, 101(4): 200-209.
- [43] Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, et al. Molecular cloning of a cystatin from parasitic intestinal nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*[J]. J Med Invest, 2001a, 48(1-2): 81-87.
- [44] Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, et al. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response [J]. Infect Immun, 2001b, 69(12): 7380-7386.
- [45] Hao YJ, Montiel R, Nascimento G, et al. Identification, characterization of functional candidate genes for host-parasite interactions in entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* by suppressive subtractive hybridization[J]. Parasitol Res, 2008, 103(3): 671-683.

(收稿日期: 2011-07-13 编辑: 瞿麟平, 盛慧锋)