

DOI:10.13350/j.cjpb.240207

• 论著 •

弓形虫致密颗粒蛋白 GRA35 多克隆抗体的制备与初步应用*

韩萌, 李丹, 都建, 安然**

(安徽医科大学生物化学教研室, 病原生物学安徽省重点实验室, 人兽共患病安徽高校省级重点实验室, 安徽合肥 230032)

【摘要】 目的 制备兔多抗弓形虫致密颗粒蛋白 GRA35 抗体, 并对其进行初步的鉴定和应用。方法 利用 GRA35 重组蛋白免疫新西兰兔, 获得抗 GRA35 抗体。采用 ELISA 检测抗体效价, 采用 Western Blot 鉴定抗体的特异性, 并将获得的多克隆抗体应用于免疫荧光技术。结果 获得的抗体效价在 1:32 000 之上; 经重组的外源性致密颗粒蛋白 GRA35 和弓形虫速殖子中的内源性致密颗粒蛋白 GRA35 能够被制备的多克隆抗体特异性识别; 弓形虫入侵细胞时形成的纳虫泡膜与弓形虫致密颗粒蛋白 GRA35 共定位。结论 成功获得具有高效价和较强特异性的弓形虫致密颗粒蛋白 GRA35 的兔多克隆抗体, 为弓形虫致密颗粒蛋白 GRA35 在弓形虫入侵宿主细胞时发挥的作用的进一步研究创造了条件。

【关键词】 弓形虫; GRA35; 多克隆抗体; 免疫荧光

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)02-0162-04

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Feb;19(2):162-165,171.]

Preparation and preliminary application of polyclonal antibody against GRA35 protein of *Toxoplasma gondii*

HAN Meng, LI Dan, DU Jian, AN Ran (Department of Biochemistry, Anhui Medical University / Anhui provincial Laboratory of Zoonoses of Microbiology and Parasitology / Anhui Provincial Laboratory of Microbiology and Parasitology, Hefei 230032, China)

【Abstract】 **Objective** To prepare and identify rabbit polyclonal antibody *Toxoplasma gondii* against dense granular protein (GRA35), and apply it. **Methods** By constructing the expression vector of GRA35, the GRA35 protein was obtained and immunized New Zealand rabbits to prepare anti-GRA35 antibody. ELISA was used to identify the antibody titer and Western Blot was used to identify the specificity of the antibody. The location of GRA35 was identified by immunofluorescence. **Results** ELISA results showed that the antibody obtained titer was above 1:32 000; Western Blot results showed that exogenous recombinant GRA35 protein and endogenous natural GRA35 protein in *T. gondii* tachyzoites could be specifically recognized by the polyclonal antibody. Immunofluorescence results indicated that dense granular protein GRA35 co-localized with Parasite vesicle membrane (PVM). **Conclusion** The polyclonal antibody of GRA35 was successfully obtained. The antibody has high titer and strong specificity, which provide a basis for further study on the role, mechanism and function of *T. gondii* dense granule protein GRA35 in *T. gondii* invasion of host cells.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; GRA35; Polyclonal antibody; immunofluorescence

***刚地弓形虫是一种专性的胞内寄生虫, 能够引起人兽共患弓形虫病, 感染包括人类在内的几乎全部温血动物。在全世界范围内大概有 1/3 的人感染弓形虫, 检测其弓形虫血清抗体呈现阳性^[1]。正常人体被弓形虫感染时通常表现为隐性感染, 无明显临床症状; 而当弓形虫感染免疫缺陷症的患者和孕妇时, 可导致严重并发症甚至会造成死亡^[2]。

致密颗粒作为弓形虫的重要分泌型细胞器之一, 它分泌的致密颗粒蛋白 (GRAs) 能够参与纳虫泡 (PV) 及纳虫泡网状结构 (PVN) 的形成与修饰, 以维持弓形虫在宿主细胞内的生存。致密颗粒蛋白在弓形虫入侵宿主细胞时, 毒力发挥强弱的控制以及在宿主细胞内

的存活、复制发挥着关键作用。同时, GRAs 是宿主在感染弓形虫后血液循环中的抗原的重要组成部分, 因此 GRAs 能够在宿主体内发挥比较强的免疫原性^[3]。研究发现 GRA35 能够定位于纳虫泡膜 (PVM) 上^[4], 但是目前对于 GRA35 在弓形虫入侵宿主细胞发挥的作用以及免疫逃避的机制尚不清楚。本研究通过体外诱导纯化 GRA35 蛋白, 将其作为抗原免疫新西兰兔

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 81902084)。

** **【通讯作者】** 安然, E-mail: enron90721@163.com

【作者简介】 韩萌 (1999-), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事弓形虫致病机制的研究。E-mail: hmeng0611@163.com

来制备抗 GRA35 多克隆抗体,并应用于免疫荧光技术,为进一步研究 GRA35 在弓形虫中的功能及其在入侵时发挥的作用奠定了基础。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 细胞株和质粒 N2a 细胞与 Vero 细胞为本实验室冻存,pet-28a 载体为本实验室保存。

1.2 实验动物和弓形虫株 新西兰兔是由安徽医科大学实验动物中心提供。野生型弓形虫株 ME-49 速殖子为本实验液氮保存,经复苏后接种于 Vero 细胞内培养,传代后用于实验。

1.3 主要试剂 弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)、弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FCA)购自美国西格玛奥德里奇贸易有限公司;Ni-NTA Agarose 购自美国凯杰公司;澳洲胎牛血清购自上海道鹏生物科技有限公司;DAPI 染色液、抗荧光淬灭封片液购自上海碧云天公司;羊抗兔 HRP-IgG 抗体购自成都正能生物技术有限公司;BSA 购自广州赛国生物科技有限公司;多聚甲醛固定液购自武汉塞维尔生物科技有限公司;NC 膜购自美国默克密理博公司;lipofectamine3000、山羊抗兔罗丹明 IgG 购自赛默飞世尔科技公司。

2 方法

2.1 pET-28a-GRA35 重组表达载体的构建 在 ToxoDB 上查找出 GRA35 的序列并利用 Oligo6.0 软件设计 1 对引物:GRA35-F:5'-GAATTCCTCGTCCGTA-3' GRA35-R:5'-CTCGAG AAGCTCTTGAAATGAGTTGCG-3',在上游引入 EcoR I 酶切位点,下游引入 Xho I 酶切位点。以野生型 ME-49 虫株的全基因组为模板,PCR 扩增 GRA35 基因,GRA35 基因克隆至原核表达载体 pET-28a,后利用 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切验证。

2.2 pET-28a-TgGRA35 外源重组蛋白的诱导表达 将 pET-28a-TgGRA35 重组质粒进行转化,导入大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞中,加入 750 μ L LB 培养基,37 $^{\circ}$ C,150 r/min 震荡培养 1 h,涂板后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵箱过夜(14 h);挑取单个菌落,于 37 $^{\circ}$ C,220 r/min 培养过夜,将过夜的菌液加入含有卡那抗生素的 200 mL 培养基,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 培养 2 h 后,加入 1 mmol/L 的 IPTG(1 : 1 000),将 30 $^{\circ}$ C,220 r/min 作为诱导条件,诱导表达 6 h,之后取诱导后菌液进行 SDS-PAGE 电泳验证,观察蛋白表达量。8 000 r/min 离心收集后放入 -20 $^{\circ}$ C,用于后续纯化。

2.3 pET-28a-GRA35 外源重组蛋白的纯化 将 5 mL 的裂解液(1% triton-100)加入诱导表达后收集的

菌体内,重悬后在低温条件下进行超声破碎;将蛋白上清装入 Ni-beads 柱,4 $^{\circ}$ C 旋转结合 2 h;用预冷的 PBS 洗涤两次后,洗柱数次;洗脱蛋白,取 40 μ L 洗脱后的样品进行 12% SDS-PAGE 电泳验证,鉴定纯化的效果。

2.4 抗体的制备 采集免疫前兔血清,作为阴性对照。免疫,以 1 : 1 的比例将免疫原即纯化获得的 GRA35 重组蛋白和弗式完全佐剂混合乳化。充分乳化后,以皮下注射的方式在多个部位免疫新西兰兔,每只兔子共注射 400 μ g 蛋白。之后每间隔一周同样以 1 : 1 的比例将免疫原 GRA35 蛋白和弗式不完全佐剂混合,充分乳化后进行免疫,共进行 3 次免疫,最后一次免疫结束后的一周,通过心脏取血的方式获得免疫后新西兰兔的血清,分装,-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.5 抗体效价的测定 将纯化后获得的 GRA35 蛋白按照 1 μ g/孔包被至 96 孔板,包被后每孔加入 100 μ L 封闭液(1% BSA)进行封闭,37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h;使用 PBST 洗板(5 min/次,3 次),将免疫后和免疫前血清进行梯度稀释后加入 96 孔板,在 37 $^{\circ}$ C 的条件下孵育 1 h,使用 PBST 洗板 3 次;加入羊抗兔 HRP-IgG(1 : 400 稀释),37 $^{\circ}$ C 条件下反应 1 h 后使用 PBST 洗板;避光条件下加入 TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 显色 5~10 min,加入终止液终止反应;用酶标仪测吸光度 A_{450} 值

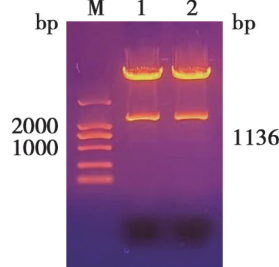
2.6 抗体特异性测定 分别提取野生型弓形虫株 ME-49 株和敲除 GRA35 ME-49 虫株的总蛋白,以及转染 GFP 质粒和 GFP-TgGRA35 重组质粒的 N2a 细胞的总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白使用湿转法转至 NC 膜上,配制浓度为 5% 的脱脂牛奶,将转好的膜封闭 1.5 h 后,用 TBST 洗涤(10 min/次,共 3 次),加入 GRA35 多克隆抗体(1 : 1 000)和作为对照的 CDPK3 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;同上洗涤,加入羊抗兔二抗,低速摇床室温孵育 1.5 h,使用 TBST 洗膜后显影并分析结果。

2.7 间接免疫荧光试验 将 Vero 细胞悬液加入到 24 孔板中,24 h 后加入野生型弓形虫株 ME-49 株悬液;继续培养 24 h 后,使用多聚甲醛固定液将细胞和弓形虫固定在盖玻片上,使用 PBS 洗涤(5 min/次,3 次),加入 0.5% triton-100 对细胞打孔,之后加入 5% 的 BSA 室温封闭 30 min,按上述方法洗涤之后,取出盖玻片,加入 GRA35 多克隆抗体(稀释比为 1 : 50)孵育过夜,使用 PBS 洗涤后,加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 1 h 洗涤之后,加入 DAPI 染细胞核 10 min,同样按照上述方法洗涤之后滴加抗淬灭剂封片,荧光显微镜下观察。

结果

1 pET-28a-TgGRA35 重组表达载体

GRA35 基因经扩增克隆至 pET-28a 载体后,利用 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切验证。经 1% 琼脂糖凝胶电泳的结果显示, pET-28a-TgGRA35 双酶切之后,在 1 137 bp 处显示出条带,与预期大小相一致。(图 1)

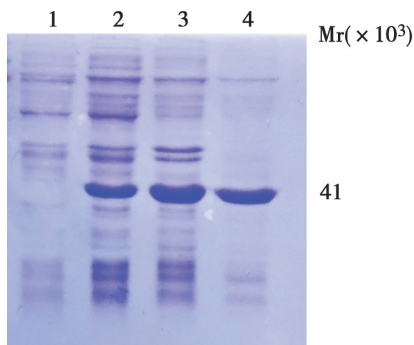


M DNA 分子量标准(DL2000) 1,2 pET-28a-TgGRA35 双酶切产物
图 1 pET-28a-TgGRA35 重组表达载体鉴定结果
M DNA marker(DL2000) 1,2 Endonucleaseproducts of pET-28a-TgGRA35

Fig. 1 Results of pET-28a-TgGRA35 recombinant expression vector identification

2 pET-28a-TgGRA35 融合蛋白的诱导表达及纯化

将 pET-28a-TgGRA35 质粒转化入 BL21(DE3) 感受态细胞中,经 IPTG 诱导表达,过 Ni-beads 柱纯化获得目的蛋白后,进行 12% SDS-PAGE 电泳验证。使用考马斯亮蓝染色后在 41 ku 的位置可见大量目的蛋白,与预期大小符合(图 2)。



1 GRA35 诱导表达前 2 GRA35 诱导表达后 3 GRA35 超声破碎后 4 GRA35 纯化后

图 2 pET-28a-TgGRA35 融合蛋白 SDS-PAGE 鉴定结果

1 GRA35 induced without IPTG 2 GRA35 induced with IPTG
3 The bacterial protein of GRA35 induced with IPTG 4 Purified GRA35

Fig. 2 Results of SDS-PAGE identification of pET-28a-TgGRA35 fusion protein

3 抗体效价的测定

抗体的 A₄₅₀ 值通过 ELISA 检测获得,结果如图 3 所示,将血清稀释至 1 : 32 000 时,其 A₄₅₀ 值仍大于相同稀释度下阴性血清的 2.1 倍,这表明获得的抗体效价在 1 : 32 000 之上。

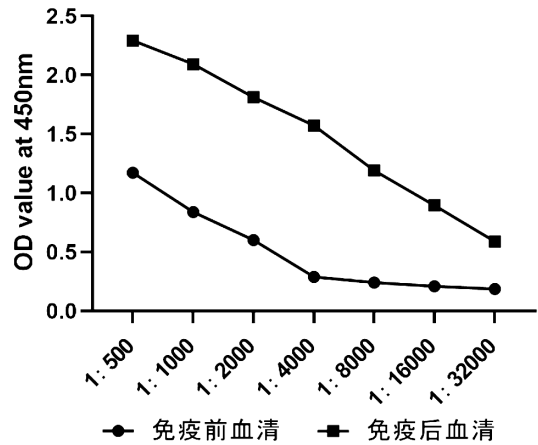
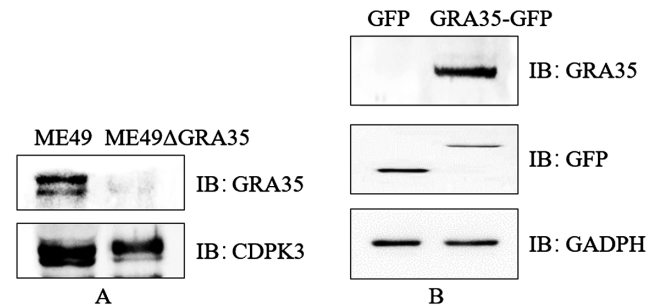


图 3 GRA35 多克隆抗体效价的 ELISA 结果
Fig. 3 The titer of GRA35 polyclonal antibodies

4 抗体特异性的测定

利用提取的野生型弓形虫株 ME-49 株和敲除 GRA35 ME-49 虫株的总蛋白,以及转染 GFP 和 GFP-TgGRA35 重组质粒的 N2a 细胞总蛋白对获得的多克隆抗体特异性强弱进行 Western blot 鉴定。内源性天然的 TgGRA35 抗原和经质粒转染细胞过表达的外源蛋白都能够被制备的 GRA35 多克隆抗体特异性识别,相对分子量约 41 ku,蛋白条带与预期位置一致(图 4)。



A 以 CDPK3 抗体作为对照,野生型弓形虫株 ME-49 株和本实验室构建的 GRA35 敲除虫株的 Western blot 结果 B 以 GFP 和 GADPH 抗体作为对照,经质粒转染提取的总蛋白的 Western blot 结果

图 4 GRA35 多克隆抗体的 Western Blot 的结果分析

A Western blot results of ME49-wt and ME49-ΔGRA35 using CDPK3 antibody as a control B Western blot results of total proteins extracted by plasmid transfection using GFP and GADPH antibodies as controls

Fig. 4 Western Blot analysis of polyclonal antibodies against GRA35

5 间接免疫荧光试验

荧光显微镜下观察发现,呈现蓝色的是 Vero 细胞和弓形虫的细胞核,呈现红色则是 GRA35 多克隆抗体的结合部位,它与弓形虫的纳虫泡膜位置一致。

讨论

作为一种严重的人畜共患病,弓形虫病仍旧是一个严重的全球性公共问题,不仅会感染人类危害人类

健康,同时也会引起牛、羊等牲畜的感染,从而影响畜牧业的发展^[5]。弓形虫主要分泌型细胞器包括微线体(MIC)、棒状体(ROP)和致密颗粒(GRA)^[6],主要分泌微线体蛋白、棒状体蛋白和致密颗粒蛋白^[7]。其中,微线体蛋白包含有黏附结构域,其结构域能够结合宿主细胞表面的一些相关受体发挥功能,同时这类蛋白也能够参与弓形虫的滑行运动,协助入侵宿主细胞^[8-10]。棒状体蛋白由于分布不同可分为棒状体基部蛋白和棒状体颈部蛋白^[11],棒状体蛋白参与形成和维持PVM和PVN,从而调控弓形虫入侵宿主细胞及在宿主内的增殖^[12-13];致密颗粒蛋白在PV和PVN的形成和维持中发挥着关键作用^[14-15],同时致密颗粒蛋白能够刺激宿主产生强烈的免疫反应。

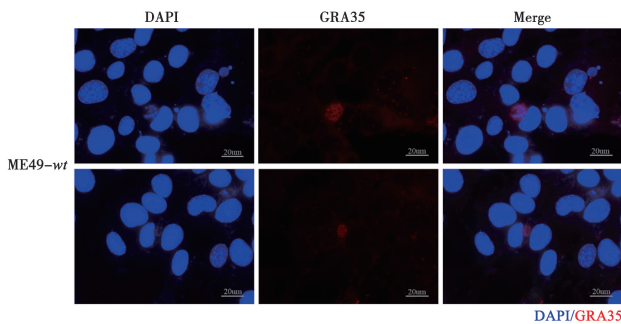


图5 GRA35多克隆抗体的免疫荧光检测结果

Fig. 5 Results of immunofluorescence detection with GRA35 polyclonal antibodies

目前发现的GRAs已有50余种,包括GRA1-17、GRA23-25、GRA35、GRA39、GRA42-43、组织蛋白酶、三磷酸核苷酸水解酶、蛋白酶抑制剂、STAT1转录活性抑制因子、Myc调节因子等^[16]。能够分泌到PVM上的致密颗粒蛋白被鉴定为寄生虫效应分子,可以参与宿主-寄生虫相互作用,包括调节宿主信号通路、逃避宿主免疫反应和营养获取^[7]。研究显示GRA35、GRA42和GRA43能够介导大鼠巨噬细胞焦亡和成熟IL-1 β 的分泌。感染 Δ GRA35、 Δ GRA42和 Δ GRA43的弓形虫,能够减少大鼠巨噬细胞死亡^[4]。 Δ GRA35的弓形虫无法在大鼠体内建立慢性感染,表明其在体内建立慢性感染中起着关键作用,但具体机制尚不清楚。为了进一步研究GRA35在弓形虫入侵宿主细胞与宿主细胞的相互作用以及免疫逃避机制,本研究制备了弓形虫致密颗粒蛋白GRA35的特异性多克隆抗体,为后续的实验创造更多条件。目前单克隆抗体制备和多克隆抗体的制备是常用的两种抗体制备的方法。小鼠是单克隆抗体制备常用的实验动物,将获得的免疫原免疫小鼠,之后将骨髓瘤细胞与免疫后小鼠的脾细胞进行融合获得杂交瘤细胞,经过逐一筛选后进行下一步实验获得所需的单克隆抗体。而多

克隆抗体常选用新西兰兔作为免疫动物,免疫结束后取免疫动物的血清即为所制备的抗体。该研究制备了弓形虫致密颗粒蛋白GRA35的多克隆抗体,通过质粒转化,IPTG诱导表达以及利用Ni-beads柱纯化出浓度和纯度较高的GRA35蛋白,将其作为抗原免疫新西兰兔制备GRA35的多克隆抗体。用ELISA检测获得的抗体效价,结果表示制备的抗体效价在1:32000之上。Western Blot的结果显示GRA35的多克隆抗体可以用于特异性识别弓形虫内源性的GRA35蛋白以及经转染的外源重组GRA35蛋白。通过免疫荧光试验成功检测到GRA35可以定位于弓形虫顶端的分泌型细胞器致密颗粒以及感染细胞的纳虫泡。

综上所述,通过本研究成功获得弓形虫致密颗粒蛋白GRA35的多克隆抗体,经检测抗体的效价高,特异性强,其中经外源重组的GRA35蛋白以及弓形虫速殖子内源性GRA35蛋白都能够被该抗体特异性识别,GRA35多克隆抗体也可应用于Western Blot、免疫荧光等比较常规的实验技术。为对于弓形虫中GRA35蛋白发挥的作用及功能、弓形虫入侵宿主细胞时发挥的作用以及与宿主细胞相互作用的机制的进一步深入研究创造了条件。

【参考文献】

- [1] Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*[J]. Int J Parasitol, 2009, 39(8): 877-882.
- [2] Awoke K, Nibret E, Munshea A. Sero-prevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women attending antenatal care at Felege Hiwot Referral Hospital, northwest Ethiopia[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2015, 8(7): 549-554.
- [3] Mercier C, Adjogble K D Z, Dubener W, et al. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? [J]. Int J Parasitol, 2005, 35(8): 829-849.
- [4] Wang Y, Cirelli KM, Barros PDC, et al. Three *Toxoplasma gondii* dense granule proteins are required for induction of lewis rat macrophage pyroptosis[J]. mBio, 2019, 10(1): e02388-18.
- [5] 刘侠, 阚松鹤, 林青. 弓形虫套式PCR检测方法的建立及其在奶山羊中应用[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(6): 133-135.
- [6] Ngo HM, Hoppe HC, Joiner KA. Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10(2): 67-72.
- [7] Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(3): 615-645.
- [8] Meissner M, Reiss M, Viebig N, et al. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 3): 563-574.

(下转 171 页)

- papillomavirus positive cervical cancer cell lines: Evidence from RNA Seq transcriptome analysis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13646-13656.
- [6] Liu S, Li Y, Li Z. Salidroside suppresses the activation of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting miR-4262/GRP78 axis[J]. Cell Cycle, 2022, 21(7): 720-729.
- [7] 黄进, 刘福蓉, 温婷, 等. 红景天苷通过 JAK2/STAT3 通路影响宫颈鳞癌 C33A 细胞的增殖、侵袭和凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(5): 522-527.
- [8] Jang HJ, Bak Y, Pham TH, et al. STK899704 inhibits stemness of cancer stem cells and migration via the FAK-MEK-ERK pathway in HT29 cells[J]. BMB Rep, 2018, 51(11): 596-601.
- [9] Qi Z, Tang T, Sheng L, et al. Salidroside inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells via suppression of Src-associated signaling pathway activation and heat shock protein 70 expression[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(1): 147-156.
- [10] 张珊珊, 刘嗣同, 石洪爽, 等. 刺芒柄花素通过 FAK/AKT/Bcl-2 通路促进外阴鳞癌 SW962 细胞凋亡[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(6): 653-656.
- [11] Burmeister CA, Khan SF, Schafer G, et al. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives [J]. Tumour Virus Res, 2022, 13(1): 200238-200251.
- [12] Singh G, Sharma SK, Singh SK. miR-34a negatively regulates cell cycle factor Cdt2/DTL in HPV infected cervical cancer cells [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 777-787.
- [13] Kubiczak M, Szustka A, Rogalinska M. Molecular targets of natural compounds with anti-cancer properties [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13659-13685.
- [14] Yang P, Chai Y, Wei M, et al. Mechanism of salidroside in the treatment of endometrial cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 14114-14123.
- [15] 张洋, 董天睿, 倪锦红. 红景天苷对宫颈癌 HeLa 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 国际妇产科学杂志, 2017, 44(4): 396-398, 481.
- [16] 袁肇方, 时小凤, 张向博, 等. 红景天苷抑制卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的基因水平研究 [J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2022, 43(1): 32-39.
- [17] Mogi K, Koya Y, Yoshihara M, et al. 9-oxo-ODAs suppresses the proliferation of human cervical cancer cells through the inhibition of CDKs and HPV oncoproteins [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 19208-19220.
- [18] Morale MG, Tamura RE, Cintra R, et al. TLR4 and SARM1 modulate survival and chemoresistance in an HPV-positive cervical cancer cell line [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 6714-6725.
- [19] Wang YL, Wu WR, Lin PL, et al. The Functions of PCNA in Tumor Stemness and Invasion [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5679-5690.
- [20] Xu J, Qu Q, Liu B, et al. The circular RNA circ_0030018/miR-136/migration and invasion enhancer 1 (MIEN1) axis promotes the progression of polycystic ovary syndrome [J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 5999-6011.
- [21] Li Z, Wei J, Chen B, et al. The role of MMP-9 and MMP-9 inhibition in different types of thyroid carcinoma [J]. Molecules, 2023, 28(9): 3705-3732.
- [22] Niu X, Han Q, Li X, et al. EDIL3 influenced the α v β -FAK/MEK/ERK axis of endothelial cells in psoriasis [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(20): 5202-5212.
- [23] Yang K, Gao K, Hu G, et al. CTGF enhances resistance to 5-FU-mediated cell apoptosis through FAK/MEK/ERK signal pathway in colorectal cancer [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(1): 7285-7295.
- 【收稿日期】 2023-10-11 【修回日期】 2024-01-20
- ~~~~~
- (上接 161 页)
- [23] Kullaya V, van der Ven A, Mpagama S, et al. Platelet-monocyte interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Tuberculosis (Edinb), 2018, 111: 86-93.
- [24] Biswas SK M M S E. Exploring the role of C-C motif chemokine ligand-2 single nucleotide polymorphism in pulmonary tuberculosis: a genetic association study from north india [J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 1019639.
- [25] Badewa AP, Quinton LJ, Shellito JE, et al. Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2005, 85(3): 185-195.
- [26] Ness TL, Carpenter KJ, Ewing JL, et al. CCR1 and CC chemokine ligand 5 interactions exacerbate innate immune responses during sepsis [J]. J Immunol, 2004, 173(11): 6938-6948.
- [27] Pydi SS, Ghousunnissa S, Devalraju KP, et al. Down regulation of RANTES in pleural site is associated with inhibition of antigen specific response in tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2019, 116S: S123-S130.
- [28] Vesosky B, Rottinghaus EK, Stromberg P, et al. CCL5 participates in early protection against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(6): 1153-1165.
- ~~~~~
- (上接 165 页)
- [9] Azzouz N, Kamena F, Laurino P, et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures [J]. Glycobiology, 2013, 23(1): 106-120.
- [10] Lourenco EV, Pereira SR, Faca VM, et al. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin [J]. Glycobiology, 2001, 11(7): 541-547.
- [11] Zhang Y, Lai BS, Juhás M, et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis [J]. Microbiol Res, 2019, 227: 126293.
- [12] Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 79-88.
- [13] Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane [J]. J Cell Biol, 2001, 154(1): 95-108.
- [14] Rezaei F, Sharif M, Sarvi S, et al. A systematic review on the role of GRA proteins of *Toxoplasma gondii* in host immunization [J]. J Microbiol, 2019, 165: 105696.
- [15] 胡玲英, 张念章, 王金磊, 等. 弓形虫致密颗粒蛋白的生物学功能及免疫原性研究的新进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(7): 663-668.
- [16] 柳方远, 李双星, 印春生, 等. 弓形虫主要分泌蛋白及其功能的研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(5): 94-102.
- ~~~~~
- 【收稿日期】 2023-09-14 【修回日期】 2023-12-10