

DOI:10.13350/j.cjpb.240309

• 论著 •

华支睾吸虫 3 个半胱氨酸蛋白酶 N 端短片段原核表达及其抗原性分析*

韦帅^{1,2,3}, 李晓芹^{1,2}, 赖雅诗^{1,2}, 张立林^{1,2}, 卢婷^{1,2}, 邓佩超^{1,2}, 石云良^{1,2**}, 李艳文^{1,2**}

(1. 广西医科大学基础医学院寄生虫学教研室, 广西南宁 530021; 2. 广西高校区域性疾病预防控制重点实验室;
3. 广西河池市人民医院医学检验科)

【摘要】 目的 通过克隆和表达获得华支睾吸虫 3 个半胱氨酸蛋白酶 N 端短片段重组蛋白并分析其抗原性。方法 以 pET-28a-CsCP1-3 重组质粒为模板进行目的片段 CsCP1a-3a PCR 扩增, 构建 pET28a-CsCP1a-3a 表达载体, 并转化至 BL21(DE3) 大肠埃希菌, 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 表达产物进行 SDS-PAGE 分析; 表达产物经变性、纯化及复性, 与华支睾吸虫感染大鼠血清行 Western blot 分析。结果 成功构建 pET28a-CsCP1a-3a 重组质粒; SDS-PAGE 分析显示, 重组蛋白 CsCP1a-3a 以包涵体形式表达; 重组蛋白 CsCP1a-3a 可被华支睾吸虫感染后第 4、5 周大鼠血清识别。结论 重组蛋白 CsCP1a-3a 具有较好抗原性, 可作为华支睾吸虫感染诊断候选分子。

【关键词】 华支睾吸虫; 半胱氨酸蛋白酶; 重组蛋白; 抗原性

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)03-0297-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Mar.; 19(3): 297-301, 307.]

Prokaryotic expression and antigenicity analysis of three N-terminal short fragments of cysteine proteases from *Clonorchis sinensis*

WEI Shuai^{1,2,3}, LI Xiaoqin^{1,2}, LAI Yashi^{1,2}, ZHANG Lilin^{1,2}, LU Ting^{1,2}, DENG Peichao^{1,2}, SHI Yunliang^{1,2}, LI Yanwen^{1,2} (1. Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Key Laboratory of Basic Research on Regional Diseases (Guangxi Medical University), Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region; 3. Department of Clinical Laboratory, The people's Hospital of Hechi)

【Abstract】 **Objective** Clone and express three short N-terminal fragments of cysteine proteases from *Clonorchis sinensis* and analyze their antigenicity. **Methods** The CsCP1a-3a genes were amplified by PCR using pET-28a-CsCP1-3 plasmid as template. The target gene fragments were ligated into the prokaryotic expression vector pET-28a by Double enzyme digestion and ligation to construct recombinant plasmids pET-28a-CsCP1a-3a. After identification by double enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmids were transformed into competent cell BL21 (DE3) for expression induction and the expressed products were obtained by IPTG induction. The expressed products were purified using a Ni-NTA column under denatured conditions and refolded using the gradient dialysis method, characterized by SDS-PAGE and analyzed with *C. sinensis* infected rat serum by Western blot. **Results** The molecular weight of the target fragments obtained by double enzyme digestion were the same as that amplified by PCR using pET-28a-CsCP1-3 plasmid as template, and consistent with the theoretical molecular weight of the target genes. *E. coli* BL21-pET-28a-CsCP1a-3a were induced by IPTG, and the recombinant proteins were expressed in the form of inclusion bodies. After denaturation purification and renunciation, 0.7-0.8 mg/mL pure soluble protein were obtained. Western blot showed that the recombinant proteins CsCP1a-3a could not recognize the negative serum, but could recognize the positive serum. The earliest positive band was detected at the 4th week of infection, which was consistent with the detection of eggs.

Conclusion The pET28a-CsCP1a-3a recombinant plasmids were successfully constructed and pure soluble recombinant proteins were obtained. The recombinant proteins show good antigenicity and can be used as candidate molecules for diagnosis of *C. sinensis* infection.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; cysteine protease; recombinant protein; antigenicity***

* **【基金项目】** 广西自然科学基金面上项目 (No. 2019GXNSFAA245069, 2020GXNSFAA159068)。

** **【通讯作者】** 李艳文, E-mail: 2506345708@qq.com; 石云良, E-mail: 36469116@qq.com

【作者简介】 韦帅 (1988-), 男, 广西河池人, 硕士研究生, 主管技师, 主要研究方向: 蠕虫致病分子机制。E-mail: hcryws@163.com

华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)又称肝吸虫,是一种重要的食源性寄生虫。2009年被世界卫生组织国际癌症研究署列为11种I类致癌病原生物之一^[1]。成虫主要寄生于患者的肝内胆管,寿命长达30余年,其慢性感染可导致肝脏和胆道系统各种并发症,严重者可发生肝硬化、肝癌以及胆管癌^[2]。目前临床上诊断华支睾吸虫感染的金标准是传统病原学方法即从感染者粪便中查到虫卵。但在实际工作中,由于该方法使用粪便量较少,对于粪便中虫卵较少的早期或轻度感染者极易漏检;而对于胆道梗阻的感染者,因虫卵无法排入肠道,无法从粪便中查到虫卵而误诊^[3]。免疫学诊断因其具有特异性高,操作简便、快速,影响因素相对较少、重复性好、容易标准化等优势,已成为临床上主要的辅助诊断手段。应用较为广泛的抗体检测,其关键是找到高敏感性高特异性的诊断抗原。而重组抗原不仅解决了虫源问题,还能通过重新剪接目的基因以提高其敏感性和特异性^[4],也因此重组抗原的研究越来越受到重视。

半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteases, CP)作为寄生虫分泌排泄物(excretory-secretory products, ESPs)的组成成分,能诱导宿主产生较强的细胞免疫和体液免疫反应,具有作为疫苗和免疫诊断分子的潜在价值^[5-8]。但即便同属于半胱氨酸蛋白酶家族,也会因不同的蛋白酶在其活性、最佳pH值和底物特异性以及虫体生长发育不同时期的转录与表达不同而存在差异^[9-13],而这些差异也会导致其抗原性与免疫原性的差别^[14-15]。因此,本研究将对华支睾吸虫3个半胱氨酸蛋白酶CsCP1、CsCP2、CsCP3(CsCP1-3)所对应的N端B细胞优势线性表位短片段CsCP1a、CsCP2a、CsCP3a(CsCP1a-3a)进行克隆表达,并通过感染大鼠动物模型对其抗原性进行分析,以评价其作为华支睾吸虫感染诊断候选抗原分子的潜在价值。

材料与方 法

1 材料

1.1 菌株和质粒 大肠埃希菌DH5 α 、BL21(DE3)菌株,载体质粒pET-28a、构建于pET-28a的3个半胱氨酸蛋白酶(GenBank序列号为DQ902582、DQ902586、DQ909016)全长序列的重组质粒(pET-28a-CsCP1-3)由教研室-70℃冰箱保存。

1.2 主要试剂 Premix TaqTM、QuickCutTM BamH I、QuickCutTM Xho I、T4 DNA Ligase购自宝生物工程(大连)有限公司;StarPrep快速胶回收试剂盒购自北京康润诚业生物科技有限公司;HiPure Plasmid Micro Kit C购自广州美基生物科技有限公司;ECL化学发光底物购自北京兰杰柯科技有限公司;辣根过

氧化酶(HRP)标记的兔抗大鼠IgG购自美国SouthernBiotech公司;ChampChemi 610 PLUS荧光凝胶成像分析系统购自北京森西赛智科技有限公司。

1.3 实验动物 5只SPF级6~8周龄(230 \pm 30)g雄性SD大鼠(动物生产许可证号:SCXK桂2014-0002;动物使用许可证号:SYXK桂2014-0003),由广西医科大学实验动物中心提供。一鼠一笼,光照保持昼夜节律各12h,24~26℃常规饲养。本研究已获得广西医科大学动物实验伦理审查委员会审核批准(伦理批准号:202202001)。

2 方法

2.1 生物信息学分析 应用Vector NTI软件AlignX功能将CsCP1-3与GenBank上已登录的日本血吸虫(AAW27185.1)、猪蛔虫(ADY48108.1)、多房棘球绦虫(BAF02516.1)、猪肉绦虫(AAS00027.1)、十二指肠钩口线虫(KIH64157.1)、棘颚口线虫(ABY28387.1)、粪类圆线虫(CEK45733.1)、罗阿罗阿丝虫(EFO18631.2)、溶组织阿米巴(CAA62836.1)、间日疟原虫(AAA60368.1)、旋毛虫(XP_003377240.1)、刚地弓形虫(ABD64744.1)组织蛋白酶L进行多序列比对,分析其氨基酸序列的相似性和一致性;应用IEDB在线分析软件B Cell Epitope Prediction Tools程序(<http://tools.immuneepitope.org/main/bcell/>)预测CsCP1-3序列B细胞表位。选择序列相似性较低并具有多个B细胞优势线性表位的短片段进行克隆表达,分别命名为CsCP1a、CsCP2a、CsCP3a(CsCP1a-3a)。

2.2 引物设计与合成 以GenBank上已登录的全长序列为依据设计目的短片段的特异性引物。CsCP1a(294bp):上游引物F为5'-GCGGATCCCAAGTTGAGCCTGACA-3'、下游引物R为5'-GGCTCGAGCTAAACTTCTCGTTATCCATCGT-3';CsCP2a(294bp):上游引物F为5'-GCGGATCCATTCCTGAA TCAGAAAATGCCC-3'、下游引物R为5'-GTCTC GAGCTAGAAGTTGTCGTCATCCACA-3';CsCP3a(411bp):上游引物F为5'-GCGGATCCCTTACAGTTCAATGGAGG-3'、下游引物R为5'-GTCTCGAGCTAGATTTCCGATGGTG-3'。上、下游引物下划线部分分别为BamH I和Xho I酶切位点。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

2.3 CsCP1a-3a克隆及重组质粒构建 以重组质粒pET-28a-CsCP1-3为模板进行目的序列CsCP1a-3a的PCR扩增。反应条件为:94℃2min;94℃15s,61℃15s,72℃30s,30个循环;72℃10min。扩增产物经回收,与pET-28a质粒分别进行BamH I和Xho I双酶切。酶切产物经回收,按目的基因与表达载体5

: 1 摩尔比于 16 °C 进行连接反应 16-18 h。将连接产物转化至大肠埃希菌 DH5 α 并涂布于含卡那霉素 (0.1 mg/mL) 的 LB 固体培养基, 37 °C 培养过夜。筛选阳性克隆, 进行 PCR 及双酶切鉴定及重组质粒目的基因测序。测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

2.4 CsCP1a-3a 重组蛋白的原核表达、纯化及复性
将测序无误的重组质粒 pET-28a-CsCP1a-3a 分别转化至大肠埃希菌 BL21(DE3)。在含卡那霉素 (0.1 mg/mL) 的 LB 培养基中 37 °C、250 rpm 振荡培养至对数生长期 (A 值为 0.4-0.6), 加入终浓度 1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达, 37 °C、250 rpm 震荡培养 4 h; 4 °C、12 000 rpm 离心 10 min 收集菌体, 经超声破碎后取上清及沉淀行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (12% SDS-PAGE) 分析。大量培养诱导表达, 超声破碎菌体, 离心收集包涵体沉淀。包涵体经 8M 尿素溶液变性后采用 Ni-琼脂糖凝胶 6-His 亲和层析柱纯化, 纯化样品采用梯度透析法进行复性。

2.5 华支睾吸虫感染大鼠模型建立 感染麦穗鱼采自华支睾吸虫病流行区横州, 去除鱼鳞和内脏, 称重后绞碎, 按 1 : 10 (g : mL) 比例加入人工消化液 (0.6 g 胃蛋白酶-100 mL 生理盐水-1 mL 浓盐酸), 于 37 °C 消化过夜; 次日, 用水洗沉淀法反复水洗消化产物直至上液澄清; 小心弃去上清, 加入少量的生理盐水重悬沉淀并移至小平皿, 于体视镜下分离囊蚴备用。采用经口灌胃方法感染 SD 大鼠, 每鼠灌囊蚴 150 个。于感染前 (0 周)、感染后 1、2、3、4、5 周鼠尾静脉采血并分离血清。分别于感染后第 21 和 28 d 收集粪便, 采用改良酸醚离心沉淀法^[16], 取沉淀制片 3 张, 显微镜下查找华支睾吸虫卵, 查见虫卵表示感染成功。

2.6 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 重组蛋白 10 μ g 行 SDS-PAGE 电泳, 随后转印至 PVDF 膜, PBS-2% BSA 封闭, 4 °C, 过夜; 分别与大鼠阴性血清 (感染前, 0 周)、阳性血清、感染 1、2、3、4、5 周血清 (1 : 200 稀释) 孵育, 37 °C, 2 h; PBS-0.5% Tween (PBST) 洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗大鼠 IgG (1 : 25 000 稀释) 孵育, 37 °C, 2 h; PBST 再次洗涤, 加入 ECL 化学发光底物避光显色 3 min 后进行图像采集和分析。

结 果

1 生物信息学分析

多序列比对结果显示 N 端 aal-150 (信号肽 + cathepsin 前体肽抑制功能域) 氨基酸序列相似性较低 (图 1); B 细胞表位预测显示该段序列有多个 B 细胞优势线性表位 (图 2), 依此, 选取该段序列 (不包含信

号肽) 进行克隆表达 (图 3)。

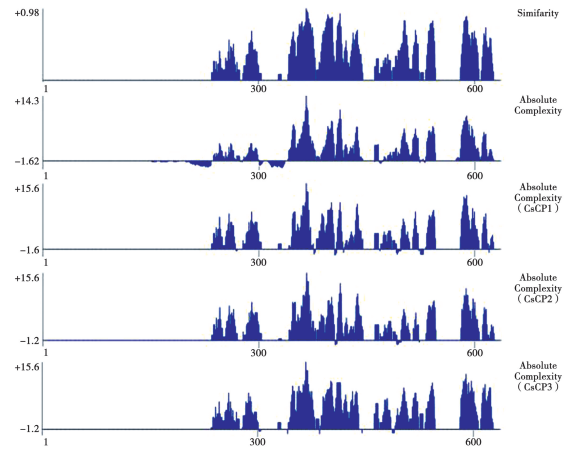
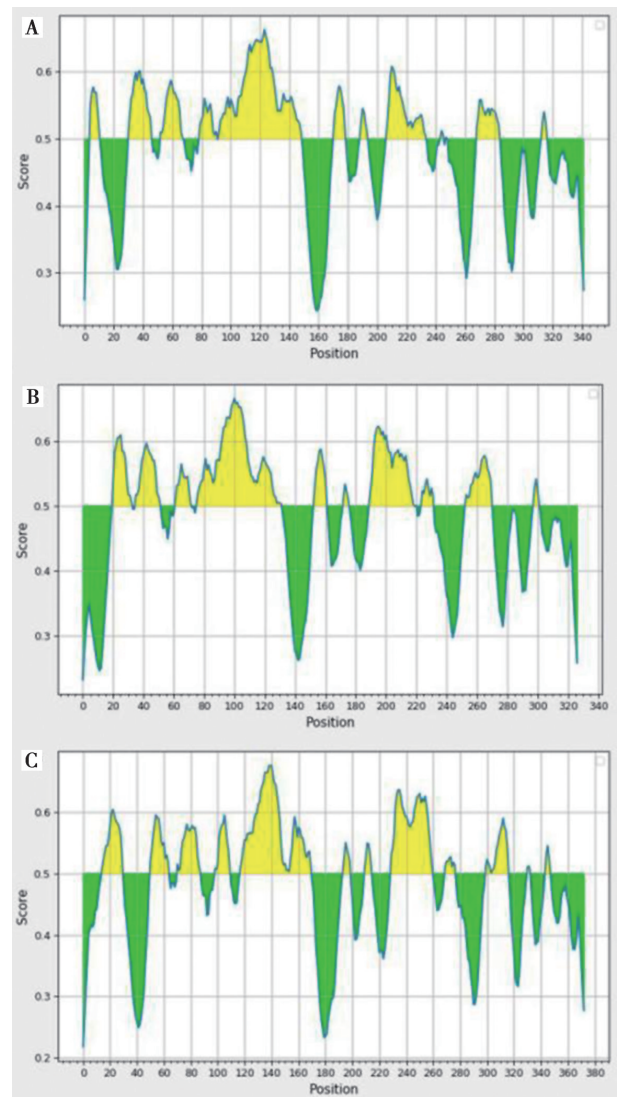


图 1 序列相似性与一致性的多序列比对结果
Fig. 1 Multiple sequence alignment results for sequence similarity and identity



A CsCP1 B CsCP2 C CsCP3
图 2 CsCP1-3 序列 B 细胞优势表位预测结果
Fig. 2 Results of B-cell dominant epitope prediction in CsCP1-3 sequence

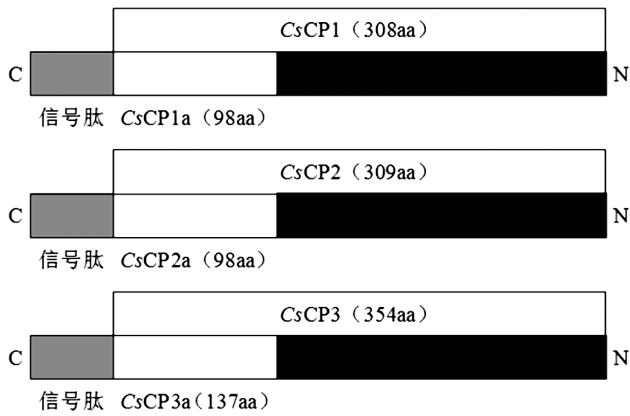
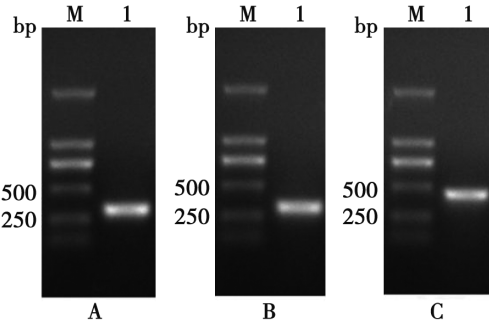


图 3 CsCP1a-3a 所在基因位置示意图

Fig. 3 Schematic representation of the gene location of CsCP1a-3a

2 CsCP1a-3a 的克隆、表达、纯化和复性

CsCP1a-3a 理论分子量分别是 294、294、411 bp。以重组质粒 pET-28a-CsCP1-3 为模板,经特异引物进行 PCR 扩增获得与理论分子量相符合条带(图 4)。以重组质粒为模板进行目的片段扩增的 PCR 产物,其分子量与经双酶切获得的目的片段(图 5)一致,并与目的基因理论分子量相符;测序结果显示重组质粒插入的目的片段序列与 GenBank 中目的基因序列相一致。上述结果说明重组质粒 pET-28a-CsCP1a-3a 构建成功。大肠埃希菌 BL21-pET-28a-CsCP1a-3a 菌株经 IPTG 诱导表达后,在 17 ku 分子量附近出现与目的蛋白分子量(15.3、15.4、19.53 ku)大小相符的条带,显示重组蛋白 CsCP1a-3a 成功表达。重组蛋白以包涵体的形式表达,经变性纯化及复性后最终获得浓度为 0.7-0.8 mg/mL 较纯的可溶性蛋白(图 6)。



A CsCP1a B CsCP2a C CsCP3a M DNA 标准分子量
1 目的片段 PCR 产物

图 4 CsCP1a-3a 扩增产物

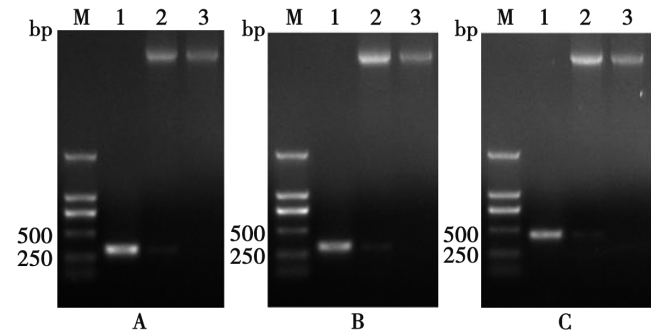
A CsCP1 B CsCP2 C CsCP3 M DNA standard molecular weight 1 PCR product of the target fragment

Fig. 4 Amplification products of CsCP1a-3a

3 Western blot 分析重组蛋白 CsCP1a-3a 抗原性

大鼠于华支睾吸虫感染后 28 d 粪检均查到了虫卵,说明华支睾吸虫感染大鼠模型建立成功。Western blot 结果显示重组蛋白 CsCP1a-3a 不与阴性血清结合,能识别阳性血清。重组蛋白 CsCP1a-3a 未

能检测出感染 1、2、3 周血清中特异 IgG 条带,最早检出阳性条带是感染 4 周血清(图 7),与虫卵检出时间一致。

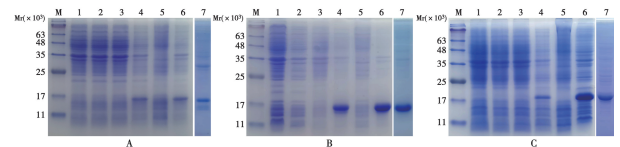


A CsCP1a B CsCP2a C CsCP3a M DNA 标准分子量
1 重组质粒 PCR 产物 2 重组质粒双酶切产物 3 载体质粒 pET-28a 双酶切产物

图 5 重组质粒 pET-28a-CsCP1a-3a PCR 及双酶切鉴定结果

A CsCP1 B CsCP2 C CsCP3 M DNA standard molecular weight 1 PCR product of recombinant plasmid 2 double digestion product of recombinant plasmid 3 double digestion product of vector plasmid pET-28a

Fig. 5 The recombinant plasmid pET-28a-CsCP1a-3a was identified by PCR and double enzyme digestion

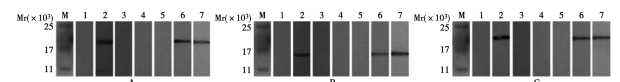


A CsCP1a B CsCP2a C CsCP3a M 蛋白标准分子量
1 BL21-pET-28a-空质粒未诱导 2 BL21-pET-28a-空质粒诱导 3 BL21-pET-28a-重组质粒未诱导 4 BL21-pET-28a-重组质粒经 IPTG 诱导表达 4 h 5 BL21-pET-28a-重组质粒诱导经超声裂菌后的上清 6 BL21-pET-28a-重组质粒诱导经超声裂菌后的沉淀 7 重组蛋白经 Ni-琼脂糖凝胶 6-His 亲和层析柱纯化及复性后

图 6 12%SDS-PAGE 分析重组蛋白 CsCP1a-3a 的表达、纯化与复性

A CsCP1a B CsCP2a C CsCP3a M protein molecular weight 1 BL21-Pet-28a-empty plasmid was not induced 2 BL21-Pet-28a-empty plasmid induction 3 BL21-pET-28a-recombinant plasmid was not induced 4 BL21-pET-28a-recombinant plasmid was induced by IPTG for 4 h 5 BL21-pET-28a-recombinant plasmid was used to induce the supernatant after sonication 6 BL21-pET-28a-recombinant plasmid induced precipitation after sonication 7 Recombinant proteins were purified and renatured by Ni-agarose gel 6-His affinity chromatography column

Fig. 6 Expression, purification and renaturation of recombinant protein CsCP1a-3a by 12%SDS-PAGE analysis



A CsCP1a B CsCP2a C CsCP3a M 蛋白标准分子量
1 阴性血清(0 周) 2 阳性血清 3~7 感染 1、2、3、4、5 周血清

图 7 Western blot 分析重组蛋白 CsCP1a-3a 检测华支睾吸虫感染大鼠血清特异 IgG

A CsCP1a B CsCP2a C CsCP3a M protein molecular weight 1 Negative serum (at week 0) 2 Positive serum 3-7 Sera at 1,2,3,4, and 5 weeks of infection

Fig. 7 Western blot analysis of recombinant protein CsCP1a-3a for detection of specific IgG in serum of rats infected with *C. sinensis*

讨 论

目前,临床上诊断华支睾吸虫感染的金标准仍是粪检查虫卵。该方法对操作者的经验及技术水平要求高,所需工作量大大耗时长,难以满足大规模检测和流行病学筛查的需要,存在一定局限性^[17]。而免疫诊断因操作简便,对仪器设备及实验室空间布局要求不高,易应用于大规模的筛查等优点,常用于华支睾吸虫感染的辅助诊断。华支睾吸虫感染的免疫诊断应用较为广泛的是抗体检测。用于抗体检测的抗原包括成虫粗抗原、纯化抗原和重组抗原 3 大类。成虫粗抗原虽敏感性高但特异性较低,易出现交叉反应;纯化抗原虽特异性高,但制备过程工艺复杂,存在抗原产出率低,不易标准化等问题。而随着分子生物学技术、基因工程技术及重组蛋白技术的发展,重组抗原越来越受到重视,已陆续发现一些具有诊断价值的重组抗原,而其中的半胱氨酸蛋白酶家族因具有较强的抗原性和免疫原性受到了广泛关注^[18-24]。

半胱氨酸蛋白酶主要分为组织蛋白酶 L、组织蛋白酶 B 以及钙激活蛋白酶等,广泛存在于动物和植物以及寄生虫的蛋白酶家族,其功能域序列相对保守。而与其他寄生虫感染血清发生交叉反应,是基于重组半胱氨酸蛋白酶开发可靠的华支睾吸虫血清学诊断方法的主要问题^[20]。相同的抗原结构、相同的抗原表位、相似的空间构象是产生交叉反应的主要因素。通过重新剪接目的基因来改变其表达的氨基酸序列可减少上述三种因素的影响,以期降低重组蛋白的交叉反应,提高诊断特异性。Kang 等^[25]对华支睾吸虫副肌球蛋白(CsPmy) 151 个氨基酸残基(aa375-525)的 CsPmyC-2 片段进行原核表达,并分析其与肺吸虫、血吸虫、后殖吸虫、颚口线虫感染血清的交叉反应。结果显示,CsPmyC-2 与血吸虫、后殖吸虫、颚口线虫感染血清不发生交叉反应,仅与肺吸虫感染血清存在较弱的交叉反应(2/12, 16.7%)。本研究应用生物信息学将 CsCP1-3 与其他常见 12 种寄生虫的组织蛋白酶 L 进行多序列比对,结果显示 CsCP1-3 的木瓜蛋白酶家族功能保守域序列的相似性与一致性远较其 N 端 aa1-150(信号肽+ cathepsin 前体肽抑制功能域)序列高;而 B 细胞线性表位分析结果显示主要的优势表位集中在 N 端,提示位于 N 端的 cathepsin 前体肽抑制功能域作为诊断分子可能具有较高的特异性。

刘宜升等^[26]利用华支睾吸虫成虫粗抗原检测感染家兔血清特异性抗体,在感染后 1 周即可检测到血清特异 IgG。Chen 等^[15]利用 4 个华支睾吸虫组织蛋白酶 B 来检测感染大鼠血清特异 IgG 水平,结果显示感染后第 4 周血清特异 IgG 水平明显升高;本实验通

过原核表达系统获得的重组蛋白 CsCP1a-3a 能与阳性血清结合,显示出较好的抗原性;最早能识别出感染后第 4 周血清,与 Chen 等^[15]研究结果一致,与虫卵检出时间同步,在诊断时效上亦不滞后,避免假阴性发生。

特异性抗体的检出除了与宿主的反应性、感染程度以及抗原分子的抗原性、免疫原性有关外,还与检测方法的敏感度有关。Li 等^[27]曾将高特异性低敏感性的华支睾吸虫 28 和 26 ku 谷胱甘肽 s-转移酶(Cs28GST 和 Cs26GST)、卵黄前体蛋白(CsVpB1)重组蛋白混合制备了多重抗原,在保证特异性的同时将检测敏感度提升至 87%。本研究所使用的重组蛋白 CsCP1a-3a 为单一组分,其抗原表位较全长 CsCP1-3 少,理论上其敏感性或低于全长而特异性或高于全长。后续将对 CsCP1a-3a 和 CsCP1-3 用于免疫诊断的特异性和敏感性做进一步分析,以期筛选出具有实际应用价值的诊断抗原,为华支睾吸虫病防治提供新方法。

【参考文献】

- [1] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4): 321-322.
- [2] Na BK, Pak JH, Hong SJ. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis [J]. Acta Trop, 2020, 203: 105309.
- [3] Joo KR, Bang SJ. A bile based study of *Clonorchis sinensis* infections in patients with biliary tract diseases in Ulsan, Korea [J]. Yonsei Med J, 2005, 46(6): 794-798.
- [4] Cho PY, Lee JY, Kim TI, et al. Serodiagnostic antigens of *Clonorchis sinensis* identified and evaluated by high-throughput proteogenomics[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(12): e8998.
- [5] Lopez CJ, Cwiklinski K, De Marco VC, et al. Diagnosis of sheep fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* using cathepsin L enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [J]. Vet Parasitol, 2021, 298: 109517.
- [6] Meshgi B, Jalousian F, Fathi S, et al. Design and synthesis of a new peptide derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 with potential application in serodiagnosis of fascioliasis [J]. Exp Parasitol, 2018, 189: 76-86.
- [7] Nandini A, Varghese A, Bora C, et al. Prevalence of anti-*Toxocara canis* antibodies in dogs detected with recombinant cathepsin L-1 and TES-26 antigens in three states of India [J]. Acta Parasitol, 2022, 67(1): 523-529.
- [8] Sadaow L, Yamasaki H, Morishima Y, et al. Effectiveness of *Fasciola gigantica* excretory-secretory and recombinant cathepsin L antigens for rapid diagnosis of human fascioliasis using immunochromatographic devices [J]. Parasitol Res, 2020, 119(11): 3691-3698.
- [9] Barbour T, Cwiklinski K, Lalor R, et al. The zoonotic helminth parasite *Fasciola hepatica*: virulence-associated cathepsin B and cathepsin L cysteine peptidases secreted by infective newly excysted juveniles (NEJ) [J]. Animals (Basel), 2021, 11(12): 2076-2615.

- Sci, 2021, 42(5): 354-366.
- [7] Effenberger M, Widjaja AA, Grabherr F, et al. Interleukin-11 drives human and mouse alcohol-related liver disease[J]. Gut, 2023, 72(1): 168-179.
- [8] Huang S, Wang Y, Xie S, et al. Hepatic TGF β 1 deficiency attenuates lipopolysaccharide/D-Galactosamine-induced acute liver failure through inhibiting GSK3 β -Nrf2-mediated hepatocyte apoptosis and ferroptosis[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2022, 13(6): 1649-1672.
- [9] Liao H, Du S, Jiang T, et al. UMSCs attenuate LPS/D-GalN-induced acute liver failure in mice by down-regulating the MyD88/NF- κ B pathway[J]. J Clin Transl Hepatol, 2021, 9(5): 690-701.
- [10] Yang S, Kuang G, Zhang L, et al. Mangiferin attenuates LPS/D-GalN-induced acute liver injury by promoting HO-1 in kupffer cells[J]. Front Immunol, 2020, 11: 285.
- [11] Nie XH, Han T, Ha FU, et al. Comparison of the effects of the pretreatment and treatment with RhIL-11 on acute liver failure induced by D-galactosamine[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(8): 1142-1150.
- [12] Ray K. Re-thinking the role of IL-11 in liver injury[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(8): 523.
- [13] Guo YT, Lu YY, Lu X, et al. Kr ppe1-like factor 15/Interleukin 11 axis-mediated adventitial remodeling depends on extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in angiotensin II-induced hypertension[J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(16): e020554.
- [14] Kim MW, Kang JH, Jung HJ, et al. Deficiency of Ninjurin1 attenuates LPS/D-galactosamine-induced acute liver failure by reducing TNF- α -induced apoptosis in hepatocytes[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(20): 5122-5134.
- [15] He Y, Guo X, Lan T, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve the function of liver in rats with acute-on-chronic liver failure via downregulating Notch and Stat1/Stat3 signaling[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 396.
- [16] Wang F, Zhang X, Liu W, et al. Activated natural killer cell promotes nonalcoholic steatohepatitis through mediating JAK/STAT pathway[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2022, 13(1): 257-274.
- [17] Chan JM, Zaidi S, Love JR, et al. Lineage plasticity in prostate cancer depends on JAK/STAT inflammatory signaling [J]. Science, 2022, 377(6611): 1180-1191.
- [18] 张荣臻, 吕超, 王娜, 等. 大黄、赤芍注射液调控 JAK/STAT 信号通路促进急性肝衰竭大鼠肝再生的机制研究[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2022, 47(1): 245-253.
- [19] 刘鹏, 胡阳黔, 曹扶胜, 等. 白术内酯 I 对自身免疫性肝损伤小鼠 JAK/STAT 信号通路的调节作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(27): 2975-2980, 2986.
- [20] 郭丽颖, 李秋伟, 李力, 等. 鲜生地黄对慢加急性肝衰竭大鼠 JAK2/STAT3 通路的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(8): 1976-1978, 1983.

【收稿日期】 2023-10-22 【修回日期】 2024-01-11

(上接 301 页)

- [10] Dvorak J, Mashiyama ST, Sajid M, et al. SmCL3, a gastrodermal cysteine protease of the human blood fluke *Schistosoma mansoni* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(6): e449.
- [11] Guiliano DB, Hong X, Mckerrow JH, et al. A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling[J]. Mol Biochem Parasitol, 2004, 136(2): 227-242.
- [12] Tsubokawa D, Hatta T, Maeda H, et al. A cysteine protease from *Spirometra erinaceieuropaei* plerocercoid is a critical factor for host tissue invasion and migration[J]. Acta Trop, 2017, 167: 99-107.
- [13] Hernandez HM, Marcet R, Sarracent J. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis* [J]. Parasite, 2014, 21: 54.
- [14] Wu Z, Tang Z, Shang M, et al. Comparative analysis of immune effects in mice model: *Clonorchis sinensis* cysteine protease generated from recombinant *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* spores[J]. Parasitol Res, 2017, 116(7): 1811-1822.
- [15] Chen WJ, Wang X, Lv X, et al. Characterization of the secreted cathepsin B cysteine proteases family of the carcinogenic liver fluke *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2014, 113(9): 3409-3418.
- [16] 胡纓, 李艳文, 卢作超. 诊断华支睾吸虫病 4 种粪检方法的比较 [J]. 中国热带医学, 2012, 12(8): 976-978.
- [17] 孙青松, 于妮娜, 尚信池, 等. 华支睾吸虫病在我国的流行及诊断方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2019, 40(8): 84-88.
- [18] Kang JM, Yoo WG, Le HG, et al. Partial characterization of two cathepsin D family aspartic peptidases of *Clonorchis sinensis* [J]. Korean J Parasitol, 2019, 57(6): 671-680.
- [19] Kang JM, Bahk YY, Cho PY, et al. A family of cathepsin F cysteine proteases of *Clonorchis sinensis* is the major secreted proteins that are expressed in the intestine of the parasite [J]. Mol Biochem Parasitol, 2010, 170(1): 7-16.
- [20] Li Y, Hu X, Liu X, et al. Serological diagnosis of clonorchiasis: using a recombinant propeptide of cathepsin L proteinase from *Clonorchis sinensis* as a candidate antigen [J]. Parasitol Res, 2012, 110(6): 2197-2203.
- [21] Cheng N, Xu XN, Zhou Y, et al. Cs1, a *Clonorchis sinensis*-derived serodiagnostic antigen containing tandem repeats and a signal peptide [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2018, 12(8): e6683.
- [22] Ma XX, Qiu YY, Chang ZG, et al. Identification of myoferlin, a potential serodiagnostic antigen of clonorchiasis, via immunoproteomic analysis of sera from different infection periods and excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 779259.
- [23] 王婷, 杨庆利, 冷静, 等. 华支睾吸虫 HMGB1 同源分子的识别及其进化研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(9): 1035-1039.
- [24] 赵磊, 莫刚, 李佳, 等. 华支睾吸虫感染 BALB/c 小鼠肝胆管纤维化模型的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(10): 1160-1163.
- [25] Kang JM, Ju HL, Lee J, et al. Mapping of the putative epitope domain of *Clonorchis sinensis* paramyosin (CsPmy) recognized by CsPmy-specific immunoglobulin G in sera of human clonorchiasis [J]. Mol Biochem Parasitol, 2015, 201(1): 66-71.
- [26] 刘宜升, 毛克强. ABC-ELISA 检测华支睾吸虫抗体的动态研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1991(3): 142-145.
- [27] Li SY, Shin JG, Cho PY, et al. Multiple recombinant antigens of *Clonorchis sinensis* for serodiagnosis of human clonorchiasis [J]. Parasitol Res, 2011, 108(5): 1295-1302.

【收稿日期】 2023-09-14 【修回日期】 2023-12-01