

• 基础实验研究论著 •

日本血吸虫重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗的构建及鉴定*

张丽,李文桂[△],向进平

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

摘要:目的 构建日本血吸虫重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗,并对其进行鉴定。方法 采用 RNeasy Mini 试剂盒提取日本血吸虫成虫总 RNA,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法获得 Sj26GST 抗原编码基因;将该编码基因与 pGEX-1 λ T 载体进行连接,得到重组质粒 pGEX-Sj26GST,并对其进行双酶切鉴定;将重组质粒电转化入两歧双歧杆菌中,构建重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗,PCR 鉴定疫苗。结果 RT-PCR 扩增出的日本血吸虫成虫 Sj26GST 基因片段长度为 676 bp;双酶切证实 Sj26GST 抗原编码基因成功插入 pGEX-1 λ T 载体中;PCR 证实从重组两歧双歧杆菌疫苗中扩增出长度为 676 bp 的 Sj26GST 基因片段。结论 成功构建了日本血吸虫重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗。

关键词:日本血吸虫; 两歧双歧杆菌; 疫苗

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2795-03

Construction and identification of recombinant *Bifidobacterium bifidum* (pGEX-Sj26GST) vaccine of *Schistosoma japonicum**Zhang Li, Li Wengui[△], Xiang Jinping

(Institute of Infectious and Parasitic Disease, the First Affiliated Hospital,

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct and identify recombinant *Bifidobacterium bifidum* (pGEX-Sj26GST) vaccine of *Schistosoma japonicum*. **Methods** Mini kit was employed to extract total RNA from adult *Schistosoma japonicum*. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was adopted to amplify the Sj26GST antigen encoding gene which connected to pGEX-1 λ T vector. Recombinant plasmid pGEX-Sj26GST was obtained and identified by double enzyme digestion. The recombinant plasmid was electrotransformed into *Bifidobacterium bifidum* to construct recombinant *Bifidobacterium bifidum* (pGEX-Sj26GST) vaccine. PCR was used to identify the vaccine. **Results** The Sj26GST gene fragment of adult *Schistosoma japonicum* with length of 676 bp was amplified by RT-PCR. Sj26GST antigen encoding gene was successfully inserted into pGEX-1 λ T vector which identified by double enzyme digestion. PCR identified that the length of 676 bp Sj26GST gene fragment had been amplified from recombinant *Bifidobacterium bifidum* vaccine. **Conclusion** The recombinant *Bifidobacterium bifidum* (pGEX-Sj26GST) vaccine of *Schistosoma japonicum* was successfully constructed.

Key words: *Schistosoma japonicum*; *Bifidobacterium bifidum*; vaccine

日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*, Sj)是日本血吸虫病的病原体,该病是一种严重影响人类健康的人兽共患寄生虫病,已被 WHO 确定为六大热带病之一^[1]。目前的防治难点在于化疗药物无法阻断再感染,且其已有抗药性的产生。人们认为针对血吸虫自身特点,设计特异性的疫苗是有效控制和阻断血吸虫传播的有效策略之一^[2-4]。Sj26GST 是 WHO/热带病研究所(Tropical Disease Research, TDR)推荐的 6 种较为理想的血吸虫疫苗候选分子之一^[5]。众多研究表明,两歧双歧杆菌是一种理想的疫苗新载体^[6]。本研究拟将 Sj26GST 基因克隆到 pGEX-1 λ T 中构建重组质粒 pGEX-Sj26GST,再将其电穿孔转化两歧双歧杆菌,构建重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗,欲将双歧杆菌的优点与 Sj26GST 的功能相结合,为日本血吸虫病的防治提供一种新型有价值的疫苗。

1 材料与方

1.1 主要试剂与仪器 主要试剂为 DNA Marker, *Bam*H I、*Eco*R I 限制性内切酶, T₄ DNA 连接酶(立陶宛 Fermentas 公司);RNeasy Mini 试剂盒(德国 Qiagen 公司);SK2431 一步法逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain

reaction, RT-PCR)试剂盒、SK1192 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒、SK2303 高效感受态细胞制备试剂盒、SK2073 PCR 扩增试剂盒、SK1142 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);日本血吸虫感染兔动物模型由本研究所传代保存;LB 液体培养基、MRS 液体和固体培养基由本研究室制备;两歧双歧杆菌菌种及大肠埃希菌 BL21(DE3)菌株由本研究室保存。主要仪器:PTC-200 型 PCR 仪为美国 MJ Research 公司产品,电泳仪、凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品,台式高速离心机、核酸蛋白仪均为德国 Eppendorf 公司产品,振荡器、恒温摇床、恒温水箱为日本三洋公司产品。

1.2 检测方法

1.2.1 Sj26GST 抗原编码基因的扩增、纯化、鉴定及序列测定 根据 GenBank 中日本血吸虫 Sj26 基因序列设计引物,上游引物 P1:5'-GCG GAT CCA TGT CCC CTA TAC TAG GTT AT-3';下游引物 P2:5'-TAG AAT TCT TAC AAT CGT TTG TAA TTC CG-3',为了便于克隆,分别在 P1、P2 的 5'端引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 的酶切位点。引物的合成由上海生工

* 基金项目:重庆市科委地方病重大专项资助项目(No. 2008AB5055, 2008AB5008, 2008AB5054)。 作者简介:张丽(1987~),女,在读硕士研究生,主要从事病原微生物的分子生物学研究工作。 [△] 通讯作者, E-mail: cqliwengui@163.com。

生物工程技术服务有限公司完成。按 RNeasy Mini 试剂盒说明书获得日本血吸虫成虫总 RNA, 以此为模板, 以 P1、P2 为引物, 采用 RT-PCR 法扩增 676 bp 的 *Sj26GST* 基因片段。RT-PCR 反应体系为: 2 × RT-PCR Master 25 μL, P1、P2 各 5 μL, *Sj26* 3 μL, RT/*Taq* mix 1 μL, 双蒸水 11 μL, 共 50 μL。按照 SK1142 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒说明书对 RT-PCR 产物进行纯化, 然后取 RT-PCR 产物 3 μL, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。以上、下游引物为测序引物, 对 *Sj26GST* 的 RT-PCR 产物进行测序, 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.2 pGEX-1λT 制备 取本室保存的重组菌 BL21(pGEX-1λT)300 μL, 将其加入含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C 条件下连续搅拌转速为 220 r/min, 厌氧培养 24~72 h。然后取过夜培养的上述菌液 1~2 mL, pGEX-1λT 质粒的提取按 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒说明书进行。

1.2.3 重组质粒 pGEX-Sj26GST 的构建及鉴定

1.2.3.1 重组质粒 pGEX-Sj26GST 的构建 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对目的基因 *Sj26GST* 的 RT-PCR 扩增产物和载体 pGEX-1λT 进行双酶切, 酶切体系: 双蒸水 9.4 μL, 10 × Tango Buffer 6 μL, pGEX-1λT 或 RT-PCR 产物 42 μL, *Bam*H I、*Eco*R I 各 1.3 μL, 总体积均为 60 μL。将上述物质混匀, 离心 15 s(离心半径 8 cm, 2 000 r/min), 置 37 °C 水浴 2 h。按照 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒说明书对酶切产物进行纯化。按 *T*₄ DNA 连接酶的说明书将其连接(酶切后载体与目的基因的摩尔比约为 3 : 1)。连接体系: 目的基因为 4 μL, pGEX-1λT 载体大片段为 12 μL, 10 × *T*₄ Buffer 为 2 μL, *T*₄ DNA 连接酶为 2 μL, 总体积 20 μL。同上离心, 4 °C 过夜, 再置于 70 °C 水浴 10 min 以灭活 *T*₄ DNA 连接酶。将连接产物转化感受态大肠埃希菌 BL21(DE3), 于 37 °C 条件下连续搅拌转速为 150 r/min, 培养 1 h 后接种于含氨苄青霉素(50 μg/mL)的 LB 固体培养基上, 37 °C 厌氧培养 48~72 h。

1.2.3.2 重组质粒 pGEX-Sj26GST 的双酶切鉴定 挑取上述筛选琼脂平板上单个菌落至含氨苄青霉素(50 μg/mL)的 LB 液体培养基中, 于 37 °C 条件下连续搅拌转速为 250 r/min 培养 48~72 h, 提取重组质粒 pGEX-Sj26GST。采用 *Bam*H I、*Eco*R I 及上述相同的酶切体系对重组质粒进行双酶切鉴定, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行鉴定。

1.2.4 重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗的构建及鉴定

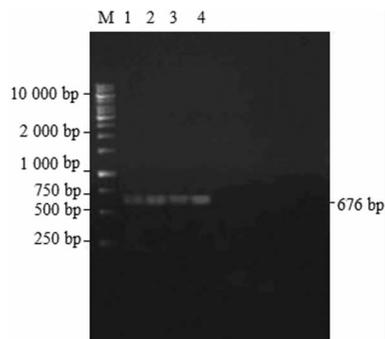
1.2.4.1 重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗的构建 吸取 1 mL 的两歧双歧杆菌菌种接种于 100 mL 含 0.5 mol/L 蔗糖的 MRS 培养液中, 制成感受态两歧双歧杆菌菌液。吸取 80 μL 上述菌液和 20 μL 重组质粒 pGEX-Sj26GST 至 Ep 管中, 混匀冰浴 1 min 后, 将其转移至电穿孔杯中(规格为 0.1 cm)。电穿孔完毕后将重组质粒 pGEX-Sj26GST 在电穿孔中停留 5~10 min, 加入 1 mL 含蔗糖(0.5 mol/L)的 MRS 培养液中, 混匀, 将其转移至 10 mL 培养管中, 厌氧培养 2 h。吸取培养后的菌液 0.1 mL, 将其涂布于含氨苄青霉素(50 μg/mL)的 MRS 琼脂平板上, 37 °C 厌氧培养 24~72 h。

1.2.4.2 重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗的鉴定 从上述 MRS 琼脂平板中挑取单个两歧双歧杆菌菌落, 加入 100 mL 含蔗糖(0.5 mol/L)的 MRS 培养液, 厌氧培养 7~10 d。用质粒抽提试剂盒提取质粒, 以抽提的质粒为模板, 对

其进行 PCR 反应, 取 3 μL PCR 产物, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结 果

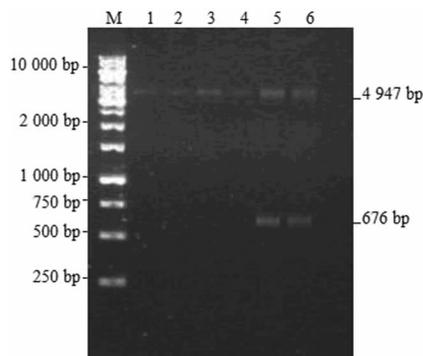
2.1 Sj26GST 抗原编码基因的鉴定 RT-PCR 扩增产物, 琼脂糖电泳显示在约 700 bp 处出现一条清晰的条带, 与 *Sj26GST* 基因片段长度一致, 见图 1。



M: DNA 标志物; 1~4: *Sj26GST* 的 RT-PCR 扩增产物。

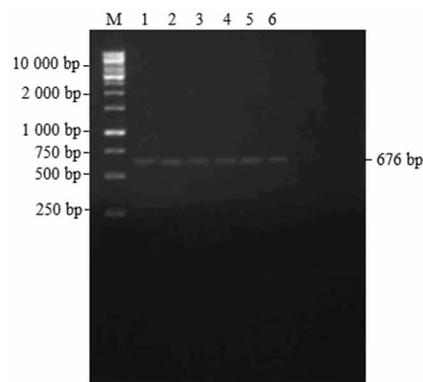
图 1 RT-PCR 扩增产物电泳图谱

2.2 重组质粒 pGEX-Sj26GST 的双酶切鉴定 重组质粒 pGEX-Sj26GST 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳产生 2 条带, 分别为 4 947 bp 的载体片段和 676 bp 的基因片段, 见图 2。



M: DNA 标志物; 1~4: pGEX-1λT 空质粒; 5~6: 重组质粒 pGEX-Sj26GST 双酶切产物。

图 2 重组质粒 pGEX-Sj26GST 的双酶切产物电泳图



M: DNA 标志物; 1~6: 重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)的 PCR 产物。

图 3 重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗的 PCR 产物电泳图

2.3 重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗的 PCR 鉴定 以重组两歧双歧杆菌中抽提的质粒 pGEX-Sj26GST 为模板, 经 PCR 可扩增出 676 bp 的 *Sj26GST* 基因片段, 与 RT-PCR

产物及双酶切产物一致,见图 3。

3 讨 论

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 是由 Sj26/Sj28 基因编码的一种多功能的酶蛋白,其在细胞解毒、生长发育及抗损伤等方面具有重要作用^[7]。近年来 Sj26GST 抗原分子受到了国内、外学者的广泛关注,先后构建了蛋白疫苗、DNA 疫苗、重组 BCG 疫苗、转基因植物疫苗和基因转染的树突状疫苗,均获得了不同程度的免疫保护作用^[8]。He 等^[9]用 rSj26GST 抗原加福氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA) 及弗氏不完全佐剂 (Freund's incomplete adjuvant, FIA) 皮下注射免疫水牛后获得了 0.223 的减虫率及 0.479 的肝组织减卵率,表明 rSj26GST 抗原可诱导水牛产生一定的保护力。杨平等^[10]用 pIRES-Sj26 疫苗肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠,发现其能有效刺激宿主细胞产生 IgG 和干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ), 刺激淋巴细胞转化和增强 CD8⁺ T 细胞的水平,表明 pIRES-Sj26 疫苗具有较强的免疫原性。李文桂等^[11]用重组 BCG-Sj26GST 疫苗免疫 BALB/c 小鼠,发现该疫苗抗尾蚴攻击的减虫率为 0.166 4~0.462 0,减卵率为 0.557 5~0.605 0,疫苗免疫组小鼠肝组织病变程度明显减轻,虫卵肉芽肿的平均周长和平均面积显著减少,血清 IgG 和 IgG2a 水平明显升高,提示此疫苗能诱导机体产生较强的保护力。沈定文等^[12]将 Sj26GST 编码基因成功转染小鼠树突状细胞,使其在树突状细胞中稳定表达后,采用静脉注射法免疫 BALB/c 鼠,证实其可诱导小鼠产生辅助性 T 淋巴细胞 1(helper T lymphocyte 1, Th1) 型免疫应答。这些资料表明 Sj26GST 是一种有希望的疫苗候选分子。本研究成功克隆了 Sj26GST 编码基因,为构建 pGEX-Sj26GST 重组质粒提供了有利条件。

为了将外源 DNA 有效引入双歧杆菌,需构建大肠埃希菌-双歧杆菌穿梭表达载体,使外源 DNA 在大肠埃希菌中操作,然后转化双歧杆菌,通过自动复制或同源整合的方式,外源 DNA 与基因组进行基因交换,从而在双歧杆菌中稳定表达外源基因。pMB1 是首个从长双歧杆菌中分离到的隐蔽性质粒,将其与大肠埃希菌质粒 pJH101 重组可得 7.3 kb 的重组质粒 pDG7,Matteuzzi 等^[13]首次用电穿孔法将该重组质粒成功导入大肠埃希菌中。Missich 等^[14]将 pGEM-52f(+) 插入 pMB,成功构建 pRM1 质粒,同时将 SPr 基因导入 pMB,构建出 pMB2 质粒,再将 pRM1 和 pMB2 分别转化长双歧杆菌和大肠埃希菌,均筛选到重组子,表明 pRM1 和 pMB2 均为大肠埃希菌-双歧杆菌的穿梭载体。大肠埃希菌-双歧杆菌穿梭表达载体的成功构建,使双歧杆菌作为疫苗新载体成为现实。Argnani 等^[15]用电穿孔法成功将外源 DNA 导入双歧杆菌(在两歧双歧杆菌与电穿孔液中加入蔗糖,4℃ 孵育过夜),解决了双歧杆菌细胞壁厚和摄取外源 DNA 困难的问题,为构建双歧杆菌疫苗提供了强有力的保障。

pGEX-1 λ T 含有大肠埃希菌、双歧杆菌的复制起始点,一个多克隆位点和一个氨苄西林抗性基因,是一种大肠埃希菌-双歧杆菌穿梭融合表达载体,其多克隆位点上游有 GST 编码基因的一个片段,融合位点上有特异蛋白酶水解位点,方便去除 GST 编码基因片段,脱落的 GST 片段可进入宿主体内,为抗原与宿主免疫系统的直接接触提供了基础,在 GST 编码基因上游有一个启动子 Ptac,使其可在异丙基-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导下表达。本文成功将 Sj26GST 基因定向克隆到 pGEX-1 λ T 中,构建了重组质粒 pGEX-Sj26GST,这为构建重组两歧双歧杆菌疫苗打

下了基础。

现已构建多种重组双歧杆菌疫苗,包括表达内皮抑素基因、胞嘧啶脱氨酶基因、第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 抑癌基因、霍乱弧菌肠毒素 B 亚单位基因、多房棘球绦虫 *Em* II /3-*Em*14-3-3 融合基因、结核分枝杆菌 MPT64 基因、细粒棘球绦虫 *Eg*95-*Eg*A31 融合基因、日本血吸虫 (Sj14-3-3) 的双歧杆菌疫苗^[16]。这些重组两歧双歧杆菌疫苗具有诸多优点:表达的靶抗原不需纯化,可直接用于免疫接种,免除了蛋白质的后处理;单次接种即可诱导机体产生针对靶抗原的免疫应答;运用分子生物学手段,对不同靶抗原进行剪切和拼接,可使新型疫苗理想化;可定植肠道,发挥益生菌和外源基因的双重功能,达到一剂多用的目的;成本低廉,可作为食品添加剂,接种方便,可采用滴鼻、口服等方式进行;安全性好,对抗菌药物非常敏感,小剂量抗菌药物即可杀灭该菌^[17]。本研究利用双歧杆菌的上述优点将其与 Sj26GST 相结合,使 Sj26GST 基因在双歧杆菌中不断稳定的表达蛋白抗原,刺激机体产生有效的免疫应答。

本研究在成功扩增 Sj26GST 抗原编码基因的基础上,经双酶切后,将其定向克隆至融合表达载体 pGEX-1 λ T 中,再用电穿孔法将重组质粒 pGEX-Sj26GST 转化至两歧双歧杆菌中,成功构建了重组两歧双歧杆菌 (pGEX-Sj26GST) 疫苗,从两歧双歧杆菌疫苗中抽提重组质粒,并以此为模板,经 PCR 扩增出 676 bp 的 Sj26GST 基因片段,提示重组两歧双歧杆菌 (pGEX-Sj26GST) 疫苗构建成功,这为下一步从 mRNA 水平、蛋白水平等方面验证质粒的功能以及疫苗免疫机制的研究奠定了基础。

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] Guidi A, Andolina C, Makame Ame S, et al. Praziquantel efficacy and long-term appraisal of schistosomiasis control in Pemba Island [J]. Trop Med Int Health, 2010, 15(5): 614-618.
- [3] Tchuenté LA, Shaw DJ, Polla L, et al. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma haematobium* infection in children [J]. Am J Trop Med Hyg, 2004, 71(6): 778-782.
- [4] Keiser J, N'Guessan NA, Adoubryn KD, et al. Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, mefloquine-artesunate, and praziquantel against *Schistosoma haematobium*; randomized, exploratory open-label trial [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(9): 1205-1213.
- [5] Bergquist NR. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1995, 90(2): 221-227.
- [6] 李文桂, 陈雅棠. 重组双歧杆菌疫苗研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(8): 768-770.
- [7] Tiu WU, Davern KM, Wright MD, et al. Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* [J]. Parasite Immunol, 1988, 10(6): 693-706.
- [8] 李文桂, 陈雅棠. 日本血吸虫 Sj26GST 疫苗研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(10): 1008-1013.
- [9] He YK, Liu SX, Zhang XY, et al. Field assessment of recombinant *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione S-transferase in Chinese water buffaloes [J]. Southeast Asian J Trop (下转第 2800 页)

S 期的转变过程,使细胞周期停滞于 G₁-S 期,其机制可能是抑制了 DNA 合成和有丝分裂,诱导了细胞分化,从而引起了细胞周期阻滞和细胞生长抑制。因此,Chabranol 可能是通过影响细胞周期来抑制肿瘤生长的,有望成为一种有效的抗肿瘤药物,但是其具体调控机制还有待进一步的研究。

TEM 下的亚细胞结构表明,Chabranol 能显著诱导 BGC-823 细胞发生自噬和凋亡。TEM 下观察到经 Chabranol 干预后的肿瘤细胞,其内部产生了较多的自噬空泡和脂肪滴,可能是 Chabranol 干预后肿瘤细胞需要通过自噬为自身提供营养;另外,镜下还出现了髓样体、胞体收缩及染色质边聚现象,这可能是凋亡的早期反应。

自噬是细胞维持稳态和防止外界侵入的一种防御机制在细胞的废物清除、结构重建和生长分化等方面发挥重要作用,同时也与多种疾病的病理、生理过程相关,当出现自噬过度或不足时均可引起疾病的发生。某些抗肿瘤药物可以通过诱导自噬活性,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。研究证明,对前列腺癌、乳腺癌以及结肠癌细胞系进行放疗时均可诱导细胞自噬性死亡^[13-14]。凋亡是程序性细胞死亡,自噬和凋亡有非常密切的关系^[15]。

凋亡细胞 DNA 琼脂糖电泳是一种检测凋亡的简单而经典的方法。若 DNA 电泳中出现梯状条带,则表明细胞发生了程序性死亡。其原理是凋亡细胞 DNA 发生断裂,导致胞内小分子量的 DNA 片段增加,而相对分子量大的 DNA 片段减少,细胞质内出现 DNA 片段。本实验的 DNA 电泳结果显示,Chabranol 可以诱导 BGC-823 细胞发生凋亡。

以上实验表明倍半萜化合物 Chabranol 可以抑制人低分化胃癌 BGC-823 细胞增殖并影响细胞周期的分布,可能的发生机制是促进肿瘤细胞自噬和凋亡。但因为细胞凋亡网络十分复杂,且肿瘤的发生是一个多因素、多步骤、多阶段和多基因共同作用的结果,因此,Chabranol 的抗肿瘤机制也比较复杂,其诱导细胞凋亡的分子机制有待进一步研究,但它仍有望成为治疗低分化胃癌的新药。

参考文献

[1] Roukos DH. Targeting gastric cancer with trastuzumab: new clinical practice and innovative developments to overcome resistance [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(1): 14-17.

[2] Yi JF, Li YM, Liu T, et al. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol* 2010, 16(37): 4738-4746.

(上接第 2797 页)

Med Public Health, 2003, 34(3): 473-479.

[10] 杨平,戴五星,刘朔捷,等. 血吸虫 Sj26 膜锚定表达 DNA 疫苗的构建、表达及其免疫原性 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2007, 36(2): 141-144.

[11] 李文桂,石佑恩. 日本血吸虫重组 BCG-Sj26GST 疫苗免疫小鼠保护力的观察 [J]. *中国地方病学杂志*, 2004, 23(4): 300-303.

[12] 沈定文,罗金萍,李雍龙,等. Sj26 基因转染的树突状细胞对日本血吸虫感染的免疫保护机制研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2007, 25(1): 17-21.

[13] Matteuzzi D, Brigidi P, Rossi M, et al. Characterization and molecular cloning of *Bifidobacterium longum* cryptic plasmid pMB1 [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1990, 11(4): 220-223.

[3] Lee HE, Jee CD, Kim MA, et al. Loss of promyelocytic leukemia protein in human gastric cancers [J]. *Cancer Lett*, 2007, 247(1): 103-109.

[4] Ryu JK, Lee WJ, Lee KH, et al. SK-7041, a new histone deacetylase inhibitor, induces G2-M cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2006, 237(1): 143-154.

[5] 赵晓艳,胡玉娜,康向东,等. 熊果酸诱导人胃癌 BGC823 细胞凋亡及其作用机制初探 [J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(2): 101-104.

[6] Feltenstein MW, Schühly W, Warnick JE, et al. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from *Magnolia* and *Bear's foot* [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 79(2): 299-302.

[7] Bach SM, Fortuna MA, Attarian R, et al. Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(2): 163-166.

[8] Hehner SP, Hofmann TG, Dröge W, et al. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex [J]. *J Immunol*, 1999, 163(10): 5617-5623.

[9] Cheng SY, Wen ZH, Wang SK, et al. Anti-inflammatory cembranolides from the soft coral *Lobophytum durum* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(11): 3763-3769.

[10] Mathema VB, Koh YS, Thakuri BC, et al. Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone, Expresses Multiple Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities [J]. *Inflammation*, 2012, 35(2): 560-565.

[11] Kupchan SM, MA Eakin, AM Thomas. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones [J]. *J Med Chem*, 1971, 14(12): 1147-1152.

[12] Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a myc-induced model of lymphoma [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(2): 326-336.

[13] Opipari AW Jr, Tan L, Boitano AE, et al. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 696-703.

[14] Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2103-2108.

[15] Shao Y, Gao Z, Marks PA, et al. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(52): 18030-18035.

(收稿日期:2013-07-25)

[14] Missich R, Sgorbati B, LeBlanc DJ. Transformation of *bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *escherichia coli*-*B. longum* shuttle vector [J]. *Plasmid*, 1994, 32(2): 208-211.

[15] Argnani A, Leer RJ, van Luijk N, et al. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium* [J]. *Microbiology*, 1996, 142(Pt 1): 109-114.

[16] 张宁,李文桂. 日本血吸虫重组两歧双歧杆菌 pGEX-Sj14-3-3 疫苗构建及鉴定 [J]. *中国地方病学杂志*, 2011, 30(4): 357-360.

[17] 周必英,陈雅棠,李文桂,等. 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95 疫苗的构建及鉴定 [J]. *中国地方病学杂志*, 2009, 28(2): 218-221.

(收稿日期:2013-06-11)