

广州管圆线虫抗原 IF 的体外表达系统的建立和分析

孟锦绣^{1,2}, 何 藹¹, 程 梅¹, 李素丽¹, 甘 明¹, 徐贵峰¹, 李卓雅¹, 詹希美¹

(1. 中山大学中山医学院寄生虫学教研室, 2. 广东省人民医院医学研究中心, 广东 广州 510080)

摘 要: **【目的】**建立广州管圆线虫特异性抗原中间纤维(IF)基因的体外表达系统,研究 IF 蛋白的结构和功能关系。**【方法】**将 IF 基因亚克隆入原核表达载体 pET-30a-c(+)并在原核中诱导表达,Western blot 鉴定融合表达产物的免疫特性,用组氨酸(His)亲和层析柱分离纯化表达产物,鉴定表达体系效率。生物信息学分析目的蛋白结构和功能关系。**【结果】**抗原基因 IF 在原核中与 6 个组氨酸进行了融合表达,以可溶性表达为主,并能在该系统大量、稳定表达,其相对分子质量 $M_r = 48 \times 10^3$,该表达产物具有较好的抗原性,可被大鼠感染血清识别,抗原 IF 具有典型的中间纤维家族特征,该蛋白具有多个抗原表位存在。**【结论】**建立了 IF 的有效原核表达系统,IF 抗原蛋白的结构决定了它的属性和功能。

关键词: 广州管圆线虫; 抗原; 中间纤维; 原核表达

中图分类号:R383.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)06-0619-06

Angiostrongylus Cantonensis: Construction of Expression System in Vitro and Identification of Antigen Gene IF

MENG Jin- Xiu^{1,2}, HE Ai¹, CHENG Mei¹, LI Shu- li¹, GAN Ming¹, XU Gui- feng¹, LI Zhuo- ya¹, ZHAN Xi- mei¹

(1. Department of Parasitology, Zhongshan Medical College, SUN Yat- sen University, 2. Research Center of Medical Science, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **【Objective】**To construct the expression system in vitro of specific antigen cDNA, the intermediate filament gene (IF) of *Angiostrongylus cantonensis*, and study IF protein structure correlating its property and function.

【Methods】The IF cDNA was subcloned into the prokaryotic expressing vector pET-30a-c(+) and expressed in vitro. The immuno- characteristics of expressed products were identified by western blot, the expressed products His- tagged were isolated and purified by affinity chromatography resins and the expression ratio was analyzed. The correlation between structure and function of IF proteins was analyzed by bioinformatics. **【Results】**The antigen IF was expressed as recombinant protein fused with 6 histidine, it could be expressed effectively as soluble protein. The molecular mass of antigen IF was $M_r=48 \times 10^3$, it had effective antigenicity and could be recognized by infected rat antiserum. IF protein had the characteristics of intermediate filament protein family and several hydrophilic domain as well.

【Conclusion】An effective prokaryotic expression system of antigen IF of *Angiostrongylus cantonensis* was constructed, the study showed that the structure of IF protein determine its property and function.

Key words: *Angiostrongylus cantonensis*; antigen; intermediate filament; prokaryotic expression

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):619- 624]

广州管圆线虫病在我国台湾和福建两省发生了多起暴发流行事件,全国各地散发病例的报道也时有发生,我国卫生部在 2003 年将其列为新发传染病^[1]。广州管圆线虫病的流行地域已经不局限于

太平洋沿岸国家和地区,在美洲、欧洲和澳洲都有发生,广州管圆线虫病已被世界公认为新流行或再流行的人兽共患寄生虫病^[2]。广州管圆线虫病是由三期幼虫的感染而引起的以嗜酸性粒细胞增多性

收稿日期:2006-06-06

基金项目:国家“十五”科技攻关重大项目(2003BA712A03-07);国家自然科学基金资助项目(301708377);广州市科技计划基金资助项目(2005Z3-7561;2006Z3-C7191);广东省医学科研基金资助项目(B2006003);广东省人民医院科学技术研究基金资助项目(Y200532)

作者简介:孟锦绣(1973.5),女,辽宁抚顺人,博士生;詹希美,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: zhanximel@yahoo.com.cn

脑炎或脑膜脑炎为主的中枢神经系统的损害,严重的可造成死亡。但因为缺少有效的诊断手段,该病的误诊率颇高,寻找适合的抗原来制备诊断试剂成为防治该病的热点和关键。在前期工作中,我们通过免疫探针筛选获得了广州管圆线虫特异性抗原候选基因中间纤维(intermediate filament, IF)^[3],为此本研究将对该基因进行体外表达、鉴定分析以及运用生物信息学分析和预测该蛋白的结构和功能特征,建立 IF 基因的有效表达系统,为 IF 抗原的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

载体 TriplEx2 (CLONTECH, 美国), pET-30a-c(+)载体和 BL21(DE3)菌株(INVITROGEN, 美国),限制性内切酶 BamH 和 Sal (NEB, 美国), PCR 引物(上海博亚合成), Taq Plus I DNA Polymerase (上海生工), T4 DNA Ligase (MBI, 美国), NC 膜(Pall, 美国), Ni-NTA His-Bind Resin 和抗 6 个组氨酸抗体 (NOVAGEN, 美国)。离心机 Hettich Universal 32R (HETTICH, 德国; 半径 5.5 cm)。

1.2 IF 的 pET-30a-c(+)原核表达载体的构建

IF cDNA 片段在前期工作中已构建于噬菌体载体 TriplEx2 中,将其亚克隆入 pET-30a-c(+)原核表达载体。

1.2.1 引入 BamH 和 Sal 限制性酶切位点的 PCR 扩增 引入 BamH 酶切位点的上游引物 ET-IF P1 BamH 5'>GCGGATCCCTAGTCAAATTG TCGAATATTG< 3 和引入 Sal 酶切位点的下游引物 ET-IF P2 Sal 5'>GCGTCTGACTTACGTAG CGCT TTGACTC<3 扩增目的片段。在总体积为 50 μ L 反应体系中,加入 10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L, 重组质粒 pTripE/IF 模板 1 μ L, Taq Plus I DNA Polymerase(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 39.5 μ L。反应条件为:95 2 min 热启动,94 45 s,64 45 s,72 60 s,35 个循环,72 延伸 10 min,产物行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR 产物和 pET-30a-c(+)载体的纯化按 Qiaquick Gel Extraction Kit 说明书进行。

1.2.2 IF 基因 PCR 产物和 pET-30a-c(+)载体的

Sal 单酶切 纯化的载体和 IF PCR 产物分别用紫外分光光度计定量后分别进行 Sal 单酶切。pET-30a-c(+)载体经 Sal 酶切后生成 pET/Sal : 反应体系为 25 μ L, 10 \times Sal Buffer 2.5 μ L, pET-30a-c(+) vector(20 ng/ μ L) 5 μ L, Sal (10 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 16.5 μ L 混匀,37 15 h,65 20 min 灭活。IF 基因 PCR 产物经 Sal 酶切后生成 IF/Sal : 反应体系为 25 μ L, 10 \times Sal Buffer 2.5 μ L, IF PCR Products(25 ng/ μ L) 4 μ L, Sal (10 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 17.5 μ L, 混匀,37 15 h,65 20 min 灭活。酶切产物进行回收、纯化。

1.2.3 Sal 单酶切产物的 BamH 单酶切 纯化的 pET/Sal 载体框和 IF/Sal 产物经定量后分别进行 BamH 酶切。pET/Sal 载体的 BamH 酶切反应:反应体系为 25 μ L, 10 \times BamH Buffer 2.5 μ L, BSA(1 g/L) 0.25 μ L, pET/Sal vector(20 ng/ μ L) 6 μ L, BamH (20 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 15.25 μ L, 混匀,37 15 h,65 20 min 灭活。IF/Sal PCR 产物的 BamH 酶切反应:反应体系为 25 μ L, 其中 10 \times BamH Buffer 2.5 μ L, BSA(1 g/L) 0.25 μ L, IF/Sal PCR products (25 ng/ μ L) 5 μ L, BamH (20 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 16.25 μ L, 混匀,37 15 h,65 20 min 灭活。IF/Sal 和 pET/Sal 的 BamH 酶切产物的回收、纯化同上。

1.2.4 双酶切产物的连接和转化 纯化的 pET-30a-c(+)双酶切载体与 IF 双酶切 PCR 产物按其摩尔比 1:12 混合,建立 20 μ L 的连接反应体系。10 \times T4 DNA Ligase Buffer 2 μ L, IF 双酶切 PCR 产物 3 μ L, pET 双酶切载体(50 ng) 1 μ L, T4 DNA Ligase (3 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 13 μ L, 混匀,22 6 h,65 10 min。常规氯化钙法制备 BL21(DE3)细菌感受态,连接产物的转化和筛选按文献[4]进行。重组质粒扩增后抽提质粒 DNA 直接电泳。重组质粒 DNA 为模板,以 ET-IF P1 BamH 和 ET-IF P2 Sal 为引物进行 PCR 扩增,反应条件同上。质粒的双酶切鉴定:反应体系为 50 μ L,其中 10 \times BamH Buffer 5 μ L, BSA 0.5 μ L, BamH 2 μ L, Sal 2 μ L, pET-IF(30 ng/ μ L) 8 μ L, ddH₂O 32.5 μ L 混匀,37 过夜,65 20 min 灭活,双酶切产物行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并摄像记录。同时阳性重组质粒送上海博亚公司进行核苷酸序列测定。

1.3 重组质粒 pET-IF 在 BL21(DE3)中的诱导表达

以空质粒 pET-30a-c(+) 的 BL21(DE3) 表达菌株为阴性对照, 进行 pET-IF 的融合表达。将 -70 质粒表达菌株划线接种在 LB/Kan 平板上, 37 °C 倒置培养过夜, 挑取单克隆转接入 3 mL LB/Kan 培养液, 37 °C 280 r/min 振荡培养 12~16 h, 1 100 转接入新鲜 LB/Kan 培养液, 37 °C 280 r/min 振荡培养 2.5~3 h, 至 $A_{600}=0.5-0.7$ 。留取 1 mL 菌液作为诱导前样品, 吸取若干份 1 mL 菌液加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 30 °C 280 r/min 诱导表达, 对照组于诱导后 4 h 留取样品, 融合表达菌液分别于诱导后每隔 1 h 留取 1 份 1 mL 菌液样品, 留取至 8^h。

1.4 pET-IF 表达产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 鉴定

留取表达样品 13 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 加入 100 μ L 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液重悬裂解, 煮沸 5 min, 13 000 r/min 离心 1 min 行 SDS-PAGE, 按预定顺序各加样 15 μ L, 电泳结束后一块凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色并记录结果, 另外一块凝胶在冰浴下 100 V 电压下转印 NC 膜 1 h, 描记 Marker 泳带, 余下泳带置 50 g/L 脱脂奶粉 4 轻缓振荡过夜封闭, 取出 NC 膜, 于室温 PBST 洗膜 3~5 次, 每次 5 min, 泳条分别用抗 6 \times His 抗体 (1 1 000 稀释) 和大鼠感染血清 (1 100 稀释) (已经大肠杆菌预吸附) 置脱色摇床 37 °C 轻缓振荡结合 1~2 h, 取出 NC 膜, 室温 PBST 洗膜 3~5 次, 每次 5 min, 置兔抗小鼠 IgG-HRP 溶液 (1 300 稀释) 37 °C 轻缓振荡结合 1~2 h, 取出 NC 膜, 室温 PBST 洗膜 3~5 次, 每次 5 min, DAB 显色, 记录图像。

1.5 重组蛋白的可溶性分析

配备菌体裂解缓冲液: 50 mmol/L NaH_2PO_4 、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L 咪唑、pH 8.0。将少量诱导表达的菌液以及未诱导表达的对照菌液各取 1 mL, 分别 13 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入菌体裂解液缓冲液 25 mL, 重新悬浮细胞沉淀, 加入新鲜配制的溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL, 冰上放置 30 min, 冰上超声破菌 (输出 80 W, 强度 40 %, 超声 1 s, 停 2 s, 超声 4 min), 10 000 r/min 离心 10 min, 可溶性上清液和不溶性沉淀经裂解后行 SDS-PAGE 电泳。

1.6 表达蛋白的 His 亲和层析纯化

将表达质粒按上述方法大量表达后收集菌体超声裂解, 留取蛋白裂解上清液进行 His 亲和层析纯化。将 4 保存的 Ni-NTA His-Bind Resin 平衡

至室温并充分悬匀, 将 2.5 mL 加入空柱, 弹除气泡, 开放出口滤出乙醇储存液, 再加入 15 mL 无菌去离子水洗涤, 加入 12 mL 蛋白结合缓冲液使 Resin 具有吸附能力, 逐渐加入蛋白裂解上清液, 液体流尽后, 加入 4 mL 蛋白纯化清洗缓冲液清洗, 重复 1 次后, 加入 0.5 mL 蛋白纯化洗脱缓冲液, 洗脱 8 次, 分管收集, 每管取 5 μ L 加入 10 μ L 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色并记录结果。

1.7 生物信息学分析

为了解 IF 蛋白的结构和功能关系, 登陆网站, 在线进行蛋白理化性质、一级、二级结构和亲水性分析, 用 SWISS-MODEL Protein Modelling 软件进行蛋白三级结构分析。

2 结 果

2.1 原核表达载体 pET-IF 的构建

特异性抗原候选基因 IF 与噬菌体载体 TriplEx2 重组成为 TriplEx2-IF, 经 PCR 引物 (引入了 Sal 和 Bam H 限制性酶切位点) 扩增出片段长度和序列与目的基因相符的 PCR 产物, 双酶切后将其定向亚克隆入原核表达载体 pET-30a-c (+) 构建为重组质粒 pET-IF, 经质粒直接电泳、PCR 扩增, 单酶切、双酶切和核苷酸序列测定证实 IF 基因按正确的读码框和方向亚克隆入了 pET-30a-c (+) 表达载体多克隆位点, IF 基因 5 端连接 6 个组氨酸编码序列 (6 \cdot His), 终止密码子为 IF 基因的终止密码, pET-IF 按预定设计成功克隆。

2.2 pET-IF 原核表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

纯化的 pET-IF 以氯化钙方法转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 进行诱导表达, 表达目的蛋白的最适诱导条件为 1 mmol/L 的 IPTG 30 °C 诱导表达 6 h。诱导后的表达产物经 SDS-PAGE 检测, 重组质粒 pET-IF 表达蛋白谱明显增加一条蛋白条带, 在未经 IPTG 诱导的空质粒 pET 和重组 pET-IF 均未见该条带, 该条带位于 $M_r=45\ 000$ 和 $M_r=66\ 000$ 之间, 与生物信息学推测的目的融合蛋白相对分子质量 $M_r=48\ 000$ 相符, 重组质粒 pET-IF 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中成功表达出目的蛋白。pET-IF 的融合表达产物以可溶性表达为主, 目的蛋白占菌体可溶性总蛋白的 23 %, 纯化后蛋白纯度可达 82.26 %。pET-IF 的鉴定结果如图 1。

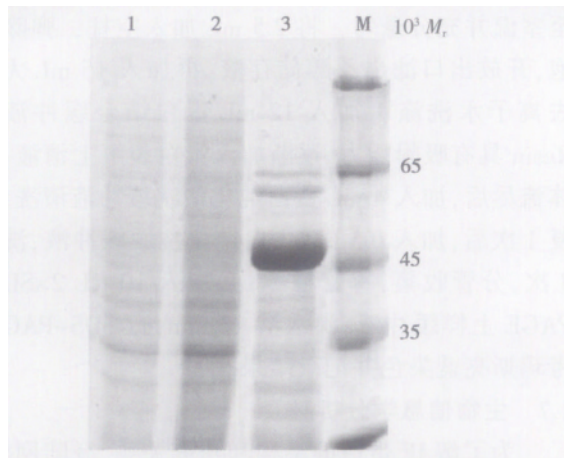


图 1 pET-IF 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Analysis of insoluble and purified soluble pET-IF expression products

1: pET induced; 2: pET-IF uninduced; 3: purified soluble pET-IF expression products; M: protein molecular marker

2.3 pET-IF 表达产物的 Western blot 鉴定

pET-IF 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达产物经 SDS-PAGE 转印到硝酸纤维素膜上, Western blot 鉴定目的蛋白均能被抗 6×His 单克隆抗体和大鼠感染血清识别, 证明融合表达蛋白表达了 6×His 标签和抗原 IF 蛋白, 是为融合表达。pET-IF 的融合表达产物同时具有与大鼠感染血清中抗体结合的能力, 保持了 IF 的抗原性。Western blot 鉴定结果见图 2。

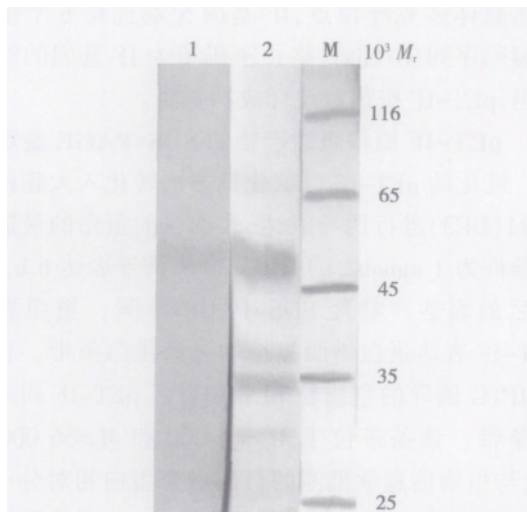


图 2 pET-IF 融合表达产物的 Western blot 鉴定

Fig. 2 Identification of the pET-IF fusion protein by Western-blot

1: identified by anti-His monoclonal antibody; 2: identified by rat antiserum; M: protein ladder

2.4 抗原 IF 的生物信息学分析

ProtParam tool 分析推导氨基酸半衰期在哺乳动物红细胞为 1 h, 在酵母内为 30 min, 而在大肠杆菌中大于 10 h, 这一特性保证了 IF 蛋白在有效的原核表达时间内保持稳定并达到在丰度表达(6 h), 从理论上保证了 IF 原核表达体系的成功构建。二级结构分析, IF 具有 α -螺旋和 β -折叠, EMBL 的 smart 分析具有 2 个螺旋(coiled-coil) 结构, 分别位于第 1-76 和 6-247 位氨基酸之间, 构成了中间纤维的 1 区和 2 区。绘出 IF 的结构简图包括 L1-1B-L12-2A-L2-2B-尾部(图 3), 该结果表明, 研究所获得的 IF 基因正确编码出中间纤维的特征结构, 并具有完整的羧基端。在线经 ExPASy 分析 IF-cDNA 推导氨基酸的疏水性结果表明存在多个亲水性区域, 说明 IF 具有多个抗原表位。三级结构分析, 本研究获得的 IF 经 SWISS-MODEL Protein Modelling 模型构建结果如图 4, IF 的三级结构包括了折叠集中的球部和明显线性结构的尾部, 符合中间纤维家族蛋白三级结构。

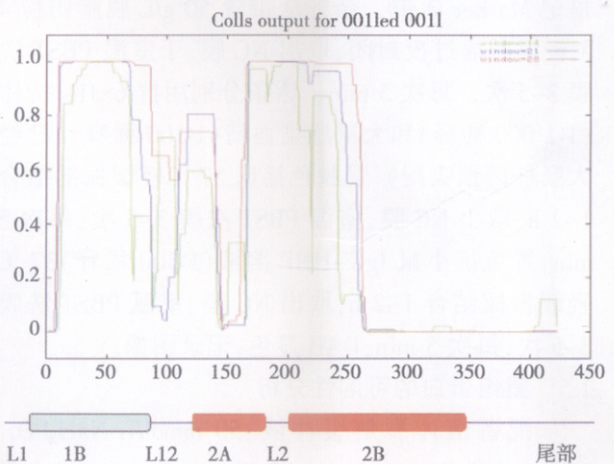


图 3 IF 的二级结构分析及结构图绘制

Fig. 3 The secondary structure analysis of IF



图 4 IF 的三级结构分析

Fig. 4 The tertiary structure analysis of IF

3 讨 论

广州管圆线虫病成为近年来严重威胁人类健康的新发传染病。广州管圆线虫三期幼虫通过螺和蜗牛等软体动物或污染蔬菜而经消化道感染人体, 引起人的广州管圆线虫病, 临床主要表现为药物难以控制的剧烈头痛等神经系统损害, 因此常被误诊为细菌性或病毒性脑膜炎或脑膜脑炎^[5], 该病具有较高的病死率和致残率。但目前广州管圆线虫病的诊断尚缺乏有效的检测手段, 主要原因是至今未能获得用于诊断的理想抗原。

很多学者力求通过分离的虫体蛋白组分来寻找广州管圆线虫特异性的诊断抗原, 如 Maleewong 等^[6]纯化出的 $M_r=29\ 000$, Eamsobhana 等^[7]纯化的 $M_r=31\ 000$ 、Wongkham 等^[8]纯化的 $M_r=315\ 000$ 和李华等^[9, 10]纯化的 $M_r=320\ 000$ 和 $M_r=330\ 000$ 都证实广州管圆线虫的检测中具有较高的敏感性和特异性, 但不同学者用相同的方法却得到的相对分子质量上非常相近的抗原蛋白, 这些不同实验室得到的理想的抗原分子是不同蛋白还是相同蛋白, 无法证实也难以重复, 因为直接分离虫体蛋白组分的方法具有很大的局限性, 尚不能明确获得蛋白的氨基酸序列或核酸编码序列。为获得明确的特异抗原, 本研究从功能基因的筛选着手, 获得了 IF 特异性抗原基因及其表达蛋白, 其性质明确并可大量稳定表达, 重组载体 pET-IF 经大肠杆菌表达, IF 蛋白以可溶性表达为主, 占菌体可溶性总蛋白的 23%, 纯化后可得 82% 的纯度, 能满足诊断抗原的制备需求, 也可以用于疫苗的研究。与虫体蛋白组份分离的研究策略相比优点更加突出, 这为广州管圆线虫的免疫机制研究和免疫诊断奠定了良好的前期工作基础。

本研究在前期工作中构建了广州管圆线虫成虫噬菌体文库, 经免疫筛选获得了抗原基因 IF, 该 cDNA 片段长 1 510 bp, 推测氨基酸序列长 371 aa, 生物信息学分析属中间纤维家族蛋白, 筛选实验表明该基因表达蛋白有较好的特异性, 可望成为广州管圆线虫候选诊断抗原和疫苗候选分子。为进一步确定该基因表达产物的理化性质, 并建立一套能够大量并有效表达该抗原的表达系统, 特进行了该基因的亚克隆, 融合蛋白的表达、鉴定和生物信息学的深入分析。本研究构建了抗原 IF 的原核表达

载体 pET-IF, 经体外诱导表达, 表达产物为目的蛋白, 并能被大鼠感染血清所识别, 表达产物较好地保留了原目的蛋白的抗原性, 为利用该表达产物制备诊断抗原和进一步研究抗原 IF 的特性奠定了基础。分析抗原 IF 的结构和功能的关系, IF 的氨基酸序列编码的结构在原核中具有较长的半衰期 (10 h), 因此本研究中构建的表达体系可以制备出表达量、纯度和抗原性理想的目的蛋白。分析二、三级结构, 抗原 IF 具有典型的中间纤维家族蛋白结构, 形成了较完整的空间构象, 确保了目的蛋白的稳定性。亲水性分析表明抗原 IF 存在多个亲水基团, 表明抗原 IF 具有多个抗原表位, 尤其是在“尾部”, 因为“尾部”为多变区, 因此推测抗原 IF 的特异性来自于“尾部”, 这为进一步优化和利用该抗原提供了依据。

pET-IF 重组原核表达载体的构建和表达大大简化了获取目的蛋白的操作, 并保证目的蛋白的生物活性。pET-30a-c(+) 在氨基酸和羧基端各带有由 6 个组氨酸编码基因组成的组氨酸标签 (6×His Tag), 本研究中构建的重组 pET-IF 保留了氨基端的组氨酸标签, 终止密码子采用的是 IF 基因读码框的终止密码子, 融合表达蛋白不带有羧基端 6×His 标签, 根据融合表达蛋白羧基端的组氨酸可以被抗 6×His 抗体识别并结合的特性, IF 基因的融合表达蛋白就可以用抗 6×His 抗体鉴定和纯化出来。IF 融合蛋白带有的 6×His 标签相对分子质量 $M_r=0.84 \times 10^3$, 与谷胱甘肽转移酶 (GST) 融合表达载体^[11] 的 GST 标签 ($M_r=26.8 \times 10^3$) 相比, 由于其分子远远小于目的蛋白 IF ($M_r=48 \times 10^3$), 在 SDS-PAGE 和 Western blot 的鉴定中可以忽略不计。组氨酸为蛋白中的稀有氨基酸, 只占氨基酸总量的 2%, 组氨酸连续排列现象在蛋白中则更为少见, 抗 6×His 抗体与蛋白 IF 无交叉反应。另外, 6×His 的简单序列也不会影响 IF 蛋白的功能, 对 IF 蛋白的功能进行研究时也不用切除标签蛋白, 从而避免了因标签蛋白切除不充分或非特异酶切造成的对蛋白研究的影响。

参考文献:

- [1] CHEN X G, LI H, LUN Z R. Angiostrongyliasis, Mainland China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(10): 1645-1647.
- [2] POLLEY L. Navigating parasite webs and parasite flow: emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife

- origin[J]. *Int J Parasitol*, 2005, 35(11-12):1279-1294.
- [3] 孟锦绣, 李卓雅, 詹希美, 等. 广州管圆线虫成虫 cDNA 文库抗原基因的筛选[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(11):17-20.
- [4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning. a laboratory manual* [M]. Vol 2. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:55-56.
- [5] HELBOK R, PONGPAKDEE S, YENJUN S, et al. Chronic meningitis in Thailand. Clinical characteristics, laboratory data and outcome in patients with specific reference to tuberculosis and cryptococcosis [J]. *Neuroepidemiology*, 2006, 26(1):37-41.
- [6] MALEEWONG W, SOMBATSAWAT P, INTAPAN P M, et al. Immunoblot evaluation of the specificity of the 29-kDa antigen from young adult female worms *Angiostrongylus cantonensis* for immunodiagnosis of human angiostrongyliasis [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2001, 19(4):267-273.
- [7] EAMSOBHANA P, YOOLEK A, SUVOUTTHO S, et al. Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrostrongylus cantonensis* antigen by electroelution from SDS-polyacrylamide gels[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2001, 32(2):308-313.
- [8] WONGKHAM C, MALEEWONG W, INTAPAN P, et al. Partially purified antigens of *Paragonimus heterotremus* for serodiagnosis of human paragonimiasis[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1994, 25(1):176-180.
- [9] 李华, 陈晓光, 沈浩贤, 等. 不同发育阶段广州管圆线虫的抗原分析[J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2005, 23(1):36-39.
- [10] ZHAO X C, GU J B, LI H, et al. Screening and identification of therapeutic effect evaluation antigens of angiostrongyliasis [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(3):284-286, 289.
- [11] 肖刚, 张文敏, 张萌, 等. *MAGE-3* 基因的表达、纯化及其抗血清的制备[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(2):176-179.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 609 页 from page 609)

- [9] AKHTAR M, WU G F, DU Z M, et al. Effect of external counterpulsation on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels[J]. *Am J Cardiol*, 2006, 98(1):28-30.
- [10] 刘磊, 伍贵富, 周少春, 等. 体外反搏对犬血流脉动性和血管阻力的影响[J]. *生物医学工程学杂志*, 2002, 19(2):196-199.
- [11] 钱孝贤, 郑振声, 吴伟康, 等. 体外反搏对心肌梗死犬一氧化氮系统的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16(11):1217-1220.
- [12] 蒋涛, 顾熊飞, 马润泉, 等. 体外反搏治疗失血性休克中一氧化氮合酶的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 1998, 14(3):243-245.
- [13] WU G F, DU Z M, ZHENG Z S. A neurohormonal mechanism for the effectiveness of enhanced external counterpulsation[J]. *Circulation*, 1999, 100(18-S1):1-832.
- [14] 伍贵富, 郑振声, 张苗青. 体外反搏对冠心病血管内皮细胞功能的影响[J]. *国际心血管杂志*, 1999, 1(1):32-35.
- [15] 张焰, 何小洪, 陈小林, 等. 体外反搏对高胆固醇血症猪动脉粥样硬化病理形态及核因子 B 表达的影响[J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(3):159-164.
- [16] 陈小林, 何小洪, 张焰, 等. 慢性体外反搏对高胆固醇血症猪动脉内皮细胞的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(12):1491-03.
- [17] 何小洪, 张焰, 陈小林, 等. 长期体外反搏对高胆固醇血症猪血管内皮细胞的保护作用及机制[J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(10):730-733.
- [18] 陈燕铭, 钱孝贤, 吴伟康, 等. 体外反搏对心肌缺血犬血流动力学的影响及内皮素机制的探讨[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(12):2350-2353.
- [19] 陆丽, 吴伟康, 郑振声. 蛋白激酶 C 在体外反搏保护缺血心肌中作用的实验研究[J]. *广州医学院学报*, 2003, 31(2):32-34.
- [20] 陆丽, 吴伟康, 郑振声, 等. 对心肌缺血与体外反搏时血管紧张素转换酶的研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2003, 22(3):168-171.
- [21] 陆丽, 吴伟康, 郑振声, 等. 局部肾素-血管紧张素系统在反搏治疗心肌缺血时的改变及其机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(6):646-649.
- [22] 陆丽, 郑振声, 吴伟康, 等. 体外反搏对心肌缺血时血管紧张素转换酶的抑制作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29(12):761-764.
- [23] 陆丽, 郑振声, 伍贵富, 等. 冠心病患者体外反搏治疗时血管紧张素系统与指脉的关系[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(4):446-448.
- [24] 钱孝贤, 陈燕铭, 陈璘, 等. 体外反搏对心肌梗死犬一氧化氮和 cGMP 的作用[J]. *中华中西医杂志*, 2001, 2(3):205-207.

(编辑 张敏瑞)