

# 猪链球菌细胞壁蛋白 SSU05\_1000 的表达、纯化及活性分析

王 涛<sup>1,2</sup>, 郑玉玲<sup>2</sup>, 袁 媛<sup>2</sup>, 江 华<sup>2</sup>, 郝淮杰<sup>3</sup>, 李雪琴<sup>2</sup>, 姜永强<sup>1,2</sup>

**摘要:**目的 构建猪链球菌细胞壁蛋白 SSU05\_1000 基因的重组表达质粒, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中高效表达, 并研究其对细胞间紧密连接的调控作用。方法 以 05ZYH33 基因组为模板设计引物, 构建 pET30a-SSU05\_1000 重组表达质粒, 转化到大肠杆菌中诱导表达, 用镍亲和层析的方法对目的蛋白进行纯化, Western blot 检测其对人脑微血管内皮细胞紧密连接的调控。结果 构建的 SSU05\_1000 重组表达质粒能够在大肠杆菌中高效表达, 纯化的 SSU05\_1000 蛋白纯度达 90% 以上, Western blot 结果显示其与人脑微血管内皮细胞(hCMEC/D3) 相互作用后, 可以下调细胞间紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达。结论 SSU05\_1000 蛋白能够破坏人脑微血管内皮细胞的紧密连接结构, 提示其在猪链球菌穿血脑屏障(BBB, blood-brain barrier) 过程中起重要作用。

**关键词:**猪链球菌; SSU05\_1000; 紧密连接

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)08-0757-05

## Expression, purification and activity assay of *Streptococcus suis* cell wall protein SSU05\_1000

WANG Tao<sup>1,2</sup>, ZHENG Yu-ling<sup>2</sup>, YUAN Yuan<sup>2</sup>, JIANG Hua<sup>2</sup>,  
HAO Huai-jie<sup>3</sup>, LI Xue-qin<sup>2</sup>, JIANG Yong-qiang<sup>1,2</sup>

(1. Anhui Medical University, Graduate Department, Hefei 230032, China;

2. State key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology,  
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

3. Key Laboratory of Pathogen and Immunology, Institute of Microbiology,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**ABSTRACT:** The role of recombinant SSU05\_1000 protein on the regulation of tight junctions is investigated in this study. The SSU05\_1000 gene was amplified using the primers designed according to 05ZYH33 genome sequences and cloned to the expression vector pET30a to construct recombinant plasmid. The plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced to express by IPTG. The recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography. Results showed that the recombinant expression plasmid could be highly expressed in *E. coli* and the purity of recombinant SSU05\_1000 protein was above 90%. The purified protein was then treated with Triton X-114 to remove the contamination of endotoxin. Then, the human brain microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) were treated by SSU05\_1000 for different time and tested the expression of tight junctions by Western blot. The Western blot results show that SSU05\_1000 could down-regulate the expression of tight junction protein Claudin-5 in hCMEC/D3, which indicates that SSU05\_1000 protein might play important role on the traversal of *S. suis* across the human blood-brain barrier.

**KEY WORDS:** *Streptococcus suis*; SSU05\_1000; tight junction

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171528)

Corresponding author: Jiang Yong-qiang, Email: jiangyq710327@gmail.com

国家自然科学基金项目(No. 81171528)资助

通讯作者:姜永强, Email: jiangyq710327@gmail.com

作者单位:1. 安徽医科大学研究生学院, 合肥 230032;

2. 军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物

安全国家重点实验室, 北京 100071;

3. 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实

验室, 北京 100101

猪链球菌是革兰阳性球菌, 兼性厌氧, 是一种新发的人兽共患病病原体<sup>[1]</sup>。根据其荚膜多糖抗原性的不同分为 35 种血清型(1-34 型、1/2 型), 其中猪链球菌 2 型致病最强, 流行最广。自 1968 年丹麦首

次报道人感染猪链球菌病例<sup>[2]</sup>,猪链球菌感染被认为散发病。但是,1998 和 2005 年分别在我国江苏和四川地区暴发了大规模猪链球菌感染,共造成 200 多人感染和 50 多人死亡,给我国养猪业造成重大损失并对公共卫生安全造成了严重的威胁<sup>[3]</sup>。猪链球菌感染后主要引起脑膜炎、肺炎、多浆膜炎、心内膜炎、关节炎、败血症及猝死<sup>[4]</sup>,其中脑膜炎是最常见的临床症状。

目前,人感染猪链球菌致脑膜炎的致病机制仍不是非常清楚<sup>[5]</sup>,其中细菌如何穿过血脑屏障到达中枢神经系统(CNS)是引起脑膜炎的关键。致脑膜炎细菌穿血脑屏障主要有 3 种途径:跨细胞转移;细胞旁转移;特洛伊木马模型<sup>[6]</sup>。目前研究发现,猪链球菌血清 2 型不太可能通过跨细胞的途径穿过 BBB<sup>[7]</sup>。猪链球菌血清 2 型是胞外致病菌,其重要的毒力因子荚膜多糖能有效抵抗单核细胞<sup>[8]</sup>、中性粒细胞<sup>[9]</sup>和巨噬细胞的吞噬<sup>[10]</sup>,因此猪链球菌血清 2 型也不太可能通过特洛伊木马模型穿过 BBB。最近研究发现<sup>[11-12]</sup>,致脑膜炎细菌可以通过破坏紧密连接从而穿过 BBB。紧密连接在维持上皮和内皮细胞屏障功能中起重要作用,因此研究紧密连接对揭示脑膜炎的致病机制具有重要意义。

前期我们通过蛋白质组学研究发现:SSU05\_1000 是一种新的 2 型猪链球菌细胞壁蛋白<sup>[13]</sup>,具有较强的免疫原性,推测其在猪链球菌感染过程中发挥重要作用,但具体的生物学功能并不清楚。本研究旨在构建 SSU05\_1000 重组表达质粒,获得高纯度的重组表达蛋白,并研究其对 hCMEC/D3 紧密连接的调控作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** *Bam*H I、*Xho* I 内切酶购自 TaKaRa, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, PCR 引物(PF: 5'-CG GGATCC GGTGGTGGTATGAACCAAGTCG-GCTATGATGC-3', PR: 5'-CCG CTCGAG AAT-GATACGTGAATATGGGTTGACA-3')由上海生工生物工程有限公司合成, 表达载体 pET-30a(+)购自 Novagen 公司, 大肠杆菌 BL21(DE3)为本室保存, Ni-NTA 柱购自 GE 公司, 显色基质鲎试剂盒购自厦门市鲎试剂试验场有限公司, 人脑微血管内皮细胞系 HCMEC/D3 由法国国家医学卫生研究院 Pierre-Olivier Couraud 教授馈赠, 胎牛血清 Gibco, EBM-2(lonza)购自北京中科锐进科技有限责任公司, Mouse anti-Claudin-5 购自 Invitrogen 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体购自中

杉金桥。

### 1.2 方法

**1.2.1 SSU05\_1000 重组表达质粒的构建** 以 05ZYH33 基因组为模板, 以 PF、PR 为引物, 扩增 SSU05\_1000 基因。PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环。PCR 产物经 *Bam*H I、*Xho* I 酶切后连接到表达载体 pET-30a(+), 通过化学转化将质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中。通过菌落 PCR 筛选阳性克隆并提取质粒进行酶切和测序鉴定。

**1.2.2 SSU05\_1000 蛋白的表达** 将含有重组蛋白基因表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)接种到含有卡那霉素(50 μg/mL)抗性的 LB 中, 待细菌生长到  $A_{600}$  0.8 左右时, 加入 IPTG(终浓度 1 mmol/L)并继续培养 4~5 h, 离心集菌, 然后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

**1.2.3 SSU05\_1000 蛋白的纯化** 离心后的菌体用蛋白纯化 A 液(5 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PB), pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 25 mmol/L 咪唑)重悬, 冰上将菌体超声破碎, 目的蛋白为上清表达, 12 000 r/min 离心 15 min, 上清用 A 液稀释后经 0.45 μm 滤膜抽滤去除杂质, 上样于 A 液平衡过的 Ni-NTA 柱, 上样结束后, 用蛋白纯化 B 液(5 mmol/L PB, pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol 咪唑)线性洗脱, SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。

**1.2.4 TritonX-114 去除重组 SSU05\_1000 蛋白中的 LPS** LPS 作用于内皮细胞可以提高一氧化氮合酶 mRNA 的水平, 增加胞内一氧化氮的释放, 一氧化氮会破坏紧密连接蛋白的结构<sup>[14]</sup>。TritonX-114 可以去除 LPS, 主要操作过程如下: TritonX-114 以终体积 1% 加入到纯化的蛋白中, 4 °C 持续搅拌 30 min, 37 °C 水浴孵育 10 min, 25 °C, 20 000 × g 离心 10 min 后取上清, 此操作至少重复 3 次<sup>[15]</sup>。

**1.2.5 鲎试剂检测蛋白中 LPS 含量** 按照显色基质鲎试剂盒说明书操作步骤: 取无热原试管, 加入 100 μL 细菌内毒素检查用水、内毒素标准溶液, 或供试品。再加入 100 μL 鲎试剂溶液, 混匀, 37 °C 温育 45 min。温育结束, 加入 100 μL 显色基质溶液, 混匀, 37 °C 温育 6 min。温育结束, 依次加入 3 种偶氮化试剂, 混匀, 静置 5 min, 于 545 nm 波长处读取吸光度值。

**1.2.6 Western blot 检测 SSU05\_1000 对人脑微血管内皮细胞系(hCMEC/D3)紧密连接的调控** hCMEC/D3 经 0.25% 胰酶消化后, 以 1~2 × 10<sup>5</sup>

个/mL 铺于 0.01% 鼠尾胶原包被过的 6 孔板, 培养 48 h 至形成紧密的单层细胞后, 加入终浓度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的重组蛋白, 分别作用 0, 1, 3, 6 h 后吸出培养基, 预冷的 PBS 洗一遍, 加入 100  $\mu\text{L}$  细胞裂解液冰上裂解 15 min, 细胞刮刀刮下细胞, 收集细胞悬液 14 000  $\times g$ , 10 min 离心后收集上清, NanoDrop 2000 进行蛋白定量。SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上, 以 mouse-anti-Claudin-5 作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体作为二抗孵育 PVDF 膜, 最后加入化学发光显色液, 于化学发光成像仪(Bio-rad ChemiDoc XRS)下观察。

**1.3 数据处理** EXCEL2003 建立数据库, GraphPad Prism 5 进行统计分析, 计量单位采用 t 检验。

## 2 结 果

**2.1 SSU05\_1 000 重组表达质粒的构建及鉴定** 以 05ZYH33 基因组为模板, 以 PF、PR 为引物 PCR 扩增 SSU05\_1 000 基因, 如图 1 所示, 在 1 300 bp 左右出现特异性扩增条带, 大小同预期的结果相符。SSU05\_1 000 基因的 PCR 回收产物和 pET-30a(+) 质粒分别用 *Bam*H I、*Xho* I 内切酶双酶切后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 获得重组质粒。并将其转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 通过菌落 PCR 鉴定筛选阳性克隆并提取质粒。阳性克隆用 *Bam*H I、*Xho* I 内切酶双酶切进行鉴定, 如图 2 所示, 在 1 300 bp 左右出现目的条带, 测序结果(未显示)表明重组质粒中 SSU05\_1 000 基因序列完全正确。

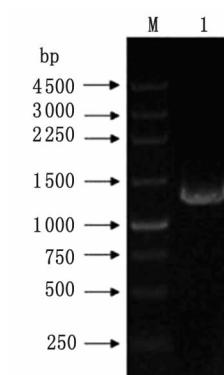


图 1 SSU05\_1000 基因 PCR 扩增产物的凝胶电泳

**Fig. 1 SDS-PAGE on PCR product of SSU05\_1000 gene**

M: DNA marker; 1: Amplification product of SSU05\_1000 gene

**2.2 SSU05\_1 000 蛋白的表达纯化** 将含有 SSU05\_1 000 基因表达质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 接种到卡那霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 抗性的 LB 液体

培养基中, 诱导表达后离心集菌弃上清, 菌体重悬后冰上超声, SDS-PAGE 电泳显示为上清表达, 结果见图 3。将上清等体积稀释, 镍柱亲和层析纯化, SDS-PAGE 电泳显示蛋白纯度在 90% 以上, 见图 4。

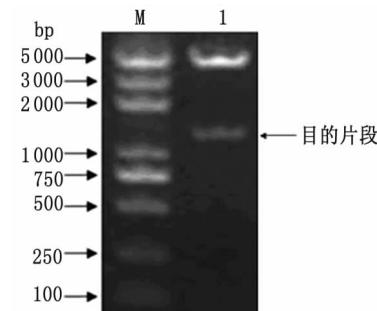


图 2 SSU05\_1000-pET30a(+) 重组表达质粒的酶切鉴定

**Fig. 2 Restriction endonuclease digestion of the recombinant expression plasmid SSU05\_1000-pET30a (+)**

M: DNA marker; 1: Double digestion of recombinant plasmid SSU05\_1000-pET30a (+)

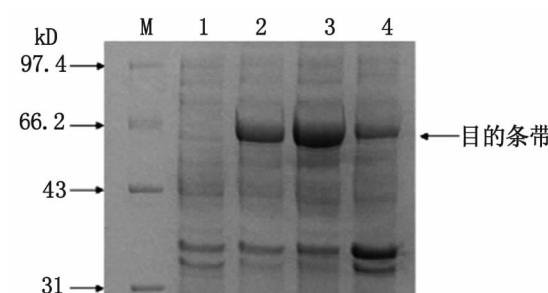


图 3 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白诱导前、后的表达

**Fig. 3 SDS-PAGE of the expression of recombinant protein before and after induction**

M: Protein marker; 1: Lysate of whole bacteria before induction; 2: Lysate of whole bacteria after induction with IPTG; 3: Supernatant of the bacteria lysate; 4: Pellet of the bacteria lysate.

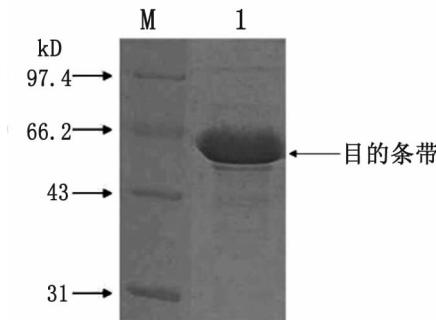


图 4 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白的纯化

**Fig. 4 SDS-PAGE of the purified recombinant protein**

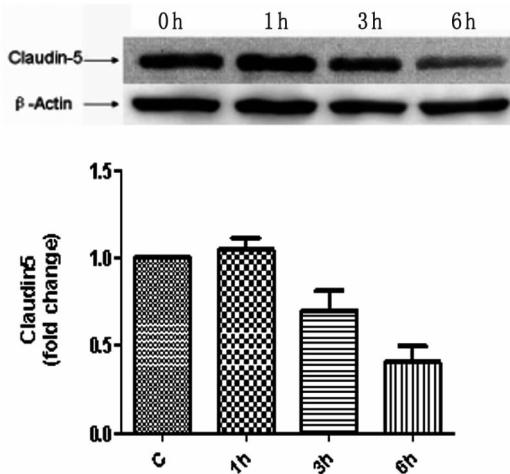
M: Protein marker; 1: SSU05\_1 000 protein

**2.3 TritonX-114 去除重组 SSU05\_1 000 蛋白中**

的 LPS 经方法中操作步骤去除 LPS 操作后, 离心得到的上清即为目的蛋白。

**2.4 猪试剂检测重组 SSU05\_1 000 蛋白中 LPS 含量** 按照显色基质试剂盒操作步骤检测纯化后的 SSU05\_1 000 蛋白中 LPS 的含量, 检测结果显示, 经 TritonX-114 处理后 SSU05\_1 000 蛋白中 LPS 含量  $< 0.02 \text{ EU/mL}$ , 达到实验要求, 可以用于下一步实验。

**2.5 Western blot 检测 SSU05\_1 000 对 hCMEC/D3 的紧密连接调控** 待 6 孔板中的 hCMEC/D3 细胞形成紧密的单层细胞后, 加入去除 LPS 的 SSU05\_1 000 蛋白(终浓度  $2 \mu\text{g/mL}$ ), 分别作用 0, 1, 3, 6 h 后, 提取细胞总蛋白, NanoDrop 2 000 定量, SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上, 孵育一抗、二抗后显影。结果显示, SSU05\_1 000 蛋白与 hCMEC/D3 作用后, 随着作用时间的延长, 细胞的紧密连接蛋白 Claudin-5 灰度值减弱, 提示 Claudin-5 表达下调, 血脑屏障的完整性被破坏, 见图 5。



**图 5 Western blot 检测 SSU05\_1000 蛋白与 hCMEC/D3 作用后紧密连接的变化情况**

**Fig. 5 Western blot of the level changes of tight-junction after the interaction of SSU05\_1000 protein and hCMEC/D3**

### 3 讨 论

BBB 主要由脑微血管内皮细胞(BMEC)、星形胶质细胞和周细胞组成, BMEC 是其中最重要的组成部分。内皮细胞屏障功能依赖细胞间结合部的完整性, 主要通过胞间的粘着连接、紧密连接和桥粒连接在一起<sup>[16]</sup>。紧密连接主要密封相邻细胞基底外侧膜最顶端膜间的缝隙, 主要由 Claudin、Occludin 和连接粘附分子(JAM)组成<sup>[17]</sup>。Claudin 家族包括 26 个成员, 只有 Claudin-5 在全部器官的内皮细胞有表达<sup>[18]</sup>, 是内皮细胞紧密连接重要组成部分<sup>[19]</sup>。

Claudin-5 的降解与表皮微血管通透性的升高密切相关<sup>[20]</sup>。抑制人脐经脉内皮细胞 Claudin-5 的表达, 会降低细胞的跨膜电阻<sup>[21]</sup>。在急性肺损伤小鼠模型中, 提高 Claudin-5 水平后, 可以观察到小鼠对血管渗漏出现抵抗作用<sup>[22]</sup>, 提示 Claudin-5 对调节内皮通透性极其重要。

本研究使用镍柱亲和层析得到纯度较高的重组 SSU05\_1000 蛋白。蛋白与 hCMEC/D3 相互作用后提取细胞总蛋白进行 Western blot, 结果显示 SSU05\_1000 与 hCMEC/D3 作用后可以下调细胞间紧密连接蛋白 Claudin-5 的水平, 提示猪链球菌很可能通过下调 Claudin-5, 破坏细胞间的紧密连接, 导致通透性升高, 从而有助于猪链球菌通过细胞旁通路进入中枢神经系统。

### 参 考 文 献:

- [1] Feng Y, Zhang H, Ma Y, et al. Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent[J]. Trends Microbiol, 2010, 18(3): 124-131. DOI: 10.1016/j.tim.2009.12.003
- [2] Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K. Group R streptococci pathogenic for man: two cases of meningitis and one fatal case of sepsis[J]. Acta Pathol Scand, 1968, 74(1): 69-76. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1968.tb03456.x
- [3] Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America[J]. Anim Health Res Rev, 2007, 8(1): 29-45. DOI: 10.1017/S1466252307001247
- [4] Okwumabua O, O'Connor M, Shull E. A polymerase chain reaction(PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 218(1): 79-84. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01072-9
- [5] Gottschalk M, Xu J, Calzas C, et al. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen[J]. Future Microbiol, 2010, 5(3): 371-391. DOI: 10.2217/fmb.10.2
- [6] Kim KS. Microbial translocation of the blood-brain barrier[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(8): 625-634. DOI: 10.1016/j.nrmicro.2006.01.013
- [7] Charland N, Nizet V, Rubens CE, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells[J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 637-643. DOI: 10.1128/IAI.68.2.637-643.2000
- [8] Charland N, Harel J, Kobisch M, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression[J]. Microbiology, 1998, 144(Pt 2): 325-332. DOI: 10.1099/00221287-144-2-325
- [9] Wibawan IW, Lammler C. Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*[J]. Zentralbl Veterinarmed B, 1994, 41(7/8): 453-459. DOI: 10.1111/j.1439-

0450. 1994. tb00250. x
- [10] Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(8): 4312-4322. DOI: 10.1128/IAI.70.8.4312-4322.2002
- [11] Coureuil M, Mikaty G, Miller F, et al. Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium [J]. *Science*, 2009, 325 (5936): 83-87. DOI: 10.1126/science.1173196
- [12] Coureuil M, Lecuyer H, Scott MG, et al. Meningococcus Hijacks a beta2-Adrenoceptor/beta-Arrestin pathway to cross brain microvasculature endothelium [J]. *Cell*, 2010, 143(7): 1149-1160. DOI: 10.1016/j.cell.2010.11.035
- [13] Geng H, Zhu L, Yuan Y, et al. Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Proteome Res*, 2008, 7(9): 4132-4142. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.12.047
- [14] Singh AK, Jiang Y, Gupta S. Effects of bacterial toxins on endothelial tight junction *in vitro*: A Mechanism-Based Investigation [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2007, 17(6): 331-347. DOI: 10.1080/15376510601077029
- [15] Liu S, Tobias R, McClure S, et al. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations [J]. *Clin Biochem*, 1997, 30 (6): 455-463. DOI: 10.1016/S0009-9120(97)00049-0
- [16] Sutherland TC, Quattroni P, Exley RM, et al. Transcellular passage of *Neisseria meningitidis* across a polarized respiratory epithelium [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(18): 4133-4141. DOI: 10.1242/jcs.00620
- [17] de Boer AG, Gaillard PJ. Blood-brain barrier dysfunction and recovery [J]. *Neural Transm*, 2006, 113(4): 455-462. DOI: 10.1007/S00702-005-0375-4
- [18] Morita K, Sasaki H, Furuse M, et al. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells [J]. *Cell Biol*, 1999, 147(1): 185-194. DOI: 10.1083/jcb.147.1.185
- [19] Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice [J]. *Cell Biol*, 2003, 161(3): 653-660. DOI: 10.1083/jcb.200302070
- [20] Gillrie MR, Krishnegowda G, Lee K, et al. Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins [J]. *Blood*, 2007, 110(9): 3426-3435. DOI: 10.1182/blood-2007-04-084582
- [21] Yuan L, Le Bras A, Sacharidou A, et al. ERG controls endothelial cell permeability via transcriptional regulation of claudin-5 (CLDN5) [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6582-6591. DOI: 10.1074/jbc.M111.300236
- [22] Jang AS, Concel VJ, Bein K, et al. Endothelial dysfunction and claudin5 regulation during acrolein-induced lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(4): 483-490. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0391OC

收稿日期:2013-01-25;修回日期:2013-02-26

## (上接第 756 页)

- [8] Cui J, Ren HJ, Liu RD, et al. Phage-displayed specific polypeptide antigens induce significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice [J]. *Vaccine*, 2013, 31(8): 1171-1177. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.070
- [9] Ren HJ, Cui J, Wang ZQ, et al. Normal mouse intestinal epithelial cells as a model for the *in vitro* invasion of *Trichinella spiralis* infective larvae [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e27010. DOI: 10.1371/journal.pone.0027010
- [10] Ren HJ, Liu RD, Wang ZQ, et al. Construction and use of a *Trichinella spiralis* phage display library to identify the interactions between parasite and host enterocytes [J]. *Parasitol Res*, 2013, 112(5): 1857-1863. DOI: 10.1007/s00436-013-3339-x
- [11] Wang L, Cui J, Wang SW, et al. Observation of the *in vitro* invasion of intestinal epithelial cells by *Trichinella spiralis* larvae and their development in those cells [J]. *J Pathog Biol*, 2010, 5(12): 901-903, 911. (in Chinese)  
王莉, 崔晶, 王书伟, 等. 旋毛虫幼虫体外对肠上皮细胞侵入及发育的观察 [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(12): 901-903, 911.
- [12] McVay CS, Bracken P, Gagliardo LF, et al. Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference with the epithelial-al niche of *Trichinella spiralis* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68 (4): 1912-1918.
- [13] Mildvan AS, Xia Z, Azurmendi HF, et al. Structures and mechanisms of Nudix hydrolases [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 433(1): 129-143. DOI: 10.1016/j.abb.2004.08.017
- [14] McLennan AG. The Nudix hydrolase superfamily [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(2): 123-143. DOI: 10.1007/s00018-005-5386-7
- [15] Butcher BA, Gagliardo LF, ManWarren T, et al. Larvae-induced plasma membrane wounds and glycoprotein deposition are insufficient for *Trichinella spiralis* invasion of epithelial cells [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 107 (2): 207-218. DOI: 10.1016/S0166-6851(00)00189-4
- [16] Wang L, Wang ZQ, Cui J. Proteomic analysis of the changed proteins of *Trichinella spiralis* infective larvae after co-culture in vitro with intestinal epithelial cells [J]. *Vet Parasitol*, 2013, 194(2-4): 160-163. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.01.045
- [17] Wang ZQ, Wang L, Cui J. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* proteins in intestinal epithelial cells after culture with their larvae by shotgun LC-MS/MS approach [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(8): 2375-2383. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.02.005

收稿日期:2013-01-21;修回日期:2013-02-16