

蓝氏贾第鞭毛虫的免疫逃避机制

王 洋,田喜凤

摘要: 蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*,简称贾第虫)是一种世界性分布的机会性致病原虫,能够引起以腹泻为主要表现的贾第虫病,严重影响人类尤其是儿童的健康和发育。在贾第虫感染过程中,宿主的非特异性和特异性免疫系统均会产生强烈的抗贾第虫效应,但贾第虫通过抗原漂变、L-精氨酸饥饿等机制逃避和抑制宿主的免疫反应,引起宿主的长期或反复感染。本文对宿主的抗贾第虫免疫以及贾第虫的免疫逃避机制做一综述。

关键词: 蓝氏贾第鞭毛虫;免疫逃避;抗原漂变;L-精氨酸饥饿

中图分类号:R382

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)09-0909-05

Immune evasion mechanisms of *Giardia lamblia*

WANG Yang, TIAN Xi-feng

(College of Life Sciences, Hebei Union University, Tangshan 063000, China)

ABSTRACT: As a world-wide opportunistic protozoan parasite, *Giardia lamblia* can cause giardiasis in human and other mammals, which are hazardous to human health, especially to children. During the infection of *Giardia lamblia*, the non-specific and specific immune response of host individuals would generate strong anti-*Giardia* effect. However, *Giardia lamblia* can evade or inhibit the host's immune response by some mechanisms including antigenic shift and arginine starvation, which results in prolonged or repeated infection. This article will review the hosts' anti-*Giardia* immune and the immune evasion mechanisms of *Giardia lamblia*.

KEY WORDS: *Giardia lamblia*; immune evasion; antigenic shift; L-arginine starvation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30970313), and the Hebei Province Science Fund of Youth (No. C2012401039)

Corresponding author: Tian Xi-feng, Email: tstianxifeng@163.com

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*,简称贾第虫)是一种世界性分布的机会性致病原虫,主要寄生于人和多种哺乳动物的小肠,引起以腹泻、腹痛、吸收不良为主要症状的蓝氏贾第鞭毛虫病(giardiasis,简称贾第虫病)^[1]。贾第虫是最早分化出来的真核生物之一,生活史简单,包括具有感染能力的包囊和致病能力的滋养体。包囊随污染食物和饮水进入人体,在十二指肠内脱囊形成滋养体,滋养体依赖其鞭毛和腹吸盘游弋并吸附在肠粘膜上,结果减少了肠粘膜的吸收面积,同时造成微绒毛的损伤和萎缩,最终导致营养物质和水分吸收障碍而发生腹泻。大部分的贾第虫感染患者能够自愈,但部分患者会发生

长期或者反复感染,主要见于儿童和免疫功能受损人群^[2-3]。儿童患者可引起贫血和营养不良,导致生长滞缓。若不及时治疗,多发展为慢性,表现为周期性稀便,反复发作,病程可长达数年。在贾第虫感染过程中,人体的非特异性和特异性免疫系统均能产生强烈的抗贾第虫效应,贾第虫如何对抗人体免疫系统的攻击,在人体内长期生存一直以来都是一个值得关注的问题。本文将对贾第虫如何逃避宿主的免疫防御系统做一综述。

1 宿主的抗贾第虫免疫

1.1 非特异性免疫 贾第虫感染者会表现出不同的症状,有些患者会在几天内恢复,而另一些患者即使在血液和肠腔中存在特异性抗体并且有良好细胞免疫的情况下,仍会出现持续数年的症状。一些非特异性免疫因素可能在贾第虫的排除方面具有重要

国家自然科学基金(No. 30970313)和河北省青年科学基金(No. C2012401039)联合资助

通讯作者:田喜凤,Email: tstianxifeng@163.com

作者单位:河北联合大学生命科学院,唐山 063000

的意义。例如,来自未曾感染贾第虫的正常人的乳汁能够杀死贾第虫滋养体,乳汁中的结合胆盐、不饱和脂肪酸以及游离脂肪酸均有杀灭贾第虫的效果^[4]。而十二指肠和空肠液中的脂解反应也能杀灭贾第虫^[5]。中性粒细胞释放的防御素以及 indolicidin 在体外具有抗贾第虫效果^[6]。Li E 等发现肥大细胞通过其分泌的各种细胞因子在早期快速控制贾第虫感染方面具有重要的作用^[7]。包括 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-12 在内的多种细胞因子具有体外抑制杀伤贾第虫的作用^[7]。另一些细胞因子则可以通过激活巨噬细胞间接发挥杀伤贾第虫的作用^[12]。此外,补体系统能够通过甘露糖途径被激活直接发挥杀伤贾第虫的作用^[13]。另一方面,某些非免疫因素能够保护寄生虫免受非特异性免疫损伤,例如肠液中的粘液成分能够保护贾第虫滋养体免受脂肪代谢产物的损伤,如果向乳汁中加入肠粘液也能消除乳汁对贾第虫的杀伤作用^[14]。

1.2 特异性免疫

大量的研究表明,宿主的细胞免疫和体液免疫在控制贾第虫感染中都起了重要的作用。

1.2.1 体液免疫

低免疫球蛋白血症患者感染贾第虫后往往迁延不愈,说明抗体在宿主对抗贾第虫的过程中起着一定的作用。鉴于贾第虫寄生于肠腔中,不会直接进入体内,有理由相信,能够分泌到肠腔中的分泌型 IgA(sIgA)是发挥抗贾第虫体液免疫的主力。sIgA 不能激活补体,也不能介导调理吞噬作用,主要通过和贾第虫结合抑制其粘附发挥作用。之后的研究显示,IgA 缺陷的小鼠虽然不能完全清除体内的贾第虫,但能在一定程度上控制贾第虫的感染,且控制效果较 B 细胞缺陷的小鼠更好,这说明 IgA 是控制和清除贾第虫感染的重要因子,而其它类型抗体在控制贾第虫感染方面也有一定的作用^[15]。血清中的抗贾第虫抗体对贾第虫的杀伤作用依赖于补体的存在,含有贾第虫抗体的人类血清在体外能够杀灭超过 98% 的贾第虫。但加入钙离子螯合剂 EDTA 以及 56 °C 0.5 h 灭活补体后抗血清对贾第虫失去杀伤力^[16]。但是由于贾第虫寄生在肠道,肠道中无补体存在,且 sIgA 不能激活补体,因而无法通过上述途径达到杀灭贾第虫的效果。藉此考虑补体参与的裂解贾第虫效应可能在限制贾第虫入侵组织中起着重要作用^[17]。

1.2.2 细胞免疫

T 细胞缺陷小鼠不能控制贾第虫感染并且特异性缺失 CD $^{+}$ T 细胞可以导致慢性贾第虫感染,说明细胞免疫在抗贾第虫感染中也起着重要的作用^[18]。哺乳动物的肠道中有着丰富的

淋巴细胞,主要分布在肠道固有层、集合淋巴小结以及上皮细胞层。这些粘膜淋巴组织的主要成分是各种类型的 T 细胞。由于从粘膜分离淋巴细胞的技术不够成熟,早期有关抗贾第虫细胞免疫的研究采用的都是外周血中分离的淋巴细胞。研究显示,当采用贾第虫抗原刺激外周血白细胞时淋巴细胞会发生明显的增殖^[19]。Singer SM 等发现在抗贾第虫细胞免疫中发挥作用的是 $\alpha\beta$ T 细胞,其作用方式不依赖 B 细胞的存在,而 $\gamma\delta$ T 细胞在其中根本不起作用^[18]。

同时,研究人员也发现,T 细胞对于贾第虫感染作用的是一把双刃剑,一方面对贾第虫的感染具有一定的抑制作用,发挥作用的细胞主要为 CD $^{+}$ T 细胞;另一方面,增殖的 CD $^{+}$ T 细胞可以造成小肠粘膜细胞刷状缘微绒毛的破坏以及双糖酶活性的减弱,导致肠功能紊乱,可能参与贾第虫病的发病^[11,20,22]。

2 贾第虫的免疫逃避机制

2.1 贾第虫的抗原漂变

表面抗原变异是病原微生物在宿主持续免疫压力下维持感染状态最重要的免疫逃避机制,参与慢性和反复感染的发生。贾第虫的抗原漂变最早是在体外环境中被发现的。体外培养的不同种群贾第虫会分泌不同抗原性的蛋白产物到培养基中,并且识别某种表面分子的特异性单克隆抗体只能和同一种群中个别贾第虫细胞结合。这些证据都表明贾第虫在生存过程中其表面抗原分子会发生改变,也说明贾第虫在没有任何免疫压力的条件下即能发生抗原漂变^[22]。

贾第虫的抗原漂变在人类以及实验动物的感染过程中也会发生。在感染过程中,滋养体的增殖产生不同表面抗原分子的贾第虫亚群,虽然这些亚群的贾第虫之后可以被免疫系统识别并消灭,但不断产生的新表面分子可以防止感染被完全清除,并且在一定时间内某一贾第虫表面仅表达一种抗原分子。依分离株的不同大约 6.5~13.5 代贾第虫表面抗原分子会发生漂变,产生另一种抗原分子^[23]。在抗原转换过程中可以观察到单个贾第虫滋养体细胞上同时表达两种抗原分子^[24]。此时贾第虫滋养体表面可以同时结合两种标记单克隆抗体,持续大约 15 h,这一过程常常与滋养体向包囊或者包囊向滋养体转化的过程同时发生^[25]。

贾第虫的抗原漂变主要依赖其表面的多样表面蛋白(variant surface protein, VSP)实现的。VSP 属于 I 型整合膜蛋白,分子量 20 kD 到 200 kD 大小

不等,位于贾第虫表面,厚约 18 nm,覆盖了包括鞭毛、腹吸盘、粗面内质网以及外周囊泡在内的整个虫体。在体外培养中,VSP 可以脱落到培养基中。VSP 蛋白含高达 11%~12% 的半胱氨酸,主要分布于 VSP 的 N 末端,这些半胱氨酸以 CXXC 模体(C:半胱氨酸;X:任意氨基酸)形式存在,VSP 中没有游离的巯基存在。VSP 的 N 末端部分可变度最高,是寄生虫与环境作用的部分。不同 VSP 的区别主要在于 N 末端 CXXC 基序的差异。VSP 的 C 末端相当保守,由 38 个氨基酸残基构成,约 90% 的氨基酸残基在各种 VSP 是完全相同的,包含一段长约 23~25 个氨基酸残基的跨膜区。C 末端的 5 个氨基酸残基(CRGKA)位于胞浆中。VSP 还包含有一段保守的 GGCY 基序以及一段或者几段锌指结构域。其中 GGCY 基序通常位于靠近 C 末端的胞外区,在某些 VSP 此段基序则位于 N 末端。此外,有研究报道 VSP 存在 RING 和 LIM 锌指结构,存在锌指结构的蛋白可能具有多种功能,其中之一就是作为转录因子,但 VSP 中锌指结构的功能、VSP 是否与 Zn²⁺ 结合并参与 VSP 空间结构以及生物学活性的维持仍然未知^[24]。

大约 25% 的贾第虫基因组编码 VSP 蛋白,第一个 vsp 基因——TSA417 于 1990 年被克隆并表达。随着贾第虫 A 组 WB 克隆、B 组 GS/M-H7 克隆以及 E 组 P15 克隆全基因组测序的完成,几乎所有的 VSP 蛋白全序列均已获得。从 WB 分离株中已鉴定出了 303 个 vsp 基因。在这 303 个 vsp 基因中,228 个序列完整。这些基因成簇分布,分散在贾第虫的五条染色体上。同大多数其他贾第虫基因一样,vsp 基因没有内含子,它们的启动子相对较短且序列保守性较差,3' 非翻译区通常比较短,很少超过 30 个核苷酸。此外,vsp 基因通常离端粒较远,提示 vsp 基因的重组并不涉及同贾第虫染色体基因组其它部位的转位,而这种转位现象在其它能够产生抗原漂变的寄生虫中经常出现。vsp 基因的上游序列具有极高的相似性,据此推断位于贾第虫基因组中的 vsp 基因库通过分离和重组完成 vsp 基因的重排,这个假设很快得到了证实。采用多克隆抗体鉴定 VSP 蛋白会产生强烈的交叉反应,一些同源性很高的 VSP 蛋白甚至可以被同一株单克隆抗体识别^[26]。

虽然多个研究小组致力于发现贾第虫抗原漂变的分子机制,目前为止,仍然未能解释清楚这个调节机制究竟发生在基因组、转录还是转录后水平。在仅表达一种 VSP 的贾第虫克隆中,只能检测出一种

VSP mRNA,说明尽管存在几百种 vsp 基因,但同时仅有一个 vsp 基因被转录,而其他 vsp 基因处于沉默状态。之后的研究显示所有的 vsp 基因均被转录,但除了表达的那个 vsp 基因外,其它的 mRNA 被一种类似 RNA 干扰的机制降解掉。目前已经在贾第虫鉴定出几株 microRNA 能够调控 VSP 的表达,并且推测在贾第虫的基因组中,可能含有大量的 microRNA 编码序列。在抗原漂变发生过程中,原本的 vsp 基因转录本消失,而另一株 vsp 基因的 mRNA 被保留而翻译形成新的 VSP。如果内源性 RNA 干扰系统参与贾第虫的抗原多样性表达,一个单一的 vsp 转录本如何跳过基因沉默机制,在抗原漂变的过程中,不同 VSP 的 mRNA 又是以何种机制完成过渡的,这些问题仍然函待解决^[27~29]。

2.2 贾第虫诱导的 L-精氨酸(L-Arg)饥饿

在成年哺乳动物中,L-Arg 被看做一种半必需氨基酸,大部分的 L-Arg 可以由 L 脯氨酸、谷氨酸或谷氨酰胺合成。在一定生理和病理状态下,自身生成的 L-Arg 不能满足机体的需要,还需要食物提供。

L-Arg 不仅是合成蛋白质的原料,还可以被不同的酶催化形成多种不同功能的生物活性物质。诱导型一氧化氮合成酶(NOS)是哺乳动物小肠上皮细胞代谢 L-Arg 最重要的酶,该酶可以催化 L-Arg 生成 L 瓜氨酸和 NO,其中 NO 是一种高活性的自由基,参与维持上皮细胞的功能,在抗肿瘤以及先天免疫中起着重要作用。NO 还是一种广谱抗菌剂,可以对抗细菌和致病寄生虫。除此之外还有许多其他功能,包括神经传导、调节粘膜屏障的完整性以及肠道血管张力等^[30]。此外,L-Arg 在调节 T 细胞功能方面还有重要的作用。CD3 ζ 链是 T 细胞受体(TCR)中负责传递信号的部分,其正确组装和表达对 TCR 发挥正常功能起着重要作用。L-Arg 缺失能够削弱抗原刺激后 CD3 ζ 链的内化和再表达,并且抑制细胞因子的产生和细胞增殖。CD3 ζ 链信号传导以及 T 细胞功能的异常可以通过补充 L-Arg 得到恢复^[16]。CD3 ζ 链的下调表达和对抗原或者丝裂原反应下调的关系已经在癌症、慢性感染性疾病以及自身免疫病人中得到证实^[32~33]。具体 L-Arg 通过何种方式影响 CD3 ζ 链的功能仍需进一步研究才能明确。

在单细胞生物中,营养耗竭战术常被用来遏制消耗营养物质细胞的增殖。L-Arg 在贾第虫生长的早期和大多数增殖阶段作为偏爱营养物质。贾第虫利用精氨酸双水解酶(ADH)途径水解 L-Arg 作为能量的来源。这个途径包括 3 个酶促反应步骤,涉

及精氨酸脱亚氨酶(ADI), 鸟氨酸氨甲酰转移酶(OTC), 以及氨基甲酸盐激酶(CK), 同时伴有ATP的生成。ADI和CK两种酶在真核生物非常稀有, 在高等动物中不存在。尽管1分子L-Arg仅能生成1分子ATP, 但是贾第虫利用这条途径能够较糖酵解途径更快的获得ATP。

L-Arg被NOS催化生成NO。小肠上皮细胞生成的NO能够抑制贾第虫生长、成囊以及脱囊。贾第虫通过消耗肠道中的L-Arg, 一方面抑制小肠上皮细胞的正常发育^[34], 另一方面间接抑制上皮细胞生成NO, 而小肠细胞中NO的水平对于调控水平的吸收和分泌具有重要意义, 提示这可能与贾第虫病的腹泻症状相关^[35]。贾第虫和上皮细胞都有一套高效的L-Arg运输系统, 但贾第虫的L-Arg运输能力比上皮细胞强10—20倍。因此贾第虫比宿主更高效的利用L-Arg。在贾第虫中, L-Arg与瓜氨酸对向跨膜运输, 因此, 贾第虫对L-Arg代谢可以通过产生和输出瓜氨酸而有效地促进自身的吸收。并且, 瓜氨酸可以竞争性抑制上皮细胞对L-Arg的吸收, 从而进一步抑制NO的生成^[36]。Ringqvist E等人的研究显示在体外, 贾第虫与肠上皮细胞接触过程中, ADI、烯醇酶以及OTC可以被贾第虫释放到培养基中, 直接降解环境中的L-Arg, 进一步消耗用于生产NO的游离L-Arg^[36]。除了非特异性免疫, 贾第虫还可以诱导宿主特异性免疫应答的发生。在多种细菌和其他寄生虫实验中发现, 细胞环境中的L-Arg的耗尽可以导致T细胞反应性降低。尽管在贾第虫病中还未有相关的研究, 但有理由相信, 贾第虫可能通过ADI高效消耗L-Arg干扰TCR的功能, 从而抑制T细胞产生特异性的、强烈的抗贾第虫免疫反应。有关CD3γ链动物模型中的研究将会阐明贾第虫抑制T细胞免疫的分子机制。

再者, 贾第虫也能够利用ADI逃避宿主的体液免疫反应。研究表明多种VSP蛋白的胞浆内C末端都是瓜氨酸化的。瓜氨酸是一种非标准氨基酸, 自然界没有能够携带瓜氨酸的tRNA, 蛋白中瓜氨酸都是翻译后修饰的结果, 在贾第虫中, 这一修饰作用有ADI行使。最近的研究显示, 抑制VSP的瓜氨酸化可以抑制VSP造成的抗原漂变, 提高特异性抗体的杀伤能力, 而高表达ADI能够提高虫体的抗原漂变能力, 其具体机制仍有待进一步研究^[37]。

此外, 贾第虫还可能通过其他一些途径抑制宿主的免疫反应, 例如, 将贾第虫与骨髓树突细胞共培养可以抑制树突细胞释放IL-6、IL-10、IL-12等具有

免疫调节功能的细胞因子, 但其具体机制仍不清楚^[10]。

综上所述, 贾第虫的免疫逃避涉及多种复杂的机制, 其中部分机制仍未十分明了, 例如贾第虫抗原漂变的调节机制、L-Arg饥饿对特异性免疫的影响机制等。并且, 目前很多抗贾第虫免疫的研究都是在血液免疫环境中进行的, 例如补体、IgG、骨髓树突细胞等作用的研究, 这些物质通常并不存在于肠道中, 真正肠道环境中的抗贾第虫免疫机制及贾第虫逃逸机制仍有待进一步的研究。作为肠道寄生虫和寄生性原虫的代表, 对其免疫逃避机制的更深入研究, 对于抗贾第虫治疗乃至其它肠道寄生虫的治疗方法提供十分重要的依据。

参 考 文 献:

- [1] Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(1): 114-128. DOI: 10.1128/CMR.14.1.114-128.2001
- [2] Kucik CJ, Martin GL, Sortor BV. Common intestinal parasites [J]. Am Fam Physician, 2004, 69(5): 1161-1168.
- [3] Stark D, Barratt JL, van Hal S, et al. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(4): 634-650. DOI: 10.1128/CMR.00017-09
- [4] Gillin FD, Reiner DS, Wang CS. Human milk kills parasitic intestinal protozoa[J]. Science, 1983, 221(4617): 1290-1292. DOI: 10.1126/science.6310751
- [5] Das S, Reiner DS, Zenian J, et al. Killing of *Giardia lamblia* trophozoites by human intestinal fluid *in vitro*[J]. J Infect Dis, 1988, 157(6): 1257-1260. DOI: 10.1093/infdis/157.6.1257
- [6] Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, et al. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides[J]. Infect Immun, 1994, 62(12): 5397-5403.
- [7] Li E, Zhao A, Shea-Donohue T, et al. Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis[J]. Infect Immun, 2007, 75(9): 4514-4518. DOI: 10.1128/IAI.00596-07
- [8] Zhou P, Li E, Shea-Donohue T, et al. Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice[J]. Parasite Immunol, 2007, 29(7): 367-374. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2007.00953.x
- [9] Matowicka-Karna J, Kralisz M, Kemona H. Assessment of the levels of nitric oxide (NO) and cytokines (IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN-gamma) in giardiosis[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2011, 49(2): 280-284.
- [10] Kamda JD, Nash TE, Singer SM. Giardia duodenalis: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection[J]. Exp Parasitol, 2012, 130(3): 288-291. DOI: 10.1128/IAI.00718-08
- [11] Long KZ, Rosado JL, Santos JI, et al. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of

- diarrheal pathogen infections[J]. Infect Immun, 2010, 78(3): 1221-1228. DOI: 10.1128/IAI.00767-09
- [12] Belosevic M, Daniels CW. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by cytokine-activated macrophages[J]. Clin Exp Immunol, 1992, 87(2): 304-309.
- [13] Evans-Osset I, Ansa-Addo EA, Inal JM, et al. Involvement of lectin pathway activation in the complement killing of *Giardia intestinalis*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 395(3): 382-386. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.025
- [14] Zenian AJ, Gillin FD. Intestinal mucus protects *Giardia lamblia* from killing by human milk[J]. J Protozool, 1987, 34(1): 22-26.
- [15] Langford TD, Housley MP, Boes M, et al. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp[J]. Infect Immun, 2002, 70(1): 11-18. DOI: 10.1128/IAI.70.1.11-18.2002
- [16] Davids BJ, Palm JE, Housley MP, et al. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*[J]. J Immunol, 2006, 177(9): 6281-6290.
- [17] Amorim RM, Silva DA, Taketomi EA, et al. Giardia duodenalis: kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected[J]. Exp Parasitol, 2010, 125(3): 297-303. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.02.007
- [18] Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice[J]. Infect Immun, 2000, 68(1): 170-175. DOI: 10.1128/IAI.68.1.170-175.2000
- [19] Ebert EC. Giardia induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes[J]. Gut, 1999, 44(3): 342-346. DOI: 10.1136/gut.44.3.342
- [20] Scott KG, Yu LC, Buret AG. Role of CD₈⁺ and CD₄⁺ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis[J]. Infect Immun, 2004, 72(6): 3536-3542. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3536-3542.2004
- [21] Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. Giardia duodenalis: the double-edged sword of immune responses in giardiasis[J]. Exp Parasitol, 2010, 126(3): 292-297. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.014
- [22] Nash TE, Aggarwal A. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates[J]. J Immunol, 1986, 136(7): 2628-2632.
- [23] Nash TE, Banks SM, Alling DW, et al. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*[J]. Exp Parasitol, 1990, 71(4): 415-421. DOI: 10.1016/0014-4894(90)90067-M
- [24] Nash TE, Lujan HT, Mowatt MR, et al. Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*[J]. Infect Immun, 2001, 69(3): 1922-1923. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1922-1923.2001
- [25] Carranza PG, Feltes G, Ropolo A, et al. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation[J]. Infect Immun, 2002, 70(9): 5265-5268. DOI: 10.1128/IAI.70.9.5265-5268.2002
- [26] Adam RD, Nigam A, Seshadri V, et al. The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 424. DOI: 10.1186/1471-2164-11-424
- [27] Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, et al. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference[J]. Nature, 2008, 456(7223): 750-754. DOI: 10.1038/nature07585
- [28] Saraiya AA, Li W, Wang CC. A microRNA derived from an apparent canonical biogenesis pathway regulates variant surface protein gene expression in *Giardia lamblia*[J]. RNA, 2011, 17(12): 2152-2164. DOI: 10.1261/rna.028118.111
- [29] Li W, Saraiya AA, Wang CC. The profile of snoRNA-derived microRNAs that regulate expression of variant surface proteins in *Giardia lamblia*[J]. Cell Microbiol, 2012, 14(9): 1455-1473. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01811.x
- [30] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 641-654. DOI: 10.1038/nri1668
- [31] Zea AH, Rodriguez PC, Culotta KS, et al. L-Arginine modulates CD₈⁺ zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes[J]. Cell Immunol, 2004, 232(1-2): 21-31. DOI: 10.1016/j.cellimm.2005.01.004
- [32] Rossi E, Matutes E, Morilla R, et al. Zeta chain and CD₂₈ are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia[J]. Leukemia, 1996, 10(3): 494-497.
- [33] Tate DJ Jr, Vonderhaar DJ, Caldas YA, et al. Effect of arginase II on L-arginine depletion and cell growth in murine cell lines of renal cell carcinoma[J]. J Hematol Oncol, 2008, 1: 14. DOI: 10.1186/1756-8722-1-14
- [34] Stadelmann B, Merino MC, Persson L, et al. Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45325. DOI: 10.1371/journal.pone.0045325
- [35] Li E, Zhou P, Singer SM. Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice [J]. J Immunol, 2006, 176(1): 516-521.
- [36] Knodler LA, Schofield PJ, Edwards MR. L-arginine transport and metabolism in *Giardia intestinalis* support its position as a transition between the prokaryotic and eukaryotic kingdoms[J]. Microbiology, 1995, 141(Pt 9): 2063-2070. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2063
- [37] Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, et al. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells[J]. Mol Biochem Parasitol, 2008, 159(2): 85-91. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2008.02.005
- [38] Touz MC, Rópolo AS, Rivero MR, et al. Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 17): 2930-2938. DOI: 10.1242/jcs.026963