南京农业大学学报 2026,49(4):874-884
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202501023

冯佳俊,李媛,张玉恒,等. 旋毛虫与小鼠 TLR2 结合蛋白 GGH 的鉴定及其免疫调节作用[J]. 南京农业大学学报,2026,49(4):874-884.
Feng J J,Li Y,Zhang Y H,et al. Identification and immunomodulatory effects of mouse TLR2 binding protein GGH from *Trichinella spiralis*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(4):874-884.

# 旋毛虫与小鼠 TLR2 结合蛋白 GGH 的鉴定及其免疫调节作用

冯佳俊,李媛,张玉恒,陆明敏,宋小凯,徐立新,李祥瑞,严若峰*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210014)

**摘要**:[**目的**]本文旨在探究旋毛虫肌肉幼虫排泄分泌蛋白(*Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory proteins,TsMESP)中叶酸 γ-谷氨酰水解酶(folate gamma-glutamyl hydrolase,GGH)结合小鼠 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2,TLR2)能力,以及结合后对小鼠巨噬细胞功能和下游通路的影响。[**方法**]通过 Pull-down 试验和质谱分析,筛选出与小鼠 TLR2 结合的 TsMESP,对其中 GGH 进行鉴定。构建表达 GGH 和 TLR2 胞外域的真核质粒,共转染 HEK293T 细胞,利用免疫共沉淀(Co-IP)和荧光共定位试验分析二者的结合情况。将重组旋毛虫 GGH 蛋白(rTsGGH)与小鼠巨噬细胞共孵育,研究其对细胞吞噬、活性氧(ROS)释放、一氧化氮(NO)分泌、细胞因子(IL-1β、IL-6 和 IL-10)和 TLR2、Myd88 蛋白表达的影响。[**结果**]筛选到 28 个与小鼠 TLR2 结合的旋毛虫候选蛋白。Co-IP 结果显示 GGH 和 TLR2 胞外域存在较强的共定位关系,共定位系数为 0.88。rTsGGH 能够显著促进巨噬细胞的吞噬、ROS 的释放和 NO 的分泌($P<0.05$),显著上调 TLR2、Myd88、IL-1β、IL-6 和 IL-10 的表达($P<0.05$)。[**结论**]旋毛虫 GGH 是小鼠 TLR2 的结合蛋白,rTsGGH 通过 TLR2/Myd88 通路显著影响宿主免疫功能,是有效的免疫调节分子。

**关键词**:旋毛虫;Toll 样受体 2;叶酸 γ-谷氨酰水解酶(GGH);结合蛋白;免疫共沉淀(Co-IP)
**中图分类号**:S855.9+1　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1000-2030(2026)04-0874-11

# Identification and immunomodulatory effects of mouse TLR2 binding protein GGH from *Trichinella spiralis*

FENG Jiajun,LI Yuan,ZHANG Yuheng,LU Mingmin,SONG Xiaokai,XU Lixin,LI Xiangrui,YAN Ruofeng*

(College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210014,China)

**Abstract**:[**Objectives**]:This study aimed to investigate whether the folate gamma-glutamyl hydrolase (GGH) in *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory proteins (TsMESP) could bind to mouse Toll-like receptor 2 (TLR2) and its effects on macrophage function and downstream pathway. [**Methods**]Pull-down experiments combined with mass spectrometry analysis were used to screen TsMESP that bind to mouse TLR2,and the GGH among them was identified. Eukaryotic plasmids expressing the GGH and extracellular domain of TLR2 were constructed and co-transfected into HEK293T cells,and their binding was analyzed by immunoprecipitation. Co-IP and fluorescence co-localization assays. Recombinant *Trichinella spiralis* GGH protein (rTsGGH) was co-incubated with mouse macrophage to study its effects on cellular phagocytosis,reactive oxygen species (ROS) release,nitric oxide (NO) secretion,cytokine (IL-1β,IL-6,and IL-10),and TLR2,Myd88 protein expression. [**Results**]Twenty-eight candidate proteins that might bind to mouse TLR2 were screened from *Trichinella spiralis*. Co-IP results showed that GGH and TLR2 extracellular domains had binding effect. Co-localization results showed that they had a strong co-localization relationship,and the co-localization coefficient was 0.88. rTsGGH could significantly promote macrophage phagocytosis,ROS release and NO secretion($P<0.05$),significantly upregulate the expression of TLR2,Myd88,IL-1β,IL-6 and IL-10 ($P<0.05$). [**Conclusions**]*Trichinella spiralis* GGH is a binding protein of mouse TLR2. The rTsGGH upregulates host immune function through the TLR2/Myd88 pathway and is an effective immune regulatory molecule.

**Keywords**:*Trichinella spiralis*;Toll-like receptor 2 (TLR2);folate gamma-glutamyl hydrolase;binding protein;immunoprecipitation (Co-IP)

旋毛虫病是一种重要的人畜共患寄生虫病,严重威胁公共卫生安全[1]。2009—2020 年期间,在我国发生的 479 起病例和 2 例死亡中,由病猪肉引起的占 87.50%[2]。猪群接种疫苗对于旋毛虫病防控具有重要意义,但目前尚无商品化的疫苗用于该病的免疫预防,新型疫苗候选抗原的发掘十分必要和迫切。

先天免疫系统是机体的第一道防线,其通过模式识别受体(pattern recognition receptors,PRR)识别病原体并激活宿主免疫应答,快速响应病原体入侵。PRR 识别的病原体组分通常保守且广泛存在,这些组

**收稿日期**:2025-01-21
**基金项目**:江苏省社会发展计划项目(BE2022848)
**作者简介**:冯佳俊,硕士研究生。* 通信作者:严若峰,教授、博导,研究方向为兽医寄生虫与免疫学,E-mail:yanruofeng@njau.edu.cn。

分被称为病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)[3]。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是一类重要的 PRR,在识别 PAMP 后,TLR 会募集接头蛋白 Myd88、TIRAP 和 TRIF 等,启动下游的信号转导,激活核因子 κB(nuclear factor-κB, NF-κB)等转录因子,诱导Ⅰ型干扰素、炎症因子、趋化因子和共刺激因子的表达和释放[4]。TLR2 作为 TLR 的重要成员,在旋毛虫与宿主相互作用中发挥重要作用。小鼠感染旋毛虫后,其 TLR2 表达水平显著上调[5]。TsMESP 能够显著上调 RAW264.7 细胞 TLR2 的转录水平[6]。TsMESP 中存在一些 TLR2 的配体成分[7],然而 TsMESP 中 TLR2 的结合分子具体有哪些,其功能和作用机制仍不清楚。

本试验拟通过 Pull-down 试验结合质谱分析和 Co-IP 等方法,鉴定出 TsMESP 中与小鼠 TLR2 结合的旋毛虫蛋白,对其中 GGH 的结合作用进行验证,并分析该蛋白对小鼠巨噬细胞免疫功能的影响。研究结果可为进一步了解旋毛虫对宿主先天免疫的反应机制奠定基础,并为寻找疫苗候选抗原提供新思路。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

**1.1.1　试验虫株和动物**　旋毛虫为中国河南猪分离株,国际编号 ISSS534,由本课题组传代保存;健康 6 周龄雌性 SD 大鼠,购自江苏青龙山生物科技有限公司。

**1.1.2　载体、菌种和细胞系**　pET-32a(+)载体、大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)菌株、人胚胎肾(HEK293T)细胞和小鼠单核巨噬细胞白血病(RAW264.7)细胞均由本课题组保存。

**1.1.3　主要试剂、材料和仪器**　重组小鼠 TLR2 蛋白(His-Tag)购自北京义翘神州科技股份有限公司;抗 FLAG 标签和抗 HA 标签兔源抗体购自 ABclonal 公司;抗 Myd88 抗体、抗 His 标签抗体和抗 β-Tubulin 抗体均购自 Proteintech 公司;抗 FLAG 标签和抗 HA 标签鼠源抗体购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;抗 TLR2 抗体购自 Abcam 公司;NO 和 ROS 检测试剂盒购自碧云天公司;FITC-dextran 购自 Sigma 公司;抗 His 磁珠和 Protein A/G 磁珠购自上海翎因生物科技有限公司;内毒素去除试剂盒购自南京金斯瑞生物科技有限公司;SYBR Green *Pro Taq HS* 预混型 qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;RNA Isolater Total RNA Extraction Reagent 试剂购自南京诺唯赞生物科技有限公司;胃蛋白酶购自上海源叶生物科技有限公司;消化液由 10 g 胃蛋白酶与 10 mL 浓盐酸溶于去离子水后定容至 1 L 配制;电泳仪、转印系统为 Bio-Rad 产品;化学发光系统为 Tanon 5200。

### 1.2　方法

**1.2.1　TsMESP 的收集**　大鼠经口感染 5 000 条旋毛虫肌肉幼虫,35 d 后剖杀。取全身肌肉,剪碎,加入消化液,消化 6 h 后收集肌肉幼虫,洗净,加入 RPMI-1640 培养基,调整虫体密度至 10 000 $mL^{-1}$,37 ℃、5% $CO_2$ 培养 24 h。收集上清液,透析浓缩,过滤除菌,BCA 法测定蛋白浓度,分装后置于-80 ℃保存。

**1.2.2　抗 TsMESP 多克隆抗体的制备**　将 300 μg TsMESP 与弗氏完全佐剂等体积混合,经乳化器充分乳化后皮下多点注射 SD 大鼠。14 d 后将 300 μg TsMESP 与弗氏不完全佐剂等体积混合,充分乳化后加强免疫 1 次。7 d 后进行第 3 次免疫。第 3 次免疫 7 d 后采血并取血清,分装后置于-80 ℃冰箱保存。

**1.2.3　Pull-down 富集 TLR2 结合蛋白**　将 10 μg 小鼠 TLR2 胞外域(His-Tag)重组蛋白与 800 μg TsMESP 混合,4 ℃、旋转孵育过夜。试验组加入偶联抗 His 抗体的磁珠,对照组加入偶联 Normal IgG 的磁珠,4 ℃、旋转孵育过夜。收集磁珠,PBS 清洗后取出部分磁珠,加入 SDS Loading Buffer 混匀,水浴煮沸 10 min。取上清液进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,剩余样品送至上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱检测。

**1.2.4　真核表达载体的构建**　根据小鼠 *TLR2* 基因序列(NM_011905.3, GeneBank No.)设计胞外段引物,上游添加 *Kpn* Ⅰ酶切位点,下游添加 *Xho* Ⅰ酶切位点和 HA 标签蛋白基因序列。根据旋毛虫 *GGH* 基因序列(KRY31078),去除信号肽序列后设计特异性引物,上游添加 *Eco*R Ⅰ酶切位点,下游添加 *Xho* Ⅰ酶切位点和 FLAG 标签蛋白基因序列。引物对序列(pCAGGS-TLR2 和 pCAGGS-GGH)见表 1。分别提取 RAW264.7 细胞和旋毛虫肌肉幼虫 RNA,通过反转录 PCR(RT-PCR)扩增目的基因。将 *TLR2* 胞外域和 *GGH* 基因片段连接到 pCAGGS 载体,阳性质粒分别命名为 pCAGGS-*TLR2*-HA 和 pCAGGS-*GGH*-FLAG。

**1.2.5　Co-IP 验证结合**　重组质粒 pCAGGS-*GGH*-FLAG 和 pCAGGS-*TLR2*-HA 共转染 HEK293T 细胞,培养 24 h 后收集细胞,用 NP-40 裂解液裂解细胞。向细胞裂解液中分别加入 FLAG-Tag Rabbit mAb、HA-Tag

Rabbit mAb 和 Normal Rabbit IgG,4 ℃旋转孵育过夜,加入 Protein A/G 磁珠,4 ℃再孵育 4 h。收集磁珠,用 PBS 清洗,蛋白洗脱和制样与 1.2.3 节相同。使用 FLAG-Tag mouse mAb 和 HA-Tag mouse mAb 进行 Western blot 分析。

**表 1 本试验中使用的 PCR 引物序列**

**Table 1 Primer sequences used for PCR**

| 引物名称 Primer name | 引物对序列 Primer pairs sequences(5′→3′) |
|---|---|
| pCAGGS-*TLR2* | GGGGTACCGCCACCATGCAGGAGTCTCTGTCATGTGAT/<br>CCGCTCGAGCTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACTGGTGACATTCCAAGACGGA |
| pCAGGS-*GGH* | CGGAATTCGCCACCATGGTTGAAAAGAGCAACATGCCT/<br>CCGCTCGAGTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCGGGGAAAAAATACTTTTCCTC |
| pET-32a-*GGH* | CGGGATCCATGGTTGAAAAGAGCAACATG/CCGCTCGAGTCAGGGGAAAAAATACTTTTCCTC |
| *GAPDH* | CATCACTGCCACCCAGAAGACTG/ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG |
| *IL*-6 | AGACAAAGCCAGAGTCCTTCA/GCCACTCCTTCTGTGACTCC |
| *IL-1β* | GCAACTGTTCCTGAACTCAACT/ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT |
| *IL-10* | GACAACATACTGCTAACCGACTCC/TCCTTGATTTCTGGGCCATGC |
| *TLR2* | CGTTGTTCCCTGTGTTGCTG/CAGAGCTGGCGTCTCCATAG |
| *Myd88* | CGGAACTTTTCGATGCCTTTAT/CACACACAACTTAAGCCGATAG |

注:1) *GAPDH*:甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene;*IL-6*:白细胞介素 6 基因 Interleukin 6 gene;*IL-1β*:白细胞介素 1β 基因 Interleukin 1β gene;*IL-10*:白细胞介素 10 基因 Interleukin 10 gene;*TLR2*:Toll 样受体 2 基因 Toll-like receptor 2 gene;*Myd88*:髓样分化因子 88 基因 Myeloid differentiation primary response gene 88 gene. 2)下划线部分的序列为酶切位点。The underlined sequence is the restriction enzyme site.

**1.2.6 共定位分析** 将 HEK293T 细胞接种于细胞爬片,转染操作同 1.2.5 节。培养 24 h,固定细胞后进行通透和封闭。加入抗 HA 标签兔源抗体和抗 FLAG 标签鼠源抗体,4 ℃过夜孵育。去除一抗,加入 FITC-conjugated Goat anti-Mouse IgG(H+L)和 Cy3-conjugated Goat anti-Rabbit IgG(H+L)二抗,37 ℃孵育 1 h。去除二抗后封片,使用激光共聚焦显微镜进行观察。

**1.2.7 旋毛虫 GGH 原核表达载体的构建** 根据 *GGH* 基因序列(KRY31078)去除信号肽后设计特异性引物,上游添加 *Bam*HⅠ酶切位点,下游添加 *Xho*Ⅰ酶切位点。引物对(pET-32a-*GGH*)序列见表 1。通过 RT-PCR 扩增目的基因,将 *GGH* 基因片段连接到 pET-32a(+)载体,阳性质粒命名为 pET-32a-*GGH*。

**1.2.8 蛋白的表达与纯化** 将 pET-32a-*GGH* 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,在 *A* 值约为 0.6 时加入终浓度为 0.5 mmol·$L^{-1}$的 IPTG,继续培养 5 h,分析蛋白分布。用镍柱纯化重组蛋白,用试剂盒去除内毒素,pET-32a(+)载体的标签蛋白纯化操作相同。

**1.2.9 rTsGGH 对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响** 调整 RAW264.7 细胞密度为 $1\times10^6$ $mL^{-1}$,接种 24 孔板,加入 rTsGGH,调整浓度为 5、10、20 和 40 μg·$mL^{-1}$,同时设置 PBS 和 5 μg·$mL^{-1}$的 pET-32a(+)标签蛋白 2 个对照组,每组至少 3 个重复。孵育 12 h,加入终浓度为 500 μg·$mL^{-1}$ FITC-dextran,继续孵育 1 h。收集细胞,PBS 清洗后利用流式细胞仪检测平均荧光强度。

**1.2.10 rTsGGH 对小鼠巨噬细胞 ROS 释放的影响** 调整 RAW264.7 细胞密度为 $1\times10^6$ $mL^{-1}$,接种 96 孔板并加入 rTsGGH,分组同 1.2.9 节。孵育 18 h 后按照试剂盒说明检测细胞 ROS 释放情况。

**1.2.11 rTsGGH 对小鼠巨噬细胞 NO 分泌的影响** 调整 RAW264.7 细胞密度为 $1\times10^6$ $mL^{-1}$,接种 24 孔板并加入 rTsGGH,分组同 1.2.9 节。孵育 18 h 后按照试剂盒说明检测细胞 NO 分泌情况。

**1.2.12 rTsGGH 对小鼠巨噬细胞 TLR2 和 Myd88 mRNA 表达水平的影响** 调整 RAW264.7 细胞密度为 $1\times10^6$ $mL^{-1}$,接种 12 孔板并加入 rTsGGH,分组同 1.2.9 节。孵育 6 h,提取细胞 RNA 进行反转录 qPCR(RT-qPCR)。反应体系:5 μL 2×SYBR Green *Pro Taq HS* Premix,上、下游引物各 0.2 μL,1 μL cDNA 模板,3.6 μL 无酶水。按试剂盒推荐反应程序进行 qPCR,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$计算 mRNA 相对表达水平。qPCR 引物见表 1。

**1.2.13 rTsGGH 对小鼠巨噬细胞 TLR2 和 Myd88 蛋白表达水平的影响** 调整 RAW264.7 细胞密度为 $1\times10^6$ $mL^{-1}$,接种 12 孔板并加入 rTsGGH,分组同 1.2.9 节。孵育 12 h 后用 RIPA 裂解液裂解后提取蛋白,进行 Western blot 分析。

**1.2.14 rTsGGH 对小鼠巨噬细胞部分细胞因子 mRNA 表达的影响** 操作同 1.2.12 节。采用 RT-qPCR 检测 rTsGGH 刺激后 RAW264.7 细胞 *IL-6*、*IL-1β* 和 *IL-10* mRNA 表达水平的变化。引物见表 1。

### 1.3 数据处理与分析

使用 IBM SPSS Statistics 26 软件的 one-way ANOVA Duncan's 法对数据进行方差分析和差异显著性检

验。使用 GraphPad Prism 8 软件绘图。

## 2　结果与分析

### 2.1　旋毛虫肌肉幼虫 ESP(TsMESP)的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

由图 1 可见:TsMESP 相对分子质量主要分布在(10~100)×10³(图 1-A 泳道 1),收集 TsMESP 时使用的 RPMI-1640 培养基没有观察到蛋白条带(图 1-A 泳道 2);TsMESP 可以被大鼠感染血清识别(图 1-B 泳道 3),而不能被阴性大鼠血清识别(图 1-B 泳道 4)。

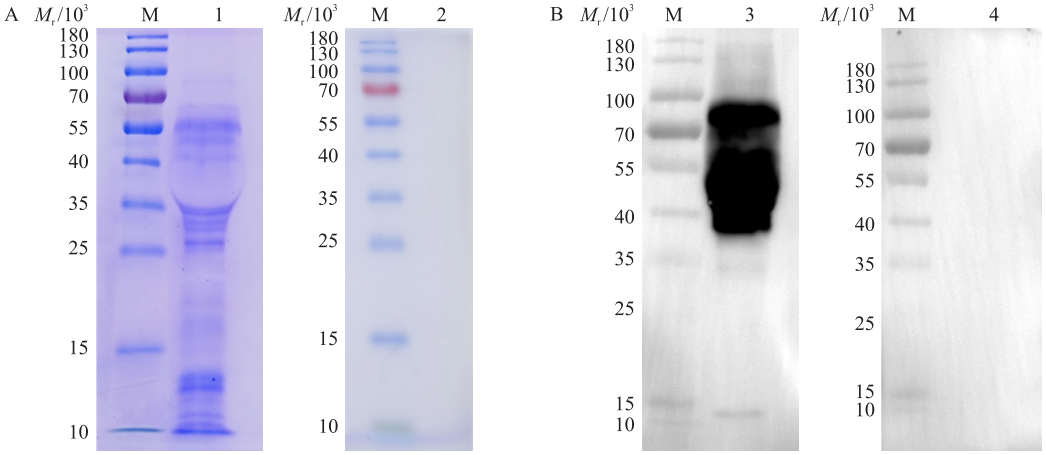


**图 1　TsMESP 的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析**

**Fig. 1　SDS-PAGE and Western blot analysis of TsMESP**

A. TsMESP 的 SDS-PAGE;B. 大鼠感染血清识别 TsMESP 的 Western blot。

M. 标准分子质量蛋白;1. TsMESP;2. RPMI-1640 培养基;3. 感染旋毛虫大鼠血清;4. 阴性大鼠血清。

A. SDS-PAGE of TsMESP;B. Western blot of TsMESP identified by rat infection serum.

M. Standard molecular weight protein;1. TsMESP;2. RPMI-1640 medium;3. Serum from *Trichinella spiralis* infected rats;4. Serum from negative rats.

### 2.2　抗 TsMESP 多克隆抗体的 Western blot 分析

由图 2 可见:抗 TsMESP 多克隆抗体能够识别 TsMESP,而阴性大鼠血清不能识别 TsMESP。

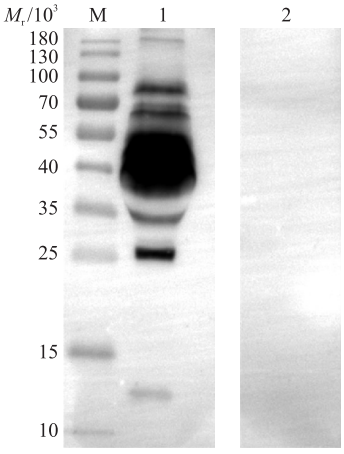


**图 2　抗 TsMESP 多克隆抗体识别 TsMESP 的 Western blot 分析**

**Fig. 2　Western blot analysis of anti-TsMESP polyclonal antibody recognizing TsMESP**

M. 标准分子质量蛋白;1. 抗 TsMESP 多克隆抗体;2. 阴性大鼠血清。

M. Standard molecular weight protein;1. Anti-TsMESP polyclonal antibody;2. Negative rat serum.

### 2.3　旋毛虫肌肉幼虫 ESP 与 TLR2 胞外域结合蛋白的分析

SDS-PAGE 结果(图 3)显示,Pull-down 试验组和对照组存在差异的蛋白条带(图 3-A 泳道 2 和 1)。与使用小鼠非特异性抗体 IgG 对照组(图 3-B 泳道 2 和图 3-C 泳道 2)相比,使用抗 His-Tag 抗体下拉的蛋白复合物中检测到 TLR2 胞外域(图 3-B 泳道 1)和差异的 ESP 蛋白(图 3-C 泳道 1)。选取质谱结果中仅出现在试验组中的蛋白,结合现有研究,确定了 28 个候选蛋白为小鼠 TLR2 结合蛋白(表 2)。

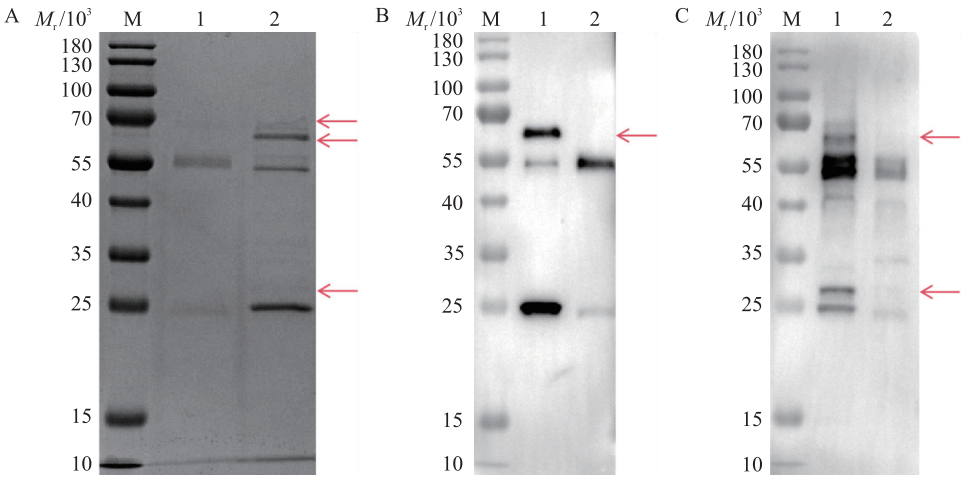


**图 3 TsMESP 与 TLR2 结合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析**

**Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of TsMESP binding protein to TLR2**

A. TsMESP 与 TLR2 Pull-down 蛋白复合物的 SDS-PAGE 分析(M. 标准分子质量蛋白;1. IgG 对照组;2. 抗 His 抗体试验组);B. 抗 His-Tag 抗体识别 TsMESP 与 TLR2 Pull-down 蛋白复合物(M. 标准分子质量蛋白;1. 抗 His 抗体试验组;2. IgG 对照组);C. 抗 TsMESP 多克隆抗体识别 TsMESP 与 TLR2 Pull-down 蛋白复合物(M. 标准分子质量蛋白;1. 抗 His 抗体试验组;2. IgG 对照组)。箭头指示为差异条带。

A. SDS-PAGE analysis of TsMESP and TLR2 pull-down protein complexes (M. Standard molecular weight protein;1. IgG control group;2. His-Tag monoclonal antibody test group); B. His-Tag monoclonal antibody recognizes TsMESP and TLR2 pull-down protein complexes (M. Standard molecular weight protein;1. His-Tag monoclonal antibody test group;2. IgG control group);C. Anti-TsMESP polyclonal antibody recognizes TsMESP and TLR2 pull-down protein complexes (M. Standard molecular weight protein;1. His-Tag monoclonal antibody test group;2. IgG control group). The arrows indicate the differential bands.

**表 2 与小鼠 TLR2 结合的候选蛋白 TsMESP**

**Table 2 Candidate proteins of TsMESP that bind to mouse TLR2**

| 序号 Serial number | 登录号 Accession number | 蛋白名称 Protein name | 相对分子质量/$10^3$ Relative molecular weight |
|---|---|---|---|
| 1 | A0A0V1BBQ6 | 未表征蛋白 Uncharacterized protein | 95.1 |
| 2 | A0A0V1B5A1 | 脂质结合血清糖蛋白 C 末端结构域蛋白(片段) Lipid-binding serum glycoprotein C-terminal domain-containing protein (Fragment) | 66.4 |
| 3 | A0A0V1B210 | 叶酸 γ-谷氨酰水解酶(片段) Folate gamma-glutamyl hydrolase (Fragment) | 36.8 |
| 4 | A0A0V1BZ35 | 丝氨酸蛋白酶抑制剂 B9 Serpin B9 | 66.5 |
| 5 | A0A0V1BLS5 | 未表征蛋白 Uncharacterized protein | 17.0 |
| 6 | A0A0V1AUB1 | 推测的肌球蛋白调节轻链 Putative myosin regulatory light chain | 117.3 |
| 7 | A0A0V1B3R3 | WAP 结构域蛋白(片段) WAP domain-containing protein (Fragment) | 13.4 |
| 8 | A0A0V1BXV2 | Dpp 拮抗蛋白 Protein mothers against Dpp | 284.6 |
| 9 | Q27073 | 43 kD 分泌型糖蛋白 43 kD secreted glycoprotein | 37.7 |
| 10 | A0A0V1BM68 | 白细胞弹性蛋白酶抑制剂 C(片段) Leukocyte elastase inhibitor C (Fragment) | 43.5 |
| 11 | A0A481WXF8 | 普兰西毒素 1(片段) Plancitoxin 1 (Fragment) | 40.0 |
| 12 | A0A0V1AWQ4 | 推测的酸性磷酸酶 5 Putative acid phosphatase 5 | 113.1 |
| 13 | E5S171 | 延伸因子 2 Elongation factor 2 | 99.1 |
| 14 | A0A0V1B1M0 | 含 Apple 结构域蛋白 Apple domain-containing protein | 67.6 |
| 15 | A0A0V1B001 | 前列蛋白酶(片段) Prostasin (Fragment) | 29.6 |
| 16 | A0A0V1B6N9 | 含未知功能 DB 结构域蛋白 Domain of unknown function DB domain-containing protein | 26.6 |
| 17 | E5SPR9 | 小核糖体亚基蛋白 US4 Small ribosomal subunit protein US4 | 22.6 |
| 18 | A0A0V1BN64 | 小核核糖核蛋白 Sm D3 Small nuclear ribonucleo protein Sm D3 | 12.3 |
| 19 | A0A0V1C090 | 棕榈酰蛋白硫酯酶 1(片段) Palmitoyl-protein thioesterase 1 (Fragment) | 31.5 |
| 20 | A0A0V1B1A4 | TBC1 结构域家族成员 30 TBC1 domain family member 30 | 159.1 |
| 21 | A0A0V1B3V5 | 含 EB 结构域蛋白(片段) EB domain-containing protein (Fragment) | 16.9 |
| 22 | A0A0V1C1J7 | P53 和 DNA 损伤调节蛋白 1 P53 and DNA damage-regulated protein 1 | 15.1 |
| 23 | A0A0V1BC23 | 分泌型卷曲相关蛋白 5(片段) Secreted frizzled-related protein 5 (Fragment) | 39.1 |
| 24 | A0A0V1AY88 | 液泡蛋白分选相关蛋白 45 Vacuolar protein sorting-associated protein 45 | 137.0 |
| 25 | A0A0V1BB96 | 膜突蛋白/埃兹蛋白/根蛋白同源物 1 Moesin/ezrin/radixin homolog 1 | 74.3 |
| 26 | Q961X6 | 热休克蛋白 70(片段) Heat shock protein 70 (Fragment) | 68.7 |
| 27 | A0A0V1BJ71 | 5-甲基胞嘧啶 rRNA 甲基转移酶 NSUN4 5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4 | 81.4 |
| 28 | C9DTY3 | 14-3-3 蛋白 14-3-3 protein | 28.2 |

### 2.4　旋毛虫 *GGH* 和小鼠 *TLR2* 胞外域真核表达载体的构建

由图 4 可见:旋毛虫 *GGH* 和小鼠 *TLR2* 胞外域基因 PCR 扩增产物与预期大小一致。重组质粒 pCAGGS-*GGH*-FLAG 和 pCAGGS-*TLR2*-HA 经双酶切后,观察到载体片段和目的基因片段。

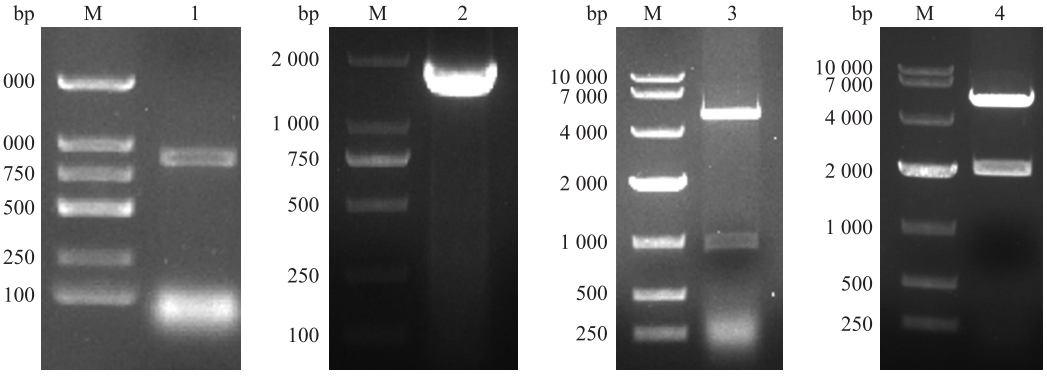


**图 4　旋毛虫 *GGH* 和小鼠 *TLR2* 胞外域真核表达载体的构建**

**Fig. 4　Construction of eukaryotic expression vectors for *T. spiralis GGH* and mouse *TLR2* extracellular domain**

M. DNA 标准品;1. 旋毛虫 *GGH* 基因的 PCR 产物;2. 小鼠 *TLR2* 胞外域基因的 PCR 产物;3. 双酶切的 pCAGGS-*GGH*-FLAG 质粒;4. 双酶切的 pCAGGS-*TLR2*-HA 质粒。

M. DNA marker; 1. PCR product of *T. spiralis GGH* gene; 2. PCR product of mouse *TLR2* extracellular domain gene; 3. The double-digested pCAGGS-*GGH*-FLAG plasmid; 4. The double-digested pCAGGS-*TLR2*-HA plasmid.

### 2.5　旋毛虫 GGH 与小鼠 TLR2 胞外域结合的验证

如图 5 所示:使用 FLAG 抗体进行 Co-IP 时可以同时检测到 GGH-FLAG 和 TLR2-HA,使用 HA 抗体进行 Co-IP 时也可以同时检测到 TLR2-HA 和 GGH-FLAG,而使用非特异性抗体 IgG 进行 Co-IP 时没有检测到条带。以上结果表明,旋毛虫 GGH 能结合小鼠 TLR2 胞外域。

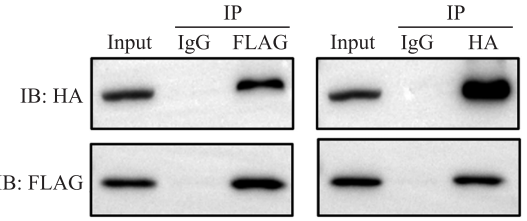


**图 5　Co-IP 验证旋毛虫 GGH 与小鼠 TLR2 胞外域相结合**

**Fig. 5　Interaction between *T. spiralis* GGH and mouse TLR2 extracellular domains validated by Co-IP**

### 2.6　旋毛虫 GGH 与小鼠 TLR2 胞外域共定位

从图 6 可知,将重组真核质粒共转染进细胞中,可观察到 GGH(绿色)和 TLR2 胞外域(红色)主要表达在胞质内,存在较强的共定位荧光(黄色),共定位系数为 0.88,横断面的荧光分布曲线相似,表明 GGH 与 TLR2 胞外域存在较强的共定位关系。

### 2.7　旋毛虫 *GGH* 基因的克隆表达

双酶切鉴定重组质粒 pET-32a-*GGH*,在相应位置分别观察到载体与目的基因条带(图 7-A);rTsGGH 蛋白主要以包涵体形式存在(图 7-B 泳道 3),纯化后的 rTsGGH 和 pET-32a 载体标签蛋白纯度较好(图 7-B 泳道 4 和 5),rTsGGH 能够被抗 His-Tag 抗体识别(图 7-C)。

### 2.8　rTsGGH 对巨噬细胞功能的影响

从图 8 可以看出:rTsGGH 能够显著促进巨噬细胞的吞噬功能,20 μg·mL$^{-1}$时促进效果最显著(图 8-A,$P$<0.05)。同时,rTsGGH 能够以浓度依赖性方式显著促进 ROS 和 NO 的产生(图 8-B、C,$P$<0.05)。

### 2.9　rTsGGH 对巨噬细胞 TLR2 和 Myd88 表达水平的影响

由图 9 可知:rTsGGH 能够显著上调巨噬细胞 *TLR2* 和 *Myd88* mRNA 相对表达水平,在 40 μg·mL$^{-1}$时,对 *TLR2* 和 *Myd88* mRNA 相对表达水平的促进作用最显著($P$<0.05)。同时,rTsGGH 能够上调巨噬细胞 TLR2 和 Myd88 蛋白表达水平,在 10 和 40 μg·mL$^{-1}$时能够显著上调 TLR2 蛋白表达水平($P$<0.05),在 5 和 10 μg·mL$^{-1}$时能够显著上调 Myd88 蛋白表达水平($P$<0.05)。

### 2.10　rTsGGH 对巨噬细胞部分细胞因子 mRNA 表达水平的影响

由图 10 可知:rTsGGH 能够显著上调巨噬细胞 *IL-1β*、*IL-6* 和 *IL-10* mRNA 水平。在 5 μg·mL$^{-1}$时,对 *IL-1β* mRNA 促进表达效果最显著($P$<0.05),在 40 μg·mL$^{-1}$时,对 *IL-6* 和 *IL-10* mRNA 的促进表达效果最显著($P$<0.05)。

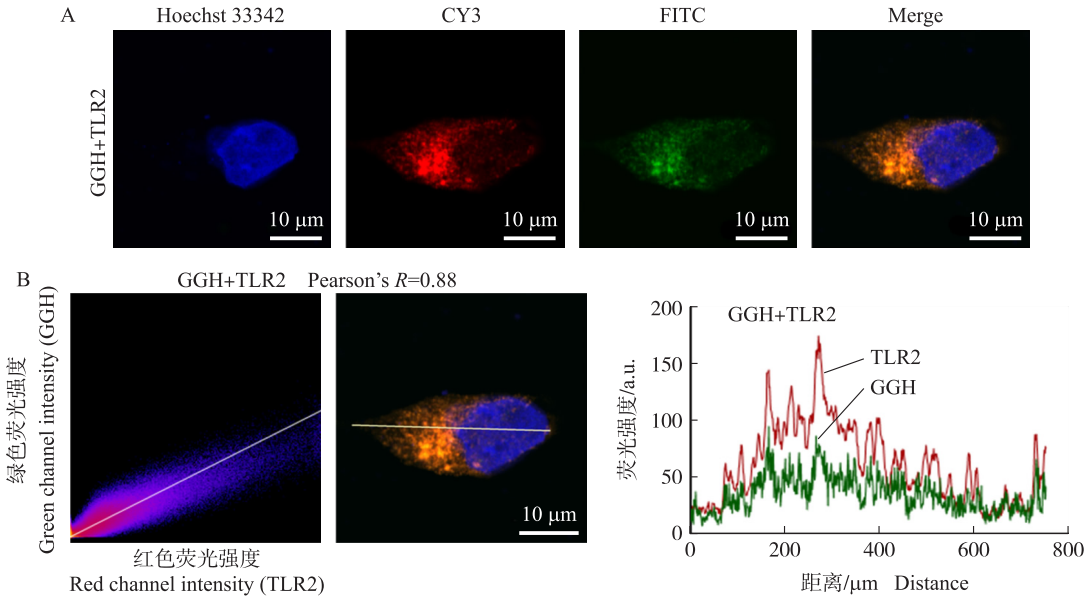


**图 6 旋毛虫 GGH 与小鼠 TLR2 胞外域共定位结果**

**Fig. 6 *T. spiralis* GGH and mouse TLR2 extracellular domains co-localization results**

A. 共转染后通过激光共聚焦显微镜观察旋毛虫 GGH 和小鼠 TLR2 胞外域在 HEK293T 细胞中的定位情况(细胞核使用 Hoechst 33342 染色,TLR2 使用 Cy3 进行标记,GGH 使用 FITC 进行标记,在对应的激发波长下分别呈现蓝色、红色和绿色);B. 通过荧光强度分析共定位情况,红色曲线代表 TLR2 胞外域荧光分布,绿色曲线代表旋毛虫 GGH 荧光分布。左图为共定位散点图,右图为荧光强度分布曲线图。

A. After co-transfection, the localization of *T. spiralis* GGH and mouse TLR2 extracellular domains in 293T cells is observed using laser confocal microscopy (The nucleus is stained with Hoechst 33342, TLR2 is labeled with Cy3, and GGH is labeled with FITC, respectively showing blue, red, and green under the corresponding excitation wavelengths); B. The co-localization is analyzed by fluorescence intensity, where the red curve represents the fluorescence distribution of the TLR2 extracellular domain, and the green curve represents the fluorescence distribution of the *T. spiralis* GGH. The left image is a colocalization scatter plot, and the right image is a fluorescence intensity profile plot.

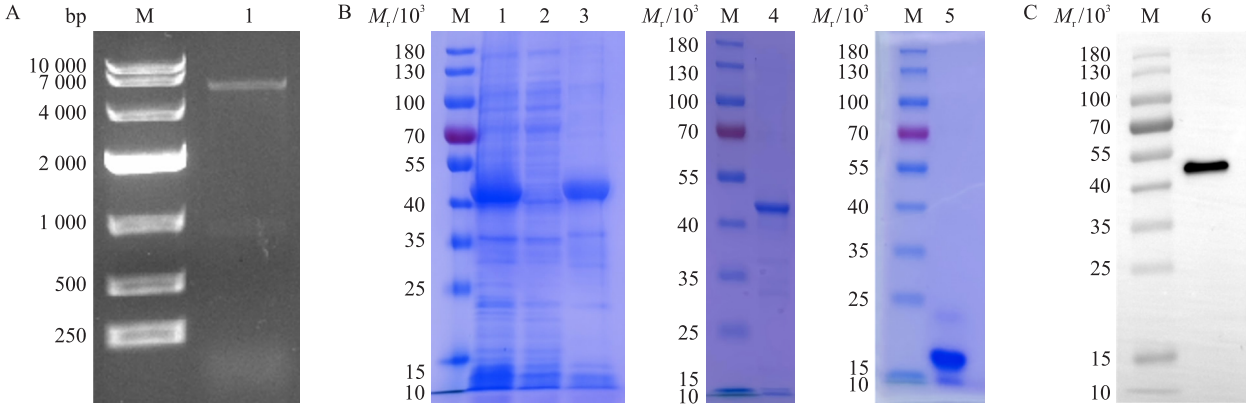


**图 7 旋毛虫 *GGH* 基因的克隆表达**

**Fig. 7 Cloning and expression of the *T. spiralis GGH* gene**

A. 双酶切的 pET-32a-*GGH* 质粒;B. rTsGGH 和 pET-32a(+)载体标签蛋白的纯化;C. 抗 His-Tag 抗体识别纯化的 rTsGGH。

M. 标准分子质量蛋白;1. 全菌裂解液;2. rTsGGH 在上清液的分布;3. rTsGGH 在包涵体的分布;4. 纯化的 rTsGGH 蛋白;5. 纯化的 pET-32a(+)载体标签蛋白;6. 抗 His-Tag 抗体识别纯化的 rTsGGH。

A. The double-digested pET-32a-*GGH* plasmid; B. Purification of rTsGGH protein and pET-32a (+) vector tag protein; C. His-Tag mAb recognizes the purified rTsGGH.

M. Standard molecular weight protein; 1. Whole-cell lysate; 2. Distribution of rTsGGH in the supernatant; 3. Distribution of rTsGGH in inclusion bodies; 4. Purified rTsGGH protein; 5. Purified pET-32a (+) vector tag protein; 6. Anti His-Tag mAb recognizes the purified rTsGGH.

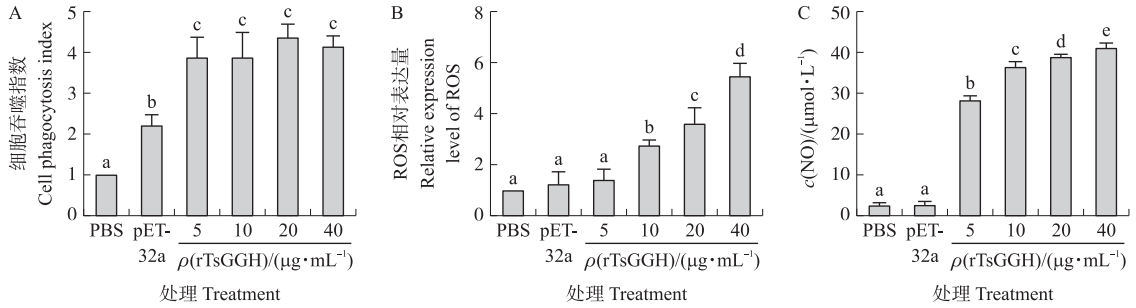


**图 8　rTsGGH 对巨噬细胞功能的影响**

**Fig. 8　Effects of rTsGGH on macrophage function**

A. rTsGGH 对巨噬细胞吞噬功能的影响;B. rTsGGH 对巨噬细胞 ROS 表达的影响;C. rTsGGH 对巨噬细胞 NO 表达的影响。采用 one-way ANOVA Duncan's 法对各组进行组间差异分析。相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

A. Effect of rTsGGH on the phagocytic function in macrophage cells; B. Effect of rTsGGH on ROS expression in macrophage cells; C. Effect of rTsGGH on NO expression in macrophage cells.

One-way ANOVA Duncan's method is used to analyze the differences among groups. The same letter means no significant difference ($P>0.05$), and the different letters mean significant difference ($P<0.05$). The same below.

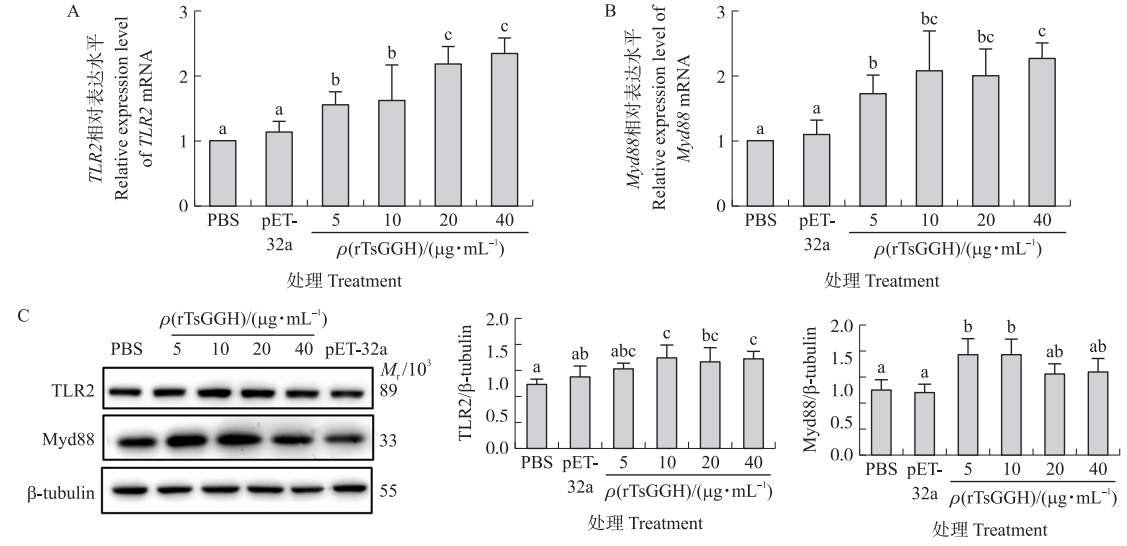


**图 9　rTsGGH 对巨噬细胞 TLR2 和 Myd88 表达水平影响**

**Fig. 9　Effect of rTsGGH on the expression level of TLR2 and Myd88 in macrophages**

A. rTsGGH 对巨噬细胞 *TLR2* mRNA 相对表达水平的影响;B. rTsGGH 对巨噬细胞 *Myd88* mRNA 相对表达水平的影响;C. rTsGGH 对巨噬细胞 TLR2 和 Myd88 蛋白表达水平的影响与 Western blot 半定量分析。

A. Effect of rTsGGH on the relative expression level of *TLR2* mRNA in macrophages; B. Effect of rTsGGH on the relative expression level of *Myd88* mRNA in macrophages; C. Effect of rTsGGH on the protein expression levels of TLR2 and Myd88 in macrophages and semi-quantitative analysis of Western blot.

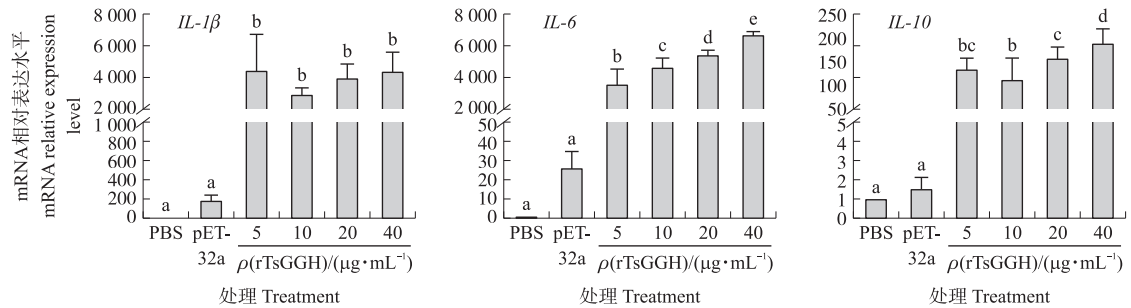


**图 10　rTsGGH 对巨噬细胞细胞因子 mRNA 表达水平的影响**

**Fig. 10　Effects of rTsGGH on mRNA expression levels of cytokines in macrophages**

## 3 讨论

排泄分泌蛋白在寄生虫与宿主的相互作用中发挥重要作用[8-9]。TsMESP能够通过诱导T细胞极化、抑制树突状细胞成熟、选择性活化B细胞、调节巨噬细胞表型和抑制中性粒细胞胞外诱捕网(NET)释放等方式来调节宿主的免疫功能,确保虫体的长期定殖[10-13],其中某些蛋白可能具有作为疫苗候选抗原的潜力。TLR是最早发现的PRR,属于Ⅰ型跨膜蛋白,分为胞外域、胞浆区和跨膜区3部分,其中胞外域部分可以选择性识别PAMP,将信号传导至胞内发挥相应的免疫功能[14-15]。

本研究首先利用Pull-down试验结合质谱分析,选取质谱结果中仅出现在试验组中的蛋白,得到26个可能与TLR2结合的蛋白,再结合现有的研究结果,旋毛虫14-3-3和HSP70蛋白可能结合小鼠TLR2[16-18],最终确定了28个候选蛋白。这些蛋白参与生命活动的各个过程,包括抗感染反应、炎症调节、细胞凋亡和蛋白修饰等。研究发现14-3-3蛋白能够通过TLR2抑制NF-κB活性[16],堆型艾美耳球虫14-3-3蛋白能够与鸡TLR2A结合[17],重组的旋毛虫14-3-3蛋白能够刺激小鼠产生高水平的Th1和Th2型细胞因子,对小鼠肌肉幼虫减虫率达46.2%[19]。HSP70蛋白可以通过TLR2和TLR4激活树突状细胞,诱导针对旋毛虫的保护性免疫[18]。丝氨酸蛋白酶抑制剂B9和白细胞弹性蛋白酶抑制剂C都是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员,丝氨酸蛋白酶抑制剂B9可以抑制颗粒酶B对细胞的损伤[20],白细胞弹性蛋白酶抑制剂C主要在慢性炎症和肠道疾病中发挥作用[21]。前列蛋白酶是上皮钠通道的刺激剂,具有胰酶样活性,能够通过增强细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)的表达,抑制LPS诱导的炎症反应[22-23]。延伸因子2是保守的蛋白质合成调节因子,显著影响细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的功能[24]。Plancitoxin 1具有核酸酶活性[25],旋毛虫可以通过分泌Plancitoxin 1蛋白,降解中性粒细胞NET,从而逃避宿主免疫[26]。P53和DNA损伤调节蛋白1在调节DNA损伤和细胞程序性死亡等方面发挥作用[27],能够通过MEK/ERK/CD44通路促进细胞的增殖和迁移[28]。分泌型卷曲相关蛋白5能够抑制Wnt通路,调节代谢,发挥抗炎作用[29]。5-甲基胞嘧啶rRNA甲基转移酶NSUN4是秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)线粒体中多位点特异性tRNA/rRNA甲基转移酶,在RNA胞嘧啶的甲基化中发挥作用[30]。GGH是叶酸代谢途径的关键酶,维持着细胞内叶酸的稳态,影响着DNA甲基转移酶活性,在生物DNA合成、甲基化、细胞增殖和细胞修复中起着关键作用[31]。GGH可以通过影响癌细胞对5-氟尿嘧啶和甲氨蝶呤的化学敏感性,抑制癌细胞的生长[32-33]。

本试验首先对GGH蛋白进行了验证,通过双向Co-IP再结合荧光共定位的结果,确定其为TLR2结合蛋白。目前有关GGH的研究大多集中在人类癌症方面,在寄生虫免疫方面的研究还比较少,但叶酸代谢途径中的其他关键酶已经在抗寄生虫感染方面有了广泛的研究和应用。基于抑制叶酸代谢途径中的二氢叶酸还原酶和二氢蝶酸合酶开发的Fansidar(磺胺多辛-乙胺嘧啶复方制剂)曾是治疗疟疾的主要化学药物[34-35]。二氢叶酸还原酶-胸苷酸合成酶和蝶啶还原酶是开发抗非洲锥虫病药物的潜在位点[36]。GGH在旋毛虫与宿主相互作用中发挥的具体作用仍有待进一步研究。

巨噬细胞是动物机体重要的免疫细胞,在先天免疫和获得性免疫中都发挥着重要作用[37-38],RAW264.7是理想的巨噬细胞体外模型,已被广泛用于各种巨噬细胞的研究。ROS和NO具有重要的生物学作用,包括传导信号、影响代谢、调节炎症、直接杀伤病原体等[39-41],是宿主抵抗寄生虫侵入的重要手段。大鼠能够通过增加NO分泌,阻断日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)的寄生[42]。ROS能够杀伤利什曼原虫(*Leishmania* spp.)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*),保护宿主[43-44]。

大多数TLR识别到配体后都是通过Myd88进行信号传导,激活下游通路(如NF-κB),从而刺激细胞因子的释放[45-46]。rTsGGH能够通过TLR2/Myd88途径激活下游通路,上调*IL-6*、*IL-1β*和*IL-10* mRNA的表达。IL-1β和IL-6是重要的促炎因子,在抗寄生虫感染中发挥重要作用。嘌呤能受体P2X7能够通过激活NF-κB/NLRP3/IL-1β通路介导抗旋毛虫的免疫保护[47],IL-6在小鼠抗丝虫感染早期发挥重要作用,缺乏IL-6的小鼠,丝虫负荷数显著增多[48]。IL-10属于调节性细胞因子,能抑制多种炎性因子产生和释放,平衡免疫功能,避免过度的炎症反应造成机体损伤[49]。上述试验结果说明rTsGGH能够激活巨噬细胞,影响宿主的免疫功能,调控炎症反应进行,在旋毛虫与宿主的相互作用中发挥重要作用。

综上,本研究证实旋毛虫GGH是小鼠TLR2的结合蛋白,能够通过TLR2/Myd88影响下游通路,调节免疫反应,是有效的免疫调节分子,具有进一步研究的潜力。

**参考文献** References:


[1] Bai X,Hu X X,Liu X L,et al. Current research of trichinellosis in China[J]. Frontiers in Microbiology,2017,8:1472.

[2] Zhang X Z,Wang Z Q,Cui J. Epidemiology of trichinellosis in the people's republic of China during 2009-2020[J]. Acta Tropica,2022,229:106388.

[3] Amarante-Mendes G P,Adjemian S,Branco L M,et al. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery[J]. Frontiers in Immunology,2018,9:2379.

[4] Kawai T,Ikegawa M,Ori D,et al. Decoding toll-like receptors:recent insights and perspectives in innate immunity[J]. Immunity,2024,57(4):649-673.

[5] Wojtkowiak-Giera A,Derda M,Wandurska-Nowak E,et al. Changes in the expression of TLR2 during the intestinal phase of trichinellosis[J]. Journal of Veterinary Research,2020,64(2):269-274.

[6] 禹洋,徐佳,吕兴锋,等. 旋毛虫 ES 抗原对小鼠巨噬细胞 *TLR2/4* mRNA 表达的影响[J]. 中国兽医科学,2012,42(6):562-565.
Yu Y,Xu J,Lü X F,et al. Effect of *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigen on expression of *TLR2/4* mRNA in mouse macrophage[J]. Chinese Veterinary Science,2012,42(6):562-565 (in Chinese with English abstract).

[7] 俞昭旸. 旋毛虫抗原对 Toll 样受体作用及双抗体夹心 ELISA 检测方法建立[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.
Yu Z Y. The interaction between *Trichinella spiralis* antigen and toll like receptor,and establishment of double-antibody sandwich ELISA[D]. Harbin:Northeast Agricultural University,2013(in Chinese with English abstract).

[8] Wen Z H,Zhang Y,Feng J J,et al. Excretory/secretory proteins inhibit host immune responses by downregulating the TLR4/NF-κB/MAPKs signaling pathway:a possible mechanism of immune evasion in parasitic nematode *Haemonchus contortus*[J]. Frontiers in Immunology,2022,13:1013159.

[9] Harnett W,Harnett M M. Epigenetic changes induced by parasitic worms and their excretory-secretory products[J]. Biochemical Society Transactions,2024,52(1):55-63.

[10] Gruden-Movsesijan A,Ilic N,Colic M,et al. The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells[J]. Comparative Immunology,Microbiology and Infectious Diseases,2011,34(5):429-439.

[11] Han C X,Yu J,Zhang Z Q,et al. Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens on macrophages[J]. Experimental Parasitology,2019,196:68-72.

[12] Hu X X,Liu X L,Bai X,et al. Effects of *Trichinella spiralis* and its excretory/secretory products on autophagy of host muscle cells *in vivo* and *in vitro*[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases,2021,15(2):e0009040.

[13] 钱艳红,宋帅,温肖会,等. 旋毛虫免疫逃避机制的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2024,40(1):70-75.
Qian Y H,Song S,Wen X H,et al. Research progress in the immune escape mechanism of *Trichinella spiralis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses,2024,40(1):70-75 (in Chinese with English abstract).

[14] Behzadi P,García-Perdomo H A,Karpiński T M. Toll-like receptors:general molecular and structural biology[J]. Journal of Immunology Research,2021,2021:9914854.

[15] Xia P P,Wu Y P,Lian S Q,et al. Research progress on Toll-like receptor signal transduction and its roles in antimicrobial immune responses[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2021,105(13):5341-5355.

[16] Schuster T B,Costina V,Findeisen P,et al. Identification and functional characterization of 14-3-3 in TLR2 signaling[J]. Journal of Proteome Research,2011,10(10):4661-4670.

[17] 刘晓倩. 鸡球虫共同抗原激活先天性免疫反应作用研究[D]. 南京:南京农业大学,2023.
Liu X Q. Activation of innate immune response by chicken coccidia common antigen[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2023 (in Chinese with English abstract).

[18] Zhang R,Sun Q,Chen Y,et al. Ts-HSP70 induces protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in mouse by activating dendritic cells through TLR2 and TLR4[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases,2018,12(5):e0006502.

[19] Yang J,Zhu W,Huang J J,et al. Partially protective immunity induced by the 14-3-3 protein from *Trichinella spiralis*[J]. Veterinary Parasitology,2016,231:63-68.

[20] Huang H Z,Mu Y Q,Li S. The biological function of Serpinb9 and Serpinb9-based therapy[J]. Frontiers in Immunology,2024,15:1422113.

[21] Torriglia A,Martin E,Jaadane I. The hidden side of SERPINB1/leukocyte elastase inhibitor[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology,2017,62:178-186.

[22] Aggarwal S,Dabla P K,Arora S. Prostasin:an epithelial sodium channel regulator[J]. Journal of Biomarkers,2013,2013:179864.

[23] Chen L M,Chai J C,Liu B,et al. Prostasin regulates PD-L1 expression in human lung cancer cells[J]. Bioscience Reports,2021,41(7):BSR20211370.

[24] Das J K,Ren Y J,Kumar A,et al. Elongation factor-2 kinase is a critical determinant of the fate and antitumor immunity of $CD8^+$ T cells[J]. Science Advances,2022,8(5):eabl9783.

[25] Liao C S,Liu M Y,Bai X,et al. Characterisation of a plancitoxin-1-like DNase Ⅱ gene in *Trichinella spiralis*[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases,2014,8(8):e3097.

[26] Ding J,Xu N,Wang J,et al. Plancitoxin-1 mediates extracellular trap evasion by the parasitic helminth *Trichinella spiralis*[J]. BMC Biology,2024,22(1):158.

[27] Zhang W,Yao F,Zhang H,et al. The potential roles of the apoptosis-related protein PDRG1 in diapause embryo restarting of *Artemia sinica*[J]. International Journal of Molecular Sciences,2018,19(1):126.

[28] Sun J M,Xu Y X,Liu J,et al. PDRG1 promotes the proliferation and migration of GBM cells by the MEK/ERK/CD44 pathway[J]. Cancer Science,2022,113(2):500-516.

[29] Sun M H,Wang W J,Min L T,et al. Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) protects ATDC5 cells against LPS-induced inflammation and apoptosis *via* inhibiting Wnt5a/JNK pathway[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research,2021,16(1):129.

[30] Navarro I C,Tuorto F,Jordan D,et al. Translational adaptation to heat stress is mediated by RNA 5-methylcytosine in *Caenorhabditis elegans*[J]. The EMBO Journal,2021,40(6):e105496.

[31] Yu C,Qi H N,Zhang Y H,et al. Elevated expression of gamma-glutamyl hydrolase is associated with poor prognosis and altered immune signature in uterine corpus endometrial carcinoma[J]. Frontiers in Genetics,2022,12:764194.

[32] Maezawa Y,Sakamaki K,Oue N,et al. High gamma-glutamyl hydrolase and low folylpolyglutamate synthetase expression as prognostic biomarkers in patients with locally advanced gastric cancer who were administrated postoperative adjuvant chemotherapy with S-1[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,2020,146(1):75-86.

[33] Kim S E,Cole P D,Cho R C,et al. γ-Glutamyl hydrolase modulation and folate influence chemosensitivity of cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate[J]. British Journal of Cancer,2013,109(8):2175-2188.

[34] Chulay J D,Watkins W M,Sixsmith D G. Synergistic antimalarial activity of pyrimethamine and sulfadoxine against *Plasmodium falciparum in vitro*[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,1984,33(3):325-330.

[35] Chin W,Contacos P G,Coatney G R,et al. The evaluation of sulfonamides,alone or in combination with pyrimethamine,in the treatment of multi-resistant falciparum malaria[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,1966,15(6):823-829.

[36] Sienkiewicz N,Jarosławski S,Wyllie S,et al. Chemical and genetic validation of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase as a drug target in African trypanosomes[J]. Molecular Microbiology,2008,69(2):520-533.

[37] Li P F,Hao Z F,Wu J Y,et al. Comparative proteomic analysis of polarized human THP-1 and mouse RAW264.7 macrophages[J]. Frontiers in Immunology,2021,12:700009.

[38] Wynn T A,Vannella K M. Macrophages in tissue repair,regeneration,and fibrosis[J]. Immunity,2016,44(3):450-462.

[39] Yang S S,Lian G J. ROS and diseases:role in metabolism and energy supply[J]. Molecular and Cellular Biochemistry,2020,467(1):1-12.

[40] García-Ortiz A,Serrador J M. Nitric oxide signaling in T cell-mediated immunity[J]. Trends in Molecular Medicine,2018,24(4):412-427.

[41] Herb M,Schramm M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity[J]. Antioxidants,2021,10(2):313.

[42] Shen J,Lai D H,Wilson R A,et al. Nitric oxide blocks the development of the human parasite *Schistosoma japonicum*[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2017,114(38):10214-10219.

[43] Sasidharan S,Saudagar P. An anti-leishmanial compound 4′,7-dihydroxyflavone elicits ROS-mediated apoptosis-like death in *Leishmania* parasite[J]. The FEBS Journal,2023,290(14):3646-3663.

[44] Ofori E A,Garcia-Senosiain A,Naghizadeh M,et al. Human blood neutrophils generate ROS through FcγR-signaling to mediate protection against febrile *P. falciparum* malaria[J]. Communications Biology,2023,6:743.

[45] Owen A M,Luan L M,Burelbach K R,et al. Myd88-dependent signaling drives Toll-like receptor-induced trained immunity in macrophages[J]. Frontiers in Immunology,2022,13:1044662.

[46] 张梦凯,张泽栋,梅杰,等. 弓形虫与宿主IL-12结合蛋白的筛选[J]. 畜牧与兽医,2025,57(11):105-114.
Zhang M K,Zhang Z D,Mei J,et al. Screening of potential interacting molecules of *Toxoplasma gondii* with host IL-12[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2025,57(11):105-114(in Chinese with English abstract).

[47] Guan F,Jiang W F,Bai Y,et al. Purinergic P2X7 receptor mediates the elimination of *Trichinella spiralis* by activating NF-κB/NLRP3/IL-1β pathway in macrophages[J]. Infection and Immunity,2021,89(5):e00683-20.

[48] Muhsin M,Ajendra J,Gentil K,et al. IL-6 is required for protective immune responses against early filarial infection[J]. International Journal for Parasitology,2018,48(12):925-935.

[49] Saraiva M,Vieira P,O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10[J]. The Journal of Experimental Medicine,2020,217(1):e20190418.

**责任编辑**:周广礼