

# 小鼠细粒棘球蚴体外促血管生成作用研究

尹建海, 沈玉娟, 于爱萍, 曹建平\*

**[摘要]** **目的** 分析细粒棘球蚴体外对人脐静脉内皮细胞血管生成能力的影响及其促血管生成因子转录水平, 初步探讨细粒棘球蚴的促血管生成作用。**方法** 将继发感染小鼠体内的细粒棘球蚴体外培养后的上清作用于体外培养的人脐静脉内皮细胞, 观察其成管现象并用 NIH Image J 软件的 Angiogenesis 模块进行分析。同时, 在细粒棘球蚴基因组中寻找同宿主(小鼠)的基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和高迁移率族蛋白 B1(High mobility group box B1, HMGB1)的同源蛋白, 并对其转录水平进行分析。**结果** 鼠源细粒棘球蚴囊培养上清能显著促进人脐静脉内皮细胞的成管( $F = 73.03, P < 0.001$ ), 在细粒棘球蚴囊壁和原头节中存在小鼠 MMP-9 和 HMGB1 同源蛋白的表达, 且 MMP-9 在原头节中的转录水平高于棘球蚴囊( $t = -11.65, P < 0.001$ ), 而 HMGB1 在棘球蚴囊中的转录水平高于原头节( $t = 6.43, P = 0.003$ )。**结论** 细粒棘球蚴囊培养上清可能含有促进血管生成的虫源分子, 但其确切机制还有待进一步研究。

**[关键词]** 细粒棘球蚴; 血管生成; 基质金属蛋白酶-9; 高迁移率族蛋白 B1; 体外试验

**[中图分类号]** R383.33 **[文献标识码]** A

## *In vitro* pro-angiogenic activity of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts from experimentally infected mice

YIN Jian-hai, SHEN Yu-juan, YU Ai-ping, CAO Jian-ping\*

National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center for Tropical Diseases, National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology, Shanghai 200025, China

\* Corresponding author

**[Abstract]** **Objective** To preliminarily study the pro-angiogenic activity of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts against human umbilical vein endothelial cells *in vitro* and the transcriptional level of potential pro-angiogenic factors. **Methods** The hydatid cysts and protoscolex derived from experimentally infected mice were collected and cultured *in vitro*, then the human umbilical vein endothelial cells were stimulated by the supernatant and cyst fluid respectively, and the angiogenesis was observed and analyzed through a microscope and the angiogenesis mode of the software NIH Image J. Meanwhile, the mouse homologous proteins of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and high mobility group box B1 (HMGB1) were identified in *E. granulosus* genome through sequence alignment, and their transcriptional levels in the cyst wall and protoscolex were analyzed. **Results** The culture supernatant of hydatid cysts significantly promoted human umbilical vein endothelial cells into tubes ( $F = 73.03, P < 0.001$ ), the transcriptions of MMP-9 and HMGB1 were detected in the cyst wall and protoscolex, and the transcriptional level of MMP-9 was higher in protoscolex ( $t = -11.65, P < 0.001$ ), while the level of HMGB1 was higher in hydatid cysts ( $t = 6.43, P = 0.003$ ). **Conclusion** Some parasite-derived pro-angiogenic molecules may exist in the supernatant of *E. granulosus* hydatid cysts, while further researches are required into their exact mechanisms.

**[Key words]** *Echinococcus granulosus*; Angiogenesis; Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); High mobility group box B1 (HMGB1); *In vitro*

棘球蚴病(Echinococcosis)又称包虫病,是一类全球分布的重要人兽共患寄生虫病,被世界卫生组织列

为17种被忽视的热带病之一<sup>[1-2]</sup>。包虫病在我国呈高度流行,受威胁人口近5 000万,患者数量庞大,是近

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81371842、81371841);上海市三年行动计划第四轮重点学科(15GWZK0101)

**[作者单位]** 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室、世界卫生组织热带病合作中心、科技部国家级热带病国际联合研究中心(上海200025)

**[作者简介]** 尹建海,男,硕士,助理研究员。研究方向:寄生虫感染与免疫

\* 通信作者 E-mail: caojpcdc@163.com

**[数字出版日期]** 2017-05-23 11:47

**[数字出版网址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20170523.1147.001.html>

年来我国重点防控的重大寄生虫病<sup>[3-6]</sup>。

该病是由棘球属绦虫的幼虫(棘球蚴)寄生于人和动物的肝、肺等组织器官而引起的。与其他寄生生物一样,棘球蚴的寄生需要相应的脉管系统来提供氧气、营养物质和生长因子等,并排泄二氧化碳和代谢废物<sup>[7-10]</sup>。其中,血管系统是一种重要的脉管系统。在正常生理状态下,已存在的毛细血管和毛细血管后微静脉会生成新的毛细血管,称为血管新生<sup>[11]</sup>。但在病理状态下,血管新生更加复杂,其不仅取决于血管生成促进因子和抑制因子的动态平衡,还有赖于细胞-细胞以及细胞-基质间的相互作用<sup>[11]</sup>。除此之外,寄生虫感染机体后,为了满足其在宿主体内的生长发育,血管新生亦受到宿主、寄生虫以及两者相互作用的影响<sup>[7]</sup>。目前,该方面研究多集中于宿主或宿主与寄生虫的联合因素,而较少关注虫源因素。有研究发现,多房棘球蚴的磷酸葡萄糖异构酶<sup>[12]</sup>、秀丽隐杆线虫的血管内皮生长因子样(Vascular endothelial growth factor-like, VEGF-like)分子<sup>[13-14]</sup>和血吸虫虫卵分泌物<sup>[15]</sup>等可能具有促血管生成因子的作用。

实验感染小鼠腹腔中的细粒棘球蚴囊多由一层薄膜包裹,该包膜与小鼠腹腔壁相连,其中肉眼可观察到丰富的血管,推测寄生虫可通过其进行同宿主的物质交换,但是血管的生成机制目前尚未明确。本文通过研究细粒棘球蚴囊培养上清体外对人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)成管的影响作用,旨在为进一步阐述细粒棘球蚴寄生促进宿主血管新生的机制提供依据。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 实验动物 本实验室保种的细粒棘球蚴腹腔感染昆明种小鼠,小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,在本所SPF级实验动物室饲养。该研究得到中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所实验动物福利伦理审查委员会批准(批准号:IPD-2016-4)。

1.2 内皮细胞 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)细胞株购自ScienCell公司。

1.3 主要试剂 RPMI-1640培养基购自Gibco公司;双抗(青霉素和链霉素)购自上海生物工程有限公司;HyClone DPBS购自GE公司;BCA蛋白浓度检测试剂盒购于天根生化科技有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;内皮细胞完全培养基(Endothelial cell medium, ECM)试剂盒(包括100 ml基础培养基、5 ml胎牛血清、1 ml内皮细胞生长支持

物和1 ml双抗)、胰酶消化液、胰酶中和液和纤维粘连蛋白购自ScienCell公司;基底膜基质(Matrigel matrix)购自BD公司;RNA提取试剂盒购自Qiagen公司;RNA反转录试剂盒购自Takara公司;DnaseI和引物购自ThermoFisher Scientific公司;SYBR Green Realtime PCR Master Mix购自Toyobo公司。

### 2 方法

2.1 细粒棘球蚴剖检 保种的细粒棘球蚴感染小鼠,无菌条件下收集其腹腔中的细粒棘球蚴囊,用无菌生理盐水清洗3~5次后分离原头节及囊液。将上述细粒棘球蚴囊和原头节用RPMI-1640(含100 U/ml青霉素以及100  $\mu$ g/ml链霉素)于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,收集培养上清于2 500  $\times$  g离心10 min后收集上清液。用BCA蛋白浓度检测试剂盒测上清液和囊液中的总蛋白浓度。

2.2 HUVEC复苏、传代与培养 T75培养瓶中加入5 ml DPBS混匀,再加入150  $\mu$ l纤维粘连蛋白,混匀后放入37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱过夜包被。吸出DPBS和纤维粘连蛋白,加入内皮细胞完全培养基15 ml,同时将HUVEC从液氮中取出,在37  $^{\circ}$ C水浴中快速融化后,加入到培养瓶中,轻轻混匀细胞,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱,第二天更换完全培养基,而后每隔2~3 d换培养基1次。

重新包被新的培养瓶,当细胞生长覆盖面积超过90%时即可传代。用10 ml DPBS清洗第一个培养瓶,加2 ml胰酶消化液,混匀后置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱1~2 min直至细胞变圆,然后吸取培养瓶中大部分液体至含有5 ml胎牛血清的50 ml离心管,而培养瓶继续消化1~2 min后,轻轻拍打培养瓶,再加入5 ml胰酶中和液终止消化,将培养瓶中的所有溶液一起加入到50 ml离心管,继续往培养瓶中加5 ml胰酶中和液,收集残余细胞到50 ml离心管,然后300  $\times$  g离心5 min,弃上清后用完全培养基重悬,再以5 000个/cm<sup>2</sup>的细胞浓度置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

2.3 内皮细胞成管试验 将Matrigel matrix和移液器等在4  $^{\circ}$ C过夜预冷。向96孔板内注入60  $\mu$ l Matrigel matrix,再次于4  $^{\circ}$ C冷藏过夜。将铺好的96孔板在37  $^{\circ}$ C孵育30 min,同时按2.2中的步骤取对数期生长的HUVEC,用RPMI-1640培养基重悬HUVEC,密度为3  $\times$  10<sup>5</sup>个/ml,每孔加100  $\mu$ l,再向各孔加100  $\mu$ l细粒棘球蚴囊培养上清(棘球蚴囊组)、原头节培养上清(原头节组)、囊液(囊液组)和RPMI-1640培养基(空白对照组),各组重复2孔。在倒置显微镜下观察各组HUVEC成管情况,每孔采集3张图像,采用NIH

Image J软件的Angiogenesis模块,计算各组的片段长度总和。该实验重复3次。

**2.4 序列比对与引物设计** 从Sanger数据库下载细粒棘球蚴的氨基酸序列,建立本地数据库,用Blast 2.2.25程序对小鼠的基质金属蛋白酶9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和高迁移率族蛋白B1(High mobility group box B1, HMGB1)的氨基酸序列进行比对,根据指标“identity 大于40%”或“bit score 大于100”选择同源序列,并应用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物用于实时定量荧光PCR反应。

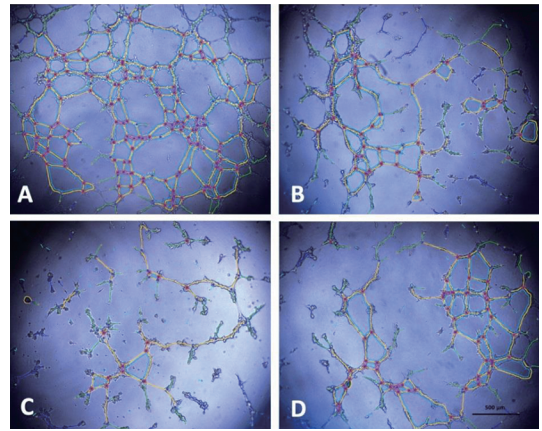
**2.5 RNA提取、反转录与实时定量** 荧光PCR提取并纯化细粒棘球蚴囊和原头节RNA,应用反转录试剂盒生成cDNA后,用实时定量荧光PCR进行扩增。扩增体系为:体系 ddH<sub>2</sub>O 6.4 μl、SYBR Green PCR Master Mix 10 μl、正向引物和反向引物各0.8 μl (10 pmol/μl)、cDNA 2 μl,共计20 μl。反应条件:95℃预变性30 s;变性温度95℃5 s,退火温度60℃10 s,聚合温度72℃30 s,共40个循环;95℃10 s;从65~95℃,在520 nm下每10 s升高0.5℃,直至加热到95℃时连续测量荧光,获得温度的融解曲线。

**2.6 统计学分析** 采用SPSS 20.0,以单因素方差分析比较片段长度总和和组间差异,并采用LSD法进行两两比较;采用Livak法分析促血管生成因子转录水平并用*t*检验进行统计学分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 细粒棘球蚴培养上清与囊液对HUVEC的成管作用

以细粒棘球蚴囊培养上清、原头节培养上清和囊液分别刺激HUVEC,RPMI-1640为空白对照。每隔1 h观察一次HUVEC成管情况,计算3 h时成管片段长度总和(图1)。结果显示,棘球蚴囊组( $13\,253 \pm 1\,469$ )、囊液组( $2\,838 \pm 410$ )、原头节组( $7\,586 \pm 1\,694$ )和空白对照组( $7\,497 \pm 709$ )的片段长度总和之间差异有统计学意义( $F = 73.03, P < 0.001$ );两两比较结果表明,棘球蚴囊组片段长度总和显著大于原头节组( $P < 0.001$ )、囊液组( $P < 0.001$ )和空白对照组( $P < 0.001$ );原头节组大于囊液组( $P < 0.001$ ),而囊液组小于空白对照组( $P < 0.001$ )(图2)。

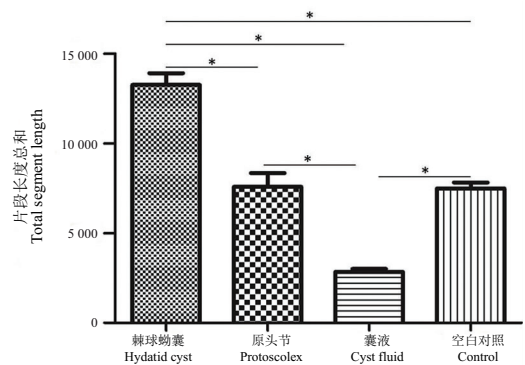


A 棘球蚴囊组;B 原头节组;C 囊液组;D 空白对照组

A Hydatid cyst group; B Protoscolex group; C Cyst fluid group; D Blank control group

图1 细粒棘球蚴体外对HUVEC成管的影响

Fig. 1 Effects of *Echinococcus granulosus* on HUVEC into tube in vitro



\* 组间比较,  $P < 0.001$

\* Comparison among groups,  $P < 0.001$

图2 细粒棘球蚴体外促血管生成片段长度总和

Fig. 2 Total segment length of angiogenesis induced by *E. granulosus* hydatid cysts and protoscolex in vitro

### 2 细粒棘球蚴来源的促血管生成因子同源序列实时定量荧光PCR结果

通过序列比对获得小鼠MMP-9和HMGB1在细粒棘球蚴中的同源蛋白序列,分别为EgrG\_000939100.1 (Eg-MMP-9)和EgrG\_001049000.1 (Eg-HMGB1)(表1)。

Eg-MMP-9和Eg-HMGB1在细粒棘球蚴囊和原头节两个发育阶段均有表达,其中Eg-MMP-9在原头节中的转录水平高于棘球蚴囊( $t = -11.65, P < 0.001$ ),而Eg-HMGB1( $t = 6.43, P = 0.003$ )在棘球蚴囊中的转录水平高于原头节(图3)。



表1 细粒棘球蚴类似小鼠促血管生成因子及其引物

Table 1 Mouse pro-angiogenic factors analogous molecules and primers in *E. granulosus*

促血管生成因子 Pro-angiogenic factor	细粒棘球蚴 <i>E. granulosus</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	引物序列(5'-3')	
			Primer sequence (5'-3')	
			正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
MMP-9	EgrG_000939100.1	Gi:7305277	GGCGAGTATCAATGGCG	TGTAGATCAAAGAGTCT GGACGT
HMGB1	EgrG_001049000.1	Gi:84040262	AGGAAGTGGAGGAAGA GGG	ATCGCCGCAGCATAGAA

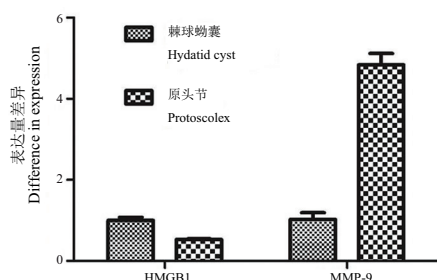


图3 细粒棘球蚴囊与原头节中Eg-MMP-9和Eg-HMGB1的转录情况

Fig. 3 Transcription of Eg-MMP-9, Eg-HMGB1 between *E. granulosus* hydatid cysts and protoscolex

## 讨 论

本研究结果表明,棘球蚴囊能促进HUVEC成管,但作为囊的重要组成部分,囊液和原头节并未表现出明显的促血管生成效果。本研究尝试将囊液和囊培养液上清总蛋白浓度调整到0.1 mg/ml,仍未发现囊液的促血管生成作用。这可能与囊液和囊培养液中所含的确切成分有关<sup>[16]</sup>,也可能与血管生成作用和成分间存在某种计量依赖关系有关。细粒棘球蚴囊是寄生虫-宿主相互作用的关键,其释放的物质中可能存在某些促血管生成的因子,可能是虫体调节宿主血管生成的一种方式。此外,本研究还对原头节培养上清的作用进行了探讨。虽然原头节是细粒棘球蚴的重要组成部分,在致病过程中发挥重要作用,但鉴于小鼠体内绝大部分为不育囊,无原头节,使得本实验获得的原头节数目较少,其培养上清的浓度较低,从而导致促血管生成效果未能观察到。

在进一步探讨细粒棘球蚴囊产生促血管生成作用机制的过程中,本研究发现在细粒棘球蚴中有小鼠MMP-9和HMGB1的同源蛋白,其对应基因在细粒棘球蚴囊和原头节中均存在转录且其表达量存在差异。有研究表明,MMP-9通常由活化的巨噬细胞、粒细胞、毛细血管内皮细胞和恶性肿瘤细胞等分泌,能

降解细胞外基质中的IV、V型胶原和明胶,在炎症反应、肉芽肿反应、血管生成和肿瘤的浸润转移中起重要作用<sup>[17]</sup>。有研究报道,牛源细粒棘球蚴囊壁和囊液中存在有生物学活性的宿主来源的MMP-9,但其在细粒棘球蚴囊与宿主间或在细粒棘球蚴囊内的作用尚不清楚<sup>[18]</sup>。那么,小鼠的棘球蚴囊是否也存在类似现象以及宿主的MMP-9是否对虫源的MMP-9存在竞争性抑制也有待研究。近年来研究发现, HMGB1除了介导炎症反应外,还可促进多种肿瘤的新生血管生成<sup>[19]</sup>。Thirugnanam等<sup>[20]</sup>在班氏丝虫和马来丝虫中发现了与人同源性高达99%的HMGB1,其能促进小鼠腹腔巨噬细胞和人早幼粒白血病细胞分泌TNF- $\alpha$ 、GM-CSF和IL-6等炎性因子,在丝虫致病过程中发挥重要作用。

综上所述,本研究发现虫源MMP-9和HMGB1在细粒棘球蚴两个发育阶段均有转录表达,且棘球蚴囊培养上清能促进内皮细胞成管,提示虫源分子可能在细粒棘球蚴寄生宿主的过程中参与了宿主的血管生成,其有助于细粒棘球蚴在宿主体内的寄生与致病,且这些分子可能为潜在的抗棘球蚴药物靶点。阻断相关虫源分子而抑制宿主血管生成现象可能是治疗包虫病的潜在途径,但虫源分子促进血管生成的确切机制还有待进一步研究。

## 【参考文献】

- [1] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis [J]. Adv Parasitol, 2017, 95: 315-493.
- [2] Eckert J, Gemmell M, Meslin FX, et al. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern [M]. Paris: Office International des Epizooties, 2001: 21-72.
- [3] Craig PS, Hegglin D, Lightowers MW, et al. Echinococcosis: control and prevention [J]. Adv Parasitol, 2017, 96: 55-158.
- [4] 温浩, 吐尔干艾力·阿吉, 邵英梅, 等. 棘球蚴病防治成就及面临的挑战 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33(6): (下转第333页)

- [17] Wang L, Chen H, Liu D, et al. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolate from animals and humans in China [J]. PLoS One, 2013, 8(1):e53483.
- [18] 付晓莹, 冯永杰, 梁宏德, 等. 中国弓形虫分离株基因型及致病性的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(7):669-673.
- [19] 候照峰, 臧传俊, 朱鸿飞, 等. 扬州及周边地区动物弓形虫病流行病学调查及虫株遗传多样性分析[C]. 中国畜牧兽医学会兽医寄生虫学分会第十三次学术研讨会论文集, 2015:52.
- [20] 张蔚, 刘静山, 马以武, 等. 自畸形死胎分离出弓形体[J]. 中国人兽共患病杂志, 1987, 3(3):26.
- [21] 张蔚, 刘静山, 马以武, 等. 弓形虫速殖子超微结构的观察[J]. 苏州医学院学报, 1987, 7(3):202.
- [22] 张蔚, 刘静山. 从人体分离的弓形虫速殖子对人体细胞和鸡胚成纤维细胞的寄生适应观察[J]. 苏州医学院学报, 1988, 8(4):272-275.
- [23] 杨秋林, 陆惠民, 闵太善, 等. 弓形虫昆山分离株P30抗原基因的克隆与表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(4):27-29.
- [24] 杨秋林, 陆惠民, 郭敏辰, 等. 弓形虫昆山分离株速殖子期表达型cDNA文库的构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(5):25-27.
- [25] Dubey JP, Zhu XQ, Sundar N, et al. Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China [J]. Vet Parasitol, 2007, 145(3-4):352-356.
- [26] Wang H, Wang T, Luo Q, et al. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 157(3):393-397.
- [27] 聂大平, 贾玉玺, 陈凌娟, 等. 云南HIV阳性患者感染弓形虫基因型的初步分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(5):410-411.
- [28] 陈凌娟, 贾玉玺, 冷丽, 等. 分离自HIV阳性者的弓形虫与RH株GRA6基因比较[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2014, 26(4):434-436.
- [29] 沈茜, 王林, 方强, 等. 肿瘤患者弓形虫感染的抗体检测及虫株基因型分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(5):366-370.
- [30] Wang L, He LY, Meng DD, et al. Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in cancer patients in Anhui province, Eastern China [J]. Parasit Vectors, 2015, 8:162.
- [31] Rosowski EE, Lu D, Julien L, et al. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein [J]. J Exp Med, 2011, 208(1):195-212.
- [32] 沈继龙, 王林. 弓形虫的基因型及其主要效应分子的致病机制[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33(6):429-435.

[收稿日期] 2016-08-04 [编辑] 汪伟

(上接第323页)

- 466-471.
- [5] Zhang W, Zhang Z, Wu W, et al. Epidemiology and control of echinococcosis in central Asia, with particular reference to the People's Republic of China [J]. Acta Trop, 2015, 141(Pt B):235-243.
- [6] 王国强. 全国包虫病流行情况调查报告[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016: 28.
- [7] Dennis RD, Schubert U, Bauer C. Angiogenesis and parasitic helminth-associated neovascularization [J]. Parasitology, 2011, 138(4):426-439.
- [8] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(6):464-478.
- [9] Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease [J]. Nature, 2005, 438(770):946-953.
- [10] Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation [J]. Nat Med, 2003, 9(6):685-693.
- [11] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. Nature, 2005, 438(770):932-936.
- [12] Stadelmann B, Spiliotis M, Müller J, et al. *Echinococcus multilocularis* phosphoglucose isomerase (EmPGI): a glycolytic enzyme involved in metacestode growth and parasite-host cell interactions [J]. Int J Parasitol, 2010, 40(13):1563-1574.
- [13] Popovici C, Isnardon D, Birnbaum D, et al. Caenorhabditis elegans receptors related to mammalian vascular endothelial growth factor receptors are expressed in neural cells [J]. Neurosci Lett, 2002, 329(1):116-120.
- [14] Tarsitano M, De Falco S, Colonna V, et al. The *C. elegans* pvf-1 gene encodes a PDGF/VEGF-like factor able to bind mammalian VEGF receptors and to induce angiogenesis [J]. FASEB J, 2006, 20(2):227-233.
- [15] Lejoly-Boisseau H, Appriou M, Seigneur M, et al. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* adhesion of parasite eggs to the vascular endothelium. Subsequent inhibition by a monoclonal antibody directed to a carbohydrate epitope [J]. Exp Parasitol, 1999, 91(1):20-29.
- [16] 吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 543-547.
- [17] Yoon SO, Park SJ, Yun CH, et al. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis [J]. J Biochem Mol Biol, 2003, 36(1):128-137.
- [18] Marco M, Baz A, Fernandez C, et al. A relevant enzyme in granulomatous reaction, active matrix metalloproteinase-9, found in bovine *Echinococcus granulosus* hydatid cyst wall and fluid [J]. Parasitol Res, 2006, 100(1):131-139.
- [19] Van Beijnum JR, Nowak-Sliwinska P, Van Den Boezem E, et al. Tumor angiogenesis is enforced by autocrine regulation of high-mobility group box 1 [J]. Oncogene, 2013, 32(3):363-374.
- [20] Thirugnanam S, Munirathinam G, Veerapathran A, et al. Cloning and characterization of high mobility group box protein 1 (HMGB1) of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi* [J]. Parasitol Res, 2012, 111(2):619-627.

[收稿日期] 2017-03-27 [编辑] 邓瑶