

寄生性蠕虫丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展

盖文燕^{1,2}, 王君玮², 付宝权¹

(1.中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室,农业部兽医公共卫生重点开放实验室,甘肃省动物寄生虫病重点实验室,甘肃兰州 730046;2.中国动物卫生与流行病学中心,山东青岛 266032)

摘要: 丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpin)是一种蛋白水解酶,广泛存在于生物体中。本文论述了丝氨酸蛋白酶抑制剂的分类、结构、功能及在寄生性蠕虫中的研究进展。指出通过对Serpin的研究,有望使其作为寄生性蠕虫病诊断和疫苗的候选分子,为寄生性蠕虫病防治奠定基础。

关键词: 寄生性蠕虫; 丝氨酸蛋白酶抑制剂

中图分类号: R978.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-944X(2015)03-0057-05

Research Progress on Serine Proteinase Inhibitor (Serpin) in Parasitic Helminth

Gai Wenyan^{1,2}, Wang Junwei², Fu Baoquan^{1*}

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology; Key Laboratory of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province; Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046; China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032)

Abstract: Serine proteinase inhibitor, also called Serpin belongs to a proteinase enzymes distributed ubiquitously in organisms. The construction, function of Serpins and the research progress on Serpins in parasitic helminthes were briefly reviewed in this article, pointing out that Serpin could be the candidate molecule in parasitic helminth diagnostics and vaccine.

Key words: parasitic helminth; serine proteinase inhibitor (Serpin)

蛋白酶抑制剂,也称蛋白酶抑制物。到目前为止,自然界中已经发现四类蛋白酶抑制剂,分别是丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂。丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor,简称Serpin)是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一类蛋白酶,它广泛存在于多细胞动物和植物界中。在植物、动物、病毒和微生物中已经发现了几百种Serpin,所有的Serpin都有一个共同的保守结构—螺旋状反

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD40B03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(0032007012); 甘肃省科技重大专项(0702NKDA039); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

通讯作者: 付宝权

应位点(RSL),目标蛋白酶通过裂解RSL内部P1和P1'残基的肽键,使RSL被裂解^[1]。Serpin参与到许多基本的生理学反应中,如血液凝固、(血)纤维蛋白溶解作用、炎症、信号级联放大、免疫应答、肿瘤抑制和荷尔蒙的传导^[2]。寄生性蠕虫的Serpin通过抑制宿主丝氨酸蛋白酶活性,使寄生性蠕虫免受宿主体内蛋白水解酶类的降解作用,从而逃避宿主的防御机制,有利于寄生性蠕虫在宿主体内存活。近年来寄生性蠕虫Serpin研究广泛的受到重视,本文就Serpin的分类、作用机制以及寄生性蠕虫Serpin的研究进展进行简要综述。

1 分类

Serpin超家族由40多个来源不同的成员组成,其中大多数的成员都是单链的糖蛋白,相对分子量

(Mr) 为 40 kDa~100 kDa, 在羧基末端有一个反应位点^[3]。根据 Serpin 与蛋白水解酶作用方式的不同, 可将 Serpin 分为可逆的抑制剂和不可逆的抑制剂, MEROPS 抑制剂家族是不可逆的抑制剂, Kunitz 抑制剂家族和 Kaza 抑制剂家族是可逆的抑制剂; 根据丝氨酸蛋白酶抑制剂存在部位的不同, 可将 Serpin 分为细胞内丝氨酸蛋白酶抑制剂和细胞外丝氨酸蛋白酶抑制剂两种。

2 作用机制

Serpin 超家族是一个保守结构的蛋白质家族, 有序列相似性。所有 Serpin 家族的成员都有一个由 9 个 α 螺旋和 3 个 β 折叠片组成的三级结构^[4]。Serpin 序列可分为基序、螺旋状反应位点 (RSL) 和信号序列三部分。RSL 暴露在 Serpin 表面, 位于 Serpin 序列的 C 末端附近, 是 Serpin 的一个保守的功能性区。RSL 有一个易裂开的结合物, 这个结合物可以作为诱饵去捕获目标蛋白水解酶, 当结合物捕获到目标蛋白水解酶后, Serpin 通过诱导作用使蛋白水解酶的构象发生变化, 从而使捕获到的目标蛋白水解酶的活性受到抑制^[5]。当蛋白水解酶从 RSL 中裂解下来的时候, 整个活性中心和蛋白水解酶一起经由丝氨酸活性位点穿过 Serpin 分子, 在整个过程中蛋白水解酶构象发生了变化, 并且是很容易降解的。螺旋状反应位点 (RSL) 自身的氨基酸序列都具有高度的变异性^[6], RSL 的高度变异性是 Serpin 一个显著地特征, 这种氨基酸的差异性为抑制因子从根本上选择蛋白水解酶的特异性提供了可能^[7]。

在寄生性蠕虫感染宿主的过程中, 宿主体内的分泌的蛋白水解酶类增多, 分解的蛋白水解酶类集中降解侵入宿主体内的寄生性蠕虫, 而寄生性蠕虫的 Serpin 通过抑制宿主丝氨酸蛋白水解酶的活性, 使寄生性蠕虫免受宿主蛋白水解酶的降解作用, 从而逃避宿主的防御机制, 有利于寄生性蠕虫在宿主体内存活。因此 Serpin 在宿主和寄生性蠕虫之间的相互作用中起着重要的作用。

3 研究进展

3.1 线虫

线虫有两种丝氨酸蛋白酶抑制剂: 一类是经典的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serpin), Mr 为 40 kDa~100 kDa; 另一种新型的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族, 以小的丝氨酸蛋白酶抑制因子 (Smapiin) 来命名, Mr 只有 6.4 kDa。

马来丝虫 (*Brugia malayi*) Serpin 在线虫中是最早被发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族。Yenbutr 等^[8]首次克隆到马来丝虫的 Serpin 基因 BmY8, 其融合蛋白 Bmserpin 的 Mr 为 44.0 kDa。氨基酸序列与其它物种的 Serpin 有 22%~30% 的同源性, 高度保守的氨基酸位点序列的相似性为 35%~39%, 这种特殊位点氨基酸的高度保守性可能是 Serpin 三级结构和功能所必须的^[9-10]。大部分的 Serpin 活性位点都在高度保守的丙氨酸下游 10 个氨基酸处, 而 Bmserpin 的高度保守的丙氨酸在 349 位点处。Bmserpin 在马来丝虫感染阶段幼虫的表达量是成虫和微丝蚴表达量的 10~16 倍。马来丝虫的幼虫通过抑制 XII 因子和丝氨酸蛋白酶的功能, 来抑制内源性凝血, 从而抑制早期血栓的形成, 这种抑制活性在马来丝虫粗提物和微丝蚴 (Mf) 中也存在。Bmserpin 可以抑制人嗜中性粒细胞中的丝氨酸蛋白酶, 有利于马来丝虫逃避宿主的免疫防御功能。Zang 等^[7]从马来丝虫 cDNA 文库中筛选到了马来丝虫的 Serpin 基因 Bm-spn-2, Mr 为 47.5 kDa。Bm-spn-2 只在微丝蚴 (Mf) 表达, 它的第 22 位氨基酸的羧基端含有保守的 Serpin 信号序列。Bm-spn-2 是目前已知的 93 种丝氨酸蛋白酶抑制中分子量最大的一种 Serpin。

与马来丝虫一样, 旋毛虫的 Serpin 有期特异性表达的特性, Nagano 等^[11]用旋毛虫感染两月后的小鼠血清免疫筛选旋毛虫肌幼虫 cDNA 文库, 获得 Serpin 的阳性克隆 Ts11-1, 其融合蛋白的 Mr 为 42.4 kDa。其氨基酸序列与马来丝虫 Serpin 的相似性约为 30%, 活性区域相似性约为 50%。抗重组 Ts11-1 抗体可以识别新生幼虫和感染 18 天后的肌幼虫粗提物, 分别获得 Mr 为 42 kDa 和 37 kDa 的蛋白条带, 识别成虫 (Ad6) 有微弱的反应, 但是不能识别感染 30 天后的肌幼虫。在新生幼虫和

感染 18 天后的肌幼虫, Ts11-1 的转录水平较强, 在成虫和感染 30 天后的肌幼虫转录水平较弱, 可以推断旋毛虫 *Serpin* 只在肌幼虫的早期被合成。Ts11-1 融合蛋白可以对胰蛋白酶活性进行剂量依赖性抑制, 抑制效果比 SigmaT9253 还要好。吴秀萍等^[12]也克隆到了旋毛虫 *Serpin* 基因片段, 其融合蛋白与旋毛虫感染 60 天的猪血清反应, 与感染 26 天的猪血清几乎不反应。*Serpin* 在新生幼虫、感染后 35 天的肌幼虫、1-6 日龄的成虫都有转录。并且在旋毛虫感染宿主 35 天(肌幼虫期) *Serpin* 蛋白大量表达。

回旋钩尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*) 的 *Serpin* 也是期特异性表达, Ford 等^[13]从回旋钩尾丝虫三期幼虫的 cDNA 表达文库中筛选出 *Serpin* 基因 Ov-SPI-1。Ov-SPI-1 与 Ov-SPI-2 一起构成了线虫新的 *Serpin* 家族 Ov-SPI。Ov-SPI 与猪蛔虫新型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*Smapin*) 有相似性功能, 它们都能保护寄生虫免受宿主肠道内蛋白水解酶的侵蚀。其融合蛋白具有 *Serpin* 超家族的特性, 能抑制丝氨酸蛋白酶、特殊的弹性蛋白、糜蛋白和组织蛋白 G 的活性。Ov-SPI-1 具有期特异性的表达, 主要集中在三期幼虫角质层的基底层; 成虫的 Ov-SPI 蛋白集中在精子和卵壳的周围, 这有助于胚胎的发育。Ov-SPI 在回旋钩尾丝虫的蜕皮、胚胎的发育和生殖发育过程及在终末宿主体内的定居均发挥着重要的作用。

锡兰钩虫中 (*Ancylostoma ceylanicum*) 存在着一种 Kunitz 型的 *Serpin*, 它与疾病的致病机理有关。Milestone 等^[14]从锡兰钩虫成虫中获得 *Serpin* 基因 AceKI-1。其有线虫特有的前导序列, Mr 为 7.9 kDa, pI 为 6.79。融合蛋白 rAceKI-1 是一种紧密结合的抑制剂, 可以抑制糜蛋白酶、胰弹性蛋白酶、中性白细胞弹性蛋白酶和胰蛋白酶的活性。在锡兰钩虫成虫的可溶性蛋白和排泄分泌物可以检测到 rAceKI-1 抑制活性存在, 但是在感染第 3 阶段的幼虫检测不到抑制活性。天然的 AceKI 蛋白分布于成虫的角质层中, AceKI-1 能有效的抑制哺乳动物肠内蛋白水解酶, 因此 AceKI-1 在寄生虫入侵

和钩虫性贫血的发病机理中均发挥着重要的作用。同时融合蛋白 rAceKI 能部分的消除由锡兰钩虫引起的营养不良和生长延迟, 说明 rAceKI 在疾病的致病机理中发挥的作用。

透明毛圆线虫 (*Trichostrongylus vitrinus*) 感染阶段的粗提物中克隆到了丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *Serpin*^[15], 它主要存在于第四阶段的幼虫和成虫的 ES 产物中。其融合蛋白能很好的抑制宿主体内的丝氨酸蛋白酶的活性, 也能抑制宿主体内肥大细胞中蛋白酶的活性。*Serpin* 可以调节感染阶段丝氨酸蛋白酶的活性; 也可以通过抑制宿主炎症细胞释放的丝氨酸蛋白酶的活性而调节宿主的免疫反应。

捻转血矛线虫 (*Haemonchus contortus*) 的丝氨酸蛋白酶抑制剂 hc-serpin, 融合蛋白 rHc-*Serpin* 的 Mr 为 40.3 kDa, PI 为 8.5^[16]。在稳定的 PH 和温度的条件下, rHc-*Serpin* 可以有效的抑制胰蛋白酶和抗凝血酶的活性。rHc-*Serpin* 可以被自然感染的山羊血清特异性的识别。hc-serpin 主要存在于捻转血矛线虫在成虫胃肠道的上皮细胞。

线虫中还有一种新型的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族, 它少于 100 个氨基酸残基, Mr 为 6.4 kDa。这种丝氨酸蛋白酶抑制剂与 *Serpin* 家族没有结构的相似性, 以小丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*Smapin*) 来命名。线虫还有一种新型的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族, 它少于 100 个氨基酸残基, Mr 为 6.4 kDa。在蛋白水平上, *Smapin* 有 10 个半胱氨酸残基, 它们相互作用形成的二硫键构成了蛋白质的核心, 这种特殊的结构促进了 *Smapin* 与蛋白水解酶的相互作用。目前主要在猪鞭虫 (*Trichuris suis*) 中发现了 *Smapin* 的存在, Rhoads 等^[17]从猪鞭虫的成虫中分离到了糜蛋白酶抑制剂的基因 TsTCI, 它与蜜蜂幼虫血淋巴中的糜蛋白酶抑制剂 (*AmCI*) 有同源性。其融合蛋白 Mr 为 6.6 kDa, 主要抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的活性, 不能抑制弹性蛋白酶、凝血酶和凝血因子 Xa 等的活性。TsTCI 序列的 N 端活性区域与蜜蜂血淋巴蛋白酶抑制因子有 36% 的同源性, 与该家族的其它成员没有序列的同源性, 与猪蛔虫、单一异尖线虫、犬钩口线虫的 *Serpin* 和 *AmCI*

在反应活性区域均有相似性。猪蛔虫聚集于酶丰富的消化道，而猪鞭虫主要集中在哺乳动物消化酶量少的盲肠和结肠，可能与 TsTCI 这种丝氨酸蛋白酶抑制剂有关。同时从猪鞭虫成虫中获得另外一种 Smapin 基因 TsCEI^[18]，其融合蛋白的 Mr 为 6.4kDa，TsCEI 与 TsTCI 有 48% 的序列相似性，与蜜蜂血淋巴蛋白酶抑制因子有 36% 的同源性，其与欧洲蟾蜍的胰蛋白酶抑制因子或凝血酶抑制因子、单一异尖线虫的弹性蛋白酶抑制剂、蛔虫的糜蛋白酶抑制剂和胰蛋白酶抑制剂均有序列的相似性。TsCEI 主要通过调节肠粘膜的肥大细胞的蛋白水解酶和宿主的免疫反应，从而利于在宿主体内寄生。

3.2 吸虫

吸虫中也存在 Serpin，Mr 为 40 kDa~100 kDa，但是目前其功能尚不清楚。Blanton 等^[19]通过免疫筛选从埃及血吸虫 cDNA 文库中筛选出丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 serpin，融合蛋白的 Mr 为 46.2 kDa，其天然抗原是一种糖蛋白，位于成虫的体表，Mr 为 54 kDa~58 kDa。序列对比发现其蛋白在活性区域有苯丙氨酸的存在，目前其功能还不清楚。Huang 等^[20]也从埃及血吸虫 (*Schistosoma haematobium*) 中分离到 Serpin，在 Serpin 的活性中心有抗胰蛋白酶的残基。与已知的 Serpin 超家族的成员不同，埃及血吸虫的 Serpin 是一种膜嵌合形蛋白，它存在于寄生虫的体表。

曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 有 Serpin 的存在，Ghendler 等^[21]从曼氏血吸虫成虫中克隆到丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 Smpi56，其融合蛋白的 Mr 为 56.0 kDa。Smpi56 能抑制抑肽酶和嗜中性粒细胞中的弹性蛋白酶的活性，不能抑制木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、凝血酶、糜蛋白酶、蛋白酶 K、尿激酶和乙酰胆碱酯酶的活性。目前 Smpi56 的生物学功能尚不清楚，但是其弹性蛋白酶的抑制活性却被检测到，曼氏血吸虫可以利用 Smpi56 使自身免受嗜中性粒细胞的活化。

已报道从卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) 的 cDNA 文库中筛选到丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 PwSERPIN^[22]，其融合蛋白 rPwSERPIN 的

Mr 大约为 43 kDa，PwSERPIN 有丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族基本的结构基序，与先前报道的其它寄生性蠕虫的 Serpin 序列相似性为 16.5~29.6%。它能有效地抑制猪胰蛋白酶、牛胰凝乳蛋白酶和人凝血酶等酶的活性，对人的嗜中性的组织蛋白酶 G、人的弹性酶和猪的弹性酶的抑制能力很低。它主要存在于寄生虫可溶性的提取物中，在排泄分泌物中 (ESP) 和不可溶性分泌物中不存在。PwSERPIN 是胞内的丝氨酸蛋白酶抑制剂，它在调节寄生虫胞内丝氨酸蛋白酶抑制剂的活性发挥着重要的作用。

最近从华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) 后囊蚴时期的 CDNA 文库中筛选到一种新的丝氨酸蛋白酶抑制剂 CsSERPIN^[23]，与其它寄生性蠕虫的 Serpin 有很高的序列相似性。其开放读码框编码 382 个氨基酸，融合蛋白 rCsproSERPIN 的 Mr 为 42.2 kDa。CsSERPIN 的转录本在华支睾吸虫后囊蚴时期的表达量明显高于成虫时期。

3.3 绦虫

绦虫的 Serpin 为典型的细胞内丝氨酸蛋白酶抑制剂，目前绦虫中只发现一种 Serpin。多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*) 中分离到 Serpin 基因是扁形动物门中第一个发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族^[24]，其氨基酸序列没有 N 末端的糖基化位点。Serpin 融合蛋白有丝氨酸蛋白酶抑制剂的活性，可以抑制哺乳动物肠道内胰蛋白酶和胰弹性蛋白酶两种消化酶的活性。

4 展望

Serpin 在寄生性蠕虫中广泛存在，在调节内源性蛋白酶和外源性蛋白酶中均发挥着重要的作用。目前在线虫、吸虫和绦虫中均有 Serpin 的存在，它们大多数都是非经典的 Kazal 抑制剂家族。在线虫中发现了一种新型的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Smapin)，它的 Mr 只有 6.4 kDa，经典的 Serpin 的 Mr 为 40 kDa~100 kDa，两者的分子量存在很大的差异，但是在功能方面 Smapin 与 Serpin 的差异性却很小，因此还需要继续进行相关方面的研究。寄生性蠕虫 Serpin 通过抑制宿主丝氨酸蛋白酶活性，使寄生性蠕虫免受宿主蛋白酶的降解作用，从

而逃避宿主的防御机制,有利于寄生性蠕虫在宿主内存活。Serpín 可以干扰宿主的保护机制,可以被免疫系统识别,从而引起宿主抗体应答。另外 Serpín 也控制内源性蛋白酶参与寄生虫的生殖和发育过程中。因此通过对 Serpín 研究,有望使其作为寄生性蠕虫病诊断和疫苗的候选分子,为寄生性蠕虫病防治奠定基础。

参考文献:

- [1] Irving J A, Askew D J, Whisstock J C. Computational analysis of evolution and conservation in a protein superfamily[J]. *Methods*, 2004, 32 (2): 73-92.
- [2] Irving J A, Pike R N, Lesk A M, et al. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function[J]. *Genome Res*, 2000, 10 (12): 1845-1864.
- [3] Gettings P, Patston P A, Schapira M. The role of conformational change in serpin structure and function[J]. *Bioessays*, 1993, 15 (7): 461-467.
- [4] Whisstock J, Skinner R, Lesk A M. An atlas of serpin conformations[J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(2): 63-67.
- [5] Huntington J A, Read R J, Carrell R W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation[J]. *Nature*, 2000, 407: 923-926.
- [6] Zang X, Maizels R M. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26 (3): 191-197.
- [7] Zang X, Yazdanbakhsh M, Jiang H, et al. A novel serpin expressed by the blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases[J]. *Blood*, 1999, 94 (4): 1418-1428.
- [8] Yenbutr P, Scott A L. Molecular cloning of a serine proteinase inhibitor from *Brugia malayi*[J]. *Infect Immun*, 1995, 63 (5): 1745-1753.
- [9] Huber R, Carrell R W. Implications of the three-dimensional structure of α_1 -antitrypsin for structure and function of serpins[J]. *Biochemistry*, 1989, 28: 8951-8966.
- [10] Stein P, Chothia C. Serpin tertiary structure transformation[J]. *J Mol Biol*, 1991, 221 (2): 615-621.
- [11] Nagano I, Wu Z, Nakada T, et al. Molecular cloning and characterization of a serine proteinase inhibitor from *Trichinella spiralis*[J]. *Parasitology*, 2001, 123 (Pt1): 77-83.
- [12] 吴秀萍, 于申业, 刘相叶, 等. 旋毛虫 Serpín 基因的体外表达及其特征性鉴定 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22 (2): 105-110.
- [13] Ford L, Guiliano D B, Oksov Y, et al. Characterization of a novel filarial serine protease inhibitor, Ov-SPI-1, from *Onchocerca volvulus*, with potential multifunctional roles during development of the parasite[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (49): 40845-40856.
- [14] Milstone A M, Harrison L M, Bungiro R D, et al. A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (38): 29391-29399.
- [15] MacLennan K, McLean K, Knox D P. Serpin expression in the parasitic stages of *Trichostrongylus vitrinus*, an ovine intestinal nematode[J]. *Parasitology*, 2005, 130 (Pt3): 347-357.
- [16] Yi D, Xu L, Yan R, et al. *Haemonchus contortus*: cloning and characterization of serpin[J]. *Exp Parasitol*, 2010, 125 (4): 363-370.
- [17] Rhoads M L, Fetterer R H, Hill D E, et al. *Trichuris suis*: a secretory chymotrypsin/elastase inhibitor with potential as an immunomodulator[J]. *Exp Parasitol*, 2000, 95 (1): 36-44.
- [18] Rhoads M L, Fetterer R H, Hill D E. *Trichuris suis*: a secretory serine protease inhibitor[J]. *Exp Parasitol*, 2000, 94 (1): 1-7.
- [19] Blanton R E, Licate L S, Aman R A. Characterization of a native and recombinant *Schistosoma haematobium* serine protease inhibitor gene product[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1994, 63 (1): 1-11.
- [20] Huang W, Haas T A, Biesterfeldt J. Purification and crystallization of a novel membrane anchored protein: the *Schistosoma haematobium* serpin[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55 (1): 350-352.
- [21] Ghendler Y, Arnon R, Fishelson Z. *Schistosoma mansoni*: isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor[J]. *Exp Parasitol*, 1994, 78 (2): 121-131.
- [22] Hwang J H, Lee W G, Na B K, et al. Identification and characterization of a serine protease inhibitor of *Paragonimus westermani*[J]. *Parasitol Res*, 2009, 104 (3): 495-501.
- [23] Yang Y, Hu D, Wang L, et al. Molecular cloning and characterization of a novel serpin gene of *Clonorchis sinensis*, highly expressed in the stage of metacercaria[J]. *Parasitol Res*, 2009, 106 (1): 221-225.
- [24] Merckelbach A, Ruppel A. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 156 (1): 84-88.