

文章编号: 1004-0374(2009)04-0579-05

血吸虫基因操作研究进展

陈 晶, 林矫矫, 蔡幼民, 程国锋*

(中国农业科学院上海兽医研究所, 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200241)

摘 要: 近年来, 血吸虫基因组、转录组、蛋白质组和分泌组研究广泛开展, 迫切需要针对单个分子功能深入研究。开展血吸虫基因操作研究不仅可在虫体内深入研究基因功能, 对进一步理解血吸虫生长发育机理和寄生生活特征具有重要意义, 还可建立抗血吸虫候选疫苗和药物靶标筛选的重要平台。为此, 本文总结基因操作技术在血吸虫学中的应用并分析其现状。

关键词: 血吸虫; 基因操作; 疫苗; 药物靶标

中图分类号: S85; R18 **文献标识码:** A

Advances in genetic manipulations of schistosomes

CHEN Jing, LIN Jiao-jiao, CAI You-min, CHENG Guo-feng*

(Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract: There is a great need for deeply understanding the functions of single molecule of schistosomes *in vivo* due to the accumulated information from schistosome genomics, transcriptomics and proteomics. The studies on genetic manipulations of schistosomes not only provide the techniques for further investigating gene functions of schistosomes *in vivo*, which could help not only to understand the mechanism of schistosome growth and development as well as parasitic characters, but also establish the platform for screening novel vaccine candidates and/or drug targets for controlling schistosomiasis. Therefore, we reviewed the advances in genetic manipulations of schistosomes, its application, and its current status.

Key words: schistosome; genetic manipulation; vaccines; drug targets

日本血吸虫病人畜共患, 危害严重, 是我国最重要的公共卫生问题之一, 与艾滋病、肝炎、结核病一道被列为当前我国优先防治的重大传染病。虽然半个多世纪来, 我国血吸虫病防治取得了重大成就, 但防治形势仍然很严峻^[1]。2007年我国仍有血吸虫病患者约52万, 受威胁人口6735万, 局部地区疫情呈现回升趋势。因此, 血吸虫病防治仍是一项长期且艰巨的任务。目前, 血吸虫病治疗高度依赖化学药物——吡喹酮, 但药物治疗并不能控制重复感染, 且吡喹酮的大量使用可能诱导耐药虫株的产生^[2]。利用血吸虫辐射致弱尾蚴或童虫免疫动物可诱导高达60%—80%的保护效果, 提示发展血吸虫疫苗是可行的。但因血吸虫虫体大, 生活史

复杂, 无论是早期的虫体抗原苗、辐射致弱童虫苗, 或近十多年来研制的现代生物技术疫苗尚不宜在现场推广应用, 或诱导的保护效果不甚理想, 亟待开拓新途径。

利用现代分子生物学技术, 已经完成了血吸虫多个发育期的转录组^[3]和蛋白质组^[4]分析, 基因组测序也已完成, 这些研究结果不仅对深入理解血吸虫生长发育机理和寄生生活特征机理具有重要意义

收稿日期: 2009-04-14; 修回日期: 2009-06-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2007CB513108)

*通讯作者 E-mail: chenggfeng@yahoo.com.cn; Tel: 021-34293659

义, 而且为筛选有效抗血吸虫候选疫苗和药物靶标提供了新信息。深入研究一些具有潜在重要功能的分子, 并阐述它们在血吸虫发育、进化以及与宿主寄生关系中的功能, 对探寻并发现高效的疫苗抗原和药物靶标具有重要意义。因此, 开展血吸虫基因操作技术研究尤显得重要。虽然血吸虫生活史复杂, 体外全生活史培养难以实现, 但经过有关学者的努力, 目前已实现了对其进行转基因和基因敲降(knock down)操作, 为深入进行基因功能研究奠定了基础。目前, 用于血吸虫基因操作方法主要有基因枪法、电穿孔法和病毒介导的转基因法, 本文就当前血吸虫基因操作研究进展及其应用作一简要综述。

1 血吸虫转基因研究进展

1999年, Davis等^[5]利用基因枪将携带编码荧光素酶报告基因的DNA导入到血吸虫成虫体内, 并检测到荧光素酶的表达, 首次实现了血吸虫体内表达异源基因的操作。随后, 包括电转法和病毒介导的转基因等技术都在血吸虫中得以成功应用。

1.1 基因枪法 基因枪法基本原理是利用高压冲击波, 将DNA或RNA包被的金属微粒(钨、铜和金颗粒等)加速去穿透细胞膜, 从而使吸附到微粒上的DNA和RNA进入细胞并整合到靶染色组中^[6], 此方法目前被广泛应用到动植物等多种细胞生物的转基因研究中。根据动力来源不同, 基因枪可分为火药式、气动式和电动式三种, 目前在血吸虫转基因研究中主要为气动式基因枪。

在Davis等^[5]利用基因枪将编码萤火虫荧光素酶的DNA导入血吸虫成虫体内后, 类似研究报道相继出现在血吸虫中。Wippersteg等^[7]首先检测了另一种报告基因——绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)在血吸虫中表达情况, 他们利用基因枪将热休克蛋白70(heat shock protein 70, Hsp70)启动子驱动的编码GFP基因的DNA转入到曼氏血吸虫成熟雄虫和孢蚴体内, 观察表明GFP在成虫体表表达, 并应用RT-PCR和免疫印迹进行了验证分析。Heyers等^[8]利用基因枪法将血吸虫Hsp70启动子驱动的编码增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)基因的DNA转入曼氏血吸虫毛蚴体内, 并将毛蚴感染中间宿主(光滑扁卷螺), 观察结果表明, 毛蚴不仅可在螺体内发育成母孢蚴, 还在感染10d后的扁卷螺中检测到了eGFP mRNA, 该研究首次尝试使转基因虫体在宿主体内进入下一

发育时期并追踪检测报告基因的表达情况。Beckmann等^[9]也利用基因枪将曼氏血吸虫肌动蛋白(Actin)启动子驱动的编码GFP报告基因的DNA转入到毛蚴体内, 并将毛蚴感染中间宿主(钉螺), 在母孢蚴和子孢蚴中均观察到报告基因的表达, 并可检测到GFP的mRNA, 结果表明, 转基因血吸虫经过无性繁殖仍可将外源报告基因传给下一发育阶段。Wippersteg等^[10, 11]利用基因枪将半胱氨酸蛋白酶(ER60)启动子驱动的编码GFP基因的DNA转入雄虫体内, 应用激光共聚焦显微镜观察表明GFP在排泄上皮中表达, 利用Texas Red-BSA共定位证明ER60启动子的激活转录具有组织特异性, 这是首次利用基因操作分析血吸虫基因元件的报道。

基因枪法虽然能将外源基因高效地导入到血吸虫多个发育时期体内, 并可传给子代, 但此方法需要特殊装置, 且设备较昂贵。携带外源基因或其他生物小分子的微粒(比如金、铜颗粒等)在强压条件下易对虫体造成一定的物理损伤, 降低虫体存活率。

1.2 电穿孔法 电穿孔法基本原理是将细胞置于高强度的电脉冲下, 引起细胞局部短暂的屏障失稳, 细胞膜在扰动中形成微孔, 对环境中的外源分子表现高通透性, 从而有利于细胞吸收DNA、RNA或其他大分子物质^[12]。

Correnti等^[13]首次利用电穿孔法将编码荧光素酶的RNA导入到曼氏血吸虫童虫体内, 并检测到荧光素酶表达, 利用免疫组化并对其表达进行了定位。Beckmann等^[9]也利用电穿孔法比较了几种不同启动子在血吸虫中表达荧光素酶基因的情况, 结果表明, 曼氏血吸虫肌动蛋白启动子比曼氏血吸虫反式剪切引导序列启动子要好, 而应用SV40启动子并不表达。袁小松等^[14]也利用电穿孔法将Cytomegalovirus (CMV)启动子驱动的编码eGFP质粒导入到日本血吸虫童虫和成虫体内, 观察结果表明, eGFP主要在童虫虫体前端的皮层和副皮层表达, 而在成虫的表达主要集中在皮层、口吸盘和尾部。Cheng等^[15]比较了基因枪和电穿孔两种方法在血吸虫不同时期虫体的基因导入效率, 并鉴定了一种分泌型荧光素酶报告基因, 与其他荧光素酶比较发现该报告基因在血吸虫中的表达量高, 且能分泌到培养基中, 易于检测, 可作为血吸虫基因功能研究的新工具。

1.3 病毒介导的转基因法 病毒介导的转基因法原理是将外源基因插入到人工改造的病毒基因组中,

制成高滴度的重组病毒粒子, 然后将重组病毒感染细胞, 表达外源基因。按病毒基因组遗传物质不同, 病毒载体可分为DNA病毒(腺病毒、腺病毒相关载体等)和RNA病毒(逆转录病毒和慢病毒等)载体。目前, 在血吸虫中已成功地应用逆转录病毒载体进行基因转移, 其根本原理是逆转录病毒经宿主表面受体蛋白识别后进入宿主细胞, 然后在自身基因组编码的反转录酶作用下, 以基因组RNA为模板反转录为DNA, 双链基因组能整合到宿主染色体, 实现外源基因的稳定表达^[16]。

Kines等^[17]首次利用莫洛尼鼠白血病逆转录病毒(moloney murine leukemia retroviral, MMLV)载体将编码eGFP或荧光素酶报告基因转到曼氏血吸虫胞蚴、童虫和成虫三个时期虫体内, 证实携带外源报告基因的病毒能有效整合到虫体基因组中。随后, 他们进一步研究表明逆转录病毒可将报告基因整合到血吸虫染色体中^[18], 应用此方法将来有可能建立稳定的转基因血吸虫虫株。

总之, 基因枪、电穿孔和病毒介导的转基因三种方法在血吸虫多个发育时期中均成功地得以初步应用。基因枪和电穿孔为物理方法, 特别是基因枪法, 对虫体具有较大的损伤。这两种方法都具有转基因效率高, 操作相对简便等优点。病毒介导的转基因法虽能将外源基因整合到虫体基因组中, 但存在重组虫体筛选困难、工作量大等缺点, 还存在重组后目的基因沉默、虫体内源基因功能丧失等潜在问题。目前包括肌动蛋白、Hsp70和反式剪切引导序列启动子等数个血吸虫自身启动子已应用于血吸虫转基因的研究, 但这些启动子存在转录效率差, 导致报告基因表达量低, 不易检测等困难。利用新鉴定的分泌型荧光素酶报告基因(gaussia luciferase)并选择更高效启动子, 建立简便易行的报告基因表达评估方法, 可望为最终建立稳定的转基因血吸虫虫株建立良好的技术平台。

2 血吸虫基因敲降技术

在过去三十年中, 随着现代分子生物学和遗传学的发展, 数种方法已成功地应用于多种生物的基因敲降, 有的方法已经成为对人类某些疾病治疗的新手段, 它们包括反义核酸(antisense oligodeoxynucleotides)、适配体(apptamers)、核酶(ribozyme和DNAzymes)和RNA干扰技术(RNA interference, RNAi)。虽然上述方法已在锥虫、疟原虫和利什曼原虫等寄生虫中得以较广泛的应用, 而

在血吸虫中, 反义核酸技术仅限于对反义核酸分子的分布和稳定性情况进行研究的报道, 实现基因敲降主要依赖于RNAi技术。

2.1 反义核酸技术 反义核酸技术是指利用与mRNA特异性互补的DNA或RNA分子, 阻断或封闭某些基因的表达, 使其低表达或不表达。虽然目前在血吸虫中还没有应用反义核酸技术对其基因进行敲降的研究报道, 但早在1995年, Tao等^[19]已对硫代寡核苷酸分子(oligodeoxynucleotidephosphorothioate)在曼氏血吸虫体内的分布和稳定情况进行了研究, 表明硫代寡核苷酸主要分布在虫体体被膜, 且具有较高的稳定性。

2.2 RNAi技术 RNAi技术是一种外源dsRNA(double stranded RNA, dsRNA)导入生物体内引发同源mRNA降解, 是通过转录后调控基因表达的一种方式^[20]。由于血吸虫基因敲降的实现主要依赖RNAi技术, 因此, 本节主要介绍RNAi技术在血吸虫基因功能研究和治疗血吸虫病方面的新进展。

Skelly等^[21]首次利用RNAi技术抑制了体外培养6d的曼氏血吸虫童虫组织蛋白酶B基因(cathepsin B, SmCB)的表达, 免疫组化和酶活性分析表明使组织蛋白酶B基因的表达降低。Boyle等^[22]在曼氏血吸虫的胞蚴中也成功地应用此项技术在体外培养处理6d的虫体中使葡萄糖转移酶和三磷酸甘油醛脱氢酶的转录降低了70%—80%。其中针对葡萄糖转移酶基因的干扰表明能使葡萄糖的摄入降低40%, 干扰的效果可以持续28d。但该干扰只对毛蚴转化到胞蚴时期作用有效, 对发育成熟胞蚴则效果不明显, 提示在血吸虫的两个生活时期可能其dsRNA的干扰效果不同。

RNAi技术在日本血吸虫中也已经成功地应用, 作者所在实验室根据日本血吸虫抱雌沟蛋白mRNA(gynaecophoral canal protein gene, GCP)序列设计了小干扰RNA分子(small interference RNA, siRNA), 并化学合成了该分子, 然后通过体表渗透法成功地沉默SjGCP的表达, 并证明此干扰特征是剂量依赖型^[23]。进一步利用荧光标记的siRNA分析体表渗透法导入的siRNA在虫体内分布, 结果表明siRNA在虫体内广泛分布, 而且主要在口吸盘和复吸盘^[24]。为进一步提高siRNA的干扰效果, Krautz-Peterson等^[25]以组织蛋白酶B1(cathepsin B1, SmCB1)为靶基因, 通过比较体表渗透法与电穿孔法以研究最优的曼氏血吸虫RNAi条件, 结果表明电穿孔法比体表

渗透法能更好地导入 siRNA, 从而获得更好的基因沉默效果。除了应用化学合成的小 siRNA 外, 血吸虫 RNAi 也可通过重组载体表达发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 得以实现, Zhao 等^[26] 利用哺乳动物 RNA pol III 启动子表达 shRNA 干扰血吸虫 *Mago nashi* 基因的表达, 他们利用电穿孔法将 *Mago nashi* shRNA 的表达载体转到日本血吸虫童虫体内, 分别在电转化后的 1、3、5 d 后用 RT-PCR 和 Western blotting 检测靶基因的转录和表达。结果表明载体表达的 shRNA 特异性地沉默了 *Mago nashi* 基因表达。

RNAi 技术已用于血吸虫基因功能的研究。Correnti 等^[27] 利用电穿孔法代替体表渗透法导入 siRNA 分子到曼氏血吸虫中以干扰 SmCB1 的表达, 研究结果表明干扰 SmCB1 的表达可抑制血吸虫的发育, 提示 SmCB1 参与血吸虫发育。Nabhan 等^[28] 利用脂质体将 siRNA 导入到尾蚴体外转化的曼氏血吸虫童虫中以干扰 26S 蛋白酶体的功能, 结果表明干扰亚基的转录水平降低 80%, 虫体成活率降低 78%, 提示 26S 蛋白酶体在血吸虫的发育中发挥重要作用。Cheng 等^[24] 利用 siRNA 沉默 sjGCP 基因, 结果表明雌雄虫合抱受到明显抑制, 提示 sjGCP 具有影响血吸虫雌雄虫合抱的功能。

RNAi 在血吸虫还可应用于信号转导通路的研究。Osman 等^[29] 利用基因枪将曼氏血吸虫转化生长因子 β 受体 II 型 (transforming growth factor β type receptor II, TGF- β RII) 的特异性 siRNA 导入血吸虫成虫体内, 发现原来宿主转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 诱导 SmGCP 的转录发生改变, 提示宿主 TGF- β 通过虫体 TGF- β RII 调控 SmGCP 的表达。

近几年, RNAi 技术正发展成为治疗某些疾病的新途径^[30], 有关研究在血吸虫病动物模型已尝试, 并取得令人鼓舞的结果。Pereira 等^[31] 注射次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HGPRTase) 特异性 siRNA 到曼氏血吸虫感染的小鼠体内, 6 d 后剖杀小鼠, 发现小鼠虫载量减少了 27%。Cheng 等^[24] 利用尾静脉动态注射技术将 sjGCP 特异性的 siRNA 导入到感染血吸虫的小鼠体内, 经过 7 d 注射, 剖杀小鼠, 发现血吸虫雌雄合抱抑制率达 52%, 宿主虫载量降低 27%。作者所在实验室还比较了 2-O-甲基化修饰和未修饰的 siRNA 在动物体内干扰血吸虫 GCP 的情况, 发现 2-O-甲基化修饰的 siRNA 可显著提高干扰

效果, 其中抑制血吸虫雌雄虫合抱率 74%。经过 5 次注射, 在感染后 32 d 小鼠体内可抑制血吸虫雌雄合抱达 38%, 并降低宿主虫载量达 35%, 提示 RNAi 可能成为治疗血吸虫病的新途径^[24]。

总之, 利用脂质体、电穿孔、基因枪和体表渗透法等多种方法导入 siRNA 在血吸虫多个发育时期已成功应用并沉默靶基因。不同方法各具千秋, 脂质体通常会对血吸虫特别是体外培养的童虫造成一定的毒性, 影响虫体培养的存活率。电穿孔和基因枪法导入 siRNA 虽具有转染效率高, 基因沉默效果好等优点, 但两者多会对虫体造成应激和物理损伤, 特别是对某些基因沉默后的生物表型观察造成影响。无论化学合成的 siRNA 还是载体转录 shRNA 在血吸虫中都可发挥作用, 但靶基因沉默是瞬时的。利用 2-O-甲基化修饰的 siRNA 可显著提高基因沉默的时效, 提示 siRNA 基因沉默效果可能与 siRNA 或 shRNA 稳定性有关。发展操作简便、性状稳定的干扰分子, 甚至可诱导长效表达干扰分子的重组载体将是血吸虫基因功能研究和血吸虫病治疗的新需求。

3 结语

血吸虫生活史复杂, 中间宿主和终末宿主转换, 有性生殖和无性繁殖交替。血吸虫基因组为 270 Mb, 由 7 对常染色体和 1 对 ZW 性染色体组成, 预测编码 1.5 万—2 万个基因。对其转录组和蛋白质组的研究表明, 不同发育时期或性别虫体均存在大量差异表达的基因和蛋白, 甚至某一个基因在不同发育阶段也具有表达的特异性, 提示血吸虫生长发育的复杂性。目前, 仍没有发现高效的血吸虫疫苗候选抗原和药物靶标, 迫切需要对血吸虫生长发育机理和其寄生生活特征进行深入探讨, 为筛选抗血吸虫疫苗或药物靶标提供理论支撑。因此, 结合血吸虫基因组、蛋白质组和转录组研究成果继续深入开展血吸虫基因操作研究, 不仅可为深入探讨血吸虫生长发育机理和寄生虫生活特征等研究提供理论基础, 还可发现高效的抗血吸虫疫苗抗原或药物靶标, 具有重要的现实意义。

[参 考 文 献]

- [1] McManus DP, Li Y, Gray DJ, et al. Conquering "snail fever": schistosomiasis and its control in China. *Exp Rev Anti Infect Ther*, 2009, 7(4): 473-85
- [2] Vennervald BJ, Dunne DW. Morbidity in schistosomiasis: an update. *Curr Opin Infect Dis*, 2004, 17(5): 439-47

- [3] Hu W, Yan Q, Shen DK, et al. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nat Genet*, 2003, 35(2): 139-47
- [4] Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics*, 2005, 5(2): 511-21
- [5] Davis RE, Parra A, LoVerde PT, et al. Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(15): 8687-92
- [6] Higazi TB, Merriweather A, Shu L, et al. *Brugia malayi*: transient transfection by microinjection and particle bombardment. *Exp Parasitol*, 2002, 100(2): 95-102
- [7] Wipperfurth V, Kapp K, Kunz W, et al. HSP70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 120(1): 141-50
- [8] Heyers O, Walduck AK, Brindley PJ, et al. *Schistosoma mansoni* miracidia transformed by particle bombardment infect *Biomphalaria glabrata* snails and develop into transgenic sporocysts. *Exp Parasitol*, 2003, 105(2): 174-8
- [9] Beckmann S, Wipperfurth V, El-Bahay A, et al. *Schistosoma mansoni*: germ-line transformation approaches and actin-promoter analysis. *Exp Parasitol*, 2007, 117(3): 292-303
- [10] Wipperfurth V, Ribeiro F, Liedtke S, et al. The uptake of Texas Red-BSA in the excretory system of schistosomes and its colocalisation with ER60 promoter-induced GFP in transiently transformed adult males. *Int J Parasitol*, 2003, 33(11): 1139-43
- [11] Wipperfurth V, Kapp K, Kunz W, et al. Characterisation of the cysteine protease ER60 in transgenic *Schistosoma mansoni* larvae. *Int J Parasitol*, 2002, 32(10): 1219-24
- [12] Favard C, Dean DS, Rols MP. Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Curr Gene Ther*, 2007, 7(1): 67-77
- [13] Correnti JM, Pearce EJ. Transgene expression in *Schistosoma mansoni*: introduction of RNA into schistosomula by electroporation. *Mol Biochem Parasitol*, 2004, 137(1): 75-9
- [14] 袁小松, 沈继龙, 汪学龙, 等. 用电穿孔法将绿色荧光蛋白基因导入日本血吸虫童虫并表达. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 23: 23-5
- [15] Cheng GF, Davis RE. An improved and secreted luciferase reporter for schistosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 155(2): 167-71
- [16] Yu JH, Schaffer DV. Advanced targeting strategies for murine retroviral and adeno-associated viral vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 99: 147-67
- [17] Kines KJ, Mann VH, Morales ME, et al. Transduction of *Schistosoma mansoni* by vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped Moloney murine leukemia retrovirus. *Exp Parasitol*, 2006, 112(4): 209-20
- [18] Kines KJ, Morales ME, Mann VH, et al. Integration of reporter transgenes into *Schistosoma mansoni* chromosomes mediated by pseudotyped murine leukemia virus. *FASEB J*, 2008, 22(8): 2936-48
- [19] Tao LF, Marx KA, Wongwit W, et al. Uptake, intracellular distribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioate by *Schistosoma mansoni*. *Antisense Res Dev*, 1995, 5(2): 123-9
- [20] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-11
- [21] Skelly PJ, Da' dara A, Harn DA. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int J Parasitol*, 2003, 33(4): 363-9
- [22] Boyle JP, Wu XJ, Shoemaker CB, et al. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol*, 2003, 128(2): 205-15
- [23] Cheng GF, Lin JJ, Shi Y, et al. Dose-dependent inhibition of gynecophoral canal protein gene expression in vitro in the schistosome (*Schistosoma japonicum*) by RNA interference. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(6): 386-90
- [24] Cheng GF, Fu Z, Lin JJ, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of small interference RNA-mediated gynaecophoral canal protein silencing in *Schistosoma japonicum*. *J Gene Med*, 2009, 11(5): 412-21
- [25] Krautz-Peterson G, Radwanska M, Ndegwa D, et al. Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 153(2): 194-202
- [26] Zhao ZR, Lei L, Liu M, et al. *Schistosoma japonicum*: inhibition of *Mago nashi* gene expression by shRNA-mediated RNA interference. *Exp Parasitol*, 2008, 119(3): 379-84
- [27] Correnti JM, Brindley PJ, Pearce EJ. Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. *Mol Biochem Parasitol*, 2005, 143(2): 209-15
- [28] Nabhan JF, El-Shehabi F, Patocka N, et al. The 26S proteasome in *Schistosoma mansoni*: bioinformatics analysis, developmental expression, and RNA interference (RNAi) studies. *Exp Parasitol*, 2007, 117(3): 337-47
- [29] Osman A, Niles EG, Verjovski-Almeida S, et al. *Schistosoma mansoni* TGF- β receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog*, 2006, 2(6): e4
- [30] Chen Y, Cheng GF, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res*, 2008, 25(1): 72-86
- [31] Pereira TC, Pascoal VD, Marchesini RB, et al. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Exp Parasitol*, 2008, 118(4): 619-23