

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.11.011

ZNF185 基因抗原表位分析及合成肽免疫避孕效果研究*

樊姝彤 满 怡 梁祖穆 李清华 陈丽梅 郭璐瑶 潘智芳[△] 冯卫国[△]

(潍坊医学院细胞生物学教研室 山东 潍坊 261053)

摘要 目的:预测 ZNF185 基因的抗原表位,并研究相应合成多肽诱导的免疫应答和免疫避孕效应。**方法:**应用 DNA Star 软件预测 ZNF185 蛋白二级结构、亲水性、可塑性、表面可及性与抗原指数。合成携带 ZNF185 抗原表位的多肽,进行小鼠免疫实验,检测小鼠血清中 IgG 抗体水平、交配率、妊娠率及每窝产仔数,并观察生殖器官是否发生病变。**结果:**筛选 ZNF185 两段氨基酸序列合成多肽,该多肽能够诱导小鼠产生较高的抗体水平,实验组小鼠交配率和妊娠率显著低于对照组,生殖器官并无发生明显的组织病理学变化。**结论:**ZNF185 具有一定的抗生育作用。

关键词:ZNF185; 抗原表位; 合成肽; 免疫避孕

中图分类号:R-33; Q492; Q593.4; Q579.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)11-2052-05

Antigenic Epitopes Analysis of ZNF185 Gene and Study on the Effect of Synthetic Peptide Immunocontraception*

FAN Shu-tong, MAN Yi, LIANG Zu-mu, LI Qing-hua, CHEN Li-mei, GUO Lu-yao, PAN Zhi-fang[△], FENG Wei-guo[△]

(Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261053, China)

ABSTRACT Objective: To predict the antigenic epitopes of the ZNF185 gene and investigate the immune response and immune contraceptive effect induced by corresponding synthetic peptides. **Methods:** The secondary structure, hydrophilicity, plasticity, surface probability and antigen index of ZNF185 protein were predicted by DNA Star software. The synthetic polypeptide carrying antigenic epitopes of ZNF185 was used to vaccinate mice, and then the IgG antibody levels in mouse serum, mating rate, fertility rate and mean litter size were examined. In addition, pathologic change of the reproductive organs was observed. **Results:** Two amino acid sequences of ZNF185 were screened to synthesize polypeptide, the polypeptide could induce mice to produce higher antibody levels. Furthermore, the rate of mating and fertility was significantly lower in the experimental group than in the control group, and no significant histopathological changes were observed in reproductive organs. **Conclusion:** ZNF185 has a certain anti-fertility effect.

Key words: ZNF185; Antigenic epitopes; Synthetic peptides; Immune contraception

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q492; Q593.4; Q579.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)11-2052-05

前言

世界人口的高增长率和非意愿妊娠的高发生率一直影响着社会经济发展和人类身体健康,而传统的避孕方法(输精管结扎、激素类避孕药以及避孕套等)都存在一定的局限性^[1,2]。因此,寻找一种安全、有效、可逆的避孕措施对控制人口增长和避免非意愿性妊娠具有十分重要的意义。近年来,男性避孕疫苗的研究日益增多,可能成为控制人口过度增长的理想措施,而抗原靶点的选择是其中的关键^[3]。

锌指蛋白(Zinc finger protein, ZNF)185 是一种 C 端含有保守序列 LIM(Lin-1, Isl-1 and Mec-3, LIM 型锌指蛋白)结构域的蛋白质,在其 N 末端还含有与肌动蛋白 actin 结合的 ATD (actin-targeting-domain)结构域,属于 LIM 蛋白家族中一员^[4],是一种具有重要生物学功能的转录因子^[5-8]。最近,一些研究表明

ZNF185、ZNF230、ZNF105 和 ZNF300 等几种锌指蛋白参与了精子发生和雄性生殖过程^[9-12]。本课题组前期研究发现 ZNF185 在小鼠睾丸中的表达显著高于其它组织,特别是在精子和睾丸间质细胞中呈高表达。此外, ZNF185 在性成熟小鼠睾丸中表达显著高于性成熟前小鼠^[9,13]。由此,我们推测 ZNF185 可能是避孕疫苗的候选靶点。本研究将通过 DNA Star 软件预测 ZNF185 优势抗原表位,合成携带 ZNF185 抗原表位的多肽,进行小鼠免疫实验,检测小鼠血清中 IgG 抗体水平、交配率、妊娠率及每胎产仔数,以探讨 ZNF185 对生育的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA Star 分析软件; ZNF185 多肽由上海吉尔生化公司合成; BALB/c 小鼠购自青岛大任富城畜牧有限公司; 酶标抗体

* 基金项目: 山东省科技发展计划项目(2015GSF118178); 山东省卫计委科技项目(201411); 山东省自然科学基金项目(ZR2015HL021)

作者简介: 樊姝彤(1989-), 硕士, E-mail: fanshutong689@163.com, 电话: 15653696720

[△] 通讯作者: 潘智芳, 电话: 13869680020, E-mail: pzhifang@163.com;

冯卫国, 电话: 15053639039, E-mail: sdaqfwg@126.com

(收稿日期: 2017-12-20 接受日期: 2018-01-26)

(HRP- 山羊抗鼠 IgG)、5% BSA 封闭液、TMB 单组份显色液和包被抗原的 96 孔酶标板购自北京索莱宝科技有限公司; 弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA)购自美国 sigma 公司。

1.2 ZNF185 抗原表位分析

应用 DNA Star 软件的 Gamier-Robson 和 Chou-Fasman 法预测 ZNF185 形成 α 螺旋、 β 折叠和转角的情况; 应用 Kyte-Doolittle 法预测 ZNF185 的亲水性; 应用 Karplus Schulz

法预测 ZNF185 的可塑性; 应用 Emini 法预测 ZNF185 的表面可及性;应用 Jameson-Wolf 法预测 ZNF185 的抗原性区域。

1.3 小鼠免疫实验

1.3.1 动物分组 选取健康的 BALB/c 雄性小鼠 (6-8 周龄)24 只,小鼠免疫按照抗原的不同分为以下 3 组:抗原肽 - I 组,抗原肽 - II 组,阴性对照组(注射 PBS)(表 1)。免疫途径均为皮下注射免疫(subcutaneous injection, SI),免疫注射剂量为 80 μ g。

表 1 实验动物分组

Table 1 Experimental animals grouping

Grouping	Immune route	The type of immunogen	Immunization dose	Adjuvant
I	SI	Peptide- I	80 μ g	CFA/IFA
II	SI	Peptide- II	80 μ g	CFA/IFA
PBS	SI	PBS	80 μ g	CFA/IFA

Note: SI, Subcutaneous injection,皮下注射

1.3.2 免疫途径 皮下注射免疫:取免疫原 100 μ L(含 80 μ g 的抗原肽)与等体积的弗氏完全佐剂(初次免疫)或弗氏不完全佐剂(加强免疫)混合,充分乳化,皮下注射免疫小鼠,每周一次,共免疫四次。

1.3.3 样本采集 初次免疫开始,在 0、2、4、6、8、10、12 周,分别取小鼠尾静脉血约 20 μ L,室温静置 2 h。待血清析出后加入 180 μ L 抗体稀释液(含 0.1%BSA 的 PBST 稀释液),1500 rpm 离心 5 min。吸出上清,ELISA 法检测 IgG 抗体滴度。

1.4 抗体水平检测

采用间接 ELISA 法测定抗体水平,操作流程具体步骤为:抗原包被,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;5%BSA 封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;加待测血清,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;加酶标二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min;加底物显色,室温避光显色 15 min;2 M 硫酸终止反应;全自动酶标仪(BioTek Instruments, Inc)检测 450 nm 处的 OD 值。每个步骤之间均用洗涤液洗涤 3 次,每次洗 3 min,每种试剂加入的体积均为 100 μ L。当 OD 值大于或等于空白孔 2 倍时定为阳性。

1.5 免疫避孕效果检测

于免疫第 12 周,将各组免疫过的雄性小鼠分别与正常雌性小鼠进行合笼,雌、雄比例为 2:1。次日晨检查雌鼠阴栓,将见有阴栓的雌鼠单独喂养,3-4 周后观察计算各组雌性小鼠的妊娠率和每窝产仔数。

1.6 组织病理学观察

取交配后 3 只雄性小鼠,取其睾丸、附睾等生殖器官常规脱水、透明、浸蜡,做石蜡切片。HE 染色后,观察组织病理学变化。

1.7 统计分析

应用软件 SPSS17.0 进行统计学分析,结果采用 ANOVA (one-way analysis of variance) 法分析组间统计学差异,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF185 蛋白二级结构预测

应用 DNASTar 软件的 Gamier-Robson 和 Chou-Fasman 法预测 ZNF185 形成 α 螺旋、 β 折叠和转角的情况。结果显示 α 螺

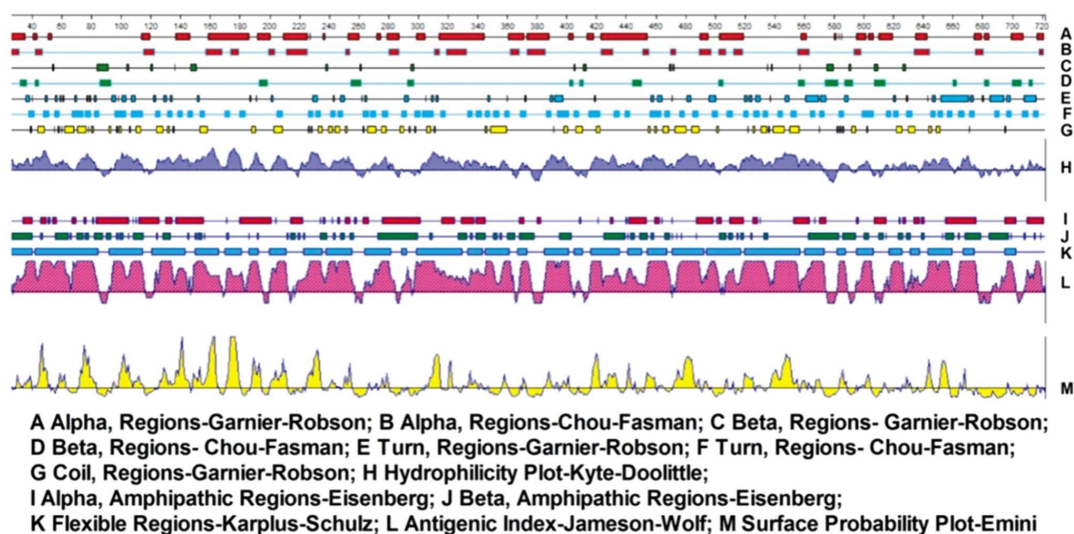


图 1 ZNF185 二级结构与抗原表位预测

Fig.1 ZNF185 secondary structure and antigenic epitopes prediction

旋分布比较均匀, β 折叠比较少, 两种方法预测的共同 β 折叠位于 86-91、295-297、575-580 和 607-610 位氨基酸残基。此外, 长短不一的转角和无规则卷曲分布于各 β 折叠单元之间(图 1)。

2.2 ZNF185 的亲水性预测

应用 Kyte-Doolittle 法预测 ZNF185 的亲水性, 结果显示 ZNF185 亲水性区域分布比较均匀, 其中 N 端和中部的亲水性最高, 亲水性较高区域位于 13-25、42-51、72-81、98-112、157-164、172-180、225-235、306-317、386-400、419-433、453-465、476-488、520-530 和 540-553 位氨基酸残基(图 1)。

2.3 ZNF185 的可塑性预测

应用 Karplus Schulz 法预测 ZNF185 的可塑性, 结果显示 ZNF185 含有较多的可塑性区域, 且分布比较均匀。主要分布于 7-40、42-85、91-115、122-144、150-166、238-256、264-282、300-330、345-361、385-401、416-436、471-492、494-518 和 520-557 位氨基酸残基(图 1)。

2.4 ZNF185 的表面可及性预测

应用 Emini 法预测 ZNF185 的表面可及性, 结果显示可及性曲线类似于亲水性曲线。可及性较高区域主要分布于 19-24、44-51、72-82、98-106、136-143、157-165、172-180、224-235、308-314、416-423、478-486、544-553 和 650-657 位氨基酸残基(图 1)。

2.5 ZNF185 的抗原指数预测

采用 Jameson-Wolf 法预测 ZNF185 的抗原性区域, 结果显示, ZNF185 存在有多个潜在的抗原表位点, 主要分布于 7-26、47-64、68-83、94-115、127-165、225-254、297-363、384-402、416-469、476-502、518-574 和 644-677 位氨基酸残基(图 1)。

2.6 ZNF185 抗原表位的选择

根据蛋白质二级结构、亲水性、可塑性、表面可及性及抗原性预测结果综合考虑, 选择氨基酸序列 I (VPKPRPPSTR, 图 2 I)、II (TPYSERTTGG, 图 2 II) 合成多肽, 应用该多肽进行后续免疫避孕实验(二级结构及抗原性分析见图 2)。

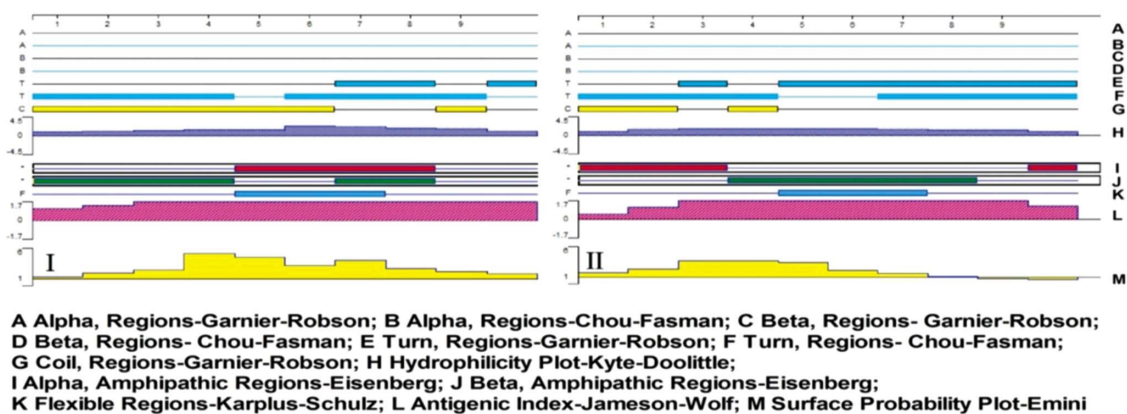


图 2 氨基酸序列的二级结构及抗原性分析

I 氨基酸序列 I ; II 氨基酸序列 II

Fig.2 The secondary structure and antigenicity analysis of screened amino acid sequence

I amino acid sequences I ; II amino acid sequences II

2.7 免疫小鼠的抗体水平检测

实验结果显示抗原肽免疫组 (抗原肽 - I 和抗原肽 - II) 的抗体滴度显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且随免疫周数的增加而逐渐上升, 于免疫后第 12 周达到高峰(图 3)。

2.8 免疫避孕效果研究

实验结果表明抗原肽免疫组 (抗原肽 - I 和抗原肽 - II) 的交配率和妊娠率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而每窝产仔数差异不显著 ($P > 0.05$)。其中, 抗原肽 - II 免疫组的交配率降至 63.67%, 妊娠率降至 41.67%, 显著低于对照组和抗原肽 - I 组 ($P < 0.05$)(表 2)。

2.9 睾丸和附睾的组织病理学分析

交配后, 将雄性小鼠安乐死以用于睾丸和附睾的组织学分析。结果显示在抗原肽组和 PBS 组的睾丸和附睾的组织学中没有观察到明显的病理变化(图 4)。然而, 在睾丸和附睾发现轻微的变化, 例如, 与 PBS 组比较, 抗原肽组附睾管腔内精子数量明显减少 ($P < 0.05$), 其中抗原肽 - II 组精子数量下降较明显。

3 讨论

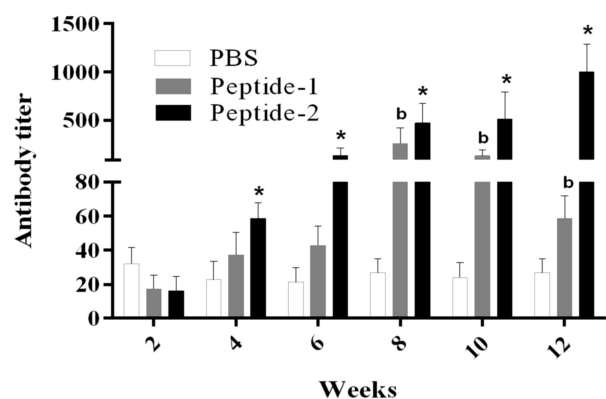


图 3 ELISA 法检测免疫后小鼠血清抗体滴度变化

*、b: $p < 0.05$, 与 PBS 组比

Fig. 3 ELISA was used to detect the changes of serum antibody titer after immunization

*、b: $p < 0.05$, compared with PBS group

虽然国家 " 放开二孩 " 政策已在全国实施, 但长期实行计划生育政策依然是我国的一项基本国策^[14]。另外, 控制人口过

表 2 小鼠免疫后生育力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Fertility of male and female immunized mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Mating rate(%)	Fertility rate(%)	Litter size
PBS-SI	100.00 ^a	99.78 ^a	11.03 $\pm$ 0.92 ^a
I -SI	100.00 ^a	87.72 ^b	12.40 $\pm$ 2.07 ^a
II -SI	63.67 ^c	41.67 ^c	12.67 $\pm$ 0.52 ^a

注:同一列中含不同字母的各项之间差异显著($P<0.05$)。

Note: The difference between values with different letters in the same column is significant ($P<0.05$).

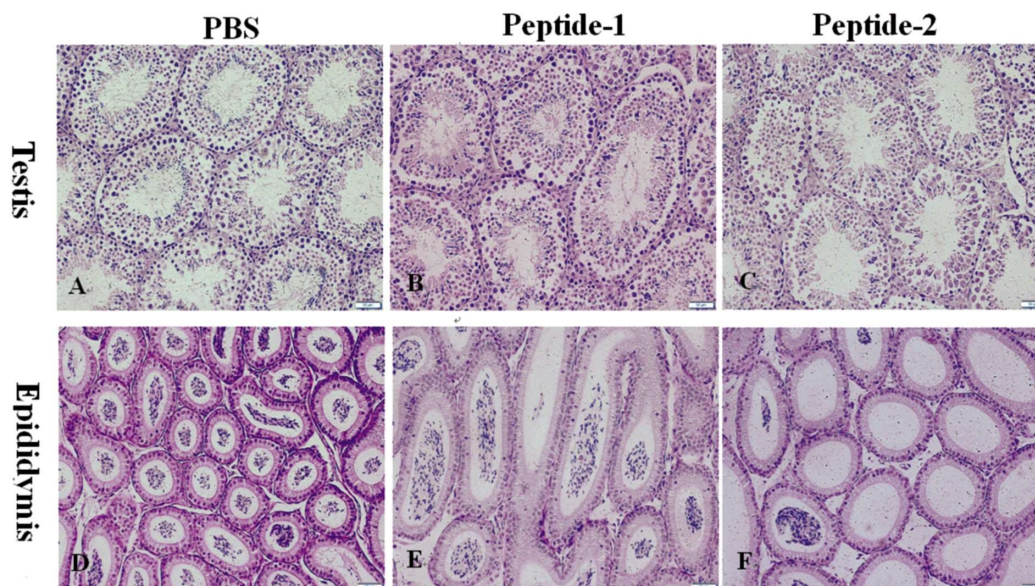


图 4 睾丸和附睾组织学分析

交配后,将雄性小鼠安乐死以用于睾丸和附睾的组织病理学分析。(A) PBS-SI 组睾丸;(B) 肽 -1-SI 组睾丸;(C) 肽 -2-SI 组睾丸;(D) PBS-SI 组附睾;(E) 肽 -1-SI 组附睾;(F) 肽 -2-SI 组附睾。SI: Subcutaneous injection,皮下注射。HE,比例尺=50 μ m。

Fig. 4 Histological analysis of testis and epididymis

After mating, the male mice were euthanized for histological analysis of testis and epididymis. (A) testis of PBS group; (B) testis of peptide-1 group; (C) testis of peptide-2 group; (D) epididymis of PBS group; (E) epididymis of peptide-1 group; (F) epididymis of peptide-2 group. IP: Intraperitoneal injection. HE, scale bar = 50 μ m.

快速增长,维持正常范围的性别比例,使其与我国经济的发展相协调是当今社会发展的主题。因此,寻找有效的避孕措施显得尤为重要。避孕疫苗的出现改变了当前避孕措施的现状,可以作为理想的避孕措施,因其具有特异性、长期性和最小副作用等优点。目前,对于免疫避孕抗原的研究主要有三大类:一是生殖激素类抗原,如促性腺激素释放激素^[15]、人绒毛膜促性腺激素^[16]等;二是抗卵透明带抗原^[17];三是抗精子抗原^[18],如 Sp17 蛋白^[19]。本课题组前期研究结果表明 ZNF185 可能参与精子发生和雄性生殖过程^[9],但 ZNF185 是否是避孕疫苗的候选靶标尚不清楚。我们首先应用 DNA Star 软件预测 ZNF185 的抗原表位,根据蛋白质二级结构、 α 螺旋、 β 折叠、亲水性、可塑性、表面可及性及抗原性预测结果综合考虑,选择两段氨基酸序列合成多肽,进行后续免疫避孕实验。DNA Star 软件目前已广泛用于抗原表位预测,李等利用该软件成功预测 Rv1410c 结核分枝杆菌蛋白抗原表位^[20]。Cheng 等人应用该软件筛选 FSHR 抗原表位制备男性避孕疫苗,取得良好的避孕效果^[21]。Sun 等人还通过该软件预测了人 Eppin 表位,共得到 8 个表位^[22],然后合成肽,纯度达到 90%。类似于以前的研究,这种纯度可以满足避孕

试验的要求^[23]。

研究显示肽靶向 ZNF185 可以引起明显的抗体反应^[24]。我们用 ELISA 法检测免疫后小鼠血清中的抗体水平,实验结果显示两种抗原肽免疫组的抗体滴度均显著高于对照组,说明靶向 ZNF185 肽能有效激发小鼠机体免疫应答,免疫途径可以影响机体免疫应答。此外,实验结果还表明抗原肽 -II 实验组的抗体滴度随免疫周数的增加而逐渐上升,于免疫后第 12 周达到高峰。这种差异可能是由于这些表位的不同免疫潜力所造成的^[25]。因此,我们将选取免疫后 12 周小鼠进行后续生育实验检测。

抗生育的机制可能是肽靶向 ZNF185 诱导特异性抗体的增加,然后抗体可以通过血清进入男性生殖道,进一步抑制 ZNF185 的调节机制等功能^[26]。生育试验结果显示抗原肽免疫组(抗原肽 -I 和抗原肽 -II)的交配率和妊娠率显著低于对照组,其中抗原肽 -II 对雄性小鼠生育能力的抑制作用显著高于对照组和抗原肽 -I 组。抗体的作用机制可能是以 ZNF185 为靶点的肽能够诱导特异性抗体增加,进而通过血清进入雄性生殖道,进一步抑制 ZNF185 的功能^[25,26]。该结果说明抗原肽 -II 更有制备为避孕疫苗的潜能,同时也验证了我们之前的研究,

ZNF185 涉及精子发生和雄性生殖^[9]。此外,我们发现免疫组和对对照组的每窝产仔量无明显差异,该结果说明抗原肽只能降低受孕的几率,而不能影响产仔量,这与 Chen 等^[27]人的研究结果相一致。这一结果表明肽免疫只抑制交配率和妊娠率,而不是影响幼鼠的数量,ZNF185 可能是避孕疫苗的候选对象。组织病理学结果显示肽组和 PBS 组的睾丸和附睾的组织学中没有生精小管明显的病理改变,与其他研究结果相一致^[24,28,29]。与 PBS 组比较,肽组附睾管腔内精子数量发生明显减少的现象。该结果说明本研究的 ZNF185 避孕疫苗具有安全无副作用等优势,为男性避孕疫苗的研发提供了新的可能。

总之,本研究通过生物信息学方法筛选 ZNF185 两段氨基酸序列合成多肽,抗原肽 - II 能够产生较高的抗体滴度和明显的避孕效果,靶向 ZNF185 的肽首次诱导了对小鼠生育力的抑制而不损害生殖器官,这将为男性避孕疫苗研发提供新的靶标。下一步,我们将以抗原肽 - II 为基础进行加工修饰,期望能研制出理想的避孕疫苗。

参考文献(References)

- [1] Naz RK. Recent progress toward development of vaccines against conception[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13(1): 145-154
- [2] 刘瑞华, 马毅敏, 孙彬桂, 等. 输精管结扎术后中远期对附睾、睾丸影响的超声观察[J]. *中国男科学杂志*, 2016, 30(4): 23-25
Liu Rui-hua, Ma Yi-min, Sun Bin-gui, et al. Ultrasound Observation of Epididymal and Testicular Effects after Vasectomy in Middle and Long Term[J]. *Chinese Journal of Andrology*, 2016, 30(4): 23-25
- [3] 周青松, 新风烁, 李彦锋, 等. 真核表达质粒 pSG.SS.C3d3.YL.Bin1b 雄鼠免疫避孕效应研究 [J]. *现代泌尿外科杂志*, 2015, 20(3): 190-192
Zhou Qing-song, Jin Feng-shuo, Li Yan-feng, et al. Study on Immunocontraceptive Effect of Eukaryotic Expression Plasmid pSG.SS.C3d3.YL.Bin1b [J]. *Journal of Modern Urology*, 2015, 20 (3): 190-192
- [4] Zhang JS, Gong A, Young CYF. ZNF185, an actin-cytoskeleton-associated growth inhibitory LIM protein in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2007, 26(1): 111-122
- [5] Ma J, Mi C, Wang KS, et al. Zinc finger protein 91 (ZFP91) activates HIF-1 α via NF- κ B/p65 to promote proliferation and tumorigenesis of colon cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36551-36562
- [6] Tseng K Y, Lin S. Zinc finger factor 521 enhances adipogenic differentiation of mouse multipotent cells and human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(17): 14874-14884
- [7] Yang F, Ma H, Feng L, et al. Zinc finger protein x-linked (ZFX) contributes to patient prognosis, cell proliferation and apoptosis in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8(11): 13886-13899
- [8] Buchner DA, Charrier A, Srinivasan E, et al. Zinc finger protein 407 (ZFP407) regulates insulin-stimulated glucose uptake and glucose transporter 4 (Glut4) mRNA [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(10): 6376-6386
- [9] You X, Wei L, Fan S, et al. Expression pattern of Zinc finger protein 185 in mouse testis and its role in regulation of testosterone secretion [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(2): 2101-2106
- [10] Zhang S, Qiu W, Wu H, et al. The shorter zinc finger protein ZNF230 gene message is transcribed in fertile male testes and may be related to human spermatogenesis[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 359 (Pt3): 721-727
- [11] Zhou H, Liu LH, Zhang H, et al. Expression of zinc finger protein 105 in the testis and its role in male fertility [J]. *Molecular reproduction and development*, 2010, 77(6): 511-520
- [12] Cao Y, Cao Y, Li J-X, et al. Molecular cloning and characterization of a novel splice variant of human ZNF300 gene, which expressed highly in testis[J]. *DNA Sequence*, 2007, 18(4): 312-315
- [13] 冯卫国, 潘智芳, 连波, 等. 锌指蛋白 (ZNF)185 在小鼠不同发育阶段睾丸中的表达[J]. *生殖与避孕*, 2012, 10(32): 672-675
Feng Wei-guo, Pan Zhi-fang, Lian Bo, et al. Expression of zinc finger protein (ZNF) 185 in testes at different developmental stages in mice [J]. *Chinese Journal of Reproduction and Contraception*, 2012, 10 (32): 672-675
- [14] 习近平. 计划生育基本国策必须长期坚持[R]. 北京: 中国计划生育协会第八次全国会员代表大会暨先进表彰会, 2016
Xi Jin-ping. The basic State policy of family planning must persist[R]. Beijing: China Family Planning Association eighth time National member Congress and Advanced Commendation, 2016
- [15] Gava G, Lantadilla C, Martelli V, et al. Hot issues in female and male hormonal contraception[J]. *Minerva Ginecol*, 2016, 68(1): 78-89
- [16] Pocius K D, Maurer R, Fortin J, et al. Early serum human chorionic gonadotropin (hCG) trends after medication abortion [J]. *Contraception*, 2015, 91(6): 503-506
- [17] Mask T A, Schoenecker K A, Kane A J, et al. Serum antibody immunoreactivity to equine zona protein after SpayVac vaccination[JO/L]. *Theriogenology*, 2015, 84(2): 261-267
- [18] Xue F, Wang L, Liu Y, et al. Vaccination with an epitope peptide of IZUMO1 to induce contraception in female mice [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 75(4): 474-485
- [19] 张巧玉, 梁志清, 李玉艳, 等. 小鼠精子 Sp17 与 IL-5 融合蛋白的免疫性避孕效应和安全性研究[J]. *生殖与避孕*, 2010, 4(30): 230-234
Zhang Qiao-yu, Liang Zhi-qing, Li Yu-yan, et al. Immune contraceptive effects and safety of mouse sperm Sp17 and IL-5 fusion proteins[J]. *Chinese Journal of Reproduction and Contraception*, 2010, 4(30): 230-234
- [20] 李江英, 白雪娟, 梁艳, 等. 用 DNASTar 软件预测 Rv1410c 结核分枝杆菌蛋白抗原表位 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(4): 474-477
Li Jiang-ying, Bai Xue-juan, Liang Yan, et al. Prediction of Rv1410c Mycobacterium tuberculosis Protein Epitope with DNA Star Software [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(4): 474-477
- [21] Cheng Xu, Ying Chun Li, Hua Yang, et al. The preparation and application of N terminal 57 amino acid protein of the follicle stimulating hormone receptor as a candidate male contraceptive vaccine[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2014, 16(4): 623-630
- [22] Sun L L, Li J T, Wu Y Z, et al. Screening and identification of dominant functional fragments of human epididymal protease inhibitor[J]. *Vaccine*, 2010, 28(7): 1847-1853 (下转第 2080 页)

- Chinese Journal of Nosocomiology, 2015, 25 (23): 5435-5437
- [5] 陈闽江, 柳涛, 蔡柏嵩, 等. 2010 年英国胸科协会胸腔疾病指南: 成人胸腔感染的诊治简介[J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(12): 881-885
- Chen Min-jiang, Liu Tao, Cai Bai-qiang, et al. Chest disease guidelines for British Thoracic Society, 2010: introduction to diagnosis and treatment of adult thoracic infection [J]. International Journal of Respiration Int, 2011, 31(12): 881-885
- [6] Haughey N, Booth K, Parissis H. Post-cardiotomy open chest management. A single-unit experience [J]. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2016, 24(6): 530-534
- [7] Schipper P, Tieu BH. Acute Chest Wall Infections: Surgical Site Infections, Necrotizing Soft Tissue Infections, and Sternoclavicular Joint Infection[J]. Thorac Surg Clin, 2017, 27(2): 73-86
- [8] 孙宝利, 刘利平, 陈颖华, 等. 胸腔闭式引流术后发生胸腔感染的危险因素调查及预防[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(13): 3017-3019
- Sun Bao-li, Liu Li-ping, Chen Ying-hua, et al. Investigation and prevention of risk factors for thoracic infection after closed thoracic drainage [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2016, 26 (13): 3017-3019
- [9] 杨红坡, 师革, 李哲恒, 等. 开胸术后患者发生胸腔感染的高危因素调查分析[J]. 河北医学, 2015, 21(06): 978-980
- Yang Hong-po, Shi Ping, Li Zhe-heng, et al. Investigation and analysis of high risk factors of thoracic infection after thoracotomy [J]. Hebei medicine, 2015, 21 (06): 978-980
- [10] Thiels CA, Aho JM, Naik ND, et al. Infected hardware after surgical stabilization of rib fractures: Outcomes and management experience [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2016, 80(5): 819-823
- [11] 赵霞, 王力红, 张京利, 等. 老年患者术后医院感染的危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(08): 1825-1828
- Zhao Xia, Wang Li-hong, Zhang Jing-li, et al. Journal of infection risk factors of hospital infection in elderly patients after surgery [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2017, 27 (08): 1825-1828
- [12] 潘丽杰, 孟建斌, 董颖, 等. ICU 老年患者肺部感染的临床特点与预防措施[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(08): 1773-1774+1780
- Pan Li-jie, Meng Jian-bin, Dong Ying, et al. ICU clinical features and preventive measures of pulmonary infection in elderly patients [J]. Chinese Journal of nosocomial infection, 2015, 25 (08): 1773-1774+1780
- [13] Aguilar PR, Bemiss BC, Witt C, et al. Impact of Delayed Chest Closure on Surgical Site Infection After Lung Transplantation[J]. Ann Thorac Surg, 2017, 104(4): 1208-1214
- [14] Vyhňánek F, Jirava D, Očádlík M, et al. Surgical Stabilisation of Flail Chest Injury: Indications, Technique and Results[J]. Acta Chir Orthop Traumatol Cech, 2015, 82(4): 303-307
- [15] 郁爱侠. 开胸术后患者发生胸腔感染的高危因素调查分析[J]. 临床护理杂志, 2014, 13(03): 19-21
- Yu Ai-xia. Investigate the risk factors of pleural infection analysis[J]. Journal of clinical nursing of patients with occurred after thoracic surgery, 2014, 13(03): 19-21
- [16] 陈磊. 88 例严重胸部外伤并发胸腔感染的临床诊治[J]. 中国实用医药, 2015, 10(25): 10-12
- Chen Lei. Clinical diagnosis and treatment of 88 cases of severe chest trauma complicated with thoracic infection [J]. Chinese Practical Medicine, 2015, 10 (25): 10-12
- [17] Muto S, Suzuki H. Management of Chest Drain after Lung Resection [J]. Kyobu Geka, 2017, 70(8): 683-687
- [18] 陈长清, 黄冬梅, 王小园. 不同引流液更换时间对支气管胸膜瘘患者胸腔感染的影响[J]. 抗感染药学, 2015, 12(02): 264-265
- Chen Chang-qing, Huang Dong-mei, Wang Xiao-yuan. Different drainage fluid replacement time pharmaceutical anti infection effect on bronchopleural fistula in patients with pleural infection [J]. Anti-Infec Pharm, 2015, 12 (02): 264-265.
- [19] Tsai CH, Lai YC, Chang SC, et al. Video-assisted thoracoscopic surgical decortication in the elderly with thoracic empyema: Five years' experience[J]. J Chin Med Assoc, 2016, 79(1): 25-28
- [20] Vallabhaneni S, Purfield AE, Benedict K, et al. Cardiothoracic surgical site phaeohyphomycosis caused by Bipolaris mould, multiple US states, 2008-2013: a clinical description[J]. Med Mycol, 2016, 54 (3): 318-312
- [21] 季学波, 黄正军, 景永, 等. 食管癌术后胸腔感染病原分布及危险因素分析[J]. 预防医学, 2017, 29(08): 839-841
- Ji Xue-bo, Huang Zheng-jun, Jing Yong, et al. Analysis of the distribution and risk factors of the pathogen of thoracic infection after esophagus cancer operation [J]. preventive medicine, 2017, 29 (08): 839-841

(上接第 2056 页)

- [23] Chen Z, He W, Wu Y, et al. A highly specific antibody response after protein prime-peptide boost immunization with Eppin/B-cell epitope in mice[J]. Human vaccines, 2011, 7(8): 849-855
- [24] Shen Z g, He W, Zhang J, et al. Induction of specific immune response and suppression of fertility by B-cell-epitope-based mimovirus vaccine[J]. Reproduction, 2011, 142(5): 659-666
- [25] Yu Q, Mei X Q, Ding X F, et al. Construction of a catSper1 DNA vaccine and its antifertility effect on male mice [J]. PloS one, 2015, 10(5): e0127508
- [26] Knee RA, Hickey DK, Beagley KW, et al. Transport of IgG across the blood-luminal barrier of the male reproductive tract of the rat and the effect of estradiol administration on reabsorption of fluid and IgG by the epididymal ducts[J]. Biology of reproduction, 2005, 73(4): 688-694
- [27] Chen Z, Shen Z, Li J, et al. Nasal immunization using a mimovirus vaccine based on the Eppin B-cell epitope induced suppressed fertility in mice [J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2014, 10 (8): 2227-2234
- [28] Yang L-H, Li J-T, Yan P, et al. Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR)-derived peptide vaccine induced infertility in mice without pathological effect on reproductive organs [J]. Reproduction, Fertility and Development, 2011, 23(4): 544-550
- [29] Xu P, Tang S, Jiang L, et al. Nanomaterial-dependent immunoregulation of dendritic cells and its effects on biological activities of contraceptive nanovaccines [J]. Journal of Controlled Release, 2016, 225: 252-268