

行政院國家科學委員會專題研究計劃報告

分析廣東住血線蟲在不同發育時期所製造的蛋白分解酵素
Analysis of the proteinase made from different development stages of
Angiostrongylus cantonensis

計劃編號：90-2320-B-040-015

執行期限：2001-08-01~2002-07-31

主持人：李秀雄

執行機構及單位名稱：中山醫學大學寄生蟲學科

壹、中文摘要

廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)其幼蟲寄生於宿主腦中，發育成熟後移行至肺動脈中。在太平洋及東南亞地區，大部份罹患嗜伊紅性腦膜炎的患者是因此寄生蟲寄生於腦部所引發，其感染途徑是因人攝食了感染廣東住血線蟲第三期幼蟲的蝸牛所造成，此幼蟲會穿過消化道移行至腦、脊髓、及眼部而引起疾病，至今造成此種腦膜炎的致病機轉尚不十分清楚。蛋白分解酵素是指可分解 peptide bonds 的酵素，其可出現在小到病毒大至人類的物種中，若以其作用部位的化學基來分類可將其分為四大類蛋白分解酵素，分別是-serine、metallo、thiol 及 aspartyl；蛋白分解酵素可催化許多重要的生物反應，包括荷爾蒙原的代謝過程、血液凝結與血纖分解、蛋白代謝、免疫反應及組織復原，因此不難想像蛋白分解酵素在寄生蟲感染疾病中，可扮演很重要的角色，如協助寄生蟲侵入宿主組織、消化宿主蛋白、躲避宿主免疫系統攻擊及防止血液凝結；蛋白分解酵素的功能除了可幫助寄生蟲感染之外，對於研究寄生蟲發育過程中，基因調控方面的研究也可提供極易偵測的標的，此外其也可作為寄生蟲感染的免疫治療及化學治療藥物作用的對象，甚至可作為免疫診斷時偵測的標的。然而對廣東住血線蟲這種本土性

的寄生蟲而言，至今仍無這類研究其蛋白分解酵素的報告。

利用 gelatin 及 casein-substrate zymography 分析廣東住血線蟲第一期、第二期、第四期及第五期幼蟲和成蟲蟲體本身及各時期蟲體所分泌的蛋白酵素，再進一步以 EDTA，Leupeptin 及 PMSF 等不同類型蛋白質抑制劑加以分辨其蛋白酵素之種類，實驗結果得知：第一期和第三期幼蟲本身具有之酵素分子量為 94kDa 之 MMP-9，而同時期蟲體亦可分泌相同之酵素但活性表現強度較弱。在第四、五期幼蟲及成蟲之蟲體及分泌並無發現此酵素。實驗結果顯示其與蟲體侵入宿主之機轉有關。

關鍵詞：廣東住血線蟲；腦膜炎；間質蛋白分解酵素。

Abstract :

Angiostrongylus cantonensis, also named rat lung worm, was originally described by Chen in 1935 from the *Rattus norvegicus* and *R. rattus* caught in Canton, China. It was found to mature in the pulmonary arteries of rats after migration from their brains. In the areas of Pacific and Southeast Asia, eosinophilic meningitis or meningoencephalitis is caused mainly by invasion of the human central nervous system by the lung worm. Human infection is from the ingestion of snails infected with third-stage larvae that will migrate into the brain, spinal

cord, and eyes and cause disease. The pathogenesis of this parasitic meningitis is not fully understood until now. In Taiwan, people living in rural and mountain areas frequently collect and eat snails infected with larvae of *A. cantonensis*. Therefore, cases continue to occur yearly despite public educational programs. Physical diagnosis for *A. cantonensis* infection is difficult and inconsistent. Recently, some different immunodiagnostic methods for *A. cantonensis* infection in human have been achieved. Although immunodiagnosis is more convenient, the sensitivity and specificity is not good enough in these methods. On the other hand, effective therapy for *A. cantonensis* infection is still lacking.

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds. They are found in species from viruses to humans. On the basis of the important chemical groups in their active site, proteases are separated into four major classes-serine, metallo, thiol and aspartyl. Protease catalyze a broad spectrum of important biological reactions, including prohormone processing, blood coagulation and fibrinolysis, protein metabolism. Immune reactions, and tissue remodeling. It is not surprising, therefore, that proteases have been found to play a number of critical roles in the pathogenesis of parasitic diseases. Parasitic proteases facilitate invasion of host tissues, allow parasites to digest host proteins, help parasites evade the host immune response, and prevent blood coagulation. Aside from the functions that proteases perform for parasites, they have been immensely useful in providing researchers with easily detectable probes for studying developmental regulation of parasite genes. Parasite-derived proteases have also been proposed as potential targets for immunotherapeutic and chemotherapeutic agents and, in some

cases, serodiagnostic reagents for detection of parasite diseases. To date, no information is available on the proteases present in or secreted by the different developmental stages of *A. cantonensis*.

The purpose of this study was to analyze proteases of first, third, fourth and fifth stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, as well as proteases secreted or excreted from larvae into the cultured fluid by utilizing Gelatin and Casein-substrate Zymography. Moreover, different types of proteases inhibitors were distinguished through EDTA, Leupeptin and PMSF. The result of this study showed the first and third stage larvae carried protease which molecular weight was MMP-9 of 94kDa. Besides, exact the same protease with weaker presenting intensity was also found in the cultured fluid of first and third stage larvae. No protease was found in either the fourth and fifth stage larvae, or in the same stage of cultured fluid. The finding of this study suggests the relationship between proteases and the mechanism of how the parasites attack the host environment.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; meningitis; matrix metalloproteinase 9.

貳、緣由與目的

廣東住血線蟲是一種寄生在大白鼠(Rat)肺動脈的線蟲，可經意外感染於人類，屬於人畜共通寄生蟲(zoonotic parasites)中的一種⁽¹⁾，主要分佈於東南亞和南太平洋一帶，台灣整個島嶼幾乎都有此寄生蟲的存在，每年都有因飲食不當而感染廣東住血線蟲病例報告出現，大部分發生於南部和東部山地部落等，尤以屏東縣最多⁽²⁾。此寄生蟲病因吃蝸牛肉而感染，主要侵犯人類中樞神經系統(CNS)，是引起嗜伊紅性腦膜炎(eosinophilic meningitis)或嗜伊紅性腦膜腦炎(eosinophilic

meningoencephalitis)的主要原因⁽³⁻⁵⁾，更是對人類性命造成嚴重威脅。引起的病理變化特徵是，腦脊髓液(CSF)及末梢血液的嗜伊紅性白血球(Eosinophils)增加，腦部嗜伊紅性白血球(Eosinophils)、及淋巴球浸潤等發炎反應，血腦障壁(BBB)破壞，神經細胞脫髓鞘(demyelination)及小腦(cerebellar)浦金氏細胞(purkinje cells)喪失、損傷、有空泡等⁽⁶⁾。常見症狀有頭痛、噁心、嘔吐、嗜睡及發燒等，有時會出現頸部強直、視覺障礙及昏迷等神經症狀⁽⁷⁾。對此寄生蟲感染疾病的診斷上，傳統物理診斷很困難且準確度不高，目前以偵測病患血中特定抗體或抗原的免疫診斷法較可行^(8,9)，但其專一性與特异性仍偏低，有待改進。而在治療上目前多使用 Albendazole 來殺死蟲體⁽¹⁰⁾，但病患求診時往往已感染此寄生蟲兩週以上，蟲體已進入腦部，此時單純用 Albendazole 來殺死蟲體，死亡的蟲體屍體仍會造成腦部病變，所以此療法療效有限，仍有待改進。

目前為止，相關文獻對於其引起腦部傷害及神經細胞損傷，脫髓鞘(demyelination)等主要的致病機轉尚不清楚。而這些病理變化都與細胞外基質的破壞或蛋白質成份的分解有關，細胞外基質的破壞或蛋白質成份的分解，則須靠蛋白分解酵素的作用來達成，另一種會引起原發性阿米巴腦膜炎(primary amebic meningoencephalitis)的原蟲類寄生蟲-福氏內格里阿米巴(*Naegleria fowleri*)也會造成腦部傷害，神經細胞損傷及脫髓鞘(demyelination)等病變，其致病機轉目前已知與其所釋放出的蛋白分解酵素有關⁽¹¹⁾；廣東住血線蟲的幼蟲

在被攝入人體後，其會穿透消化道組織在組織中移行至腦，寄生蟲的移行也與宿主組織的分解有關，如犬蛔蟲及犬鉤蟲感染人體後所造成的組織移行症，已證實與寄生蟲的幼蟲所分泌的蛋白分解酵素有關^(12,13)，其可有效分解宿主組織達成移行的目的，另一種在感染人體後也會穿過消化道的寄生蟲-海獸胃線蟲(*Anisakis simplex*)也已證實其的確會分泌出蛋白分解酵素以協助其分解宿主組織，以穿透消化道^(14,15)；廣東住血線蟲的成蟲會以宿主的血紅蛋白為食，將其消化分解以作為營養物，像血吸蟲及這種同樣以血紅蛋白為食的寄生蟲，目前已證實血吸蟲的確可製造出這種分解血紅蛋白的蛋白分解酵素存在⁽¹⁶⁾；廣東住血線蟲的成蟲是寄生在血管中，外來的寄生蟲如何能在血管中生存而不造成血液凝結也是一個須要克服的問題，解決的方法不外乎抑制血液凝結及加速血纖溶解，這些都得靠蛋白分解酵素來執行完成，所以，綜上所述，可推測廣東住血線蟲應會製造出一些蛋白分解酵素來幫助蟲體的寄生生活，我們初步的實驗也發現廣東住血線蟲的第一、三期幼蟲的蟲體均質液中，的確存在一些蛋白分解酵素，至於蟲體培養液中是否也有類似的蛋白分解酵素，以及這些蛋白分解酵素是屬於那一類的及其特性為何，則有待研究。

蛋白分解酵素是指可分解 peptide bonds 的酵素，其可出現在小到病毒大至人類的物種中，若以其作用部位的化學基來分類可將其分為四大類蛋白分解酵素，分別是-serine, metallo, thiol 及 aspartyl；蛋白分解酵素可催化許多重要的生物反應，包括荷爾蒙原的代

謝過程、血液凝結與血纖分解、蛋白代謝、免疫反應及組織復原，因此不難想像蛋白分解酵素在寄生蟲感染疾病中可扮演很重要的角色，如協助寄生蟲侵入宿主組織⁽¹¹⁻¹⁵⁾、消化宿主蛋白⁽¹⁶⁾、分解黏附在蟲體表面的免疫球蛋白及補體等、以躲避宿主免疫系統攻擊^(17,18)及防止血液凝結⁽¹⁹⁾，所以這類寄生蟲蛋白分解酵素方面的研究，對於瞭解寄生蟲感染症的致病機轉上，意義重大；既然蛋白分解酵素對寄生蟲感染症的致病過程扮演很重要的角色，若能研發出特定的蛋白分解酵素抑制劑，或許對治療上也有幫助，而實際上，也的確有科學家使用特定蛋白分解酵素抑制劑，抑制痢疾阿米巴(*Entamoeba histolytica*)所釋放的一種可分解宿主腸道組織的蛋白分解酵素，其可使痢疾阿米巴的致病性大大降低⁽²⁰⁾；同時也有科學家利用單株抗體來阻斷血吸蟲尾動幼蟲所釋放的蛋白分解酵素，來抑制血吸蟲的感染⁽²¹⁾，進一步推測或可以此蛋白分解酵素作為疫苗，來預防此寄生蟲之感染。所以蛋白分解酵素可作為寄生蟲感染的免疫治療及化學治療藥物作用的對象。至於蟲體所釋放的蛋白分解酵素，若會出現在患者血中，也可作為免疫診斷時偵測的標的⁽²²⁾。此外，對於研究寄生蟲發育過程中，基因調控方面的研究也可提供極易偵測的標的^(23,24)；然而對廣東住血線蟲這種本土性的寄生蟲而言，至今仍無這類研究其蛋白分解酵素的報告，本研究若能初步將廣東住血線蟲所製造的蛋白分解酵素加以定性，對之後有關治病機轉、診斷及治療上的研究將開出一條新的研究方向。

參、材料與方法

一、廣東住血線蟲第三期幼蟲(L3)之收集：

- 由田野撿拾非洲大蝸牛。
- ↓將非洲大蝸牛外殼碾碎，取其組織，剁碎。
- ↓用組織均質器絞碎。
- ↓以1:30比例加入人工胃蛋白酶消化液。
- ↓以磁性攪拌子於37°C之恆溫箱中，均勻攪拌消化2小時。
- ↓以雙層紗布濾去雜質，加入生理時鹽水稀釋並靜置。
- ↓每隔30分鐘到去約一半的上清液。
- ↓再加入生理時鹽水稀釋靜置，重複至完全清澈為止。
- ↓以滴管吸取下層之沈澱物，置於玻璃皿中。
- ↓置於解剖顯微鏡下，觀察並吸取L3幼蟲。
- ↓每30隻L3幼蟲為一單位，置於玻璃皿中。

二、動物感染

自國科會動物中心購買三週齡雄性大白鼠。感染前飼養於動物房一週，並維持在12小時亮及12小時暗的動物飼養中心。在感染前12小時均給予禁水、禁食，每隻大白鼠以口胃管分別灌入30隻第三期幼蟲(L3)，於感染後12小時再恢復其供水、供食。

三、幼蟲回收

- 1.自感染廣東住血線蟲八週後的大白鼠糞便中，收集第一期幼蟲。
- 2.自感染廣東住血線蟲的非洲大蝸牛中收集第三期幼蟲。
- 3.自感染廣東住血線蟲兩週後的大白鼠腦中收集第四期幼蟲。

4. 自感染廣東住血線蟲三週後的大白鼠腦中收集第五期幼蟲。

5. 自感染廣東住血線蟲六週後的大白鼠腦中收集成蟲。

將各期幼蟲與成蟲培養於無添加胎牛血清之 RPMI-1640 的培養液中三天, 收集培養液, 貯存於 -80°C 冰櫃中, 而蟲體部份以含有 Triton X-100 的緩充液加以均質, 離心後取上清液, 貯存於 -80°C 冰櫃中, 備用。

四、分析 MMP-9 的方法

1. 膠體的配製法(Gel Preparation)

同 SDS-PAGE, 不同的是 Separating Gel 加入 0.1% 的 Gelatin。

2. 0.1% Gelatin SDS-PAGE 電泳後 gel 之處理:

↓ 取下 gel, 加入 100ml Washing buffer (2.5% Triton X-100 in dH₂O) washing gel。

↓ 在室溫下搖動 30 分鐘, 換 Washing buffer 再洗一次。

↓ 倒掉 Washing buffer, gel 以 dH₂O washing。

↓ 加入 200ml Reaction buffer (40 mM Tris-HCL, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)。

↓ Incubation at 37°C, 搖動 12 小時以上。

↓ Stain gel with Staining solution (0.25% Coomassie Blue R250, in 50% MeOH, 10% Acetic acid), for 1 hr。

↓ Destain gel with Destaining solution (20% MeOH, 10% Acetic acid)。

3. 反應最佳酸鹼度分析

取 30µl Sample loading 至

0.1% Gelatin-8% SDS-PAGE (Bio-Rad Mini-Protean II)。

↓ 進行電泳分析: 150 V、60 min。

↓ 經過電泳後的凝膠, 每個 Lane 切成小片後加入 50ml 含 2.5% Triton X-100 的 Washing buffer 在室溫下洗 30min, 在換一次 Washing buffer 洗 30min。

↓ 將每條凝膠分別放入各種不同 pH 值的 Reaction buffer (內含 10 mM CaCl₂) 中, 在 37°C 下反應 15 小時以上。

↓ 反應後之凝膠, 再染色和脫色, 方法同前述。

↓ 取膠片以密度掃描儀量化結果。

4. 蛋白抑制劑的分析

↓ 方法同 Optimal pH 測定。

↓ 主要差別為 Reaction buffer 內分別加入不同的蛋白酶抑制劑。

↓ 取膠片以密度掃描儀量化結果。所使用的抑制劑依其所抑制的蛋白酶的类型分為下列數種:

metalloprotease inhibitor

1,10-phenanthroline, EDTA

serine protease inhibitor

4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl

fluoride, AEBSF

cysteine protease inhibitor

Z-phe-ala-FMK and E-64

aspartyl protease inhibitor

pepstatin

serine and cysteine protease

inhibitor

leupeptin

肆、結果

在蟲體方面，第一期幼蟲及第三期幼蟲本身具有強的 gelatinase 的酵素，第四期幼蟲及成蟲沒有發現此種酵素，但其中第一期幼蟲及第三期幼蟲除了具有分子量約 92-94kDa 之 gelatinase 外尚有其它種類的酵素。在以二價陽離子之螯合劑 EDTA 加入反應的 buffer，在第一期幼蟲及第三期幼蟲所具有的酵素活性有明顯被抑制，因此第一期幼蟲及第三期幼蟲之蟲體具有之酵素的活化需要二價陽離子。Leupeptin 為 cysteine proteinase 之抑制劑，第一期幼蟲及第三期幼蟲之酵素沒有顯著被抑制。PMSF 為 serine proteinase 之抑制劑，第一期幼蟲及第三期幼蟲之酵素沒有顯著被抑制(圖一)。第一期幼蟲及第三期幼蟲具有之酵素由上可知其分子量在 94kDa 附近者為須二價陽離子之酵素且不受 Leupeptin 及 PMSF 抑制，因此此酵素為 MMP-9，但除此之外第一期幼蟲及第三期幼蟲尚具有其它種的酵素需再更進一步的定性分析。

在蟲分泌物方面，在蟲體所分泌酵素分析中可發現其所分泌的量少於蟲體本身的酵素活性。在究中發現第一期幼蟲及第三期幼蟲除了具有分子量約 92-94kDa 之 gelatinase(但不強)外尚有其它種類的酵素。第四期幼蟲及成蟲沒有發現此種酵素。EDTA 為二價陽離子之螯合劑，在第一期幼蟲及第三期幼蟲所具有的酵素活性有明顯被抑制，因此第一期幼蟲及第三期幼蟲之蟲體具有之酵素的活化需要二價陽離子。Leupeptin 為 cysteine proteinase 之抑制劑，第一期幼蟲及第三期幼蟲之酵素沒有顯著被抑制。PMSF 為 serine proteinase 之抑制劑，第一期幼蟲及第三期幼蟲分子量在 94kDa 附近之酵素沒有顯著被抑制，但

在分子量較小的酵素活性則有被抑制(圖二)。第一期幼蟲及第三期幼蟲所分泌之酵素由上可知其分子量在 94kDa 附近者為須二價陽離子之酵素且不受 Leupeptin 及 PMSF 抑制，因此此酵素為 MMP-9，但蟲體分泌的量遠遠小於蟲體本身所具有的。除此之外第一期幼蟲及第三期幼蟲尚具有其它種的酵素需再更進一步的定性分析。

伍、討論

廣東住血線蟲症之致病機轉可分為①蟲體移行進入腦部過程中之機械性破壞。②嗜伊紅性白血球過度升高所誘發的毒素，在臨床上稱之為嗜伊紅性腦膜炎^(1,3,5)。在腦部之病理特徵是神經細胞脫髓鞘(demyelination)及小腦(cerebellar)浦金氏細胞(purkinje cells)喪失、損傷、有空泡等⁽⁶⁾。常見症狀有頭痛、噁心、嘔吐、嗜睡及發燒等，有時會出現頸部強直、視覺障礙及昏迷等神經症狀⁽⁷⁾。相關文獻至目前為止，對其引起之腦部傷害 詳細機轉尚不清楚。

在 1998 年，Yong 等人指出⁽²⁵⁾，Alzheimer's disease 所造成的神經細胞脫髓鞘及 BBB 的破壞與 MMPs 有相關性，且 MMPs 在 CNS 受傷修護過程中扮演重要的角色。原發性阿米巴腦膜炎(primary amebic meningoencephalitis)的原蟲類寄生蟲-福氏內格里阿米巴(*Naegleria fowleri*)也會造成腦部傷害，神經細胞損傷及脫髓鞘(demyelination)等病變，而其致病機轉目前已知與其所釋放出的蛋白分解酵素有關⁽¹¹⁾。因此可知 MMPs 活性升高與 CNS 疾病扮演重要的角色。廣東住血線蟲是廣義之內臟性(中樞神經系統)之幼蟲移行症之一，其幼蟲能進入中樞神經系統引發神經症狀與第三期幼蟲蟲體及分泌 MMP-9 應有重大之關連。Aldape(1994)指出⁽¹¹⁾，*N.fowleri* 分泌之酵素可破壞宿主組織，另一種會造成內臟幼蟲移

行症之犬蛔蟲可發現不同之蛋白分解酵素(Hotej,1985),在感染人體後也會穿過消化道的寄生蟲-海獸胃線蟲(*Anisakis simplex*)也已證實其的確會分泌 25kDa 之蛋白分解酵素以協助其分解宿主組織,以穿透消化道⁽¹⁴⁻¹⁵⁾。包含原蟲類、線蟲類及吸蟲類正實均可分泌蛋白分解酵素來協助其分解宿主組織,破壞組織等致病作用。

在本實驗中,在第一期及第三期幼蟲蟲體及其分泌物中均可發現分子量 94kDa 之蛋白分解酵素(MMP-9),這兩個時期之幼蟲分別感染中間宿主 *Achatina Fulica* 及人類(非適當宿主),第四、五期幼蟲與成蟲則未發現有蛋白分解酵素活化之現象,可見 94kDa 之蛋白分解酵素在蟲體侵入宿主之機轉有其功能性,也就是在致病機轉中之角色有其探討之重要性。

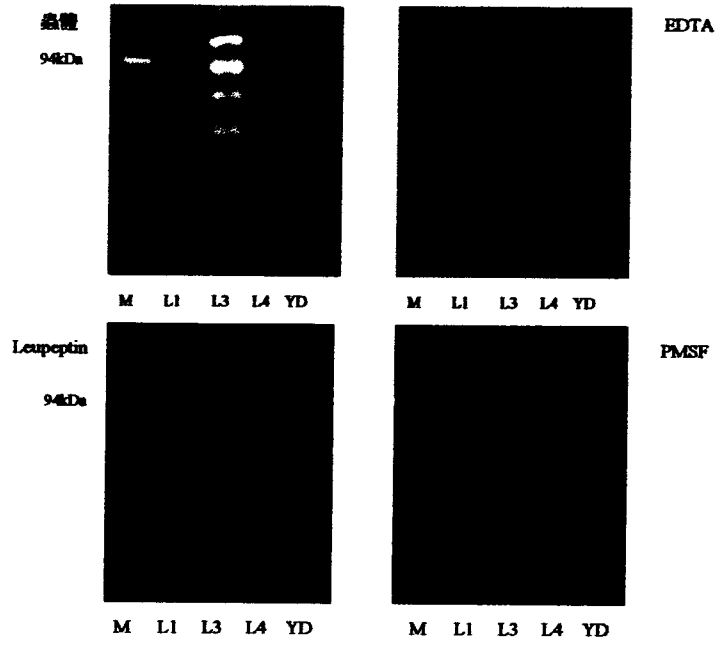
在我們過去的實驗中得知,感染廣東住血線蟲第三期幼蟲之小白鼠(非適當宿主),在感染後第 14 天時其腦部組織均質液中 MMP-9 活性大量上升,CSF 中嗜伊紅性白血球量亦達最高峰,並且嗜伊紅性白血球在廣東住血線蟲之致病機轉中佔最重要的角色。但本次實驗中,在形成第四期幼蟲後 MMP-9 即不產生,而第三期幼蟲所具有及分泌之 MMP-9 活性卻是廣東住血線蟲在發育過程中最強,因此可推測 MMP-9 是廣東住血線蟲致病機轉中另一個重要的因子,但其確定機轉則有待進一步研究,且在蟲發育過程中 MMPs 扮演何種角色,也需再進一步探討。

陸、參考文獻

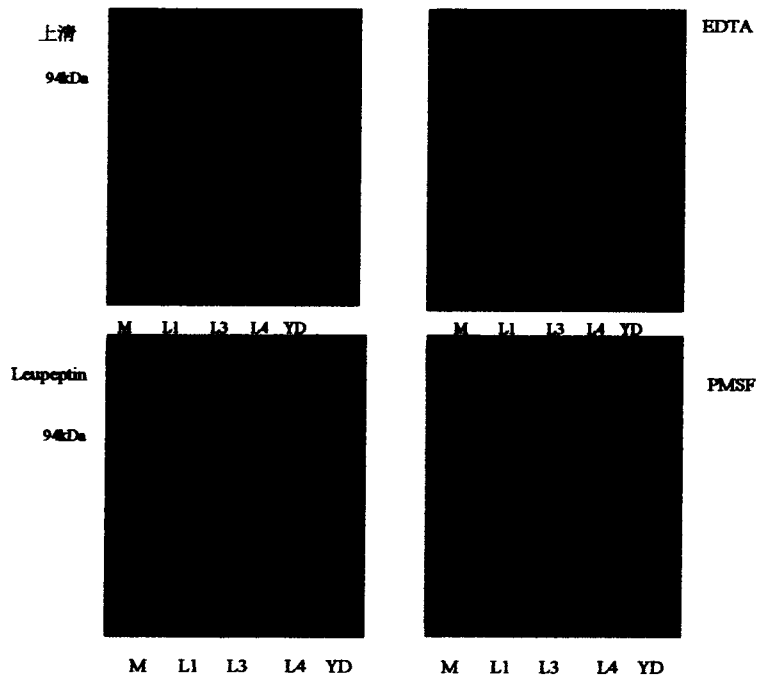
1. Alicata JE. (1965) Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. In: Advances in parasitology. (Dawes, B. et al), Academic press, London and New York: 223-248.
2. Chen ER. (1979) Angiostrongyliasis and eosinophilic meningitis on Taiwan: a review. In: J. H. Cross (Ed.), Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia. Taipei, Taiwan, U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, NAMRU-2-SP-44, 57-73.
3. Hsu WT, Chen JY, Chien CT, Chi CS, and Han NT. (1990) Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. Pediatric. Infections Disease Journal; 9: 443-445.
4. Ismail Y and Arsura EL. (1993) Eosinophilic meningitis. Western Journal Medicine;159: 623.
5. Gardiner CH, Well S, Gutter AE, Fitzgerald L, Anderson DC, Harris RK, and Nichols DK. (1990) Eosinophili meningocephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. Am. J. Trop. Med. Hyg.;42: 70-74.
6. Hwang KP, Hwang AL, Hsieh HC, Liu KM, and Chen SC. (1993) Ultrastructural findings of mice brain infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Scientific Program and Abstracts of the 9 Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology ; December 3-4: 37.
7. Hung TP, and Chen ER. (1988)

- Angiostrongyliasis
(*Angiostrongylus cantonensis*):
Handbook of Clinical Neurology ; 8:
(52): Microbial Disease 545-562. A.
A. Harris, Ed. Elsevier Science
Publishers B. V.
8. Chye SM, Chang JH, and Yen CM.
(2000) Immunodiagnosis of human
eosinophilic meningitis using an
antigen of *Angiostrongylus
cantonensis* L5 with molecular weight
204 kD. *Acta Tropica*. 75:9-17.
 9. Chang JH. Yen CM. Chen ER. Chung
LY. Wang JJ. Chye SM. and Wang LC.
(1995) Detection of antibodies to
surface antigens of *Angiostrongylus
cantonensis* by ELISA. *Annals of
Tropical Medicine & Parasitology*.
89:569-72.
 10. Hwang KP and Chen ER.(1988)
Larvicidal effect of albendazole
against *Angiostrongylus cantonensis*
in mice. *American Journal of Tropical
Medicine & Hygiene*. 39:191-5.
 11. Aldape K, Huizinga H, Bouvier J,
and McKerrow J. (1994) *Naegleria
fowleri*: characterization of a secreted
histolytic cysteine protease.
Experimental Parasitology.
78:230-41.
 12. Robertson BD, Bianco AT,
McKerrow JH, and Maizels
RM.(1989) *Toxocara canis*:
proteolytic enzymes secreted by the
infective larvae in vitro. *Experimental
Parasitology*. 69:30-6.
 13. Hotez PJ, Trang NL, McKerrow JH,
and Cerami A. (1985) Isolation and
characterization of a proteolytic
enzyme from the adult hookworm
Ancylostoma caninum. *Journal of
Biological Chemistry*. 260:7343-8.
 14. Sakanari JA and McKerrow JH.
(1990) Identification of the secreted
neutral proteases from *Anisakis
simplex*. *Journal of Parasitology*.
76:625-30.
 15. Morris SR and Sakanari JA. (1994)
Characterization of the serine protease
and serine protease inhibitor from the
tissue-penetrating nematode *Anisakis
simplex*. *Journal of Biological
Chemistry*. 269:27650-6.
 16. Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP,
Day SR, Wong JY, Smythe ML, and
McManus DP. (1997) Proteolytic
degradation of host hemoglobin by
schistosomes. *Molecular &
Biochemical Parasitology*. 89:1-9.
 17. Auriault C, Ouaisi MA, Torpier G,
Eisen H, and Capron A. (1981)
Proteolytic cleavage of IgG bound to
the Fc receptor of *Schistosoma
mansoni schistosomula*. *Parasite
Immunology*. 3:33-44.
 18. Leid RW, Suquet CM, and Tanigoshi
L. (1987) Parasite defense
mechanisms for evasion of host attack;
a review. *Veterinary Parasitology*.
25:147-62.
 19. Hotez PJ, Trang NL, McKerrow JH,
and Cerami A. (1985) Isolation and
characterization of a proteolytic
enzyme from the adult hookworm
Ancylostoma caninum. *Journal of
Biological Chemistry*. 260:7343-8.

20. Keene WE, Hidalgo M, Orozco E, and McKerrow JH. (1989). Evidence that a secreted thiol proteinase mediates the cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. Joint ASCB/AJBMB Meeting, San Francisco, CA.
21. Pino-Heiss S, Pettitt M, Beckstead JH, and McKerrow JH. (1986) Preparation of mouse monoclonal antibodies and evidence for a host immune response to the preacetabular gland proteinase of *Schistosoma mansoni* cercariae. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. 35:536-43.
22. Knox DP and Jones DG (1991). Diagnosis and control of ruminant nematodiasis. In: Parasitic Nematodes-Antigens, Membranes and Genes. (editor, Kennedy MW) pp.170-194, Taylor and Francis: London-New York-Philadelphia.
23. McKerrow JH, Brindley P, Brown M, Gam AA, Staunton C, and Neva FA. (1990) *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. Experimental Parasitology. 70:134-43.
24. Robertson BD, Bianco AT, McKerrow JH, and Maizels RM. (1989) *Toxocara canis*: proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro. Experimental Parasitology. 69:30-6.
25. Voon W.Y, Craig A.K, Peter A.F, Robert Bell and Dylan R.E (1998) Matrix metalloproteinases and disease of CNS. Trends Neurosci. 21, 75-80.



圖一、gelatin-substrate zymography 分析廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*, A.c)蟲體所具有酵素種類。M：人之全血做為 mark；L1：第一期幼蟲；L3：第三期幼蟲；YD：成蟲。分別添加不同蛋白質抑制劑 EDTA、Leupeptin 及 PMSF。



圖二、gelatin-substrate zymography 分析廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*, A.c)蟲體所分泌之酵素種類。M：人之全血做為 mark；L1：第一期幼蟲；L3：第三期幼蟲；YD：成蟲。分別添加不同蛋白質抑制劑 EDTA、Leupeptin 及 PMSF。