

# 蜱类半胱氨酸蛋白酶抑制剂研究进展\*

张松渤\*\* 高志华 杨小龙\*\*\*

(教育部分子细胞生物学重点实验室, 河北省动物生理生化与分子生物学重点实验室,  
河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050024)

**摘要** 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cysteine protease inhibitors) 是一类与木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶可逆结合的抑制功能分子, 在抑制宿主稳态反应中起到相加或协同作用。蜱作为一种专性吸血的体外寄生虫, 分布于世界各地, 对人类健康、畜牧业生产和野生动物生存构成了严重威胁。2005 年蜱类半胱氨酸蛋白酶抑制剂首次从美洲花蜱 *Amblyomma americanum* 中被鉴定, 之后其在不同蜱种内所参与的生理过程及功能得到深入研究。本文综述了半胱氨酸蛋白酶抑制剂的分类、结构与功能, 总结其在蜱类吸血适应、先天免疫和寄生阶段免疫调节的分子机制以及潜在的应用价值, 并分析存在的问题, 以期为此领域的研究拓展思路。

**关键词** 蜱; 功能分子; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 免疫调节; 防治

## Advancements in the research of tick cysteine protease inhibitors

ZHANG Song-Bo\*\* GAO Zhi-Hua YANG Xiao-Long\*\*\*

(Ministry of Education Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Key Laboratory of Animal Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Hebei Province, College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

**Abstract** Cysteine protease inhibitors are a class of inhibitory functional molecules that reversibly bind to papain-like cysteine proteases and exert additive or synergistic interactions in the inhibition of host homeostatic responses. Ticks are an exclusively hematophagous ectoparasite with a worldwide distribution and pose a serious threat to human health, livestock production, and wildlife survival. Since cystatins were first identified in *Amblyomma americanum* in 2005, the physiological mechanisms and functions these proteins play in different tick species have been extensively studied. This paper reviews the classification, structure, and function of cystatins and summarizes the molecular mechanisms and potential application value of their immunomodulation in tick blood-sucking adaptation, innate immunity and parasitism stages. It also discusses the challenges with the aim of expanding research ideas in this field.

**Key words** ticks; functional molecules; cysteine protease inhibitors; immunological regulation; control

蜱是寄生在爬行动物、鸟类和哺乳动物体表的专性吸血外寄生虫, 也是各种人畜共患疾病的重要媒介 (Olivier *et al.*, 1989; Ogue *et al.*, 2009), 在全球六大动物地理区系中均有广泛分布 (Flores *et al.*, 2014)。在虫媒疾病中, 由蜱传播的病原体种类繁多, 包括病毒、立克次体、细菌、螺旋体、原虫和毒素等, 引发严重疾病, 如森林脑炎、出血热、Q 热、蜱媒斑疹热、莱姆

病、巴贝斯虫病和蜱瘫等。此外, 由于蜱频繁更换宿主, 且某些病原体能在蜱体内长期存活 (Chen *et al.*, 2014), 甚至可以经卵传代 (于志军等, 2014), 从而加重了疾病传播, 给人类健康和畜牧业发展造成了极大危害 (Anderson and Magnarelli, 2008; 刘敬泽和杨晓军, 2013; Estrada-Peña *et al.*, 2020), 全世界每年因蜱类造成的经济损失高达 180 亿美元 (Calvano *et al.*,

\*资助项目 Supported projects: 河北省自然科学基金 (C2023205011); 河北省高等教育教学改革研究与实践项目 (2022GJJG111)

\*\*第一作者 First author, E-mail: 13833425382@163.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: yangxl@hebtu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-03-31; 接受日期 Accepted: 2024-03-25

2019)。近年来, 由于气候变化导致的蜚种群动态变化, 以及人与动物接触蜚类机率增加, 使蜚传播疾病对人体的危害日趋严重, 已成为全球人类和动物健康关注的焦点 (Dantas-Torres *et al.*, 2012; Bouzek *et al.*, 2013; Delord *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2015; Madison-Antenucci *et al.*, 2020)。蜚对人类健康的危害仅次于蚊类 (Jongejan and Uilenberg, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2012)。目前主要通过化学杀虫剂防治蜚害, 但这易造成蜚对杀虫剂的抗药性, 同时也对环境和人类健康构成威胁。因此, 基于功能分子的研究, 运用有效的免疫手段防治蜚害有望成为新策略 (杜艳芳和周金林, 2016; 陈泽和刘敬泽, 2020)。

半胱氨酸蛋白酶抑制剂简称胱抑素 (Cystatins), 在生物学领域有着广泛应用, 参与抗原加工和呈递、细胞吞噬、细胞因子和一氧化氮的表达等多种生物过程, 并调节正常的蛋白水解及下调肿瘤侵袭和转移 (Zavasnik-Bergant, 2008)。胱抑素普遍存在于生物体内, 首次从人多形核白细胞的细胞质溶胶中纯化出胱抑素 Stefin (P01040), 命名为 Stefin A, 随后在人的肝脏中发现另一个家族 1 型 Stefin, 命名为 Stefin B (P04080) (Margis *et al.*, 1998)。此外, 胱抑素在昆虫发育中起着至关重要的作用。例如, 在枯氏锥虫 *Trypanosoma cruzi* 感染恰加斯氏病的过程中, 肠道中的胱抑素 (Tigutcystatin) 显著上调, 这一结果表明胱抑素可能通过抑制枯氏锥虫的毒力因子——半胱氨酸蛋白酶, 调节寄生虫在肠道中的活动 (Buarque *et al.*, 2011)。将病毒胱抑素注射到烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫体内后, 诱导了血细胞和造血器官细胞凋亡, 改变了烟草天蛾的免疫防御反应 (Espagne *et al.*, 2005)。胱抑素不仅在昆虫发育和害虫防治中具有潜在研究价值, 在蜚研究领域也备受关注。胱抑素从美洲花蜚 *Amblyomma americanum* 的唾液腺和中肠首次鉴定, 研究发现蜚唾液腺分泌的胱抑素能调节宿主的免疫反应, 使蜚成功寄生到宿主体表进行吸血, 敲低胱抑素基因的表达可降低蜚的摄食能力 (Karim *et al.*, 2005)。在近 20 年的研究

中, 所发现的胱抑素参与了蜚的吸血、血餐消化和生长发育等多种重要生理过程 (Zavasnik-Bergant, 2008)。由于胱抑素是组织蛋白酶 B、C、S、H 和 L 的可逆结合的紧密抑制分子, 组织蛋白酶 B 参与蜚的胚胎发育, 推测胱抑素可能参与蜚的胚胎发育 (Qiu *et al.*, 2020)。胱抑素还参与多种病理过程, 组织蛋白酶 B、H 和 L 在小鼠黑色素肿瘤细胞的侵袭和扩散中具有重要作用, 蜚体内胱抑素可以抑制肿瘤生长提高小鼠存活率 (Wei *et al.*, 2018)。美洲花蜚的唾液腺胱抑素与人胱抑素 C 同源, 胱抑素可以与组织蛋白酶 C 和 S 形成复合物, 进而抑制 DC 的分化和成熟, 并调节宿主免疫刺激功能 (Zavašnik-Bergant *et al.*, 2017), 蜚分离出的胱抑素还通过抑制甘露聚糖参与银屑病样炎症中的免疫反应 (Wu *et al.*, 2024)。综上所述, 蜚类胱抑素的研究发现了该物种逃避宿主免疫系统的一种方式, 有助于抗蜚疫苗以及医学治疗药物的研发。目前, 还没有研究者对蜚类胱抑素进行系统性的总结。本文系统的总结了各种蜚类胱抑素的分类及功能, 旨在为蜚类解毒代谢研究拓展新思路。

## 1 Cystatins 的分类和结构

胱抑素的分类方法有两种: 第一种是在 MEROPS 分类系统中为每个肽酶或肽酶抑制剂家族分配一个唯一的识别号, 根据 MEROPS 数据库, 胱抑素属于 I25 家族, 该家族又分为 I25A 亚科 (Stefins)、I25B 亚科 (Cystatins and kinogen) 和 I25C 亚科 (Fetuin, histidine-rich proteins) (Rawlings *et al.*, 2010)。第二种是根据某些序列基序和保守胱抑素结构域的数量进行分类, 胱抑素分为 4 个亚家族: 1 型胱抑素 (Stefins), 2 型胱抑素 (Cystatins), 3 型胱抑素 (Kininogens) 和 4 型胱抑素样蛋白 (Fetuin, histidine-rich proteins) (Schwarz *et al.*, 2012)。第二种分类方法的公认度较高, 本文采用第二种分类方法 (表 1)。

### 1.1 家族 1 型 Cystatins

家族 1 型 Cystatins 主要为细胞内蛋白质,

表 1 Cystatins 4 个家族的序列信息  
Table 1 Sequence information for the four families of cystatins

| 胱抑素家族分类                        | 理论相对分子量 (kD)                               | 保守结构域和其他特征                                                          |
|--------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Cystatin family classification | Theoretical relative molecular weight (kD) | Conserved domains and other features                                |
| 1 型胱抑素                         | 9-12                                       | G, QXVXG                                                            |
| Type 1 cystatins               | ( AAY66864; ABZ89553 )                     |                                                                     |
| 2 型胱抑素                         | 13-16                                      | G, QXVXG, PW, 1 个信号肽 One signal peptide, 2 个二硫键 Two disulfide bonds |
| Type 2 cystatins               | ( BAI59105; ABC94582 )                     |                                                                     |
| 3 型胱抑素                         | 60-120                                     | G, QXVXG, PW, 具有信号肽 Signal peptide, 9 个二硫键 Nine disulfide bonds     |
| Type 3 cystatins               | ( KAI4032961; KAI4032961 )                 |                                                                     |
| 4 型胱抑素                         | 14-63                                      | G, QXVXG, PW, 具有信号肽 Signal peptide, 二硫键 Disulfide bond, DRXXEXG     |
| Type 4 cystatins               | ( AK171732; JAO36318 )                     |                                                                     |

括号里为登录号。Accession number in parentheses.

简称胱抑蛋白 Stefins, 分布于上皮细胞、中性粒细胞和多形核白细胞等细胞及各类组织中, 由约 100 个氨基酸组成, 相对分子量约 9-12 kD, 结构中无信号肽、二硫键桥和糖基化侧链, 包含 1 个 N 端保守甘氨酸和 2 个  $\beta$  折叠的结构域, 发夹环 1 含有 1 个 QXVXG 保守氨基酸序列, 这是识别胱抑素的特殊结构域 ( Gao *et al.*, 2024 )。

1.2 家族 2 型 Cystatins

家族 2 型 Cystatins 属于分泌型蛋白, 广泛分布于动植物的体液中。1983 年, Anastasi 首次从鸡蛋清中检测鉴定出人胱蛋白 C 的同种蛋白, 命名为 Cys-C ( Anastasi *et al.*, 1983 )。家族 2 型 Cystatins 包含由 110-120 个氨基酸组成的多肽链, 相对分子量约 13-16 kD, 肽链 N 前端和 C 末端通常具有信号肽, 含有 2 个二硫键桥, 发夹 2 结构中具有 PW 模体, 其他结构与家族 1 型 Stefins 相同, 由 N 端保守甘氨酸、QXVXG 序列以及 PW 模体共同构成与半胱氨酸蛋白酶活性中心相互作用的楔状空间结构, 最终形成紧密结合且可逆的酶抑制剂复合物。常见的家族 2 型 Cystatins 能够抑制半胱氨酸蛋白酶的活性, 如木瓜蛋白酶、组织蛋白酶 B、C、S、H 和 L 等 ( Margis *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 2013 )。此外, SNS、SND 或 SNV 保守序列位于 Cystatins 的 N 端甘氨酸和 QXVXG 之间, 这类 Cystatins 能产生对豆类等其他蛋白的抑制活性。

1.3 家族 3 型 Cystatins

家族 3 型 Cystatins 又称激肽原

( Kininogens ), 肽链较长, 主要分布于血浆和分泌液中, 相对分子量约 60-120 kD, 由 3 个家族 2 型 Cystatins 结构域组成, 具有信号肽、多个二硫键桥及糖基化侧链, 通常有 2 个结构域保留了半胱氨酸蛋白酶抑制活性, 以保护机体不受溶酶体半胱氨酸蛋白酶和病原体源蛋白酶的侵害。Kininogens 可引起血管通透性增加、刺激伤害感受器、释放 OFR、PAF 和 ET 等炎症介质, 有助于维持正常血压 ( Khan *et al.*, 2015 )。

1.4 家族 4 型 Cystatins

家族 4 型 Cystatins 的分类存在一定争议。此类型包括胎球蛋白和组氨酸蛋白, 具有类似其他 3 种家族的功能或结构特征, 但不完全符合上述各类型的归类条件。家族 4 型 Cystatins 由 2 个串联的 Cystatin 结构域组成, 但对半胱氨酸蛋白酶无抑制活性, 属于分泌性蛋白。胎球蛋白与炎症反应相关, 而组氨酸蛋白对不同动物的代谢和生理过程有积极影响 ( Zhou *et al.*, 2019; Moro *et al.*, 2020 )。

2 蜚 Cystatins 的类型及功能

蜚胱抑素与在动物和植物中表达的胱抑素不同。与原型人胱抑素 A、B 和 C 相比, 家族 1 型和 2 型蜚胱抑素仅分别显示出 37% 和 25% 的氨基酸同源性 ( Schwarz *et al.*, 2012 )。现阶段, 蜚胱抑素研究主要集中在家族 1 型 Cystatins 和家族 2 型 Cystatins, 三级结构可见图 1 和图 2。

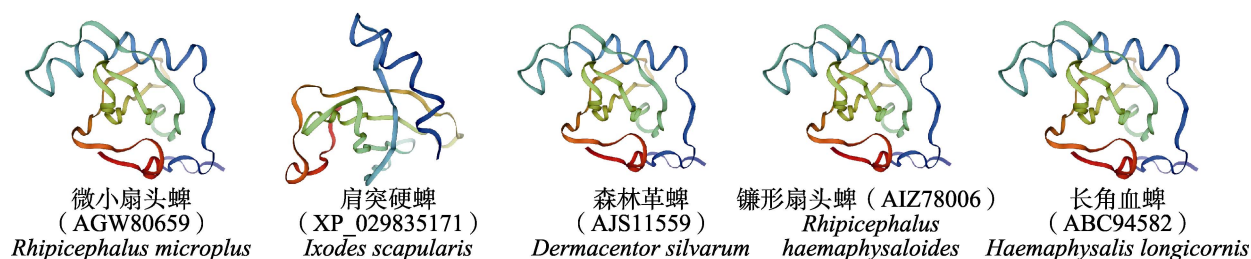


图 1 蜱家族 1 型胱抑素三级结构

Fig. 1 The tertiary structure of tick family type 1 cystatins

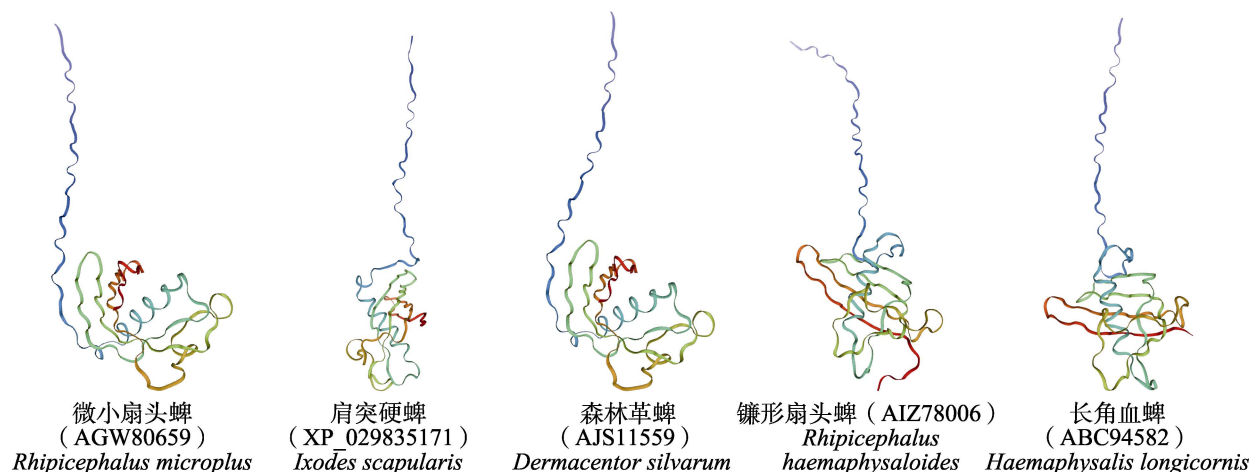


图 2 蜱家族 2 型胱抑素三级结构

Fig. 2 The tertiary structure of tick family type 2 cystatins

## 2.1 蜱家族 1 型 Cystatins

蜱家族 1 型 Cystatins 参与调节蜱血液消化过程, 主要分布于蜱唾液腺或中肠中。在肩突硬蜱 *Ixodes scapularis* 唾液腺中发现的胱抑素 Cytoplasmic cystatin (AAY66864), 可能具有抗炎和免疫调节功能 (Sá-Nunes *et al.*, 2009)。长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis* 中的胱抑素 Hlcyst-1 位于中肠上皮细胞 HLCPL-A, 对木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 L、B 均有抑制活性, 能够调节 HLCPL-A 对血红蛋白的降解 (Zhou *et al.*, 2009)。微小扇头蜱 *Rhipicephalus microplus* 家族 1 型胱抑素 Rmcystatin-1b 在部分和完全充血的雌蜱中肠中高度表达, 并且 Rmcystatin-1b 在体外可以干扰牛巴贝斯虫 *Babesia bovis* 的生长, 推测 Rmcystatin-1b 是中肠血液消化的调节因子 (Lu *et al.*, 2020)。在变异革蜱 *Dermacentor variabilis* 中肠中发现 82 个转录物为直接参与血液消化的蛋白质, 其中包括胱抑素 DvM602

(ACF35512)。

蜱家族 1 型 Cystatins 在蜱生殖发育中发挥着重要作用。从微小扇头蜱的脂肪体鉴定出一种家族 1 型 Cystatins 分子, 命名为 Bmcystatin (ABG36931), 推测 Bmcystatin 在卵巢中发挥作用, 参与胚胎发育, 并作为一个防御蛋白或调节宿主免疫因子参与蜱吸血 (Lima *et al.*, 2006)。镰形扇头蜱 *Rhipicephalus haemaphysaloides* 的家族 1 型胱抑素 RHcyst-1 能抑制组织蛋白酶 B、C、H、L、S 以及木瓜蛋白酶的活性, 对组织蛋白酶 S 抑制活性最高, 且该基因在卵的表达量相对较高, 敲低 RHcyst-1 的表达后发现产卵量降低, 推测 RHcyst-1 可能参与了胚胎发育, 进而影响生殖过程 (Wang *et al.*, 2015)。

蜱家族 1 型 Cystatins 还可能具有抑癌功能。镰形扇头蜱的胱抑素 RHcyst-1 在小鼠肿瘤治疗模型建立过程中, 可在体外抑制外周血单个核细胞 PBMCs 和脾脏中髓源性抑制细胞 MDSCs、

CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平的增殖、迁移和侵袭,抑制肿瘤生长提高小鼠存活率。RHcyst-1 在体外不会引起细胞凋亡和正常细胞活性的改变,在体内不会造成正常组织器官损伤,具有很好的安全性。应用 RHcyst-1 后,在 PBMCs 和脾脏中分别观察到骨髓来源的抑制细胞 MDSCs 水平的变化,显示 RHcyst-1 抑制了肿瘤生长,延长了生命周期。RHcyst-1 在体内和体外均具有很好的抑瘤效果,且在体外可针对不同的肿瘤细胞系发挥抑瘤活性,推测 RHcyst-1 具有潜在的抗肿瘤作用 (Wei *et al.*, 2018)。

## 2.2 蜱家族 2 型 Cystatins

蜱家族 2 型 Cystatins 的研究相较于家族 1 型 Cystatins 更加深入。蜱家族 2 型 Cystatins 不仅在蜱吸血、血液消化、胚胎发育和先天免疫的过程中发挥重要作用,还在蜱吸血过程中调节宿主免疫反应、协助抗原传播、抗炎并抑制细胞毒性 T 淋巴细胞。因此,揭示 Cystatins 在免疫调节方面的奥秘对于研发新型消炎药和深入理解其在蜱虫中的作用具有重要意义。

### 2.2.1 血蜱属 *Haemaphysalis* 2 型 Cystatins

从长角血蜱中鉴定出的胱抑素 Hlcyst-2 (ABC94582)、HISC-1 (BAI59105) 和 Hlcyst-3 (ABZ89554) 均属于家族 2 型 Cystatins。Hlcyst-2 主要在蜱的中肠和血细胞中表达,吸血会诱导中肠 Hlcyst-2 表达显著上调。将脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 注射到长角血蜱成蜱后,发现 Hlcyst-2 参与蜱先天免疫,并与 Hlcyst-1 共同参与血液消化 (Zhou *et al.*, 2006)。Hlcyst-3 与 Hlcyst-2 具有显著同源性,主要在中肠中表达,并可抑制木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 L 活性 (Zhou *et al.*, 2010)。HISC-1 也具有类似的功能,能抑制木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 L 的活性,但不影响组织蛋白酶 B 的活性。HISC-1 在蜱吸血时表达上调,预测 HISC-1 可能在吸血过程中发挥关键作用。此外,RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 沉默溶血素和胱抑素基因,影响了长角血蜱雌蜱的吸血和繁殖,延长雌蜱的吸血时间,并降低产卵量 (Yamaji *et al.*, 2009)。

从褐黄血蜱 *Haemaphysalis flava* 唾液腺中鉴定出的 Cystatin 与长角血蜱 Hlcyst-2 的同源性为 77.86% (和 小明 和刘磊, 2018)。随后,从褐黄血蜱全蜱中分离出 4 种胱抑素,分别命名为 Hfcyst-1 (QGW58124)、Hfcyst-2 (AZB52851)、Hfcyst-3 (QBR53058) 和 Hfcyst-4 (MK387350)。复性的 rHfcyst-3 可抑制组织蛋白酶 S 活性,组织蛋白酶 S 是一种与自身免疫性疾病、动脉瘤和关节炎密切相关的半胱氨酸蛋白酶,因此推测 Hfcyst-3 参与癌细胞的生理活动 (匡利平, 2019)。Liu 等 (2022) 分析了褐黄血蜱的血淋巴蛋白质谱,发现 Cystatins 同源性高达 99.3% 和 100%,并推测 Cystatins 在组织蛋白酶介导的血红蛋白消化或蜱胚胎发育过程中起着调节作用,并与蜱的免疫行为密切相关。

### 2.2.2 硬蜱属 *Ixodes* 2 型 Cystatins

到目前为止,对硬蜱属胱抑素的研究开展最多且开始最早。Valenzuela 等 (2002) 在肩突硬蜱唾液腺中发现了第一个家族 2 型 Cystatin,命名为 Sialostatin L (AAM93646),它对木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 L 有较强抑制活性,但不抑制组织蛋白酶 S。在不表达组织蛋白酶 L 的小鼠树突状细胞的免疫研究过程中发现,Sialostatin L 可干扰抗原呈递。在实验性小鼠自身免疫性脑脊髓炎的免疫阶段,向小鼠静脉内注射 Sialostatin L 能显著缓解疾病症状,表明这种胱抑素具有抗炎作用,可阻止细胞毒性 T 淋巴细胞的增殖,显示了其在防控自身免疫性疾病方面的潜能 (Hsing and Rudensky, 2005; Kotsyfakis *et al.*, 2006)。此外,Horka 等 (2012) 报道 Sialostatin L 可有效抑制 Th 细胞亚群 (Th9) 产生白细胞介素-9 (IL-9),IL-9 在哮喘症状的诱导中起重要作用,表明 Sialostatin L 可被用于治疗实验性哮喘。另一方面,肥大细胞、嗜酸性细胞、中性粒细胞以及其他淋巴细胞亚群也可以分泌 IL-9。Klein 等 (2015) 采用 Sialostatin L 预防实验性哮喘,发现 Sialostatin L 优先通过抑制干扰素调节因子 4 (Interferon regulatory factor 4, IRF4) 来抑制肥大细胞产生 IL-9,从而显著减轻了哮喘症状,证明了蜱 Sialostatin L 具有免疫抑制能力。

Sialostatin L2 在肩突硬蜱的唾液腺蛋白组中被发现, 与 Sialostatin L 分子的氨基酸序列同源性达到 75%, 同 Sialostatin L 功能相似, 两者包含的特异氨基酸序列使其对组织蛋白酶 B 和 H 无抑制活性 (Sá-Nunes *et al.*, 2009)。Kotsyfakis 等 (2010) 首次解析了 Sialostatin L 和 L2 的晶体结构, Sialostatin L2 作为小鼠皮肤中病原体建立的阳性调节因子, 可促进伯氏疏螺旋体 *Borrelia burgdorferi* 在小鼠皮肤中的增殖, Sialostatin L 和 L2 能够抑制宿主防御反应的特定蛋白酶, 进而影响伯氏疏螺旋体的感染, 有助于媒介吸血和病原体向脊椎动物宿主的传播。Sialostatin L2 与磷脂结合蛋白膜联蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2) 的结合可阻断 NLRC4 炎性体寡聚化、胱天蛋白酶-1 (Caspase-1) 活化以及白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和白细胞介素-18 (IL-18) 分泌, 从而在立克次体感染过程中削弱 NLRC4 炎症体的形成。有关 Sialostatin L2 的免疫信号传递机制需进一步研究。值得注意的是, 以血液为食的节肢动物可能建立病原体逃避炎症小体的独特模式 (Wang *et al.*, 2016)。

从蓖子硬蜱 *Ixodes ricinus* 鉴定出两种新的免疫调节胱抑素 Iristatin 和 Mialostatin。Iristatin 在饲养的蓖子硬蜱的唾液腺中表达上调, 可抑制组织蛋白酶 L 和 C 的蛋白水解活性, 降低 T 细胞群体产生的白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-4 (IL-4)、IL-9 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), 同时降低肥大细胞产生的白细胞介素-6 (IL-6) 和 IL-9 以及巨噬细胞产生的一氧化氮。此外, Iristatin 抑制 OVA 抗原诱导的 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖和白细胞募集, 表明 Iristatin 参与吸血过程, 影响脊椎动物宿主的大范围抗蜱免疫反应, 并可用作免疫治疗剂。Mialostatin 对组织蛋白酶 L 的抑制效果最好, 能有效地阻断体外中肠半胱氨酸组织蛋白酶对血液蛋白的水解, 推测 Mialostatin 可能参与调节肠道相关蛋白的水解途径 (Kotál *et al.*, 2019; 2021)。

全沟硬蜱 *Ixodes persulcatus* 唾液腺胱抑素 Ip-sL1 和 Ip-sL2 抑制 LPS 刺激的骨髓来源的树突状细胞 BMDCs 产生干扰素诱导蛋白-10 (IP-

10)、TNF $\alpha$  和 IL-6。特别是, Ip-sL1 显著阻碍了 BMDC 的成熟, 表明 Ip-sL1 和 Ip-sL2 通过抑制宿主的免疫反应参与病原体传播 (Sajiki *et al.*, 2020)。在体外研究中, Ip-sL2 可抑制蜱介导的细菌传播过程中 CD11c<sup>+</sup>和 CD3<sup>+</sup>细胞的活化, 以及宫本双歧杆菌 *B. miyamotoi* 抗原刺激下脾脏细胞产生的细胞因子, 揭示 Ip-sL2 可能通过减弱宿主免疫反应使宫本双歧杆菌的感染性增强 (Sajiki *et al.*, 2022)。

### 2.2.3 扇头蜱属 *Rhipicephalus* 2 型 Cystatins

在扇头蜱属微小扇头蜱半饱血的雌蜱 PEF 唾液中, 发现家族 2 型胱抑素 RMCys-2b 表达显著。RMCys-2b 对组织蛋白酶 B、L 和 C 具有一定抑制作用, 在牛体表寄生进食阶段, 可以作为免疫调节剂 (Tirloni *et al.*, 2014)。家族 2 型胱抑素 Rmcystatin-3 主要存在于血细胞中, 少量存在于脂肪体和唾液腺中, 可抑制组织蛋白酶 L 和 BmCl-1 的活性, 但对木瓜蛋白酶无抑制作用。通过 RNAi 沉默胱抑素基因后, 发现病原菌清除效率明显增加, 表明 Rmcystatin-3 参与免疫反应 (Lu *et al.*, 2014)。Rmcystatin-4 主要存在于微小扇头蜱中肠组织, 可抑制木瓜蛋白酶、组织蛋白酶 B、L、V 和 S 的活性, 特别是对组织蛋白酶 BmCl-1 表现出高度选择性的抑制作用。Rmcystatin-4 通过抑制 BmCl-1 对牛血红蛋白的活性, 参与中肠血液的消化 (Cardoso *et al.*, 2017)。

与 Rmcystatin-4 相同, 镰形扇头蜱胱抑素 RHcyst-2 在中肠中大量表达, 对组织蛋白酶 L、B、C、H 和 S 以及木瓜蛋白酶均有抑制作用, 其中对组织蛋白酶 S 的抑制效果最好 (Wang *et al.*, 2015)。然而, RHcyst-2 只参与了宿主免疫应答反应阶段 T 细胞激活的过程, 对树突状细胞 DCs 分化、成熟及效应阶段 CTL 杀伤都无明显影响 (Wei *et al.*, 2018)。

### 2.2.4 钝缘蜱属 *Ornithodoros* 2 型 Cystatins

从钝缘蜱属的非洲钝缘蜱 *Ornithodoros moubata* 中鉴定出两种家族 2 型胱抑素 Om-cystatin 1 (AAS01021) 和 Om-cystatin2 (AAS55948), Om-cystatin 1 主要在中肠中表达, 而 Om-cystatin

2 (OmC2) 在中肠和唾液腺中表达。它们均可有效抑制木瓜蛋白酶样组织蛋白酶 B 和 H, 但对组织蛋白酶 C 的亲合力明显不同, 在蜱的血液消化和亚铁血红素的解毒过程中发挥作用 (Grunclová *et al.*, 2006)。此外, OmC2 对组织蛋白酶 C、L 和 S 亦有抑制作用, OmC2 作用机制不仅直接作用于组织蛋白酶, 还可通过抑制促炎细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素-12 (IL-12) 的产生以及抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖, 影响抗原呈递小鼠树突状细胞的功能, 进而影响 CD86 细胞的表达。OmC2 还可与重组组织蛋白酶 S、C 形成复合体, 并在分化的 MUTZ-3 细胞中检测到组织蛋白酶 S、C, 推测宿主树突细胞对 OmC2 的内化作用靶向组织蛋白酶 S 和 C, 进而参与宿主的免疫反应 (Salát *et al.*, 2010; Zavašnik-Bergant *et al.*, 2017)。

### 2.3 Cystatins 的潜在应用价值

胱抑素作为一种应用于疫苗研发的潜在功能分子, 其在蜱类防治方面具有重要的研究的价值。胱抑素是一种先天免疫的关键分子, 在蜱的吸血过程中发挥着不可或缺的作用 (Nandy *et al.*, 2023)。例如, 用钝刺血蜱 *Haemaphysalis doenitzi* 中的胱抑素 HDcyst-1 制备的蛋白疫苗能够有效降低其饱血后的体重。微小扇头蜱中的胱抑素被证实可显著降低具尾扇头蜱 *Rhipicephalus appendiculatus* 雌蜱和若蜱的饱血体重 (Parizi *et al.*, 2020)。

值得一提的是, 胱抑素不仅在防治蜱类方面具有研发价值, 其在抗菌和抗其他虫害方面也展现出良好的应用前景。研究表明, 从植物体外分离出的胱抑素可以有效地抑制细菌所分泌的蛋白酶, 并能抑制 3 种革兰氏阴性菌的生长, 包括根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*、洋葱伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia* 和软腐病菌 *Erwinia carotovora* (Popovic *et al.*, 2012)。通过体外合成含有胱抑素的工程菌体, 研究人员用浸渍工程菌的柳叶饲喂柳蓝叶甲 *Plagioderia versicolora* 成虫后, 观察到柳蓝叶甲产卵量、产

卵持续期、孵化率和羽化率均显著降低, 这些结果验证了胱抑素的潜在抗菌和抗虫能力 (张普, 2021)。

## 3 展望

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (胱抑素) 在蜱类生殖发育、血液消化、解毒、调节半胱氨酸蛋白酶活性和逃避宿主免疫系统等方面发挥着重要作用。虽然蜱类胱抑素的研究已取得一定进展, 但仍有许多问题需要解决, 如蜱源胱抑素功能分子的分离纯化与鉴定、胱抑素功能分子参与调控蜱类生长发育的作用机制以及如何将胱抑素功能分子应用于药物设计等, 这些问题的解决将为新型杀蜱剂、抗蜱疫苗和抗真菌药物的研发提供新思路。

### 参考文献 (References)

- Anastasi A, Brown MA, Kembhavi AA, Nicklin MJ, Sayers CA, Sunter DC, Barrett AJ, 1983. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *The Biochemical Journal*, 211(1): 129–138.
- Anderson JF, Magnarelli LA, 2008. Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2): 195–215.
- Bouzek DC, Foré SA, Bevell JG, Kim HJ, 2013. A conceptual model of the *Amblyomma americanum* life cycle in northeast Missouri. *Journal of Vector Ecology*, 38(1): 74–81.
- Buarque DS, Spindola LMN, Martins RM, Braz GRC, Tanaka AS, 2011. Tigutecystatin, a cysteine protease inhibitor from *Triatoma infestans* midgut expressed in response to *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(2): 241–247.
- Calvano MPCA, Brumatti RC, Garcia MV, Barros JC, Andreotti R, 2019. Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. *Experimental & Applied Acarology*, 79(3/4): 459–471.
- Cardoso THS, Lu S, Gonzalez BRG, Torquato RJS, Tanaka AS, 2017. Characterization of a novel cystatin type 2 from *Rhipicephalus microplus* midgut. *Biochimie*, 140(2): 117–121.
- Chen Z, Liu JZ, 2020. Recent progress in tick taxonomy and a global list of tick species. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(5): 1009–1045. [陈泽, 刘敬泽, 2020. 蜱分类学研究进展. 应用昆虫学报, 57(5): 1009–1045.]

- Chen Z, Liu Q, Liu JQ, Xu BL, Lv S, Xia S, Zhou XN, 2014. Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. *Parasites & Vectors*, 7(1): 237.
- Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D, 2012. Ticks and tick-borne diseases: A one health perspective. *Trends in Parasitology*, 28(10): 437–446.
- Delord M, Socolovschi C, Parola P, 2014. Rickettsioses and Q fever in travelers (2004–2013). *Travel Medicine and Infectious Disease*, 12(5): 443–458.
- Du YF, Zhou JL, 2016. Research progress of cysteine protease inhibition molecules in tick. *Progress in Veterinary Medicine*, 37(12): 95–99. [杜艳芳, 周金林, 2016. 蜱半胱氨酸蛋白酶抑制剂分子研究进展. 动物医学进展, 37(12): 95–99.]
- Espagne E, Douris V, Lalmanach G, Provost B, Cattolico L, Lesobre J, Kurata S, Iatrou K, Drezen JM, Huguet E, 2005. A virus essential for insect host-parasite interactions encodes cystatins. *Journal of Virology*, 79(15): 9765–9776.
- Estrada-Peña A, Cabezas-Cruz A, Obregón D, 2020. Behind taxonomic variability: The functional redundancy in the tick microbiome. *Microorganisms*, 8(11): 1829.
- Flores FS, Nava S, Batallán G, Tauro LB, Contigiani MS, Diaz LA, Guglielmone AA, 2014. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild birds in north-central Argentina. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(6): 715–721.
- Gao X, Tian Y, Liu ZL, Li D, Liu JJ, Yu GX, Duan DY, Peng T, Cheng TY, Liu L, 2024. Tick salivary protein cystatin: Structure, anti-inflammation and molecular mechanism. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 15(2): 102289.
- Grunclová L, Horn M, Vancová M, Sojka D, Franta Z, Mares M, Kopáček P, 2006. Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: Differential expression pattern and inhibitory specificity. *Chemistry & Biology*, 387(12): 1635–1644.
- He XM, Liu L, 2018. Cloning and prokaryotic expression of full-length cystatin gene from *Haemaphysalis flava*. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 23(1): 13–16, 20. [和 小明, 刘磊, 2018. 褐黄血蜱 cystatin 基因全长的克隆及原核表达研究. 黑龙江畜牧兽医, 23(1): 13–16, 20.]
- Horka H, Staudt V, Klein M, Taube C, Reuter S, Dehzad N, Andersen JF, Kopecký J, Schild H, Kotsyfakis M, Hoffmann M, Gerlitzki B, Stassen M, Bopp T, Schmitt E, 2012. The tick salivary protein sialostatin L inhibits the th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. *Journal of Immunology*, 188(6): 2669–2676.
- Hsing LC, Rudensky AY, 2005. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews*, 207(1): 229–241.
- Imamura S, Konnai S, Yamada S, Parizi LF, Githaka N, da S Vaz I Jr, Murata S, Ohashi K, 2013. Identification and partial characterization of a gut *Rhipicephalus appendiculatus* cystatin. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(1/2): 138–144.
- Jongejan F, Uilenberg G, 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(Suppl.): S13–S14.
- Karim S, Miller NJ, Valenzuela J, Sauer JR, Mather TN, 2005. RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(4): 1336–1342.
- Khan GH, Galazis N, Docheva N, Layfield R, Atiomo W, 2015. Overlap of proteomics biomarkers between women with pre-eclampsia and PCOS: A systematic review and biomarker database integration. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 30(1): 133–148.
- Klein M, Brühl TJ, Staudt V, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, Hoffmann M, Bohn T, Ulges A, Stergiou N, de Graaf J, Löwer M, Taube C, Becker M, Hain T, Dietzen S, Stassen M, Huber M, Lohoff M, Campos Chagas AC, Andersen J, Kotál J, Langhansová H, Kopecký J, Schild H, Kotsyfakis M, Schmitt E, Bopp T, 2015. Tick salivary sialostatin L represses the initiation of immune responses by targeting irf4-dependent transcription in murine mast cells. *Journal of Immunology*, 195(2): 621–631.
- Kotál J, Buša M, Urbanová V, Řezáčová P, Chmelař J, Langhansová H, Sojka D, Mareš M, Kotsyfakis M, 2021. Mialostatin, a novel midgut cystatin from *Ixodes ricinus* ticks: Crystal structure and regulation of host blood digestion. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10): 5371.
- Kotál J, Stergiou N, Buša M, Chlastáková A, Beránková Z, Řezáčová P, Langhansová H, Schwarz A, Calvo E, Kopecký J, Mareš M, Schmitt E, Chmelař J, Kotsyfakis M, 2019. The structure and function of Iristatin, a novel immunosuppressive tick salivary cystatin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(10): 2003–2013.
- Kotsyfakis M, Horka H, Salat J, Andersen JF, 2010. The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Molecular Microbiology*, 77(2): 456–470.
- Kotsyfakis M, Sá-Nunes A, Francischetti IMB, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JMC, 2006. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin

- from the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36): 26298–26307.
- Kuang LP, 2019. Cloning, expression and functional research of the cystatin family in *Haemaphysalis flava*. Master dissertation. Changsha: Agricultural University of Hunan. [匡利平, 2019. 褐黄血蜱 Cystatin 家族的基因克隆、表达和功能研究. 硕士学位论文. 长沙: 湖南农业大学.]
- Lima CA, Sasaki SD, Tanaka AS, 2006. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(1): 44–50.
- Liu JZ, Yang XJ, 2013. Tickology. Beijing: China Forestry Publishing House. 187–201. [刘敬泽, 杨晓军, 2013. 蜱类学. 北京: 中国林业出版社. 187–201.]
- Liu L, Yan F, Zhang L, Wu ZF, Duan DY, Cheng TY, 2022. Protein profiling of hemolymph in *Haemaphysalis flava* ticks. *Parasites & Vectors*, 15(1): 179.
- Lu S, da Rocha LA, Torquato RJS, da Silva Vaz Junior I, Florin-Christensen M, Tanaka AS, 2020. A novel type 1 cystatin involved in the regulation of *Rhipicephalus microplus* midgut cysteine proteases. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(3): 101374.
- Lu S, Soares TS, Vaz Junior IS, Lovato DV, Tanaka AS, 2014. Rmcystatin3, a cysteine protease inhibitor from *Rhipicephalus microplus* hemocytes involved in immune response. *Biochimie*, 106: 17–23.
- Madison-Antenucci S, Kramer LD, Gebhardt LL, Kauffman E, 2020. Emerging tick-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2): e00083–e000118.
- Margis R, Reis EM, Villeret V, 1998. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 359(1): 24–30.
- Moro J, Tomé D, Schmidely P, Demersay TC, Azzout-Marniche D, 2020. Histidine: A systematic review on metabolism and physiological effects in human and different animal species. *Nutrients*, 12(5): E1414.
- Nandy K, Tamakloe C, Sonenshine DE, Sultana H, Neelakanta G, 2023. Anti-tick vaccine candidate subolesin is important for blood feeding and innate immune gene expression in soft ticks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(11): e0011719.
- Oguge NO, Durden LA, Keirans JE, Balamu HD, Schwan TG, 2009. Ectoparasites (sucking lice, fleas and ticks) of small mammals in southeastern Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(4): 387–392.
- Olivier B, Mos J, van der Heyden J, Hartog J, 1989. Serotonergic modulation of social interactions in isolated male mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 97(2): 154–156.
- Parizi LF, Rangel CK, Sabadin GA, Saggin BF, Kiio I, Xavier MA, da Silva Matos R, Camargo-Mathias MI, Seixas A, Konnai S, Ohashi K, Githaka NW, da Silva Vaz I Jr, 2020. *Rhipicephalus microplus* cystatin as a potential cross-protective tick vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(3): 101378.
- Popovic M, Andjelkovic U, Grozdanovic M, Aleksic I, Gavrovic-Jankulovic M, 2012. In vitro antibacterial activity of cysteine protease inhibitor from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Indian Journal of Microbiology*, 53(1): 100–105.
- Portillo A, Santibáñez S, García-Álvarez L, Palomar AM, Oteo JA, 2015. Rickettsioses in Europe. *Microbes and Infection*, 17(11/12): 834–838.
- Qiu ZX, Li Y, Li MM, Wang WY, Zhang TT, Liu JZ, 2020. Investigation of three enzymes and their roles in the embryonic development of parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis*. *Parasit Vectors*, 13(1): 46.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A, 2010. Merops: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 38(Suppl.1): D227–D233.
- Sajiki Y, Konnai S, Ochi A, Okagawa T, Githaka N, Isezaki M, Yamada S, Ito T, Ando S, Kawabata H, Logullo C, da Silva Vaz I Jr, Maekawa N, Murata S, Ohashi K, 2020. Immunosuppressive effects of sialostatin L1 and L2 isolated from the taiga tick *Ixodes persulcatus* schulze. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(2): 101332.
- Sajiki Y, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Isezaki M, Yamada S, Ito T, Sato K, Kawabata H, Logullo C, da Silva Vaz I Jr, Murata S, Ohashi K, 2022. Suppressive effects of *Ixodes persulcatus* sialostatin L2 against *Borrelia miyamotoi*-stimulated immunity. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(4): 101963.
- Salát J, Paesen GC, Rezáková P, Kotsyfakis M, Kovárová Z, Sanda M, Majtán J, Grunclová L, Horká H, Andersen JF, Brynda J, Horn M, Nunn MA, Kopáček P, Kopecký J, Mares M, 2010. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick. *Ornithodoros moubata*. *Biochemical Journal*, 429(1): 103–112.
- Sá-Nunes A, Bafica A, Antonelli LR, Choi EY, Francischetti IMB, Andersen JF, Shi GP, Chavakis T, Ribeiro JM, Kotsyfakis M, 2009. The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *Journal of Immunology*, 182(12): 7422–7429.
- Schwarz A, Valdés JJ, Kotsyfakis M, 2012. The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(3): 117–127.

- Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M, 2014. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(6): 816–827.
- Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, Fox JW, Yates JR 3rd, Termignoni C, Pinto AFM, da Silva Vaz I Jr, 2014. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE*, 9(4): e94831.
- Valenzuela JG, Francischetti IMB, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JMC, 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Experimental Biology*, 205(Pt 18): 2843–2864.
- Wang XW, Shaw DK, Sakhon OS, Snyder GA, Sundberg EJ, Santambrogio L, Sutterwala FS, Dumler JS, Shirey KA, Perkins DJ, Richard K, Chagas AC, Calvo E, Kopecký J, Kotsyfakis M, Pedra JHF, 2016. The tick protein sialostatin L2 binds to annexin A2 and inhibits nlr4-mediated inflammasome activation. *Infection and Immunity*, 84(6): 1796–1805.
- Wang YJ, Yu XM, Cao J, Zhou YZ, Gong HY, Zhang HS, Li XR, Zhou JL, 2015. Characterization of a secreted cystatin from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Experimental & Applied Acarology*, 67(2): 289–298.
- Wei NN, Lin ZB, Xu ZM, Cao J, Zhou YZ, Zhang HS, Gong HY, Zhou JL, Li GQ, 2018. A tick cysteine protease inhibitor RHcyst-1 exhibits antitumor potential. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(6): 2385–2400.
- Wu HM, Jmel MA, Chai JW, Tian ML, Xu XQ, Hui Y, Nandakumar KS, Kotsyfakis M, 2024. Tick cysteine protease inhibitors suppress immune responses in mannan-induced psoriasis-like inflammation. *Frontiers in Immunology*, 15: 1344878.
- Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman M, Kushibiki S, Fujisaki K, 2009. A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes. *Parasitology Research*, 106(1): 61–68.
- Yu ZJ, Yang XL, Chen J, Liu JZ, 2014. An overview on the physiological and ecological adaptation mechanisms of the overwinter ticks. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 232(5): 385–392. [于志军, 杨小龙, 陈洁, 刘敬泽, 2014. 蜱类越冬生理生态适应机制概述. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 232(5): 385–392.]
- Zavasknik-Bergant T, 2008. Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Frontiers in Bioscience*, 13: 4625–4637.
- Zavašnik-Bergant T, Vidmar R, Sekirnik A, Fonović M, Salát J, Grunclová L, Kopáček P, Turk B, 2017. Salivary tick cystatin OmC2 targets lysosomal cathepsins S and C in human dendritic cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7: 288.
- Zhang P, Shao WJ, Du KJ, Zhang S, 2021. Cloning and functional analysis of cysteine proteinase inhibitor gene EuCPI from *Eucommia ulmoides*. *Agroforestry Science*, 57(3): 29–38. [张普, 邵文靖, 杜克久, 张爽, 2021. 杜仲半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 EuCPI 的克隆及功能分析. 林业科学, 57(3): 29–38.]
- Zhou JL, Liao M, Gong HY, Xuan XN, Fujisaki K, 2010. Characterization of Hlcyst-3 as a member of cystatins from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Experimental & Applied Acarology*, 51(4): 327–333.
- Zhou JL, Liao M, Ueda M, Gong HY, Xuan XN, Fujisaki K, 2009. Characterization of an intracellular cystatin homolog from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Veterinary Parasitology*, 160(1/2): 180–183.
- Zhou JL, Ueda M, Umemiya R, Battsetseg B, Boldbaatar D, Xuan XN, Fujisaki K, 2006. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(7): 527–535.
- Zhou ZW, Ji YQ, Ju HX, Chen HM, Sun MZ, 2019. Circulating fetuin-A and risk of all-cause mortality in patients with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Physiology*, 10: 966.