DOI:10.13350/j. cjpb. 231111

论著。 细粒棘球绦虫糖转运体早期响应脱水蛋白的生物信息学 及系统发育分析*

周润^{1,2},周婧^{1,2},许少全^{1,2},颜明智²,吕国栋^{1,2**} (1. 新疆医科大学药学院,新疆乌鲁木齐 830054;2. 新疆医科大学第一附属医院,临床医学研究院, 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室)

【摘要】 目的 克隆细粒棘球绦虫糖转运体早期响应脱水蛋白(Sugar transporter early responsive to dehydration 6 of Echinococcus granulosus, EgERD6)基因序列,并进行生物信息学分析。 方法 从细粒棘球绦虫中通过 RT-PCR 方法 扩增 EgERD6 基因全长序列,结合生物信息学方法预测 EgERD6 蛋白分子的生物学特性,并进行系统发育、同源序列比 对以及多蛋白相互作用关系分析。 结果 克隆获得 EgERD6 基因全长序列,共1470 bp,编码488 aa 蛋白,该蛋白具 有主要协同转运蛋白超家族(Major facilitator superfamily, MFS)特征结构域。生物信息学分析该蛋白为疏水性蛋白,二 级结构以α螺旋为主,约占50.92%。氨基酸序列比对显示该蛋白与多房棘球绦虫的同源性为97.48%,与其他物种同 源性较低。系统进化分析显示,细粒棘球绦虫 ERD6 与人 ERD6 亲缘关系较远。该蛋白可与细粒棘球绦虫内啡肽-A3、 网格蛋白、肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶底物等多种蛋白质共同参与内吞作用和囊泡介导转运等生物学过程。 结论 成功克隆了 EgERD6 基因,生物信息学分析其编码蛋白含有 MFS 保守的功能结构域,可能参与虫体多种重要物 质及能量代谢过程,为囊型棘球蚴病的致病机制研究和新的临床治疗方案的探索奠定了基础。

【关键词】 细粒棘球绦虫;糖转运体早期响应脱水蛋白;生物信息学分析

【中图分类号】 R383.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1296-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Nov.; 18(11): 1296-1302, 1310.]

Bioinformatic analysis and phylogenetic tree of ERD6 of Echinococcus granulosus

ZHOU Run^{1,2}, ZHOU Jing^{1,2}, XU Shaoquan^{1,2}, YAN Mingzhi², LV Guodong^{1,2} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Central Asian High Incidence Diseases, Clinical Medical Research Institute, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University) ***

[Abstract] Objective To obtain the full-length sequence of the ERD6 gene and to clone and bioinformatically analyze the sequence of the sugar transporter early responsive to dehydration 6 of Echinococcus granulosus (EgERD6) gene.

Methods The amplification of the complete length of the EgERD6 gene was achieved through RT-PCR using E. granulosus as the source. Subsequently, the target gene was isolated and purified, followed by the construction of the pMD19-T-ERD6 plasmid. This plasmid was then transformed into Escherichia coli DH5a receptor cell culture, and the resulting plasmids were extracted and subjected to enzymatic profiling and PCR for identification purposes. Bioinformatics techniques were employed to forecast the biological characteristics of EgERD6 protein molecules, encompassing phylogenetic analysis, homologous sequence comparison, and multiprotein interaction investigation. Results The complete sequence of EgERD6, consisting of 1,470 base pairs, was successfully cloned. This sequence encodes a protein of 488 amino acids, which exhibits the characteristic domain of the Major facilitator superfamily (MFS) and contains 12 transmembrane regions. The results of a systematic evolutionary analysis indicate a close relationship between ERD6 of E. granulosus and ERD6 of Homo sapiens. Furthermore, the findings from protein-protein interaction studies suggest that this protein has the potential to be involved in various biological processes, such as endocytosis and vesico-mediated transport, including the regulation of endorphin-A3, lattice protein, and tyrosine kinase substrate by hepatocyte growth factor (HGF). Conclusion The EgERD6 gene was successfully cloned and bioinformatically analysed to have a conserved functional structural domain of MFS, which may be involved in a variety of important material and energy metabolic processes in the worm, laying the foundation for studying the pathogenesis of cystic echinococcosis and exploring new clinical treatment options.

【基金项目】

新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2022D01E66)。

吕国栋, E-mail:lgd_xj@qq.com

周 润(1997-),女,新疆伊犁人,在读硕士研究生。研究方向:包虫病新药研发。E-mail:1455930895@qq.com

[Key words] Echinococcus granulosus; sugar transporter early responsive to dehydration 6; bioinformatic analysis

囊型棘球蚴病(cystic echinococcosis, CE),又称 囊型包虫病,是一种由细粒棘球绦虫(Echinococcus granulosus)幼虫感染引起的寄生性人畜共患病^[1]。 在全世界范围内人群 CE 发病率为 1/10 万~200/10 万^[2]。寄生虫病调查显示,我国有 23 个省市自治区发 现棘球蚴病^[3]。目前该病的治疗主要以手术为主,辅 助药物治疗能降低手术后疾病复发率,提高治愈率^[4]。 阿苯达唑是当前治疗囊型棘球蚴病的首选药物^[5],但 长期服用阿苯达唑可引起多种不良反应^[6],因此亟需 探究新的药物治疗靶点,开发新的药物治疗分子。

通过基因组测序研究发现细粒棘球绦虫合成代谢 能力日益退化,但体内仍存在完整的糖酵解、柠檬酸循 环等糖代谢途径^[7-8]。细粒棘球绦虫需要从宿主环境 中摄取大量葡萄糖作为自身生长发育的能量来源,因 此糖代谢通路对细粒棘球绦虫的生存至关重要^[9]。有 研究证明部分糖代谢通路抑制剂,如二甲双胍^[10]、 HNMPA-(AM)3^[11]、3-溴丙酮酸^[9]、WZB117^[12]和 2-脱氧-D-葡萄糖^[13]等均有治疗棘球蚴病的潜力,提示 针对细粒棘球绦虫的糖代谢通路开发药物靶点和药物 分子是一项重要的治疗策略。

糖转运体早期响应脱水蛋白(Sugar transporter early responsive to dehydration 6, ERD6),又名 GLUT6或GLUT9,与细菌、酵母、植物和哺乳动物体 内的尿酸及葡萄糖转运过程有关^[14]。在人类多种癌 症细胞中的葡萄糖转运中 ERD6 的作用不容忽视,如 子宫内膜癌细胞中敲低 ERD6 基因可降低葡萄糖代谢 从而诱导癌细胞死亡^[15]。此外,由于 ERD6 在人体中 表达较少^[16],并且小鼠 ERD6 的表达不影响其正常生 理学、葡萄糖代谢^[17]以及巨噬细胞炎症等功能^[18],因 此 ERD6 有望成为糖尿病、多种癌症以及寄生虫病高 效低毒的治疗靶标^[19]。但关于细粒棘球绦虫 ERD6 的研究鲜有报道。

本研究拟对细粒棘球绦虫 ERD6 的蛋白理化性质、结构域以及 3D 结构等功能进行预测,并进行系统 发育分析,以期阐明 ERD6 在细粒棘球绦虫糖代谢通 路中的作用,为细粒棘球绦虫糖代谢机制及囊型棘球 蚴病新型药物靶点研究提供参考。

材料与方法

1 材料

1.1 原头蚴的获取 感染细粒棘球绦虫绵羊株(E. granulosus sensu stricto)肝脏标本采自新疆乌鲁木齐 某屠宰场病羊,无菌条件下从肝脏囊泡中获取原头蚴。 反复清洗后将活性良好的原头蚴分装,置于-80 ℃冰

箱冻存。

1.2 主要试剂 胃蛋白酶及 DEPC 水购于美国 Sigma 公司; cDNA 合成试剂盒(6210A), Premix Ex Taq Hot Start Version 酶(RR030A), DNA 切胶回收试剂 盒(9762), Mighty TA-cloning Reagent Set for Prime-STAR[®](6019), DH-5 α 感受态细胞(CD201), 质粒提 取试剂盒(CW0500M)、DL2000 DNA Marker (BM111), 限制性核酸内切酶 Quick Cut Hind III (1615)和 Quick Cut EcoR I (1611)均购于日本 Takara 公司; 琼脂糖(1110GR100)和 Trizol (15596026)购自美国 Invitrogen 公司。

2 方法

2.1 EgERD6 基因克隆及测序 在冰浴条件下利用 Trizol 法提取原头蚴总 RNA,按试剂盒说明将总 RNA 逆转录为 cDNA,置于-80 ℃保存。以 Worm-Base Parasite^[20]数据库中的 EgERD6 基因序列为模 板,使用 SnapGene^[21]设计该基因全长序列的特异性 引物,使用 DNAMAN 软件对引物进行验证。上游引 物 EgERD6-F: 5'-ATGACGGGGGGGGCTAC-3';下游 引物 EgERD6-R: 5'-TGTGTCTCTGCCGTAG-3'。 引物由上海生物工程股份有限公司合成。PCR 反应 体系(50 µL): Premix Ex Tag Hot Start Version 酶 25 μL, cDNA 2 μL, 上、下游引物各 2 μL, 无菌水 19 μL。反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,共 35 个循环。取 PCR 产 物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。切胶回收符合目的基 因预期大小的 PCR 产物,经纯化后与 pMD[™]19-T 载 体连接,连接产物转化到大肠埃希菌杆菌 DH5α 感受 态细胞,培养后提取质粒,经酶切鉴定正确后交由上海 生物工程股份有限公司测序。

2.2 生物信息学分析 利用美国国家生物信息中心 数据库(National Center for Biotechnology Information,NCBI)进行 EgERD6 蛋白核酸序列比对,得到 对应的氨基酸序列:细粒棘球绦虫(GeneBank ID: CDS16626.1)、多 房 棘球绦虫(GeneBank ID: CDS41399.1)、智人(GeneBank ID: XP 011512169. 1)、小鼠(GeneBank ID: NP 001095885.1)、微口膜绦 虫(GeneBank ID: CDS26458.1)、华支睾吸虫(Gene-Bank ID: KAG5451202.1)、中华蜜蜂(GeneBank ID: PBC33461.1)、牡蛎(GeneBank ID: XP 052704099. 1)、非洲爪蟾(GeneBank ID: XP 041428009.1)、链状 石斛(GeneBank ID: XP 020690096.1)、柑橘(Gene-Bank ID: XP 024039965.1)、葡萄糖酸杆菌(GeneBank ID: GFE95545.1)、丁香假单胞菌(GeneBank ID: RMP16096.1)、黑腹果蝇(GeneBank ID: NP 523658. 1)、大麦(GeneBank ID: CAD58959.1)、大肠埃希菌 (GeneBank ID: KIH37653.1)、斑马鱼(GeneBank ID: NP 001012515.1)、家兔(GeneBank ID: NP 001301123.1)。

通过 ExPASy ProtParam tool^[21]在线网站预测细 粒棘球绦虫 ERD6 蛋白的分子质量、等电点、不稳定性 指数等生理生化特性。使用 ExPASy ProtScale 在线 网站预测 EgERD6 亲水性。通过 SignalP 5.0^[22]氨基 酸序列信号肽在线预测工具分析 EgERD6 蛋白信号 肽。使用 TMHMM18 2.0 注释蛋白序列的跨膜结 构。采用 Motif Scan 和 NetPhos 3.1 Server^[23]对 Eg-ERD6蛋白进行磷酸化位点预测。采用 Conserved Domain Database^[24]数据库对 EgERD6 蛋白的结构域 进行分析。采用 SOPMA^[25]在线服务器在线预测 Eg-ERD6 二级结构。采用 SWISS-MODEL^[26]对 Eg-ERD6 和 HsERD6 序列进行同源建模。采用 VMD V. 1.9.4a53^[27]可视化软件呈现 EgERD6 和 HsERD6 3D结构中的氨基酸结合位点。通过 Clustal Omega^[28]对 EgERD6 与 ERD6 同源基因进行比对分析,使 用Jalview^[29]软件对同源比对结果进行可视化及美 化。通过 MEGA 11 的邻接法,基于 EgERD6 及不同 种属 ERD6 基因构建系统进化关系。采用 STRING [30] 在线数据库预测 EgERD6 蛋白互作关系及相关 GO分析,使用 Cytoscape 3.9.1^[31]软件对结果作进 一步分析。

结果

1 EgERD6 基因的克隆

以 EgERD6 的 cDNA 为克隆模板进行 PCR 扩 增,获得 1 470 bp 的目的基因片段(图 1),大小与预期 相符符合。提取质粒进行测序分析,质粒中的目的基 因与 E. granulosus strain: G1 ERD6 相似性为 99.99%。



M DNA标志物(DL2000) 1 阴性对照 2 EgERD6 基因 PCR 产物
 图 1 EgERD6 基因 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker (DL2000) 1 Negative control 2 EgERD6 gene PCR product

Fig. 1 Expansion electrophoresis plot of the PCR products of the EgERD6 gene

2 EgERD6 生物信息学分析

2.1 理化性质 预测 EgERD6 的化学式为 C₂₃₉₁H₃₇₉₄N₆₁₄O₆₅₃S₁₈,包含氨基酸数 488 aa,分子量 52.17 ku,原子总数 7 470,等电点 9.03,带负电荷的 残基总数(Asp+Glu)为 20,带正电荷的残基总数 (Arg+Lys)为 26。脂肪指数为 117.11,不稳定指数 41.75,为不稳定型蛋白质。EgERD6 蛋白包含多个疏 水性区域,亲水性平均值(GRAVY)为 0.667,其中第 181 位氨基酸疏水性最强,Score 值为 3.289,第 473 位 氨基酸亲水性最强,Score 值为-2.189。疏水氨基酸多 于亲水氨基酸,因此属于疏水性蛋白质(图 2)。



注:横轴表示氨基酸在该蛋白中的位置,纵轴正值表示疏水性,负 值表示亲水性。

图 2 EgERD6 疏水区域预测

Notes: The horizontal axis indicates the position of the amino acid in the protein, the positive vertical axis indicates hydrophobicity and the negative affinity.

Fig. 2 The prediction of hydrophobic region of EgERD6

2.2 信号肽及跨膜区域 预测 EgERD6 的信号肽 (Sec/SPI)为 0.0203,无信号肽裂解位。通过 TM-HMM 服务器分析,EgERD6 蛋白具有 12 个跨膜区 域,为跨膜蛋白(图 3)。



注:横坐标为对应位置的氨基酸序列,纵坐标为氨基酸位于膜内侧、膜外侧和跨膜螺旋区的概率值;红色矩形为跨膜螺旋结构,蓝色线段为膜内结构,红色线段为膜外结构。

图 3 EgERD6 蛋白的跨膜区域

Notes: The abscissa is the amino acid sequence of the corresponding position, and the ordinate is the probability value that the amino acid is in the inner membrane; the red rectangle is the transmembrane helical structure, the blue line is the intra-membrane structure, and the red line is the extra-membrane structure.

Fig. 3 The transmembrane region of the EgERD6 protein

2.3 翻译后修饰位点 通过 Motif Scan 和 NetPhos 3.1 Server 预测 EgERD6 蛋白翻译后修饰位点,结果 如图 4。EgERD6 蛋白含有 1 个酰胺化位点,位于 72-75 aa;2 个 N-糖基化位点,分别位于 211-214,443-446 aa。5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,分别位于 103-106,170-173,233-236,253-256,438-441 aa;8 个 N-肉 豆蔻酰化位点,分别位于 27-32,57-62,121-126,158-163,166-171,352-357,406-411,435-440 aa;4 个蛋白 激酶 C 磷酸化位点,分别位于 102-104,144-146,316-318,475-477 aa。



注:红色线段为丝氨酸磷酸化,绿色线段为绿色表示苏氨酸磷酸化 位点;蓝色线段为酪氨酸磷酸化位点;粉色横线为阈值。

图 4 EgERD6 蛋白翻译后修饰位点

Notes: red line is serine phosphorylation, green line indicates threonine phosphorylation site; blue line is tyrosine phosphorylation site; pink horizontal line is the threshold.

Fig. 4 Post-translational modification sites of the EgERD6 protein

2.4 结构域 预测 EgERD6 具有主要协同转运蛋白 超家族结构域,位于 15-475 aa;具有 Sugar transporter 结构域,位于 16-475 aa(图 5)。



图 5 EgERD6 蛋白的结构域预测 Fig. 5 EgERD6 protein domain prediction

2.5 二级结构及细胞表位 预测 EgERD6 二级结构 中 α 螺旋约占 50.92%, 无 β 折叠和 β 转角约占 5.73%, 无规卷曲约占 27.81%(图 6)。EgERD6 主要 的细胞抗原表位在 1、96-105、139-147、191-193、195-199、227-244、252-260、274-278、293-294、369-370、399-410、434-446、473-474 aa(表 1)。

2.6 3D 结构 利用 SWISS-MODEL 服务器进行同 源性建模, EgERD6 3D 结构与模板序列相似性为 25.29%, GMQE 得分为 0.58。利用 VMD 可视化软 件呈现 EgERD6 和 HsERD6 的 3D 结构中的氨基酸 结合位点(图 7)。

• 1299 •

表 1 EgERD6 B 细胞抗原表位预测 Table 1 EgERD6 B cell antigen epitope

序号 Serial number	起始位点 Start site	结束位点 End site	长度(bp) Length
1	1	1	1
2	96	105	10
3	139	147	9
4	191	193	3
5	195	199	5
6	227	244	18
7	252	260	9
8	274	278	4
9	293	294	2
10	369	370	2
11	399	410	12
12	434	446	13
13	473	474	2



注:1)第 1-7 行为使用 Gramier-Robson 和 Chou-Fasman 方法分析 EgERD6 蛋白的二级结构,其中第 1、3、5、7 行为 Gramier-Robson 方法 (红色代表 Alpha 螺旋,绿色代表 Beta 折叠,蓝色代表转弯,黄色代表随 机线圈),第 2、4、6 行为 Chou-Fasman 方法(红色代表 Alpha 螺旋,绿色 代表 Beta 折叠,蓝色代表转弯,无随机线圈预测);2)第 8 行为 Karplus-Schulz 法预测 EgERD6 的柔性区,第 9 行为 Jameson-Wolf 指数法预测 EgERD6 的抗原指数,第 10 行为 Emini 法预测 EgERD6 的表面可及性 区。

图 6 EgERD6 蛋白的细胞表位预测

Notes: Secondary structure of the EgERD6 protein was analyzed using the Gramier-Robson and Chou-Fasman methods. Lines 1,3,5,and 7 are the Gramier-Robson method. Red represents the Alpha helix, green represents the Beta fold, blue represents turns, and yellow represents the random coil; rows 2,4, and 6 are the Chou-Fasman method. Red represents the Alpha helix,green represents the Beta fold, and blue represents turns, without random coil prediction. Line 8 indicates the flexible region of EgERD6 predicted by the Karplus-Schulz method, line 9 indicates the antigen index of EgERD6 predicted by the Jameson-Wolf index method, and line 10 predicts the surface accessibility region of Eg-ERD6.

Fig. 6 Cellular epitope prediction of the EgERD6 protein

3 EgERD6 及其同源基因多重序列比对

通过 Jalview 软件进行比对分析, EgERD6 与其 同源基因如 GenBank ID: CDS41399.1、CDS26458.1、 KAG5451202.1、XP 020690096.1、XP_052704099.1、 NP 001095885.1、XP 024039965.1、XP 041428009.1 和 XP_011512169.1 的相似性分别为 97.48%、 61.04%、30.02%、27.61%、27.35%、27.27%、 26.63%、23.64%和 20.49%(图 8)。



A EgERD6 蛋白表面 B HsERD6 蛋白表面 注:结构中红色表示丝氨酸结合位点,黄色表示苏氨酸结合位点;紫色 和蓝色为α螺旋;青色为β转角。

图 7 EgERD6 及 HsERD6 3D 结构

Notes: Red in the structure indicates serine binding site; yellow indicates threonine binding site; helix (purple and blue); turn angle (cyan).

Fig. 7 3D Structure of EgERD6 and HsERD6



注:细粒棘球绦虫,GeneBank ID:CDS16626.1;多房棘球绦虫, GeneBank ID:CDS41399.1;智人,GeneBank ID:XP 011512169.1);小 鼠,GeneBank ID: NP 001095885.1;微口膜绦虫,GeneBank ID: CDS26458.1;华支睾吸虫,GeneBank ID:KAG5451202.1;铁皮石斛, GeneBank ID: XP 020690096.1;葡萄牙牡蛎,GeneBank ID: XP 052704099.1;柑橘,GeneBank ID:XP 024039965.1;非洲爪蟾,Gene-Bank ID:XP 041428009.1。

图 8 EgERD6 及其同源基因多序列比对

Notes: Echinococcus granulosus (CDS16626.1), Echinococcus multilocularis (CDS41399.1), Homo sapiens (XP 011512169.1), Mus musculus (NP 001095885.1), Hymenolepis microstoma (CDS26458.1), Clonorchis sinensis (KAG5451202.1), Dendrobium catenatum (XP 020690096.1), Crassostrea angulata (XP 052704099.1), Citrus clementina (XP 024039965.1), Xenopus laevis (XP 041428009.1).

Fig. 8 Multiple sequence alignment of EgERD6 and its homologs

4 EgERD6 的系统进化关系

利用 MEGA 11 软件,采用邻接法构建不同种属 ERD6 之间的系统发育关系,结果如图 9。EgERD6 与 多房棘球蚴、微口膜绦虫以及华支睾吸虫形成一个分 支,亲缘关系较近;与智人(XP 011512169.1)、小鼠 (NP 001095885.1)等物种形成不同分支,亲缘关系较远。



注:细粒棘球绦虫, GeneBank ID: CDS16626.1;多房棘球绦虫, GeneBank ID: CDS41399.1;智人, GeneBank ID: XP 011512169.1;小 鼠, GeneBank ID: NP 001095885.1; 微口 膜绦虫, GeneBank ID: CDS26458.1;华支睾吸虫, GeneBank ID: KAG5451202.1;中华蜜蜂, GeneBank ID: PBC33461.1;牡蛎, GeneBank ID: XP 052704099.1;非洲 爪蟾, GeneBank ID: XP 041428009.1;链状石斛, GeneBank ID: XP 020690096.1;柑橘, GeneBank ID: XP 024039965.1;葡萄糖酸杆菌, GeneBank ID: GFE95545.1;丁香假单胞菌, GeneBank ID: RMP16096. 1;黑腹果蝇, GeneBank ID: NP 523658.1;大麦, GeneBank ID: CAD58959.1;大肠埃希菌, GeneBank ID: KIH37653.1;斑马鱼, Gene-Bank ID: NP 001012515.1;家兔, GeneBank ID: NP 001301123.1。

图 9 EgERD6 基因与其他物种 ERD6 基因系统进化树

Notes: Echinococcus granulosus (CDS16626.1), Echinococcus multilocularis (CDS41399.1), Homo sapiens (XP 011512169.1), Mus musculus (NP 001095885.1), Hymenolepis microstoma (CDS26458.1), Clonorchis sinensis (KAG5451202.1), Apis cerana (PBC33461.1), Crassostrea angulata (XP _ 052704099.1), Xenopus laevis (XP 041428009.1), Citrus clementina (XP 024039965.1), Dendrobium catenatum (XP 020690096.1), Gluconobacter sp. Gdi (GFE95545.1), Pseudomonas syringae syringae pv. delphinii (RMP16096.1), Drosophila melanogaster (NP 523658.1), Hordeum vulgare subsp. vulgare (CAD58959.1), Escherichia coli (KIH37653.1), Danio rerio (NP 001301123.1), Capra hircus (NP 001301123.1), Oryctolagus cuniculus (XP 017201321.1).

Fig. 9 Phylogenetic tree of EgERD6 gene with other species

5 蛋白互作关系

对 EgERD6 蛋白的互作网络进行预测,该蛋白与 细粒棘球绦虫啡肽-A3、网格蛋白、肝细胞生长因子调

节的酪氨酸激酶底物等多种蛋白质存在相互作用关系 (图 10)。GO 富集分析显示, EgERD6 蛋白主要参与 内吞、囊泡介导转运等生物学过程。



注:PPI 网络节点数为 11,互作关系数目为 48,预期互作关系数为 18,局部聚类系数为 0.9,PPI 互作网络 P 值为 7.31e-09。

图 10 EgERD6 相互作用蛋白分析

Notes: The number of PPI network nodes is 11, the number of interaction relationships is 48, the expected interaction relations are 18, the local clustering coefficient is 0.9, and the PPI interaction network Pvalue is 7.31e-09.

Fig. 10 Protein-Protein Interaction Analysis of the EgERD6

讨论

随着细粒棘球绦虫基因组测序工作的完成,基因 组学、生物信息学和分子生物学揭示了多个基因对细 粒棘球绦虫生长发育的影响^[32-34]。与传统的分析方法 相比,生物信息学方法能够高效且低成本地预测未知 蛋白质的结构及其它生物学功能^[35]。Tsai等^[8]通过 测序分析了解到细粒棘球绦虫糖转运蛋白 ERD6 的基 因组信息,但尚未对 EgERD6 进行深入研究。本研究 利用生物信息学方法分析预测 EgERD6 的结构和功 能特性,不仅有利于了解和探究细粒棘球绦虫的生物 学功能,也为寻找囊型棘球蚴病药物治疗新靶点奠定 基础。

在其他模式生物或者肿瘤细胞中,ERD6 能够在 维持能量代谢平衡中发挥重要作用,提示了 EgERD6 在细粒棘球绦虫生长发育中的重要性,可能是重要的 药物开发靶点^[36]。本研究克隆出 EgERD6 基因并分 析了其编码蛋白的氨基酸序列。蛋白质的二级结构是 决定蛋白质功能的基础^[37],α螺旋和β折叠则被认为 在细胞稳定性、机械信号传导和组织构成中发挥作用, 而无规则卷曲容易折叠并暴露在蛋白质表面,构成酶 活性部位和其他蛋白质特异功能的部位^[38]。二级结 构分析表明,EgERD6 蛋白中α螺旋占 50.92%,无规 则卷曲占 27.81%。α螺旋和无规则卷曲是 EgERD6 的主要二级结构,因为 α 螺旋结构使蛋白质结构具有 一定的刚性,对于蛋白质的整体构象起着支撑作用,因 此在一定程度上保证了 EgERD6 蛋白质的稳定性。

由于寄生虫主要依靠糖酵解等糖代谢通路提供生 长发育所需能量,因此阻断其葡萄糖摄取或 ATP 生 成的相应靶点是治疗寄生虫疾病的关键[39]。结构域 预测结果显示, EgERD6 具有 MFS 保守结构域, 表明 EgERD6 属于 MFS 家族其中的糖转运亚家族。MFS 家族蛋白主要负责促进多种物质跨细胞质或内膜的转 运,包括离子、葡萄糖、磷酸盐、药物和神经递质等^[40]。 细粒棘球绦虫的其它基因研究表明,具有相同 MFS 结构域的葡萄糖转运蛋白(Glucose transporters, GLUTs)是细粒棘球绦虫体内葡萄糖代谢过程中的重 要载体,是治疗棘球蚴病的关键药物靶点[33]。由于 EgERD6 与 EgGLUTs 具有相同的结构域,提示 Eg-ERD6 与细粒棘球绦虫的糖代谢通路有关,可能与 EgGLUTs 具有相似的生物学功能。MFS 结构域可 作为药物靶点被特异性结合,最终达到治疗 CE 的目 的。蛋白翻译位点预测显示,EgERD6存在4个蛋白 激酶磷酸化位点,而蛋白激酶是生物体内信号转导途 径中的关键分子,因此推测 EgERD6 可能通过这 4 个 蛋白激酶磷酸化位点参与细粒棘球绦虫的能量代谢等 生物学过程。

3D结构预测显示,EgERD6 与 HsERD6 结构差 异较大,同源基因序列比对分析表明 EgERD6 与 HsERD6 的相似性仅为 20.49%,因此可推断其作为 治疗 CE 的药物靶点具有一定程度的特异性,可避免 与宿主结合导致影响宿主的正常生理功能。系统发育 树分析显示 EgERD6 与 EmERD6 亲缘关系较近,与 智人等亲缘关系较远,提示其由于进化导致蛋白差异 形成不同的分支。因此可针对其差异性设计靶向性药 物,从而达到靶向作用于细粒棘球绦虫而不会对宿主 产生任何不良影响。靶向治疗可避免药物对人体产生 不良反应,提高药物疗效,从而达到精准治疗的目的。

蛋白-蛋白相互作用分析显示,EgERD6 与多种分 泌蛋白存在紧密的相互作用关系,而 EgERD6 及细粒 棘球绦虫网格蛋白、内啡肽-A3 及肝细胞生长因子调 节的酪氨酸激酶底物等多种蛋白质均可参与细胞内吞 作用及囊泡介导转运。细胞通过内吞作用将质膜上的 分子内化,从而调节细胞信号传导,最终导致多种生物 反应^[41]。而囊泡介导的转运为细胞间的物质转运(包 括 RNA),在生理和病理过程中起关键作用^[42]。因此 认为 EgERD6 可能作为细粒棘球绦虫虫体内参与多 种物质转运以及能量代谢过程的关键蛋白质之一,参 与调控机体的多项生命活动。

本实验克隆鉴定了 EgERD6 基因,并利用生物信

中国病原生物学杂志 2023年11月 第18卷第11期 Journal of Pathogen Biology Nov. 2023, Vol. 18, No. 11

息学对其结构域等进行了功能预测,为囊型棘球蚴病的致病机制研究奠定了基础。EgERD6 作为细粒棘球 绦虫糖代谢通路的重要成员,参与调控能量代谢过程,因此可作为囊型棘球蚴病的防治靶点,为相关药物的研制提供参考。

【参考文献】

- [1] Romig T, Deplazes P, Jenkins D, et al. Ecology and life cycle patterns of echinococcus species [J]. Adv Parasitol, 2017, 95: 213-314.
- [2] Nunnari G, Pinzone MR, Gruttadauria S, et al. Hepatic echinococcosis: clinical and therapeutic aspects[J]. World J Gastroenterol, 2012,18(13):1448-1458.
- Borhani M, Fathi S, Lahmar S, et al. Cystic echinococcosis in the Eastern Mediterranean region: Neglected and prevailing! [J].
 PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(5); e0008114.
- [4] Gong Y, Lv S, Tian C, et al. Effect of harmine and its derivatives against *Echinococcus granulosus* and comparison of DNA damage targets[J]. J Biomed Nanotechnol, 2020, 16(6):827-841.
- [5] Bakhtiar NM, Akbarzadeh A, Casulli A, et al. Therapeutic efficacy of nanocompounds in the treatment of cystic and alveolar echinococcoses: challenges and future prospects [J]. Parasitol Res, 2019,118(9):2455-2466.
- [6] Brunetti E, Kern P, Vuitton DA, et al. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans[J]. Acta Trop,2010,114(1):1-16.
- Zheng H, Zhang W, Zhang L, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* [J]. Nat Genet, 2013, 45 (10):1168-1175.
- [8] Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism [J]. Nature, 2013,496(7443):57-63.
- [9] Xin Q, Yuan M, Li H, et al. In vitro and in vivo effects of 3-bromopyruvate against Echinococcus metacestodes [J]. Vet Res, 2019,50(1):96.
- [10] Loos JA. Davila VA. Brehm K. et al. Metformin suppresses development of the *Echinococcus multilocularis* larval stage by targeting the TOR pathway[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020,64(9):e01808-19.
- [11] Hemer S, Konrad C, Spiliotis M, et al. Host insulin stimulates Echinococcus multilocularis insulin signalling pathways and larval development[J]. BMC Biol, 2014, 12:5.
- [12] Amahong K, Yan M, Li J, et al. EgGLUT1 Is Crucial for the Viability of *Echinococcus granulosus* sensu stricto Metacestode: A New Therapeutic Target? [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021,11:747739.
- [13] Xin Q, Lv W, Xu Y, et al. 2-Deoxy-D-glucose and combined 2-Deoxy-D-glucose/albendazole exhibit therapeutic efficacy against *Echinococcus granulosus* protoscoleces and experimental alveolar echinococcosis[J]. PLoS Negl Trop Dis,2022,16(7):e0010618.
- [14] Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. ERD6, a cD-NA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter[J]. Biochim Biophys Acta, 1998,1370(2):187-191.

- [15] Byrne FL, Poon IK, Modesitt SC, et al. Metabolic vulnerabilities in endometrial cancer[J]. Cancer Res, 2014, 74(20):5832-5845.
- [16] Doege H.Bocianski A.Joost HG.et al. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes[J]. Biochem J, 2000, 350(Pt 3):771-776.
- [17] Byrne FL, Olzomer EM, Brink R, et al. Knockout of glucose transporter GLUT6 has minimal effects on whole body metabolic physiology in mice[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2018, 315(2):E286-E293.
- [18] Maedera S, Mizuno T, Ishiguro H, et al. GLUT6 is a lysosomal transporter that is regulated by inflammatory stimuli and modulates glycolysis in macrophages[J]. FEBS Lett, 2019, 593(2): 195-208.
- [19] Liu WC, Hung CC, Chen SC, et al. The rs1014290 polymorphism of the SLC2A9 gene is associated with type 2 diabetes mellitus in Han Chinese[J]. Exp Diabetes Res, 2011, 2011: 527520.
- [20] Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, et al. WormBase ParaSite-a comprehensive resource for helminth genomics [J]. Mol Biochem Parasitol, 2017, 215:2-10.
- [21] Wilkins MR,Gasteiger E,Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods Mol Biol, 1999,112:531-552.
- [22] Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sonderby CK, et al. SignalP 5. 0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. Nat Biotechnol,2019,37(4):420-423.
- [23] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J]. J Mol Biol.1999.294(5):1351-1362.
- [24] Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, et al. CDD: NCBI's conserved domain database[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue):D222-226.
- [25] Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Comput Appl Biosci, 1995, 11(6): 681-684.
- [26] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [27] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics[J]. J Mol Graph, 1996, 14(1): 33-38, 27-38.
- [28] Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega[J]. Mol Syst Biol, 2011, 7:539.
- [29] Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, et al. Jalview Version
 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench
 [J]. Bioinformatics, 2009, 25(9):1189-1191.
- [30] Szklarczyk D.Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. Nucleic Acids Res,2021,49(D1):D605-D612.

(下转1310页)

[EB/OL]. (2023-1-10)[2023-3-01]. http://www.carss.cn/Report/Details? aId=862.

- [4] Li W, Sun G, Yu Y, et al. Increasing occurrence of antimicrobialresistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(2):225-232.
- [5] Yao B,Xiao X,Wang F,et al. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing,China[J]. Int J Infect Dis,2015,37:107-112.
- [6] 胡福泉. 噬菌体的过去、现在与未来[J]. 西南医科大学学报, 2021,44(5):417-424.
- [7] 张志宏,钟佑宏,王鹏. 噬菌体疗法的研究现状[J].中国热带医学,2021,21(7):698-703.
- [8] 张改,黄德海,靳静,等. 肺炎克雷伯菌噬菌体 LH-02 的生物学特性及基因组初步研究[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(1):9-12.
- [9] Ye F,Kotta-Loizou I,Jovanovic M, et al. Structural basis of transcription inhibition by the DNA mimic protein Ocr of bacteriophage T7[J]. Elife,2020,9;e52125-45.
- [10] 高明明,王灿,李璞媛,等. 一株新型裂解 K63 荚膜型肺炎克雷

(1)

伯菌的噬菌体分离鉴定和生物学特性研究及全基因组分析[J]. 微生物学通报,2020,47(1):210-221.

- [11] Marchand I, Nicholson AW, Dreyfus M. Bacteriophage T7 protein kinase phosphorylates RNase E and stabilizes mRNAs synthesized by T7 RNA polymerase[J]. Mol Microbiol, 2001, 42 (3):767-776.
- Zhang H, Lee SJ, Zhu B, et al. Helicase-DNA polymerase interaction is critical to initiate leading-strand DNA synthesis [J].
 Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(23), 9372-9377.
- [13] Sberro H. Leavitt A. Kiro R. et al. Discovery of functional toxin/ antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning[J]. Mol Cell, 2013,50(1):136-148.
- [14] Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats[J]. Nature,2017,543(7643):15.
- [15] Majkowska-Skrobek G, Latka A, Berisio R, et al. Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2517-2528.

【收稿日期】 2023-05-16 【修回日期】 2023-08-06

(上接1302页)

- [31] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [32] 李锦田,马瑞丽,吕国栋,等. 细粒棘球绦虫蛋白激酶 B AKT2 的 生物信息学及系统发育树分析[J]. 中国病原生物学杂志,2020, 15(12):1411-1416,1421.
- [33] 库尔班尼沙•阿马洪,刘辉,李锦田,等. 细粒棘球绦虫葡萄糖转运蛋白 GLUT3 的生物信息学分析及系统发育树[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(8):910-916.
- [34] 颜明智,李锦田,刘辉,等. 细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK α生物信息学分析[J]. 新疆医科大学学报,2021,44(3): 266-273.
- [35] Tang B,Pan Z,Yin K,et al. Recent advances of deep learning in bioinformatics and computational biology[J]. Front Genet,2019, 10:214.
- [36] Itahana Y, Han R, Barbier S, et al. The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense [J]. Oncogene, 2015, 34 (14): 1799-1810.

- [37] 唐媛,李春花,张瑗,等. 蛋白质的二级结构预测研究进展[J]. 现 代生物医学进展,2013,13(26):5180-5182.
- [38] Tani K,Fujiyoshi Y. Water channel structures analysed by electron crystallography[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(5): 1605-1613.
- [39] Jiang X. An overview of the *Plasmodium falciparum* hexose transporter and its therapeutic interventions[J]. Proteins, 2022, 90(10):1766-1778.
- [40] Deng D, Yan N. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters[J]. Protein Sci,2016,25(3):546-558.
- [41] Schiano Lomoriello I, Sigismund S, Day KJ. Biophysics of endocytic vesicle formation: A focus on liquid-liquid phase separation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2022, 75:102068.
- [42] de Jong OG, Murphy DE, Mager I, et al. A CRISPR-Cas9-based reporter system for single-cell detection of extracellular vesiclemediated functional transfer of RNA[J]. Nat Commun, 2020, 11 (1):1113.

【收稿日期】 2023-05-26 【修回日期】 2023-08-17

• 1310 •