DOI:10.13350/j.cjpb.220114

• 65 •

论著 细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 AMPKβ 基因克隆 及生物信息学分析*

颜明智^{1,2},库尔班尼沙·阿马洪^{1,2},周婧^{1,2},吕国栋^{1,2**}

(1. 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,新疆乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学药学院)

【摘要】 目的 克隆细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 β(AMP-activated protein kinase β of Echinococcus granulosus 方法 提取细粒棘球绦虫原头蚴总 RNA,利用 sensu stricto, EgAMPKβ) 基因全长序列,并进行生物信息学分析。 PCR技术克隆 EgAMPKβ基因全长序列,并采用生物信息学技术对该基因编码蛋白的理化性质、磷酸化位点、抗原表 位、结构域、二级结构、三级结构、多序列分析和亲缘性比较等进行生物信息学分析。 结果 EgAMPKβ的 cDNA 全长 981 bp,编码 326 个氨基酸,相对分子质量为 35.235 85×10³,属于亲水性蛋白,无信号肽序列和跨膜区,具有 22 个丝氨 酸磷酸化位点,15个苏氨酸磷酸化位点,含有5个酪氨酸磷酸化位点;4个B细胞抗原表位,具有碳水化合物结合模块 (Carbohydrate-binding module,CBM)和 αγ 亚单位相互作用域(αγ-subunits interaction domain, αγ-SID)。EgAMPKβ 基 因与多房棘球绦虫和人 AMPKβ基因序列相似性分别为 98.47%和 39.57%,与多房棘球绦虫、微口膜壳绦虫同属于绦 虫纲,与人、猩猩和小鼠等哺乳纲动物的进化关系较远。 结论 成功克隆了 EgAMPKβ 基因,生物信息学分析其编码 蛋白具有保守的功能结构域,对细粒棘球绦虫的能量代谢具有调控作用,为进一步了解细粒棘球绦虫能量代谢机制及其 新型抗包虫病药物靶点开发提供了研究基础。

【关键词】 细粒棘球绦虫;腺苷酸活化蛋白激酶 β;基因克隆;生物信息学分析

【中图分类号】 R383.33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2022)01-0065-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan; 17(1):65-70.]

Cloning and bioinformatic analysis of the AMP-activated protein kinase β gene from *Echinococcus granu*losus sensu stricto

YAN Ming-zhi^{1,2}, KUERBANNISHA Amahong^{1,2}, ZHOU Jing^{1,2}, LV Guo-dong^{1,2} (1. 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, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University) ***

(Abstract) Objective To clone the full-length sequence of the AMP-activated protein kinase β gene of *Echinococcus* granulosus sensu stricto (E. granulosus ss) (EgAMPK β), and to bioinformatically analyze the gene. Methods Total RNA of *E. granulosus* ss protoscoleces was extracted, and the full-length sequence of the EgAMPK β gene was cloned using PCR. Bioinformatic analysis, including multiple sequence analysis and comparison of its affinity, was performed to determine aspects of the gene such as its physicochemical properties, phosphorylation sites, subcellular localization, epitopes, structural domains, secondary structure, and tertiary structure. **Results** The cDNA of EgAMPKβ is 981 bp in length, it encodes 326 amino acids, and it has a molecular weight of $35.235 85 \times 10^3$. It is a hydrophilic protein with no signal peptide sequences or transmembrane regions. It has 22 serine phosphorylation sites, 15 threonine phosphorylation sites, 5 tyrosine phosphorylation sites, and 4 B-cell epitopes. EgAMPK^β has a carbohydrate-binding module (CBM) and an α and γ subunit interaction domain ($\alpha\gamma$ -SID). EgAMPK β is 98.47% similar to *E. multilocularis* and 39.57% similar to Homo sapiens AMPK β . EgAMPK β is evolutionarily related to E. multilocularis and Hymenolepis microstoma in the class Taenia, but it is distantly related to Homo sapiens, Pan paniscus, Mus musculus, and other mammals. Conclusion The EgAMPKB gene was successfully cloned, and this gene was found to contain a conserved functional domain

【通讯作者】 昌国栋,E-mail:lgd_xj@qq.com 颜明智(1997-),男,甘肃张掖人,在读硕士研究生。研究方向:包虫病新药研发。E-mail:451417137@qq.com 【作者简介】

[【]基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 81760369,82060373,82060371);省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题 (No. SKL-HIDCA-2021-YG1, SKL-HIDCA-2020-BC3, SKL-HIDCA-2019-28);新疆维吾尔自治区创新环境建设专项项目(天山雪松计划 2019XS13)。

that regulates the energy metabolism of *E. granulosus* ss. These findings provide a basis for further understanding of the mechanism of energy metabolism in *E. granulosus* sensu lato and the development of new anti-echinococcosis drug targets. **(Key words)** *Echinococcus granulosus sensu stricto*; AMP-activated protein kinase β ; gene cloning; bioinformatics analysis

囊型包虫病(cystic echinococcosis,CE)是一种由细 粒棘球绦虫(Echinococcus granulosus sensu lato,Egsl)的 幼虫寄生所引起的人畜共患寄生虫病^[1]。全球每年用 于治疗 CE 的费用超过 30 亿美元,且危害严重^[2],然而 关于 Egsl 的致病机制尚且不清楚。目前,根治 CE 的主 要手段是手术治疗,但是手术治疗存在二次感染的风 险,且需要长期服用抗 CE 药物辅以治疗^[3]。阿苯达唑 和甲苯达唑是世界卫生组织推荐用于治疗 CE 的药物, 但该类药物存在毒副作用,病人长期服用易产生耐药性 等^[4]。因此,亟需筛选新型抗 CE 药物靶点和药物分子。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,负责调控细胞 的能量代谢平衡,由一个催化亚基(AMPKα)、一个支架 亚基(AMPKβ)和一个参与核苷酸结合的调节亚基 (AMPKγ)组成^[5]。当细胞发生代谢压力时,AMPK 被 激活,通过分解代谢途径(如葡萄糖摄取)产生 ATP 并 抑制非必需的合成代谢途径(包括脂质、蛋白质和碳水 化合物的生物合成)来恢复能量平衡。AMPK 已经在 病毒^[6]、细菌^[7]和寄生虫^[8]等感染性疾病中被证明是一 种重要的药物靶点。Loos 等^[9]研究发现,EgAMPK 在 Egsl 的生长发育过程中高表达,激活 EgAMPK 是二甲 双胍等药物发挥抗 Egsl 活性的机制之一。

AMPKα和 AMPKγ被认为是 AMPK 发挥生物活 性过程中的重要亚基, AMPKβ常被当作是一种连接 AMPKα和 AMPKγ的支架,然而对于 Egsl来说, EgAMPKβ亚基在 EgAMPK 功能调控中的作用研究较 少,目前尚不清楚 EgAMPKβ能否作为治疗 CE 的药物 开发靶点。本研究拟从 Echinococcus granulosus sensu stricto(Egss)克隆 EgAMPKβ基因,并采用生物信息学技 术分析 EgAMPKβ基因特性及蛋白的氨基酸序列结构, 通过多重序列比对建立系统发育树,为了解 Egsl 能量代 谢机制及其新型抗棘球绦虫药物靶点开发奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 Egss 原头蚴 Egss 自然感染的绵羊肝脏购于 新疆乌鲁木齐市某屠宰场,在无菌条件下从肝脏囊泡 中获取原头蚴。

1.2 主要试剂 胃蛋白酶和 DEPC 水购自美国 Sigma 公司; RNA 提取试剂盒, cDNA 合成试剂盒, DNA 提取试剂盒, 质粒提取试剂盒, pMD[™]18-T 载体, DH5a 感受态细胞, DL2000 DNA Maker, 以及限制性 内切酶 Eco R I 和 Hind Ⅲ均购自日本 Takara 公司; PCR 反应试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;Trizol,琼脂糖和 M-MLV 反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

2 方法

2.1 原头蚴总 RNA 的提取及其逆转录 在低温环 境下,利用 Trizol 法提取 Egss 原头蚴的总 RNA,按试 剂盒说明书方法将总 RNA 逆转录成 cDNA,-80 ℃保 存待用。

2.2 EgAMPKβ 基因克隆 以 GeneDB 数据库提供的 EgAMPKβ 基因序列 (Gene ID:)为模板,使用 DMAMAN 6.0 软件设计特异性引物。上游引物 EgAMPKβ-F: 5'-ATGGGCAATACTCCAGGTAC-3';下游引物 EgAMPKβ-R:5'-CTATATCGGCTTG-TAGAGAAC-3'。引物由生工生物工程(上海)股份 有限公司合成。PCR 反应体系(20 μ l):2× Es Taq MasterMix(Dye) 10 μ l,cDNA 2 μ l,上、下游引物各 1.5 μ l,DEPC 水 5 μ l。反应条件:94 °C预热 2 min;94 °C变性 30 s,55 °C退火 1 min,72 °C延伸 1 min,共 30 个循环。取 PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。 胶回收与目的基因预期大小的 PCR 产物,纯化后与原 核表达载体 pMD18-T 连接,连接产物转入 DH5a 感 受态细胞。筛选阳性克隆,获得的重组质粒交由生工 生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.3 EgAMPKβ生物信息学分析 从 NCBI 网站中 获取多个物种的 AMPKβ 基因序列;使用 网站中的 ProtParam tool 和 ProtScale 对 Egss 和其他物种的 AMPKβ的理化性质进行预测分析^[10];使用 SignalP 5.0 在线服务器分析 EgAMPKβ 信号肽^[11];使用 TM-HMM 在线服务器分析 EgAMPKβ 的跨膜区域^[12];使 用 NetPhos 3.1 在线服务器分析 EgAMPKβ 翻译后 修饰位点^[13-14];使用 CDD 数据库分析 EgAMPKβ 的 结构域^[15];通过 SOPMA 在线服务器分析 EgAMPKβ 二级结构;使用 DNAStar 软件对 EgAMPKβ 柔性区、 表面可及区和抗原指数进行分析^[16];使用 IEDB 在线 服务器分析 EgAMPKβ 的 B 细胞抗原表位;使用 SWISS-MODEL 在线服务器对 EgAMPK 进行同源 建模,并通过 VMD 软件对模型进行可视化;使用 DNAMAN 6.0 软件对 Egss 和其他物种的 AMPKβ 序列进行多序列比对分析;使用 MEGA-X 软件(Version 10.0.5)对 Egss 和其他物种的 AMPKβ 序列构建 系统发育树。

结果

1 EgAMPKβ基因的克隆

以 EgAMPKβ的 cDNA 为克隆模板,PCR 扩增获 得的目的片段大小为 981 bp,与理论值相符;对 PCR 产物 测 序,结果 测 序 基 因 与 NCBI 中 已 知 的 EgAMPKβ基因序列完全相符,基因克隆正确(图 1)。



M DNA标志物(DL2000) 1 阴性对照 2 EgAMPKβ基因 PCR 产物

图 1 EgAMPKβ基因 PCR 扩增产物电泳图

 $M \quad Marker(DL2000) \quad 1 \quad Negative \ control \quad 2 \quad PCR \ amplification \ product \ of \ EgAMPK\beta \ gene$

Fig. 1 Electrophoretic image of PCR amplification product of EgAMPKβ gene

2 EgAMPKβ 的理化性质

EgAMPKβ的 cDNA 全长 981 bp,编码 326 个氨 基酸,化学式为 C₁₅₅₈ H₂₄₆₀ N₄₂₀ O₄₈₈ S₁₁,相对分子质量 为 35.235 85×10³,等电点为 5.88,不稳定指数是 49. 07,为不稳定蛋白。脂肪族氨基酸指数为 78.28,亲水 性值范围为-2.578~2.333,亲水性的总平均值(GRA-VY)为-0.357,为亲水性蛋白。

3 EgAMPKβ的信号肽和跨膜区域

EgAMPKβ的信号肽(Sec/SPI)是 0.0014,没有 信号肽裂解位点。EgAMPKβ没有跨膜区域。

4 EgAMPKβ的磷酸化位点

EgAMPKβ有 22 个丝氨酸磷酸化位点,15 个苏 氨酸磷酸化位点,5 个酪氨酸磷酸化位点(图 2)。



注:红色竖线代表丝氨酸磷酸化位点;绿色竖线代表苏氨酸磷酸化 位点;蓝色竖线代表酪氨酸磷酸化位点。

图 2 EgAMPKβ磷酸化位点

Notes: Red vertical lines represent serine phosphorylation sites; green vertical lines represent threonine phosphorylation sites; blue vertical lines represent tyrosine phosphorylation sites.

Fig. 2 EgAMPKβ phosphorylation site

5 EgAMPKβ的抗原表位

EgAMPKβ主要抗原区域在 3-21、23-34、43-45、 55-57、63-79、82-108、110-118、121-132、135-138、142-145、160-178、200-209、239-248、252-264、273-276、280-288、313-318 位氨基酸(图 3)。EgAMPKβ含有4个B 细胞抗原表位(表 1)。

表 1	E	gAMPKf	3 B	细	胞扩	「原表	位
Table	1	EgAMP	Kβ	В	cell	epitor	pes

序号 No.	起始位点 Start	结束位点 End	长度 Length					
1	5	102	98					
2	127	132	6					
3	163	173	11					
4	186	287	102					



注:Karplus-Schulz 法预测 EgAMPKβ 的柔性区;Jameson-Wolf 指数法预测 EgAMPKβ 的抗原指数;Emini 法预测 EgAMPKβ 的表面可及性区。

图 3 EgAMPKβ柔韧性、抗原性指数和表面可及性分析

Notes: Karplus-Schulz method is used to predict the flexible region of EgAMPKβ. The Jameson-Wolf method was used to predict the antigenic index of EgAMPKβ. The Emini method was used to predict the surface probability plot of EgAMPKβ.

Fig. 3 Analysis of flexible region, antigenic index, and urface probability plot of EgAMPKβ

6 EgAMPKβ结构域

EgAMPK^β中存在碳水化合物结合模块(Carbohydrate-binding module,CBM),位于第 105 至 189 个 氨基酸之间,在 EgAMPK^β亚基 C-末端发现了 αγ-SID 结构域,负责 α 和 γ 亚单位的相互作用,位于 269 至 325 之间(图 4)。



图 4 EgAMPKβ的保守结构域 Fig. 4 Conserved Domain of EgAMPKβ

7 EgAMPKβ的二级结构

EgAMPKβ二级结构中 α 螺旋约占 11.96%,β 折 叠约占 20.25%,β 转角约占 4.91%,无规卷曲约占 62.88%(图 5)。

8 EgAMPKβ 的三级结构

EgAMPKβ与模板序列的氨基酸序列同一性为 47.91%,GMQE得分为 0.41,在 C端形成一个 β 折 叠结构,在 CBM 结构域部位由 β 折叠形成 β 夹心结构 (图 6)。



注:h(蓝色)表示 α 螺旋;e(红色)表示延伸链;t(绿色)表示 β 转角; c(黄色)表示无规卷曲

图 5 EgAMPKβ二级结构

Notes: h (blue) represents α helix; e (red) is the extended strand; t (green) represents the β turn; c (yellow) represents random coil. Fig. 5 Secondary structure of EgAMPK β



注: α 螺旋(紫色和蓝色); β 折叠(黄色); β 转角(青色);红色方框区 域包含 CBM 结构域。

图 6 EgAMPKβ三级结构

Notes: α helix (purple and blue); β fold (yellow); β turn (cyan); the red boxed area contains the CBM structural domain. Fig. 6 Tertiary structure of EgAMPKβ

9 Egss 与其他物种 AMPKβ 的多重序列比对

EgAMPKβ与其他物种相比,具有保守的 CBM 和 αγ-SID 功能结构域。Egss 与多房棘球绦虫(Gen-Bank:CDS37007.1)、智人(GenBank:NP_005390.1)、 华支睾吸虫(GenBank:GAA50585.1)、斑马鱼(Gen-Bank:NP_001124105.1)、鸡(NP_001038127.1)、美洲 鲎(GenBank:XP_013778710.1)、曼氏血吸虫(Gen-Bank:XP_018646108.1)、微小膜壳绦虫(GenBank: CDS32620.1)、小嘴狐猴(GenBank:XP_012617354. 和 倭 黑 猩 猩 (GenBank: XP_003809245.1)的 AMPKβ序列相似性分别为 98.47%、39.57%、48. 74%、38.53%、40.18%、39.57%、54.88%、86.22%、 38.96%和 39.57%(图 7)。



注:灰色透明方框表示肉豆蔻酰化的 N 端共有序列;两个*中间的 横线表示 CBM 结构域;两个•之间的横线表示 αγ-SID 结构域;▲表示 参与与碳水化合物结合的保守的共有残基;★表示参与自身磷酸化的 关键残基。

图 7 EgAMPKβ和其他物种 AMPKβ的多序列比对

Notes: Gray transparent boxes is indicated myristoylated N-terminal shared sequences; CBM structural domain is indicated by the horizontal line between the two *; $\alpha\gamma$ -SID structural domain is indicated by the horizontal line between the two \cdot ; the \blacktriangle is indicated a conserved shared residue involved in binding to carbohydrates.

Fig. 7 Multiple sequence comparison of EgAMPK β and AMPK β of other species

10 EgAMPKβ的系统进化关系

AMPKβ具有多个分支,EgAMPKβ与多房棘球 绦虫同属于一个分支,与微口膜壳绦虫同属于绦虫纲, 进化关系较近,与哺乳动物、如人、倭黑猩猩和小鼠的 进化关系较远(图 8)。



图 8 EgAMPKβ和其他物种 AMPKβ系统进化树 Fig. 8 Phylogenetic tree of EgAMPKβ and other species AMPKβ

讨论

CE 被公认为是重大公共卫生问题,亟需加强防 治和研发新的治疗途径^[17]。然而,目前对 CE 的药物 治疗仍有一定的局限性,迫切需要探索潜在的药物靶 标并开发有效且安全的治疗药物。筛选药物靶点蛋白 是研制新型抗 CE 药物的必要条件^[18],而生物信息学 是一种高效、经济的用于靶点蛋白质筛选和生物学功 能预测的技术,近年来在癌症^[19]、病原体感染^[20]等多 个领域中成为研究热点。目前,对于 Egsl 的能量代谢 调节研究较少,利用生物信息学方法分析 EgAMPKβ 的结构和功能特性,不仅可以为理解 Egsl 的能量代谢 过程提供研究基础,也可以为 CE 的药物靶点开发提 供理论依据。

基因组学研究揭示,Egsl 代谢脂类和氨基酸的能 力有限,需要外源糖作为主要能量来源,Egsl 依赖糖 酵解、三羧酸循环和其他代谢途径产生 ATP,以供于 虫体的生长发育^[21-22]。由于 Egsl 无法从宿主体内直 接获取 ATP,因此通过靶向干预 Egsl 的能量代谢系 统开发新型抗 CE 药物,是一种有效治疗 Egsl 感染的 策略。鉴于 AMPK 在能量代谢平衡中发挥的关键作 用,EgAMPKβ可能是一个重要的药物开发靶点^[23]。 本研究从一种具有代表性的 Egsl 分型 Egss 中克隆出 EgAMPKβ基因并分析其编码蛋白的氨基酸序列,结 果显示 EgAMPKβ 二级结构中 α 螺旋和 β 折叠结构占 比仅为 32. 21%, 而 β 转角和无规卷曲结构占 67. 79%,表明 EgAMPKβ柔性大,易发生形变,是一种不 稳定的蛋白。DNAStar 软件和 IEDB 服务器分析结 果预测 EgAMPKβ 含有多个抗原表位,可作为抗原用 于制备 EgAMPKβ 抗体。多重序列比对结果显示 EgAMPK_β与其他物种的 AMPK_β 基因存在显著的差 异,与人类 AMPKβ 的序列相似性仅为 39.57%。进 化关系上,EgAMPKβ与绦虫纲中的多房棘球绦虫、微 口膜壳绦虫的 AMPKβ 亲缘关系较近,而与哺乳纲中 的人亲缘关系较远,提示针对 EgAMPKβ 蛋白结构开 发更具选择性的 EgAMPKβ 靶向药物可作为 CE 药物 未来发展的重点,在避免干扰宿主 AMPKβ 表达的同 时保留治疗效果。

糖原是 Egsl 的能量代谢过程中重要的储能分 子^[24],但糖原在 Egsl 中的结合位点尚不清楚。在人 AMPKβ 亚基中发现的 CBM 结构域可以参与糖原结 合^[25],然而 EgAMPKβ 对 Egsl 能量代谢的影响尚不 明确。为了探究 EgAMPKβ 对 Egsl 能量代谢的作用, 本研究分析了 EgAMPKβ 的功能结构域和翻译后修 饰位点,发现 EgAMPKβ 的 N 端具有 1 个肉豆蔻酰 基,该结构负责将修饰的蛋白质募集到细胞膜^[26]。在

EgAMPKβ序列的中央和 C 末端具有保守的功能结 构域 CBM 和 αγ-SID。EgAMPKß 的 CBM 上有至少 3个参与碳水化合物结合的保守的共有残基,负责将 AMPK 定位在糖原上。Warden 等^[27] 报道人 AMPKβ1 的 108 号丝氨酸可被 AMPKα1 催化活化而 发生自磷酸化,增加了AMPK的活性。本研究分析在 EgAMPKg上该磷酸化位点位于136号丝氨酸,推测 该位点可能与人 108 号丝氨酸有着类似的作用,但与 NetPhos 3.1 分析结果不同,需要进一步证明 $E_{gAMPK\beta136}$ 号 丝 氨 酸 的 生 物 学 功 能。此 外, EgAMPKβ可能存在自身抑制作用,二级和三级结构 显示 E_gAMPK_β 的 CBM 结构域采用 β -夹心折叠,由 1 个β折叠和1个β发夹环形成1个碳水化合物结合位 点,包含5个葡萄糖基单位,研究发现麦芽五糖是阻止 人 AMPKβ 结合到糖原的最小寡糖^[28],然而目前对 EgAMPKβ的影响尚不清楚。当 CBM 与糖原结合 时,AMPKβ发生变构,从而抑制 AMPK 活性(并抑制 上游激酶的磷酸化)^[28-29],提示当虫体自身的糖原增多 时,可通过结合 EgAMPKβ 促使 EgAMPK 变构,导致 AMPK 失活从而减少 ATP 的产生,以减少不必要的 能量消耗。对人 AMPK 来说,缺少整个 CBM 结构域 的截短β亚基仍然可与α和γ亚基形成稳定的 AMPK 复合物,表明 AMPKβ 亚基的 CBM 结构域不 影响 AMPK 复合物的形成,因为对于 EgAMPKβ 来 说,CBM 结构域可能更多地充当 Egsl 的细胞糖原传 感器^[30]。此外, EgAMPKβ的 C-末端存在 αγ-SID 结 构域,该结构域对于 AMPK 活化至关重要,主要负责 连接 EgAMPKα和 EgAMPKγ。研究发现,在哺乳动 物中,该结构域的部分缺失将导致 AMPK 复合物无法 形成,进而使其失活^[31-32],提示 EgAMPKβ 是 EgAMPK 发挥生物学功能过程中的关键参与者。

本研究从 Egss 中克隆出 EgAMPKβ 基因,生物 信息学分析表明该基因参与调控 Egss 的能量代谢过 程,为研究 EgAMPK 的生物学功能提供了理论基础, 也有助于进一步了解 Egsl 在中间宿主中的寄生机制, 为治疗 CE 病提供了新的药物靶点。

【参考文献】

- Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [2] Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(2): 296-303.
- [3] Stojkovi M, Weber TF, Junghanss T. Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art and perspectives[J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31(5):383-392.
- [4] Lundstr m-Stadelmann B, Rufener R, Ritler D, et al. The impor-

tance of being parasiticidal an update on drug development for the treatment of alveolar echinococcosis[J]. Food Waterborne Parasitol,2019,15:e00040.

- [5] Vazirian M, Nabavi S M, Jafari S, et al. Natural activators of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) and their pharmacological activities [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 122, 69-79.
- [6] Li M, Li J, Zeng R, et al. Respiratory syncytial virus replication is promoted by autophagy-mediated inhibition of apoptosis [J]. J Virol, 2018, 92(8):e02193-17.
- [7] Liu W, Jiang Y, Sun J, et al. Activation of TGF-β-activated kinase 1 (TAK1) restricts Salmonella typhimurium growth by inducing AMPK activation and autophagy[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(5): 570.
- [8] Choi JW, Lee J, Lee JH, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent *Toxoplasma gondii* Infection by inducing autophagy via AMPK activation[J]. Nutrients, 2019, 11(9):2137.
- [9] Loos JA, Cumino AC. In vitro anti-echinococcal and metabolic effects of metformin involve activation of AMP-activated protein kinase in larval stages of Echinococcus granulosus [J]. PLoS One,2015,10(5):e0126009.
- [10] Wilkins M R,Gasteiger E,Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods Mol Biol, 1999,112:531-552.
- [11] Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, S nderby CK, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. Nat Biotechnol,2019,37(4):420-423.
- [12] Chen Y, Yu P, Luo J, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT[J]. Mamm Genome, 2003, 14(12):859-865.
- [13] 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.
- [14] Rai S, Agrawal C, Shrivastava A K, et al. Comparative proteomics unveils cross species variations in Anabaena under salt stress[J]. J Proteomics, 2014, 98:254-270.
- [15] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46 (D1): D493-D496.
- [16] Geourjon C, Del age G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Comput Appl Biosci,1995,11(6): 681-684.
- [17] Fadel S A, Asmar K, Faraj W, et al. Clinical review of liver hydatid disease and its unusual presentations in developing countries[J]. Abdom Radiol (NY),2019,44(4):1331-1339.
- Wang F, Ye B. Bioinformatics analysis and construction of phylogenetic tree of aquaporins from *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitol Res, 2016, 115(9): 3499-3511.

- [19] Yuan C, Zhang J, Lou J, et al. Comprehensive analysis of Monocarboxylate Transporter 4 (MCT4) expression in breast cancer prognosis and immune infiltration via integrated bioinformatics analysis[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):3850-3863.
- [20] Lanjanian H, Nematzadeh S, Hosseini S, et al. High-throughput analysis of the interactions between viral proteins and host cell RNAs[J]. Comput Biol Med, 2021, 135:104611.
- [21] 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.
- [22] Zheng H, Zhang W, Zhang L, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* [J]. Nat Genet, 2013, 45 (10):1168-1175.
- [23] Loos JA, D vila VA, Rodr gues CR, et al. Metformin exhibits preventive and therapeutic efficacy against experimental cystic echinococcosis[J]. PLoS Negl Trop Dis,2017,11(2):e0005370.
- [24] Parkinson J, Wasmuth JD, Salinas G, et al. A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages:implications for parasite biology and host adaptation[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012,6(11):e1897.
- [25] Janeek , Svensson B, Macgregor EA. Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals [J]. Enzyme Microb Technol, 2011, 49(5): 429-440.
- [26] Resh MD. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins[J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(11):584-590.
- [27] Warden SM, Richardson C, O'donnell J Jr., et al. Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization[J]. Biochem J,2001,354(Pt 2):275-283.
- [28] Polekhina G,Gupta A,Van Denderen BJ,et al. Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase[J]. Structure,2005,13(10):1453-1462.
- [29] Mcbride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, et al. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor[J]. Cell Metab, 2009, 9(1):23-34.
- [30] Russell FM, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Do we need activators or inhibitors to treat or prevent cancer? [J]. Int J Mol Sci,2020,22(1):186.
- [31] Iseli TJ, Walter M, Van Denderen BJ.et al. AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270)[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13395-13400.
- [32] Iseli TJ, Oakhill JS, Bailey MF, et al. AMP-activated protein kinase subunit interactions; beta1;gamma1 association requires beta1 Thr-263 and Tyr-267[J]. J Biol Chem, 2008, 283(8); 4799-4807.

【收稿日期】 2021-07-26 【修回日期】 2021-12-16