DOI:10.16016/j.1000-5404.202006204

细粒棘球绦虫囊化原头蚴 AQP 基因转录动态及异源表达实验研究

谭青青[1],吴宏烨[1],高 剑[2],李 锴[1],范俊杰[1],李 想[1],廖 鹏[1],曹纹侨[1],叶 彬[1,3] 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:病原生物学教研室[1],分子医学与肿瘤研究中心[3];830011 乌鲁木齐,新疆医科大学寄生虫学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 探索细粒棘球蚴水通道蛋白(*Echinococcus granulosus* aquaporins, *Eg*AQPs)在棘球蚴液形成过程中的作用。**方法** 收集体外培养不同时期的棘球蚴标本和 BALB/c 小鼠体内接种的继发棘球蚴标本,RT-qPCR 方法检测 12 个 *Eg*AQPs 基因在体内、体外培养不同发育时期的转录表达。以细粒棘球蚴 cDNA 为模板,扩增 *Eg*AQP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP3、*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-4 和 *Eg*AQP9-1 6 个基因编码区片段,同时,通过化学合成方法扩增另外 6 个 *Eg*AQPs(*Eg*AQPAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP4-2、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP4-5、*Eg*AQP9-2)基因编码区片段,并在非洲爪蟾卵母细胞中检测这 12 个 *Eg*AQPs 基因的透水功能,Western blot 检测 *Eg*AQPs 在卵母细胞膜上的表达。**结果** 体外培养的原头蚴及感染小鼠的继发棘球蚴体积均随培养时间的延长而逐渐增大,棘球蚴囊内透明液体增多。RT-qPCR 结果显示 12 个 *Eg*AQPs 基因在体内、体外培养不同发育时间的转录表达水平均较低。注射 *Eg*AQPs 基因的非洲爪蟾卵母细胞的体积变化率和透水系数与阴性对照组差异无统计学意义,这 12 个 *Eg*AQPs 基因在卵母细胞中未表现出水通道功能。Western blot 检测 12 个 *Eg*AQPs 基因在卵母细胞总蛋白、胞质蛋白与胞膜蛋白上的表达,结果均未观察到蛋白在预期的水通道蛋白理论分子量处表达。**结论** 12 个 *Eg*AQPs 基因在原头蚴囊化形成棘球蚴过程中转录表达水平均较低,这些基因在爪蟾卵母细胞的异源表达均未表现出通透水的功能。

[**关键词**] 细粒棘球绦虫;水通道蛋白;原头蚴;棘球蚴;转录谱;异源表达
[**中图法分类号**] R341; R383.33; R394.3 [**文献标志码**] A

Transcription profile and heterologous expression of *Echinococcus granulosus* aquaporins genes in the encysted protoscolex

TAN Qingqing[1], WU Hongye[1], GAO Jian[2], LI Kai[1], FAN Junjie[1], LI Xiang[1], LIAO Peng[1], CAO Wenqiao[1], YE Bin[1,3] [1]Department of Pathogenic Biology, [3]Research Center for Molecular Medicine and Tumor, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Parasitology, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830011, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of *Echinococcus granulosus* aquaporins (*Eg*AQPs) in the accumulation of hydatid fluid. **Methods** The secondary hydatids cultured *in vitro* and inoculated in BALB/c mice were collected respectively, and the relative transcription expression levels of 12 *Eg*AQPs genes from the hydatid cysts cultured *in vitro* and in mice were detected by RT-qPCR. Six gene coding region fragments of *Eg*AQP, *Eg*AQP1, *Eg*AQP3, *Eg*AQP4-1, *Eg*AQP4-4 and *Eg*AQP9-1 were amplified using cDNA templates. The other 6 genes coding region fragments of *Eg*AQPs (*Eg*AQPAn. G, *Eg*AQPFA-CHIP, *Eg*AQP4-2, *Eg*AQP4-3, *Eg*AQP4-5 and *Eg*AQP9-2) were amplified with chemical synthesis. The water permeability of these 12 *Eg*AQPs genes were detected in *Xenopus laevis* (*X. laevis*), and the expression of *Eg*AQPs on the oocytes membranes was detected by Western blotting. **Results** The volume of hydatid cultured *in vitro* and *in vivo* was increased gradually with the extension of culture time, and there was more and more transparent

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81672045)
[**通信作者**] 叶 彬,E-mail: yebin@cqmu.edu.cn

hydatid fluid in hydatid cyst. The results of RT-qPCR showed that the relative transcription levels of *Eg*AQPs genes in the hydatid cysts were very low or even undetectable except for *Eg*AQP3 and *Eg*AQP9-1 at the beginning of culture *in vitro*. There were no significant differences in relative volume change rates and water permeability coefficients of *X. laevis* oocytes injected with *Eg*AQPs genes when compared with the negative control, and these *Eg*AQPs genes did not show water channel functions in the oocytes. Western blot assay displayed that there was no expression of *Eg*AQPs genes in total, cytoplasmic and membrane protein on the oocytes. **Conclusion** The transcription levels of *Eg*AQPs genes are quite low in the encystation process of protoscolex, and their heterologous expression do not show water channel functions in *X. laevis* oocytes.

[**Key words**] *Echinococcus granulosus*; aquaporin; protoscolex; hydatid; transcription profile; heterologous expression

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81672045). Corresponding author: YE Bin, E-mail: yebin@cqmu.edu.cn

细粒棘球蚴病,也称为囊型包虫病(cystic echinococcosis, CE),是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, *Eg*)的幼虫棘球蚴引起的人畜共患寄生虫病,主要损害人体肝(60%~70%)、肺(10%~25%)等器官[1-2]。该病在中亚、东欧、北美、南美和中国西北部游牧地区等地流行,引起当地严重的公共健康问题[3]。中国被认为是全球棘球蚴病流行最严重的国家之一,以西藏、新疆、青海、四川等游牧地区发病率较高[4]。棘球蚴呈圆形或近圆形的囊状体,包囊内充满无色或淡黄色的透明液体,囊液对棘球蚴的存活十分重要[5]。然而到目前为止,棘球蚴囊液生成机制仍然未知。

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是一类具有完整质膜的跨膜通道蛋白,能快速转运水分子及一些小分子物质,广泛存在于原核及真核生物的细胞膜上[6-7]。研究发现在寄生虫体内也存在 AQPs,多种寄生虫 AQPs 可参与寄生虫体内水的跨膜转运、营养物质吸收及代谢产物排出等生理过程,还可参与抗寄生虫药物的转运[8-9]。而对于细粒棘球蚴 AQPs(*Echinococcus granulosus* aquaporins, *Eg*AQPs)的研究目前处于空白状态,是否具有类似的调控功能还不清楚,本研究拟探索 *Eg*AQPs 基因在棘球蚴囊液形成中的作用。

对于 *Eg*AQPs 基因所编码蛋白的结构和功能,前期课题组利用生物信息学进行了详细的分析[10-11]。为进一步探讨 *Eg*AQPs 的具体生物学功能,本研究利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分别检测 *Eg*AQPs 基因在体内、体外培养的棘球蚴不同发育时间相对转录表达水平,观察它们在棘球蚴体内的表达状态;克隆所有 *Eg*AQPs 基因,并分别将其注入非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, *X. laevis*)卵母细胞中,验证它们的水通道功能;最后在卵母细胞膜上异源表达 *Eg*AQPs,验证其蛋白分子量大小,为深入研究 *Eg*AQPs 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 感染细粒棘球蚴的绵羊肝脏采自新疆乌鲁木齐某屠宰场,通过冷链运输至本实验室;50 只 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠来自重庆医科大学实验动物中心;*X. laevis* 由清华大学陶庆华教授惠赠。动物实验通过伦理委员会审批(2020 年 6 月),动物饲养及实验相关程序均遵循实验动物管理和保护相关规定。

1.1.2 主要试剂 TRIzol、TaKaRa PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser、TaKaRa SYBR Premix *Ex Taq*™ Ⅱ(Tli RNaseH Plus)、T_4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司;1-5™2×High-Fidelity Master Mix 购自北京擎科生物科技有限公司;*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ、*Bam*HⅠ、*Cla*Ⅰ和 *Nsi*Ⅰ等限制性内切酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司;无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Flag 标签抗体、E-cad 抗体、α-tublin 抗体、山羊抗大鼠 IgG、山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司;HA 标签抗体购自 Roch 公司;β-actin 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 体外培养的棘球蚴及 BALB/c 小鼠体内的继发棘球蚴标本的收集 收集感染细粒棘球蚴绵羊肝脏中的原头蚴,参考吴宏烨等[12]的培养方法培养原头蚴。培养至 0、10、30、60、90、120、150、180 d 时,分别吸取轻摇混匀的棘球蚴悬液 0.5 mL,经台盼蓝(0.4%)染色,通过光学显微镜观察不同时期棘球蚴囊泡的形态特征并测量各时期棘球蚴囊大小,剩余的棘球蚴悬液用 PBS 充分洗涤 3 遍后冻存于-80 ℃冰箱备用。

取 50 只 BALB/c 健康雌性小鼠,用无菌注射器吸 0.2 mL 棘球蚴悬液注射入每只小鼠腹腔,计数约含

2 000 个棘球蚴。感染小鼠喂养到第 3、6、9、12、15 个月,分别随机解剖 10 只小鼠,观察棘球蚴在小鼠体内寄生部位,剥离出棘球蚴囊泡,测量并记录囊泡大小。无菌注射器抽吸囊液后,囊壁组织用 PBS 充分洗涤后冻存于-80 ℃超低温冰箱中待用。

1.2.2 提取棘球蚴总 RNA 及逆转录合成 cDNA

从-80 ℃冰箱取出各时期适量棘球蚴囊壁组织放入冰上准备的 1.5 mL 无酶 EP 管中,按照 TRIzol 说明书提取各组织样本的总 RNA。根据 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书将提取合格的 RNA 逆转录成 cDNA,cDNA 产物保存于-20 ℃冰箱备用。

1.2.3 RT-qPCR 检测 *Eg*AQPs 基因相对转录表达水平

1.2.3.1 *Eg*AQPs 基因的 RT-qPCR 引物设计与合成

在 NCBI 数据库共检索到 15 个编码 AQPs 的基因,其中有 3 对分别反向互补,*Eg*AQP3(accession number:EGR_03137)与 *Eg*AQP9(accession number:*Eg*rG_001190800),*Eg*AQP4(accession number:EGR_04157)与 *Eg*AQP4(accession number:*Eg*rG_000124900),*Eg*AQP9(accession number:EGR_06907)与 *Eg*AQP9(accession number:*Eg*rG_000153200),因此记为 12 个 AQPs 的基因。*Eg*AQP4 与 *Eg*AQP9 有多个转录本,为方便区分,以编号的方式呈现出来(表 1)。

由于 *Eg*AQP 和 *Eg*AQPAn. G、*Eg*AQP4-3 和 *Eg*AQP4-5 这两对基因在核苷酸水平上差异非常小,故分别共用 1 对引物,分别标记为 *Eg*AQP-An. G 和 *Eg*AQP4-3-5。*actin*+*Act* Ⅱ 和 *ND* 1+*ATP* 6 两个内参基因组合分别对体外培养的囊化原头蚴和小鼠体内继发棘球蚴的 *Eg*AQPs 基因转录表达水平进行校正和标准化[13]。引物由北京擎科生物科技有限公司合成,引物序列及相关信息见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列及相关信息

基因名称	登录号	引物序列(5′→3′)	预期大小/bp
Act Ⅱ	AF003749	上游:ATGGTTGGTATGGGACAAAAGG 下游:TTCGTCACAATACCGTGCTC	118
*ND*1	AF408688	上游:GCCGCCAGAACATCTAGGTA 下游:AGCACATCGAACCGACCTTA	87
*ATP*6	JF690977	上游:GTGTGCTTGGCCGAGTCTAT 下游:CACAAATTACCCAATGCCACT	113
Actin	L07775	上游:AATTGGGACGACATGGAGAA 下游:GCGATTGGCTTTAGGATTGA	117
*Eg*AQP-An. G	EgrG_000125500 EGR_04162	上游:GGGTGGGGGGCTCTACGTT 下游:CTCATTGCTTCCAGGCGGT	199
*Eg*AQPFA-CHIP	EGR_04161	上游:CCCCTGCTCTCTCTTGACCAC 下游:GACAACAACCCTCTCCACCCT	123
*Eg*AQP1	*Eg*rG_000125400	上游:CTGTCTGTTAAGTCCGCC 下游:GCTTCTGCGTTGCTCACT	163
*Eg*AQP3	EGR_03137	上游:GCTGGTCCCTTCTGCCACTC 下游:TCCCGCCGTCATTCTCTGT	123
*Eg*AQP4-1	EGR_04157	上游:GATGACGCTTCCTGGGAATGG 下游:CGTTAATCATGAGGGCCAACATG	179
*Eg*AQP4-2	EGR_04164	上游:CTTCGTTTGCGAGGCCGTTGCTG 下游:GGTCACCATTGGGTTGATGTG	172
*Eg*AQP4-3-5	*Eg*rG_000125600 EGR_04165	上游:CATGGGTATGACTATGCCTCGC 下游:TGAGCATGTAGACGCAAGCCA	170
*Eg*AQP4-4	*Eg*rG_000125550	上游:CTACCAGCGGAGGTCACATCAAC 下游:GTTGTTGGGCTCTTGGGGTCG	170
*Eg*AQP9-1	EGR_06907	上游:CAAGAACACATATGACAATGGCAC 下游:GTCCAAAATAGCCATTATCGCTGC	148
*Eg*AQP9-2	EGR_10069	上游:GCCCTCTCATCGCATATCCAAC 下游:GAAGGTTGCGGCTAGCTCAGC	152

1.2.3.2 RT-qPCR 检测棘球蚴体内 AQPs 相对转录表达水平 以各时期的棘球蚴 cDNA 为模板,按照 SYBR Premix Ex TaqTM Ⅱ试剂盒说明书进行,具体反应体系与反应条件参考吴宏烨[14]方法进行操作。

1.2.4 *Eg*AQPs 基因扩增及重组表达载体的构建

1.2.4.1 *Eg*AQP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP3、*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-4、*Eg*AQP9-1 和 *Rn*AQP1 基因的扩增 根据 NCBI 数据库提供的 *Eg*AQP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP3、*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-4、*Eg*AQP9-1 和 *Rn*AQP1 基因 mRNA 序列,设计并合成 PCR 引物(表 2),引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

以 0 d 的原头蚴 cDNA 为模板,应用设计好的上、下游引物扩增 *Eg*AQP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP3、*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-4、*Eg*AQP9-1 和 RnAQP1 基因。反应结束后,取 5 μL PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,按照 TaKaRa DNA 片段纯化试剂盒说明书纯化与目的基因大小一致的片段。

1.2.4.2 化学合成 *Eg*AQPAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP4-2、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP4-5 和 *Eg*AQP9-2 基因

根据 NCBI 数据库提供的 *Eg*AQPAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP4-2、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP4-5 和 *Eg*AQP9-2 基因 mRNA 序列,化学合成这 6 个基因,相关信息见表 3。

表 2 PCR 引物序列及相关信息

基因名称	登录号	引物序列(5′→3′)	预期大小/bp
*Eg*AQP	EgrG_000125500	上游:CCCATCGATTCGAATTCATGTTCTTGGAGGATTTG 下游 1:TCA**CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATC**TTTTCCACCAGTTTCTTC 下游 2:AGGGCGAGAGGCTCGAGTCACTTGTCATCGTCG	738
*Eg*AQP1	EgrG_000125400	上游:CCCATCGATTCGAATTCATGCCCGGTCCTGGAG 下游 1:TCA**CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAAT**CGCTTCTGCGTTGCTCAC 下游 2:AGGGCGAGAGGCTCGAGTCACTTGTCATCGTCG	657
*Rn*AQP1	X67948.1	上游:CGGGATCCATGGCCAGCGAAATCAAGAAG 下游:CGGAATTCCTA**CTTATCGTCATCGTCCTTGTAATC**TTTGGGCTTCATCTCCAC	810
*Eg*AQP3	EGR_03137	上游:CGGAATTCATGTCAGTGAGCCAAAATAATAACC 下游:CCCTCGAGTCAA**GCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**CTTTGCCTCGCTTAAATC	978
*Eg*AQP4-1	EGR_04157	上游:CGGAATTCATGAAGAAGCCATCCTACAAAGG 下游:CCCTCGAGTTA**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**GACACCCACGTCTTCTTGG	786
*Eg*AQP4-4	EgrG_000125550	上游:CGGAATTCATGACTAAGAATCCGGTGCCCA 下游:CCCTCGAGTCA**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**GCTGTTCCCCAAGTCGTC	801
*Eg*AQP9-1	EGR_06907	上游:CGGAATTCATGAAACATATCACCGAATCTTAC 下游:CCCTCGAGTT**AAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**TTTTTTATAAACATCCGATTCATCGC	891
*Rn*AQP1	X67948.1	上游:CGGGATCCATGGCCAGCGAAATCAAGAAG 下游:CGGAATTCCTA**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**TTTGGGCTTCATCTCCACC	810

GAATTC 为酶切位点 *Eco*R Ⅰ,CTCGAG 为酶切位点 *Xho* Ⅰ,GGATCC 为酶切位点 *Bam*H Ⅰ;**CTTATCGTCATCGTCCTTGTAAT** 为 Flag 标签;**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA** 为 HA 标签

表 3 化学合成 6 个 *Eg*AQPs 基因的相关信息

基因名称	登录号	预期大小/bp	限制性酶切位点	标签
*Eg*AQP4-2	EGR_04164	957	*Eco*R Ⅰ:GAATTC *Xho* Ⅰ:CTCGAG	HA
*Eg*AQP4-5	EgrG_000125600	777	*Eco*R Ⅰ:GAATTC *Xho* Ⅰ:CTCGAG	HA
*Eg*AQP4-3	EGR_04165	996	*Cia* Ⅰ:ATCGAT *Xho* Ⅰ:CTCGAG	Flag
*Eg*AQP9-2	EGR _10069	582	*Eco*R Ⅰ:GAATTC *Xho* Ⅰ:CTCGAG	Flag
*Eg*AQPAnG	EGR _04162	717	*Eco*R Ⅰ:GAATTC *Xho* Ⅰ:CTCGAG	Flag
*Eg*AQPFA-CHIP	EGR _04161	1 050	*Bam*H Ⅰ:GGATCC *Xho* Ⅰ:CTCGAG	Flag

1.2.4.3 *Eg*AQPs、*Rn*AQP1 基因与 pCS107 质粒双酶切 纯化后的 PCR 产物 *Eg*AQPs、*Rn*AQP1 基因和提取的 pCS107 质粒经对应的限制性内切酶进行双酶切。反应条件为:37 ℃ 酶切 90 min,65 ℃ 20 min 使酶失活。反应结束后,按照 TaKaRa DNA 片段纯化试剂盒说明书纯化与目的基因大小一致的片段,回收的双酶切产物保存于-20 ℃冰箱备用。

1.2.4.4 *Eg*AQPs-pCS107 重组质粒的构建及鉴定 采用 T_4 连接酶连接双酶切后纯化的 *Eg*AQPs、*Rn*AQP1 基因和 pCS107 质粒,4 ℃冰箱放置 24 h 后,转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,均匀涂布在含氨苄西林(终浓度为 100 μg/mL)的 LB 固体琼脂平板上,倒置于 37 ℃培养箱中培养 14~16 h。挑取生长良好的单个菌落加入到 2 mL 含氨苄西林(终浓度为 100 μg/mL)的 LB 液体培养基中,在 37 ℃,200 r/min 条件下振摇 4 h,进行菌液 PCR 鉴定,反应结束后 1%琼脂糖凝胶电泳检测,符合目的基因条带的阳性菌液送至北京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.5 体外转录模板的制备 *Eg*AQPs-pCS107 和 *Rn*AQP1-pCS107 重组质粒按照去内毒素质粒大提试剂盒说明书提取,重组质粒经限制性内切酶 *Nsi* Ⅰ 酶切,进行线性化处理。纯化酶切产物,利用体外转录试剂盒 mMESSAGE mMACHINE High Yield Capped RNA Transcription Kit 合成 cRNA。

1.2.6 检测非洲爪蟾卵母细胞异源表达 *Eg*AQPs 的透水系数 非洲爪蟾用 MS-222(鱼安定)麻醉完全后,在体视显微镜下剥离卵母细胞滤泡膜,挑选Ⅴ或Ⅵ期生长良好的卵母细胞。实验组、阳性对照组及阴性对照组每颗卵母细胞分别注射 50 nL *Eg*AQPs cRNA、50 nL *Rn*AQP1 cRNA 和 50 nL RNA free water,每个基因重复 3 次。具体操作参考王芬[11]的实验方法,按下列公式计算水的渗透速率(osmotic water permeability, Pf)[15-16]。

$$Pf=V_0[d(V/V_0)/dt]/[S_0\times V_w(osm_{in}-osm_{out})]$$

其中 V_0 代表初始体积为 9×10^{-4} cm^3,S_0 代表初始细胞表面积为 0.045 cm^2, V_w 代表水分子的偏摩尔体积为 18 cm^3/mol, 体积 V 计算公式为:$V=(4/3)\times S\times(S/\pi)/2$,S 代表细胞表面积, osm_{in} 代表细胞内渗透压,osm_{out} 代表细胞外渗透压。

1.2.7 Western blot 检测 *Eg*AQPs 表达 提取的各组卵母细胞总蛋白、胞质蛋白和胞膜蛋白经过热变性处理后,在 SDS-PAGE 胶的每个孔中加入蛋白样品各 10 μL。电泳结束后转移至 PVDF 膜,转膜结束后 PVDF 膜用 5%脱脂奶粉在 37 ℃封闭 2 h;一抗标签抗体加入 5%奶粉中,按 1∶1 000 稀释,E-cadherin、α-tublin 或 β-actin 用 5%奶粉按 1∶2 000 稀释后加入,4 ℃过夜孵育;二抗加入山羊抗大鼠 IgG(一抗为 Anti-Flag 或 Anti-HA)或山羊抗小鼠 IgG(一抗为 E-cadherin、α-tublin 或 β-actin)按 1∶5 000 的比例稀释,室温孵育 1 h,TBST 漂洗膜 3 次,每次 10 min;洗膜结束后 ECL 显影,凝胶成像仪上读取结果并保存。

1.2.8 统计学分析 应用 SPSS 19.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验和方差分析对实验数据进行处理,检验水准 $\alpha=0.05$。

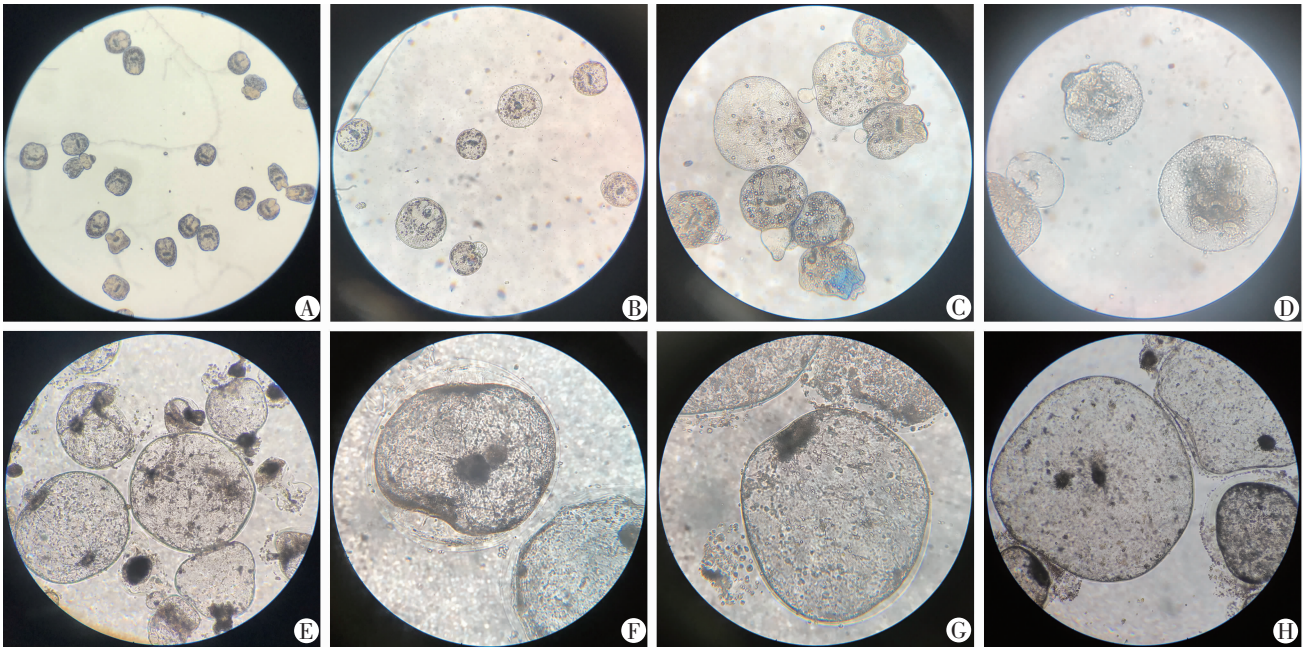
2 结果

2.1 原头蚴的分离培养及囊化原头蚴成囊效果

从绵羊肝脏收集的原头蚴在光学显微镜下观察呈椭圆或类椭圆形,大小较均匀,未见头节外翻及成囊现象(图 1A);培养至 10 d 时,镜下观察到部分原头蚴开始向棘球蚴方向发育,大部分原头蚴处于头节外翻状态,顶突逐渐退化,虫体内钙颗粒明显可见(图 1B);培养至 30 d 时,可见部分棘球蚴角质层,呈透明状,大部分原头蚴向棘球蚴囊泡发育(图 1C);培养至 60 d 时,棘球蚴已具有完整的角质层,吸盘已退化不可见,囊泡体积逐渐增大(图 1D);90 d 时,肉眼即可看到微小、透明的棘球蚴囊泡(图 1E);培养 120、150 d 和 180 d 分别观察棘球蚴囊泡,随着时间延长,除囊泡体积逐渐增大、囊液逐渐增多外,无其他明显变化。

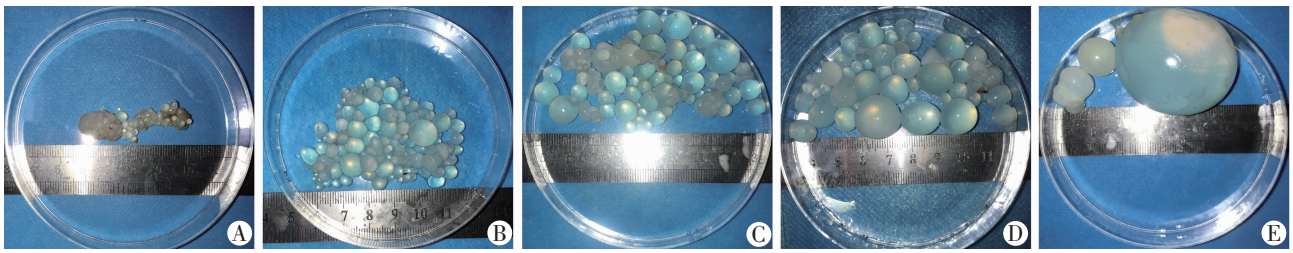
2.2 小鼠体内继发棘球蚴囊泡生长情况

在第 3、6、9、12、15 个月分别解剖 10 只小鼠,腹腔中均可见大小不同、数量不等的棘球蚴囊泡,游离在腹腔或黏附在肝、脾等脏器表面。小心分离囊泡,取出后放入无菌培养皿中。随感染时间延长,小鼠体内囊泡直径逐渐增大,囊泡内透明囊液逐渐增多(图 2)。



A: 0 d; B: 10 d; C: 30 d; D: 60 d; E: 90 d; F: 120 d; G: 150 d; H: 180 d

图 1　体外培养 0~180 d 的囊化原头蚴光学显微镜观察　(×20)



A: 3 个月; B: 6 个月; C: 9 个月; D: 12 个月; E: 15 个月

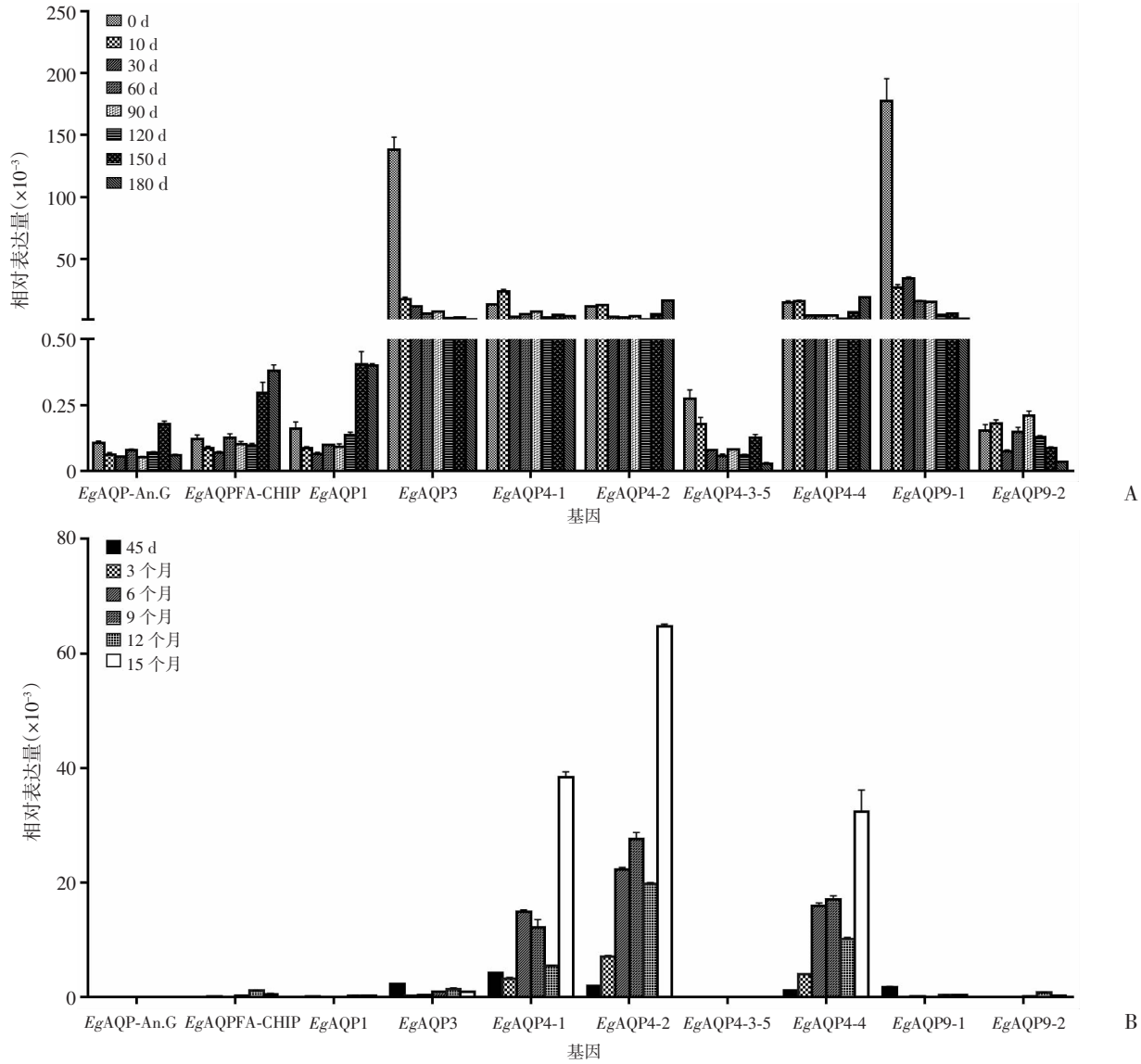
图 2　小鼠体内继发棘球蚴在不同时期囊泡发育情况

2.3　RT-qPCR 检测体内、体外培养不同时期囊化原头蚴 *Eg*AQPs 基因转录表达水平

体内、体外培养的棘球蚴各样本总 RNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,纯度较高,逆转录后可用于后续实验。

以 *actin* 和 *Act* Ⅱ作为内参基因,RT-qPCR 检测体外培养 180 d 的棘球蚴在不同时期体内 AQPs 基因的相对转录表达水平(图 3A)。*Eg*AQP、*Eg*AQPAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP4-5 和 *Eg*AQP9-2 7 个基因的相对转录表达值太低,仪器基本检测不到。虽然能够检测到 *Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-2 和 *Eg*AQP4-4 3 个基因的相对转录表达值,最大值仅 0.02。*Eg*AQP3 和 *Eg*AQP9-1 基因的相对转录表达值在 0 d 的原头蚴中转录表达量最高,分别为 0.138 和 0.177,培养至 10 d 时迅速下降,180 d 时降至最低,几乎检测不出。*Eg*AQP3 和 *Eg*AQP9-1 基因在培养 10 d 及以后各个时期的相对转录表达值与 0 d 相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。

以 *ATP*6 和 *NDI* 作为内参基因,RT-qPCR 检测小鼠体内培养不同时期(45 d 至 15 个月)的继发棘球蚴 AQPs 基因相对转录表达水平(图 3B)。*Eg*AQP、*Eg*AQPAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP3、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP4-5、*Eg*AQP9-1 和 *Eg*AQP9-2 检测几乎无信号;*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-2 和 *Eg*AQP4-4 基因虽然有相对转录表达值,但其值都太低,所有 AQPs 中最大相对转录表达值仅有 0.065。



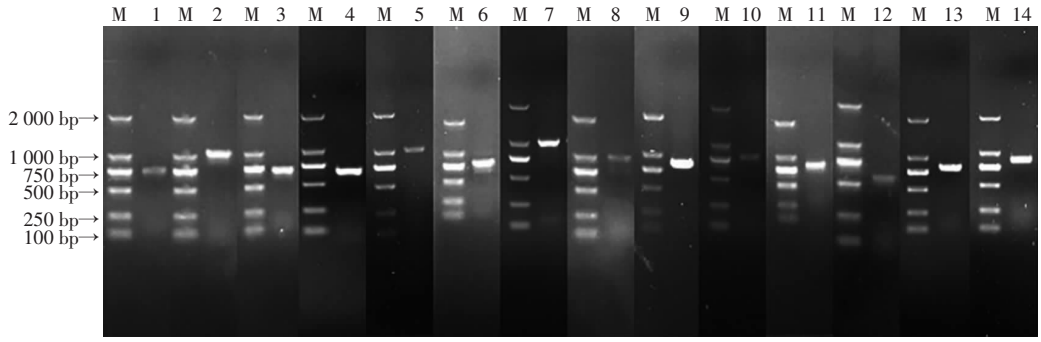
A:体外培养不同时期囊化原头蚴 *Eg*AQPs 基因相对转录表达水平;B:小鼠体内培养不同时期的继发棘球蚴 *Eg*AQPs 基因相对转录表达水平

图 3 体内外原头蚴不同培养时期 *Eg*AQPs 基因相对转录表达水平

2.4 棘球蚴 12 个 *Eg*AQPs 及阳性对照 *Rn*AQP1 基因扩增及重组质粒鉴定

*Eg*AQPs 基因以原头蚴 cDNA 为模板,阳性对照以提取的大鼠肺组织的 AQP1 cDNA 为模板,扩增 *Eg*AQP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP3、*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-4、*Eg*AQP9-1 和 *Rn*AQP1 7 个基因,1%琼脂糖凝胶电泳得到 7 条特异性条带,与目的基因片段(分别为 738、657、978、786、801、891、810 bp)大小一致;化学合成的 *Eg*AQPAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP4-2、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP4-5、*Eg*AQP9-2 基因,1%琼脂糖凝胶电泳验证基因片段大小,与目的基因片段(分别为 717、1 050、957、996、777、582 bp)大小一致(图 4)。

带有 Flag 标签和 HA 标签的 *Eg*AQPs 基因与 pCS107 载体经双酶切后,通过 T_4 连接酶过夜连接,获得 *Eg*AQPs-pCS107 重组质粒;带 Flag 标签和 HA 标签的 *Rn*AQP1 基因分别与 pCS107 载体连接,构成重组质粒 *Rn*AQP1-pCS107。构建好的重组质粒测序结果与目的基因序列比对结果一致,且 Flag 或 HA 标签成功插入终止密码子前面,表明成功构建 *Eg*AQPs-pCS107 和 *Rn*AQP1-pCS107 重组质粒。

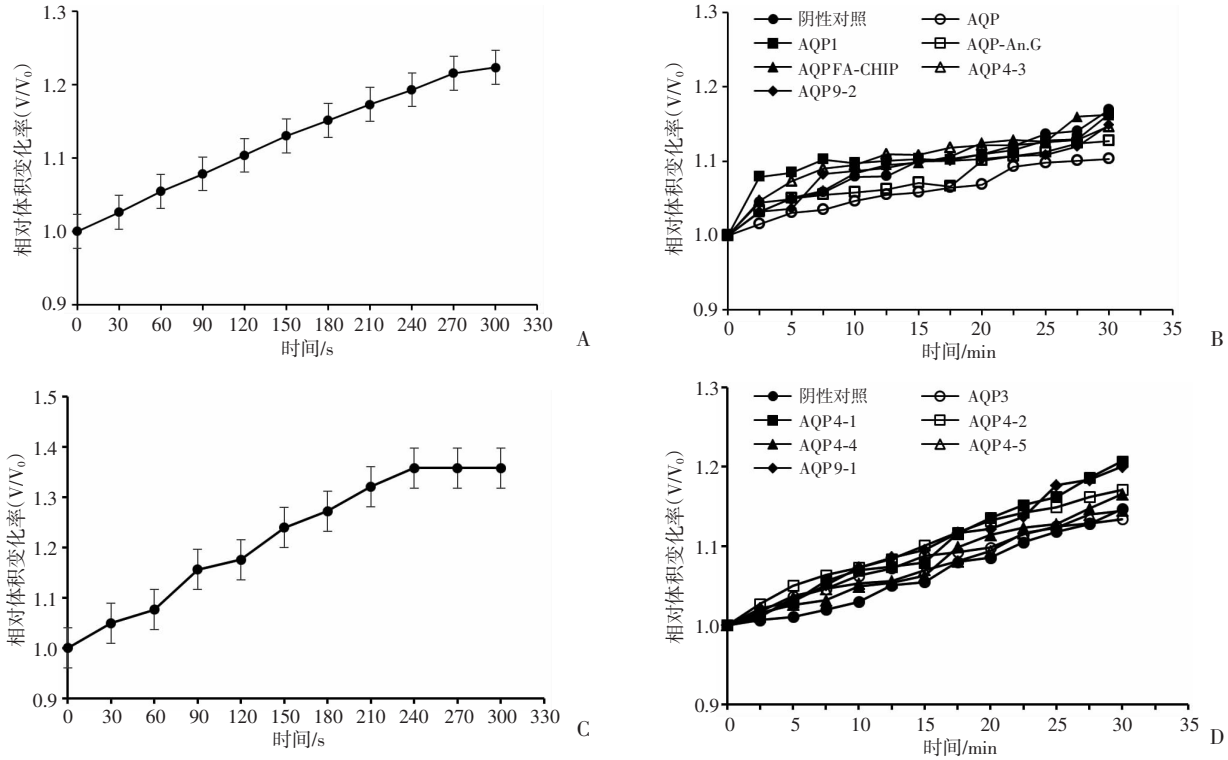


M:DNA Marker 2000; 1:*Eg*AQP (Flag); 2:*Eg*AQPFA-CHIP (Flag); 3:*Eg*AQPAn. G(Flag); 4:*Eg*AQP1 (Flag);5:*Eg*AQP3 (HA); 6: *Eg*AQP4-1 (HA); 7: *Eg*AQP4-2 (HA); 8: *Eg*AQP4-3 (Flag); 9: *Eg*AQP4-4 (HA); 10: *Eg*AQP4-5 (HA); 11:*Eg*AQP9-1(HA); 12:*Eg*AQP9-2(Flag); 13:*Rn*AQP1(Flag); 14:*Rn*AQP1 (HA);括号中代表对应基因所携带标签

图 4 *Eg*AQPs 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果

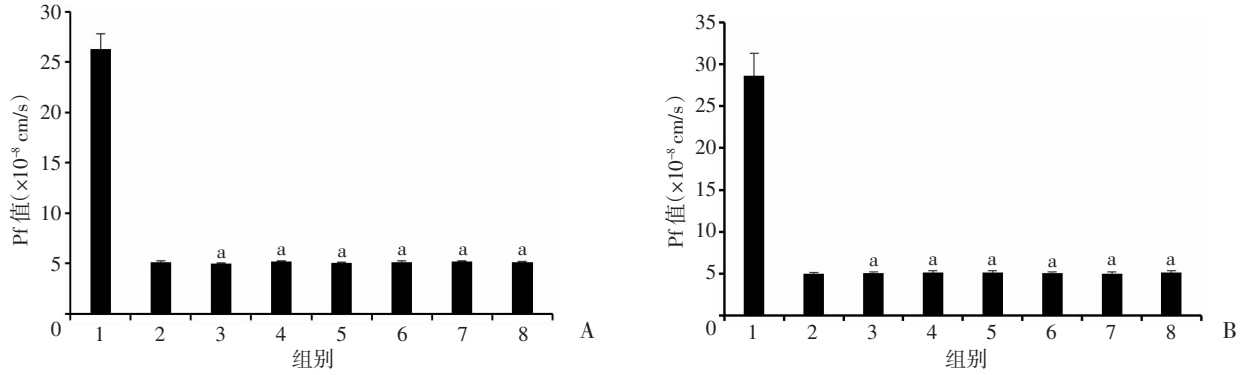
2.5 注射 *Eg*AQPs 基因的非洲爪蟾卵母细胞透水系数检测

含 *Eg*AQPs、*Rn*AQP1 cRNA 或 RNA free water 的爪蟾卵母细胞在 ND96 溶液中培养 48 h 后,*Rn*AQP1 cRNA 的卵母细胞转入 5 倍稀释的低渗溶液中,显微镜下观察到细胞体积迅速增大,5 min 内几乎全部胀破;注射 *Eg*AQPs cRNA 或 RNA free water 的卵母细胞转入 5 倍稀释的低渗溶液后,连续观察 30 min,卵母细胞体积仅有轻微变化,无细胞破裂发生。结果显示注射 *Eg*AQPs cRNA 的卵母细胞与注射 RNA free water 的卵母细胞的相对体积变化率(V/V0)差异无统计学意义(图 5),实验组注射 *Eg*AQPs cRNA 基因的卵母细胞 Pf 值与注射 RnAQP1 cRNA 基因的阳性对照组卵母细胞 Pf 值相比差异有统计学意义($P<0.05$),与注射 RNA free water 的阴性对照卵母细胞 Pf 值相比差异无统计学意义(图 6)。



A:带 Flag 标签的阳性对照 *Rn*AQP1 在卵母细胞中的相对体积变化率(V/V_0);B:阴性对照 RNA free water 与带 Flag 标签的 *Eg*AQPs 在卵母细胞中的相对体积变化率(V/V_0);C:带 HA 标签的阳性对照 *Rn*AQP1 在卵母细胞中的相对体积变化(V/V_0);D:阴性对照 RNA free water 与带 HA 标签的 *Eg*AQPs 在卵母细胞中的相对体积变化率(V/V_0)

图 5 *Eg*AQPs 基因在非洲爪蟾卵母细胞中的相对体积变化率



A:1~8 分别为携带 Flag 标签的阳性对照 *Rn*AQP1,阴性对照 RNA free water,实验组 *Eg*AQP、*Eg*AQPAn. G、*Eg*AQP FA-CHIP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP9-2 cRNA 基因的卵母细胞 Pf 值;B:1~8 分别为携带 HA 标签的阳性对照 *Rn*AQP1,阴性对照 RNA free water,实验组 *Eg*AQP3、*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-2、*Eg*AQP4-4、*Eg*AQP4-5、*Eg*AQP9-1 基因的卵母细胞 Pf 值;a:$P<0.05$,与阳性对照比较

图 6 *Eg*AQPs 基因卵母细胞透水系数 Pf 值检测

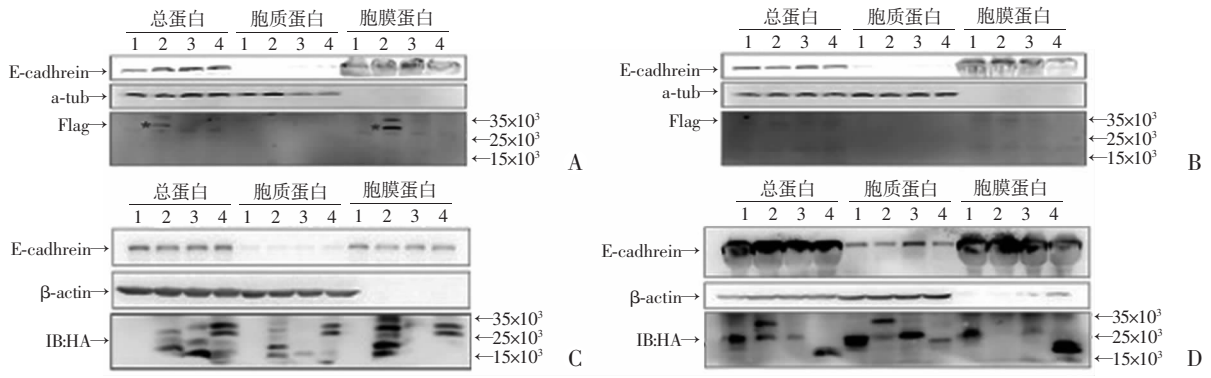
2.6 Western blot 检测 *Eg*AQPs 蛋白在非洲爪蟾卵母细胞膜上的表达

注射 *Rn*AQP1 基因的非洲爪蟾卵母细胞作为阳性对照,总蛋白和胞膜蛋白均能被 Flag 和 HA 标签抗体识别,在约 28×10^3 处均有一条识别条带,与其理论蛋白分子量相符;而分别注射 12 个 *Eg*AQPs 基因和 RNA free water 的卵母细胞,Western blot 结果显示 12 个基因的理论分子量在对应条带附近无条带显示。AQP3 基因的总蛋白和胞质蛋白在约 20×10^3 处出现一条条带,AQP9-1 基因的总蛋白和胞膜蛋白在约 25×10^3 和 28×10^3 处各有 2 条条带,AQP4-1 基因的总蛋白、胞质蛋白和胞膜蛋白在约 28×10^3 处各有一条条带,AQP4-2 基因的总蛋白和胞质蛋白在约 28×10^3 和 32×10^3 处各有 2 条条带,AQP4-4 基因的总蛋白和胞质蛋白在约 28×10^3 处各有一条条带,AQP4-5 基因的总蛋白和胞膜蛋白在约 22×10^3 处各有一条条带(图 7)。

3 讨论

棘球蚴囊壁生发层细胞可产生原头蚴,中间宿主体内的棘球蚴意外破裂会导致原头蚴形成次生棘球蚴。此外,原头蚴体外培养时具有双向发育特征,在胆汁酸盐刺激调控下会向成虫方向发育,无胆汁酸盐刺激时则会形成次生棘球蚴[17]。在有关棘球蚴的分子生物学及药物试验研究中,通常采用的方法是以原头蚴体外培养或接种实验动物获取次生棘球蚴[18-19]。本实验将从羊肝分离出来的细粒棘球绦虫原头蚴体外成功培养为棘球蚴,随着培养时间的延长,棘球蚴囊泡体积不断增大,体内棘球蚴液也不断增多。

棘球蚴囊液形成原因至今未知,但我们推测与细粒棘球蚴体内 AQPs 基因有关。水通道蛋白是一类跨膜通道蛋白家族[20-21],在人、细菌、病毒、动植物体内均发现 AQPs[22-23]。经典的 AQPs 具有 6 个 α 螺旋跨膜



A、B:Western blot 检测带 Flag 标签的 EgAQPs 与 RnAQP1 蛋白在非洲爪蟾卵母细胞膜上的表达;C、D:Western blot 检测带 HA 标签的 EgAQPs 与 RnAQP1 蛋白在非洲爪蟾卵母细胞膜上的表达

图 7 Western blot 检测 EgAQPs 在非洲爪蟾卵母细胞膜上表达

结构域和 2 个高度保守的 NPA(Asn-Pro-Ala)基序,NPA 基序位于通道中心的狭窄部位,与水或其他小分子的选择性通过有关[11,24]。课题组前期通过生物信息学分析了 *Eg*AQPs 基因在棘球蚴体内分布状态,*Eg*AQP 和 *Eg*AQPAn. G 定位于膜结合囊泡,*Eg*AQP-FA-CHIP 和 *Eg*AQP3 定位于膜结合内质网,*Eg*AQP9-1 定位于膜结合高尔基复合体,其余 7 种 *Eg*AQPs 蛋白定位于细胞膜。进化树分析将 *Eg*AQPs 划分为两大分支,其中 *Eg*AQP9-1、*Eg*AQP9-2、*Eg*AQP3 均属于水-甘油通道蛋白,其余 9 种 *Eg*AQPs 蛋白属于水通道蛋白。

为了解原头蚴在囊化形成次生棘球蚴过程中 *Eg*AQPs 基因转录变化状态与囊液形成之间的关系,本研究利用 RT-qPCR 方法检测细粒棘球蚴在不同培养时期 12 个基因的相对转录表达水平。无论体外还是体内检测 *Eg*AQPs 相对转录表达水平,相对转录表达值都并不高,但 0 d 的原头蚴转录表达水平与原头蚴 RNA-Seq 转录组分析的表达量结果是一致的[25],从而说明 *Eg*AQPs 在棘球蚴体内的表达状态是可信的。

非洲爪蟾卵母细胞具有细胞体积较大易于操作、质膜内源性转运系统数量少、外源 mRNA 表达量高且质膜水渗透性低等特点。因此,非洲爪蟾卵母细胞被认为是研究 AQPs 的理想异源表达系统[26]。多种寄生虫水通道蛋白经证实在非洲爪蟾卵母细胞中具有通透水及一些小分子的功能,例如日本血吸虫 AQP 能够渗透水、甘油和尿素[27];刚地弓形虫 AQP 对水的渗透性较野生型增加了 8 倍[28]。

本研究涉及基因较多,耗时费力,因此验证 *Eg*AQPs 功能的实验分成 2 批完成。第 1 批为 *Eg*AQP、*Eg*AQ-PAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP1、*Eg*AQP4-3 和 *Eg*AQP9-2 6 个基因,设计引物带有 Flag 标签,Flag 标签蛋白通常不会影响目的蛋白的生物活性,也不会干扰目的蛋白的正常折叠[29];第 2 批为 *Eg*AQP3、*Eg*AQP4-1、*Eg*AQP4-2、*Eg*AQP4-4、*Eg*AQP4-5 和 *Eg*AQP9-1,在方法上略有改进,设计引物时选用 HA 标签。HA 融合蛋白是一种小肽,由 9 个氨基酸组成(YPYDVPDYA),来源于流感病毒的红细胞凝集素表面抗原决定簇。它对外源目的蛋白空间结构影响较小,容易构建成标签蛋白融合到 N 端或者 C 端[30]。其中,*Eg*AQPAn. G、*Eg*AQPFA-CHIP、*Eg*AQP4-2、*Eg*AQP4-3、*Eg*AQP4-5、*Eg*AQP9-2 这 6 个基因 PCR 无法扩增出来,为了验证细粒棘球蚴体内所有 AQPs 透水功能,选择化学合成这 6 个基因。把 12 个 *Eg*AQPs 基因注射入非洲爪蟾卵母细胞中,结果在卵母细胞中均未表现出透水功能。Western blot 检测这 12 个 AQPs 基因在非洲爪蟾卵母细胞膜上表达,条带显示与预测的理论分子量大小不符或者未表达。AQP3、AQP4-2 和 AQP4-4 基因仅表达了总蛋白和胞质蛋白,表明这 3 个基因没有整合到卵母细胞胞膜上;AQP9-1 基因的总蛋白和胞膜蛋白在约 25×10^3 和 28×10^3 处各出现 2 条条带,AQP4-1 基因的总蛋白、胞质蛋白和胞膜蛋白在约 28×10^3 处各出现一条条带,AQP4-5 基因的总蛋白和胞膜蛋白在约 22×10^3 处各出现一条条带,虽然能在膜上表达,但是与其理论分子量并不相符,可能因为卵母细胞是异源表达系统,在翻译过程中蛋白质不能正确地进行剪切、折叠或化学修饰等。王芬[11]的前期实验中 AQP3 与 AQP4-4 基因携带 Flag 标签,本研究中的 AQP3 与 AQP4-4 基因携带 HA 标签,但是所得结果一致,在非洲爪蟾卵母细胞进行异源表达时均未见透水功能。

分析 *Eg*AQPs 在卵母细胞膜上不能正常表达的原因,发现 12 个 *Eg*AQPs 基因含有多个疏水性区域,虽然均具有 MIP 超家族特征性结构域,但 AQPs 的 NPA 基序并不保守,都已发生缺失或改变[11]。这种 NPA 基序的改变可能会影响 AQP 对水的渗透性[31]。有报道显示,果蝇大脑组织水通道蛋白第 2 个 NPA 基序的改变使其丧失了转运水的能力[32]。另外,在 AHMADPOUR 等[33]的综述中提到了 AQPs 跨膜转运水的能力会受到微生物生存环境的影响,可能在进化过程中会逐渐适应生活环境而发生改变。棘球蚴囊内积累的棘球蚴液具有滋养囊壁生发层细胞的功能[5]。这也可能是棘球蚴 AQPs 不同于其他寄生虫的原因之一。

12 个 *Eg*AQPs 基因是研究人员通过生物信息学分析得到的细粒棘球绦虫基因组数据,可能某些 AQPs 在棘球蚴生长过程中的特定阶段发挥通透水作用,比如在成虫阶段而不是在幼虫阶段发挥作用。实际上,随着时间延长棘球蚴体积越来越大,棘球蚴液也在增加。棘球蚴液增加的部分原因可能是棘球蚴囊壁生发细胞产水量增加,棘球蚴囊壁的生发层细胞营养代谢会产生水,比如有氧代谢三羧酸循环[34-35]。从以上实验结果发现,体内外培养的棘球蚴 AQPs 基因转录表达水平呈现极低水平表达,*Eg*AQPs 在卵母细胞中的功能验证似乎表现为“失能”。如果有更多的 *Eg*AQPs 表达实验在其他表达系统来证实本研究结果,就可能表明棘球蚴的 AQPs 基因没有表现出渗透水的功能,正好可阻止棘球蚴包囊内的水流出,致使囊液逐渐增加。因此,下一步将选取新的表达系统来验证 *Eg*AQPs 基因的功能,进一步说明 *Eg*AQPs 基因与棘球蚴液积累的关系。

参考文献:

[1] ALAM-ELDIN Y H, BADAWY A F. Destructive effect of gamma irradiation on *Echinococcus granulosus* metacestodes [J]. Parasitol Res, 2015, 114(8): 3145-3150. DOI: 10.1007/s00436-015-4533-9.

[2] XIN Q, YUAN M M, LI H P, *et al*. *In vitro* and *in vivo* effects of 3-bromopyruvate against *Echinococcus* metacestodes [J]. Vet Res, 2019, 50(1): 96. DOI: 10.1186/s13567-019-0710-7.

[3] ZHANG W B, ZHANG Z Z, WU W P, *et al*. Epidemiology and control of echinococcosis in central Asia, with particular reference to the People's Republic of China[J]. Acta Trop, 2015, 141: 235-243. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.03.014.

[4] 伍卫平,王虎,王谦,等.2012-2016年中国棘球蚴病抽样调查分析[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(1):1-14.
WU W P, WANG H, WANG Q, *et al*. A nationwide sampling survey on echinococcosis in China during 2012-2016 [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2018, 36(1): 1-14.

[5] 王慧. 棘球蚴囊液蛋白质组学及主要分泌蛋白对宿主免疫调节的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2015.
WANG H. Proteomic analysis of hydatid cyst fiuid and effect of mainly secreted protein on host immune regulation[D]. Urumchi: Xinjiang Medical University, 2015.

[6] ABASCAL F, IRISARRI I, ZARDOYA R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(5): 1468-1481. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.12.001.

[7] FARLORA R, VALENZUELA-MUNOZ V, CHAVEZ-MARDONES J, *et al*. Aquaporin family genes exhibit developmentally-regulated and host-dependent transcription patterns in the sea louse Caligus rogercresseyi[J]. Gene, 2016, 585(1): 119-127. DOI: 10.1016/j.gene.2016.03.035.

[8] MA G X, JIANG A Y, LUO Y F, *et al*. Aquaporin 1 is located on the intestinal basolateral membrane in *Toxocara canis* and might play a role in drug uptake[J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 243. DOI: 10.1186/s13071-019-3500-1.

[9] NI Z X, CUI J M, ZHANG N Z, *et al*. Structural and evolutionary divergence of aquaporins in parasites[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(6): 3943-3948. DOI: 10.3892/mmr.2017.6505.

[10] WANG F, YE B. Bioinformatics analysis and construction of phylogenetic tree of aquaporins from *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitol Res, 2016, 115(9): 3499-3511. DOI: 10.1007/s00436-016-5114-2.

[11] 王芬. 细粒棘球绦虫棘球蚴的水通道蛋白基因研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2018.
WANG F. Studies on aquaporins genes of hydatid of *Echinococcus granulosus*[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2018.

[12] 吴宏烨,李锴,王芬,等.原头蚴体外形成棘球蚴的优化培养体系研究[J].第三军医大学学报, 2019,41(5):415-423. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808123.
WU H Y, LI K, WANG F, *et al*. Study on the culture systems for transformations of hydatid cysts from protoscoleces *in vitro* [J]. J Third Mil Med Univ, 2019,41(5):415-423. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808123.

[13] 王芬, 刘许诺, 吴宏烨, 等. 原头蚴成囊过程中内参基因的确定及水通道候选基因的转录表达[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(17): 1533-1541. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201803049.
WANG F, LIU X N, WU H Y, *et al*. Identification of optimal reference genes during development of hydatid cysts from protoscoleces and transcriptional expression of candidate aquaporins[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(17): 1533-1541. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201803049.

[14] 吴宏烨. 细粒棘球绦虫的6种水通道蛋白基因研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2019.
WU H Y. Study on six aquaporins genes of *Echinococcus granulosus*[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2019.

[15] ZHOU S Y, HU W, DENG X M, *et al*. Overexpression of the wheat aquaporin gene, *Ta*AQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco[J]. PLoS ONE, 2012, 7(12): e52439. DOI: 10.1371/journal.pone.0052439.

[16] MONTALVETTI A, ROHLOFF P, DOCAMPO R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*[J]. J Biol Chem, 2004,279(37):38673-38682. DOI:10.1074/jbc.M406304200.

[17] 郭刚, 张文宝. 胆汁酸盐对细粒棘球绦虫分化和发育的调控[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2018, 39(2): 129-131. DOI: 10.13452/j.cnki.jqmc.2018.02.012.
GUO G, ZHANG W B. Regulation of bile salts on differentiation and development of *Echinococcus granulosus*[J]. Chin High Altitude Med Biol, 2018, 39(2): 129-131. DOI: 10.13452/j.cnki.jqmc.2018.02.012.

[18] WANG H, LI J, GUO B P, *et al*. *In vitro* culture of *Echinococcus multilocularis* producing protoscoleces and mouse infection with the cultured vesicles[J]. Filaria J, 2016, 9(1): 411. DOI: 10.1186/s13071-016-1687-y.

[19] MORTEZAEI S, AFGAR A, MOHAMMADI M A, *et al*. The effect of albendazole sulfoxide on the expression of miR-61 and let-7 in different *in vitro* developmental stages of *Echinococcus granulosus*[J]. Acta Trop, 2019, 195: 97-102. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.04.031.

[20] PEREZ DI GIORGIO J, SOTO G, ALLEVA K, *et al*. Prediction of aquaporin function by integrating evolutionary and functional analyses[J]. J Membr Biol, 2014, 247(2): 107-125. DOI:10.1007/s00232-013-9618-8.

[21] SONG J, MAK E, WU B H, *et al*. Parasite aquaporins: current developments in drug facilitation and resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(5): 1566-1573. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.10.014.

[22] MURATA K, MITSUOKA K, HIRAI T, *et al*. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1[J]. Nature, 2000, 407(6804): 599-605. DOI: 10.1038/35036519.

[23] GOMES D, AGASSE A, THIÉBAUD P, *et al*. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2009,1788(6): 1213-1228. DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.03.009.

[24] VERKMAN A S, MITRA A K. Structure and function of aquaporin water channels[J]. Am J Physiol Ren Physiol, 2000, 278(1): F13-F28. DOI: 10.1152/ajprenal.2000.278.1.F13.

[25] 范俊杰, 吴宏烨, 李锴, 等. 细粒棘球绦虫原头蚴水通道蛋白编码基因的转录组分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(11): 1187-1192, 1197. DOI: 10.13350/j.cjpb.181103.
FAN J J, WU H Y, LI K, *et al*. Characterization of the transcriptome of aquaporin-encoding genes in the protoscoleces of *Echinococcus granulosus*[J]. J Pathogen Biol, 2018,13(11): 1187-1192,1197. DOI: 10.13350/j.cjpb.181103.

[26] PIKE S, MATTHES M S, MCSTEEN P, *et al*. Using *Xenopus laevis* oocytes to functionally characterize plant transporters[J]. Curr Protoc Plant Biol, 2019, 4(1): e20087. DOI:10.1002/cppb.20087.

[27] HUANG Y Z, LI W, LU W G, *et al*. Cloning and *in vitro* characterization of a *Schistosoma japonicum* aquaglyceroporin that functions in osmoregulation[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35030. DOI:10.1038/srep35030.

[28] PAVLOVIC-DJURANOVIC S, SCHULTZ J E, BEITZ E. A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins[J]. FEBS Lett, 2003, 555(3): 500-504. DOI:10.1016/s0014-5793(03)01313-9.

[29] 邹珊珊, 王萍, 魏威, 等. 携带 GFP 和 FLAG 标签的真核表达载体介导细胞珠蛋白在细胞内表达的定位研究[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(4): 456-460, 548.
ZOU S S, WANG P, WEI W, *et al*. The difference of localization of GFP-tagged/FLAG-tagged eukaryotic expression vector of cytogiobin in the cells[J]. J Trop Med, 2014, 14(4): 456-460, 548.

[30] 孔佑宾, 王冰, 张华, 等. 植物蛋白融合 HA 标签通用载体构建与应用[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(6): 131-137.
KONG Y B, WANG B, ZHANG H, *et al*. Construction and amplification of protein fusion HA tag universal expression vector in plant[J]. J Agric Sci Technol, 2017, 19(6): 131-137.

[31] HEDFALK K,PETTERSSON N,OBERG F,*et al*. Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin[J]. Protein Expr Purif, 2008, 59(1): 69-78. DOI: 10.1016/j.pep.2008.01.004.

[32] FINN R N, CERDÀ J. Evolution and functional diversity of aquaporins[J]. Biol Bull, 2015, 229(1): 6-23. DOI:10.1086/BBLv229n1p6.

[33] AHMADPOUR D, GEIJER C, TAMÁS M J, *et al*. Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(5):1482-1491. DOI:10.1016/j.bbagen.2013.09.027.

[34] ZHENG H J, ZHANG W B, ZHANG L, *et al*. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*[J]. Nat Genet, 2013, 45(10): 1168-1175. DOI: 10.1038/ng.2757.

[35] WANG N, ZHU H, ZHAN J F, *et al*. Cloning, expression, characterization, and immunological properties of citrate synthase from *Echinococcus granulosus*[J]. Parasitol Res, 2019, 118(6): 1811-1820. DOI: 10.1007/s00436-019-06334-6.

(**收稿**:2020-06-22;**修回**:2020-08-11)
(编辑 张 维)