中图分类号:R932;R285.5　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2024)11－0042－07
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.11.010

去氢骆驼蓬碱治疗细粒棘球蚴病的作用机制研究*

林玉霞[1],巩月红[2,3],赵一聪[1],潘美驰[1],王建华[2,3△]

(1. 新疆医科大学药学院,新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院,新疆 乌鲁木齐 830054; 3. 新疆医科大学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 830000)

摘要:目的 应用网络药理学方法预测去氢骆驼蓬碱(HM)治疗细粒棘球蚴病的作用机制。**方法** 从中药系统药理学数据库(TCMSP)、瑞士靶点预测数据库(SwissTargetPrediction)、药物银行数据库(Drugbank)获取HM相关基因,在基因卡数据库(GeneCards)、DISGENET数据库、DrugBank数据库获取细粒棘球蚴病的作用靶点,将HM的预测靶点和细粒棘球蚴病相关基因相互映射,得到HM作用细粒棘球蚴病的靶点基因,导入String数据库进行网络拓扑属性分析,筛选重要靶点蛋白,构建蛋白质－蛋白质互作(PPI)和成分－疾病－靶点网络。采用DAVID数据库进行基因本体论(GO)功能分析和Kyoto京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,筛选与DNA损伤相关的基因靶点。采用Autodock Vina软件及Pymol软件对相关靶点进行分子对接验证和展示。将活力不低于98%的细粒棘球蚴随机分为空白对照组、1% DMSO组、25 μmol/L HM组、50 μmol/L HM组、100 μmol/L HM组,采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT－PCR)法、免疫印迹(Western blot)法体外验证HM干预细粒棘球蚴肿瘤蛋白P53(TP53)、拓扑异构酶Ⅰ(TopoⅠ)、染色体组蛋白H2A的变异体(H2AX)、共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)mRNA和蛋白表达水平。**结果** 共获得HM靶点105个,细粒棘球蚴病相关基因88个,二者共有靶点为2个。HM干预细粒棘球蚴病的作用靶点主要有促分裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、MAPK1、TP53、热休克蛋白90α家族A类成员1(HSPAA1)、MAPK14、Jun,机制可能涉及MAPK信号通路、受体酪氨酸激酶(ERBB)信号通路、DNA损伤与DNA修复通路、细胞凋亡等过程。体外验证结果显示,与空白对照组相比,25 μmol/L HM组、50 μmol/L HM组、100 μmol/L HM组的TP53,TopoⅠmRNA和蛋白表达均呈下调趋势($P<0.05$),H2AX,ATM mRNA和蛋白表达均呈上调趋势($P<0.05$)。**结论** HM可通过多种生物学过程和相关信号途径治疗细粒棘球蚴病,HM参与细粒棘球蚴病DNA损伤与DNA修复信号通路的调控作用,TP53,TopoⅠ,H2AX,ATM均可能是其作用靶点。该研究为进一步阐明HM治疗细粒棘球蚴病的分子机制奠定了基础。

关键词:去氢骆驼蓬碱;细粒棘球蚴病;DNA损伤与DNA修复;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应法;网络药理学;作用机制

Mechanism of Dehydrocamptothecin in the Treatment of Echinococcosis Granulosa

LIN Yuxia[1], *GONG Yuehong*[2,3], *ZHAO Yicong*[1], *PAN Meichi*[1], *WANG Jianhua*[2,3]

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830011; 2. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830054; 3. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830000)

Abstract: Objective To predict and analyze the mechanism of dehydrocamptothecin (HM) in the treatment of echinococcosis granulosa (EG) based on the network pharmacology method. **Methods** HM－related genes were obtained from the Traditional

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金[2020D01C240,2021D01D15]。

第一作者:林玉霞,女,硕士研究生在读,研究方向为抗包虫病机制,(电子信箱)1356947550@qq.com。

△通信作者:王建华,女,博士,主任药师,研究方向为抗包虫病机制与临床药学,(电子信箱)jhw716@163.com。

Br J Clin Pharmacol, 2022, 88(1): 271－281.

[29] RIMAWI BH, JOHNSON E, RAJAKUMAR A, et al. Pharmacokinetics and Placental Transfer of Elvitegravir, Dolutegravir, and Other Antiretrovirals during Pregnancy[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(6): e02213－16.

[30] RASOOL MF, ALI S, KHALID S, et al. Development and evaluation of physiologically based pharmacokinetic drug－disease models for predicting captopril pharmacokinetics in chronic diseases[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8589.

[31] HANKE N, FRECHEN S, MOJ D, et al. PBPK Models for CYP3A4 and P－gp DDI Prediction: A Modeling Network of Rifampicin, Itraconazole, Clarithromycin, Midazolam, Alfentanil, and Digoxin[J]. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2018, 7(10): 647－659.

[32] GAJEWSKA M, BLUMENSTEIN L, KOURENTAS A, et al. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Oral Absorption, pH, and Food Effect in Healthy Volunteers to Drive Alpelisib Formulation Selection[J]. AAPS J, 2020, 22(6): 134.

[33] CHOW EC, TALATTOF A, TSAKALOZOU E, et al. Using Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling to Evaluate the Impact of Pharmaceutical Excipients on Oral Drug Absorption: Sensitivity Analyses[J]. AAPS J, 2016, 18(6): 1500－1511.

(收稿日期:2023－08－17;修回日期:2024－01－12)

Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), SwissTargetPrediction, and Drugbank databases. The target genes of EG were obtained from GeneCards, DISGENET database, and Drugbank databases. The predicted targets of HM and genes related to EG were mapped to obtain the target genes of HM acting on EG. The network topology attribute analysis was performed by importing them into the String database to screening important target proteins to construct protein - protein interaction (PPI) network and component - disease - target network. DAVID database was used for gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis to screen gene targets related to DNA damage. Autodock Vina and Pymol softwares were used to validate and display molecular docking of relevant targets. *Echinococcus granulosus* with activity not less than 98% was randomly divided into the blank control group, 1% DMSO group, 25 μmol / L HM group, 50 μmol / L HM group, and 100 μmol / L HM group through *in vitro* experiments. Quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (qRT - PCR) method and Western blot method were selected to verify the intervention effect of HM on the expression levels of TP53, Topo Ⅰ, H2AX, and ATM mRNA and proteins. **Results** A total of 105 targets of HM and 88 genes related to EG were obtained, with two intersecting targets. The main targets of HM acting on EG were MAPK3, MAPK1, TP53, HSPAA1, MAPK14, Jun, and the mechanism might involve MAPK signaling pathway, ERBB signaling pathway, DNA damage pathway and DNA repair pathway, cell apoptosis, and other processes. *In vitro* validation method showed that compared with those in the blank control group, the expression levels of TP53 and Topo Ⅰ mRNA and proteins showed a downward trend, while the expression levels of H2AX and ATM mRNA and proteins showed an upward trend in the 25 μmol / L HM group, 50 μmol / L HM group, and 100 μmol / L HM group ($P < 0.05$). **Conclusion** HM can treat EG through various biological processes and related signaling pathways. HM is involved in the regulation of DNA damage pathway and DNA repair signaling pathway in the treatment of EG, and TP53, Topo Ⅰ, H2AX, and ATM may be the targets. This study lays a foundation for further elucidating the molecular mechanism of HM in the treatment of EG.

Key words: dehydrocamptothecin; echinococcosis granulosa; DNA damage and DNA repair; qRT - PCR; network pharmacology; mechanism

囊型包虫病是由细粒棘球蚴 *Echinococcus granulosus* 引起的人畜共患寄生虫病[1]。我国至少有 23 个省(直辖市、自治区)存在人感染囊型包虫病病例,其病死率为 2%～4%[2]。目前,包虫病主要治疗方法有手术治疗和药物治疗。但手术治疗的并发症和复发率较高,世界卫生组织(WHO)推荐的治疗药物为阿苯达唑[3]。临床研究发现,此药易发生耐药和不良反应,长期使用存在药物毒性,故寻找新的药物及作用靶点十分必要。去氢骆驼蓬碱(HM)是从蒺藜科植物骆驼蓬种子中提取获得的主要成分之一,属三环β-咔啉类生物碱,具有抗菌、抗疟原虫、抗氧化、抗诱变、细胞毒性和致幻特性[4]。本课题组的前期研究证实,HM 及其衍生物具有良好的抗囊型包虫病作用,是一种具有开发潜力的抗包虫药物。文献[5]报道,HM 通过激活内源性凋亡途径和抑制 DNA 拓扑异构酶Ⅰ活性,而诱导草地贪夜蛾 Sf9 细胞凋亡。网络药理学融合了系统生物学、生物信息学、网络分析等学科理念,与中药多成分、多靶点协同发挥药效的原理相适应。运用此方法初探复方、单味中药或单体化合物治疗疾病的机理,可为后续研究提供重要参考。本研究中选取 HM 治疗细粒棘球蚴病潜在的作用靶点,构建药物-疾病-靶点网络和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,进行基因本体论(GO)功能分析和 Kyoto 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析及网络关键分子的分子对接,并通过实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)法、免疫印迹(Western blot)法检测不同剂量 HM 干预细粒棘球蚴后,DNA 损伤修复通路中关键蛋白细粒棘球蚴肿瘤蛋白 P53(TP53)、拓扑异构酶Ⅰ(Topo Ⅰ)、染色体组蛋白 H2A 的变异体(H2AX)、共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)的 mRNA 及蛋白表达水平,分析 DNA 损伤修复因子在囊型包虫病中潜在的代谢-改变效应,为 HM 抗囊型包虫病拓展新靶点的研究奠定基础。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

仪器:Z30 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Sorvall Legene Micro 型微量离心机,Heraeus Fresco17 型离心机,Varioskan Flash 型酶标仪,均购自美国 Thermo Scientific 公司;JXFSTPRP-24 型研磨仪(上海净信科技有限公司);BSA124S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为 0.1 mg);YM-080S 型超声仪(深圳市方奥微电子有限公司,功率为 100 W,频率为 40 kHz)。

试药:青链霉素溶液(货号为 SV30010),RPMI 1640 培养基(货号为 22400097),均购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号为 SH30255.FS);二甲基亚砜(DMSO,货号为 0231-100),蛋白酶抑制剂苯甲磺酰氟(PMSF,批号为 HR0303),cDNA 逆转录试剂盒(货号为 RR036A),qRT-PCR 试剂盒(货号为 RR014A),

均购自日本TaKaRa公司；Topo Ⅰ抗体（批号为120705－1－AP），ATM抗体（批号为27156－1－AP），TP53抗体（批号为60283－2－Ig），H2AX抗体（批号为10856－1－AP），均购自武汉三鹰公司；HM（摩尔质量为212.25 g/mol）由新疆医科大学第一附属医院药研室提供。

1.2 细粒棘球蚴收集与培养

从新疆乌鲁木齐华凌屠宰场购买自然感染细粒棘球蚴的绵羊肝脏，无菌采集细粒棘球蚴，于倒置荧光显微镜下观察活力。收集活力不低于98%的细粒棘球蚴，置37 ℃、5%CO_2恒温培养箱中培养。培养基为RPMI 1640－胎牛血清－青链霉素培养基（89∶10∶1，*m*/*m*/*m*）。

1.3 HM与细粒棘球蚴病的网络药理学分析

HM有效成分筛选及作用靶点获取：通过中药系统药理学数据库（TCMSP，http：//lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php），瑞士靶点预测数据库（SwissTargetPrediction，http：//www.swisstargetprediction.ch/），药物银行数据库（Drugbank，https：//www.drugbank.ca/）对HM的作用靶点进行预测，根据概率大于0进行靶点筛选。通过Uniprot数据库（https：//www.uniprot.org/）将靶点名字转换为统一的基因名，限定物种为人。合并上述平台检索到的活性成分靶点，删去重复靶点，将最终获得的靶点蛋白信息经Uniprot数据库进行标准化，得到活性成分对应关键靶点的基因信号。

疾病靶点获取与筛选：通过DISGENET（http：//www.disgenet.org/）、DrugBank（https：//go.drugbank.com/）、基因卡（GeneCards，https：//www.genecards.org/）等数据库，以“Echinococcosis”为关键词，检索基因和疾病的相关靶点，合并靶点后删去重复项，采用维恩平台将药物预测的靶点与疾病靶点进行映射，获得HM治疗幼粒棘球蚴病的潜在作用靶点。

药物－靶点－疾病网络构建：合并靶点后删去重复项，采用维恩平台将药物预测的靶点与疾病靶点进行映射，获得HM治疗细粒棘球蚴病的潜在作用靶点，将其导入String数据库（https：//cn.string－db.org/），限定物种为人，以蛋白互作综合得分（interaction score）≥0.4为筛选条件，构建PPI网络，利用Cytoscape 3.8.0软件进行蛋白网络结构可视化分析，构建药物－靶点－疾病网络，筛选出排名前20的核心靶点。

GO功能及KEGG通路富集分析：将HM治疗细粒棘球蚴病的潜在靶点上传至Metascape平台（https：//metascape.org/gp/index.html），设定$P<0.01$，采用DAVID数据库（https：//david.ncifcrf.gov/）进行GO功能分析及KEGG通路富集分析，使用在线生物信息学分析可视化云平台，将GO功能分析结果以柱状图输出，将通路富集分析结果以KEGG气泡图输出。GO功能分析主要包括生物过程（BP）、细胞组分（CC）和分子功能（MF）三大类，分别选择三者中校正*P*值最小的前10个条目进行展示。

药物化合物及靶点基因分子对接分析：将药物－靶点－疾病网络度值排名前10的靶点，结合PPI网络、KEGG通路富集分析筛选出来的DNA损伤通路及上下游靶点进行分子对接。从TCMSP数据库下载上述有效成分的MOL2格式文件，从PDB数据库（https：//www.rcsb.org/）中获得核心蛋白的3D结构，使用AutoDock Vina软件进行分子对接，运用Pymol软件对结合能最低的模型进行可视化分析。

1.4 体外实验验证

分组与HM体外给药：将活力不低于98%的细粒棘球蚴随机分为空白对照组、1% DMSO组、25 μmol/L HM组、50 μmol/L HM组、100 μmol/L HM组，平行3份。将细粒棘球蚴加入24孔培养板中，密度为2 000头/孔，加入培养基连续干预5 d，每2 d更换1次培养基并复加药。

qRT－PCR法检测TP53，Topo Ⅰ，H2AX，ATM mRNA表达水平：取0，25，50，100 μmol/L HM干预后的细粒棘球蚴，加入Trizol提取总RNA，采用逆转录试剂盒将总RNA逆转录成cDNA，使用SYBR Premix ExTaq™ Ⅱ试剂盒进行qRT－PCR试验。反应体系：cDNA模板1.0 μL，上、下游引物（5.0 μmol/L）各0.4 μL，Taq酶5 μL，活性氧（ROS）荧光标记0.2 μL，ddH_2O补足体积至10.0 μL。反应条件：起始在95 ℃下变性30 s，扩增40个周期，在95 ℃下变性5 s，退火30 s，读取荧光数据。以β－肌动蛋白（β－action）为内参基因，重复测量3次。采用$2^{-\Delta\Delta C_t}$法确定mRNA的表达水平。药物干预组目的基因表达水平/空白对照组表达水平不低于2倍，认为该基因表达增高；不超过0.5倍，认为基因表达降低。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

Wertern blot法检测TP53，Topo Ⅰ，H2AX，ATM蛋白表达水平：取药物干预后的细粒棘球蚴，处理完成后加基础培养液冲洗3次，提取蛋白，定量，上样，进行十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS－PAGE），转膜，脱脂牛奶封闭膜1 h，将TP53，Topo Ⅰ，H2AX，ATM，甘油醛－3－磷酸脱氢酶（GAPDH）等一抗稀释液（1∶1 000）与膜混匀后在4 ℃孵育过夜，将二抗稀释液（1∶2 000）与膜混匀后在室温孵育1 h。膜与化学发光试剂混合后，曝光显影并拍照，经Image J软件量化灰度值，计算待测蛋白与内参蛋白GAPDH的比值，即得该蛋白的相对表达水平。

2 结果

2.1 网络药理学分析与预测结果

相关基因获取及PPI、药物－疾病－靶点网络构建：经多个数据库检索及预测，删除重复靶点，共获得105个HM靶点，88个细粒棘球蚴病相关基因，两者取交集，得HM治疗细粒棘球蚴病的潜在作用靶点（图1）。

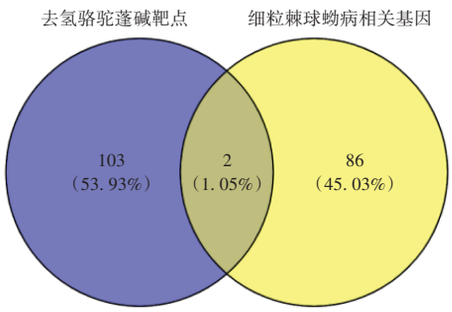


图 1　去氢骆驼蓬碱靶点－细粒棘球蚴病靶点维恩图

Fig. 1　Venn diagram of dehydrocamptothecin target－EG target

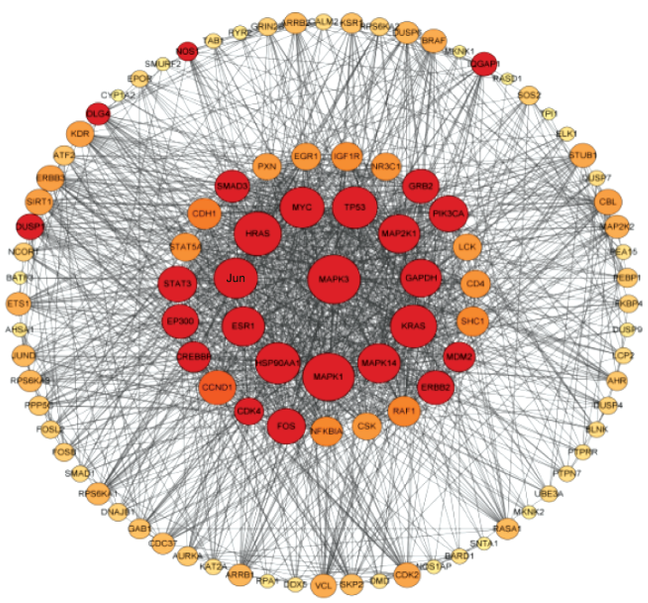


图 2　去氢骆驼蓬碱治疗细粒棘球蚴病的 PPI 网络

Fig. 2　PPI network of dehydrocamptothecin in the treatment of EG

将 Venny 分析获得共有靶点输入 String 数据库，限定物种为人，隐藏游离点，构建 HM 治疗细粒棘球蚴病的 PPI 网络，红色代表相关性，颜色越深表明相关性越强，最终得到核心基因分别为促分裂原活化蛋白激酶 3（MAPK3）、MAPK1、TP53、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1（HSPAA1）、MAPK14、Jun。详见图 2。药物－疾病－靶点网络见图 3。

GO 功能和 KEGG 通路富集分析：采用 Metascape 平台对 PPI 网络分析度值排名前 10 的靶点进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。GO 功能分析排名前 10 的柱状图见图 4，KEGG 通路富集分析排名前 10 的气泡图见图 5。可见，去氢骆驼蓬碱干预细粒棘球蚴病的作用机制可能涉及 MAPK 信号通路、受体酪氨酸激酶（ERBB）信号通路、DNA 损伤与 DNA 修复通路、细胞凋亡等过程。

分子对接验证：采用 AutoDock Vina 软件对 TP53，Topo Ⅰ，H2AX，ATM 与去氢骆驼蓬碱进行分子对接，获得结合能；对接结果运用 Pymol 软件进行可视化分析，

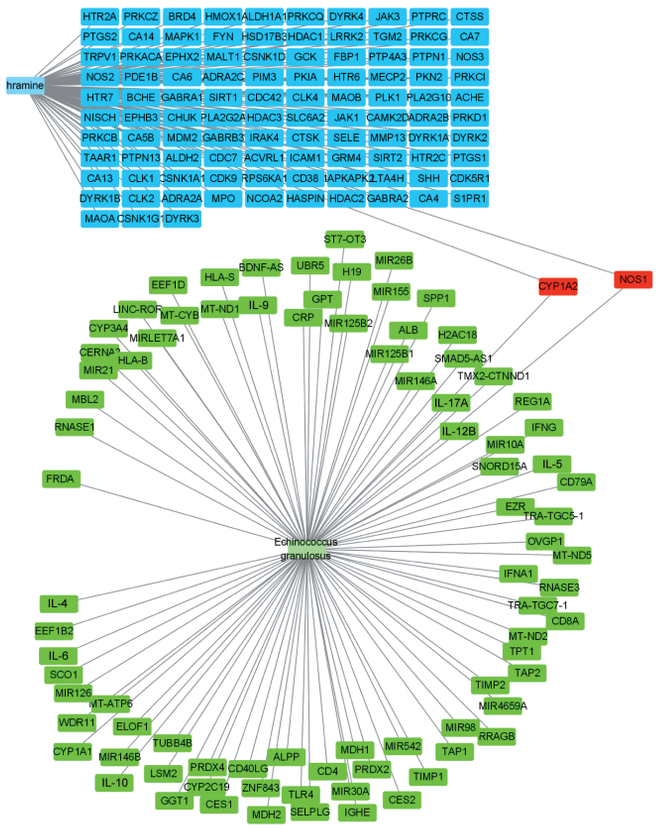


图 3　去氢骆驼蓬碱治疗细粒棘球蚴病的成分－疾病－靶点网络

Fig. 3　Component－disease－target network of dehydrocamptothecin in the treatment of EG

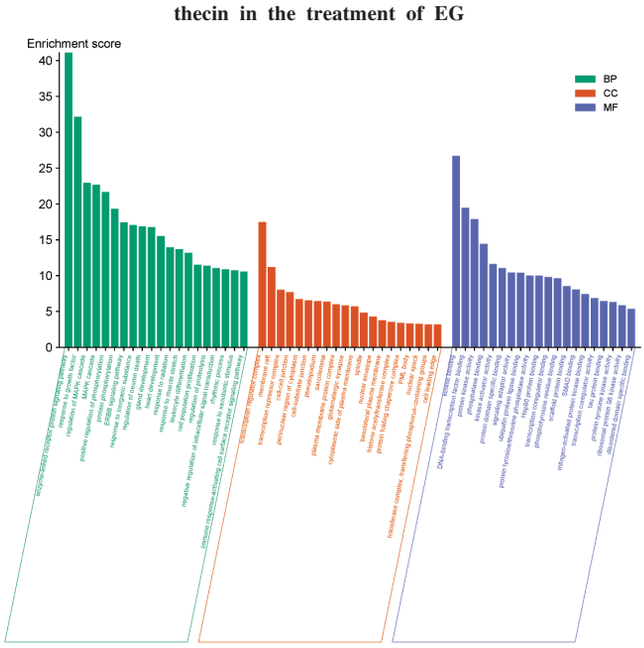


图 4　去氢骆驼蓬碱治疗细粒棘球蚴病核心靶点的 GO 功能分析柱状图

Fig. 4　Histogram of GO function analysis of core targets of dehydrocamptothecin in the treatment of EG

结果见图 6。Score 值小于 0 时，表明配体、受体具有强烈的结合活性。HM 与 TP53，Topo Ⅰ，H2AX，ATM 的结合

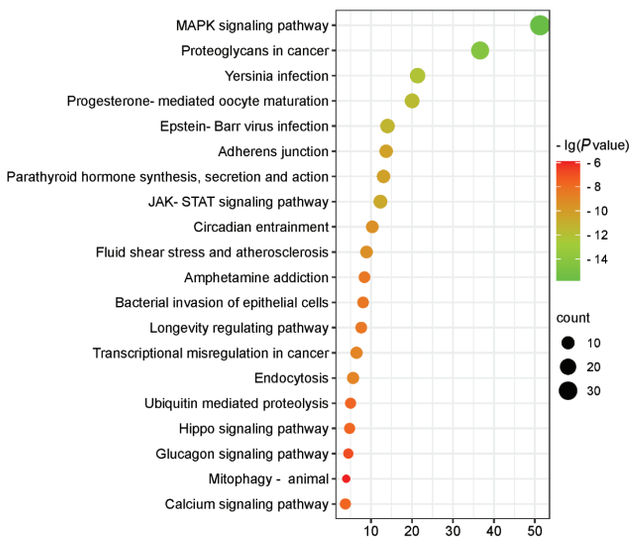
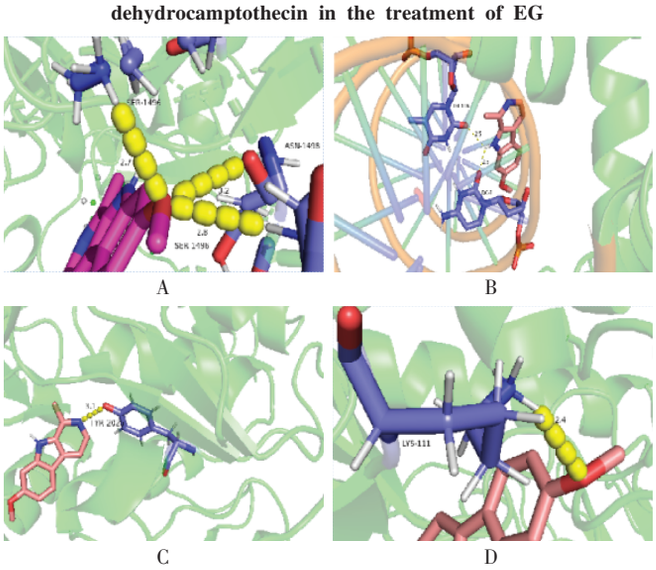


图 5　去氢骆驼蓬碱治疗细粒棘球蚴病核心靶点的 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 5　Bar graph of KEGG pathway analysis of core targets of dehydrocamptothecin in the treatment of EG



A. TP53 与 HM　B.　Topo Ⅰ与 HM　C. H2AX 与 HM　D. ATM 与 HM

图 6　TP53，Topo Ⅰ，H2AX，ATM 与 HM 的分子对接位点图

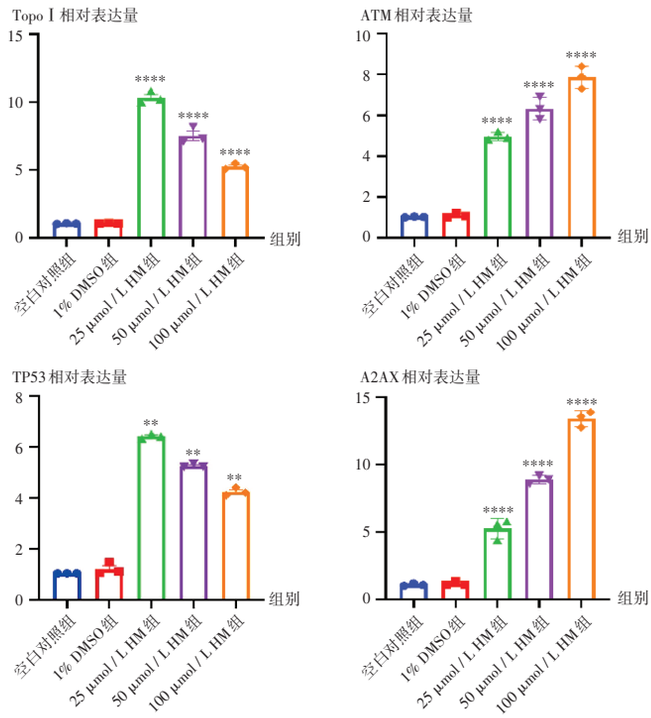
A. TP53 and HM　B. Topo Ⅰ and HM　C. H2AX and HM　D. ATM and HM

Fig. 6　Molecular docking sites of TP53, Topo Ⅰ, H2AX, ATM and HM

能分别为 - 4. 44，- 6. 17，- 4. 80，- 5. 03 kcal / mol，推测其都可能成为 HM 治疗细粒棘球蚴病的靶点。

2. 2　qRT - PCR 法检测结果

与空白对照组比较，25 μmol / L HM 组、50 μmol / L HM 组、100 μmol / L HM 组的 TP53 和 Topo Ⅰ mRNA 表达均显著下调（$P < 0.01$），H2AX 和 ATM mRNA 表达均显著上调（$P < 0.01$）；随着 HM 浓度的增加，TP53 和 Topo Ⅰ mRNA 的表达均呈下调趋势，H2AX 和 ATM mRNA 的表达均呈上调趋势。详见图 7。



注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.000\ 1$。图 8 同。

图 7　去氢骆驼蓬碱对细粒棘球蚴 TP53，Topo Ⅰ，H2AX，ATM mRNA 表达水平的影响（$n = 3$）

Note: Compared with those in the blank control group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ (for Fig. 7 - 8).

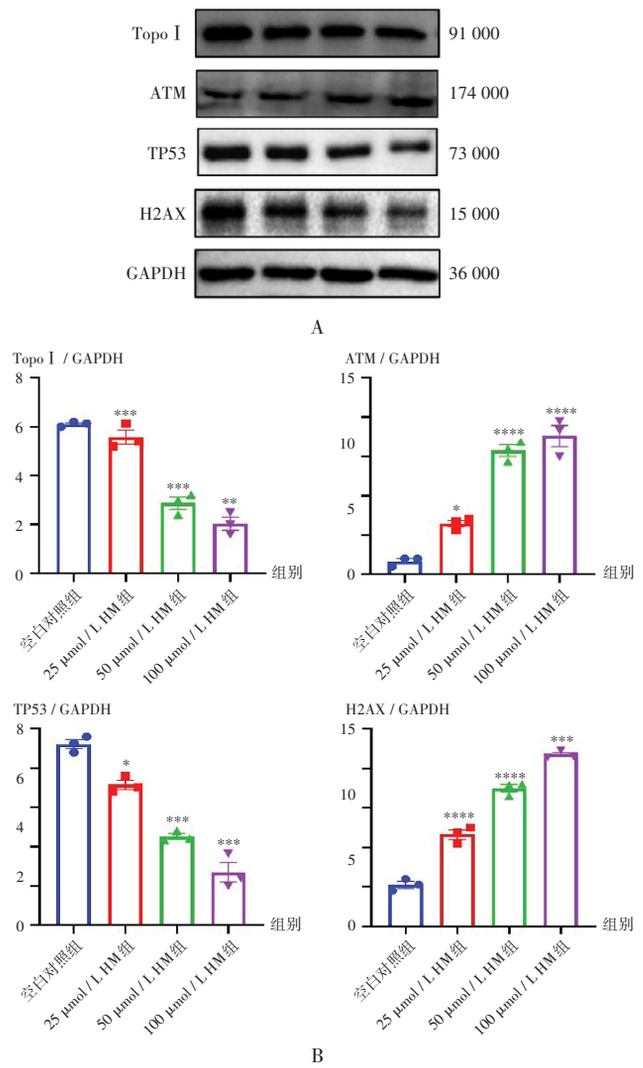
Fig. 7　Effect of dehydrocamptothecin on the expression levels of TP53, Topo Ⅰ, H2AX, and ATM mRNA of *Echinococcus granulosus* ($n = 3$)

2. 3　Western blot 法检测结果

与空白对照组比较，25 μmol / L HM 组、50 μmol / L HM 组、100 μmol / L HM 组的 Topo Ⅰ 和 TP53 蛋白表达均显著下调（$P < 0.05$），ATM 和 H2AX 蛋白表达均显著上调（$P < 0.05$）；随着 HM 浓度的增加，Topo Ⅰ 和 TP53 蛋白表达均呈下调趋势，ATM 和 H2AX 蛋白表达均呈上调趋势。详见图 8。

3　讨论

天然药物成分 HM 具有抗菌、抗疟原虫等作用，但存在作用靶点不明确、作用机制不清晰、神经毒性机制不明确等问题[6]。因此，分析 HM 的抗包虫病作用机制，寻找作用靶点是提高 HM 药效的关键环节。DNA 损伤与 DNA 修复是抵御致癌物和内源性机制导致突变的重要防线，可使损伤的 DNA 结构恢复原样，重新执行原来的功能，维护基因组稳定及遗传信息完整性[7]。不同的损伤方式会激活不同的修复类型[8]。本研究中基于网络药理学相关理论发现，HM 在治疗细粒棘球蚴病时可调控 MAPK14，HSP90AA1，TP53 等靶点基因的表达。KEGG 通路富集分



A. 凝胶电泳图　B. Topo Ⅰ, ATM, TP53, H2AX蛋白表达水平柱状图

图 8　去氢骆驼蓬碱对细粒棘球蚴 Topo Ⅰ, ATM, TP53, H2AX 蛋白表达水平的影响(n = 3)

A. Gel electrophoregram　B. Bar chart of the expre ssion levels of Topo Ⅰ, ATM, TP53, and H2AX proteins

Fig. 8　Effect of dehydrocamptothecin on the expression levels of Topo Ⅰ, ATM, TP53, and H2AX proteins of *Echinococcus granulosus* (n = 3)

析及GO功能分析筛选出MAPK信号通路、ERBB信号通路、DNA损伤与DNA修复通路、细胞凋亡等过程。

TP53是细胞生长、增殖和损伤修复的重要调节因子[9]，TP53蛋白阻止细胞停止于G_1 / S期，从而修复损伤，如不能修复，则促进细胞凋亡[10]。Topo Ⅰ, H2AX, ATM是TP53下游的基因，在DNA损伤通路中扮演重要角色[11-12]，提示TP53通过该通路对细粒棘球蚴病产生影响。HM干预后，随着HM浓度的增加，细粒棘球蚴的TP53, Topo Ⅰ mRNA和蛋白表达均呈下调趋势。TP53是一种肿瘤抑制基因，可维持基因组稳定，修复DNA损伤[13]。当细胞受到DNA损伤时，TP53通常会被激活，促使细胞进入修复模式或引导受损细胞凋亡。因此，TP53的下调表明了DNA损伤应答能力的减弱，有助于细粒棘球蚴病的治疗[14]。Topo Ⅰ在DNA拓扑结构的调控中扮演关键角色，参与DNA链的解旋和重合，而DNA链的损伤可能引发DNA损伤应答[15]，抑制Topo Ⅰ的功能可能导致DNA损伤。Topo Ⅰ的下调可能增加了细粒棘球蚴的DNA脆弱性。HM干预后，TP53和Topo Ⅰ的活性受到抑制，降低DNA修复蛋白的可用性，减慢或阻碍DNA损伤的修复[16]，这可能导致DNA受损位点的积累，细粒棘球蚴基因组的不稳定性增加，增加了基因突变的风险，影响生存和繁殖。HM干预后，随着HM浓度的增加，细粒棘球蚴的H2AX, ATM mRNA和蛋白表达均呈上调趋势。H2AX是组蛋白，在DNA受到损伤时发挥重要作用。当DNA受到双链断裂等严重损伤时，H2AX蛋白通常会被磷酸化，形成γ-H2AX，作为DNA损伤应答的一部分[17]。γ-H2AX的形成有助于吸引DNA修复蛋白到受损的DNA区域，启动DNA修复过程。H2AX的上调提示细粒棘球蚴受到了DNA损伤，HM可能通过促进DNA损伤的修复以对抗感染。ATM是蛋白激酶，在细胞应对DNA损伤时发挥关键作用。ATM激活后，会引发一系列信号传导事件，促使DNA修复通路的启动，维护基因组的完整性[18]。ATM的上调表明了DNA损伤通路的激活，有助于细粒棘球蚴应对DNA损伤，并可能有助于治疗。研究结果进一步验证了TP53, Topo Ⅰ, H2AX, ATM可能是细粒棘球蚴病的作用靶点，上述基因在DNA损伤通路中发挥关键作用，包括信号检测、信号传递和修复DNA损伤。HM通过改变基因的表达，可能干扰了细粒棘球蚴的DNA损伤能力，阻碍生存和增殖。

综上所述，TP53和Topo Ⅰ表达下调及H2AX和ATM表达上调会破坏细粒棘球蚴的DNA损伤通路，严重影响DNA的修复能力，导致损伤在细粒棘球蚴中积累，导致虫体死亡。本研究结果强调了HM对细粒棘球蚴病的DNA损伤通路的影响，验证了TP53, Topo Ⅰ, H2AX, ATM可能为细粒棘球蚴病的作用靶点，这不仅有助于更深入地理解HM在寄生虫治疗中的机制，还为寄生虫感染的治疗提供了新的研究方向。下一步将致力揭示HM与细粒棘球蚴病间的相互作用，为开发更有效的治疗方法提供参考。

参考文献

[1] 特列克·库拉别克，力拜尔·木拉提，赛木斯尔·瓦克力，等. 新疆阿勒泰部分地区羊棘球蚴病(包虫病)流行情况调查[J]. 中国动物检疫，2023，40(4)：25-29.

[2] 艾麦提·牙森，温　浩. 免疫学在包虫病研究中的应用[J]. 新疆医科大学学报，2020，43(6)：830-836.