

DOI:10.13350/j.cjpb.221209

• 论著 •

# 旋毛虫原肌球蛋白的特性分析及原核表达\*

朱莹莹,王灏轩,郭文平,谢广成,杜雯英\*\*

(承德医学院基础医学院,河北承德 067000)

**【摘要】** 目的 分析旋毛虫(*Trichinella spiralis*)的原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)特性并制备重组旋毛虫 TM 蛋白。方法 在 NCBI 的 Nucleotide 数据库选取旋毛虫 TM (GenBank: AF419300.1), 利用在线分析工具分析旋毛虫 TM 的氨基酸组成、二级/三级结构、疏水性等特性。密码子优化后合成旋毛虫 TM (GenBank: AF419300.1) 的全长并插入到原核表达载体 pET-28a(+), 构建重组原核表达质粒 pET-28a(+)-TM, 转化至 BL21(DE3) 中, 以终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导旋毛虫 TM 的表达, 纯化后采用 Western blot 法对重组旋毛虫 TM 蛋白进行鉴定。结果 旋毛虫 TM 为亲水性不稳定蛋白, 二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主, 无复杂的空间结构。构建的重组原核质粒 pET-28a(+)-TM 经双酶切得到 867 bp 的基因片段, 序列测定后证实重组原核质粒 pET-28a(+)-TM 构建正确。经 IPTG 诱导的菌体超声混悬液、离心后上清均检测到相对分子质量约  $40 \times 10^3$  的目的蛋白, 纯化后得到条带单一的旋毛虫 TM。Western blot 显示纯化的重组旋毛虫 TM 具有良好的反应原性, 能被相应抗体识别。结论 获得具有反应原性的纯化的重组旋毛虫 TM, 该蛋白为亲水性不稳定蛋白, 无复杂空间结构, 为进一步研究旋毛虫 TM 蛋白的生物学功能奠定了基础。

**【关键词】** 旋毛虫; 原肌球蛋白; 原核表达; 生物信息学分析

**【中图分类号】** R383.15

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)12-1410-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Dec;17(12):1410-1414,1419.]

## Characteristics analysis and prokaryotic expression of tropomyosin of *Trichinella spiralis*

ZHU Ying-ying, WANG Hao-xuan, GUO Wen-ping, XIE Guang-cheng, DU Luan-ying (School of Basic Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei, China) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To analyze the characteristics of Tropomyosin (TM) protein and obtain recombinant TM protein of *Trichinella spiralis*. **Methods** The TM gene sequence of *T. spiralis* (GenBank: AF419300.1) was selected from the NCBI Nucleotide database, the physicochemical properties of deduced TM protein were analyzed by ExPASyProtParam. The secondary structure of deduced TM protein was predicted by SOPMA, and its 3D homology model was analyzed by Swissmodel. The hydrophilicity of TM protein was analyzed by ProtScale. The phosphorylation sites of TM protein were predicted by NetPhos3.1 Server software, and the conserved domain of TM protein was identified by the NCBI CDD database. The complete ORF of *T. spiralis* TM gene was synthesized and cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a(+) with a His tag after codon optimization. The recombinant prokaryotic expression plasmid pET-28a(+)-TM was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cells. The transformants were selected on LB agar plates and then inoculated into 100 mL LB liquid medium containing kanamycin. The plasmid was extracted and identified by restriction enzyme digestion with *Bam*H I and *Xho* I restriction enzymes (completed by Beijing Tianyi Hui Yuan Biological Co., LTD.). The corrected recombinant prokaryotic plasmid pET-28a(+)-TM was transformed into BL21(DE3). The expression of *T. spiralis* TM was induced by IPTG with the final concentration of 0.5 mM/L. The recombinant protein was purified using a BeyoGoldTM His-tag Purification Resin and analyzed by Western blot using anti-His-tag monoclonal antibody and mouse antiserum against *Trichinella spiralis* as the primary antibody. **Results** The secondary structure analysis of *T. spiralis* TM protein showed that 279 amino acids (98.24%) were involved in the formation of  $\alpha$  helix and 5 amino acids formed irregular curls (1.76%). The tertiary structure prediction showed that the rod-like structure consisted of two identical  $\alpha$  helix chains winding round each other. Glutamic acid was the most abundant amino acid in *T. spiralis* TM protein, accounting for 22.2% (63/284). The theoretical isoelectric point of *T. spiralis* TM protein was 4.64. It was predicted that *T. spiralis* TM protein was an unstable hydrophilic protein, and the instability coefficient was 44.44. The protein has 33 potential phosphorylation sites, including 12 phosphorylated serine sites, 12 phosphorylated threonine

\* **【基金项目】** 河北省科技厅“技术创新引导专项-科技工作会商”项目(No. KY202002);河北省高校重点学科项目(冀教高[2013]4号);国家自然科学基金培育基金项目(No. 202005)。

\*\* **【通讯作者】** 杜雯英, E-mail: luanyingd@126.com

**【作者简介】** 朱莹莹(1996-),女,河南驻马店人,硕士研究生。研究方向:寄生虫分子免疫。E-mail: zhuyingyinghy@163.com

sites, and 9 phosphorylated tyrosine sites. According to the CDD database, TM protein has one conserved domain, which belongs to the TM superfamily. The recombinant prokaryotic plasmid pET-28a(+)-TM was double-digested to obtain the 867bp gene fragment, and the sequence analysis confirmed that the recombinant prokaryotic plasmid pET-28a(+)-TM was correctly constructed. Gel staining showed that the target protein with a molecular weight of about 40 ku was detected in the lane with the bacterial lysate and the lane with the induced protein supernatant. A single band of the *T. spiralis* TM protein was obtained after purification. Western blot results showed that the purified recombinant *T. spiralis* TM protein present good immunoreactivity and could be specifically recognized by anti-His-tag monoclonal antibody as well as mouse antiserum against *Trichinella spiralis*. **Conclusion** The TM protein is a hydrophilic and unstable protein without complex spatial structure. The purified recombinant *T. spiralis* TM protein with good immunoreactivity was obtained, and our results provide a foundation for further studies on the biological function of *T. spiralis* TM protein.

**【Key words】** *Trichinella spiralis*; Tropomyosin; Prokaryotic expression; Bioinformatics analysis

旋毛虫(*Trichinella spiralis*)是一种重要的食源性人兽共患寄生虫,近年来有研究表明旋毛虫感染可增加宿主对肿瘤的抵抗力<sup>[1-2]</sup>。用旋毛虫菌株或其培养上清等相关组分处理荷瘤小鼠能抑制骨髓瘤<sup>[3]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[4]</sup>、人结直肠癌<sup>[5]</sup>和肝癌<sup>[6-7]</sup>细胞的生存。旋毛虫感染小鼠也能抑制肿瘤细胞的增殖,对R1白血病细胞、同基因E1-4肿瘤细胞和异基因P815肿瘤细胞具有较强的细胞毒作用<sup>[8]</sup>。但旋毛虫抗肿瘤作用的具体机制尚不完全清楚。

原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)是一个细胞骨架蛋白家族,结合并稳定肌动蛋白微丝,是由两条相同的 $\alpha$ -螺旋链互相缠绕组成的杆状结构。罗婧梅等<sup>[9]</sup>对旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白(excrete secreted proteins, ESPs)进行的质谱分析显示旋毛虫TM蛋白显著富集。本实验通过检测和分析旋毛虫TM的特性并进行重组蛋白的原核表达鉴定,为进一步研究旋毛虫TM潜在的生物学功能奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 菌株、血清** 大肠埃希菌的感受态DH5 $\alpha$ 和BL21(DE3)购自北京天根有限公司;小鼠抗旋毛虫多抗血清由本实验室制备并保存。

**1.2 主要试剂** 预染蛋白分子质量标准购自美国ThermoScientific公司;BamH I和Xho I限制性内切酶购自日本Takara公司;氯化钠购自天津市大茂化学试剂厂;酵母粉、蛋白胨购自英国OXOID公司;His标签抗体购自北京全式金生物技术有限公司;His标签蛋白纯化试剂盒和HRP标记的羊抗鼠IgG购于上海碧云天生物有限公司;硫酸卡那霉素和IPTG均购自北京索莱宝科技有限公司。

### 2 方法

**2.1 旋毛虫TM基因的获取和生物信息学分析** 在NCBI的Nucleotide数据库查找获取旋毛虫TM基因序列(GenBank: AF419300.1),利用SOPMA([http://](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.htm)

[npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.htm](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.htm))预测旋毛虫TM蛋白质的二级结构。通过在线网站Swissmodel(interactive)分析TM的三维同源模型。利用在线网站ExpasyProtParam(<https://www.expasy.org/>)分析TM蛋白的理化性质。通过ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)分析TM蛋白质的亲水性。采用NetPhos3.1 Server(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)软件预测TM蛋白磷酸化位点,登陆NCBI的CDD数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)分析TM蛋白保守结构域。

**2.2 重组旋毛虫TM蛋白的原核表达** 重组原核质粒pET-28a(+)-TM由北京天一辉远生物有限公司以旋毛虫TM基因序列(GenBank: AF419300.1)为靶序列进行密码子优化后合成并构建。将重组原核质粒pET-28a(+)-TM转化至DH5 $\alpha$ 感受态,涂板于含卡那霉素的LB固体培养基,37℃培养12h,挑取单菌落接种在100ml含卡那霉素的LB液体培养基中,提取质粒,用BamH I和Xho I限制性内切酶进行酶切鉴定及序列测序(由北京天一辉远生物有限公司完成)。验证正确的重组原核质粒pET-28a(+)-TM转化至BL21(DE3),挑取单克隆菌落于含卡那霉素的LB液体培养基,37℃培养4~6h至A<sub>600</sub>值约为0.6时,加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L,22℃诱导表达12h,收集菌体,超声破碎后离心,分别取超声混悬液、离心后上清和沉淀制样,进行SDS-PAGE电泳鉴定。

**2.3 重组旋毛虫TM蛋白纯化** 取500 $\mu$ l混合均匀的BeyoGold<sup>TM</sup> His-tag Purification Resin,4℃离心(1000g $\times$ 10s),弃去储存液,向凝胶中加入2ml非变性裂解液混匀以平衡凝胶,4℃离心(1000g)10s,弃去液体,再重复平衡1~2次,弃去液体,加入约2ml细菌裂解液上清,4℃水平摇床上缓慢摇动60min,以充分结合。打开亲和层析顶部活塞,使液体流出。加入5ml非变性洗涤液重悬凝胶,使液体流出。重复上

步洗涤步骤,再次洗涤。加入 500 μl 非变性洗脱液,轻轻重悬凝胶,打开亲和层析顶部活塞,使液体流出,即为纯化的带有 His 标签的目的蛋白。重复步骤两次。

**2.4 重组旋毛虫 TM 蛋白的反应原性分析** 测定纯化的重组旋毛虫 TM 蛋白浓度,取 50 μl 并加入上样缓冲液,100 °C 煮沸 5 min 后上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,泳毕后 250 mA 转膜 45 min,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别以小鼠抗 His 标签抗体、小鼠抗旋毛虫多克隆抗体血清为一抗,以羊抗小鼠 IgG 为二抗进行 Western blot, PBST 漂洗后进行 ECL 化学发光显影。

## 结 果

### 1 旋毛虫 TM 蛋白特性

旋毛虫 TM 蛋白含量最多的氨基酸是谷氨酸,为 63 个(Glu, 占比 22.2%),其次是丙氨酸(Ala, 占比 11.6%)和亮氨酸(Leu, 占比 10.6%)。不含半胱氨酸(Cys)、脯氨酸(Pro)、色氨酸(Trp)、硒半胱氨酸(Sec)和吡咯赖氨酸(Pyl)。负电荷残基数 Asp 和 Glu 共 79 个,占 27.81%;正电荷残基数 Arg 和 Lys 共 50 个,占 17.6%(表 1)。

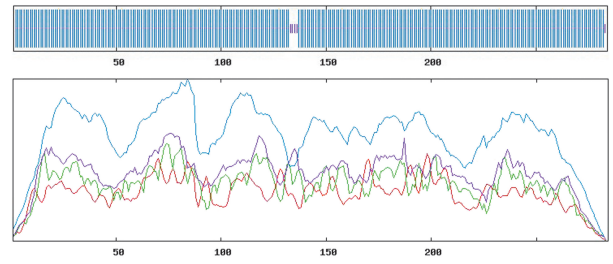
旋毛虫 TM 蛋白二级结构分析显示 279 个氨基酸参与 α 螺旋的形成(98.24%),5 个氨基酸参与无规则卷曲的形成(1.76%)(图 1)。选取相似度达 58.8% 的 1clg.2.A 蛋白 Alpha-链为模板构建 TM 蛋白三级结构,结果如图 2。三级结构为由两条相同的 α 螺旋链互相缠绕组成的杆状结构, TM 与 PDB 数据库中的 1clg.2.A 序列相似性为 69%,预测的可信度为 79%。

表 1 旋毛虫 TM 蛋白的氨基酸组成  
Table 1 Amino acid composition of *T. spiralis* TM

氨基酸种类 Amino acid species	个数 Number	含量(%) Content (%)	氨基酸种类 Amino acid species	个数 Number	含量(%) Content (%)
丙氨酸	33	11.6	亮氨酸	30	10.6
精氨酸	23	8.1	赖氨酸	27	9.5
天冬酰胺	8	2.8	甲硫氨酸	8	2.8
天冬氨酸	16	5.6	苯丙氨酸	3	1.1
谷氨酰胺	22	7.7	丝氨酸	9	3.2
谷氨酸	63	22.2	苏氨酸	7	2.5
甘氨酸	5	1.8	酪氨酸	5	1.8
组氨酸	1	0.4	缬氨酸	16	5.6
异亮氨酸	8	2.8			

旋毛虫 TM 蛋白理论等电点为 4.64,蛋白质不稳定系数为 44.44,为不稳定蛋白。预测旋毛虫 TM 蛋白为亲水性蛋白(图 3),具有 33 个潜在磷酸化位点,其中磷酸化丝氨酸位点 12 个,磷酸化苏氨酸位点 12 个,磷酸化酪氨酸位点 9 个(图 4)。经 NCBI 的 CDD

数据库分析, TM 蛋白有 1 个为 TM 的保守结构域,属于 TM 超家族(图 5)。



注:蓝色表示 α-螺旋,红色表示 β-折叠,绿色表示 β-转角,橙色和紫色表示无规则卷曲。

图 1 旋毛虫 TM 蛋白的二级结构

Notes: blue: α-helix, red: β-folding, green: β-turning, orange and purple: random crimp.

Fig. 1 Secondary structure of *T. spiralis* TM

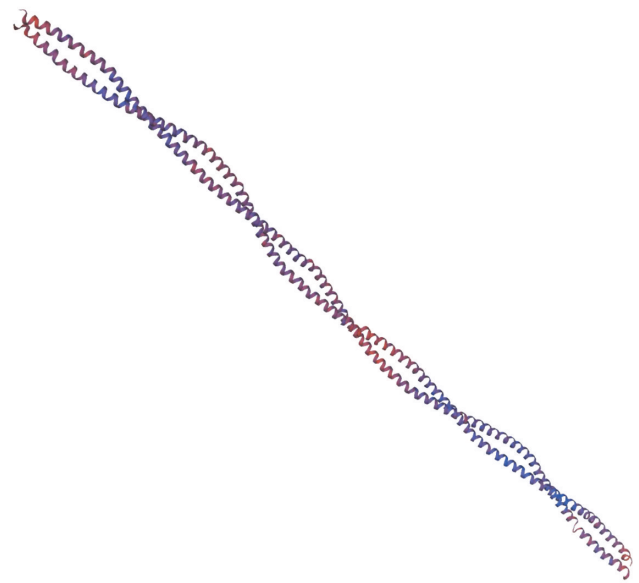


图 2 *T. spiralis* TM 蛋白的三级结构

Fig. 2 Three-dimensional structure of *T. spiralis* TM

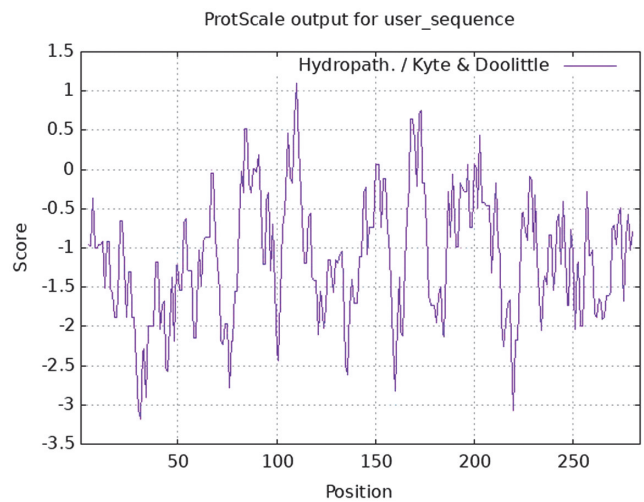


图 3 旋毛虫 TM 蛋白的疏水性预测

Fig. 3 Hydrophobicity prediction of *T. spiralis* TM

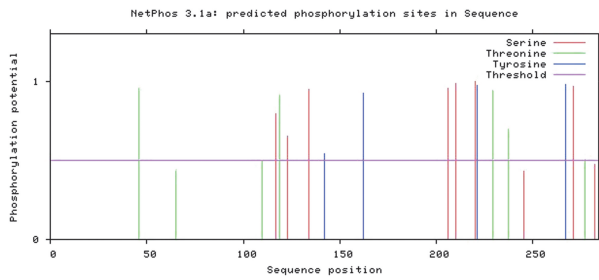


图4 旋毛虫 TM 蛋白的磷酸化位点预测

Fig. 4 Phosphorylation sites prediction of *T. spiralis* TM

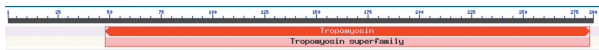
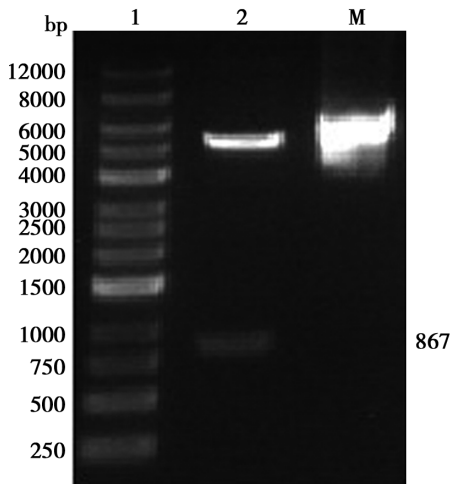


图5 旋毛虫 TM 蛋白的保守结构域

Fig. 5 Conserved domain of *T. spiralis* TM

## 2 重组旋毛虫 TM 蛋白的表达及纯化

为了获得重组旋毛虫 TM 蛋白,构建旋毛虫 TM 的重组原核表达质粒 pET-28a(+)-TM,经 BamH I 和 Xho I 双酶切后得到 867 bp 的酶切产物(图 6),结合测序验证确定重组原核表达质粒 pET-28a(+)-TM 构建正确。重组质粒转化菌经 IPTG 诱导后的全菌体超声裂解液和超声破碎上清液中均检出分子质量约 40 ku 的目的蛋白,经 His 标签介质纯化后得到目的蛋白条带唯一且浓度较高的重组旋毛虫 TM 蛋白(图 7)。



M DNA 标志物(DL12000 Plus) 1 重组 pET-28a(+)-TM 质粒双酶切 2 重组 pET-28a(+)-TM 质粒

图6 重组质粒 pET-28a(+)-TM 的酶切鉴定

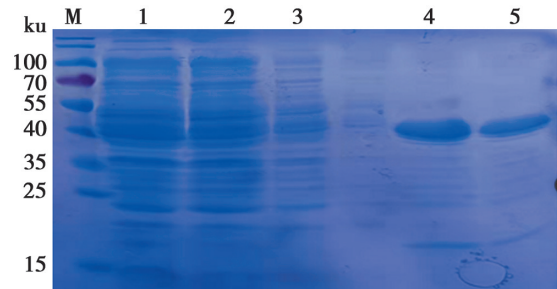
M DL12000 marker 1 Digestion products of recombinant pET-28a(+)-TM plasmid by double restriction enzymes 2 Recombinant pET-28a(+)-TM plasmid

Fig. 6 Identification of recombinant pET-28a(+)-TM plasmid

## 3 重组旋毛虫 TM 蛋白鉴定

Western blot 分析显示,重组旋毛虫 TM 蛋白能被 His 标签抗体和小鼠抗旋毛虫多抗血清识别,反应条带位于相对分子质量约  $40 \times 10^3$  处,表明制备的重

组旋毛虫 TM 蛋白具有的反应原性(图 8)。

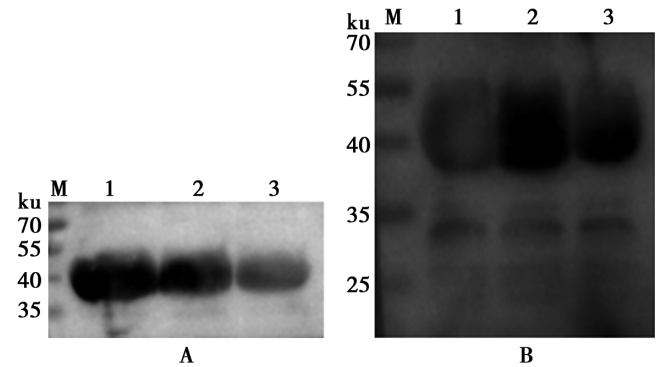


M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导后菌体超声破碎悬液 2 超声破碎上清 3 超声破碎沉淀 4,5 纯化的重组旋毛虫 TM 蛋白

图7 重组 *T. spiralis* TM 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M Standard protein ruler 1 Total ultrasonic suspension induced by IPTG 2 Supernatant of ultrasonic whole bacteria by centrifugation 3 Precipitation of ultrasonic whole bacteria by centrifugation 4,5 Purified recombinant *T. spiralis* TM protein

Fig. 7 Identification of recombinant *T. spiralis* TM protein



A 以 His 标签抗体为一抗的 Western blot M 蛋白分子质量标准 1~3 重组旋毛虫 TM 蛋白与相应抗体反应条带 B 以小鼠抗旋毛虫多抗血清为一抗的 Western blot M 蛋白分子质量标准 1~3 重组旋毛虫 TM 蛋白与相应抗体反应条带

图8 重组旋毛虫 TM 蛋白的 Western blot 鉴定

A M Standard protein ruler 1-3 Recombinant *T. spiralis* TM protein B M Standard protein ruler 1-3 Recombinant *T. spiralis* TM protein

Fig. 8 Identification of recombinant *T. spiralis* TM protein by Western blot

## 讨论

研究发现,旋毛虫虫体蛋白与排泄分泌蛋白有一定的抗肿瘤作用<sup>[10-11]</sup>,任保彦等<sup>[12]</sup>克隆并成功表达与乳腺癌细胞 MCF-7 相关的旋毛虫 TS498 基因,表达产物能够被兔抗旋毛虫肌幼虫阳性血清所识别。高江明等<sup>[13]</sup>克隆及表达与肺癌细胞 A549 抗原相关旋毛虫 Tsp06172 基因,表达的融合蛋白能被抗 A549 细胞的多克隆抗体识别。鹿香云等<sup>[14]</sup>表达了小鼠 Lewis 肺癌(LLC)细胞与旋毛虫相关抗原基因 sHSPs,其表达产物可被抗 LLC 细胞多抗血清识别。表明旋毛虫与多种肿瘤细胞具有相同抗原,具有抗肿瘤作用的潜在价值。

有学者以人体中的原肌球蛋白(TM)为对象,探讨了其与肿瘤的发生发展的关系<sup>[15-16]</sup>。有研究发现

TM 作为肿瘤抑制基因在多种癌症中下调,如 TM1 通过抑制 Ras 效应途径或其启动子的去甲基化可导致食管鳞状细胞癌细胞迁移减少<sup>[17]</sup>。在肾细胞癌中, 转染 TM1 后, 肾细胞癌 OSRC-2 和 786-O 细胞系的迁移和侵袭能力下降, 细胞凋亡增强<sup>[18]</sup>。Mahadev 等<sup>[19]</sup>报道 TM1 对乳腺癌转化表型具有抑制作用<sup>[19]</sup>。以上研究表明 TM1 可通过不同的信号通路和机制来抑制肿瘤的进展。此外, 宫鹏涛等<sup>[20]</sup>的研究发现旋毛虫与骨髓瘤细胞 SP2/0 之间的骨髓瘤相关抗原 TM 可能具有诱导交叉保护作用, 用制备的骨髓瘤相关抗原 TM 免疫小鼠, 抑瘤率 45.3%。另有报道在转化细胞和几种人类癌症中, TM 下调<sup>[21]</sup>。这些证据均表明原肌球蛋白与肿瘤的发生发展有密切联系。

肺癌是危害人体健康的重要疾病, 根据国家癌症中心最近估计, 我国每年新发肺癌病例约为 78.7 万例, 每年因肺癌死亡例数约为 63.1 万<sup>[22]</sup>, 其发病率高, 且治疗效果有限。实验表明旋毛虫排泄分泌蛋白<sup>[23-25]</sup>、虫体蛋白<sup>[26]</sup>可促进小细胞肺癌细胞 H446 凋亡, 旋毛虫排泄分泌产物可促进非小细胞肺癌细胞 A549 发生 S 期周期阻滞<sup>[27]</sup>。为进一步明确是哪些蛋白起主要作用, 利用质谱法分析了旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白(ESPs), 确定了其中抗肿瘤活性蛋白, 即原肌球蛋白, 本研究将原肌球蛋白进行了原核表达, Western blot 显示旋毛虫重组蛋白 TM 能被小鼠抗 His 标签抗体和小鼠抗旋毛虫多克隆抗体阳性血清所识别, 表明制备的重组蛋白具有反应原性。

生物信息学分析显示, 旋毛虫融合蛋白 TM 为亲水性不稳定蛋白。预测该蛋白有多个磷酸化位点, 说明其可能参与细胞间的信号转导。预测旋毛虫 TM 蛋白的二级结构,  $\alpha$  螺旋占 98.24%。 $\alpha$  螺旋在 DNA 结合基序(DNA binding motifs)中有非常重要的作用, DNA 结合基序为保守序列, 表明该蛋白较为保守。本研究为探讨旋毛虫 TM 蛋白的功能及其对肺癌的抑制作用机制奠定了基础。

【参考文献】

[1] Molinari JA, Ebersole JL. Antineoplastic effects of long term *Trichinella spiralis* infection on B16 melanoma[J]. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1977, 55(1-6): 444-448.  
[2] Molinari JA, Carrick L Jr, Lubiniecki AS, et al. Influence of *Trichinella spiralis* infection on development of sarcoma 180 ascites tumors[J]. Tropenmed Parasitol, 1979, 30(4): 429-433.  
[3] 吴涛, 张西臣, 李建华, 等. 旋毛虫抗小鼠体内 SP2/0 肿瘤作用的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18(6): 445-447.  
[4] 宫鹏涛, 张西臣, 李建华, 等. 旋毛虫抗小鼠体内 A549 肺癌细胞作用的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(3): 200-202.  
[5] 李霞, 张国才, 张西臣, 等. 旋毛虫对 BALB/c 小鼠体内人结肠癌 HCT-8 细胞的作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(4): 285-

287.  
[6] 张媛媛, 宫鹏涛, 张西臣, 等. 旋毛虫抗 C57BL/6 小鼠体内 Hepa1-6 肝癌细胞作用的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(1): 24-26.  
[7] Elhasawy FA, Ashour DS, Elsaka AM, et al. The apoptotic effect of *Trichinella spiralis* infection against experimentally induced hepatocellular carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev. 2021, 22(3): 935-946.  
[8] Poccock D, Meerovitch E. The anti-neoplastic effect of *Trichinella* in a syngeneic murine model[J]. Parasitology, 1982(84): 463-473.  
[9] 罗婧梅, 程露阳, 关晓东, 等. 质谱法分析旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白的组分[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016, 34(1): 53-57.  
[10] 王学林, 杨世杰, 吴秀萍, 等. 旋毛虫虫体蛋白对肝癌细胞 H7402 的抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007(5): 440-444.  
[11] 吴合亮, 李美辰, 潘靖丹, 等. 旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白对非小细胞肺癌 A549 增殖的影响[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(9): 1284-1285, 1294.  
[12] 任保彦, 左绍志, 高江明, 等. 与乳腺癌细胞 MCF-7 相关的旋毛虫 TS498 基因的克隆与表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(3): 300-303.  
[13] 高江明, 徐晓芳, 吕萌, 等. 肺癌细胞 A549 抗原相关旋毛虫 Tsp06172 基因的克隆及原核表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(3): 245-247.  
[14] 鹿香云, 张西臣, 李娜, 等. 小鼠 Lewis 肺癌细胞与旋毛虫相关抗原基因 sHSPs 的原核表达及鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(4): 409-412.  
[15] Helfman DM, Flynn P, Khan P, et al. Tropomyosin as a regulator of cancer cell transformation[J]. Adv Exp Med Biol, 2008(644): 124-131.  
[16] Zhu S, Si ML, Wu H, et al. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1)[J]. J Biol Chem, 2007, 282(19): 14328-14336.  
[17] Zare M, Jazii FR, Soheili ZS, et al. Downregulation of tropomyosin-1 in squamous cell carcinoma of esophagus, the role of Ras signaling and methylation[J]. Mol Carcinog, 2012, 51(10): 796-806.  
[18] Wang J, Guan J, Lu Z, et al. Clinical and tumor significance of tropomyosin-1 expression levels in renal cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 33(3): 1326-1334.  
[19] Mahadev K, Raval G, Bharadwaj S, et al. Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1[J]. Exp Cell Res, 2002, 279(1): 40-51.  
[20] Gong P, Zhang J, Cao L, et al. Identification and characterization of myeloma-associated antigens in *Trichinella spiralis*[J]. Exp Parasitol. 2011, 127(4): 784-8.  
[21] Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis[J]. Curr Opin Genet Dev 2001(11): 41-47.  
[22] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.

PCR法具有更高的敏感性,可用于人感染山羊无形体的早期检测与蜱携带该病原体的监测。

【参考文献】

[1] 吴东兴,李淑艳,包黎明,等. 蜱传人兽共患无形体科属病原体研究[J]. 畜禽业,2021,32(11):8-10.  
[2] Li H,Zheng YC, Ma L, et al. Human infection with a novel tick-borne Anaplasma species in China; a surveillance study[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(6):663-670.  
[3] Liu Z, Ma M, Wang Z, et al. Molecular survey and genetic identification of Anaplasma species in goats from central and southern China[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(2):464-470.  
[4] Sun XF, Zhao L, Wen HL, et al. Anaplasma species in China[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(11):1263-1264.  
[5] Zhao L, Li J, Cui X, et al. Distribution of *Haemaphysalis longicornis* and associated pathogens: analysis of pooled data from a China field survey and global published data[J]. Lancet Planet Health, 2020, 4(8):e320-9.  
[6] Chvosta M, pitalska E, Vaclav R, et al. Seasonal patterns in the prevalence and diversity of tick-borne *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, *Anaplasma phagocytophilum* and Rickettsia spp. in an Urban Temperate Forest in South Western Slovakia[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018, 15(5):994.  
[7] 刘梦莹,许士奇. 蜱传疾病实验检测方法研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(1):83-87.  
[8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):E63.  
[9] 刘旺,靳晶豪,陈孝仁. 环介导等温扩增技术的应用进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(2):128-135.  
[10] Moore KJM, Cahill J, Aidelberg G, et al. Loop-mediated isothermal amplification detection of SARS-CoV-2 and myriad other applications[J]. J Biomol Tech, 2021, 32(3):228-275.

[11] Yang J, Liu Z, Niu Q, et al. A novel genotype of "Anaplasma capra" in wildlife and its phylogenetic relationship with the human genotypes[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1):210.  
[12] Yang J, Han R, Niu Q, et al. Occurrence of four *Anaplasma* species with veterinary and public health significance in sheep, northwestern China[J]. Ticks Tick Borne Dis, 2018, 9(1):82-85.  
[13] 牛泽,张勇,尉超,任殿玉,刘丽霞,梁薇. 牛羊无形体病检测技术的研究进展[J]. 兽医导刊, 2019(21):78-79.  
[14] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? [J]. Cells, 2021, 10(8):1931.  
[15] Giglioti R, Bassetto CC, Okino CH, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Anaplasma marginale*[J]. Exp Appl Acarol, 2019, 77(1):65-72.  
[16] Pan L, Zhang L, Wang G, et al. Rapid, simple, and sensitive detection of *Anaplasma phagocytophilum* by loop-mediated isothermal amplification of the msp2 gene[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(12):4117-4120.  
[17] Wang J, Zhang Y, Cui Y, et al. A rapid, simple and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect *Anaplasma bovis* in sheep and goats samples[J]. Parasitol Int, 2018, 67(1):70-73.  
[18] Wang J, Zhang Y, Wang X, et al. A loop-mediated isothermal amplification assay targeting 16S rRNA gene for rapid detection of *Anaplasma phagocytophilum* infection in sheep and goats [J]. J Parasitol, 2017, 103(2):187-192.  
[19] Pan L, Zhang L, Wang G, et al. Rapid, simple, and sensitive detection of the ompB gene of spotted fever group rickettsiae by loop-mediated isothermal amplification [J]. BMC Infect Dis, 2012(12):254.

【收稿日期】 2022-08-12 【修回日期】 2022-11-05

(上接 1414 页)

[23] 常红敏,赵蕾,王小杰,等. 旋毛虫排泄分泌蛋白对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞凋亡的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(4):299-303.  
[24] 吴合亮,安子熙,邵薪诺,等. 热疗联合旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白对小细胞肺癌 H446 凋亡及 S 期阻滞的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(11):1250-1254, 1260.  
[25] Luo J, Yu L, Xie G, et al. Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by *Trichinella spiralis* muscle larvae ESPs[J]. Parasitology. 2017,

144(6):793-800.

[26] 于莉,苏萌,谢广成,等. 旋毛虫肌幼虫虫体蛋白对小细胞肺癌 H446 细胞凋亡的影响[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(2):124-128.  
[27] Wu H, Li M, Shao X, et al. *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory/secretory products trigger apoptosis and S-phase arrest of the non-small-cell lung cancer line A549[J]. Exp Parasitol, 2020(218):107983.

【收稿日期】 2022-07-12 【修回日期】 2022-10-07