

DOI:10.13350/j.cjpb.221106

• 论著 •

华支睾吸虫 CsLegumain 促胆管癌细胞迁移和侵袭的机制研究*

褚衍菲, 颜丙芳, 任乐彬, 薛钧予, 王楠, 孟玮**, 柏雪莲**

(滨州医学院附属医院医学研究中心, 山东滨州 256603)

【摘要】 目的 探讨华支睾吸虫 CsLegumain 在胆管癌细胞的增殖、侵袭和转移中的作用及其分子机制。方法 构建真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-CsLegumain 并转染胆管癌细胞, 建立 CsLegumain 过表达细胞株。通过 CCK8 试验、细胞划痕试验、Matrigel Transwell 试验分析 CsLegumain 在胆管癌细胞的增殖、侵袭和转移中的作用。通过实时荧光定量 PCR 及 Western blot 分别检测 CsLegumain 影响的靶分子转录水平和蛋白表达水平。结果 成功构建 CsLegumain 稳定表达细胞株。CCK8 试验显示, CsLegumain 对 RBE 细胞的增殖无显著影响(均 $P > 0.05$)。划痕实验中, 过表达 CsLegumain 的 RBE 细胞其运动能力与对照组细胞相比显著增强, 细胞间的距离明显变窄(均 $P < 0.05$)。Transwell 试验显示, 过表达 CsLegumain 的 RBE 细胞穿过基质小室的数量较对照组细胞数量多($P < 0.05$)。过表达 CsLegumain 组 RBE 细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 的转录水平及其蛋白表达水平均较对照组细胞显著降低(均 $P < 0.05$)。结论 CsLegumain 对胆管癌细胞的增殖无显著影响, 但具有促进胆管癌细胞迁移和侵袭能力, 可能的机制是通过调控 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达诱导 EMT 促进胆管癌细胞的迁移和侵袭。

【关键词】 华支睾吸虫; CsLegumain; 胆管癌; 迁移和侵袭

【中图分类号】 R383.22

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1268-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Nov. ;17(11):1268-1272, 1277.]

Research on the mechanism of *Clonorchis sinensis* CsLegumain promoting the migration and invasion of cholangiocarcinoma cells

CHU Yan-fei, YAN Bing-fang, REN Le-bin, XUE Jun-yu, WANG Nan, MENG Wei, BAI Xue-lian
(Medical Research Center, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, Shandong, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of *Clonorchis sinensis* CsLegumain in the proliferation, invasion and metastasis of cholangiocarcinoma and its molecular mechanism. **Methods** The plasmid pcDNA3.1(+)-CsLegumain was constructed and transfected into cholangiocarcinoma cells to establish a cell line with CsLegumain overexpression. The role of CsLegumain in the proliferation, invasion and metastasis of cholangiocarcinoma was investigated by CCK8 assay, scratch wound healing assay and matrigel transwell assay respectively. The transcription level and protein expression level of target molecules affected by CsLegumain were detected by real-time quantitative PCR and Western blotting, respectively. **Results** CsLegumain expression cell line was successfully constructed. The CCK8 assay showed that CsLegumain had no significant influence on the proliferation of RBE cells from 24 h to 72 h after culture ($P > 0.05$) however enhanced the cells motor ability and narrowed the distance between cells significantly which detected by scratch wound healing assay 48 h later ($P < 0.05$). Transwell experiments also showed that the number of RBE cells overexpressing CsLegumain passing through the stromal compartment was five times as many as the control group ($P < 0.05$). The transcriptional and protein level of E-cadherin and N-cadherin in CsLegumain expressing cells were significantly lower than those in control cells detected by qRT-PCR and western blotting ($P < 0.05$). **Conclusion** CsLegumain had no significant influence on the proliferation of RBE cells but promoted the migration and invasion ability of them through downregulating the expression of E-cadherin and N-cadherin which might induce EMT.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; CsLegumain; cholangiocarcinoma; migration and invasion; EMT

***华支睾吸虫又称肝吸虫, 主要分布于东南亚地区, 包括中国、越南、韩国和泰国等^[1-2], 在中国主要分布广东、广西和吉林省等地^[3]。华支睾吸虫病为我国目前重要的食源性寄生虫病之一^[4]。人和哺乳动物是华支睾吸虫的终宿主, 通过误食含有华支睾吸虫囊蚴

* **【基金项目】** 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2017WS884); 滨州医学院科研启动基金项目(No. BY2017KYQD12)。

** **【通讯作者】** 柏雪莲, E-mail: xuelianbai99@163.com;
孟 玮, bymengwei2008@126.com

【作者简介】 褚衍菲(1997-), 女, 山东德州人, 在读硕士。研究方向: 病原生物致病机制。E-mail: 3201193668@qq.com

的生的或未煮熟的淡水鱼而感染。囊蚴被食入后通过胃到达十二指肠,在消化液的作用下脱囊,逆胆汁方向快速迁移到肝胆管内并发育为成虫^[5]。华支睾吸虫虫体的机械刺激及虫体分泌排泄代谢产物(excretory secretory proteins,ESP)可引起胆管上皮细胞增生、管壁增厚、官腔狭窄等病理改变,导致胆管炎、胆囊炎、肝纤维化甚至胆管癌^[6]。2009年世界卫生组织国际癌症研究署(IARC)将肝吸虫列为I类致癌物^[7]。研究发现,其ESP与胆管癌的发生和发展密切相关。

Legumain 又称天冬酰胺内肽酶(Asparaginylendopeptidase, AEP),是半胱氨酸蛋白酶C13家族的一个新成员,结构保守,特异性水解天冬酰胺(Asn)的羧基端。Legumain是一种失活的酶原,在不同的pH阈值下,经过自催化激活,依次去除C-末端和N-末端的前肽酶,在免疫、炎症以及肿瘤的发生发展中发挥生物学作用^[8]。近年来,Legumain被发现在多种实体瘤组织中高表达,如结肠直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和胃癌等^[9-13],与肿瘤的生长和侵袭转移等行为高度相关,被认为是肿瘤预后因子和治疗的靶分子。研究发现,Legumain不仅可通过活化MMP-2降解细胞外基质促进肿瘤的侵袭与转移,还可通过增加G2/M期癌细胞的数量促进肿瘤的生长^[14-16]。此外,Legumain通过下调闭锁带蛋白ZO-1诱导内皮通透性和肿瘤转移^[17]。由此可见,Legumain在肿瘤的生长和侵袭转移中发挥重要作用。

华支睾吸虫 Legumain(CsLegumain)基因全长1299 bp,编码432个氨基酸残基,与人 Legumain 氨基酸序列有37.7%的相似性。Kang等^[18]研究发现CsLegumain可特异性酶切底物肽段Z-Ala-Ala-Asn-MCA中的Asn,具有天冬酰胺内肽酶活性,该酶以前体的形式合成,能够自我酶切,成为成熟活性酶。CsLegumain主要分布于华支睾吸虫肠上皮细胞内,能够被分泌到管腔中,最终作为ESP成分被释放入虫体周围的宿主胆管中^[19]。作为华支睾吸虫ESP的成分,CsLegumain是否与胆管癌的发生和发展有关尚不清楚。本研究通过在胆管癌细胞中过表达CsLegumain,探讨其在胆管癌发生和发展中的作用及其分子机制,为华支睾吸虫所致胆管癌的防治提供科学依据。

材料与方 法

1 材料

1.1 细胞及载体 人胆管癌细胞系RBE购自普诺赛生物有限公司;Lipofectamine R 2000购自美国Invitrogen公司;pcDNA3.1(+)-CsLegumain和pcDNA3.1(+)购自GenePharma公司。

1.2 主要试剂 PRMI-1640培养基购自美国HyClone公司;胰蛋白酶-EDTA购自索莱宝公司;胎牛血清FBS购自美国Gibco公司;Trizol购自上海Sangon Biotech公司;Matrigel购自美国Corning公司;反转录试剂盒,实时荧光定量PCR试剂盒,蛋白裂解液(RIPA),蛋白酶抑制剂PMSF,SDS-PAGE凝胶试剂盒,HRP标记的羊抗兔IgG二抗和超敏ECL发光液均购自山东SparkJade公司;GAPDH、E-cadherin、N-cadherin引物由上海生工公司合成;兔抗人单克隆抗体Anti-E Cadherin抗体(EP700Y)、Anti-N Cadherin抗体(EPR1791-4)和Anti-GAPDH抗体(EPR16891)购自美国Abcam公司。

2 方法

2.1 质粒的构建和细胞转染 由GenePharma公司构建稳定表达CsLegumain的真核质粒pcDNA3.1(+)-CsLegumain,过程如下:根据CsLegumain开放读码框架ORF设计引物,PCR扩增CsLegumain片段,PCR产物经Hind III和EcoR I双酶切后插入真核表达质粒pcDNA3.1(+),构建pcDNA3.1(+)-CsLegumain。将pcDNA3.1(+)-CsLegumain或pcDNA3.1(+)分别与Lipofectamine R 2000混合并转染RBE细胞(RBE细胞不表达Legumain),过程如下:在胆管癌RBE细胞中加入含有10%FBS的PRMI-1640的培养基,置37℃、5%CO₂培养箱中培养。待细胞长满培养瓶后加入胰蛋白酶-EDTA消化2 min,使贴壁细胞脱落,加入含有10%FBS的PRMI-1640培养基,终止消化并重悬细胞并进行计数。将细胞铺入六孔板,每孔铺入10⁵个细胞,等细胞密度为60%~70%后实验组加入质粒pcDNA3.1(+)-CsLegumain和Lipofectamine R 2000,对照组加入质粒pcDNA3.1(+)和Lipofectamine R 2000。每孔加入2 ml的无血清PRMI-1640培养基培养4 h,吸去转染液,再加入2 ml含10%FBS的PRMI-1640培养基培养48 h,收集细胞。

2.2 CCK8 试验 将上述两组细胞分别制成细胞悬液并计数,调整细胞浓度为10⁵个/mL。在96孔板中每孔加入100 μL的细胞悬液,设置0、24、48、72 h 4个时间点,每个时间点设3个复孔。分别在上述4个时间点于酶标仪450 nm处测各孔的吸光度(A)值。比较各组A值,分析CsLegumain对RBE细胞增殖的影响。

2.3 细胞划痕试验 将细胞铺入六孔板,每孔铺入3×10⁵个细胞。每孔加入2 mL含10%FBS的PRMI-1640培养基,置37℃、5%CO₂温箱中培养直至细胞长满。弃去培养液,用10 μL移液枪尖端将细胞划痕,用PBS清洗划掉的细胞,加入不含血清的PRMI-1640

培养基,在倒置显微镜下观察并记录 0h 的划痕面积,放入培养箱中培养 48 h 后,再次观察并记录划痕面积。比较两组细胞划痕面积的改变和细胞迁移率,分析 CsLegumain 对 RBE 细胞迁移的影响。

2.4 Matrigel Transwell 试验 收集实验组和对照组细胞,用不含血清的 PRMI-1640 培养 AA 液重悬,加入铺有基质胶 Matrigel 的 Transwell 的上层小室,下层小室中加入含有 20% FBS 的 PRMI-1640 培养液作为趋化引诱剂,培养 36 h。轻轻将上层小室中的细胞移除,将迁移到下层中的细胞用 4% 甲醛固定,结晶紫染色,PBS 清洗掉多余的染色液,显微镜下计数,计算各组中迁移的细胞数量。

2.5 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 E-cadherin、N-cadherin 的相对转录水平 用 trizol 提取每组细胞的总 RNA,以此为模板,以 oligo-d(T)18 为引物,用反转录试剂盒合成 cDNA。根据 E-cadherin、N-cadherin 序列设计并合成引物,以 GAPDH 作为参考基因进行 qRT-PCR 扩增。E-cadherin、N-cadherin 和 GAPDH 的上、下游引物分别为 GCTCTTCCAG-GAACCTCTGTGATG、AAGCGATGGCGGCATTGTAGG, AAGGTGGATGAAGATGGCATGGTG、TGCTGACTCCTTCACTGACTCCTC, GCACCGT-CAAGGCTGAGAAC、TGGTGAAGACGCCAGTGA。反应体系为 20 μL,包括 2 μL 的 cDNA 模板,上、下游引物各 1 μL,2×SYBR qPCR Mix 10 μL,补充 ddH₂O 至 20 μL。qRT-PCR 反应过程:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 15 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 20 s,共 41 个循环;72℃ 延伸 20 s,使用 2^{-ΔΔCt} 方法计算两组细胞 E-cadherin、N-cadherin 的相对转录水平。

2.6 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白 将上述两组细胞培养 48 h 后离心,收集细胞。加入蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂 PMSF 裂解细胞,提取蛋白,经 10% SDS-PAGE 电泳后转移到硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂奶粉将膜在室温下封闭 1 h;不同的蛋白条带分别加入兔抗人 E-Cadherin、N-Cadherin 和 GAPDH 单克隆抗体,置于 4℃ 过夜,T-BST 冲洗 3 次;加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体,室温孵育 1 h,T-BST 冲洗 3 次;加入超敏 ECL 发光液检显色,化学发光仪采集图像。用 ImageJ 处理图像,计算各条带的灰度值。

2.7 统计学分析 应用 SPSS 软件进行统计学分析,数据采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对于来自正态总体且方差齐性的两组独立样本数据采用独立样本 *t* 检验;多个样本均数的比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 CsLegumain 对胆管癌细胞增殖的影响

将 CsLegumain 的 cDNA 片段插入质粒 pcDNA3.1(+)并转染 RBE 细胞,通过 CCK8 测定以评估 CsLegumain 对 RBE 细胞增殖及活性的影响,结果见图 1。在 0~72 h 4 个时间点,两组细胞悬液的灰度值差异均无统计学意义(均 *P* > 0.05),表明 CsLegumain 对 RBE 细胞的增殖无显著影响。

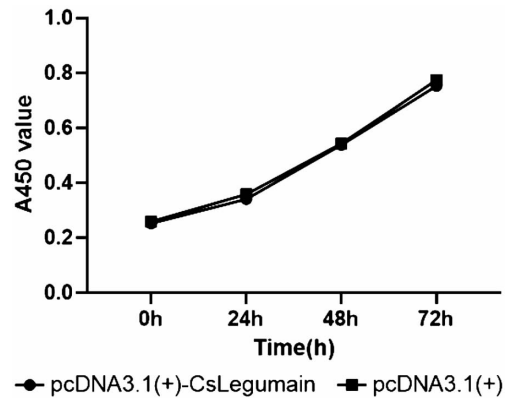
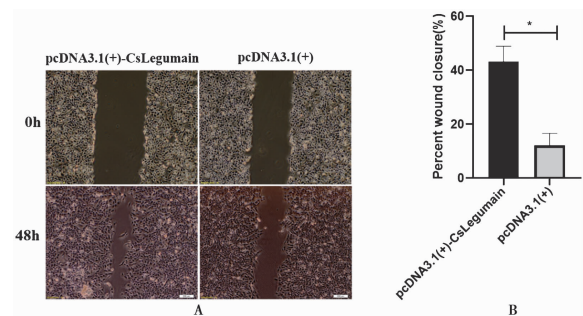


图 1 CsLegumain 对胆管癌细胞增殖影响
Fig. 1 Effects of CsLegumain on the proliferation of RBE cells

2 CsLegumain 的促胆管癌细胞迁移和侵袭作用

通过划痕试验评估 CsLegumain 的促进胆管癌细胞迁移作用。结果见图 2。与转染 pcDNA3.1(+) 的对照组细胞相比,pcDNA3.1(+) -CsLegumain 转染的 RBE 细胞其运动能力显著增强,细胞间的距离变窄(均 *P* < 0.05。Matrigel Transwell 分析显示,pcDNA3.1(+) -CsLegumain 转染的 RBE 细胞中穿过基质小室的细胞数量显著多于空质粒转染对照组和空白对照组穿过的细胞数量(均 *P* < 0.05(图 3)。

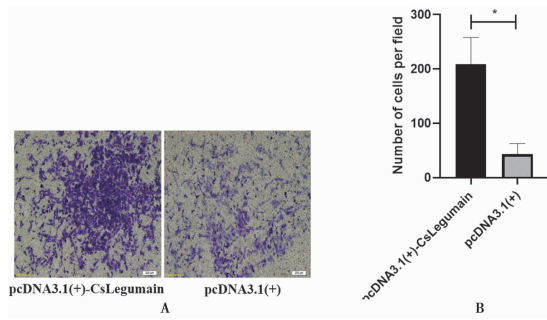


A 48h 后实验组 (pcDNA3.1(+) -CsLegumain) 比对照组 (pcDNA3.1(+)) 的细胞间距明显变窄,划痕愈合面积明显增加 B 细胞间距直方图。* 组间比较,*P* < 0.05。

图 2 CsLegumain 对 RBE 细胞运动迁移能力的影响

A Showed that the experimental group (pcDNA3.1(+) -Cslegumain) displayed faster wound healing speed than control group (pcDNA3.1(+)) at 48 h B Shows that the difference is statistically significant. * Represents *P* < 0.05.

Fig. 2 Effects of CsLegumain on the migration of RBE cells



A 36h后实验组(pcDNA3.1(+)-CsLegumain)细胞数量较对照组(pcDNA3.1(+))显著增多 B 细胞数量直方图。*组间比较, $P < 0.05$ 。

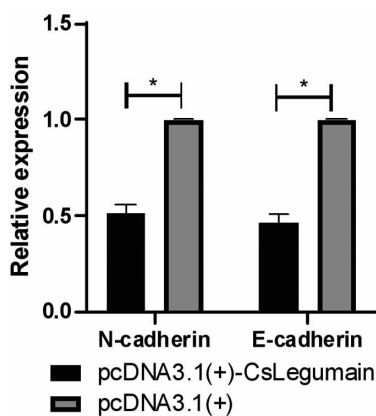
图3 CsLegumain对RBE细胞侵袭能力的影响

A Shows that the number of cells in the experimental group (pcDNA3.1(+)-Cslegumain) was significantly higher than that in the control group (pcDNA3.1(+)) after 36 h B Shows that the difference is statistically significant. * Represents $P < 0.05$.

Fig. 3 Effects of CsLegumain on the invasion of RBE cells

3 CsLegumain通过EMT作用促RBE细胞迁移侵袭的分子机制

采用qRT-PCR对EMT相关基因进行转录水平的检测,结果显示pcDNA3.1(+)-CsLegumain转染组RBE细胞中E-cadherin和N-cadherin的转录水平较pcDNA3.1(+)-转染组细胞显著降低(均 $P < 0.05$) (图4)。采用Western blot检测E-cadherin和N-cadherin蛋白相对表达水平,结果见图5。pcDNA3.1(+)-CsLegumain转染组RBE细胞中E-cadherin和N-cadherin的表达较pcDNA3.1(+)-组细胞显著降低($P < 0.05$,与mRNA水平变化相一致)。



注(Notes): *组间比较(Comparison among groups), $P < 0.05$ 。

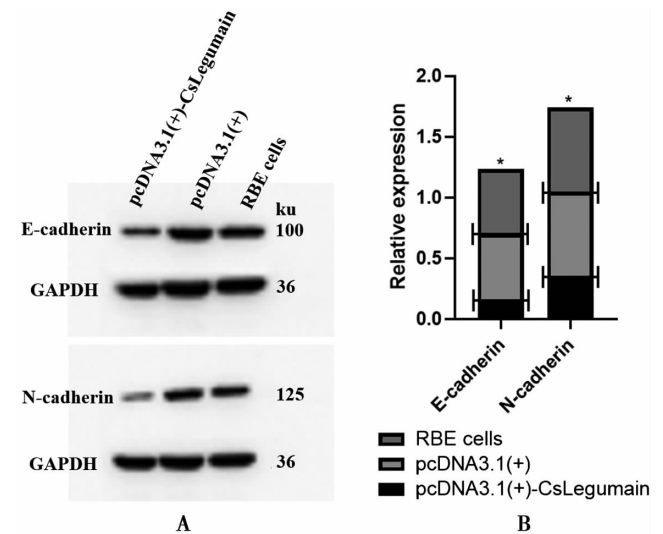
图4 CsLegumain对RBE细胞E-cadherin和N-cadherin mRNA水平的影响

Fig. 4 Effects of CsLegumain on mRNA levels of E-cadherin and N-cadherin in RBE cells

讨论

华支睾吸虫感染所致的肿瘤约占肝胆系统肿瘤病例的0.4%^[20]。由于肝吸虫病的流行具有显著的地方性,因此华支睾吸虫感染地区人群胆管癌的患病率明

显偏高。华支睾吸虫的ESP在胆管癌的发生发展中发挥重要作用^[6]。研究发现,华支睾吸虫ESP可改变胆管癌细胞中多种分子的表达水平,导致胆管癌的发生和发展^[21]。Pak等^[22]报道华支睾吸虫ESP可通过调节癌基因改变与肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭相关的人胆管癌细胞中的miRNA水平。由于ESP的不同成分可能通过不同的机制促进胆管癌的进展,因此,需要发现更多功能性的华支睾吸虫ESP成分以阐明华支睾吸虫ESP促进胆管癌发生和发展的分子机制。



A Western blot检测E-cadherin和N-cadherin蛋白水平 B Western blot检测E-cadherin和N-cadherin蛋白水平直方图。*组间比较, $P < 0.05$ 。

图5 CsLegumain对RBE细胞E-cadherin和N-cadherin蛋白水平的影响

A Shows that the protein levels of E-cadherin and N-cadherin were detected by Western blot. B Shows that the difference is statistically significant. * Represents $P < 0.05$.

Fig. 5 Effects of CsLegumain on protein levels of E-cadherin and N-cadherin in RBE cells

Legumain是新发现的一种C13家族半胱氨酸蛋白酶,与肿瘤的发生和发展密切相关,Legumain高表达预示着肿瘤病人预后不良、生存期短,因此Legumain已成为肿瘤生物学、预后和靶向治疗的新热点^[8]。华支睾吸虫CsLegumain与人的Legumain有相似性,尤其是重要的结构域和酶活性部分,且存在于ESP中^[19]。氨基酸序列和结构相似的蛋白质可能具有相似或相同的生物学功能。本实验通过在胆管癌细胞内过表达CsLegumain基因,研究其对胆管癌细胞的作用。结果显示,CsLegumain对胆管癌细胞增殖和活性并无显著影响,但能促进胆管癌的侵袭和转移能力,证实CsLegumain与Legumain在促进肿瘤侵袭和转移中发挥相似的作用。

上皮间质转化(Epithelial mesenchymal transformation, EMT)通过促进恶性肿瘤细胞的侵袭和转移能力在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用,许

多分子如 E-钙粘蛋白、N-钙粘素、Snail 等参与 EMT 的过程。E-cadherin 和 N-cadherin 是典型的钙黏蛋白,具有相似的结构,在调节细胞增殖与分化及维持组织结构 and 稳态中发挥重要的作用。E-cadherin 主要表达于上皮细胞膜,形成“拉链”结构,将细胞“粘”在一起,其表达下调或缺失可导致细胞间的粘附下降^[23]。E-cadherin 在乳腺癌、胃癌和宫颈癌等在内的许多肿瘤细胞转移中表达下调或缺失^[24-26],被视为 EMT 的标志。E-cadherin 缺失不仅破坏细胞之间的连接,而且通过诱导多个下游转录途径来促进转移^[23]。本研究中,E-cadherin 在 CsLegumain 转染的胆管癌 RBE 细胞中的表达也显著下调,表明 Cslegum 可能通过抑制 E-cadherin 表达从而诱导 EMT 的发生,继而促进胆管癌细胞的迁移和侵袭,其机制值得进一步研究。

N-cadherin 主要分布于神经及内皮细胞等间叶组织中,参与调节 Ca²⁺ 介导的同一种类型细胞间的粘附、细胞的聚集和迁移等。Cao 等^[27] 的研究发现,N-cadherin 的表达与肿瘤的侵袭转移成正相关,如乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胃癌等,其高表达可促进肿瘤细胞的侵袭与转移,从而促进肿瘤的发展。然而也有研究显示 N-cadherin 的低表达或缺失可促进肿瘤细胞的迁移和侵袭,如骨肉瘤、胶质瘤、浆液性卵巢癌、肝癌等^[28-29]。此外,N-cadherin 的低表达也与肝癌的复发密切相关^[28]。本研究中 CsLegumian 过表达的 RBE 细胞 N-cadherin 的表达也显著降低,且细胞的迁移和侵袭能力增强。由此可见,CsLegumian 也能够通过降低 N-cadherin 促进胆管癌细胞的迁移和侵袭。N-cadherin 表达异质性的原因可能是由肿瘤的类型不同或其发挥作用的通路不同导致。因此,EMT 通过不同通路在不同肿瘤的作用机制还需进一步探讨。

综上所述,华支睾吸虫 CsLegumian 在胆管癌进展中发挥重要作用,可能通过诱导 EMT 促进胆管癌细胞的迁移和侵袭,其具体机制值得进一步探讨。本研究为华支睾吸虫所致胆管癌的防治提供了新的科学依据。

【参考文献】

[1] Chang JI, Lee K, Kim D, et al. Clinical characteristics of *Clonorchis sinensis*-associated cholangiocarcinoma: A large-Scale, single-center study[J]. Front Med, 2021(8):741.

[2] Wang D, Young ND, Korhonen PK, et al. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis: The relevance of exploring genetic variation[J]. Adv Parasitol, 2018(100):155-208.

[3] 曹立军, 贺学强, 姜海行. 肝吸虫感染诱发胆管癌的研究进展[J]. 广西医学, 2015, 37(10):4.

[4] Wang C, Lei H, Tian Y, et al. *Clonorchis sinensis* granulin: identification, immunolocalization, and function in promoting the

metastasis of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1):262.

[5] Na BK, Pak JH, Hong SJ. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis [J]. Acta Tropica, 2019(203):105309.

[6] Pak JH, Bashir Q, Kim IK, et al. *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products promote the migration and invasion of cholangiocarcinoma cells by activating the integrin $\beta 4$ - FAK/ Src signaling pathway [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2017, 214(1):1-9.

[7] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens—Part B: Biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4):321-322.

[8] Dall E, Brandstetter H. Structure and function of legumain in health and disease[J]. Biochimie, 2016, 122(12):126-150.

[9] Zhen Y, Chunlei G, Wenzhi S, et al. Clinicopathologic significance of legumain overexpression in cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2015, 5(1):16599.

[10] Liu C, Wang J, Zheng Y, et al. Autocrine pro-legumain promotes breast cancer metastasis via binding to integrin $\alpha v \beta 3$ [J]. Oncogene, 2022, 41(34):4091-4103.

[11] Wang L, Chen S, Zhang M, et al. Legumain: A biomarker for diagnosis and prognosis of human ovarian cancer[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(8):2679-2686.

[12] Ohno Y, Nakashima J, Izumi M, et al. Association of legumain expression pattern with prostate cancer invasiveness and aggressiveness[J]. World J Urol, 2013, 31(2):359-364.

[13] Wang H, Chen B, Lin Y, et al. Legumain promotes gastric cancer progression through tumor-associated macrophages *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(1):172-180.

[14] Qi Q, Obianyo O, Du Y, et al. Blockade of asparagine endopeptidase inhibits cancer metastasis[J]. J Med Chem, 2017, 60(17):7244-7255.

[15] Meng F, Liu W. Knockdown of legumain suppresses cervical cancer cell migration and invasion. [J]. Oncol Res, 2016, 23(1):7-12.

[16] Shen L, Li H, Shi Y, et al. M2 tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma[J]. Sci Rep, 2016(6):30347.

[17] Zhu W, Shao Y, Yang M, et al. Asparaginyl endopeptidase promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells via PI3K/AKT signaling pathway[J]. Gene, 2016, 594(2):176-182.

[18] Kang J M, Le HG, Na B K, et al. pH-dependent structural dynamics of cathepsin D-family aspartic peptidase of *Clonorchis sinensis* [J]. Pathogens, 2021, 10(9):1128.

[19] Kang J, Lee J, Ju H, et al. Characterization of a gut-associated asparaginyl endopeptidase of *Clonorchis sinensis* [J]. Exp Parasitol, 2015(153):81-90.

[20] Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002[J]. Int J Cancer, 2006, 118(12):3030-3044.

(下转 1277 页)

- 原生物学杂志,2014,9(4):384-386,389.
- [3] 周晓农. 空间流行病学[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [4] 赵月,伍卫平. 空间统计学方法在棘球蚴病研究中的应用[J]. 中国人兽共患病学报,2015,31(3):272-276.
- [5] 黄秋兰,唐咸艳,周红霞,等. 四种空间回归模型在疾病空间数据影响因素筛选中的比较研究[J]. 中国卫生统计,2013,30(3):334-338.
- [6] Kihal-Talantikite W, Padilla CM, Lalloue B, et al. An exploratory spatial analysis to assess the relationship between deprivation, noise and infant mortality: an ecological study [J]. Environ Health, 2013, 12:109.
- [7] 伍劲屹,周艺彪,姜庆五. 空间回归模型在公共卫生中的应用[J]. 中华流行病学杂志,2013,34(11):1151-1153.
- [8] Cai Y, Dong Y, Hoenders BJ. Interdependence between the temporal and spatial longitudinal and transverse degrees of partial coherence and a generalization of the van Cittert-Zernike theorem [J]. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2012, 29(12):2542-2551.
- [9] Anselin L. Exploring spatial data with GeoDa: A workbook [M]. USA, Center for spatially integrated social science, 2005: 198-199.
- [10] 王劲峰,廖一兰,刘鑫. 空间数据分析教程[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [11] Kelejian HH, Prucha IR. Specification and estimation of spatial autoregressive models with autoregressive and heteroskedastic disturbances[J]. J Econom, 2010, 157(1):53-67.
- [12] 叶子容,陈佳,周肱,等. 空间回归方法在慢性病研究中的应用进展[J]. 中国卫生统计,2018,35(1):137-141.
- [13] 陈艳艳,蔡顺祥,刘建兵,等. 湖沼型血吸虫病流行区气候因素与钉螺分布的空间回归分析[J]. 中华疾病控制杂志,2015,19(3):277-280.
- [14] 潘翔,杨亚,李林瀚,等. 2012年和2014年洞庭湖区人群血吸虫感染时空分布及其影响因素分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2017,29(2):163-168.
- [15] White G, Ghosh SK. A stochastic neighborhood conditional autoregressive model for spatial data [J]. Comput Stat Data Anal, 2009, 53(8):3033-3046.
- [16] Craig PS, Giraudoux P, Shi D, et al. An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu, China [J]. Acta Trop, 2000, 77(2):167-177.
- [17] 刀吉,刘继蓉,鲁明德,等. 1962-2012年四川省甘孜藏族自治州棘球蚴病流行病学分析[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2015, 13(2):73-80.
- [18] 何伟,王谦,黄燕,等. 四川省石渠县棘球蚴病流行的影响因素分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(04):428-432.
- [19] Zeng X, Guan Y, Wu W, et al. Analysis of factors influencing cystic echinococcosis in Northwest Non-Qinghai Tibetan Plateau Regions of China [J]. Am J Trop Med Hyg, 2020, 102(3):567-573.
- [20] Yuan R, Wu H, Zeng H, et al. Prevalence of and risk factors for cystic echinococcosis among herding families in five provinces in western China: a cross-sectional study [J]. Oncotarget, 2017, 8(53):91568-91576.
- 【收稿日期】 2022-07-30 【修回日期】 2022-10-04

(上接 1272 页)

- [21] Pak JH, Moon JH, Hwang SJ, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in human cholangiocarcinoma cells treated with *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products [J]. J Cell Biochem, 2009, 108(6):1376-1388.
- [22] Pak JH, Kim IK, Kim SM, et al. Induction of cancer-related microRNA expression profiling using excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2014, 113(12):4447-4455.
- [23] Onder TT, Gupta PB, Mani SA, et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways [J]. Cancer Res, 2008, 68(10):3645-3654.
- [24] Zhang F, Shi YR, Zhang L, et al. Epithelial-mesenchymal transitions and the expression of twist in MCF-7/ADR, human multidrug-resistant breast cancer cells [J]. 中国肿瘤临床(英文版), 2007(1):21-25.
- [25] Tian S, Peng P, Li J, et al. SERPINH1 regulates EMT and gastric cancer metastasis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(4):3574-3593.
- [26] Liu M, Liu J, Yang B, et al. Inversed expression patterns of S100A4 and E-cadherin in cervical cancers: Implication in epithelial-mesenchymal transition [J]. Anat Rec (Hoboken), 2017, 300(12):2184-2191.
- [27] Cao ZQ, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2019(118):109320.
- [28] 占大钱. N-cadherin 在肝癌侵袭转移中的作用及其机制研究 [D]. 武汉:华中科技大学, 2011.
- [29] Camand E, Peglion F, Osmani N, et al. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration [J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 4):844-857.
- 【收稿日期】 2022-07-13 【修回日期】 2022-10-04