

• 论 著 •

细粒棘球蚴 GST 抗原表位的生物信息学预测*

李宗吉¹, 楚元奎¹, 于欣¹, 丁淑琴¹, 刘学英¹, 赵巍^{2△}

(1. 宁夏医科大学临床检验与血液检验教研室, 宁夏银川 750004;

2. 宁夏医科大学医学科学技术研究中心, 宁夏银川 750004)

摘要:目的 应用生物信息软件分析细粒棘球蚴谷胱甘肽 S-转移酶(EgGST)的蛋白二级结构并预测 B 淋巴细胞表位和 T 淋巴细胞表位, 为后续表位疫苗的设计研究提供基本的数据和资料。方法 采用 DNASTar 软件、ProPred MHC Class-II Binding Peptide Prediction Server 和 Biosun 软件对 EgGST 的 B 淋巴细胞表位和 T 淋巴细胞表位进行预测。结果 预测 EgGST 存在 8 个 B 淋巴细胞表位区域和 7 个 T 淋巴细胞表位。结论 分析预测的 EgGST 抗原表位将对后续的表位疫苗研究具有重要意义。

关键词: 细粒棘球蚴; 谷胱甘肽 S-转移酶; 抗原表位; 生物信息学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1818-03

Bioinformatics prediction on glutathione S-transferase antigen epitopes of *Echinococcus granulosus**Li Zongji¹, Chu Yuankui¹, Yu Xin¹, Ding Shuqin¹, Liu Xueying¹, Zhao Wei^{2△}

(1. Department of Clinical and Hematological Examination, Ningxia Medical University, Yinchuan,

Ningxia Hui Autonomous Region 750004, China; 2. The Sci-technology Center of

Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region 750004, China)

Abstract: Objective To analyse the secondary structure of glutathione S-transferase of *Echinococcus granulosus* (EgGST) and predict the B cell and T cell epitopes with informatics tools, in order to provide basic data and references for the following design of epitope vaccine. **Methods** The B cell and T cell epitopes of EgGST were predicted by DNASTar, Biosun software and Propred MHC class-II Binding Peptide Prediction Server software. **Results** Many distinct antigenic epitopes of EgGST were identified by computer, there existed 8 B cell epitopes and 7 T cell epitopes. **Conclusion** Analysis of predicted epitopes of EgGST antigenic might be significant for future research of epitope vaccine.

Key words: *Echinococcus granulosus*; glutathione S-transferase; antigenic epitope; bioinformatics

包虫病是由细粒棘球绦虫的幼虫(细粒棘球蚴, Eg)感染并寄生于人畜体内引发的一种呈世界性分布的人畜共患寄生虫病, 该病严重危害人畜健康和经济发展。包虫病传播广泛, 呈全球性分布, 主要流行于畜牧业发达的地区, 如亚洲、非洲、欧洲、北美洲、澳大利亚等。我国是包虫病发病率最高的国家之一, 该病被列为我国重点防治的寄生虫病。现已证实我国有 31 个省、市、区存在包虫病感染病例, 包虫病高发区约占全国面积的 44%, 包虫病流行范围约占国土面积的 80%, 现有 100 多万包虫病现症患者, 受威胁人口达几千万, 包虫病畜超过 4 000 万头, 每年新发病畜达 800 多万头, 年经济损失超过 10 亿^[1-2]。近年来, 随着社会经济和自然生态环境的急剧变化, 包虫病传播范围迅速扩大, 传播风险不断增加, 这一新的特点成为该病防治中面临的最棘手的问题, 如何最有效地预防和控制疾病的传播, 巩固和提高防治效果是目前迫切需要解决的问题。传统的综合防治措施虽然在局部地区有效, 但效果难以巩固, 极易受到自然生态环境、经济和人为因素变化的挑战。就目前而言, 发展包虫病新型疫苗, 进行免疫预防是预防和控制包虫病传播的最为理想的方法^[3]。本实验室已经克隆、重组并表达了细粒棘球蚴谷胱甘肽 S-转移酶(EgGST)重组蛋白, 初步免疫学研究表明该重组蛋白具有良好的抗原性和免疫原性, 并在小鼠中可诱导出较高的免疫保护力。随着分子生物学理论和技术的发展, 表位疫苗以其独特的优势, 逐渐成为分子疫

苗的研究热点, 是目前研制抗感染性疾病、恶性肿瘤、寄生虫病疫苗的发展方向。表位疫苗研究中首要解决的问题就是寻找抗原上免疫原性最强的区域, 即抗原表位所在的位置。本研究采用生物信息学方法进行 EgGST 重组蛋白的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞抗原表位预测, 为后续包虫病诊断抗原和多肽表位疫苗的研究设计提供实验数据和材料。

1 材料与方法

1.1 材料与分析软件

1.1.1 EgGST 克隆基因序列 本室已经测序的 EgGST DNA 序列, 它由 660 bp 组成, 编码 221 个氨基酸的多肽链: MAPTLAYWDI RGLAEQSRL LKYLEVEYDD KRCKIGSTPT FDRSAWLSEK FSLGLDFPNL PYYIDGDFKL TQSGAILEYI ADRHGMIPDC KKRRAVLHML QCEVVDLRMA FTRTCYSPDF EKLKPGLFET LAQKLPNFEA YLGEKEWLTG DKINYPDFSL CELLNQLMKF EPTCLEKYPR LKAYLSRFEN LPALRDYMAS KEFKTRPCNG ASAKWRGDC。将克隆的中国虫株 EgGST 序列注册到 Genbank 获得登陆号为 EF: 077179。

1.1.2 分析软件 DNASTar (<http://www.dnastar.com>)、ProPred MHC Class-II Binding Peptide Prediction Server (www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html) 在线获取, Biosun 软件购自军事医学研究所。

* 基金项目: 宁夏自然科学基金项目(NZ13069)。 作者简介: 李宗吉, 女, 讲师, 主要从事寄生虫分子疫苗及免疫机理研究。 △ 通讯作者, E-mail: zw-6915@163.com。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质二级结构预测 利用 DNASTar 软件对 EgGST 二级结构进行预测。

1.2.2 重组 EgGST 的抗原表位预测 采用 DNASTar 软件,通过被测肽链的多种理化参数综合进行 B 淋巴细胞抗原表位的预测;基于同样原理,利用 Biosun 专业表位分析软件进行 EgGST 的 B 淋巴细胞表位分析预测。目前对 T 淋巴细胞抗原表位的预测均基于对主要组织相容性复合体(MHC)分子结合肽的预测,利用 ProPred MHC Class- II Binding Peptide Prediction Server 分析预测 EgGST T 淋巴细胞表位。

2 结 果

2.1 B 淋巴细胞表位预测结果 通过 DNASTar 对 EgGST 蛋白的组成、理化特性进行初步分析,见表 1。通过对亲水性区域、蛋白可及性、Karplus-Schulz 柔性区域的分析,可塑性分析等理化特性对 EgGST 的抗原性分析并预测可能的 B 淋巴细胞表位区域,联合以上的参数和 EgGST 的二级结构进行综合分析预测,见图 1。Biosun 分析软件对 EgGST 重组蛋白 B 淋巴细胞表位分析预测结果与 DNASTar 预测结果基本一致,见图 2;综合分析得出 EgGST 有 8 个潜在的 B 淋巴细胞抗原表位。DNASTar 软件对 EgGST 抗原 B 淋巴细胞表位肽段的预测结果和对氨基酸序列的分析数据,见表 2。

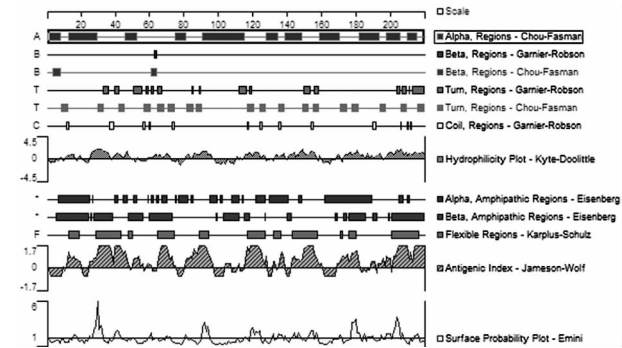


图 1 EgGST 二级结构的分析预测

表 2 预测的 B 淋巴细胞表位抗肽段

序号	15~21	30~37	40~48	69~76	85~92	92~99	121~128	134~141
氨基酸肽段	GLAEQSR	EYDDQRC	STPRTTFDR	GDFKLTO	IADRHGM	DCKKRRA	PDFEKLK	LAQKLPN

表 3 T 淋巴细胞表位预测结果

序号	96~104	106~114	177~185	166~174	32~40	67~75	98~106
氨基酸肽段	LHMLQCEVV	LRMAFTRTC	YPRLKAYLS	LMKFPTCL	YKIGSTPTF	FKLTQSGAI	MLQCEVVDL

3 讨 论

包虫病目前依然是严重影响我国西北部地区经济发展,危害人民健康的亟待解决的公共卫生问题。多年来,研究人员不断探索各种途径来防治包虫病的传播,通过注射疫苗来防控包虫病,是目前科研工作者追求的目标。随着分子生物学技术在医学科学中的广泛应用,重组蛋白疫苗、核酸疫苗、合成肽疫苗已经问世,并在疟疾、血吸虫等疾病预防中发挥着巨大的作用。然而,包虫疫苗的研究还远滞后于疟疾、血吸虫病等寄生虫病的相关研究。目前,包虫病的新型疫苗大多是重组蛋白疫苗及核酸疫苗,合成肽表位疫苗尚未有深入的研究探索。抗原表位指抗原分子中能够被免疫细胞识别并决定抗原特异性的区域。抗原通过其抗原表位区域与相应的淋巴细胞表面的受体特异

表 1 EgGST 氨基酸序列的分析

序列长度	219 氨基酸
相对分子质量	25×10 ³
等电点	7.53
酸性氨基酸	数目=31
碱性氨基酸	数目=32
极性氨基酸	数目=52
非极性氨基酸	数目=7

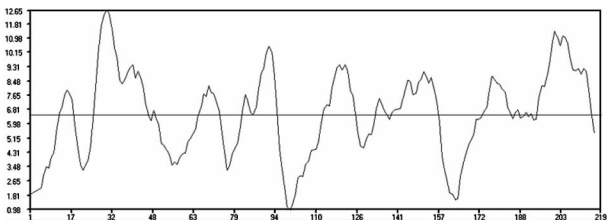


图 2 Biosun 预测抗原表位的分布

2.2 T 淋巴细胞表位预测结果 ProPred MHC Class-II Binding Peptide Prediction Server 软件对 T 淋巴细胞抗原表位肽段预测分析见图 3,软件预测 T 淋巴细胞抗原表位肽段结果见表 3。

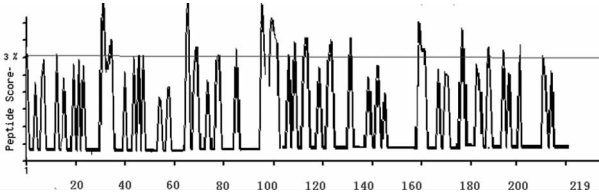


图 3 ProPred MHC Class- II Binding Peptide Prediction Server 预测抗原表位的分布

结合后激活该细胞,诱导免疫应答;对抗原表位进行分析预测,对了解重组疫苗的结构功能、特异性诊断抗原和药物作用靶点的研究及表位疫苗的设计制备提供理论和实验材料。传统的抗原表位预测方法主要采用 X 射线晶体衍射技术和氨基酸序列分析技术,通过测定蛋白质氨基酸序列和空间结构来分析可能的优势表位区域,这需要精密的仪器和昂贵的试剂,费时、费力且一般实验室难于开展实验。近年来,得益于分子生物学、免疫学理论和技术的迅猛发展,生物信息学分析成为抗原表位预测最为理想的工具,随着网络信息分析技术和数据库的扩展,多参数、多方法的综合预测使得生物信息学表位预测的准确性和实效性不断提升^[4]。

本课题组前期研究已克隆了细粒棘球绦虫中国大陆株

GST 分子,在此基础上利用分析软件 DNASTar、在线 T 淋巴细胞表位预测软件 ProPred MHC Class- II Binding Peptide Prediction Server,以及从中国军事医学科学研究所购买的专业细胞抗原表位分析软件 Biosun 对 EgGST 的 B 淋巴细胞表位和 T 淋巴细胞表位分别进行预测分析。B 淋巴细胞表位是抗原分子中能特异性结合并激活产生抗体的 B 淋巴细胞的特定结构域,B 淋巴细胞表位通常由 5~20 个氨基酸组成。常用的 B 淋巴细胞表位预测方案有亲水性、抗原性、可塑性、表面可及性、二级结构和电荷分布方案。单参数检测的准确率往往不高,需要将多个参数综合进行分析以此提高分析的准确率^[5-6]。本研究采用 DNASTar 和 Biosun 软件分析 EgGST 的 B 淋巴细胞表位,两个软件分析得到的表位信息基本一致,从而提高了数据分析的可靠性,经过软件预测筛选得到 8 个 B 淋巴细胞表位。相对于 B 淋巴细胞表位的预测分析而言,T 淋巴细胞表位的预测分析相对不成熟。T 淋巴细胞不像 B 淋巴细胞可以直接识别抗原上的表位,而只能识别结合到 MHC 分子,因此对 T 淋巴细胞表位的研究多是从 MHC 分子入手^[7-8]。T 淋巴细胞表位是抗原经过抗原提呈细胞处理后经由 MHC 分子递呈给 T 淋巴细胞表面受体的抗原线性肽段。T 淋巴细胞对抗原的特异性识别主要通过 T 淋巴细胞受体(TCR)和 MHC-抗原肽段之间的相互作用来完成。TCR 所识别的是抗原递呈细胞表面的 MHC 分子及其递呈的线性短肽组成的复合物,分为 MHC I 类和 II 类分子。MHC I 类分子主要提呈一些细菌、病毒、原虫经抗原提呈细胞吞噬处理后衍生于抗原递呈细胞内部的抗原肽段,递呈给细胞毒性 T 淋巴细胞;而 MHC II 类分子主要递呈从细胞外环境摄取的外来病原体抗原,被辅助性 T 淋巴细胞(Th)识别并介导针对特异抗原的细胞免疫应答。由于细粒棘球绦虫为虫体较大的多细胞生物,其抗原分子被抗原

提呈细胞识别后主要由 MHC II 分子递呈给 CD4⁺ Th 细胞产生免疫应答效应。因此,笔者主要基于 MHC II 分子分析 EgGST 的 T 淋巴细胞表位。ProPred MHC Class- II Binding Peptide Prediction 软件主要是通过 motif 模型建立的预测方法,预测 EgGST 有 7 个特异性 T 淋巴细胞表位。在后续研究中还需要进一步通过实验对分析预测得到的实验数据和结果进行验证。

参考文献

[1] 蒋次鹏. 今日中国包虫病地区分布[J]. 中华医学杂志,2002,115(8):1244-1247.

[2] 李文佳,陈雅荣. 细粒棘球绦虫 AgB 研究进展[J]. 2008,24(2):170-172.

[3] Polat KY,Balik AA,Celebi F,et al. Hepatic alveola echinococcosis[J]. Can J Surg,2002,45(6):415-419.

[4] 黄艳新,鲍永利,李玉新,等. 抗原表位预测的免疫信息学方法研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2008,24(9):857-861.

[5] 梁瑾,王靖飞. B 细胞表位预测方法研究进展[J]. 生命科学,2009,21(2):320-323.

[6] Saha S,Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network[J]. Proteins,2006,65(1):40-48.

[7] Yang WC,Chen L,Li HB,et al. Identification of two novel immunodominant UreB CD4(+) T cell epitopes in Helicobacter pylori infected subjects[J]. Vaccine,2013,31(8):1204-1209.

[8] Leen AM,Christin A,Khalil M,et al. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy[J]. J Virol,2008,82(1):546-548.

(收稿日期:2015-04-18)

(上接第 1817 页)

者加入 RAGE 受体抑制剂阻断 S100A9 与 RAGE 结合,结果发现单核细胞分泌的 VEGF-A 明显下降。进一步探讨 S100A9 诱导单核细胞分泌 VEGF-A 的信号机制,结果发现在均有 S100A9 刺激条件下,预先加入 NF-κB 信号通路抑制剂的处理组上清中 VEGF-A 的浓度明显低于未处理组,基于 NF-κB 可介导 RAGE 受体的下游信号^[12],提示在体外培养的单核细胞体系中,S100A9 可经 RAGE-NF-κB 信号级联诱导 VEGF-A 的分泌。由于肿瘤细胞也表达 RAGE 受体,那么,S100A9 是否也能够有效刺激肿瘤细胞分泌 VEGF-A 还有待进一步研究。

综上所述,S100A9 可通过 RAGE 受体及其下游 NF-κB 信号通路诱导单核细胞分泌 VEGF-A,从而促进新生血管的形成。进一步全面阐明 S100A9 在肿瘤微环境中的调节功能,将为设计阻断 S100A9 及其受体的治疗方案提供帮助。

参考文献

[1] 蒋秋林,孙晓红. S100A8/A9 在炎症和肿瘤中的应用及作用机制研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2011,13(9):125-127.

[2] Wang L,Chang EW,Wong SC,et al. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins[J]. J Immunol,2013,190(2):794-804.

[3] Tidehag V,Hammarsten P,Egevad L,et al. High density of S100A9 positive inflammatory cells in prostate cancer stroma is associated with poor outcome[J]. Eur J Cancer,2014,50(10):1829-1835.

[4] Tobon-Velasco JC,Cuevas E,Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF-κB pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets,2014,13(9):1615-1626.

[5] Chen X,Zhang L,Zhang IY,et al. RAGE expression in tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in glioma[J]. Cancer Res,2014,74(24):7285-7297.

[6] Francescone R,Hou V,Grivennikov SI. Cytokines,IBD, and Colitis-associated Cancer[J]. Inflamm Bowel Dis,2015,21(2):409-418.

[7] Caronni N,Savino B,Bonecchi R. Myeloid cells in cancer-related inflammation[J]. Immunobiology,2015,220(2):249-253.

[8] Tidehag V,Hammarsten P,Egevad L,et al. High density of S100A9 positive inflammatory cells in prostate cancer stroma is associated with poor outcome[J]. Eur J Cancer,2014,50(10):1829-1835.

[9] Markowitz J,Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer[J]. Biochim Biophys Acta,2013,1835(1):100-109.

[10] 张菁. S100A8/A9 和 RAGE 相互作用的研究[D]. 南方医科大学,2012.

[11] Fontana E,Sclafani F,Cunningham D. Anti-angiogenic therapies for advanced esophago-gastric cancer[J]. Indian J Med Paediatr Oncol,2014,35(4):253-262.

[12] Xie J,Méndez JD,Méndez-Valenzuela V,et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE)[J]. Cell Signal,2013,25(11):2185-2197.

(收稿日期:2015-05-12)