

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-02-013

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

基于转录组学探讨水蛭素对 HK-2 细胞的影响机制

何华梅¹, 赵应学², 吴林秀¹, 周维海³, 刘喜华¹, 甄汉深⁴

(1.广西卫生职业技术学院, 南宁 530023; 2.广西壮族自治区江滨医院, 南宁 530021;
3.广西科康科技集团有限公司, 南宁 530001; 4.广西中医药大学, 南宁 530001)

摘要 **目的** 采用转录组学技术探讨水蛭素对人肾皮质近曲小管上皮细胞(HK-2 细胞)的影响及机制。**方法** 利用 CCK-8 法检测水蛭素处理之后的 HK-2 细胞活力,通过转录组学的技术对溶剂对照组和水蛭素组进行转录组测序;通过 RSEM 的方法计算不同样品中的基因表达水平,差异基因的筛选采用 DEseq2 方法,筛选标准为 $|\log_2FC| \geq 1, P < 0.05$ 。随后根据差异表达的基因进行富集分析。**结果** 水蛭素 5 mg/mL 下提高 HK-2 细胞活力效果最佳,转录组学研究结果表明,与正常 HK-2 细胞相比,水蛭素处理后的 HK-2 细胞有 1 723 个基因发生差异表达。GO 和 KEGG 分析结果表明,炎症通路的调控是水蛭素治疗高尿酸血症的主要作用机制。**结论** 水蛭素作用于多条炎症信号通路,进而促进尿酸排泄,促进集体代谢和尿酸排出体外,起到降尿酸的作用,表明水蛭素在治疗高尿酸血症方面效果显著。

关键词: 水蛭素; 人肾皮质近曲小管上皮细胞; 转录组

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)02-0087-08

Exploring the influencing mechanisms of hirudin on HK-2 cells based on transcriptomics

HE Huamei¹, ZHAO Yingxue², WU Linxiu¹, ZHOU Weihai³, LIU Xihua¹, ZHEN Hanshen⁴

(1.Guangxi Health Science College, Nanning 530023, China; 2. Jiangbin Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China; 3. Guangxi Kekang Technology Group Co., Ltd, Nanning 530001, China;
4. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract **Objective** To explore the effects and mechanisms of hirudin on human kidney-2 cell (HK-2 cells) using transcriptomics techniques. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the viability of HK-2 cells, and transcriptome sequencing was performed in the solvent control group and hirudin group. The gene expression levels in different samples were calculated using the RSEM method, and differential gene screening was performed using the DEseq2 method with a screening criterion of $|\log_2FC| \geq 1$ and $P < 0.05$. Subsequently, enrichment analysis was

基金项目: 广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281093); 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目(2020KY43012)。

第一作者: 何华梅, 硕士, 讲师, 研究方向为内科慢性病防治。

通信作者: 刘喜华, liuxihua104@163.com。

performed based on differentially expressed genes. **Results** The hirudin(5 mg/mL) had the best effect on enhancing the viability of HK-2 cells. Transcriptomic studies found that compared with normal HK-2 cells, there were 1723 genes were differentially expressed in HK-2 cells treated with hirudin. GO and KEGG analysis results showed that the regulation of inflammatory pathways was the main mechanism by which hirudin increased HK-2 cells viability. **Conclusion** Hirudin increases the viability of HK-2 cells, and its mechanism may be involved the regulation of inflammatory pathways.

Keywords: hirudin; human kidney-2 cells; transcriptome

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是指在正常饮食下,非同日两次空腹血尿酸水平在男性和绝经期女性中 $>420 \mu\text{mol/L}$,或绝经前女性 $>360 \mu\text{mol/L}$ ^[1]。近年来,随着饮食结构变化,高尿酸血症患病人群不断扩大^[2]。较低等生物可利用尿酸酶将尿酸氧化成尿酸素,然后排出体外,但是,对人类而言,尿酸酶的缺乏导致尿酸最终代谢为嘌呤^[3]。体内尿酸的产生和排泄在正常情况下始终保持平衡状态,但尿酸生成增减或者排出减少时,发生高尿酸血症的风险大大增加^[4]。血液中的尿酸浓度超出正常范围时便会发生诸多的病理反应,如线粒体形态改变、炎症、细胞凋亡^[5]。高尿酸血症成为慢性肾病、高血压、心血管病变等多种疾病发生的高危因素,严重危害人类机体健康,因此,降尿酸治疗已成为防治高尿酸血症的研究重点^[6]。中药基于多途径多靶点的特点,在高尿酸血症的治疗上发挥独特优势,能有效弥补目前临床药物的不足^[7]。

水蛭素来源医蛭科动物菲牛蛭及其唾液腺中。金边蚂蟥为广西道地药材,野生资源丰富,近年来,人工养殖技术和提取其主要活性组分中的水蛭素技术也趋于成熟。研究^[2,8]结果表明,水蛭素具有缓解肾纤维化及保护肾损伤作用,并增加细胞对于氧化应激的抵抗能力,有效修复线粒体的损伤,延缓并阻止尿酸导致的肾细胞凋亡。

转录组学是一种用于深入了解基因表达模式的高通量技术。它在已知生理状态下,基于RNA水平的测量来比较不同组织或细胞类型,从而鉴定出表达量发生显著变化的基因。在现代生物医学研究^[9-10]中,转录组学已成为诊断标记物和治疗靶点鉴定的重要工具。本研究选用人肾皮质近曲小管上皮细胞(human kidney-2 cells, HK-2 细胞)作为实验

模型,以水蛭素为干预因子,分析水蛭素对HK-2细胞活力的潜在增强效应,并且运用转录组学技术对其作用机制进行深入探究,为水蛭素治疗高尿酸血症提供科学依据。

1 材料

1.1 药物及试剂

水蛭素冻干粉:金边蚂蟥选择活体(购于南宁市金海科康生物医药科技有限公司,批准文号:20161205),经广西科学院生物研究所周维官研究员鉴定为医蛭科牛蛭属动物菲牛蛭。金边蚂蟥首先经由吸饱诱导液2%氯化钠活体吸取,然后转移到专用容器中。在乙醇与硫酸锌的混合溶液作用下,蚂蟥排放出其唾液,从而获得未经处理的天然水蛭素提取液。该提取液经过纯化和添加辅料后,进行冷冻干燥处理。最终得到的粉末形态的天然水蛭素具有约5 200 ATU/g的凝血酶滴定值和96%的质量分数。为满足实验需求,该水蛭素与稀释剂(蒸馏水)混合,配制成含水蛭素200 ATU/g的溶液。

其他试剂:青链霉素(购自中国兰杰柯科技公司,产品货号:BL505A),Trizol(购自赛默飞世尔科技公司,产品货号:15596018),DEPC water(购自Ambion公司,产品货号:AM9915),异丙醇(购自西陇化工化学试剂公司,产品型号AR 500 mL),胰蛋白酶(购自百普赛斯生物科技有限公司,产品货号:BL501A),胎牛血清(购自澳洲CLARK公司,产品货号:FB15015),HK2(购自武汉普诺赛生命科技有限公司,产品货号:CL-0109),HK2细胞专用培养基(购自武汉普诺赛生命科技有限公司,产品货号:CM-0109),尿酸(UA)(购自上海源叶生物科技有限公司,产品货号:S30640),总RNA提取试剂盒(购自

康为世纪生物科技有限公司,产品货号: CW0597S), 逆转录试剂盒(购自全式金生物技术有限公司,产品货号: AE311), SYBR Green PCR 试剂盒(购自全式金生物技术有限公司,产品货号: AQ131), CCK8(购自百普赛斯生物科技有限公司,产品货号: BS350B)。

1.2 仪器

超净工作台(购自苏州安泰空气技术有限公司,产品型号: SW-CJ-2FD), 超低温冰箱[购自赛默飞世尔科技公司,产品型号: 905- μ ITS(490L)], 低温离心机(购自德国 Eppendorf 公司,产品型号: 5427R), 生物安全柜(购自艾斯克公司,产品型号: Airstream), 显微镜(购自江南永新光学仪器有限公司,产品型号: XD202), 破碎仪(购自德国 QIAGEN 公司,产品型号: TissueLyser II), CO₂ 培养箱(购自赛默飞世尔科技公司,产品型号: 3111), Real-time PCR 检测仪(购自罗氏公司,产品型号: LC96), 微量分光光度计(购自杭州奥盛仪器有限公司,产品型号: Nano-100), 台式离心机(购自赛默飞世尔科技公司,产品型号: Pico17), 酶标仪(购自南京德铁实验设备有限公司,产品型号: HBS-1096A)。

2 方法

2.1 分组及给药

于 DMEM+10% FBS+1% 双抗的培养基中进行 HK-2 细胞培养,培养条件为 37 °C、5% CO₂,待细胞生长至黏合度为 80%~90% 时进行传代。实验设计分两组: 溶媒对照组和水蛭素组。在水蛭素组中分别设置 0.1、1.0、5.0、10、20 mg/mL 等 5 个不同的水蛭素浓度,水蛭素的作用时间设置为 24 h。作用结束后,利用 CCK-8 检测细胞活力变化。CCK-8 检测实验步骤: 将 HK2 细胞以 3×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h; 待细胞融合度为 70%~80% 时给药,24 h 后进行 CCK-8 检测,先按 1:10 配制 CCK-8 试剂; 将原孔培养基弃去,每孔加入 100 μ L 稀释后的 CCK-8 溶液; 培养箱孵育 2 h 后,酶标仪检测 OD 值的波长为 450 nm。

2.2 转录组测序

测序样本准备流程: 将 HK-2 细胞以密度

5×10^6 个/皿的浓度接种到 10 cm 培养皿中,并维持 24 h。当细胞融合度达到 70%~80% 时,根据预定的实验组别进行水蛭素的添加。实验分组: 空白对照组、水蛭素组(5 mg/mL); 加水蛭素 24 h 后,收集细胞进行细胞 RNA 提取。

实验过程中,从空白组及水蛭素药效最佳剂量组中随机选取样本(各 2 个重复),进行总 RNA 的提取。RNA 纯度的测定采用 Nanodrop2000 设备,而 RNA 的完整性则通过琼脂糖凝胶电泳进行评估。RNA 的完整性数值通过生物分析仪进行量化测定。提取样品总 RNA 后,用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA。加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段,以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成第 1 条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第 2 条 cDNA 链,接下来对双链 cDNA 进行末端修复,加 poly(A),连接测序接头,使用磁珠进行纯化及片段选择,最后进行 PCR 扩增,获得文库。文库质检合格后进行上机测序。转录组测序由武汉灵思生物技术有限公司完成。

2.3 差异基因筛选和富集分析

过滤原始读段后得到洁净读段,比对参考基因组并计算每个样品的基因表达水平,使用 DEseq2 方法筛选差异基因,筛选条件为 $|\log_2FC| \geq 1$, $P < 0.05$ 。对差异基因进行富集分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件分析数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行评估。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 水蛭素改善 HK-2 细胞活力

除 0.1 mg/mL 的水蛭素以外,其余浓度的水蛭素的 HK-2 细胞活力均明显提升,其中 5 mg/mL 效果最好,为 4.97,与对照组的 3.58 相比,细胞活力显著提升,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果如图 1 所示。

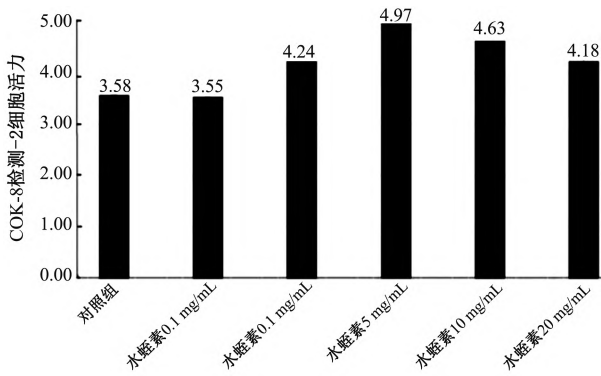


图 1 不同组别细胞活力

3.2 测序数据统计分析

使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台完成转录组测序,具体信息如表 1 所示。

表 1 测序数据统计

样本	总读取量	总基数	洁净读段	洁净基数	Q20 含量/%	Q30 含量/%	GC/%
细胞对照 1	45 552 520	6 832 878 000	45 552 516	6 828 236 632	97.6	92.5	52.9
细胞对照 2	47 715 818	7 157 372 700	47 715 816	7 152 867 028	97.3	91.5	52.3
水蛭素 1	44 885 692	6 732 853 800	44 885 690	6 727 724 238	97.8	93.2	54.3
水蛭素 2	43 163 396	6 474 509 400	43 163 386	6 469 833 518	98.0	93.6	54.5

3.3 差异基因表达分析

水蛭素组有 1 723 个基因在水蛭素组中差异表达,其中有 886 个上调基因、837 个下调基因,结果如图 2 所示。

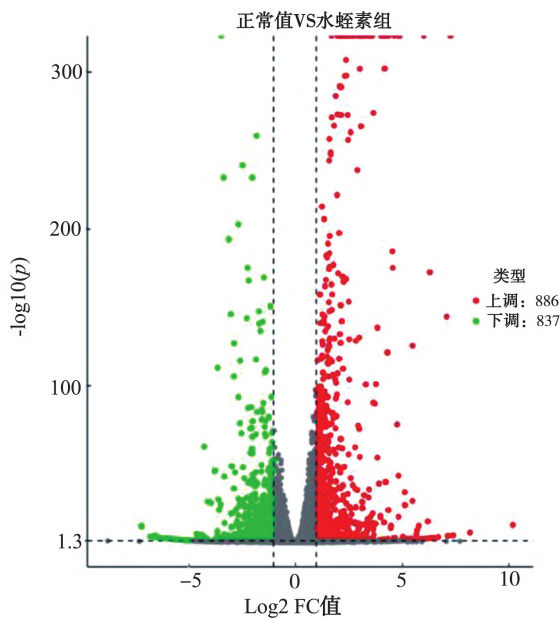
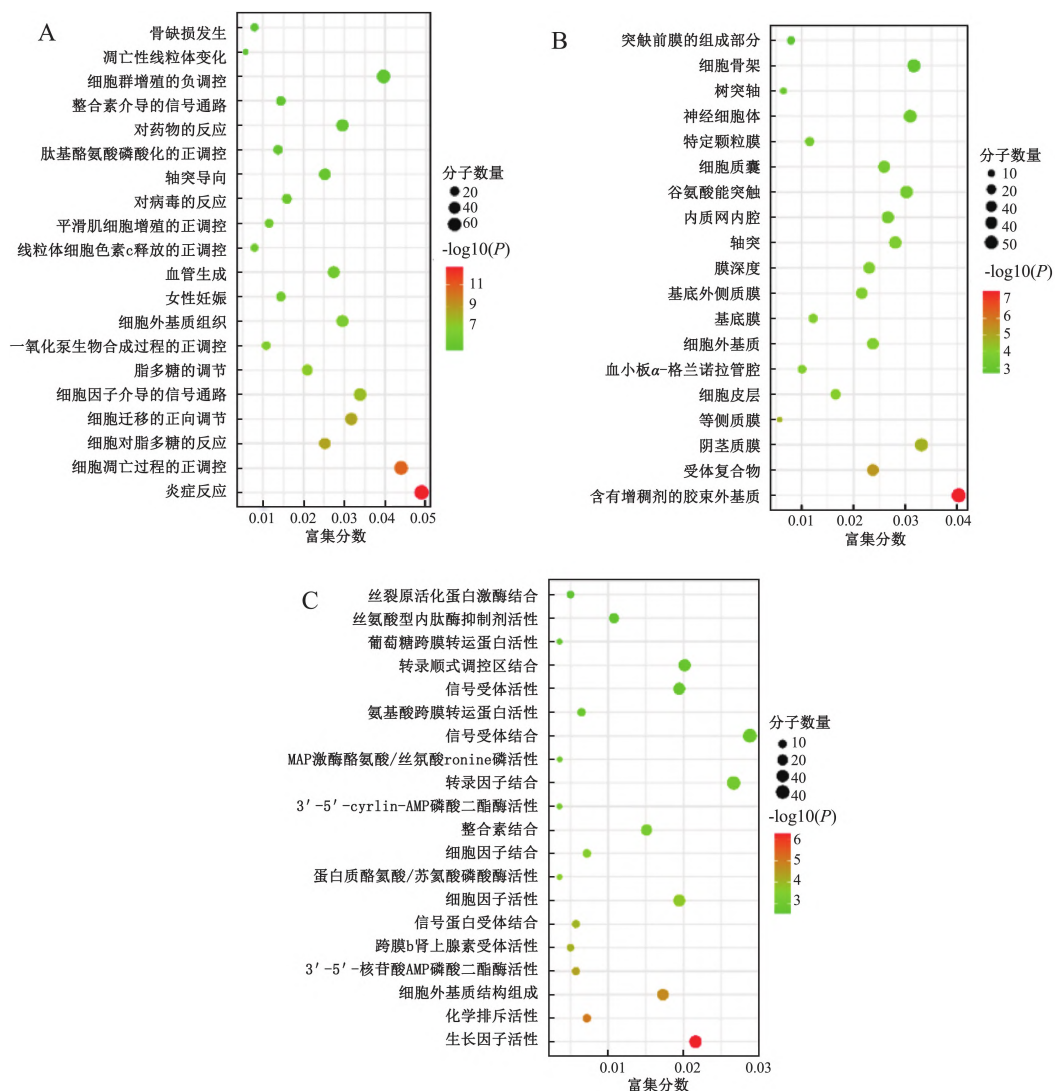


图 2 差异基因的火山图

3.4 差异表达基因 GO 功能富集分析

对差异基因进行 GO 分析,并对前 20 位的重要生物过程、细胞成分、分子功能进行可视化,结果如图 3 所示。在生物学过程分析中,药物反应、炎症反应、细胞因子信号通路、凋亡过程的正向调控较为重要(图 3A);在细胞成分中,以细胞的各种组成成分较为重要,如基底外侧质膜、细胞受体复合体、细胞外基质、薄膜、轴突、内质网内腔、谷氨酸能突触等(图 3B);在分子功能中,以调控分子活性和结合功能为主,如转录因子结合、生长因子活性、细胞因子结合、整合素结合等(图 3C)。



注:A.生物过程;B.细胞成分;C.分子功能。

图 3 GO 分析

3.5 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

对差异基因进行 KEGG 富集分析结果表明, 1 723个差异基因富集 321 条不同的信号通路, 有 85 条富集显著的通路, 对前 20 条通路进行可视化, 结果如图 4 所示。KEGG 分析包括 TNF 信号通路、IL-17信号通路、细胞凋亡、NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路等。上、下调基因的富集分析结果如图 5 和图 6 所示。

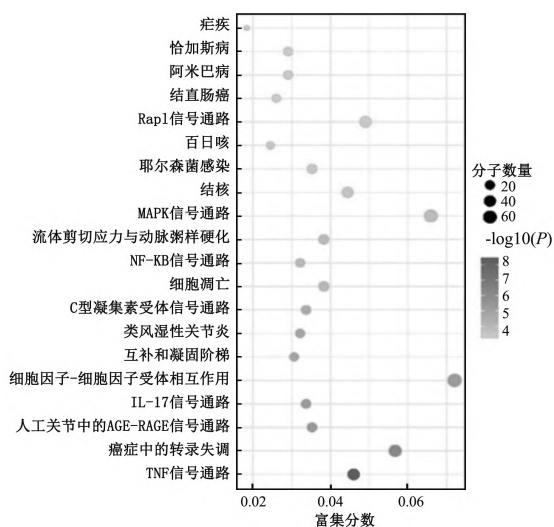


图 4 KEGG 通路分析

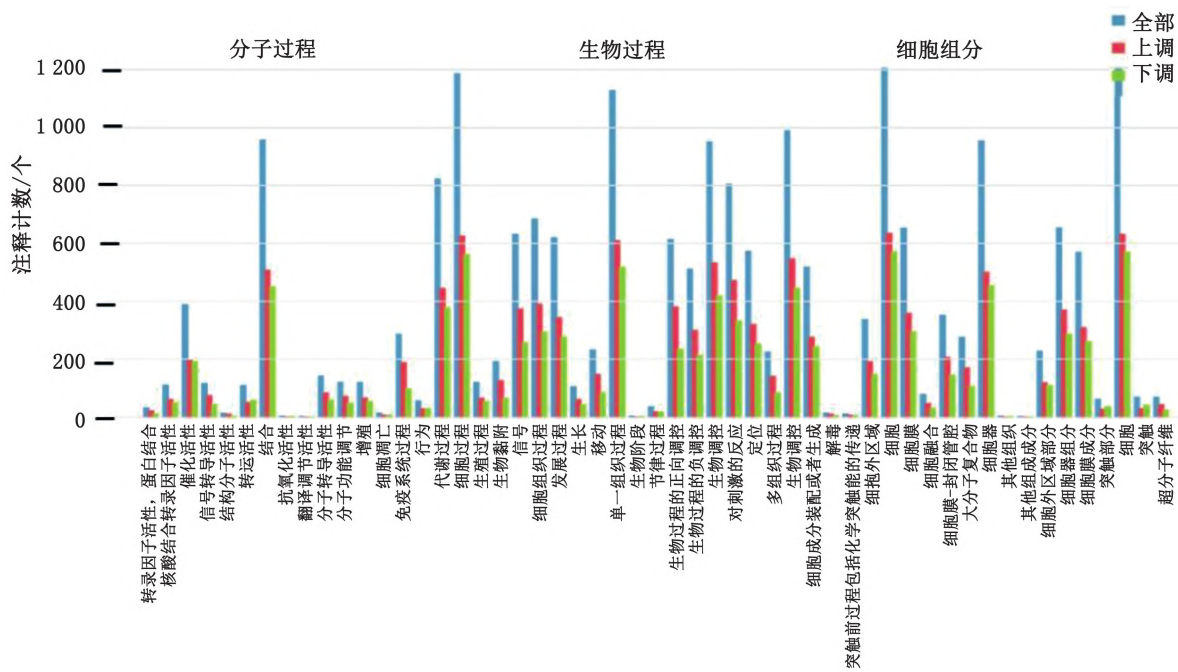


图 5 上、下调差异基因的 GO 分析

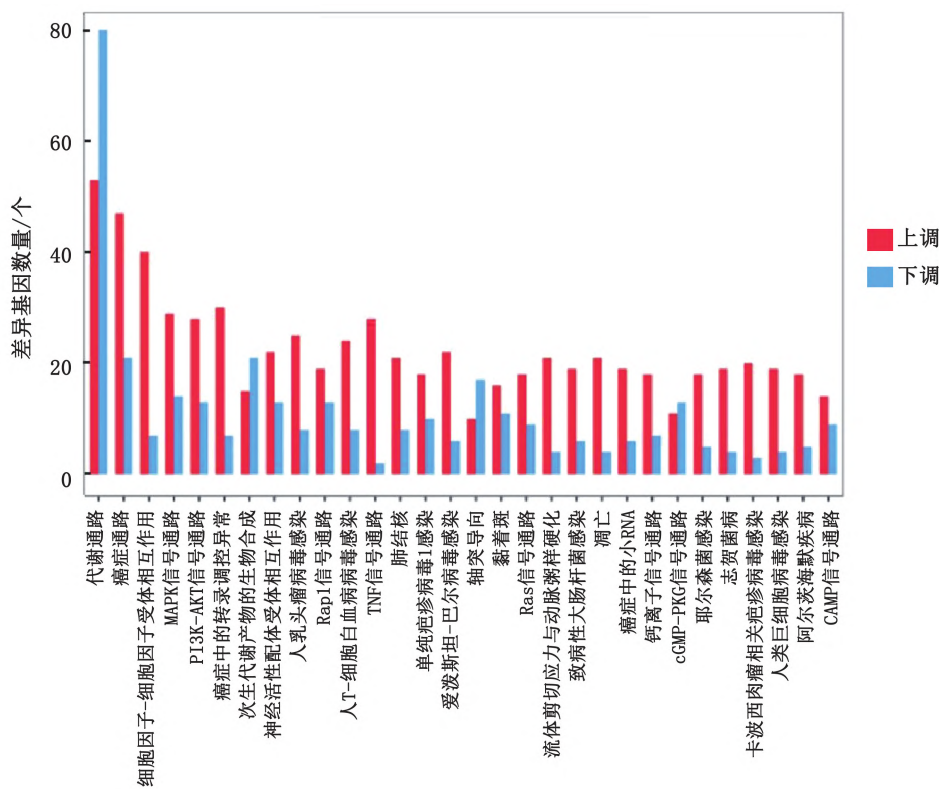


图 6 上、下调差异基因的 KEGG 分析

4 讨论

金边蚂蟥为广西珍贵药材,在广西民间多采用

该药材治疗痛风病症,疗效确切^[2]。金边蚂蟥作用于高尿酸血症小鼠后,能显著降低血液中的尿酸水

平,且使用安全,无毒副作用^[11]。另有研究^[12]结果表明,对高尿酸血症小鼠采用金边蚂蟥活性组分水蛭素治疗后,小鼠血清中的尿素氮水平显著下降,并且能够有效治疗模型小鼠的肾脏损伤。此外,水蛭素可能是一种潜在优良的抗高尿酸痛风药物,具有高效、低毒的特性^[11,13]。在既往研究结果的基础上,本研究基于转录组学探索水蛭素治疗高尿酸血症的作用机制。

随着经济的发展,生活水平的提高,人们的饮食结构发生改变,且社会老龄化日趋严重,造成高尿酸血症的发病率显著升高。有研究^[6,14]结果表明,高尿酸血症人群中以绝经后女性和老年男性居多,但近来显现出趋于年轻化倾向,且显示出沿海地区较高的现象,这可能与沿海地区吃海鲜的饮食习惯、男性喜饮酒等有关。高尿酸血症具有诸多危害,可引起痛风、肾脏疾病、动脉粥样硬化、高血压等,严重威胁人类的生命健康。因此,对高尿酸血症采取预防和控制措施,对于防治肾脏疾病具有重要的临床意义。

转录组学是在 mRNA 层面,基于 mRNA 的表达水平所进行的研究,近年来生物信息学不断发展完善,转录组学已成为揭示药物作用机制的重要方法。本研究结果表明,5 mg/mL 的水蛭素可以有效提升 HK-2 细胞活力。对差异基因进行 KEGG 富集分析结果表明,1 723 个差异基因富集 321 条不同的信号通路,有 85 条富集显著的通路,其中 TNF 信号通路较为显著。TNF 是一种促炎因子,根据以往的调查^[15]数据,不正常升高的促炎因子在某种程度上引起高尿酸血症患者异常的尿酸水平,在短时间内升高,这种情况也会致使尿酸盐堆积,尿酸盐着重堆积在肾脏处,对于患者肾小管上皮细胞有一定的影响,局部会产生炎症反应,这种情况也使炎症细胞越来越多,进而增加了 TNF- α 的含量,在炎症反应下,肾实质细胞也会有一定的损伤,此时会严重损坏患者的肾功能^[16]。此外,当患者体内尿酸水平处于长期高水平时,会导致机体出现尿酸过饱和状态,尿酸及衍生物会在肾脏和关节大量堆积,导致这些脏器或者组织周围的单核巨噬细胞出现黏附现象,释放炎症因子并朝着其他部位渗出,造成恶性循环,加重病

情,引起炎症反应、氧化应激等,从而造成肾损伤、痛风等,因此调控炎症反应是治疗高尿酸血症的有效方法。

水蛭素是一种有效的凝血酶抑制剂,具有从水蛭唾液中提取的抗凝血特性。多项研究已经显示,水蛭素在多种疾病中起抗炎作用。DENG 等^[17]研究了水蛭素治疗大鼠免疫球蛋白 A 肾病的潜力。研究发现,水蛭素治疗可显著降低 IgAN 模型中的蛋白尿、血清肌酐和尿素氮水平、凋亡相关蛋白和炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和 IL-18)。YANG 等^[18]研究了水蛭素在单侧输尿管梗阻大鼠模型肾间质纤维化中的作用,结果显示,水蛭素通过调节 TGF- β 1/Smad 和 NF- κ B 信号通路,减轻肾损伤和肾间质细胞外基质(ECM)沉积。LI 等^[19]研究水蛭素降低 PI3K/AKT 信号通路以治疗肾脏纤维化的分子机制,结果显示,水蛭素治疗显著抑制 PI3K/AKT 信号通路,并降低高尿酸血症大鼠模型中的血尿酸水平和肾损伤。

GO 分析结果表明,水蛭素在高尿酸血症治疗中发挥重要作用,能够在一定程度上激活生长因子的活性,发挥正常功能,也能有效抑制炎症反应,保证生物体的生命健康。IL-17 信号通路能够在一定程度上改善炎症反应,通过建立这一通路,患者体内的软骨细胞、滑液、半月板的功能得到恢复,能在很大程度上避免炎症反应。相关研究^[20]结果表明,IL-17 与其受体反应时,能够在一定程度上激活下游的路径。在此基础上,借助水蛭素能够在一定程度上改善炎症反应,对于高尿酸血症的治疗也有重要意义。本研究结果表明,显著富集的通路大部分集中于炎症和免疫相关的通路,而高尿酸血症最易引起炎症反应进而引发其他各种疾病和并发症,通过转录组学的富集分析结果可知,水蛭素主要通过调控炎症通路进而促进尿酸排泄,促进集体代谢和尿酸排出体外,起到降尿酸的作用。

5 结束语

本研究着重探究金边蚂蟥活性组分水蛭素对于高尿酸血症的治疗作用,通过一系列相关研究获取的数据为今后研究提供有效方向。研究结果提示,水蛭素作用多条炎症信号通路,通过调控多种生物

过程来实现抗高尿酸血症的作用,表明水蛭素是治疗高尿酸血症很有前景的药物。水蛭素抗高尿酸血症靶点及通路丰富,在后续的实验中应进一步验证相关靶点和通路,为抗高尿酸血症药物研发、临床治疗提供参考。

参考文献

- [1] 夏丽芳,何倩,王鑫,等.综合干预措施对肥胖合并高尿酸血症的效果观察[J].新疆医科大学学报,2020,43(1):49-52.
- [2] 吴林秀,何华梅,赵应学,等.水蛭素对尿酸诱导的大鼠肾NRK-52E细胞氧化应激及凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2022,42(15):3735-3739.
- [3] 郭淑云,张薇,张琰.土茯苓对高尿酸血症小鼠血清尿酸的影响[J].中国药业,2012,21(13):3-4.
- [4] 杨方,古红发,秦一磊.清痹散代茶饮联合氯沙坦钾片治疗高尿酸血症合并高血压的临床研究[J].河北中医,2022,44(7):1138-1141.
- [5] JOHNSON R J, BAKRIS G L, BORGHI C, et al. Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a scientific workshop organized by the national kidney foundation[J].Am J Kidney Dis,2018,71(6):851-865.
- [6] BORGHI C, AGABITI-ROSEI E, JOHNSON R J, et al. Hyperuricaemia and gout in cardiovascular, metabolic and kidney disease[J].Eur J Intern Med,2020,80:1-11.
- [7] 曹慧雅,李凯文,李阁,等.健脾祛湿中药治疗高尿酸血症的作用机制研究进展[J].中南药学,2022,20(9):2110-2116.
- [8] 范丽,董正华,杨海霞,等.水蛭素通过JAK/STAT3信号通路缓解人肾小管上皮细胞纤维化的相关机制研究[J].中药材,2018,41(4):982-985.
- [9] GAO X, HUANG D, YANG L S, et al. Identification of gut microbiome and transcriptome changes in ulcerative colitis and pouchitis[J].Scand J Gastroenterol,2022,57(8):942-952.
- [10] 刘喜华,黄敏琪,林忠文,等.金边蚂蟥抗痛风作用研究[J].中草药,2014,45(12):1747-1750.
- [11] 刘喜华,赵应学,周元明,等.水蛭素抗痛风作用及其机制研究[J].中草药,2018,49(6):1365-1370.
- [12] 吴林秀,梁红,赵应学,等.水蛭素对高尿酸血症大鼠尿酸盐转运体OAT1、URAT1、GLUT9表达的影响[J].中草药,2020,51(22):5776-5780.
- [13] ERNY D, HRABĚ DE ANGELIS A L, JAITIN D, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS[J].Nat Neurosci,2015,18(7):965-977.
- [14] 白雪,邱洪斌,王景涛,等.原发性痛风和高尿酸血症相关基因研究现状[J].海南医学院学报,2019,25(16):1275-1280.
- [15] 朱超超,张格艳.血清尿酸、CRP、IL-6、TNF- α 联合检测诊断急性痛风的价值[J].临床医学研究与实践,2021,6(14):92-94.
- [16] 马二秀,李思颖,程雪瑶,等.藤茶总黄酮抗高尿酸血症及肾功能保护作用研究[J].中药药理与临床,2021,37(3):80-85.
- [17] DENG F, ZHANG J W, LI Y, et al. Hirudin ameliorates immunoglobulin A nephropathy by inhibition of fibrosis and inflammatory response[J].Ren Fail,2019,41(1):104-112.
- [18] YANG K, FAN B Y, ZHAO Q Y, et al. Hirudin ameliorates renal interstitial fibrosis via regulating TGF- β 1/smad and NF- κ B signaling in UUO rat model[J].Evid Based Complement Alternat Med,2020,2020:7291075.
- [19] LI Y, ZHANG L, XIONG W J, et al. A molecular mechanism study to reveal hirudin's downregulation to PI3K/AKT signaling pathway through decreasing PDGFR β in renal fibrosis treatment[J].Biomed Res Int,2022,2022:5481552.
- [20] XU S, CAO X T. Interleukin-17 and its expanding biological functions[J].Cell Mol Immunol,2010,7(3):164-174.

[收稿日期:2022-12-23]

[责任编辑:桂根浩 英文编辑:周寿红]