

蛋清源抗氧化肽对 H₂O₂ 诱导的 HEK293 细胞的转录组学研究

张 燕, 魏汝君, 张 婷, 刘博群, 刘静波*
(吉林大学食品科学与工程学院 长春 130062)

摘要 通过转录组学及其生物信息学分析, 研究蛋清源抗氧化肽 WNWAD 对 H₂O₂ 诱导的 HEK293 细胞差异表达基因及相关信号转导通路。结果表明, 损伤组与对照组相比, 共有 866 条基因差异表达, 保护组与损伤组相比, 共有 226 条基因差异表达, 其中 95 条基因在 H₂O₂ 诱导损伤组(H₂O₂ alone)和蛋清源抗氧化肽保护组(WNWAD+H₂O₂)共同表达, 占有差异表达基因的 9.4%。在这些基因中, 41 条基因在过氧化氢诱导损伤的 HEK293 中表达上调, 然而, 加入蛋清源抗氧化肽 WNWAD 预处理的 HEK293 细胞中这些基因显著下调; 47 条基因在过氧化氢诱导损伤的 HEK293 中表达下调, 而加入蛋清源抗氧化肽 WNWAD 预处理的 HEK293 细胞中这些基因显著上调。生物信息学分析结果表明: 对损伤组和保护组共有差异基因进行 GO 功能分析, 结果显示, 这些差异表达的基因可能参与细胞增殖、分化、凋亡以及细胞信号传导等多个生物学过程, 其功能与细胞周期和细胞凋亡有较大的相关性。KEGG 通路富集分析结果显示, 由过氧化氢诱导损伤的 HEK293 细胞的差异表达的基因可能参与丝裂原活化蛋白(MAPK)信号传导途径、转化生长因子信号通路、WNT 信号通路、hippo 信号通路、肌醇磷酸盐代谢、p53 信号通路、癌症调控通路等多条通路的传导, 这些通路与氧化应激和细胞凋亡有较大的相关性。其中, 13 个差异基因参与 MAPK 信号通路的传导。

关键词 蛋清源抗氧化肽; 氧化应激; 转录组学; HEK293 细胞

文章编号 1009-7848(2024)10-0047-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.005

氧化应激被定义为以产生过量的自由基(活性氧 ROS)为特点, 结果会导致生物体各个器官的氧化损伤^[1]。氧化应激会造成机体生物大分子, 如 DNA、脂质、蛋白质和糖类物质等的氧化损伤, 干扰细胞膜功能, 引起衰老, 并促进癌症、糖尿病和动脉粥样硬化等疾病的发展^[2-5], 因此预防和治疗尤为重要。生物活性肽以多种方式发挥其抑制氧化应激的特性, 包括清除自由基, 抑制 ROS 的产生, 上调抗氧化酶活性, 抑制促炎细胞因子的释放以及降血压等^[6-12]。

RNA 测序(RNA-seq)是一种全基因组高通量转录组测序技术, 能够在全基因组范围内检测基因表达情况, 已广泛应用于生命科学、医学、系统生物学等领域, 对于研究和掌握细胞的功能、活性物质的作用机制及生化代谢途径提供了重要的平台^[13-14]。本文通过课题组前期体外化学和细胞试验结果筛选出蛋清源抗氧化肽 WNWAD, 采用

RNA-seq 技术探讨其对 HEK293 细胞氧化应激的抑制作用。以过氧化氢诱导的 HEK293 细胞为氧化损伤模型, 采用 RNA-seq 技术研究蛋清源抗氧化肽 WNWAD(Trp-Asn-Trp-Ala-Asp)对 HEK293 细胞的转录组, 分析基因表达情况, 并对差异表达的基因进行 GO 功能分析和 KEGG 信号通路富集分析, 旨在揭示蛋清源抗氧化肽 WNWAD(Trp-Asn-Trp-Ala-Asp)对 HEK293 细胞氧化应激的抑制作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

人胚肾细胞(HEK293), 中国科学院细胞库。

蛋清源抗氧化肽 WNWAD(Trp-Asn-Trp-Ala-Asp)(纯度>95%), 由上海强耀生物科技有限公司制备合成。

DMEM 培养基(生化级), 美国 GIBCO 公司; 过氧化氢(分析纯级), Alfa Aesar 公司; MTS 检测试剂盒(生化级), 美国 Promega 公司; BCA 蛋白定量分析试剂盒(生化级), 北京鼎国生物有限公司; Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒(生化级), 上海普洛麦格生物产品有限公司。

收稿日期: 2023-10-14

基金项目: 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目
(JJKH20201017KJ)

第一作者: 张燕, 女, 博士, 高级实验师

通信作者: 刘静波 E-mail: ljb168@sohu.com

1.2 仪器与设备

多功能微孔板检测仪,美国 BioTek 仪器公司;SW-CF-1F 洁净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;HF90 二氧化碳培养箱,香港力康生物医疗科技控股集团;Ts2 倒置生物显微镜,日本尼康;CFX96 实时定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad;c BotClonal Amplification System,HiSeq 2500 Sequencing System,美国 Illumina 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 HEK293 细胞培养及试验分组 将 HEK293 细胞接种于 6 孔板中,接种密度为 5×10^5 cells/mL,置于恒温箱中培养,细胞分为对照组、损伤组和保护组。培养 24 h 后,保护组加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 WNWAD 溶液,对照组和损伤组均加入等量完全培养基,继续培养。孵育 24 h 后,损伤组和保护组均加入 $400 \mu\text{mol/L}$ 过氧化氢稀释液,对照组加入培养基,将 3 组细胞置于恒温箱中孵育 24 h。

1.3.2 总 RNA 的提取与纯化 在 HEK293 细胞培养结束时,分别对 3 组 HEK293 细胞进行消化收集,总 RNA 的提取按照 Eastep®Super 总 RNA 提取试剂盒操作说明进行。细胞用 RNA 裂解液裂解后,采用离心分离法将总 RNA 从细胞裂解液中分离出来,并用无水乙醇洗 2~3 次除去杂质。采用 Agilent 2100 对总 RNA 进行质量检测,用 RNeasy micro kit 和 RNase-Free DNase Set 试剂盒进行纯化。

1.3.3 RNA 质检及定量 纯化后的 RNA 在紫外分光光度计下测定波长 260 nm 和 280 nm 的 OD 值。根据 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值估计 RNA 的纯度。并取 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 进行凝胶电泳,检查 18S 和 28S 带的存在情况。

1.3.4 RNA 测序文库的建立与 RNA-seq 除去总 RNA 中的 rRNA 杂质后,将纯化的 RNA 进行片段化处理,随后将 RNA 反转录成第一、二链 cDNA,对 cDNA 进行末端修复并将 poly A 连接到 3' 端上,最后将测序接头连接到 cDNA 上并将其富集。用 Qubit® 2.0 Fluorometer 测定测序文库的浓度,用 FastQC v0.11.5 软件测定文库质量。测定合格后,采用 Illumina Hi Seq 2500 对文库进行测序。

1.3.5 基因组对比和基因表达分析 将原始

reads 过滤除去质量较低、含有测序接头等不合格的 reads,得到干净的 reads。采用 Hisat2(version: 2.0.4) 将干净 reads 对比到基因组(version:hg38)上,映射到基因组上 reads 的数量能大致显示基因表达水平,除此之外,它还与基因长度和测序样本的数量有关。利用 FPKM(Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads)对表达式的值进行归一化处理,映射得到的 fragments (a pair of reads)采用 Stringtie (version:1.3.0)对其计数。

1.3.6 基因差异表达分析 样本间差异基因的分析应用 edgeR 进行,通过控制 FDR(False Discovery Rate)来决定 p -value 的阈值,校正后的 p -value 即 q -value,差异基因选择要求 q -value ≤ 0.05 。同时,根据 FPKM 值计算差异表达倍数,即 Fold-change,差异基因选择要求(Fold-change) ≥ 2 。

为了进一步研究不同表达基因及其表型的生物学关系,将每个不同表达的基因输入 GO 数据库中进行分析。对基因进行 GO 分析将差异基因分为 3 类,包括生物过程、细胞成分和分子功能。同时进行 KEGG 通路分析。

1.3.7 统计分析 结果均表示为“平均值 \pm 标准偏差”。单因素方差分析用来验证组间差异的显著性,显著 $P < 0.05$,极显著 $P < 0.01$ 。

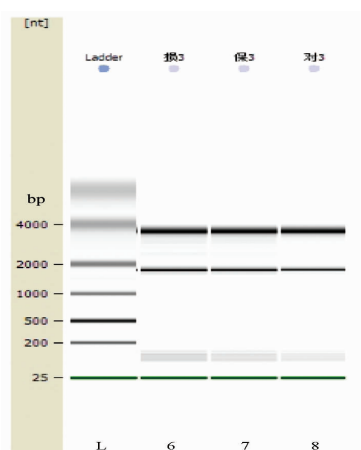
2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量检测结果

试验结果见图 1、表 1 和表 2。由结果可知,本试验提取的 RNA 样品合格,能满足 RNA-seq 的要求。经过 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测, RNA 样品电泳条带清晰(如图 1),细胞 RNA(损 3、保 3、对 3)的 23S/16S rRNA 条带亮度比 ≥ 1.8 ,且 RIN 值 ≥ 9.5 ,表明本试验 RNA 样品完整,没有发生降解。

2.2 RNA-Seq 文库构建结果

试验结果见表 3 和图 2。由结果可知,所建文库可以进行上机测序。经质量检测合格的 RNA 样品进行纯化后,按照操作说明对纯化后的 Total RNA 进行 mRNA 的分离、片段化、cDNA 合成、末端修复、连接接头、富集等步骤,完成测序样本文库构建。使用 Qubit® 2.0 Fluorometer 对所建文库



注:对 3/D3:对照组 RNA;损 3/S3:损伤组 RNA;保 3/B3:保护组 RNA;Ladder:maker。

图 1 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 质量结果

Fig.1 Assessment of RNA quality using Agilent 2100 Bioanalyzer

质量浓度进行检测(表 3),使用 Agilent2100 Bio-analyzer 检测文库的大小(图 2)。

2.3 测序结果质控情况

试验结果见表 4。由结果可知,质控结果符合标准,能够进行数据分析。

2.4 数据预处理结果

试验结果见表 5。由结果可知,对原始 RNA 进行去接头,去低质量 reads,去污染等处理,对照组、损伤组、保护组分别得到干净的序列 59 362 132, 75 934 696,62 435 359 条。利用 Seqtk 对获得的原始 reads 进行过滤处理。

2.5 基因组对比与表达相关性分析

试验结果见表 6。由结果可知,基因组对比与表达相关性良好。

表 1 RNA 质检结果

Table 1 The results of RNA quality inspection

| 序号 | 样本名称 | 质量浓度/ (ng/ μ L) | 体积/ μ L | 总量/ μ g | A_{260nm}/A_{280nm} | 结果 | | 结果 |
|----|------|------------------------|-------------|-------------|-----------------------|------|---------|----------|
| | | | | | | RIN | 28S/18S | |
| 1 | 损 3 | 527.8 | 100 | 52.78 | 2.00 | 9.5 | 1.8 | RNA 基本完好 |
| 2 | 保 3 | 441.2 | 100 | 44.12 | 1.99 | 9.6 | 1.9 | RNA 完好 |
| 3 | 对 3 | 651.1 | 100 | 65.11 | 2.01 | 10.0 | 2.1 | RNA 完好 |

注:对 3 为对照组;损 3 为损伤组;保 3 为保护组;RIN 为 RNA 完整性,RNA 完整性的检测指标,从 0~10,数值越高,RNA 的完整性越好。

表 2 RNA 质检标准及说明

Table 2 The standards and instructions of RNA quality control

| 样品质检情况 | RIN | 28S/18S |
|--------|------------|------------|
| 合格 | ≥ 7.0 | ≥ 0.7 |
| 部分降解 | ≥ 6.0 | < 0.7 |
| 降解 | < 6.0 | — |

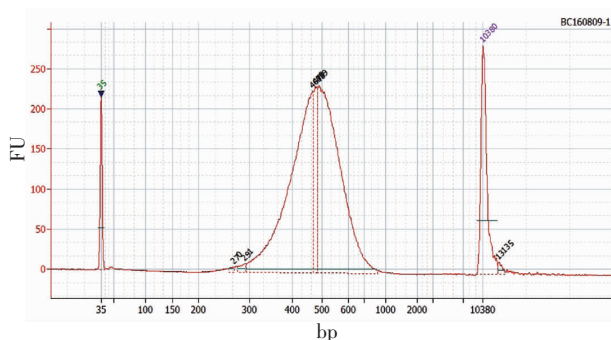


图 2 c DNA 文库构建结果评估

Fig.2 Assessment of c DNA library

表 3 Qubit® 2.0 Fluorometer 定量结果

Table 3 The quantification result of Qubit® 2.0 Fluorometer

| 序号 | 样本名称 | 索引编号 | 质量浓度/(ng/ μ L) | 主峰长度/bp |
|----|------|------|--------------------|---------|
| 1 | 损 3 | 20 | 13.1 | 479 |
| 2 | 保 3 | 21 | 12.0 | 479 |
| 3 | 对 3 | 22 | 19.3 | 479 |

注:对 3 为对照组;损 3 为损伤组;保 3 为保护组。

表4 测序结果质控结果

Table 4 Quality tests result of sequence result

| 样品名称 | 测序类型 | 方向 | 原始碱基数(G) | Q20 比率/% |
|------|------|-----------------|----------|----------|
| B3 | mRNA | Forward/Reverse | 10.1 | 94.05 |
| D3 | mRNA | Forward/Reverse | 9.5 | 94.02 |
| S3 | mRNA | Forward/Reverse | 12.2 | 94.09 |

注: B3 为保护组; D3 为对照组; S3 为损伤组; Q20 比率=Q20 数量/全部碱基数。

表5 Clean 统计结果

Table 5 Clean summary

| 样品名称 | 原始序列数 | 纯净序列数 | 纯净序列比率/% | 修剪后 rRNA | rRNA 比率/% | rRNA 配对数 |
|------|------------|------------|----------|------------|-----------|------------|
| D3 | 63 047 588 | 59 362 132 | 94.15 | 59 301 786 | 0.10 | 56 793 330 |
| S3 | 80 757 042 | 75 934 696 | 94.03 | 75 823 481 | 0.15 | 72 748 826 |
| B3 | 66 557 296 | 62 435 359 | 93.81 | 62 345 964 | 0.14 | 59 727 328 |

注: D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组; 清洁数据比率=(清洁数据/原始数据) \times 100%; rRNA 比率=[(清洁数据-修剪后 rRNA)/清洁数据] \times 100%。

表6 基因组对比结果

Table 6 Mapping result of genome statistics

| 样品名称 | 原始序列数 | 比对到基因组的序列数 | 双端测序方式产生的序列数 | 损坏的双端测序序列数 | 唯一比对位置的序列数 | 多个比对位置的序列数 | 比对到参考基因组上序列比率/% |
|------|------------|------------|--------------|------------|------------|------------|-----------------|
| D3 | 56 793 330 | 53 904 728 | 52 408 544 | 496 184 | 52 768 644 | 136 084 | 93.15 |
| S3 | 72 748 826 | 68 406 771 | 67 756 192 | 650 579 | 68 218 798 | 187 973 | 94.03 |
| B3 | 59 727 328 | 56 130 383 | 55 595 676 | 534 707 | 55 792 084 | 158 299 | 93.98 |

注: D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组; 比对到基因组的序列比率=比对到基因组的序列数/原始序列数。

2.6 样品的表达分布及相关性

试验结果见图3和图4。由结果可知,样品表达分布图(图3)表现为2个明显的峰,证明本试验样品数据量足够。在图中可以观测出基因表达的分布情况以及高丰度基因、低丰度基因的构成情况。根据表达相关性散点图(图4)可以判定2个样本的相关程度。

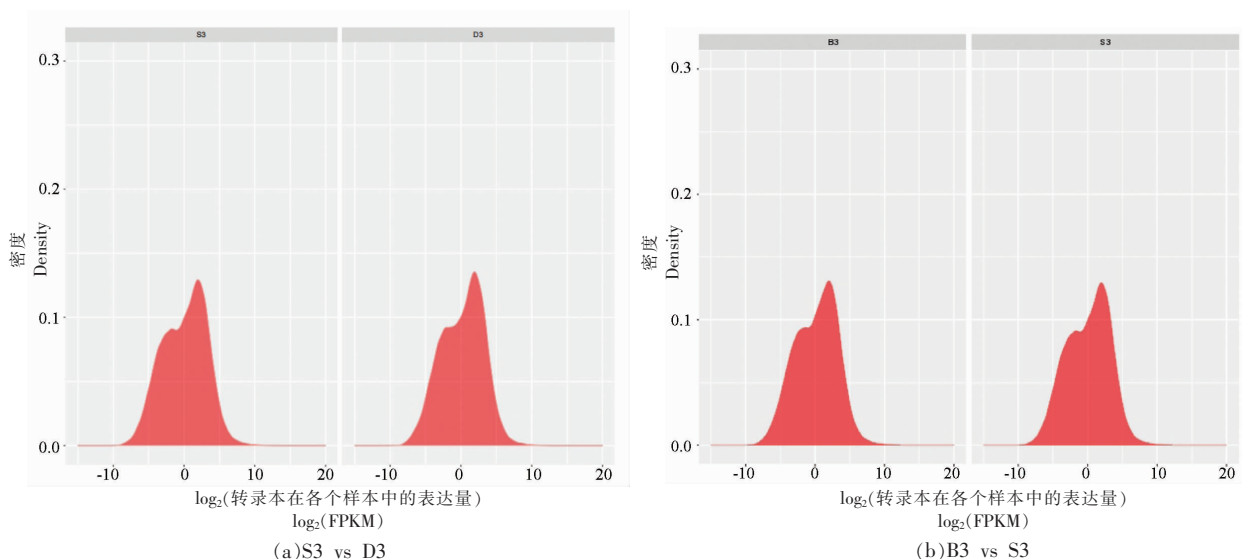
2.7 蛋清源抗氧化肽对过氧化氢诱导损伤的 HEK293 细胞基因表达的影响

试验结果见图5。由火山图可以看出变化显著的差异基因的分布情况。用 Audic 介绍的算法来确定蛋清源抗氧化肽作用后 HEK293 细胞的差异表达基因,当一个基因与对照组相比,向上或向下调节2倍时,被定义为差异表达基因。在本文中,由损伤组与对照组相比,共有866个基因差异表达,在这些基因中,有311个显著上调(≥ 2 fold),有555个显著下调(≤ -2 fold);保护组与损

伤组相比,共有226个基因差异表达,在这些基因中,有104个显著上调(≥ 2 fold),有122个显著下调(≤ -2 fold)。尽管表达水平不同,有95个基因在 H₂O₂ 诱导损伤组(H₂O₂ alone)和蛋清源抗氧化肽保护组(WNWAD+H₂O₂)共同表达了,占有差异表达基因的9.4%(图6)。在这些基因中,其中41个基因在过氧化氢诱导损伤的 HEK293 中表达上调,而加入蛋清源抗氧化肽 WNWAD 预处理的 HEK293 细胞中,这些基因显著下调;其中有47个基因在过氧化氢诱导损伤的 HEK293 中表达下调,而加入蛋清源抗氧化肽 WNWAD 预处理的 HEK293 细胞中这些基因显著上调(表7)。

2.8 差异基因 GO 功能富集分析

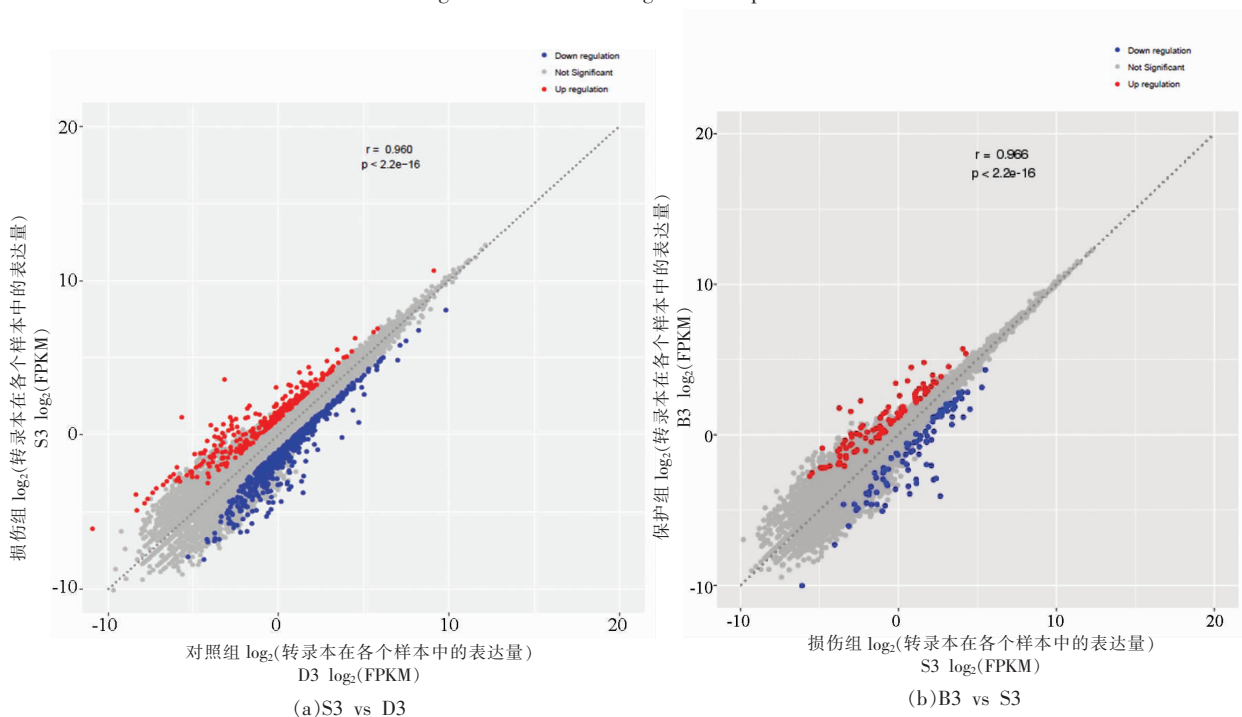
试验结果见图7和图8。由结果可知,蛋清源抗氧化肽和过氧化氢处理 HEK293 细胞后差异基因富集的 GO 条目。基因本体数据库 GO 分析用于研究基因在分子功能(MF)、生物过程(BP)和细胞



注: D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组。

图 3 表达分布图

Fig.3 Distribution diagram of expression



注: 红色表示上调差异基因, 蓝色表示下调差异基因。D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组。FPKM: 转录本在各个样本中的表达量。

图 4 表达相关性散点图

Fig.4 Correlation figure of expression

成分(CC)水平上对不同物质刺激后的差异表达基因的潜在生物学功能。GO 富集分析就是把所挑选的差异表达基因向 GO 数据库的各个条目(term)映射, 计算每个条目的基因数目, 然后应用超几何检验, 与整个基因组背景相比, 筛选在差异

表达基因中显著富集的 GO 条目。当 $P < 0.05$ 时, 认为基因组有效富集。因为一些基因被分配到多个 GO 条目下面, 所以在 3 个 GO 条目中的基因总数大于差异基因总数。损伤组与对照组相比(S3 vs D3), 在 866 个差异基因中, 有 594 个基因被映射

表7 对照组、损伤组和保护组共同表达的基因

Table 7 The genes expressed in the control group, the injury group and the protection group

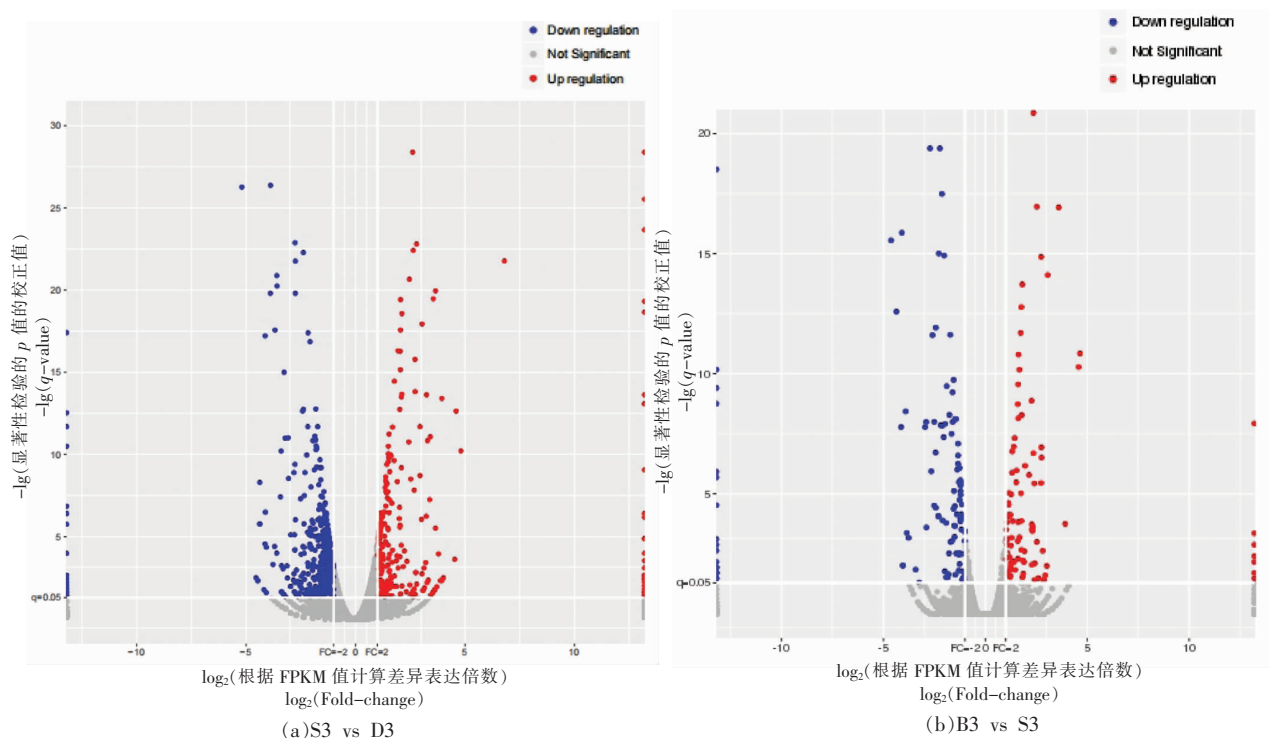
| 分类 | 基因名称 |
|-----------|---|
| 共有基因(95个) | <i>RP11-473I1.9, SH3BP1, RHEBPI, RP11-196G11.1, RABL6, ISY1-RAB43, NDUFC2-KCTD14, ATP6V1G2-DDX39B, NIPAL2, C10orf12, RP11-119K6.6, CLEC11A, AC005519.4, RP11-717K11.2, ZNF24, RP11-1035H13.3, AC018804.7, BLOC1S5-TXNDC5, CTC-260F20.3, ASAH2, RP11-521B24.4, BIVM-ERCC5, ERF, AC009336.19, RP11-762I7.5, SIAH1, TRAPPC2, NEAT1, HELLPAR, GPRASP1, MAP3K2, RP5-1039K5.12, DUSP3, C1orf95, TMEM164, RP11-482H16.1, ITIH4, RP11-548K23.11, TGFB2, TMEM265, MTURN, METTL16, SAMD12, ZNF804A, RP4-583P15.15, RP11-970I2.7, RNASEK-C17orf49, CDIPT, RP11-140L24.4, TBC1D20, RP11-77P16.4, PI15, P2RY11, TUBB4A, SH3BP5-AS1, CCDC93, HAPLN4, PDXP, MATR3, TGFA, ANKRD34B, SOGA3, SCHIP1, RP11-432B6.3, AC138430.4, SUMO3, CTD-307407.11, FBXO16, AC098614.2, HOXD3, RUNX2, RP5-1056L3.3, ZBED6, PAK6, CTD-2196E14.9, MUSTN1, EIF2S3L, RP5-1139B12.3, RUNDC3A-AS1, TCAF2, SLX1A, ARM CX4, BAX, RP11-146B14.1, MINOS1-NBL1, AC010547.9, RP11-574K11.31, C9orf47, LEAP2, AC007192.4, HRH1, PTGS1, RP13-104F24.1, GPR12, ZNF497</i> |
| 下调基因(41个) | <i>RP11-473I1.9, SH3BP1, ISY1-RAB43, NDUFC2-KCTD14, ATP6V1G2-DDX39B, C10orf12, CLEC11A, AC005519.4, RP11-1035H13.3, AC018804.7, CTC-260F20.3, RP11-521B24.4, ERF, RP11-762I7.5, HELLPAR, MAP3K2, RP5-1039K5.12, DUSP3, RP11-482H16.1, RP11-548K23.11, METTL16, SAMD12, CDIPT, RP11-140L24.4, TBC1D20, BAX, P2RY11, TUBB4A, HAPLN4, SCHIP1, RP11-432B6.3, CTD-307407.11, AC098614.2, HOXD3, PAK6, MUSTN1, SLX1A, RP11-146B14.1, HRH1, PTGS1, GPR12</i> |
| 上调基因(47个) | <i>RHEBPI, RP11-196G11.1, NIPAL2, RP11-119K6.6, RP11-717K11.2, ZNF24, ASAH2, BIVM-ERCC5, AC009336.19, SIAH1, TRAPPC2, NEAT1, GPRASP1, C1orf95, TMEM164, ITIH4, TGFB2, TMEM265, MTURN, ZNF804A, RP4-583P15.15, RP11-970I2.7, RP11-77P16.4, SH3BP5-AS1, CCDC93, PDXP, MATR3, TGFA, ANKRD34B, SOGA3, AC138430.4, SUMO3, FBXO16, RUNX2, RP5-1056L3.3, ZBED6, RP5-1139B12.3, RUNDC3A-AS1, TCAF2, ARM CX4, AC010547.9, RP11-574K11.31, C9orf47, LEAP2, AC007192.4, RP13-104F24.1</i> |

到 GO 条目中,在基因执行的分子功能分类中,有很高比例的基因被分配到结合活性[GO:0005488],蛋白结合活性[GO:0005515]和离子结合活性[GO:0043167]($P < 0.05$);在基因所处的细胞组分分类中,有很高比例的基因被分配到细胞膜固有组分 [GO:0031224], 细胞外区域 [GO:0005576];在基因以及参与的生物学过程分类中,有很高比例的基因被分配到细胞过程[GO:0009987],代谢过程[GO:0008152],细胞过程的调节[GO:0050794],细胞代谢过程[GO:0044237],细胞通讯传递[GO:0050896]等。然而,目前基因分布只是基于同源搜索理论预测的结果,应该通过试验进一步验证。

保护组与损伤组相比(B3 vs S3),在 226 个差异基因中,有 168 个基因被映射到 GO 条目中,在基因执行的分子功能分类中,有很高比例的基

因被分配到有机化合物结合活性[GO:0097159],核酸结合活性 [GO:0003676], 阳离子结合活性 [GO:0043169],金属离子结合活性[GO:0046872],DNA 结合活性[GO:0003677]($P < 0.05$);在基因所处的细胞组分分类中,有很高比例的基因被分配到膜的固有成分 [GO:0031224],膜的组成部分 [GO:0016021],高尔基体[GO:0005794];在基因以及参与的生物学过程分类中,有很高比例的基因被分配到有机物质的反应过程 [GO:0010033],细胞表面受体信号通路[GO:0007166],细胞对有机物质的反应 [GO:0071310] 和胞内运输[GO:0046907]。

图 8 展示的是 Rich Factor 排名前 30 的 GO 条目。其中 Rich Factor = (某个 GO term 中差异基因的数目/能够对应到 GO 数据库中的所有差异基因的数目)/(某个 GO term 中包含的基因数目/



注:红色表示上调差异基因,蓝色表示下调差异基因。两条竖线是指表达差异倍数为 2 倍。D3:对照组;S3:损伤组;B3:保护组。

图 5 差异基因火山图

Fig.5 The figure of volcano

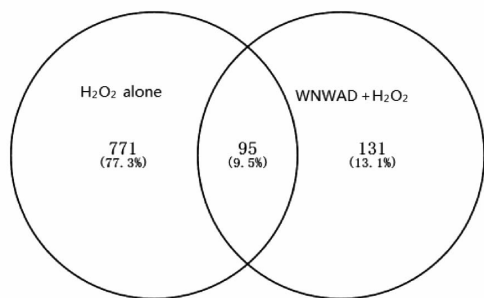


图 6 过氧化氢和蛋清源抗氧化肽处理 HEK293 细胞基因表达数目和百分比的韦恩图

Fig.6 Venn diagram showing numbers and percentages of gene expressions induced by peptides and H₂O₂

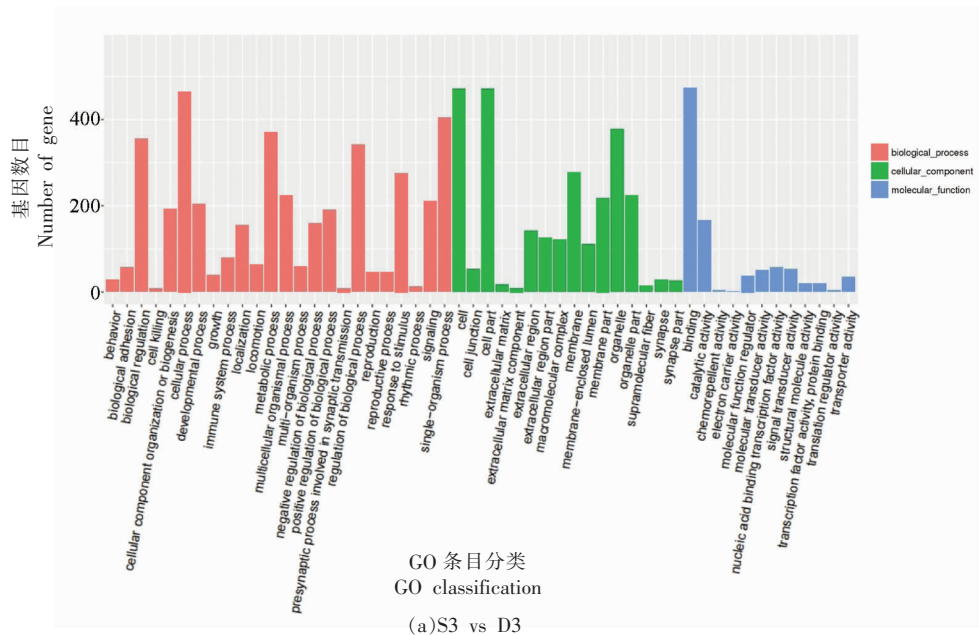
能够对应到 GO 数据库中的总的基因数目), Rich Factor 越大,表示富集的程度越大。 q -value 是多重假设检验校正之后的 p -value,数值越小表示富集越显著。

此外,对损伤组和保护组共有差异基因进行 GO 功能分析。在生物过程 (BP) 中,富集因子 (rich_factor) 最高的条目为:软骨发展[GO:

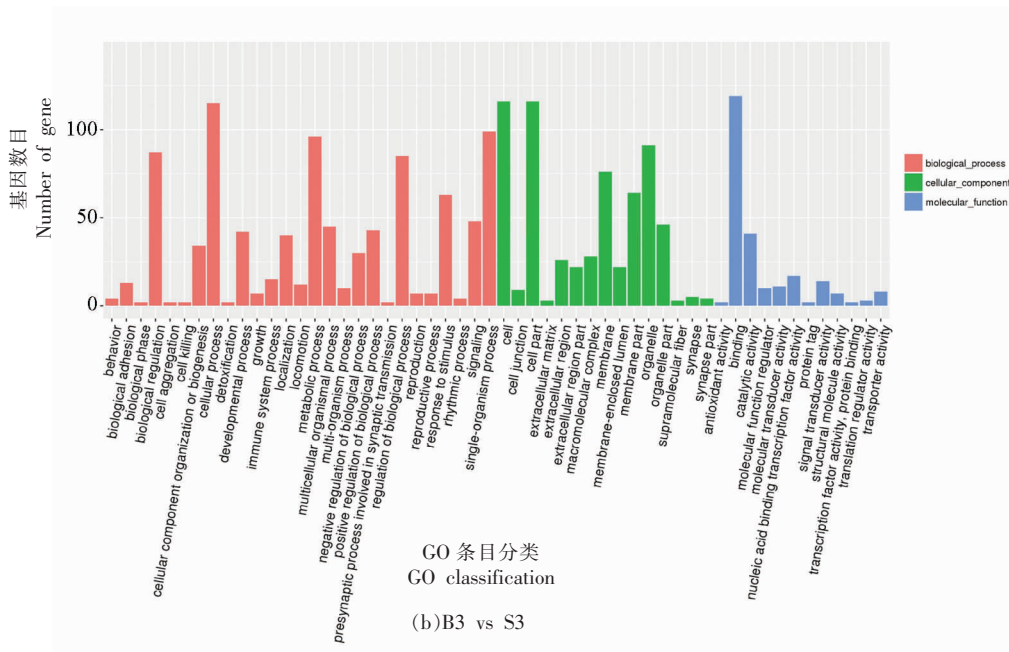
0051216], 结缔组织发展[GO:0061448], 应激引起的蛋白激酶信号[GO:0031098], 高尔基小泡的转运 [GO:0048193], 细胞周期中有丝分裂的调节 [GO:0007346], MAPK 信号的调节[GO:0043408], 细胞周期的调节[GO:0051726]($P < 0.05$), GO 分析结果显示, 这些差异表达的基因可能参与了细胞增殖、分化、凋亡以及细胞信号传导等多个生物学过程, 其功能与细胞周期和细胞凋亡有较大的相关性。

2.9 差异基因 KEGG 通路富集分析

试验结果见图 9 和图 10。由结果可知,由过氧化氢诱导损伤的 HEK293 细胞的差异表达的基因可能参与了多条通路的传导, 这些通路氧化应激和细胞凋亡有较大的相关性。将所有差异表达基因导入京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库, 按照相似的原理对各个通路上的差异表达基因数目进行统计 (图 9), 并进行 KEGG 通路富集分析。结合文献中已报道的氧化应激相关通路进行比较分析以确定相关的路径。



(a)S3 vs D3



(b)B3 vs S3

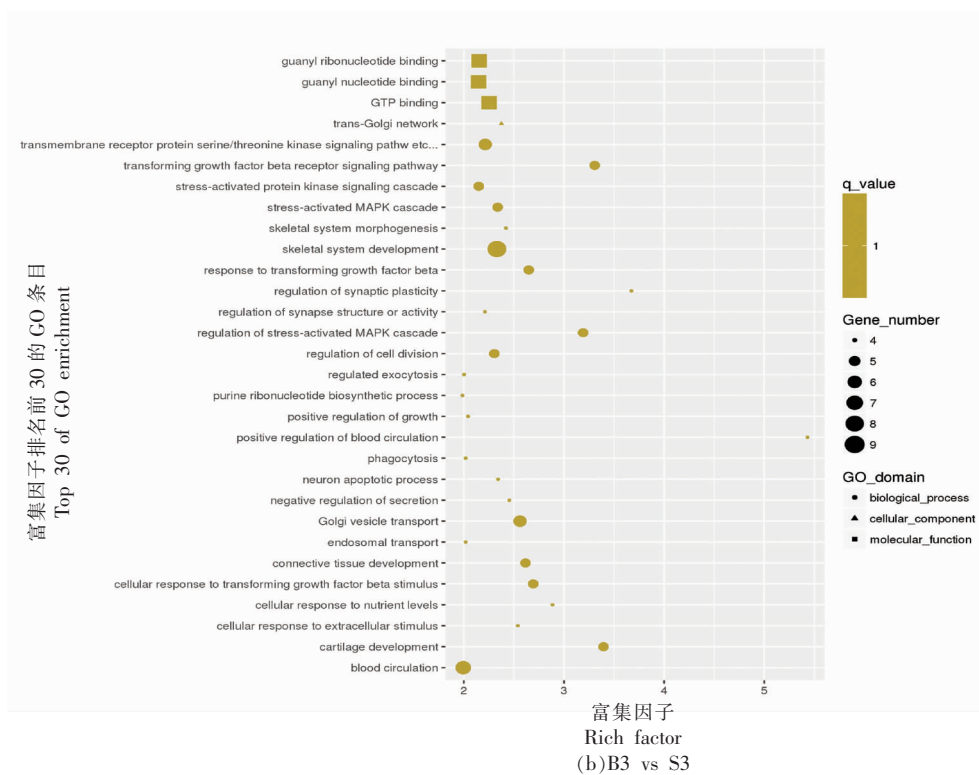
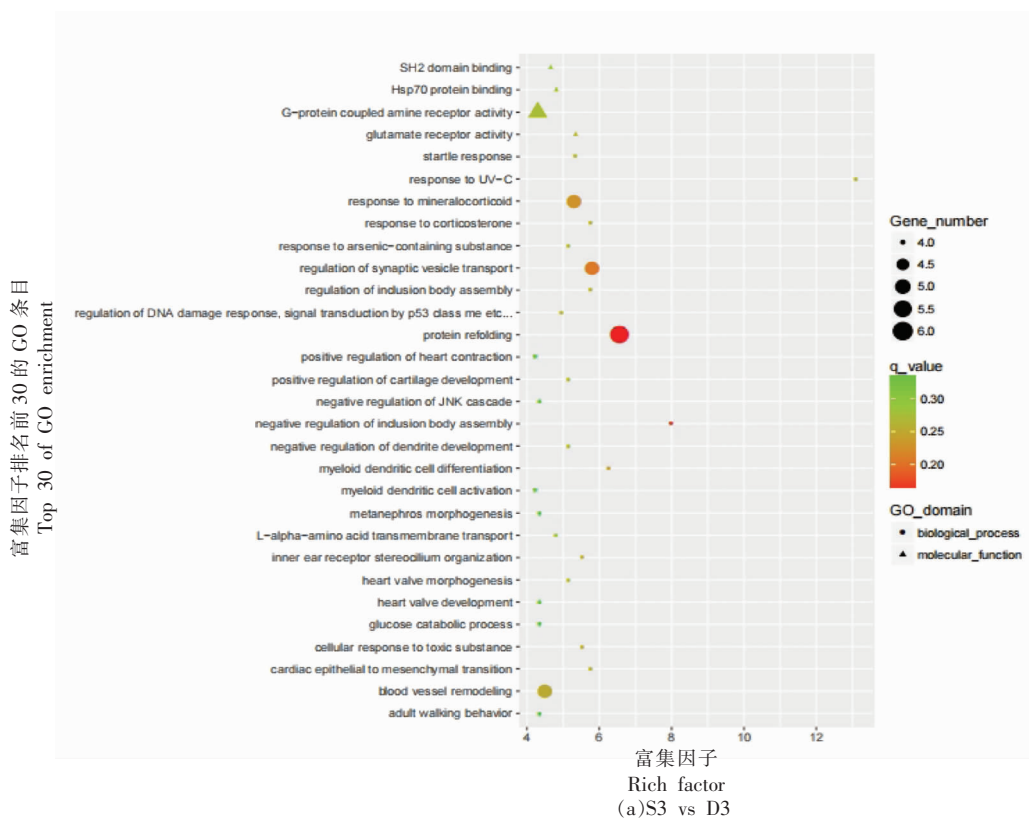
注: D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组。

图 7 差异表达基因的 GO 功能分类条形图

Fig.7 Bar plot of GO enrichment result

损伤组与对照组相比, 共有 866 个基因表达显著差异, 其中 209 个基因被注释到特定的 KEGG 通路中; 保护组与损伤组相比, 共有 226 个基因表达显著差异, 其中 40 个基因被注释到特定的 KEGG 通路中, 当 P 值小于 0.05 时, 认为基因组为有效富集。KEGG 信号通路分析结果显示, 由

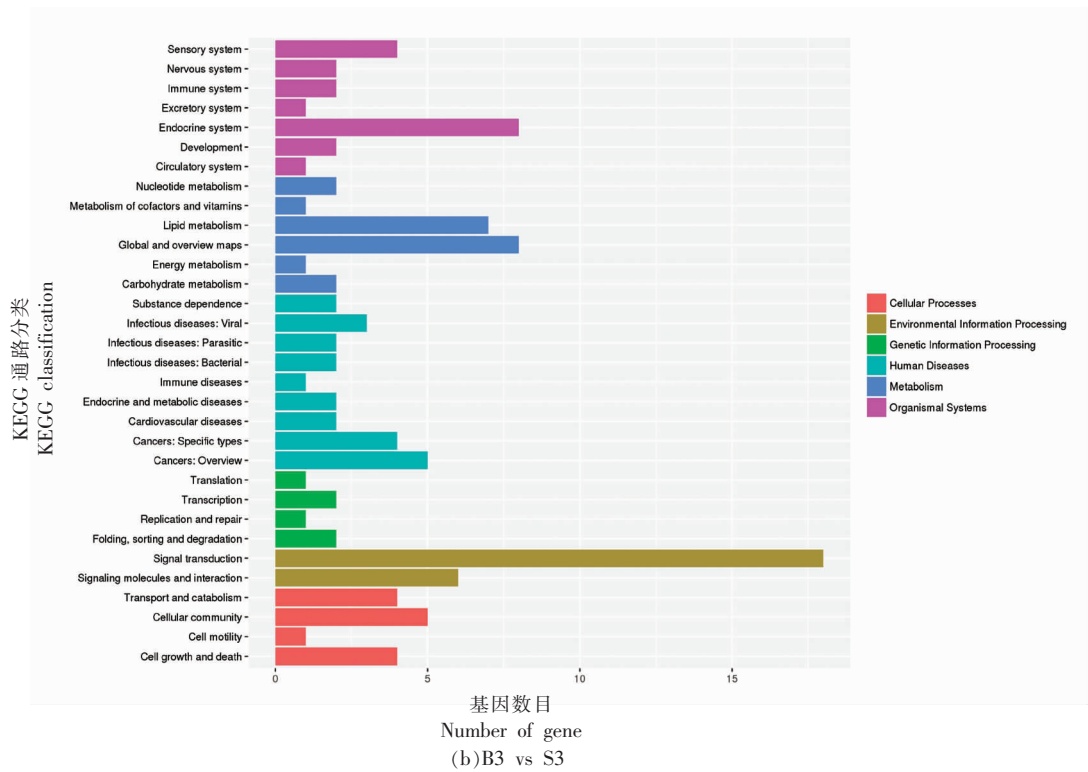
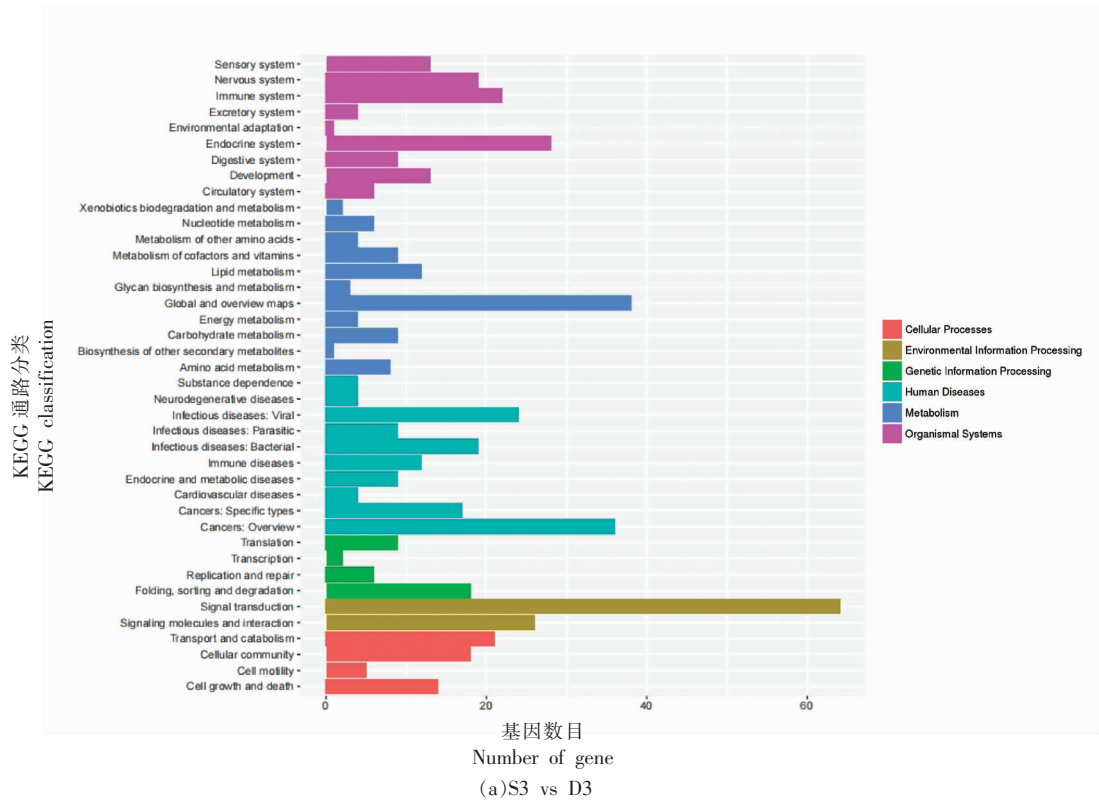
过氧化氢诱导损伤的 HEK293 细胞的差异表达的基因可能参与了丝裂原活化蛋白(MAPK)信号传导途径 [hsa04010], 转化生长因子信号通路 [hsa04350], WNT 信号通路 [hsa04310], hippo 信号通路 [hsa04390], 肌醇磷酸盐代谢 [hsa00562], 激酶信号通路 [hsa04012], 帕金森病 [hsa05012], 炎症中



注: D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组。

图 8 差异表达基因的 GO 富集散点图

Fig.8 Scatter plot of GO enrichment result

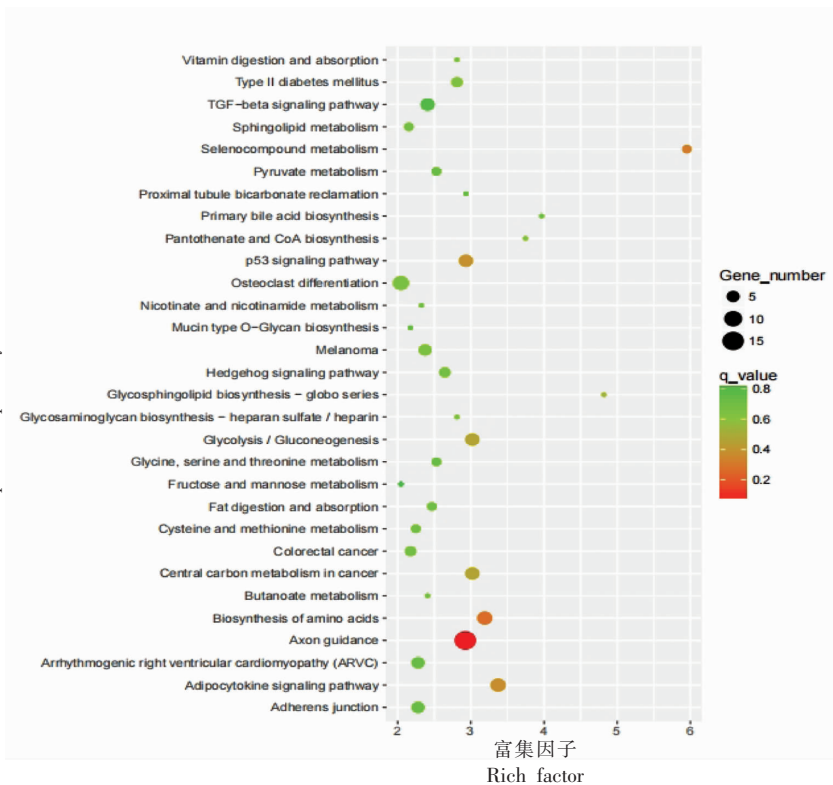


注: D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组。

图 9 差异表达基因的 KEGG pathway 分类统计图

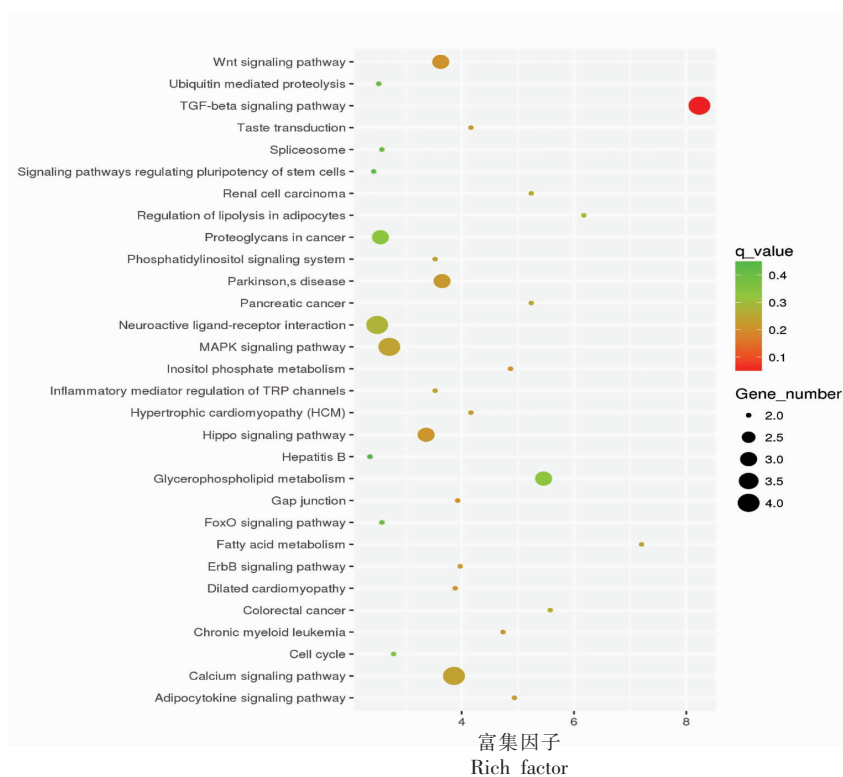
Fig.9 Bar plot of KEGG enrichment result

富集程度排名前 30 的 KEGG 通路
Top 30 of pathway enrichment



(a)S3 vs D3

富集程度排名前 30 的 KEGG 通路
Top 30 of pathway enrichment



(b)B3 vs S3

注: D3 为对照组; S3 为损伤组; B3 为保护组。

图 10 差异表达基因的 KEGG 富集散点图

Fig.10 Scatter plot of KEGG enrichment result

介调节的 TRP 通道[hsa04750], 磷脂酰肌醇信号系统[hsa04070], 钙信号通路[hsa04020], 脂肪酸代谢 [hsa01212], 胰腺癌 [hsa05212], 细胞周期 [hsa04110], 叉头盒 O(FOXO)家族的转录因子信号通路[hsa04068], p53 信号通路[hsa04115], 氨基酸的生物合成 [hsa01230], 癌症调控通路 [hsa05200]等多条通路的传导, 这些通路氧化应激和细胞凋亡有较大的相关性。其中, 13 个差异基因参与了 MAPK 信号通路的传导。

氧化应激造成细胞损伤, 以及最终的炎症, 包括通过 MAPK 和 PPAR 信号传导途径的信号传导。促炎细胞因子对受体的结合触发了有丝分裂激活蛋白激酶(MAPK)途径, 并最终导致转录因子的激活, 包括核因子 kappa B 和激活蛋白-1 的 c-jun 部分。PPAR 途径调节各种炎症反应, 使用与神经相关的机制来影响转录因子的水平, 如 AP1, STATs 和 NFAT 29。这些转录因子激活了多种基因的表达。氧化应激与凋亡细胞死亡密切相关, 并提示氧化应激激活转录机制导致细胞凋亡^[15-16]。例如, 肿瘤抑制基因 *p53* 会在氧化应激反应中被激活, 而氧化应激反过来会激活多种途径, 包括有丝蛋白激活的蛋白激酶(MAPK)。氧化应激引起的信号的最终结果很大程度上取决于细胞通过负反馈来克服氧化应激刺激的能力, *p53* 通过各种不同的中介体, 比如 MAPK 和 AKT 来激活环氧酶 II(COX)^[17-18]。当压力超过细胞时, 细胞凋亡就会发生, 包括各种各样的级联反应, 最终导致细胞周期的停滞和死亡。*p38* MAPK 信号通路主要参与应激条件下细胞炎症反应和凋亡过程, 在炎症、应激反应中具有重要作用。本文发现, 参与 MAPK 信号通路调控的部分基因在 H₂O₂ 诱导的 HEK293 氧化损伤的细胞中表达明显上调, 其靶基因的转录后翻译可能被抑制, 从而导致 MAPK 信号通路失活, 细胞凋亡增加。

转化生长因子 β (Transforming growth factor, TGF- β)是一种多功能的多肽类细胞因子, 在肿瘤的形成、发展及肿瘤免疫抑制的产生中发挥着重要作用。TGF- β 对细胞增殖具有双向调节作用。一方面, 通过诱导 c-sis 基因编码血小板衍生生长因子, 发挥对成纤维细胞的促增殖作用; 激活 Ras/MAPKs 信号通路, 使肿瘤细胞发生有丝分裂; 另

一方面, 通过 Smads 通路, 对多种肿瘤表现为细胞增殖抑制, 使肿瘤细胞停滞在 G1 期^[19]。在本文中, 在过氧化氢诱导损伤的细胞模型中 TGF- β 的表达下调, 细胞增殖受到抑制, 促进细胞凋亡。

在氧化应激细胞模型中 MAP3K2 的表达上调, MAP3K2 作为 MEKK2 参与了 MAPK 信号通路的激活。MAP3K2 可能参与了氧化应激致 MAPK 信号通路失活而促细胞凋亡的病理过程^[20]。氧化应激状态下 MAP3K2 基因的转录后翻译, 抑制细胞生长和分化等, 从而促进 HEK293 细胞的凋亡。在 MAPK 途径中, 磷酸化和激活 MAPK 激酶(MAPKKK)会导致 MAPK 激酶(MAPKK)的磷酸化, 而 MAPKK 则会使 MAPKs 磷酸化(包括胞外信号调控激酶, ERK, JNK, p38)。激活的 MAPKs 会对多种转录因子(如 c-Myc, ATF-2, c-Jun)进行磷酸化, 导致细胞增殖、迁移、分化, 对 ERK1/2 信号通路和存活等多种细胞活动。引起对 JNK 和 p38 信号通路的自体吞噬、凋亡压力和炎症^[21]。类似地, 当细胞因子与相应的受体结合时, JAKs 会被激活, 从而导致 STAT 的磷酸化和 STAT-STAT 二聚体的形成。随后, 二聚体被转移到细胞核中, 并通过直接与 DNA 的结合来调节特定的基因表达, 从而导致炎症反应^[22]。

BAX 是凋亡家族的重要成员之一, 组织中广泛表达, 在促进肿瘤细胞增殖、分化、侵袭等方面发挥重要的调控作用。本文中, H₂O₂ 刺激后 HEK293 细胞中 BAX 的表达量明显增加, 而加入蛋清源抗氧化肽预处理后, BAX 的表达量下降, 说明蛋清源抗氧化肽可能参与了氧化应激损伤抑制的调控。

研究结果表明, H₂O₂ 产生了造成细胞凋亡的基因 BAX, *p38* MAPK 和 *CDK4* 的转录, 而蛋清源抗氧化肽显示一些相反的转录变化表明 WNWAD 倾向于 HEK293 细胞的生存。通过提高抗氧化能力, 蛋清源抗氧化肽可以减少氧化应激, 可能是通过对 MAPKs 信号通路基因的转录调节来实现的。MAPKs 信号通路一直是众多研究的热点。地骨皮乙素、红景天苷、橄榄油多酚等活性物质也被证明可以通过抑制 MAPKs 信号途径, 防止过氧化氢诱导的细胞氧化损伤和凋亡^[23-24]。

3 结论

利用RNA-seq技术研究蛋清源抗氧化肽WNWAD对过氧化氢诱导的HEK293细胞的转录组的影响,发现当HEK293细胞经H₂O₂诱导损伤后,与对照组相比,有866个基因差异表达,在这些基因中,有311个显著上调(≥ 2 fold),555个显著下调(≤ -2 fold);当加入蛋清源抗氧化肽后,保护组与损伤组相比,共有226个基因差异表达,在这些基因中,有104个显著上调(≥ 2 fold),有122个显著下调(≤ -2 fold);对这些差异表达的基因进行GO功能和KEGG通路富集分析,结果发现,损伤组与对照组相比,共有866个基因表达显著差异,有594个基因被映射到GO条目中,其中209个基因被注释到特定的KEGG通路中;保护组与损伤组相比,共有226个基因表达显著差异,有168个基因被映射到GO条目中,其中40个基因被注释到特定的KEGG通路中。许多重要的基因都受到了显著的调控,它们涉及到各种通路,比如丝裂原活化蛋白(MAPKs)信号传导途径,转化生长因子信号通路,WNT信号通路,hippo信号通路,癌症调控通路等,这些通路与氧化应激和细胞凋亡有较大的相关性。其中,13个差异基因参与了MAPK信号通路的传导。蛋清源抗氧化肽WNWAD对过氧化氢诱导所致细胞凋亡基因的转录有一定的负调控作用,显示WNWAD倾向于HEK293细胞的生存。通过提高抗氧化能力,蛋清源抗氧化肽可以减少氧化应激,可能是通过对MAPKs信号通路基因的转录调节来实现的。

参 考 文 献

- [1] YAO E H, YU Y, FUKUDA N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2006, 7 (2): 101-108.
- [2] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 246 (2): 501-514.
- [3] YOUNG Y K, LALONDE C, DEMLING R. Oxidants and the pathophysiology of burn and smoke inhalation injury[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1992, 12(5): 409-415.
- [4] LEE J, KOO N, MIN D B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2004, 3(1): 21-33.
- [5] HARMAN D. Aging: A theory based on free-radical and radiation-chemistry[J]. *Journals of Gerontology*, 1956, 11(3): 298-300.
- [6] MINE Y, KOVACS-NOLAN J. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg [J]. *Worlds Poultry Science Journal*, 2006, 62(1): 87-95.
- [7] YOUNG D, FAN M Z, MINE Y. Egg yolk peptides up-regulate glutathione synthesis and antioxidant enzyme activities in a porcine model of intestinal oxidative stress [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(13): 7624-7633.
- [8] LIU J B, CHEN Z F, HE J, et al. Anti-oxidative and anti-apoptosis effects of egg white peptide, Trp-Asn-Trp-Ala-Asp, against H₂O₂-induced oxidative stress in human embryonic kidney 293 cells[J]. *Food & Function*, 2014, 5(12): 3179-3188.
- [9] NAGAI T, NAGASHIMA T, ABE A, et al. Antioxidative activities and angiotensin I-converting enzyme inhibition of extracts prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) cartilage and skin[J]. *International Journal of Food Properties*, 2006, 9 (4): 813-822.
- [10] 杨瑾. 鸡蛋蛋白酶水解物的制备、物化及抗氧化性质的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
YANG J. Preparation, physicochemical and antioxidant properties of egg protease hydrolysate [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [11] RAJAPAKSE N, MENDIS E, JUNG W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. *Food Research International*, 2005, 38(2): 175-182.
- [12] WANG J, WANG K, LIN S Y, et al. Improvement of antioxidant activity of peptides with molecular weights ranging from 1 to 10 kDa by PEF technology[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(3): 244-249.

- [13] KHATOON Z, FIGLER B, ZHANG H, et al. Introduction to RNA-Seq and its applications to drug discovery and development [J]. *Drug Development Research*, 2014, 75(5): 324-330.
- [14] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用[J]. *遗传*, 2011(11): 1191-1202.
- QI Y X, LIU Y B, RONG W H. New technology of transcriptome research: RNA-seq and its application[J]. *Heredity*, 2011(11): 1191-1202.
- [15] BUTTKE T M, SANDSTROM P A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis [J]. *Immunology Today*, 1994, 15(1): 7-10.
- [16] CHANDRA J, SAMALI A, ORRENIUS S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(3/4): 323-333.
- [17] CHOI E M, HEO J I, OH J Y, et al. COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 328(4): 1107-1112.
- [18] HAN J A, KIM J I, ONGUSAHA P P, et al. p53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53-or genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Embo Journal*, 2002, 21(21): 5635-5644.
- [19] QI Z L, SHEN L, ZHOU H T, et al. Phosphorylation of heat shock protein 27 antagonizes TNF-alpha induced HeLa cell apoptosis via regulating TAK1 ubiquitination and activation of p38 and ERK signaling[J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(7): 1616-1625.
- [20] QI Z L, YIN F, LU L N, et al. Baicalein reduces lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing JAK/STATs activation and ROS production [J]. *Inflammation Research*, 2013, 62(9): 845-855.
- [21] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: An update[J]. *Archives of Toxicology*, 2015, 89(6): 867-882.
- [22] O'SHEA J J, SCHWARTZ D M, VILLARINO A V, et al. The JAK-STAT pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention[J]. *CASKEY C T. Annual Review of Medicine*, 2015, 66: 311-328.
- [23] QING Y, LIANG Y F, DU Q Q, et al. Apoptosis induced by trimethyltin chloride in human neuroblastoma cells SY5Y is regulated by a balance and cross-talk between NF-kappa B and MAPKs signaling pathways[J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87(7): 1273-1285.
- [24] INCANI A, DEIANA M, CORONA G, et al. Involvement of ERK, Akt and JNK signalling in H₂O₂-induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(6): 788-796.

Transcriptomic Analyses of Antioxidant Peptides from Egg White on H₂O₂-Induced Oxidative Stress Injury in Human Embryonic Kidney 293

Zhang Yan, Wei Rujun, Zhang Ting, Liu Boqun, Liu Jingbo*
(College of Food Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130062)

Abstract This article used transcriptomic analysis and bioinformatics analysis to study the differentially expressed genes at the transcriptional level and related signal transduction pathways of antioxidant peptides from egg white on H₂O₂-induced oxidative stress injury in human embryonic kidney 293. The results showed that when HEK293 cells were injured by H₂O₂, 866 genes were differentially expressed compared with the control group. When egg white-derived active peptides were added, a total of 226 genes were differentially expressed in the protected group compared to the injured group. Among these genes, 95 genes are expressed in the H₂O₂-induced injury group (H₂O₂ alone) and the egg white-derived antioxidant peptide protection group (WNWAD+H₂O₂). Among these genes, 41 genes were significantly up-regulated (≥ 2 fold) in HEK293 damaged by hydrogen peroxide, but these genes were significantly down-regulated in HEK293 cells pretreated with WNWAD, an antioxidant peptide derived from egg white; and 47 genes were significantly down-regulated (≤ -2 fold) in HEK293 damaged by hydrogen peroxide, but these genes were significantly up-regulated in HEK293 cells pretreated with the anti-oxidant peptide. In the end, these differentially expressed genes were analyzed

for GO function and KEGG pathway enrichment. The results showed that these differentially expressed genes may be involved in multiple biological processes such as cell proliferation, differentiation, apoptosis, and cell signal transduction. KEGG pathway enrichment analysis results show that the differentially expressed genes in HEK293 cells injured by hydrogen peroxide may be involved in the mitogen-activated protein (MAPK) signaling pathway, transforming growth factor signaling pathway, WNT signaling pathway, and hippo signaling pathway, inositol phosphate metabolism, p53 signaling pathway, cancer regulation pathway and many other pathways, these pathways have a greater correlation with oxidative stress and apoptosis. Among them, 13 differential genes are involved in the conduction of MAPK signaling pathway.

Keywords antioxidant peptides from egg white; oxidative stress injury; transcriptomics; HEK293 cells