



日本医蛭唾液腺对饥饿胁迫响应的转录组比较

邢月婷^{1,2}, 管峰¹, 李诗语¹, 张世雄¹, 罗媛媛^{1*}

(1. 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018;

2. 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 为了探究饥饿胁迫对日本医蛭唾液腺基因表达水平的影响, 本实验通过Illumina HiSeq 2500高通量测序平台分别对饥饿30 d处理组(D30)和饥饿0 d (D0)对照组的日本医蛭的唾液腺组织进行双端测序, 对获得的原始数据进行质量控制及从头组装, 获得145 981个unigenes, 平均长度为675 bp, N50为1 127 bp。针对CDD、KOG、COG、NR、NT、PFAM、Swissprot、TrEMBL、GO和KEGG等数据库的序列比对分析, 145 981个unigenes均能得到注释。通过引入TPM (transcripts per million) 来估算基因表达水平, 并通过DEGseq进行基因表达差异分析。以饥饿0 d为对照组, 显著差异基因筛选条件设置为 Q value<0.05且差异倍数|Fold Change|>2, 获得2 650个差异基因, 其中667个基因显著上调, 1 983个基因显著下调。选取日本医蛭唾液腺4个重要功能基因进行荧光定量PCR (qRT-PCR) 验证, 结果证明转录组测序分析可靠。将所有差异表达基因进行GO功能富集分析, 显著富集到175条途径, 其中胞质核糖体途径富集程度最为显著, 核糖体途径次之, 且参与这些途径的差异基因基本均下调。KEGG通路富集分析进一步证明, 差异基因在核糖体通路中富集程度最为显著。此外, 差异基因中4个基因被预测参与抗凝、抗血栓、抗菌、抗炎和抗肿瘤过程, 这可能在各种疾病的治疗中发挥重要作用。参与核糖体通路的基因表达量显著降低, 表明日本医蛭唾液腺通过降低蛋白质代谢以应对饥饿环境。该实验结果为深入研究日本医蛭唾液腺饥饿胁迫适应的分泌调控机制以及药用价值基因的发掘提供了重要的参考材料, 并为其他医学蛭类研究提供参考依据。

关键词: 日本医蛭; 唾液腺; 饥饿胁迫; 转录组测序; 从头组装; 差异表达分析

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

日本医蛭(*Hirudo nipponia*)属无吻蛭目(Arhyndobdellida)、医蛭科(Hirudinidae), 俗称水蛭, 记载始于《神农本草经》, 据考证, 是古人所使用的医学蛭类之一^[1]。日本医蛭广泛分布于亚洲地区, 是2015年版《中国药典》收录的唯一吸食血液的蛭类药材物种, 具有极强的抗凝血酶活性和抗血小板聚集作用^[2], 药效远高于《中国药典》收录的另外两个物种, 即宽体金钱蛭(*Whitmania pigra*)和尖细金钱蛭(*W. acranulata*)^[3]。日本医蛭的药用价值主要来源于唾液腺中的各

类生物活性成份^[4-5], 例如guamerin^[6]、piguamerin^[7]和bdellin-KL具有镇痛抗炎的功效^[8]; 透明质酸酶(hyaluronidase)能够促进细胞外基质降解^[9-10]。水蛭素(hirudin)作为弥漫性血管内凝血综合征患者的首选药物, 具有直接抑制凝血酶的优点^[4]。如今, 重组水蛭素和地西卢定已被食品药品监督管理局(FDA)批准使用^[11]。相较于其他种属, 日本医蛭存在个体小、生长慢、养殖难度大的问题^[3], 因此, 国内对于日本医蛭的研究主要集中在生长繁殖^[12]、生理结构^[13-14]、同工酶^[15]及抗凝

收稿日期: 2018-12-19 修回日期: 2019-10-13

资助项目: 国家自然科学基金(31440030)

通信作者: 罗媛媛, E-mail: yyluo@cjlu.edu.cn

活性等方面^[16]。

自然界中由于环境及季节的改变而出现食物分布不均的现象,导致蛭类动物受到饥饿胁迫^[17],蛭类动物从而在行为、形态和生理等方面做出适应性调节^[18]。因此,通过研究饥饿胁迫下日本医蛭唾液腺的一系列生理反应过程与特点,进而揭示其适应饥饿胁迫的能量分配机制与生理对策,这对于日本医蛭养殖及唾液腺药用价值挖掘具有较为重要的现实意义。

当外界环境发生改变,生物体内并非某个基因的表达模式发生变化,而是整个通路途径发生改变^[19]。RNA-Seq技术可以对多种生物进行深度转录组分析,具有成本低、信息量大、灵敏度高、易于检测低表达基因等优点^[20-21],在揭示转录组的复杂性、新基因和非编码RNA的鉴定以及基因和功能的作用机理中起着重要作用^[22]。

近年来,随着高通量测序技术的不断发展,医学蛭类的研究工作也不断涌现新思路和新方法。王斌等^[23]利用RNA测序技术对取食前后的棒纹牛蛭(*Poecilobdella javanica*)、日本医蛭、宽体金线蛭和洞穴山蛭(*Heamadipsa cavatuses* sp. nov.)进行了转录水平比较分析,并重点关注了简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)的分析以及发掘抗凝血相关功能EST-SSR。Liu等^[24]通过对饥饿及取食后不同时期的棒纹医蛭的取食及消化组织进行转录组学比较后发现, DNA/RNA相关通路主要在饥饿状态下表达,而在血液喂养期间,脂肪酸代谢、抗凝途径和氨基酸生物合成被激活。另有研究报道表明,饥饿和喂食后的不同状态下,蛭类的单个分泌蛋白丰度呈现规律性变化^[25]。Lemke等^[26]同样分析了饥饿再投喂后,蛭类唾液腺在组织学水平上的差异。但关于日本医蛭唾液腺饥饿胁迫的分子机制尚未见报道。

本实验利用新一代高通量测序手段,即转录组测序(RNA-Seq)技术,对饥饿状态和取食后日本医蛭唾液腺进行比较分析。以实现大规模的基因筛选和鉴定挖掘,更好地对信号通路进行分析,增加对日本医蛭分子层面的认识,为日本医蛭唾液腺细胞分泌调控机制研究奠定基础,具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 组织收集和RNA制备

本实验所使用的日本医蛭购买于重庆志微

生物技术有限公司,体质量为(0.4±0.1) g。经过体表形态学鉴定后,于实验室中驯养30 d,室温为(26±2) °C,光照时间L:D=12:12,每隔1日更换清水。选取20只个体大小相近、状态良好的健康日本医蛭,平均分为2组,按日本医蛭习性设置投喂血液后30 min(D0)及饥饿30 d(D30)2个组^[23-24]。D0和D30组分别取10只日本医蛭,解剖得到唾液腺组织,并保存于-80 °C用于RNA制备。

根据Total RNA Extractor (Trizol)试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]使用说明,对所得唾液腺样品进行RNA提取。用Qubit 2.0荧光计检测RNA浓度,琼脂糖凝胶检测RNA完整性以及基因组污染情况。将所得到的RNA溶液置于-80 °C保存或立刻用于后续实验。

1.2 文库构建和RNA测序

利用Qubit 2.0 RNA检测试剂盒(Invitrogen)对总RNA精确定量,确定文库构建所需总RNA量。根据VAHTS™ mRNA-seq V2 Library Prep Kit for Illumina®试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)使用说明制备cDNA文库。简言之, Oligo dT磁珠与带有poly-A尾的mRNA结合以富集mRNA,而后将其片段化。利用随机引物进行mRNA的逆转录,实现cDNA第一链合成。通过RNase H消化杂合双链中的mRNA链,合成cDNA互补链,实现cDNA第二链合成。将黏性末端修复成平末端、加A-尾、连接接头。利用VAHTS DNA Clean Beads(南京诺唯赞生物科技有限公司)对双链cDNA进行纯化,扩增连接产物以产生最终的cDNA文库。然后通过Illumina HiSeq 2500平台对每个cDNA文库进行测序,并产生配对末端读数。

1.3 转录组De novo组装、质量评估和注释

Illumina Hiseq™测序原始图像数据文件经CASAVA碱基识别分析转化为原始测序序列,以FASTQ文件格式存储。对原始数据质量值等信息进行统计,并使用FastQC在线工具对样本的测序数据质量进行可视化评估。使用Trimmomatic^[27]进行数据处理,以过滤原始数据中含有带接头的、低质量的序列,从而得到干净(Clean)数据。使用Trinity^[28-29]将Clean数据De novo组装成转录本,对Trinity拼装得到的转录本去冗余,取每个转录本聚类中最长的转录本作为unigene,以此作为后续分析的参考序列。

将unigenes与公共数据库进行比较,并基于

基因的相似性进行功能注释。使用NCBI数据库中BLAST+将unigenes与CDD、KOG、COG、NR、NT、PFAM、Swissprot及TrEMBL中的序列进行比较。基于Swissprot和TrEMBL两部分的蛋白注释结果,根据uniprot的注释信息得到GO注释。对unigenes做KO注释后,根据KO与Pathway的联系对其进行KEGG代谢通路分类。根据NR、SwissProt和TrEMBL的最佳比对结果,按其优先级顺序确定unigenes的开放阅读框(open reading frame, ORF),然后根据标准密码子表确定其CDS及编码的氨基酸序列,同时将未比对上的unigenes通过TransDecoder软件预测其CDS序列。

1.4 差异基因表达

为了检测基因表达水平,将每个样品中的Clean读数映射到组装的转录组以获得每个基因的读数,通过计算TPM(transcripts per million)值以比较不同样本之间基因表达的差异。该方法同时考虑了测序深度和基因长度以及样本对reads计数的影响。采用TMM对read count数据进行标准化处理,之后用DEGseq^[30]进行差异分析。为了得到显著差异的基因,将筛选条件设为 Q value <0.05 且 $|\text{Fold Change}|>2$ 。使用cluster Profiler对差异基因进行KEGG通路和KOG分类富集分析,当矫正后的 P 值(Q value) <0.05 时,认为该功能存在显著富集。

1.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

通过qRT-PCR分析验证日本医蛭唾液腺4个关键功能基因^[31]的表达, β -actin作为内参基因。根据转录组测序数据用Primer premier 5.0软件设计引物(表1),从与转录组测序相同的样品中提取总RNA,并使用具有gDNA wiper的HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR试剂盒合成第一链cDNA。根据ChamQTM Universal SYBR[®] qPCR Master Mix试剂盒使用说明,在ABI 7300 Plus荧光定量PCR仪进行qRT-PCR。反应在总体积20 μ L中进行,含10 μ L 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、2 μ L稀释的cDNA模版、0.4 μ L引物(10 mmol/L)和7.2 μ L ddH₂O。按下列条件进行qPCR反应:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性10 s;60 $^{\circ}$ C退火延伸30 s;40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} ^[32]方法分析基因相对表达水平。使用SPSS 16.0软件对结果进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表1 荧光定量PCR引物

基因 genes	引物 primers	序列(5'-3') sequences
<i>bdellin-KL</i>	RT-bdellin-KL-F	CTGCACCAAGGAAGT GCTGAG
	RT-bdellin-KL-R	TGTTCTGGGGCAACTG ACG
<i>guamerin</i>	RT-guamerin-F	TGACGATGACAAAAG TCGACGAG
	RT-guamerin-R	GACTTGTGCTGGAGA GCAGG
<i>hyaluronidase</i>	RT-hyaluronidase-F	AGAAGCGGCCAACT TACATCAC
	RT-hyaluronidase-R	TCGACTCGTCTGCATT CAGTTCTG
<i>hirudin</i>	RT-hirudin-F	TGGTTGTTTGCATCTC CGTGT
	RT-hirudin-R	CAAATTGCGGTACCCCT CGCA
β -actin	RT- β -actin-F	CAAGACCTACGACGG AGTCA
	RT- β -actin-R	TGGTGAACCTGTGGAT GGAA

2 结果

2.1 转录组测序和De novo组装

通过对饥饿0 d和饥饿30 d两种不同状态下的日本医蛭唾液腺进行转录组测序,分别获得59 031 284和55 245 692个原始读长。两组数据Q20碱基比例均超过96.5%,这表明数据的质量适合后续分析。对原始数据过滤,即去除含有带接头的、低质量的序列,分别获得57 542 906和52 999 370个有效读长(表2)。使用Trinity将有效数据De novo组装,获得261 051个转录本。将转录本去冗余后获得145 981个unigenes。unigenes中35.61%的长度大于500 bp,17.88%的长度大于

表2 转录组测序数据统计

项目 items	饥饿0 d D0	饥饿30 d D30
原始数据 raw data	59 031 284	55 245 692
原始碱基/ bp raw bases	8 854 692 600	8 286 853 800
原始碱基平均读长/ bp average reads length of raw bases	150	150
Q20 bases/bp	8 669 973 119	8 001 054 496
Q20/%	97.91	96.55
Clean 数据 Clean data	57 542 906	52 999 370
Clean 碱基/bp Clean bases	8 528 572 127	7 787 343 591
Clean 碱基平均读长/ bp average reads length of Clean bases	148.21	146.93
Q20碱基/ bp Q20 bases	8 423 256 901	7 617 730 604
Q20/%	98.77	97.82

注: Q20表示碱基测序质量值大于20

Notes: Q20 represents that phred quality score is greater than 20

1 000 bp, 其长度范围为201~27 163 bp, 平均长度为675.04 bp(表3)。此外, 还对unigenes长度

和GC含量分布进行了统计(图1)。后续分析均以unigenes序列作为参考序列。

表3 De nove组装结果统计

Tab. 3 Statistic summary of De nove assembly data

项目 items	总数量/个 numbers	数量/个		N50	N90	最大长度/bp max length	最小长度/bp min length	全长/bp total length	平均长度/bp average length
		≥500 bp	≥1 000 bp						
转录本 transcript	261 051	123 985	71 223	1 546	326	27 163	201	228 980 320	877.15
通用基因 unigene	145 981	51 987	26 104	1 127	259	27 163	201	98 542 861	675.04

注: N50、N90为按照长度将拼接转录本从大到小排序并累加转录本的长度, 到不小于总长50%、90%的拼接转录本的长度
Notes: N50, N90 is defined as arranging the spliced transcripts from large to small according to their length, and accumulating the length of transcripts to the length of spliced transcripts no less than 50%, 90% of their total length

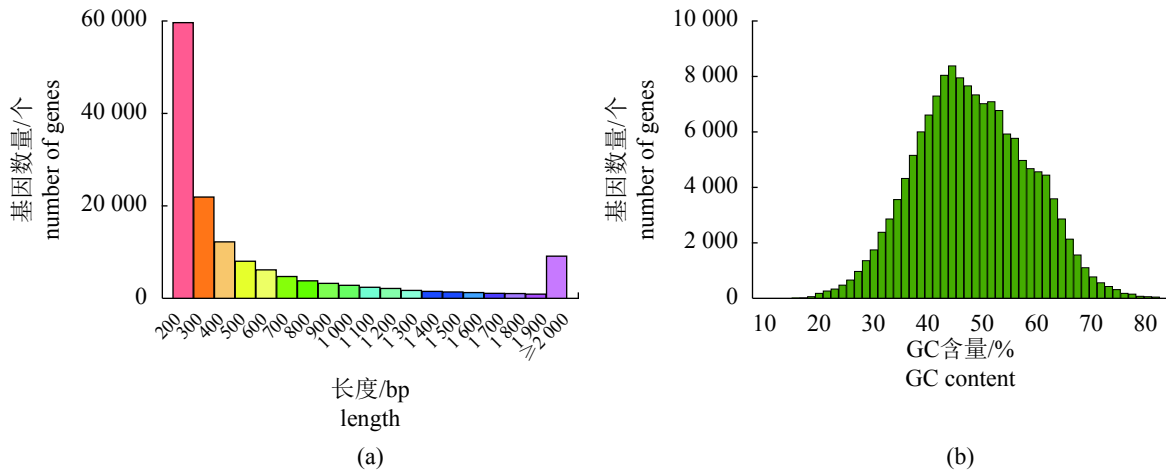


图1 unigene特征分布

(a) unigene长度分布; (b) unigene GC含量分布

Fig. 1 Characteristic distribution of unigene

(a) length distribution of unigene; (b) GC content distribution of unigene

2.2 基因注释

基于BLAST算法将unigene基因序列分别与NR、NT、KOG、CDD、PFAM、Swissprot、TrEMBL、GO和KEGG数据库进行比对, 取相似度>30%, 且e<1e-5的注释, 合并基因得到的所有注释详细信息, 并统计各数据库中unigene基因注释数量及百分比(表4)。对于4个主要的蛋白数据库NR、KEGG、Swissprot和KOG, 其分别获得55.64%、6.31%、41.98%和27.62%的注释, 其中7 594个unigenes在4个数据库中均有注释(图2)。

GO是一套国际化的基因功能描述的分类系统。基于转录本与Swissprot、TrEMBL的注释结果, 68 767个unigenes被分配到生物过程(biological process)、分子功能(molecular function)和细胞组分(cellular component), 其数量分别为

57 188、57 076和61 591个(图3-a)。基于基因直系同源关系, 使用KOG数据库进一步对功能进行分类, 40 314个unigenes被分配到26个特定的KOG类别, 其中信号传导机制最多(6 037个unigenes), 其次是一般功能预测基因(5 048个unigenes), 翻译后修饰、蛋白质转运及伴侣(4 333个unigenes)(图3-b)。KEGG是系统分析基因产物和化合物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物功能的数据库。根据KO功能注释与Pathway的联系利用KAAS系统对9 207个unigenes进行KEGG代谢通路分类, 获得34条通路途径注释。将34条通路分为5类, 即细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理和代谢和有机系统, 其unigenes数量分别为1 894、1 991、3 039、3 380和2 111个(图4)。根据NR、SwissProt和TrEMBL数据库的最佳比对结果

表4 基因注释统计

数据库 database	unigenes数目/个 number of unigenes	百分比/% percentage
CDD	43 784	29.99
KOG	40 314	27.62
NR	81 220	55.64
NT	61 399	42.06
PFAM	32 271	22.11
Swissprot	61 288	41.98
TrEMBL	74 734	51.19
GO	68 767	47.11
KEGG	9 207	6.31
至少1个数据库 least one database	99 918	68.45
所有数据库 all database	4 454	3.05
总基因数 total genes number	145 981	100

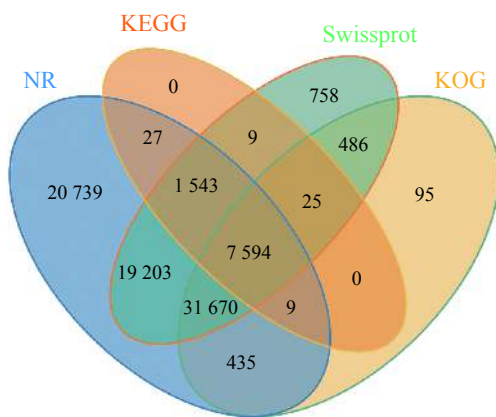


图2 蛋白数据库注释

Fig. 2 Annotation of protein database

按其优先级顺序确定unigene的ORF,同时将未比对上的unigene通过TransDecoder软件预测其CDS, unigene主要集中在200~300 bp, 其次为100~200和300~400 bp, unigenes数量分别为35 494 (32.0%)、20 441(18.4%)和13 893(12.5%) (图5)。

2.3 表达差异分析

通过引入TPM来计算样品中基因表达丰度。此外,根据表达丰度使用DEGseq软件进行差异表达分析,并通过设置 Q value <0.05 且 $|\text{Fold Change}|>2$ 来筛选显著差异基因。通过对D30组与D0组比较,发现总体基因表达水平在D30样本较D0样品低(图6-a),并鉴定了2 650个显著差异基

<http://www.sxuebao.cn>

因,其中667个基因显著上调,1 983个基因显著下调。基于表达丰度值(TPM),比较两组样品的基因表达水平(图6-b),横纵轴分别为两组样本 $\log_2(\text{TPM}+1)$ 值,图中每个点代表一个基因,越接近于原点的点表达量越低。其中红色表示上调基因,绿色表示下调基因,黑色表示非差异基因,上调/下调均是饥饿30 d样本相对于饥饿0 d样本。在这些差异基因中,注释到几种可能与治疗效果相关的蛋白质基因,即*Antistasin*、*Saratin*、*Destabilase*和*Theromyzin*,对应蛋白质均具有抗凝血、抗血栓、抗炎症、抗肿瘤和血管扩张等功能,这可能在各种疾病的治疗中发挥重要作用。

2.4 GO和KEGG数据库对差异基因富集分析

在GO功能分类体系中,2 650个差异表达基因共得到71个GO功能注释,其中生物过程涉及27个,细胞组分涉及22个,分子功能涉及22个。将差异基因映射到GO数据库进行功能富集分析,差异基因总共显著富集到175个,其中生物过程包含76个,细胞组分包含47个,分子功能包含52个。本实验仅挑选富集程度最高的前30个GO功能注释(图7-a),在生物过程功能类型中包含7个,其中细胞酰胺代谢过程、肽生物合成过程和酰胺生物合成过程中的差异表达基因较多。在细胞组成功能类型中包含11个,其中胞外区、核糖体和胞质部分所含差异表达基因较多。在分子功能类型中包含12个,其中肽酶活性、结构分子活性和肽酶活性对L-氨基酸肽的作用中所含差异基因较多。总之,日本医蛭唾液腺的生物合成受到了饥饿胁迫的极大限制,这可能会降低能量消耗。

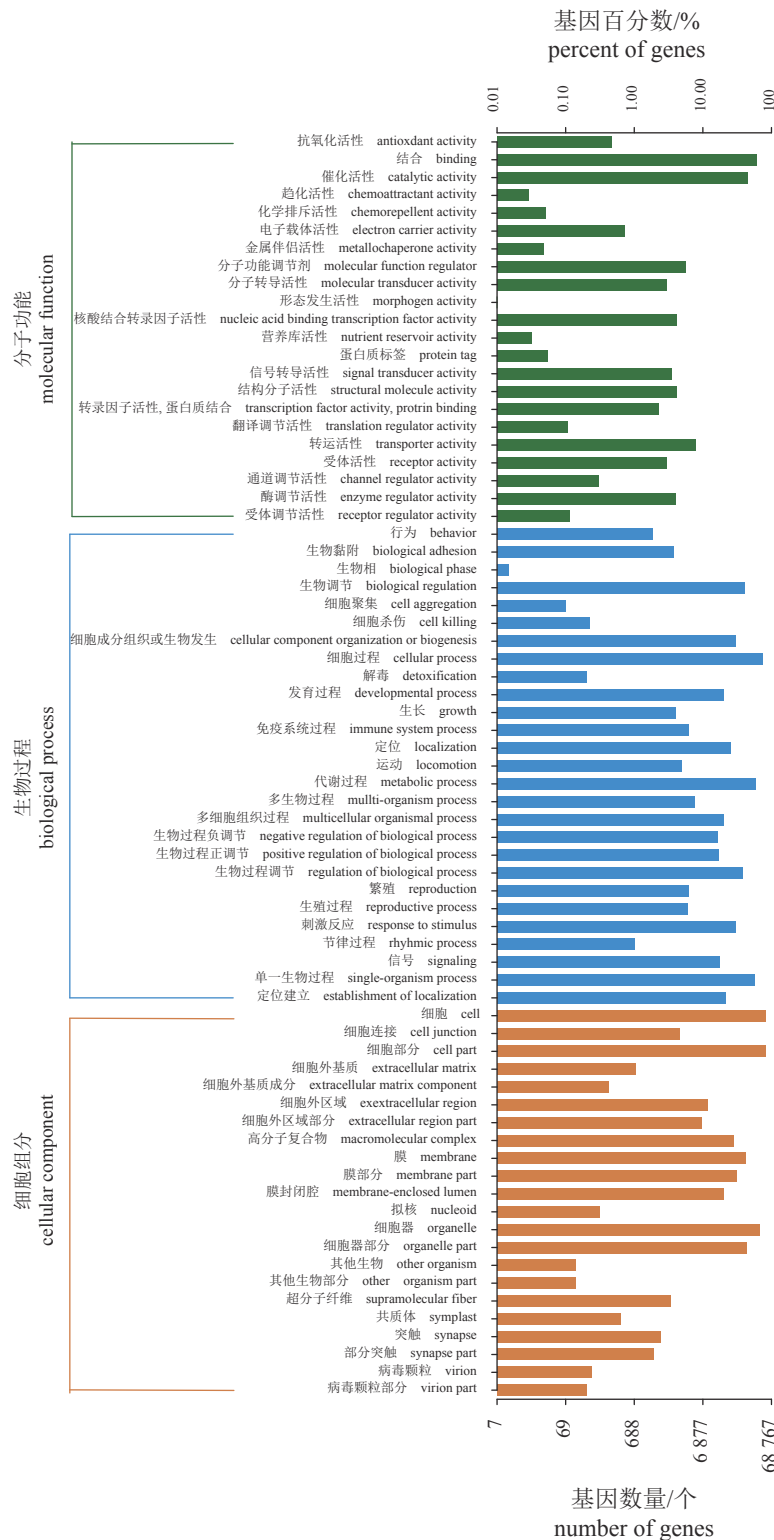
将差异基因映射到KEGG数据库进行通路富集分析,当矫正后的 P 值(Q value) <0.05 时,认为该功能存在显著富集情况,且 Q value越小越显著富集。结果显示,2 650个差异表达基因总共富集到125条通路上,其中,仅核糖体和细胞外基质—受体相互作用2条通路显著富集(图7-b),且核糖体通路富集程度最高。核糖体是mRNA被翻译成蛋白质的场所。在注释为涉及该核糖体途径的79个差异基因中有77个差异基因下调,而上调的差异基因仅有2个。在表达下调的77个差异基因中,55个基因被注释为核糖体蛋白,且这些差异基因在D30样本中表达水平至少降低了3倍。核糖体的减少可能意味着生物合成过程的巨大

抑制, 从而节省能量以应对饥饿胁迫, 这与上面讨论的GO分析结果一致。

2.5 qRT-PCR结果

为进一步验证高通量测序结果的可靠性, 通

过qRT-PCR验证了日本医蛭唾液腺4个重要功能基因的表达, 即*bdellin-KL*、*guamerin*、*hyaluronidase*和*hirudin*。将饥饿30 d与饥饿0 d的差异与转录组测序结果相比较(图8), 结果显示, 被检测的基因表达趋势与转录组表达分析结果基本一致,



(a)

Fig. 3

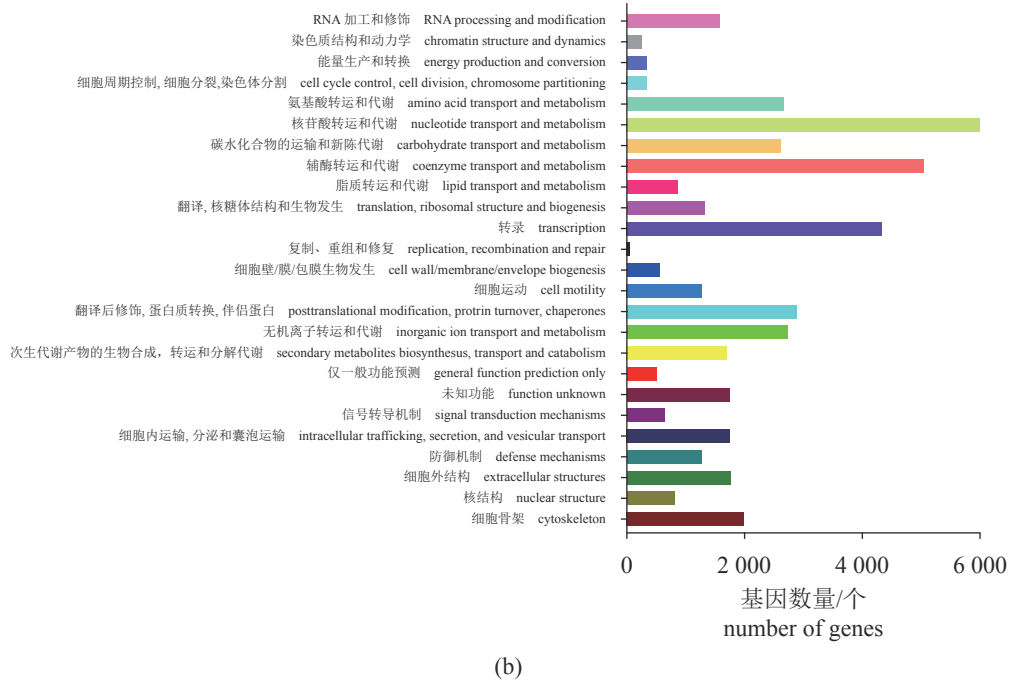


图 3 GO和KOG功能分类注释

Fig. 3 Functional classification annotation of GO and KOG database

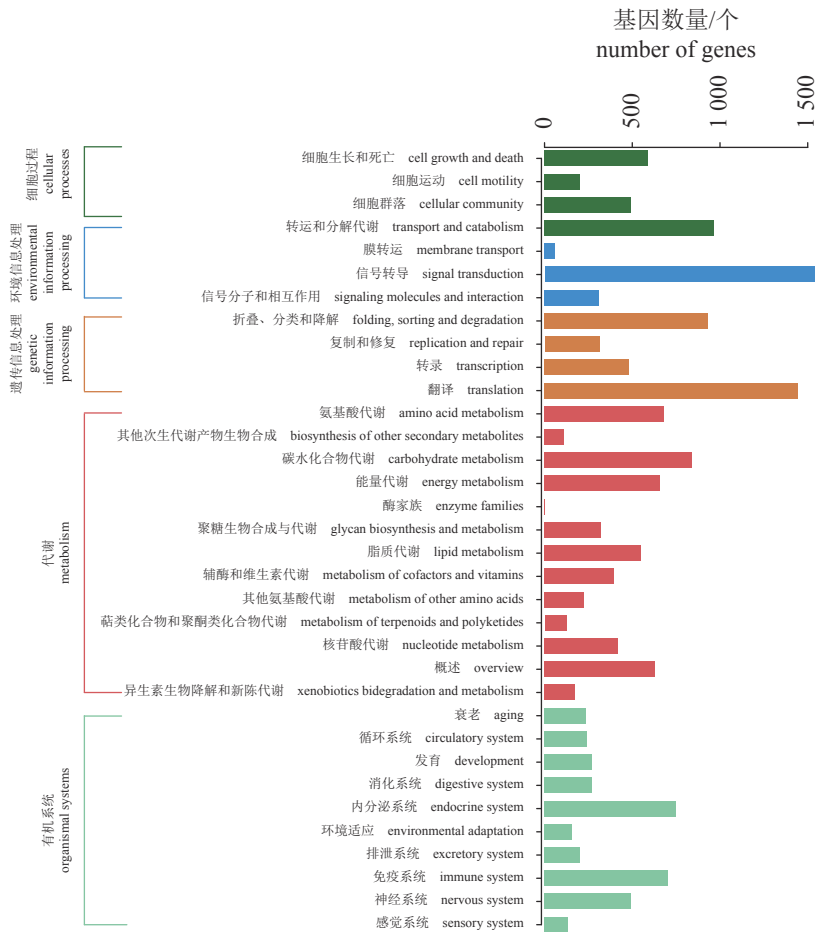


图 4 KEGG分类注释

Fig. 4 Functional classification annotation of KEGG database

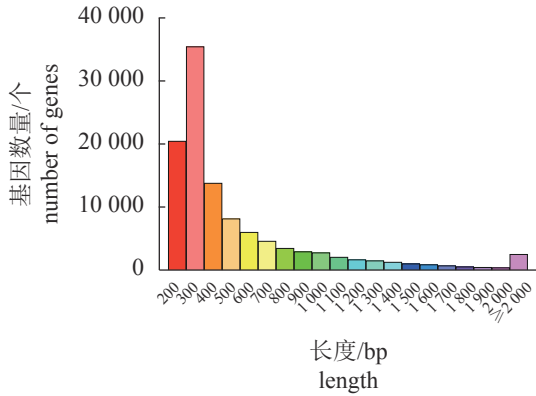


图5 CDS长度分布

Fig. 5 Length distribution of CDS

即证明转录组测序结果可靠。

3 讨论

实验通过转录组测序研究日本医蛭唾液腺并获得高质量有效读长。结果显示98%测序的准确度超过99%，表明测序深度可用于后续分析^[33-34]。

饥饿胁迫是涉及大量基因的复杂过程，本实验通过表达水平分析、表达差异分析以及基因富集分析来研究。与饥饿0 d相比较，饥饿30 d日本医蛭唾液腺的总体基因表达水平较低。通过TPM方法分析D0和D30样品，鉴定出2 650个差异基因，这些基因可能参与唾液腺的分泌过程。GO功能富集分析与KEGG富集分析结果一

致，均显示差异基因在核糖体通路中显著富集。参与核糖体通路的显著下调的差异基因中，有55个基因编码核糖体蛋白，包括L4e、L7Ae、L13e、L15、S8、S4和S5等。核糖体蛋白基因的下调将减少相应核糖体蛋白的产生，从而减少细胞中核糖体的数量。日本医蛭在取食期间，其唾液腺通过合成大量的蛋白类活性物质，如抗凝剂、舒张血管物质及麻醉剂等^[35-36]来确保顺利取食以及使血液能够长期储存于体内，取食后通过严格控制核糖体代谢活动以维持正常的生理机能。因此，当日本医蛭受到饥饿胁迫后，其唾液腺代谢途径中多个基因发生了显著下调，即降低了蛋白质合成过程。由此可知，饥饿胁迫使日本医蛭唾液腺的代谢活动、蛋白质合成活动和应激反应等发生显著变化。

通过GO功能注释和KEGG信号通路分析，筛选出*bdellin-KL*、*guamerin*、*hirudin*和*hyaluronidase*等重要的差异基因。*bdellin-KL*是一种蛋白酶抑制剂相关基因，其能参与多种生命过程^[37]。与饥饿0 d相比，*bdellin-KL*表达量下降，表明取食可以刺激日本医蛭唾液腺*bdellin-KL*基因表达，而当处于饥饿状态时，*bdellin-KL*表达量则会降低。*guamerin*是一种小分子弹性蛋白酶抑制剂，具有抗凝、抗炎的功能^[38]。研究表明*guamerin*可以抑制血小板活化，聚集和促进纤维蛋白水解^[39-40]。水蛭素*hirudin*是一种凝血酶抑制剂，可有效抑制凝血酶对纤维蛋白原的催化作

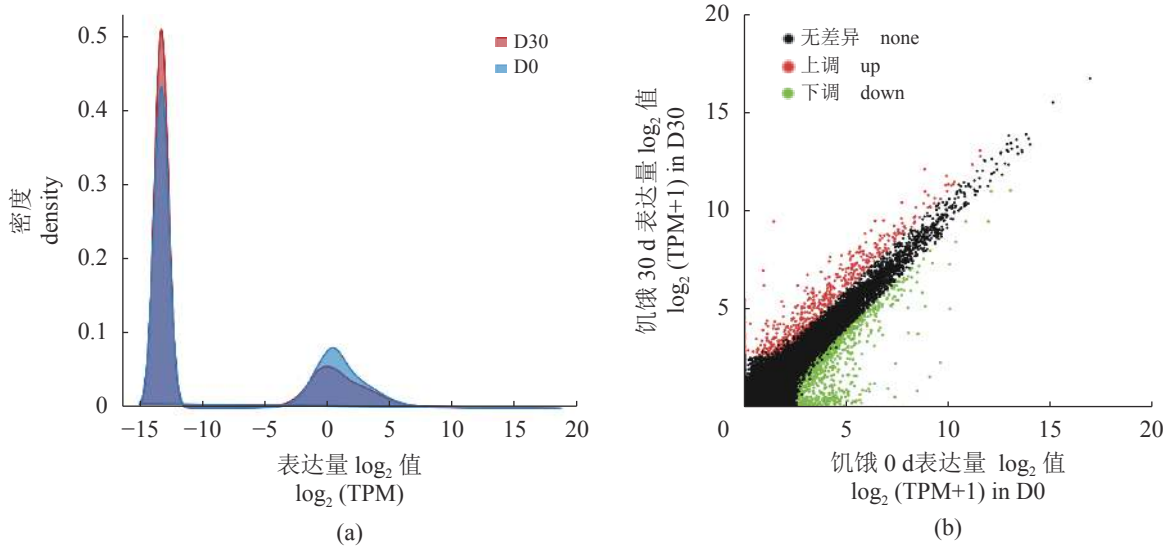


图6 表达差异分析

(a) 基因表达密度分布; (b) 基因表达差异散点图

Fig. 6 Analysis of differential expression

(a) density distribution of gene expression; (b) differential gene scatter diagram

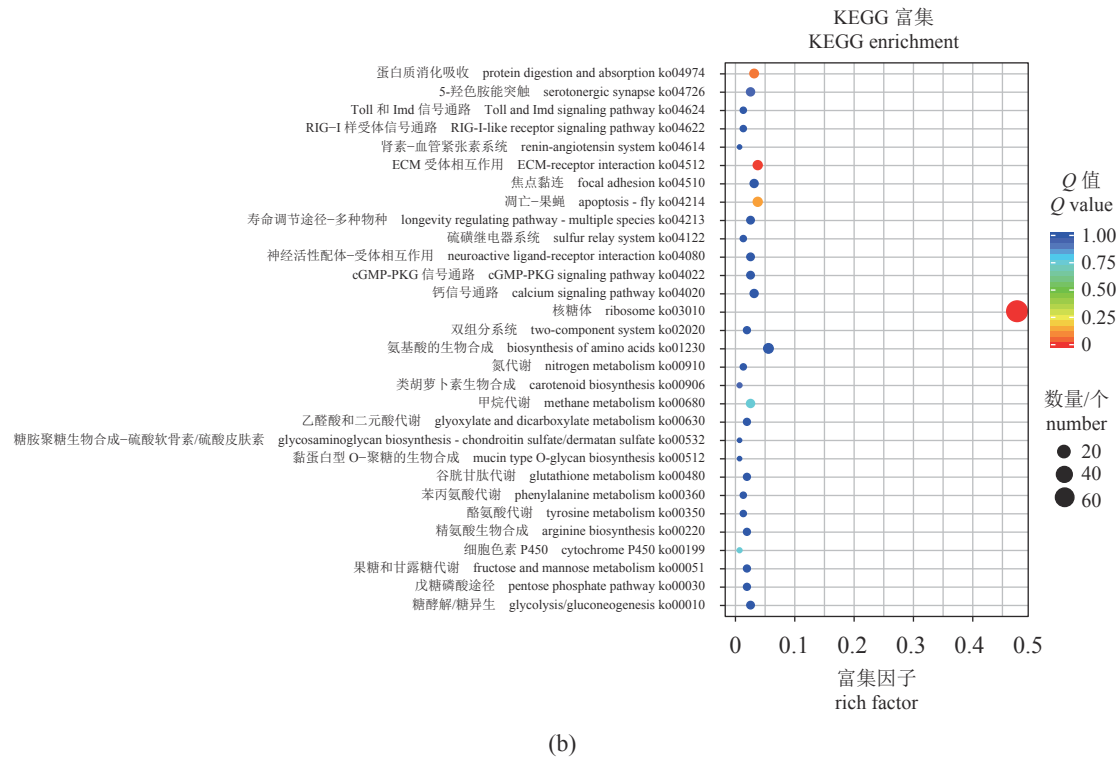
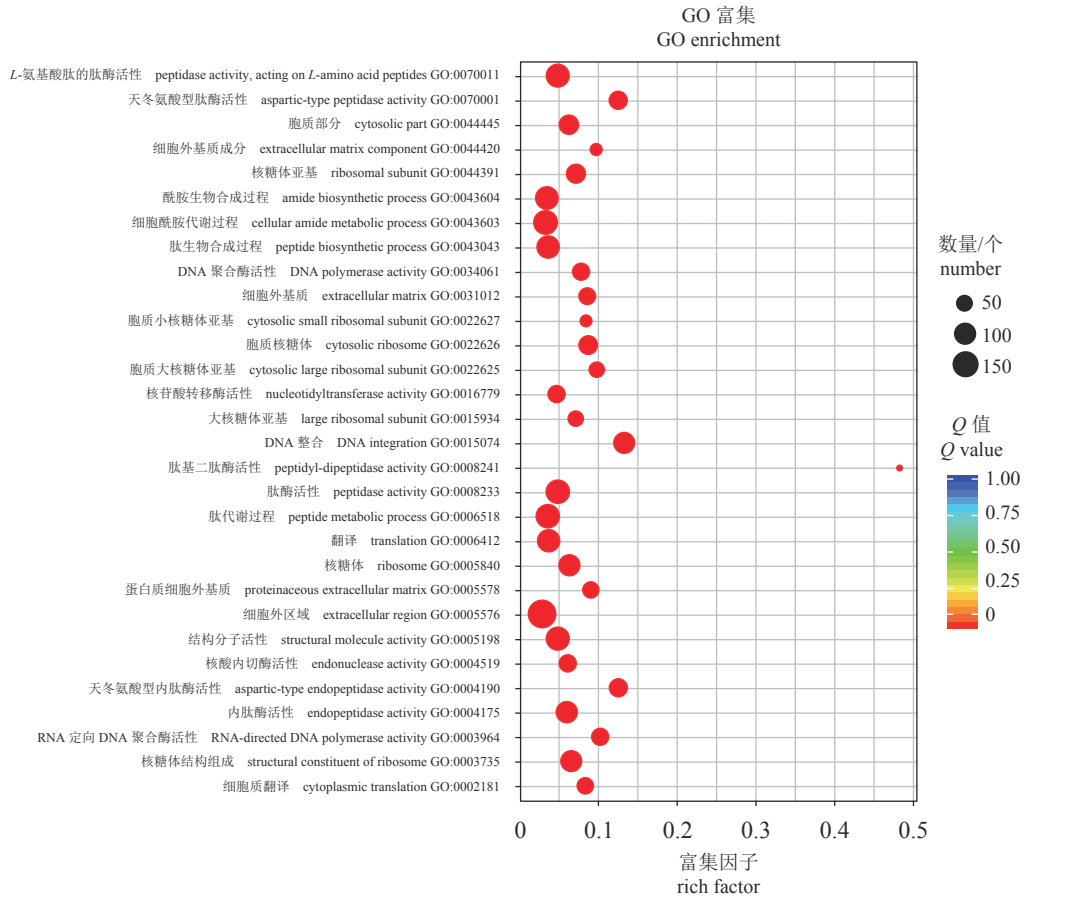


图 7 GO功能(a)和KEGG通路(b)富集分析

Fig. 7 GO function and KEGG pathway enrichment analysis

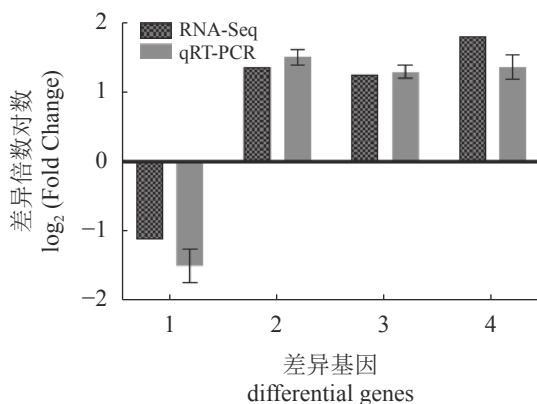


图8 功能基因qRT-PCR与转录组之间的相对表达水平

Fig. 8 Comparison of functional gene expression level between qRT-PCR and transcriptome analysis

1. *bdellin-KL*, 2. *guamerin*, 3. *hirudin*, 4. *hyaluronidase*

用^[41-42]。与饥饿0 d相比, *guamerin*和*hirudin*基因均上调, 表明其参与了抗凝血过程, 发挥了抑制凝血酶活性的功能。透明质酸酶*hyaluronidase*主要功能是分解透明质酸, 破坏细胞外基质, 是一种具有抑菌作用的活性蛋白, 可有效抑制多种细菌和真菌的活性^[43]。与饥饿0 d相比, *hyaluronidase*基因表达量升高, 表明饥饿胁迫有可能激活日本医蛭体内的一系列免疫反应。以上与张秀秀^[44]的研究结果相似。

此外, 通过对差异基因分析还揭示了几种医用价值相关的蛋白质, 即Antistasin、Saratin、Destabilase和Theromyzin。Antistasin是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 其与Guamerin均是Xa因子抑制剂, 具有抗凝、抗炎的功能^[38], 可以抑制血小板活化, 聚集和促进纤维蛋白水解^[39-40]。Saratin蛋白质可通过与胶原蛋白结合, 干扰血小板与胶原蛋白的第一个结合步骤来预防血小板聚集^[45]。Destabilase是一种异肽酶, 在纤维蛋白溶解活性^[45]和抑制血小板聚集^[46]中起主要作用, 同时, 其也是一种具有酶和非酶促抗菌活性的溶菌酶^[47]。Theromyzin是一种阴离子抗菌肽, 对革兰氏阳性菌具有抗菌活性^[48]。

本实验通过转录组分析和比较, 获得了日本医蛭唾液腺转录组数据, 并了解了饥饿胁迫对其的影响。通过进一步功能分析, 筛选到受饥饿胁迫影响的候选基因, 并发掘出更多抗凝血、抗血栓、抗炎症、抗肿瘤和抗菌类等医学治疗相关的生物活性蛋白质。此外, 转录组比较分析将初步阐明日本医蛭在饥饿条件下潜在

的适应性机制, 为进一步研究日本医蛭唾液腺分泌调控机制提供分子基础。

感谢重庆志微生物技术有限公司在样本养殖方面以及生工生物工程(上海)股份有限公司在测序平台方面给予的支持!

参考文献:

- [1] 杨潼. 中国动物志. 环节动物门: 蛭纲[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
Yang T. Fauna Sinica. Annelida: Hirudinea[M]. Beijing: Science Press, 1996 (in Chinese).
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
Chinese pharmacopoeia commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: part one[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010 (in Chinese).
- [3] 杨谋, 张选杰, 张娇, 等. 水蛭的药用价值和养殖现状[J]. 当代畜牧, 2018(6): 58-60.
Yang M, Zhang X J, Zhang J, et al. Medicinal value and current situation of breeding of leech[J]. Contemporary Animal Husbandry, 2018(6): 58-60(in Chinese).
- [4] Abdulkader A M, Ghawi A M, Alaama M, et al. Leech therapeutic applications[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 75(2): 127-137.
- [5] 周易勇, 杨潼. 医蛭唾液腺分泌物: 成分、功能及应用前景[J]. 天然产物研究与开发, 1991, 3(4): 54-57.
Zhou Y Y, Yang T. Leech salivary gland secretion: its components, function and uses[J]. Natural Product Research and Development, 1991, 3(4): 54-57(in Chinese).
- [6] Jung H I, Kim S I, Ha K S, et al. Isolation and characterization of guamerin, a new human leukocyte elastase inhibitor from *Hirudo nipponia*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(23): 13879-13884.
- [7] Kim D R, Kang K W. Amino acid sequence of piguamerin, an antistasin-type protease inhibitor from the blood sucking leech *Hirudo nipponia*[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 254(3): 692-697.
- [8] Moser M, Auerswald E, Mentele R, et al. Bdelastasin, a serine protease inhibitor of the antistasin family from the medical leech (*Hirudo medicinalis*): primary structure, expression in yeast, and characterisation of native and recombinant inhibitor[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 253(1): 212-220.

- [9] 杨潼. 关于水蛭透明质酸酶的研究[J]. 动物学杂志, 1994, 29(5): 50-52.
Yang T. Study on hyaluronidase of leech[J]. Chinese Journal of Zoology, 1994, 29(5): 50-52(in Chinese).
- [10] Sig A K, Guney M, Guclu A U, *et al.* Medicinal leech therapy-an overall perspective[J]. *Integrative Medicine Research*, 2017, 6(4): 337-343.
- [11] Corral-Rodríguez M Á, Macedo-Ribeiro S, Barbosa Pereira P J, *et al.* Leech-derived thrombin inhibitors: from structures to mechanisms to clinical applications[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53(10): 3847-3861.
- [12] 张健, 龚元, 于翔, 等. 温度和密度对日本医蛭繁殖的影响[J]. 水产学杂志, 2017, 30(2): 17-21.
Zhang J, Gong Y, Yu X, *et al.* Effects of temperature and density on breeding of leech *Hirudo nipponia* Whitman[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2017, 30(2): 17-21(in Chinese).
- [13] 罗媛媛, 姜乃澄, 卢建平, 等. 日本医蛭(*Hirudo Nipponica*)耗氧量的研究[J]. 杭州大学学报(自然科学版), 1998, 25(3): 81-84.
Luo Y Y, Jiang N C, Lu J P, *et al.* Studies on oxygen consumption of *Hirudo Nipponica*[J]. Journal of Hangzhou University (Natural Science Edition), 1998, 25(3): 81-84(in Chinese).
- [14] 罗媛媛, 姜乃澄. 两种吸血蛭类光感受器的超微结构[J]. 浙江大学学报(理学版), 2005, 32(4): 428-432, 458.
Luo Y Y, Jiang N C. Ultrastructure of photoreceptors in two blood-suck leeches[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2005, 32(4): 428-432, 458(in Chinese).
- [15] 罗媛媛, 姜乃澄. 日本医蛭和天目山蛭4种同工酶的比较研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2002, 29(1): 99-102.
Luo Y Y, Jiang N C. Comparative studies on four isozymes in *Hirudo nipponia* and *Haemadipatanmushana*[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2002, 29(1): 99-102(in Chinese).
- [16] 鲁增辉, 贺宗毅, 石萍, 等. 日本医蛭抗凝活性研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(1): 37-39.
Lü Z H, He Z Y, Shi P, *et al.* Anticoagulant activity analysis of *Hirudo nipponica*[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2017, 19(1): 37-39(in Chinese).
- [17] 柳敏海, 罗海忠, 傅荣兵, 等. 短期饥饿胁迫对(鮡)鱼生化组成、脂肪酸和氨基酸组成的影响[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 230-235.
Liu M H, Luo H Z, Fu R B, *et al.* Biochemical composition, amino acid and fatty acid composition in juvenile of *Miichthys miiuy* under short-time starvation[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(2): 230-235(in Chinese).
- [18] 覃川杰, 邵婷, 杨洁萍, 等. 饥饿胁迫对瓦氏黄颡鱼脂肪代谢的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 58-65.
Qin C J, Shao T, Yang J P, *et al.* The effect of starvation on lipid metabolism of darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 58-65(in Chinese).
- [19] 邓素贞, 韩兆方, 陈小明, 等. 大黄鱼高温适应的转录组学分析[J]. 水产学报, 2018, 42(11): 1673-1683.
Deng S Z, Han Z F, Chen X M, *et al.* Transcriptome analysis of high-temperature adaptation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(11): 1673-1683(in Chinese).
- [20] Khorramdelazad M, Bar I, Whatmore P, *et al.* Transcriptome profiling of lentil (*Lens culinaris*) through the first 24 hours of Ascochyta lentis infection reveals key defence response genes[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19: 108.
- [21] Sankaran V G, Gallagher P G. Applications of high-throughput DNA sequencing to benign hematology[J]. *Blood*, 2013, 122(22): 3575-3582.
- [22] Li E C, Li C. Use of RNA-seq in aquaculture research[J]. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 2014, 2(2): 1000e108.
- [23] 王斌, 孙静, 刘凌云, 等. 蛭类转录组中EST-SSR分析及抗凝血相关分子标记的挖掘[J]. 中草药, 2017, 48(1): 172-178.
Wang B, Sun J, Liu L Y, *et al.* Analysis on EST-SSR in transcriptome of medicinal leeches and mining of anticoagulant related functional molecular markers[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(1): 172-178(in Chinese).
- [24] Liu Z C, Wang Y J, Tong X R, *et al.* De novo assembly and comparative transcriptome characterization of *Poecilobdella javanica* provide insight into blood feeding of medicinal leeches[J]. *Molecular Omics*, 2018, 14(5): 352-361.
- [25] Lemke S, Müller C, Hildebrandt J P. Be ready at any time: postprandial synthesis of salivary proteins in salivary gland cells of the haematophagous leech *Hirudo*
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- verbana*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2016, 219(8): 1139-1145.
- [26] Lemke S, Müller C, Lipke E, *et al.* May salivary gland secretory proteins from hematophagous leeches (*Hirudo verbana*) reach pharmacologically relevant concentrations in the vertebrate host?[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73809.
- [27] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [28] Haas B J, Papanicolaou A, Yassour M, *et al.* De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [29] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652.
- [30] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [31] 张素杰, 吕士红, 王继红. 水蛭唾液腺分泌物活性物质的功能多样性及其应用[J]. *中国生化药物杂志*, 2017, 37(2): 316-319.
- Zhang S J, Lv S H, Wang J H. The functional diversity of leech salivary gland secretions and its application[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2017, 37(2): 316-319(in Chinese).
- [32] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [33] Tan F Q, Tu H, Liang W J, *et al.* Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 89.
- [34] Bai B, Wu J, Sheng W T, *et al.* Comparative analysis of anther transcriptome profiles of two different rice male sterile lines genotypes under cold stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(5): 11398-11416.
- [35] 李桃. 宽体金线蛭的化学成分研究[D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- Li T. Chemical constituents from *Whitmania pigra*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2013 (in Chinese).
- [36] 黄园园, 戴秋云. 抗凝血多肽及类肽研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 28(5): 349-352.
- Huang Y Y, Dai Q Y. Study progresses on antithrombotic peptides and pseudopeptides[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2007, 28(5): 349-352(in Chinese).
- [37] 赖艳梅. 菲牛蛭胰蛋白酶抑制剂Bdenlin-HM的分离纯化及功能研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- Lai Y M. Purification and functions of a novel kazal-type trypsin inhibitor Bdenlin-HM from the leech of *Hirudinadia manillensis*[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2017 (in Chinese).
- [38] Jo Y J, Choi H S, Jun D W, *et al.* The effects of a new human leukocyte elastase inhibitor (recombinant guamerin) on cerulein-induced pancreatitis in rats[J]. *International Immunopharmacology*, 2008, 8(7): 959-966.
- [39] Janoff A, Dearing R. Prevention of elastase-induced experimental emphysema by oral administration of a synthetic elastase inhibitor[J]. *American Review of Respiratory Disease*, 1980, 121(6): 1025-1029.
- [40] Cruz F F, Antunes M A, Abreu S C, *et al.* Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model[J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, 182(1): 26-36.
- [41] Müller C, Haase M, Lemke S, *et al.* Hirudins and hirudin-like factors in *Hirudinidae*: implications for function and phylogenetic relationships[J]. *Parasitology Research*, 2017, 116(1): 313-325.
- [42] Huang Y N, Zhang Y L, Zhao B, *et al.* Structural basis of RGD-hirudin binding to thrombin: Tyr₃ and five C-terminal residues are crucial for inhibiting thrombin activity[J]. *BMC Structural Biology*, 2014, 14: 26.
- [43] Buhren B A, Schrupf H, Hoff N P, *et al.* Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms[J]. *European Journal of Medical Research*, 2016, 21: 5.
- [44] 张秀秀. 基于转录组分析菲牛蛭吸血相关基因的表达[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.
- Zhang X X. Transcriptome-based analysis of the expression of blood-sucking related genes in *Hirudinadia manillensis*[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2018 (in Chinese).
- [45] Gronwald W, Bomke J, Maurer T, *et al.* Structure of the

- leech protein saratin and characterization of its binding to collagen[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 381(4): 913-927.
- [46] Baskova I, Zavalova L, Berezhnoy S, *et al.* Inhibition of induced and spontaneous platelet aggregation by destabilase from medicinal leech[J]. *Platelets*, 2000, 11(2): 83-86.
- [47] Zavalova L L, Yudina T G, Artamonova I I, *et al.* Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical amphipathic peptides[J]. *Chemotherapy*, 2006, 52(3): 158-160.
- [48] Tasiemski A, Vandenbulcke F, Mitta G, *et al.* Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(30): 30973-30982.

Comparative transcriptome analysis of salivary glands of *Hirudo nipponia* in response to starvation

XING Yueting^{1,2}, GUAN Feng¹, LI Shiyu¹, ZHANG Shixiong¹, LUO Yuanyuan^{1*}

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China,;

2. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: In order to investigate the variations of gene expression of salivary gland in *Hirudo nipponia* under starvation stress, two libraries of starvation treatment group (D30) and control group (D0) were constructed and sequenced using the Illumina HiSeq 2500 platform (paired-end). After stringent quality control of raw data, 145 981 unigenes were obtained using de novo assembly. The average length of unigenes was 675 bp and N50 length was 1 127 bp. And then all of unigenes were annotated via sequence alignment analysis in CDD, KOG, COG, NR, NT, PFAM, Swissprot, TrEMBL, GO and KEGG databases. The amount of gene expression was also estimated according to TPM (transcripts per million). By comparing the transcriptome data of D30 sample and D0 sample, the differentially expressed genes (DEGs) were screened out with a threshold criteria Q value < 0.05 and |Fold Change| > 2. Totally 2 650 DEGs were identified under starvation stress, among which 667 genes were up-regulated and 1 983 genes were down-regulated. Four functional DEGs were selected for qRT-PCR analysis, and the results confirmed that the transcriptome analysis was reliable. In addition, 175 pathways were significantly enriched when all the DEGs were subject to GO enrichment analysis. The results showed that most of the DEGs were involved in cytoplasmic ribosome pathway and ribosome pathway was second. The DEGs were almost down-regulated in these pathways. It was also proved in KEGG enrichment analysis that most DEGs were involved in ribosome pathway was second. The DEGs down-regulated in ribosome pathway can indicate that it reduces protein metabolism under starvation stress. Furthermore, 4 genes were predicted to be involved in anticoagulatory, antithrombotic, antibacterial, anti-inflammatory and antitumor processes, which might play important roles in the treatment of various diseases. The results above mentioned provide important reference information for further study on the molecular mechanism of starvation tolerance of salivary gland and the discovery of pharmaceutical value genes in *H. nipponia*, and also provide reference for other medicinal leeches.

Key words: *Hirudo nipponia*; salivary glands; starvation stress; transcriptome sequence; De novo assembly; differential expression analysis

Corresponding author: LUO Yuanyuan. E-mail: yyluo@cjlu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31440030)