

# 芥子酸对油酸诱导 HepG2 细胞脂毒性模型 差异表达基因的影响

许江彬, 杨晓宇, 徐勇将, 刘元法

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 菜籽油富含酚酸, 其中芥子酸具有较强的抗氧化能力, 能够清除氧自由基, 提高细胞氧化应激反应能力。以油酸诱导 HepG2 细胞构建脂毒性模型, 通过 RNA-seq 分析芥子酸干预对 HepG2 细胞差异表达基因的影响, 并对 HepG2 细胞中差异表达基因进行了 GO 分类和 KEGG 富集分析。结果表明: 对照组、模型组、实验组、模型实验组间均存在差异表达基因, 与对照组相比, 模型组、模型实验组和实验组中下调基因多于上调基因。GO 功能分类分析发现油酸和芥子酸主要从细胞过程、刺激反应、催化活性方面影响细胞物质代谢和酶的催化基因表达。在 KEGG 通路富集中, 油酸和芥子酸干预改变了 HepG2 细胞相关有丝分裂原活化蛋白激酶信号通路、松弛素信号通路和白细胞介素 17 信号通路等多个通路, 说明芥子酸对细胞有机系统有一定的影响, 并且可以通过调节 PPAR 信号通路来刺激 PPAR $\gamma$  的活性从而影响脂肪的代谢与沉积。

**关键词:** 芥子酸; HepG2 细胞; 差异表达基因; 菜籽油

中图分类号: TS222+.1; R151 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)10-0070-05

## Effects of sinapic acid on differentially expressed genes in oleic acid - induced HepG2 cytotoxicity model

XU Jiangbin, YANG Xiaoyu, XU Yongjiang, LIU Yuanfa

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** Rapeseed oil is rich in phenolic acids, among which sinapic acid has a strong antioxidant ability. Sinapic acid can scavenge oxygen free radicals and improve the ability of oxidative stress response of cells. The RNA-seq technology was used to analyze the effect of sinapic acid on the differentially expressed genes in HepG2 cells based on the lipotoxicity model established by oleic acid. The classification of Gene Ontology (GO) and KEGG enrichment of differentially expressed genes in HepG2 cells were analyzed. The results showed that there were differentially expressed genes among control group, model group, experimental group and experimental group based on the model. Compared with the control group, the expression level of down-regulated genes was more than that of up-regulated genes in model group, experimental group based on the model and experimental group. The GO analysis showed that oleic acid and sinapic acid affected the cellular metabolism and the catalytic gene expression of enzymes mainly from the aspects of cellular process, response to stimulus and catalytic activity. In the analysis of the KEGG pathway enrichment, the intervention of oleic acid and sinapic acid changed the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, relaxin signaling pathway and interleukin 17 signaling pathway in HepG2 cell, etc. These results indicated that sinapic acid had a certain effect on

the cellular organic system, and could stimulate the activity of PPAR $\gamma$  by regulating the PPAR signaling pathway, thereby affecting the metabolism and deposition of fat.

**Key words:** sinapic acid; HepG2 cell; differentially expressed gene; rapeseed oil

收稿日期: 2020-11-02; 修回日期: 2021-06-20

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0400200); 江苏特聘教授项目和“太湖人才计划”资助

作者简介: 许江彬(1994), 男, 在读博士, 研究方向为脂质营养健康与安全(E-mail) xujiangbin94@163.com。

通信作者: 徐勇将, 教授, 博士(E-mail) yxutju@gmail.com。

近年来,随着人们生活水平的提高和饮食方式的改变,心脑血管疾病、糖尿病及脂肪肝等代谢综合征的患病率急剧增加,并逐渐成为全球关注的焦点<sup>[1]</sup>。研究指出,脂代谢存在障碍时,机体内因脂肪量超标而沉积在器官上,其产生的毒性会对器官造成伤害,甚至形成脂代谢疾病<sup>[2]</sup>。游离脂肪酸(FFA)与肝脏发生脂肪性病变密切相关。研究表明,非酒精性脂肪肝患者肝脏中 FFA 的摄取和脂质合成明显增加,而肝脏线粒体中对 FFA 的氧化程度降低<sup>[3]</sup>。FFA 含量超标导致其不能及时被肝组织氧化而沉积形成脂毒性,导致肝细胞脂肪变性<sup>[4]</sup>。同时,有研究指出,FFA 引起的氧化应激及由此介导的细胞凋亡是肝细胞诱发脂毒性病变的主要机制之一<sup>[5]</sup>。

油菜籽中的酚类物质具有抗炎、抗氧化等生理活性<sup>[6]</sup>。菜籽油中富含人类饮食中所需要的酚酸,其中芥子酸是主要的酚酸类化合物,主要以酯和葡萄糖苷的形式存在,占游离酚酸 73% 以上,也是 80%~99% 酚酸结构的主要组成部分<sup>[7-8]</sup>。此外,芥子酸衍生物还能够以葡萄糖苷酸酯、吡喃葡萄糖基芥子酸酯和脱羧产物 2,6-二甲氧基-4-乙基苯酚(Canolol, CA)等形式存在。本文通过油酸诱导 HepG2 细胞构建细胞高脂模型,利用芥子酸对脂毒性模型进行干预实验,观察其对 HepG2 细胞基因表达的影响,对各组之间差异表达基因进行 GO 分类和 KEGG 通路富集分析,阐述芥子酸对 HepG2 细胞脂毒性相关作用机制,以期对芥子酸的营养作用机理研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

油酸钠( $\geq 99.5\%$ ),国药集团化学试剂有限公司;芥子酸( $> 98\%$ ),美国 Sigma 公司;HepG2 细胞,美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC);胎牛血清, Lonsera 公司;100 $\times$ 青霉素-链霉素溶液、MEM 培养基, Gibco 公司;无脂肪酸牛血清白蛋白(FFA-free BSA), Equitech-Bio 公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

CO<sub>2</sub>培养箱,美国 Nuair 公司;HVE-50 高压灭菌器,日本 Hirayama 公司;高速冷冻离心机,日本 Hitach 公司;流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;超净工作台,上海博讯公司;万分之一分析天平,美国 Mettler Toledo 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 HepG2 细胞的处理

将接种于含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 100 $\times$

青霉素-链霉素的 MEM 培养基中的 HepG2 细胞培养于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中<sup>[9]</sup>。HepG2 细胞以  $6 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 cm 培养皿,每皿 5 mL 培养基,贴壁 24 h 后饥饿处理一晚,按实验分组分别加入不同浓度的药物干预,培养 24 h。实验分为对照组(C)、模型组(OA)、实验组(SA)和模型实验组(OS),其中:对照组采用含 0.5% 的 FFA-free BSA 的 MEM 培养基;模型组用浓度为 0.7 mmol/L 的油酸钠与含有 0.5% FFA-free BSA 的 MEM 培养基;实验组用浓度为 300  $\mu$ mol/L 的芥子酸和含有 0.5% FFA-free BSA 的 MEM 培养基;模型实验组用浓度为 0.7 mmol/L 的油酸钠、300  $\mu$ mol/L 的芥子酸和含有 0.5% FFA-free BSA 的 MEM 培养基。

#### 1.2.2 转录组测序分析

通过 Trizol 法提取各个待测样品的总 RNA,并采用 Nanodrop 检测各个 RNA 质量是否达标。随后利用 DNBSEQ 平台进行测序,主要包括 mRNA 文库构建、数据过滤和基因比对。

#### 1.2.3 差异基因(DEG)功能分析

通过 PossionDis 算法进行 DEG 检测,为了提高 DEG 的准确性,定义差异倍数为两倍以上并且  $Q$  值小于等于 0.001 的基因为显著差异表达基因。根据 GO 和 KEGG 注释结果以及官方分类,将差异基因进行功能分类,同时使用 R 软件中的 Phyper 函数进行富集分析,计算  $p$  值,然后对  $p$  值进行 FDR 校正,通常  $Q$  值小于等于 0.05 的功能视为显著富集。

#### 1.2.4 统计学方法

使用 SPSS 18.0 软件中 Tukey 的多重比较测试,通过方差分析(ANOVA)进行统计分析,置信水平为 5%。

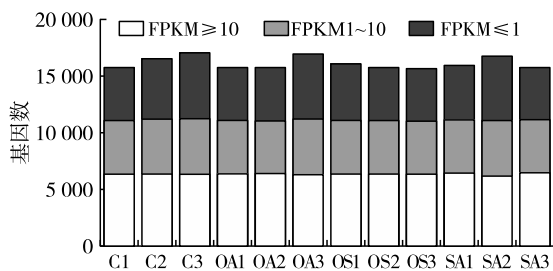
## 2 结果与分析

### 2.1 HepG2 细胞转录组测序参考基因组比对

为了揭示芥子酸对油酸诱导的脂毒性 HepG2 细胞中差异表达的 mRNA,提取对照组、模型组、实验组和模型实验组每组 3 个样品共 12 个样品的总 RNA 构建 cDNA 文库。使用 DNBSEQ 平台测得每个样品平均产出 6.85 gb 数据。样品比对基因组的平均比率为 93.02%,且每个样品的比率分布均匀(见表 1),这表明样品的 RNA 纯度高且参考基因组选择合适<sup>[10]</sup>。同时,根据各个样本的表达量 FPKM 信息绘制的堆积柱状图中,每个样本的 FPKM 分布均匀,属于正常的基因表达分布(见图 1),说明该数据之间具有可比性<sup>[11]</sup>。

表1 HepG2 细胞测序数据对比 %

组别	比对上参考基因组的有效序列比例	比对上参考基因组某一位置的有效序列比例
C1	92.68	76.47
C2	92.94	76.53
C3	93.41	76.45
OA1	93.15	76.61
OA2	93.23	77.28
OA3	92.88	76.30
OS1	93.15	76.09
OS2	92.84	76.42
OS3	92.64	76.24
SA1	93.03	76.86
SA2	93.16	73.93
SA3	93.09	75.15
平均	93.02	76.19

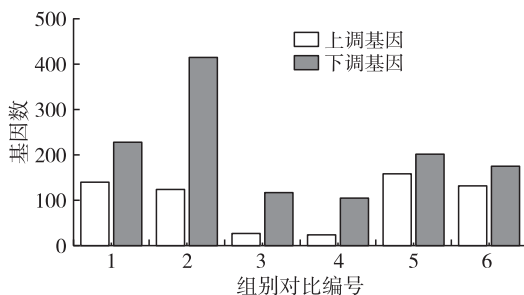


注: FPKM ≤ 1 为极低表达水平的基因; FPKM 在 1 ~ 10 之间为较低表达水平的基因; FPKM ≥ 10 为中高表达水平的基因。

图1 HepG2 细胞的基因表达量分布统计

## 2.2 HepG2 细胞中差异表达基因

通过 Illumina HiSeq 平台对模型组、对照组、实验组和模型实验组的 RNA 进行高通量测序, 采用 PoissonDis 算法进行差异基因检测。根据各个样品基因表达水平, 检测到的显著差异表达基因统计结果如图 2 所示。



注: 1. OA 与 C 相比; 2. OS 与 C 相比; 3. SA 与 C 相比; 4. OS 与 OA 相比; 5. SA 与 OA 相比; 6. OS 与 SA 相比。

图2 显著差异表达基因数量统计

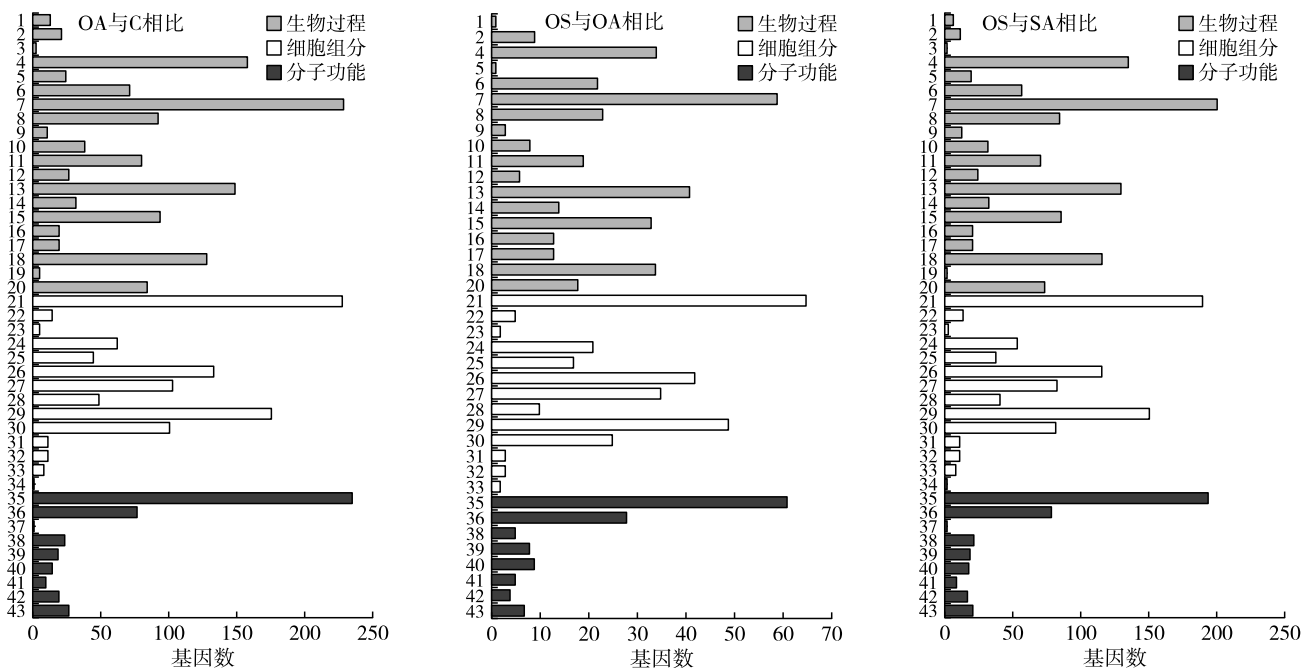
由图 2 可知, 各个组别之间均存在差异表达基因, 与对照组相比, 模型组、模型实验组和实验组中下调基因多于上调基因。与对照组相比, 模型组中检测到 366 个差异表达基因, 其中 139 个基因表达

上调, 227 个基因表达下调; 与模型组相比, 模型实验组中检测到 127 个差异表达基因, 其中 23 个基因表达上调, 104 个基因表达下调; 与实验组相比, 模型实验组中检测到 305 个差异表达基因, 其中 131 个基因表达上调, 174 个基因表达下调。这表明油酸和芥子酸可以影响 HepG2 细胞的基因表达且主要以下调基因为主。

## 2.3 HepG2 细胞差异基因 GO 分类分析

差异基因 GO 分类包括分子功能 (Molecular function)、细胞组分 (Cellular component) 和生物过程 (Biological process) 3 个功能类<sup>[12]</sup>。通过差异基因的表达结果对其进行功能分类, 每个功能分类下又包含各个层级的子类别, 得到差异基因 GO 分类柱状图如图 3 所示。

由图 3 可知: 模型组与对照组相比的差异基因 GO 分类结果中生物过程分类中包含 20 个子类别, 主要涉及生物调节 (Biological regulation)、细胞过程 (Cellular process)、代谢过程 (Metabolic process) 和刺激反应 (Response to stimulus) 等; 细胞组分分类中包含 13 个子类别, 主要涉及细胞 (Cell)、膜 (Membrane) 和细胞器 (Organelle) 等; 分子功能分类中包含 10 个子类别, 主要涉及分子键 (Binding)、催化活性 (Catalytic activity) 等。由图 3 可知: 模型实验组与模型组相比的差异基因 GO 分类结果中生物过程分类中包含 18 个子类别, 主要涉及生物调节、细胞过程、代谢过程和刺激反应等; 细胞组分分类中包含 13 个子类别, 主要涉及细胞、膜和细胞器等; 分子功能分类中包含 8 个子类别, 主要涉及分子键、催化活性等。由图 3 可知: 模型实验组与实验组相比的差异基因 GO 分类结果中生物过程分类中包含 20 个子类别, 主要涉及生物调节、细胞过程、代谢过程和刺激反应等, 细胞组分分类中包含 13 个子类别, 主要涉及细胞、膜和细胞器等; 分子功能分类中包含 10 个子类别, 主要涉及分子键、催化活性等。结果显示, 3 个组间差异基因 GO 分类中, 生物过程占的比例最高, 且它们涉及到的主要子类别相同。这说明油酸和芥子酸主要是从细胞过程、刺激反应、生物调节等方面影响细胞增长。在生物过程的 GO 条目中, 初级代谢过程是化合物的化学反应和途径, 这些化合物是正常合成代谢和分解代谢过程的一部分。在分子功能的 GO 条目中, 催化活性是反映细胞内有关生化反应中酶的催化作用的基因表达, 表明油酸和芥子酸的干预影响肝脏中催化反应、调节机体物质代谢过程的基因<sup>[11]</sup>。



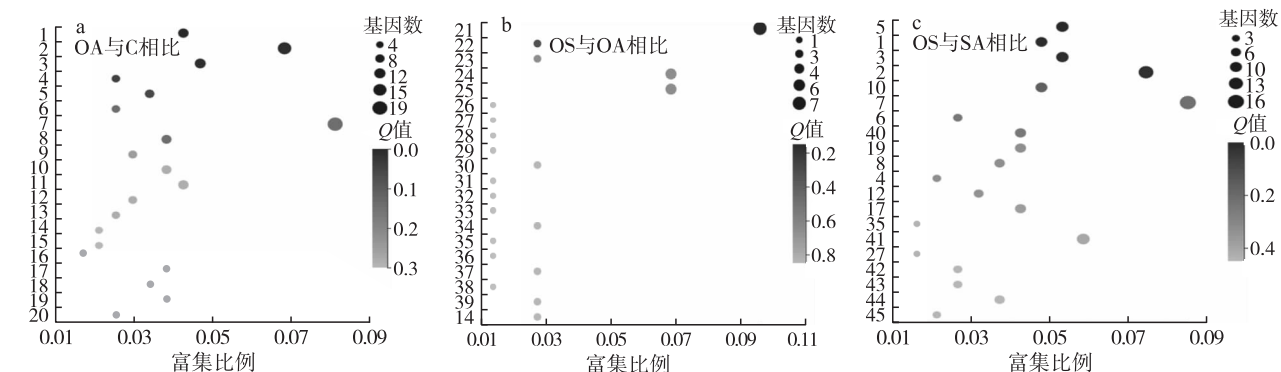
注: 1. Behavior; 2. Biological adhesion; 3. Biological phase; 4. Biological regulation; 5. Cell proliferation; 6. Cellular component organization or biogenesis; 7. Cellular process; 8. Developmental process; 9. Growth; 10. Immune system process; 11. Localization; 12. Locomotion; 13. Metabolic process; 14. Multi - organism process; 15. Multicellular organismal process; 16. Reproduction; 17. Reproductive process; 18. Response to stimulus; 19. Rhythmic process; 20. Signaling; 21. Cell; 22. Cell junction; 23. Cell part; 24. Extracellular region; 25. Macromolecular complex; 26. Membrane; 27. Membrane part; 28. Membrane - enclosed lumen; 29. Organelle; 30. Organelle part; 31. Supramolecular complex; 32. Synapse; 33. Synapse part; 34. Antioxidant activity; 35. Binding; 36. Catalytic activity; 37. Hijacked molecular function; 38. Molecular function regulator; 39. Molecular transducer activity; 40. Signal transducer activity; 41. Structural molecule activity; 42. Transcription regulator activity; 43. Transporter activity。

图 3 差异基因 GO 分类柱状图

2.4 HepG2 细胞差异基因 KEGG 富集分析

差异基因 KEGG 通路富集散点图, 结果见图 4。

总结了 Q 值最小的前 20 个富集通路, 得到差



注: 1. Legionellosis; 2. Cytokine - cytokine receptor interaction; 3. TNF signaling pathway; 4. Malaria; 5. PPAR signaling pathway; 6. Retinol metabolism; 7. MAPK signaling pathway; 8. Salivary secretion; 9. Pancreatic secretion; 10. IL - 17 signaling pathway; 11. Estrogen signaling pathway; 12. Insulin resistance; 13. Amphetamine addiction; 14. Aminoacyl - tRNA biosynthesis; 15. Steroid hormone biosynthesis; 16. Ferroptosis; 17. NOD - like receptor signaling pathway; 18. Dopaminergic synapse; 19. AGE - RAGE signaling pathway in diabetic complicatio; 20. Gastric acid secretion; 21. Protein digestion and absorption; 22. Taurine and hypotaurine metabolism; 23. Other glycan degradation; 24. Platelet activation; 25. Relaxin signaling pathway; 26. Glycolysis/Gluconeogenesis; 27. Glycine serine and threonine metabolism; 28. Cysteine and methionine metabolism; 29. Arginine and proline metabolism; 30. Glutathione metabolism; 31. Mucin type O - glycan biosynthesis; 32. Glycerophospholipid metabolism; 33. Ether lipid metabolism; 34. Arachidonic acid metabolism; 35. Linoleic acid metabolism; 36.  $\alpha$  - Linolenic acid metabolism; 37. Sphingolipid metabolism; 38. Pyruvate metabolism; 39. Thiamine metabolism; 40. Measles; 41. Human cytomegalovirus infection; 42. NF - kappa B signaling pathway; 43. p53 signaling pathway; 44. Adrenergic signaling in cardiomyocytes; 45. Regulation of lipolysis in adipocytes。

图 4 差异基因 KEGG 通路富集散点图

由图 4a 可知,有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路(MAPK signaling pathway)富集到的差异基因数量最多,细胞因子受体相互作用(Cytokine - cytokine receptor interaction)和 MAPK 信号通路富集程度最强。研究指出,MAPK 信号通路可被细胞因子、生长因子、激素等细胞外和细胞内刺激以及氧化应激和内质网应激等应激源激活。该通路在细胞增殖、分化、应激反应、运动、生长、分化、生存和死亡等许多过程的调节中起着关键作用,这与我们之前对细胞周期的研究相一致<sup>[5]</sup>。MAPK 信号异常可能导致细胞增殖和/或凋亡抵抗的增加或失控。MAPK 信号的失调已被证明在许多疾病的发生和进展中有重要的作用,包括各种类型的癌症和神经退行性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病和肌萎缩性脊髓侧索硬化症<sup>[13]</sup>。由图 4b 可知,蛋白质消化吸收(Protein digestion and absorption)通路中富集的差异基因数量最多,且它的富集程度也最大,其次是血小板激活(Platelet activation)和松弛素信号通路(Relaxin signaling pathway)。值得注意的是,蛋白质消化吸收和松弛素信号通路都属于有机系统分类,这说明芥子酸对细胞有机系统有一定的影响。由图 4c 可知,MAPK 信号通路富集到的差异基因数量最多,细胞因子受体相互作用和 MAPK 信号通路富集程度最强,其次是人类巨细胞病毒感染(Human cytomegalovirus infection)、过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路(PPAR signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)和白细胞介素 17(IL - 17)信号通路(IL - 17 signaling pathway)。研究指出,TNF $\alpha$  和 IL - 17 与氧化应激有关,主要参与机体炎症反应,在宿主免疫学中起关键作用<sup>[14-15]</sup>。PPAR $\gamma$  可以改善胰岛素抵抗和降低脂肪酸浓度,减轻非脂肪组织中的脂质沉积<sup>[16]</sup>。这说明,芥子酸可以通过调节 PPAR 信号通路来刺激 PPAR $\gamma$  的活性从而影响脂肪的代谢与沉积。

### 3 结论

通过芥子酸干预油酸诱导的 HepG2 细胞脂毒性模型,油酸和芥子酸均不同程度改变了细胞的基因表达。随后对其组间差异基因进行 GO 功能分类分析,发现油酸和芥子酸主要是从细胞过程、刺激反应、催化活性等方面影响细胞物质代谢和酶的催化基因表达。在 KEGG 通路富集中,油酸和芥子酸干预改变了 HepG2 细胞相关 MAPK 信号通路、松弛素信号通路、肿瘤坏死因子信号通路和 IL - 17 信号通

路等多个通路,说明芥子酸对细胞有机系统有一定的影响,并且可以通过调节 PPAR 信号通路来刺激 PPAR $\gamma$  的活性从而影响脂肪的代谢与沉积。

### 参考文献:

- [1] 郑庆凯. 代谢综合征及其组分与 2 型糖尿病的关系 [D]. 河南 新乡:新乡医学院,2015.
- [2] 张文将. 安化黑茶防治脂类代谢障碍相关疾病的机理研究 [D]. 长沙:湖南中医药大学,2019.
- [3] 刘志远. 健脾清化方对非酒精性脂肪肝大鼠肝内 FFA、TG 的影响 [D]. 郑州:河南中医学院,2014.
- [4] 程媛,尚靖,张陆勇. 脂毒性与非酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. 华西医学,2008(6): 1482 - 1484.
- [5] 杨晓宇. 菜籽油中酚酸的定量分析及其对 HepG2 肝细胞脂毒性损伤的抑制研究 [D]. 江苏 无锡:江南大学,2019.
- [6] NOWAK H, KUJAWA K, ZADERNOWSKI R, et al. Antioxidative and bactericidal properties of phenolic compounds in rapeseeds [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2010, 94(4): 149 - 152.
- [7] THIYAM U, KUHLMANN A, STÖCKMANN H, et al. Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential [J]. CR Chim, 2004, 7(6/7): 611 - 616.
- [8] 郑畅,杨湄,张苗,等. 菜籽多酚研究进展 [J]. 中国油料作物学报,2017, 39(2): 269 - 280.
- [9] 刘东东. 尼克酰胺对肾癌细胞的影响及其分子机制的研究 [D]. 广东 汕头:汕头大学,2015.
- [10] 魏柏,杨盛力,占静,等. 消癌平对肝癌细胞 HepG2 差异表达基因及可变剪接的影响 [J]. 胃肠病学和肝病杂志,2019(11): 1206 - 1210.
- [11] 岳鼎鼎. 茶多酚对草鱼生长、碳水化合物代谢及肝脏转录组影响 [D]. 合肥:安徽农业大学,2019.
- [12] 王伟. 转录组分析文冠果幼苗抗冷性机制 [D]. 山东 泰安:山东农业大学,2015.
- [13] PINTUS G, TADOLINI B, POSADINO A M, et al. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by the novel antimetastatic agent NAMI - A down regulates c - myc gene expression and endothelial cell proliferation [J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 5861 - 5870.
- [14] OYAMA R, JINNIN M, KAKIMOTO A, et al. Circulating microRNA associated with TNF -  $\alpha$  signaling pathway in patients with plaque psoriasis [J]. J Dermatol Sci, 2011, 61(3): 209 - 211.
- [15] 刘蕾. 二氢杨梅素通过抑制 PPAR $\gamma$  磷酸化改善胰岛素抵抗的作用及机制研究 [D]. 重庆:第三军医大学,2017.