

## 转录组学分析月桂酸单甘油酯对 HepG2 细胞脂代谢的调节作用

林萌慧<sup>1</sup>, 刘畅<sup>1</sup>, 黄佳敏<sup>1</sup>, 冯凤琴<sup>2</sup>, Le Thanh Ninh<sup>3</sup>, 蔡海莺<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 浙江科技学院生物与化学工程学院 杭州 310023

<sup>2</sup> 浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310058

<sup>3</sup> 新加坡国立大学食品科学与技术系 新加坡 119077)

**摘要** 为阐明月桂酸单甘油酯(GML)调节脂代谢的具体靶点和信号通路,本研究通过 GML 处理油酸诱导的肝脏肿瘤细胞 HepG2 高脂模型,结合生物信息学预测和细胞转录组测序分析 GML 对肝细胞脂代谢的调节作用及其潜在靶点和机制。生物信息学分析显示:通过 GML 潜在靶点的 GO 和 KEGG 富集分析,分别获得信号通路 519 个和 144 条( $P<0.05$ )。分子对接验证 GML 可能通过调节 ALB、AKT1、EGFR 等核心靶点蛋白实现其对脂代谢的调控。细胞试验结果显示:经 GML 干预的细胞组与高脂对照组相比,脂质积累水平有一定改善。转录组分析共筛选出 2 879 个差异表达基因,上调和下调分别为 1 363 个和 1 516 个。由 KEGG 信号通路富集分析可知,低氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )通路和脂肪酸氧化分解代谢通路基因富集较显著,通路中重要蛋白 CPT1B、FABP1 等基因转录水平表达处理组比高脂组分别上升 1.79 倍和 2.81 倍,且 HIF-1 $\alpha$  调控下游主要基因表达显著上升,表明 GML 干预以 HIF-1 $\alpha$  通路介导改善高脂细胞氧化应激,并通过脂肪酸分解途径改善高脂细胞模型的脂代谢紊乱。本研究为探索功能性油脂成分改善高脂膳食脂代谢紊乱的作用和机制提供一定的理论参考。

**关键词** 月桂酸单甘油酯; 脂肪酸氧化; 脂代谢; 分子对接; 低氧诱导因子 1 $\alpha$

**文章编号** 1009-7848(2024)08-0101-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.010

月桂酸单甘油酯 (Glycerol monolaurate, GML) 是一种存在于母乳、棕榈仁油和椰子油等动、植物的天然油脂成分,具有抗菌、抗病毒、抗炎等多种生物活性<sup>[1]</sup>。GML 具有较强抑菌活性,尤其对革兰氏阳性菌,如单核李斯特菌、金黄色葡萄球菌等有极强的抑制作用<sup>[2]</sup>,对革兰氏阴性菌也具有较好的抑制效果<sup>[3]</sup>。另外,有文献报道 GML 的抗病毒活性,能显著抑制包膜病毒的毒力<sup>[4-5]</sup>。GML 兼具乳化性和抗菌性,已广泛应用于食品、保健品、化妆品和畜牧、水产养殖等领域<sup>[6]</sup>。如通过添加 GML 乳液,改善食品品质并延长储存和保质效果。近年来,GML 在动物和水产养殖领域改善动物营养和生理健康方面的应用多有报道<sup>[6-7]</sup>。研究显示,GML 能有效提高肉猪、肉鸡和蛋鸡等的生长性能,改善消化能力和肠道健康,提高肉营养品

质以及改善脂肪代谢和营养健康等<sup>[8-9]</sup>。

近年来,由于生活方式和饮食规律的改变,高脂膳食人群急剧增加,导致肥胖、代谢综合征、糖尿病等一系列健康问题和隐患。通过膳食添加精准调控脂代谢和肠道微生态是防治上述健康问题的重要手段。GML 作为具有肠道微生态调节作用的功能性油脂成分,具有与长链脂肪酸不同的吸收和利用途径,展现了很好的改善脂代谢的潜力<sup>[10]</sup>。小鼠动物实验证明,GML 能改善高脂条件下的肠道菌群紊乱,降低脱硫弧菌属等变形菌门微生物含量,提高双歧杆菌属和乳杆菌属等有益菌含量<sup>[11]</sup>。GML 显著调节脂代谢相关通路,如提高脂肪酸  $\beta$  氧化通路重要基因表达。有研究还表明 GML 可调节肠道菌群的胆盐水解酶 BSH 活性,进而调节胆汁酸组成及其介导的脂代谢调控相关信号通路等<sup>[12-13]</sup>。GML 调节脂代谢的机制研究还不完善,其对机体直接作用靶点仍未完全揭示,可通过 GML 处理肝脏细胞试验解决上述科学问题。另外,生物信息学分析是信息时代生物学研究的重要辅助工具,为揭示科学问题高效、快速地提供重要线索和依据,也是重要的验证手段之一。本研究通过油酸诱导的肝细胞 HepG2 细胞高脂模型,结

**收稿日期:** 2023-08-17

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(31972079,32172214); 浙江省自然科学基金一般项目(LQ19E030001, LY18C200006); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202211057021)

**第一作者:** 林萌慧,女,本科

**通信作者:** 蔡海莺 E-mail: caihaiy@hotmail.com

合生物信息学靶点预测和转录组测序分析方法,探究 GML 在分子水平的潜在作用靶点以及调节细胞脂代谢的机制,为功能性油脂成分 GML 改善由高脂膳食引起的健康问题提供一定的理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

HepG2 细胞,购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

月桂酸单甘油酯(CAS: 142-18-7),梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;油酸(CAS: 112-80-1),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;油红 O(CAS: 1320-06-5),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;胎牛血清(货号: 164210),武汉普诺赛生命科技有限公司;MEM 培养基,武汉普诺赛生命科技有限公司;CCK-8 细胞活力试剂盒、甘油三酯(TG)试剂盒、总胆固醇(T-CHO)试剂盒,南京建成生物工程研究所。CO<sub>2</sub> 细胞培养箱,赛默飞科技有限公司。

### 1.2 月桂酸单甘油酯潜在靶点和通路生物学分析

1.2.1 月桂酸单甘油酯化学结构及靶点获取 通过 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取月桂酸单甘油酯化学结构,下载 2D 结构并保存为.sdf 格式,导入至 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和 PharmMapper 数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)进行靶点预测,并获取 GML 潜在靶点文件。Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)查询蛋白的基因名,删除重复项。

1.2.2 脂代谢通路相关的 GML 潜在靶点获取 使用 Gene Cards 数据库(<https://www.genecards.org/>),输入关键词:脂代谢(Lipid metabolism),获得脂代谢靶点基因。利用 Venny 2.1 在线作图工具(<http://www.liuxiaoyu.com/>),将脂代谢靶基因与 GML 潜在靶点基因取交集,获取脂代谢通路相关 GML 潜在靶点。

1.2.3 GML 潜在靶点蛋白质互作网络构建及核心靶点基因筛选 将上述脂代谢通路相关 GML 潜在靶点蛋白导入 STRING 数据库([\[db.org/cgi/input.pl\]\(https://string-db.org/cgi/input.pl\)\),设定生物种类为“Homo Sapiens”,构建脂代谢通路相关 GML 潜在靶点的蛋白相互作用关系\(PPI\)网络。结果导入可视化软件 Cytoscape 3.8.0,进行 PPI 网络图的拓扑学分析\(筛选标准为大于度值中位数 2 倍<sup>\[14\]</sup>\),挑选排名前 15 位为核心靶点蛋白。](https://string-</a></p></div><div data-bbox=)

1.2.4 基于 GML 潜在靶点的 GO 和 KEGG 富集分析 使用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对脂代谢通路相关 GML 潜在靶点进行基因本体(Gene ontolog, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。并利用在线微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对校正后 P 值排名前 20 位通路绘制气泡富集图。

1.2.5 GML 与潜在靶点分子对接 从 PubChem 中下载 GML 结构(.sdf 形式),通过 Swiss Target Prediction 数据库转化为.pdb 格式。利用 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)或 AlphaFold 网站中下载核心靶点基因编码的蛋白结构,即为对接蛋白受体。用 PyMOL 2.3 软件进行前处理,拆分蛋白结合配体、去除氢键和水分。再利用 AutoDock 1.5.6 软件对该蛋白结构加氢等处理,对配体进行加氢、加电荷等处理后,均保存为.pdbqt 格式。最后将受体和配体分别设置为刚性与柔性进行对接,并将对接结果用 PyMOL 2.3 软件进行可视化展示。

### 1.3 GML 细胞试验和转录组学分析

1.3.1 HepG2 细胞高脂模型诱导和 GML 处理 将复苏后的 HepG2 细胞置于含 10%胎牛血清的 MEM 培养基(含 1%青霉素和 1%链霉素)中,于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养,取对数生长期细胞按 10<sup>6</sup> 个/mL 终浓度接种于 24 孔板,培养 24 h 待细胞贴壁生长后,吸去孔板里的培养基。采用 0.2 mmol/L 油酸诱导高脂模型,通过不同浓度 GML(100, 150, 200, 250 μmol/L)处理高脂细胞模型,同时以正常 HepG2 细胞和高脂模型细胞分别作为正常对照组和高脂对照组,每组 6 个平行。对处理后的细胞进行油红 O 染色、显微镜观察和定量检测,并在冰水浴下超声破碎细胞后进行细胞总甘油三酯(TG)和细胞总胆固醇(TC)指标检测,筛选降脂效果最佳 GML 处理浓度进行转录组水平试验及分析。

1.3.2 CCK-8 细胞活力检测 按照正常对照组 (NCD)、高脂对照组 (HFD)、GML 高脂处理组 (GML 100  $\mu\text{mol/L}$ 、GML 150  $\mu\text{mol/L}$ 、GML 200  $\mu\text{mol/L}$ 、GML 250  $\mu\text{mol/L}$ ) 分组,参考南京建成生物工程研究所 CCK-8 试剂盒操作方法,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后,测定在波长 450 nm 处的吸光值。

1.3.3 细胞总胆固醇(TC)和总甘油三酯(TG)含量检测 按照 1.3.1 节步骤处理后,收集破碎后的细胞匀浆液,按照南京建成生物工程研究所 TC (胆固醇)、TG (甘油三酯) 试剂盒说明书,在 96 孔板中,加入 2.5  $\mu\text{L}$  细胞匀浆液和 250  $\mu\text{L}$  试剂盒工作液,混匀 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min,于波长 510 nm 处测定各孔吸光值。

1.3.4 细胞转录组分析 根据试验结果,将调节脂代谢指标较显著的 200  $\mu\text{mol/L}$  GML 组进行转录组水平测定分析。培养 HepG2 细胞至对数生长期,以  $5 \times 10^5$  细胞/孔接种量转接到 6 孔细胞板中,待细胞贴壁覆盖率达到 80% 左右,加入 0.2 mmol/L 油酸将细胞诱导成高脂肪模型,培养 24 h 后,处理组弃去旧液,加入 0.2 mmol/L 油酸+GML 200  $\mu\text{mol/L}$  混合培养液处理 24 h,并以油酸诱导组作为高脂对照组,每个条件设置 3 组平行,即 HFD-1、HFD-2、HFD-3 和 GML-1、GML-2、GML-3。收集细胞匀浆液,液氮保存。细胞样品 RNA 提取、质量检测、反转录及转录组分析由上海美吉生物医药科技有限公司完成。利用 Illumina 平台对反转录 cDNA 序列进行高通量转录组测序<sup>[15]</sup>。通过 Hisat2 软件进行序列比对分析,综合多个数据库 (GO 和 KEGG) 对所表达的基因进行注释;利用 DEGseq 进行表达量差异分析,差异基因筛选标准为  $\log_2\text{FC} \geq 1$  且  $P \leq 0.05$  (FC 差异倍数为试验组基因/对照组基因)。采用美吉生信云平台 (<https://cloud.majorbio.com/>) 对基因集中的基因/转录本进行 GO 分析和 KEGG Pathway 富集分析,当  $P < 0.05$  时,认为该通路富集显著。

#### 1.4 统计分析

数据分析采用 Origin 2019 软件,并利用 GraphPad prism6 软件进行作图,试验数据结果以平均数 $\pm$ 标准差 ( $n=3$ ) 表示,数据间显著性分析采用单因素方差分析 (ANOVA) 分析,  $P < 0.05$  即表示

差异显著。

## 2 结果与分析

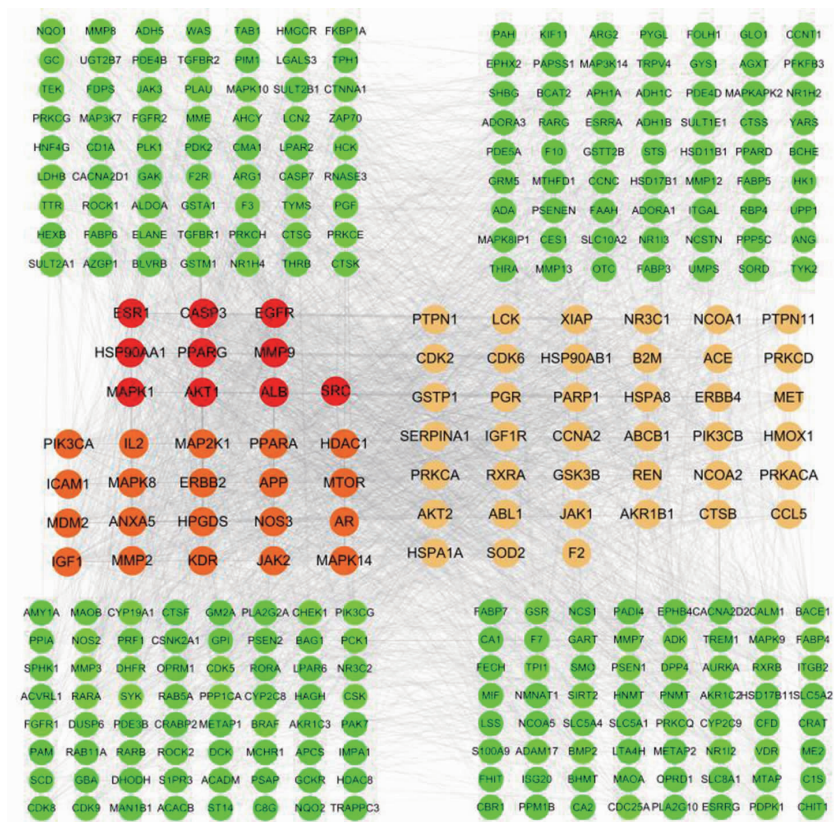
### 2.1 GML 靶点预测以及与脂代谢相关共有靶点筛选

通过分子的蛋白靶点预测数据库高通量筛选 GML 的潜在靶点,将为本研究 GML 调节脂代谢机制提供重要参考。Swiss Target Prediction 寻找到 GML 靶蛋白 100 个,PharmMapper 寻找到 GML 靶蛋白 299 个,总计 330 个,利用 Gene Cards 数据库找到与脂肪酸代谢相关基因 9 194 个。查询 GML 靶蛋白基因名并删除重复项后共获取 GML 脂代谢相关靶点 330 个,表明 GML 具有通过潜在靶向作用广泛参与脂代谢通路的活性调控的潜力。

利用 STRING 数据库构建上述 330 个脂代谢相关靶点的靶点蛋白-蛋白质相互作用 PPI 网络,并将结果导入 Cytoscape 软件拓扑学分析后,结果如图 1 所示。其中,度值大于平均度值 (17) 两倍的核点共 70 个,度值、介数、最短路径、楔点等多种节点中心性参数用于衡量节点在网络中的影响能力和重要性,最终基于度值、介数中心性和接近中心性等重要参数进行综合排序<sup>[16]</sup>,核点包括 ALB、AKT1、EGFR 等,具体见表 1。通过潜在靶点蛋白质分子对接评估其与配体的结合能力,结果显示 GML 与核点 AKT1、EGFR、HSP90AA1、CASP3、MAPK1、PPARG 蛋白的结合自由能分别为 -4.51, -2.84, -1.30, -0.83, -3.47, -1.46 kJ/mol,显示 GML 具有靶向和影响核点基因编码蛋白结构的潜力,表明 GML 可通过影响多种核点蛋白的稳定和活性,进一步调节脂代谢相关通路调节细胞功能和活性。

### 2.2 GML 预测靶点的 GO 和 KEGG 通路富集分析

GO 功能显著性富集分析给出了与基因组背景相比显著富集基因的 GO 功能条目,即给出了显著相关的基因的生物学功能<sup>[17]</sup>,按校正后  $P$  值标准,富集到 GO 条目 519 个,其中,生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 分别为 373, 50, 96 个。BP 涉及信号转导、凋亡过程负调控、基因表达正调控、蛋白质磷酸化、平滑肌细胞



注:按照基因度值(Degree)数值大小排序,颜色越深表示此靶点基因越重要<sup>[16-17]</sup>,其中,红色及橙色表示其度值大于平均度值(17)2倍的70个核心基因,绿色基因表示其余基因。

图1 脂代谢相关GML潜在靶点的PPI网络

Fig.1 PPI network of GML prediction target related with lipid metabolism

表1 GML影响脂代谢的核心靶点基因拓扑学分析(排名前15位)

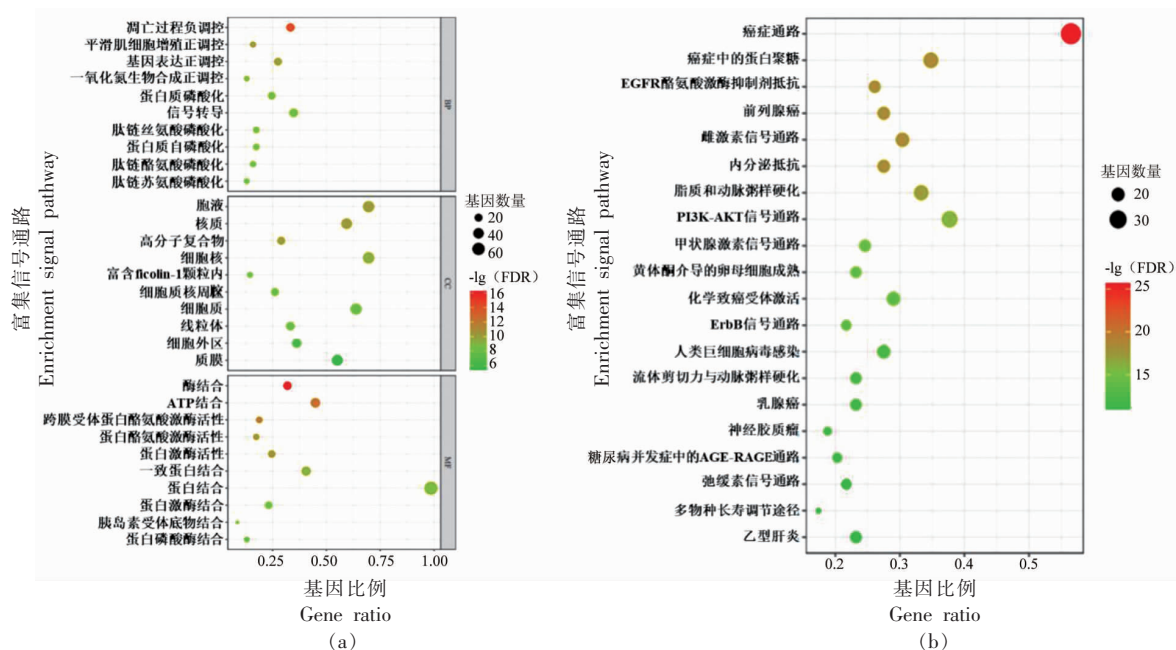
Table 1 Topological analysis of the core target genes of GML affecting lipid metabolism (Ranking top 15)

核心靶点	蛋白名称	度值	介数中心性	接近中心性	结合自由能/(kJ/mol)
ALB	血清白蛋白	153	14 538.3	0.6466	-7.32
AKT1	AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1	143	9 153.4	0.6326	-7.90
EGFR	表皮生长因子受体	116	5 009.1	0.5963	-8.57
SRC	非受体酪氨酸激酶	115	5 087.8	0.5941	-4.97
HSP90AA1	热休克蛋白 90AA1	105	4 609.8	0.5844	-15.51
CASP3	caspase 3 蛋白酶	98	2 427.7	0.5750	-4.93
ESR1	雌激素受体 1	95	3 769.8	0.5620	-6.14
MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1	90	2 393.6	0.5523	-10.37
PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$	83	3 239.3	0.5523	-11.08
MMP9	基质金属蛋白酶 9	82	1 999.8	0.5421	-8.57
ERBB2	erb-b2 受体酪氨酸激酶 2	78	1 543.4	0.5458	-3.97
IGF1	胰岛素样生长因子 1	78	1 263.3	0.5394	-9.57
MTOR	雷帕霉素激酶的机制靶点	75	1 181.1	0.5394	-3.34
MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14	69	1 388.6	0.5305	-9.82
HPGDS	造血前列腺素 D 合成酶	68	2 810.7	0.5421	-10.12

增殖正调控、蛋白质自磷酸化等;CC 涉及胞液、细胞核、质膜、线粒体等;MF 涉及蛋白质结合、ATP 结合、一致蛋白结合、酶结合、蛋白激酶活性等。具体 GO 功能富集分析气泡图见下图 2a。

按校正后  $P$  值标准,共富集到 KEGG 信号通路 144 条。校正后  $P$  值排名前 20 位通路见图 2b, GML 影响潜在靶点通路包括癌症通路、雌激素信

号通路、内分泌抵抗、甲状腺素信号通路、PI3K-AKT 信号通路、脂质和动脉粥样硬化等多条通路。以上结果表明 GML 可通过影响核心靶点蛋白的稳定和活性,参与脂代谢、信号转导和炎症等相关的通路,生物信息学分析结果将为进一步通过细胞试验和转录组学分析 GML 调节脂代谢的作用机制提供参考。



注:a 图中 BP、CC、MF 依次代表生物过程、细胞组分、分子功能;b 图中气泡大小表示富集该通路的基因数量(Count),颜色越深表示  $-\lg(\text{FDR})$  越大,即 FDR 越小。

图 2 GO 功能富集分析(a)与 KEGG 通路富集分析(b)

Fig.2 GO function enrichment analysis (a) and KEGG pathway enrichment analysis (b)

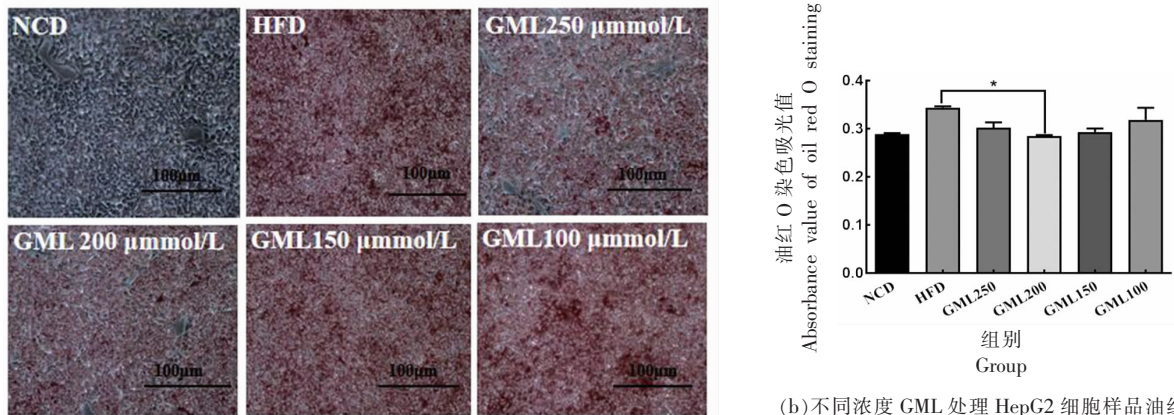
### 2.3 GML 对 HepG2 细胞活力、TC、TG 含量的影响

根据前期通过 CCK-8 细胞活力检测分析 GML 对细胞活性影响,结果显示不同浓度 GML (50, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 24 h 后, GML 浓度高于 300  $\mu\text{mol/L}$  时对细胞活性有一定影响,其余各组细胞存活率均大于 90%,因此,选择 100, 150, 200, 250  $\mu\text{mol/L}$  浓度 GML 用于高脂条件下脂代谢调节作用研究。与高脂模型组相比(见图 3),不同浓度 GML 处理组油红 O 染色的着色有明显变化,且受剂量影响,200  $\mu\text{mol/L}$  改善效果最佳,表明 GML 能够改善细胞内脂质沉积。定

量检测结果显示,与 HFD 组相比,GML 处理组细胞内总 TC 和 TG 含量有所变化(见图 4),200  $\mu\text{mol/L}$  改善效果虽然是最佳的,但均无显著性,后续将选择 200  $\mu\text{mol/L}$  浓度进行细胞试验和转录组测序分析。

### 2.4 GML 调节 HepG2 细胞脂代谢的转录组学分析

2.4.1 GML 处理表达量差异基因和聚类分析 各样品细胞转录组测序结果显示,原始平均转录子条目数经质控并去除低质量条目后,HFD 处理组与 GML 处理组获得转录子条目数分别为 49 844 905 和 46 877 561 条。质量评估结果表明,



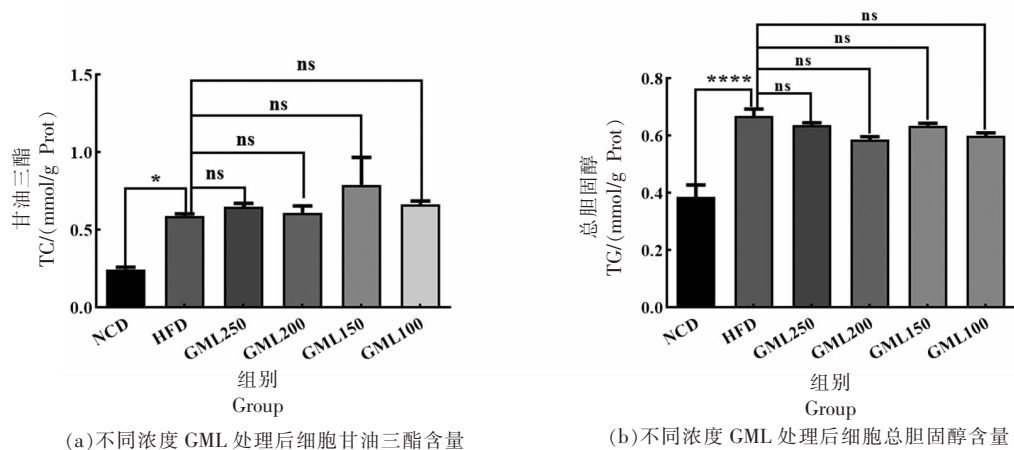
(a)不同浓度 GML 处理 HepG2 细胞样品油红 O 染色观察

(b)不同浓度 GML 处理 HepG2 细胞样品油红 O 染色吸光度

注: \* $P < 0.05$ 。

图 3 经 GML 处理 HepG2 细胞染色及吸光值

Fig.3 Staining and absorbance of HepG2 cells treated with GML



(a)不同浓度 GML 处理后细胞甘油三酯含量

(b)不同浓度 GML 处理后细胞总胆固醇含量

注: \* $P < 0.05$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns. 不显著。

图 4 GML 处理后细胞 TG 和 TC 含量变化

Fig.4 Changes of TG and TC contents of cells with GML treatment

测序数量及质量均达到后续分析要求。通过 GML 组与 HFD 组表达量差异基因筛选, GML 处理组与 HFD 组共有 2 879 个表达量差异基因, 其中上调和下调基因分别为 1 363 个和 1 516 个, 大量基因的差异表达表明 GML 可通过靶向调节潜在靶点, 进一步影响下游信号传导和代谢网络。通过样本的层次聚类分析 (HCA), 经过 GML 处理组的 HepG2 细胞基因表达谱发生明显变化 (图 5); 主成分分析 (PCA)<sup>[20]</sup> 结果类似, GML 处理组与 HFD 模型组样品显著分离, 主成分 1 (PC1) 和主成分 2 (PC2) 对区分样本的贡献度分别为 47.23% 和

23.49%。上述结果均表明 GML 处理对 HepG2 高脂细胞模型有明显调节作用。

#### 2.4.2 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

对 GML 处理组和高脂对照组差异表达基因涉及的通路进行富集分析结果见图 6。结果显示 GO 富集到葡萄糖代谢过程、羧酸代谢过程、NAD 代谢过程、小分子分解代谢过程等途径。KEGG 富集到果糖和甘露糖代谢、酪氨酸代谢、糖酵解/糖异生、胆汁分泌、p53 信号通路、视黄醇代谢和内分泌抵抗等代谢或信号通路。转录组测序分析结果再次表明 GML 处理能影响高脂 HepG2 细胞的多

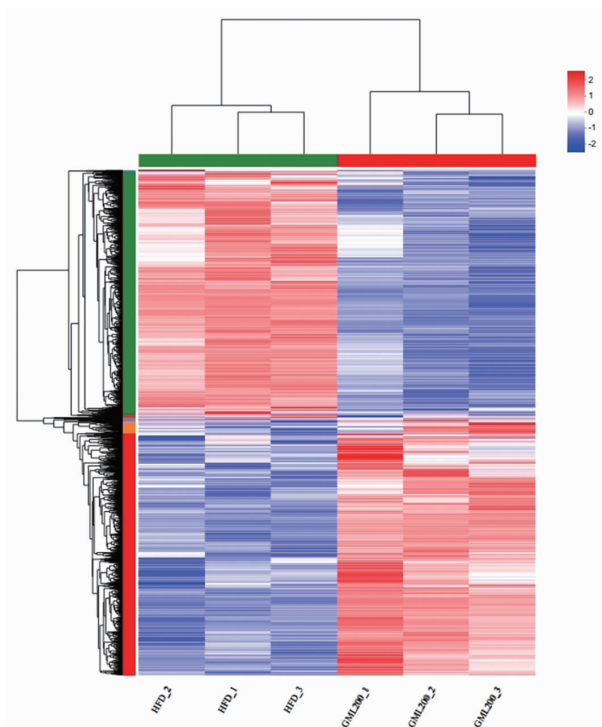


图 5 GML 处理差异表达基因的聚类分析

Fig.5 Cluster analysis of differentially expressed genes treated with GML

个糖脂代谢相关通路。另外,GML在肝脏细胞中可通过调节胆汁酸代谢,抑制胆汁酸合成基因 *CYP7A1* 以及胆汁酸核受体 FXR 以及转运受体 *OATPs* 基因的表达,间接调节肝细胞脂代谢。通过比较转录组测序差异表达基因的 KEGG 富集结果与生物信息学预测 GML 潜在靶点的 KEGG 富集结果发现,仅有内分泌抵抗通路为共有的富集通路,表明生物信息学分析具有一定的参考价值,可为生物相关研究提供科学假设并辅助设计试验方案,以及为试验结果提供一定解释和验证<sup>[21]</sup>。然而,预测的 GML 作用靶点蛋白为人体所有组织细胞已知蛋白,未限定在肝脏组织特异性表达蛋白范围,与本研究 GML 直接作用肝细胞的转录组测序结果具有一定差异。另外,本研究 GML 干预脂肪酸诱导的高脂模型肝细胞 HepG2 进一步限定转录表达代谢通路的特异性,也造成与生物信息学分析结果的差异,细胞试验转录组测序分析能比较直接地显示 GML 在高脂模型下的特异性效应位点和代谢通路。

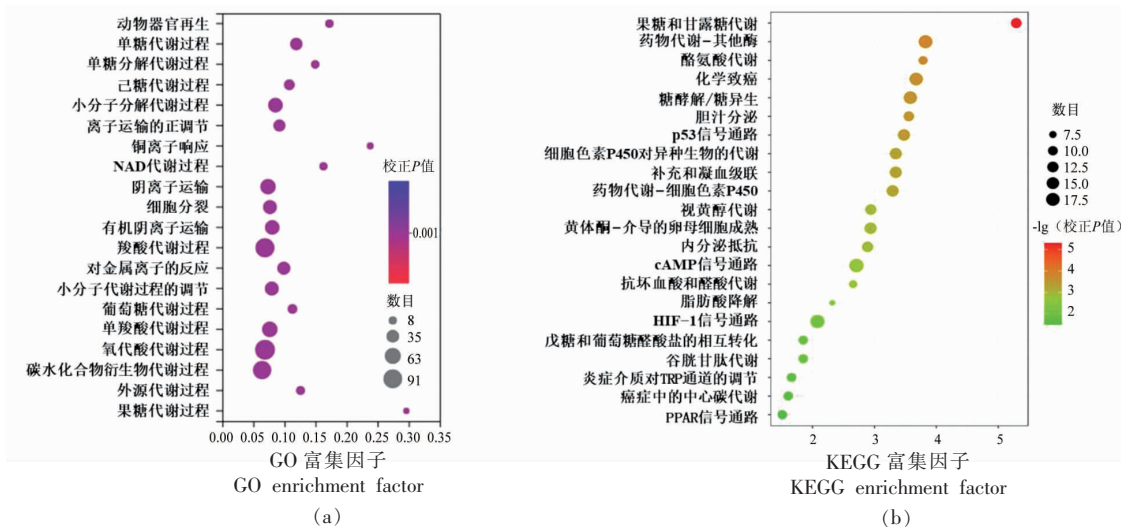


图 6 GML 差异表达基因的 GO 富集分析(a)及 KEGG 富集分析(b)

Fig.6 GO enrichment analysis (a) and KEGG enrichment analysis (b) of GML differentially expressed genes

2.4.3 GML 调节 HepG2 细胞脂代谢的潜在机制分析 通过转录组学测序对 GML 可能调节的代谢通路进一步分析表明,GML 可能通过影响 HIF-1 $\alpha$  代谢通路和脂肪酸氧化分解代谢通路,进而调节高脂细胞模型脂代谢。GML 处理可显著调节高

脂细胞 *HIF-1 $\alpha$*  下游厌氧呼吸通路基因 *PDK1*、*HK1*、*PFKL*、*ALDOC*、*ENO1*、*PGK1*、*LDHA*、*PFKFB3* 的表达(如图 7);另外,GML 处理分别上调了或下调了 *HIF-1 $\alpha$*  基因翻译相关蛋白表达,但结果不显著。GML 还可能通过抑制 PHD 蛋白表达,影响

HIF-1 $\alpha$  的泛素化蛋白降解通路,表明 GML 处理可调控 HIF-1 $\alpha$  信号通路。根据计算机辅助靶点预测显示,上游调节 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达相关的 MAPK 信号通路中 AKT、mTOR 和 MAPK 等蛋白激酶为 GML 的潜在作用靶点,表明 GML 可能通过影响上述潜在靶点调节 HIF-1 $\alpha$  蛋白翻译表达。高脂膳食诱导产生的活性氧(ROS)促进 HIF-1 $\alpha$  保持稳定,并易位至细胞核与 HIF-1 $\beta$  形成异二聚,激活下游基因通路,减少氧消耗和活性氧(ROS)生成,并恢复氧递送<sup>[22]</sup>。HIF-1 蛋白积累还

被认为能抑制线粒体呼吸作用,有效延长线虫寿命的益处<sup>[23]</sup>,因此,GML 处理可能通过调节 HIF-1 $\alpha$  的翻译和泛素化降解,积累 HIF-1 $\alpha$  蛋白水平,促进无氧呼吸并缓解高脂细胞模型的氧化应激。氧化应激被认为在脂代谢紊乱及相关疾病中的扮演重要角色,机体氧化应激的提高,常伴随脂质代谢紊乱,如促进细胞因子释放、脂质过氧化、线粒体和过氧化物酶体等的脂肪酸氧化损伤等,促进肝脏疾病发展<sup>[24-25]</sup>。

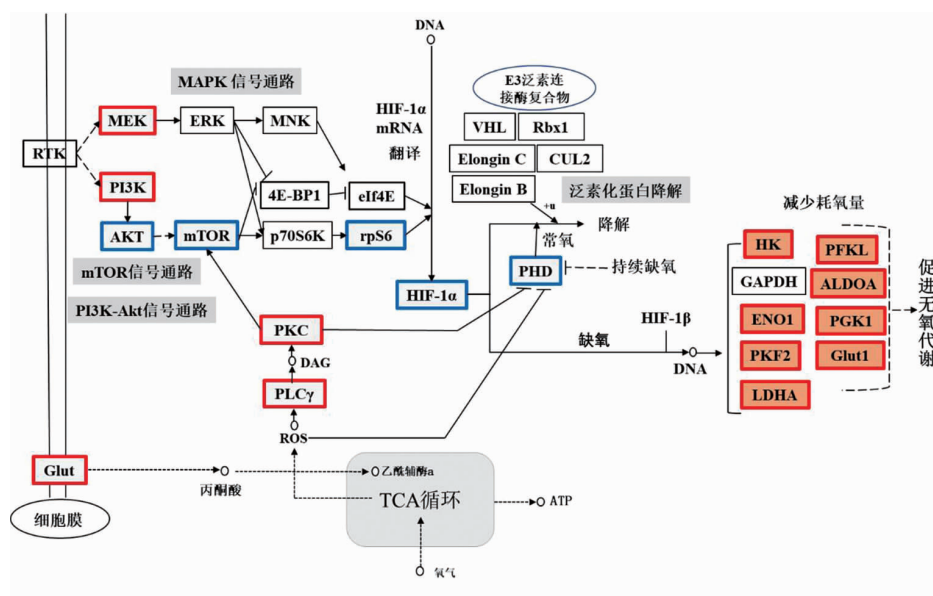


图7 GML 调节 HIF-1 $\alpha$  通路的潜在机制分析

Fig.7 Analysis of the potential regulation mechanism of GML on HIF-1 $\alpha$  pathway

GML 处理提高了高脂 HepG2 细胞模型的脂肪酸分解代谢的多个基因表达,涉及脂肪酸  $\beta$  氧化的氧化、水合、脱氢、硫解过程等多个基因,但结果不显著。GML 处理显著提高了脂肪酸转运蛋白基因脂肪酸结合蛋白 1(FABP1)和肉碱棕榈酰转移酶 1B(CPT1B)的转录表达,较对照组分别表达量为 2.81 倍和 1.79 倍。CPT 蛋白为脂肪酸氧化分解的关键限速酶,表明 GML 处理可诱导高脂细胞模型脂肪酸的快速氧化分解。脂肪酸结合蛋白(FABP)参与细胞内脂肪酸转运到不同位点进行代谢或储存,研究发现肝脏中 FABP1 基因表达与肝脏重量和甘油三酯(TG)含量有关<sup>[26]</sup>。因此,GML 能够影响肝细胞 HepG2 高脂模型的多种脂代谢通路,主要影响 HIF-1 $\alpha$  代谢通路和脂肪酸氧化

分解代谢通路发挥脂代谢调节作用。然而,GML 调节高脂细胞模型总甘油三酯含量和总胆固醇含量效果并不显著,表明 GML 通过直接靶向细胞脂代谢相关蛋白作用调节肝细胞脂代谢的效果比较有限,这一结果与 GML 调节模式生物体内试验调节脂代谢的结果有一定差别<sup>[27-29]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>最新研究显示,GML 和月桂酸甘油三酯能够显著改善高脂膳食引起的斑马鱼(Danio rerio)脂质沉积和肝损伤,并证明与 AMPK 通路调节有关。Zhao 等<sup>[30]</sup>研究了 GML、月桂酸和月桂酸甘油三酯对高脂膳食小鼠脂代谢和肠道微生态紊乱的影响,结果显示三者均能显著改善模型小鼠高脂血症、糖代谢紊乱和炎症反应,提高有益菌双歧杆菌属(Bifidobacterium)并降低有害菌脱硫弧菌属(Desulfovibrio)



组成。综上所述,GML 调节脂代谢的靶点和机制更多与 GML 特殊的消化吸收特性、调节肠道微生态和胆汁酸稳态等体内因素相关。GML 虽然直接对高脂模型肝细胞的靶向作用较多,但是脂代谢调节效果低于体内因素,主要包括 HIF-1 $\alpha$  信号通路介导的细胞氧化应激改善,脂肪酸氧化分解代谢通路调节和胆汁酸代谢调节等。研究表明,其它中链脂肪酸及其甘油酯(如辛酸单干酯、癸酸单干酯)也具有明显的脂代谢调节作用<sup>[31-32]</sup>,本研究将进一步揭示中链脂肪酸及其甘油酯的作用靶点和机制提供一定的参考。

### 3 结论

本文通过生物信息学分析与细胞转录组测序分析结合的方法研究月桂酸单甘油酯调节高脂细胞模型脂代谢的潜在作用靶点和机制。生物信息学分析显示,GML 预测靶点蛋白和脂代谢的共有靶点基因 330 个,表明 GML 具有通过潜在靶向作用广泛参与脂代谢通路基因的表达调控的潜力。GML 潜在靶点的 GO 和 KEGG 富集分析分别获得信号通路 519 个和 144 条( $P < 0.05$ ),分子对接验证 GML 可能通过调控多个核心靶点蛋白的稳定和活性,参与脂代谢、信号转导和炎症等相关的通路,生物信息学分析结果将进一步通过细胞试验和转录组学分析 GML 调节脂代谢的作用机制提供参考。细胞试验证明,GML 可一定水平上改善脂质积累。转录组测序分析共筛选出 2 879 个差异表达基因,由 KEGG 信号通路富集分析可知,HIF-1 $\alpha$  通路和脂肪酸氧化分解代谢通路基因富集较显著,HIF-1 $\alpha$  调控下游基因表达显著上升,表明 GML 干预以 HIF-1 $\alpha$  通路介导改善高脂细胞氧化应激。GML 还通过脂肪酸分解途径改善高脂细胞模型的脂代谢紊乱。然而,GML 整体调节高脂细胞模型脂代谢和相关通路信号效果并不显著,表明 GML 直接靶向细胞脂代谢相关蛋白的效果有限,直接靶向作用低于文献报道的动物体内消化和调节肠道菌群和胆汁酸等因素。另外,由于预测的 GML 作用靶点蛋白为人体所有组织细胞已知蛋白,未限定在肝脏组织特异性表达蛋白范围,而本研究 GML 直接作用肝细胞,且干预脂肪酸诱导的高脂模型,转录表达代谢通路呈现特异

性,转录组测序结果与生物信息学分析具有一定差异,而基于分子潜在蛋白靶点预测的生物信息学分析仍然可为生物相关研究提供科学假设,以及为试验结果提供一定解释依据。本研究为 GML 调节脂代谢的靶点和机制以及功能性油脂成分调节高脂膳食脂代谢紊乱研究提供一定的理论参考。

### 参 考 文 献

- [1] MARTEN B, PFEUFFER M, SCHREZENMEIR J. Medium-chain triglycerides (special issue: Technological and health aspects of bioactive components of milk) [J]. International Dairy Journal, 2016, 16: 1374-1382.
- [2] YU D W, JIANG Q X, XU Y S, et al. The shelf life extension of refrigerated grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets by chitosan coating combined with glycerol monolaurate [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101: 448-454.
- [3] CAI H Y, YU L Y, LI Y, et al. Antimicrobial mechanism analysis of an oil in water microemulsion by DNA microarray-mediated transcriptional profiling of *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Safety, 2014, 34(2): 176-183.
- [4] ZHANG H, CUI W H, ZHAO Y N, et al. Antibacterial interactions of monolaurin with commonly used antimicrobials and food components [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(7): M418-M421.
- [5] WELCH J R L, XIANG J H, OKEOMA C M, et al. Glycerol monolaurate, an analogue to a factor secreted by *Lactobacillus*, is virucidal against enveloped viruses, including HIV-1 [J]. mBio, 2020, 11(3): 00686-20.
- [6] LUO X L, LIU W X, ZHAO M J, et al. Glycerol monolaurate beyond an emulsifier: Synthesis, *in vivo* fate, food quality benefits and health efficacies [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 127: 291-302.
- [7] WANG J, JIANG H Q, ALHAMOUD Y, et al. Integrated metabolomic and gene expression analyses to study the effects of glycerol monolaurate on flesh quality in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130749.
- [8] LIU T, MO Q F, WEI J, et al. Mass spectrome-

- try-based metabolomics to reveal chicken meat improvements by medium-chain monoglycerides supplementation: Taste, fresh meat quality, and composition[J]. *Food Chemistry*, 2021, 365: 130303.
- [9] LIU T, LI C, ZHONG H, et al. Dietary medium chain  $\alpha$ -monoglycerides increases body weight, feed intake, and carcass yield in broilers with muscle composition alteration [J]. *Poultry Science*, 2020, 100: 186-195.
- [10] XIA J H, YU P, ZENG Z L, et al. Lauric triglyceride ameliorates high-fat-diet-induced obesity in rats by reducing lipogenesis and increasing lipolysis and  $\beta$ -oxidation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(32): 9157-9166.
- [11] WANG C, ZHANG C, YU H, et al. Glycerol monolaurate and triglycerol monolaurate alleviated high-fat diet induced lipid accumulation and damage of liver in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 561: 738616.
- [12] XIA J H, YU P, ZENG Z L, et al. Lauric triglyceride ameliorates high-fat-diet-induced obesity in rats by reducing lipogenesis and increasing lipolysis and beta-oxidation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021, 69(32): 9157-9166.
- [13] LI H Z, LIU Y H, ZHANG X S, et al. Medium-chain fatty acids decrease serum cholesterol via reduction of intestinal bile acid reabsorption in C57BL/6J mice [J]. *Nutrition & Metabolism*, 2018, 15(1): 1-12.
- [14] 罗武龙, 陈洁, 牛婕, 等. 基于网络药理学的二仙汤治疗抑郁症的作用机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(9): 1317-1324.
- LUO W L, CHEN J, NIU J, et al. Study on the mechanism of Erxian Decoction in treating depression based on network pharmacology[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(9): 1317-1324.
- [15] REN Y, YU G, SHI C P, et al. Majorbio cloud: A one-stop, comprehensive bioinformatic platform for multiomics analyses[J]. *iMeta*, 2022, 1(2): e12.
- [16] 赵俊, 孙加琳, 刘洪玲, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨熊果酸治疗骨质疏松的分子机制[J]. *中国药房*, 2021, 32(17): 2066-2073.
- ZHAO J, SUN J L, LIU H L, et al. To explore the molecular mechanism of ursolic acid in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. *China Pharmacy*, 2021, 32(17): 2066-2073.
- [17] MOMOTA R, OHTSUKA A. Network of anatomical texts (NAnaTex), an open-source project for visualizing the interaction between anatomical terms [J]. *Anat Science Int*, 2018, 93(1): 149-153.
- [18] 刘志强, 王博龙. 中药网络药理学研究: 蛋白互作网络构建与功能注释[J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2018, 35(3): 49-52.
- LIU Z Q, WANG B L. Research on network pharmacology of traditional Chinese medicine: Construction and functional annotation of protein-protein interaction network[J]. *Journal of Hubei University for Nationalities (Medical Edition)*, 2018, 35(3): 49-52.
- [19] 刘粉香, 杨文国, 孙勤红. 基于转录组测序数据分析及高通量 GO 注释理论的研究[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(31): 88-91, 100.
- LIU F X, YANG W G, SUN Q H. Research based on transcriptome sequencing data analysis and high-throughput GO annotation theory[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2018, 46(31): 88-91, 100.
- [20] 张博. 伞裙追寄蝇滞育的转录组学和代谢组学分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- ZHANG B. Transcriptomic and metabolomic analysis of diapause in *Euphorbia parasitica* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [21] MATHAI N, CHEN Y, KIRCHMAIR J. Validation strategies for target prediction methods[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2020, 21(3): 791-802.
- [22] JANBANDHU V, TALLAPRAGADA V, PATRICK R, et al. HIF-1 $\alpha$  suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 29(2): 281-297.
- [23] HWANG A B, LEE S J. Regulation of life span by mitochondrial respiration: The HIF-1 and ROS connection[J]. *Aging*, 2011, 3(3): 304-310.
- [24] LAURA B, SYLVAIN B, GRÉGORIE M, et al. Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: Beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2017, 40: 95-104.
- [25] OKUNO Y, FUKUHARA A, HASHIMOTO E, et al. Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway[J]. *Diabetes*, 2018, 67(6): 1113-

- 1127.
- [26] 姚俊秀, 肖毅, 王强, 等. 肝脏因子 FABP1 与血脂异常的相关性分析[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(6): 580–586.
- YAO J X, XIAO Y, WANG Q, et al. Correlation analysis between liver factor FABP1 and abnormal blood lipids[J]. PLA Medical Journal, 2021, 46(6): 580–586.
- [27] ZHAO M J, JIANG Z L, CAI H Y, et al. Modulation of the gut microbiota during high-dose glycerol monolaurate-mediated amelioration of obesity in mice fed a high-fat diet[J]. mBio, 2020, 11(2): e00190–20.
- [28] ZHAO M J, CAI H Y, JIANG Z L, et al. Glycerol monolaurate-mediated attenuation of metabolic syndrome is associated with the modulation of gut microbiota in high fat diet-fed mice[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63(18): 1801417.
- [29] MO Q F, LIU T, FU A K, et al. Novel gut microbiota patterns involved in the attenuation of dextran sodium sulfate-induced mouse colitis mediated by glycerol monolaurate via inducing anti-inflammatory responses[J]. mBio, 2021, 12(5): e0214821.
- [30] ZHAO M J, ZHANG J H, LIU T, et al. Differential modulations of lauric acid and its glycerides on high fat diet-induced metabolic disorders and gut microbiota dysbiosis[J]. Food Research International, 2022, 157: 111437.
- [31] ZHANG J H, YU H L, ZHONG H, et al. Dietary emulsifier glycerol monodecanoate affects the gut microbiota contributing to regulating lipid metabolism, insulin sensitivity and inflammation[J]. Food & Function, 2022, 13(17): 8804–8817.
- [32] ROOPASHREE PG, SHETTY S S, SUCHETHA K N. Effect of medium chain fatty acid in human health and disease[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104724.

### Regulation Effect Analysis of Glycerol Monolaurate on Lipid Metabolism of HepG2 Based on Transcriptomics

Lin Menghui<sup>1</sup>, Liu Chang<sup>1</sup>, Huang Jiamin<sup>1</sup>, Feng Fengqin<sup>2</sup>, Le Thanh Ninh<sup>3</sup>, Cai Haiying<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023

<sup>2</sup>College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058

<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, National University of Singapore, Singapore 119077

**Abstract** In this study, to illustrate the specific regulation targets and pathways of glycerol monolaurate (GML) on lipid metabolism, GML was used to treat hyperlipidemia model of liver tumor cells HepG2 induced by oleic acid, and explore the regulation effects of GML on lipid metabolism of liver cells and its potential targets and mechanisms based on bioinformatics prediction and transcriptome sequencing analysis. Bioinformatics analysis showed that the GO and KEGG enrichment analysis of potential GML targets obtained 519 and 144 signal pathways ( $P < 0.05$ ), respectively. Molecular docking supported that GML might regulate lipid metabolism through regulating ALB, AKT1, EGFR and other core target proteins. The results of cell experiment showed that the level of lipid accumulation in the cell group treated with GML was improved compared with the high-fat control group. A total of 2 879 differentially expressed genes were screened by transcriptome analysis, with 1 363 up-regulated and 1 516 down-regulated genes, respectively. According to the enrichment analysis of KEGG signal pathway, HIF-1 $\alpha$  pathway and fatty acid oxidative catabolism pathway were significantly enriched. The gene transcription expression levels of important proteins CPT1B, FABP1 in the pathway were up-regulated to 1.79 times and 2.81 times in the GML treatment group compared with those in the high-fat group, respectively, and the expression levels of main downstream regulation genes of HIF-1 $\alpha$  were significantly increased ( $P < 0.05$ ), indicating that GML intervention improved the oxidative stress of high-fat cells through regulation of HIF-1 $\alpha$  pathway, and improved the lipid metabolism disorder in high-fat cells mediated by fatty acid degradation pathway. This study provides a theoretical reference for the research on the regulation and mechanisms of functional lipid components in improving lipid metabolism disorder induced by high-fat diet.

**Keywords** glycerol monolaurate; fatty acid oxidation; lipid metabolism; molecular docking; HIF-1 $\alpha$