

基于转录组学分析红小豆热加工蛋白水解物的降脂机理

赵卿宇^{1,2,3,4,5}, 郝智慧⁵, 席孟瑶^{1,2,3,4}, 王超^{1,2,3,4}, 薛勇^{1,2,3,4}, 沈群^{1,2,3,4*}

¹ 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

² 国家粮食产业(青稞深加工)技术创新中心 北京 100083

³ 国家粮油标准研究验证测试中心 北京 100083

⁴ 国家果蔬加工工程技术研究中心 北京 100083

⁵ 国家粮食产业(药用功能资源开发)技术创新中心 北京 100193

摘要 本文基于转录组学分析了红小豆热加工蛋白水解物对高脂饮食小鼠脂代谢紊乱的影响,结果表明,该蛋白水解物可改变高脂喂养小鼠肝脏基因转录谱。与模型组相比,热加工蛋白水解物干预后的小鼠肝脏有 730 个差异表达基因,其中显著上调的 390 个,显著下调的 340 个。KEGG 功能注释分析发现热加工蛋白水解物引起 32 个差异表达基因注释到脂代谢通路。KEGG 通路富集分析进一步表明该蛋白水解物干预显著改变 PPAR 信号通路、精氨酸生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及 AMPK 信号通路,其中 PPAR 信号通路是最显著富集的脂代谢相关通路。结合 RNA-Seq 技术和 qPCR 验证,红小豆热加工蛋白水解物通过显著下调 *PPAR γ* 、*CD36*、*Fabp2* 和 *Me1* 基因表达,同时显著上调 *Cyp7a1*、*Angptl4* 和 *Pck1* 基因表达来改善脂代谢紊乱。本研究为红小豆功能性食品开发以及豆类蛋白改善慢性代谢性疾病的研究提供了参考。

关键词 红小豆; 蛋白水解物; 热加工; 转录组; PPAR 信号通路

文章编号 1009-7848(2025)02-0179-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.016

随着经济的高速发展,人们的饮食习惯发生了巨大变化,从传统的高碳水、高膳食纤维向高糖、高脂肪模式转变,导致脂代谢紊乱人群显著增加。世界卫生组织预计:到 2030 年,全球每年有 2 300 万人死于血脂异常,中国的血脂异常患病率近年来也显著增加,成人的血脂异常总体患病率是 40.40%,并逐渐呈现年轻化趋势,这表明未来我国血脂异常及相关疾病负担将持续加重^[1]。豆类的利用与许多健康益处密切相关。研究发现肥胖受试者遵循限制热量的豆类饮食 8 周后,血脂水平显著改善^[2]。由于豆类对预防和控制脂代谢紊乱有积极作用,因此受到越来越多的关注。

红小豆(*Vigna angularis*)是我国重要的杂豆作物,广泛分布于黑龙江、辽宁、吉林、河北等地,其种植面积和产量均居世界首位^[3]。据统计,2021

年我国红小豆种植面积达到 15.286 万 hm^2 ,产量达 21.61 万 t ^[4]。红小豆的蛋白含量丰富(16.33%~29.2%),研究发现其具有降胆固醇、抗糖尿病和抗炎作用^[5]。据报道,与天然蛋白水解物相比,热加工可以显著增强红小豆蛋白水解物对胆固醇吸收的抑制作用^[6]。前期研究发现用 6% 红小豆热加工蛋白水解物干预,能显著降低高脂饮食小鼠的总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平,抑制肝脏脂肪变性和脂质积累,且不影响正常饮食小鼠的健康状态^[6],而其在体内调控脂代谢的具体机制尚不明晰。

转录组学技术可以全面、迅速地检测特定细胞在某一功能状态下几乎所有转录水平的变化,并能够筛选到差异表达基因及其富集的调控通路,为相关分子机制的深入挖掘提供可能,被广泛应用于基础研究、临床诊断和药物研发等领域^[7]。肝脏是调节脂质代谢的重要器官,为研究红小豆热加工蛋白水解物缓解高脂喂养小鼠脂代谢紊乱的机制,本文进行肝脏转录组分析,以弄清其与脂代谢有关的代谢通路以及关键差异表达基因。

收稿日期: 2024-02-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32301983);
“十四五”国家重点研发计划项目(2022YFF1100505);
中国博士后科学基金资助项目(2022M723417,
2023T160693)

第一作者: 赵卿宇,男,博士,副教授

通信作者: 沈群 E-mail: shenqun@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红小豆,山西东方亮生命科技股份有限公司;4周龄雄性标准无病原体(SPF)级C57BL/6小鼠[SCXK(京)2016-0006],北京维通利华实验动物技术有限公司;对照饲料(D12450J)和高脂饲料(D12492),常州鼠一鼠二生物科技有限公司;胃蛋白酶和胰酶,Sigma公司;TRIzol法总RNA提取试剂盒,美国Invitrogen公司;TruSeq™ RNA样品制备试剂盒,美国Illumina公司;反转录试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR引物,上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

NovaSeq 6000型DNA测序仪,美国Illumina公司;NanoDrop2000型微量分光光度计,美国Thermo Fisher公司;CFX96型实时荧光定量PCR仪,E1101型电泳仪,美国Bio-rad公司;NewClassic MF MS105DU型电子天平,瑞士梅特勒公司;Centrifuge 5430R型高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司。

1.3 方法

1.3.1 红小豆蛋白的提取和热加工 采用碱溶酸沉法提取红小豆蛋白^[9]。具体而言,红小豆粉使用正己烷进行脱脂,其中固液比为1:3,并在过夜静置后弃去正己烷。脱脂红小豆粉按照料液比1:10的比例和蒸馏水充分混合,然后使用1 mol/L NaOH将溶液pH值调节到8.5,在40℃的水浴摇床中连续搅拌1 h后,将该溶液在4℃,7 000×g下离心30 min,收集上清液。用1 mol/L HCl将上清液pH值调至4.5后,在室温下静置1 h以利于蛋白质沉淀。收集蛋白质沉淀,用蒸馏水洗涤沉淀3次,将pH值调节至7.0后,冷冻干燥并保存在-20℃。

参考先前的研究^[9],将获得的红小豆蛋白在沸水浴中加热10 min,得到红小豆热加工蛋白。

1.3.2 红小豆热加工蛋白水解物的制备 采用胃蛋白酶-胰酶消化体系制备红小豆热加工蛋白水解物^[9]。具体而言,将红小豆热加工蛋白溶液pH值调节到2.0后添加质量分数4%的胃蛋白酶,并将溶液在37℃下孵育2 h。孵育结束后,先使用0.9 mol/L NaHCO₃将溶液pH值调节到5.3,再用

1 mol/L NaOH将pH值维持在7.5,最后加入质量分数4%的胰酶。溶液在37℃下孵育2 h后,置于沸水浴中10 min,终止反应。溶液经室温冷却后,在4℃,13 600×g下离心10 min,收集上清液,冷冻干燥,于-20℃保存。

1.3.3 动物实验设计 实验方案经中国农业大学动物护理委员会批准(AW03401202-4-2)。24只四周龄雄性C57BL/6J小鼠在SPF条件下[(24±2)℃,(55±5)%湿度,12 h光/暗循环]饲养,并可不受限制地进食和饮水。适应性喂养1周后,在保证组间体重质量无显著差异的情况下,所有实验小鼠被随机分为3组(每组8只),并进行为期12周的饮食干预实验。具体处理如下:1)对照饮食(NCD)、2)高脂饮食(HFD)、3)高脂饮食中添加6%红小豆热加工蛋白水解物(HFD-HAPH)。在实验结束后,收集小鼠肝脏组织并在-80℃保存以用于转录组分析。

1.3.4 肝脏转录组测序

1.3.4.1 小鼠肝脏组织总RNA的提取 根据试剂盒说明书,采用TRIzol法提取肝脏组织总RNA。随后检测所提RNA的纯度、浓度和完整性,并测定RIN值。

1.3.4.2 文库的建立和测序 采用TruSeq™ RNA样品制备试剂盒完成RNA文库的建立,并使用NovaSeq 6000测序平台进行高通量测序。

1.3.4.3 测序数据分析 使用RSEM软件以TPM为单位对基因的表达水平进行定量分析,并通过DESeq2软件进行基因表达差异分析。显著差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)的筛选标准为:FDR<0.05且|log₂FC|≥1.5。通过KOBAS软件对DEGs进行KEGG通路富集分析,当P值<0.05时,表示该KEGG通路为显著富集的KEGG通路。

1.3.5 荧光定量PCR(q-PCR)

1.3.5.1 RNA的提取 采用TRIzol法从小鼠肝脏组织样本中抽提RNA,并进行RNA的质量检测。

1.3.5.2 RT逆转录 采用HiScript一链cDNA合成试剂盒对所提取的RNA进行反转录。反转录程序是:25℃,5 min;50℃,15 min;85℃,5 min。采用20 μL反应体系:2×RT Mix 10 μL、HiScript Enzyme Mix 2 μL、Oligo(dT)18 (50 μmol/L) 1 μL、

Random hexamers (50 ng/ μ L) 1 μ L、Total RNA 200 ng、Rnase free 双蒸水补足至 20 μ L。

1.3.5.3 PCR 引物设计与合成 本试验使用的不同引物的序列见表 1。

表 1 目的基因 PCR 引物序列

Table 1 The primers information of target gene

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
<i>GAPDH</i>	AAGAAGGTGGTGAAGCAGG	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGT
<i>PPARγ</i>	GCTGTTCCCAAGGTGCT	GGTGAAGGCTCATGTCTGTCTC
<i>Me1</i>	AATCCGACCAGCAAAGCG	AAGAGCAACTCCAGGGAACAC
<i>Cd36</i>	CAGGAGTGCTGGATTAGTGTT	CATGCAGTGCAGAAGGGTG
<i>Fabp2</i>	GCTCGGTGTAACCTTCCCTAC	AATCAGCTCCTTCCATTGTCT
<i>Pck1</i>	AACACCGACCTCCCTTACG	TCAGCATTGTGCCGCTATCT
<i>Cyp7a1</i>	GATGGGTCTCCTGGTGCTG	GCACAGAAACGGGAAGAGTAAC
<i>Angptl4</i>	GCTCTAAGTAGGGCTATCTGCC	GCCATTTGTTTCTGTTGCT

1.3.5.4 Real-time PCR 荧光定量 PCR 体系的反应条件是 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。采用 20 μ L 反应体系: 2 \times SYBR Green Mix 5 μ L、正向引物序列(10 μ mol/L)0.5 μ L、反向引物序列(10 μ mol/L)0.5 μ L、cDNA 2 μ L、双蒸水补足至 10 μ L。

以 *GAPDH* 基因为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法完成基因表达的相对定量。

1.3.6 数据分析 运用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 图片利用 Prism 5.0 绘制。所有数据表示为平均值 \pm 标准误差的形式, 其中数据组间差异通过单因素方差分析 (One-way ANOVA, Duncan test) 确定, 当 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 测序数据的质量评估

首先对测序和序列比对结果进行统计以开展测序数据的质量评估。由表 2 可知, 每个样品均得到超过 4 694 万的原始数据。由于原始测序数据中会包含低质量读段、测序接头序列、 N (N 表示不确定碱基信息) 率较高序列及长度过短序列, 这将影响后续分析。经过质控后, 每个样品均得到超过 4 661 万的高质量数据。错误率 (Error rate) 指原始数据对应的测序碱基平均错误率, Q_{30} 、 Q_{20} 分别指测序质量在 99.9% 和 99% 以上的碱基占总碱基的百分比, GC 含量指原始数据对应的 G 和 C 碱基总和占总碱基的百分比。一般质控后错误率在 0.1% 以下, Q_{20} 在 85% 以上, Q_{30} 在 80% 以上。该

研究的所有样品错误率控制在 0.02% 左右, Q_{20} 值和 Q_{30} 值均大于 95%, GC 含量在 50% 左右, 没有出现 GC、AT 分离现象。这些结果表明测序质量良好, 可以进行后续分析。此外, 测序结果与参考基因组的比对结果显示, 超过 91% 的高质量数据可以比对到参考基因组上, 这也表明测序结果的有效性。

2.2 红小豆热加工蛋白水解物改变高脂喂养小鼠肝脏基因转录谱

主成分分析和 Venn 分析被用来进行不同实验组样本间关系分析。由主成分分析 (图 1a) 可知, NCD 组与 HFD 组可以彼此形成相互独立的区域。在红小豆热加工蛋白水解物干预后, HFD-HAPH 组能与 HFD 组显著分开, 这表明与 HFD 组相比, 红小豆热加工蛋白水解物可以显著改变高脂喂养小鼠肝脏基因转录谱。接着通过韦恩 (Venn) 分析发现 3 组样本有 9 609 个共有基因, NCD 组、HFD 组和 HFD-HAPH 组分别有 255, 236 和 189 个特有基因 (图 1b)。

NCD 组和 HFD 组之间共有 415 个差异表达基因, 其中与 NCD 组相比, HFD 组有 198 个显著上调的差异表达基因, 217 个显著下调的差异表达基因 (图 2a)。经红小豆热加工蛋白水解物干预后, 与 HFD 组相比, HFD-HAPH 组有 730 个差异表达基因, 其中显著上调的有 390 个, 显著下调的有 340 个。组间差异基因 Venn 分析结果显示两个差异基因组有 125 个共有基因, NCD v.s. HFD 和 HFD v.s. HFD-HAPH 分别有 290 个和 605 个特

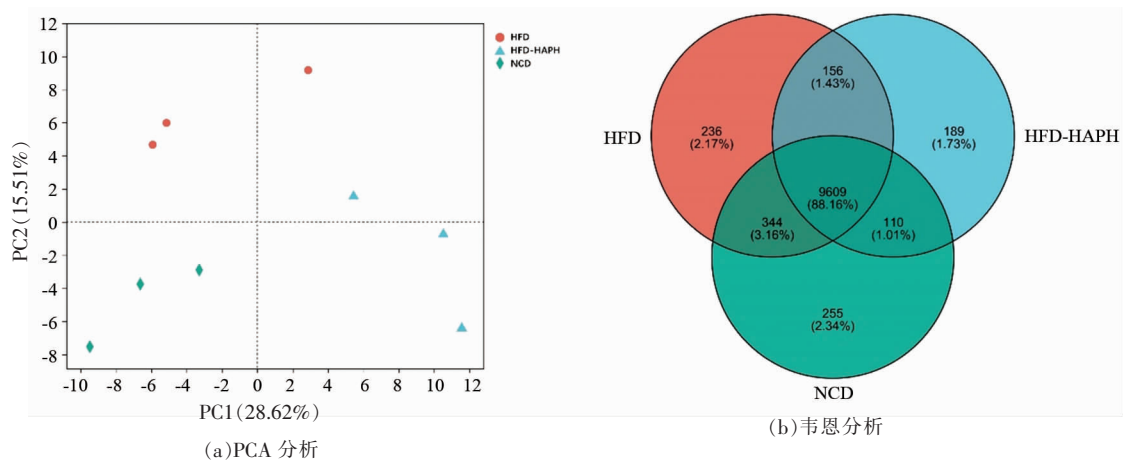


图 1 不同实验组样本间关系分析

Fig.1 Relationship analysis among samples of different experimental groups

表 2 测序和序列比对结果统计

Table 2 Statistics of sequencing and sequence alignment results

样品	原始测序 数据总条 目数	错误率/%	Q20/%	Q30/%	GC 含量/ %	测序序列 经过过滤 后的序列	能定位到 基因组上 的序列	在参考序 列上有多 个比对位 置的序列	在参考序 列上只有 一比对位 置的序列
NCD-1	55 751 172	0.0232	98.74	95.94	50.45	55 410 228	52 754 038	5 134 970	47 619 068
NCD-2	56 538 888	0.0233	98.69	95.88	50.97	56 141 686	53 945 977	4 351 785	49 594 192
NCD-3	46 948 402	0.0233	98.69	95.86	51.26	46 613 852	44 849 800	3 847 983	41 001 817
HFD-1	52 002 126	0.0233	98.71	95.93	50.13	51 559 068	48 514 779	5 391 276	43 123 503
HFD-2	60 617 486	0.0235	98.64	95.69	50.69	60 108 744	56 836 283	5 328 682	51 507 601
HFD-3	49 428 184	0.0236	98.57	95.64	50.91	49 043 040	46 819 234	3 887 790	42 931 444
HFD-	47 422 336	0.0235	98.64	95.63	49.64	47 116 890	43 219 161	5 427 912	37 791 249
HAPH-1									
HFD-	48 868 170	0.0234	98.66	95.74	50.34	48 498 838	44 830 916	4 859 220	39 971 696
HAPH-2									
HFD-	56 205 808	0.0234	98.68	95.77	49.86	55 851 914	52 022 806	6 228 331	45 794 475
HAPH-3									

有基因(图 2b)。

2.3 差异表达基因的 KEGG 功能注释分析

KEGG 数据库中丰富的通路信息有助于从系统水平去了解基因的生物学功能。KEGG 通路包括代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、生物体系统、人类疾病。为了进一步探究差异表达基因的生物学功能，对 HFD v.s. HFD-HAPH 之间的差异表达基因进行 KEGG 注释分析。由图 3 可知,红小豆热加工蛋白水解物有 32 个差异表达基因注释到脂代谢通路, 这表明红小豆热加工蛋

白水解物在基因层面显著调控了高脂喂养小鼠的脂代谢。

2.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析能提供差异表达基因参与的主要信号通路和代谢途径信息, 图 4 为 NCD v.s. HFD 和 HFD v.s. HFD-HAPH 两组差异表达基因的 KEGG 富集分析。结果表明上述差异表达基因主要参与视黄醇代谢、PPAR 信号通路、精氨酸生物合成等途径。

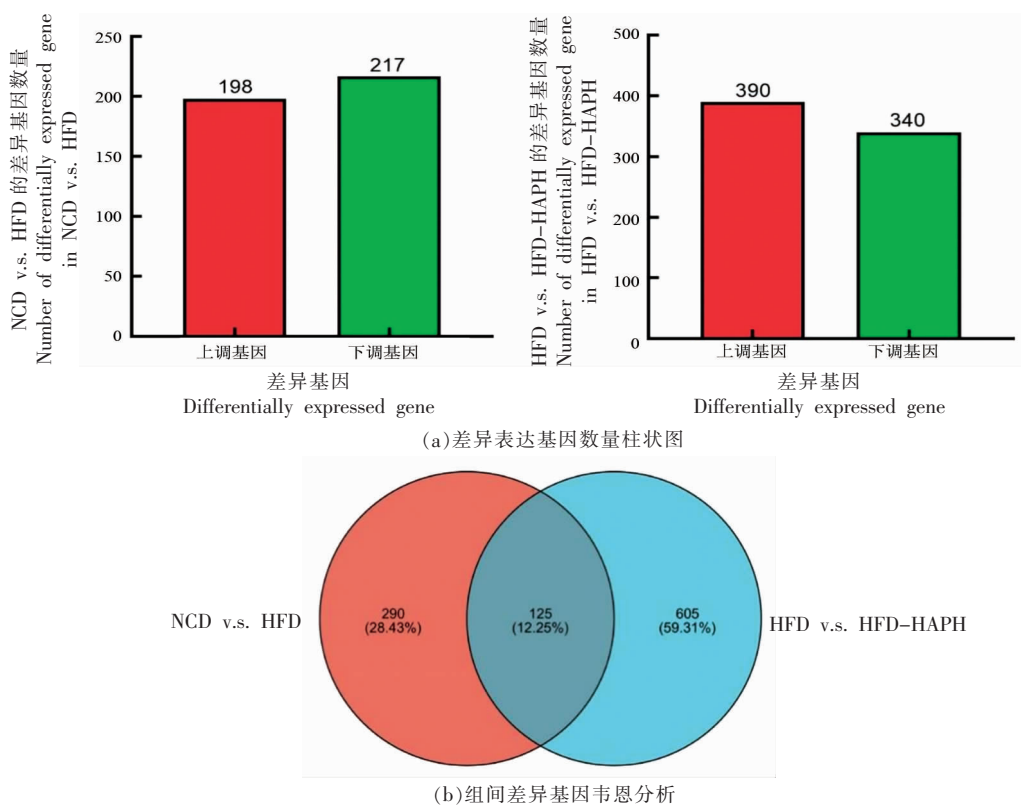


图 2 不同实验组的差异表达基因分析

Fig.2 Analysis of DEGs in different experimental groups

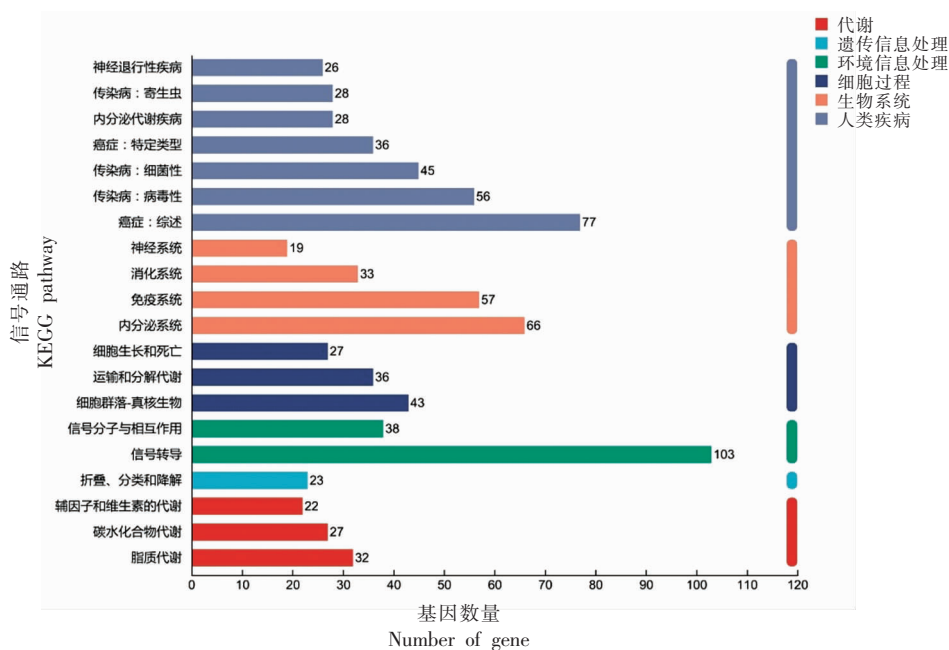


图 3 差异表达基因的 KEGG 注释分析

Fig.3 KEGG annotation analysis of DEGs

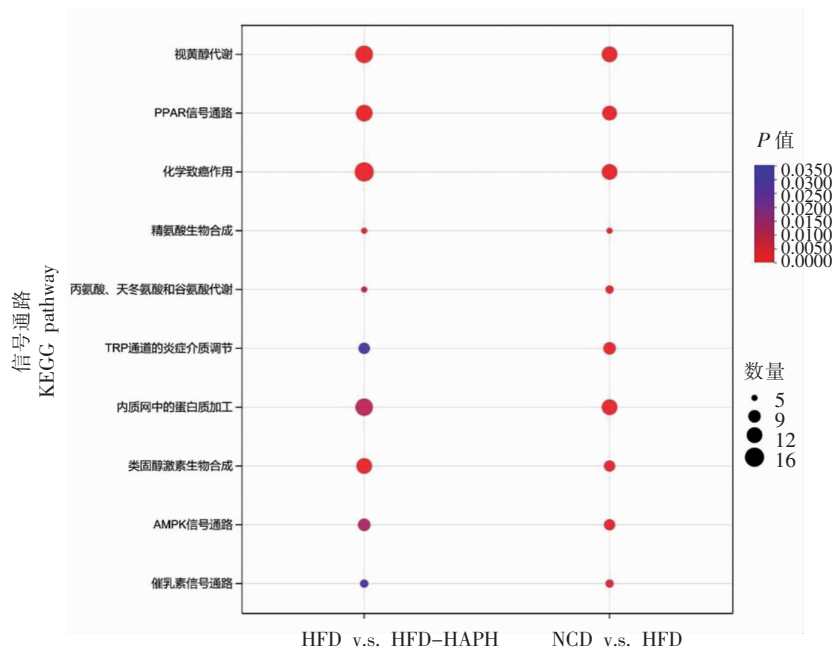


图 4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig.4 KEGG enrichment analysis of DEGs

为了解红小豆热加工蛋白水解物对高脂喂养小鼠脂代谢的调控机制, 本文从 KEGG 富集通路中筛选出与脂代谢存在联系的通路, 分别是 PPAR 信号通路, 精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢和 AMPK 信号通路, 其中 PPAR 信号通路是最显著富集的脂代谢通路。由表 5 可知, 与 NCD 组相比, HFD 组分别有 11, 5, 6 和 8 个差异表达基因显著富集在 PPAR 信号通路, 精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢和 AMPK 信号通路。与 HFD 组相比, HFD-HAPH 组分别有 13, 5, 5 和 9 个差异表达基因显著富集在 PPAR 信号通路, 精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷

氨酸代谢和 AMPK 信号通路。PPAR 信号通路是调控脂代谢的经典信号通路, 其通过参与胆固醇的合成与分解、脂肪酸氧化、糖异生、脂肪细胞分化等多种生物学过程, 维持脂代谢的动态平衡^[9]。L-精氨酸是一种功能性氨基酸, 补充 L-精氨酸可以减轻肥胖、缓解二型糖尿病、降低血压、抗氧化和使内皮功能障碍正常化^[10]。丙氨酸被认为是肝脏糖异生中最重要的氨基酸供体, 天冬氨酸可以调节三羧酸循环中间体例如草酰乙酸和苹果酸, 而天冬氨酸氨基转移酶可以催化 α-氨基在天冬氨酸和谷氨酸之间的转移^[11]。AMPK 信号通路参与糖尿病、肥胖、肿瘤、炎症以及阿尔茨海默病等多

表 3 不同实验组中与脂代谢调节相关的 KEGG 富集通路分析

Table 3 Analysis of KEGG enrichment pathway related to lipid metabolism regulation in different experimental groups

分组	差异代谢通路	差异基因数量	P 值
NCD v.s. HFD	PPAR 信号通路	11	1.03×10 ⁻⁶
	精氨酸生物合成	5	8.00×10 ⁻⁵
	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	6	8.19×10 ⁻⁵
	AMPK 信号通路	8	1.28×10 ⁻³
HFD v.s. HFD-HAPH	PPAR 信号通路	13	6.69×10 ⁻⁶
	精氨酸生物合成	5	9.63×10 ⁻⁴
	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	5	7.81×10 ⁻³
	AMPK 信号通路	9	1.02×10 ⁻²

种疾病的发生和发展^[12]。总之,精氨酸生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及 AMPK 信号通路,虽然对脂代谢有一定的影响,但是相较于 PPAR 信号通路,却不能表现出更加重要的作用。此外,PPAR 信号通路在 KEGG 富集分析中相较于其余的脂代谢相关通路最显著富集且具有最多的差异表达基因。基于此,推测红小豆热加工蛋白水解物可能通过 PPAR 信号通路调节高脂喂养小鼠的脂代谢。

进一步将 PPAR 信号通路上的关键差异表达基因做表达量热图分析,以更加直观地了解红小豆热加工蛋白水解物干预对高脂喂养小鼠肝脏差异表达基因的影响。由图 5 可知,与 HFD 组相比,HFD-CPH 显著下调 *CD36*、*Fabp2*、*Me1* 表达,显著上调 *Cyp7a1*、*Angptl4* 和 *Pck1* 表达。*CD36* 称为脂肪酸转位酶,*CD36* 表达增加会诱发肝细胞和肠上皮细胞对脂肪酸摄取的异常,促进肝脏甘油三酯的储存和分泌,导致血脂水平升高^[13]。*Fabp2* 参与饱和长链脂肪酸的转运和代谢,常常作为肥胖症、胰岛素抵抗和葡萄糖代谢的重要标志物^[14]。研究表明在高脂饮食喂养的小鼠肝脏中,*Fabp2* 显著上调与非酒精性脂肪肝的发展有关^[15]。*Me1* 是一种主要的脂肪生成酶,在 NADP^+ 转化为 NADPH 的过程中催化苹果酸转化为丙酮酸,被认为在肥胖及相关疾病中发挥重要作用^[16]。*Cyp7a1* 是将胆固醇转化为胆汁酸的限速酶,在调节脂质、葡萄糖和能量代谢中起重要作用。肝脏 *Cyp7a1* 表达上调,可以促进胆固醇向胆汁酸的转化,并使胆汁酸有效排出体外,降低小鼠体内胆固醇水平^[17]。*Angptl4* 与肥胖、高脂血症、高血糖和胰岛素抵抗呈负相关关系,其通过抑制胰脂肪酶活性,刺激脂质分解基因的表达来参与脂质代谢^[18]。*Pck1* 是糖异生中的限速酶,研究表明沉默肝脏 *Pck1* 基因导致小鼠出现肝脏脂肪变性,并伴随着血浆脂肪酸和甘油三酯水平的升高^[19]。

2.5 红小豆热加工蛋白水解物对 PPAR 信号通路中差异表达基因的影响

PPAR γ 是 PPAR 信号通路的关键转录因子,研究表明脂肪生成因子需要通过激活 PPAR γ 的活性才起作用^[20]。为验证 RNA-Seq 分析得到的差异表达基因的可靠性,本试验利用 qPCR 技术分

析了红小豆热加工蛋白水解物对 PPAR 信号通路中差异表达基因和 PPAR γ 的影响。由图 6 可知,与 NCD 组相比,HFD 组显著上调 PPAR γ 、*CD36*、*Fabp2* 和 *Me1*,显著下调 *Cyp7a1*、*Angptl4* 和 *Pck1*。相反,这些变化在 HFD-HAPH 组中被逆转。曾有报道发现红小豆热水提取物通过降低 PPAR γ 的表达来抑制脂肪生成^[21]。黑小豆通过抑制 PPAR γ 和 *CD36* 的表达来缓解高脂饮食诱导的脂代谢紊乱^[22]。*Cyp7a1* 的表达以剂量依赖的方式随着食用豆类摄入量的增加而增加^[23]。总之,红小豆热加工蛋白水解物通过抑制 PPAR γ 的表达,下调 *CD36*、*Fabp2* 和 *Me1* 的表达,上调 *Angptl4*,减少脂质积累,并上调 *Pck1* 的表达,增强糖异生,促进脂质消除;同时通过上调 *Cyp7a1* 的表达,来降低胆固醇的合成并促进胆固醇向胆汁酸的转化,实现胆固醇稳态,最终改善脂代谢紊乱。

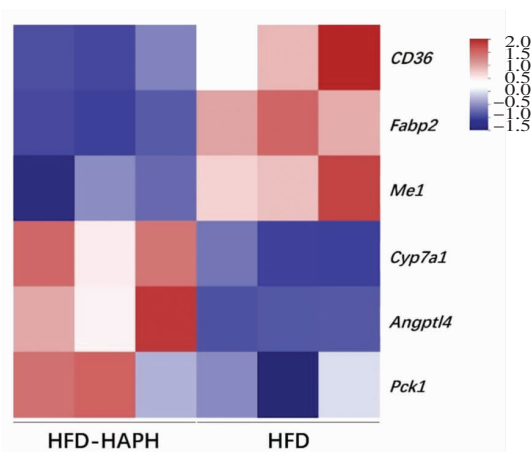


图 5 PPAR 信号通路的差异表达基因的表达量变化

Fig.5 Changes in the expression levels of DEGs of PPAR signaling pathway

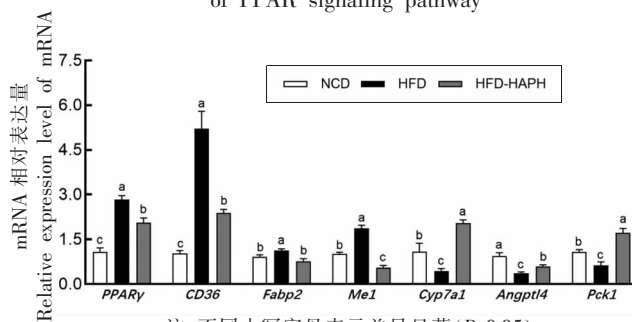


图 6 红小豆热加工蛋白水解物对 PPAR 信号通路中差异表达基因的影响

Fig.6 Effects of heat-treated adzuki bean protein hydrolysates on DEGs in PPAR signaling pathway

3 结论

红小豆热加工蛋白水解物可以改变高脂喂养小鼠肝脏基因转录谱。与 HFD 组相比, HFD-HAPH 组有 730 个差异表达基因。经差异表达基因的 KEGG 富集分析发现, 红小豆热加工蛋白水解物富集的和脂代谢相关的代谢通路包括 PPAR 信号通路、精氨酸生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及 AMPK 信号通路, 其中 PPAR 信号通路是最显著富集的脂代谢通路。结合 RNA-Seq 技术和 qPCR 验证, 红小豆热加工蛋白水解物通过抑制 PPAR γ 的表达, 下调 CD36、Fabp2 和 Me1 的表达, 上调 Angptl4, 减少脂质积累, 并上调 Pck1 的表达, 增强糖异生, 促进脂质消除; 同时通过上调 Cyp7a1 的表达, 来降低胆固醇的合成并促进胆固醇向胆汁酸的转化, 实现胆固醇稳态, 最终达到改善脂代谢紊乱的目的。

参 考 文 献

- [1] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(10): 937-953.
ZHU J R, GAO R L, ZHAO S P, et al. Guidelines for the prevention and treatment of adult dyslipidemia in China (Revised in 2016)[J]. Chinese Journal of Circulation, 2016, 31(10): 937-953.
- [2] HERMSDORFF H H M, ANGELES ZULET M, ABETE I, et al. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects[J]. European Journal of Nutrition, 2011, 50(1): 61-69.
- [3] 杨小雪. 红小豆淀粉消化性及血糖生成指数的影响因素研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
YANG X X. Study on the influencing factors of starch digestibility and glycemic index of adzuki bean[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.
- [4] ZHAO Q Y, FAN Y M, ZHAO L X, et al. Identification and molecular binding mechanism of novel pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory peptides from heat-treated adzuki bean protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2024, 439: 138129.
- [5] ASHRAF J, AWAIS M, LIU L, et al. Effect of thermal processing on cholesterol synthesis, solubilization into micelles and antioxidant activities using peptides of *Vigna angularis* and *Vicia faba*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 129: 109504.
- [6] ZHAO Q Y, FU Y X, ZHANG F, et al. Heat-treated adzuki bean protein hydrolysates reduce obesity in mice fed a high-fat diet via remodeling gut microbiota and improving metabolic function [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2022, 66(8): 2100907.
- [7] ZHANG L, WANG P, SHI M, et al. The modulation of *Luffa cylindrica* (L.) Roem supplementation on gene expression and amino acid profiles in liver for alleviating hepatic steatosis via gut microbiota in high-fat diet-fed mice: Insight from hepatic transcriptome analysis[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 80: 108365.
- [8] LO W M Y, LI-CHAN E C Y. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from *in vitro* pepsin-pancreatin digestion of soy protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(9): 3369-3376.
- [9] WANG Y P, NAKAJIMA T, GONZALEZ F J, et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-Null mice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 2061.
- [10] HU S D, HAN M, REZAEI A, et al. L-Arginine modulates glucose and lipid metabolism in obesity and diabetes[J]. Current Protein & Peptide Science, 2017, 18(6): 599-608.
- [11] YUDKOFF M, NELSON D, DAIKHIN Y, et al. Tricarboxylic-acid cycle in rat-brain synaptosomes - fluxes and interactions with aspartate -aminotransferase and malate aspartate shuttle[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(44): 27414-27420.
- [12] RANA S, BLOWERS E C, NATARAJAN A. Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 58(1): 2-29.
- [13] HOSUI A, TATSUMI T, HIKITA H, et al. Signal transducer and activator of transcription 5 plays a crucial role in hepatic lipid metabolism through regulation of CD36 expression[J]. Hepatology Research, 2017, 47(8): 813-825.
- [14] SAQLAIN M, KALSOOM H, FIAZ M, et al. As-

- sociation of intestinal fatty acid binding protein (FABP2) polymorphism with metabolic syndrome risk[J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2018, 50(1): 175–181.
- [15] DE CONTI A, TRYNDYAK V, WILLETT R A, et al. Characterization of the variability in the extent of nonalcoholic fatty liver induced by a high-fat diet in the genetically diverse collaborative cross mouse model[J]. *Faseb Journal*, 2020, 34(6): 7773–7785.
- [16] YANG X, DEIGNAN J L, QI H X, et al. Validation of candidate causal genes for obesity that affect shared metabolic pathways and networks[J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(4): 415–423.
- [17] DUAN Y T, ZHANG F, YUAN W Z, et al. Hepatic cholesterol accumulation ascribed to the activation of ileum Fxr–Fgf15 pathway inhibiting hepatic Cyp7a1 in high-fat diet-induced obesity rats[J]. *Life Sciences*, 2019, 232: 116638.
- [18] MATTIJSSEN F, ALEX S, SWARTS H J, et al. Angptl4 serves as an endogenous inhibitor of intestinal lipid digestion[J]. *Molecular Metabolism*, 2014, 3(2): 135–144.
- [19] SHE P, SHIOTA H, SHELTON K D, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(17): 6508–6517.
- [20] SUN C, MAO S Y, CHEN S Y, et al. PPARs–orchestrated metabolic homeostasis in the adipose tissue[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8974.
- [21] LEE P S, TENG C Y, HSIEH K F, et al. Adzuki bean water extract attenuates obesity by modulating M2/M1 macrophage polarization and gut microbiota composition [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(23): 1900626.
- [22] YOON J S, KIM M, KIM K A, et al. Anti-inflammatory effect of black adzuki bean in high fat diet induced obese mice[J]. *The FASEB Journal*, 2016, 30: 90865540.
- [23] DANIELL E L, RYAN E P, BRICK M A, et al. Dietary dry bean effects on hepatic expression of stress and toxicity–related genes in rats[J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 108: S37–S45.

Transcriptomic Analysis of Lipid-lowering Mechanism of Heat-treated Adzuki Bean Protein Hydrolysates

ZHAO Qingyu^{1,2,3,4,5}, HAO Zhihui⁵, XI Mengyao^{1,2,3,4}, WANG Chao^{1,2,3,4}, XUE Yong^{1,2,3,4}, SHEN Qun^{1,2,3,4*}

¹College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

²National Center of Technology Innovation (Deep Processing of Highland Barley) in Food Industry, Beijing 100083

³National Center of Verifying and Testing in Grains and Oils Standard, Beijing 100083

⁴National Engineering Research Centre for Fruits and Vegetables Processing, Beijing 100083

⁵National Center of Technology Innovation for Medicinal Function of Food, National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100193)

Abstract Transcriptomic analysis was used to investigate the effect of adzuki bean protein hydrolysates (HAPH) on lipid metabolism disorder in high-fat diet (HFD)–fed mice in this study. The results showed that HAPH changed the transcriptional profile of liver genes in HFD–fed mice. Compared with the model group, there were 730 differentially expressed genes (DEGs) in the liver of mice treated with HAPH, of which 390 genes were significantly up-regulated and 340 genes were significantly down-regulated. KEGG annotation analysis revealed that HAPH caused 32 DEGs to be annotated to lipid metabolism pathways. KEGG enrichment analysis further indicated that HAPH significantly altered the PPAR signaling pathway, arginine biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism, and AMPK signaling pathway, with the PPAR signaling pathway being the most significantly enriched lipid metabolism related pathway. Combined with RNA–Seq technology and qPCR verification, HAPH could significantly down-regulate the expression of *PPAR γ* , *Cd36*, *Fabp2*, and *Me1*, and up-regulate the expression of *Cyp7a1*, *Angptl4*, and *Pck1* to improve the abnormal lipid metabolism. This study provided a new reference for the development of functional food of adzuki bean and the study of improving chronic metabolic diseases with bean protein.

Keywords adzuki bean; protein hydrolysates; heat-treated; transcriptomics analysis; PPAR signaling pathway