

基于转录组测序分析葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞基因及其相关功能的影响

Effects of grape seed proanthocyanidins on HepG2 cell genes and related functions based on transcriptome sequencing

郑万财^{1,2} 党斌^{1,2} 张迹³ 罗巧玉⁴ 冯作山⁵

ZHENG Wancai^{1,2} DANG Bin^{1,2} ZHANG Ji³ LUO Qiaoyu⁴ FENG Zuoshan⁵

(1. 青海大学农林科学院青藏高原种质资源研究与利用实验室, 青海 西宁 810023; 2. 青海省青藏高原农产品加工重点实验室, 青海 西宁 810023; 3. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏 淮安 223300; 4. 青海师范大学生命科学学院, 青海 西宁 810023; 5. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

(1. Academy of Agriculture and Forestry Sciences of Qinghai University, Qinghai Tibetan Plateau Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Xining, Qinghai 810023, China; 2. Qinghai Tibetan Plateau Germplasm Resources Research and Utilization Laboratory, Xining, Qinghai 810023, China; 3. College of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huai'an, Jiangsu 223300, China; 4. College of Life Science, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810000, China; 5. Food Science and Pharmacy College, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

摘要:目的: 基于转录组测序分析葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞基因及相关功能的影响, 明确原花青素处理 HepG2 细胞的关键基因及代谢通路。方法: 通过转录组测序, 筛选差异基因, 基因功能注释和 KEGG 通路的富集分析, 进行葡萄籽原花青素处理细胞后的转录组学研究。结果: 葡萄籽原花青素处理 HepG2 细胞后主要富集到的生物学过程为细胞过程、代谢过程、生物调控过程、免疫系统过程、繁殖调节、生长调节。细胞凋亡的 12 个关键差异基因与 TNF、p53、MAPK、PI3K-Akt、NF- κ B 信号通路密切相关。结论: 细胞凋亡与 TNF 信号通路、p53 信号传导途径、PI3K/Akt 信号通路、NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路密切相关。

关键词: 葡萄籽; 原花青素; 转录组测序; HepG2 细胞; 基因功能

Abstract: Objective: Based on transcriptome sequencing analysis, the effect of grape seed proanthocyanidins on HepG2 cell genes and related functions was identified. The key genes and metabolic

pathways involved in the treatment of HepG2 cells with proanthocyanidins were confirmed. **Methods:** Through transcriptome sequencing, screening differential genes, gene functional annotation and enrichment analysis of the KEGG pathway, transcriptome studies were conducted on grape proanthocyanidin-treated cells. **Results:** After treating HepG2 cells with grape anthocyanins, the main biological processes enriched are cellular processes, metabolic processes, biological regulatory processes, immune system processes, reproductive regulation, and growth regulation. Research has found that 12 key differentially expressed genes in cell apoptosis are associated with TNF, p53, MAPK, PI3K-Akt and NF- κ B signaling pathway is closely related. **Conclusion:** Cell apoptosis is closely related to the TNF signaling pathway, p53 signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, NF- κ B signaling pathway and MAPK signaling pathway.

Keywords: grape seeds; proanthocyanidins; transcriptome sequencing; HepG2 cells; gene function

基金项目: 青海省科技厅创新平台建设项目(编号: 2022-ZJ-T04); 青海“昆仑英才·高端创新创业人才”计划特色人才项目(编号: 2022-027)

作者简介: 郑万财, 男, 青海大学农林科学院副研究员, 博士。

通信作者: 冯作山(1963—), 男, 新疆农业大学教授, 博士。

E-mail: fengzuoshan@126.com

收稿日期: 2023-08-16 **改回日期:** 2023-11-13

近年来, 对植物中的活性成分的分析成为研究热点。其中, 原花青素(proanthocyanidins, PCs) 作为一类重要的植物次生代谢产物, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性^[1-5]。然而, 原花青素对人体细胞的影响及其相关功能尚不完全清楚。原花青素是植物中广泛存在的酚类化

合物^[6-8],主要被应用于保健食品、功能性食品和生物医药等方面的开发利用^[9-11]。目前,HepG2 细胞作为人类肝癌细胞系,在肝癌研究中被广泛应用。通过研究原花青素对 HepG2 细胞的影响,可以探索其对肝癌的潜在治疗作用。然而,有关原花青素对 HepG2 细胞及其相关功能的影响机制还存在许多未知之处^[12-15]。中国肝癌发病总数占全球肝癌病人总数的 50%,已成为影响人们生命健康的主要疾病^[16]。化学疗法是肝癌中最常用的治疗方法,由于癌细胞的剂量限制和耐药性,化学药物不能完全有效地治疗癌症^[17]。

研究拟采用转录组测序(RNA-Seq)技术^[18-20],通过分析 HepG2 细胞在原花青素处理前后的基因表达差异,来鉴定潜在的关键基因和通路。利用 RNA-Seq 技术研究葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞的作用机制,为进一步研究其在肝癌治疗中的应用提供依据。同时,也有助于拓展对原花青素的认识,并为开发植物活性成分的药物提供新的思路 and 方向。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

葡萄籽原花青素:原花青素质量分数>95%,四川省维克奇生物科技有限公司;

RPMI 1640 培养基、胎牛血清:美国 Corning 公司;

HepG2 细胞:北京中科院生物化学和细胞生物学研究所;

Real-time 试剂盒:美国 BIO-RAD 公司;

琼脂糖:荷兰 Duchefa Biochemie 公司;

Trizol:美国 Ambion 公司。

1.2 仪器与设备

分析天平:BT25S 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;

真空冷冻干燥机:FD-1A-50 型,德国 Christ 公司;

台式高速冷冻离心机:5810R 型,德国 Eppendorf 公司;

PCR 扩增仪:T100 Thermal 型,德国 Eppendorf 公司;

酶标仪:Infinite M200 Pro 型,瑞士 Tecan 公司;

超微量紫外可见分光光度计:NanoDrop One 型,美国 Thermo 公司;

二氧化碳培养箱:HERACELL I50i 型,日本 SANYO 公司;

PCR 电泳槽:Power PacTMHC 型,美国 BIO-RAD 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养及处理 取对数生长期人肝癌 HepG2 细胞于 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中培养,每

3 d 传代 1 次,当细胞贴壁达到 70%时,以体积分数为 0.25%的胰酶消化传代。预试验采用不同质量浓度的原花青素(5, 10, 15, 20, 25 g/mL)处理 HepG2 细胞 24, 48 h,以确认后续转录组处理的原花青素最适质量浓度及时间。选取 50 μg/mL 的虾青素添加到 HepG2 细胞中,处理 48 h;另添加等量 1%的 DMSO 作为溶剂对照组。

1.3.2 RNA 提取和质量检测 采用 Trizol 试剂法^[21]提取总 RNA,每组 3 个重复。利用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度;提取样本的总 RNA 后,通过常规试剂盒去除 rRNA,将 mRNA 富集。进一步将富集得到的 mRNA 反转录形成双链 cDNA,修复 cDNA 双末端后,加上接头,PCR 扩增构建上机文库。通过带有 Oligo(dT)的磁珠富集具有 polyA 尾巴的真核 mRNA 后,用超声波将 mRNA 打断。以片段化的 mRNA 为模板,随机寡核苷酸为引物,在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链,随后用 RNaseH 降解 RNA 链,并在 DNA polymerase I 体系下,以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头,用 AMPure XP beads 筛选 200 bp 左右的 cDNA,进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,最终获得文库。为保证测序质量,采用严格的质控构建文库。

1.3.3 转录组测序和差异基因分析 由广州基迪奥生物科技有限公司利用 Illumina HiseqTM 4000system 平台进行转录组测序。对测序得到的原始序列(raw reads)进行过滤,去除接头序列、重复冗余序列和低质量的 reads,得到高质量序列(clean reads)。利用 HISAT2^[22]软件开展基于参考基因组的比对分析。根据 HISAT2 的比对结果,利用 Stringtie 重构转录本,并计算每个样本中所有基因的表达量。基于基因表达量信息,利用 R(<http://www.r-project.org/>)开展主成分分析(PCA),基因差异表达分析的数据为基因表达水平分析中得到的 reads count 数据,使用 DESeq2^[23]软件分析筛选差异表达基因,差异倍数筛选 FDR<0.05 且 |log₂FC|>1 的基因为显著差异基因。

利用 GO 和 KEGG 数据库对差异表达基因进行功能注释,并采用 FPKM 值反映基因的表达量。

1.4 数据处理

利用 IBM SPSS Statistics 22 软件、计算机软件 R(版本 3.5.0)、Excel 对数据进行分析并作图。

2 结果与分析

2.1 葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞转录组数据分析

由表 1 可知,最小 Q20 值为 98.04%,最小 Q30 值为 94.31%,说明获得的 clean reads 质量较高,重复性在误差范围内,完全满足后续生物学及相关分析的要求。

表 1 数据质量和参考序列比对分析结果[†]

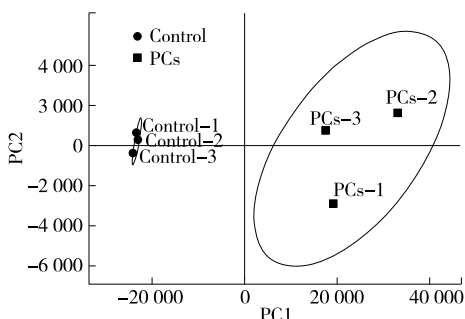
Table 1 Data quality and reference sequence alignment analysis results

样品名称	原始测序数据	干净数据	测序深度/G	Q20/%	Q30/%	GC 含量/%
Control-1	70 548 878	70 435 060	10.53	98.11	94.48	51.76
Control-2	52 915 820	52 826 952	7.90	98.04	94.31	52.10
Control-3	52 967 274	52 912 032	7.91	98.61	95.74	52.46
PCs-1	51 737 274	51 675 770	7.72	98.49	95.41	52.03
PCs-2	57 009 748	56 930 098	8.50	98.36	95.09	51.56
PCs-3	54 760 468	54 669 832	8.17	98.26	94.89	51.96

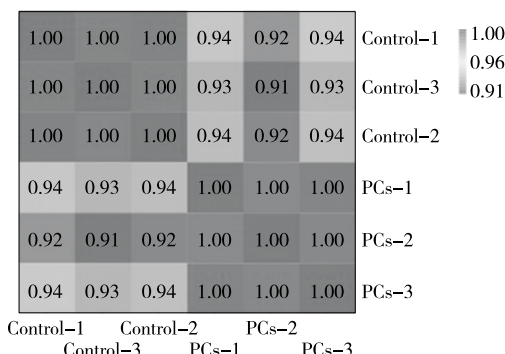
[†] PCs 为葡萄籽原花青素处理组。

由图 1 可知,Control 组和 PCs 组各自聚为一类,且 Control 组的重复性较好。每两个样品之间的皮尔逊 (Pearson) 相关系数均 >0.99, 说明同一处理组样品间差

异较少,组内稳定性较好;不同组样品间的相关性均 >0.90,不同处理组之间差异表达基因较少,说明不同组之间差异较小。



(a) 主成分



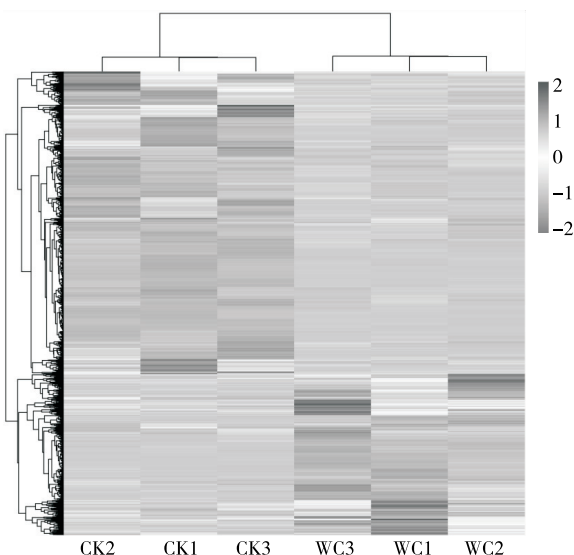
(b) 相关性

图 1 葡萄原花青素对 HepG2 细胞转录组主成分和相关系数分析

Figure 1 Analysis of the principal component and correlation coefficient of grape procyanidins on transcriptome of HepG2 cells

2.2 葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞转录组差异表达基因分析

原花青素处理细胞后,通过两组转录本对比,对基因表达进行层次聚类分析(图 2、图 3),并筛选差异基因(表达倍数差异 $\log_2 FC > 2$, 显著性 $P\text{-value} < 0.05$)结果显示,共有 2 554 个差异基因,其中有 887 个上调基因和 1 667 个下调基因。由图 4、图 5 可知,在 PCs 的作用下,细胞 HepG2 差异表达基因表达上调与表达下调的数量相比,下调的基因数高于上调的。原花青素的生物活性主要是清除自由基抗氧化,原花青素通过抑制细胞生长增殖、诱导细胞程序性凋亡、调节核因子 NF- κ B 的活性、阻滞细胞周期、抑制目标基因的表达等达到其抗癌作用^[24]。课题组^[25]前期研究表明:小剂量 PCs(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 即能诱导 HepG2 细胞凋亡,与空白对照相比差异极显著 ($P < 0.01$),且 PCs 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用具有时间和浓度依赖关系。通过两组样本中差异表达基因分析,原花青素可明显抑制 HepG 细胞中基因的转录水平。



深灰色代表上调基因;浅灰色代表下调基因;白色代表基因无显著差异

图 2 差异基因聚类热图

Figure 2 Differential gene change heat map

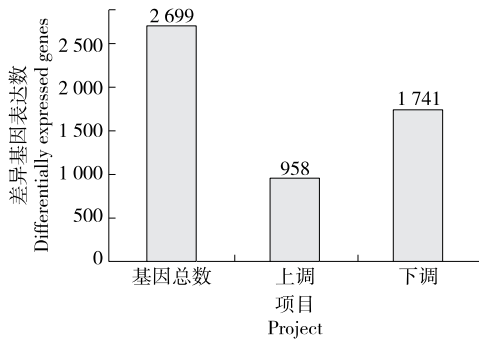


图3 差异表达基因统计

Figure 3 Distribution pattern for differentially expressed genes

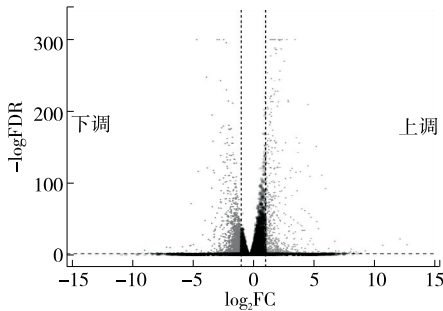
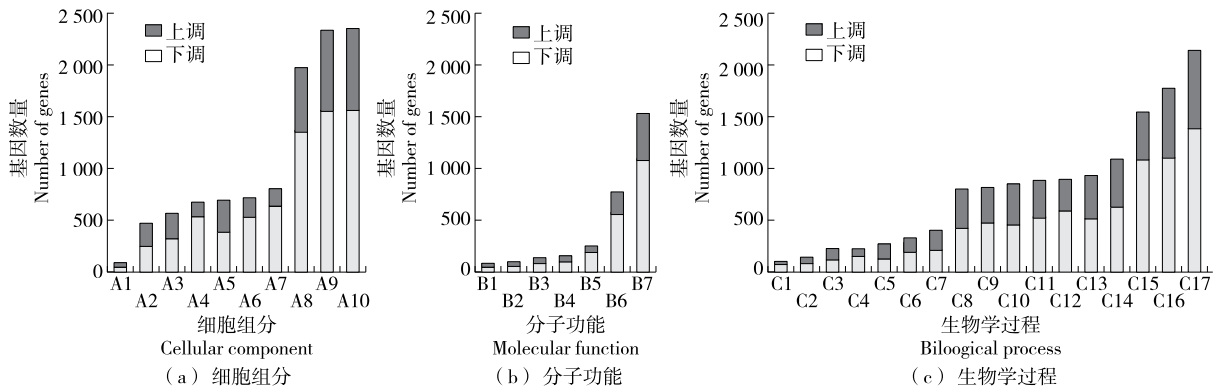


图4 HepG2 细胞葡萄籽原花青素处理条件下的差异基因表达火山图

Figure 4 Volcano map of differential gene expression in HepG2 cells treated with grape procyanidins



A1. 细胞 A2. 细胞部分 A3. 细胞器 A4. 细胞器部分 A5. 大分子复合物 A6. 膜封闭腔 A7. 膜 A8. 细胞外区域 A9. 细胞外区域部分 A10. 细胞外基质 B1. 结合 B2. 催化活性 B3. 核酸结合转录因子活性 B4. 转运活性 B5. 分子功能调节 B6. 结构分子活性 B7. 转录因子活性 C1. 细胞过程 C2. 单一生物过程 C3. 代谢过程 C4. 应激效应 C5. 生物调节 C6. 细胞组分组织或合成 C7. 发育进程 C8. 信号转导 C9. 胞质定位 C10. 生物调控过程 C11. 免疫系统过程 C12. 多细胞组织过程 C13. 运动调节 C14. 生物黏附 C15. 繁殖调节 C16. 生长调节 C17. 多组织过程

图5 原花青素对 HepG2 细胞转录组 GO 分类图

Figure 5 Proanthocyanidin GO classification map of HepG2 cell transcriptome

合成,阻滞其增殖的作用。梁惠敏等^[28]研究发现,原花青素可抑制肝癌细胞的生长,且浓度和时间呈剂量关系,原花青素对肝癌细胞 SMMC27721 具有抑制增殖和促进肝癌细胞分化作用,进一步研究发现,原花青素通过清除活

2.3 葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞转录组 GO 功能分析

对葡萄籽原花青素处理的 HepG2 细胞转录组数据进行差异表达基因 GO 功能富集分析。每组差异基因被注释到生物学过程、分子功能、细胞组分和 3 个 GO 分类中(图 5),2 279 个差异基因富集到 166 个分子功能通路中,具有显著差异的通路依次为细胞过程、单一生物过程、代谢过程、刺激反应、生物调节、细胞组分组织或合成、发育进程、信号转导、胞质定位、生物调控过程、免疫系统过程、多细胞组织过程、运动调节、生物黏附、繁殖调节、生长调节、多组织过程。2 286 个差异基因富集到 62 个分子功能通路中,具有显著差异的通路依次为结合、催化活性、核酸结合转录因子活性、转运活性、分子功能调节、结构分子活性、转录因子活性。2 400 个差异基因富集到 60 个细胞组分通路中,具有显著差异的通路依次为细胞、细胞部分、细胞器、细胞器部分、大分子复合物、膜封闭腔、膜、细胞外区域、细胞外区域部分、细胞外基质。

葡萄籽原花青素处理后主要富集到的生物学过程为细胞过程、代谢过程、生物调控过程、免疫系统过程、繁殖调节、生长调节,符合原花青素在肝癌细胞上的作用机制^[26]。杜宏等^[27]研究发现,莲房原花青素可诱导肝癌细胞凋亡,抑制其生长且呈浓度依赖性,通过对肝癌细胞周期比率分析显示,莲房原花青素具有抑制肝癌细胞 DNA

性氧酶活降低脂质过氧化反应抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。许慧等^[29]研究发现,莲房原花青素可降低肝癌细胞合成 DNA 的能力,使其停滞于 S 期,继而抑制细胞的生长介导其凋亡。综上,原花青素通过抑制细胞生长,清

除氧自由基,对癌细胞 DNA 合成具有抑制作用,可以阻滞细胞增殖,导致细胞凋亡。

2.4 葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞转录组 KEGG Pathway 富集分析

葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞转录组的 KEGG 通路富集分析,共有 1 016 个基因富集到 322 条代谢通路(图 6、图 7),差异基因主要被聚类到六大途径:基础代谢过程、生物系统、人类疾病、细胞过程、基因信息过程和环境信息过程。基础代谢过程包括外源化合物的生物降解与代谢、氨基酸代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢和核苷酸代谢等;生物系统包括免疫系统、内分泌系统、神经系统和消化系统等;人类疾病包括传染性疾病、癌症、内分泌和代谢疾病、心血管疾病、神经退行性疾病和免疫疾病等;细胞过程包括细胞凋亡、运输与分解代谢和细胞运动等;基因信息过程主要包括基因复制、修复、翻译、折叠、转录和降解等;环境信息过程包括信号转导、信号分子与相互作用、膜运输。如图 7 所示,细胞凋亡相关的信号传导途径包括 TNF 信号通路、p53 信号传导途径被显著地富集。这两个途径类别中的差异表达基因可能与原花青素处理引起的细胞凋亡密切相关,突显出葡萄籽原花青素在抑制 HepG2 细胞的作用,与 TNF 信号通路、p53 信号传导途径相关的信号通路有 PI3K/Akt 信号通路、NF-κB 信号通路、MAPK 信号通路均与细胞凋亡密切相关。

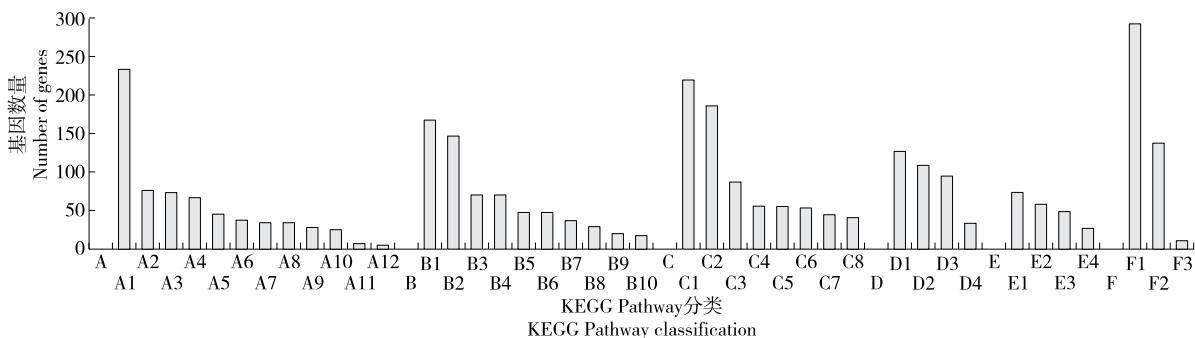
通过细胞凋亡相关差异基因筛选出 5 条与细胞凋亡相关的通路,包括 NF-κB 信号通路、MAPK 通路、TNF 信号通路、p53 信号传导途径和 PI3K/Akt 信号通路,NF-κB 是基因表达的重要调控因子之一。Maldonado 等^[30]研究

发现,原花青素通过 NF-κB 和 p53 上调细胞凋亡相关受体的表达与其诱导的癌细胞凋亡具有一定的相关性。卢婷婷等^[31]研究发现,用荧光素酶表达载体 PGL3 质粒感染 A549 细胞,原花青素对 COX-2 启动子活性有明显抑制作用。Engelbrecht 等^[32]研究发现,原花青素处理后 Caco 细胞无明显变化,而 NCM460 细胞随原花青素浓度的增大,其细胞抑制率也增大,通过蛋白印迹试验,原花青素使 PI3K/Akt 的催化亚基(P110)和调节亚基(P85)出现衰减,使 PKB-SER473 的磷酸化减弱,细胞出现程序性死亡。据报道^[33-34],丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路参与细胞内炎症信号的级联,与促炎细胞因子和 NF-κB 转录激活密切相关,并参与增殖、分化、转化和凋亡等一系列生物学过程。综上,原花青素通过抑制 HepG2 细胞相关基因的表达和通路的活化,诱导 HepG2 细胞发生凋亡。

2.5 葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞转录组信号通路及差异基因表达分析

对两组差异代谢通路对比分析(表 2),细胞凋亡通路相关的差异基因 24 个,与 TNF 信号通路相关的差异基因 28 个,p53 信号通路相关的差异基因 18 个,MAPK 信号通路相关的差异基因 47 个,PI3K-Akt 信号通路相关的差异基因 51 个,NF-κB 信号通路相关的差异基因 18 个。

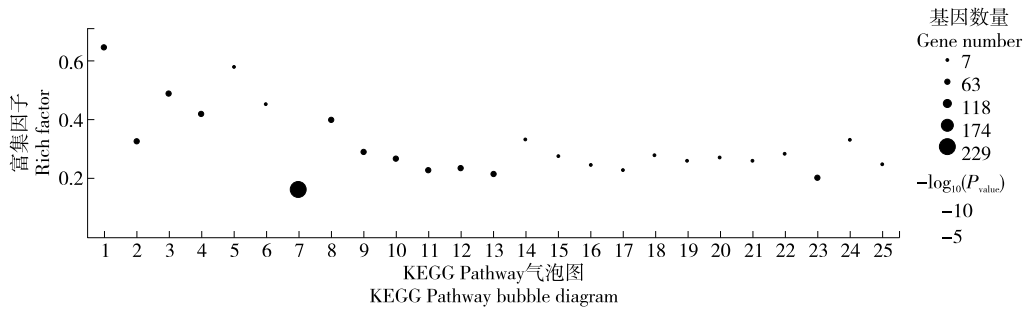
结合 GO 和 KEGG 富集结果,与细胞凋亡相关的差异基因有 24 个(表 3),12 个关键差异基因中,上调基因有 9 个,下调基因有 3 个。细胞凋亡 12 个关键差异基因与 TNF、p53、MAPK、PI3K-Akt、NF-κB 信号通路密切相关,其中,与 TNF 信号通路相关差异基因有 9 个,与 p53 信号通路相关的差异基因有 2 个,与 MAPK 信号通路相关



- A. 基础代谢过程 A1. 外源化合物的生物降解与代谢 A2. 氨基酸代谢 A3. 脂质代谢 A4. 碳水化合物代谢 A5. 核苷酸代谢 A6. 辅因子和维生素代谢 A7. 其他氨基酸的代谢 A8. 多糖合成和代谢 A9. 外源生物的生物降解与代谢 A10. 能量代谢 A11. 其他次生代谢生物的生物合成 A12. 萜类和聚酮类代谢 B. 生物系统 B1. 免疫系统 B2. 内分泌系统 B3. 神经系统 B4. 消化系统 B5. 发育 B6. 环境适应 B7. 血液循环系统 B8. 感官系统 B9. 排泄系统 B10. 老化 C. 人类疾病 C1. 传染性疾病 C2. 癌症 C3. 内分泌 C4. 代谢疾病 C5. 心血管疾病 C6. 神经退行性疾病 C7. 免疫疾病 C8. 抗药性 D. 细胞过程 D1. 细胞凋亡 D2. 运输与分解代谢 D3. 真核细胞群落 D4. 细胞运动 E. 基因信息过程 E1. 基因复制和修复 E2. 翻译 E3. 折叠和转录 E4. 降解 F. 环境信息过程 F1. 信号转导 F2. 信号分子与相互作用 F3. 膜运输

图 6 原花青素对 HepG2 细胞转录组 KEGG Pathway 分类图

Figure 6 KEGG Pathway classification and bubble diagram of procyanidins on HepG2 cell transcriptome



1. DNA 复制 2. 细胞周期 3. 同源重组 4. 范可尼贫血信号通路 5. 失配修正 6. 碱基切除修复 7. 代谢途径 8. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 9. 过氧化物酶体 10. 真核生物核糖体的生物发生 11. 流体剪切应力与动脉粥样硬化 12. 为嘧啶代谢 13. TNF 信号通路 14. 二羧酸代谢 15. 胆固醇代谢 16. p53 信号通路 17. TGF-β 信号通路 18. 膀胱癌 19. 核苷酸切除修复 20. 脂肪酸降解 21. 精氨酸和脯氨酸代谢 22. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 23. 白细胞经外周迁移 24. 精氨酸生物合成 25. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解

图 7 原花青素对 HepG2 细胞转录组 KEGG Pathway 气泡图

Figure 7 KEGG Pathway classification and bubble diagram of procyanidins on HepG2 cell transcriptome

表 2 差异基因与细胞凋亡相关的 KEGG 途径

Table 2 Differential genes and apoptosis-related KEGG pathways

通路	基因数量	P 值	Q 值	通路 ID
细胞凋亡	24	0.084 679	0.438 707	ko04210
肿瘤坏死因子	28	0.001 085	0.026 870	ko04668
抑癌基因	18	0.001 695	0.036 392	ko04115
丝裂原活化蛋白激酶	47	0.088 571	0.438 768	ko04010
细胞内信号转导途径	51	0.148 164	0.595 594	ko04151
核因子 κB	18	0.220 013	0.689 212	ko04064

差异基因有 6 个,与 PI3K-Akt 信号通路相关差异基因有 2 个,与 NF-κB 信号通路相关差异基因有 6 个。

葡萄籽原花青素对 HepG2 细胞的转录组信号通路产生了明显影响,尤其在细胞凋亡过程中起到了重要的调控作用。差异基因与多个信号通路的调控相互交织,共同参与了细胞凋亡的调控过程。

3 结论

葡萄籽花青素处理 HepG2 细胞后,其主要富集到的生物学过程为细胞过程、代谢过程、生物调控过程、免疫系统过程、繁殖调节和生长调节。通过 KEGG pathway 分析,葡萄籽花青素处理 HepG2 细胞后的基因差异表达水平涉及到细胞凋亡和多个信号通路的调控。12 个关键差异基因与相关通路结果表明,细胞凋亡与 TNF 信号通路、p53 信号传导途径、PI3K/Akt 信号通路、NF-κB 信号通路及 MAPK 信号通路密切相关。葡萄籽花青素通过调节这些信号通路的活性,可能在细胞中诱导细胞凋亡,从而抑制细胞进一步生长和扩散。后续可以重点关注差异基因在信号通路中的具体作用和相互调控关系,以深

表 3 原花青素对 HepG2 细胞差异基因及差异表达水平分析

Table 3 Analysis of differential genes and differential expression levels of proanthocyanidins in HepG2 cells

基因 ID	基因名称	对照组 表达量	处理组 表达量	差异 倍数	上调/ 下调
ENSG00000232810	TNF	0.01	0.79	6.30	上调
ENSG00000056558	TRAF1	0.15	4.12	4.75	上调
ENSG00000177606	JUN	20.91	62.40	1.58	上调
ENSG00000023445	BIRC3	0.25	9.73	5.26	上调
ENSG00000170345	FOS	4.06	9.55	1.23	上调
ENSG00000140379	BCL2A1	0.19	1.26	2.73	上调
ENSG00000105327	BBC3	7.16	35.11	2.29	上调
ENSG00000149311	ATM	25.68	10.04	-1.35	下调
ENSG00000197442	MAP3K5	0.06	0.00	-5.82	下调
ENSG00000006062	MAP3K14	2.81	5.82	1.05	下调
ENSG00000117020	AKT3	0.01	0.10	2.91	下调
ENSG00000145675	PIK3R1	14.67	5.17	-1.50	下调
ENSG00000163131	CTSS	0.25	1.11	2.15	下调
ENSG00000123104	ITPR2	8.91	3.17	-1.49	下调
ENSG00000135116	HRK	0.01	0.15	3.87	下调
ENSG00000150995	ITPR1	7.46	2.19	-1.77	下调
ENSG00000162909	CAPN2	10.90	23.16	1.09	下调
ENSG00000180644	PRF1	1.54	0.51	-1.60	下调
ENSG00000169598	DFFB	5.45	1.73	-1.65	下调
ENSG00000129484	PARP2	38.55	17.14	-1.17	下调
ENSG00000167552	TUBA1A	32.83	139.53	2.09	下调
ENSG00000164733	CTSB	384.22	779.43	1.02	下调
ENSG00000121858	TNFSF10	13.03	3.72	-1.81	下调
ENSG00000113368	LMNB1	75.35	24.82	-1.60	下调

入揭示葡萄原花青素在肝癌细胞中的作用机制。

参考文献

- [1] 刘洁. 葡萄籽提取物原花青素对人膀胱癌细胞生长的抑制作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009: 1-10.
LIU J. Effect of growth inhibition of grape seedprocyanidin extract on human bladder cancer BIU87 cells [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2009: 1-10.
- [2] GORAN J, MARIJA M, PREDRAG M, et al. Mechanisms of endothelium-dependent vasorelaxation induced by procyanidin B2 in venous bypass graft [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2020, 142(3): 101-108.
- [3] YANG H B, XU P L, SONG W, et al. Anti-tyrosinase and antioxidant activity of proanthocyanidins from *Cinnamomum camphora* [J]. *International Journal of Food Properties*, 2021, 24 (1): 1 265.
- [4] ZHU Y Y, SHI Z X, YAO Y, et al. Antioxidant and anti-cancer activities of proanthocyanidins-rich extracts from three varieties of sorghum (*Sorghum bicolor*) bran [J]. *Food & Agricultural Immunology*, 2017, 28(6): 1-14.
- [5] 刘贺, 贺阳, 谷家栋, 等. 山葡萄花青素对慢性酒精中毒小鼠认知障碍的改善作用[J]. *食品与机械*, 2021, 37(8): 163-168, 200.
LIU H, HE Y, GU J T, et al. Effect of anthocyanins from *Vitis amurensis* on cognitive impairment in mice with chronic alcoholism [J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(8): 163-168, 200.
- [6] 林童, 解春艳, 侯鑫然, 等. 不同种类葡萄籽综合营养成分分析 [J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(3): 59-65.
LIN T, XIE C Y, HOU X R, et al. Analysis of comprehensive nutritional components of different grape seeds [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2021, 36(3): 59-65.
- [7] 陈梦雨, 黄小丹, 王钊, 等. 植物原花青素的研究进展及其应用现状 [J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(3): 54-58.
CHEN M Y, HUANG X D, WANG Z, et al. Research progress and application of plant proanthocyanidin [J]. *Food and Nutrition in China*, 2018, 24(3): 54-58.
- [8] 周向辉. 葡萄籽提取物营养成分组成及其生物学功能研究进展 [J]. *食品与机械*, 2023, 39(7): 228-233, 240.
ZHOU X H. Research progress in nutritional composition and biological functions of grape seed extracts [J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(7): 228-233, 240.
- [9] OU K, GU L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 43-53.
- [10] MIRIAM C D, MARIA R C, JOSE M O, et al. Production of an anthocyanin-rich food colourant from *Thymus moroderi* and its application in foods [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(6): 1 283-1 293.
- [11] ALMA A V, ALEJANDRA I M, EMILIO A P, et al. Proanthocyanidins with a low degree of polymerization are good inhibitors of digestive enzymes because of their ability to form specific interactions: A hypothesis [J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(10/11/12): 2 895-2 902.
- [12] WONG M C S, JIANG J Y, GOGGINS W B, et al. International incidence and mortality trends of liver cancer: A global profile [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(4): 458-468.
- [13] MANDAL D, SHAW T K, DEY G, et al. Preferential hepatic uptake of paclitaxel-loaded poly-(D-lactide-co-glycolide) nanoparticles: A possibility for hepatic drug targeting: Pharmacokinetics and biodistribution [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 45(5): 156-168.
- [14] ZENG J, LU L, MEI Z C. Efficacy and safety of transarterial chemoembolization plus sorafenib for early or intermediate stage hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2016, 56(3): 145-156.
- [15] FEDERICO A, ORDITURA M, COTTICELLI G, et al. Safety and efficacy of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and Child-Pugh A or B cirrhosis [J]. *Oncology Letters*, 2015, 9(4): 1 628-1 632.
- [16] 徐春明, 庞高阳, 李婷. 花青素的生理活性研究进展 [J]. *中国食品添加剂*, 2013(3): 205-210.
XU C M, PANG G Y, LI T. Progress in the research on physiological activities of anthocyanin [J]. *China Food Additives*, 2013(3): 205-210.
- [17] LENCIONI R, LLOVET J M, HAN G, et al. Sorafenib or placebo plus TACE with doxorubicin-eluting beads for intermediate stage HCC: The SPACE trial [J]. *Journal of Hepatology*, 2016, 64(5): 1 090-1 098.
- [18] 陈政, 朱涵予. 银耳芽孢和菌丝的转录组分析 [J]. *食品与机械*, 2019, 35(9): 45-49, 63.
CHEN Z, ZHU H Y. Transcriptome analysis for the mycelia and yeast-like cells of *tremella fuciformis* [J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(9): 45-49, 63.
- [19] 孙墨可, 孙晓文, 田娟, 等. 综述高通量转录组测序技术在生物中的应用 [J]. *南方农机*, 2018, 49(19): 22-23.
SUN M K, SUN X W, TIAN J, et al. Review the application of high-throughput transcriptome sequencing technology in biology [J]. *Southern Agricultural Machinery*, 2018, 49(19): 22-23.
- [20] 刘厚伯. RNA-Seq 在药用植物研究中的应用 [J]. *中草药*, 2019, 50(21): 5 346-5 354.
LIU H B. The application of RNA-Seq in the study of medicinal plants [J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2019, 50(21): 5 346-5 354.
- [21] 曹玉凤. 20-Hydroxy-3-oxolupan-28-oic acid 抗炎活性及其作用机制研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2019: 5-10.
CAO Y F. Study on the anti-inflammatory activity and mechanism of action of 20-Hydroxy-3-oxolupan-28-oil acid [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019: 5-10.
- [22] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357.

- [23] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [24] 陈美珺, 梁统, 周克元. 原花青素的抗炎作用及其作用机制探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(12): 1 080-1 082.
CHEN M J, LIANG T, ZHOU K Y. The anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2008, 29(12): 1 080-1 082.
- [25] ZHENG W C, FENG Y J, BAI Y J, et al. Proanthocyanidins extracted from grape seeds inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells and induce apoptosis through the MAPK/Akt pathway[J]. *Food Bioscience*, 2022, 45: 101337.
- [26] SINGLETARY K W, MELINE B. Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model[J]. *Nutrition and Cancer*, 2001, 39(2): 252-258.
- [27] 杜宏, 张娜, 高霞, 等. 莲房原花青素对人肝癌细胞 HepG2 生长及凋亡的作用[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(6): 891-893.
DU H, ZHANG N, GAO X, et al. The effect of Lianfang proanthocyanidins on the growth and apoptosis of human liver cancer cell line HepG2[J]. *Journal of Practical Medicine*, 2008, 24(6): 891-893.
- [28] 梁慧敏, 时小燕, 梁志刚, 等. 原花青素对人肝癌细胞 SMMC-7721 的诱导分化作用[J]. *中国医疗前沿*, 2010, 55(21): 18-19.
LIANG H M, SHI X Y, LIANG Z G, et al. The induced differentiation effect of procyanidins on human liver cancer cell line SMMC-7721[J]. *China Medical Frontier*, 2010, 55(21): 18-19.
- [29] 许慧. 莲房原花青素诱导 ROS 积蓄介导 HepG2 细胞自噬和凋亡的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016: 5-15.
- XU H. Study on the induction of ROS accumulation mediated autophagy and apoptosis in HepG2 cells by Lianfang proanthocyanidins[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016: 5-15.
- [30] MALDONADO M E, BOUSSEROUEL S, GOSSE F, et al. Implication of NF- κ B and p53 in the expression of TRAIL-death receptors and apoptosis by apple procyanidins in human metastatic SW620 cells [J]. *Biomédica Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 2010, 30(4): 577-580.
- [31] 卢婷婷, 梁统. 原花青素对 IL-1 β 诱导的 A549 细胞环氧化酶-2 启动子活性的影响[J]. *郑州牧业工程高等专科学校学报*, 2010, 30(2): 1-3.
LU T T, LIANG T. Effect of procyanidins on the COX-2 promoter activity in A549 cells induced by IL-1 β [J]. *Journal of Zhengzhou Animal Husbandry Engineering College*, 2010, 30(2): 1-3.
- [32] ENGELBRECHT A M, MATTHEYSE M, ELLIS B, et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line [J]. *Cancer Letters*, 2007, 258(1): 150-153.
- [33] 栾秋英. 天然药物有效成分诱导白血病细胞凋亡与分化的研究进展[J]. *河南职工医学院学报*, 2010, 34(6): 126-129.
LUAN Q Y. Research progress on the induction of apoptosis and differentiation of leukemia cells by natural drug active ingredients [J]. *Journal of Henan Workers' Medical College*, 2010, 34(6): 126-129.
- [34] ZHANG R, YU Q, LU W, et al. Grape seed procyanidin B2 promotes the autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells via regulating PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncology Targets and Therapy*, 2019, 12: 4 109-4 118.
-
- (上接第 187 页)
- [18] 王宁, 张叶韬, 芦晓芳. 黑豆异黄酮的提取分离及其对 DPPH 自由基的清除能力[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(1): 171-176.
WANG N, ZHANG Y T, LU X F. Extraction of isoflavones from *Glycine max* and its ability to scavenge DPPH free radicals[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2022, 50(1): 171-176.
- [19] LIANG L F, WANG T, CAI Y S, et al. Brominated polyunsaturated lipids from the Chinese sponge *Xestospongia testudinaria* as a new class of pancreatic lipase inhibitors [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 79(8): 290-297.
- [20] 田丝竹, 李绪文, 臧爽, 等. 10 种野生植物果实对 α -淀粉酶和酪氨酸酶的抑制作用及其酚类化合物含量和抗氧化活性研究[J]. *分析化学*, 2021, 49(3): 449-459.
TIAN S Z, LI X W, ZANG S, et al. Investigation of α -amylase and tyrosinase inhibitory activities, phenolic compounds, and antioxidant activity in ten kinds of wild fruits[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2021, 49(3): 449-459.
- [21] 丁林玲, 谢颖欣, 高伟, 等. 三叶木通果肉提取物的体外抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶能力[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(4): 1 058-1 065.
- DING L L, XIE Y X, GAO W, et al. In vitro antioxidant activities, α -glucosidase and acetylcholinesterase inhibition ability of *Akebia trifoliata* pulp extracts[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(4): 1 058-1 065.
- [22] 黄淑安, 丁红霞, 杨远帆, 等. 瑄溪蜜柚疏果黄酮酶法辅助提取工艺优化及其抑制酪氨酸酶活性[J/OL]. *食品工业科技*. (2023-11-03) [2023-11-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060298>.
HUANG S A, DING H X, YANG Y F, et al. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Guanxi Pomelo fruit and its inhibition of tyrosinase activity[J/OL]. *Food Industry Science and Technology*. (2023-11-03) [2023-11-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060298>.
- [23] 余雨婷, 张彦, 张迎, 等. 基于分子对接探究紫苏粗提物对代谢综合征相关酶的抑制作用[J]. *食品与机械*, 2022, 38(4): 183-188.
YU Y T, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Explore the inhibitory effect of *Perilla* crude extract on metabolic syndrome-related enzymes based on molecular docking[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(4): 183-188.