

李容容,孙鑫,黄恺,等. C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠的转录组学分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1519-1529.

Li RR, Sun X, Huang K, et al. Transcriptomic analysis of C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst hepatitis B virus transgenic mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1519-1529.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.001

C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠的转录组学分析

李容容^{1#}, 孙鑫^{1,2#}, 黄恺², 赵志敏², 彭渊^{1*}, 刘成海^{1,2,3*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203; 2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203; 3. 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 观察 C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 转基因 (HBV-Tg) 小鼠模型的特征, 并分析 HBV-Tg 小鼠模型的转录组学特点。**方法** 以 10 只雄性 HBV-Tg 小鼠为实验组, 10 只野生型小鼠为对照组。以血清 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 水平和肝组织 HBsAg、HBeAg 表达情况评价模型小鼠病毒学特征, 检测血清 ALT、AST, 肝组织 HE、天狼猩红染色及肝组织 Hyp 含量评估小鼠肝脏炎症及纤维化程度。两组各随机选择 3 例肝组织样本提取 RNA 进行高通量转录组测序。经 R 软件分析获得表达显著的差异基因, 经 GO 和 KEGG 分析获得差异基因功能富集情况, 再采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 对差异显著的基因进行验证。**结果** 与正常组相比, 模型组 ALT、AST 水平均有所升高, 以 ALT 更为显著 ($P < 0.05$); 模型组肝组织 HE 染色可见肝细胞核增大, 个别肝细胞出现肿胀。天狼猩红染色结果显示, HBV 转基因组汇管区及小叶间出现少量胶原沉积, 呈细线状。通过筛选条件 ($|\log FC| > 2$ 倍且 $P_{adj} < 0.05$) 获得差异基因共计 1352 个, 其中上调基因 703 个, 下调基因 649 个。KEGG 分析提示差异基因主要在 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解等通路中富集 ($P_{adj} < 0.05$)。明显上调的差异基因主要有 Cyp4a10、Cyp4a14、Acot1、Acot3、Ehhadh 等, 明显下调基因包括 Scn5a、Apol10b、Igdde4、Cxcl1、9530077C05Rik 等, 经 RT-qPCR 验证趋势一致 ($P < 0.05$)。**结论** HBV-Tg 小鼠具有自发纤维化的趋势, 经转录组学分析, 慢性乙型病毒性肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 发生的潜在机制主要涉及 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解、药物代谢等通路。

【关键词】 乙型病毒性肝炎; 转基因小鼠; 转录组学; 基因表达

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1519-11

Transcriptomic analysis of C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst hepatitis B virus transgenic mice

【基金项目】 国家自然科学基金 (82205052, 82174057, 82274305), 上海市科委启明星计划扬帆专项 (22YF1449300), 上海中医药大学预算内项目 (2021LK081), 上海市临床重点专科建设项目 (shslczdzk01201), 山西中医药大学科技创新团队项目 (2022TD2003)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82205052, 82174057, 82274305), Shanghai Science and Technology Commission Sailing Project (22YF1449300), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Budget Project (2021LK081), Shanghai Key Clinical Specialty Construction Project (shslczdzk01201), Science and Technology Innovation Team Project of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (2022TD2003).

【作者简介】 李容容 (1993—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。
Email: 529734514@qq.com;

孙鑫 (1990—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。Email: 913637769@qq.com。
#共同第一作者

【通信作者】 刘成海 (1965—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。
Email: chenghailiu@hotmail.com;

彭渊 (1983—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。
Email: pengyuan1026@shutcm.edu.cn。

* 共同通信作者

LI Rongrong^{1#}, SUN Xin^{1,2#}, HUANG Kai², ZHAO Zhimin², PENG Yuan^{1*}, LIU Chenghai^{1,2,3*}

(1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203. 3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai 201203)

Corresponding author: LIU Chenghai. E-mail: chenghailiu@hotmail.com; PENG Yuan. E-mail: pengyuan1026@shutcm.edu.cn

[Abstract] Objective To observe the characteristics of C57BL/6N-Tg (1.28HBV)/Vst transgenic hepatitis B virus (HBV-Tg) model mice and analyze their transcriptomic characteristics. **Methods** Twenty male HBV-Tg mice were divided into an experimental group and a wild-type (control) group ($n = 10$ mice per group). The virological characteristics of the model mice were evaluated according to serum levels of HBV DNA, HBsAg, and HBeAg, and expression levels of HBsAg and HBeAg in liver tissue. Serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), hematoxylin and eosin (HE) and Sirius red staining, and hydroxyproline (Hyp) in liver tissue were detected to evaluate the degree of liver inflammation and fibrosis. Liver tissue samples were randomly selected from three mice in each group for RNA extraction for high-throughput transcriptome sequencing. Significantly differentially expressed genes were identified using R software. Functional enrichment of differential genes was determined by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses, and genes with significant differences were verified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** ALT and AST levels were increased in the model group compared with the normal group, with the result for ALT being more significant ($P < 0.05$). HE staining of liver tissue showed enlargement of the liver nucleus and swelling of some hepatocytes in the model group, while Sirius red staining showed a small amount of collagen deposition in the sink area and interlobule in the HBV transgenic group, in the shape of thin lines. A total of 1352 differential genes were obtained by screening ($|\log FC| > 2$ and $P_{adj} < 0.05$), including 703 up-regulated and 649 down-regulated genes. KEGG analysis suggested that differential genes were mainly enriched in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway, retinol metabolism, fatty acid degradation, and other pathways ($P_{adj} < 0.05$). The main significantly up-regulated genes included Cyp4a10, Cyp4a14, Acot1, Acot3, and Ehhadh, and the significantly down-regulated genes included Scn5a, Apol10b, Igddc4, Cxcl1, 9530077C05Rik. The trend was consistent after RT-qPCR detection ($P < 0.05$). **Conclusions** HBV-Tg mice have a tendency to develop spontaneous fibrosis. Transcriptomic analysis showed that chronic hepatitis B mainly involves PPAR signaling, retinol metabolism, fatty acid degradation, drug metabolism, and other pathways.

[Keywords] chronic hepatitis B; transgenic mice; transcriptomics; gene expression

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性乙型病毒性肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是临床常见传染性疾病^[1], 临床以乏力、食欲减退、转氨酶增高、肝肿大为主要表现; 以肝细胞炎症浸润、坏死和肝组织胶原沉积为病理特点^[2], 最终发展为肝纤维化/肝硬化, 甚至肝癌^[3]。由于 CHB 与患者乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染、宿主免疫、遗传、共存肝病等因素密切相关^[4], 发病机制较为复杂, 因此研究 CHB 发病的机制既是重点也是难点, 而选择适宜的 CHB 动物模型是 CHB 机制研究的必要条件。

C57BL/6N-Tg (1.28HBV)/Vs 乙肝病毒转基因 (HBV-transgenic, HBV-Tg) 小鼠 (C57BL/6N 背景) 是将 HBV 的基因或基因组片段植入小鼠胚胎, 使小鼠肝细胞高表达 HBV 相关的蛋白或产生完整的

HBV 病毒颗粒。既往研究表明, HBV-Tg 小鼠可较好地模拟乙型肝炎病毒在人类体内的感染和病理过程, 是常见的用于 CHB 研究的小鼠模型^[5-6]。全转录组高通量测序 (full transcriptome high-throughput sequencing, RNA-Seq) 是一种先进的分子生物学技术, 可用于研究细胞或组织中的所有 RNA 分子的表达情况^[7], 已广泛应用于肝相关疾病的发病机制以及分子标志物的筛选等研究^[8]。鉴于小鼠全基因组已被证实有 90% 左右的基因与人类高度相似且近似于人类的病理解剖结构^[9-10], 本研究应用 RNA-Seq 分析 HBV 转基因小鼠的基因表达变化, 解析 CHB 研究的理想动物——HBV-Tg 小鼠的基因网络变化特点, 可为临床 CHB 早期诊断、药物筛查及生物标记物的发现提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

野生型 (wide type, WT) C57BL/6N 小鼠和 HBV-Tg 小鼠, 雄性, SPF 级, 数量各 10 只, 24 周龄, 体重 30 ± 2 g, 购自北京维通达生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0002】。在恒定温度 25℃、湿度 $55\% \pm 5\%$ 和光暗循环(昼夜明暗交替 12 h/12 h)条件下自由饮食和饮水, 饲养于北京维通达生物技术有限公司 SPF 级别实验室【SYXK(京)2019-0025】。所有操作符合实验动物福利伦理要求, 研究方案实施前经上海中医药大学动物实验伦理委员会审查批准(SZY201711007)。

1.1.2 主要试剂与仪器

乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B virus s antigen, HBsAg) 诊断试剂盒 (酶联免疫法, 批号: 202008071)、乙型肝炎病毒 e 抗原 (hepatitis B virus e antigen, HBeAg) 检测试剂盒 (酶联免疫法, 批号: 202001011)、乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒 (PCR-荧光探针法, 批号: 20050111), 均购自上海科华生物工程股份有限公司; 三氯甲烷 (Trichloromethane, 氯仿, 分析纯, Cat No.10006818)、无水乙醇 (Ethanol absolute, 分析纯, Cat No.100092680), 均购自国药集团化学试剂有限公司; DEPC 处理水 (Water-DEPC Treated Water, Cat No. B501005)、UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒 (Cat No. B511321), 均购自上海生工生物工程股份有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 测试盒 (Cat No. C009-1)、谷草转氨酶 (AST/GOT) 测试盒 (Cat No. C010-1), 均购自南京建成生物工程研究所; 羟脯氨酸标准品 (trans-4-Hydroxy-L-proline, Cat No. H54409), 购自 Sigma 公司; HBsAg 预稀释小鼠单克隆抗体 (Cat No. ab859)、HBcAg 小鼠单克隆抗体 (Cat No. ab140243), 均购自 Abcam 中国艾博抗(上海)贸易有限公司; SABC 免疫组化染色试剂盒 (Cat No. SA1022-兔 IgG)、SABC 免疫组化染色试剂盒 (Cat No. SA1021-小鼠 IgG)、DAB 显色试剂盒 (Cat No. AR1022), 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Cat No. RR047A)、扩增试剂盒 TBGreen™ Premix EX Taq™ (Cat No. RR420A), 均购自 TaKaRa 公司; MyCycler™ Thermal Cycler 逆转录仪, 购自美国 Bio-Rad 公司;

TECAN F200 PRO 多功能酶标仪, 购自 TECAN 公司; LEICA ASP300 自动脱水机、LEICA EG1160 石蜡包埋机、转轮切片机 RM2035、HI1220 烤片机及 SCN400 数字扫描系统, 均购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 HBV-Tg 小鼠的构建与繁育

由北京维通达生物技术有限公司采用全基因显微注射法将 1.28 倍长度的 HBV (A 型, GenBank: AF305422.1) 线性化片段导入 C57BL/6Ncrl 小鼠胚胎原核, 获得转基因阳性小鼠。通过外周血 HBV 拷贝数分析, 保留了拷贝数达到 $10^7 \sim 10^8$ IU/mL 的首建鼠^[11-12]。按照半合子配野生 C57BL/6Ncrl 小鼠的方式建立了 HBV 转基因小鼠品系。

1.2.2 样本采集

所有小鼠采用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉, 打开腹腔, 下腔静脉取血, 室温静置 2 h, 以 4℃、3000 r/min, 离心 15 min, 收集血清, 4℃ 保存。采血后剪断下腔静脉, 摘取小鼠肝、脾并称重记录。留取约 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 肝组织, 10% 甲醛溶液固定, 其余肝组织 -70℃ 保存。

1.2.3 血清肝功能检测

按照试剂盒说明检测血清 ALT、AST 水平, 每个样本重复 3 次检测。

1.2.4 血清乙肝病毒学检测

参照试剂盒说明书使用酶联免疫法 (ELISA) 检测血清 HBsAg、HBeAg 水平; PCR-荧光探针法检测血清 HBV-DNA 含量, 每个样本重复 3 次检测。

1.2.5 病理染色

HE 染色观察肝组织炎症浸润, 天狼猩红染色观察肝组织胶原沉积情况, 并参照文献进行肝组织炎症分级和纤维化分期^[13-14]。

1.2.6 免疫组织化学染色

将石蜡切片脱蜡至水后置入柠檬酸缓冲液 (pH = 6.0) 进行热修复; 0.6% 过氧化物-甲醇溶液孵育灭活内源性酶; 5% BSA 封闭; 滴加 HBsAg 小鼠单克隆预稀释抗体及 HBcAg 小鼠单克隆抗体 (1:100 稀释), 一抗 4℃ 过夜孵育, 滴加二抗孵育, 37℃ 孵育 40 min, DAB 显色, 苏木素衬染, 中性树胶封片后观察。

1.2.7 肝组织羟脯氨酸检测

参照 Jamall's 盐酸水解法^[15], 称取 100 mg 肝组织放入 50% 盐酸中 105℃ 水解过夜。后取 3 层滤纸过滤水解液并吸取 100 μL 烘干处理。取 Hyp 标准品 0.2 ~ 1.6 μg 设为标准曲线, 经氯胺 T 溶液

0.2 mL、含 25%对二甲基氨基苯甲醛和 27.3%高氯酸的异丙醇溶液反应,50℃水浴 1 h,558 nm 测定吸收值,每个样本重复 3 次检测。

1.2.8 RNA 提取、文库构建和测序

采用 TRIzol 试剂提取 WT、HBV-Tg 小鼠的总 RNA,检测 RNA 纯度、定量,并评估 RNA 完整性。质检合格后,构建转录组文库。库检合格后,使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台进行全转录组测序分析,获得待测片段的序列信息。利用 Fastp 软件对原始数据进行质控并过滤,分别去除含接头的序列、含 N 比例大于 10%的序列、全部是 A 碱基的序列和低质量序列。

1.2.9 差异表达基因筛选

通过 R4.2.1 软件的“DESeq2 包”对原始 Counts 矩阵进行标准化处理(Normalize),并进行差异分析,将筛选条件设为 $|\text{LogFC}| > 2$ 和 $P.\text{adj} < 0.05$,获取上调和下调的差异基因。利用“ggplot2 [3.3.6]包”和“VennDiagram[1.7.3]包”对差异分析结果进行可视化,绘制火山图、韦恩图和 UpSet 图^[16-17]。

1.2.10 蛋白质与蛋白质互作 (protein-protein Interaction, PPI) 分析

采用 STRING 在线数据库 (<https://string-db.org/>, 更新至 2023 年 7 月 1 日),检索类型为 Multiple Proteins by Names/Identifiers,基因类型为小鼠 (mus musculus);对网络呈现交互分数选择高等可信值 0.7;同时隐藏孤立的蛋白,在线获得差异表达基因的 PPI 网络图。

1.2.11 基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析

利用 R4.2.1 软件的“org.Mm.eg.db 包”将差异基因转换成 EntrezID,再用“clusterProfiler [4.4.4] 包”进行 GO 和 KEGG 富集分析,显著性 cut-off 值设置为 $P.\text{adj} < 0.05$ 。通过超几何分析获得生物学过程 (biologicalprocess, BP)、细胞组分 (cellularcomponent, CC) 和分子功能 (molecularfunction, MF) 上的基因富集数,并绘制 GO 和 KEGG 气泡图^[18]。

1.2.12 关键基因的 RT-qPCR 验证

将转录组测序提取的总 RNA 剩余样品逆转录为 cDNA 模板,并按照说明书进行 PCR 扩增。根据各组的 Ct 值,选用 GAPDH 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组样本 mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列详见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列(5'→3')
Table 1 RT-qPCR primer sequence(5'→3')

基因名称 Gene name	上游 Forward	下游 Reverse
Acot1	CGTCATGGCTCTGGCTTATTACAAC	CAGGTAGTTCACGGCTTCTTCAAAG
Cyp4a14	GGCACCATCTGAAGGACAAGGAG	AGAGACACTGTAAGCAGGCACATT
Acot3	GGAAGAGCGAGTTCTATGCCAGAG	GGGAAGCCTTACACAGTGGGAAG
Dmbt1	AACCACAGCAGAGCAGACAACC	TCTCTCCATTCTCCAGCCTCAC
Cyp4a10	TGCTCCTGCTGCTGGTGAAAG	AGGTGATGGAACTGCTGGAAAG
Ehhadh	GGTCATTCTAGCCGATACTTTCC	GCAGTTACCAACAACGACTCCAATC
Muc3	GAAGTGGTGAGAGCGTAGAGATAG	ACTGGTTACTGTCACACTCACTTCC
Acot2	ATGGTCTCTTGATGTCGTGGAAG	GAGGAACAGGAAGGTCGTGTGAG
Ctrb1	TCCGATGAAGAGAATGTCCAGGTC	CATTACGCACGGTGAAAGAGTTG
S100g	TCAGAGTTCCCCAGCCTCTG	CTTCTCCATCGCCATTCTTATCCAG
Scn5a	CTCCTCGTCTGCTCATCTTCTG	CTCACACTCGCTCTTGTGTTCAC
S100a9	AGCACAGTTGGCAACCTTTATGAAG	GTGTCCAGGTCCTCCATGATGTC
S100a8	ATGCCGTCTGAACTGGAGAAGG	TCTTGTAGAGGGCATGGTGATTTT
Apol10b	GAGGAAGCAGCAGAATTGTCAAGTG	ACTCAGGAAACTCTCGCAGAAACC
Ngp	ATCCTGCTACCAATATCCCCTCC	GTTGACTGCCGCTTCTGTAAG
Igdec4	GCCATAAAGAGCAACGGGAGAAAG	AGGTCTTGGAGGTGGAGGTCAG
Mpo	CCACACCCTCATCCAACCCCTTC	ATGCCACCTTCCAACACGACTC
9530077C05Rik	TGTAGTTTATCTCACCGAAGACCTG	GTGTGCCTATCTCGTGCCCTCAG
Cxcl1	TGGCTGGGATTACCTCAAGAAC	GTGTGGCTATGACTTCGGTTTGG
Derl3	TCGGTGCTTCTTATGACTCTGC	CTGCGACGGCTCCATACATAGAC
GAPDH	GACTCCACTCACGGCAAATTC AAC	GACTCCACTCACGGCAAATTC AAC

1.3 统计学分析

各组数据使用 SPSS Statistics 25.0 软件进行统计分析,采用 Graphpad Prism (V 8.0.2) 软件做图。计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对两个独立组进行方差齐性检验和正态检验,符合正态分布采用独立样本 *T* 检验,不符合正态分布,则采用 Wilcoxon 秩和检验。两组间采用单因素方差分析检验 (LSD 进行两两比较)。单有序分类资料采用 Ridit 分析, *P* < 0.05 表示有统计学意义。

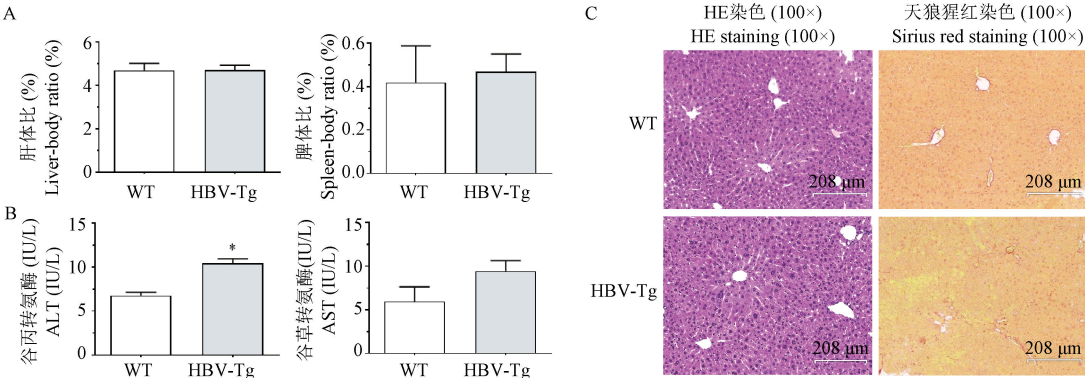
2 结果

2.1 一般生物学特征观察

两组小鼠均反应敏捷,活跃度良好,毛发有光泽,无掉毛、皮损等症状。每日的饮水饮食量、体重、肝体比、脾体比均无统计学差异 (图 1A)。

2.2 血清肝功能、肝组织炎症及纤维化比较

与 WT 组相比,HBV-Tg 组小鼠血清 ALT 水平升高 (*P* < 0.05);血清 AST 水平有升高趋势,但无统计学意义 (图 1B)。肝组织 HE 染色结果显示:两组小鼠肝小叶均结构完整、清晰,肝细胞呈条索状排列整齐,在中央静脉周围呈放射状分布;HBV-Tg 组小鼠另可见肝细胞核增大及核边缘化,个别肝细胞出现肿胀。肝组织天狼猩红染色结果显示,WT 组未见明显胶原沉积,HBV-Tg 组汇管区及小叶间出现少量胶原沉积,呈细线状,未见明显的桥接和假小叶形成。肝组织 Hyp 含量检测显示,两组小鼠肝组织 Hyp 含量的差异无统计学意义 (*P* > 0.05) (图 2B)。经 Ridit 分析,两组在炎症分级上无统计学差异,而纤维化分级具有显著性差异 (图 1C,表 2,表 3)。



注:A:肝体比与脾体比;B:血清生化 ALT、AST 水平;C:肝组织 HE、天狼猩红染色;与 WT 组相比, * *P* < 0.05。(下图同)

图 1 脏器指数、血清肝功能及肝组织病理染色 (*n* = 10)

Note. A. Liver-body ratio and spleen-body ratio. B. Serum ALT and AST levels of mice. C. HE and Sirius red staining of liver tissue. Compared with WT group, * *P* < 0.05. (The same in the following figures)

Figure 1 Organ index, serum liver function and pathological staining of liver tissue(*n* = 10)

表 2 肝组织炎症分级 (*n* = 10)

组别 Groups	肝组织炎症分级 Liver tissue inflammation grades					R 值 R-value
	G0	G1	G2	G3	G4	
WT	10	0	0	0	0	0.425
HBV-Tg	7	3	0	0	0	0.575

表 3 肝组织纤维化分期 (*n* = 10)

组别 Groups	肝组织纤维化分期 Hepatic fibrosis stages					R 值 R-value
	S0	S1	S2	S3	S4	
WT	10	0	0	0	0	0.3
HBV-Tg	2	7	1	0	0	0.7**

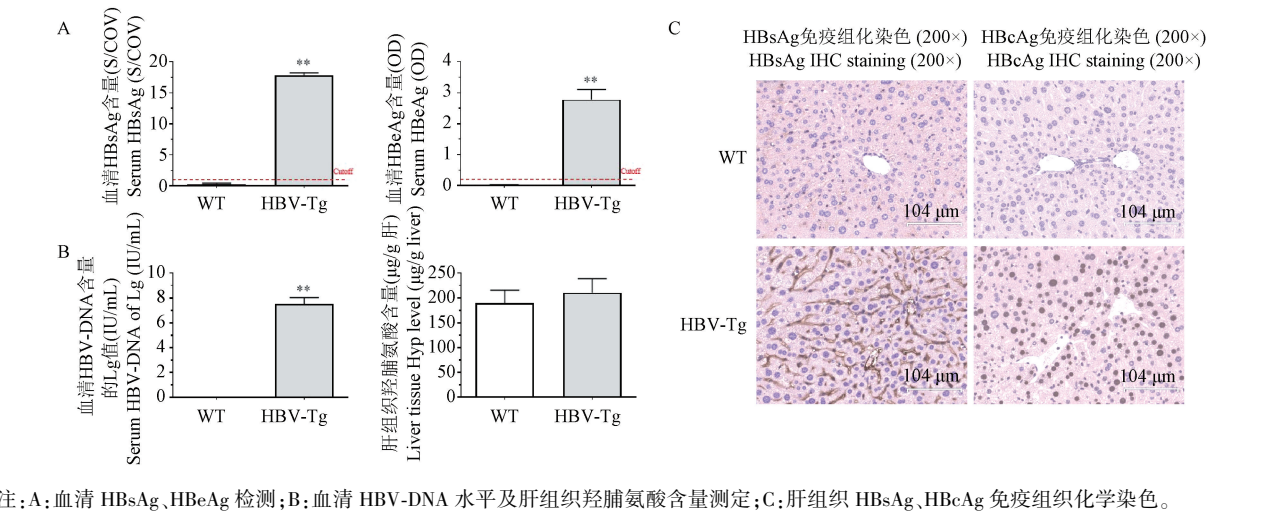
注:与 WT 组相比, ** *P* < 0.01。(下图同)
Note. Compared with WT group, ** *P* < 0.01. (The same in the following figures)

2.3 血清及肝组织 HBV 病毒指标比较

WT 组小鼠血清 HBsAg、HBeAg (低于 Cutoff 值) 和 HBV-DNA (未测及) 均为阴性,而 HBV-Tg 组小鼠血清 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 水平均呈阳性 (*P* < 0.01) (图 2A, 2B)。肝组织石蜡切片免疫组化结果显示,HBV-Tg 组小鼠肝组织 HBsAg 和 HBcAg 均可见明显的阳性表达,其中 HBsAg 主要围绕肝窦表达在细胞膜周围,HBcAg 主要表达于细胞核内 (图 2C)。

2.4 两组小鼠肝组织的差异表达基因

差异表达基因热图和火山图显示了两组小鼠肝组织差异基因的分布情况,WT 组和 HBV-Tg 组小鼠共有 1352 个差异基因 (| LogFC | > 2, *P*.adj < 0.05),其中 703 个上调基因、649 个下调基因。与



注:A:血清 HBsAg、HBeAg 检测;B:血清 HBV-DNA 水平及肝组织羟脯氨酸含量测定;C:肝组织 HBsAg、HBeAg 免疫组织化学染色。

图 2 血清及肝组织 HBV 病毒学评价 (n = 10)

Note. A. Serum HBsAg and HBeAg level. B. Serum HBV-DNA level and Hyp content of liver tissue. C. Expression of HBsAg and HBeAg in liver tissue.

Figure 2 Evaluation of HBV virology in serum and liver tissue(n = 10)

WT 组小鼠相比,HBV-Tg 组小鼠肝 *Muc3*、*Ctrlb1*、*Slc9a3*、*Reg1*、*Scn4b* 等基因表达显著上调;*Mpo*、*Fcnb*、*Clec2i*、*Gpr141*、*Derl3* 等基因表达显著下调(图 3)。

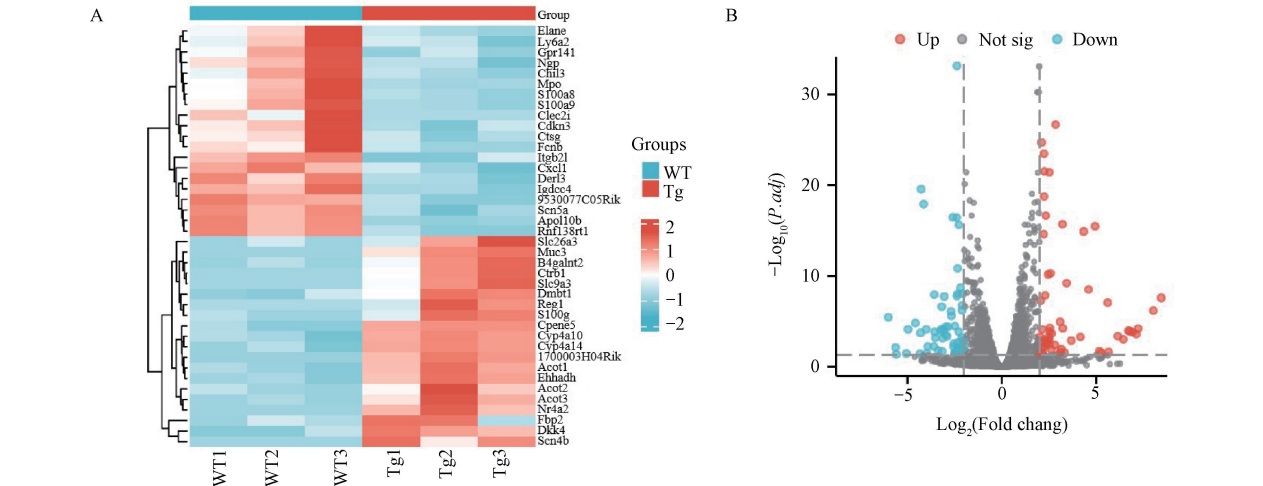
2.5 差异表达蛋白-蛋白互作 (Protein-Protein interaction networks,PPI) 分析

通过 String 数据库构建差异表达基因的蛋白网络互作图,组成互作网络的基因主要与 *Cyp51*、*Cyp2c40*、*Fdft1*、*Calr*、*Fdps*、*Hmgcs1*、*Creld2*、*Cyp26a1*、*Hsp90b1*、*Adh4* 等蛋白相关,占据了 PPI 网络的中心

位置(图 4,表 4)。

2.6 差异表达基因的 GO 分析

两组小鼠肝组织差异表达基因涉及 926 个生物过程 (biological process, BP)、58 个细胞组分 (cell component, CC) 和 150 个分子功能 (molecular function, MF)。BP 包括脂肪酸代谢、羧酸生物合成、有机酸生物合成等过程;CC 包括内质网膜伴侣复合物、顶端质膜、过氧化物酶体等组分;MF 包括氧化还原酶活性、羧酸跨膜转运蛋白活性、有机酸跨膜转运蛋白活性等功能(图 5)。

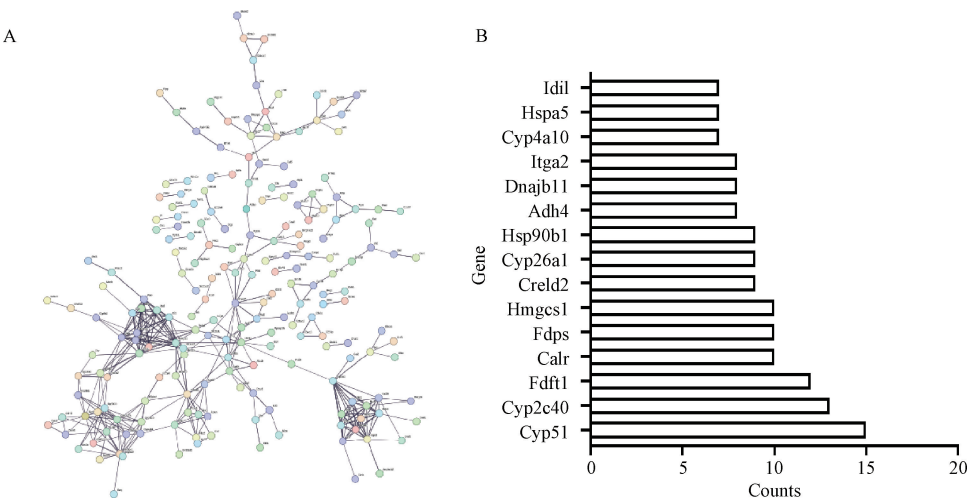


注:A:WT 组和 HBV-Tg 组小鼠差异基因热图;B:WT 组和 HBV-Tg 组小鼠差异基因火山图;红色:上调基因;蓝色:下调基因;灰色:无显著差异基因。

图 3 肝组织的差异表达基因

Note. A. Heat map of differentially expressed genes in WT and HBV-Tg mice. B. Differential gene volcano map of WT and HBV-Tg mice. Red. Up-regulated gene. Blue. Down-regulated gene. Grey. No significant differenced genes.

Figure 3 Differentially expressed genes in the liver



注:A:蛋白与蛋白相互作用图;B:差异基因表达量分布图。

图 4 肝组织差异基因的 PPI 网络图

Note. A. PPI network diagram. B. Differential gene expression distribution map.

Figure 4 PPI network of differentially expressed genes in the liver

表 4 调控 PPI 网络排名前 10 名关键基因

Table 4 Top 10 key genes in regulating PPI network

关键基因 Key gene	调控基因数 Regulatory gene number	调控基因 Regulatory gene
Cyp51	15	Hmgcs2、Hsd3b2、Insig1、Hsd3b3、Mvk、Por、Mvd、Fdps、Nsdhl、Idi、Hmgcs1、Fdft1、Sqle、Lss、Msmo1
Cyp2c40	13	Gstm3、Cyp4a14、Ugt2b1、Gsta2、Hsd3b5、Gstt2、Cyp4a10、Ugt2b38、Ugt1a9、Cyp4a32、Cyp4a12a、Cyp4a12b、Hsd3b3
Fdft1	12	Mvd、Sqle、Nsdhl、Msmo1、Mvk、Lss、Hmgcs2、Hsd3b2、Hsd3b3、Hmgcs1、Idi1、Fdps
Calr	10	Fcnb、Dnajb11、Manf、Sdf2l1、Hyou1、Pdia6、Pdia4、Hsp90b1、Pdia3、Hspa5
Fdps	10	Mvd、Rsad2、Sqle、Nsdhl、Msmo1、Mvk、Lss、Hmgcs2、Idi1、Hmgcs1
Hmgcs1	10	Mvd、Srebfl、Sqle、Nsdhl、Msmo1、Mvk、Lss、Insig1、Hmgcs2、Idi1
Creld2	9	Derl3、Hsp90b1、Sdf2l1、Gmppb、Hyou1、Pdia4、Hspa5、Dnajb11、Manf
Cyp26a1	9	Ugt2b1、Cyp4a32、Cyp4a12b、Cyp4a12a、Cyp2c40、Cyp4a10、Cyp4a14、Rarg、Retsat
Hsp90b1	9	Pcsk9、Manf、Sdf2l1、Thr2、Pdia3、Pdia6、Pdia4、Hyou1、Hspa5
Adh4	8	Gstm3、Ugt1a9、Gsta2、Ugt2b38、Aldh3a2、Ugt2b1、Retsat、Cyp26a1

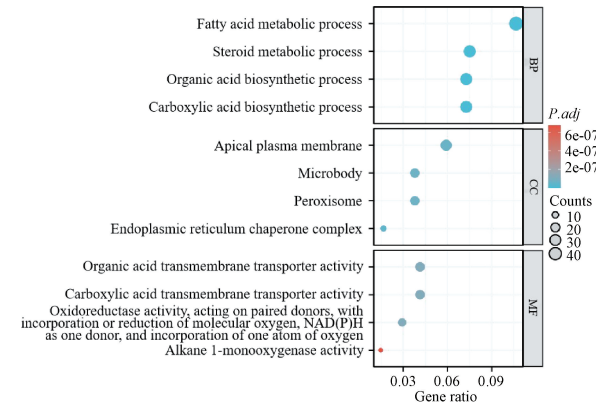


图 5 差异表达基因 GO 富集分析

Figure 5 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

2.7 差异表达基因的 KEGG 分析

与 WT 小鼠相比,HBV-Tg 小鼠的差异表达基因 KEGG 结果显示,共激活 21 条信号通路。排名前 10 位的包括:PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解、化学致癌-受体活化、药物代谢-其他酶、过氧化物酶体、胆汁分泌、TGF- β 信号通路、类固醇激素生物合成、药物代谢-细胞色素 P450 等通路(图 6)。

2.8 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

为进一步验证转录组测序差异基因的表达水平,将两组小鼠肝差异表达基因关键基因进行 RT-qPCR 验证。其中上调最显著的 10 个基因分别是 S100g、Ctrb1、Acot2、Muc3、Ehhadh、Cyp4a10、Dmbt1、Acot3、Cyp4a14、Acot1;下调最显著的 10 个

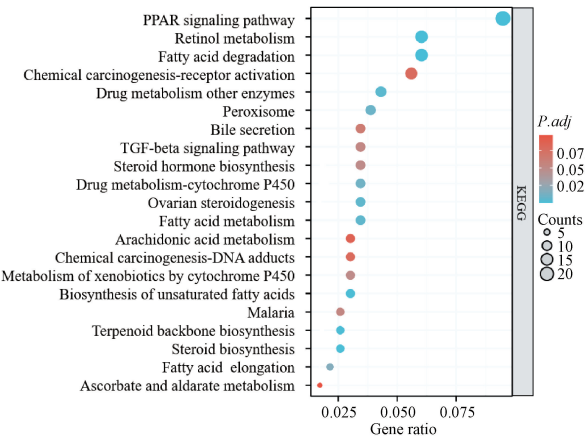


图 6 差异表达基因的 KEGG 分析

Figure 6 KEGG enrichment bubble map of differentially expressed genes

基因分别是 *Derl3*、*Cxcl1*、*9530077C05Rik*、*Mpo*、*Igdcc4*、*Ngp*、*Apol10b*、*S100a8*、*S100a9*、*Scn5a* (图 7)。

与 WT 小鼠相比,HBV-Tg 小鼠的 *Acot3*、*Muc3*、

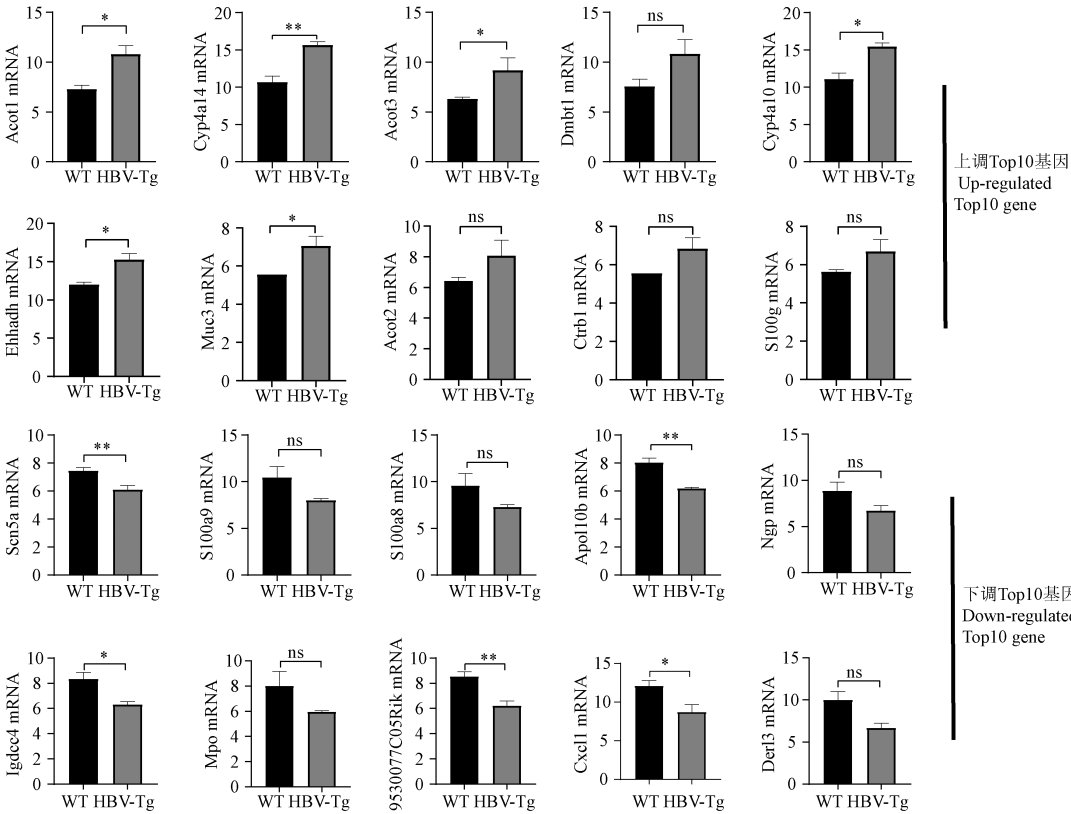


图 8 两组小鼠差异表达基因 RT-qPCR 分析

Figure 8 RT-qPCR analysis of differentially expressed genes in two groups of mice

Ehhadh、*Cyp4a10*、*Cyp4a14*、*Acot1* 基因 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$) ; *Cxcl1*、*9530077C05Rik*、*Igdcc4*、*Apol10b*、*Scn5a* 基因 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$) ,与转录组测序趋势一致(图 8)。

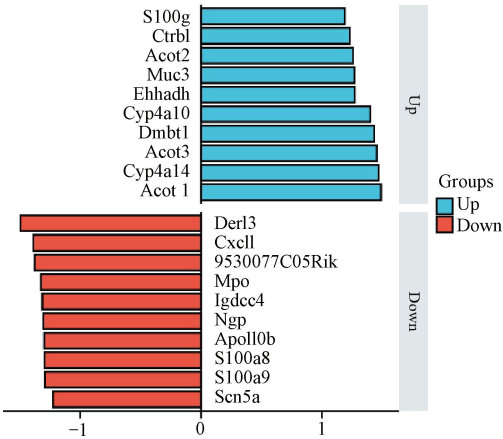


图 7 两组小鼠肝组织差异基因的表达水平

Figure 7 Expression levels of different genes in liver tissues of two groups of mice

3 讨论

目前常见的 CHB 动物模型有 HBV 转基因小

鼠^[19]、人源化嵌合肝小鼠模型^[20]、重组腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体介导的 HBV 感染小鼠模型^[21] 等。其中 HBV-Tg 小鼠可以持续高表

达 HBV 相关蛋白,产生病毒颗粒,价格低廉,随周龄的增加还可出现自发的肝组织损伤及纤维化^[6],在乙肝病毒相关机制研究及抗病毒治疗药物的疗效评价方面得到了广泛应用。本研究观察到 HBV-Tg 小鼠血清 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 水平及肝组织 HBsAg 及 HBcAg 的表达均呈阳性;肝组织 HE 染色显示均未见明显炎性细胞浸润;天狼猩红染色结果显示 HBV-Tg 小鼠有自发纤维化的趋势,与先前报道一致^[6,22]。

RNA-Seq 作为新一代的高通量测序技术,凭借测序成本低、精度高、覆盖范围广等优点^[23],已成为生物信息学分析前沿的研究方法。本研究采用 RNA-Seq 转录组测序筛选 HBV-Tg 小鼠与 WT 小鼠肝差异基因,共筛选出 1352 个特异性表达基因,其中表达上调基因数 703 个、下调基因数 649 个。差异基因中上调最明显前 6 位分别为 Cyp4a14、Cyp4a10、Acot1、Acot3、Ehhadh、Muc3,下调最明显前 5 位分别为 Scn5a、Apol10b、Igddc4、Cxcl1、9530077C05Rik。对排名靠前的差异基因采用 RT-qPCR 验证,各差异基因的改变与转录组测序结果一致。GO 和 KEGG 分析显示这些差异基因参与脂肪酸代谢、羧酸生物合成、有机酸生物合成等多个生物学过程,与内质网膜伴侣复合物、顶端质膜、过氧化物酶体等细胞组分相关;分子功能涉及氧化还原酶活性、羧酸跨膜转运蛋白活性、有机酸跨膜转运蛋白活性等;在 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解、药物代谢等通路显著富集。

CHB 患者的感染与乙型肝炎病毒量密切相关,而乙型肝炎病毒中以亚病毒颗粒为主,其形成需要消耗大量宿主来源的肝细胞脂质,从而导致肝的脂质代谢紊乱^[24]。本研究中 KEGG 分析提示 HBV-Tg 小鼠肝差异基因在 PPAR 信号通路富集最为显著。PPAR α 作为核受体家族中的配体激活受体,与配体结合并激活后,可通过调节脂肪酸合成酶、脂蛋白等的表达来改善脂质代谢。有研究发现,HBsAg 阳性的 CHB 患者发生非酒精性脂肪肝病风险更低^[25-26];而增强脂质代谢能够显著降低 HBsAg 水平^[27-28]。细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 enzymes, CYP) 4A10 与 4A14 的表达与脂肪酸的肝内氧化应激和脂质过氧化作用等密切相关^[29]。基辅酶 A 硫酯酶 1 (Acyl-CoA thioesterase 1, Acot1) 与 Acot3, 可以将脂肪酸酰基辅酶 A (fatty acid acyls-coAs) 水解成为游离脂肪酸 (free fatty acids) 和相应

的辅酶 A (coenzyme A, CoASH), 在脂肪酸的代谢中扮演者重要角色^[30]。此外, PPAR α 激活后还能抑制 NF- κ B 的活性从而降低炎症因子的水平,减轻肝的炎症反应^[31]。叶军等^[32]发现 miRNA-18a 可以激活 PPAR α / γ 信号通路,上调免疫功能相关细胞表面因子和细胞因子水平,改善 CHB 患者的免疫功能。视黄醇结合蛋白 (RBP) 分子主要由肝细胞的粗面内质网合成,可与视黄醇特异性结合后入血,在疾病早期反映肝的合成功能与分解代谢的变化^[33]。研究表明:CHB 同时伴发肝脂肪变性会加剧患者的肝纤维化^[34]。而天冬氨酰 β -羟化酶 (aspartate β -hydroxylase, ASPH) 可以通过 Cyp4a14/视黄醇代谢通路促进 HSC 活化从而促进肝纤维化的发生与发展^[35]。这些均提示脂质代谢在 CHB 的发生机制中占据重要地位,其可对乙型肝炎抗原的表达产生调控作用,为后续进一步研究 HBV 感染中脂类代谢的作用提供了重要的组学依据。

综上,本研究通过高通量测序技术发现的差异基因以及 KEGG 的通路,符合 CHB 的临床病理生理及转录基因水平的变化差异,尤其是涉及 CHB 的 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解等通路。因此,该模型具有一定的 CHB 相关研究借鉴价值和意义。

然而,本研究仍存在一定的局限性。首先,HBV-Tg 复合腹腔注射 CCl₄ 的乙肝背景肝纤维化小鼠模型可加速肝纤维化形成,提高模型的稳定性,更好地模拟疾病内在的生理病理状态,因此后续可开展该复合模型的转录组学进一步研究。其次,该研究局限在转录组学水平,蛋白组学、代谢组学、多因子检测等其他技术方法有待进一步补充和完善,可为该模型的分子机制提供多维度的验证。最后,这些差异表达基因的确切功能和临床 HBV 相关疾病中的作用也有待进一步深入研究,以期 CHB 治疗提供依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] 张力公, 史珂, 许庆宝. 恩替卡韦治疗肺结核伴乙型肝炎病毒感染的临床疗效 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2022, 32 (19): 95-97.
Zhang LG, Shi K, Xu QB. Clinical efficacy of entecavir in the treatment of pulmonary tuberculosis with hepatitis B virus infection [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 32 (19): 95-97.
- [2] 尤红, 王福生, 李太生, 等. 慢性乙型肝炎防治指南 (2022 年版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2023, 26 (3): 457-478.
You H, Wang FS, Li TS, et al. Guidelines for the prevention

- and treatment of chronic hepatitis B (version 2022) [J]. J Pract Hepatol, 2023, 26(3): 457-478.
- [3] Wang JH, Lee SB, Lee DS, et al. Total antioxidant capacity in HBV carriers, a promising biomarker for evaluating hepatic fibrosis: a pilot study [J]. Antioxidants, 2021, 10(1): 77.
- [4] 邢卉春. 影响慢性乙型肝炎病毒感染临床结局的宿主因素 [J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(7): 495-499.
- Xing HC. Host factors influencing the clinical outcome of chronic hepatitis B virus infection [J]. Chin J Hepatol, 2017, 25(7): 495-499.
- [5] Huang LR, Gäbel YA, Graf S, et al. Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice [J]. Gastroenterology, 2012, 142(7): 1447-1450.
- [6] 孙鑫, 黄恺, 赵志敏, 等. C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙型肝炎病毒转基因小鼠肝脏炎症与纤维化的病理特点 [J]. 肝脏, 2018, 23(1): 26-30.
- Sun X, Huang K, Zhao ZM, et al. Pathological features of liver inflammation and fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst [J]. Chin Hepatol, 2018, 23(1): 26-30.
- [7] Breschi A, Gingeras TR, Guigó R. Comparative transcriptomics in human and mouse [J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(7): 425-440.
- [8] Scheel J, von Brevern MC, Hörlein A, et al. Yellow pages to the transcriptome [J]. Pharmacogenomics, 2002, 3(6): 791-807.
- [9] Moore P. Mining the mouse [J]. Genome Biol, 2001, 2(1): spotlight-20010518-02.
- [10] 林兆宇, 高翔. 小鼠的遗传学研究 [J]. 生命科学, 2006, 18(5): 437-441.
- Lin ZY, Gao X. Genetic research of mouse [J]. Chin Bull Life Sci, 2006, 18(5): 437-441.
- [11] 立春雨. 利用腺相关病毒介导 CRISPR-Cas9 抑制 HBV 转基因小鼠体内乙型肝炎病毒复制的研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院; 2018.
- Sheng CY. Inhibition of HBV replication using AAV-delivered CRISPR-Cas9 *in vivo* [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences; 2018.
- [12] 杨炜峰, 苗振川, 宋希军, 等. HBV 感染的动物模型研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(5): 999-1005.
- Yang WF, Miao ZC, Song XJ, et al. Research advances in animal models of hepatitis B virus infection [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(5): 999-1005.
- [13] Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging [J]. Hepatology, 1994, 19(6): 1513-1520.
- [14] Chen M, Sällberg M, Hughes J, et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins [J]. J Virol, 2005, 79(5): 3016-3027.
- [15] Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112(1): 70-75.
- [16] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [17] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
- [18] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287.
- [19] Araki K, Miyazaki J, Hino O, et al. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(1): 207-211.
- [20] Du Y, Broering R, Li X, et al. *In vivo* mouse models for hepatitis B virus infection and their application [J]. Front Immunol, 2021, 12: 766534.
- [21] Yang D, Liu L, Zhu D, et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy [J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1): 71-78.
- [22] Jin Z, Sun R, Wei H, et al. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: involvement of natural killer T cells [J]. Hepatology, 2011, 53(1): 219-229.
- [23] Jiang Z, Zhou X, Li R, et al. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(18): 3425-3439.
- [24] Satoh O, Umeda M, Imai H, et al. Lipid composition of hepatitis B virus surface antigen particles and the particle-producing human hepatoma cell lines [J]. J Lipid Res, 1990, 31(7): 1293-1300.
- [25] Joo E, Chang Y, Yeom J, et al. Hepatitis B virus infection and decreased risk of nonalcoholic fatty liver disease: a cohort study [J]. Hepatology, 2017, 65(3): 828-835.
- [26] Chung TH, Kim M, Kim CS. Association between hepatitis B surface antigen seropositivity and metabolic syndrome [J]. Korean J Fam Med, 2014, 35(2): 81-89.
- [27] 荆沙, 马泽林, 赵超. 乙型肝炎病毒表面抗原对细胞脂质合成作用的研究 [J]. 微生物与感染, 2020, 15(6): 360-369.
- Jing S, Ma ZL, Zhao C. Transcriptomics analysis reveals the up regulation of lipid synthesis by HBsAg [J]. J Microbes Infect, 2020, 15(6): 360-369.
- [28] 刘钦. 脂肪酸代谢影响 HBV 清除的初步研究 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2016.
- Liu Q. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of medicine [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology; 2016.
- [29] 黎宏章. SREBP-1c、CYP4A10、CYP4A14 和 CYP2E1 mRNA 在非酒精性脂肪性肝病大鼠中的表达 [D]. 杭州: 浙江大学; 2005.
- Li HZ. The mRNA expression of SREBP-1c、CYP4A10、CYP4A14 and CYP2E1 in rat with nonalcoholic fatty liver disease [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2005.
- [30] Hunt MC, Alexson SE. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism [J]. Prog Lipid Res,

2002, 41(2): 99-130.

[31] Li Q, Sun J, Mohammadtursun N, et al. Curcumin inhibits cigarette smoke-induced inflammation via modulating the PPAR γ -NF- κ B signaling pathway [J]. Food Funct, 2019, 10(12): 7983-7994.

[32] 叶军, 韩山山, 卢昕奕, 等. microRNA-18a 通过 PPAR α 信号通路上调慢性乙型肝炎患者调节性免疫功能 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(5): 1024-1028.
Ye J, Han SS, Lu XY, et al. microRNA-18a upregulates the regulatory immune function in patients with chronic hepatitis B through the PPAR α signaling pathway [J]. J Clin Hepatol, 2020, 36(5): 1024-1028.

[33] 殷艳天, 王立蓉, 黄菁, 等. 慢性乙型肝炎重叠急性戊型肝炎患者视黄醇结合蛋白检测 [J]. 江苏医药, 2013, 39(11): 1282-1283.

Yin YT, Wang LR, Huang J, et al. Detection and clinical significance of retinol binding protein in patients with chronic hepatitis B combined with acute hepatitis E [J]. Jiangsu Med J, 2013, 39(11): 1282-1283.

[34] Yang M, Wei L. Impact of NAFLD on the outcome of patients with chronic hepatitis B in Asia [J]. Liver Int, 2022, 42(9): 1981-1990.

[35] 张汉. ASPH 促进肝纤维化发生发展的作用与机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学; 2018.
Zhang H. The role of aspartate B-hydroxylase on the development and progression of liver fibrosis [D]. Shanghai: Second Military Medical University; 2018.

[收稿日期] 2023-08-08

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

