

闫阮玉,吴洪雨,黄恺,等. 两种肝毒性化学物诱导的肝纤维化小鼠模型转录组学的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 32-45.

Yan RY, Wu HY, Huang K, et al. Comparative study of transcriptomics in two murine liver fibrosis models induced by hepatotoxic chemicals [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 32-45.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.004

两种肝毒性化学物诱导的肝纤维化小鼠模型 转录组学的比较研究

闫阮玉¹, 吴洪雨¹, 黄 恺², 孙 鑫², 薛静波¹, 陶艳艳¹, 刘成海^{1,2,3*}, 彭 渊^{1*}

(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 比较四氯化碳(CCl_4)和3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁(DDC)两种肝毒性化学物诱导的肝纤维化小鼠模型的转录组学差异,为使用肝纤维化小鼠模型的研究提供参考依据。**方法** 分别采用10% CCl_4 (2 mL/kg)腹腔注射和0.1% DDC 饮食喂养诱导小鼠肝纤维化模型。造模4周后,检测血清 ALT、AST、TBil 水平; HE 染色观察肝内炎症浸润情况;天狼猩红染色观察肝胶原沉积情况;Jamall's 法测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量; ELISA 检测肝组织上清 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量。提取小鼠总 RNA 进行测序(RNA-Seq),使用 R 软件分析 2 种肝纤维化模型的差异基因,并进行 GO 和 KEGG 富集分析,并验证差异显著的基因。**结果** 与正常小鼠相比, CCl_4 染毒小鼠和 DDC 饮食小鼠血清 ALT、AST、TBil 水平和肝组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量显著升高,血清 Alb 水平下降。病理染色提示 CCl_4 染毒小鼠肝组织结构破坏,中央静脉周围大量肝细胞玻璃样变及坏死;DDC 饮食小鼠肝内卟啉沉积,大量炎症细胞在汇管区和胆管周围浸润;两种模型小鼠肝内均有不同程度胶原沉积。通过筛选条件($|\log\text{FC}| > 2$ 倍且 $P < 0.05$)获得 CCl_4 染毒模型、DDC 饮食模型的差异基因分别为 1820、2373 个,其中上调基因分别为 1302、1978 个,下调基因分别为 518、395 个。GO 注释发现 2 种模型在分子功能(MF)、生物学过程(BP)、细胞成分(CC)等方面具有重要功能,KEGG 分析发现 CCl_4 染毒模型、DDC 饮食模型分别激活 22、29 条信号通路,其中细胞外基质受体的相互作用、细胞周期、蛋白的消化与吸收、焦点粘附、PI3K-Akt 等 16 条信号通路在 2 种模型中均显著富集($P < 0.05$)。聚类分析发现在 2 种模型中均明显下调基因包括 *Mup11*、*Mup15*、*Mup17*、*Mup1* 等,采用 RT-qPCR 得以证实($P < 0.05$)。**结论** 本研究报道了 CCl_4 染毒和 DDC 饮食两种肝纤维化模型的 RNA-Seq 转录组学特点并进行比较,观察基因表达的场所、基因表达所调节的通路等方面,为后续肝纤维化的发病机制和治疗研究的动物模型的选择提供参考依据。

【关键词】 肝纤维化;实验动物模型;四氯化碳;3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁;RNA 测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0032-14

Comparative study of transcriptomics in two murine liver fibrosis models induced by hepatotoxic chemicals

YAN Ruanyu¹, WU Hongyu¹, HUANG Kai², SUN Xin², XUE Jingbo¹, TAO Yanyan¹, LIU Chenghai^{1,2,3*}, PENG Yuan^{1*}

【基金项目】 国家自然科学基金(81874363, 82174057, 82274305, 82205052);曙光四明学者计划(SGXZ-201910);山西中医药大学科技创新团队项目(2022TD2003)。

【作者简介】 闫阮玉(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治肝病的基础与临床。E-mail:yu20220212@126.com

【通信作者】 刘成海(1965—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:慢性肝病的治疗学。E-mail:chenghailiu@hotmail.com

彭渊(1983—),女,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:中医药防治慢性肝病。E-mail:pengyuan1026@shutcm.edu.cn

* 共同通信作者

- (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)

[Abstract] Objective To assess transcriptomic differences between carbon tetrachloride (CCl₄)-induced and diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate (DDC) diet-induced mouse models of liver fibrosis to provide a framework for future research using mouse liver fibrosis models. **Methods** Mouse models of liver fibrosis were induced by a 10% CCl₄ (2 mL/kg) injection or a 0.1% DDC diet. After 4 weeks of induction, serum levels of ALT, AST, and TBil were measured. HE and Sirius red staining were used to observe hepatic inflammation and collagen deposition. Jamall's method was used to evaluate hydroxyproline (Hyp) content in liver tissues. Hepatic tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-6, and IL-1β were measured by ELISA. Total RNA was extracted from murine liver tissues for RNA-sequencing (RNA-seq). Differentially expressed genes of the two models were analyzed by R software and then GO and KEGG enrichment was performed. Then, genes with significant differences were verified. **Results** Compared with normal mice, serum levels of ALT, AST, and TBil and hepatic expression of TNF-α, IL-6, and IL-1β were significantly increased in mice that received CCl₄ and DDC, while the Alb serum level was decreased. Pathological staining showed that the structures of liver tissues were destroyed and a large number of hepatocytes around the central vein were hyalinized and necrotic in CCl₄-treated mice. In DDC diet-treated mice, a large amount of porphyrins had been deposited in the liver and a large number of inflammatory cells had infiltrated into the portal area and bile duct. Different degrees of collagen deposition were observed in the liver tissues of the two model mice. Different genes (DEGs) of CCl₄- and DDC diet-treated mice were screened using a filter (|logFC| > 2-fold and P < 0.05). As a result, 1820 and 2373 DEGs in CCl₄- and DDC diet-treated mice were analyzed, including 1302 and 1978 upregulated genes, and 518 and 395 downregulated genes, respectively. GO annotation showed that the two models had important functions in molecular function, biological process, and cell component. KEGG analysis showed that 22 and 29 signaling pathways were activated in CCl₄- and DDC diet-induced models, respectively. Among them, 16 signaling pathways, such as extracellular matrix receptor interaction, cell cycle, protein digestion and absorption, focal adhesion, and PI3K-Akt, were significantly enriched in the two models (P < 0.05). Cluster analysis showed that *Mup11*, *Mup15*, *Mup17*, and *Mup1* were significantly down-regulated in both models, which were identified by RT-qPCR (P < 0.05). **Conclusions** This study conducted a comparative analysis of the RNA-Seq transcriptomic features of liver fibrosis models induced by exposure to CCl₄ and a DDC diet. It examined the gene expression patterns and the pathways influenced by gene expression. The findings serve as a valuable resource for selecting appropriate animal models for future research on the pathogenesis and treatment of liver fibrosis.

[Keywords] liver fibrosis; experimental animal models; carbon tetrachloride; diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate; RNA-sequencing

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

肝纤维化是由于肝内弥漫性细胞外基质过度沉积引起的肝疾病^[1],目前常见的肝纤维化模型主要有毒性、胆汁和代谢诱导的肝纤维化模型,具有代表性的有四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)、硫代乙酰胺/胆管结扎、3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁(diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate, DDC)和高脂肪饮食诱发引起的^[2]。CCl₄模型是经典的肝毒素诱导的肝纤维化模型,主要表现为小叶中心肝细胞坏死,中央静脉周围纤维化;DDC模型是饮食诱导胆汁淤积的模型,主要变现为门静脉周围炎症、胆管增殖(也称为胆管反应)和胆汁性肝纤维化^[3]。本研究采用转录

组学基因测序的方法,比较两种模型血清肝功能、病理及肝组织差异基因的表达,以期为深入研究肝纤维化的发病机制和临床治疗提供模型的依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠,雄性,32 只,SPF 级,8 周龄,体重(23±2)g,购于维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。所有小鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心[SYXK(沪)2020-0009],自由饮水、饮食不受限,维持 12 h/12 h 光明/黑暗循环光照,室温 22~23 ℃。本实验经上海中医药大学

实验动物中心伦理委员会审查批准 (SZY201710014, SZY201804009), 并按实验动物使用 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DDC (批号: 102579026)、反式-4-羟基-L-脯氨酸 (Trans-4-Hydroxy-L-prolin, Hyp, 批号: 20230621) 购于 Sigma-Aldrich 公司; CCl_4 (批号: 20161116) 购于国药集团化学试剂有限公司; Mouse IL-6 Uncoated ELISA Kit (批号: 279559-008)、Mouse IL-1 beta (IL-1 β) Uncoated Elisa Kit (批号: 267273-010)、Mouse TNF alpha (TNF- α) Uncoated ELISA Kit (批号: 297764-002) 均购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。DP71 显微图像分析仪 (OLYMPUS, 日本); NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国); Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, 美国); Novaseq 6000 测序平台 (Illumina, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与小鼠模型制备

CCl_4 染毒模型: 16 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 适用性饲养 2 周后, 按体重分层随机分为 2 组: 正常对照组 1 (CCl_4 -N, $n=8$)、模型对照组 1 (CCl_4 -M, $n=8$)。 CCl_4 -M 组予腹腔注射 10% CCl_4 诱导肝纤维化模型, 剂量为 2 mL/kg^[4], 2 d 1 次, 每周连续 3 次, 共持续 4 周。 CCl_4 -N 组小鼠于相同时间点腹腔注射等体积橄榄油。

DDC 饮食模型: 16 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 适用性饲养 2 周后, 按体重分层随机分为 2 组: 正常对照组 2 (DDC-N, $n=8$)、模型对照组 2 (DDC-M, $n=8$)。 DDC-M 组予 0.1% DDC 饲料喂养^[5], DDC-N 组予不含 DDC 的普通饲料喂养, 共连续喂养 4 周。

1.3.2 样本采集

造模 4 周后, 各组小鼠按体重腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉, 剂量为 30 mg/kg。下腔静脉取血, 收集血清; 摘取肝、脾, 称重记录。留取约 0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm 大小肝组织, 10% 甲醛溶液固定。

1.3.3 血清肝功能检测

按试剂盒说明书操作检测小鼠血清 ALT、AST、TBil 及 Alb 水平。

1.3.4 肝组织 Hyp 含量检测

在冰水混合物上称取约湿肝 50 mg, 参照 Jamall 盐酸水解法^[6]检测肝组织 Hyp 含量, 结果以“ $\mu\text{g/g}$

肝组织”表示。

1.3.5 肝组织病理染色

取 1 cm×1 cm×0.3 cm 大小肝组织固定于 10% 中性甲醛溶液。固定 24 h 后, 梯度乙醇逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片。HE 染色观察肝组织炎症活动情况, 并根据 Scheuer 评分系统对炎症程度进行分级^[7]。天狼猩红染色观察肝组织胶原沉积情况, 采用 Ishak 评分系统对肝纤维化进行分期^[8]。

1.3.6 ELISA 检测

称取 50 mg 的肝组织置于含 0.5 mL RIPA 裂解液的离心管中, 置入组织匀浆机中裂解蛋白, 4℃ 以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集组织上清液。按试剂盒说明书检测肝组织上清 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量。

1.3.7 RNA 提取、文库构建和测序

采用 TRIzol 裂解液提取小鼠的总 RNA, 检测 RNA 纯度及分析 RNA 的完整性。质检合格后构建转录组文库, 并在 Illumina Novaseq 6000 测序平台对文库进行测序, 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, 去除低质量及冗余序列^[9]。

1.3.8 差异表达基因筛选

采用 R4.2.1 软件的“DESeq2 包”对原始 Counts 矩阵进行标准化处理及差异分析^[10], 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”绘制火山图、韦恩图和 UpSet 图^[11]。

1.3.9 蛋白质与蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 分析

采用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>, 更新至 2023 年 8 月 13 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, 获得差异表达基因的 PPI 网络图。

1.3.10 GO 和 KEGG 富集分析

利用 R4.2.1 软件的“org. Mm. eg. db 包”将差异基因 ($|\text{LogFC}| > 2$ 且 $p.\text{adj} < 0.05$) 转换成 EntrezID, 再通过“clusterProfiler[4.4.4]包”进行 GO 和 KEGG 富集分析, 显著性 cut-off 值设置为 $p.\text{adj} < 0.05$, 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^[12]。

1.3.11 关键基因的实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 验证

通过 RT-qPCR 检测关键基因的表达水平, 进一步验证转录序列数据的可靠性。提取 15 mg 肝组织的总 RNA, 逆转录为 cDNA 模板, 并参照说明书进行 PCR 扩增。根据各组的 Ct 值, 选用 *GAPDH* 作为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组样本 mRNA 的相对表达量。引物序列详见表 1。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示; 若符合正态分布时采用独立样本 *t* 检验分析; 若不符合正态分布时采用非参数检验。单有序分类资料采用 Ridit 分析;

以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种模型小鼠一般情况比较

正常小鼠皮毛有光泽, 活泼好动, 自由饮食饮水不受限。与正常小鼠相比, CCl₄ 染毒小鼠随着造模时间的延长, 出现体重下降、食欲减退、行动迟缓, 肝/体比与脾/体比明显增加 ($P<0.01$)。DDC 饮食的小鼠食量减退、反应迟缓、活动减少、皮毛无光泽, 小鼠脚掌及耳缘皮肤黄染明显, 肝指数显著增加 ($P<0.05$)。见表 2、表 3。

2.2 两种模型血清肝功能情况比较

经 CCl₄ 染毒或 DDC 饮食后, 小鼠血清 ALT、AST、TBil 水平均显著升高 ($P<0.01$), Alb 水平均明显降低 ($P<0.01$)。见表 4、表 5。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名 Gene name	上游引物序列 (5'→3') Upstream primer sequence (5'→3')	下游引物序列 (5'→3') Downstream primer sequence (5'→3')
<i>Mup15</i>	TGAAGATGCTGTGCTGCTGTG	GTCAGAGGCCAGGATAATAGTATGC
<i>Mup-ps16</i>	TGGCAGGTAGTAGCAAAGAAAGTG	AATCTCATTCATTCTCGGTCCACAC
<i>Mup12</i>	TGTGAGAAGCATGGAATCCTTAGAG	TGGAGGCAGCGATCTGTAGTGG
<i>Mup7</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCACGCGATTGGCATTGG
<i>Mup19</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCACGCGATTGGCATTGG
<i>Mup17</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GGAGGCAGCGATTGGCATTG
<i>Mup1</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCACGCGATTGGCATTGG
<i>Mup5</i>	TCGAGAACCAGATTGAGTTCAGAC	GGAGGCAGCGATTGGCATTG
<i>Mup11</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCACGCGATTGGCATTGG
<i>Hsd3b5</i>	AGCCAAGGTGACGGTACTGAG	GCAGCGGTGTGGATGATGAC
<i>Mup13</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCACGCGATTGGCATTGG
<i>Moxd1</i>	GCCTGCCAGTGAATGTGAGATG	ACACCAAAGGTTCTGCTTTATAGGG
<i>S100g</i>	CCGGACCAGCTCTCCAAGG	AACTTCTCCATCGCCATTCTTATCC
<i>Sprr1a</i>	GCCAGCCTAAGGTGCCAGAG	GTATGCTGATGGAGTGACAGTTGAG
<i>Gpnmf</i>	AGATGCCAGAAGGAAGATGCTAATG	CAGGTCAGATGTCAGTCCCAAATC
<i>Vmn2r3</i>	AACTGTTTCTCCACCACCAAAGC	CTCCAGCAAGTGACATAGTTGATCC
<i>Atf3</i>	GGAAGAGCTGAGATTCGCCATC	TCTGTTGTTGACGGTAACTGACTC
<i>Egr2</i>	CCTGAACTGGACCACCTCTACTC	GGCGGCGATAAGAATGCTGAAG
<i>Dmkn</i>	AACAGCGGCAACAGCAACAG	ACCACCCTTCCACCCTTCC
<i>Cyp2b9</i>	AGCGGAGTGTGAGGAGAGG	AAGACAATGGAGCAGATGATGTTGG
<i>Cdc25c</i>	TGACAACTGAACTTGCTGGACAG	ATCTCTTCTGCCTGGTCTTCTCC
<i>Tinag</i>	CACCTCTGATTGCTGTCTGATTAC	TCTGGGTCTGAAGGCTGTTGG
<i>Sle7a11</i>	GTTGCGTGTCTCCAGGTTATTCTAC	AGAGCATCACCATCGTCAGAGG
<i>Fmo3</i>	TGCCTTCTGTAAACGACATGATGG	GTCTGGATGGTGGTCTATTGC
<i>Cftr</i>	AATAGTCGTCTCGGCATTACAACC	GCTGTGCTGTATGAAGGAAGTAGG
<i>Aszl</i>	GGCTGCTGGAGGCGAGAG	GGTGTGCTAGTCTTTCTTAAATGTC
<i>Mmp12</i>	GGACAACTCAACTCTGGCAATAATG	CGCTTCATCCATCTTGACCTCTG
<i>Cla3a2</i>	GCAGAGACAGTACTTGGACTTAC	ATGTGAGCGGTAGCCAGGAG
<i>Fbn2</i>	TCTGAATGCTGCTGTGCTAATCC	GATGCCGATGCCACTGCTAC
<i>Gapdh</i>	GACTCCACTCAGGCAAAATTCAC	GACACCAGTAGACTCCAGCAGATAC

表 2 CCl₄ 染毒对小鼠肝/体比和脾/体比的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 2 Effect of CCl₄ toxicity on liver/body and spleen/body ratios in mice

组别 Groups	肝/体比/% Liver/body ratio	脾/体比/% Spleen/body ratio
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	4. 21±0. 08	3. 70±0. 35
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	5. 32±0. 08 **	6. 10±0. 35 **

注:与正常对照组 1 相比, ** P<0. 01。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0. 01.

表 3 DDC 饮食对小鼠肝、脾体比的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 3 Effect of DDC diet on liver/body and spleen/body ratios in mice

组别 Groups	肝/体比/% Liver/body ratio	脾/体比/% Spleen/body ratio
正常对照组 2 DDC-N group	3. 85±0. 26	4. 48±1. 44
模型对照组 2 DDC-M group	9. 01±0. 77 **	6. 14±0. 74 *

注:与正常对照组 2 相比, * P<0. 05, ** P<0. 01。
Note. Compared with DDC-N group, * P<0. 05, ** P<0. 01.

表 4 CCl₄ 染毒对小鼠血清肝功能的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 4 Effects of CCl₄ toxicity on serum liver function in mice

组别 Groups	丙氨酸氨基转移酶/(IU/L) ALT	天门冬氨基转移酶/(IU/L) AST	总胆红/(μmol/L) TBIL	白蛋白/(g/L) Alb
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	23. 94±1. 56	32. 56±3. 90	4. 02±0. 19	29. 95±0. 69
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	162. 49±2. 13 **	131. 45±6. 19 **	9. 55±0. 44 **	21. 90±0. 18 **

注:与正常对照组相比, ** P<0. 01。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0. 01.

表 5 DDC 喂养对小鼠血清肝功能的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 5 Effects of DDC diet on serum liver function in mice

组别 Groups	丙氨酸氨基转移酶/(IU/L) ALT	天门冬氨基转移酶/(IU/L) AST	总胆红/(μmol/L) TBIL	白蛋白/(g/L) Alb
正常对照组 2 DDC-N group	22. 92±6. 66	21. 54±8. 86	2. 65±0. 59	32. 56±0. 73
模型对照组 2 DDC-M group	153. 18±12. 20 **	118. 15±17. 02 **	11. 88±0. 90 **	26. 26±1. 61 **

注:与正常对照组 2 相比, ** P<0. 01。
Note. Compared with DDC-N group, ** P<0. 01.

2.3 两种模型肝组织 HE 和天狼猩红染色比较

正常小鼠肝组织肝小叶结构完整、肝窦清晰;肝细胞呈条索状排列整齐,在中央静脉周围呈放射状分布;汇管区无明显炎症细胞浸润,炎症分级均为 G0,纤维化分期均为 S0。CCl₄ 染毒小鼠肝板结构破坏,肝细胞排列紊乱呈气球样变,汇管区周围可见许多炎性细胞浸润,炎症分级主要以 G3 为主,纤维化分期主要以 S3 为主。DDC 喂养小鼠肝肝细胞排列紊乱,汇管区及胆管周围可见大量炎症细胞

浸润,炎症分级主要以 G3 为主,纤维化分期主要以 S2 为主。见图 1、表 6~表 9。

2.4 两种模型肝组织 Hyp 水平比较

经 CCl₄ 染毒或 DDC 饮食后,小鼠肝组织 Hyp 含量均显著升高(P<0. 01)。见表 10、表 11。

2.5 两种模型肝组织炎症因子水平比较

经 CCl₄ 染毒或 DDC 饮食后,小鼠肝组织炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量均显著升高(P<0. 01)。见表 12、表 13。

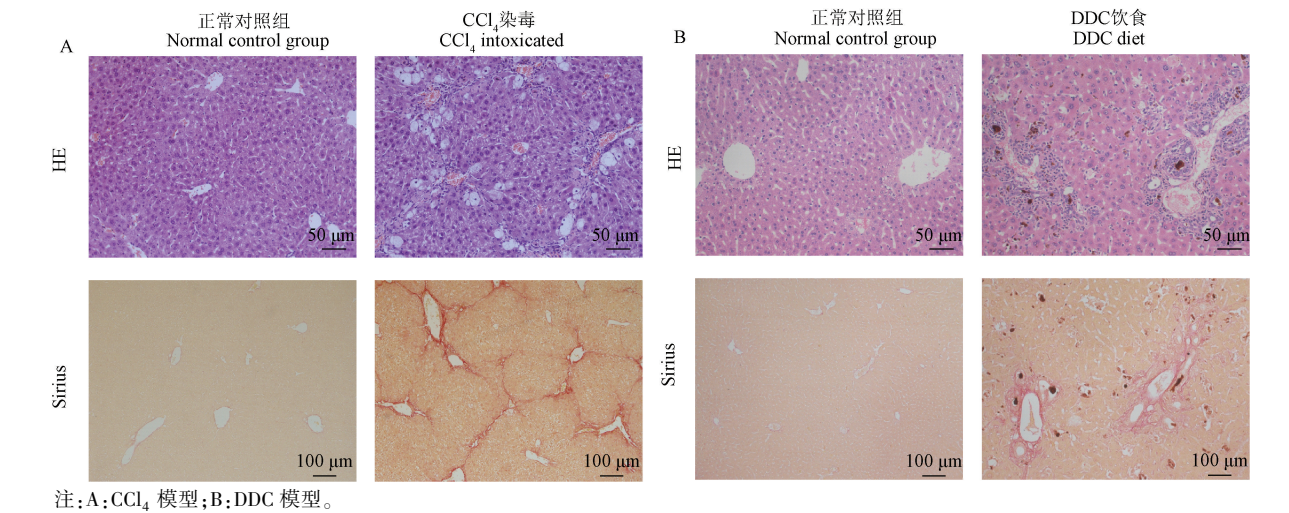


图 1 两种模型肝组织 HE 和天狼猩红染色情况

Note. A, CCl₄ model. B, DDC model.

Figure 1 HE and Sirius red staining of liver tissue in two models

表 6 CCl₄ 染毒对小鼠肝炎症分级的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effects of CCl₄ toxicity on the grades of liver inflammation in mice

组别 Groups	肝炎症分级 Grades of liver inflammation					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	R 值
	G0	G1	G2	G3	G4	R value
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	0	1	2	4	1	0.75 **

注: 与正常对照组 1 相比, ** P<0.01。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0.01.

表 7 CCl₄ 染毒对小鼠肝纤维化分期的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

Table 7 Effects of CCl₄ toxicity on the stages of liver fibrosis in mice

组别 Groups	肝纤维化分期 Stages of liver fibrosis					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 期	1 期	2 期	3 期	4 期	R 值
	S0	S1	S2	S3	S4	R value
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	0	0	3	5	0	0.75 **

注: 与正常对照组 1 相比, ** P<0.01。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0.01.

表 8 DDC 饮食对小鼠肝炎症分级的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

Table 8 Effects of DDC diet on the grading of liver inflammation in mice

组别 Groups	肝炎症分级 Grades of liver inflammation					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	R 值
	G0	G1	G2	G3	G4	R value
正常对照组 2 DDC-N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 2 DDC-M group	0	0	2	5	1	0.75 **

注: 与正常对照组 2 相比, ** P<0.01。
Note. Compared with DDC-N group, ** P<0.01.

表 9 DDC 饮食对小鼠肝纤维化分期的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Table 9 Effects of DDC diet on the staging of liver fibrosis in mice

组别 Groups	肝纤维化分期 Stages of liver fibrosis					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 期	1 期	2 期	3 期	4 期	R 值
	S0	S1	S2	S3	S4	R value
正常对照组 2 DDC-N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 2 DDC-M group	0	4	4	0	0	0.75**

注:与正常对照组 2 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with DDC-N group, ** $P<0.01$.

表 10 CCl₄ 染毒对小鼠肝组织 Hyp 水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Table 10 Effects of CCl₄ toxicity on Hyp levels in mouse liver tissue

组别 Groups	Hyp (μg/g 肝组织) Hyp (μg/g liver tissue)
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	45.10±6.29
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	202.37±54.32**

注:与正常对照组 1 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** $P<0.01$.

表 11 DDC 饮食对小鼠肝组织 Hyp 水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Table 11 Effects of DDC diet on Hyp levels in mouse liver tissue

组别 Groups	Hyp (μg/g 肝组织) Hyp (μg/g liver tissue)
正常对照组 2 DDC-N group	44.70±10.17
模型对照组 2 DDC-M group	149.94±7.69**

注:与正常对照组 2 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with DDC-N group, ** $P<0.01$.

表 12 CCl₄ 染毒对小鼠血清炎症因子水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)
Table 12 Effects of CCl₄ toxicity on serum inflammatory factor levels in mice

组别 Groups	白介素-1β IL-1β	肿瘤坏死因子-α TNF-α	白介素-6 IL-6
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	4.27±2.16	3.45±1.09	2.68±0.53
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	44.31±6.23**	12.28±2.25**	5.04±0.62**

注:与正常对照组 1 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** $P<0.01$.

表 13 DDC 饮食对小鼠血清炎症因子水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)
Table 13 Effects of DDC diet on serum inflammatory factor levels in mice

组别 Groups	白细胞介素-1β IL-1β	肿瘤坏死因子-α TNF-α	白介素-6 IL-6
正常对照组 2 DDC-N group	3.38±0.35	1.86±0.79	2.20±0.89
模型对照组 2 DDC-M group	1392.36±227.64**	350.66±123.90**	16.36±1.45**

注:与正常对照组 2 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with DDC-N group, ** $P<0.01$.

2.6 两种模型小鼠肝的差异表达基因

差异表达基因热图和火山图显示了两种模型小鼠肝差异基因的分布情况。与正常小鼠相比, CCl₄ 染毒小鼠肝组织 *S100g*、*Sprr1a*、*Gpnmb*、*Vmn2r3*、*Atf3*、*Egr2*、*Dmkn*、*Cyp2b9*、*Cdc25c*、*Bhlha15* 等 1302 个基因表达显著上调, *Mup15*、*Mup-ps16*、*Mup12*、*Mup7*、*Mup19*、*Mup17*、*Mup1*、*Mup5*、*Mup11*、*Hsd3b5* 等 518 个基因表达显著下调;DDC 饮食小鼠肝组织 *Sprr1a*、*Cacna1b*、*Tinag*、*Slc7a11*、*Fmo3*、*Cftr*、

Asz1、*Mmp12*、*Clca3a2*、*Fbn2* 等 1978 个基因表达显著上调, *Mup13*、*Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup19*、*Moxd1*、*Mup17*、*Mup12*、*Hsd3b5* 等 395 个基因表达显著下调。

将 CCl₄ 染毒模型的差异基因与 DDC 饮食模型的差异基因取交集,结果发现共有 1055 个交集基因,其中同时在 CCl₄ 染毒与 DDC 饮食小鼠肝组织上调基因有 880 个: *Sprr1a*、*Gpnmb*、*Atf3*、*Egr2*、*Cyp2b9*、*Cdc25c*、*Fosl1*、*Akr1c18*、*Tinag* 等;同时下调

基因有 103 个：*Mup7*、*Mup1*、*Mup16*、*Hsd3b5*、*Mup19*、*Mup17*、*Mup11*、*Mup14*、*Mup18* 等（图 2）。

进一步分析,仅在 CCl₄ 染毒模型中表达的差异基因有 792 个,其中上调基因有 415 个：*S100 g*、*Vmn2r3*、*Dmkn*、*Bhlha15*、*Areg* 等;下调基因有 377 个：*Irx1*、*Fitm1*、*Slc22a3*、*Vwa5b2*、*Dmrt2* 等;仅在 DDC 饮食模型中表达的差异基因有 1345 个,其中上调基因有 1060 个：*Cacna1b*、*Fmo3*、*Asz1*、*Krt20*、*Gjb3* 等;下调基因有 285 个：*Pitx3*、*Serpina9*、*Serpina1e*、*Trhde*、*Mup10* 等。

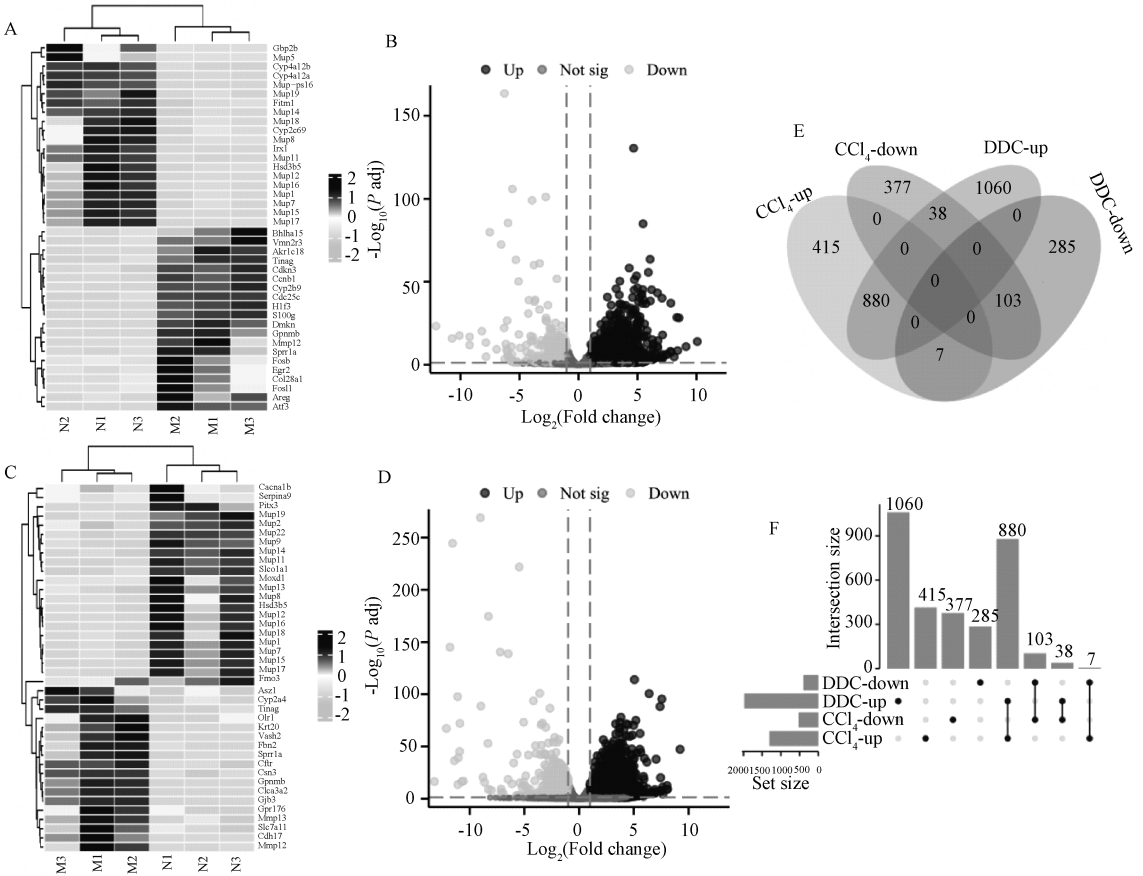
2.7 两种模型肝组织差异基因的 PPI 分析

通过 String 数据库构建差异两种模型肝组织差异基因的蛋白网络互作图,CCl₄ 染毒模型的差异基

因组成互作网络主要与 *Bublb*、*Kif11*、*Plk1*、*Cdk1*、*Cdc20*、*Cenpe*、*Bub1*、*Ccna2*、*Cdca8*、*Cenpf* 等蛋白相关,占据了其 PPI 网络的中心位置;DDC 饮食模型的差异基因组成互作网络主要与 *Bublb*、*Cdk1*、*Plk1*、*Cenpe*、*Ccna2*、*Cenpf*、*Bub1*、*Kif20a*、*Cdc20*、*Cdca8* 等蛋白相关,占据了其 PPI 网络的中心位置;将 CCl₄ 染毒模型的差异基因与 DDC 饮食模型的差异基因取交集,结果发现两者的交集基因组成的互作网络主要与 *Kif11*、*Bublb*、*Plk1*、*Cdk1*、*Cenpe*、*Bub1*、*Cdc20*、*Ccna2*、*Cdca8*、*Cenpf* 等蛋白相关,占据了其 PPI 网络的中心位置（图 3）。

2.8 两种模型肝组织差异表达基因的 GO 分析

CCl₄ 染毒模型中,小鼠肝差异表达基因在 1853

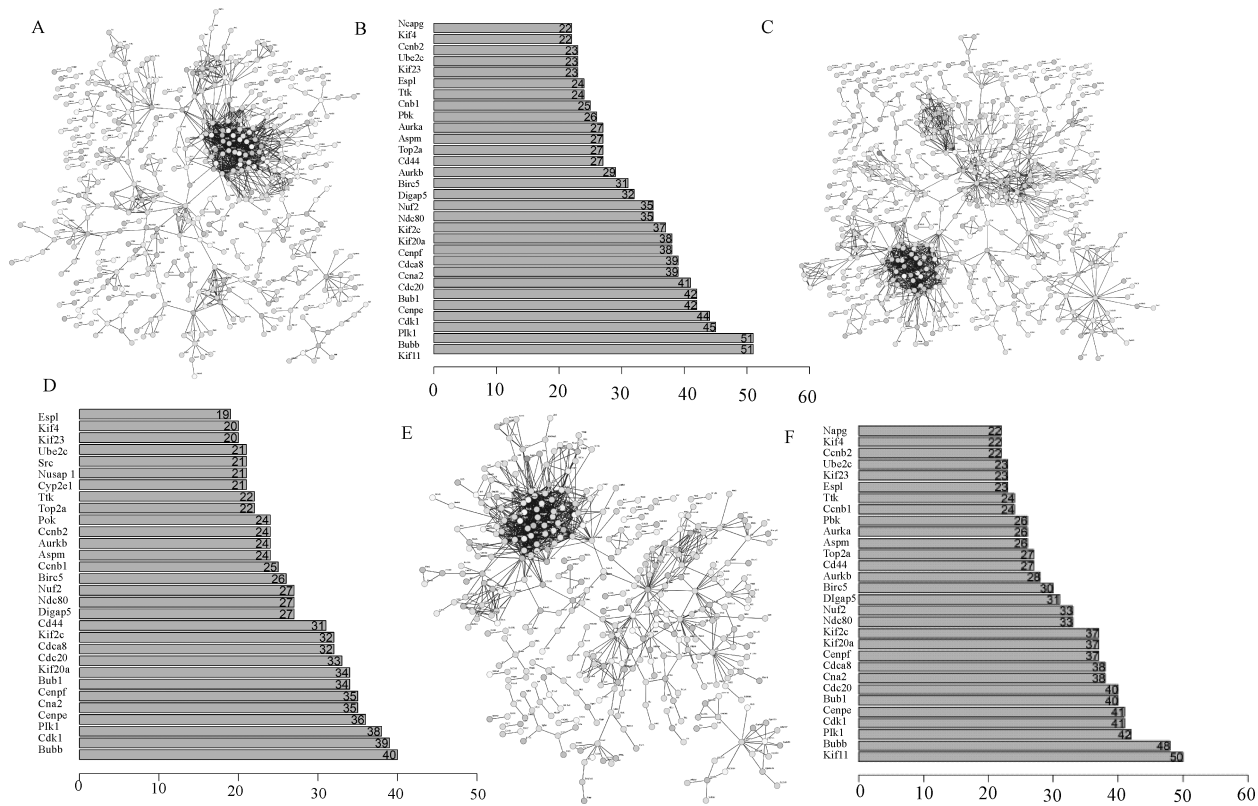


注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因热图;B:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因火山图;C:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因热图;D:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因火山图;E:CCl₄ 模型和 DDC 模型差异基因的韦恩图;F:CCl₄ 模型和 DDC 模型差异基因的 Upset 图。

图 2 两种模型肝组织差异基因比较情况

Note. A, Heat map for hepatic differential genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, Volcano map for hepatic differential genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. C, Heat map for hepatic differential genes between normal mice and DDC diet mice. D, Volcano map for hepatic differential genes between normal mice and DDC diet mice. E, Venn diagram for differential genes between CCl₄ and DDC models. F, Upset diagram for differential genes between CCl₄ and DDC models.

Figure 2 Comparisons of differential genes between two models in liver tissue



注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因 PPI 网络图;B:调控正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因 PPI 网络排名前 30 名关键基因;C:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 PPI 网络图;D:调控正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 PPI 网络排名前 30 名关键基因;E:CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因 PPI 网络图;F:调控 CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因 PPI 网络排名前 30 名关键基因。

图 3 两种模型肝组织差异基因的 PPI 网络图

Note. A, PPI network map of liver differential genes in normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, Top 30 genes in the PPI network that regulate the differential expression of liver genes in normal mice and CCl₄ toxicity mice. C, PPI network map of liver differential genes in normal mice and DDC diet mice. D, Top 30 genes in the PPI network that regulate the differential expression of liver genes in normal mice and DDC diet mice. E, PPI network map of liver differential genes in CCl₄ toxicity mice and DDC diet mice. F, Top 30 genes in the PPI network that regulate the differential expression of liver genes in CCl₄ toxicity mice and DDC diet mice.

Figure 3 PPI network for differential genes of the two models in liver tissue

个生物过程 (biological process, BP)、204 个细胞组分 (cell component, CC) 和 257 个分子功能 (molecular function, MF) 中富集。BP 包括染色体分离、减数分裂细胞周期、核分离、细胞器位置的建立、膜电位的调节等过程;CC 包括含胶原蛋白的细胞外基质、微管、谷氨酸能突出、浓缩染色体、离子通道复合物等组分;MF 包括细胞粘附分子结合、离子通道激活、细胞外基质结构组成、糖胺聚糖结合、GTP 酶调节器的激活等功能(图 4A)。

DDC 饮食模型中,小鼠肝差异表达基因在 2184 个 BP、180 个 CC 和 242 个 MF 中富集。BP 包括细胞粘附的正向调节、细胞外基质组织形成、细胞趋化、外界刺激正向调控、免疫系统的负向调节等过程;CC 包括包含胶原蛋白的外基质、微管、染色体区

域、基底膜、跨膜转运蛋白复合物等组分;MF 包括细胞粘附分子结合、肌动蛋白结合、微管蛋白结合、糖胺聚糖结合、G 蛋白偶联受体结合等功能(图 4B)。

CCl₄ 染毒模型的差异基因与 DDC 饮食模型的差异基因取交集,结果发现两者的交集基因在 1355 个 BP、128 个 CC 和 146 个 MF 中富集。BP 包括细胞外基质组织的形成、核分离、突触组织的形成、染色体分离调节、减数核分裂等过程(图 4C);CC 包括胶原蛋白的外基质、染色体着丝粒区、染色体区域、突触前、胶原蛋白三聚体等组分(图 4D);MF 包括细胞外基质结构组成、细胞粘附分子结合、细胞外基质结构的抗拉强度、糖胺聚糖结合、肝素结合等功能(图 4E)。

进一步分析两种模型的非交集基因在 BP、CC

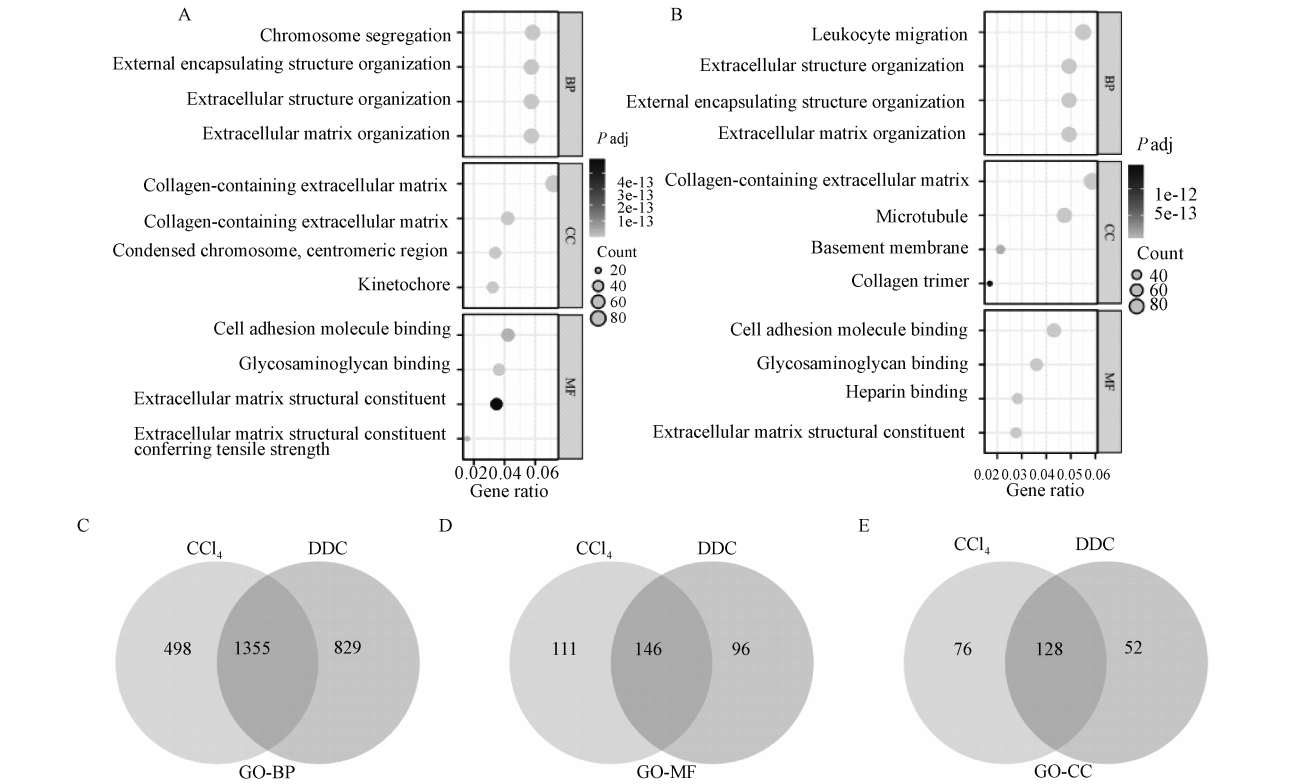
和 MF 中的富集情况,结果发现:仅在 CCl₄ 染毒模型表达的差异基因在 984 个 BP、151 个 CC 和 190 个 MF 中富集。BP 包括突触组织、认识、学习或者记忆等过程;CC 包括突触前、突触膜、神经元突触等过程;MF 被动跨膜转运体活性、通道活性、离子通道活性等过程。仅在 DDC 饮食模型表达的差异基因在 1421 个 BP、159 个 CC 和 234 个 MF 中富集。BP 包括突触认识、白细胞迁移、认识等过程;CC 包括突触前、受体复合体、突触膜等过程;MF 包括金属离子跨膜转运体活性、通道活性、门控通道活动等过程。

2.9 两种模型肝组织差异表达基因的 KEGG 分析

CCl₄ 染毒模型中,小鼠肝差异表达基因 KEGG 结果显示,共激活 22 条信号通路。排名前 5 位的信号通路包括:PI3K-Akt、MAPK、焦点粘附、细胞因子间相互作用、细胞周期等(图 5A)。DDC 饮食模型

中,小鼠肝差异表达基因 KEGG 结果显示,共激活 29 条信号通路,排名前 5 位的信号通路包括:细胞因子间相互作用、PI3K-Akt、焦点粘附、趋化因子、MAPK 等信号通路(图 5B)。将两种模型的 KEGG 通路取交集,共 16 条信号通路有交集,分别是细胞外基质受体的相互作用、细胞周期、蛋白的消化与吸收、焦点粘附、PI3K-Akt 等信号通路(图 5C)。

进一步分析两种模型的非交集基因在 KEGG 中的富集情况,结果发现:仅在 CCl₄ 染毒模型表达的差异基因在 19 个 KEGG 通路中富集,包括神经活性配体-受体相互作用、MAPK 信号通路、钙离子信号通路、cAMP 信号通路等。仅在 DDC 饮食模型表达的差异基因在 22 个 KEGG 通路中富集,包括细胞因子与细胞因子受体的相互作用、钙离子信号通路、Rap1 信号通路、趋化因子信号通路、PPAR 信号通路等。



注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠差异表达基因的 GO 分析图;B:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 GO 分析图;C:CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 GO 分析中 BP 的韦恩图;D:CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 GO 分析中 CC 的韦恩图 E:CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 GO 分析中 MF 的韦恩图。

图 4 两种模型肝组织差异表达基因的 GO 分析

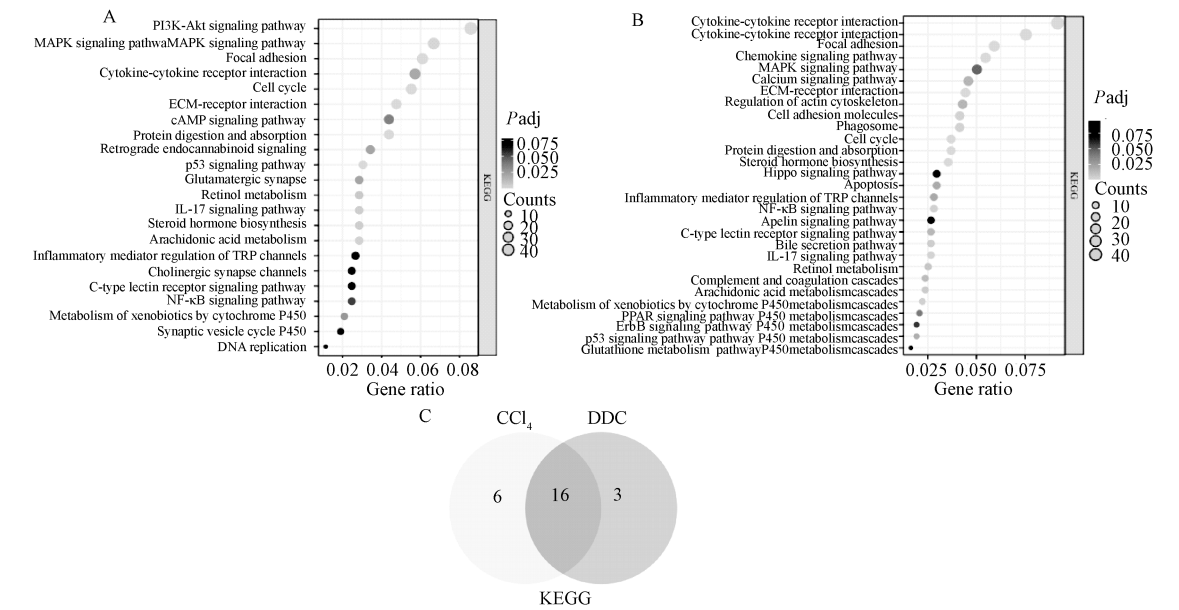
Note. A, GO analysis of differentially expressed genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, GO analysis of liver differential genes in normal mice and DDC diet mice. C, Venn diagram of BP in GO analysis of liver differential genes in CCl₄ and DDC models. D, Venn diagram of CC in GO analysis of liver differential genes in CCl₄ and DDC models. E, Venn diagram of MF in GO analysis of liver differential genes in CCl₄ and DDC models.

Figure 4 GO analysis of differentially expressed genes of the two models in liver tissues

2.10 两种模型肝组织差异表达基因的 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。在 CCl₄ 模型中,上调最显著的 top10 基因是*Bhlha15*、*Cdc25c*、*Cyp2b9*、*Dmkn*、*Egr2*、*Atf3*、

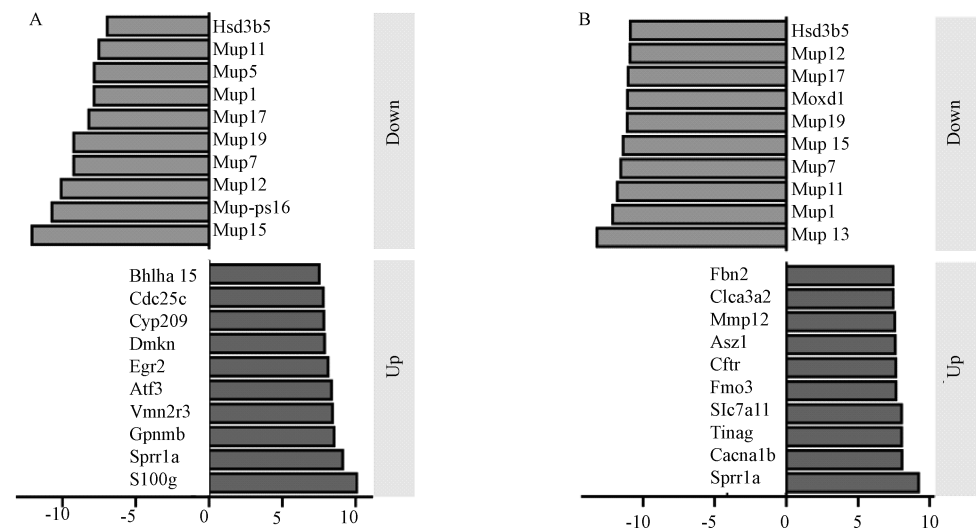


注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠差异表达基因的 KEGG 分析图;B:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 KEGG 分析图;C:CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 KEGG 分析的韦恩图。

图 5 两种模型肝组织差异表达基因的 KEGG 分析

Note. A, KEGG analysis of differentially expressed genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, KEGG analysis of liver differentially genes between normal mice and DDC diet mice. C, Venn diagram of KEGG analysis of liver differential genes between CCl₄ and DDC models.

Figure 5 KEGG analysis of differentially expressed genes of the two models in liver tissues



注:A:正常小鼠与 CCl₄ 染毒小鼠肝组织差异基因表达双向柱状图;B:正常小鼠与 DDC 染毒小鼠肝组织差异基因表达双向柱状图。

图 6 两种模型肝组织上调和下调差异基因的表达水平

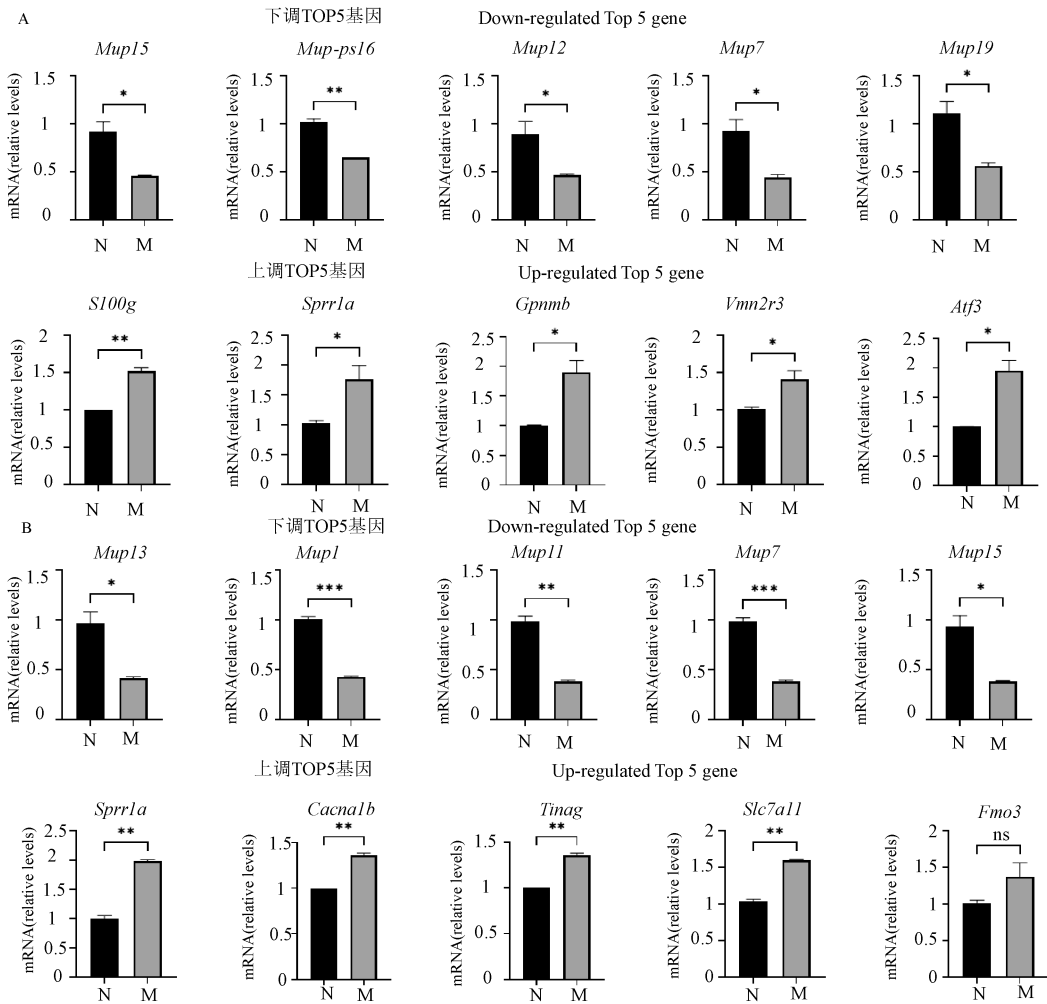
Note. A, Two-way histogram of differential genes expression between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, Two-way histogram of differential genes expression between normal mice and DDC diet mice.

Figure 6 Expression levels of liver up-regulated and down-regulated differentially expressed genes in two models

Vmn2r3、*Gpnmb*、*Sprr1a*、*S100 g*；下调最显著的 top10 基因是 *Hsd3b5*、*Mup11*、*Mup5*、*Mup17*、*Mup19*、*Mup7*、*Mup12*、*Mup-ps16*、*Mup15* (图 6A)。在 DDC 饮食模型中,上调最显著的 top10 基因是 *Sprr1a*、*Cacna1b*、*Tinag*、*Slc7a11*、*Fmo3*、*Cftr*、*Asz1*、*Mmp12*、*Clca3a2*、*Fbn2*；下调最显著的 top10 基因是 *Mup13*、*Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup19*、*Moxd1*、*Mup17*、*Mup12*、*Hsd3b5* (图 6B)。

与正常小鼠相比,CCl₄ 染毒小鼠的 *Bhlha15*、*Cdc25c*、*Cyp2b9*、*Dmkn*、*Egr2*、*Atf3*、*Vmn2r3*、*Gpnmb*、

Sprr1a、*S100 g* 基因 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$)；*Hsd3b5*、*Mup11*、*AMup5*、*Mup1*、*Mup17*、*Mup19*、*Mup7*、*Mup12*、*Mup-ps16*、*Mup15* 基因 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$)，与转录组测序趋势一致 (图 7A)。与正常小鼠相比,DDC 饮食小鼠的 *Sprr1a*、*Cacna1b*、*Tinag*、*Slc7a11*、*Fmo3*、*Cftr*、*Asz1*、*Mmp12*、*Clca3a2*、*Fbn2* 基因 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$)；*Mup13*、*Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup19*、*Moxd1*、*Mup17*、*Mup12*、*Hsd3b5* 基因 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$)，与转录组测序趋势一致 (图 7B)。



注:A;CCl₄ 染毒小鼠肝差异表达基因中下调 TOP 5 和上调 TOP 5 基因的 RT-qPCR 分析;B;DDC 饮食小鼠肝差异表达基因中下调 TOP 5 和上调 TOP 5 基因的 RT-qPCR。N:正常对照组;M:模型对照组。与模型对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 7 CCl₄ 染毒和 DDC 饮食模型小鼠肝差异表达基因 RT-qPCR 分析

Note. A, RT-qPCR analysis of liver down-regulated TOP 5 and up-regulated TOP 5 differentially expressed genes in CCl₄ toxicity mice. B, RT-qPCR analysis of liver down-regulated TOP 5 and up-regulated TOP 5 differentially expressed genes in DDC diet mice. N, Normal control group. M, Model control group. Compared with model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 7 RT-qPCR analysis of liver differentially expressed genes in CCl₄ toxicity and DDC diet mice

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝疾病共同的病理结局，常见病因包括病毒感染、酒精滥用、毒物接触、药品使用不当、遗传代谢性疾病、自身免疫性疾病等^[13]。

尽管不同病因导致肝纤维化的血清生化及肝组织病理学特点有所差异,但多有肝组织炎症细胞浸润和肝胶原沉积等共同表现。目前,肝纤维化的治疗仍存在难点,针对各种病因引起的肝纤维化的病理机制以及相关治疗药物筛选的研究仍存在巨大挑战。目前,针对肝纤维化的病理、药理研究仍较大幅度地依赖于与人类肝纤维化病理机制相似的实验动物模型的建立与应用。

动物模型是研究肝纤维化病理生理机制重要的工具。在肝纤维化的研究中可采用的模型种类较多,目前常见的肝纤维化模型主要有:化学物质诱导的模型(如乙醇、四氯化碳、硫代乙酰胺、二甲基亚硝胺和二乙基亚硝胺等)、饮食诱导模型(如蛋氨酸和胆碱缺乏饮食、高脂肪饮食、胆碱缺乏的 L-氨基酸限定的饮食、DDC 饮食等)、手术模型(如胆管结扎)、转基因模型(如多药耐药相关蛋白 2 缺陷小鼠)、感染模型(如肝炎病毒感染)等^[14]。尽管这些模型均可导致不同程度的肝炎症和纤维化,但制备模型使用的诱导剂和诱导途径等不同都会影响模型小鼠的病理生理过程。 CCl_4 诱导肝纤维化模型是经典的肝毒素诱导模型,其模型特点表现为肝细胞气球样变及坏死、库普弗细胞激活和炎症反应,导致多种细胞因子产生,促进 HSC 激活,从而促进肝纤维化^[15]。DDC 饮食诱导肝纤维化模型是饮食诱导胆汁淤积的模型,其模型特点表现为原卟啉在肝的积累,进而在导管内形成卟啉栓,阻塞小胆管,损害胆管上皮,从而导致门静脉周围炎症、胆管增殖(也称为胆管反应)和胆汁性肝纤维化^[16]。以上两种模型在肝纤维化病理和药理机制研究中广泛应用,本研究复制 CCl_4 染毒和 DDC 饮食两种肝毒性化合物诱导的肝纤维化小鼠模型,旨在观察 CCl_4 染毒和 DDC 饮食这两种不同的肝毒性化合物诱导的肝纤维化模型共性和差异性的病理生理机制,拟通过转录组测序进一步洞悉这两种模型细胞和组织学特异性的表达特征,以进一步了解肝纤维化模型的分子机制。

研究通过检测 CCl_4 和 DDC 两种模型的血清肝功能(ALT、AST、TBil、Alb)、肝组织炎症因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)、HE 病理染色评价肝炎症情况,通过检测肝组织 Hyp 含量及肝组织天狼猩红染色评价肝纤维化程度,发现这两种模型均可引起血清肝功能异常、肝炎症浸润和胶原沉积,与文献报道一致^[17]。但两种模型的病理表现有所差别: CCl_4 染毒

模型表现为小叶中心肝细胞坏死、细胞凋亡、中央静脉周围纤维化;DDC 饮食小鼠表现为门静脉周围炎症、胆管增殖(也称为胆管反应)和胆汁淤积性肝纤维化。

研究进一步使用生物信息学方法分析比较两种模型的转录组数据,探索这两种肝毒性化合物诱导肝纤维化模型关键基因构建的信号通路的共性和差异。结果发现, *Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup17*、*Mup12* 等基因在两种模型中均明显下调,且均在肝纤维化病理过程中参与了细胞因子-细胞因子受体相互作用、花生四烯酸代谢、类固醇激素生物合成、谷氨酸能突触、TRP 通道的炎症介质调节等与肝纤维化密切相关的通路及生物学过程。值得注意的是,这些共性作用基因均属于主要尿蛋白(major urinary protein, Mup)基因家族。Mup 由一个 ca. 35 基因家族编码,在几个分泌器官中以组织特异性方式表达,在肝、颌下、舌下腺、腮腺和泪腺以及皮肤皮脂腺中大量分布^[18-19]。Mups 与肝疾病密切相关,涉及肠道菌群调控^[20]、内质网应激反应^[21],并受到上皮-间质转分化重要蛋白锌指和同源盒 2 的调控^[22]。此外,在 CCl_4 和 DDC 两个肝纤维化模型中共同上调的基因主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、ECM-受体相互作用、细胞周期、蛋白质消化和吸收等环节。更值得注意的是, *Cldn15*、*Derl3*、*Hspa1b*、*Lrp2*、*Ltf* 等基因在 CCl_4 模型中上调,而在 DDC 模型中表现为下调; *Amer2*、*Aplp1*、*Bex2*、*Bsn*、*Camk2a* 等基因在 CCl_4 模型中下调,而在 DDC 模型中表现为上调,这提示同种基因在不同的生理病理状态下可能发挥不同的作用。

研究通过 PPI 网络分析还发现, CCl_4 染毒和 DDC 饮食模型共同的枢纽基因有 *Bub1*、*Plk1*、*Cdk1*、*Cenpe*、*Cdc20* 等基因,他们是肝纤维化 p53 信号通路、细胞周期环节调节中的关键基因。通过 GO 和 KEGG 富集分析发现,两者共有的 BP 涉及细胞外基质组织的形成、核分离、突触组织的形成、染色体分离调节等过程;MF 涉及细胞外基质结构组成、细胞粘附分子结合、细胞外基质结构的抗拉强度、糖胺聚糖结合、肝素结合等功能;CC 主要是胶原蛋白的外基质、染色体着丝粒区、染色体区域、突触前、胶原蛋白三聚体等组分;KEGG 主要是细胞外基质受体的相互作用、细胞周期、蛋白的消化与吸收、焦点粘附、PI3K-Akt 等信号通路,提示这两种模型均可用于研究上述通路与肝纤维化发病机制。而谷氨

酸能突触、逆行内源性大麻素信号传导、cAMP 信号通路、胆碱能突触、突触囊泡周期等通路特异性地 CCl₄ 模型富集;类固醇激素生物合成、吞噬体、细胞粘附分子、胆汁分泌、补体和凝血级联等通路特异性地在 DDC 饮食模型富集,这提示在研究 cAMP 信号通路通路与肝纤维化发病机制时,CCl₄ 模型可能是更好的选择;而在研究胆汁分泌通路与肝纤维化发病机制时,DDC 模型可能是更合适的模型。

本研究通过高通量测序技术发现 CCl₄ 染毒和 DDC 饮食两种模型的差异基因以及 KEGG 的通路,符合肝纤维化的临床病理生理及转录基因水平的变化差异。然而,本研究仍存在一定的局限性。首先,小鼠和人类存在种属差异,小鼠测序所得差异基因并不能完美地模仿人类肝纤维化的疾病表达谱。其次,该研究局限于转录组学水平上的观察,缺乏蛋白组学、代谢组学等其他技术方法评价,为该模型的分子机制提供多维度的验证。最后,通过 RNA-Seq 检查获得的差异表达基因的确切功能和临床肝纤维化相关疾病中的作用也有待进一步深入研究,以期为肝纤维化的防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151–166.
- [2] FRIEDMAN S L, PINZANI M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future [J]. Hepatology, 2022, 75(2): 473–488.
- [3] RAVICHANDRA A, SCHWABE R F. Mouse models of liver fibrosis [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2299: 339–356.
- [4] RADAIEVA S, SUN R, JARUGA B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners [J]. Gastroenterology, 2006, 130(2): 435–452.
- [5] MARONI L, AGOSTINELLI L, SACCOMANNO S, et al. Nlrp3 activation induces il-18 synthesis and affects the epithelial barrier function in reactive cholangiocytes [J]. Am J Pathol, 2017, 187(2): 366–376.
- [6] JAMALL I S, FINELLI V N, QUE HEE S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112(1): 70–75.
- [7] DESMET V J, GERBER M, HOOFNAGLE J H, et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging [J]. Hepatology, 1994, 19(6): 1513–1520.
- [8] ISHAK K, BAPTISTA A, BIANCHI L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis [J]. J Hepatol, 1995,

- 22(6): 696–699.
- [9] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884–i890.
- [10] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [11] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139–140.
- [12] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284–287.
- [13] BAO Y L, WANG L, PAN H T, et al. Animal and organoid models of liver fibrosis [J]. Front Physiol, 2021, 12: 666138.
- [14] YANGUAS S C, COGLIATI B, WILLEBRORDS J, et al. Experimental models of liver fibrosis [J]. Arch Toxicol, 2016, 90(5): 1025–1048.
- [15] GAO J, WEI B, DE ASSUNCAO T M, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis [J]. J Hepatol, 2020, 73(5): 1144–1154.
- [16] LUA I, LI Y, ZAGORY J A, et al. Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers [J]. J Hepatol, 2016, 64(5): 1137–1146.
- [17] XU L M, LIU P. Hepatology Committee of Chinese Association of Integrative Medicine C. Guidelines for diagnosis and treatment of hepatic fibrosis with integrated traditional Chinese and Western medicine (2019 edition) [J]. J Integr Med, 2020, 18(3): 203–213.
- [18] SHI Y, RODRIGUEZ M, SHAHAN K, et al. Subfamily of submaxillary gland-specific Mup genes: chromosomal linkage and sequence comparison with liver-specific Mup genes [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(15): 6191–6203.
- [19] SHAW P H, HELD W A, HASTIE N D. The gene family for major urinary proteins: expression in several secretory tissues of the mouse [J]. Cell, 1983, 32(3): 755–761.
- [20] TUNG Y T, CHEN Y J, CHUANG H L, et al. Characterization of the serum and liver proteomes in gut-microbiota-lacking mice [J]. Int J Med Sci, 2017, 14(3): 257–267.
- [21] GAO R, WANG H, LI T, et al. Secreted MUP1 that reduced under ER stress attenuates ER stress induced insulin resistance through suppressing protein synthesis in hepatocytes [J]. Pharmacol Res, 2023, 187: 106585.
- [22] JIANG J, CREASY K T, PURNELL J, et al. Zfx2 (zinc fingers and homeoboxes 2) regulates major urinary protein gene expression in the mouse liver [J]. J Biol Chem, 2017, 292(16): 6765–6774.