DOI:10.16016/j.2097-0927.202303158

基于转录组测序对胆汁酸诱导肝细胞反应的 Hub 基因的筛选及验证

张孟妮[1,2],张晓珣[2],欧阳佳凤[2],柴 进[2],吴晓玲[1,3] 610031 成都,西南交通大学医学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院消化内科,胆汁淤积肝病中心和代谢性肝病中心[2];610083 成都,西部战区总医院消化内科[3]

[**摘要**] **目的** 通过转录组测序分析结合型胆汁酸诱导肝细胞的基因表达情况,筛选和验证结合型胆汁酸诱导肝细胞代谢的 Hub 基因。**方法** 使用牛磺胆酸(taurocholate acid,TCA)处理野生型小鼠的原代肝细胞,转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)检测经 TCA 诱导后肝细胞的基因表达情况,将 Fold Change≥1.5 且 $P<0.05$ 作为筛选标准获取差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)并进行生物信息学分析。使用 STRING(search tool for the retrieval of interesting genes)数据库建立 DEGs 的蛋白质-蛋白质互作网络(protein-protein interaction,PPI),基于 PPI 网络利用 Cytoscape 软件找寻 Hub 基因。利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)在体内外水平对目标 Hub 基因进行验证,使用蛋白质免疫印迹试验检测肝细胞内 PSAT1/AKT/GSK3β 信号通路相关蛋白的表达,使用糖原检测试剂盒检测肝细胞和肝组织糖原水平。**结果** TCA 处理小鼠原代肝细胞共有差异基因 293 个,其中上调基因 122 个,下调基因 171 个。基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析、京都基因与基因百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析及基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)的结果显示,DEGs 主要富集在代谢、炎症、肿瘤等通路。使用 Cytohubba 插件得到 16 个 Hub 基因,包括 *Ccnd*1、*Ppara*、*Irs*1、*Ccl*2、*Ddit*3、*Serpine*1、*Nr*0*b*2、*Atf*3、*Phgdh*、*Trib*3、*Lepr*、*G*6*pc*、*Psat*1、*Cxcl*2、*Asns*、*Fgf*21。RT-qPCR 检测结果显示,多种结合型胆汁酸包括 TCA、甘氨鹅去氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)、甘氨胆酸(glycocholic acid hydrate, GCA)均能诱导小鼠原代肝细胞内 *Psat*1 mRNA 表达水平增高($P<0.05$)。此外,胆管结扎(bile duct ligation, BDL)胆汁淤积小鼠肝脏中的 *Psat*1 mRNA 水平增高($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示,TCA 能够诱导肝细胞内 *Psat*1 表达及激活 AKT/GSK3β 信号通路。TCA 能够诱导小鼠原代肝细胞糖原合成增加,与 BDL 小鼠模型肝组织糖原合成增加以及血糖水平降低的结果一致($P<0.05$)。**结论** *Psat*1 可能是胆汁酸影响肝细胞糖代谢的相关基因,其高水平表达可能与肝细胞糖代谢的改变有关。

[**关键词**] 胆汁淤积;糖代谢;小鼠原代肝细胞;转录组测序
[**中图法分类号**] R322.47; R394-33; R394.3 [**文献标志码**] A

Screening and validation of Hub genes in bile acid-induced hepatocyte response based on transcriptome sequencing

ZHANG Mengni[1,2], ZHANG Xiaoxun[2], OUYANG Jiafeng[2], CHAI Jin[2], WU Xiaoling[1,3] [1]College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan Province, 610031; [2]Department of Gastroenterology, Cholestatic Liver Diseases Center and Center for Metabolic Associated Fatty Liver Disease, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Department of Gastroenterology, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China

[**Abstract**] **Objective** To screen and verify the Hub genes involved in conjugated bile acid-induced hepatocyte metabolism through transcriptome sequencing analysis. **Methods** Primary mouse hepatocytes were

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(82000545);国家自然科学基金面上项目(81770583)
[**通信作者**] 吴晓玲,E-mail:wxllady@163.com
柴 进,E-mail:jin.chai@cldcsw.org

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

treated with taurocholic acid (TCA), and the gene expression of TCA-induced hepatocytes was detected by RNA-Seq analysis. Differential expression genes (DEGs) were identified using a fold change ≥1.5 and *P* value<0.05 as the screening criteria. The protein-protein interaction (PPI) network of DEGs was constructed using the STRING database, and Hub genes were screened using Cytoscape software based on the PPI network. Real-time qPCR was used to validate the identified Hub gene *in vitro* and *in vivo*. Western blotting was employed to detect the expression of proteins related to PSAT1/AKT/GSK3β signaling pathway. The glycogen level in the hepatocytes and liver tissues were detected using glycogen detection kit. **Results** RNA-Seq analysis identified 293 DEGs in primary mouse hepatocytes upon TCA treatment, including 122 up-regulated genes and 171 down-regulated genes. Gene Ontology (GO) analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) revealed that these DEGs were mainly enriched in metabolism, inflammatory and tumorigenic pathways. Cytohubba plugin identified 16 Hub genes, including *Ccnd*1, *Ppara*, *Irs*1, *Ccl*2, *Ddit*3, *Serpine*1, *Nr*0*b*2, *Atf*3, *Phgdh*, *Trib*3, *Lepr*, *G*6*pc*, *Psat*1, *Cxcl*2, *Asns*, *and Fgf*21. RT-qPCR results demonstrated that various conjugated bile acids, glycocholic acid (GCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), and TCA can induce a significant increase in *Psat*1 mRNA level in primary mouse hepatocytes (*P*<0.05). *In vivo* experiments also showed that the mRNA level of *Psat*1 was increased significantly in the liver tissues of mouse cholestatic model induced by bile duct ligation (BDL) when compared to the control group (*P*<0.05). Western blotting indicated that TCA treatment induced the expression of *Psat*1 and activation of AKT/GSK3β signaling pathway in primary mouse hepatocytes. TCA treatment also resulted in an increase in glycogen synthesis in primary mouse hepatocytes, which was consistent with an increase in glycogen synthesis in the liver tissue and a decrease in blood glucose level in the mouse model established with BDL (*P*<0.05). **Conclusion** *Psat*1 may be a gene involved in alteration of glucose metabolism induced by bile acid, and its high expression may be associated with these changes in glucose metabolism in hepatocytes.

[**Key words**] cholestasis; glucose metabolism; primary mouse hepatocytes; RNA-sequencing

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82000545) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81770583). Corresponding author: WU Xiaoling, E-mail: wxllady@163.com; CHAI Jin, E-mail: jin.chai@cldcsw.org

胆汁淤积是以肝脏中胆汁酸(bile acid, BAs)过度积累,肝脏和血清中 BAs 水平升高从而导致肝细胞、胆道损伤为病理特征的临床综合征。随着疾病的发展,可能进展为肝硬化及肝癌[1]。过度累积的 BAs 不仅可以引起炎症反应,造成肝损伤[2-3],还能作为一种重要的信号分子,调控葡萄糖、氨基酸和能量代谢,在胆汁淤积疾病发展中发挥重要作用。在胆汁淤积的进程中常伴随糖代谢紊乱。一方面,胆汁酸信号途径可以改善胰岛素抵抗:对 2 型糖尿病患者施用胆汁酸螯合剂,可以使与胆汁酸谱及与其信号通路相关的血糖反应得到显著改善[4];另一方面,随着胆汁淤积性肝病的发展,肝细胞受损,肝脏合成糖原能力下降及肝糖原输出减低,胆汁淤积患者最终会形成以空腹血糖降低,餐后血糖升高为特征的糖代谢紊乱[5];高血糖和高胰岛素水平又会活化肝星状细胞,上调最关键的纤维原性基因——结缔组织生长因子的表达,从而引起肝纤维化[6],促进疾病发展。因此,糖代谢在胆汁淤积疾病发展中十分重要。

转录组测序(RNA sequencing,RNA-seq)技术能够捕捉组织或细胞转录组的变化,由此获得特定处理条件下组织或细胞基因的表达差异信息,并能够进一步将差异表达显著的基因与生物学功能联系起来,揭示可能的分子调控机制[7]。因此,本研究使用牛磺胆酸(taurocholate acid,TCA)处理小鼠原代肝细胞作为胆汁淤积细胞模型,通过转录组测序分析结合型胆汁酸诱导肝细胞的基因表达情况,筛选和验证结合型胆汁酸诱导肝细胞糖代谢相关的 Hub 基因,为进一步探讨胆汁淤积病程中胆汁酸影响肝细胞糖代谢的可能基因提供新的思路和线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物购自陆军军医大学(第三军医大学)实验动物中心,为 8 周雄性 C57BL/6J 野生型小鼠,平均体质量为 25 g。实验方案获得陆军军医大学(第三军医大学)实验动物福利和伦理委员会批准,批准编号:

AMUWEC20212056。

1.2 试剂及仪器

William E 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(trypsin)购自美国 Gibco 公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;6 孔细胞培养板购自美国 Costar 公司;*Psat*1 引物构建自北京擎科生物科技股份有限公司;DMSO 购自北京索莱宝科技股份有限公司,胆汁酸购自美国 Sigma 公司。

1.3 胆汁淤积小鼠模型

手术结扎 C57BL/6J 小鼠胆总管,7 d 后处死小鼠并取材血液、肝组织。血糖含量检测由陆军军医大学第一附属医院检验科进行。肝脏用生理盐水灌流后存于液氮备用。

1.4 小鼠原代肝细胞的分离与培养

麻醉小鼠后穿刺门静脉,然后将下腔静脉剪断,使用 DMEM 培养基灌注去除肝内血液,灌注胶原酶Ⅱ,消化肝脏至软塌,研磨、过滤后[1]将肝细胞悬液 4 ℃ 500 r/min 离心 1 min 后弃上清,使用 5% William E 培养基将其吹打混匀后铺至 6 孔板内,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱孵育,待细胞贴壁后分为处理组和对照组,处理组分别使用 100 μmol/L TCA、甘氨胆酸(glycocholic acid hydrate, GCA)、甘氨鹅去氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)刺激,对照组加入同等体积的 DMSO,每种处理均设置 3 个生物学重复,12 h 后提取总 RNA。

1.5 小鼠原代肝细胞转录组测序

将对照组及 TCA 处理的原代肝细胞总 RNA 作为 mRNA 的建库起始样品送至北京擎科生物科技股份有限公司,进行样品质检、文库构建、原始数据测序、数据过滤、与参考基因组对比、对已知基因和新基因进行定量分析、并对筛选出的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行关于基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析、京都基因与基因百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析、基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)、构建 STRING 数据库、蛋白质-蛋白质互作网络(protein-protein interaction, PPI)、Cytoscape 软件筛选 Hub 基因等进一步的挖掘分析。

1.6 实时定量荧光 PCR

总 RNA 的提取、逆转录、RT-qPCR 步骤分别参考 TRIzol 试剂盒、TaKaRa 试剂盒和 TB Green® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ试剂盒。SYBR Green qPCR 体系(10 μL):正、反向引物各 0.5 μL、SYBR premix Ex *Taq*™(2×) 5 μL、RNase Freed H_2O 2 μL、样品 cDNA 2 μL。反应条件设置如下:95 ℃ 1.5 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;65 ℃ 2 s。引物信息如下:*Psat*1 正向引物 5′-AAGCCACCAAGCAAGTGGTTA-3′,反向引物 5′-GATGCCGAGTCCTCTGTAGTC-3′;*β-actin* 正向引物 5′-ACCTTCTACAATGAGCTGCG-3′,反向引物 5′-CCTGGATAGCAACGTACATGG-3′。

1.7 蛋白质免疫印迹试验

使用含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂(Roche 公司)的 RIPA 裂解液提取小鼠原代肝细胞总蛋白,采用 SDS-PAGE 技术分离蛋白,转膜后封闭,孵育一、二抗后显影曝光。数据采用 Image J 软件进行分析。孵育一抗及其浓度如下:PSAT1(1∶10 000, proteintech, 10501-1-AP)、p-AKT(1∶1 000, Bioworld, BS4006)、AKT(1∶1 000, Bioworld, BS1007)、p-GSK3β(1∶2 000, Cell Signaling, 9322)、GSK3β(1∶2 000, Cell Signaling, #12456P)、GAPDH(1∶5 000, Proteintech, 10494-1-AP)。

1.8 糖原含量检测

糖原含量检测步骤参考说明书(索莱宝 BC0345)进行:收集细胞沉淀,称取组织样本,加入 0.75 mL 提取液(细胞沉淀需超声波破碎),置于沸水浴中煮沸 20 min。取出试管冷却后,用蒸馏水定容、混匀,8 000×*g* 25 ℃离心 10 min,取上清液待测。

1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.4.0 分析数据并作图,各组间的比较采用独立样本 *t* 检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组测序检测 TCA 诱导原代肝细胞的基因表达变化

2.1.1 转录组测序质量评估、DEGs 的筛选 体外细胞模型中,RNA-Seq 检测了 TCA 组和对照组(CTR)基因表达情况,测序质量控制显示 Q30 碱基百分比在 94.12%以上,CTR 和 TCA 处理组 98.09%~98.72%的质控后读数(Clean Reads)可成功比对到指定参考基因组,见表 1。

使用 R 语言 ggplot2 包对数据集进行可视化主成分分析(principal component analysis, PCA)如图 1A,TCA 处理组与对照组间可见明显的群体偏差聚类,表明 TCA 处理显著改变了小鼠原代肝细胞的基因表达谱,分析结果可信度高;使用 DEseq2 方法分析 TCA 处理组与对照组小鼠原代肝细胞的 DEGs,对比转录表达谱,将 Fold Change≥1.5 且 $P<0.05$ 作为筛选标准得到 DEGs,与对照组相比,TCA 组显著性 DEGs 数目共 293 个,其中 122 个上调,171 个下调;使用 R 语言 ggolot2 包绘制火山图,见图 1B;使用 R 语言 pheatmap 包绘制热图,直观地展示了两组间差异基因的上调和下调以

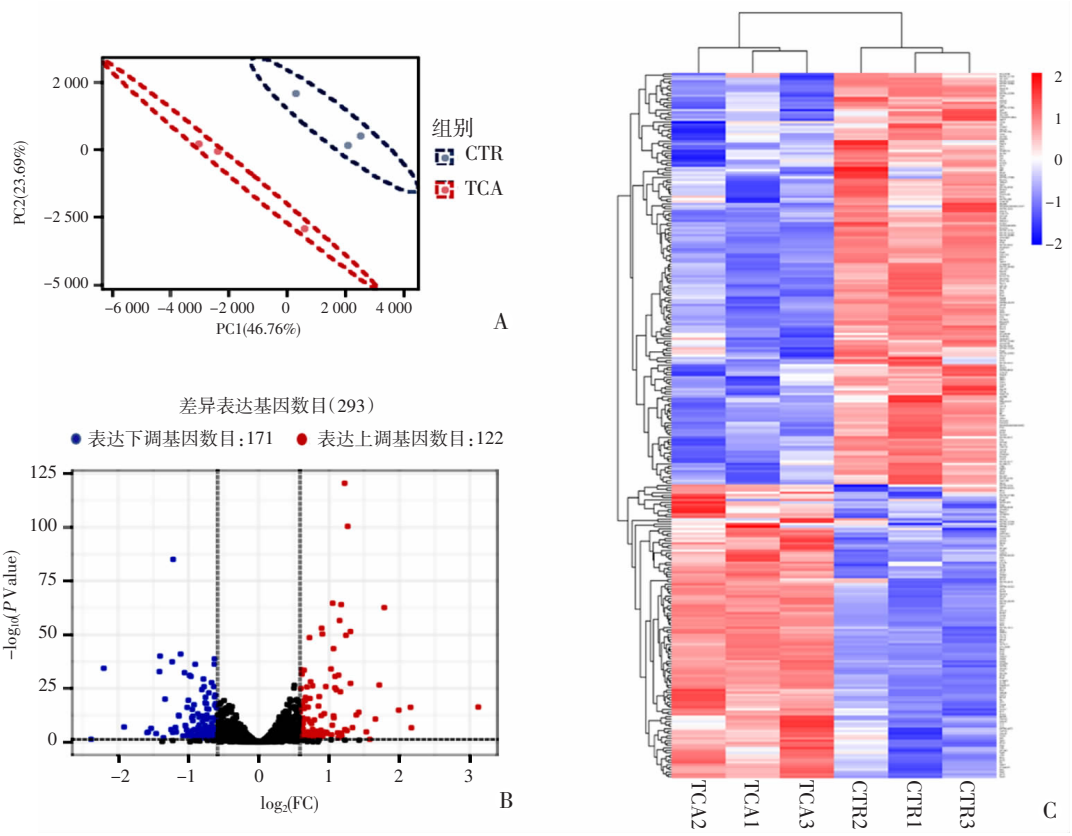
及基因表达数据的分布(图 1C)。

2.1.2　差异性表达基因 GO 功能预测和 KEGG 分析　使用 R 语言的 clusterProfiler 包对 293 个 DEGs 进行 GO 和 KEGG 分析。GO 分析结果显示,生物学进程(biological process,BP)中的 DEGs 主要富集在细胞过程、单器官过程和生物调节,其上下调基因数分别为 52/70、48/67、39/51;细胞组成(cellular component,CC)主要涉及细胞组分、细胞器、细胞膜方面,其上下调基因数分别为 47/71、44/58、27/42;分子功能(molecular function,MF)中的 DEGs 主要富集到催化、结合功能以及分子转运,其上下调基因数分别为 19/34、45/70、8/10,见图 2。选取 KEGG 分析中 $P<0.01$ 的通路,分析结果显示,DEGs 显著富集于包括细胞因子受体相互作用、MAPK、PI3K-AKT、癌症、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、糖代谢、脂代谢等在内的 12 条通路中,见图 3。

2.1.3　GSEA 分析　全基因组 GSEA 富集分析在 TCA 组主要富集到甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、细胞因子受体相互作用、MAPK 信号通路、TGFβ 信号通路、NOD 样受体信号通路以及 p53 信号通路,见图 4。

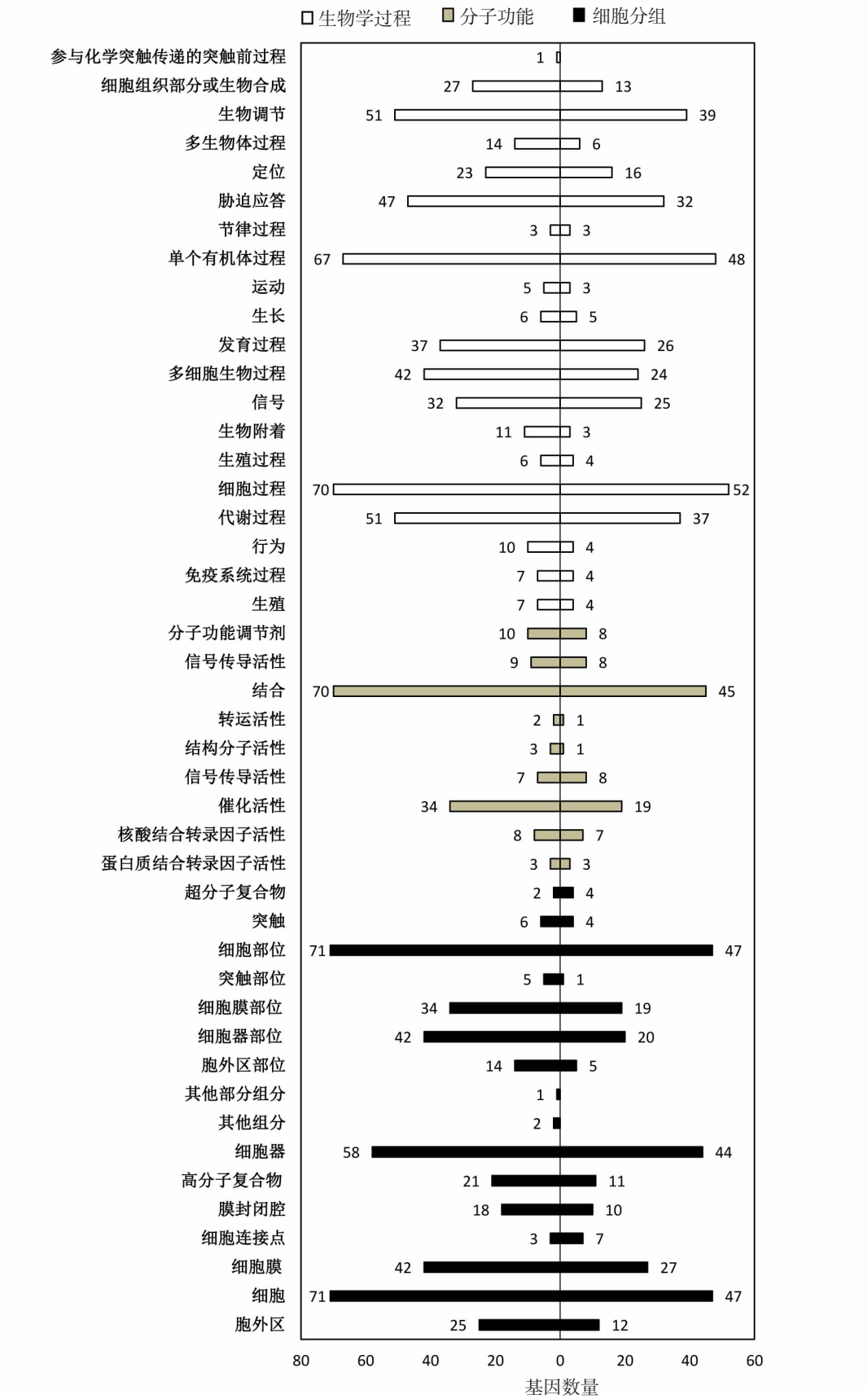
表 1　转录组数据质量评估情况

质控参数	CTR1	CTR2	CTR3	TCA1	TCA2	TCA3
质控后读数	43,675,926	36,496,437	37,411,382	31,642,818	22,704,372	38,048,110
有效序列	13060330426	10913301230	11184158978	94563334000	6790550022	11377898236
GC 含量	49.67%	49.79%	49.64%	49.63%	49.82%	49.63%
Q30 比例	94.36%	94.63%	94.59%	94.64%	94.12%	94.765
比对参考基因组效率	98.35%	98.43%	98.25%	98.09%	98.35%	98.72%



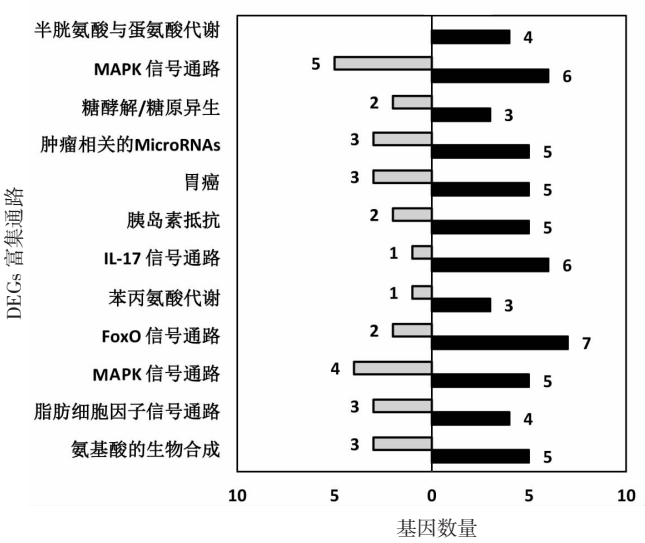
A:可视化的主成分分析;B:DEGs 火山图;C:DEGs 热图　红色代表上调基因分布,蓝色代表下调基因分布

图 1　主成分分析及差异表达基因图



横轴右侧代表上调基因数量,左侧代表下调基因数量;纵轴代表基因功能

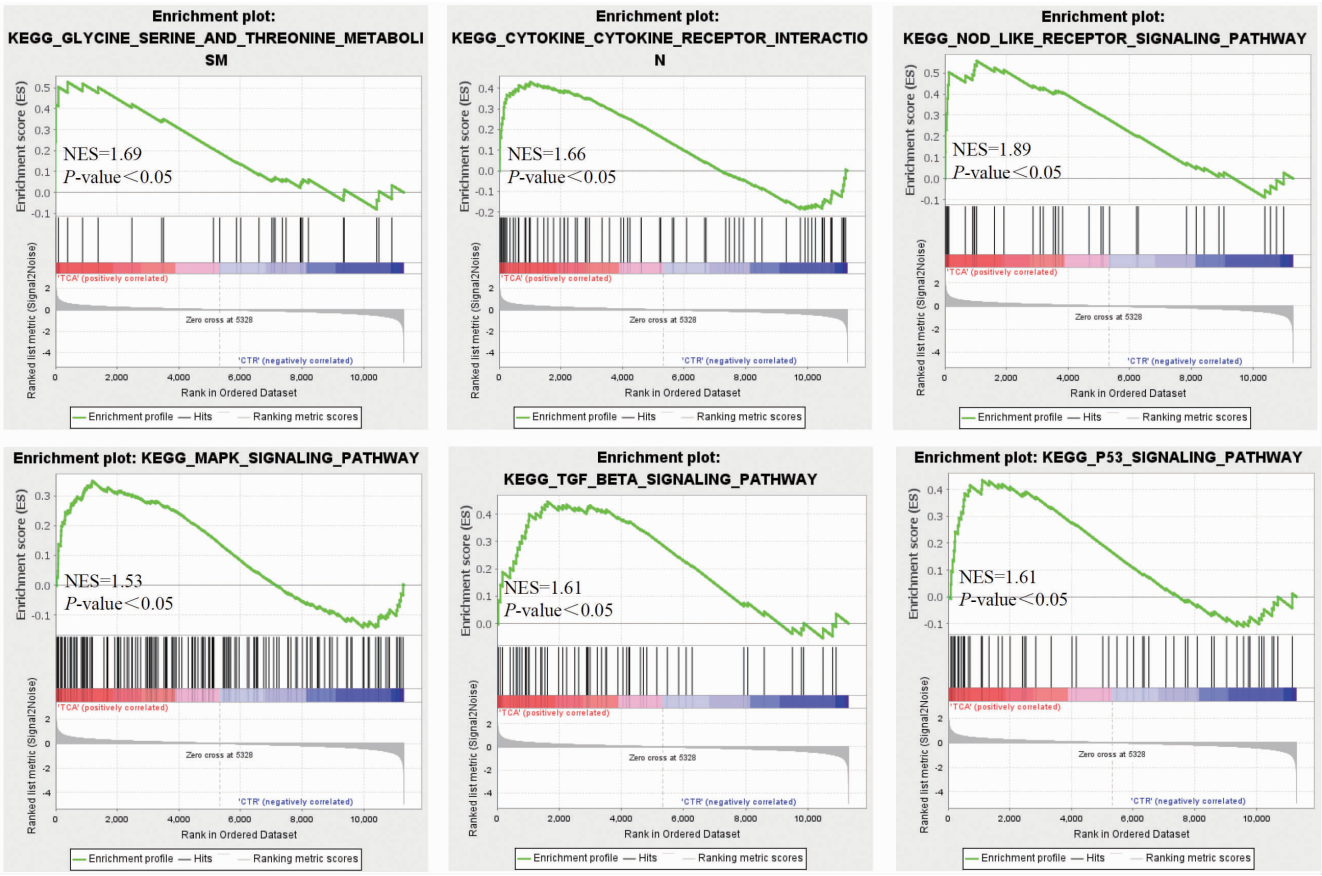
图 2 DEGs 的 GO 功能分布



横轴右侧代表上调基因数量,左侧代表下调基因数量

图 3 DEGs 的 KEGG 富集分析

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析及 Hub 基因预测 利用 STRING 在线数据库对 DEGs 编码的蛋白质进行可视化分析,筛选条件为 minimum required interaction score: medium confidence>0.4。分析得到的蛋白质互作网络如图 5。利用 Cytoscape 软件中的 Cytohubba 插件,选取其中 3 种算法 Betweenness(图 6A)、Degree(图 6B)和 MCC(图 6C)得到 DEGs 相互作用最为广泛的 TOP 30 基因,使用 VENNY2.1 取 3 种算法所得基因的交集作为 DEGs 的关键基因(图 6D),16 个 Hub 基因为:*Ccnd*1、*Ppara*、*Irs*1、*Ccl*2、*Ddit*3、*Serpine*1、*Nr*0*b*2、*Atf*3、*Phgdh*、*Trib*3、*Lepr*、*G*6*pc*、*Psat*1、*Cxcl*2、*Asns*、*Fgf*21。



红色为 TCA 处理组,蓝色为对照组,|NES|>1,*P*<0.05 的通路为显著富集

图 4 GSEA 富集分析结果

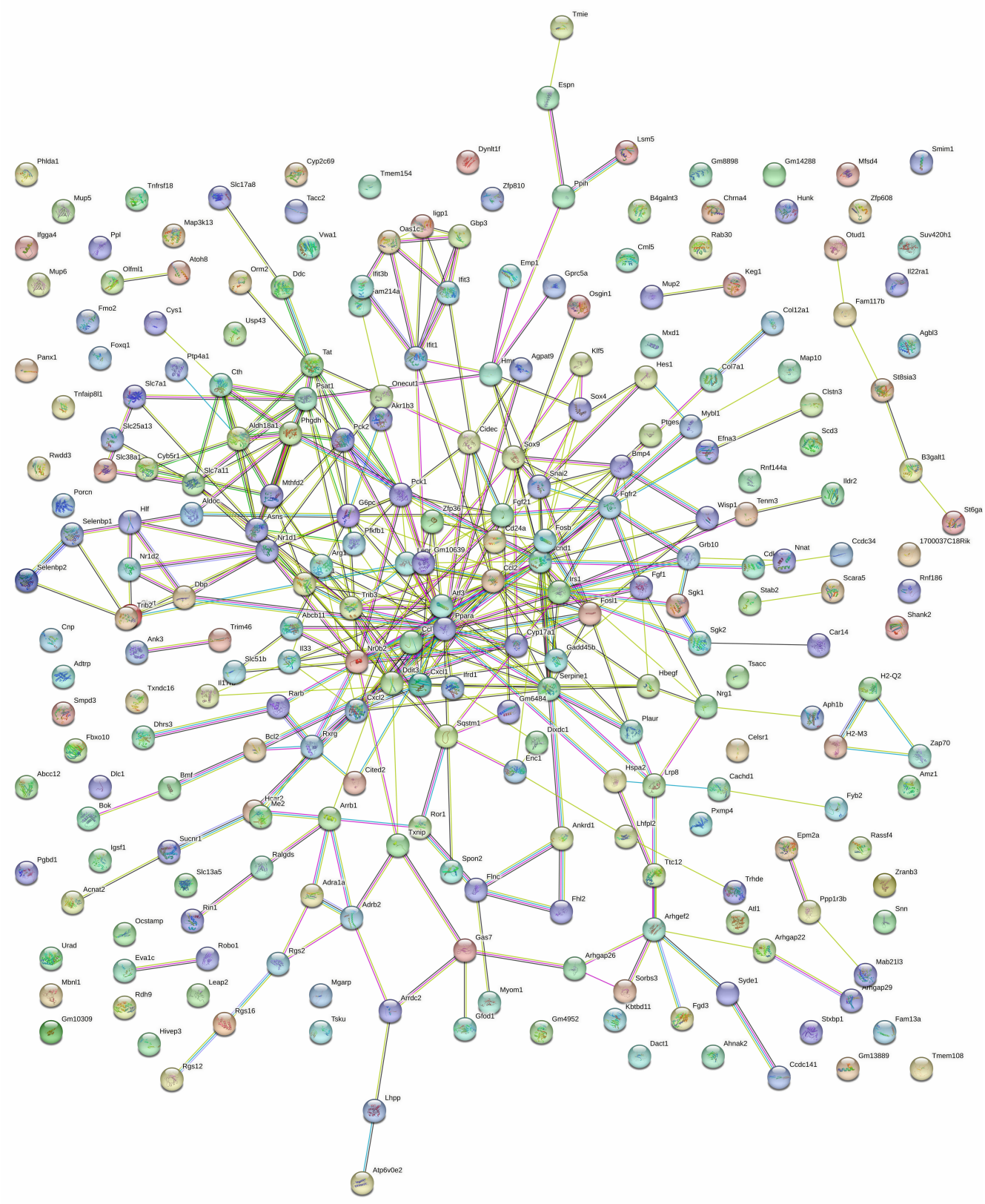
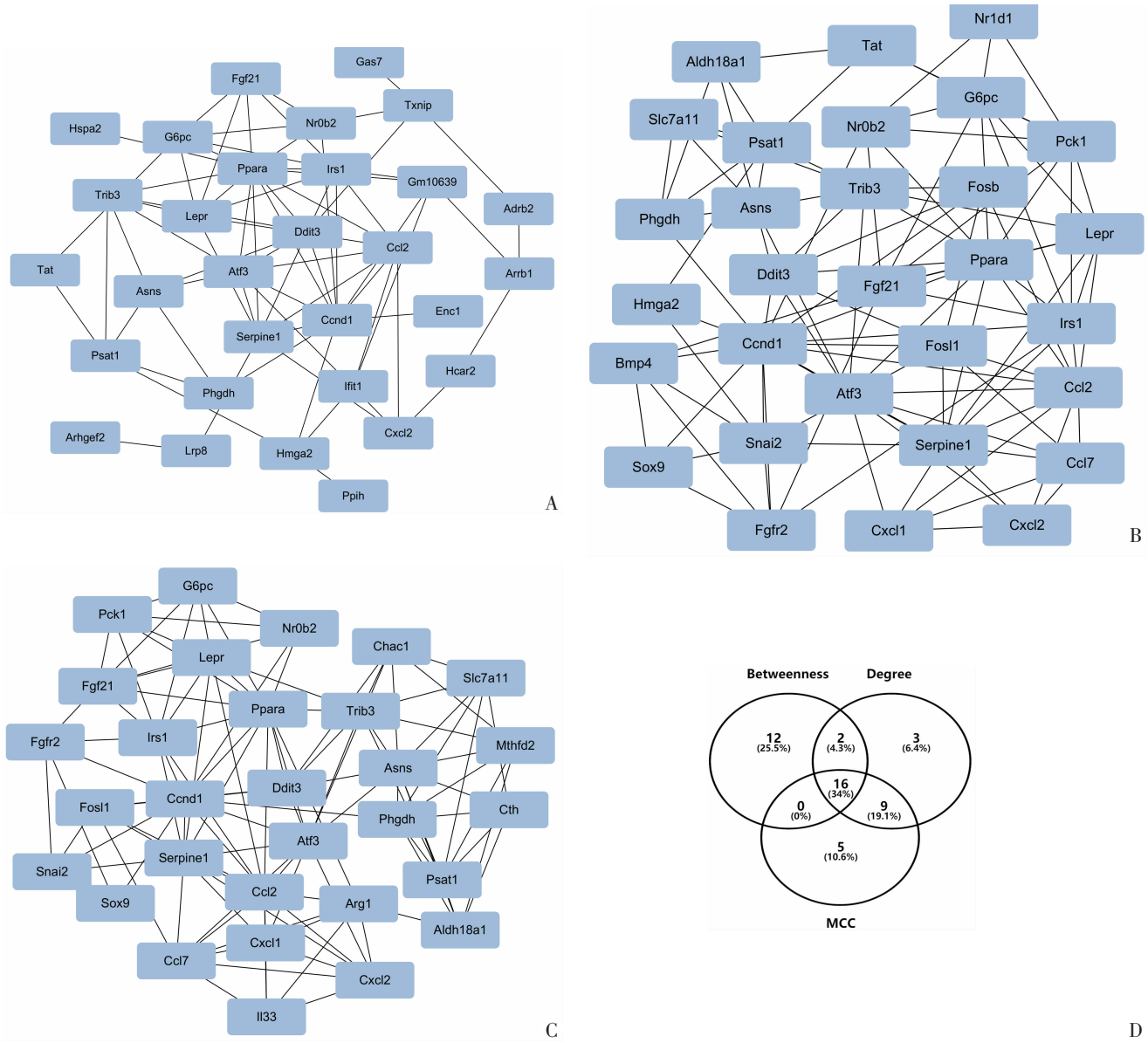


图 5　DEGs 的蛋白质-蛋白质相互作用网络

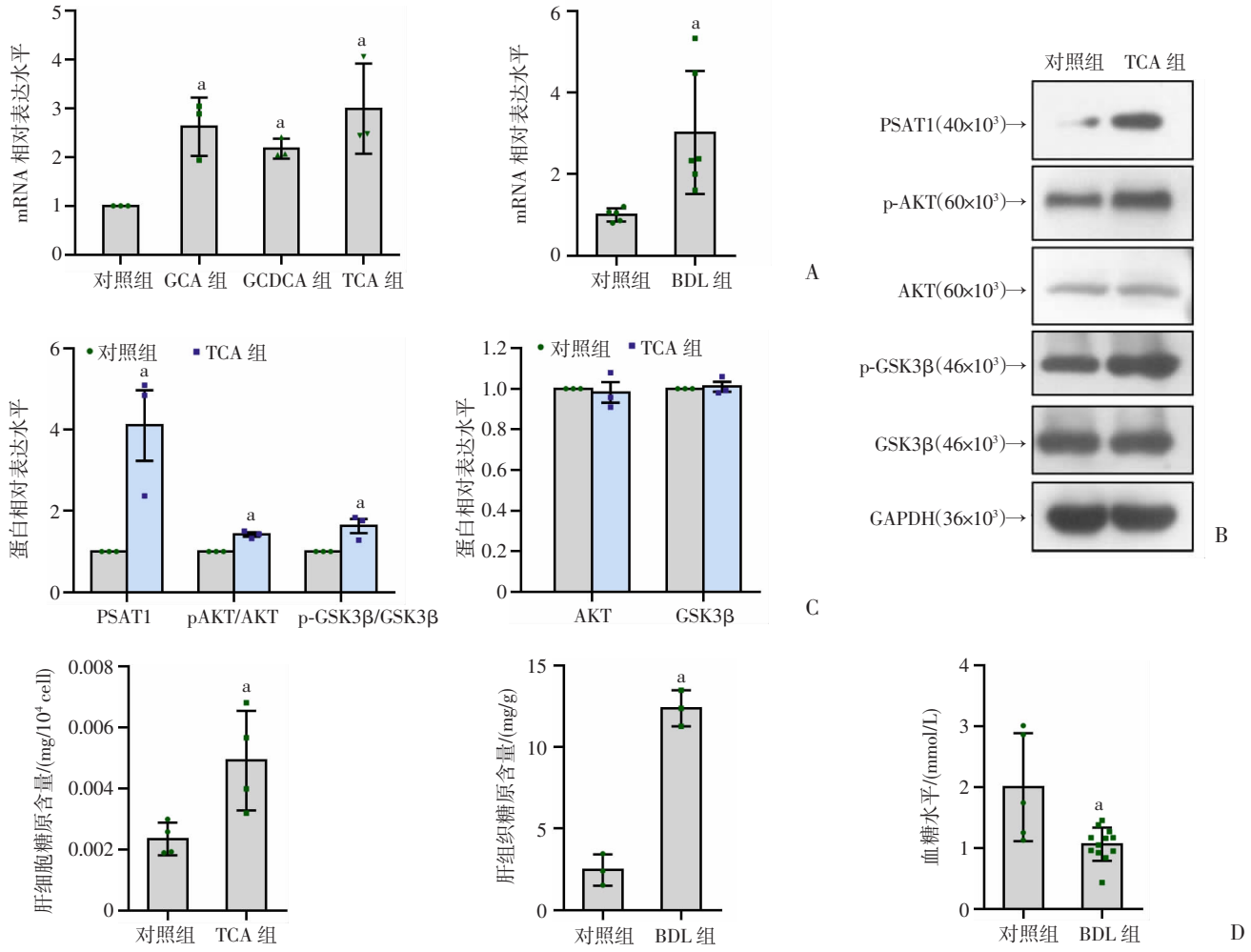


A~C:分别为通过 Betweenness、Degree 和 MCC 算法找出 DEGs 相互作用最为广泛的 Top30 基因;D:三种不同算法取交集得到 16 个 Hub 基因

图 6 Cytohubba 插件筛选 Hub 基因

2.2 体内外水平上验证 Hub 基因

在 KEGG 分析中,$P<0.01$ 的通路提示 BAs 刺激小鼠原代肝细胞与糖代谢相关,而 Hub 基因 *Psat*1 可以调控糖代谢 AKT/GSK3β 信号通路。因此,本研究聚焦于 *Psat*1 基因在 BAs 引起的肝细胞糖代谢变化中的作用。为了探究 *Psat*1 与 BAs 调控糖代谢的关系,本研究检测了糖代谢和 PSAT1/AKT/GSK3β 通路相关指标。体外细胞实验结果表明,使用结合型胆汁酸 GCA、GCDCA、TCA 刺激小鼠原代肝细胞后,与对照组相比,*Psat*1 mRNA 水平升高,胆汁淤积模型 BDL 小鼠肝组织的 *Psat*1 mRNA 水平较对照组也明显增加(图 7A);蛋白质免疫印迹试验结果表明,TCA 组 PSAT1、p-AKT 和 p-GSK3β 的蛋白表达量较对照组明显增高($P<0.05$,图 7B、C);本研究进一步检测了 TCA 诱导后小鼠原代肝细胞的糖原含量变化、BDL 小鼠肝组织的糖原含量以及 BDL 小鼠的血糖水平。实验结果显示,TCA 诱导和胆管结扎手术均使肝糖原水平增高,BDL 小鼠血糖水平较对照组显著降低,差异有统计学意义(图 7D)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

A:结合型胆汁酸(GCA、GCDCA、TCA)处理小鼠原代肝细胞及 BDL 小鼠肝组织 *Psat*1 mRNA 表达情况(肝细胞 $n=3$,肝组织对照组 $n=5$,BDL 组 $n=6$);B: TCA 处理后,小鼠原代肝细胞 PSAT1、p-AKT、AKT、p-GSK3β 和 GSK3β 蛋白表达情况;C:TCA 处理后,小鼠原代肝细胞 PSAT1、p-AKT、AKT、p-GSK3β 和 GSK3β 蛋白质免疫印迹试验统计结果($n=3$);D:肝细胞和肝组织糖原含量及小鼠血糖水平(肝细胞 $n=4$,肝组织 $n=3$,小鼠对照组 $n=5$,BDL 组 $n=14$)

图 7 体内外验证 Hub 基因 *Psat*1

3 讨论

胆汁淤积是以胆汁流动受阻,肝脏胆汁酸积聚,进而损伤肝细胞和胆道并逐渐进展至肝硬化甚至肝脏肿瘤为特点的一组疾病[8]。在疾病过程中,BAs 的累积无疑占据首要地位。一方面,BAs 主要通过诱导细胞因子及趋化因子的产生引发炎症反应,从而导致疾病的发生和发展[9],另一方面,BAs 还能作为一种重要的信号分子,通过减少肝脏糖异生,增加脂肪和骨骼肌糖原合成改善胰岛素抵抗,起到调控葡萄糖、脂质和能量代谢的作用。但同时,随着疾病发展,肝细胞功能受损,导致糖代谢紊乱,继而进一步加重肝损伤,促进疾病进展[5-6]。因此糖代谢在胆汁淤积疾病进程中起着重要作用。

本研究使用结合型胆汁酸 TCA 处理小鼠原代肝细胞,并对其进行 RNA-seq 测序分析;筛选差异基因并进一步进行 GO、KEGG 和 GSEA 富集分析,为结合型胆汁酸诱导的肝细胞反应提供了更多的方向。KEGG 和 GSEA 通路富集分析发现,相关基因主要在糖代谢、氨基酸代谢、炎症和肿瘤相关通路中显著富集。本研究筛选的 Hub 基因 *Irs*1、*G6pc*、*Nr*0*b*2 均为糖代谢通路的关键基因,且均与胆汁淤积疾病代谢相关[10-12];*Lepr* 和 *Fgf*21 参与肝内脂肪代谢[13-14];*Ccnd*1 调节 CDK 激酶,与细胞周期和肿瘤有关;*Phgdh* 基因的高表达可使肝癌病人对索拉非尼耐药风险增高[15];*Trib*3[16] 和 *Asns*[17] 基因高表达则会促进肝癌的发生发

展;*Ppara*、*Serpine*1、*Atf*3、*Ddit*3 与胆汁淤积疾病关系密切[18-23]。

既往研究表明,胆汁酸通过作用于类法尼醇 x 受体(FXR)和 TGR5 信号通路调节甘油三酯、葡萄糖以及能量代谢[24],其主要通过使磷酸化 AKT 增加,从而促进 GSK3β 磷酸化,改善胰岛素抵抗[25]。AKT/GSK3β 是调节糖代谢的重要信号通路。研究表明,在胰岛素作用下,AKT 促进 GSK3β 磷酸化使其失活,进而抑制 Gs(糖原合酶)磷酸化,糖原合成增加[26-28]。Hub 基因 *Psat*1,是参与丝氨酸合成的关键酶,在代谢中扮演重要角色。研究表明,过表达 *Psat*1 可以促进 AKT 和 GSK3β 的磷酸化,从而发挥调节细胞分化、肿瘤细胞生长等多种生物学效应[29-32],且过表达 *Psat*1 通过促进 GSK3β 磷酸化引起胰岛素抵抗,降低血糖[33]。因此,为了探索胆汁酸对 PSAT1/AKT/GSK3β 信号通路和糖代谢的影响,本研究首先验证了多种结合型胆汁酸(GCA、GCDCA、TCA)处理后小鼠原代肝细胞和 BDL 模型中 *Psat*1 的基因表达情况,体内外实验结果均提示其表达增高。为了探究 Hub 基因 *Psat*1 是否正向调节 AKT 信号通路,本研究通过 WB 检测了 TCA 刺激对 AKT 信号通路相关蛋白表达的影响。实验结果表明,TCA 作用使 PSAT1 蛋白表达水平显著增高的同时,磷酸化 AKT 和 GSK3β 的蛋白表达量也升高。本研究进一步检测 TCA 对小鼠原代肝细胞糖原水平的影响,结果表明,TCA 使小鼠原代肝细胞糖原合成增加,这与小鼠肝组织糖原水平增高以及 BDL 小鼠血糖水平降低的实验结果相一致。说明胆汁酸可以通过增加小鼠原代肝细胞合成糖原从而降低 BDL 小鼠血糖,这与先前研究一致[25]。这提示,PSAT1/AKT/GSK3β 可能在胆汁酸调控糖代谢中发挥调节作用。

综上所述,本研究通过对 TCA 处理小鼠原代肝细胞后基因的表达情况进行测序分析,拓展了相关基因库,并筛选出 16 个 Hub 基因,均与胆汁淤积相关病理生理关系密切。其中,对代谢相关基因 *Psat*1 的表达情况进行了 qPCR 验证,实验证实 *Psat*1 在不同类型胆汁酸处理小鼠原代肝细胞后均不同程度升高,且在 BDL 小鼠中观察到同样的结果。同时,本研究证实 TCA 诱导小鼠原代肝细胞 PSAT1/AKT/GSK3β 信号通路激活,并推测其可能与小鼠原代肝细胞糖原合成增加、BDL 小鼠血糖水平降低有关。因此,*Psat*1 可能是胆汁酸影响糖代谢的相关基因,其在体内外胆汁淤积条件下表达的升高为胆汁酸影响糖代谢的相关病理生理过程提供了新的思路。

参考文献:

[1] CAI S Y, YU D, SOROKA C J, *et al*. Hepatic NFAT signaling regulates the expression of inflammatory cytokines in cholestasis[J]. J Hepatol, 2021, 74(3): 550-559. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.09.035.

[2] RAMM G A, SHEPHERD R W, HOSKINS A C, *et al*. Fibrogenesis in pediatric cholestatic liver disease: role of taurocholate and hepatocyte-derived monocyte chemotaxis protein-1 in hepatic stellate cell recruitment[J]. Hepatology, 2009, 49(2): 533-544. DOI: 10.1002/hep.22637.

[3] CAMPISI J, D'ADDA DI FAGAGNA F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 729-740. DOI: 10.1038/nrm2233.

[4] SHAPIRO H, KOLODZIEJCZYK A A, HALSTUCH D, *et al*. Bile acids in glucose metabolism in health and disease[J]. J Exp Med, 2018, 215(2): 383-396. DOI: 10.1084/jem.20171965.

[5] 胡晗, 田彩云, 张国远, 等. 肝源性糖尿病发病机制的最新进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(2): 429-432. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.02.038.
HU H, TIAN C Y, ZHANG G Y, *et al*. Latest advances in the pathogenesis of hepatogenous diabetes[J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(2): 429-432. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.02.038.

[6] 田彩云, 胡晗, 张国远, 等. 糖代谢紊乱对肝硬化相关并发症的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(5): 1197-1200. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.05.046.
TIAN C Y, HU H, ZHANG G Y, *et al*. Influence of glucose metabolism disorder on complications associated with liver cirrhosis[J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(5): 1197-1200. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.05.046.

[7] STARK R, GRZELAK M, HADFIELD J. RNA sequencing: the teenage years[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 631-656. DOI: 10.1038/s41576-019-0150-2.

[8] LI M, CAI S Y, BOYER J L. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver[J]. Mol Aspects Med, 2017, 56: 45-53. DOI: 10.1016/j.mam.2017.06.001.

[9] FICKERT P, WAGNER M. Biliary bile acids in hepatobiliary injury-What is the link?[J]. J Hepatol, 2017, 67(3): 619-631. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.04.026.

[10] HOOGERLAND J A, LEI Y, WOLTERS J C, *et al*. Glucose-6-phosphate regulates hepatic bile acid synthesis in mice[J]. Hepatology, 2019, 70(6): 2171-2184. DOI: 10.1002/hep.30778.

[11] ALVARO D, METALLI V D, ALPINI G, *et al*. The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis[J]. J Hepatol, 2005, 43(5): 875-883. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.04.011.

[12] VAN NOORDEN C J, DÖPP E A, DIJKSTRA C D, *et al*. Reduction in phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver

parenchymal cells following experimentally induced cholestasis[J]. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1988, 54(4): 252-255. DOI: 10.1007/bf02899219.

[13] ZHENG T, YANG X, LI W, *et al*. Salidroside attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease *via* AMPK-dependent TXNIP/NLRP3 pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 8597897. DOI: 10.1155/2018/8597897.

[14] KATSUMURA S, SIDDIQUI N, GOLDSMITH M R, *et al*. Deadenylase-dependent mRNA decay of GDF15 and FGF21 orchestrates food intake and energy expenditure[J]. Cell Metab, 2022, 34(4): 564-580. e8. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.03.005.

[15] WEI L, LEE D, LAW C T, *et al*. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4681. DOI: 10.1038/s41467-019-12606-7.

[16] WANG X J, LI F F, ZHANG Y J, *et al*. TRIB3 promotes hepatocellular carcinoma growth and predicts poor prognosis [J]. Cancer Biomark, 2020, 29(3): 307-315. DOI: 10.3233/cbm-201577.

[17] LI H, NING S, GHANDI M, *et al*. The landscape of cancer cell line metabolism[J]. Nat Med, 2019, 25(5): 850-860. DOI: 10.1038/s41591-019-0404-8.

[18] YOSHII D, SHIMATA K, YOKOUCHI Y, *et al*. SOX9 contributes to the progression of ductular reaction for the protection from chronic liver injury[J]. Hum Cell, 2022, 35(2): 721-734. DOI: 10.1007/s13577-022-00683-8.

[19] FAN J, SHEN H, SUN Y, *et al*. Bone morphogenetic protein 4 mediates bile duct ligation induced liver fibrosis through activation of Smad1 and ERK1/2 in rat hepatic stellate cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 207(2): 499-505. DOI: 10.1002/jcp.20593.

[20] DAI M, HUA H, LIN H, *et al*. Targeted metabolomics reveals a protective role for basal PPARα in cholestasis induced by α-naphthylisothiocyanate[J]. J Proteome Res, 2018, 17(4): 1500-1508. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00838.

[21] WANG H, VOHRA B P, ZHANG Y, *et al*. Transcriptional profiling after bile duct ligation identifies PAI-1 as a contributor to cholestatic injury in mice[J]. Hepatology, 2005, 42(5): 1099-108. DOI: 10.1002/hep.20903.

[22] XU Y, LI Y, JADHAV K, *et al*. Hepatocyte ATF3 protects against atherosclerosis by regulating HDL and bile acid metabolism[J]. Nat Metab, 2021, 3(1): 59-74. DOI: 10.1038/s42255-020-00331-1.

[23] WANG P, YANG Y, PANG G, *et al*. Hepatocyte-derived MANF is protective for rifampicin-induced cholestatic hepatic injury via inhibiting ATF4-CHOP signal activation [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 162: 283-297. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.028.

[24] LEFEBVRE P, CARIOU B, LIEN F, *et al*. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation[J]. Physiol Rev, 2009, 89(1): 147-191. DOI: 10.1152/physrev.00010.2008.

[25] GAO F, ZHANG X, ZHOU L, *et al*. Type 2 diabetes mitigation in the diabetic Goto-Kakizaki rat by elevated bile acids following a common-bile-duct surgery [J]. Metabolism, 2016, 65(2): 78-88. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.09.014.

[26] CHO H, MU J, KIM J K, *et al*. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)[J]. Science, 2001, 292(5522): 1728-1731. DOI: 10.1126/science.292.5522.1728.

[27] CROSS D A, ALESSI D R, COHEN P, *et al*. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B[J]. Nature, 1995, 378(6559): 785-789. DOI: 10.1038/378785a0.

[28] SALTIEL A R. Insulin signaling in the control of glucose and lipid homeostasis[J]. Handb Exp Pharmacol, 2016, 233: 51-71. DOI: 10.1007/164_2015_14.

[29] JIA L, LI D, WANG Y N, *et al*. PSAT1 positively regulates the osteogenic lineage differentiation of periodontal ligament stem cells through the ATF4/PSAT1/Akt/GSK3β/β-catenin axis[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 70. DOI: 10.1186/s12967-022-03775-z.

[30] DUAN W, LIU X. PSAT1 Upregulation contributes to cell growth and cisplatin resistance in cervical cancer cells *via* regulating PI3K/AKT signaling pathway[J]. Ann Clin Lab Sci, 2020, 50(4): 512-518.

[31] FANG Y, LIANG X, XU J, *et al*. MiR-424 targets AKT3 and PSAT1 and has a tumor-suppressive role in human colorectal cancer[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 6537-6547. DOI: 10.2147/cmar.S185789.

[32] GUO Z F, KONG F L. Akt regulates RSK2 to alter phosphorylation level of H2A.X in breast cancer[J]. Oncol Lett, 2021, 21(3): 187. DOI: 10.3892/ol.2021.12448.

[33] YU J, XIAO F, GUO Y, *et al*. Hepatic phosphoserine aminotransferase 1 regulates insulin sensitivity in mice *via* tribbles homolog 3[J]. Diabetes, 2015, 64(5): 1591-602. DOI: 10.2337/db14-1368.

(**收稿**:2023-04-26;**修回**:2023-06-01)

(编辑 邓强庭)