

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201804003

HBV 感染者肝细胞样本的关键基因和信号通路的生物信息学挖掘

李林芝, 谢君*, 朱乃硕*

(遗传工程国家重点实验室 分子免疫学实验室(复旦大学 生命科学学院), 上海 200438)

摘要:为探究乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染后肝细胞基因表达和信号通路的改变情况,从 Gene Expression Omnibus(GEO)数据库中下载了 HBV 感染者肝细胞样本制作的基因表达谱数据集 GSE83148,进行质量检测、数据标准化后筛选出差异表达基因,进一步做 GO 和 KEGG 富集分析以及基因网络相互作用分析,筛选关键基因和信号通路。从 HBV 感染样本中筛选出 $\text{fold change} \geq 2$, $p\text{-value} < 0.05$ 的上调差异表达基因 44 个,GO 分析获得关键基因 *BAK1* 和 *TP63*,差异表达基因网络互作获得 5 个位于枢纽位置的基因:*NDUFS1*、*NDUFS2*、*COX7B*、*ATP5B*、*OPA1*。KEGG 分析获得关键信号通路有:乙型肝炎信号通路、病毒癌变信号通路、FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路。本研究筛选出的多数基因与线粒体和氧化呼吸链有关,造成这一现象的具体机制还需进一步探究。

关键词: HBV; 差异表达基因; 关键基因; 关键信号通路

中图分类号: R711.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2018)04-214-08

Identification of key genes and signaling pathways in HBV infected liver cell samples

LI Linzhi, XIE Jun*, ZHU Naishuo*

(Lab of Molecular Immunology, State Key Lab of Genetic Engineering (School of Life Sciences, Fudan University), Shanghai 200438, China)

Abstract: In order to explore the key genes and signaling pathways in HBV-infected liver cells, we downloaded genes expression profile data GSE83148 from the Gene Expression Omnibus (GEO) database and conducted a series of studies. Differentially expressed genes were screened out after quality testing and data normalization, GO and KEGG enrichment analysis and gene network interaction analysis were further performed to select key genes and signaling pathways. In this study, 44 up-regulated differentially expressed genes that $\text{fold change} \geq 2$ and $p\text{-value} < 0.05$ were screened out from HBV-infected sampe group. Key genes *BAK1* and *TP63* were obtained by GO analysis. From GeneMANIA analysis, we obtained five genes located in the hub: *NDUFS1*, *NDUFS2*, *COX7B*, *ATP5B*, and *OPA1*. The key signaling pathways obtained by KEGG analysis were as follows: hepatitis B signaling pathway, viral cancerous signaling pathway, FoxO signaling pathway, and PI3K-Akt signaling pathway. Most genes selected in this study are related to mitochondria and oxidative respiratory chain, but the specific mechanisms that cause this phenomenon need further exploration.

Keywords: HBV; Differentially expressed genes; Key genes; Key signaling pathways

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个在全球范围危害公众健康的问题^[1]。全球约有 20 亿人感染过乙肝

病毒,超过 3.5 亿慢性乙肝携带者^[2]。其中大约有 15%~40%的乙肝患者会发展成肝硬化、肝功能衰竭

收稿日期:2018-04-17;修回日期:2018-07-09.

基金项目:国家自然科学基金(No. 31370927).

作者简介:李林芝,女,硕士研究生,研究方向:生物信息学。E-mail:15210700032@fudan.edu.cn.

* 通信作者:谢君,男,副教授,硕士生导师,研究方向:生物信息学。E-mail: xiejun@fudan.edu.cn.

朱乃硕,男,教授,博士生导师,研究方向:免疫学。E-mail: nzhu@fudan.edu.cn.

或肝细胞癌^[3]。每年大约有50~120万人因乙肝死亡^[4-5],感染乙肝病毒已成为全球第十大死因^[6]。感染乙肝病毒使肝细胞癌的发病率增加^[7],每年约有30~50万人因感染乙肝病毒罹患肝细胞癌,肝细胞癌已成为常见的癌症^[8],是全球癌症死亡的第二大原因^[9]。全球人口大约有45%居住在HBV高发地区^[10-11]。

随着高通量平台大量应用于医学,生物芯片成为临床样本病理分析的有效工具,可以快速、高效、精确、低成本地进行信号通路探索、疾病预测分子诊断、新药靶点发现、肿瘤反应预测等工作^[12-13],本研究便采取了芯片分析的方法来探索乙肝感染造成的基因表达和信号通路的改变,从GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载了基因表达谱数据集GSE83148后对样本进行质量检测、数据标准化后筛选出fold change ≥ 2 , p-value < 0.05 的差异表达基因,接着对差异表达基因进行了GO和KEGG富集分析和GeneMANIA(<http://genemania.org/>)基因网络互作分析,发现了一些HBV感染细胞后的关键基因和信号通路,这对我们研究HBV感染发病以及癌变的具体机制有一定意义。

1 材料和方法

1.1 材料

芯片数据集GSE83148从GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载,pHBV1.3质粒,pcDNA3.1质粒,hepG2细胞为实验室自有,RNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,PCR生化反应试剂购自宝生物工程(大连)有限公司,引物由华津生物科技有限公司合成,veriti96-well thermal cycler PCR仪购置于Applied Biosystems公司,5424型高速离心机购置于Eppendorf公司。

1.2 实验方法

1.2.1 获得差异表达基因

GSE83148基因表达谱数据集由美国Affymetrix公司制作,基于GPL570平台。GSE83148包含122个HBV感染者的肝细胞样本和6个健康对照肝细胞样本。下载CEL格式的原始数据,使用R语言做质量检测后将质量合格的芯片做数据标准化处理,然后用经典t检验筛选出fold change ≥ 2 , p-value < 0.05 的差异表达基因。

1.2.2 差异表达基因的GO分析和KEGG分析

将筛选获得的差异表达基因上传到DAVID生物信息学数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),进行

GO分析和KEGG分析,找出差异表达基因的分子功能、细胞组成、生物过程和富集的KEGG信号通路。

1.2.3 差异表达基因互作网络分析

将获得的差异表达基因上传到GeneMANIA(<http://genemania.org/>)数据库进行基因网络互作分析,选择合适的“network”和“function”,获得差异表达基因间的网络互作关系和枢纽基因图。

1.2.4 Real-time PCR验证上述预测结果

(1)转染细胞。复苏HepG2细胞,传代3次后,布6孔板,待细胞有60%融合度时,实验组每孔转染4 μg 乙肝病毒1.3倍体质粒pHBV1.3,对照组转染4 μg 空载pcDNA3.1质粒,48h后收集样品。

(2)总RNA提取。收取样品后,进行RNA的提取。收集样品时,弃去细胞孔中的培养液,用PBS清洗3次,各1~2min。然后向每个细胞孔中添加400 μL Trizol试剂,室温放置2~3min后,充分吹打以保证细胞从孔壁上完全脱落,然后将液体收集于RNase free的EP管中。

提取RNA的步骤如下:①将上述EP管放在混匀器上剧烈振荡20s,然后室温静置15min;②向每个EP管内加入80 μL 氯仿,置于混匀器剧烈振荡2s,室温放置5min后,12000 r/min离心15min。离心后取上层的水相到另一个RNase free的EP管内,然后加等量异丙醇,混合均匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置30min以上;③在4 $^{\circ}\text{C}$,12000 r/min离心15min,弃去上清,向EP管内加入300 μL 75%的无水乙醇,洗涤沉淀,然后4 $^{\circ}\text{C}$,12000 r/min离心5min。弃去上清,将EP管盖子打开,置于超净台中,直到沉淀被吹至透明后,向每个EP管内加入20 μL RNase free水。

(3)反转录。按照反转录试剂盒(TaKaRa公司)提供的说明书获得cDNA。步骤简述如下:在10 μL 体系中,5X PrimScript RT Master Mix 2 μL , total RNA 4 μL , RNase free水4 μL 。反应体系中,RNA的用量最大为500ng。将反应体系设置为37 $^{\circ}\text{C}$ 15min;85 $^{\circ}\text{C}$ 5s。

(4)引物的设计和合成。根据GenBank公布的全基因序列作为设计引物的参考序列,用Primer Premier 5设计,引物合成由上海华津生物科技有限公司完成。目的和内参引物序列见表1。

Real-time PCR反应程序为95 $^{\circ}\text{C}$ 30s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5s,62 $^{\circ}\text{C}$ 31s,一共40个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 15s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15s。结果用 β -actin做为内参,用2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法进行相对定量分析。

表1 基因引物列表
Table 1 List of gene primers

基因名称	引物上下游	(5'-3')
<i>β-actin</i>	Forward	5' GACAGGATGCAGAAGGAG 3'
	Reverse	5' TGATCCACATCTGCTGGAAGGT 3'
BAK1	Forward	5' GCAGGTAGCCCAGGACA 3'
	Reverse	5' GTGGCAATCTTGGTGAAGTA 3'
TP63	Forward	5' ATGCTGCGACAAACAA 3'
	Reverse	5' GACTGGTGGACGAGGA 3'
NDUFS1	Forward	5' ATGATAGGAGCCGATTT 3'
	Reverse	5' CCTGATGCAGCGAGTA 3'
NDUFS2	Forward	5' CCCAAGCAAAGAAACA 3'
	Reverse	5' GACTCTCGCTCGTAGAA 3'
COX7B	Forward	5' CGCACTAAATCGTCTC 3'
	Reverse	5' GGTAACCTGCCAAACA 3'
ATP5B	Forward	5' GGTGGTCTGGAGTTG 3'
	Reverse	5' CTGGGTGAAGCGAAAG 3'
OPA1	Forward	5' AAGATAGTTCTCGGGAGT 3'
	Reverse	5' ATGGTCTCAGGGCTAA 3'

2 结果分析

2.1 获得差异表达基因

下载 GSE83148 数据集 (CEL 格式), 芯片信息如表 2。

对样品芯片进行灰度扫描、RNA 降解分析、以及用 simpleaffy 包进行分析后, 表明芯片制作的技术误

差在允许范围内, 因此将 122 张 HBV 样本和 6 张对照样本全部纳入分析, 图 1 为 122 张 HBV 芯片和 6 张对照组芯片灰度扫描箱线图。

表 2 芯片 GSE83148 的基本信息

Table 2 Basic information of chip GSE83148

细胞类型	检查平台	HBV 样本	对照样本
人肝细胞	GPL15207	GSM2195416~	GSM2291960~
		GSM2195537	GSM2291965

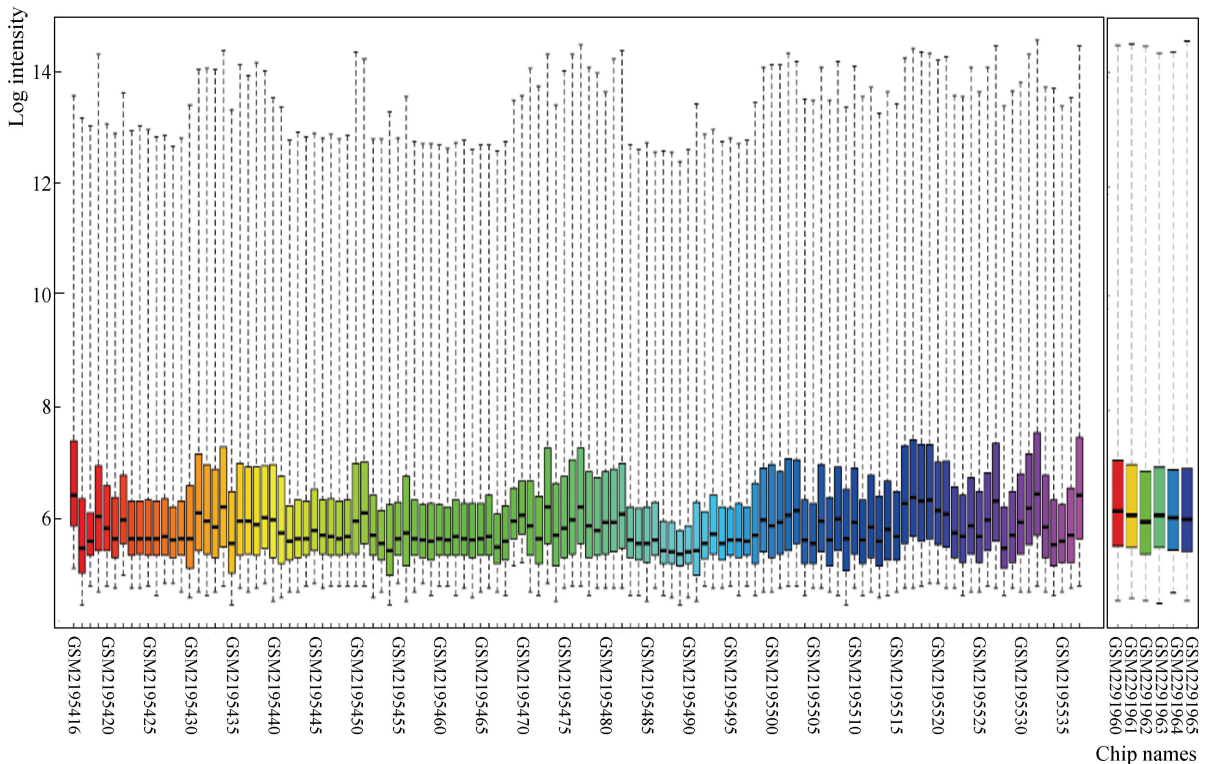


图1 芯片灰度扫描箱线图

Fig.1 Chip grayscale scanning box plot

从芯片中提取基因数据 37 707 个,用 RMA 法进行背景校正,中位数标准化后,筛选出 HBV 组相

于对照组 fold change ≥ 2 , p-value < 0.05 的上调表达基因 44 个(见表 3)。

表 3 fold change ≥ 2 , p-value < 0.05 的上调基因
Table 3 Up-regulated genes with fold change ≥ 2 , p-value < 0.05

基因号	p-value	基因号	p-value
1552955_at	0.042 769 517	217465_at	0.030 367
1556877_at	0.026 816 443	217520_x_at	0.027 832
1564010_at	0.022 386 329	219253_at	0.027 205
1565840_at	0.019 796 197	220995_at	0.035 026
200738_s_at	0.040 237 284	221079_s_at	0.014 449
201520_s_at	0.023 005 656	223324_s_at	0.003 068
201966_at	0.012 769 118	224560_at	0.044 941
202587_s_at	0.040 229 508	226063_at	0.010 496
203100_s_at	0.029 773 418	226713_at	0.047 253
203290_at	0.045 576 511	227446_s_at	0.002 896
203728_at	0.032 011 524	228686_at	0.048 853
210496_at	0.049 458 537	228825_at	0.042 104
210883_x_at	0.006 514 413	228917_at	0.032 083
211193_at	0.003 754 325	229835_s_at	0.021 28
212225_at	0.039 798 591	234827_at	0.028 414
212396_s_at	0.013 717 089	236997_at	0.008 392
212770_at	0.016 682 128	237621_at	0.035 615
213065_at	0.042 219 214	238114_at	0.029 73
216202_s_at	0.009 283 899	239001_at	0.019 723
216218_s_at	0.007 387 834	240789_at	0.009 939
217125_at	0.040 997 144	242363_at	0.031 7
217204_at	0.047 383 654	243485_at	0.016 139

2.2 GO 富集分析

对获得的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 分析(见表 4)。GO 分析结果表明,HBV 感染的肝细胞上调的差异表达基因主要富集的细胞过程有:对伽玛辐射的反应,蛋白质四聚化,细胞对紫外线反应,对药物反应;主要富集的细胞代谢区域为线粒体。BAK1 基因和 TP63 基因被富集入多条信号通路。BAK1 基因编码的蛋白属于 BCL2 蛋白家族,BCL2 家族成员形成寡聚体或异二聚体并且充当涉及各种细胞活性的抗凋亡或促凋亡调节剂,这种蛋白定位于线粒体,并起到诱导细胞凋亡的作用,它与线粒体电压依赖性阴离子通道的开放相互作用并加速其开放,这导致膜电位的丧失和细胞色素 c 的释放,暴露于细胞应激后,该蛋白还与肿瘤抑制因子 P53 相互

作用^[14]。TP63 基因编码的蛋白是 p53 家族转录因子的成员^[15],与 NF-KB 信号通路相互作用^[16]。

2.3 KEGG 通路分析

将上述获得的差异表达基因做 KEGG 通路富集(见表 5),未获得富集基因的信号通路。将筛选条件放宽至 fold change ≥ 1.5 , p-value < 0.05 后获得差异表达基因富集 KEGG 信号通路,获得的信号通路有:乙型肝炎信号通路、病毒癌变信号通路、FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路。FoxO 信号通路在细胞凋亡,细胞周期控制,葡萄糖代谢,氧化应激抗性等方面有着重要作用^[17],FoxO 信号通路的调节机制是响应于胰岛素以及几种生长因子,通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)下游的丝氨酸-苏氨酸激酶 Akt / 蛋白激酶 B(Akt / PKB)磷酸化,三个保守残基磷酸化导致

FoxO 蛋白从细胞核输出到细胞质,从而降低 FoxO 靶基因的表达。而应激激活的 c-Jun N 端激酶 (JNK) 和能量感应 AMP 激活蛋白激酶 (AMPK) 在氧化和应激刺激下磷酸化并激活 FoxO。除了 PKB, JNK 和 AMPK 之外, FoxO 还受到多个参与者的调控,包括磷酸化,乙酰化,甲基化和泛素化等。磷脂酰肌醇 3'-激酶 (PI3K)-Akt 信号通路可被多种类型

的细胞刺激或毒性损伤激活,调节转录,翻译,增殖,生长和存活等基本的细胞功能。生长因子与其受体酪氨酸激酶 (RTK) 或 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 的结合分别刺激 PI3K 的 Ia 和 Ib 亚型。PI3K 催化细胞膜上磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (PIP3) 的产生。第二信使 PIP3 激活 Akt, 激活后 Akt 通过磷酸化参与凋亡,蛋白质合成,代谢和细胞周期调节等过程。

表 4 差异表达基因的 GO 分析

Table 4 GO analysis of differentially expressed genes

分类	功能	基因数	基因缩写	P 值
BP	Response to gamma radiation	2	<i>BAK1</i> <i>TP63</i>	5.0×10^{-10}
BP	Protein tetramerization	2	<i>TRPM7</i> <i>TP63</i>	6.5×10^{-2}
BP	Cellular response to UV	2	<i>BAK1</i> <i>TP63</i>	7.1×10^{-2}
BP	Response to drug	3	<i>BAK1</i> <i>TIMP2</i> <i>MGST1</i>	9.1×10^{-2}
C	Mitochondrion	7	<i>BAK1</i> <i>GRSF1</i> <i>NDUFS2</i> <i>MGST1</i> <i>MTRF1L</i> <i>SPTLC2</i> <i>TP63</i>	1.4×10^{-2}

表 5 差异表达基因的 KEGG 分析

Table 5 KEGG analysis of differentially expressed genes

通路 ID	通路名称	基因数	百分率/%	P 值	基因
Hsa05161	Hepatitis B	5	7.0	5.9×10^{-3}	<i>AKT1</i> <i>CCNA2</i> <i>CCNE2</i> <i>EGR2</i> <i>TGFB1</i>
Hsa05203	Viral carcinogenesis	6	7.0	1.9×10^{-2}	<i>JAK3</i> <i>CCNA2</i> <i>CXCL10</i> <i>CCND2</i> <i>CCNE2</i> <i>EGR2</i>
Hsa04068	FoxO signaling pathway	4	5.6	3.0×10^{-2}	<i>AKT1</i> <i>CCND2</i> <i>EGFR</i> <i>TGFB1</i>
Hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	5	7.0	9.5×10^{-2}	<i>AKT1</i> <i>JAK3</i> <i>CCND2</i> <i>CCNE2</i> <i>EGFR</i>

2.4 基因互作网络分析

差异表达基因生成的互作网络图如图 2 所示: *BAK1*、*GNG5*、*ATP5B*、*NDUFS1*、*NDUFS2*、*IMMT*、*MLX*、*OPA1* 等 9 个基因被富集,这些基因均与线粒体氧化呼吸链有关,基因 *NDUFS1*、*NDUFS2*、*ATP5B*、*COX7B*、*OPA1* 处于互作网络中的核心位置。

NDUFS1、*NDUFS2* 是线粒体呼吸链复合体 1 的

核心基因,复合体 1 是线粒体内膜上最大的蛋白质复合物,催化 NADH 氧化,既是电子传递体又是质子传递体。呼吸作用会产生活性氧,活性氧化学性质活泼,既是电子供体又是电子受体,是生命活动中不可缺失的活性物质,可以提高某些酶的活性,如肝脏中一些合成酶和解毒酶,分析结果显示与 *NDUFS1* 基因共表达的基因有 *NDUFS2*、*ATP5B*、*IMMT*、*MLX*、

PRELID3B, CAST, TFRC, GNG5, COX7B, GRSF1, METAP1, NCKAP1, PGK1, 共定位的基因有 *COX7B* 和 *NDUFS2*; 与 *NDUFS2* 共表达的基因有 *NDUFS1, OPA1, GSS, ATP5B, BAK1, METAP1, MTRF1L, COX7B, G3BP2, ALAS1, MLX, CTNNA1, SPTLC2, TFRC, PRELID3B, RBM5, CLCN4, LDHA, IMMT, MRTTL2A, GRSF1*, 共定位的基因有 *NDUFS1* 和 *COX7B*。*COX7B* 编码细胞色素 c 氧化酶的一个的结构亚基, 线粒体呼吸链复合物 IV 的重要组成部分, 是线粒体呼吸不可缺失的部分^[18], 本研究筛选出的差异表达基因中与 *COX7B* 共表达的基因有 *IMMT, NDUFS1, NDUFS2, ATP5B, PGK1, ALAS1, GNG5, KRT10, CAST*, 与 *COX7B* 共定位的基因有 *ATP5B,*

PGK1, GRSF1, AK1。*ATP5B* 编码 ATP 合酶的 F1 部分的 β 亚基, β 亚基是 ATP 酶氧化磷酸化合成 ATP 的限速组分, 它是 ATP 酶复合体中唯一的一个催化亚单位^[19], 筛选的差异表达基因中与 *ATP5B* 共表达的基因有 *NDUFS1, NDUFS2, MGST1, IMMT, GRSF1, VAV2, MTRF1L, METAP1, ALAS1, MLX, CTNNA1, SPTLC2, PRELID3B, TFRC*, 共定位的基因有 *COX7B, SPTLC2, KRT10, GRSF1, AK1*。*OPA1* 位于线粒体内膜, 参与线粒体嵴重塑, 阻止细胞色素 C 释放, 是调节线粒体分裂与融合的关键基因^[20], 与 *OPA1* 共表达的基因有 *CAST, CDYL, G3BP2, ANKRD17, NDUFS2, ZFC3H1, NCKAP1*。这些表达上调说明 HBV 感染后肝细胞氧化还原反应活跃。

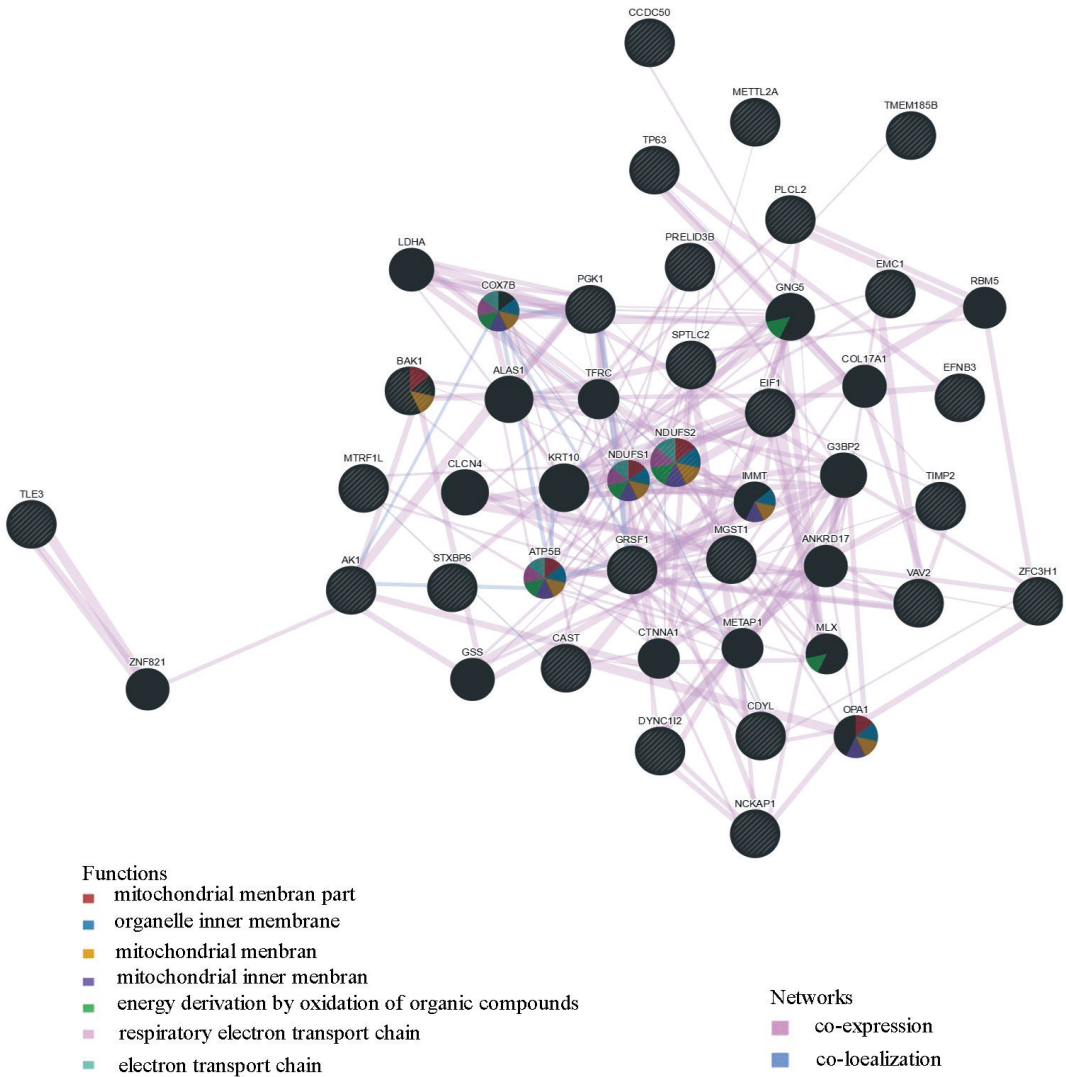


图 2 GeneMANIA 网络图

Fig.2 GeneMANIA network diagram

注: 彩图见电子版 (<http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx>.2018 年第 4 期)。

2.5 Real-time PCR 验证芯片分析结果

如图 3 所示, X 轴表示基因名称, Y 轴表示基因表达量之比, HepG2 细胞在转染乙肝病毒 1.3 倍体

质粒 48h 后, *BAK1, TP63, NDUFS1, NDUFS2, COX7B, ATP5B, OPA1* 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 与预测结果一致。

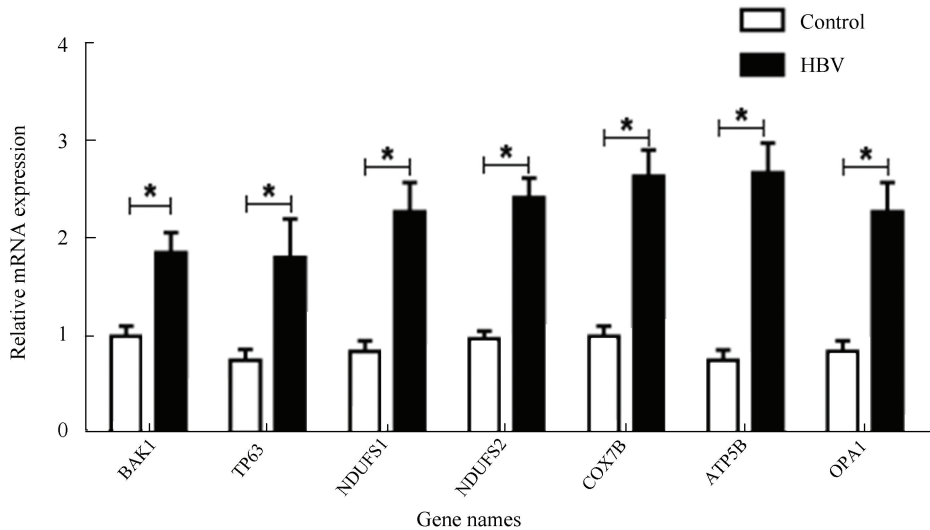


图3 Real-time PCR 验证芯片分析结果

Fig.3 Real-time PCR verification chip analysis results

注:图中结果以 β -actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析,转乙型肝炎病毒 1.3 倍体质粒组中 *BAK1*、*TP63*、*NDUFS1*、*NDUFS2*、*COX7B*、*ATP5B*、*OPA1* mRNA 表达水平,与正常对照相比, * $P < 0.05$ ($n = 3$)。

3 讨论

本研究从 GSE83148 基因表达谱中获得 37 707 个基因,从这 37 707 个基因中获得 HBV 组 fold change ≥ 2 , px-value < 0.05 的差异表达基因 44 个,对这 44 个上调差异表达基因做了一系列分析后获得 7 个关键基因, *BAK1*、*TP63*、*NDUFS1*、*NDUFS2*、*COX7B*、*ATP5B*、*OPA1*,这些基因均与线粒体以及氧化呼吸链相关,提示患者感染乙肝病毒后线粒体氧化还原反应活跃。氧化还原活跃后会产生更多的活性氧,已有研究表明感染乙肝病毒后会,细胞会产生大量活性氧,活性氧增多导致机体氧化应激反应 (Oxidative stress) 造成细胞损伤,这一损伤参与多种病理机制^[21]。线粒体靶向抗氧化剂可以显著改善 HBV 感染后的线粒体和抗病毒 CD8T 功能^[22]。但 HBV 感染后如何造成这些基因表达量增高的具体原因尚不明了,仍需进一步探索研究。本研究发现 HBV 感染者差异表达基因富集的信号通路有:乙型肝炎信号通路、病毒癌变信号通路、FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路。FoxO 信号通路响应于胰岛素以及几种生长因子,通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 下游的丝氨酸-苏氨酸激酶 Akt / 蛋白激酶 B (Akt / PKB) 磷酸化,在细胞凋亡,细胞周期控制,葡萄糖代谢,氧化应激抗性等方面有着重要作用,且与 PI3K-Akt 信号通路联系紧密。筛选出的关键基因和富集的信号通路均与细胞氧化应激相关,表明 HBV 感染

后的氧化损伤可能是造成感染者肝细胞损伤及细胞癌变的关键因素,但具体机制尚不明确,仍需进一步探究。

参考文献 (References)

- [1] 范竹萍, 邱德凯. 乙型肝炎的流行病学 [J]. 胃肠病学, 2002, 7 (5): 289-292. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2002.05.010.
FAN Zhuping, QIU Dekai. Epidemiology of hepatitis B [J]. Gastroenterology, 2002, 7 (5): 289-292. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2002.05.010.
- [2] PREVISANI N, LAVANCHY D. World health organization. Fact sheet [J]. Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences, 2000, 42 (2): 126.
- [3] LOK A S. Chronic hepatitis B [J]. New England Journal of Medicine, 2002, 346 (22): 1682-1683. DOI: 10.1002/hep.21513.
- [4] MAHONEY F J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12 (2): 351-366.
- [5] LIAW Y F, CHU C M. Hepatitis B virus infection. [J]. New England Journal of Medicine, 2007, 12 (3): 160-167. DOI: 10.1016/j.siny.2007.01.013.
- [6] 徐舒. 白背叶根抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究 [D]. 广州: 南方医科大学 (原中国人民解放军第一军医大学), 2006.
XU Shu, Experimental study on anti-duck hepatitis B virus in white back leaf root [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2006.

- [7] 赵作银, 佟月婷. 原发性肝癌与乙型肝炎病毒感染关系再探讨[J]. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(3): 180-181. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2006.03.026.
- ZHAO Zuoyin, TONG Yueting. Further discussion on the relationship between primary liver cancer and hepatitis B virus infection[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2006, 16: 180-181. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2006.03.026.
- [8] PARKIN D M, BRAY F, FERLAY J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 [J]. International Journal of Cancer, 2001, 94(2): 153. DOI: 10.1002/ijc.1440.
- [9] LEVRERO M, ZUCMAN-ROSSI J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Hepatology, 2016, 64(1 Suppl): S84. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.021.
- [10] LAFARO K J, DEMIRJIAN A N. Epidemiology of hepatocellular carcinoma [J]. Surgical Oncology Clinics of North America, 2015, 24(1): 1-17.
- [11] BANATVALA J E, VAN D P. Hepatitis B vaccine-do we need boosters? [J]. Journal of Viral Hepatitis, 2003, 10(1): 1. DOI: 10.1046/j.1365-2893.2003.00400.x.
- [12] FENG L, DU J, LIU J, et al. Identification of key target genes and pathways in laryngeal carcinoma [J]. Oncology Letters, 2016, 12(2): 1279-1286. DOI: 10.3892/ol.2016.4750.
- [13] GUO Y, BAO Y, MA M, et al. Identification of key candidate genes and pathways in colorectal cancer by integrated bioinformatical analysis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(4): 722. DOI: 10.3390/ijms18040722.
- [14] NAM K H, LI J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling [J]. Cell, 2002, 110(2): 203-212. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00814-0.
- [15] THOMASON H A, DIXON M J, DIXON J. Facial clefting in Tp63 deficient mice results from altered Bmp4, Fgf8 and Shh signaling [J]. Developmental Biology, 2008, 321(1): 273-282. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.06.030.
- [16] 陈中, 张嘉玲, 杨歆萍, 等. 抑癌基因 TP53 及新家族成员 TP63 和 TP73 的研究新进展 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(1): 57-62. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2113.2013.01.012.
- CHEN Zhong, ZHANG Jialing, YANG Xinping, et al. New progress in the study of tumor suppressor gene TP53 and new family members TP63 and TP73 [J]. Journal of Inner Mongolia Medical University, 2013, 35(1): 57-62. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2113.2013.01.012.
- [17] ESSERS M A, WEIJZEN S, DE VRIES MITS A M, et al. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK [J]. The EMBO Journal, 2014, 23(24): 4802-4812. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600476.
- [18] INDRIERI A, VANRAHDEN V A, TIRANTI V, et al. Mutations in COX7B cause microphthalmia with linear skin lesions, an unconventional mitochondrial disease [J]. American Journal of Human Genetics, 2012, 91(5): 942-949. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.09.016.
- [19] 王春枝. 低氧胁迫对鲢线粒体 ATP 酶活性及 β 、 γ 、 δ 亚基表达的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014. DOI: 10.7666/d.Y2565765.
- WANG Chunzhi. Effects of mitochondria ATPase activity and the expressions of β , γ , δ subunits during hypoxia stress in hypophthalmichthys molitrix [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. DOI: 10.7666/d.Y2565765.
- [20] 孙丽娟. 前脑特异性 Presenilins 双敲除小鼠模型中线粒体结构与功能的探讨 [D]. 上海: 华东师范大学, 2010. DOI: 10.7666/d.y1742228.
- SUN Lijuan. Discussion on mitochondrial structure and function in forebrain-specific Presenilins double knockout mouse model [D]. Shanghai: East China Normal University, 2010. DOI: 10.7666/d.y1742228.
- [21] YUAN K, LEI Y, CHEN H N, et al. HBV-induced ROS accumulation promotes hepatocarcinogenesis through Snail-mediated epigenetic silencing of SOCS3 [J]. Cell Death & Differentiation, 2016, 23(4): 616-627. DOI: 10.1038/cdd.2015.129.
- [22] FISCARO P, BARILI V, MONTANINI B, et al. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B [J]. Nature Medicine, 2017, 23(3): 327. DOI: 10.1038/nm.4275.