



张文韬,刘水兵,蒋红霞,等.笼养急性应激下蛋鸭垂体 microRNA 的差异表达分析[J].江西农业大学学报,2023,45(4): 931-943.

ZHANG W T,LIU S B,JIANG H X,et al.MicroRNA differential expression in egg duck pituitary gland under acute stress in cage-rearing[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2023,45(4):931-943.

笼养急性应激下蛋鸭垂体 microRNA 的差异表达分析

张文韬^{1,2},刘水兵^{1,2},蒋红霞^{1,2},周明芳^{1,2},熊 婷^{1,2,3},刘秋红^{1,2},
胡晓龙^{1,2},毛辉荣^{1,2},刘三凤^{1,2},陈 彪^{1,2*}

(1.江西农业大学 动物科学技术学院,江西 南昌 330045;2.江西农业大学 家禽研究所,江西 南昌 330045;3.江西生物科技职业学院,江西 南昌 330200)

摘要:【目的】研究基于 microRNA(miRNA)高通量测序技术鉴定蛋鸭在笼养急性应激情况下垂体 miRNA 的表达特性,旨在探索 miRNA 在应激情况下的潜在功能,为进一步探究龙岩山麻鸭在笼养过程中产生急性应激的分子机制提供参考。【方法】试验选取 20 只 110 d 龙岩山麻鸭,随机分组为笼养急性应激试验组(C 组),即叠层笼上笼 3 d 状态下龙岩山麻鸭,和非应激对照组(FW 组),即半舍饲散养龙岩山麻鸭;收集 113 d 时 C 组和 FW 组各 4 只龙岩山麻鸭垂体组织样品(C_P,FW_P),进行 miRNA 测序和分析。【结果】C_P 和 FW_P 两组文库共检测到 331 个已知的 miRNAs,预测了 5 个新 miRNAs。差异分析结果显示,C_P 组相对于 FW_P 组有 8 个 miRNAs 显著差异表达($P<0.05$),其中 4 个 miRNAs 上调表达,4 个 miRNAs 下调表达。差异表达 miRNA 的靶基因富集分析结果显示,靶基因极显著富集到钙信号通路(Calcium signaling pathway)、GnRH 信号通路(GnRH signaling pathway)、孕酮介导的卵母细胞成熟(Progesterone-mediated oocyte maturation)等信号通路上($P<0.01$)。【结论】笼养急性应激引起龙岩山麻鸭垂体组织中 hsa-miR-129-1-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-129-1-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-15b-5p 8 个 miRNAs 的差异表达,以上 miRNAs 可能通过调控多种信号通路调节龙岩山麻鸭的应激、生长、繁殖等生命活动。

关键词:龙岩山麻鸭;笼养;应激;垂体;microRNA 测序

中图分类号:S834⁺.83 文献标志码:A
文章编号:1000-2286(2023)04-0931-13

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



收稿日期:2023-04-18 修回日期:2023-05-15

基金项目:国家自然科学基金项目(32102541)、江西省自然科学基金项目(20212BAB215016)和江西省现代农业家禽产业技术体系(JXARS-09)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32102541), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province(20212BAB215016) and the Technology System of Modern Agricultural Poultry Industry of Jiangxi Province(JXARS-09)

作者简介:张文韬,硕士生,orcid.org/0009-0000-3299-6963,1145151652@qq.com;*通信作者:陈彪,副教授,博士,主要从事家禽遗传育种与生产研究,orcid.org/0000-0003-1852-5289,chenbiao@jxau.edu.cn。

MicroRNA Differential Expression in Egg Duck Pituitary Gland Under Acute Stress in Cage-rearing

ZHANG Wentao^{1,2}, LIU Shuibing^{1,2}, JIANG Hongxia^{1,2}, ZHOU Mingfang^{1,2},
XIONG Ting^{1,2,3}, LIU Qihong^{1,2}, HU Xiaolong^{1,2}, MAO Huirong^{1,2},
LIU Sanfeng^{1,2}, CHEN Biao^{1,2*}

(1.College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
2. Poultry Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. Jiangxi Biotech Vocational College, Nanchang 330200, China)

Abstract: [Objective] Based on the high-throughput sequencing technology of microRNA (miRNA), this study aims to identify the expression characteristics of pituitary miRNA in egg-laying ducks under acute stress in cage and explore the potential function of miRNA under stress, thus providing a reference for further exploring the molecular mechanism of acute stress in Longyanshan hemp ducks during cage rearing. [Method] In this study, twenty 110-day-old Longyan shan hemp ducks were chosen. The ducks were randomly assigned into two groups: cage-reared (C group, $n=10$), which was subjected to a stacked cage system for three consecutive days, and free-range non-stressed group (FW group, $n=10$), which was raised under semi-houseing conditions. At 113 days of rearing, four pituitary tissue samples were collected from each group (C_P, FW_P) for miRNA sequencing and analysis. [Result] A total of 331 known miRNAs were detected in the C_P and FW_P libraries, and 5 new miRNAs were predicted. Differential analysis revealed eight significantly differentially expressed miRNAs in C_P vs FW_P ($P<0.05$), with four miRNAs upregulated and four miRNAs downregulated. Enrichment analysis of target genes indicated significant enrichment in calcium signaling pathway, gonadotropin-releasing hormone signaling pathway (GnRH signaling pathway), progesterone-mediated oocyte maturation and other signaling pathways ($P<0.01$). [Conclusion] These results suggest that acute stress in cages leads to differential expression of hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-27a-3p_R-2, hsa-miR-99a-5p_R-1, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-15b-5p_R+1_2ss20AG21CT, PC-5p-1405_462, hsa-let-7f-1-3p_1ss22CT miRNAs in pituitary tissue, which may regulate stress, growth, reproduction, and other life activities of Longyan shan hemp ducks through various signaling pathways.

Keywords: Longyan shan hemp duck; cage rearing; stress response; pituitary; microRNA sequencing

【研究意义】我国养鸭历史悠久,2021年我国鸭存栏量仍居世界第一。随着社会发展和农业科技的进步,传统蛋鸭养殖模式已不适应我国以绿色、健康、环保为主题的规模化、集约化产业发展需求。蛋鸭养殖模式逐渐从小规模散养向大规模集约化养殖转变且快速发展。笼养模式作为近年来兴起的新型蛋鸭养殖模式,发展前景良好^[1-2]。笼养模式下饲养蛋鸭,有利于促进蛋鸭饲养科学化、标准化发展,提高生物安全和产品品质,节约生产成本,提高生产效率。蛋鸭在笼养模式下取得了优异的生产性能和人工授精效果^[3-6],但将蛋鸭由散养转为笼养模式的过程中会产生应激反应。应激反应可能会导致鸭生长缓慢、产蛋率偏低、体表羽毛不齐等问题,严重制约了蛋鸭笼养技术的推广普及^[7]。【前人研究进展】蛋鸭本身具有耐寒不耐热、体温高、代谢旺盛、皮肤无汗腺分布、难散热等生理特点。在笼养模式下,蛋鸭机体产生的热量使环境温度升高,易造成蛋鸭热应激,从而影响其生产性能^[5]。饲养密度也是引起家禽应激的因素之一。大量研究发现,高密度饲养可能会导致家禽发生应激,从而降低家禽生产性能^[9-10]。此外,养殖过程中的各种刺激,如氨气、硫化氢等生物应激因素,均可导致家禽应激^[11-12]。应激是指机体受到各种因

素刺激时所出现的全身性非特异性适应反应,是家禽常见的生理或病理反应^[13]。将蛋鸭由散养转为笼养模式的过程中产生的应激反应在上笼初期尤为明显,Zhang等^[14]在绍兴蛋鸭笼养早期机体抗氧化和炎症损伤的研究中通过组织病理学分析发现,相较于散养组经过1,2 d的笼养应激组鸭肝脏表现出严重的损伤、炎症浸润和血细胞渗出,4 d后肝损伤开始好转,这些结果表明,在笼养早期应激期,短期应激刺激足以对机体组织造成应激损伤。Zheng等^[15]采用液相色谱串联质谱法测定传统饲养和笼养5,10,15 d后鸭血浆中代谢物的变化,分析了笼养应激对鸭生产性能参数和氧化应激指标的影响,推断笼养应激组鸭在笼养后的前5 d处于敏感期。本课题组前期比较了笼养蛋鸭和平养蛋鸭上笼3 d后血浆非靶代谢组学的异同,探究了急性笼养应激对蛋鸭代谢的影响,通过分析发现,笼养急性应激会导致蛋鸭血浆中甘油磷脂代谢途径紊乱,蛋鸭在笼养条件下机体代谢发生适应性变化^[16]。以上研究结果均表明笼养应激影响蛋鸭生长发育等生命活动。应激通过下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)刺激机体做出相应应激反应^[17]。垂体在应激反应的调节中通过内分泌系统发挥重要作用^[18]。

【本研究切入点】关于家禽特别是蛋鸭应激的研究多集中于表现性能,其作用机制还需系统性研究。随着科学技术的发展,组学技术在动物生产上的应用逐渐普及,可利用组学技术研究蛋鸭在笼养过程发生应激的具体调控机制。microRNA(miRNA)是一类长度为20~24 nt的具有调控功能的非编码RNA,主要通过与其靶基因mRNA的3'UTR结合的方式,介导mRNA的翻译抑制^[19]。miRNA参与各种各样的细胞活动和生物过程,例如细胞增殖和代谢、生长发育、病毒防御、癌症等^[20-22]。【拟解决的关键问题】本研究拟以龙岩山麻鸭作为研究对象,笼养作为应激源,从垂体miRNA表达水平的角度,探究笼养模式下蛋鸭应激发生的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物与分组

选取110 d半舍饲散养、体格均一的龙岩山麻鸭20只(江西天韵农业开发有限公司,南昌),随机分为叠层笼饲养组即笼养急性应激组(cage-rearing system, C组, 试验组)和半舍饲散养组即非应激组(floor-water combination system, FW组, 对照组),每组10个个体。C组在110 d时转移到叠层笼中饲养,上笼3 d后即113 d后随机选取C组和FW组龙岩山麻鸭各4只作为试验对象,分别取垂体组织液氮速冻后-80℃保存备用。将叠层笼饲养急性应激组垂体命名为C_P(试验组),半舍饲散养非应激组垂体命名为FW_P(对照组)。

1.2 试验方法与步骤

1.2.1 RNA提取和文库构建 采用TruSeq Small RNA Sample Prep Kits[因美纳(中国)科学器材有限公司]试剂盒提取RNA,制备小RNA测序文库。分别提取垂体样品总RNA,经质检合格后,在小RNA 3'、5'连接接头并反转录成cDNA,经PCR扩增建立小RNA测序文库。文库经长度检测后用于测序和生物信息学分析。

1.2.2 miRNA测序分析 使用Illumina HiSeq 2500单端1×50 bp测序模式对构建的文库进行高通量测序,再用ACGT101-miR(杭州联川生物技术股份有限公司)对miRNA数据进行分析参照Bi等^[23]方法,首先去除3'接头和无效序列,获取clean data,并对其进行长度筛选(保留碱基长度在18~26 nt的序列);随后进行RNA数据库[不包含miRNA(mRNA、rFam和Repbase)]比对分析和过滤得到Valid数据;将有效数据比对到前体和基因组(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2793?genome_assembly_id=426073)进行miRNA鉴定、预测和命名;以 $P<0.05$ 为阈值进行差异表达miRNA的筛选;使用TargetScan(v5.0)、miRanda(v3.3a)两款软件分别对显著性差异的miRNA进行靶基因预测,最后取此两款软件预测结果的交集作为差异miRNA的最终靶基因。

1.2.3 差异性miRNA靶基因富集性分析 对差异表达的miRNA靶基因进行GO和KEGG富集分析,参考Bi等^[23]方法,将靶基因向GO和KEGG数据库映射,将这些基因按照对应的GO和KEGG条目进行注

释,计算每个条目和通路的差异基因数,然后应用超几何检验找出与整个基因组背景相比显著富集的GO条目和KEGG通路,并对结果进行可视化绘图。

1.2.4 miRNA 及靶基因实时荧光定量 PCR 验证分析 采用 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop)试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将总 RNA 中的 miRNA 进行反转录,合成 cDNA 第一链。has-let-7c-5p (TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT)、hsa-miR-99a-5p_R-1 (AACCCGTAG-ATCCGATCTTGT)、hsa-let-7b-5p (TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT)、hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG (AAGCCCTTACCCCAAAAAGGAT)4 个 miRNAs 均由锐博生物(广州锐博生物技术有限公司)设计特异性的 Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR 引物组(每组包含一个反转录引物和一对定量引物),以 U6 为内参基因,按照 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)配制反应体系:每个 10 μL 的 qPCR 混合物含有 5 μL 的 2×miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix、0.2 μL 的反向引物(10 μmol/L)、0.2 μL 的正向引物(10 μmol/L)、2 μL 的 cDNA 和 2.6 μL 的不含核糖核酸酶的 ddH₂O。在 Applied Biosystems QuantStudioTM 5 实时荧光定量 PCR 系统[赛默飞世尔(中国)有限公司]按照:初始变性(95 ℃ 15 min);40 个循环的扩增(95 ℃ 10 s 和 60 ℃ 30 s);热变性(95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,95 ℃ 15 s)产生熔解曲线的条件进行 PCR 反应^[24];使用 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)对 mRNA 进行反转录,使用 2×T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I)试剂盒(北京擎科生物科技股份有限公司)按照说明书,以 GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)为内参,进行 ACTA2(Actin Alpha 2)、PANK3(Pantothenate Kinase 3)、NMRK2(Nicotinamide Riboside Kinase 2)、CHAC1(ChaC Glutathione Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1) mRNA 的扩增和定量,引物见表 1。每个样品设置 3 个技术学重复。结果以 2^{-ΔΔCt}法进行目的基因相对表达量的计算,用 GraphPad Prism 8.0(<https://www.graphpad.com/features>)进行分析和绘图,结果以平均值±标准误展示。

表 1 引物信息
Tab.1 Primer information

引物名称 Primer names	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Product size
qACTA2-F	CACAGGGATTGTGCTCGACT	60	188
qACTA2-R	CACGGACAATTTACGCTCC		
qPANK3-F	GGTCTATTGCCCCGATGTGT	60	111
qPANK3-R	CCAGTGCATACGCAAGAAGC		
qNMRK2-F	GTCCACCAGGACGACTTCTT	60	152
qNMRK2-R	GAACGGGCAAACTTCACTGG		
qCHAC1-F	GTCGCTGCAGTACCTGAACA	60	195
qCHAC1-R	CCGCTTGAGGCCATGATTTG		
qGAPDH-F	GGTAGTGAAGGCTGCTGCTGATG	60	197
qGAPDH-R	CCACCACACGGTTGCTGTATCC		

2 结果与分析

2.1 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体 miRNA 文库测序质量及数据处理情况

对提取的笼养和半舍饲散养鸭垂体 RNA 进行质量检测,结果如表 2 所示,OD₂₆₀/OD₂₈₀在 2.1 左右,浓度均在 0.5 μg/μL 以上,表示所提 RNA 浓度高且无蛋白质、DNA 等污染,符合后期建库和测序要求。

样品经建库测序,获得原始数据。对原始数据产出进行统计,通过质控得到高质量数据如表 3,对照组和试验组平均每个样品获得 Valid reads 高达 8 050 163.25 条,质控率均在 73.68% 以上,且各个文库所

得序列长度超过 92.23% 分布在 20~24 nt,其中长度为 22 nt 的序列所占比例最大,符合 Dicer 酶切割的典型特征,测序结果可靠,可用于后续分析。

表 2 RNA 质量检测
Tab.2 RNA quality test

序号 Serial number	样本名称 Sample name	浓度/($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) Concentration	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
1	FW_P_1	1.06	2.14
2	FW_P_2	1.04	2.17
3	FW_P_3	0.63	2.03
4	FW_P_4	0.74	2.12
5	C_P_1	0.57	2.12
6	C_P_2	0.63	2.11
7	C_P_3	0.70	2.16
8	C_P_4	0.65	2.15

表 3 miRNA 测序数据统计
Tab.3 miRNA-seq statistics

样本名称 Sample name	原始数据 Raw data	有效序列 Valid reads	有效序列占比/% Percentage of valid reads	Q ₃₀ /%
FW_P_1	9 817 810	7 233 803	73.68	96.19
FW_P_2	9 361 144	7 920 850	84.61	96.58
FW_P_3	9 254 025	7 279 490	78.66	96.48
FW_P_4	11 949 660	9 965 990	83.40	96.56
C_P_1	12 187 673	9 890 631	81.15	96.57
C_P_2	8 889 578	6 723 432	75.63	95.82
C_P_3	9 986 848	8 372 612	83.84	96.72
C_P_4	8 931 306	7 014 498	78.54	96.06

2.2 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体差异表达 miRNA 的鉴定和聚类分析结果

将 Valid reads 与参考基因组进行比对和筛选,C_P 和 FW_P 两组文库共检测到 554 个已知的 miRNAs,预测了 43 个新 miRNAs。去除重复及表达量为 0 的 miRNAs 后,共鉴定出了 331 个已知的 miRNAs,预测了 5 个新 miRNAs。其中 18 个 miRNAs 仅在 C_P 中可以检测到,14 个 miRNAs 只在 FW_P 中检测到(图 1)。以 FW_P 作为对照,以 $P<0.05$ 为筛选条件,检测到 8 个 miRNAs(hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG、hsa-let-7c-5p、hsa-miR-27a-3p_R-2、hsa-miR-99a-5p_R-1、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-15b-5p_R+1_2ss20AG21CT、PC-5p-1405_462、hsa-let-7f-1-3p_1ss22CT)显著差异表达(图 2)。以 $\log_2(\text{foldchange})$ 为横坐标, $-\log_{10}(P\text{-value})$ 为纵坐标,对差异表达分析中所有的 miRNAs 绘制火山图(图 3a)。结果表明,笼养急性应激状态下一些 miRNAs 的表达上调,一些 miRNAs 的表达被抑制,暗示这些 miRNAs 发挥着各自不同的生物学功能。根据样品 miRNA 表达量的相近程度,将差异表达 miRNAs 进行聚类分析(图 3b),采用 $\log_{10}(\text{norm 值})$ 表达直观地展示差异 miRNAs 在不同样品中的表达情况,差异 miRNA 聚类分析显示 C_P 和 FW_P 的样本可以显著分离,说明差异表达分析结果是可靠的。

2.3 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体差异表达 miRNA 靶基因 GO 和 KEGG 富集分析

对差异 miRNAs 进行靶基因预测,以 TargetScan_score ≥ 50 ,miranda_Energy <-10 为筛选条件,共预测到靶基因 374 个(表 1)。对上述靶基因进行 GO、KEGG 富集分析。GO 富集性分析显示差异表达 miRNA

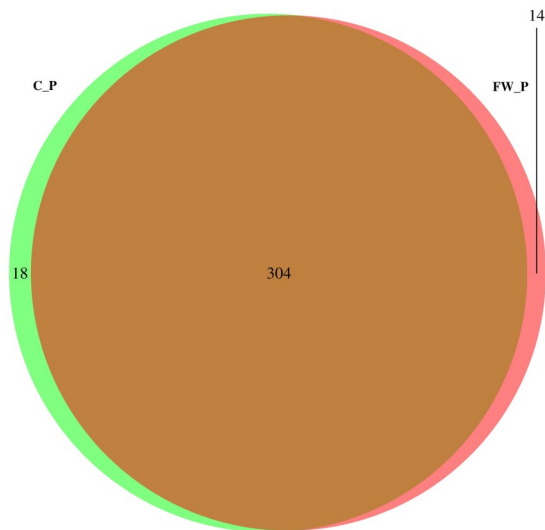


图1 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体miRNA韦恩图解

Fig.1 Venn diagram of miRNAs in pituitary gland of caged ducks with acute stress and free-range ducks with no stress

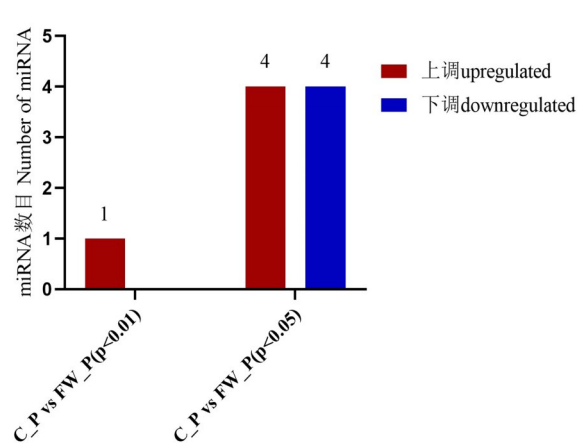
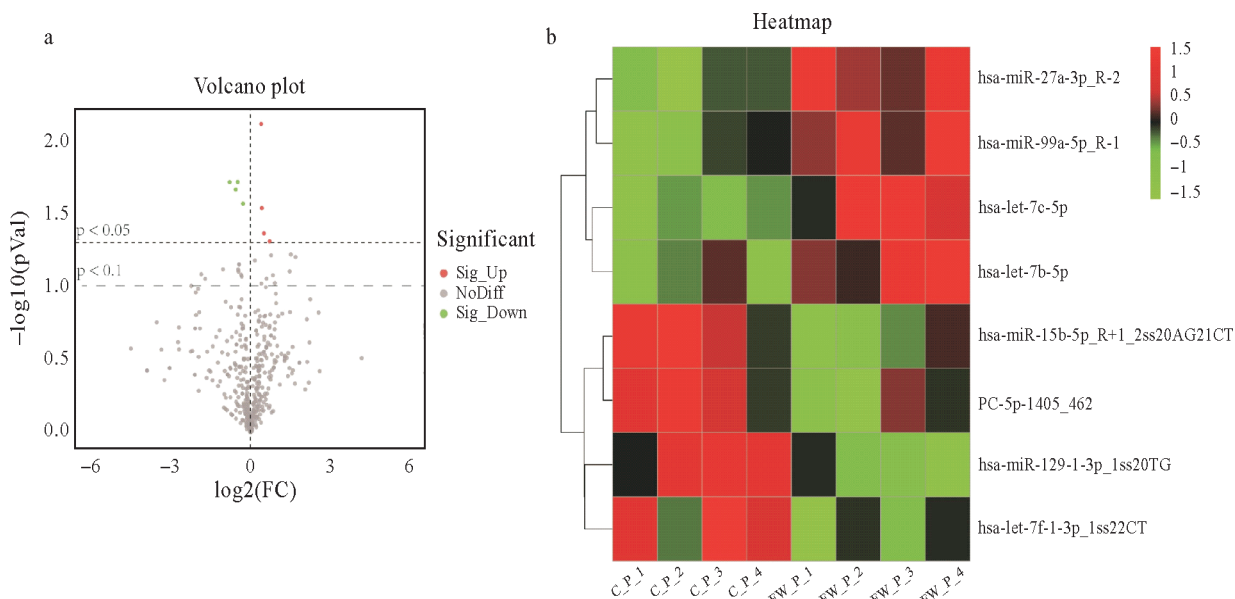


图2 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体差异表达miRNA数量

Fig.2 Differential expression of miRNAs in the pituitary gland of egg-laying ducks subjected to acute stress in captivity and those raised under semi-free-range conditions without stress



(a) 横坐标为 $\log_2(\text{foldchange})$ 代表 miRNA 在不同样本中差异表达倍数变化, 纵坐标为 $-\log_{10}(P \text{ value})$, 代表 miRNA 表达量变化差异的统计学显著性; 红色代表上调的显著差异表达 miRNA, 绿色代表下调的显著差异表达 miRNA, 灰色的点代表非显著性差异表达 miRNA ($P > 0.05$); (b) 横坐标为样本, 纵坐标为 miRNA, 不同的颜色表示 miRNA 不同的表达水平, 颜色由绿色至黑色至红色表示表达量 [$\log_{10}(\text{norm 值})$] 从低到高, 红色表示高表达 miRNA, 绿色表示低表达 miRNA。

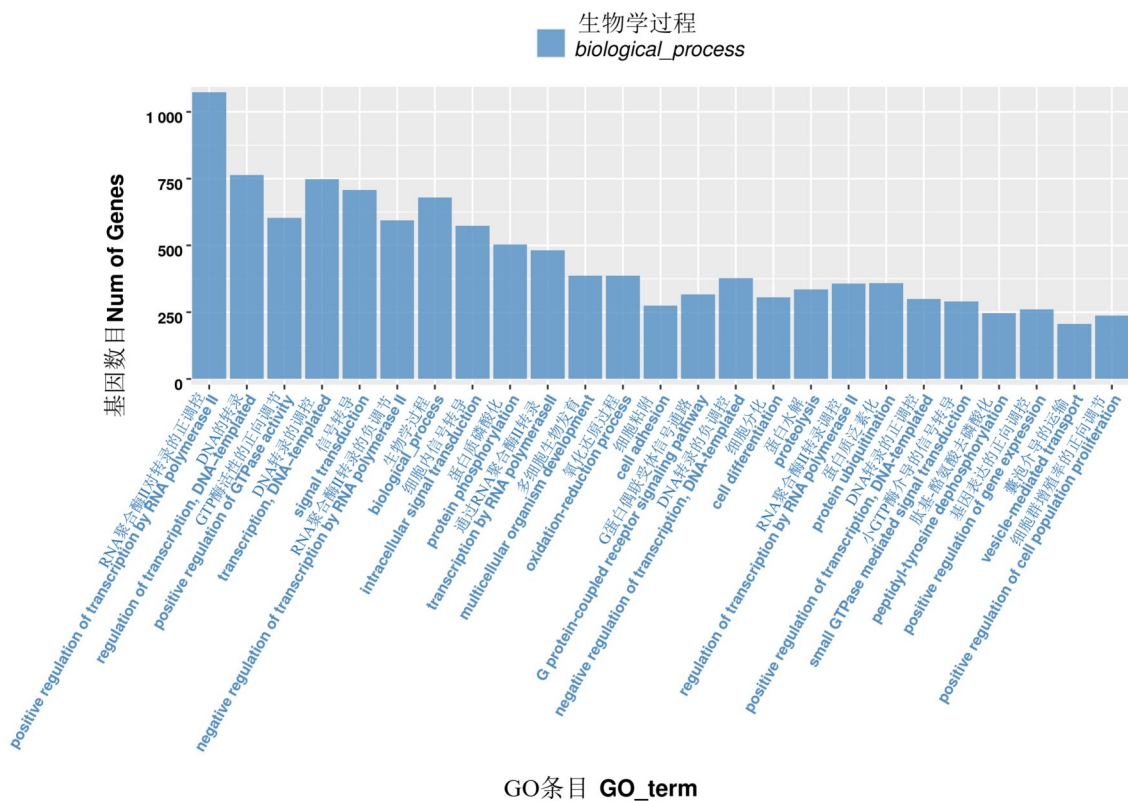
(a) The x -axis denotes $\log_2(\text{foldchange})$, reflecting varied miRNA expression in different groups. The y -axis indicates $-\log_{10}(P \text{ value})$, symbolizing the statistical significance of altered miRNA expression. Red dots depict significantly upregulated miRNAs, green dots represent significantly downregulated miRNAs, and gray dots signify insignificantly changed miRNAs ($P > 0.05$). (b) Samples are displayed along the x -axis, whilst miRNAs are presented along the y -axis. Distinct hues illustrate diverse levels of miRNA expression, indicated by a color scale ranging from green to black to red, signifying ascending expression levels [$\log_{10}(\text{norm value})$]. High miRNA expression is depicted by red, while low miRNA expression is denoted by green.

图3 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体表达的miRNA的火山图和差异表达miRNA热图

Fig.3 Volcano plot and heat map of differentially expressed miRNAs in the pituitary gland of egg-laying ducks under acute stress and non-stressful semi-free-range feeding

靶基因在生物过程(biological process, BP)分类中主要是富集到:RNA 聚合酶 II 对转录的正调控(positive regulation of transcription by RNA polymerase II)、DNA 转录的调控(regulation of transcription, DNA-templated)、GTP 酶活性的正向调节(positive regulation of GTPase activity)、DNA 转录(transcription, DNA-templated)、信号转导(signal transduction)等 25 个 GO 条目中(图 4,表 2)。

基于 Pathway 的分析有助于更进一步了解基因的生物学功能。C_P vs FW_P 差异表达 miRNAs 的靶基因显著富集到脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)、钙信号通路(calcium signaling pathway)、细胞粘附分子(cell adhesion molecules)、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢(D-glutamine and D-glutamate metabolism)、GnRH 信号通路(gonadotropin-releasing hormone signaling pathway, GnRH signaling pathway)、MAPK 信号通路(mitogen-activated protein kinases signaling pathway, MAPK signaling pathway)、VEGF 信号通路(vascular endothelial growth factor signaling pathway, VEGF signaling pathway)等信号通路上(图 5,表 3),其中涉及繁殖相关的 GnRH 信号通路中 Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(*JUN*)、Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog(*KRAS*)、Mitogen-activated protein kinase(*MAPK*)等 39 个基因被富集(图 6),暗示急性笼养应激可能影响蛋鸭的内分泌、生长、繁殖等过程。



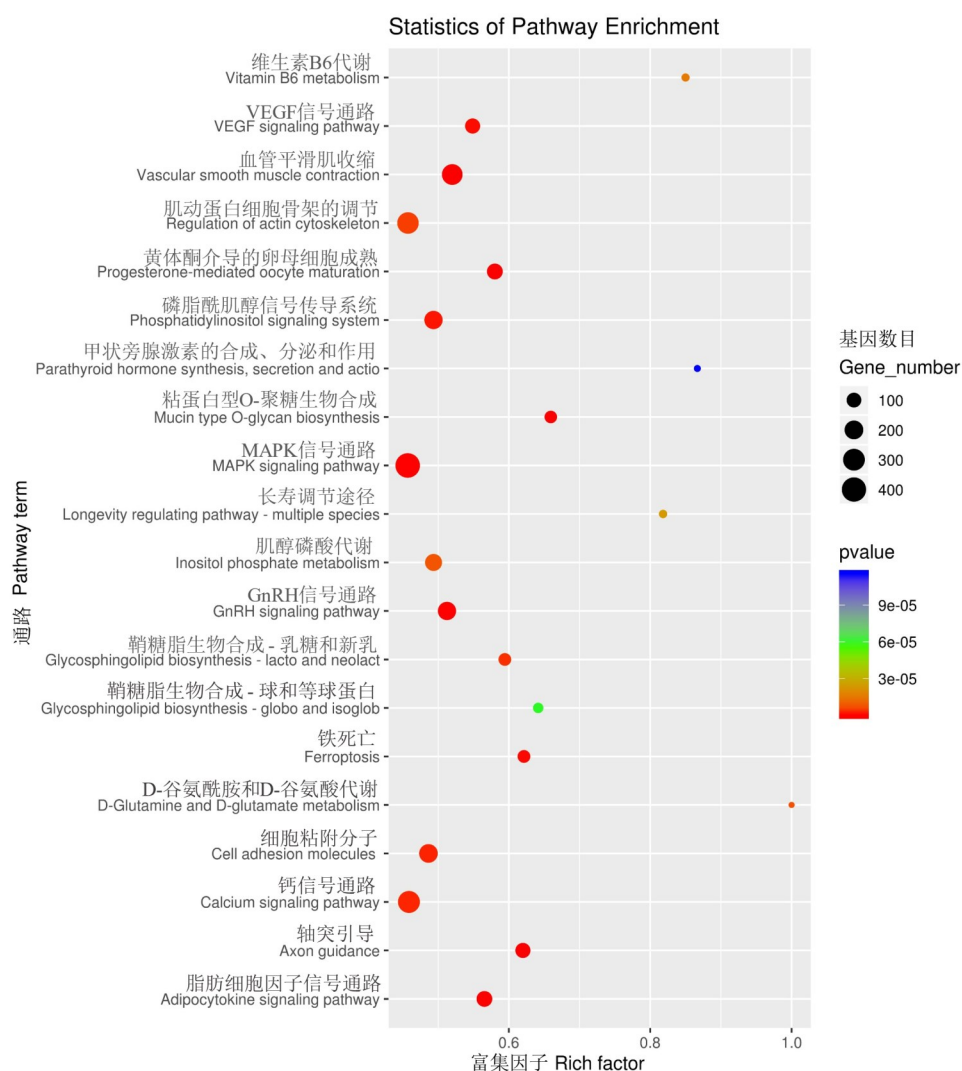
横坐标是对GO的分类,纵坐标是靶基因占该GO条目所有基因的百分比。
The y-axis represents the percentage of target genes relative to the entire gene population of the GO terms ,
and the x-axis represents the classification of GO terms.

图4 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体差异 miRNAs 的靶基因 GO 生物学功能富集分析结果

Fig.4 GO biological process enrichment analysis results of the target genes of miRNAs with differential expression in pituitary gland between egg-laying ducks under acute stress and free-range non-stressed ducks in semi-free-range feeding system

2.4 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体差异表达 miRNA 及靶基因的实时荧光定量 PCR 验证结果

为验证测序结果的准确性,根据差异表达 miRNA 表达量(mean 值)、差异倍数(Fold change 值)、显著性(P value 值)随机选择 4 个差异表达 miRNA 进行荧光定量 PCR 验证分析,结果如图 7 所示,miRNAs:



Rich factor表示位于该KEGG的差异基因数/位于该KEGG的总基因数, Rich factor值越大, KEGG富集程度越大, 纵坐标为KEGG条目, 圆圈大小表示靶基因数目多少, 圆圈越大靶基因数目越多, 不同的颜色表示 P 值大小, 颜色由蓝色经由绿色至红色表示 P 值从大到小, P 值越小, KEGG富集程度越高($P < 0.05$ 为显著)。

The Rich factor, defined as the ratio of differentially expressed genes to total genes in a given KEGG pathway, indicates the degree of enrichment. A higher rich factor value suggests a greater level of enrichment. The y -axis denotes the KEGG pathways and the circle size corresponds to the number of target genes with larger circles indicating more target genes present. The P -values are represented in various colors with blue indicating larger P -values and red representing smaller P -values. A P -value less than 0.05 is considered significant indicating a higher degree of enrichment for that KEGG pathway.

图5 笼养急性应激与半舍饲散养非应激蛋鸭垂体差异表达miRNAs靶基因的KEGG分析结果

Fig.5 KEGG enrichment analysis of the target genes of miRNAs with differential expression in pituitary gland between egg-laying ducks under acute stress and free-range non-stressed ducks in semi-free-range feeding system

has-let-7c-5p、hsa-miR-99a-5p_R-1、hsa-let-7b-5p显著差异表达($P < 0.05$), 且表达趋势与miRNA测序结果一致, hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG表达趋势(以散养组为对照, 下调表达)与测序结果相反, 但未见显著下调表达(图7a、图7b)。根据TargetsCan的阈值大于50和miRada的阈值小于-10的靶基因预测标准, 在最终获得的与差异表达miRNA可能存在靶向关系的候选基因里随机选择4个进行荧光定量PCR验证分析, 结果: *NMRK2* (hsa-let-7f-1-3p_1ss22CT)显著差异表达($P < 0.05$), *ACTA2* (hsa-let-7c-5p、hsa-miR-27a-3p_R-2、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-15b-5p_R+1_2ss20AG21CT)、*CHAC1* (hsa-let-7b-5p、hsa-let-7c-5p、hsa-miR-15b-5p_R+1_2ss20AG21CT)极显著差异表达($P < 0.01$), *PANK3* (PC-5p-1405_462、hsa-let-7f-1-3p_1ss22CT)未见差异表达(图7c)。

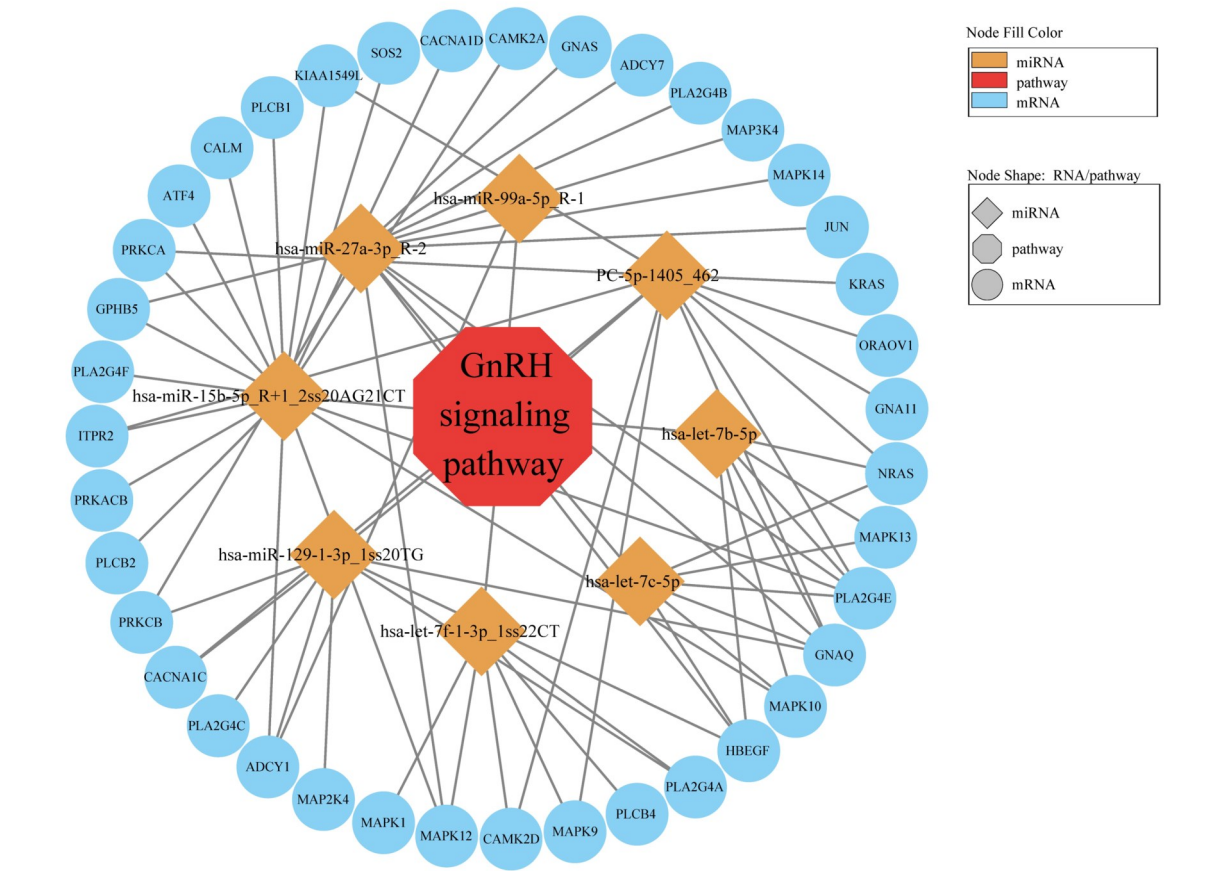
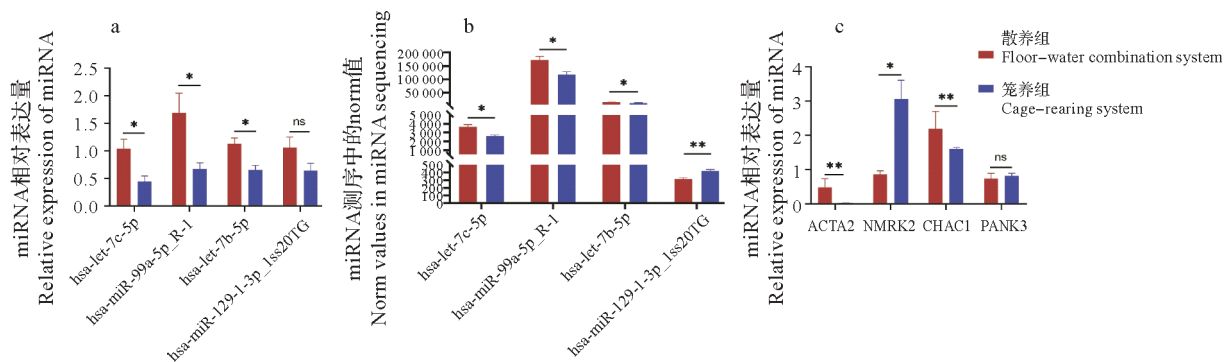


图 6 GnRH 通路-基因-miRNAs 调控网络
Fig.6 GnRH pathway-gene-miRNAs regulatory network



横坐标为 miRNA 或基因,纵坐标为 miRNA 或基因的表达量,红色为散养组,蓝色为笼养组(* $P<0.05$ 为显著,** $P<0.01$ 为极显著)。

The x -axis represents miRNAs or their target genes, the y -axis represents the expression level of miRNA or their target genes. The red bars indicates the FW_P group, while the blue bars represent the C_P group(* indicates $P<0.05$, ** indicates $P<0.01$).

图 7 笼养急性应激与半舍散养非应激蛋鸭垂体 miRNA 及靶基因的定量验证
Fig.7 qPCR validation of pituitary miRNA and some target genes in caged acute stress and semi-free-range non-stress laying ducks

3 讨论

应激对家禽生产和繁殖影响的研究主要集中在生产性能、免疫力及各项生理指标等方面,涉及 RNA 分子水平的研究目前尚少^[25]。本研究以笼养急性应激后的蛋鸭垂体为研究模型,通过 miRNA 测序数据的差异表达分析、靶基因预测分析、通路富集分析等,阐明笼养急性应激对垂体 miRNA 表达的影响,探究笼养急性应激对蛋鸭机体的影响。

垂体 miRNA 测序以半舍饲散养非应激组为对照,检测到 8 个差异 miRNAs,其中 3 个(hsa-let-7c-5p、hsa-let-7b-5p、hsa-let-7f-1-3p_1ss22CT)为 let-7 家族成员。研究表明 let-7 是一种肿瘤抑制因子 miRNA,能够抑制多种癌基因,在许多类型的人类癌症中下调^[26]。let-7 家族 miRNAs 能调节癌基因如 RAS [HRAS(HRas proto-oncogene, GTPase)、NRAS(neuroblastoma RAS viral oncogene homolog)、KRAS(kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)]的表达,Weidhaas 等^[27]在放射治疗对抗癌细胞耐药性的研究中,用放射性射线照射肺癌细胞系 A549,发现这会使 let-7(let-7a、let-7b)表达水平降低,RAS 被激活;用放射性射线照射癌性和正常肺上皮 2 h 后发现 let-7(let-7a、let-7b)表达显著减少。let-7 在机体和皮肤老化过程中也发挥了重要作用,一些包括 let-7 在内的寿命相关 miRNAs 在长寿的人中下调,这可能与促进寿命延长有关^[28]。let-7 还与卵巢颗粒细胞的衰老相关^[29]。此外,有研究表明 let-7 家族 miRNAs 与应激反应相关,如 let-7c 与细胞热应激相关;Wilmink 等^[30]在参与热诱导的细胞应激反应相关 miRNAs 的研究中,正常成人真皮成纤维细胞(HDF)暴露在 44 °C 的水浴中 1 h 后,发现 let-7c、miR-125b 等 miRNAs 差异表达。这与本研究 miRNA 测序发现 miRNA:hsa-let-7c-5p 差异表达的结果相似。对 3 个 let-7 家族成员的靶基因(*ACTA2*、*PANK3*、*NMRK2*、*CHAC1*)及包括 2 个 let-7 家族成员在内的 4 个 miRNAs(hsa-let-7c-5p、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-99a-5p_R-1、hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG)进行定量分析,以半舍饲散养非应激组为对照 hsa-let-7c-5p、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-99a-5p_R-1 定量结果均和测序结果一致。hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG 未见差异表达,这可能是由于 hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG 的反转录或定量引物存在一定问题导致其 qPCR 结果不稳定。每组测序样品采用了 4 个非常规的 3 个生物学重复,提高了数据的可信度,因此推测 miRNA 测序结果仍然是可靠的。

let-7 家族成员 miRNAs(hsa-let-7c-5p、hsa-let-7b-5p)在叠层笼上笼 3 d 急性应激龙岩山麻鸭垂体样本组中差异下调表达,这与 Saleh 等^[31]在细胞水平研究 let-7 相应应激的调节作用和机制的结果一致,在这项研究中发现 let-7a 和 let-7b 在暴露于包括电离辐射在内的诱导应激的物质后显著降低,并通过染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)分析和双荧光素酶报告试验进一步证明了 p53 能直接抑制 let-7 表达。hsa-let-7b-5p 的靶基因 *CHAC1* 作为一种促细胞凋亡因子,可能参与细胞凋亡、氧化应激和铁死亡,Zhou 等^[32]在氧化应激与细胞凋亡或铁死亡之间的关系研究中发现:*CHAC1* 通过增强脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 HK-2 细胞中的氧化应激来加剧细胞铁死亡和凋亡。上述结果表明 has-let-7 家族 miRNAs 及其靶基因参与机体的各种应激反应过程,推测其可能参与蛋鸭笼养应激过程的调控,但具体机制有待进一步试验和探讨。

下丘脑-垂体的靶器官有肾上腺、性腺及甲状腺。下丘脑-垂体轴一直被公认为是大脑中关键的调节生殖的内分泌系统^[33]。下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)在调节生殖功能中起关键作用,下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)作用于垂体,释放促性腺激素,刺激促黄体生成激素(LH)和促卵泡激素(FSH)合成和分泌,最终影响动物的生殖过程^[34]。多个研究揭示了 miRNAs 在涉及 GnRH 分泌和垂体后续活动关键调控过程中的中心地位^[33]。应激能够激活 HPA 轴,HPA 轴产生的激素可以通过上调促性腺激素抑制激素(gonadotropin inhibiting hormone, GnIH)抑制 GnRH 发挥作用,导致垂体分泌 FSH 和 LH 减少,从而抑制动物繁殖^[35-36]。差异 miRNA 靶基因 KEGG 富集性分析发现显著差异表达 miRNAs 可以靶向 GnRH 信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟(progesterone-mediated oocyte maturation)等通路上的多个基因,如:*ITPR2*(Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2)不仅是蛋形相关基因^[37],而且还是编码哺乳动物维持胎盘连接完整性和胚胎活力相关的 *IP3Rs*(Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors)亚型的基因之一^[38]; *CACNA1C*(calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C)可能与人胎盘中的钙转运有关^[39]; *PRKCB*(protein kinase C beta)和 *PLCBI*(phospholipase C beta 1)是下丘脑中 *GNAQ*(G protein subunit alpha qG, 蛋白亚基 q)调节 GnRH 表达和分泌的下游基因。*GNAQ* 调控下丘脑神经细胞中 *PLCBI*,并通过钙和 PRKC(protein kinase C)信号通路直接调控 GnRH 的表达和分泌^[40]。差异表达 miRNAs 可能通过靶向这些基因,调节相关通路的活动进而影响蛋鸭繁殖过程。

Ca²⁺是一种多功能的细胞内信使,是细胞信号转导过程中的主要信号分子,用于调节能量输出、细胞

代谢和表型,参与感知各种应激并调节随后的细胞反应^[41-42]。应激诱导的细胞内 Ca^{2+} 增加已被证实会在体内产生各种不良的影响,可能触发各种有害信号通路,包括自由基生成,细胞凋亡,谷氨酸突触释放增加以及细胞毒性细胞因子的合成、释放^[43]。有研究发现氧化应激通过对钙泵、交换剂、通道和结合蛋白的综合作用来增加细胞质中 Ca^{2+} 的胞质含量^[44]。在本研究龙岩山麻鸭笼养应激过程中,差异表达 miRNAs 的靶基因显著富集到钙信号通路(calcium signaling pathway),证明笼养急性应激状态下蛋鸭垂体钙信号通路活动发生变化。

4 结 论

(1)本研究探究了叠层笼养模式下急性应激对蛋鸭垂体 miRNA 表达的影响,鉴定出 hsa-miR-129-1-3p_1ss20TG、hsa-let-7c-5p、hsa-miR-27a-3p_R-2、hsa-miR-99a-5p_R-1、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-15b-5p_R+1_2ss20AG21CT、PC-5p-1405_462、hsa-let-7f-1-3p_1ss22CT 等 8 个显著差异表达的 miRNAs。

(2)靶基因预测及富集分析表明笼养急性应激通过 Calcium signaling pathway、Gonadotropin-releasing hormone signaling pathway、GnRH signaling pathway 等代谢、繁殖相关通路调节蛋鸭机体生命活动。

致谢:叠层笼养蛋鸭繁殖性能提升的技术研究(2021JXAUXH100)和江西省研究生创新专项资金项目(YC2022-s410)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] 陈斌丹,张科杰,李柳萌,等.蛋鸭笼养现状与发展趋势[J].浙江农业科学,2022,63(8):1868-1870.
CHEN B D,ZHANG K J,LI L M,et al.Present status and development trend of egg duck cage rearing[J].Journal of Zhejiang agricultural sciences,2022,63(8):1868-1870.
- [2] 刘秋红,郭海宁,谢金泉,等.不同蛋鸭品种及笼养模式对鸭蛋品质的影响[J].江西农业大学学报,2022,44(4):961-967.
LIU Q H,GUO H N,XIE J Q,et al.Analysis and comparison of egg quality of three breeds of laying ducks rearing in different cage modes[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2022,44(4):961-967.
- [3] 熊婷,邬崇华,陈彪,等.笼养山麻鸭精液品质的测定与分析[J].黑龙江畜牧兽医,2020(14):53-56.
XIONG T,WU C H,CHEN B,et al.Determination and analysis of semen quality in caged Shanma ducks[J].Heilongjiang animal science and veterinary medicine,2020(14):53-56.
- [4] 林勇,陈宽维,师蔚群,等.笼养对苏邮1号蛋鸭生产性能与蛋品质的影响[J].家畜生态学报,2018,39(1):41-44.
LIN Y,CHEN K W,SHI W Q,et al.Effects of cage rearing system on production performance,egg quality and egg component of Suyou No.1 laying ducks[J].Journal of domestic animal ecology,2018,39(1):41-44.
- [5] 郭海宁,陈开丰,苏红卫,等.笼养山麻鸭适宜采精频率和输精参数的研究[J].江西农业大学学报,2018,40(2):350-357.
GUO H N,CHEN K F,SU H W,et al. Optimum semen collection frequency and insemination parameters of cage-rearing ShanMa duck[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2018,40(2):350-357.
- [6] 邬崇华,熊婷,陈开丰,等.鱼肝油对山麻鸭公鸭繁殖性能的影响[J].江西农业大学学报,2020,42(1):135-142.
WU C H,XIONG T,CHEN K F,et al.Effects of Cod-liver oil on reproductive performance of Shan partridge duck[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2020,42(1):135-142.
- [7] LIU H H,QI J W,YANG Q L,et al.Effects of cage and floor rearing systems on the metabolic components of the uropygial gland in ducks[J].Animals,2022,12(2):214.
- [8] 陈开丰,毛辉荣,苏红卫,等.不同阶梯笼层山麻鸭生产性能和蛋品质比较分析[J].家畜生态学报,2019,40(11):45-49.
CHEN K F,MAO H R,SU H W,et al.Effect of cage tier on production performance and egg quality of Shanma duck[J].Journal of domestic animal ecology,2019,40(11):45-49.
- [9] 袁艳枝,魏凤仙,王琳焱,等.肉鸡饲养密度研究进展[J].中国家禽,2020,42(6):96-101.
YUAN Y Z,WEI F X,WANG L Y,et al.Research progress on stocking density of broilers[J].China poultry,2020,42(6):

- 96-101.
- [10] 许晏维,袁建敏.饲养密度对肉鸭生产性能和胴体品质影响研究进展[J].中国家禽,2021,43(4):78-82.
XU Y W, YUAN J M. Progress of the effect of stocking density on performance and meat quality of meat ducks [J]. China poultry, 2021, 43(4): 78-82.
- [11] 姜庆林,王志国,徐文娟,等.舍内氨气浓度对鸭肝脏 *PPAR α* 、*FABP1* 及 *LPL* 基因表达的影响[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2019,40(6):82-85.
JIANG Q L, WANG Z G, XU W J, et al. Effect of different ammonia concentration on the expression of *PPAR α* , *FABP1* and *LPL* genes in duck liver[J]. Journal of Yangzhou university (agricultural and life science edition), 2019, 40(6): 82-85.
- [12] 孟庆平.不同硫化氢浓度对肉仔鸡生长性能、免疫功能和肉质的影响[D].杭州:浙江大学,2009.
MENG Q P. Effects of atmospheric hydrogen sulfide concentration on growth, immunity and meat quality in broiler chickens [D]. Hangzhou: Zhejiang university, 2009.
- [13] TIAN H, GUO Y, DING M, et al. Identification of genes related to stress affecting thymus immune function in a chicken stress model using transcriptome analysis[J]. Research in veterinary science, 2021, 138: 90-99.
- [14] ZHANG Y, GU T T, TIAN Y, et al. Effects of cage and floor rearing system on the factors of antioxidant defense and inflammatory injury in laying ducks[J]. BMC genetics, 2019, 20(1): 1-7.
- [15] ZHENG C, WU Y, LIANG Z H, et al. Plasma metabolites associated with physiological and biochemical indexes indicate the effect of caging stress on mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) [J]. Animal bioscience, 2021, 35(2): 224-235.
- [16] 刘水兵,方文杰,李言凯,等.基于血浆非靶代谢组学探究急性笼养应激对蛋鸭代谢的影响[J].畜牧兽医学报,2022, 53(12): 4271-4282.
LIU S B, FANG W J, LI Y K, et al. Effect of acute cage stress on the metabolism of laying ducks studied by plasma nontargeted metabolomics [J]. Acta veterinaria et zootechnica sinica, 2022, 53(12): 4271-4282.
- [17] KNOTT S A, CUMMINS L J, DUNSHEA F R, et al. Feed efficiency and body composition are related to cortisol response to adrenocorticotropin hormone and insulin-induced hypoglycemia in rams [J]. Domestic animal endocrinology, 2010, 39(2): 137-146.
- [18] PHUMSATITPONG C, WAGENMAKER E R, MOENTER S M. Neuroendocrine interactions of the stress and reproductive axes [J]. Frontiers in neuroendocrinology, 2021, 63: 100928.
- [19] PU M F, CHEN J, TAO Z T, et al. Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression [J]. Cellular and molecular life sciences, 2019, 76(3): 441-451.
- [20] WEI F L, YANG S Y, WANG S L, et al. MicroRNAs: a critical regulator under mechanical force [J]. Histology and histopathology, 2018, 33(4): 335-342.
- [21] PENG S X, WANG J, WEI S T, et al. Endogenous cellular microRNAs mediate antiviral defense against influenza A virus [J]. Molecular therapy nucleic acids, 2018, 10: 361-375.
- [22] HE B X, ZHAO Z Y, CAI Q D, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer [J]. International journal of biological sciences, 2020, 16(14): 2628-2647.
- [23] BI Y K, QIAO X L, LIU Q, et al. Systemic proteomics and miRNA profile analysis of exosomes derived from human pluripotent stem cells [J]. Stem cell research & therapy, 2022, 13(1): 449.
- [24] LI C, XIONG T, ZHOU M F, et al. Characterization of microRNAs during embryonic skeletal muscle development in the Shan Ma duck [J]. Animals, 2020, 10(8): 1417.
- [25] 梁薇,鹿碧波,李启黄,等.热应激对文昌鸡雏鸡垂体、卵巢生长发育的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2018(21):20-23.
LIANG W, LU B B, LI Q H, et al. Effect of heat stress on the growth and development of pituitary and ovary in Wenchang chicks [J]. Heilongjiang animal science and veterinary medicine, 2018(21): 20-23.
- [26] BOYERINAS B, PARK S M, HAU A, et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer [J]. Endocrine-related cancer, 2010, 17(1): 19-36.
- [27] WEIDHAAS J B, BABAR I, NALLUR S M, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy [J]. Cancer research, 2007, 67(23): 11111-11116.
- [28] GERASYMCHUK M, CHERKASOVA V, KOVALCHUK O, et al. The role of microRNAs in organismal and skin aging [J]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(15): 5281.
- [29] LIU T, JING F Y, HUANG P R, et al. Thymopentin alleviates premature ovarian failure in mice by activating YY2/Lin28A

- and inhibiting the expression of let-7 family microRNAs[J].Cell proliferation,2021,54(8):e13089.
- [30] WILMINK G J, ROTH C L, IBEY B L, et al. Identification of microRNAs associated with hyperthermia-induced cellular stress response[J].Cell stress and chaperones,2010,15(6):1027-1038.
- [31] SALEH A D, SAVAGE J E, CAO L, et al. Cellular stress induced alterations in microRNA let-7a and let-7b expression are dependent on p53[J].PloS one,2011,6(10):e24429.
- [32] ZHOU Z H, ZHANG H W. CHAC1 exacerbates LPS-induced ferroptosis and apoptosis in HK-2 cells by promoting oxidative stress[J].Allergologia et immunopathologia,2023,51(2):99-110.
- [33] CAO C Y, DING Y F, KONG X J, et al. Reproductive role of miRNA in the hypothalamic-pituitary axis[J].Molecular and cellular neurosciences,2018,88:130-137.
- [34] BLANCO A M. Hypothalamic-and pituitary-derived growth and reproductive hormones and the control of energy balance in fish[J].General and comparative endocrinology,2020,287:113322.
- [35] TSUTSUI K, UBUKA T. How to contribute to the progress of neuroendocrinology: discovery of GnIH and progress of GnIH research[J].Frontiers in endocrinology,2018,9:662.
- [36] ULLAH R, BATOOL A, WAZIR M, et al. Gonadotropin inhibitory hormone and RF9 stimulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult male rhesus monkeys[J].Neuropeptides,2017,66:1-7.
- [37] CHEN H, LUO K Y, WANG C, et al. Genomic characteristics and selection signals of Zhongshan ducks[J].Animal,2023,17(5):100797.
- [38] YANG F L, HUANG L, TSO A, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are essential for fetal-maternal connection and embryo viability[J].PLoS genetics,2020,16(4):e1008739.
- [39] PHUAPITTAYALERT L, SAENGANANTAKARN P, SUPANPAIBOON W, et al. Increasing *CACNA1C* expression in placenta containing high Cd level: an implication of Cd toxicity[J].Environmental science and pollution research international,2016,23(24):24592-24600.
- [40] ZHU M T, ZHANG H M, YANG H, et al. Targeting *GNAQ* in hypothalamic nerve cells to regulate seasonal estrus in sheep[J].Theriogenology,2022,181:79-88.
- [41] LI F Y, LONG Y, XIE J H, et al. Generation of *GCaMP6s*-expressing zebrafish to monitor spatiotemporal dynamics of calcium signaling elicited by heat stress[J].International journal of molecular sciences,2021,22(11):5551.
- [42] KASS G E, ORRENIUS S. Calcium signaling and cytotoxicity[J].Environmental health perspectives,1999 107(S1):25-35.
- [43] BALI A, GUPTA S, SINGH N, et al. Implicating the role of plasma membrane localized calcium channels and exchangers in stress-induced deleterious effects[J].European journal of pharmacology,2013,714(1/2/3):229-238.
- [44] TANG T H, CHANG C T, WANG H J, et al. Oxidative stress disruption of receptor-mediated calcium signaling mechanisms[J].Journal of biomedical science,2013,20(1):48.