

易昕睿, 马金虎, 王毅, 等. 蛋鸡脂肪肝出血综合征对肝脏及腹脂转录组的影响研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (2): 37-45.

YI X R, MA J H, WANG Y, et al. Effects of fatty liver hemorrhage syndrome on the liver and abdominal fat transcriptomic profile in laying hens [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (2): 37-45.

蛋鸡脂肪肝出血综合征对肝脏及腹脂转录组的影响研究

易昕睿^{1#}, 马金虎^{1#}, 王毅¹, 王玉洁², 朱枚子¹, 李鑫宇¹,
唐云书¹, 薛敏¹, 黄建珍², 朱亚玲^{1,3*}

(1. 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230032;

2. 江西农业大学动物科学技术学院, 江西 南昌 330045;

3. 安徽医科大学 P2 级动物实验中心, 安徽 合肥 230032)

摘要: 旨在鉴定并比较脂肪肝出血综合征 (FLHS) 蛋鸡肝脏及腹脂组织的转录组特征, 揭示 FLHS 发生发展中肝脏和腹脂调控的关键基因及潜在分子机制, 为精确靶向肝脏及腹脂用药提供理论依据。采用高能低蛋白日粮构建蛋鸡 FLHS 模型, 利用转录组测序 (RNA-Seq) 比较患鸡与正常组肝脏及腹脂基因表达图谱, 利用基因本体 (GO) 功能注释、京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集和基因集富集分析 (GSEA) 阐明 FLHS 蛋鸡肝脏和腹脂差异基因的功能及作用通路; 通过反转录 PCR (RT-PCR) 和 RNA-Seq 数据验证关键基因的差异表达。结果显示: 高能低蛋白日粮可成功诱发蛋鸡 FLHS, 肝脏和腹脂转录谱发生明显改变。FLHS 患鸡肝脏和腹脂中分别有 443 个 (151 上调表达, 292 下调表达) 和 526 个 (409 上调表达, 117 下调表达) 显著差异表达基因 ($|\log_2FC| \geq 1, P < 0.05$)。富集分析提示, 包括磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PCK1)、载脂蛋白 a-1 (APOA1) 在内的肝脏差异基因显著富集于代谢过程和 PPAR 信号通路而诱发肝脏脂质沉积; 白细胞介素 6 (IL-6)、细胞因子信号通路抑制因子 3 (SOCS3) 等腹脂差异基因更倾向于参与调控免疫过程和 JAK-STAT 信号通路导致炎症发生。提示: 肝脏和腹脂通过不同途径共同参与蛋鸡 FLHS 发生发展, 特异性靶向干扰肝脏及腹脂间关键差异基因及信号通路, 对于优化 FLHS 的预防及治疗具有重要意义。

关键词: 高能低蛋白日粮; 蛋鸡; 脂肪肝出血综合征; 转录组测序; 差异基因

中图分类号: S852.2 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)02-0037-09

Effects of fatty liver hemorrhage syndrome on the liver and abdominal fat transcriptomic profile in laying hens

YI Xinrui^{1#}, MA Jinhu^{1#}, WANG Yi¹, WANG Yujie², ZHU Meizi¹, LI Xinyu¹,
TANG Yunshu¹, XUE Min¹, HUANG Jianzhen², ZHU Yaling^{1,3*}

(1. School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. School of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

3. Laboratory Animal Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: This study was to identify and compare the transcriptomic profiles of liver and abdominal fat tissue of laying hens with fatty liver hemorrhage syndrome (FLHS), to reveal the important interaction between liver and abdominal fat, key genes and the underlying mechanisms, and to provide theoretical basis for precise targeting of liver and abdominal fat drugs. The FLHS model of laying hens was constructed by high-energy low-protein diet. Then, the gene expression profiles of liver and abdominal fat of FLHS laying hens and normal laying hens were compared by RNA-Seq. GO annotation, KEGG and GSEA pathway enrichment analysis were used to elucidate the critical biological processes and signaling pathways in FLHS pathogenesis enriched by differential genes of liver and abdominal fat from FLHS laying hens. Finally, RT-PCR and RNA-Seq data were employed to verify the differential expressions of the key genes. The results showed that high-energy low-protein diet successfully triggered FLHS in the laying hens with significant alterations of transcription profiles of liver and abdominal fat. By our RNA-seq data, we screened out 443 differential genes (151 upregulated, 292 downregulated) and 526 differential genes (409

收稿日期: 2023-02-05; 修回日期: 2023-11-08

基金项目: 安徽省科学技术厅省级重点项目 (KJ2021A0205); 安徽医科大学校级项目 (2020xkj007)

第一作者: 易昕睿, 女, 本科生; 马金虎, 男, 本科生。[#]共同第一作者

* 通信作者: 朱亚玲, 副教授, 研究方向为生物信息学、非酒精性脂肪肝的表观调控机制、脓毒症的发病机制等, E-mail: zhuyaling@ahmu.edu.cn。

upregulated, 117 downregulated) in liver and abdomen fat, respectively, of FLHS laying hens, as compared with the controls ($|\log_2FC| \geq 1$, $P < 0.05$). The functional enrichment analysis suggested that the differential genes identified in the liver, including PCK1 and APOA1, had a higher enrichment in the metabolic process and the PPAR signaling pathway, accelerating liver lipid deposition. However, IL-6, SOCS3 and other differential genes identified in the abdominal fat exhibited a tendency to be predominantly enriched in the regulation of the immune process and the JAK-STAT signaling pathway, contributing to inflammation. Liver and abdominal fat were both involved and had a critical interaction in the development of FLHS in the laying hens through different pathways. Specific targeted interference of key differential genes and signaling pathways between liver and abdominal fat was of great significance and should be considered to apply to optimizing the prevention and treatment of FLHS.

Keywords: high-energy low-protein diet; laying hens; FLHS; RNA-Seq; differentially expressed genes

脂肪肝出血综合征 (fatty liver hemorrhagic syndrome, FLHS) 是由于蛋鸡肝脏脂肪代谢紊乱导致脂质异常积累而引起的一种营养代谢性疾病, 以肝脏肿大、质地松脆易碎、表面伴出血点或出血斑、大量腹脂沉积为主要临床特征^[1]。FLHS 是笼养蛋鸡死亡的主要原因, 给蛋鸡养殖业造成巨大经济损失^[2], 然而其发病机制尚不清晰。

肝脏是家禽脂代谢的主要场所, 几乎承担了 90%~95% 的脂质合成压力^[3-4]。Aziza 等^[5] 阐释脂肪酸在肝脏内合成后与载脂蛋白结合, 运输至血液后经脂蛋白脂肪酶水解为脂肪酸, 由腹脂组织摄取并储存。而腹脂沉积过多则会反向影响肝脏功能, 使得肝脏受损^[6-8]。同时, 郭连营等^[9] 发现蛋鸡肝脏受损, 也会导致游离脂肪酸沉积于肝细胞中, 进一步诱发炎症级联反应, 造成 FLHS。Wang 等^[10] 表明腹脂组织可通过分泌多种细胞因子如瘦素调控机体脂代谢的动态平衡; Sun 等^[11] 揭示腹脂组织大量分泌促炎因子如白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等可调节炎症反应, 促进肝脏代谢疾病的发生发展。刘春凌等^[12] 进一步表明降低 FLHS 患鸡血清中 IL-6、TNF- α 水平可减轻 FLHS 患病程度。前人研究表明肝脏和腹脂是反映脂质代谢过程的重要组织, 而针对 FLHS 机制的探索, 前期研究多关注肝脏或腹脂单个组织, 组织间调控 FLHS 病程进展的互作性及差异性仍有待阐明。因此, 本研究基于转录组测序 (RNA-Seq) 靶向研究肝脏和腹脂, 进一步揭示高能低蛋白日粮通过肝脏和腹脂诱发蛋鸡 FLHS 的分子机制, 为预防和治疗 FLHS 提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验设计与材料

选取 30 只 150 日龄健康依萨褐蛋鸡 (江西农业大学动物科学技术学院实验室种蛋孵化), 平均体重约 1.5 kg, 随机分成对照组和试验组, 每组各 15 只。对照组给予普通饲料, 试验组饲喂高能低蛋白日粮 (表 1), 自由采食和饮水, 光照 14~16 h/d。60 d 后, 采用苯巴比妥心脏麻醉, 颈动脉放血处死, 保存

血清测量甘油三酯 (TG), 总胆固醇 (TC); 分别取 2 组蛋鸡同一部位新鲜肝脏称量肝湿重, 以肝湿重/体重计算肝指数, 取腹部脂肪组织置 -80 °C 冰箱保存备用。

表 1 日粮成分及营养水平

项目		对照组	试验组
日粮组成/%	玉米	64	70
	麦麸	2.0	1.2
	豆粕	24.00	14.58
	大豆油	0	4.22
	石灰石	8	8
	预混料 ¹⁾	2	2
	营养水平	能量/(MJ·kg ⁻¹)	11.21
	粗蛋白/%	15.86	12.00
	磷/%	0.51	0.46
	精氨酸/%	1.03	0.74
	蛋氨酸/%	0.37	0.32
	缬氨酸/%	0.77	0.58
	蛋氨酸+胱氨酸/%	0.67	0.56

注:¹⁾ 每千克饲料预混料由以下成分组成: 铜 2.50 mg; 铁 20.00 mg; 锌 17.50 mg; 锰 15.00 mg; 碘化钾 4.00 mg; 硫酸钠 6.00 mg; 可可碱 2.50 mg; 蛋氨酸 50.00 mg; 吡啶铬 2.00 mg; 维生素 15.00 mg; 植酸酶 10.00 mg; 激肽酶 7.50 mg; 抗氧化剂 2.00 mg; 甘氨酸 15.00 mg; 胆碱 50.00 mg; 盐 200.00 mg; Ca₃PO₄ 500.00 mg 和沸石 76.00 mg。

1.2 组织病理学观察

每只蛋鸡分别取黄豆粒大小肝脏和腹脂组织固定于 4% 甲醛溶液中 24 h, 然后进行常规脱水包埋^[13]。切片厚 5 μ m, 随后利用苏木精-伊红 (HE) 染色, 使用蔡司正置光学显微镜分别观察比较肝脏和腹脂组织形态学变化并拍照。切片制作及 HE 染色过程由武汉塞维尔生物科技有限公司完成。采用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件测量并统计每组腹脂组织切片中 100 个脂滴直径。

1.3 RNA 建库测序及数据处理

利用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, USA) 从肝脏和

腹脂中分别提取 RNA, 随后将成功提取的 RNA 样本送至诺禾致源公司进行建库, 并采用 HiSeq 4000 (Illumina) 平台测序。获得原始数据后, 进行基本的数据处理: 去除接头、N 碱基比例超过 10% 及低质量测序序列 (reads) ($Q_{phred} \leq 20$ 的碱基数占整个 reads 长度的 50% 以上的序列), 过滤后得到高质量测序序列 (clean reads)。其次使用 FastQC 软件 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 对 clean reads 进行质量检测。然后使用 STAR-2.5.3a (<https://github.com/alexdobin/STAR>) 软件将 clean reads 比对到鸡 Gallus_gallus-5.0 版本 (Ensembl) 基因组上^[14]。使用 StringTie (<http://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>) 软件分两步对转录本进行组装: 第一步为序列初组装, 第二步为转录本合并组装。最后使用 featureCounts 软件 (<http://subread.sourceforge.net/>) 对转录本进行定量^[15]。

1.4 差异表达分析

利用 DESeq2 R 包软件 (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) 对定量后的基因表达量进行标准化, 转化为每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (FPKM)。随后继续根据基因表达量的差异倍数 (fold change, FC) 利用 DESeq2 进行差异分析^[16], 设定筛选差异表达基因 (DEGs) 阈值为 $|\log_2 FC| \geq 1$, $P < 0.05$ 。

1.5 DEGs 注释和富集分析

利用 PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) 和 DAVID (<https://david.ncicrf.gov/summary.jsp#>) 对 DEGs 进行基因本体 (GO) 功能注释、京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 利用基因集富集

分析 (GSEA) 软件对 DEGs 进行分析。

1.6 RT-PCR 验证

利用 Molony 小鼠白血病病毒转录酶 (Promega, USA) 和 Oligo (dT) (TaKaRa, Japan) 将 2 μg 总 RNA 反转录成 cDNA 第一链, 使用 LightCycler 480 仪器和 LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, USA) 进行 RT-PCR, 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。随后根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算靶基因相对管家基因 β -actin 的相对表达量。

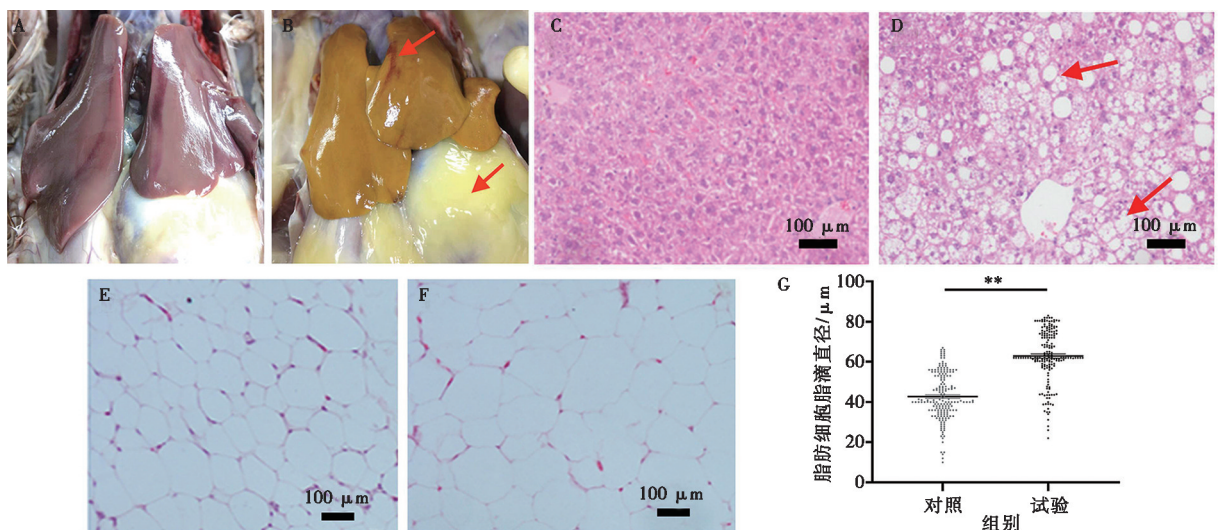
1.7 数据统计与分析

使用 Student's *t* 检验进行显著性分析。结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 肝脏解剖学、组织病理学和血清变化

利用正常和高能低蛋白日粮分别喂养对照组和试验组蛋鸡。结果显示, 对照组肝脏未见异常变化, 呈正常棕红色, 表面光滑、质地紧密、大小正常, 肝脏下有不明显脂肪垫 (图 1A); 而试验组肝脏呈土黄色, 表面油腻肿大, 边缘厚钝, 质地松脆易碎, 肝脏下可见厚脂肪垫且肝脏表面有针尖状大小出血点 (图 1B)。HE 染色显示, 与对照组相比, 试验组蛋鸡肝脏组织有较多脂质空泡 (图 1D), 腹脂细胞肿胀明显 (图 1F) 且腹脂细胞脂滴直径明显高于对照组 (图 1G)。同时, 试验组肝指数、血清 TG 和 TC 的浓度显著高于对照组 ($P < 0.01$, 表 2)。该结果表明高能低蛋白日粮可成功诱发蛋鸡 FLHS。



A. 对照组肝脏大体观; B. 试验组肝脏大体观, 箭头指示出血点和肝下厚脂肪垫; C. 对照组肝脏组织 HE 染色; D. 试验组肝脏组织 HE 染色, 箭头指示脂质空泡; E. 对照组腹脂组织 HE 染色; F. 试验组腹脂组织 HE 染色; G. 对照组与试验组的腹脂细胞脂滴直径比较 (** 表示 $P < 0.01$)。

图 1 蛋鸡肝脏的组织形态及肝脏、腹脂组织病理学观察

表 2 FLHS 对蛋鸡肝指数、血清 TG 和 TC 浓度的影响

指标	对照组	试验组
肝重/g	21.32±0.06 ^B	32.60±0.15 ^A
肝指数/%	14.12±0.70 ^B	21.88±2.08 ^A
TG/(mmol·g ⁻¹)	0.22±0.29 ^B	0.34±0.02 ^A
TC/(mmol·g ⁻¹)	1.64±0.15 ^B	2.91±0.31 ^A

注：同行数据肩标不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

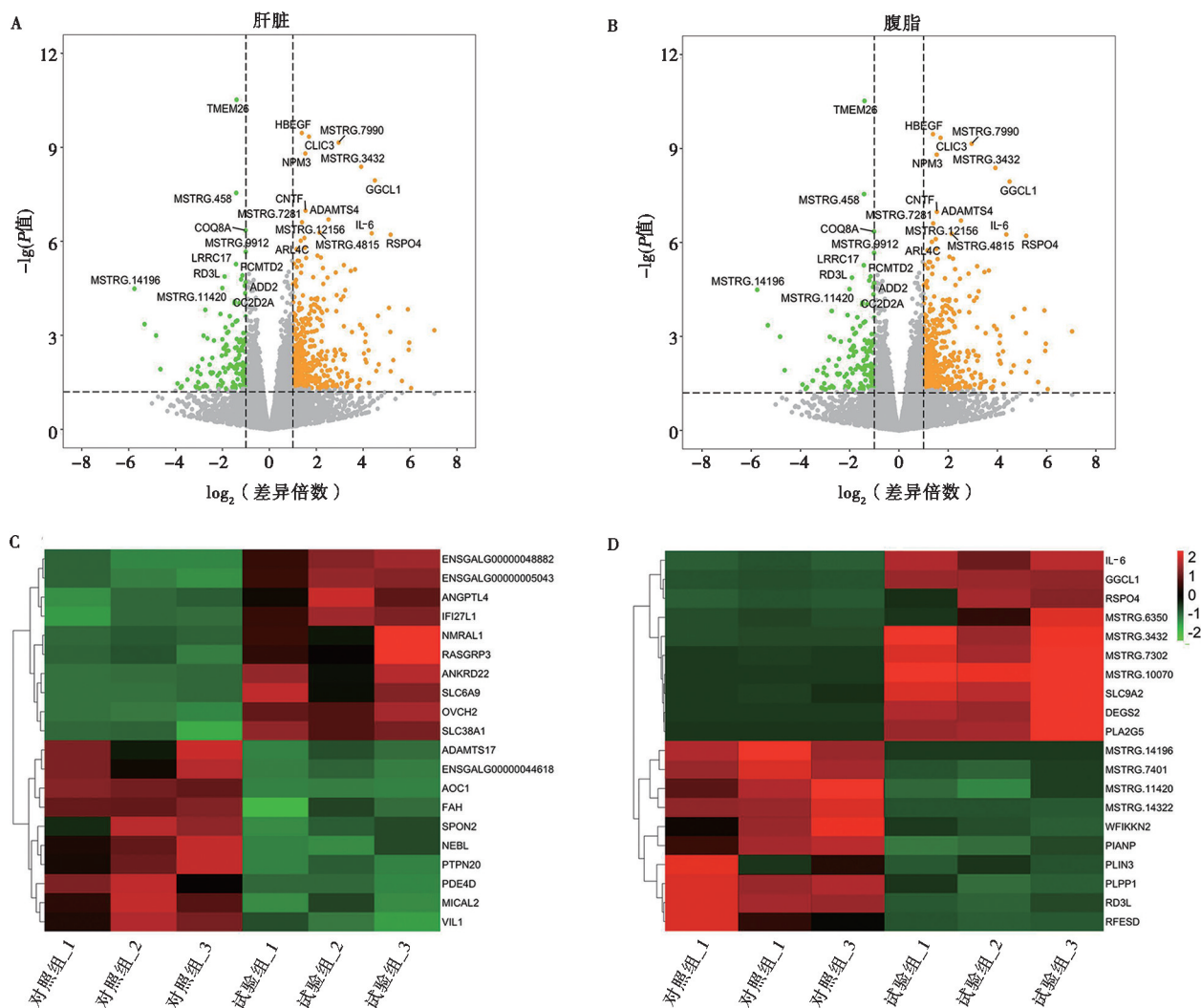
2.2 蛋鸡肝脏和腹脂 RNA-Seq 数据分析与质量控制

RNA-Seq 序列进行质控和过滤后，从肝脏和腹脂样本中分别平均得到 4 620 万个和 4 010 万个 clean reads，利用 STAR-2.5.3a (<https://github.com/alex-dobin/STAR>) 软件将 clean reads 比对到鸡 Gallus_

gallus-5.0 基因组，分别鉴别到 4 260 万个和 3 620 万个唯一匹配 reads，唯一匹配率高达 92.4% 和 90.2%，表明该数据质量较好，可用于进一步分析。

2.3 RNA-Seq 挖掘 FLHS 蛋鸡肝脏和腹脂的关键 DEGs

进一步利用 RNA-Seq 分析在肝脏和腹脂中分别鉴定出 443 个和 526 个 DEGs ($|\log_2 FC| \geq 1, P < 0.05$)。其中，在试验组蛋鸡肝脏中，DEGs 有 151 个表达上调，292 个表达下调 (图 2A)；而在腹脂中，DEGs 有 409 个表达上调，117 个表达下调 (图 2B)。ENSGALG00000048882 等为肝脏相关的差异显著性前 20 的 DEGs (图 2C)，IL-6 等为腹脂相关的差异显著性前 20 的 DEGs (图 2D)。



A. 对照组 ($n=151$) 和试验组 ($n=292$) 肝脏 DEGs 火山图；B. 对照组 ($n=295$) 和试验组 ($n=203$) 腹脂 DEGs 火山图 ($|\log_2 FC| \geq 1, P < 0.05$)；C. 前 20 个肝脏极显著 DEGs 热图；D. 前 20 个腹脂极显著 DEGs 热图 ($|\log_2 FC| \geq 1, P < 0.05$)。黄色和绿色点分别表示上调基因和下调基因。

图 2 蛋鸡肝脏和腹脂 DEGs 转录图谱比较

肝脏前 10 个极显著上调基因 (表 3) 与氨基酸的代谢与转运、胆固醇稳态和脂质代谢密切相关,表明高能低蛋白日粮可能通过影响肝脏中营养物质代谢调节 FLHS 发生发展;而腹脂前 10 个极显著上调基

因 (表 4) 则与免疫调节、炎症反应及 B 细胞的成熟等过程密切相关,揭示了患鸡腹脂组织可能通过调节免疫、炎症反应影响 FLHS 发生发展。

表 3 FLHS 蛋鸡肝脏组织 RNA-Seq 中前 10 个极显著 DEGs

基因	阈值 ($ \log_2FC $)	P 值	上调/下调	功能
蛋白酶卵磷脂酶 2 (OVCH2)	2.42	<0.001	上调	氨基酸的代谢与转运
锚定蛋白重复结构域 22 (ANKRD22)	3.56	<0.001	上调	炎症反应和细胞凋亡
ENSGALG00000005043	2.36	<0.001	上调	胆固醇稳态和脂质代谢
溶质载体家族 6 成员 9 (SLC6A9)	3.17	<0.001	上调	神经递质和氨基酸转运
ENSGALG00000048882	2.61	<0.001	上调	/
NMRA 类氧化还原传感器 1 (NMRAL1)	2.99	<0.001	上调	免疫反应和细胞凋亡
干扰素 α 诱导蛋白 27 样 1 (IFI27L1)	1.23	<0.001	上调	细胞凋亡过程
RAS 鸟嘌呤释放蛋白 3 (RASGRP3)	2.08	<0.001	上调	Ras 信号转导与免疫应答
溶质载体家族 38 成员 1 (SLC38A1)	1.43	<0.001	上调	氨基酸转运体和能量代谢
血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4)	1.25	<0.001	上调	葡萄糖和脂质代谢
含铜胺氧化酶 1 (AOC1)	-1.94	<0.001	下调	脂质代谢
ENSGALG00000044618	-1.71	<0.001	下调	/
磷酸二酯酶 4D (PDE4D)	-2.07	<0.001	下调	磷酸二酯酶活性和炎症
分泌型去整合素金属蛋白酶 17 (ADAMTS17)	-1.94	<0.001	下调	体脂分布与金属蛋白酶活性
绒毛蛋白 1 (VIL1)	-1.83	<0.001	下调	炎症反应
延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (FAH)	-1.44	<0.001	下调	免疫反应与 II 型糖尿病
20 型蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 (PTPN20)	-2.44	<0.001	下调	增殖、分化、迁移和存活
与 CasL 相互作用分子 2 (MICAL2)	-1.38	<0.001	下调	细胞分化、迁移和血管生成
Nebulette 蛋白 (NEBL)	-1.29	<0.001	下调	细胞器组成和原肌凝蛋白结合
脊椎蛋白 2 (SPON2)	-1.96	<0.001	下调	免疫反应

注: /表示未知。下同。

2.4 FLHS 蛋鸡肝脏及腹脂 DEGs 的富集分析

为进一步探究肝脏及腹脂 DEGs 影响的生物学功能,对 2 个组织 DEGs 进行 GO 功能注释。结果显示肝脏 DEGs 显著富集于代谢过程 (GO: 0008152),

腹脂 DEGs 显著富集于免疫系统过程 (GO: 0002376)。该结果提示试验组蛋鸡肝脏 DEGs 可能通过影响代谢过程,腹脂组织 DEGs 可能通过影响免疫系统过程,共同参与蛋鸡 FLHS 的发生发展 (图 3)。

表 4 FLHS 蛋鸡腹脂组织 RNA-Seq 中前 10 个极显著 DEGs

基因	阈值 (log ₂ FC)	P 值	上调/下调	功能
MSTRG. 3432	3.92	<0.001	上调	免疫调节和炎症过程
趋化因子样配体 4 (GGCL1)	4.50	<0.001	上调	炎症和 B 细胞的成熟
白细胞介素 6 (IL-6)	4.36	<0.001	上调	Wnt/ β -catenin 信号通路的激活
R-脊椎蛋白 4 (RSP04)	5.17	<0.001	上调	/
MSTRG. 10070	5.10	<0.001	上调	脂质代谢过程
δ 4-去饱和酶, 鞘脂 2 (DEGS2)	5.91	<0.001	上调	/
MSTRG. 7302	4.63	<0.001	上调	参与 pH 调节以清除酸
溶质载体家族 9 成员 2 (SLC9A2)	3.87	<0.001	上调	/
MSTRG. 6350	3.97	<0.001	上调	磷脂代谢过程
磷脂酶 A2 家族 5 (PLA2G5)	7.03	<0.001	上调	莱伯氏先天性黑蒙症
RD3 样 (RD3L)	-1.91	<0.001	下调	/
MSTRG. 11420	-2.01	<0.001	下调	/
MSTRG. 14196	-5.76	<0.001	下调	氧化还原酶活性和代谢过程
含 Rieske Fe-S 结构域 (RFESD)	-1.48	<0.001	下调	水解从细胞外摄取脂质
磷脂磷酸酶 1 (PLPP1)	-1.49	<0.001	下调	免疫系统过程
生长分化因子相关血清蛋白 2 (WFIKKN2)	-2.73	<0.001	下调	/
MSTRG. 14322	-2.08	<0.001	下调	/
MSTRG. 7401	-1.69	<0.001	下调	免疫调节
II 型成对免疫球蛋白样受体相关神经蛋白 (PIANP)	-1.58	<0.001	下调	脂质代谢过程
围脂滴蛋白 3 (PLIN3)	-1.87	<0.001	下调	/

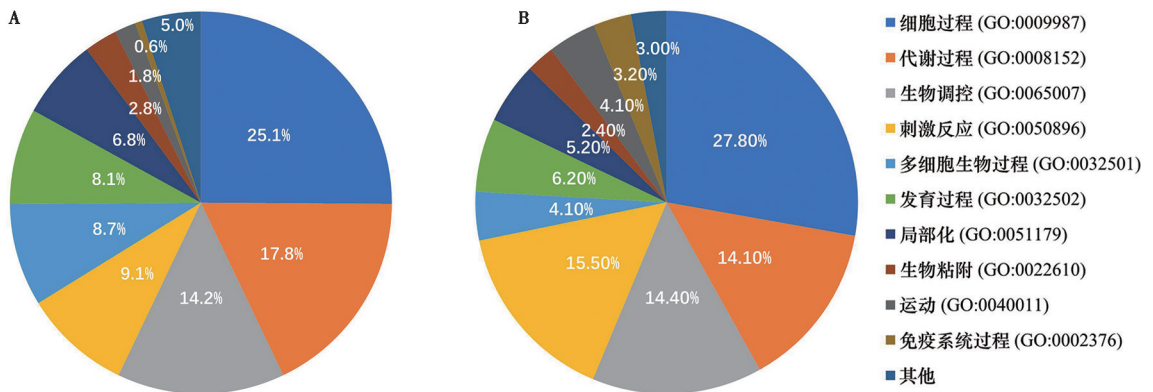


图 3 肝脏 (A) 和腹脂 (B) 中 DEGs 的 GO 功能注释结果

此外, DEGs 的 KEGG 通路富集分析结果显示, 肝脏中磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PCK1)、载脂蛋白 a-1 (APOA1) 等基因显著富集于 PPAR 信号通路 (图 4A、4C); 而腹脂中 IL-6、细胞因子信号通路抑制因子 3 (SOCS3) 等基因显著富集于 JAK-STAT 信号通路 (图 4B、4D)。该结果提示, 肝脏 PCK1、APOA1 等 DEGs 与腹脂 IL-6、SOCS3 等 DEGs 可能分别通过 PPAR 信号通路、JAK-STAT 信号通路影响

蛋鸡 FLHS 的发生发展。为进一步确定蛋鸡 FLHS 发生发展的关键通路, 本研究对肝脏和腹脂组织 DEGs 进行了 GSEA 富集分析。结果显示, 试验组蛋鸡肝脏中 PPAR 信号通路活性和腹脂中 JAK-STAT 信号通路活性均显著上调 (图 5E、5F)。该结果与 KEGG 富集分析结果一致, 进一步提示试验组蛋鸡肝脏和腹脂组织分别上调 PPAR 信号通路和 JAK-STAT 信号通路活性共同参与 FLHS 的发生发展。

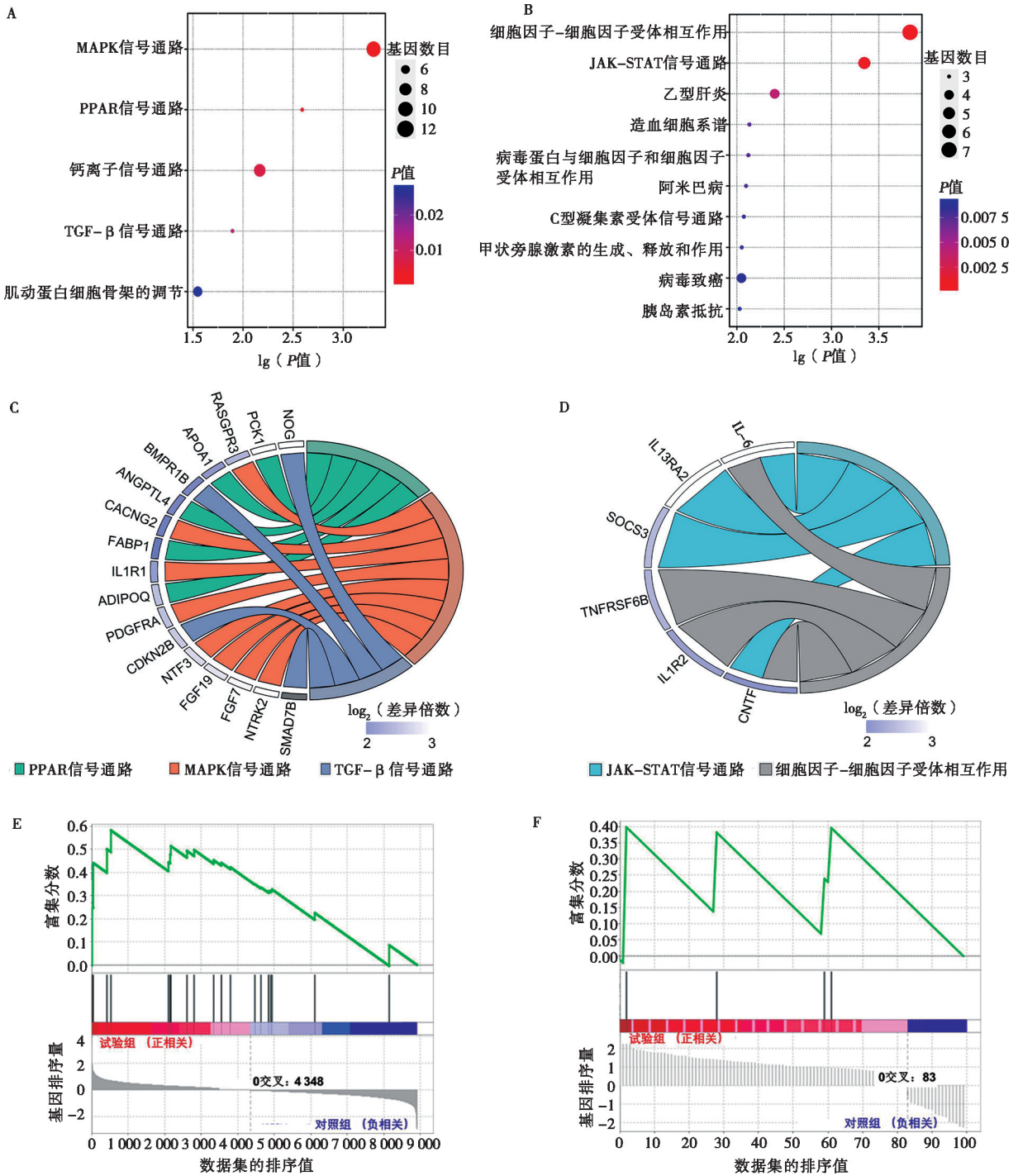
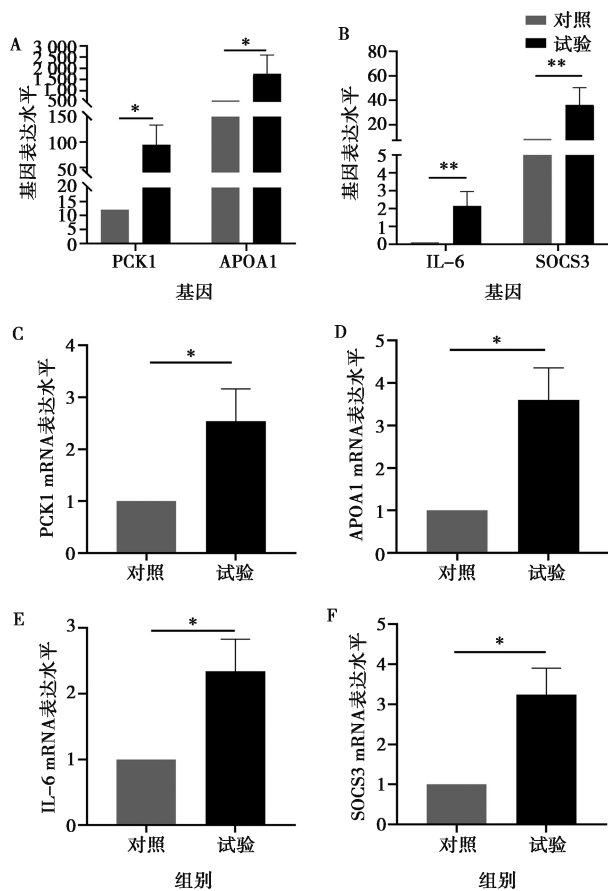


图 4 肝脏和腹脂组织 DEGs 的功能富集分析

2.5 关键基因差异表达水平的验证

为验证 RNA-Seq 数据分析的 DEGs 及富集分析结果的准确性, 选取肝脏中脂质代谢关键 DEGs (PCK1、APOA1) 和腹脂中炎症反应关键 DEGs (IL-6、SOCS3) 利用 RNA-Seq 数据和 RT-PCR 技

术进行验证。患鸡肝脏 PCK1、APOA1 基因表达水平和腹脂 IL-6、SOCS3 基因表达水平均显著高于对照组 (图 5A、5B); RT-PCR 结果也与 RNA-Seq 结果保持高度一致 (图 5C、5D、5E 和 5F)。上述数据进一步证实前期结果的可靠性。



A. PCK1、APOA1 基因在肝脏样本 RNA-Seq 数据中的基因表达水平；B. IL-6、SOCS3 基因在腹脂样本 RNA-Seq 数据中的基因表达水平；C. 肝脏 PCK1 mRNA 表达水平；D. 肝脏 APOA1 mRNA 表达水平；E. 腹脂 IL-6 mRNA 表达水平；F. 腹脂 SOCS3 mRNA 表达水平。
* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 5 肝脏和腹脂组织特异性差异基因表达水平的验证

3 讨论

FLHS 是由多重因素相互作用导致的营养代谢性疾病，好发于产蛋高峰期的笼养蛋鸡，严重损害了蛋鸡的生产性能，给养殖业造成了巨大的损失^[2,17]。FLHS 主要表现为肝脏脂肪变性，家禽体内 90% ~ 95% 的脂类来源于肝脏脂肪酸的从头合成^[18]，在机体中，少量的腹脂能够保护肝脏，但过多的腹脂堆积则会反向影响肝脏功能^[19]，从而诱发 FLHS。因此，肝脏和腹脂是反映脂质代谢的重要组织。前期针对 FLHS 的研究忽略了肝脏和腹脂重要的相互作用，往往造成其应用及治疗效果不佳。本研究针对肝脏和腹脂组织，在转录水平上系统性揭示了 2 种组织参与高能低蛋白日粮所致蛋鸡 FLHS 发生发展的关键基因及其潜在分子机制。

基于肝脏 RNA-Seq 数据，我们发现 FLHS 患病

蛋鸡肝脏中 PCK1、APOA1 等基因出现明显组织特异性表达上调。PCK1 基因所编码的磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶是糖异生的限速酶^[20]，前人研究在高脂日粮喂养的肥胖小鼠中，PCK1 水平显著提高，与脂质合成与代谢密切相关^[21]；APOA1 是高密度脂蛋白中主要的载脂蛋白，逆向胆固醇转运调节外周组织胆固醇含量，同时可以激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 促进细胞内胆固醇的运出、酯化和转移^[22]；同时，本研究发现，PCK1、APOA1 等基因明显富集于 PPAR 信号通路，该通路被广泛认为调控脂质代谢，通过干预脂肪酸稳态导致肝脏脂质代谢紊乱，参与脂肪性肝病的发生^[23]。该结果提示高能低蛋白日粮可能通过影响载脂蛋白合成、糖异生等途径来影响蛋鸡肝脏脂质转运代谢，造成 TG 过度蓄积进而造成肝脏脂肪变性；因载脂蛋白合成被影响，导致肝外游离脂肪酸增多，易被腹脂摄取造成腹脂沉积。在腹脂组织中，本研究鉴定出关键组织特异性 DEGs，IL-6、SOCS3 等。IL-6，由脂肪细胞分泌的重要炎症因子，其表达水平在一定程度上与脂肪组织炎症反应正相关^[24]，同时高表达的 IL-6 可以协同 STAT3 促进肝脏脂质合成^[25]；而 SOCS3 已被证明是 IL-6/JAK/STAT3 信号转导的关键调节因子，与炎症性疾病密切相关^[26]；同时，IL-6、SOCS3 高度富集的信号通路 JAK-STAT 信号通路已被广泛报道参与炎症反应、脂质代谢等生物学过程，其活性失调可加重肝脏脂质代谢紊乱^[27-28]。有意思的是，PPAR 与 JAK-STAT 信号通路均可参与脂质代谢相关过程，提示高能低蛋白日粮同时作用肝脏及腹脂，分别通过 PPAR 及 JAK-STAT 信号通路导致肝脏及腹脂代谢紊乱，加重脂质蓄积造成肝细胞损伤。此外，PPAR 与 JAK-STAT 信号通路的失调不仅影响肝脏脂质代谢过程，也可诱发腹脂组织分泌炎症因子，反向引起肝细胞氧化应激从而对肝细胞造成更大损伤，进一步表明脂质代谢及炎症反应在 FLHS 病程中发挥重要作用。

综上，上述结果揭示高能低蛋白日粮所致 FLHS 蛋鸡转录谱特征与正常蛋鸡间存在显著差异，患鸡肝脏可通过特异性高表达 APOA1、PCK1 等基因上调 PPAR 信号通路活性，加重肝脏脂质沉积；腹脂可通过特异性高表达 IL-6、SOCS3 等基因，上调 JAK-STAT 信号通路，诱发炎症反应。肝脏和腹脂协同促进高能低蛋白日粮所致蛋鸡 FLHS 的发生发展。因此，APOA1、PCK1、IL-6、SOCS3 等基因可能是蛋鸡 FLHS 发生发展的关键靶基因，PPAR 及 JAK-STAT 信号通路作为调节脂质代谢和炎症反应的关键信号通路，提供靶向肝脏和腹脂联合用药的新思路，为优化 FLHS 的预防和治疗提供更为有效精准的新

方法。

参考文献:

- [1] 肖隆华. 蛋鸡脂肪肝出血综合征的诊断与防治 [J]. 福建畜牧兽医, 2022, 44 (6): 112-113.
- [2] 张弥, 涂闻君, 张奇, 等. 影响鸡脂肪肝出血综合征的因素及“多重打击”学说 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53 (8): 2453-2469.
- [3] 王玉洁, 刘佳, 魏庆, 等. 高能低蛋白日粮诱导的脂肪肝出血综合征 (FLHS) 蛋鸡脂肪组织代谢差异的比较 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (10): 2061-2065.
- [4] MENG J, MA N, LIU H, et al. Untargeted and targeted metabolomics profiling reveals the underlying pathogenesis and abnormal arachidonic acid metabolism in laying hens with fatty liver hemorrhagic syndrome [J]. *Poult Sci*, 2021, 100 (9): 101320.
- [5] AZIZA A E, AWADIN W, CHERIAN G. Impact of choline supplementation on hepatic histopathology, phospholipid content, and tocopherol status in layer hens fed flaxseed [J]. *J Appl Poult Res*, 2019, 28 (3): 679-687.
- [6] ZHANG M, LI C C, LI F, et al. Estrogen promotes hepatic synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids by regulating ELOVL5 at post-transcriptional level in laying hens [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (7): 1405.
- [7] 葛晓可, 李璐, 马晓娇, 等. 不同油脂水平日粮添加胆汁酸对肉鸡肝脏及其脂代谢的影响 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47 (21): 236-241.
- [8] LIANG M J, WANG Z P, XU L, et al. Estimating the genetic parameters for liver fat traits in broiler lines divergently selected for abdominal fat [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14 (3): 9646-9654.
- [9] 郭连营, 黄橙, 刘平, 等. 脂肪变性对蛋鸡原代肝细胞相关炎症因子表达的影响 [J]. 中国兽医学报, 2021 (9): 41.
- [10] WANG M, MAO Y, WANG B, et al. Quercetin improving lipid metabolism by regulating lipid metabolism pathway of ileum mucosa in broilers [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8686248.
- [11] SUN J, JIAO Z, ZHU W, et al. Astilbin attenuates cadmium-induced adipose tissue damage by inhibiting NF- κ B pathways and regulating the expression of HSPs in Chicken [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 201 (5): 2512-2523.
- [12] 刘春凌, 王鹏, 徐彤, 等. 茵陈提取物对肉鸡脂肪肝出血综合征发生率及 PPAR- γ , NF- κ B mRNA 表达的影响 [J]. 中国家禽, 2020 (6): 42.
- [13] 梁津杰. 病理检验过程中石蜡切片及 HE 染色常见问题及对策分析 [J]. 中国卫生标准管理, 2021, 12 (12): 90-93.
- [14] DOBIN A, DAVIS C A, SCHLESINGER F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29 (1): 15-21.
- [15] LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (7): 923-930.
- [16] 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.
- [17] 郭小权, 胡国良, 曹华斌, 等. 高能低蛋白日粮致脂肪肝出血综合征鸡抗氧化能力和肝损伤的研究 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30 (6): 829-832.
- [18] 田卫华, 杨丽玉, 李红, 等. 蛋鸡脂肪代谢相关基因 ACACA 和 FASN 表达及调控特性 [J]. 农业生物技术学报, 2019, 27 (2): 280-288.
- [19] 黄泰来, 金睿, 温建崇, 等. 桑叶提取物对爱拔益加肉鸡腹脂沉积及其相关脂质代谢指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2022, 34 (11): 7072-7081.
- [20] XU D, WANG Z, XIA Y, et al. The gluconeogenic enzyme PCK1 phosphorylates INSIG1/2 for lipogenesis [J]. *Nature*, 2020, 580 (7804): 530-535.
- [21] XU J, ZHANG M, ZHANG X, et al. Contribution of hepatic retinaldehyde dehydrogenase induction to impairment of glucose metabolism by high-fat-diet feeding in C57BL/6J mice [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 123 (5): 539-548.
- [22] COOKE A L, MORRIS J, MELCHIOR J T, et al. A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59 (7): 1244-1255.
- [23] ZHAO T, WU K, HOGSTRAND C, et al. Lipophagy mediated carbohydrate-induced changes of lipid metabolism via oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and ChREBP/PPAR γ pathways [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (10): 1987-2003.
- [24] HIRANO T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer [J]. *Int Immunol*, 2021, 33 (3): 127-148.
- [25] LI H, DONG M, LIU W, et al. Peripheral IL-6/STAT3 signaling promotes beiging of white fat [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868 (10): 119080.
- [26] ZANDERS L, KNY M, HAHN A, et al. Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13 (1): 713-727.
- [27] YANG M, WU S, CAI W, et al. Hypoxia-induced MIF induces dysregulation of lipid metabolism in Hep2 laryngocarcinoma through the IL-6/JAK-STAT pathway [J]. *Lipids Health Dis*, 2022, 21 (1): 82.
- [28] ZHU Y, MAO H, PENG G, et al. Effect of JAK-STAT pathway in regulation of fatty liver hemorrhagic syndrome in chickens [J]. *Anim Biosci*, 2021, 34 (1): 143-153.