

徐银莹, 赵洁, 于昊, 等. 基于转录组测序分析日粮添加槲皮素对夏季湖羊睾丸组织基因表达的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 1-8.
XU Y Y, ZHAO J, YU H, et al. Transcriptome sequencing-based analysis of the effect of dietary quercetin supplementation on testicular gene expression in Hu sheep in summer [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 1-8.

基于转录组测序分析日粮添加槲皮素对夏季湖羊睾丸组织基因表达的影响

徐银莹, 赵洁, 于昊, 茆达干*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在探究夏季日粮添加槲皮素对湖羊睾丸组织基因表达的影响。采集对照组 (基础日粮) 和槲皮素组 (每千克体重添加 150 mg 槲皮素的基础日粮饲喂 5 周) 各 3 个湖羊睾丸组织样本, 提取总 RNA 进行转录组测序 (RNA-seq), 并进行差异表达分析、基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证测序结果。结果: 共获得 36.5 Gb 的有效数据, 以 $P \leq 0.05$ 和 $|\log_2(FC)| \geq 1$, 检测出 2 268 个差异表达基因。相比于对照组, 槲皮素组有 980 个基因表达显著上调, 1 288 个基因表达显著下调, 涉及氧化应激和类固醇激素合成相关基因。GO 富集分析发现, 差异基因主要富集在胞质运输、细胞质囊泡部分、高尔基体相关囊泡和 GTP 酶结合等 19 个条目。KEGG 富集分析发现, 差异基因主要富集在肌动蛋白细胞骨架调节、细胞凋亡、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶/热休克蛋白 B1 (p38MAPK/HSPB1) 等 37 条显著通路, 其中 25 条为极显著通路。随机抽取的 6 个差异基因的 RT-qPCR 分析结果与测序结果一致。结论: 筛选出夏季高温条件下日粮添加槲皮素影响湖羊睾丸组织氧化应激和类固醇激素合成相关基因及 p38MAPK/HSPB1 等通路, 为进一步阐明槲皮素缓解夏季高温影响湖羊繁殖性能分子机制提供参考。

关键词: 槲皮素; 湖羊; 睾丸; 转录组测序

中图分类号: S826.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)02-0001-08

Transcriptome sequencing-based analysis of the effect of dietary quercetin supplementation on testicular gene expression in Hu sheep in summer

XU Yinying, ZHAO Jie, YU Hao, MAO Dagan*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effect of dietary quercetin on testicular gene expression in Hu sheep in summer. Testicular tissue samples were collected ($n=3$) from the control (basal diet) and quercetin groups (basal diet with quercetin added at 150 mg/kg body weight for 5 weeks), and the total RNA was extracted from the sheep for transcriptome sequencing, differential expression analysis, and for gene ontology (GO) and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. Finally, RT-qPCR was employed to validate the sequencing outcomes. The results were as follows: A total of 36.5 Gb of valid data were obtained, and 2 268 differentially expressed genes (DEGs) were screened with a $P \leq 0.05$ and $|\log_2(FC)| \geq 1$. Compared with the control group, 980 genes were significantly up-regulated and 1 288 genes were significantly down-regulated in the quercetin group, including genes related to oxidative stress and steroidogenesis. GO enrichment analysis revealed that DEGs were enriched in 19 entries such as cytoplasmic transport, cytoplasmic vesicle fraction, Golgi-associated vesicles and GTPase binding. KEGG enrichment analysis showed that DEGs were enriched in 37 significant pathways, such as regulation of actin cytoskeleton, apoptosis, vascular endothelial growth factor (VEGF) and p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein beta-1 (p38MAPK/HSPB1) signaling pathway, of which 25 were highly significant. The RT-qPCR results of six randomly selected genes with significant differences were consistent with the sequencing results. In conclusion, transcriptome sequencing analysis screened out testicular DEGs related to oxidative stress and steroidogenesis and pathways such as p38MAPK/HSPB1 which were affected by the addition of quercetin to the diet under high temperature in summer. This would serve as a reference for further elucidating the molecular mechanism of quercetin in the alleviation of high temperature on the reproductive performance in Hu sheep.

Keywords: quercetin; Hu sheep; testis; RNA-seq

收稿日期: 2024-04-18; 修回日期: 2024-12-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1300205); 江苏现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (JATS [2022] 478)

第一作者: 徐银莹, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 茆达干, 教授, 主要从事动物生殖生理与调控研究, E-mail: maodagan@njau.edu.cn.

湖羊为我国特有的地方品种,具有肉质鲜美、羔皮轻柔、繁殖力高等优点。然而夏季高温高湿环境会造成湖羊热应激,引起机体内部激素水平紊乱,导致其抗氧化能力下降,通常被认为是下丘脑-垂体-肾上腺轴受到热应激影响的原因^[1],破坏了机体内环境稳态,最终影响动物的生长机能与繁殖性能。一般来说哺乳动物睾丸的温度比核心体温低 2~7 °C,同时精子的发生也依赖低温环境,高于阴囊正常温度会降低精子活力,增加精子畸形率,还可能造成生殖细胞的死亡,甚至导致不育^[2]。因此,降低夏季高温对湖羊产生的不利影响成为湖羊生产中亟待解决的问题。

槲皮素是一种源自植物的黄酮类化合物,具备清除自由基、抗炎、抗氧化以及调节免疫功能等多重作用。近年来,向畜禽饲料中添加植物源性生物活性物质,如姜黄素、槲皮素、萝卜硫素等,用以减少炎症与应激反应逐渐成为一种趋势^[3-4]。研究表明,精液稀释液中添加二甲基乙酰胺和槲皮素,可改善山羊精子动力学,抑制冷冻解冻时脂质过氧化,提升精子质量^[5]。

近年来,转录组测序(RNA-seq)广泛应用于动物体中各种机制的研究以及功能基因的筛选^[6-7]。马祺琦等^[8]通过 RNA-seq 发现抗凋亡蛋白 PTD-FNK 的机制可能涉及对猪睾丸支持细胞抗热应激的多个基因以及磷脂酰肌醇-3-羟基酶-蛋白激酶(PI3K-Akt)信号通路。本课题组前期研究发现,夏季日粮按每千克体重添加 150 mg 槲皮素可降低湖羊料重比,提高其免疫机能,促进睾丸发育及脂质代谢^[9]。然而,目前关于槲皮素缓解夏季高温对湖羊睾丸损伤影响的分子机制鲜见报道。因此,本研究通过 RNA-seq 探究日粮添加槲皮素对夏季湖羊睾丸组织基因表达的影响,为阐明槲皮素缓解夏季湖羊繁殖性能下降的分子机制及其在湖羊生产中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与主要材料

以健康且体重相近的 4 月龄雄性湖羊为研究对象,在江苏省南通市启东瑞鹏牧业有限公司进行试验。试验期间日均气温为(36±3)°C,日均相对湿度为(75±10)%,羊舍内日均气温为(34±2)°C,日均相对湿度为(75±10)%。槲皮素购于百斯特食品添加剂有限公司,纯度>98%。

1.2 试验设计

将 96 只 4 月龄的湖羊分为对照组和槲皮素组,每组 3 个重复,每个重复(圈) 16 只羊。对照组饲喂基础日粮,槲皮素组饲喂每千克体重含 150 mg 槲

皮素的基础日粮,试验周期 5 周(含 1 周预试)。结束后从每个重复中随机挑选 1 只羊采集睾丸,保存于-80 °C。

表 1 基础日粮精料配方及营养成分(以干物质为基础)

组分	占比/%	营养成分	含量
玉米	51.22	粗蛋白/(g·kg ⁻¹)	171.73
豆粕	17.41	消化能/(MJ·kg ⁻¹)	12.81
大麦麸皮	15.91	钙/%	0.85
芝麻粕	4.98	磷/%	0.66
预混料 ¹⁾	6.46		
小苏打	2.48		
食盐	1.49		
亚硒酸钠维	0.05		

注:¹⁾每千克的预混料中提供:维生素 A 80 kIU,维生素 D3 20 kIU,维生素 E 200 mg,烟酰胺 120 mg,铜 120 mg,铁 640 mg,钴 2.5 mg,锰 640 mg,硒 2.5 mg,锌 640 mg,碘 10.5 mg,磷 2.5%,钙 8%,镁 2%,氯化钠 5%。

表 2 基础日粮粗料配方及营养成分(以干物质为基础)

组分	占比/%	营养成分	含量
青贮	52.24	粗蛋白/(g·kg ⁻¹)	49.00
干草	29.85	消化能/(MJ·kg ⁻¹)	3.79
豆腐渣	17.91	钙/%	0.40
		磷/%	0.07

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 提取与检测

采用 TRIzol 法从睾丸组织提取总 RNA,设置对照组、槲皮素组各 3 个样品,构建文库后,先用 Qubit2.0 Fluorometer 初步定量,稀释至 1.5 ng/μL,再使用 Agilent 2100 Bioanalyzer (RNA Nano 6000 Assay Kit of the Bioanalyzer 2100 System, Agilent Technologies, 美国)检测,确认质量后精确测定文库有效浓度,确保浓度高于 2 nmol/L 以保障文库质量。

1.3.2 上机测序与质控

不同文库采用 Illumina NovaSeq 6000 平台(Illumina, 美国)测序,清洗原始数据以去除不良数据,计算有效数据的 Q20、Q30 及 GC 含量。后续分析均基于有效数据进行。从基因组网站下载绵羊参考基因组(http://ftp.ensembl.org/pub/release-99/fasta/ovis_aries/)及基因模型注释文件(http://ftp.ensembl.org/pub/release-99/gtf/ovis_aries/),使用 HISAT2 v2.0.5 构建索引,并将有效数据与参照基因组进行比对。

1.3.3 差异表达分析及富集分析

使用 DESeq2 (1.20.0) 进行差异表达分析,

Benjamini-Hochberg 法调整 P 值以控制错误发现率, $P \leq 0.05$ 为显著差异表达的基因。另用 EdgeR (3.22.5) 重复分析, 并同样调整 P 值。以校正后的 P 值和 $|\log_2(FC)|$ 为差异表达显著的阈值。采用 cluster Profiler (3.4.4) 进行基因本体论 (GO) 富集分析, 修正基因长度偏差。同样利用 cluster Profiler 分析京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路中差异表达基因的富集情况。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

参考文献 [10], 基于 NCBI 数据库目标基因的

序列设计相应的引物 (表 3)。通过 PCR 技术验证目的条带的大小, 再进行后续试验。对总 RNA 反转录后进行 RT-qPCR。反应体系: $2 \times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix $10 \mu\text{L}$, 引物各 $0.4 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$, ddH₂O $7.2 \mu\text{L}$ 。扩增程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , 共 40 个循环; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s , $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s 。以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

表 3 荧光定量 PCR 所用引物

基因	引物序列 (5'→3')	引物大小/bp	GenBank 登录号
AREL1	F: ACCCCAGTTTGGCTGTTTT	77	XM_027972023.2
	R: CGAGGGAGCACGTCTATTC		
CA3	F: AACCAGTCGCCATTGAACT	170	XM_015097942.3
	R: GGACCACCTCTCAGCATTGA		
HSPB1	F: CACTCGCAAATACACGCTGC	211	XM_027961472.2
	R: GGGCCTTTACTTGTTCGCCG		
NEDD8	F: CAATTTGCTGTGTGCAGCCC	71	XM_004010305.4
	R: TCCTTCCGGTCAGCGTCTTC		
MAP3K14	F: CGACAGTGAGAAGAACCCGT	251	XM_004012997.3
	R: TGATGCCTGTTCCGATGTCT		
PI16	F: CAGTCTCCTTGCCAGATGT	112	XM_027958945.2
	R: GAAGCAGTAGCAGCAGTCCC		
GAPDH	F: GTC AAGCAGAGAACGGGAA	232	NM_001190390.1
	R: GGTTCACGCCCATCACAAAC		

注: AREL1, 抗凋亡 E3 泛素蛋白连接酶 1; CA3, 碳酸酐酶 III; HSPB1, 热休克蛋白 B1; NEDD8, 神经前体细胞表达的发育下调因子 8; MAP3K14, 丝裂原活化蛋白激酶激酶 14; PI16, 肽酶抑制剂 16; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.4 数据统计与分析

试验数据应用 Excel 2019 整理后, 使用 GraphPad 7.0 进行 t 检验, 以“平均值 \pm 标准误”表示。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $0.05 \leq P < 0.1$ 表示有趋势。

2 结果与分析

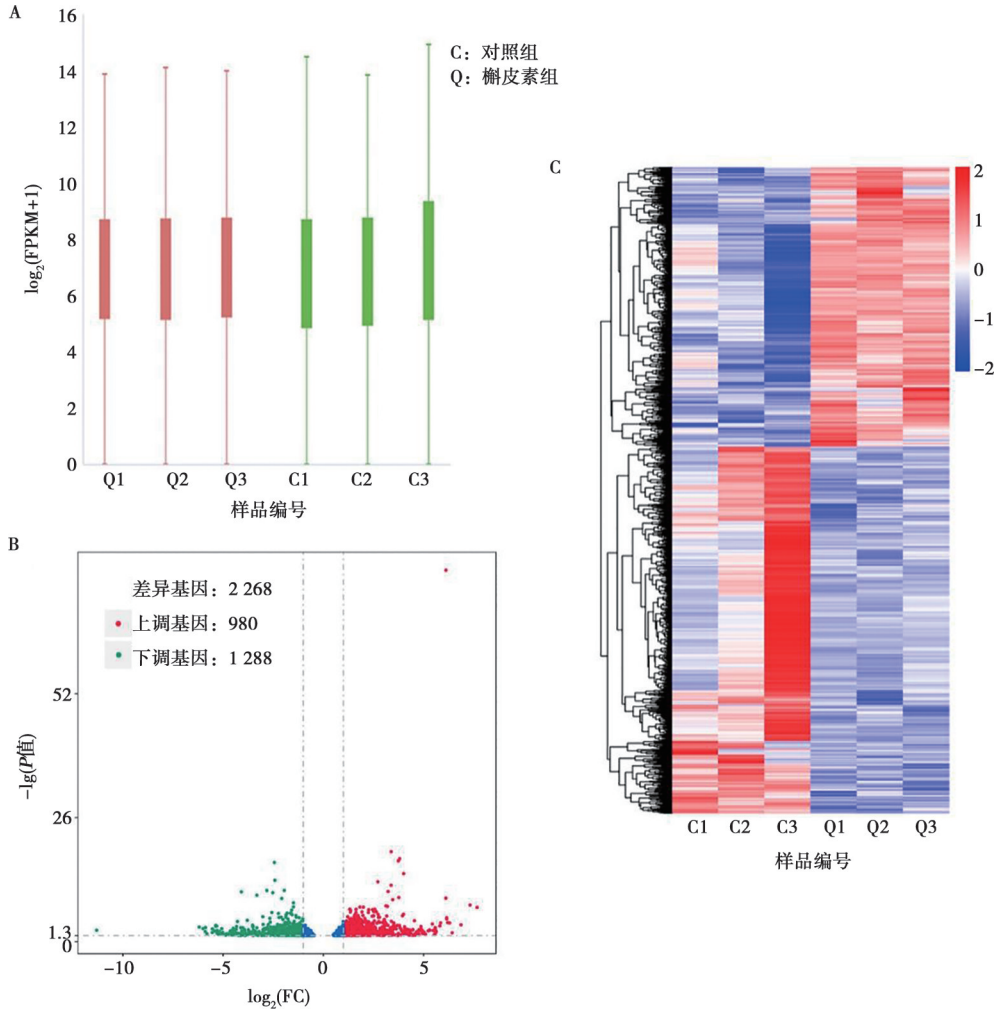
2.1 RNA-seq 质量评估

试验中共 6 个睾丸样本, 去除低质量数据获得 36.5 Gb 有效数据, 碱基错误率均低于 0.03%, Q20 > 97.88%, Q30 > 94.15%, GC 含量平均约为 50.33%。6 个睾丸样品均能获得高于 5.75 Gb 的高质量数据。本试验样品所得到的数据成功比对到基因组上数据的比例处于 88.66%~91.97%, 其中对照组平均达到 91.41%, 槲皮素组平均达到 88.80%; 比对到参考基因多个位置的数据比例处于 4.81%~9.43%, 其中对

对照组平均达到 7.33%, 槲皮素组平均达到 5.85%。上述结果可知, 测序结果比对良好, 可进行进一步分析。

2.2 差异基因的分布与聚类情况

计算出各个样本所有基因的表达值 (FPKM) (对测序深度和基因长度进行校正), 盒形图直观地呈现了两组中各个样本的基因表达分布情况 (图 1A)。将 $P \leq 0.05$ 且 $|\log_2(FC)| \geq 1$ 设定为本项目的差异表达阈值。测序结果共检测到 3 484 个基因, 通过筛选, 两组之间共检测出 2 268 个差异显著的基因, 与对照组相比, 槲皮素组中上调基因 980 个, 下调基因 1 288 个 (图 1B)。对所有差异基因的聚类分析, 结果显示两组组间的差异性显著高于组内的差异性 (图 1C)。表 4 为筛选出的与氧化应激和类固醇合成相关的差异表达基因。



A. 样本基因表达量盒形图；B. 差异基因火山图；槲皮素组与对照组相比，红点代表上调的基因，绿点代表下调的基因，蓝点表示无显著差异的基因；C. 差异基因聚类热图。

图 1 RNA-seq 数据统计及差异基因分析

表 4 氧化应激及类固醇合成相关差异基因

基因名称	基因 ID	log ₂ (FC)	P 值	校正后的 P 值
APP	ENSOARG00000015056	-1.095	0.005	0.131
CYP7B1	ENSOARG00000017011	1.865	0.017	0.217
HSPB1	ENSOARG00000013748	-1.455	0.000	0.011
IL22	ENSOARG00000001598	-4.391	0.012	1
LRRK2	ENSOARG00000019970	-1.240	0.028	0.256
MAPK1	ENSOARG00000015529	-1.077	0.003	0.106
NDUFB3	ENSOARG00000016831	1.173	0.008	0.164
NOX1	ENSOARG00000001070	-1.016	0.037	0.283
RHOB	ENSOARG00000019441	-1.821	0.002	0.095
ROCK1	ENSOARG00000008819	-1.242	0.008	0.165
SIRT6	ENSOARG00000010598	1.200	0.021	0.228

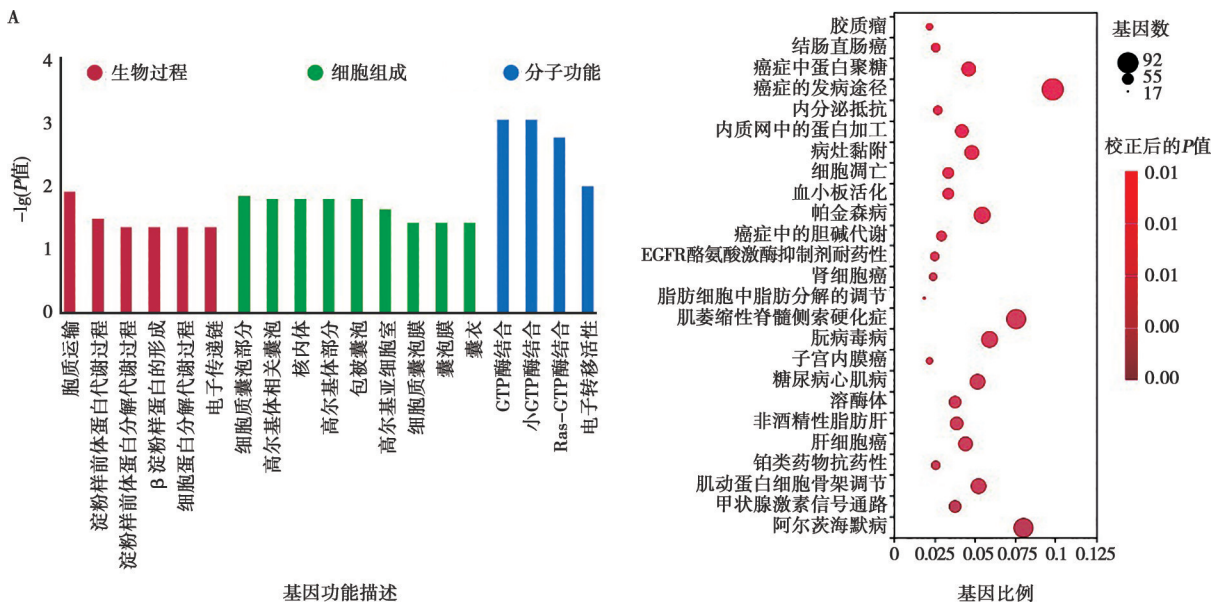
注：APP, 淀粉样 β 前体蛋白；CYP7B1, 细胞色素 P450 家族 7 亚家族 B 成员 1；IL22, 白细胞介素 22；LRRK2, 亮氨酸丰富重复激酶 2；MAPK1, 丝裂原活化蛋白激酶 1；NDUFB3, 泛醌氧化还原酶亚基 B3；NOX1, 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 1；RHOB, 同系物家族成员 B；ROCK1, Rho 关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶 1；SIRT6, 沉默信息调节因子 2 相关酶类 6。

2.3 差异表达基因 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析包括生物过程 (BP)、细胞组成 (CC) 和分子功能 (MF) 三部分。GO 功能富集以校正后的 $P \leq 0.05$ 作为显著性富集的阈值, 结果如图 2A 所示。生物过程中共富集到 6 条差异显著的条目: 胞质运输 (GO: 0016482), 淀粉样前体蛋白代谢过程 (GO: 0042982) 和分解代谢过程 (GO: 0042987), β 淀粉样蛋白的形成 (GO: 0034205), 细胞蛋白分解代谢过程 (GO: 0044257) 和电子传递链 (GO: 0022900); 细胞组成中共富集到 9 条差异显著的条目: 细胞质囊泡部分 (GO: 0044433), 高尔基体相关囊泡 (GO: 0005798), 核内体 (GO: 0005768), 高尔基体部分 (GO: 0044431), 包被囊泡 (GO: 0030135), 高尔基亚细胞室 (GO: 0098791), 细胞质囊泡膜 (GO: 0030659), 囊泡膜 (GO: 0012506) 和囊衣 (GO: 0030120); 分子功能中共富集到 4 条

差异显著的条目: GTP 酶结合 (GO: 0051020), 小 GTP 酶结合 (GO: 0031267), Ras - GTP 酶结合 (GO: 0017016) 和电子转移活性 (GO: 0009055)。

KEGG 富集结果中选取前 25 条最显著的通路如图 2B 所示, 以校正后的 $P \leq 0.01$ 作为极显著富集的阈值, 共富集到包括阿尔茨海默病 (oas05010)、甲状腺激素信号通路 (oas04919)、肌动蛋白细胞骨架调节 (oas04810)、铂类药物抗药性 (oas01524)、肝细胞癌 (oas05225)、非酒精性脂肪肝 (oas04932)、细胞凋亡 (oas04210) 等 25 条通路。以校正后的 $P \leq 0.05$ 作为显著性富集的阈值, 共富集到包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) /HSPB1 信号通路在内的 37 条显著性通路。



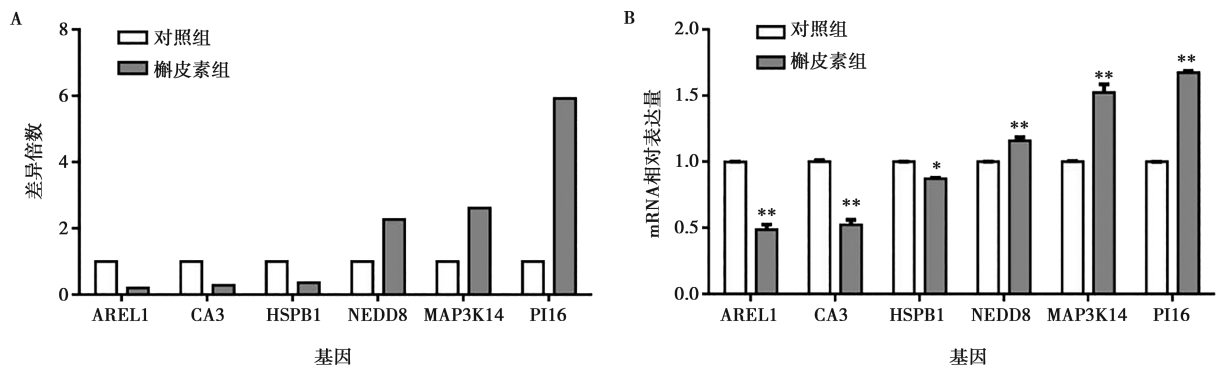
A. GO 富集分析柱状图; B. KEGG 富集气泡图, 基因比例为差异基因数与差异基因总数的比值。

图 2 GO 和 KEGG 基因功能富集图

2.4 RT-qPCR 检测

从 2 268 个差异表达的基因中, 随机抽取 6 个差异显著的基因, 其中上调基因为 NEDD8、MAP3K14 和 PI16, 下调基因为 AREL1、CA3 和 HSPB1 (图

3A), RT-qPCR 结果如图 3B 所示, 随机挑选的 6 个基因表达水平变化趋势与测序结果相符, 验证了测序结果的可信度。



A. RNA-seq 基因差异倍数; B. RT-qPCR 测定基因的相对表达量。* 表示组间差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 3 测序分析与定量验证

3 讨论

本试验通过转录组分析, 筛选出对照组和槲皮素组睾丸组织 2 268 个表达显著差异的基因, 如与炎症相关的 IL22, 与类固醇合成相关的 CYP7B1 以及与氧化应激相关的 SIRT6。研究表明, IL22 基因的消融或抗体阻断逆转了内质网应激反应并减轻了小鼠慢性结肠炎^[11]。本试验中日粮添加槲皮素后湖羊睾丸组织中 IL22 基因表达显著下调, 说明槲皮素缓解了热应激对湖羊睾丸引发的炎症反应。CYP7B1 作为细胞色素 P450 (CYP) 家族中的一员, 在脑内类固醇激素代谢、肝脏胆盐合成、免疫细胞抗体产生和前列腺雌激素受体配体代谢中起重要作用。研究表明, CYP7B1 的缺失会导致嗅觉系统中 AR 依赖性信号传导的受损, 从而导致雄性生殖行为缺陷^[12]。SIRT6 是一种应激反应蛋白脱乙酰酶, 在调节 DNA 修复、基因组稳定性、氧化应激和炎症中起重要作用。SIRT6 通过下调氧化应激、炎症、应激活化蛋白激酶 (JNK) 活化和半胱天冬酶活化来减弱对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导的肝细胞坏死和凋亡。研究表明, 槲皮素与 SIRT (尤其是 SIRT1 和 SIRT6) 相互作用, 并调节多种信号通路, 在减少氧化应激、炎症、自噬调节、线粒体生物发生、葡萄糖利用、脂肪酸氧化和基因组稳定性方面发挥作用^[13]。本试验中 CYP7B1 和 SIRT6 基因表达显著上升, IL22 基因表达显著下降, 说明日粮添加槲皮素可以缓解湖羊睾丸由热应激引起的氧化应激和炎症反应, 从而降低热应激对湖羊睾丸造成的损伤。

通过 GO 功能富集分析发现, 差异基因主要富集在线粒体 (生物过程)、高尔基体 (细胞组成) 和 GTP 酶 (分子功能) 相关功能上。热应激造成机体出现氧化应激, 线粒体作为细胞中氧自由基产生的主

要场所, 普遍认为线粒体介导了氧化应激^[14]; 同时也有研究表明当机体受到氧化应激时, 高尔基体也会出现结构和功能上的变化, 发生高尔基体应激^[15]。NDUFB3 是 GO 富集到的电子传递中的基因, 用多氯联苯处理大鼠甲状腺细胞后, NDUFB3 的 mRNA 表达下降, 活性氧 (ROS) 产量增加, 细胞出现氧化应激反应^[16]。在 GO 富集结果中, GTP 酶结合、小 GTP 酶结合和 Ras - GTP 酶结合都富集到了 RHOB、ROCK1、NOX1、LRRK2 基因。RHOB 是 Rho 小 GTP 酶家族的成员, 可调节细胞骨架动力学和囊泡运输。细胞暴露于遗传毒性物质中而出现 DNA 损伤时, RHOB 的表达迅速增加^[17], 而热应激会对细胞造成 DNA 损伤。ROCK1 属于丝/苏氨酸激酶家族, 是小 GTP 结合蛋白 Rho 的下游靶标, 调节炎症和氧化应激反应, 其过表达促进雄性 WKY 和 SHR 大鼠 NOX1 和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 (NOX2) 表达, 增加超氧化物和 H₂O₂ 的生成^[18]。有研究表明, 在苯并[a]芘诱导的氧化应激模型中, ROCK1 基因缺陷小鼠活性氧水平降低, 存活率提高^[19]。NOX 家族的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶是 ROS 的主要酶源和氧化还原信号调节因子。NOX 酶的主要功能是在大的跨膜 NOX 蛋白上产生 ROS, 它们催化从 NADPH 到分子氧的电子传递, 产生超氧化物。NOX1 位于质膜和小泡中, 产生超氧化物。有研究表明, siRNA 介导的 NOX1 或尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NOX4) 下调抑制了 NOD1 介导的 ROS 产生, 并增加了抗氧化防御酶过氧化氢酶和超氧化物歧化酶 (SOD) 的表达^[20]。本试验中 RHOB、ROCK1、LRRK2 和 NOX1 表达均显著下调, 推测向热应激湖羊日粮中添加槲皮素可以通过缓解线粒体和高尔基体的氧化应激以及影响细胞信号传导缓解热应激对湖羊睾丸造成的 DNA 损伤和由氧

化应激引起的炎症反应。

KEGG 通路富集分析中,共筛选出 37 条差异显著通路,其中极显著的通路有 25 条,主要集中于疾病相关通路,如阿尔茨海默病和帕金森病等,这些疾病相关通路都会通过氧化应激对机体造成损伤。 β -淀粉样蛋白聚集成细胞外纤维沉积是阿尔茨海默病的特征,其来源于 APP 通过 β 分泌酶 (BACE1) 和 γ -分泌酶的顺序裂解。有研究表明,天然合成的槲皮素-3-O-glc-1-3-rham-1-6-葡萄糖苷可以通过降低 β 分泌酶活性来抑制 β -淀粉样蛋白的产生,并且减弱 β -淀粉样蛋白介导的神经元死亡、ROS 和 NO 的产生以及促炎细胞因子的释放^[21]。这正与本测序 GO 富集到的 β 淀粉样蛋白的形成结果一致。有研究发现,槲皮素灌胃可通过调节氧化应激来缓解阿尔茨海默病大鼠认知功能障碍,抑制炎症反应,降低调亡率,保护大鼠神经^[22]。LRRK2 与帕金森病相关,参与调节线粒体功能,具有激酶和 GTP 酶活性。研究表明,抑制 LRRK2 可阻断毒物诱导的 ROS 并促进体外线粒体自噬,防止大鼠黑质纹状体束中由三氯乙烯引起的多巴胺能神经退行性变、神经炎症和线粒体损伤^[23]。这与本测序 GO 富集到的 GTP 酶相关结果一致。推测热应激造成的氧化应激激活了湖羊神经退行性疾病相关通路,间接对湖羊睾丸的功能造成影响,而槲皮素被认为是治疗神经退行性疾病的最有效的天然抗氧化剂之一,从而缓解热应激对湖羊睾丸造成的氧化应激损伤。

此外,KEGG 还富集到了差异显著的 VEGF 信号通路。研究表明,热应激会导致心脏组织中热休克蛋白 70 (HSP70) 和 VEGF 上调,促进心脏局灶性内皮增殖^[24]。槲皮素对 VEGF 具有抑制作用,可通过抑制 HSP70 和 VEGF 的表达缓解大鼠手术诱导的子宫内膜异位症^[25]。VEGF 通路富集到了包括 HSPB1 和 MAPK1 在内的 15 个差异显著的基因。MAPK1 是氧化应激相关的关键基因之一,有研究表明 Ni 可以通过激活间质细胞中的细胞外调节蛋白激酶 ERK1/2 (MAPK1) 和 p38MAPK (MAPK14) 信号通路来抑制睾酮生成^[26],本测序结果中,MAPK1 显著下调,说明添加槲皮素可以缓解热应激造成的睾酮分泌下降。HSPB1 是热休克蛋白家族的一员,当细胞受到热暴露刺激时,通过热休克元件 (HSE) 和热休克因子 (HSF) 的结合,从而激活 HSPB1 基因,上调其表达水平,从而起到抗氧化应激与抗调亡的作用。有研究表明,细胞受到热暴露刺激时,通过 HSE 和 HSF 的结合,从而激活 HSPB1 基因,上调其表达水平^[27]。极端热暴露促进了 HSPs 的积累,HSPB1 通过与生肌调节因子 (Myf5) 结合作为分子伴侣,调

节卫星细胞受热暴露刺激而出现的分裂或分化现象。VEGF 刺激了 MAP 和 p38,但不激活应激活蛋白激酶-1/c-Jun NH2 末端激酶 (SAPK1/JNK)。p38 的激活导致 MAPK 活化蛋白激酶-2/3 的激活和热休克蛋白 27 (HSP27) 的磷酸化。研究表明,热应激会促进软骨细胞调亡,主要是通过激活 p38 的磷酸化反应^[28]。槲皮素被认为与 p38MAPK 抑制剂具有相似作用,可通过抑制 p38MAPK 磷酸化发挥作用。研究表明,槲皮素处理受到热应激的 HeLa 细胞会导致 HSF1 表达下降,尤其是磷酸化水平下降,抑制 HSF 和 HSE 的结合^[29]。本试验结果显示,槲皮素处理显著下调 HSPB1,推测是槲皮素下调了 HSF 的表达,从而抑制 HSF 与 HSE 的结合,最终降低了热应激对睾丸发育的损伤。结果提示,槲皮素可通过 p38MAPK/HSPB1 通路缓解热应激对机体的氧化损伤。

综上,RNA-seq 分析筛选出了夏季高温条件下添加槲皮素影响湖羊睾丸组织氧化应激和类固醇激素合成相关基因与 p38MAPK/HSPB1 等通路,为进一步阐明槲皮素缓解夏季高温影响湖羊繁殖性能的分子机制奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 李述方,王海荣.热应激对绵羊机体氧化损伤及免疫功能的影响[J].江苏农业学报,2023,39(7):1606-1612.
- [2] ALDAHAN R A, STANTON P G. Heat stress response of somatic cells in the testis [J]. Mol Cell Endocrinol, 2021, 527: 111216.
- [3] ISMAIL A A, ABDEL-KHALEK A K E, KHALIL W A, et al. Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen [J]. Cryobiology, 2020, 97: 144-152.
- [4] KOSTIC A Z, MILINCIC D D, STANISAVLJEVIC N S, et al. Polyphenol bioaccessibility and antioxidant properties of *in vitro* digested spray-dried thermally-treated skimmed goat milk enriched with pollen [J]. Food Chem, 2021, 351: 8.
- [5] SEIFI-JAMADI A, AHMAD E, ANSARI M, et al. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen [J]. Cryobiology, 2017, 75: 15-20.
- [6] 王宏玲,陈琨,吴斌,等.基于 RNA-seq 测序的弓獭蛤 (*Lutraria rhynchaena*) 不同组织转录组差异研究 [J]. 广西科学院学报,2024,40(1):80-92.
- [7] 陈哲,曲小露,郭彬彬,等.基于转录组测序研究绿光影响鹅胚心脏早期发育的候选基因 [J]. 畜牧兽医学报,2024,55(5):1978-1988.
- [8] 马祺琦,纪伟霞,汪燕玲,等. PTD-FNK 蛋白影响猪睾丸支持细胞抗热应激能力的转录组学分析 [J]. 畜牧与兽医,2022,54(10):4-11.
- [9] 姜志洋.日粮添加姜黄素和槲皮素对夏季湖羊生产性能、血液

- 指标和睾丸发育的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [10] 夏雨婷. 硒对夏季湖羊血液指标和睾丸发育的影响及缓解睾丸间质细胞热暴露损伤的机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- [11] POWELL N, PANTAZI E, PAVLIDIS P, et al. Interleukin-22 orchestrates a pathological endoplasmic reticulum stress response transcriptional programme in colonic epithelial cells [J]. *Gut*, 2020, 69 (3): 578-590.
- [12] OYOLA M G, ZULOAGA D G, CARBONE D, et al. CYP7B1 enzyme deletion impairs reproductive behaviors in male mice [J]. *Endocrinology*, 2015, 156 (6): 2150-2161.
- [13] UNGURIANU A, ZANFIRESCU A, MARGINĂ D. Exploring the therapeutic potential of quercetin; a focus on its sirtuin-mediated benefits [J]. *Phytother Res*, 2024, 38 (5): 2361-2387.
- [14] ENO C O, ZHAO G, VENKATANARAYAN A, et al. Noxa couples lysosomal membrane permeabilization and apoptosis during oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 26-37.
- [15] JIANG Z, HU Z, ZENG L, et al. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50 (8): 907-917.
- [16] XU W L, ZHU X X, WANG L, et al. 2, 3', 4, 4', 5-Pentachlorobiphenyl induced thyroid dysfunction by increasing mitochondrial oxidative stress [J]. *J Toxicol Sci*, 2022, 47 (12): 555-565.
- [17] MA Y F, GONG Y Y, CHENG Z X, et al. Critical functions of RhoB in support of glioblastoma tumorigenesis [J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17 (4): 516-525.
- [18] WU N, ZHENG F, LI N, et al. RND3 attenuates oxidative stress and vascular remodeling in spontaneously hypertensive rat via inhibiting ROCK1 signaling [J]. *Redox Biol*, 2021, 48: 102204.
- [19] VEMULA S, SHI J, MALI R S, et al. ROCK1 functions as a critical regulator of stress erythropoiesis and survival by regulating p53 [J]. *Blood*, 2012, 120 (14): 2868-2878.
- [20] SHARMA A, SINGH S, AHMAD S, et al. NOD1 activation induces oxidative stress via NOX1/4 in adipocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 162: 118-128.
- [21] TAN S, WU L, LIU J, et al. Quercetin-3-O-glc-1-3-rham-1-6-glucoside decreases A β production, inhibits A β aggregation and neurotoxicity, and prohibits the production of inflammatory cytokines [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 970: 176491.
- [22] 王玲, 杜潇, 祝华莲, 等. 槲皮素调控 TLR4/NF- κ B 通路对阿尔茨海默病大鼠认知功能障碍及海马神经元损伤的影响 [J]. *中医药导报*, 2023, 29 (12): 19-23.
- [23] ILIEVA N M, HOFFMAN E K, GHALIB M A, et al. LRRK2 kinase inhibition protects against Parkinson's disease-associated environmental toxicants [J]. *Neurobiol Dis*, 2024, 196: 106522.
- [24] GONG B, ASIMAKIS G K, CHEN Z P, et al. Whole-body hyperthermia induces up-regulation of vascular endothelial growth factor accompanied by neovascularization in cardiac tissue [J]. *Life Sci*, 2006, 79: 1781-1788.
- [25] 张习, 王欣, 王洪静, 等. 槲皮素对手术诱导的子宫内膜异位症的抑制作用和机制 [J]. *四川大学学报医学版*, 2009, 40: 228-231.
- [26] HAN A, ZOU L, GAN X, et al. ROS generation and MAPKs activation contribute to the Ni-induced testosterone synthesis disturbance in rat Leydig cells [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 290: 36-45.
- [27] SAMALI A, ROBERTSON J D, PETERSON E, et al. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6 (1): 49-58.
- [28] TAKEBE K, NISHIYAMA T, HAYASHI S, et al. Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27: 329-335.
- [29] HOSOKAWA N, HIRAYOSHI K, KUDO H, et al. Inhibition of the activation of heat-shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12 (8): 3490-3498.