



李晓庆,李盛,周晓铎,等. 孵化后期热处理对肉雏鸡骨骼肌和肝脏温敏 TRP 离子通道及线粒体功能的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):530-538.

LI Xiaoqing,LI Sheng,ZHOU Xiaohua,et al. Effects of thermal manipulation on thermo-TRP channels and mitochondrial function in skeletal muscle and liver of broilers during late incubation period[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(3):530-538.

## 孵化后期热处理对肉雏鸡骨骼肌和肝脏温敏 TRP 离子通道及线粒体功能的影响

李晓庆,李盛,周晓铎,Mohamed Ahmed Fathi,李春梅\*

(南京农业大学动物科技学院家畜环境控制与智慧生产研究中心,江苏 南京 210095)

**摘要:**[目的]孵化后期热处理能够在一定程度上提高肉鸡的耐热性,而骨骼肌和肝脏线粒体功能及温敏瞬时电位(transient receptor potential,TRP)离子通道与机体耐热性密切相关。因此,本试验旨在研究孵化后期热处理(thermal manipulation, TM)对雏鸡骨骼肌和肝脏温敏 TRP 离子通道及线粒体功能的影响。[方法]选取 240 枚 AA 肉鸡种蛋随机分为 3 组(每组 8 个重复,每重复 10 枚种蛋):CON 组,37.5 °C 孵化;TM1 组,在孵化期第 16~18 天 39.5 °C 热处理 3 h·d<sup>-1</sup>;TM2 组,在孵化期第 16~18 天 41.5 °C 热处理 3 h·d<sup>-1</sup>。出雏后测定 1 日龄雏鸡的直肠温度,检测胸肌、腿肌和肝脏组织相关基因表达水平。[结果]与 CON 组相比,孵化后期热处理显著降低了 1 日龄雏鸡的直肠温度( $P<0.01$ ),TM1 组雏鸡腿肌器官指数显著增加( $P<0.05$ )。与 CON 组相比,TM2 组雏鸡胸肌的 *avUCP* 基因表达水平显著降低( $P<0.01$ ),*COX IV*( $P<0.05$ )、*Tfam*( $P<0.01$ )、*PGC1 $\alpha$* ( $P<0.05$ )、*ATP5B*( $P<0.01$ )和 *IDH3 $\alpha$* ( $P<0.01$ )基因表达水平均显著增加,*TRPV1*、*TRPV2* 和 *TRPV3* 基因表达水平均显著降低( $P<0.05$ ),*SERCA1* 基因表达水平显著增加( $P<0.01$ )。与 CON 组相比,TM2 组雏鸡腿肌的 *avUCP* 基因表达水平显著降低( $P<0.01$ ),*ATP5B* 基因表达水平显著增加( $P<0.05$ );TM2 组雏鸡肝脏组织的 *Tfam* 和 *SERCA1* 基因表达水平显著增加( $P<0.05$ )。相关性分析结果显示,温敏 TRP 基因表达水平与线粒体经典产热基因 *avUCP* 和 *avANT* 表达呈正相关关系,与线粒体氧化磷酸化功能相关基因表达水平呈负相关关系。[结论]孵化后期热处理可通过降低 1 日龄雏鸡胸肌的温敏 TRP 基因和线粒体产热相关基因表达水平水平,增加线粒体生物发生及氧化磷酸化功能相关基因表达水平,引起线粒体热适应性变化。

**关键词:**肉鸡;孵化期热处理;温敏 TRP 离子通道;线粒体功能

中图分类号:S831.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)03-0530-09

## Effects of thermal manipulation on thermo-TRP channels and mitochondrial function in skeletal muscle and liver of broilers during late incubation period

LI Xiaoqing,LI Sheng,ZHOU Xiaohua,Mohamed Ahmed Fathi,LI Chunmei\*

(Research Center for Livestock Environmental Control and Smart Production,College of Animal Science and Technology,  
Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

**Abstract:**[Objectives]Thermal manipulation(TM)in the late incubation period can improve the heat resistance of broilers to a certain extent. Skeletal muscle and liver mitochondrial function and temperature-sensitive transient receptor potential(thermo-TRP)ion channels are closely related to body heat resistance. Therefore,the aim of this experiment was to study the effects of thermal manipulation in the late incubation period on thermo-TRP ion channels and mitochondrial function in skeletal muscle and liver of chicks. [Methods]240 AA broiler eggs were randomly divided into 3 groups:CON group,incubated at 37.5 °C;TM1 group,39.5 °C thermal manipulation for 3 h·d<sup>-1</sup> on the 16 to 18 day of incubation period;TM2 group,thermal manipulation at 41.5 °C for 3 h·d<sup>-1</sup> on the 16 to 18 day of incubation. The rectal temperature of chicks was measured one day after hatching,and samples of chest muscle, leg muscle and liver were collected to detect the expression levels of related genes. [Results]Compared with the CON group, TM significantly reduced the rectal temperature of hatched chicks( $P<0.01$ ). The leg muscle organ index of TM1 group significantly increased( $P<0.05$ ). Compared with the CON group,the expression level of *avUCP* gene in TM2 group significantly decreased( $P<0.01$ ). The expression levels of *COX IV*( $P<0.05$ ),*Tfam*( $P<0.01$ ),*PGC1 $\alpha$* ( $P<0.05$ ),*ATP5B*( $P<0.01$ )and *IDH3 $\alpha$* ( $P<0.01$ )gene significantly increased. The expression levels of *TRPV1*,*TRPV2* and *TRPV3* genes significantly decreased( $P<0.05$ ). *SERCA1* gene

收稿日期:2023-06-17

基金项目:国家自然科学基金项目(32072781)

\*通信作者:李春梅,教授,研究方向为养殖环境与畜禽健康,E-mail:chunmeili@njau.edu.cn。

expression level significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the CON group, the expression level of *avUCP* gene in TM2 group significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression level of *ATP5B* gene significantly increased ( $P < 0.05$ ). The expression level of *Tfam* gene in liver of chicks in TM2 group significantly increased ( $P < 0.05$ ). *SERCA1* gene expression level significantly increased ( $P < 0.05$ ). The gene expression level of thermo-TRP was positively correlated with the gene expression level of *avUCP* and *avANT*. The expression of genes related to mitochondrial oxidative phosphorylation function was negatively correlated. [Conclusions] Thermal manipulation in the late incubation period could reduce the expression levels of thermo-TRP genes and mitochondrial heat-related genes in the breast muscle of one-day-old chicks, and increase the expression levels of genes related to mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation, resulting in changes in mitochondrial thermal adaptability.

**Keywords:** broiler; thermal manipulation during incubation period; thermo-TRP ion channels; mitochondrial function

快速生长的肉鸡由于被覆羽毛、缺乏汗腺、代谢旺盛等生理特点,极易产生热应激,影响生长,造成经济损失<sup>[1-2]</sup>,因此缓解高密度养殖家禽热应激问题是现代养殖业广泛关注并亟待解决的问题。热习服也被称为热适应,即高温耐受性,是机体对体表温度升高时作出的生理、感知适应性应答<sup>[3]</sup>。研究表明热习服能够使机体体温升高,增强机体的体温调节能力和出汗能力,使得出汗的阈值有所降低<sup>[4]</sup>。此外,热习服也能够降低机体的代谢率,减少产热<sup>[5]</sup>。已有研究表明在肉鸡胚胎孵化期间进行热处理能够提高孵化后雏鸡机体的耐热性<sup>[6]</sup>,称为孵化期热习服。胚胎孵化期是能够影响肉鸡对高温感知能力和调节能力的关键时期,孵化期间的热处理可以通过影响肉鸡的直肠温度、氧化应激和免疫调节来提高耐热性,有可能从根本上解决肉鸡的低耐热性问题<sup>[7-8]</sup>。将 16~18 胚龄鸡胚在 39.5 °C 条件下每日热处理 3 h,在遭受热应激时体温最低,具有更好的耐热性<sup>[9]</sup>。因此,孵化期热处理能够一定程度上影响肉鸡的体温调节能力,使机体更好地适应高温,但其作用机制尚未研究清楚。

体温调节主要通过产热与散热平衡来实现。家禽的产热主要在肌肉和肝脏。骨骼肌是机体最大的耗能组织,肝脏是肉鸡脂肪生成的主要部位,含有大量的线粒体。在热适应过程中,线粒体会产生一系列适应性变化。机体产热部位主要在线粒体,产热量主要取决于线粒体上解耦联蛋白,能够消除线粒体内膜两侧的质子浓度差,导致质子电位差势能以热量形式损失,引起机体产热量增加,增加动物的基础代谢率,对维持动物体温平衡有重要意义。氧化磷酸化功能是线粒体最重要的功能之一,氧化磷酸化过程产生的电势推动 ATP 的产生并实现其他线粒体功能,可以由内膜摄取缓冲信号离子  $Ca^{2+}$ ,保持细胞内钙稳态<sup>[10-11]</sup>,影响钙信号传导。同时线粒体  $Ca^{2+}$  能够激活参与 ATP 合成的关键酶,影响氧化磷酸化进程。

瞬时电位(transient receptor potential, TRP)离子通道蛋白是一种非选择性的阳离子通道,对  $Ca^{2+}$  具有高度的通透性。细胞内外的钙离子浓度变化可以影响机体的生理功能,如肌肉收缩、神经递质释放等。TRP 离子通道是最大的温度传感家族,如果环境温度超过阈值,会激活热感 TRP,如果环境温度低于阈值,则会激活冷感 TRP,其中 TRPV 亚家族蛋白离子通道对温度的敏感性远远高于其他通道<sup>[12]</sup>。此类对温度敏感的 TRP 离子通道可被称为温敏离子通道,温敏 TRP 家族在热适应中的表现值得探索。在啮齿动物中,通过拮抗剂阻断 TRPV1 通路,能够引起动物机体发生高热反应<sup>[13]</sup>,说明 TRPV1 在动物机体调控体温过程中发挥重要的作用。最新的研究表明,鸡胚孵化期热处理(thermal manipulation, TM)可以通过抑制 TRPV4 表达,从而减少  $Ca^{2+}$  内流,最终通过影响 NF- $\kappa$ B 信号通路缓解肉鸡热应激引起的空肠炎症<sup>[14]</sup>。

高温环境可能通过影响肉鸡骨骼肌和肝脏中温敏离子通道的表达,引起线粒体钙稳态变化,进而影响氧化磷酸化功能和产热功能,使线粒体发生热适应性变化。孵化后期是肉鸡体温调节发育关键时期,因此,本试验研究孵化后期热处理对雏鸡骨骼肌和肝脏温敏 TRP 离子通道及线粒体功能的影响,并对温敏 TRP 离子通道及线粒体功能相关基因表达进行相关性分析,以探究两者之间的相互关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

选取日龄相同、大小相近的 AA 肉鸡种蛋 240 枚(平均蛋质量 68 g),随机分为 3 组,每组 8 个重复,每重复 10 枚种蛋。在胚胎期第 7 天,照蛋并取出未受精蛋和胚胎死亡的受精蛋。依据 Collin 等<sup>[9]</sup>的方法,将受精蛋在 3 组不同孵化条件下孵化(图 1):对照组(CON),37.5 °C 条件下孵化;39.5 °C 热处理组(TM1),在孵化期第 16~18 天在 39.5 °C 条件下进行 3 h·d<sup>-1</sup>热处理,其余时间孵化温度均为 37.5 °C;41.5 °C 热处理组(TM2),在孵化期第 16~18 天在 41.5 °C 条件下进行 3 h·d<sup>-1</sup>热处理,其余时间孵化温度均为 37.5 °C。

3组孵化相对湿度均设定为65%，翻蛋模式相同，每1.5 h自动转动1次。孵化结束，测定1日龄雏鸡直肠温度，采集胸肌、腿肌和肝脏样品称重，采集样品于液氮速冻，-80℃保存用于后续分析。

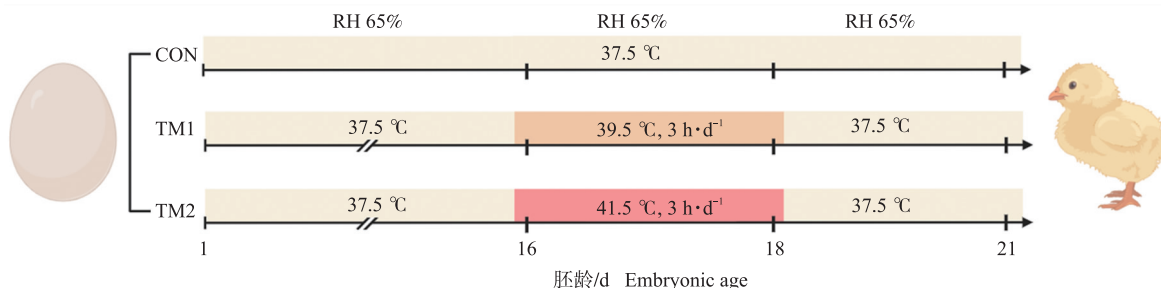


图1 试验分组设计示意图

Fig. 1 Experimental grouping design illustration

## 1.2 主要试剂及仪器

主要试剂:Trizol II (R401-01)购自南京诺唯赞公司;AB Script III RT Master Mix for qPCR with gDNA Remove 和 AB Script II One Step SYBR Green RT-qPCR 试剂盒购自 ABclonal 公司。主要仪器:旋涡混匀仪 (Thermo, 美国);NanoDrop 分光光度计 (Thermo, 美国);QuantStudio 7 Flex 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国);GeneAmp 聚合酶链反应系统 (ABI, 美国);RET-2 直肠温度计 (Physitemp, 美国)。

## 1.3 直肠温度测定

雏鸡出壳约2 h待羽毛干燥后每个重复随机选取3只雏鸡,使用动物体温仪(精度 $\pm 0.1$ ℃)将热敏电阻探头插入泄殖腔内约2 cm深度,待其读数稳定时读取并记录直肠温度。

## 1.4 样品采集及器官指数的测定

雏鸡出壳12 h后每个重复随机选取一只称量活鸡体重,颈部错位处死。采集胸肌、腿肌和肝脏样品置于液氮速冻,再置于-80℃保存用于后续分析。器官指数计算公式:器官指数=(器官重/活体重) $\times 100\%$ 。

## 1.5 总RNA提取与荧光定量PCR

使用Trizol试剂提取总RNA,用核酸分光光度计检测RNA浓度值( $D_{260}/D_{280}$ 值1.8~2.0),调整浓度至300~800 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,根据反转录试剂盒的试验操作说明,将总RNA统一调整为1 000 ng,配制20  $\mu\text{L}$ 的反转录体系。采用一步法反转录获得cDNA。反转录结束后cDNA样品置于-20℃保存。

荧光定量PCR检测采用SYBR Green I 嵌合荧光染料法,在QuantStudio™7实时荧光定量PCR仪上进行,反应总体积为20  $\mu\text{L}$ 。试验前首先将引物、2 $\times$ T5 Fast qPCR Mix 和 ddH<sub>2</sub>O 等反应原料体积混合配制成混合体系。每个孔取混合体系8  $\mu\text{L}$ 加入96孔板,随后加入2  $\mu\text{L}$ 的cDNA模板混匀,离心,放置4℃冷藏待上机。反应结束后以鸡 $\beta$ -actin基因为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算不同处理组相关基因的相对表达量。试验检测的相关基因的引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。引物序列见表1。

表1 荧光定量PCR所用引物

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR

基因 Genes	基因序列号 GenBank No.	引物对序列 Primers pair sequences(5'→3')	产物长度/bp Product length
$\beta$ -actin	NM_007393.5	CTGGCACCTAGCACAATGAA/CTGCTTGCTGATCCACATCT	123
TRPV1	NM_080704.4	GGGAAGACTCAGCACTGGAA/ATTGGAGCCATGTCCCTTGTC	136
TRPV2	XR_001469393.1	GCACCTGTCCCGCAAGTTCAC/GTCACTGCTGTATGCCAGAATCTCC	124
TRPV3	XM_001235154.4	CCCGTCCAGTCTTCTCTCTATG/TCCATTTTCATTCCGAGGAGT	151
TRPV4	NM_204692	CGTGTGGAGATCCTCGTTT/AGGAGACAGCACCAGAACTTG	116
avUCP	AB088685.1	ATCGGGCTCTACGACTCTGTG/GCAGCAGTGTGTCTCTGTATGA	334
avANT	AB088686.1	TGTGGCTGTGTGTTTCTCA/GCGTCTGACTGCATCATCA	67
Cyt C	NM_001299055.1	AATGTTCCCACTGCCATACGGTTG/AGCCCTCAGCTTGTCTGTTTTC	99
ATP5A1	NM_204286.3	GGTATCCGTCCAGCCATCAA/GCATCCAAATCAGACCCAAACT	158
ATP5B	NM_016774.3	AGAGATGAGCGTCCGAGCAGGAG/ACACCAGCGAACACCGAATAACC	186
COX IV	NM_001273684.1	AAGCAGACGATTCAGCCATCCAG/AAGCGGTCCAAGATGCCCTTTTCC	132
PGC1 $\alpha$	NM_031347.1	GACTCAGGTGTCAATGGAAGTG/ATCAGAACAAGCCCTGTGGT	272
Tfam	NM_003201.3	AGCAGAACCCAGAACTGAAC/CAAGCACAGTCAATTCTCTC	249
IDH3 $\alpha$	XM_046924760.1	TGCTGGATTGATTGGAGGCTTGG/AGGTGCTGTCCATGAACCGATTC	94

续表 1 Table 1 continued

基因 Genes	基因序列号 GenBank No.	引物对序列 Primers pair sequences(5'→3')	产物长度/bp Product length
<i>SERCA1</i>	NM_205519.1	CAGCCTCGGAAATGCTGTT/GAGATGAGGTATCGGATGAAC TG	112
<i>SLN</i>	XM_046906235.1	GAGCGATCCACACAAGA AACTTTTCC/TAGGACTTCACCAGGACCATG	83
<i>CaMK II</i>	NM_204295.2	CGTCACTCCCGAAGCGAAAGATC/ATCCACCGTCTCCTGCCTATGC	148

注:*β-actin*:β-肌动蛋白基因 *β-actin* gene;*TRPV1/TRPV2/TRPV3/TRPV4*:瞬时受体电位香草酸通道家族 V 1/2/3/4 基因 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1/2/3/4 gene;*avUCP*:禽解偶联蛋白基因 Uncoupling protein 3 gene;*avANT*:禽腺苷酸转运蛋白基因 Adenine nucleotide translocator gene;*Cyt C*:细胞色素 C 氧化酶基因 Cytochrome C gene;*ATP5A1*:线粒体 ATP 酶 F1 复合体 α 亚基 1 基因 Adenosine triphosphate synthase F1 subunit alpha 1 gene;*ATP5B*:线粒体 ATP 酶 F1 复合体 β 亚基基因 Adenosine triphosphate synthase F1 subunit beta gene;*COX IV*:细胞色素 C 氧化酶亚基 IV 基因 Cytochrome c oxidase subunit IV gene;*PGC1α*:过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α 基因 Peroxisome proliferative activated receptor-gamma-coactivator 1 alpha gene;*Tfam*:线粒体转录因子 A 基因 Transcription factor A, mitochondrial gene;*IDH3α*:异柠檬酸脱氢酶(NAD<sup>+</sup>)3α 亚基基因 Isocitrate dehydrogenase(NAD<sup>+</sup>)3 catalytic subunit alpha gene;*SERCA1*:肌浆网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶 1 基因 ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transporting 1 gene;*SLN*:肌脂蛋白基因 Sarcolipin gene;*CaMK II*:钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 基因 Calcium/calmodulin dependent protein kinase II gene.

1.6 数据处理与统计分析

用 Excel 2010 软件进行数据的前处理,使用 IBM SPSS 25.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),用 Duncan's 法进行 0.05 和 0.01 水平的多重比较。使用 GraphPad Prism 9.2 统计软件进行 Pearson's 相关性分析并绘图。试验数据以平均值±标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示。

2 结果与分析

2.1 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡直肠温度及器官指数的影响

由表 2 可知,与 CON 组相比, TM1 组和 TM2 组 1 日龄雏鸡的直肠温度极显著降低( $P < 0.01$ )。与 CON 组相比, TM1 组雏鸡腿肌器官指数显著增加( $P < 0.05$ )。孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡体重、胸肌和肝脏器官指数没有显著影响。

表 2 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡直肠温度、体重和器官指数的影响

Table 2 Effects of heat treatment in late incubation period on rectal temperature, body weight and organ index of one-day-old broilers

项目 Item	对照组 (CON) Control group	39.5 °C 热处理组 (TM1) 39.5 °C heat treatment group	41.5 °C 热处理组 (TM2) 41.5 °C heat treatment group
直肠温度/°C Rectal temperature	38.30±0.29 <sup>a</sup>	38.00±0.38 <sup>b</sup>	37.69±0.32 <sup>c</sup>
体重/g Body weight	48.16±1.67	51.24±1.57	51.76±1.39
胸肌指数/% Breast muscle index	1.63±0.10	1.49±0.06	1.47±0.04
腿肌指数/% Leg muscle index	7.39±0.56 <sup>b</sup>	8.85±0.25 <sup>a</sup>	8.44±0.37 <sup>ab</sup>
肝脏指数/% Liver index	2.29±0.10	2.29±0.07	2.17±0.10

注:不同小写字母表示处理组间差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatment groups. The same below

2.2 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡胸肌线粒体功能相关基因表达的影响

由图 2 可知,与 CON 组相比, TM1 组雏鸡胸肌 *COX IV* ( $P < 0.05$ )、*PGC1α* ( $P < 0.01$ )、*ATP5B* ( $P < 0.05$ ) 和 *IDH3α* ( $P < 0.05$ ) 基因表达水平显著或极显著增加, TM2 组雏鸡胸肌 *avUCP* 基因表达水平极显著降低( $P <$

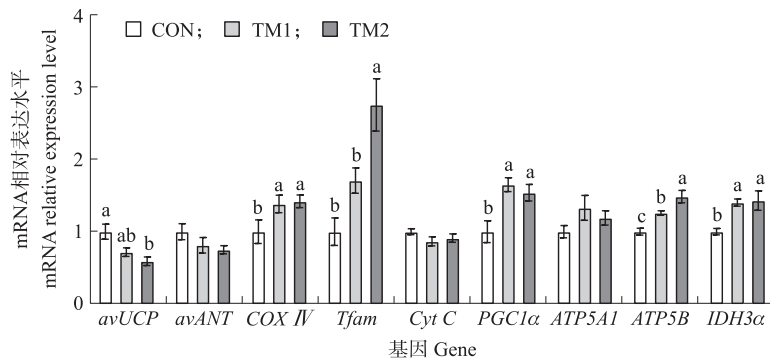


图 2 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡胸肌线粒体功能相关基因表达的影响

Fig. 2 Effects of heat treatment in the late incubation period on the expression of genes related to mitochondrial function in breast muscle of one-day-old broilers

0.01), *avANT* 基因表达水平有一定程度降低,但差异不显著( $P>0.05$ );胸肌 *COX IV*( $P<0.05$ )、*Tfam*( $P<0.01$ )、*PGC1 $\alpha$* ( $P<0.05$ )、*ATP5B*( $P<0.01$ )和 *IDH3 $\alpha$* ( $P<0.01$ )基因表达水平均显著或极显著增加。

### 2.3 孵化后期热处理对1日龄雏鸡胸肌温敏TRP及钙离子通路相关基因表达的影响

对1日龄雏鸡不同温敏TRP基因表达水平进行测定,如图3-A所示,与CON组相比,TM1组雏鸡胸肌 *TRPV2* 基因表达水平显著降低( $P<0.05$ ),TM2组雏鸡胸肌 *TRPV1*、*TRPV2*和 *TRPV3* 基因表达水平均显著降低( $P<0.05$ ),对照组1日龄雏鸡胸肌中 *TRPV2* 基因表达水平极显著高于其他温敏TRP基因( $P<0.01$ )。由图3-B可知,与CON组相比,TM1和TM2组雏鸡胸肌的 *SERCA1* 基因表达水平均极显著增加( $P<0.01$ ),*SLN*和 *CaMK II*基因表达水平没有显著差异( $P>0.05$ )。

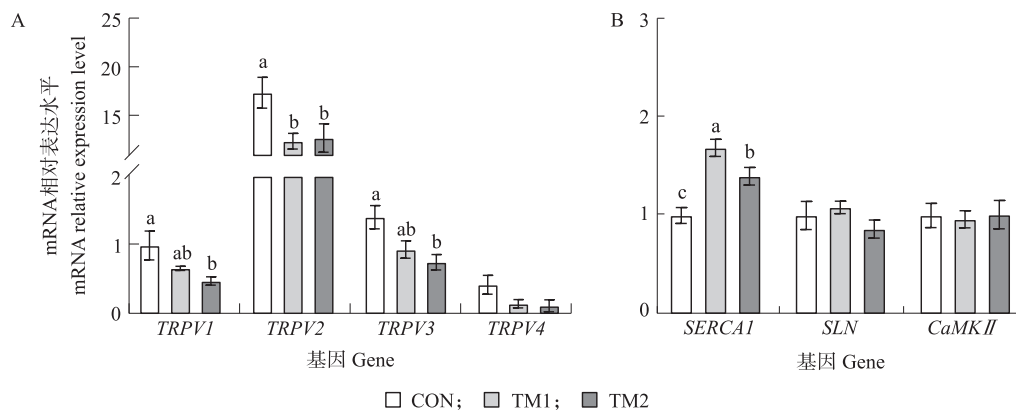


图3 孵化后期热处理对1日龄雏鸡胸肌温敏TRP基因(A)及钙离子通路相关基因(B)表达的影响

Fig. 3 Effects of heat treatment in late incubation period on the expression of thermo-TRP gene(A) and calcium ion pathway related genes(B) in breast muscle of one-day-old broilers

### 2.4 孵化后期热处理对1日龄雏鸡腿肌线粒体功能相关基因表达的影响

由图4可知,与CON组相比,TM2组1日龄雏鸡腿肌 *avUCP* 基因表达水平极显著降低( $P<0.01$ ), *avANT* 基因表达水平没有显著差异,TM2组雏鸡腿肌 *ATP5B* 基因表达水平显著增加( $P<0.05$ ),TM1组和TM2组雏鸡腿肌 *Tfam*、*COX IV*、*Cyt C*、*PGC1 $\alpha$* 、*ATP5A1*和 *IDH3 $\alpha$*  基因表达水平均没有显著差异。

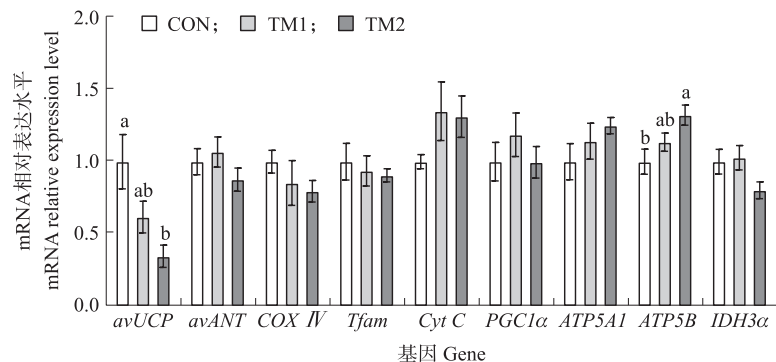


图4 孵化后期热处理对1日龄雏鸡腿肌线粒体功能相关基因表达的影响

Fig. 4 Effects of heat treatment in late incubation period on mitochondrial function-related genes expression in leg muscle of one-day-old broilers

### 2.5 孵化后期热处理对1日龄雏鸡腿肌温敏TRP及钙离子通路相关基因表达的影响

与CON组相比,TM1和TM2组1日龄雏鸡腿肌 *TRPV1*、*TRPV2*和 *TRPV3* 基因表达水平均没有显著差异(图5-A)。由图5-B可知,与CON组相比,TM1和TM2组雏鸡腿肌 *SERCA1*和 *CaMK II*基因表达水平也没有显著差异。

### 2.6 孵化后期热处理对1日龄雏鸡肝脏线粒体功能相关基因表达的影响

由图6可知,与CON组相比,TM2组雏鸡肝脏 *Tfam* 基因表达水平显著增加( $P<0.05$ );TM1和TM2组雏鸡肝脏 *COX IV*、*Cyt C*、*PGC1 $\alpha$* 、*ATP5A1*、*ATP5B*和 *IDH3 $\alpha$*  基因表达水平均没有显著差异( $P>0.05$ ); *avUCP* 基因表达水平有一定程度降低,但没有显著差异( $P>0.05$ )。

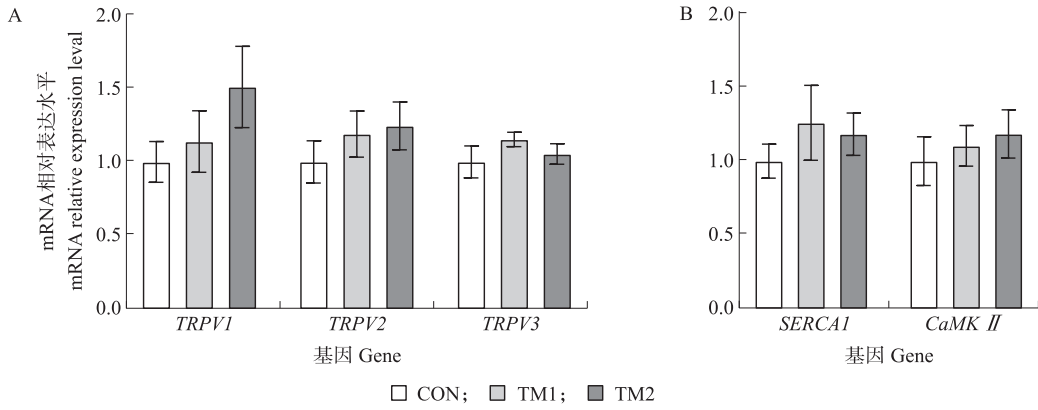


图 5 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡腿肌温敏 TRP 基因 (A) 及钙离子通路相关基因 (B) 表达的影响

Fig. 5 Effects of heat treatment in the late incubation period on the expression of thermo-TRP genes (A) and calcium ion pathway-related genes (B) in leg muscle of one-day-old broilers

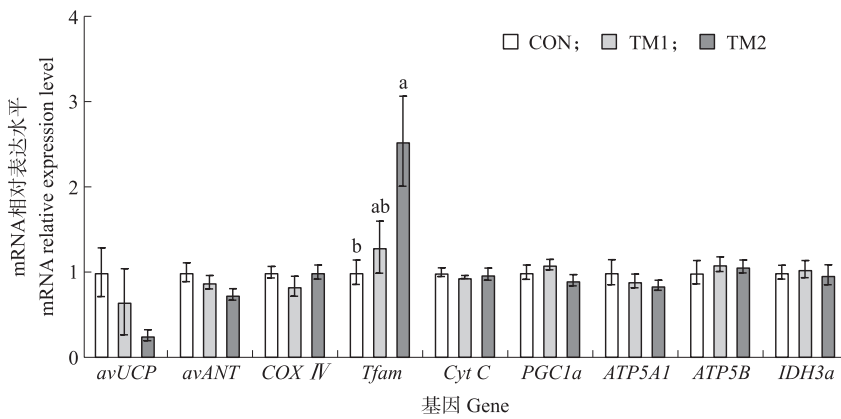


图 6 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡肝脏线粒体功能相关基因表达的影响

Fig. 6 Effects of heat treatment in the late incubation period on the expression of liver mitochondrial function related genes in one-day-old broilers

### 2.7 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡肝脏温敏 TRP 基因及钙离子通路相关基因表达的影响

与 CON 组相比, TM1 和 TM2 组 1 日龄雏鸡肝脏 TRPV1、TRPV2 和 TRPV3 基因表达水平均无显著差异 (图 7-A)。由图 7-B 可知, 与 CON 组相比, TM2 组雏鸡肝脏 SERCA1 基因表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。

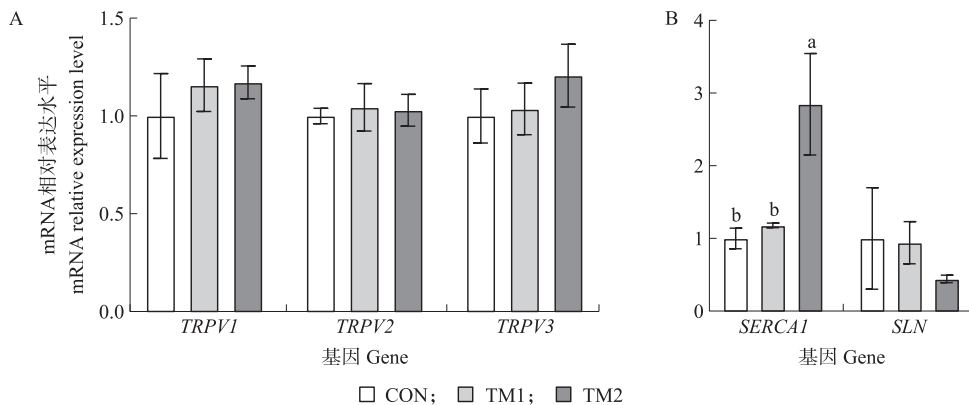


图 7 孵化后期热处理对 1 日龄雏鸡肝脏温敏 TRP 基因 (A) 及钙离子通路相关基因 (B) 表达的影响

Fig. 7 Effects of heat treatment in late incubation period on the expression of thermo-TRP genes (A) and calcium ion pathway related genes (B) in liver of one-day-old broilers

### 2.8 1 日龄雏鸡胸肌线粒体功能基因与钙离子通路基因表达相关性

皮尔逊相关性分析结果 (图 8) 显示, 1 日龄雏鸡胸肌中温敏 TRP 基因表达水平与线粒体经典产热基因 avUCP 和 avANT 表达水平呈正相关关系, 与线粒体氧化磷酸化功能相关基因表达水平呈负相关关系。

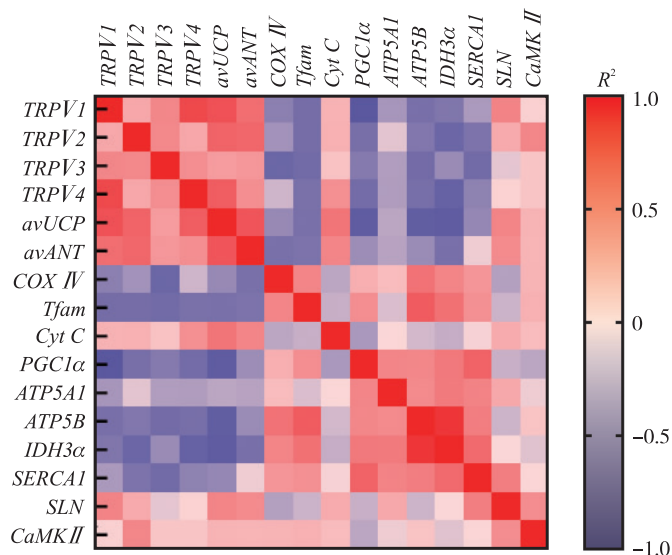


图8 1日龄雏鸡胸肌表达的线粒体功能相关基因与钙离子通路相关基因间皮尔逊相关性

Fig. 8 Pearson correlation between mitochondrial function related genes expression and calcium ion pathwa related genes expression in breast muscle of one-day-old broilers

### 3 讨论

在鸡胚孵化期肾上腺轴和甲状腺轴尚未发育完全时进行热处理会影响孵化后雏鸡对于体温调节的能力。Collin 等<sup>[9]</sup>研究表明,对 16~18 胚龄鸡胚每日进行不同时间的 39.5 °C 热处理,发现不同热处理持续时间对孵化雏鸡的体重没有影响,但会显著影响孵化率。而 Tona 等<sup>[15]</sup>的研究发现,在孵化后期 16~18 胚龄鸡胚每日进行 3 h 38.5 °C 的热处理对雏鸡出雏体重和出雏率没有显著影响。最近的一项研究表明,孵化期热处理与卵内注射 GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid) 补充剂相结合,可以通过提高肉鸡的存活率来减少循环热应激的不利影响<sup>[16]</sup>。另有研究表明,在孵化早期进行热处理(39 °C, 18 h)改善了孵化后 35 d 肉鸡的胸肌和腿肌发育<sup>[17]</sup>。本试验结果发现,39.5 °C 热处理显著增加 1 日龄雏鸡腿肌器官指数,但体重、胸肌和肝脏器官指数没有显著差异。在不同的试验条件下,孵化期热处理对于雏鸡体重、器官指数等生长性能产生的影响不同,这可能与处理的时间点、持续时间、温度以及各种环境因素相互作用相关。本试验结果表明,孵化后期热处理能够一定程度上增强雏鸡腿肌的发育。

肉鸡的体温通常用直肠温度来表示,在外界环境适宜稳定时,肉鸡的直肠温度通常很稳定。当外界环境发生变化时,机体通过协调各个器官系统调整产热和散热来维持机体热平衡,从而保持体温恒定。此时,直肠温度往往会有所变化。有研究显示<sup>[18]</sup>雏鸡孵化后的体温变化是鸡后期获得耐热性的有效指标之一,孵化期热处理可以通过降低暴露于急性热应激肉鸡的泄殖腔温度来改善耐热性,使它们适应不断变化的环境温度<sup>[19]</sup>。Collin 等<sup>[9]</sup>研究发现孵化期每日热处理 3 h 的肉鸡在遭受热应激时体温最低。本研究结果显示,经过孵化后期热处理后,出雏后 1 日龄雏鸡的直肠温度显著降低,表明孵化后期热处理可以提高雏鸡的热调节能力。

先前研究已经表明,孵化期热处理对于孵化后肉鸡的耐热性塑造具有积极的影响<sup>[9,15-17]</sup>,在本研究中也得出相似结论。肉鸡耐热性的改变与其体温调节方式的改变相关,在这一复杂的生理过程中,线粒体生物能量学在热适应性反应中至关重要。根据生物进化理论,气候和热环境能够影响生物体线粒体功能和生物能量学<sup>[20-21]</sup>。在热适应过程中线粒体呼吸链活性会发生改变,热量产生减少<sup>[22]</sup>。研究表明,UCP3 敲除小鼠提高了线粒体的氧化效率<sup>[23]</sup>。Mujahid 等<sup>[24]</sup>发现,热应激(34 °C, 18 h)降低了白菜航鸡骨骼肌线粒体中 *avUCP* 基因表达水平。本研究结果表明,孵化后期热处理能够降低 1 日龄雏鸡骨骼肌经典产热基因 *avUCP* 的表达水平,增加线粒体氧化磷酸化相关基因表达水平,从而减少 *avUCP* 依赖性产热,增加呼吸效率,使机体生理更加适应高温环境。

过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活剂 1 $\alpha$ (PGC1 $\alpha$ ) 参与调节温度等环境刺激因子引起的机体反应<sup>[25]</sup>(温度交感神经途径和改变线粒体生物发生过程)。热处理能够降低 PGC1 $\alpha$  途径中的细胞色素 C 氧

化酶(COX)、柠檬酸合酶(CS)和下游靶标<sup>[26]</sup>的水平。本研究发现,39.5℃和41.5℃热处理雏鸡胸肌中 *PGC1α* mRNA 表达水平显著增加,41.5℃热处理使雏鸡胸肌和肝脏中 *Tfam* mRNA 表达水平显著增加,结果提示 PGC1α 途径参与调节孵化后期热处理引起的机体适应性反应,孵化后期热处理促进雏鸡胸肌线粒体生物发生过程,从而提高机体能量利用效率,其中41.5℃热处理效果更加显著。

瞬时受体电位(TRP)离子通道蛋白作为最大的温度传感家族,其在高温中的热适应性变化备受关注,同时 TRP 通道作为广泛存在的钙离子通道,影响着机体钙分布和钙信号系统,而调节线粒体功能的一个主要因素是线粒体  $Ca^{2+}$ 。在不同温度处理下,肉鸡大脑中4个温敏离子通道(*TRPM8*、*TRPA1*、*TRPM2*、*TRPC3*)mRNA 表达水平具有显著变化,表明这几个基因可能在肉鸡的温度调节发育和热编程诱导的适应效应中起着功能作用<sup>[27]</sup>。多数 TRPV1 拮抗剂用于治疗疾病时出现了发热、体温过高等不良反应<sup>[28]</sup>,但有研究发现,TRPV1 拮抗剂 A-1165901 可以通过触发尾部皮肤血管舒张(在热中性)或抑制产热(在寒冷中)引起大鼠体温过低<sup>[29]</sup>。这些研究表明 TRPV1 与体温调节之间的机制复杂。本研究发现,孵化后期热处理显著降低1日龄雏鸡胸肌中 *TRPV1*、*TRPV2* 和 *TRPV3* mRNA 表达水平,但对腿肌和肝脏中的 TRP 基因表达水平没有显著影响,结果提示,孵化后期热处理对 TRP 基因表达水平的影响具有器官特异性。已有研究发现,生物能量增加与线粒体  $Ca^{2+}$  增加之间存在相关性<sup>[30]</sup>,然而过量的  $Ca^{2+}$  会使线粒体通透性过渡孔打开,引起线粒体自噬<sup>[31]</sup>。本研究发现,孵化后期热处理雏鸡胸肌中 *SERCA1* mRNA 表达均有显著增加,腿肌中 *SERCA1* 和 *CaMK II* mRNA 表达水平有增加趋势,雏鸡肝脏中 *SERCA1* 表达水平显著增加。结果表明孵化后期热处理会增加雏鸡细胞肌质网钙泵的基因表达,引起细胞钙的分布变化,形成与钙信号通路有关的机体适应性变化,具体作用机制还需要进一步研究。

本研究结果表明,孵化后期热处理能够引起1日龄雏鸡骨骼肌和肝脏线粒体功能相关基因表达水平的改变,相较于腿肌和肝脏,胸肌中线粒体功能相关基因表达变化更显著。说明本研究中孵化后期热处理主要影响了雏鸡胸肌中线粒体功能基因、TRP 基因及钙离子通路相关基因表达。皮尔逊相关性分析结果提示,孵化后期热处理降低了1日龄雏鸡胸肌 TRP 基因表达水平,进而引起钙离子通路相关基因和线粒体功能相关基因表达水平改变,经典产热基因 *avUCP* 表达水平减少,氧化磷酸化功能相关基因表达水平显著增加,造成线粒体热适应性变化。另有研究表明<sup>[32]</sup>, *TRPV2*-KO 小鼠与线粒体氧化代谢相关基因的 mRNA 水平发生了改变,缺乏 *TRPV2* 的小鼠脂肪细胞中 *UCP1* mRNA 表达水平降低,表明 TRPV2 与线粒体产热和氧化磷酸化功能之间联系紧密。本研究发现,在胸肌中, *TRPV2* 的表达水平显著高于其他 TRP,提示其可能是影响钙分布与钙信号通路的主要 TRP 通道,与线粒体功能之间相互联系,需要进一步探究。

综上,孵化后期热处理可通过降低1日龄雏鸡胸肌温敏 TRP 基因和线粒体产热相关基因表达水平,增加线粒体生物发生及氧化磷酸化功能相关基因表达水平,引起线粒体热适应性变化。

#### 参考文献 References:

- [1] 何宗亮,杨硕,郝正林,等. 热应激对家禽生产性能及生理功能的影响[J]. 养殖与饲料,2018(4):36-38.  
He Z L, Yang S, Chi Z L, et al. Effects of heat stress on production performance and physiological function of poultry[J]. *Animals Breeding and Feed*, 2018(4):36-38 (in Chinese).
- [2] Awad E A, Najaa M, Zulaikha Z A, et al. Effects of heat stress on growth performance, selected physiological and immunological parameters, caecal microflora, and meat quality in two broiler strains[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2020, 33(5):778-787.
- [3] Shukuya M. Exergetic aspect of human thermal comfort and adaptation[M]//Sustainable Houses and Living in the Hot-Humid Climates of Asia. Singapore: Springer, 2018:123-129.
- [4] 葛常英,戴胜归. 沙漠环境热适应[J]. 西北国防医学杂志,2002,23(6):460-461.  
Ge C Y, Dai S G. Thermal adaptation of desert environment[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China*, 2002, 23(6):460-461 (in Chinese).
- [5] 张晓鹏,王大虎. L-精氨酸对小鼠热习服模型建立及高温应激的影响[J]. 医学动物防制,2004,20(5):265-269.  
Zhang X P, Wang D H. Establishment of mice heat acclimatization model of intervening with L-arginine[J]. *Chinese Journal of Pest Control*, 2004, 20(5):265-269 (in Chinese with English abstract).
- [6] 唐润姿,赖世雄,王韩可,等. 胚蛋的热处理对肉鸡耐热性及生产性能影响的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2023,55(10):121-127.  
Tang R Z, Lai S X, Wang H K, et al. Research progress on the effects of thermal manipulation of embryonic eggs on heat tolerance and production performance in broilers[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(10):121-127 (in Chinese with English abstract).
- [7] 任洪涛. 孵化后期热习服对肉鸡耐热性影响的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.  
Ren H T. Effect of thermal acclimation in later hatching stage on thermotolerance of broiler[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.

- (in Chinese with English abstract).
- [8] Goel A, Ncho C M, Gupta V, et al. Embryonic modulation through thermal manipulation and *in ovo* feeding to develop heat tolerance in chickens[J]. *Animal Nutrition*, 2023, 13: 150–159.
- [9] Collin A, Picard M, Yahav S. The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks[J]. *Animal Research*, 2005, 54(2): 105–111.
- [10] de Stefani D, Raffaello A, Teardo E, et al. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter[J]. *Nature*, 2011, 476: 336–340.
- [11] Berridge M J, Bootman M D, Lipp P. Calcium: a life and death signal[J]. *Nature*, 1998, 395(6703): 645–648.
- [12] Romanovsky A A. Thermoregulation; some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 292(1): R37–R46.
- [13] Tékus V, Böleskei K, Kis-Varga á, et al. Effect of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor antagonist compounds SB705498, BCTC and AMG9810 in rat models of thermal hyperalgesia measured with an increasing-temperature water bath [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 641(2/3): 135–141.
- [14] Xu P, Lin H, Jiao H C, et al. Chicken embryo thermal manipulation alleviates postnatal heat stress-induced jejunal inflammation by inhibiting Transient Receptor Potential V4[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 256: 114851.
- [15] Tona K, Onagbesan O, Bruggeman V, et al. Effects of heat conditioning at d 16 to 18 of incubation or during early broiler rearing on embryo physiology, posthatch growth performance and heat tolerance[J]. *Archiv für Geflügelkunde*, 2008, 72: 75–83.
- [16] Ncho C M, Goel A, Gupta V, et al. Impact of embryonic manipulations on core body temperature dynamics and survival in broilers exposed to cyclic heat stress[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 15110.
- [17] Dalab A S, Ali A M, Althnaian T A, et al. Molecular and ultrastructural investigations of the effect of thermal manipulation during embryogenesis on pectoral and thigh muscles growth factors in broilers[J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2022, 31(1): 100188.
- [18] de Basilio V, Requena F, Leon A, et al. Early age thermal conditioning immediately reduces body temperature of broiler chicks in a tropical environment[J]. *Poultry Science*, 2003, 82(8): 1235–1241.
- [19] Al-Zghoul M B, Sukker H, Ababneh M M. Effect of thermal manipulation of broilers embryos on the response to heat-induced oxidative stress[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(2): 991–1001.
- [20] Gershoni M, Templeton A R, Mishmar D. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation[J]. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2009, 31(6): 642–650.
- [21] Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 171–176.
- [22] Cassuto Y. Metabolic adaptations to chronic heat exposure in the golden hamster[J]. *The American Journal of Physiology*, 1968, 214(5): 1147–1151.
- [23] Cline G W, Vidal-Puig A J, Dufour S, et al. *In vivo* effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 20240–20244.
- [24] Mujahid A, Akiba Y, Toyomizu M. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein[J]. *Poultry Science*, 2007, 86(2): 364–371.
- [25] Arany Z, He H M, Lin J D, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle[J]. *Cell Metabolism*, 2005, 1(4): 259–271.
- [26] Cassuto Y. Oxidative activities of liver mitochondria from mammals, birds, reptiles and Amphibia as a function of temperature[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B, Comparative Biochemistry*, 1971, 39(4): 919–923.
- [27] Verlinden S M D, Norton T, Larsen M L V, et al. Influence of temperature during incubation on the mRNA levels of temperature sensitive ion channels in the brain of broiler chicken embryos[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2022, 268: 111199.
- [28] Garami A, Shimansky Y P, Rumbus Z, et al. Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials; insights from mathematical modeling and meta-analysis[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2020, 208: 107474.
- [29] Garami A, Pakai E, McDonald H A, et al. TRPV1 antagonists that cause hypothermia, instead of hyperthermia, in rodents: compounds' pharmacological profiles, *in vivo* targets, thermoeffectors recruited and implications for drug development [J]. *Acta Physiologica*, 2018, 223(3): e13038.
- [30] Nguyen M H T, Dudycha S J, Jafri M S. Effect of Ca<sup>2+</sup> on cardiac mitochondrial energy production is modulated by Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> dynamics[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2007, 292(6): C2004–C2020.
- [31] Lu N, Sun Y G, Zheng X X. Orientin-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition[J]. *Planta Medica*, 2011, 77(10): 984–991.
- [32] Sun W P, Uchida K, Suzuki Y, et al. Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue[J]. *EMBO Reports*, 2016, 17(3): 383–399.