



杨铭宣,刘梦杰,王晋,等. 基于 TMT 蛋白组学分析姜黄素对热应激蛋鸡肝脏抗氧化性能的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):96-104.
YANG Mingxuan,LIU Mengjie,WANG Jin,et al. Effects of curcumin on the antioxidative properties of the liver of heat-stressed laying hens based on TMT proteomics[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):96-104.

基于 TMT 蛋白组学分析姜黄素对热应激蛋鸡肝脏 抗氧化性能的影响

杨铭宣,刘梦杰,王晋,虞德兵*

(南京农业大学动物科技学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本试验旨在研究日粮添加姜黄素对由热应激引起的蛋鸡肝脏抗氧化性能损伤的影响。[方法]以南京盘滁机械化养鸡场提供的 180 只 280 日龄海兰蛋鸡为研究对象,随机分成 3 组:对照组(Con)饲喂基础饲料,环境温度为(24±2)℃;热应激组(HS)是基于对照组的基础上每天维持热应激 6 h 以上,环境温度为(34±2)℃;姜黄素组(HS+CUR)是在热应激组的基础上,饲喂基础饲料中添加 150 mg·kg⁻¹姜黄素的试验饲料;每组 4 个重复,每个重复 15 只鸡。采集蛋鸡肝脏组织样利用 TMT (tandem mass tags)蛋白质组学技术分析蛋鸡肝脏蛋白质差异表达。[结果]实时荧光定量 PCR 结果显示:热应激组与对照组相比肝脏 *SOD1* 和 *GPXI* 的表达极显著降低($P<0.01$),*CAT* 表达水平显著降低($P<0.05$);添加姜黄素可以极显著增加肝脏 *SOD1* 和 *GPXI* 表达水平($P<0.01$),显著增加 *CAT* 表达水平($P<0.05$)。TMT 蛋白组学分析共检测到 5 039 个蛋白,其中 4 235 个具有定量信息,差异表达蛋白主要参与脂质和葡萄糖代谢、氧化应激、线粒体功能障碍和炎症反应等生物进程;主要参与的途径有 PPAR 信号通路、过氧化物酶体、脂质代谢、细胞色素 P450、生物合成以及脂肪细胞因子信号通路等。选取 15 个显著表达的蛋白进行基因水平上的验证,结果表明基因水平和蛋白组学分析结果一致。[结论]补充姜黄素可以缓解蛋鸡由热应激引起的肝脏氧化应激以及与脂质代谢相关生物学过程。

关键词:姜黄素;鸡;热应激;肝脏;氧化应激;脂质代谢

中图分类号:S831

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0096-09

Effects of curcumin on the antioxidative properties of the liver of heat-stressed laying hens based on TMT proteomics

YANG Mingxuan,LIU Mengjie,WANG Jin,YU Debing*

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

Abstract:[Objectives]The purpose of this experiment was to investigate the effect of dietary curcumin supplementation on the damage of liver antioxidant properties in laying hens caused by heat stress. [Methods]One hundred and eighty 280-day-old Hylan laying hens provided by the Nanjing Panchu Mechanized Chicken Farm were taken as the research objects,and they were randomly divided into 3 groups. The control group(Con)was fed a basal diet and the ambient temperature was(24±2)℃;the heat stress group(HS)was based on the control group and maintained heat stress for more than 6 hours a day,the ambient temperature was(34±2)℃;curcumin group(HS+CUR)was based on the heat stress group and was fed basal diet supplemented with 150 mg·kg⁻¹ curcumin;4 repetitions per group,15 chickens per replicate. In order to explore the protective effect of curcumin on the liver of heat-stressed laying hens,TMT (tandem mass tags)proteomics technology was used to analyze the differential expression of liver proteins in laying hens. [Results]The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the expressions levels of *SOD1* and *GPXI* in the liver of the heat stress group were significantly lower than those of the control group($P<0.01$),and the expression level of *CAT* significantly reduced($P<0.05$);after adding curcumin,the expression levels of *SOD1* and *GPXI* in the liver significantly increased($P<0.01$),and the expression level of *CAT* significantly increased($P<0.05$). A total of 5 039 proteins were detected by TMT proteomic analysis,of which 4 235 had quantitative information. The results of TMT showed that the differentially expressed proteins were mainly involved in lipid and glucose metabolism,oxidative stress,mitochondrial dysfunction,and inflammation. The KEGG enrichment analysis showed that the PPAR signaling pathway,peroxidase Body,lipid metabolism,cytochrome P450,biosynthesis and adipocytokine signaling pathways were significantly enriched among groups. Fifteen differentially expressed proteins were selected for gene level verification,and the results showed that the gene level was consistent with the proteomics results. [Conclusions]Curcumin supplementation could alleviate heat stress-induced hepatic oxidative stress and biological processes related to lipid metabolism in laying hens.

Keywords:curcumin;laying hens;heat stress;liver;oxidative stress;lipid metabolism

收稿日期:2022-08-10

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目(CX[22]3196)

*通信作者:虞德兵,副教授,研究方向为家禽遗传育种,E-mail:yudebing@njau.edu.cn。

长期高温和过度温暖的环境会造成动物的应激反应,直接或间接影响动物各种生理状态,进而影响动物生产性能^[1-2]。热应激会促进畜禽机体的产热,从而导致凝血障碍、脑组织损伤、心血管系统功能障碍、内毒素血症、代谢紊乱以及多系统器官衰竭等不良反应产生,对内分泌系统、神经-消化系统、免疫系统和泌尿生殖系统等都会造成影响^[3]。研究发现热应激会导致蛋鸡的死亡率增加,饲料效率以及鸡蛋的产量和质量下降^[4]。之前有研究表明,高温饲养的蛋鸡与常温饲养相比,活体重(LWG)和饲料转化率(FCR)分别降低了 14.6%和 14.3%^[5]。因此缓解蛋鸡在饲养过程中的热应激现象是养鸡业亟待解决的重要问题之一。

在饲料中添加一些植物提取物,如芦丁、白藜芦醇和茶多酚等是蛋鸡生产中常用的一种抗氧化应激方式。姜黄素(curcumin)是姜黄中的主要成分,姜黄素具有多种生物学特性,包括抗氧化、抗炎、抑制脂质过氧化、抗病毒、抗微生物、抗肿瘤和清除自由基等^[6-7]。前人研究发现姜黄素可以抑制脂质过氧化并中和体内的 ROS(超氧化物、过氧化氢、羟基自由基),对机体的氧化应激有一定的保护作用^[8]。动物试验证明,姜黄素可提高家禽免疫机能,同时还可以起到改善脂类代谢和肠道健康,提高生产性能等作用。胡忠泽等^[9-10]研究发现,日粮中添加姜黄素能显著提高肉鸡的日增重和采食量,降低料重比,能显著促进肉鸡胸腺的生长发育和增加血清中免疫球蛋白的含量。近几年,姜黄素被发现可以缓解肉鸡养殖过程中的热应激反应,但潜在的分子调控机制尚不清楚。

蛋白质组学(proteomics)技术是将蛋白质组作为研究对象,在疾病的早期诊断,预后和监测疾病的发展中起到至关重要的作用^[11]。蛋白质作为生物学功能的效应物,其水平不仅取决于相应的 mRNA 水平,而且还取决于宿主的翻译控制和调控。因此,蛋白质组学被当作解释生物系统的最有力的数据集^[12]。串联质谱标记(tandem mass tags, TMT)的分析方法已经成为蛋白质定量的主流方法^[13]。TMT 是一种化学标记,可用于定量和鉴定蛋白质、肽、核酸和其他生物大分子^[14]。TMT 的化学结构虽然相同,但每个都包含在不同区域被取代的同位素。在片段化过程中获得了生物分子序列信息,同时获得了生物分子的数量,这使得 TMT 成为高通量表征外泌体蛋白的理想工具^[15]。蛋白质组学现已成为研究整体蛋白质功能和信号通路的最重要方法之一^[16]。近年来,蛋白质组学已被广泛用于猪、奶牛、海洋动物以及肉鸡的研究,也被用于评估牲畜适应热应激的能力^[17]。因此,本试验旨在利用蛋白组学技术筛选与热应激相关的肝脏分子标记物,进而为在蛋白质水平上解释姜黄素对蛋鸡热应激的缓解作用提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及试验设计

试验动物由江苏省南京市南京盘滁机械化养鸡场提供。选取 180 只 280 日龄体况基本一致的海兰蛋鸡随机分成 3 组,每组 4 个重复,每个重复 15 只鸡。对照组(Con)饲喂基础饲料,环境温度为(24±2)℃;热应激组(HS)是基于对照组的基础上每天维持热应激 6 h 以上,平均温度为(34±2)℃;姜黄素组(HS+CUR)饲喂在基础饲料中添加姜黄素的试验饲料,环境温度同热应激组。

试验蛋鸡均保证自由采食和饮水,恒定光照时间为 16 h,自然通风,每隔 2 d 清粪 1 次。参考本实验室之前的研究,姜黄素的合适剂量为 150 mg·kg⁻¹^[18]。

1.2 试验方法

1.2.1 TMT 标记 从 3 组蛋鸡中随机选取 9 个样本用于蛋白组学测定,称取 150 mg 肝脏组织样品,采用蛋白裂解试剂盒提取蛋白质并采用 BCA 试剂盒测定浓度。按蛋白、酶的质量比为 20:1 加入胰酶,在 37℃ 环境温度下酶解 4 h。胰酶酶解的肽段用 Strata X C18 (Phenomenex) 除盐后真空冷冻干燥,以 0.5 mol·L⁻¹ TEAB 溶解肽段,之后按照试剂盒说明书对肽段进行 TMT 标记,简单操作如下:标记试剂解冻后用乙腈溶解,与肽段混合后室温孵育 2 h,标记后的肽段混合后除盐,真空冷冻干燥。将标记过的各组肽段混合,进行 HPLC 分级肽段,对每组样品进行液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)分析,LC-MS/MS 的具体流程参考 Biancotto 等^[19]的方法。二级质谱数据使用 Maxquant v1.5.2.8 进行检索,数据库为 Gallus gallus (共 30 252 条序列)。利用 InterProScan v.5.14-53.0 对鉴定到的差异蛋白进行 GO 注释,包括 3 个方面:生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF);利用 KEGG Mapper V2.5 软件对差异蛋白进行 KEGG 通路注释;通过 Wolfpsort v.0.2 来分析差异蛋白亚细胞定位;利用 Perl module v.1.31 进行差异蛋白的功能富集分析^[20-21]。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 分析 用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)提取肝脏组织总 RNA。使用 PrimeScript™ RT Master Mix Reagent 试剂盒(TaKaRa,大连),通过逆转录合成 cDNA。查阅 NCBI 数据库,根据 GenBank 中收录鸡的相关基因 mRNA 序列,用 Primer 5.0 软件设计引物,引物序列见表 1。实验结果剔除非正常值后取 3 个重复的平均 C_T 值,通过内参基因 β -actin 校正后,用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析基因表达情况。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the target genes

目的基因 Target genes	引物对序列 Primer pairs sequences(5'→3')	序列编号 Sequence No.	产物大小/bp Product size
<i>β-actin</i>	F:AGTACCCCATTTGAACACGGT/R:ATACATGGCTGGGGTGTGTA	NM_205518.1	224
<i>DNAJB1</i>	F:AGGGTGTCTTGGAGGAGAT/R:TGATTTTGGTGCTTCCTTC	XM_025145813	151
<i>HSP70</i>	F:CAATGGCAAAGAGCTGAACA/R:GGTGGAAATGGTGGTGTAC	NM_001006685	205
<i>SOD1</i>	F:ATTACCGGCTTGTCTGTATGG/R:CCTCCCTTTGCAGCTCACATT	NM_205064	173
<i>CAT</i>	F:CTCATTCCAAGTGGGCAAGCT/R:GTAGGGGCAATTCACCAGGA	NM_001031215	210
<i>GPXI</i>	F:AYGYCCGAGAAGYCGAGGT/R:AGTCCAGGAGACGTCGTTG	NM_001277853	160
<i>PPARGC1B</i>	F:TTGGTGATGACTGACTCCCC/R:CCGTCTCACACCTGTACCT	XM_015297138.2	209
<i>CARF</i>	F:AAGTCCCTGAGAAATGGCGA/R:TTGGTGATGACTGACTCCCC	XM_015289503.2	189
<i>NRK</i>	F:CGCTTTGTCACAGAACCACA/R:CCCATCTGGTACTCTCGTCC	NM_001031126.2	151
<i>IKBKB</i>	F:TACTTGGCTCCAGATGCACA/R:TCCAGCTCACTCTTCTGTCTG	NM_001031397.1	210
<i>MAP3K19</i>	F:TTGTGCTCTTCCAACCGCA/R:TGCTGTCCCATCTGTAACCT	XM_025152332.1	226
<i>UGP2</i>	F:AGGCCACGGAGACATCTATG/R:AGTCCACCCCTTCACATCTG	NM_204111.2	153
<i>ASNS</i>	F:CGGTATCTGGGCCTTGTG/R:TCTCCATTGTAGCAGACCCA	NM_001030977.1	218
<i>NEO1</i>	F:AGTTCGTGGGCATCTGTTA/R:TCTGTTACAATGCTCCCA	XM_015279053.2	153
<i>ZFP36LI</i>	F:CTGCCACTTCATCCACAACG/R:CTGGAGAAGGTGAAGGGGTT	NM_001319031.1	182
<i>APOA1</i>	F:AGTCCCTGAGAAGGGCATC/R:AGGAAGGAGATCAAGCGGTT	XM_015297971.2	180
<i>SQSTM1</i>	F:GGAACACGGAGACAGAGAA/R:GCAACAGTGTTTACGACCGT	XM_004944953.3	247
<i>NCOR2</i>	F:ACATGGGTTGGAGGCAATA/R:CTCGTTTCGTCCATCAGCAG	XM_015275621.2	188
<i>TP53I3</i>	F:TGTGCTGCCGTATTCTCTG/R:GGGTGTTTTACTGGCATT	XM_419987.5	249

注:*β-actin*: β -肌动蛋白基因 β -actin gene;*DNAJB1*:DnaJ 热休克蛋白家族(HSP40)成员 B1 基因 DnaJ heat shock protein family(HSP40) member B1 gene;*HSP70*:热休克蛋白 70 基因 Heat shock protein 70 gene;*SOD1*:超氧化物歧化酶 1 基因 Superoxide dismutase 1 gene;*CAT*:过氧化氢酶基因 Catalase gene;*GPXI*:谷胱甘肽过氧化物酶 1 基因 Glutathione peroxidase 1 gene;*PPARGC1B*:PPARG 辅激活因子 1 β 基因 PPARG coactivator 1 beta gene;*CARF*:钙反应转录因子基因 Calcium responsive transcription factor gene;*NRK*:Nik 相关激酶基因 Nik related kinase gene;*IKBKB*:核因子 κ B 激酶亚基 β 抑制因子基因 Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta gene;*MAP3K19*:有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 19 基因 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19 gene;*UGP2*:UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 2 基因 UDP-glucose pyrophosphorylase 2 gene;*ASNS*:天冬酰胺合成酶(谷氨酰胺水解)基因 Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing) gene;*NEO1*:新生素 1 基因 Neogenin 1 gene;*ZFP36LI*:ZFP36 无名指蛋白样 1 基因 ZFP36 ring finger protein like 1 gene;*APOA1*:载脂蛋白 A-1 基因 Apolipoprotein A-1 gene;*SQSTM1*:整合体 1 基因 Sequestosome 1 gene;*NCOR2*:核受体辅阻遏物 2 基因 Nuclear receptor corepressor 2 gene;*TP53I3*:肿瘤蛋白 p53 诱导蛋白 3 基因 Tumor protein p53 inducible protein 3 gene.

1.3 数据统计分析

每项试验结果至少重复 3 次,试验数据用 GraphPad Prism 5.0 版进行统计分析和图形绘制,结果用平均值 \pm 标准误($\bar{x}\pm SE$)表示,采用独立样本 t 测验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 姜黄素对热应激蛋鸡肝脏抗氧化基因表达的影响

由图 1 可见,热应激极显著抑制蛋鸡肝脏中 *SOD1* 和 *GPXI* 的表达($P<0.01$),显著抑制 *CAT* 表达($P<0.05$),而热应激状态下补充姜黄素后蛋鸡肝脏中 *SOD1* 和 *CAT* 表达水平与热应激组相比分别增加 35.66% ($P<0.01$)和 79.54% ($P<0.05$),*GPXI* 表达水平是热应激组的 14.26 倍($P<0.01$)。结果表明热应激诱导蛋鸡肝脏抗氧化功能降低,而添加姜黄素可以缓解这一现象。

2.2 蛋鸡肝脏蛋白鉴定的结果分析

采用 TMT 蛋白组学分析技术测定了蛋鸡肝脏的蛋白质图谱,通过质谱分析共得到 313 208 张二级谱图,可利用有效谱图数为 66 217,谱图利用率为 21.1%。通过谱图解析共鉴定到 36 789 条肽段,其中特异性肽段为 34 549。共检测到 5 039 个蛋白,其中 4 235 个具有定量信息。为了更加深入揭示不同组肝脏的蛋白差异,分别定

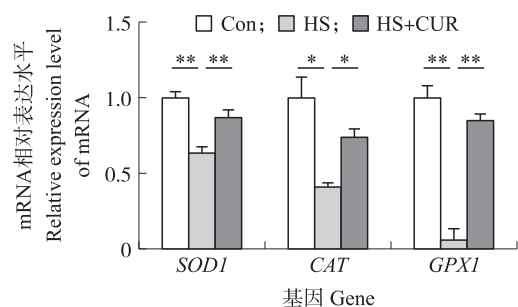


图 1 姜黄素对热应激蛋鸡肝脏抗氧化基因表达的影响

Fig. 1 The effect of curcumin on the expression of antioxidant genes in the liver of heat-stressed laying hens

Con: 对照组 Control group; HS: 热应激组 Heat stress group; HS+CUR: 姜黄素组 Curcumin group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. 下同 The same as follows.

量比较了差异蛋白表达量,结果见表 2。

2.3 不同组别比较的 GO 二级分析

从图 2 可知:在 HS+CUR vs Con 和 HS+CUR vs HS 中,差异表达蛋白参与的生物学过程 (BP) 主要有代谢过程 (metabolic process)、单一生物过程 (single-organism process) 和细胞进程 (cellular process) 等 GO 条目;DEG 在细胞组分 (CC) 中主要有细胞 (cell)、细胞器 (organelle)、膜 (membrane)、大分子复合物 (macromolecular complex) 等 GO 条目;在分子功能 (MF) 中主要是催化活性 (catalytic activity) 和结合 (binding) 等 GO 条目。

表 2 差异表达蛋白统计信息

Table 2 Differentially expressed protein statistics

比较组 Comparison	上调(>1.2) Up	下调(<1/1.2) Down
HS vs Con	246	289
HS+CUR vs Con	249	370
HS+CUR vs HS	206	317

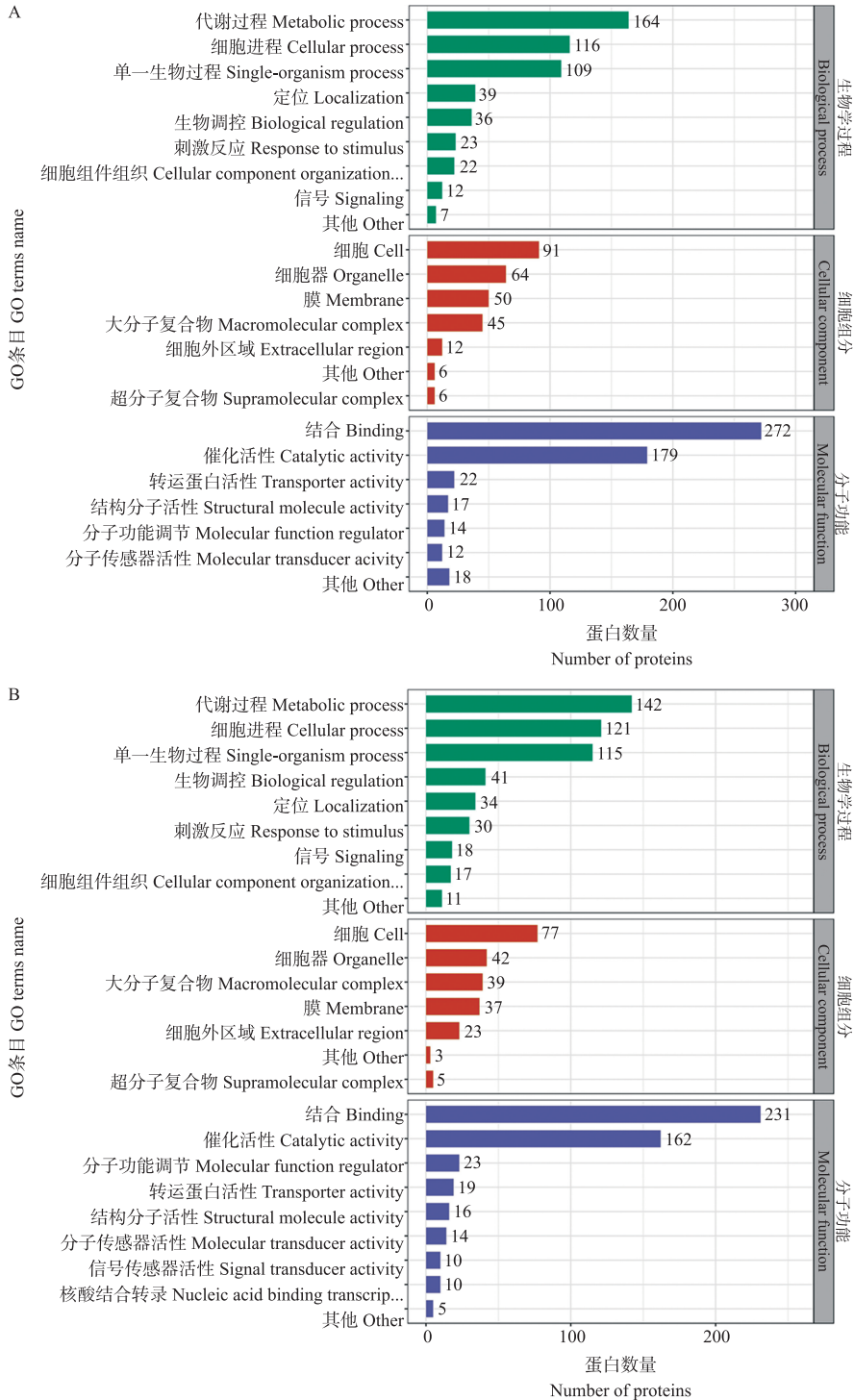


图 2 GO 二级注释的分布图

Fig. 2 Statistical distribution chart of GO category (2nd level)

A. HS+CUR group vs Con group; B. HS+CUR group vs HS group.

2.4 不同组别比较的 KEGG 通路富集分析

对差异表达蛋白进行 KEGG 通路富集分析(图3)发现:HS+CUR 组和 Con 组比较过氧化物酶体(peroxisome)、PPAR 信号通路(PPAR signaling pathway)、脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)、药物代谢-细胞色素 P450(drug metabolism-cytochrome P450)、甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)、酪氨酸代谢(tyrosine metabolism)等通路被显著富集($P < 0.05$);HS+CUR 组和 HS 组比较氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、药物代谢-其他酶(drug metabolism-other enzymes)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine,serine and threonine metabolism)、细胞黏附分子(CAM)、药物代谢-细胞色素 P450(drug metabolism-cytochrome P450)、PPAR 信号通路(PPAR signaling pathway)等通路被极显著富集($P < 0.01$)。

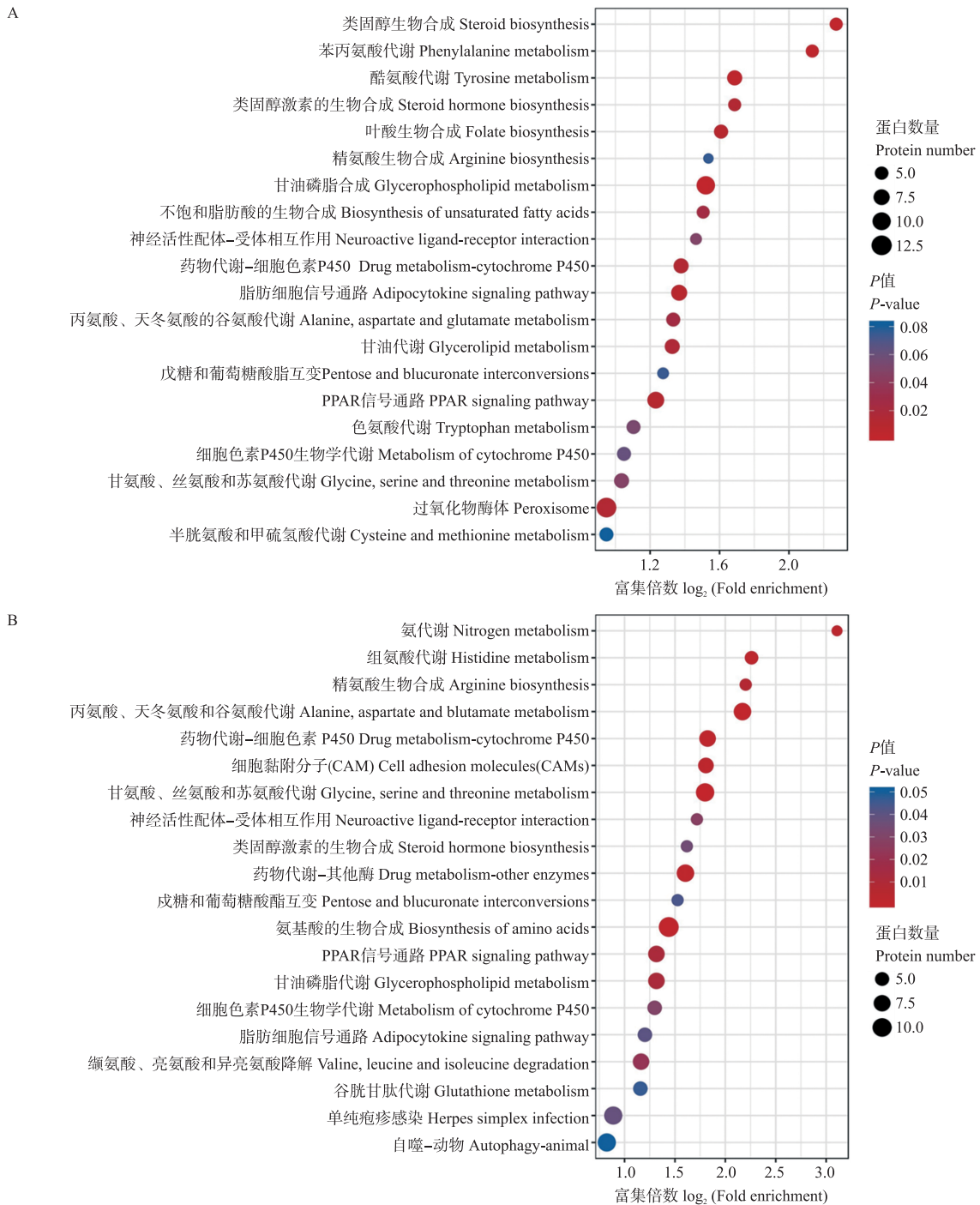


图3 差异表达蛋白在 KEGG 通路中富集分布气泡图

Fig. 3 KEGG pathway enrichment bubble plot of differentially expressed proteins

A. HS+CUR group vs Con group; B. HS+CUR group vs HS group.

2.5 差异显著蛋白表达及其 mRNA 表达的比较分析

生物体中的基因组是遗传信息的存储,mRNA 是基因表达的前提,蛋白质水平是基因功能的执行者。根据差异表达蛋白亚细胞不同的定位,选择分布在细胞核、细胞质和细胞外的 15 种差异显著表达蛋白质进行 RT-qPCR 分析,以验证蛋白组结果的可靠性。结果如表 3 和图 4 所示,15 种蛋白质在基因水平上具有与蛋白组结果中相似的变化趋势。

表 3 蛋白组学分析挑选的差异表达显著蛋白

Table 3 Differential expression significant protein selected by proteome

蛋白质 Protein	分组 Group					
	HS vs Con			HS+CUR vs HS		
	比率 Ratio	调节类型 Regulated type	P 值 P-value	比率 Ratio	调节类型 Regulated type	P 值 P-value
PPARG 辅激活因子 1 PPARC coactivator 1 beta	0.792	下调 Down	<0.001	1.439	上调 Up	0.001
钙反应转录因子 Calcium responsive transcription factor	1.631	上调 Up	<0.001	0.513	下调 Down	<0.001
Nik 相关激酶 Nik-related protein kinase	0.697	下调 Down	<0.001	1.361	上调 Up	<0.001
核因子 κB 激酶亚基 β 抑制因子 Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta	0.77	下调 Down	0.011	1.309	上调 Up	0.038
有丝分裂原激活的蛋白激酶激酶激酶 19 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19	0.522	下调 Down	<0.001	2.763	上调 Up	<0.001
UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 2 UDP-glucose pyrophosphorylase 2	0.702	下调 Down	0.002	1.287	上调 Up	0.002
天冬酰胺合成酶 Asparagine synthetase	1.413	上调 Up	<0.001	0.595	下调 Down	<0.001
新生素 1 Neogenin 1	0.317	下调 Down	<0.001	3.075	上调 Up	<0.001
ZFP36 无名指蛋白样 1 Gallus gallus ZFP36 ring finger protein like 1	1.868	上调 Up	<0.001	0.492	下调 Down	<0.001
载脂蛋白 A-1(促脂蛋白 A-1) Apolipoprotein A-1(proapolipoprotein A-1)	1.342	上调 Up	<0.001	0.829	下调 Down	<0.001
螯合体 1 Sequestosome 1	1.348	上调 Up	<0.001	0.633	下调 Down	<0.001
核受体辅阻遏物 2 Nuclear receptor corepressor 2	1.298	上调 Up	0.002	0.732	下调 Down	0.008
肿瘤蛋白 p53 诱导蛋白 3 Tumor protein p53 inducible protein 3	0.536	下调 Down	0.014	2.229	上调 Up	<0.001
热休克蛋白 70 Heat shock protein 70	2.562	上调 Up	<0.001	0.471	下调 Down	<0.001
DnaJ 热休克蛋白家族(HSP40)成员 B1 DnaJ heat shock protein family(HSP40)member B1	2.007	上调 Up	<0.001	0.54	下调 Down	<0.001

3 讨论与结论

动物拥有针对热应激的生理机制,以保护不同细胞的功能。各器官对这种与热应激相关损伤的反应和敏感度不同,而肝脏作为主要的代谢和产热器官,是热应激的主要靶器官,可控制长时间受热应激影响的许多生理过程。研究已经证实热应激可能诱发肝损伤^[22]。在热应激条件下,已经证明肝脏组织超微结构发生改变,肝细胞部分变性,坏死并伴有凋亡增加^[23]。但目前尚不清楚热应激如何在蛋白质水平上影响肝脏各种生理过程。在本研究中,我们发现与对照组相比,热应激组蛋鸡肝脏抗氧化指标 *SOD1*、*CAT* 和 *GPX1* mRNA 的表达水平显著降低,意味着(34±2)℃ 温度下蛋鸡发生了热应激。姜黄素作为一种植物提取物,具有抗氧化、抗炎、抑制脂质过氧化等作用。在我们的研究中发现添加姜黄素显著增加由热应激引起的 *SOD1*、*CAT* 和 *GPX1* 的降低水平。据报道,姜黄素可以通过减少 ROS 的产生和脂质过氧化来维持线粒体功能,防止超氧化物歧化酶 2(*SOD2*)和谷胱甘肽过氧化物酶 1(*GPX1*)的活性降低^[24]。也有研究证明,姜黄素可以逆转受热应激的抗氧化活性表达的下调^[25],这与本研究得到的结果一致。因此,姜黄素可以有效抑制由高温引起的蛋鸡热应激。

为了进一步在蛋白水平上研究姜黄素对蛋鸡热应激缓解作用的分子机制,我们利用 TMT 蛋白组学技术在蛋鸡肝脏组织中筛选得到与热应激相关的差异表达蛋白,并进一步进行生物信息学分析。本研究挑选了不同亚细胞定位的 15 个表达显著的差异蛋白进行 RT-qPCR 验证,得到的基因水平结果与蛋白组学分析结果保持一致,证明蛋白组学结果的可靠性。

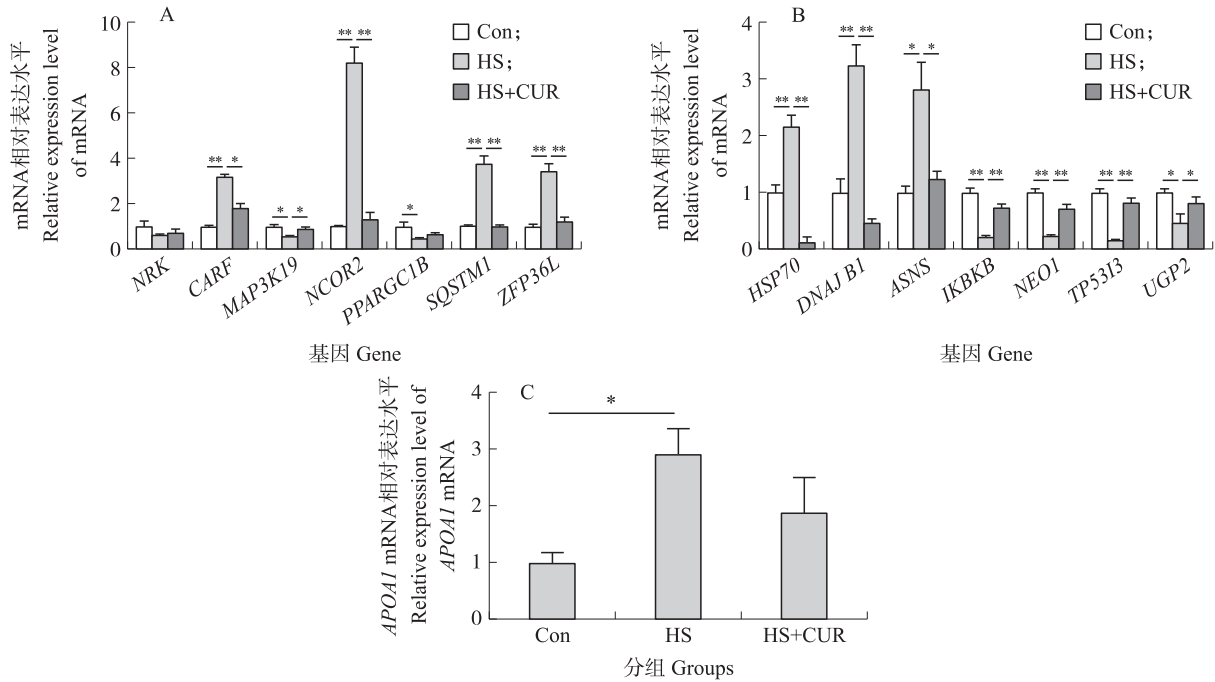


图 4 肝脏中基于 TMT 蛋白组学筛选的不同亚细胞定位差异表达显著蛋白相关基因 mRNA 水平的表达变化

Fig. 4 Different sub-cellular positioning differences based on the TMT protein group expressed significant protein-related genes in the liver mRNA level in the liver

A. 细胞核 Nucleus; B. 细胞质 Cytoplasm; C. 细胞外 Extracellular. 将对照组中的数据设置为 1.0, 得到的数值是每组的 $\bar{x} \pm SE (n=3)$ 。

Setting the data in the control group to 1.0, the resulting value is the $\bar{x} \pm SE (n=3)$ in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

KEGG 通路富集分析结果提示差异表达蛋白参与了 PPAR 信号通路和过氧化物酶体, 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 家族的 3 个主要成员 (PPARGC-1 α , PPARGC-1 β 和 PRC), 其在能量代谢调节、维持葡萄糖稳态和脂质代谢中发挥着关键作用, PPARGC-1 β 作为其成员的重要组成部分, 是线粒体氧化能量代谢和抗氧化防御的主要调控因子^[26]。研究发现其与多种生物学过程相关并且参与多种疾病的发生, 诸如脂肪肝变性、糖尿病和心肌病等。PPARGC-1 β 基因是一种调控基因转录的共激活剂, 对转录因子和核受体活动、脂肪氧化、糖酵解以及能量代谢等多种生物学过程具有调控作用^[27]。本研究结果表明热应激状态下的蛋鸡肝脏 PPARGC-1 β 表达显著降低, 添加姜黄素可以促进 PPARGC-1 β 的表达。

HSP 通过调节细胞稳态并促进细胞存活而充当分子伴侣, HSP40 (DnaJ) 是 HSP70 在调节 ATP 水解中的伴侣^[28]。本研究中, DnaJB1 和 HSP70 蛋白差异表达水平显著升高, 补充姜黄素后 DnaJB1 和 HSP70 的表达水平与热应激组相比显著减少。检测肝脏 mRNA 表达的结果显示 DnaJB1 和 HSP70 的变化趋势一致, DnaJB1 的表达对 HSP70 具有依赖性。据报道, HSP70 蛋白通过肝脏线粒体途径增加, 最终导致细胞凋亡^[29]。本研究结果显示热应激组蛋鸡肝脏的 HSP70 表达水平与对照组和姜黄素组相比均显著升高, 这与 da Silva 等^[30]研究结果一致。本研究结果表明添加姜黄素可以调节 HSP 相关蛋白的表达, 但其作用机制还有待进一步研究。

MAPK 在信号传导的信号程序中起多种功能作用, 导致特定细胞类型的增殖、运动、温度变化和存活以及各种生理过程^[31]。有研究表明 MAPK 可以在热应激下维持细胞的氧化还原稳态^[32]。本研究差异蛋白分析结果显示, 姜黄素组与对照组和热应激组相比, 核因子 κB 激酶亚基 β (IKKBK) 的表达在饲喂姜黄素后显著增加, 其参与 NF- κB 和 MAPK 信号通路调节。参与 MAPK 信号通路调节的相关蛋白还包括 Nik 相关激酶 (NRK), 其表达水平与其他 2 组比较在姜黄素组显著升高。这些结果都提示姜黄素缓解蛋鸡肝脏氧化应激可能是通过参与 MAPK 和 NF- κB 信号通路来实现的。

脂质代谢是肝脏最重要的代谢过程之一, 正常的脂质代谢与机体健康密切相关。肝脏中脂质代谢的失调可使脂肪肝变性, 导致慢性脂肪性肝炎^[33]。本研究结果表明, 热应激组与对照组相比载脂蛋白 A-1 (APOA1) 表达水平显著升高, 饲喂姜黄素能缓解热应激状态下蛋鸡肝脏载脂蛋白 A-1 的表达下调。载脂蛋白 A-1 是高密度脂蛋白的主要结构和功能蛋白成分, 主要由肝细胞在肝脏中产生^[34]。本研究证明了饲

喂姜黄素可以有效保护热应激对蛋鸡肝脏脂质代谢的影响。

综上所述,姜黄素可改变蛋鸡肝脏热应激和氧化应激相关蛋白的表达,本研究相关结果可为探索夏季蛋鸡肝脏热应激机制提供试验基础,下一步研究中可通过检测蛋鸡肝脏中上述几种蛋白的表达水平变化,进一步敲除编码这些蛋白的基因,以验证其在热应激及氧化应激过程中发挥的具体作用。

参考文献 References:

- [1] Ribeiro B P VB, Lanferdini E, Palencia J Y P, et al. Heat negatively affects lactating swine: a meta-analysis[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2018, 74: 325–330.
- [2] 唐宇杰, 卢浩诚, 韩兆玉, 等. 芦丁对热应激奶牛生产性能的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44(6): 1144–1153. DOI: 10.7685/jnau.202012023.
Tang Y J, Lu H C, Han Z Y, et al. Effect of rutin on production performance of dairy cows under heat stress[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44(6): 1144–1153 (in Chinese with English abstract).
- [3] Ngoula F, Lontio F A, Tchhoffo H, et al. Heat induces oxidative stress: reproductive organ weights and serum metabolite profile, testes structure, and function impairment in male cavy (*Cavia porcellus*) [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 37.
- [4] Mashaly M M, Hendricks G L, Kalama M A, et al. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens[J]. *Poultry Science*, 2004, 83(6): 889–894.
- [5] Che L Q, Xu Q, Wu C, et al. Effects of dietary live yeast supplementation on growth performance, diarrhoea severity, intestinal permeability and immunological parameters of weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2017, 118(11): 949–958.
- [6] Dai C S, Ciccotosto G D, Cappai R, et al. Curcumin attenuates colistin-induced neurotoxicity in N2a cells via anti-inflammatory activity, suppression of oxidative stress, and apoptosis[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(1): 421–434.
- [7] Sahin K, Orhan C, Tuzcu Z, et al. Curcumin ameliorates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(11): 4035–4041.
- [8] Martín-Aragón S, Benedí J M, Villar A M. Modifications on antioxidant capacity and lipid peroxidation in mice under fraxetin treatment[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, 49(1): 49–52.
- [9] 胡忠泽, 金光明, 王立克, 等. 姜黄素对肉鸡生产性能和免疫机能的影响[J]. *粮食与饲料工业*, 2004(10): 44–45.
Hu Z Z, Jin G M, Wang L K, et al. Effects of curcumin on performance and immune function of broilers[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2004(10): 44–45 (in Chinese with English abstract).
- [10] 胡忠泽, 金光明, 王立克, 等. 姜黄素对肉鸡免疫功能和抗氧化能力的影响[J]. *粮食与饲料工业*, 2006(4): 34–35, 40.
Hu Z Z, Jin G M, Wang L K, et al. Effects of curcumin on immune function and anti-oxidation activity of broilers[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2006(4): 34–35, 40 (in Chinese with English abstract).
- [11] Lund P J, Lehman S M, Garcia B A. Quantitative analysis of global protein lysine methylation by mass spectrometry[J]. *Methods in Enzymology*, 2019, 626: 475–498.
- [12] Cox J, Mann M. Is proteomics the new genomics? [J]. *Cell*, 2007, 130(3): 395–398.
- [13] Shen J Q, Pagala V R, Breuer A M, et al. Spectral library search improves assignment of TMT labeled MS/MS spectra[J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(9): 3325–3331.
- [14] Dayon L, Hainard A, Licker V, et al. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(8): 2921–2931.
- [15] Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(8): 1895–1904.
- [16] Ma D, Liu Q, Zhang M, et al. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of the spleen reveals innate immunity and cell death pathways associated with heat stress in broilers (*Gallus gallus*) [J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 196: 11–21.
- [17] Bassols A, Turk R, Roncada P. A proteomics perspective: from animal welfare to food safety[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2014, 15(2): 156–168.
- [18] Liu M J, Lu Y L, Gao P, et al. Effect of curcumin on laying performance, egg quality, endocrine hormones, and immune activity in heat-stressed hens[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(4): 2196–2202.
- [19] Biancotto G, Bovo D, Mastrorilli E, et al. TMT-based proteomics profiling of bovine liver underscores protein markers of anabolic treatments[J]. *Proteomics*, 2019, 19(9): e1800422.
- [20] Xiao S, Liu L T, Zhang Y J, et al. Tandem mass tag-based (TMT) quantitative proteomics analysis reveals the response of fine roots to drought stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 328.
- [21] Wu J, Wang Y P, Jiang Z. Immune induction identified by TMT proteomics analysis in *Fusobacterium nucleatum* autoinducer-2 treated macrophages[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2020, 17(2): 175–185.
- [22] Hubbard A H, Zhang X K, Jastrebski S, et al. Understanding the liver under heat stress with statistical learning: an integrated metabolomics and

- transcriptomics computational approach[J]. *BMC Genomics*,2019,20(1):502.
- [23] Liu Z P,Gu W B,Tu D D,et al. Effects of both cold and heat stress on the liver of the giant spiny frog(*Quasipaa spinosa*):stress response and histological changes[J]. *The Journal of Experimental Biology*,2018,221(21):jeb186379.
- [24] Correa F,Buelna-Chontal M,Hernández-Reséndiz S,et al. Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease[J]. *Free Radical Biology & Medicine*,2013,61:119-129.
- [25] Wu J,Ibtisham F,Niu Y F,et al. Curcumin inhibits heat-induced oxidative stress by activating the MAPK-Nrf2/ARE signaling pathway in chicken fibroblasts cells[J]. *Journal of Thermal Biology*,2019,79:112-119.
- [26] 赵菊芬,马荣,曹佳,等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1β 对乳腺癌干细胞干性表达的调控[J]. *中国组织工程研究*,2023,27(1):59-65.
- Zhao J F,Ma R,Cao J,et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta on stemness expression in breast cancer stem cells[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*,2023,27(1):59-65(in Chinese with English abstract).
- [27] 牟芳. 鸡 *ADRA1B* 和 *PPARGC1B* 基因在卵泡中的时空表达及其新 SNPs 对产蛋性状的遗传效应[D]. 长春:吉林农业大学,2016.
- Mu F. The temporal-spatial expression of *ADRA1B* and *PPARGC1B* genes in the ovarian follicles and effect of their novel SNPs on the egg production traits in hens[D]. Changchun:Jilin Agricultural University,2016(in Chinese with English abstract).
- [28] Chen T,Lin T H,Li H M,et al. Heat shock protein 40(HSP40) in Pacific white shrimp(*Litopenaeus vannamei*): molecular cloning, tissue distribution and ontogeny, response to temperature, acidity/alkalinity and salinity stresses, and potential role in ovarian development [J]. *Frontiers in Physiology*,2018,9:1784.
- [29] Londeroé P,Bressan C A,Pês T S,et al. Rutin-added diet protects silver catfish liver against oxytetracycline-induced oxidative stress and apoptosis[J]. *Comp Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology & Pharmacology*,2021,239:108848.
- [30] da Silva L S,Catalão C H R,Felippotti T T,et al. Curcumin suppresses inflammatory cytokines and heat shock protein 70 release and improves metabolic parameters during experimental sepsis[J]. *Pharmaceutical Biology*,2017,55(1):269-276.
- [31] Liu W,Leng J,Hou J G,et al. Saponins derived from the stems and leaves of *Panax ginseng* attenuate scrotal heat-induced spermatogenic damage via inhibiting the MAPK mediated oxidative stress and apoptosis in mice[J]. *Phytotherapy Research*,2021,35(1):311-323.
- [32] Kumar R R,Arora K,Goswami S,et al. MAPK enzymes;a ROS activated signaling sensors involved in modulating heat stress response ,tolerance and grain stability of wheat under heat stress[J]. *Biotech*,2020,10(9):380.
- [33] Zheng X X,Ren B Y,Li X M,et al. Selenoprotein F knockout leads to glucose and lipid metabolism disorders in mice[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*,2020,25(7):1009-1022.
- [34] Eggerman T L,Hoeg J M,Meng M S,et al. Differential tissue-specific expression of human ApoA- I and ApoA- II [J]. *Journal of Lipid Research*,1991,32(5):821-828.

责任编辑:周广礼 刘怡辰