

DOI: 10.11686/cyxb2025212

http://cyxb.magtech.com.cn

周亚楠, 徐玉麟, 别欣亚, 等. 基于转录组学分析代乳粉饲喂量对42日龄断奶牦牛犊牛脾脏和胸腺发育的影响. 草业学报, 2026, 35(5): 196-211.
ZHOU Ya-nan, XU Yu-lin, BIE Xin-ya, et al. Transcriptomics-based analysis of the effect of feeding weaned yak calves with milk replacer powder on their spleen and thymus development. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(5): 196-211.

基于转录组学分析代乳粉饲喂量对42日龄断奶牦牛犊牛脾脏和胸腺发育的影响

周亚楠^{**}, 徐玉麟^{**}, 别欣亚, 袁金泉, 谷颖超, 王紫莹, 杨得玉, 孙璐, 闫忠心, 刘书杰, 崔占鸿^{*}

(青海大学畜牧兽医科学院, 农业农村部青藏高原放牧牦牛藏羊动物营养与饲草料重点实验室, 青海省牦牛工程技术研究中心, 青海省高原放牧家畜动物营养与饲料科学重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要:本研究基于转录组学技术,以14头42日龄健康公牦牛犊牛[体重(36.30±1.09) kg,遗传背景一致]为研究对象,随机分为低(dC组,代乳粉饲喂量为平均体重的0.8%)和高(dH组,代乳粉饲喂量为平均体重的1.2%)代乳粉饲喂量两组,探究其对脾脏和胸腺免疫功能的影响。试验期间犊牛自由采食开食料及苜蓿干草,经30 d预试期后,当体重达60 kg以上且固体饲料日采食量超过1 kg时,每组随机选取5头屠宰取样,采集脾脏和胸腺组织样品用于相关指标的测定分析。结果表明:1)转录组学结果显示,牦牛犊牛脾脏中,高代乳粉饲喂量显著促进脾脏免疫相关基因(如CXCL14, CXCL11, CXCL9)的上调,且差异表达基因显著富集在病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、细胞DNA感应途径、趋化因子信号通路、RIG-I样受体信号通路等,增强了脾脏的抗病能力。2)牦牛犊牛胸腺中,高代乳粉饲喂量中抗原呈递相关基因(HSPA6, HSPA1A)及Toll/Imd通路基因(MAPK10)表达增强,且差异表达基因显著富集在抗原处理和表达、细胞色素P450对外源物质代谢的影响、Toll和Imd信号通路等。3)牦牛犊牛胸腺和脾脏组织实时荧光定量PCR结果与测序结果一致,表明测序结果可靠。综上所述,相较于低代乳粉饲喂量,高代乳粉饲喂量组牦牛脾脏调节病毒蛋白与宿主免疫系统的相互作用影响病毒-宿主互作,同时还能影响病毒防御相关通路(如干扰素信号通路)的激活程度;胸腺能够优化抗原呈递细胞的加工和表达功能,进而提高犊牛的免疫能力,为牦牛犊牛早期免疫发育的营养干预提供理论依据。

关键词:牦牛犊牛;代乳粉饲喂量;脾脏;胸腺;转录组学

Transcriptomics-based analysis of the effect of feeding weaned yak calves with milk replacer powder on their spleen and thymus development

ZHOU Ya-nan^{**}, XU Yu-lin^{**}, BIE Xin-ya, YUAN Jin-quan, GU Ying-chao, WANG Zi-ying, YANG De-yu, SUN Lu, YAN Zhong-xin, LIU Shu-jie, CUI Zhan-hong^{*}

Academy of Animal Husbandry and Veterinary Science, Qinghai University, Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Grazing Yak and Tibetan Sheep Animal Nutrition and Feed-Forage, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qinghai Yak Engineering Technology Research Center, Qinghai Provincial Plateau Grazing Livestock Animal Nutrition and Feed Science Key Laboratory, Xining 810016, China

Abstract: This study investigated the effects of feeding weaned yak calves with milk replacer at a range of levels on

收稿日期:2025-05-27;改回日期:2025-07-07

基金项目:青海省科技计划项目(2025-NK-124)资助。

作者简介:周亚楠(1997-),女,河南项城人,在读博士。E-mail: yanan_zhou0312@163.com;徐玉麟(1999-),女,天津人,在读硕士。E-mail: xuyulin0524@163.com。 ** 共同第一作者 These authors contributed equally to this work.

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: cuizhanhong27@126.com

the immune function of the spleen and thymus, using a transcriptomics approach to analyze gene transcript profiles. Fourteen healthy male yak calves were selected for this experiment. The calves were 42 days old at the start of the experiment, had a consistent genetic background, and an average weight of (36.30 ± 1.09) kg. The calves were randomly assigned to either a low milk replacer group (dC, 0.8% of average body weight) or a high milk replacer group (dH, 1.2% of average body weight). The calves had *ad libitum* access to calf starter and alfalfa (*Medicago sativa*) hay. After a 30-day preliminary period, when calves reached a body weight of more than 60 kg and a daily solid feed intake exceeding 1 kg, five calves from each group were randomly selected for slaughter and sample collection. Spleen and thymus tissues were collected for analysis. The main results were as follows: 1) Transcriptomics analysis of spleen tissue revealed significant upregulation of immune-related genes (e.g., *CXCL14*, *CXCL11*, *CXCL9*) in the spleen of the dH group. Differentially expressed genes (DEGs) between the dH and dC groups were significantly enriched in pathways such as viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor, cellular DNA-sensing pathway, chemokine signaling pathway, and RIG- I -like receptor signaling pathway, suggesting enhanced antiviral capacity of the spleen. 2) In thymus tissue, the dH group exhibited increased transcript levels of antigen presentation-related genes (*HSPA6*, *HSPA1A*) and Toll/Imd pathway genes (*MAPK10*). Furthermore, the DEGs were significantly enriched in pathways including antigen processing and presentation, cytochrome P450 xenobiotic metabolism, and the Toll and Imd signaling pathway. 3) Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analyses of thymus and spleen tissues corroborated the transcriptomic sequencing results, confirming the accuracy of the sequencing data. In conclusion, compared with the dC group, the dH group displayed changes in gene expression in the spleen indicative of enhanced immune responses to viral proteins, including the activation of virus defense-related pathways such as the interferon signaling pathway. Similarly, antigen-presenting cell processing and presentation functions were improved in the thymus of calves in the dH group, indicative of increased immune competence. These findings provide a theoretical basis for nutritional interventions aimed at promoting early immune development in yak calves.

Key words: yak calves; milk replacer feeding level; spleen; thymus; transcriptomics

脾脏作为牦牛犏牛最大的外周免疫器官,通过B细胞和T细胞介导适应性免疫应答^[1],同时协同自然杀伤细胞和树突状细胞执行血液过滤、先天免疫防御及抗原呈递功能^[2-5]。胸腺作为T细胞发育的中枢器官^[6],对牦牛犏牛的细胞免疫至关重要^[7]。研究表明,胸腺在犏牛早期呈现快速发育状态,并随着性成熟逐渐退化^[8],其中的T细胞成熟后迁移至脾脏和肝脏,进一步参与局部和全身的免疫防御。此外,研究还发现牦牛犏牛胸腺中的上皮细胞表达高水平的MHC II类分子^[9],可能构成牦牛高海拔免疫适应的关键机制。

代乳粉的营养组成显著调控免疫器官发育,其中的蛋白质与氨基酸直接影响胸腺重量及T细胞数量^[10]。而添加的益生菌或益生元可通过双重途径增强免疫功能,既提升脾脏淋巴细胞数量^[11],又激活胸腺免疫基因(如*IL-2*、*IFN- γ*)的表达^[12]。这种协同作用可能是由于代乳粉配方优化能够通过影响器官间互作从而提升犏牛免疫效能。

转录组学作为研究基因表达的重要工具,近年来在幼龄反刍动物免疫研究中的应用日益广泛。研究表明,幼龄反刍动物在早期发育阶段,免疫系统的成熟与特定基因的表达密切相关^[13-15]。通过RNA-seq技术分析了犏牛在初生期的免疫相关基因表达变化,发现Toll样受体(TLRs)和细胞因子(如*IL-6*和*TNF- α*)在初生期显著上调^[16],提示这些基因在早期免疫防御中具关键作用,这为解析代乳粉的免疫调控提供了分子靶标。因此,本研究基于转录组学技术分析代乳粉饲喂量对42日龄断奶牦牛犏牛在脾脏和胸腺上的差异表达基因以及找到与免疫相关的基因本体论(gene ontology, GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路,以期获得适合牦牛犏牛的代乳粉饲喂量,系统阐明代乳粉饲喂量对42日龄断奶牦牛双重免疫器官发育的影响机制,最终建立基于免疫优化的代乳粉精准供给方案。

1 材料与amp;方法

1.1 试验动物及地点

牦牛犊牛购自青海省大通种牛场,品种为大通牦牛。饲养试验在青海省海北州海晏县高原现代生态畜牧业科技试验示范园进行。试验期为2023年6—11月。

1.2 试验设计

动物试验已由青海大学畜牧兽医科学院实验动物管理委员会批准,审批号:2024-QHMKY-002。

试验选取14头42日龄健康公牦牛犊牛[体重(36.30 ± 1.09) kg,遗传背景一致],随机分为两组:dC组(代乳粉饲喂量为平均体重的0.8%,低代乳粉饲喂量)和dH组(代乳粉饲喂量为平均体重的1.2%,高代乳粉饲喂量)。试验包含30 d预试期,当犊牛体重 ≥ 60 kg且固体饲料日采食量 ≥ 1 kg时,每组随机选取5头进行称重屠宰采样。代乳粉及开食料购自北京精准动物营养研究中心,其营养水平与苜蓿(*Medicago sativa*)干草成分详见表1。

1.3 饲养管理

试验期间,每日07:00和17:00定时饲喂代乳粉两次,代乳粉按1:5比例与42℃温水混合搅拌,冷却至38℃后通过专用奶瓶人工投喂。预试期第

1~3天采用牦牛乳与代乳粉1:1混合饲喂,并添加电解多维以缓解犊牛应激、补充电解质及维生素;第4~7天逐步提高代乳粉比例直至完全替代牦牛乳,实现断乳过渡。正式试验首日晨饲前对两组犊牛称重,按平均体重计算初始代乳粉饲喂量,此后每15 d依据体重调整饲喂量。试验全程采用单栏饲养,自由饮水,每日按开食料与苜蓿干草3:7比例投喂(先投开食料后投干草),记录干物质采食量,并监测犊牛健康状况及行为表现,及时处理异常情况。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 脾脏和胸腺样品采集 在饲养试验结束时,每组随机选取5头牦牛犊牛进行屠宰,采集脾脏和胸腺组织,用生理盐水冲净脏器表面的血液并用滤纸吸干多余液体,将组织剪成碎样状置于5 mL冻存管中,投入液氮冷冻,后转入-80℃冰箱保存备用。

1.4.2 转录组文库构建及测序 将脾脏和胸腺组织样本送至上海欧易生物医学科技有限公司,利用转录组学测定脾脏和胸腺的差异表达基因。采用TRIzol试剂(日本TaKaRa公司)依照说明书提取总RNA;使用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo scientific,美国)鉴定RNA纯度和定量;使用Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent technologies,美国)评估RNA完整性;使用VAHTS Universal V5 RNA-seq Library Prep试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)依照说明书构建转录组文库。转录组测序和分析由上海欧易生物技术有限公司(上海,中国)进行。

采用Illumina Novaseq 6000测序平台对文库进行测序,并生成150 bp双端reads。每个样本获得raw reads。采用fastp软件对fastq格式的raw reads进行处理,去除低质量reads后获得clean reads用于后续数据分析。使用HISAT 2软件进行参考基因组比对,并进行基因表达量(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM)计算,并通过HTSeq-count获得每个基因的reads计数(counts)。使用R(v 3.2.0)对基因(counts)进行PCA分析以及绘图,以评估样本生物学重复。

1.4.3 差异表达基因筛选注释及PCR验证 利用DESeq 2软件进行差异表达基因分析,其中符合 $P\text{-adjust} <$

表1 代乳粉、开食料和苜蓿干草营养水平(干物质基础)

Table 1 Nutrient levels of milk replacer, starter and alfalfa hay (dry matter basis)

营养水平 Nutrient levels	代乳粉 Milk replacer	开食料 Starter	苜蓿干草 Alfalfa hay
粗蛋白质 Crude protein (CP, %)	26.24	21.34	13.68
粗脂肪 Ether extract (EE, %)	27.79	7.01	5.79
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, %)	—	15.55	43.00
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, %)	—	4.90	29.39
钙 Calcium (Ca, %)	2.50	0.80	1.45
磷 Phosphorus (P, %)	1.40	0.55	0.34
钙/磷 Ca/P	1.79	1.45	4.26

—: 未检出 Not detected.

0.05 且 $|\log_2 FC| > 1$ 阈值的基因被定义为差异表达基因。使用 R(v 3.2.0) 对差异表达基因进行层次聚类分析, 以展示基因在不同组和样本中的表达模式。

随后, 基于超几何分布算法对差异表达基因进行 GO、KEGG Pathway 富集分析, 用于筛选显著性富集功能条目。以 $P\text{-adjust} < 0.05$ 作为显著性富集的阈值, 进行 GO 功能富集分析, 将差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析, 通过 GO 数据库和 KEGG 数据库进行基因功能注释分析, 分析差异表达基因参与的信号通路。

在脾脏和胸腺中随机选择 6 个差异表达基因, 引物均由武汉赛维尔生物科技有限公司合成(表 2 和表 3), 使用实时荧光定量 PCR 技术对测序结果进行验证。使用 Nanodrop 2000 分光光度计检测 RNA 浓度及纯度, 将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释, 使其终浓度为 $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 用于逆转录备用。使用逆转录试剂盒(G3337, 武汉赛维尔生物科技有限公司), 配置成 $20 \mu\text{L}$ 反应体系, 轻轻混匀并离心, 于普通 PCR 仪(ETC811, 北京东胜创新生物科技有限公司)上经过 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s 完成逆转录。取 0.1 mL PCR 反应板(PCR-9601-NS, 武汉赛维尔生物科技有限公司), 配制反应体系[即 $7.5 \mu\text{L}$ $2 \times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix (G3326, 武汉赛维尔生物科技有限公司) + $1.5 \mu\text{L}$ $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 基因引物(上游+下游) + $2.0 \mu\text{L}$ 反转录产物(cDNA) + $4.0 \mu\text{L}$ Water Nuclease-Free(G4700, 武汉赛维尔生物科技有限公司)], 每个反转录产物配制 3 管。点完样用 PCR 封板膜(G6065, 武汉赛维尔生物科技有限公司)配合封膜仪(FS-A20, 武汉赛维尔生物科技有限公司)完成封膜, 用微孔板离心机(SMP-2, 武汉赛维尔生物科技有限公司)离心。PCR 扩增反应程序为: 预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s; 变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, 退火/延伸 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s(40 个循环); 熔解曲线 $65 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 95 \text{ }^\circ\text{C}$, 每升温 $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 采集一次荧光信号(从机器中直接调出熔曲程序), 于荧光定量 PCR 仪(CFX Connect, 美国 Bio-rad 公司)上完成扩增。采用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法^[17]分析基因的相对表达量。

表 2 脾脏基因引物信息

Table 2 Gene primer information for spleen

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	长度 Length (bp)
C-X-C 基序趋化因子配体 9 C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9)	S:AATGGGAATGAAGCCTGCCTA A:AACACAAGATAGTGGTTGGTGAAGT	208
C-X-C 基序趋化因子配体 11 C-X-C motif chemokine ligand 11 (CXCL11)	S:GGCCCTGGAGTAAAAGCAGT A:TAGCTTTCGCTTGCTTTGCC	154
C-X-C 基序趋化因子配体 14 C-X-C motif chemokine ligand 14 (CXCL14)	S:CACCACCAAGAGCATGTCCA A:TCCAACCGGTGTGAAGTTT	168
DExD/H-box 解旋酶 58 DExD/H-box helicase 58 (DDX58)	S:TAAGTTCCAACAAGGGGCTGAT A:TTCTCTACCATCCACAGTTCGCT	145
环鸟苷酸-腺苷酸合成酶 Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase (CGAS)	S:TTAGAAGGGGAATCTTATCGGC A:TCTAATCAGAAGTGTTACAGCAGGG	144
Z-DNA 结合蛋白 1 Z-DNA binding protein 1 (ZBP1)	S:TAAAGCCCTGATGATCGCCA A:ACAGAGCCCATTGTCTCACTAG	288

$\Delta\Delta\text{CT}$ 法:

$$A = CT(\text{目的基因, 待测样本}) - CT(\text{内标基因, 待测样本})$$

$$B = CT(\text{目的基因, 对照样本}) - CT(\text{内标基因, 对照样本})$$

$$K = A - B$$

$$\text{表达倍数} = 2^{-K}$$

表3 胸腺基因引物信息

Table 3 Gene primer information for thymus

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences (5'—3')	长度 Length (bp)
热休克蛋白家族 A(Hsp70)成员 1A Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A (<i>HSPA1A</i>)	S:CTACGTGGCCTTCACCGATAC A:AACGCCTTGGTCTCCCTTGTA	220
丝裂原活化蛋白激酶 10 Mitogen-activated protein kinase 10 (<i>MAPK10</i>)	S:GGAGCTGATGGATGCTAACTTGT A:ACACAACATTTGGTAGAGCAGGTAA	88
热休克蛋白家族 A(Hsp70)成员 6 Heat shock protein family A (Hsp70) member 6 (<i>HSPA6</i>)	S:ATCTTCTGCTGCTGGATGTGG A:TTGTCTGAATAGGTGGTGAAGTC	133
双氧化酶 1 Dual oxidase 1 (<i>DUOX1</i>)	S:AGGAAGAACGGCAAGTGATGG A:GGAGAAAAGGTGCCTGAAAAAG	164
T 细胞受体 α 可变区基因 8-3 T cell receptor alpha variable gene 8-3 (<i>TRAV8-3</i>)	S:CATCAACGTCTCTGAAGGAAACC A:GCTTTCATCAGGTGGAAGGAGTT	207
杀伤细胞凝集素样受体 C1 Killer cell lectin like receptor C1 (<i>KLRC1</i>)	S:CAAGGGAATGAGGAGAACTACCA A:AGAAGCACAGGCTGTCAAACCTC	291

1.5 数据处理与统计分析

采用 Excel 2016 初步处理试验数据后,再利用 SPSS 21.0 分析数据,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较数据差异性,Duncan 氏法进行多重比较,结果用“平均值±标准差”表示,以 $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著, $0.05 < P < 0.10$ 表示具有差异显著的趋势。组学使用 R 包 ggradar 绘图,荧光定量 PCR 则使用 GraphPad Prism 10 软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 转录组学分析代乳粉饲喂量对牦牛犊牛脾脏功能的影响

2.1.1 差异表达基因的筛选 以 $P\text{-adjust} < 0.05$ 和 $|\log_2 FC| > 1$ 为标准筛选两组间脾脏组织的差异表达基因(图 1),dH 与 dC 组脾脏对比有 234 个差异表达基因,其中与 dC 组相比,dH 组中有 100 个上调基因,134 个下调基因。

2.1.2 差异表达基因的 GO 富集分析 以 $P\text{-adjust} < 0.05$ 作为显著性富集的阈值,进行 GO 功能富集分析(图 2),结果表明差异表达基因在生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三大类上均有所富集。

dH 组相较于 dC 组,脾脏差异表达基因在 BP 一类中富集到 45 个 GO 功能,在 CC 一类中富集到 15 个 GO 功能,在 MF 一类中富集到 20 个 GO 功能。在 BP 功能中,2 组间脾脏的差异表达基因主要富集在对病毒的防御反应、对病毒的反应、病毒基因组复制的负调控、对干扰素- α 的反应、对干扰素- β 的反应、对干扰素- γ 的反应、I 型干扰素信号通路、先天性免疫反应、对病毒物质细胞内转运的负调控、免疫反应;在 CC 功能中,2 组间脾脏差异表达基因主要富集在核核小体、细胞外空间、与 CA3 锥体神经元之间的海马苔藓纤维突触、膜锚定元件、液泡、次级内体膜、质膜、细胞外空间、核小体、顶体膜;在 MF 功能中,2 组间脾脏差异表达基因主要富集在单链 RNA 结合、核糖体 DNA 结合、金属内肽酶抑制剂活性、双链 DNA 结合、 β -半乳糖苷酶活性、趋化因子活性、双链 RNA 结合、电压门控钾通道活性、氧化还原酶活性,作用于配对供体,以分子氧、还原黄素或黄素蛋白为一个供体,结合或还原一个氧原子、类固醇羟化酶活性。

2.1.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析 将差异表达基因进行 KEGG Pathway 富集分析(图 3),dH 与 dC 组脾脏共富集到 12 条差异信号通路,差异表达基因主要参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、泛酸和辅酶 A

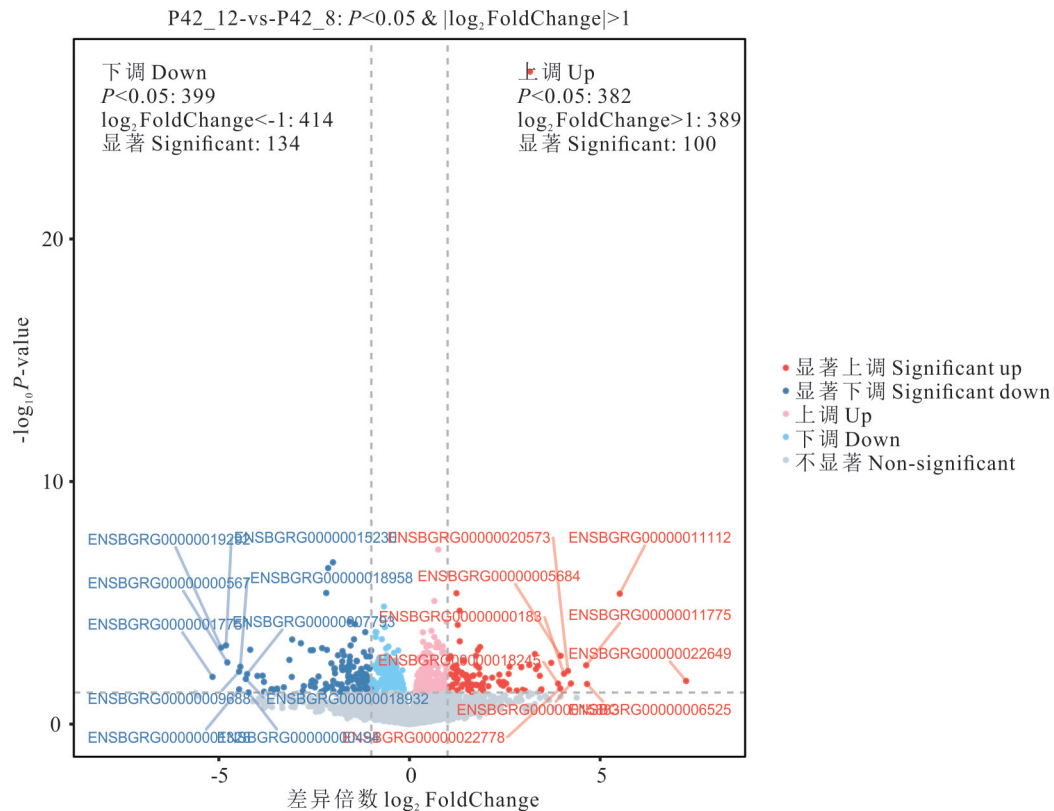


图 1 脾脏差异基因火山图

Fig. 1 Volcano plot of differentially expressed genes in the spleen

P42_12: dH组脾脏 Spleen sample from the dH group; P42_8: dC组脾脏 Spleen sample from the dC group. P -value: P 值; FoldChange: 差异倍数. 下同 The same below.

(coenzyme A, CoA)的生物合成、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、细胞DNA感应途径、5-羟色胺能突触、皮质醇的合成和分泌、趋化因子信号通路、甲状腺激素合成、胆汁分泌、亚油酸代谢、RIG-I样受体信号通路等。

挑选出图3中与免疫相关的KEGG通路进行富集分析,包括病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、细胞DNA感应途径、趋化因子信号通路、RIG-I样受体信号通路(表4)。表明牦牛犊牛机体正在发生一个由病毒核酸感知所触发的、强烈的固有免疫反应,其特征是I型干扰素和趋化因子的产生,并伴随着病毒与宿主免疫系统之间的复杂相互作用。

2.1.4 实时荧光定量PCR验证结果 从dC与dH组的脾脏组织中随机选择6个差异表达基因,进行实时荧光定量PCR的测定,结果显示与转录组定量结果的显著性及趋势一致,说明转录组数据准确性较高(图4)。

2.2 转录组学分析代乳粉饲喂量对牦牛犊牛胸腺功能的影响

2.2.1 差异表达基因的筛选 以 $P\text{-adjust} < 0.05$ 和 $|\log_2 \text{FC}| > 1$ 为标准筛选两组间胸腺组织的差异表达基因,结果表明dH与dC组胸腺对比有158个差异表达基因,其中与dC组相比,dH组中有78个上调基因,80个下调基因(图5)。

2.2.2 差异表达基因的GO富集分析 以 $P\text{-adjust} < 0.05$ 作为显著性富集的阈值,进行GO功能富集分析(图6),可以看出差异表达基因在BP、CC和MF三大类上均有所富集。

dH组相较于dC组,胸腺差异表达基因在BP一类中富集到75个GO功能,在CC一类中富集到22个GO功能,在MF一类中富集到28个GO功能。在BP功能中,2组间胸腺的差异表达基因主要富集在B细胞受体信号通路的负调控、B细胞增殖的负调控、B细胞分化调控、神经元细胞-细胞粘附、过氧化氢分解代谢过程、肿瘤坏死

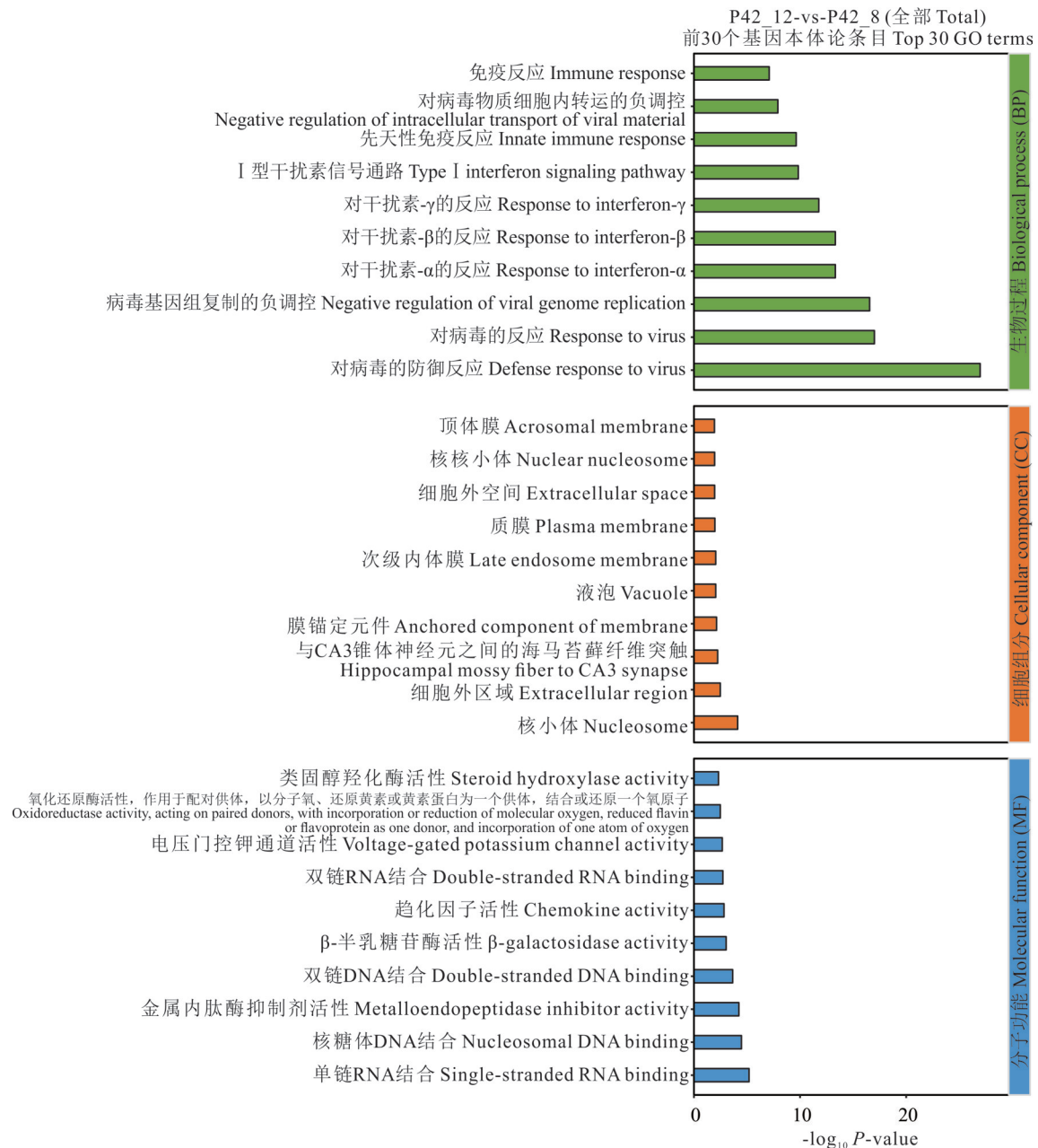


图2 脾脏差异表达基因的基因本体论富集分析

Fig. 2 Gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes in the spleen

因子生成的负向调节、对活化T细胞增殖的正向调节、T细胞受体信号通路、免疫反应调节、参与炎症反应的白细胞迁移;在CC功能中,2组间胸腺差异表达基因主要富集在纤毛膜、突触、突触前活动区细胞质成分、细胞连接、质膜、细胞表面、突触小泡膜、突触前活跃区、膜的组成部分、神经元投射;在MF功能中,2组间胸腺差异表达基因主要富集在钙离子结合、血红素结合、二酰甘油结合、过氧化物酶活性、α-肌动蛋白结合、钙调蛋白结合、磷脂酰乙醇胺结合、NAD(P)H氧化酶活性、乙酰胆碱受体抑制剂活性、乙酰胆碱结合。

2.2.3 差异表达基因的KEGG富集分析 将差异表达基因进行KEGG Pathway富集分析(图7),dH与dC组胸腺共富集到10条差异信号通路,差异表达基因主要参与抗原处理和表达、神经活性配体与受体的相互作用、突触囊泡循环、丝裂原活化蛋白激酶信号通路-fly、胰高血糖素信号通路、酪氨酸代谢、细胞色素P450对外源物质代谢的影响、类固醇激素的生物合成、Toll和Imd信号通路、神经营养因子信号通路等。

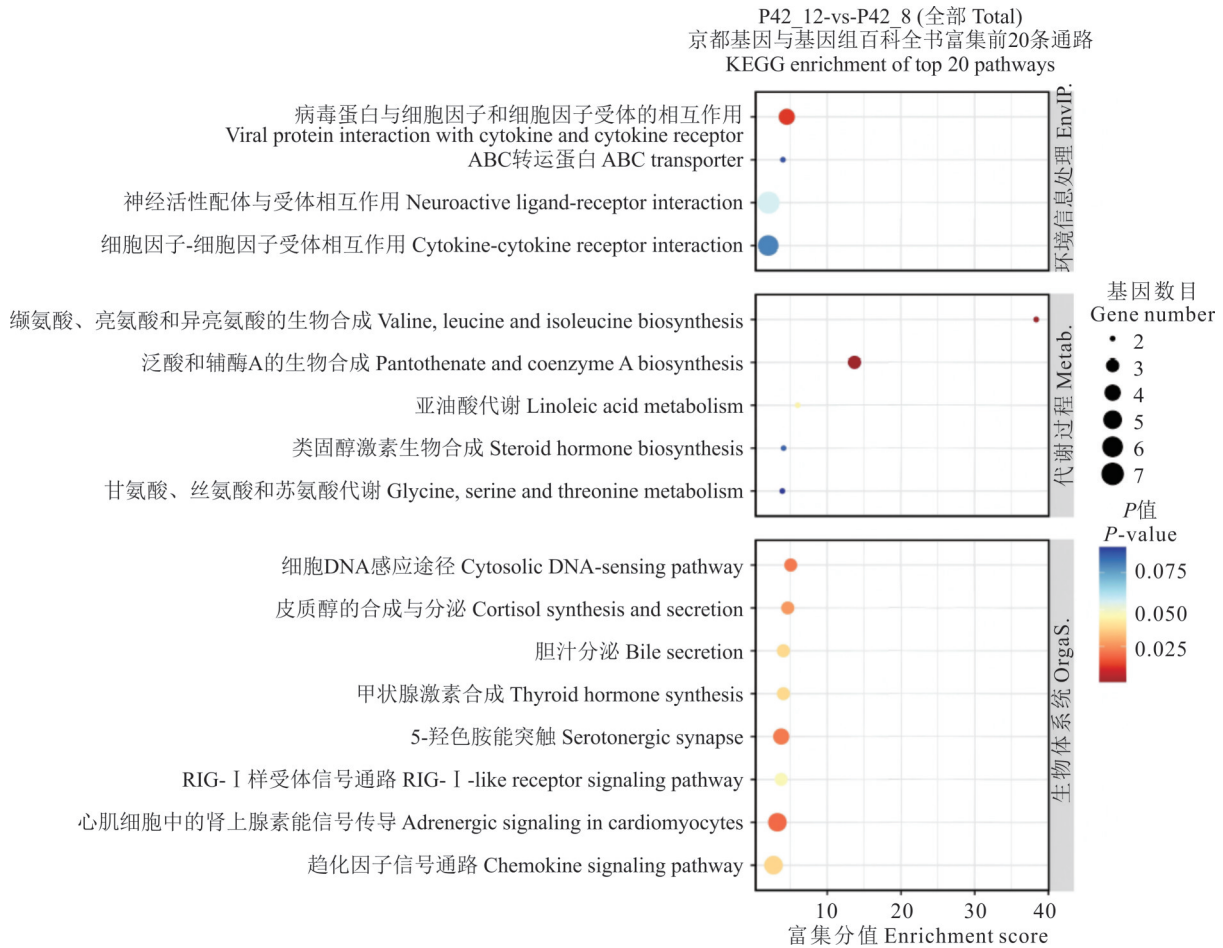


图 3 脾脏差异表达基因京都基因与基因组百科全书气泡图

Fig. 3 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) bubble diagram of differentially expressed genes in the spleen

EnvIP.: Environmental information processing; Metab.: Metabolism process; OrgaS.: Organismal systems. 下同 The same below.

表 4 代乳粉饲喂量对牦牛犊牛脾脏京都基因与基因组百科全书通路以及相关差异表达基因的影响

Table 4 Effect of milk replacer feeding allowance on spleen Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways and associated differential expressed genes of yak calves

KEGG 通路名称 KEGG pathway name	N _{DEG}	主要差异表达基因名称 Name of major differentially expressed genes	调控 Regulation
病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用 Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	3	<i>CXCL14, CXCL11, CXCL9</i>	上调 Up
细胞DNA感应途径 Cytosolic DNA-sensing pathway	3	<i>DDX58, ZBP1, CGAS</i>	下调 Down
趋化因子信号通路 Chemokine signaling pathway	4	<i>CXCL14, CXCL11, CXCL9</i> 腺苷酸环化酶8 Adenylate cyclase 8 (<i>ADCY8</i>)	上调 Up 下调 Down
RIG- I 样受体信号通路 RIG- I -like receptor signaling pathway	3	<i>DDX58, 干扰素刺激基因 15 Interferon-stimulated gene 15 (ISG15)</i>	下调 Down

N_{DEG}: 差异表达基因数 Number of differentially expressed genes. 下同 The same below.

KEGG 富集分析(表 5)揭示,dH 组显著激活了免疫防御网络,包括由 Toll 和 Imd 信号通路介导的天然免疫、抗原处理和表达,并同时启动了细胞色素 P450 介导的外源物质代谢反应。

2.2.4 实时荧光定量 PCR 验证结果 从 dC 与 dH 组的胸腺组织中随机选择 6 个差异表达基因,进行实时荧光定量 PCR 测定,结果显示与转录组定量结果的显著性及趋势一致,说明转录组数据准确性较高(图 8)。

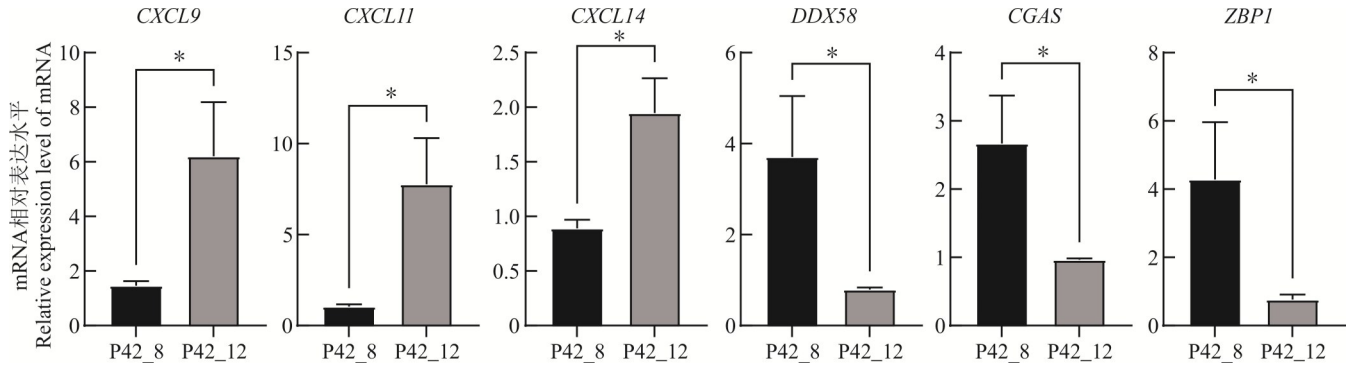


图4 实时荧光定量PCR验证差异基因表达水平

Fig. 4 Differential mRNA expression level by qRT-PCR validation

代表两组数据存在显著差异 ($P < 0.05$)。下同。 indicates a significant difference between two sets of data ($P < 0.05$). The same below.

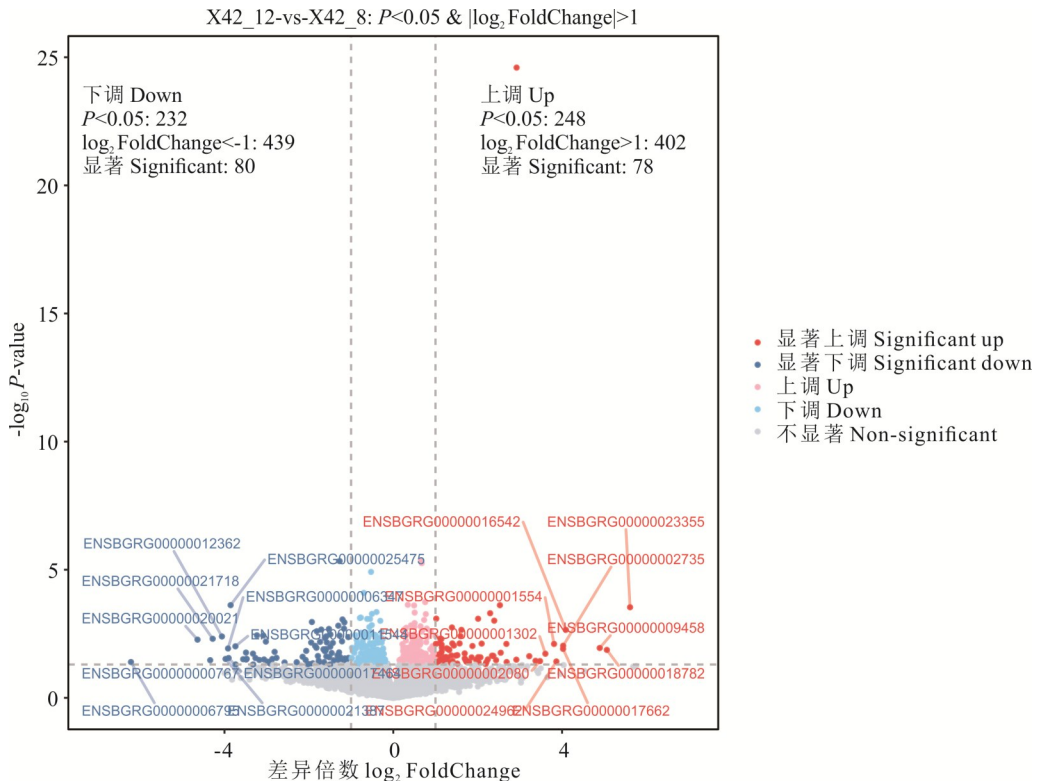


图5 胸腺差异基因火山图

Fig. 5 Volcano plot of differentially expressed genes in the thymus

X42_12: dH组胸腺 Thymus sample from the dH group; X42_8: dC组胸腺 Thymus sample from the dC group. 下同 The same below.

3 讨论

3.1 转录组学分析代乳粉饲喂量对牦牛犊牛脾脏功能的影响

脾脏是动物体内最大的外周免疫器官,在哺乳动物的生长过程中起着重要的免疫作用^[18-19],脾脏主要由骨髓、红髓和边缘区构成,各部分在免疫应答中扮演着不同的角色。脾脏不仅是一个免疫应答的重要场所,还具有过滤血液、清除衰老红细胞和病原体的功能,起到免疫防御的作用^[20]。转录组结果显示脾脏的差异表达基因主要参与了免疫调控相关通路。脾脏中差异表达基因富集的和免疫相关的通路有病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、细胞DNA感应途径、趋化因子信号通路、RIG- I 样受体信号通路等。在病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用通路中,与dC组相比,dH组的 *CXCL14*、*CXCL11*、*CXCL9* 显著上调;在细胞DNA感应

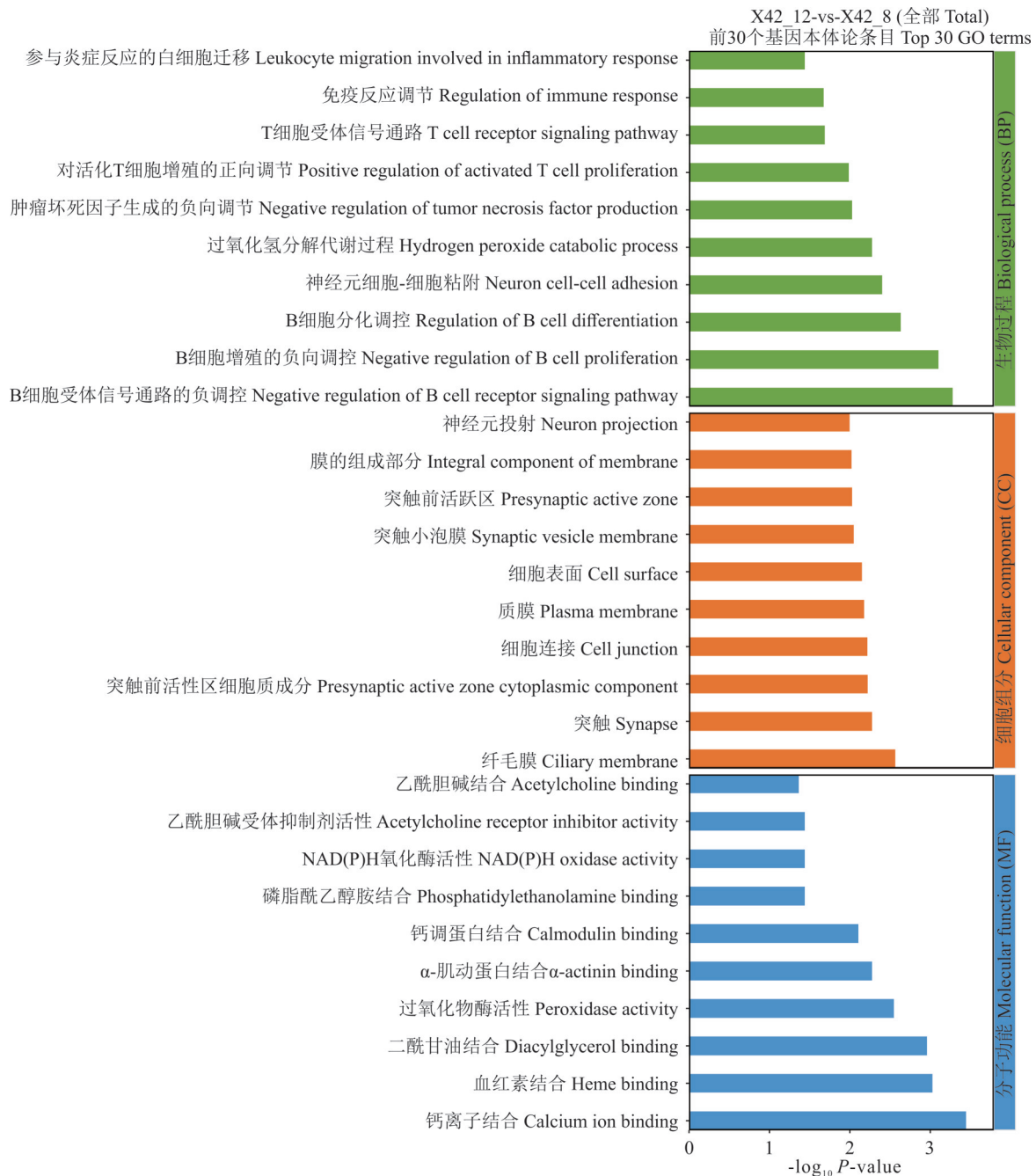


图 6 胸腺差异表达基因的基因本体论富集分析

Fig. 6 Gene ontology (Go) enrichment analysis of differentially expressed genes in the thymus

途径通路中,与dC组相比,dH组的 *DDX58*、*ZBP1*、*CGAS* 显著下调;在趋化因子信号通路中,与dC组相比,dH组的 *CXCL14*、*CXCL11*、*CXCL9* 显著上调,*ADCY8* 显著下调;在 RIG- I 样受体信号通路中,与dC组相比,dH组的 *DDX58*、*DHX58*、*ISG15* 显著下调。

病毒蛋白与细胞因子及其受体的相互作用在病毒感染和免疫反应中起着关键作用。病毒蛋白可通过结合细胞因子阻止其与受体结合,抑制免疫反应,还可调节细胞因子的产生,影响炎症反应。Zheng 等^[19]发现与普通牛相比,牦牛脾脏内免疫相关基因 *CXCL14* 表达上调有助于提高牦牛的抗病能力。Han 等^[21]发现 *CXCL11* 是可驱动肿瘤中免疫细胞归巢的枢纽基因,促进免疫细胞分化。*CXCL11* 等趋化因子基因可促进免疫细胞向肿瘤部位定向迁移,提高肿瘤浸润性淋巴细胞的数量,增强局部免疫反应^[22]。*CXCL9* 的表达提示单核细胞从外周向组织迁移,激活炎症反应^[23]。在病毒蛋白与细胞因子受体的相互作用通路中,高代乳粉饲喂量组牦牛犊牛的

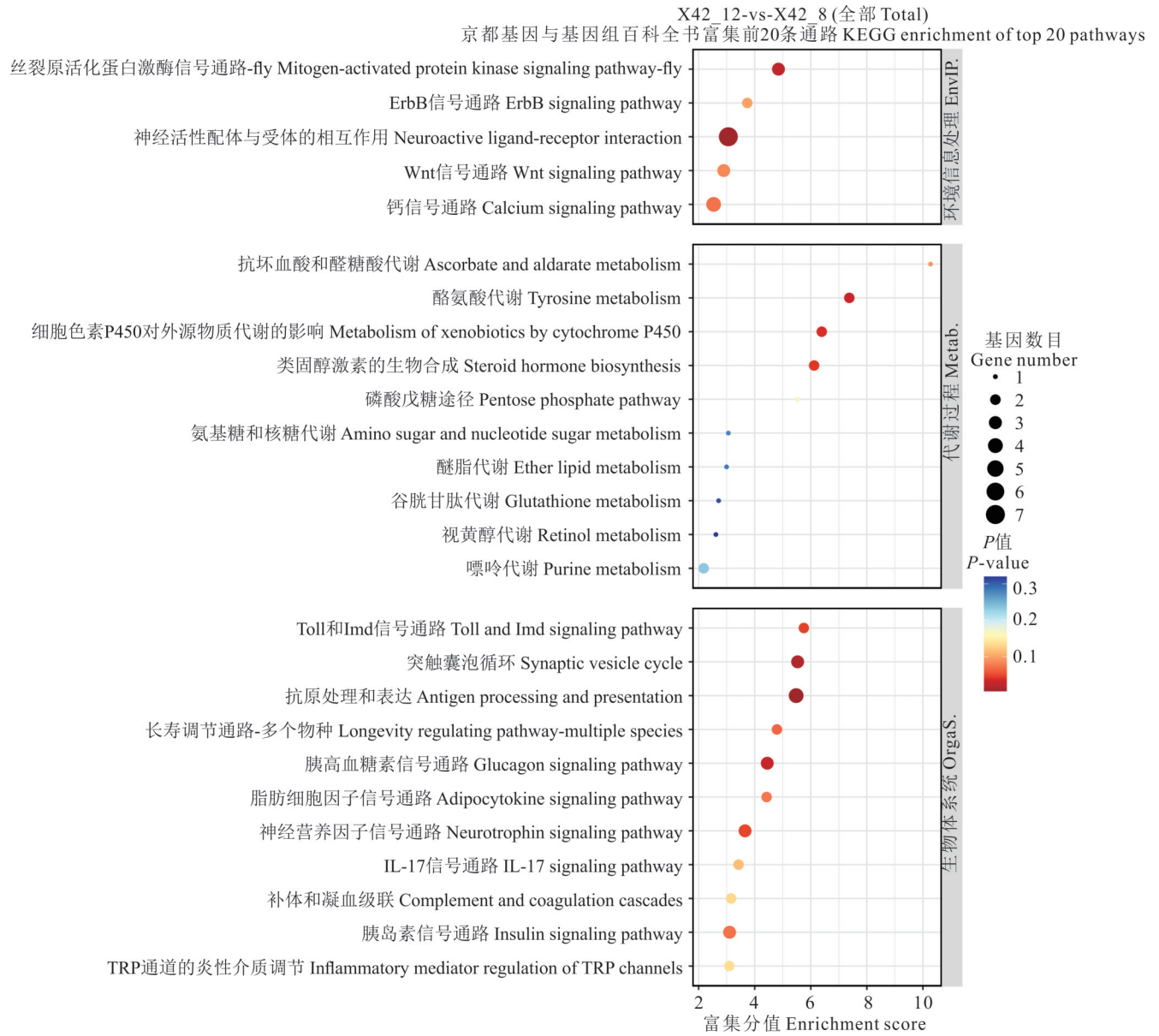


图7 胸腺差异表达基因京都基因与基因组百科全书气泡图

Fig. 7 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) bubble diagram of differentially expressed genes in the thymus

表5 代乳粉饲喂量对牦牛犊牛胸腺京都基因与基因组百科全书通路以及相关差异表达基因的影响

Table 5 Effect of milk replacer feeding allowance on thymus Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways and associated differential expressed genes of yak calves

KEGG 通路名称 KEGG pathway name	N _{DEG}	主要差异表达基因名称 Name of major differentially expressed genes	调控 Regulation
抗原处理和表达 Antigen processing and presentation	4	热休克蛋白家族 A (Hsp70) 成员 6 和 1A Heat shock protein family A (Hsp70) member 6 and 1A (<i>HSPA6</i> , <i>HSPA1A</i>), 杀伤细胞凝集素样受体 C1 Killer cell lectin like receptor C1 (<i>KLRC1</i>) T 细胞受体 α 可变区基因 8-3 T cell receptor alpha variable gene 8-3 (<i>TRAV8-3</i>)	上调 Up 下调 Down
细胞色素 P450 对外源物质代谢的影响 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	2	细胞色素 P450 家族 2 亚家族 F 成员 3 Cytochrome P450 family 2 subfamily F member 3 (<i>CYP2F3</i>), 谷胱甘肽 S-转移酶 Alpha 1 Glutathione S-transferase alpha 1 (<i>GSTA1</i>)	上调 Up
Toll 和 Imd 信号通路 Toll and Imd signaling pathway	2	丝裂原活化蛋白激酶 10 Mitogen-activated protein kinase 10 (<i>MAPK10</i>) 双氧化酶 1 Dual oxidase 1 (<i>DUOX1</i>)	上调 Up 下调 Down

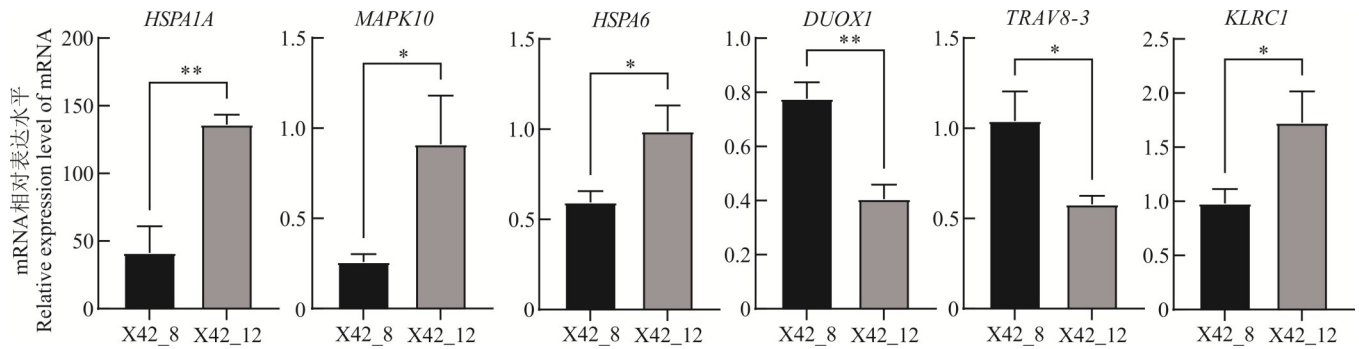


图 8 实时荧光定量 PCR 验证差异基因表达水平

Fig. 8 Differential mRNA expression level by qRT-PCR validation

**代表两组数据存在极显著差异 ($P < 0.01$)。* indicates a significant difference between two sets of data ($P < 0.01$)。*

CXCL14、*CXCL11* 和 *CXCL9* 显著上调,这些趋化因子在抗病毒免疫中发挥关键作用,其中 *CXCL14* 可增强牦牛对病原体的清除能力,而 *CXCL11* 和 *CXCL9* 能促进免疫细胞向感染部位迁移。本研究结果显示,高代乳粉饲喂可能通过上调这些趋化因子基因的表达,增强牦牛犊牛脾脏对病毒感染的防御能力。

细胞 DNA 感应途径是细胞识别和响应 DNA 损伤或异常 DNA 存在的重要机制。*DDX58* 基因是先天免疫系统中关键的细胞质模式识别受体,主要识别病毒 RNA 并启动抗病毒免疫应答,其不仅能够识别 RNA 病毒,还在某些 DNA 病毒感染中发挥重要作用^[24-26]。*ZBP1* 是一种感知核酸并激活泛凋亡和炎症的先天免疫受体^[27],*ZBP1* 可以诱导细胞凋亡和坏死性凋亡,帮助清除受感染的细胞,还可以激活炎症小体,促进炎症因子的释放^[28]。趋化因子信号通路是细胞对外部趋化因子刺激的响应机制,主要调控细胞的迁移、增殖、存活和分化等过程^[29]。趋化因子通过与细胞表面的趋化因子受体结合,激活下游信号通路,从而引导细胞定向迁移^[30]。在细胞 DNA 感应途径中,高代乳粉饲喂量组的 *DDX58*、*ZBP1* 和 *CGAS* 显著下调,这些基因编码的蛋白可识别病毒核酸并激活炎症反应,其下调可能意味着高代乳粉组犊牛的脾脏在稳态降低了过度免疫激活的风险,但在病原体入侵时仍能通过其他途径(如 RIG-I 样受体通路)维持免疫监视功能。而趋化因子信号通路中,除 *CXCL* 家族基因上调外,*ADCY8*(腺苷酸环化酶 8)显著下调,该基因参与调控免疫细胞的迁移和活化,其表达降低可能影响细胞内 cAMP 的水平,进而优化免疫细胞的趋化效率。

RIG-I 样受体信号通路是先天免疫系统中识别病毒 RNA 并触发抗病毒反应的关键途径,通过识别病毒 RNA,刺激干扰素和炎症因子的分泌,进而触发宿主的抗病毒防御机制^[31]。高代乳粉饲喂量组的牦牛犊牛在 RIG-I 样受体信号通路中,*DDX58*、*DHX58* 和 *ISG15* 均下调,这一结果与细胞 DNA 感应途径的变化一致,提示高代乳粉饲喂可能通过精细调控先天免疫传感器的活性,避免过度炎症反应,同时维持基础抗病毒能力。

在本试验中,dH 组牦牛犊牛脾脏中 *CXCL14*、*CXCL11*、*CXCL9* 显著上调;*DDX58*、*ZBP1*、*CGAS*、*ADCY8*、*DHX58*、*ISG15* 显著下调影响了细胞因子与病毒蛋白的结合,改变了免疫因子的迁移方向,有效清除脾脏组织内的病原体,增强了脾脏的抗病能力。

3.2 转录组学分析代乳粉饲喂量对牦牛犊牛胸腺功能的影响

胸腺是机体重要的中枢免疫器官,主要负责 T 淋巴细胞的分化、发育和成熟。造血干细胞在骨髓特定的微环境中,通过一系列精确的分子调控分化为淋巴样干细胞。这些细胞表达特定的归巢受体,通过血液循环转移至胸腺。转录组结果显示胸腺的差异表达基因主要参与了免疫调控相关通路。胸腺中差异表达基因富集的和免疫相关的通路有抗原处理和表达、细胞色素 P450 对外源物质代谢的影响、Toll 和 Imd 信号通路等。在抗原处理和表达通路中,与 dC 组相比,dH 组的 *HSPA6*、*HSPA1A*、*KLRC1* 显著上调,*TRAV8-3* 显著下调;在细胞色素 P450 对外源物质代谢的影响通路中,与 dC 组相比,dH 组的 *CYP2F3*、*GSTA1* 显著上调;在 Toll 和 Imd 信号通路中,与 dC 组相比,dH 组的 *MAPK10* 显著上调,*DUOX1* 显著下调。

抗原处理和表达通路是免疫系统中的关键过程,主要涉及抗原呈递细胞如树突状细胞、巨噬细胞和 B 细胞,

这些细胞通过捕获、加工抗原并将其呈递给 T 细胞,激活适应性免疫应答^[32]。抗原呈递细胞通过吞噬、胞饮或受体介导的内吞作用捕获外源抗原,捕获的抗原在细胞内被降解为小肽片段,内源性抗原在胞质中被蛋白酶降解,肽段通过 TAP 转运蛋白进入内质网,与 MHC I 类分子结合的内源性抗原肽呈递给 CD8+T 细胞,激活细胞毒性 T 细胞;外源性抗原在内吞体或溶酶体中被酶降解,与 MHC II 类分子在内质网中结合的外源性抗原肽呈递给 CD4+T 细胞,激活辅助性 T 细胞^[33]。CD8+T 细胞分化为细胞毒性 T 细胞,直接杀伤感染细胞^[34];CD4+T 细胞分化为辅助性 T 细胞,分泌细胞因子,调节免疫反应^[35]。激活的 T 细胞引发一系列免疫反应,包括细胞免疫和体液免疫,最终清除病原体或异常细胞。*HSPA6*、*HSPA1A* 是热休克蛋白相关基因,*HSPA6* 的分子伴侣功能依赖于其腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的结合与水解活性,通过腺嘌呤核苷三磷酸—腺嘌呤核苷二磷酸(adenosine triphosphate-adenosine diphosphate, ATP-ADP)转换循环引发的磷酸化修饰及构象重排,动态调控底物蛋白的结合与释放过程^[36]。孔凡升^[37]在探索 *HSPA1A*、*HSPA1B* 和 *HSPA6* 的功能时发现这些基因在细胞应答中,尤其是在免疫反应、激素调节以及细胞信号传递中起着关键作用。高擎^[38]发现 *KLRC1* 基因在组织中的表达升高可用于激活记忆细胞的增殖和免疫功能的活化。在抗原处理和表达通路中,高代乳粉饲喂量组的 *HSPA6*、*HSPA1A* 和 *KLRC1* 显著上调,而 *TRAV8-3* 下调。其中,热休克蛋白(*HSPA6*、*HSPA1A*)可促进抗原肽的折叠与递呈,而 *KLRC1* 的上调可能增强胸腺中 NK 细胞的免疫监视功能。*TRAV8-3* 的下调则可能影响特定 T 细胞克隆的发育,暗示高代乳粉饲喂优化了胸腺 T 细胞受体库的多样性。

细胞色素 P450 对外源物质代谢的影响主要反映在氧化还原反应上,P450 的代谢产物通常与葡萄糖醛酸、硫酸、谷胱甘肽等结合,代谢某些外源物质时,可能生成活性或毒性代谢物,与细胞大分子结合,导致细胞损伤或突变^[39]。细胞色素 P450 代谢通路中,*CYP2F3* 和 *GSTA1* 的上调可能增强胸腺对外源物质(如代乳粉中的功能性成分)的代谢能力,减少毒性中间产物的积累,从而保护胸腺微环境的稳定性。

Toll 和 Imd 信号通路是两条重要的先天免疫通路,负责识别和抵御病原体感染^[40]。Toll 通路主要参与抗真菌和革兰氏阳性菌的免疫反应,Imd 通路主要参与抗革兰氏阴性菌的免疫反应,调控抗菌肽的产生和免疫相关基因的表达,在维持宿主—微生物稳态中起重要作用^[41-43]。Toll/Imd 信号通路中,高代乳粉饲喂量组 *MAPK10* 的上调和 *DUOX1* 的下调共同作用,可能通过抑制过度氧化应激,维持牦牛犊牛胸腺上皮细胞的稳态,促进 T 细胞的正常发育。

在本试验中,dH 组牦牛犊牛胸腺中 *HSPA6*、*HSPA1A*、*KLRC1*、*CYP2F3*、*GSTA1*、*MAPK10* 显著上调,*TRAV8-3*、*DUOX1* 显著下调使得与免疫相关的通路发生变化,对胸腺的发育起到了正向的调控作用,提高了胸腺的免疫力。

4 结论

相较于低代乳粉饲喂量,高代乳粉饲喂量显著促进了牦牛犊牛脾脏的生长发育,转录组学结果表明代乳粉饲喂量的提高影响细胞因子与病毒蛋白的结合,改变免疫因子的迁移方向,优化抗原呈递细胞的加工和表达功能,调控关键免疫信号通路的激活水平,进而提高了犊牛的免疫能力。

5 数据可用性声明

本篇论文的关联数据为不宜共享的数据,可依据合理理由从作者处获取,作者联系方式:yanan_zhou0312@163.com。

参考文献 References:

- [1] Han S M, Chen X, Ma L, *et al.* Spleen-brain axis role in neuropathic pain: research progress. *Progress in Modern Biomedicine*, 2025, 25(3): 590—600.
韩守孟,陈欣,马莉,等.脾脑轴在神经病理性疼痛中作用机制的研究进展. *现代生物医学进展*, 2025, 25(3): 590—600.
- [2] Fujiyama S, Nakahashi-Oda C, Abe F, *et al.* Identification and isolation of splenic tissue-resident macrophage sub-populations by flow cytometry. *International Immunology*, 2019, 31(1): 51—56.

- [3] Yu Z Y, Chen D W, Tan C R, *et al.* Physiological clearance of A β by spleen and splenectomy aggravates Alzheimer-type pathogenesis. *Aging Cell*, 2022, 21(1): e13533.
- [4] Xun Y, Yang H, Kaminska B, *et al.* Toll-like receptors and toll-like receptor-targeted immunotherapy against glioma. *Journal of Hematology and Oncology*, 2021, 14(1): 176.
- [5] Cunningham N, Lapointe R, Lerouge S. Biomaterials for enhanced immunotherapy. *Applied Bioengineering*, 2022, 6(4): 123–124.
- [6] Zhang D, Huang X Q, Wang Z H. The effects of *Pseudotsuga chinensis* on growth performance, immune function and slaughtering performance of meat rabbit. *Chinese Journal of Animal Science*, 2020, 56(10): 123–126.
张代, 黄修奇, 王中华. 泡桐花对肉兔生长性能、免疫功能及屠宰性能的影响. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(10): 123–126.
- [7] Cepeda S, Griffith A V. Thymic stromal cells: roles in atrophy and age-associated dysfunction of the thymus. *Experimental Gerontology*, 2018, 105(S1): 113–117.
- [8] Li L L, Zhang L J, Zhao Y. Developmental regulation of thymus organogenesis. *Laboratory Animal Science*, 2010, 27(3): 50–54.
李兰兰, 张连军, 赵勇. 哺乳动物胸腺器官发育及调控. *实验动物科学*, 2010, 27(3): 50–54.
- [9] Merkenschlager J, Eksmond U, Danelli L, *et al.* MHC class II cell-autonomously regulates self-renewal and differentiation of normal and malignant B cells. *Blood*, 2019, 133(10): 1108–1118.
- [10] Xiong M L, Li G M. Effects of baby meals with different vegetable protein levels on organs of lamb thymus gland and spleen. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 65(6): 83–85.
熊忙利, 李光芒. 不同植物蛋白水平的代乳粉对羔羊胸腺和脾脏组织器官的影响. *陕西农业科学*, 2019, 65(6): 83–85.
- [11] Li Z. Effects of compound probiotics on growth performance and intestinal health of lactating calves. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020.
李政. 复合益生菌对哺乳期犊牛生长性能和肠道健康的影响. 广州: 华南农业大学, 2020.
- [12] Zhu S R. Exploration and mechanism study of biomarkers related to feed efficiency in large white pigs. Nanning: Guangxi University, 2023.
朱思燃. 大白猪饲料利用率相关生物标记的挖掘及其机制研究. 南宁: 广西大学, 2023.
- [13] Van Vaerenbergh I, Fatemi H M, Blockeel C, *et al.* Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reproductive Biomedicine Online*, 2011, 22(3): 263–271.
- [14] Labarta E, Martinez-Conejero J A, Alama P, *et al.* Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Human Reproduction*, 2011, 26(7): 1813–1825.
- [15] Wang M X, Shao X G. Increased level of progesterone on the day of HCG to the disadvantage of IVF outcomes. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning*, 2016, 35(2): 142–145, 150.
王美仙, 邵小光. 人绒毛膜促性腺激素日孕酮升高对体外受精的影响. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2016, 35(2): 142–145, 150.
- [16] Dong J J. Effects of yeast polysaccharide on growth performance and gastrointestinal development of pre-weaning calves. Baoding: Hebei Agricultural University, 2018.
董金金. 酵母多糖对哺乳犊牛生长性能及胃肠道发育的影响. 保定: 河北农业大学, 2018.
- [17] Bustin S A, Benes V, Garson J A, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611–622.
- [18] El-naseery N I, Mousa H S E, Noreldin A E, *et al.* Aging-associated immunosenescence via alterations in splenic immune cell populations in rat. *Life Sciences*, 2020, 241: 117168.
- [19] Zheng Y, Guan J Q, Wang X L, *et al.* Comparative proteomic analysis of spleen reveals key immune-related proteins in the yak (*Bos grunniens*) at different growth stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D-Genomics & Proteomics*, 2022, 42: 100968.
- [20] Li C, He M C, Shu Y S, *et al.* Effect of supplementary Sijunzi decoction on serum cytokine levels, intestinal immunoglobulin levels and spleen tissue morphology and function in Spleen-Qi deficiency canines. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2019, 54(2): 17–25.
李成, 贺濛初, 舒迎霜, 等. 加味四君子汤对脾气虚犬血清细胞因子水平、肠道免疫球蛋白水平以及脾脏组织形态及功能的影响. *甘肃农业大学学报*, 2019, 54(2): 17–25.

- [21] Han J P, Zhou Y, Zhang C D, *et al.* Intratumoral immune heterogeneity of prostate cancer characterized by typing and hub genes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2023, 27(1): 101–112.
- [22] Gao Q, Xun J, Wang X M, *et al.* Application of oncolytic adenoviruses and their immunotherapies in tumor immunotherapy. *Chinese Journal of Immunology*, 2025: 1–18. <https://link.cnki.net/urlid/22.1126.R.20250313.1612.010>.
高琪, 荀敬, 王西墨, 等. 溶瘤腺病毒及其免疫疗法在肿瘤治疗中的应用. *中国免疫学杂志*, 2025: 1–18. <https://link.cnki.net/urlid/22.1126.R.20250313.1612.010>.
- [23] Liu G C. Multi-omics analysis of the pathogenic mechanism of immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. Beijing: Peking Union Medical College, 2024.
刘光成. 基于临床多组学探究免疫检查点抑制剂相关心肌炎的致病机制研究. 北京: 北京协和医学院, 2024.
- [24] Thoresen D, Wang W S, Galls D, *et al.* The molecular mechanism of RIG-I activation and signaling. *Immunological Reviews*, 2021, 304(1): 154–168.
- [25] Liu X, Ma Y J, Voss K, *et al.* The herpesvirus accessory protein γ 134.5 facilitates viral replication by disabling mitochondrial translocation of RIG-I. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(3): e1009446.
- [26] Suresh M, Li B, Murreddu M G, *et al.* Involvement of innate immune receptors in the resolution of acute hepatitis B in woodchucks. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 713420.
- [27] Malireddi R K S, Kesavardhana S, Kanneganti T D. ZBP1 and TAK1: master regulators of NLRP3 inflammasome/pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PAN-optosis). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 406.
- [28] Tang L L. Study on the mechanism of PANoptosis induced by newcastle disease virus. Yangzhou: Yangzhou University, 2024.
唐兰兰. 新城疫病毒诱导细胞泛凋亡的机制研究. 扬州: 扬州大学, 2024.
- [29] Sun G H. Duffy antigen receptor for chemokines(DARC) and cytoskeletal protein fascin expression in laryngeal squamous cell carcinoma and its significance. Shanghai: Fudan University, 2009.
孙国华. Duffy抗原趋化因子受体(DARC)及细胞骨架蛋白Fascin在喉癌中表达及其临床意义. 上海: 复旦大学, 2009.
- [30] Li H M, Xing T, Wei G J, *et al.* Research progress of the role of PI3K/Akt signaling pathway in rheumatoid rthritis. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2024, 30(7): 1060–1066.
李辉明, 邢涛, 魏国俊, 等. PI3K/Akt信号通路在类风湿关节炎中的作用研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30(7): 1060–1066.
- [31] Wei X L. A high-throughput screening method for genes associated with reprogramming by *piggyBac* gene trap system. Beijing: China Agricultural University, 2014.
魏兴林. 基于 *piggyBac* 基因抓捕体系的重编程相关基因的高通量筛选. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [32] Jensen P. Mechanisms of antigen presentation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1999, 37(3): 179–186.
- [33] Zhou D, Blum J S. Presentation of cytosolic antigens via MHC class II molecules. *Immunologic Research*, 2004, 30(3): 279–290.
- [34] Zhu Y, Zhou J G, Lu W F, *et al.* Pathogenic bactepria, drug resistance and T lymphocyte subsets for hospital-associated infection in non-small cell lung cancer patients treated with radio-chemotherapy. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2025, 35(7): 966–970.
朱跃, 周建国, 卢文芬, 等. 非小细胞肺癌放疗患者医院感染病原菌与耐药性及T淋巴细胞亚群变化. *中华医院感染学杂志*, 2025, 35(7): 966–970.
- [35] Zhu S J, Zhao Z Q, Zu X R, *et al.* Research progress of lymphocyte to monocyte ratio and stress hyperglycemia ratio in ischemic stroke. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2025, 28(4): 524–528.
朱素洁, 赵志琴, 祖孝荣, 等. 淋巴与单核细胞比值和应激性高血糖比值在缺血性脑卒中的研究进展. *中国实用神经疾病杂志*, 2025, 28(4): 524–528.
- [36] Qu N. The research on ATP-ADP exchange activity and molecular chaperone activity of Hsp70. Xiamen: Xiamen University, 2007.
曲宁. 热休克蛋白Hsp70 ATP-ADP转换活性及分子伴侣功能研究. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [37] Kong F S. A-to-I RNA editing analysis and its regulatory mechanism in polycystic ovary syndrome. Wuxi: Jiangnan University, 2024.
孔凡升. 多囊卵巢综合征A-to-I RNA编辑分析及其调控机制初探. 无锡: 江南大学, 2024.
- [38] Gao Q. Exploration and difference study of local and systemic immunity in takayasu arteritis. Beijing: Peking Union Medical College, 2022.

- 高擎. 大动脉炎患者局部免疫与循环免疫的初步探索及差异性研究. 北京: 北京协和医学院, 2022.
- [39] Velazquez M N R, Parween S, Udhane S S, *et al.* Variability in human drug metabolizing cytochrome P450 CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 activities caused by genetic variations in cytochrome P450 oxidoreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 515(1): 133–138.
- [40] Orus-Alcalde A, Borve A, Hejnol A. The localization of Toll and Imd pathway and complement system components and their response to *Vibrio* infection in the nemertean *Lineus ruber*. *BMC Biology*, 2023, 21(1): 7.
- [41] Duneau D F, Kondolf H C, Im J H, *et al.* The Toll pathway underlies host sexual dimorphism in resistance to both gram-negative and gram-positive bacteria in mated *Drosophila*. *BMC Biology*, 2017, 15(1): 124.
- [42] Zhai Z Z, Huang X S, Yin Y L. Beyond immunity: The Imd pathway as a coordinator of host defense, organismal physiology and behavior. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 83(SI): 51–59.
- [43] Aittomäki S, Valanne S, Lehtinen T, *et al.* Proprotein convertase *Furin1* expression in the *Drosophila* fat body is essential for a normal antimicrobial peptide response and bacterial host defense. *FASEB Journal*, 2017, 31(11): 4770–4782.