

冷应激引起鸡下丘脑基因表达谱差异分析

陈兴勇 李丽 姜润深 耿照玉*

(安徽农业大学 动物科技学院,合肥 230036)

摘要 为研究冷应激发生机制以及冷应激过程中下丘脑神经内分泌系统基因表达变化,选取 28 日龄淮南麻黄鸡为研究对象,采用全基因组表达谱芯片技术分析冷应激 24 h 后下丘脑组织差异表达基因。通过比较淮南麻黄鸡冷应激 24 h 前后下丘脑组织基因表达谱,表达倍数 > 3 倍的基因共 877 个,其中下调基因 334 个,主要涉及 *HAAO*、*CHRNA9* 及 *STAM2* 等信号转导接头分子基因的低表达;上调基因 543 个,主要为 *CCK*、*NPY* 及其受体基因、*CAMK2A*、*SST* 及 *TRH* 等基因。对差异表达基因参与的生物学过程分析可见,在冷应激 24 h 过程中,鸡下丘脑首先启动神经受体-配体相互作用,刺激鸡体产生采食欲望,随后启动脂质代谢途径以供应机体能量需求。在此过程中,*Jak-STAT*、*Ca* 离子信号通路等一系列生物反应途径发生响应,以调节机体对寒冷应激的反应。差异表达基因的生物学通路分析为阐明鸡冷应激机理提供重要信息,差异表达基因分析有助于抗冷应激分子育种候选基因筛选。

关键词 淮南麻黄鸡; 冷应激; 下丘脑; 基因表达谱

中图分类号 S 831.1

文章编号 1007-4333(2013)02-0142-05

文献标志码 A

Identification of differentially expressed genes in hypothalamus of chicken during cold stress

CHEN Xing-yong, LI Li, JIANG Run-shen, GENG Zhao-yu*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract In order to discover the mechanism of cold stress and identify differentially expressed genes in hypothalamus during cold stress, Huainan partridge chickens with 28 days, the Chinese indigenous breed, were selected for 24 hours cold stress and then hypothalamus was isolated and labeled by reverse transcription reaction for cDNA. The labeled cDNA was hybridized with cDNA microarray for scanning and image processing. The different gene expression profiling of hypothalamus was investigated from Huainan partridge chicken including 334 down-regulated genes and 543 up-regulated genes. As for these differentially regulated genes, *HAAO*, *CHRNA9* and *STAM2*, etc., which were involved in carbohydrate metabolism enzymes and signal transduction adapter, were significantly down-regulated, while genes like *CCK*, *NPY* and its receptor, *CAMK2A*, *SST* and *TRH* were significantly up-regulated. Through pathway analysis using Gene Ontology (GO), and the Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomics (KEGG), during 24 hours cold stress, the neuroactive ligand-receptor interaction was firstly initiated in chickens for stimulation of central nerves for feed intake. Adipocytokine signaling pathway was also in high activation for supplementation of body energy. *Jak-STAT*, Ca^{2+} signaling pathway and other biological reactions were also initiated in response to cold stress. The biological pathway analysis for cold stress would provide important information for clarifying the mechanism of cold stress and the differentially expressed genes would give much help for screening of candidate genes in breeding of cold stress resistant species.

Key words Huainan partridge chicken; cold stress; hypothalamus; gene expression

收稿日期: 2012-07-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31101710)

第一作者: 陈兴勇, 讲师, 博士研究生, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: chenxingyong@ahau.edu.cn

通讯作者: 耿照玉, 教授, 主要从事家禽遗传育种与生产研究, E-mail: gzy@ahau.edu.cn

研究冷应激发生机制,冷应激过程中神经-内分泌变化规律及其基因表达,对于确定家禽冷应激水平指标具有指导意义。此外,冷应激过程中基因表达变化规律的研究对于阐明冷应激的发生机制,发现各品种间在冷应激时的基因表达变化差异,从而研制出克服冷应激的方法等均具有重要意义。当环境温度降至 4 ℃ 及以下时,即引起家禽发生冷应激反应,冷应激可导致家禽免疫功能^[1-3]及神经内分泌活动^[4-6]改变。研究认为,冷应激促使交感神经和肾上腺髓质活动加强,使血液中肾上腺素和去甲肾上腺素水平升高,并引起下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统反应,进而引发一系列生理和病理反应^[7]。冷应激的不利影响是制约畜牧业发展的主要因素之一,2002 年内蒙古东部大部分地区遭受雪灾,据不完全统计,全区受灾牲畜 232 219 万头,因灾死亡牲畜 3 814 万头,大量母畜因灾流产,造成许多死胎;2008 年元月 10 日起,持续的冰雪灾害使上海、浙江、江苏和安徽等南方十多个省市家禽业受到很大影响,据统计,家禽因灾死亡 1 955 万只;倒塌禽舍总面积 700 万 m²,畜牧业累计直接经济损失达 16.8 亿元,家禽所占的直接经济损失达 10 亿;极低的环境温度加上冰雪灾,给我国畜牧业造成了严重的经济损失。因此,研究人员提出,为有效地降低冷应激给家禽养殖带来的损失,培育耐寒品种或品系显得尤为重要^[8]。本研究利用鸡全基因表达谱芯片技术,研究地方鸡种在冷应激前后差异表达基因,旨在为进一步阐释家禽冷应激基因变化规律及家禽抗低温品种或品系的选育提供候选基因。

1 材料与方 法

1.1 试验鸡群

试验 300 只 28 日龄健康淮南麻黄鸡公鸡,设对照组和试验组各 150 只,每组各 3 个重复,每个重复 50 只,分别饲养于 6 个小间内。对照组 3 个重复饲养舍温度控制在 24~26 ℃,自由采食和饮水;试验组 3 个重复饲养舍温度控制在(2±2) ℃(低温间),自由采食和饮水。3 个对照组鸡只一直饲养于 24~26 ℃ 的小间内;当试验组鸡在(2±2) ℃ 试验舍饲养达到 24 h 时,分别于对照组和试验组的 6 个饲养小间内各取 10 只鸡,立即处死后取下丘脑,置于 RNAlater 液中保存,用于 RNA 提取。

1.2 芯片及主要试剂

鸡基因表达谱芯片为 Chicken (V1) Gene

Expression Microarray, 4x44K, RNA 提取试剂盒购自 Agilent 公司(美国),One-step RNA PCR Kit、Neasy Micro Kit 购自 Qiagen 公司(德国),one-cycle cDNA Synthesis Kit、Cy3 NHS ester 购自 GE healthcare(英国),aaUTP 购自 Ambion(美国),Low RNA Input Linear Amplification Kit、Gene Expression Hybridization Kit、Gene Expression Wash Buffer Kit、Stabilization and Drying Solution、Gasket slide 和 Hybridization Chamber 购自 Agilent(美国)。引物由 Invitrogen 公司(美国)合成。

1.3 RNA 提取

保存的组织样经液氮研磨后,经 TRIzol (Invitrogen)法提取总 RNA。TRIzol 混合研磨样后离心并取上清,上清液进行 2 次氯仿抽提,RNA 沉淀用 75%乙醇洗涤 2 次。提取的 RNA 首先测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值以检测 RNA 浓度及纯度,再进行甲醛变性胶电泳检测完整性。

1.4 探针制备及杂交

随机抽取的 10 只鸡取下丘脑后提取总 RNA,定量后等量混合形成的 3 个重复样品再等量混合。总 RNA 经第一链和第二链合成得到 cRNA,aaUTP 标记 cRNA 链后,Qiagen RNeasy Mini kit 纯化荧光标记的 cRNA,按照 Gene Expression Hybridization kit 杂交,首先将 cRNA 进行片段化,作为探针与芯片进行杂交(3 个重复进行 3 次生物学重复),最后依次洗脱芯片并染色。

1.5 数据分析

芯片扫描采用 Agilent G2565BA microarray scanner 进行,分辨率为 5 μm,扫描仪自动以 100% 和 10%PMT 各扫描 1 次,以 Agilent 自动合并 2 次结果作为最终结果。应用 SBC Analysis System (SAS)软件进行数据分析。比较试验组和对照组芯片结果前,先将芯片所有探针组的信号进行均一化(Normalize)处理,处理后的数据用于计算 SLR 值。差异表达基因筛选严格按照如下标准:试验组与对照组间上调基因比值大于 3,下调基因对应比值小于 0.33。差异表达的基因进行 KEGG pathway 注释分析(*P* 阈值设为 0.05),寻找差异表达基因集中的生物学信号通路。

1.6 qRT-PCR 验证芯片结果

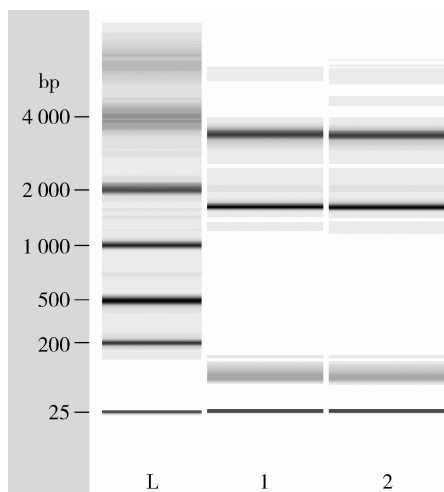
根据芯片分析结果,选取差异表达基因并设计引物。以对照组和试验组总 RNA 为模板,按照

one-step RNA PCR Kit 方法对芯片筛选结果进行 qRT-PCR 验证。采用相对定量法中的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算冷应激 24 h 后与冷应激前比较, 淮南麻黄鸡下丘脑组织中各基因 mRNA 相对表达量。

2 结果与分析

2.1 RNA 电泳及纯度检测

提取的 RNA 样品的 2100RIN 为 9.4, 28S/18S 值为 1.1, 纯度高。经甲醛变性胶电泳可见清晰的 28S、18S 及 5S 条带(图 1), 完整性好, 符合芯片检测的质控要求。



L. 标准分子量; 1. 冷应激 0 h 下丘脑 RNA; 2. 冷应激 24 h 下丘脑 RNA。

L. Marker standard ladder marker, 1. Hypothalamus RNA after 0 hour cold stress, 2. Hypothalamus RNA after 24 hour cold stress.

图 1 下丘脑总 RNA 样本电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from chicken hypothalamus

2.2 芯片分析

2.2.1 差异表达基因分析

冷应激 24 h 与冷应激前比较, 下丘脑差异表达基因共有 877 个, 其中表达上调的基因有 543 个, 主要有 *CCK*、*NPY* 基因及其受体基因、*CAMK2A*、*SST* 及 *TRH* 等基因; 表达下调基因有 334 个, 涉及编码肌球蛋白轻链的 *MYL9* 和肌球蛋白重链的 *MYH11* 基因, *HAAO*、*CHRNA9*(烟碱型受体) 及 *STAM2* 等信号转导接头分子基因(具体内容存于本课题组)。

2.2.2 差异表达基因聚类 GO 分析(Gene Ontology Annotation, GO)

以 $P < 0.05$ 为筛选依据, 差异表达的基因主要参与胞外区神经递质传递(GO 为 0005576)、神经细胞突触信号传递(GO 为 0045202; GO 为 0044456)、多细胞间信号传导(GO 为 0032501) 和生长发育(GO 为 0040007) 等生物学过程(图 1)。

2.2.3 差异表达基因的生物学信号通路分析

根据 P 值大小确定差异表达基因在信号通路中的集中趋势, P 值越小表示集中趋势越强。在阈值范围内差异表达基因最多的几条信号通路主要包括神经配体-受体互作通路、脂肪细胞因子信号通路、细胞因子与受体作用通路、*Jak-STAT* 信号通路、丁酸代谢通路、*Ca* 离子信号通路、黑色素通路、赖氨酸降解、色氨酸代谢、血管平滑肌收缩等信号通路(表 1)。(2±2) °C 下冷应激 24 h 与冷应激前比较, 鸡下丘脑差异表达基因 KEGG 通路分析可见, (2±2) °C 的冷应激启动神经信号传导起主要作用。(2±2) °C 冷应激激发 *CCK*、*NPY*、*NPY5R* 等基因表达上调 3.7~5.9 倍。

表 1 显著性差异表达基因 KEGG 通路分析结果

Table 1 KEGG pathway analysis with differentially expressed genes

KEGG 通路名称 KEGG pathway name	包含基因数量 Genes	P P value	包含主要基因 Genes involved
神经配体-受体互作通路 Neuroactive ligand-receptor interaction	28	0.000 0	<i>CCK</i> , <i>NPY</i> , <i>NPY5R</i> , etc
脂肪细胞因子信号转导通路 Adipocytokine signaling pathway	3	0.008 4	<i>AGRP</i> , <i>NPY</i> , <i>POMC</i>
细胞因子与其受体互作通路 Cytokine-cytokine receptor interaction	5	0.008 5	<i>GHI</i> , <i>IL10RA</i> , etc
<i>Jak-STAT</i> 信号通路 Jak-STAT signaling pathway	4	0.010 8	<i>EPO</i> , <i>STAM2</i> , <i>CytokineR</i>
丁酸酯代谢通路 Butanoate metabolism	2	0.017 1	<i>ACSM5</i> , <i>GADI</i>

续 表

KEGG 通路名称 KEGG pathway name	包含基因数量 Genes	<i>P</i> <i>P</i> value	包含主要基因 Genes involved
钙离子信号调节通路 Calcium signaling pathway	4	0.022 2	<i>ROC, GPCR, CAMK</i>
黑素生成路径 Melanogenesis	3	0.026 4	<i>POMC, TYRPI, CAMK</i>
赖氨酸降解路径 Lysine degradation	2	0.027 9	<i>OGDHL, SETDBI</i>
色氨酸代谢路径 Tryptophan metabolism	2	0.027 9	<i>HAAO, OGDHL</i>
平滑肌血管收缩通路 Vascular smooth muscle contraction	3	0.035 8	<i>AGT, MYL9, NPPC</i>
紧密连接路径 Tight junction	3	0.049 0	<i>Myosin, Rab3B</i>

2.3 芯片结果的半定量 qRT-PCR 验证

从 GenBank 检索附表 1 中列出的 8 条基因序

列,设计引物进行半定量 qRT-PCR 检测,发现待测基因上调或下调趋势与芯片结果吻合(表 2)。

表 2 引物序列及各基因相对表达量

Table 2 Primer sequences and relative expression level for each gene

基因名称 Gene name	GenBank 号 GenBank No.	引物序列 Primer sequence	冷应激时间/h Cold stress time	
			0	24
<i>DRD3</i>	XM_003640452.1	tgcaggagggtctctctcat tcaccatgaaggggaggtag	2.14	8.35
<i>GHI</i>	NM_204359.1	ggaggaccagaggtacacca tccttcttccaggctcttt	1.05	3.40
<i>CCK</i>	NM_001001741	aggttccactgggaggttct cgcttctgttcttttaggag	2.01	11.23
<i>POMC</i>	NM_001031098.1	aaggcggaggagaaaagaag ccttctttaggcgcttttg	4.52	20.30
<i>MYH11</i>	NM_205274.1	gcagctgacaaaactgatga gacggaatctctggaagaca	7.23	2.01
<i>CHRNA9</i>	NM_204760.1	tatgctccctctgaaaacg attaccactctgcccactg	1.89	0.64
<i>NPY5R</i>	NM_001031130.1	tggatgtttggcactgtcat gccatgtttgcccgttaagt	2.56	6.08
<i>TSHB</i>	AF033495.1	ctcttggcctgacttttgg tgtgcacagttttgagaca	1.37	5.61

3 讨 论

本研究利用 Agilent 高密度全基因组表达谱芯片分析了鸡在 24~26 °C 温度下饲养和在 (2±2) °C 冷应激条件下饲养 24 h 后下丘脑组织中的差异表达基因,并对基因功能和定位等信息进行了分析。

以差异倍数 > 3、*P* < 0.05 为筛选条件,鸡受 (2±2) °C 条件下冷应激 24 h 后下丘脑组织中明显上调的基因共 543 个,下调基因 334 个。下调表达基因中,MYL9、MYH11 及 CHRNA9(N 型)均显著表达下调,且下调倍数达 4 倍以上。MYL9 和 MYH1 分别编码肌球蛋白的轻链和重链,在肌肉运动

中起重要作用,从而在理论上验证了鸡体受到冷刺激后肌肉运动下降,在行为上表现为蜷缩不动。

研究认为,寒冷应激使鸡的基础代谢率升高,能量代谢和采食量增加,但生产性能下降^[1,9]。从本试验芯片 GO 分析结果来看,冷应激引起鸡体内源性应激反应,并启动多个细胞反应,通过一系列复杂的生物反应过程,影响鸡的生长发育。

冷应激引起下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统反应,以神经递质为媒介的自主神经系统、以神经肽和激素为媒介的神经内分泌系统二者共同参与应激反应^[1,4-5]。本研究对芯片的生物学通路分析发现,(2±2)℃下冷应激 24 h 后 Neuroactive ligand-receptor interaction 通路极显著活化,可见冷应激可显著引起鸡下丘脑的自主神经系统和神经内分泌系统应激反应。进一步分析 Neuroactive ligand-receptor interaction 通路基因表达变化发现,胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)、神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 及神经肽 Y 受体 5 (Neuropeptide Y receptor 5, NPY5R) 等基因表达量上调 3 倍以上。NPY 是较早发现的具有较强促食欲功能的下丘脑神经肽之一,涉及采食的短期调控和能量的长期调控,是下丘脑食欲调节网中最重要的功能因子之一,其调控作用主要是通过 Y2、Y2 和 Y5 受体结合而发挥^[10]。CCK 则是食欲外周调节系统中一种重要的脑肠肽,主要刺激胰酶分泌与合成,增强胰碳酸氢盐分泌和胃排空,刺激胆囊收缩与奥狄氏括约肌松弛,还可兴奋肝汁分泌,调节小肠、结肠运动^[11-12]。由此可见,冷应激过程鸡下丘脑 CCK、NPY、NPY5R 等基因表达量上升与鸡的采食行为密切相关。

Adipocytokine signaling pathway 路径的活化,说明(2±2)℃下冷应激 24 h 后启动脂肪代谢相关基因的高表达,以加强机体的能量代谢。在寒冷刺激下,外周血管平滑肌收缩以及心肌收缩,对于保证重要脏器的供血及氧气及时输送至大脑细胞提供了保障^[13]。

由以上分析可见,鸡在(2±2)℃温度下冷应激 24 h 后,首先启动神经受体-配体相互作用,以刺激中枢神经产生采食欲望,随后启动脂质代谢供应机体能量需求,在此过程中,Jak-STAT、Ca 离子信号通路等一系列生物反应发生响应,以调节机体对寒冷应激反应。

参 考 文 献

- [1] Hangalapura B N. Cold stress and immunity: Do chickens adapt to cold by trading-off immunity for thermoregulation? [D]. Wageningen: Wageningen University and Research Centre, 2006
- [2] Hangalapura B N, Nieuwland M G B, de Vries Reilingh G, et al. Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells[J]. Poultry Science, 2003, 82: 1692-1700
- [3] Hangalapura B N, Nieuwland M G B, de Vries Reilingh G, et al. Durations of cold stress modulates overall immunity of chicken lines divergently selected for antibody responses[J]. Poultry Science, 2004, 83: 765-775
- [4] Noh S J, Kang D W, Yoo S B, et al. Stress-responsive hypothalamic-nucleus accumbens regulation may vary depending on stressors[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2012, 50: 447-454
- [5] Chen X Y, Jiang R S, Geng Z Y. Neuroendocrine responses to cold stress in Chinese indigenous breeds from different latitude [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2011, 10 (23): 3043-3047
- [6] Wang J T, Xu S W. Effects of cold stress on hypothalamic corticotrophin-releasing and thyrotropin-releasing hormone messenger RNA levels in chickens[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 14(4): 327-332
- [7] Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders[J]. Endocr Rev, 2001, 22: 502-548.
- [8] 丘家祥, 米克热木沙衣布扎提, 赵红琼. 家禽冷应激研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(3): 96-101
- [9] Chen X Y, Jiang R S, Geng Z Y. Differential effects of two indigenous broilers exposed to cold stress and characters of follicle density and diameter [J]. Italian Journal of Animal Science, 2011, 10: 38-41
- [10] Kuo L E, Kitlinska J B, Tilan J U, et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome[J]. Nature Medicine, 2007, 13(7): 803-811
- [11] Roses A D. Stimulation of cholecystokinin-A receptors with Gl181771X: A failed clinical trial that did not test the pharmacogenetic hypothesis for reduction of food intake[J]. Clinical Pharmacology Therapeutics, 2009, 85: 362-365
- [12] Chandra R, Liddle R A. Cholecystokinin[J]. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, 2007, 14(1): 63-67
- [13] Dadgar S, Crowe T G, Classen H L, et al. Broiler chicken thigh and breast muscle responses to cold stress during simulated transport before slaughter[J]. Poultry Science, 2012, 91: 1454-1464