

中图分类号

学校代码 10224

密 级 公开

学 号 1505060

東北農業大學

博士学位论文

氨气暴露通过 lncGRN/miR-6615-5p 调控 SMAD7 诱导鸡胸腺细胞凋亡的研究

作 者 陈德纯

导 师 滕小华 教授

学位类别 农学博士

所在学院 动物科学技术学院

一级学科 畜牧学

二级学科 动物生产学

二〇一九年六月

Classified Index:

Code: 10224

Confidential (yes/no): no

No.1505060

Dissertation for the Doctoral Degree

Study on lncGRN/miR-6615-5p Regulating Thymocyte Apoptosis through SMAD7 in Chickens Exposed to Ammonia

Candidate: Chen Dechun

Supervisor: Prof. Teng Xiaohua

Degree Category: Doctor of Agriculture

College: College of Animal Science and Technology

First level discipline: Animal Husbandry

Second level discipline: Animal Production

Harbin China

June 2019

目 录

摘要	I
英文摘要	III
1 引言	1
1.1 氨气 (NH ₃) 产生的来源与危害	1
1.1.1 氨气产生的来源	1
1.1.2 氨气的危害	1
1.2 免疫器官凋亡的研究进展	2
1.2.1 鸡的免疫器官	2
1.2.2 细胞凋亡的形态学特征	3
1.2.3 细胞凋亡的机制	3
1.2.4 免疫器官凋亡的研究	4
1.3 ceRNA 的研究概况	5
1.4 转录组学的发展概况	6
1.4.1 转录组学在动物毒理学中的运用	6
1.4.2 转录组学在家禽中的运用	6
1.5 蛋白质组学研究概述	7
1.5.1 蛋白组学在动物毒理学中的运用	7
1.5.2 蛋白组学在家禽中的运用	8
1.6 研究目的与意义	9
1.7 技术路线	11
2 材料与方法	12
2.1 主要仪器和试剂	12
2.1.1 主要仪器	12
2.1.2 主要试剂	12
2.2 动物分组与饲养	13
2.3 实验设计	13
2.3.1 病理组织学结构观察	13
2.3.2 超微结构学观察	14
2.3.3 TUNEL 染色细胞凋亡检测	14
2.3.4 高通量测序	15
2.3.5 ceRNA 调控网络的靶向关系验证	16
2.3.6 miR-6615-5p 过表达/敲低模型的建立	21
2.3.7 蛋白组学测序	27
2.3.8 氨气暴露诱导胸腺组织细胞凋亡机理的研究	29
2.3.9 氯化铵暴露诱导淋巴细胞凋亡机理的研究	30
3 结果与分析	33

3.1 胸腺细胞形态学检测结果	33
3.1.1 细胞凋亡的病理组织学观察结果	33
3.1.2 细胞凋亡的超微结构形态学变化结果	34
3.1.3 TUNEL 染色检测细胞凋亡结果	35
3.2 全转录组学分析结果	36
3.2.1 测序数据分析的结果	36
3.2.2 差异 mRNA 的分析	39
3.2.3 差异 miRNA 分析	43
3.2.4 差异 circRNA 分析	44
3.2.5 差异 lncRNA 分析	48
3.2.6 lncRNA-miRNA-mRNA 联合分析	48
3.2.7 转录组学数据验证	49
3.3 双荧光素酶报告基因系统验证 lncGRN 与 miR-6615-5p、miR-6615-5p 与 SMAD7 的靶 向关系的结果	50
3.4 miR-6615-5p 过表达和敲低的结果	52
3.4.1 miR-6615-5p 转染效率的检测	52
3.4.2 miR-6615-5p 对靶基因 SMAD7 的 mRNA 和蛋白表达的影响	52
3.4.3 miR-6615-5p 过表达/敲低对凋亡通路的影响	53
3.5 蛋白组学分析结果	56
3.5.1 质控分析	56
3.5.2 蛋白质定量结果统计	57
3.5.3 差异蛋白的筛选	58
3.5.4 差异蛋白聚类分析	58
3.5.5 差异蛋白 GO 富集分析	59
3.5.6 差异蛋白 KEGG 分析	61
3.5.7 差异蛋白互作分析	63
3.5.8 差异蛋白表达验证的结果	63
3.6 氨气暴露诱导胸腺组织细胞凋亡机理研究的结果	64
3.6.1 氨气暴露 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 的 ce 调控网络影响的结果	64
3.6.2 氨气暴露对胸腺组织氧化应激影响的检测结果	65
3.6.3 氨气暴露对胸腺组织炎症细胞因子影响的检测结果	65
3.6.4 氨气暴露对胸腺组织细胞凋亡影响的检测结果	66
3.7 氯化铵暴露诱导细胞凋亡机理研究的结果	67
3.7.1 台盼蓝检测细胞活力的结果	67
3.7.2 CCK8 法检测细胞活性的结果	68
3.7.3 氯化铵暴露对淋巴细胞 AO/EB 染色检测细胞凋亡的检测结果	69
3.7.4 流式细胞术检测氯化铵暴露对淋巴细胞细胞凋亡影响的检测结果	70
3.7.5 氯化铵暴露对淋巴细胞线粒体膜电位影响的检测结果	73

3.7.6 氯化铵暴露对淋巴细胞线粒体钙影响的检测结果.....	73
3.7.7 氯化铵暴露对淋巴细胞 ROS 影响的检测结果.....	76
3.7.8 氯化铵暴露对淋巴细胞氧化应激影响的检测结果.....	78
3.7.9 氯化铵暴露对淋巴细胞炎性细胞因子影响的检测结果	79
3.7.10 氯化铵暴露对淋巴细胞凋亡影响的检测结果	80
3.7.11 氯化铵暴露 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 ceRNA 调控网络的检测结果.....	81
4. 讨论.....	82
4.1 胸腺组织全转录组学分析	82
4.2 胸腺组织蛋白组学学分析	84
4.3 ceRNA 调控网络分析	87
4.4 氨气暴露诱导胸腺组织细胞凋亡机理的研究	88
4.4.1 氨气暴露对胸腺细胞氧化应激影响的作用	88
4.4.2 氨气暴露对鸡胸腺细胞炎性细胞因子的影响	89
4.4.3 氨气暴露对鸡胸腺细胞凋亡线粒体通路的影响	90
4.4.4 氨气暴露对胸腺细胞 SMAD7 诱导凋亡影响	93
5. 结论.....	95
致谢	96
参考文献.....	97
附录	108
攻读博士学位期间发表的学术论文.....	109

CONTENTS

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
1 Introduction	1
1.1 Sources and hazards of ammonia (NH ₃) generation	1
1.1.1 Sources of ammonia production.....	1
1.1.2 Harm of ammonia gas.....	1
1.2 Advances in apoptosis of immune organs	2
1.2.1 Immune organs of chickens	2
1.2.2 Morphological characteristics of apoptosis	3
1.2.3 Mechanisms of apoptosis.....	3
1.2.4 Study on Apoptosis of Immune Organs.....	4
1.3 A survey of ceRNA research.....	5
1.4 Development of Transcriptomics	6
1.4.1 Application of Transcriptomics in Animal Toxicology	6
1.4.2 Application of transcriptome in poultry	6
1.5 Overview of Proteomics Research.....	7
1.5.1 Application of Proteomics in Animal Toxicology.....	7
1.5.2 Application of Proteomics in Poultry	8
1.6 Research Purpose and Significance	9
1.7 Technology Roadmap	11
2 Materials and methods	12
2.1 Main instruments and reagents	12
2.1.1 Main instruments.....	12
2.1.2 Main reagent	12
2.2 Grouping and Feeding of Animals	13
2.3 experimental design	13
2.3.1 Histopathological observation	13
2.3.2 Ultrastructural observation	14
2.3.3 Detection of apoptotic cells by TUNEL staining	14
2.3.4 Illumina Genome Analyzer Iix	15
2.3.5 Validation of Targeting Relations of ceRNA Regulatory Networks	16
2.3.6 Establishment of Overexpression/Knock-Down Model of MicroRNA-6615.....	21
2.3.7 Proteomic sequencing.....	27
2.3.8 Study on the mechanism of thymocyte apoptosis induced by ammonia exposure	29
2.3.9 Study on the mechanism of lymphocyte apoptosis induced by ammonium chloride exposure.....	30

3 Results	33
3.1 Morphological examination results of thymocytes	33
3.1.1 Histopathological observation of apoptosis	33
3.1.2 Ultrastructural and Morphological Changes of Cell Apoptosis	34
3.1.3 Detection of apoptotic cells by TUNEL staining	35
3.2 Total transcriptome analysis results	36
3.2.1 Results of Sequencing Data Analysis	36
3.2.2 Analysis of differentially expressed genes	39
3.2.3 Differential mRNAs analysis	43
3.2.4 Differential microRNAs analysis	44
3.2.5 Differential lncRNA Analysis	48
3.2.6 Combined analysis of lncRNA-microRNA-RNA	48
3.2.7 Validation of transcriptome data	49
3.3 Dual Luciferase Reporter Gene System to Verify the Targeting Relationship between lncGRN and Mi-6615, Mi-6615 and SMAD7	50
3.4 Overexpression and knockdown of microRNA-6615	52
3.4.1 Detection of Transfection Efficiency of MicroRNA-6615	52
3.4.2 Effect of microRNA-6615 on the expression of target gene SMAD7	52
3.4.3 Effect of overexpression/knockdown of microRNA-6615 on apoptotic pathway	53
3.5 Proteomic analysis results	56
3.5.1 Quality control analysis	56
3.5.2 Quantitative results statistics of protein	57
3.5.3 Screening of differential proteins	58
3.5.4 Cluster Analysis of Differential Proteins	58
3.5.5 Enrichment analysis of differential protein GO	59
3.5.6 Analysis of differential protein KEGG	61
3.5.7 Differential protein interaction analysis	63
3.5.8 Validation of differential protein expression	63
3.6 The mechanism of thymocyte apoptosis induced by ammonia exposure	64
3.6.1 Effects of ammonia exposure on the CE regulatory network of lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7	64
3.6.2 Test results of the effects of ammonia exposure on oxidative stress in thymus	65
3.6.3 Test results of the effects of ammonia exposure on inflammatory cytokines in thymus tissue	65
3.6.4 Detection results of apoptotic effect of ammonia exposure on thymus tissue	66
3.7 Result of study on apoptosis induced by ammonium chloride exposure	67
3.7.1 The results of trypan blue assay for cell viability	67
3.7.2 CCK8 assay for cell viability	68

3.7.3 Detection of apoptotic cells by AO/EB staining in lymphocytes exposed to ammonium chloride.....	69
3.7.4 Detection of apoptotic effect of ammonium chloride exposure on lymphocyte by flow cytometry.....	70
3.7.5 Detection of the effect of ammonium chloride exposure on mitochondrial membrane potential of lymphocytes	73
3.7.6 Detection of the effect of ammonium chloride exposure on mitochondrial calcium in lymphocytes.....	73
3.7.7 Detection results of ROS in lymphocytes exposed to ammonium chloride	76
3.7.8 Detection results of oxidative stress in lymphocytes exposed to ammonium chloride...	78
3.7.9 Detection the effect of ammonium chloride exposure on lymphocyte inflammatory cytokines.....	79
3.7.10 Detection the effect of ammonium chloride exposure on lymphocyte apoptosis	80
3.7.11 Detection results of lncGRN-microRNA-6615-SMAD7 ceRNA regulatory network exposed to ammonium chloride	81
4. Discussion.....	82
4.1 Total transcriptome analysis of thymus.....	82
4.2 Thymic proteomics analysis	84
4.3 Analysis of the regulatory network of ceRNA	87
4.4 Study on the mechanism of thymocyte apoptosis induced by ammonia exposure	88
4.4.1 Effects of ammonia exposure on oxidative stress in thymocytes	88
4.4.2 Effects of ammonia exposure on inflammatory cytokines in chicken thymocytes...	89
4.4.3 Effects of ammonia exposure on mitochondrial pathway of thymocyte apoptosis in chickens.....	90
4.4.4 Effects of ammonia exposure on SMAD7-induced apoptosis in thymocytes	93
5. Conclusion.....	95
Acknowledgement.....	96
References	97
Appendix	108
Papers published in the period of Ph.D. education.....	109

摘要

氨气是集约化养殖厂有刺激性气味的污染气体之一,家禽较反刍动物有更高的敏感性,氨气降低鸡的生产性能,甚至导致鸡的死亡,严重威胁家禽和养殖人员的健康。畜牧生产过程产生的氨气也是大气污染物的重要来源,大气中氨气导致的环境和健康风险,已经成为环境及健康风险评估的主要指标之一。因此迫切需要研究鸡氨气中毒的机理,加深对氨气暴露生物学作用机理的认识,为鸡氨气中毒的防治提供理论依据。

本研究通过体内胸腺组织和体外鸡胸腺淋巴细胞、脾脏淋巴细胞两部分来研究氨暴露对鸡免疫器官细胞凋亡的影响。体内试验中,80只1日龄肉鸡,随机分为两组,每组40只,分别为对照组(NH_3 浓度,0-6周为 5 mg/m^3)和氨气处理组(高 NH_3 浓度,0-3周为 20 mg/m^3 ,4-6周为 45 mg/m^3),氨气浓度的设定依据国家畜禽场环境质量标准(NY/T388-1999)而定,处理组雏鸡氨气暴露浓度是国家畜禽场环境质量标准的2倍,成鸡氨气暴露浓度是国家畜禽场环境质量标准的3倍。氨气暴露42d后,分离出胸腺组织,用于显微结构和超微结构观察、TUNEL法检测细胞凋亡、全转录组学测序、蛋白质组学定量分析以及后续mRNA以及蛋白分析检测;双荧光素酶报告基因检测系统验证miR-6615-5p与SMAD7、lncGRN与miR-6615-5p的靶向结合;体外实验通过原代培养鸡胸腺淋巴细胞和脾脏淋巴细胞,以氯化铵为氨气的替代物体外模拟氨气暴露的环境,通过CCK-8检测确定氯化铵染毒浓度,AO/EB染色观察细胞凋亡情况、流式细胞术分析淋巴细胞凋亡、荧光显微镜观察线粒体膜电位的变化、钙离子荧光探针检测线粒体内钙离子变化、ROS荧光探针检测细胞内活性氧的变化,结合实时荧光定量PCR和免疫蛋白印记法验证氨暴露时抗氧化酶(GPx和GST4)、炎症细胞因子(HO-1、NF- κ B、COX-2、iNOS、TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10和IL-12)、凋亡相关基因(BCL-2、BAX、BAK、CytC、APAF1、Caspase-9和Caspase-3)等mRNA和蛋白表达水平的变化,过表达和敲低转染检测miR-6615-5p对凋亡通路的影响。结果表明:

(1)氨暴露导致胸腺组织形态学发生改变,胸腺组织发生炎性损伤、血管内皮细胞增生、炎性细胞浸润,凋亡小体增多;细胞核固缩,染色质凝集,线粒体肿胀、空泡化,细胞凋亡。体外培养胸腺淋巴细胞和脾脏淋巴细胞,氨暴露导致淋巴细胞细胞凋亡率升高,并随着浓度的增加,凋亡水平上升。TUNEL法检测凋亡率结果显示氨气处理组为13.46%与对照组3.20%相比较差异显著($P<0.05$)。

(2)全转录组学分析结果显示circRNA、lncRNA、miRNA和mRNA参与了氨气暴露的应激反应。通过生物信息学分析揭示了差异基因参与氧化应激、炎症和凋亡过程等过程。ceRNA联合分析存在lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7调控网络,通过qRT-PCR和Western blot验证在体内胸腺组织和体外脾脏淋巴细胞该通路的存在。转录组学基因热图显示氨气暴露后与氧化应激、细胞因子和细胞凋亡相关基因发生差异表达。蛋白组学结果分析显示差异蛋白的功能与凋亡过程、氧化应激、炎症和免疫应答密切相关。差异蛋白Q5F3P4、E1BXY6、E1C765和Q5ZMR6的表达与凋亡相关基因BCL-2、Caspase-9和Caspase-3密切相关,差异蛋白的基因在调控线粒体途径凋亡中起到重要的作用。

(3)双荧光素酶报告基因检测证实miR-6615-5p与SMAD7、lncGRN与miR-6615-5p之

间存在靶向结合关系。在原代培养的脾脏淋巴细胞内转染 miR-6615-5p 进行过表达和敲低,结果显示过表达组淋巴细胞内 miR-6615-5p 表达显著升高,靶基因 SMAD7 mRNA 和蛋白表达水平下降,敲低组淋巴细胞内靶基因 SMAD7 mRNA 和蛋白水平表达增加。

(4) 通过验证氨中毒模型鸡胸腺组织和淋巴细胞中抗氧化酶活性,结果显示氨暴露在体内胸腺组织中抑制 GPx 和 GST 的 mRNA 表达,抑制 GPx 的蛋白表达;在体外淋巴细胞氨暴露 ROS 产生增多,抑制 GPx 和 GST 的 mRNA 表达,抑制 GPx 的蛋白表达。

(5) 通过检测炎性细胞因子的变化,发现氨气暴露诱导了体内胸腺组织中炎性细胞因子 HO-1、NF- κ B、COX-2 和 iNOS 的 mRNA 表达,抑制了 TGF- β 的 mRNA 表达;诱导了白介素 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IL-12 的 mRNA 表达,抑制了 IL-10 的 mRNA 表达;诱导了 HO-1、NF- κ B 和 iNOS 的蛋白表达。体外氨暴露诱导了脾脏淋巴细胞中细胞因子 HO-1、NF- κ B、COX-2 和 TGF- β 的 mRNA 表达,抑制了 iNOS 的 mRNA 表达;诱导了 HO-1 和 NF- κ B 的蛋白表达,抑制 iNOS 的蛋白表达。

(6) 氨暴露后,胸腺淋巴细胞和脾脏淋巴细胞中线粒体膜电位下降和线粒体钙离子含量升高,ROS 活力升高,随着浓度增加作用越明显。通过检测凋亡相关基因的变化,发现氨暴露体内胸腺组织中抑制了 BCL-2 的 mRNA 和蛋白表达;诱导了 BAX、BAK、Cyt c、APAF1、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 表达;诱导了 BAX、Cyt c、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 的蛋白表达。体外脾脏淋巴氨暴露时,抑制了 BCL-2 的 mRNA 和蛋白表达;诱导了 BAX、BAK、Cyt c、APAF1、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 表达;诱导了 BAX、Cyt c、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 的蛋白表达。miR-6615-5p 过表达转染时,靶基因 SMAD7 表达下降,线粒体途径的凋亡相关基因 BAX、BAK、Cyt c、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 基因 mRNA 表达上升,BCL-2 mRNA 表达下降。miR-6615-5p 过表达诱导淋巴细胞发生细胞凋亡。

结论:本研究应用全转录组学和蛋白组学分析技术筛选、鉴定氨气暴露鸡胸腺组织差异表达基因,通过生物信息学分析揭示了差异基因和蛋白参与氧化应激、炎症和凋亡过程等多个生理和病理过程。荧光素酶实验证实 miR-6615-5p 与 SMAD7、lncGRN 与 miR-6615-5p 之间存在靶向结合关系。lncGRN 作为 ceRNA 通过 miR-6615-5p 调节 SMAD7 的表达。氨气暴露通过 lncGRN/miR-6615-5p 调控 SMAD7 诱导鸡胸腺细胞凋亡。体内和体外实验证实了氨暴露诱导鸡胸腺组织和淋巴细胞发生氧化应激、炎症反应和细胞凋亡,氨暴露通过线粒体途径诱发凋亡。丰富了氨气暴露生物学作用机理的认识,为鸡氨气中毒防治提供参考。

关键词: 氨气; 鸡; 转录组和蛋白组学; ceRNA; 细胞凋亡

Study on lncGRN/miR-6615-5p Regulating Thymocyte Apoptosis through SMAD7 in Chickens Exposed to Ammonia

Abstract

Ammonia is one of the polluted gases with irritating odor in intensive farms. Poultry is more sensitive than ruminants. Ammonia reduces the performance of chickens and even leads to the death of chickens, which seriously threatens the health of poultry and breeding personnel. Ammonia produced in livestock production process is also an important source of air pollutants. The environmental and health risks caused by ammonia in the atmosphere have become one of the main indicators of environmental and health risk assessment. Therefore, it is urgent to study the mechanism of ammonia poisoning in chickens, deepen the understanding of the biological mechanism of ammonia exposure, and provide theoretical basis for the prevention and treatment of ammonia poisoning in chickens.

In this study, the effects of chicken exposure to ammonia on apoptosis of immune organs were studied on thymus tissue in vivo and thymus lymphocyte and spleen lymphocyte in vitro. In vivo, 80 one-day-old broilers were randomly divided into two groups, 40 broilers in each group, the control group (low NH_3 concentration, 5 mg/m^3 for 0-6 weeks) and the ammonia treatment group (high NH_3 concentration, 20 mg/m^3 for 0-3 weeks, 45 mg/m^3 for 4-6 weeks). The ammonia concentration was set according to the national environmental quality standard for livestock and poultry farms (NY/T388-1999). The ammonia exposure concentration of the treated group was the ring of livestock and poultry farms. The exposure concentration of ammonia in adult chickens was twice as high as that in domestic livestock and poultry farms. After 42 days of ammonia exposure, thymus tissues were isolated for microscopic and ultrastructural observation, TUNEL assay for cell apoptosis, total transcriptome sequencing, proteomic quantitative analysis, and subsequent RNA and protein analysis. Double luciferase reporter gene detection system validated the targeting binding of miR-6615-5p (microRNA-6615-5p) with SMAD7, lncGRN and miR-6615-5p; In vitro, chicken thymocytes and spleen lymphocytes were cultured in primary culture. Ammonium chloride was used as a substitute for ammonia to simulate the exposure environment. The concentration of ammonium chloride was determined by CCK-8 assay. Apoptosis was observed by AO/EB staining, lymphocyte apoptosis was analyzed by flow cytometry, mitochondrial membrane potential was observed by fluorescence microscopy, and calcium ion in mitochondria was detected by fluorescence probe. Changes of reactive oxygen species were detected by ROS fluorescence probe. Antioxidant enzymes (GPx and GST4), inflammatory cytokines (HO-1, NF- κ B, COX-2, iNOS, TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-

2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12, apoptosis-related genes (BCL-2, BAX, BAK, CytC, APAF1, Caspase-9 and Caspase-3) were verified by real-time quantitative PCR and immunoblotting. Changes of expression levels, over-expression and knock-down transfection were used to detect the effect of miR-6615-5p on apoptotic pathway. The results show that:

(1) Ammonia exposure leads to changes in thymus histomorphology, including inflammatory injury, proliferation of vascular endothelial cells, infiltration of inflammatory cells, increase of apoptotic bodies, nuclear condensation, chromatin condensation, swelling and vacuolation of mitochondria, and apoptosis. Thymic lymphocytes and splenic lymphocytes were cultured in vitro. The apoptotic rate of lymphocytes increased with the increase of ammonia exposure, and the apoptotic level increased with the increase of concentration. TUNEL assay showed that the apoptotic rate was 13.46% in ammonia treatment group compared with 3.20% in control group ($P < 0.05$).

(2) Total transcriptome analysis showed that circRNA, lncRNA, microRNA and RNA were involved in the stress response to ammonia exposure. Bioinformatics analysis revealed that differentially expressed genes were involved in oxidative stress, inflammation, and apoptotic processes. The lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 regulatory network was identified by ceRNA analysis. The pathway was verified by qRT-PCR and Western blot in thymus tissues in vivo and spleen lymphocytes in vitro. Transcriptional genome thermogram showed differential expression of oxidative stress, cytokines and apoptotic genes after ammonia exposure. Proteomic analysis showed that the functions of differential proteins were closely related to oxidative stress, inflammation, immune response and apoptotic process. The expression of differentially expressed proteins Q5F3P4, E1BXY6, E1C765 and Q5ZMR6 is closely related to apoptosis-related genes BCL-2, Caspase-9 and Caspase-3. The differentially expressed proteins play an important role in regulating mitochondrial pathway apoptosis.

(3) Detection of double luciferase reporter gene confirmed that there was a targeted binding relationship between miR-6615-5p and SMAD7, lncGRN and miR-6615-5p. In primary cultured splenic lymphocytes, the expression of miR-6615-5p was overexpressed and knocked down. The results showed that the expression of miR-6615-5p was significantly increased in overexpressed lymphocytes, the expression of target gene SMAD7 and protein was decreased, and the expression of target gene SMAD7 and protein in knocked-down lymphocytes was increased.

(4) The results showed that ammonia exposure inhibited the expression of GPx and GST in thymus tissue and the expression of GPx protein, increased ROS production in lymphocyte exposed to ammonia in vitro, inhibited the expression of GPx and GST, and inhibited the expression of GPx protein.

(5) By detecting the changes of inflammatory cytokines, it was found that ammonia exposure induced the expression of inflammatory cytokines HO-1, NF- κ B, COX-2 and iNOS in thymus tissue, inhibited the expression of TGF- β , induced the expression of IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 and IL-12, inhibited the expression of IL-10, and induced the expression of HO-1, NF- κ B and iNOS. Ammonia exposure in vitro induced the expression of cytokines HO-1, NF- κ B, COX-2 and TGF- β in splenic

lymphocytes, inhibited the expression of iNOS, induced the expression of HO-1 and NF- κ B, and inhibited the expression of iNOS.

(6) After ammonia exposure, mitochondrial membrane potential of thymic lymphocytes and splenic lymphocytes decreased, mitochondrial calcium content increased, ROS activity increased, and the effect became more obvious with the increase of concentration. By detecting the changes of apoptosis-related genes, we found that the expression of BCL-2 was inhibited in thymus tissues exposed to ammonia, and the expression of BAX, BAK, Cytc, APAF1, Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-3 was induced. The expression of BAX, Cytc, Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-3 was also induced. The expression of BCL-2 was inhibited by splenic lymphatic ammonia exposure in vitro; BAX, BAK, Cytc, APAF1, Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-3 were induced; the expression of BAX, Cytc, Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-3 were induced. miR-6615-5p overexpression transfection induces lymphocyte apoptosis.

CONCLUSION: The differential expression genes in thymus tissues of chickens exposed to ammonia were screened and identified by full transcription histology and proteomics analysis. Bioinformatics analysis revealed that the differential genes and proteins participated in many physiological and pathological processes, such as oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Luciferase assay confirmed that there was a targeted binding relationship between miRNA-6615-5p and SMAD7, lncGRN and miR-6615-5p. As ceRNA, lncGRN regulates the expression of SMAD7 through miR-6615-5p. Ammonia exposure induces apoptosis of chicken thymocytes by regulating SMAD7 through lncGRN/miR-6615-5p. In vivo and in vitro experiments confirmed that ammonia exposure induced oxidative stress, inflammatory reaction and cell apoptosis in chicken thymus and lymphocyte, and ammonia exposure induced apoptosis through mitochondrial pathway. It enriched the understanding of the biological mechanism of ammonia exposure and provided reference for the prevention and control of ammonia poisoning in chickens.

Key words: Ammonia; Chicken; Transcriptomics and Proteomics; ceRNA; Apoptosis

Candidate: Chen Dechun

Speciality: Animal Production

Supervisor: Prof. Teng Xiaohua

1 引言

1.1 氨气 (NH_3) 产生的来源与危害

氨气为一种无色但有强刺激性气味的气体, 能够被感觉的最低浓度为 5.3 mg/kg ^[1]。我国禽类养殖业发展迅速, 年肉鸡产量位于世界第二位。随着集约化养殖程度的提高, 现代化大型养殖场的出现, 动物饲养密度不断地增加, 饲养数量的增加, 舍内微生物剧增与粪便、饲料残渣和垫料混合作用, 氨气的浓度不断地增高, 严重影响动物和饲养人员的身体健康。鸡比反刍动物和猪对氨气有更高的敏感性^[2]。长期的氨气暴露会导致鸡氨中毒, 甚至造成死亡。

1.1.1 氨气产生的来源

禽舍内的氨气主要来自于圈舍内的微生物细菌分解动物排泄物、饲料以及畜禽的垫料等富含氮元素的物质产生而来。由于禽类的特殊生理结构及排泄方式, 氨气主要的来源方式之一是畜舍内尿酸被微生物的降解发生化学反应而来。其次, 饲料中的氨基酸富含大量氮元素, 在发酵时也会产生氨气, 是另一个主要来源。鸡粪中未被机体消化完的饲料占百分之二十多, 其中的含氮成分在机体的代谢下会被分解为氨气挥发到空气中。Ritz 等^[3]研究发现家禽能够将日粮中约 33%左右的氮吸收利用, 而其余的氮则排到体外。粪便中的氮元素最终转变成氨气。饲养过程中产生的氨气也是大气污染气体来源之一。

1.1.2 氨气的危害

氨气被认为是鸡舍里最有害的气体之一, 禽类对氨气特别敏感, 中华人民共和国农业行业标准畜禽场环境质量标准 NY/T388-1999: 针对雏鸡圈舍内的氨气的含量应控制在 10 mg/m^3 以内, 成鸡舍内的含量应在 20 mg/m^3 以内。氨气具有很高的水溶性, 通过动物机体呼吸进入到肺泡进而进入到血液当中影响血红素结构, 降低了血红蛋白的携氧能力, 造成机体抵抗力下降。高浓度的氨气也会刺激呼吸道上皮组织, 易引发各种炎症。增加了呼吸系统患病的几率, 对呼吸道黏膜的刺激, 破坏了天然的保护屏障, 减弱了动物机体对病毒、细菌的抵抗能力。研究表明低浓度 (5 mg/kg) 的氨气也会引起结膜炎和上呼吸道黏膜发生充血, 水肿和分泌物增多^[4, 5]。

舍内的氨气能对畜禽造成各种不良的影响。舍内高浓度的氨气能够诱发多种疾病症状, 如畜禽的胃肠炎、腹水症、呼吸道疾病都与之相关。氨气可以被呼吸道粘膜直接吸收, 当氨气吸附在粉尘上时就会随着微小颗粒被吸入呼吸道, 进入肺部。当氨气浓度较高时, 会引起鸡的呼吸道粘膜出现炎症症状, 如粘膜的出血、充血; 气道肿胀; 肺部发生淤血的现象^[6]。鸡舍氨气浓度达 20 mg/m^3 时, 鸡被病毒感染的几率也会增高, 如鸡球虫病的发病率与低浓度氨组相比较也提高了^[7]。当氨气的浓度达到 50 mg/m^3 , 鸡呼吸道感染的症状加剧, 如支气管炎, 肺部出血等, 鸡的呼吸次数也发生了改变, 出现病死鸡^[8]。高氨使肉鸡采食量降低, 日增重下降, 呼吸频率减慢, 死亡率和淘汰率上升^[9, 10]。因此, 鸡经常处于氨气浓度过高的环

境,势必对鸡的生长和健康造成影响。对于高氨在免疫器官的影响,现阶段国内外研究较少,尤其是对胸腺组织更少。

已有研究表明高氨会引发鸡的心脏和肝脏发生病理学改变。长时间高浓度的氨气刺激,会造成动物机体发生中毒。高氨条件下,不仅呼吸道的结构发生改变,心脏,肾脏也会发生病理变化如炎症反应,包括细胞坏死和炎性细胞浸润等^[6]。肉鸡暴露在高氨环境下,鸡的免疫功能也会被破坏,如体内的自由基产生增加,抗氧化酶的含量降低,造成氧化应激;肝脏功能受损,饲料消耗增多,生长缓慢;鸡出现神经紊乱,行动迟缓,福利水平下降,影响肉鸡的生长和健康^[11]。舍内高氨状态的应激会增加鸡群患病的风险,氨气对呼吸道的刺激,诱发机体发生呼吸障碍,肾脏代谢负担增多,产生腹水^[12]。高浓度氨气导致鸡采食量下降,进而日增重量也降低,饲养周期增加;iTRAQ 蛋白定量分析中显示上调的蛋白的功能主要涉及氧化应激、损伤标志物蛋白、以及氨基酸和脂类分解代谢合成等;下调蛋白功能主要涉及能量代谢、免疫和炎症反应、解毒等过程。高氨条件不仅影响鸡生产性能,而且肝脏组织发生氧化应激发生损伤,功能蛋白的表达发生改变^[13]。

氨气应激也会降低肉鸡屠宰率、胸肌率和腿肌率等。氨气应激使腿肌中饱和脂肪酸含量升高,降低了不饱和脂肪酸含量以及多不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值^[14]。鸡舍高浓度氨气可降低肉鸡的抗氧化能力,进而对鸡肉的品质造成影响,且氨气的浓度越高,对动物的影响越强,具有时间累加效应^[15]。利用高通量 RNA 测序技术对暴露于高氨(25 ppm)水平下的肉鸡胸肌中的差异表达基因进行鉴定,转录组分析表明,共有 163 个基因表达显著变化。基因本体(GO)功能注释分析揭示了空气氨暴露对肉鸡胸肌生长发育抑制的潜在基因、过程和途径^[16]。长时间的慢性氨气刺激也会对鸡肉品质造成影响,氨气诱发机体发生氧化应激、免疫应答,鸡的生理性能下降,对组织器官功能受损,生长性能下降^[17]。以上研究表明,氨气刺激能够降低肉鸡的屠宰性能和肉品质。

在禽生产中,控制氨气的浓度和接触氨气的时间是家禽福利的一项重要内容。长时间的氨气刺激会使家禽遭受痛苦和应激。研究发现腹水的发生与氨气的浓度有一定的联系,呼吸道疾病随着氨气浓度的升高而增加^[18]。有研究表明长时间低浓度的氨气刺激,随着时间的累积,也会对鸡造成同高浓度氨气刺激类似的危害^[19]。长期氨气刺激影响鸡的福利。当鸡舍内氨气浓度达到 25 mg/kg 时,鸡的气囊炎发病率增加,鸡的角膜炎和结膜炎发病率增加^[20]。高氨浓度会显著降低肉鸡的趴卧持续时间,氨气刺激降低了动物福利,造成羽毛污损,脚部和关节疾病多发,以及脚垫、关节及步态评分下降^[21, 22],造成福利水平下降。

1.2 免疫器官凋亡的研究进展

1.2.1 鸡的免疫器官

鸡的免疫器官根据结构和功能分为外周免疫器官(包括脾脏和盲肠扁桃体等)和中枢免疫器官(包括胸腺和法氏囊)。中枢免疫器官是免疫细胞发育的场所。中枢免疫器官从胚胎期开始发生,随年龄增长发育为功能完整的器官,其不需抗原刺激就能够培育出成熟的淋巴细胞输出到外周免疫系统,参与免疫反应并影响外周免疫器官的发育^[23]。随着性成熟而逐渐退

化消失。免疫器官的生长发育情况决定鸡的整体免疫机能状态,影响机体对环境中各种病原感染和应激的抵抗力。鸡的胸腺共有 7 对,位于鸡颈部气管两侧皮下,呈扁平状,淡黄色,为实质器官,胸腺表面附有一层结蹄组织深入到胸腺内部分为多个小叶,胸腺小叶又分为皮质和髓质两部分。胸腺细胞主要是胸腺淋巴细胞。胸腺髓质相比皮质上皮细胞增多,淋巴细胞大量减少,故着色浅。髓质中常可见胸腺小体。胸腺小体作为胸腺中独特的结构,参与 T 细胞发育过程,可以限制胸腺中免疫抗原的范围,溶解死亡细胞^[24]。

鸡的脾脏位于腺胃右上方,呈棕红色,近于球形。脾脏是鸡体内最大的外周免疫器官,脾脏淋巴细胞主要是 B 细胞和 T 细胞,是免疫应答的场所。

1.2.2 细胞凋亡的形态学特征

细胞凋亡又称为细胞程序性死亡,是各种生命过程的重要组成部分,存在正常的生理性和病理性细胞凋亡两种情况。细胞凋亡在组织中可以维持细胞群稳态,也是疾病或有害物质侵害细胞的过程中起到防御保护机制。

光学显微镜和透射电子显微镜都可观察到细胞凋亡时细胞内发生的多种形态结构改变。光学显微镜可观察到在早期凋亡时,细胞核发生固缩,体积减小,细胞核染色质凝集,细胞器排列密集,细胞质聚集;透射电子显微镜能够观察到亚细胞结构上细胞的变化,凋亡早期核固缩,线粒体膜通透性增加,线粒体肿胀,大量溶解。细胞核破裂,质膜包裹细胞碎片,可见凋亡小体。细胞与周围的细胞脱离。随后凋亡小体被巨噬细胞等细胞吞噬,并在吞噬溶酶体内降解。在整个凋亡过程中,因为没有细胞组分的释放和抗炎因子的产生,因此基本没有涉及到炎症反应^[25]。

1.2.3 细胞凋亡的机制

目前认为细胞凋亡途径主要包括三种途径,分别是内质网途径、外源性途径和内源性途径。

内质网途径主要与内质网的功能相关,在生理病理或者外界不良刺激作用下,细胞的正常功能由于内质网损伤受到影响而发生凋亡。内质网应激如内质网胁迫、蛋白质错误折叠或未折叠会导致细胞内钙离子稳态失衡或钙超载,能够引发 Caspase-12 的激活,而 Caspase-12 进一步激活 Caspase-9 最终导致凋亡的发生,同时激活 BCL-2 家族中促凋亡蛋白 BAX 和 BAK 来诱导凋亡^[26]。

外源性途径,是细胞凋亡的另一条通路是由死亡受体调控的。FADD 结合在死亡结构域上后,激活 Caspase-8 和 Caspase-10,进一步激活下游的 Caspase-3,从而进入细胞凋亡的过程^[27]。

内源性途径,也称为线粒体途径,通过激活 Caspase 通路引发凋亡,线粒体中的 Cytc (细胞色素 C) 在一系列凋亡诱导因素刺激下被释放至细胞质中, Cytc 与 APAF1 (Apoptosis protease activating factor 1, 凋亡蛋白酶活化因子 1) 结合后, 又与 Caspase-9 结合, 激活下游的凋亡执行分子 Caspase-3, Caspase-6 和 Caspase-7 等诱导细胞凋亡^[28]。

细胞凋亡的调控是通过凋亡相关的信号传导系统实现的,其受一系列凋亡相关基因的调

节。凋亡调控因子的研究较多集中在 APAF1、Caspase 家族、BCL-2 家族、c-myc、ATM、Parp 和 p53 蛋白等^[29]。

Caspase 为半胱氨酸天冬氨酸酶，也是一种存在于细胞质中的 IL-1 β 转化蛋白酶，是一种能够导致细胞凋亡的特异性蛋白酶家族，Caspase 在细胞死亡过程中作为主要执行者^[30]。凋亡信号激活 Caspase 基因后，细胞内的蛋白可迅速地被降解并且诱发凋亡。Caspase 家族成员都富含半胱氨酸，目前发现已有 14 种成员，命名为 Caspase 1-14，他们都具有相同的分子结构和特性。

Caspase-3 是最为关键的细胞凋亡执行者，在细胞凋亡的过程中起着关键作用^[31]。Caspase-3 可被 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10 等活化。Caspase-3 是上述 3 条凋亡通路的共同效应分子，活化的 Caspase-3 可促使下游的凋亡相关蛋白活化，细胞骨架和管家基因的功能在下游 Caspase 的作用下则进一步受到破坏，同时蛋白激酶、DNA 修复蛋白以及核酸内切酶的亚基蛋白受到损伤。此外，正常细胞信号的传导、破坏骨架结构也会受到 Caspase 的影响，也包括影响细胞周期的调节，最后细胞内会出现核裂解、凝结等凋亡形态学上的改变。因此我们说 Caspase-3 不仅是凋亡信息的执行者，也是关键酶，更是 Caspase 介导的凋亡信息传递的必经之路^[32]。

Caspase-9 是线粒体介导的内源凋亡途径中的起始者，在活化的 Caspase-8 酶催化下或其它的一些凋亡因子作用下其转移到线粒体外膜上来调控线粒体外膜的通透性，释放 Cytc 到细胞基质中，Cytc 在 ATP/dATP 作用下与凋亡因子 APAF1 结合，结合后 APAF1 招募 Caspase-9 酶原形成凋亡复合体，引起细胞凋亡^[33]。此外，也有研究表明在内质网介导的细胞凋亡途径中 Caspase-9 也同样发挥着重要作用^[34]。

Cytc 是与细胞凋亡关系紧密的一种细胞色素氧化酶，其位于线粒体内侧外膜的外周蛋白。在促凋亡作用时，线粒体将 Cytc 释放入胞质，Cytc 与 IP3 受体作用引起内质网钙释放，钙的升高与 Cytc 的释放形成正反馈，这也就是内质网钙释放能够导致细胞毒性的原因。

BCL-2 家族在线粒体介导的细胞内源凋亡途径的上游起调控作用，主要存在于线粒体外膜、内质网和核膜中^[35]。BCL-2 家族蛋白目前已发现的共有 20 多种，BCL-2 家族蛋白调控细胞凋亡主要通过家族蛋白间的相互作用来调控线粒体外膜的通透性，释放 Cytc 等促凋亡分子引发细胞凋亡。根据其在内源细胞凋亡通路中的功能不同分为两类：抗凋亡蛋白包括 BCL-2、BCL-XL 和 BCL-W 等十余种；促凋亡蛋白包括 BAX、BAK、BOK、BAD、BID 和 BIM 等十余种^[36]。当细胞受到死亡信号刺激后，促凋亡蛋白在某些蛋白酶的作用下发生构象变化，从胞液中易位到细胞器的膜结构上，尤其是线粒体外膜上，并与膜上和膜内的抗凋亡蛋白发生相互作用，使抗凋亡蛋白丧失对细胞凋亡的抑制活性，引起细胞器功能丧失和各种促凋亡因子的释放，最终导致细胞凋亡。

1.2.4 免疫器官凋亡的研究

免疫器官作为机体抵抗外界不良刺激反应的应答器官，在生理和病理过程中有重要的作用。当环境温度增高，热应激会导致牛和鸡的免疫功能抑制，胸腺细胞内凋亡小体增多^[37]。淋巴细胞发生凋亡数目增多，机体的免疫功能就会发生障碍^[38, 39]。禽流感病毒和鸭呼肠孤病毒感染可致鸭胸腺和脾脏中淋巴细胞凋亡，机体免疫抑制^[40]。玉米赤霉烯酮可诱发脾脏淋巴

细胞发生凋亡,降低机体免疫功能^[41]。当小鼠被电离辐照损伤后,会诱发脾脏发生线粒体途径的凋亡^[42]。凋亡的发生是免疫器官抵抗外界环境不良刺激的一种保护机制。魏玮等^[43]研究发现氟降低胸腺及脾脏中淋巴细胞的增殖能力,诱导了淋巴细胞发生凋亡,损伤机体的免疫功能。砷能够通过线粒体途径和死亡受体途径诱导鸡的免疫器官脾脏,胸腺和法氏囊发生凋亡^[44]。Zhu 等^[45]研究发现黄曲霉毒素可导致鸡脾脏细胞发生死亡受体途径和内质网途径凋亡。刘慈^[46]研究发现缺硒诱导了鸡脾脏和胸腺发生氧化应激性细胞凋亡,免疫功能降低。徐喆^[47]研究发现镉诱导了鸡的脾脏发生细胞凋亡和免疫功能障碍。Lin 等^[48]研究发现放养密度增加会引起草鱼脾脏发生细胞凋亡,与 FasL 信号传导途径密切相关。溴氰菊酯能够诱导小鼠的胸腺和脾脏发生细胞凋亡,但其机制仍不清楚^[49]。Hu 等^[50]研究发生硫化氢暴露造成鸡法氏囊发生氧化应激和细胞凋亡,导致免疫损伤。免疫器官作为机体重要的免疫应答器官,细胞凋亡的发生在保护机体抵抗外界不良刺激时发挥重要的作用。

1.3 ceRNA 的研究概况

竞争性内源 RNA (Competing endogenous RNA, ceRNA) 是 2011 年提出的一种假说,认为:一种 miRNA 可能调控多种不同的基因的表达,而每个基因可能同时受到多种 miRNA 的调节。如果具有相同 miRNA 应答元件 (miRNA response element, MRE) 的 RNA 分子,包括长链非编码 RNA (long-coding RNA, lncRNA)、环状 RNA (circular RNA, circRNA)、信使 mRNA 等与同一个 miRNA 相结合相互之间产生竞争,间接影响 miRNA 对靶基因的调控,从而影响翻译编码蛋白,影响细胞的功能。这些具有相同应答元件的 RNA 被称为 ceRNA。

基因组中仅有不到 2% 的 mRNA 可以参与蛋白翻译转录,余下的 RNA 包括 miRNA、ncRNA/lncRNA 以及 circRNA 等^[51]。虽然非编码 RNA 不参与编码蛋白,但它们可以特异性地与 mRNA 靶向结合,从而调控机体内蛋白的表达。ceRNA 是一种竞争机制假说,即 lncRNA/circRNA 和 miRNA 以“海绵吸附”的方式结合,调控下游靶基因 mRNA 的表达^[52],这种 ceRNA 调控网络在多种疾病和肿瘤过程中均有报道。在人食管鳞状细胞癌中, lncRNA HOTAIR 通过竞争性结合 miR-125 和 miR-143,进而调节靶基因 HK2 的表达^[53]。同样在其他肿瘤疾病如肾癌、甲状腺癌、卵巢癌和胰腺癌等均有 ceRNA 的研究报道^[54-57]。体内实验证实 lncRNA-H19 可参与调控肌细胞的分化, H19 通过海绵分子吸附 Let-7 进而影响靶基因的表达,加速体内肌细胞的分化速度,导致肌营养不良症^[58]。也有一些研究报道 ceRNA 参与了人类疾病如病毒性脑炎、科凯恩综合征和阿尔茨海默病等的发生与发展^[59-61]。

由于发现时间较晚,对于 lncRNA 的生理功能还不是很清楚,现阶段已有一些研究表明 lncRNA 通过 ceRNA 对细胞发育、凋亡和细胞周期调控中起到一定的作用。STARD13 3'UTR 通过 ceRNA 作用机制影响 Fas 的表达来促进肝癌细胞发生凋亡^[62]。lnc00483 作为 ceRNA 通过激活胃癌中的 MAPKs 进而调节细胞的增殖和凋亡^[63]。lncRNA-ATB 可作为 ceRNA 与 miR-200c 竞争性地调控靶分子 KRAS 的表达而促进淋巴瘤细胞的增殖和凋亡^[64]。张恒东^[65]研究发现在成骨细胞铅暴露中存在 lncAFT4-KCNQ1OT1/miR-24-3p 调控 FASL 细胞凋亡信号。这种 ceRNA 存在的竞争机制为研究机体凋亡提供了新的方向。

1.4 转录组学的发展概况

转录组学(Transcriptomics)是指一门在整体水平上研究一些特定细胞、组织等中基因转录的情况及转录调控规律的学科^[66]。转录组学是从 RNA 水平研究基因表达的情况。它是在这些细胞、组织等发展到特定的生长阶段下所有转录本的科学,这些转录本也被称作转录组,其中不仅包含了编码蛋白质的 mRNA,同时也涵盖了非编码 RNA^[67]。转录组即一个活细胞所能转录出来的所有 RNA 的总和,是研究细胞表型和功能的一个重要手段。和其它比较稳定的基因组不同的是,转录组是可以伴随着生产的发育阶段产生的改变而进行不断变化的^[68]。转录组的定义中包含了时间和空间的限定。所以在对生物生长发育、应激生理等进行研究的过程中,最有力的手段就是转录组分析。

1.4.1 转录组学在动物毒理学中的运用

近年来转录组学在动物毒理学中的应用越来越多。比如有研究应用转录组学测序方法解析蓝藻毒素MC-LR暴露对白鲢肝毒性的分子机制研究,不但发现了包括Wnt、p53、磷脂酰肌醇3、NF- κ B等信号通路与其毒性作用机制相关,也发现了与其相关的新的信号通路^[69]。目前已有学者应用转录组对氨态氮在动物体内毒性分子机制进行研究,曹滕飞等^[70]利用转录组分析了氨态氮对菲律宾蛤仔毒性研究,通过geNorm和Normfinder软件,以暴露30 d中不同时间点的鳃组织cDNA为模板,发现在6个备选管家基因中,当选择EF1 α 作为内参基因时,unigene1的qRT-PCR的表达趋势与其转录组表达倍数的变化趋势一致,以此确定对菲律宾蛤仔进行NH₃-N暴露时,EF1 α 是在鳃组织中表达最为稳定的内参基因。在锯拟环纹豹蛛的毒理机制研究中发现^[71],锯对拟环纹豹蛛的代谢和消化过程有严重的影响,差异表达基因(DEG)功能富集分析表明,抗氧化酶等基因、信号转导分子、热休克蛋白和跨膜转运蛋白在拟环纹豹蛛响应锯胁迫中发挥了重要作用。王成花^[72]应用基因本体(GO)显著性富集分析及京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)富集分析,确定了在对刺激物的反应、应激反应及代谢过程方面小菜蛾对氟苯虫酰胺产生抗性的分子机制。

1.4.2 转录组学在家禽中的运用

转录组学在家禽研究中起到了重要作用。高广琦^[73]应用二代测序技术,测得了红腹锦鸡全基因组序列和锦鸡羽毛毛囊组织转录组序列,并进行了组装,其中基因组大小为 1.029 Gb,注释到 16088 个蛋白编码基因,10 个样本的转录组组装序列 57.66 Gb,注释得到 15118 个基因。经过进一步表达分析及鉴定发现了一系列参与红腹锦鸡羽毛黑色素和类胡萝卜素调控的因子,为开展色素相关基因的功能研究奠定了基础。赵玉辉^[74]研究首次进行了 AIV 感染鸡脾脏蛋白质组和转录组表达的分析,通过对比 AIV 感染组与对照组得到差异表达基因 2457 条,其中上调基因 1284 个、下调基因 1173 个,结合 GO 分析和 KEGG 检索分析,整理出 24 个类别和 137 个信号通路,这些研究丰富了人们对 AI 的致病机制和病毒与宿主间相互作用的了解,也为进一步研究和筛选抗病毒药物宿主靶标奠定基础。韩昆鹏等^[75]利用转录组测序

(RNA-Seq)技术对检测了京海黄鸡卵巢的转录组,对数据进行生物信息学分析后筛选出1445264个京海黄鸡品种内SNP位点,其中位于基因区的SNP位点916108个,位于基因间区的SNP位点552168个,该研究了完善京海黄鸡的基因结构信息,同时也从分子水平发掘了潜在的新基因。丛锋^[76]在IBV的致病机制和宿主的抗病毒机制的研究中应用IBV感染后宿主,利用转录组学分析了宿主脾脏和肾脏全基因表达的差异情况,分析后表明IBV感染后宿主后,脾脏参与了宿主对IBV的免疫反应,引发的免疫反应在感染早期高于感染晚期,而引发的炎症反应在感染晚期要高于感染早期;采取IBV感染致死鸡的肾脏检测发现,差异表达基因共有1777个,其中有103个与免疫和炎症相关的基因,这些包括干扰素诱导跨膜蛋白1(IFITM1)在内的基因能够组成一个以IL6, STAT1, MYD88, IRF1和NFkB2为中心的相互作用网络,提示在宿主抵抗IBV感染过程中可能是这些基因发挥了重要的作用。林雨鑫^[77]进行了鸡球虫病的研究,采用RNA-seq技术分析了感染鸡盲肠组织的基因组表达水平,结果发现感染与未感染的鸡盲肠组织有5477个基因表达差异显著,这里包括其中2942个上调基因和2535个下调基因;通过GO和KEGG通路的富集分析发现这些存在差异的基因主要与血管生成、炎症应答、细胞交流、脂类代谢、免疫/防御、信号转导等相关,在感染后鸡体内产生了复杂的免疫应答,包括涉及过氧化物酶体增殖物激活受体、细胞因子-受体相互作用、过氧化物酶体、黏着斑、细胞外基质-受体相互作用等信号通路。

1.5 蛋白质组学研究概述

澳大利亚学者Wilkins和Willias在1994年首次提出了蛋白质组学的概念。它是指从细胞水平、组织水平、分子水平上对某一环境中所有的蛋白质进行检测,从而研究环境中蛋白表达情况规律及分子相互作用关系的研究方法。其本质就是应用高通量检测某一特定环境或时间中的所有蛋白质的特征^[78]。蛋白质组学研究方法通过检测在不同环境、不同时间、不同生理状态或处理方法条件下检测蛋白质表达情况,包括蛋白丰度情况,以此分析各种条件对不同种类蛋白与各种刺激条件的关系及蛋白质之间的作用关系。

现阶段常用的蛋白质组学研究方法包括有无标记质谱鉴定技术(Label free)、同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)、双向电泳技术(2-DE)以及串联质谱标记(TMT)等。TMT(Tandem Mass Tag)是多肽体外标记技术具有高效、适用范围广和高灵敏度的优势^[79]。这种技术能够对10组不同样品同时进行检测,采用10种同位素的标签,标记多肽的氨基基团,经过LC-MS/MS分析。现在TMT技术是实验室进行蛋白组学分析常用的差异蛋白质组学技术,它在动物发育分化机理、药物作用靶点、抗胁迫机制、动物抗病、疾病标记物筛选等领域都有广泛应用。

1.5.1 蛋白组学在动物毒理学中的运用

尽管近年来蛋白组学研究内容及技术发展较快,但在科研技术飞速发展的条件下,蛋白组学研究仍存在研究手段落后的问题。其在动物毒理学研究中的应用也仍然不够深入,随着技术发展和对动物毒理认识的加强,从蛋白水平研究分析毒物的具体作用机制与靶点都将是重点研究方向,寻找监测的毒物作用的蛋白生物标志物和毒物中毒的药物治疗靶标都将是蛋

白组学研究的优势和特点。

在动物毒理的相关研究中,蛋白组学的应用成为了近年来深入研究与探讨的重要方法。比如在镉和砷对紫贻贝的毒性效应机制的研究中,于德良^[80]将蛋白质组学技术与传统毒理学方法相结合,结果发现镉的毒性干扰了稚贝的细胞骨架、免疫调节和信号转导等过程,而砷暴露则是从能量代谢、细胞凋亡、基因表达和氧化应激反应等方面影响稚贝。程华民^[81]在粗野鹿角珊瑚对苯并芘(BaP)胁迫响应实验中应用了蛋白组学的方法,从差异蛋白质的表达情况具体研究并分析了珊瑚在应答 BaP 时的毒理作用及其机制,通过蛋白分析发现其中的差异蛋白主要是参与了细胞代谢、有机物代谢、调控生物合成、自我调节、生物应答、细胞自噬、毒性及解毒作用相关的,该研究为珊瑚礁生态系统的保护和修复提供重要依据。还有在污染胁迫下蚯蚓的蛋白质组学研究中,李德金等^[82]选取了不同的污染物下蚯蚓作为研究对象,通过蛋白组学检测及分析发现其中的差异蛋白主要涉及信号传导、糖酵解、能量代谢、分子伴侣和转录调节等过程,提示了相关污染物可能的生态毒理学机制,有望成为潜在的生物标志物,用于有毒污染物的监测。

蛋白组学在有关氨的毒理学研究也越来越多,例如高娜^[83]的实验中将海水青鳉暴露于 0.6 mmol/L 氯化钠条件下,利用蛋白质组学的研究技术研究发现有 16 种蛋白的表达发生明显的变化,这些蛋白主要参与氧化应激的产生,影响海水青鳉细胞结构组成、肌肉收缩、视觉通路、代谢调节和免疫调节,引起神经毒性。通过利用蛋白质组学的研究方法研究了长期氨氮暴露对海水青鳉的毒理效应,为利用蛋白质组学探讨环境污染物的毒性效应提供了更深刻的认识。

1.5.2 蛋白组学在家禽中的运用

蛋白质组学技术的快速发展及应用对禽类在日常生产、营养状态、疾病诊断与防治中都有着重要的意义和作用。蛋白组学在禽类生产和疾病防治方面都有广阔的应用前景。

比如禽类蛋壳最外层的角质层有多种未被发现的蛋白成分,这些蛋白有着不同的生物学功能。Megan 等人^[84]通过蛋白组学方法研究发现这些蛋白成分具有一定的抗菌作用,可有效防止外界微生物对蛋内环境的干扰。在对蛋壳的强度研究实验中,Sun 等^[85]对高强度的蛋壳和低强度的蛋壳进行了蛋白质组学研究分析,对其中的蛋白表达情况进行分析,包括蛋壳基质特异性蛋白,钙结合和运输,蛋白质折叠和分选,发现骨发育或疾病以及甲状腺激素活性相关的 15 种蛋白质被认为与蛋壳的形成强度密切相关。通过蛋白组学研究方法分析,Sophis 等^[86]进行了孵化 12 d 后的受精蛋和非受精蛋的卵黄蛋白成分含量的变化研究,发现共有 69 种蛋白的含量显示差异表达,这些结果对今后蛋类在孵化期蛋白变化和蛋类储存中蛋白的变化都有一定的借鉴作用。在对不同品种鸡蛋中的蛋白成分对比分析后,Wang 等^[87]在不同蛋品种中发现了 19 种高丰度的差异蛋白,这就表示真正区分不同鸡蛋品种的关键因素是蛋白质的含量。

在禽类病毒的相关研究中,我们能够通过对其进行蛋白组学分析,进一步阐明其致病机理及其具体的生物学进程。比如 Zheng 等^[88]进行禽传染性法氏囊病毒(IBDV)感染细胞的研究,实验中通过蛋白质组学检测发现 51 种差异表达蛋白,在 IBDV 感染的细胞中发现细胞泛素表达量显著增多,抑制了 RhoA 蛋白表达,并且细胞骨架微丝和中间丝蛋白的结构受到了

破坏。蛋白组学研究方法在禽流感的相关研究也越来越多, Cheung 等^[89]进行了 H5N1 AIV 感染人巨噬细胞的实验研究, 通过蛋白质组学方法发现 H5N1 AIV 感染 1 h 后, 宿主细胞的蛋白质组分就产生了显著的变化, 这表明 H5N1 AIV 可能在感染早期的自身的复制是通过利用宿主细胞蛋白的合成机制来完成的, 这种实验结果可能为病毒的诊断、治疗及其感染研究提供了新的思路。

在病毒对禽类感染过程的研究中, 学者们通过蛋白组学方法研究发现了许多差异表达蛋白, 这些蛋白有可能指示着多方面的生物学意义。吴双^[90]在新城疫病毒 (NDV) 感染的鸡胚成纤维细胞的研究中应用蛋白组学, 并在感染后成功鉴定出 36 种差异表达蛋白。王郁杨等^[91]进行了鹅 NDV 的感染研究, 感染后通过蛋白质组学研究发现 Hert/33 感染组脾脏组织有 154 个差异蛋白, 而 JS5/05 感染脾脏组织有 148 个差异蛋白, 这其中有 86 个是两组中共有的蛋白质。Lu 等^[92]在进行马立克氏病病毒 (MDV) 强毒感染 SPF 鸡的研究中利用 2-DE 结合 MALDITOF-MS 的方法分析了不同阶段的法氏囊差异蛋白谱, 通过蛋白质表达情况检测发现 26 种差异表达蛋白, 这些蛋白的主要功能与细胞分化、免疫防御、肿瘤及细胞凋亡等密切相关。进一步的研究阐明了这些蛋白在 MDV 中的作用, 为今后的研究奠定了基础。胡顺磊^[93]进行了网状内皮组织增生症病毒 (REV) HLJ071 毒株感染 1 日龄的 SPF 鸡的实验研究对其进行接种后 7、14、21 d 鸡脾脏蛋白质组学分析, 该项研究一共成功鉴定出 60 个差异蛋白, 鉴定出的蛋白主要功能与细胞骨架、大分子代谢、应激反应、信号转导、细胞增殖及凋亡等相关性较强, 在这个实验中得到了比较完整的 REV 感染后脾脏差异蛋白质数据, 同时分析了鉴定蛋白的具体功能并探讨了 REV 和宿主的相互作用关系, 为进一步分析 REV 引起免疫抑制机制奠定了基础。

总的看来, 近年来蛋白组学研究的发展对家禽的多方面研究中起着至关重要的作用, 为我们开展禽类疾病的研究提供了更多的思路和研究方法; 在长远发展角度来看, 家禽蛋白质组学的相关工作对推动我国家禽科研的发展有着重要的意义。

1.6 研究目的与意义

现阶段集约化养殖和现代化养殖水平不断提高, 动物饲养密度增加, 数量不断上升, 活动空间狭窄, 舍内微生物剧增以及粪便、垫料和饲料残渣混合作用, 不断地产生氨气, 氨气浓度的增加严重危害禽类和饲养人员的身体状况。养殖场饲养过程中产生的氨气也是大气污染气体来源之一。针对氨气的生态风险评估与毒性机制研究已成为热点科学问题。目前, 围绕鸡氨气暴露的研究中, 大多关注于呼吸道、肝脏的损伤及生产性能等方面, 且多为细胞水平和形态学变化。lncRNA 的功能对动物生理和病理过程有重要的意义, 越来越多的研究发现 ceRNA 调控靶基因的转录与翻译。为探讨 lncGRN/miR-6615-5p 在鸡氨暴露胸腺淋巴凋亡中的作用。本课题在建立氨中毒基础上, 通过全转录组学、蛋白组学分析胸腺组织内 ceRNA 调控网络表达的变化, 并结合生物信息技术, 筛选氨暴露特异性 lncGRN/miRNA、靶基因以及凋亡发生中的信号转导通路。在此基础上, 通过原代培养鸡脾脏淋巴细胞, 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-6615-5p 与 SMAD7、lncGRN 与 miR-6615-5p 之间存在靶向结合关系, 确定 ceRNA 调控网络的存在。建立 miR-6615-5p 过表达/抑制模型, 确定其调控靶基因 SMAD7 的表达。本研究揭示了一种由 lncGRN、miR-6615-5p 与 SMAD7 组成的 ceRNA 调控网络, 为

胸腺凋亡机制提供了新的见解。

氨气对免疫器官及功能的影响对禽类机体的影响十分关键，但其对于胸腺的损伤情况尚不清楚，并且暂未发现有关其全转录组学测序和蛋白组学的研究。整合转录组学和蛋白质组学研究鸡氨气暴露对胸腺的影响，可以系统分析氨气暴露对鸡毒理效应及机体应答机制。本研究通过转录组学和蛋白质组学技术研究方法，结合传统毒理学研究手段，旨在从整体水平阐明氨气对鸡胸腺的致毒机理，探究鸡在不同浓度的氨气暴露条件下的毒理效应差异。本研究为解析氨气对鸡胸腺的毒性效应机制提供了较为系统的研究基础，从而为氨气暴露后的分子生物学进程提供了科学依据。

本研究结合生产现状，设定对照组（处于低 NH_3 浓度，0~6 周为 5 mg/m^3 ）和氨气处理组（ NH_3 浓度，0~3 周为 20 mg/m^3 ，4~6 周为 45 mg/m^3 ），分别暴露在不同浓度的氨气条件下，以肉仔鸡为研究对象，观察鸡氨气暴露在后对胸腺的具体影响，研究目的主要包括以下四个部分：

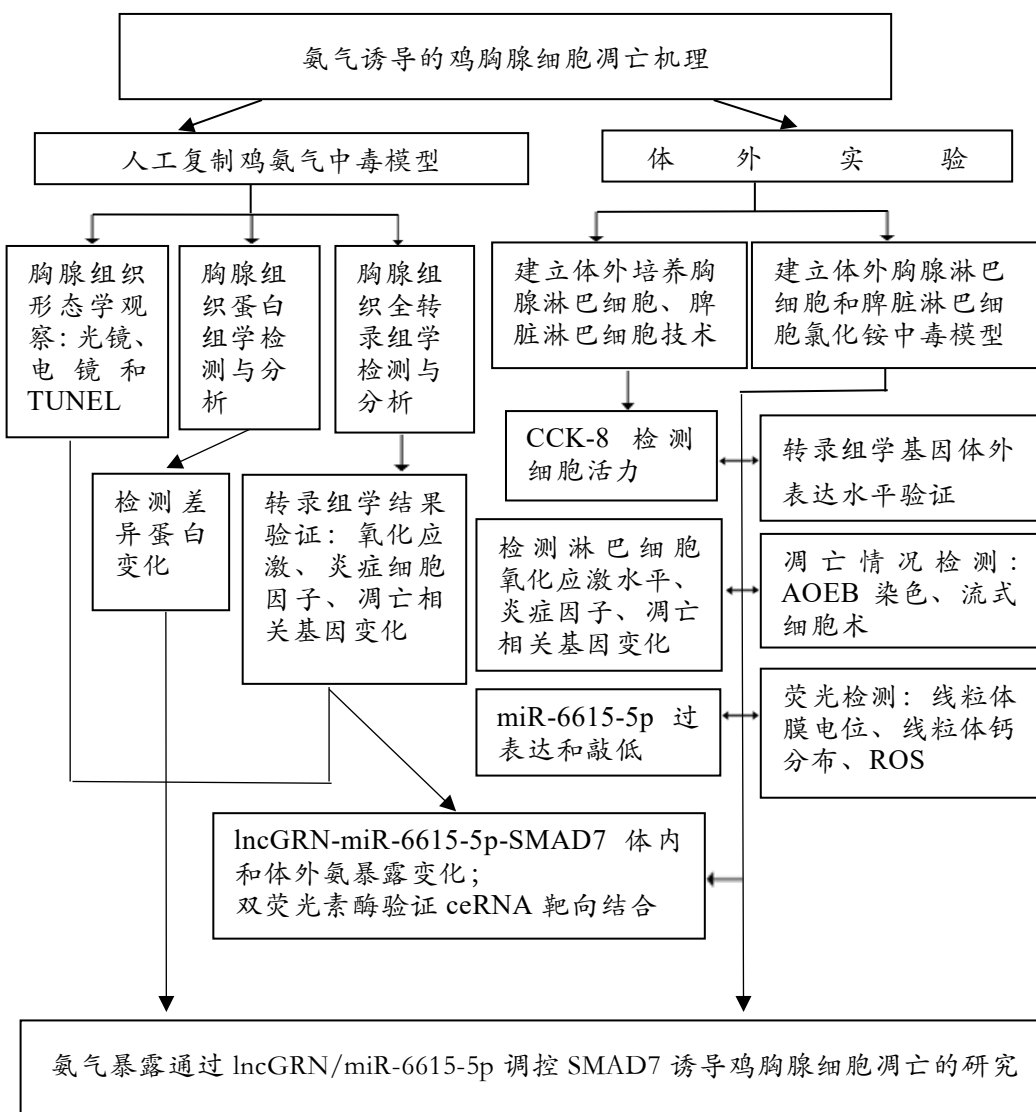
（1）观察氨气暴露后胸腺组织形态学变化，研究组织病理学和组织超微结构变化，确定氨气对胸腺造成损伤情况。

（2）利用全转录组学和蛋白组学研究方法分析鸡胸腺在氨气暴露后 mRNA 和蛋白代谢物的变化，筛选鸡氨气暴露后胸腺组织中的差异基因和蛋白，通过生物信息学分析基因和蛋白功能和代谢通路等影响。

（3）测定氨暴露后体内和体外 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 表达的变化，确定 SMAD7 诱导了细胞凋亡发生。双荧光素酶报告验证 ceRNA 靶向结合；lncGRN 作为 ceRNA 通过 miR-6615-5p 调节 SMAD7 的表达。

（4）体内和体外试验研究氨暴露诱导鸡胸腺组织和淋巴细胞发生氧化应激、炎症反应和细胞凋亡，氨暴露通过线粒体途径诱发凋亡。

1.7 技术路线



2 材料与方法

2.1 主要仪器和试剂

2.1.1 主要仪器

高速低温离心机 (Sigma 公司);
-80℃ 冰箱 (美国 Thermo 公司);
318MC 酶标仪 (上海三科仪器有限公司);
DK-8D 型电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司);
紫外分光光度计 (Promega 公司);
超净工作台 (苏州净化);
多功能酶标仪 (Spectra Max iD3);
荧光显微镜 (美国 Life Technologies);
Amersham Imager 600 凝胶成像系统 (美国通用电气公司);
F90 二氧化碳培养箱 (上海力康公司);
倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司);
电热干燥培养箱 (南京试验仪器厂);
罗氏 480 实时定量荧光 PCR 仪 (罗氏公司);
FA1604N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司);
流式细胞仪 (美国 BD 公司);
电泳仪 (伯乐公司);
电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂);
生物发光仪 (美国 GE 公司)。

2.1.2 主要试剂

NaCl (国产分析纯);
Trizol (大连宝生物公司);
胎牛血清 (BI 公司);
RIPI 细胞裂解液 (碧云天);
反转录试剂盒 (大连宝生物公司);
L-多聚赖氨酸 (Sigma 公司);
BCA 蛋白浓度测定试剂 (Solarbio 公司);
氯化铵 (Sigma 公司);
E.coli DH5 α 感受态细胞 (北京天根公司);

Opti 培养基 (BI 公司);
 脱脂乳 (完达山公司);
 DEPC 试剂 (鼎国生物技术有限公司);
 RMPI 1640 (BI 公司);
 青链霉素混合液 (HyClone 新西兰);
 CCK-8 增殖试剂盒 (上海尚宝生物公司);
 Real-Time PCR 试剂盒 (大连宝生物公司);
 Annexin-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (南京凯基公司);
 RFect 质粒 DNA 转染试剂盒 (常州百代生物);
 RFect 悬浮细胞小核酸转染试剂 (常州百代生物);
 AO-EB 双染试剂 (Solarbio 公司);
 超敏 ECL 化学发光液 (海基生物公司);
 MiRcute microRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (北京天根公司);
 MiRcute microRNA 荧光定量检测试剂盒 (北京天根公司);
 SYBR Green Master (罗氏公司);
 蛋白酶抑制剂 PMSF (碧云天);
 RFectSP 悬浮细胞小核酸转染试剂 (百代生物);
 鸡脾脏淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物公司);
 AOEB 试剂 (Solarbio 公司);
 活性氧 (ROS) 测试盒 (南京建成);
 线粒体膜电位 (碧云天);
 细胞可渗透钙离子荧光探针 (上海翊圣);
 Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega 公司);
 胶回收试剂盒 (Solarbio 公司)。

2.2 实验设计

2.2.1 动物分组与饲养

本研究共使用 80 只肉鸡 (1 日龄, 中国哈尔滨威威有限公司), 所有鸡自由采食和饮水, 并饲养在呼吸代谢舱 (尺寸长×宽×高: 4.5 m×3.0 m×2.5 m)。通过计算机自控程序全封闭管理, 根据雏鸡日龄调控相应的温度和湿度。温度设定第 1 周时为 33℃ 的育雏温度, 第 2 周为 30℃, 第 3 周为 27℃, 第四周为 25℃, 第 5~6 周温度保持在 21℃。湿度在 60%~70%, 采用灯泡照明, 0~3 日龄, 每天光照 23 h。3~42 日龄每天光照 16 h。进风口和出风口双向控制通风量, 使用液氨瓶 24 h 保持氨气浓度, 实时监测氨气浓度。确保呼吸舱内环境条件的均匀一致, 参照王长平^[94]的研究。饲养条件设置依据罗斯 308 商品代肉鸡管理手册而定。这些肉鸡随机被分为两组, 平均每组 40 只。具体分组及处理方法如下:

对照组: 低 NH_3 浓度, 0~6 周为 5 mg/m^3 ;

氨气处理组：高 NH_3 浓度，0~3 周为 20 mg/m^3 ，4~6 周为 45 mg/m^3 。

鸡舍内氨气浓度的设定依据中华人民共和国农业行业标准畜禽场环境质量标准 NY/T388-1999，雏鸡 10 mg/m^3 ，成鸡 15 mg/m^3 ，根据罗斯 308 商品代肉鸡管理手册，14 日龄以下的肉鸡属于雏鸡。对照组氨气浓度设定是畜禽场环境质量标准的 0.5 倍；氨气处理组氨气浓度设定在鸡 0~3 周日龄是畜禽场环境质量标准的 2 倍，4~6 周时是畜禽场环境质量标准的 3 倍。

42 d 时，对照组没有鸡死亡的情况，氨气处理组死亡 8 只鸡，可能是由于氨气刺激导致机体免疫功能下降，抵抗力下降发生死亡。在 42 日龄时用戊巴比妥钠进行安乐死，分离出胸腺，用冰的生理盐水清洗。一部分胸腺组织立即放入液氮中，放入 -80°C 保存，用来检测抗氧化酶（GPx 和 GST4），炎性细胞因子（IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、HO-1、NF- κ B、COX-2、iNOS、TNF- α 和 TGF- β ），凋亡相关基因（BCL-2、BAK、BAX、Cyt c、APAF1、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 和 SMAD7），非编码 RNA（circRNA-ZNF644、circRNA-RP11、circRNA-SMC6、circRNA-ARAP2、lncGRN、miR-6615-5p、miR-15a 和 miR-187）的 mRNA 以及蛋白的表达；一部分胸腺组织甲醛浸泡，用于病理组织学形态观察；一部分胸腺组织使用 2.5% 戊二醛固定，用于超微结构形态学观察；一部分胸腺组织（每组三个重复）进行全转录组学测序，干冰保存运输送往烈冰有限公司（NovelBio，上海）；一部分胸腺组织（每组取六个样品）经干冰保存运输，委托中国农业科学院北京畜牧兽医研究所蛋白质组学研究中心进行蛋白质组定量分析。

2.2.2 病理组织学结构观察

用 10% 甲醛将切好的组织块过夜固定，自来水冲洗数小时，梯度酒精脱水除去组织块内多余水分和丙酮透明处理、浸蜡和包埋组织。切片机连续切片，设定 $5 \mu\text{m}$ 的厚度，用镊子将切片平铺水面上，展开切片并固定到载玻片； 60°C 烘箱烤 1 h 除去间隙中石蜡；使用苏木素和伊红染色即 H.E 染色法，再经脱水、透明和树胶封片；切片干燥后，光学显微镜观察。

2.2.3 超微结构学观察

将分离的胸腺组织用预冷的生理盐水洗净，冰袋上切取 1 mm 左右大小的组织；用 2.5% 戊二醛溶液固定，锡纸包裹避光，放于 4°C 冰箱保存；缓冲溶液洗涤 3 次；用 2% 的 OsO 固定 1.5 h；缓冲溶液洗涤 3 次；用乙醇梯度脱水；用等体积混合的乙醇和丙酮混合液置换一次；包埋剂浸透过夜；聚合；切片，设定厚度 50 nm ；染色；透射电子显微镜观察。

2.2.4 TUNEL 染色细胞凋亡检测

石蜡切片脱蜡后， H_2O_2 水避光孵育，蒸馏水漂洗，柠檬酸缓冲液高温处理。分别用蒸馏水和 PBS 洗涤，TUNEL 反应混合液，避光作用 1 h。PBS 洗涤，转化-POD 溶液孵育。PBS 洗涤，DAB 避光孵育。使用苏木素复染。再经脱水、透明和树胶封片；切片干燥后，光学显微镜观察。每张切片随机取 5 个视野，统计总细胞数和 TUNEL 阳性细胞数目，计算凋亡率。

2.2.5 高通量测序

2.2.5.1 样品送检

胸腺样品对照组和处理组各取三个生物学重复,分别命名为(对照组)C-XX1, C-XX2, C-XX3, (处理组)N-XX1, N-XX2 和 N-XX3。样品经干冰保存运输。委托上海烈冰公司进行测序。

2.2.5.2 测序原始数据、GC 含量分布等测序数据过滤

将高通量测序平台 Illumina Hi Seq TM2000 测序获得数据经碱基识别转化为原始测序序列即 Raw Reads。Fa 文件为测序得到的序列。GC 含量的测定用于观测有无碱基分离,避免由于建库造成的误差。理论上 GCAT 碱基在每次测序循环上数量应保持一致。为保证高质量的 clean reads, 应将低质量的 reads 和接头剔除和过滤掉。

2.2.5.3 Reads 在基因组 mapping 以及在染色体上的密度分布

鸡的基因组测序已经完成,本研究为真核有参转录组测序。Clean reads 和基因组进行序列比对(mapping),然后统计总序列比对 reads 比对到基因组上在各个染色体的密度数量,记录染色体长度和 reads 总数的关系。

2.2.5.4 基因的差异表达筛选

所有差异基因表达使用的是 RPKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads),即不考虑基因长度,计算的是每个基因的表达数,可以有效避免长序列碱基造成的统计量偏高问题。每组设立三个生物学重复,对差异基因筛选的标准为 $\log_2FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$ 。

2.2.5.5 差异基因 GO 富集分析

GO 富集分析 (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>) 是对基因功能分类的一种体系。主要富集三个方向,分别是生物过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function),得到的差异基因进行基因功能上分类,采用 Fisher 计算显著性水平既 $p < 0.05$,多重假设检验的结果校正 $FDR < 0.05$ 。

2.2.5.6 ceRNA 联合分析

由于在 mRNA 上存在多种 miRNA 的应答元件 MRE,而 miRNA 通过 MRE 与靶向 mRNA 结合,导致 mRNA 翻译被抑制或者被降解,影响蛋白的表达,因此 miRNA 主要以负调控的方式来调节 mRNA 的表达水平。另一方面,ncRNA 也能吸附 miRNA,进而影响 miRNA 对于 mRNA 的调控作用,这里的 ncRNA 和 circRNA 就可以作为 ceRNA。也就是说,满足这个关系的差异 mRNA 和差异 lncRNA 的表达情况应为正相关,即上下调一致,也就是所谓的 ceRNA 作用。结合靶基因预测,保证在 lncRNA、miRNA 和 mRNA 三者联合分析的结果中 lncRNA 和 mRNA 二者的趋势相同。选取全部显著性差异 mRNA、lncRNA 和 miRNA 构建 ceRNA 联合分析。

靶基因的验证使用 miranda 算法和 RNAhybrid 算法相结合的方式。

(1) 用 miranda 算法 (Score $\geq$ 140, Score $\leq$ -15) 分别对各组显著差异 miRNA 和显著差异 lncRNA/mRNA 的靶向关系进行预测;

(2) 用 RNAhybrid 算法 (Score $\leq$ -20) 分别对各组显著差异 miRNA 和显著差异 lncRNA/mRNA 的靶向关系进行预测;

(3) 取两种算法的交集作为靶基因预测的最终结果。结合靶基因预测, 保证在 ncRNA、miRNA 和 mRNA 三者联合分析的结果中 ncRNA 和 mRNA 二者的趋势相同。

2.2.6 ceRNA 调控网络的靶向关系验证

2.2.6.1 ceRNA 调控网络的生物信息学方法预测

采用 RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/>) 在线工具预测 miR-6615-5p (miR-6615-5p) 与 SMAD7、lncGRN 与 miR-6615-5p 存在的结合位点, 具体见图 2-1 和图 2-2。

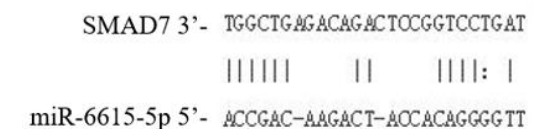


图 2-1 miR-6615-5p 与 SMAD7 的结合位点

Fig.2-1 binding sites of miR-6615-5p and
SMAD7



图 2-2 lncGRN 与 miR-6615-5p 的结合位点

Fig.2-2 binding sites of lncGRN and miR-
6615-5p

2.2.6.2 培养细胞的准备工作

(1) 器材的消毒灭菌: 将清洗后的普通眼科有齿直镊、眼科剪、200 目不锈钢筛网等器械一并包装后高压灭菌, 烘箱内烘干后备用;

(2) 铺板: 培养前 1 d, 96 孔板中每孔加入 100 μ L 浓度为 20 μ g/mL 多聚赖氨酸, 四周用封口膜封闭, 37 $^{\circ}$ C 作用过夜, 次日回收多聚赖氨酸, 用 PBS 清洗 96 孔板 3 次, 晾干备用。

(3) 超净台紫外照射 30 min。提前预热 PBS, 细胞培养液。

2.2.6.3 鸡淋巴细胞的原代培养

(1) 胸腺淋巴细胞的原代培养

45~60 日龄蛋鸡心脏采血处死后, 用 0.2% 新洁尔灭浸泡 10 min, 消毒后转移到细胞间进行后续操作。剖开颈部皮肤, 取出胸腺放置到平皿中, 剥离胸腺外膜, 用眼科剪刀将胸腺剪成小块。将组织块放在 70 μ m 细胞筛网上, 注射器胶塞轻轻挤压, 反复研磨, 边研磨边加入匀浆冲洗液滤过筛网成细胞悬液。弃去筛网, 离心组织滤过液 4000 r/min, 20 min, 弃掉上清液, 5 mL 样本稀释液重悬沉淀细胞。另取 15 mL 离心管, 加入 5 mL 分离液。移液枪缓慢将重悬的细胞液加到分离液上。离心 10 min, 4000 r/min。借助分离液, 由于红细胞和淋巴细胞密度不一样, 离心管内分为四层, 移液枪小心吸取第二层淋巴细胞分离层到新的离心管。加 8 mL 洗涤液, 重悬混匀细胞。离心 10 min, 4000 r/min。弃掉上清。移液枪加 5 mL 清洗液重

悬混匀细胞。离心 10 min, 2000r/min, 清洗液重复洗涤一次, 弃掉上清后加入 10 mL 含 10% 胎牛血清含双抗 (浓度 1%) 的 RPMI1640 培养基重悬细胞。

(2) 脾脏淋巴细胞的原代培养:

45~60 日龄蛋鸡心脏采血处死后, 用 0.2% 新洁尔灭浸泡 10 min, 消毒后转移到细胞间进行后续操作。剖开胸腹腔, 取出脾脏放置到平皿中, 剥离脾脏外膜, 用眼科剪刀将脾脏剪成小块。将组织块放在 70 μ m 细胞筛网上, 注射器胶塞轻轻挤压, 反复研磨, 边研磨边加入匀浆冲洗液滤过筛网成细胞悬液。弃去筛网, 离心组织滤过液 4000r/min, 20 min, 弃掉上清液, 5 mL 样本稀释液重悬沉淀细胞。另取 15 mL 离心管, 加入 5 mL 分离液。移液枪缓慢将重悬的细胞液加到分离液上。离心 10 min, 4000r/min。借助分离液, 由于红细胞和淋巴细胞密度不一样, 离心管内分为四层, 移液枪小心吸取第二层淋巴细胞分离层到新的离心管。加 8 mL 洗涤液, 重悬混匀细胞。离心 10 min, 4000r/min。弃掉上清。移液枪加 5 mL 清洗液重悬混匀细胞。离心 10 min, 2000r/min, 清洗液重复洗涤一次, 弃掉上清后加入 10 mL 含 10% 胎牛血清含双抗 (浓度 1%) 的 RPMI1640 培养基重悬细胞。

2.2.6.4 台盼蓝染色检测细胞活力

台盼蓝是一种细胞染料, 可通过死亡细胞的细胞膜, 其通透性增加, 使细胞在显微镜下呈现淡蓝色。而台盼蓝无法进入到活的细胞体内, 活细胞不被染色。取上述细胞悬液稀释 20 倍后, 取 90 μ L 细胞稀释液置于 EP 管内, 加入 10 μ L 4% 台盼蓝溶液混合, 染色 3 min。吸取 10 μ L 染色后的细胞悬液, 加入到血细胞计数板中, 镜下计数, 查四个角的大方格和中间的 1 个方格内蓝色细胞数和细胞总数。染色后尽量在 10 min 内操作完, 避免活细胞被染料聚集而染上颜色, 造成结果误差。用台盼蓝检测细胞活力大于 95% 以上时继续后续实验。

2.2.6.5 CCK-8 检测细胞活力

CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 在细胞培养基中可被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有水溶性的黄色甲臞染料, 活细胞数量越多产生的甲臞数量越多, 二者成正比。

用天平称取氯化铵约 0.214 g, 溶于 2 mL 培养液中, 过滤除菌, 采用倍比稀释成最终使用的浓度 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、5.0 mmol/L、25 mmol/L 和 125 mmol/L。

96 孔板提前用多聚赖氨酸包被。取 0.25 mg 多聚赖氨酸加 125 mL PBS, 配置成 0.2 mg/mL 的工作液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱存储。使用时用 PBS 10 倍稀释, 过滤除菌后使用。在 96 孔板四周填充 200 μ L PBS, 测量孔加入 100 μ L 浓度为 20 μ g/mL 的多聚赖氨酸, 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜。第二天取出, 回收多聚赖氨酸。用 PBS 清洗三次。放置培养箱烘干待用。

(1) 接种细胞悬液

使用细胞计数板计算细胞的密度, 不断调整至最终密度在 6×10^6 个/mL, 然后将细胞悬液按每孔 100 μ L 加入提前用多聚赖氨酸包被好的 96 孔板中, 96 孔板四周孔用 PBS 填充。将 96 孔板放入 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中生长 3 h 至细胞稳定贴壁。

(2) 加氯化铵

将不同浓度氯化铵培养液加入到 96 孔板中, 每孔 100 μ L 含不同比例稀释的氯化铵, 使氯化铵终浓度为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、5.0 mmol/L、25 mmol/L 和 125 mmol/L。每个浓度设置五个重复, 并设空白孔 (培养液和不含细胞) 和对照孔。

(3) 加 CCK-8

96 孔板放到细胞培养箱, 继续培养 48 h 后, 用加样枪弃掉培养液。之后取出在避光条件下每孔加 CCK-8 试剂 10 μL 和 100 μL 的培养基, 注意不能产生气泡, 再放回培养箱约 3 h 后, 取出 96 孔板, 避光的条件下放入到酶标仪, 测定其在 450 nm 波长处的吸光值, 并记录结果。

2.2.6.6 miR-6615-5p 和 SMAD7 靶向关系的双荧光素酶报告基因系统验证

(1) SMAD7 野生型/突变型 3'UTR 的序列合成

合成表 2-1 的 SMAD7 3'UTR 野生型/突变型序列单链寡核苷酸, 进行退火, 合成互补双链 DNA 片段。其中的结合位点碱基, 转换成对应的其他碱基。取两个单链寡核苷酸各 1 μL (100 μM), 将 48 μL 无菌水加入于 EP 管中沸水煮 5 min, 退火后取出冷却至室温。

表 2-1 SMAD7 3'UTR 野生型/突变型序列

Table 2-1 SMAD7 3'UTR wild type/mutant type sequence

3'UTR	上游引物 (5'-3')
SMAD73'UTR 野生型	CTCAAAGCTCCTGCACTTAAGAGGCTCAGACAGGAGC <u>TGGCTGAGACAGACTCCGGTCC</u> TGATCTCCCTCCCCC CTCCAGAAAAGGATTTATCTGGAAA
SMAD73'UTR 突变型	CTCAAAGCTCCTGCACTTAAGAGGCTCAGACAGGAGC <u>ACCGACAGACACTCTCCGCAGGTGT</u> TCTCCCTCCCCC CTCCAGAAAAGGATTTATCTGGAAA

(2) 琼脂糖凝胶电泳及胶回收纯化

电泳及胶回收纯化。配置琼脂糖凝胶, 合成片段电泳, 胶回收, DNA 产物纯化回收。参考索莱宝 DNA 产物纯化试剂盒说明书。

(3) 表达载体的构建

对表达载体 pMIR-RB-REPORTTM 用 XhoI 和 NotI 进行酶切、纯化, 根据表 2-2 配置酶切反应体系, 总体积为 100 μL 。将反应体系 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴, 反应 4 h, 再次进行胶回收后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

表 2-2 酶切反应体系

Table 2-2 Enzyme Digestion Reaction System

组分	体积
灭菌水	70 μL
XhoI	5 μL
NotI	5 μL
Buffer	10 μL
载体质粒	10 μL

载体图谱如图 2-3:

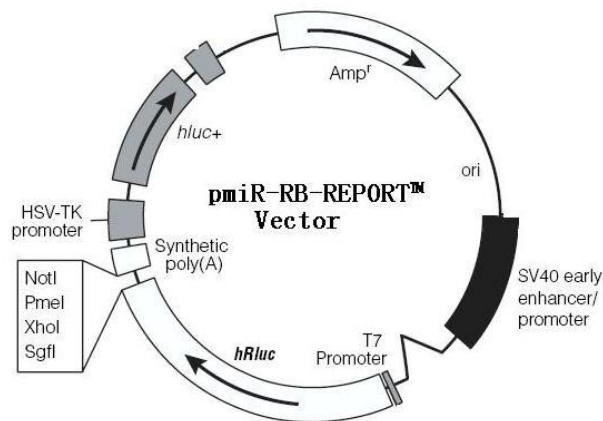


图 2-3 pmir-RB-REPORT 载体图谱

Fig 2-3 The diagrammatic sketch of carrier pmir-RB-REPORT

- (4) 酶切表达载体与 SMAD7 3'UTR 片段连接
- 1) 按照表 2-3 的 10 μ L 连接反应体系进行配制，后进行连接转化。
 - 2) 将装有连接体系的 EP 管放置在金属浴中，16 $^{\circ}$ C 连接 30 min。
 - 3) 取 E.coli DH5 α 感受态细胞，在感受态细胞中加入上述 10 μ L 体系，冰浴 30 min。
 - 4) 将 3) 中转化液 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s。迅速将其放置到冰盒中，作用 2 min。
 - 5) 向 4) 管中加入 900 μ L 不加抗生素的 LB 液体培养液，封口膜将 EP 管口封闭，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 45 min，150 r/min。
 - 6) 2500r/min 常温离心 5min，移液枪弃掉部分上清液，留 100 ul 混匀菌液，涂菌培养，用氨苄抗性的 LB 固体培养基培养，37 $^{\circ}$ C 温箱培养过夜。
 - 7) 分别挑取五个单个菌落于五支 LB 液体培养基（加氨苄抗生素）中扩增。
 - 8) 提取质粒。
 - 9) 将所得质粒送至广州锐博生物科技有限公司进行测序鉴定。

表 2-3 连接反应体系

Table 2-3 Ligation reaction system

组分	体积
T4 连接酶	1 μ L
Buffer	1 μ L
酶切载体	1 μ L
SMAD7 3'UTR 野生型\突变型片段	2.5 μ L
灭菌水	4.5 μ L

(5) 重组质粒转染细胞

- 1) 在 6 孔板中培养淋巴细胞，每孔接种细胞数量保持一致，为 1×10^6 个/mL。
- 2) 培养 24 h 后，转染 miR-6615-5p mimic、mimic NC、重组质粒和海肾荧光素酶载体。配制比例为 pMIR-REPOR: **RFect**=1 μ g: 2 μ L。mimic 稀释至 50 nM。将转染试剂和 OPTI-MEM 培养基混合，室温作用 5 min。将重组载体和 miR-6615-5p mimic 于 OPTI-MEM 培养基混合，室温作用 5 min。然后将转染液滴加到重组载体混合液中。室温放置 20 min。然后将配置好的 DNA 转染混合液加入到 6 孔板中。“8”字晃动培养板混匀。每个样品转染 3 个重复孔。

(6) 双荧光素酶报告基因系统检测

根据下列四个分组，进行双荧光素酶报告基因系统检测：

- 1) mimic NC + pMIR-SMAD7-WT；
- 2) miR-6615-5p mimic + pMIR-SMAD7-WT；
- 3) mimic NC + pMIR-SMAD7-MT；
- 4) miR-6615-5p mimic + pMIR-SMAD7-MT。

37℃培养 48h 后，离心，弃去培养基，用 PBS 洗一次。配置 1×PLB 液体，用超纯水 4 倍体积加一倍体积的 5×PLB，现配现用。每管加 500 μ L 1×PLB。室温摇床摇动 20min，使细胞裂解。取白色不透光的 96 孔酶标板中每孔加裂解好的上清液 40 μ L，使用多功能酶标仪检测，连接试剂 Luciferase Assay Reagent II 和 Stop&Glo Reagent，每孔进样 100 μ L。Stop&Glo Reagent 现用现配，避光配置和保存，用 Stop&Glo Reagent buffer 稀释 50×Stop&Glo Reagent 到 1×Stop&Glo Reagent 而成。测数据，检测萤火虫和内参海肾荧光素酶反应强度。

2.2.6.7 lncGRN 和 miR-6615-5p 靶向关系的双荧光素酶报告基因系统验证

lncGRN 野生型/突变型序列（见表 2-4）合成单链寡核苷酸进行退火，合成互补双链 DNA 片段。构建重组质粒转染细胞，其它步骤及报告基因检测的过程同 2.2.6.6。

试验分组为：

- (1) mimic NC + pMIR-lncGRN-WT；
- (2) miR-6615-5p mimic + pMIR-lncGRN-WT；
- (3) mimic NC + pMIR-lncGRN-MT；
- (4) miR-6615-5p mimic + pMIR-lncGRN-MT。后续操作程序同 2.2.6.6。

表 2-4 lncGRN 野生型/突变型序列

Table 2-4 lncGRN wild type/mutant type sequence

3'UTR	上游引物 (5'-3')
lncGRN 野生型	TGCTGCGGCACAGCCCCGGCTCCGCGTCCCAGCAGTG CGCTGCTCCGGGTGCAGTGTCCCGACAACAGCTCCGCG TGTCCTCGACGGCGCCACGTGCTGC
lncGRN 突变型	TGCTGCGGCACAGCCCCGGCTCCGCGTCCCAGCAGTG CCGACCAAGCGCCACCACAGGGGTCAACAGCTCCGCG TGTCCTCGACGGCGCCACGTGCTGC

2.2.7 miR-6615-5p 过表达/敲低模型的建立

2.2.7.1 转染前准备

分离脾脏淋巴细胞，6 孔板接种细胞，每孔的细胞数量保持一致，浓度为 2×10^6 个/mL，每孔 2 mL。用完全培养基（无双抗）培养 12 h。

miR-6615-5p 的转染效率的检测，设置 miR-6615-5p mimic 终浓度在 50 nM、75 nM 和 100 nM 的转染表达量，通过荧光定量实时 PCR 检测淋巴细胞对照组和转染组 miR-6615-5p 的表达量，确定满足了实验的 miR-6615-5p 的转染量后进行后续实验。

2.2.7.2 过表达/敲低转染

- 每个转染样品设置 3 个重复孔，对于每个转染样品，按以下步骤准备：
- （1）a 液（mimic 稀释液）：用 OPTI-MEM 培养基稀释 50 μ L+5 μ L（20 uM）minic，轻轻混匀，室温孵育 5 min；
 - （2）b 液（RFec 稀释液）：用 opti-MEM 无血清培养基稀释 50 μ L+10 μ L RFect。轻轻混匀，室温孵育 5 min；
 - （3）将 a 和 b 混匀为 c 混合液。室温孵育 20 min；
 - （4）将 c 混合液加入到无双抗完全培养基中，轻轻晃动培养板 5 min 混匀；
 - （5）37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h。miR-6615-5pm、miR-6615-5pi 及其相应 Negative Control 序列见表 2-5。

2.2.7.3 qRT-PCR 验证

- （1）样品搜集：取六孔板内 3 重复孔细胞培养液混合，离心 1500 转，3 min，去上清。预冷的 PBS 1 mL 洗涤一次，去上清，加入 1 mL TRIZOL。用加样枪吹打几次。以上操作均在冰盒上操作，然后将样品做好标号-80℃ 冰箱保存；

表 2-5 miR-6615-5p 模拟物和抑制物序列
Table 2-5 mimic and inhibitor sequences of miR-6615-5p

基因名	Primer Sequence (5'-3')
gga-miR-6615-5p miR-6615-5p mimic	UUGGGGACACCAUCAGAACAGCCA
	正义链：UUGGGGACACCAUCAGAACAGCCA
	反义链：AACCCCTGTGGTAGTCTTGTCGGT
miR-6615-5p inhibitor miR-6615-5p mimic NC	AACCCCTGTGGTAGTCTTGTCGGT
	正义链：UUUGUACUACACAAAAGUACUG
	反义链：AAACAUGAUGUGUUUUAUGAC
miR-6615-5p inhibitor NC	mCmAmGmUmAmCmUmUmUmUmGmUmAmGmUmAmCmAm AmA

注：m 代表 2'-Ome（甲基化修饰）

(2) RNA 提取

常规 Trizol 法提取细胞内的 RNA，将冻存好的样品搜集液，室温缓冻，混匀后，低速离心机 12000 g 离心 20 min (4°C)。移液器吸取 300 μ L 的上清液转移到新的 EP 管后，加入等体积的氯仿，EP 管颠倒数次混匀后室温静置 10 min，让试剂充分混匀。再次低温高速离心 15 min，移液器吸取最上层清液到新的 EP 管，避免碰触到中间的蛋白质层。加入等体积的异丙醇，EP 管颠倒数次混匀后冰盒中静置 15 min。低温高速离心 15 min，EP 管低肉眼可见白色小点，移液枪吸掉上清液，加入 1 mL 70% 的酒精溶液，移液枪吹打几次，洗涤有机溶剂。低温高速离心 10 min，弃掉酒精溶液，室温放置 5 min，等待酒精蒸发。加入 20 μ L DEPC 水，溶解白点 RNA。紫外分光光度计测量 RNA 的浓度和丰度，RNA 样本纯度 (A260/A280 在 1.8-2.1 之间)。调整 RNA 的浓度统一不同样品间 RNA 的量。

(3) 反转录

1) 冰盒上按如下体系配置反转录 cDNA 反应混合液，反应体系为 20 μ L。

RNase Inhibitor	0.5 μ L
10 $\times$ RT Buffer	2 μ L
Golden MLV Reverse Transcriptase	3 μ L
dNTP Mixture	3 μ L
Total RNA Poly (A) RNA	2 μ L
20 $\times$ Oligo dt (25) & RandomPrimer	1 μ L
RNase Free H ₂ O	12.5 μ L

2) 在 PCR 仪上按以下条件进行反转录反应:

30°C	15 min
55°C	30~60 min
85°C	10 min
4°C 终止。-20°C 冰箱保存。	

(4) Real-Time PCR 反应

1) 生工合成好的引物，引物序列见表 2-6，开盖前离心防止扩散，慢慢打开管盖，加入适量的灭菌水，配置成 10 μ M。-20°C 冰箱保存，用于以下 qRT-PCR。

表 2-6 引物序列
Table 2-6 Primer sequence

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Size (bp)
circRNA-ZNF644	F: ACAGTCCATTGATGTATCAGCCAC	175
	R: TGTCCATGGCTCCTTGCACT	
circRNA-RP11	F: ATCCACTTCCACGTCTCTCT	152
	R: TTTCGAAAAGCAACTGCATAGATGT	
circRNA-SMC6	F: ACTGAAAAGCAAATCTGGCGCT	199
	R: CTGCCTTGTTTTGCAGTGTT	

(转下页)

(接上页)

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Size (bp)
circRNA-ARAP2	F: CCAATGTGGCTGAACTGCTGG R: CCAAAGTGCACCATCTTTTGTTC	198
GAPDH	F: AGAACATCATCCCAGCGT R: AGCCTTCACTACCCTCTTG	153
GPx	F: ACGGCGCATCTTCCAAAG R: TGTTCCTCCCAACCATTCTC	132
GST	F: CATCCGATGGCTGCTGTCTGC R: TCTGCACTGCACCAACTTCATCC	154
PIK3CD	F: GGTGTGGAAGCACGCTCAGTATG R: GCTCTTGCTGCTCTGCTGTCTG	101
GOLGA3	F: CGCAGCCATAAGGAACTGGAAGG R: TTGCCATGCTTCAGGTCCATCTTC	197
WHSC1	F: AGCAAGCAAGTGAAGCAGTAGGC R: AGCTCCACAGCAATGCCAACTTC	127
CTSS	F: GGTGATGCTGCACAACCTGGAG R: GGCGGTACGTGGAGGTCTGG	152
BCL-2	F: ATCGTCGCCTTCTTCGAGTT R: CTGACTATCACCAAGAACCACC	150
BAK	F: ACCCGGAGATCATGGAGA R: GATGCCTTGCTGGTAGACG	106
BAX	F: TATGGGACACCAGGAGGGTA R: CGTAGACCTTGCGGATAAAGC	90
Cyt-c	F: AGGCAAGCACAAGACTGGA R: CTGACTATCACCAAGAACCACC	132
P53	F: CCCATCCTCACCATCCTTACA R: CTCGATCTTGCGGTCCCTC	145
APAF1	F: AAGGGCATAAGGAAGCAATCAA R: CAGCACAAGAAAGAACAGCACC	143
Caspase-8	F: TGGGAAAGTGGACAAGAGCCT R: CCACAGATGATGCCAGCCAA	134
Caspase-9	F: CCGAAGGAGCAAGCACG R: AGGTTGGACTGGGATGGAC	107
Caspase-3	F: CTGAAGGCTCCTGGTTTA R: CTCGATCTTGCGGTCCCTC	129

(转下页)

(接上页)

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Size (bp)
NF- κ B	F: TCAACGCAGGACCTAAAGACAT R: GCAGATAGCCAAGTTCAGGATG	162
COX-2	F: TGTCTTTTCACTGCTTTCCAT R: TTCCATTGCTGTGTTTGAGGT	105
TNF- α	F: GCCCTTCCTGTAACCAGATG R: ACACGACAGCCAAGTCAACG	98
HO-1	F: ACTTCTATGGCAGCAACT R: AATAGCGGGTGTAGGC	116
iNOS	F: CCTGGAGGTCCTGGAAGAGT R: CCTGGGTTTCAGAAGTGGC	82
TGF- β	F: GCCGACACGCAGTACACCAAG R: GCAGGCACGGACCACCATATTG	168
IL-1 β	F: GGGACTTTGCTGACAGCGACCTG R: GTCGAAGGACTGTGAGCGGGTGT	142
IL-2	F: GAACCTCAAGAGTCTTACGGGTCTA R: ACAAAGTTGGTCAGTTCATGGAGA	138
IL-4	F: GTGCCCACGCTGTGCTTAC R: AGGAAACCTCTCCCTGGATGTC	147
IL-6	F: AAATCCCTCCTCGCCAATCT R: CCCTCACGGTCTTCTCCATAAA	106
IL-8	F: GAACTGGACAGGGAGAAATGAGA R: ACGCCATCAGGAAGGTTGTT	132
IL-10	F: CGCTGTCACCGCTTCTTCA R: TCCCGTTCTCATCCATCTTCTC	94
IL-12	F: TGTCTCACCTGCTATTTGCCTTAC R: CATAACATTTCTCTCTAAGTTTCCACTGT	87
IncGRN	F: TGCGACGACAGGACGAGCTG R: AGCAGTGCTGGTGGTCCTTACAG	115
SMAD7	F: CTGGTGCGTGGTGGCATACTG R: CTGGCTTCTGTTGTCCGAGTTGAG	145
gga-miR-6615-5p	agTTGGGGACACCATCAGAACAGCCA	
gga-miR-15a	cgcggegTAGCAGCACATAATGGTTTGT	
gga-miR-187	acgGGCTACAACACAGGACATGGGA	
gga-U6	CACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCA	

2) 冰盒上配制下列反应体系。

SYBR Green I	5.0 μL
PCR Forward Primer (10 uM)	0.3 μL
PCR Reverse Primer (10 uM)	0.3 μL
RNase-Free dd H ₂ O	3.4 μL
模板	1.0 μL

3) 扩增条件

预变性 95°C、10 min, 95°C、15 s, 60°C、1 min, 罗氏 480 实时定量荧光 PCR 仪进行检测, 共 40 个循环。熔解曲线确定扩增的特异性, 以 GAPDH 作为内参对照, 所有组做 3 个样品重复, 每个样品做 3 个平行重复。结果分析用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的计算方法统计目的基因 RNA 的相对表达量。

(5) circRNA 和 miRNA 引物的设计

测序结果预测获得 circRNA 的序列, 先进行序列转换。将 3'端 100~200 bp 长度序列置于 5'端 100~200 bp 长度序列前, 构成一个新的序列, 将其输入到 Primer5 软件中按照常规设计引物方法, 设计好的上下游引物序列, 输入到 NCBI 中 BLAST 比对确保引物特异性。

miRNA 上游引物序列设计原则, 将成熟的 miRNA 序列中的 U 替换成 T, 可在 5'端添加或去掉几个碱基确保设计上游引物的 T_m 值, 天根 miRNA 荧光定量检测盒子提供 miRNA 的下游引物, 温度在 65°C 左右, 并应避免引入二级结构。

(6) 鸡胸腺组织 microRNA 提取和 cDNA 合成

miRNA cDNA 合成使用天根 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒。miRNA 3'端采用加 Poly (A) 法。

(7) miRNA 操作步骤

1) 反转录体系的配制

室温下缓冻 2×miRNA RT Reaction Buffer 混匀后使用, 将 miRNA RT Enzyme Mix 置于冰中备用, 无 RNase 的 EP 管置于冰盒上预冷, 加入共 20 μL 如下试剂 ((最后加入 miRNA RT Enzyme Mix)):

Total RNA	2 μL
2×miRNA RT Reaction Buffer	10 μl
miRNA RT Enzyme Mix	2 μl
RNase-Free dd H ₂ O	补至 20 μl 。

用移液器将反应液轻轻混匀后进行反转录, 程序设计为: 42°C 作用 60 min, 95°C 作用 3 min 和 4°C 终止。合成的 cDNA 反应液 -20°C 冰箱保存; 预实验测定 Ct 值在 15-30 之间后, 将 cDNA 模板稀释 10 倍后进行 qRT-PCR 反应。

2) miRNA 荧光定量检测操作步骤

①室温融化 2×miRcute Plus miRNA PreMix、50×ROX Reference Dye 和 Reverse Primer。

②使用前将 2×miRcute Plus miRNA PreMix 上下颠倒均匀混合, 试剂充分混匀离心后再使用。

③将试剂置于冰盒上，按如下体系配制反应液：

组成成分	10 μ l 体系
2×miRcute Plus miRNA PreMix (SYBR&ROX)	5 μ l
Forward Primer (自备)	0.3 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.3 μ l
miRNA 第一链 cDNA	1 μ l
ddH ₂ O	3.4 μ l

罗氏 480 实时定量荧光 PCR 仪进行检测。PCR 反应程序设置：95℃ 作用 15 min，起始模板变性；设置 45 个循环，94℃ 作用 20 s，PCR 循环中模板变性；60℃ 作用 34 s，退火和延伸。对照组和处理组各设定 3 个样品重复，所有样品做 3 个重复孔，鸡的 U6 作为内参，qRT-PCR 法检测 miRNA 表达，相对定量分析的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法。

2.2.7.4 蛋白提取与 Western blot (WB)

(1) 蛋白样品提取：取六孔板内 3 重复孔细胞培养液混合，离心 1500 转，3 min，去上清。预冷的 PBS 1mL 洗涤一次，去上清，加入 1 mL RIPI 蛋白裂解液和 10 μ L PMSF (浓度为 100 mM)。用加样枪吹打几次。以上操作均在冰盒上操作，然后将样品做好标号 -80℃ 冰箱保存。

(2) 蛋白裂解：冰箱内取出蛋白样品，室温缓冻后，放置到 4℃ 冰箱 15 min，使组织充分裂解。4℃ 离心 25 min，12000 r/min。取上清，去掉底部沉淀。取 60 μ L 进行 BCA 蛋白浓度测定。新的 EP 管中加入四倍体积的上清液，加入一倍体积量的 5×SDS，封口膜封住 EP 管口，煮沸加热 15 min，使蛋白彻底变性。冷却后，放于 -20℃ 冰箱保存。

(3) BCA 蛋白浓度测定：配置 Cu 与 BCA 试剂按照 1:50 的比列充分混合为工作液。取试剂盒中 10 μ L BSA 标准品用 PBS 稀释至 100 μ L，BSA 标准品终浓度为 0.5 mg/mL。依次取 0、2、4、6、8、12、16 和 20 μ L 的标准品加入到透明 96 孔板中，用 PBS 补充使每孔液体的体积都是 20 μ L。测定样品稀释 2 倍和 4 倍后再进行测定，分别取 20 μ L 样品量加入到 96 孔板中。标准品孔和样品孔均加入 200 μ L BCA 工作液，96 孔板四周加入 200 μ L PBS 防止液体蒸发，盖上 96 孔板盖子，37℃ 烘箱放置 20 min。使用微孔酶标仪法测定蛋白浓度，酶标仪测定吸光度值为 A562 nm，根据标准曲线计算出蛋白浓度。

(4) Western blot：提取的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，加样量的多少根据测定蛋白浓度确定。上层电泳胶浓度为 5%，下层电泳胶为 12%；电泳条件采用上层胶为 80 V，下层胶为 120 V，全程 90 min；用含甲醇 20% 体积的转膜液进行转膜，以电流 200 mA 稳流，转膜槽四周加冰袋防止温度过热，根据分子量大小确定转膜时间在 1 h~1.5 h 之间；用 5% 完达山脱脂奶粉封闭 37℃ 烘箱放置 2 h，使 NC 膜表面被蛋白占位，一抗按相应比例用脱脂乳稀释，放置到 4℃ 冰箱孵育过夜。第二天，用 TBST 清洗三次，每次 15 min。二抗用脱脂乳稀释，37℃ 烘箱孵育 1 h。用 TBST 清洗三次，每次 15 min。清水清洗一次，加入显色液，现配现用，Amersham Imager 600 凝胶成像系统拍摄蛋白条带影像，用 Image J 软件计算蛋白条带光密度值 (OD)。以 GAPDH 作为内参蛋白，蛋白表达量以所测蛋白 OD 值/GAPDH OD 值的比值表示。所用抗体稀释倍数和分子量信息见表 2-7。

表 2-7 抗体信息如下

Table 2-7 Antibody information

名称	稀释倍数	分子量 (KD)
SMAD7	1:500	51
Cytc	1:500	15
BCL-2	1:500	29
BAX	1:500	21
Caspase-8	1:500	50
Caspase-9	1:500	19
Caspase-3	1:500	34
HO-1	1:500	33
iNOS	1:500	67
NF-κB	1:500	50
GAPDH	1:1000	36

2.2.7.5 miR-6615-5p 过表达/敲低对凋亡通路的影响

原代培养的淋巴细胞 6 孔板培养，浓度为 1×10^6 个/mL，每孔 2 mL。mir-223 mimic 和 mir-223 inhibitor 转染 48 h。qRT-PCR 检测凋亡相关基因 (BCL-2、BAX、BAK、Cytc、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3) 的 mRNA 表达水平。引物序列由生工合成，见表 2-6。

2.2.8 蛋白组学测序

2.2.8.1 样品送检

对照组和处理组的胸腺组织各取六个生物学重复，样品经干冰保存运输，委托中国科学院北京畜牧兽医研究所蛋白质组学研究中心进行蛋白质组定量分析。

2.2.8.2 蛋白质提取和定量

单独提取各个蛋白质，每个样品中加 0.5 mL 的蛋白质提取缓冲液 (50 mM Tris-HCl, 4% SDS-PAGE, 100 mM NaCl, pH 8.0)，使用组织匀浆机破碎，作用时间 2 min。然后低温离心，20000g、15min 后收集上清。同组样品进行两两混合形成 6 个生物样本，分别命名为 (对照组) C-1, C-2, C-3, (氨气处理组) N-1, N-2 和 N-3。使用 BCA 法定量测定上清中的蛋白质含量，并使用蛋白质提取缓冲液调整各个样品浓度，统一各个样品浓度。

2.2.8.3 蛋白质酶切

分别取 100 ug 蛋白进行胰蛋白酶酶切，每个样品中添加终浓度为 25 mM 的 DTT，37°C 水浴锅中放置 1 h；添加终浓度为 50 mM 的 IAA，室温避光作用 30 min 后；添加 5 倍体积的丙酮后置于 -20°C 过夜。20000 g 4°C 离心 15 min，并收集沉淀；沉淀使用 100 μL 的 50 mM TEAB 重悬蛋白沉淀，按照 1: 50 的比例添加胰蛋白酶后，在 37°C 温度酶切 16 h；将不同的

酶切多肽进行 TMT 标记。

2.2.8.4 TMT 标记多肽

TMT 同位素标记是定量分析被标记的多肽末端和侧链基团的标记技术。是蛋白组学常用筛选技术。TMT 同位素标记试剂盒室温放置 30min，每个标记通道加入 30 μ L 的乙腈并充分混匀后，分别向每个标记通道加入等量的酶切多肽。在室温放置 1 h 后，加入终浓度为 1% 的甲酸终止反应，并按照相同比例将标记好的多肽样品混合后液相分级。

2.2.8.5 高 pH 反相液相分级

将上述混合多肽在 Agilent 1290 高压液相色谱仪色谱分离，流动相 A 使用甲酸铵+水，流动相 B 使用甲酸铵+乙腈。分离色谱柱型号为 PAK C18 ES (5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm, 120 $\text{\AA}$)，收集 6-41 min 共 40 个馏分，每个馏分收集 1 min，流速为 1 mL/min，检测波长为 214 nm，液相梯度见表 2-8。最终 36 个馏分合并成 9 个馏分，使用旋转蒸发仪流动相，待下一步的质谱分析。

表 2-8 高 pH 反相液相色谱分级流动相梯度表

Table 2-8 Table of high pH reversed phase high performance liquid chromatography gradient

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	95	5
3	95	5
40	40	60
48	20	80
52	20	80
53	95	5
55	95	5

2.2.8.6 数据采集

使用 2%乙腈 + 0.1%的甲酸水充分溶解多肽样品，在 Easy-nLC 1000 system (Thermo Scientific + Orbitrap Fusion Tribrid MS 液质联用仪系统进行分析。分析时多肽富集柱型号为：200 μ m $\times$ 1mm ChromXP C18-CL 3 μ m 100 $\text{\AA}$ ，分析柱型号为 75 μ m $\times$ 25 cm AcclaimTM Pep MapTM 100 C18 LC Columns，流动相 A 为 95%水 + 5%乙腈 + 0.1%甲酸，流动相 B 为 95%乙腈 + 5%水 + 0.1%甲酸，洗脱梯度见表 2-9。

表 2-9 Nano LC 液相洗脱梯度

Table 2-9 Nano LC liquid phase elution gradient

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	8
2	11	89
75	65	35
82	5	95
90	5	95

2.2.8.7 数据库分析

质谱下机数据进行蛋白数据库搜索。本研究数据库检索使用 Maxquant (vision 1.6.4) 检索软件，检索蛋白质数据库 UniProt Proteomes UP000002494 (Gallus gallus, 11 月 2018)。数据库检索参数如表 2-10。

表 2-10 数据库检索参数
Table 2-10 Database of retrieval parameters

参数名称	参数值
酶	Trypsin
固定修饰	Carbamidomethyl (C)
可变修饰	Oxidation (M), Deamidated (NQ)
MS 误差值	± 10 ppm
MS2 误差值	± 0.01 Da
反库检索	yes
FDR	≤1%
最大酶漏切个数	2
分子量类型	Monoisotopic
定量方法	TMT10plex Report ion MS2

2.2.9 氨气暴露诱导胸腺组织细胞凋亡机理的研究

2.2.9.1 胸腺组织基因的 qRT-PCR 检验

(1) RNA 提取

常规 Trizol 法提取组织中的 RNA，-80℃冰箱内取出冻存组织，置于冰袋上。分析天平称取 0.1 mg 组织到提前用液氮预冷的研钵中，再次加入液氮，研磨，多次加入适量液氮，确保组织一直冷冻避免降解，加入 1 mL Trizol，充分混匀，转移到 EP 管中，室温静置 10 min 使组织充分裂解；后续操作同 2.2.7.3。

(2) 用 qRT-PCR 验证胸腺转录组学结果 (circRNA-ZNF644、circRNA-RP11、circRNA-SMC6、circRNA-ARAP2、miR-187-5p 和 miR-15a) 的 mRNA 表达水平。引物序列由生工合成，见表 2-6。

(3) 用 qRT-PCR 检测 ceRNA (lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7) 的 mRNA 表达水平。引物序列由生工合成，见表 2-6。

(4) 用 qRT-PCR 验证胸腺组织差异蛋白基因 PIK3CD、GOLGA3、NSD2 和 CTSS 的 mRNA 表达水平。引物序列由生工合成，见表 2-6。

(5) 用 qRT-PCR 检测抗氧化酶 (GPx 和 GST) 的 mRNA 表达水平。引物序列由生工合成，见表 2-6。

(6) 用 qRT-PCR 检测炎性细胞因子 (HO-1、NF-κβ、COX-2、iNOS、TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 和 IL-12) 的 mRNA 表达水平。引物序列由生工合成，见表 2-

6。

(7) 用 qRT-PCR 检测凋亡相关基因 (BCL-2、BAX、BAK、Cyt c、APAF1、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3) 的 mRNA 表达水平。引物序列由生工合成, 见表 2-6。

2.2.9.2 胸腺组织蛋白提取与 Western blot

(1) 蛋白提取: 冰盒上操作, 取 0.1 g 组织加入 1 mL RIPI 蛋白裂解液和 10 μ L PMSF (浓度为 100 mM)。研磨器研磨, 转移到 EP 管中, 放置到 4 $^{\circ}$ C 冰箱 15 min, 使组织充分裂解。后续裂解提取、BCA 蛋白浓度测定和 Western blot 操作同 2.2.7.4。所用抗体信息见表 2-7。

(2) 胸腺组织中的蛋白表达含量采用 WB 法检测。检测 ceRNA (lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7) 中靶基因 SMAD7 的蛋白水平变化。

(3) WB 法检测抗氧化酶 (GPx)、炎症细胞因子 (HO-1、NF- κ B 和 iNOS) 的蛋白水平变化。

2.2.10 氯化铵暴露诱导淋巴细胞凋亡机理的研究

使用氯化铵作为氨气的替代物, 体外淋巴细胞模拟氨暴露模型, NH_3 进入体内转变为 NH_4^+ , NH_4Cl 在体内代谢转变为 NH_4^+ , 参考^[95, 96]。

2.2.10.1 氯化铵暴露对淋巴细胞 AOEB 染色影响的检测

根据吖啶橙 (AO) 和溴化乙锭 (EB) 是否能透过完整细胞膜, 使细胞核着色不同。可以将细胞分为不同的颜色, 荧光显微镜下观察到颜色的变化分为活细胞和凋亡的细胞。AO 将细胞着色绿色; 细胞发生早期凋亡时, 细胞核固缩, 体积发生改变, 细胞发生晚期凋亡时, EB 将细胞核着色橘红色。本产品 AO、EB 溶液浓度分别为 100 μ g/mL, 所含稳定剂不影响实验效果。

6 孔板加入 1 mL 新提取的淋巴细胞调整浓度为 2×10^6 个/mL, 放入 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO_2 的细胞培养箱中生长 3 h。加入氯化铵培养液 1 mL, 使氯化铵终浓度为 1.0 mmol/L 和 5.0 mmol/L。不含氯化铵的对照组。每组设定 3 个重复孔。放入 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO_2 的细胞培养箱中作用 48 h。取浓度为 100 μ g/mL 的 AO 和 EB 溶液按 1:1 混合成工作液, 先用现配。细胞用 PBS 洗涤一次, 用 1 mL PBS 重悬。每孔加入 20 μ L 工作液。室温放置 3 min 避光保存, 用荧光显微镜下观察。

2.2.10.2 流式细胞术检测氯化铵暴露对淋巴细胞细胞凋亡影响的检测

6 孔板加入 1 mL 新提取的淋巴细胞调整浓度为 1×10^6 个/mL, 将六孔板放入温度 37 $^{\circ}$ C, CO_2 浓度为 5% 的细胞培养箱中生长 3 h。将不同浓度的氯化铵培养液 1 mL 加入六孔板中使氯化铵终浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L, 并设置含相同细胞数目的对照 (不含氯化铵), 处理后的六孔板放回细胞培养箱, 培养 48 h 后, 在低速离心机中 2500rpm 离心 5 min, 弃去上清, 用新配制的 PBS 洗 2 遍, 离心后去上清, 加入 Binding Buffer 500 μ L 重悬细胞, 避光条件下依次加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 5 μ L Propidium Iodide, 混合均匀, 避光室温反应 15 min。流式细胞仪上检测凋亡情况。

使用多功能酶标仪 (SpectraMax iD3) 检测荧光强度, 使用黑色不透明 96 孔板, 每孔加

样 100 μL ，同一组样品设立三个平行孔。

2.2.10.3 氯化铵暴露对淋巴细胞线粒体膜电位影响的检测

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)是以 JC-1 为荧光探针检测线粒体膜电位的探针。当线粒体膜电位高时, JC-1 在线粒体基质聚合成聚合物呈红色荧光, 当线粒体膜电位低时, JC-1 不能聚合呈绿色荧光。当细胞发生凋亡时, 线粒体膜电位发生变化, 膜电位下降, 可以根据红色和绿色荧光数量的比值, 检测细胞早期凋亡的一种手段。

(1) JC-1 染色工作液的配制:

将 200 $\times$ JC-1, 用超纯水稀释 200 倍成 1 $\times$ JC-1 配置 8 mL, 涡旋震荡混匀。加入 2 mL 5 $\times$ JC-1 染色缓冲液, 将其 5 倍稀释, 混匀备用。

(2) 阳性对照的设置

取 CCCP (10 mM) 2 μL 加到细胞培养液中, 混匀, 作用 20 min 后, 线粒体的膜电位会完全丧失, JC-1 染色后观察应呈绿色荧光。

操作步骤: 6 孔板加入 1 mL 新提取的淋巴细胞调整浓度为 1×10^6 个/mL, 将六孔板放入温度 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 浓度为 5% 的细胞培养箱中生长 3 h。将不同浓度的氯化铵培养液 1 mL 加入六孔板中使氯化铵终浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L, 并设置含相同细胞数目的对照 (不含氯化铵), 处理后的六孔板放回细胞培养箱, 培养 48 h 后, 在低速离心机中 2500rpm 离心 5 min, 弃去上清, 用 PBS 洗 1 遍, 离心后去上清。0.5 mL 细胞培养液重悬细胞。加入同体积的 JC-1 染色工作液, 混匀, 培养箱内孵育 20 min。配置适量的 1 $\times$ JC-1 染色缓冲液, 冷藏保存。孵育结束后, 离心弃上清。用冷藏的 1 $\times$ JC-1 染色缓冲液洗涤两次。用 500 μL 的 1 $\times$ JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 用荧光显微镜。

多功能酶标仪检测时, 检测 JC-1 单体时, 把激发光设置为 490nm, 发射光设置为 530 nm; 检测 JC-1 聚合物时, 可以把激发光设置为 525 nm, 发射光设置为 590 nm。

2.2.10.4 氯化铵暴露对淋巴细胞线粒体钙影响的检测

Rhod-2 是一种可见光激发的高亲和力 Ca^{2+} 指示剂, 与其他可见光激发荧光探针如 Fluo-3/4 相比, Rhod-2 具有长波长, 更适用于检测具有较高自荧光现象的细胞和组织内钙离子水平。

(1) 试剂准备:

1) Rhod-2/AM 储存液的配制: 利用高质量无水 DMSO 溶解 Rhod-2/AM 配制成 2~5 mM 的储存液, 该储存液可分装于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光干燥密封保存。每次使用前需回温至室温。

2) Rhod-2/AM 工作液的配制: 利用合适缓冲液(如 Hanks & Hepes)将 Rhod-2/AM 稀释成 1-10 μM 的工作液, 具体稀释方法如 1 mM 母液配制 1 mL 浓度为 4 μM 工作液, 用 1 mL 缓冲液稀释 4 μL 1 mM 母液即可, 混匀。

(2) 操作步骤:

1) 取出氯化铵处理培养 48 h 的细胞, 离心弃掉培养基, 缓冲液洗涤细胞 3 次;

2) 每个样品加入 1 mL Rhod-2/AM 工作液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 min, 离心除去 Rhod-2/AM 工作液;

3) 每次使用 1 mL 缓冲液洗涤细胞 3 次, 然后加入 1 mL 缓冲液重悬细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20

min;

4) 荧光显微镜检测。

2.2.10.5 氯化铵暴露对淋巴细胞活性氧 (ROS) 影响的检测

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的检测采用 DCFH-DA 活性氧检测探针。DCFH-DA 本身没有荧光, 可被细胞内的酶水解, 无颜色变化。当细胞内有活性氧存在时, DCFH 被氧化成有绿色荧光的物质。

操作步骤:

- (1) 取出氯化铵处理组和对照组, 培养 48 h 的淋巴细胞, 离心除去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 1 次;
- (2) 用 1 mL PBS 重悬细胞, 加入 1 μ L DCFH-DA; 37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 30 min;
- (3) 孵育结束后, 1000 g 离心 5 min, 弃掉上清液, 用 PBS 洗涤 1 次, 离心收集细胞用 1 mL PBS 重悬细胞;
- (4) 荧光检测。

2.2.10.6 氯化铵暴露对淋巴细胞凋亡影响的检测

6 孔板加入 1 mL 新提取的淋巴细胞调整浓度为 3×10^6 个/mL, 将六孔板放入温度 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 浓度为 5% 的细胞培养箱中生长 3 h。将不同浓度的氯化铵培养液 1 mL 加入六孔板中使氯化铵终浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L, 并设置含相同细胞数目的对照 (不含氯化铵), 处理后的六孔板放回细胞培养箱, 培养 48 h。

- (1) 样品搜集: 取六孔板内 3 重复孔细胞培养液混合, 离心 1500 转, 3 min, 去上清。预冷的 PBS 1 mL 洗涤一次, 去上清, 加入 1 mL TRIZOL。用加样枪吹打几次。以上操作均在冰盒上操作, 然后将样品做好标号 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存;
- (2) RNA 的提取、反转录和 RT-PCR, 同 2.2.7.3;
- (3) 蛋白样品提取: 取六孔板内 3 重复孔细胞培养液混合, 离心 3000rpm, 5 min, 去掉培养基。用预冷的 PBS 1mL 洗涤一次, 弃掉上清, 加入 1 mL RAPI 蛋白裂解液和 10 μ L PMSF (浓度为 100 mM)。用加样枪吹打几次。以上操作均在冰盒上操作, 然后将样品做好标号 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存;
- (4) BCA 测定蛋白浓度和 WB 检测, 同 2.2.7.4。

2.2.11 数据统计与分析

数据统计、分析以及绘图应用 SPSS 19.0 和 Graphpad prism 5。所有数值表示为“mean $\pm$ SD”, n=5。两组之间比较使用 T 检验, 三组比较时使用 OneWayANOVA 单因素方差分析。实验结果中标有*符号或不同字母的表示存在显著性差异 $P < 0.05$, $P > 0.05$ 被认为差异不显著。

3 结果与分析

3.1 胸腺细胞形态学检测结果

3.1.1 细胞凋亡的病理组织学观察结果

使用 HE 染色检查胸腺的组织学变化（图 3.1-3.6）。如图 3.1、3.3 和 3.5 所示，对照组胸腺皮质、髓质分界显著，髓质小体清晰可见。淋巴细胞完整，排列紧密。然而，在 42 d 时处理组的鸡胸腺皮质髓质分界不显著，髓质小体增多，大量淋巴细胞出现坏死和淋巴细胞减少（图 3.2、3.4 和 3.6），淋巴细胞排列松散。观察到血管内皮细胞增生，组织纤维化（黑色箭头所示），炎性细胞浸润（绿色箭头所示），淋巴细胞核固缩和染色质凝集，可见凋亡小体（红色箭头所示）。

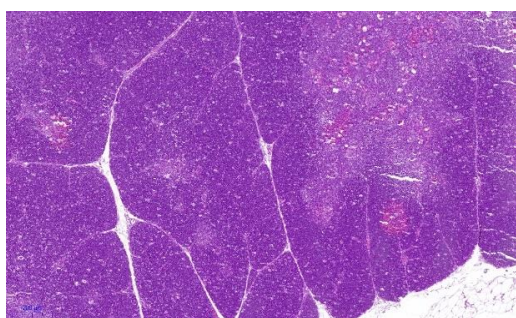


图 3-1 对照组 42 d 时胸腺 HE 切片×50
Fig.3-1 HE section of thymus at 42 d in
control group ×50

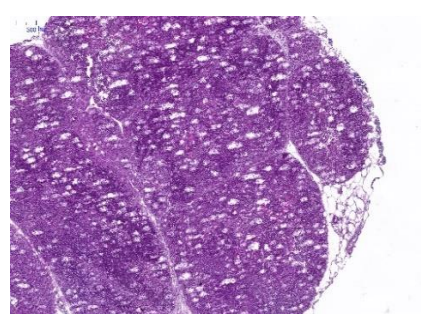


图 3-2 处理组 42 d 时胸腺 HE 切片×50
Fig.3-2 HE section of thymus at 42 d in
treatment group 50 x

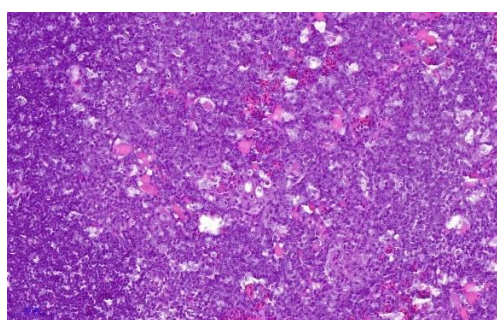


图 3-3 对照组 42 d 时胸腺 HE 切片×200
Fig.3-3 HE section of thymus at 42 d in
control group ×200

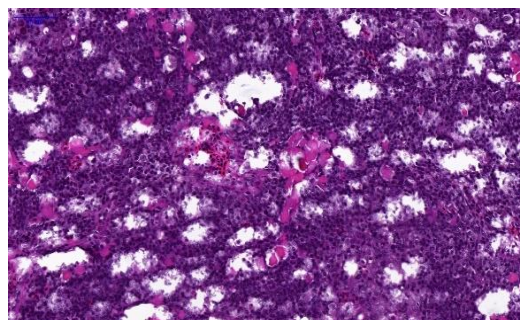


图 3-4 处理组 42 d 时胸腺 HE 切片×200
Fig.3-4 HE section of thymus at 42 d in
treatment group ×200

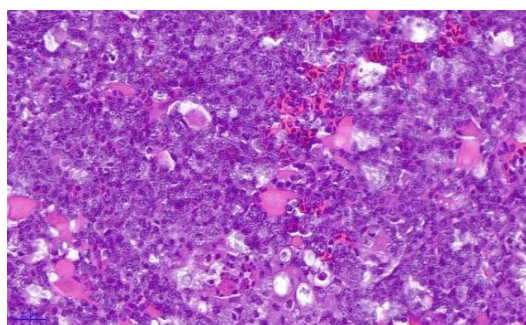


图 3-5 对照组 42 d 时胸腺 HE 切片×400
Fig.3-5 HE section of thymus at 42 d in control group 400 x

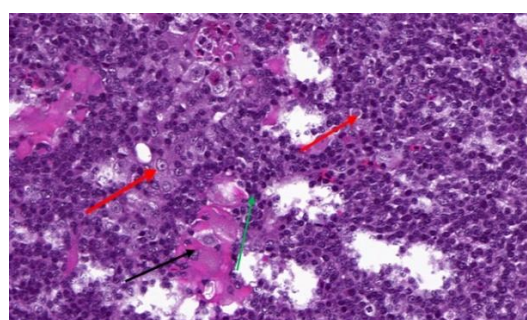


图 3-6 处理组 42 d 时胸腺 HE 切片×400
Fig.3-6 HE section of thymus at 42 d in treatment group ×400

3.1.2 细胞凋亡的超微结构形态学变化结果

使用透射电镜检查胸腺的超微结构学变化（图 3.7-3.10）。如图 3.7 和 3.8 所示，对照组胸腺淋巴细胞结构完整，细胞器完整，线粒体结构清晰。然而，在 42 d 时处理组的鸡胸腺细胞细胞核固缩和变形，染色质凝集，线粒体肿胀、体积变大、空泡化，线粒体损伤严重（图 3.9-3.10），淋巴细胞发生凋亡的数量增多。

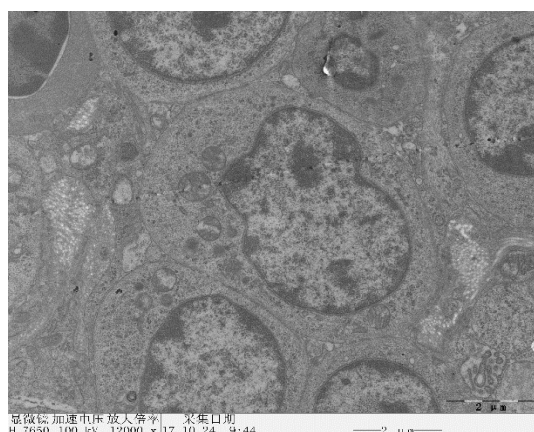


图 3-7 对照组 42 d 时胸腺电镜观察
Fig.3-7 Thymus electron microscopic observation at 42 d in the control group

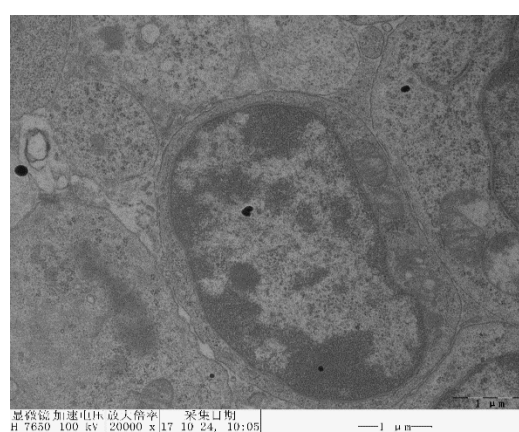


图 3-8 对照组 42 d 时胸腺电镜观察
Fig.3-8 Thymus electron microscopic observation at 42 d in the control group

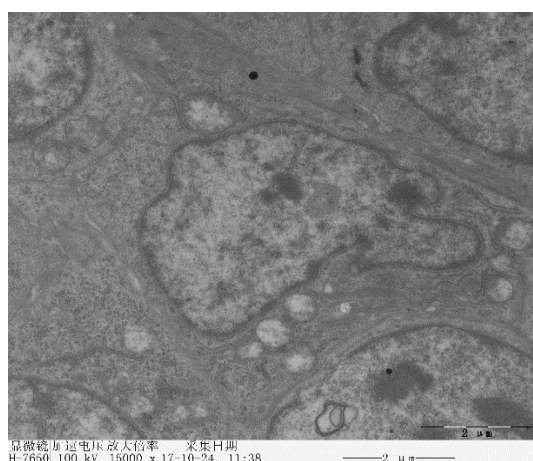


图 3-9 处理组 42 d 时胸腺电镜观察

Fig.3-9 Thymus electron microscopic observation at 42 d in the treatment group

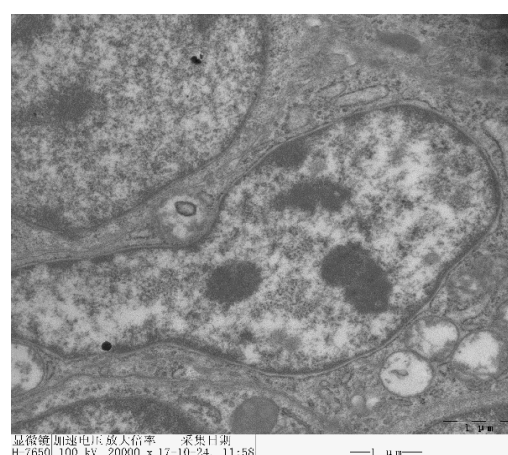


图 3-10 处理组 42 d 时胸腺电镜观察

Fig.3-10 Thymus electron microscopic observation at 42 d in the treatment group

3.1.3 TUNEL 染色检测细胞凋亡结果

光学显微镜观察 TUNEL 法检测细胞凋亡。对照组 42 d 时，细胞凋亡数量较少，细胞形态正常，如图 3-11 和 3-12。氨气暴露 42 d 时，见图 3-13 和 3-14，阳性细胞呈黄褐色，细胞体积变小，细胞核固缩或变形，凋亡数量上升。400 倍镜下进行凋亡率分析，结果见表 3-1，其中对照组的凋亡率为 3.20%，处理组为 13.46%。处理组与对照组相比较差异显著($P < 0.05$)。

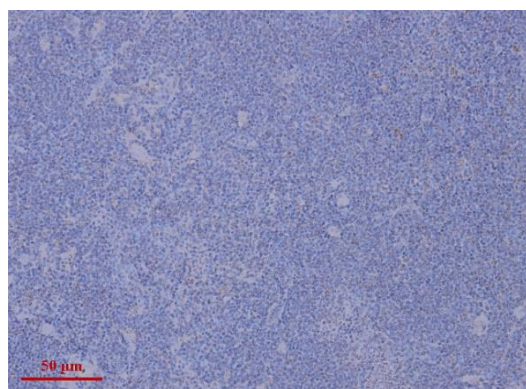


图 3-11 对照组胸腺 TUNEL 染色观察×200
Fig.3-11 TUNEL staining of thymus in control group×200

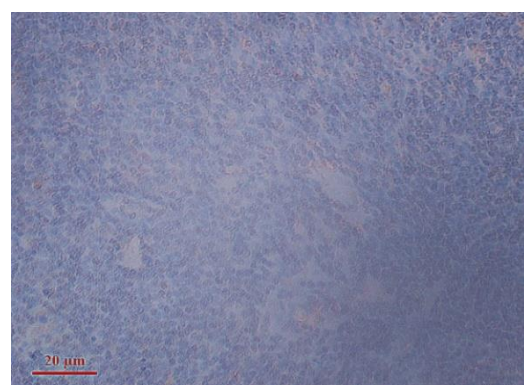


图 3-12 对照组胸腺 TUNEL 染色观察×400
Fig.3-12 TUNEL staining of thymus in control group×400

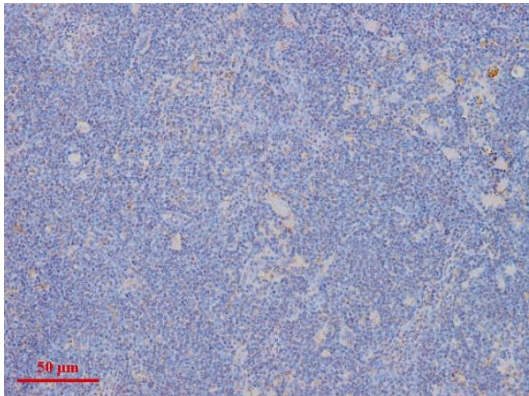


图 3-13 处理组胸腺 TUNEL 染色观察×200
Fig.3-13 TUNEL staining of thymus in treatment group×200

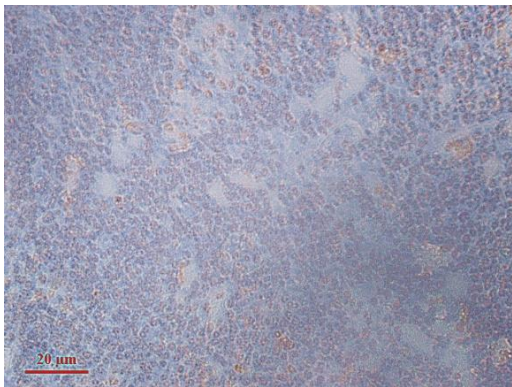


图 3-14 处理组胸腺 TUNEL 染色观察×400
Fig.3-14 TUNEL staining of thymus in treatment group×400

表 3-1 TNNEL 法检测氨气暴露后细胞凋亡率检测结果（mean±SD, n=5）

Tab. 3-1 Detection of apoptotic rate after ammonnia exposure by TNNEL（mean±SD, n=5）

时间	对照组	氨气处理组
42 d	3.20 ± 0.10*	13.46 ± 0.53*

注：*表示与对照组相比凋亡率有显著差异（P < 0.05）

3.2 全转录组学分析结果

3.2.1 测序数据分析的结果

3.2.1.1 转录组序列质控过滤前后统计结果

为了了解鸡氨气暴露条件下,42 d时鸡胸腺中基因变化的影响,本研究基于 Illumina Hiseq 2000 分别对对照组和氨气处理组的胸腺样本进行全转录组测序。质控后,分别获得 73893434、87763122 和 70689994 reads。质控后碱基的质量值分布在 0.935%~0.947%之间, GC 含量在 43.5%~44%, 数据滤过率在 0.937%~0.947%, 见表 3-2。

表 3-2 样本的转录组序列质控结果

Table 3-2 Results of transcriptome sequences quality control

样品	质控前数 据	质控前碱 基	质控后数 据 T	质控后碱 基	原始数据滤 过率	碱基过 滤率	GC 含量
N-XX-1	78068504	117039047 78	73893434	110647372 10	0.94652043	0.94538 8519	43.5
N-XX-2	92588588	138807807 44	87763122	131417559 05	0.94788271 3	0.94675 913	44
N-XX-3	75430258	113083764 72	70689994	105841369 50	0.93715699 6	0.93595 5482	43.5

3.2.1.2 测序数据的 mapping 率

对照组（C-XX）和处理组（N-XX），mapping 率分别为 0.906 和 0.908，均大于 90%，符合数据分析要求，见表 3-3。

表 3-3 数据的 mapping 率
Table3-3 Mapping Rate of Data

Statistics	C-XX	N-XX
All	89210241	75992183
UnMapped	8357569	6979200
Mapped	80852672	69012983
Mapped Rate	0.906	0.908
Unique Mapped	73200246	62874825
Unique Mapped Rate	0.821	0.827
Repeat Mapped	7652426	6138158
Junction All Mapped	15564264	12115081
Junction Unique Mapped	13803887	10756877
All Base	12471292972	10624135893
UnMapped Base	1166537829	974309190
Mapped Base	11304755143	9649826703
Uniqu eMapped Base	10234944939	8791672980
Repeat Mapped Base	1069810204	858153723

3.2.1.3 基因组结构分析

将过滤后的 Clean Reads 进行 Mapping 分析。基因组结构分析显示，CDS 的 Read Number 值为 17093470。UTR 3’的 Read Number 值为 7625636。UTR5’的 Read Number 值为 696912，见图 3-15。

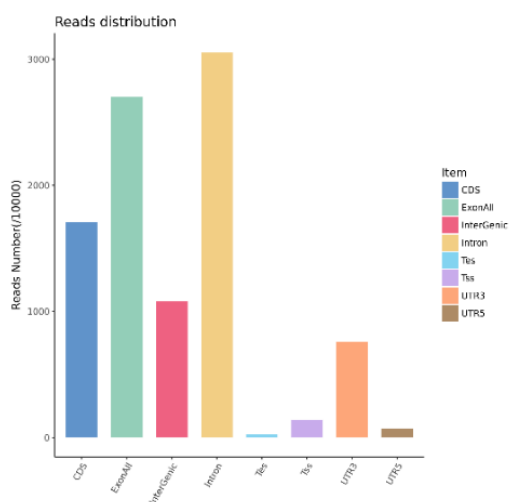


图 3-15 基因组结构分析
Fig.3-15 Gene Structure

3.2.1.4 在染色体上的分布统计

统计 Reads 数在染色体上的分布，如图 3-16。Reads 在染色体上在 chr1、chr2、chr3、chr4 以及 chrz 上分布较多。

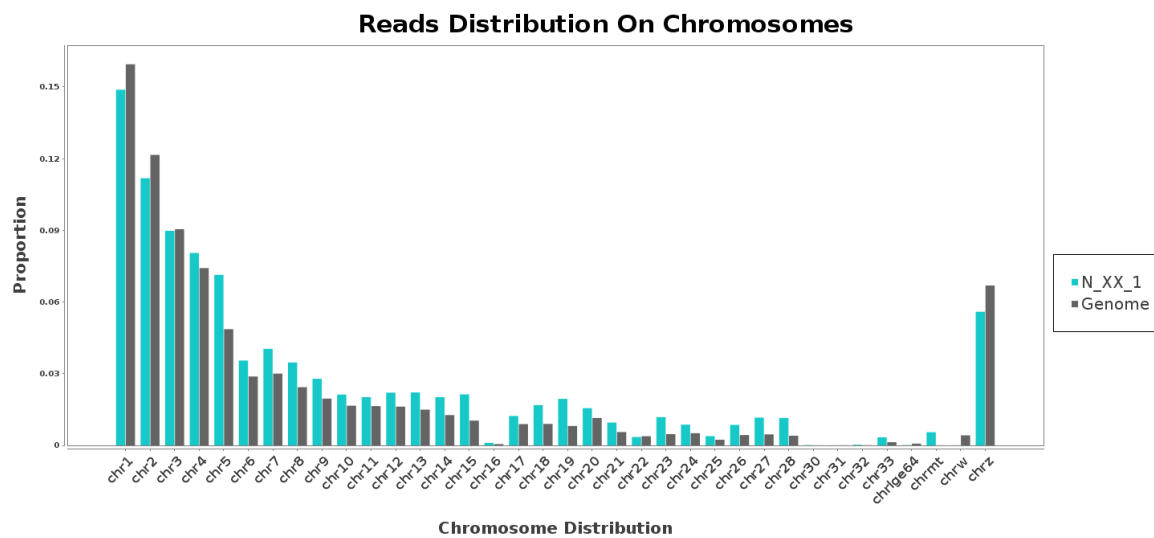


图 3-16 Reads 在染色体上的分布统计
Fig.3-16 Reads Distribution On Chromosomes

3.2.2 差异 mRNA 的分析

3.2.2.1 差异 mRNA 的筛选

用 EB-Seq 算法对 counts 进行差异筛选的结果，从差异倍数和校正后的显著水平 ($\log_2 FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$) 两方面进行评估，对差异 mRNA 进行筛选。为全部的差异 mRNA。火山图显示差异 mRNA 的分布情况，共有 16490 个差异 mRNA。本实验采用 FDR 结合 fold change 筛选，发现在鸡氨气暴露 42 d 时，分别有 100 个差异显著的 mRNA ($\log_2 FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$)，其中 56 个 mRNA 表达量上调，同时有 44 个 mRNA 表达量下调 (图 3-17)。

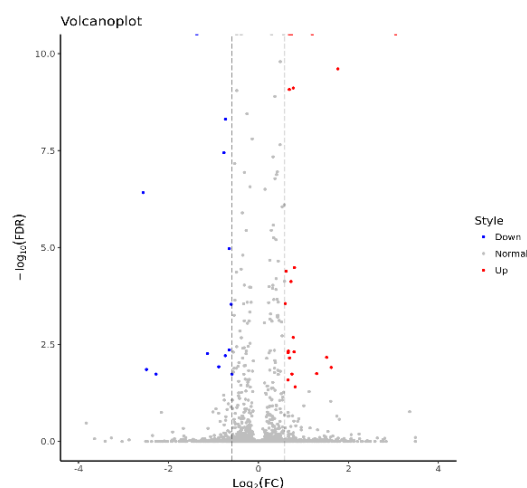


图 3-17 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 mRNA 火山图

Fig.3-17 Differential expression mRNA volcano map of thymus in chicken exposed to ammonia

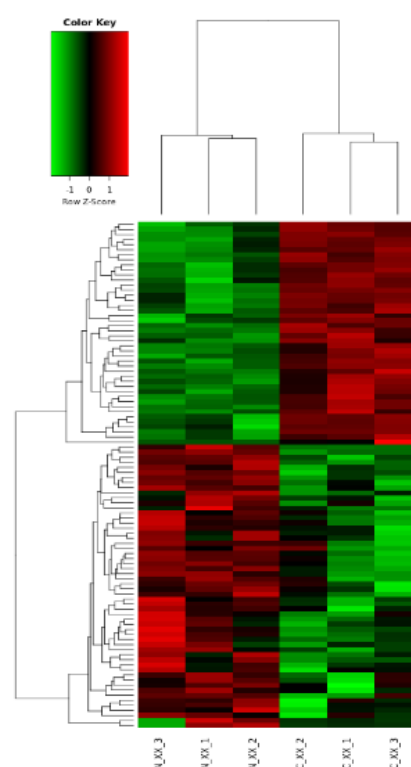


图 3-18 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 mRNA 聚类图

Fig.3-18 Differential expression mRNA cluster analysis of thymus in chicken exposed to ammonia

3.2.2.2 差异 mRNA 聚类分析差异

mRNA 聚类分析是用于在对照和处理组比较具有显著差异 mRNA ($\log_2 FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$) 表达量的聚类模式。在聚类分析图 3-18 中可见，表达量水平相近的基因会聚集一类，每一个差异表达的 mRNA 在各组之间的差异分布及组别间的聚类。处理组显著

差异的 mRNA 颜色的变化表示表达量的不同，区别于对照组的表达量。

3.2.2.3 差异 mRNA GO 富集分析

对全部显著差异 mRNA 基因进行 GO 分析，选取基因 term 富集较多的前 15 个功能区绘制成 GO 富集分析图。从图 3-19 中可见，鸡氨气暴露 42 d 时，生物过程（biological process）功能区主要富集在酰胺转运（amide transport）、内源性肽抗原经 MHC Ib 类经 ER 途径的抗原加工和表达（antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib via ER pathwa）、免疫应答（immune response）、tRNA 修饰（tRNA modification）、震惊反应（startle response）T1 细胞的激活（T-helper 1 cell activation）等过程。分子功能（Molecular Function）的功能区主要富集在 TAP1 结合（TAP1 binding）、肽抗原转运 ATP 酶活性（Peptide antigen-transporting ATPase activity）、G-富链端粒 DNA 结合（G-rich strand telomeric DNA binding）、趋化因子激活（chemokine activity）、磷酸甘油酸变位酶活性（Phosphoglycerate mutase activity）及 tRNA 结合（tRNA binding）等分子功能。细胞组分（cellular component）主要富集在 TAP 复合物（TAP complex）、横纤维（transverse filament）、MHC I 类肽复合物（MHC class I peptide loading complex）、核染色体及端粒区（nuclear chromosome, telomeric region）等组分中。说明鸡氨气暴露后调控免疫反应的基因发生差异表达，机体积极参与免疫应答的过程。

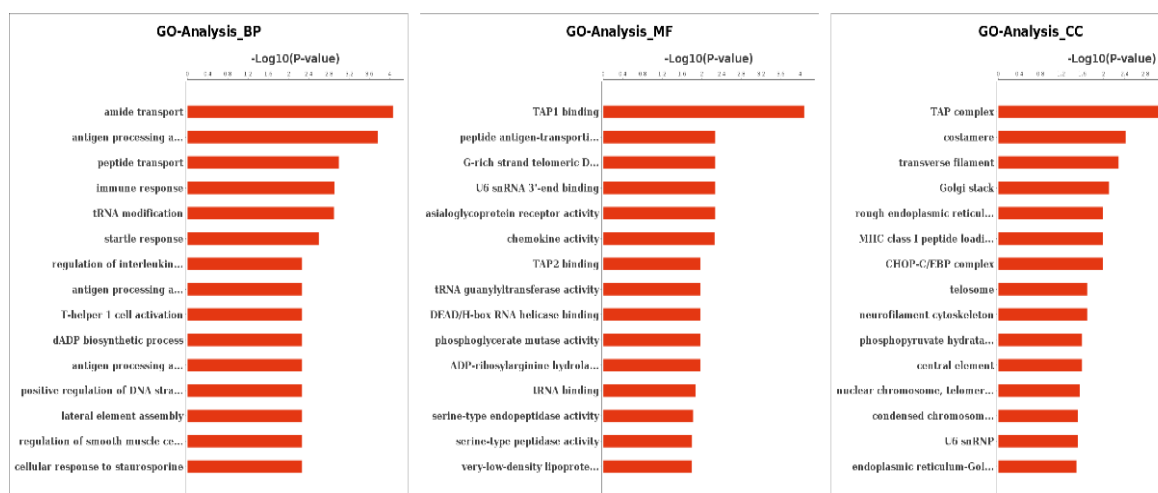


图 3-19 鸡氨气暴露时胸腺 mRNA GO Term 显著差异图

Fig.3-19 GO Term of significant difference of thymus in chicken exposed to ammonia

对显著差异 mRNA 基因进行 GO 富集分析(图 3-20)。其中,氨基酸转运(amide transport)、内源性肽抗原经 MHC I 类抗原的制备与表达(antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I)、肽转运(Peptide transport)、免疫应答(immune response)和 tRNA modification (tRNA 修复)等为富集量较高的项。

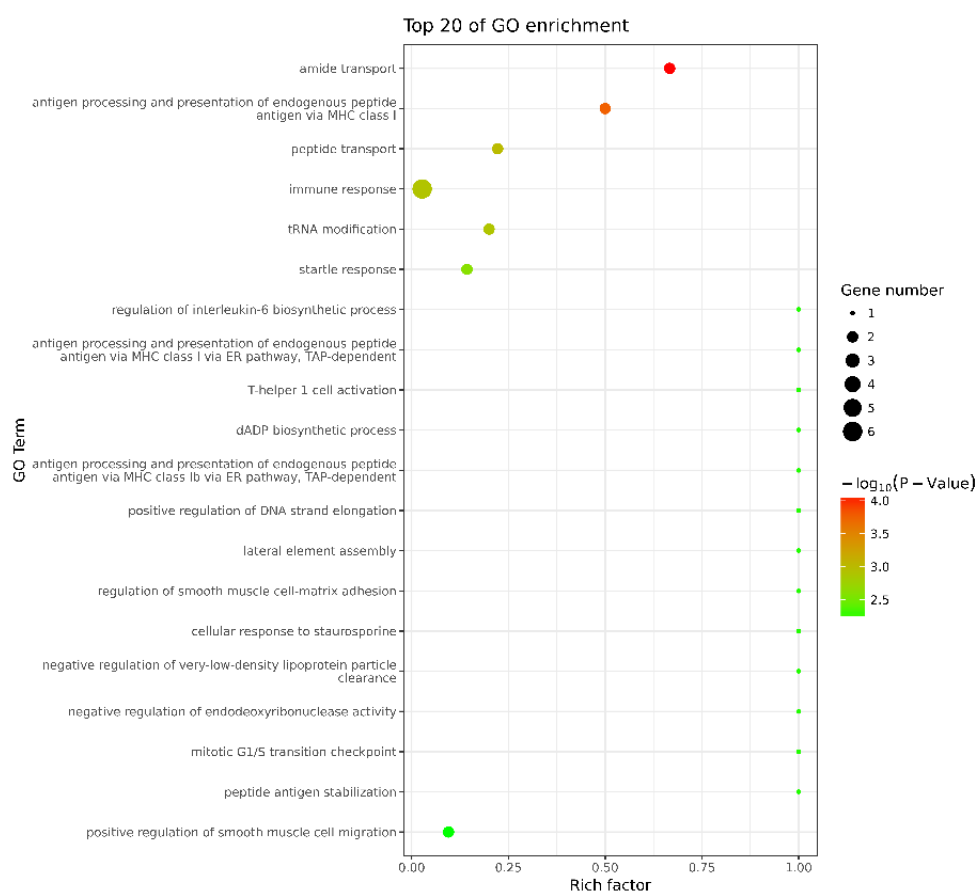


图 3-20 鸡氨气暴露时胸腺显著差异 mRNA GO 富集图

Fig.3-20 GO enrichment map of significant difference of thymus in chicken exposed to ammonia

3.2.2.4 氧化应激、细胞因子和凋亡相关基因的转录水平分析

氨气暴露对氧化应激相关基因影响的热图，如图 3-21 所示。总共有 34 氧化应激相关基因在氨气暴露胸腺转录组中存在。在 34 个基因中，共有 20 个基因上调和 14 个基因下调。

氨气暴露对细胞因子影响的热图，如图 3-22 所示。总共有 123 个炎症和相关细胞因子在氨气暴露胸腺转录组中存在。在 123 个基因中，共有 50 个基因上调和 73 个基因下调。

氨气暴露对凋亡相关基因影响的热图，如图 3-23 所示。总共有 30 个凋亡相关基因在氨气暴露胸腺转录组中存在。在 30 个基因中，共有 11 个基因上调和 19 个基因下调。进一步验证氨气对胸腺的影响，后续 qRT-PCR 进行验证。

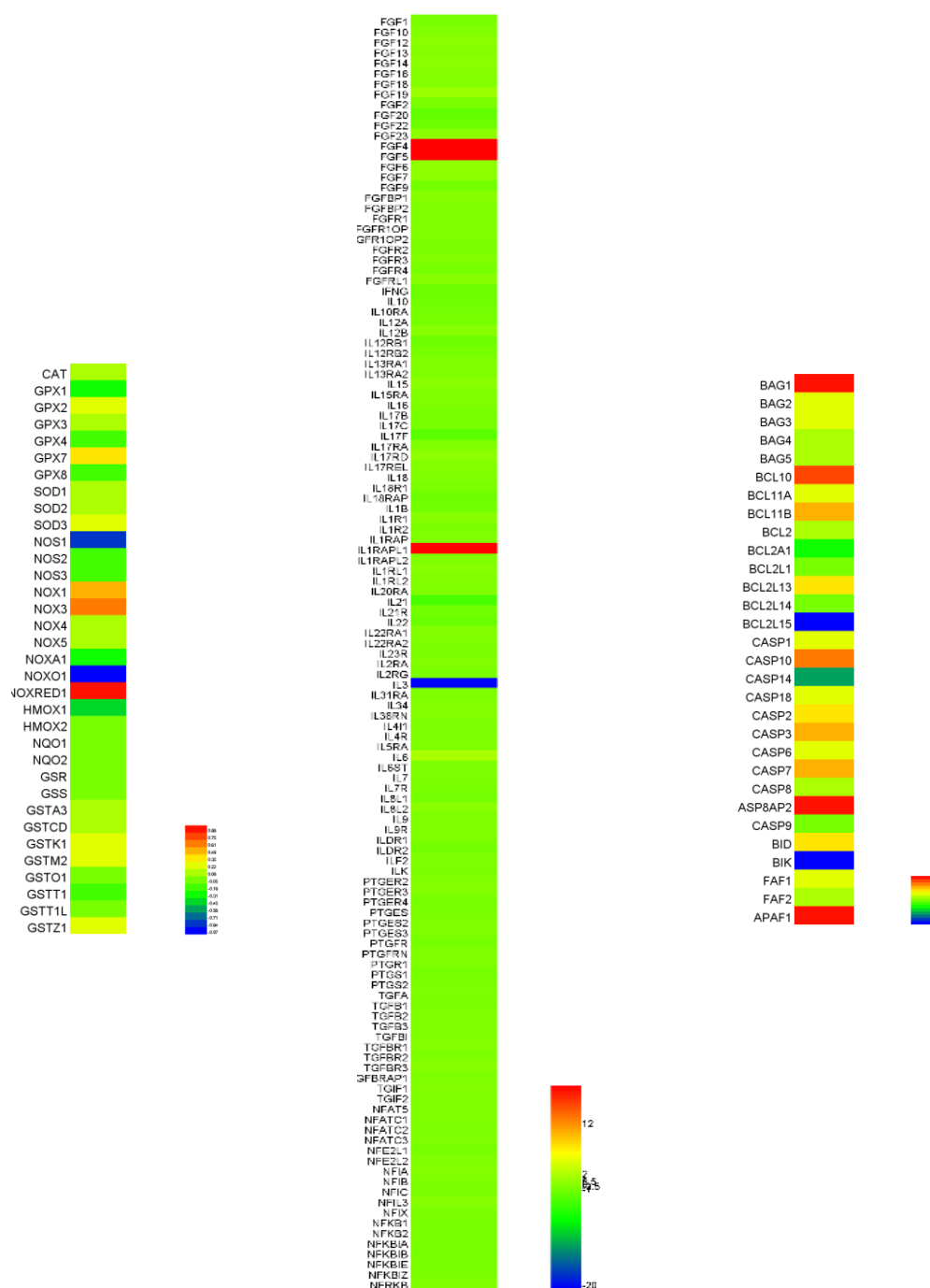


图3-21 氧化应激相关基因转录水平的热图。
Fig.3-21 Heat map showing the relative gene expression of oxidative stress at the transcriptional level.

图3-22 细胞因子相关基因转录水平的热图。
Fig.3-22 Heat map showing the relative gene expression of cytokine at the transcriptional level.

图3-23 凋亡相关基因转录水平的热图。
Fig.3-23 Heat map showing the relative gene expression of apoptosis at the transcriptional level.

3.2.3 差异 miRNA 分析

3.2.3.1 差异 miRNA 的筛选

用 EB-Seq 算法对 counts 进行差异筛选的结果，从差异倍数和校正后的显著水平 ($\log_2$ FC>0.585 或<-0.585 且 FDR<0.05) 两方面进行评估，对差异 miRNA 进行筛选，为全部的差异 miRNA。用火山图显示差异 miRNA 的分布情况，本实验采用 FDR 结合 fold change 筛选，发现在氨气暴露 42 d 时，分别有 3 个 miRNA 表达量上调，同时有 3 个 miRNA 表达量下调 (图 3-24)。

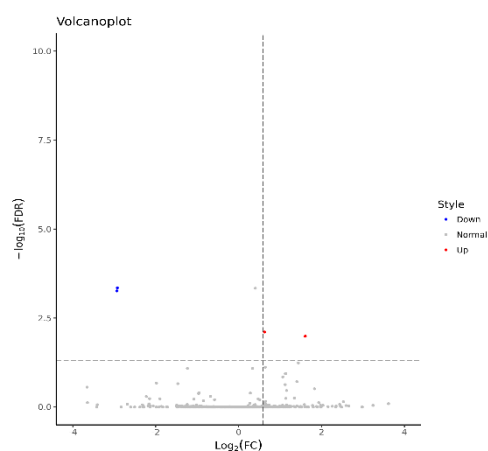


图 3-24 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 miRNA 火山图

Fig.3-24 Differential expression miRNA volcano map of thymus in chicken exposed to ammonia

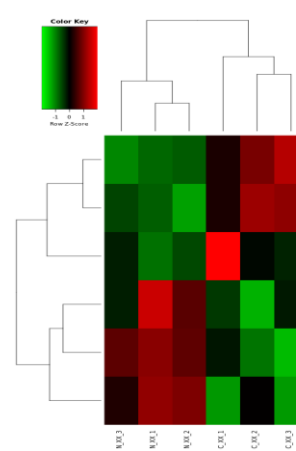


图 3-25 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 miRNA 聚类图

Fig.3-25 Differential expression miRNA cluster analysis of thymus in chicken exposed to ammonia

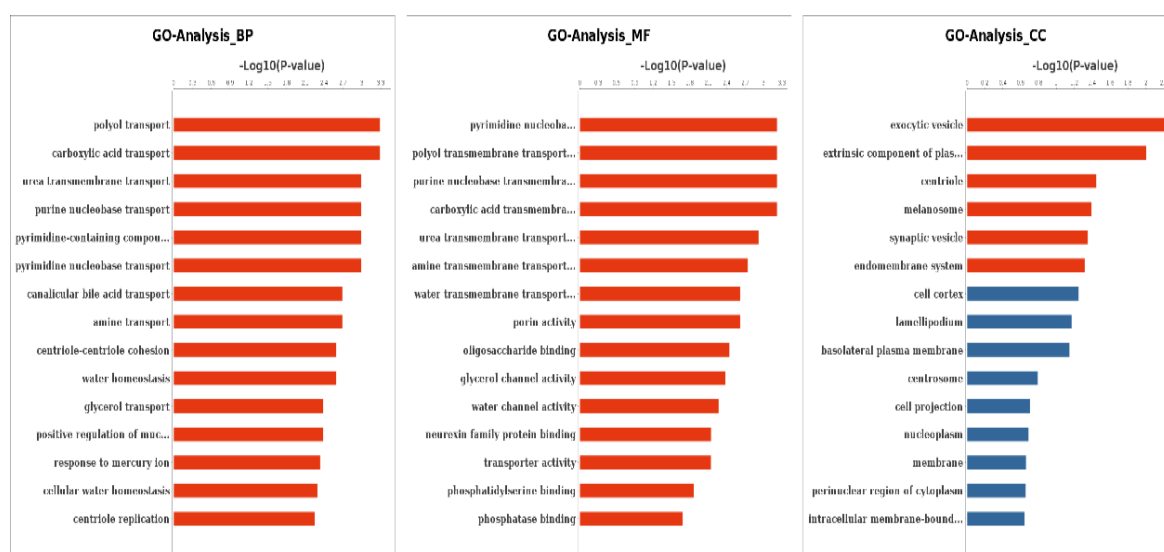
3.2.3.2 差异 miRNA 聚类分析差异

miRNA 聚类分析是用于在对照组和处理组比较具有显著差异 miRNA ($\log_2$ FC>0.585 或<-0.585 且 FDR<0.05) 表达量的聚类模式。在聚类分析图 3-25 中可见，表达量水平相近的基因会聚集一类，每一个差异表达的 miRNA 在各组之间的差异分布及组别间的聚类。处理组显著差异的 miRNA 颜色的变化表示表达量的不同，区别于对照组的表达量。

3.2.3.3 差异 miRNA 基因功能分析

显著性差异 miRNA 的宿主基因进行 GO 注释。得到宿主基因的功能分析，图 3-26 中可见，鸡氨气暴露 42 d 时，miRNA 的宿主基因的生物过程 (biological process) 功能区主要富集在羧酸运输 (carboxylic acid transport)、尿素跨膜转运 (urea transmembrane transport)、嘌呤核苷转运 (Purine nucleobase transport)、含嘧啶的化合物跨膜转运 (Pyrimidine-containing compound transmembrane transport) 及嘧啶核苷转运 (Pyrimidine nucleobase transport) 等过

程。分子功能（Molecular Function）的功能区主要富集在嘧啶核苷跨膜转运蛋白活性（Pyrimidine nucleobase transmembrane transporter activity）、多元醇跨膜转运蛋白活性（Polyol transmembrane transporter activity）、嘌呤核苷跨膜转运蛋白活性（Purine nucleobase transmembrane transporter activity）、羧酸跨膜转运蛋白活性（carboxylic acid transmembrane transporter activity）、尿素跨膜转运蛋白活性（urea transmembrane transporter activity）、胺跨膜转运蛋白活性（amine transmembrane transporter activity）和寡糖结合（glycerol channel activity）等功能上。细胞组分（cellular component）主要富集在胞外囊泡（exocytic vesicle）、质膜外成分（extrinsic component of plasma membrane）、中心粒（centriole）、黑素体（melanosome）、突触囊泡（synaptic vesicle）及内膜系统（endomembrane system）等成分。说明鸡氨气暴露后 miRNA 广泛参与了机体应答的反应当中。



注：横轴-----功能显著性水平（P-Value）的-Log₁₀ P 值；

纵轴-----Gene Ontology 数据库中对应 GO 的前 15 条名称；

BP: Biological Process; CC: Cellular Component; MF: Molecular Function

图 3-26 miRNA 宿主基因 GO 分析

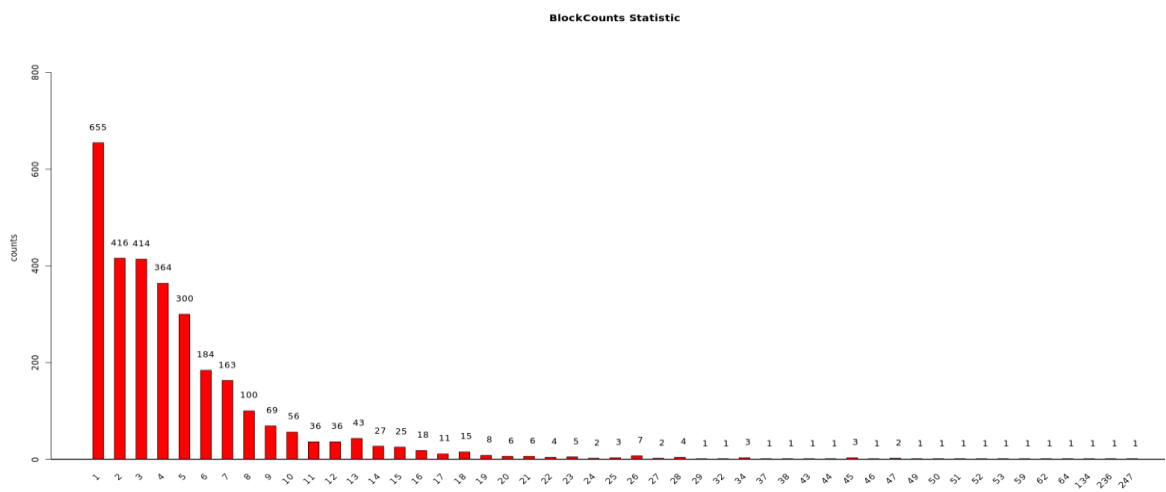
Fig.3-26 miRNA.GO-Analysis

3.2.4 差异 circRNA 分析

3.2.4.1 circRNA 块计数、染色体分布及正反义链统计

circRNA 具有闭合环状结构的一种 RNA，在组织及不同发育阶段的表达具有特异性。运用 circRNA 在表达过程中特殊的剪接形式，对测序得到 reads 进行预测，查找到这样一类 reads：同时覆盖两个外显子且方向与线性 RNA 相反，即得到该测序样品中可能存在的 circRNA。

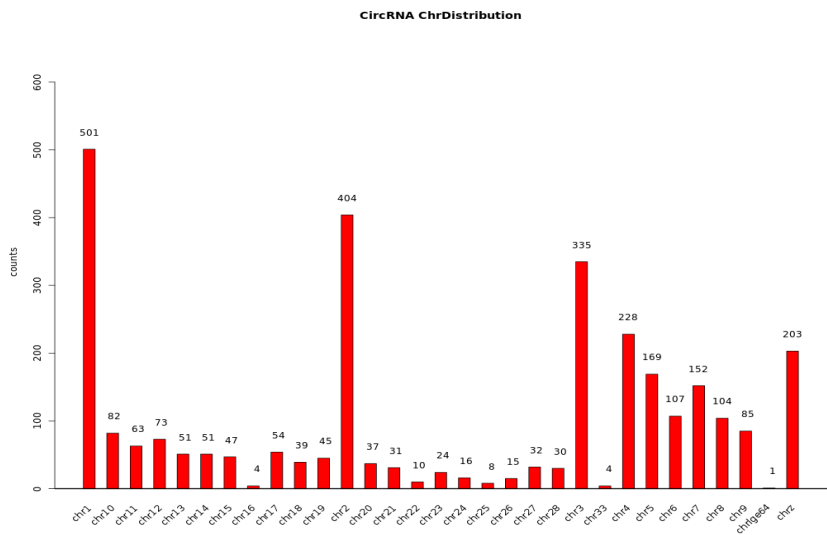
如图 3-27，circRNA 覆盖的外显子数量是 1 个的共有 655 种 circRNA，为数量最多的覆盖量。其次覆盖的外显子数量是 2 和 3 的分别有 416 和 414 种 circRNA。



注：横轴表示 circRNA 覆盖的外显子数量，纵轴表示 circRNA 数量。

图 3-27 Block Counts 统计图
Fig.3-27 Block Counts Statistics Plot

如图 3-28，circRNA 在染色体 chr1、chr2、chr3 和 chrz 上的 circRNA 数量较多，分别为 501、404、335 和 203 个。



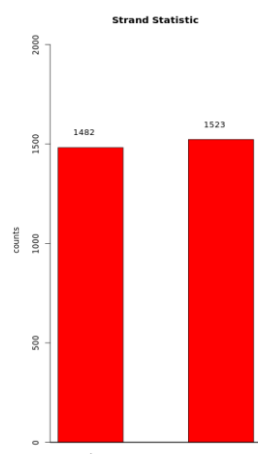


图 3-29 正义链反义链统计结果

Fig.3-29 Strand statistics plot

3.2.4.1 差异 circRNA 的筛选

用 EB-Seq 算法对 counts 进行差异筛选的结果，为全部的差异 circRNA。用火山图显示差异 circRNA 的整体分布情况，从差异倍数和校正后的显著水平 ($\log_2 FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$) 两方面进行评估，对差异 circRNA 进行筛选。本实验采用 FDR 结合 fold change 筛选，发现在氨气暴露 42 d 时，有 5 个 circRNA 表达量上升（图 3-30）。

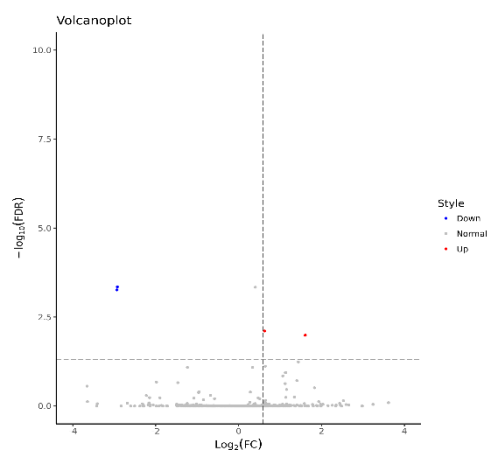


图 3-30 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 circRNA 火山图

Fig.3-30 Differential expression circRNA volcano map of thymus in chicken exposed to ammonia

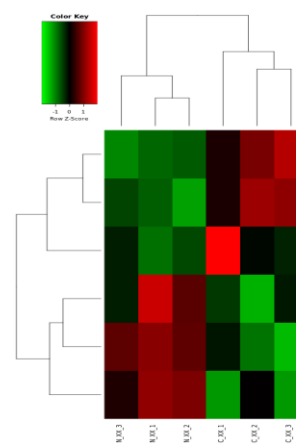


图 3-31 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 circRNA 聚类图

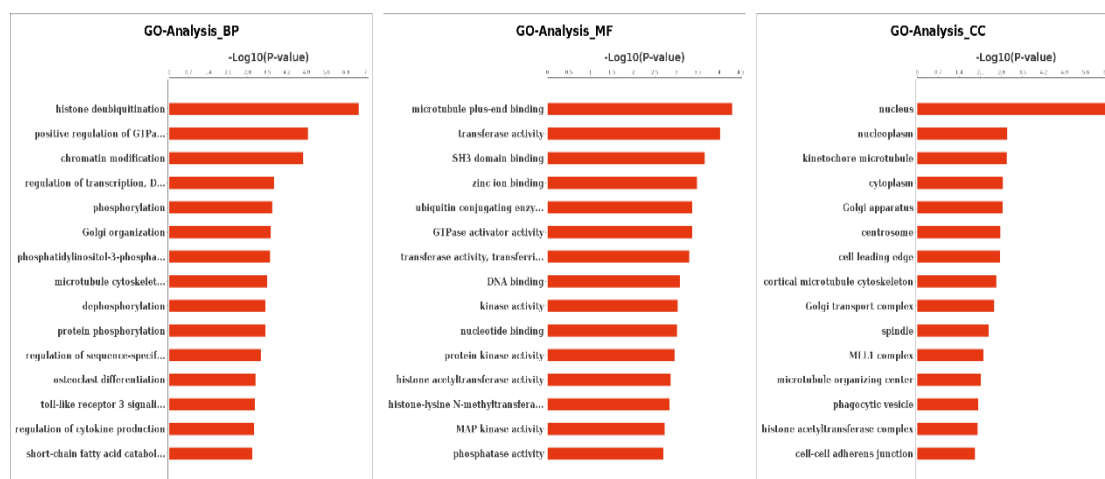
Fig.3-31 Differential expression circRNA cluster analysis of thymus in chicken exposed to ammonia

3.2.4.2 差异 circRNA 聚类分析差异

circRNA 聚类分析是用于在不同实验条件下判断显著差异 circRNA ($\log_2 FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$) 表达量的聚类模式。在聚类分析图 3-31 中可见, 表达量水平相近的基因会聚集一类, 每一个差异表达的 circRNA 在各组之间的差异分布及组别间的聚类。处理组显著差异的 circRNA 颜色的变化表示表达量的不同, 区别于对照组的表达量。

3.2.4.3 差异 circRNA 基因功能分析

显著性差异 circRNA 的宿主基因进行 GO 注释, 图 3-32 中可见, 鸡氨气暴露 42 d 时, circRNA 的宿主基因的生物过程 (biological process) 功能区主要富集在 GTP 酶活性的阳性调节 (Positive regulation of GTPase activity)、蛋白质磷酸化 (Protein phosphorylation)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、细胞因子产生的调节 (regulation of cytokine production)、组蛋白甲基化 (histone methylation) 及胚胎后发育 (Post-embryonic development) 等过程。分子功能 (Molecular Function) 的功能区主要富集在蛋白激酶 C 活性 (Protein kinase C activity)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (Protein serine/threonine kinase activity)、组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶活性 (histone-lysine N-methyltransferase activity)、蛋白激酶活性 (GTPase activator activity) 及转移酶活性 (transferase activity) 等功能上。细胞组分 (cellular component) 主要富集在细胞核 (nucleus)、细胞质 (cytoplasm)、中心体 (centrosome)、皮质微管细胞骨架 (cortical microtubule cytoskeleton) 和高尔基体 (Golgi apparatus) 等成分。说明鸡氨气暴露后 circRNA 广泛参与了机体应答的反应当中。



注: 横轴-----功能显著性水平 (P -Value) 的 $-\log_{10} P$ 值;

纵轴-----Gene Ontology 数据库中对应 GO 的前 15 条名称

BP: Biological Process; CC: Cellular Component; MF: Molecular Function

图 3-32 circRNA 宿主基因 GO 分析

Fig.3-32 circRNA GO-Analysis

3.2.5 差异 lncRNA 分析

3.2.5.1 差异 lncRNA 的筛选

用 EB-Seq 算法对 counts 进行差异筛选的结果，从差异倍数和校正后的显著水平 ($\log_2 FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$) 两方面进行评估，对差异 lncRNA 进行筛选，为全部的差异 lncRNA。用火山图显示差异 lncRNA 的分布情况。本实验采用 FDR 结合 fold change 筛选，发现在氨气暴露 42 d 时，分别有 10 个 lncRNA 表达量上调，同时有 8 个 lncRNA 表达量下调（图 3-33）。

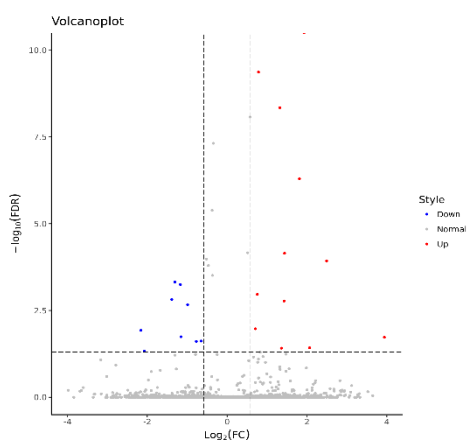


图 3-33 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 lncRNA 火山图

Fig.3-33 Differential expression lncRNA volcano map of thymus in chicken exposed to ammonia

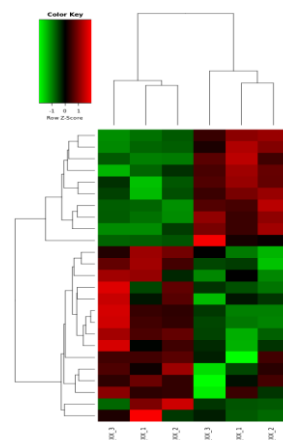


图 3-34 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 lncRNA 聚类图

Fig.3-34 Differential expression lncRNA cluster analysis of thymus in chicken exposed to ammonia

3.2.5.2 差异 lncRNA 聚类分析差异

lncRNA 聚类分析是用于在不同实验条件下判断显著差异 lncRNA ($\log_2 FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$) 表达量的聚类模式。在聚类分析图 3-34 中可见，表达量水平相近的基因会聚集一类，每一个差异表达的 lncRNA 在各组之间的差异分布及组别间的聚类。处理组显著差异的 lncRNA 颜色的变化表示表达量的不同，区别于对照组的表达量。

3.2.6 lncRNA-miRNA-mRNA 联合分析

lncRNA 作为竞争性内源 ceRNA，如图 3-35 所示，在鸡氨气暴露后 lncGRN (LOC101748909) 和 SMAD7、CLSTN2 的表达量与对照组比较下降，而 miR-6615-5p 的表达上升；lncRNA (LOC107053343、LOC101748002 和 LOC107051786) 和 KLHL31 的表达水

平升高，而 miR-7469-3p 表达水平下降；鸡氨气暴露 42 d 时，lncRNA（LOC107051941 和 LOC107053381）和 SLMO1 的表达水平上升，miR-1684b-3p 表达水平下降。在 lncRNA、miRNA 和 mRNA 三者联合分析的结果中 lncRNA 和 mRNA 二者的趋势相同。

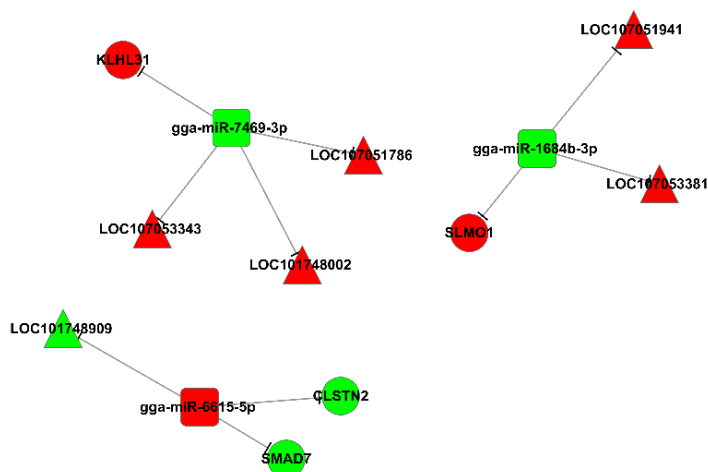


图 3-35 lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA 联合分析的结果

Fig.3-35 lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA analysis

3.2.7 转录组学数据验证

为了验证转录组学的基因 mRNA 表达差异分析，我们选取了在 RNA-seq 表达差异中有差异的基因进行 qRT-PCR 验证。这些基因 qPCR 引物见表 2-6，qRT-PCR 检测差异 circRNA 基因（circRNA-ZNF644、circRNA-RP11、circRNA-SMC6 和 circRNA-ARAP2），结果表明，基因的 qRT-PCR 结果表达水平和 RNA 测序（RNA-seq）的结果一致（图 3-36），这证实了 RNA-seq 分析的真实性。qRT-PCR 检测差异 miRNA 基因（miR-187-5p、miR-15a 和 miR-6615-5p），结果表明，qRT-PCR 数据的表达水平与 miRNA 测序（RNA-seq）的结果一致（图 3-37）。qRT-PCR 检测差异 mRNA 基因（TGH1、CD244 和 SMAD7），结果表明，qRT-PCR 数据的表达水平与 mRNA 测序（RNA-seq）的结果一致（图 3-38），这些证实了 RNA-seq 分析的真实性。

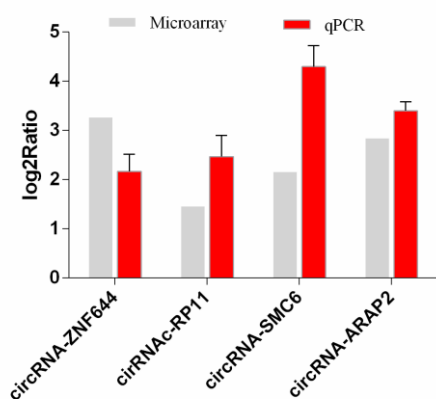


图 3-36 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 circRNA 转录水平和实时基因 mRNA 表达水平

Fig.3-36 Differential expression circRNA of thymus in chicken exposed to ammonia

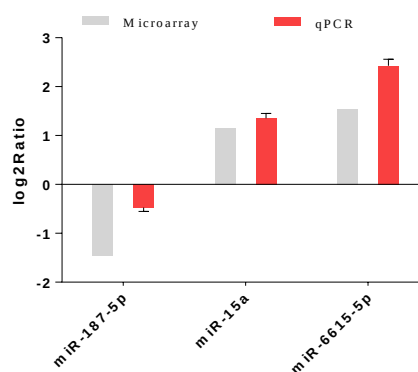


图 3-37 鸡氨气暴露时胸腺组织中 microRNA 转录水平和实时基因 mRNA 表达水平

Fig.3-37 Differential expression miRNA of thymus in chicken exposed to ammonia

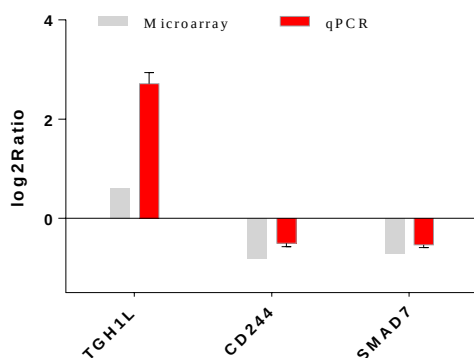


图 3-38 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异 mRNA 转录水平和实时基因 mRNA 表达水平

Fig.3-38 Differential expression mRNA of thymus in chicken exposed to ammonia

3.3 双荧光素酶报告基因系统验证 lncGRN 与 miR-6615-5p、miR-6615-5p 与 SMAD7 的靶向关系的结果

在初步验证了体内和体外氨暴露时 lncGRN 与 miR-6615-5p 的靶向性后，通过双荧光素酶报告基因系统在原代培养脾脏淋巴细胞中验证其靶向关系。构建野生型 (wild type, WT) pMIR-report-GRN 荧光素酶报告基因载体和突变型 (mutant type, MUT) pMIR-report-GRN 荧

光素酶报告基因载体后,将萤火虫荧光素酶和海肾荧光内参载体、miR-6615-5p mimic 和 mimic NC 分为四组在原代培养脾脏淋巴细胞中转染,多功能酶标仪检测荧光强度。在图 3-39 所示,第二组的荧光强度与第一组相比较降低了约 21%,两组之间差异显著 ($P<0.05$),第一组、第三组和第四组之间荧光强度比值差异不显著 ($P>0.05$)。miR-6615-5p 可以调控野生型 GRN 的重组表达载体的表达,当结合位点人工突变后,miR-6615-5p 与 lncGRN 的靶向调控关系消失,故 miR-6615-5p 是通过种子区非经典模式与 lncGRN 相结合的。

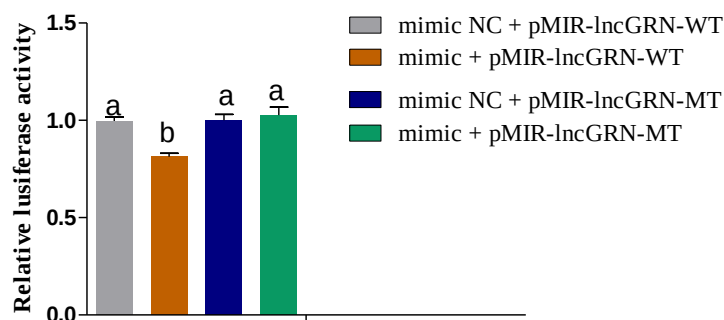


图 3-39 lncGRN 与 miR-6615-5p 荧光素酶报告基因系统检测结果

Fig. 3-39 Luciferase reporter gene system test results of lncGRN 与 miR-6615-5p

初步验证了体内和体外氨暴露时 miR-6615-5p 与 SMAD7 的靶向性后,通过双荧光素酶报告基因系统在原代培养的脾脏淋巴细胞中体外验证其靶向关系。构建野生型 (WT) pMIR-report-SMAD7 3'UTR 荧光素酶报告基因载体和突变型 (MUT) pMIR-report-SMAD7 3'UTR 荧光素酶报告基因载体后,将萤火虫荧光素酶和海肾荧光内参载体、miR-6615-5p mimic 和 mimic NC 分为四组在原代培养脾脏淋巴细胞中转染,检测荧光强度。在图 3-40 所示,第二组的荧光强度与第一组相比较降低了约 19%,两组之间差异显著 ($P<0.05$),第一组、第三组和第四组之间荧光强度比值差异不显著 ($P>0.05$)。miR-6615-5p 可以调控野生型 SMAD7 的重组表达载体的表达,当 3'UTR 结合位点人工突变后,miR-6615-5p 与 SMAD7 的靶向调控关系消失,故 miR-6615-5p 是通过结合位点与 SMAD7 的 3'UTR 结合的。

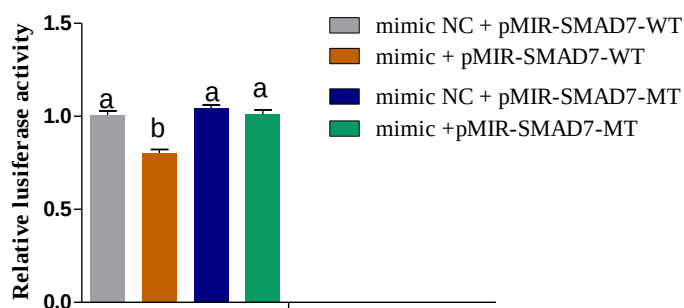


图 3-40 miR-6615-5p 与 SMAD7 荧光素酶报告基因系统检测结果

Fig. 3-40 Luciferase reporter gene system test results miR-6615-5p and SMAD7

3.4 miR-6615-5p 过表达和敲低的结果

3.4.1 miR-6615-5p 转染效率的检测

使用 mimic 后采用 qPCR 对 miRNA 过表达进行验证, 但 inhibitor 是与 miRNA 发生结合从而抑制了 miRNA 发挥作用, 它并非改变了 miRNA 的生成, 不适用 qPCR 检测。其效果检测可通过检测靶基因的蛋白表达水平, 或者通过萤光素酶报告系统。agomir 与 antagomir 由于增加了化学修饰, 可能会对 qRT-PCR 造成一定的影响, 不能通过 qPCR 方法验证使用效果。agomir 可以通过 Northern Blot 检测 miRNA 表达, antagomir 可以通过检测 miRNA 的靶基因 mRNA 表达来验证其使用效果。

miR-6615-5p 的转染效率, 结果如图 3-41 所示, 通过荧光定量实时 PCR 检测淋巴细胞对照组和转染组 miR-6615-5p 的表达量, 结果显示 miR-6615-5p mimic 终浓度在 50 nM 时 mRNA 表达量就已经显著高于对照组 ($P<0.05$), 与转染终浓度在 75 nM 和 100 nM 的 miR-6615-5p 表达量相当, 所以 mimic 终浓度用 50 nM 即可, 满足了实验的需求。

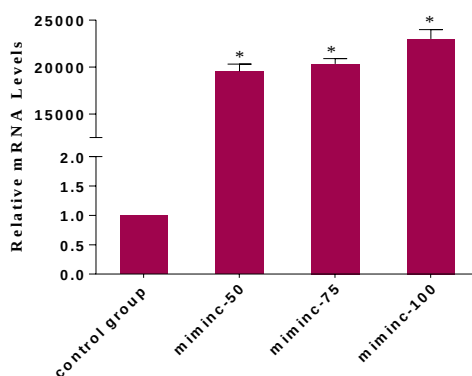


图 3-41 miR-6615-5p 不同浓度条件下转染的表达量

Figure 3-41 The expression of miR-6615-5p in different transfer condition

3.4.2 miR-6615-5p 对靶基因 SMAD7 的 mRNA 和蛋白表达的影响

图 3-42 是 miR-6615-5p 在脾脏淋巴细胞过表达和敲低时, SMAD7 mRNA 表达影响的结果。与空白对照组相比, 在 miminc 组 (miR-6615-5p 过表达) SMAD7 基因 mRNA 表达水平下降 ($P<0.05$)。与对照组比较, inhibit 组 (miR-6615-5p 敲低) 中 SMAD7 基因 mRNA 表达水平增加 ($P<0.05$)。

图 3-43 是 miR-6615-5p 在脾脏淋巴细胞过表达和敲低时, SMAD7 蛋白表达影响的结果。与空白对照组相比, 在 miminc 组 (miR-6615-5p 过表达) SMAD7 基因蛋白表达水平下降 ($P<0.05$)。与对照组比较, inhibit 组 (miR-6615-5p 敲低) 中 SMAD7 基因蛋白表达水平增加

($P<0.05$)。这些数据表明 miR-6615-5p 能在 mRNA 及蛋白水平上分别调控 SMAD7 基因的表达, 进一步确定 SMAD7 为 miR-6615-5p 靶基因之一。

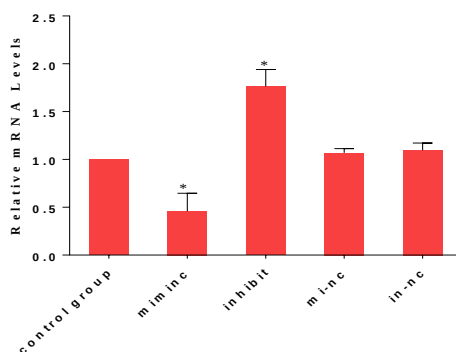


图 3-42 SMAD7 不同转染条件下的 mRNA 表达量

Figure3-42 The expression of SMAD7 in different transfer condition

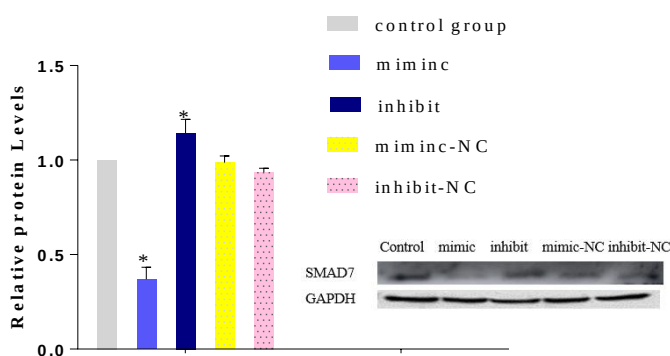


图 3-43 SMAD7 不同转染条件下的蛋白表达量

Figure3-43 The expression of SMAD7 in different transfer condition

3.4.3 miR-6615-5p 过表达/敲低对凋亡通路的影响

转染 miR-6615-5p miminc 和 inhibit 48 h 后, 检测凋亡相关基因 BCL-2、BAX、BAK、CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 表达的水平如图 3-44 到 3-50 所示。结果表明, 与对照组 (只含细胞和培养基) 相比较, miR-6615-5p miminc 过表达后, BAX、BAK、CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$); BCL-2 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。与对照组 (只含细胞和培养基) 相比较, miR-6615-5p 敲低后, BAX、BAK、CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$); BCL-2 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$)。

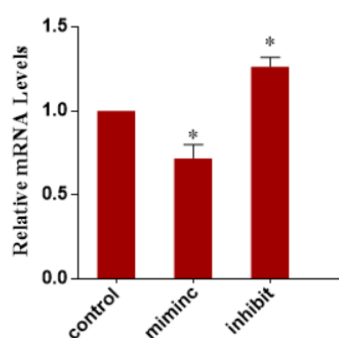


图 3-44 转染 miR-6615-5p mimic 和 inhibitor 后, BCL-2 的 mRNA 表达水平

Figure3-44 BCL-2 mRNA expression transfected with microRNA-6615 mimic and inhibitor

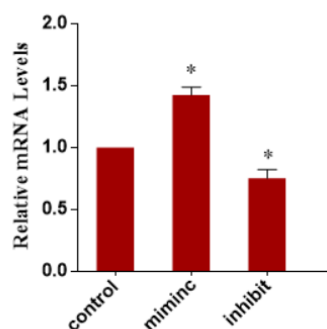


图 3-45 转染 miR-6615-5p mimic 和 inhibitor 后, BAX 的 mRNA 表达水平

Figure3-45 BAX mRNA expression transfected with microRNA-6615 mimic and inhibitor

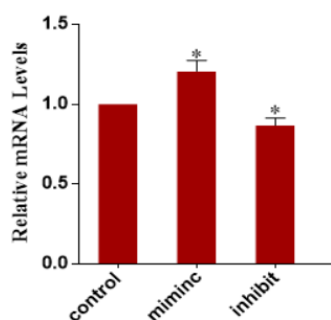


图 3-46 转染 miR-6615-5p mimic 和 inhibitor 后, BAK 的 mRNA 表达水平

Figure3-46 BAK mRNA expression transfected with microRNA-6615 mimic and inhibitor

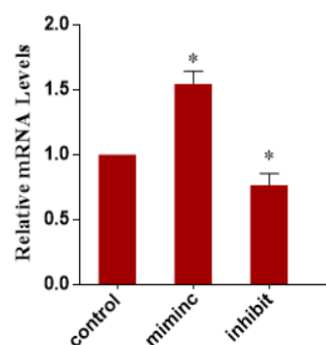


图 3-47 转染 miR-6615-5p mimic 和 inhibitor 后, Cytc 的 mRNA 表达水平

Figure3-47 Cytc mRNA expression transfected with microRNA-6615 mimic and inhibitor

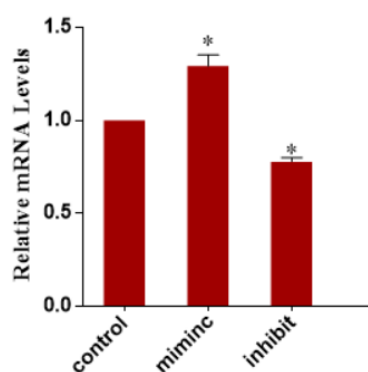


图 3-48 转染 miR-6615-5p mimic 和 inhibitor 后, APAF1 的 mRNA 表达水平
Figure3-48 APAF1 mRNA expression transfected with microRNA-6615 mimic and inhibitor

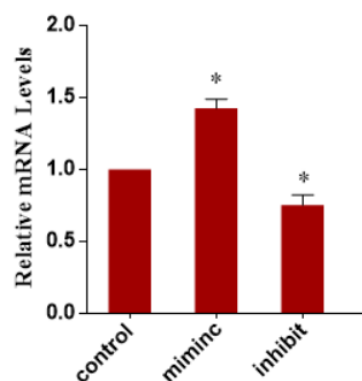


图 3-49 转染 miR-6615-5p mimic 和 inhibitor 后, Caspase-9 的 mRNA 表达水平
Figure3-49 Caspase-9 mRNA expression transfected with microRNA-6615 mimic and inhibitor

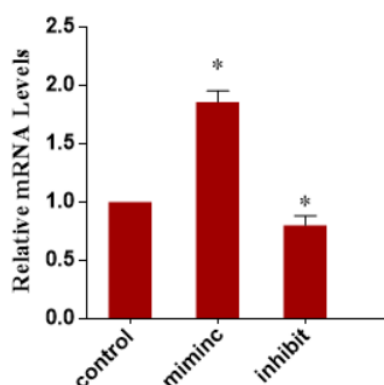


图 3-50 转染 miR-6615-5p mimic 和 inhibitor 后, Caspase-3 的 mRNA 表达水平
Figure3-50 Caspase-3 mRNA expression transfected with microRNA-6615 mimic and inhibitor

3.5 蛋白组学分析结果

3.5.1 质控分析

3.5.1.1 蛋白质酶切效果评估

胰蛋白酶可以水解蛋白质序列中的精氨酸和赖氨酸羧基端的肽键，理论上只产生以 R 或 K 为结尾的多肽，且多肽内部不再含有 K 和 R。在实际实验中，由于蛋白自身序列的特点、胰蛋白酶质量以及缓冲液条件等因素影响酶切效果，产生漏切多肽（肽段内部含有 K 或 R）和非 K 或 R 结尾的多肽（Semi-specific）。本实验产生理论酶切特异性可达 97.37%（图 3-51），多肽酶切>1 漏切数目控制在 1%以内（图 3-52），满足后续蛋白定量分析要求。

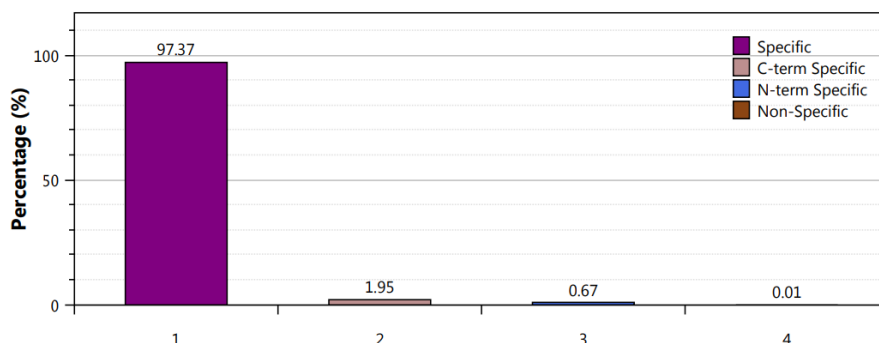


图 3-51 酶切特异性评估

Figure3-51 Assessment of Enzyme Digestion Specificity

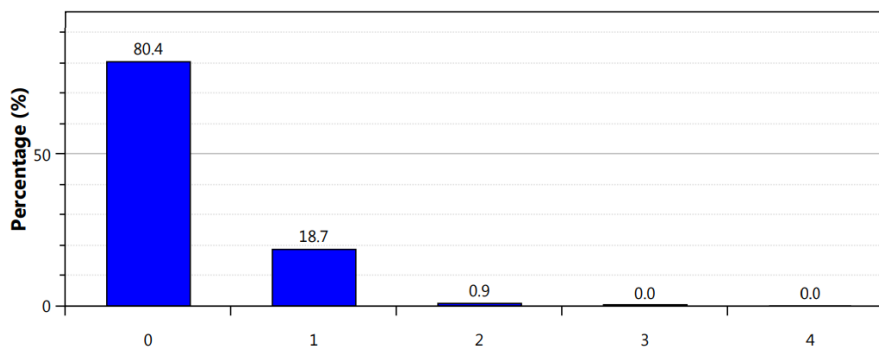


图 3-52 多肽酶切漏切比例评估

Figure3-52 Assessment of Leakage Ratio of Peptide Enzyme Digestion

质谱数据采集时，MS1 的扫描范围一般设置在 m/z 350-1200 左右，带有 2^+ 和 3^+ 的多肽容易产生高质量的 MS2 谱图，因此鉴定得分高的肽段质量在 700-3600 Da。本次分析肽段长度集中在 6-20 个氨基酸（图 3-53）。

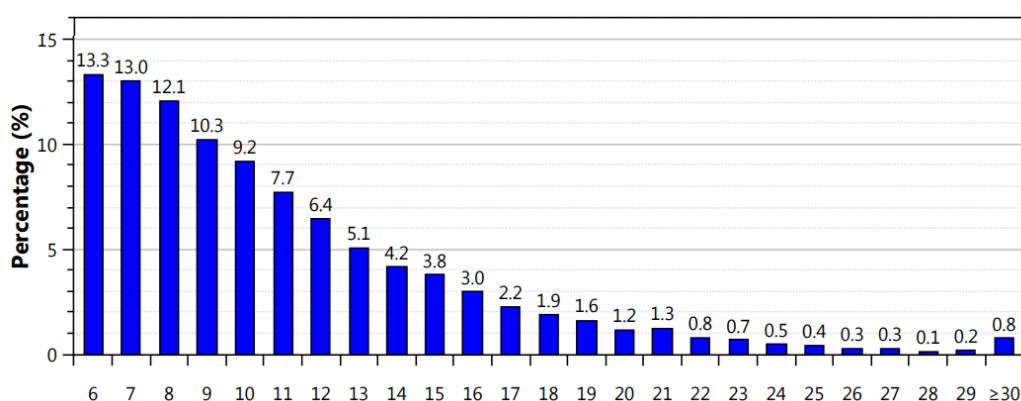


图 3-53 多肽长度分布示意图

Figure3-53 Distribution of Peptide Length

3.5.1.2 质谱精度和稳定性评估

精确的质荷比 (M/Z) 是影响蛋白质鉴定准确性的重要因素。本项目分析时质谱的质量精度控制在 ± 10 ppm 以内, 多数集中在 ± 1 ppm 以内, 质谱条件满足后续分析要求 (图 3-54)。

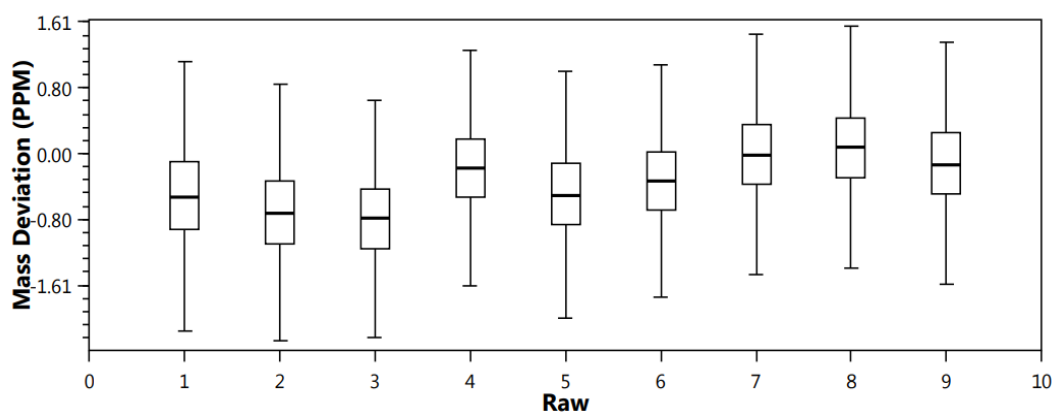


图 3-54 MS1 质量偏差分布图

Figure3-54 MS1 Mass Deviation Distribution

3.5.2 蛋白质定量结果统计

本次分析在 $FDR < 1\%$ 的条件下, 共鉴定到 9681 个蛋白, 蛋白鉴定和定量结果统计见表 3-4。由于鉴定的蛋白之间存在同源系列, 即鉴定多肽的序列相同, 在定量时将含有同源系列的蛋白归成一个蛋白组 (Protein group), 本项目鉴定蛋白组的数目为 3449, 其中能满足定量条件的蛋白数量为 3221 个。

表 3-4 蛋白鉴定和定量结果统计

Table 3-4 Results Statistics of Protein Identification and Quantitative

名称	鉴定蛋白 (Proteins)	鉴定蛋白组 (Protein groups)	定量蛋白 (Quantified proteins)
数量	9681	3449	3221

3.5.3 差异蛋白的筛选

通过 t. test 和变化倍数两重选择条件进行差异蛋白筛选, 阈值为 $p < 0.05$, 变化倍数 ≥ 1.3 , 氨气处理组与对照组相比较, 存在 66 个差异蛋白, 其中上调蛋白的数量为 28 个, 下调蛋白的数量为 38 个, 见图 3-55。

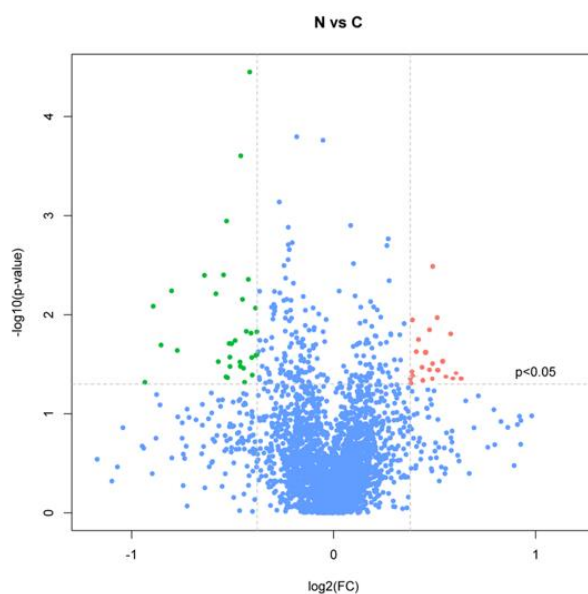


图 3-55 鸡氨气暴露时胸腺组织中差异蛋白火山图

Fig.3-55 Differential expression protein volcano map of thymus in chicken exposed to ammonia

3.5.4 差异蛋白聚类分析

在聚类分析图 3-56 中可见, 表达量水平相近的基因会聚集一类, 每一个差异表达的蛋白在各组之间的差异分布及组别间的聚类。

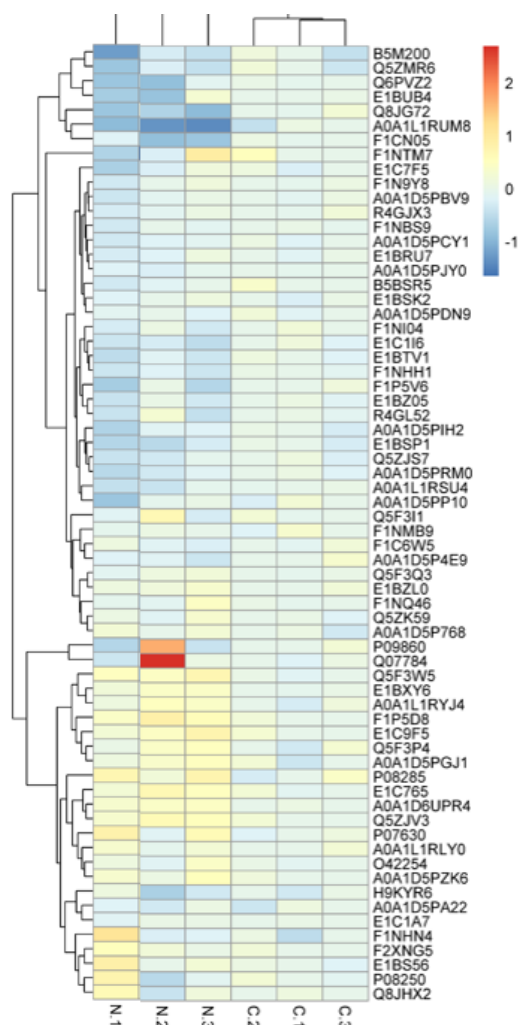


图 3-56 差异蛋白聚类分析图

Fig.3-56 Cluster analysis map of differentially expressed proteins

3.5.5 差异蛋白 GO 富集分析

对差异显著的蛋白使用 WEB-based、Gene、SeT、AnaLysis、Toolkit (2019 最新版, <http://www.webgestalt.org/index.php>) 进行蛋白功能分析, 基于目前已知的蛋白功能进行分类, 结果如图 3-57 所示。Go Term 涉及生物学过程主要包括代谢过程 (metabolic process)、生物调节 (biological regulation)、对刺激的反应 (Response to stimulus)、定位 (Localization) 等。Go Term 涉及细胞组分主要包括细胞膜 (membrane)、胞质 (Cytosol)、细胞核 (nucleus) 和细胞骨架 (cytoskeleton) 等。分子功能主要涉及 Go Term 包括离子结合 (ion binding)、蛋白质结合 (Protein binding)、转移酶活性 (transferase activity)、核苷酸结合 (nucleotide binding) 等。

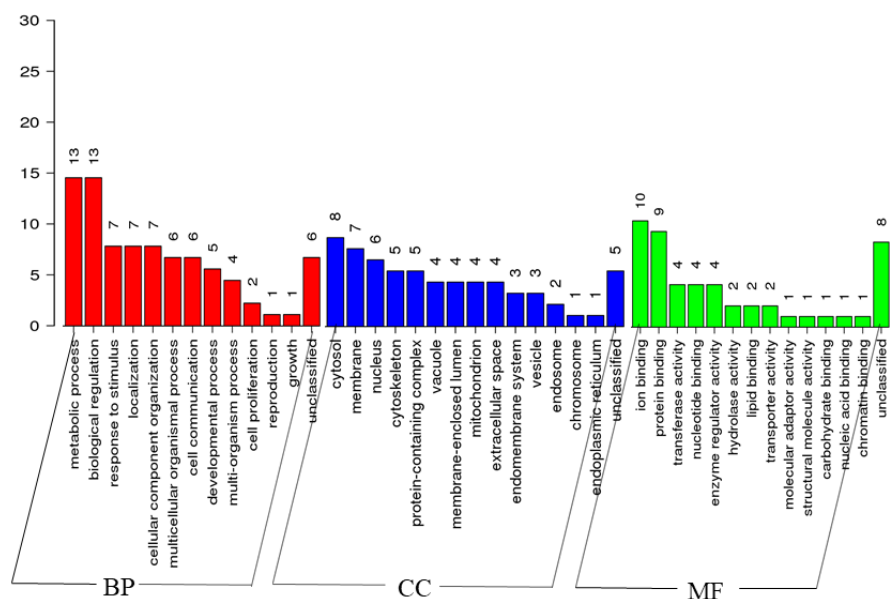


图 3-57 差异蛋白 GO Term 分析

Fig.3-57 GO Term analysis of Differential protein

差异蛋白的 GO 富集结果见图 3-58。离子结合（cation binding）、细胞过程的负调节（negative regulation of cellular process）、金属离子结合（metal ion binding）和大分子代谢过程的负调节（negative regulation of macromolecule metabolic process）是差异蛋白富集程度较高的 term，表明氨暴露主要导致蛋白质、代谢和免疫功能的变化。

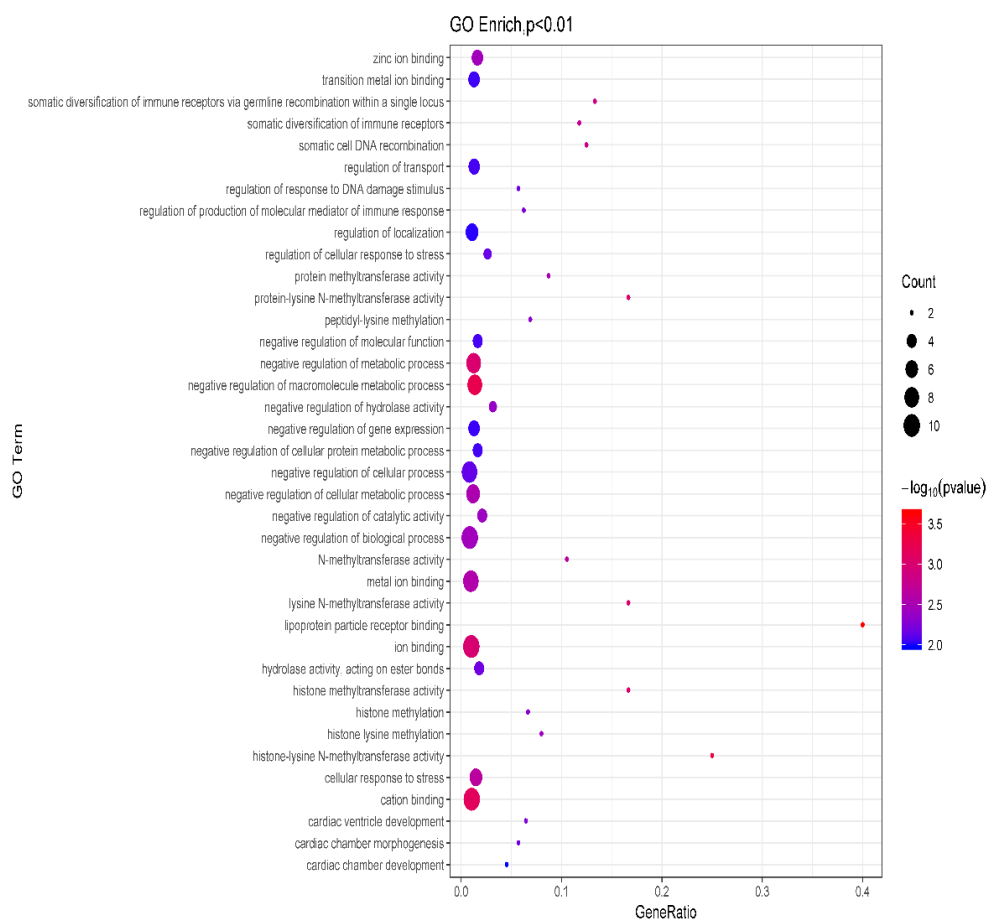


图 3-58 差异蛋白 GO 富集分析

Fig.3-58 GO enrichment analysis of Differential protein

3.5.6 差异蛋白 KEGG 分析

Pathway 可以将差异蛋白参与的生化代谢途径和信号转导途径进行富集, 结果见图 3-59。氨气暴露 42 d 时, 差异蛋白中参与的代谢途径和信号通路包括糖胺聚糖降解 (Glycosaminoglycan degradation)、氮代谢 (Nitrogen metabolism)、赖氨酸降解 (Lysine degradation)、半乳糖代谢 (Galactose metabolism)、Toll 样受体信号转导通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、凋亡 (Apoptosis)、PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)、磷脂酰肌醇信号转导系统 (Phosphatidylinositol signaling system)、Wnt 信号转导通路 (Wnt signaling pathway) 等。Q5F3P4 和 Q5ZMR6 为 KEGG 分析富集到凋亡通路的蛋白, 影响 BCL-2 的表达, 进而参与到细胞凋亡的调控。其中 Q5F3P4 可通过 PI3K/Akt 途径影响 BCL-2/BAD 和 Caspase-9 的表达参与凋亡过程的调控。Q5ZMR6 能够影响 BCL-2 参与细胞凋亡的调控。P08285、A0A1L1RUM8、A0A1D6UPR4、Q5ZJV3、F1P5D8 和 P08285 等蛋白的功能主要主要是参与组织损伤、炎症和免疫应答的过程。

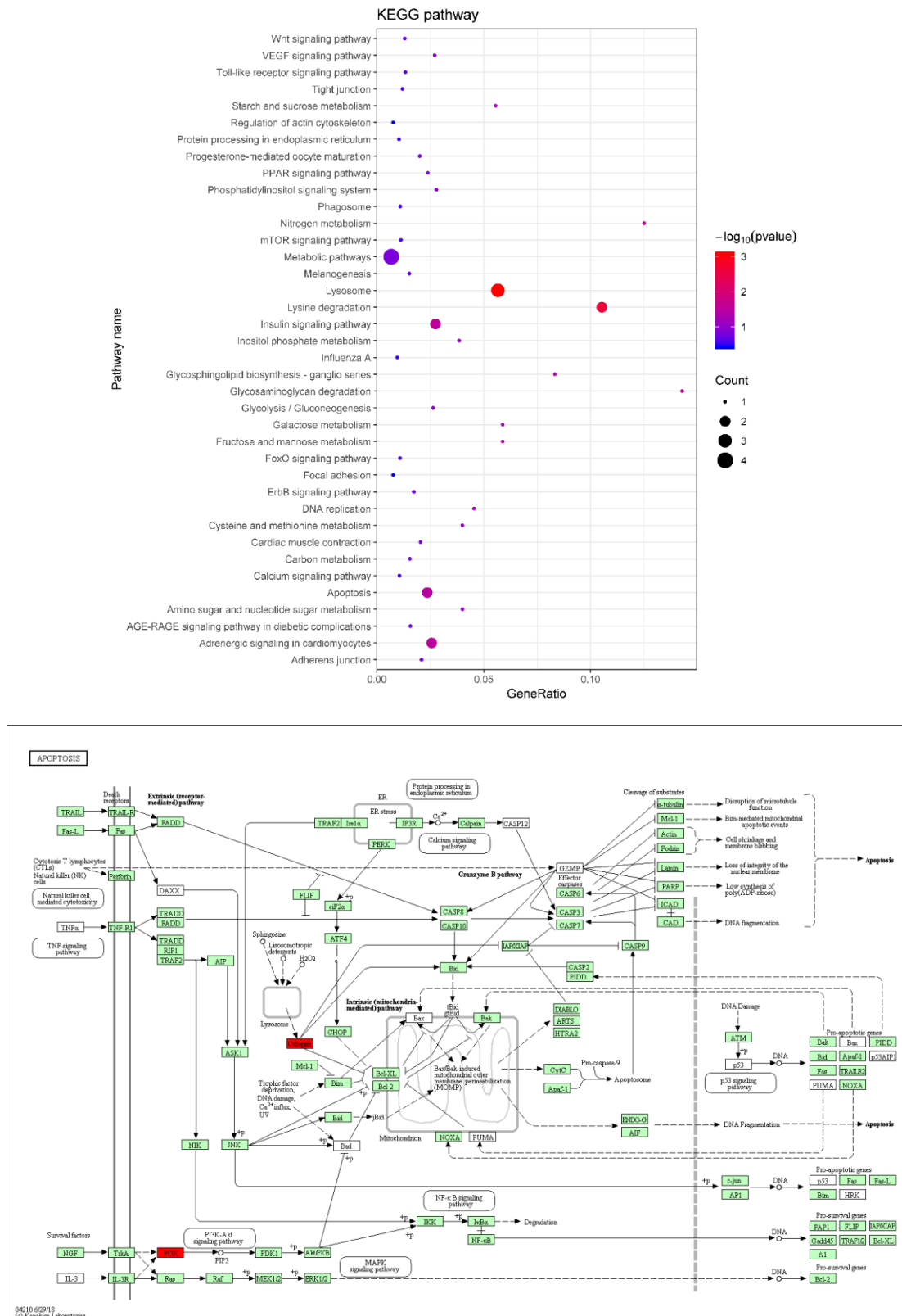


图 3-59 差异蛋白 KEGG 分析
Fig.3-59 KEGG analysis of Differential protein

3.5.7 差异蛋白互作分析

使用 Genemania (<http://genemania.org/>) 进行蛋白互作分析结果如图 3-60, 应用的生物信息学方法包括物理互作、基因共表达、共定位以及网站预测等。结果显示 PIK3CD、NFATC2、GOT1 和 APOA1 等节点相连接的边较多, 在该网络中的重要性较强。PIK3CD 是 PI3K 的催化亚单位之一, 参与 PI3K/ATK 信号途径介导细胞增殖和凋亡的发生。BTK 是 B 细胞表面受体细胞因子受体介导的信号转导过程中的核心因子。

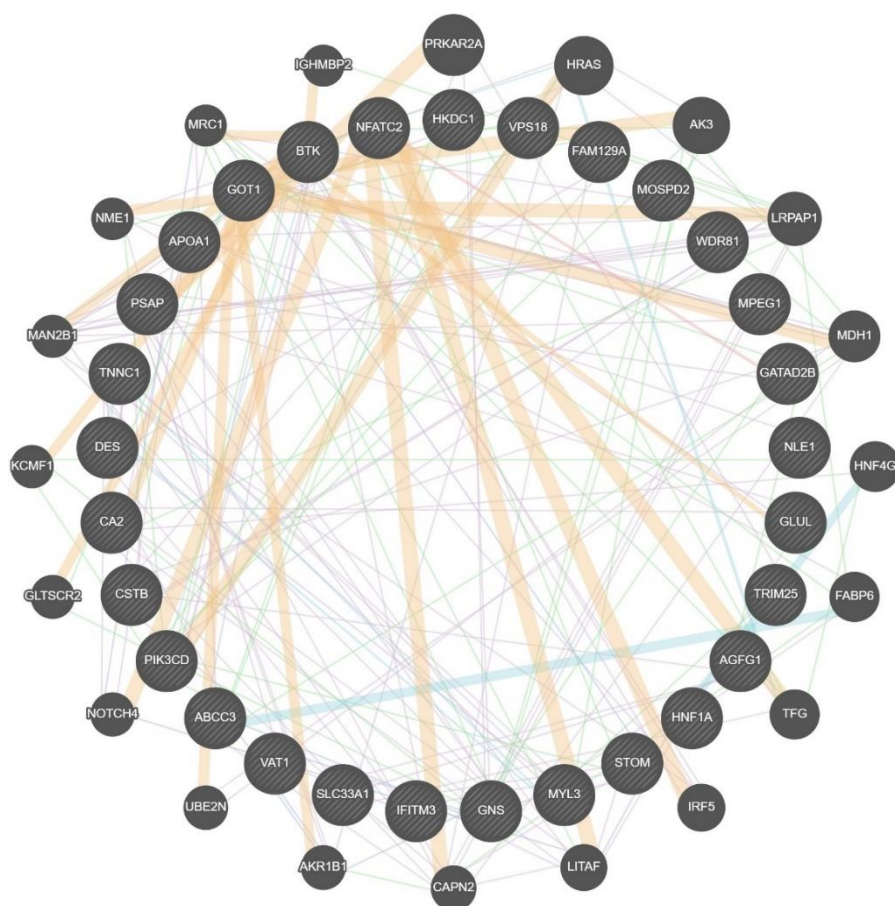


图 3-60 差异蛋白互作分析

Fig.3-60 Analysis of differential protein interactions

3.5.8 差异蛋白表达验证的结果

氨气暴露后, 鸡胸腺组织差异蛋白基因 PIK3CD、GOLGA3、NSD2 和 CTSS 的 mRNA 表达水平如图 3-61 所示。结果表明, 氨气暴露后处理组的 PIK3CD、NSD2 和 GOLGA3 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P < 0.05$)。CTSS mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P < 0.05$)。

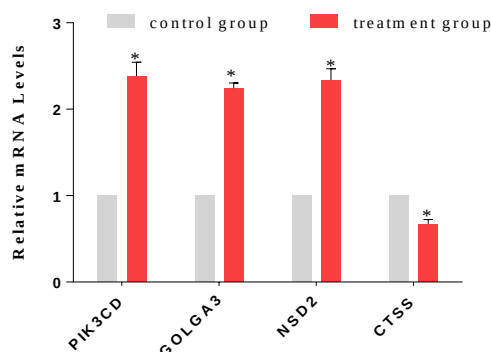


图 3-61 鸡氨气暴露后胸腺组织差异蛋白基因的 mRNA 表达水平

Fig.3-61 mRNA expression of differential protein in thymuses of chickens exposed to ammonia

3.6 氨气暴露诱导胸腺组织细胞凋亡机理研究的结果

3.6.1 氨气暴露 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 的 ceRNA 调控网络影响的结果

氨气暴露后，鸡胸腺组织中 lncGRN，miR-6615-5p 和 SMAD7 基因 mRNA 表达水平如图 3-62 所示。结果表明，氨气暴露后处理组的 lncGRN 和 SMAD7 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。miR-6615-5p mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$)。鸡氨气暴露 42 d 胸腺中 SMAD7 的蛋白表达如图 3-63。处理组的 SMAD7 蛋白表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。

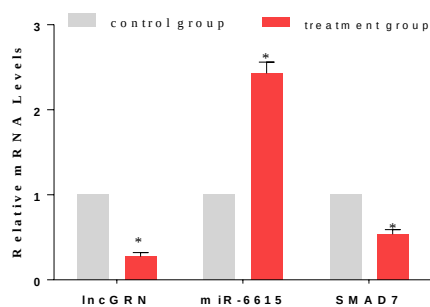


图 3-62 鸡氨气暴露时胸腺组织中 ceRNA 调控网络 mRNA 表达水平

Fig.3-62 mRNA expression of ceRNA regulatory network in thymus of chickens exposed to ammonia

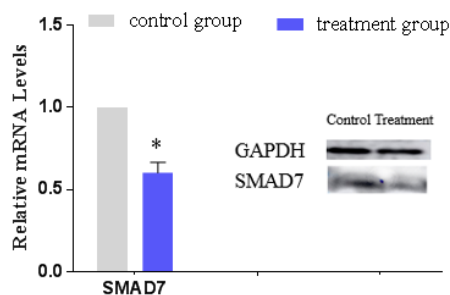


图 3-63 鸡氨气暴露后胸腺组织 SMAD7 蛋白表达水平

Fig.3-63 Protein expression of SMAD7 in thymuses of chickens exposed to ammonia

3.6.2 氨气暴露对胸腺组织氧化应激影响的检测结果

氨气暴露后,鸡胸腺中抗氧化基因 GPx 和 GST4 的 mRNA 表达变化如图 3-64 所示。结果表明,氨气暴露后处理组的抗氧化基因 GPx 和 GST4 的 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。鸡氨气暴露 42 d 胸腺中 GPx 的蛋白表达如图 3-65。处理组的 GPx 蛋白表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。

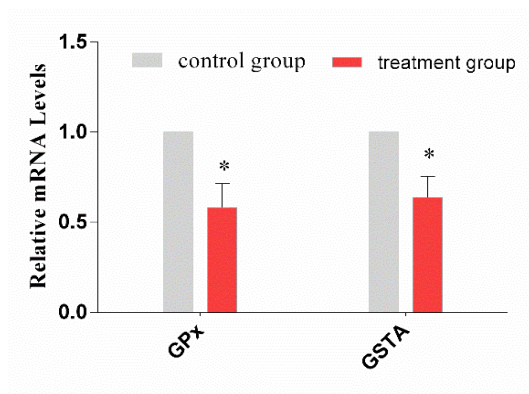


图 3-64 鸡氨气暴露后胸腺组织 GPx 和 GST4 基因的 mRNA 表达水平

Fig.3-64 mRNA expression of GPx and GST4 in thymuses of chickens exposed to ammonia

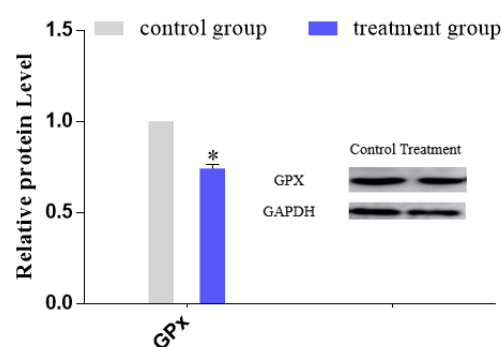


图 3-65 鸡氨气暴露后胸腺组织 GPx 蛋白表达水平

Fig.3-65 Protein expression of GPx in thymuses of chickens exposed to ammonia

3.6.3 氨气暴露对胸腺组织炎性细胞因子影响的检测结果

氨气暴露后,鸡胸腺组织炎性细胞因子 HO-1、NF- κ B、COX-2、iNOS、TNF- α 和 TGF- β 的 mRNA 表达水平如图 3-66 所示。结果表明,氨气暴露后处理组的 HO-1、NF- κ B、COX-2 及 iNOS 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$)。TNF- α mRNA 表达水平和对照组相比无显著差异。TGF- β mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。鸡氨气暴露 42 d 胸腺中 HO-1、NF- κ B 和 iNOS 的蛋白表达如图 3-67。处理组的 HO-1、NF- κ B 和 iNOS 蛋白表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$)。

氨气暴露后,鸡胸腺中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 和 IL-12 的 mRNA 表达的水平如图 3-68 所示。结果表明,氨气暴露后处理组的 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IL-12 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$)。IL-4 mRNA 表达水平和对照组相比无显著差异。IL-10 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。

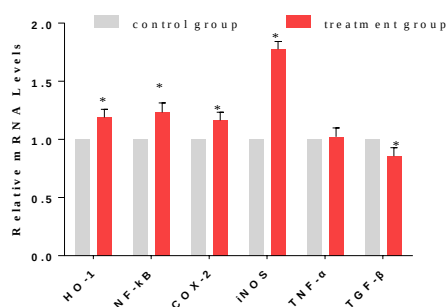


图 3-66 鸡氨气暴露后胸腺组织炎症细胞因子基因的 mRNA 表达水平

Fig.3-66 mRNA expression of inflammatory cytokines in thymuses of chickens exposed to ammonia

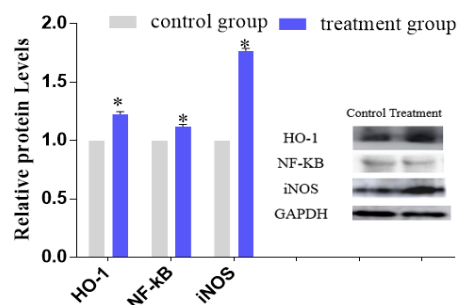


图 3-67 鸡氨气暴露后胸腺组织炎症细胞因子蛋白表达水平

Fig.3-67 Protein expression of inflammatory cytokines in thymuses of chickens exposed to ammonia

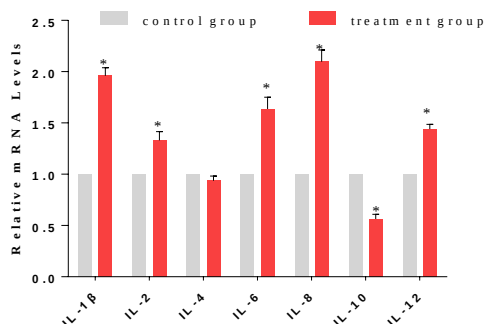


图 3-68 鸡氨气暴露后胸腺组织中白介素的 mRNA 表达水平

Fig.3-68 mRNA expression of interleukinin in thymuses of chickens exposed to ammonia

3.6.4 氨气暴露对胸腺组织细胞凋亡影响的检测结果

氨气暴露后，鸡胸腺中凋亡相关基因 BCL-2、CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 表达的水平如图 3-69 所示。结果表明，氨气暴露后处理组的 BCL-2 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)；而 CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$)。

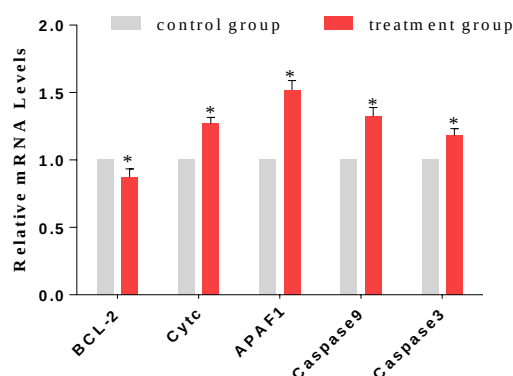


图 3-69 鸡氨气暴露后胸腺组织中凋亡相关的 mRNA 表达水平

Fig.3-69 mRNA expression of apoptosis-related genes in thymuses of chickens exposed to ammonia

3.7 氯化铵暴露诱导细胞凋亡机理研究的结果

3.7.1 台盼蓝检测细胞活力的结果

分别提取胸腺和脾脏淋巴细胞后，采用台盼蓝染色，胸腺淋巴细胞染色如图 3-70 和图 3-71，死细胞被台盼蓝染色呈现淡蓝色，活细胞不能被台盼蓝染色呈无色透明，活细胞率为 95%以上；脾脏淋巴细胞染色如图 3-72 和图 3-73，死细胞被台盼蓝染色呈现淡蓝色，活细胞不能被台盼蓝染色呈无色透明，活细胞率为 95%以上。



图 3-70 胸腺淋巴细胞台盼蓝染色×100
Fig.3-70 Trypan blue staining of thymic lymphocyte ×100

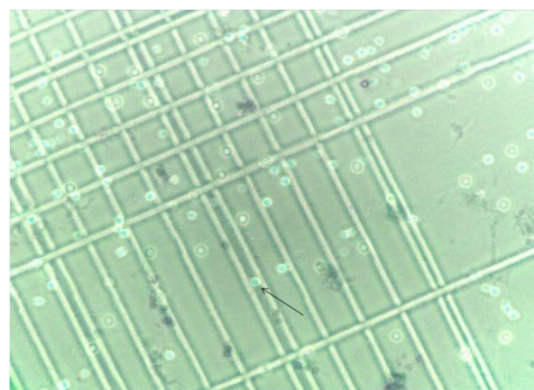


图 3-71 胸腺淋巴细胞台盼蓝染色×200
Fig.3-71 Trypan blue staining of thymic lymphocyte ×200

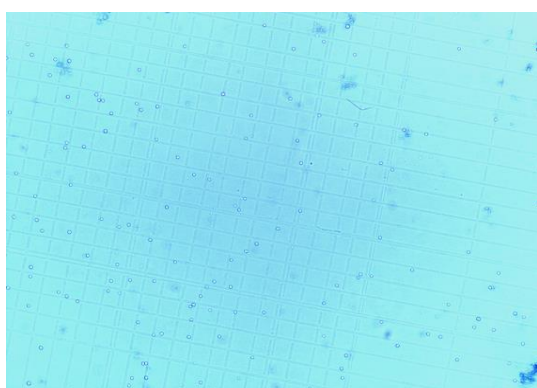


图 3-72 脾脏淋巴细胞台盼蓝染色×100
Fig.3-72 Trypan blue staining of splenic lymphocyte ×100

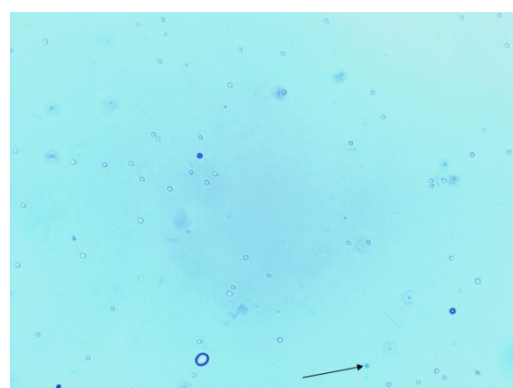


图 3-73 脾脏淋巴细胞台盼蓝染色×200
Fig.3-73 Trypan blue staining of splenic lymphocyte ×200

3.7.2 CCK-8 法检测细胞活性的结果

CCK-8 检测不同浓度氯化铵对细胞活性的影响，氯化铵作用胸腺淋巴细胞 48 h 结果如图 3-74，其中，作用 48 h 时，氯化铵浓度为 0.1 mmol/L 中，细胞活性显著降低 ($P<0.05$)。在其余各组中随着浓度的增加，细胞活性显著降低。氯化铵作用脾脏淋巴细胞 48 h 结果如图 3-75。其中，作用 48 h 时，氯化铵浓度为 0.1 mmol/L 时，脾脏细胞活性无差异显著。氯化铵浓度为 0.5 mmol/L 组中，细胞活性显著降低 ($P<0.05$)。在其余各组中随着浓度的增加，细胞活性显著降低，呈下降趋势。

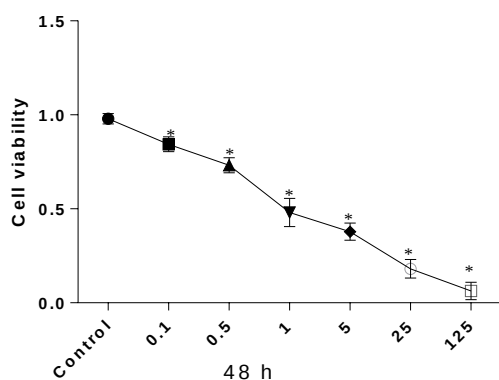


图 3-74 不同浓度的氯化铵作用胸腺淋巴细胞 48 h 后，细胞活性的影响
Fig.3-74 Effects of different concentrations of ammonium chloride on thymic lymphocyte activity for 48 h

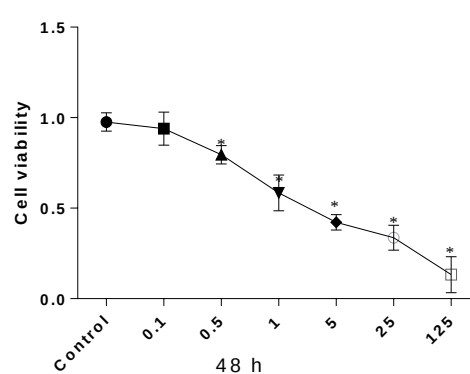


图 3-75 不同浓度的氯化铵作用脾脏淋巴细胞 48 h 后，细胞活性的影响
Fig.3-75 Effects of different concentrations of ammonium chloride on splenic lymphocyte activity for 48 h

3.7.3 氯化铵暴露对淋巴细胞 AO/EB 染色检测细胞凋亡的检测结果

荧光显微镜观察氯化铵培养胸腺淋巴细胞 48 h 后 AO/EB 染色细胞凋亡情况，胸腺淋巴细胞对照组（图 3-76）、1 mmol/L 氯化铵处理组（图 3-77）和 5 mmol/L 氯化铵处理组（图 3-78）结果如下所示。活细胞，呈绿色；早期凋亡细胞，呈绿色但核染色固缩；晚期凋亡细胞，核染色质为橘红色并呈固缩状；死亡细胞，呈红色。随着氯化铵浓度的增加，凋亡细胞数量增多。随机选取 5 个视野进行细胞定量计数分析，定量分析结果如图（图 3-79）。对照组中细胞凋亡率约为 17.84%。浓度为 1 mmol/L 氯化铵组凋亡率为 36.92%。浓度为 5 mmol/L 氯化铵组凋亡率为 26.14%。

荧光显微镜观察氯化铵培养脾脏淋巴细胞 48 h 后 AOEB 染色细胞凋亡情况，脾脏淋巴细胞对照组（图 3-80）、1 mmol/L 氯化铵处理组（图 3-81）和 5 mmol/L 氯化铵处理组（图 3-82）结果如下所示。活细胞，核染色质着绿色并呈正常结构；早期凋亡细胞，核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状；晚期凋亡细胞，核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状；非凋亡的死亡细胞，核染色质着橘红色并呈正常结构。随着氯化铵浓度的增加，凋亡细胞数量增多。随机选取 5 个视野进行细胞定量计数分析，定量分析结果如图（图 3-83）。对照组中细胞凋亡率约为 17.84%。浓度为 1 mmol/L 氯化铵组凋亡率为 36.92%。浓度为 5 mmol/L 氯化铵组凋亡率为 26.14%。

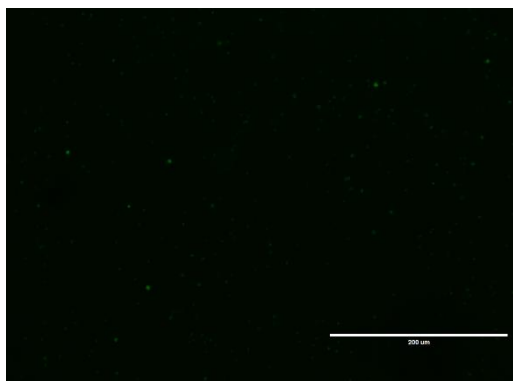


图 3-76 对照组胸腺淋巴细胞 AOEB 染色荧光显微镜观察×200

Fig.3-76 Observation of thymic lymphocyte in control group by AOEB staining fluorescence microscopy ×200

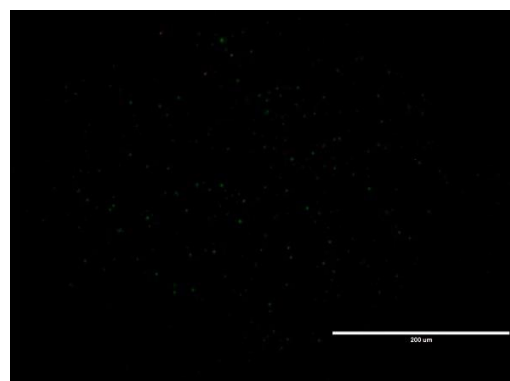
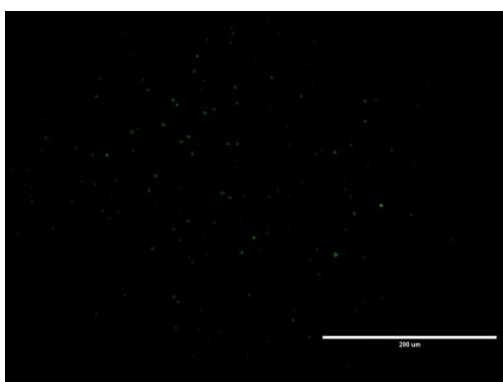


图 3-77 1 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞 AOEB 染色荧光显微镜观察×200

Fig.3-77 Observation of thymic lymphocyte treated with 1 mmol/L ammonium chloride by AOEB staining and fluorescence microscopy×200



3-78 5 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞

AOEB 染色荧光显微镜观察×200

Fig.3-78 Observation of thymic lymphocyte treated with 5 mmol/L ammonium chloride by AOEB staining and fluorescence microscopy×200

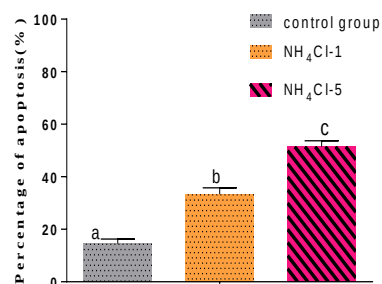


图 3-79 胸腺淋巴细胞凋亡率定量分析

Fig.3-79 Quantitative analysis of apoptotic rate in thymic lymphocyte

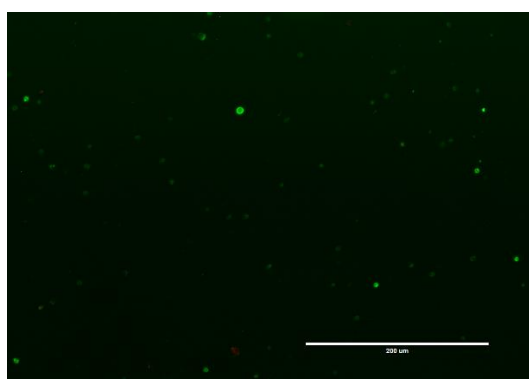


图 3-80 对照组脾脏淋巴细胞 AOEB 染色荧光显微镜观察×200

Fig.3-80 Observation of splenic lymphocyte in control group by AOEB staining and fluorescence microscopy ×200

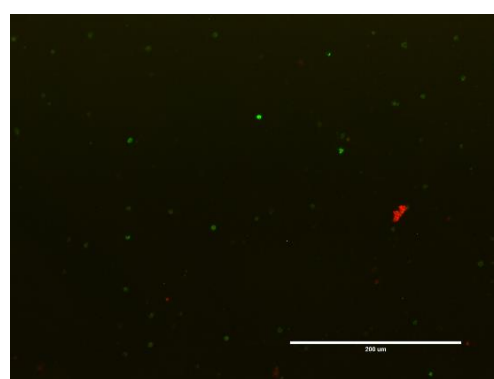


图 3-81 1 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞 AOEB 染色荧光显微镜观察×200

Fig.3-81 Observation of splenic lymphocyte treated with 1 mmol/L ammonium chloride by AOEB staining and fluorescence microscopy ×200

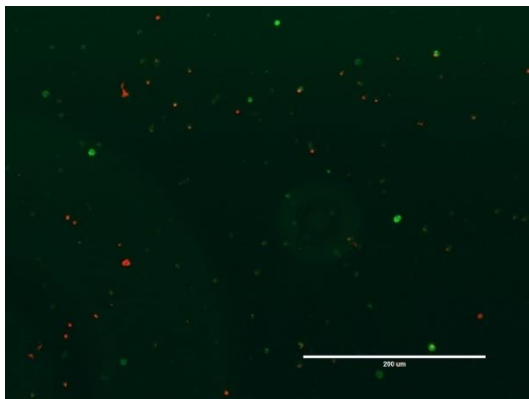


图 3-82 5 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞
AOEB 染色荧光显微镜观察×400

Fig.3-82 Observation of splenic lymphocyte
treated with 5 mmol/L ammonium chloride by
AOEB staining and fluorescence microscopy
×200

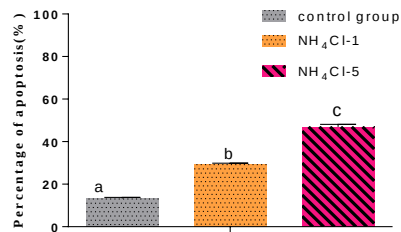


图 3-83 脾脏淋巴细胞凋亡率定量分析

Fig.3-83 Quantitative analysis of apoptotic
rate in splenic lymphocyte

3.7.4 流式细胞术检测氯化铵暴露对淋巴细胞细胞凋亡影响的检测结果

多功能酶标仪检测胸腺淋巴细胞吸光度值，激发波长设置为 Ex = 488 nm；发射波长 Em = 530 nm，结果见表 3-5。其中，1 mmol/L 氯化铵处理组和 5 mmol/L 氯化铵处理组与对照组相比较，荧光吸光度值对比值均下降，分别为 0.896 和 0.690，下降水平差异显著（ $P<0.05$ ）。

表 3-5 胸腺淋巴细胞吸光度值
Table 3-5 Absorption value of thymic lymphocyte

	空白组	对照组	氯化铵 1 mmol/L 组	氯化铵 5 mmol/L 组
荧光值	11863.58	92898.15	83274.21	70112.42
	10770.24	89347.32	87295.69	69854.68
	11836.32	105710.84	91077.52	69570.83
对比值			0.896 ± 0.078*	0.690± 0.654*

注：*表示与对照组相比对比值有显著差异（ $P<0.05$ ）

多功能酶标仪检测脾脏淋巴细胞吸光度值，激发波长设置为 Ex = 488 nm；发射波长 Em = 530 nm，结果见表 3-6。其中，1 mmol/L 氯化铵处理组和 5 mmol/L 氯化铵处理组与对照组相比较，荧光吸光度值对比值均下降，分别为 0.951 和 0.612，下降水平差异显著（ $P<0.05$ ）。

表 3-6 脾脏淋巴细胞吸光度值

Table 3-6 Absorption value of splenic lymphocyte

	空白组	对照组	氯化铵 1 mmol/L 组	氯化铵 5 mmol/L 组
荧光值	2396	70560	64491	50215
	3819	69494	65230	37253
	3601	63363	64289	42225
对比值			$0.951 \pm 0.092^*$	$0.619 \pm 0.612^*$

注：*表示与对照组相比吸光值有显著差异

使用 Annexin-FITC/PI 染色进行脾脏淋巴细胞流式凋亡细胞检测分析，对照组（图 3-84）、氯化铵浓度为 1 mmol/L（图 3-85）和 5 mmol/L（图 3-86）结果如下所示。不同象限代表不同状态的细胞，其中 Q1（坏死细胞），Q2（晚期凋亡细胞），Q3（正常细胞），Q4（早期凋亡细胞）。培养 24 h 后，对照组的凋亡率为 8.64%，1 mmol/L 氯化铵组凋亡率为 17.23%，5 mmol/L 氯化铵组凋亡率为 30.65%。三组定量分析柱状图（图 3-87），对照组、1 mmol/L 组和 5 mmol/L 组，不同组之间差异显著（ $P < 0.05$ ）。字母不同表示组间差异显著。

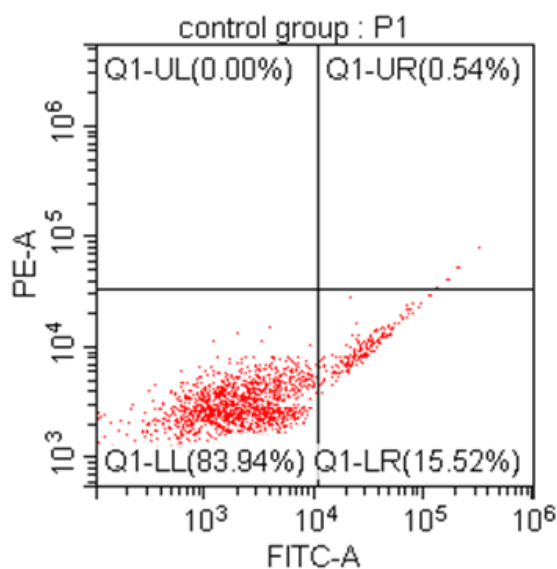


图 3-84 对照组淋巴细胞 Annexin-FITC/PI 染色流式图

Fig.3-84 Annexin-FITC/PI staining flow chart of lymphocyte in control group

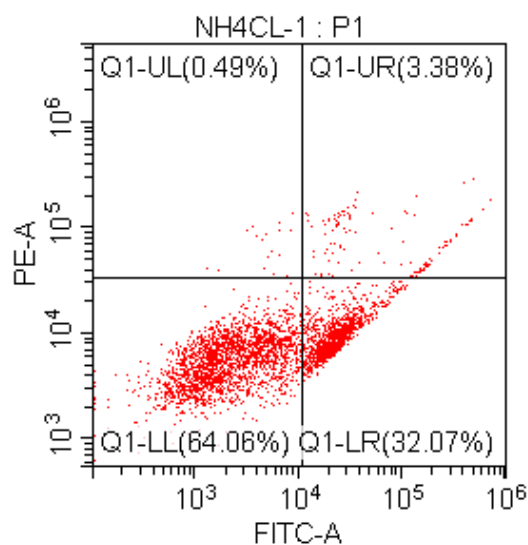


图 3-85 氯化铵浓度 1 mmol/L 淋巴细胞 Annexin-FITC/PI 染色流式图

Fig.3-85 Annexin-FITC/PI staining flow chart of lymphocytes with ammonium chloride concentration of 1 mmol/L

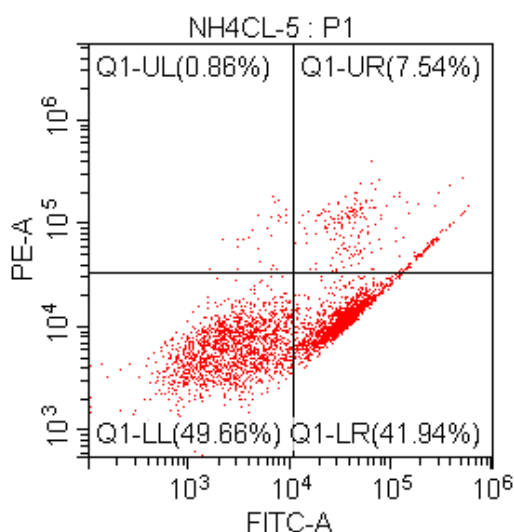


图 3-86 氯化铵浓度 5 mmol/L 淋巴细胞
Annexin-FITC/PI 染色流式图

Fig.3-86 Annexin-FITC/PI staining flow chart
of lymphocytes with ammonium chloride
concentration of 5 mmol/L

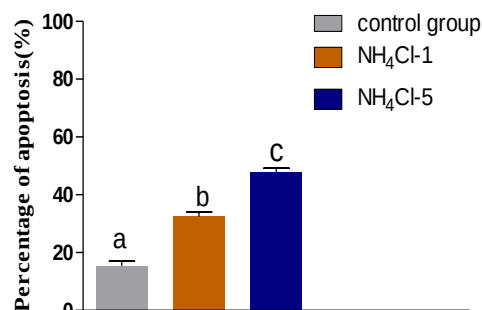


图 3-87 脾脏淋巴细胞凋亡率分析

Fig.3-87 Analysis of apoptotic rate in splenic
lymphocyte

3.7.5 氯化铵暴露对淋巴细胞线粒体膜电位影响的检测结果

荧光显微镜观察胸腺淋巴细胞培养 48 h 后线粒体膜电位情况,对照组(图 3-88)、1 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-89)和 5 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-90)结果如下所示。随着氯化铵浓度的增加,绿色的单体数量增多。红绿荧光数量的比值分析如图 3-91,对照组为 6.14,1 mmol/L 氯化铵处理组为 1.87,5 mmol/L 氯化铵处理组为 0.37,组与组间比较差异显著 ($P < 0.05$)。

3.7.6 氯化铵暴露对淋巴细胞线粒体钙影响的检测结果

荧光显微镜观察胸腺淋巴细胞培养 48 h 后线粒体钙分布情况,对照组(图 3-92)、1 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-93)和 5 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-94)的结果如下所示。Rhod-2 是一种可见光激发的高亲和力 Ca^{2+} 指示剂,呈红色荧光。Mito Tracker 是线粒体绿色探针,呈绿色荧光。用绿红荧光的相对比例来衡量线粒体钙的变化情况。随着氯化铵浓度的增加,红色的单体数量增多,线粒体内钙聚集增多。随机选取 5 个视野进行绿红荧光值定量计数分析,定量分析结果如图 3-95。对照组中细胞绿红荧光比值为 42.42,1 mmol/L 氯化铵处理组为 8.32,5 mmol/L 氯化铵处理组为 4.26,组与组间比较差异显著 ($P < 0.05$)。

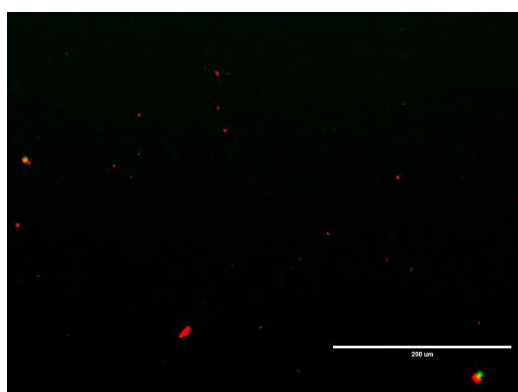


图 3-88 对照组胸腺淋巴细胞线粒体膜电位
荧光显微镜观察×200

Fig.3-88 Observation of thymic lymphocyte
mitochondrial membrane potential
fluorescence microscopy in control group
×200

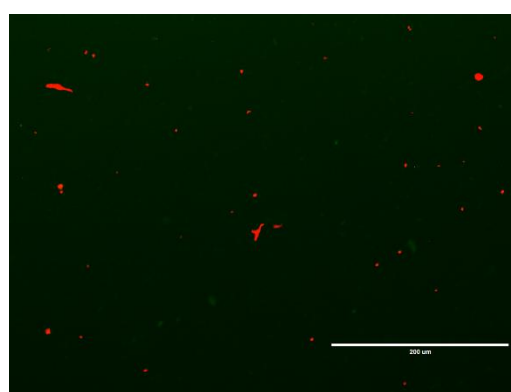


图 3-89 1 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞
线粒体膜电位荧光显微镜观察×200

Fig.3-89 Mitochondrial membrane potential
fluorescence microscopic observation of
thymic lymphocyte treated with 1 mmol/L
ammonium chloride×200

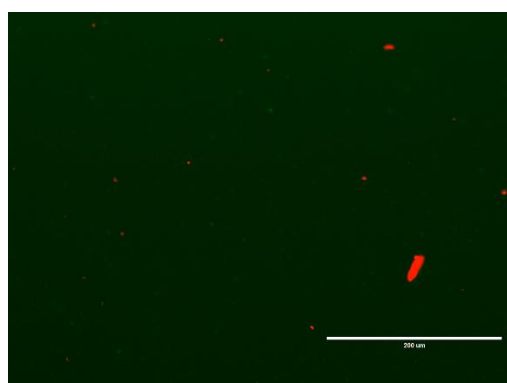


图 3-90 5 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞
线粒体膜电位荧光显微镜观察×200

Fig.3-90 Mitochondrial membrane potential
fluorescence microscopic observation of
thymic lymphocyte treated with 5 mmol/L
ammonium chloride×200

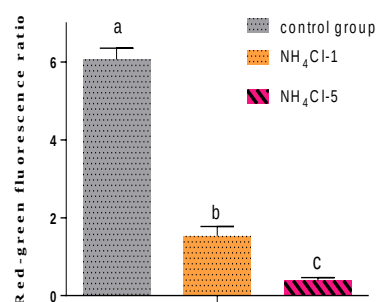


图 3-91 红绿荧光数量值定量分析

Fig.3-91 Quantitative analysis of value of red
and green fluorescence

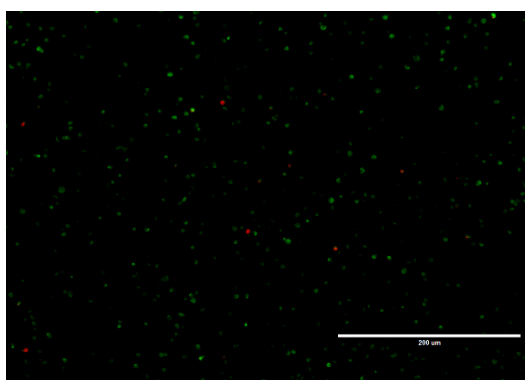


图 3-92 对照组胸腺淋巴细胞线粒体钙荧光显微镜观察×200

Fig.3-92 Observation of thymic lymphocyte mitochondrial membrane potential fluorescence microscopy in control group ×200

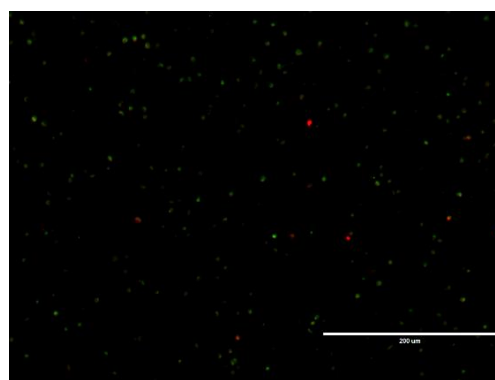


图 3-93 1 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞线粒体钙荧光显微镜观察×200

Fig.3-93 Fluorescence microscopic observation of mitochondrial calcium in thymic lymphocytes treated with 1 mmol/L ammonium chloride×200

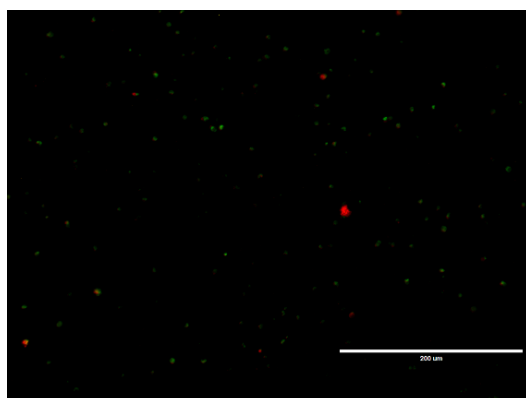


图 3-94 5 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞线粒体钙荧光显微镜观察×200

Fig.3-94 Fluorescence microscopic observation of mitochondrial calcium in thymic lymphocytes treated with 5 mmol/L ammonium chloride×200

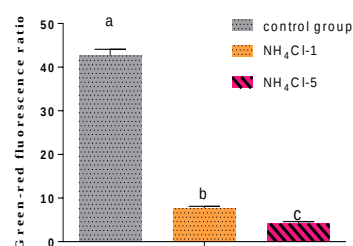


图 3-95 绿红荧光数量值定量分析

Fig.3-95 Quantitative analysis of value of green and red fluorescence

荧光显微镜观察脾脏淋巴细胞培养 48 h 后线粒体钙分布情况,对照组(图 3-96)、1 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-97)和 5 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-98)结果如下所示。随着氯化铵浓度的增加,红色的单体数量增多,线粒体内钙聚集增多。随机选取 5 个视野进行绿红荧光值定量计数分析,定量分析结果如图 3-99。对照组中细胞绿红荧光比值为 18.13, 1 mmol/L 氯化铵处理组为 6.16, 5 mmol/L 氯化铵处理组为 4.59, 组与组间比较差异显著 ($P<0.05$)。

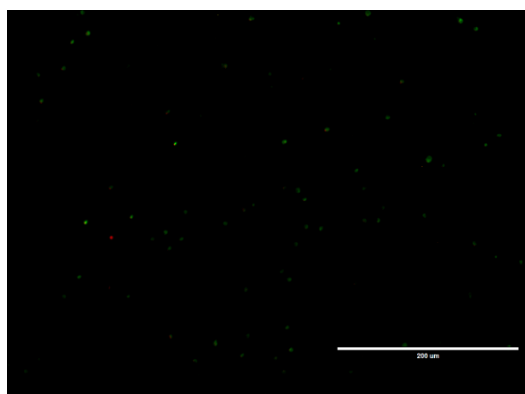


图 3-96 对照组脾脏淋巴细胞线粒体钙荧光显微镜观察×200

Fig.3-96 Observation of splenic lymphocyte mitochondrial membrane potential fluorescence microscopy in control group ×200

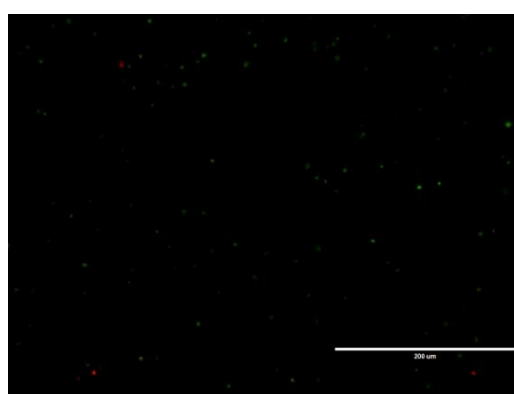


图 3-97 1 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞线粒体钙荧光显微镜观察×200

Fig.3-97 Fluorescence microscopic observation of mitochondrial calcium in splenic lymphocytes treated with 1 mmol/L ammonium chloride×200

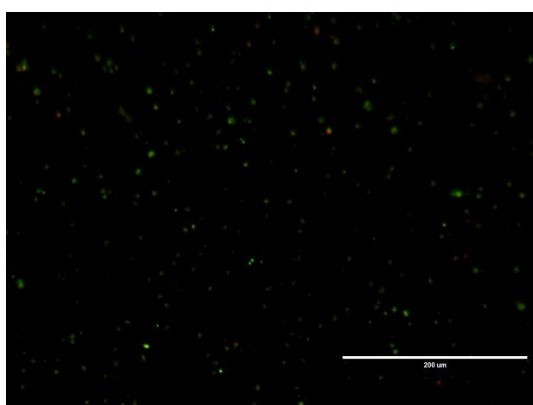


图 3-98 5 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞线粒体钙荧光显微镜观察×200

Fig.3-98 Fluorescence microscopic observation of mitochondrial calcium in splenic lymphocytes treated with 5 mmol/L ammonium chloride×200

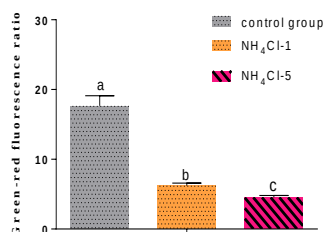


图 3-99 绿红荧光数量值定量分析

Fig.3-99 Quantitative analysis of value of green and red fluorescence

3.7.7 氯化铵暴露对淋巴细胞 ROS 影响的检测结果

荧光显微镜观察胸腺淋巴细胞培养 48 h 后活性氧 ROS 情况,对照组(图 3-100)、1 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-101)和 5 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-102)结果如下所示。DCFH-DA 没有荧光,进入细胞后被酯酶水解为 DCFH。在活性氧存在时荧光激发呈现绿色。氯化铵浓度为 1 mmol/L 时,细胞内产生 ROS 的数量显著上升,氯化铵浓度为 5 mmol/L 组中 ROS 数量更多。随机选取 5 个视野统计 ROS 绿色荧光数值,定量分析结果如图 3-103。对照组中细

胞 ROS 数量相对值为 1, 1 mmol/L 氯化铵处理组与对照组相比较对比值为 1.43, 5 mmol/L 氯化铵处理组与对照组相比较对比值为 2.26, 处理组与对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。

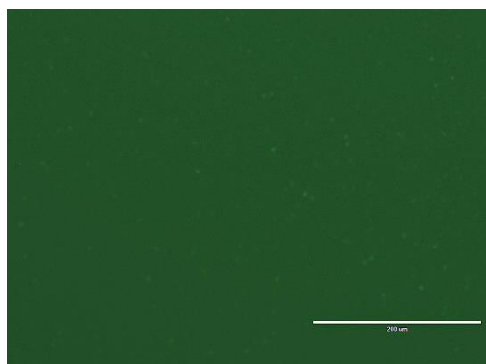


图 3-100 对照组胸腺淋巴细胞 ROS 荧光显微镜观察×200

Fig.3-100 Observation of thymic lymphocyte ROS fluorescence microscopy in control group ×200

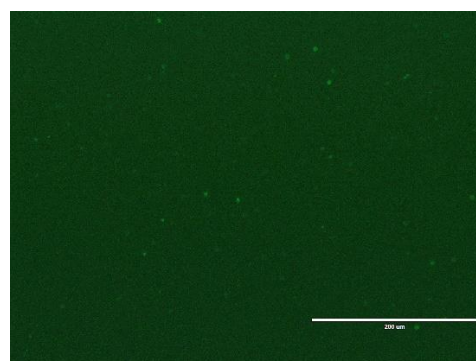


图 3-101 1 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞 ROS 荧光显微镜观察×200

Fig.3-101 ROS fluorescence microscopic observation of thymic lymphocytes treated with 1 mmol/L ammonium chloride ×200

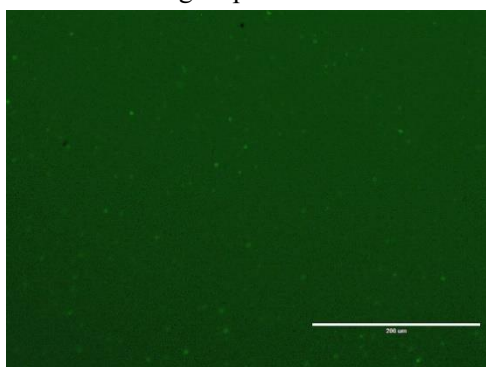


图 3-102 5 mmol/L 氯化铵作用胸腺淋巴细胞 ROS 荧光显微镜观察×200

Fig.3-102 ROS fluorescence microscopic observation of thymic lymphocytes treated with 5 mmol/L ammonium chloride ×200

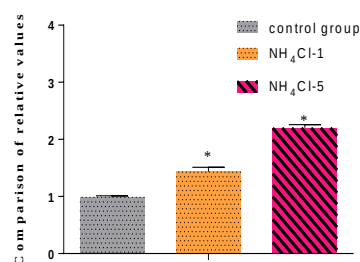


图 3-103 ROS 荧光数值定量分析

Fig.3-103 Quantitative analysis of ROS fluorescence

荧光显微镜观察脾脏淋巴细胞培养 48 h 后活性氧 ROS 情况,对照组(图 3-104)、1 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-105)和 5 mmol/L 氯化铵处理组(图 3-106)结果如下所示。氯化铵浓度为 1 mmol/L 时,细胞内产生 ROS 的数量显著上升,并高于氯化铵浓度为 5 mmol/L 组。随机选取 5 个视野统计 ROS 绿色荧光数值,定量分析结果如图 3-107。对照组中细胞 ROS 数量相对值为 1, 1 mmol/L 氯化铵处理组与对照组相比较对比值为 1.78, 5 mmol/L 氯化铵处理组与对照组相比较为 2.33, 处理组与对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。



图 3-104 对照组脾脏淋巴细胞 ROS 荧光显微镜观察×200

Fig.3-104 Observation of splenic lymphocyte ROS fluorescence microscopy in control group ×200

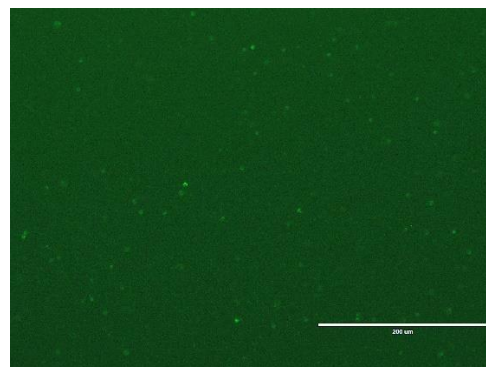


图 3-105 1 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞 ROS 荧光显微镜观察×200

Fig.3-105 ROS fluorescence microscopic observation of splenic lymphocytes treated with 1 mmol/L ammonium chloride ×200

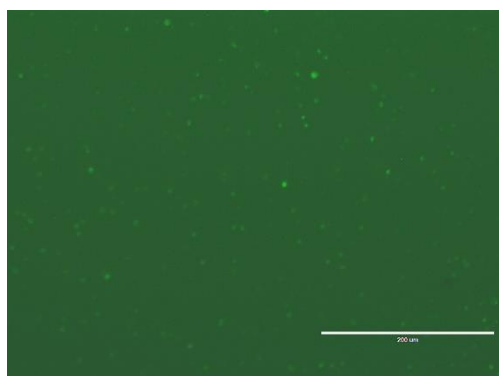


图 3-106 5 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞 ROS 荧光显微镜观察×200

Fig.3-106 ROS fluorescence microscopic observation of splenic lymphocytes treated with 5 mmol/L ammonium chloride ×200

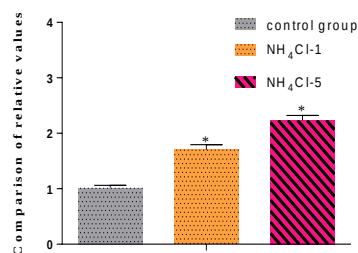


图 3-107 ROS 荧光数值定量分析

Fig.3-107 Quantitative analysis of ROS fluorescence

3.7.8 氯化铵暴露对淋巴细胞氧化应激影响的检测结果

1 mmol/L 氯化铵处理组, 抗氧化基因 GPx 和 GST4 的 mRNA 表达变化如图 3-108 所示。结果表明, 氯化铵处理组的抗氧化基因 GPx 的 mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$); 氯化铵处理组的抗氧化基因 GST4 的 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。氯化铵处理组淋巴细胞中 GPx 的蛋白表达如图 3-109。处理组的 GPx 蛋白表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。

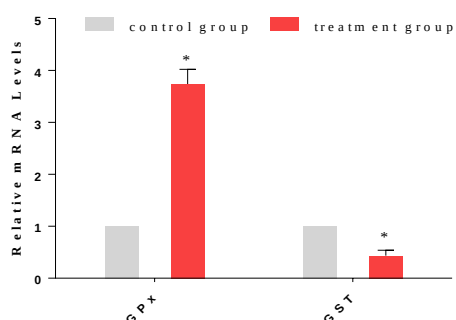


图 3-108 抗氧化基因 mRNA 表达水平
Fig.3-108 mRNA expression level of antioxidant gene

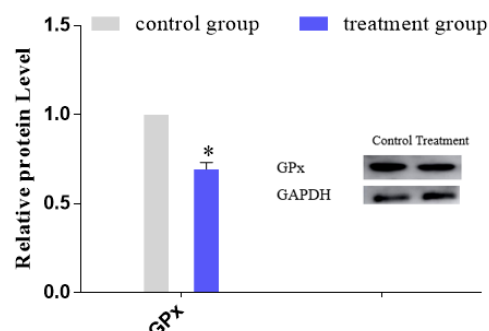


图 3-109 GPx 蛋白表达水平
Fig.3-109 Protein expression level of GPx protein expression level

3.7.9 氯化铵暴露对淋巴细胞炎性细胞因子影响的检测结果

1 mmol/L 氯化铵处理组，检测炎性细胞因子 HO-1、NF- κ B、COX-2、iNOS、TNF- α 和 TGF- β 的基因 mRNA 表达水平，结果如图 3-110 所示。其中，HO-1、NF- κ B、COX-2、TNF- α 和 TGF- β 基因的 mRNA 表达水平显著上升与对照组相比较 ($P<0.05$)；iNOS 基因的 mRNA 表达水平显著下降与对照组相比较 ($P<0.05$)。

1 mmol/L 氯化铵处理组，检测细胞炎性因子 HO-1、NF- κ B 及 COX-2 的蛋白表达水平，结果如图 3-111 所示。其中，HO-1 和 NF- κ B 的蛋白表达水平显著上升与对照组相比较 ($P<0.05$)，iNOS 基因蛋白的表达水平显著下降与对照组相比较 ($P<0.05$)。

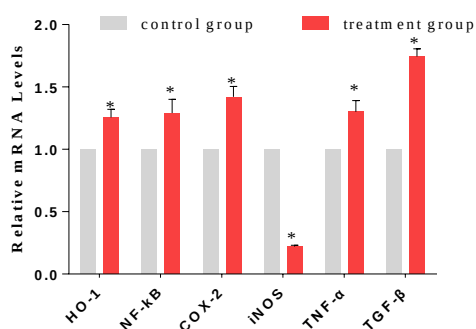


图 3-110 炎性细胞因子 mRNA 表达水平
Fig.3-110 mRNA expression level of inflammatory cytokines-related genes

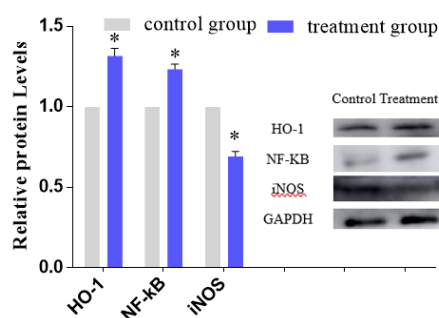


图 3-111 炎性细胞因子蛋白表达水平
Fig.3-111 Protein expression level of inflammatory cytokines

3.7.10 氯化铵暴露对淋巴细胞凋亡影响的检测结果

浓度为 1 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞 48 h 后, 检测 miRNA-15a mRNA 表达水平 (图 3-112); 凋亡相关基因 BCL-2、BAX 及 BAK 基因 mRNA 表达水平, 如图 3-112 所示。浓度为 1 mmol/L 氯化铵作用脾脏淋巴细胞 48 h 后, Cytc、APAF1、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 的基因 mRNA 表达水平, 结果如图 3-113 所示。其中, BCL-2 基因的表达水平显著下降与对照组相比较 ($P<0.05$); 而凋亡相关基因 BAX、BAK、Cytc、APAF1、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 表达水平显著上升与对照组相比较 ($P<0.05$)。

浓度为 1 mmol/L 氯化铵作用淋巴细胞 48 h 后, 检测凋亡相关基因 BCL-2、BAX、Cytc、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 的蛋白表达水平, 结果如图 3-114 所示。其中, BCL-2 基因蛋白的表达水平显著下降与对照组相比较 ($P<0.05$); BAX、Cytc、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 基因的蛋白表达水平显著上升与对照组相比较 ($P<0.05$)。

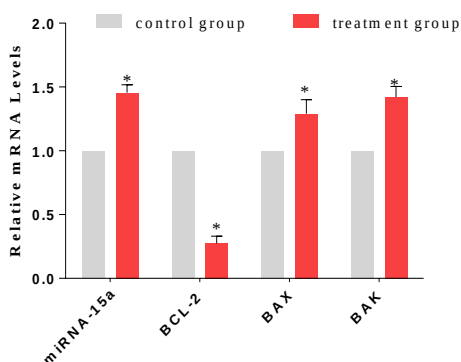


图 3-112 凋亡相关基因 mRNA 表达水平
Fig.3-112 mRNA expression level of apoptosis-related gene

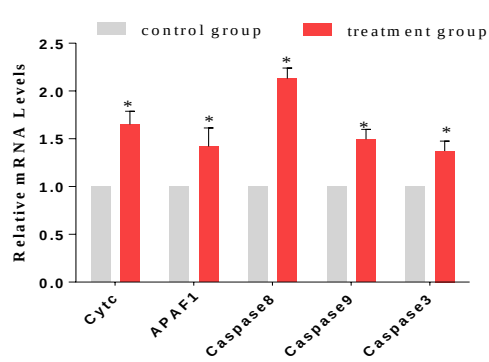


图 3-113 凋亡相关基因 mRNA 表达水平
Fig.3-113 mRNA expression level of apoptosis-related gene

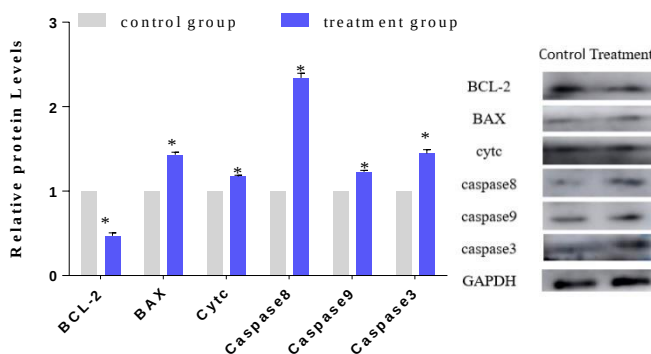


图 3-114 凋亡相关蛋白表达水平
Fig.3-114 Protein expression level of apoptosis-related proteins

3.7.11 氯化铵暴露 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 ceRNA 调控网络的检测结果

浓度为 1 mmol/L 氯化铵作用淋巴细胞 48 h 后, lncGRN, miR-6615-5p 和 SMAD7 基因 mRNA 表达水平如图 3-115 所示。结果表明, 氯化铵处理组的 lncGRN 和 SMAD7 基因 mRNA 表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。miR-6615-5p mRNA 表达水平和对照组相比显著上升 ($P<0.05$)。1 mmol/L 氯化铵处理组中 SMAD7 的蛋白表达如图 3-116, SMAD7 蛋白表达水平和对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。

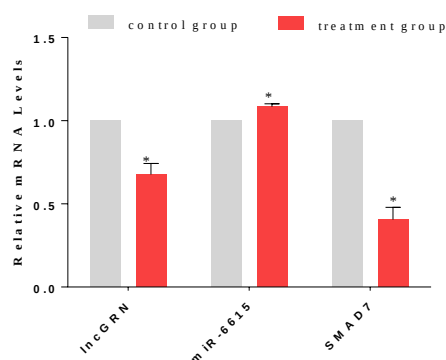


图 3-115 氯化铵处理时 ceRNA 调控网络 mRNA 表达水平

Fig.3-115 mRNA expression of ceRNA regulatory network in ammonium chloride treatment group

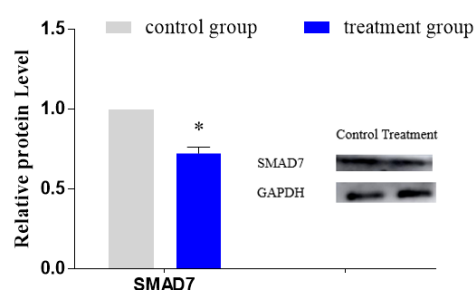


图 3-116 氯化铵处理时 SMAD7 蛋白表达水平

Fig.3-116 Protein expression of SMAD7 in ammonium chloride treatment group

4. 讨论

氨气是集约化养殖环境中的最主要污染气体之一,严重影响家禽养殖业的发展,高浓度的氨气给家禽养殖带来诸多危害。然而关于氨气对免疫器官的影响尤其是胸腺组织的研究报道较少。为了阐明氨气暴露对鸡胸腺的影响,可能的调控机制和生物学特点,为氨气暴露提供相关基础理论研究及免疫防治研究提供参考,本研究应用 Illumina Seq2000 测序技术对暴露于不同氨气浓度下样本进行了全转录组学测序。TMT 标记蛋白质组学技术具有结果稳定、可靠、能够对肽段进行标记等优势。蛋白质是生命活动的直接参与者,通过对蛋白质水平的检测能够更加真实地反应生物体内发生的各种具体理化过程。双荧光素酶报告基因验证 lncGRN 与 miR-6615-5p、miR-6615-5p 与 SMAD7 靶向结合。结合组织形态学、生物信息学分析和分子生物学等手段,在细胞和分子水平上分析氨气暴露后胸腺组织中炎性细胞因子(HO-1、NF- κ B、COX-2、iNOS、TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 和 IL-12)的变化、氧化应激酶(GPx 和 GST)的变化、凋亡相关基因(BCL-2、CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3)的变化及 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 等 mRNA 和蛋白表达水平的变化。体外原代培养胸腺淋巴细胞和脾脏淋巴细胞,以氯化铵为氨气的替代物,通过 CCK-8 检测确定氯化铵染毒浓度、应用流式细胞仪分析氨暴露后淋巴细胞凋亡情况、通过 AOEB 染色观察细胞凋亡情况、利用钙离子荧光探针检测钙在线粒体内聚集情况、应用 ROS 荧光探针观察细胞活性氧的变化、应用荧光显微镜观察线粒体膜电位的变化情况。阐明氨气暴露对鸡胸腺的凋亡影响的分子机制,丰富了氨气暴露生物学作用机理的认识,为动物毒理学提供依据,为鸡氨气中毒防治提供参考依据。

4.1 胸腺组织全转录组学分析

转录组学是发现化学风险评估生物标志物的一种新方法。转录组学分析可在动物对环境压力反应提供相关的重要信息^[97]。全转录组学分析结果显示 circRNA、lncRNA、miRNA 和 mRNA 参与了氨气暴露的应激反应。ceRNA 联合分析存在 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 ce 竞争机制,通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证在体内胸腺组织和体外脾脏淋巴细胞该通路的存在。转录组学基因热图显示氨气暴露后氧化应激、细胞因子和凋亡基因的发生差异表达。本研究用 EB-Seq 算法对 counts 进行差异筛选的结果,为全部的差异 mRNA。胸腺组织一共鉴定出 16490 个差异表达基因。然后对全部的差异 mRNA 进行筛选,筛选标准为 $\log_2FC > 0.585$ 或 < -0.585 且 $FDR < 0.05$,符合表达量升高 1.5 倍或者下降 1.5 倍,且 FDR (false discovery rate),错误发现率 < 0.05 的标准为全部显著性差异 mRNA。鸡氨气暴露 42 d 后,共有 100 个显著性差异 mRNA,其中 56 个基因表达上调,44 个基因表达下调。mRNA GO Term 分析显示生物学过程涉及内源性肽抗原经 MHC Ib 类经 ER 途径的抗原加工和表达、免疫应答、趋化因子激活等。对显著差异 mRNA 基因进行 GO Term 富集分析,氨基酸转运、内源性肽抗原经 MHC I 类抗原的制备与表达、肽转运、免疫应答和 tRNA 修复等为富集量较高的项。鸡氨气暴露后调控免疫反应的基因发生差异表达,机体积极参与免疫应答的过程。但同时我们也观察到,

胸腺在高浓度的氨气刺激后血管内皮细胞增生, 发生炎性浸润, 细胞凋亡数量增多, 氨气暴露造成胸腺细胞的损伤。

环状 RNA (circRNA) 大量存在于真核转录组中, 是一类具有闭合环状结构的、与传统的线性 RNA 不同的一类新型 RNA。多数的环状 RNA 在不同的物种中具有一定的保守性, 大多数是由外显子序列构成, 同时在组织及不同发育阶段中存在的表达特异性。迄今为止, 大多数 circRNA 的功能还没有被很好地认识。目前研究认为 circRNA 也是通过应答元件调控编码基因参与机体生理和病理过程。Lai 等^[98]研究发现在胃癌细胞增殖和侵袭过程中, circ-0047905、circ-0138960 和 circ-7690-15 三者敲除时, 宿主基因的功能也被抑制。Wang 等^[99]研究发现 circHRCR 通过海绵吸附作用 miR-223 调控 ACR 的表达, 过表达 circHRCR 时, ACR 的表达增加, 有效抑制心肌肥大。本研究在鸡氨气暴露 42 d 时, 显著性差异 circRNA 的宿主基因进行 GO 注释发现, circRNA 的宿主基因的生物过程功能区主要富集在 GTP 酶活性的阳性调、蛋白质磷酸化、T 细胞受体信号通路、细胞因子产生的调节、组蛋白甲基化等过程。分子功能的功能区主要富集在蛋白激酶 C 活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶活性、蛋白激酶活性及转移酶活性等功能上。细胞组分主要富集在细胞核、细胞质、中心体、皮质微管细胞骨架和高尔基体等成分。说明鸡氨气暴露后 circRNA 广泛参与了机体应答的反应当中。

microRNA (miRNA) 最早是由 Lee 等^[100]在秀丽线虫中发现的一种生物体内源性的单链非编码小 RNA, 其长度约为 19~22 个核苷酸, 在进化过程中高度保守, miRNA 参与了多种生物学过程, 它可通过翻译、转录和转录后水平来调控 mRNA。miRNA 在生物学进程中发挥着至关重要的作用, miRNA 以碱基互补配对的方式与靶基因 mRNA 的 3'端非编码区相结合, 从而抑制靶基因 mRNA 的翻译或引起靶基因的降解, 以此从转录后水平对靶基因 mRNA 的表达进行调控, miRNA 参与了包括细胞增殖、凋亡、分化及发育等绝大多数的生物学过程。但是绝大部分 miRNA 的功能仍然是未知的。通过 EB-Seq 算法对 counts 进行差异筛选的结果, 是全部的差异 miRNA。胸腺组织一共鉴定出 941 个差异表达基因, 然后对全部的差异 miRNA 进行筛选, 筛选标准为 $\log_2FC > 0.585$ 或 ≤ -0.585 且 $FDR < 0.05$, 符合标准的为全部显著性差异 miRNA。鸡氨气暴露 42 d 后, 共有 6 个显著性差异 mRNA, 其中 3 个基因表达上调, 3 个基因表达下调。鸡氨气暴露 42 d 时, miRNA 的宿主基因的生物过程功能区主要富集在羧酸运输、尿素跨膜转运、嘌呤核苷转运、含嘧啶的化合物跨膜转运及嘧啶核苷转运等过程。说明鸡氨气暴露后 miRNA 广泛参与了机体应答的反应当中。

长链非编码 RNA (lncRNA, long non-coding RNA) 是近年新发现的一类转录物质, 其在包括细胞核和细胞质中基因的剪切、转录、翻译、转运、表观遗传及细胞周期等过程中发挥着重要的调节作用, lncRNA 被认为是在基因表达的转录和转录后调节具有重要作用的功能性 RNA。但其具体调控机制尚未完全被了解^[101]。竞争性内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 假说揭示了一种 RNA 间相互作用的新机制。我们知道 mRNA 被 miRNA 结合后能够导致基因沉默, 但是 miRNA 也能够被 ceRNA 通过竞争性结合起到基因表达的调节作用。通过 miRNA 应答元件 (microRNA response elements, MREs) 与 miRNA 结合, ceRNA 可以影响 miRNA 导致的基因沉默, 这种调节方式也表明了 RNA-miRNA 调节通路的存在, 这些关于 RNA 调节的发现具有重大的生物意义。本研究结果中, 生物信息学显示 lncRNA 就

作为竞争性内源 ceRNA, 在鸡氨气暴露后 lncGRN (LOC101748909) 和 SMAD7、CLSTN2 的表达量下降, miR-6615-5p 的表达上升。在 lncRNA、miRNA 和 mRNA 三者联合分析的结果中 lncRNA 和 mRNA 二者的趋势相同。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示靶基因 SMAD7 呈下降趋势, lncGRN 表达也下降, 而 miR-6615-5p 的 mRNA 表达水平显著上升。表明鸡体内可能存在 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 ceRNA 网络调控。

在对转录组中氧化应激、细胞因子和凋亡相关基因进行表达量热图分析中, 分别有 34、123 和 30 个基因的表达发生改变, 说明经氨气刺激后胸腺发生了严重的应激反应。转录组学结果显示氨气暴露后有大量氧化应激、细胞因子和凋亡基因的发生差异表达, 这也为后续的研究提供了指导作用。

4.2 胸腺组织蛋白组学分析

蛋白质组指的是基因组所表达的全部蛋白质, 蛋白质组学是指通过蛋白质组研究细胞、组织或生物体特定状态下蛋白质组成及表达变化规律的科学。通常蛋白质组学的研究内容包括对蛋白质种类、蛋白质丰度及其功能的鉴定, 转录组的 mRNA 分子翻译形成蛋白质, 蛋白质是生物体行使生物功能的最终执行者^[102]。近年来有关蛋白组学的研究内容越来越丰富, 对蛋白质组学的研究能够使我们更全面、准确地了解整个生物学过程, 同时也为转录组学的研究提供了补充和验证。在本研究中, 我们利用 TMT 技术对不同氨气暴露条件下蛋白质进行质谱检测, 并使用蛋白质数据库 UniProt Proteomes UP000002494 (Gallus gallus, 11 月 2018) 检索蛋白。满足定量条件的蛋白数量为 3167 个, 在进行蛋白质的肽段长度分布以及肽段序列覆盖程度分析后发现, 检测的肽段长度主要集中在包含 7 到 13 个氨基酸之间。然后我们将全部蛋白与 GO 和 KEGG 数据库进行比对, 进而整体分析全部的蛋白质生物功能。GO 分类研究中生物学过程主要涉及代谢过程、生物调节、对刺激的反应、转移酶活性、核苷酸结合等; 在 KEGG pathway 研究中有部分蛋白质富集显著性富集能确定差异蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径, 通路包括糖胺聚糖降解、氮代谢、赖氨酸降解、糖肽类生物合成-神经节系列等。

氨气暴露实验组与对照组比较发现共有 66 个差异蛋白, 这其中包括 28 个上调蛋白和 38 个下调蛋白。这些差异蛋白功能主要涉及细胞发育能力, 组织损伤修复、炎症反应, 免疫应答和凋亡等过程。其中, Q5F3P4、E1BXY6、E1C765、Q5ZMR6、A0A1D6UPR4、Q5ZJV3、F1P5D8、P08285 的蛋白定量分析结果显示表达量上升; Q5ZMR6、A0A1L1RUM8 的蛋白定量分析结果显示表达量下降。通过 qRT-PCR 检测 Q5F3P4、E1BXY6 和 E1C765 蛋白的 mRNA 的表达水平发现处理组高于对照组, 差异显著 ($P < 0.05$), Q5ZMR6 蛋白的 mRNA 表达水平处理组低于对照组, 差异显著 ($P < 0.05$)。

Q5F3P4, 磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit), 其基因名 RCJMB04_11a21 (或 PIK3CD), 为磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinases, PI3Ks) 蛋白家族的一个催化亚单位, 参与细胞增殖、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞活动^[103]。本研究中, 氨气暴露后, Q5F3P4 蛋白表达显著上升。Fan 等^[104]研究发现二烯酮通过 PI3K/Akt 途径诱导肺癌细胞发生细胞凋亡。查璐琴等^[105]研究发现二甲双胍可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路抑制胃癌干细胞增殖并诱导其凋亡。其参与磷脂酰肌醇

3-激酶信号转导的生物过程。磷脂酰肌醇是细胞膜磷脂的主要成分之一，在多种细胞途径中承担重要调节作用。通过酶类参与自身代谢，比如作为脂质第二信使的前体；磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸本身也作为信号分子，其直接招募或结合多种蛋白质和酶，参与各种信号转导并调节细胞功能。参与磷脂酰肌醇 3 激酶信号转导生物过程。PI3K-Akt 信号通路能够作用 BCL-2 家族成员 BAD 的激酶，影响 BAD 在细胞凋亡过程中。通过调控下游基因 AKT 抑制 BIM 和 BCL-2，促进细胞凋亡的发生，或通过抑制 Caspase-9，在细胞生存中就有重要意义^[106, 107]。

E1BXY6，高尔基体 A3 (Golgin A3)，基因名 GOLGA3，参与的生物过程为精子发生 (spermatogenesis)。GOLGA3 是一种高尔基体复合物相关蛋白，涉及蛋白质运输，细胞凋亡，高尔基体定位和精子发生^[108]。在细胞培养时，与对照比较 GOLGA3 的缺失导致凋亡率上升，表明 GOLGA3 通过 Caspase 的信号机制调控凋亡途径。在脑部，GOLGA3 可能参与泛素化依赖蛋白质降解途径^[109]，以及在缺血诱导的细胞凋亡中起保护作用^[110]。在细胞核中没有发现全长的 GOLGA3，但在细胞碎片中发现了 GOLGA3 的聚集，提示 GOLGA3 在凋亡信号中起作用^[111]。

E1C765，核受体结合集域蛋白 2，基因名为 NSD2 (或 WHSC1)，参与的生物过程包括转录调控，DNA 模板化 (regulation of transcription, DNA-templated)。目前对于 NSD2 的研究多集中在肿瘤方面。研究发现 NSD2 与大多数肿瘤细胞的转移及其预后相关，它能够引起细胞的转化，进而引起细胞癌变。表达增多的 NSD2 能够诱导细胞黏附、克隆生长和引发骨髓瘤的产生^[112]。同时还有研究发现 NSD2 作为激活剂能够直接与 NF- κ B 作用并且激活包括 IL-6、IL-8、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等在内的相关靶基因。NF- κ B 可以激活肿瘤细胞中大量与增殖相关基因的转录，这些基因包括如血管内皮生长因子 (VEGFs)、抗凋亡基因 BCL-2 和 Birc5 蛋白、细胞周期蛋白 D1 和 c-Myc 以及促炎细胞因子 (IL-6、IL8 和 TNF- α) 等^[113]。

Q5ZMR6，组织蛋白酶 S，其基因名为 RCJMB04_1f23，(或 CTSS)。CTSS 与细胞发育能力、损伤和凋亡过程相关。有研究表明，在牛卵母细胞内，卵母细胞的发育能力与 CTSS mRNA 表达量呈负相关^[114]。当 CTSS 的活性下降时，胰脏中的血管生成和细胞增殖水平降低，并且胶原蛋白和血管生成素 γ 2 前体的分泌量也会受到影响^[115]。CTSS 抑制剂和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂的结合可协同促进肿瘤细胞发生凋亡^[116]。刘梦鹤^[117]的研究发现在绵羊卵母细胞内卵母细胞的质量与 Caspase-3 和 CTSS 的活性、基因及蛋白表达量呈负相关。表明 CTSS 表达可能通过某种途径影响 Caspase-3 的表达。

A0A1D6UPR4，为乙酰辅酶 A 合成酶 (Acetoacetyl-CoA synthetase)，基因名为 AACs，参与的生物过程为脂质代谢过程 (lipid metabolic process)。乙酰辅酶 A 合成酶在原核生物和真核生物中均有存在，是他们代谢的核心酶，广泛发现于各类细胞器及组织中。乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 是生物细胞内的重要因子，它直接参与了诸如糖酵解途径、脂肪酸代谢、氨基酸代谢和糖异生作用等重要代谢过程。在动物、酵母及脂质代谢中的各步反应，乙酰辅酶 A 合成酶也起到了使蛋白质发生酰基化反应的作用^[118]。乙酰辅酶 A 既是能源代谢的中间产物也是某些物质合成的前体，在体内代谢循环的所有能源物质代谢中，乙酰辅酶 A 是枢纽性物质之一^[119]。

Q5F3W5, 组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶, 基因名为 SUV39H2, 参与的生物过程包括细胞周期源 (cell cycle Source)、细胞分化源 (cell differentiation Source)、细胞对缺氧源的反应 (cellular response to hypoxia Source)、染色质组装或拆卸源 (chromatin assembly or disassembly Source)、染色质重塑源 (chromatin remodeling Source) 和 RNA 聚合酶 II 对转录的负调控 (negative regulation of transcription by RNA polymerase II)。组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶既能够通过单甲基化组蛋白 H4K20, 也可以通过甲基化 Numb、p53 和 Wnt 等来调节 DNA 的复制、染色质固缩和细胞周期等细胞活动, 参与肿瘤的发生发展^[120]。

Q5ZJV3, DnaJ 热休克蛋白家族 (hsp40) 成员 A1 (DnaJ heat shock protein family member A1), 基因名为 DNAJA1, 参与的生物过程包括雄激素受体信号通路 (androgen receptor signaling pathway)、蛋白质折叠 (protein folding) 和对热的反应 (response to heat)。DnaJ 的生物学作用非常广泛, 不仅在蛋白的体内运输、降解, 蛋白质的折叠与组装过程中起着重要作用, 同时还参与了自身免疫反应, 还可以根据其在机体内表达水平来促进或者抑制肿瘤的生长等^[121]。

F1P5D8, Unc-13 同系物 D, 基因名为 UNC13D, 参与的生物过程包括病毒防御反应 (defense response to virus)、生发中心形成 (germinal center formation)、肉芽肿形成 (granuloma formation)、吞噬作用 (phagocytosis)、自然杀伤细胞脱粒 (natural killer cell degranulation)、调节分泌途径的阳性调节 (positive regulation of regulated secretory pathway)、基质粘附依赖性细胞扩散的正调控 (positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading) 和肥大细胞脱粒的调控 (regulation of mast cell degranulation)。UNC13D 基因与细胞死亡途径中的蛋白及穿孔素颗粒酶的表达关系密切。自然杀伤细胞 (NK 细胞) 和细胞毒性 T 淋巴细胞能够形成包含穿孔素和颗粒酶的攻击性囊泡, 其中穿孔素能够通过打穿靶细胞膜从而让颗粒酶进入到靶细胞中, 最终诱导一系列作用而使靶细胞死亡^[122]。其中 UNC13D 蛋白在囊泡的形成、活化、极化、停靠及引发与细胞膜融合等过程中发挥着重要作用^[123]。

P08285, 组蛋白 H1.03 (Histone H1.03), 参与的生物过程包括染色体凝聚 (chromosome condensation)、染色质沉默的负调节 (negative regulation of chromatin silencing)、核小体组装 (nucleosome assembly)、DNA 重组的负调控 (negative regulation of DNA recombination)、核小体定位 (nucleosome positioning) 和转录调控, DNA 模板化 (regulation of transcription, DNA-templated)。组蛋白是富含精氨酸和赖氨酸等碱性氨基酸的高度保守的碱性蛋白质, 与一定化学计量的 DNA 相结合能够组成核小体, 这在真核生物中的基因组装配过程中形成的紧密结构是必需的。组蛋白和小鼠的发育有关, 影响核小体之间的间隔。组蛋白有助于维持或确定特殊的甲基化模式, 从而参与基因表达的表观遗传调节^[124]。组蛋白有抑制体外转录的功能, 能够促进异染色质的形成^[125]。在脊椎动物中, 组蛋白可以中和电荷作用, 促进染色质的凝集^[126]。

A0A1LIRUM8, 组织蛋白酶 G, 人类上称为糜蛋白酶, 基因名为 CMA1 (或 CTSG), 参与的分子功能为丝氨酸型内肽酶活性 (serine-type endopeptidase activity)。糜蛋白酶能够调控基质蛋白基因的表达、加速泡沫细胞的形成、促进血管内皮细胞的凋亡, 其原因可能是通过降解细胞外基质蛋白, 最终导致生长因子、潜在细胞因子、化学趋化因子及前酶原的激活^[127]。

糜蛋白酶能够促进斑块内形成新生的血管, 以及增加新生血管的渗透性, 这些都使斑块内出血的风险增加^[128]。

差异表达蛋白的生物信息学分析结果显示, 多个生理及病理过程与这些差异表达蛋白有关。蛋白组学结果分析显示差异蛋白的功能与炎症、免疫应答和凋亡过程密切相关。氨气暴露后, 鸡胸腺组织发生炎症损伤、凋亡过程和免疫应答, 因此我们认为这些蛋白的改变与氨气暴露的发生有直接的关系, 但是其中具体的发生过程及其相应机制还有待进一步的研究验证。在转录组和蛋白质组学及凋亡相关基因的鉴定中发现, 蛋白质水平上参与的富集的蛋白功能分类较为一致。差异蛋白 Q5F3P4、E1BXY6、E1C765、Q5ZMR6 的表达与凋亡相关基因 BCL-2、Caspase-9 和 Caspase-3 密切相关, 差异蛋白的基因在调控线粒体途径凋亡中扮演重要的角色。转录组数据和蛋白质数据的互补和整合, 能够较全面地阐释鸡氨气暴露后胸腺中基因表达及其调控机制。

4.3 ceRNA 调控网络分析

根据转录组学结果显示, mRNA、lncRNA 和 miRNA 之间存在 ceRNA 调控网络。在进一步的双荧光素酶报告基因系统, 证实 lncGRN 与 miR-6615-5p、miR-6615-5p 与 SMAD7 之间存在靶向结合。其中 SMAD7 在胸腺细胞凋亡的作用是不可忽视的。这一结果也为 miRNA 控制胸腺细胞进程的研究提供了新的线索。在 miR-6615-5p miminc 组中, SMAD7 mRNA 和蛋白水平表达发生下降; 同时, 在 miR-6615-5p inhibit 组中, SMAD7 mRNA 和蛋白水平表达增加。这进一步表明 miR-6615-5p 与 SMAD7 之间存在调控关系。

在哺乳动物中, 75%的基因组是可转录的, 其中绝大多数的转录本是 ncRNA 非编码 RNA, 只有 2%的 RNA 参与编码蛋白质^[129]。近年的研究结果发现, ncRNA 具有许多重要的生物学功能, lncRNA 是特指其中长链的 ncRNA, 尽管在基因表达过程中 lncRNA 不能够编码蛋白质, 但也作为调节因子起着关键的调节作用, 它们在转录调控、表观调控以及转录后调控等多个层面调控基因表达。许多研究表明 lncRNA 具有包括参与调节染色质的重塑、调控 mRNA 降解、X 染色体失活、参与细胞核亚结构的形成等多种重要功能^[130]。周瑞等^[131]研究发现 lncRNA 通过靶向关键因子参与调控骨骼肌发育, 包括肌纤维肥大和纤维类型转换, 成肌细胞和骨骼肌干细胞增殖、分化等过程。淋巴细胞的发育和分化具有较高的特异性及阶段性。其发育和分化过程中有着严密的调控网络, 除了受细胞因子及关键转录因子的调控外, 还受到 microRNA、lncRNA 等非编码 RNA 的调控。lncRNA FAS-AS1 能调控 B 细胞淋巴瘤 FAS 受体的信号通路。当 FAS 受体与配体 FAS-L 结合后能介导细胞的凋亡, 而可溶型受体 sFAS 和 FAS-L 结合后能抑制细胞的凋亡^[132]。双荧光素酶报告基因系统结果显示, 证实了 lncGRN 与 miR-6615-5p 之间的靶向关系, 从而抑制 miR-6615-5p 对靶基因 SMAD7 的负调控作用。

4.4 氨气暴露诱导胸腺组织细胞凋亡机理的研究

4.4.1 氨气暴露对胸腺细胞氧化应激影响的作用

动物机体正常生理代谢是通过氧化系统和抗氧化系统的相互作用来维持的。在机体生理代谢正常时,氧化系统和抗氧化系统是处于一种动态平衡的状态的,但如果是在发生病理状况时或者受到外界刺激时,这两种系统的平衡就会被打破,从而就会引起机体的氧化应激^[133]。在动物的饲养管理过程中很多因素会引起动物机体的氧化应激,这包括有害气体、温度等环境因素,还有微量元素的缺乏、饲料变质及饲料配比失衡等饲料质量因素等等原因^[134]。体内产生过多氧自由基与机体发生氧化应激关系密不可分。在动物受到各种应激因素刺激时,动物机体内多种代谢过程都会发生变化甚至紊乱,这时氧自由基会经由机体内的各种代谢途径产生,而导致氧自由基总量增加,但是机体内抗氧化系统清除自由基的清除能力有限,增加的氧自由基超出机体的清除能力就导致过多的氧自由基积累在细胞内,这些氧自由基会对核酸、脂肪、蛋白质等生物大分子以及膜细胞造成损伤,进而影响细胞的增殖和分化以及代谢受阻,这一系列过程最终会引发动物机体的代谢紊乱、组织损伤受损以及导致疾病的发生。

ROS 是一类氧代谢产物,包括过氧亚硝酸阴离子(ONOO^-)、过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子自由基(O_2^-)和羟自由基($\cdot\text{OH}$)等^[135],其化学性质高度活泼,其在许多医学领域是重要的一个研究靶点,并且发挥着关键作用,其中包括创伤愈合、辐射损伤及应激等。机体内产生的 ROS 主要来自于细胞代谢,在细胞的能量代谢过程中线粒体是其主要场所,也是胞内 ROS 的主要来源。目前最常用、最灵敏的细胞内活性氧检测探针是全细胞探针 DCFH-DA。比如 DCFH-DA 探针检测发现在人早孕细胞滋养细胞在缺氧时 ROS 水平升高,这就表示细胞发生了氧化应激^[136]。同样检测发现 ROS 的水平在高糖诱导的视网膜血管内皮细胞中升高,使细胞发生了氧化应激^[137]。我们将氯化铵作用于原代培养的胸腺淋巴细胞和脾脏淋巴细胞中,发现与对照组相比,浓度为 1 mmol/L 的氯化铵处理组中 ROS 荧光数量对比值显著升高($P<0.05$);与对照组相比浓度为 5 mmol/L 的氯化铵处理组中 ROS 荧光数量对比值显著升高($P<0.05$)。这些表明消除过氧化物和活性氧是抗氧化防御系统防止氧化应激的途径。

通常认为,在抗氧化损伤中细胞防御的一道防线就是抗氧化酶(比如 GPx 等),抗氧化酶能够在氧化应激中保护细胞免受氧化应激损伤。机体细胞中含有多种氧化酶类(GPx、GST),这些酶能够降低 ROS 的含量,共同组成了机体的抗氧化防御系统。Mona 等^[138]研究发现罗非鱼长期暴露于氨氮环境中,肝脏和肌肉抗氧化酶 GPx 和 GST 的活性显著升高,是机体抗氧化系统抵御机体氧化应激的反应。抗环境刺激会引发机体氧化酶和抗氧化酶失衡,在一定条件下,抗氧化酶不足以抵抗氧化酶的作用,机体发生氧化应激,抗氧化酶活性下降。比如在高脂肪饮食诱发大鼠脑海马区发生的氧化应激研究中发现,GPx 酶的活性下降^[139]。赭曲霉毒素 A 会引发肉鸡发生氧化应激而导致 GPx 活性下降^[140]。氟他胺染毒孕鼠对子代雌鼠子宫、卵巢发育及氧化应激的影响研究发现 GPx 基因表达水平显著下降^[141]。镉暴露可以诱发蚯蚓体内氧化应激,能够检测到 GST 和 GPx 的活力表达降低,在长期的试验研究中发现,GPx 是蚯蚓体内氧化应激的主要指标之一^[142]。在动物机体中防御氧化损伤过程中 GPx 属于敏感分子指示剂,是其中的关键酶。GST 是一种超家族蛋白酶,具有抗氧化功能,广泛存在于各

种生物体的各组织细胞内, GST 主要参与氧化应激、解毒等生物学进程。在本试验中, 鸡氨气暴露后胸腺组织中 GPx 的 mRNA 和蛋白水平表达降低, GST 基因的表达水平也显著降低 ($P<0.05$); 氯化铵作为氨气的体外实验替代物在原代培养脾脏淋巴细胞中, 浓度为 1 mmol/L 氯化铵处理组, GPx 的 mRNA 和蛋白水平表达降低, GST 基因的表达水平也降低 ($P<0.05$)。在氨气暴露时, GPx 和 GST 可以作为评定氧化损伤的指标。反映出由于氨气暴露导致的抗氧化能力的下降。在本研究中, NH_3 引起的 GPx 和 GST 显著降低, 表明 NH_3 破坏了鸡的抗氧化防御系统。

4.4.2 氨气暴露对鸡胸腺细胞炎性细胞因子的影响

氧化应激可以引发包括炎症反应^[143]在内的各种不良反应。炎症是活体组织对外界因子造成损伤所发生的防御反应, 是机体自身免疫系统清除有害刺激, 促进组织修复的一种复杂的保护措施。白细胞介素是由多种细胞产生的一类细胞因子, 并能够作用于多种细胞。在多种生理过程中均发挥重要作用, 其中包括免疫细胞的成熟、活化、增殖和免疫调节等, 同时在机体的多种生理及病理反应中白介素也参与其中。IL-1 β 是一种原发的、生物学活性广泛的细胞因子, 也是炎症过程和免疫反应中的初级细胞因子之一, IL-1 β 在炎症反应网络中占有重要地位。在细胞凋亡时, IL-1 β 被大量产生并释放。IL-2 主要来自于 CD8 + T 细胞和活化的 CD4 + T 细胞, 属于细胞因子的一种, 具有免疫调节的功能, 对 IL-1 β 受体的生成起到了促进作用, 能够激活多种免疫细胞。IL-4 的生物作用包括刺激 CD4+T 细胞分化成 II 型辅助 T 细胞以及刺激活化 B 细胞和 T 细胞的增殖。在适应性免疫和调节体液免疫中, IL-4 也起着关键作用。炎症发生时通过释放促炎性细胞因子 (包括 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 来保护宿主免受伤害, 从而在宿主防御中起着至关重要的作用^[144]。 H_2S 可导致肉鸡空肠中的氧化应激和炎症反应^[145]。与上述研究一致, 我们的研究表明, 暴露于 NH_3 环境中的鸡胸腺中炎症相关基因 (IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 iNOS) 的 mRNA 表达增加。这些数据表明, NH_3 可以通过氧化应激刺激稳态失衡从而诱导鸡胸腺的炎症反应。在鸡体内研究中, 硒缺乏能通过上调 IL-1 γ 、IL-6 和 IL-7 的表达, 导致氧化应激诱导的免疫功能障碍^[146]。镉暴露通过调节鲤鱼头肾中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的表达导致氧化应激和免疫抑制^[147]。氧化应激通过上调鱼类中 iNOS、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达在肝毒性中起着重要作用^[148]。我们的研究结果表明, 氧化/抗氧化失衡和炎症导致了细胞损伤。

白细胞介素与细胞凋亡之间存在关系。细胞的死亡方式会决定机体释放 IL-1 的种类。细胞坏死以后会释放出 IL-1 α , 其中包括有加工或未加工的, 但与此不同的是, 释放出的 IL-1 β 却只是未经加工的前体形式。相反, 细胞凋亡时释放成熟的 IL-1 β 。IL-1 β 可诱导大鼠骨关节炎软骨细胞发生凋亡和免疫反应。也有研究报道, TNF- α 与 IL-2 在体外对涎腺多形性腺瘤细胞凋亡具有诱导作用^[149]。IL-6 可以通过减少有 4-羟基过氧化环磷酰胺诱导的 BCL-2 表达下降, 从而对 4-HC 的细胞凋亡诱导作用有一定的抑制作用。IL-6 可通过调节 BCL-2 表达而实现其对地塞米松诱导的骨髓瘤细胞凋亡产生抑制作用^[150]。IL-10 能抑制 HepG2 细胞发生凋亡而促进其生长增殖^[151]。说明白介素与凋亡之间存在相关的调控机制。

HO-1 具有发挥抗炎、抗氧化、减少线粒体损伤、调节钙离子内流、调控细胞凋亡等作用, 能够抵抗氧化应激损伤。Konrad 等^[152]对比野生型及条件性 HO-1 敲除 (flox/flox) 小鼠肺炎

模型后,发现 HO-1 活化能够减缓细胞骨架肌动蛋白重构,减缓趋化因子 CXCL1 相关的多形核白细胞向肺泡隔的迁移,减轻微血管内皮通透,从而发挥抗炎效应。环氧合酶-2 (COX-2) 是一种可参与细胞增殖、分化的诱导酶,会在炎症、组织损伤等情况下的表达增强。包括 TNF- α 、IL-1、IL-6、NF- κ B 等在内的多种促炎性细胞因子或转录因子的可以调节 COX-2 的表达情况^[153]。Philip 等^[154]发现高脂饮食喂养的小鼠能通过 COX-2 激活 Kras 基因,导致胰腺炎症和纤维化。核转录因子- κ B (NF- κ B) 是一种拥有启动和调控细胞增殖分化、免疫应答及机体炎症反应功能免疫反应蛋白。其表达情况受细胞因子、自由基和 TLR 调节通路等活化,能刺激心肌细胞和巨噬细胞分泌产生大量的 TNF- α , TNF- α 是 TLR4/NF- κ B 信号通路激活过程中产生的促炎性因子,在炎症反应中最先表达,在缺血和再灌注期间, TNF- α 可通过鞘氨醇依赖机制诱导心肌细胞凋亡^[155]。本研究结果显示,氨气暴露胸腺组织中 HO-1 和 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平均呈现上升趋势, COX-2 的基因表达上升,这些结果都指示了氨气暴露诱导了胸腺组织内的炎症反应。

NF- κ B 的活化不仅上调了许多编码炎症的细胞因子、介质等促炎基因的表达,同时也可以激活 iNOS 等相关酶类,使炎症反应级联放大,激活炎症介质趋化及相关炎症细胞^[156]。也有研究表明,胞因子、细菌、TNF- α 、IFN- γ 、脂多糖均可诱导 iNOS 活化。研究表明, NF- κ B 上调了 HO-1 的表达, NF- κ B 通路可能与 HO-1/CO 体系联合调节 iNOS 的表达,以此产生抗炎作用^[157]。多个通路之间的相互作用共同调节 iNOS 的转录,每个组分本身有多个调控者或效应者,共同构成了 iNOS 转录的复杂调控网络。而过量的 NO 也受动物机体自身的代偿保护机制及平衡调节保护,如 HO-1/CO 通路、PI3K-Akt 通路等对 NO 信号通路的负反馈作用。NO 对 iNOS 的负反馈是一条重要的调控通路。有研究发现, NO 自主调节 iNOS 表达的方式是通过 NF- κ B 通路实现的,当 NO 浓度低时, NF- κ B 活化, iNOS 表达的水平被上调;而 NO 为高浓度时,就会抑制 NF- κ B 和 DNA 结合活性,进而 iNOS 的转录水平就会降低^[158]。本实验的结果也显示,氨暴露胸腺组织中 iNOS 的 mRNA 和蛋白水平呈上升趋势。而在淋巴细胞中,氨暴露后 iNOS 的 mRNA 和蛋白水平呈下降趋势。这说明氨气可诱导 HO-1、NF- κ B、COX-2 和 iNOS mRNA 和蛋白的表达量,引起鸡胸腺炎症的发生。

4.4.3 氨气暴露对鸡胸腺细胞凋亡线粒体通路的影响

钙离子 (Ca^{2+}) 作为一种重要的信号分子,对很多器官和组织细胞内的生理活动具有关键的调控作用。在受到外来刺激和内环境变化刺激时,细胞内钙离子浓度会发生波动,从而引起细胞内生理活动状态的改变。内质网和线粒体是细胞内主要的钙离子库,线粒体通过摄取从内质网释放到胞浆的钙离子而引起其活性的变化,这对于线粒体能量代谢、形态维持、氧化状态的调节具有重要意义^[159]。细胞内 Ca^{2+} 浓度过度增加可以通过多种途径产生氧化应激而致机体功能障碍,如线粒体内 Ca^{2+} 超载、 Ca^{2+} 依赖性降解酶活化、诱发细胞凋亡等。在内源性细胞凋亡途径中,高浓度的 Ca^{2+} 发挥着重要的作用^[160]。有研究发现甲基汞染毒大鼠脑神经细胞内游离的 Ca^{2+} 水平显著升高,并且细胞凋亡率显著升高,提示细胞内 Ca^{2+} 超载可能是诱导细胞凋亡的关键因素之一^[161]。Wei 等^[162]将激动素作用于小鼠海马神经元细胞后,发现其能逆转谷氨酸诱导的神经氧化毒性作用,促进 HO-1 表达而挽救细胞死亡、减少 Ca^{2+} 内流和 ROS 的累积。在本研究中,采用全细胞钙探针对线粒体内钙离子进行检测,发现淋巴细

胞在氯化铵刺激时, 线粒体内钙含量随着氯化铵浓度的增加而增加, 与对照组相比较差异显著。说明线粒体内钙离子的稳态对外界环境的刺激产生了反应。

细胞的能量代谢中心是线粒体, ROS 的主要来源是线粒体呼吸链, 细胞凋亡的早期的关键因素之一就是线粒体膜电位的下降^[163]。随着线粒体损伤, 线粒体产生 ROS 也增多。Wang 等^[164]发现 H_2O_2 产生的 ROS 通过降低 SOD 等抗氧化物酶的活性, 增加脂质过氧化作用而显著增加线粒体内 Ca^{2+} 的产生和 Cyt c 的释放, 改变 BCL-2 蛋白水平并激活了 Caspase-9 和 Caspase-3, 促进凋亡级联反应。线粒体膨胀引起的线粒体外膜破裂能够导致 Cyt c 的释放。Lee 等^[165]在 2008 年就用电镜观察到这种由线粒体膨胀而导致的外膜破裂现象。 Ca^{2+} 的信号调节可能与线粒体的膨胀机制有关。内质网受到凋亡的因素刺激释放 Ca^{2+} , 从而引起线粒体通透孔的形成和线粒体内 Ca^{2+} 超负荷, 线粒体外膜由于线粒体发生膨胀而破裂, 导致膜间隙中的促凋亡蛋白流入细胞质中。赵松峰^[166]研究发现氨诱导了肝细胞的凋亡, 肝细胞的线粒体发生氧化损伤和膜通道孔的开放, 通过内源性的线粒体氧化损伤途径诱导了肝细胞的凋亡。本研究也发现, 在 1 mmol/L 氯化铵处理的淋巴细胞中, 线粒体 Ca^{2+} 发生内流、线粒体膜电位下降和 ROS 产生的增多, 随着氯化铵浓度的增加, Ca^{2+} 内流、线粒体膜电位下降和 ROS 产生的数量也增多。鸡高浓度氨气暴露后, 在胸腺细胞的超微结构中我们观察到了大量线粒体肿胀, 破裂, 线粒体嵴溶解消失。这表示线粒体结构被破坏, 因为线粒体膜通透性改变, 凋亡相关蛋白释放到胞质中, 介导细胞凋亡。

BCL-2 家族成员在线粒体介导的细胞凋亡机制中具有重要的调控作用。线粒体受 BCL-2 家族蛋白的精确调控其线粒体通透性, 形成的孔道可以使线粒体内容物流出, 同时线粒体能够在 BCL-2 的诱导下开放 MPTP 来促进凋亡相关蛋白释放。BCL-2 家族具有调控线粒体膜通透性的功能, 其中 BAX 和 BAK 蛋白能够在线粒体膜上形成通道促进 Cyt c 的释放^[167]。氨暴露后, 抗凋亡基因 BCL-2 的表达量下降, 促凋亡的基因 BAK 和 BAX 表达上升。BCL-2 家族是促进 Cyt c 调控线粒体凋亡途径的核心因子。

Caspase 家族基因表达产物是促进细胞凋亡的主要酶类, 经过一系列酶激活级联反应导致细胞凋亡^[168]。在内源性凋亡途径中, Cyt c 的释放是主要步骤, 线粒体途径凋亡发生的关键是线粒体释放 Cyt c 和线粒体外膜通透性增加^[169]。绝大多数线粒体膜通道转换孔在正常情况下是处于关闭状态的, 然而当线粒体钙超载、膜电位下降时, 线粒体膜转换孔会大量开放, 然后导致线粒体膜电位下降, 线粒体膜通透性增加, 存在于线粒体内的 Cyt c 可进入到胞质中。凋亡蛋白酶激活因子能与释放到胞质中的 Cyt c 结合, 形成 Cyt c 凋亡蛋白酶激活因子凋亡体, 这种物质能够促进 Caspase-9 前体的自身活化^[170]。Caspase-3 和 Caspase-9 在正常细胞中以没有活性的酶原形式存在, Caspase-9 是 Caspase 凋亡反应的上游因子, Caspase-3 和 Caspase-9 是细胞凋亡发生的直接参与因子。活化的 Caspase-9 可以迅速激活 Caspase 级联反应, 最终激活位于凋亡反应下游的 Caspase-3, 促进凋亡相关因子从线粒体内的释放, 从而诱导非 Caspase 依赖及 Caspase 依赖的细胞凋亡^[171]。

Cyt c 从线粒体释放后, 线粒体呼吸链、电子传递受阻, 细胞能量供应减少, 促进凋亡蛋白酶激活因子 APAF1 构象变化并发生同源寡聚化。凋亡的内源通路会通过由电离辐射、化疗药物和诱变剂导致的细胞内不可修复的基因组损伤而激活, 即线粒体通路。本研究中, Cyt c、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达水平在氨暴露后均显著升高, 表明氨通过诱导胸腺细胞线粒

体钙超载，降低线粒体膜电位，开放线粒体膜通道转换孔，从而加速线粒体内凋亡因子的释放，活化线粒体凋亡途径并最终引发细胞凋亡。

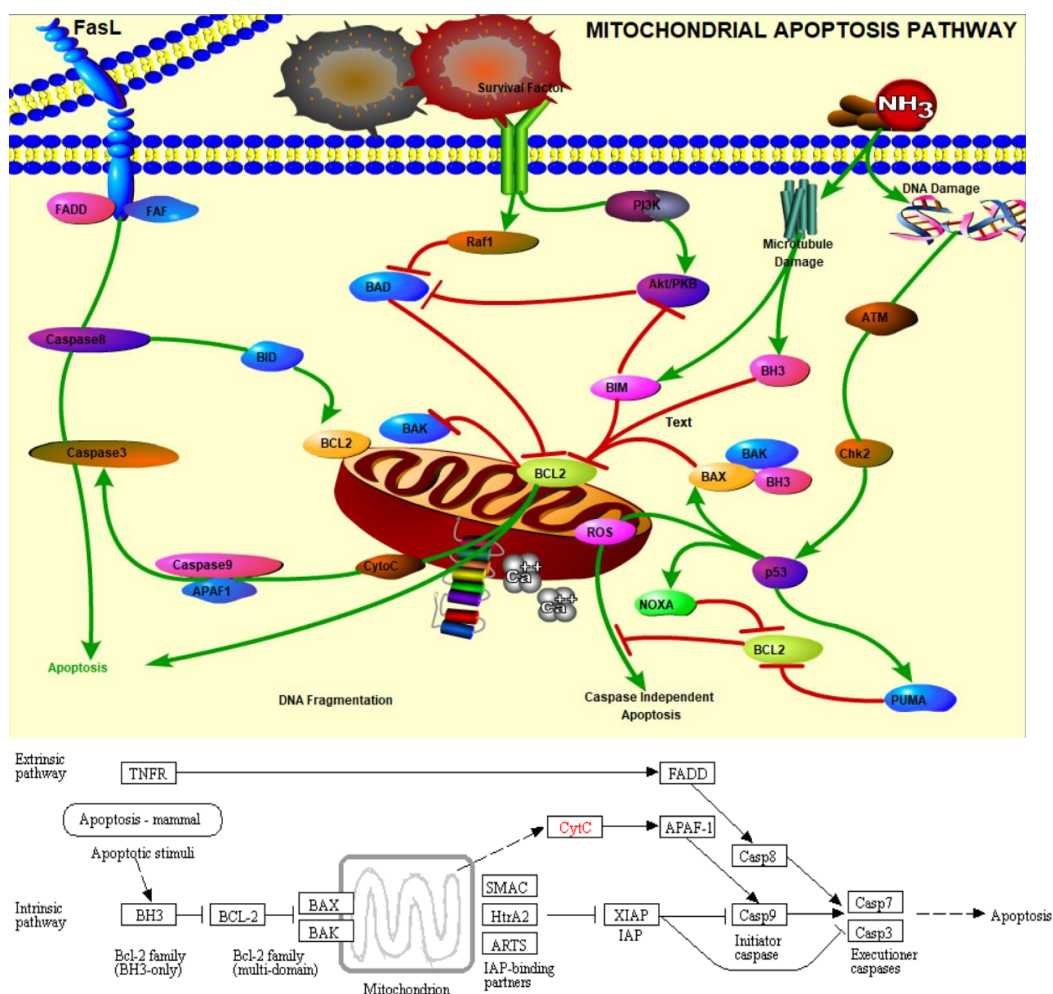


图 4-1 线粒体凋亡通路机制图

Fig. 4-1 Mechanisms of mitochondrial apoptotic pathway

Caspase 级联反应对细胞凋亡的发生具有高度的调控作用，该级联反应的下游效应子是 Caspase-3，其可以降解细胞内的底物来诱导细胞凋亡的发生，现在的普遍认识是凋亡执行者是 Caspase-3。当以酶原的形式合成 Caspase-3 以后，必须受到起始型 Caspase 成员激活才可以发挥凋亡促进作用^[172]。Caspase-9 和 Cytc 等形成的复合物是 Caspase-3 激活的诱导因素之一，也是目前研究的与细胞凋亡有关的线粒体凋亡途径。本实验的结果也显示，氨暴露淋巴细胞线粒体膜电位降低，Caspase-9、Caspase-3 和 Cytc 的 mRNA 和蛋白水平平均升高，线粒体中 Ca^{2+} 增多，线粒体膜电位降低，提示氨暴露可以通过线粒体途径诱导胸腺凋亡的发生，机制通路见图 4-1。

miRNA 是由单链 RNA 前体加工而来，靶基因的 mRNA 被降解或翻译受到抑制是通过 miRNA 与靶 mRNA 的 3'端非翻译区结合，进而负性调控下游靶基因的表达。黄玉民^[173]研究

表明 miR-15b 可能通过下调 BCL-2 的表达从而诱导 A549、DDP 细胞的凋亡。近年研究发现, 在人类白血病患者中, BCL-2 会由于血液 B 细胞中的 miR-15 簇表达缺失或下调而产生过表达, 同时 BCL-2 翻译也会由于 miR-15/16 而受到抑制, 诱导白血病细胞的凋亡^[174]。本研究中转录组学结果显示 miR-15a 的表达量上升, 同 qRT-PCR 的结果一致。在氨体内和体外暴露时, 处理组的 miR-15a 的 mRNA 表达升高, BCL-2 mRNA 表达下降与对照组比较差异显著。使用 Targetscan (<http://www.targetscan.org>) 预测 miR-15a 与 BCL-2 的结合位点, 显示在 1889 到 1896 位点存在 8 个结合位点, 为种子区经典结合模式, 结合位点碱基高度保守, 人、猩猩、恒河猴、松鼠、小鼠、大鼠、兔、猪、牛、猫、狗、蝙蝠、大象、负鼠、金刚鹦鹉、蜥蜴以及酵母高度一致, 见图 4-2。miR-15a 与靶基因 BCL-2 的 3'端非翻译区结合, 进而负性调控 BCL-2 的表达, 诱导细胞凋亡的发生。

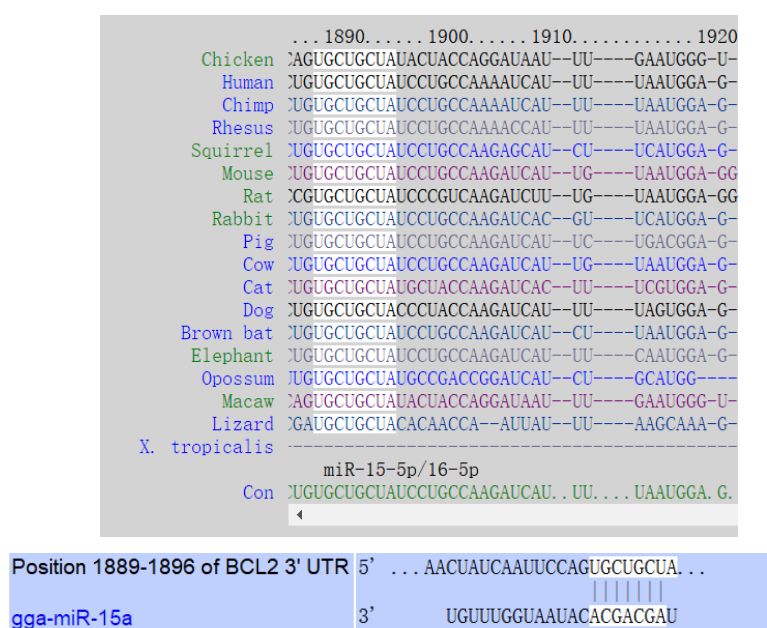


图 4-2 miR-15a 与 BCL-2 的预测结合位点

Fig. 4-2 Predictive binding sites of microRNA-15a and BCL-2

4.4.4 氨气暴露对胸腺细胞 SMAD7 诱导凋亡影响

生物体及胚胎发育等多种细胞过程都有转化生长因子 β (Transforming growth factor beta, TGF- β) 信号通路的参与, TGF- β 参与了机体内包括细胞稳态、细胞生长、细胞凋亡、细胞分化等生物学进程。TGF- β 家族主要包括三种功能相似的亚型 (TGF- β 1、 β 2 和 β 3), 通常情况 TGF- β 对来源于间充质的细胞具有刺激作用, 但是能够抑制上皮或神经外胚层来源的细胞。TGF- β 超家族的配体能够与一个 II 型受体相结合, 然后募集并将一个 I 型受体磷酸化, 该 I 型受体磷酸化受体调节 SMAD (receptor-regulated SMADs, R-SMADs), 其结合为 coSMAD SMAD4。R-SMAD/coSMAD 复合物积聚在细胞核中, 作为转录因子并参与靶基因表达的调控。

SMAD7 是 TGF- β 受体抑制剂,能够抑制 TGF- β 受体的表达进而影响 TGF- β 通路。SMAD7 能够通过与 TGF- β I 类受体牢固结合,阻止 SMAD2 和 SMAD3 发生磷酸化,进而终止 TGF- β 的信号转导^[175]。SMAD7 和 TGF- β 受体复合物结合后,在相关配体和酶的协同作用下诱导其降解。徐国萍等^[176]将 TGF- β 放入体外培养的大鼠肺泡 II 型上皮细胞中后,结果发现体外的肺泡 II 型上皮细胞能够向间质细胞转变,并且证实 TGF- β 的这种诱导作用机制与 SMAD 信号转导途径相关。张庚等^[177]发现在用大黄素处理博来霉素导致的肺纤维化大鼠模型中,TGF- β 1 和 SMAD3 在中、低剂大黄素的大鼠中表达较少,而 SMAD7 表达明显增强,表明中、低剂量的大黄素的组能减少肺纤维化程度,并且调控 TGF- β 1 的 SMAD3/7 信号转导蛋白表达与这种作用机制有关。

TGF- β 1 能够通过组织重建和凋亡维持细胞内部环境的稳定,TGF- β 1 也是组织纤维化促进因子。氨气暴露的组织形态学可观察到,处理组胸腺皮质和髓质分界不清,淋巴细胞减少、排列疏松,髓质内大量血管内皮细胞增生、炎性细胞浸润,胸腺间质细胞发生纤维化。长时间的氨气暴露导致了胸腺组织纤维化的发生。42 d 时检测发现处理组 TGF- β 1 mRNA 的表达与对照组相比呈降低趋势。鸡体内长期的高氨刺激,诱发胸腺组织发生炎症。而 SMAD7 的 mRNA 和蛋白表达水平呈现下降趋势,与对照组相比较差异显著。Higgins 等^[178]认为在细胞凋亡与组织纤维化的过程中存在着直接或间接的作用,细胞凋亡这种程序性死亡方式会直接影响成纤维细胞,机体过度凋亡在肾管细胞造成间质纤维化。

SMAD 蛋白表达能够通过 TGF- β 途径诱导系膜细胞凋亡^[179]。而最近的文章报道了 SMAD7 调控细胞凋亡,过表达的 SMAD7 蛋白对细胞凋亡的影响仍存在争议。SMAD7 可抑制 TGF- β 诱导的 B 淋巴细胞、M1 细胞和 Hep3b 细胞的细胞凋亡^[180, 181]。还发现 SMAD7 可以促进人结肠癌细胞 FET 细胞增殖,通过阻碍 TGF 诱导的生长抑制来抑制凋亡^[182]。Mazars 等^[183]研究发现 SMAD7 通过抑制 NF- κ B 或激活 JNK 信号通路而诱导正常细胞发生凋亡。还有研究表明 TGF- β 和 SMAD7 通过激活在系膜细胞中的 Caspase-3 诱导凋亡。SMAD7 的过表达可有效诱导凋亡,而 SMAD7 的抑制剂可减轻 TGF- β 诱导的凋亡^[184]。SMAD7 对细胞凋亡的影响也取决于细胞类型。本研究中,氨气暴露后转录组学、qRT-PCR 和免疫印迹试验均显示 SMAD7 的表达水平呈现下降趋势,与对照组相比较差异显著,在胸腺细胞中鸡氨气暴露后 SMAD7 具有抗凋亡的作用。在淋巴细胞中,miR-6615-5p 的过表达能诱导细胞凋亡的发生。miR-6615-5p 过表达时,靶基因 SMAD7 表达下降,线粒体途径凋亡相关基因 BAX、BAK、CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 基因 mRNA 表达上升,BCL-2 mRNA 表达下降。在淋巴细胞中,miR-6615-5p 敲低时,靶基因 SMAD7 表达上升,线粒体途径凋亡相关基因 BAX、BAK、CytC、APAF1、Caspase-9 和 Caspase-3 基因 mRNA 表达下降,BCL-2 mRNA 表达上升。我们推测氨气暴露时 SMAD7 可能是通过 Caspase-3 参与线粒体凋亡通路,具体的机制有待于进一步研究。

5. 结论

(1) 通过建立体内氨暴露模型, 结合组织病理形态学、细胞超微结构学和 TUNEL 检测发现氨气导致胸腺组织损伤, 线粒体空泡化、染色质凝集, 凋亡小体增多, 氨气暴露诱导胸腺发生细胞凋亡。

(2) 全转录组学分析结果显示 circRNA、lncRNA、miRNA 和 mRNA 参与了氨气暴露的应激反应, 基因热图显示氨气暴露后氧化应激、细胞因子和凋亡基因的发生差异表达。蛋白组学结果分析显示氨气暴露后差异蛋白的功能与炎症、免疫应答和细胞凋亡过程密切相关, 差异蛋白参与线粒体途径的细胞凋亡的调控。

(3) 双荧光素酶报告基因检测系统证实 miR-6615-5p 与 SMAD7、lncGRN 与 miR-6615-5p 之间存在靶向结合关系; 体内和体外氨暴露也证实 lncGRN-miR-6615-5p-SMAD7 ceRNA 调控网络存在。

(4) 通过检测抗氧化酶和炎性细胞因子表达水平, 证实了氨暴露导致氧化应激和炎症的发育。

(5) 氨气暴露通过 lncGRN/miR-6615-5p 调控 SMAD7 诱导鸡胸腺细胞凋亡。miR-6615-5p 过表达能诱导细胞发生凋亡。淋巴细胞中线粒体膜电位、线粒体钙离子、ROS 活力、变化和凋亡相关基因的 mRNA 和蛋白的变化也证实氨暴露导致细胞凋亡是通过线粒体途径发生的。

致 谢

首先感谢我的导师滕小华教授，严谨的科学态度和精益求精的品质是我学习的榜样，感谢老师在我读博期间学习上指导和帮助，使我不断地进步。

感谢我的硕士导师徐世文教授，在我实验设计和实验过程中提供巨大的帮助。感谢邢厚娟老师和张子威老师，在实验过程中对我耐心细致的讲解和帮助。

感谢师弟陈俭清、安阳、韩齐、彭牧桥、张帅和全剑宇；师妹苗芷英、焦婉莹和徐艳敏，对我实验中提供的帮助。感谢内科教研室杨子江博士、李小晶博士、杨杰博士、王巍博士和苗芷若博士，师弟蔡敬增、陈梦毫、时群翔、尹凯、汪圣晨、崔原，师妹龚亚凡、郭金铭、张桥鉴、郑淑芳、刘琪、张元、柳青青、王冰、刘静和郑莹莹等对我的帮助。一起拼搏和奋斗的日子中并肩同行。学习中有你们陪伴，特别的开心和充实。

感谢我的父母、爱人和我的儿子，对我求学之路的支持。

感谢帮助过我的老师、同学和朋友，人生中遇到你们真好。

我特别珍惜这段读博求学的时光，珍惜每一次的实验过程，这段日子会永远留在我的记忆中。

参考文献

- [1] Skewes PA, Harmon JD. Ammonia Quick Test and Ammonia Dosimeter Tubes for Determining Ammonia Levels in Broiler Facilities[J]. Journal of Applied Poultry Research, 1995, 4(2): 148-153.
- [2] 安丽蓉. 猪舍中氨气治理的有效措施[J]. 养殖与饲料, 2010, (7): 3-5.
- [3] Ritz CW, Fairchild BD, Lacy MP. Implications of Ammonia Production and Emissions from Commercial Poultry Facilities: A Review[J]. Journal of Applied Poultry Research, 2004, 13(4): 684-692.
- [4] Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology[J]. Annual Review of Microbiology, 2001, 55(1): 485-529.
- [5] 王建彬. 养鸡场利用枯草杆菌培养物降低氨气排放[J]. 河南畜牧兽医: 综合版, 2008, 29(12): 27-28.
- [6] 张西雷. 氨气对肉鸡的影响及地衣芽孢杆菌对氨气减量排放的技术研究 [D]: 山东农业大学; 2006.
- [7] 刘振军, 丁静, 关乃鹏, 等. 鸡舍中氨气等有害气体的产生、危害及控制措施[J]. 现代畜牧兽医, 1998, (4): 38-41.
- [8] 谢家声, 王贵波, 李锦宇, 等. 氨气对鸡群的危害及防治方法[J]. 中国禽业导刊, 2016, (9): 70-71.
- [9] 李聪. 不同浓度氨气对肉鸡生长性能及呼吸道黏膜屏障的影响 [D]: 中国农业科学院; 2014.
- [10] 吴莉芸. 鸡舍内的环境监测[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2000, (4): 28-31.
- [11] 徐彬, 魏凤仙, 李绍钰. 氨气的产生及其对肉鸡健康与生产性能的影响[J]. 中国家禽, 2018, 40(7): 1-5.
- [12] 王树春. 舍内氨气对肉鸡的影响及有效控制措施[J]. 现代畜牧科技, 2018, (4): 22.
- [13] 张继泽. 动物健康养殖研究中蛋白质组学技术的应用 [D]2015.
- [14] Xing H, Luan S, Sun Y, et al. Effects of ammonia exposure on carcass traits and fatty acid composition of broiler meat[J]. Animal Nutrition, 2016, 2(4): 282-287.
- [15] 邢焕, 栾素军, 孙永波, 等. 舍内不同氨气浓度对肉鸡抗氧化性能及肉品质的影响[J]. 中国农业科学, 2015, 48(21): 4347-4357.
- [16] Yi B, Chen L, Sa R, et al. Transcriptome Profile Analysis of Breast Muscle Tissues from High or Low Levels of Atmospheric Ammonia Exposed Broilers (Gallus gallus)[J]. Plos One, 2016, 11(9): e0162631.
- [17] 周凤珍. 鸡舍氨浓度对肉仔鸡免疫机能和肉品质影响的研究 [D]: 华南农业大学; 2003.
- [18] Terzich M, Quarles C, Goodwin MA, et al. Effect of Poultry Litter Treatment(R) (PLT(R)) on the development of respiratory tract lesions in broilers[J]. Avian Pathology, 1998, 27(6): 566-569.
- [19] 李卫华. 农场动物福利规范: 国外资料汇编[M]2009.

- [20] Kristensen HH, Wathes CM. Ammonia and poultry welfare: a review[J]. Worlds Poultry Science Journal, 2000, 56(3): 235-245.
- [21] 孟丽辉, 李聪, 卢庆萍, 等. 不同氨气浓度对肉鸡福利的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(8): 1574-1580.
- [22] 李东卫, 卢庆萍, 白水莉, 等. 模拟条件下鸡舍氨气浓度对肉鸡生长性能和日常行为的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(2): 322-326.
- [23] 吕艳杰. 鸡胚胸腺和法氏囊发育过程中 Shh 和 Bmp2 表达的研究 [D]: 山东大学; 2005.
- [24] 张国权, 刘皓. 胸腺上皮细胞与神经内分泌免疫网络[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2003, 23(5): 356-358.
- [25] Kahori K, Munehisa T, Naoko W, et al. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages[J]. Journal of Immunology, 2003, 171(9): 4672-4679.
- [26] Ghavami S, ., Hashemi M, ., Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes[J]. Journal of Medical Genetics, 2009, 46(8): 497-510.
- [27] Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, et al. A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c[J]. Embo Journal, 2014, 20(4): 661-671.
- [28] Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(49): 46639.
- [29] Van EM, Nieland LJ, Ramaekers FC, et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure[J]. Cytometry, 2015, 31(1): 1-9.
- [30] Du Y, Dodel RC, Bales KR, et al. Involvement of a Caspase - 3 - Like Cysteine Protease in 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Mediated Apoptosis of Cultured Cerebellar Granule Neurons[J]. Journal of Neurochemistry, 2010, 69(4): 1382-1388.
- [31] Shota K, Kaori S, Yuji T. Loss of ADAR1 in human iPS cells promotes caspase3-mediated apoptotic cell death[J]. Genes to Cells Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms, 2015, 20(8): 675-680.
- [32] 骆小华. 凋亡相关蛋白 Caspase3 在头颈肿瘤的研究进展 [D]: 重庆医科大学; 2018.
- [33] Gross A, ., Yin XM, Wang K, ., et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(2): 1156-1163.
- [34] Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al. An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis CYTOCHROME c-INDEPENDENT ACTIVATION OF CASPASE-9 BY CASPASE-12[J]. Jbiolchem, 2002, 277(37): 34287-34294.
- [35] 贾炜. Bcl-2 家族研究进展[J]. 当代医学, 2012, 18(3): 26-28.
- [36] 付永锋, 樊廷俊. Bcl—2 家族蛋白与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理学报(英文), 2002, 34(4): 389-394.
- [37] 阮炜珊, 许丹宁, 杨舒展, 等. HSP27 在热应激致岭南黄鸡雏鸡免疫器官损伤中的作用

- [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, 20118(15): 11-15,236-238.
- [38] 王晓燕, 刘文超, 付礼胜, 等. 禽网状内皮组织增生病毒感染 SPF 雏鸡血液淋巴细胞增殖功能及其细胞周期相关因子变化[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(1): 157-163.
- [39] Liu C, Sun Z, Xu Z, et al. Down-regulation of microRNA-155 promotes selenium deficiency-induced apoptosis by tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B in the broiler spleen[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 58513-58525.
- [40] 刘文, 赵佳荣, 邓桦, 等. 禽流感病毒与番鸭呼肠病毒感染番鸭免疫器官细胞凋亡的研究[J]. 动物医学进展, 2013, 34(2): 37-43.
- [41] 李欣虹, 郑若愚, 辜彦霏, 等. 玉米赤霉烯酮对体外培养鸡脾脏淋巴细胞凋亡的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(8).
- [42] Duan Y, Yao X, Zhu J, et al. Effects of yak-activated protein on hematopoiesis and related cytokines in radiation-induced injury in mice[J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2017, 14(6): 5297-5304.
- [43] 魏玮, 王伟, 赵巧湜, 等. 氟对大鼠免疫细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中华地方病学杂志, 2018, 37(11): 876-880.
- [44] Zhao H, He Y, Li S, et al. Subchronic arsenism-induced oxidative stress and inflammatory contribute to apoptosis through mitochondrial and death receptor dependent pathways in chicken immune organs[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40327-40344.
- [45] Zhu P, Zuo Z, Zheng Z, et al. Aflatoxin B1 affects apoptosis and expression of death receptor and endoplasmic reticulum molecules in chicken spleen[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 99531-99540.
- [46] 刘慈. microRNA-155 在缺硒性肉鸡淋巴细胞凋亡中作用机制的研究 [D]: 东北农业大学; 2017.
- [47] 徐喆. 某市鸡场饲料镉含量调查及硒镉诱导鸡脾脏免疫抑制的效应 [D]: 东北农业大学; 2018.
- [48] Lin W, Li L, Chen J, et al. Long-term crowding stress causes compromised nonspecific immunity and increases apoptosis of spleen in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 540-545.
- [49] Kumar A, Sasmal D, Sharma N. Mechanism of deltamethrin induced thymic and splenic toxicity in mice and its protection by piperine and curcumin: in vivo study[J]. *Drug & Chemical Toxicology*, 2017, 41(1): 33-41.
- [50] Hu X, Chi Q, Wang D, et al. Hydrogen sulfide inhalation-induced immune damage is involved in oxidative stress, inflammation, apoptosis and the Th1/Th2 imbalance in broiler bursa of Fabricius[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2018, 164: 201-209.
- [51] Mustoe AM, Iii CLB, Alhashimi HM. Hierarchy of RNA Functional Dynamics[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2014, 83(83): 441-466.
- [52] Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(5): 272-283.

- [53] Ma J, Fan Y, Feng T, et al. HOTAIR regulates HK2 expression by binding endogenous miR-125 and miR-143 in oesophageal squamous cell carcinoma progression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 86410-86422.
- [54] 陆敏佳. 基于分子网络的甲状腺癌相关 ceRNAs 鉴定及药物预测 [D]: 浙江理工大学; 2018.
- [55] 于永春, 张诚, 张大明, 等. 竞争性内源 RNA 网络与肾癌[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2017, 22(10): 795-798.
- [56] 李海北, 宋瑾, 曹鹏博, 等. 竞争性内源 RNA 在转录后水平调控基因表达[J]. *生物物理学报*, 2015, 31(3): 186-195.
- [57] 刘跃娟, 齐靖, 李萌, 等. 胰腺癌中 mRNAs、ncRNAs 研究进展[J]. *智慧健康*, 2017, 3(4): 13-16.
- [58] Kallen AN, Zhou XB, Xu J, et al. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs[J]. *Molecular Cell*, 2013, 52(1): 101-112.
- [59] Kumari B, Jain P, Das S, et al. Dynamic changes in global microRNAome and transcriptome reveal complex miRNA-mRNA regulated host response to Japanese Encephalitis Virus in microglial cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20263.
- [60] Arancio W. A ceRNA analysis on gene focusing on the Hutchinson-Gilford progeria syndrome[J]. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 2013, 3(1): 1-22.
- [61] Wang Z, Xu P, Chen B, et al. Identifying circRNA-associated-ceRNA networks in the hippocampus of A β 1-42-induced Alzheimer's disease-like rats using microarray analysis[J]. *Aging*, 2018, 10(4): 775-788.
- [62] Zhang H, Wang F, Hu Y. STARD13 promotes hepatocellular carcinoma apoptosis by acting as a ceRNA for Fas[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(2): 207-217.
- [63] Li D, Yang M, Liao A, et al. Linc00483 as ceRNA regulates proliferation and apoptosis through activating MAPKs in gastric cancer[J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2018, 22(8): 3875-3886.
- [64] 赵伟, 李晓明. 被转化生长因子 β 活化的长链非编码 RNA 对人淋巴瘤 Raji 细胞增殖、周期及凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(5): 18-23.
- [65] 张恒东. AFT4-KCNQ1OT1-miR-24-3p-FASL 信号通路在铅暴露致成骨细胞凋亡中的作用机制研究 [D]: 苏州大学; 2017.
- [66] Mcgettigan PA. Transcriptomics in the RNA-seq era[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(1): 4-11.
- [67] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用[J]. *遗传*, 2011, 33(11): 1191-1202.
- [68] 罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用[J]. *水产学报*, 2015, 39(4): 598-607.
- [69] 谢文婕. 基于转录组学方法研究微囊藻毒素致白鲢肝损伤的作用机制 [D]: 河南师范大学; 2017.

- [70] 曹腾飞, 丛明, 李兆艳, 等. 氨态氮对菲律宾蛤仔毒理机制研究的内参基因筛选[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 182-190.
- [71] 李长春. 镉对拟环纹豹蛛的毒理效应及其机制研究 [D]: 湖北大学; 2017.
- [72] 王成花, 孙诗晴, 徐巨龙, 等. 抗氟苯虫酰胺小菜蛾差异表达基因及其通路[J]. 中国农业科学, 2018, 51(11).
- [73] 高广琦. 基于红腹锦鸡基因组、转录组测序的羽毛色素调控机制研究 [D]: 内蒙古大学; 2016.
- [74] 赵玉辉. H5N1 亚型禽流感病毒感染鸡脾脏蛋白质组和转录组差异研究 [D]: 东北农业大学; 2015.
- [75] 韩昆鹏, 段炼, 李婷婷, 等. 京海黄鸡卵巢转录组研究: 基因结构分析与新基因发掘注释[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(4): 854-861.
- [76] 丛锋. IBV 感染鸡肾脏和脾脏转录组学分析及鸡 IFITM1 抑制 IBV 和 NDV 复制机制的研究 [D]: 中国农业科学院; 2015.
- [77] 林雨鑫. 京海黄鸡柔嫩艾美耳球虫感染后盲肠转录组分析及其杂交配套系亲本的抗性评价 [D]: 扬州大学; 2015.
- [78] 王乐乐, 赵濛, 韩文静, 等. 基于质谱的蛋白质组学技术及其在绒毛用羊中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(12): 3179-3185.
- [79] Bomgarden RD, Jacobs R, Fong J, et al. Abstract 1608: Profiling c-Met and EGFR kinase inhibitor resistance pathways in non-small lung cancer cells[J]. Cancer Research, 2014, 74(19 Supplement): 1608-1608.
- [80] 于德良. 镉和砷对不同发育阶段紫贻贝毒理效应的组学研究 [D]: 中国科学院烟台海岸带研究所; 2017.
- [81] 程华民. 鹿角珊瑚对苯并芘 (BaP) 胁迫响应的蛋白质组学初步研究 [D]2017.
- [82] 李德金, 高宏生, 张丽, 等. 污染胁迫下的蚯蚓蛋白质组学研究进展[J]. 生态学报, 2016, 36(1): 44-50.
- [83] 高娜, 朱丽梅, 于德良, 等. 长期高氨氮暴露对海水青鲙毒理效应的蛋白质组学研究[J]. 热带海洋学报, 2017, 36(5): 40-48.
- [84] Rose-Martel M, Du J, Hincke MT. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(9): 2697-2706.
- [85] Sun C, Xu G, Yang N. Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property[J]. Proteomics, 2013, 13(23-24): 3523-3536.
- [86] Sophie RG, Karlheinz M, Marie B, et al. Effect of embryonic development on the chicken egg yolk plasma proteome after 12 days of incubation[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(12): 2531-2540.
- [87] Jiawei W, Yue L, Omana DA, et al. Proteomics analysis of egg white proteins from different egg varieties[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(1): 272.
- [88] Zheng X, Hong L, Shi L, et al. Proteomics Analysis of Host Cells Infected with Infectious

- Bursal Disease Virus[J]. *Molecular & Cellular Proteomics* Mep, 2008, 7(3): 612.
- [89] Chung Yan C, Chan EY, Alexei K, et al. H5N1 virus causes significant perturbations in host proteome very early in influenza virus-infected primary human monocyte-derived macrophages[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2012, 206(5): 640-5.
- [90] 吴双, 开妍, 王晓泉, 等. 新城疫病毒感染细胞的双向凝胶电泳方法建立及其初步分析[J]. *中国家禽*, 2010, 32(10): 25-29.
- [91] 王郁杨, 开妍, 段志强, 等. 新城疫病毒人工感染鹅脾脏差异表达蛋白质组初步分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(7): 1088-1095.
- [92] Lu Z, Qin A, Qian K, et al. Proteomic analysis of the host response in the bursa of Fabricius of chickens infected with Marek's disease virus[J]. *Virus Research*, 2010, 153(2): 250-257.
- [93] 胡顺磊. 禽网状内皮组织增生症病毒感染 SPF 鸡脾脏差异蛋白质组学分析 [D]: 中国农业科学院; 2012.
- [94] 王长平. 不同冷刺激对商品肉鸡生理、免疫、肉质、行为及生产性能的影响 [D]: 东北农业大学; 2012.
- [95] 黄叶盛. 氯化铵对大鼠海马神经元生长的影响 [D]: 暨南大学; 2016.
- [96] M.Lazarenko R, DelBove CE, Strothman CE, et al. Ammonium chloride alters neuronal excitability and synaptic vesicle release[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-12.
- [97] Searfoss GH, Ryan TP, Jolly RA. The Role of Transcriptome Analysis in Pre-Clinical Toxicology[J]. *Current Molecular Medicine*, 2005, 5(1): 53-64.
- [98] Lai Z, Yang Y, Yan Y, et al. Analysis of co-expression networks for circular RNAs and mRNAs reveals that circular RNAs hsa_circ_0047905 , hsa_circ_0138960 and has-circRNA7690-15 are candidate oncogenes in gastric cancer[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(23): 2301-2311.
- [99] Wang K, Long B, Liu F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223[J]. *European Heart Journal*, 2016, 37(33): 2602-2611.
- [100] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, . The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843.
- [101] 何丽, 周瑶, 黄瑞雪. P53 与 lnc RNA 之间相互调控机制的研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2019, 33(1): 74-80.
- [102] 郭春燕, 詹克慧. 蛋白质组学技术研究进展及应用[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2010, 25(4): 583-591.
- [103] Wang Z, Xiong L, Wang G, et al. Insulin-like growth factor-1 protects SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced apoptosis via the PI3K/Akt-Nrf2 pathway[J]. *Experimental Gerontology*, 2017, 87(Pt A): 23-32.
- [104] Fan J, Wu M, Wang J, et al. 1,7 - Bis(4 - hydroxyphenyl) - 1,4 - heptadien - 3 - one induces lung cancer cell apoptosis via the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 234(5): 6336-6349.
- [105] 查璐琴, 韩本高, 张超杰. 二甲双胍通过 Akt 通路调控胃癌干细胞的增殖与凋亡[J]. 中

- 国组织工程研究, 2019, 23(5): 657-662.
- [106]李莘, 牛勃, 王建华. 磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸调控细胞迁移的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2019, 46(2): 121-127.
- [107]钱洲楠, 张金虎, 王诚悦, 等. PIK3CD-AS1 对肾癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, v.28; No.142(04): 15-19.
- [108]Bentson LF, Agbor VA, Agbor LN, et al. New point mutation in Golga3 causes multiple defects in spermatogenesis[J]. *Andrology*, 2013, 1(3): 440-450.
- [109]Elena D, Inna B, Foltyn VN, et al. Modulation of D-serine levels via ubiquitin-dependent proteasomal degradation of serine racemase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(29): 20291.
- [110]Ran R, Pan R, Lu A, et al. A novel 165-kDa Golgin protein induced by brain ischemia and phosphorylated by Akt protects against apoptosis[J]. *Molecular & Cellular Neuroscience*, 2007, 36(3): 392-407.
- [111]Sbodio JI, Hicks SW, Dan S, et al. GCP60 preferentially interacts with a caspase-generated golgin-160 fragment[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(38): 27924.
- [112]Morishita M, Luccio ED. Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1816(2): 158-163.
- [113]Ping Y, Linlang G, Duan ZJ, et al. Histone methyltransferase NSD2/MMSET mediates constitutive NF- κ B signaling for cancer cell proliferation, survival, and tumor growth via a feed-forward loop[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2012, 32(15): 3121-31.
- [114]Anilkumar B, Patel OV, Kyung-Bon L, et al. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence : functional and diagnostic implications[J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 79(2): 301.
- [115]Bing W, Jiusong S, Shiro K, et al. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(9): 6020.
- [116]Huang CC, Lee CC, Lin HH, et al. Cathepsin S attenuates endosomal EGFR signalling: A mechanical rationale for the combination of cathepsin S and EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29256.
- [117]刘梦鹤. 绵羊卵母细胞内 CTSB、CTSS 和 caspase3 基因和蛋白表达及活性变化规律 [D]: 河北农业大学; 2015.
- [118]Diaz EC, Martin F, Tagu D. Eucalypt alpha-tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 31(4): 905.
- [119]胡红. 乙酰辅酶 A 合成酶性质分析及其应用 [D]: 长春理工大学; 2015.
- [120]徐金升, 高少辉, 白亚玲, 等. 干扰组蛋白赖氨酸甲基转移酶 SET8 对肾透明细胞癌 786-O 细胞增殖的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(8): 524-528.
- [121]赵沙沙. 肺炎链球菌 DnaJ 蛋白质的初步晶体学和功能研究 [D]: 重庆医科大学; 重庆医科大学; 2013.
- [122]袁媛. 儿童噬血细胞综合征的 UNC13D 和 STX11 基因研究 [D]: 广西医科大学; 2013.

- [123]Bryceson YT, Rudd E, Zheng C, et al. Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11-deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients[J]. Blood, 2007, 110(6): 1906.
- [124]Fan Y, Nikitina T, Zhao J, et al. Histone H1 Depletion in Mammals Alters Global Chromatin Structure but Causes Specific Changes in Gene Regulation[J]. Cell, 2005, 123(7): 1199-1212.
- [125]Vaquero A, Scher M, Lee D, et al. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin[J]. Molecular Cell, 2004, 16(1): 93-105.
- [126]Misteli T, Gunjan A, Hock R, et al. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells[J]. Nature, 2000, 408(6814): 877-881.
- [127]Schmid M, Sen M, Rosenbach MD, et al. A methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) fusion transcript identifies a new gene on chromosome 9p21 that is frequently deleted in cancer[J]. Oncogene, 2000, 19(50): 5747.
- [128]Y L, HK S, H C, et al. INK4/ARF Transcript Expression Is Associated with Chromosome 9p21 Variants Linked to Atherosclerosis[J]. Plos One, 2009, 4(4): e5027.
- [129]Mathiyalagan P, Keating ST, Du XJ, et al. Interplay of chromatin modifications and non-coding RNAs in the heart[J]. Epigenetics, 2014, 9(1): 101-112.
- [130]李伟松, 肖学文, 苏惠, 等. 长链非编码 RNA 研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2017, 37(3): 433-437.
- [131]周瑞, 王以鑫, 龙科任, 等. LncRNA 调控骨骼肌发育的分子机制及其在家养动物中的研究进展[J]. 遗传, 2018, 40(4).
- [132]Sehgal L, ., Mathur R, ., Braun FK, et al. FAS-antisense l lncRNA and production of soluble versus membrane Fas in B-cell lymphoma[J]. Leukemia, 2014, 28(12): 2376.
- [133]Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress[J]. Redox Biology, 2017, 11(C): 613-619.
- [134]Nunes VA, Gozzo AJ, Cruz-Silva I, et al. Vitamin E prevents cell death induced by mild oxidative stress in chicken skeletal muscle cells[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Toxicology & Pharmacology Cbp, 2005, 141(3): 225-240.
- [135]陈洁, 赵明峰. 活性氧在免疫应答中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2015, (6): 855-858.
- [136]黄艳君, 吴洁, 蒋维, 等. 脂氧素 A4 抑制缺氧诱导的滋养细胞氧化应激和凋亡[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(4): 361-366.
- [137]陆骏, 秦瑜, 肖文玮, 等. FOXO4 对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响[J]. 国际眼科杂志, 2018, (12): 2146-2150.
- [138]Hegazi MM, Attia ZI, Ashour OA. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure[J]. Aquatic Toxicology, 2010, 99(2): 118-125.
- [139]Hajiluiian G, Farhangi MA, Nameni G, et al. Oxidative stress-induced cognitive impairment in obesity can be reversed by vitamin D administration in rats[J]. Nutritional Neuroscience, 2017: 1-9.

- [140]Hameed MR, Khan MZ, Saleemi MK, et al. Study of ochratoxin A (OTA)-induced oxidative stress markers in broiler chicks[J]. Toxin Reviews, 2017, 36(4): 1-5.
- [141]周小青, 文可欣, 尹洪萍, 等. 宫内暴露氟他胺对子鼠子宫和卵巢发育及氧化应激的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(5): 54-58+64.
- [142]刘丽艳, 宁玉翠, 邬欣慧, 等. 基于因子分析的 Cd²⁺胁迫下赤子爱胜蚓氧化应激响应[J]. 生态学杂志, 2017, 36(7): 1923-1932.
- [143]Wang W, Chen M, Jin X, et al. H₂S induces Th1/Th2 imbalance with triggered NF- κ B pathway to exacerbate LPS-induced chicken pneumonia response[J]. Chemosphere, 2018, 208: 241.
- [144]Wang Y, Zhao H, Shao Y, et al. Copper (II) and/or arsenite-induced oxidative stress cascades apoptosis and autophagy in the skeletal muscles of chicken[J]. Chemosphere, 2018: 597-605.
- [145]Chen M, Li X, Shi Q, et al. Hydrogen sulfide exposure triggers chicken trachea inflammatory injury through oxidative stress-mediated FOS/IL8 signaling[J]. J Hazard Mater, 2019, 368: 243-254.
- [146]Jin X, Jia T, Liu R, et al. The antagonistic effect of selenium on cadmium-induced apoptosis via PPAR- γ /PI3K/Akt pathway in chicken pancreas[J]. J Hazard Mater, 2018, 357: 355-362.
- [147]Zhang Z, Zheng Z, Cai J, et al. Effect of cadmium on oxidative stress and immune function of common carp (Cyprinus carpio L.) by transcriptome analysis ☆[J]. Aquatic Toxicology, 2017, 192: 171-177.
- [148]Jia R, Cao LP, Du JL, et al. Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (Cyprinus carpio)[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152(152C): 11-19.
- [149]陈玮, 王洁, 顾洪涛, 等. TNF- α 与 IL-2 诱导人多形性腺瘤细胞凋亡[J]. 现代口腔医学杂志, 2003, 17(6): 481-484.
- [150]宋伦, 黎燕, 孙英勋, 等. IL-6 抑制地塞米松诱导的人骨髓瘤细胞凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(11): 757-759.
- [151]叶园, 童章隆, 张宁, 等. IL-10 对 HepG2 细胞凋亡的影响[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(7): 28-30+34+125.
- [152]Konrad FM, Knausberg U, Höne R, et al. Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation[J]. Mucosal Immunology, 2016, 9(1): 98.
- [153]王小青, 高杨, 马帅, 等. 肾蕨对乙酸致小鼠肛门溃疡的作用及 NF- κ B, TNF- α , IL-1 β 和 COX-2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, (8): 122-127.
- [154]Philip B, Roland CL, Daniluk J, et al. A High-Fat Diet Activates Oncogenic Kras and COX2 to Induce Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice[J]. Gastroenterology, 2013, 145(6): 1449-1458.
- [155]Zhou S, Wang G, Zhang W. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on sepsis-associated acute respiratory distress syndrome in rats, via regulation of macrophage activation and inflammatory response[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2018, 15(4): 3376-3384.

- [156]钟艳梅, 陈坚平, 陈淑玲, 等. 知母皂苷通过调节 NF- κ B-iNOS-NO 信号通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞功能[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 198-202.
- [157]Kim YS, Pi SH, Lee YM, et al. The anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 in lipopolysaccharide and cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in human periodontal ligament cells[J]. Journal of Periodontology, 2009, 80(12): 2045.
- [158]Vo PA, Bhavini L, Tomlinson JAP, et al. autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(8): 7236-7243.
- [159]高鹏, 杨明, 孙林. 线粒体相关内质网膜(MAM)钙转运及调节蛋白介导线粒体钙稳态[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, v.40(4): 129-137.
- [160]张玉静, 钟才高. 钙离子依赖的内质网应激在细胞凋亡中作用研究进展[J]. 中国职业医学, 2017, 44(3): 365-370.
- [161]董长松, 刘师兵, 徐治. 胞浆内的 Ca^{2+} 浓度变化在五味子乙素诱导 HepG2 细胞凋亡过程中的作用[J]. 毒理学杂志, 2017, (01): 19-24+29.
- [162]Wei Y, Liu D, Zheng Y, et al. Neuroprotective Effects of Kinetin Against Glutamate-Induced Oxidative Cytotoxicity in HT22 Cells: Involvement of Nrf2 and Heme Oxygenase-1[J]. Neurotoxicity Research, 2018, 33(4): 725-737.
- [163]陈倩, 王瑶, 焦方舟, 等. 线粒体凋亡在肝脏疾病中的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(20): 20-24.
- [164]Wang LL, Yu QL, Han L, et al. Study on the effect of reactive oxygen species-mediated oxidative stress on the activation of mitochondrial apoptosis and the tenderness of yak meat[J]. Food Chemistry, 2018, 244: 394.
- [165]Lee WK, Bork U, Thévenod F. Mitochondria as a Target of Cadmium Nephrotoxicity: Induction of Swelling and Cytochrome c Release[J]. Toxicology Methods, 2008, 14(1-2): 67-71.
- [166]赵松峰. 氮导致的线粒体损伤对肝细胞凋亡和胆红素转运相关蛋白 MRP2 的影响 [D]: 郑州大学; 2014.
- [167]Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond: mitochondrial performance in apoptosis[J]. Febs Journal, 2017, 285(3): 416-431.
- [168]赵瑞杰, 李引乾, 王会, 等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(17): 73-78.
- [169]辛国松, 季宇彬, 于淼, 等. 基于线粒体靶向机制的石蒜碱抗肝癌作用研究[J]. 中草药, 2018, 49(5): 1132-1138.
- [170]Jin H, Dong LA, Lukas H, et al. The Role of Sulfur Dioxide in the Regulation of Mitochondrion-Related Cardiomyocyte Apoptosis in Rats with Isopropylarterenol-Induced Myocardial Injury[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(5): 10465-10482.
- [171]周炳文. 哈巴苷对急性脑缺血小鼠神经细胞及 caspase 非依赖性凋亡通路的影响[J]. 中

- 国药理学通报, 2017, 33(12): 1754-1761.
- [172]Kim CG, V C-A, R A, et al. Caspase-3/MAPK pathways as main regulators of the apoptotic effect of the phyto-mediated synthesized silver nanoparticle from dried stem of *Eleutherococcus senticosus* in human cancer cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 99: 128.
- [173]黄玉民. MicroRNA-15b 下调 Bcl-2 促进耐药肺癌细胞凋亡[J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18(11): 2070-2072.
- [174]Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(13): 5166-71.
- [175]Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2017, 9(2): a022129.
- [176]徐国萍, 徐璟达, 李海霞, 等. TGF- β 1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞向间质细胞转变[J]. *复旦学报 (医学版)*, 2007, 34(2): 223-227.
- [177]张庚, 李玉花, 许先荣, 等. 大黄素对肺纤维化大鼠 TGF- β 1 及 smad3/7 信号通路的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 2: 346-347.
- [178]Higgins SP, Tang Y, Higgins CE, et al. TGF- β 1/p53 signaling in renal fibrogenesis[J]. *Cell Signal*, 2018, 43: 1-10.
- [179]李肖亮. 中药康肾合剂对酒精性肾损伤大鼠的疗效与机制研究 [D]: 兰州大学; 2018.
- [180]Patil S, Wildey GM, Brown TL, et al. Smad7 is induced by CD40 and protects WEHI 231 B-lymphocytes from transforming growth factor-beta -induced growth inhibition and apoptosis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(49): 38363-38370.
- [181]Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, et al. Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta -dependent apoptosis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(46): 36295-36302.
- [182]Halder SK, R Daniel B, Datta PK. Smad7 induces tumorigenicity by blocking TGF-beta-induced growth inhibition and apoptosis[J]. *Experimental Cell Research*, 2005, 307(1): 231-246.
- [183]Mazars A, Lallemand F, Prunier C, et al. Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36797-36803.
- [184]Tomokazu O, Yoshio T, Hiroyuki T, et al. Smad7 mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in mesangial cells[J]. *Kidney International*, 2002, 62(4): 1178-1186.

附 录

缩略语中英文注释

英文缩写	英文全称	中文全称
ROS	reactive oxygen species	活性氧
GPx	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
GST	glutathione S-transferase	谷胱甘肽 S 移换酶
HO-1	heme oxygenase	血红素加氧酶
COX-2	Cyclooxygenase	环氧化酶
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	诱导型一氧化氮合酶
NK- κ B	nuclear factor kappa-B	核因子 κ B
IL-1 β	Interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
IL-2	Interleukin-2	白细胞介素-2
IL-4	Interleukin-4	白细胞介素-4
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6
IL-8	Interleukin-8	白细胞介素-8
IL-10	Interleukin-10	白细胞介素-10
IL-12	Interleukin-12	白细胞介素-12
miRNA	microRNA	微小 RNA
circRNA	Circular RNA	环状 RNA
BCL-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2
Cytc	Cytochrome C	细胞色素 C
APAF1	apoptotic protease activating factor-1	凋亡酶激活因子
lncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
CTSS	Cathepsin S	组织蛋白酶 S
TNF- α	Tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子- α
NSD2	Nuclear receptor binding domain protein 2	核受体结合集域蛋白 2
TGF- β_1	Transforming growth factor β_1	转化生长因子 β_1
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞计数试剂盒

攻读博士学位期间发表的学术论文

- [1] Dechun Chen, Zhiying Miao, Muqiao Peng et al. The co-expression of circRNA and mRNA in the thymuses of chickens exposed to ammonia [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019,176: 146–152.