

doi:10.7668/hbxb.2014.05.010

恶性高温综合征患猪基因表达变化及生物信息学分析

方晓敏,涂 枫,任守文,王学敏,李碧侠,付言峰,赵为民,赵 芳

(江苏省农科院 畜牧研究所,江苏 南京 210014)

摘要:为揭示猪发生恶性高温综合征后基因表达改变,分析基因表达变化在疾病发展过程中的生物学意义,取恶性高温综合征病猪和健康对照猪各3头,采用表达谱基因芯片检测患猪与健康猪的基因表达差异,借助NCBI、NETWORK数据库对差异基因的功能、信号传导途径及其表达改变在猪恶性高温综合征病程发展中的意义作生物信息学分析。结果表明,高温综合征患猪较健康对照出现表达上调基因30个,下调基因108个,GO分析生物学功能聚为免疫防御调节、生化调节、有机物应激调节等几大类,富集信号传导途径26条,其中猪组织相容性复合体SLA-DMA介导的免疫防御调控通路在猪恶性高温综合征中扮演重要角色。恶性高温综合征患猪 *stefinA1*、*APOD*、*SLA-DMA* 基因的表达改变导致免疫功能紊乱影响疫病进展。

关键词:猪;恶性高温综合征;基因表达;生物信息学

中图分类号:Q78;5828 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)05-0054-05

Differential Expression and Biological Functions of Related Genes to Porcine Malignant Hyperthermia Syndrome

FANG Xiao-min, TU Feng, REN Shou-wen, WANG Xue-min, LI Bi-xia,

FU Yan-feng, ZHAO Wei-min, ZHAO Fang

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To detect gene expression changes after suffering from porcine malignant hyperthermia syndrome (pMHS) and analyze the biological significance of differential expression genes in the process of disease infection. Three pigs were used in this study as cases and controls, respectively. Gene chips was conducted to investigate gene expression difference between two groups. Gene ontology and pathway analysis were applied to determine the roles of these differentially expressed genes in pMHS by NCBI and NETWORK. 138 genes were identified in MHS pigs, including 30 up-regulated and 108 down-regulated genes, comparison with the control group. These genes were confirmed associated mainly with the regulation of immune defense, biochemistry, organic stress, etc, and involved in 26 signal pathways, of which SLA-DMA mediated immune defense pathway plays an important role in pMHS. The expression changes of *stefinA1*, *APOD*, *SLA-DMA* genes result in immune dysfunction, which was crucial in the pathological process of pMHS.

Key words: Pig; Malignant hyperthermia syndrome; Gene expression; Bioinformatics

恶性高温综合征(Malignant hyperthermia syndrome, MHS)的肆虐流行曾给生猪养殖业造成重大创伤,猪MHS的病因虽已初步探明,发病情况有所控制,但每逢夏季高温时节南方部分猪场仍呈爆发式流行^[1-4]。MHS发病后,患猪免疫系统经受复杂的连锁反应,一系列免疫调控因子表达随之改变,机

体防御系统相关信号通路呈现异常活跃状态。本研究采用高通量基因芯片技术,检测恶性高温综合征发生后机体表现显著表达差异的关键基因,分析目标基因的生物学功能及信号调控途径,探讨相关基因在疫病发展过程中表达改变的生物学意义,为恶性传染性疾病的诊治提供新思路。

收稿日期:2014-07-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31301953);国家生猪现代产业技术体系项目(nycyt-009);江苏省自然科学基金项目(BK20131332);江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(13)2037)

作者简介:方晓敏(1975-),女,河南信阳人,副研究员,博士,主要从事生物技术与动物遗传育种研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选择江苏浦口某猪场 MHS 发病猪、健康对照猪各 3 头, 体重均为 60 kg 左右, 剖杀采样保存备用。采用安捷伦猪表达谱基因芯片 (Agilent Pig 4x44K Gene Expression Microarray) 进行高通量检测。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备与芯片杂交 TRIzol 提取 RNA, 纯化、检测后分光光度计定量, 拟转录合成 cDNA, 并以 Cy3-dCTP 荧光素单色标记 cRNA, PCR NucleoSpin Extract II 试剂盒纯化后抽干。处理好的标记样品经 60 °C 片段化温浴 30 min 后, 与 Agilent 表达谱基因芯片 65 °C 封闭杂交 17 h, 室温下专用洗涤液清洗芯片, 晾干后用 Agilent DNA Microarray Scanner (part number G2505B) 扫描芯片荧光强度并成像。

1.2.2 数据统计处理 提取芯片扫描信号强度和比值, 用 Agilent Feature Extraction 软件转换为数字信号后, lowess 归一化法校正信号值, 以单个信号值 ≥ 600 , Fold Change ≥ 2 为上调基因, Fold Change ≤ 0.5 为下调基因, 对检测结果作进一步分析。所有计量数据均采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 试验和对照组进行两类样本比较随机方差 t 检验, 差异基因 $P < 0.05$ 有统计学意义。

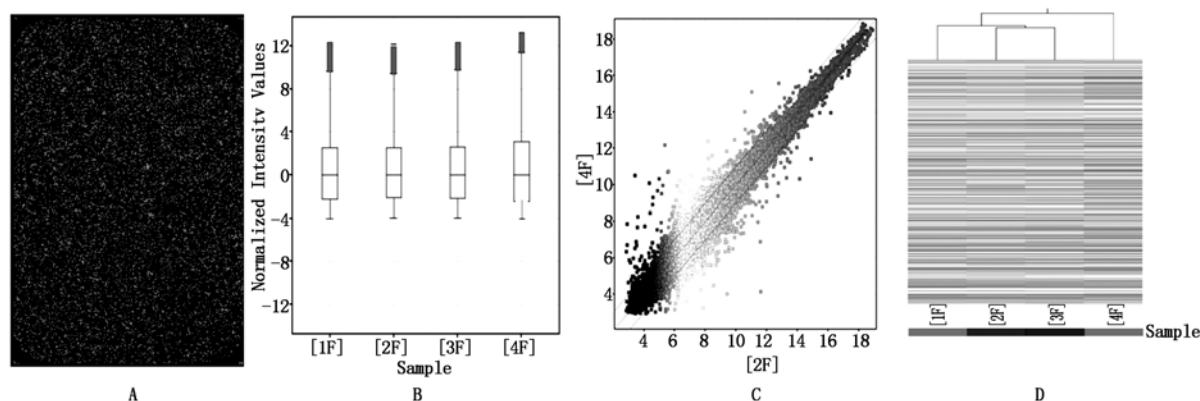
1.2.3 生物信息学分析 借助 Agilent 芯片系统软件对差异基因进行 Box plot, Scatter plot, Hierarchical

clustering 分析; 利用 Gene Ontology analysis (<http://www.geneontology.org>) 从生物进程 (Biological Process, BP)、细胞构成元件 (Cellular Component, CC) 和分子生物学功能 (Molecular Function, MF) 3 个层面注释差异表达基因, 结合 NCBI 基因数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 分析基因功能; 利用 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)、Cellsigal (<http://www.cellsigal.com>) 网络分析系统富集差异表达基因涉及的信号通路及调控途径, 结合 Pubmed 文献讨论目标基因表达改变的生物学意义。

2 结果与分析

2.1 芯片杂交结果

Agilent 猪表达谱基因芯片可检测超过 4 万个基因。本试验芯片杂交信号清晰, 背景值均匀, 阳性点和阴性对照区域结果明显 (图 1-A)。盒图 (Box plot) 分析表明, 试验猪和对照信号强度分布基本一致, 具可比性 (图 1-B)。散点图 (Scatter plot) 分布提示, 大部分基因位于回归线内, 表明恶性高温综合征患猪与健康对照猪大部分基因表达趋于一致, 少部分基因表达差异, 预示试验结果可靠 (图 1-C)。基因聚类分析 (Hierarchical clustering) 显示, 大部分基因在试验组患猪间呈现较为一致的表达谱, 而患猪与健康对照猪则有一定程度的基因表达差异, 为后续目标基因的选择提供了依据与可能 (图 1-D)。



A. 芯片杂交; B. 基因表达; C. 差异比较; D. 聚类分析。

A. Array images; B. Box plot of gene expression; C. Scatter plot of gene expressions; D. Hierarchical clustering.

图 1 芯片杂交结果统计示例图

Fig. 1 The results of gene chip analysis

2.2 差异表达基因功能分析

进一步的基因表达分析显示, 恶性高温综合征患猪较健康对照猪表达改变基因共 138 个, 其中上调基因 30 个, 下调基因 108 个。除 11 个未知基因外, 其余差异表达基因通过参与细胞器、细胞膜及胞

外基质构成影响机体的免疫防御、补体激活、新陈代谢、氧化应激等生物进程, 并以信号转录因子、调节因子、内肽酶、氧化还原调节酶等发挥相应的分子功能。部分差异表达基因见表 1。

表 1 部分差异表达基因及其生物功能

Tab.1 Partial differential genes and its biological function

探针 Probe name	基因 Gene symbol	调节 Regulation	染色体定位 Chromosome location	基因描述 Gene description
A_72_P177496	RETN	上调	2q21	猪抵抗素
A_72_P176386	LOC396866	上调		猪可逆性半胱氨酸酶抑制剂
A_72_P260757	CAPNS1	上调	6	猪钙蛋白小亚基
A_72_P371558	APOD	上调	13	猪卵巢表达的 mRNA
NM_213828	LOC396781	下调		猪 IgG 重链
NM_001003924	C1QA	下调		猪补体成分 C1QA
NM_001101031	BMP4	下调		猪骨形态生产蛋白 4
NM_001004039	SLA-DMA	下调	7	猪组织相容性复合体
NM_214162	CASP1	下调		猪细胞凋亡相关半胱氨酸肽酶
NM_001097497	COX6B	下调		猪细胞色素氧化酶

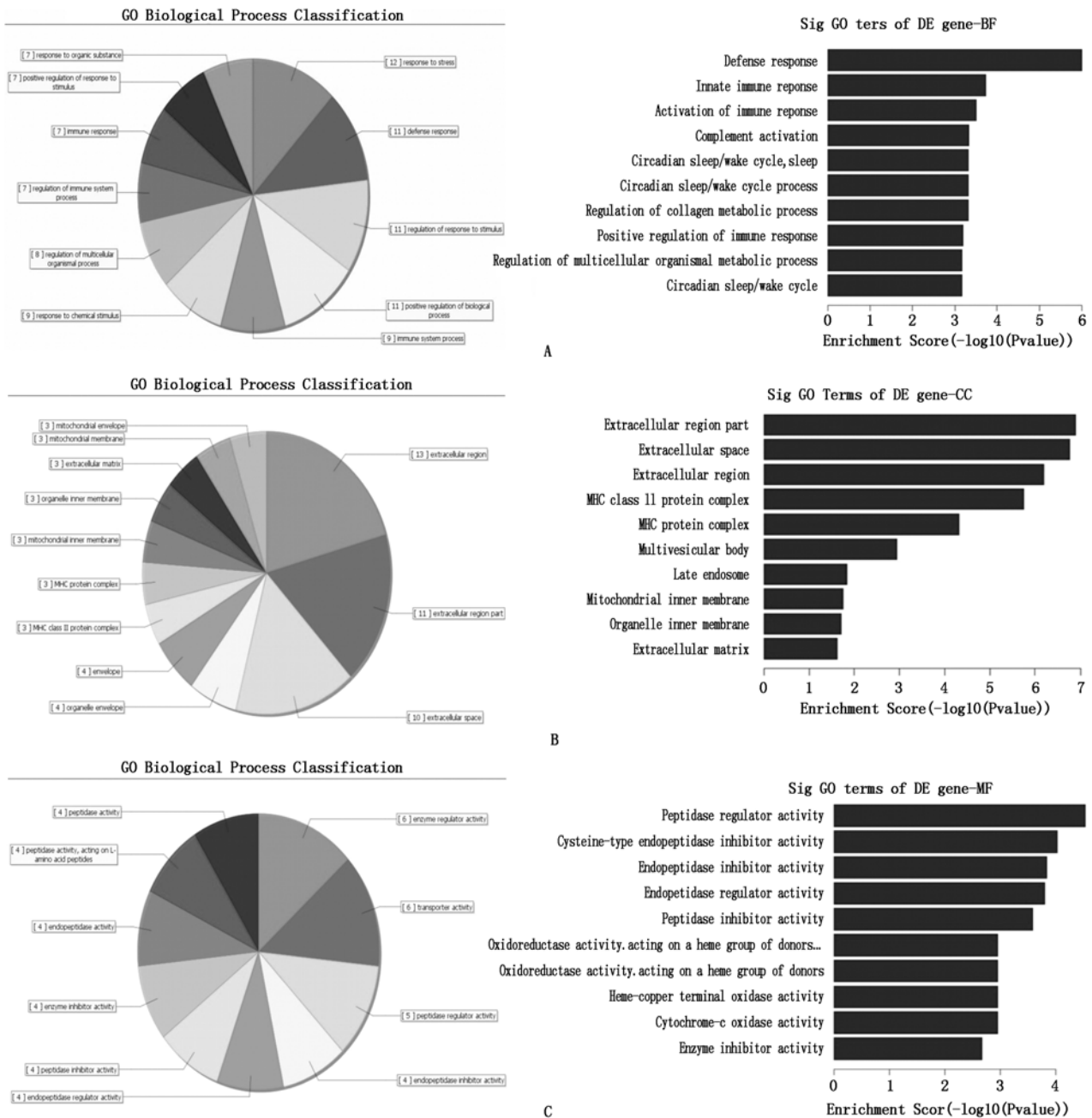


图 2 差异表达基因的功能分析

Fig.2 Cluster analysis of differential genes function

其中,涉及生物进程的差异基因为有机物应激 (Response to organic substance)、免疫防御 (Immune response)、免疫调节 (Regulation of immune system process)、生化调节 (Positive regulation of biological process)、应激调节 (Regulation of response to stimulus) 等 11 类(图 2-A),参与细胞构成的差异基因归为胞外组分 (Extracellular region and matrix)、线粒体膜构成 (Mitochondrial envelope, membrane and inner membrane)、组织相容复合体 (MHC protein complex)、细胞器膜 (Organelle envelope) 等 12 类(图 2-B);差异基因的分子功能主要为参与肽酶活性 (Peptidase activity)、肽链内切酶活性调节 (Endopeptidase activity, inhibitor activity and endopeptidase reg-

ulator activity)、转录子活性 (Transporter activity) 以及酶活性调节 (Enzyme regulator activity and enzyme inhibitor activity) 等(图 2-C)。

2.3 差异基因涉及的信号通路及调控途径

进一步的基因网络分析表明,差异表达基因主要富集在机体免疫调节及细菌、病毒感染等 26 条调控通路,较为典型的有葡萄球菌感染信号通路、系统性红斑狼疮调控通路、气喘调控通路、类风湿性关节炎发生调控通路、A 型流感通路、抗原信号处理调控通路、细胞黏着吸附通路及氧化磷酸化调控通路(表 2)。另外,半胱氨酸蛋白酶抑制剂及钙调蛋白酶的表达改变,则以 Jak-STAT、NF-κ 通路为途径,通过调节细胞功能影响机体免疫应答。

表 2 差异表达基因 Pathway 通路分析结果

Tab. 2 Signal pathway of differential genes

编号 Pathway ID	通路 Definition	P 值 Fisher-P value	富集评分 Enrichment_Score	基因 Genes
ssc05150	葡萄球菌感染	0.000 1	6.809 1	CIQA//C2//SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc05322	系统性红斑狼疮	0.000 2	5.225 6	CIQA//C2//SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc05310	哮喘	0.000 4	4.271 0	SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc05323	类风湿性关节炎	0.000 4	4.124 2	SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI//UF
ssc04672	免疫球蛋白 A 生成肠免疫网络	0.000 6	3.598 9	SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc05164	A 型流感	0.000 7	3.142 5	CASPI//SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc04612	抗原应答	0.000 8	3.106 4	SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc04514	细胞黏着分子	0.005 6	2.253 0	SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc04145	吞噬体	0.006 3	2.198 8	SLA-DMA//SLA-DMB//SLA-DQAI
ssc00190	氧化磷酸化通路	0.046 7	1.330 8	COX6B//COX7AI
ssc05012	帕金森氏病	0.049 5	1.305 7	COX6B//COX7AI

3 讨论

生猪发生高温综合征后,常伴以间质性肺炎、胸膜炎、结膜炎、淋巴结肿大等炎性病理特征,患猪耳发绀,通体发红,并有块状紫红斑分布,最终无法站立,抽搐死亡^[5-6]。本研究发现具免疫活性调节的内源性抑制剂 stefinA1 (LOC396866) 在 MHS 患猪表达显著上调,作为 cystatin 超家族成员, stefinA1 可逆性抑制半胱氨酸蛋白酶,影响机体生物学及病理过程^[7],还可通过抗原递呈,诱导细胞因子 TNFα 和 IL-10 的合成,刺激 IFN-γ 因子,加剧机体炎性效应和组织损伤^[8-10]。同时,涉及能量代谢的胰岛素抗性基因 *RETN* 和载脂蛋白 *APOD* 基因也表达上调,其中 *RETN* 可降低胰岛素敏感性,削弱胰岛素功能,影响胰岛素相关葡萄糖与脂类代谢,抑制脂肪细胞的分化成熟^[11-12]; *APOD* 是重要的载脂蛋白,不仅参与脂蛋白的转化与代谢,还参与机体免疫调节^[13]、细胞增殖分化^[14]、神经系统发生^[15] 等过程,并与人类精神分裂密切相关^[16-17]。据此推测, MHS

患猪 *RETN*、*APOD* 基因表达改变影响机体能量代谢途径,造成糖、脂代谢紊乱,生理功能异常,甚至炎性因子表达的改变。而且,大部分 MHS 患猪表现的抽搐死亡和载脂蛋白的过度表达可能存在某种联系。

对于 MHS 病理过程中 IgG 重链和补体 *CIQA* 的表达下调,因免疫蛋白直接参与机体免疫反应,补体 *CIQA* 则辅助或增强抗体作用,参与机体免疫机制,介导免疫病理损伤,考虑为免疫防御系统抵御外来侵入的自我调节结果。而猪组织相容性复合体 *SLA-DMA* 可作为白细胞抗原介入免疫应答调控、免疫识别,以及抗原递呈过程^[18-20],且猪 MHS 病原复杂,组织相容性复合体表达下调导致患猪免疫应答减弱,或抗原递呈迟缓,机体抵抗力降低后各种病原入侵,造成机体综合性病理反应。至于细胞色素氧化酶 *COX6B* 的表达下调,则直接降低线粒体功能,导致细胞 ATP 合成减少,线粒体呼吸链电子单价泄露增强,活性氧 ROS 产物增多而激活程序性细胞死亡信号通路,增加细胞毒性死亡,加重患猪疫病损伤。

针对 MHS 患猪表达改变基因涉及的免疫系统调节通路,涵盖免疫球蛋白产生、抗原处理、补体凝集、吞噬体作用等调控途径,多与疫病感染后机体复杂的免疫应答反应有关;参与代谢调节的氧化磷酸化调控通路通过相关分子接点影响免疫防御系统。部分表达差异基因参与如流感、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、帕金森综合征等信号通路,应与 MHS 患猪机体病理变化及内在反应机制有必然的联系。尽管猪恶性高温综合征多呈复合性继发感染,病情发展迅速,但本试验结果仍为未来针对该疫病的综合诊治提供了新的思维空间。

参考文献:

- [1] 覃芳慧. 猪高热病的流行特点与防控对策[J]. 畜牧业,2013(7):24-27.
- [2] 鲁锦成,钱 慧. 夏季生猪高热病的综合防控措施[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013(8):100.
- [3] 黄 玉. 猪高热病流行及预防[J]. 农业与技术,2013,33(7):168-168.
- [4] 卢献文. 猪高热病及其防治措施[J]. 畜牧兽医杂志,2013,32(5):130,132.
- [5] 汤智君,陆则基. 夏季生猪高热病的流行及防控[J]. 养殖技术顾问,2011(8):102-103.
- [6] 张西胜,纪立志,封士军. 夏季猪高热病的防与治[J]. 中国动物保健,2013,15(7):48-49.
- [7] Anastasi A, Brown M A, Kembhavi A A, *et al.* Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum[J]. The Biochemical Journal, 1983, 211(1):129-138.
- [8] Sun Y X, Liu G Y, Li Z T, *et al.* Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*[J]. Immunology, 2013, 138(4):370-381.
- [9] Manoury B, Hewitt E W, Morrice N, *et al.* An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation[J]. Nature, 1998, 396(6712):695-699.
- [10] Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins[J]. International Journal for Parasitology, 2003, 33(11):1291-1302.
- [11] Stepan C M, Bailey S T, Bhat S, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. Nature, 2001, 409(6818):307-312.
- [12] Nohira T, Nagao K, Kameyama K, *et al.* Identification of an alternative splicing transcript for the resistin gene and distribution of its mRNA in human tissue[J]. European Journal of Endocrinology, 2004, 151(1):151-154.
- [13] Navarro A, Tolivia J, Astudillo A, *et al.* Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain[J]. Neuro Science Letters, 1998, 254(1):17-20.
- [14] Sánchez D, Ganfornina M D, Mart nez S. Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis[J]. Mech Dev, 2002, 110(1-2):225-229.
- [15] Navarro A, Méndez E, Diaz C, *et al.* Lifelong expression of apolipoprotein D in the human brainstem: correlation with reduced age-related neurodegeneration[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e77852.
- [16] Hansen T, Hemmingsen R P, Wang A G, *et al.* Apolipoprotein D is associated with long-term outcome in patients with schizophrenia[J]. The Pharmacogenomics Journal, 2006, 6(2):120-125.
- [17] Zhang X, Li D, Duan S, *et al.* Analysis of the association between apolipoprotein D and schizophrenia[J]. Neuropsychobiology, 2006, 54(1):40-44.
- [18] Smith D M, Lunney J K, Ho C S, *et al.* Nomenclature for factors of the swine leukocyte antigen class II system, 2005[J]. Tissue Antigens, 2005, 66(6):623-639.
- [19] Kim M, Seo H, Choi Y, *et al.* Swine leukocyte Antigen-DQ expression and its regulation by Interferon-Gamma at the Maternal-Fetal interface in pigs[J]. Biology of Reproduction, 2012, 86(2):43.
- [20] Hara H, Witt W, Crossley T, *et al.* Human dominant-negative class II transactivator transgenic pigs-effect on the human anti-pig T-cell immune response and immune status[J]. Immunology, 2013, 140(1):39-46.