

初小雅, 高修歌, 江善祥. 鸭睾丸间质细胞感染鸭坦布苏病毒的转录组学分析 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 101-110.

Chu X Y, Gao X G, Jiang S X. Transcriptomic analysis of duck Tembusu virus infection in leydig cells of ducks [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 101-110.

鸭睾丸间质细胞感染鸭坦布苏病毒的转录组学分析

初小雅, 高修歌*, 江善祥*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014)

摘要: 为阐明鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 感染对原代鸭睾丸间质细胞 (LC) 的影响, 本研究利用 Illumina Novaseq 6000 高通量测序平台对 DTMUV 感染后的原代鸭 LC 及对照组样本进行转录组测序, 并筛选 2 组之间的差异表达基因 (DEG)。结果: 共鉴定到 11 722 个 DEG, 其中 6 037 个基因表达上调, 5 685 个基因表达下调; 进一步通过 GO 和 KEGG 富集分析发现, 这些 DEG 显著富集于类固醇激素生物合成、PI3K-AKT 信号通路、类固醇激素合成相关的脂质和动脉粥样硬化、细胞因子-受体相互作用、神经活性配体-受体相互作用以及癌症通路等重要途径; 从中选取 9 个关键 DEG 进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证, 发现其结果与测序数据一致。综上, DTMUV 感染可影响 LC 的类固醇激素合成及 PI3K-AKT 等信号通路, 进而干扰细胞功能与睾酮生成, 这为 DTMUV 的生物防控提供了新的理论支撑。

关键词: 鸭坦布苏病毒; 睾丸间质细胞; 转录组测序; 睾酮

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)10-0101-10

Transcriptomic analysis of duck Tembusu virus infection in leydig cells of ducks

CHU Xiaoya, GAO Xiuge*, JIANG Shanxiang*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China)

Abstract: To elucidate the impact of duck Tembusu virus (DTMUV) infection on Leydig cells (LCs) primary ducks, this study utilized the Illumina Novaseq 6000 high-throughput sequencing platform to conduct transcriptome sequencing of DTMUV-infected primary duck LCs and control group samples, followed by screening for differentially expressed genes (DEGs) between the two groups. The results were as follows: A total of 11 722 DEGs were identified, among which 6 037 genes were upregulated and 5 685 genes were downregulated. Further enrichment analysis using GO and KEGG revealed that these DEGs were significantly enriched in key pathways such as steroid hormone biosynthesis, the PI3K-AKT signaling pathway, lipid and atherosclerosis related to steroid hormone synthesis, cytokine-receptor interaction, neuroactive ligand-receptor interaction, and cancer pathways. Additionally, nine key DEGs were selected for RT-qPCR validation, and the results were consistent with the sequencing data. To conclude, the above findings indicated that DTMUV infection affected steroid hormone synthesis and signaling pathways such as PI3K-AKT in LCs, thereby disrupting cellular function and testosterone production. This study provided new theoretical support for biological prevention and control of DTMUV.

Keywords: duck Tembusu virus; leydig cells; RNA-seq; testosterone

鸭坦布苏病毒 (duck Tembusu virus, DTMUV) 是一种典型黄病毒^[1], 感染雌性生殖系统后, 可使蛋鸭产蛋量骤降^[2], DTMUV 感染鸭雄性生殖系统后, 可出现睾丸体积减小、输精管萎缩等病理变化^[3]。组织病理学变化包括睾丸内精子生成减少、

间质淋巴细胞浸润、生精细胞空泡变性/脱落等^[4]。有研究发现, 一养鸡场的种鸡精液样本能够被成功分离出 DTMUV, 并且使用携带 DTMUV 的精液进行人工授精后, 蛋鸡产蛋率下降, 而且在蛋鸡的卵巢和血清中也能够检测到 DTMUV^[5]。这一发现表明, 种公鸡也有可能感染 DTMUV, 且会通过交媾将病毒水平传播给蛋鸡, 造成蛋鸡产蛋量下降。目前, DTMUV 感染禽类睾丸后导致精液质量降低的机制尚不清楚。

黄病毒家族中, 寨卡病毒 (ZIKV) 可通过感染 I 型干扰素受体敲除小鼠的睾丸间质细胞 (LC), 降低睾酮合成相关基因的表达量, 同时也降低睾酮水平^[6]。ZIKV 感染除了能够降低睾酮合成外, 还会引起睾丸间质炎症^[7]。在针对另一种黄病毒日本乙型

收稿日期: 2025-11-13; 修回日期: 2026-08-07

基金项目: 江苏省基础研究专项资金 (自然科学基金) 青年基金项目 (BK20240910); 江苏省高等学校基础科学 (自然科学) 研究面上项目 (24KJB230010)

第一作者: 初小雅, 女, 博士研究生

* 通信作者: 江善祥, 教授, 主要从事新兽药研发方面的工作, E-mail: jiangshanxiang@163.com; 高修歌, 副教授, 主要从事新兽药研发方面的工作, E-mail: vetgao@njau.edu.cn。

脑炎病毒 (JEV) 与雄性生殖系统相互作用的研究中发现, 该病毒可经 RIG-I/NF- κ B 信号通路感染猪睾丸, 并诱发间质炎性病变^[8]。上述研究表明, LC 细胞是黄病毒感染睾丸过程中的关键靶点, 而病毒对其睾酮合成功能的干扰以及所引起的间质性炎症, 均是导致睾丸损伤的重要因素。

睾酮是启动和维持精子发生的关键激素^[9], 睾酮的缺乏能够抑制精子发生, 使其停留在精母细胞阶段 (减数分裂)^[10]。DTMUV 感染可引发公鸭睾丸间质炎症^[4], 并伴随睾酮水平降低及精子数量减少, 但其具体致病机制仍有待阐明。目前, 尚未有研究阐明 DTMUV 是否通过直接感染 LC 细胞影响睾酮合成。基于睾酮在精子发生中的核心作用, 本研究拟采用转录组测序 (RNA-Seq) 技术, 对 DTMUV 感染后的原代鸭 LC 细胞进行差异表达基因筛选与鉴定, 以期从睾酮合成途径揭示病毒感染导致睾丸萎缩及生殖能力下降的机制, 并为防控 DTMUV 感染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验毒株

DTMUV XZ-2012 毒株由南京农业大学传染病诊断与免疫课题组惠赠, -80 ℃ 冻存。试验中使用的病毒滴度为 5×10^5 TCID₅₀/mL。

1.2 试验动物

选取南京市六合区的麻鸭生态养殖场 3~6 月龄麻鸭 12 只, DTMUV 检测为阴性。

1.3 主要试剂

75%乙醇、氯仿和异丙醇购自上海麦克林生化科技股份有限公司; DMEM/F12 培养基、青链霉素混合液及 FBS 胎牛血清购自赛默飞世尔科技公司; PBS 缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司; 胶原酶 II 购自上海源叶生物科技有限公司; Percoll 细胞分离液购自格来赛生命科技 (上海) 有限公司; 台盼蓝染色液购自上海碧云天生物技术有限公司; TRIzol、DEPC 水、定量 PCR 检测试剂盒及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 预混液均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.4 主要仪器

上海美瑞克台式低速离心机 (MD-550), Thermo Fisher 低温高速离心机 (Micro17R), Roche 荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 96), 杭州柏恒智能三槽梯度基因扩增仪 (GET3XG), 美国 FEI 公司透射电镜 (Tecnai G2 Spirit Bit Win)。

1.5 原代鸭 LC 细胞的分离与培养

将试验麻鸭麻醉处死后, 颈静脉放血, 剖开腹腔, 摘取睾丸组织, 置于含双抗的无菌 PBS 缓冲液

(0.01 mol/L, pH = 7.2) 中。剔除结缔组织与白膜后, 将睾丸组织剪碎, 按 1:5 体积比加入 1 mg/mL 胶原酶 II, 于 37 ℃ 水浴振荡消化至组织形态消失、曲细精管间的间质松散。消化结束后, 加入含 1% 双抗的无血清 DMEM/F12 培养基终止反应。细胞悬液经 100 目与 200 目细胞筛过滤后, 1 500 r/min 离心收集沉淀。将沉淀重悬并加至 Percoll 梯度液 (60%、34%、26% 各 3 mL) 上, 2 000 r/min 离心 30 min。离心后, 管中可见 3 条目的细胞带, 吸取第 3 层细胞带, 用无血清 DMEM/F12 培养基清洗 (1 500 r/min, 4 ℃ 条件下, 离心 10 min, 弃去上清液) 数次后, 获得纯化的 LC 细胞。用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 以 5×10^5 个/mL 的细胞密度接种于培养皿中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.6 透射电子显微镜观察

以薄层吸附的方式, 将稀释好的病毒 (DTMUV) 与原代鸭 LC 细胞在细胞培养箱中孵育。随后, 将对照组 (C48) 和攻毒组 (V48, DTMUV 攻毒 48 h) 的原代鸭 LC 细胞, 用 2.5% 的戊二醛溶液固定, 4 ℃ 条件下固定至少 30 min, 然后用细胞铲刮取细胞并离心。制样时, 先将细胞沉淀洗涤, 随后将洗涤后的细胞放入 1% 的锇酸固定液中固定 2 h, 再用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 随后在丙酮溶液中升序浓度脱水, 丙酮浓度升序依次为 50% I、50% II (更换新的 50% 丙酮)、70% I、70% II (更换新的 70% 丙酮)、95% I、95% II (更换新的 95% 丙酮)、100% I 和 100% II (更换新的 100% 丙酮), 每次 10 min 脱水完成后, 使用丙酮和树脂的混合液 (丙酮:Pon 812 树脂=1:1) 室温浸泡过夜, 次日将组织嵌入 Pon 812 树脂中包埋。在超薄切片机上进行超薄切片, 厚度为 70 nm, 切片使用醋酸铀和柠檬酸铅进行双重染色。染色完成后, 用透射电镜拍照记录, 摄像机为 AMT XR-50。试验中加速电压为 80.0 kV。

1.7 ELISA 检测

采用双抗体夹心法测定不同处理组细胞上清液的鸭睾酮水平。将标准品分别稀释到 2、4、8、16、32 nmol/L, 并加入 96 孔板中, 用以制作标准曲线。分别加入样本 10 μ L 和样本稀释液 40 μ L (样本的最终稀释浓度为 5 倍)。加样完成后, 用锡箔纸封住 96 孔板, 在 37 ℃ 条件下孵育 30 min。孵育完成后, 弃去所加溶液, 接着用洗涤剂反复清洗 96 孔板, 用吸水纸拍干, 洗涤和拍干操作重复 5~10 次。然后, 在每孔中加入酶标试剂 50 μ L, 空白孔除外, 接着孵育、清洗。完成上述操作后, 在 96 孔板中加入显色液, 在 37 ℃ 条件下孵育 10 min。孵育完成后, 迅速加入终止液, 并在酶标仪下以 450 nm 波长检测每孔的吸

光值（OD 值）。

1.8 细胞总 RNA 提取、Illumina 测序及文库构建

原代鸭 LC 细胞经 TRIzol 法提取总 RNA。简要步骤如下：向 6 孔板每孔加入 1 mL TRIzol，充分吹打裂解细胞，收集裂解液并于 4 ℃、12 000 g 离心 5 min。取上清液，加入 200 μL 氯仿，振荡混匀后 4 ℃、12 000 g 离心 15 min。移除上层水相后，加入 500 μL 异丙醇沉淀 RNA，4 ℃、12 000 g 离心 15 min 后收集沉淀。用 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀，4 ℃、7 500 g 离心 5 min，弃上清液，收集下层的 RNA 沉淀。使用 NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度与纯度，琼脂糖凝胶电泳评估完整性，Agilent 2100 测定 RNA 完整值（RIN 值）。建库要求 RNA 总量≥1 μg，浓度≥35 ng/μL，且 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ ， $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.0$ 。

mRNA 的 Oligo dT 富集：利用带有 Oligo（dT）的磁珠与 mRNA 的 polyA 尾互补配对，从总 RNA 中分离 mRNA 用于转录组分析。

mRNA 片段化：使用 RNA 片段化缓冲剂将完整 mRNA 随机打断，并通过磁珠筛选获得约 300 bp 的片段，以适应 Illumina Novaseq 6000 平台的短序列测序要求。

cDNA 合成：以片段化 mRNA 为模板，加入随机六碱基引物，在逆转录酶作用下合成一链 cDNA，随后合成二链，形成双链 cDNA。

连接（adaptor）：使用末端修复混合液将双链 cDNA 补平为平末端，并在 3'端添加“A”碱基，进而连接 Y 字形接头。

Illumina 测序：PCR 扩增（15 个循环），回收目的条带并定量，经桥式 PCR 扩增生成 DNA 簇，在 Illumina Novaseq 6000 平台上进行测序（PE 文库，读长 2×150 bp）。测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.9 测序数据质控与分析

由于原始测序数据中常含有测序接头、低质量读

段、高 N 率序列以及长度过短的序列，这些因素会严重影响后续分析结果的可靠性。因此，为保证数据准确性，需对原始数据进行质控，以获取高质量的 clean data。质控步骤采用 fastp 软件，依次执行以下处理：去除 reads 中的接头序列及无插入片段的 reads；对序列 5'端和 3'端进行低质量碱基修剪；剔除含 N 碱基数目超过 5 的 reads；过滤掉修剪后长度低于 30 bp 的序列。完成质控后，对 clean reads 进行统计与质量评估，并比对至鸭基因组。基因表达量采用每百万转录本数（transcripts per million reads，TPM）方法进行比较。此外，为鉴定比较组间的差异表达基因/转录本，本研究使用 DESeq2 软件对原始计数（raw counts）进行基于负二项分布的统计分析，筛选条件设定为校正后 P 值 < 0.05 且 $|\log_2[FC]| \geq 1$ 。

1.10 差异性表达基因的注释与分析

使用 Goatools 对目标基因集进行 GO 富集分析，了解该基因主要的 GO 功能，通过 Fisher 精确检验，校正后 P 值 < 0.05 视为显著富集。同时，采用 R 脚本进行 KEGG 通路富集分析，其统计方法与 GO 富集一致，以校正后 P 值 < 0.05 作为 KEGG 通路显著富集的阈值。

1.11 RT-qPCR

提取对照组与攻毒组原代鸭 LC 细胞的总 RNA（TRIzol 法）进行 RT-qPCR 试验。根据转录组筛选结果，选取类固醇激素生物合成和 PI3K-AKT 信号通路中相关的差异表达基因，利用 Primer3 Input（version 4.1.0）设计相应引物（表 1）。反应在荧光定量 PCR 仪上进行，程序设置：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 10 s，60 ℃ 退火延伸 30 s，共 40 个循环。试验以 β-actin 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

表 1 原代鸭 LC 中差异表达基因 RT-qPCR 分析所用引物

基因	NCBI 登录号	上游引物序列（5'→3'）	下游引物序列（5'→3'）
ApoB	XM_005012904.6	CACCTTCTGCTGGGACCTTA	AGTCTTTGGCAGCATCCTCT
HSD3B	XM_038183577.2	CCATGCCTCTGACAATGCTG	TTGCCTCTTCCCACGTGTAA
HSD17B11	XM_027459191.3	CACACCTGCAGCAGTAACAG	TAGCTGCTCTGACCCCAAAA
LCAT	NM_001310370.2	TGTGGGAGGACATGAAGGAC	CCCCGTAAATCATGTCCACG
LAL	XM_038180975.2	TGCCCATGAGAAGTGTCTT	CCAACATAGGGACGTGAAGC
PCSK9	XM_038182856.2	CATCACCACAGGAGCACAAC	TGACAACACAAACAGCCTCG
SOAT	XM_027462933.3	CGATTTGGAATGTTCTGATGTGG	AGAGGACAGTGCTGACGCTG
PIK3CA	XM_027464233.3	GCCATCTTATTCCAGGCGTA	GGTTCCCTCCATGGTAGAT

续表1

基因	NCBI 登录号	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
PIK3R1	XM_038170176.2	AAATCCCATCATTCACAGCAG	GCTGGAGGCTTGACAAAGTC
PIK3R2	XM_027472381.3	AACGAGAGGACCAAGCAGAA	GGAGAGGAGACCCTTGCTCT
PIK3CG	XM_072032638.1	GCCCAAGCACAGGATAACAT	GCAGCTTAGGATACGCCTTG
β-actin	NM_001310421.1	GATCTGGCACCACACCTTCT	GCTACATACATGGCTGGGGT

注：ApoB 为载脂蛋白 b，HSD3B 为 3β-羟基类固醇脱氢酶，HSD17B11 为 17β-羟基类固醇脱氢酶 11 型，LCAT 为卵磷脂胆固醇酯转移酶，LAL 为溶酶体酸性脂肪酶，PCSK9 为前蛋白转化酶枯草溶菌素 9，SOAT 为固醇 O-酰基转移酶 1，PIK3CA、PIK3CG 分别为磷脂酰肌醇 4，5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α 和 γ，PIK3R1、PIK3R2 分别为磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 1 和 2。

1.12 数据统计与分析

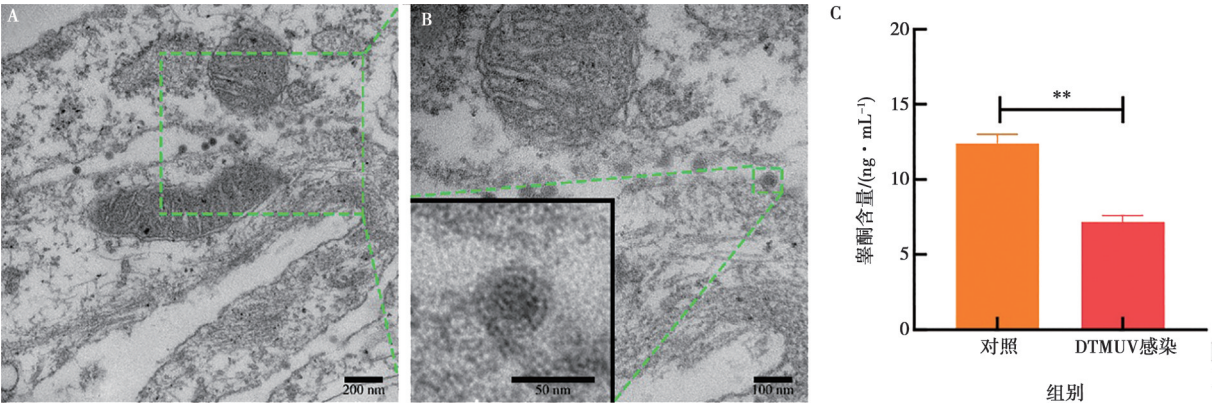
统计对照组和 DTMUV 感染组原代鸭 LC 细胞中类固醇激素生物合成和 PI3K-AKT 信号通路中相关基因的变化，结果以“平均值±标准误”表示。SPSS 27.0.1 进行统计分析，差异性比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞的睾酮水平检测

在原代鸭 LC 细胞被 DTMUV 感染 48 h 后，收集

细胞并进行超微结构观察，结果显示（图 1A、B），在透射电子显微镜下，可见清晰的病毒颗粒，这表明原代鸭 LC 细胞能够被 DTMUV 所感染；同时，收集对照组和感染组细胞上清液，并进行睾酮水平的 ELISA 检验，结果显示（图 1C），与对照组相比，在 DTMUV 感染 48 h 后，原代鸭 LC 细胞上清液中的睾酮水平显著下降。上述结果表明，DTMUV 能够感染原代鸭 LC 细胞，并降低其睾酮产生水平。



A. DTMUV 感染后的原代鸭 LC 细胞的超微结构；B. DTMUV 病毒；C. DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞 48 h 后睾酮水平的变化。* * 表示 $P<0.01$ 。

图1 DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞

2.2 RNA-Seq 筛选 DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞后的差异表达基因 (DEG)

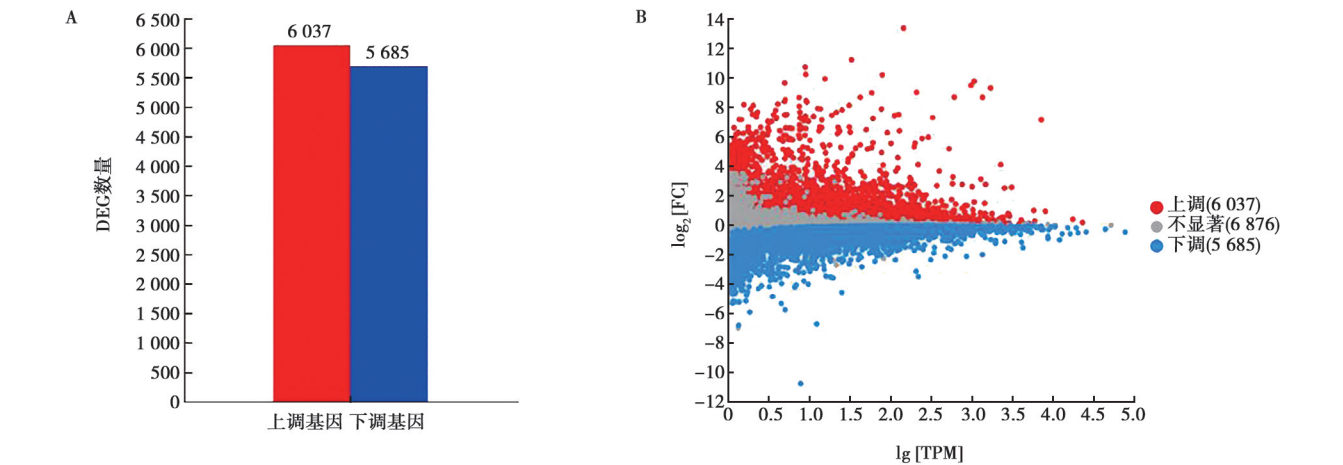
收集对照组和 DTMUV 感染后 48 h 的原代鸭 LC 细胞样本，并以此构建了 2 个文库，进而基于 Illumina Novaseq 6000 平台进行 RNA-Seq 分析，RNA-Seq 测序结果见表 2。将以上数据与麻鸭的参考基因组比对，结果显示，各样本匹配率在 79.36%~81.39% 间。同时，进一步采用 DESeq2 软件（以校正后 P 值 <0.05 且 $|\log_2[FC]| \geq 1$ 为阈值）对原始计数进行差异分析，共鉴定到 11 722 个 DEG，其中 6 037 个基因表达上调，5 685 个基因表达下调（图 2）。

2.3 GO 和 KEGG 功能富集分析

以 $|\log_2[FC]| \geq 0$ 且校正后 P 值 <0.5 作为阈值，对 DEG 进行了功能富集分析。GO 分析涵盖分子功能 (molecular function)、细胞组分 (cellular component) 和生物学过程 (biological process) 三个类别，图 3 列出显著富集前 20 的条目，其中富集程度最高的前 20 项展示于图 4。在生物学过程中，DEG 主要参与细胞过程 (cellular process)、生物学调控 (biological regulation) 和代谢过程 (metabolic process)；在细胞组分中，主要富集于细胞组分 (cell part) 和膜组分 (membrane part)；在分子功能方面，则主要涉及结合 (binding) 和催化活性 (catalytic activity)。

表 2 对照组和 DTMUV 感染组测序 reads 统计

样本	序列总数	总比对		多重比对		唯一比对	
		数量	占比/%	数量	占比/%	数量	占比/%
C48_1	49 909 760	40 017 439	80. 18	1 303 550	2. 61	38 713 889	77. 57
C48_2	58 841 762	47 889 828	81. 39	1 548 964	2. 63	46 340 864	78. 76
C48_3	50 729 530	41 065 667	80. 95	1 264 486	2. 49	39 801 181	78. 46
V48_1	56 034 102	44 468 843	79. 36	1 417 524	2. 53	43 051 319	76. 83
V48_2	53 306 480	42 440 809	79. 62	1 353 027	2. 54	41 087 782	77. 08
V48_3	56 529 026	45 121 675	79. 82	1 411 179	2. 5	43 710 496	77. 32



A. 差异基因的柱状图 (V48 vs C48); B. 对照组和 DTMUV 感染 48 h 后原代鸭 LC 细胞差异基因的表达式差异 MA 图 (TPM 是基因表达量的标准化单位, 消除了测序深度和基因长度的影响)。

图 2 对照组和 DTMUV 感染组原代鸭 LC 细胞中 DEG 统计

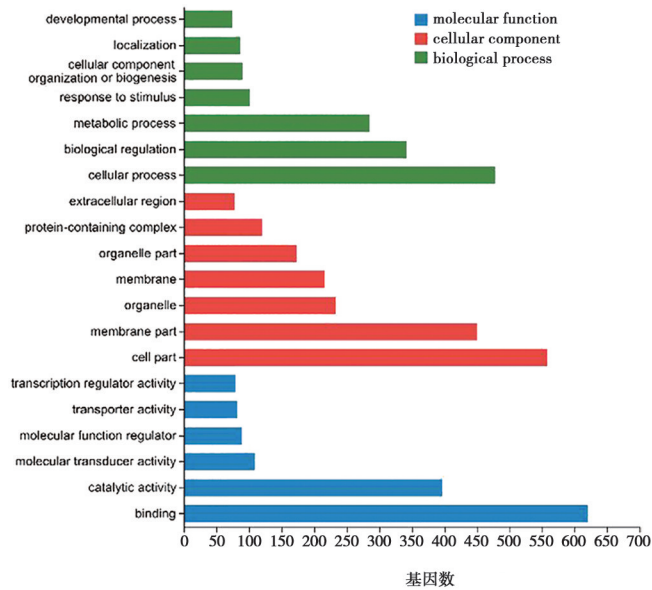


图 3 GO 分类统计

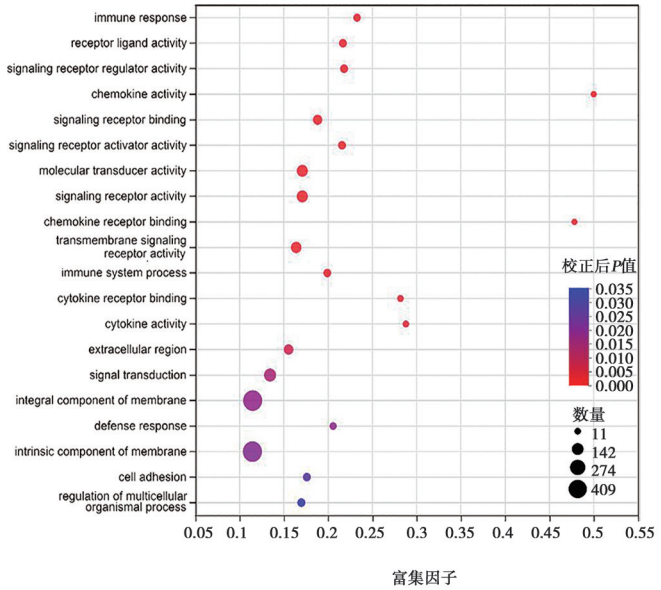


图 4 DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞后 DEG 最为富集的前 20 条 GO 条目

KEGG 富集分析结果显示 (图 5), 最显著富集的通路包括细胞因子-细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction)、神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、癌症通路 (pathways in cancer), 以及与类固

醇激素合成相关的脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、类固醇激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis) 和 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)。

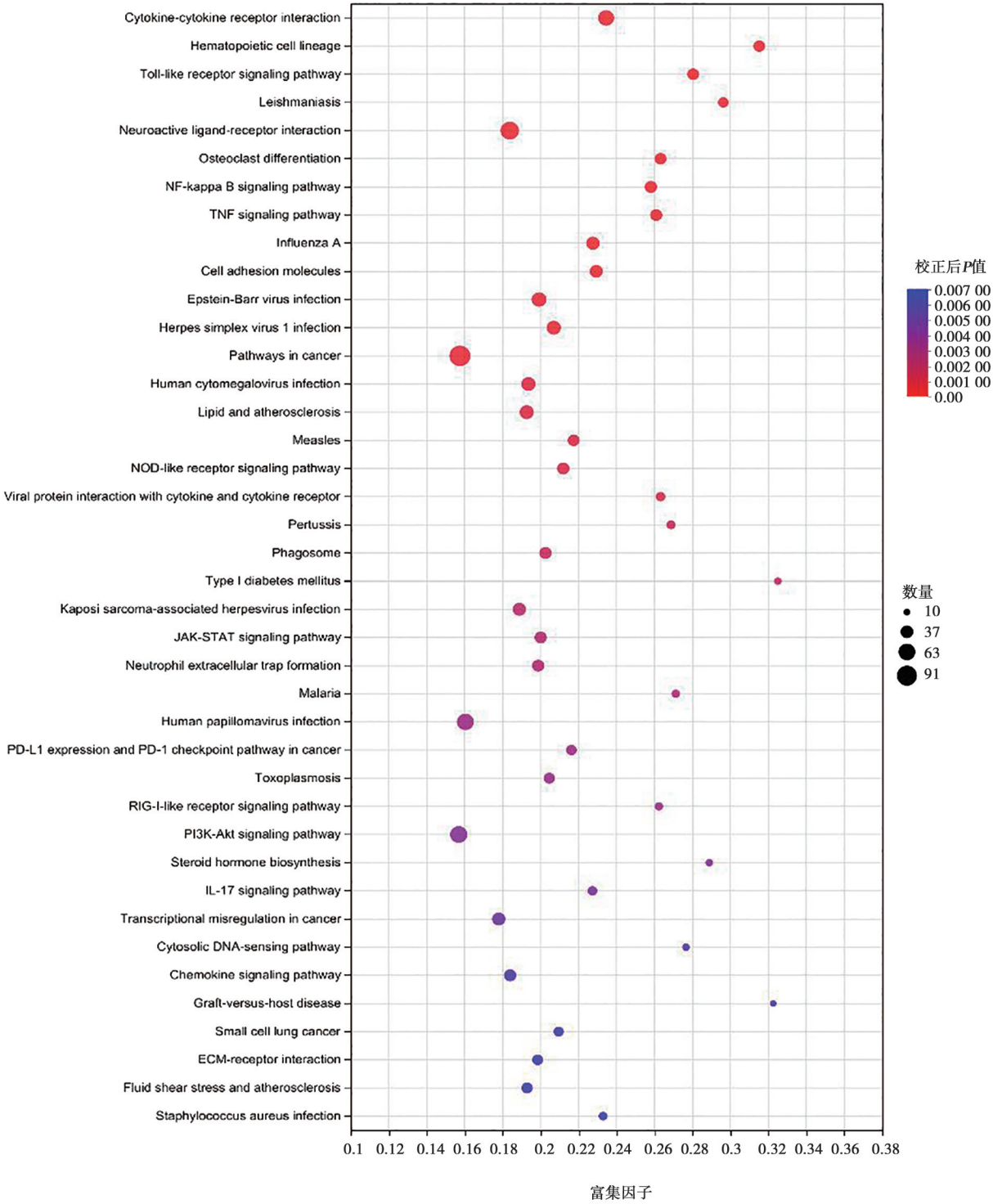
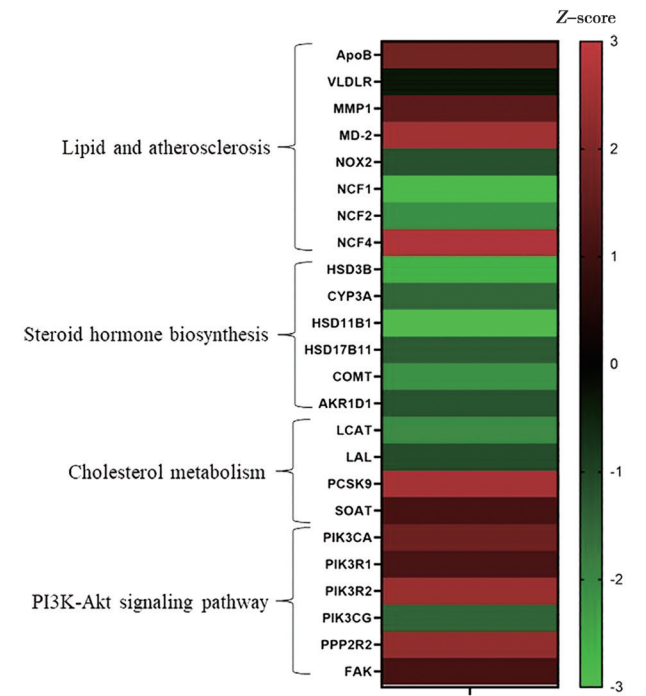


图 5 DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞后 DEG 最为富集的前 40 条 KEGG 通路

2.4 类固醇激素合成相关 DEG 的鉴定

在 DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞后，LC 细胞中胆固醇代谢的调控机制 PI3K-AKT 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）受到显著干扰（图 6），涉及 12 个上调基因和 8 个下调基因（表 3）。类固醇激素生物合成（steroid hormone biosynthesis）途径被显著抑制（图 6），进一步分析发现，伴随睾酮合成过程中 3 个基因上调和 9 个基因下调（表 4）。胆固醇代谢（cholesterol metabolism）途径也受到影响，涉及 3 个上调和 3 个下调的基因（表 5）。此外，部分基因还参与脂质与动脉粥样硬化（lipid and atherosclerosis）相关通路，涉及 5 个上调基因和 8 个下调基因（表 6）。



注：VLDLR 为极低密度脂蛋白受体，MMP1 为基质金属蛋白酶-1，MD2 为髓样分化蛋白-2，NOX2 为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶-2，NCF1、NCF2、NCF4 分别为中性粒细胞胞质因子 1、2 和 4，HSD3B 为 3β-羟基类固醇脱氢酶，CYP3A 为细胞色素 P450 3A，HSD11B1 为 11β-羟基类固醇脱氢酶 1 型，COMT 为儿茶酚-O-甲基转移酶，AKR1D1 为醛酮还原酶家族 1 成员 D1，PPP2R2 为蛋白磷酸酶 2 调节亚基，FAK 为黏附斑激酶。

图 6 DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞后 DEG 表达模式热图

表 3 参与 PI3K-AKT 信号通路的主要 DEG

项目	基因编号	TPM 值		差异 倍数	P 值	基因名称
		处理组	对照组			
上调 基因	gene3921	11.45	3.80	1.58	1.01	AREG
	gene6331	6.16	2.53	1.73	1.99	PIK3CD
	gene3710	58.83	22.85	1.17	3.09	PIK3R3
	gene13103	4.95	0.82	2.28	1.89	PPP2R2
	gene1103	49.44	28.33	0.57	7.03	PIK3R1
	gene15268	27.31	18.07	0.59	5.71	PIK3CA
	gene11805	56.43	25.47	1.13	7.51	PHLPP
	gene13715	7.55	1.77	2.10	2.45	GYS
	gene14575	203.43	86.31	1.32	1.40	P21
	gene10597	23.88	4.96	2.64	4.02	CREB5
	gene8491	144.82	60.36	1.29	8.05	NFKB1
	gene5104	6.12	1.41	2.14	3.32	MYB
下调 基因	gene18803	4.92	17.47	-1.86	0.003 6	DDIT4
	gene5115	30.03	76.48	-1.36	2.36	SGK1
	gene11713	0.10	0.79	-2.96	9.34	TLR2
	gene16242	0.06	0.78	-3.75	5.51	TLR4
	gene18535	72.44	113.75	-0.67	3.68	PIK3R2
	gene20961	0.16	0.73	-2.22	0.000 4	PIK3R5
	gene365	0.92	2.10	-1.21	0.002 1	CCNE2
	gene19827	15.02	30.89	-1.05	1.31	IKBKB

表 4 参与类固醇激素生物合成的主要 DEG

项目	基因编号	TPM 值		差异 倍数	P 值	基因名称
		处理组	对照组			
上调 基因	gene12067	2.39	0.31	3.02	3.94	CYP11A
	gene10957	6.62	1.59	2.47	1.27	HSD17B3
	gene5690	7.10	0.26	4.79	1.22	E7.6.2.1
下调 基因	gene19112	0.20	1.27	-2.65	0.000 3	HSD3B
	gene3447	2.69	7.73	-1.57	4.15	CYP2D
	gene10889	16.59	43.74	-1.54	1.32	CYP3A
	gene12248	1.60	3.74	-1.24	0.004 0	AKR1D1
	gene8012	1.30	9.86	2.97	2.48	HSD11B1
	gene16272	1.51	3.93	-1.40	0.000 3	HSD11B2
	gene14954	158.34	711.78	-2.15	0.117 6	COMT
	gene10889	16.59	43.74	-1.54	1.32	CYP3A
	gene3951	2.04	4.52	-1.35	0.000 6	HSD17B11

表 5 参与胆固醇代谢的主要 DEG

项目	基因编号	TPM 值		差异 倍数	P 值	基因名称
		处理组	对照组			
上调	gene10066	116.35	52.05	1.12	9.81	SOAT
基因	gene4063	0.61	0.17	1.81	1.93	APOB
	gene11590	8.24	1.30	2.57	1.97	PCSK9
下调	gene5268	14.83	60.55	-2.05	1.38	LCAT
基因	gene7566	0.31	1.80	-2.65	2.55	CD36
	gene8158	0.26	0.55	-1.14	0.000 6	LAL

表 6 参与脂质和动脉粥样硬化的主要 DEG

项目	基因编号	TPM 值		差异 倍数	P 值	基因 名称
		处理组	对照组			
上调	gene4063	0.61	0.17	1.81	1.93	ApoB
基因	gene1702	6.27	2.23	1.48	1.13	MMP1
	gene11957	3.64	0.63	2.52	9.55	MD-2
	gene8438	11.12	4.84	1.18	2.52	POU2F1
	gene14177	9.00	1.32	2.59	1.58	p38

续表 6

项目	基因编号	TPM 值		差异 倍数	P 值	基因 名称
		处理组	对照组			
下调	gene5300	1.13	2.61	-1.22	3.60	NOX2
基因	gene8577	0.48	3.53	-2.88	1.51	NCF1
	gene1054	0.21	0.95	-2.13	0.0056	NCF2
	gene11713	0.10	0.79	-2.96	9.34	TLR2
	gene1175	0.30	0.77	-1.37	0.0197	CD14
	gene16242	0.06	0.78	-3.75	8.63	TLR4
	gene7566	0.31	1.80	-2.65	2.55	CD36
	gene16242	0.06	0.78	-3.75	8.63	TLR4

2.5 原代鸭 LC 细胞中关键 DEG 的验证

选出 12 个 DEG（SOAT、HSD17B11、ApoB、HSD3B、LCAT、LAL、PIK3CA、PIK3R1、PCSK9、PIK3R2 和 PIK3CG）进行 RT-qPCR 验证，结果显示，这些基因的表达变化趋势与 RNA-Seq 测序所得的转录丰度一致（图 7），表明转录组测序数据具有较好的可靠性与准确性。

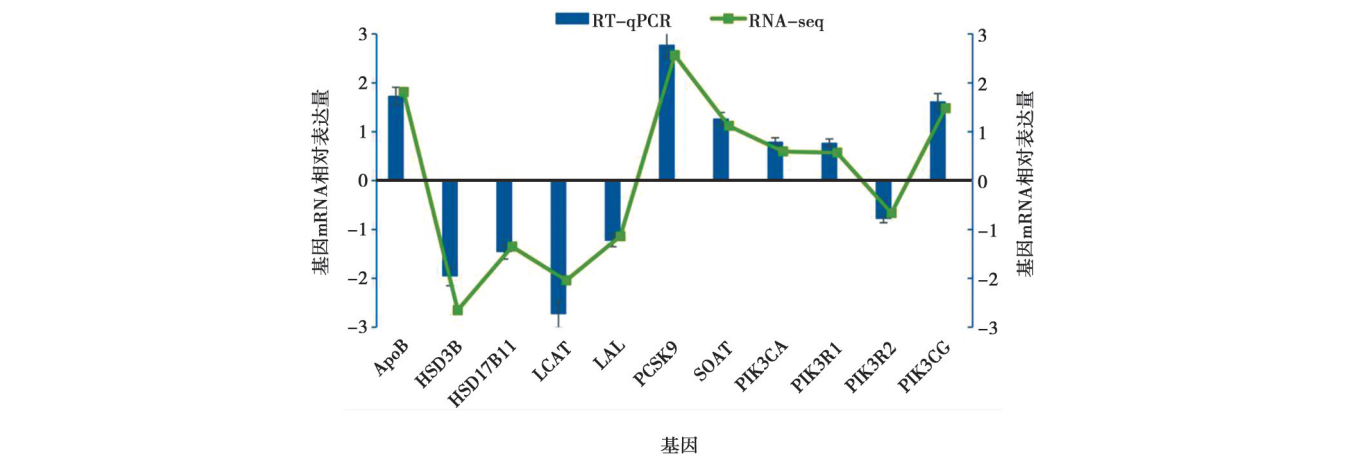


图 7 RT-qPCR 验证的基因 mRNA 表达水平与其在 RNA-Seq 中转录丰度比较

3 讨论

近年来，随着高通量测序技术的发展，RNA-Seq 已被广泛应用于病毒与宿主相互作用的研究中^[11]。在黄病毒与宿主生殖系统方面的研究显示^[12]，ZIKV 感染支持细胞后，RNA-Seq 分析表明，在病毒复制高峰期，模式识别受体 (PPRs) (如 TLR3、TLR7 和 MAVS) 及其下游干扰素调节因子 (IRF)、I 型和 III 型干扰素、促炎细胞因子均显著富集。同时，ZIKV 能够感染 BALB/c 乳鼠下丘脑中的神经内分泌细胞，引起下丘脑-垂体-性腺轴激素分泌长期紊乱，造成乳鼠睾丸发育迟缓、精子质量下降和行为

异常，最终导致其生育能力下降^[13]。并且，ZIKV 感染能够通过其非结构蛋白 NS2A (ZIKV-NS2A) 的结合作用，损害细胞色素 P450 家族 17 亚族 A 成员 1 (CYP17A1) mRNA 的翻译过程，从而降低 CYP17A1 表达并最终减少睾酮合成^[14]。此外，ZIKV 还可以影响多种细胞免疫通路，激活强烈的抗病毒防御反应^[15]。另一项关于 JEV 的研究发现，感染猪睾丸细胞后出现 100 多个差异表达的 miRNA，其中显著差异的 miRNA 主要参与免疫应答、细胞因子产生、炎症及细胞凋亡等关键生物学过程^[16]。

本研究关注的 DTMUV，其感染主要导致蛋鸭产蛋量下降，现有研究多集中于卵巢病变与卵泡闭锁机

制^[2,17-18]。为了阐明 DTMUV 与宿主生殖系统的互作机制,多种高通量测序技术被应用于解析其致病机制。其中,蛋白质组学分析技术被用于解析 DTMUV 感染后鸭卵泡蛋白的变化,共鉴定出 131 个差异表达蛋白(其中 53 个上调,78 个下调),主要参与细胞结构、RNA 加工、囊泡运输、蛋白质合成与修饰、信号转导及线粒体途径等过程^[19]。此外,RNA-Seq 被用于解析 DTMUV 感染鸭卵泡膜细胞后的差异基因,结果显示差异表达基因主要涉及免疫系统、脂质代谢与转运以及卵泡发育相关通路^[20]。这些高通量测序结果推动了 DTMUV 与宿主雌性生殖系统互作机制的解析,同时为 DTMUV 感染致产蛋率下降提供了重要线索。然而,目前尚缺乏 DTMUV 与宿主雄性生殖系统互作的高通量测序研究。基于此,本研究将对对照组和 DTMUV 感染 48 h 的原代鸭 LC 细胞进行转录组测序,结果显示,差异表达基因主要富集于细胞过程、生物调节和代谢过程等相关类别,KEGG 通路分析突出表现为类固醇激素生物合成、PI3K-AKT 信号通路、细胞因子-受体相互作用、神经活性配体-受体相互作用以及类固醇合成相关的脂质与动脉粥样硬化通路。这表明,DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞后,能够对 LC 细胞的类固醇激素以及细胞因子的合成与分泌造成显著影响。

睾酮作为 LC 细胞合成的最主要雄激素,它能够推动并维持精子发生的进行^[21-22],并且睾酮的缺乏会在减数分裂阶段扰乱其精子发生过程^[10,23-24]。睾酮的合成原料为胆固醇^[25],其合成过程始于转位因子蛋白(TSPO)介导的胆固醇线粒体转运,随后由细胞色素 P450 家族 11 亚族 A 成员 1(CYP11A1)催化转化为孕烯醇酮,再经 3 β -羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD)、CYP17A1 和 17 β -羟基类固醇脱氢酶(17 β -HSD)等酶依次催化生成睾酮^[26]。本研究中,DTMUV 感染导致 3 β -HSD、CYP3A、HSD11B1 和 HSD17B1 等关键睾酮合成基因表达显著下调。HSD17B1 可以作为辅助因子,催化雄烯二酮转化为睾酮,而该酶的缺乏则会使雄烯二酮转化为睾酮受阻。同时,HSD11B1 可间接参与睾酮代谢,它主要通过催化可的松转化为活性的皮质醇。这也从分子层面解释了前期动物试验中观察到的血清及睾丸组织睾酮水平降低的原因。

本研究进一步分析表明,DTMUV 感染原代鸭 LC 细胞后的差异基因还富集于脂质与动脉粥样硬化及胆固醇代谢通路。LC 细胞获取胆固醇的途径主要包括细胞内合成和胞外脂蛋白摄取^[27]。脂质与动脉粥样硬化及胆固醇代谢通路的变化,可能反映了胆固醇和脂质代谢的变化。RNA-Seq 结果显示,DTMUV 感染

原代鸭 LC 细胞后,其载脂蛋白 ApoB 和极低密度脂蛋白受体 VLDLR 表达上调,提示胞内胆固醇合成途径可能紊乱,从而激活了外源性脂蛋白摄取通路。结合先前研究^[4]可知,DTMUV 感染鸭 LC 细胞,可导致其睾酮水平下降、干扰其类固醇激素合成通路,并上调 ApoB 的表达量。同时,ApoB 的调控涉及营养与激素等多种因素,在肝细胞中已知 PI3K-Akt-mTORC1 通路可通过 ApoB mRNA 5'UTR 与 RNA 结合蛋白作用抑制其翻译^[28];同时,MTTP 介导的酯化及载脂蛋白 C3(ApoC III)均能促进 ApoB 分泌,转录过程受 FoxO1 调控,而 FoxO1 本身受 PI3K-Akt 通路抑制^[29]。因此,PI3K-Akt-FoxO1 轴在肝细胞中可多层面调控 ApoB 合成与分泌。

在本研究中,DTMUV 感染鸭 LC 细胞后 PI3K-Akt 通路显著富集,且 ApoB 表达上升,推测 PI3K-Akt 通路可能被激活,进而促进 ApoB 合成,影响低密度脂蛋白摄入过程,最终导致胆固醇供应异常与睾酮合成障碍。本研究的 RNA-Seq 结果将从差异基因的角度阐明 DTMUV 抑制鸭睾酮合成与精子活力的分子机理,从而为鸭规模化养殖提供全新的疫病防控策略。然而,DTMUV 感染下 LC 细胞中 PI3K-Akt 通路的具体调控作用及其对 ApoB 合成与分泌的影响机制,仍有待进一步阐明。

综上,本研究对 DTMUV 感染 48 h 后的原代鸭 LC 细胞进行转录组测序分析,结果显示差异表达基因显著富集于类固醇激素生物合成、脂质与动脉粥样硬化、PI3K-AKT 信号通路及胆固醇代谢等相关通路。进一步分析发现,DTMUV 可能通过激活 PI3K-Akt 通路促进细胞内 ApoB 合成,干扰 LDL 内吞过程,最终引起胆固醇和睾酮合成障碍。

参考文献:

- [1] Yan Z, Shen H, Wang Z, et al. Isolation and characterization of a novel tembusu virus circulating in Muscovy ducks in South China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64 (5): e15-e17.
- [2] Lv C, Li R, Liu X, et al. Pathogenicity comparison of duck Tembusu virus in different aged Cherry Valley breeding ducks [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15 (1): 282.
- [3] Wu L, Liu J, Chen P, et al. The sequential tissue distribution of duck Tembusu virus in adult ducks [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 703930.
- [4] Huang Y, Chu X, Zhang Y, et al. Duck Tembusu virus infection causes testicular atrophy [J]. *Theriogenology*, 2022, 188: 52-62.
- [5] 陈珍,施少华,刘荣昌,等.种公鸡精液在坦布苏病毒感染传播中的作用[J].*中国兽医学报*, 2019, 39 (7): 1275-1279.
- [6] Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika virus causes testis damage and

- leads to male infertility in mice [J]. *Cell*, 2016, 167 (6): 1511–1524. e10.
- [7] Uraki R, Hwang J, Jurado K A, et al. Zika virus causes testicular atrophy [J]. *Sci Adv*, 2017, 3 (2): e1602899.
- [8] Zheng B, Wang X, Liu Y, et al. Japanese Encephalitis Virus infection induces inflammation of swine testis through RIG-I–NF- κ B signaling pathway [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 238: 108430.
- [9] Smith L B, Walker W H. The regulation of spermatogenesis by androgens [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 30: 2–13.
- [10] Cooke P S, Walker W H. Male fertility in mice requires classical and nonclassical androgen signaling [J]. *Cell Rep*, 2021, 36 (7): 109557.
- [11] van Aerle R, Santos E M. Advances in the application of high-throughput sequencing in invertebrate virology [J]. *J Invertebr Pathol*, 2017, 147: 145–156.
- [12] Stassen L, Armitage C W, Van der Heide D J, et al. Zika virus in the male reproductive tract [J]. *Viruses*, 2018, 10 (4): 198.
- [13] Liu L B, Yang W, Chang J T, et al. Zika virus infection leads to hormone deficiencies of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and diminished fertility in mice [J]. *J Virol*, 2023, 97 (10): e0100623.
- [14] Yang W, Li H, Wang S, et al. Zika virus disrupts steroidogenesis and impairs spermatogenesis by stalling the translation of CYP17A1 mRNA [J]. *Nat Commun*, 2025, 16 (1): 6756.
- [15] Strange D P, Green R, Siemann D N, et al. Immunoprofiles of human Sertoli cells infected with Zika virus reveals unique insights into host–pathogen crosstalk [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 8702.
- [16] Kumar M, Sahoo G C, Das V N R, et al. A review of miRNA regulation in Japanese encephalitis (JEV) virus infection [J]. *CPB*, 2024, 25 (5): 521–533.
- [17] Ninvilai P, Nonthabenjawan N, Limcharoen B, et al. The presence of duck Tembusu virus in Thailand since 2007: a retrospective study [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (5): 1208–1216.
- [18] Su J, Li S, Hu X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3): e18106.
- [19] Han K, Zhao D, Liu Y, et al. Quantitative proteomic analysis of duck ovarian follicles infected with duck tembusu virus by label-free LC–MS [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 463.
- [20] 孙梦许. 坦布苏病毒 E 蛋白氨基酸突变对病毒致病力影响研究及感染鸭卵泡膜细胞转录组学分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2020. 1–117.
- [21] Neto F T, Bach P V, Najari B B, et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59: 10–26.
- [22] Sharma A, Minhas S, Dhillon W S, et al. Male infertility due to testicular disorders [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106 (2): e442–e459.
- [23] Cooke P S, Walker W H. Nonclassical androgen and estrogen signaling is essential for normal spermatogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 121: 71–81.
- [24] Toocheck C, Clister T, Shupe J, et al. Mouse spermatogenesis requires classical and nonclassical testosterone signaling [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94 (1): 11.
- [25] Wang Z, Shen L, Wu M, et al. The relationship between remnant cholesterol and low testosterone in adult males [J]. *J Sex Med*, 2025, 22 (2): 258–264.
- [26] Bhattacharya I, Dey S. Emerging concepts on Leydig cell development in fetal and adult testis [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1086276.
- [27] Millington K, Chan Y M. Lipoprotein subtypes after testosterone therapy in transmasculine adolescents [J]. *J Clin Lipidol*, 2021, 15 (6): 840–844.
- [28] Sidiropoulos K G, Zastepa A, Adeli K. Translational control of apolipoprotein B mRNA *via* insulin and the protein kinase C signaling cascades: evidence for modulation of RNA–protein interactions at the 5'UTR [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 459 (1): 10–19.
- [29] Taskinen M R, Björnson E, Matikainen N, et al. Postprandial metabolism of apolipoproteins B48, B100, C-III, and E in humans with APOC3 loss-of-function mutations [J]. *JCI Insight*, 2022, 7 (19): e160607.