



廖艳鹏, 曾宇航, 经岱昀, 任超. 非复制型尿嘧啶营养缺陷型弓形虫刺激雏鸡胸腺细胞的转录组学分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(9): 122-134.
LIAO Yanpeng, ZENG Yuhang, JING Daiyun, REN Chao. Transcriptome analysis of chicken thymocytes stimulated by nonreplicating *Toxoplasma uracil* auxotrophs[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(9): 122-134.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.09.11

非复制型尿嘧啶营养缺陷型弓形虫刺激雏鸡胸腺细胞的 转录组学分析

廖艳鹏 曾宇航 经岱昀 任超*

(天津农学院 动物科学与动物医学学院/天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392)

摘要 为研究非复制型尿嘧啶营养缺陷型弓形虫(Nonreplicating *Toxoplasma uracil* auxotrophs, NRTUAs)在转录组水平对雏鸡胸腺的免疫调节作用,本研究以接种NRTUAs虫株3 d的雏鸡为试验对象,利用RNA-seq技术对其胸腺组织进行转录组测序以挖掘其中的差异表达基因(DEGs),进而对得到的DEGs进行GO功能注释、KEGG信号通路富集分析和蛋白互作网络分析。结果表明:1)筛选出964个DEGs,其中517个基因表达上调,447个表达下调。2)通过GO功能注释发现差异基因在生物过程、细胞组分和分子功能三大类别显著富集在免疫应答、防御反应、对外界刺激反应、对刺激反应、细胞外区域、细胞表面等条目。3)KEGG信号通路富集分析发现DEGs显著集中在细胞因子及其受体相互作用、IgA产生的肠道免疫网络、细胞粘附分子、Toll样受体信号通路等通路上。4)通过蛋白互作网络分析发现9个重要的关键分子,其中IL-6和IL-18具有调节细胞分化促进干扰素产生的功能,IRF1和IRF7能够调节巨噬细胞等细胞的活化以及抗原递呈能力,SOCS1能够防止STAT1信号通路异常活跃而导致的过度炎症反应,CCL4、CCR5和CCL20作为趋化因子能够诱导多种免疫细胞浸润炎症区域,CD40能够增强抗原递呈进而调节机体的免疫功能。综上,NRTUAs虫株刺激雏鸡胸腺后,胸腺细胞的增殖活动减弱,T细胞活化以及细胞因子分泌等活动增强,并且IL-6、IL-18、IRF1、IRF7、SOCS1、CCL4、CCR5、CCL20和CD40是NRTUAs虫株调节雏鸡胸腺细胞的重要分子,本研究为深入探讨NRTUAs虫株调节家禽胸腺的先天性免疫反应的分子机制提供了理论依据。

关键词 非复制型尿嘧啶营养缺陷型弓形虫; 转录组学; 雏鸡; 胸腺

中图分类号 S852.72

文章编号 1007-4333(2024)09-0122-13

文献标志码 A

Transcriptome analysis of chicken thymocytes stimulated by nonreplicating *Toxoplasma uracil* auxotrophs

LIAO Yanpeng, ZENG Yuhang, JING Daiyun, REN Chao*

(Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry/College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China)

Abstract In order to investigate the immunomodulatory effects of nonreplicating *Toxoplasma uracil* auxotrophs (NRTUAs) on the thymus of chickens at the transcriptional level, this study employed RNA-seq technology to conduct transcriptome sequencing on thymus of chickens inoculated with NRTUAs for 3 days, which aimed to identify differentially expressed genes (DEGs). Then, the identified DEGs were conducted by GO analysis, enrichment analysis of KEGG signaling pathways, and protein-protein interaction network analysis. The results showed that: 1) 964 DEGs were screened, of which 517 genes were upregulated and

收稿日期: 2024-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31902277); 中央引导地方科技发展资金科技成果转化项目(23ZYCGSN00080)

第一作者: 廖艳鹏(ORCID: 0009-0006-0890-3249), 硕士研究生, E-mail: 13051584421@163.com

通讯作者: 任超(ORCID: 0000-0002-1994-6876), 实验师, 主要从事兽医免疫学与寄生虫学研究, E-mail: chaoren04050110@163.com

447 genes were downregulated. 2) Through GO functional annotation, it was found that differentially expressed genes were significantly enriched in immune response, defense response, response to external stimulus, response to stimulus, extracellular region, cell surface, and other categories. 3) KEGG signaling pathway enrichment analysis revealed that DEGs were mainly involved in pathways such as cytokine-cytokine receptor interactions, intestinal immune network for IgA production, cell adhesion molecules, Toll-like receptor signaling pathway. 4) Through protein-protein interaction network analysis, nine important key molecules were analyzed, among which IL-6 and IL-18 molecules had the function of regulating cell differentiation and promoting interferon production. IRF1 and IRF7 can regulate the activation of macrophages and other cells as well as antigen presentation ability. SOCS1 can prevent excessive inflammatory response caused by overactive STAT1 signaling pathway. CCL4, CCR5 and CCL20 as chemokines, can induce infiltration of various immune cells in inflammatory areas. CD40 can enhance antigen presentation and regulate the immune function of the body. In conclusion, stimulation of the chicken thymus with NRTUAs at the transcriptional level resulted in a reduction in thymocyte proliferation activity, enhanced activation of T cells, and increased secretion of cytokines. The molecules IL-6, IL-18, IRF1, IRF7, SOCS1, CCL4, CCR5, CCL20 and CD40 played crucial roles in the regulation of NRTUAs in the chicken thymocyte cells. This study provides a theoretical foundation for further exploring the molecular mechanisms of NRTUAs regulating the innate immune response in poultry thymus.

Keywords nonreplicating *Toxoplasma* uracil auxotrophs; transcriptomics; chickens; thymus

弓形虫是一种呈世界性流行的人畜共患寄生虫。根据从数据库中统计的1993—2021年的中国弓形虫病例发现,禽弓形虫病总体血清抗体阳性率为4.95%,其中散养鸡的阳性率显著高于集约化养殖模式^[1]。据报道在我国的张家口坝下地区散养鸡血清抗体阳性率为11.01%,而在河南地区散养鸡的弓形虫血清阳性率高达18.86%^[2-3]。目前,弓形虫病的治疗主要采用乙胺嘧啶和磺胺嘧啶等药物,但应用于养殖业,具有药物残留和耐药性等问题,而弓形虫病的预防,也缺少有效的商品化疫苗^[4-5]。因此,研发一种安全高效的禽用弓形虫疫苗十分必要。

非复制型尿嘧啶营养缺陷型弓形虫(Nonreplicating *Toxoplasma* uracil auxotrophs, NRTUAs)是一种因尿嘧啶合成缺陷而无法进行复制的弓形虫^[6-7]。研究发现,NRTUAs虫株能够调节宿主的肿瘤微环境,对抗肿瘤的侵袭^[8-9]。NRTUAs虫株能够有效激活小鼠的CD4⁺和CD8⁺T细胞,诱导机体的抗弓形虫免疫反应,感染NRTUAs虫株的小鼠在40 d内未见异常且各器官无显著的病理变化,同时NRTUAs刺激小鼠脾脏上调了多种细胞因子并诱导了温和的炎症反应,说明NRTUAs虫株能够作为一种良好的小鼠抗弓形虫疫苗株^[10-14]。然而NRTUAs虫株能否作为禽用弓形虫疫苗候选株尚需要进一步探究。NRTUAs虫

株在家禽上的相关研究较少。刘思勤等^[15]研究发现,经NRTUAs虫株感染4 d后,雏鸡无明显临床症状且各器官无显著的病理变化,NRTUAs虫株没有激发雏鸡脾脏的促炎因子和抑炎因子的过量产生,并且虫体会随时间推移而逐渐被宿主清除,说明NRTUAs虫株不会过度刺激雏鸡的先天性免疫反应而诱导过度的炎症反应。吴绿怡等^[16]在雏鸡感染NRTUAs虫株3 d后对雏鸡脾脏细胞进行转录组分析,发现其中多种免疫相关基因的表达上调,其富集分析结果显示与内质网蛋白质合成的信号通路、细胞周期以及代谢相关通路的活动增强;在其差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)中,筛选出VPREB3、EAF2、TNFRSF13B、IRF4和IL-1R2等多个关键基因。结果表明,经NRTUAs虫株刺激后,雏鸡脾脏细胞活动明显增强并且启动了先天性免疫反应对抗弓形虫入侵。上述研究初步探讨了在先天性免疫阶段NRTUAs对雏鸡脾脏的免疫调节作用,并揭示了NRTUAs虫株作为禽用弓形虫疫苗的潜力,是研发禽用弓形虫疫苗的重要环节。

疫苗的免疫保护作用衡量疫苗有效性的标准,而疫苗激发的先天性免疫则是启动和调节适应性免疫的关键。胸腺作为必要的中枢免疫器官,在抗弓形虫感染的固有免疫中发挥重要作用,其中NKT细胞、NK细胞和 $\gamma\delta$ T细胞等参与抗弓形

虫感染的免疫细胞均在胸腺中增殖、分化和成熟^[17-19]。因此解析在先天性免疫阶段NRTUAs虫株对胸腺的免疫调节作用是研究禽用弓形虫疫苗的重要一环,然而目前尚无相关研究。为此,本研究利用转录组测序技术对感染NRTUAs虫株3 d的雏鸡胸腺组织进行转录组学分析,分析NRTUAs虫株对雏鸡胸腺细胞的免疫调节作用,为深入研究NRTUAs虫株调节家禽胸腺的先天性免疫反应的分子机制提供了理论数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于天津市进华养殖场购得1日龄海兰褐蛋鸡。各组鸡只体重(25 ± 2)g,健康状况良好。NRTUAs虫株和Vero细胞由中国农业大学国家动物原虫实验室馈赠。

1.2 NRTUAs虫株的培养

在37℃,5% CO₂的恒温培养箱中,使用添加2%胎牛血清的DMEM完全培养基培养Vero细胞。使用5 mL注射器将培养物分离,再用1 mL注射器将Vero细胞破碎后释放出弓形虫速殖子,最后用5 μm孔径的聚碳酸酯薄膜将细胞碎片等杂质过滤掉,得到纯化后的弓形虫速殖子。

1.3 虫株接种以及样本保存

以每组3只的标准将雏鸡分成两组,分别饲养,不限制雏鸡饮水和进食。至14日龄时,全部鸡只各项指标均正常,平均体重(137 ± 10)g。NRTUAs组每只雏鸡以颈部皮下注射0.2 mL弓形虫速殖子悬液(5×10^6 个/mL),PBS组则以同样方式注射等量磷酸盐缓冲液。对注射后的雏鸡状态进行监测并对临床症状进行观察,在3 d后对每组雏鸡进行称重并进行剖检,剖检后样本放入-80℃保存。

1.4 胸腺组织cDNA文库构建及转录组测序

样本提取总RNA,然后通过NanoDrop 2000分光光度计检验总RNA的纯度和浓度;使用Agilent2100/LabChip GX检测RNA的完整性。质检合格后处理mRNA并合成cDNA,纯化后的cDNA进行末端修复、加A尾并连接测序接头,用AMPure XP beads进行片段大小选择,最后PCR扩增得到的文库。质检合格后使用Illumina NovaSeq6000进行转录组测序,由北京百迈客生物科技有限公司测序。

1.5 测序分析流程

对下机后得到的数据进行过滤得到Clean data,与指定的参考基因组进行序列比对,得到Mapped Data后,进行文库质量评估、结构水平分析、差异表达分析、基因功能注释和功能富集等分析。

1.6 基因表达定量及差异表达分析

RNA-seq测序结果为表达的转录本的序列片段(Reads),一般一个基因表达的转录本越多,获得的来自该基因的Reads会越多,因此可以根据测序reads比对到每个转录本中的数目(Count)计算该基因的表达水平。此外基因的Read counts数目还和基因长度和测序深度有关,还需要对样品中的Mapped Reads的数目和转录本长度进行归一化,使片段数目能够真实反映转录本表达水平。本研究使用String Tie通过最大流量算法,采用FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)进行标准化,作为衡量转录本表达水平的指标^[20]。基于不同基因在各个样本中的count值使用差异分析软件DESeq2进行DEGs的筛选^[21]。

1.7 差异表达基因的数据分析

获得DEGs后使用blast将筛选的基因序列和GO功能数据库及KEGG数据库进行比对,获得对应基因的注释信息后进行GO功能注释分析及KEGG信号通路富集分析。使用FPKM为衡量基因表达水平的值,计算样品中基因的表达量,使用pheatmap进行聚类热图分析。将DEGs分析结果导入STRING数据库进行蛋白互作关系比对,将获得的互作网络信息文件导入Cytoscape(v 3.10.1)中进行数据处理。

1.8 RT-qPCR验证转录组分析

将各组感染3 d后的组织提取Total RNA,检测RNA浓度以及OD₂₆₀和OD₂₈₀等指标,检测合格后反转录得到cDNA。从转录组分析得到的DEGs列表中选取部分基因进行荧光定量PCR验证。

实时荧光定量PCR体系20.0 μL:2×qPCR Mix 10.0 μL,上、下游引物(2.5 μmol/L)各1.0 μL,模板cDNA 1.0 μL, Nuclease-Free Water 7.0 μL。荧光定量扩增引物如表1。

验证试验以鸡GAPDH基因为内参,通过定量结果计算目的基因表达量,计算方法采用2^{-ΔΔCt}法(Livak法),最终结果使用t检验分析差异显著性。

表1 荧光定量PCR扩增引物序列
Table 1 RT-qPCR amplification primer sequence information

基因 Gene	引物序列(5'-3') Prime sequence(5'-3')	扩增长度/bp Amplification length	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>GAPDH</i>	F: CTGGGGCTCATCTGAAGGGT R: GGACGCTGGGATGATGTTCT	308	60
<i>TMSB15B</i>	F: AAACCGGACCTGTCGGAG R: ACATTCTTCTCCTGCTCGAT	114	60
<i>STAT1</i>	F: TCACTTCCCATCATTGTCATCTCT R: AATTCTTGGGATCAGTAGACAGCA	97	60
<i>GNLY</i>	F: ATGGTTTACGCTGCGTGGGAT R: ACCCACAATCTTCTGCACCTTC	110	60
<i>HBA1</i>	F: TTCGATCTGTACACGCTC R: ACCACCACCAGGAAGCATTG	191	60
<i>HBBA</i>	F: CTCTGGGGCAAGGTCAATGT R: CAGTTCGGACAGTTGGGAGA	234	60
<i>HBAD</i>	F: GCCGAGGACAAGAAGCTCAT R: TCGAAGTGGGGGAAGTAGGT	131	60
<i>CBL</i>	F: CCACTGCCTGTACCGAAACT R: GGTCTCAAAAAGCAGAGGGCA	246	60
<i>CHGA</i>	F: TGCCAGCTATCTCCCTTCCT R: CACCTTGAGCCGCAATTTCC	219	60

2 结果与分析

2.1 雏鸡胸腺转录组测序

雏鸡胸腺样本通过 Illumina NovaSeq6000 测序后,过滤掉低质量 Reads 后获得了 56.99 Gb Clean Data,其中各个样本 Clean Data 均在 5.97 Gb 以上, NRTUAs 组和 PBS 组 Clean Data 的 Q30 在 93.00% 以上。两组中样本比对率在 80.28%~88.15%,说明转录本数据可靠质量合格。

2.2 RT-qPCR 结果验证

根据转录组分析得到 DEGs(图1),从中随机抽取 8 个基因进行实时荧光定量 PCR 验证。定量结果表明有 6 个基因表达上调分别是:胸腺肽 β 15B(*TMSB15B*),信号转导与转录激活因子 1(*STAT1*),颗粒溶素基因(*GNLY*),血红蛋白亚单位 α 1(*HBA1*),血红蛋白亚单位 ϵ 1(*HBBA*),血红蛋白 α 亚基 D(*HBAD*)。有 2 个基因表达下调,分别为

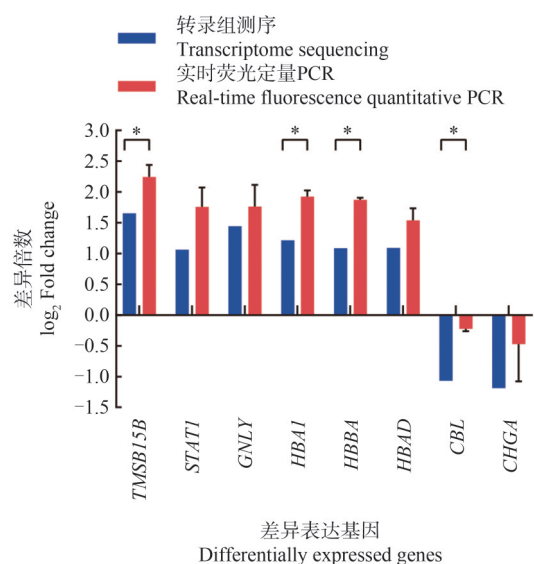


图1 雏鸡胸腺部分 DEGs 荧光定量 PCR 验证

Fig.1 RT-qPCR validation of partial DEGs in chicken thymus

原癌基因(*CBL*)和嗜铬粒蛋白A(*CHGA*)。经比对荧光定量结果发现两者趋势一致,表明转录组测序结果是可靠的,得出的DEGs具有较高的可信度。

2.3 雏鸡胸腺差异表达基因筛选

以 Fold Change ≥ 2.0 且 FDR <0.05 为标准,通过与参考基因组 *Gallus_gallus. GCF_016700215.1. genome.fa* 进行对比,最终在 NRTUAs 组和 PBS 组之间筛选出 964 个 DEGs,其中 517 个基因表达量升高,447 个基因表达量降低。通过将结果绘制热图,发现这些 DEGs 组内差异不显著,大多数基因组间差异明显(图 2),在已知名称的差异基因中,差异倍数最大的 5 个上调表达基因是: *IL-2*、*CCL26*、*CCL4*、*GBP* 和 *MOG*;差异倍数最大的 5 个下调基因是: *LOC112530942*、*ADCK5*、*NPBWR1*、*DYNLRB2* 和 *LOC121112558*,结果如表 2 所示。除了已知名称的基因,新基因 *Gallus_gallus_newGene_5846* 在上调 DEGs 中差异表达倍数最大,

而在下调 DEGs 中新基因 *Gallus_gallus_newGene_912* 差异表达倍数最大。

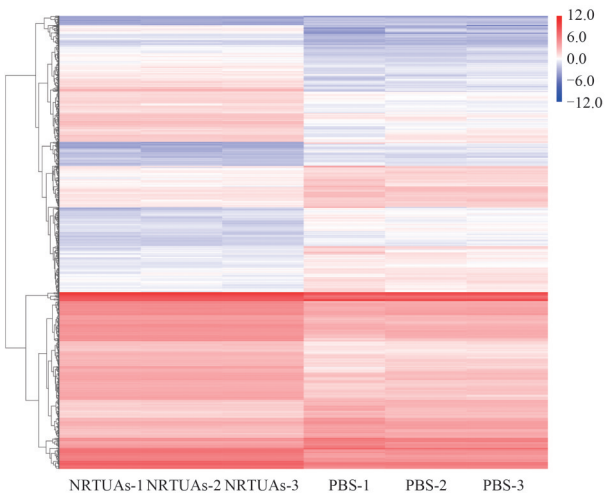


图 2 雏鸡胸腺组织差异表达基因聚类分析热图

Fig.2 The heatmap of cluster analysis for DEGs in chicken thymus

表 2 差异倍数前五的上调及下调基因

Table 2 Top five genes with the highest fold change in upregulation and downregulation

基因 Gene	差异倍数 log ₂ (Fold change)	错误发现率 False discovery rate	上调/下调 Up-regulated/ Down-regulated	功能 Function
<i>IL-2</i>	3.956 881	<0.01	上调	促进 T 细胞增殖和分化以及增强 CTL 细胞和 NK 细胞的活性
<i>CCL26</i>	3.711 991	<0.01	上调	诱导巨噬细胞迁移
<i>CCL4</i>	3.683 87	<0.01	上调	诱导巨噬细胞和 NK 细胞迁移
<i>GBP</i>	3.655 82	<0.01	上调	调节胞内信号传导以及免疫细胞活化和迁移
<i>MOG</i>	3.476 407	<0.01	上调	髓鞘的结构分子
<i>LOC112530942</i>	-5.195 39	<0.01	下调	—
<i>ADCK5</i>	-4.897 55	<0.01	下调	与细胞能量代谢和线粒体蛋白质磷酸化有关
<i>NPBWR1</i>	-3.551 34	<0.01	下调	神经活性配体-受体相互作用
<i>DYNLRB2</i>	-2.950 39	<0.01	下调	与细胞内细胞器运输和定位有关
<i>LOC121112558</i>	-2.938 73	<0.01	下调	—

2.4 差异表达基因的 GO 功能注释分析

通过 GO 功能注释发现,共有 509 个 DEGs(283 个上调基因和 226 个下调基因)被注释到生物过程(Biological process, BP)、细胞组分(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF)3 个一级节点分类下的 38 个二级节点分类中,结果如图 3(a)所示。

在生物过程中共有 500 个条目被显著富集,并且极显著富集的条目有 207 个,其中大量基因在免疫反应、防御反应、对外界刺激的反应、对化学物质的反应、对刺激的反应、对有机物的反应等二级节点上极显著富集,并且免疫应答条目共注释到 67 个基因。将显著性前 20 的条目,以显著性排列如图 3(b)。

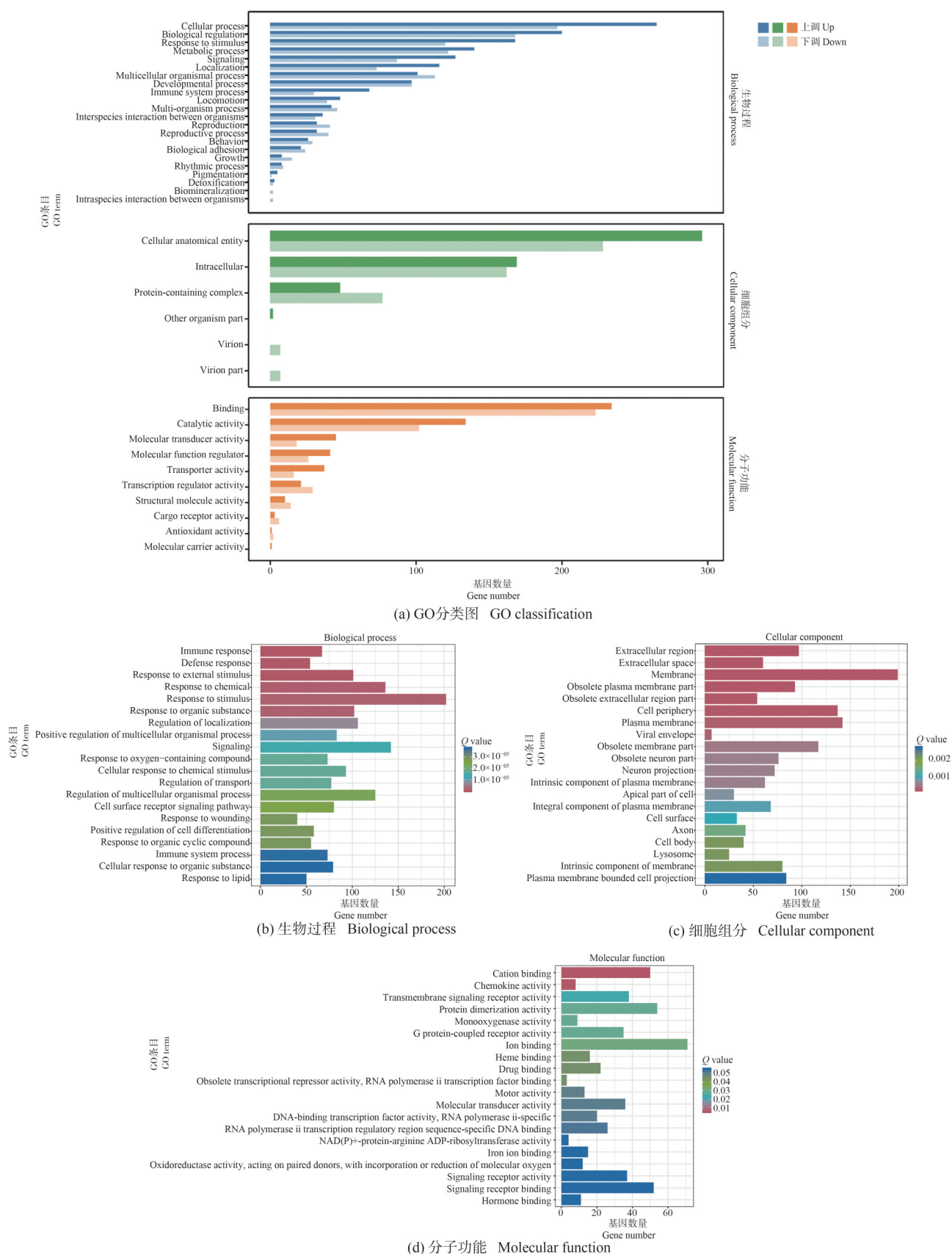


图 3 胸腺组织差异表达基因 GO 富集分类图及 GO 富集分析柱状图

Fig.3 GO enrichment classification graph and GO enrichment analysis bar diagram of DEGs in thymus

在细胞组分的一级节点下,共有47个条目显著富集,其中极显著富集的条目有31个。在这些条目中大部分基因极显著富集在细胞外区域、细胞外空间、细胞膜、退化的浆膜区、退化的胞外区、细胞外周、浆膜、病毒囊膜等二级节点上,将显著性前20的条目,以显著性排列如图3(c)。

在分子功能分类中共有11个条目显著富集,其中2个条目被极显著富集。极显著富集在阳离子结合、趋化因子活性条目上。显著富集在跨膜信号受体活性、蛋白质二聚化活性、单加氧酶活性、G蛋白偶联受体活性等条目上,将显著性前20的条目,以显著性排列如图3(d)。

将得到的所有条目选取其中极显著且变化情况较大的条目,按照功能进行分类得到表3,观察其变化情况。结果发现与细胞周期相关条目呈下调

趋势,与之相似,在染色体与着丝粒相关区域的条目也呈现下调趋势;与免疫反应相关条目、T细胞活化与生长相关条目、细胞因子分泌相关条目均呈现上调趋势,而与内质网及高尔基体区域相关条目也呈现上调趋势。由此可见,胸腺受到NRTUAs虫株刺激后,组织中大部分细胞增殖活动减弱,T细胞的分化与激活增多,同时细胞内产生和分泌细胞因子等物质的活动增强。

2.5 差异表达基因的KEGG信号通路富集分析

将差异基因利用KEGG信号通路富集分析,结果富集到了175条信号通路,这些通路分布在五大类中,即细胞过程(Cellular process)、环境信息处理(Environmental information processing)、人类疾病(Human disease)、代谢(Metabolism)、生物系统(Organismal system)(图4)。

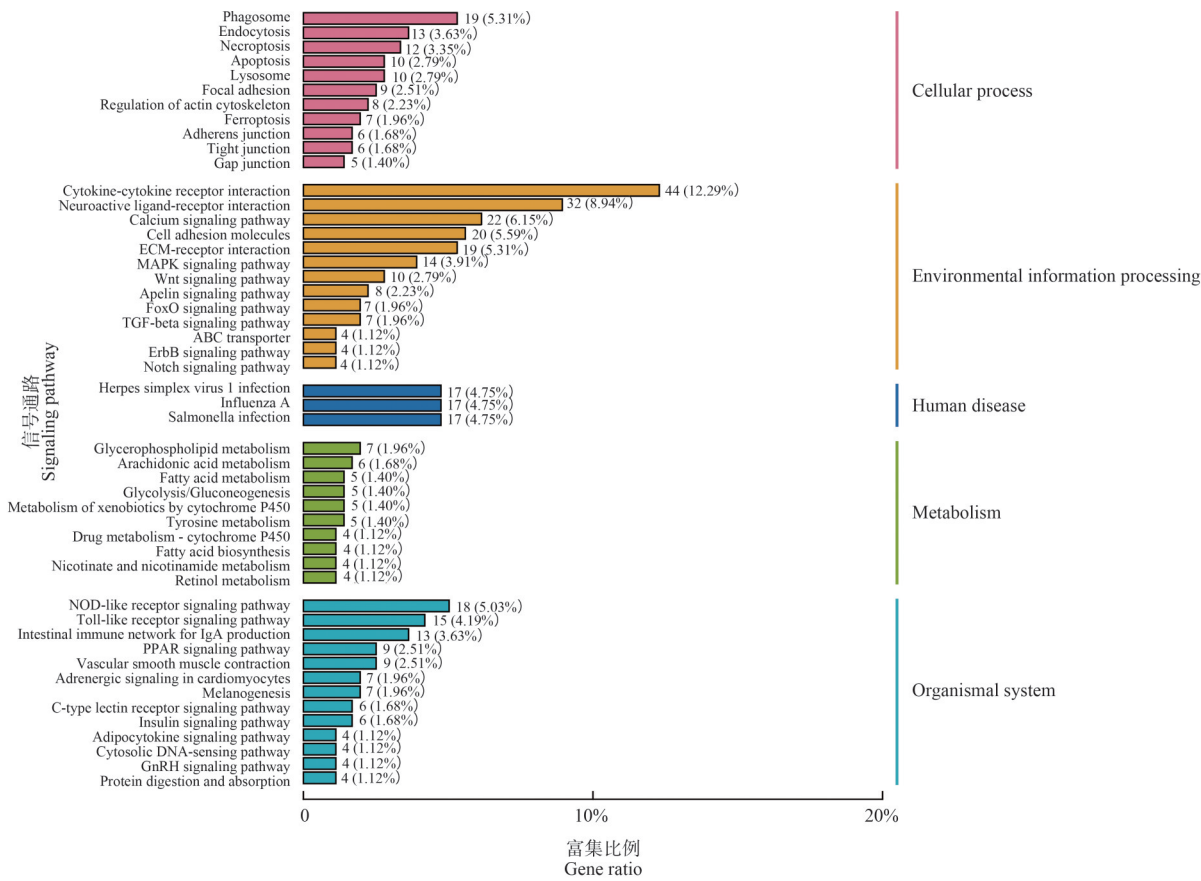


图4 KEGG分类图

Fig.4 KEGG classification map

在得到的信号通路中,按照富集显著性排名前十个信号通路分别是:细胞因子及其受体相互作用、IgA产生的肠道免疫网络、细胞粘附分子、Toll

样受体信号通路、NOD样受体信号通路、甲型流感、吞噬体、ECM受体相互作用、铁死亡、胰岛素分泌。将得到的通路按照富集到的基因数量以及富集因

表 3 差异表达基因 GO 富集分析显著富集条目

Table 3 Significantly enriched terms in GO enrichment analysis of DEGs

GO 分类 GO category	GO 条目 GO Term	Q 值 Q value	上调/下调 Up- regulated/ Down-regulated	功能 Function
生物过程 Biological process	Regulation of mitotic cell cycle phase transition	<0.01	Down	细胞周期与细胞分裂相关
	Regulation of cell cycle phase transition	<0.01	Down	
	Regulation of mitotic cell cycle	<0.01	Down	
	Regulation of cell cycle process	<0.01	Down	
	Regulation of cell cycle	<0.01	Down	
	Immune response	<0.01	Up	免疫反应相关
	Innate immune response	<0.01	Up	
	Regulation of immune response	<0.01	Up	
	Regulation of innate immune response	<0.01	Up	
	Adaptive immune response	<0.01	Up	
	Activation of immune response	<0.01	Up	
	Regulation of developmental process	<0.01	Up	T 细胞活化与生长相关通路
	Regulation of T cell receptor signaling pathway	<0.01	Up	
	Regulation of leukocyte activation	<0.01	Up	
	Regulation of T cell activation	<0.01	Up	
	Cytokine-mediated signaling pathway	<0.01	Up	
	Positive regulation of cytokine production	<0.01	Up	细胞因子分泌相关通路
	Regulation of cytokine production	<0.01	Up	
	Regulation of interleukin-12 production	<0.01	Up	
	Regulation of interleukin-2 production	<0.01	Up	
细胞组分 Cellular component	Condensed chromosome , centromeric region	<0.01	Down	染色体与着丝粒相关区域
	Condensed chromosome kinetochore	<0.01	Down	
	Spindle microtubule	<0.01	Down	
	Chromosome , centromeric region	<0.01	Down	
	Kinetochore	<0.01	Down	
	Obsolete endoplasmic reticulum part	<0.01	Up	内质网及高尔基体区域
	Endoplasmic reticulum lumen	<0.01	Up	
	Organelle subcompartment	<0.01	Up	
	Golgi apparatus subcompartment	<0.01	Up	
分子功能 Molecular function	Chemokine activity	<0.01	Up	趋化因子活性以及跨膜信号受体活性
	Transmembrane signaling receptor activity	<0.05	Up	

子的大小排列做气泡图(图5)。数据分析发现,细胞因子及其受体相互作用通路极显著富集,IgA产生的肠道免疫网络、细胞粘附分子、Toll样受体信号通路显著富集。将显著富集的信号通

路以及其中差异倍数前十的DEGs汇总,结果如表4所示。结合这些DEGs的功能可知,在NRTUAs虫株的刺激下,胸腺细胞受到大量细胞因子的刺激,同时免疫相关通路启动。

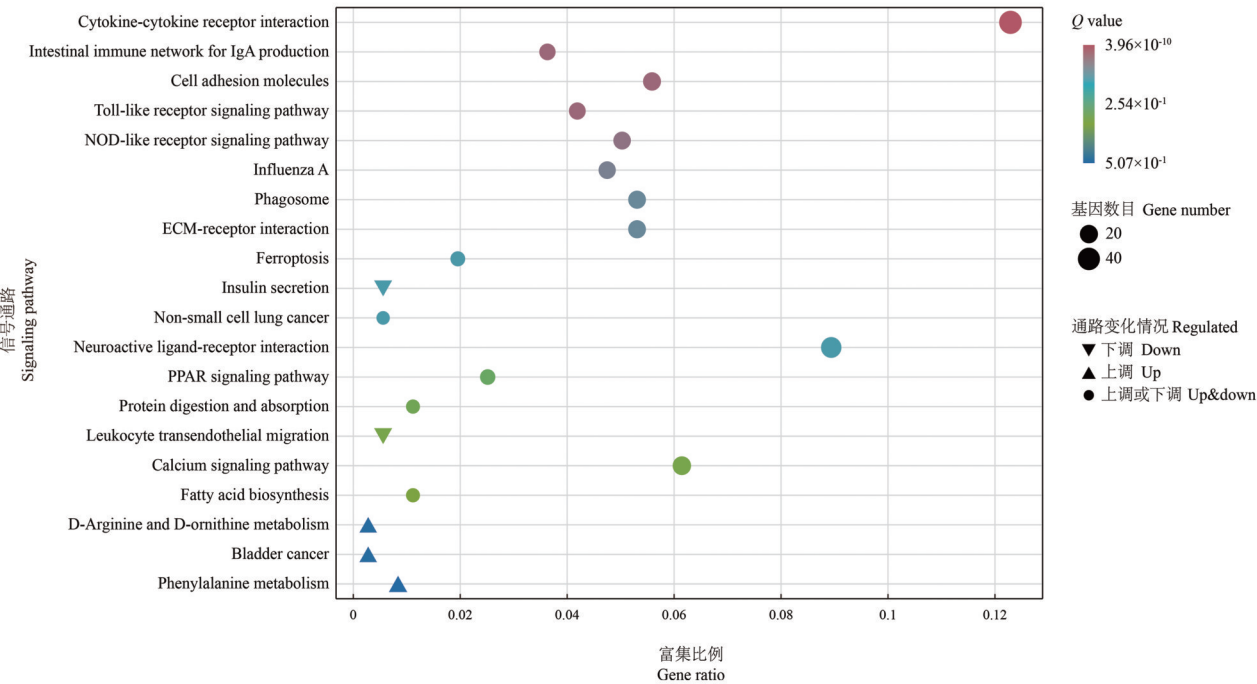


图5 DEGs在前20名KEGG信号通路上富集情况

Fig.5 Enrichment of DEGs in the top 20 KEGG signaling pathways

2.6 差异表达基因蛋白互作分析

将DEGs的编码蛋白与STRING数据库中的蛋白序列做比对分析,以互作分数0.7为条件,根据节点degree值大小排列构建蛋白互作网络图(图6)。其中degree值前十的基因是IL-6、IFNG、IL-18、EP300、CREBBP、STAT1、IRF1、IRF7、PPARG和SOCS1,这些基因与其他基因联系较多且相邻节点之间互作关系强,推测在胸腺组织受到刺激后发挥重要功能。除上述分子外,还有CTLA4、SOCS3、CCR5、IL-22、IL-2、CEBPB、FABP4、VCAM1、CCL20和IL-15等聚集系数较高的基因,有可能在胸腺组织中的部分子网络中起重要作用。在筛选出的基因中白介素最多,其次是干扰素及干扰素调节因子。分析其功能发现绝大多数都与免疫反应直接相关,如IL-6、IL-18、IFNG、IRF1和STAT1等基因,此外,还有CCL4、CCL20等能够募集免疫细胞浸润炎症区域的趋化因子。

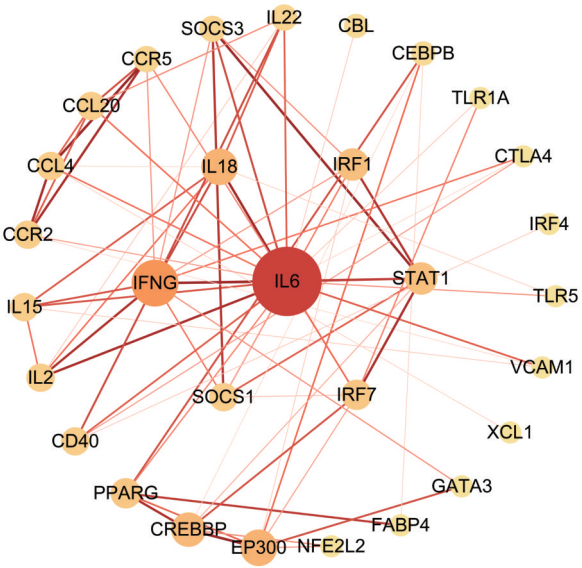


图6 DEGs编码蛋白互作网络图

Fig.6 Interaction network diagram of DEGs coding proteins

表 4 KEGG 富集分析显著富集通路

Table 4 KEGG enrichment analysis showed significant enrichment pathway

通路 Pathway	基因 Gene	差异倍数 log ₂ (Fold change)	功能 Function
细胞因子及其受体相互作用 Cytokine-cytokine receptor interaction	<i>IL-2</i>	3.956 881 08	促进 T 细胞增殖和分化以及增强 CTL 和 NK 细胞的活性
	<i>CCL26</i>	3.711 991 142	诱导巨噬细胞迁移
	<i>CCL4</i>	3.683 869 889	诱导巨噬细胞和 NK 细胞迁移
	<i>IL-22</i>	3.475 925 552	促进免疫细胞的增殖和分化以及上皮细胞的增殖和修复
	<i>IL-6</i>	3.038 475 928	调节免疫细胞的增殖和分化并影响 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的功能
	<i>IFNG</i>	2.597 508 911	增强巨噬细胞和 NK 细胞的杀伤能力、促进 T 细胞的分化和增殖以及增强抗原递呈细胞的抗原呈递能力
	<i>CCR2</i>	2.431 084 587	介导单核细胞和巨噬细胞的趋化和迁移
	<i>CXCL13L2</i>	2.341 671 097	调节淋巴细胞的定向迁移和聚集以及免疫细胞的增殖和分化
	<i>IL-18RAP</i>	2.310 087 708	激活 NF- κ B 和 MAPK 等通路以刺激免疫细胞的活化
IgA 产生的肠道免疫网络 Intestinal immune network for IgA production	<i>LIF</i>	2.268 269 384	促进 T 细胞的增殖和分化以及调节巨噬细胞和树突状细胞的功能和活化相关细胞
	<i>IL-2</i>	3.95 688 108	促进 T 细胞增殖和分化以及增强 CTL 和 NK 细胞的活性
	<i>IL-6</i>	3.038 475 928	调节免疫细胞的增殖和分化并影响 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的功能
	<i>LOC121112596</i>	1.866 461 991	/
	<i>CD40</i>	1.610 293 048	激活抗原递呈细胞并增强其递呈和免疫调节能力
	<i>TNFRSF13B</i>	1.379 529 713	促进 B 细胞的生存、增殖和分化
	<i>TNFSF13B</i>	1.309 142 503	促进 B 细胞的生存、增殖和分化
	<i>IL-15</i>	1.303 501 383	促进 NK 细胞、T 细胞的增殖和存活
	<i>LOC121112130</i>	1.136 914 524	/
细胞粘附分子 Cell adhesion molecules	<i>LOC121112137</i>	-1.742 112 955	/
	<i>ESAM</i>	1.687 741 829	调节血管通透性以及参与炎症反应和免疫细胞的迁移
	<i>VCAM1</i>	1.658 951 697	介导白细胞的黏附和迁移
	<i>CTLA4</i>	1.630 186 181	抑制 T 细胞的活化和增殖以及调节免疫耐受
	<i>CD40</i>	1.610 293 048	激活抗原递呈细胞并增强其递呈和免疫调节能力
	<i>SELE</i>	1.595 839 734	介导白细胞的黏附和迁移
	<i>CDH2</i>	1.493 267 308	维持细胞间连接以及参与细胞迁移等过程
	<i>LOC771804</i>	1.417 5007	/
	<i>LOC121112502</i>	1.219 673 787	/
Toll 样受体信号通路 Toll-like receptor signaling pathway	<i>CAD3</i>	1.103 597 302	参与细胞黏附、迁移和聚集
	<i>LOC121110779</i>	1.088 556 012	/
	<i>CCL26</i>	3.711 991 142	诱导巨噬细胞迁移
	<i>CCL4</i>	3.683 869 889	诱导巨噬细胞和 NK 细胞迁移
	<i>IL-6</i>	3.038 475 928	调节免疫细胞的增殖和分化并影响 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的功能
	<i>LOC121106433</i>	2.145 981 665	/
	<i>TLR1A</i>	2.029 882 495	激活免疫细胞并促使其释放细胞因子
	<i>IL-8L2</i>	1.953 657 757	调控炎症反应和免疫细胞的活化和迁移
	<i>LY96</i>	1.618 886 103	传递信号以引发炎症反应并且能够调节炎症因子的产生和免疫细胞的活化
	<i>CD40</i>	1.610 293 048	激活抗原递呈细胞并增强其递呈和免疫调节能力
	<i>TLR1B</i>	1.575 926 922	促进抗原呈递细胞和 T 细胞的活化
	<i>TLR5</i>	1.272 562 168	激活 NF- κ B 和 MAPK 信号通路以诱导炎症因子的产生和免疫细胞的活化以及促进抗原递呈细胞的成熟和活化

注：“/”表示功能尚不明确。

Note: “/” indicates that the function is still ambiguous.

3 讨 论

3.1 NRTUAs 虫株刺激雏鸡胸腺细胞的相关通路分析

在GO富集分析结果中,生物过程部分有500个显著条目,其中显著性较强的条目大多与免疫反应以及细胞因子分泌等功能相关,且这些条目大多呈现上调情况。这一结果与细胞组分中内质网与高尔基体区域相关条目的上调,以及分子功能中趋化因子与跨膜信号受体活性相关通路的上调相互印证。在生物过程的其他条目中,与细胞周期相关的部分条目呈下调趋势,结合细胞组分中与染色体和着丝粒区域相关条目下调的结果,推测胸腺细胞在NRTUAs虫株刺激下细胞分裂活动减弱。本课题组关于 $\Delta ku80$ RH虫株刺激胸腺细胞的研究中,在GO富集分析的结果里,生物过程部分仅免疫反应这一条目被显著富集且只有24个基因注释到该条目上,而在NRTUAs虫株刺激下的免疫反应条目共注释到67个基因,NRTUAs虫株刺激下的该条目注释到的基因远多于 $\Delta ku80$ RH虫株刺激下该条目注释到的基因。在NRTUAs虫株刺激胸腺细胞的KEGG信号通路富集分析结果中,细胞因子及其受体相互作用、IgA产生的肠道免疫网络和Toll样受体信号通路被显著富集,在 $\Delta ku80$ RH虫株刺激胸腺细胞的研究中同样富集到细胞因子及其受体相互作用和Toll样受体信号通路,然而其中的基因数均少于NRTUAs虫株刺激下的这2条通路。综合上述结果能够看出,与 $\Delta ku80$ RH虫株相比,NRTUAs虫株刺激胸腺引起了更明显的免疫反应。

3.2 NRTUAs 虫株刺激雏鸡胸腺细胞的重要差异表达基因分析

将蛋白互作网络分析结果结合KEGG信号通路分析中显著富集通路的DEGs,最终发现了 $IL-6$ 、 $IL-18$ 、 $IRF1$ 、 $IRF7$ 、 $SOCS1$ 、 $CCL4$ 、 $CCR5$ 、 $CCL20$ 和 $CD40$ 共9个可能具有重要功能且表达量均显著上调的DEGs。 $IL-6$ 分子在之前的研究中发现能够促进辅助性T淋巴细胞的分化并且有助于 $IL-21$ 分子的产生^[22]。同时 $IL-6$ 还能诱导 $CD8^+$ T细胞分化成为细胞毒性T淋巴细胞,这对于机体抵抗弓形虫感染十分重要^[23]。研究发现,包括巨噬细胞、T细胞及树突状细胞等多种细胞均能够表达 $IL-18$,并且 $IL-18$ 能够刺激Th1细胞产生 $IFN-\gamma$ ^[24-25]。 $IRF1$ 和

$IRF7$ 均为干扰素因子,能够活化巨噬细胞和树突状细胞,增强细胞的抗原递呈能力。其中, $IRF1$ 能够促进 $STAT1$ 激活,而 $STAT1$ 也能够增强 $IRF1$ 的表达,从而促进免疫细胞对病原的杀伤和清除^[26]。在本研究中,NRTUAs虫株刺激后的胸腺细胞中 $IFN-\gamma$ 表达量明显上调,差异倍数高达2.6倍,推测与上述分子表达上调有关。 $IRF7$ 能够诱导 $IFN-\alpha$ 和 $IFN-\beta$ 的产生,并且 $IRF7$ 表达量的增加能够使 $STAT1$ 的表达水平升高^[27]。在本研究中,弓形虫感染机体后, $IRF7$ 以及 $IFN-\gamma$ 等分子激活 $STAT1$ 信号通路,而 $STAT1$ 信号通路的激活对于抗弓形虫感染十分重要^[28]。 $SOCS1$ 能够通过抑制 $STAT1$ 上游分子JAK的活性来阻断其信号传导,以此来阻止因 $STAT1$ 信号通路活跃异常导致的过度炎症反应^[29-30]。 $SOCS1$ 的转录水平上调表明 $STAT1$ 被显著激活,说明NRTUAs虫株刺激胸腺细胞产生针对弓形虫的免疫反应。上述结果结合GO和KEGG富集分析结果表明,NRTUAs虫株接种雏鸡后,胸腺组织中细胞活动增强,许多围绕免疫相关的基因表达水平出现明显的变化。

$CCL4$ 分子通过与特异性受体CCR5结合,招募单核细胞、NKT细胞等免疫细胞,同样的 $CCL20$ 在功能上能够招募树突状细胞、调节性T细胞等免疫细胞浸润炎症区域^[31-32]。 $CD40$ 及 $CD40L$ 作为一种细胞表面受体在B细胞、NK细胞、巨噬细胞和树突状细胞上均有表达,在功能上能够增强抗原递呈作用和免疫调节功能,同时 $CD40$ 分子在B细胞成熟、增殖和抗体产生过程中也扮演了重要角色^[33-37]。这说明NRTUAs虫株感染雏鸡胸腺调动了先天性免疫和适应性免疫的相关机制。

上述研究仅局限于转录组水平分析NRTUAs对雏鸡胸腺的免疫调节作用。在未来的研究中,本课题组会扩大样本量,综合评价不同感染量的NRTUAs在转录水平、蛋白水平和代谢水平对雏鸡各免疫器官的影响,并利用流式细胞术筛选NRTUAs特异性免疫细胞,通过Western Blot和ELISA对免疫细胞的相关细胞因子进行检测分析。Wang等^[27]通过干扰和过表达技术研究 $IRF7$ 在禽白血病病毒感染中的作用。借鉴上述方法,对筛选的免疫细胞的关键基因进行干扰和过表达,再通过NRTUAs虫株刺激,从而进一步分析上述关键基因在NRTUAs调节家禽免疫系统的特定通路中的作用。

4 结 论

NRTUAs虫株刺激雏鸡胸腺后,胸腺细胞的增殖活动减弱,T细胞活化以及细胞因子分泌等活动增强,并且IL-6、IL-18、IRF1、IRF7、SOCS1、CCL4、CCR5、CCL20和CD40是NRTUAs虫株调节雏鸡胸腺细胞的重要分子,本研究为深入探讨NRTUAs虫株调节家禽胸腺的先天性免疫反应的分子机制提供了理论依据。

参考文献 References

- [1] Nie L B, Gong Q L, Wang Q, Zhang R, Shi J F, Yang Y, Li J M, Zhu X Q, Shi K, Du R. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in China during 1993-2021: A systematic review and meta-analysis[J]. *Parasitology Research*, 2022, 121(1): 287-301
- [2] 田培荣, 崔平. 张家口坝下地区鸡弓形虫感染情况调查[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(9): 172-173
Tian P R, Cui P. Investigation on *Toxoplasma* infection in chickens in Zhangjiakou city[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(9): 172-173 (in Chinese)
- [3] 冯永杰, 陆瑶瑶, 党冰怡, 王英华, 杨玉荣. 散养鸡新孢子虫、弓形虫血清与分子流行病学调查及风险因素分析[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(9): 1726-1730
Feng Y J, Lu Y Y, Dang B Y, Wang Y H, Yang Y R. Seroprevalence and molecular characterization and risk factors of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in free-ranged chickens [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(9): 1726-1730 (in Chinese)
- [4] Deng Y, Wu T, Zhai S Q, Li C H. Recent progress on anti-*Toxoplasma* drugs discovery: Design, synthesis and screening [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 183: 111711
- [5] Chu K B, Quan F S. Advances in *Toxoplasma gondii* vaccines: Current strategies and challenges for vaccine development [J]. *Vaccines*, 2021, 9(5): 413
- [6] Fox B A, Bzik D J. Avirulent uracil auxotrophs based on disruption of orotidine-5'-monophosphate decarboxylase elicit protective immunity to *Toxoplasma gondii*[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(9): 3744-3752
- [7] Fox B A, Butler K L, Guevara R B, Bzik D J. Cancer therapy in a microbial bottle: Uncorking the novel biology of the protozoan *Toxoplasma gondii*[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(9): e1006523
- [8] Komita H, Zhao X, Katakam A K, Kumar P, Kawabe M, Okada H, Braughler J M, Storkus W J. Conditional interleukin-12 gene therapy promotes safe and effective antitumor immunity [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2009, 16(12): 883-891
- [9] Baird J R, Fox B A, Sanders K L, Lizotte P H, Cubillos-Ruiz J R, Scarlett U K, Rutkowski M R, Conejo-Garcia J R, Fiering S, Bzik D J. Avirulent *Toxoplasma gondii* generates therapeutic antitumor immunity by reversing immunosuppression in the ovarian cancer microenvironment [J]. *Cancer Research*, 2013, 73(13): 3842-3851
- [10] Fox B A, Sanders K L, Rommereim L M, Guevara R B, Bzik D J. Secretion of rhoptry and dense granule effector proteins by nonreplicating *Toxoplasma gondii* uracil auxotrophs controls the development of antitumor immunity[J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(7): e1006189
- [11] 任超, 王超越, 刘贤勇, 索勋. 非复制型弓形虫的构建及其对小鼠致病性分析[J]. 中国农业大学学报, 2021, 26(5): 83-91
Ren C, Wang C Y, Liu X Y, Suo X. Construction of nonreplicating *Toxoplasma* and its pathogenicity in mice [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2021, 26(5): 83-91 (in Chinese)
- [12] 任超, 王超越, 卢春霞, 王思, 段春慧, 刘贤勇, 索勋. NRTUAs感染对小鼠的组织荷虫量及脾脏细胞因子转录水平的影响[J]. 中国农业大学学报, 2022, 27(12): 180-188
Ren C, Wang C Y, Lu C X, Wang S, Duan C H, Liu X Y, Suo X. Impacts of NRTUAs infection on the parasite load and the transcriptional levels of splenic cytokines in mice [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2022, 27(12): 180-188 (in Chinese)
- [13] Gigley J P, Fox B A, Bzik D J. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication[J]. *Journal of Immunology*, 2009, 182(2): 1069-1078
- [14] Gigley J P, Fox B A, Bzik D J. Long-term immunity to lethal acute or chronic type II *Toxoplasma gondii* infection is effectively induced in genetically susceptible C57BL/6 mice by immunization with an attenuated type I vaccine strain[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(12): 5380-5388
- [15] 刘思勤. 非复制型弓形虫刺激雏鸡先天性免疫相关细胞因子与组织荷虫量研究[D]. 天津: 天津农学院, 2023
Liu S Q. Research of Cytokines Related with Innate Immunity and Parasite Load in Chickens Infected with NRTUAs[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2023 (in Chinese)
- [16] 吴绿怡, 刘思勤, 廖艳鹏, 任超. 非复制型尿嘧啶营养缺陷型弓形虫刺激雏鸡脾脏的转录组学分析[J]. 南方农业学报, 2023, 54(3): 774-783
Wu L Y, Liu S Q, Liao Y P, Ren C. Transcriptome analysis of chick spleens stimulated by nonreplicating *Toxoplasma* uracil auxotrophs [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2023, 54(3): 774-783 (in Chinese)
- [17] Ronet C, Darche S, Leite de Moraes M, Miyake S, Yamamura T, Louis J A, Kasper L H, Buzoni-Gatel D. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii* [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(2): 899-908
- [18] Perce-da-Silva D S, Joaquim T E, Aleixo A L Q D C, Motta J P R, Lima-Junior J D C, Ribeiro-Alves M, de Oliveira-Ferreira J, Porto L C M S, Banic D M, Amendoeira M R R. Influence of killer immunoglobulin-like receptors genes on the recurrence rate of ocular toxoplasmosis in Brazil[J]. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2023, 118: e220203
- [19] Ma L, Papadopoulou M, Taton M, Genco F, Marchant A, Meroni V, Vermijlen D. Effector Vγ9Vδ2 T cell response to congenital *Toxoplasma gondii* infection[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(16): e138066
- [20] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515
- [21] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- [22] Ma C S, Deenick E K, Batten M, Tangye S G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209(7): 1241-1253
- [23] Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells[J]. *Journal of Immunology*, 1988, 141(5): 1543-1549

- [24] Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in health and disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3): 649
- [25] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses[J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19: 423-474
- [26] Xiang C W, Yang Z K, Xiong T, Wang T, Yang J, Huang M, Liu D X, Chen R A. Avian IRF1 and IRF7 play overlapping and distinct roles in regulating IFN-dependent and-independent antiviral responses to duck tembusu virus infection[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1506
- [27] Wang Y, Yang F L, Yin H D, He Q J, Lu Y X, Zhu Q, Lan X, Zhao X L, Li D Y, Liu Y P, Xu H Y. Chicken interferon regulatory factor 7 (IRF7) can control ALV-J virus infection by triggering type I interferon production through affecting genes related with innate immune signaling pathway [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 119: 104026
- [28] Beiting D P, Hidano S, Baggs J E, Geskes J M, Fang Q, Wherry E J, Hunter C A, Roos D S, Cherry S. The orphan nuclear receptor TLX is an enhancer of STAT1-mediated transcription and immunity to *Toxoplasma gondii*[J]. *PLoS Biology*, 2015, 13(7): e1002200
- [29] Feng M, Xie T T, Li Y F, Zhang N, Lu Q Y, Zhou Y H, Shi M Q, Sun J C, Zhang X Q. A balanced game: Chicken macrophage response to ALV-J infection[J]. *Veterinary Research*, 2019, 50(1): 20
- [30] Liao N P D, Laktyushin A, Lucet I S, Murphy J M, Yao S G, Whitlock E, Callaghan K, Nicola N A, Kershaw N J, Babon J J. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1558
- [31] Mukaida N, Sasaki S I, Baba T. CCL4 signaling in the tumor microenvironment[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1231: 23-32
- [32] Chen W L, Qin Y Y, Liu S L. CCL20 signaling in the tumor microenvironment[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1231: 53-65
- [33] Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Kärre K, Zappacosta S. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: The CD40-CD40 ligand interaction [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, 185(12): 2053-2060
- [34] Pinchuk L M, Klaus S J, Magaletti D M, Pinchuk G V, Norsen J P, Clark E A. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation[J]. *Journal of Immunology*, 1996, 157(10): 4363-4370
- [35] Mach F, Schönbeck U, Sukhova G K, Bourcier T, Bonnefoy J Y, Poher J S, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(5): 1931-1936
- [36] Grammer A C, Bergman M C, Miura Y, Fujita K, Davis L S, Lipsky P E. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses[J]. *Journal of Immunology*, 1995, 154(10): 4996-5010
- [37] van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000, 67(1): 2-17

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 廖艳鹏,在读硕士研究生。2020年毕业于塔里木大学动物科学学院动物医学专业。2021年考入天津农学院,攻读硕士学位。在2023—2024年获动物科学与动物医学学院院级三等奖学业奖学金。



通讯作者简介: 任超,博士,实验师,硕士研究生导师。天津市家禽产业科技帮扶特派员,津甘双地科技特派员,天津市优秀农业科技特派员,天津市优秀企业特派员,津科帮扶专家,天津市科技局专家库专家,天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室团队成员,天津市兽医生物技术创新团队成员。2012年起在天津农学院动物科学与动物医学学院工作,承担兽医病理学、兽医学的教学工作,主要从事疫苗与佐剂方面的研究。独立完成国家自然科学基金青年基金项目1项,主持完成天津市科技计划项目3项,参与国家级和省部级项目5项。以第一作者身份发表论文20篇,其中SCI论文1篇,中文引文3篇,核心期刊12篇,授权并实施许可发明专利1项。