中国农业大学学报 2024,29(7):34-46
Journal of China Agricultural University http://zgnydxxb.ijournals.cn

李家乐,金涛,朱国志,陈沈峻,杨林,刘心雨,李升和,赵春芳. gga-miR-130b-3p对鸡MDCC-MSB1细胞中肿瘤相关基因表达的影响[J]. 中国农业大学学报,2024,29(07):34-46.
LI Jiale, JIN Tao, ZHU Guozhi, CHEN Shenjun, YANG Lin, LIU Xinyu, LI Shenghe, ZHAO Chunfang. Effects of gga-miR-130b-3p on the expression of tumour-related genes in chicken MDCC-MSB1 cells[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(07):34-46.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.07.04

gga-miR-130b-3p对鸡MDCC-MSB1细胞中肿瘤相关基因表达的影响

李家乐 金涛 朱国志 陈沈峻 杨林 刘心雨 李升和 赵春芳*
(安徽科技学院 动物科学学院/动物营养调控与健康安徽省重点实验室,安徽 滁州 233100)

摘 要 为鉴定MD淋巴瘤转化细胞中gga-miR-130b-3p调控的肿瘤相关基因,本研究在MDV转化的鸡淋巴细胞系MDCC-MSB1中过表达该miRNA,转染48 h后收集并提取RNA,利用高通量测序获得过表达gga-miR-130b-3p组和阴性对照组(Negative control, NC)的转录组数据,筛选这些数据中的差异表达基因(Differential expressed genes, DEGs),对DEGs进行基因本体GO功能富集分析、信号通路分析以及基因集富集分析,筛选过表达gga-miR-130b-3p前后基因表达变化可能参与的信号通路,并对两组中的差异可变剪切进行分析。结果表明:1)与NC组相比,过表达gga-miR-130b-3p组中共鉴定出117个DEGs,其中83个DEGs显著上调,34个DEGs显著下调。其中*MCM10*、*KCNA3*、*PTK2*、*FGL2*、*GPAM*、*BMP4*、*LOXL3*、*DDO*和*KRAS*等基因可能影响MD肿瘤转化。2)DEGs注释到46个GO条目中,其中生物过程包含免疫系统过程等在内的22个条目,分子功能包括10个条目,细胞组分包括14个条目。3)mimics NC和mimics转染组中的DEGs以及微效基因富集到7个与肿瘤发生相关的通路,其中主要是通过甲状腺激素信号途径、胆碱代谢等通路发挥抑癌作用。4)过表达gga-miR-130b-3p后差异可变剪切类型最多的是外显子跳跃(Exon skipped, ES),其次是内含子滞留(Intron retained, IR),最少的是外显子互斥(Mutually exclusive exon, MXE)。综上,gga-miR-130b-3p高表达会引起MSB1细胞中的部分基因差异表达,这些DEGs通过抑癌信号通路抑制MD的肿瘤发展进程,该研究可为解析miRNA在MD肿瘤转化过程中的作用机制提供理论依据。

关键词 gga-miR-130b-3p; MD肿瘤相关基因; 转录组测序; 生物信号通路
中图分类号 S858.31 **文章编号** 1007-4333(2024)07-0034-13 **文献标志码** A

Effects of gga-miR-130b-3p on the expression of tumour-related genes in chicken MDCC-MSB1 cells

LI Jiale, JIN Tao, ZHU Guozhi, CHEN Shenjun, YANG Lin, LIU Xinyu, LI Shenghe, ZHAO Chunfang*
(Anhui Provincial Key Laboratory of Animal Nutrition Regulation and Health /College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, China)

Abstract To identify tumour-associated genes regulated by gga-miR-130b-3p in MD lymphoma-transformed cells, in the study, the miRNA mimics was overexpressed in MDV-transformed chicken lymphoblastoid cell

收稿日期: 2024-03-03
基金项目: 国家自然科学基金项目(32002160,32172816);安徽省教育厅青年拔尖人才项目;安徽省高校科研项目计划自然科学重点项目(2023AH051872);安徽省重点研究与开发计划项目(202204c06020074);安徽科技学院人才引进项目(DKYJ201901);安徽省研究生创新创业实践项目(2023cxcysj175);大学生创新创业训练计划项目(202110879059, S202210879200, S202210879194, X202310879019)
第一作者: 李家乐(ORCID: 0009-0002-6627-893X),硕士研究生, E-mail: 15256785638@163.com
通讯作者: 赵春芳(ORCID:0000-0002-1744-8130),副教授,主要从事动物遗传育种研究,E-mail:zhyy199002@163.com

line MDCC-MSB1, and cells were collected and RNA extracted 48 h after transfection. The transcriptome data were obtained for the overexpression of gga-miR-130b-3p group and the negative control (NC) group using high-throughput sequencing. Screening these data for differentially expressed genes (DEGs), functional enrichment analysis of DEGs for Gene ontology (GO), signaling pathway analysis and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) were performed to screen the signaling pathways that may be involved in the changes in gene expression before and after overexpression of gga-miR-130b-3p and to analyze the differentially alternative splicing in the two groups. The results showed that: 1) Compared to the NC group, a total of 117 DEGs were identified in the overexpression gga-miR-130b-3p group, of which 83 DEGs were significantly up-regulated and 34 DEGs were significantly down-regulated. Among them, *MCM10*, *KCNA3*, *PTK2*, *FGL2*, *GPAM*, *BMP4*, *LOXL3*, *DDO* and *KRAS* may affect MD tumor transformation. 2) DEGs were annotated into 46 GO entries, of which 22 entries including immune system processes for biological processes, 10 entries for molecular functions, and 14 entries for cellular components. 3) DEGs in the mimics NC and mimics transfected groups as well as genes of small effect were enriched to seven pathways associated with tumourigenesis, which mainly exerted oncogenic effects through the thyroid hormone signaling pathway, choline metabolism and other pathways. 4) The most differentially alternative splicing type after overexpression of gga-miR-130b-3p was exon skipped (ES), followed by intron retained (IR), and the least was mutually exclusive exon (MXE). Taken together, high expression of gga-miR-130b-3p can cause differential expression of some genes in MSB1 cells, and these DEGs inhibit tumour progression in MD through oncogenic signaling pathways. This study may provide a theoretical basis for analyzing the mechanism of gga-miR-130b-3p in MD tumour transformation process.

Keywords　gga-miR-130b-3p; Marek´s disease; transcriptome sequencing; biosignaling pathway

马立克氏病病毒(MDV)是一种高度致瘤性的甲型疱疹病毒,是鸡马立克氏病(MD)的病原体,可引起各种临床症状,最主要的特征是全身性神经炎症、免疫抑制和T细胞淋巴瘤形成[1]。作为鸡最重要的传染病之一,MD每年在全球广泛流行并给家禽业造成巨大的经济损失[2],引起的恶性淋巴瘤是家禽发病率最高的肿瘤性疾病[3]。

MicroRNA(miRNA)是一类长度约为18～24个核苷酸的非编码RNA,通过促进mRNA降解或抑制mRNA翻译发挥调节靶基因表达的作用[4]。因其对基因表达的影响、在机体组织和体液中的稳定存在以及作为疾病生物标志物的潜在用途,miRNA成为生物医学基础研究的一个重要方向[5]。

近年来与MD相关的miRNAs被广泛报道[6-7]。miR-130b-3p属于miR-130家族,参与机体小脑共济性失调、脂肪形成、缺氧应激和肿瘤发生等生物学过程[8]。此前,通过高通量测序和实时荧光定量PCR证实,MD肿瘤组织中的gga-miR-130b-3p显著下调,并且发现该miRNA在MD肿瘤转化过程中发挥肿瘤抑制因子的作用[9]。尽管gga-miR-130b-3p与鸡MD抗性关系密切,但关于gga-miR-130b-3p具体调控的基因表达或通过的生物信号通路影响MD肿瘤形成的作用机制尚不清楚。本研究通过对过表达gga-miR-130b-3p后的MD肿瘤转化细胞进行转录组测序,筛选该miRNA过表达前后的差异表达基因,利用荧光定量PCR验证测序结果的准确性,并通过GO分析和KEGG生物信号通路分析,揭示差异基因在MD肿瘤发展进程中可能发挥的作用,为研究gga-miR-130b-3p在MD肿瘤发生中的作用机理提供更多的理论依据。

1　材料与方法

1.1　细胞培养和miRNA转染

MDV转化的鸡淋巴细胞系MDCC-MSB1由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。细胞在37 ℃,5%CO_2下,在RPMI 1640培养基(Gibco, USA)中培养,辅以9%胎牛血清(Invitrogen, USA)和1%青霉素-链霉素溶液(Invitrogen, USA)。

按照2×10^4～5×10^4个细胞/孔的浓度接种于6孔细胞培养板进行转染,使用X-treme GENE siRNA转染试剂(罗氏,德国),mimics NC和gga-miR-130b-3p mimics终浓度为100 nmol/L,转染48 h后收集细胞[10]。gga-miR-130b-3p模拟物和阴性对照(NC)购自GenePharma公司(GenePharma有限公司,中国上海)。

1.2　RNA提取和RNA测序

使用Trizol试剂(Invitrogen, USA)提取总

RNA，通过琼脂糖凝胶电泳分析样品RNA完整性及是否存在DNA污染，使用Qubit2.0 Fluorometer测定RNA的浓度，NanoPhotometer spectrophotometer检测RNA纯度（OD_{260}/OD_{280}及OD_{260}/OD_{230}比值），Agilent 2100 bioanalyzer检测RNA完整性。通过带有Oligo（dT）的磁珠富集具有polyA尾巴的真核mRNA后，用缓冲液把mRNA打断。以片段化的mRNA为模版，随机寡核苷酸为引物，在M-MuLV逆转录酶体系中合成互补DNA（cDNA）第一条链，随后用RNaseH降解RNA链，并在DNA polymerase I体系下，以dNTPs为原料合成cDNA第二条链。纯化后的双链DNA经过末端修复、加A尾并连接测序接头，用AMPure XP beads筛选200 bp左右的DNA，进行PCR扩增并再次使用AMPure XP beads纯化PCR产物，最终获得文库。DNA文库由Genedenovo公司（中国广州）在Illumina测序平台上进行测序。

1.3 数据质控与比对分析

为了保证数据质量，对raw reads利用fastp进行质控，去除含adapter、含N比例大于10%、全部都是A碱基的reads以及Q≤20的碱基数占整条read 50%以上的低质量reads，得到clean reads。数据经过过滤后，分析碱基的组成及质量分布。使用bowtie2将clean reads比对到鸡的核糖体数据库，在不允许错配情况下去除比对上核糖体的reads，将保留下来的unmapped reads用于后续转录组分析。以GRCg6a（版本号：GCA_000002315.5）为参考基因组，利用Hisat2软件进行比对分析。

1.4 miRNA潜在靶基因预测与基因互作网络分析

使用生物信息学预测软件miRDB预测gga-miR-130b-3p的下游靶基因。通过STRING12.0（https://cn.string-db.org/）数据库，对转录组数据中的差异表达基因和miRNA的潜在靶基因进行互作分析，构建基因互作网络。

1.5 差异基因分析与功能注释

基因表达量用FPKM值表示，使用DESeq2软件进行差异基因分析。基于差异分析结果，按$P<0.05$和$|\log_2(FC)|\geqslant 1.5$的条件筛选显著差异基因。通过Goatools软件进行基因本体论（GO）（http://www.geneontology.org/）分析，以说明过表达gga-miR-130b-3p与对照组之间差异基因的生物学意义。利用京都基因与基因组百科全书（KEGG）数据库阐明差异基因的潜在生物途径。同时，进行GSEA分析（Gene set enrichment analysis）挖掘微效基因的有效信息，进一步筛选相关功能信号通路。利用rMATS进行可变剪切分析。

1.6 实时荧光定量PCR

RT-qPCR反应使用SYBR Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒（TaKaRa，大连，中国），在ABI Prism 7500 HT检测系统（Applied Biosystems，Foster City，CA）上检测。RT-qPCR采用以下循环进行。95 ℃ 15 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 32 s，40个循环。根据NCBI上公布的鸡不同基因的cDNA序列，利用Primer premier 5.0软件跨内含子设计各基因的荧光定量PCR引物，*β-actin*为内参基因。引物序列见表1。

表1 实时荧光定量PCR引物

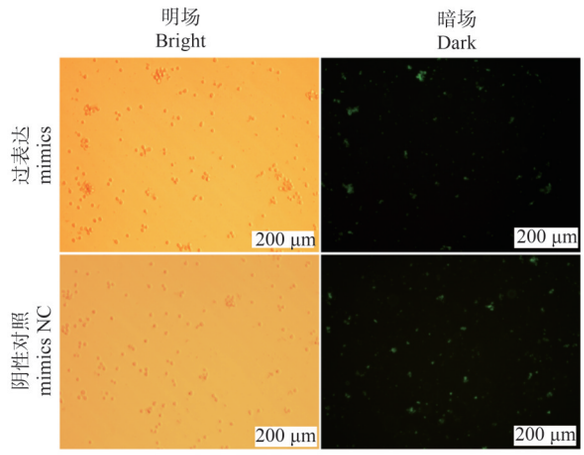
Table 1 PCR primers for real time-quantative polymerase chain reaction

基因 Gene	引物序列（5'-3'） Primer sequence（5'-3'）	序列号 Serial number
KCNA3	F：TTCTGCCTGGAGACCCTG R：GAAACAGCCGAGGACGAG	ENSGALG00000040681
TXNL1[11]	F：CGGAATTCATGGTGGGCGTGAAGCTGAT R：TTGCGGCCGCTTAGTGGCTCTCTCCTTTTT	ENSGALG00000054870
MAT1A	F：TGTCGTCGTGTTCTGGTT R：CTTCTGGTAAATTGGCTTTT	ENSGALG00000002479
RND2	F：TCAGCCGCCCAGAAACCT R：GGAAAGCTCCCGCAACGT	ENSGALG00000002804
BMP4	F：TGGTAACCGAATGCTGATGG R：ATGGCTTTGGGCAGAGTG	ENSGALG00000012429
NMUR1[12]	F：AGGAGGCAGGTCACGAAGATG R：GTAGAGGATGGGGTTGGCAG	ENSGALG00000007714
MED1	F：AGTGCGTGTCCATACCAT R：GCCCTCCAATAACAAAGC	ENSGALG00000037112

2　结果与分析

2.1　过表达 gga-miR-130b-3p 的转染效率及转录组数据质控分析

为分析 gga-miR-130b-3p 在 MDV 转化的 T 淋巴细胞系 MSB1 中的功能，本试验利用转染 miRNA 模拟物（mimics）的方式在该细胞中过表达 miR-130b-3p。将 100 nmol/L FAM 标记的 mimics 和 mimics 阴性对照转染至 MSB1 细胞，在荧光显微镜下观察转染效率，从图 1 中可以观察到 mimics 和 mimics 阴性对照转染组在荧光显微镜下均可见绿色荧光，且转染效率都在 70% 以上，能够保证测序试验正常进行。



明场和暗场下 MSB1 细胞图像，放大倍数 100×。

MSB1 cell image in the bright and dark field. The magnification is 100×.

图 1　过表达 gga-miR-130b-3p 的转染效率

Fig. 1　Transfection efficiency of gga-miR-130b-3p overexpression.

在 MSB1 中分别转染未添加荧光标记的 mimics 和 mimics NC，对获得的总 RNA 进行转录组谱分析。首先对转录组原始数据进行质控分析，由表 2 可知，质控过后 mimics 和 mimics NC 组分别获得 41 473 024 和 38 987 260 个 clean reads，两组中 Q20 和 Q30 值分别达到 97% 和 93% 以上，比对率都达到 92.6% 以上，特异性比对率达到 90% 以上。

表 2　RNA-Seq 数据质控分析

Table 2　Quality control analysis of RNA-Seq data

样品 Sample	原始读数 Raw reads	干净读数 Clean reads	Q20/%	Q30/%	GC 含量/% GC contents	映射读数 Mapped reads
Mimics	41 966 836	41 473 024	97.52	93.29	48.68	38 316 842
Mimics NC	39 462 899	38 987 260	97.53	93.36	49.23	35 844 878

2.2　过表达 gga-miR-130b-3p 后差异表达基因分析

按照 $|\log_2(FC)| \geqslant 1.5$ 和 $P < 0.05$ 的阈值标准共获得 117 个差异表达基因。与阴性对照组相比，过表达 gga-miR-130b-3p 组有 83 个差异基因上调，34 个差异基因下调（图 2）。其中前 10 个上调和下调差异基因的详细信息分别如表 3 和表 4 所示，上调基因包含微小染色体维持 10 复制起始因子（*MCM10*）、晶体蛋白 γS（*CRYGS*）、钾离子通道 A 亚家族成员 3（*KCNA3*）、类硫氧还原蛋白 1（*TXNL1*）、Rho 家族 GTP 酶 2（*RND2*）、D-天冬氨酸氧化酶（*DDO*）、含 MANSC 域蛋白 4（*MANSC4*）、甲硫氨酸腺苷转移酶 1A（*MAT1A*）、蛋白酪氨酸激酶 2（*PTK2*）等，下调基因包含 ATP/GTP 类结合蛋白 1（*AGBL1*）、骨形成蛋白 4（*BMP4*）、神经生长因子 U 受体 1（*NMUR1*）、胆汁酸-CoA：氨基酸 N-酰基转移酶（*BAAT*）、印度刺猬（*IHH*）、类赖氨酰氧化酶 3（*LOXL3*）、GDP-D-葡萄糖磷酸化酶 1（*GDPGP1*）、中介复合体亚基 1

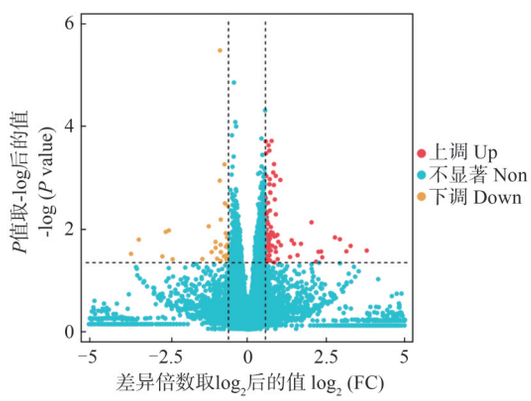


图 2　差异表达基因的火山图

Fig. 2　Volcano map of differentially expressed genes

(*MED1*)、卷曲螺旋结构域蛋白87(*Ccdc87*)等。利用miRDB生物在线软件预测gga-miR-130b-3p的潜在靶基因共有994个,结合预测结果,发现差异基因*AHRR*、*GAREM1*、*SLC44A1*、*GPAM*、*ERC1*、*ETNK1*、*KPNA5*、*SMARCD3*、*NR3C1*、*GFOD1*和*QKI*是该miRNA的潜在靶基因。

表3 表达量上调的前10个差异基因

Table 3 Top 10 differentially expressed genes with up-regulated expression

基因 Gene	序列号 Serial number	差异倍数 $\log_2$(FC)	*P*	参与的GO terms或KEGG信号通路 Involved GO terms or KEGG signaling pathways
MCM10	ENSGALG00000051529	11.05	0.01	
pol	ENSGALG00000051508	7.04	0.03	核酸结合、细胞大分子代谢过程
CRYGS	ENSGALG00000006574	3.28	0.02	上皮细胞的形态发生
KCNA3	ENSGALG00000040681	3.15	0.03	电压门控钾离子通道复合物、钾离子跨膜转运
TXNL1	ENSGALG00000054870	2.94	0.02	
RND2	ENSGALG00000002804	2.78	0.02	细胞皮层、细胞质囊、细胞迁移
DDO	ENSGALG00000015057	2.38	0.04	过氧物酶体、D-天冬氨酸氧化酶活性
MANSC4	ENSGALG00000026372	2.26	0.03	
MAT1A	ENSGALG00000002479	2.19	0.04	甲硫氨酸腺苷基转移酶活性
PTK2	ENSGALG00000031741	2.04	0.00	癌症中的通路、癌症中的蛋白聚糖

注:*MCM10*、*TXNL1*和*MANSC4*未参与GO terms或KEGG信号通路。

Note: *MCM10*, *TXNL1* and *MANSC4* are not involved in GO terms or KEGG signaling pathway.

表4 表达量下调的前10个差异基因

Table 4 Top 10 differentially expressed genes with down-regulated expression

基因 Gene	序列号 Serial number	差异倍数 $\log_2$(FC)	*P*	参与的GO terms或KEGG信号通路 Involved GO terms or KEGG signaling pathways
AGBL1	ENSGALG00000006819	−5.18	0.05	金属羧肽酶活性、锌离子结合
BMP4	ENSGALG00000012429	−3.67	0.03	癌症中的通路、甲状腺激素信号通路
NMUR1	ENSGALG00000007714	−3.42	0.02	氯离子转运、G-蛋白偶联受体信号通路
Flnc	MSTRG.38	−2.68	0.04	癌症中的蛋白聚糖、细胞骨架
BAAT	ENSGALG00000040619	−2.57	0.01	牛磺酸和低牛磺酸代谢、过氧物酶体
IHH	ENSGALG00000011347	−2.35	0.04	癌症中的蛋白聚糖、细胞外基质
LOXL3	ENSGALG00000036142	−1.41	0.04	细胞核、氧化还原酶活性
GDPGP1	ENSGALG00000045045	−1.21	0.01	GDP-D-葡萄糖磷酸化酶活性
MED1	ENSGALG00000037112	−1.12	0.03	甲状腺激素信号通路、内分泌抵抗
Ccdc87	ENSGALG00000050539	−0.99	0.02	

注:*Ccdc87*未参与GO terms或KEGG信号通路。

Note: *Ccdc87* is not involved in GO terms or KEGG signaling pathway.

2.3 过表达gga-miR-130b-3p后差异表达基因的互作和GO分析

利用STRING数据库中蛋白互作数据分析差异表达基因的互作关系,如图3所示,共有73个差异表达基因存在互作关系。gga-miR-130b-3p的候选靶基因*AHRR*、*GAREM1*、*SLC44A1*、*GPAM*、*ERC1*、*ETNK1*、*KPNA5*、*SMARCD3*、*NR3C1*、*GFOD1*和*QKI*的表达水平在gga-miR-130b-3p过表达后的转录组数据中呈现显著差异,并且这些基因与其他差异基因之间存在互作调控。

为了解差异表达基因的特定功能,将117个差异基因映射到GO数据库中进行分析。结果如图4所示,差异表达基因分别按照生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3个组分进行注释,大

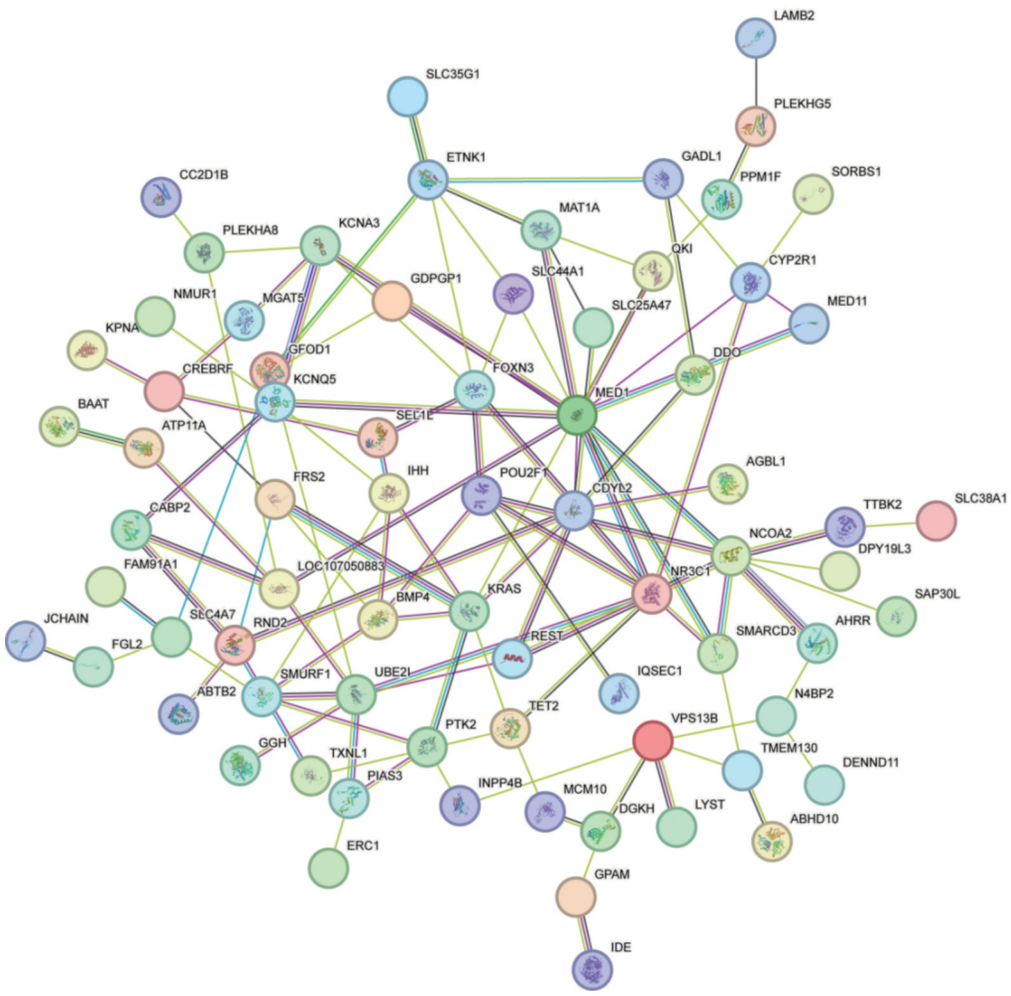


图 3　gga-miR-130b-3p 潜在靶基因和过表达该 miRNA 后差异表达基因的互作网络图

Fig. 3　Interaction network diagram of gga-miR-130b-3p potential target genes and differentially expressed genes after overexpression of this miRNA

多数差异基因被分配到生物过程条目中。在生物过程组分中，差异基因被分配到细胞过程、单有机体过程、代谢过程、生物调节、生物过程调控、生物过程的正向调节、对刺激的反应、定位、多细胞生物过程和免疫系统过程。在细胞组分中，差异基因被分配到细胞、细胞部分、细胞器、细胞器部分和膜条目中。在分子功能组分中，差异基因被分配到结合、催化活性和转运活性条目中。其中免疫系统过程中的差异基因有 *FGL2*、*GPAM*、*TET2*、*IHH*、*JCHAIN*、*BMP4*、*PTK2*、*SMPD3*、*LOXL3* 和 *IDE*。

2.4　过表达 gga-miR-130b-3p 后差异表达基因的 KEGG 分析

利用 KEGG 数据库对差异基因进行信号通路分析，筛选 gga-miR-130b-3p 可能参与的生物学通路。如图 5 所示，这些差异基因富集在牛磺酸和低牛磺酸代谢、甲状腺激素信号途径、Hedgehog 信号通路、过氧物酶体、内分泌抗性、甘油磷脂代谢、癌症中的胆碱代谢、鞘磷脂代谢、癌症中的蛋白聚糖和调节干细胞多能性的信号通路中。

2.5　过表达 gga-miR-130b-3p 后基因的 GSEA 分析

为弥补传统富集分析对微效基因的有效信息挖掘不足的问题，更为全面地对某一功能通路的调节作用进行解释，本研究利用 GSEA 分析（Gene set enrichment analysis）进一步对基因可能参与的生物学通路进行分析。如图 6 所示，mimics NC 和 mimics 转染组中的基因富集在胆碱能突触、TNF 信号通路、癌症中的 miRNAs、甘油磷脂代谢、甲状腺激素合成、氧化磷酸化、Toll 和 Imd 信号通路、NF-kappa B 信号通路、磷脂酰肌醇信号系统、cAMP 信

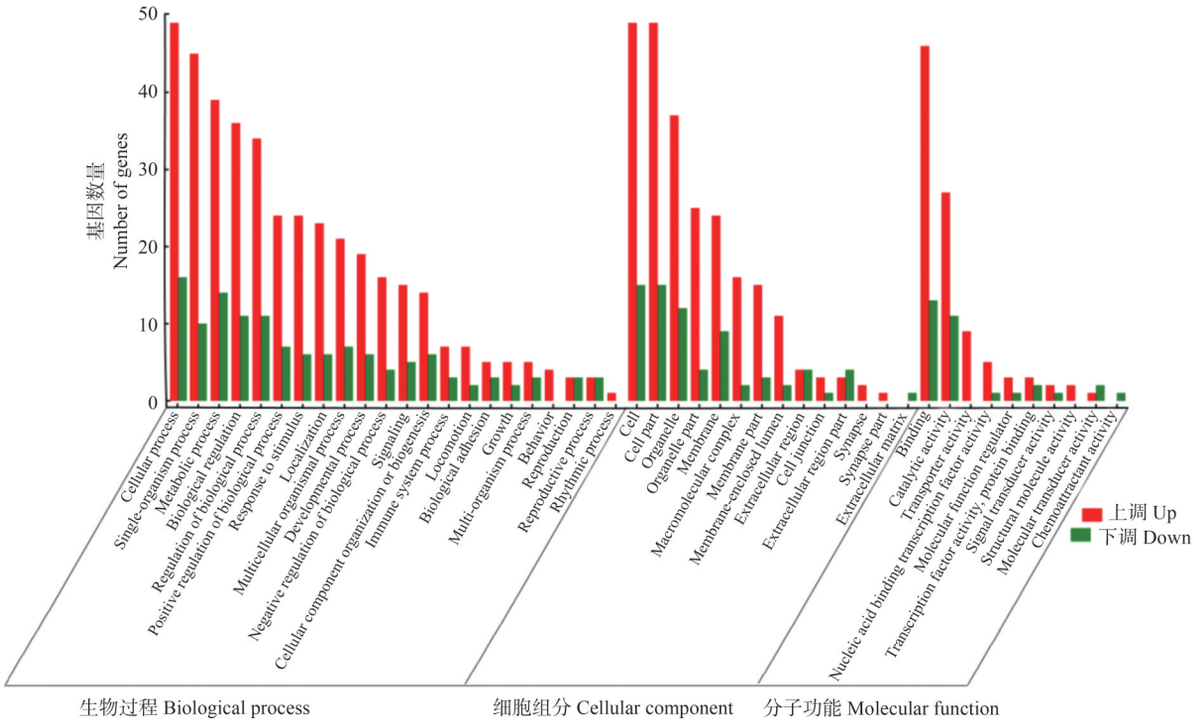


图 4 过表达 gga-miR-130b-3p 后差异表达基因的 GO 分析

Fig. 4 GO analysis of differentially expressed genes after overexpression of gga-miR-130b-3p

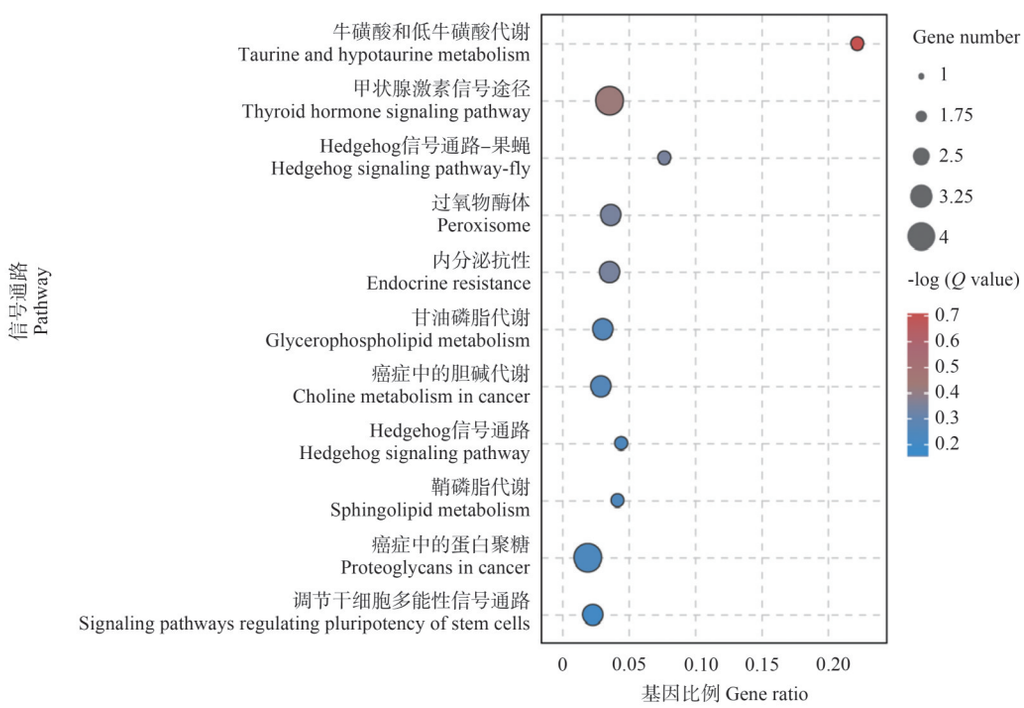


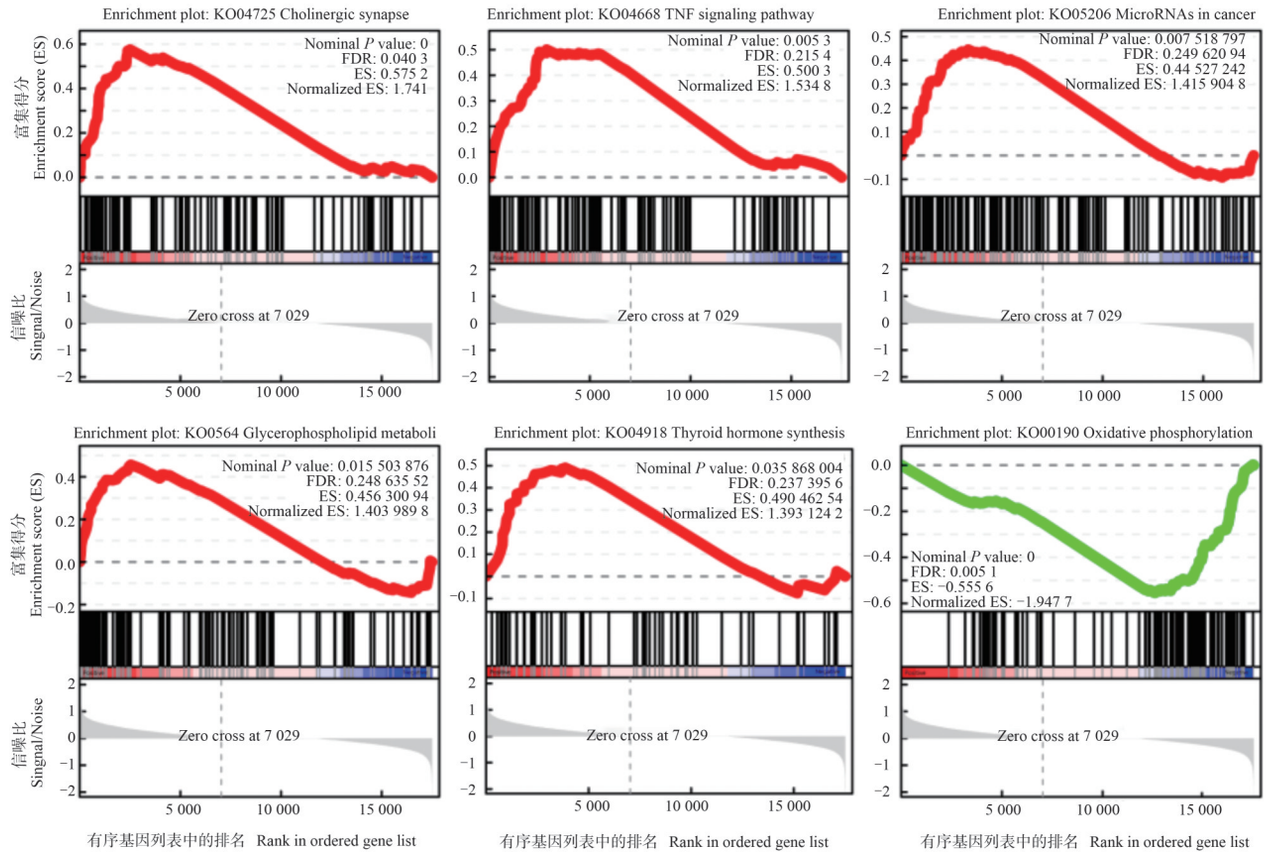
图 5 过表达 gga-miR-130b-3p 后差异表达基因的 KEGG 分析

Fig. 5 KEGG analysis of differential expressed genes after overexpression of gga-miR-130b-3p

号通路、C 型凝集素受体信号通路和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抗性等生物信号通路中。

2.6 过表达 gga-miR-130b-3p 后的差异可变剪切分析

在 MSB1 细胞中过表达 gga-miR-130b-3p 或



ES 为正值（红色曲线）代表该通路被激活，ES 为负值（绿色曲线）代表该通路被抑制。

A positive value of ES (red curve) means that the pathway is activated and a negative value of ES (green curve) means that the pathway is inhibited.

图 6　过表达 gga-miR-130b-3p 后基因的 GSEA 分析

Fig. 6　GSEA analysis of genes before and after overexpression of gga-miR-130b-3p

NC 后共发现有外显子跳跃（Exon skipping，ES）、5’端外显子发生可变剪接（Alternative 5’splice site，A5SS）、3’端外显子发生可变剪接（Alternative 3’splice site，A3SS）、外显子互斥（Mutually exclusive exon，MXE）和内含子滞留（Intron retention，IR）5 种可变剪切类型。两组中各类型的可变剪切数目如图 7（a）所示，ES 类型的数目最多，共有 18 363 个，其中 gga-miR-130b-3p 过表达组有 18 187 个，NC 组有 18 150 个，其次是 MXE 类型，A5SS 类型的数目最少。对两组内各类型的可变剪切数量和表达量进行差异分析，结果如图 7（b）所示，与 NC 组相比，gga-miR-130b-3p 过表达组中差异可变剪切类型最多和最少的分别是 ES 和 MXE，分别占所有差异可变剪切的 72.07% 和 2.79%。

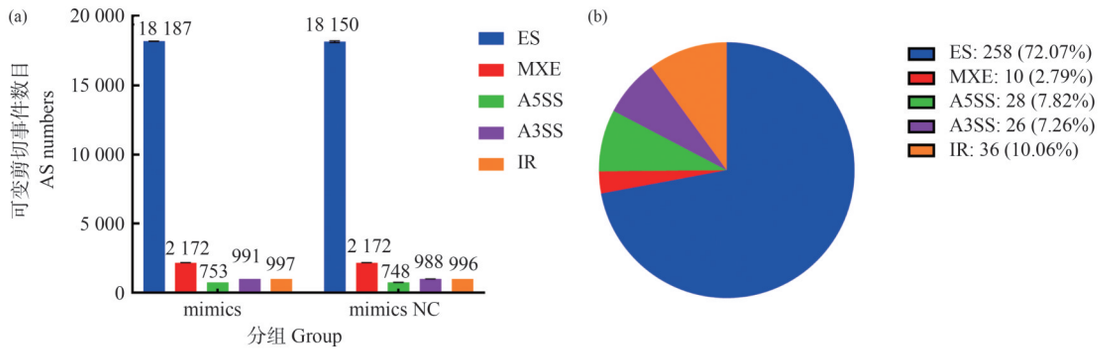
2.7　RT-qPCR 验证 RNA-seq 结果

为验证 RNA-seq 测序数据的准确性，随机选择 7 个差异基因并通过 RT-qPCR 对其表达模式进行定量。RT-qPCR 结果与 RNA-seq 结果一致，显示这些基因的表达有类似的上调或下调趋势（图 8），证明测序结果真实可靠。

3　讨　论

miRNAs 作为癌症诊断、预后、分类、分期和治疗监测的潜在标记物，它们的生物学作用受到了广泛关注。与哺乳动物相比，miR-130b 在鸡中的研究较少。Yuan 等[13]发现，gga-miR-130b-3p 表达在鸡毒支原体（MG）感染的鸡胚和鸡胚成纤维细胞中均明显上调，从而激活 PI3K/AKT/NF-KB 通路，通过抑制 PTEN 表达促进细胞增殖并阻滞细胞周期。此外，miR-130b-3p 水平在多种癌症中显著上调，并与 mTORC1 信号通路呈正相关；过表达 miR-130b-3p 将会增强被 mTORC1 激活的细胞在体内或体外生成血管和形成肿瘤的能力[14]。

有研究已经证实 miRNAs 的靶向基因与鸡 MD



(a)不同类型可变剪切数目的柱状图;(b)不同类型差异可变剪切比例的饼状图。

(a) Histogram of the number of alternative splicing identified; (b) Pie chart of the proportion of differentially alternative splicing identified.

图 7 过表达 gga-miR-130b-3p 后的可变剪切分析

Fig. 7 Alternative splicing analysis of genes after overexpression of gga-miR-130b-3p.

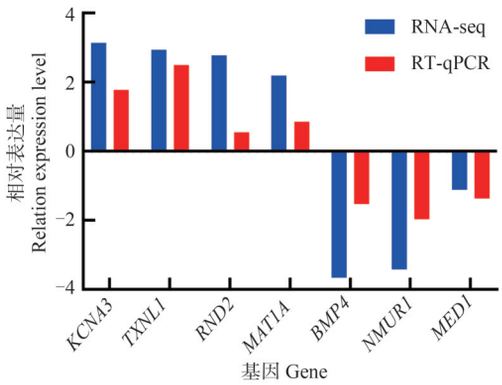


图 8 随机 7 个差异表达基因的 RNA-seq 和 RT-qPCR 结果的比较

Fig. 8 Comparison of RNA-seq and RT-qPCR results for seven random differentially expressed genes

发病和肿瘤的形成具有密切关系,可调节 MD 肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡和迁移,发挥原癌或抑癌基因的作用[15]。本研究通过对 MD 肿瘤细胞 MSB1 中 gga-miR-130b-3p 过表达前后的差异基因进行分析,结果表明差异表达基因中,有较多与恶性肿瘤发生相关的基因,包括 *MCM10*、*KCNA3* 和 *PTK2*。在差异基因中,*MCM10* 已被报道可以通过影响细胞 DNA 复制从而在肿瘤的发生发展过程中起重要作用,并在多种肿瘤组织中显著上调,调节癌细胞的生物学行为[16]。Hu 等[17]在对 MDV 感染的鸡胸腺组织进行转录组表达分析中发现,与未感染鸡相比 *MCM10* 呈现上调趋势。此外,还有研究发现作为 CMG 解旋酶的组分,*MCM10* 基因可以使 DNA 解旋并在增殖活跃的细胞中持续表达,当 *MCM10* 缺陷时将会引发 NK 细胞缺乏症,从而使机体降低对病毒的抵抗力[18]。在本研究的转录组分析结果中,与 mimics NC 相比,在 MD 肿瘤细胞中过表达 gga-miR-130b-3p 后 *MCM10* mRNA 显著上调,这提示 *MCM10* 可能参与了鸡 MD 肿瘤的发生与发展。本研究发现 *KCNA3* 在 gga-miR-130b-3p 过表达组中的表达水平是对照组的 3.15 倍。已有研究表明,*KCNA3* 通过影响钾离子通道的开放或关闭调控 T 细胞的活性,从而参与机体自身免疫性疾病的免疫调节[19]。Angi 等[20]研究发现 *KCNA3* 通过钾离子通道调控膜电位、钙稳态对癌细胞增殖提供优势。此外,在对传统中药进行多组学分析发现 *KCNA3* 可以作为潜在的治疗癌症的生物靶点[21]。上述研究表明,*KCNA3* 与机体细胞免疫能力密切相关,或许可以作为选择 MD 抗性个体的候选基因。非受体蛋白酪氨酸激酶 2(*PTK2*),也称为黏着斑激酶(*FAK*),可调节整合素和生长因子受体的信号传导,活化的 *PTK2* 可以调节多种细胞功能,包括细胞粘附、增殖和迁移[22]。研究表明,*PTK2* 过表达可能与肿瘤细胞迁移和细胞外信号调节激酶信号通路的激活有关[23]。此外,*PTK2* 在淋巴细胞白血病中高表达,可以作为淋巴细胞白血病的预测性生物标记物[24]。

在对差异基因进行 GO 分析发现,部分差异基因注释到生物过程中的免疫系统过程,免疫系统在抑制肿瘤细胞增殖中发挥重要调控作用[25]。其中显著上调的基因有 *FGL2*、*PTK2* 和 *GPAM* 等,显著下调的基因有 *IHH*、*BMP4* 和 *LOXL3*。Chi 等[26]发现,在感染 MDV 的鸡肝组织中 *BMP4* 表达水平显著上调,推测可能与 *BMP4* 对免疫细胞起负调控的

作用有关。*BMP4*可以诱导多种肿瘤细胞转移，其在大肠癌中表达上调促进癌症的发展进程[27]。*LOXL3*属于类赖氨酰氧化酶（*LOXL*）家族，负责将可溶性胶原蛋白和弹性蛋白链共价交联为不溶性形式，有助于提高细胞外基质的硬度和稳定性[28]。已有研究发现，*LOXL3*参与鸡胸腺对MDV感染的转录反应[29]。Schilter等[30]开发了一种选择性*LOXL2*/*LOXL3*双重抑制剂PXS-5153A，可减少胶原交联和纤维化用于治疗多种肿瘤疾病。在MSB1中过表达gga-miR-130b-3p，促进肿瘤转化的基因*BMP4*和*LOXL3*都呈现出明显的下调趋势，这表明gga-miR-130b-3p在机体内的表达可能与机体对MDV的抗性呈正相关。感染MDV后鸡胸腺的转录组分析发现*FGL2*和*GPAM*的表达水平存在明显差异[16]。类纤维蛋白原2（*FGL2*）作为T细胞的一种新型效应物，具有免疫调节功能[31]。肿瘤细胞分泌的*FGL2*可以阻止CD103树突状细胞特殊亚群的分化，参与免疫抑制肿瘤微环境的调节[32]。此外，在一项研究中发现*FGL2*在肝癌细胞中异常高表达，敲除*FGL2*可抑制癌细胞增殖，这表明肝癌细胞中*FGL2*的表达可能与肿瘤生长或其他恶性生物学行为有关[33]。Irifune等[34]研究表明，急性髓细胞性白血病的特异性分子甘油-3-磷酸酰基转移酶（*GPAM*），在维持线粒体功能方面起着关键作用，是治疗该病的一个有效靶点。作为一种线粒体酶，*GPAM*催化甘油磷脂和三酰甘油生物合成过程中的关键步骤[35]。甘油磷酸二酯酶（*EDI3*）可以促进细胞迁移、粘附和扩散，*GPAM*作为其靶向基因，通过脂质溶血磷脂酸（*LPA*）信号传递影响细胞迁移[36]。Yang等[37]发现，miR-494-3p通过靶向*BMAL1*抑制肝癌的生长和转移，而*BMAL1*抗肿瘤作用的发挥依赖于*GPAM*下调。这些结果表明，*GPAM*介导脂质代谢重编程有助于癌症发展。有意思的是，在MSB1细胞中过表达gga-miR-130b-3p后*FGL2*和*GPAM*的表达上调，这2个基因在MD肿瘤转化过程中的具体作用机制还需要进一步研究。

KEGG分析发现差异基因富集在过氧物酶体、癌症中的蛋白聚糖和调节干细胞多能性等信号通路中。过氧物酶体是免疫细胞发育和功能发挥的重要代谢调节器，通过产生不同的脂质，控制吞噬和分泌炎性细胞因子等核心细胞免疫反应[38]。细胞内的病原体通过干扰过氧物酶体，从而逃避过氧物酶依赖性免疫反应[39]。该通路中差异基因D-天冬氨酸氧化酶（*DDO*）显著富集，*DDO*在D-天冬氨酸（D-Asp）代谢中起主要作用，参与调节D-Asp的水平[40]。蛋白聚糖（PG）是构成细胞外基质（ECM）的主要成分，通过与ECM内的各种细胞因子、生长因子、细胞表面受体、粘附分子、酶和糖蛋白的直接和间接作用影响细胞行为和基质特性，从而影响癌症进展，其在肿瘤血管生成以及肿瘤细胞增殖、侵袭和转移中起重要作用[41]。*KRAS*基因在该信号通路中起调控作用，是所有癌症中突变率最高的致癌基因[42]。*KRAS*将转导信号从细胞表面传输到细胞核，影响细胞分化、生长、趋化性和凋亡，其突变与肿瘤的发生、发展密切相关[43]。除了突变引起的异常激活外，野生型和突变型*KRAS*之间的关联在介导*KRAS*驱动的恶性肿瘤中起着重要作用，有研究表明野生型*KRAS*在*KRAS*突变型癌症中表现出抑制肿瘤生长的功能[44]。

对差异基因分别进行KEGG和GSEA分析，同时表现富集的通路有甲状腺激素信号途径、癌症中的胆碱代谢和甘油磷脂代谢。在许多情况下，甲状腺激素信号与其他信号通路发生交叉作用[45]。有研究表明，作为甲状腺激素受体亚型（TR）的突变体，病毒致癌基因 *v*—*erbA* 是禽红细胞增多症逆转录病毒诱导鸡红细胞增多症和纤维肉瘤的介质，删除了螺旋 12 TR 结构域，从而阻止了与三碘甲状腺原氨酸的结合，具有致癌性[46]。在垂体瘤发生过程中，TR突变体通过激活细胞周期蛋白激酶、细胞周期蛋白*D1*和*E2F*途径发挥作用[47]。胆碱代谢异常是肿瘤发生和癌症进展的标志，其特征是磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱增加，临床检测甘油磷酸胆碱可用于癌症诊断、预后和治疗反应的监测[48]。癌细胞转化和肿瘤微环境之间的相互作用导致了癌细胞中胆碱代谢的异常[49]。近年来研究表明，甘油磷脂代谢在多种恶性肿瘤中表现异常，癌细胞通过调控甘油磷脂代谢促进肿瘤的快速增殖、侵袭和迁移，说明该通路在肿瘤的发生过程中发挥重要作用[50]。有意思的是，本研究中GESA分析结果显示在MSB1中过表达gga-miR-130b-3p后基因富集在癌症中的miRNAs，提示该miRNA的异常高表达可能会影响其他miRNA的表达水平。Heidari等[51]对感染MDV的MD抗性和易感品系鸡的胸腺组织进行转录组比较分析，鉴定出78个差异表达miRNA，分

析这些miRNA的功能靶点将有助于理解MD的发病机制。

4 结 论

本研究利用转录组测序分析了在MDV转化的T淋巴细胞系MSB1中过表达具有抑癌作用的miRNA miR-130b-3p后基因在转录组水平上的表达变化，并筛选鉴定了可能与MD遗传抗性相关的基因和生物信号通路。结合差异基因、GO功能注释和pathway分析，证实了差异基因（如*MCM10*、*KCNA3*、*PTK2*、*FGL2*、*GPAM*、*BMP4*、*LOXL3*、*DDO*和*KRAS*）和信号通路（如过氧物酶体、癌症中的蛋白聚糖、调节干细胞多能性、甲状腺激素信号途径、癌症中的胆碱代谢、甘油磷脂代谢和癌症中的miRNAs）在MD发展进程中发挥重要作用。同时也进一步表明gga-miR-130b-3p可作为选育MD抗性鸡的候选分子标记，为研究家禽抗病育种机制提供更多的理论依据。

参考文献 References

[1] Lee L F, Wu P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung H J, Witter R L. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000,97(11):6091-6096

[2] Teng M, Zheng L P, Li H Z, Ma S M, Zhu Z J, Chai S J, Yao Y X, Nair V, Zhang G P, Luo J. Pathogenicity and pathotype analysis of Henan isolates of Marek's disease virus reveal long-term circulation of highly virulent MDV variant in China[J]. *Viruses*, 2022,14(8):1651

[3] Bertzbach L D, Kheimar A, Ali F A Z, Kaufer B B. Viral factors involved in Marek's disease virus (MDV) pathogenesis[J]. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2018,5(4):238-244

[4] Ergin K, Çetinkaya R. Regulation of microRNAs[M]. In: *miRNomics*. New York:Humana,2022:1-32

[5] Yoon A J, Wang S, Kutler D I, Carvajal R D, Philipone E, Wang T, Peters S M, LaRoche D, Hernandez B Y, McDowell B D, Stewart C R, Momen-Heravi F, Santella R M. MicroRNA-based risk scoring system to identify early-stage oral squamous cell carcinoma patients at high-risk for cancer-specific mortality[J]. *Head & Neck*, 2020,42(8):1699-1712

[6] Bai Y L, Liao Y F, Yang S K, Jin J X, Lu W L, Teng M, Luo J, Zhang G P, Sun A J, Zhuang G Q. Deletion of miR-M8 and miR-M13 eliminates the bursa atrophy induced by Marek's disease virus infection [J]. *Veterinary Microbiology*, 2022,268:109409

[7] 王伟东，滕蔓，郑鹿平，刘金玲，张文凯，李林燕，张志会，樊剑鸣，罗俊. MiR-M11基因编辑对马立克病病毒体外复制的影响[J]. 河南农业科学，2023，52(1)：134-143
Wang W D, Teng M, Zheng L P, Liu J L, Zhang W K, Li L Y, Zhang Z H, Fan J M, Luo J. Effect of miR-M11 gene editing on replication of Marek's disease virus *in vitro*[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2023, 52(1): 134-143 (in Chinese)

[8] Fu M J, Wang B, Chen X, He Z Y, Wang Y Q, Li X Q, Cao H, Zheng S J. MicroRNA gga-miR-130b suppresses infectious bursal disease virus replication via targeting of the viral genome and cellular suppressors of cytokine signaling 5[J]. *Journal of Virology*, 2017,92(1):e01646-e01617

[9] Zhao C F, Li X, Han B, Qu L J, Liu C J, Song J Z, Lian L, Yang N. Gga-miR-130b-3p inhibits MSB1 cell proliferation, migration, invasion, and its downregulation in MD tumor is attributed to hypermethylation. [J]. *Oncotarget*, 2018,9(36):24187-24198

[10] 赵春芳. miRNA和MDV原癌基因Meq在鸡马立克氏病肿瘤转化过程中作用机制研究[D]. 北京:中国农业大学, 2018
Zhao C F. Roles of miRNA and MDV oncogene Meq in the transformation of chicken Marek's disease lymphoma[D]. Beijing:China Agricultural University,2018 (in Chinese)

[11] Wang C Y, Chu Z L, Liu W K, Pang Y, Gao X L, Tang Q X, Ma J G, Lu K J, Adam F E A, Dang R Y, Xiao S, Wang X L, Yang Z Q. Newcastle disease virus V protein inhibits apoptosis in DF-1 cells by downregulating TXNL1[J]. *Veterinary research*, 2018,49(1):102

[12] Wan Y P, Zhang J N, Fang C, Chen J N, Li J, Li J, Wu C L, Wang Y J. Characterization of neuromedin U (NMU), neuromedin S (NMS) and their receptors (NMUR1, NMUR2) in chickens[J]. *Peptides*, 2018,101:69-81

[13] Yuan B, Zou M Y, Zhao Y B, Zhang K, Sun Y F, Peng X L. Up-regulation of miR-130b-3p activates the PTEN/PI3K/AKT/NF-κB pathway to defense against Mycoplasma gallisepticum (HS strain) infection of chicken[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018,19(8):2172

[14] Li H W, Liu P, Li D P, Wang Z X, Ding Z, Zhou M, Chen X, Miao M L, Ding J L, Lin W, Liu Y H, Zha X J. STAT3/miR-130b-3p/MBNL1 feedback loop regulated by mTORC1 signaling promotes angiogenesis and tumor growth[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022,41(1):297

[15] Bai Y L, Liao Y F, Yang S K, Jin J X, Lu W L, Teng M, Luo J, Zhang G P, Sun A J, Zhuang G Q. Deletion of miR-M8 and miR-M13 eliminates the bursa atrophy induced by Marek's disease virus infection [J]. *Veterinary Microbiology*, 2022,268:109409

[16] Abdel-Maksoud M A, Iqbal K, Gull S, Kumar S K, Mastoor M, Almutairi S M, Almanaa T N, Alfuraydi A A, Mubarak A, Kotob M H, Jamil M, Zaky M Y. Immune modulation and prognostic significance of MCM10 in pan-cancer: A comprehensive analysis[J]. *American Journal of Translational Research*, 2023,15(11):6451-6463

[17] Hu X M, Qin A J, Xu W C, Wu G H, Li D, Qian K, Shao H X, Ye J Q. Transcriptional analysis of host responses to Marek's disease virus infection in chicken thymus[J]. *Intervirology*, 2015,58(2):95-105

[18] Guilz N C, Ahn Y O, Seo S, Mace E M. Unwinding the role of the CMG helicase in inborn errors of immunity [J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2023,43(5):847-861

[19] Kang J A, Park S H, Jeong S P, Han M H, Lee C R, Lee K M, Kim N, Song M R, Choi M, Ye M, Jung G, Lee W W, Eom S H, Park C S, Park S G. Epigenetic regulation of Kcna3-encoding Kv1.3 potassium channel by cereblon contributes to regulation of $CD4^+$ T-cell activation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(31): 8771-8776

[20] Angi B, Muccioli S, Szabò I, Leanza L. A meta-analysis study to infer voltage-gated K^+ channels prognostic value in different cancer types[J]. *Antioxidants*, 2023,12(3):573

[21] Li R X, Zhou W A. Multi-omics analysis to screen potential therapeutic biomarkers for anti-cancer compounds[J]. *Heliyon*, 2022,8(9):e09616

[22] Batista S, Maniati E, Reynolds L E, Tavora B, Lees D M, Fernandez I, Elia G, Casanovas O, Celso C L, Hagemann T, Hodivala-Dilke K. Haematopoietic focal adhesion kinase deficiency alters haematopoietic homeostasis to drive tumour metastasis [J]. *Nature communications*, 2014,5:5054

[23] Sethuraman A, Brown M, Seagroves T N, Wu Z H, Pfeffer L M, Fan M Y. SMARCE1 regulates metastatic potential of breast cancer cells through the HIF1A/PTK2 pathway[J]. *Breast Cancer Research*, 2016, 18(1):81

[24] Weisser M, Yeh R F, Duchateau-Nguyen G, Palermo G, Nguyen T Q, Shi X Y, Stinson S Y, Yu N, Dufour A, Robak T, Salogub G N, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, Larratt L, Rossiev V A, Bence-Bruckler I, Geisler C H, Montillo M, Fischer K, Fink A M, Hallek M, Bloehdorn J, Busch R, Benner A, Döhner H, Valente N, Wenger M K, Stilgenbauer S, Dornan D. PTK2 expression and immunochemotherapy outcome in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood*, 2014,124(3):420-425

[25] Schreiber R D, Old L J, Smyth M J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. *Science*, 2011, 331(6024):1565-1570

[26] Chi J Q, Teng M, Yu Z H, Xu H, Su J W, Zhao P, Xing G X, Liang H D, Deng R G, Qu L H, Zhang G P, Luo J. Marek's disease virus-encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting LTBP1 and suppressing the TGF-β signaling pathway [J]. *Virology*, 2015,476:72-84

[27] Deng H Y, Makizumi R, Ravikumar T S, Dong H L, Yang W C, Yang W L. Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells [J]. *Experimental Cell Research*, 2007,313(5):1033-1044

[28] de S Laurentino T, da S Soares R, Marie S , da S Oba-Shinjo S M. LOXL3 function beyond amino oxidase and role in pathologies, including cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3587

[29] Hu X M, Qin A J, Xu W C, Wu G H, Li D, Qian K, Shao H X, Ye J Q. Transcriptional analysis of host responses to Marek's disease virus infection in chicken thymus[J]. *Intervirology*, 2015,58(2):95-105

[30] Schilter H, Findlay A D, Perryman L, Yow T T, Moses J, Zahoor A, Turner C I, Deodhar M, Foot J S, Zhou W B, Greco A, Joshi A, Rayner B, Townsend S, Buson A, Jarolimek W. The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(3): 1759-1770

[31] Zeng M, Li Q X, Chen J Z, Huang W F, Liu J H, Wang C Y, Huang M N, Li H, Zhou S, Xie M Y, Zeng K. The Fgl2 interaction with Tyrobp promotes the proliferation of cutaneous squamous cell carcinoma by regulating ERK-dependent autophagy [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2022,19(1):195-204

[32] Yan J, Zhao Q N, Gabrusiewicz K, Kong L Y, Xia X Q, Wang J, Ott M, Xu J D, Davis R E, Huo L F, Rao G, Sun S C, Watowich S S, Heimberger A B, Li S L. FGL2 promotes tumor progression in the CNS by suppressing $CD103^+$ dendritic cell differentiation [J]. *Nature Communications*, 2019,10(1):448

[33] Liu Y L, Xu L, Zeng Q L, Wang J L, Wang M, Xi D, Wang X J, Yang D F, Luo X P, Ning Q. Downregulation of FGL2/prothrombinase delays HCCLM6 xenograft tumour growth and decreases tumour angiogenesis [J]. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* ,2012,32(10):1585-1595

[34] Irifune H, Kochi Y, Miyamoto T, Sakoda T, Kato K, Kunisaki Y, Akashi K, Kikushige Y. GPAM mediated lysophosphatidic acid synthesis regulates mitochondrial dynamics in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Science*, 2023,114(8):3247-3258

[35] Sun C B, Li B, Yang M M, Guo R R, Yuan S M, Wang J C, Hu H. Generation of GPAM knockout human embryonic stem cell line SYSUe-008-a using CRISPR/Cas9[J]. *Stem Cell Research*, 2021,53:102303

[36] Marchan R, Büttner B, Lambert J, Edlund K, Glaeser I, Blaszkewicz M, Leonhardt G, Marienhoff L, Kaszta D, Anft M, Watzl C, Madjar K, Grinberg M, Rempel E, Hergenröder R, Selinski S, Rahnenführer J, Lesjak M S, Stewart J D, Cadenas C, Hengstler J G. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 promotes tumor cell migration and poor survival in ovarian carcinoma[J]. *Cancer Research*, 2017,77(17):4589-4601

[37] Yang Y, Yang T, Zhao Z F, Zhang H X, Yuan P, Wang G, Zhao Z, An J Z, Lyu Z M, Xing J L, Li J B. Down-regulation of BMAL1 by miR-494-3p promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis by increasing GPAM-mediated lipid biosynthesis[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022,18(16):6129-6144

[38] Di Cara F, Savary S, Kovacs W J, Kim P, Rachubinski R A. The peroxisome: an up-and-coming organelle in immunometabolism [J]. *Trends in Cell Biology*, 2023,33(1):70-86

[39] Kim J A. Peroxisome metabolism in cancer[J]. *Cells*, 2020,9(7):1692

[40] Nuzzo T, Feligioni M, Cristino L, Pagano I, Marcelli S, Iannuzzi F, Imperatore R, D'Angelo L, Petrella C, Carella M, Pollegioni L, Sacchi S, Punzo D, De Girolamo P, Errico F, Canu N, Usiello A. Free d-aspartate triggers NMDA receptor-dependent cell death in primary cortical neurons and perturbs JNK activation, Tau phosphorylation, and protein SUMOylation in the cerebral cortex of mice lacking d-aspartate oxidase activity[J]. *Experimental Neurology*, 2019,317:51-65

[41] Wei J F, Hu M L, Huang K T, Lin S D, Du H L. Roles of proteoglycans and glycosaminoglycans in cancer development and progression [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020,21(17):5983

[42] Cox A D, Fesik S W, Kimmelman A C, Luo J, Der C J. Drugging the undruggable RAS: Mission possible [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014,13(11):828-851

[43] Huang L M, Guo Z X, Wang F, Fu L W. KRAS mutation: From undruggable to druggable in cancer [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021,6(1):386

[44] Westcott P M K, Halliwill K D, To M D, Rashid M, Rust A G, Keane T M, Delrosario R, Jen K Y, Gurley K E, Kemp C J, Fredlund E, Quigley D A, Adams D J, Balmain A. The mutational landscapes of genetic and chemical models of Kras-driven lung cancer [J]. *Nature*, 2015, 517(7535):489-492

[45] Liu Y Y, Brent G A. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2010,21(3):166-173

[46] Rosen M D, Chan I H, Privalsky M L. Mutant thyroid hormone receptors (TRs) isolated from distinct cancer types display distinct target gene specificities: A unique regulatory repertoire associated with two renal clear cell carcinomas[J]. *Molecular Endocrinology*, 2011, 25(8): 1311-1325

[47] Furumoto H, Ying H, Chandramouli G V R, Zhao L, Walker R L,

Meltzer P S, Willingham M C, Cheng S Y. An unliganded thyroid hormone beta receptor activates the cyclin D1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma/E2F pathway and induces pituitary tumorigenesis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005,25(1):124-135

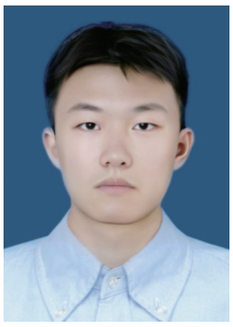
[48] Sonkar K, Ayyappan V, Tressler C M, Adelaja O, Cai R Q, Cheng M L, Glunde K. Focus on the glycerophosphocholine pathway in choline phospholipid metabolism of cancer [J]. *NMR in Biomedicine*, 2019, 32(10):e4112

[49] Gillies R J, Raghunand N, Karczmar G S, Bhujwalla Z M. MRI of the tumor microenvironment [J]. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2002,16(4):430-450

[50] Li Z Y, Zhang H F. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016,73(2):377-392

[51] Heidari M, Zhang H M, Sunkara L. MDV-induced differential microRNA expression in the primary lymphoid organ of thymus [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022,170:105688

责任编辑:秦梅



第一作者简介: 李家乐,安徽科技学院在读硕士研究生,主要从事家禽遗传抗性的分子机制研究。曾获得三好学生,国家励志奖学金等荣誉。参与省级重点研发项目(202204C06020074),省级高校自然科学项目(2023AH051872)各一项。

通讯作者简介: 赵春芳,副教授,博士,安徽科技学院硕士生导师,主要从事家禽、水禽优良性状的遗传机制解析研究。主持国家自然科学基金项目、安徽省重点研发项目、安徽省教育厅青年拔尖人才项目、安徽省高等学校自然科学项目和安徽省自然科学基金各1项。授权国内发明专利1项,国际发明专利2项,完成省级科技成果登记2项,以第一或通讯作者在国内外高质量期刊发表论文8篇。