

宋祥军,程悦,邱明宇,等.禽致病性大肠杆菌 *phoP/Q* 基因缺失对雏鸡脾脏 microRNAs 功能的影响[J].江苏农业学报,2019, 35(5):1167-1174.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.024

禽致病性大肠杆菌 *phoP/Q* 基因缺失对雏鸡脾脏 microRNAs 功能的影响

宋祥军,程悦,邱明宇,薛媚,涂健,邵颖,祁克宗

(安徽农业大学兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室,安徽合肥230036)

摘要: 从 microRNA (miRNA) 水平探究禽致病性大肠杆菌 (APEC) *phoP/Q* 基因缺失对雏鸡脾脏功能表达的影响,为 APEC 的防治提供参考资料。用禽致病性大肠杆菌和其 *phoP/Q* 基因的缺失株分别攻毒 14 日龄雏鸡,采集其脾脏组织为材料进行高通量测序获得 miRNA 表达谱,选择差异倍数大于 8 的 miRNA 进行 Real-time PCR,对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测以及 GO、KEGG 富集分析。测序结果获得 10 个差异表达的 miRNA,其中 1 个 miRNA 表达量下调,9 个 miRNA 表达量上调,Real-time PCR 结果表明,miRNA 变化趋势与测序结果一致,GO 分析结果表明,差异表达基因主要富集在能量代谢、免疫系统、细胞生长与凋亡、糖合成与代谢等生物学过程。KEGG 分析结果显示预测靶基因参与 MAPK 信号通路、糖代谢通路、Wnt 信号通路等重要通路。本试验分析禽致病性大肠杆菌 *phoP/Q* 基因缺失后感染雏鸡脾脏 miRNA 的表达差异,从 miRNA 水平探讨了 *phoP/Q* 基因缺失对 APEC 致病性的影响,为 APEC 的防治提供参考资料。

关键词: 禽致病性大肠杆菌; *phoP/Q*; 脾脏; miRNA; 差异表达

中图分类号: S858.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2019)05-1167-08

Effect of avian pathogenic *Escherichia coli phoP/Q* gene mutation on microRNAs function in chicken spleen

SONG Xiang-jun, CHENG Yue, QIU Ming-yu, XUE Mei, TU Jian, SHAO Ying, QI Ke-zong

(Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract: The effect of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *phoP/Q* gene deletion on the expression of spleen function in chicks was investigated from the level of microRNA (miRNA), which provided reference for the prevention and control of APEC. The 14-day-old chicks were challenged with avian pathogenic *Escherichia coli* and their *phoP/Q* gene deletion strains, and their spleen tissues were collected for high-throughput sequencing to obtain miRNA expression profiles. The miRNAs with a fold difference greater than eight fold were selected for real-time PCR, target gene prediction and GO and KEGG enrichment analysis were carried out for differentially expressed miRNAs. Ten differentially expressed miRNAs were obtained by sequencing. One miRNA expression was down-regulated and nine miRNA expression levels were up-regulated.

Real-time PCR results showed that the change trend of miRNA was consistent with sequencing results. GO analysis results showed that differentially expressed genes were mainly enriched in biological processes such as energy metabolism, immune system, cell growth and apoptosis, sugar synthesis and metabolism. KEGG analysis results showed that the predicted target genes were involved in important pathways, such as MAPK signaling pathway,

收稿日期:2018-12-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31802161、31772707);安徽农业大学引进与稳定人才项目(yj2017-31);安徽农业大学青年科学基金重点项目(2017zd01)

作者简介:宋祥军(1987-),男,山东省临沭人,博士,讲师,主要从事动物疫病防控与生物防治研究。(E-mail) sxj@ahau.edu.cn

通讯作者:祁克宗,(E-mail) qkz@ahau.edu.cn

glucose metabolism pathway and Wnt signaling pathway. In this study, the difference of microRNA expression in spleen of chickens infected with avian pathogenic *Escherichia coli* *phoP/Q* gene deletion was analyzed, and the influence of *phoP/Q* gene deletion on APEC pathogenicity was discussed from the level of microRNA in order to provide reference for the prevention and control of APEC.

Key words: avian pathogenic *Escherichia coli*; *phoP/Q*; spleen; microRNA; differential expression

禽致病性大肠杆菌(APEC)是严重危害养殖业和人类健康的重要病原菌,可以通过呼吸道途径感染禽类从而引起多系统损伤综合征^[1]。引起以气囊炎、关节滑膜炎、输卵管炎和腹膜炎为主要特征的传染病,雏鸡发病率可达 30%~60%,病死率可达 100%^[2]。该病原菌除了可以自发感染外,还可以继发其他病原体感染,使病情加重。随着集约化养殖技术的发展,给养禽业带来了巨大的损失,已成为养禽业中危害最大的细菌性病菌之一。另有研究结果表明,APEC 与引起人尿道感染的致病性尿道大肠杆菌具有高度相似性^[3],目前,APEC 被认为是一种危害人类和动物的食源性病原菌,研究其致病机理与防治对策具有重要的公共卫生学意义。因此,越来越多的专家学者从不同方向研究其致病机理,深入了解 APEC 的结构功能,为该病的防治提供新思路。

phoP/Q 二元调控系统是一种广泛存在于禽致病性大肠杆菌中的信号传导调控系统,可参与调控细菌毒力和许多细胞活性,也是最早被发现对 APEC 致病性及逃逸宿主防御反应起重要作用的二元调控系统,有关研究结果表明,APEC 致病过程中 *phoP/Q* 二元调控系统在调控细菌致病力方面发挥着重要作用^[4]。有文献报道研究人员通过检测缺失株的 13 个毒力基因转录水平,发现呈不同程度的上调或下调,并对其运动性进行检测,发现 *phoP/Q* 基因缺失能使禽致病性大肠杆菌的运动力显著下降,并且可降低 APEC 的黏附性和入侵 CEF 细胞的能力,说明 *phoP/Q* 二元调控系统是通过影响下游毒力基因的表达影响 APEC 的致病性^[5-6]。脾脏作为动物体的主要血液过滤器,起着重要作用,在雏鸡感染 APEC 过程中可用于检测细胞损伤以及 APEC 的病理机制。此外,由于家禽淋巴管及淋巴结发育不良,脾脏是禽类最大的淋巴器官,在免疫功能中发挥的作用比哺乳动物大。一些研究已经通过使用 cDNA 微阵列或转录组测序(RNA-Seq)分析感染 APEC 鸡的免疫器官或细胞中 miRNA 表达谱的变化,结果显示了由 APEC 调节的有 1 603 个基因^[7]。

在鸡脾脏中,感染后 1 d 和 5 d 分别在显示严重病理症状的 APEC 感染组和未感染组之间发现 1 101 和 1 723 个差异表达的基因,其他免疫相关组织如骨髓、法氏囊和胸腺中,在易感和抗性鸟类之间检测到大量差异表达的基因^[8]。目前,对于 miRNA 在宿主反应和 APEC 感染抗性中的作用等研究尚不够深入。

微小核糖核酸(miRNA)是一类长度 19~24 nt 的内源性非编码小 RNA,广泛存在于真核生物中,并通过与靶基因非翻译序列互补结合促进靶基因降解或抑制其翻译,从而发挥基因转录后的调节功能^[9-10]。研究表明,miRNA 分子广泛参与调控多种生物学过程,如免疫应答、细胞分化、增殖、代谢、凋亡、生殖发育、病毒和细菌感染等^[11-12]。已有多篇关于 miRNA 参与调控天然免疫应答的相关报道,如 miRNA-146、miRNA-101 分别在炎症反应中起着负向和正向的调控作用;miRNA-92a 已被报道在肿瘤和血管生成方面起着重要作用^[13]。Rodriguez 等通过敲除小鼠 miRNA 加工的关键酶 *Dicer*,使胸腺细胞减少十倍,导致小鼠产生严重的免疫疾病,主要表现为脾脏肿大、肠淋巴结肿大和肠炎^[14]。本试验采用禽致病性大肠杆菌分离株和缺失 *phoP/Q* 基因的 APEC 菌株分别攻毒雏鸡,取雏鸡病变明显的脾脏组织进行 miRNA 差异表达分析,分析 miRNA 的功能变化及对 APEC 致病性调控的影响,通过 miRNA 表达分析和靶基因预测,探究 *phoP/Q* 二元调控系统与 APEC 致病力之间的关系,为 *phoP/Q* 二元调控系统对 APEC 毒力调控机制的研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物与样品采集

本试验所采用 1 日龄 20 羽罗曼雏鸡均购于安徽省安禽养殖公司。标准饲喂至 14 日龄后随机分为 A、B 两组。采用本实验室分离保存的 APEC 菌种对 A、B 两组分别攻毒,A 组记为 APEC 攻毒

组,B组记为 *phoP/Q* 基因缺失组。攻毒 48 h 后,分别取 2 组病鸡剖检采集脾脏组织,取出的脾脏组织通过液氮快速冷冻后转移至-80 ℃冰箱储存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采用生工生物工程(上海)股份有限公司的 Total RNA Extractor (Trizol) 试剂盒,按照说明书步骤提取样品的 RNA,提取到的所有 RNA 样品检测完整性、浓度及基因组污染情况。

1.2.2 miRNA 文库的构建及高通量测序 总 RNA 质量检测合格后,利用 Qubit 2.0 RNA 检测试剂盒对 Total RNA 精确定量,以确定文库构建 Total RNA 所需的量。利用 T4 RNA 连接酶直接将 miRNA 两端连接上特异的接头序列,然后将加上接头后的 miRNA 进行反转录合成 cDNA 链,再将反转录产物进行 PCR 扩增和胶回收得到 cDNA 文库。用 12% PAGE 胶电泳检测 PCR 产物,回收 140~150 bp 左右的 PCR 产物,利用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,按照 1:1 (质量比)混合后在 HiSeq/XTen 测序仪(Illumina 公司产品)上进行测序。

1.2.3 差异表达 miRNA 测序及分析 通过 Fast QC 对测序的原始数据(Raw reads)进行质量评估,使用 cutadapt 去除接头,trimmomatic 去除两端低质量碱基和 reads 过滤以获得纯净序列(Clean reads)。使用 blastn 将 reads 比对 Rfam 数据库的 sRNA、tRNA、snRNA、snoRNA,统计比对上的 reads 数目和百分比,过滤掉比对上的 reads;使用 bowtie 将 reads 比对物种的 exon 和 intron 序列,统计比对上的 reads 数目和百分比,过滤掉比对上的 exon;使用 bowtie 将 reads 比对物种参考基因组序列,统计比对上的 reads 数目和百分比,过滤掉不能比对上的 reads。使用 edgeR 进行差异表达分析,以 $P<0.05$ 、差异倍数大于 2 作为筛选条件,过滤掉表达量低的 miRNA,得到差异显著表达的 miRNA。

1.2.4 Real-time PCR 验证部分差异表达基因 选取测序结果中差异倍数超过 2^3 的表达基因进行验证,根据 NCBI 中的基因序列,用引物设计软件 Primer Premier 5 分析设计引物(表 1),以 *U6 snRNA* 作为差异表达 miRNA 的内参基因,进行 Real-time PCR 检测,反应体系 20 μ l,上、下游引物各 1 μ l (20 pmol/ μ l),2 μ l 模板,用 ddH₂O 补至 20 μ l,其他成分按照说明书加入。定量 PCR 仪扩增反应条件设

置如下:95 ℃预变性 10 min;95 ℃变性 15 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 25 s,共 40 个循环。

表 1 miRNA 定量引物序列

Table 1 Sequence of miRNA quantitative primers

引物名称	序列(5'→3')
gga-miR-1551-5p RT-Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACTCTGAAGT
gga-miR-1551-5p F-Primer	CCAGCCTAGCAGCAAAAAGAAC
gga-miR-1717 RT-Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACAGTTTTCT
gga-miR-1717 F-Primer	ACACTACTCTCTAACCTGACAG
gga-U6 F-Primer	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC
gga-U6 R-Primer	TGGAACGCTTCACGAATTTGCCG

1.2.5 miRNA 靶基因和生物信息学功能预测 利用 miRanda 算法对两组间差异表达的 miRNA 进行靶基因预测,通过 cluster Profiler 软件对预测到的靶基因进行基因注释(GO term)和 KEGG 通路(KEGG Pathway)分析,获得 miRNA 靶基因富集的生物学通路,并绘制 GO-GO 网络图和 pathway-gene 网络图。

2 结 果

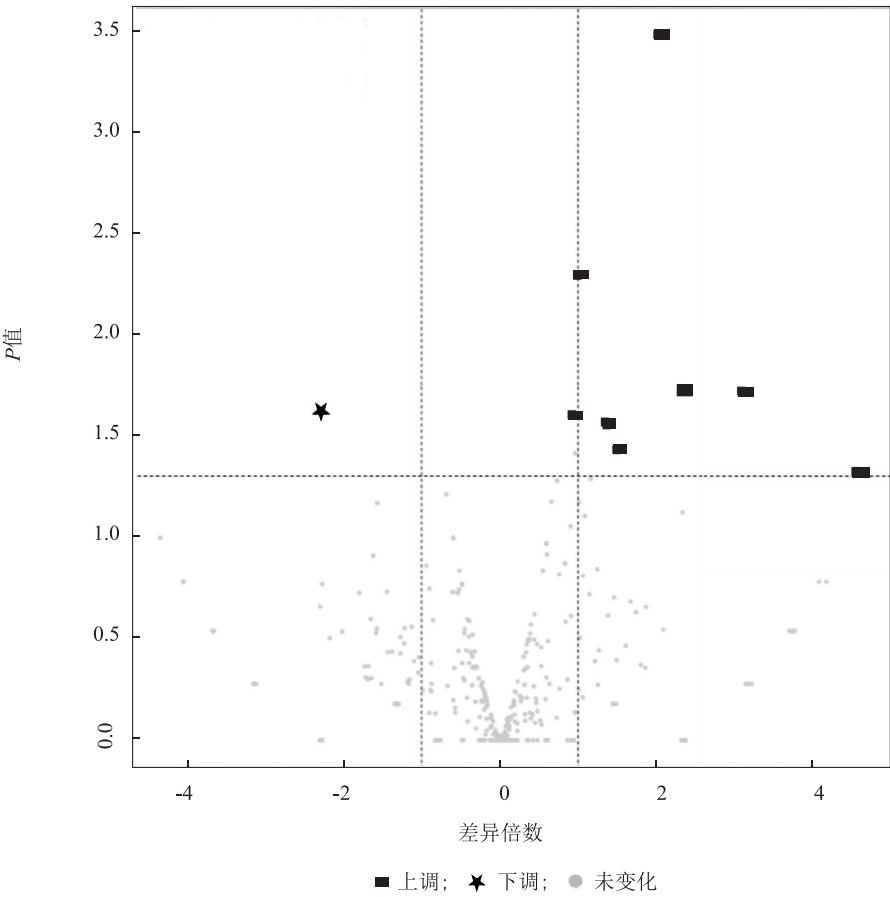
2.1 脾脏组织中 miRNA 测序结果

提取样本 RNA 后,以 $P<0.05$ 、Fold Change 值的对数绝对值大于 1 (即差异倍数大于 2)作为筛选条件,筛选得到差异显著的 miRNA。*phoP/Q* 基因缺失后雏鸡脾脏有 10 个 miRNA 差异表达,其中有 1 个下调的 miRNA 和 9 个上调的 miRNA,由 volcano 图(图 1)展示差异显著 miRNA 分布。高通量测序成功获取了 APEC 和其 *phoP/Q* 基因缺失株感染的雏鸡脾脏组织的差异表达 miRNA 序列及其表达谱,如表 2 所示。

2.2 miRNA 的靶基因分析

利用 miRanda 算法预测差异表达 miRNA 的潜在靶基因,并进行生物信息学分析。通过差异表达 miRNAs 预测靶基因并进行 GO 功能注释和富集分析,确定 miRNA 靶基因的功能。从图 2 可以看出,预测的靶基因主要注释到生物调节、细胞过程、免疫和刺激反应等生物过程,胞外区、细胞器、细胞膜、腔上包膜和高分子配合物等细胞组分,结合、催化活性、核酸结合转录活性和转运活性等分子功能上。

KEGG 信号通路分析发现, *phoP/Q* 基因缺失株感染雏鸡脾脏差异表达 miRNA 的靶基因主要富集于代谢通路、MAPK 信号通路、Wnt 信号通路、C 型凝集素受体等信号通路(表 3)。

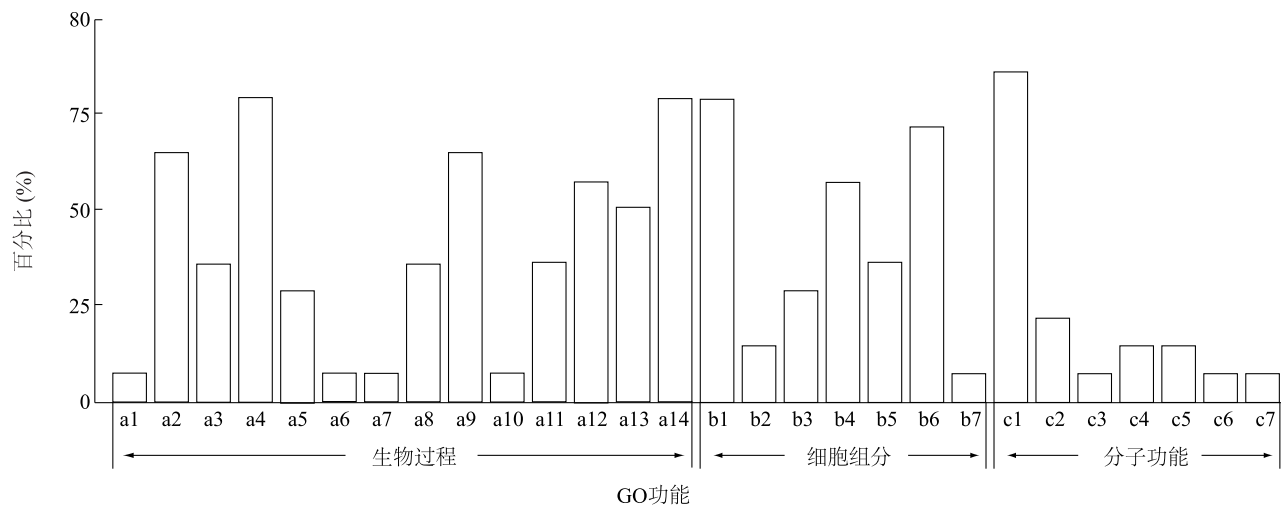


图中横坐标为表达差异倍数,取 lg2 的数值;纵坐标为表达差异显著性 *P*-value, 取 -lg10 的数值。

图 1 差异表达 miRNA 火山图
Fig.1 Volcano map of differentially expressed miRNA

表 2 差异表达 miRNA
Table 2 The differentially expressed miRNA

miRNA 名称	差异倍数	<i>P</i> 值	miRNA 序列 (5'→3')
<i>gga</i> -miR-1551-5p	9.3	1.94×10^{-2}	CUAGCAGCAAAAAGAACUUCAGA
<i>gga</i> -miR-1717	25.7	4.96×10^{-2}	ACUCUCUAACCUGACAGAAAACU
<i>gga</i> -miR-27b-5p	3.0	3.70×10^{-2}	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAA
<i>gga</i> -miR-3538	5.4	1.88×10^{-2}	GUUCGGUGAUGAAACCAUGGA
<i>gga</i> -novel-2-mature	2.0	2.48×10^{-2}	CUCGACACAAGCUUUUGU
<i>gga</i> -novel-2-star	4.3	3.33×10^{-4}	CUGAUUCUGGGUCGGGGUU
<i>gga</i> -novel-3-mature	2.0	2.48×10^{-3}	CUCGACACAAGCUUUUGU
<i>gga</i> -novel-62-star	2.7	2.70×10^{-2}	CUGGUUAGUACUUGGAU
<i>gga</i> -novel-62-mature	2.1	5.03×10^{-3}	ACCGGGUGCUGUAGGCCUU
<i>gga</i> -novel-50-star	-5.0	2.48×10^{-2}	GAUUCUGGAAAACUGUUCU



柱形图上数字代表基因数量。a1:反应过程;a2:生物学调控过程;a3:细胞成分合成;a4:细胞过程;a5:发育过程;a6:生长;a7:免疫系统过程;a8:定位;a9:代谢过程;a10:多生物过程;a11:多细胞生物过程;a12:刺激反应;a13:信号;a14:单一生物过程;b1:细胞;b2:细胞外区域;b3:大分子复合物;b4:膜成分;b5:囊泡腔;b6:细胞器;b7:突触;c1:综合;c2:催化活性;c3:分子功能调节器;c4:分子转导活性;c5:核酸结合转录因子活性;c6:信号转导活性;c7:转运活性。

图2 差异表达 miRNA 靶基因 GO 分析

Fig.2 GO analysis of differentially expressed miRNA target gene

表3 差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析结果

Table 3 KEGG pathway enrichment analysis results of differentially expressed miRNA target genes

序号	通路 ID	通路名称	靶基因
1	gga00510	N-多糖生物合成网	MAN2A2
2	gga04625	C 型凝集素受体信号通路	NFATC1
3	gga04933	糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路	NFATC1
4	gga00190	氧化磷酸化	NDUFS2
5	gga04310	Wnt 信号通路	NFATC1
6	gga04218	细胞衰老	NFATC1
7	gga04010	MAPK 信号通路	NFATC1
8	gga04080	神经活性配体与受体的相互作用	NPFFR1

2.3 差异表达 miRNA 的 Real-time PCR 验证结果

为了验证 RNA-Seq 数据中筛选的差异基因的可靠性,选取 2 个测序结果中的差异倍数大于 8 的表达基因,以 *U6* 作为内参基因,根据 NCBI 中的基因序列设计引物,利用 Real-time PCR 方法进行验证,结果如图 3 所示, RNA-Seq 数据与荧光定量 PCR 数据表达趋势基本一致,因此说明转录组数据可信。

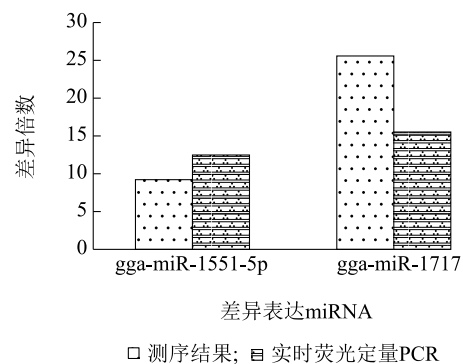


图3 荧光定量 PCR 与 RNA-Seq 的基因表达比较

Fig.3 Comparison of gene expression between fluorescent quantitative PCR and RNA-Seq

2.4 miRNA 靶基因的 GO 和 KEGG 富集网络图

利用 Blast 等软件对靶基因进行 GO 和 KEGG 分析得到 GO-GO 网络图(图 4)和 Pathway-gene 网络图(图 5)。图 4 展示不同目的基因集合在 GO 注释分布上的差异,揭示了靶基因富集的各功能注释之间的关联,以共有靶基因富集为连接点,GO 条目间构成复杂又紧密相关的 GO-GO 网络图,其中共有靶基因主要集到细胞质、细胞膜、细胞器等 GO 注释。图 5 揭示了各靶基因与信号通路间的联系,发现靶基因参与的重要通路有 MAPK 信号通路、Wnt 信号通路和 C 型凝集素受体信号通路等。

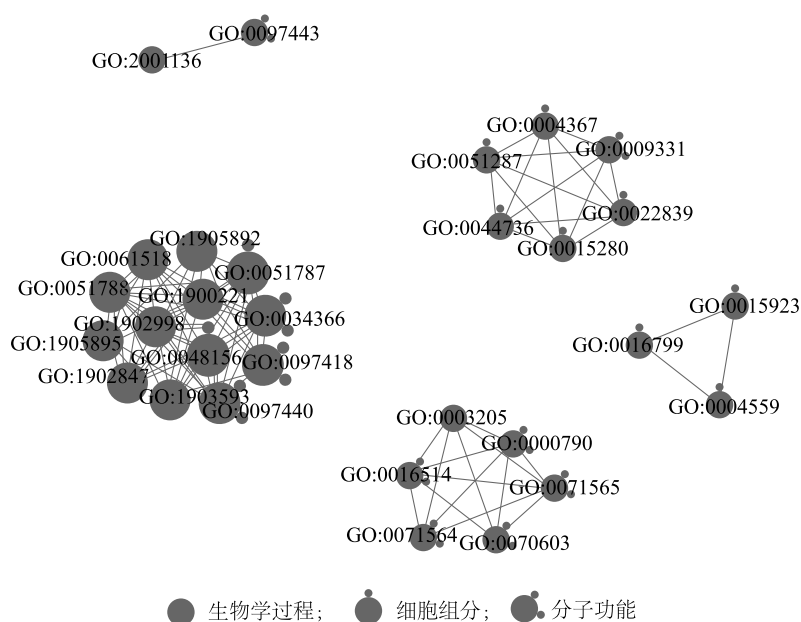
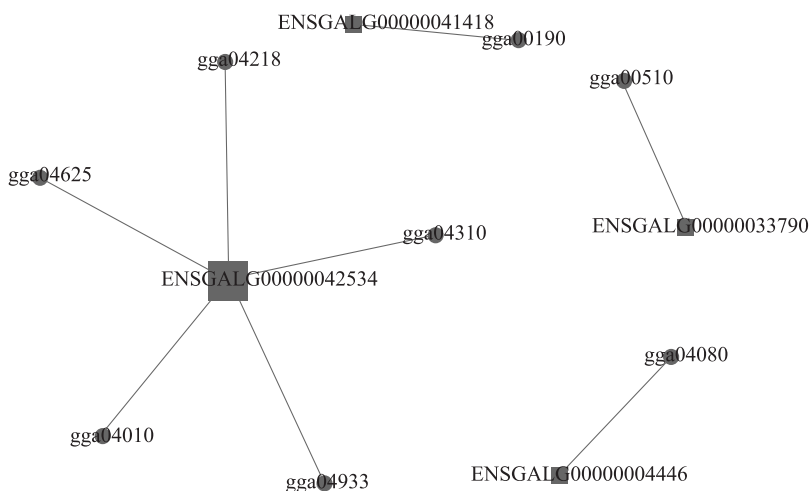


图 4 GO 富集 GO-GO 互作网络图

Fig.4 GO enrichment GO-GO network diagram



图中圆点代表 pathway, 方形点代表基因, 节点大小正相关于网络连接度。

图 5 Pathway 富集 pathway-gene 网络图

Fig.5 Pathway enrichment pathway-gene network diagram

3 讨 论

本试验利用 Illumina 高通量测序平台分别对 2 组 14 日龄雏鸡脾脏进行 miRNA 的测序, 检测到 10 个差异表达的 miRNA, 通过对差异表达的核心 miRNA 进行靶基因预测和功能富集分析, 其主要富集在能量代谢、免疫系统、细胞生长与凋亡、糖合成与

代谢等方面。

APEC 感染可使雏鸡出现脾脏组织间隙增大、淋巴组织减少、吞噬细胞增多等病理变化, 以致免疫能力降低而患病^[15]。本试验利用高通量测序技术研究了 APEC 对雏鸡脾脏 miRNA 表达的影响, 探讨 APEC 的致病机制。脾脏是家禽有机体免疫应答的重要场所, 家禽脾脏由白髓和红髓构成, 白髓由脾小

体和动脉周围淋巴鞘组成,红髓由脾索和脾窦组成^[16-17]。脾脏是家禽体内最大的免疫器官,含有大量的免疫活性细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心,可通过淋巴细胞的产生、成熟和存储结合先天适应性免疫系统^[18]。不同菌株对 miRNA 表达谱的影响是不一样的,本试验采用的 APEC 是由本实验室从感染禽致病性大肠杆菌的家禽中分离而来的 AE17 菌株,实验室人员也对 APEC 做了大量其他相关研究工作^[19],但在 *phoP/Q* 基因缺失对雏鸡脾脏 microRNAs 功能影响方面尚未进行深入研究。

细菌及病毒感染能改变宿主细胞的 miRNA 表达谱,这些变化可能是机体用来抵抗外来物质侵入的宿主细胞先天性免疫应答,亦或通过改变某个通路,而利于细菌及病毒的繁殖^[20-21]。有研究结果表明,EB 病毒感染人 B 细胞时,miR-155 可上调 1 000 倍以上,高表达的 miR-155 可引发 B 细胞白血病和淋巴瘤^[22]。本试验利用 APEC 感染雏鸡脾脏模型,通过 miRNA 测序技术发现雏鸡脾脏组织 miRNA 表达量丰富,预测了 10 个差异表达的 miRNA 的靶基因,包括 1 个下调和 9 个上调的 miRNA,通过 miRanda 软件预测了这 10 个差异表达的 miRNA 的靶基因,并对靶基因进行了生物信息学分析。GO 富集分析发现靶基因主要富集在细胞、细胞器、细胞膜和生物调节等过程上,另外也较多地注释到刺激反应和信号传导过程。说明 *phoP/Q* 基因缺失后的 APEC 感染雏鸡脾脏,对脾脏细胞组分的影响很大,生物调节和刺激反应等在感染过程中起重要作用。KEGG 信号通路分析发现,这些靶基因参与多种细胞新陈代谢和免疫相关的信号通路(如 MAPK 信号通路、Wnt 信号通路等)。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是细胞内重要的信号通路之一,MAPK 通路与多种细胞过程有关,多数研究结果表明,MAPK 通路在细胞的生长、迁移、增殖分化、凋亡、中胚层分化、精子成熟^[23-24]等功能中都发挥着重要作用,表明该通路对大部分生物体是必不可少的^[25]。Wnt 信号通路是重要的细胞信号转导途径,参与从胚胎到成体的一系列过程,如控制胚胎早期发育、决定细胞分化、调控细胞增殖及生长,异常表达或激活该途径会导致各种疾病甚至肿瘤发生^[26]。C 型凝集素受体信号通路是一条天然免疫途径,对动物机体免疫调节极为重要。C 型凝集素受体(CLR)是一类含有糖类识别结构域(CRD)和细胞外结构域的钙结

合位点的蛋白质^[27],可作为一种模式识别受体识别病原体上碳水化合物成分,识别碳水化合物结构后,树突细胞即被激活,触发细胞内信号级联反应,启动特异性细胞因子产生及调节^[28]。

参考文献:

- [1] 马兴树,朱美霞,石 虎,等.禽致病性大肠杆菌的分离、O 血清群鉴定及药物敏感试验[J].中国畜牧兽医,2016,43(12):3343-3348.
- [2] 王传春,袁东方,孙秋艳,等.禽致病性大肠杆菌的分离鉴定及致病性研究[J].山东畜牧兽医,2017,38(3):8-9.
- [3] 夏 乐.禽致病性大肠杆菌 E058 株在鸡感染模型中的转录组学分析及 *sodA* 基因功能和致病性评价[D].扬州:扬州大学,2017.
- [4] 李春晓,张宇曦,祁克宗,等. *phoP/Q* 双组分系统对禽致病性大肠杆菌的毒力调控作用[J].畜牧兽医学报,2016,47(1):157-164.
- [5] 黄博言.禽致病性大肠杆菌 *phoP/Q* 基因缺失对其致病性的影响[D].合肥:安徽农业大学,2015.
- [6] 薛 娟,祁克宗,薛 挺,等.利用基因芯片筛选禽致病性大肠杆菌中与 *phoP/Q* 二元调控系统相关的耐药基因[J].中国预防兽医学报,2017,39(8):672-674.
- [7] LAVRIC M, MAUGHAN M N, BLISS T W, et al. Gene expression modulation in chicken macrophages exposed to *Mycoplasma synoviae* or *Escherichia coli* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 126(1): 111-121.
- [8] JIA X Z, NIE Q H, ZHANG X Q, et al. Novel MicroRNA involved in host response to avian pathogenic *Escherichia coli* identified by deep sequencing and integration analysis[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(1): e00688.
- [9] BARTEL D P. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [10] BARTEL D P. microRNAs: genomics, target recognition and regulatory function[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [11] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H A. The diverse function of microRNAs in animal development and disease [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-450.
- [12] TIRON A, VASILESCU C. Spleen and immunity immune implications of splenectomy[J]. *Chirurgia*, 2008, 103(3): 255-263.
- [13] 李基棕,李文良,毛 立,等.山羊副流感病毒 3 型感染 MDBK 细胞的 miRNA 表达谱变化分析[J].畜牧兽医学报,2017,48(5):896-906.
- [14] RODRIGUEZ A, VIGORITO E, CLARE S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function [J]. *Science*, 2007, 316(5824): 608-611.
- [15] 黄 超,吴海斌,杨 娟,等.大肠杆菌病患鸡肝、脾结构的病理学研究[J].畜牧与饲料科学,2016,37(6/7):134-136.
- [16] 王福传,韩一超,赵洪恩,等.复方中草药免疫增强剂对鸡免疫器官组织形态学影响的研究[J].中国预防兽医学报,2001,23

- (6):419-421.
- [17] ZHU S, PAN W, QIAN Y C. MicroRNA in immunity and autoimmunity[J]. Journal of Molecular Medicine, 2013, 91(9): 1039-1050.
- [18] SANGFORD E E, ORR M, BALFANZ, et al. Spleen transcriptome response to infection with avian pathogenic Escherichia coli in broiler chickens[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 469.
- [19] 王惠珂, 李少参, 祁克宗, 等. 基于 RNA-Seq 筛选禽致病性大肠杆菌损伤雏鸡小肠差异表达基因[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(2): 111-115.
- [20] 王 军, 燕晓晓, 丁 赫, 等. LPS 诱导牛子宫内膜细胞 miRNA 差异表达分析[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(10): 10-12, 16.
- [21] 韩亚儒. 马传染性贫血病毒感染靶细胞后差异表达 microRNA 的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [22] 陈严玉. 新城疫病毒感染鸡巨噬细胞 miRNA 表达谱分析及 gga-miRNA155 的功能[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [23] ALMOG T, NAOR Z. The role of mitogen activated protein kinase (MAPK) in sperm functions[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 314(2): 239-243.
- [24] 郭永娟, 郑亚琳, 张彩霞, 等. MAPK 信号通路在动物繁殖中的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(5): 1268-1273.
- [25] 张秀秀, 郭云涛, 黄万龙, 等. 靶向 MAPK 信号通路调控脂肪细胞分化的 microRNAs[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(11): 2159-2166.
- [26] 孙宏亮, 许美花, 王 瑶, 等. Wnt 信号通路在牛胎盘发育过程中的功能研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(1): 161-166.
- [27] LARA M K, LIN X. C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses[J]. Chinese Journal of Immunology, 2012, 9(2): 105-112.
- [28] 杨 婷, 唐 丽, 贺福初. C 型凝集素受体 CLRs 与固有免疫[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(5): 476-478.

(责任编辑: 陈海霞)