

重组鸡 GSTA3 蛋白对福美双诱导胫骨软骨发育不良肉鸡红细胞免疫相关基因转录的影响

贾发杰¹, 牛 胜¹, 张 宁¹, 李 欣¹, 宁官保¹, 张 鼎¹,
李宏全¹, 马海利¹, 郝卫芳², 高文伟¹, 赵宇军¹, 高诗敏¹,
李桂兰¹, 李建慧¹, 闫 芳¹, 高荣琨¹, 田文霞^{1*}

(1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; 2. 太原市动物疫病预防控制中心, 太原 030024)

摘 要: 为研究胫骨软骨发育不良(TD)肉鸡红细胞免疫相关基因转录水平的变化及重组鸡谷胱甘肽 S-转移酶 A3(chGSTA3)蛋白对 TD 肉鸡红细胞免疫相关基因转录的影响, 将 120 只肉雏鸡饲喂一周后, 随机分为基础日粮组(A、B、C 组)和福美双处理组(D、E、F 组), 对福美双处理组肉鸡通过饲料中添加 100 mg · kg⁻¹ 福美双诱发建立肉鸡 TD 模型, 通过腿部肌肉注射法, 对 B 组和 E 组肉雏鸡注射有活性的低剂量(20 μg · kg⁻¹)重组 GSTA3 蛋白, 对 C 组和 F 组肉雏鸡注射高剂量(50 μg · kg⁻¹)重组 GSTA3 蛋白, 对 A 和 D 组的肉雏鸡注射等体积的磷酸盐缓冲液(PBS); 使用 Real-time PCR 对肉鸡红细胞中免疫基因的 mRNA 转录水平进行检测。结果显示, Toll 样受体(TLR)2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR15、髓样分化因子 88(MyD88)、主要组织相容性复合体(MHC)Ⅱ、核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族中的 C5 型受体(NLRC5)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)、白细胞介素-7(IL-7)基因可以在鸡红细胞转录; 福美双处理组 D 与磷酸缓冲盐溶液(PBS)处理组 A 相对比, TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR15、MyD88、TRAF6、MHC Ⅱ 和 NLRC5 在试验的第 4 天显著升高, IL-7 显著降低(P<0.05), 在试验的第 15 天 TD 肉鸡红细胞中 TLR2、TLR4、MyD88 和 NLRC5 显著下调(P<0.05), IL-7、TLR3、TLR5、TLR7、TLR15、MHC Ⅱ、TRAF6 变化不明显(P>0.05); E 组和 F 组与 D 组相比, 在试验第 4 天, 除 E 组 TLR4、TLR5 和 MyD88 外, 其余基因都有显著性变化(P<0.05); 在第 15 天, E 组中 TLR4、TLR5、MyD88 和 NLRC5, 及 F 组中 TLR3、TLR5、MyD88、TRAF6 和 IL-7 变化不显著, 其他基因都有显著性差异(P<0.05)。鸡红细胞可能通过免疫相关基因 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR15、IL-7、MyD88、TRAF6、MHC Ⅱ 和 NLRC5 转录水平的变化, 在早期诱导 TD 发生, 后期减轻肉鸡 TD 症状; GSTA3 能够对福美双诱导肉鸡 TD 的作用产生影响。

关键词: 福美双; 胫骨软骨发育不良; 红细胞; chGSTA3; TLRs

中图分类号: S852.34

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0811-07

The Effect of Recombinant Protein GSTA3 on the Transcription of Erythrocytes Immune Related Genes in Tibial Dyschondroplasia Broilers Induced by Thiram

JIA Fa-jie¹, NIU Sheng¹, ZHANG Ning¹, LI Xin¹, NING Guan-bao¹, ZHANG Ding¹,
LI Hong-quan¹, MA Hai-li¹, HAO Wei-fang², GAO Wen-wei¹, ZHAO Yu-jun¹,
GAO Shi-min¹, LI Gui-lan¹, LI Jian-hui¹, YAN Fang¹, GAO Rong-kun¹, TIAN Wen-xia^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Taiyuan Center for Disease Control and Prevention, Taiyuan 030024, China)

Abstract: The objective of this study was to evaluate the transcriptional changes of immune related

收稿日期: 2017-10-09

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500800); 山西省回国留学人员科研资助项目(2017-073); 晋中市重点科技创新平台(P171002-3); 山西省科技攻关项目(20130311027-3); 国家自然科学基金(31072179); 山西省自然科学基金(2014011028-1)

作者简介: 贾发杰(1989-), 男, 河南商丘人, 硕士生, 主要从事动物传染病发病与免疫机制研究, E-mail: 2251651836@qq.com

* 通信作者: 田文霞, E-mail: wenxiatian@126.com

genes and the effect of recombinant chicken glutathione S-transferase A3 (chGSTA3) protein on the transcription of immune related genes in erythrocytes of Tibial Dyschondroplasia (TD) broiler chickens. Therefore, the model of TD broiler chickens was established, in which 120 broiler chickens were randomly broken up into 6 groups; group A, B and C (fed with basal diet), group D, E and F (fed with basal diet containing $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Thiram) after one week normal feeding. The broiler chickens of group B and E were treated with chGSTA3 protein by intramuscular injection (low dose: $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and the broilers of group C and F were treated intramuscularly with chGSTA3 protein (high dose: $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), while groups A and D received the same dosage of phosphate buffered solution (PBS). We used Real-time PCR to investigate the mRNA expression of the immune-related genes in chicken erythrocytes. The transcripts for *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*), major histocompatibility complex (*MHC*) class II, Nucleotidebinding oligomerization domain receptor caspase recruitment domain 5 (*NLRC5*), TNF receptor-associated factor 6 (*TRAF6*) and Interleukin (*IL-7*) were constitutively expressed in erythrocytes of healthy broiler chickens. Contrasted with group A with phosphate buffered solution (PBS) treatment, the mRNA transcription level of *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *MyD88*, *MHC II*, *NLRC5*, *TRAF6* of Thiram-treated chicken erythrocytes in group D on the 4th day were significantly up-regulated ($P < 0.05$), whereas *IL-7* was significantly downregulated. We observed that the transcripts of immune-related genes: *TLR2*, *TLR4*, *MyD88* and *NLRC5* in the chicken erythrocytes of group D were significantly downregulated than that in group A ($P < 0.05$), but *IL-7*, *TLR3*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *MHC II* and *TRAF6* were insignificant ($P > 0.05$) on the 15th day. The changes of above mentioned genes mRNA expression in group E and F were significant except *TLR4*, *TLR5*, *MyD88* in group E as compared with group D on the 4th day. The changes of *TLR4*, *TLR5*, *MyD88*, *NLRC5* genes in group E and *TLR3*, *TLR5*, *MyD88*, *TRAF6*, *IL-7* genes in group F were insignificant, whereas the others were significant compared with group D on the 15th day. Broiler chicken erythrocytes could induce the occurrence of TD in the early stage and alleviate TD symptoms in the late stage by changing the mRNA expression of *IL-7*, *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *MyD88*, *MHC II*, *NLRC5*, *TRAF6*. The recombinant chicken glutathione S-transferase A3 protein could influence TD development caused by Thiram.

Key words: Thiram; TD; erythrocytes; chGSTA3; *TLRs*

肉鸡 TD 是一种家禽胫骨近端生长板成骨受阻的疾病^[1]。TD 可导致肉鸡骨变形^[2], 该病严重危害了肉鸡养殖业, 导致 TD 的因素很多, 其致病机制还不清楚, 也没有有效的预防措施。福美双是一类二硫代氨基甲酸酯相关化合物, 不但被广泛的用作种子处理农用杀菌剂, 而且在橡胶工业中被较小范围的用作促进剂^[3]。鸡慢性接触二硫代氨基甲酸酯杀虫剂, 例如福美双或戒酒硫, 会增加 TD 发病率^[4-5]。福美双能有效地诱发肉鸡 TD, 并且与自然发生的肉鸡 TD 在症状上十分相似^[6]。谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GSTs) 是 II 相抗氧化家族中的一类蛋白酶, 且有解毒的作用^[7]。相

关研究表明, GSTA3 在保护正常的小鼠抵抗黄曲霉毒素毒性中起重要作用^[8]。患有 TD 的肉鸡生长板的很多软骨细胞发生凋亡^[9-10]。受到刺激的 TLRs 能够通过引发促凋亡信号通路而诱导凋亡^[11-13]。相关研究表明, 鸡红细胞不但具有免疫功能而且可以表达 *TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*^[14]。田文霞 (W. X. Tian) 等利用微阵列芯片技术筛选出 TD 早期的肉鸡胫骨生长板软骨细胞内差异性表达的免疫相关基因^[15]。先前人们主要从生长板血管的生成、生长板细胞的代谢、成熟和凋亡方面研究了 TD 的发生机制^[16-18], 但是红细胞免疫功能和 chGSTA3 蛋白解毒作用对 TD 发生的影响

尚未见报道。为研究福美双诱导的 TD 肉鸡中红细胞免疫基因的转录变化和重组 chGSTA3 对 TD 肉鸡红细胞免疫基因 mRNA 水平的影响,我们对福美双处理组肉鸡饲喂 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 福美双建立 TD 模型,并在不同的时间利用 chGSTA3 对 TD 肉鸡进行腿部肌肉注射,使用 Real-time PCR 检测 *TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*IL-7*、*MyD88*、*TRAF6*、*MHC II* 和 *NLRC5* 转录水平的变化,以探明其在肉鸡 TD 中的作用以及 chGSTA3 在 TD 发生时对它们的影响,为更深入全面的了解 TD 的发病机制和预防 TD 的发生提供新的科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1 日龄 120 只健康艾维茵肉雏鸡购自山西省大象农牧集团有限公司。

1.2 实验试剂

福美双 (Amresco); 实验室自行制备的重组鸡 GSTA3 纯化蛋白^[19]; RNAiso plus (Trizol) (AA909-1); prime script TM RT Reagent Kit (AK3020); SYBR® Premix Ex Taq II (TaKaRa 大连宝生物工程有限公司); DEPC 购于 Amresco 公司; $6 \times$ DNA Loading Buffer, 600 bp DNA ladder (中科瑞泰生物科技有限公司); $50 \times$ TAE Buffer (北京博奥拓达科技有限公司); 2 mL、1.5 mL 离心

管 (Axygen)。

1.3 试验方法

1.3.1 动物处理 将饲喂一周后的 120 只肉雏鸡随机分为基础日粮组 (A、B、C 组) 和饲喂福美双组 (D、E、F 组)。参考田文霞等^[20-21] 试验设计方案构建肉鸡 TD 模型; 通过肌肉注射, 在肉鸡第 8、10、12、14 日龄时, 分别给 B、E 组肉鸡腿部注射浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的重组 chGSTA3 蛋白; 给 C、F 组肉鸡腿部注射 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的重组 chGSTA3 蛋白; 给 A、D 组肉鸡注射等体积的 PBS, 对试验鸡进行常规的饲养管理。在饲喂福美双后第 4 和 15 天, 对各组鸡每只采集静脉抗凝血 2 mL, 用于后续试验。

1.3.2 鸡红细胞分离和红细胞 RNA 提取及质量检测 参照相关文献从上述血液样品中分离红细胞^[14], 使用本实验室改进的 Trizol 法提取红细胞总 RNA, 用核酸测定仪测定提取的 RNA 的浓度、A260/280、A260/230 的值, 并用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的红细胞 RNA 的质量。对质量合格的 RNA 反转录, 用于后续试验。

1.3.3 引物的设计与合成 根据 NCBI 收录的免疫相关的基因 *IL-7*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*NLRC5* 的 mRNA 序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计其引物, 参考相关文献^[22-24] 得到 *TLR4*、*MyD88*、*MHC II*、*TRAF6* 基因的引物序列, 利用 18S rRNA 作为内参基因。由上海捷瑞生物工程有限公司合成本试验所用引物 (表 1)。

表 1 Real-time PCR 扩增所使用的引物序列及 GenBank 登录号

Table 1 Primer sequences and GenBank accession numbers used in the Real-time PCR analysis

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequences	GenBank 登录号 GenBank accession number
<i>MHC II</i>	F: TGCCCGAAACCGACCGTCTG R: TCCAGCACCACCAGCACCTG	NM001318995
<i>MyD88</i>	F: CAGAAAGACCTTCAGTTTGTCCAG R: AATGACGACCACCATCCTCC	NM001030962
<i>TRAF6</i>	F: ATGGAAGCCAAGCCAGAGTT R: ACAGCGCACCAGAAGGGTAT	XM015287208
<i>TLR2</i>	F: ACCTGGCCCAT AACAGGATA R: ATGGAGCTGATTTGGTTGGA	AB046119
<i>TLR3</i>	F: GCCTAAATATCACGGTACTC R: CACAACAGTGGTAGTGATCA	NM_001011691
<i>TLR4</i>	F: AGTCTGAAATTGCTGAGCTCAAAT R: GCGACGTTAAGCCATGGAAG	NM001030693

(续表 1 Continued)

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences	GenBank 登录号 GenBank accession number
<i>TLR5</i>	F: CTGCCAAATCTTCGTGTCTT R: ACAGACGGAGTATGGTCAAA	FJ915552
<i>TLR7</i>	F: GGTGTTAGCCACGTGCTTAG R: CCATCCCTGTGCTGATAGAG	NM_001011688
<i>TLR15</i>	F: GTGTCCAACCTGCTCCATCGT R: GAAGCATGCAAATCCGATTG	NM_001037835
<i>IL-7</i>	F: CTTGTTCTGTCGCCAGTGAA R: CTTTCGATGTCATGGCTGAGT	NM_001037833
<i>NLRC5</i>	F: GTGTGGATACAGCCGTGAGA R: TTGCCTGTACCTGGTTTACC	JQ044414
18S rRNA	F: TTCCGATAACGAACGACAC R: GACATCTAAGGGCATCACAG	FM165414

F. 上游引物;R. 下游引物

F. Forward primers; R. Reverse primers

1.3.4 Real-time PCR 检测肉鸡红细胞 *IL-7*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MyD88*、*MHCII*、*NLRC5* 和 *TRAF6* 基因 根据 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] II 试剂盒说明书要求进行 Real-time PCR 反应,采用 10 μ L 的反应体系,体系组成: 0.25 μ L 的上游和下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹),5.0 μ L SYBR Premix Ex *Taq* II (2 \times),0.1 μ L ROX Reference Dye II (50 \times),1.0 μ L RT 反应液,3.4 μ L 单蒸水(dH₂O);Real-time PCR 条件:预变性反应1个循环,95 $^{\circ}$ C 3 min,PCR 反应 42 个循环,95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s;熔解曲线分析 1 个循环,55 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 30 s。

1.3.5 数据分析 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算免疫相关基因在鸡红细胞中的相对转录量,使用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件分析各组数据的差异显著性, $P < 0.05$ 即为差异表达显著, $P > 0.05$ 表达不显著;各组间显著差异标注不同英文小写字母。

2 结果

2.1 *IL-7*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MyD88*、*MHCII*、*NLRC5* 和 *TRAF6* 在肉鸡红细胞中的转录

试验结果表明正常肉鸡红细胞能够在 mRNA 水平上表达 *IL-7*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MyD88*、*MHCII*、*NLRC5* 和 *TRAF6*,其中

TLR7 表达量最高,其次是 *IL-7*、*TLR5*、*TLR4*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR15*、*MyD88*,而 *MHCII*、*NLRC5*、*TRAF6* 表达量较低,见图 1。

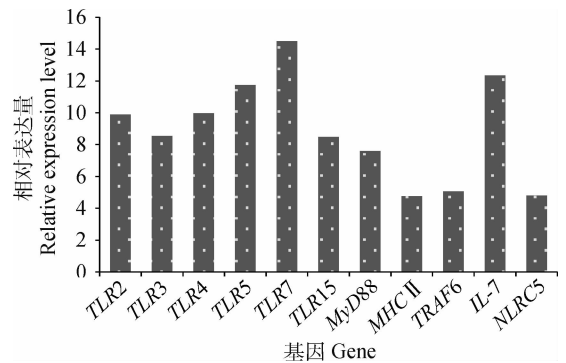


图 1 在正常肉鸡红细胞中 *TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MyD88*、*MHC II*、*TRAF6*、*IL-7*、*NLRC5* 相对于内参基因 18S 的 mRNA 表达量

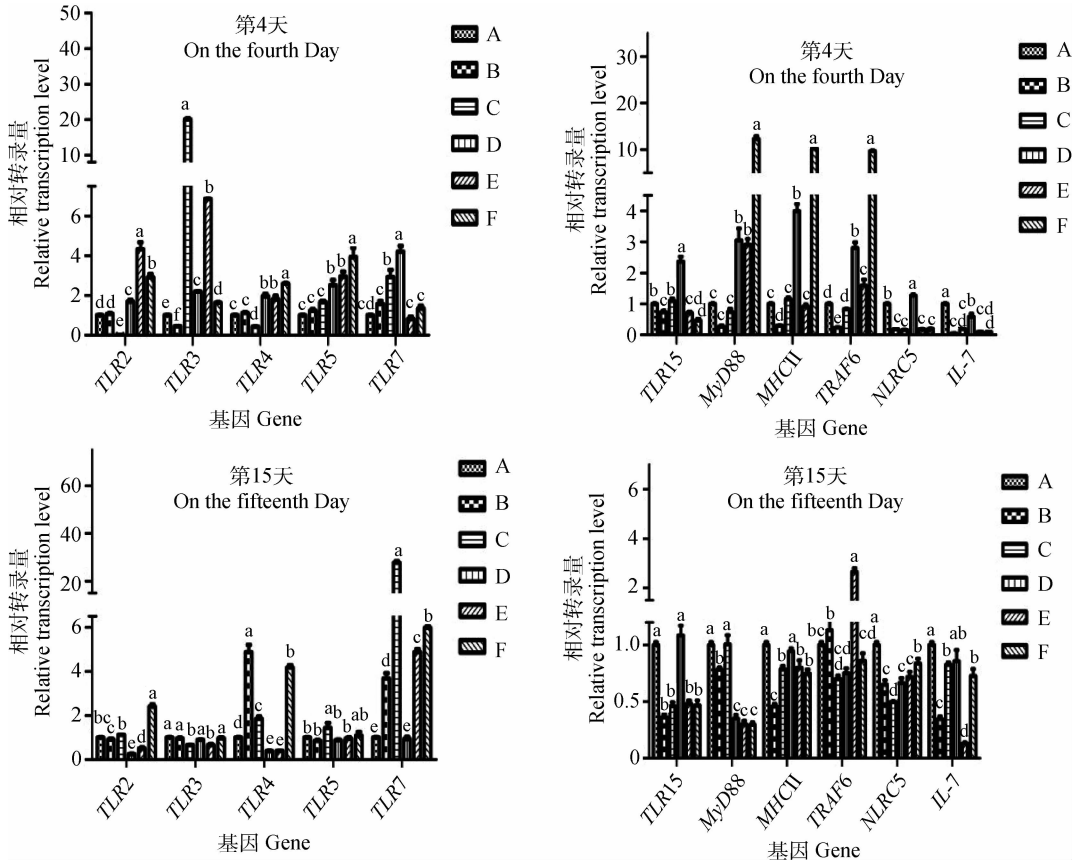
Fig. 1 The mRNA expression level of *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *MyD88*, *MHC II*, *TRAF6*, *IL-7*, *NLRC5* in erythrocytes of healthy broiler chickens relative to reference gene 18S

2.2 TD 肉鸡红细胞中免疫相关基因 mRNA 水平变化及 chGSTA3 对 TD 肉鸡红细胞中免疫相关基因转录的影响

通过 Real-time PCR 对 TD 肉鸡红细胞免疫相关基因的转录水平进行检测,发现在 TD 损伤期的第 4 天,D 组与 A 组相比,鸡红细胞中的 *TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MyD88*、

MHC II、*NLRC5*、*TRAF6* 基因转录水平显著上调, *IL-7* 显著降低 ($P < 0.05$); 在饲喂福美双后第 15 天, D 组 TD 肉鸡红细胞中 *TLR2*、*TLR4*、*MyD88* 和 *NLRC5* 显著下调 ($P < 0.05$), *IL-7*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MHC II* 和 *TRAF6* 变化不显著 ($P > 0.05$)。chGSTA3 处理的 E 组和 F 组与

D 组相比, 在试验第 4 天, 除了 E 组中的 *TLR4*、*TLR5*、*MyD88*, 其余基因都发生了显著变化 ($P < 0.05$), 在第 15 天 E 组中的 *TLR4*、*TLR5*、*MyD88*、*NLRC5* 及 F 组中的 *TLR3*、*TLR5*、*MyD88*、*TRAF6*、*IL-7* 变化不显著, 其余基因都有显著差异 ($P < 0.05$), 见图 2。



A. PBS 组; B. $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ chGSTA3 组; C. $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ chGSTA3 组; D. $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 福美双 + PBS 组; E. $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 福美双和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ chGSTA3 组; F. $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 福美双 + $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ chGSTA3 组; 不同的小写字母 (例如 a、b、c、d、e、f) 表示各组间差异显著 ($P < 0.05$)

A. PBS group; B. chGSTA3 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; C. chGSTA3 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; D. Thiram $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + PBS group; E. Thiram $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + chGSTA3 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; F. Thiram $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + chGSTA3 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; Different lower-case letters (such as a, b, c, d, e, f) indicate the significant difference between groups ($P < 0.05$)

图 2 TD 肉鸡红细胞中免疫相关基因的转录变化及 chGSTA3 对其的影响

Fig. 2 The transcription level of immune related genes in erythrocytes of TD affected-broiler chickens and the effect of recombinant chGSTA3 on the transcription

3 讨论

田文霞等研究发现, 肉鸡 TD 的发生可能与福美双影响 GSTs 的解毒功能有关^[25-26], 同时利用 cDNA 芯片技术筛选出 1 630 个差异表达基因, 经生物信息学分析, 这些基因与免疫应答、抗凋亡和氧化应激等有关^[15]。本试验对肉鸡 TD 红细胞中免疫基因的转录水平进行检测, 发现注射重组 chG-

STA3 蛋白后, *IL-7*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MHC II*、*MyD88*、*NLRC5*、*TRAF6* 有差异, 表明 chGSTA3 在福美双诱导的肉鸡 TD 中发挥一定的作用, 但其作用的分子机制有待进一步研究。研究表明, 福美双能改变神经元样 PC12 细胞的钙稳态, 从而使其凋亡^[27]; N. C. Rath 等^[16]和张宁等^[17]通过 TUNEL 法检测技术发现 TD 肉鸡胫骨生长板内许多软骨细胞和血管内皮细胞发生

凋亡,最终导致 TD 发生。

有研究发现,机体细胞中的 *TLR3* 基因被激活后,通过信号转导激活核因子 κ B(*NF- κ B*),使有生物活性的细胞因子和化学介质被大量生成和释放,导致干扰素等蛋白的活化,进而使感染病毒的细胞发生凋亡^[28],而卡介苗能通过活化 *TLR7* 而引起浅表膀胱癌细胞的凋亡^[29];鸡红细胞也可能通过上调 *IFNs* 的表达,促进病毒感染的细胞凋亡^[14]。本试验结果显示,在试验第 4 天,饲喂福美双 D 组 *TLR3* 和 *TLR7* 显著上调,可能使软骨细胞凋亡,而诱导 TD 发生^[17]。

研究表明,鞭毛蛋白诱导活化的 *TLR5* 也能导致足细胞凋亡^[30],银纳米颗粒通过 *TLR2* 信号转导通路也会引起软骨细胞的凋亡^[31],活化的 *TLR4-MyD88* 信号通路也参与了血管紧张素 II 诱导的肾小球系膜细胞的凋亡过程^[32]。本试验结果显示,在试验第 4 天 D 组 *TLR2*、*TLR4* 和 *TLR5* 与 A 组相比显著上调,可能通过一系列信号转导,激活 *caspases* 信号通路,最终导致软骨细胞凋亡。

白细胞介素 7 能通过使促凋亡蛋白 Bad 失活而促进 T 细胞的存活^[33]。本研究显示,在饲喂福美双后第 4 天,*IL-7* 基因显著下调,可能在 TD 发生中也有促进软骨细胞凋亡的作用。

在试验第 15 天,D 组与对照组 A 相比,*IL-7*、*MHC II*、*TRAF6*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15* 不显著,*MyD88*、*NLRC5*、*TLR2*、*TLR4* 下调,这可能与减轻软骨损伤有关。

4 结 论

鸡红细胞能转录 *IL-7*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MHC II*、*MyD88*、*NLRC5*、*TRAF6*;鸡红细胞 *TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15*、*MHC II*、*MyD88*、*NLRC5*、*TRAF6* 基因 mRNA 水平升高,*IL-7* 降低后,可能通过一系列信号转导,促进软骨细胞凋亡,而在后期可减轻 TD 症状;*chGSTA3* 可改变红细胞免疫相关基因的转录,这将为预防 TD 和深入研究其发病机制提供理论支持。

参考文献(References):

[1] RASAPUTRA K S, LIYANAGE R, LAY J O Jr, et al. Tibial dyschondroplasia-associated proteomic changes in chicken growth plate cartilage[J]. *Avian*

Dis, 2010, 54(4): 1166-1171.

- [2] LYNCH M, THORP B H, WHITEHEAD C C. Avian tibial dyschondroplasia as a cause of bone deformity[J]. *Avian Pathol*, 1992, 21(2): 275-285.
- [3] CERESER C, BOGET S, PARVAZ P, et al. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death[J]. *Toxicology*, 2001, 163(2-3): 153-162.
- [4] VARGAS M I, LAMAS J M, ALVARENGA V. Tibial dyschondroplasia in growing chickens experimentally intoxicated with tetramethylthiuram disulfide[J]. *Poult Sci*, 1983, 62(7): 1195-1200.
- [5] EDWARDS H M Jr. Efficacy of several vitamin D compounds in the prevention of tibial dyschondroplasia in broiler chickens[J]. *J Nutr*, 1990, 120(9): 1054-1061.
- [6] RATH N C, HUFF W E, BALOG J M, et al. Comparative efficacy of different dithiocarbamates to induce tibial dyschondroplasia in poultry[J]. *Poult Sci*, 2004, 83(2): 266-274.
- [7] SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY V M, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily[J]. *Biochem J*, 2001, 360(1): 1-16.
- [8] ILIC Z, CRAWFORD D, EGNER P A, et al. Glutathione-S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B1[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242(3): 241-246.
- [9] RATH N C, BAYYARI G R, BALOG J M, et al. Physiological studies of turkey tibial dyschondroplasia[J]. *Poult Sci*, 1994, 73(3): 416-424.
- [10] RATH N C, HUFF W E, BAYYARI G R, et al. Cell death in avian tibial dyschondroplasia[J]. *Avian Dis*, 1998, 42(1): 72-79.
- [11] LÓPEZ M, SLY L M, LUU Y, et al. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2[J]. *J Immunol*, 2003, 170(5): 2409-2416.
- [12] ALIPRANTIS A O, YANG R B, WEISS D S, et al. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2 [J]. *EMBO J*, 2000, 19(13): 3325-3336.
- [13] INTO T, KIURA K, YASUDA M, et al. Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation[J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6(2): 187-199.
- [14] ST PAUL M, PAOLUCCI S, BARJESTEHE N, et

- al. Chicken erythrocytes respond to Toll-like receptor ligands by up-regulating cytokine transcripts[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 95(1): 87-91.
- [15] TIAN W X, LI J K, QIN P, et al. Screening of differentially expressed genes in the growth plate of broiler chickens with tibial dyschondroplasia by microarray analysis [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 276.
- [16] RATH N C, RICHARDS M P, HUFF W E, et al. Changes in the tibial growth plates of chickens with thiram-induced dyschondroplasia [J]. *J Comp Pathol*, 2005, 133(1): 41-52.
- [17] 张 宁, 李 欣, 宁官保, 等. 福美双诱导的肉鸡胫骨软骨发育不良软骨细胞凋亡[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(12): 2421-2428.
ZHANG N, LI X, NING G B, et al. Apoptosis of chondrocytes in tibial dyschondroplasia induced by thiram in broilers[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(12): 2421-2428. (in Chinese)
- [18] RATH N C, HUFF W E, HUFF G R. Thiram-induced changes in the expression of genes relating to vascularization and tibial dyschondroplasia[J]. *Poult Sci*, 2007, 86(11): 2390-2395.
- [19] 卢晓晓. 肉鸡谷胱甘肽 S-转移酶 A3 基因的克隆及蛋白的表达和纯化[D]. 太谷: 山西农业大学, 2016.
LU X X. Cloning, expression and purification of broilers Glutathione S-Transferase A3 [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [20] 田文霞, 李家奎, 王 瑞, 等. 四甲基秋兰姆二硫化物对肉鸡胫骨生长板超微结构的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(6): 965-971.
TIAN W X, LI J K, WANG R, et al. The ultrastructure changes of tibia growth plate in broiler chickens with a thiram-feeding procedure[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(6): 965-971. (in Chinese)
- [21] 田文霞, 李家奎, 毕丁仁, 等. 福美双对肉鸡生长性能和胫骨软骨发育不良组织病理学变化的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(6): 733-738.
TIAN W X, LI J K, BI D R, et al. Effect of Thiram on Growth Performance and Histopathologic Changes of tibial dyschondroplasia in Broiler[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(6): 733-738. (in Chinese)
- [22] XU M, ZHANG H M, LEE L, et al. Gene expression profiling in rMd5- and rMd5 Δ meq-infected chickens[J]. *Avian Dis*, 2011, 55(3): 358-367.
- [23] KOGUT M H, IQBAL M, HE H Q, et al. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(9): 791-807.
- [24] JIE H, LIAN L, QU L J, et al. Differential expression of Toll-like receptor genes in lymphoid tissues between Marek's disease virus-infected and noninfected chickens [J]. *Poult Sci*, 2013, 92(3): 645-654.
- [25] 宁官保, 田文霞, 王 瑞, 等. 福美双诱发肉鸡胫骨软骨发育不良早期生长板消减 cDNA 文库的构建[J]. 中国农业科学, 2011, 44(4): 829-834.
NING G B, TIAN W X, WANG R, et al. Construction of subtracted cDNA library of the early growth plate in broiler chickens with thiram-induced tibial dyschondroplasia[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(4): 829-834. (in Chinese)
- [26] 田文霞, 刘红霞, 喻 进, 等. cDNA 芯片筛选肉鸡胫骨软骨发育不良相关基因[J]. 中国畜牧杂志, 2014, 50(17): 17-20.
TIAN W X, LIU H X, YU J, et al. Screening of associated genes in the growth plate of broiler chickens with tibial dyschondroplasia by cDNA microarrays [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2014, 50(17): 17-20. (in Chinese)
- [27] SOOK HAN M, SHIN K J, KIM Y H, et al. Thiram and ziram stimulate non-selective cation channel and induce apoptosis in PC12 cells[J]. *Neurotoxicology*, 2003, 24(3): 425-434.
- [28] KALAI M, VAN LOO G, VANDEN BERGHE T, et al. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA[J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(9): 981-994.
- [29] YU D S, WU C L, PING S Y, et al. Bacille Calmette-Guerin can induce cellular apoptosis of urothelial cancer directly through toll-like receptor 7 activation [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(8): 391-397.
- [30] LIN X, HUANG H T, YOU Y W, et al. Activation of TLR5 induces podocyte apoptosis[J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(2): 63-68.
- [31] KIM A S, CHAE C H, KIM J, et al. Silver nanoparticles induce apoptosis through the Toll-like receptor 2 pathway[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2012, 113(6): 789-798.
- [32] LV J L, JIA R H, YANG D P, et al. Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(1): 81-86.
- [33] LI W Q, JIANG Q, KHALED A R, et al. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein bad promoting T cell survival[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(28): 29160-29166.