



罗伊氏乳杆菌对仔猪空肠 miRNAs 表达谱的影响

孙倩^{1,2}, 王琪^{2,3}, 黄金秀^{2,3}, 齐仁立^{2,3}, 杨飞云², 王瑞生^{2*}, 兰云贤^{1*}

(1. 西南大学动物科学学院, 重庆 402460; 2. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460;

3. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460)

摘要: 试验旨在研究罗伊氏乳杆菌对仔猪空肠 miRNAs 表达的影响。选用 1 日龄健康约克×荣昌仔猪 6 窝, 随机分为两组, 每组 3 窝(共 27 头)。即对照组(每天每头灌喂 0.1% 的无菌蛋白胨溶液), LR 组(每天每头灌喂活菌总数为 1.0×10^{10} CFU 的罗伊氏乳杆菌), 分别在 10 和 20 日龄, 每组选取 6 头进行屠宰, 采集空肠样品。通过 Solexa 高通量测序技术检测空肠 miRNA 的表达谱, 利用生物信息学技术进行靶基因预测和功能分析。结果显示: 1) 试验构建了 8 个文库, 共获得 187 103 840 条纯净 reads 序列, 其中 22 nt 长度序列占的比例最大; 2) 10 和 20 日龄分别鉴定出 354 和 352 个已知的 miRNAs, 其中有 329 个 miRNAs 共表达; 3) 灌喂罗伊氏乳杆菌组仔猪空肠 miRNA 差异表达, 10 和 20 日龄分别获得 7 和 9 个差异显著的 miRNAs, ssc-miR-218 在两个日龄中都差异表达; 4) 对差异表达的 miRNAs 进行靶基因预测和 KEGG 通路分析, 发现有 10 221 个靶基因富集到 293 条通路上, 有 66 条通路显著富集($P < 0.05$), 包括与肠道发育及免疫调控相关的 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路; 5) 随机挑选 6 个差异表达 miRNAs 进行荧光定量 PCR 验证, 验证结果与测序结果基本一致。本研究表明, 罗伊氏乳杆菌可能通过影响空肠 miRNAs 表达来调控有关肠道健康的信号通路。

关键词: 罗伊氏乳杆菌; miRNA; Solexa 高通量测序; 空肠; 仔猪

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)09-2156-09

Effect of *Lactobacillus reuteri* on the Expression Profile of miRNAs in the Jejunum of Piglets

SUN Qian^{1,2}, WANG Qi^{2,3}, HUANG Jinxiu^{2,3}, QI Renli^{2,3},
YANG Feiyun², WANG Ruisheng^{2*}, LAN Yunxian^{1*}

(1. College of Animal Science, Southwest University, Chongqing 402460, China;

2. Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China;

3. Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Ministry of Agriculture, Chongqing 402460, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effect of *Lactobacillus reuteri* on the expression of miRNAs in the jejunum of piglets. Six litters of healthy 1-day-old York × Rongchang piglets were selected and randomly divided into the two group, 3 litters per group ($n = 27$). The two groups were control group (daily orally administrated with 0.1% sterile peptone solution per piglet), and the LR group (daily orally administrated with 1.0×10^{10} CFU of *L. reuteri* per piglet), respectively. At 10 and 20 days of age, six piglets per group were selected for slaughter, respectively, and the jejunum samples were collected. After RNA extraction, the library was constructed and the miRNA expression profile of the jejunum was detected by Solexa

收稿日期: 2019-12-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31702151); 重庆市财政专项资金项目(19513); 重庆市百千万工程领军人才培养计划(19234)

作者简介: 孙倩(1997-), 女, 云南宣威人, 硕士, 主要从事肠道微生物研究, E-mail: 1552029022@qq.com

* 通信作者: 王瑞生, 主要从事畜牧养殖技术研究, E-mail: 50856054@qq.com; 兰云贤, 主要从事猪营养研究, E-mail: lyunxian@163.com

high-throughput sequencing technology. Bioinformatics technology was used to conduct target genes prediction and functional analysis. The results showed that: 1) A total of 8 libraries were constructed and a total of 187 103 840 clean reads were obtained, of which the 22 nt length sequence accounted for the largest proportion; 2) Three hundred and fifty-four and 352 known miRNAs were respectively identified at 10 and 20 days of age, of which 329 miRNAs were co-expressed; 3) Differentially expressed (DE) miRNAs in the jejunum were found after *L. reuteri* administration, 7 and 9 DE miRNAs were obtained at 10 and 20 days of age, respectively. Notably, ssc-miR-218 was expressed differentially at two ages. 4) KEGG pathway analysis and target gene prediction on the differentially expressed miRNAs revealed that 10 221 target genes were enriched in 293 biological pathways, of which 66 were significantly enriched ($P < 0.05$), including the MAPK signaling pathway and PI3K-Akt signaling pathway, which were known to regulate intestinal development and immune. 5) Six miRNAs were selected to validate the sequencing results by qRT-PCR, the qRT-PCR expression results corresponded well with those from the sequencing. The results indicates that *L. reuteri* may regulate intestinal health related pathways by influencing the expression of jejunal miRNAs.

Key words: *Lactobacillus reuteri*; miRNA; Solexa high-throughput sequencing; jejunum; piglet
* **Corresponding authors:** WANG Ruisheng, E-mail: 50856054@qq.com; LAN Yunxian, E-mail: lyunxian@163.com

罗伊氏乳杆菌是一种具有很强特异性的益生菌,也是肠道微生物群的重要成员^[1]。研究表明,罗伊氏乳杆菌对仔猪生长、肠道微生物菌群组成与代谢、肠道免疫功能等都具有重要的调节作用。早期补充罗伊氏乳杆菌有助于仔猪肠道菌群的稳定,减少肠道潜在病原体的数量,降低仔猪腹泻率^[2-3];可以促进肠绒毛发育,提高肠道防御肽、紧密连接蛋白等的表达量,增加仔猪肠道屏障的完整性^[4-6];还能通过 Toll 样受体信号通路抑制炎症因子的表达来减少肠道炎症反应^[7],但具体的分子机制目前尚不十分清楚。

miRNA 是一类参与真核和原核细胞转录调控的内源性非编码 RNA 分子,在肠上皮细胞分化和免疫调控中具有非常重要的作用^[8-10]。它们不仅可以直接调控肠道免疫相关因子,而且可以通过影响肠道模式识别受体间接调控肠道免疫^[11]。试验发现,外源微生物可以影响宿主肠道 miRNA 的表达,进而调控宿主肠道的健康。仔猪感染沙门菌后,回肠 miR-29a 显著上调,导致小窝蛋白 2 显著下调^[12];嗜酸乳杆菌和双歧杆菌能降低小鼠结肠中癌基因 miR-135b、miR-155 的表达,增加肿瘤抑制基因 miR-26b、miR-18a 的表达,从而改善结肠癌^[13]。然而,对于肠道 miRNA 是否参与罗伊氏乳杆菌对仔猪肠道健康的调节过程,目前尚未见相关报道。因此,本试验拟通过高通量测序,研究罗伊氏乳杆菌

对仔猪空肠 miRNA 表达谱的影响,探寻发生明显变化的肠道 miRNAs 并预测可能的作用通路,为深入探究罗伊氏乳杆菌在肠道上的作用机制提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和样品采集

选用 1 日龄健康的约克×荣昌仔猪 6 窝,随机分为对照组和试验组,每组 3 窝(共 27 头)。从出生开始,对照组每天每头灌喂 2 mL 0.1% 的蛋白胨溶液,LR 组每天每头灌喂 2 mL 0.1% 蛋白胨溶液溶解的罗伊氏乳杆菌(罗伊氏乳杆菌 I5007 0.5×10^{10} CFU · mL⁻¹,由中国农业大学提供),连续灌喂 20 d。试验期间,哺乳母猪自由采食和饮水,仔猪由各自母猪哺乳喂养,自由饮水;母、仔猪按常规程序进行管理。在第 10 日龄(对照组 CN10、LR 组 LR10)和 20 日龄(对照组 CN20、LR 组 LR20)时,每组选取接近平均体重的 6 头仔猪(2 头 · 窝⁻¹)进行屠宰,采集空肠中段样品,于液氮迅速冻存后再转移至 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 RNA 文库构建及高通量测序

空肠组织液氮研磨,用 Trizol 试剂提取总 RNA,每组 6 个重复,3 个重复等量混合为一个样,共 2 个样,检测混合后的总 RNA 质量,保证样品 RIN 为 7.5~9.0。测序流程:15% 的聚丙烯酰胺凝

胶电泳分离长度为 18~30 nt 的小 RNA, 连接 3' 和 5' 接头, 然后进行反转录, 合成 cDNA, 再进行 PCR 扩增, 最后凝胶电泳并纯化, 由此构建对照组 CN10、CN20 和 LR 组 LR10、LR20 文库, 每个组 2 个重复, 共建 8 个文库, 分别为 CN10a、CN10b、CN20a、CN20b、LR10a、LR10b、LR20a 和 LR20b。文库构建完成后, 上机测序, 使用 BGISEQ-500 测序平台进行高通量测序, 测序由华大基因科技有限公司完成。

1.3 鉴定 miRNA 序列及 miRNA 的差异表达分析

测序所得序列去除低质量、接头污染和长度小于 18 nt 等序列, 然后统计小 RNA 片段的序列总数、种类和长度分布, 获得 clean reads。通过 SOAP 和 bowtie 筛选后的 sRNA 与猪的参考基因定位, 去除 rRNA、tRNA、scRNA、snRNA、snoRNA 等小 RNA, 过滤后, 与 miRBase21.0 中猪的已知 miRNAs 进行匹配, 匹配上的序列为已知 miRNAs, 再用 mirdeep 软件预测新 miRNA。对样本中已知 miRNA 的表达量进行统计, 用 TPM 进行表达量归一化处理。使用 SPSS 18.0 中的描述统计分析数据, 再使用 ExpDiff 方法比较对照组和试验组之间 miRNA 表达量的差异, 计算对照组和试验组中 miRNA 的差异倍数 (Fold change) 和 *P* 值, 筛选出差异表达的 miRNAs。

1.4 靶基因预测和功能分析

用 RNAhybrid、miRanda 和 TargetScan 多个软件对差异表达的已知 miRNAs 进行靶基因预测, 取交集作为预测结果。获得靶基因后, 与 KEGG 通路公共数据库进行匹配, 找出与整个基因组背景相比显著富集的通路 ($P < 0.05$), 并确定显著富集通路的靶基因数目。KEGG 通路的分析有助于更进一步了解基因的生物学功能, 确定候选基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

1.5 差异极显著 miRNAs 验证

为验证高通量测序结果的准确性, 随机挑选 10 和 20 日龄差异表达的 miRNAs 各 3 个, 每个样品设置 3 个重复, 进行荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试验。首先, 根据选中 miRNA 的成熟序列设计荧光定量 PCR 引物 (表 1), 然后, 利用反转录试剂盒 SYBR Prime Script^{RM} miRNA RT-PCR 获得 cDNA, 以 U6 作为内参基因, 用 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应, 反应体系: cDNA 模板 2.0 μ L、miRNA 引物 0.8 μ L、下游引物 (试剂盒) 0.8 μ L、2 \times SYBR Premix Ex Taq II 10 μ L、

ROX Reference Dye 0.4 μ L、ddH₂O 7 μ L; 反应条件为: 1) 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 2) 扩增: 95 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 20 s; 40 个循环。所有的反应设置 3 个重复, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量统计分析。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of qRT-PCR

miRNA 名称 miRNA name	引物序列 (5'→3') Primer sequence
miRNA-124a	TAAGGCACGCGGTGAATGCCA
miRNA-148a-3p	TCAGTGCCTACAGAACTTTGT
miRNA-182	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT
miRNA-150	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG
miRNA-125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG
let-7d-3p	CTATACGACCTGCTGCCTTTCT
U6	GCTTCGGCAGCACATATACT

2 结果

2.1 测序数据质量与分布

经过 Solexa 测序得到 raw data 数据, 进行过滤处理, 主要包括去除接头、污染及低质量等序列。本试验共建了 8 个文库, 每个试验组包含 a 和 b 两个文库 (例如 CN10 组包括 CN10a 和 CN10b), 为保证后续分析结果的准确性, 每个文库截取完全一样的 raw reads 进行过滤分析。CN10 共获得了 47 207 231 条 clean reads, 占两个文库 raw reads 总数的 93.80%; CN20 获得了 47 156 868 条 clean reads, 占两个文库 raw reads 总数的 93.69%; LR10 获得了 47 744 290 条 clean reads, 占两个文库 raw reads 总数的 94.86%; LR20 获得了 44 995 451 条 clean reads, 占两个文库 raw reads 总数的 89.40% (表 2)。筛选对照组和 LR 组获得的纯净序列, 选取一定长度范围内的小 RNA 进行长度统计分布, 过滤掉小于 18 nt、大于 30 nt 的 reads, 绝大多数序列长度为 20~24 nt, 其中 22 nt 长度序列占的比例最大 (图 1)。

2.2 已知 miRNAs 鉴定分析

通过与 miRBase 21.0 中猪 miRNAs 序列比对, 10 日龄鉴定出 354 个已知的 miRNAs, 20 日龄鉴定出 352 个已知的 miRNAs, 有 329 个 miRNAs 在两个日龄共表达。其中 miR-194b-5p、miR-192、miR-143-3p、miR-26a、miR-22-3p 和 miR-21-5p 等 miRNAs 在两个日龄的空肠组织中都高表达, 表达量都在 100 000 拷贝数以上, 与肠道发育密切相关的 miR-194b-5p 和 miR-26a 表达量均排在前五 (图 2)。

表 2 数据过滤信息

Table 2 Data filtering information

类型 Type	10 日龄 10-day-old				20 日龄 20-day-old			
	CN10a	CN10b	LR10a	LR10b	CN20a	CN20b	LR20a	LR20b
原始序列 Total reads	25 165 824	25 165 824	2 5165 824	25 165 824	25 165 824	25 165 824	25 165 824	25 165 824
低质量序列 Low quality	589 039	681 986	627 514	544 609	702 599	536 433	519 911	2 826 402
接头污染 Adapter contaminants	540 654	457 162	471 594	473 563	478 761	604 601	507 039	564 094
小于 18 nt Smaller than 18 nt	677 513	177 462	256 020	213 710	528 658	322 774	450 602	467 485
包含 polyA Poly A	467	134	126	222	803	151	238	426
纯净序列 Clean reads	23 358 151	23 849 080	23 810 570	23 933 720	23 455 003	23 701 865	23 688 034	21 307 417

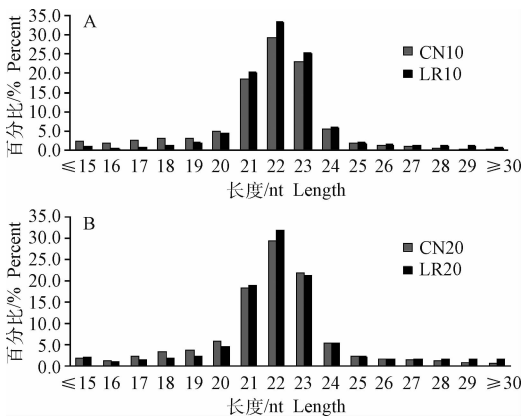


图 1 10(A)和 20 日龄(B)小 RNA 序列长度分布图
Fig. 1 Length distribution of small RNA sequences at 10(A) and 20(B) days of age

2.3 差异表达 miRNAs 分析

将对照组和 LR 组的已知 miRNAs 用软件进行统计分析,以 $\log_2(\text{Fold change}) > 1$ 或 < -1 (正值代表上调,负值代表下调), $P < 0.05$ 为标准筛选两个组之间差异表达的 miRNAs (表 3), 分析得出, 20 日龄差异表达的 miRNAs 数量比 10 日龄的多 2 个。在 10 日龄有 7 个差异表达的 miRNAs, 3 个上调, 4 个下调, 其中 *ssc-miR-218b* 差异倍数最大; 而 *ssc-miR-150* 虽然表达量最高, 但差异倍数较小。在 20 日龄有 9 个差异表达的 miRNAs, 5 个上调, 4 个下调, *ssc-miR-182* 和 *ssc-miR-125a* 表达量最高, 但差异倍数都不大。在差异表达的 miRNAs 中, 只有 *ssc-miR-218* 在两个日龄中都差异表达 (表 3)。

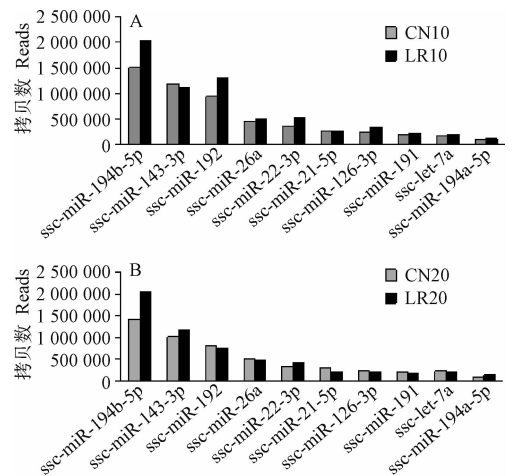


图 2 10(A)和 20 日龄(B)表达量前 10 的 miRNAs
Fig. 2 The top 10 expressed miRNAs at 10(A) and 20(B) days of age

2.4 差异表达 miRNAs 靶基因预测和功能分析

10 和 20 日龄的空肠分别有 7 和 9 个 miRNAs 差异表达显著, 只有 1 个 miRNA 在两个日龄中都出现差异表达, 故共有 15 个差异表达的 miRNAs。用 RNAhybrid、miRanda 和 TargetScan 分析软件对其进行靶基因预测, 共得到 10 221 个靶基因。KEGG 功能分析发现, 靶基因共富集到 293 条通路中, 其中有 66 条显著富集通路 ($P < 0.05$), 图 3 中列出前 20 个显著富集通路。在显著富集的通路中, 前 5 个靶基因数量最多的通路是 PI3K-Akt 信号通路 (219 个靶基因)、MAPK 信号通路 (184 个靶基

表 3 灌喂罗伊氏乳杆菌后空肠组织显著差异表达的 miRNAs

Table 3 Significant differentially expressed miRNAs in the jejunum response to *L. reuteri* treatment

基因名称 Gene ID	对照组 CN group	LR 组 LR group	log ₂ 差异倍数 log ₂ (Fold change)	P 值 P-value
10 日龄 10-day-old				
ssc-miR-148a-3p	2 306.50	1 336.50	-1.04	0.00
ssc-miR-221-3p	3 463.00	1 999.50	-1.04	0.00
ssc-miR-124a	1 044.50	470.00	-1.40	0.00
ssc-miR-218b	3 984.00	25.00	-7.57	0.00
ssc-miR-150	6 507.00	17 137.00	1.15	0.00
ssc-miR-423-5p	2 630.50	9 029.50	1.53	0.00
ssc-miR-218	1 546.50	6 938.50	1.92	0.00
20 日龄 20-day-old				
ssc-miR-214-3p	1 016.50	532.50	-1.01	0.00
ssc-miR-125a	16 564.00	7 930.50	-1.14	0.00
ssc-let-7d-3p	3 428.50	1 622.50	-1.16	0.00
ssc-miR-130b-5p	923.00	393.00	-1.31	0.00
ssc-miR-182	13 897.50	31 260.50	1.09	0.00
ssc-miR-9	1 911.50	4 659.00	1.21	0.00
ssc-miR-9-1	318.50	795.50	1.24	0.00
ssc-miR-490-5p	287.50	819.00	1.43	0.00
ssc-miR-218	1 642.00	3130	1.03	0.00

因)、胞吞作用(156 个靶基因)、Ras 信号通路(144 个靶基因)和 cAMP 信号通路(133 个靶基因),这些通路调节着细胞的凋亡、生长以及一些重要基因的表达,根据信号通路中包含的靶基因及可能的生物学意义,其中被证实参与调节宿主肠道发育及免疫调节的 PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路,可能参与调节仔猪肠道健康。在 PI3K-Akt 信号通路中(图 4),Toll 样受体和 MAPK 等免疫相关信号通路参与其中;而在 MAPK 信号通路中(图 5),与炎症免疫反应相关的 TNF 信号通路也参与其中。在两个信号通路中,抑癌基因 *p53*, *Ras* 和涉及机体防御反应相关的因子 *NF-κB* 等都是重要的靶基因。

2.5 差异表达 miRNAs 验证

在 15 个差异表达的 miRNAs 中,10 和 20 日龄各随机挑选 3 个 miRNAs 进行 qRT-PCR 验证,在 10 日龄中检测 ssc-miR-124a、ssc-miR-150 和 ssc-miR-148a-3p 的表达,在 20 日龄中检测 ssc-miR-125a、ssc-miR-182 和 ssc-let-7d-3p 的表达。

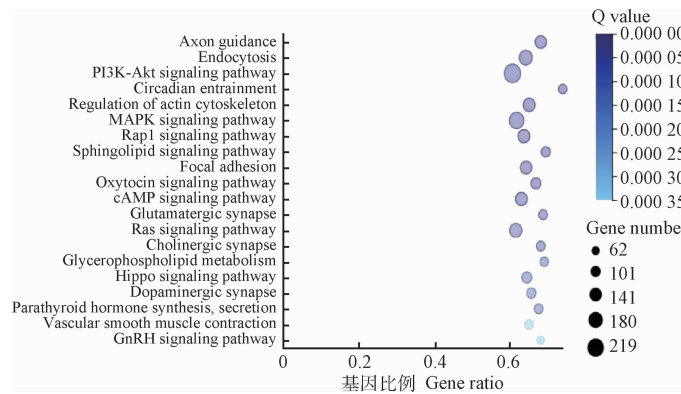


图 3 15 个差异表达 miRNAs 靶基因富集的前 20 位 KEGG 通路

Fig. 3 The top 20 KEGG pathways enriched for target genes of the 15 differentially expressed miRNAs

qRT-PCR 结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示,与测序结果的 log₂ (Fold change) 值相对比。图 6 中,qRT-PCR 的测定结果与 Solexa 测序结果基本一致,6 个 miRNAs 在空肠组织中都有表达,仅在第 20 日龄中,ssc-miRNA-

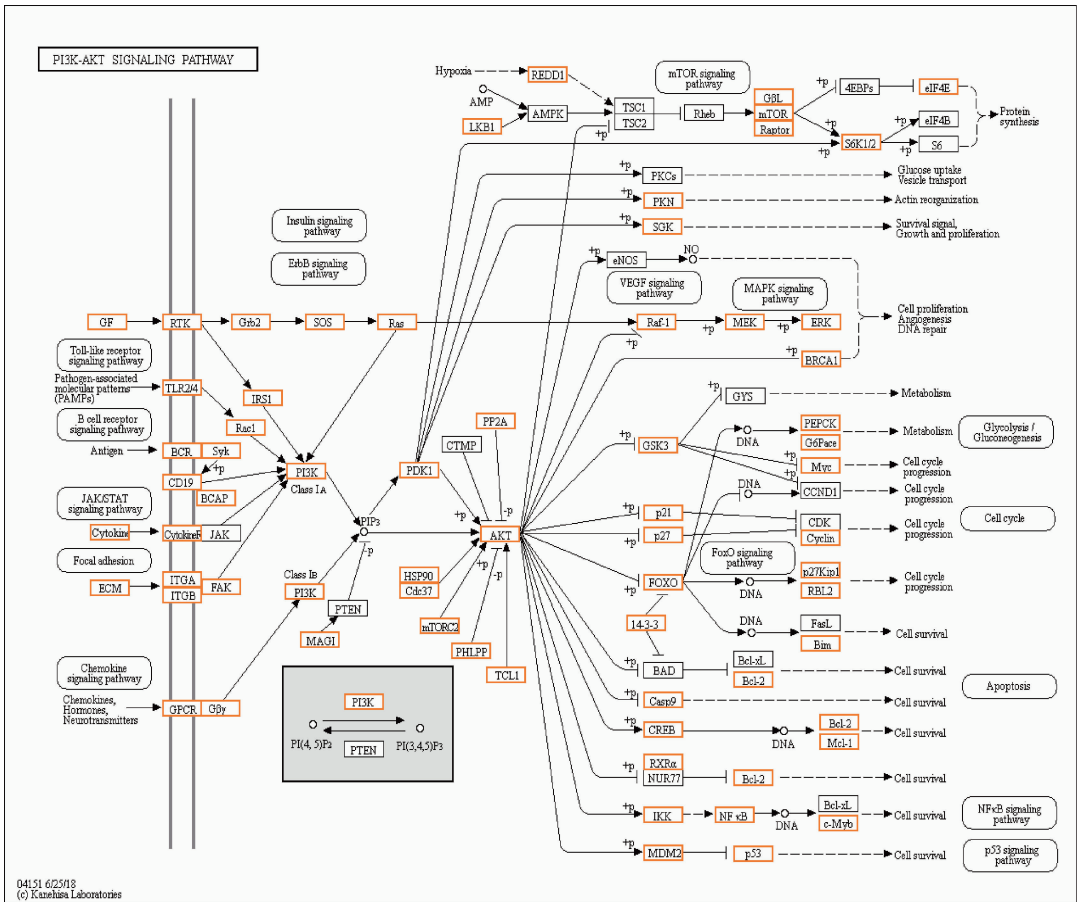


图 4 PI3K-Akt 信号通路

Fig. 4 PI3K-Akt signaling pathway

182 的表达与测序结果相比显著降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

miRNAs 已经被证实是调节宿主肠道基因表达的一个重要因素,且在肠道微生物与宿主互作中,参与宿主细胞的分化、免疫应答等过程^[14]。本文统计了仔猪 10 和 20 日龄空肠中表达量前 10 的 miRNAs, miR-194b-5p、miR-21-5p、miR-143-3p 和 miR-26a 在仔猪空肠中高表达,这与 Sharbati 等^[15]在仔猪小肠上的研究结果一致,其中 miR-194b-5p 能促进肠上皮细胞的分化^[16];而 miR-22-3p、miR-143-3p、miR-192 和 let-7a 被证实与胃肠道癌有关^[17-18]。以上结果提示,这些高表达的 miRNAs 可能在仔猪肠道中发挥着重要功能。

本试验比较分析了有/无灌喂罗伊氏乳杆菌对仔猪空肠 miRNA 表达谱的影响,发现灌喂罗伊氏乳杆菌后,仔猪空肠有 15 个 miRNAs 差异表达显著 ($P < 0.05$),在差异表达的 miRNAs 中,miR-221-

3p、miR-150、miR-130b-5p、miR-9、miR-124a、miR-218 和 miR-182 被证实参与胃肠道癌的调节^[19-22],而 miR-423-5p、miR-125a 和 miR-490-5p 则被发现与肠道炎症相关^[23-24]。试验已证实,miR-423-5p、miR-218 和 miR-150 对肠道的健康具有重要的调控作用,miR-423-5p 是三叶因子 1 的靶标,参与调节免疫球蛋白和细胞之间的相互作用^[25]。本试验发现,给新生仔猪灌喂罗伊氏乳杆菌使空肠 miR-423-5p 显著上调,这与 Kreuzer-Redmer 等^[26]的试验结果类似,他们给仔猪饲喂屎肠球菌后,回肠 miR-423-5p 也显著上调,并通过抑制免疫球蛋白 λ 轻链 C 区的合成,影响仔猪肠道免疫功能。miR-218 主要调节细胞增殖、分化和凋亡,其过表达能抑制结肠癌和直肠癌的发生^[27];miR-150 通过调节体内 β -连环蛋白抑制结肠癌的生长^[28]。在本试验中,仔猪空肠 miR-218 和 miR-150 显著上调。推测罗伊氏乳杆菌可能通过影响上述差异表达的 miRNAs 来调控仔猪肠道健康。

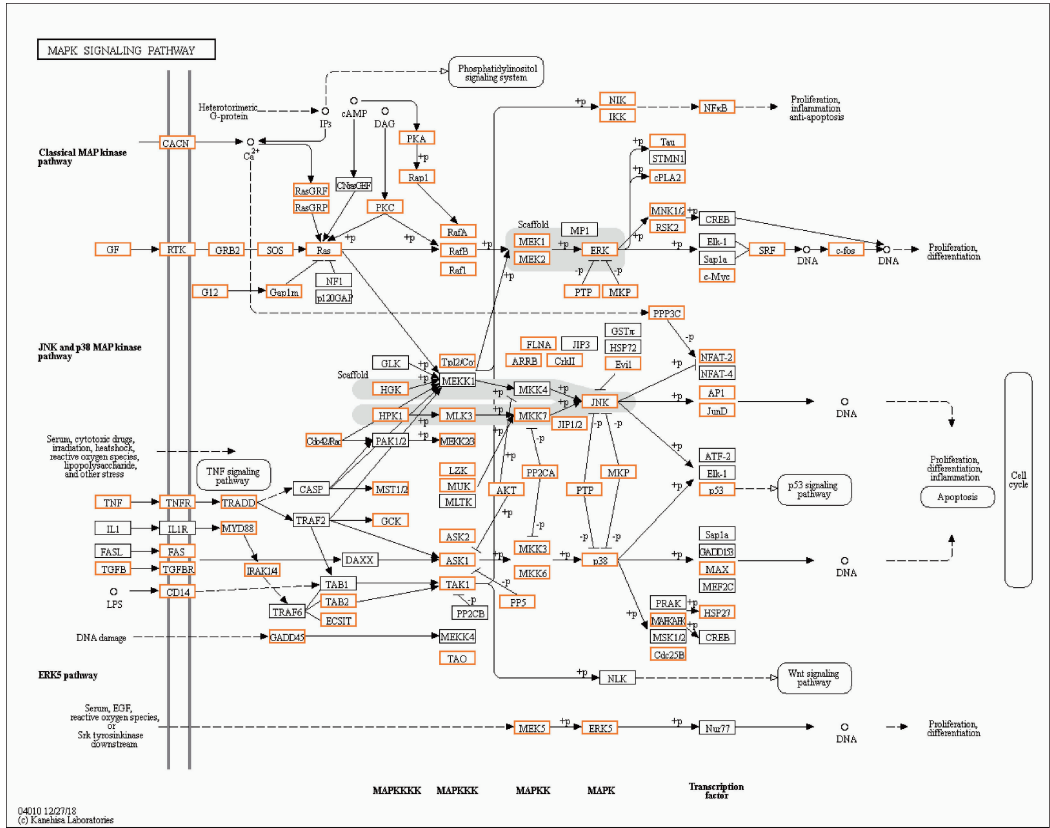
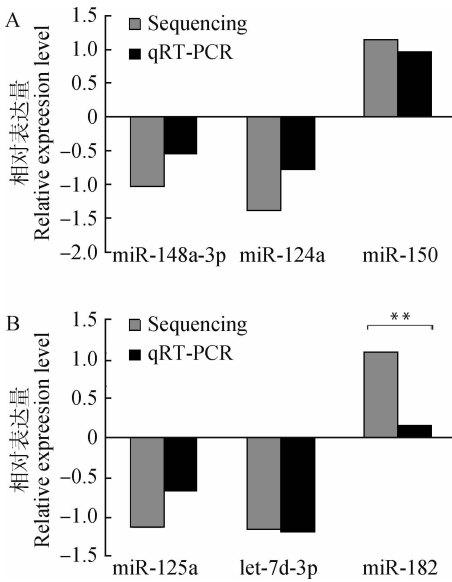


图 5 MAPK 信号通路
Fig. 5 MAPK signaling pathway



** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)
** indicates highly significant difference ($P < 0.01$)
图 6 10(A) 和 20 日龄 (B) 中随机挑选 6 个差异表达 miRNAs 的 qRT-PCR 验证
Fig. 6 qRT-PCR verification of the differentially expressed miRNAs randomly selected from 10-day-old (A) and 20-day-old (B)

生物信息学分析发现, 15 个差异表达 miRNAs 的靶基因显著富集到 66 条通路中 ($P < 0.05$), 其中, PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路在益生菌调节宿主肠道中起重要作用。PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路涉及多种细胞功能, 包括细胞增殖、分化和迁移, 且能被多种类型的刺激所激活, MAPK 信号通路还能响应促炎性刺激而激活细胞外调节蛋白激酶 ERK1/2^[29-33]。研究发现, 罗伊氏乳杆菌能抑制脂多糖诱导的小鼠肠道 MAPK 和 ERK1/2 磷酸化信号的激活, 下调促炎因子 TNF- α 、IL-6 等的表达水平, 进而调节肠道免疫反应和代谢, 发挥益生作用^[34]; 体外试验发现, 罗伊氏乳杆菌在脂多糖处理的小鼠巨噬细胞中能够调节 NF- κ B 的表达, 并抑制 PI3K-Akt 途径, 显著降低促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达^[35]。研究表明, miR-423-5p 通过 PI3K-Akt 和 MAPK 信号转导途径来保护糖尿病、肾病中高糖介导的足细胞损伤^[36]; miR-218 通过 PI3K-Akt 信号通路直接靶向肿瘤基因调节因子 BMI-1, 抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[37]; miR-124a 通过抑制 PI3K-Akt 信号通路关键因子的表达, 调节成纤维细

胞样滑膜细胞增殖、分化,并抑制促炎因子 TNF- α 和 IL-6 的表达^[38]。本课题组研究还发现,新生仔猪灌喂罗伊氏乳杆菌后,空肠促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达也都下调(数据未发表)。结合本试验结果提示,罗伊氏乳杆菌可能通过这些差异表达 miRNAs 介导的 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路来影响仔猪肠道的健康,但具体分子机制仍需后续验证。

4 结 论

通过高通量测序及其生物信息学分析获得罗伊氏乳杆菌作用仔猪空肠后的 miRNA 表达谱,筛选出 10 和 20 日龄仔猪空肠组织显著差异表达的 15 个 miRNAs,这些 miRNAs 的靶基因预测和功能分析得出,MAPK 和 PI3K-Akt 等信号通路可能参与罗伊氏乳杆菌调控的仔猪肠道健康。

参考文献 (References):

- [1] WEGMANN U, MACKENZIE D A, ZHENG J S, et al. The pan-genome of *Lactobacillus reuteri* strains originating from the pig gastrointestinal tract[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):1023.
- [2] LIU H, ZHANG J, ZHANG S H, et al. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(4):860-866.
- [3] DOWARAH R, VERMA A K, AGARWAL N, et al. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs[J]. *Livest Sci*, 2017, 195:74-79.
- [4] TALARICO T L, CASAS I A, CHUNG T C, et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988, 32(12):1854-1858.
- [5] HOU C L, WANG Q W, ZENG X F, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus reuteri* I5007, a probiotic strain isolated from healthy piglet[J]. *J Biotechnol*, 2014, 179:63-64.
- [6] YANG F J, WANG A N, ZENG X F, et al. *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions[J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15(1):32.
- [7] LIU Y Y, FATHEREE N Y, MANGALAT N, et al.

Lactobacillus reuteri strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF- κ B signaling in the intestine[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(6):G608-G617.

- [8] PUA H H, ANSEL K M. MicroRNA regulation of allergic inflammation and asthma[J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 36:101-108.
- [9] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2):215-233.
- [10] WU L Y, MA X P, SHI Y, et al. Alterations in microRNA expression profiles in inflamed and non-inflamed ascending colon mucosae of patients with active Crohn's disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(10):1706-1715.
- [11] MCKENNA L B, SCHUG J, VOUREKAS A, et al. MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(5):1654-1664.
- [12] HOEKE L, SHARBATI J, PAWAR K, et al. Intestinal *Salmonella typhimurium* infection leads to miR-29a induced Caveolin 2 regulation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67300.
- [13] HEYDARI Z, RAHAIE M, ALIZADEH A M, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* probiotics on the expression of MicroRNAs 135b, 26b, 18a and 155, and their involving genes in mice colon cancer [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2019, 11(4):1155-1162.
- [14] 孙 倩, 王 琪, 王 敬, 等. miRNAs 参与肠道微生物和宿主免疫互作的调控 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32(1):79-84.
- SUN Q, WANG Q, WANG J, et al. miRNAs regulation on interaction between gut microbiota and host immunity [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(1):79-84. (in Chinese)
- [15] SHARBATI S, FRIEDLANDER M R, SHARBATI J, et al. Deciphering the porcine intestinal microRNA transcriptome [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1):275.
- [16] TAO X, XU Z W, MEN X M. Analysis of serum microRNA expression profiles and comparison with small intestinal microRNA expression profiles in weaned piglets [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9):e0162776.
- [17] ARDILA H J, SANABRIA-SALAS M C, MENESES X, et al. Circulating miR-141-3p, miR-143-3p and miR-200c-3p are differentially expressed in colorectal cancer and advanced adenomas [J]. *Mol Clin Oncol*, 2019, 11(2):201-207.

- [18] KONNO M, KOSEKI J, ASAI A, et al. Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):3888.
- [19] ZHANG Y, HUANG H F, ZHANG Y, et al. Combined detection of serum MiR-221-3p and MiR-122-5p expression in diagnosis and prognosis of gastric cancer [J]. *J Gastric Cancer*, 2019, 19(3):315-328.
- [20] CHEN H, YANG Y Q, WANG J, et al. MiR-130b-5p promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via targeting RASAL1 [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5):6361-6367.
- [21] HANG C, YAN H S, GONG C, et al. MicroRNA-9 inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting neuropilin-1[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4):2524-2530.
- [22] TAHARA T, TAHARA S, HORIGUCHI N, et al. Gastric mucosal microarchitectures associated with irreversibility with *Helicobacter pylori* eradication and downregulation of Micro RNA (miR)-124a[J]. *Cancer Invest*, 2019, 37(9):417-426.
- [23] SUN C M, WU J, ZHANG H, et al. Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(44):7888-7898.
- [24] REN H X, ZHANG F C, LUO H S, et al. Role of mast cell-miR-490-5p in irritable bowel syndrome[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(1):93-102.
- [25] YOUNGER S T, COREY D R. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(13):5682-5691.
- [26] KREUZER-REDMER S, BEKURTZ J C, ARENDS D, et al. Feeding of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 leads to intestinal miRNA-423-5p-induced regulation of immune-relevant genes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(8):2263-2269.
- [27] LAMPROPOULOU D I, ARAVANTINOS G, LASCHOS K, et al. MiR-218 and miR-100 polymorphisms as markers of irinotecan-based chemotherapy response in metastatic colorectal cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2019, 34(11):1871-1877.
- [28] HE Z Y, DANG J, SONG A L, et al. The involvement of miR-150/ β -catenin axis in colorectal cancer progression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121:109495.
- [29] KWON K H, OHIGASHI H, MURAKAMI A. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 β release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages[J]. *Life Sci*, 2007, 81(5):362-371.
- [30] WAETZIG G H, SEEGER T D, ROSENSTIEL P, et al. P38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- α signaling in inflammatory bowel disease[J]. *J. Immunol*, 2002, 168(10):5342-5351.
- [31] NAGAE K, UCHI H, MORINO-KOGA S, et al. Glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide facilitates wound healing by activating PI3K/Akt pathway in keratinocytes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 146:155-161.
- [32] LING L, GU S H, CHENG Y, et al. bFGF promotes Sca-1⁺ cardiac stem cell migration through activation of the PI3K/Akt pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2):2349-2356.
- [33] LV C, YANG S W, CHEN X, et al. MicroRNA-21 promotes bone mesenchymal stem cells migration in vitro by activating PI3K/Akt/MMPs pathway[J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 46:156-162.
- [34] GAO K, LIU L, DOU X X, et al. Doses *Lactobacillus reuteri* depend on adhesive ability to modulate the intestinal immune response and metabolism in mice challenged with lipopolysaccharide[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:28332.
- [35] GRIET M, ZELAYA H, MATEOS M V, et al. Soluble factors from *Lactobacillus reuteri* CRL1098 have anti-inflammatory effects in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110027.
- [36] XU Y X, ZHANG J Z, FAN L, et al. miR-423-5p suppresses high-glucose-induced podocyte injury by targeting Nox4 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2):339-345.
- [37] XU L, SUN H B, XU Z N, et al. MicroRNA-218 regulates the epithelial-to-mesenchymal transition and the PI3K/Akt signaling pathway to suppress lung adenocarcinoma progression by directly targeting BMI-1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(18):7978-7988.
- [38] YANG B L, GE Y, ZHOU Y, et al. MiR-124a inhibits the proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting PI3K/NF- κ B pathway[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(4):208-215.