



EAV-HP在SLCO1B3基因5'端非编码区整合 影响芦花鸡肝脏代谢组学研究

王雅君^{1,2,3,4}, 刘奇^{1,2,3}, 王扬扬^{1,2,3}, 何雷^{1,2,3}, 魏颖^{1,2,3}, 陈松彪^{1,2,3}, 余祖华^{1,2,3},
丁轲^{1,2,3*}, 陈建^{1,2,3*}

(1. 河南科技大学动物科技学院 功能微生物与畜禽健康实验室, 洛阳 471003;

2. 洛阳市活载体生物材料与动物疫病防控重点实验室, 洛阳 471003; 3. 河南科技大学 动物疫病与公共卫生重点实验室, 洛阳 471003; 4. 河南科技大学化学与化工学院, 洛阳 471003)

摘要: 鸡绿蛋壳特征的形成与内源性逆转录病毒EAV-HP启动蛋壳腺中溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员1B3(SLCO1B3)的高表达相关。作为代谢核心器官, 鸡的肝脏中SLCO1B3高表达, 但EAV-HP的插入突变下调鸡肝脏中SLCO1B3的表达, 该过程中鸡肝脏的代谢组学研究未见报道。本研究以芦花鸡为研究对象, 利用绿壳蛋判型引物确定38只芦花鸡中产绿壳蛋频率为47.4%; EAV-HP^{+/+}和EAV-HP^{+/-}整合均显著降低芦花鸡肝脏中SLCO1B3转录水平($P < 0.05$), 尤其是EAV-HP^{+/+}整合影响效果更为显著; 代谢组学共筛选到80个差异代谢物, 其中上调30个, 下调50个; 代谢物所富集到的通路主要涉及牛磺酸和次牛磺酸代谢、柠檬酸循环(TCA循环)、碳水化合物代谢、醚脂质代谢及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等生物过程。研究结果揭示了EAV-HP插入突变所致的SLCO1B3表达下调对芦花鸡肝脏代谢物及代谢通路的影响, 为充分了解和利用内源性逆转录病毒改善鸡群生产性能提供研究思路 and 方向。

关键词: EAV-HP; SLCO1B3; 代谢组学; 代谢物

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0476-10

Study on the Effect of EAV-HP Integration in the 5' Non-Coding Region of the SLCO1B3 Gene on the Liver Metabolomics of Luhua Chicken

WANG Yajun^{1,2,3,4}, LIU Qi^{1,2,3}, WANG Yangyang^{1,2,3}, HE Lei^{1,2,3}, WEI Ying^{1,2,3},
CHEN Songbiao^{1,2,3}, YU Zuhua^{1,2,3}, DING Ke^{1,2,3*}, CHEN Jian^{1,2,3*}

(1. Laboratory of Functional Microbiology and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Luoyang Key Laboratory of Live Carrier Biomaterial and Animal Disease Prevention and Control, Luoyang 471003, China; 3. The Key Laboratory of Animal Disease and Public Health, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 4. College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: The formation of green eggshell characteristics in chickens is associated with the high expression of Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B3 (SLCO1B3) in eggshell

收稿日期: 2025-05-22

基金项目: 国家自然科学基金(32302908)

作者简介: 王雅君, 硕士, 主要从事家禽病毒感染机制研究, E-mail: 670822426@qq.com

* 通信作者: 丁轲, 主要从事动物传染病与微生态研究, E-mail: keding19@163.com; 陈建, 主要从事动物病毒检测及感染机制研究, E-mail: Chenillejian@163.com

glands initiated by the endogenous retrovirus EAV-HP. As a core metabolic organ, SLCO1B3 is highly expressed in the chicken liver. The insertion mutation of EAV-HP downregulates the expression of SLCO1B3 in the chicken liver. Metabolomics studies of chicken liver during this process have not been reported. This study took the Luhua chicken as the research object. Using the green-shelled egg genotypic primers, it was determined that the frequency of green-shelled eggs produced in 38 Luhua chickens was 47.4%. Both the integration of EAV-HP^{+/+} and EAV-HP^{+/-} significantly reduced the transcriptional level of SLCO1B3 in the liver of Luhua chicken ($P < 0.05$), especially the effect of the integration of EAV-HP^{+/+} was especially significant. A total of 80 differential metabolites were screened out by metabolomics, among which 30 were up-regulated and 50 were down-regulated. The pathways through which metabolites are enriched mainly involve biological processes such as taurine and hypotaurine metabolism, the citric acid cycle (TCA cycle), carbohydrate metabolism, ether lipid metabolism and alanine, aspartic acid and glutamic acid metabolism. The research results revealed the effect of down-regulation of SLCO1B3 expression caused by EAV-HP insertion mutation on liver metabolites and metabolic pathways in chickens, providing research ideas and directions for fully understanding and utilizing endogenous retroviruses to improve the production performance of chicken flocks.

Keywords: EAV-HP; SLCO1B3; metabolomics; metabolites

* **Corresponding authors:** DING Ke, E-mail: keding19@163.com; CHEN Jian, E-mail: Chenillejian@163.com

蛋壳颜色是蛋的重要性状之一,主要有白色、粉色、褐色和绿色等,其中绿壳蛋因其蛋壳中的胆绿素和锌螯合物含量较高而呈现淡绿色,维生素、微量元素和氨基酸含量高,胆固醇含量低,被国家卫生部批准为“保健食品”,被誉为“蛋中人参”。蛋壳绿色的形成是由于EAV-HP插入整合在溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员1B3(SLCO1B3)基因5'端,导致SLCO1B3蛋白在鸡的卵壳腺中高表达,从而导致蛋壳绿性状的形成^[1]。且不同绿壳鸡群体(沂蒙、武隆、林甸、东乡、卢氏和荆门)整合的内源性逆转录病毒EAV-HP的序列具有较高的同源性^[2]。进一步研究发现,SLCO1B3启动子区的甲基化与蛋壳腺组织中SLCO1B3的表达和蛋壳颜色呈显著负相关,随着甲基化水平的升高,CpG5和CpG8位点的甲基化阻断了转录因子和启动子的结合,降低了SLCO1B3的晚期表达,导致蛋壳绿色变浅^[3-4]。此外,EAV-HP整合导致SLCO1B3在母鸡的整个输卵管和公鸡的睾丸中均高表达,但肝脏中EAV-HP插入降低了鸡肝脏中SLCO1B3的表达,且EAV-HP纯合子比杂合子展现出更加明显的下降趋势^[5]。

SLCO1B3作为肝脏中正常表达的功能性转运蛋白,可转运多种内源性和外源性化合物,其异常表达与多种癌症的化疗药物的耐药相关^[6]。值得注

意的是,EAV-HP的插入突变可下调鸡肝脏中SLCO1B3的表达,转录组学和蛋白质组学的数据显示鸡肝脏中SLCO1B3下调导致脂肪代谢和外源性物质转运能力下降,且EAV-HP整合上调了鸡免疫相关基因NFKBIZ、NFKBIA、IL1RL1等的表达,具有免疫调节功能^[7]。作为核心代谢器官,肝脏通过协调糖、脂质及蛋白质代谢网络调控机体能量稳态,表现为血糖动态平衡调节、脂质生物合成与分解代谢、氨基酸转氨基作用等生理过程,从而保障生物能量供给及结构物质合成,维持机体生理稳态^[8]。因此,EAV-HP整合导致SLCO1B3表达量的下调对鸡肝脏代谢水平的影响有待进一步探究。

芦花鸡是产自山东省汶上县的地方鸡,其蛋壳的颜色表现为绿壳和粉壳,这为研究鸡肝脏中EAV-HP的整合导致SLCO1B3表达下调对肝脏代谢物影响的研究提供了良好的动物模型。本研究拟收集芦花鸡种蛋,孵育出壳后饲养至能够从外观区分性别,采集公鸡睾丸和母鸡卵壳腺,分别提取DNA后检测其蛋壳性状,并以纯合子绿壳蛋性状的鸡生殖腺DNA为模板扩增其EAV-HP基因组全长,最后利用代谢组学分析产绿/粉壳蛋的鸡肝脏代谢物差异情况。研究结果将揭示SLCO1B3表达下调对鸡肝脏代谢物的影响,丰富内源性逆转录病

毒调控鸡代谢物水平的研究证据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

38只芦花鸡分别孵育自18枚粉壳蛋和20枚绿壳蛋,并采集鸡抗凝血进行病毒血症检测,将外源ALV阴性鸡与其他鸡分组饲养用于后续研究,所有鸡均饲养在相同环境和自由条件下的笼中,试验程序经河南科技大学实验动物福利与伦理委员会批准(批准号:HAUST-025-P0310018)。饲养至60日龄后将所有鸡CO₂缺氧安乐死,并采集公鸡睾丸和母鸡卵壳腺,提取DNA并利用分光光度计测定其浓度和纯度,保存至-20℃备用。

1.2 主要试剂及仪器

动物组织DNA提取试剂盒购自美国Omega

Bio-Tek公司;RNA试剂盒购自上海飞捷生物试剂有限公司;Taq聚合酶购自北京聚合美生物科技有限公司;逆转录酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司(RR036A TaKaRa);荧光定量PCR试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;99.9%纯度甲醇和乙腈购自美国Thermo Fisher公司;98.0%纯度甲酸购自日本TCI公司;98.0%纯度L-2-氯苯丙氨酸购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;超高效液相色谱仪和高分辨率质谱仪购自美国Thermo Fisher公司。

1.3 引物设计

参考周玉^[4]的研究合成绿壳蛋判型引物(*ISU*、*ISD*、*IDD*)的引物序列,参考Chen^[5]等的研究合成SLCO1B3的荧光定量引物,所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

表1 本研究所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence	产物长度/bp Product size
<i>ISU</i>	TGTAAGAAGGCAGAGGGTTGA	500,700
<i>ISD</i>	GGAAACGAGGTGTGTTGTAGG	
<i>IDD</i>	AATCTTGTCTCCTCCCAGTTC	
qSLCO1B3-F	TGGTGATTGCATTTGTAAGCTA	197
qSLCO1B3-R	TGGAGAGCAGGGATTTATGC	
qGAPDH-F	GAACATCATCCCAGCGTCCA	112
qGAPDH-R	CGGCAGGTCAGGTCAACAAC	

1.4 PCR扩增及荧光定量PCR定量

以8周龄芦花鸡蛋壳腺组织或睾丸组织DNA为模板,用绿壳蛋判型引物*ISU*、*ISD*及*IDD*进行扩增,双重PCR反应体系:2×Taq Master Mix 10 μL, *IDD*、*ISD*、*ISU*、DNA各0.5 μL, ddH₂O 8 μL;扩增程序:94℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30循环, 72℃ 10 min, 16℃保存,随后1%琼脂糖凝胶电泳检测。提取8周龄芦花鸡肝脏组织RNA,反转录为cDNA,依次为模板进行荧光定量PCR检测,扩增体系:2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL, qSLCO1B3-F/R或者qGAPDH-F/R 0.5 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 8 μL;扩增程序:95℃预变性3 min, 95℃变性10 s, 58℃退火15 s, 40个循环。

1.5 代谢物提取

称取30 mg鸡肝脏组织置于2 mL离心管中,注入200 μL预冷水溶液并添加两颗钢珠。将样本置于高通量组织研磨仪中进行两次60 s机械破碎(55 Hz)。随后加入800 μL预冷甲醇-乙腈混合溶液(体积比1:1),经30 min超声提取后转移至-20℃环境静置30 min。低温条件下以12 000 r·min⁻¹离心10 min,收集800 μL上清液进行真空干燥处理。干燥残留物用150 μL含5 mg·kg⁻¹ 2-氯苯丙氨酸的50%甲醇溶液复溶,经涡旋混合30 s后再次离心(12 000 r·min⁻¹, 4℃, 10 min)。最终上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤后转移至检测瓶待测。

1.6 色谱和质谱条件

色谱分离采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, 100 Å),流速

0.4 mL·min⁻¹, 柱箱温度 40 °C。自动进样系统维持 8 °C, 进样体积 2 μL。正负离子模式下均采用二元梯度系统: 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液。质谱检测在 Thermo Orbitrap Exploris 120 平台完成, 通过 Xcalibur 4.7 软件 (Thermo Scientific) 控制数据采集。采用混合式电喷雾离子源 (HESI), 关键参数设置: 喷雾电压 3.5 kV (正模式)/-3.0 kV (负模式), 鞘气流速 40 arb, 辅助气流速 10 arb, 毛细管与辅助气加热温度分别为 320 和 300 °C。数据依赖采集 (DDA) 设置包括: 一级质谱分辨率 60 000 (*m/z* 200), 扫描范围 70~1 000 *m/z*, 自动增益控制 (AGC Target) Standard 模式, 最大注入时间 100 ms; 触发二级碎裂时选取前 4 强响应离子, 动态排除时间 4 s, 二级分辨率 15 000, HCD 碰撞能量 30%, 二级最大注入时间设为 Auto 模式。

1.7 代谢物筛选及数据分析

原始质谱数据 (. raw 格式) 经 MS-DIAL (v4.9.221218) 进行峰识别与对齐, 执行以下处理流程: 1) 数据质控: 剔除 QC 样本检出率 < 50% 的特征峰; 2) 缺失值补偿: 应用 Gap filling 算法插补; 3) 丰度标准化: 采用总离子强度归一化法。代谢物的鉴定基于派森诺 PSNGM (PerSonalbio Next-Generation Metabolomics Database) 数据库进行, 该库包含标准品自建库、mzCloud 库 (<https://www.mzcloud.org/>)、LIPIDMAPS (<https://www.lipidmaps.org/>)、HMDB (<https://hmdb.ca/>)、MoNA (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>)、NIST_2020_MSMS 以及 AI 预测 MSMS 图谱库。使用代谢组学数据处理软件 metaX 对数据进行转换后进行偏最小二乘法判别分析 (Partial Least Squares Discrimination Analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal PLS-DA, OPLS-DA) 进而得到每个代谢物对模型的重要性。代谢物组间差异分析采用双侧 *t* 检验计算统计学显著性 (*P* 值), 结合差异倍数

(fold change, FC) 评估代谢物浓度变化。设定筛选标准为: 变量重要性投影 (VIP) > 1, 显著性阈值 $P < 0.05$, 且 $|\log_2(FC)| \geq 1$ (对应 $FC \geq 2$ 或 ≤ 0.5)。通过 R 语言 Pheatmap 软件包绘制层次聚类热图, 代谢物丰度经 z-score 标准化处理。显著差异代谢物的通路富集分析在 MetaboAnalyst 6.0 平台完成, 基于 KEGG 数据库进行代谢途径注释。采用超几何分布检验识别显著富集通路 ($P < 0.05$), 并可视化关键代谢网络的功能关联。

2 结 果

2.1 芦花鸡绿壳蛋判型及其肝脏中 *SLCO1B3* 相对表达量检测

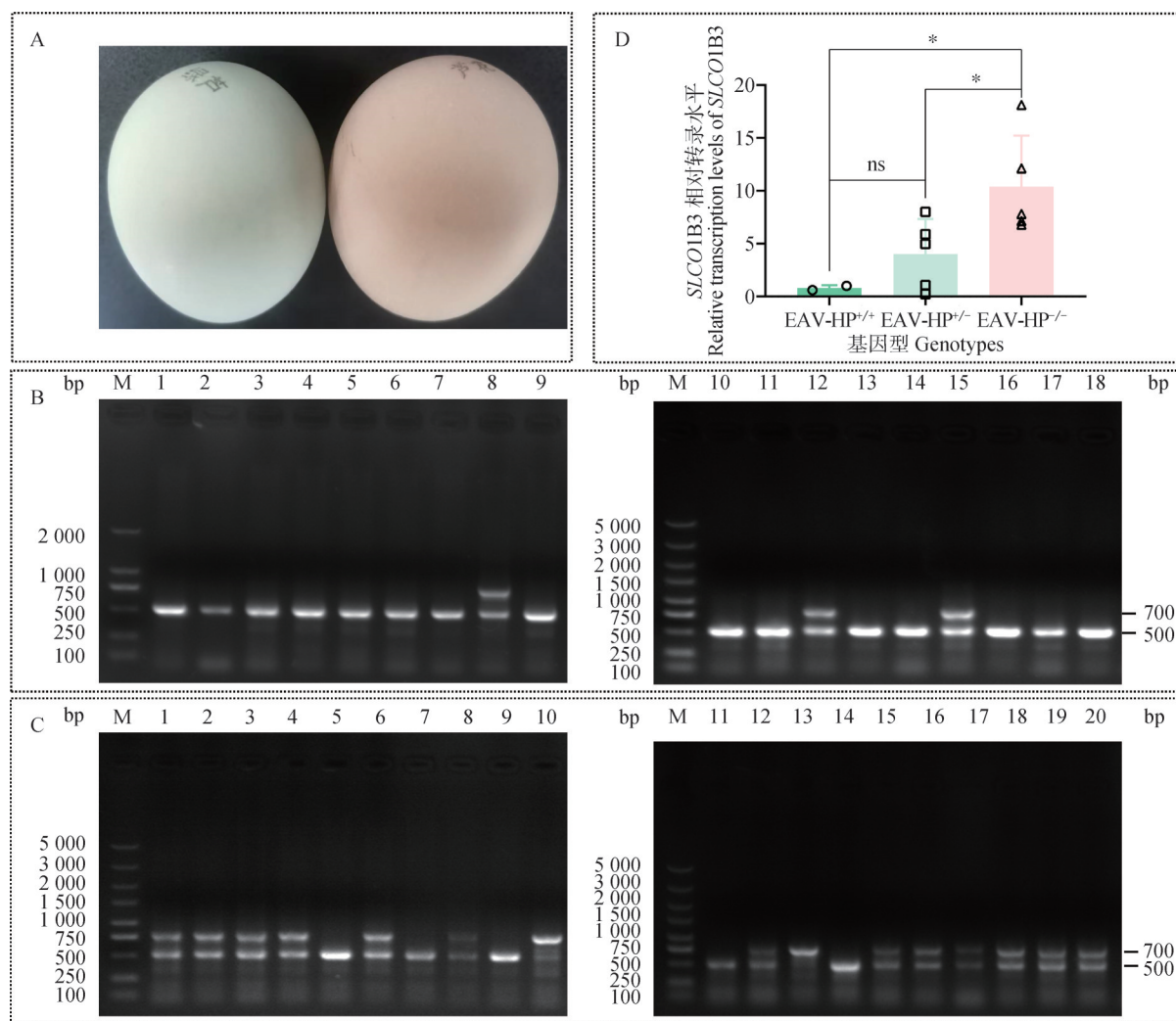
用绿壳蛋判型引物 (表 1) *ISU*、*ISD* 及 *IDD* 对公鸡的睾丸和母鸡的卵壳腺 DNA 进行扩增, 绿壳显性纯合子为一条带, 其对应条带所在位置为 700 bp; 绿壳杂合子为两条带, 其对应条带所在位置分别为 700 和 500 bp; 非绿壳隐性纯合子为一条带, 其对应条带所在位置为 500 bp。结果显示, 18 枚粉壳蛋孵化鸡中, 3 只鸡携带绿壳杂合基因, 15 只鸡携带非绿壳隐性纯合子基因 (图 1A、B)。20 枚绿壳蛋孵化鸡中, 13 只鸡携带绿壳杂合基因, 2 只鸡携带绿壳显性纯合子基因, 5 只携带非绿壳隐性纯合子基因 (图 1A、C, 表 2)。

SLCO1B3 通常在动物肝脏中高表达, 本研究对芦花鸡中 *SLCO1B3* 基因 5' 端有 EAV-HP 插入和无 EAV-HP 插入的肝脏中 *SLCO1B3* 转录水平进行荧光定量 PCR 检测, 由于 EAV-HP^{+/+} 整合鸡仅检测到 2 只, 因此分组 EAV-HP^{+/+} 样品重复量为 2, 分组 EAV-HP^{+/-} 和 EAV-HP^{-/-} 样品重复量为 5。结果显示, EAV-HP 插入显著降低了芦花鸡肝脏中 *SLCO1B3* 的转录水平 ($P < 0.05$), 且纯合子 EAV-HP^{+/+} 整合对鸡肝脏 *SLCO1B3* 基因转录水平的影响程度强于杂合子 EAV-HP^{+/-} (图 1D)。

表 2 EAV-HP 在芦花鸡中的基因型频率和基因频率

Table 2 Genotype frequency and gene frequency of EAV-HP in Luhua chicken

芦花鸡 Luhua chicken	数量/只 Number	基因型数量/只 (频率/%) Number of genotypes (frequency)			绿壳蛋频率/% Green shell egg frequency	基因频率/% Gene frequency	
		N/N	LC/N	LC/LC		N	LC
粉壳蛋 Pink shell egg	18	15 (83.3)	3 (16.7)	0 (0)	16.7	91.65	8.35
绿壳蛋 Green shell egg	20	5 (25)	13 (65)	2 (10)	75	57.5	42.5
总计 Total	38	20 (52.6)	16 (42.1)	2 (5.3)	47.4	73.65	26.35



A. 芦花鸡绿壳种蛋(左)和粉壳种蛋(右);B. 粉壳蛋源孵化鸡绿壳蛋基因检测结果;C. 绿壳蛋源孵化鸡绿壳蛋基因检测结果;D. 不同EAV-HP插入基因型芦花鸡肝脏中*SLCO1B3*相对转录量[*表示差异显著($P < 0.05$),^{ns}表示差异不显著($P > 0.05$),EAV-HP^{+/+}表示为*SLCO1B3*的5'端EAV-HP纯合子插入($n=2$),EAV-HP^{+/-}和EAV-HP^{-/-}分别表示为杂合子插入和隐性基因($n=5$)]

A. Green shell hatching egg (left) and pink shell hatching egg (right) of Luhua chicken; B. Genetic testing results of hatching chicken green shell eggs from powdered shell sources; C. Green shell egg source hatching chicken green shell egg gene testing results; D. The relative transcription levels of *SLCO1B3* in the liver of Luhua chickens with different EAV-HP insertion genotypes [* indicates significant difference ($P < 0.05$), ^{ns} indicates no significant difference ($P > 0.05$), EAV-HP^{+/+} represents homozygous insertion of the 5'EAV-HP end of *SLCO1B3* ($n=2$), EAV-HP^{+/-} and EAV-HP^{-/-} represent heterozygous insertion and recessive genes, respectively ($n=5$)]

图1 芦花鸡绿壳蛋判型

Fig. 1 Classification of Luhua chicken green shell egg

2.2 EAV-HP影响鸡肝脏差异代谢物比较分析

2.2.1 EAV-HP影响鸡肝脏差异代谢谱分析

通过对*SLCO1B3*基因5'端EAV-HP整合组和无EAV-HP整合组芦花鸡肝脏进行PLS-DA分析,结果显示两个分组之间代谢物分离明显,提示EAV-HP的整合影响了鸡肝脏代谢物表达(图2A)。基于PLS-

DA构建OPLS-DA解析EAV-HP整合对宿主代谢重编程的影响。建模结果显示,阳离子代谢物组($R^2Y=0.999$, $Q^2=0.659$)与阴离子代谢物组($R^2Y=0.999$, $Q^2=0.552$)均呈现显著组间分离趋势(图2B),模型解释度分别达 $R^2X=0.488$ 和 0.442 。模型未出现过拟合,满足差异代谢物筛选的统计效能要求。

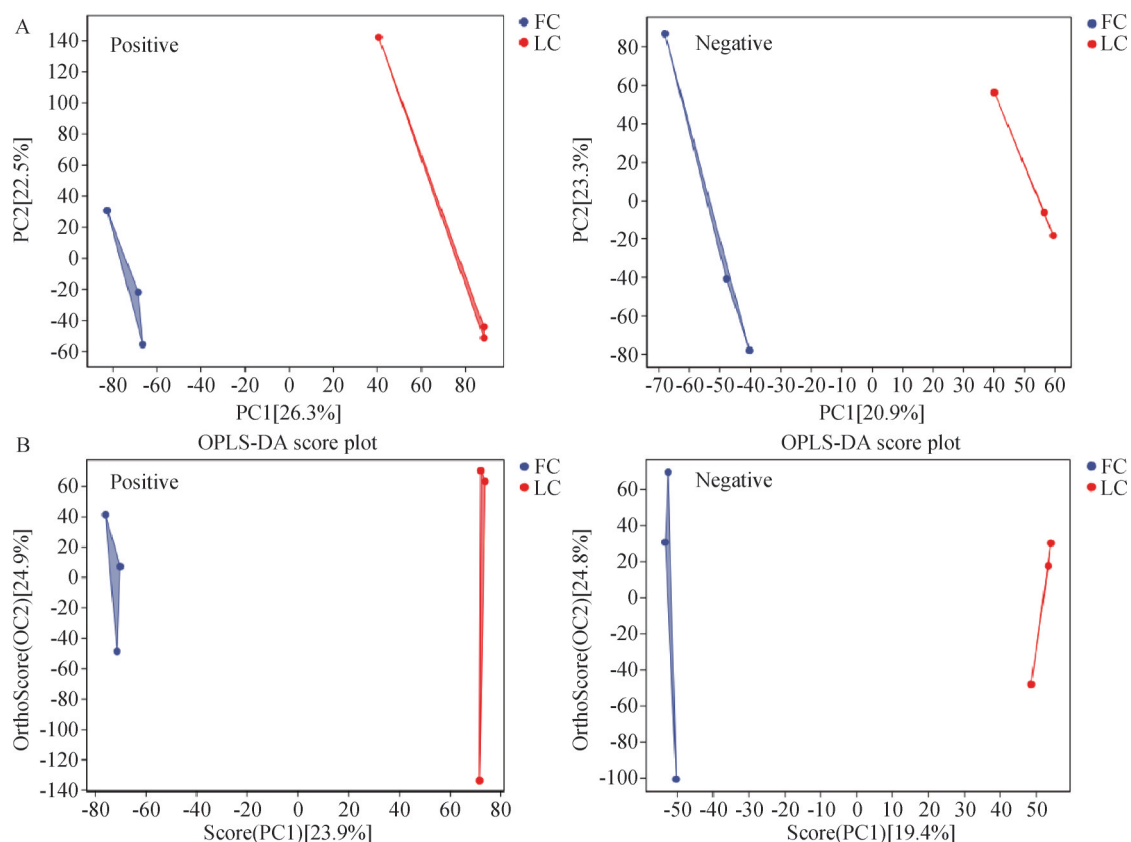


图2 多元统计PLS-DA和OPLS-DA分析

Fig. 2 Multivariate statistical PLS-DA and OPLS-DA analysis

表3 PLS-DA和OPLS-DA模型参数

Table 3 PLS-DA and OPLS-DA model parameters

分析类型 Analysis type	分析项目 Analysis project	R^2X (cum)	R^2Y (cum)	Q^2 (cum)
PLS-DA	阳离子 Cation	0.488	0.999	0.811
	阴离子 Anion	0.442	0.999	0.673
OPLS-DA	阳离子 Cation	0.488	0.999	0.659
	阴离子 Anion	0.442	0.999	0.552

2.2.2 差异代谢物筛选 根据正交偏最小二乘分析(OPLS-DA)获得的变量重要性(VIP)值,结合 t 检验和差异倍数(FC)结果,按照VIP值 >1 、 P 值 <0.05 、FC值 >2 或 <0.5 为标准进行差异代谢物筛选,共筛选到80个差异代谢物,其中上调代谢物30个,下调代谢物50个(表4)。

2.2.3 差异物质聚类分析 聚类分析常用于将数据集中的对象根据相似性进行分组,使得同一组(簇)内的对象尽可能相似,而不同组的对象尽可能不同。对EAV-HP整合影响芦花鸡肝脏差异代谢物进行层次聚类分析,结果如图3所示,组内样本聚

表4 差异代谢物统计表

Table 4 Statistical table of differential metabolites

分析项目 Analysis project	上调 Upregulated	下调 Downregulated	合计 Total
阳离子 Cation	17	49	66
阴离子 Anion	13	1	14
总计 Total	30	50	80

类紧密,且代谢物共表达模式呈现功能模块化分布,提示筛选的差异代谢物具有生物学的一致性。

2.2.4 EAV-HP对鸡肝脏差异代谢物通路分析

根据鸡肝脏差异表达代谢产物的KEGG富集分析结果,挑选 P -value最小即富集最显著的前20个Pathway进行展示,结果如图4所示,EAV-HP影响鸡肝脏代谢物通路,主要涉及牛磺酸和次牛磺酸代谢、柠檬酸循环(TCA循环)、碳水化合物代谢、脂质代谢及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等生物过程。因此,上述代谢通路会受EAV-HP整合的影响,进而影响鸡肝脏内相关代谢物出现差异表达,提示这些通路可能在EAV-HP转录过程中发挥着重要作用。

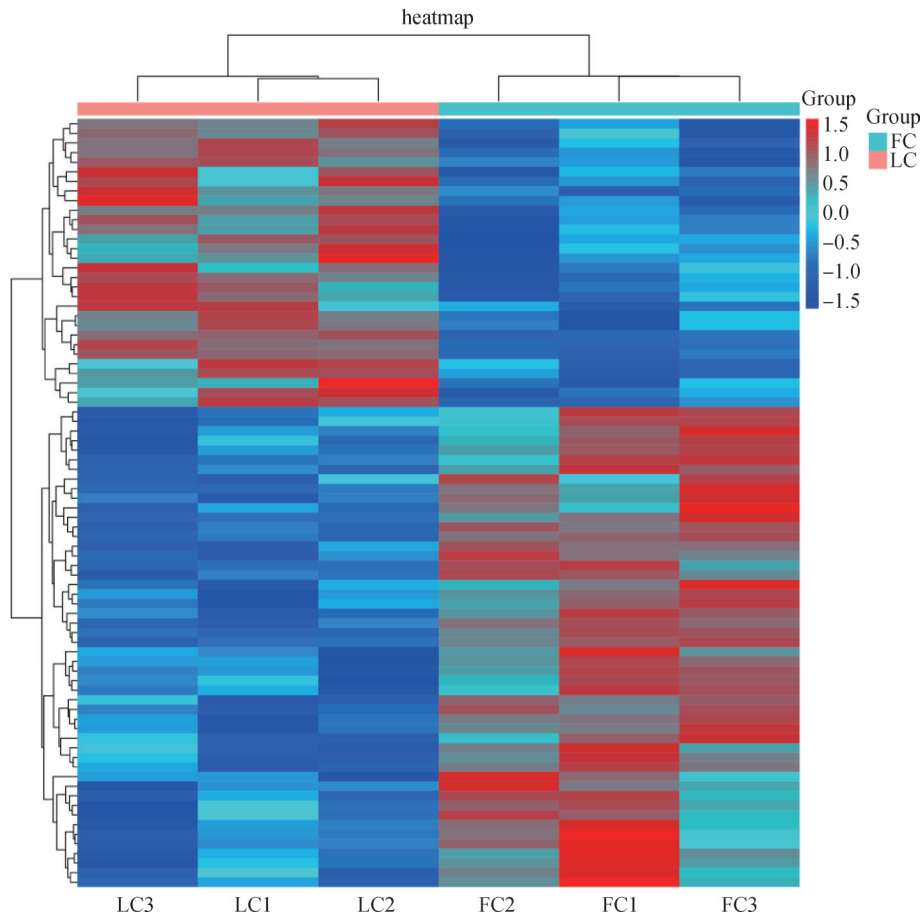


图3 差异物质聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of differential substances

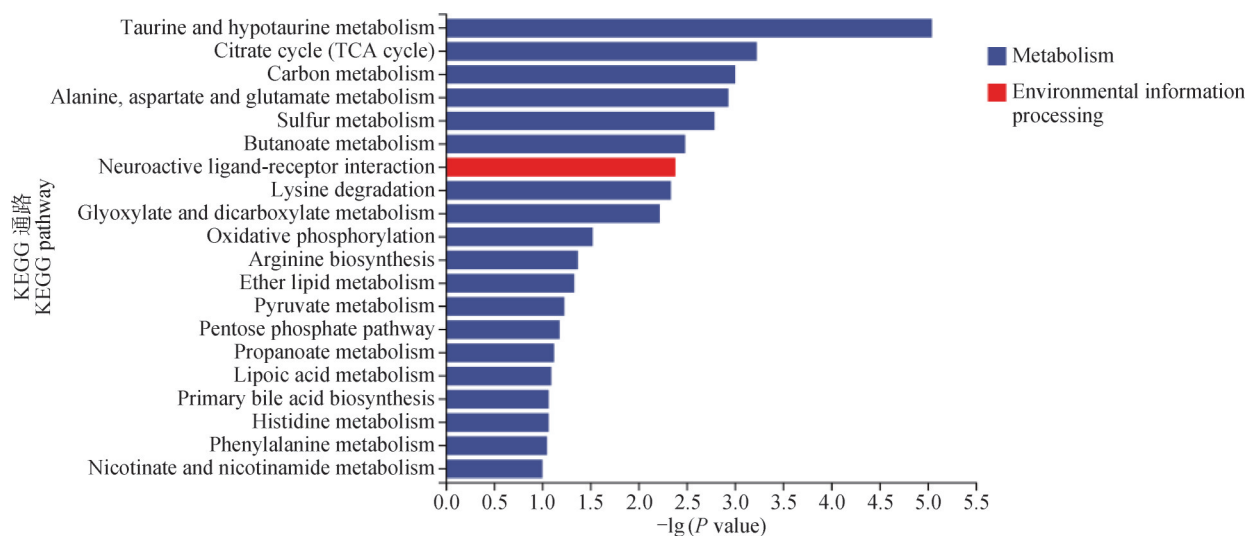


图4 差异物质富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of differential substances

3 讨论

鸡绿蛋壳特征的形成机制已经明确,SLCO1B3

是调控绿蛋壳颜色的关键基因,内源性逆转录病毒EAV-HP在SLCO1B3 5'侧区插入,促进蛋壳腺中SLCO1B3的表达,导致胆盐进入壳腺,胆绿素分泌

到蛋壳中,形成绿色外壳^[1]。鸟类中完整的逆转录病毒由 5' LTR-*gag-pol-env*-3' LTR 组成,鸡 EAV-HP 与完整的鸟类逆转录病毒相比,缺少整个 *pol* 基因,且 *gag* 基因和 *env* 基因存在部分缺失,以 *gag-env* 融合蛋白形式存在,表现为低水平转录物积累,不能翻译活性蛋白以阻断 ALV-J 感染^[9-10]。此外,EAV-HP 可作为良好的外源基因插入位点,用于转基因鸡的研发,郭苗苗等^[11]利用 CRISPR/Cas9 技术敲入并成功表达外源基因 eGFP 确定 EAV-HP 的整合位点;徐超^[12]进一步尝试启动鸡体内 EAV-HP *env* 蛋白表达,并验证具有抵抗 ALV-J 感染的效果。

本研究对芦花鸡绿壳种蛋和粉壳种蛋中 EAV-HP 基因插入频率进行统计,结果显示,20 只绿壳蛋孵化的鸡中绿壳蛋频率 75%,绿壳蛋基因频率 42.5%;18 只粉壳蛋孵化的绿壳蛋频率 16.7%,绿壳蛋基因频率 8.35%;总体上芦花鸡绿壳蛋频率 47.4%,绿壳蛋基因 26.35%。与之前报道的其他品种鸡相比^[13-14],芦花鸡中绿壳蛋频率偏低,通过筛选 EAV-HP 纯合子鸡可以提高绿壳蛋频率。沂蒙鸡中 *SLCO1B3* 基因 5' 端 EAV-HP 的插入导致生殖腺中 *SLCO1B3* 基因高表达,但肝脏中 *SLCO1B3* 基因表达水平下降,且 EAV-HP^{+/+} 整合对鸡肝脏中 *SLCO1B3* 基因的下调效应强于 EAV-HP^{+/-} 整合^[5],本研究对 EAV-HP 不同整合类型的芦花鸡肝脏 *SLCO1B3* 基因检测的结果得到了相同的结论。

内源性逆转录病毒是古老逆转录病毒感染的遗迹,嵌入到宿主生殖细胞的基因组中并跨代传播,成为宿主细胞中的调控元件,通常被认为是基因组中的“暗物质”^[15]。基于 RNA-seq 数据的生物信息学分析揭示 *SLCO1B3* 基因在鸡的健康肝脏和脂肪肝中的差异表达,在脂肪肝中观察到较低的表达水平,且 *SLCO1B3* 基因的表达可以抑制脂肪生成、肝细胞凋亡和炎症,提示 *SLCO1B3* 在鸡肝脏脂质代谢过程中发挥着重要作用^[16]。为探究 *SLCO1B3* 的下调对鸡肝脏代谢组学的影响,本研究以 EAV-HP 整合所致的 *SLCO1B3* 基因差异表达的芦花鸡为研究对象比较其代谢物差异,结果显示两组间代谢谱分离明显,解释性良好,提示该模型拟合质量高,可进行下一步分析;共筛选到 80 个差异代谢物,其中上调 30 个,下调 50 个。代谢物所富集到的通路对于研究疾病发生的潜在机制、确定代谢物潜在标志物使用价值以及挖掘新的药物靶点

具有重要意义^[17-18]。本研究主要涉及到牛磺酸和次牛磺酸代谢、柠檬酸循环(TCA 循环)、碳水化合物代谢、醚脂质代谢及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等生物过程。牛磺酸代谢是氧化还原反应的重要途径,可作为抗氧化剂,起着清除自由基、保护细胞免受损伤的作用,牛磺酸还可以抑制细胞凋亡保护身体健康^[19-20],次牛磺酸可以转化为牛磺酸参与肌肉的能量代谢^[21];柠檬酸循环是三大营养素(糖类、脂类、氨基酸)的最终代谢通路,也是各种有机物相互转化的枢纽,该循环的部分产物在免疫调节等生理过程中也发挥着重要作用^[22]。天冬氨酸参与神经系统信号传导及体内能量代谢,谷氨酸参与肝脏的解毒过程,并可与丙氨酸结合形成谷丙酰胺,参与能量代谢和氨基酸合成^[23]。因此,EAV-HP 的插入突变对鸡肝脏的能量代谢、脂质代谢、氨基酸合成及免疫调节等生理过程中发挥着重要作用。由于本研究样品数量偏少,研究结果的普遍性和代表性欠佳,未来研究可能注重提高样品量和针对不同发育阶段鸡来监测和验证代谢物和代谢通路与内源性逆转录病毒之间的调控规律。探究动物组织代谢物作为潜在生物标志将为提高疾病的精准防控及动物的生产性能奠定理论基础。

4 结 论

芦花鸡中绿壳蛋频率 47.4%,绿壳蛋基因频率 26.35%;EAV-HP^{+/+} 和 EAV-HP^{+/-} 整合均显著下调芦花鸡肝脏中 *SLCO1B3* 转录水平($P < 0.05$),尤其是 EAV-HP^{+/+} 影响效果更为显著;代谢组学共筛选到 80 个差异代谢物,其中上调 30 个,下调 50 个;代谢物所富集到的通路主要涉及到牛磺酸和次牛磺酸代谢、柠檬酸循环(TCA 循环)、碳水化合物代谢、醚脂质代谢及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等生物过程。

参考文献(References):

- [1] WANG Z, QU L, YAO J, et al. An EAV-HP insertion in 5' flanking region of *SLCO1B3* causes blue eggshell in the chicken[J]. *PLoS Gen*, 2013, 9(1): p. e1003183.
- [2] DALIRSEFAT S B, DONG X, DENG X, et al. Molecular phylogenetic analysis of Chinese indigenous blue-shelled chickens inferred from whole genomic region of the *SLCO1B3* gene[J]. *Poult Sci*, 2015, 94

- (8):1776-1786.
- [3] LI Z, REN T, LI W, et al. Association between the methylation statuses at CpG sites in the promoter region of the *SLCO1B3*, RNA expression and color change in blue eggshells in Lushi chickens [J]. *Front Gen*, 2019, 10:161.
- [4] 周玉. 卢氏绿壳鸡蛋壳颜色变浅机制及调控技术研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2017.
ZHOU Y. Echanism and regulation technology for the color change of Lushi Chicken green shell eggs [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [5] CHEN J, DALIRSEFAT S B, HAN D, et al. An EAV-HP insertion in the 5' flanking region of *SLCO1B3* is associated with its tissue-expression profile in blue-eggshell Yimeng chickens (*Gallus gallus*) [J]. *Poult Sci*, 2020; 99(12):6371-6377.
- [6] SUN R, YING Y, TANG Z, et al. The emerging role of the *SLCO1B3* protein in cancer resistance [J]. *Protein Pept Lett*, 2020; 27(1):17-29.
- [7] CHEN J, HUA G, HAN D, et al. An EAV-HP insertion in the promoter region of *SLCO1B3* has pleiotropic effects on chicken liver metabolism based on the transcriptome and proteome analysis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):7571.
- [8] TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN D H. The liver [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21):R1147-R1151.
- [9] ISHIHARA S. Detection of long terminal repeat loci derived from endogenous retrovirus in junglefowl using whole-genome sequencing [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):7380.
- [10] SACCO M A, HOWES K, SMITH L P, et al. Assessing the roles of endogenous retrovirus EAV-HP in avian leukosis virus subgroup J emergence and tolerance [J]. *J Virol*, 2004, 78(19):10525-10535.
- [11] 郭苗苗, 杨理凯, 杜伟立, 等. CRISPR/Cas9 介导的外源基因靶向插入鸡 EAV-HP 基因组 [J]. 生物工程学报, 2019, 35(2):236-243.
GUO M M, YANG L K, DU W L, et al. CRISPR/Cas9-mediated foreign gene targeted knock-in into the chicken EAV-HP genome [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(2):236-243. (in Chinese)
- [12] 徐超. CRISPR/Cas9 介导的表达 EAV-HP Env 细胞系与 ALV-J Env 重组禽腺病毒构建及其特性研究 [D]. 扬州:扬州大学, 2024.
XU C. Study on the characteristics of CRISPR/Cas9-Mediated cell line expressing EAV-HP env and recombinant fowl adenovirus expressing ALV-J env [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2024. (in Chinese)
- [13] 王晨, 张丹萍, 张浩, 等. 5 个绿壳蛋鸡群体中 EAV-HP 在 *SLCO1B3* 基因 5'-非编码区插入整合频率和类型的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10):183-188.
WANG C, ZHANG D P, ZHANG H, et al. Frequency and type of EAV-HP insertion in the 5'-flanking region of *SLCO1B3* gene in five blue-eggshelled chicken populations [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(10):183-188. (in Chinese)
- [14] 张丹萍, 蒋光海, 廖恩俊, 等. EAV-HP 在两个绿壳蛋鸡群体中的插入整合研究 [J]. 四川畜牧兽医, 2023, 50(5):30-31, 36.
ZHANG D P, JIANG G H, LIAO E J, et al. Insertion and integration study of EAV-HP in two green-shelled laying hen populations [J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2023, 50(5):30-31, 36. (in Chinese)
- [15] WANG J, LU X, ZHANG W, et al. Endogenous retroviruses in development and health [J]. *Trends Microbiol*, 2024; 32(4):342-354.
- [16] ZHU X, CHEN Y, LAN T, et al. Transcriptome analysis of healthy and fatty liver revealed that inhibition of *SLCO1B3* induces abnormal liver metabolism and lipid synthesis [J]. *Poult Sci*, 2023; 102(11):103023.
- [17] 孟祥旭, 李 佳, 任德明, 等. 民猪猪繁殖与呼吸综合征恢复力高低组血清代谢组学研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(4):1689-1699.
MENG X X, LI J, REN D M, et al. Study on serum metabolomics of high and low resilience group of Min pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(04):1689-1699. (in Chinese)
- [18] 朱靛芸, 曾一桐, 童庆芳, 等. 猪流行性腹泻病毒感染猪肾细胞的代谢组学研究 [J]. 中国兽医科学, 2023, 53(8):1065-1072.
ZHU L Y, ZENG Y T, TONG Q F, et al. Metabonomics of porcine kidney cells infected with porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Chinese Veterinary*

- Science*, 2023, 53(8):1065-1072. (in Chinese)
- [19] RAFIEE Z, GARCÍA-SERRANO A M, DUARTE J M N. Taurine supplementation as a neuroprotective strategy upon brain dysfunction in metabolic syndrome and diabetes[J]. *Nutrients*, 2022, 14(6):1292.
- [20] SANTULLI G, KANSAKAR U, VARZIDEH F, et al. Functional role of taurine in aging and cardiovascular health: An updated overview [J]. *Nutrients*, 2023, 15(19):4236.
- [21] BASEGGIO CONRADO A, D'ANGELANTONIO M, D'ERME M, et al. The interaction of hypotaurine and other sulfinates with reactive oxygen and nitrogen species: a survey of reaction mechanisms[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 975(Pt1):573-583.
- [22] CHOI I, SON H, BAEK J H. Tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates: Regulators of immune responses[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(1):69.
- [23] LING Z N, JIANG Y F, RU J N, et al. Amino acid metabolism in health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023; 8(1):345.
- (编辑 白永平)