

DOI: 10.12264/JFSC2022-0007

基于血液转录组分析的长江江豚雌雄两性免疫适应性

尹登花^{1,2}, 蔺丹清², 严燕³, 郭弘艺¹, 朱孝彦³, 张亚¹, 刘凯², 唐文乔¹

1. 上海海洋大学, 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 安庆市水产技术推广中心站, 安徽 安庆 246001

摘要: 为阐明长江江豚两性免疫系统特征及免疫适应性机制, 本研究以 3 头雌性和 3 头雄性长江江豚(*Neophocaena asiaeorientalis*)血液为实验样本, 经 BGISEQ-500 测序平台进行 mRNA 和 microRNA 测序。结果显示, 从 6 个样本中共获得了 15878 个 unigenes 和 985 个 microRNAs, KEGG 分析发现有 1534 个 unigenes 注释到免疫系统相关类别并显著富集于 20 个常见免疫通路($P < 0.05$)。将两性血液转录组进行比较, 鉴定了 539 个差异表达基因(DEGs)和 160 个差异表达 miRNAs (DEMs), 其中有 299 个是雌偏好表达基因, 240 个是雄偏好表达基因。GO 和 KEGG 富集分析显示, 雌性长江江豚中血液基因与免疫反应和能量代谢功能显著相关, 而雄性长江江豚中血液基因与免疫反应和细胞生长功能显著相关。此外, 通路富集分析还发现 FoxO 和 Hippo 两条免疫相关信号通路在雌性长江江豚血液中被激活。基于 DEGs 和 DEMs 的联合分析, 预测了 45 对 miRNA-mRNA 负调控关系, 包括 13 个 DEMs 和对应靶向关系的 37 个免疫相关 DEGs。研究表明, microRNAs 通过调控基因表达参与长江江豚两性免疫系统, 且成年雌性长江江豚可能具有更强的免疫力及维持机体内稳态的能力。本研究旨在利用 RNA-seq 测序技术从基因表达调控水平解析长江江豚两性免疫适应性机制, 并为阐释雌雄长江江豚对多样生境的适应能力从免疫角度提供新视角, 同时为长江江豚保护提供科学借鉴。

关键词: 长江江豚; 免疫适应性; 性别; 血液转录组

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)09-1247-17

长江江豚(*Neophocaena asiaeorientalis*)主要栖息于长江中下游干流、洞庭湖和鄱阳湖及支流尾间^[1]。近几十年来, 随着长江流域社会经济迅猛发展, 人类活动强度激增, 导致水域生态环境不断恶化, 水生生物资源严重衰退, 作为长江生态系统健康与否的重要指示物种, 长江江豚仅剩千余头, 种群极度濒危。自 2007 年白鱀豚(*Lipotes vexillifer*)被宣告功能性灭绝以后^[2], 长江江豚成为长江中现存的唯一鲸类动物。作为水生野生动物, 长江江豚时刻面临着水体中环境污染物和病原微生物等风险胁迫。环境污染由于具有持久

性、生物毒性、生物累积性以及长距离迁移等特点, 对鱼类和长江江豚等水生生物构成严重威胁^[3-4]。长江江豚处于水生态系统食物链顶端, 生物体内富集的高浓度环境污染物可引发急性或慢性毒理效应, 包括免疫系统紊乱、神经系统损伤以及致癌等^[5]。严重的水环境污染使病原微生物大量滋生, 造成长江江豚抵抗力下降, 诱发感染性疾病^[6]。如气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)等病原体可导致长江江豚皮肤坏死、免疫力下降、内脏出血甚至死亡^[7]。此外, 长江江豚还面临着巨大的生存压力, 如噪声干扰、船舶通航和食物短缺等, 这使其长期处

收稿日期: 2022-01-06; **修订日期:** 2022-02-21.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900802); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费资助项目(2017JBFM10, 2018JBFM04); 农业农村部长江江豚调查和保护项目(17200360).

作者简介: 尹登花(1990-), 女, 博士研究生, 研究方向为保护生物学. E-mail: 251665245@qq.com

通信作者: 唐文乔, 教授, 研究方向为水生生物学, E-mail: wqtang@shou.edu.cn; 刘凯, 研究员, 研究方向为渔业资源生态保护及长江江豚保护, E-mail: liuk@ffrc.cn

于应激状态,导致免疫力下降,疾病感染率增加^[8]。因此,进一步了解长江江豚免疫系统特征对于研究其免疫适应和抗病能力具有重要意义。

影响免疫系统功能的因素包括遗传和环境,其中性别是影响免疫系统组成、发育和病原性损伤反应的重要因素^[9]。直至目前,已有多项研究通过血液转录组对大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)^[10]、宽吻海豚(*Tursiops truncatus*)^[11]、狼(*Canis lupus*)^[12]和东方喜鹊(*Pica pica*)^[13]等动物的两性免疫适应性机制进行了探讨。这些研究表明,通过血液转录组监测动物免疫系统状况的策略是可行的,特别是针对长江江豚等国家重点保护野生动物而言,通过无损伤采集血液样本,利用血液转录组技术研究免疫系统更有现实价值。我国对江豚保护的研究主要集中在生态学^[14-15]、声学^[16-17]、生理学^[18-19]、行为学^[20-21]和分子生物学^[22]等方面。早期关于江豚分子生物学的研究主要集中在种群遗传学方向,近年来随着高通量测序技术的迅速发展,组学技术也应用到了江豚的分子生物学的研究领域。Ruan 等^[23]解析了长江江豚 MHC I 类和 II 类基因结构特征,并且对长江江豚和东亚江豚(*N. sunameri*)的肾脏转录组进行了测序和比较分析,从分子水平初步探讨了江豚适应不同栖息地环境的渗透压调节机制。Zhou 等^[24]对长江江豚基因组进行测序,并进一步对来自 3 个不同水域的地理种群进行重测序,探究长江江豚的淡水适应机制,结果证明长江江豚不再是窄脊江豚的亚种,而是一个独立物种。但涉及江豚血液转录组学方面的研究很少,本课题组首次通过血液转录组的方法开展了针对不同年龄长江江豚免疫系统分子机制的初步研究,发现江豚的先天免疫在早期具有明显优势,而适应性免疫随着年龄增长先增强后衰退^[25]。直至目前,还未见从基因表达调控水平对江豚两性免疫系统分子机制进行探讨的研究报道。

本研究对不同性别的长江江豚血液组织进行 mRNA 和 microRNA 测序和分析,构建血液组织 mRNAs 和 miRNAs 表达谱,鉴定两性免疫相关差异表达基因和 miRNAs,找到富集信号通路,从基因表达调控水平探讨江豚两性免疫系统分子机

制,为进一步从免疫角度阐释雌雄江豚对多样生境的适应能力丰富研究素材,为长江江豚保护提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2017 年 11 月,经原农业部长江流域渔政监督管理办公室批准,中国水产科学研究院淡水渔业研究中心组织实施长江江豚迁地保护行动。在任务执行过程中,从长江安庆段采集了 3 头雌性和 3 头雄性长江江豚的血液样本,样本信息见表 1。用于转录组学分析的血液样本采用 10 mL 的一次性无菌注射器从动物尾静脉抽取,并立即将新鲜的血样储存在 RNA 保存管(PAXgeneTM)内,−20 ℃ 运回实验室后于−80 ℃ 超低温冰箱储存至 RNA 提取。

表 1 长江江豚样本信息
Tab. 1 Sample information of *Neophocaena asiaeorientalis* used in this study

样本编号 code	性别 sex	体长/cm body length	体重/kg body weight	分组 group
M1_YFP	♂	147	46.7	M_YFP
M2_YFP	♂	146	45.0	M_YFP
M3_YFP	♂	145	44.6	M_YFP
F1_YFP	♀	134	37.6	F_YFP
F2_YFP	♀	139	53.6	F_YFP
F3_YFP	♀	141	40.8	F_YFP

本研究严格遵循我国动物保护和使用的国家法规和政策制度,相关工作及实验研究经原安庆市渔业局批准,且符合 1993 年颁布、2013 年修订的《中华人民共和国水生野生动物保护实施条例》(中华人民共和国国务院令第 645 号)。

1.2 实验方法

1.2.1 mRNA 文库构建、测序和分析 利用 PAXgene Blood RNA 试剂盒(QIAGEN, 德国)从 6 个血液样本中提取总 RNA。采用 Oligo (dT)磁珠富集 mRNAs,将上一步得到的 mRNAs 用打断试剂裂解成短片段,用得到的片段作为模板合成 cDNA。对 cDNA 进行末端修复和接头连接,并进一步对连接产物进行 PCR 扩增。PCR 产物环化后即得到最终的文库。使用 Agilent 2100 生物分析

仪(Agilent, 美国)检测文库的片段大小和浓度。通过滚环复制, 制备一个包含 200 多个拷贝的 DNA 纳米球(DNB), 在 BGISEQ-500 平台(华大基因, 中国)上进行测序。

使用 SOAPnuke (v1.5.2)软件过滤序列数据。通过去除接头序列、空序列及低质量序列获得 clean reads。使用 HISAT2 (v2.0.4)软件将 clean reads 比对到长江江豚参考基因组(MKKW000000000)。使用 DEGseq (v1.4.5)软件进行差异表达基因分析。使用 Phyper 函数对注释的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.2.2 miRNA 文库构建、测序和分析 取 1 μg 的 RNA 样品, 用 15%聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化总 RNA, 分离回收 18~30 nt 的 Small RNA。然后将 Small RNA 先后连接到 3'接头和 5'接头上, 用 SuperScript II 逆转录酶(Invitrogen, 美国)将 Small RNA 转录成 cDNA 并进行 PCR 扩增。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳回收 PCR 后的文库目的条带。使用 Agilent 2100 生物分析仪检测浓度和文库长度。文库在 phi29 酶的作用下, 形成包含 300 多个拷贝的 DNA 纳米球(DNB), 在 BGISEQ-500 平台上进行测序。

过滤低质量序列, 使用 Bowtie2 软件将 clean tags 比对到参考基因组和其他 sRNA 数据库。将比对后的 clean tags 到 GenBank 和 Rfam 数据库进行注释。

1.2.3 靶基因预测和 miRNA-mRNA 相互作用分析 使用 miRanda、TargetScan 和 RNAhybrid 软件预测 miRNAs 的靶基因, 并利用 GO 和 KEGG 数据库进行基因的注释。使用 phyper 函数对靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并使用 MMpred 软件分析 miRNA-mRNA 的相互作用。使用 Cytoscape 软件构建 miRNA-mRNA 调控网络。

1.2.4 荧光定量 PCR 验证 从雌雄两性差异表达 mRNAs 和 miRNAs 中随机挑选了 6 个 mRNAs 和 6 个 miRNAs 进行实时荧光定量 PCR 验证, 引物序列信息见表 2。通过 QuantStudio 3 Real-Time PCR 系统(ABI, 美国)进行 SYBR Green RT-PCR 实验。使用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物。选择 GAPDH 和 U6 snRNA 作为内参基因。每个样品有 3 个生物学重复, 并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基

因表达水平。

2 结果与分析

2.1 雌雄两性血液 mRNA 表达谱分析

从 6 个长江江豚血液样本中获得了约 4.82 亿条 raw reads, 去除低质量 reads 和接头序列, 剩余 4.74 亿条 clean reads, 总长度达 47.42 Gb。Q20 平均为 97.99%, Q30 平均为 94.33%, 表明测序质量良好。将 6 个样本测序数据分别与江豚参考基因组进行比较, 发现每个样本平均有 6533 万条 reads (82.7%)可以成功映射到基因组上(表 3)。将 6 个样本的 clean reads 拼接组装后, 共得到了 15878 个 unigenes, 占基因组注释基因总数($n=22014$)的 72.1%。

将拼接组装的所有基因进行 KEGG 通路分析, 发现有 14231 个 unigenes 注释到 KEGG 数据库, 其中“信号转导”(signal transduction)、“免疫系统”(immune system)和“内分泌系统”(endocrine system)条目注释到的基因最多(图 1a)。进一步分析发现, 注释到免疫系统中的 1534 个 unigenes 富集到 20 个常见免疫通路中(图 1b)。

2.2 长江江豚雌雄两性血液差异表达基因分析

将 6 个样本的血液转录组数据归纳成雌雄两组进行差异表达分析, 共鉴定出 539 个差异表达基因 DEGs (图 2a), 其中 299 个呈雌偏好, 240 个呈雄偏好(Fold Change ≥ 2 且 $P < 0.05$), 可见雌性和雄性长江江豚表现出明显不同的基因表达谱(图 2b)。此外, 发现了与人类 X 染色体连锁基因同源的 SMC1A 和 CD40LG 基因, 这 2 个基因在雌性长江江豚中的表达量都略高[$\log_2(\text{fold change})=0.4$]。SMC1A 是细胞分裂过程中姐妹染色单体黏合所必需的, 位于 X 染色体上不受 X 失活影响的区域^[26]。X 连锁基因 CD40LG 可以编码 1 种 T 细胞共激活受体 CD40L^[27]。已有研究表明, CD40L 缺陷患者表现出免疫球蛋白分类转换障碍和细胞免疫缺陷^[28]。

对雌性和雄性差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析显示, 雌性偏好表达基因富集到“DNA 重组调控”(regulation of DNA recombination)、“色氨酸代谢过程”(tryptophan metabolic process)、“炎

症反应”(inflammatory response)和“钙转运 ATP 酶活性”(calcium-transporting ATPase activity)等 GO 条目中(图 3a); 雄性偏好表达基因富集到“钙离子结合”(calcium ion binding)、“质膜”(plasma membrane)、“细胞黏附”(cell adhesion)和“活性氧反应”(response to reactive oxygen species)等 GO 条目中(图 3b), 表现出明显的生物学功能差异。

图 3c 和 3d 分别展示了雌性和雄性偏好表达基因中具有统计意义的前 20 个 KEGG 富集通路。299 个雌性偏好表达基因显著富集于: 肠道免疫

表 2 荧光定量 PCR 引物信息
Tab. 2 RT-qPCR primers for mRNAs and miRNAs

mRNAs 荧光定量 PCR 引物				
基因序列号 transcript ID	基因名 gene name	全名 full name	上游引物(5'-3') forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') reverse primer (5'-3')
112399840	CCR10	C-C chemokine receptor type 10	TATTCGGCCTCCTTCCACG	AGCAGCGACAGCAACCACA
112413934	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	AACTCTGTTC AAGGGGAAAGATTAC	GGGATTTGTGGCAGGGACT
112392762	IL23R	interleukin-23 receptor	AACTGCTCTGGACGCATCTG	AAATAAAGTTTCCTTGGTGGC
112394907	FOS	proto-oncogene protein c-fos	CACTCCAAGCGGAAACAGAC	GGAAGCCCATGTCATCAGG
112401967	NLRP12	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12	TGAACTAAATGTGTGTCTGGAG	CATTCTTCTCAGGCCAAACC
112393748	IL15	interleukin-15	GTCCAGAAATTCAGACATTAACGA	GTTGTTGCCTCTAAGCAGTGG
112391848	GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	AGGTCGGAGTGAACGGATTT	TTCTCAGCCTTGACTGTGCC
miRNAs 荧光定量 PCR 引物				
miRNA 序列号 miRNA ID	通用下游引物(5'-3') universal reverse primer (5'-3')	逆转录引物(5'-3') miRNA RT primer (5'-3')	上游引物(5'-3') forward primers (5'-3')	下游引物(5'-3') reverse primer (5'-3')
miR-107b_1	TGGTGTCTGAGAGTCG	CTCAACTGGTGTCTGAGAGTCG GCAATTCAGTTGAGAGCCC	ACACTCCAGCTGGGAG CAGCATTGTACA	
miR-455-3p_6	TGGTGTCTGAGAGTCG	CTCAACTGGTGTCTGAGAGTCG GCAATTCAGTTGAGTGTATA	ACACTCCAGCTGGGGC AGTCCATGGGCA	
miR-24	TGGTGTCTGAGAGTCG	CTCAACTGGTGTCTGAGAGTCG GCAATTCAGTTGAGCCTGTTC	ACACTCCAGCTGGGTGG CTCAGTTCAGCA	
miR-34b-5p	TGGTGTCTGAGAGTCG	CTCAACTGGTGTCTGAGAGTCG GCAATTCAGTTGAGCAACCAG	ACACTCCAGCTGGGTG GCAGTGTCTTAG	
miR-24-3p	TGGTGTCTGAGAGTCG	CTCAACTGGTGTCTGAGAGTCG GCAATTCAGTTGAGCTGTTCCT	ACACTCCAGCTGGGTGG CTCAGTTCAGC	
miR-124c-3p	TGGTGTCTGAGAGTCG	CTCAACTGGTGTCTGAGAGTCG GCAATTCAGTTGAGCCGTGTT	ACACTCCAGCTGGGTC AAGGTCCGCTGT	
U6			TTCCATGTGGTCTTAAAGGCC	AATAATAGCAAGCACTGCCTCA

表 3 mRNA 测序、拼接组装及比对结果分析
Tab. 3 Sequencing, assembly and comparison of generated mRNA data

样本编号 code	原始读段 数量/M total raw reads	过滤读段 数量/M total clean reads	过滤碱基 数量/Gb total clean bases	过滤读段质控 Q20/% clean reads Q20	过滤读段质控 Q30/% clean reads Q30	过滤读段 占比/% clean reads ratio	基因表达数量 no. of genes expressed
M1_YFP	59.93	58.21	5.82	98.02	94.36	97.14	14468
M2_YFP	72.27	70.90	7.09	97.98	94.28	98.11	15058
M3_YFP	101.56	100.27	10.03	98.03	94.43	98.73	15358
F1_YFP	104.16	102.97	10.30	97.89	94.06	98.85	15390
F2_YFP	54.79	53.42	5.34	98.02	94.37	97.50	14546
F3_YFP	89.8	88.44	8.84	98.00	94.50	98.49	15016

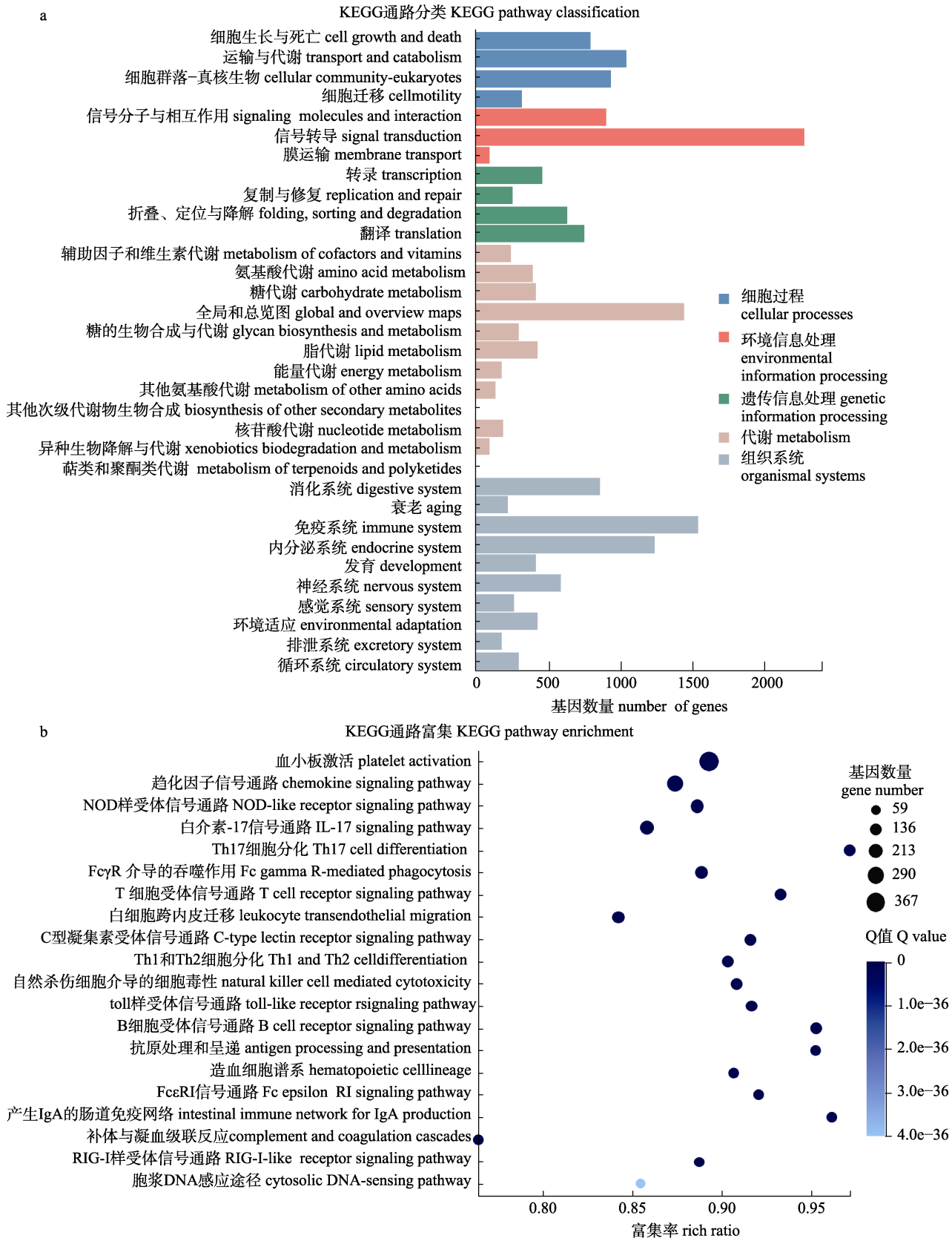


图 1 KEGG 通路功能分类(a)和免疫系统 KEGG 通路富集(b)

Fig. 1 KEGG pathway functional classification (a) and enrichment of unigenes involved in the immune system pathways (b)

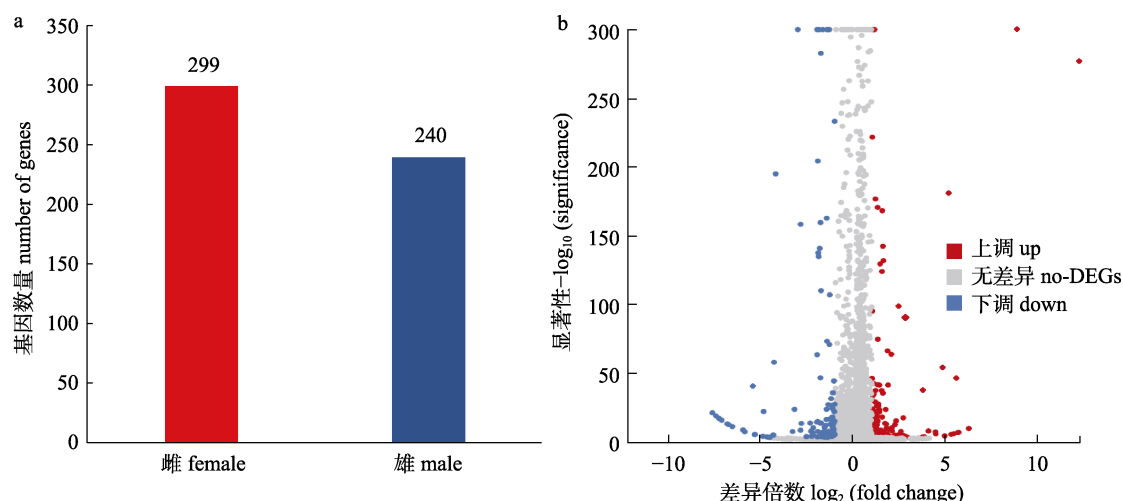


图 2 长江江豚雌雄两性差异表达基因数量(a)和火山图(b)
Fig. 2 The bar chart (a) and volcano plot (b) of differentially expressed genes in female and male *Neophocaena asiaeorientalis* transcriptome

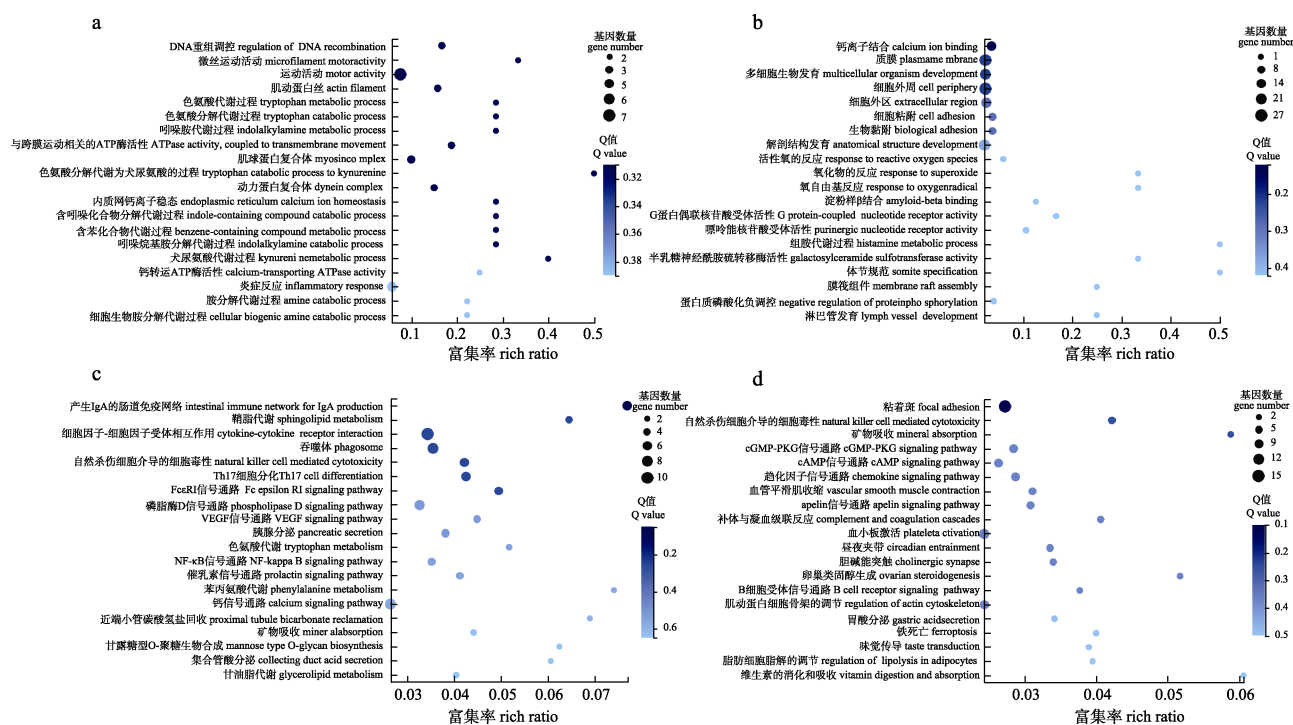


图 3 长江江豚雌雄差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

a. 雌偏好表达 DEGs GO 富集分析; b. 雄偏好表达 DEGs GO 富集分析; c. 雌偏好表达 DEGs KEGG 富集分析;
d. 雄偏好表达 DEGs KEGG 富集分析

Fig. 3 Go and KEGG enrichment analysis of female (F_YFP) and male (M_YFP) *Neophocaena asiaeorientalis* differentially expressed genes

a. Go enrichment of up-regulated DEGs in F_YFP; b. Go enrichment of up-regulated DEGs in M_YFP; c. KEGG enrichment of up-regulated DEGs in F_YFP; d. KEGG enrichment of up-regulated DEGs in M_YFP.

网络产生的 IgA(intestinal immune network for IgA production)、鞘脂代谢(sphingolipid metabolism)、Th17 细胞分化(Th17 cell differentiation)和苯丙氨酸代谢(phenylalanine metabolism)等通路(图 3c)。240

个雄性偏好表达基因显著富集于: 细胞的焦点粘连(focal adhesion)、趋化因子信号通路(chemokine signaling pathway)、补体与凝血级联(complement and coagulation cascades)和肌动蛋白细胞骨架调节

(regulation of actin cytoskeleton)等通路(图 3d)。

差异表达基因功能分析发现有 49 个 DEGs 富集到免疫通路, 其中 23 个呈雌偏好, 26 个呈雄偏好(表 4)。KEGG 通路分析发现 23 个雌偏好 DEGs 显著富集于 8 条免疫相关通路($Q<0.05$), 有 4 个差异表达基因(*IL7R*, *CyclinB*, *p38*, *P15*)被富集到 FoxO 信号通路中。26 个雄偏好 DEGs 显著富集于 4 条免疫相关通路($Q<0.05$), 有 6 个差异表达基因(*IGF1*, *SGK*, *GPCR*, *ITGA9*, *BCR*, *VWF*)被富集到 PI3K-Akt 信号通路中(表 5)。此外, 根据通路富集分析还发现了 Hippo 信号通路在雌性江豚血液中被激活(图 4)。

表 4 长江江豚雌雄两性免疫相关差异表达基因

Tab. 4 List of differentially expressed genes related to immunity in female and male *Neophocaena asiaeorientalis* transcriptome

基因名 gene name	全名 description	基因序列号 gene ID	差异倍数 log ₂ FC (F_YFP/M_YFP)
雌偏好表达基因 female preferred genes			
<i>IL2</i>	白细胞介素-2 interleukin-2	112399755	4.45
<i>PIGR</i>	聚免疫球蛋白受体 polymeric immunoglobulin receptor	112403452	3.52
<i>IGBP1</i>	免疫球蛋白结合蛋白 1 immunoglobulin-binding protein 1	112410976	1.81
<i>IL22</i>	白细胞介素-22 interleukin-22	112394330	1.78
<i>BDKRB1</i>	B1 缓激肽受体 B1 bradykinin receptor	112409628	1.74
<i>HSPB6</i>	热休克蛋白 beta-6 heat shock protein beta-6	112392298	1.63
<i>IGH</i>	免疫球蛋白重链 immunoglobulin heavy chain	BGI_novel_G000046	1.60
<i>p38</i>	p38 MAP 激酶 mitogen-activated protein kinase	112413934	1.55
<i>CPLA2</i>	胞质磷脂酶 A2 cytosolic phospholipase A2	112391289	1.49
<i>IL7R</i>	白细胞介素-7 受体 interleukin-7 receptor	112414006	1.46
<i>IL17F</i>	白细胞介素-17 受体 interleukin-17F	112413991	1.31
<i>JAM2</i>	连接黏附分子 2 junctional adhesion molecule 2	112390937	1.24
<i>PLPP3</i>	磷脂酸磷酸酶 3 phospholipid phosphatase 3	112407066	1.20
<i>AAP</i>	α -2-抗血浆蛋白 alpha-2-antiplasmin	112394520	1.18
<i>CCR10</i>	C-C 趋化因子受体 10 型 C-C chemokine receptor type 10	112399840	1.11
<i>COX2</i>	环氧合酶 2 cyclooxygenase-2	112403598	1.08
<i>IL23R</i>	白细胞介素-23 受体 interleukin-23 receptor	112392762	1.07
<i>CyclinB</i>	有丝分裂特异性细胞周期蛋白 B mitosis-specific cydlin B	112393128	1.07
<i>TEAD</i>	转录增强子 transcriptional enhancer factor	112414044	1.07
<i>RAET1</i>	维甲酸早期转录物 1 retinoic acid early transcript 1	112395609	1.04
<i>CFL2</i>	亲合素-2 cofilin-2	112411171	1.02
<i>SHC1</i>	SHC 转化蛋白 1 SHC-transforming protein 1	112415046	1.01
<i>P15</i>	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制子 cyclin-dependent kinase inhibitor	112415059	1.01
雄偏好表达基因 male preferred genes			
<i>CRK</i>	原癌基因 C-crk proto-oncogene C-crk	112401625	4.24
<i>CFB</i>	补体因子 B complement factor B	112395373	3.65
<i>ITGA9</i>	α 9 整合素 integrin alpha9	112401332	2.32
<i>F10</i>	凝血因子 X coagulation factor X	112401492	2.19
<i>MYLK</i>	肌球蛋白轻链激酶 myosin-light-chain kinase	112411806	2.07
<i>BCR</i>	细胞抗原受体 B-cell receptor B	BGI_novel_G000385	1.84

(待续 to be continued)

(续表 4 Tab. 4 continued)			
基因名 gene name	全名 description	基因序列号 gene ID	差异倍数 log ₂ FC (F_YFP/M_YFP)
雄偏好表达基因 male preferred genes			
<i>PRKG1</i>	cGMP 依赖性蛋白激酶 1 cGMP-dependent protein kinase 1	112399588	1.81
<i>DDX3X</i>	ATP 依赖性 RNA 解旋酶 DDX3X ATP-dependent RNA helicase DDX3X	112396076	1.74
<i>P3H3</i>	前胶原脯氨酸 3-双加氧酶 3 procollagen-proline 3-dioxygenase 3	112403679	1.73
<i>RAC3</i>	Rac 蛋白 ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	112410198	1.71
<i>IGF1</i>	胰岛素样生长因子 1 insulin-like growth factor 1	112391070	1.65
<i>BCAR1</i>	乳腺癌抗雌激素抵抗蛋白 1 breast cancer anti-estrogen resistance protein 1	112393343	1.56
<i>PIGR</i>	聚免疫球蛋白受体 polymeric immunoglobulin receptor	112403513	1.39
<i>IL15</i>	白细胞介素-15 interleukin-15	112393748	1.32
<i>GPCR</i>	G 蛋白偶联受体 G protein-coupled receptor	112397450	1.32
<i>FOS</i>	原癌基因蛋白 c-fos proto-oncogene protein c-fos	112394907	1.29
<i>TFPI</i>	组织因子途径抑制剂 tissue factor pathway inhibitor	112400874	1.26
<i>PTGIR</i>	前列环素受体 prostacyclin receptor	112415247	1.23
<i>TAZ</i>	转录辅激活蛋白 transcriptional co-activator with PDZ-binding motif	112415931	1.15
<i>VWF</i>	血管性血友病因子 von Willebrand factor	112391767	1.14
<i>F9</i>	凝血因子 IX coagulation factor IX	112404539	1.14
<i>CLDN4</i>	紧密连接蛋白 4 claudin-4	112401114	1.13
<i>SGK</i>	血清/糖皮质激素调节激酶 serum/glucocorticoid-regulated kinase	112400904	1.09
<i>ECSCR</i>	内皮细胞特异性趋化调节因子 endothelial cell-specific chemotaxis regulator	112404324	1.07
<i>NCR3</i>	天然细胞毒性触发受体 3 natural cytotoxicity triggering receptor 3	112395470	1.06
<i>NLRP12</i>	NOD 样受体 12 NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12	112401967	1.02

表 5 长江江豚雌雄两性免疫相关差异表达基因富集通路
Tab. 5 Significantly enriched pathways of DEGs related to immunity in female and male *Neophocaena asiaeorientalis* transcriptome

通路序列号 pathway ID	通路名 pathway name	基因 gene	Q 值 Q value
雌偏好基因富集的免疫通路 immune pathways enriched for female preferred genes			
ko04068	FoxO 信号通路 FoxO signaling pathway	<i>IL7R, CyclinB, p38, P15</i>	4.50E-02
ko04659	Th17 细胞分化 Th17 cell differentiation	<i>IL23R, IL22, IL2, p38, IL17F</i>	5.22E-03
ko04672	产生 IgA 的肠道免疫网络 intestinal immune network for IgA production	<i>IL2, CCR10, PIGR, IGH</i>	1.01E-03
ko04650	自然杀伤细胞介导的细胞毒性 natural killer cell mediated cytotoxicity	<i>RAET1, ODF3L1, SHC1, IGH</i>	4.13E-03
ko04664	FcεRI 信号通路 Fc epsilon RI signaling pathway	<i>CPLA2, p38, IGH</i>	1.68E-02
ko04657	白介素-17 信号通路 IL-17 signaling pathway	<i>COX2, p38, IL17F</i>	1.76E-02
ko04625	C 型凝集素受体信号通路 C-type lectin receptor signaling pathway	<i>IL2, p38, COX2</i>	3.29E-02
ko04666	FcγR 介导的吞噬作用 Fc gamma R-mediated phagocytosis	<i>PLPP3, CFL2, IGH</i>	4.50E-02
雄偏好基因富集的免疫通路 immune pathways enriched for male preferred genes			
ko04662	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	<i>IGF1, SGK, GPCR, ITGA9, BCR, VWF</i>	4.03E-02
ko04610	补体与凝血级联反应 complement and coagulation cascades	<i>VWF, CFB, TFPI, F10, F9</i>	1.89E-03
ko04672	产生 IgA 的肠道免疫网络 intestinal immune network for IgA production	<i>IL15, PIGR, BCR</i>	2.34E-02
ko04611	血小板激活 platelet activation	<i>VWF, PRKG1, CRK, MYLK, PTGIR</i>	1.90E-02

2.3 雌雄两性血液 miRNA 表达谱分析

使用与 mRNA 测序相同的样本, 进一步研究江豚血液 miRNA 在雌雄两性中的表达情况。去除垃圾序列后, M1_YFP、M2_YFP、M3_YFP、F1_YFP、F2_YFP 和 F3_YFP 分别获得了 23227777 (96.39%)、23773796 (97.19%)、23168825 (97.56%)、23371998 (96.33%)、23102270 (97.02%)和 23071513

(96.20%)条 clean tags (表 6)。笔者在 6 个样品中共鉴定了 457 个保守序列和 528 个新序列。根据长江江豚雌雄两组数据进行差异表达基因分析, 获得了 160 个差异表达的 miRNAs (DEMs), 包括 114 个新 miRNAs, 其中有 97 个 DEMs 在雌性长江江豚中上调表达, 63 个 DEMs 在雄性长江江豚中上调表达。

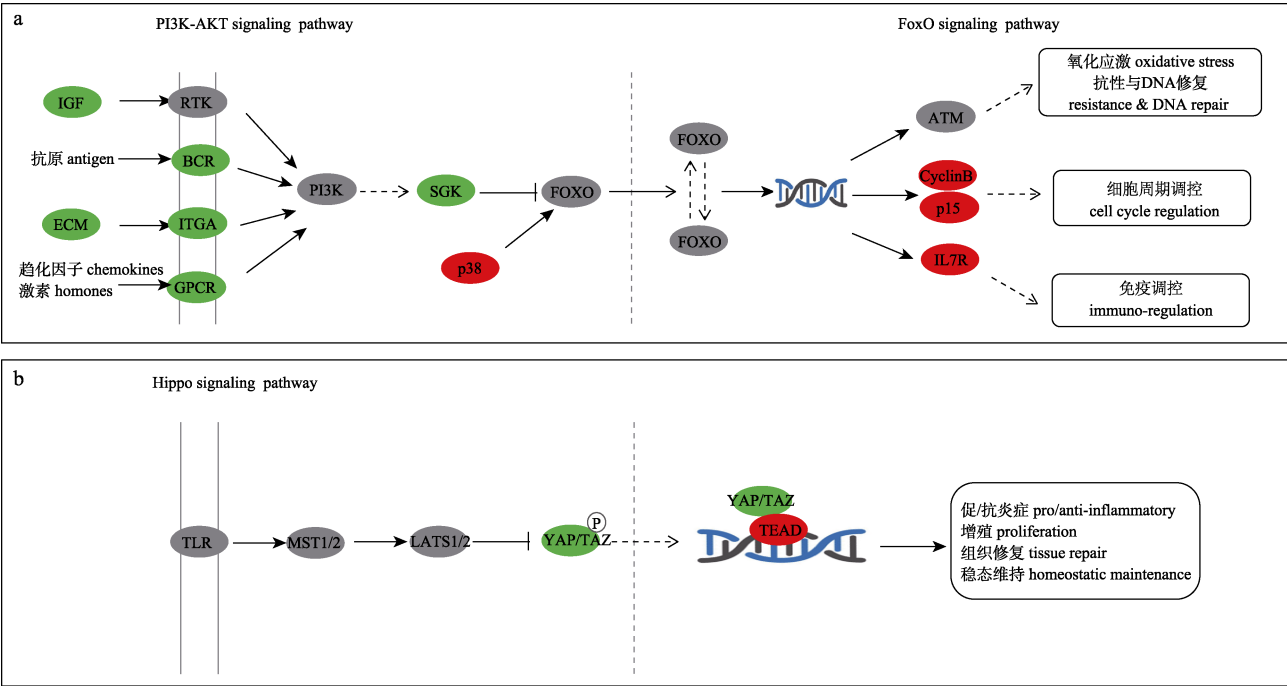


图 4 长江江豚两性血液中 PI3K-Akt-FoxO 信号通路(a)和 Hippo 信号通路(b)在雌性 vs 雄性比较组中, 上调的 DEGs 用红色标记, 下调的 DEGs 用绿色标记。
Fig. 4 Major changes of PI3K-Akt-FoxO signaling pathway (a) and Hippo signaling pathway (b) in female and male *Neophocaena asiaeorientalis* blood transcriptome
Expression of up-regulated DEGs is marked as red and down-regulated DEGs as green in female vs male comparison.

表 6 miRNA 测序、拼接组装及比对结果分析
Tab. 6 Sequencing, assembly and comparison of generated miRNA data

样本编号 code	原始序列数量 raw tag count	过滤序列数量 tag count	clean	过滤序列质控/% Q20 of clean tag	过滤序列占比/% percentage of clean tag	比对数量 mapped tag	比对数量占比/% percentage
M1_YFP	24098082	23227777		98.7	96.39	21091855	90.8
M2_YFP	24460272	23773796		98.4	97.19	21908371	92.15
M3_YFP	23749060	23168825		98.6	97.56	21446295	92.57
F1_YFP	24263384	23371998		98.5	96.33	21841706	93.45
F2_YFP	23811996	23102270		98.6	97.02	21533329	93.21
F3_YFP	23982483	23071513		98.5	96.20	21206194	91.92

2.4 差异表达基因和 miRNA 联合分析

基于上述转录组数据获得的 DEMs 及其预测的靶基因来确定 miRNA 和 mRNA 之间的相互作

用关系, 结果显示, 有 190 对 miRNA-mRNA 呈负调控关系, 包括 30 个已知的 DEMs 和 136 个对应靶向关系的 DEGs。进一步筛选了 45 对与免疫相

关的 miRNA-mRNA 靶向关系, 包括 13 个 DEMs 和 37 个对应靶向关系的免疫相关 DEGs。通过对上述预测的 136 个 DEGs 进行 KEGG 富集分析, 发现有 6 条途径参与了免疫反应, 即补体与凝血级联、血小板激活(platelet activation)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性(natural killer cell mediated cytotoxicity)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、Ras 信号通路(Ras signaling pathway)和

趋化因子信号通路(图 5)。

基于上述获得的 DEMs 和免疫相关 DEGs, 笔者绘制了 miRNA-mRNA 靶点图。结果分析发现, miR-24、miR-103、miR-455-3p_6、miR-107b_1、miR-15a-3p_1、miR-34a-5p、miR-140-5p_1、miR-140-3p_3、miR-18a-3p_2 在雌性长江江豚中上调表达, miR-34b-5p、miR-18a-3p_3、miR-124c-3p 和 miR-24-3p 在雄性长江江豚中上调表达(图 6)。

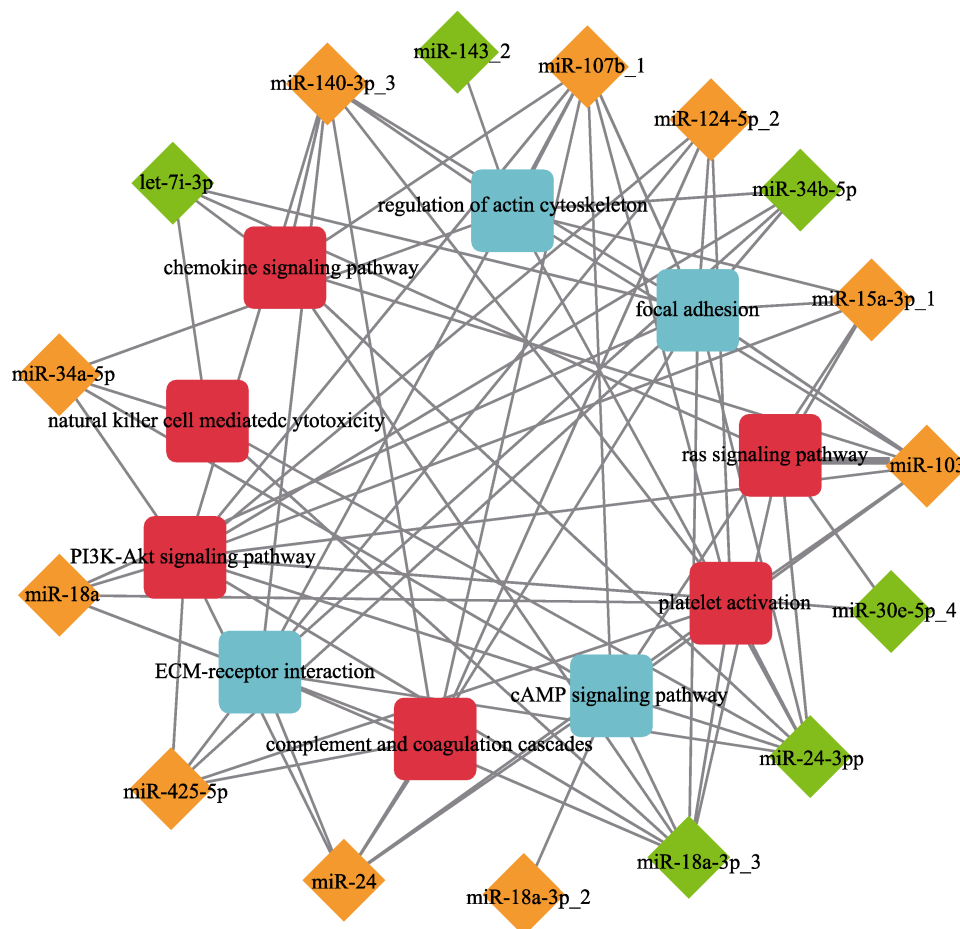


图 5 雌雄两性长江江豚对比的 miRNA 靶向通路网络图

橙色菱形代表上调 miRNA, 绿色菱形代表下调 miRNA, 红色方块代表免疫通路, 青色方块代表其他通路。

Fig. 5 miRNA target pathway networks in female and male *Neophocaena asiaeorientalis* comparison
The orange diamond represents up regulation of miRNA, the green diamond represents down regulation of miRNA, the red square represents immune pathway, and the cyan square represents other pathways.

2.5 qRT-PCR 验证

为了验证上述转录组测序鉴定的差异表达 mRNAs 和 miRNAs 的可靠性, 随机选择 6 个 DEGs 和 6 个 DEMs 进行 qRT-PCR 验证(图 7), 分别以 *GAPDH* 和 U6 snRNA 作为内参基因。实验结果发现, 这些 mRNAs 和 miRNAs 的表达模式与

转录组测序的结果一致, 这也证实了分析的可靠性。

3 讨论

血液作为免疫系统的载体, 携带多种免疫调节因子和特异性抗体, 参与先天性免疫防御和适应性免疫应答的启动。通过血液转录组研究可以

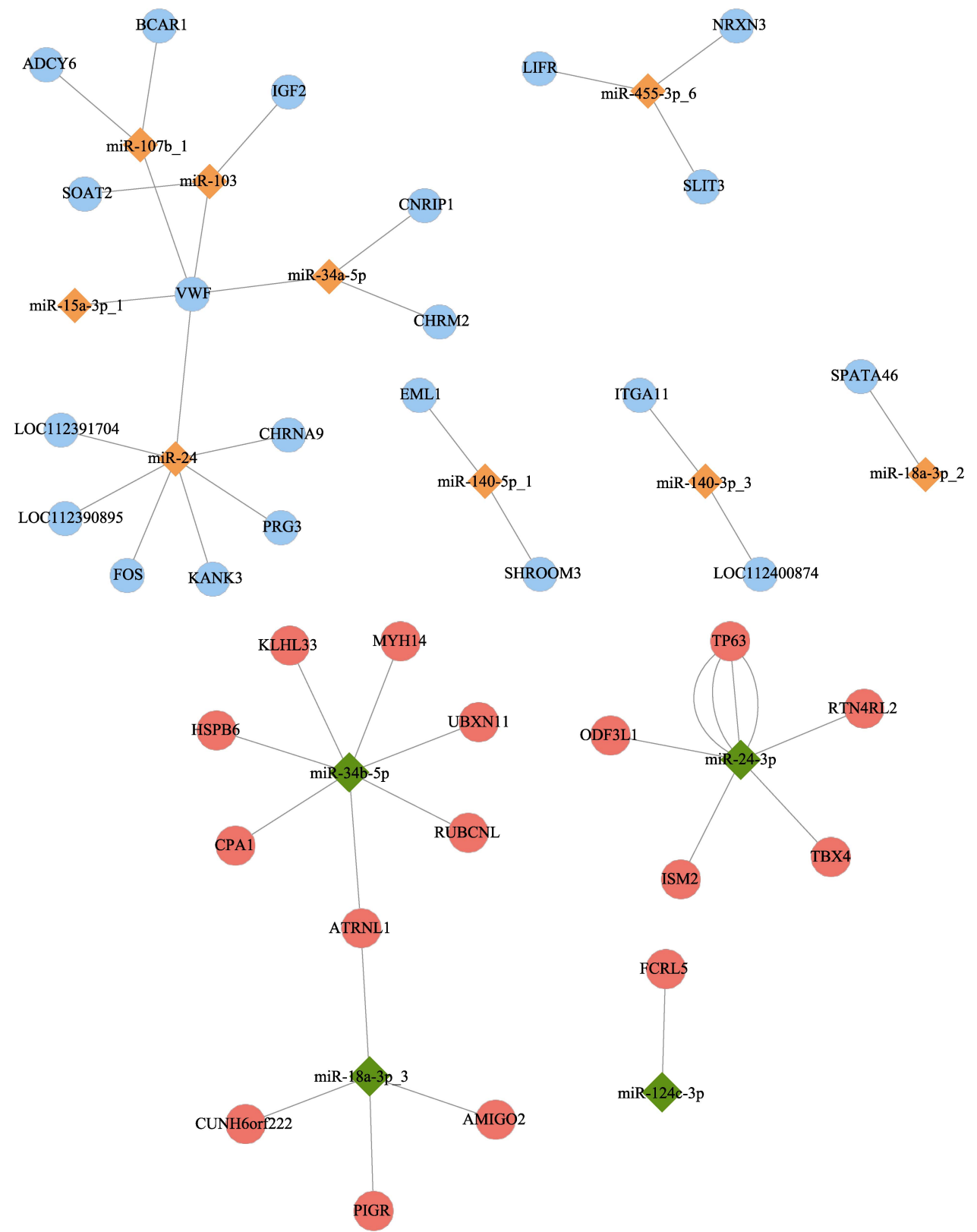


图 6 雌雄两性长江江豚对比的 miRNA 和靶基因网络图

橙色菱形代表上调 miRNAs, 绿色菱形代表下调 miRNAs, 蓝色圆圈代表下调基因, 红色圆圈代表上调基因.

Fig. 6 miRNA and target genes network in femdle and male *Neophocaena asiaeorientalis* comparison

The orange diamond represents up-regulated miRNAs, the green diamond represents down-regulated miRNAs, the blue circle represents down-regulated genes, and the red circle represents up-regulated genes.

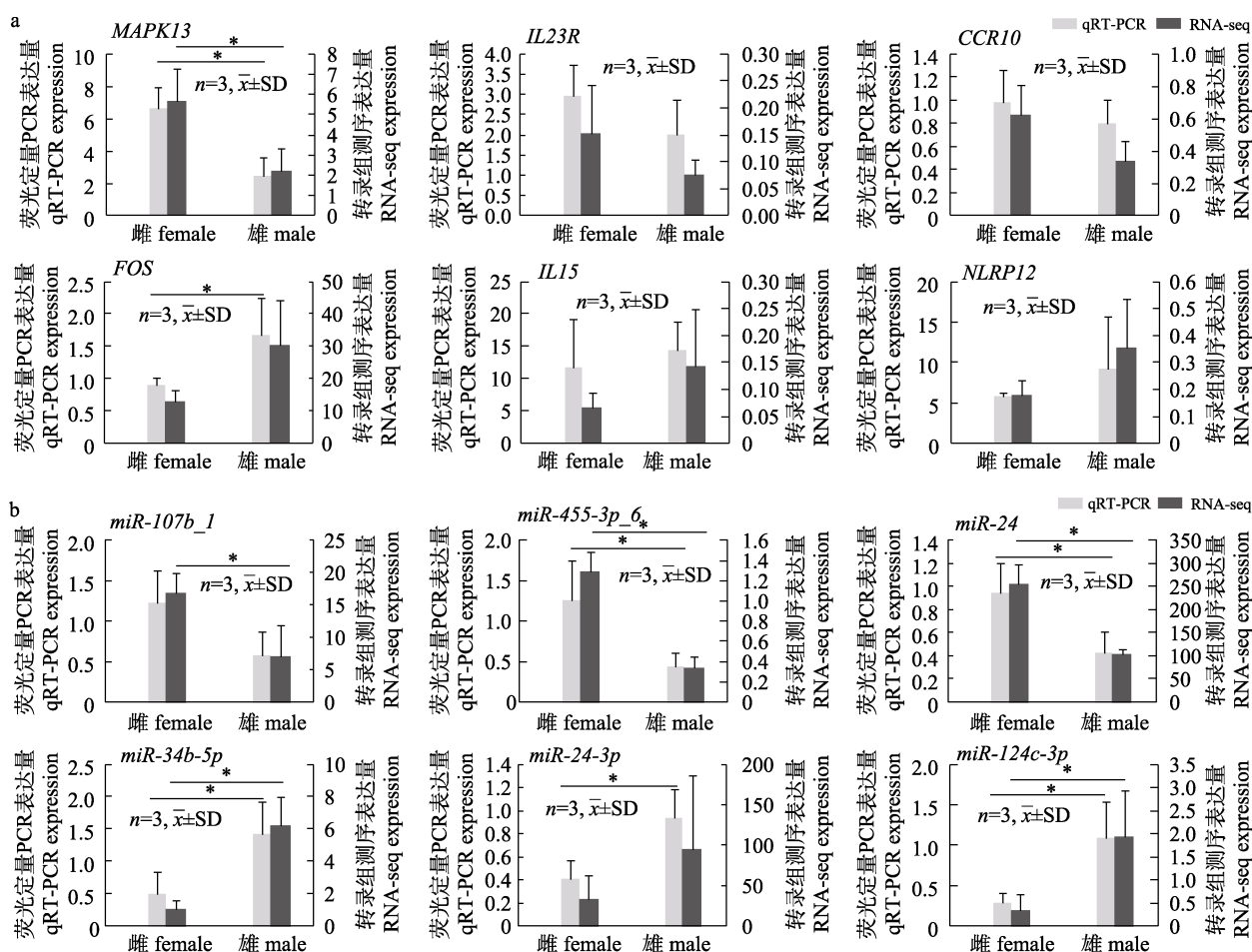


图 7 差异表达基因(a)和 miRNA (b)的 qRT-PCR 验证

左纵轴代表 qRT-PCR 的相对表达量, 右纵轴代表 RNA-seq 表达值。*表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 7 qRT-PCR verification of differentially expressed mRNA and miRNA

The left vertical axis represents qRT-PCR relative expression, the right vertical axis represents RNA-seq expression. * refers to significant difference ($P < 0.05$).

从整体上了解免疫系统机制, 获取丰富的免疫反应相关基因和通路, 尤其是能反映物种免疫偏性的功能基因^[29]。为了研究长江江豚免疫系统及雌雄差异, 利用 RNA-seq 技术获得了 6 头长江江豚血液转录组数据, 以期通过对两组转录组样本间差异表达基因的鉴定和功能注释, 从基因调控水平对雌雄两性长江江豚的免疫适应性机制进行探讨。

3.1 性别对长江江豚免疫适应性的影响

本研究中, 将转录组测序数据与长江江豚基因组注释信息进行比对, 共得到了 15878 个基因, 占基因总数的 72.1%, 其中包括很多表达量较高的免疫相关基因, 如 *CD74* 和 *CFD* 等。在高表达基因中, 没有发现球蛋白基因, 这表明使用 PAXgene 试剂盒提取血液 RNA 效果良好。差异表

达基因分析显示, 雄性长江江豚血液显著偏好表达 *IGF1* (胰岛素样生长因子 1)、*RAC3* (Rac 蛋白) 和 *SHC3* (Src 同源结构域) 基因, 并显著富集于“Ras signaling pathway”、“Wnt signaling pathway”、“mTOR signaling pathway”、“PI3K-AKT signaling pathway”通路中, 调节细胞周期、细胞生长、细胞迁移、细胞骨架和肌动蛋白骨架形成^[30-33]。可见, 雄豚血液基因与细胞生长功能显著相关, 这可能预示着雄豚有较快的生长性能。此外, 雌性长江江豚血液显著偏好表达 *PLPP3* (磷脂酸磷酸酶)、*ALDH* (乙醛脱氢酶) 和 *COX7B* (细胞色素 c 氧化酶亚基) 基因, 并显著富集于鞘脂代谢、色氨酸代谢 (tryptophan metabolism)、糖酵解 (glycolysis)、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 通路中, 调节

脂代谢、氨基酸代谢和糖代谢^[34-35]。可见, 雌豚血液基因与能量代谢功能显著相关, 这可能预示着雌豚有更强的能量代谢能力。

根据通路富集分析结果, 雌性长江江豚 PI3K-Akt 信号通路中的 *IGF1*、*ECM* (细胞外基质)、*BCR* (B 细胞抗原受体)、*ITGA9* ($\alpha 9$ 整合素)、*GPCR* (G 蛋白偶联受体) 和 *SGK* (血清/糖皮质激素调节激酶) 等免疫相关基因表达量下调(图 4a), 表明 *IGF1* 等细胞外生长因子与多种受体结合抑制了 PI3K-Akt 信号通路。已有研究发现, *FoxO* 信号通路受 PI3K-AKT 信号通路的负调控, 通过激活下游信号分子在免疫调节、抗应激反应、细胞周期调节、细胞分化和凋亡等过程中发挥重要作用^[36-37]。研究发现 *FoxO* 信号通路中的 *p38* (*p38* MAP 激酶)、*CyclinB* (细胞周期蛋白 B)、*p15* (细胞周期蛋白依赖性激酶抑制子) 和 *IL7R* (白细胞介素-7 受体) 等免疫相关基因在雌性长江江豚中表达量上调(图 4a), 表明受上游 PI3K-AKT 信号通路的负调控, 激活了 *FoxO* 信号通路。这一结果表明, 雌性长江江豚可能通过激活 *FoxO* 信号通路来调节免疫系统。

Hippo 信号通路最初是在果蝇中发现的, 并在哺乳动物中高度保守^[38]。近年来的研究发现, Hippo 信号通路在天然免疫和炎症反应中发挥着重要的作用^[39]。Hippo 信号通路上游的模式识别受体感受到胞外病原体相关分子模式信号后, 激活该通路, 转录激活因子 YAP/TAZ 被磷酸化, 导致其在细胞质滞留, 不能进入细胞核行使其转录激活功能。Hippo 信号通路关闭后, 失活的 MST1/2 和 LATS1/2 通过抑制磷酸化释放 YAP/TAZ, 导致其在细胞核内积累。然后 YAP/TAZ 与转录因子 TEAD 结合, 诱导基因转录, 促进细胞增殖、抗炎症反应、组织修复以及维持机体内稳态^[40-41]。本研究发现, Hippo 信号通路中关键基因 YAP/TAZ 在雌性长江江豚中表达量下调, 而 TEAD 转录因子的表达量上调(图 4b), 表明该通路被激活。可见, 雌性长江江豚可能具有更强的免疫力及维持机体内稳态的能力。

本课题组针对野外死亡长江江豚组织样品中重金属和持久性有机污染物(POPs)积累规律的研究

发现, 雄性江豚体内 Ca、Cr 元素以及 POPs 含量均大于雌性, 这些化学物质会对长江江豚的肝功能及其他生理过程产生负面影响^[3]。本研究应激相关基因 *HSPB6* (热休克蛋白 beta-6) 和 *COX2* (环氧化酶 2) 在雌性江豚血液中显著偏好表达。动物体处于应激状态时所诱导的热休克反应可以对抗极端的蛋白质毒性损伤, 如氧化应激、毒素、重金属、病原体、缺氧、高温和其他有害条件^[42]。*COX2* 是前列腺素合成的关键限速酶, 在氧化应激通路中发挥重要作用^[43]。此外, *SGK* 基因在雄性江豚血液中显著偏好表达, 此基因对细胞各种压力如炎症、氧化应激、紫外线等刺激敏感, 可以直接磷酸化并负调节 *FoxO* 转录因子^[44]。而雌性江豚显著偏好表达 *p38* 基因, 通过 *p38* 依赖途径可诱导 *FoxO* 转录因子的表达, 这两个基因都在 *FoxO* 信号通路中发挥重要作用^[30]。这一结果表明雌性江豚在受到环境应激影响后, 会通过表达抗应激基因以响应环境压力, 且雌性比雄性能更快地适应环境压力。

3.2 长江江豚血液 miRNA-mRNA 联合分析

MicroRNAs (miRNAs) 是一种长度约 22 nt 的非编码小 RNA, 主要通过与其靶基因 3'UTR 结合来调控基因的表达^[45]。miRNA 介导的 RNA 干扰作为一种重要调节机制, 在翻译水平上调控发育、凋亡、增殖、免疫、代谢和发病机制等多种生物学过程^[46]。许多疾病都与免疫调节有关, 一些 miRNAs 已被证明在免疫功能中发挥重要作用^[47]。例如, miR-24 与许多癌症和炎症性疾病有关, 并已证实在这几种不同的细胞类型中调节炎症反应^[48]。本研究依据长江江豚性别相关 miRNA 及其靶基因表达情况, 探讨雌雄偏好表达 miRNA 在免疫反应中发挥的作用。研究发现, 两性血液中共鉴定了 160 个 DEMs, 有 97 个 DEMs 在雌性江豚中上调表达, 其中 9 个 miRNAs (miR-24、miR-103、miR-455-3p_6、miR-107b_1、miR-15a-3p_1、miR-34a-5p、miR-140-5p_1、miR-140-3p_3、miR-18a-3p_2) 调控免疫相关基因; 同时有 63 个 DEMs 在雄性江豚中上调表达, 其中 4 个 miRNAs (miR-34b-5p、miR-18a-3p_3、miR-124c-3p 和 miR-24-3p) 调控免疫相关基因。以上鉴定的 13 个两性差异表

达 miRNAs 参与多种炎症性疾病和肿瘤组织致病机制的调控^[49-50]。miR-103^[51]和 miR-140-5p^[52]通过调控 PI3K-Akt 信号通路分别参与肝癌和卵巢癌细胞的功能。miR-34a 通过激活树突状细胞介导先天性免疫反应,广泛表达于肥大细胞、树突状细胞、巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞等免疫细胞中,调节其发育、功能和生存^[53]。可见,这些差异表达的 miRNA 可能通过调节靶基因的表达而影响江豚的免疫功能。

本研究发现两性差异表达 miRNAs 的预测靶基因与免疫或疾病有关。例如, VWF (血管性血友病因子)由 miR-24、miR-34a-5p、miR-15a-3p_1、miR-107b_1 和 miR-103 共同调控并在补体与凝血级联和 PI3K-Akt 信号通路中发挥作用, VWF 是一种大分子量多聚糖蛋白,对补体介导的免疫损伤具有保护作用^[54]。FOS (原癌基因蛋白 c-fos)是 miR-24 的靶基因并在 MAPK 和 Toll 样受体信号通路中发挥作用, FOS 作为一种原癌基因,其编码的 FOS 蛋白与 c-Jun 结合形成激活蛋白 1 (AP1),构成免疫系统最强大的转录因子之一^[55]。可见,这些显著差异表达的 miRNA 与免疫相关,并且大多数血液 miRNA 在雌性个体中表达上调,这可能预示着成年雌性长江江豚具有更强的免疫能力。

参考文献:

- [1] Gao A L, Zhou K Y. Geographical variation of external measurements and three subspecies of *Neophocaena phocaenoides* in Chinese waters[J]. Acta Theriologica Sinica, 1995, 15(2):81-92. [高安利, 周开亚. 中国水域江豚外形的地理变异和江豚的三亚种[J]. 兽类学报, 1995, 15(2):81-92.]
- [2] Wang K X, Wang D, Zhang X F, et al. Range-wide Yangtze freshwater dolphin expedition: The last chance to see Baiji? [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2006, 13(6): 418-424.
- [3] Kan X Y, Yin D H, Fang X, et al. Accumulation of elements in Yangtze finless porpoise *Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis* in the lower reaches of the Yangtze River and Poyang Lake[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2021, 36(5): 775-784. [阚雪洋, 尹登花, 方昕, 等. 长江下游及鄱阳湖长江江豚体内元素累积特征比较[J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(5): 775-784.]
- [4] Xiong X, Qian Z Y, Mei Z G, et al. Trace elements accumulation in the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*) - A threat to the endangered freshwater cetacean[J]. Science of the Total Environment, 2019, 686: 797-804.
- [5] Zhang K, Qian Z Y, Ruan Y F, et al. First evaluation of legacy persistent organic pollutant contamination status of stranded Yangtze finless porpoises along the Yangtze River Basin, China[J]. Science of the Total Environment, 2020, 710: 136446.
- [6] Liu Z G, Jiang H Y, Zhang X K, et al. Identification and characterizations of *Aeromonas salmonicida* isolated from Yangtze finless porpoise[J]. Acta Theriologica Sinica, 2018, 38(6): 562-571. [刘志刚, 蒋胡艳, 张晓可, 等. 长江江豚杀鲑气单胞菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 兽类学报, 2018, 38(6): 562-571.]
- [7] Liu Z G, Zheng A F, Chen M M, et al. Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* from a dead Yangtze finless porpoise[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2018, 132(1): 13-22.
- [8] Nabi G, Li Y, McLaughlin R W, et al. Immune responses of the critically endangered Yangtze finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis* ssp. *asiaeorientalis*) to escalating anthropogenic stressors in the wild and seminatural environments[J]. Frontiers in Physiology, 2020, 10: 1594.
- [9] Huang Z H, Chen B Y, Liu X X, et al. Effects of sex and aging on the immune cell landscape as assessed by single-cell transcriptomic analysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(33): e2023216118.
- [10] Yang M Y, Du L M, Li W J, et al. Profile of microRNA in giant panda blood: A resource for immune-related and novel microRNAs[J]. PLoS ONE, 2015, 10(11): e0143242.
- [11] Morey J S, Neely M G, Lunardi D, et al. RNA-Seq analysis of seasonal and individual variation in blood transcriptomes of healthy managed bottlenose dolphins[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 720.
- [12] Charruau P, Johnston R A, Stahler D R, et al. Pervasive effects of aging on gene expression in wild wolves[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(8): 1967-1978.
- [13] Wang Y, Guo J X, Wang L, et al. Transcriptome analysis revealed potential mechanisms of differences in physiological stress responses between caged male and female magpies[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 447.
- [14] Yao S C, Fan M N, Tang W Q, et al. Survey on population size of finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis*) in the estuary of Yangtze River[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(2): 145-153. [姚思聪, 樊明宁, 唐文乔, 等. 长江河口区江豚种群调查[J]. 动物学杂志, 2014, 49(2):

- 145-153.]
- [15] Zhao X J, Barlow J, Taylor B L, et al. Abundance and conservation status of the Yangtze finless porpoise in the Yangtze River, China[J]. *Biological Conservation*, 2008, 141(12): 3006-3018.
- [16] Ju T, Zhang T C, Wang Z T, et al. Characteristics of riprapping underwater noise and its possible impacts on the Yangtze finless porpoise[J]. *Technical Acoustics*, 2017, 36(6): 580-588. [居涛, 张天赐, 王志陶, 等. 抛石噪声特性及其对长江江豚的可能影响[J]. *声学技术*, 2017, 36(6): 580-588.]
- [17] Shi W J, Wang Z T, Fang L, et al. A preliminary study on impact of piling underwater noise on the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 399-407. [时文静, 王志陶, 方亮, 等. 打桩水下噪声对长江江豚影响初探[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(2): 399-407.]
- [18] Hao Y J, Wang D, Zhang X F. Review on breeding biology of Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*)[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2006, 26(2): 191-200. [郝玉江, 王丁, 张先锋. 长江江豚繁殖生物学研究概述[J]. *兽类学报*, 2006, 26(2): 191-200.]
- [19] Nabi G, Hao Y J, Zeng X Y, et al. Hematologic and biochemical differences between two free ranging Yangtze finless porpoise populations: The implications of habitat[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0188570.
- [20] Zhang C Q, Zheng Y, Sara P, et al. Homosexual and masturbating behaviors in a group of captive Yangtze finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*)[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2015, 35(3): 241-252. [张长群, 郑杨, Platto Sara, 等. 人工饲养长江江豚的同性行为和自慰行为[J]. *兽类学报*, 2015, 35(3): 241-252.]
- [21] Wu L, Chen R, Wei Y L, et al. The maternal care by Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*) in a semi-natural environment[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2015, 35(3): 253-259. [吴亮, 陈燃, 魏垚麟, 等. 半自然条件下成年雌性长江江豚的抚幼行为[J]. *兽类学报*, 2015, 35(3): 253-259.]
- [22] Du H J, Zheng J S, Wu M, et al. High MHC DQB variation and asymmetric allelic distribution in the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*[J]. *Biochemical Genetics*, 2010, 48(5): 433-449.
- [23] Ruan R, Guo A H, Hao Y J, et al. *De novo* assembly and characterization of narrow-ridged finless porpoise renal transcriptome and identification of candidate genes involved in osmoregulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(1): 2220-2238.
- [24] Zhou X M, Guang X M, Sun D, et al. Population genomics of finless porpoises reveal an incipient cetacean species adapted to freshwater[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1276.
- [25] Yin D H, Lin D Q, Guo H Y, et al. Integrated analysis of blood mRNAs and microRNAs reveals immune changes with age in the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 256: 110635.
- [26] Brown C J, Miller A P, Carrel L, et al. The DXS423E gene in Xp11.21 escapes X chromosome inactivation[J]. *Human Molecular Genetics*, 1995, 4(2): 251-255.
- [27] Le Coz C, Trofa M, Syrett C M, et al. CD40LG duplication-associated autoimmune disease is silenced by nonrandom X-chromosome inactivation[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(6): 2308-2311.e7.
- [28] Hop H T, Arayan L T, Huy T X N, et al. The key role of c-fos for immune regulation and bacterial dissemination in *Brucella* infected macrophage[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 287.
- [29] Liu G S, Zhang H H, Sun G L, et al. Characterization of the peripheral blood transcriptome and adaptive evolution of the MHC I and TLR gene families in the wolf (*Canis lupus*)[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 584.
- [30] Ma Y Y, Wang H. PI3K/Akt/FoxO: A novel participant in signal transduction in bone cells under mechanical stimulation[J]. *Cell Biology International*, 2012, 36(10): 923-926.
- [31] Adjei A A. Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2001, 7(16): 1581-1594.
- [32] Duchartre Y, Kim Y M, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016, 99: 141-149.
- [33] Wang Y, Zhang H B. Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206: 67-83.
- [34] Mao G G, Smyth S S, Morris A J. Regulation of PLPP3 gene expression by NF- κ B family transcription factors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(38): 14009-14019.
- [35] Indrieri A, van Rahden V A, Tiranti V, et al. Mutations in COX7B cause microphthalmia with linear skin lesions, an unconventional mitochondrial disease[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2012, 91(5): 942-949.
- [36] de Magalhães J P, Passos J F. Stress, cell senescence and organismal ageing[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2018, 170: 2-9.

- [37] Zhang M, Zhang X Y. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis[J]. Archives of Dermatological Research, 2019, 311(2): 83-91.
- [38] Justice R W, Zilian O, Woods D F, et al. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation[J]. Genes & Development, 1995, 9(5): 534-546.
- [39] Ma Y C, Han H, Zou C G. Hippo signaling pathway regulation of innate immune response[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2019, 49(7): 781-787. [马怡诚, 韩晖, 邹成钢. Hippo 信号通路调控天然免疫的研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(7): 781-787.]
- [40] Zhang Y C, Zhang H T, Zhao B. Hippo signaling in the immune system[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2018, 43(2): 77-80.
- [41] Taha Z, Janse van Rensburg H J, Yang X L. The hippo pathway: Immunity and cancer[J]. Cancers, 2018, 10(4): 94.
- [42] Li E R, Yan D W, Zhao B, et al. Research advances in the heat shock proteins in mammals[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 49(11): 141-144. [李俄然, 严达伟, 赵宝, 等. 哺乳动物热休克蛋白研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(11): 141-144.]
- [43] Chen J, Luo Y H. Research progress in cyclooxygenase and its inhibitors[J]. China Animal Health, 2011, 13(4): 15-18. [陈君, 罗永煌. 环氧合酶及其抑制剂的研究进展[J]. 中国动物保健, 2011, 13(4): 15-18.]
- [44] Leong M L L, Maiyar A C, Kim B, et al. Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(8): 5871-5882.
- [45] Bartel D P, Chen C Z. Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan microRNAs[J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5(5): 396-400.
- [46] Hirschberger S, Hinske L C, Kreth S. MiRNAs: Dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer[J]. Cancer Letters, 2018, 431: 11-21.
- [47] Li C J, Fang Z J, Jiang T, et al. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris[J]. BMC Medical Genomics, 2013, 6: 16.
- [48] Naqvi A R, Fordham J B, Nares S. miR-24, miR-30b, and miR-142-3p regulate phagocytosis in myeloid inflammatory cells[J]. Journal of Immunology, 2015, 194(4): 1916-1927.
- [49] Zhang C P, Fu Q, Ding M, et al. Comprehensive analysis of differentially expressed serum microRNAs in humans responding to Brucella infection[J]. Annals of Translational Medicine, 2019, 7(14): 301.
- [50] Zeng Y, Gao T Y, Huang W, et al. microRNA-455-3p mediates GATA3 tumor suppression in mammary epithelial cells by inhibiting TGF- β signaling[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(43): 15808-15825.
- [51] Tan Y H, Zhao L. miR-103 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration in the simulation transition zone of RFA through PI3K/Akt signaling pathway by targeting PTEN[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2020, 13(3): 473-479.
- [52] Xu H, Ding Y, Yang X Y. Overexpression of long noncoding RNA H19 downregulates miR-140-5p and activates PI3K/AKT signaling pathway to promote invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 6619730.
- [53] Taheri F, Ebrahimi S O, Shareef S, et al. Regulatory and immunomodulatory role of miR-34a in T cell immunity[J]. Life Sciences, 2020, 262: 118209.
- [54] Noone D G, Riedl M, Pluthero F G, et al. Von Willebrand factor regulates complement on endothelial cells[J]. Kidney International, 2016, 90(1): 123-134.
- [55] Clegg C H, Rulfes J T, Haugen H S, et al. Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in gp39 transgenic mice[J]. International Immunology, 1997, 9(8): 1111-1122.

Potential mechanisms of differences in immune adaptability between female and male Yangtze finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis*) revealed by blood transcriptome analysis

YIN Denghua^{1,2}, LIN Danqing², YAN Yan³, GUO Hongyi¹, ZHU Xiaoyan³, ZHANG Ya¹, LIU Kai², TANG Wenqiao¹

1. Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
3. Anqing Aquatic Technology Promotion Center Station, Anqing 246001, China

Abstract: The Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis*, YFP) has attracted much attention because of the dramatic decline in population size over the past decades, which raises the concern of extinction. Exploring the immune adaptability that occurs between female and male YFPs is important for their protection. In this study, blood samples of 3 female and 3 male YFPs were used for mRNA and miRNA sequencing by RNA-seq technology. We systematically investigated the mRNA and miRNA profiles of female and male YFPs to screen for genes, pathways, and predicted miRNA-mRNA networks associated with the immune system. A total of 15878 unigenes and 985 microRNAs were obtained from 6 samples. KEGG analysis revealed that 1534 unigenes were annotated to the immune system category and were significantly ($P < 0.05$) enriched in 20 common immune pathways. Further, 539 differentially expressed genes (DEGs) and 160 differentially expressed miRNAs (DEMs) were identified, of which 299 were female-preferred genes and 240 were male-preferred genes. GO and KEGG enrichment analysis showed that blood genes were significantly correlated with immune response and energy metabolism in females, and with immune response and cell growth in males. In addition, pathway enrichment analysis revealed that FoxO and Hippo signaling pathways were activated in the female blood. Based on the integrated analysis of DEGs and DEMs, 45 negative regulatory relationships of miRNA-mRNA were predicted, including 13 DEMs and 37 immune-related DEGs. Studies have shown that microRNAs are involved in the immune system of both female and male YFPs by regulating gene expression, and adult female YFPs may have stronger immunity and the ability to maintain homeostasis. This study provides a new perspective for interpreting the adaptability of male and female YFPs to diverse habitats from the perspective of immunity, and the study's findings are of great significance for protecting this endangered species.

Key words: *Neophocaena asiaeorientalis*; immune adaptability; sex; blood transcriptome

Corresponding author: TANG Wenqiao, E-mail: wqtang@shou.edu.cn; LIU Kai, E-mail: liuk@ffrc.cn