引用:张书茵,Ahmed Zafar,张国丽,等. 蒙古牛肝脏单细胞图谱构建及关键代谢因子筛选[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2026,39(6):969-977.

Citation: Zhang Shuyin, Ahmed Zafar, Zhang Guoli, Dong Xinde, Fan Ruiwen. Construction of a single-cell atlas of Mongolian cattle liver and screening of key metabolic factors[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition),2026,39(6):969-977.

文章编号 1672-6634(2026)06-0969-09 **DOI** 10.19728/j.issn1672-6634.2026060011

蒙古牛肝脏单细胞图谱构建及关键代谢因子筛选

张书茵[1],Ahmed Zafar[1],张国丽[2],董新德[1],范瑞文[1,2]

(1 山西农业大学 动物医学学院,山西 太谷 030801;2 聊城大学 农业与生物学院,山东 聊城 252059)

摘要 蒙古牛是我国重要的地方黄牛品种,经过长期自然选择和人工驯养,形成了耐粗饲、抗寒、抗病等优异的抗逆性。肝脏作为机体代谢的重要器官,在抗逆性中发挥重要作用。针对蒙古牛肝脏代谢关键信号分子的研究较少,亦缺少可用于代谢状态评估的有效分子标记。本研究选取健康的 6 月龄幼年和 16 月龄成年蒙古牛肝组织,通过单细胞核 RNA 测序解析蒙古牛肝脏细胞异质性及转录表达特征,筛选肝脏胰岛素信号相关分子,并用 qPCR、Western blotting、免疫组织化学技术以及蛋白互作网络分析,验证代谢相关分子糖皮质激素诱导转录本 1(*GLCCI1*)等基因在蒙古牛肝脏中的表达变化和预测 *GLCCI1* 的互作蛋白。结果显示蒙古牛肝脏细胞图谱共鉴定出 14 个主要的细胞类型,幼年牛肝脏中免疫相关细胞(如 T 细胞、Kupffer 细胞、NK 细胞等)占比显著高于成年牛。通过成年与幼年蒙古牛肝组织差异基因表达分析,筛选了 4 个与胰岛素信号转导相关的差异表达基因,分别为中性粒细胞中表达的 *GLCCI1*、抑瘤素 M(*OSM*)和主控样转录辅激活因子 3(*MAML3*),以及在其他细胞中表达的 B 细胞锚蛋白重复序列支架蛋白 1(*BANK1*)。qPCR 结果显示 *GLCCI1*、*MAML3* 和 *BANK1* 在成年牛肝脏中表达显著较低,而 *OSM* 在成年牛中表达较高,Western blotting 结果表明,GLCCI1 和 BANK1 在成年牛肝脏中表达极显著低于幼年牛($P < 0.001$,$P < 0.01$),免疫组织化学结果显示 GLCCI1、MAML3 和 BANK1 在成年牛肝脏中表达的阳性信号较弱,而 OSM 的表达信号较强;蛋白互作网络显示,*GLCCI1* 与 PI3K 信号通路的肌腱蛋白 C(*TNC*)紧密关联。本研究构建了蒙古牛肝组织细胞图谱,筛选获得肝脏胰岛素信号相关基因 *GLCCI1*,揭示蒙古牛肝脏代谢可能的细胞分子调控机制,也为蒙古牛胰岛素相关代谢检测提供分子基础,对提升蒙古牛健康养殖水平具有重要的理论意义。

关键词 蒙古牛;肝脏;*GLCCI1*;胰岛素信号;单细胞核 RNA 测序

中图分类号 S823 **文献标志码** A

Construction of a single-cell atlas of Mongolian cattle liver and screening of key metabolic factors

ZHANG Shuyin[1], AHMED Zafar[1], ZHANG Guoli[2],
DONG Xinde[1], FAN Ruiwen[1,2]

(1. School of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;
2. School of Agriculture and Biology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

收稿日期:2026-06-11

基金项目:内蒙古自治区"揭榜挂帅"项目(2022JBGS0023)资助

通信作者:范瑞文,女,汉族,博士,教授,博士生导师,山西省"青年三晋学者"特聘教授,研究方向:动物细胞分子调控,E-mail:ruiwenfan@163.com。

Abstract Mongolian cattle are an important and indigenous yellow cattle breed in China. Through long-term natural selection and artificial domestication, Mongolian cattle have developed excellent stress resistance traits, including roughage tolerance, cold resistance, and disease resistance. As an important organ for metabolism, the liver plays functional roles in the stress resistance of Mongolian cattle. Currently, the researches on key signaling molecules related to liver metabolism in Mongolian cattle are limited, and there is a lack of effective molecular markers for assessing metabolic status. Here, liver tissues from healthy 6-month-old juvenile and 16-month-old adult Mongolian cattle were collected for single-nucleus RNA sequencing (snRNA-seq) to analyze cell population and transcriptional expression characteristics. The methods of qPCR, Western blotting, immunohistochemistry and protein-protein interaction network analysis were used to verify the expression changes of the metabolism-related molecule glucocorticoid-induced transcription factor 1 (*GLCCI1*) and other genes in the liver of Mongolian cattle at different growth stages. The results showed that a total of 14 cell types were,identified in the Mongolian cattle livers, with the proportion of immune-related cells (such as, T cells, Kupffer cells, NK cells, etc.) in the livers of juvenile cattle significantly higher than those in adult cattle. Through differential expressed genes (PEGS) livers between adult and juvenile Mongolian cattle, four differentially expressed genes involved in insulin signaling regulation were screened, that were *GLCCI1*, Oncostatin M (*OSM*), Mastermind-like transcriptional coactivator 3 (*MAML3*) expressed in neutrophil, and B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 (*BANK1*) expressed in other cells. The results of qPCR showed that *GLCCI1*, *MAML3* and *BANK1* were expressed significantly expressed lower and *OSM* higher in adult cattle liver, and Western blotting showed *GLCCI*1 and *BANK1* were significantly lower in adult cattle liver than that in juvenile cattle liver ($P < 0.001$, $P < 0.01$), and immunohistochemical analysis revealed that the positive signal of GLCCI1, MAML3 and BANK1 in hepatic lobules of adult Mongolian cattle was markedly weaker and OSM stronger. Protein-protein interaction network analysis showed that GLCCI1 was closely associated with tenascin C (TNC) of the PI3K signaling pathway. From the cell heterogeneity of Mongolian cattle liver, the insulin signal-related gene *GLCCI1* was identified. The results elucidated the potential cellular and molecular regulatory mechanisms of liver in Mongolian cattle and provided a molecular basis for insulin-related metabolic detection in Mongolian cattle, which supplied theoretical for improving the health farming of Mongolian cattle.

Keywords Mongolian cattle; liver; *GLCCI1*; insulin signal; single-nucleus RNA sequencing

0 引言

蒙古牛作为我国北方地区特有的地方黄牛品种,以其耐粗饲、抗寒、抗病等卓越的抗逆性而著称,是研究家畜环境适应性与代谢调控机制的理想模型。肝脏在维持蒙古牛代谢稳态和抗逆性中发挥着重要作用。近年来,尽管已在模式动物和部分家畜中揭示了肝脏的细胞组成与功能,但针对蒙古牛这一地方性种质资源的肝脏细胞图谱及分子调控网络仍十分有限。特别是在不同年龄阶段,肝脏细胞的组成如何变化、哪些关键信号分子参与调控胰岛素敏感性与脂滴沉积,均是揭示其抗逆性和代谢稳态需要解决的科学问题。

基于 snRNA-seq 技术,已成功构建了多种动物肝脏的细胞全景。如,构建了猪出生后肝脏发育的单细胞转录组图谱,动态解析了代谢与免疫系统的协同演化[1];通过整合单分子荧光原位杂交技术,首次系统性地揭示了小鼠肝脏细胞的空间异质性与区域化分布特征[2];构建了奶牛 10 种关键代谢组织类型的单细胞图谱[3],以及斑马鱼肝脏单细胞转录图谱[4]。此外,相关研究已延伸至代谢病领域,在四氯化碳诱导的小鼠早期肝纤维化模型中,通过单细胞技术精确界定了参与纤维化进程的肝星状细胞亚群[5];利用 snRNA-seq 对比了健康奶牛与 II 型酮病奶牛的肝脏差异,识别了与酮病发生密切相关的致病细胞群体[6]。这些发现不仅深化了对肝脏功能演变的认知,更为临床疾病的精准诊疗奠定了坚实的数据基础。然而,针对蒙古牛这一重要地方品种的肝脏单细胞图谱构建及相关代谢调控机制研究甚少,揭示蒙古牛肝脏抗逆适应性的细胞分子

机制受到限制。

肝脏代谢过程中涉及复杂的信号网络，其中 PI3K/*Akt*、整合素-FAK、Wnt/β-catenin 以及 TGF-β/Smad 等通路在维持其生理功能中发挥着核心作用[7-10]。作为胞内信号转导的关键枢纽，PI3K/*Akt* 通路不仅协同介导了细胞的生长、代谢重编程及抗凋亡进程[7]，还是胰岛素信号传导链条中不可或缺的组成部分[8]。此外，由整合素受体介导的 FAK 通路充当了细胞与胞外基质间的通讯桥梁，精准调控细胞骨架重构及迁移行为[9]；Wnt/β-catenin 信号轴在界定肝细胞区域化功能、维持组织稳态及驱动肝再生方面表现出极强的调控活性[10]。在上述信号网络中，PI3K 通路因其在胰岛素信号传导及代谢调控中的核心地位[11]，而受糖皮质激素显著调控的 *GLCCI1* 是该路径中的关键调节因子[12]，与肾素、podocin 在足细胞中存在共表达现象，并协同响应特定的激活信号，为 *GLCCI1* 与 PI3K 信号轴的内在联系提供了有力证据[13]。GLCCI1 作为一种新发现的足细胞足突蛋白，在体内外环境下均表现出经由 PI3K 通路介导的调控特征。此外，作为细胞外基质中一种关键的寡聚糖蛋白，TNC 的表达具有显著的时空特异性：在胚胎发育阶段广泛分布于多种组织，但在健康成年机体中表达水平极低甚至缺失[14]；而在组织损伤、恶性转化及炎症背景下，其表达量迅速上升，并随组织修复而动态降解[14-16]。从分子机制看，*TNC* 除通过 Integrin-FAK 轴调节细胞黏附与迁移外，还能跨通路激活 PI3K/*Akt*/mTOR 信号[17]。在代谢应激模型中，*TNC* 缺失能显著缓解高脂饮食诱导下肝脏缺血再灌注损伤所致的炎症浸润与纤维化进程[18]。这些研究为揭示蒙古牛肝细胞脂滴沉积及代谢适应性的分子机制提供了理论依据。

本研究旨在通过构建肝脏高分辨率细胞图谱和转录图谱，系统解析肝组织的细胞组成和代谢基因表达谱，挖掘调控肝脏代谢的关键候选基因，为深入理解蒙古牛肝脏代谢的细胞分子基础提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

（1）试验动物。试验蒙古牛饲养于内蒙古自治区阿拉善盟左旗的某牧场，3 头幼年牛年龄为 6 月龄，3 头成年牛年龄为 16 月龄。其中肝脏单细胞测序使用 2 头幼年牛和 2 头成年牛，自由采食和饮水（时间为 2022 年 2 月至 8 月，冬季饲喂较多当地牧草以及少量精料）。通过肌肉注射氯丙嗪（剂量 1.5 mg/kg）进行人道安乐死，随后静脉注射巴比妥类药物（剂量 90 mg/kg）。本研究已获得山西农业大学实验动物伦理委员会批准（批准号：SXAU-EAW-2022M. PQ. 003010001）

（2）样本采集。采集安乐死后的牛肝脏组织，一部分立即置于液氮保存，一部分置于 10%甲醛中过夜固定，并进行处理和保存。

1.2　试验方法

1.2.1　snRNA-seq 解析。（1）snRNA-seq 样本制备。取液氮保存的 100 mg 组织于冰上研磨，加入预冷匀浆缓冲液孵育 3～5 min 至细胞核释放。依次过 70 μm 和 40 μm 滤网，4 ℃离心后制成沉淀悬液。台盼蓝染色计数，活性大于 80%的细胞用于 10× Genomics 建库。（2）文库构建与测序。将单细胞悬液包裹为凝胶微滴（GEMs），逆转录合成 cDNA；经片段化、末端修复、加 A 尾、连接接头和 PCR 扩增后，构建测序文库。使用 NovaSeq 6000 测序。以 Read10x 函数将数据导入 Seurat R 包，筛选转录本数在 200～7000 且线粒体基因占比不小于 25%的细胞；利用 PercentageFeatureSet 去除重复细胞污染，并根据 UMAP 聚类手动剔除异常共表达的细胞簇。（3）snRNAseq 生物信息学分析。（a）本研究中生物信息学分析所使用的牛参考基因组及基因组注释文件的版本来源网站 NCBIGCF_002263795. 2_ARSUCD1. 3.（https://hgdownload-test. gi. ucsc. edu/hubs/GCF/002/263/795/GCF_002263795. 2/html/GCF_002263795. 2_ARS-UCD1. 3. description. html；https://www. ncbi. nlm. nih. gov/assembly/GCF_002263795. 2）。（b）使用 Cell Ranger 6. 1. 2（10× Genomics）处理原始 snRNA-seq 数据，以生成原始基因表达矩阵，并通过 Cell Ranger（v5. 0. 1）对数据进行合并（https://www. 10xgenomics. com/support/software/cell-ranger/downloads）[19]。（c）下游分析使用 R 包 Seurat（v3. 2. 0）进行（https://www. satijalab. org/seurat/）[20]。基于以下质控分析标准进行：将目标基因数少于 200、超过最大基因数 90%以及线粒体 reads 数处于前 15%的细胞过滤剔除。（d）使

用 Doublet Detection 识别双细胞(https://satijalab.org/seurat/articles/cell_cycle_vignette.html),并随后将其去除。使用 Seurat 程序的 CellCycle 评分工具分析细胞周期分布。基于 2 000 个高变基因对标准化后的基因表达数据集进行主成分分析,随后采用统一流形逼近与投影对由标记基因生成的聚类进行二维可视化。(e) 聚类结果通过 FindClusters(参数设置为 resolution=0.5)和 Seurat(v4.0.2)包中集成的 FindAllMarkers 函数(参数设置为 logfc.threshold > 0.25,min.pct > 0.1,p_val_adj ≤ 0.05)进行鉴定。最后,利用单细胞 RNA 测序数据细胞类型注释方法将各聚类归属至已知的细胞类型(https://github.com/bioinfo-ibms-pumc/)[21]。(f) 使用 Seurat 中的 Find Markers 函数识别差异表达基因(参数设置为 logfc.threshold > 0.25,min.pct > 0.1,p_val_adj < 0.05),并以|$\log_2$FC| > 1 且 p_val_adj < 0.05 作为筛选显著差异表达基因的阈值。

基因本体论(GO):(UniProt:Downloads | European Bioinformatics Institute)NCBI gene2GO:(Index of /gene/DATA),GO 官方网站:(http://geneontology.org/)和京都基因与基因组百科全书(KEGG,V93.0)通路分析使用 phyper(R 语言中的一个函数,参数设置为 FDR ≤ 0.05,并使用 q 值对 P 值进行校正以判断显著富集)进行。采用 CytoTRACE(https://cytotrace.stanford.edu/)根据细胞类型或 5000 个细胞的聚类计算分化程度,分化程度越低数值越高。红色表示较低分化程度,蓝色表示较高分化程度,UMAP 按细胞类型或聚类显示。蛋白质与蛋白质相互作用分析在 Cytoscape(v3.5.1)中进行[22]。

1.2.2 实时定量 PCR。取液氮保存的 50~100 mg 肝组织,加 Trizol 裂解,氯仿萃取,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤,提取总 RNA,逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量。设计实时定量 PCR(qPCR)引物(见表 1),反应程序(见表 2)。

1.2.3 组织总蛋白提取。取液氮保存的 50 mg 肝组织,加入 RIPA-PMSF 裂解液(100:1),冰上研磨。4 ℃、14 000×g 离心 15 min,取上清用于 Western blotting 分析。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物名称 Primer Name	引物序列(5′-3′) Primer Sequences(5′-3′)
β-actin-F	GACCTCTACGCCAACACG
β-actin-R	GCAGCTAACAGTCCGCCTA
MAML3-F	CGGAATCCATACCCAGTGCA
MAML3-R	TCCCATTCCCATCATGCCTG
GLCCI1-F	GACACCTAGTTGTTGGGCAGA
GLCCI1-R	CAGTTGATCAGCACTCCCCC
BANK1-F	ACGCCAACTACGAGATTGCA
BANK1-R	TTTGGATGGTGCACAATGGT
OSM-F	ACTGCTCAGTCTGGTCCTCA
OSM-R	AGAAGCTCGTGGTACTTGCC

表 2 qPCR 反应程序

Tab.2 The reaction program of qPCR

反应阶段	温度/℃	时间/s	循环数
预变性	95	30	1 Cycle
变性	95	15	
退火	55~60	15	40 Cycles
延伸	72	20	

1.2.4 Western blotting。蛋白样品与上样缓冲液按 1∶3 混匀,沸水浴变性 10 min。SDS-PAGE(15%分离胶,5%浓缩胶)分离,120 V 恒压电泳。200 mA 恒流转膜至 NC 膜(约 1 min/ku)。封闭后,一抗用 GLCCI1(兔多克隆抗体,博士德)和 BANK1(兔多克隆抗体,赛默飞)4 ℃孵育过夜,相应二抗 HRP-山羊抗兔 IgG(康为)室温孵育 2 h。ECL 显影成像。

1.2.5 免疫组织化学。取 10%甲醛中的 1 cm^3 肝脏组织,固定 24 h,经梯度乙醇脱水(70%→80%→90%→95%→无水乙醇),二甲苯透明,浸蜡 2.5 h 后包埋,制备 6 μm 连续切片。切片脱蜡后,柠檬酸钠抗原修复 10 min,3% H_2O_2 处理 30 min,5% BSA 封闭 1 h。分别滴加 MAML3(兔多克隆抗体,博士德),GLCCI1(兔多克隆抗体,博士德),BANK1(兔多克隆抗体,赛默飞),OSMR(兔多克隆抗体,博士德),4 ℃过夜,阴性对照加封闭液。次日复温后,HRP-山羊抗兔 IgG(康为)孵育 1 h,DAB 显色,苏木精复染,封片观察。

1.3 数据统计

所有数据图均采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘制,所有数据分析使用 SPSS 26 软件利用 T 检验和方差分析来比较各组之间的差异性。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001,所有结果均采用平均值±标准误(Mean±SEM)形式表示。

2　结果与分析

2.1　蒙古牛肝脏单细胞转录组图谱的构建与差异基因表达分析

通过对蒙古牛肝脏样本进行单细胞转录组测序及降维聚类分析（UMAP），构建了成年与幼年阶段的蒙古牛肝脏单细胞图谱（图 1），共鉴定出 14 个主要的细胞类型，包括肝细胞、内皮细胞、窦内皮细胞、肝星状细胞、胆管细胞，以及免疫细胞群体（T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、Kupffer 细胞、单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞、B 细胞及浆细胞）。

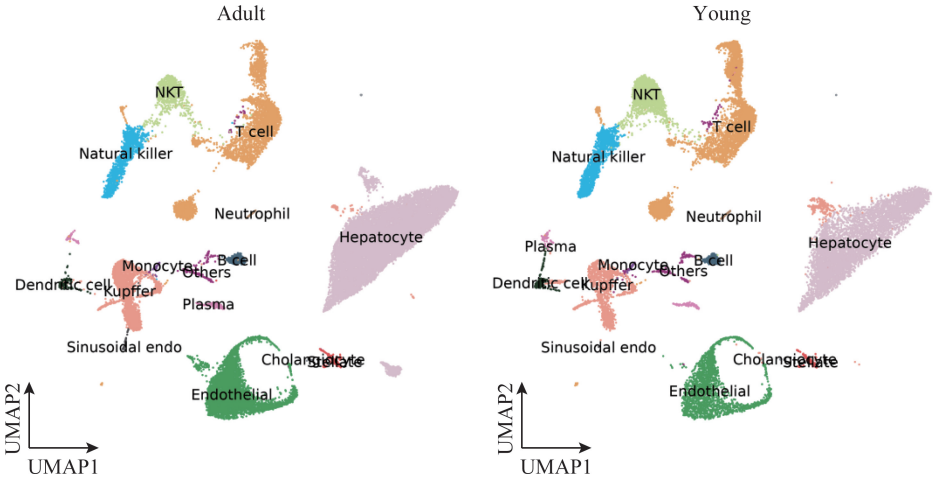


图 1　（a）成年牛肝组织细胞注释后的非线性降维和可视化图；（b）幼年牛肝组织细胞注释后的非线性降维和可视化图

Fig. 1　(a) Non-linear dimensionality reduction and visualization (UMAP) map of cell annotation of liver tissues from adult cattle; (b) Non-linear dimensionality reduction and visualization (UMAP) map of cell annotation of liver tissues from juvenile cattle

通过成年与幼年蒙古牛肝脏细胞组成比例差异分析发现，蒙古牛肝脏的细胞组成在成年与幼年期间发生了显著的重塑，如图 2（a）。幼年牛的肝脏中、T 细胞、Kupffer 细胞、NK 细胞等免疫相关细胞占比更高，而成年牛肝脏中这些细胞比例有所下降，肝细胞比例也略有降低。为了进一步探究不同细胞类群的分子特征，本试验对识别出的主要细胞簇进行了差异表达分析，如图 2（b），结果显示，各细胞类型均表现出独特的基因表达谱。其中，中性粒细胞与 Kupffer 细胞表现出最为活跃的转录波动，拥有大量显著上调（红色点）和下调（蓝色点）的基因。为了筛选关键调控因子，构建了以 GLCCI1 为主的 PPI 蛋白网络互作图，如图 2（c），结果显示，GLCCI1 和 TNC 这两个蛋白之间存在相互作用关系。

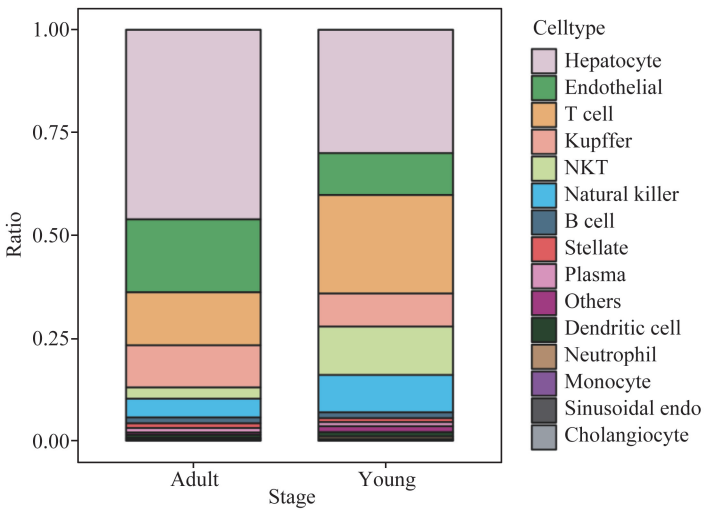


图 2　（a）肝组织中各细胞类型占比；（b）肝组织中各细胞类型中的差异表达基因；（c）以 GLCCI1 为中心的蛋白互作网络

Fig. 2　(a) The proportion of cell types in livers of Mongoligan cattle; (b) Differentially expressed gene analysis in cells of livers of Mongolian cattle; (c) Protein-protein interaction as GLCCI1 centered

2.2　差异表达基因信息

以 $|log_2FC|>1$、校正后 P 值（$padj$）<0.05 为筛选阈值，对成年牛和幼年牛肝组织进行差异表达基因分析，结果筛选得到 4 个差异表达基因，与幼年牛肝组织基因表达相比，成年牛肝组织中性粒细胞中表达的 *OSM* 基因显著上调，中性粒细胞中表达的 *GLCCI1* 和 *MAML3* 以及其他细胞类型（未知的）中表达的 *BANK1* 基因显著下调，且差异显著或极显著（$P<0.05$ 或 $P<0.001$）（表 3）。

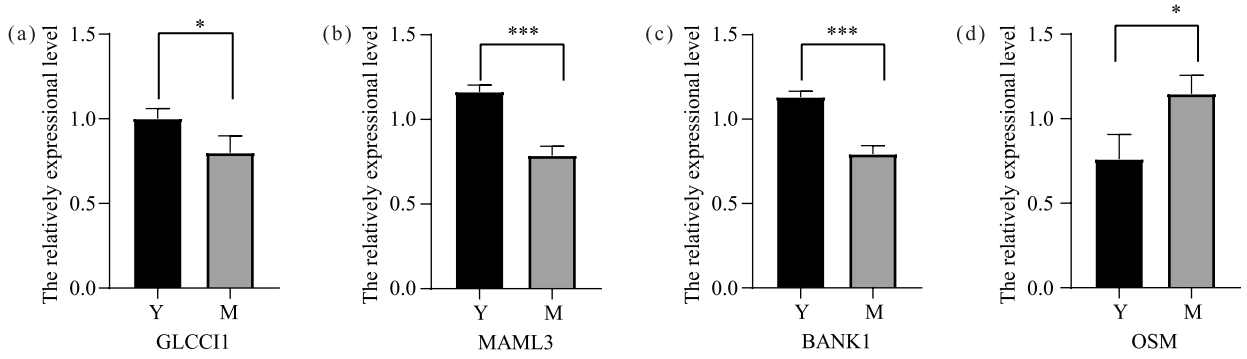
表 3 成年牛和幼年牛肝组织中的差异表达基因

Tab. 3 Differentially expressed genes in livers of adult and juvenile Mongolian cattle

基因名称	avg_log_2FC	Cell type	p_val_adj
*GLCCI*1	−1.662	Neutrophil	0.004 65
*MAML*3	−1.586	Neutrophil	0.040 68
*BANK*1	−1.533	Others	0.000 38
OSM	1.617	Neutrophil	0.000 14

2.3 qPCR 检测差异基因在蒙古牛肝脏中的表达

qPCR 技术检测幼年牛与成年牛肝脏中 *GLCCI*1、*MAML*3、*BANK*1、*OSM* 基因的相对表达水平。结果显示,上述 4 种基因 mRNA 均在蒙古牛肝脏中表达;其中 *GLCCI*1、*MAML*3、*BANK*1 在幼年牛肝脏中的表达量显著高于成年牛($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),而 *OSM* 表达量则显著低于成年牛($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),与单细胞测序结果基本一致(图 3)。



注:Y 代表幼年牛肝组织;M 代表成年牛肝组织(* $P < 0.05$;*** $P < 0.001$, $n = 3$)。

图 3 (a) qPCR *GLCCI*1 在蒙古牛肝脏中的表达;(b) qPCR *MAML*3 在蒙古牛肝脏中的表达;(c) qPCR *BANK*1 在蒙古牛肝脏中的表达;(d) qPCR *OSM* 在蒙古牛肝脏中的表达

Fig. 3 (a) Expression of *GLCCI*1 gene detected by qPCR in the livers of Mongolian cattle; (b) Expression of *MAML*3 gene detected by qPCR in the livers of Mongolian cattle; (c) Expression of *BANK*1 gene detected by qPCR in the livers of Mongolian cattle; (d) Expression of *OSM* gene detected by qPCR in the livers of Mongolian cattle

2.4 Western blotting 检测差异基因编码蛋白在蒙古牛肝脏中的表达

为验证 GLCCI1、BANK1 在蒙古牛肝脏中的表达情况,采用 Western blotting 技术检测肝脏总蛋白中 GLCCI1、BANK1 的相对表达水平。结果表明,GLCCI1 与 BANK1 蛋白在蒙古牛肝脏中均有表达,且幼年牛肝脏中的表达量极显著高于成年牛($P < 0.001$,$P < 0.01$),与单细胞测序结果相符(图 4)。

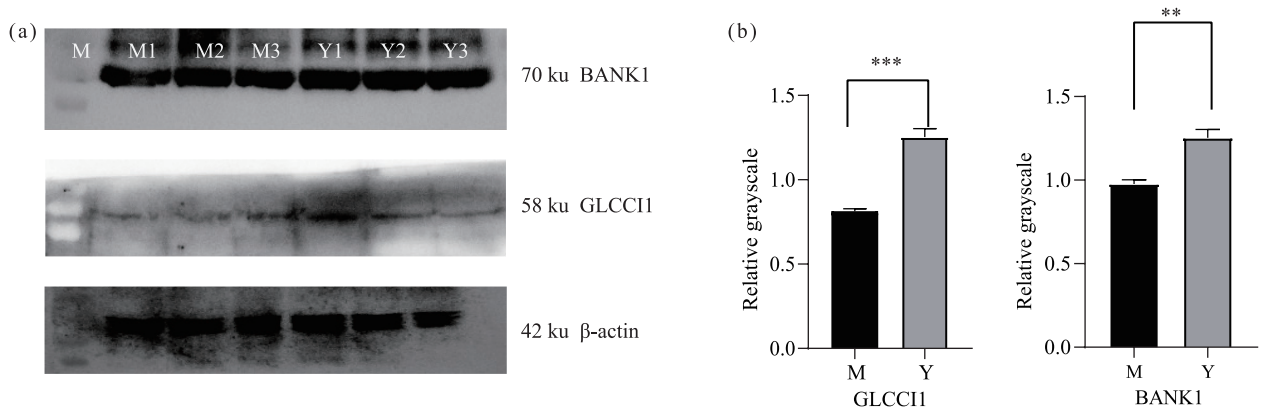
2.5 免疫组织化学法检测差异基因编码蛋白在蒙古牛肝脏中的表达

免疫组织化学法结果显示,GLCCI1、MAML3、BANK1 蛋白在幼年蒙古牛(YM)肝脏中肝小叶的阳性表达信号明显强于成年组(MM)。OSM 蛋白在幼年蒙古牛(YM)肝脏中肝小叶的阳性表达信号明显弱于成年组(MM)(图 5)。

3 讨论

本研究构建了蒙古牛的肝脏细胞异质性图谱,该图谱不仅丰富了反刍动物肝脏转录组数据库,也为后续研究蒙古牛肝脏组织及病理状态下的细胞类型及基因表达分析提供了重要参考。幼年牛的肝脏中、T 细胞、Kupffer 细胞、NK 细胞等免疫相关细胞占比更高,表明这些细胞为幼年牛抗病性和内环境稳定提供了细胞基础。而成年牛肝脏中这些细胞比例有所下降,肝细胞比例也略有降低,这些细胞占比差异反映了与年龄相关的肝脏免疫微环境重塑,幼年状态下免疫细胞更活跃,血管内皮细胞更丰富,而成年后免疫与血管细胞比例下降,可能与肝脏功能稳态、代谢变化或衰老进程相关。肉牛肝脏细胞图谱呈现出显著的物种特异性与环境适应性特征[19],肝实质细胞亚群功能分化更为清晰,靠近肝小叶中央静脉与门静脉区域的细胞亚群,分别

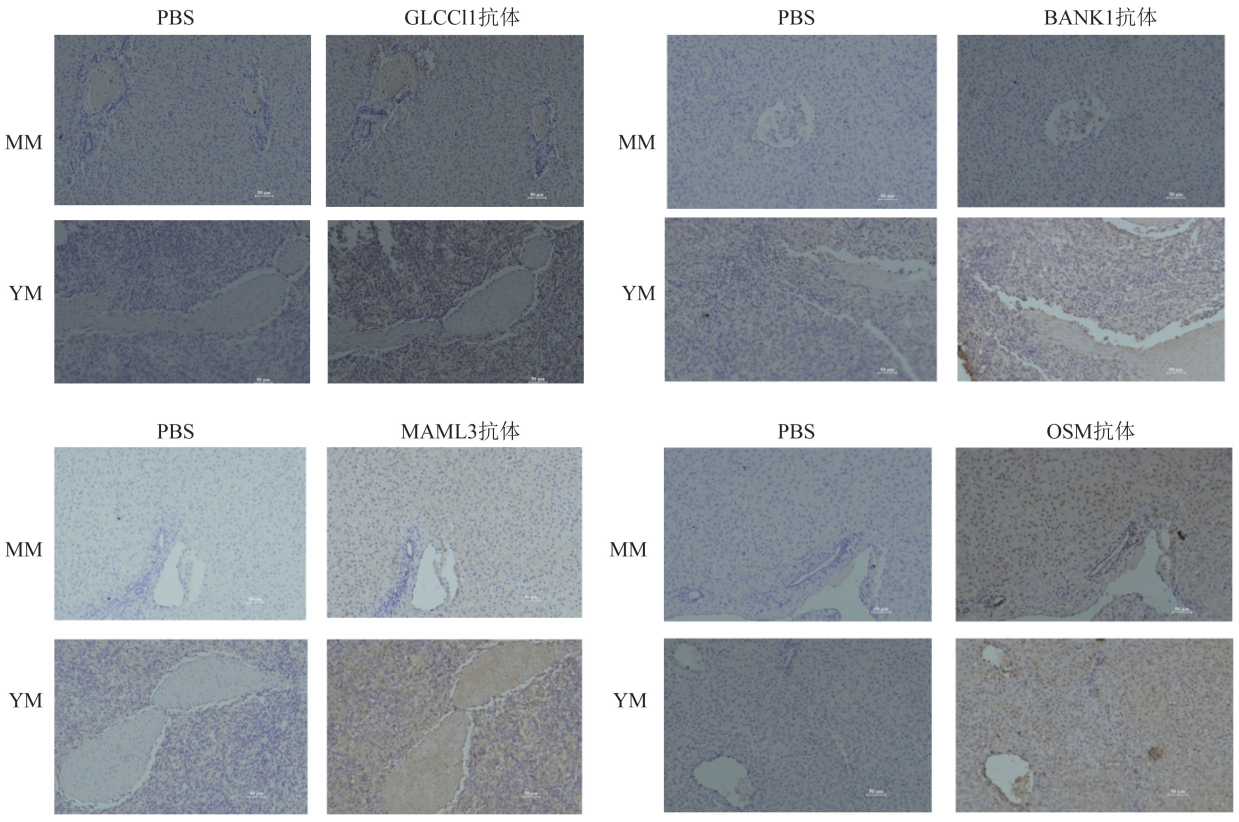
富集脂肪酸代谢、糖异生、胆汁酸合成及毒素降解相关通路，与蒙古牛耐粗饲、高效降解粗纤维与抗毒素的生理特性相匹配[23]，Kupffer 细胞与肝星状细胞亚群高表达免疫调控、炎症抑制及抗应激相关基因，印证了蒙古牛极强的环境抗逆性。



注：M 代表蛋白质 marker；M1-M3：成年牛肝组织；Y1-Y3：幼年牛肝组织（$*P<0.05$；$**P<0.01$；$***P<0.001$；$n=3$）。

图 4　(a) Western blotting 检测 BANK1 和 GLCCI1 在蒙古牛肝脏中的表达；(b) Western blotting 检测 BANK1 和 GLCCI1 在蒙古牛肝脏中的表达的灰度值分析

Fig. 4　(a) Expression of BANK1 and GLCCI1 by Western blottingin livers of Mongolian cattle; (b) Densitometric analysis of the expression of BANK1 and GLCCI1 by Western blotting in Mongolian cattle liver



注：YM 代表公幼年牛肝组织；MM 代表成年公牛肝组织（标尺：2 μm；放大倍数：20 ×）。

图 5　(a) 免疫组织化学法检测 GLCCI1 在牛肝脏中的表达；(b) 免疫组织化学法检测 BANK1 在牛肝脏中的表达；(c) 免疫组织化学法检测 MAML3 在牛肝脏中的表达；(d) 免疫组织化学法检测 OSM 在牛肝脏中的表达

Fig. 5　(a) Expression of GLCCI1 in liver tissues of Mongolian cattle by immunohistochemistry; (b) Expression of BANK1 in liver tissues of Mongolian cattle by immunohistochemistry; (c) Expression of MAML3 in liver tissues of Mongolian cattle by immunohistochemistry; (d) Expression of OSM in liver tissues of Mongolian cattle by immunohistochemistry

本研究通过差异基因表达分析发现,与幼年牛肝组织基因表达相比,成年牛肝组织中 *OSM* 基因显著上调,*GLCCI*1、*MAML*3 和 *BANK*1 基因显著下调,且除了表达 *BANK*1 的细胞类型未知外,其他 3 个差异表达基因均在中性粒细胞中表达。*GLCCI*1 作为糖皮质激素信号的敏感标记物,其在中性粒细胞中的高丰度表达预示着机体对皮质醇信号的高灵敏性[24],在应对高原严寒或营养匮乏等应激时,该基因发挥"生物制动"作用,从而规避潜在的肝脏免疫损伤。*GLCCI*1 表达随着年龄的增长而降低,可能反映了肝脏功能完善过程中调控的迁移[25-26]。*GLCCI*1 此前被报道与糖皮质激素诱导的细胞凋亡相关[26],但在肝脏发育与成熟过程中的作用尚不明确。其可能在幼年肝脏中发挥调控作用,随着年龄的增长,其表达下调可能是肝脏功能完善的必要条件之一。通过蛋白互作分析,GLCCI1 与 TNC 具有互作关系,且 TNC 为 PI3K 信号通路中的关键调控因子[17],因此,推测 *GLCCI*1 可能通过 PI3K 信号通路调控胰岛素,*GLCCI*1 高表达可能与抑制脂滴沉积有关,但需进一步验证。*MAML*3 作为 Notch 通路的共激活因子,其在 Notch 信号通路中介导细胞命运与激活功能[27],Notch 通路通过 *MAML*3 调控中性粒细胞的成熟、浸润以及与内皮细胞的相互作用[28]。*MAML*3 的表达可能暗示这些细胞正在接受肝脏微环境的信号指令,维持其在肝脏中的特定驻留状态或执行非经典的免疫功能。*OSM* 是 IL-6 家族的重要细胞因子,中性粒细胞是 *OSM* 的重要来源[29]。在肝脏中,*OSM* 的表达可以诱导肝脏急性期反应,促进肝细胞再生,并调节脂质代谢[30],与胰岛素信号通路存在密切的调控关系。*OSM* 可通过诱导细胞因子信号转导抑制因子 3 的表达,进而抑制胰岛素受体底物的磷酸化,干扰下游 PI3K/Akt 信号通路的激活,这可能是 *OSM* 参与胰岛素抵抗形成的关键分子机制之一。此外,*OSM* 在炎症后期具有促进组织重建的作用,调控肝细胞代谢、促进组织修复[31]。对于蒙古牛而言,中性粒细胞表达 *OSM* 可能是在代谢应激下,通过免疫细胞向肝细胞发送信号,协调能量分配和组织修复。

蒙古牛作为我国特有的优良地方品种,具有较强的耐粗饲和抗逆性能,但在高生产性能选育和集约化饲养背景下,围产期能量负平衡依然是诱发脂肪肝等代谢性疾病的主要风险因素[32-33]。目前针对牛脂肪肝的早期诊断和干预手段仍然有限,本研究筛选出的 *GLCCI*1 可为蒙古牛代谢健康提供了潜在的分子标志物。

4 结论

本研究成功解析了蒙古牛肝脏的细胞组成、年龄相关的细胞重塑特征及代谢相关的关键差异表达基因的表达特征,蛋白互作网络预测提示 *GLCCI*1 可能与 *TNC* 存在互作,并可能通过 PI3K 信号通路参与肝脏代谢调控,但该推测尚需进一步功能实验验证。

参 考 文 献

[1] Rao L, Cai L P, Huang L S. Single-cell dynamics of liver development in postnatal pigs[J]. Science Bulletin, 2023, 68(21): 2583-2597.

[2] Halpern K B, Shenhav R, Matcovitch-Natan O, et al. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver[J]. Nature, 2017, 542(7641): 352-356.

[3] Lee J W, Stone m l, Porrett P M, et al. Hepatocytes direct the formation of a pro-metastatic niche in the liver[J]. Nature, 2019, 567(7747): 249-252.

[4] 黄英毅. 基于单细胞测序的斑马鱼肝脏细胞异质性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.

[5] Krenkel O, Hundertmark J, Ritz T P, et al. Single cell RNA sequencing identifies subsets of hepatic stellate cells and myofibroblasts in liver fibrosis[J]. Cells, 2019, 8(5): 503.

[6] 冯雪. Ⅱ型酮病奶牛肝脏细胞图谱构建及 HADHA 调控肝脂质稳态的机制初探[D]. 银川: 宁夏大学, 2024.

[7] Zhang Y Y, Jiang Y Y, Zhang D M, et al. Role of GLCCI1 in inhibiting PI3K-induced NLRP3 inflammasome activation in asthma[J]. Chinese Medical Journal Pulmonary and Critical Care Medicine, 2024, 2(4): 279-288.

[8] Yousif M H M. Phosphoinositide 3-kinase contributes to diabetes-induced abnormal vascular reactivity in rat perfused mesenteric bed[J]. Cell Biochemistry and Function, 2008, 26(4): 451-458.

[9] 农云宏, 白浪. tenascin-C 促进肿瘤转移的分子机制研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2015, 32(1): 240-244.

[10] Sun Y, Xiao Z L, Yang S G, et al. Advances and insights for DKK3 in non-cancerous diseases: a systematic review[J]. PeerJ, 2025, 13: e18935

[11] 汪颖珏. 关于仙鹤草治疗糖尿病的现代研究[C]. //中华中医药学会. 中华中医药学会糖尿病分会 2019 首届全国中青年中医糖尿病论坛论文集, 2019.

[12] Nishibori Y, Katayama K, Parikka M, et al. Glcci1 deficiency leads to proteinuria[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2011, 22(11): 2037-2046.

[13] Kim S H, Jang Y W, Hwang P, et al. The Reno-protective effect of a phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin on streptozotocin-induced proteinuric renal disease rats[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2012, 44(1): 45-51.

[14] Yilmaz A, Loustau T, Salomé n, et al. Advances on the roles of tenascin-C in cancer[J]. Journal of Cell Science, 2022, 135(18): jcs260244.

[15] Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C in heart diseases—the role of inflammation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5828.

[16] Song J, Schwenzer A, Wong A, et al. Shared recognition of citrullinated tenascin-C peptides by T and B cells in rheumatoid arthritis[J]. JCI Insight, 2021.

[17] Wang A Q, Yan S T, Liu J T, et al. Endoplasmic reticulum stress-related super enhancer promotes epithelial-mesenchymal transformation in hepatocellular carcinoma through CREB5 mediated activation of TNC[J]. Cell Death & Disease, 2025, 16: 73.

[18] Kato H, Duarte S, Miller M G, et al. Overproduction of tenascin-C driven by lipid accumulation in the liver aggravates hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice[J]. Liver Transplantation, 2019, 25(2): 288-301.

[19] Butler A, Hoffman P, Smibert P, et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species [J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(5): 411-420.

[20] Yuhan H,Stephanie H,Erica A, et al. Integrated analysis of multimodal single-celldata. [J]. Cell, 2021, 184(13) : 3573-3587. e29.

[21] Cao Y H, Wang X Y, Peng G X. SCSA: a cell type annotation tool for single-cell RNA-seq data[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 490.

[22] Gulati G S, Sikandar S S, Wesche D J, et al. Single-cell transcriptional diversity is a hallmark of developmental potential[J]. Science, 367(6476):405-411.

[23] 齐昱. 基于转录组学的蒙古牛抗寒机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.

[24] Tantisira K G, Lasky-Su J, Harada M, et al. Genomewide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma [J]. New England Journal of Medicine, 2011,365(13): 1173-1183.

[25] Wang M, Gao P, Wu X, et al. Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma[J]. Respiratory Research, 2016, 17(1): 153.

[26] Kiuchi Z, Nishibori Y, Kutsuna S, et al. GLCCI1 is a novel protector against glucocorticoid-induced apoptosis in T cells[J]. FASEB Journal, 2019, 33(6): 7387-7402.

[27] Kanda T, Goto T, Hirotsu Y, et al. Molecular mechanisms: connections between nonalcoholic fatty liver disease, steatohepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4) :1525

[28] Johnston K J A, Adams M J, Nicholl B I, et al. Genome-wide association study of multisite chronic pain in UK Biobank[J]. PLOS Genetics, 2019,15(6): e1008164.

[29] Grenier A, Dehoux M, Boutten A, et al. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils[J]. Blood, 1999, 93(4):1413-1421.

[30] Tamura S, Morikawa Y, Senba E. Localization of oncostatin M receptor β in adult and developing CNS[J]. Neuroscience, 2003, 119(4): 991-997.

[31] Beigel F, Friedrich M, Probst C, et al. Oncostatin M mediates STAT3-dependent intestinal epithelial restitution via increased cell proliferation, decreased apoptosis and upregulation of SERPIN family members[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93498.

[32] 刘阳, 张新颖, 耿万友, 等. 围产期蒙古牛外周中性粒细胞凋亡相关基因的表达分析[J]. 河南农业科学, 2018, 47(6):127-133.

[33] 张新颖, 杨晓燕, 杜立银. 围生期蒙古牛外周血中性粒细胞 CD11b 表达研究[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2018(8):80-83.

(责任编辑:刘庆松)