

牛至精油对嗜热四膜虫基因表达的影响

李文秋¹,张晶²,罗帅²,胡澈¹,陈璞¹,缪炜²

(1.哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院,哈尔滨 150025;2.中国科学院 水生生物多样性与保护重点实验室;
水生生物研究所,武汉 430072)

摘要:牛至精油(Oregano Essential Oil,OEO)具有抗菌、杀菌、抑制寄生虫生长等功效.为了解牛至精油影响细胞生长的分子调控过程,对牛至精油作用下 0 h 和 24 h 的嗜热四膜虫的基因表达情况进行分析.高通量转录组测序结果表明,对照组即未加入牛至精油 24 h 与 0 h 的样本数据,比较分析后鉴定到了 6 297 个差异表达基因(包括下调 4 232 个、上调 2 065 个),而实验组即加入牛至精油 24 h 与 0 h 的样本数据,比较分析后鉴定到 7 596 个差异表达基因(包括下调 6 254 个、上调 1 342 个).通过与对照组差异表达基因的比较发现,实验组特异上调和下调差异表达基因分别有 257 个和 2 329 个.GO 功能富集发现,特异上调差异表达基因无功能富集,特异下调差异表达基因功能主要富集在 RNA 加工、蛋白质分解代谢、细胞定位和信号转导等过程.KEGG 通路分析发现,特异下调差异表达基因主要涉及细胞自噬及细胞周期等通路.而这些过程或通路上基因表达水平的下调可能会抑制细胞的生长.对通路中 7 个下调的差异表达基因和 3 个无明显差异表达变化的基因进行实时荧光定量 PCR 检测,实验结果和转录组测序数据结果的相关性高.根据相关基因和通路的分析,绘制了牛至精油作用下影响嗜热四膜虫细胞生长的可能模型,为探讨分子调控机理提供线索.

关键词:牛至精油;嗜热四膜虫;转录组;差异表达基因

中图分类号:Q75

文献标志码:A

牛至(*Origanum vulgare* L),又名小叶薄荷,为多年生草本植物,广泛分布在中国大部分地区^[1].牛至精油(Oregano Essential Oil,OEO)是从牛至草中提取的具有特殊芳香气味的挥发性油,颜色呈淡黄色且透明,是一种混合物,其化学成分大部分为酚类化合物及其前体萜类物质,主要是百里香酚、香荆芥酚、 γ -萜品烯和 β -聚伞花素等^[2-3].牛至精油的作用广泛,包括抗菌作用,可破坏细菌细胞壁和细胞膜的结构,或与细胞膜中的磷脂反应,破坏蛋白质合成,使细菌生长受到抑制,或破坏细菌的 DNA 复制,影响细菌繁殖;抗氧化作用,通过其主要成分清除烷氧自由基;抑制寄生虫作用,包括人或动物的肠道寄生虫,例如疟原虫、艾美尔球虫、线虫和小隐孢子虫等^[4-10].牛至精油是一种新型的天然植物抗生素,具有来源广泛、抗菌效果显著、不易产生耐药性等特点^[11].相对于传统的抗生素,其经济市场需求更加强烈,在水产养殖方面尤为重要,发展前景十分广阔.然而,目前研究主要集中在牛至精油对水产鱼类的诱食作用、提高水产动物的生产性能、增添肤色肌肉的优质营养性、提高水产品品质、抗菌抗虫等方向^[11].鲜有研究牛至精油影响细胞生长的分子调控和代谢通路等过程.相对于遗传背景复杂的多细胞生物,单细胞真核原生动物是一类很好的实验材料,从形态上看,原生动物是单一的细胞,从生理上看,它是很复杂的,具有维持生命和持续后代所必需的一切功能^[12],用其来研究牛至精油对细胞生长分子调控的影响,有利于理解和认识牛至精油影响细胞生长的分子调控机理.

原生动物模式生物嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)具有典型的纤毛虫特征,多倍体的大核和二倍体的小核,大核是营养核,基因表达活跃,小核是生殖核,基因在营养生长期不表达^[12].嗜热四膜虫能在

收稿日期:2022-01-12;修回日期:2022-02-09.

基金项目:国家自然科学基金(21976208);武汉市应用基础前沿项目(2019020701011483).

作者简介:李文秋(1997-),女,黑龙江双鸭山人,哈尔滨师范大学硕士研究生,研究方向为原生动物学,E-mail:13339336600@163.com.

通信作者:缪炜,E-mail:miaowei@ihb.ac.cn.张晶,E-mail:zhangjing@ihb.ac.cn.

实验室进行纯培养,繁殖速度快(即 2.5~3 h 一代),基因敲除、基因插入等遗传操作手段已广泛运用^[13]。嗜热四膜虫的遗传背景清晰,目前已鉴定到 26 996 个基因^[14],建立了四膜虫的功能基因组学数据库^[15]、比较基因组学数据库^[16]、转录组学数据库^[17]和蛋白磷酸化组学数据库^[18]等,为嗜热四膜虫基因分子功能的研究提供重要支撑。

本研究通过牛至精油对嗜热四膜虫基因表达的影响,对转录组数据进行分析,探究了牛至精油对嗜热四膜虫生长的影响,为了解牛至精油抑制细胞生长的分子调控机理提供线索。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

嗜热四膜虫在无菌条件下培养,培养基由质量分数分别为 2% 的示蛋白胨,0.1% 酵母粉,0.2% 葡萄糖,0.003% 柠檬酸铁高温高压灭菌配制而成。培养过程中置于 30 °C,135 r/min 摇床内^[19]。

1.2 牛至精油 EC50 测定

牛至精油由广东海洋大学鲁义善教授惠赠。该牛至精油的质量分数是 100%,质量浓度为 1 g/mL。牛至精油不溶于水,利用 DMSO 水溶液配置了牛至精油的母液,质量浓度为 0.1 g/mL。

将嗜热四膜虫大量培养至对数期前期后(约 1.2×10^5 cells/mL),取 4.5 mL 细胞分装至黑盖瓶,然后分别加入不同质量浓度(1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} g/mL)的牛至精油 500 μ L,作用 0,12,24,36 h 后测取细胞密度,来绘制细胞密度与时间的变化曲线。同时,测量 0 h 和 24 h 不同质量浓度 DMSO 对嗜热四膜虫的细胞密度变化。

在不同质量浓度的牛至精油(包括 0 , 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} g/mL)的作用下,测量 0 h 和 24 h 的嗜热四膜虫细胞密度,计算牛至精油 24 h 作用下嗜热四膜虫的相对生长速率。通过 GraphPad Prism 8.0.2 软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)计算半数抑制浓度(median effective concentration, EC50),软件参数均默认。

1.3 总 RNA 提取、文库构建及测序

牛至精油作用 0 h 和 24 h 时,对照组(牛至精油的质量浓度为 0,此时 DMSO 的质量浓度为 0.18%,分别标记为 C0 和 C24)和实验组(牛至精油的质量浓度为 EC50 值,此时 DMSO 的质量浓度也为 0.18%,分别标记为 P0 和 P24)分别收集 4 mL 嗜热四膜虫经 1 500 r/min 离心 3 min 富集细胞,并加入 RNA 保护细胞试剂(RNA protect cell reagent, QIAGEN, USA)冻存在 -80 °C。根据 RNeasy Plus Mini kit(QIAGEN, USA)说明书进行样品提取,总 RNA 溶于 RNA-free H₂O 水中。转录组样品委托了北京诺禾致源科技股份有限公司借助 Illumina HiSeq 4000 的平台完成文库构建及测序。

1.4 转录组数据处理和差异表达基因分析

转录组测序(transcriptome sequencing, RNA-seq)的原始数据,首先进行质量检测,主要是利用 FASTX-Toolkit 软件对低质量的 reads 进行过滤,去除,并利用 Trim-Galore 软件对测序的原始 reads 进行去接头以及去除错误率大于 0.001 的碱基。然后,过滤后的 reads 序列使用 Tophat2(version 2.0.9)软件将每个样品的 reads 分别比对至嗜热四膜虫的大核参考基因组,软件参数均为默认值。并根据比对结果用 featureCounts(v1.6.0)软件统计比对到每一个基因的 reads 数目。比对完成后,利用 R(version 4.0.2)中的 DESeq2 包对基因表达值进行标准化,并计算分析得到相对表达值(fragments per kilobase of exon per million fragments mapped, FPKM)。

在差异表达基因分析过程中,为降低由于低覆盖的 reads 造成 FPKM 值极低所带来的影响,筛选差异表达基因的时候需满足以下两条标准条件之一:两样品间的 FPKM 值比较后的差异倍数变化(Fold Change, FC)大于等于 2 且其中表达值 FPKM 大于等于 5;或当其中一个样本基因表达的 FPKM 值为 0 时,而另一样本中该基因表达的 FPKM 值大于等于 5。筛选得到的差异表达基因将用于分析。

1.5 GO 富集分析与代谢通路分析

差异表达基因的 gene ontology(GO)富集分析由 Cytoscape 中的插件 Bingo(版本号:3.0.2)完成的,使

用的是错误发现率(FDR, False Discovery Rate)多重矫正,显著性阈值设置为 0.001,软件参数均为默认值.富集分析中所参考的嗜热四膜虫全基因组 GO 注释是四膜虫基因组数据库(*Tetrahymena* genome database wiki,简称 TGD, <http://ciliate.org/index.php/home/welcome/>)中公布的蛋白质组序列.KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/mapper/color.html>)可在线分析差异表达基因的代谢通路.

1.6 实时荧光定量 PCR 反应

利用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real Time Polymerase Chain reaction, RT-qPCR)反应分析差异基因的表达倍数.基因扩增的引物序列由 Primer Premier 5 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign>)设计,具体信息如附表 I.利用提取的 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录试剂盒是利用全式金生物公司的.PCR 反应是使用诺唯赞生物科技有限公司的 $2 \times$ Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 预混液,反应条件参考说明书.每个反应设置 3 组重复.以核糖体小亚基蛋白基因(RPS18)为内参基因,所有得到的数据均一化后进行比较分析.

2 结果与分析

2.1 牛至精油对嗜热四膜虫细胞密度的影响

将嗜热四膜虫培养至对数期前期,然后将其放置于一系列不同质量浓度的牛至精油中,在不同时间点(0、12、24、36 h)通过 Beckman 计数仪测取细胞密度,发现不同时间点嗜热四膜虫在不同质量浓度牛至精油比没有牛至精油的细胞密度明显减少,而且在 12 h 到 24 h 的过程细胞密度受到较大的影响(如图 1(a)).实验结果发现牛至精油质量浓度为 1×10^{-3} g/mL 时,嗜热四膜虫细胞基本死亡,此时 DMSO 的质量分数为 0.9%.为了验证 DMSO 对嗜热四膜虫细胞生长的影响,测量了不同质量浓度的 DMSO 作用下嗜热四膜虫在 0 h 和 24 h 的细胞密度变化,结果显示 DMSO 在 1% 的质量分数范围内嗜热四膜虫的细胞密度变化不显著(如图 1(b)).

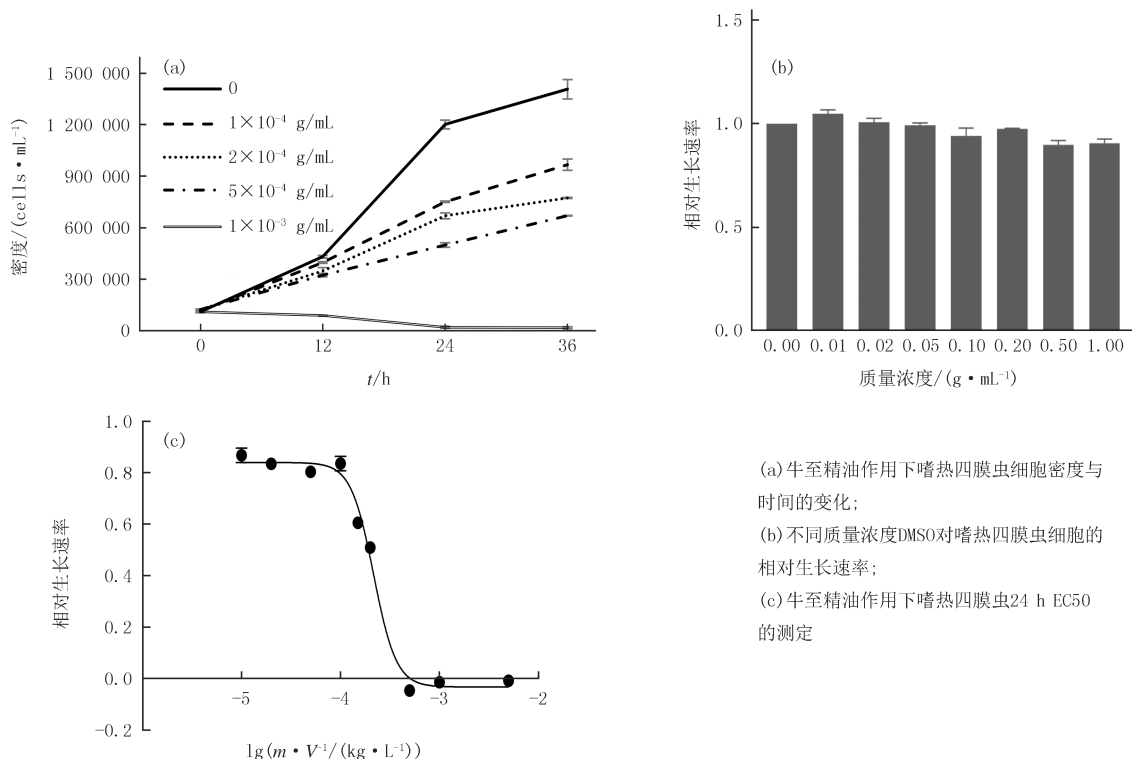


图1 牛至精油对嗜热四膜虫细胞密度的影响

Fig.1 The effects of OEO on cells density of *T. thermophila*

将嗜热四膜虫放置于牛至精油中作用 24 h 后,其半数效应浓度 EC_{50} 值为 2×10^{-4} g/mL(如图 1(c)).嗜热四膜虫的相对生长率随着牛至精油质量浓度的升高而降低,说明牛至精油对嗜热四膜虫细胞的生长有抑制作用.为了探究牛至精油抑制嗜热四膜虫细胞生长的分子调控过程,分别收集了牛至精油作用下(包括 0 和 EC_{50} 值的质量浓度)的 0 h 和 24 h(对照组即为牛至精油作用质量浓度为 0,分别记为 C0 和 C24,实验组即为牛至精油作用质量浓度为 EC_{50} 值,分别记为 P0 和 P24)的嗜热四膜虫细胞,进行了 RNA 的提取及转录组测序.

2.2 样本相关性分析以及差异表达与功能富集分析

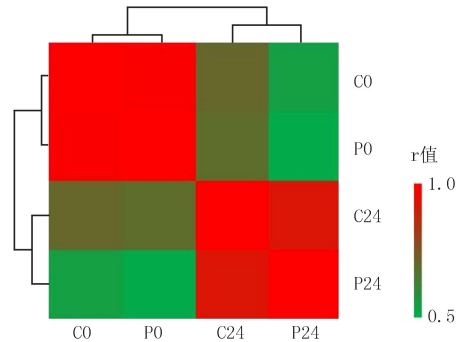
为了研究样品间的相关性,通过皮尔逊相关系数 r 检测结果发现,没有牛至精油作用下的对照组 C0 和牛至精油作用下的实验组 P0 聚为一类,C24 和 P24 聚为一类.结果表明,同一时间下牛至精油作用下的实验组与没有牛至精油作用下的对照组相关性接近,随着时间的延长,实验组与对照组的相关性变差,而且差距越来越大(图 2),牛至精油对嗜热四膜虫生长的影响较大.

通过对照组 24 h 与 0 h 的转录组数据比较分析发现,差异表达基因共计 6 297 个.其中下调差异表达基因 4 232 个(图 3(a)),这些基因功能富集之后主要涉及这些过程:包括基因表达相关过程(例如 DNA 复制和修复,RNA 修饰,蛋白质合成,蛋白质翻译等)、细胞周期过程(例如调节有丝分裂过程,染色凝聚和分离等)、氨基酸代谢、生物大分子代谢等(图 3(b)).其中上调差异表达基因 2 065 个(图 3(a)),这些基因功能富集之后主要涉及这些过程:代谢过程、碳水化合物代谢、氧化还原等过程(图 3(b)).嗜热四膜虫细胞密度在 0 h 时,细胞处于对数期前期,即营养状态非常旺盛,细胞状态非常良好的一个阶段,24 h 后细胞密度已接近于平台期,这一过程中培养基中的营养物质不断被消耗.因此,这个过程是营养相对丰富的状态过渡到不丰富的状态,细胞内基本生命过程(包括 DNA 复制和修复、细胞周期等)均处于下调的,而细胞定位及细胞组建过程加强,并可以通过细胞代谢过程为细胞提供能量.

通过实验组 24 h 与 0 h 的转录组数据比较分析发现,差异表达基因共计 7 596 个,其中下调差异表达基因 6 254 个(图 3(a)),这些基因功能富集之后主要涉及这些过程:包括 DNA 复制和修复、基因转录、蛋白定位、蛋白折叠、蛋白转运、有丝分裂、染色体分离、核分裂、生物大分子定位与组装等(图 3(b)).其中上调差异表达基因 1 342 个(图 3(a)),这些基因功能富集之后主要涉及这些过程:代谢过程、碳水化合物代谢、氧化还原等过程(图 3(b)).实验组基因功能富集的差异表明,细胞基本生命过程(包括 DNA 复制和修复等)也是处于下调的.此外,与有丝分裂 M 期调控过程、转录调控过程、细胞和蛋白运输与定位、生物合成、信号转导等过程也都处于下调.结果说明,在牛至精油作用下,培养基内的成分发生改变,营养处于更为匮乏的状态,更多的生命过程受阻,细胞基本生命过程难以维持.因此,在牛至精油作用 24 h 后,嗜热四膜虫细胞的密度相对于没有牛至精油作用下的密度是减少的.

2.3 牛至精油作用下嗜热四膜虫上下调基因过程分析

在对照组和实验组差异表达基因的比较中,发现实验组特异上调和下调差异表达基因分别有 257 个和 2 329 个(图 4(a)).GO 富集分析仅发现特异下调差异表达基因的富集在 RNA 合成加工、蛋白质定位与运输、蛋白质代谢、细胞定位和细胞内信号转导等过程中(图 4(b)),特异上调的差异表达基因没有功能富集.KEGG 通路分析发现,特异下调差异表达基因主要涉及的代谢通路包括细胞自噬、溶酶体、PI3K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路、细胞周期等(图 4(c)),而特异上调的差异表达基因主要涉及的代谢通路包括多种疾病,如神经退行性变的途径、朊病毒疾病等.这些结果表明,牛至精油作用下,嗜热四膜虫基本生长过程受到影响,主要是由于细胞周期、细胞自噬等相关通路的基因表达水平下调,而与疾病通路相关的基因表达水平

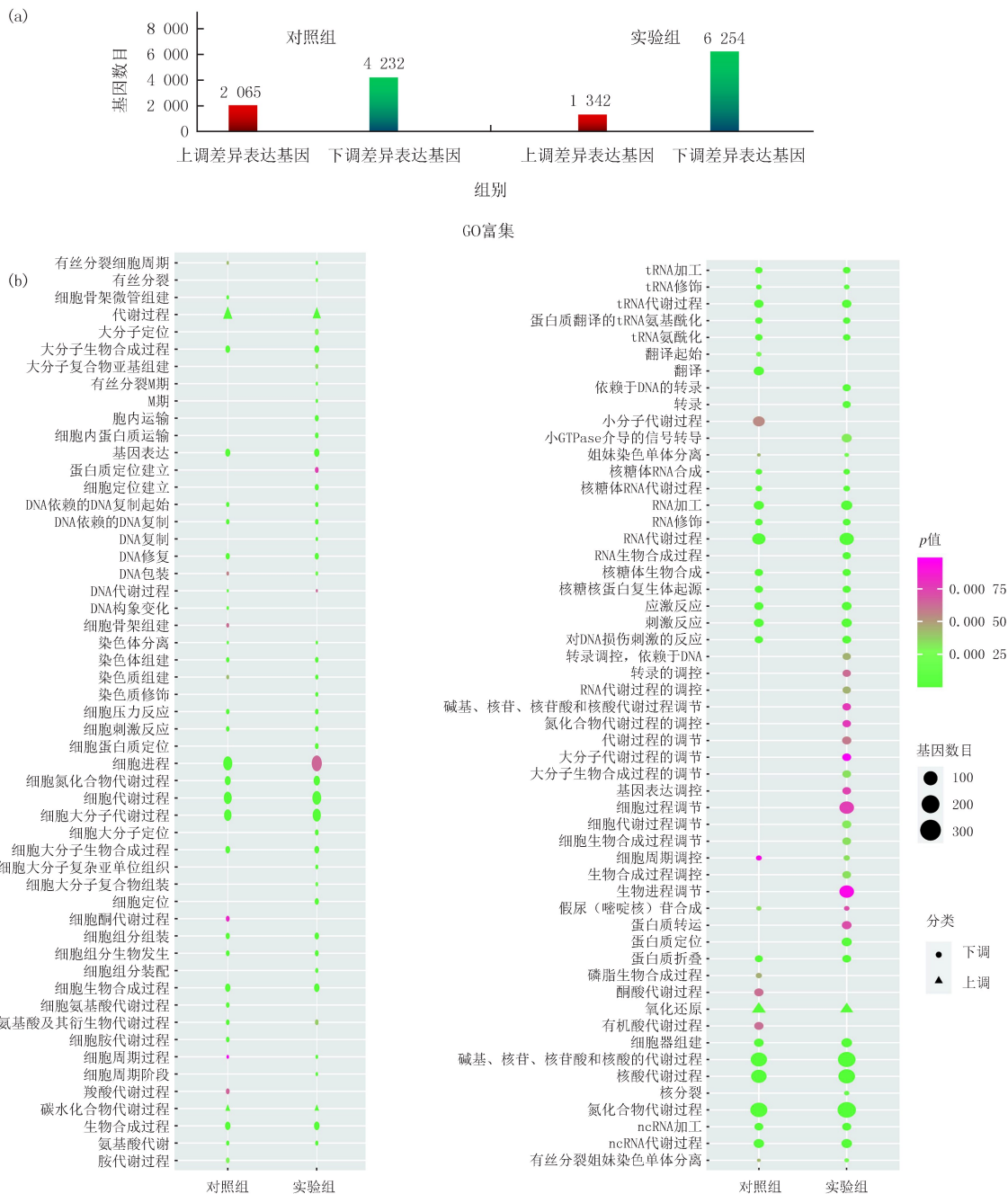


注:热图中值越大相关性越高,红色表示,反之用绿色表示.

图2 不同样本的相关性分析(在线彩图)

Fig.2 Correlations among different samples(colour online)

上调.因此,在牛至精油作用下,嗜热四膜虫细胞生长受到了抑制.



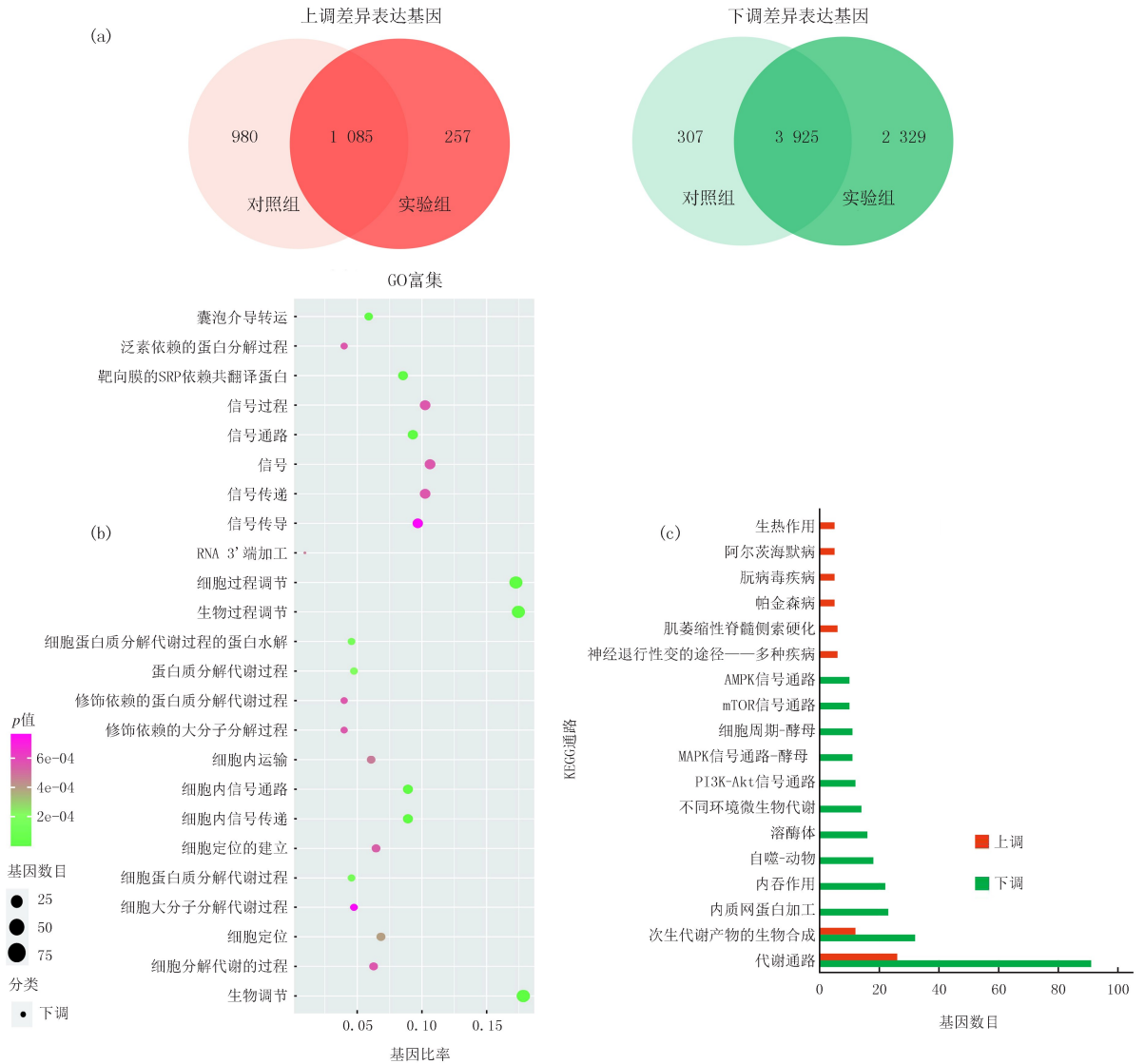
(a) 对照组 (C0 v.s. C24) 与实验组 (P0 v.s. P24) 差异表达基因的统计分析; (b) 对照组 (C0 v.s. C24) 与实验组 (P0 v.s. P24) 差异表达基因的GO富集分析, p 值用颜色表示, 差异表达基因用图形表示.

图3 牛至精油作用下对照组与实验组差异表达基因及GO富集分析

Fig.3 The analysis of differentially expressed genes (DEGs) and gene ontology (GO) enrichment in control and experimental groups under OEO

为了检验样品转录组测序的准确性,7 个差异表达下调基因和 3 个差异表达无明显变化的基因进行了 RT-qPCR 验证.差异表达下调基因包括 AMPK 信号通路关键基因 AMPK 及 RAB2A, 细胞自噬通路中的 ATG1L1, ATG1L2 和 ATG3, DNA 合成相关基因 C-MYB 和 AURKA A.差异表达无明显变化的基因包括细胞色素 c 相关基因 CYT1, 过氧化物酶相关基因 CAT1 及核糖体相关基因 RPS12.结果显示, RT-qPCR 和 RNA seq 的倍数变化相关系数 R^2 为 92.32%, 说明它们相关性高(图 5).因此, 本实验牛至精油作用下嗜热

四膜虫基因差异表达分析是可靠的.



(a)对照组和实验组上调和下调差异表达基因统计Venn图; (b)牛至精油作用下,嗜热四膜虫特异下调差异表达基因的功能富集图; (c)牛至精油作用下嗜热四膜虫特异下调差异表达基因的KEGG通路富集及相关基因数目.

图4 牛至精油作用下嗜热四膜虫特异差异表达基因的GO富集及KEGG分析

Fig.4 GO enrichment and KEGG analysis of specific DEGs of *T. thermophila* under OEO

3 讨论

牛至精油抑制了嗜热四膜虫细胞的生长,嗜热四膜虫的转录组分析发现牛至精油可能是影响了生长过程中的重要过程或通路,进而改变过程或通路上某些基因的表达变化导致细胞生长受到抑制.

已有研究表明,PI3K/AKT 信号通路参与调控细胞增殖、生长等多个生物学过程,是非常重要的^[20]. PI3K 是磷脂酰肌醇 3-激酶,可以接收不同受体传递的信号,发挥活性;而 AKT 也称蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB),受 PI3K 蛋白直接调控^[21],进而通过磷酸化激活多种激酶(包括细胞周期蛋白激酶(cyclin dependent kinases,CDKs)、转录因子(包括 C-MYB)等,进而调控细胞的生长^[22].CDKs 细胞周期中的必需成分,也是关键的活化因子^[23].C-MYB 是细胞核内的转录因子,与细胞增殖、分化密切相关^[24].AMP 依赖的蛋白激酶 AMPK 通路是调节能量平衡一条关键通路^[25-26].在营养物质不足时,AMPK 被激活,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1(complex 1 of mammalian target of rapamycin,mTORC1)受到抑制,而 mTORC1 可通

过激活核糖体 S6 蛋白激酶促进细胞增殖和蛋白质合成,激活自噬相关基因 (autophagy-related gene, ATG) 诱导细胞发生自噬,补充能量等^[26],因此该通路也是相当关键的。

根据不同通路上不同基因或者蛋白在起作用,并结合本实验中的分析结果,绘制了牛至精油对嗜热四膜虫生长调控影响的模型:第 1 条通路可能是,牛至精油主要活性成分如酚类物质,通过结合膜蛋白上的某种受体或者通过改变细胞膜的通透性,直接进入细胞.当活性成分直接或者与细胞某受体作用进入细胞后,结合 PI3K,改变 AKT 蛋白结构并使其活化,并以磷酸化作用于下游相关的因子,包括 CDK 的抑制分子 p21 和 p27,抑制 CDKs 的表达,从而影响细胞周期的进程;IkB 激酶 (IKK α),抑制下游 NF- κ B 表达,进一步抑制了 C-MYB 转录因子的表达,导致与 DNA 合成相关基因的表达受阻,使得细胞不能存活 (图 6).第 2 条通路可能是,牛至精油中酚类活性分子通过改变细胞膜通透性进入细胞,AMP 量改变,从而激活 AMPK.AMPK 通过 mTORC1 复合物的去磷酸化抑制 S6K,从而抑制细胞蛋白合成,导致细胞蛋白合成受阻,同时抑制细胞自噬复合体 ATG1 等相关基因的表达,使得细胞在低营养条件下不能维持自己的基本生存需要,使细胞数减少 (图 6).其中,2 条通路中的一部分基因包括 C-MYB,ATG1,AMPK 等的表达水平变化,也进行了 RT-qPCR 验证,结果与转录组测序结果一致,说明这些基因的表达变化在牛至精油的作用下明显下调。

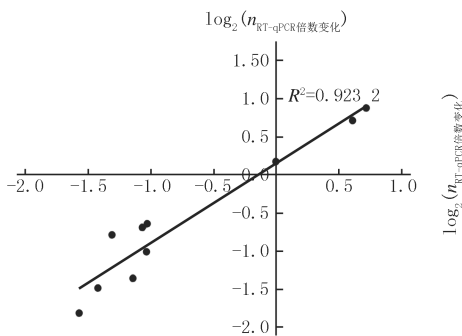
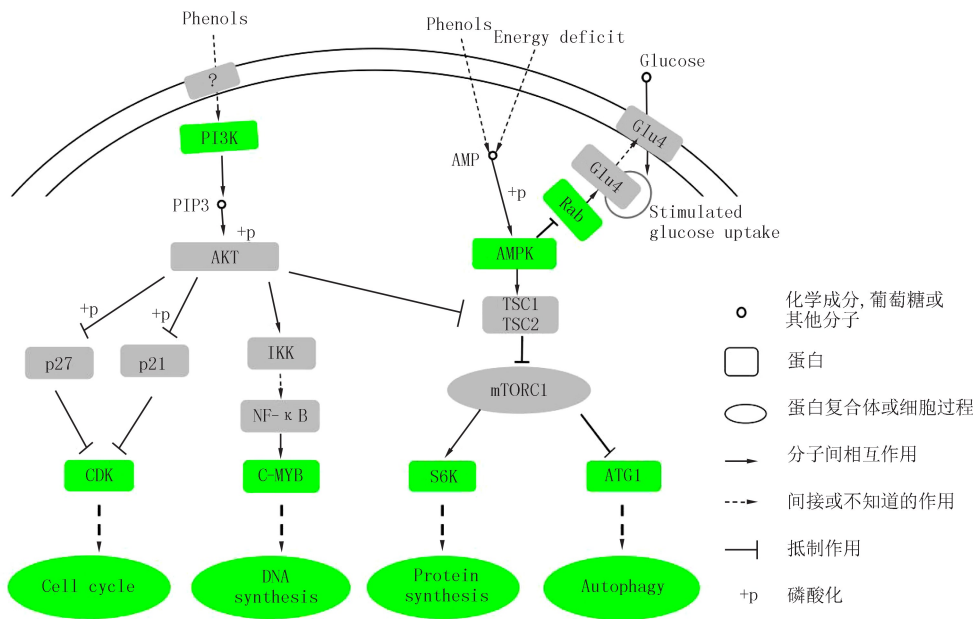


图5 RT-qPCR与RNA-seq数据中差异表达基因倍数的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis of fold-change values based on RT-qPCR and RNA-seq data



注:下调基因编码的蛋白用绿色表示,没有明显变化基因编码的蛋白用灰色表示。

图6 牛至精油影响嗜热四膜虫生长的可能模型 (在线彩图)

Fig.6 Hypothetical model for *T. thermophila* growth under OEO (colour online)

假设的 2 条通路说明,在牛至精油作用下,嗜热四膜虫细胞密度降低有以下几方面原因:一是细胞周期过程受到抑制,主要是与细胞周期相关基因包括 CDKs 等,其表达水平下调,影响了细胞周期的过程,进而影响细胞复制和有丝分裂,使嗜热四膜虫细胞数目减少;二是抑制 DNA 合成过程,主要是与 DNA 合成相关基因 C-MYB 的表达下降,不能正常行使转录的功能,进而影响下游基因的表达,使嗜热四膜虫不能正常的进行 DNA 合成;三是阻碍细胞蛋白质合成,主要影响了 S6 蛋白激酶的表达,影响细胞增殖,使细胞不能正常存活;四是影响了细胞自噬过程,主要自噬相关基因 ATG1,ATG3 等表达下调,使细胞无法在低营养的条件

下继续维持生存,进而导致细胞不能生长。

牛至精油影响细胞生长的分子调控和代谢通路等过程作用目前尚不清楚,而牛至精油的成分复杂,可能的作用方向较多,要深入研究的话,实验对象最好一个完整生命体。本研究中的嗜热四膜虫是一个单细胞真核模式生物,利用转录组数据分析的方法,从基因层面理解牛至精油影响嗜热四膜虫细胞生长的分子调控过程,这对研究牛至精油如何调控细胞的分子机理提供方向。

附 录

附表见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.01.016)。

参 考 文 献

- [1] 牛彪,梁剑平,刘宇.牛至精油在兽药基础研究中的进展[J].动物医学进展,2018(4):92-96.
NIU B,LIANG J P,LIU Y.Progress on oregano essential oil in basic veterinary drug research[J].Progress in Veterinary Medicine,2018(4):92-96.
- [2] 韩飞,李瑾,潘悄悄,等.新型天然植物抗生素牛至油的研究进展[J].中国新药杂志,2015,24(3):303-307.
Han F,LI J,Pan Q Q,et al.Research progress in a new natural plant antibiotics-oregano oil[J].Chinese Journal of New Drugs,2015,24(3):303-307.
- [3] LAMBERT R J,SKANDAMIS P N,COOTE P J.A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil thymol and carvacrol[J].Journal of Applied Microbiology,2001,91(3):453-622.
- [4] GAUR S,KUHLENSCHMIDT T B,KUHLENSCHMIDT M S.Effect of oregano essential oil and carvacrol on *Cryptosporidium parvum* infectivity in HCT-8 cells[J].Parasitology International,2018,67(2):170-175.
- [5] MILHAU G,VALENTIN A,BENOIT F,et al.In vitro antimalarial activity of eight essential oils[J].Journal of Essential Oil Research,1997,9(3):329-333.
- [6] GIANNENAS I,FLOROU-PANERI P,PAPAZAHARIADOU M,et al.Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*[J].Archives of Animal Nutrition,2003,57(2):99-106.
- [7] PONCE-MACOTELA M,RUFINO-GONZÁLEZ YADIRA,GONZÁLEZ-MACIEL ANGÉLICA.Oregano (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro:antigiardiasis activity and ultrastructural damage[J].Parasitology Research,2006,98(6):557-560.
- [8] CAMURC-VASCONCELOS A L F,BEVILAQUA C L,MORAIS S M,et al.Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils[J].Veterinary Parasitology,2007,148(3/4):288-294.
- [9] FORCE M,PARKS W S,RONZIO R A.Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo[J].Phytotherapy Research,2000,14(5):213-214.
- [10] 郑云峰,沈水宝.牛至及其精油的生物学功能研究进展[J].饲料工业,2021(4):15-20.
ZHENG Y F,SHEN S B.Advances in biological function of oregano and its essential oil[J].Feed Industry,2021(4):15-20.
- [11] 沈韞芬.原生动植物学[M].北京:科学出版社,1999.
- [12] TURKEWITZ A P,ORIAS E,KAPLER G.Functional genomics:the coming of age for *Tetrahymena thermophila*[J].Trends in Genetics,2002,18(1):35-40.
- [13] EISEN J A,COYNE R S,WU M,et al.Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote[J].PLOS Biology,2006,4(9):e286.
- [14] 杨文涛,张晶,闫冠雄,等.四膜虫功能基因组数据库增量更新 2016:生活史和减数分裂转录组及磷酸化蛋白组资源建设[J].基因组学与应用生物学,2016(6):1443-1450.
YANG W T,ZHANG J,YAN G X,et al.*Tetrahymena* functional genome database updated in 2016 on resources construction of life cycle transcriptome,meiosis transcriptome and phosphoproteome data[J].Genomics and Applied Biology,2016(6):1443-1450.
- [15] YANG W T,JIANG C Q,ZHU Y,et al.*Tetrahymena* comparative genomics database(TCGD):a community resource for *Tetrahymena* [J].Database:The Journal of Biological Databases and Curation,2019,2019:baz029.
- [16] XIONG J,LU X Y,ZHOU Z M,et al.Transcriptome analysis of the model protozoan, *Tetrahymena thermophila*, using deep RNA sequencing[J].PLOS One,2012,7(2):e30630.
- [17] TIAN M,CHEN X,XIONG Q,et al.Phosphoproteomic analysis of protein phosphorylation networks in *Tetrahymena thermophila*, a model single-celled organism[J].Molecular & Cellular Proteomics,2014,13(2):503-519.
- [18] ORIAS E,HAMILTON E P,ORIAS J D.*Tetrahymena* as a laboratory organism:useful strains,cell culture,and cell line maintenance[J].Method in Cell Biology,2000,62:189-211.
- [19] ZHANG J,LIU Y X,LIU S L,et al.PI3K/Akt signaling pathway involved in regulation of T lymphocyte activation and apoptosis media-

- ted by CD3ε[J].Chinese Science Bulletin,2001,46(7):568-570.
- [20] ALTOMARE D A,TESTA J R.Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer[J].Oncogene,2005,24(50):7455-7464.
- [21] GAO Y,MOTEN A,LIN H K.Akt;a new activation mechanism[J].Cell Research,2014,24(7):785-786.
- [22] SANCHEZ I,DYNLACHT B D.New insights into cyclins,CDKs,and cell cycle control[J].Seminars In Cell & Developmental Biology,2005,16(3):311-321.
- [23] GREIG K T,CAROTTA S,NUTT S L.Critical roles for c-Myb in hematopoietic progenitor cells[J].Seminars in Immunology,2008,20(4):247-256.
- [24] HARDIE D G.AMPK:A key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism[J].International Journal of Obesity,2008,32(4):S7-S12.
- [25] 饶敏腊,张明萌,石本艳,等.AMPK 的生物学功能及其激活机制研究进展[J].广东医科大学学报,2018(6):603-608.
RAO M L,ZHANG M M,SHI B Y,et al.Biological function and activation mechanism of AMPK:a review[J].Journal of Guangdong Medical University,2018(6):603-608.
- [26] 肖昊,谭碧娥,吴苗苗,等.mTOR 信号通路调节细胞能量代谢的机制[J].中国科学:生命科学,2015(11):1124-1131.
XIAO H,TAN B E,WU M M,et al.Regulatory mechanism of mTOR signaling pathway on cell energy metabolism[J].Scientia Sinica (Vita),2015(11):1124-1131.

Effects of oregano essential oil on gene expression of *Tetrahymena thermophila*

Li Wenqiu¹, Zhang Jing², Luo Shuai², Hu Che¹, Chen Ying¹, Miao Wei²

(1. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation; Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Oregano Essential Oil(OEO)has the functions of antibacterial, bactericidal and inhibition of the parasite cells. In order to understand the molecular regulation mechanism of cells under OEO, the gene expression of *Tetrahymena thermophila* at 0 h and 24 h was analyzed in this study. Based on the analysis of high-throughput transcriptome sequencing(RNA-seq)6 297 differentially expressed genes(DEGs)were identified in the control group in which there was no OEO at 0 h and 24 h, including 4 232 downregulated DEGs and 2 065 upregulated DEGs. And, 7 596 DEGs were identified in the experimental group in which OEO was added at 0 h and 24 h, including 6 254 downregulated DEGs and 1 342 upregulated DEGs. Compared to the control group, there were 257 specific upregulated DEGs and 2 329 specific downregulated DEGs in the experimental group. GO enrichment analysis showed that there was no function enriched among the specific upregulated DEGs and the process of RNA processing, protein catabolic process, cell localization and signal transduction were enriched among specific downregulated DEGs. According to KEGG analysis, downregulated DEGs were involved in autophagy and cell cycle pathway under OEO. The downregulated DEGs in these processes and pathways may inhibit cell growth. 7 downregulated DEGs and 3 unchanged genes in pathways were chosen to validate the expression differences by quantitative real time polymerase chain reaction(RT-qPCR). RT-qPCR and RNA-seq were highly correlated to each other. Based on the analysis of relevant genes and pathways, the possible model of *T. thermophila* cells growth under OEO was analyzed. These provide clues to explore the molecular regulation mechanism under OEO.

Keywords: oregano essential oil; *Tetrahymena thermophila*; transcriptome; differentially expressed genes

[责任编辑 刘洋 杨浦]

附表 I 实时荧光定量 PCR 引物

Attached tab. I Primers for quantitative real time PCR(RT-qPCR)

基因名	基因序列号	引物序列(5'-3')	表达水平
AMPK	TTHERM_00670860	AACTGCAAATAGTAAATATCCAAGC TGAACATTTGGATTTGCTATTTAG	下调
ATG3	TTHERM_01050620	TAATATCTGTTGTTTATGCTCCTCC AGATACTGCTTCTCAGCAGGAAG	下调
AURKA A	TTHERM_00852690	TCCAAATGATAGAAAAGATATCAAC AGGCTAATTTTGTGCATAATATTAC	下调
C-MYB	TTHERM_00496990	AAGAAGACTACATCTATGCGAGACT TAGTCTTAGCTTCTTTAAGAGCTGG	下调
RAB2A	TTHERM_00579220	AGGCTTTTTATGCATTAGCTAAAC AGCTCCTACTTTTACTCCACTGC	下调
ATG1L1	TTHERM_00314920	GGAAGGTAAAAGTTATTGTGATTTG AGAGTTCTTCCCAGCTTATTCTATC	下调
ATG1L2	TTHERM_00468000	TTGATTTAACAACGATTCTAAAC TATGCTCTAGCCATTTTAAAACCTC	下调
CYT1	TTHERM_00918500	ATCGGTTTGTCTTAGCTAACTC AATTGGGGCCAATAATTATGAC	无变化
CAT1	TTHERM_01146030	AGTTATGCCATTAACGATGG AGTTTCAGCAAAGTAGTTTTTCAGG	无变化
RPS12	TTHERM_00434040	TCTCACGCTAAGGGTTTAGTCAC TTTCAGCTAAGAAGTTAAGGCAAC	无变化
RPS18	TTHERM_00131110	TCGTATCCTCAACACCAACATC ATCTTGTGCATTAATCTTCGG	内参