

黄睿,陈栋,赵真坚,等.基于GWAS的哺乳仔猪抗腹泻候选基因筛选及通路研究[J].华中农业大学学报,2025,44(4):239-247.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.04.023

## 基于GWAS的哺乳仔猪抗腹泻候选基因筛选 及通路研究

黄睿<sup>1</sup>,陈栋<sup>1</sup>,赵真坚<sup>1</sup>,申琦<sup>1</sup>,崔晟颀<sup>1</sup>,王俊戈<sup>1</sup>,陈子旻<sup>1</sup>,吴平先<sup>2</sup>,唐国庆<sup>1</sup>

1. 猪禽种业全国重点实验室/四川农业大学动物科技学院/农业农村部畜禽生物组学重点实验室/  
畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室,成都 611130; 2. 国家生猪技术创新中心,重庆 402460

**摘要** 为研究哺乳仔猪抗腹泻的遗传因素和通路,通过对640头腹泻仔猪进行采样和统计分析,选取其中600个样本,包括大白猪453头、长白猪105头和杜洛克猪42头进行低深度重测序(1×),对测序结果质控后开展全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS),在大白猪和长白猪中分别筛选出42个和107个显著SNPs,这些位点上下游20 kb区域分别涉及32个和82个基因,对这些基因进行GO和KEGG富集分析,最终分别确定了6个(*PLA2G4A*、*C1RL*、*PTPN6*、*C1R*、*PPP1R12A*和*GRID2*)和8个(*DAPK1*、*TMC8*、*ITM2C*、*CHMP4B*、*CAST*、*PDE4D*、*HSPA4*和*GRID2*)可能与哺乳仔猪腹泻性状相关的重要候选基因,其中*GRID2*在大白猪和长白猪中同时被筛选到。结果表明,仔猪腹泻性状候选基因与细胞凋亡、免疫、细胞屏障和物质的跨膜运输相关功能有关。

**关键词** 哺乳仔猪; GWAS; 腹泻; 抗腹泻; 基因; 通路

**中图分类号** S858.28

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-2421(2025)04-0239-09

我国是生猪养殖和消费大国,外三元的养殖结构已经成为大多数生猪养殖场(户)的选择。随着养殖技术和育种技术的发展,生猪的养殖生产效率不断提高,但抗病力水平却没有显著进步<sup>[1]</sup>。初生仔猪的免疫系统尚未发育成熟,体温调节能力和消化吸收能力也需要一定时间才能适应出生后的饲养环境,因此新生仔猪腹泻在实际生产中十分常见。腹泻会不同程度地破坏仔猪肠道黏膜和绒毛,影响仔猪的消化吸收功能和生长性能,可能导致生长迟缓、僵猪,严重的可导致死亡<sup>[2]</sup>。

GWAS是利用全基因组范围的遗传变异和疾病性状进行关联,寻找到关键变异位点和候选基因,并通过试验验证解析候选基因调控疾病的内在分子机制的研究方法。GWAS方法最初是由Risch于1996年提出,并在2005年被Klein等<sup>[3]</sup>应用到人的视网膜黄斑病的研究上,自此GWAS研究方法开始在各个领域被应用并发展起来,在猪肠道疾病相关研究中的应用也取得了诸多重要突破。Wang等<sup>[4]</sup>在研究

表达F4ac fimbriae的产肠毒素大肠杆菌(ETEC)时发现,基因*ITGB5*编码整合素 $\beta 5$ 亚基与 $\alpha v$ 亚基组成以产生整合素 $\alpha v\beta 5$ ,与ETEC F4ac易感性的强烈关联,表明*ITGB5*是影响仔猪对ETEC F4ac易感性的关键因素。Schut等<sup>[5]</sup>在对阳性感染沙门氏菌(*Salm*)的猪GWAS时发现了5个显著性SNV,确定了2号染色体上*PTPRJ*基因中的内含子变异和6号染色体上*ST6GALNAC3*基因的下位点与*Salm*感染具有提示性关联。Luo等<sup>[6]</sup>研究猪梭菌性肠炎的转录组数据,发现试验性感染产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)的仔猪回肠组织中有38个差异表达基因,这些基因富集于MAPK信号通路中。从这些差异表达基因中筛选出*MAPK1*、*TP53*、*MAPK8*、*MYC*和*CHUK*基因可能与猪梭菌性肠炎有关。同时,一些病毒<sup>[7-9]</sup>导致的腹泻疾病等方面均有重大进展。

目前报道的腹泻相关候选基因研究大多从特定病原入手,其结果与特定病原相关,这些研究对于揭示非传染性因素导致的腹泻机制仍存在局限性。在

收稿日期: 2024-04-10

基金项目: 国家生猪技术创新中心先导科技项目(NCTIP-XD/B01); 四川省科技厅项目(2020YFN0024; 2021ZDZX0008; 2021YFYZ0030)

黄睿, E-mail: 408001391@qq.com

通信作者: 唐国庆, E-mail: tyq003@163.com

现代规模化养殖场中,更多的普遍性腹泻病因是非传染性的。因此,本研究以腹泻症状作为重要表型进行分析,通过对大量无特定病原微生物感染导致哺乳仔猪腹泻的样本进行GWAS分析,从更广泛的层面鉴定与腹泻相关联的关键SNP位点和候选基因,以期仔猪腹泻遗传机制解析和抗病育种提供新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物、表型鉴定和样本采集

试验样本采集于2021年10月1日至2022年1月1日出生的哺乳仔猪,饲养条件为舍饲,其间所有分娩环境中未检出流行性腹泻、传染性胃肠炎等可导致仔猪严重腹泻的病原微生物,猪群均位于产房单元的分娩产床上。

该时间段内出生的仔猪群体共11 042头,其中大白猪8 966头、长白猪1 344头以及杜洛克猪732头。在采样时根据腹泻评分表,对采样腹泻仔猪进行评分并记录,共计640头仔猪发生腹泻,选取其中600个样本进行测序。其中大白猪453头、长白猪105头、杜洛克猪42头。产房环境温度为(23.5±1.5)℃,保温灯下温度为(33±3)℃。

严格执行相同的饲养标准和管理办法。观察标准为每日观察3次(08:00、13:00、18:00),若观察到有发生腹泻的仔猪,第一时间采集耳组织样本并收集记录个体信息、父母信息、腹泻评分、环境温度、体质量、日龄等信息,同时对腹泻猪肛周拍照保存,样本保存于-20℃的75%乙醇溶液中。

1.2 腹泻评分标准

根据腹泻的临床症状,包括排泄物形态和颜色、吮奶和饮欲、精神和被毛状态、肛周污染情况并参考相关研究<sup>[10]</sup>制定腹泻评分标准,详见表1。

1.3 组织样本DNA提取和SNP分型

1)测序。使用CTAB法提取600份耳组织样本的基因组DNA。在1%琼脂糖凝胶上检测DNA降解和污染程度,采用分光光度计检测DNA纯度,采用Qubit 2.0荧光计(Life Technologies,CA,USA)中的Qubit DNA测定试剂盒测定DNA浓度。使用制造商建议的Truseq Nano DNA HT试剂盒构建测序文库,采用DNBSEQ-T7测序仪对600个样本进行低深度重测序,测序深度为1×。

2)质控。对测序数据进行质控处理,包括:①去除含有≥10%未知碱基(N)的序列;②去除含50%

表 1 仔猪腹泻评分表		
Table 1 The scoring system for evaluating diarrhea in piglets		
腹泻评分 Diarrhea score	临床表现 Clinical manifestation	标准参考图片 Reference picture
1分 1 point	吮奶、饮水正常,粪便不成形,肛周有少量粪便污染,一般为黄色或乳白色,无其他异常。	
2分 2 point	吮奶、饮水欲不佳,粪便呈糖稀状,肛周存在少量粪便污染,含少量水分,一般为黄色或乳白色,无明显异常。	
3分 3 point	吮奶、饮水欲低,粪便含水量大,呈稀粥状,可见肛周和肢体污染,一般为黄色,精神稍沉郁,脱水。	
4分 4 point	吮奶、饮水废绝,肛周和肢体污染,一般为浅黄色或浅绿色,精神沉郁,偶见神经症状,严重脱水,体况差,严重的可导致死亡。	

以上碱基质量值小于5的序列;③去除>10个碱基比对到接头的序列,允许≤10%的不匹配;④去除文库构建过程中PCR扩增的重复序列;⑤使用Burrows-Wheeler Aligner(BWA)软件,采用MEM算法,分配4个线程,设置32个的种子长度,并启用M超参数标记。基于猪参考基因组(Sscrofa11.1,来自Ensembl数据库)进行比对;⑥变异检测:使用基因组分析工具包(GATK)和贝叶斯模型进行SNP鉴定;⑦质量控制:使用VCFtools进行质量控制,包括最小等位基因频率(MAF)>0.05和Hardy-Weinberg平衡(HWE)阈值为10~5。

1.4 全基因组关联分析

在本研究中使用GEMMA v0.98.5软件中的线性混合模型对每个仔猪腹泻性状进行GWAS分析。

1)数据预处理。在进行GWAS分析之前,先对数据进行预处理,以处理仔猪腹泻的评分性质。使

用R的expm1函数对腹泻表型进行指数转换,确保数据分布符合线性混合模型的分析要求。将对数函数作为关联函数,使用R软件中的通用线性模型(glm)对经过指数转换的表型数据进行进一步的校正。在模型中,性别和批次作为固定因子,年龄、体质量和室温等作为协变量。

2)GWAS。得到的校正表型值用于GWAS分析,使用的线性混合模型如下:

$$y=Xm+Wa+e \tag{1}$$

式(1)中, $y$ 表示校正后的表型值向量,包含了每个仔猪的腹泻表型数据; $m$ 表示SNP效应向量,代表每个SNP对表型的影响效应; $a$ 表示剩余残差多基因效应向量,服从( $a\sim MVN(0,G\sigma_a^2)$ )分布,代表除了SNP效应之外的其他遗传和环境因素对表型的影响; $e$ 表示残差,服从( $e\sim MVN(0,I\sigma_e^2)$ )分布; $X$ 和 $W$ 表示 $m$ 和 $a$ 的关系矩阵。

$G$ 表示基因组亲缘关系矩阵(genomic relatedness matrix,GRM),GRM表达式如下:

$$G=\frac{ZZ'}{2\sum p_i(1-p_i)} \tag{2}$$

式(2)中, $G$ 是个体间的亲缘关系矩阵; $Z$ 为标记的关联矩阵; $I$ 表示单位向量; $p_i$ 为所有基因型个体的观察MAF,与近交和选择无关。

3)显著性阈值确定。采用Bonferroni校正法用以确定GWAS分析的全基因组显著性阈值。当该SNP的关联 $P$ 值在GWAS结果中达到 $P<0.05/N$ 时,该SNP被认为是显著SNP位点,其中 $N$ 表示用于GWAS分析的SNP数量。

4)结果可视化。使用R软件中的qqman包进行数据可视化和图形生成。以图形表示关联结果,显示SNPs的基因组位置及其相应的显著性水平,将基因组中的SNP标记按照其位置排列在水平轴上,同时将每个SNP的显著性水平标在垂直轴上。

1.5 候选基因注释和功能分析

本研究中,以显著SNP位点上下游20 kb范围的基因组区域作为搜索区域,先根据Ensembl网站的VEP模块检索范围内的候选基因,然后使用DAVID网站对候选基因进行GO和KEGG富集分析,并结合候选基因相关的已发表文献综合分析候选基因的生物学功能。

1.6 数据分析

数据分析采用IBM SPSS statistics 27进行统计和显著性分析,对不同分组进行独立样本 $t$ 检验和卡

方检验,数据以“平均值±标准差”(mean±SD)表示。

2 结果与分析

2.1 表型统计

1)基本信息统计。本研究中640头腹泻哺乳仔猪的日龄、体质量、腹泻评分及环境温度等信息统计结果见表2。

表2 640头腹泻哺乳仔猪的基本信息  
Table 2 Basic information of 640 diarrheal suckling piglets

项目 Item	日龄 Age in days	体质量/kg Body weight	环境温度/℃ Ambient temperature	腹泻评分 Diarrhea score
平均值±标准差 Mean±SD	3.82±0.12	1.57±0.64	23.14±0.02	2.38±0.03
最小值Min	1	0.8	21.9	1
最大值Max	21	5.5	25	4

注:结果表示为平均值±标准差(Mean±SD),Min表示最小值,Max表示最大值。Note: Results are expressed as Mean±SD, Min as minimum and Max as maximum.

2)品种差异。640份样本中有大白猪484头、长白猪114头和杜洛克猪42头,分别占其品种总群体的5.40%、8.48%和5.74%。大白猪与长白猪的腹泻评分具有显著差异( $P<0.05$ ),长白猪与杜洛克猪的腹泻评分同样有显著差异( $P<0.05$ )。说明不同品种间存在腹泻发生率的差异,长白猪>杜洛克猪>大白猪,根据分析结果,可以确定在该群体中品种对腹泻评分有显著影响。长白仔猪最易发生腹泻,且腹泻评分最高,详见表3。

3)性别差异。对本次采样记录的统计分析发现,除了不同品种之间存在显著的腹泻评分差异外,性别间的腹泻评分也存在显著差异,本次采样统计的640头猪中,公猪有136头,母猪有504头进行独立样本 $t$ 检验,发现具有显著差异( $P<0.05$ )。母猪的发病率显著高于公猪,说明性别对发病率有显著影响,虽然公猪的发病率低,但是腹泻发生时,公猪的腹泻严重程度较母猪更高,详见表4。

4)日龄差异。对本次采样记录进行日龄阶段-发病数量卡方检验, $\chi^2=1\,368.71,P<0.05$ ,1~5日龄的哺乳仔猪腹泻发生数量最多,随日龄增加发生腹泻的猪数量减少。在腹泻评分方面,1~5日龄猪的评分显著低于6~15分的腹泻评分,16日龄以上哺乳后期猪的腹泻评分介于初生仔猪和哺乳中前期之



间,哺乳前期的仔猪发生腹泻数量显著高于哺乳中后期,详见表 5。

表 3 不同品种仔猪的腹泻评分  
Table 3 Diarrhea scores sof piglets of different genders

品种 Variety	腹泻数 Total di- arrhea	群体总数 Population total	群体发病占比/% Population incidence ratio	腹泻评分 Diarrhea score
大白猪 Large white	484	8 966	5.40	2.36± 0.69b
长白猪 Landrace	114	1 344	8.48	2.56± 0.61a
杜洛克猪 Duroc	42	732	5.74	2.21± 0.75b

注:不同字母表示不同品种之间差异显著( $P<0.05$ ),相同字母表示不同品种之间差异不显著( $P>0.05$ ),下同;群体发病占比指该品种发病数占观察群体内该品种总数的比例。Note: Different letters indicate significant differences among different varieties ( $P<0.05$ ), and the same letter indicates no significant differences among different varieties( $P>0.05$ ), the same as below; Population incidence ratio refers to the proportion of the number of cases of this variety to the total number of this variety in the observation population.

表 4 不同性别仔猪的腹泻评分  
Table 4 Diarrhea scores of piglets of different genders

性别 Sex	腹泻数 Total diar- rhea	发病占比/% Incidence ratio	腹泻评分 Diarrhea score
公猪 Boar	136	21.25	2.52±0.58a
母猪 Sow	504	78.75	2.35±0.70b

注:发病占比为性别发病数占发病群体总数的比例。Note: The incidence ratio was the proportion of the number of cases by gender to the total number of cases in the population.

表 5 不同日龄阶段仔猪的腹泻评分  
Table 5 Diarrhoea scores of piglets at different age stages

日龄 Age in days	腹泻数 Total diarrhea	发病占比/% Incidence ratio	腹泻评分 Diarrhea score
1~5	565	88.28	2.35±0.68b
6~10	32	5.00	2.63±0.61a
11~15	32	5.00	2.62±0.70a
>16	11	1.72	2.56±0.53ab

注:发病占比为日龄阶段发病数占发病群体总数的比例。Note: The incidence ratio was the proportion of the number of cases in day-age stages to the total number of disease groups.

5)环境温度差异。对处在不同环境温度的样本评分进行分析,发现 22.6~23.0℃区间的腹泻猪数量最多,其中 23.0~23.5℃区间的腹泻评分显著低于其

他温度区间,23.5~24.0℃区间的腹泻评分为次低,当环境温度低于 22.5℃或高于 24.0℃时,腹泻评分显著升高。进行环境温度-发病数量卡方检验, $\chi^2=466.86, P<0.05$ ,具有统计学意义,详见表 6。

表 6 不同环境温度下仔猪的腹泻评分  
Table 6 Diarrhea scores of piglets at different environ-  
mental temperatures

环境温度/℃ Ambient temperature	腹泻数 Total diar- rhea	发病占比/% Incidence ratio	腹泻评分 Diarrhea score
≤22.5	36	5.63	2.58±0.50a
22.6~23.0	308	48.13	2.52±0.63a
23.0~23.5	193	30.16	2.15±0.73b
23.5~24.0	90	14.06	2.33±0.69ab
>24.0	13	2.03	2.54±0.52a

注:发病占比为环境温度下发病数占发病群体总数的比例。Note: The incidence ratio is the proportion of the number of cases in the total number of cases at ambient temperature.

2.2 全基因组关联分析

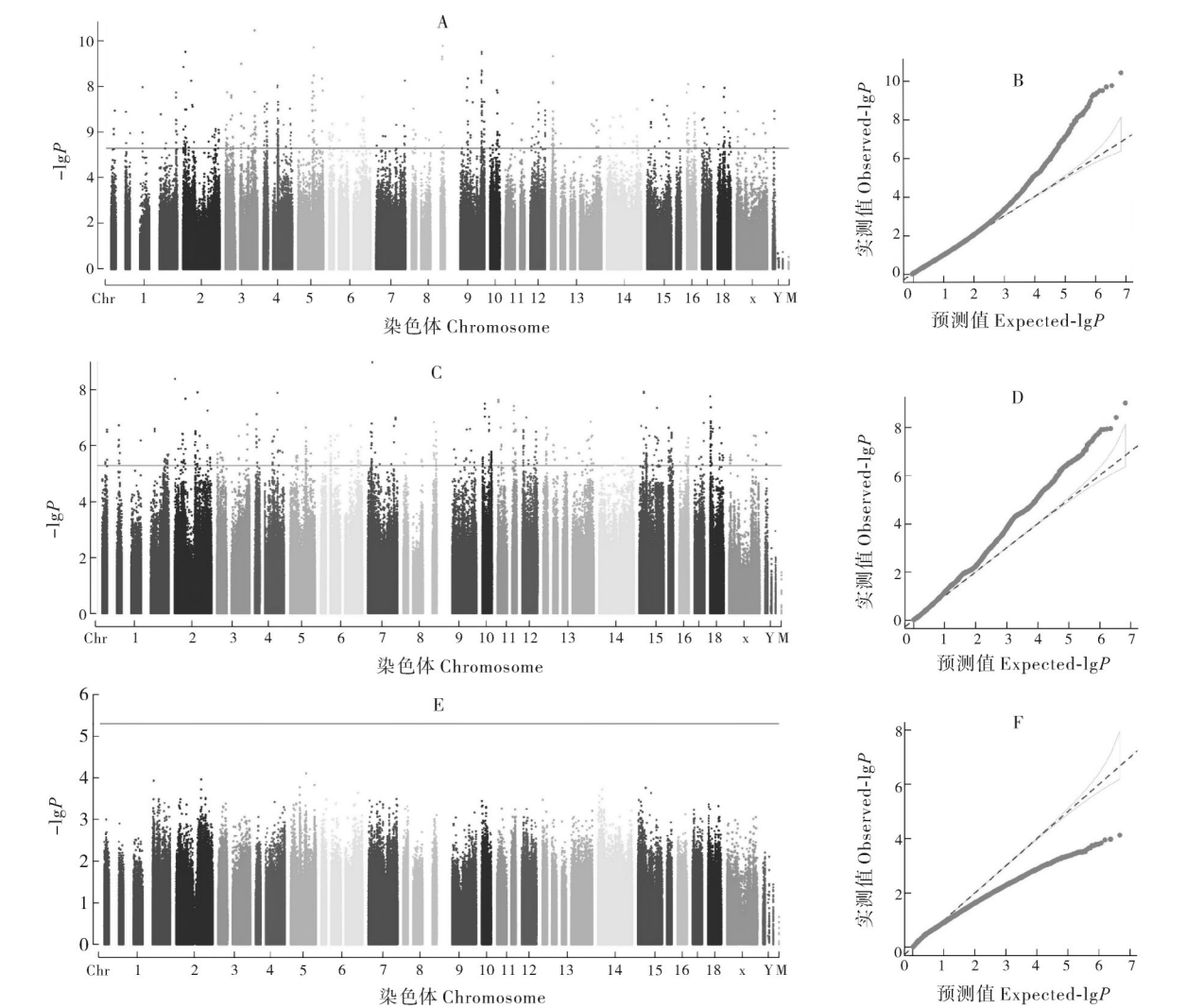
通过 LcWGS 对 600 头哺乳阶段的腹泻仔猪进行测序,其中大白猪 453 头、长白猪 105 头、杜洛克猪 42 头。通过 GWAS,分别鉴定出 7 439 287、6 656 386 和 4 550 017 个 SNPs,采用 Bonferroni 校正法得到 3 个品种的显著位点阈值,分别为  $6.72\times10^{-9}$ 、 $7.51\times10^{-9}$  和  $1.10\times10^{-8}$ 。曼哈顿图和 Q-Q 图见图 1。

2.3 候选基因注释及功能分析

利用 GWAS 获得与仔猪腹泻性状关联的位点并筛选出显著 SNP,并在其上下游 20 kb 区域搜索基因,在大白猪显著位点附近搜索到 32 个基因,在长白猪显著位点附近搜索到 82 个基因,杜洛克猪因样本量较少,无位点达到显著阈值。

对这些基因进行 GO 和 KEGG 分析。GO 分析表明大白猪腹泻关联基因主要在胞吐的正向调节、酶原激活、突触后电位、补体激活、突触传递、细胞质、细胞核、血液微粒、钙离子结合等相关条目中富集。长白猪的 GO 富集分析显示在内皮细胞迁移的调节、cAMP 分解代谢过程、离子跨膜运输、神经肌肉控制、蛋白质分解代谢过程、内质网、核膜、细胞核等条目中富集。GO 和 KEGG 富集分析图见图 2。

大白猪 KEGG 通路富集结果显示,关联基因在 cAMP 信号通路、长时程抑制通路、药物成瘾通路存在富集。长白猪未富集到相关通路。通过富集分析提示关联基因可能与跨膜物质运输、补体激活、突触传递、cAMP 代谢等相关功能有关。



A:大白猪曼哈顿图;B:大白猪Q-Q图;C:长白猪曼哈顿图;D:长白猪Q-Q图;E:杜洛克猪曼哈顿图;F:杜洛克猪Q-Q图。A:Manhattan chart of large white pigs;B:Q-Q chart of large white pig;C:Manhattan chart for landrace pigs;D:Landrace pig Q-Q chart;E:Duroc pig Manhattan map;F:Duroc pig Q-Q chart.

图1 仔猪腹泻GWAS结果的曼哈顿图和Q-Q图

Fig. 1 Manhattan chart and Q-Q chart of GWAS results of piglet diarrhea

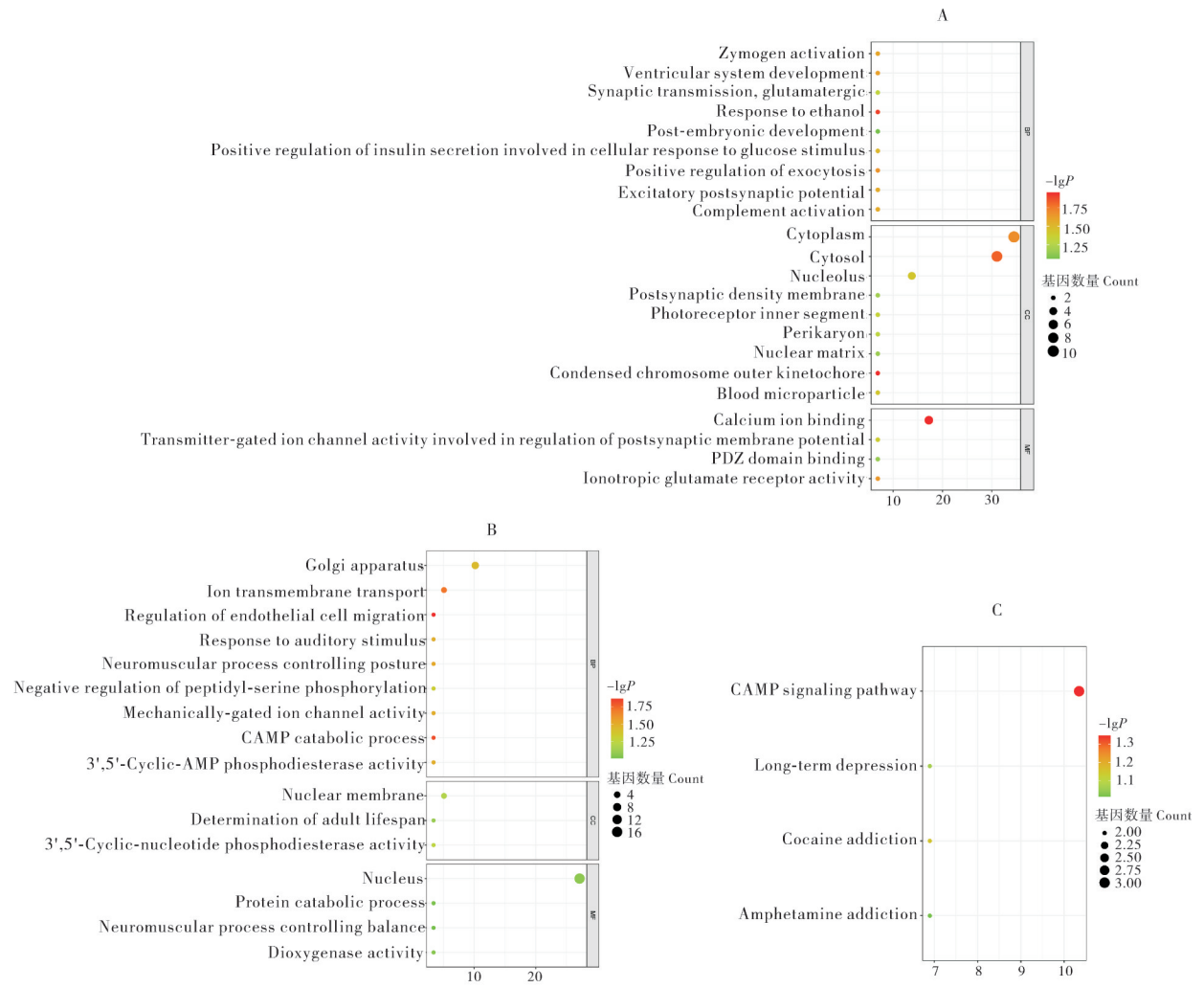
2.4 候选基因筛选

通过对长白猪、大白猪腹泻显著关联基因进行功能富集分析以及查阅相关文献,最终确定了23个

可能与哺乳仔猪腹泻性状相关的重要候选基因,其中GRID2为2个品种共同筛选到的候选基因,详见表7、表8。

表7 大白猪腹泻性状候选基因信息

Table 7 Candidate genes for diarrhea traits in white pigs						
Ensembl基因编号 Ensembl gene ID	基因符号 Gene symbol	染色体 Chr	起始位点 Start position	终止位点 End position	P值 P value	功能 Function
ENSSSCG00000023351	PLA2G4A	9	127 853 581	128 164 825	3.81E-11	凋亡 Apoptosis
ENSSSCG00000033913	C1RL	5	63 623 398	63 640 065	6.70E-10	免疫 Immune
ENSSSCG00000025537	PTPN6	5	63 762 109	63 779 086	2.18E-11	免疫 Immune
ENSSSCG00000060530	C1R	5	63 644 097	63 655 149	6.70E-10	免疫 Immune
ENSSSCG00000038973	PPP1R12A	5	101 490 282	101 639 456	3.89E-09	屏障 Barrier
ENSSSCG00000009197	GRID2	8	125 821 195	127 130 617	6.81E-11	跨膜运输 Transmembrane transport



A:大白猪GO富集分析;B:长白猪GO富集分析;C:大白猪KEGG富集分析。A: GO enrichment analysis of large white pigs; B: GO enrichment analysis of landrace pigs; C:KEGG enrichment analysis of large white pigs.

图2 基于所有建议显著水平 SNPs 注释的候选基因富集分析气泡图

Fig.2 The bubble diagram of GO and KEGG analysis of candidate genes based on significant SNPs achieve suggestive threshold

表8 长白猪腹泻性状候选基因信息

Table 8 Information table of candidate genes for diarrhea traits in landrace pigs

Ensembl基因编号 Ensembl gene ID	基因符号 Gene symbol	染色体 Chr	起始位点 Start position	终止位点 End position	P值 P value	功能 Function
ENSSSCG00000010949	DAPK1	10	27 724 644	27 954 708	3.00E-10	凋亡 Apoptosis
ENSSSCG00000033592	TMC8	12	3 802 344	3 837 413	5.44E-09	凋亡 Apoptosis
ENSSSCG00000016267	ITM2C	15	131 614 887	131 627 428	7.14E-09	凋亡 Apoptosis
ENSSSCG00000007272	CHMP4B	17	37 285 422	37 334 103	7.65E-10	凋亡 Apoptosis
ENSSSCG00000014170	CAST	2	103 255 738	103 378 623	5.03E-09	凋亡 Apoptosis
ENSSSCG00000016929	PDE4D	16	37 897 300	39 406 534	7.21E-09	免疫 Immune
ENSSSCG00000014292	HSPA4	2	135 345 724	135 391 112	1.11E-10	免疫 Immune
ENSSSCG00000009197	GRID2	8	125 821 195	127 130 617	6.81E-10	跨膜运输 Transmembrane transport

### 3 讨论

#### 3.1 母猪品种与环境温度

本研究的观察对象为11 042头哺乳仔猪,群体中表现出腹泻的有640头,总体腹泻发生率为5.87%。这与Svensmark等<sup>[11]</sup>的研究结果相似,该研究中自1976年至1982年观察了104个母猪群、70 796窝,哺乳仔猪腹泻发生率为6.8%,本试验结果相较其略低。这可能是近几十年养猪技术和饲养管理水平的不断提升,降低了新生仔猪腹泻的发生率。

群体中腹泻表型的种间差异可能与不同品种母猪初乳成分及仔猪的代谢的差异有关<sup>[12]</sup>。Cheng等<sup>[13]</sup>研究发现不同品种母猪的初乳中的脂肪酸、氨基酸、胆汁酸、肉碱和碳水化合物等的浓度不同,且不同品种的仔猪对于这些物质的代谢存在差异。群体中表现出的性别间差异这说明在本群体中母猪在腹泻发生后的耐受能力较公猪更强,其具体原因还有待进一步研究。

不同日龄表现出的腹泻表型差异较大,哺乳前期腹泻发生率显著高于哺乳中后期,这可能与仔猪的肠道发育程度和肠道菌群有关<sup>[14]</sup>。

仔猪对于生存环境温度要求很高,不同的环境温度会影响仔猪的生理稳态<sup>[15]</sup>。在秋冬季节该哺乳仔猪群体最适的环境温度为23.0~23.5℃,腹泻多集中于22.6~24.0℃,这可能与不同栋舍温控系统的采暖效果有关,该养殖场大部分栋舍温控系统的采暖效果较一致,环境温度可稳定在22.6~24.0℃,但各栋舍间仍然存在差异。

#### 3.2 重要候选基因

在对大白猪和长白猪的腹泻关联基因搜索后,最终分别确定了6个和8个可能与哺乳仔猪腹泻性状相关的重要候选基因。搜索到的长白猪腹泻的关联位点和基因较大白猪更多,这可能与长白猪表现出更高的腹泻评分和腹泻发生率有关。长白猪与大白猪在腹泻抗性方面确实存在遗传差异。其中在SSC8上的126 252 574 bp位置被2个品种的猪同时确定为显著位点,这说明在该位点附近搜索到的GRID2基因可能参与了2个品种的腹泻过程,但具体作用机制还有待进一步验证。与腹泻相关的多个候选基因,包括以下几个方面:

1)与细胞凋亡相关的候选基因。肠上皮细胞损伤和凋亡,导致仔猪出现腹泻、腹痛、呕吐、营养不良等一系列症状。PLA2G4A通过调节溶酶体膜通透性,从而影响细胞凋亡的进程<sup>[16]</sup>。TMC8编码的

EVER2参与诱导TNF- $\alpha$ 和TRAIL依赖性细胞凋亡,TNF是一种细胞因子,主要参与宿主对细菌、寄生虫和病毒感染的防御,这3种病原微生物都有可能引起仔猪腹泻,所以TMC8可能参与了病原微生物感染导致的腹泻过程<sup>[17]</sup>。ITM2C可以通过溶酶体途径诱导L929细胞的凋亡<sup>[18]</sup>。CHMP4B通过与染色质的结合,参与微核和其他核外染色质的自噬溶酶体降解,影响细胞凋亡<sup>[19]</sup>。CAST编码的钙蛋白酶通过参与兰尼定受体诱导细胞凋亡途径参与细胞凋亡过程<sup>[20]</sup>。同样,抗细胞凋亡因子也参与了腹泻的疾病过程。DAPK1通过抑制p38MAPK/NF- $\kappa$ B通路改善LPS诱导的小鼠的氧化应激,从而抑制自噬和凋亡过程<sup>[21]</sup>。

2)与免疫功能相关的候选基因。仔猪发生腹泻时肠道及全身的免疫系统起着不可忽视的作用。细胞免疫和体液免疫在仔猪腹泻疾病中非常重要<sup>[22]</sup>。PTPN6是CD22调节B细胞激活的重要元件之一<sup>[23]</sup>,该基因可能通过这一途径参与了腹泻过程。C1R基因编码肽酶S1蛋白家族的成员,C1RL编码的是一种丝氨酸蛋白酶,其与补体成分C1r同源,补体系统在炎症和免疫反应中起着重要作用<sup>[24]</sup>。PDE4D和IL-2、IFN- $\gamma$ 和IL-5调控因子<sup>[25]</sup>,这些因子在腹泻发生时直接参与免疫过程。HSPA4通过控制Bcl-2和IL-17的表达从而影响炎症细胞的凋亡和肠道中的免疫反应<sup>[26]</sup>。

3)与肠道屏障功能相关的候选基因。肠道屏障功能受损是腹泻发生的直接原因。PPP1R12A编码PPP1R12A亚基,参与组成肌球蛋白磷酸酶(MP),MP催化的ERM蛋白去磷酸化对LPS诱导的内皮通透性具有保护作用,该基因可能参与了肠道细胞屏障的功能运转<sup>[27]</sup>。

4)共同候选基因。GRID2编码的蛋白质是离子型谷氨酸受体家族的成员,离子型谷氨酸受体是哺乳动物大脑中主要的兴奋性神经递质受体,主要在神经系统中富集。有研究发现GRID2基因会影响小鼠肠道微生物的物种丰富度和组成,进而影响肠道微生物的功能<sup>[28]</sup>。在对肠应激的相关研究中发现GRID2可能与肠应激抗性有关<sup>[29]</sup>。这2项研究都说明了GRID2在肠道疾病中的潜在作用,是1个重要的仔猪腹泻抗性候选关联基因。

#### 3.3 连续空白SNP区域

在分析SNP分布情况时发现,质控后的SNP位点在染色体上存在部分连续区域的缺失,这可能是



由于1×的测序深度较低,基因组中部分区域较为保守,导致某些区域的遗传变异难以被检测到。

综上所述,本研究通过对仔猪腹泻进行GWAS和相关基因的通路分析,结果表明哺乳仔猪的腹泻发病是多基因参与的复杂过程,涉及包括细胞凋亡、免疫、细胞屏障和物质的跨膜运输等多个生物学过程,但其发挥的具体作用机制还有待进一步验证。

## 参考文献References

- [1] 王超,赵书红,朱猛进.猪抗病育种的相关问题及研究进展[J].中国畜牧杂志,2014,50(22):67-72.WANG C,ZHAO S H,ZHU M J.Research progress on breeding for disease resistance in pigs[J].Chinese journal of animal science,2014,50(22):67-72(in Chinese with English abstract).
- [2] 常伟.仔猪的饲养管理[J].中国畜牧兽医文摘,2014,30(11):77.CHANG W.Feeding and management of piglets[J].China animal and veterinary abstracts,2014,30(11):77(in Chinese).
- [3] KLEIN R J,ZEISS C,CHEW E Y,et al.Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration[J].Science,2005,308(5720):385-390.
- [4] WANG W,LIU Y,TANG H,et al.*ITGB5* plays a key role in *Escherichia coli* F4ac-induced diarrhea in piglets[J/OL].Front Immunol,2019,10:2834[2024-04-10].https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02834.
- [5] SCHUT C H,FARZAN A,FRASER R S,et al.Identification of single-nucleotide variants associated with susceptibility to *Salmonella* in pigs using a genome-wide association approach[J/OL].BMC Vet Res,2020,16(1):138[2024-04-10].https://doi.org/10.1186/s12917-020-02344-0.
- [6] LUO R,HUANG X,YAN Z,et al.Identification and characterization of MAPK signaling pathway genes and associated lncRNAs in the ileum of piglets infected by clostridium perfringens type C[J/OL].Biomed Res Int,2020,2020:8496872[2024-04-10].https://doi.org/10.1155/2020/8496872.
- [7] WU J,SHI X,WU L,et al.Genome-wide dna methylome and transcriptome analysis of porcine testicular cells infected with transmissible gastroenteritis virus[J/OL].Front Vet Sci,2021,8:779323[2024-04-10].https://doi.org/10.3389/fvets.2021.779323.
- [8] PENG O,WEI X,ASHRAF U,et al.Genome-wide transcriptome analysis of porcine epidemic diarrhea virus virulent or avirulent strain-infected porcine small intestinal epithelial cells[J].Virol Sin,2022,37(1):70-81.
- [9] 李星星,左涵琪,李春巧,等.氧化石墨烯基二维复合纳米片对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究[J].华中农业大学学报,2024,43(3):267-74.LI X,ZUO H Q,LI C Q,et al.Study on the inhibitory effect of graphene oxide two-dimensional composite nanosheets on porcine epidemic diarrhea virus[J].Journal of Huazhong Agricultural University,2024,43(3):267-274(in Chinese with English abstract).
- [10] 丁静,沈明霞,刘龙申,等.基于机器视觉的断奶仔猪腹泻自动识别方法[J].南京农业大学学报,2020,43(5):969-78.DING J,SHEN M X,LIU L S,et alAutomatic identification method of weaning piglets diarrhea based on machine vision[J].Journal of Nanjing Agricultural University,2020,43(5):969-978(in Chinese with English abstract).
- [11] SVENSMARK B,JORSAL S E,NIELSEN K,et al.Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds I:pre-weaning diarrhoea[J].Acta Vet Scand,1989,30(1):43-53.
- [12] FARMER C,CHARAGU P,PALIN M F.Influence of genotype on metabolic variables,colostrum and milk composition of primiparous sows[J].Canadian journal of animal science,2007,87(4):511-515.
- [13] CHENG Y,AZAD M A K,DING S,et al.Metabolomics analysis reveals the potential relationship between sow colostrum and neonatal serum metabolites in different pig breeds[J/OL].Mol Nutr Food Res,2023,67(16):e2200677[2024-04-10].https://doi.org/10.1002/mnfr.202200677.
- [14] 王书凤.哺乳仔猪消化生理特点及其腹泻防制[J].畜牧与饲料科学,2007(2):39-41.WANG S F.Digestive physiological characteristics and diarrhea control of suckling piglets[J].Animal husbandry and feed science,2007(2):39-41(in Chinese with English abstract).
- [15] 王秀静.不同无机磷源对断奶仔猪生长性能、肠道形态结构及肠道稳态的影响[D].南昌:江西农业大学,2015.WANG X J.Effects of different inorganic phosphorus sources on growth performance,intestinal morphological structure and intestinal homeostasis of weaned piglets[D].Nanchang:Jiangxi Agricultural University,2015(in Chinese with English abstract).
- [16] LOU J,WANG X,ZHANG H,et al.Inhibition of PLA2G4E/cPLA2 promotes survival of random skin flaps by alleviating lysosomal membrane permeabilization-induced necroptosis[J].Autophagy,2022,18(8):1841-1863.
- [17] GAUD G,GUILLEMOT D,JACOB Y,et al.EVER2 protein binds TRADD to promote TNF-alpha-induced apoptosis[J/OL].Cell Death Dis,2013,4(2):e499[2024-04-10].https://doi.org/10.1038/cddis.2013.27.
- [18] WU H,LIU G,LI C,et al.Bri3,a novel gene,participates in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death[J].Biochem Biophys Res Commun,2003,311(2):518-524.
- [19] SAGONA A P,NEZIS I P,STENMARK H.Association of CHMP4B and autophagy with micronuclei: implications for cataract formation[J/OL].Biomed Res Int,2014,2014:974393[2024-04-10].https://doi.org/10.1155/2014/974393.
- [20] JOHNSON J D,HAN Z,OTANI K,et al.RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets[J].J Biol Chem,2004,279(23):24794-24802.
- [21] LI T,WU Y N,WANG H,et al.DapK1 improves inflammation,oxidative stress and autophagy in LPS-induced acute lung



- injury via p38MAPK/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Mol Immunol*, 2020, 120: 13-22.
- [22] 刘果. 猪流行性腹泻病毒诱导派伊尔结内 T 细胞依赖性 IgA~+B 细胞分化的机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021. LIU G. Mechanism of porcine epidemic diarrhea virus induced T-cell-dependent IgA~+B cell differentiation in Pyl node [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [23] ALBORZIAN D A, AKATSU C, ABDU-ALLAH H H M, et al. The protein tyrosine phosphatase SHP-1 (PTPN6) but not CD45 (PTPRC) is essential for the ligand-mediated regulation of CD22 in BCR-ligated B cells [J]. *J Immunol*, 2021, 206(11): 2544-2551.
- [24] BASSIG B A, ZHENG T, ZHANG Y, et al. Polymorphisms in complement system genes and risk of non-Hodgkin lymphoma [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2012, 53(2): 145-151.
- [25] PETER D, JIN S L, CONTI M, et al. Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4<sup>+</sup> T cells: predominant role of PDE4D [J]. *J Immunol*, 2007, 178(8): 4820-4831.
- [26] RAFIEE P, THERIOT M E, NELSON V M, et al. Human esophageal microvascular endothelial cells respond to acidic pH stress by PI3K/AKT and p38 MAPK-regulated induction of Hsp70 and Hsp27 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(5): C931-C945.
- [27] KISS A, ERDODI F, LONTAY B. Myosin phosphatase: unexpected functions of a long-known enzyme [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(1): 2-15.
- [28] HUANG S, ZHANG C, XIE X, et al. GRID2 aberration leads to disturbance in neuroactive ligand-receptor interactions via changes to the species richness and composition of gut microbes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 631: 9-17.
- [29] EK W E, REZNICHENKO A, RIPKE S, et al. Exploring the genetics of irritable bowel syndrome: a GWA study in the general population and replication in multinational case-control cohorts [J]. *Gut*, 2015, 64(11): 1774-1782.

## GWAS-based screening of candidate genes and pathways for anti-diarrhea in suckling piglets

HUANG Rui<sup>1</sup>, CHEN Dong<sup>1</sup>, ZHAO Zhenjian<sup>1</sup>, SHEN Qi<sup>1</sup>, CUI Shengdi<sup>1</sup>,  
WANG Junge<sup>1</sup>, CHEN Ziyang<sup>1</sup>, WU Pingxian<sup>2</sup>, TANG Guoqing<sup>1</sup>

1. *National Key Laboratory of Swine and Poultry Seed Industry/College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University/ Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Animal Biomics/Sichuan Provincial Key Laboratory of Livestock and Poultry Genetic Resources Exploration and Innovative Utilization, Chengdu 611130, China;*  
2. *National Pig Technology Innovation Center, Chongqing 402460, China*

**Abstract** 640 piglets with diarrhea were sampled and statistically analyzed to study the genetic factors and pathways for anti-diarrhea in suckling piglets. 600 samples including 453 large white pigs, 105 landrace pigs and 42 Duroc pigs were selected for the low depth resequencing (1×). Genome-wide association study (GWAS) was conducted after the quality control of the results of sequencing. 42 and 107 significant SNPs were screened in large white pigs and landrace and pigs, respectively, with 32 and 82 genes involved at the upstream and downstream 20 kb regions of these loci. GO and KEGG enrichment analysis was performed on these genes. The results showed that 6 important candidate genes including *PLA2G4A*, *C1RL*, *PTPN6*, *C1R*, *PPP1R12A*, and *GRID2* and 8 important candidate genes including *DAPK1*, *TMC8*, *ITM2C*, *CHMP4B*, *CAST*, *PDE4D*, *HSPA4*, and *GRID2* that may be associated with diarrhea traits in suckling piglets were identified, with *GRID2* being screened simultaneously in both large white pigs and landrace pigs. It is indicated that candidate genes for diarrhea in piglets are associated with functions related to cell apoptosis, immunity, cell barrier, and transmembrane transport of substances.

**Keywords** suckling piglets; genome-wide association study (GWAS); diarrhea; anti-diarrhea; gene; pathway

(责任编辑: 赵琳琳)