

PPV 感染 PK-15 细胞后对 4 种抗病毒细胞因子 mRNA 转录时相的影响

耿静微¹, 李厚伟², 尹海燕³, 陈红英², 李金磊¹, 韩志涛¹, 崔保安¹, 魏战勇¹

(1 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002; 2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002;

3 河南省农业科学院 农业质量标准与检测技术研究中心, 河南 郑州 450002)

[摘要] **【目的】**了解猪细小病毒(PPV)感染对抗病毒相关细胞因子 mRNA 转录时相的影响, 探讨宿主-病毒之间的作用关系。**【方法】**对 PPV 感染 PK-15 细胞的病变进行了显微观察, 运用荧光定量 PCR 技术, 测定和分析 PPV 感染 PK-15 细胞后, 细胞病毒 DNA 含量及巨噬细胞炎症蛋白 1 α (MIP-1 α)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、磷酸甘油酸激酶 1(PGK1)和 MURR1 等细胞因子 mRNA 相对表达量的变化。**【结果】**PPV 可以快速诱导 PK-15 细胞产生细胞病变。感染后 1 h 即可检测到 PPV DNA, 随着时间的延长, PPV DNA 含量逐渐增加, 并于 48 h 时达到峰值, 相对含量为 1 800 左右。MIP-1 α 和 PGK1 mRNA 的相对表达量在感染后 2 h 显著增加, 之后下降; TGF- β 1 mRNA 的相对表达量在 72 h 时显著增加; MURR1 mRNA 的相对表达量在 24 h 时显著增加, 48 h 后下降。**【结论】**PPV 感染可引起 PK-15 细胞抗病毒因子 mRNA 表达水平升高。

[关键词] 猪细小病毒; 细胞因子; PK-15 细胞; 转录时相

[中图分类号] S858.28; Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)02-0017-06

Transcriptional profiles of four kinds of antiviral cytokines mRNA on PK-15 cell cultures following infection with *Porcine parvovirus*

GENG Jing-wei¹, LI Hou-wei², YIN Hai-yan³, CHEN Hong-ying², LI Jin-lei¹,
HAN Zhi-tao¹, CUI Bao-an¹, WEI Zhan-yong¹

(1 Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

3 Henan Province Academy of Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research Center,
Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: **【Objective】**The study was done to survey the transcriptional profiles of cytokines, particularly antiviral cytokines mRNA transcriptional profiles of *Porcine parvovirus* infection, and the host-PPV interaction. **【Method】**We used PPV to infect the Porcine Kidney-15 cells, observed the PK-15 cells of inoculation PPV by microscope, measured and analyzed the viral DNA using real-time PCR. We also detected the transcript levels of cytokines MIP-1 α , TGF- β 1, PGK1 and MURR1 by real-time PCR. **【Result】**PPV can induce cytopathic effect in PK-15 cells. The cells can be detected with PPV on 1 h postinoculation(p. i.), and the relative content of PPV DNA achieved 1 800 on 48 h p. i.. We found that the transcript levels of MIP-1 α and PGK1 increased obviously on 2 h p. i., then decreased, the transcript level of TGF- β 1 increased obviously on 72 h p. i., the transcript level of MURR1 increased obviously on 24 h p. i., then decreased after 48 h p. i.. **【Conclusion】**The levels of antiviral cytokines increased when PPV infected PK-15 cell.

* [收稿日期] 2010-07-22

[基金项目] 河南省杰出人才创新基金项目(0621002100)

[作者简介] 耿静微(1984—), 女, 河南郑州人, 在读硕士, 主要从事动物分子免疫学研究。

[通信作者] 魏战勇(1975—), 男, 河南安阳人, 副教授, 主要从事动物分子免疫学研究。E-mail: weizhanyong@henau.edu.cn

Key words: *Porcine parvovirus*; cytokines; PK-15 cell; transcriptional profiles

猪细小病毒(*Porcine parvovirus*, PPV)是引起妊娠母猪繁殖障碍的主要病原体之一。初产妊娠母猪感染后,经胎盘侵袭胚胎或胎儿,引起母猪流产、胚胎死亡、胎儿畸形及木乃伊化,致使母猪不孕或反复发情,同时还可引起仔猪发生皮炎和腹泻^[1]。猪细小病毒在猪群中检出率甚高,在猪群中的血清抗体阳性率达 50%~80%,给养猪业带来了巨大的经济损失^[2]。

巨噬细胞炎症蛋白 1 α (MIP-1 α)在炎症反应、清除病原体、细胞生长和分化及直接抑菌方面起着重要的作用^[3-4]。转化生长因子 β 1(TGF- β 1)为多效能细胞因子,在诱导细胞凋亡、调控细胞的分化与增殖以及免疫应答方面有重要作用,而且广泛参与多种疾病的发生和发展过程^[5]。MURR1 是新近发现的具有直接抗病毒活性的小分子蛋白质^[6],在免疫、细胞凋亡、调节细胞周期等方面也具有重要作用。目前,关于 PPV 感染引起细胞的反应,特别是其对细胞因子分泌的影响尚不清楚。本试验利用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法,分 5 个时间点定量检测 PPV 感染 PK-15 细胞后 MIP-1 α 、TGF- β 1、磷酸甘油酸激酶 1(PGK1)和 MURR1 等细胞因子 mRNA 的表达情况,以期对上述细胞因子的抗病毒机制研究提供理论参考和试验依据,并为 PPV 的预防控制提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 猪细小病毒 7909 标准毒株(PPV-7909)购自中国兽药监察所,病毒滴度为 $10^{6.1}$ TCID₅₀/mL。

1.1.2 细胞 猪肾细胞 PK-15(Porcine Kidney-15 cells)由中国兽药监察所提供,细胞生长于含体积分数 7%新生犊牛血清的 RPMI-1640 培养基中,在 37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养。

1.1.3 主要试剂 主要试剂有 Protein K(Pro-mega 公司)、RPMI-1640 培养基(GIBCOBR 公司)、Trypsin(Invitrogen)、胎牛血清(Hyclone 公司)、E. Z. N. A Total RNA Kit I(OMEGA)、SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa)、RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI Fermentas)。其他常规试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器 主要仪器有 CFX96 Real-Time

PCR 仪(BioRad 公司)、台式高速低温离心机(德国 Sigma 公司)、PTC-200 型 PCR 仪(M J Research 公司)、紫外凝胶成像系统(美国 SIM 公司)、小型台式离心机(德国 Sigma 公司)。

1.2 病毒感染

将 PK-15 细胞用胰酶分散后,接种 6 孔培养板(2×10^5 个/孔)培养,待细胞融合度达 80%以上时,用 PBS 洗 2 次,将 PPV 接种于 PK-15 细胞(感染复数 MOI=1),吸附 60 min,期间每隔 15 min 翻转 1 次,洗去未吸附的病毒,添加含体积分数 2%胎牛血清的 1640 维持液,逐日观察细胞病变情况。

1.3 细胞的收集

分别将病毒感染后 0(未感染的 PK-15 细胞,即对照组细胞),1,2,3,12,24,48 和 72 h 的细胞用 PBS 洗 2 次,添加 2.5 g/L 胰酶消化细胞,2 000 g 离心 10 min 收集 PK-15 细胞,−80℃保存备用。

1.4 DNA 及 RNA 的提取和反转录

采用蛋白酶 K 法提取病毒 DNA,参照 E. Z. N. A Total RNA Kit I 说明书提取细胞总 RNA,具体方法和步骤参照文献[7]进行。以提取的总 RNA 为模板进行反转录,将反转录合成的 cDNA 及提取的 DNA 作为荧光定量 PCR 模板。

1.5 荧光定量 PCR

参照 GenBank 公布序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。

以 β actin 基因为持家基因,进行荧光定量 PCR 反应,反应体系为 20 μ L,其中 SYBR Premix Ex Taq 10 μ L,上、下游引物(10 pmol/L)各 0.4 μ L, cDNA (43.5 ng/ μ L) 9.2 μ L。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 10 s,退火 15 s(退火温度因引物而异),72℃ 30 s,共进行 40 个循环;循环结束后升温至 95℃ 30 s,再降至 55℃,开始以 0.5℃/s 递增至 95℃,采集荧光信号得出扩增产物的溶解曲线,于 10℃时结束反应。

1.6 数据分析

在荧光定量 PCR 中,循环阈值(*Ct*)是反映模板中目标基因含量的一个重要指标,通过比较样品和标准曲线 *Ct* 值,可以准确计算出 RNA 含量。另外,将目标基因与持家基因 β actin 比较,消除由于收集细胞、反转录和加样中操作产生的误差。将 0 h 未接种病毒的细胞因子的 mRNA 含量设为 1 $\times$,使用 CFX96 Real-Time PCR 软件分析不同细胞因子

mRNA 含量相对于 0 h mRNA 含量的变化,即为 mRNA 相对表达量。

表 1 Real-time PCR 引物及其反应条件

Table 1 Primers and conditions used for Real-time PCR assays

引物 Primer	参考序列 GenBank 登录号 Accession number in GenBank	上游引物序列(5'→3') Forward primer	下游引物序列(5'→3') Reverse primer	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增长度/bp Size of amplicon
PPV	NC001560	AGTTCAATGATTCAATG	TTAACCAACATTCCCAT	56	203
β-actin	AF508792	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	GCACCGTGTTGGCGTAGAGG	55	254
MIP-1α	AY643423	GGCCTGCTGCTTCTCCTA	GCATTCAAGCTCCAGGTCAG	60	183
TGF-β1	NM214015	CCTTCCTGCTCCTCATG	TCGGGTGTGTGCTGGTTG	58	279
PGK1	AY677198	TAAGGTGCTCAACAACATG	TAAATACGCCCACAGGTC	55	296
MURR1	CV873378	TTCAGATTCTGCCCCTT	TTGGAAGACCCATAAGACA	58	182

2 结果与分析

2.1 PPV 感染 PK-15 细胞的病变观察

显微观察结果(图 1)显示,PPV 可以快速诱导

PK-15 细胞产生细胞病变(CPE),主要表现为细胞体积缩小,胞浆浓缩,染色质凝集,核固缩、裂解,质膜内陷将细胞分裂为有膜包裹但内含物不能外泄的凋亡小体。

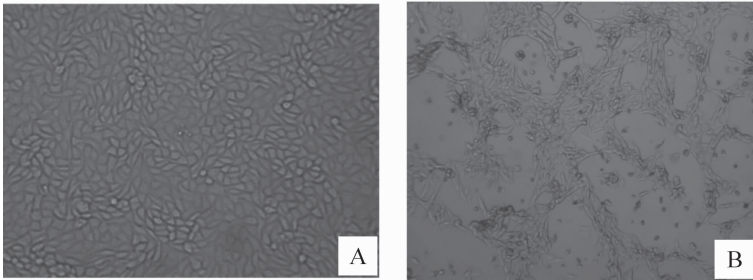


图 1 PPV 感染 PK-15 细胞的显微观察(100×)

A. 正常的 PK-15 细胞;B. 感染 PPV 48 h 的 PK-15 细胞

Fig. 1 Microexamination of PK-15 cells of inoculation PPV(100×)

A. Normal PK-15 cells;B. 48 h of PK-15 cells of inoculation PPV

2.2 PPV DNA 相对含量的变化

PK-15 单层细胞感染 PPV 后,分别在 0,1,2,3,12,24,48,72 h 收集细胞,提取 DNA 进行荧光定量 PCR,与 $\beta actin$ 基因进行比较分析,并将 PPV 感染后 1 h 时 PPV DNA 含量定义为 1×,可得出不同时间 PPV DNA 在细胞中的相对含量(图 2)。

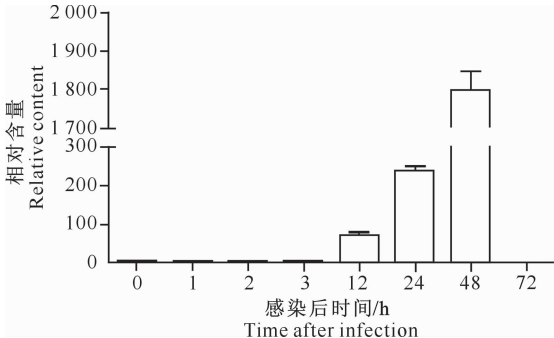


图 2 感染 PK-15 细胞后 PPV DNA 相对含量的变化

Fig. 2 Changes of relative content of

PPV DNA in PK-15 cell

由图 2 可知,PPV 感染后 1 h 时,可以检测到

PPV DNA,但 PPV DNA 相对含量较低;随着时间的延长,在感染后 12 h PPV 开始迅速大量增殖,DNA 相对含量逐渐增加,48 h 时达到最高峰,为 1 800 左右。

2.3 4 种抗病毒细胞因子 mRNA 相对表达量的变化

分别于 PK-15 单层细胞感染 PPV 后 0,1,2,12,24,48,72 h 收集细胞,提取 RNA,反转录获得 cDNA,进行荧光定量 PCR,与 $\beta actin$ 基因进行比较分析,并以病毒感染 0 h 时 mRNA 含量为 1×,得到不同时间各细胞因子 mRNA 的相对表达量,结果见图 3。由图 3 可知,MIP-1α mRNA 在 PPV 感染 PK-15 细胞后 1 h 即开始大量表达,在感染后 2 h 达到峰值,其相对表达量是对照组细胞的 13 倍;TGF-β1 mRNA 在感染后 1 h 开始少量表达,在感染后 72 h 相对表达量是对照组细胞的 8.8 倍,而在其余时间点相对表达量均无显著变化;PGK1 mRNA 在感染后 2 h 的相对表达量最大,是对照组细胞的 95 倍,随后相对表达量开始下降,但仍高于对

照组细胞;MURR1 mRNA 在感染后 2 h 即开始表达,12 h 时其相对表达量是对照组细胞的 81 倍,24 h 时相对表达量是对照组细胞的 301 倍,48 h 时相

对表达量仍是对照组细胞的 12 倍,至 72 h 时相对表达量较低,与对照组细胞相比差异较小。

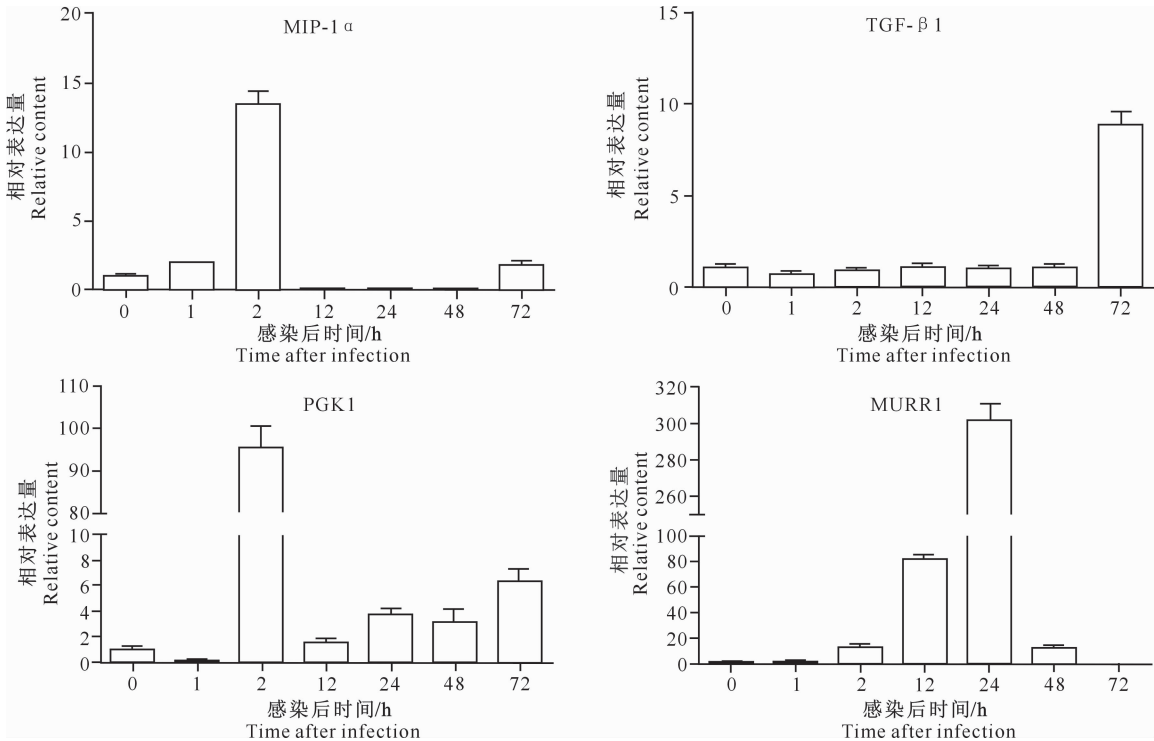


图 3 PPV 对 MIP-1 α 、TGF- β 1、PGK1 和 MURR1 mRNA 转录时相的影响
Fig. 3 Effect of PPV on transcriptional profiles of MIP-1 α 、TGF- β 1、PGK1 and MURR1

3 讨 论

PPV 可以在多数原代和传代细胞中增殖,且能引起较明显的细胞病变,常作为模式病毒用于病毒感染机制和药物的抗病毒作用研究。本研究结果表明,PPV 可以快速诱导 PK-15 细胞产生 CPE,表现为细胞体积缩小,胞浆浓缩,染色质凝集,核固缩、裂解,质膜内陷将细胞分裂为有膜包裹但内含物不能外泄的凋亡小体。PPV 在感染后 1 h 即能被检测到,12 h 开始大量增殖,48 h 达最高峰,此时其 DNA 相对含量是感染 1 h 时的 1 800 倍左右,这可能是由于病毒大量增殖,引起细胞死亡,导致病毒释放所致。

细胞因子的主要活性是促进先天和后天的免疫调节性炎症应答,在宿主防御中起着至关重要的作用,但其含量过多或出现在不适当的自身免疫应答反应过程中,则有破坏自身的作用。作为宿主防御的重要参与者,越来越多的细胞因子成为研究的热点。本试验应用荧光定量 PCR,首次定量研究了参与抗病毒感染机制的部分细胞因子 mRNA 的转录时相,为更深入地研究细胞因子的抗病毒机制以及

PPV 的致病机理提供了科学依据。

MIP-1 α 是由多种白细胞和其他类型细胞产生的趋化因子 CC 亚族成员,在激活单核细胞,促进体液和细胞介导免疫反应,诱导过氧化物生成,防御病毒感染中起着关键的作用^[8-9]。Cocchi 等^[10]研究发现,MIP-1 α 能阻止 HIV-1 对单核细胞系的感染;Choi 等^[11]在 31 例多发性骨髓瘤(MM)患者中发现,在活跃期的 MM(active MM)患者中,骨髓 MIP-1 α 的表达增加比例达到了 62.0%,而稳定期患者中该比例仅为 17.0%。本研究发现,PPV 感染 PK-15 细胞后 1 h,MIP-1 α mRNA 即开始大量表达,2 h 时 mRNA 的相对表达量达到峰值,12 h 之后 MIP-1 α mRNA 的相对表达量与对照组细胞无显著差异。表明 MIP-1 α 在 PPV 感染早期即发挥抑制病毒复制的生物学效应,随着感染程度的加剧,MIP-1 α 基因的表达量反而下降,进一步证实了 MIP-1 α 在感染早期能够有效阻止病原微生物的入侵和抑制病毒的复制。

TGF- β 1 是一种多功能细胞因子,具有调节生长和各种类型细胞分化的作用,而且还具有促炎和抑制免疫力的作用。许多正常的细胞和组织组成型

表达 TGF- β 1 并且在受到刺激时表达量增加^[12-13]。TGF- β 1 参与调控体内生理生化反应、细胞分化和增殖以及多种抗细胞效应,从整体水平看,它抑制免疫系统;从局部水平看,它刺激免疫应答和炎症反应^[14]。Wang 等^[15]利用腺病毒 31、7b 攻击人胚肺成纤维细胞后,经 ELISA 检测发现,细胞上清液中 TGF- β 1 的含量显著高于正常对照组,证实腺病毒感染可显著上调 TGF- β 1 mRNA 的表达量,同时也说明了 TGF- β 1 参与了腺病毒肺炎的发病过程。本研究发现,PPV 感染 PK-15 细胞后 72 h 时,TGF- β 1 mRNA 的相对表达量才显著增加,72 h 之前并无明显变化。这一结果提示,PPV 感染 PK-15 细胞后早期 TGF- β 1 发挥其抑制细胞免疫力的作用,在感染后期其参与 PPV 的发病过程。但是 PPV 发病机理复杂,细胞的抗病毒感染效应也是多种细胞因子共同作用的结果,TGF- β 1 究竟通过何种途径发挥其生物学功能尚需进行更深入的研究。

PGK1 存在于所有的有机生命中并高度保守,不仅是糖酵解的关键酶之一,而且是生物赖以生存的必需酶之一,如果缺乏 PGK1 则可引起机体代谢紊乱^[16]。此外 PGK1 对哺乳动物细胞核内 DNA 的复制和修复具有调控功能,其表达水平的高低也可反映肿瘤的预后情况,如在肺腺癌患者的肿瘤组织中,PGK1 的表达量越高,则患者的预后性越差^[17]。有研究表明,如果 PGK1 的表达量增加,人卵巢癌细胞会明显抵抗抑癌药物紫杉醇的疗效^[18]。本研究发现,PPV 感染 PK-15 细胞后 2 h PGK1 mRNA 相对表达量显著增加,是对照组细胞的 95 倍,随着时间的延长,PGK1 mRNA 的相对表达量下降,但仍然高于对照组细胞。表明 PGK1 参与机体抗病毒感染过程,其表达情况可能与感染程度有密切关系,PGK1 是否具有抗病毒作用尚需进一步试验证实。由于 PGK1 是多功能的效应分子,目前的研究仅局限在其糖酵解功能,本试验为探索和发掘 PGK1 其他生物学功能提供了参考。

MURR1 是最近发现的一种多功能蛋白,可于所有的细胞和组织中表达^[19],其主要功能是调节核转录因子 NF- κ B 和控制铜代谢^[20];此外,在自然免疫、主动免疫、细胞凋亡、调节细胞周期以及抑制肿瘤的发展方面均具有显著作用^[21]。Burstein 等^[22]报道,MURR1 能通过抑制 NF- κ B 的活性进而抑制 HIV-1 在 CD4⁺淋巴细胞上的复制和增殖。本研究发现,PPV 感染 PK-15 细胞后 2 h 时,MURR1 mRNA 的相对表达量显著增加,在 24 h 达到峰值,为

对照组细胞的 301 倍,随后相对表达量下降,72 h 时与对照组细胞无显著差异。因此推测,PPV 感染 PK-15 细胞后,MURR1 可直接抑制 NF- κ B 的活性进而抑制 PPV 的增殖,在病毒感染早期及中期参与了细胞的免疫反应。

本试验利用荧光定量 PCR,测定和分析了 PPV 感染 PK-15 细胞后细胞因子 mRNA 表达量的变化情况,结果表明,PPV 感染后可引起 MIP-1 α 、TGF- β 1、PGK1 和 MURR1 细胞因子 mRNA 相对表达量增加,这为今后疫苗的细胞免疫效果评价,及 PPV 分子致病机制和药物抗病毒的药效机制研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:1148-1182.
Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press Publishing Company, 1997:1148-1182. (in Chinese)
- [2] Letchworth G J, Rodriguez L L, Delcarrera J. Vesicular stomatitis [J]. Veterinary Journal, 1999, 157(3): 239-260.
- [3] Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity [J]. Adv Immunol, 2001, 78: 57-110.
- [4] Cascieri M A, Springer M S. The chemokine/chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention [J]. Curr Opin Chem Bio, 2000, 4(4): 420-427.
- [5] Ramont L, Pasco S, Hornebeck W, et al. Transforming growth factor- β 1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system [J]. Exp Cell Res, 2003, 291(1): 1-10.
- [6] Klomp A E, Van De Sluis B, Klomp L W, et al. The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis [J]. J Hepatol, 2003, 39(5): 703-709.
- [7] 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京:科学出版社, 2002:463-471.
Joseph S, David W R. Molecular cloning laboratory manual [M]. 3rd ed. Huang P T, translation. Beijing: Science Press Publishing Company, 2002:463-471. (in Chinese)
- [8] Kukita T, Nomiyama H, Ohmoto Y, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment [J]. Lab Invest, 1997, 76(3): 399-406.
- [9] Nakashima E, Oya A, Kubota Y, et al. A candidate for cancer gene therapy: MIP-1 α gene transfer to an adenocarcinoma cell line reduced tumorigenicity and induced protective immunity in immunocompetent mice [J]. Pharm Res, 1996, 13(12): 1896-1901.
- [10] Cocchi F, De Vico A L, Garzino-Demo A, et al. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells [J]. Science, 1995, 270: 1811-1815.

- [11] Choi S J, Cruz J C, Craig F, et al. Macrophage inflammatory protein 1- α is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2000, 96(2): 671-675.
- [12] Atamas S P, White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(6): 537-550.
- [13] Massague J, Blain S W, Lo R S. TGF- β signaling in growth control, review cancer, and heritable disorders [J]. *Cell*, 2000, 103: 295-309.
- [14] Derynck R, Akhurst R J, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression [J]. *Nature Genet*, 2001, 29: 117-129.
- [15] Wang W G, Chen S W, Wang S C. Effect of qingfei oral liquid on transforming growth factor- β 1 and platelet-derived growth factor-BB mRNA gene expression of human embryonic lung fibroblast cells infected by adenovirus type 31 and 7b [J]. *Chinese Journal of Information on TCM*, 2009, 16(7): 33-35.
- [16] 吴 德, 吴忠道, 余新炳. 磷酸甘油酸激酶的研究进展 [J]. *中国热带医学*, 2005, 5(2): 385-387.
Wu D, Wu Z D, Yu X B. Advance in the research of phosphoglycerate kinase [J]. *China Tropical Medicine*, 2005, 5(2): 385-387. (in Chinese)
- [17] Chen G, Gharib T G, Wang H, et al. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma [J]. *Proc Natl Acad USA*, 2003, 100(23): 13537-13542.
- [18] Duan Z, Lamendola D E, Yusuf R Z, et al. Overexpression of human phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) induces a multi-drug resistance phenotype [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(4): 1933-1941.
- [19] Stuehler B, Reichert J, Stremmel W, et al. Analysis of the human homologue of the canine copper toxicosis gene MURR1 in Wilson disease patients [J]. *J Mol Med*, 2004, 82(9): 629-634.
- [20] Van De Sluis B, Rothuizen J, Pearson P L, et al. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(2): 165-173.
- [21] Tao T Y, Liu F L, Klomp L, et al. The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 41593-41596.
- [22] Burstein E, Hoberg J E, Wilkinson A S, et al. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23): 22222-22232.

(上接第 16 页)

- [4] 高志强, 郭 鑫, 杨汉春, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒缺失变异株的基因组特征 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 578-584.
Gao Z Q, Guo X, Yang H C, et al. Genomic characterization of a mutant of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with deletion [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(6): 578-584. (in Chinese)
- [5] Snijder E J, Meulenberg J J. The molecular biology of arteriviruses [J]. *Gen Virol*, 1998, 79: 961-979.
- [6] Allende R, Kutish G F, Laegreid W, et al. Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype [J]. *Archives of Virology*, 2006, 145: 1149-1161.
- [7] 王 波, 张 鹏, 杨增岐, 等. 陕西省 PRRSV 与 CSFV、PCV2、PRV 混合感染的检测 [J]. *西北农业学报*, 2009, 18(5): 27-30.
Wang B, Zhang P, Yang Z Q, et al. Detections of the Co-infection of PRRSV, CSFV, PCV2 and PRV in Shaanxi Province [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18(5): 27-30. (in Chinese)
- [8] Gerald R, Christina F, Sebastian B, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in wild boars [J]. *Veterinary microbiology*, 2009, 136: 250-258.
- [9] Tian K G, Yu X L, Zhao T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants; unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. *Plosone*, 2007, 2(6): e526.
- [10] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome [J]. *China Emerg Infect Dis*, 2007, 13(9): 1434-1436.
- [11] Tong G Z, An T Q, Tian Z J, et al. Origin of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *China. Emerging Infectious Diseases*, 2010, 2(16): 365-367.
- [12] Byunghoon K, Israrul H A, Asit K P, et al. Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones [J]. *Virology*, 2008, 380(2): 371-378.
- [13] Zhou L, Zhang J L, Yang H C. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and rRespiratory sSyndrome virus emerging in China is not related to its virulence [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(10): 5156-5167.