

分类号: S858.99
密级: 公开

单位代码: 10193
学号: 20160923



吉林农业大学

博士学位论文

我国AMD流行情况分析及水貂Syk基因参与AMDV体外感染的ADE
机制探究

**Analysis of the prevalence of AMD in China and mechanism research on
ADE of mink Syk gene involved AMDV infection in vitro**

作者姓名: 宫庆龙

学位类别: 农学博士

专业名称: 预防兽医学

研究方向: 经济动物疫病

指导教师: 杜锐 教授

所在学院: 动物科学技术学院

2021年 05 月

水貂阿留申病 (Aleutian Mink Disease, AMD) 又名浆细胞增多症, 是由细小病毒科细小病毒属的水貂阿留申病毒 (Aleutian Mink Disease virus, AMDV) 引起的一种急性或慢性传染性疾病, 主要侵害水貂单核-巨噬细胞。AMD 是毛皮动物三大疫病之一, 在全世界水貂养殖场中均有分布, 造成严重的经济损失。AMDV 感染过程中存在较强的抗体依赖性增强 (Antibody-dependent enhancement, ADE) 效应, 产生的大量抗体不能中和 AMDV, 反而促进病毒内化至巨噬细胞并加重感染, 至今没有针对性药物及获批疫苗。脾酪氨酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk) 广泛表达于淋巴细胞、造血细胞及成纤维细胞等, 不仅在某些疾病的致病机制和细胞信号转导中起到关键作用, 而且作为 Fc γ R 受体家族介导的巨噬细胞内吞通路中的上游基因, 亦可调节巨噬细胞的吞噬作用。为了明确 AMD 在我国的流行情况, 探究 AMDV 感染过程中的 ADE 机制, 进行了如下研究:

1. 我国 AMD 流行情况的调查分析

为了深入了解 AMD 在我国的分布情况, 对过去 40 年 (1981-2019) 的 AMD 阳性率进行 meta 分析及流行病学调查:

(1) 首先应用 meta 分析对 1981 年至 2017 年发表的有关国内 AMDV 的流行病学调查文章进行系统评价。结果表明, 1981 年至 2017 年间我国 AMD 流行率从 1981-2009 年间的 48.0% 上升到 2010-2017 年间的 61.4%, 总阳性率高达 55.3%; 亚组分析发现, AMD 的流行趋势呈地区多样性分布。华中地区及东北地区 AMDV 阳性率分别为 69.8% 和 61.3%; 江苏省的 AMDV 阳性率最高, 高达 96.0%, 陕西省阳性率最低, 为 22.1%。年龄亚组发现成年貂的 AMDV 阳性率高于幼年貂; 检测方法亚组中, 酶联免疫吸附剂测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法测得的阳性率最高, 为 76.4%。Meta 分析结果表明, AMDV 在我国貂场严重流行。

(2) 基于上述 meta 分析结果, 为进一步了解我国东北部分地区 AMD 流行现状, 对 2019 年中国东北部分地区 (吉林省左家镇、黑龙江省帽儿山镇和黑龙江省集贤县) AMD 流行情况进行调查。结果表明, 2019 年东北部分地区的 AMDV 总体阳性率为 46.8%, 不同地区之间差异显著 ($P < 0.05$)。多变量分析结果显示, 季节和水貂的年龄可能是 AMDV 感染的潜在风险因素 ($P < 0.05$)。综合 meta 分析结果可知, 目前东北部分地区的 AMDV 阳性率虽低于我国 AMDV 总阳性率, 但流行情况仍较为严峻。

2. 水貂 Syk 基因调控 AMDV 体外感染的 ADE 机制探究

为了缓解我国 AMDV 感染情况, 对 AMDV 感染过程中的 ADE 机制进行深入研究, 以期改善 AMDV 无特效药物及疫苗的现状:

(1) 使用水貂外周血单核-巨噬细胞构建了 AMDV 感染水貂的 ADE 机制体外研究模型: 试验组为 AMDV 强毒株 AMDV-DL125 与 AMDV 阳性血清共孵育以形成抗原-抗体复合物 (AMDV-DL125PS 组), 对照组为 AMDV-DL125 与阴性血清共孵育 (AMDV-DL125NS 组), 两组分别感染分离纯化的水貂外周血单核-巨噬细胞 12 h。使用荧光定量检测 0-12 h

AMDV-DL125 复制情况,结果显示,培养 8-12 h 的 AMDV-DL125PS 组的病毒拷贝数及 AMDV VP2 基因表达量均高于 AMDV-DL125NS 组 ($P < 0.05$),说明抗原-抗体复合物加强了 AMDV-DL125 的复制能力;间接免疫荧光结果显示,在抗原-抗体复合物存在的条件下,AMDV-DL125 更容易侵入单核-巨噬细胞中;对 ADE 相关细胞因子进行 qRT-PCR 检测,发现抗病毒细胞因子受体 interferon-gamma receptor 1 (IFN- γ R1)、interleukin 2 receptor gamma (IL-2R γ)、interleukin 18 (IL-18)、tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) 和 tumor necrosis factor receptor 2 (TNF-R2) 表达量上调,interleukin 6 (IL-6) 表达量下调;对 ADE 相关基因进行 qRT-PCR 检测,结果细胞因子信号抑制物 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS 1)、维甲酸诱导基因蛋白 I (RIG-I)、TNFRs 及 TRAFs 基因表达量上调,而 JAK-1 及 MDA-5 基因表达量下调。此研究模型初步证实了 AMDV-DL125 感染水貂外周血单核-巨噬细胞过程中存在依赖抗原-抗体复合物的 ADE 效应。

(2) 对上述试验构建的 ADE 体外研究模型进行全转录组高通量测序,发现大量差异表达基因,其中 mRNA 2658 个, lncRNA 2588 个, miRNA 1428 个;发现存在互作调控的基因 554 对;GO 富集发现代谢过程 (Metabolic process)、结合 (Binding)、细胞骨架 (Cytoskeleton) 等功能被显著富集;KEGG 通路富集发现 Fc γ R 受体家族介导的巨噬细胞内吞 (Fc gamma R-mediated phagocytosis)、吞噬体 (Phagosome)、胞吞 (Endocytosis)、NF- κ B、MAPK、ToLL 样受体及 PI3K 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等通路被显著富集。进一步研究发现位于 Fc γ R 受体家族介导的巨噬细胞内吞通路的上游基因 Syk 表达量显著上调,预测其可能是感染过程中调控 ADE 机制的关键基因。此外,通过 qRT-PCR 技术验证了部分差异基因相对表达量,证明测序结果准确。

(3) 为验证 Syk 基因对 AMDV 感染过程中 ADE 机制的调控作用,构建了 pcDNA3.1-Syk 过表达载体及 siRNA-Syk 以干预水貂外周血单核细胞中 Syk 基因的表达;联合抗原-抗体复合物共培养 12 h 后,发现相比于对照组,过表达 Syk 组的 AMDV-DL125 拷贝数显著增加,而抑制表达组病毒拷贝数显著降低;间接免疫荧光结果显示过表达 Syk 组的单核细胞更容易被病毒侵入;ADE 相关细胞因子的 qRT-PCR 结果显示当过表达 Syk 时,IL-10 表达量上调,进一步介导 ADE 作用;而抗病毒因子受体 (IFN- γ R1、TNF-R1 及 TNF-R2) 表达量升高,说明病毒处于活跃状态;抑制 Syk 表达时,IL-10 表达量下调,ADE 作用减轻;由于更少的病毒进入细胞内部,因此抗病毒因子受体表达量降低。上述试验表明 Syk 参与了 AMDV 感染过程中的 ADE 效应。

本研究评估了 AMDV 在国内的流行情况,并初步探究了 AMDV 感染过程中存在的 ADE 机制,为国内 AMDV 的防控提供了合理建议,为进一步探索 AMDV 感染机制提供了研究思路,为 AMDV 疫苗的研制奠定理论基础。

关键词: 水貂阿留申病; meta 分析; 抗体依赖性增强; 全转录组学; 脾酪氨酸激酶

Abstract

Aleutian Mink Disease (AMD), also known as plasmacytosis, is an acute or chronic infectious disease caused by Aleutian mink disease virus (AMDV), a member of the parvoviridae family, which mainly damages monocyte-macrophages of mink. AMD is one of the three major epidemics of fur animals and is found in mink farms worldwide, causing serious economic losses. Due to the strong antibody-dependent enhancement (ADE) effect during the process of infection, the large number of antibodies can not neutralize AMDV, but promote the internalization of the virus into macrophages and aggravate the infection, therefore, there is no targeted drug and approved vaccine so far. Spleen tyrosine kinase (Syk) is widely expressed in lymphocytes, hematopoietic cells and fibroblasts, etc. It not only plays a key role in the pathogenesis of certain diseases and cell signal transduction, but also acts as an upstream gene in the macrophage endocytosis pathway mediated by the FcγR receptor family, and it can also regulate the phagocytosis of macrophages. In order to clarify the prevalence of mink Aleutian in China and to explore the AMD mechanisms in the process of AMDV infection, the following studies were carried out:

1. Investigation and Analysis on the prevalence of AMD in China

To further explore the distribution of AMD in China, we conducted a meta-analysis and epidemiological survey of AMD positive rates over the past 40 years (1981-2019):

(1) A meta-analysis was applied to systematically evaluate the epidemiological survey articles on domestic AMD published from 1981 to 2017. The results showed that the prevalence of AMDV in China increased from 48.0% between 1981 and 2009 to 61.4% between 2010 and 2017, with an overall positive rate of 55.3% between 1981 and 2017. Subgroup analysis revealed a regionally diverse distribution of AMD prevalence trends. The prevalence of AMDV in Central China and Northeastern China were 69.8% and 61.3%, respectively. Jiangsu Province had the highest AMDV positive rate, as high as 96.0%, and that in Shanxi Province was the lowest at 22.1%. Age subgroup revealed that the prevalence of AMDV in adult minks was higher than that in juvenile minks. The prevalence measured by ELISA method was 76.4%, reaching the highest. The results of meta-analysis indicated that AMDV was seriously prevalent in mink farms in China.

(2) Based on the the above meta-analysis results, for further explore the current status of AMD prevalence in parts of Northeast China, a survey was conducted on the prevalence of AMD in parts of Northeastern China (Zuojia town, Jilin Province; Maoershan town, Heilongjiang Province; and Jixian county, Heilongjiang Province) in 2019. The results showed that the overall prevalence of AMDV in 2019 in parts of Northeast China was 46.8%, with significant differences between different regions ($P < 0.05$). According to the results of multivariate analysis, age of mink and sampling season may be the potential risk factors of AMDV infection (P

< 0.05). Combined with the results of meta-analysis, although the current prevalence of AMDV in parts of Northeast China is lower than the total positive rate of AMDV in China, the epidemic situation is still relatively serious.

2. Mechanism research on ADE by mink Syk gene regulating AMDV infection in vitro

In order to alleviate the situation of AMDV infection in China, an in-depth study of the ADE mechanism in the course of AMDV infection was conducted with the aim of improving the status of no specific drugs and vaccines for AMDV.

(1) An in vitro model of ADE mechanism of AMDV infection in mink was constructed using peripheral blood monocyte-macrophages. In the test group, AMDV-DL125, a strong strain of AMDV, was co-incubated with AMDV-positive sera to form antigen-antibody complexes (AMDV-DL125PS group). In the control group, AMDV-DL125 was co-incubated with negative sera (AMDV-DL125NS group). Both groups were infected the isolated and purified mink peripheral blood monocytes-macrophages for 12 h. QPCR was use to detect the replication of AMDV-DL125 during 0-12 h, the results showed that the virus copy number and AMDV VP2 gene expression in AMDV-DL125PS group cultured for 8-12 h were higher than those in AMDV-DL125NS group, which showed that the antigen-antibody complex strengthens the replication ability of AMDV-DL125. Indirect immunofluorescence results showed that AMDV-DL125 was more likely to invade monocyte-macrophages in the presence of antigen-antibody complexes. The results of qRT-PCR for ADE-related cytokines revealed that the expressions of IFN- γ R1, IL-2R γ , IL-18, TNF-R1 and TNF-R2 were upregulated while IL-6 was downregulated. ADE related genes were detected by qRT-PCR, and the expressions of SOCS 1, RIG-I, TNFRs and TRAFs were upregulated, while the expressions of JAK-1 and MDA-5 were downregulated. This sresearch model preliminarily confirmed that the ADE effect of AMDV-DL125 was dependent on antigen-antibody complex during the infection of mink peripheral blood monocyte-macrophages.

(2) The whole transcriptome high-throughput sequencing of the ADE in vitro research model constructed by the above experiment revealed a large number of differentially expressed genes, including 2658 mRNA, 2588 lncRNA, and 1428 miRNA; 554 pairs of genes were found to be mutually regulated. The GO enrichment showed significant enrichment of metabolic process, binding, cytoskeleton and other functions. The KEGG pathway enrichment revealed that Fc γ R receptor family mediated phagocytosis, phagosome, endocytosis, NF- κ B, MAPK, ToLL-like receptor and PI3K signaling pathway (PI3K-Akt signaling pathway) were significantly enriched. Further studies revealed significant upregulation of Syk expression, a gene located upstream of the Fc γ R receptor family mediated macrophage endocytosis pathway, predicting that it may be a key gene regulating the ADE mechanism during infection. In addition, the accuracy of the sequencing results was demonstrated by verifying the relative expression of some differential genes by qRT-PCR technique.

(3) To verify the regulatory role of Syk gene on ADE mechanism in the process of AMDV infection, we constructed the overexpression mink Syk gene plasmid Syk-pcDNA3.1 and Syk-siRNA to intervene the

expression of Syk gene in peripheral blood mononuclear cells of mink. After adding antigen-antibody complexes to mink peripheral blood mononuclear cells and incubating them for 12 h, it was found that the copy number of AMDV-DL125 was significantly increased in the overexpressing Syk group and decreased in the suppressing group compared to the control group. The results of indirect immunofluorescence showed that monocytes in the overexpression group of Syk were more susceptible to viral invasion. The results of qRT-PCR for ADE-related cytokines showed that IL-10 was upregulated when Syk was overexpressed, further mediating ADE effects. While the expression of antiviral factor receptors (IFN- γ R1, TNF-R1 and TNF-R2) was upregulated, indicating that the virus may be in an active state. When Syk expression was inhibited, IL-10 expression was also inhibited and ADE effects were reduced. The expression of antiviral factor receptor was reduced because less virus entered the cell interior. The results showed that Syk played an important role in the regulation of ADE effect during AMDV infection.

This study assessed the prevalence of AMDV in China, and preliminarily explored the ADE mechanism that exists in the process of AMDV infection. It provides reasonable suggestions for the prevention and control of AMDV in China, provides research ideas for further exploring the mechanism of AMDV infection, and lays a theoretical foundation for the development of AMDV vaccines.

Keywords: Mink Aleutian disease; meta-analysis; antibody-dependent enhancement; whole transcriptomics; spleen tyrosine kinase

目 录

摘 要.....	3
Abstract.....	6
目 录.....	9
前 言.....	1
第一篇 文献综述.....	3
第一章 水貂阿留申病概述.....	3
1.1 阿留申病.....	3
1.2 流行病学.....	3
1.3 病原学.....	4
1.4 体内复制机制.....	7
第二章 病毒抗体依赖性增强机制（ADE）研究进展.....	9
2.1 抗体依赖性增强（ADE）机制概述.....	9
2.2 AMDV 感染水貂过程中的 ADE 机制概述.....	10
第三章 脾酪氨酸激酶 Syk 研究进展.....	11
3.1 Syk 简介.....	11
3.2 Syk 与疾病.....	11
3.3 Syk 激活信号转导.....	12
第四章 Meta 分析概述及其在流行病学调查中的应用.....	14
4.1 Meta 分析概述.....	14
4.2 数据库建立.....	14
4.3 模型选择.....	14
4.4 数据分析.....	15
4.5 Meta 分析在流行病学应用.....	15
第二篇 研究内容.....	17
第一章 1981-2017 年我国 AMDV 感染情况的 meta 分析.....	17
1.1 材料方法.....	17

1.2	结果.....	18
1.3	讨论.....	26
1.4	小结.....	27
第二章	我国东北部分地区水貂阿留申病流行情况调查	28
2.1	材料方法.....	28
2.2	结果.....	29
2.3	讨论.....	31
2.4	小结.....	32
第三章	AMDV-DL125 强毒株感染水貂外周血单核细胞的 ADE 机制体外研究模型构建	33
3.1	材料方法.....	33
3.2	结果.....	41
3.3	讨论.....	46
3.4	小结.....	48
第四章	AMDV 感染过程中的 ADE 机制探究——基于全转录组测序技术.....	49
4.1	材料方法.....	49
4.2	结果.....	54
4.3	讨论.....	72
4.4	小结.....	75
第五章	水貂 Syk 基因调控 AMDV 感染过程中 ADE 机制探究	76
5.1	材料方法.....	76
5.2	结果.....	83
5.3	讨论.....	93
5.4	小结.....	94
结 论		95
创 新 点		96
参 考 文 献		97
附 录		111
附录 A	常用试剂配制.....	111
附录 B	常用试验方法.....	112

附录 C 缩略词.....	116
作者简介.....	120
致 谢.....	122

前 言

阿留申病（AD）是水貂的一种重要疾病，其特征在于持续性感染，症状包括体重减轻，多饮，多尿，生殖能力下降和貂群死亡率增加，给水貂养殖业造成巨大的经济损失^[1]。另外，在某些情况下，AMD 也将影响浣熊、猫、狗、小鼠，甚至人类^[2,3]，受感染的农场很难根除这种病毒。目前，尚无针对该疾病的有效药物或疫苗^[4]。AMDV 可以通过气溶胶、四肢接触、伤口、体液或排泄物进行传播，亦可通过垂直传播感染幼崽。在水貂养殖场中，阿留申病毒可以在笼子、土壤、废水甚至饲养员的手套中持续存在^[5]。研究人员在水貂农场的家蝇中提取了 AMD 的 DNA，表明果蝇也可能充当 AMD 的传播载体^[6]。广泛的传播途径和出色的环境耐受能力导致水貂场普遍存在阿留申病毒，而且不易清除和控制。

在欧洲，美国水貂是一种入侵物种，在 20 世纪初的欧洲商业貂皮养殖场中饲养^[7,8]，并与其它宿主一起出口到全球^[9,10]。AMD 在水貂养殖场中很常见，尤其是在尚未执行消灭计划的国家中。控制 AMD 最常见的方法是通过系统地剔除貂群中具有高 γ 球蛋白滴度的病貂^[5]。从 1980 年到 2014 年，芬兰所有养殖的水貂中 AMD 的年平均阳性率在 3% 至 60% 之间^[11]。另有研究表明，AMD 在野生貂和养殖貂之间传播^[12]。

我国于 1956 年建立了第一个毛皮动物饲养场，并从国外引进了水貂等毛皮动物进行人工繁殖^[13]。因此，AMDV 也随着这些进口的毛皮动物进入我国^[14]。目前，中国貂皮年产量超过 3200 万，经济效益可观^[15]。由于我国政府尚未实施相应的 AMD 清除计划，因此国内的 AMD 尚未得到有效控制^[16]。

AMDV 能引起与免疫复合物、高丙种球蛋白血症和高水平抗病毒抗体相关的持续感染。研究发现病毒与抗病毒抗体的相互作用在 AMDV 感染的发病机制中起着重要作用^[17-20]。当病毒与特异性抗体（非中和抗体）结合时，形成具有感染性的抗原-抗体复合物。此时，AMDV 的毒力蛋白 VP2 可与 Fc 受体家族的 Fc γ RII（Fc γ RII 主要表达于单核-巨噬细胞表面）结合介导 ADE 效应。通过这一机制，AMDV 可感染巨噬细胞或单核细胞系 K562^[21,22]。由于 ADE 的存在，导致目前尚无获批的疫苗或药物以预防或治疗 AMD。因此，明确 AMDV 感染过程中可能参与 ADE 机制的具体通路及主要功能基因是解决问题的关键所在。

本研究首先对国内近 40 年的 AMD 流行情况进行评估量化，呈现各地区 AMD 流行率的同时，预测了感染过程中潜在的风险因素；其次为缓解我国 AMDV 感染情况，改善 AMDV 无特效药物及疫苗的现状，本文使用水貂原代外周血单核巨噬细胞建立了 AMDV-DL125 株感染过程中抗体依赖性增强作用的体外研究模型；通过全转录组高通量测序，对 AMDV-DL125 株感染过程中的 ADE 机制进行初步探究，预测了多个可能与 ADE 相关的重要通路，并发现水貂 Syk 可能参与调控 AMDV 感染过程中的 ADE 机制；基于此发现，

通过过表达及抑制表达水貂外周血单核细胞中 Syk 表达量，以明析 Syk 对感染过程中的 ADE 的调控作用。本研究为探索 AMDV 感染机制提供新的思路和靶点，为彻底净化 AMDV 提供技术储备。

第一篇 文献综述

第一章 水貂阿留申病概述

1.1 阿留申病

水貂阿留申病 (Aleutian mink disease, AMD) 是由细小病毒科细小病毒属的水貂阿留申病毒 (Aleutian mink disease virus, AMDV) 感染水貂引起的一种慢性传染性疾病, 发病机制及免疫机制复杂 (图 1.1)。病貂通常表现为明显的高丙种球蛋白血症, 浆细胞增多和免疫复合物沉积等症状^[23]。患病母貂常表现为空怀和流产, 患病仔貂易引发急性间质性肺炎而导致死亡^[24]。此病在全世界的貂场中广泛流行, 对养貂业造成巨大经济损失, 目前尚无可靠的商用疫苗。

1.2 流行病学

AMDV 除感染水貂外, 还可感染其他物种, 如浣熊, 蓝狐及臭鼬等^[25]。甚至有罕见的人类感染病例^[26]。由于 AMDV 尚无针对性防治药物且对环境的抵抗能力较强, 不仅阳性水貂可以作为传染源, 生活在水貂养殖场的其它动物 (如老鼠, 苍蝇等) 体表均能检测到 AMDV 的基因组, 甚至笼子、土壤以及工人的手套和衣帽也都检测到了 AMDV 的残留, 因此难以实施有效的隔离和净化^[5]。目前国际上通用的净化方案为扑杀阳性水貂, 此方法效果虽好, 但经济损失颇大^[27, 28]。自 1999 年以来, 丹麦立法支持根除 AMDV, 对受感染的农场实施贸易限制及设施补贴。截至 2001 年, 丹麦全国只有约 5% 的农场受到 AMDV 感染^[29]。然而, 1981-2017 年国内 AMDV 感染总阳性率则高达 55.3% (95% CI 48.5-62.0; 77870/192833) ^[30]。我国貂场也对 AMDV 的流行进行了限制, 通过貂场自主淘汰 AMDV 阳性水貂, 以净化 AMDV 污染。但由于缺乏政府相关福利支持, 大多数貂场仅将阳性水貂进行隔离饲养, 当年捕杀制皮。此举或为导致 AMDV 在国内貂场无法真正根除的原因之一。

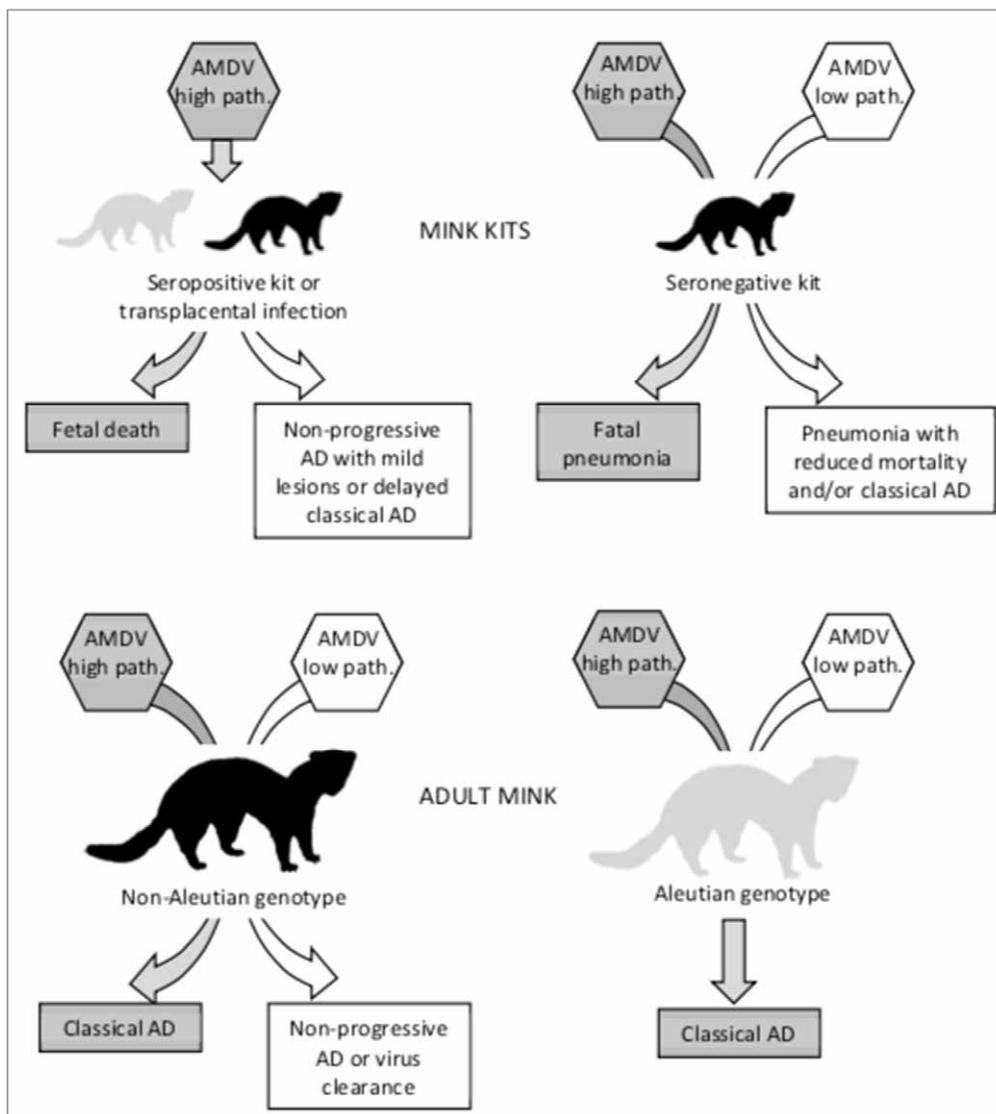
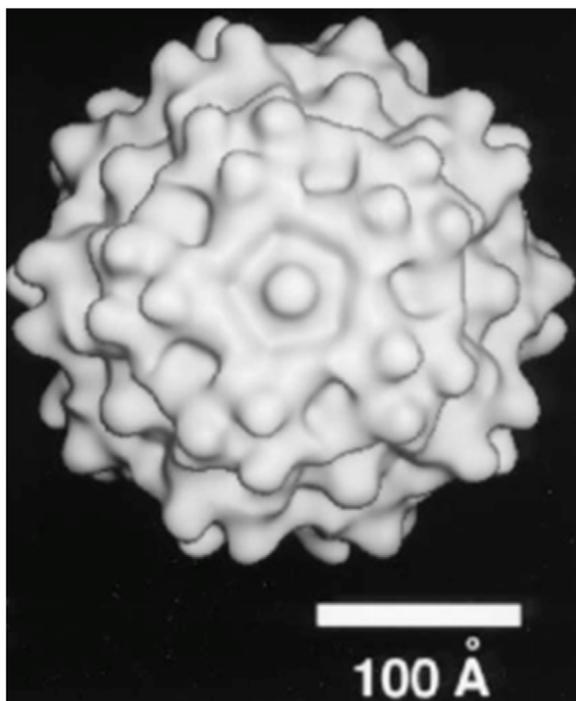


图 1.1 阿留申的发病结果与病毒毒株、貂的基因型（阿留申-灰色，非阿留申-黑色）和年龄有关^[28]

Fig.1.1 The incidence of Aleutian is related to virus strain, mink genotype (Aleutian-grey, non-Aleutian-black) and age^[28]

1.3 病原学

AMDV 是一种小型且结构简单的单股负链 DNA 病毒，无包膜衣壳，具有二十面体结构，基因组大小约为 4.7 kb，末端具有发夹结构和长回文序列^[31]。基因组包含 3 个开放阅读框(ORFs)，编码 5 种蛋白。其中 ORF1 编码 NS1 蛋白，蛋白大小为 70 kilodaltons(kDa)，ORF2 编码 NS2 和 NS3，蛋白大小分别为 17 kDa 和 10 kDa，ORF3 编码结构蛋白 VP1 (85 kDa) 和 VP2 (75 kDa) 蛋白 (图 1.2)^[32,33]。一个 P3 启动子通过交替剪接和聚腺苷酸化产生 6 个信使 RNA (mRNA)^[34]。

图 1.2 AMDV-G 株 VP2 蛋白 3D 构像^[33]Fig.1.2 3D conformation of VP2 protein of AMDV-G^[33]

AMDV 是一种自主性细小病毒，无需辅助病毒（如腺病毒）即可进行复制。其复制机制类似于一般细小病毒，即滚动发夹复制（图 1.3）。基因组一个显著特点是 3'端和 5'端各有一个发夹样的回文结构，一般由 120 bp-160 bp 碱基组成，但末端序列的整个发夹结构被两个短的回文序列折成 T 形或 Y 形结构。AMDV 复制过程如下：第一步，病毒基因组两端形成特异的发夹结构，在 DNA 聚合酶及其辅助蛋白作用下，以 3'端回文序列折叠形成的发夹作为引物，合成基因组的互补链，此单体双链 DNA 分子可作为起始病毒转录模板，在 P4 启动子调控下合成 NS1 蛋白；第二步，新合成 DNA 的 3'-OH 末端共价结合模板的 5'端发夹结构末端，闭合双链，形成复制中间体^[35]；第三步，NS1 蛋白切割闭合的中间体以形成复制原点。切割使得子代链的 3'-OH 再次暴露，组装成新的复制叉，NS1 蛋白则共价结合到模板链的 5'末端，行使解旋酶的功能^[36]。来自胞内的复制蛋白 A（replication protein A, RPA）由 NS1 蛋白招募并参与形成复制叉以稳定被替换的单链^[37]；第四、五步，5'发夹结构在 NS1 的作用之下折叠解开，并作为子链合成的模板，形成的双链末端随之解链并各自再次折叠，形成发夹结构。这一过程依赖于 ATP 水解和 NS1 蛋白的解旋酶功能以及位点特异性结合活性^[38-40]。第六步，子代链再次利用 3'-OH 末端开始子代链的反向延伸，置换出模板链；第七步，当 DNA 合成至模板链 3'端发夹结构时，发夹结构解折叠，使得子代链进一步延伸，合成的子代链与模板链形成一个二聚体复制性 DNA；第八、九步，双链末端再次折叠形成发夹结构，以相同的方式复制，形成四聚体及多聚体复制型 DNA。单体双链 DNA 可以从多聚体 DNA 上切割得来，并进一步在特异性酶的切割作用下，在距离 NS1 蛋白 18 个核苷酸的位置切开，置换原 DNA（引物为连接 NS1 蛋白的序

列), 进而合成子代病毒 DNA, 最后将其包装^[37]。

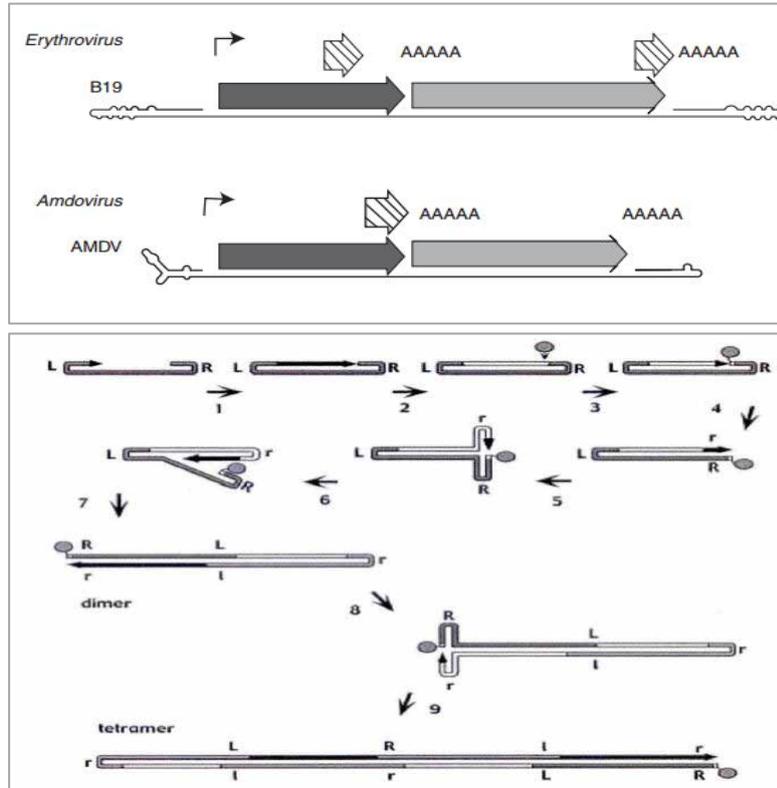
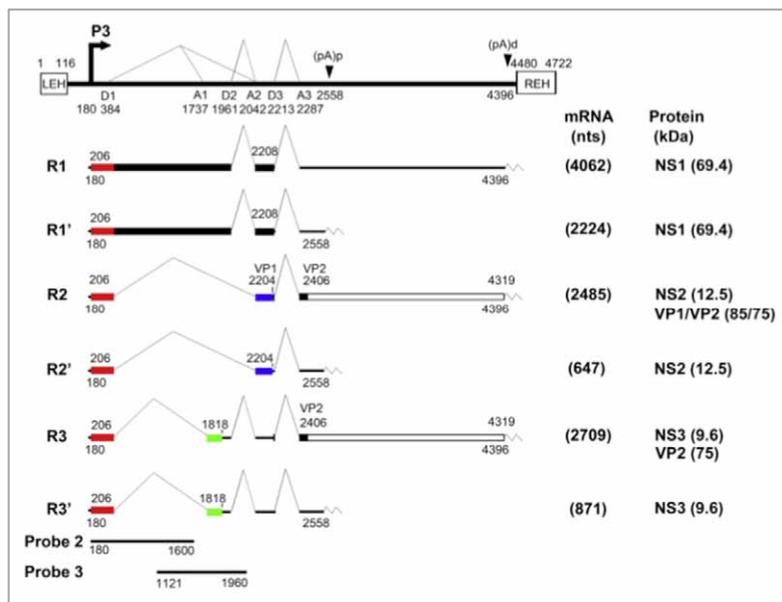


图 1.3 部分细小病毒复制特点：滚动发夹结构^[41]

Fig.1.3 Partial parvovirus replication characteristics: rolling hairpin structure^[41]

子代病毒基因组 DNA 的合成与包装同时进行, 基因组 5' 末端与 NS1 共价结合, DNA 以 3' 到 5' 方向, 在 NS1 蛋白低聚物的螺旋酶作用下, 包装入组装好的衣壳。基因组 3' 端靠近衣壳内表面, 剩下的基因组序列以一定的拓扑结构包装衣壳, 以利于复制时 3' 到 5' 方向的解链。成熟病毒粒子基因组 5' 末端约 24 个核苷酸序列暴露于衣壳外, 与 NS1 蛋白共价相连, 此序列在细胞质运输过程中被切除, 切除的 5' 端序列在基因组 DNA 合成其互补链的过程中得以恢复 (图 1.3, 图 1.4) ^[32, 35]。

图 1.4 AMDV 遗传图谱^[32]Fig.1.4 Genetic map of AMDV^[32]

1.4 体内复制机制

水貂在感染阿留申病毒 Utah I 株 14 d 后, 在脾脏、肠系膜淋巴结和肝脏中检测到最高水平的病毒 DNA^[42]。尽管感染了 AMDV 的水貂体内会产生相当高水平的相关抗体, 但这些抗体却无法清除病毒, 常规的病毒衣壳疫苗也难以起到保护作用。这些抗病毒抗体使得 AMDV 通过 Fc 受体介导的抗体依赖性增强效应 (Antibody-dependent enhancement, ADE) 感染巨噬细胞, 从而使受感染的巨噬细胞成为持续感染的靶细胞。有研究表明, AMDV 病毒的 VP2: 428-446 nt 的表面残基的暴露使其更容易与抗体结合, 推测该短肽的抗体可能与 AMDV 发病机理有关^[43]。

AMDV 突变率高, 其强毒株 (如 AMDV-Utah I) 在细胞系中不能复制, 而能在体外自由复制的弱毒株 (AMDV-G) 没有致病性^[44]。研究表明, 水貂的肠系膜淋巴结和脾脏是病毒的复制部位^[45]。AMDV-G 株是 1980 年在猫肾细胞系 (CrFK) 中, 在 31.8°C 培养条件下, 连续传代分离获得^[19]。在 AMDV 早期的研究中, 研究人员构建了 AMDV-G 的感染性克隆, 并将全长 AMDV-G 克隆作为框架, 以构建嵌合病毒的方式, 将 AMDV-Utah I 的非结构蛋白和衣壳蛋白进行替换。然而, 所得的嵌合病毒并不能如 AMDV-G 一般在 CrFK 中进行复制。因此, AMDV 基因组至少编码了两种生物学特性, 一种控制病毒的体外存活与复制, 另一种控制了病毒的体内致病性^[42]。

普遍认为, AMDV 的病毒衣壳决定其是否能引起机体免疫反应及宿主选择范围。AMDV 病毒包含 60 个蛋白亚基, 其中两个病毒蛋白 VP1 (85 kDa) 和 VP2 (75 kDa) 分别占总亚基数量的 10% 和 90%。其中 VP2 是 AMDV 主要的衣壳蛋白, 在缺少 VP1 的情

况下亦可组装成天然衣壳^[46]。通过冷冻显微镜技术和图像重建技术，研究人员展现了 AMDV-G 株的 VP2 衣壳蛋白的三维结构，并发现其与人类细小病毒 B19，CPV，猫泛白细胞减少症病毒（FPV）和小鼠微小病毒（MVM）的表面特征存在一定程度的相似性，并存在与体外组织嗜性和体内致病性相关的 AMDV 残基（图 1.2）^[33]。除了结构蛋白外，在 AMDV 感染期间，通过替代剪切和替代聚腺苷酸化作用，mRNA 前体转录还产生 3 种非结构蛋白：NS1，NS2 和 NS3。R1 和 R2 mRNA 编码非结构蛋白 NS1，转录本 R2 编码结构蛋白 VP1 和 VP2 以及非结构蛋白 NS2；NS3 可能由 Rx 和 Rx0 进行编码^[34]。已经证实，AMDV 中 NS1 与 NS2 在病毒复制及诱导细胞病变效应中起到关键作用^[47, 48]。

由于 AMDV 的致病机制尚不明确，导致其至今难以防治，严重阻碍养貂产业的发展。因此，有必要进一步对其感染机制及致病机理进行深入探究，为早日研制出有效的 AMDV 防治药物奠定基础。

第二章 病毒抗体依赖性增强机制（ADE）研究进展

2.1 抗体依赖性增强（ADE）机制概述

病毒抗体依赖性增强机制（Antibody-dependent enhancement, ADE）即病原微生物通过与非中和性的免疫球蛋白-G（IgG）结合，形成抗原-抗体复合物，并通过特异性 Fc γ 受体家族进入巨噬细胞，导致巨噬细胞内感染增加的效应^[29, 49]。目前关于 ADE 机制的报道称其主要通过抗原-抗体复合物与细胞表面 Fc γ R 交联，从而激活与肌动蛋白细胞骨架重组和细胞膜重塑相关的下游信号通路。巨噬细胞一般由单核细胞成熟分化而来，它不仅是清除体内破损细胞和其它碎片的“清道夫”，还可作为抗原提呈细胞向免疫细胞提呈相应抗原。巨噬细胞激活的经典通路需要两个信号：干扰素- γ （IFN- γ ）或肿瘤坏死因子（TNF）和外源性 Toll 样受体配体（如脂多糖等）^[50]。通过经典途径激活的巨噬细胞是机体抵御病原微生物感染的第一道防线，是宿主免疫防御系统的重要组成部分。

目前，已知多种微生物的感染涉及宿主 ADE 机制，如登革热，寨卡，埃博拉，蓝耳病以及阿留申病等^[51-54]。登革热病毒是黄病毒科成员，拥有四种血清型，存在交叉型的 ADE 感染机制。当免疫其中一种血清型后，再次感染其他血清型的登革热病毒（Dengue virus, DENV）会导致更严重的免疫反应^[55]。据研究，黄病毒科的另一位成员-寨卡病毒（Zika virus, ZIKV），由于其与 DENV 序列的相似度较高，这种相似性导致了 ZIKV 和 DENV 之间容易发生抗体交叉反应，从而 DENV 的非中和性抗体可能导致 ZIKV 的感染过程中触发 ADE 机制，并对抗体的诊断带来干扰^[56-61]。在埃博拉病毒的感染过程中，其 ADE 机制需要通过 Fc γ RIIIa 介导的细胞内下游通路 Src 家族蛋白酪氨酸激酶（PTKs）的激活发挥作用。通过抑制 Src 家族蛋白的 PTK 途径，埃博拉病毒的 ADE 显著降低，而非 ADE 感染途径则未发生显著变化^[51]。

在动物病中，猪繁殖与呼吸免疫综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV，又称猪蓝耳病）的 ADE 机制已被大量研究。1996 年 Yoon KJ 首次发现 PRRSV 的 ADE 现象，此种感染机制不仅导致持续性感染，也使得疫苗免疫失败^[62]。PRRSV 在体内及体外均存在 ADE 现象。研究发现，PRRSV 与一定浓度的抗体孵育后（1 h）感染猪肺泡巨噬细胞（PAM），病毒滴度与对照组相比显著增高（10~100 倍），并发现膜型 Fc γ RI 能通过 ADE 效应介导 PRRSV 的内吞作用促进病毒增殖^[63]。同时，研究表明，在 PRRSV-ADE 感染的 PAM 中，IFN- α 和 TNF- α 含量显著降低，IL-10 的含量显著增加。通过对小干扰 RNA（SiRNA）基因敲低，发现猪肺泡巨噬细胞的 Fc γ 受体 I（Fc γ RI）和 Fc γ RIII 在 PRRSV-ADE 的感染中均发挥了作用。通过激活分析发现，在 PRRSV 感染期间，猪的肺泡巨噬细胞中特异性激活的 Fc γ RI 或 Fc γ RIII 显著降低了 IFN- α 和 TNF- α 的

水平, 增强了 IL-10 的表达, 并且增强了 PRRSV 的复制。因此, 通过 Fc γ RI 和 Fc γ RIII 介导的 ADE 可以使猪肺泡巨噬细胞中的 IFN- α 和 TNF- α 表达降低, 导致 PRRSV 感染增强 [64]。

2.2 AMDV 感染水貂过程中的 ADE 机制概述

在阿留申病毒感染水貂的过程中亦存在较强的 ADE 途径。通常, 巨噬细胞在被病毒感染后, AMDV 病毒粒子经由病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 识别, 进而促进分泌下游的炎性细胞因子及干扰素, 抗病毒因子得到激活表达, 先天性免疫应答就此启动 [65]。一般情况下, 机体通过适应性免疫应答机制产生中和抗体 (能识别并中和病毒) 以消灭病原体。当水貂感染 AMDV 后, 机体产生大量的特异性抗体, 患病水貂体内可检测到高水平的抗病毒抗体和高丙种球蛋白 [43, 66]。然而, 产生的高水平抗体基本为非中和性抗体, 它们非但无法清除体内的 AMDV, 反而可通过一系列的途径, 加速 AMDV 的感染进程, 或者使得病貂长期处于带毒状态。这些抗病毒抗体与病毒接触后形成病毒-抗体复合物, 通过 Fc 受体依赖性机制感染巨噬细胞或单核细胞系 K562 [21]。

总之, AMDV 因其特殊的致病机理, 导致其在全球养貂行业广泛流行。对 AMDV 致病机制的深入探索和研究, 不仅能为 AMDV 疫苗的制备提供科学依据, 带来更大的经济效益, 也可为其它 ADE 相关感染性疾病的研究和治疗提供新的思路, 具有重要的科学研究意义和社会价值。

第三章 脾酪氨酸激酶 Syk 研究进展

3.1 Syk 简介

脾酪氨酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk) 是一种非受体型酪氨酸激酶 (Non-receptor tyrosine kinase, NRTK), 由脾酪氨酸激酶 Syk 基因编码, 最早发现于 1991 年, 由于是从猪脾脏的 cDNA 中获得, 因此得名^[67]。Syk 由 629 个氨基酸构成, 蛋白质分子量 72 kD (不同物种大小可能存在差异)。该蛋白由 1 个酪氨酸激酶固有的特性激酶区和 2 个 SH2 结构域组成^[68]。在 Syk 蛋白的一级结构上, 大鼠和小鼠有着极高的同源性, 人类次之, 猪的同源性最低。在不同种属间, 有一段区域序列高度保守, 其位于 SH2 (N) 和 SH2 (C) 和 2 个 SH2 结构域之间, 而激酶结构域和 SH2 (N) 末端以及 SH2 (C) 之间的序列则处于中度保守, 这提示特异性结合磷酸化的酪氨酸激酶时, 存在着某些方面的差异^[69]。Syk 广泛表达于淋巴细胞、造血细胞、成纤维细胞等, 在某些疾病的致病机制和细胞信号转导中起到关键作用^[70]。

3.2 Syk 与疾病

3.1.1 Syk 与肿瘤疾病

Syk 是一种具有抑癌作用的蛋白酪氨酸激酶 (Protein tyrosine kinases, PTKs)。研究发现, Syk 蛋白的表达与突变型 p53 蛋白的表达呈现负相关趋势, 且在胃癌癌旁的正常组织中, Syk 阳性率要高于胃癌组织中, 说明 Syk 蛋白的表达抑制了胃癌的生长及转移^[71]。在侵袭性乳腺癌的细胞株中, Syk 的表达降低甚至缺失, 而在正常腺体以及非侵袭性乳腺癌细胞株中, Syk 则很容易被检测到, 这说明 Syk 与乳腺癌的肿瘤生成、浸润及转移具有相关性^[72-75]。在原发性肝细胞性肝癌中, Syk 明显缺失, 且缺失程度与肿瘤恶性程度呈正相关^[76]。在人胆管癌组织中的 Syk 表达量均显著高于癌旁和正常肝组织。对人胆管癌组织的 Syk 和 CD163 表达进行 Pearson 相关分析显示, Syk 的异常表达与浸润的 CD163 阳性细胞数呈正相关, 即与 M2 型巨噬细胞浸润数量呈正相关^[77]。此外, Syk 基因还被证实与卵巢癌、直肠癌、黑色素瘤及血液肿瘤等相关^[78-80]。

3.1.2 Syk 与免疫疾病

Syk 还与多种免疫类疾病及基础代谢类疾病存在相关性。在自身免疫性血管炎试验模型 (Experimental autoimmune vasculitis, EAV) 中, 使用福他替尼 (Fostamatinib, R788, Syk 抑制剂) 干预后, 试验组动物的血尿、蛋白尿、巨噬细胞浸润程度和肺出血几率与对照组相比都呈现了明显的下降趋势^[81]。Ryan 等建立了肾毒性血清肾炎 (Nephrotoxic serum

nephritis, NTN) 模型, 给予 Syk 抑制剂干预和敲除 Syk 基因, 试验结果表明, 抑制 Syk 表达量使白细胞浸润、新月体形成、炎症和纤维化程度都发生了明显的降低^[82, 83]。Syk 的表达情况还与糖尿病相关, 尤其与糖尿病肾病的进展有关。有研究表明, 高糖环境下人的肾小球内皮细胞中, Syk 表达升高, 激活 NF- κ B 通路, 这一过程提示 Syk 可能参与了高糖刺激诱导的细胞内信号转导^[84]。因此, 以 Syk 为靶点抑制 Syk 的表达可能为临床预防及治疗多种疾病提供新的方向。

3.3 Syk 激活信号转导

3.3.1 Syk 参与 B 细胞受体激活信号转导

Syk 在 B 淋巴细胞发展及抗原受体信号传导过程中发挥重要作用。B 细胞受体 (B-cell receptor, BCR) 信号作为必不可少的调节网络, 为造血细胞的存活和增殖提供了主要信号^[85]。Syk 是一种接近 BCR 的 72 kDa 非受体酪氨酸激酶, 是 B 细胞成熟的主要检查点。在免疫受体结合过程中, Syk 被募集到免疫受体酪氨酸激活基序 (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM), 磷酸化并激活 BCR 辅助跨膜蛋白 (Ig- α 和 Ig- β)^[86, 87]。Syk 对 B 细胞发育至关重要^[88], 而 Syk 的缺失会损害 B 细胞分化^[89-91]。由于 Syk 可调节衔接蛋白 (如 SH3P7, 一种将 B 细胞受体信号传导与细胞骨架连接的衔接蛋白, 可被 Syk 和 Src 家族的 PTK 磷酸化), 因此, Syk 对 B 细胞中的 Ca²⁺动员和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3-K) 激活至关重要^[10]。

3.3.2 Syk 参与 T 细胞受体激活信号转导

Syk 在 T 细胞发展及抗原受体信号传导过程中同样起到重要作用。Syk 在 CD4 CD8 双阴性 (DN) 和 CD4 CD8 双阳性 (DP) 胸腺细胞中表达, 但 Syk 表达水平在 CD4⁺和 CD8⁺单阳性胸腺细胞和外周 T 细胞中显著降低。Syk 缺陷的小鼠在 DP 胸腺细胞的形成中没有缺陷, 但其 DN 胸腺细胞无法发育到 DP 阶段^[92], 该过程通常与 TCR 信号通路相关。Syk 可以通过 TCR 中 ITAM 的磷酸化来调节 TCR 信号的启动^[93]。此外, Syk 还对 $\gamma\delta$ TCR 信号转导至关重要。Syk 可通过激活 PI3K/Akt 途径诱导 $\gamma\delta$ T17 细胞 (产生 IL-17 的 $\gamma\delta$ T 细胞群) 的发育, 从而抵抗感染及参与炎症反应等^[94]。这些发现表明 Syk 在 TCR 信号传导中起到关键作用。

3.3.3 Syk 参与巨噬细胞受体激活信号转导

Syk 对于巨噬细胞中的受体 (Fc receptors, FcRs) 信号传导至关重要。巨噬细胞上 FcR 的交联引发各种信号, 这些信号调控肌动蛋白细胞骨架的重组和膜重塑, 从而导致吞噬体的形成。此外, Syk 活化对于 FcR α 亚基介导的 FcR 从内体到溶酶体的运输以及 MHC II 类分子的抗原呈递至关重要^[95]。

Fc γ R 刺激后会激活 Syk, 抑制 Syk 表达也会抑制吞噬作用^[96, 97]。在巨噬细胞吞噬过

程中, IgG 包被的抗原颗粒使 FcR 受体聚集而引发介导作用, 随后激活 ITAMs^[98]。磷酸化的 ITAM 成为 Syk 的 SH-2 域的对接口, 从而活化 Syk^[99-101]。Syk 缺失 (Syk^{-/-}) 的巨噬细胞在 FcγR 诱导的吞噬作用中存在吞噬缺陷。Syk^{-/-}小鼠巨噬细胞无法使 IgG 结合的抗原颗粒内化, 说明 Syk 的招募和激活对于巨噬细胞的吞噬作用十分重要^[102]。研究发现 DENV 感染可诱导 THP-1 细胞和人外周血单核细胞中 IL-10 分泌并增加其细胞因子信号传导下游调节因子 3 的表达。抑制 Syk 表达可导致 DENV 诱导产生的 IL-10 的表达量降低, 说明 DENV 感染的 ADE 通过增强 Syk 调节的一系列信号传导从而显著提高了 IL-10 表达^[103]。

Syk 也广泛表达于淋巴细胞和造血细胞等, 在其细胞信号转导过程中, Syk 发挥着重要作用, 故 Syk 的活性可影响众多疾病的发生和发展。基于此, 以 Syk 为靶点而进行的现代治疗手段为许多常规方法难以医治的疾病 (如自身免疫病、某些感染疾病甚至肿瘤) 提供了新的治疗思路 and 方案。

第四章 Meta 分析概述及其在流行病学调查中的应用

4.1 Meta 分析概述

Meta 分析 (Meta-analysis), 又名元分析或荟萃分析, 是一种从不同研究中获得结果加权平均值的方法^[104]。1976 年 Gene Glass 第一次提出“Meta-analysis”一词, 距今已有 40 年以上的历史^[105]。Meta 分析是一种统计程序, 用于分析来自不同研究的综合数据, 将来自多个研究的数据结合起来以分析总体效果, 是人们能获得最新信息的主要来源之一。但是, meta 分析的总体结论在很大程度上取决于其分析过程中的数据质量。Meta 分析不仅可以提供例如总体效果和多个研究之间的一致性的定量信息, 还可以提供例如主要的研究趋势和当前的知识差距的定性信息。尽管 meta 分析是后来才出现的数据分析方式, 但人们对 meta 分析的兴趣在生物科学领域迅速增长。近几年来对其兴趣的激增可能表明, meta 分析已成为生物学方面继传统叙述性的评论文章之后的另一种客观且有益的分析方法^[106]。

4.2 数据库建立

全面的文献检索是 meta 分析至关重要的环节之一, 包括多个主要数据库以查找已发表的研究。在进行文献搜索时, 需要根据数据库的检索逻辑, 制定相对统一且规范的检索词, 并根据实际情况选择合适的搜索方式进行系统检索 (高级的定制式检索或关键词检索等), 以最大程度地减少检索偏差^[107]。除此之外, 对相关研究引用的参考文献进行排查也是全面检索的途径之一, 同时鼓励纳入未发表的研究。总之, 应制定系统的检索步骤, 在保证全面检索的同时, 亦可根据搜索流程重现检索结果。一般情况下, 遵循《系统评价和元分析的首选报告项目》(Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses, PRISMA) 可确保 meta 分析的透明完整^[108]。

4.3 模型选择

Meta 分析不应该只是描述性文章。如原始研究一样, 合格的 meta 分析通常会提出问题或检验假设。而选择合理的效应量统计模型更是好的 meta 分析的必备条件之一^[109]。Meta 分析有两种主要的元分析模型, 分别为固定效应模型 (Fixed effects model)^[110]和随机效应模型 (Random effects model)^[111]。它们对所分析数据的假设不同, 但其共同目标是估计总体效果。固定效应模型是假设所有研究的总体效应大小均相同。而随机效应模型则假设所选研究是来自随机样本以尝试概括纳入研究以外的发现^[110, 111]。研究人员应在进行 meta 分析之前决定哪种模型适合其研究的问题。通常情况下, 随机效应模型对研究对象的要求更宽, 其适用范围较固定效应模型更为广泛^[111]。

4.4 数据分析

如今,许多统计程序都具有 meta 分析的功能或软件包,例如 Revman、R software、Stata、SPSS 以及 SAS,其中以 Revman、Stata 和 R 较为常用。在大多数 meta 分析涉及的各种可视化图形中,较为主要的是森林图和漏斗图^[112, 113]。森林图是对 meta 分析中所包括的每个研究的结果、合并的 meta 分析结果以及研究结果之间的异质性的可视化图形。森林图可快速直观地展示总体效果估计值并研究异质性,是 meta 分析中的强大工具^[114]。评估发表偏倚的常用方法是漏斗图和 Egger 检验^[115, 116]。这些方法有助于检测漏斗图的不对称性,其不对称可能是由于异质性引起的^[117]。漏斗图横轴表示每个研究的效应量,纵轴表示研究的精确度(例如标准误差或其倒数或样本量),若无发表偏倚,则漏斗图对称;若不对称,则意味着研究的效应大小可能与其精确度有关,因此可能存在潜在的发表偏倚^[118]。评估发表偏倚是在荟萃分析中评估综合总体证据的关键程序。由于发表偏倚的统计检验功能通常不强,并且仅给出判定偏倚是否存在的 P 值,因此检验漏斗图的不对称性已成为调查潜在缺失研究和偏倚方向的流行方法。异质性和发表偏倚是 meta 分析中两个主要判断因素,研究人员应根据统计程序所得到的图像与结果检查发表偏倚。

4.5 Meta 分析在流行病学应用

流行病学(epidemiology)是研究特定人群中疾病、健康状况的分布及其决定因素,并研究防治疾病及促进健康的策略和措施的科学,是预防医学的一个重要组成部分,是预防医学的基础。流行病学调查(Epidemiological Investigation)是指用流行病学的方法进行的调查研究。主要用于研究疾病、健康和卫生事件的分布及其决定因素。通过这些研究提出合理的预防保健对策和健康服务措施,并评价这些对策和措施的效果。然而由于人力及财力等客观因素,普通的流行病学调查往往存在一些不可避免的缺陷,如时间纵深和空间广度等的限制。

Meta 分析是总结数据结果的重要工具,它能为流行病学研究人员提供依据,从而判断预防治疗与防治措施的风险程度,并对其中的效益和危害进行系统性评价。收集并总结有关患病物种的相关研究数据,为制定流行病防治指南提供数据支撑。

Meta 分析在流行病的防治过程中发挥很大作用,其原因如下:(1)可对流行情况进行系统化的数据分析,从而发现其中的潜在问题;(2)研究人员在进行 meta 分析时明确地记录了每个研究的方法及细节,可判断试验研究的有效性;(3)对各种潜在风险因素进行系统性评价,并根据实际情况提供切实可行的防控建议。

相比于一般流行病学研究,作为荟萃分析,其优势亦显而易见:(1)在合理的范围内尽量扩大时间纵深,理论上没有限制;(2)根据需要制定空间范围,理论上没有限制;(3)可根据设计涵盖想要研究的病原及其易感的所有宿主物种;(4)最大化节省人力、物力及财力,通过统计学分析,得到相对稳定可靠的结论。

目前,患病率的 meta 分析于流行病学领域应用较为广泛。Wang 等通过研究艾滋病患者弓形虫感染情况及感染压力,发现目前世界范围内艾滋病毒感染者感染弓形虫的负担非常高,特别是在撒哈拉以南非洲地区,并强调了对所有艾滋病毒感染者进行弓形虫感染常规监测的重要性^[119]; Ahmed 等评估了诺如病毒作为全球地方性急性肠胃炎病因的作用,发现与住院患者相比,社区急性肠胃炎病例中诺如病毒患病率往往较高,并发现患者年龄和研究是否包括新毒株与诺如病毒流行无相关性^[120]; Stefan 等通过对低收入和中等收入国家女性性工作者中艾滋病负担的荟萃分析发现,纳入的 50 个国家的 99878 名女性性工作者总体 HIV 患病率为 11.8% (95%CI 11.6-12.0), HIV 高发国家的性工作者感染率 11.6% (95%CI 9.1-14.8) ^[121]。

将患病率的荟萃分析应用于流行病学意义重大,通过比普通流行病学调查更高纬度和完全批判性的角度对疾病的流行情况进行系统性评价,得到经统计学计算升华后的稳定结果,对疾病的防控以及相应措施的制定具有重要的指导意义。

第二篇 研究内容

第一章 1981-2017 年我国 AMDV 感染情况的 meta 分析

AMD 是毛皮动物三大疫病之一。它是全世界水貂养殖场中常见的免疫抑制疾病，严重危害了水貂养殖业的发展。加强对 AMDV 阳性率和空间分布的认识，对于预防和控制 AMD 具有重要意义。因此，我们筛选了 1981 年至 2017 年间发表的 45 项与我国 AMDV 阳性率相关的研究，提取了相关流行病学数据及潜在的感染风险因素，并进行了系统回顾和荟萃分析，以评估我国 AMDV 的感染情况，为水貂的规范化养殖和 AMD 防控提供理论依据。

1.1 材料方法

1.1.1 检索策略

- (1) 使用中文和英文进行文献检索。
- (2) 使用了四个数据库，分别为 PubMed、重庆维普中文期刊服务平台（VIP）、中国知网（CNKI）和万方数据库。
- (3) 在 PubMed 数据库中，使用的检索式为“(“mink”[Mesh] OR mink OR *Mustela macrondon* OR sea mink OR mink, sea OR mink, sea OR sea mink OR *Mustela vison* OR American mink OR mink, American OR *Mustela lutreola* OR European mink OR mink, European) AND (“Aleutian mink disease”[Mesh] OR disease, Aleutian mink OR mink disease, Aleutian OR Aleutian disease of mink)”；在 VIP 中文期刊数据库中，搜索策略为“标题或关键词：水貂和阿留申”；在 CNKI 和万方数据库中，搜索策略为“主题：水貂和阿留申”。在三个中文数据库中，所有检索过程都包括模糊搜索和同义词扩展。
- (4) 将检索到的文献引文信息导入 Endnote X9 (version 9.3.1)。

1.1.2 纳入和排除标准：

- (1) 本研究主要的研究对象为 1981 年至 2017 年已发表的有国内 AMDV 阳性率的数据。
- (2) 综述、重复报道的研究及其它宿主阿留申阳性率的研究未纳入到此 meta 分析数据库中。
- (3) 排除了非流行病学调查的研究及国外 AMDV 流行情况的研究。
- (4) 排除了包含疑似患病样本的研究和入境检疫的研究。
- (5) 排除了样本量小于 30 的研究^[122]。

1.1.3 数据提取

四名经过相关培训的研究人员分别从每个合格的研究中提取并记录数据。所提取的数据如下：第一作者，采样年份，文章发表年份，样品采集地点，测试的水貂数量，AMDV 阳性貂的数量，不同性别的水貂数量，不同的检测方法的水貂数量以及不同年龄的水貂数量。本研究既没有联系原始研究的作者以获取更多信息，也没有纳入未发表的相关数据。使用 Microsoft Excel (version 16.33) 构建数据库。此外，本荟萃分析收集了许多构建 AMDV 检测方法的研究。因对流免疫电泳 (Counter immune electrophoresis, CIEP) 具有较高的特异性且适用于大批量操作，因此纳入的大多数研究使用 CIEP 法作为对照组以验证其构建方法的准确性。本研究选择 CIEP 法获得的数据进行总体数据统计，以减小由不同检测方法导致的异质性。

1.1.4 质量评分

根据《Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation methods (GRADE)》得出的标准对纳入的文章进行质量评估^[123, 124]。纳入文章的质量使用评分方法进行质量评价。根据文章提供的信息，满足一项得 1 分：是否明确提供了检测方法，是否提及了采样年份，是否为随机采样，是否详细描述了样本采集方法，是否有四个或四个以上的潜在风险因素。每篇文章最终得分相加：总分为 4 或 5 分的研究定义为高质量研究，2-3 分的研究定义为中等质量研究，0-1 分的研究定义为低质量研究^[125, 126]。

1.1.5 统计分析

本荟萃分析根据 PRISMA 分析指南进行^[108]。使用 Stata 12 软件 (Stata Corp., College Station, TX, 美国)^[127]，通过荟萃分析合并计算了基于众多研究发表的 AMDV 阳性率。纳入研究的异质性很高，因此，采用随机效应模型进行效应量合并及绘制森林图。使用具有 I^2 和 Cochrane Q (分别表示为 χ^2 和 P 值) 统计量的统计方法来评估研究间的异质性。通过亚组分析和多因素回归分析进一步研究异质性来源以评估潜在的感染风险因素。统计的潜在风险因素包括：地区 (“西北地区” 组为参照组)，采样年 (“2010 年之前” 组为参照组)，检测方法 (“PCR” 组为参照组)，年龄 (“幼年” 组为参照组)，性别 (“雄性” 组为参照组)^[127]。

对纳入的研究进行了敏感性分析，以验证结果稳定性。使用漏斗图、Egger 检验及剪补法对本荟萃分析的发表偏倚进行检验^[128]。

1.2 结果

1.2.1 纳入的研究

基于上述检索策略，在四个数据库中共检索到 1298 篇有关国内 AMDV 感染的文章。

排除不合格研究后，最终 45 篇合格研究用于本荟萃分析，并绘制流程图（图 1.1）^[129]。纳入的研究用于进行荟萃分析，最终的检索日期为 2019 年 6 月。45 篇合格的文章中，有 13 篇高质量研究（4 或 5 分），23 篇中等质量研究（2 或 3 分），其余 9 篇为低质量研究（0 或 1 分）。

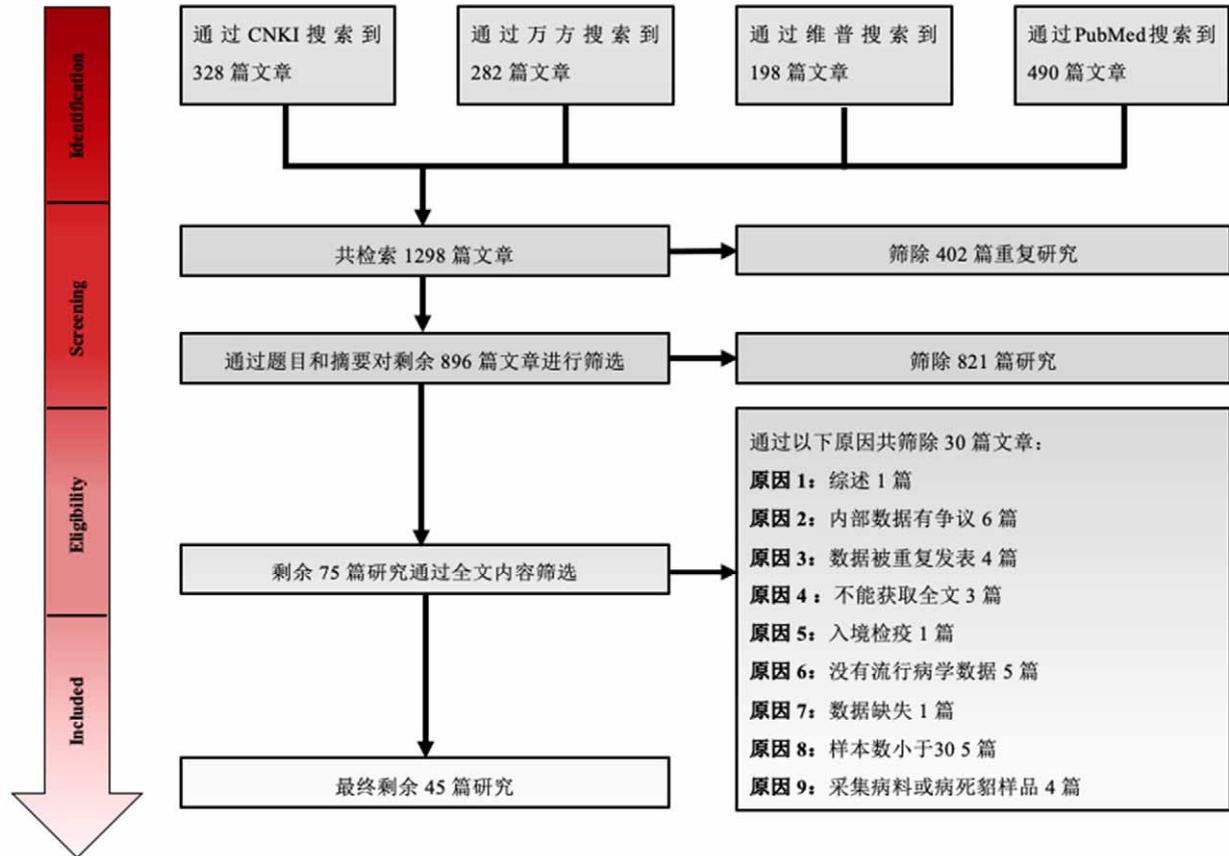


图 1.1 文献检索与选择过程流程图

Fig.1.1 Flow diagram of the literature search and selection process

1.2.2 数据合并和异质性分析

森林图中展示了国内 AMDV 的总体阳性率估计值 (图 1.2)。研究之间异质性很强 ($\chi^2 = 31503.45$; $P < 0.001$; $I^2 = 99.9\%$), 使用随机效应模型汇总的国内 AMDV 总阳性率为 55.3% (95%CI 49-62)。潜在风险因素的合并估计值见表 1-1。

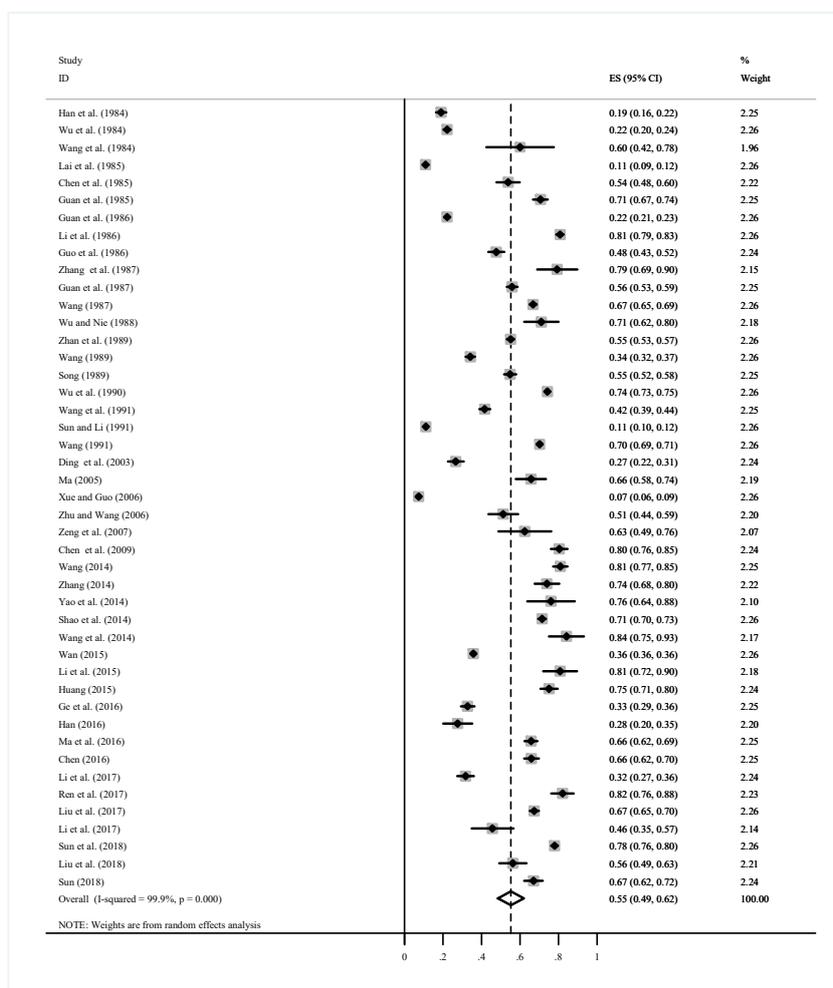


图 1.2 国内研究中 AMDV 阳性率森林图

水平线的长度表示 95% 置信区间, 菱形表示汇总效果

Fig.1.2 Forest plot of AMDV prevalence among studies conducted in China.

The length of the horizontal line represents the 95% confidence interval and the diamond represents the summarized effect

表 1-1 我国 AMDV 感染的不同风险因素间的关联

Tab.1-1 Association of different risk factors in the infection of AMDV in China

	研究数	检测数	阳性数	% (95%CI)	异质性			Meta 回归		
					χ^2	<i>P</i> -value	I ² (%)	<i>P</i> -value	Coefficient (95%CI)	
地区	华北	9	8554	3476	57.8% (41.1-74.5)	2086.13	<i>P</i> < 0.001	99.6%	0.158	0.258(-0.104 to 0.621)
	东北	20	110220	35413	61.3% (53.1-69.5)	12049.41	<i>P</i> < 0.001	99.8%	0.091	0.295(-0.191 to 0.949)
	华东	17	49799	29962	57.9% (46.2-69.7)	11582.96	<i>P</i> < 0.001	99.9%	0.137	0.260(-0.086 to 0.607)
	华中	1	275	192	69.8% (64.4-75.2)	0.00	-	-	0.187	0.379(-0.191 to 0.949)
	西北	2	3176	945	31.9% (12.7-51.1)	135.14	<i>P</i> < 0.001	99.3%		
采样年	2010 年及以后	8	132230	49191	61.4% (43.6-79.3)	3565.00	<i>P</i> < 0.001	99.8%	0.184	0.128 (-0.064 to 0.319)
	2010 年之前	24	57303	26737	48.0% (37.0-60.5)	26080.29	<i>P</i> < 0.001	99.9%		
检测方法	ELISA	7	4434	3322	76.4% (70.7-82.0)	92.66	<i>P</i> < 0.001	93.5%	0.008	0.414(0.115 to 0.713)
	CIEP	31	170569	70366	56.7% (48.2-65.2)	24021.19	<i>P</i> < 0.001	99.9%	0.115	0.214(-0.048 to 0.477)
	IAT	10	17746	4152	45.7% (37.1-54.2)	1114.79	<i>P</i> < 0.001	99.2%	0.436	0.111(-0.174 to 0.397)
	PCR	3	354	139	35.2% (4.5-65.9)	99.02	<i>P</i> < 0.001	98.0%		
年龄	成年	16	7664	3364	44.0% (32.6-55.4)	1913.56	<i>P</i> < 0.001	99.2%	0.121	0.137 (-0.039 to 0.313)
	幼年	10	9391	2476	30.3% (17.3-43.2)	4421.02	<i>P</i> < 0.001	99.8%		
性别	雄性	15	14707	5975	46.9% (33.3-60.5)	4855.96	<i>P</i> < 0.001	99.7%	0.687	0.037 (-0.149 to 0.222)
	雌性	12	5493	2414	43.2% (25.7-60.6)	2476.48	<i>P</i> < 0.001	99.6%		
总计	45	192833	77870	55.3% (48.5-62.0)	31503.45	<i>P</i> < 0.001	99.9%			

CI: 置信区间;

东北: 黑龙江, 吉林和辽宁;

华北: 山西, 河北和北京;

西北: 宁夏和陕西;

华东: 山东, 江苏, 浙江和上海;

华中: 河南;

CIEP: 对流免疫电泳; ELISA: 酶联免疫吸附试验; IAT: 碘凝集试验; PCR: 聚合酶链反应;

成年: >12个月; 幼年: ≤12个月。

1.2.3 发表偏倚

漏斗图没有直观地表明是否存在发表偏倚 (图 1.3), 因此我们进行了 Egger 检验及剪补法, 以进一步验证发表偏倚。Egger 检验结果显示 $P = 0.041$ ($P < 0.05$) (表 1-2), 说明存在发表偏倚; 剪补法结果表明添加两个阴性研究 (阳性率为 0%) 后发表偏倚消失 (图 1.4), 意味着我们纳入的研究存在发表偏倚。

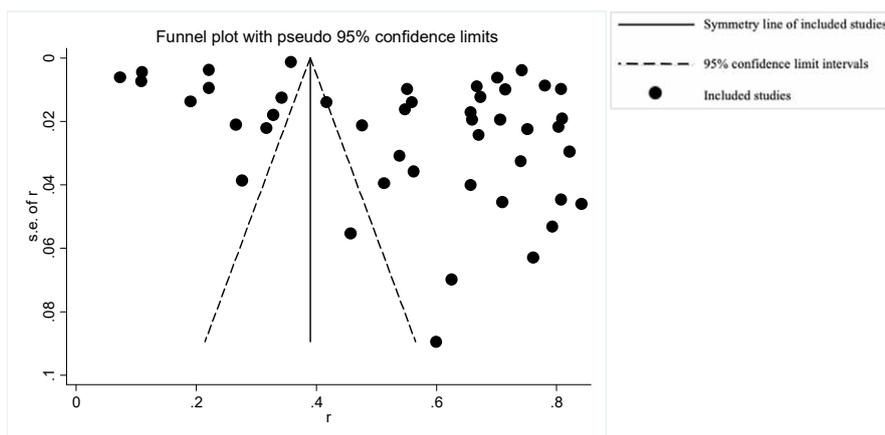


图 1.3 具有 95% 置信区间的漏斗图检查发表偏倚

Fig.1.3 Funnel plot with pseudo 95% confidence limits intervals for the examination of publication bias

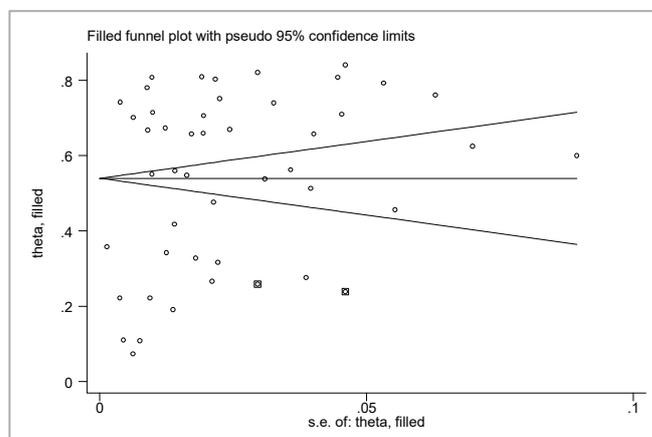


图 1.4 带有发表偏倚的剪补法漏斗图

Fig.1.4 Funnel plot with trim and fill analysis of the publication bias

表 1-2 Egger 的发表偏倚检测

Tab.1-2 Egger's test for publication bias

Std_Eff	Coef.	Std.Err.	t	$P > t $	95% Conf. Interval
slope	0.348	0.331	10.50	0.000	0.281-0.415
bias	10.130	4.797	2.11	0.041	0.455-19.803

1.2.4 敏感性分析

我们对纳入的研究进行了敏感性分析（图 1.5），一次删除一项研究，并对其它研究进行重新合并以估计结果是否可能受到一项研究的显著影响。结果表明，合并后的结果与合并前的结果基本一致，因此本荟萃分析的结果稳定可靠。

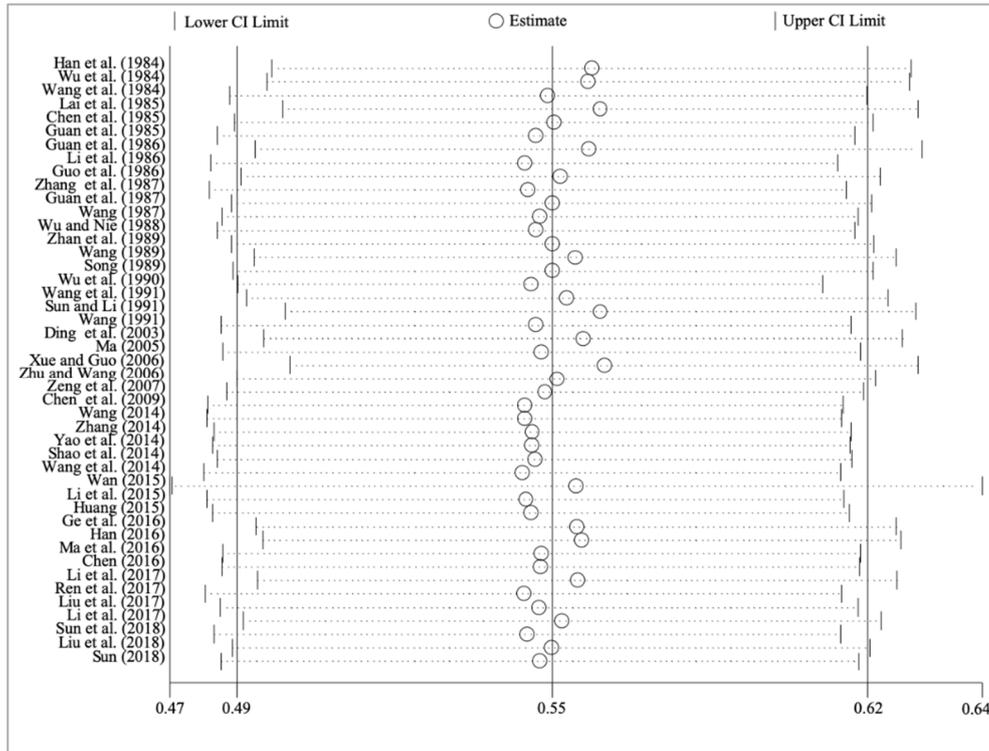


图 1.5 敏感性分析

一次删除一项研究后，其余研究使用随机效应模型重新合并，以验证单一研究对总体结果的影响

Fig.1.5 Sensitivity analysis

After removing one study at a time, the remaining studies were re-combined using a random-effects model to verify the impact of a single study on the overall results

1.2.5 国内水貂 AMDV 总体阳性率

对 45 项研究的 192833 份样本进行荟萃分析，结果表明：1981-2017 年间，中国 AMDV 的阳性率为 55.3%（95%CI 48.5-62.0）（表 1-1）。1981-2009 年间的 AMDV 阳性率为 48.0%（95%CI 37.0-60.5），而 2010-2017 年间的阳性率上升至 61.4%（95%CI 43.6-79.3）（表 1-1）。

1.2.6 国内地区及省级 AMDV 阳性率

本研究旨在评估国内 AMDV 的阳性率和分布情况。然而，在过去的四十年中，国内水貂养殖场分布不均（图 1.6）（表 1-3）。因此，大多数 AMD 研究或样本都集中在中国东部和东北地区。除华中仅 1 篇研究外，东北地区 AMD 患病率最高，为 61.3%（95%CI 53.1-

69.5)。因为缺少部分地区 AMDV 阳性率的数据,因此纳入的样本分布仅覆盖我国 13 个省。数据显示,山东、辽宁及黑龙江省的 AMDV 阳性率分别为 56% (95%CI 42.6-69.5)、57.7% (95%CI 43.9-71.5)和 56% (95%CI 34.7-77.3);但山西、陕西和宁夏自治区的 AMDV 阳性率分别为 10.8% (95%CI 9.4-12.3)、22.1% (95%CI 20.3-23.9)和 41.7% (95%CI 39.0-44.5),低于全国总阳性率。除上述省份外,吉林、河北、北京、上海、浙江、江苏和河南等多地 AMDV 流行情况亦较为严重。

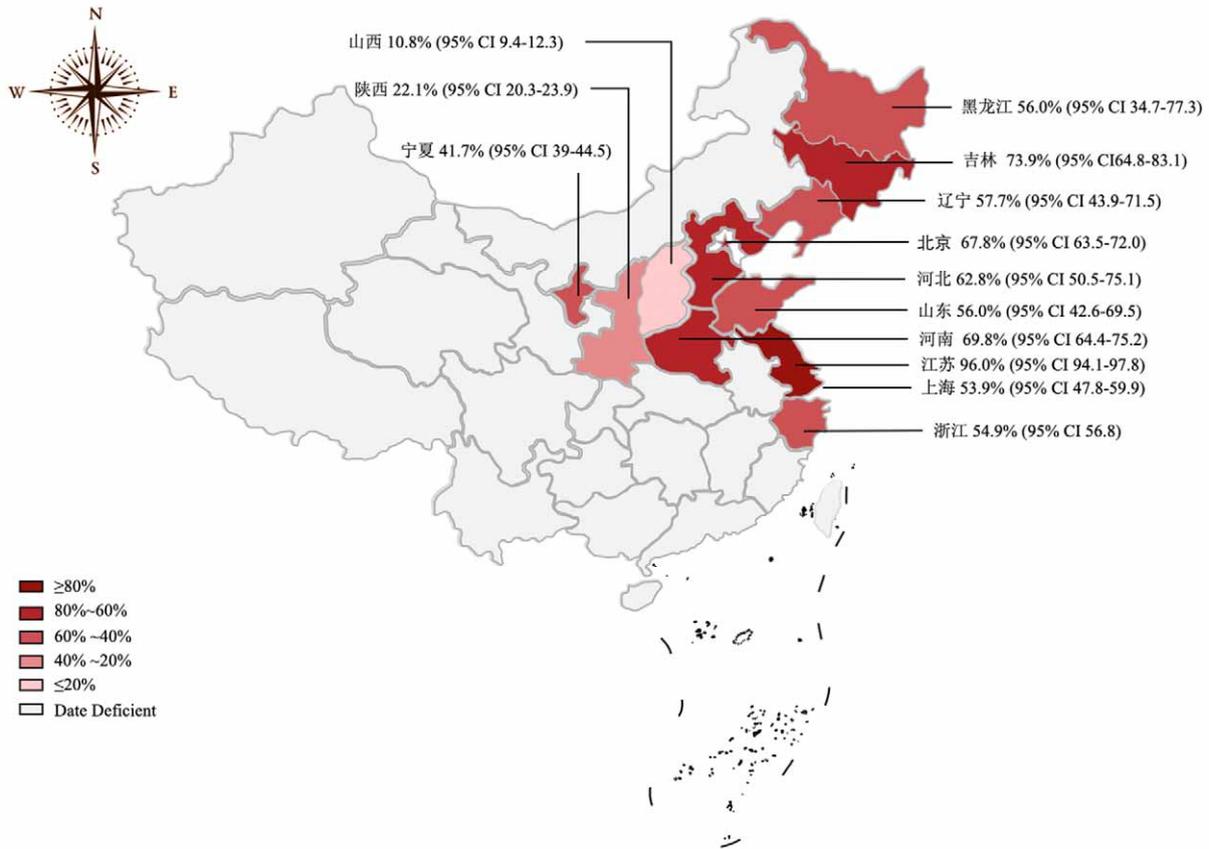


图 1.6 我国水貂的 AMDV 感染分布情况

Fig 1.6 Map of AMDV infection in mink in China

表1-3 我国各省的AMDV合并阳性率

Tab.1-3 Estimated AMDV combined prevalence in various provinces in China

Province	No. studies	Region	No. tested	No. positive	% Prevalence	% (95%CI)
Heilongjiang	5	Northeastern China	64636	19144	56.0	34.7-77.3
Jilin	5	Northeastern China	8684	5887	73.9	64.8-83.1
Liaoning	9	Northeastern China	36900	10382	57.7	43.9-71.5
Hebei	7	Northern China	6363	2977	62.8	50.5-75.1
Ningxia	1	Northwestern China	1239	517	41.7	39.0-44.5
Beijing	1	Northern China	459	311	67.8	63.5-72.0
Shanxi	1	Northern China	1732	188	10.8	9.4-12.3
Shanghai	1	Eastern China	260	140	53.9	47.8-59.9
Shandong	12	Eastern China	46373	27901	56.0	42.6-69.5
Zhejiang	2	Eastern China	2721	1494	54.9	53.0-56.8
Jiangsu	1	Eastern China	445	427	96.0	94.1-97.8
Shaanxi	1	Northwestern China	1937	428	22.1	20.3-23.9
Henan	1	Central China	275	192	69.8	64.4-75.2

1.2.7 基于不同检测方法的 AMDV 阳性率

CIEP 法目前仍是我国水貂场检测 AMDV 的主要手段。该荟萃分析中的大多数研究 ($n=31$) 使用 CIEP (56.7%, 95%CI 48.2-65.2), 有 10 项使用 IAT (45.7%, 95%CI 37.1-54.2), 7 项研究使用 ELISA (76.4%, 95%CI 70.7-82.0), 3 项研究使用 PCR (35.2%, 95%CI 4.5-65.9) (表 1-1)。

1.2.8 基于不同年龄的 AMDV 阳性率

在年龄亚组中, 将测试水貂分为两个生长阶段: 幼年 (小于一岁) 和成年 (大于或等于一岁)。该亚组共进行了 26 项研究, 共 17055 个样本。结果表明, 幼年貂的 AMDV 阳性率为 30.3% (95%CI 17.3-43.2), 成年貂的阳性率高达 44.0% (95%CI 32.6-55.4)。幼年貂的 AMDV 阳性率低于成年貂 (表 1-1)。

1.2.9 基于不同性别的 AMDV 阳性率

性别亚组中, 雄性貂的 AMDV 阳性率为 43.2% (95%CI 25.7-60.6), 略低于雌性貂的 AMDV 阳性率 (46.9%, 95%CI 33.3-60.5) (表 1-1)。

1.2.10 元回归分析

由于纳入的研究具有较高的异质性 ($I^2=99.9\%$), 因此进行了元回归分析以进一步确

定异质性来源。结果表明,检测方法亚组($P=0.010$)可能是异质性的主要来源($P<0.05$) (表 1-1)。

1.3 讨论

AMD 由 AMDV 感染引起,是全球水貂养殖业中最重要的疾病之一。AMDV 引起水貂慢性持续性感染,导致成年貂不育、流产和死胎^[130]。幼年貂感染 AMDV 可能诱发急性间质性肺炎而致死^[131]。详细了解 AMD 的流行状况有助于水貂及其他皮毛动物关于 AMD 有效预防措施的制定^[24]。

本研究首次应用 meta 分析报告 AMD 在我国的总体阳性率。研究比较了 1981-2009 年与 2010-2017 年间我国水貂的 AMDV 感染情况。研究结果表明,AMDV 的阳性率从 1981-2009 年的 48.0% 增加到 2010-2017 年的 61.4%,表明随着时间的推移,AMDV 的感染情况愈发严峻,说明我国在控制 AMDV 流行方面仍存在巨大挑战。在世界范围内,AMDV 感染情况亦不容乐观:在丹麦,养殖场的 AMDV 感染率在 5% 至 90% 之间^[132];AMDV 在芬兰水貂中的平均阳性率在 3% 至 60% 之间,意味着 AMDV 呈普遍性分布且感染率较高^[28]。

国内 AMDV 感染呈现地区多样性的空间分布特点。本研究对国内近 40 年的 13 个省的 AMDV 流行情况进行深入分析,样品总数为 192833 个。这些样本主要来自华东和东北地区,其他地区分布较少^[133]。除华中仅 1 篇研究外,东北地区 AMD 感染率最高,暗示东北地区 AMD 流行情况应予以重视^[134]。华北地区 AMD 的阳性率为 57.8% (95%CI 41.1-74.5)。西北地区的阳性率最低 (31.9%; 95%CI 12.7-51.1)。这种不均匀的分布可归咎于水貂养殖的密度差异。此外,不同地区的文化和卫生条件不尽相同。水貂场的环境、养殖技术、水貂的生长阶段以及 AMD 的检测方法等因素的共同作用最终导致了国内 AMDV 阳性率的差异。但是,应谨慎对待这一结果,因为在我国中部和西部地区鲜有关于 AMDV 阳性率的研究(只有一项研究在中部地区,两项研究在西北部,样本量分别为 275 和 3176)。因此,调查更广泛的地理范围(尤其是在我国中部和西北地区)可能有助于减少地区间患病率的差异。

山东、辽宁、黑龙江和河北是我国养貂大省,其养殖密度和毛皮产量均高于其它省^[135]。省份亚组结果表明,山东、辽宁和黑龙江省的 AMDV 阳性率与总体感染水平相似。其他省份大部分水貂场的种貂可能来自这几个省份,AMD 在这些省份的流行对我国其它地区的感染率具有重大影响^[136]。有鉴于此,建议在水貂养殖密度高的地区实施 AMD 强制控制措施,以降低国内 AMDV 总体阳性率。

在我国其它省市,AMDV 的阳性率也普遍较高 (22.1%-96%)。山西、陕西和宁夏省的 AMDV 阳性率低于全国阳性率。江苏省是中国 AMD 感染率最高的省。然而,纳入的研究中,涉及这些省份的研究很少,因此需要谨慎判断这些结果。在山西、陕西和宁夏的

研究中使用的检测方法是 IAT；在有关山西和宁夏省的文章中，检测样品来自幼貂。这些因素可能导致难以准确估计这些地区真实的 AMDV 阳性率。幼年貂的 AMD 阳性率低于成年貂。因此，我们建议在幼貂分窝之前应进行 AMDV 检测，淘汰阳性水貂^[16]。

不同性别的水貂的感染状况表明，雌性貂的 AMDV 阳性率略高于雄性貂。在貂场中，被感染的雄性貂可与多只雌性貂配种，导致 AMDV 传播给多只雌性貂。然而，AMD 的阳性率在性别上没有显著差异。因此，有必要进一步扩大流行病学调查的空间范围，加强调查的细节和深度，以获得更稳定的结论。

IAT 和 CIEP 是水貂养殖场的常用方法^[137]。纳入的研究中，部分年份较久远的研究使用了 IAT，因为 IAT 易于操作。然而，由于 IAT 的特异性差，敏感性低以及较为主观的结果判定方式可能导致对某些地区或省份 AMD 的患病率估计产生偏差^[24]。因此，某些地区的 AMDV 阳性率可能被低估了。如今，IAT 已逐渐被 CIEP 和其它方法取代^[138]。CIEP 具有较高的特异性和灵敏度，是 AMDV 检测的“黄金标准”^[139]。在选定的所有检测样本中，大多数采用 CIEP 或 IAT，而另一部分研究使用更敏感的 ELISA 和 PCR 评估 AMDV 的阳性率。元回归结果表明，研究中异质性的主要来源是来自 ELISA 组，说明检测方法可能是导致检测结果发生偏差的主要风险因素，使用高敏感性高特异性检测方法对净化貂场的 AMDV 可能有所帮助。

本研究可能存在一些局限性。首先，通过使用几种不同的 MeSH terms 进行搜索，以期在选定的数据库中找出所有与 AMD 相关的研究，但仍可能遗漏某些合格的文章；其次，由于某些研究的样本量较小，过小的样本量可能导致小样本偏倚。因此，本研究可能无法反映某些地区真实的 AMDV 阳性率；第三，除了检测方法，异质性的来源之一也可能是纳入的部分研究并未明确指出是否使用了随机抽样；第四，Wan^[140, 141]等人的采样量对于总样本量而言过大，可能导致不稳定结果；第五，将语言限制为英语和中文导致不能检索到其他语言的相关文章；最后，某些研究的研究目的并不是流行病学调查（比如检测方法构建）。这些研究可能缺少潜在的风险因素，导致亚组分析的数据不足，从而产生异质性并导致结果不稳定。

1.4 小结

- (1) 我国近 40 年间 AMDV 的阳性率呈上升趋势；AMDV 阳性率在不同地区分布不均，其中东北地区 AMD 阳性率相对较高。
- (2) 使用高敏感性、高特异性的检测方法有助于净化貂场的 AMDV。
- (3) 幼貂分窝之前进行 AMDV 检测并淘汰阳性貂可降低貂群 AMDV 感染率。

第二章 我国东北部分地区水貂阿留申病流行情况调查

基于 meta 分析结果, 1981-2017 年间 AMD 在我国且呈地区多样性分布, 且东北地区 AMD 流行情况相比其他地区较为严重。为进一步了解我国东北部分地区 AMD 流行现状, 制定科学的防治措施, 同时为后续试验筛选抗体阴性水貂, 于 2019 年 8-11 月采用 CIEP 法对我国东北部分地区水貂场 AMD 流行情况进行调查。

2.1 材料方法

2.1.1 材料

2.1.1.1 临床样品

2019 年 8-11 月对黑龙江省及吉林省部分地区水貂进行抽查。本次抽查共采集水貂血样 4095 份; 其中吉林省 210 份, 黑龙江省 3885 份; 雄性 537 份, 雌性 3558 份; 一岁以内 2190 份, 1 岁及大于 1 岁 1905 份; 570 份收集于夏季, 3525 份收集于秋季; 天鹅绒咖啡貂 3885 份, 美国短毛黑貂 210 份。

2.1.1.2 试验试剂

本章试验所用试剂见表 2-1。

表 2-1 主要试剂及来源

Tab.2-1 Main reagents and sources

试剂	公司
AMDV 抗原	特研生物有限公司
标准阳性血清	试验室保存
琼脂糖	BIOFROXX
DNA Marker DL2000	TAKARA
Marker DL15000	TAKARA
Ex Taq 酶	TAKARA
核酸染料	凯基生物
50×TAE	北京鼎国生物技术有限公司
血清病毒全基因组提取试剂盒	OMEGA

2.1.1.3 试验仪器

本章试验所用仪器见表 2-2:

表 2-2 常用仪器设备

Tab.2-2 Commonly used equipment

仪器名称	生产厂家
超净工作台	上海新苗医疗器械制造有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	Zealway
琼脂糖水平电泳槽	Tanon
高速冷冻离心机	Thermo

2.1.2 方法

2.1.2.1 CIEP 法检测水貂血清 AMDV 抗体阳性率

(1) 样品采集：以指尖采血法对水貂进行血样采集并分离血清。

具体操作方法如下：准备指甲剪若干，浸泡于 75%酒精中过夜消毒。每只水貂采集新鲜指尖血液 500 μL ，离心管标记年龄性别，置于室温静置 2 h 后，4000 rpm 离心，吸取血清，冻存于 -80°C ，备用。

(2) 对流免疫电泳 (CIEP)

- ① 备胶：根据所用样品孔的数量制备琼脂板，溶解用的缓冲液为 pH 8.6 的巴比妥缓冲溶液，胶厚度为 2.5 mm，浓度为 1%。
- ② 打孔：待琼脂冷凝后，用打孔器打成成对且间距相等的小孔数列，轻轻挑去孔内残留琼脂，最后封底。
- ③ 加样：一孔加入 AMDV 阳性抗原，另一孔加入待检 AMDV 抗体，加样量为 5-10 μL 。
- ④ 搭桥：将纱布剪成与电泳槽等宽，搭在电泳槽两端。
- ⑤ 电泳：将抗原放置在负极端，抗体放置在正极端，根据上样量在 220 V 交流电下调节电泳时间，一般电泳时间为 30-90 min。
- ⑥ 结果判断：电泳结束后，抗原孔与血清孔之间若出现白色沉积物，则判断为阳性，否则为阴性。

2.1.2.2 数据分析

应用 SAS 9.1 统计分析软件对 AMDV 阳性率与样品采集地 (x_1)、性别 (x_2)、采样季节 (x_3)、品种 (x_4) 及年龄 (x_5) 的关系进行统计学分析， $P < 0.05$ 定义为显著差异。

2.2 结果

2.2.1 不同地区 AMD 流行情况

共有 4095 份血清样本用于 AMDV 的检测。其中 1917 份样本血清学检测结果为阳性，

感染率为 46.81% (95%CI 30.7-33.1); 吉林省左家镇 AMDV 血清抗体阳性率为 40.48% (95%CI 23.6-34.0), 黑龙江省帽儿山镇的 AMDV 阳性率为 10.00% (95%CI 6.2-11.9), 黑龙江省双鸭山市集贤县的 AMDV 阳性率为 50.95% (95%CI 32.5-35.0)。不同地区之间差异显著 ($P = 0.000$) (表 2-3):

表 2-3 不同地区间 AMDV 阳性率的关系
Tab.2-3 Relations between AMDV infection and regions in mink

地区	总数	阳性数	阳性率	95% 置信区间	P 值	OR 值	95%置信区间
吉林省左家镇	210	85	40.48%	23.6-34.0	0.000	0.107	0.075-0.151
黑龙江省帽儿山镇	360	36	10.00%	6.2-11.9		参考	
黑龙江省集贤县	3525	1796	50.95%	32.5-35.0	0.000	0.655	0.493-0.869
总计	4095	1917	46.81%	30.7-33.1			

2.2.2 不同性别 AMD 流行情况

对不同性别的水貂进行了 AMDV 阳性率检测 (表 2-4)。其中雄性水貂的阳性率为 47.86% (95%CI 29.1-35.6), 雌性水貂的阳性率为 46.66% (95%CI 30.5-33.1), 二者之间差异不显著 ($P = 0.630$):

表 2-4 性别与 AMDV 阳性率的关系
Tab.2-4 Relations between AMDV infection and gender in mink

性别	总数	阳性数	阳性率	95%置信区间	P 值	OR 值	95%置信区间
雄性	537	257	47.86%	29.1-35.6	0.630	0.953	0.795-1.143
雌性	3558	1660	46.66%	30.5-33.1		参考	
总计	4095	1917	46.81%	30.7-33.1			

2.2.3 不同品种 AMD 流行情况

对不同品种的水貂进行 AMDV 阳性率检测 (表 2-5)。其中天鹅绒咖啡貂的阳性率 47.16% (95%CI 30.8-33.3), 美国短毛黑貂阳性率 40.48% (95%CI 23.6-34.0), 二者间差异不显著 ($P = 0.059$)。

表 2-5 品种与 AMDV 抗体阳性率的关系
Tab.2-5 The relationship between species and AMDV antibody positive rate

品种	总数	阳性数	阳性率	95%置信区间	P 值	OR 值	95%置信区间
天鹅绒咖啡	3885	1832	47.16%	30.8-33.3	0.059	1.312	0.989-1.741
美国短毛黑	210	85	40.48%	23.6-34.0		参考	
总计	4095	1917	46.81%	30.7-33.1			

2.2.4 不同年龄 AMD 流行情况

本研究中所选用的 4095 只水貂中, 小于 1 岁的水貂 AMDV 阳性率为 36.94% (95%CI 25.4-28.6), 大于等于 1 岁的水貂 AMDV 阳性率为 58.16% (95%CI 35.2-38.5), 不同年龄间阿留申阳性率差异显著 ($P = 0.000$) (表 2-6)。

表 2-6 年龄与 AMDV 抗体阳性率的关系

Tab.2-6 Relations between AMDV infection and age in mink

年龄	总数	阳性数	阳性率	95%置信区间	P 值	OR 值	95%置信区间
< 1 year	2190	809	36.94%	25.4-28.6	参考		
≥ 1 year	1905	1108	58.16%	35.2-38.5	0.000	0.421	0.372-0.487
总计	4095	1917	46.81%	30.7-33.1			

2.2.5 不同季节 AMD 流行情况

分别于 2019 年 8 月 (夏季) 和 2019 年 11 月 (秋季) 采集水貂血清进行 AMDV 检测。其中夏季阳性率为 21.23% (95%CI 14.7-20.4), 秋季阳性率为 50.95% (95%CI 32.5-35.0), 不同季节之间差异显著 ($P = 0.000$) (表 2-7)。

表 2-7 季节与 AMDV 阳性率之间的关系

Tab.2-7 Relations between AMDV infection and seasons in mink

季节	总数	阳性数	阳性率	95%置信区间	P 值	OR 值	95%置信区间
夏季	570	121	21.23%	14.7-20.4	参考		
秋季	3525	1796	50.95%	32.5-35.0	0.000	0.259	0.210-0.320
总计	4095	1917	46.81%				

2.3 讨论

水貂阿留申病是由 AMDV 感染引起的一种免疫抑制性疾病, 在全世界的水貂饲养行业广泛流行, 严重影响了水貂业的发展^[142]。AMDV 主要感染宿主为水貂和雪貂^[143]。雪貂是流感和囊性纤维化的动物模型^[144, 145]。水貂和雪貂感染 AMDV 后会出现肾衰竭, 形体消瘦, 脾肿大, 虎斑肾和神经症状。急性感染的貂会在几个月内死亡^[143]。近期的研究显示, 在某些情况下, AMDV 亦可感染浣熊、猫、狗、小鼠以及野生鼬类^[3]。Li 等于 2009 年首次在国内灰狐体内发现了 AMDV 的感染迹象^[146]; 甚至有报道称在水貂养殖户的血液发现了 AMDV 抗体和与 AMD 类似的病症^[26, 147]。AMDV 对环境抵抗力强, 可通过垂直传播或通过气溶胶、肢体接触、伤口、体液以及排泄物等将病毒传播给幼崽和其它水貂。在养殖场中, AMDV 可在笼子、土壤、废水甚至饲养员的手套中长时间保持感染性^[5]。Prieto 等从貂场中的家蝇中提取到了 AMDV 的 DNA, 表明果蝇也可能是貂场 AMDV 传播的载体之一^[6]。AMDV 广泛的传播途径和较强的环境耐受性导致其在水貂养殖场中普遍存在且不易被清除和控制。目前尚无针对该病的有效药物或疫苗。

我国于 1956 年建立了第一个毛皮动物饲养场，并从国外引进了水貂等毛皮动物进行人工繁殖^[13]。因此，阿留申病也随着这些进口的毛皮动物进入我国^[14]。目前，我国貂皮年产量超过 3200 万，经济效益可观。由于我国尚未实施相应的 AMD 清除计划，因此此病尚未得到有效控制^[16]。本研究通过 CIEP 方法，分别对来自吉林省左家镇、黑龙江省帽儿山镇和黑龙江省集贤县的 4095 只水貂进行 AMD 的流行病学普查。结果发现东北部分地区的 AMDV 总体阳性率为 46.81% (95%CI 0.307-0.331)，不同地区之间存在显著差异 ($P=0.000$)。虽然调查结果低于全国 AMDV 总体阳性率 55.3% (95%CI 0.485-0.620)^[30]，但感染情况依旧不容乐观。随着水貂年龄的增长，其接触到 AMDV 的几率大大增加。多变量分析结果显示，水貂的年龄和采样季节对 AMDV 阳性率存在影响。对于季节组，夏季的水貂多为春季刚刚分娩的幼貂，经历过一次 CIEP 的筛查后，留存的水貂绝大部分为阴性或早期感染，因此此时检出率并不高；而经历过高温高湿的夏季后，原本呈阴性的水貂受到 AMDV 感染的几率增加，而最初因早期感染呈假阴性的水貂此时亦进入疾病发病期，成为貂场的 AMDV 传染源。因此，每年进行两次或两次以上的检测筛查，可能有助于貂场净化 AMDV^[30]。

本部分试验对我国东北部分地区 AMDV 流行情况进行了流行病学调查，为 AMDV 相关防控计划的制定提供数据支持，亦筛选了数量充足的 AMDV 抗体阴性水貂，为后续试验的顺利进行奠定基础。

2.4 小结

(1) 利用 CIEP 法对我国吉林省左家镇、黑龙江省帽儿山镇和黑龙江省集贤县的部分水貂场 AMDV 感染情况进行调查，总体阳性率为 46.81%。

(2) 数据分析结果表明，不同水貂品种和性别之间 AMDV 阳性率无显著差异，季节和水貂年龄为东北地区 AMDV 感染的潜在风险因素。

第三章 AMDV-DL125 强毒株感染水貂外周血单核细胞的 ADE 机制体外研究模型构建

通过前面的研究发现我国 AMDV 感染形式严峻，然而由于感染过程中存在较强的抗体依赖性增强（Antibody-dependent enhancement, ADE）效应，至今没有针对性药物及获批疫苗，严重危害水貂养殖业发展。ADE 即病原微生物通过与非中和性的免疫球蛋白-G（IgG）结合，形成抗原-抗体复合物，并通过特异性 Fc γ 受体家族进入巨噬细胞，导致巨噬细胞内感染增加的效应^[29, 49]。在 AMDV 感染水貂的过程中亦存在较强的 ADE 效应，患病水貂体内可检测到高水平的抗病毒抗体和高丙种球蛋白^[43, 66]。然而，正如其它有 ADE 机制的疾病一样，产生的高水平抗病毒抗体基本为非中和性抗体，它们非但无法清除体内的 AMDV，反而可通过一系列途径增强 AMDV 的感染，使得病貂长期处于带毒状态甚至因急性发病而死亡。目前，有关 AMDV 感染过程中的 ADE 机制尚未明确。为了缓解我国 AMDV 感染情况，改善 AMDV 无特效药物及疫苗的现状，本研究构建了 AMDV 感染水貂外周血单核细胞的 ADE 机制体外研究模型，为探索 AMDV 感染过程中的 ADE 效应奠定基础。

3.1 材料方法

3.1.1 材料

3.1.1.1 试验动物

试验水貂于 2019 年 8-11 月购于黑龙江省帽儿山镇及吉林省左家镇某貂场，通过 CIEP 法进行初步筛选后，以 PCR 法复筛出 AMDV 阴性的雌性水貂 52 只，均为小于 12 月龄且生长状况良好的幼貂（表 3-1）。

表 3-1 CIEP 阴性水貂的 PCR 检测结果

Tab.3-1 PCR test results of CIEP negative mink

地区	检测方法	总数	阳性数	阴性数	阳性率
吉林省吉林市左家镇	PCR	40	31	9	77.50%
黑龙江省尚志市帽儿山镇	PCR	60	17	43	28.33%
总计		100	48	52	48.00%

3.1.1.2 试验试剂

表 3-2 主要试剂及来源

Tab.3-2 Main reagents and sources

试验耗材	厂家
采血针	江西丰临医用器械有限公司
各型号注射器	上海琪雅医疗器械有限公司
肝素钠抗凝采血管	上海琪雅医疗器械有限公司
舒泰麻醉剂	法国维克宠物保健公司 Virbac
HRP 标记的兔抗貂 IgG	北京博奥森公司
FITC 标记的山羊抗貂 IgG	北京博奥森公司
PBMC 分离管 SepMate™-50	STEMCELL Technologies
淋巴细胞分离液 Ficoll Paque PLUS	GE Healthcare Life Sciences
CD11b 磁珠分选试剂盒	美天旎 (Miltenyi Biotec) 生物科技有限公司
磁珠分选架	美天旎 (Miltenyi Biotec) 生物科技有限公司
磁珠分选柱	美天旎 (Miltenyi Biotec) 生物科技有限公司
抗小鼠 CD11b 荧光抗体 (APC)	BD Pharmingen™
人及哺乳动物单核细胞培养基	天津灏洋
胎牛血清	Gibco
细胞培养基 RPMI 1640	Gibco
氨苄青霉素	长春汇金百利生物技术有限公司
牛血清白蛋白 (BSA)	德国 Biofroxx
Trizol	Ambion
RNA 提取试剂盒	Axygen

3.1.1.3 试验设备

表 3-3 常用仪器设备

Tab.3-3 Commonly used equipment

仪器	厂家
水平冷冻离心机	THERMO
超净工作台	苏州泰安空气技术有限公司
光学倒置显微镜	德国徕卡 Leica 仪器有限公司
荧光倒置显微镜	德国徕卡 Leica 仪器有限公司
流式细胞仪	BD
CO ₂ 恒温细胞培养箱(Hera cell 240i)	THERMO
PCR 仪	德国 jena

3.1.2 方法

3.1.2.1 AMD 阴性水貂筛选

对 CIEP 筛选为阴性的水貂血清样本,选取其中 100 只雌性水貂的阴性血清,以 AMDV 基因组为模板,应用 Oie 等^[141]设计的 AMDV 鉴定引物(由吉林省库美生物公司合成,表 3-4)进行 PCR 扩增,具体方法如下:

(1) 血清病毒全基因组提取(试剂盒)。

见附录 2。

(2) 聚合酶链式反应(PCR)。

PCR 反应体系为 25 μ L, 见表 3-5:

表 3-4 PCR 鉴定引物

Tab.3-4 Identification primers

名称	方向	序列
AMDV-JD-U	5'-3'	CTTGTCACGCTACTAGAATGGT
AMDV-JD-D	5'-3'	AGCTTAAGGTTAGTTTACATGGTTTACT

表 3-5 PCR 鉴定体系

Tab.3-5 Identification PCR system

组分	用量(μ L)
灭菌水	10.5
DNA 模版	1
上游引物	0.5
下游引物	0.5
Premix Taq	12.5
总体积	25

3.1.2.2 水貂外周血原代单核细胞的分离纯化

(1) 水貂外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离。

- ① 6 月龄水貂,肌肉注射 30 μ L 舒泰麻醉剂;
- ② 以负压抗凝采血管进行心脏采血处死水貂;
- ③ 2 mL PBS 润洗离心管;
- ④ PBS:血液 = 1:4 (1 mL PBS + 4 mL 血液),置于 50 mL 离心管一次性稀释;
- ⑤ 将平衡至室温的 Ficoll 液通过 PBMCs 分离管内芯的小孔注入管底,待分离液从内芯四周溢出,形成平的液面即可(50 mL 的 PBMCs 分离管可注入 14.5-15 mL Ficoll 液);
- ⑥ Ficoll:稀释血 = 1:1 (15 mL 分离液 + 15 mL 稀释血)。将 15 mL 稀释血沿管壁注

入分离管中（由于 PBMCs 分离管内装有内芯以维持液面的分层，此分离方法较一般 PBMCs 分离方法操作更简便，且后续离心操作可使用较大的离心力，水平离心机加速和减速功能均可使用）；

- ⑦ 室温（20℃），1000×g，升速等级 5，降速等级 5，离心 10 min；
- ⑧ 离心分层后，直接倒出管内液体（由于有内芯阻隔，仅上血浆层和 PBMC 细胞层以及少部分 Ficoll 液可以倒出）；
- ⑨ 用 10 倍过量的 PBS 稀释上一步收集的细胞；
- ⑩ 在制动开启的情况下，500×g，室温离心，持续 8 min；
- ⑪ 弃上清；
- ⑫ 将细胞重悬于 5 mL PBS 中（如有必要，此时将来自多个管的细胞沉淀物混合）；
- ⑬ 500×g 离心 8 min；
- ⑭ 重复 2 次步骤 11-13（去除血小板），弃去上清液并将细胞（PBMC）重悬于 1 mL 等渗磷酸盐缓冲液或合适的细胞培养基中；
- ⑮ 一部分细胞接种于完全培养基中，温箱培养 1 h，以 37℃ 预热的 PBS 轻轻冲洗两次去除未贴壁细胞，过夜培养，形态观察；
- ⑯ 一部分与偶联了 CD11b 抗体的磁珠 4℃ 孵育，进行磁珠分选。

（2）水貂外周血单核细胞的纯化。

使用免疫磁珠分选法从水貂外周血 PBMC 中纯化单核细胞：

- ① PBMC 计数；
- ② 300×g 离心 10 min，完全吸去上清；
- ③ 重悬细胞，每 1×10^7 个细胞用 90 μ L buffer（注意保持 buffer 和细胞处于低温状态）；
- ④ 每 1×10^7 个细胞加 10 μ L CD11b 磁珠；
- ⑤ 混合均匀 4-8℃ 孵育 15 分钟；
- ⑥ 每 1×10^7 个细胞加 1-2 mL buffer，300×g 离心 10 min，吸去上清；
- ⑦ 每 1×10^8 个细胞以 500 μ L buffer 重悬（单个柱子可过滤总细胞数为 1×10^8 ）；
- ⑧ 将分离柱卡在磁性分离器上；3 mL buffer 润洗分离柱；
- ⑨ 将细胞悬液悬空加于分离柱内，不要挂壁；
- ⑩ 1 mL 缓冲液洗涤柱子，共 3 次，每次待柱内液体流尽后再加缓冲液，弃掉分离柱下方流出的液体；
- ⑪ 将柱子从磁力架上移下，置于合适的收集管上方；
- ⑫ 适量的缓冲液加到柱子中；
- ⑬ 将柱塞插入柱子，施压，洗掉磁珠标记的细胞；
- ⑭ 细胞计数。

（3）流式细胞术检测单核细胞纯度

- ① 将 1×10^6 单核细胞 $300 \times g$ 离心, 弃去上清;
- ② 加入 $200 \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞;
- ③ 加入 $1 \mu\text{L}$ APC 荧光标记的抗小鼠 CD11b 抗体, 室温孵育 20 min;
- ④ $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清;
- ⑤ PBS 重悬细胞, $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清;
- ⑥ 重复步骤 2 次后, 以 $100 \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 将细胞悬液加入到流式上样管中, 进行流式细胞术检测。

3.1.2.3 AMDV 感染过程中 ADE 机制体外研究试验

根据 ADE 形成过程的特点, 构建 AMDV-DL125 (强毒株) 感染水貂外周血单核-巨噬细胞的 ADE 体外研究试验^[21]。

(1) AMDV-DL125 病毒毒价的测定。

AMDV 感染 CrFK 细胞后并不产生细胞病变, 因此使用免疫过氧化物酶单层细胞试验 (Immunoperoxidase monolayer assay, IPMA) 测定 AMDV-DL125 毒价:

- ① 取长满单层的 CrFK 细胞, 消化后, 取细胞悬浮液加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$;
- ② 将分离的病毒从 10^{-1} 开始进行 10 倍系列稀释, 以同步接毒法, 将病毒接种于 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$;
- ③ 将细胞培养板置于 31.8°C 、5% CO_2 培养箱中培养 18-24 h;
- ④ 待细胞长满单层后, 弃去培养液, 每孔加入 PBS 溶液 $100 \mu\text{L}$ 。洗涤 3 次后, 用含有 3% 双氧水的无水乙醇, 4°C 固定 6 h;
- ⑤ 去除无水乙醇, 用 PBS 洗板 3 次, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 每次 1-3 min;
- ⑥ 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 含 5% 血清的 PBS, 封闭 2 h 后, PBS 洗涤 3 次, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 每次 1-3 min;
- ⑦ 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 100 倍稀释的 AMDV 阳性血清, 37°C 孵育 1 h;
- ⑧ 弃去培养板中液体, PBS 洗涤培养板 3 次后, 每孔加入 4000 倍稀释的 HPR 标记的兔抗貂 IgG, 37°C 孵育 1 h;
- ⑨ PBS 洗涤培养板 3 次后, 每孔加入新鲜配置的 DAB 显色液 $200 \mu\text{L}$, 在避光处显色 5 min;
- ⑩ 弃去显色液, 蒸馏水洗板 3 次后, 每孔加入 Harris-苏木素液 $200 \mu\text{L}$;
- ⑪ 复染 2 min;
- ⑫ 蒸馏水洗涤 5 min 后, 将培养板置于倒置显微镜下, 进行观察。

(2) ELISA 检测 AMDV 阳性血清 IgG 抗体效价。

- ① 病毒包被。上述病毒液在紫外灯下光照 40 min 灭活后以 0.8% 戊二醛的 PBS 稀释

- (稀释比 1:10), 铺于 96 孔细胞培养板中, 100 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜^[148];
- ② 适量 1 \times PBST 清洗平板 1-3 min;
 - ③ 封闭液 (5%脱脂奶粉) 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;
 - ④ 1 \times PBST 洗板 3 次, 每次 1 min;
 - ⑤ 每孔加入相应稀释比例的一抗 (AMDV 阳性血清, 稀释比为 1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048、1:5012 及 1:10024), 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;
 - ⑥ 1 \times PBST 洗板 3 次, 每次 1min;
 - ⑦ 每孔加入稀释好的酶标二抗 (HRP 标记的兔抗貂 IgG, 稀释比为 1:2000), 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;
 - ⑧ 1 \times PBST 洗板 3 次, 每次 1 min;
 - ⑨ 每孔加入 100 μL OPD 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;
 - ⑩ 每孔加入 50 μL 20%硫酸终止显色, A492 nm 检测吸光度。计算阳性血清与阴性血清的吸光度之比 (P/N), 当 P/N < 1.5 时为阴性, 当 P/N \geq 1.5 而 < 2.1 为可疑, 当 P/N \geq 2.1 为阳性。将 P/N \geq 2.1 时所对应的抗体最高稀释倍数作为抗体的效价。

(3) 免疫复合物 (CIC) 检测。

使用聚乙二醇沉淀比浊法^[149]检测不同浓度阳性血清与 AMDV-DL125 孵育后产生的免疫复合物含量, 孵育条件参照 Dworak^[21]等的研究。检测样本 OD 值减去对照样本 OD 值即为血清中免疫复合物检测结果。选取 OD 值最高值的血清稀释倍数作为后续试验条件。

(4) 抗原-抗体复合物制备。

按照上述试验获得的比例, 将适量 AMDV 阳性血清 (对照组加 AMDV 阴性血清) 与 AMDV-DL125 株病毒液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 以形成抗原-抗体复合物。

(5) 试验设计及分组。

将磁珠分选获得的单核细胞加入细胞培养皿中, 培养 2 h, 待单核细胞贴壁后, 弃去培养液, 用含双抗 (0.1%浓度的氨苄青霉素) 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 PBS 轻轻吹洗细胞表面 3 次, 以除去细胞表面残留的血清及未贴壁细胞。

将上述细胞分为两组, AMDV-DL125PS 组 (试验组) 添加 AMDV 阳性血清和 AMDV-DL125 病毒混合液; AMDV-DL125NS 组 (对照组) 添加 AMDV 阴性血清和 AMDV-DL125 病毒的混合液 (表 3-6)。轻轻晃动细胞板使混合液均匀铺于细胞表面, 并置于细胞培养箱中预热的湿盒 (含有 PBS 浸润纱布的半密封盒子) 内, 孵育 10 min 后, 再次轻轻晃动, 以使得混合液充分与细胞表面接触并吸附, 重复 4 次。

添加人与哺乳动物单个核细胞完全培养基, 培养 12 h, 用于后续试验。

表 3-6 试验分组
Tab.3-6 Test group

分组	添加物
AMDV-DL125PS	AMDV 阳性血清+AMDV-DL125
AMDV-DL125NS	AMDV 阴性血清+AMDV-DL125

(6) 病毒感染情况检测。

使用表 3-6 分组刺激并培养 12 h, 进行 IFA 试验检测病毒感染情况。一抗为实验室保存的 AMDV 阳性血清, 二抗为异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗貂 IgG:

- ① 固定: 室温下, 在 4%多聚甲醛 (溶于 PBS 中, pH 7.4) 中固定细胞 10 min, 预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次;
- ② 透化: 用 PBS (含 0.1-0.25% Triton X-100) 孵育样品 10 min, PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min;
- ③ 封闭与免疫染色: 用含有 5% BSA、22.52 mg/mL 甘氨酸的 PBST (PBS + 0.1% Tween 20) 孵育细胞 30 min; 用溶于 1% BSA 的 PBST 中的稀释抗体在湿盒中室温孵育细胞 1 h (或 4°C 孵育过夜); 倒出液体, PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min; 室温下, 用溶于 1% BSA 的二抗室温避光孵育细胞 1 h; 倒出二抗, 以 PBS 避光洗涤细胞 3 次, 每次 5 min;
- ④ 复染: 用 0.1-1 μg/mL DAPI (细胞核染色) 孵育细胞 1 min, PBS 漂洗细胞后于荧光显微镜下观察或 4°C 避光保存。

(7) 不同时间点的 AMDV-DL125 拷贝数检测。

提取 3.1.2.3 中细胞及培养液中的病毒总 DNA (方法见 3.1.2.2), 使用实验室构建的 AMDV 绝对定量检测方法, 检测病毒初始拷贝数。

(8) 不同时间点的 AMDV-DL125 VP2 mRNA 表达量检测。

提取 3.1.2.3 中细胞总 RNA, 以 GAPDH 为管家基因, 检测不同时间点 AMDV-DL125 的 VP2 基因表达量。

(9) ADE 相关基因及细胞因子的检测。

使用 qRT-PCR 检测两试验组中的 ADE 相关基因, 以 GAPDH 为管家基因, 检测抗原-抗体复合物存在时与无抗原-抗体复合物时的 ADE 相关基因表达量, 以进一步验证 AMDV-DL125 感染水貂外周血原代单核-巨噬细胞体外研究模型构建是否成功。检测基因及引物如表所示 3-7:

表 3-7 ADE 相关基因及细胞因子

Table 3-7 ADE-related genes and cytokines

细胞因子	基因编号	引物 (3'-5')
IL-2R γ	XM_004777214.2(1.11)	F: AATGATGATAAAGTCCAGGAGTGTG R: AGATTCTGTAGTTTTAGTGTCCGAATG
IL-6	XM_004743356.2(-2.5599)	F: CTATGAACTCCCTCTCCACAAGC R: CGGGGTAGGGAAAGCAGTAG
IL-18	TCONS_00022605(1.4897)	F: CAGAAAACGCATCCCATACCG R: CATTCCCTTCGTCCTGATACTGT
IL-19	XM_004756191.2(-2.4253)	F: CTTCCAAAATGTCACCATCCTGTC R: CCAGGAGGTTCTTGGTCATACAG
IFN- γ R1	TCONS_00005553(1.3654)	F: CACCTTGTTATCCCAGTGTCTC R: AGTACTAGAAAAAGCAGAATGGCAAC
SOCS1	XM_004750373.2(0.60289)	F: CCTGAATTTGCACCTCCTACCTC R: CACAGCAGAAAAATAAAGCCAGAGAC
JAK1	TCONS_00019749(-1.5764)	F: CTCGCCTACTGCGGTGTGTTTC R: CCCTTTTGTATTTTGTACTGATGC
RIG-I	TCONS_00050969(1.324)	F: AGTGTAAGGGCTTTGCGTGTTAC R: CACTTCCTGAAAGCATCTCCAAC
MDA5	TCONS_00012288(-2.8985)	F: AAGGTAGACGCTTGACCGACTG R: CTGTGGATTGGACGTTGTGCG
TNF-R1	XM_004766732.2(0.92374)	F: ATTCCATTTGCTGTACGAAGTGC R: CACCTGGTTCATTTCTTTTCGG
TNF-R2	TCONS_00007521(0.73799)	F: GTGCCATCGCTCCCCTATGC R: CGGGCACACACGGTATCTGAG
TRAF2/5	XM_004756911.2(1.7488)	F: AGGAAGACCGCCACCTTTGAG R: AGACAAACACGCCGTCGAAG
TRAF6	TCONS_00033596(0.68692)	F: CTCACCAGGGAATGTTGTTTCG R: ACAAAGAGCCGCTGCGATA
IL-10	XM_004756192.2	F: ATTGTTGACTGGGTCTTGCTG R: CTCCTTGACTTCTGGGTCGTGG
GAPDH	XM_013055396.1	F: AACATCATCCCTGCTTCCACTGGT R: TGTTGAAGTCGCAGGAGACAACCT

3.1.2.4 数据分析

采用 GraphPad Prism 8 中的多重 t 检验 (multiple t tests) 进行数据分析, $P < 0.05$ 定义为差异显著。

3.2 结果

3.2.1 水貂外周血 PBMC 的提取

使用 Ficoll 液对水貂外周血 PBMC 进行分离，得到如图 3.1 所示的 PBMC 层。将此层细胞进行多次离心弃上清，除去血小板等可能干扰磁珠分选的杂质后，进行磁珠分选。

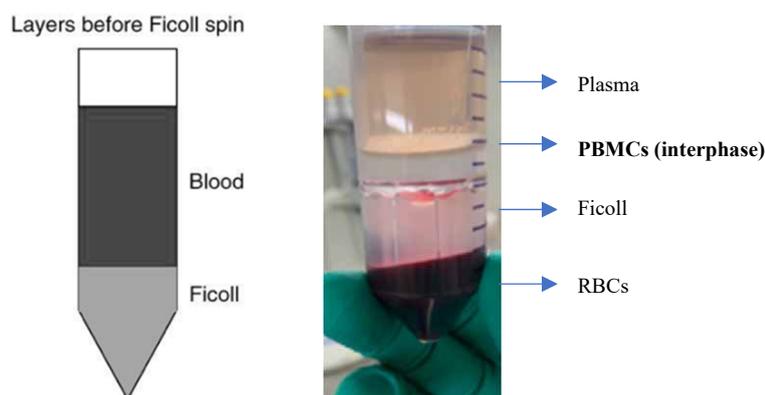


图 3.1 水貂原代外周血单个核细胞（PBMC）分离

Fig.3.1 Isolation of primary peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from mink

3.2.2 免疫磁珠分选法纯化水貂外周血单核细胞

使用偶联抗鼠 CD11b 的免疫磁珠对水貂 PBMC 进行免疫磁珠法纯化。结果显示，纯化后的单核细胞形态均一，初步判定满足后续试验要求（图 3.2）。

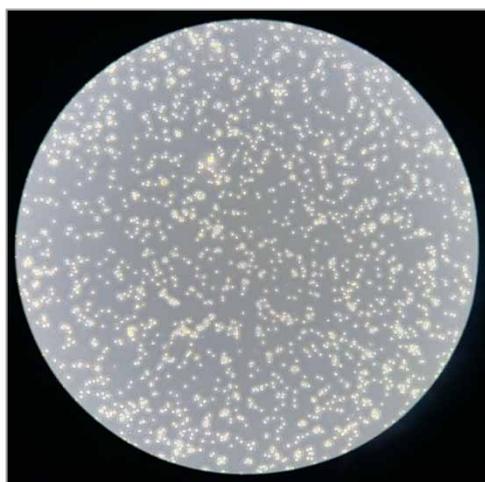


图 3.2 磁珠分选后的水貂外周血单核细胞

Fig.3.2 Peripheral blood monocyte of mink after magnetic bead sorting

3.2.3 流式细胞术检测细胞纯度

抗鼠 CD11b 磁珠筛选后, 进行免疫荧光标记, 流式细胞术检测分选细胞纯度, 结果单核细胞占分选后总细胞量的 93.2%, 纯度较高, 符合后续试验要求 (图 3.3)。

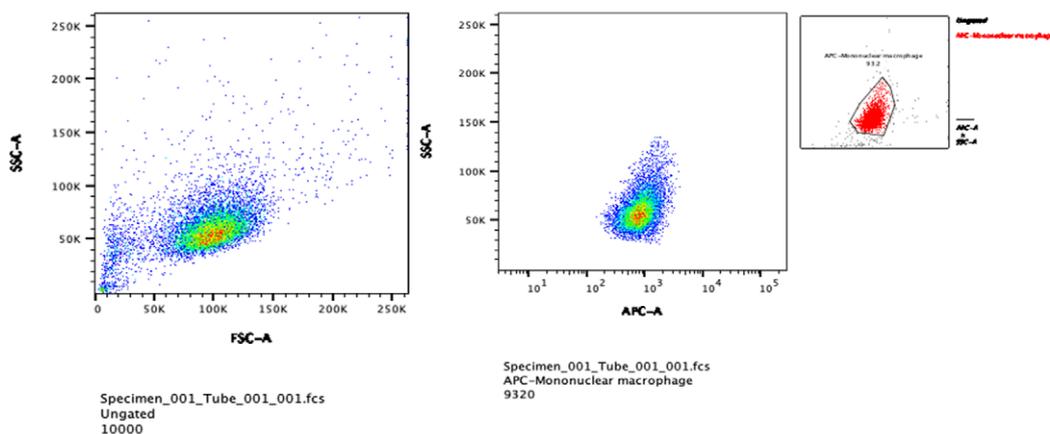


图 3.3 磁珠分选后的单核-巨噬细胞纯度

Fig.3.3 Purity of mononuclear-macrophages after magnetic bead sorting

3.2.4 AMDV-DL125 病毒滴度检测

由于 AMDV-DL125 株不能导致 CrFK 病变, 因此使用 IPMA 方法进行病毒毒价测定 (图 3.4)。结果显示, 病毒毒价为 $10^{4.45}$ TCID₅₀/0.1 mL (表 3-8)。

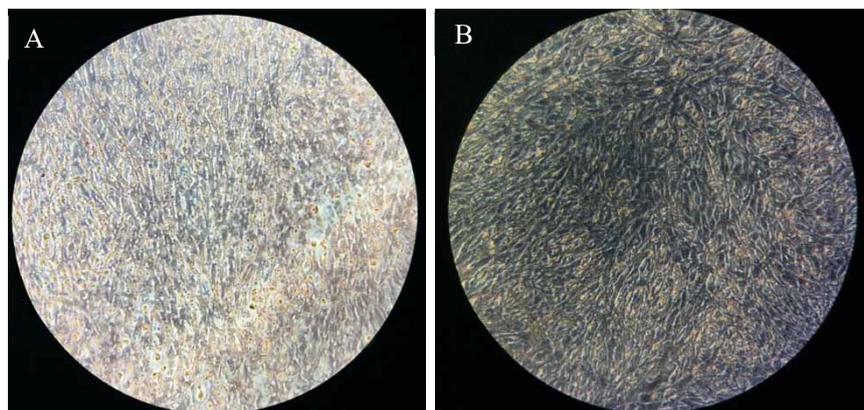


图 3.4 IPMA 法测定 AMDV-125 毒力示意图。A: 感染组, B: 未感染组

Fig.3.4 Schematic diagram of the virulence of AMDV-125 measured by IPMA method. A: Infected group, B: Uninfected group

表 3-8 Karber 法计算 AMDV-DL125 TCID₅₀Tab.3-8 Calculate TCID₅₀ of AMDV-DL125 with Karber method

病毒稀释度	染色孔数	未染色孔数	感染比
10 ⁻¹	10	0	1 (10/10)
10 ⁻²	10	0	1 (10/10)
10 ⁻³	8	2	0.8 (8/10)
10 ⁻⁴	5	5	0.5 (5/10)
10 ⁻⁵	3	7	0.3 (3/10)
10 ⁻⁶	2	8	0.2 (2/10)
10 ⁻⁷	0	10	0 (0/10)

计算公式: $\lg TCID_{50} = L - D(S - 0.5)$;

L: 最高稀释度的对数;

D: 稀疏度对数之间的差;

S: 阳性孔比率之和。

3.2.5 ELISA 检测 AMDV 阳性血清 IgG 抗体效价

使用 ELISA 方法检测实验室保存的 AMDV 阳性血清抗体效价, 结果显示抗体的效价为 1:256 (图 3.5), 说明 AMDV 阳性血清与 AMDV-DL125 发生免疫反应的最高稀释倍数为 256 倍。

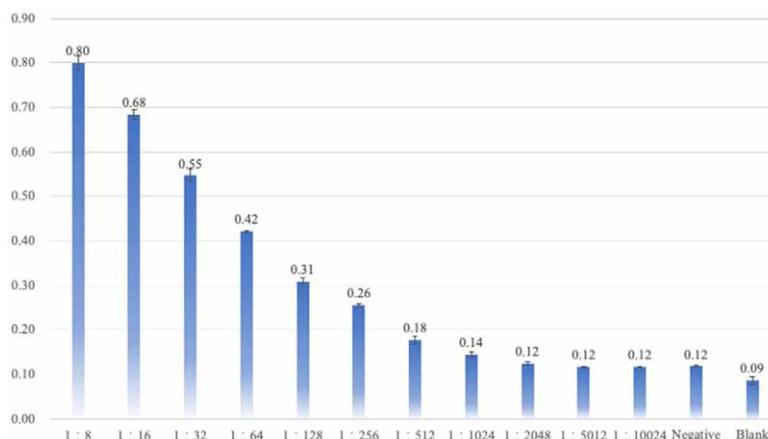


图 3.5 AMDV 阳性血清抗体效价的 ELISA 检测。横坐标为血清稀释倍数, 纵坐标为 OD 值

Fig.3.5 ELISA detection of antibody titer of AMDV positive serum. The abscissa is the serum dilution multiple, the ordinate is the OD value

3.2.6 免疫复合物 (CIC) 检测

使用聚乙二醇沉淀比浊法检测不同浓度阳性血清与病毒孵育后产生的免疫复合物含量。所用病毒毒价为 $10^{4.45}$ TCID₅₀/0.1 mL, 血清抗体效价为 1:256。选取 OD 值最高的血清稀释倍数作为后续试验条件。结果显示, 样品 OD 值随血清稀释倍数的升高呈现先升高后降低的趋势; 血清稀释比为 1:16 时 OD 值最大, 说明此时免疫复合物浓度最高 (图 3.6)。因此, 选择体积比为病毒:血清 = 1:16 的稀释比作为抗原-抗体复合物孵育的血清浓度。

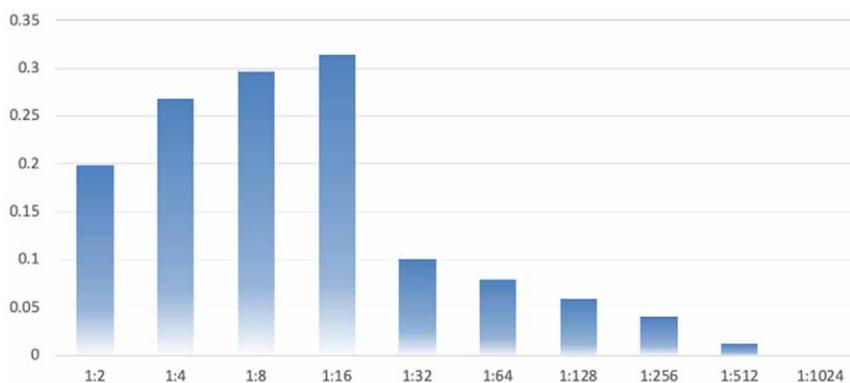


图 3.6 不同血清稀释度的免疫复合物检测 (CIC)。横坐标为血清稀释倍数, 纵坐标为 OD 值
Fig.3.6 Detection of immune complexes in different serum dilutions. The abscissa is the serum dilution multiple, the ordinate is the OD value

3.2.7 间接免疫荧光试验 (IFA)

对纯化后的单核-巨噬细胞进行病毒感染试验, 并进行 IFA 验证 AMDV-DL125 感染过程中的 ADE 现象。结果显示 AMDV-DL125PS 组的单核-巨噬细胞细胞核附近出现荧光, 且视野中的荧光数明显高于 AMDV-DL125NS 组 (图 3.7), 暗示更多的病毒粒子进入单核-巨噬细胞内。

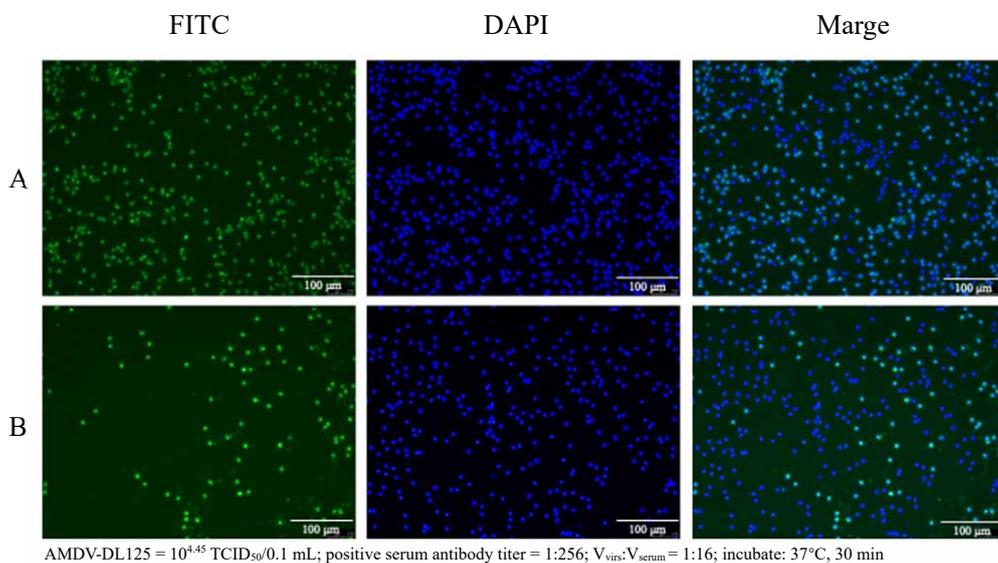


图 3.7 抗原-抗体复合物促进 AMDV-DL125 感染水貂单核细胞

A: AMDV-DL125 与阳性血清混合物; B: AMDV-DL125 与阴性血清混合物; 两组混合物分别感染单核细胞 12 h 后 AMDV-DL125 (绿色) 和 DAPI (蓝色) 的免疫染色。比例尺: 100 μm

Fig.3.7 Antigen-antibody complex promotes AMDV-DL125 infection of mink monocyte
AMDV-DL125PS: AMDV-DL125 and positive serum mixture; AMDV-DL125NS: AMDV-DL125 and negative serum mixture; Immunofluorescence staining of AMDV-DL125 (green) and DAPI (blue) after 12 hours infection of AMDV-DL125NS/ AMDV-DL125PS with mmonocytes. Scale bar: 100 μm

3.2.8 不同时间点的 AMDV-DL125 拷贝数检测

对上述两组病毒液提取病毒基因组后进行绝对定量 qPCR 检测病毒拷贝数。结果显示, 在 8 h 和 12 h 时, AMDV-DL125PS 组病毒拷贝数明显高于 AMDV-DL125NS 组 ($P < 0.05$), 说明当存在抗原-抗体复合物时, 感染 8 h 以后, AMDV-DL125 的复制效率得到加强 (图 3.8)。

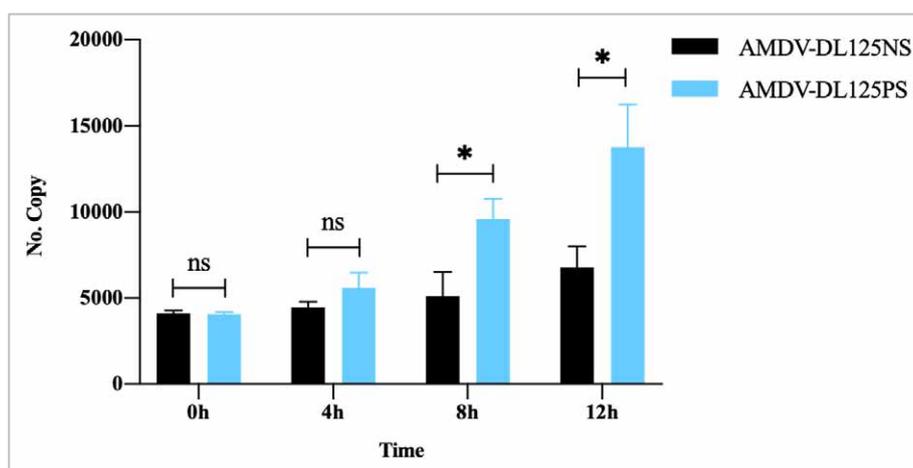


图 3.8 AMDV-DL125PS vs AMDV-DL125NS 不同时间点病毒拷贝数

Fig.3.8 AMDV-DL125PS vs AMDV-DL125NS virus copy number at different time points

3.2.9 不同时间点的 AMDV-DL125-VP2 mRNA 表达量检测

提取刺激 12 h 后的细胞总 RNA, 检测不同时间点 AMDV-DL125-VP2 基因表达量。结果如图 3.9 所示, 随时间增加, AMDV-DL125-VP2 表达量逐渐增加, 在 8 h 和 12 h 时, AMDV-DL125PS 组的 VP2 基因表达量显著高于 AMDV-DL125NS 组 ($P < 0.05$), 说明当存在抗原-抗体复合物时, 感染 8 h 以后, AMDV-DL125 的复制效率得到加强 (图 3.9)。

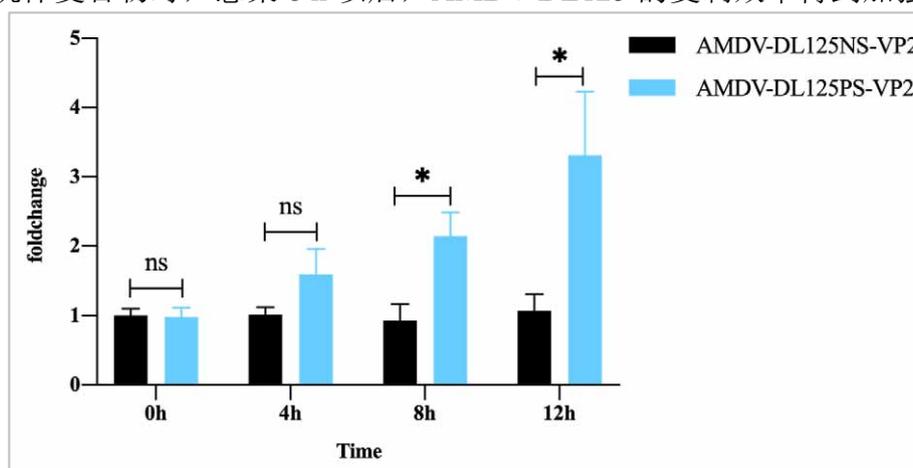


图 3.9 AMDV-DL125-VP2 表达量 qRT-PCR 检测

Fig.3.9 AMDV-DL125-VP2 expression detected by qRT-PCR

3.2.10 ADE 相关基因及细胞因子检测

通过 qRT-PCR 检测 ADE 相关细胞因子及部分基因。如图 3.10, IL-2R α 表达量显著增加。同样的, AMDV-DL125PS 组的 IL-18、IFN- γ R1 及 TNF-R1 和 TNF-R2 的表达量也显著高于 AMDV-DL125NS 组, 说明此时的抗病毒因子 IL-2、INF- γ 与 TNF- α 也可能处于高表达水平。此外, TRAF2/5、TRAF6、SOCS-1、RIG-I 表达量上调, 而 JAK-1、MDA5 表达量下调, 说明 TRAF 家族成员的表达量增加抑制了 RIG-I/MDA5 表达, 在减弱 RIG-I/MDA5 信号通路的同时, 也抑制了促炎细胞因子如 IL-6 的表达, 从而促进了病毒在细胞中的快速复制和增殖。然而, IL-10 的表达量并未发生显著变化, 可能是由于刺激时间较短所致。

综合以上试验结果, AMDV-DL125 强毒株感染水貂外周血单核细胞的 ADE 机制体外研究模型构建成功。

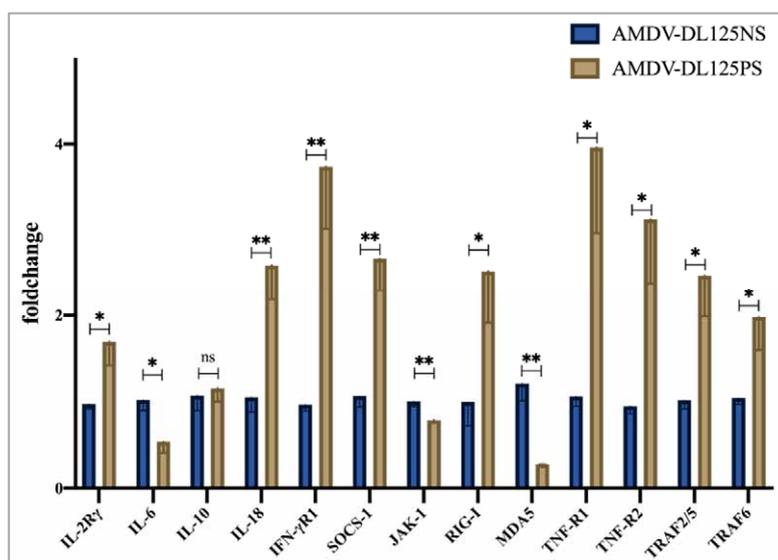


图 3.10 qRT-PCR 检测 ADE 相关基因及细胞因子

Fig.3.10 qRT-PCR detection of ADE-related genes and cytokines

3.3 讨论

水貂做为特种经济动物之一, 多年来被世界各地广泛饲养, 经济价值较高。然而, 水貂阿留申病, 一直以来困扰着养貂产业, 造成严重的经济损失。AMD检测方法众多, 其中CIEP是世界公认的金标准。但在感染初期, 该方法检测灵敏度较差, 且由于其抗原多为细胞抗原或脏器抗原等全病毒抗原, 因此可能存在散毒风险^[150]。我们对第二章中CIEP法筛选得到的阴性水貂进行了PCR方法的再次筛查, 筛选出AMDV抗原阴性水貂50余只。这一结果说明CIEP法灵敏度相比PCR法较低, 经此方法筛查的水貂场, 可能在较短时间内保持场内水貂不发病, 但对彻底清除AMDV效果并不理想。推荐在CIEP检测后, 使用灵敏度更高, 特异性更好的ELISA或PCR法进行复筛, 节约检测成本的同时可进一步净化貂场, 降

低AMDV感染风险。

众所周知, AMD目前尚无特效药物及获批生产的高保护力疫苗。部分地区或国家(如丹麦^[27])出台了捕杀阳性水貂的应对政策以控制AMDV在水貂场的流行, 取得了良好的效果。然而由于各种原因, 此方法并未被其它各地采用, AMDV在世界大多数水貂养殖场依旧广泛存在, 迫切需要高保护力的疫苗以减少AMD带来的经济损失。因此, 明确常规疫苗免疫失败的具体原因是攻克AMD的重中之重。然而, AMDV强毒株(AMDV-Utah I)难以在体外(如CrFK细胞系)复制, 而动物试验显示弱毒株AMDV-G并不诱导机体产生AMD的典型病理变化^[17, 151]。这一现象导致在体外研究AMD感染机制相对困难。AMDV-DL125株为本实验室分离的AMD强度株病毒, 已经证实其特性与AMDV-Utah I类似, 即不能产生明显细胞病变, 但可导致水貂发病, 并产生明显的阿留申病变 [152]。因此, 本部分试验改良了Dworak等在K562中研究AMDV抗体依赖性增强的试验方案, 构建了水貂阿留申病毒AMDV-DL125强毒株感染水貂外周血单核-巨噬细胞的体外模型, 通过控制单一变量(有复合物与无复合物), 较完整的还原了感染过程中是否存在ADE机制所造成的内在差异^[21, 153]。

本章试验使用水貂外周血单核细胞作为细胞模型, 以免疫磁珠分选法进一步纯化外周血PBMC, 获得了纯度90%以上的单核细胞。一般情况下, 抗原-抗体复合物的形成要在低抗体浓度下进行。借鉴Dworak的试验设计, 将抗原-抗体复合物感染单核细胞12 h以构建ADE体外研究模型^[21]。IFA结果显示, 感染12 h后, AMDV-DL125PS组视野内的荧光数明显多于AMDV-DL125NS组, 说明在抗原-抗体复合物存在时, 更多的病毒粒子进入单核细胞。通过绝对定量检测病毒初始拷贝数, 结果发现攻毒后, AMDV-DL125PS组的病毒拷贝数与AMDV-DL125NS组的拷贝数在前4个小时无显著差异, 说明感染4 h左右, AMDV-DL125在单核细胞内的复制水平较低或呈限制性复制, 这与Bloom团队的发现一致^[21]; 感染8 h及12 h时, AMDV-DL125PS组的病毒初始拷贝数较AMDV-DL125NS组的拷贝数高, 且差异显著($P < 0.05$)。对AMDV-DL125 VP2基因进行qRT-PCR检测发现8 h及12 h时, AMDV-DL125PS组的VP2基因表达量显著高于AMDV-DL125NS组, 说明病毒的复制能力得到加强。AMDV的持续性感染依赖于ADE作用, 在体外感染人K562细胞时呈限制性复制, 感染一定时间后观察到复制中间体(60 h)^[21]。对ADE相关基因进行qRT-PCR检测, 对比AMDV-DL125PS组和AMDV-DL125NS组发现, 可增强单核-巨噬细胞抗原递呈能力及细胞因子分泌水平的IL-2的受体IL-2R γ 表达量增加。IL-2作为具有抗病毒作用的细胞因子, 持续作用单核-巨噬细胞可增强其抗原递呈能力及细胞因子分泌能力; 由于IL-2存在一定的物种特异性, 因此我们没能直接检测IL-2的表达水平, 但IL-2R的表达水平升高, 说明此时的IL-2也可能处于高表达水平。此外, IL-18(主要由巨噬细胞产生, 又称干扰素 γ 诱导因子, 是一种促炎细胞因子, 可促进细胞分泌INF- γ)、IFN- γ R1、TNF-R1及TNF-R2也处于高表达水平, 这些抗病毒细胞因子或细胞因子受体表达量的增加表明此时单核-巨噬细胞

处于活跃的抗病毒状态，结合上述AMDV-DL125拷贝数定量结果，暗示单核细胞内病毒处于较活跃状态；另一方面，TRAF家族成员（TRAF2/5、TRAF6）表达量增加，控制了RIG-I/MDA5信号通路，最终导致促炎性相关细胞因子表达量降低，病毒拷贝数升高。这一结果与AMDV-DL125的拷贝数定量结果一致。

综上所述，在复合物存在的感染初期，更多的AMDV-DL125病毒粒子进入了单核-巨噬细胞内部，且在感染一定时间后病毒的复制效率增强，暗示了AMDV感染过程中存在ADE机制。

3.4 小结

- （1）构建了 AMDV-DL125 感染水貂单核细胞过程中 ADE 机制的体外研究模型。
- （2）当抗原-抗体复合物存在时，AMDV-DL125 更容易侵入单核-巨噬细胞。
- （3）当抗原-抗体复合物存在时，感染一定时间后 AMDV-DL125 的复制效率增强。

第四章 AMDV 感染过程中的 ADE 机制探究——基于全转录组测序技术

AMDV 感染水貂后导致免疫复合物沉积、高丙种球蛋白血症、高水平抗病毒抗体相关的持续感染及相应的炎性反应。抗病毒抗体使得 AMDV 通过 Fc γ 受体介导的 ADE 作用感染巨噬细胞，使其成为持续感染的靶细胞。但 AMDV 在感染过程中的 ADE 机制尚未明晰。本部分试验使用已构建的 AMDV 感染的 ADE 体外研究模型，通过全转录组高通量测序技术，对感染过程中水貂外周血原代单核细胞的 mRNA 及 ncRNA 进行差异表达分析，以探讨 AMDV 感染过程中可能存在的 ADE 机制。

4.1 材料方法

4.1.1 材料

4.1.1.1 病毒及细胞来源

AMDV-DL125 株由本实验室保存，病毒毒价 $10^{4.3}$ TCID $_{50}$ /0.1 mL；阳性血清为实验室保存，抗体效价为 1:256。

4.1.1.2 试验试剂

表 4-1 主要试剂及来源

Tab.4-1 Main reagents and sources

试剂耗材	厂家
淋巴细胞分离液 Ficoll Paque PLUS	GE Healthcare Life Sciences
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific
哺乳动物单个核细胞完全培养基	天津灏阳
FITC 标记的兔抗貂 IgG	北京博奥森公司
荧光定量 PCR 试剂盒	爱思进 AXYGEN
Small RNA Sample Pre Kit	北京奥维森
TRNzol 总 RNA 提取试剂	天根生化科技（北京）有限公司
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser	TaKaRa
SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), ROX plus	TaKaRa

4.1.1.3 试验仪器

本章常用试验仪器见表 4-2:

表 4-2 常用仪器设备

Tab.4-2 Commonly used equipment

名称	厂家
荧光定量 PCR 仪 qTOWER3 G	德国 Analytik Jena AG
荧光定量 PCR 仪 ABI7500	Applied Biosystems
水平冷冻离心机	THERMO
超净工作台	苏州泰安空气技术有限公司
光学倒置显微镜	LEICA
荧光倒置显微镜	LEICA
流式细胞仪	BD
细胞计数仪 Leica Microsystems CMS GmbH	德国徕卡 Leica 仪器有限公司
CO2 恒温细胞培养箱 (Hera cell 240i)	THERMO
二代测序仪 HiSeqTM2500	Illumina 公司
分光光度计 NANODROP 2000	Thermo scientific
凝胶成像系统 Tanon 1600	上海天能科技有限公司

4.1.2 方法

4.1.2.1 技术路线

AMDV-DL125 感染水貂原代单核巨噬细胞全转录组测序技术路线如图 4.1:

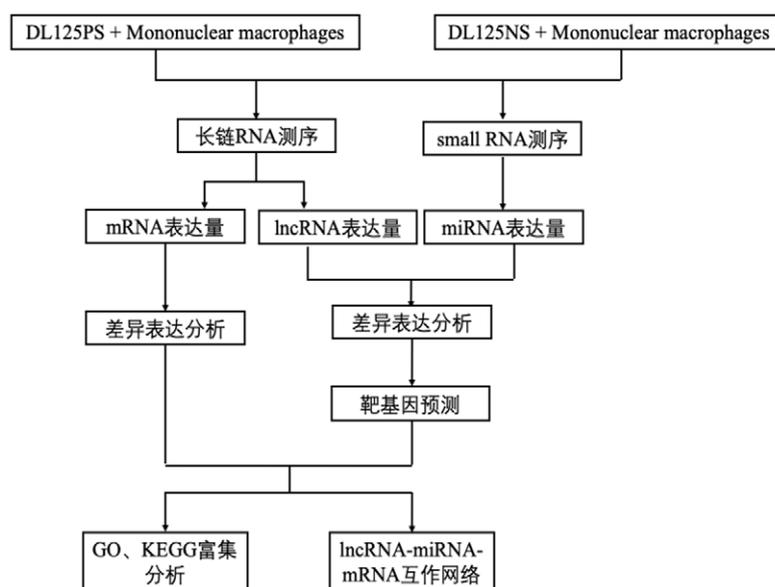


图 4.1 全转录组测序技术路线

Fig.4.1 Technology route of whole transcriptome sequencing

4.1.2.2 试验分组

模型构建策略及试验分组见 3.1.2.3。

4.1.2.3 总 RNA 提取

见附录 2。

4.1.2.4 mRNA 及 lncRNA 高通量测序

(1) mRNA 与 lncRNA 建库测序流程。

为确保 RNA 样本可用,对 4.1.2.4 提取的总 RNA 进行纯度、完整性及浓度的检测(表 4-3)。样品质量合格后,去除 rRNA,构建链特异性文库并进行文库质检,最后进行上机测序,流程如下(图 4.2):

表 4-3 Total RNA 质量检测

Tab.4-3 Total RNA Quality Assay

检测项目	技术手段
初步检测	琼脂糖凝胶电泳
浓度	Nanodrop
完整性	Agilent 2100
纯度	Nanodrop

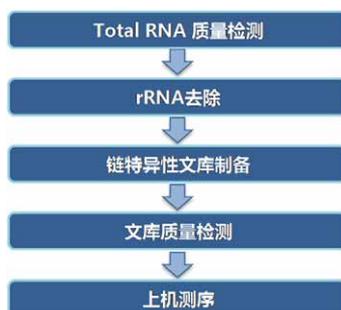


图 4.2 mRNA 及 lncRNA 建库测序流程图

Fig.4.2 Library building sequencing flowchart of mRNA and lncRNA

(2) mRNA 及 lncRNA 生信分析流程。

使用上一步骤获得的原始序列,选取合适的参考基因组。由于目前已公布的美国水貂(*Neovison vison*, American mink)参考基因组功能基因注释过少,因此选用其近源物种雪貂(*Mustela putorius furo*, Ferret; GCF_000215625.1; NCBI 链接: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3295?genome_assembly_id=34424)作为参考基因组进行分析(图 4.3):

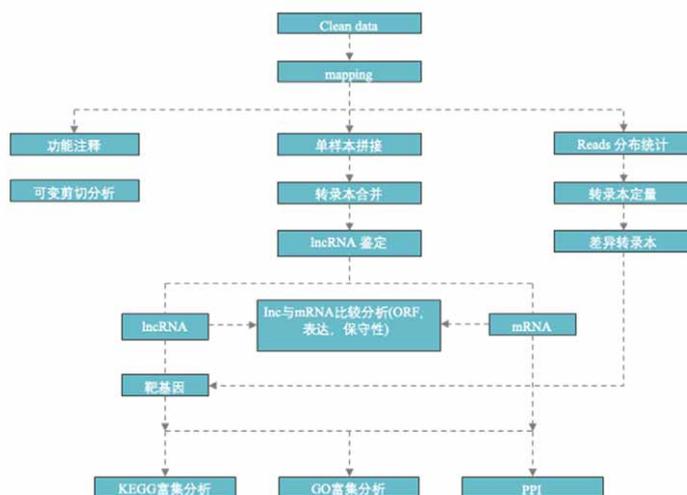


图 4.3 mRNA 及 lncRNA 生物信息分析流程

Fig.4.3 mRNA and lncRNA biological information analysis process

4.1.2.5 Small RNA 高通量测序

(1) Small RNA 建库测序流程。

Small RNA 的建库流程如下 (图 4.4):

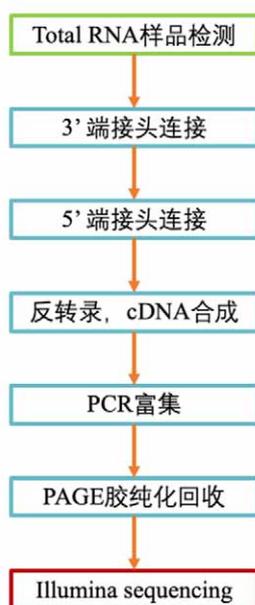


图 4.4 Small RNA 建库测序流程图

Fig.4.4 Small RNA database construction and sequencing flow chart

(2) Small RNA 文库构建。

在 small RNA 的 5'端磷酸基团及 3'端羟基加上接头（起始样本为 total RNA），通过反转录技术合成 cDNA。经以下步骤获得 cDNA 文库：①PCR 扩增；②PAGE 胶电泳分离；③切胶回收。构建原理图如下（图 4.5）：

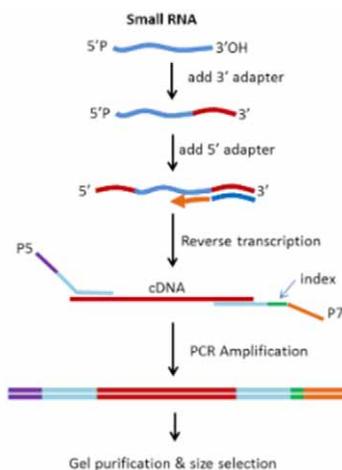


图 4.5 Small RNA 文库构建原理

Fig.4.5 Principle of small RNA library construction

(3) 库检。

完成文库构建后，以 Qubit 2.0 进行初步定量。将文库稀释为 1 ng/μL，以 Agilent 2100 检测文库的插入尺寸（insert size），合格后对文库的有效浓度以 qPCR 准确定量，要求有效浓度大于 2 nM。

(4) 上机。

把不同文库按照有效浓度稀释后进行上机测序。

(5) Small RNA 生信分析流程。

采用 small RNA 有参分析流程，示意图如下（图 4.6）：

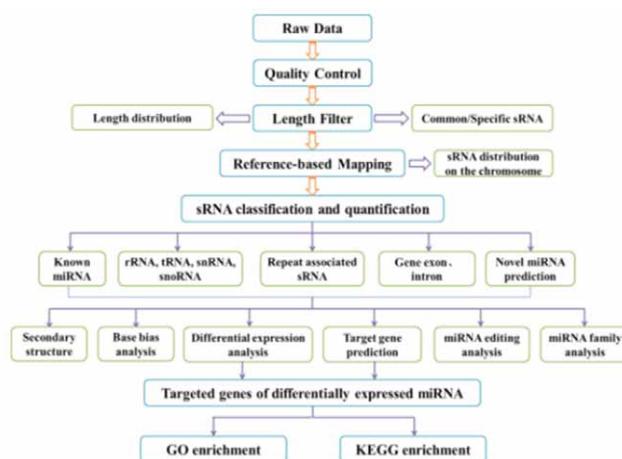


图 4.6 Small RNA 生物信息分析流程

Fig.4.6 Small RNA biological information analysis process

4.2 结果

4.2.1 mRNA、lncRNA 及 miRNA 差异表达分析

4.2.1.1 mRNA 差异表达基因数统计

对比了 AMDV-DL125PS 与 AMDV-DL125NS 两组基因的差异表达情况，为确定感染过程中 ADE 机制涉及的相关通路做准备。以火山图的形式呈现转录本质检的差异以及基因的整体分布情况：横坐标代表在不同试验组及样品中，mRNA 表达倍数的变化；纵坐标代表 mRNA 表达量变化的统计学显著性差异的程度；每个散点都代表各个不同的 mRNA，其中蓝色圆点代表 mRNA 的表达无显著性差异，红色圆点代表 mRNA 的表达呈现显著上调的差异，绿色圆点代表 mRNA 呈现显著下调的差异。如图所示，发现 AMDV-DL125PS 组对比 AMDV-DL125NS 组上调表达基因 1951 个，下调表达基因 707 个（图 4.7，图 4.8）。

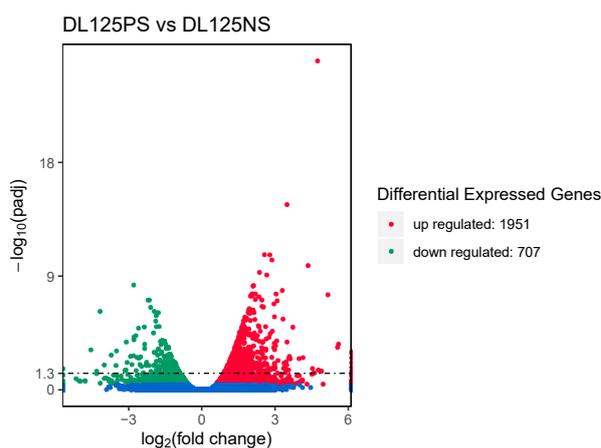


图 4.7 mRNA 差异表达火山图

Fig.4.7 mRNA differential expression volcano map

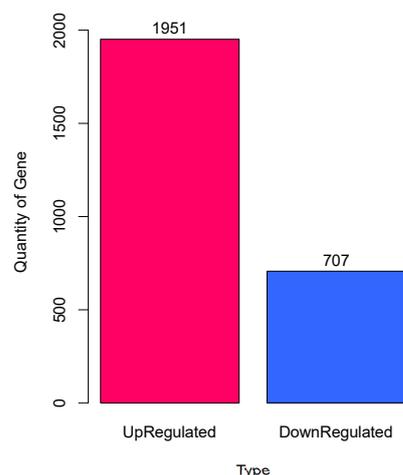


图 4.8 mRNA 差异上调及下调基因数目统计图

Fig.4.8 Statistics of the number of mRNA differentially up-regulated and down-regulated genes

4.2.1.2 mRNA 差异表达聚类分析

为了显示 mRNA 在每个样本的表达情况，对两组样本的 mRNA 表达量进行了聚类分析。在 AMDV-DL125PS 与 AMDV-DL125NS 两组的层次聚类图中，以 $\log_{10}(\text{TPM}+1)$ 值进行聚类，红色表示高表达 mRNA，蓝色表示低表达 mRNA。结果显示，AMDV-DL125PS 组的三个样本和 AMDV-DL125NS 组的三个样本分别聚在不同的 cluster 中，同组的重复样本表达趋势基本相同，而不同组的样本之间呈现出不同的表达趋势。

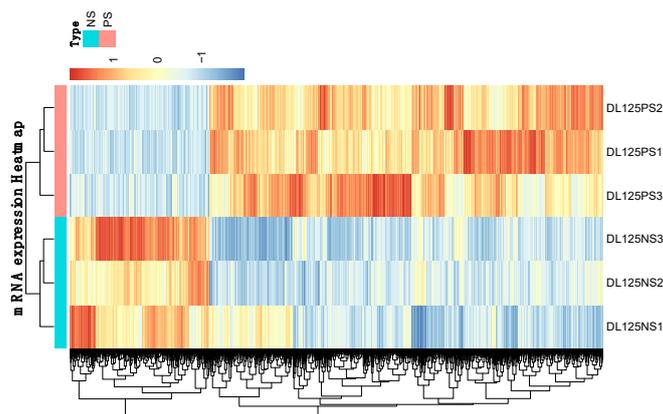


图 4.9 不同样本的 mRNA 聚类分析图

Fig.4.9 mRNA cluster analysis of different samples

4.2.1.3 PPI (protein-protein interaction, PPI) 蛋白互作网络分析

差异表达 mRNA 编码的蛋白形成了复杂的网络互作图。应用 STRING 蛋白质互作数据库 (<http://string-db.org/>) 中的互作关系, 首先将目标基因集序列应用 blastx (e-value 设为 $1e-10$) 比对到 string 数据库中包含的近缘或模式物种蛋白质序列上, 并利用所选择的近缘或模式物种的蛋白质互作关系, 使用 Cytoscape (version 3.5.2) 构建互作网络。其中 degree 从大到小按照黄色到蓝色填充渐变色, 红色为可能与本试验目的相关的基因。经分析发现了多个可能与单核-巨噬细胞内吞相关的蛋白质互作关系, 包括 Syk, VAV, PI3K, Rac 等。

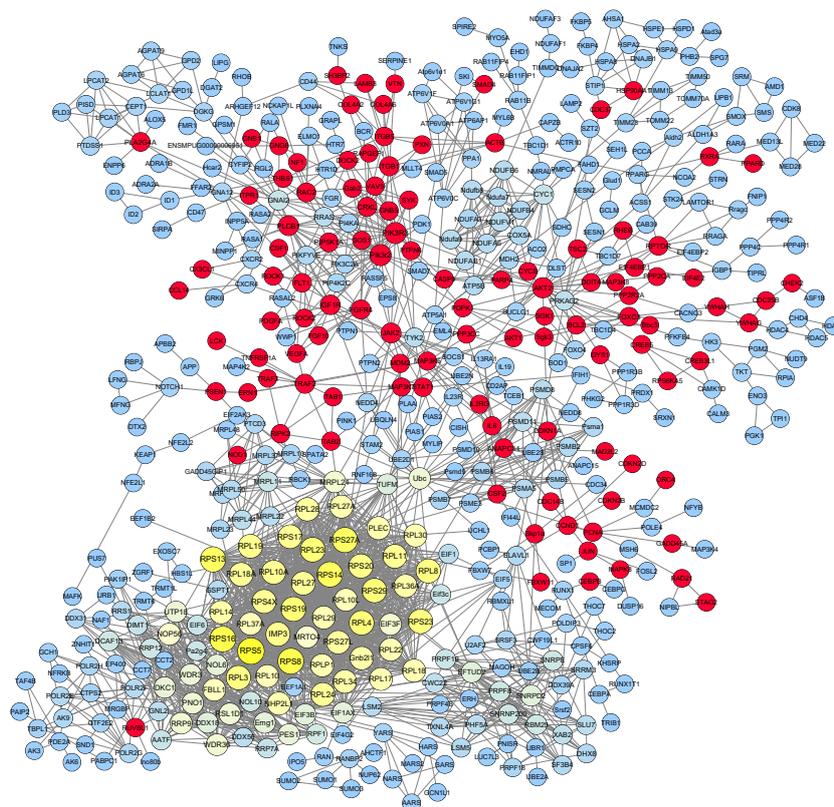


图 4.10 PPI 蛋白互作网络图

Fig.4.10 PPI protein interaction network diagram

4.2.2 lncRNA 差异表达水平分析

4.2.2.1 lncRNA 差异表达基因数统计

使用火山图表达两组间差异表达的 lncRNA。结果显示 AMDV-DL125PS 组对比 AMDV-DL125NS 组的上调表达基因 899 个，下调表达基因 1689 个（图 4.11，图 4.12）。

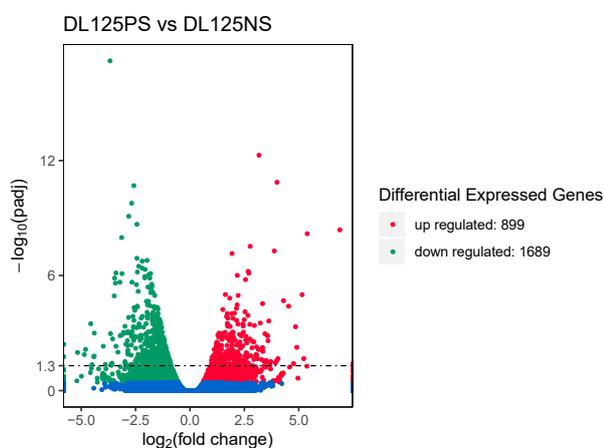


图 4.11 IncRNA 差异表达火山图

Fig.4.11 IncRNA differential expression volcano map

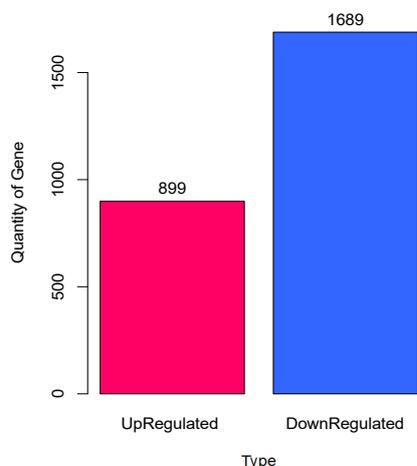


图 4.12 IncRNA 差异上调及下调基因数目统计图

Fig.4.12 Statistics of the number of IncRNA differentially up-regulated and down-regulated genes

4.2.2.2 IncRNA 差异表达聚类分析

对两组样本的 IncRNA 表达量进行了聚类分析，以展示在不同的样本中 IncRNA 的表达量情况。分析结果表明，AMDV-DL125PS 组的三个样本和 AMDV-DL125NS 组的三个样本分别聚在不同的 cluster 中，同组的重复样本基本呈现出相同的表达趋势，而不同组的样本之间的表达趋势不同（图 4.13）。

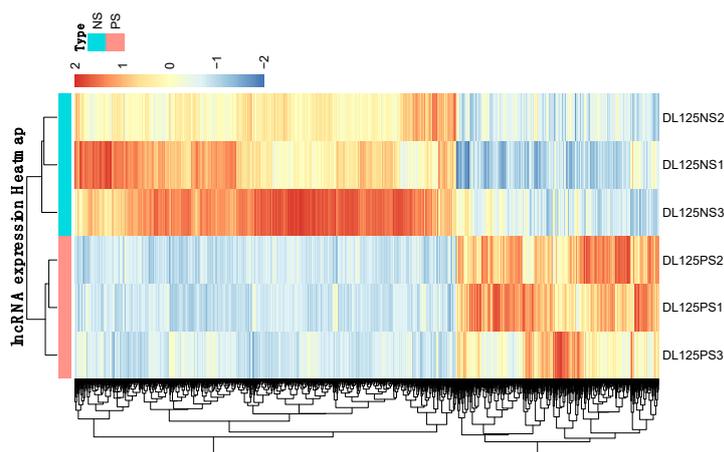


图 4.13 不同样本的 IncRNA 聚类分析图

Fig.4.13 IncRNA cluster analysis of different samples

4.2.3 miRNA 差异表达水平分析

4.2.3.1 miRNA 差异表达基因数统计

用火山图可以推断差异 miRNA 的整体分布情况，从差异倍数(Fold change)和校正后的显著水平 ($\text{padj}/q\text{value}$) 两个水平进行评估，对差异 miRNA 进行筛选。差异 miRNA 的筛选条件为： $\text{padj} < 0.05$ 。根据试验设计，对比了 AMDV-DL125PS 与 AMDV-DL125NS 两组的差异表达情况，发现 AMDV-DL125PS 对比 AMDV-DL125NS 组的上调表达基因 795 个，下调表达基因 633 个（图 4.14，图 4.15）。

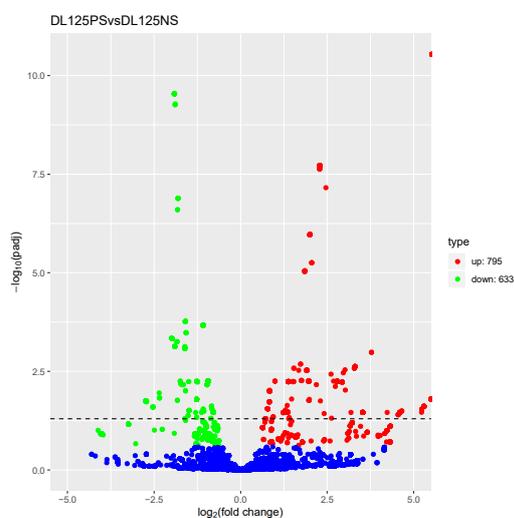


图 4.14 miRNA 差异表达火山图

Fig.4.14 miRNA differential expression volcano map

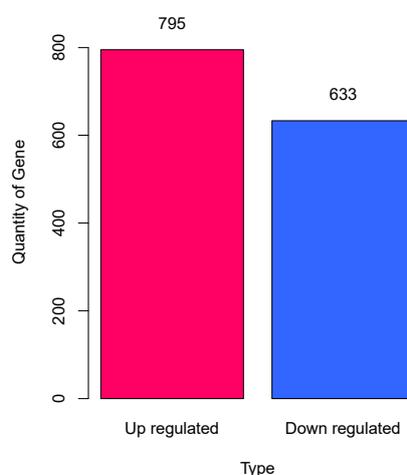


图 4.15 miRNA 差异上调及下调统计

Fig.4.15 Statistics of miRNA differences up regulated and down regulated

4.2.3.2 miRNA 差异表达聚类分析

差异 miRNA 聚类分析用于判断不同试验条件下差异 miRNA 表达量的聚类模式。结果显示，AMDV-DL125PS 组的三个样本和 AMDV-DL125NS 组的三个样本分别聚在不同的 cluster 中，同组的重复样本基本表达趋势基本相同，而不同组的样本之间呈现出不同的表达趋势（图 4.16）。

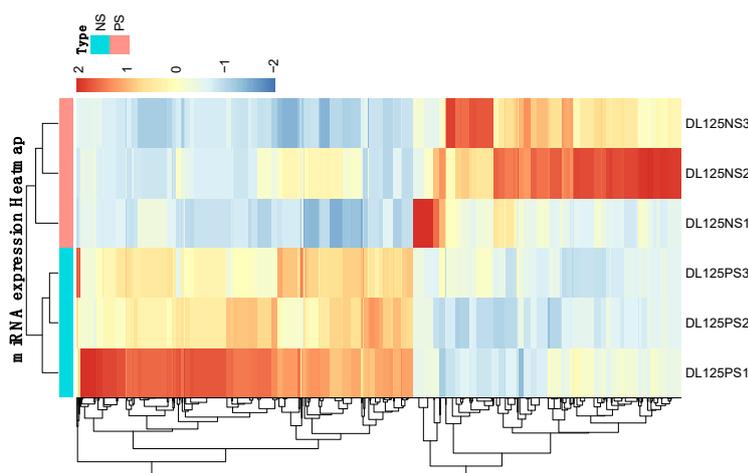


图 4.16 差异 miRNA 聚类图

Fig.4.16 Differential miRNA clustering diagram

4.2.4 mRNA、lncRNA 及 miRNA 的 GO 功能富集分析

4.2.4.1 GO 功能富集分析-mRNA

根据上述结果，统计被显著富集的各个 GO term 中的基因数，以柱状图的形式展示（图 4.17）。纵坐标为 GO 三个大类的下一层级的 GO term，横坐标为注释到该 term 下（包括该 term 的子 term）的来源基因个数，及其个数占被注释的来源基因总数的比例。3 种不同分类表示 GO term 的三种基本分类（从左往右依次为生物学过程（biological process）、细胞成分（cellular component）及分子功能（molecular function）。本试验聚焦了可能参与 AMDV 感染过程中 ADE 相关机制，因此在经过重新筛选排列后，差异表达的 mRNA 涉及 GO term 30 条，其中生物学过程 10 条、细胞成分 10 条以及分子功能 10 条。富集到的差异表达基因主要集中于细胞内（Intracellular）、细胞内部分（Intracellular part）、细胞器（organelle）、大分子复合物（macromolecular complex）、代谢过程（metabolic process）、细胞代谢过程（cellular metabolic process）、生物合成过程（biosynthetic process）、蛋白质代谢过程（protein metabolic process）及基因表达（gene expression）等二级条目。

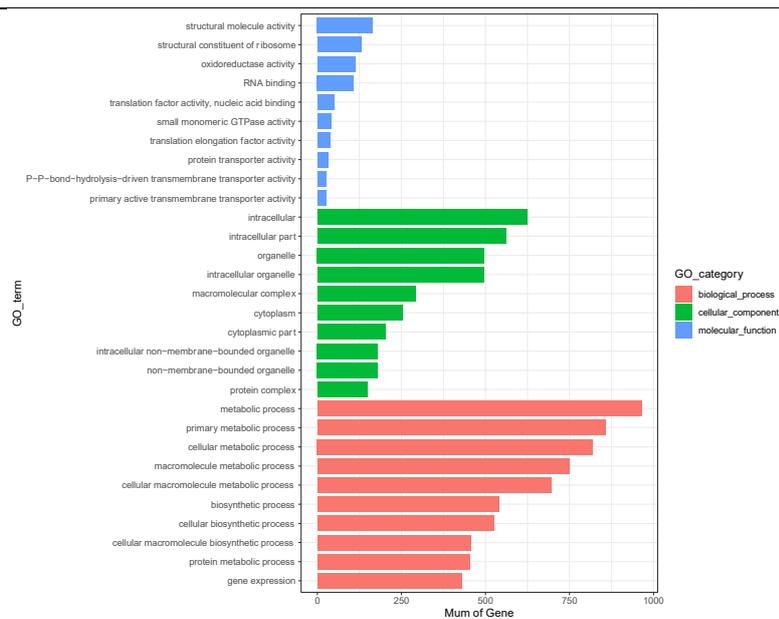


图 4.17 差异 mRNA 的 GO 功能富集可视化柱状图

Fig.4.17 Visualized histogram of GO function enrichment of differential mRNA

4.2.4.2 GO 功能富集分析-lncRNA

与 mRNA 的富集方法类似，将差异表达的 lncRNA 靶基因进行 GO 富集可视化。筛选可能参与 AMDV 感染过程中 ADE 机制条目，差异表达的 lncRNA 靶基因涉及 GO term 28 条，其中生物进程 8 条，细胞组成 10 条以及分子功能 10 条。富集到的差异表达基因主要集中于分子功能（molecular-function）、捆绑（binding）、催化活性（catalytic activity）、核酸结合（nucleic acid binding）、细胞内（intracellular）、大分子复合物（macromolecular complex）、细胞骨架（cytoskeleton）、蛋白质代谢过程（protein metabolic process）、蛋白质修饰过程（protein modification process）及细胞代谢过程（cellular metabolic process）等二级条目（图 4.18）。

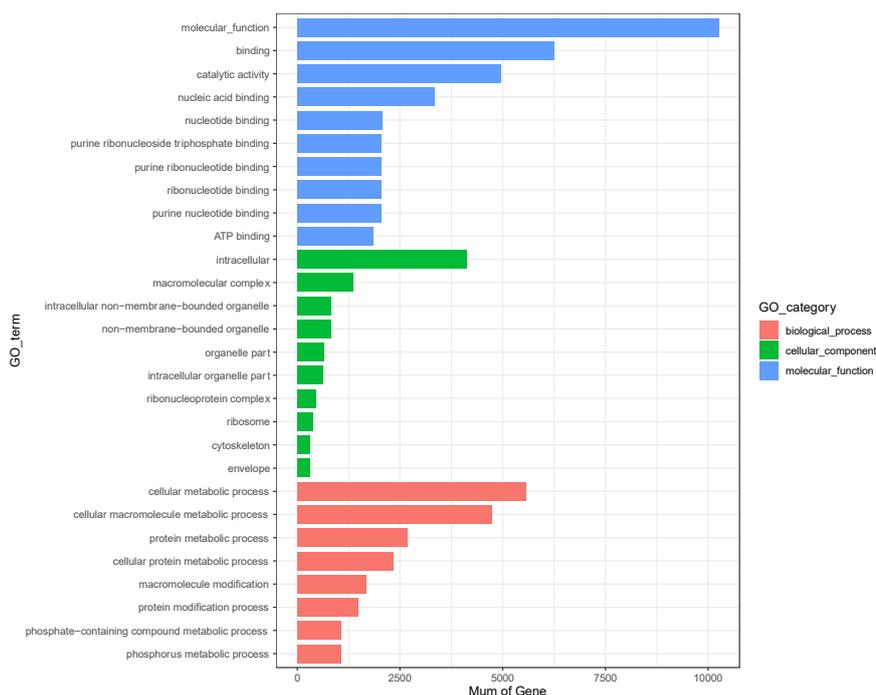


图 4.18 差异 lncRNA 靶基因的 GO 功能富集可视化柱状图

Fig.4.18 Visualized histogram of GO function enrichment of differential lncRNA target genes

4.2.4.3 GO 功能富集分析-miRNA

与 lncRNA 的富集方法类似，将差异表达的 miRNA 靶基因进行 GO 富集可视化。筛选可能参与 AMDV 感染过程中 ADE 机制条目，差异表达的 miRNA 靶基因涉及 GO term 30 条，其中生物进程 10 条，细胞组成 10 条以及分子功能 10 条。富集到的差异表达基因主要集中于分子功能(molecular-function)、捆绑(binding)、核酸结合(nucleic acid binding)、细胞内 (intracellular)、大分子复合物 (macromolecular complex)、核糖核蛋白复合体 (ribonucleoprotein complex)、代谢过程 (metabolic process)、细胞代谢过程 (cellular metabolic) 及蛋白质代谢过程 (protein metabolic process) 等 (图 4.19)。

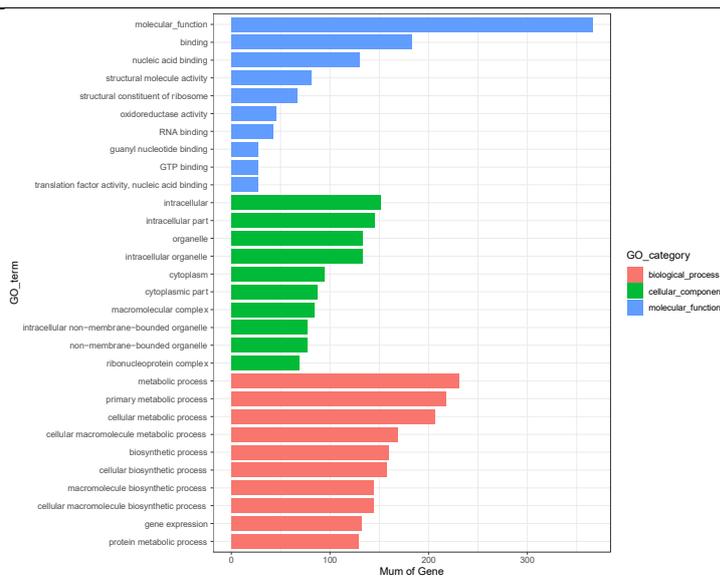


图 4.19 差异 miRNA 靶基因的 GO 功能富集可视化柱状图

Fig.4.19 Visualized histogram of GO function enrichment of differential miRNA target genes

4.2.5 mRNA、lncRNA 及 miRNA 的 KEGG 通路富集分析

4.2.5.1 mRNA KEGG 通路富集分析

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 是有关 Pathway 的主要公共数据库^[154]。Pathway 显著性富集分析以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著性富集的 Pathway。使用 KOBAS (2.0)^[154]进行 Pathway 富集分析。根据试验设计,将 mRNA 进行差异分析后再进行 KEGG 富集分析,从而找出含有差异表达基因的通路进行重点关注。

我们从富集到的显著通路中挑选了可能与 AMDV 感染过程中 ADE 相关的 20 条 pathway 条目在该图中进行展示:如图 4.20,纵轴表示 pathway 名称,横轴表示 rich factor,点的大小表示此 pathway 中来源基因个数多少,而点的颜色对应于不同的 Q-value 范围。本研究纳入了 Fc γ R 介导的吞噬作用 (Fc gamma R-mediated phagocytosis), Fc ϵ RI 信号通路 (Fc epsilon RI signaling pathway), Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway), 溶酶体 (Lysosome), 粘着斑 (Focal adhesion), 造血细胞谱系 (Hematopoietic cell lineage) 以及鞘脂信号通路 (Sphingolipid signaling pathway) 等。

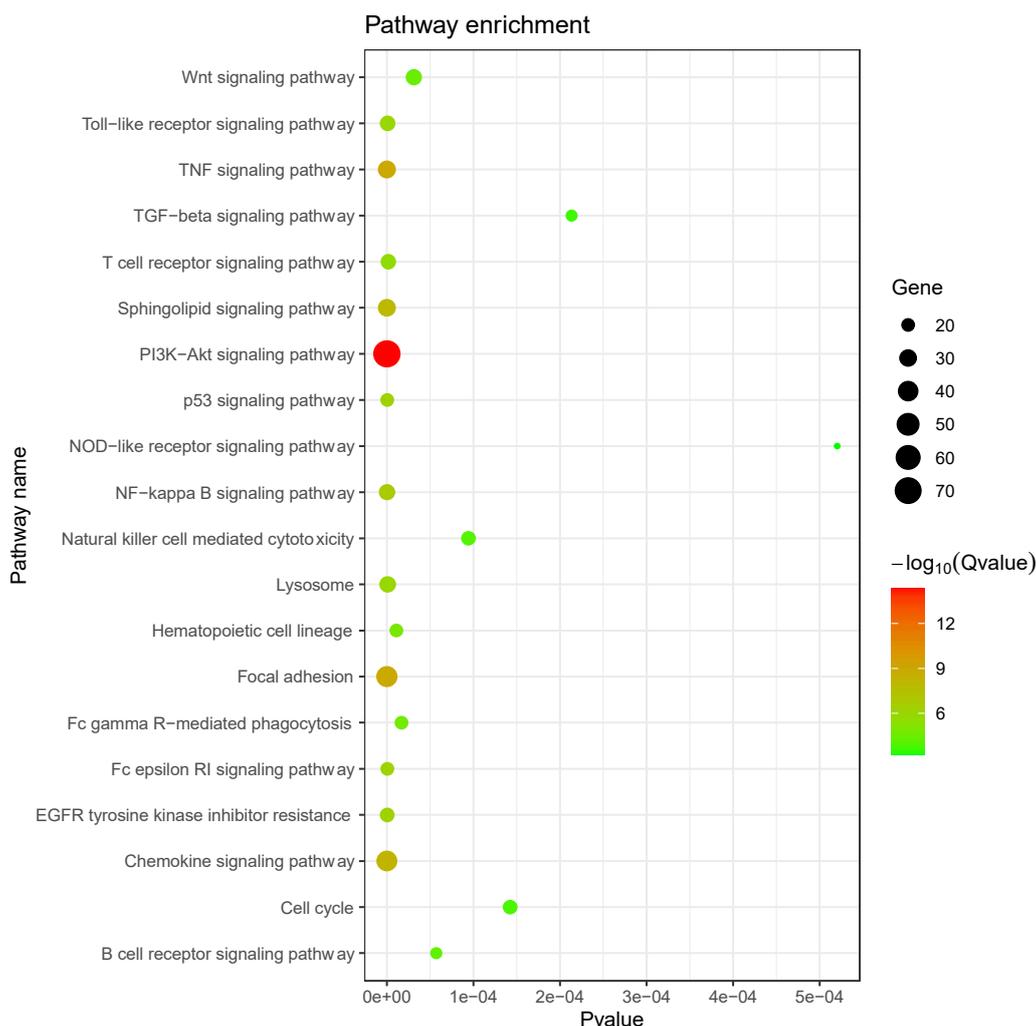


图 4.20 mRNA 差异基因 KEGG 富集散点图

Fig.4.20 Scatter plot of KEGG enrichment of mRNA differential genes

在 mRNA 的 KEGG 富集分析中，发现 PLC γ 的上游基因 Syk 基因表达量上调 (图 4.21)。Syk 对于巨噬细胞中的受体 (Fc receptors, Fc γ Rs) 信号传导至关重要。吞噬细胞上 FcR 的交联引发各种信号，这些信号调控肌动蛋白细胞骨架的重组和膜重塑，从而导致吞噬。因此，Syk 基因或为研究 AMDV 感染过程中 ADE 机制的关键基因。

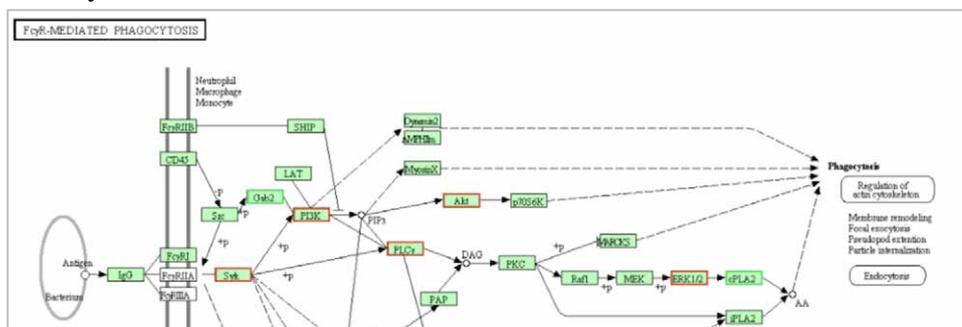


图 4.21 Fc 受体家族介导的巨噬细胞内吞通路

Figure 4.21 Fc receptor family mediated macrophage endocytosis pathway

4.2.5.2 lncRNA KEGG 通路富集分析

以散点图形式呈现 KEGG 富集到 lncRNA 差异基因靶基因相关通路，纳入了包括代谢途径 (Metabolic pathways)、Fc γ R 介导的吞噬作用 (Fc gamma R-mediated phagocytosis)、Fc ϵ RI 信号通路 (Fc epsilon RI signaling pathway)、胞吞作用 (Endocytosis)、溶酶体 (Lysosome)、肌动蛋白细胞骨架的调节 (Regulation of actin cytoskeleton)、核糖体 (Ribosome)、Ras 信号通路 (Ras signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 以及鞘脂信号通路 (Sphingolipid signaling pathway) 等 (图 4.22)

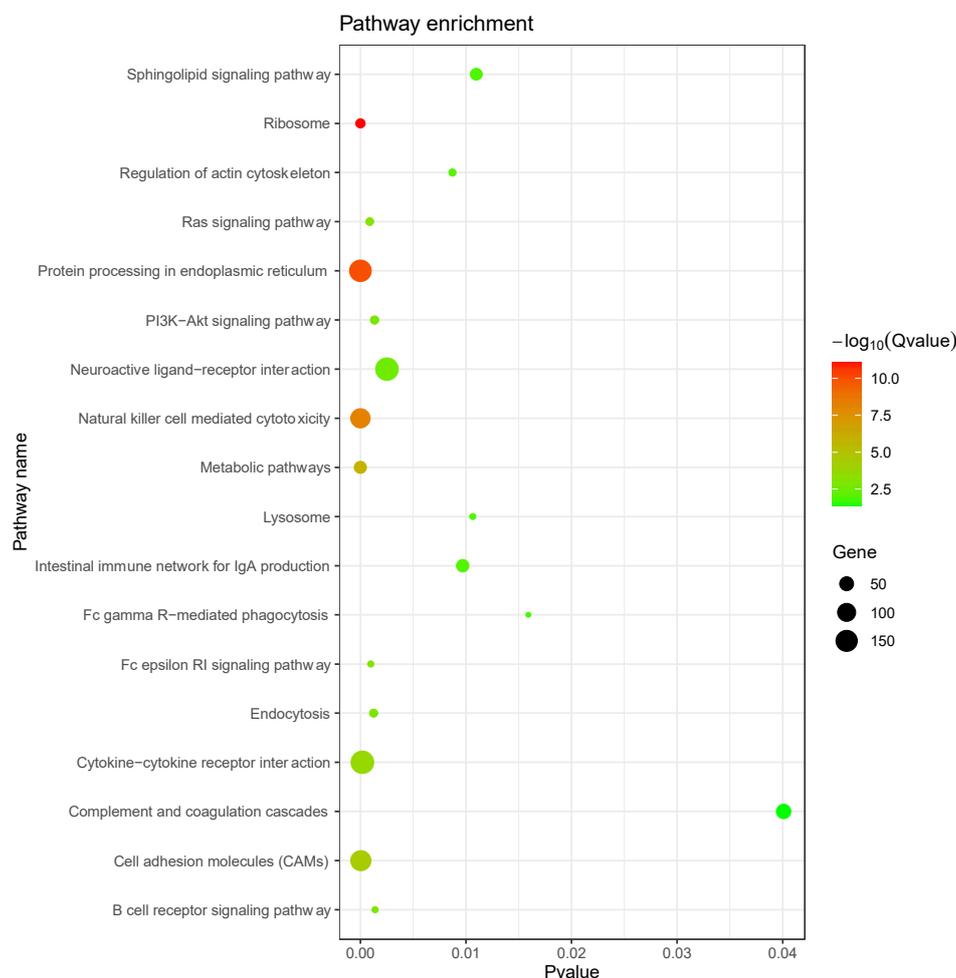


图 4.22 lncRNA 差异基因靶基因 KEGG 富集散点图

Fig.4.22 Scatter diagram of enrichment of lncRNA differential gene target gene KEGG

4.2.5.3 miRNA KEGG 通路富集分析

miRNA 差异基因靶基因 KEGG 富集的通路有核糖体 (Ribosome)、代谢途径 (Metabolic pathways)、吞噬体 (Phagosome)、RNA 转运 (RNA transport)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、抗原处理和展示 (Antigen processing and presentation)、间隙连接 (Gap junction) 以及蛋白酶体 (Proteasome) 等 (图 4.23)。

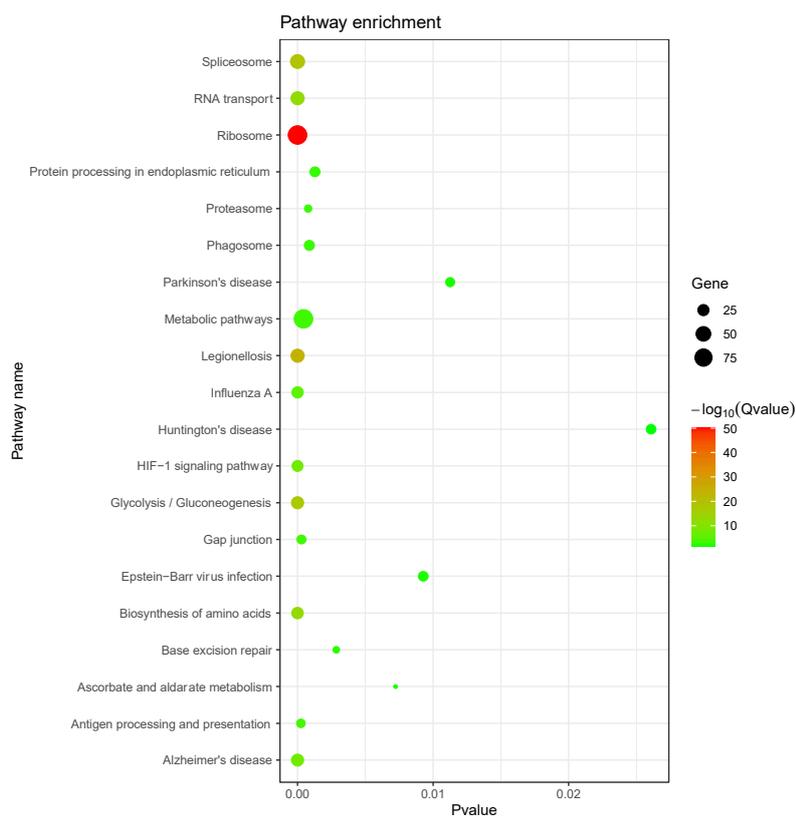


图 4.23 miRNA 差异基因靶基因 KEGG 富集散点图

Fig.4.23 Scatter diagram of enrichment of miRNA differential gene target gene KEGG

4.2.6 mRNA、lncRNA 及 miRNA 的互作分析

4.2.6.1 miRNA-mRNA 互作分析

共有 214 对 miRNA-mRNA 存在互作关系，其中正向调控的基因对有 120 对（共上调表达 107 对，共下调表达 13 对），负向调控的基因对有 93 对（miRNA 上调-mRNA 下调 21 对，miRNA 下调-mRNA 上调 72 对）。结果发现，xtr-miR-320（下调）负调控 PLC γ -2（上调）；tch-miR-486-3p（下调）负调控 CDC37（上调）；xtr-miR-92a（上调）正调控 CD14（上调）；tch-miR-326（上调）正调控 IL-2R γ （上调）和 COL4A2（上调）（表 4-4）。使用软件 Cytoscape 对 miRNA-mRNA 之间的互作关系进行可视化处理（图 4.24）：

表 4-4 miRNA-mRNA 互作列表
Tab.4-4 miRNA mRNA interaction list

miRNA	Type	Target_mRNA	Type	Gene_id	Gene_name
xtr-miR-320	down	XM_013056990.1	up	gene-LOC106005943	PLC- γ
xtr-miR-320	down	XM_004766048.2	down	gene-MSRA	MSRA
xtr-miR-320	down	XM_013047539.1	down	gene-RPA4	RPA4
xtr-miR-320	down	XM_013060448.1	up	gene-BSN	BSN
xtr-miR-320	down	XM_004767522.2	up	gene-CALM3	CALM3
xtr-miR-320	down	XM_013046410.1	up	gene-CECR6	CECR6
xtr-miR-320	down	XM_004744495.2	up	gene-DDX28	DDX28
tch-miR-486-3p	down	XM_004743890.2	down	gene-GALNT5	GALNT5
tch-miR-486-3p	down	XM_013052916.1	down	gene-PDIA6	PDIA6
tch-miR-486-3p	down	XM_013058444.1	up	gene-ADCK3	ADCK3
tch-miR-486-3p	down	XM_004778137.2	up	gene-BSG	BSG
tch-miR-486-3p	down	XM_004748437.2	up	gene-CDC37	CDC37
xtr-miR-92a	up	XM_004744791.2	up	gene-CD14	CD14
xtr-miR-92a	up	XM_004765271.2	up	gene-CEBPA	CEBPA
tch-miR-326	up	XM_004773559.2	up	gene-HACL1	HACL1
tch-miR-326	up	XM_004747838.2	up	gene-HDHD3	HDHD3
tch-miR-326	up	XM_004777214.2	up	gene-IL2RG	IL2RG

Type: 表达情况;

Target_mRNA: miRNA 对应的靶基因 mRNA;

Gene_id: mRNA 基因 ID;

Gene_name: mRNA 基因名。

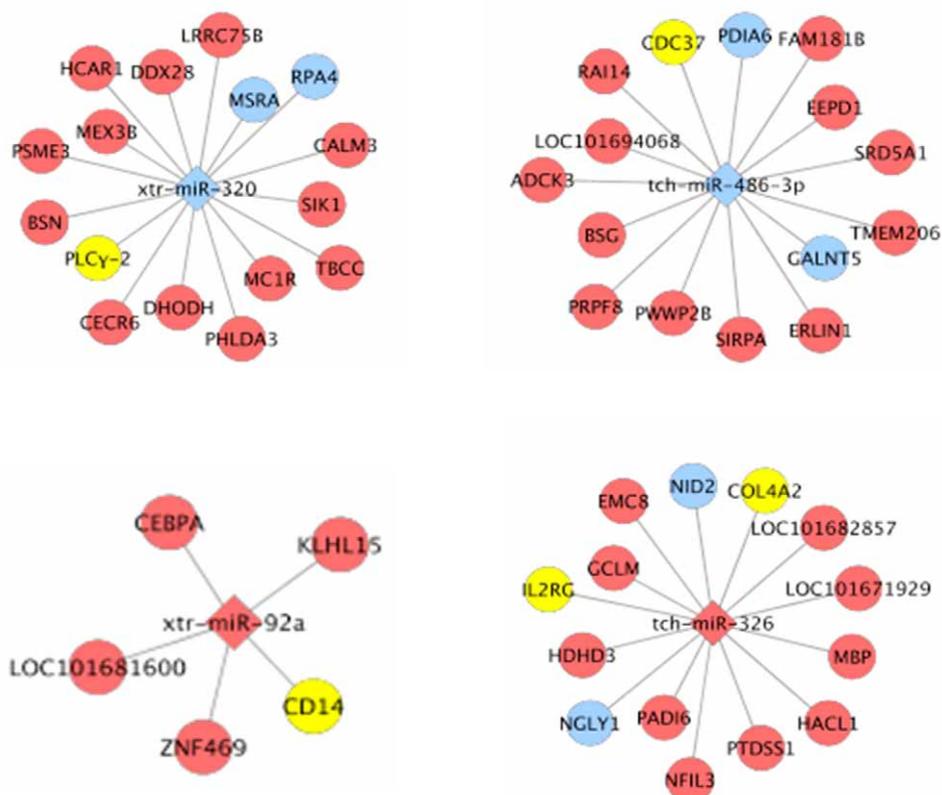


图 4.24 miRNA-mRNA PPI 蛋白互作网络图

Fig.4.24 miRNA-mRNA PPI protein interaction network diagram

4.2.6.2 lncRNA-mRNA 互作分析

共有 340 对 lncRNA-mRNA 存在互作关系，其中正向调控的基因对有 334 对（共上调表达 191 对，共下调表达 143 对），其中负向调控的基因对有 6 对（miRNA 下调-mRNA 上调 6 对）。结果发现 XR_001178194.1（上调）正向调控 RAC2（上调）和 IGF1R（上调）；XR_001181178.1（下调）负调控 PLC γ -2（上调），XR_001176625.1（上调）负调控 *VAV3*（下调）（表 4-5）。使用软件 Cytoscape 对 lncRNA-mRNA 之间的互作关进进行可视化处理（图 4.25）：

表 4-5 lncRNA-mRNA 互作列表

Tab.4-5 lncRNA mRNA interaction list

lncRNA	type	target_gene	type	gene_id	gene_name
XR_001178194.1	up	XM_004751750.2	up	gene-FAM53B	FAM53B
XR_001178194.1	up	XM_004759809.1	up	gene-IGF1R	IGF1R
XR_001178194.1	up	XM_013060223.1	up	gene-RBM38	RBM38
XR_001178194.1	up	XM_004743172.2	up	gene-RAC2	RAC2
XR_001181178.1	down	XM_013056990.1	up	gene-LOC106005943	PLC γ
XR_001176625.1	down	XM_013048422.1	down	gene-VAV3	VAV3
XR_001176625.1	down	XM_004762447.2	down	gene-NCK1	NCK1
XR_001176625.1	down	XM_013064868.1	down	gene-ALCAM	ALCAM
XR_001176625.1	down	XR_001181083.1	down	gene-PEX2	PEX2
XR_001176625.1	down	XM_004754317.2	down	gene-AZI2	AZI2
XR_001179447.1	down	XM_013052606.1	down	gene-CCDC50	CCDC50
XR_001179447.1	down	XM_004745272.2	down	gene-FGF12	FGF12
XR_001179447.1	down	XM_004756523.2	down	gene-MECOM	MECOM
XR_001179447.1	down	XM_004737629.2	down	gene-FAM196B	FAM196B
XR_001179447.1	down	XM_013047009.1	down	gene-TEX26	TEX26
XR_001179447.1	down	XM_013050480.1	down	gene-CDK8	CDK8
XR_001179447.1	down	XM_004764002.2	down	gene-TMEM156	TMEM156
XR_001179447.1	down	XM_013056735.1	down	gene-PLEKHG1	PLEKHG1
XR_001179447.1	down	XM_004776410.2	down	gene-ARNTL2	ARNTL2

Type: 表达情况;

Targe_mRNA: miRNA 对应的靶基因 mRNA;

Gene_id: mRNA 基因 ID;

Gene_name: mRNA 基因名。

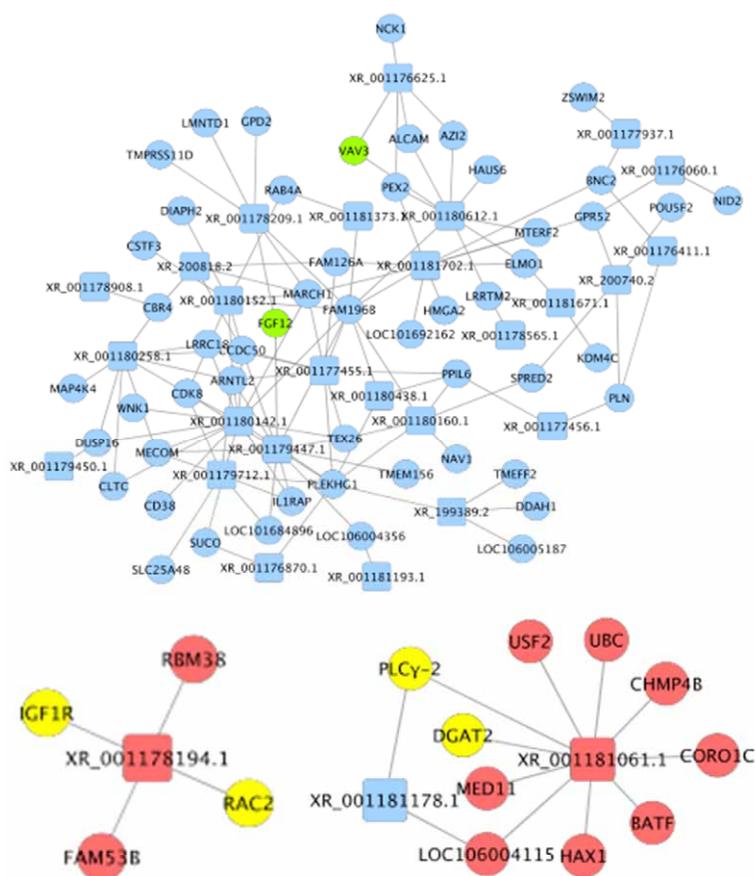


图 4.25 lncRNA-mRNA PPI 蛋白互作网络图

Fig.4.25 lncRNA-mRNA PPI protein interaction network diagram

4.2.6.3 lncRNA-miRNA-mRNA 互作分析

通过对 lncRNA-miRNA-mRNA 的内部关系进行深入挖掘，我们发现 xtr-miR-320 与 PLC- γ 2 的互作受到多条 lncRNA 调控，如图 4.33 所示，其中蓝色圆点代表 xtr-miR-320，绿色圆点代表 PLC- γ 2，黄色圆点代表参与调控互作关系的不同的 lncRNA，红色连线代表 miR-320 与 PLC- γ 2 互作，白色连线代表各 lncRNA 对 xtr-miR-320 与 PLC- γ 2 互作对的调控。预测此复杂的互作关系网可作为深入探究 AMDV 感染过程中 ADE 机制的研究方向之一（图 4.26）。

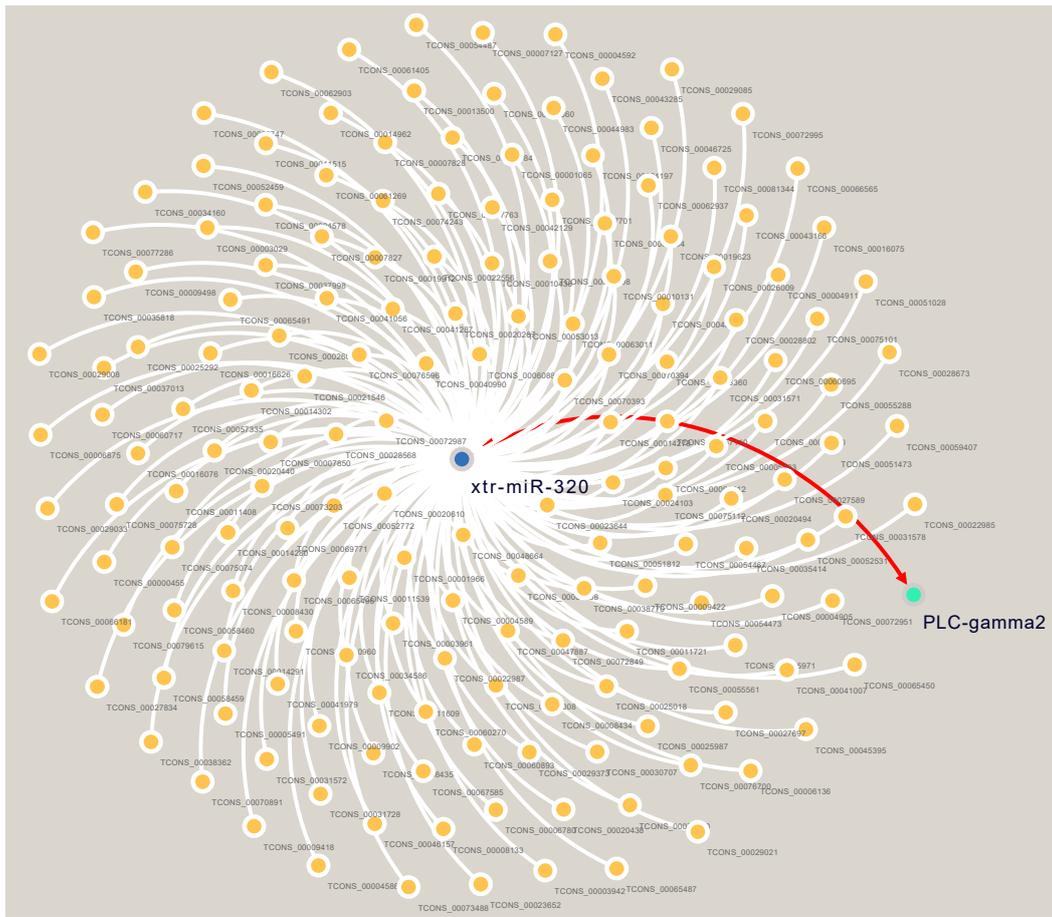


图 4.26 xtr-miR-320、PLC- γ 2 与多条 lncRNA 间的互作关系图

Fig.4.26 Interaction diagram of miR-320, PLC- γ 2 and multiple lncRNAs

4.2.7 qRT-PCR 验证差异基因表达

为了验证测序结果的准确性，我们挑选了部分与 ADE 相关的差异表达基因进行 qRT-PCR 验证，管家基因为 GAPDH（表 4-6）：

表 4-6 验证基因列表

Tab.4-6 List of Verification Genes

基因名	上调基因	下调基因
Syk	XM_013049137.1(1.1829)	-
Rac2	XM_004743172.2(1.8937)	-
Pik3r2	XM_004760961.2(0.84795)	-
Pik3r3	XM_013044306.1(1.6131)	-
Akt1	XM_004754581.2(0.61556)	-
Akt2	XM_004776137.2(0.69343)	-
PLC γ -2	XM_013056990.1(1.0663)	-
Cdc42	XM_004741240.2(0.7335)	-
PDK-1	TCONS_00023815(1.0313)	-
F-Actin	XM_004775013.2(0.61286)	-
M-CSF	TCONS_00058930(1.8057)	-
Vav-3	-	XM_013048422.1(-2.1771) TCONS_00072620(-1.6445)
GM-CSF	-	XM_013051369.1(-1.7068)

结果显示基因 Syk、Rac2、Pik3r2、Pik3r3、Akt1、Akt2、PLC γ -2、Cdc42、PDK-1、F-Actin、M-CSF、Vav-3 及 GM-CSF 的差异表达情况与测序结果一致（图 4.27）。

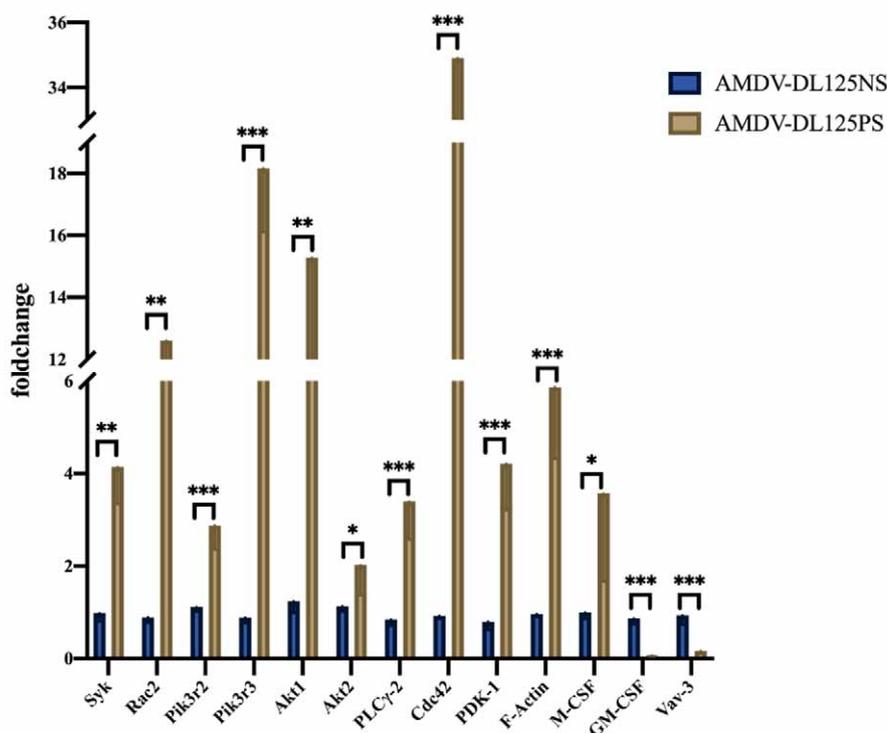


图 4.27 qRT-PCR 验证差异基因相对表达量

Fig.4.27 qRT-PCR to verify the relative expression of differential genes

4.3 讨论

AMDV 作为一种对环境抵抗力很强的细小病毒已经在世界范围内广泛流行^[6,28]。尽管部分国家已对此病进行了清除计划,然而目前彻底清除此病的国家依旧寥寥无几^[4, 155]。AMDV 引起免疫复合物疾病,高丙种球蛋白血症和高水平的抗病毒抗体相关的持续感染^[45]。尽管抗体可以在体外中和猫肾细胞中的 AMDV 感染性,但病毒在体内不被清除^[156]。参与 AMDV 发病机制的非中和性抗体在 AMDV 衣壳上具有特异性靶蛋白^[157]。抗病毒抗体还使 AMDV 能够通过 Fc 受体介导的 ADE 感染巨噬细胞,并使靶细胞持续感染^[22]。研究人员通过链特异性原位杂交和免疫组织化学技术,在 AMDV 感染水貂后第 10 天,在类似于巨噬细胞的细胞和类似于滤泡树突状细胞的细胞中观察到 AMDV 复制的证据,但仅在 60 天时才在巨噬细胞中观察到复制现象。在第 10 天和第 60 天时均发现大量的巨噬细胞和滤泡树突状细胞中存在 AMDV 病毒粒子^[21, 141]。然而在巨噬细胞中,AMDV 感染过程的详细机制仍然有待探究。

本部分试验通过采用第三章构建的 AMDV 感染的 ADE 机制体外研究模型,结合全转录组测序技术,获得了感染过程中 mRNA 及 ncRNA 的差异表达情况。对比两个试验组的 mRNA 的测序结果,富集到大量的生物学过程、细胞成分、分子功能以及多条可能与 AMDV 感染单核-巨噬细胞过程中 ADE 机制相关的通路。其中, Fc γ R 家族介导的巨噬细胞内吞 (Fc gamma R-mediated phagocytosis) 通路被显著富集。Fc γ R 家族可参与释放炎症介质、吞噬细胞的吞噬作用及抗体依赖性细胞的细胞毒性 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 等^[158-160]。吞噬作用能摄取和破坏传染性病原体,在宿主防御机制中起着至关重要的作用。在高等生物中,包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞在内的特殊细胞参与了这一过程^[161]。Ig 的 FcR 在免疫系统的许多细胞类型上表达^[159]。当抗原被抗体 (IgG) 标记 (或结合) 后,被 Fc 受体识别。Fc γ R 与它们的 Ig 配体的相互作用触发了一系列反应,这些反应在炎症和免疫中至关重要。大多数 Fc γ R 亚型,包括 Fc γ RI, Fc γ RIIa 和 Fc γ RIIIa,都能够介导吞噬作用^[162-164]。以往的研究也发现了在 AMDV 感染过程中,与非中和性抗体形成抗原-抗体复合物,并通过 Fc γ RIIIa 受体介导的 ADE 作用进入巨噬细胞内部,并在巨噬细胞内部复制^[21]。

通过 AMDV-DL125PS 组与 AMDV-DL125NS 组差异表达 mRNA 的 KEGG 富集分析,我们发现 Fc γ R 介导的巨噬细胞内吞通路中 Syk、PI3K、Akt、PLC γ 、ERK1/2、PIP5K、Cdc42、Rac 以及 CrkII 被富集为上调表达,而基因 Gab2、cPLA2、Vav、DOCK180 为下调表达。Syk 是一种广泛表达于造血细胞、淋巴细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞上的非受体酪氨酸激酶,基因位于 Fc γ R 介导的巨噬细胞内吞通路的上游位置。Syk 的招募和激活对于吞噬作用非常重要^[165]。研究发现, Syk 的反义寡核苷酸抑制 Syk 表达可抑制吞噬作用^[166]。

Syk 磷酸化后激活 PI3K (一种胞内磷脂酰肌醇激酶)。PI3K 在吞噬作用中的主要作用

是调节颗粒内部化所必需的拟足延伸^[167]。当 PI3K 接受来自酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体的信号后, 募集其 p85 调节亚基到临近质膜部位, p110 亚基通过与 p85 亚基结合把底物 Ptd Ins (4, 5) P2 (PIP2, 磷脂酰肌醇 2 磷酸) 转化为 Ptd Ins (3, 4, 5) P3 (PIP3, 磷脂酰肌醇 3 磷酸)。磷酸肌醇被募集到质膜后, 激活蛋白激酶 B (Akt)。被激活的 Akt 进一步激活 P70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70S6K), 从而间接导致吞噬作用发生; 另一方面, 被激活的 Syk 与 PI3K 以及 PIP3 共同结合并激活磷脂酰肌醇磷脂酶 (phosphatidylinositol phospholipase C, PLC γ)。在巨噬细胞中, FcRI 或 FcRII 刺激会诱导 PLC 介导的 Ca²⁺增加 (钙离子信号通路, Calcium signaling pathway), 并介导导致吞噬作用^[168]。同时, Syk 能间接激活鸟嘌呤核苷酸交换因子 Vav, 其活性可以通过酪氨酸磷酸化^[169]和 PI 脂质^[170]进行调节。研究表明, Vav 在吞噬作用中起着非常重要的作用, Vav 在 FcR 介导的吞噬作用过程中被募集到吞噬体形成的位点^[171, 172], 激活的 Vav 进一步激活 Rac 通路, 最终导致细胞吞噬。被抗原-抗体复合物刺激的 FcR 能间接结合 CrkII 与 DOCK180 的复合物, 从而激活 Rac 信号通路, 导致细胞吞噬^[173]。Rac 与 Cdc42 在吞噬作用中的调控功能不尽相同, 但皆可调节肌动蛋白导致伪足伸展以及调节吞噬功能^[174]。在本试验中, 由于富集的关键基因如 Syk、Rac、PI3K、Akt 等均上调表达, 说明抗原-抗体复合物的存在导致了 Fc γ R 介导的巨噬细胞内吞通路激活水平的加强, 而作为通路上游基因的 Syk 表达量显著升高, 暗示了其可作为深入探究 AMDV 感染过程中 ADE 机制的研究靶点。

Fc ϵ RI 信号通路 (Fc epsilon RI signaling pathway) 作为 I 型超敏反应通路也是被富集的关键通路之一。有研究发现, 在猪蓝耳病的 ADE 效应下, Fc γ RII 及 Fc ϵ RI 的转录水平显著上调, 暗示了 Fc ϵ RI 参与了 PRRSV ADE 效应^[175]。当 Fc ϵ RI 复合物是由抗原特异性免疫球蛋白 E (IgE) Fc 端与细胞表面高亲和力受体相互作用而形成^[176]。单核细胞表面上的 Fc ϵ RI 是由 α 、 β 和 γ 亚基组成, 并形成三聚体复合物。其中 γ 亚基介导 Syk 激活, β 亚基虽然本身并不 (或很少) 传导 Fc ϵ RI 交联信号, 但却是 Syk 激活效应的放大剂 (可放大 Syk 活性和 Ca²⁺内流 5 倍以上) ^[177-179]。在 Fc ϵ RI 信号通路的早期激活中, Lyn 和 Src 家族的 PTK 被激活, Lyn 的激活又使 β 链、 γ 链及邻近的蛋白酪氨酸磷酸化, 磷酸化的 β 和 γ 亚基反过来再分别激活 Lyn 和 Syk。激活的 Lyn 磷酸化激活 Btk 和 Emt。Btk 和 Emt 均属 Tec 家族, 分别引起胞内 Ca²⁺外流及激活 PKC。PKC 的激活和细胞外 Ca²⁺的增加是脱颗粒反应所必需的。另一方面, 磷酸化后结合 Syk 基因, 被上调表达的 Syk 激活并上调 PI3K, PI3K 间接激活 PDK, 并在磷酸化后激活并上调 AKT 表达, 一定程度上调 Th1 细胞反应并抑制 Th2 细胞反应。在细胞因子与细胞因子受体通路中, 抑炎性细胞因子 (或其受体) 受到抑制 (如 IL1R、IL-6、TGF β 3 等), 而 Th1 细胞反应中的 IL-2RG、IL-18 等上调表达。综上, 我们推测 Fc ϵ RI 信号通路的激活可能参与了 AMDV 感染过程中的 ADE 机制, 炎性因子的上调表达和抑炎性因子的下调表达导致了炎性反应增加, 这可能是造成 AMDV 感染晚期的病貂多呈毒血症以及全身性炎症等病理变化的众多原因之一^[66, 152, 180]。

Fc γ 受体交联引发多种蛋白酪氨酸磷酸化介导的信号,并最终导致肌动蛋白细胞骨架重排和膜重塑,进而发生吞噬(Phagosome)。肌动蛋白的细胞骨架是吞噬作用的基础。小型 GTP 酶的 Rho 家族成员,包括 Rho, Rac 和 Cdc42,在肌动蛋白细胞骨架的重组中很重要,可导致形成应力纤维、伪足和片状脂蛋白^[181]。

新生的吞噬体在细胞内分散传播并与溶酶体(Lysosome)融合。溶酶体蛋白酶的获得和活性氧的释放对于吞噬体中吞噬物质的消化至关重要^[182]。溶酶体包含 40 多种水解酶,pH 约为 5,是细胞的主要消化场所,各种大分子都被运送到此进行降解。溶酶体通过一系列过程包括内吞、吞噬和自噬作用来获取可消化物质^[183]。在溶酶体通路中,我们发现几种溶酶体酸水解酶的表达量上调(IDUA、NAGLU 和 GNS),溶酶体膜蛋白也有部分表达发生上调,其中主要溶酶体膜蛋白 LAMP 和 LIMP 均上调表达,而次要溶酶体膜蛋白也有部分表达量上调(Cystinosin, NRAMP, LAPTM 及 LITAF),再次暗示 AMDV 感染的 ADE 过程中,单核-巨噬细胞的吞噬功能可能被活化并上调了。

单核-巨噬细胞是白细胞的组成部分,由造血干细胞(HSC)自我更新或分化而来^[184, 185]。在造血细胞谱系(Hematopoietic cell lineage)通路中,我们发现 M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子,可以促进和增强巨噬细胞对肿瘤细胞和微生物的杀伤,调节巨噬细胞释放细胞因子和其他炎症调节因子并刺激细胞吞噬作用)、CD14(Lipopolysaccharide-LP 受体,存在于单核细胞和巨噬细胞等表面,是一种白细胞分化抗原)表达量升高,而 GM-CSF 表达量降低,暗示了在感染过程中,单核细胞可能更倾向巨噬细胞方向极化。

在细胞黏附通路(Focal adhesion)中,我们发现生长因子 GF 表达量上调,并通过上调桩蛋白(Paxillin,一种涉及胞外基质细胞黏附(黏着斑)位点上肌动蛋白-膜附着的细胞骨架蛋白),间接上调 actin 表达的作用路线,从而导致肌动蛋白细胞骨架调节通路(regulation of actin cytoskeleton)激活、肌动蛋白聚合、片状脂蛋白形成及细胞运动的发生^[186, 187]。在鞘脂信号通路(Sphingolipid signaling pathway)中,Gi 蛋白被显著上调,Gi 蛋白可以激活 PI3K,从而导致细胞吞噬及细胞骨架改变等^[188]。综上可推测 GF 及 Gi 的表达量上调也可能是 AMDV 感染过程中 ADE 机制的表现之一。

通过 ncRNA-mRNA 联合分析发现,在 AMDV 感染过程中非编码 RNA 对感染过程可能存在影响。其中 Syk 基因可能由 miRNA tgu-miR-193b-5p 负调控表达,然而富集结果显示表达量差异并不显著($P > 0.05$); miRNA xtr-miR-320(下调)负调控 PLC γ -2(上调); lncRNA XR_001181178.1(下调)负调控 PLC γ -2(上调),XR_001178194.1(上调)正向调控 RAC2(上调)和 IGF1R(上调),XR_001176625.1(上调)负调控 VAV3(下调)。这些 ncRNA 可同时调控多个 mRNA,从而影响生物功能及蛋白编码,但 ncRNA-mRNA 间具体的调控关系与 AMDV 感染过程中 ADE 机制的内在联系还有待进一步验证。更为有趣的是,通过对 mRNA-lncRNA-miRNA 的互作分析,发现 xtr-miR-320 与 PLC- γ 2 的互作受到多条 lncRNA 调控,如此复杂的互作关系网或可作为深入探究 AMDV 感染过程中 ADE

机制的研究方向之一。

通过 GO 富集分析获得了大量 Terms，这些条目涉及生物进程、细胞组成以及分子功能。我们发现有多条代谢相关的 Terms 被富集，如代谢过程 (metabolic process)、细胞代谢过程 (cellular metabolic process)、生物合成过程 (biosynthetic process) 及蛋白质代谢过程 (protein metabolic process) 等，暗示了 AMDV 感染可能涉及到体内代谢的改变，这与带毒病貂的病症相吻合：AMD 为慢性消耗性疾病，感染后期逐渐发展为长期带毒，病貂日渐消瘦，嗜水，精神沉郁或兴奋，部分貂可能存在煤焦油状粪便。AMDV 感染的 ADE 机制过程中的代谢变化关系有待进一步探究。

4.4 小结

(1) GO 富集分析发现 AMDV 感染过程或涉及机体代谢变化。

(2) 通过 KEGG 富集分析发现 AMDV 感染的 ADE 作用涉及 FcγR 家族介导的巨噬细胞内吞通路、FcεRI 通路、吞噬体通路、胞吞通路、PI3K 信号通路、造血细胞谱系、肌动蛋白细胞骨架调节等多条通路。

(3) Syk 作为 FcγR 受体家族介导的巨噬细胞内吞通路中的上游基因表达量升高，可作为深入探究 AMDV 感染过程中 ADE 机制的研究靶点。

(4) PLC-γ2 与 xtr-miR-320 的互作关系受到多条 lncRNA 调控。

5.1.1.3 试验试剂

本章试验常用试剂见表 5-1:

表 5-1 主要试剂及来源

Tab.5-1 Main reagents and sources

试验耗材	厂家
人及哺乳动物单核细胞培养基	天津灏洋
Opti-MEM 减血清培养基	Gibco
细胞培养基 RPMI 1640	Gibco
牛血清白蛋白 (BSA)	德国 Biofroxx
Trizol	Ambion
RNA 提取试剂盒	Axygen
兔抗人非受体型酪氨酸蛋白激酶多克隆抗体	北京博奥森公司
HRP 标记的兔抗貂 IgG	北京博奥森公司
FITC 标记的兔抗貂 IgG	北京博奥森公司
HRP 标记的山羊抗兔 IgG	北京博奥森公司
PAGE 凝胶试剂盒	上海铂莱生物科技有限公司
PAGE 彩色凝胶试剂盒	上海铂莱生物科技有限公司
ECL 显色液	上海天能科技有限公司
总蛋白提取试剂盒	贝博生物有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天生物有限公司

5.1.1.4 试验设备

试验常用设备见表 5-2:

表 5-2 常用仪器设备

Tab.5-2 Commonly used equipment

仪器	厂家
水平冷冻离心机	THERMO
超净工作台	苏州泰安空气技术有限公司
光学倒置显微镜	德国徕卡 Leica 仪器有限公司
荧光倒置显微镜	德国徕卡 Leica 仪器有限公司
细胞计数仪 Leica Microsystems CMS GmbH	德国徕卡 Leica 仪器有限公司
CO ₂ 恒温细胞培养箱(Hera cell 240i)	THERMO
聚丙烯酰胺凝胶电泳仪	Bio-Rad
半干转印仪	Bio-Rad
荧光定量 PCR 仪	德国徕卡 Leica 仪器有限公司
RFect ^{PM} 原代细胞小核酸转染试剂	常州百代生物科技股份有限公司
RFect 原代细胞质粒 DNA 转染试剂盒	常州百代生物科技股份有限公司

5.1.2 方法

5.1.2.1 水貂外周血单核细胞体外分离培养

水貂外周血单核细胞体外分离培养方法见 3.1.2。

5.1.2.2 Syk 基因过表达质粒构建

(1) Syk 基因调取。

以第四章中转录本数据为模板设计 Syk 全长 CDS 区调取引物 (表 5-3)。

(2) 构建 pcDNA3.1-Syk 真核表达载体。

根据真核表达载体 pcDNA3.1v5-HisA 序列设计同源重组引物 (表 5-4), 获得两端含有 pcDNA3.1v5-HisA 同源序列的 Syk 基因, 并连接转化至 *E. coli* DH5 α 中克隆, 提取质粒并测序。

表 5-3 Syk 基因调取 PCR 引物

Tab.5-3 PCR primers of Syk gene

片段命名	引物命名	引物序列	位置 (nt)	产物长度 (bp)
Syk	F1	5'CTCGCTTCGCTCGCGCACCTT	38-70	1666
	R1	TGGCGCTGGTG3'		
		5'TCTACTTTTACATCACCACCT	1681-1703	
		CC3'		

表 5-4 pcDNA3.1v5-HisA 同源重组引物

Tab.5-4 Homologous recombination primer of pcDNA3.1v5-HisA

片段命名	引物命名	引物序列	位置 (nt)	产物长度 (bp)
Syk-1	F2	5'AGTTAAGCTTGGTACATGGCGGGG AGCGCGCCGACAG3'	38-70	1666
	R2	5'GATATCTGCAGAATTTTAGTTCACC ACGTCGTAGTAATAA3'	1681-1703	

PCR 反应体系及反应条件如下 (表 5-5, 表 5-6):

表 5-5 PCR 反应体系 (Prime Star Max)

Tab.5-5 PCR reaction system (Prime Star Max)

组分	添加量 (μL)
Prime Star Max	12.5
DNA 模板	0.5
F (20 mM)	0.5
R (20 mM)	0.5
H ₂ O	11
Total	25

表 5-6 PCR 反应条件

Tab.5-6 PCR reaction conditions

循环数	反应温度	反应时间
30×	98° C	10 min
	98° C	10 s
	50° C	5 s
	72° C	10 s
	72° C	7 min
	4° C	保存

(3) 产物的连接转化。

见附录二。

(4) 质粒提取。

见附录二。

(5) 质粒测序。

将提取的质粒送于吉林省库美生物科技有限公司进行测序，测序结果使用 DNAMAN (version 6.0) 进行碱基序列比对，使用 Chromas (version 2.6.5) 进行碱基峰值对照，以区分鉴别重叠峰。

5.1.2.3 水貂 Syk 蛋白理化性质及结构预测

根据获得的水貂 Syk 基因序列，通过软件对其编码的 Syk 蛋白进行生物信息学分析。

(1) Syk 一级结构预测。

利用网站 <https://web.expasy.org/protparam/> 对水貂 Syk 及人源 Syk (Homo-Syk) 进行理化性质参数的在线分析。

(2) Syk 二级结构预测。

利用 <https://prabi.ibcp.fr/htm/site/web/home> 中的二级结构预测工具进行水貂 Syk 的二级结构预测。

(3) Syk 跨膜区预测。

利用网站 https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html 对水貂 Syk 进行跨膜区的分析。

(4) Syk 信号肽预测。

利用网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 的 Signal 5.0 工具分析水貂 Syk 的信号肽。

(5) Syk 细胞内定位预测。

利用网站 <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/> 对水貂 Syk 进行细胞内定位预测。

(6) Syk 糖基化位点和磷酸化位点预测。

利用网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> 在线分析水貂 Syk 的糖基化位点，利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/> 在线分析 Syk 的磷酸化位点。

(7) Syk 蛋白质三级结构预测。

利用网站 <https://swissmodel.expasy.org/> 对水貂 Syk 及 Homo-Syk 进行三级结构的预测。

(8) Syk 抗原表位分析。

利用 DNASStar 软件中的 Protean 工具进行水貂 Syk 的抗原表位分析。

5.1.2.4 Syk 干扰 AMDV 感染过程中的 ADE 机制研究

(1) SiRNA-Syk 转染原代外周血单核细胞。

由于原代细胞难以转染，因此选用针对原代细胞转染的试剂 RFect^{PM} 原代细胞小核酸

转染试剂（货号：11014）进行 siRNA 转染，具体操作步骤如下：

- ① 细胞接种：转染 4 h 前接种水貂原代外周血单核细胞，每孔 100 μL 人及哺乳动物单核细胞培养基（不含抗生素），每孔细胞数 2.5×10^5 ；
- ② 1.2 pmol siRNA 用 10 μL Opti-MEM 减血清培养基稀释；
- ③ 0.4 μL RFect^{PM} 用 10 μL Opti-MEM 减血清培养基稀释，室温轻轻混匀，静置 5 min；
- ④ 混合 siRNA 稀释液与 RFect^{PM} 稀释液，轻柔混匀，室温孵育 20 min；
- ⑤ 将 20 μL 混合物加入培养孔内，轻晃培养板混匀；
- ⑥ 5% CO₂，37°C 过夜培养，检测基因抑制效果。

注意，确保在 25 min 内进行第④-⑥步骤，以保证转染效率。

(2) pcDNA3.1-Syk 转染原代外周血单核细胞。

选用可高效转染原代细胞的 RFect 质粒 DNA 转染试剂（货号：21013）进行质粒 DNA 转染，具体操作如下：

- ① 细胞接种：转染 4 h 前接种水貂原代外周血单核细胞，每孔 100 μL 人及哺乳动物单核细胞培养基（不含抗生素），每孔细胞数 2.5×10^5 ；
- ② 0.4 μL RFect 转染试剂用 10 μL Opti-MEM 减血清培养基稀释，轻轻混匀后室温静置 7 min；
- ③ 0.2 μg 质粒用 10 μL Opti-MEM 减血清培养基稀释，轻轻混匀后室温静置 5 min；
- ④ 将 RFect-培养基混合液滴加至质粒-培养基混合液中，轻轻混匀后室温静置 15 min，立即转染；
- ⑤ 将上述混合液滴加至培养孔终，轻轻晃动混匀；
- ⑥ 5% CO₂，37°C 过夜培养，检测转染效果。

注意，步骤④中 RFec-培养基混合液和质粒-培养基混合液的滴加次序很重要，不可颠倒顺序。

(3) siRNA-Syk 转染单核细胞的间接免疫荧光检测。

使用 FITC 标记的 siRNA 进行转染，培养 12 h，固定细胞，荧光显微镜检测荧光情况。

(4) 蛋白浓度测定。

- ① 取适量细胞，12000 r/min，离心 10 min；PBS 重悬，再次离心（12000 r/min，离心 10 min），弃上清；
- ② 重复步骤①两次，加入适量 PBS 重悬，反复冻融 3 次，使蛋白完全释放；
- ③ 将试剂盒中的蛋白标准品稀释成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液并充分混匀放于 -20°C 保存，使用前将其稀释成 0.5 mg/mL 蛋白标准液；
- ④ 将蛋白标准液按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板中，加标准品稀释液补足到 20 μL ；
- ⑤ 96 孔板中加入待测蛋白样品，加标准品稀释液补足到 20 μL ；

- ⑥ 向 96 孔板中加入 BCA 工作液, 37 °C 放置 25 min;
- ⑦ 酶标仪测定 540 nm 波长的吸光度, 并计算各孔的蛋白浓度;
- ⑧ 取一定量的蛋白加入 4×蛋白上样缓冲液, 沸水煮沸 10 min, 制备成 SDS-PAGE 样品, -80°C 分装保存备用。

(5) 蛋白免疫印迹-Western-blot 检测 Syk 表达量。

- ① 按照 SDS-PAGE 分离胶制备试剂盒说明书配制 12%浓度分离胶, 并以异丙醇压平分离胶;
- ② 分离胶凝固后, 倒掉分离胶上层的异丙醇, 并以滤纸吸干残余异丙醇, 按照 SDS-PAGE 彩色浓缩胶试剂盒说明书配制浓缩胶;
- ③ 计算上样量以保持每个样品孔终蛋白量一致;
- ④ 向电泳槽内加入足量电泳液;
- ⑤ 将凝固的胶板插入电泳槽中, 按照计算好的上样量上样, 两侧多余的泳道应以 Buffer 补齐以保证条带平直;
- ⑥ 80 V, 电泳 10-15 min 后, 120 V 电泳至蓝色条带跑到凝胶底部;
- ⑦ 采用半干转印法, 将适当大小的凝胶切下, 按照从负极到正极的顺序依次为滤纸、分离胶、PVDF 膜及滤纸 (注意, PVDF 膜及滤纸应在预冷的转模缓冲液中平衡浸泡 3-5 min);
- ⑧ 于半干转印仪中 60 V 进行蛋白转印 10 min, 取出 PVDF 膜;
- ⑨ 含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 PVDF 膜 2 h;
- ⑩ TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min;
- ⑪ 加入一抗, 4°C 过夜孵育;
- ⑫ TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min;
- ⑬ 加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h;
- ⑭ TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min;
- ⑮ ECL 显色液均匀滴加在膜表面, 将膜置于化学成像仪中成像。

(6) AMDV-DL125 感染干扰 Syk 表达后 ADE 模型的病毒拷贝数检测。

使用 qPCR 检测干扰 Syk 表达后 AMDV-DL125 的复制情况。试验分组为 A: siRNA-Syk; B: pcDNA3.1-Syk; C: Control; D: NC-siRNA; E: pcDNA3.1。

(7) AMDV-DL125 感染干扰 Syk 表达后 ADE 模型的 IFA 试验。

使用干扰 Syk 表达后的水貂原代外周血单核细胞, 按照 3.1.2 的方法构建 ADE 体外研究模型, 并以 IFA 试验检测此时 AMDV-DL125 感染情况。试验分组为 pcDNA3.1-Syk 组、siRNA-Syk 组及 Control 组。

(8) AMDV-DL125 感染干扰 Syk 表达后 ADE 模型的相关细胞因子检测。

使用 qRT-PCR 检测 AMDV-DL125 感染干扰 Syk 表达后 ADE 模型的相关细胞因子 IL-

10、IFN- γ R1、TNF-R1 及 TNF-R2 表达量。

5.2 结果

5.2.1 Syk 基因调取

对转录本数据进行分析比对,发现转录本 XM_013049302.1 和 XM_013049137.1 分别与 Homo-Syk 的前后氨基酸序列高度同源(图 5.2)。因此,根据已知转录本设计引物,调取 Mink-Syk 全长 CDS 区序列。通过 PCR 获得大小为 1908 bp 的序列,基因大小符合预期(图 5.3)。

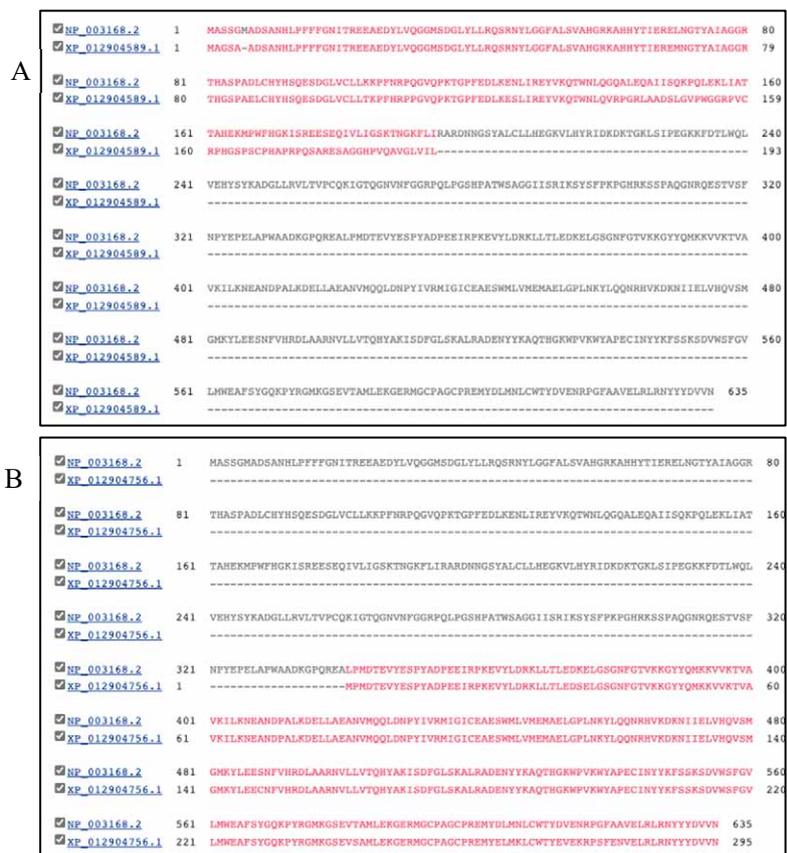


图 5.2 已知转录本氨基酸序列比对结果。A: 序列 XM_013049302.1 (氨基酸序列 XP_012904589.1) vs. Homo-Syk (氨基酸序列 NP_003168.2); B: XM_013049137.1 (氨基酸序列 XP_012904756) vs. Homo-Syk (氨基酸序列 NP_003168.2)

Fig.5.2 Amino acid sequence alignment results of known transcripts. A: XM_013049302 (Amino acid sequence XP_012904756.1) vs. Homo-Syk (Amino acid sequence NP_003168.2); B: XM_013049137.1 (amino acid sequence XP_012904756) vs. Homo-Syk (amino acid sequence NP_003168.2)

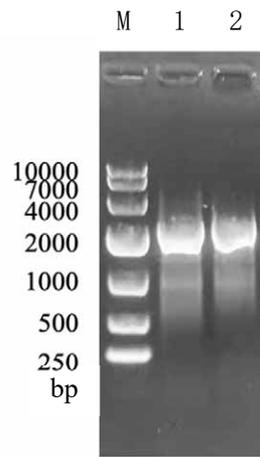


图 5.3 Syk 完整 CDS 区序列

Fig.5.3 Syk complete CDS sequence

5.2.2 过表达质粒 pcDNA3.1-Syk 的构建

通过同源重组连接真核表达载体 pcDNA3.1-v5HisA，质粒全长 7410 bp，质粒大小符合预期（图 5.4）；测序结果显示，水貂 Syk 与 Homo-Syk 核苷酸序列一致性 81.42%，氨基酸一致性 90.74%（图 5.5）。

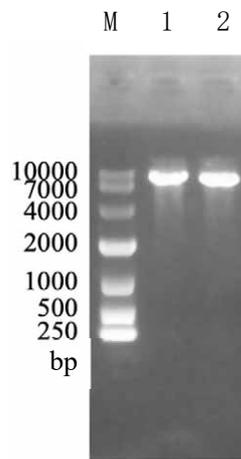


图 5.4 线性化的 pcDNA3.1-Syk 质粒电泳图

Fig.5.4 The electropherogram of the linearized pcDNA3.1-Syk plasmid

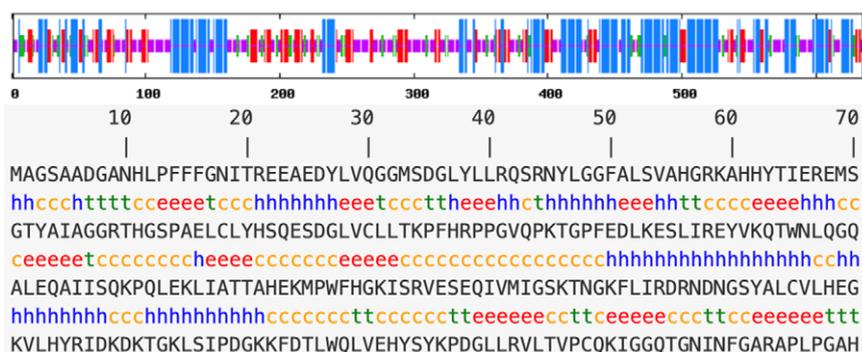


图 5.6 Syk 的二级结构预测

A: 大写字母为氨基酸简写; h、t、e 和 c 分别代表 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲; B: 长竖线表示 α 螺旋, 中竖线表示延伸链, 次中竖线表示 β 转角, 短竖线表示无规则卷曲

Fig.5.6 Syk secondary structure prediction

A: Capital letters are abbreviations of amino acids; h, t, e, and c represent α helix, β turn, extended chain and random coil respectively; B: Long vertical line indicates α helix, middle vertical line indicates extended chain, second middle vertical line Indicates β -turn angle, and short vertical lines indicate irregular curling

5.2.3.3 Syk 的跨膜区预测 L

TMpred 预测水貂 Syk 跨膜区 (图 5.7), 高于 500 分的区域或为跨膜结构域。结果显示, 发现了一个高分跨膜结构域, 位于第 549 至 596 氨基酸区域 (表 5-8)。

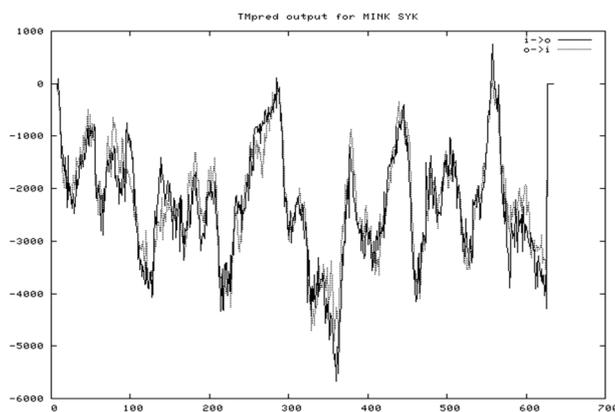


图 5.7 跨膜结构域评分预测

Fig.5.7 Transmembrane domain score prediction

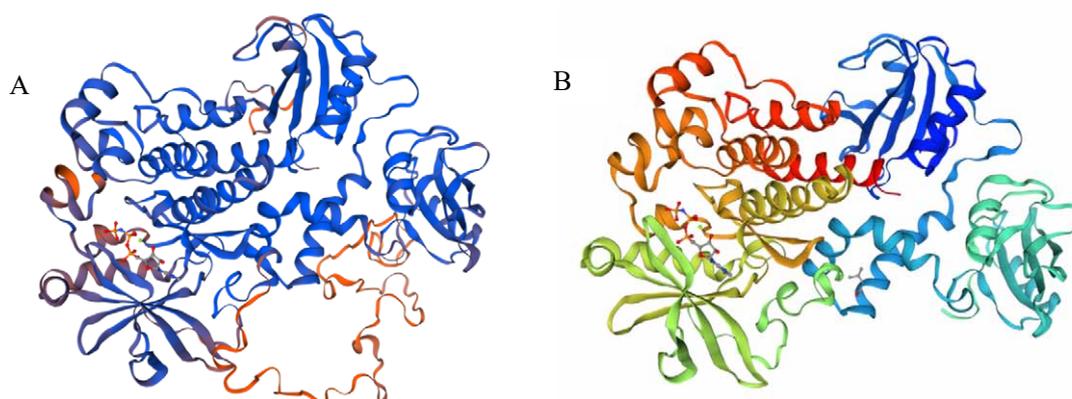


图 5.12 水貂 Syk 与 Homo-Syk 三级结构图。A: mink Syk; B: Homo-Syk

Fig.5.12 Mink Syk and Homo-Syk three-level structure diagram. A: mink Syk; B: Homo-Syk

5.2.3.8 Syk 的抗原表位分析

对水貂 Syk 进行抗原表位预测。当亲水性 (Hydrophilicity Plot) > 0、抗原性指数 (Antigenic Index) > 0、表面可及性指数 (surface probability plot) > 1, 及卷曲程度 (flexible regions) 越高时, 可能存在抗原表位。由图 5.13 可知, 水貂 Syk 可能存在多个抗原表位。

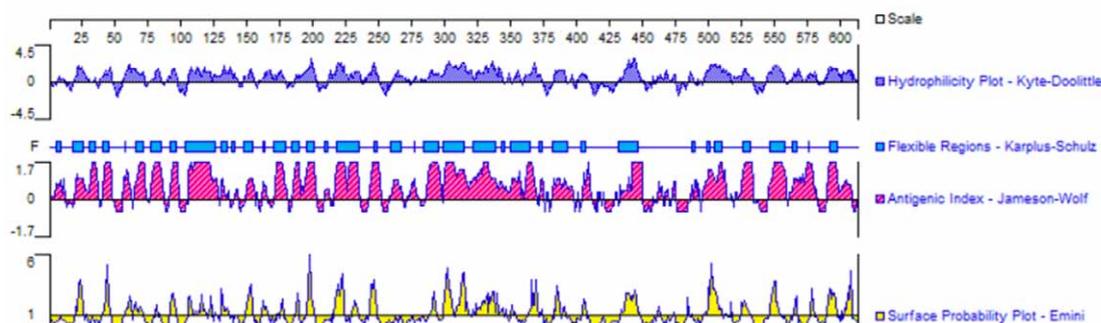


图 5.13 水貂 Syk 的抗原表位分析

Fig.5.13 Antigenic epitope analysis of mink Syk

5.2.4 Syk 干扰 AMDV 感染过程中的 ADE 机制研究

5.2.4.1 Syk 过表达及抑制表达的 RT-PCR 验证

与 Control 组相比, 转染 pcDNA3.1-Syk 组的 Syk 基因表达量上升, siRNA-Syk 组的 Syk 基因表达量下降, 而空载体对照组及 siRNA 阴性对照组表达量与 Control 组基本一致, 无显著差异 (图 5.14)

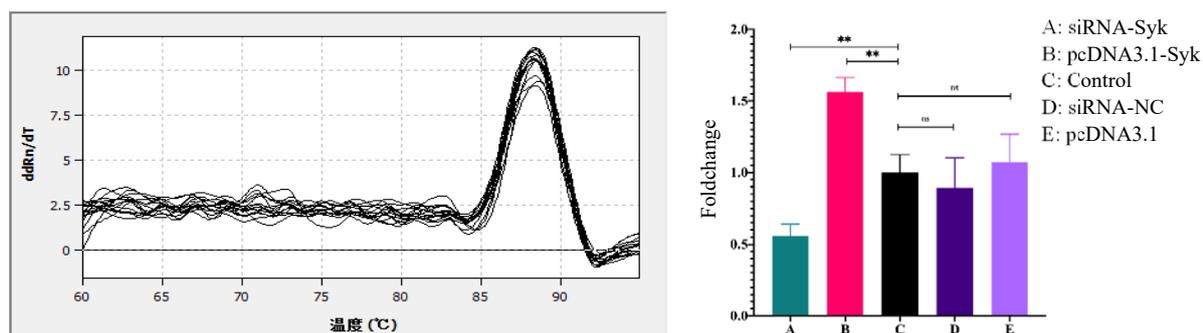


图 5.14 Syk 过表达及抑制表达的 RT-PCR 验证

Fig.5.14 RT-PCR of overexpression and inhibition of Syk

5.2.4.2 siRNA-Syk 转染原代单核细胞的 IFA 试验

使用带有 FITC 标记的 siRNA 转染单核细胞，如图 5.15 所示，其中绿色荧光为 FITC 标记的 siRNA，蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核。结果显示，siRNA 转染效率较高（图 5.15）。

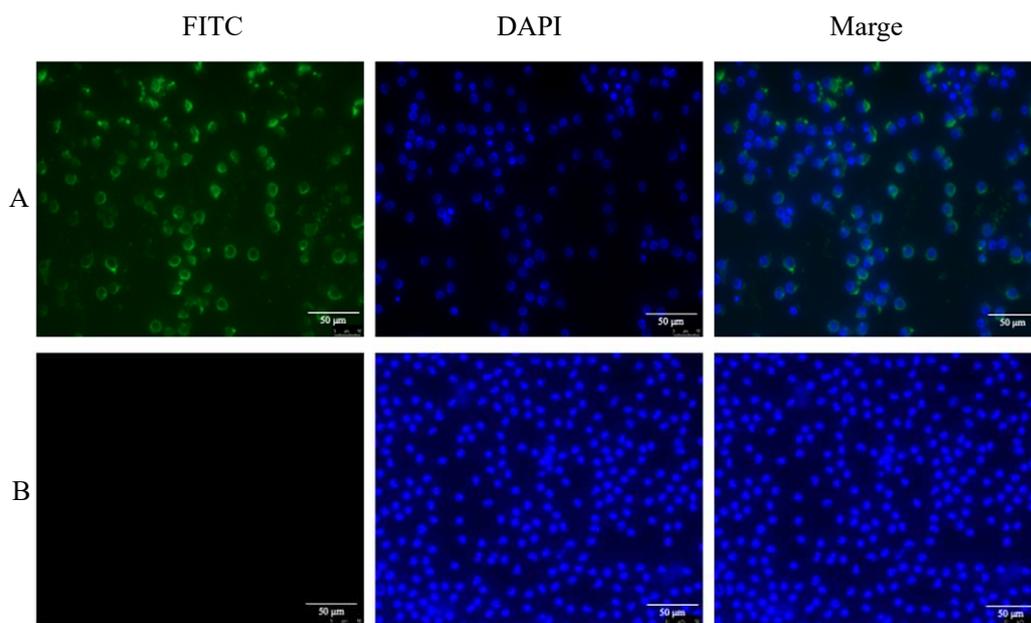


图 5.15 siRNA-Syk 转染水貂单核的 IFA 试验

A: siRNA-*syk*; B: siRNA-NC; 两组分别转染水貂单核细胞并培养 12 h 后 siRNA (绿色) 和 DAPI (蓝色) 的免疫染色。比例尺: 50 μm

Fig.5.15 IFA of siRNA-Syk transfected mink monocyte

A: siRNA-*syk*; B: siRNA-NC; immunofluorescence staining of siRNA-*syk* (green) and DAPI (blue) after the two groups were transfected with mink monocytes and cultured for 12 h. Scale bar: 50 μm

5.2.4.3 Syk 过表达及抑制表达的 Western blot 验证

Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, 转染过表达质粒 pcDNA3.1-Syk 的单核细胞的 Syk 蛋白表达量升高, 而转染 siRNA-Syk 的单核细胞的 Syk 表达量降低, 结果符合预期 (图 5.16)。

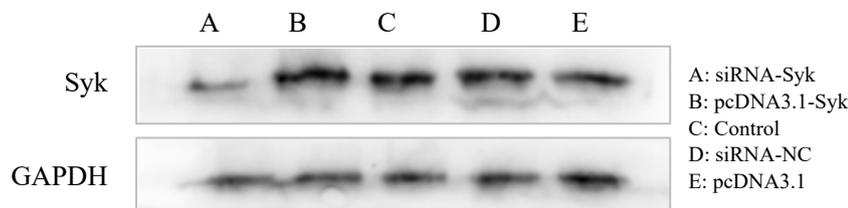


图 5.16 Syk 过表达及抑制表达的 Western blot 验证

Fig.5.16 Western blot of overexpression and suppression of Syk

5.2.4.4 干扰 Syk 表达后转染 ADE 模型 AMDV-DL125 拷贝数的 qPCR 验证

分别向过表达及抑制表达 Syk 的细胞中添加等量的抗原-抗体复合物, 通过实时荧光定量 qPCR, 对培养 12 h 的培养液中的病毒拷贝数进行定量。结果显示, 过表达 Syk 基因后, AMDV-DL125 拷贝数显著增加, 而抑制表达 Syk 的病毒拷贝数显著降低, siRNA 与 pcDNA3.1 质粒的加入对病毒拷贝数均无显著影响 (图 5.17)。

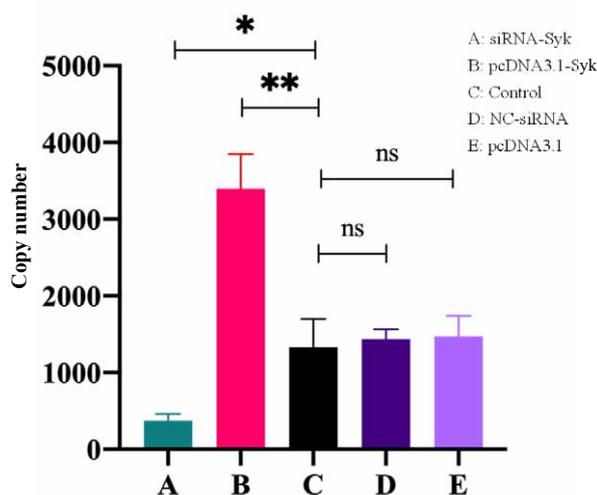


图 5.17 干扰 Syk 表达后 AMDV-DL125 拷贝数

Fig.5.17 AMDV-DL125 copy number after interference with Syk expression

5.2.4.5 干扰 Syk 表达后转染 ADE 模型的 IFA 试验

对干扰 Syk 表达量后的 AMDV-DL125 感染模型进行 IFA 试验, 结果如图 5.18, 其中绿色荧光为 FITC 标记的 AMDV-DL125, 蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核。结果显示, 感染 12 h 时, 相比 Control 组, 过表达 Syk 组的单核细胞更易受到 AMDV-DL125 感染, 而

抑制 Syk 表达组感染 AMDV-DL125 的细胞较少 (图 5.18)。

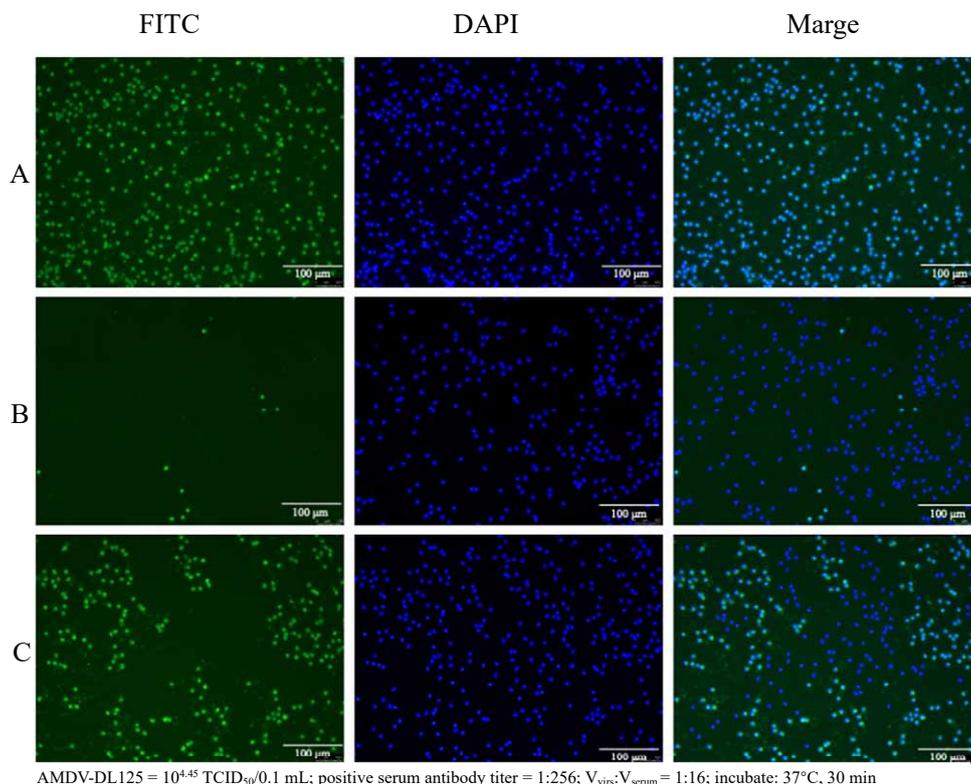


图 5.18 IFA 检测干扰 Syk 表达后 12 h 的 AMDV-DL125 感染情况

A: pcDNA3.1-Syk; B: siRNA-Syk; C: PBS (control); 水貂单核细胞分别转染 A、B 和 C 后接种抗原-抗体复合物, 培养 12 h 时 AMDV-DL125 (绿色) 和 DAPI (蓝色) 的免疫染色。比例尺: 100 μm

Fig.5.18 IFA detects AMDV-DL125 infection at 12h after interfering with Syk expression

A: pcDNA3.1-Syk; B: siRNA-Syk; C: PBS (control); mink monocytes were transfected with A, B, and C and then inoculated with antigen-antibody complexes, immunofluorescence staining of AMDV-DL125 (green) and DAPI (blue) when cultured for 12 h. Scale bar: 100 μm

5.2.4.6 干扰 Syk 表达后转染 ADE 细胞系 12 h 的细胞因子变化

使用 qRT-PCR 检测 AMDV-DL125 感染干扰 Syk 表达后 ADE 模型的相关细胞因子及受体 IL-10、IFN- γ R1、TNF-R1 及 TNF-R2 表达量。结果显示, 对比 Control 组, 过表达组 (pcDNA3.1-Syk) IL-10、IFN- γ R1、TNF-R1 及 TNF-R2 表达量均显著升高, 而抑制表达组 (siRNA-Syk) IL-10、IFN- γ R1、TNF-R1 及 TNF-R2 表达量显著降低; NC-siRNA 对照组及 pcDNA3.1 对照组相比 Control 组各基因表达量无显著差异 (图 5.19)。结合上述病毒拷贝数检测及 IFA 试验结果可知, 当过表达 Syk 时, IL-10 表达量上调, 促进 B 细胞活化, 增强体液免疫, 进一步介导 ADE 作用; 而抗病毒因子受体 (IFN- γ R1、TNF-R1 及 TNF-R2) 表达量升高, 也说明病毒可能处于活跃状态。抑制 Syk 表达时, IL-10 的表达也受到

抑制, ADE 作用减轻; 由于更少的病毒进入细胞内部, 因此抗病毒因子受体表达量降低。

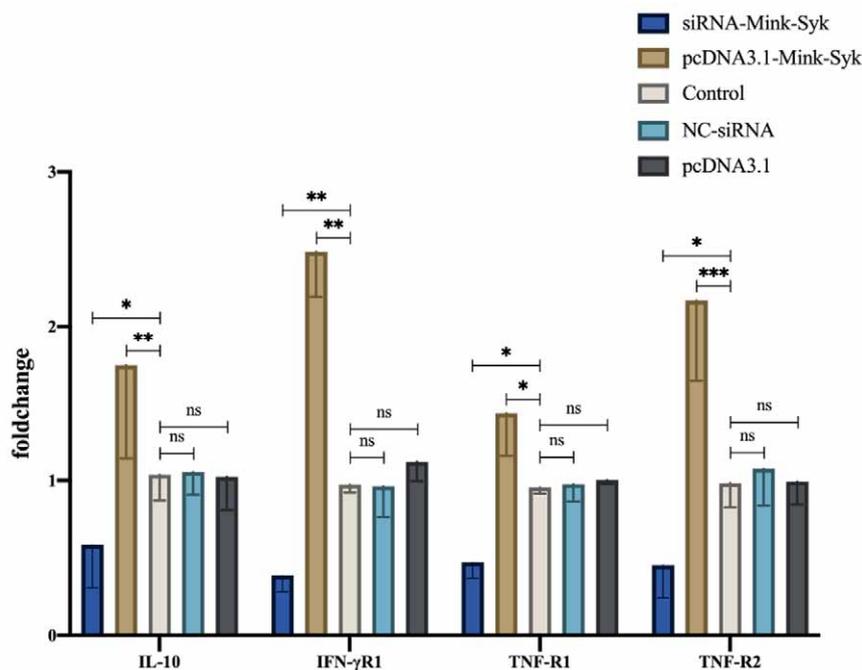


图 5.19 ADE 相关细胞因子的 qRT-PCR 检测结果

Fig.5.19 qRT-PCR test results of ADE-related cytokines

5.3 讨论

AMDV 在全世界的貂场中广泛流行, 对养貂业造成巨大损失。目前, 由于尚无可靠的商用疫苗, 养殖者仅通过淘汰 AMDV 阳性水貂以净化貂场^[5, 27, 28]。研究发现, AMDV 感染过程中, 存在 ADE 效应, 这一效应可能导致疫苗失效。通过第四章全转录组数据分析了 AMDV 感染过程中可能触发的信号通路。结果发现, Syk 基因可能在这一过程中起到重要作用。因此, 以分子生物学技术, 过表达及抑制表达水貂原代外周血单核细胞中的 Syk 基因, 以探索 Syk 基因在 AMDV 感染过程中的具体功能。

通过第四章中获得的转录本数据, 确定了 Syk 的 CDS 区, 并设计了相应的调取引物。结果表明, Syk 的 CDS 区由 635 个氨基酸组成 (基因组大小 1903 bp)。通过序列比对及蛋白质结构预测, 证实了 Syk 与人源 Syk (Homo-Syk) 高度同源, 氨基酸一致性为 90.74%。这些结果暗示了水貂 Syk 的生物学功能可能与人源 Syk 功能相同或相近。为了进一步研究 Syk 与 AMDV 感染之间的关系, 将水貂 Syk 过表达质粒 pcDNA3.1-Syk 与抑制水貂 Syk 表达的 siRNA 导入到构建的 AMDV 感染的 ADE 模型中。结果显示, 感染 12 h 后, 过表达 Syk 组 AMDV-DL125 拷贝数显著升高, 而抑制表达 Syk 组 AMDV-DL125 拷贝数显著低于对照组。IFA 试验显示过表达 Syk 后的单核细胞更易被病毒粒子侵入。这些结果提示了 Syk 基因调控了 AMDV 感染过程中的单核-巨噬细胞内吞作用^[161], 当 Syk 基因表达受到抑制时, 其下游的一系列反应均被抑制, 有助于降低感染过程中的 ADE 效应, 从而降低单核

细胞对病毒的摄入，但病毒仍可以主动感染单核细胞并侵入细胞内部。对相应细胞因子进行检测，发现 IL-10 与抗病毒因子受体的表达量在一定程度上与 Syk 的表达量成正比。暗示了当水貂感染 AMDV 强毒株时，随着感染程度的加深，Syk 的表达量增加，进而增加 IL-10 表达量；上调的 IL-10 能促进 B 细胞的活化，产生更多的非中和性抗体进一步介导 ADE 作用，从而加重感染^[65]。

本部分试验初步阐明了 Syk 基因调控 AMDV 感染过程中的 ADE 机制，为后续深入研究 AMDV 感染过程提供前期基础，为 AMDV 疫苗的研发提供了新的思路。

5.4 小结

- (1) 获得了水貂 Syk 全长 CDS 区并预测发现水貂 Syk 蛋白与人源 Syk 蛋白具有相似的理化性质及蛋白结构。
- (2) 干预单核细胞 Syk 的表达量可影响 AMDV-DL125 的内化。
- (3) Syk 可在一定程度上调控 AMDV-DL125 感染的 ADE 机制。

结 论

1. 通过对国内近 40 年的 AMDV 感染情况的荟萃分析及 2019 年部分省份的 AMDV 流行病学调查发现,我国水貂养殖场普遍存在 AMD 且分布不均。不同水貂品种和性别之间不存在显著差异。季节及年龄因素对阿留申阳性率存在显著影响,为 AMDV 感染的风险因素。采用更合理的育种方案和敏感性特异性更高的检测方法有助于水貂养殖场中 AMDV 的净化。

2. 初步构建了 AMDV 强毒株感染水貂外周血原代单核细胞的 ADE 作用的体外研究模型,发现抗原-抗体复合物的存在有利于 AMDV 病毒粒子进入单核-巨噬细胞。

3. 通过对 AMDV 感染水貂外周血原代单核细胞的全转录组测序分析,发现差异表达 mRNA 2658 个,其中上调基因 1951 个,下调基因 707 个。差异表达基因可富集到多个 ADE 相关的信号通路,其中 FcγR 家族介导的巨噬细胞内吞通路中的上游基因 Syk 存在表达量差异,可能与感染过程中存在的 ADE 机制相关。

4. 获得了水貂 Syk 全长 CDS 区,初步验证了 Syk 基因参与 AMDV 感染水貂外周血单核细胞的 ADE 机制。

创新点

- (1) 将荟萃分析应用于 AMDV 阳性率的评估；
- (2) 将全转录组测序技术应用于 AMDV 感染机制研究，对感染过程中可能存在的 ADE 机制进行探索性预测，为深入研究 AMDV 感染机制提供理论依据和研究靶点；
- (3) 证明了 Syk 基因参与 AMDV 感染水貂外周血原代单核细胞过程中的 ADE 机制。

参考文献

- [1] Andersson A M, Nyman A K, Wallgren P. A retrospective cohort study estimating the individual Aleutian disease progress in female mink using a VP2 ELISA and its association to reproductive performance [J]. *Prev Vet Med*, 2017, 140: 60-66.
- [2] Canuti M, Whitney H G, Lang A S. Corrigendum: Amdoparvoviruses in small mammals: expanding our understanding of parvovirus diversity, distribution, and pathology [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 264.
- [3] Manas S, Cena J C, Ruiz-Olmo J, et al. Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain [J]. *J Wildl Dis*, 2001, 37(1): 138-144.
- [4] Knuutila A, Uzategui N, Kankkonen J, et al. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 133(3): 229-238.
- [5] Prieto A, Fernandez-Antonio R, Diaz-Cao J M, et al. Distribution of Aleutian mink disease virus contamination in the environment of infected mink farms [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 204: 59-63.
- [6] Prieto A, Diaz-Cao J M, Fernandez-Antonio R, et al. Lesser housefly (*Fannia canicularis*) as possible mechanical vector for Aleutian mink disease virus [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221: 90-93.
- [7] White P C, Newton-Cross G A, Moberly R L, et al. The current and future management of wild mammals hunted with dogs in England and Wales [J]. *J Environ Manage*, 2003, 67(2): 187-197.
- [8] Bonesi L, Palazon S. The American mink in Europe: Status, impacts, and control [J]. *Biol Conserv*, 2007, 134(4): 470-483.
- [9] Kashtanov S N, Salnikova L E. Aleutian mink disease: Epidemiological and genetic aspects [J]. *Biol Bull Rev*, 2018, 8(2): 104-113.
- [10] Kiyonao S, Tomoko T, Shigeru Y, et al. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase [J]. *J Biochem*, 2001, 130(2): 177-186.
- [11] Knuutila A, Aronen P, Eerola M, et al. Validation of an automated ELISA system for detection of antibodies to Aleutian mink disease virus using blood samples collected in filter paper strips [J]. *Virol J*, 2014, 11: 141.
- [12] Nituch L A, Bowman J, Beauclerc K B, et al. Mink farms predict Aleutian disease exposure in wild

- American mink [J]. *PloS One*, 2011, 6(7): e21693.
- [13] 李宝全, 黄丽波, 蔡玉梅, et al. 提高水貂生产和毛皮质量的策略 [J]. *山东畜牧兽医*, 2015, 36(2): 12-13.
- [14] 李振荣, 吴斌, 胡传伟, et al. 进境水貂阿留申病关键检疫技术的研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 2008, 01): 82-83.
- [15] 于海静. 全国养殖水貂皮产量现状分析 [J]. *山东畜牧兽医*, 2018, 39(03): 65-66.
- [16] 刘长浩, 张洪学, 张小能. 水貂阿留申病的危害及净化措施 [J]. *山东畜牧兽医*, 2018, 39(2): 79-81.
- [17] Aasted B, Tierney G S, Bloom M E. Analysis of the quantity of antiviral antibodies from mink infected with different Aleutian disease virus strains [J]. *Scand J Immunol*, 1984, 19(5): 395-402.
- [18] Bloom M E, Kanno H, Mori S, et al. Aleutian mink disease: puzzles and paradigms [J]. *Infect Agents Dis*, 1994, 3(6): 279-301.
- [19] Bloom M E, Race R E, Wolfenbarger J B. Characterization of Aleutian disease virus as a parvovirus [J]. *J Virol*, 1980, 35(3): 836-843.
- [20] Porter D D, Larsen A E, Porter H G. The pathogenesis of Aleutian disease of mink. I. In vivo viral replication and the host antibody response to viral antigen [J]. *J Exp Med*, 1969, 130(3): 575-593.
- [21] Dworak L J, Wolfenbarger J B, Bloom M E. Aleutian mink disease parvovirus infection of K562 cells is antibody-dependent and is mediated via an Fc(gamma)RII receptor [J]. *Arch Virol*, 1997, 142(2): 363-373.
- [22] Kanno H, Wolfenbarger J B, Bloom M E. Aleutian mink disease parvovirus infection of mink macrophages and human macrophage cell line U937: demonstration of antibody-dependent enhancement of infection [J]. *J Virol*, 1993, 67(12): 7017-7024.
- [23] Bloom M E, Alexandersen S, Perryman S, et al. Nucleotide sequence and genomic organization of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): sequence comparisons between a nonpathogenic and a pathogenic strain of ADV [J]. *J Virol*, 1988, 62(8): 2903-2915.
- [24] Persson S, Jensen T H, Blomstrom A L, et al. Aleutian mink disease virus in free-ranging mink from Sweden [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122194.
- [25] Prieto A, Fernández-Antonio R, López-Lorenzo G, et al. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus causing outbreaks in mink farms from Southwestern Europe: a retrospective study from 2012 to 2019 [J]. *J Vet Sci*, 2020, 21(4): e65.
- [26] Jørgen R J, Francesco D A, Ulrik B, et al. Aleutian Mink Disease Virus and Humans [J]. *Emerg Infect Dis*,

- 2009, 15(12): 2040.
- [27] Themudo G E, Østergaard J, Ersbøll A K. Persistent spatial clusters of plasmacytosis among Danish mink farms [J]. *Prev Vet Med*, 2011, 102(1): 75-82.
- [28] Knuutila A. Diagnostics and epidemiology of Aleutian mink disease virus [J]. *Depart Vet Biosci Fac Vet Med*, 2015, 30: 13-26.
- [29] Christensen L S, Gram-Hansen L, Chriel M, et al. Diversity and stability of Aleutian mink disease virus during bottleneck transitions resulting from eradication in domestic mink in Denmark [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 149(1-2): 64-71.
- [30] Gong Q L, Li D, Diao N C, et al. Mink Aleutian disease seroprevalence in China during 1981-2017: A systematic review and meta-analysis [J]. *Microb Pathog*, 2019, 139: 103908.
- [31] Bloom M E, Alexandersen S, Garon C F, et al. Nucleotide sequence of the 5'-terminal palindrome of Aleutian mink disease parvovirus and construction of an infectious molecular clone [J]. *J Virol*, 1990, 64(7): 3551-3556.
- [32] Huang Q, Luo Y, Cheng F, et al. Molecular characterization of the small nonstructural proteins of parvovirus Aleutian mink disease virus (AMDV) during infection [J]. *Virology*, 2014, 452-453: 23-31.
- [33] Mckenna R, Olson N H, Chipman P R, et al. Three-dimensional structure of Aleutian mink disease parvovirus: implications for disease pathogenicity [J]. *J Virol*, 1999, 73(8): 6882-6891.
- [34] Qiu J, Cheng F, Burger L R, et al. The transcription profile of Aleutian mink disease virus in CRFK cells is generated by alternative processing of pre-mRNAs produced from a single promoter [J]. *J Virol*, 2006, 80(2): 654-662.
- [35] Cotmore S F, Gunther M, Tattersall P. Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus minute virus of mice [J]. *J Virol*, 1989, 63(2): 1002-1006.
- [36] Nüesch J P, Cotmore S F, Tattersall P. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine [J]. *Virology*, 1995, 209(1): 122-135.
- [37] Christensen J, Tattersall P. Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system [J]. *J Virol*, 2002, 76(13): 6518-6531.
- [38] Willwand K, Mumtsidu E, Kuntz-Simon G, et al. Initiation of DNA replication at palindromic telomeres is mediated by a duplex-to-hairpin transition induced by the minute virus of mice nonstructural protein NS1 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(2): 1165-1174.

- [39] Willwand K, Moroianu A, Hörlein R, et al. Specific interaction of the nonstructural protein NS1 of minute virus of mice (MVM) with [ACCA]₂ motifs in the centre of the right-end MVM DNA palindrome induces hairpin-primed viral DNA replication [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 7): 1659-1664.
- [40] Willwand K, Baldauf A Q, Deleu L, et al. The minute virus of mice (MVM) nonstructural protein NS1 induces nicking of MVM DNA at a unique site of the right-end telomere in both hairpin and duplex conformations in vitro [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78 (Pt 10)(2647-2655).
- [41] Schindler A, Schärer M, Naumann U, et al. Parvovirus B19 [J]. *Praxis*, 2006, 95(16): 609-615; quiz 616.
- [42] Bloom M E, Fox J M, Berry B D, et al. Construction of pathogenic molecular clones of Aleutian mink disease parvovirus that replicate both in vivo and in vitro [J]. *Virology*, 1998, 251(2): 288-296.
- [43] Bloom M E, Best S M, Hayes S F, et al. Identification of aleutian mink disease parvovirus capsid sequences mediating antibody-dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation [J]. *J Virol*, 2001, 75(22): 11116-11127.
- [44] Xi J, Zhang Y, Wang J, et al. Generation of an infectious clone of AMDV and identification of capsid residues essential for infectivity in cell culture [J]. *Virus Res*, 2017, 242: 58-65.
- [45] Bloom M E, Race R E, Aasted B, et al. Analysis of Aleutian disease virus infection in vitro and in vivo: demonstration of Aleutian disease virus DNA in tissues of infected mink [J]. *J Virol*, 1985, 55(3): 696-703.
- [46] Christensen J, Storgaard T, Bloch B, et al. Expression of Aleutian mink disease parvovirus proteins in a baculovirus vector system [J]. *J Virol*, 1993, 67(1): 229-238.
- [47] Nüesch J. Regulation of non-structural protein functions by differential synthesis, modification and trafficking [M]. 2005: 275-289.
- [48] Best S M, Shelton J F, Pompey J M, et al. Caspase cleavage of the nonstructural protein NS1 mediates replication of Aleutian mink disease parvovirus [J]. *J Virol*, 2003, 77(9): 5305-5312.
- [49] Khandia R, Munjal A, Dhama K, et al. Modulation of Dengue/Zika virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika virus infection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 597.
- [50] Mosser D M, Edwards J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 958-969.
- [51] Furuyama W, Marzi A, Carmody A B, et al. Fcγ-receptor IIa-mediated Src signaling pathway is essential for the antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(12): e1006139.

- [52] Valentine K M, Croft M, Shresta S. Protection against dengue virus requires a sustained balance of antibody and T cell responses [J]. *Curr Opin Virol*, 2020, 43: 22-27.
- [53] Shukla R, Beesetti H, Brown J A, et al. Dengue and Zika virus infections are enhanced by live attenuated dengue vaccine but not by recombinant DSV4 vaccine candidate in mouse models [J]. *EBioMedicine*, 2020, 60: 102991.
- [54] Shi P, Zhang L, Wang J, et al. Porcine Fc ϵ RI mediates porcine reproductive and respiratory syndrome virus multiplication and regulates the inflammatory reaction [J]. *Virol Sin*, 2018, 33(3): 249-260.
- [55] Puttikhunt C, Prommool T, N U T, et al. The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus [J]. *J Clin Virol*, 2011, 50(4): 314-319.
- [56] Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, et al. Erratum: Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 314.
- [57] Willis E, Hensley S E. Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies [J]. *Virology*, 2017, 508: 1-6.
- [58] Xu X, Vaughan K, Weiskopf D, et al. Identifying candidate targets of immune responses in Zika virus based on homology to epitopes in other flavivirus species [J]. *PLoS Curr*, 2016, 8.
- [59] Priyamvada L, Quicke K M, Hudson W H, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(28): 7852-7857.
- [60] Stettler K, Beltramello M, Espinosa D A, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection [J]. *Science*, 2016, 353(6301): 823-826.
- [61] Hueston L, Ramirez R, Mahalingam S. Enhancement of Zika infection by Dengue virus-specific antibody is associated with low levels of antiviral factors [J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(5): 612-614.
- [62] Yoon K J, Wu L L, Zimmerman J J, et al. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs [J]. *Viral Immunol*, 1996, 9(1): 51-63.
- [63] 李艺. 猪 Fc γ RI 的可变剪接及其对 PRRSV ADE 效应的调控作用 [D]. 天津大学, 2017.
- [64] Zhang L, Li W, Sun Y, et al. Antibody-mediated porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection downregulates the production of interferon- α and tumor necrosis factor- α in porcine alveolar macrophages via Fc gamma receptor I and III [J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 187.
- [65] 朱洪伟, 邢秀梅, 温永俊. 水貂阿留申病毒抗体依赖性感染增强作用的可能机制探讨 [J]. *病毒学报*, 2014, 30(4): 450-455.

- [66] Best S M, Bloom M E. Pathogenesis of aleutian mink disease parvovirus and similarities to b19 infection [J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2005, 52(7-8): 331-334.
- [67] 董秋实, 张艳炜, 程锦泉. 脾酪氨酸激酶基因研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2013, 29(03): 466-468.
- [68] 张春华, 徐强, 李胜. Syk 与肿瘤侵袭和转移关系的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008(6): 476-479.
- [69] Li X, Martin F, Oliver A M, et al. Antigen receptor proximal signaling in splenic B-2 cell subsets [J]. *J Immunol*, 2001, 166(5): 3122-3129.
- [70] 王国文, 单保恩. 酪氨酸激酶 Syk 研究进展 [J]. *河北医科大学学报*, 2010, 31(01): 112-115.
- [71] 夏建国. 酪氨酸激酶 Syk 与胃癌关系研究 [D]. 南京医科大学, 2006.
- [72] 王志美, 栾朝辉, 宋梅, et al. Syk 在肿瘤中的表达 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2010, 17(06): 559-562.
- [73] Coopman P J P, Do M T H, Barth M, et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells [J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 742-747.
- [74] Moroni, M. Progressive Loss of Syk and Abnormal Proliferation in Breast Cancer Cells [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(20): 7346-7354.
- [75] 庄晓苹, 林琼琼, 季剑乐, et al. 乳腺癌中 Syk, HGF 表达的相关性及预后的关系 [J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(5): 126-129.
- [76] 刘小卫, 郑启昌, 张传佑. 肝癌组织中酪氨酸激酶 Syk 表达及其与血管生成关系的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(015): 1163-1165.
- [77] 袁辉, 林泽龙, 胡敏, et al. 胆管癌脾酪氨酸激酶表达增高对肿瘤微环境巨噬细胞 M2 型极化的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 961-968.
- [78] 仵妍. SykmRNA 在卵巢癌中的表达及临床意义 [D]. 青岛大学, 2009.
- [79] 彭星宇. p15, Syk 基因启动子甲基化与直肠癌的相关性研究 [D]. 南昌大学, 2014.
- [80] 唐云云. 脾酪氨酸激酶抑制剂 Fostamatinib 对黑色素瘤抗肿瘤作用机制的研究 [D]. 广东药科大学, 2018.
- [81] Mcadoo S P, Tanna A, Mcdaid J, et al. Syk inhibition in experimental autoimmune vasculitis and its glomerular expression in ANCA-associated vasculitis [J]. *Lancet*, 2014, 383: S72.
- [82] Ryan J, Ma F Y, Han Y, et al. Myeloid cell-mediated renal injury in rapidly progressive glomerulonephritis depends upon spleen tyrosine kinase [J]. *J Pathol*, 2016, 238(1): 10-20.

- [83] Ryan J, Ma F Y, Kanellis J, et al. Spleen tyrosine kinase promotes acute neutrophil-mediated glomerular injury via activation of JNK and p38 MAPK in rat nephrotoxic serum nephritis [J]. *Lab Invest*, 2011, 91(12): 1727-1738.
- [84] Yang W S, Seo J W, Han N J, et al. High glucose-induced NF-kappaB activation occurs via tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha in human glomerular endothelial cells: involvement of Syk tyrosine kinase [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(5): F1065-1075.
- [85] Kenkre V P, Kahl B S. The future of B-Cell lymphoma therapy: The B-Cell receptor and its downstream pathways [J]. *Curr Hematol Malig R*, 2012, 7(3): 216-220.
- [86] Köhrer S, Havranek O, Seyfried F, et al. Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1, and MYC, and can be targeted by Syk inhibition [J]. *Leukemia*, 2016, 30(6): 1246-1254.
- [87] Cornall J R, Cheng A M, Pawson T, et al. Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(4): 1713-1718.
- [88] Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz V L. The Syk tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions [J]. *Nat Rev Immunol*. 2010,10(6):387-402.
- [89] Kremlitzka M, Mácsik-Valent B, Erdei A. Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(11): 2223-2236.
- [90] Cheng A M, Pao W, Hayday A, et al. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development [J]. *Nature*, 1995, 378(6554): 303-306.
- [91] Takano T, Sada K, Yamamura H. Role of protein-tyrosine kinase syk in oxidative stress signaling in B cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(3): 533-541.
- [92] Cheng A M, Negishi I, Anderson S J, et al. The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(18): 9797-9801.
- [93] Latour S, Fournel M, Veillette A. Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(8): 4434-4441.
- [94] Muro R, Nitta T, Nakano K, et al. $\gamma\delta$ TCR recruits the Syk/PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program [J]. *J Clin Invest*. 2018,128(1):415-426.
- [95] Braselmann S, Taylor V, Zhao H, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(3): 998-1008.

- [96] Darby C, Geahlen R L, Schreiber A D. Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein [J]. *J Immunol*, 1994, 152(11): 5429-5437.
- [97] Tabata H, Morita H, Kaji H, et al. Syk facilitates phagosome-lysosome fusion by regulating actin-remodeling in complement-mediated phagocytosis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 22086.
- [98] Isakov N. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades [J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 61(1): 6-16.
- [99] Turner M, Schweighoffer E. Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signalling [J]. *Immunol Today*, 2000, 21(3): 148-154.
- [100] Cooney D S, Phee H, Jacob A, et al. Signal Transduction by Human-Restricted FcγRIIa Involves Three Distinct Cytoplasmic Kinase Families Leading to Phagocytosis [J]. *J Immunol*, 2001, 167(2): 844.
- [101] Makhoul S, Dorschel S, Gambaryan S, et al. Feedback regulation of Syk by protein kinase C in human platelets [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1):176.
- [102] Crowley M T, Costello P S, Fitzer-Attas C J, et al. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages [J]. *J Exp Med*, 1997, 186(7): 1027-1039.
- [103] Tsai T T, Chuang Y J, Lin Y S, et al. Antibody-dependent enhancement infection facilitates Dengue virus-regulated signaling of IL-10 production in monocytes [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(11): e3320.
- [104] Barendregt J J, Doi S A, Lee Y Y, et al. Meta-analysis of prevalence [J]. *J Epidemiol Community Health*, 2013, 67(11): 974-978.
- [105] Glass G V. Meta-analysis at middle age: a personal history [J]. *Res Synth Methods*, 2015, 6(3): 221-231.
- [106] Nakagawa S, Poulin R. Meta-analytic insights into evolutionary ecology: an introduction and synthesis [J]. *Evol Ecol*, 2012, 26(5): 1085-1099.
- [107] Iaballe M C, Michael D J. The Procedure of Meta-analysis in a Nutshell: Handbook of Meta-analysis in Ecology and Evolution [J]. Princeton: Princeton University Press, 2013, pp: 14-24.
- [108] Moher D, Shamseer L, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement [J]. *Syst Rev*, 2015, 4(1): 1.
- [109] Nakagawa S, Cuthill I C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2007, 82(4): 591-605.
- [110] Borenstein M, Hedges L V, Higgins J P, et al. A basic introduction to fixed-effect and random-effects

- models for meta-analysis [J]. *Res Synth Methods*, 2010, 1(2): 97-111.
- [111] Cheung M W, Ho R C, Lim Y, et al. Conducting a meta-analysis: basics and good practices [J]. *Int J Rheum Dis*, 2012, 15(2): 129-135.
- [112] Egger M, Davey Smith G, Schneider M, et al. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test [J]. *Bmj*, 1997, 315(7109): 629-634.
- [113] Verhagen A P, Ferreira M L. Forest plots [J]. *J Physiother*, 2014, 60(3): 170-173.
- [114] Israel H, Richter R R. A guide to understanding meta-analysis [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2011, 41(7): 496-504.
- [115] Anzures-Cabrera J, Higgins J P. Graphical displays for meta-analysis: An overview with suggestions for practice [J]. *Res Synth Methods*, 2010, 1(1): 66-80.
- [116] Sterne J A, Egger M. Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: guidelines on choice of axis [J]. *J Clin Epidemiol*, 2001, 54(10): 1046-1055.
- [117] Lau J, Ioannidis J P, Terrin N, et al. The case of the misleading funnel plot [J]. *Bmj*, 2006, 333(7568): 597-600.
- [118] Lin L, Chu H. Quantifying publication bias in meta-analysis. *Biometrics* [J]. 2018, 74(3): 785-794.
- [119] Wang Z D, Wang S C, Liu H H, et al. Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet HIV*, 2017, 4(4): e177-e188.
- [120] Ahmed S M, Hall A J, Robinson A E, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8): 725-730.
- [121] Baral S, Beyrer C, Muessig K, et al. Burden of HIV among female sex workers in low-income and middle-income countries: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(7): 538-549.
- [122] Li X, Ni H B, Ren W X, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in horses: A global systematic review and meta-analysis [J]. *Acta Trop*, 2020, 201(105222).
- [123] Guyatt G H, Oxman A D, Vist G E, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations [J]. *Bmj*, 2008, 336(7650): 924-926.
- [124] Shamseer L, Moher D, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation [J]. *Bmj*, 2015, 350: g7647.

- [125] Wang W, Gong Q L, Zeng A, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* in pigs in China: A systematic review and meta-analysis [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020. (Online ahead of print)
- [126] Ran X, Cheng J, Wang M, et al. Brucellosis seroprevalence in dairy cattle in China during 2008-2018: A systematic review and meta-analysis [J]. *Acta Trop*, 2019, 189: 117-123.
- [127] Ni H B, Gong Q L, Zhao Q, et al. Prevalence of *Haemophilus parasuis* "*Glaesserella parasuis*" in pigs in China: A systematic review and meta-analysis [J]. *Prev Vet Med*, 2020, 182: 105083.
- [128] Liu Y, Gong Q L, Nie L B, et al. Prevalence of porcine circovirus 2 throughout China in 2015-2019: A systematic review and meta-analysis [J]. *Microb Pathog*, 2020, 149: 104490.
- [129] Gong Q L, Li J, Li D, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle in China from 2010 to 2019: A systematic review and meta-analysis [J]. *Acta Trop*, 2020, 211: 105439.
- [130] 夏雪蕊. 水貂阿留申疾病的危害 [J]. *山东畜牧兽医*, 2018, 39(04): 86-87.
- [131] Alexandersen S, Larsen S, Aasted B, et al. Acute interstitial pneumonia in mink kits inoculated with defined isolates of Aleutian mink disease parvovirus [J]. *Vet Pathol*, 1994, 31(2): 216-228.
- [132] Dam-Tuxen R, Dahl J, Jensen T H, et al. Diagnosing Aleutian mink disease infection by a new fully automated ELISA or by counter current immunoelectrophoresis: a comparison of sensitivity and specificity [J]. *J Virol Methods*, 2014, 199: 53-60.
- [133] Wang Z, Wu W, Hu B, et al. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in China [J]. *Virus Res*, 2014, 184: 14-19.
- [134] 孙殿钢, 雷连成, 黄盼盼, et al. 基于 B 细胞表位肽的水貂阿留申病毒抗体 ELISA 检测方法的建立及其在流行病学调查中的应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(6): 509-513.
- [135] 张志明. 中国貂、狐、貉存栏数量统计报告(2016 年) [J]. *特种经济动植物*, 2016, 19(12): 27.
- [136] 王殿华. 中国貂、狐、貉取皮数量 2017 年统计报告 [J]. *皮革与化工*, 2018, 35(2): 43-44.
- [137] 李存美. 水貂阿留申病的诊断与防治 [J]. *山东畜牧兽医*, 2017, 38(1): 67-69.
- [138] 肖家美, 程世鹏, 赵艳. 水貂阿留申病诊断方法的研究进展 [J]. *特产研究*, 2007, 46(2): 70-72.
- [139] Jensen T H, Christensen L S, Chriel M, et al. Implementation and validation of a sensitive PCR detection method in the eradication campaign against Aleutian mink disease virus [J]. *J Virol Methods*, 2011, 171(1): 81-85.
- [140] 万洪理. 我国部分地区水貂阿留申病血清学调查 [D]. 吉林农业大学, 2015.

- [141] Oie K L, Durrant G, Wolfenbarger J B, et al. The relationship between capsid protein (VP2) sequence and pathogenicity of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): a possible role for raccoons in the transmission of ADV infections [J]. *J Virol*, 1996, 70(2): 852-861.
- [142] Leng X, Liu D, Li J, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of Aleutian mink disease virus isolates in north-east China [J]. *Arch Virol*, 2018, 163(5): 1241-1251.
- [143] Stewart JD, Rozengurt N. Aleutian disease in the ferret [J]. *Vet Rec*, 1993, 133(7): 172.
- [144] Barnard D L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy [J]. *Antiviral Res*, 2009, 82(2): A110-122.
- [145] Sun X, Sui H, Fisher J T, et al. Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3149-3160.
- [146] Li L, Pesavento P A, Woods L, et al. Novel amdovirus in gray foxes [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(10): 1876-1878.
- [147] Chapman I, Jimenez F A. Aleutian-mink disease in man [J]. *N Engl J Med*, 1963, 269: 1171-1174.
- [148] 涂丽裙. 转化生长因子- $\beta 2$ 反义寡核苷酸的微生物疫苗及肿瘤疫苗的佐剂作用 [D]. 吉林大学, 2020.
- [149] 籍玉林, 曲维江, 赵元楷, et al. 应用聚乙二醇沉淀比浊法检测水貂血清中循环免疫复合物的研究 [J]. *特产研究*, 1994, 33(2): 1-4,64.
- [150] 刘洁, 李伟, 任二军, et al. 水貂阿留申病胶体金免疫层析试纸条与对流免疫电泳对比试验 [J]. *今日畜牧兽医*. 2018, 34(01): 13-14.
- [151] Jensen TH, Chriél M, Hansen MS. Progression of experimental chronic Aleutian mink disease virus infection [J]. *Acta Vet Scand*, 2016, 58(1): 35.
- [152] 刘东旭. 水貂阿留申病毒的分离鉴定和五种核酸疫苗的构建及免疫原性研究 [D]. 吉林农业大学, 2016.
- [153] 姜黎明, 杨佳佳, 罗佳, et al. III型登革病毒在 THP-1 细胞上的 ADE 模型建立 [J]. *生命科学研究*, 2017, 21(05): 429-432.
- [154] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D480-484.
- [155] Knuutila A, Aaltonen K, Virtala A M, et al. Aleutian mink disease virus in free-ranging mustelids in Finland—a cross-sectional epidemiological and phylogenetic study [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 6): 1423-

- 1435.
- [156] Porter D D. Aleutian disease: a persistent parvovirus infection of mink with a maximal but ineffective host humoral immune response [J]. *Prog Med Virol*, 1986, 33: 42-60.
- [157] Stevenson M A, Fox J M, Wolfenbarger J B, et al. Effect of a valine residue at codon 352 of the VP2 capsid protein on in vivo replication and pathogenesis of Aleutian disease parvovirus in mink [J]. *Am J Vet Res*, 2001, 62(10): 1658-1663.
- [158] 谢志坚, 熊晓东, 左筠. Fc γ R 介导巨噬细胞吞噬作用信号转导机制 [J]. *国外医学(免疫学分册)*, 2002, 25(1): 5-9.
- [159] Bournazos S, Wang T T, Dahan R, et al. Signaling by antibodies: Recent progress [J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 285-311.
- [160] Daëron M. Fc receptor biology [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 203-234.
- [161] García-García E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(6): 1092-1108.
- [162] Indik Z K, Hunter S, Huang M M, et al. The high affinity Fc gamma receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the gamma subunit of Fc gamma RIIIA imparts phagocytic function to Fc gamma RI [J]. *Exp Hematol*, 1994, 22(7): 599-606.
- [163] Tuijnman W B, Capel P J, van de Winkel J G. Human low-affinity IgG receptor Fc gamma RIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes [J]. *Blood*, 1992, 79(7): 1651-1656.
- [164] Bournazos S, Ravetch J V. Fc γ receptor pathways during active and passive immunization [J]. *Immunol Rev*, 2015, 268(1): 88-103.
- [165] Darby C, Geahlen R L, Schreiber A D. Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein [J]. *J Immunol*, 1994, 152(11): 5429-5437.
- [166] Matsuda M, Park J G, Wang D C, et al. Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides [J]. *Mol Biol Cell*, 1996, 7(7): 1095-1106.
- [167] Cox D, Tseng C C, Bjekic G, et al. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(3): 1240-1247.
- [168] Melendez A, Floto R A, Cameron A J, et al. A molecular switch changes the signalling pathway used by

- the Fc gamma RI antibody receptor to mobilise calcium [J]. *Curr Biol*, 1998, 8(4): 210-221.
- [169] Aghazadeh B, Lowry W E, Huang X Y, et al. Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation [J]. *Cell*, 2000, 102(5): 625-633.
- [170] Han J, Luby-Phelps K, Das B, et al. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav [J]. *Science*, 1998, 279(5350): 558-560.
- [171] Coppolino M G, Krause M, Hagendorff P, et al. Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fc gamma receptor signalling during phagocytosis [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 23): 4307-4318.
- [172] Patel J C, Hall A, Caron E. Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during Fc gamma R-mediated phagocytosis [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(4): 1215-1226.
- [173] Gumienny T L, Brugnera E, Tosello-Tramont A C, et al. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration [J]. *Cell*, 2001, 107(1): 27-41.
- [174] May R C, Machesky L M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 6): 1061-1077.
- [175] 沈梦露. 猪 FcεRI 的分子特征及其在 PRRSV 感染中的致炎调节作用 [D]. 天津大学, 2017.
- [176] Turner H, Kinet J P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI [J]. *Nature*, 1999, 402(6760 Suppl): B24-30.
- [177] Nadler M J, Matthews S A, Turner H, et al. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function [J]. *Adv Immunol*, 2000, 76: 325-355.
- [178] Gilfillan A M, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(3): 218-230.
- [179] Kawakami T, Galli S J. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 773-786.
- [180] 卞大伟. 水貂阿留申细小病毒的致病机制、鉴定及防治方法 [J]. *山东畜牧兽医*, 2017, 38(4): 62-65.
- [181] Ridley A J. Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility [J]. *FEBS Lett*, 2001, 498(2-3): 168-171.
- [182] Berón W, Alvarez-Dominguez C, Mayorga L, et al. Membrane trafficking along the phagocytic pathway

- [J]. *Trends Cell Biol*, 1995, 5(3): 100-104.
- [183] Tjelle T E, Lovdal T, Berg T. Phagosome dynamics and function [J]. *Bioessays*, 2000, 22(3): 255-263.
- [184] Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(6): 349-362.
- [185] Di Santo J P, Aifantis I, Rosmaraki E, et al. The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development [J]. *J Exp Med*, 1999, 189(3): 563-574.
- [186] Brown E J. Complement receptors, adhesion, and phagocytosis [J]. *Infect Agents Dis*, 1992, 1(2): 63-70.
- [187] Petit V, Thiery J P. Focal adhesions: structure and dynamics [J]. *Biol Cell*, 2000, 92(7): 477-494.
- [188] Kraft S, Kinet J P. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 365-378.

附 录

附录 A 常用试剂配制

1. LB 液体培养基。

2 g 胰蛋白胨, 2 g NaCl, 1 g 酵母, 定容至 200 mL。

2. LB 固体培养基。

2 g 胰蛋白胨, 2 g NaCl, 1 g 酵母, 3 g 琼脂, 定容至 200 mL。

3. 磷酸盐缓冲液 (PBS)。

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 , 调 pH 至 7.4, 定容至 1 L。

4. 胰酶。

在 80 mL 娃哈哈水中按顺序加入 Mall 8 g, 葡萄糖 2 g, NaHCO_3 0.58 g, KCl 0.4 g, EDTA- Na_2 0.2g, 胰酶 2.5 g, 混匀, 4°C 过夜, 定容至 100 mL, 0.22 μm 滤膜过滤后分装于 -20°C 保存。

5. 间接免疫荧光试验试剂。

① 清洗液 (PBST): 含 0.05% 吐温-20 的 1×PBS;

② 固定剂: 4% 多聚甲醛, 10×PBS, 60°C 水浴 2 h, 充分溶解后室温备用;

③ 透化剂: 含 0.02-0.03% 曲拉通 100 的 1×PBS;

④ 封闭液: 含 5% BSA 的 PBST;

⑤ 抗体稀释液: 含 1% BSA 的 PBST。

6. MACS 分选液。

0.5% BSA+2 mM EDTA 缓冲液, 配制方法如下: 500 mg BSA 加入 100 mL PBS 缓冲液中, 配制成 0.5% 的 BSA 溶液, pH = 7.2。将 0.37224 g 的 EDTA·2Na 加入 50 mL 0.5% BSA 溶液中, 充分混匀后加入 350 mL 0.5% BSA 溶液, PH 调至 7.2, 定容 500 mL, 用 0.22 μm 无菌滤膜过滤液体, 分装, 4°C 冰箱保存。

7. 6% 肉汤淀粉溶液。

牛肉膏 0.3 g, 蛋白胨 1.0 g, 氯化钠 0.5 g, 溶解于 100 mL 蒸馏水中, 加热搅拌均匀后加入 6 g 可溶性淀粉 (注意, 加热过程中为防止结块需不停搅拌), 溶解后高压灭菌, 4°C 保存。

8. TBST: NaCl 8 g, KCL 0.2 g, 吐温 20: 0.5 mL, TrisHCl (1M, pH 7.5) 50 mL, 加蒸馏水定容至 1 L。

9. 5×聚丙烯酰胺凝胶电泳液: Tris 15.1 g, Glycine 94 g, SDS 5 g, 加 900 mL 蒸馏水充分溶解后定容至 1 L, 使用时稀释为按电泳液:蒸馏水=1:4 (体积比) 稀释。

附录 B 常用试验方法

1. 血清病毒全基因组提取（试剂盒）。

取 250 μL 样品于无菌离心管，加入 10 μL OB 蛋白酶，另取 4 μL linear 于 250 μL BL buffer，加入样品中，涡旋振荡 15 s，混匀后，置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min，期间涡旋振荡；加 260 μL 纯酒精涡旋振荡 20 s 后，将吸附柱放于 2 mL 收集管内，液体加入吸附柱，8000 g 离心 1 min，更换收集管；向吸附柱中加入 500 μL HB buffer，8000 \times g 离心 1min，弃液留管；向柱中加入 700 μL DNA WB，8000 \times g 离心 1 min，更换收集管；再加入 700 μL DNA WB，8000 \times g 离心 1 min，弃液留管，15000 \times g 空离 2 min，将吸附柱置于 1.5 mL 无菌离心管中，加 50-100 μL 之前在 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热好的 EB，室温静置 5 min，8000 \times g 离心 1 min 后，反离一次（收集管底 DNA 再次加入到滤膜上离心），测算浓度。

2. 水貂腹腔巨噬细胞分离培养。

- ① 6 月龄水貂，肌肉注射 30 μL 舒泰麻醉后，剃去腹部毛发并消毒；
- ② 腹腔注射 50 mL 6% 肉汤淀粉溶液，静置苏醒，正常饲喂 3-4 d；
- ③ 肌肉注射 30 μL 舒泰麻醉后，心脏采血处死水貂，以减少腹腔中的红细胞；
- ④ 腹部消毒，沿腹中线注入 50 mL 冷 PBS-H (含 10 U/mL 肝素和 10% 胎牛血清的 PBS)。轻轻按摩腹部 5 min；
- ⑤ 无菌环境下剪开腹壁，用吸管吸出腹腔内液体；
- ⑥ 50 mL 预冷 PBS-H 冲洗腹腔 2-3 次，获得的腹腔洗液和渗出液合并，4 $^{\circ}\text{C}$ ，250 \times g，离心 10 min，弃上清；
- ⑦ 加入 2 mL 红细胞裂解液，混匀后，4 $^{\circ}\text{C}$ 静置裂解 5 min；
- ⑧ 1500 r/min，离心 10 min，弃去上清；
- ⑨ 加入 5 mL RPMI 1640 培养基重悬细胞，以无菌 200 目尼龙细胞滤网过滤细胞团块；
- ⑩ 加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中，培养 1h，换液，弃去上层悬浮细胞，过夜培养后观察细胞形态。

3. 水貂骨髓单核-巨噬细胞的分离培养。

- ① 6 月龄水貂，肌肉注射 30 μL 舒泰麻醉后，剃去腹部毛发并消毒；
- ② 心脏采血处死水貂；
- ③ 无菌条件下分离并取下水貂的胫骨，（注意在关节处断骨，不要打破两端骨膜）放入盛有 75% 酒精的培养皿中；
- ④ 无菌条件下分离骨周围组织，以含双抗的 1 \times PBS 充分清洗骨表面；
- ⑤ 以无菌骨剪剪去胫骨两端，用吸有 5 mL RPMI 1640 培养基的注射器从骨的一端向

另一端反复冲洗 3-5 次, 收集冲洗液;

⑥ 1500 r/min, 离心 10 min, 弃去上清;

⑦ 加入 2 mL 红细胞裂解液, 混匀后, 4°C 静置裂解 5 min;

⑧ 1500 r/min, 离心 10 min, 弃去上清;

⑨ 加入 5 mL RPMI 1640 培养基重悬细胞, 以无菌 200 目尼龙细胞滤网过滤细胞团块;

⑩ 将细胞加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 培养 1 h, 换液以弃掉未贴壁细胞, 过夜培养后观察细胞形态。

4. 水貂脾脏巨噬细胞的分离培养。

① 6 月龄水貂, 肌肉注射 30 μ L 舒泰麻醉后, 剃去腹部毛发并消毒;

② 心脏采血处死水貂, 以减少脾脏中的红细胞;

③ 无菌外科手术, 摘取水貂脾脏, 取 1-2 cm^3 大小脾脏组织, 置于含预冷 RPMI 1640 培养基的培养皿中;

④ 摘去脾脏表面包膜, 以 200 目钢制细胞滤网研磨过滤脾脏细胞, 收集滤液, 1500 r/min, 4°C, 离心 10 min, 弃上清;

⑤ 加入 2 mL 红细胞裂解液, 混匀后, 4°C 静置裂解 5 min;

⑥ 1500 r/min, 离心 10 min, 弃上清;

⑦ 加入 5 mL RPMI 1640 培养基重悬细胞, 以无菌 200 目尼龙细胞滤网过滤细胞团块;

加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 培养 1 h, 换液以弃掉未贴壁细胞, 过夜培养后观察细胞形态。

5. 总 RNA 提取。

TRIzol 裂解第二部分第三章 3.1.2.6 中的细胞 (250 μ L 共 5×10^5 个细胞溶于 750 μ L TRIzol 中), 反复吹打后, 室温静置 5 min 以充分裂解; 加入 200 μ L 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 室温静置 2 min; 4°C 12000 rpm 离心 10 min, 吸取 400 μ L 上层无色水相溶液至 RNase-Free 离心管中; 向上述离心管中加入 400 μ L 70%乙醇溶液, 颠倒混匀, 随后加入到带有吸附柱的收集管中, 12000 rpm 离心 30 s, 弃掉收集管中液体; 向吸附柱中加入 700 μ L RW1 Buffer, 12000 rpm 离心 30 s, 弃掉收集管中液体; 向吸附柱中加入 500 μ L RW2 Buffer, 12000 rpm 离心 30 s, 弃掉收集管中液体; 重复上一步骤一次, 12000 rpm 离心 2 min, 弃掉收集管中废液, 吸附柱室温静置 2 min, 以彻底晾干管内残余乙醇; 将吸附柱置于新的 RNase-Free 离心管中, 并加入 30 μ L RNase-Free Water, 室温静置 1 min, 12000 rpm 离心 1 min, 收集离心管底部 RNA, 分装后于 -80°C 超低温冰箱保存以防止 RNA 降解; Nanodrop 检测 RNA 浓度和纯度; Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 完整性及 28 s 与 18 s 的比值; 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带。

6. CrFK 细胞传代培养。

- ① 弃掉细胞瓶中原有培养液；加入 PBS 清洗细胞 2-3 遍，加入适量胰酶润洗细胞表面以中和残存的血清成分；
- ② 加入胰酶消化 30-40 s（细胞状态如果较老可以适当延长胰酶消化时间或使用含 EDTA 的胰酶进行消化），消化完成后倒掉胰酶；
- ③ 加入 5 mL 带有血清的培养液，用枪头轻轻吹打细胞，将细胞全部吹起后，轻柔吹散，确保细胞不成团，1:2 或 1:3 进行传代；
- ④ 加入带有血清（8%-10%）的 MEM 培养液至总体积 20 mL，放入含有 5% CO₂、37°C 培养箱中进行培养，根据细胞生长情况（铺满细胞瓶 90%面积以上），确定进行下一次传代操作的时间（一般为 2-3 d）。

7. 病毒复苏及传代。

- ① 生长状态良好的 CrFK 细胞（密度为 70%-80%）用于接种病毒。倒掉细胞瓶内培养液，预热至 37°C 的 PBS 轻柔冲洗细胞表面若干次，祛除细胞表面的血清成分；
- ② 将实验室 -80°C 超低温冰箱内保存的装有 AMDV-DL125 株病毒液的冻存管于 37°C 水浴锅中缓慢摇晃，快速解冻；
- ③ 吸取病毒液按 1 MOI 接种于准备好的细胞瓶中，左右轻摇细胞瓶，确保病毒液均匀分布于细胞表面，置于 37°C，5% CO₂ 的细胞培养箱中；
- ④ 静置 15 min 后取出，再次左右轻摇细胞瓶后放回原位；
- ⑤ 重复步骤④3-4 次，吸去细胞瓶内病毒液，加入含 2%胎牛血清、0.1% NEAA 的 MEM，置于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 72 h 后收毒；
- ⑥ 反复冻融 3 次，收集病毒液置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。

8. CrFK 细胞冻存。

- ① 90% FBS 的 DMEM 培养基加上 10%、4°C 预冷的 DMSO，4°C 放置 2 h；
- ② 将冻存管置于梯度降温冻存盒（如无此条件可用泡沫盒包裹），并放于 -80°C 过夜，第二天转入液氮罐。

9. 产物的连接转化。

在冰上融化 HB101 感受态细胞，50 μL 细胞中加入 2 μL 的重组产物，轻轻弹动离心管壁后，置于冰上放置 30 min；转入 42°C 水浴锅中热激 30 s，马上转入冰上冷却 2 min；加入 450 μL 常温的 SOC 或 LB 培养基，于 37°C 摇床中 220 rpm 培养 1 h；取 100 μL 细胞均匀地涂在 37°C 水浴预热的适宜抗性的 LB 平板上，37°C 培养箱中过夜培养。

10. 质粒小提。

取 1-4 mL 菌液，12000×g 离心 1 min，弃上清后加入 250 μL Buffer S1 悬浮均匀的细菌沉淀，再加入 Buffer S2，动作温和地上下翻转 4-6 次，均匀混匀使菌体裂解，直至透明；加入 Buffer S3，同上步翻转 6-8 次，12000×g 离心 10 min，取上清至制备管中，12000×g 离心 1 min，弃滤液；将制备管放回离心管，加入 500 μL Buffer W1，12000×g 离心 1 min，

弃滤液；将制备管放回离心管，加入 700 μL Buffer W2，12000 \times g 离心 1 min，弃滤液，同理离心第二次，弃滤液；将制备管放回离心管，12000 \times g 离心 1 min 后，将制备管放入新的离心管中，在制备管膜中央加 60-80 μL 水，室温静置 1 min，12000 \times g 离心 1 min，保存质粒。

11. 质粒大提。

向抽出过滤网的过滤柱中加入 15 mL 的 EQ1 对质粒进行激活，重力沉降后将滤网放回滤柱；向菌体沉淀中加入 10 mL R3，颠倒混匀；加入 10 mL L7 进行裂解，裂解期间颠倒混匀后室温静置 10 min；加入 10 mL N3 后室温静置沉淀，缓慢颠倒直至有大量絮状沉淀出现，分批次倒入滤网内；过滤结束后，加入 20 mL W8 进行重力沉降，沉降结束后丢弃滤液，再次向滤网中加入 50 mL W8，沉降结束后更换新的 50 mL 离心管，加入 15 mL E4 洗脱，收集洗脱液，加入 10.5 mL 异丙醇，颠倒混匀后静置 20 min；12000 \times g 离心 30 min 后弃上清，加 5 mL 70%乙醇洗去异丙醇；弃上清后凉干残留乙醇，将质粒溶解于 400 μL PBS 中于适宜条件保存。

附录 C 缩略词

缩略词	英文	中文
95%CI	95% confidence interval	95%置信区间
AD	Aleutian disease	阿留申病
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用
ADE	Antibody-dependent enhancement	抗体依赖性增强
AMD	Aleutian mink disease	水貂阿留申病
AMDV	Aleutian mink disease virus	水貂阿留申病毒
BCR	B-cell receptor	B 细胞受体
CDS	Sequence coding for aminoacids in protein	蛋白质编码区
CIEP	Counter immune electrophoresis	对流免疫电泳
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DENV	Dengue virus	登革热病毒
EAV	Experimental autoimmune vasculitis	自身免疫性血管炎试验模型
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FcRs	Fc receptors	巨噬细胞受体
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GO	Gene Ontology	基因本体
GRADE	Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation methods	建议评估, 制定和评估方法的等级
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IAT	Iodine agglutination test	碘凝集试验

IFA	Indirect Immunofluorescence Assay	间接免疫荧光法
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IL	Interleukin	白介素
INF- γ	Interferon-gamma	干扰素 γ 好
IPMA	Immunoperoxidase monolayer assay	免疫过氧化物酶单层细胞试验
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	免疫受体酪氨酸激活基序
JAK	Janus Kinase	两面神激酶
KD	Kilodalton	千道尔顿
kDa	Kilodaltons	千道尔顿
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
LB	Luria bertani medium	LB 培养基
lncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
MDA-5	Melanoma differentiation-associated gene 5	黑色素瘤分化相关抗原 5
miRNA	MicroRNA	小 RNA
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
ncRNA	Non-coding RNA	非编码 RNA
NRTK	Non-receptor tyrosine kinase	非受体型酪氨酸激酶
NRTK	Non-receptor tyrosine kinase	非受体型酪氨酸激酶
NS	Negative serum	阴性血清
NTN	Nephrotoxic serum nephritis	肾毒性血清肾炎
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PAM	Porcine alveolar macrophage	猪肺泡巨噬细胞细胞

PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns	病原相关分子模式
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PPI	Protein-protein interaction	蛋白质-蛋白质相互作用
PRISMA	Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses	系统评价和元分析的首选报告项目
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸免疫综合征病毒
PS	Positive serum	阳性血清
PTK	Protein tyrosine kinase	蛋白酪氨酸激酶
PTKs	Protein tyrosine kinases	蛋白酪氨酸激酶
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量多聚核苷酸链式反应
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
R788	Fostamatinib	福他替尼
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I	视黄酸诱导基因-I
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
Ser	Serine	丝氨酸
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
SOCS	Suppressor of cytokine signaling	细胞因子信号抑制物
Syk	Spleen tyrosine kinase	脾酪氨酸激酶
TCID ₅₀	Median tissue culture infective dose	半数组织培养感染剂量
TCR	T-cell receptor	T 细胞受体
Thr	Threonine	苏氨酸
TNF	Tumour necrosis factor	肿瘤坏死因子
TRAF	TNFR-associated factor	肿瘤坏死因子受体相关因子

Tyr	Tyrosine	酪氨酸
WB	Western-blot	蛋白免疫印迹
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒

致 谢

时光荏苒，岁月如梭，五年的博士生涯在一番嘈杂的忙碌中徐徐落幕。忆往昔，眼里心中尽是感慨。

感激我的博士导师杜锐教授！是导师的收留，才有了我继续深造的机会；受益于您平日里的教诲，我才能顺利的站在博士的高脚楼，眺望更精彩的世界。导师一生致力于实用型科研，常教导我们：“要做对社会有用的人，干对社会有用的事”、“要少说多做，注意细节，不要急躁”。此般教诲亦成为我的行事准则，时常以之自省。无论学生身处何处，必将牢记：三省吾身，三缄吾口，戒急功近利，戒好大喜功！

感谢吉林农业大学经济动物疫病实验室的冷雪副教授！您以严谨的治学态度，渊博的专业知识，严于律己、宽以待人的崇高风范影响着代代学子，我们必将秉承您的意志，在未来各自的领域中大放异彩！

感谢吉林农业大学宗颖副教授和曾范利副教授以及实验室可爱的同学们，感谢大家的悉心指导和帮助，答我所疑，解我困惑。感谢真诚、仁厚的李建明师兄、时坤师姐、刘菲师姐、赵丹师兄以及蔡若鹏师兄对我的学习及生活上的悉心引导和照顾！

感谢吉林农业大学吉林省动物微生态制剂工程研究中心的王春风教授、杨桂连教授及杨文涛副教授对本人学习上及生活中的无私帮助！

感谢吉林农业大学赵权教授的多次举荐及解惑之恩！

感谢青岛农业大学张晓轩教授的大力支持和无私帮助！感谢你在我最绝望无助之时，将我拉出自艾自责的深渊，教会我用实力武装自己。你严谨的治学态度和无私的行事风格始终是我学习的榜样！

感谢吉林大学基础医学院的王哲同学对我学习及生活上的支持与照顾！

在博士学习期间，我还得到了吉林农业大学动物科学学院全体老师和同学们的大力支持，在此表示由衷的感谢！

此外，感谢我已年迈的老父亲和老母亲！生养之恩，无以回报。“若想改换门庭，唯有读书”！您们的教诲是支持我砥砺前行的原始动力！感谢您二老对知识的虔诚，感谢您们一直在我背后做我最坚实的后盾，你们永远健康快乐是我最大的心愿！

还要感谢我的朋友们，是你们的支持与鼓励，让我在迷茫之中找到方向！

最后，感谢我自己。

五年来，除了试验和 SCI，将情感揉于打油诗中成了我这个农学博士的日常。

有博士延期时的自艾自怜：

《春伤秋悲》

何以戚来何以忧，恰似落叶兆悲秋；
他人觥筹我独饮，未了旧怨现新愁。
期期艾艾触人厌，乾乾翼翼惹花羞；
待到春去夏来时，独睇冠服亦自犹！

有为求突破，告诫自己要常“四思”：

《夜静思》

空堂两眼夜，思辨；
旷穹单紫微，思辩。
简居孤勇兮，思变；
陋塌独难寐，思遍。

有为鼓己之气势抛出的豪言：

《铭志状》

百舸争流千帆竞，是非成败谈笑声；
敢与雄鹰赛目力，誓为众庶揽苍穹。
金科律言镌于骨，鸿鹄壮志铭余生；
历尽千辛尤奋进，不忘初心方始终！

亦有独自在医院照顾抱恙老父亲时的感慨：

《求医》

别坊临闹市，往来皆色悲，
胸怀宏图志，内有中天摧；
不求功名禄，不羨摄人威，
盼君身长健，福寿比南巍！

个中滋味，唯自知尔。感谢自己在最艰难的日子没有松懈！愿接下来的路也能一如既往，策马扬帆，坚定笃行！

历尽千辛尤奋进，不忘初心方始终！最后，再次向尊敬的杜锐导师及所有关心和帮助

过我的各位老师、同学致以最真诚的谢意！