

西安电子科技大学

硕士学位论文



聚肌胞在JAK2及VEGF-A应答猪瘟病毒侵
染中的调节作用研究

作者姓名 胡傲雪

学校导师姓名、职称 张象涵副教授

企业导师姓名、职称 贾庆安助理研究员

申请学位类别 工程硕士

学校代码 10701
分类号 Q81

学 号 1612123014
密 级 公开

西安电子科技大学

硕士学位论文

聚肌胞在JAK2及VEGF-A应答猪瘟病毒侵染 中的调节作用研究

作者姓名：胡傲雪

领 域：生物医学工程

学位类别：工程硕士专业学位

学校导师姓名、职称：张象涵副教授

企业导师姓名、职称：贾庆安助理研究员

学 院：生命科学技术学院

提交日期：2019 年 6 月

Study on the role of Poly(I:C) in the regulation of JAK2 and VEGF-A responding to CSFV infection

A thesis submitted to
XIDIAN UNIVERSITY
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master
in Engineering

By

Aoxue Hu

Supervisor: XianghanZhang Title: Associate professor

Supervisor: Qing'anJia Title: Assistant professor

June 2019

西安电子科技大学 学位论文独创性（或创新性）声明

秉承学校严谨的学风和优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果；也不包含为获得西安电子科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同事对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文若有不实之处，本人承担一切法律责任。

本人签名： 胡敬亭 日 期： 2019年6月19日

西安电子科技大学 关于论文使用授权的说明

本人完全了解西安电子科技大学有关保留和使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权属于西安电子科技大学。学校有权保留送交论文的复印件，允许查阅、借阅论文；学校可以公布论文的全部或部分内容，允许采用影印、缩印或其它复制手段保存论文。同时本人保证，结合学位论文研究成果完成的论文、发明专利等成果，署名为西安电子科技大学。

保密的学位论文在____年解密后适用本授权书。

本人签名： 胡敬亭 导师签名： 张泉达

日 期： 2019年6月19日 日 期： 2019年6月19日

摘要

猪瘟是一种在猪身上引发的以高热及弥散性出血为特征的高度烈性传染病，临床病死率高，对养殖业危害很大。本论文通过生物信息学和分子生物学手段，在已获取的巨噬细胞应答猪瘟病毒（CSFV, Classical Swine Fever Virus）不同毒力株侵染的转录组学数据库中，分析获得差异性表达的信号通路相关基因。并建立猪瘟侵染巨噬细胞模型，检测分析 JAK 信号通路及血管内皮生长因子 A（Vascular endothelial growth factor-A, *VEGF-A*）等特定细胞因子的应答特征。同时开展聚肌胞抑制 CSFV 复制的验证性研究，并进一步讨论聚肌胞在 *JAK2* 及 *VEGF-A* 应答 CSFV 侵染中的调节作用。研究结果为深入理解 CSFV 感染机理及抗病毒治疗机制提供了基础数据。研究工作取得以下结果：

（1）对 CSFV 石门株、C 株感染巨噬细胞及对照组的高通量测序数据进行基于基因趋势表达分析的 GO-TREE 构建，发现 CSFV 石门株感染不仅可以影响细胞迁移、细胞生长、细胞增殖和细胞周期阻滞，还可以改变炎症反应、NF- κ B 调控、凋亡调控等特定细胞因子的活性。其中 JAK-STAT 通路在 GO-TREE 分析中被阐明是对 CSFV 石门株侵染应答的显著性通路。进一步建立 CSFV 石门株巨噬细胞侵染模型对 JAK-STAT 家族成员的侵染后应答开展分子生物学检测，定量 PCR 结果显示 *JAK2* 及 *STAT4* 在巨噬细胞中侵染 CSFV 石门株后转录出现显著性抑制。

（2）差异基因表达分析结果同时表明 *VEGF-A* 在感染 CSFV 石门株的巨噬细胞中高表达。进一步开展分子生物学验证，实时荧光定量 PCR（Quantitative Real Time PCR, qPCR）、Western blot 以及激光共聚焦分析结果显示 CSFV 石门株侵染巨噬细胞后，*VEGF-A* 的转录及蛋白表达水平出现了显著性上调。

（3）对不同浓度聚肌胞及不同时间点处理 CSFV 石门株侵染的巨噬细胞开展定量 PCR 检测分析，结果显示聚肌胞对 CSFV 石门株在巨噬细胞中的复制具有显著性抑制作用，免疫荧光检测进一步支持了这一结论。GO-TREE 分析提示 JAK-STAT 可能作为聚肌胞的抗病毒靶点，qPCR 分析结果显示，聚肌胞可拮抗 CSFV 石门株在巨噬细胞中诱导的 *JAK2* 以及 *STAT4* 抑制，提示聚肌胞可能通过激活 JAK-STAT 通路来发挥抗病毒作用。同时研究结果显示，聚肌胞可抑制 CSFV 石门株诱导的巨噬细胞 *VEGF-A* 的上调表达，提示聚肌胞可能通过抑制病毒复制来缓解 CSFV 引发的炎症反应。

关键词：聚肌胞， CSFV， 巨噬细胞， JAK-STAT 信号通路， 血管内皮生长因子-A

ABSTRACT

Classical Swine fever is a kind of highly severe infectious disease which is characterized by high fever and diffuse hemorrhage. In this paper, bioinformatics and molecular biology methods were used to analyze and obtain differentially expressed signaling pathway-related genes in the transcriptome database of macrophages responding to different viral strains of CSFV infection. The macrophage model infected by CSFV was established to detect and analyze the response characteristics of specific cytokines such as JAK signaling pathway and *VEGF-A*. At the same time, A confirmatory study was carried out on the inhibitory effect of Poly(I:C) on the replication of CSFV, and the regulatory effect of Poly(I:C) on the response of *JAK2* and *VEGF-A* to CSFV infection was further discussed. The results provide basic data for further understanding the infection mechanism and antiviral treatment mechanism of CSFV. The research results are as follows:

(1) We construct the GO-TREE based on gene trend expression analysis using The RNA-seq of macrophages infected by CSFV Shimen strain, C strain and the control group. Then, we find CSFV Shimen strain infection can not only affect cell migration, cell growth, cell proliferation and cell cycle arrest, also change the inflammatory response, NF kappaB regulation, apoptosis regulation and so on. In the GO-TREE, the JAK-STAT pathway was identified as a significant pathway in response to the infection of CSFV Shimen strain. Further the establishment of a macrophage infection model of CSFV Shimen strain was conducted to detect the post-infection response of members of the JAK-STAT by molecular biology. The quantitative PCR results showed that the mRNA expression of *JAK2* and *STAT4* is significant inhibited in macrophages after the post-infection of CSFV.

(2) Differentially expressed gene analysis also showed that *VEGF-A* was highly expressed in macrophages infected by CSFV. Further molecular biological was carried out. The quantitative PCR, Western blot and confocal analysis results showed that the transcription and protein expression levels of *VEGF-A* in macrophages were significantly up-regulated after the infection by CSFV Shimen strain.

(3) Conduct quantitative PCR detection to analysis the influence of Poly(I:C) in different concentrations and different time on CSFV Shimen straininfection. The results showed

Poly(I:C) has significant inhibitory effect on CSFV replication in macrophages. Immunity fluorescence detection further support this conclusion. GO-TREE analysis suggested that JAK-STAT might be used as an antiviral target of myoblast, and quantitative PCR analysis showed that Poly(I:C) could reverse the immune inhibition of *JAK2* and *STAT4* induced by CSFV Shimen strain in macrophages, suggesting that Poly(I:C) might play an antiviral role by activating the JAK-STAT pathway. At the same time, the results showed that Poly(I:C) could inhibit the up-regulated expression of *VEGF-A* in macrophages induced by CSFV Shimen strain, suggesting that Poly(I:C) might alleviate the inflammatory response induced by CSFV by inhibiting virus replication.

Keywords: Poly(I:C), CSFV, macrophage, JAK-STAT signaling pathway, *VEGF-A*

插图索引

图 2.1	生物信息分析流程图	10
图 2.2	高通量测序的聚类趋势分析	15
图 2.3	GO Pathway 分析和 GO 富集分析	16
图 2.4	细胞分裂、周期的 GO-TREE 分析	17
图 2.5	细胞增殖凋亡相关的 GO-TREE 分析	18
图 2.6	DNA 修复和蛋白修饰进程的 GO-TREE 分析	19
图 2.7	自噬、血管生成与 JAK-STAT 通路的 GO-TREE 分析	19
图 2.8	巨噬细胞 <i>JAK1</i> 、 <i>JAK2</i> mRNA 表达量	20
图 2.9	感染 CSFV 石门株的巨噬细胞中 <i>JAK1</i> 、 <i>JAK2</i> 蛋白的表达量	21
图 2.10	感染 CSFV 石门株的巨噬细胞 <i>STATs</i> 的 mRNA 表达量	23
图 2.11	感染 CSFV 石门株的巨噬细胞中 <i>STAT4</i> 蛋白的表达量	24
图 3.1	<i>VEGF-A</i> 的生物信息学分析	29
图 3.2	巨噬细胞 CSFV 感染 PCR 检测	29
图 3.3	巨噬细胞 CSFV 感染 <i>VEGF-A</i> 的表达量 qPCR 检测	29
图 3.4	巨噬细胞 CSFV 感染 <i>VEGF-A</i> 蛋白表达量 Western Blot 检测	31
图 3.5	巨噬细胞 CSFV 感染 <i>VEGF-A</i> 蛋白表达量激光共定位检测	32
图 4.1	琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性	34
图 4.2	聚肌胞抑制 CSFV 复制 PCR 预实验	35
图 4.3	不同浓度的聚肌胞抑制 PAMs 中 CSFV 复制	36
图 4.4	不同时间点的 Poly(I:C)抑制 PAMs 中 CSFV 复制	37
图 4.5	免疫荧光检测聚肌胞对 CSFV 在蛋白水平复制的抑制	38
图 4.6	Poly(I:C)通过激活 JAK2-STAT4 通路抑制 CSFV 复制	39
图 4.7	Poly(I:C)通过抑制 CSFV 复制抑制 CSFV 对 <i>VEGF-A</i> 的上调表达	40

表格索引

表 2.1	第二章分子生物学及细胞生物学实验主要仪器	8
表 2.2	第二章细胞生物学实验试剂与耗材	8
表 2.3	第二章分子生物学实验用试剂与耗材	9
表 2.4	第二章蛋白实验用试剂与耗材	9
表 2.5	JAK-STAT 通路 qPCR 引物序列	12
表 3.1	常规 PCR 和激光共聚焦实验主要仪器	25
表 3.2	常规 PCR 及激光共聚焦用试剂与耗材	26

符号对照表

符号	符号名称
mL	毫升
μ L	微升
$^{\circ}$ C	摄氏度
mg	毫克
kb	千碱基对
bp	碱基对
ng	纳克
kDa	千道尔顿
s	秒
min	分钟
h	小时
M	摩尔/升
rpm	每分钟转数
V	伏特

缩略语对照表

缩略语	英文全称	中文对照
BMDCs	Bone marrow derived cells	小鼠骨髓源性树突状细胞
BP	Biological process	生物过程
CC	Cellular component	细胞成分
CCHF	Crimean-congo haemorrhagic fever	克里米亚-刚果出血热
CD	Cluster of differentiation molecule	分化分子簇
CSFV	Classical swine fever virus	猪瘟病毒
DAA	Direct-acting antiviral drug	抗病毒药物
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	4', 6-二脒基-2-苯基吲哚
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery platform	注释、可视化和集成发现平台
DC cells	Dendritic Cells	树突状细胞
DGE	Digital gene expression profiling	数字基因表达谱
FDR	False discovery rate	错误发现率
FHC	Ferritin heavy chain	铁蛋白重链
GO	Gene Ontology	基因本体
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
IFN	Interferon	干扰素
IFN-I	Interferon-I	I型干扰素
IL	Interleukin	白细胞介素
IRF	Interferon Regulatory Factor	干扰素调节因子
JAK	Janus Kinase	酪氨酸激酶
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
MDA-5	Melanoma differentiation associated gene	黑色素瘤分化相关基因 5
MF	Molecular Function	分子功能
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国立生物技术信息中心
NK cells	Natural killer cell	自然杀伤细胞
NS5A	Nonstructural protein 5A	丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A

PAM	Porcine alveolar macrophage	猪肺泡巨噬细胞
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
Poly(I:C)	Polyriboinosinic polyribocytidylic acid	聚肌胞
PTX	Paclitaxel	紫杉醇
qPCR	Quantitative Real Time PCR	荧光定量 PCR
RNA-Seq	RNA-sequencing	转录组测序技术
STAT	Signal transducers and activators of transcription	信号传导及转录激活因子
TLR	Toll-like receptors	Toll 样受体
TNF α	Tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A	血管内皮生长因子 A
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C	血管内皮生长因子 C
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒

目录

摘要.....	I
ABSTRACT	III
插图索引.....	V
表格索引.....	VII
符号对照表.....	IX
缩略语对照表.....	XI
第一章 绪论.....	1
1.1 抗病毒药物及 CSFV 的研究现状.....	1
1.1.1 抗病毒药物的研究进展.....	1
1.1.2 CSFV 国内外研究进展.....	2
1.2 巨噬细胞在 CSFV 侵染中的应答.....	2
1.3 聚肌胞与病毒相关的研究现状.....	3
1.4 高通量测序技术在病毒与宿主细胞互作研究中的应用.....	5
第二章 CSFV 石门株感染巨噬细胞后对 JAK-STAT 通路基因的影响.....	7
2.1 引言.....	7
2.2 实验.....	7
2.2.1 仪器与耗材.....	7
2.2.2 高通量测序分析设计.....	10
2.2.3 趋势分析.....	10
2.2.4 GO pathway 分析和功能富集分析.....	10
2.2.5 GO-TREE 分析.....	11
2.2.6 细胞培养及病毒感染.....	11
2.2.7 引物设计.....	11
2.2.8 巨噬细胞 RNA 的提取.....	12
2.2.9 cDNA 的合成.....	13
2.2.10 差异基因表达检测的 qPCR 验证.....	13
2.2.11 免疫蛋白印迹实验.....	13
2.2.12 统计学分析.....	13
2.3 结果与讨论.....	14
2.3.1 不同表达基因的趋势分析.....	14
2.3.2 GO Pathway 分析.....	14

2.3.3 GO 富集分析	15
2.3.4 差异表达基因的 GO-TREE 分析	16
2.3.5 CSFV 石门株对巨噬细胞 <i>JAK1</i> 和 <i>JAK2</i> 转录水平的影响	20
2.3.6 CSFV 石门株对巨噬细胞 <i>JAK1</i> 和 <i>JAK2</i> 蛋白表达的影响	21
2.3.7 CSFV 石门株对 <i>STATs</i> 转录和蛋白水平的影响	22
小结	24
第三章 CSFV 石门株感染致巨噬细胞 <i>VEGF-A</i> 上调表达	25
3.1 引言	25
3.2 实验	25
3.2.1 仪器与耗材	25
3.2.2 <i>VEGF-A</i> 的基因表达差异分析	26
3.2.3 <i>VEGF-A</i> 蛋白互作分析	26
3.2.4 <i>VEGF-A</i> 的 GO 富集分析	26
3.2.5 <i>VEGF-A</i> 的引物设计	26
3.2.6 细胞培养和病毒感染	27
3.2.7 巨噬细胞 RNA 的提取	27
3.2.8 cDNA 的合成	27
3.2.9 qPCR 检测 <i>VEGF-A</i> mRNA 的表达量变化	27
3.2.10 Western Blot 检测 <i>VEGF-A</i> 蛋白表达量的变化	27
3.2.11 <i>VEGF-A</i> 蛋白的激光共聚焦 (Confocal) 检测	27
3.2.12 统计学分析	27
3.3 结果与讨论	28
3.3.1 生物信息学分析结果	28
3.3.2 PCR 和 qPCR 检测 CSFV 感染 PAMs 拷贝数的变化	28
3.3.3 qPCR 验证 PAMs 感染 CSFV 石门株 <i>VEGF-A</i> mRNA 上调表达	29
3.3.4 Western blot 和 Confocal 验证 PAMs 感染 CSFV 石门株后 <i>VEGF-A</i> 蛋白上调表达	30
小结	31
第四章 Poly(I:C)的抗病毒作用及其在 <i>JAK-2</i> 及 <i>VEGF-A</i> 应答 CSFV 侵染中的调节作用	33
4.1 引言	33
4.2 实验	33
4.2.1 仪器与耗材	33
4.2.2 细胞培养和病毒感染	33

4.2.3 巨噬细胞 RNA 的提取	34
4.2.4 RNA 完整性验证	34
4.2.5 cDNA 的合成	34
4.2.6 PCR 检测 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用	34
4.2.7 qPCR 验证 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制效果以及对信号通路的拮抗作用	34
4.2.8 免疫荧光验证 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制效果	34
4.3 结果与讨论	35
4.3.1 RNA 完整性检测及预实验 PCR 检测 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用	35
4.3.2 qPCR 验证不同浓度 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用	35
4.3.3 qPCR 验证不同时间梯度 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用	36
4.3.4 免疫荧光在蛋白水平验证 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用	36
4.3.5 Poly(I:C)和 CSFV 在 JAK2-STAT4 通路上产生拮抗作用	37
4.3.6 Poly(I:C)通过抑制 CSFV 复制抑制 <i>VEGF-A</i> 的上调表达	39
小结	40
结论	41
参考文献	43
致谢	51
作者简介	53

第一章 绪论

1.1 抗病毒药物及 CSFV 的研究现状

1.1.1 抗病毒药物的研究进展

病毒感染及其相关疾病对人民健康和社会生活带来持续性的影响。近年来,不仅埃博拉病毒和寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)这样的烈性病毒的爆发给社会带了极大的恐慌,一些持续性传播疾病,如艾滋病毒、丙型肝炎和流感病毒也给人类健康带着持续性危害。因此抗病毒治疗一直是国际研究的热点和难点^[1]。自上世纪 60 年代发现第一种抗病毒药物以来,对新型有效抗病毒药物的研究一直在不断加强^[2]。疫苗开发和抗病毒药物是现行抗病毒工作中常用的两种策略。大多数病毒疫苗是通过两种不同的方法产生的:病毒灭活和减毒。灭活疫苗的主要的缺点是免疫效应相对较弱^[3],而减毒活疫苗的安全性经常引起使用者的担忧,并且生物制品的运输和保存的要求都相对较高^[3],因此以合理的成本开发抗病毒药物可能会产生更好的经济效益和社会效益。当前抗病毒药物的作用机制主要分为两种:(1)针对病毒自身复制特点设计的抗病毒药物。例如,一类新的直接作用抗病毒药物(Direct-acting antiviral drug, DAA),作为丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)非结构蛋白 5A(Nonstructural protein 5A, NS5A)的抑制剂可在多个步骤阻断 HCV 复制周期^[4-6]。但长期使用此类药物,病毒容易发生耐药性突变。最近有报道称,在接受 DAA 治疗后的慢性丙型肝炎患者中,HCV 的 NS5A-p32 出现了一种缺失突变^[7]。抗逆转录病毒药物的引入有效的预防了艾滋病的发展,并显著提高了受感染者的预期寿命^[8]。然而,由于抗逆转录病毒药物不能完全根除感染者的艾滋病毒,残留的胶质细胞在存在抗逆转录病毒药物的情况下仍保持低水平的艾滋病毒复制^[9]。因此寿命的延长伴随着持续的大脑持续复制病毒和病毒蛋白,导致慢性感染状态和神经损伤的累积^[10]。(2)针对病毒感染特定宿主细胞微环境应答设计的抗病毒药物。病毒调控细胞信号通路以利于自身复制,因此可以针对性地设计靶点给予抑制。如丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶的抑制剂 U0126,被证明可以抑制 B 型流感病毒的传播,到目前为止还没有出现任何具有抗药性的病毒变种,表明流感病毒不能很容易地适应细胞功能的干扰^[11,12]。病毒感染宿主产生免疫抑制,所以免疫抑制靶点的激动剂也是抗病毒药物研究的热点。内皮细胞 S1PR1 缺失加重了甲型 H1N1 流感病毒引起免疫介导的肺损伤,联合使用 S1PR1 激动剂和抗病毒药物奥司他韦可最大限度地预防肺损伤^[13]。Vanwalscappel 等人用 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)激动剂治疗单核细胞和巨噬细胞,发现 TLR 激动剂可以有效的抑制 ZIKV 的复制,可将其用于预防或治疗 ZIKV^[14]。为病毒性疾病寻找

新的治疗策略是当前应对病毒感染以及防控大规模病毒性疾病流行的重要研究方向,本课题通过阐明病毒与宿主细胞微环境相互作用的关键机制,探讨抗病毒药物产生抗病毒效应的机制所在,为抗病毒药物的研发提供基础数据。

1.1.2 CSFV 国内外研究进展

本课题利用 CSFV 与巨噬细胞为模型开展病毒与宿主细胞相互作用的分子机制研究。猪瘟是在世界范围内对生猪养殖业造成重要经济危害和具有高度传染性的疾病之一^[15]。CSFV 作为猪瘟病原,与 HCV、登革热病毒、黄热病病毒等同属黄病毒科,其自然宿主是家猪和野猪,其他动物不易被感染^[16-18]。CSFV 是一种球形病毒颗粒,直径 40~60nm,单正链 RNA 基因组为 12.3kb^[19]。CSFV 的诊断方法目前已趋于成熟,可以根据病理变化、临床症状以及流行病学对猪瘟作出初步诊段。而实验室的诊断手段较多采用免疫荧光技术、酶联免疫吸附测定法、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)、qPCR 等方法,这些方法比较灵敏迅速,且特异性高。CSFV 可以通过胎盘屏障传播,通常导致胎儿死亡和先天性感染的迟发性疾病猪的出生。虽然 CSFV 不同菌株之间的毒力差异很大,但均在一定程度上对生猪养殖业造成损失。强毒力毒株会导致急性疾病并具有很高的死亡率;中等毒力毒株一般会引起亚急性或慢性感染;低毒力毒株的产后感染可导致新生猪亚临床感染和死亡率。CSFV 石门株是一种强毒性毒株,可引起典型的弥漫性出血症状^[20],CSFV C 株作为一种低毒力毒株,可完成 CSFV 的感染复制周期但不引发病理症状^[21]。目前,急性猪瘟发病的分子机制仍是该领域国际研究探讨的关键问题。急性猪瘟由 CSFV 强毒株引起,典型的病理表现为包括淋巴结出血、淋巴结炎和皮肤、肾脏及其他器官的弥漫性出血^[20]。此外,还有高烧和精神沉郁等其它症状^[20]。然而目前暂无效果良好的针对猪瘟特效药物,只是在疾病初期,采用抗猪瘟血清疗法有一定疗效。因此针对 CSFV 致病机制的研究仍需深入开展。CSFV 进入宿主细胞的调控应答与病毒引起的急性炎症的发病机制高度相关。因此,研究 CSFV 与宿主细胞在病毒进入细胞后的相互作用,如病毒触发的信号传导等机制,将对理解猪瘟的发病机制具有积极意义。以 CSFV 为研究工具,对病毒与宿主细胞相互作用的研究不仅极大地加深了研究者对 CSFV 侵染机制的理解,研究模式也可为今后的病毒学、炎症相关疾病的病理生理学研究所借鉴。

1.2 巨噬细胞在 CSFV 侵染中的应答

依附于宿主细胞是病毒感染成功的首要条件。作为“专业”的吞噬细胞,巨噬细胞通过内化和溶酶体降解清除感染颗粒,摄取凋亡细胞清除细胞碎片,并通过抗原递呈激活 T 细胞来辅助保护性免疫反应^[22]。巨噬细胞产生广泛的细胞因子,平衡免疫

介导的组织损伤、修复和稳态维持。同时，巨噬细胞在炎症的起始和消退阶段都很重要，长期以来被认为是急性和慢性炎症疾病的潜在重要治疗靶点^[23-25]。经典的抗炎机制之一为干扰素（Interferon, IFN） γ 刺激活化的巨噬细胞，通过直接杀死和释放促炎细胞因子，如白细胞介素（Interleukin, IL）-1 和细胞毒性产物（如一氧化氮）消除入侵微生物^[26]。其中具体的机制较为复杂，仍有待深入探讨。肺泡巨噬细胞是在气道管腔中发现的组织驻留细胞，参与气管功能的稳态调节和对肺部感染的早期反应，完全分化的猪肺泡巨噬细胞（Porcine Alveolar Macrophages, PAMs）作为自然感染的主要靶细胞，在 CSFV 感染过程中得到了广泛的研究。PAMs 是一个异质性的细胞群，作为检测和应对感染的前哨，最初被认为是先天免疫系统和后天免疫系统的重要组成部分，是机体内首先对病毒感染作出反应的细胞^[27]。在体内 PAMs 中可检测到病毒抗原，这表明这些细胞可能直接受到病毒感染。

巨噬细胞参与了猪瘟疾病的发病机制，在预防 CSFV 感染方面的重要性已得到充分证实^[28]。巨噬细胞过度分泌促炎细胞因子与 CSFV 引起的急性炎症的特征相吻合^[29]。研究巨噬细胞与 CSFV 相互作用的机制对于理解 CSFV 强毒力株感染猪后易产生急性炎症的原因，以及探讨依据何种侵染机制来加强治疗或预防疾病都至关重要。最近，巨噬细胞在猪瘟发病机制中的作用研究多关注其与 CSFV 的互作机制。研究人员通过分析 CSFV 非结构蛋白在巨噬细胞 TLR 及其下游信号级联调节中的作用，确定了 CSFV 非结构蛋白对 TLR 介导的先天免疫反应的影响^[30]。同时，有研究者发现巨噬细胞中 IFITM 蛋白在抑制 CSFV 感染中的发挥了重要作用，与 CSFV 内体通路之间有密切的联系^[31]。明确了解巨噬细胞在 CSFV 感染的保护和发病机制中的作用可能会有助于实施靶向治疗，从而有可能减轻与该疾病相关的经济损失和社会负担。

1.3 聚肌胞与病毒相关的研究现状

聚肌胞（Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid, Poly(I:C)），一种人工合成的双链核糖核酸，具有模拟病原体感染、促进免疫系统激活、促进抗癌治疗的药物药理作用^[32]，并已被列入美国国家癌症研究所的免疫治疗药物排名中，具有提高癌症免疫治疗结果的应用潜力。Poly(I:C)和紫杉醇（Paclitaxel, PTX）共同处理 PTX 耐药细胞系时，发现 Poly(I:C)在协调诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖的同时，对耐药细胞活性有特异性的损害，可以改善 PTX 耐药细胞系的化疗效果^[33]。同时，Poly(I:C)还可以作为一种免疫刺激剂被吸附到带正电的明胶纳米颗粒表面，促进 RAW264.7 巨噬细胞和小鼠骨髓源性树突状细胞（Bone Marrow-derived cells, BMDCs）在体外的细胞摄取，并导致成熟标记物分化分子簇（Cluster of differentiation molecule, CD）80 和 CD86 在 BMDCs 上的表达增加，进行鼻内免疫可抑制小鼠淋巴瘤的生长^[34]。Poly(I:C)引起的细胞信号

通路调控主要依赖 *TLR3* 和黑色素瘤分化相关基因 5 (Melanoma Differentiation Associated gene, *MDA-5*)。Poly(I:C)是 *TLR3* 的配体, *TLR3* 是先天免疫系统早期识别病原体相关分子模式的重要组成部分。Zhang 等人的数据表明, Poly(I:C)激活 *TLR3* 可能是预防缺血性中风的一种潜在方法。Poly(I:C)通过激活 *TLR3*, 诱导 *TLR3* 与 *Fas* 相互关联, 阻止低氧/复氧诱导的小胶质细胞 *Fas* 与 *Fadd* 的相互作用以及 *caspase-3* 和 *caspase-8* 的激活, 降低大脑 I/R 损伤^[35]。*MDA5* 是一种细胞溶质传感器, 检测渗透到细胞溶质中的 Poly(I:C)。用 Poly(I:C)模拟的病毒 dsRNA 攻击鲢鱼分析 dsRNA 病毒的宿主免疫应答模式, 发现 *MDA5* 在宿主监测 dsRNA 病毒感染和诱导 I 型干扰素 (Interferon-I, *IFN-I*) 反应中都是重要的受体, 随后形成转录因子复合物, 促进下游被称为干扰素刺激基因抑制病毒复制^[36]。此外, Poly(I:C)还可刺激抗病毒效应基因 2', 5'-寡腺苷酸合成酶和 *IFN-I* 在人角膜上皮细胞中的表达^[37]。Poly(I:C)在体内可介导不同的免疫过程, 其激活的免疫细胞类型包括巨噬细胞、树突状细胞 (Dendritic Cells, DC) 和自然杀伤细胞 (Natural Killer cell, NK)。这三种细胞都是抗病毒免疫反应的重要参与者。

(1) Poly(I:C)促进 NK 细胞毒性作用

NK 细胞是一种淋巴细胞效应因子, 被激活以控制某些微生物感染和肿瘤增殖^[38]。有研究将 Poly(I:C)作为一种 NK 细胞激活剂, 诱导肝炎, 通过他的研究发现浸润淋巴细胞明显增多, 同时肝细胞凋亡和增殖增加, 证实 NK 细胞来源的 *IFN- γ* 参与促进肝癌的发生, 揭示了先天免疫在乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 相关性肝癌发病机制中的重要性^[39]。通过对小鼠模型的研究发现肿瘤转移时 NK 细胞介导的细胞毒性功能和肺肿瘤负荷均因手术期给予 Poly(I:C)而得到提高^[40]。Jegaskanda 等人发现 Poly(I:C)可以模拟流感病毒介导的 NK 细胞抗体依赖性的增加^[41]。

(2) Poly(I:C)诱导 DC 细胞成熟

DC 细胞是一种专业的抗原递呈细胞, 参与控制和启动免疫反应^[42]。DC 细胞成熟可以通过 Poly(I:C)在体外触发。Fotaki 等人证明, Poly(I:C)成熟的 DC 细胞与感染增强的腺病毒载体结合, 表现出促炎状态^[43]。Ott 等人发现 Poly(I:C)刺激后成熟的 DC 细胞同黑色素瘤细胞共培养时细胞因子的产生和表面标志物的表达被抑制, 使用 V-RAF 鼠肉瘤病毒致癌因子系物 1 的抑制剂维罗非尼预处理的黑色素瘤细胞系可以逆转这种抑制, 因此判断维罗非尼为黑色素瘤患者采用联合免疫治疗方法的较佳选择^[44]。

(3) Poly(I:C)诱导巨噬细胞活化

巨噬细胞是一种重要的免疫前哨细胞, 调节对致病应答配体的反应, 并协调免疫反应的方向。Poly(I:C)与 *TLR3* 结合后, 介导了巨噬细胞活化的标志物 *CD11b* 和 *CD68* 表达的增加^[45]。Poly(I:C)在牛巨噬细胞中影响抗病毒反应基因, 帮助建立有效的免疫反应所需的炎症环境^[46]。

有大量的报道证明 Poly(I:C)诱导肿瘤细胞和不同类型免疫细胞分泌促炎细胞因子,在病毒学上有很广泛的研究价值。Poly(I:C)在 BALB/C 小鼠中与灭活血凝素联合鼻腔给药,对鼻部限制性感染和致命性肺部感染均有保护作用^[47]。Zhao 等人发现小鼠鼻内预处理 Poly(I:C)后通过诱导 *IFN-β* 和 *IFN-γ*,抑制了急性呼吸综合征冠状病毒在原发性人类气道上皮细胞中的复制^[48]。Poly(I:C)在 CSFV 的研究上的应用已经有了很长的历史。Cao 等人发现 CSFV 的非结构蛋白 4B 抑制 Poly(I:C)刺激介导的 TLR3 信号通路在猪单核细胞源性巨噬细胞中的激活,从而抑制 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 mRNA 转录、干扰素调节因子 (Interferon Regulatory Factor, IRF) 3 蛋白翻译和 NF- κ B p65 的磷酸化,并最终影响 IL-6 和 IFN- β 的分泌^[30]。Li 等人研究表明,在 Poly(I:C)刺激下, *IRF1* 会向细胞核移位,进而介导干扰素刺激基因 15 的上调^[49]。Dong 等人发现 CSFV NS5A 蛋白可以抑制 Poly(I:C)诱导的 *IL-1*、*IL-6*、肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor α , *TNF α*) 的表达,同时抑制了 Poly(I:C)诱导的 NF- κ B 核易位和活性^[50]。

综上所述, Poly(I:C)已在不同的体内和体外研究中显示出对免疫细胞的诱导作用,然而,在 CSFV 上的研究更多将 Poly(I:C)作为一种病毒的模拟物,刺激 TLR 信号通路的激活或者干扰素的表达。Poly(I:C)是否在细胞水平对 CSFV 的复制有所影响目前依然没有确切的结论。选择 Poly(I:C)作为 CSFV 复制可能的抑制剂,开展本课题的研究具有现实意义,如果 Poly(I:C)被证实确实有抑制 CSFV 复制的效果,其中具体的抗病毒机制更有待去探索。

1.4 高通量测序技术在病毒与宿主细胞互作研究中的应用

近年来,对于 CSFV 的致病机理的研究取得了一些进展。但其防控工作依然面临许多技术方面的难题。虽然 CSFV 感染后不会引起宿主细胞病变,但急性猪瘟是导致猪高死亡率的主要原因。感染 CSFV 后宿主细胞的应答变化对急性猪瘟的发病机制有何种贡献尚未完全研究透彻。之前的研究已经表明,由于 CSFV 与宿主细胞的相互作用,宿主细胞的生理功能经历的变化也对细胞内病毒复制产生了影响^[51,52]。然而,以往的研究大多局限于 CSFV 感染后细胞因子的广泛变化,并未将细胞因子对不同毒力株的差异性应答结合起来,到底是哪些宿主基因对宿主应答强毒株侵染产生特异性应答作用尚不清楚。通过比较不同毒力株的 CSFV 引起的宿主基因应答变化,将有助于对急性感染机制进行更为系统的研究。为此,本课题对巨噬细胞在转录水平对 CSFV 的感染应答进行了高通量深度测序分析^[53]。

高通量测序应用于病毒与宿主细胞的互作研究在近一二十年得到了快速发展。转录组测序技术 (RNA-sequencing, RNA-Seq) 是第二代测序技术之一,由于其高灵敏

度、高重现性、高通量等优点，被广泛应用于转录谱分析。RNA-Seq 技术已经成为研究细胞在感染或治疗过程中转录组特征分析的有用手段，被广泛用于病毒学的研究中。Brahma 等人分析了 ZIKV 感染人胎儿神经干细胞 GSE93385 的转录组学数据，共鉴定出 1084 个差异表达基因，利用生物信息学分析查找到 ZIKV 病毒感染宿主细胞的 7 个关键枢纽基因，为发现新的治疗靶点和开发新的干预 ZIKV 疾病的策略提供了数据^[54]。Zhang 等人对感染致死性鸭病毒性肝炎病的鸭肝组织进行了全基因表达谱分析，筛选出差异表达基因，为进一步探讨强毒株的致病性，提高对宿主-病毒相互作用的认识提供有价值的信息^[55]。

同样是针对转录水平的检测，高通量测序技术同 qPCR 和基因芯片相比具有较为明显的技术优势。基因表达谱允许识别对微生物刺激的特定反应，从而为理解侵染机制或设计治疗方法提供系统性依据。随着猪基因组的完善，通过分析转录谱，以了解导致细胞反应的宿主-病原体关系。在本研究中本课题特别关注基于数字基因表达谱（Digital Gene Expression Profiling, DGE）分析技术获得的 CSFV 石门株和 CSFV C 株感染宿主细胞后的基因差异调控应答。与之前的研究不同的是，本研究的生物信息学分析中，将通过基因趋势分析，将 CSFV 石门株和 CSFV C 株不同的感染结果进行分类比较，然后进行 GO-TREE 分析以关注强毒株引起的特异性细胞应答。在宿主细胞水平解读强毒株侵染机制的同时，为拓展抗病毒研究提供有价值的基础数据。

第二章 CSFV 石门株感染巨噬细胞后对 JAK-STAT 通路基因的影响

2.1 引言

猪瘟是由 CSFV 引起的一种高度传染性和致命性疾病^[20]。有学者发现, CSFV 石门株感染可引起猪高热、弥漫性出血等症状, 而 CSFV C 株感染未引起任何病理症状^[20,21]。巨噬细胞作为重要的免疫细胞, 具有多种功能, 与不同组织中的吞噬作用和细胞免疫密切相关。它不仅在非特异性防御中发挥重要作用, 而且在 T 细胞抗原表达和炎症反应中也发挥重要作用^[27]。因此, 感染 CSFV 的巨噬细胞一定程度上参与了猪瘟的发生和发展, 其中的确切机制有待去研究。为了进一步探讨 CSFV 的发病机制, 本章利用高通量测序平台获得了 DGE, 用于分析 CSFV 石门株和 CSFV C 株感染中巨噬细胞的转录变化。目前, 对高通量测序数据库的分析已经成为了解各个领域生物学机制的有力工具。通过 GO 分析等生物信息学手段获得了针对 CSFV 石门株的精确感染特征, 对阐明猪瘟可能的致病机制具有重要价值。结合趋势聚类进行 GO-TREE 分析, 本章分别探讨宿主细胞全基因组对 CSFV 石门株和 CSFV C 株感染的响应。通过对 CSFV 石门株巨噬细胞基因的 GO 分析, 确定了支持 CSFV 石门株感染的一系列重要 GO 项 (如炎症反应), 这些 GO 项与猪瘟猪的临床特征密切相关。部分重要 GO 项突出了 CSFV 石门株的感染特点。通过 GO-TREE, 可以进一步解释 CSFV 石门株和 CSFV C 株的不同感染特征, 探索基因表达的分子过程。这为宿主-病毒相互作用候选基因的功能研究提供了新的线索。

通过系统分析 CSFV 石门株与 CSFV C 株以及 Mock 组的数据, 发现 JAK-STAT 通路可能是造成免疫抑制的可能成因。JAK-STAT 通路是近年来发现于干扰素信号传导研究中的一条保守的信号转导通路, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程。对于 JAK-STAT 通路异常表达的研究, 一般会集中于炎症性疾病和肿瘤性疾病, 但在 CSFV 的研究中却没有给予足够的关注, 本文在巨噬细胞应答水平给予了初步探讨。

2.2 实验

2.2.1 仪器与耗材

(1) 主要仪器

本章分子生物学及细胞生物学使用的主要仪器如表 2.1 显示:

表 2.1 第二章分子生物学及细胞生物学实验主要仪器

仪器	公司	国家
二氧化碳培养箱	赛默飞公司	美国
高速离心机	Eppendorf 公司	德国
倒置生物显微镜	中显光电仪器有限公司	中国
超净工作台	亚太科龙公司	中国
定量 PCR 系统	Applied Biosystem 公司	美国
高速冷冻离心机	Eppendorf 公司	德国
微量移液器	Eppendorf 公司	德国
垂直电泳仪及转膜设备	Bio-rad 公司	美国
脱色摇床	海门公司	中国
化学发光成像系统	Bio-rad 公司	美国
多功能酶标仪	赛默飞公司	美国
紫外分光光度计	Bio-rad 公司	美国
干式恒温器	赛默飞公司	美国

(2) 主要试剂与耗材

细胞类实验及病毒感染所需试剂耗材如表 2.2 所示。

表 2.2 第二章细胞生物学实验试剂与耗材

试剂与耗材	公司	国家
CSFV 石门株	中国兽医药品监察所	中国
CSFV C 株	中国兽医药品监察所	中国
PAMs 细胞株 3D4/21(CRL-2843)	美国模式培养物集存库	美国
胎牛血清	Gibco 公司	美国
1640 培养液	Hyclone 公司	美国
胰蛋白酶	Hyclone 公司	美国
60 细胞培养皿	Corning 公司	美国
六孔板	Corning 公司	美国

分子生物学类实验用试剂与耗材如表 2.3 所示：

表 2.3 第二章分子生物学类实验用试剂与耗材

试剂与耗材	公司	国家
Trizol 试剂	Takara 公司	日本
SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒	天根有限公司产品	中国
八连管	百赛生物	中国
cDNA 反转录试剂盒	Takara 公司	日本

蛋白实验用试剂与耗材如表 2.4 所示。其它实验常规试剂如甲醇、PBS、乙醇、Tween20 等试剂均购自于西安海默生物。

表 2.4 蛋白实验用试剂与耗材

试剂与耗材	公司	国家
JAK1 一抗	CST 公司	美国
JAK2 一抗	CST 公司	美国
β -Actin 抗体	博奥龙公司	中国
Western blot 二抗	Jackson 免疫研究公司	美国
RAPI 裂解液	碧云天公司	中国
BCA 蛋白定量试剂盒	康为世纪公司	中国
1.5M Tris-HCl 缓冲液	西安赫特生物公司	中国
0.5 M Tris-HCl 缓冲液	西安赫特生物公司	中国
TEMED	西安赫特生物公司	中国
SDS	西安赫特生物公司	中国
过硫酸胺	西安赫特生物公司	中国
BSA	Sigma 公司	美国
Tris	索莱宝科技公司	中国
甘氨酸	索莱宝科技公司	中国
SDS	索莱宝科技公司	中国
PVDF 膜	Millipore 公司	美国
ECL 化学发光液	Millipore 公司	美国
蛋白 marker	赛默飞公司	美国
5×SDS PAGE 上样缓冲液	天根公司	中国

2.2.2 高通量测序分析设计

本研究将巨噬细胞分为三组，分别为 CSFV 石门株感染组、CSFV C 株感染组和对照组，进行 RNA 提取和深度测序，测序结果已经在课题组前期发表的文章中进行报道^[56]。通过聚类分析，GO 分析等生物信息学方法得到不同病毒感染条件下巨噬细胞基因表达的差异，具体流程如图 2.1 所示。

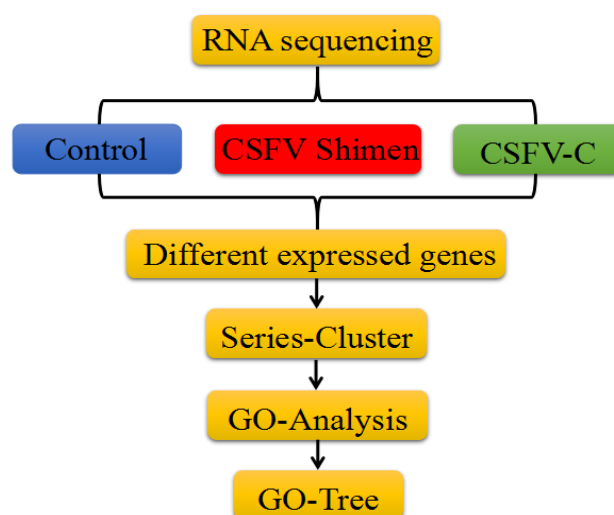


图 2.1 生物信息分析流程图

2.2.3 趋势分析

对 CSFV 石门株、CSFV C 株和对照组的巨噬细胞两两比较进行差异基因分析，错误发现率（False discovery rate, FDR）作为阈值。基因表达的显著性差异由 $FDR \leq 0.001$ 和 $\log_2\text{-ratio}$ 的绝对值 ≥ 1 共同决定。显著识别出 CSFV 石门株、CSFV C 株和对照组中上调和下调的基因^[57]。

2.2.4 GO pathway 分析和功能富集分析

利用注释、可视化和集成发现平台（Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery platform, DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>）数据库中的猪的注释，分离上调基因和下调基因，研究基因功能和通路。利用京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG），在 CSFV 石门株的基因图谱中发现了显著富集的代谢途径或信号转导途径。利用基因本体（Gene Ontology, GO）条目检测基因的功能^[58]，包括生物过程（Biological Process, BP）、细胞成分（Cellular Component, CC）和分子功能（Molecular Function, MF）。条形图由 OriginPro 2016 构建。

2.2.5 GO-TREE 分析

为了更加方便地识别 GO 条目,对 GO 条目在 GO 结构中进行交互可视化处理。同时,本课题创建了一个基于网络的工具 GO-TREE 机器(<http://genereg.ornl.gov/gotm/>),用于数据分析和基因集的数据可视化。将注释信息叠加在 GO 结构上。交互式饼图总结了所选 GO 术语的注释分布,提供了一个简洁的实验结果概览。使用 GO-TREE 机器分析高通量测序分析数据集^[59,60]。

2.2.6 细胞培养及病毒感染

将液氮罐中的巨噬细胞取出后迅速放入 37 °C 水浴锅中解冻,在超净工作台中将解冻后的细胞转移到 15 mL 无菌离心管中,1000 rpm 离心 5 min,弃掉上清液,添加 4 mL 1640 培养基将余下细胞吹打均匀后转移到 60mm 培养皿中,放入 37 °C,5% CO₂ 二氧化碳培养箱中培养,每日观察一次,根据细胞具体的生长状况及培养基酸碱度选择时间对细胞进行换液、传代。选取生长至对数期的细胞,进行铺板,六孔板每孔添加 1×10⁶ 个细胞,2 mL 完全培养液,放入二氧化碳培养箱中培养。待细胞密度生长到 70%~80%时,对 CSFV 石门株组细胞进行接毒。将六孔板中细胞上清液吸弃,用 1×PBS 缓冲液清洗 2~3 次。将病毒液用 1640 培养基(含 2%胎牛血清)进行稀释(比例为 1:200),添加到 CSFV 石门株组的细胞上,在二氧化碳培养箱中孵育 2 h,然后弃去上清,用 PBS 冲洗 3 次,添加含 1640 培养基(含 2%胎牛血清)2 mL,放入细胞培养箱中培养,到实验规定的时间点收取样品。CSFV 石门株的病毒接种在西北农林科技大学动物医学院预防兽医科研平台完成。

2.2.7 引物设计

差异表达的基因的 qPCR 引物根据美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公布的相应基因序列采用 Primer6.0 软件进行设计。PCR 产物大小控制在 100~250 bp,GC%在 40%~60% 之间,引物 T_m 值控制在 55~65 °C。引物由擎科生物公司完成合成。引物序列如表 2.5 所示。

表 2.5 JAK-STAT 通路 qPCR 引物序列

Serial	Primer	Primer sequence(5'-3')	Amplicon length(bp)	GenBank Accession NO
A	JAK1-F	GAAC TTCCCAAGGACATCA	199	XM_021093538
	JAK1-R	TTTCCAAGGTAGCCAGGTA		
B	JAK2-F	CTTCAGTCTGCCTTCTACAC	141	XM_021082809
	JAK2-R	CTTTCATTTGAGCCTTCTTG		
C	STAT1-F	GTGGAATGGAAGCGGAGAC	221	XM_021074664
	STAT1-R	TGGAAGAGGCT AAGGTGC		
D	STAT2-F	CTGAAGGGATTGAGTAGCG	155	NM_213889
	STAT2-R	CGATGTGGAGTTTGAGGC		
E	STAT3-F	AGAAGGACATCAGCGGTAAGA	146	NM_001044580
	STAT3-R	GAGGTAGACCAGCGGAGACA		
F	STAT4-F	CCTTTGGATTGATGGGTATG	218	XM_021074684
	STAT4-R	CAGCGAATGGTAGAGCAGAC		
G	STAT5A-F	TTCTGGCAGTGGTTTGACG	106	XM_021066247
	STAT5A-R	CATGGGCCTGTTGCTTATTC		
H	STAT5B-F	TTTCTGGCAGTGGTTTGATG	128	XM_021066242
	STAT5B-R	CGGGCTTGTTAATGAGTAGG		

2.2.8 巨噬细胞 RNA 的提取

实验结束后收集 CSFV 石门株组和控制组的细胞样品。离心机预冷 4 ℃；在 6 孔板中加入 Trizol 裂解液裂解细胞，每孔加入 1 mL，用移液器吹打至不再黏稠；将 Trizol 浮液裂解细胞转移到 EP 管中，室温放置 10 min 裂解充分；每只 EP 管中加入 200 uL 的氯仿，上下震荡混匀，室温静置 10 min；可以观察到 EP 管内液体分为三层，其中最上层的为 RNA。分层后将 EP 管转移到离心机中，12000 rpm 离心 15 min；吸取上层水相转移到 RNase-free EP 管中；按照 1:1 加入等体积预冷的异丙醇，上下颠倒混匀后室温静置 10 min；将 EP 管转移到离心机中，12000r pm 离心 10 min；弃去上清液，加 1 ml 75%乙醇来回颠倒洗涤 RNA 沉淀，7500 rpm 离心 3 min；重复洗涤步骤一次；弃去乙醇，倒置在一次性 EP 手套上，室温干燥 5 min；加入无酶 H₂O 15μL。全部流程实验使用无酶枪头和 EP 管操作。分装出 2 μL RNA 采用纳米分光光度计检测 RNA 完整性，其余 RNA 放入 -80 ℃冰箱保存。

2.2.9 cDNA 的合成

本次实验用的是两步法合成 cDNA，两步反应反应都在 PCR 仪中进行。第一步：反应体系（10.0 μl 体系），42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min，并储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。5 $\times$ gDNA Eraser Buffer，2.0 μL ；gDNA Eraser，4.0 μL ；Total RNA (<1 μg)，1.0 μL ；RNase free H_2O ，3.0 μL ；第二步：反应体系（20.0 μl 体系），37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min，85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s。第一步反应液，10.0 μL ；5 $\times$ Prime Script Buffer，4.0 μL ；Prime Script RT Enzyme Mix 1，1.0 μL ；RT Primer Mix，1.0 μL ；RNase free H_2O ，4.0 μL 。反应完全后取出样品储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.2.10 差异基因表达检测的 qPCR 验证

每个样品 3 个重复，同时设置 β -Actin 作为内参基因。反应为 10 μL 体系：Super SYBR Premix 5 μL ，上下游引物各 1.5 μL ，cDNA 2.0 μL 。反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 预变性；95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 变性，55 $^{\circ}\text{C}$ 31 s 退火，68 $^{\circ}\text{C}$ 31 s 延伸，35 个循环。然后计算样品每个检测基因的平均 Ct 值，基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算。

2.2.11 免疫蛋白印迹实验

使用 PAPI 裂解液对感染猪瘟石门株病毒 0 h、12 h、24 h、48 h 的细胞进行裂解，冰上裂解 30 min，每 5 min 中使用涡旋振荡混匀。待裂解液基本澄清，12000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 取上清，使用 BCA 定量法对提取的蛋白进行定量，具体定量步骤参考说明书。绘制标准曲线，调整每个时间点蛋白浓度一致，用 5 $\times$ SDS-PAGE 缓冲液对蛋白进行变性（100 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min）。8%分离胶，每孔上 30 μg 蛋白，SDS-PAGE 电泳，70 V，待蛋白跑到分离胶时，换成 90 V，120 min。对比蛋白 marker 切下目的蛋白，转到 PVDF 膜上（100V，120min）。含 5%牛血清蛋白的 TBST 室温封闭 1 h。弃去封闭液，加入 2 mL 一抗稀释液， β -Actin（稀释比为 1：5000），JAK2（稀释比为 1：1000），放入摇床 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。TBST 洗涤 6 次，每次 5 min。用与一抗相对应的二抗（稀释比为 1：5000）室温孵育 1 h。TBST 洗涤 6 次，每次 5 min。按照说明书配置 ECL 显影液显影拍照。对条带灰度使用 Image J 进行灰度分析， β -Actin 作为常见的内参相对正常化每个基因的转录和翻译表达。

2.2.12 统计学分析

每组数据以三个独立实验的平均值 $\pm$ SEM 值表示。采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析（ANOVA）。 $P < 0.05$ 被认为是具有显著差异。NS 代表无显著性差异，*代表 $P < 0.05$ ，**代表 $P < 0.01$ ，***代表 $P < 0.001$ 。

2.3 结果与讨论

2.3.1 不同表达基因的趋势分析

虽然高通量测序可以从基因调控的角度提供大量的信息,全面了解病毒感染过程中的转录和细胞反应,但如何在测序所产生的巨大数据量中快速、准确地识别出致病调控相关基因将成为研究的难点^[61]。宿主转录组对病毒感染的反应发生了相当大的变化。基因调控是健康机体发育和维持的重要过程^[62]。基因表达的调控允许细胞在需要适应、触发发育途径和对病毒刺激做出反应时表达特定的蛋白^[63]。CSFV 石门株可引起急性炎症,并可在短时间内造成致命的损伤。因此,确定宿主细胞的反应有助于理解猪瘟的发病机制。为了更加全面的了解 CSFV 石门株、CSFV C 株感染巨噬细胞后基因在转录水平的表达差异,本研究通过 CSFV 石门株、CSFV C 株及对照组高通量测序获得的 19665 个基因序列进行差异表达基因分析,将疫苗株 CSFV C 株设计成另一个对照组,以突出 CSFV 石门株在巨噬细胞中的特征。巨噬细胞对 CSFV 感染的应答反应表现的很复杂,感染后有超过 1000 个细胞基因上调或下调。为此,本章开展基因表达的趋势化分析。综合分析上调或下调的基因得到 8 个表达趋势如图 2.2 所示。其中,趋势 1 和趋势 2 表示宿主应答基因在 CSFV C 株组与 CSFV 石门株组和对照组之间存在显著差异。趋势 3、趋势 4 中 CSFV 石门株感染巨噬细胞后巨噬细胞转录组上调,趋势 5、趋势 6 中巨噬细胞基因在 CSFV 石门株侵染后发生转录下调。巨噬细胞基因在趋势 7 和趋势 8 中对 CSFV 石门株和 CSFV C 株共同产生下调或上调的应答。作为猪瘟疫苗中使用的弱毒株,CSFV C 株感染不会引发病理症状。因此,宿主细胞的非特异性病毒侵染应答信息可以被“过滤”,从而准确阐明强毒株的侵染机制。

2.3.2 GO Pathway 分析

为了进一步阐明与 CSFV 石门株感染相关的差异表达基因的功能作用,本课题应用 KEGG 数据库对趋势 3、4、5、6 中巨噬细胞只与 CSFV 石门株产生差异性应答的基因进行了通路分析(图 2.3A)。其中的关键信号通路包括 TGF- β 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、p53 信号通路和 HIF-1 信号通路。这些信号通路与细胞生长、增殖、分化、迁移和凋亡密切相关。通过以上分析推测 CSFV 石门株感染通过促进或抑制这些通路的功能影响巨噬细胞的特定生理功能。这些结果表明,CSFV 石门株感染引起了一系列信号通路的显著改变,从而触发了宿主的一系列特征性反应。

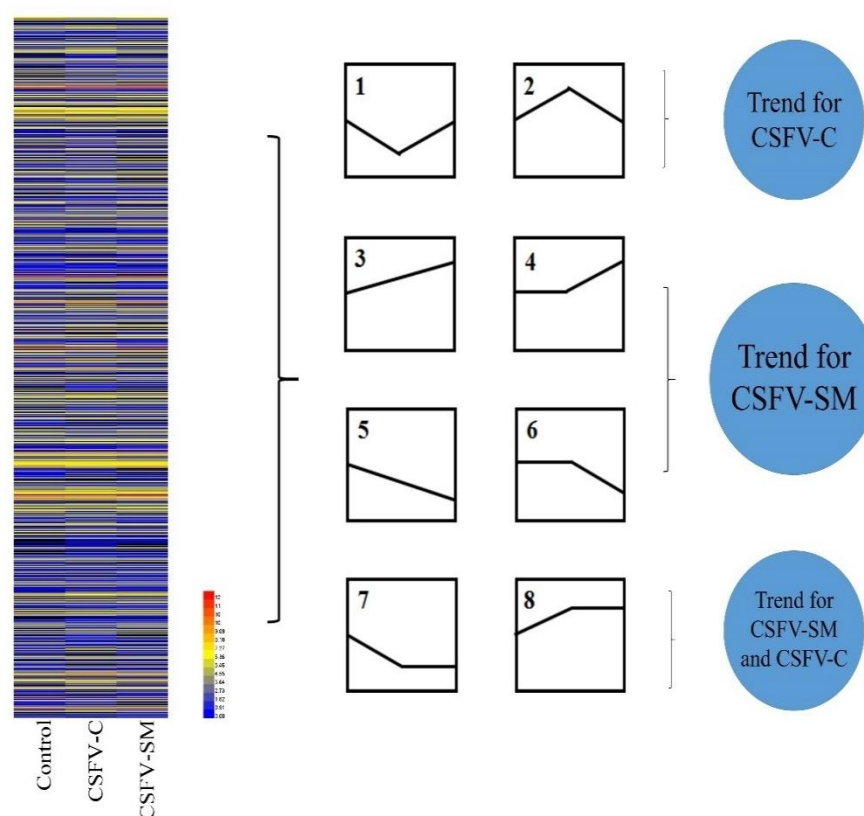


图 2.2 高通量测序的聚类趋势分析

2.3.3 GO 富集分析

为了探讨 CSFV 石门株感染相关基因表达变化的可能后果, 基于 GO 功能注释数据库对图 2.2 中趋势 3、4、5、6 的基因进行了 GO 富集分析 (图 2.3B)。CSFV 石门株感染引起巨噬细胞基因在一系列生物学过程、分子功能和细胞成分的变化中发生异常活动。CSFV 石门株感染不仅可以影响细胞迁移、细胞生长、细胞增殖和细胞周期阻滞, 还可以改变炎症反应、NF- κ B 调控、凋亡调控、局灶性粘附和整合素复合物等特定因子的活性。之前的研究表明, CSFV 石门株感染可导致细胞周期停滞, 这可能促使其破坏宿主细胞的先天免疫反应, 在宿主细胞中增殖^[64]。这些异常活动说明巨噬细胞感染 CSFV 石门株后其生理功能受到了显著的影响。CSFV 改变了巨噬细胞内基因调控的稳态, 巨噬细胞应对不同毒力的病毒感染有不同的响应机制。病毒改变了宿主细胞内基因调控的稳态, 宿主细胞也积极准备应对不同毒性的病毒感染。

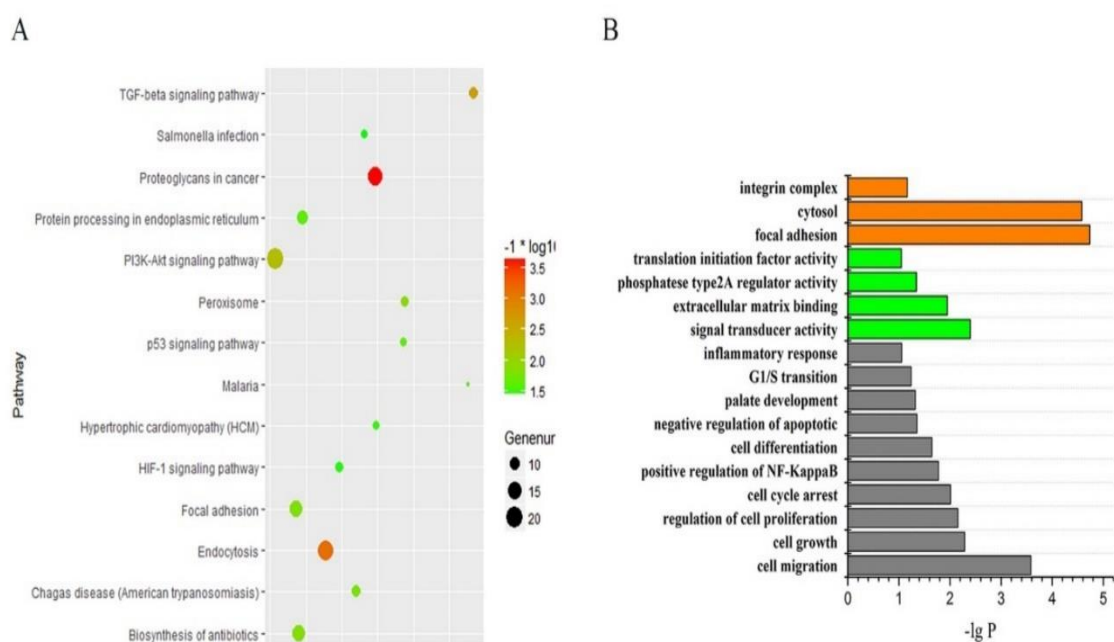


图 2.3 GO Pathway 分析和 GO 富集分析

(A) 差异表达基因的 GO Pathway 分析 (B) 差异表达基因的 GO 富集分析。橙色代表 CC，绿色代表 MF，灰色代表 BP。

2.3.4 差异表达基因的 GO-TREE 分析

GO 富集分析结果显示 CSFV 石门株引起一系列的异常活动，分别针对 2.3.3 的异常进程，应用 GO-TREE 分析 CSFV 石门株和 CSFV C 株对巨噬细胞基因功能的不同感染效果，图 2-4~2.7 显示了一系列的显著性结果。CSFV 石门株和 CSFV C 株对巨噬细胞有不同的调控过程，这很好地提示了宿主对 CSFV 石门株和 CSFV C 株对感染结果的不同响应。

如图 2.4A 所示，细胞分裂主要受 CSFV C 株感染的影响；同时，可以观察到感染 CSFV 石门株和 CSFV C 株可以显著影响巨噬细胞的有丝分裂细胞周期(图 2.4 B)，它们之间存在不同的诱导过程，编码不同的反应基因。细胞的增殖调控主要受 CSFV C 株的影响（图 2.5 A）。Zheng 等人的研究发现 CSFV C 株与小鼠骨髓来源的未成熟 DC 细胞的相互作用，CSFV C 株感染的未成熟 DC 细胞成熟程度明显增强，能有效促进 T 细胞的扩增和增殖^[65]。而图 2.5B 的结果显示，感染病毒细胞的凋亡主要受 CSFV 石门株的影响。Qian 等人发现 CSFV 石门株的复制和 NS4B 表达均上调了铁蛋白重链（Ferritin heavy chain, FHC）的表达，FHC 通过调节细胞活性氧来抑制细胞凋亡^[66]。

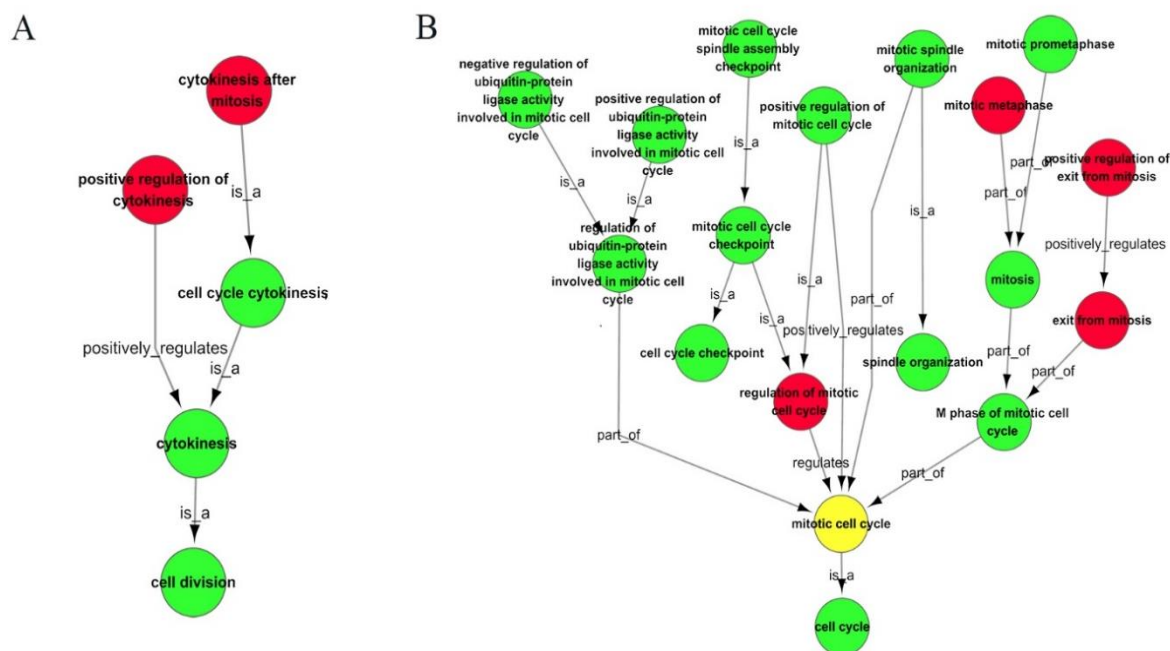


图 2.4 细胞分裂 (A)、周期 (B) 的 GO-TREE 分析

红色代表受 CSFV 石门株影响的基因，绿色代表响应 CSFV C 株感染的基因，黄色代表同时受 CSFV 石门株和 CSFV C 株影响的基因。

DNA 修复 (图 2.6A) 主要会受到 CSFV C 株的影响，蛋白调节则受 CSFV 石门株影响较大 (图 2.6B)。自噬的一些进程也会受到 CSFV 石门株以及 C 株的影响 (图 2.7B)，有研究表明 CSFV 感染靶细胞诱导细胞自噬，进而有利于病毒复制^[64, 67]。在前期发表的文章中也针对 CSFV 对自噬关键基因 *SH3GLB1* 的上调作用进行了一些探讨^[68]。血管生成主要受 CSFV 石门株的影响 (图 2.7A)。家猪感染 CSFV 石门株，可引起出血性淋巴结炎和感染猪的弥漫性出血。课题组前期分析了猪脐静脉内皮细胞感染 CSFV 石门株后的基因表达模式。发现在猪脐静脉内皮细胞中，血管内皮生长因子 C (Vascular endothelial growth factor-C, *VEGF-C*) 基因的转录和相应蛋白的翻译均在感染 CSFV 石门株后显著上调，提示了 *VEGF-C* 可能参与了由 CSFV 毒株引起的急性感染^[69]。本课题关注到 VEGF 家族的另一个成员 VEGF-A，探索 CSFV 石门株是否对巨噬细胞中 *VEGF-A* 的表达产生影响，具体的研究在第三章中展开探讨。

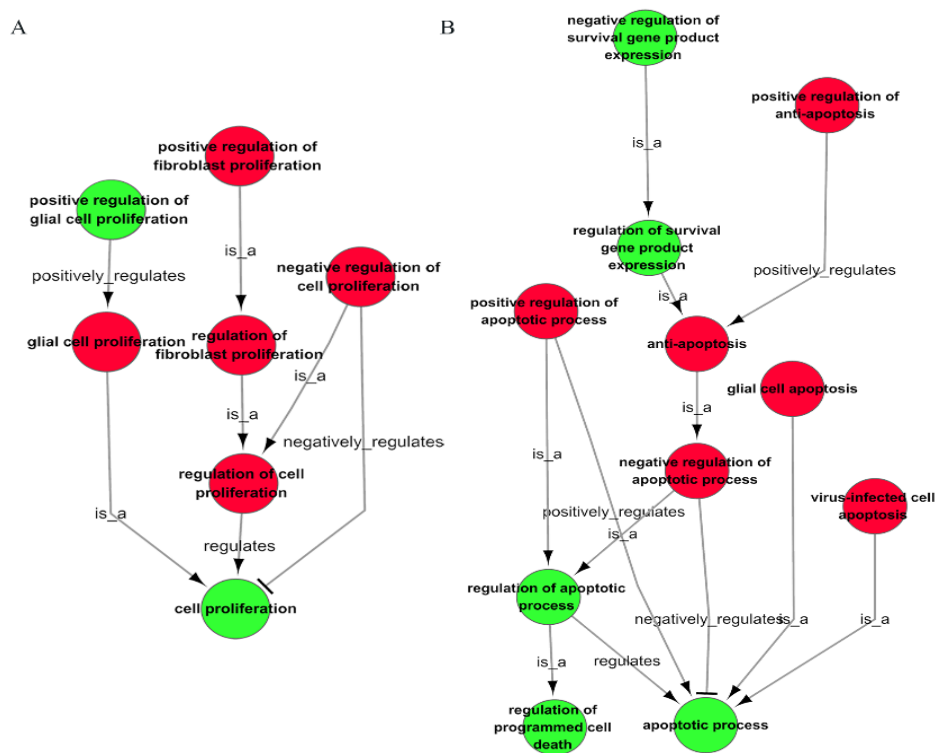


图 2.5 细胞增殖 (A)、凋亡 (B) 相关的 GO-TREE 分析

红色代表受 CSFV 石门株影响的基因，绿色代表响应 CSFV C 株感染的基因，黄色代表同时受 CSFV 石门株和 CSFV C 株影响的基因。

从图 2.7C 中可以看出以 JAK2 为代表的 JAK-STAT 通路具有 CSFV 强毒株感染应答的特异性，在 CSFV 石门株的感染的巨噬细胞中表现为显著性应答，而 CSFV C 株的感染不会造成 JAK2 的变化。JAK/STAT 信号通路是生长因子和细胞因子信号转导过程中必不可少的组成部分，已成为众多免疫、炎症和造血系统疾病的靶点。其被 CSFV 石门株影响的生物学机制有待探究。此外，免疫抑制一直被认为是病毒感染性疾病的一种可能机制。基于高通量测序方法对差异基因表达结果的计算分析表明，CSFV 石门株的感染可能介导了巨噬细胞的 JAK-STAT 通路抑制，导致感染 CSFV 石门株后的巨噬细胞正常信号通路的调控代谢发生改变。针对 JAK-STAT 展开研究有助于更深入地理解 CSFV 强毒株的临床病理机制。本课题系统比较了 CSFV 石门株与 CSFV C 株感染巨噬细胞后的基因表达差异，并通过趋势聚类分析和 GO-TREE，深度识别了 CSFV 石门株感染的基因表达变化。这些数据表明，CSFV 石门株可能通过多种途径引发炎症、抗凋亡活性以及改变细胞增殖，最终在巨噬细胞中实现感染。CSFV 石门株可能在感染巨噬细胞后影响 JAK-STAT 通路基因的表达改变，确切机制需进一步开展实验给予验证。

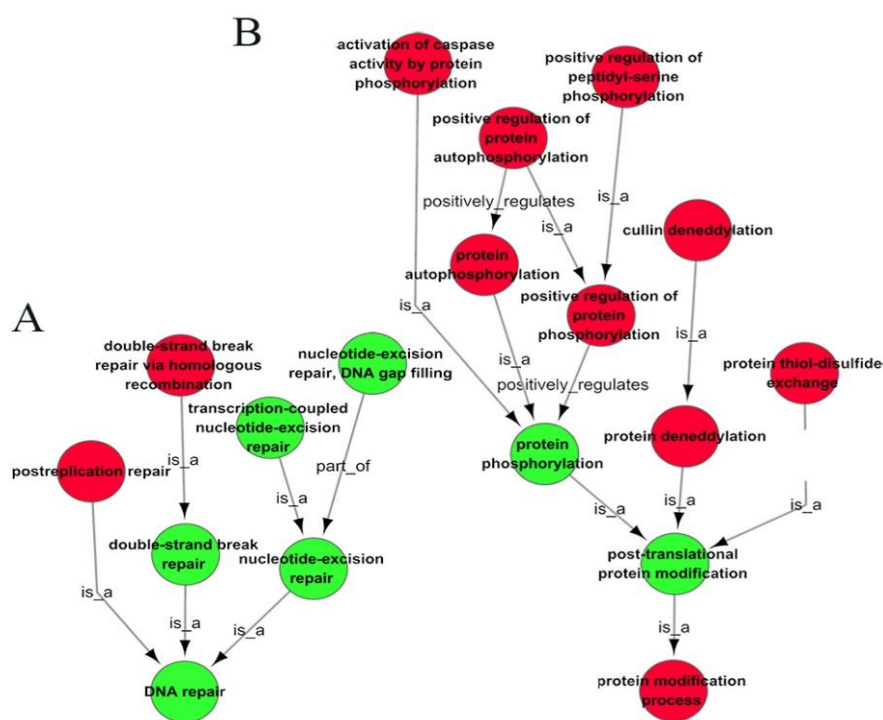


图 2.6 DNA 修复 (A) 和蛋白修饰进程 (B) 的 GO-TREE 分析

红色代表受 CSFV 石门株影响的基因，绿色代表响应 CSFV C 株感染的基因，黄色代表同时受 CSFV 石门株和 CSFV C 株影响的基因。

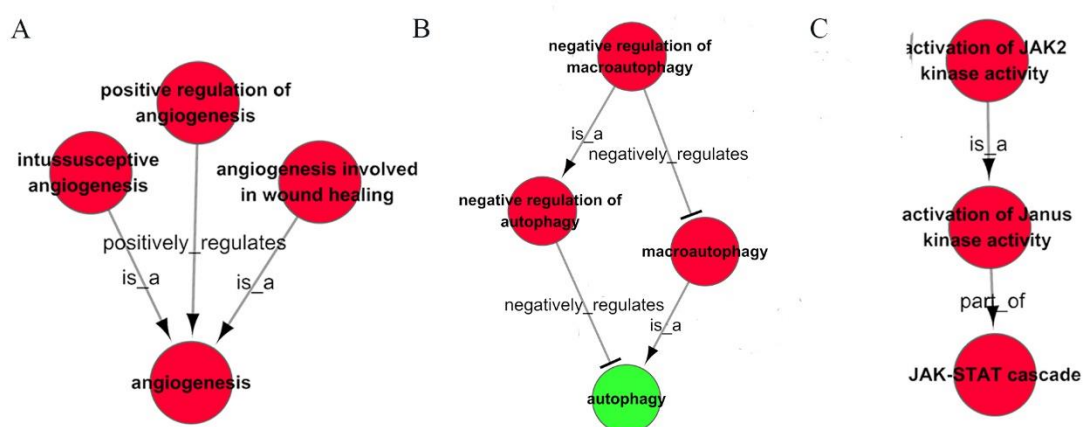


图 2.7 血管生成 (A)、自噬 (B) 与 JAK-STAT 通路 (C) 的 GO-TREE 分析

红色代表受 CSFV 石门株影响的基因，绿色代表响应 CSFV C 株感染的基因，黄色代表同时受 CSFV 石门株和 CSFV C 株影响的基因。

2.3.5 CSFV 石门株对巨噬细胞 *JAK1* 和 *JAK2* 转录水平的影响

本研究工作在对 JAK-STAT 信号通路 CSFV 石门株感染的产生的急性病症相关性开展实验检测之前,采用了生物信息学技术对相关基因表达开展分析,确定 JAK-STAT 信号通路只受 CSFV 石门株的影响(图 2.7C)。JAK/STAT 通路中个体成员在 CSFV 诱导的免疫反应中的具体作用仍不清楚。酪氨酸激酶(Janus Kinase, JAK)刺激细胞增殖、分化、迁移和凋亡。这些细胞生理活动对造血、免疫发育、乳腺发育和哺乳、脂肪生成、性发育和其他过程至关重要。因此,本课题首先关注 JAK 家族是否受到 CSFV 石门株感染的影响。JAKs 主要有 4 个成员:*JAK1*、*JAK2*、*JAK3* 和 *TYK2*,可以选择性地与各种细胞因子受体的胞质结构域相关联^[70]。*JAK1* 和 *JAK2* 是 JAKs 功能最广泛的基因,其作用范围从宿主防御和造血到生长和神经发育都有所涉及。选择本次高通量测序中检测的 *JAK1*、*JAK2*,将高通量转录组数据通过 R 语言绘制成热图获得其感染 CSFV 石门株后差异表达结果。结果表明 *JAK1* 和 *JAK2* 都对 CSFV 石门株产生差异性应答。其中 *JAK1* 上调应答,*JAK2* 下调应答。JAK-STAT 与免疫、炎症、病毒感染的发病机制密切相关。He 等人曾报道 HBV X 蛋白通过激活 JAK2/STAT3 信号通路,上调 *Bax/Bcl-2* 比值,导致肾小管上皮细胞凋亡,可能参与 HBV X 蛋白致肾组织损伤的发病机制^[71]。Li 等人的研究发现 IFN- λ 通过激活 JAK-STAT 途径介导其在 A549 细胞中的抗病毒免疫发挥其抗汉坦病毒效应^[72]。因此, JAKs 对 CSFV 石门产生差异性应答的具体机制有待深入的研究。

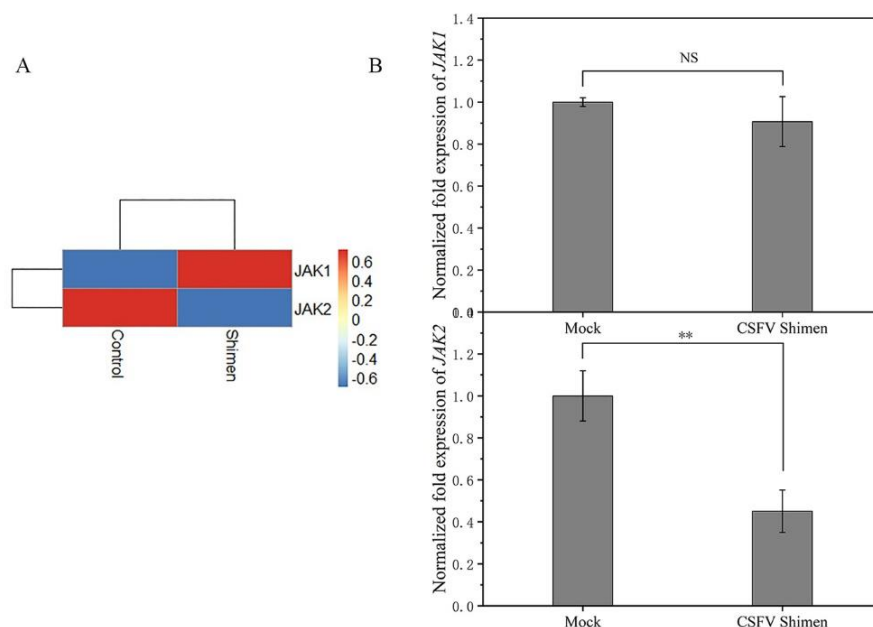


图 2.8 巨噬细胞 *JAK1*、*JAK2* mRNA 表达量

(A) *JAK1*、*JAK2* 高通量测序差异表达分析;(B) *JAK1*、*JAK2* 的 qPCR 检测。

借助高通量检测分析基因差异表达的先进性,对 CSFV 石门株感染后巨噬细胞 *JAK2* 转录水平的基因表达进行了分析,这些前期的研究工作对于深入开展 CSFV 感染巨噬细胞对 JAK-STAT 的调控机制给予了很好的数据支持。*JAK1*、*JAK2* 的基因表达差异分析显示,在 CSFV 感染巨噬细胞后 *JAK1*、*JAK2* 基因的转录谱发生了巨大变化。为进一步研究确认 CSFV 石门株感染对 JAK 家族成员在巨噬细胞中的表达影响,对 *JAK1*、*JAK2* 进行 mRNA 水平的检测,CSFV 石门株和控制组分别孵育 0、48 h, qPCR 检测 *JAK1*、*JAK2* mRNA 的相对表达量。如图 2.8B 所示, JAKs 作为细胞因子,在正常巨噬细胞中有转录表达,在感染 CSFV 石门株 48 h 后,CSFV 感染组与未感染组的表达数据的对比分析中, *JAK2* 的转录表达表现出下调的特点。而 *JAK1* 的 mRNA 表达量没有显著差异。

2.3.6 CSFV 石门株对巨噬细胞 JAK1 和 JAK2 蛋白表达的影响

感染 CSFV 石门株可引起转录水平的异常调节,改变其免疫机制。CSFV 石门株在宿主体内诱导免疫抑制调控,免疫抑制必然反映在蛋白质合成上。在明确了 CSFV 石门株复制与 JAKs 在转录水平的调控关系之后,本研究应用免疫印迹方法检测 CSFV 石门株感染对巨噬细胞中 JAK1, JAK2 蛋白合成的影响。收集感染 CSFV 石门株 0 h、12 h、24 h、48 h 的蛋白样品进行免疫印迹实验,如图 2.9 所示,CSFV 石门株感染巨噬细胞细胞后,能够显著性抑制巨噬细胞中 JAK2 的蛋白合成,而 JAK1 的蛋白表达量基本维持不变。蛋白水平的表达变化与基因水平基本吻合, β -Actin 作为内参蛋白标准化蛋白上样量。

JAK1 和 *JAK2* 是表达最广泛的两种酪氨酸激酶,并介导几种关键细胞因子的信号传导,包括 *IL-6*、*IL-23*、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、*IFN* 和红细胞生成素^[73]。随着靶向激活剂/抑制剂对个体 JAK/STAT 家族成员的选择性越来越高,确定激活剂/抑制剂治疗所需的 JAK-STAT 通路的特定成员,是至关重要的。在本研究中,利用 qPCR 和 Western blot 的方法,确定 *JAK2* 是 CSFV 抑制 JAK/STAT 通路激活的主要介质。

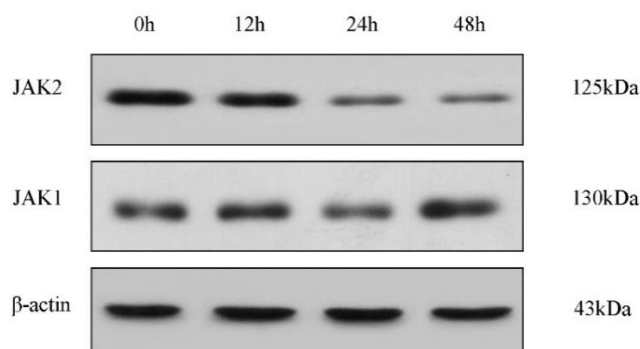


图 2.9 感染 CSFV 石门株的巨噬细胞中 JAK1、JAK2 蛋白的表达量

2.3.7 CSFV 石门株对 STATs 转录和蛋白水平的影响

JAK-STAT 信号通路主要由酪氨酸激酶相关受体、JAKs 和信号传导及转录激活因子 (Signal transducers and activators of transcription, STAT) 三部分组成。STATs 是转录因子家族的成员, 该家族根据多种不同的细胞因子激活基因转录。STATs 是潜伏的细胞质蛋白, 在细胞因子暴露后, 通过细胞因子受体相关的 JAK 激酶迅速被酪氨酸激活。激活的 STATs 进入细胞核, 在特定的靶基因的增强子序列上结合为二聚体或更复杂的低聚物, 从而调节他们的转录, 以促进参与细胞增殖、分化和炎症的靶基因的表达。已有与 STATs 研究相关表明, STATs 在免疫方面有极大的作用。STAT 家族成员目前已经确定的成员有 *STAT1*、*STAT2*、*STAT3*、*STAT4*、*STAT5A*、*STAT5B*。鉴于 *JAK2* 的检测结果, 本研究进一步评估了 CSFV 石门株诱导 *JAK2* 的关键下游因子的 STATs 关键基因转录水平的表达。如图 2.10 所示 STATs 作为细胞因子, 在正常巨噬细胞中有转录表达, 随着 CSFV 石门株感染复制的增加, 只有 *STAT4* 的转录呈现下调趋势。进一步的免疫蛋白印迹实验证实了感染 CSFV 后巨噬细胞中 *STAT4* 蛋白表达量下调 (图 2.11)。通过一系列的生物信息学实验和分子蛋白实验得到 CSFV 的感染会抑制 JAK2-STAT4 通路的表达。JAK2-STAT4 信号通路是一条对细胞因子信号传输很重要的通路, 在细胞增殖、分化、凋亡、免疫调节、炎症等多种病理生理过程的控中发挥重要作用。目前的研究表明, 在 CSFV 石门株复制过程中, JAK2-STAT4 信号通路的转录表达水平下调。这些研究结果都提示了 CSFV 石门株形成病毒逃逸的关键机制, 也就是通过抑制免疫的发生来实现自身获得持续性感染。

JAK-STAT 信号通路是一个经典的先天性免疫应答通路, JAK-STAT 信号通路的功能失调可能会导致免疫缺陷综合征及癌症等疾病。因此 JAK-STAT 被认为是病毒抑制免疫反应的重要靶点之一。通过 qPCR 检测首次发现 CSFV 石门株对 *JAK2* 的一个关键下游基因 *STAT4* 基因的抑制作用, 与巨噬细胞的生理功能密切相关。*STAT4* 是一种关键的转录因子, 在细胞介导的免疫反应的产生中起重要作用。目前的研究表明 *STAT4* 对巨噬细胞的发育和功能都有影响。Schindler 等人的研究显示 *STAT4* 缺陷巨噬细胞引起 IFN- γ 低表达。此外, 他们还证明 *STAT4* 不仅是 IFN- γ mRNA 表达所必需的, 也是 IFN- γ mRNA 进入细胞核的易位所必需的关键基因^[74]。随着 CSFV 石门株的复制, 平衡调节细胞的正常生长途径可能受损, 最终导致猪的临床疾病。因此, JAK-STAT 信号通路被认为是 CSFV 石门株对巨噬细胞功能影响进而产生急性病症的重要调控因子。结合 2.3.5 中的 GO-TREE 分析结果, 表明 JAK2 信号通路可能是引起感染性病毒病的重要因素, 为进一步研究 CSFV 的致病机制提供了新的研究思路。

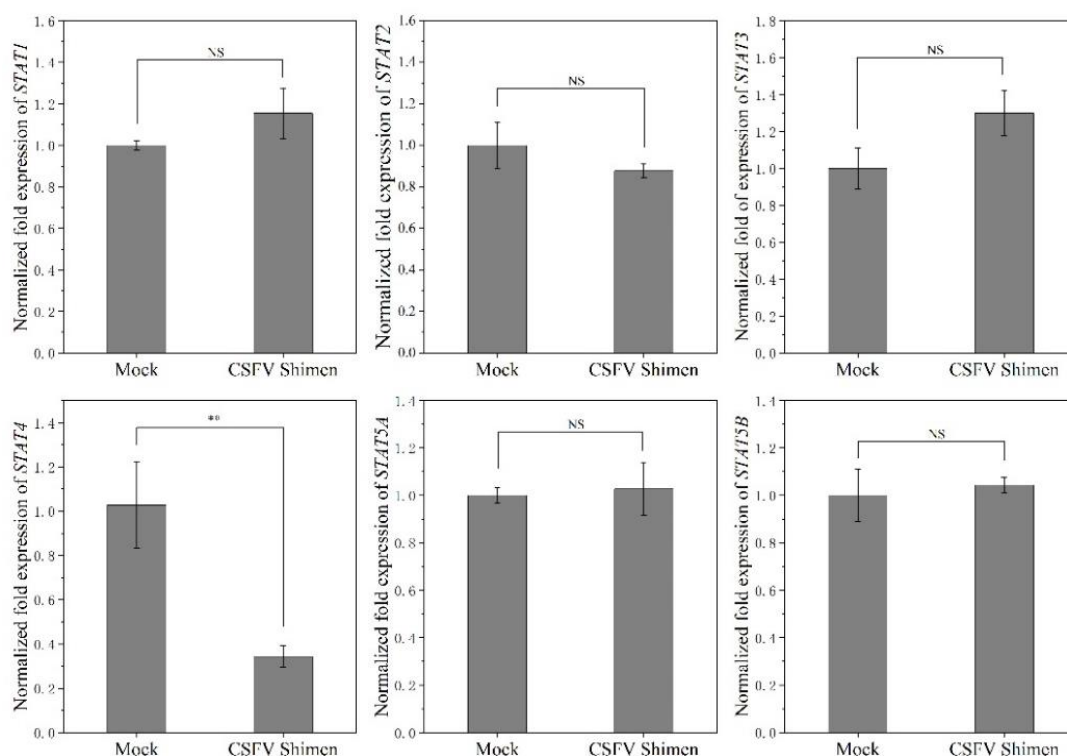


图 2.10 感染 CSFV 石门株的巨噬细胞 STATs 的 mRNA 表达量

(A) *STAT1*; (B) *STAT2*; (C) *STAT3*; (D) *STAT4*; (E) *STAT5A*; (F) *STAT5B*。

病毒在进化过程中发展出多种机制来逃逸或降解宿主免疫系统的主要分子^[75,76]。已经证实, CSFV 通过干预 IFN 信号通路(包括 IRF-3 的蛋白酶体降解)来逃避宿主的先天免疫应答,这使得病毒能够有效地复制并建立成功的感染^[77,78]。CSFV 对宿主的侵染过程中也存在这种免疫逃避,有报道认为 CSFV 的 Npro 蛋白在这种对宿主先天免疫反应的逃避中起着关键作用。由于 CSFV Npro 蛋白的存在,CSFV 抑制 Poly(I:C) 激活巨噬细胞 *IFN-I* 的进程。Liu 等人的研究发现感病毒非结构蛋白 1 通过抑制 JAK-STAT 启动子的 DNA 甲基化来调控 JAK-STAT 信号的一些关键调控因子的表达以对抗宿主干扰素应答过程^[79]。野生型麻疹病毒通过 JAK/STAT 途径抑制 IFN 信号转导进而对抗宿主先天免疫系统^[80]。通过本章的研究可以推断 CSFV 通过抑制 JAK-STAT 的表达来对抗免疫应答,进而在巨噬细胞中实现持续性的复制。JAK-STAT 通路是影响 CSFV 石门株感染巨噬细胞的重要反应调节剂。

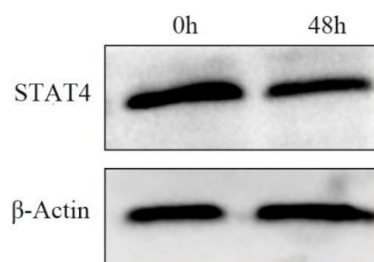


图 2.11 感染 CSFV 石门株的巨噬细胞中 STAT4 蛋白的表达量

小结

利用高通量测序获得 PAMs 的 DGE, 分别筛选出 CSFV 石门株和 CSFV C 株差异响应基因。GO 富集分析表明, CSFV 石门株感染引起巨噬细胞基因在一系列生物学过程、分子功能和细胞成分的变化中发生异常活动。GO-TREE 分析 PAMs 感染 CSFV 石门株和 CSFV C 株导致的基因表达差异, 确定具体改变生理功能的作用毒株。发现 JAK-STAT 通路特异性应答 CSFV 石门株。应用差异基因分析, 识别出 *JAK2* 基因是 CSFV 石门株感染后巨噬细胞后下调表达的基因, 以此为依据开展 qPCR 和 Western Blot 试验, 验证了 CSFV 石门株的感染确能引起 *JAK2* 在 mRNA 转录及蛋白合成水平的下调表达。进一步对 STATs 进行 qPCR 检测发现 *STAT4* 和 *JAK2* 的表达同样被 CSFV 抑制。

第三章 CSFV 石门株感染致巨噬细胞 VEGF-A 上调表达

3.1 引言

CSFV 在家猪中引起一种特别的传染病，被称为经典猪瘟，已被世界动物卫生组织列为一种高度传染性疾病。急性猪瘟通常伴有出血性淋巴结炎和皮肤、肾脏及其他器官的弥漫性出血，往往在短时间内导致高死亡率^[81]。弥漫性出血在猪瘟中发生的机制尚不完全清楚。*VEGF-A* 是 VEGF 家族的典型成员，在哺乳动物血管发育和与血管异常生长有关的疾病中发挥着重要作用。病理研究表明，VEGF 是肿瘤和炎症性疾病引发血管病变，生成新的血管过程的积极参与者^[82]。肿瘤细胞产生的 VEGF 可刺激肿瘤组织新生血管生成和肿瘤生长。同时 *VEGF-A* 在不同炎症性疾病中都有很重要的作用，阻断其信号通路被认为是治疗炎症性疾病的一种保护策略^[83]。近年来，在人类病毒感染引起的促炎环境中发现 *VEGF-A* 水平升高^[84]，进一步激发了 *VEGF-A* 的研究热度。巨噬细胞是先天免疫的重要组成部分，具有抑制和促进细胞增殖以及组织修复的多种功能^[85]。CSFV 石门株虽然造成急性器质性损伤，但没有明显的细胞病变效应，而且在巨噬细胞中高效增殖^[56]。巨噬细胞介导的炎症反应是否促进猪瘟出血机制尚不清楚。本研究在分析已获得的数字基因表达谱的基础上，确定 *VEGF-A* 是 CSFV 石门株感染巨噬细胞的潜在致病因子，确切的结论将在本章节开展实验给予验证。

3.2 实验

3.2.1 仪器与耗材

(1) 主要仪器

细胞培养、接毒、qPCR 和 Western blot 所需部分仪器同表 2.1。常规 PCR 及激光共聚焦所需仪器如表 3.1 显示。

表 3.1 常规 PCR 和激光共聚焦实验主要仪器

仪器	公司	国家
常规 PCR 仪	Bio-rad 公司	美国
水平电泳仪	君意东方电泳设备有限公司	中国
凝胶成像系统	Invitrogen 公司	美国
激光共聚焦显微镜	奥林巴斯	日本

(2) 主要试剂与耗材

细胞类实验及病毒感染所需细胞株、病毒及细胞培养试剂耗材同表 2.2。分子生物学类实验用试剂与耗材同表 2.3。Western blot 实验用试剂与耗材同表 2.4。激光共聚焦用试剂与耗材如表 3.2 所示。其它实验常规试剂如甲醇、丙酮、TritonX 等试剂均购自于西安海默生物。

表 3.2 常规 PCR 及激光共聚焦用试剂与耗材

试剂与耗材	公司	国家
琼脂糖	Biowest 公司	法国
2×TagMix	天根	中国
GeneGreen 核酸染料	天根	中国
VEGF-A 一抗	CST 公司	美国
CSFV E2 一抗	铭善上生物公司	中国
驴抗兔 IgG 共轭 Alexa Fluor® 594	赛默飞公司	美国
驴抗鼠 IgG 共轭 Alexa Fluor®488	赛默飞公司	美国
共聚焦小皿	Corning 公司	美国
DAPI	碧云天生物公司	中国

3.2.2 VEGF-A 的基因表达差异分析

基因表达差异分析步骤同 2.2.3。

3.2.3 VEGF-A 蛋白互作分析

使用 STRING 10.5 版(<https://string-db.org/>)。从猪的资源数据库中选择了与 VEGF-A 相互作用的蛋白。

3.2.4 VEGF-A 的 GO 富集分析

选取与 VEGFA 互作蛋白如 2.2.4 生成 GO 富集分析图。

3.2.5 VEGF-A 的引物设计

根据 NCBI 公布的 SusScofa *VEGF-A* (基因登陆号: NM_214084.1) 的序列作为参考序列来设计引物, 采用 Primer 6.0 设计引物。*VEGF-A* 基因的特异性上游引物序列为: 5'-CCTTGCTGCTATACCTCCAC-3'; 下游引物序列为 5'-CACTCCAGACCTTCGTCGT-3'。PCR 扩增产物预期为 241bp。引物由擎科生物公司

合成。

3.2.6 细胞培养和病毒感染

巨噬细胞培养及石门株感染过程同 2.2.6。

3.2.7 巨噬细胞 RNA 的提取

RNA 提取步骤同 2.2.8。

3.2.8 cDNA 的合成

cDNA 的合成步骤同 2.2.9。

3.2.9 qPCR 检测 VEGF-A mRNA 的表达量变化

采用 qPCR 对 VEGF-A mRNA 相对表达量进行定量分析。以 β -Actin 为内参基因。qPCR 反应体系与程序同 2.2.10。qPCR 分析每孔重复三次，和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达水平。

3.2.10 Western Blot 检测 VEGF-A 蛋白表达量的变化

确定巨噬细胞中 VEGF-A 是否在接种病毒 0 h、12 h、24 h 和 48 h 后对 CSFV 石门株感染作出反应。使用 RAPI buffer 对巨噬细胞进行裂解，并按照 2.2.11 描述的步骤进行免疫蛋白印迹实验。

3.2.11 VEGF-A 蛋白的激光共聚焦（Confocal）检测

将感染 CSFV 石门株 24 h 后的巨噬细胞同控制组细胞用磷酸盐缓冲盐水（PBS）洗涤三次，以甲醇/丙酮（比例 1:1）在 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下固定 20 min，然后用 1% Triton X-100 在 PBS 中通透 10 min。在 PBS 洗涤三次后，样本用 E2 抗体和 VEGF-A 抗体在 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵化 1 h，紧随其后用二抗（稀释比 1:200）染色 1 h， $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI）染色巨噬细胞细胞核。激光扫描共聚焦显微镜拍照。

3.2.12 统计学分析

步骤同 2.2.12。

3.3 结果与讨论

3.3.1 生物信息学分析结果

由于 *VEGF-A* 作为血管生长因子，参与新生血管生成。2.2.3 中图 2.7A 的 GO-TREE 分析结果也表明 CSFV 石门株感染巨噬细胞会影响血管新生，这引起本课题对 *VEGF-A* 的兴趣。差异基因表达分析的结果表明 *VEGF-A* 在 CSFV 石门株感染的 PAMs 中的表达量明显高于未感染组(图 3.1A)。为了进一步了解 *VEGF-A* 参与的生理活动，通过蛋白互作分析发现 *VEGF-A* 与多种蛋白相互作用，包括纤溶酶原激活物抑制剂-1、血小板反应蛋白 1 和肝细胞生长因子(图 3.1B)。对这些互作蛋白进行 GO 分析，结果显示 *VEGF-A* 的异常表达与异常基因功能调控组相关，如血管生成和局灶性粘连组装的阳性调控(图 3.1C)。

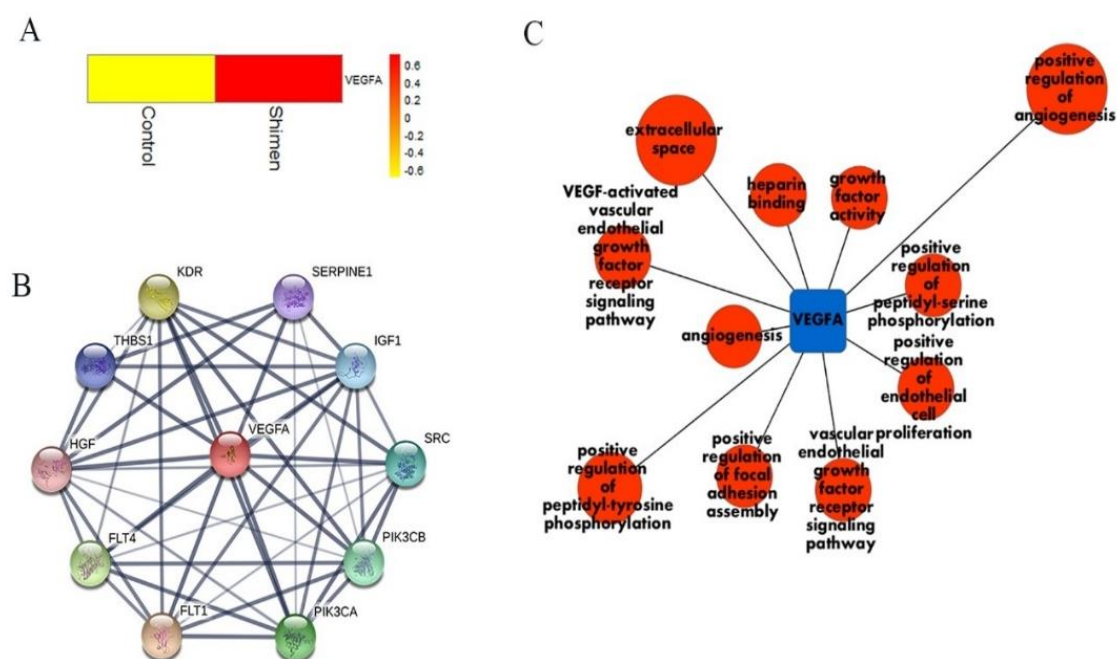


图 3.1 *VEGF-A* 的生物信息学分析

(A) *VEGF-A* 高通量测序基因表达差异分析；(B) *VEGF-A* 蛋白互作分析；(C) *VEGF-A* GO 富集分析，圆圈越大代表富集越大。

3.3.2 PCR 和 qPCR 检测 CSFV 感染 PAMs 拷贝数的变化

鉴于 *VEGF-A* 互作蛋白主要在血管生成的阳性调节过程中富集，对 CSFV 感染 PAMs 0 h、12 h、24 h 和 48 h 样品提取 RNA，进行 PCR 和 qPCR 的检测， β -Actin 作为内参基因。PCR 结果显示在 β -Actin 表达量基本一致的情况下，CSFV 的条带亮度随感染时间的增长而变亮(图 3.2A)。qPCR 的结果也显示 CSFV 的相对表达量随时

间的增加而增加(图 3.2B)。证实了 CSFV 石门株感染呈时间依赖性。结果表明 PAMs 样品被 CSFV 感染。

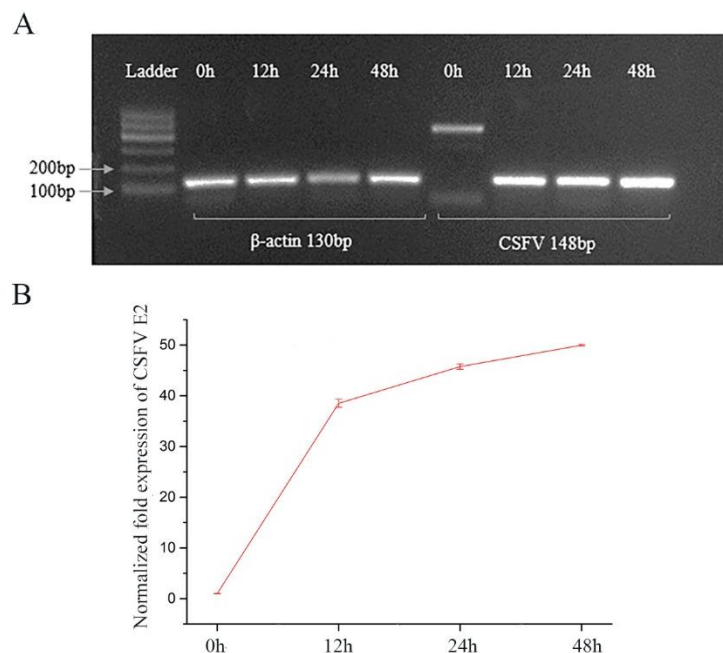


图 3.2 巨噬细胞 CSFV 感染 PCR 检测

(A) 巨噬细胞 CSFV 感染常规 PCR 检测 (B) 巨噬细胞 CSFV 感染 qPCR 检测拷贝数

3.3.3 qPCR 验证 PAMs 感染 CSFV 石门株 VEGF-A mRNA 上调表达

采用 qPCR 法检测 VEGF-A 和 mRNA 在 CSFV 感染 48 h 过程中的表达情况, 在 CSFV 石门株感染 0~48 h 组间差异有统计学意义, Control 组之间没有显著性差异, 提示 VEGF-A 的表达模式与差异基因表达分析预测的相似, 也就是巨噬细胞感染 CSFV 石门株后 VEGF-A mRNA 上调表达(图 3.3)。

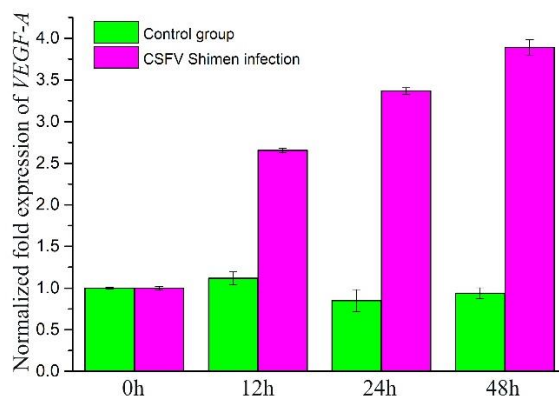


图 3.3 CSFV 感染 PAMs VEGF-A 的表达量 qPCR 检测

3.3.4 Western blot 和 Confocal 验证 PAMs 感染 CSFV 石门株后 VEGF-A 蛋白上调表达

进一步经 Western blot 分析证实, CSFV 石门株感染后 PAMs 中 VEGF-A 蛋白表达增加。E2 是 CSFV 中的一种结构蛋白,它反映了 CSFV 在细胞样本中的复制程度。在 CSFV 石门株感染 PAMs 后, PAMs 中 VEGF-A 的表达呈时间依赖性,同时 CSFV 石门株感染后 E2 表达增加(图 3.4), β -Actin 基本保持不变。用激光共聚焦显微镜观察 VEGF-A 和病毒蛋白 E2 是否在培养的 PAMs 中发生了时间和/或空间共定位。用荧光标记 E2、VEGF-A 处理 PAMs。CSFV 石门株感染 PAMs 24 h 后追踪细胞定位。观察 E2 和 VEGF-A 共定位于 CSFV 石门株感染的 PAMs 中。CSFV 石门感染组与未感染组相比,随着 E2 表达量的增强, PAMs 中 VEGF-A 的蛋白表达量显著增强(图 3.5)。

一般来说,当组织受到病原体的挑战时,巨噬细胞被激活,产生大量促炎介质,杀死入侵的有机体,激活适应性免疫^[86]。作为强毒株,CSFV 石门株感染的特点是发热后约两周出现高烧和弥漫性出血热症状,这表明在体内发生了出血病理改变。众所周知,VEGF 家族在血栓破裂、血管生成和增加血管通透性中起着核心作用^[87]。VEGF 在血管生成的起始阶段增加血管通透性。有趣的是,之前在感染 CSFV 石门株的猪脐静脉内皮细胞中观察到 *VEGF-C* 的上调^[69]。

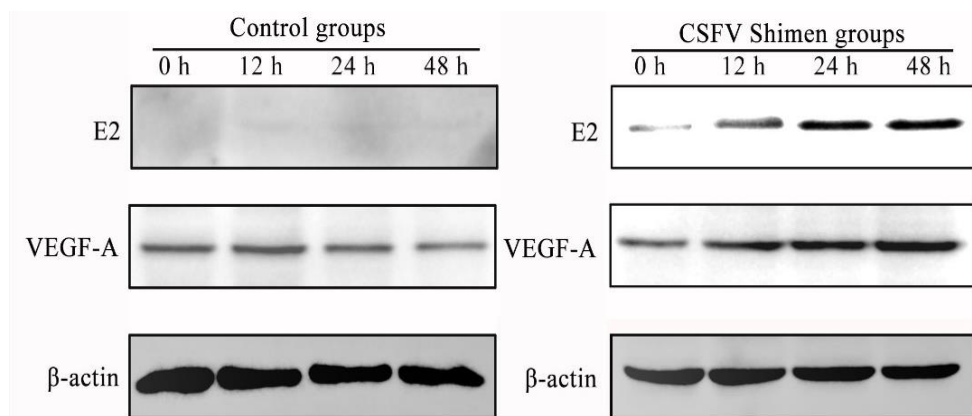


图 3.4 巨噬细胞 CSFV 感染 VEGF-A 蛋白表达量 Western Blot 检测

与以往的研究一致,本课题认为 CSFV 毒株感染巨噬细胞直接产生促炎环境,导致毛细血管炎症和血管炎。基于以上研究结果,认为 *VEGF-A* 的上调表达在巨噬细胞对 CSFV 石门株感染的炎症反应中起重要作用。本研究表明,CSFV 石门株感染在转录和翻译水平上均触发巨噬细胞 *VEGF-A* 反应。巨噬细胞募集 *VEGF-A* 在诱导炎症性新生血管生成和淋巴管生成中起重要作用^[88]。*VEGF-A* 在病毒性传染病,特别是出血病变中的作用已经得到了探索。Jones 等人之前的报告显示水痘带状疱疹病毒感染导

致脑血管细胞中 *VEGF-A* 水平显著升高^[89]。1-型单纯疱疹病毒通过上调 *VEGF-A* 的表达直接诱导角膜血管化，而阿柏西普（VEGF-Trap）作为 VEGF 的抑制剂，可以抑制血管生成，角膜血管化及控制眼部病变^[90]。病毒性出血热的一个共同特征是病毒进入巨噬细胞和树突状细胞，从而引起细胞病变。克里米亚-刚果出血热（Crimean-Congo haemorrhagic fever, CCHF）的临床症状包括急性病毒性发热、瘀斑和血小板减少，最近的一项研究显示，CCHF 患者的 *VEGF-A* 水平显著升高^[91]。以上数据支持 VEGF 家族参与急性猪瘟的病理机制，以及其对 CSFV 石门株引起的弥散性出血机制的可能作用。

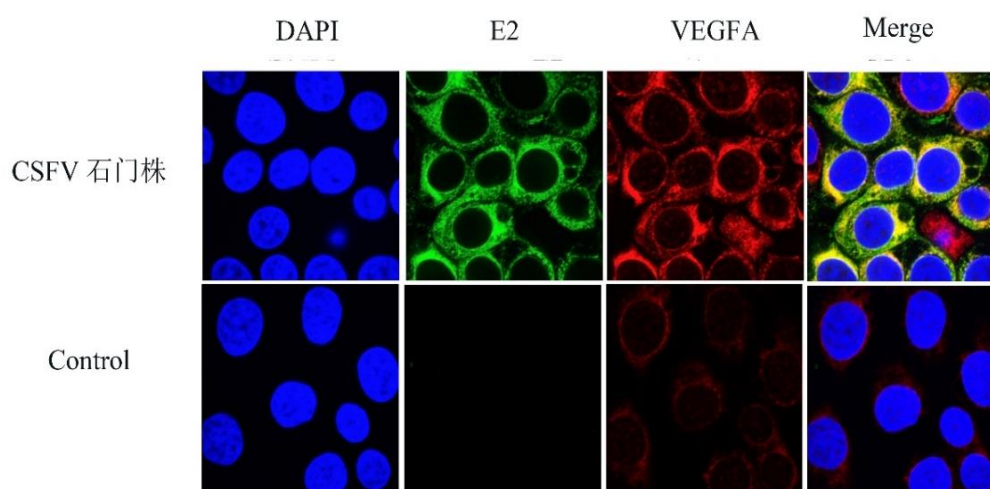


图 3.5 巨噬细胞 CSFV 感染 VEGF-A 蛋白表达量激光共定位检测

小结

CSFV 石门株引起猪瘟的主要特征是弥漫性血管内出血。巨噬细胞是机体对病原微生物先天免疫的重要组成部分，然而，巨噬细胞在猪瘟发病中的作用尚不清楚。*VEGF-A* qPCR 检测和 Western blot 分析证实，感染后 *VEGF-A* 在转录和翻译水平均显著上调。此外，共聚焦显微镜分析表明 VEGF-A 与 CSFV 蛋白 E2 在不同时间点上共定位。

第四章 Poly(I:C)的抗病毒作用及其在 JAK-2 及 VEGF-A 应答 CSFV 侵染中的调节作用

4.1 引言

宿主的先天免疫反应是抵御包括 CSFV 在内的许多病原体入侵的第一道防线。在进化过程中,宿主发展出一系列控制病毒感染的机制。有充分的证据表明,先天免疫反应对感染发展成疾病有很大的影响。巨噬细胞作为免疫系统的第一道防线是 CSFV 的主要靶细胞之一。Poly(I:C)是一种重要的免疫调节剂,产生免疫刺激的具体的分子机制尚未完全确定。用 Poly(I:C)处理的 PAMs,可以对宿主-病原体相互作用的机制提供有价值的见解。因此,在本研究中,使用 Poly(I:C)诱导 PAMs 对病毒感染的反应,以帮助了解巨噬细胞对 CSFV 石门株的反应机制。研究表明, Poly(I:C)诱导了一个类似抗病毒免疫反应。

了解到 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用后,本章进一步通过探索 Poly(I:C)和 CSFV 在巨噬细胞 VEGF-A 和 JAK-STAT 信号通路上是否产生拮抗作用,研究了 Poly(I:C)抑制 CSFV 复制特性的可能机制,在本研究中,通过对 Poly(I:C)与 CSFV 在巨噬细胞上拮抗作用的研究探讨了可能的抗病毒机制,通过实验检验 Poly(I:C)刺激后的 CSFV 石门株感染巨噬细胞,CSFV 的复制是否受到抑制, JAK-STAT 信号通路和 VEGF-A 表达是否产生影响。因此,本研究的目的是检测在 Poly(I:C)影响下巨噬细胞中基因的差异表达,以便更好地了解 Poly(I:C)在巨噬细胞系中引起的转录变化。

4.2 实验

4.2.1 仪器与耗材

(1) 主要仪器

RNA 完整性检验及常规 PCR 仪器同表 3.1。qPCR 仪器同表 2.1。免疫荧光显微镜为德国徕卡公司产品。

(2) 主要试剂与耗材

细胞类实验及病毒感染所需试剂耗材同表 2.2。Poly(I:C)为美国 Sigma 公司产品。分子生物学类实验用试剂与耗材同表 2.3。免疫荧光用试剂与耗材同表 3.2。

4.2.2 细胞培养和病毒感染

PAMs 培养及石门株感染过程同 2.2.6。

4.2.3 巨噬细胞 RNA 的提取

RNA 提取步骤同 2.2.8。

4.2.4 RNA 完整性验证

用 1% 琼脂糖凝胶 (2 mg 琼脂糖, 100 mL TAE 缓冲液) 电泳验证 RNA 的完整性, 120 V, 30 min。RNA 每孔点样 2 μ L, RNA 浓度为 500-1000 ng/ μ L, RNA 由负极向正极电泳。电泳结束后将凝胶放入凝胶成像系统观察 RNA 的电泳结果。

4.2.5 cDNA 的合成

cDNA 的合成步骤同 2.2.9。

4.2.6 PCR 检测 Poly(I:C) 对 CSFV 复制的抑制作用

PCR 体系: 2 $\times$ Taq Mix 5 μ L, cDNA 2.0 μ L, 上、下游引物各 1.5 μ L。PCR 按以下程序反应: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 永久。制备 2% (2 mg 琼脂糖, 100 mL TAE 缓冲液) 的胶, 冷却后成型后进行电泳, 120 V, 30 min。电泳结束后用凝胶成像系统观察电泳胶并且采集相应的照片。

4.2.7 qPCR 验证 Poly(I:C) 对 CSFV 复制的抑制效果以及对信号通路的拮抗作用

qPCR 实验步骤同 2.2.10。

4.2.8 免疫荧光验证 Poly(I:C) 对 CSFV 复制的抑制效果

免疫荧光样品制备步骤同 3.2.11。结果用免疫荧光显微镜观察。

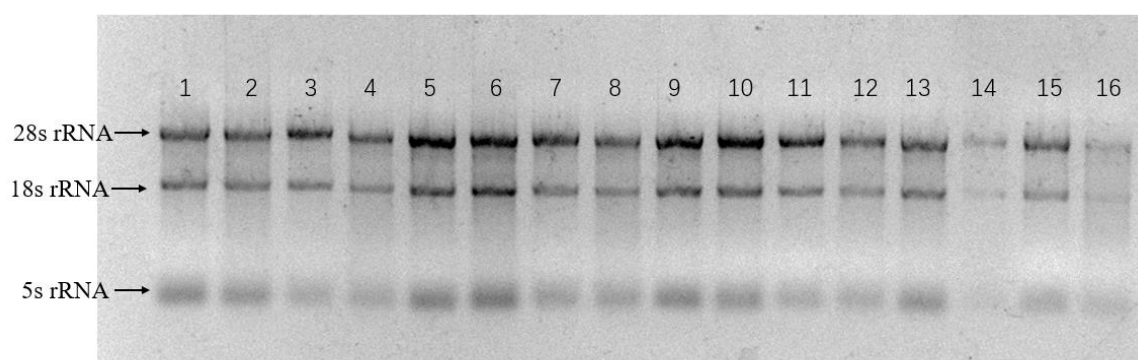


图 4.1 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性

4.3 结果与讨论

4.3.1 RNA 完整性检测及预实验 PCR 检测 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用

为了验证 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用, 设置了四个实验组: 未感染组、CSFV 石门株感染组、Poly(I:C)单加组、Poly(I:C)和 CSFV 双加组。CSFV 石门株感染组、Poly(I:C)和 CSFV 双加组受 CSFV 侵染 2 h 后, 吸取上清, 将未感染组和 CSFV 石门株感染组换上含 2%胎牛血清新鲜的 1640 培养基、Poly(I:C)和 CSFV 双加组换上 2 μ g/mL Poly(I:C)稀释液。孵育 2 h 后分别于 0 h, 12 h, 24 h, 48 h 收样。如图 4.1 为部分 RNA 完整性验证结果。泳道 1~4 分别为 Mock 组 0 h~48 h; 泳道 5~8 分别为 Poly(I:C)单加组 0 h~48 h; 泳道 9~12 分别为 CSFV 感染组 0 h~48 h; 泳道 12~16 分别为 CSFV 和 Poly(I:C)共孵育组 0 h~48 h。琼脂糖凝胶电泳结果显示 28S、18S 及 5S 小分子 RNA 条带, 说明提取的 RNA 完整性较好。28S 和 18S RNA 比值约为 2: 1, 表明本次提取的 RNA 没有降解。将 RNA 反转成 cDNA 后, 采用常规 PCR 进行预实验检测 CSFV 的表达量, 如图 4.2 所示, 实验组的 β -Actin 表达量基本一致, 表明 cDNA 的量基本相同。未感染组 CSFV 没有扩增出条带。无论是在 CSFV 石门株感染组或 Poly(I:C)和 CSFV 双加组, 经 PCR 扩增后均得到位置相同、大小约 148bp 的条带, 与预期的产物大小相同。CSFV 石门株感染组 0 h~48 h, 条带逐渐变亮。CSFV 感染的细胞在 Poly(I:C)处理后虽然仍有 CSFV 的条带, 但亮度明显低于 CSFV 石门株感染组。预实验的结果表明 Poly(I:C)对 CSFV 有一定的抗病毒作用 (图 4.2)。

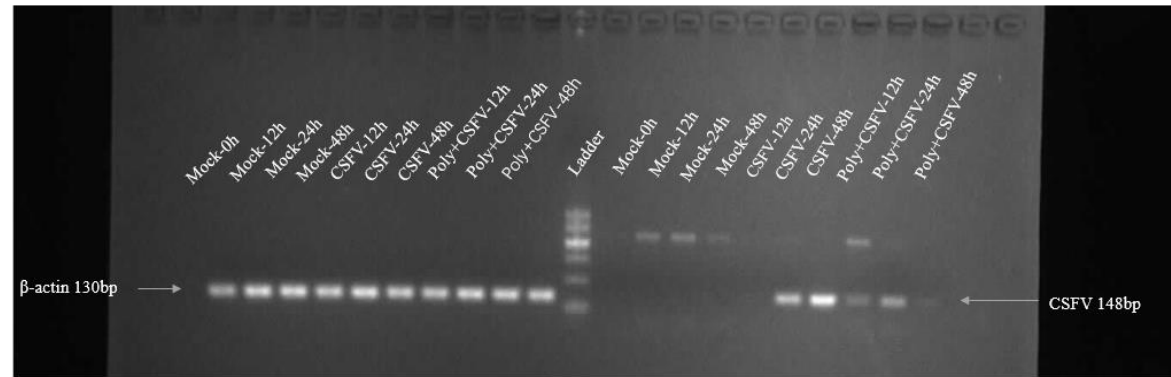


图 4.2 Poly(I:C)抑制 CSFV 复制 PCR 预实验

4.3.2 qPCR 验证不同浓度 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用

Poly(I:C)是广谱的抗肿瘤和抗病毒药物。一直作为免疫佐剂在猪瘟病毒的治疗上发挥着作用。为了验证不同浓度 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用, 将实验分为两组: Control 组和病毒感染组。病毒侵染 PAMs 2 h 后, 吸取上清, Control 组换上新鲜

的 1640 培养基（含 2%胎牛血清），病毒感染组分别加入 0 $\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C)、1 $\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C)、2 $\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C)，三个重复，Poly(I:C)采用含 2%的胎牛血清的 1640 培养基稀释。24 h 后收集样品使用实时荧光 PCR 检测 CSFV 的拷贝数，将病毒感染组与 Control 组的数据进行对比，如图 4.3 所示，得到 Poly(I:C)有一定抗病毒作用的结果，且 Poly(I:C)的浓度越高，对病毒的抑制作用越好。Control 组没有因 Poly(I:C)浓度产生显著性差异。

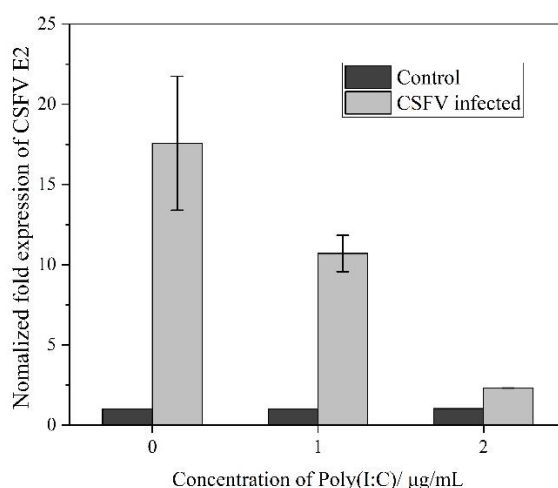


图 4.3 不同浓度的 Poly(I:C)抑制 PAMs 中 CSFV 复制

4.3.3 qPCR 验证不同时间梯度 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用

为了进一步验证 Poly(I:C)对病毒的抑制作用是否受时间影响，如图 4.4 所示，实验分为四组：Mock 组、CSFV 石门株感染组、Poly(I:C)组、Poly(I:C)和 CSFV 双加组。CSFV 石门株感染组、Poly(I:C)和 CSFV 双加组受 CSFV 侵染 2 h 后，吸取上清，将 Mock 组和 CSFV 石门株感染组换上新鲜的 1640 培养基（含 2%胎牛血清），Poly(I:C)组、Poly(I:C)和 CSFV 双加组换上 2 $\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C)稀释液。孵育 2 h 后分别于 0 h，12 h，24 h，48 h 收样。使用 qPCR 检测 CSFV 的拷贝数，发现 24 h 后 Poly(I:C)和 CSFV 双加组的 CSFV 拷贝数显著低于 CSFV 组，且 48 h 后差异增大。得到 Poly(I:C)的抗病毒作用的结果随着时间的增加，对病毒的抑制作用越好（图 4.4）。

4.3.4 免疫荧光在蛋白水平验证 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制作用

Poly(I:C)对 CSFV 在核酸水平的抑制得到了验证，其是否对 CSFV 的蛋白合成产生了抑制作用。E2 蛋白作为 CSFV 的四种结构蛋白（C，Erns，E1，E2）之一，常被作为 CSFV 蛋白表达量的标准之一。进一步通过免疫荧光验证 Poly(I:C)对病毒的转录翻译是否有抑制作用，如图 4.5 所示，实验分为四组：Mock 组、CSFV 石门株感染组、Poly(I:C)组、Poly(I:C)和 CSFV 双加组。CSFV 石门株感染组、Poly(I:C)和 CSFV

双加组受 CSFV 侵染 2 h 后, 吸取上清, 将 Mock 组和 CSFV 石门株感染组换上新鲜的 1640 培养基 (含 2% 胎牛血清), Poly(I:C) 组、Poly(I:C) 和 CSFV 双加组换上 $2\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C) 稀释液。孵育 2 h 后于 24 h 收样。如图 4.5 所示, 使用免疫荧光检测 CSFV 的 E2 的表达量, 用 DAPI 标记细胞核, 发现 E2 蛋白主要定位于细胞质。Mock 组和 Poly(I:C) 组没有 E2 表达, CSFV 单加组有较高的 E2 表达, 而 Poly(I:C) 和 CSFV 双加组虽然有 E2 蛋白的表达, 但感染细胞明显少于 CSFV 组。通过免疫荧光结果得到 Poly(I:C) 的抑制病毒作用的在蛋白水平同样有效。RNA 和蛋白水平的验证共同证明 Poly(I:C) 是 CSFV 病毒感染的抗病毒效应剂。

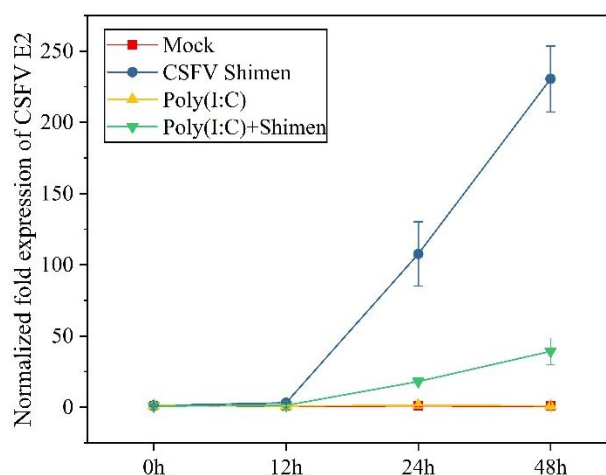


图 4.4 不同时间点的 Poly(I:C) 抑制 PAMs 中 CSFV 复制

4.3.5 Poly(I:C) 和 CSFV 在 JAK2-STAT4 通路上产生拮抗作用

JAK/STAT 信号通路与先天免疫系统相关, 在介导机体对病毒感染的免疫反应中发挥重要作用。已有研究表明, 与 CSFV 同属于黄病毒科成员的 HCV, 最终依赖宿主细胞通过抑制 JAK-STAT 信号通路进行复制^[92]。乙肝感染患者外周血单核细胞中基质金属蛋白酶 9 被激活, 进而抑制 JAK-STAT 通路, 促进 HBV 复制^[93]。第二章的研究结果表明 CSFV 在 PAMs 中的复制抑制 JAK2-STAT4 通路的表达。而 JAK2-STAT4 通路是否影响了 CSFV 在巨噬细胞的复制尚不清楚。Poly(I:C) 作为先天免疫系统的激活剂, 对 CSFV 的复制有抑制作用。JAK-STAT 系统是否参与到这个抑制过程中, 值得去研究。因此对 4.3.2 的 cDNA 样品使用实时荧光 PCR 检测 *JAK2*, *STAT4* 的 mRNA 表达量。如图 4.6 显示 Poly(I:C) 单加组明显上调 *JAK2* 和 *STAT4* 的表达量。Poly(I:C) 和 CSFV 双加组也上调 *JAK2* 和 *STAT4* 的表达量, 但幅度明显低于 Poly(I:C) 单加组, CSFV 组 *JAK2* 和 *STAT4* 的表达量随时间降低, 而 Mock 组 *JAK2* 和 *STAT4* 的表达量基本保持不变。以上结果表明 Poly(I:C) 和 CSFV 双加组在一定程度上改善了 CSFV 石门株对 JAK2-STAT4 的抑制作用。然而, 巨噬细胞在病毒感染过程中的对基因表达

水平的影响并没有完全被掩盖。Poly(I:C)诱导 *JAK2* 和 *STAT4* 的上调分别在感染 24 h 和 12 h 后放缓, 48 h 基本恢复正常水平。推测可能有以下原因导致这样的结果: Poly(I:C)作为一种 RNA 类似物, 较不稳定, 可能在 12 h 后逐渐降解, 而病毒的复制虽然被抑制, 但随着时间的增长, 巨噬细胞中的病毒量一直再增加, Poly(I:C)在与病毒的拮抗调节中逐渐处于劣势。而 *JAK2* 和 *STAT4* 的上调表达放缓时间可能与这两个基因对 Poly(I:C)的应答机制不同有关。

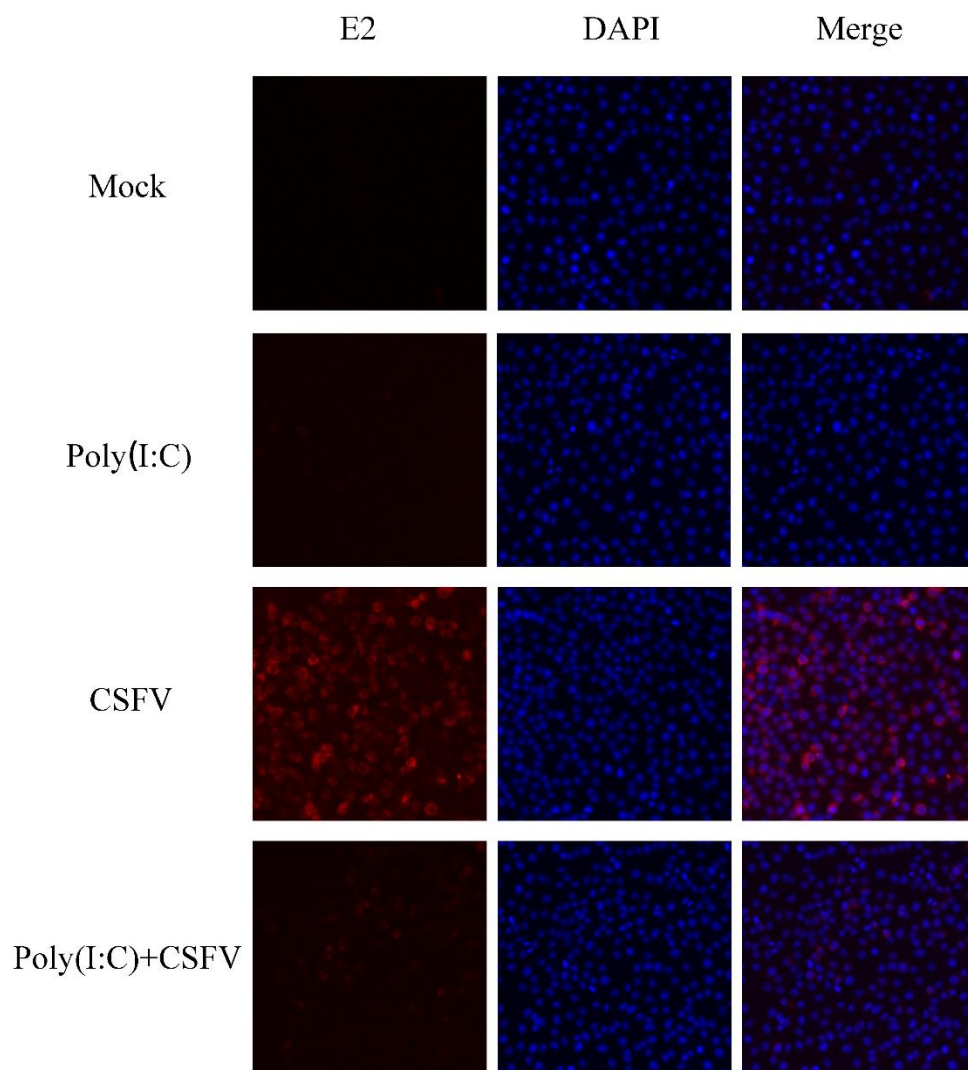


图 4.5 免疫荧光检测 Poly(I:C)对 CSFV 在蛋白水平复制的抑制

CSFV 感染最显著的特征是导致获得性免疫抑制, 动物更容易发生继发性感染。包括先天免疫在内的免疫反应的激活在宿主-病原体相互作用过程中对脊椎动物的抗病毒防御具有极其重要的作用。Poly(I:C)治疗后, 基因表达的上调与下调与防御和免疫反应有关。JAK2-STAT4 通路在先天免疫系统中调节免疫平衡中发挥重要作用。在本研究中, 使用 Poly(I:C)诱导免疫应答, 刺激 PAMs, 并进行 qPCR 分析, 以确定

Poly(I:C)抑制 CSFV 复制的信号通路。在 Poly(I:C)处理 PAMs 后, JAK-STAT 通路相关的 *JAK2*、*STAT4* 基因表达水平上调。因此, JAK-STAT 可以在对 Poly(I:C)对 CSFV 复制的抑制中发挥重要作用。CSFV 通过干扰 JAK2-STAT4 的表达, 从而逃避宿主的免疫反应, 导致持续性感染的建立。Poly(I:C)激活了 JAK/STAT 通路后抑制 CSFV 的复制。作为对 CSFV 感染的反应, 宿主先天免疫系统通过不同的细胞模式识别受体识别特定的病毒分子, 从而消除病毒。这些受体触发细胞内下游的信号通路, 这些信号通路调控细胞因子和 IFNs 产生的转录因子的易位和活化。反过来, 这些 IFNs 激活 JAK-STAT 信号, 控制 I 型干扰素刺激基因的转录, 这些基因在抗病毒免疫中发挥关键作用^[94]。因此推断 Poly(I:C)作为 IFNs 的诱导剂, 可能是通过上调 IFNs 的表达来激活 JAK-STAT 信号通路, 进而改善免疫抑制, 抑制病毒的复制。考虑到巨噬细胞对动物抵抗外界病原和发育的重要性, 开展了这项研究, 以检验在 CSFV 不同的时间点感染巨噬细胞, Poly(I:C)对巨噬细胞的影响。本研究有可能揭示 Poly(I:C)诱导的巨噬细胞免疫屏障自我保护的新基因和途径。了解 Poly(I:C)如何抑制 CSFV 复制的, 有利于开发有针对性的治疗方法来减轻由 CSFV 引起的严重疾病。此外, 还有可能应用于其他可以感染巨噬细胞并在巨噬细胞中复制以引起疾病的病原体。

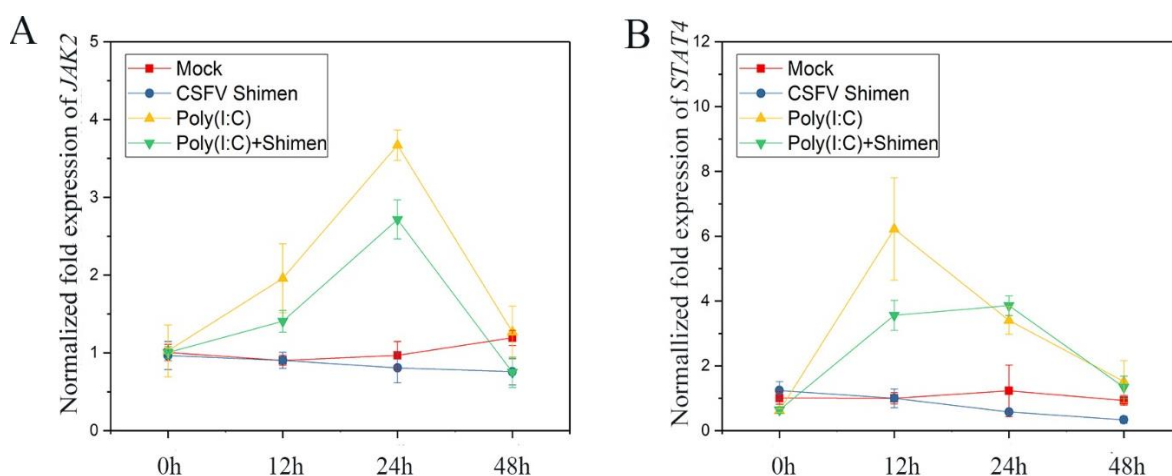


图 4.6 Poly(I:C)通过激活 JAK2-STAT4 通路抑制 CSFV 复制

(A) Poly(I:C)激活 *JAK2* 的 mRNA 表达; (B) Poly(I:C)激活 *STAT4* 的 mRNA 表达。

4.3.6 Poly(I:C)通过抑制 CSFV 复制抑制 VEGF-A 的上调表达

巨噬细胞在 CSFV 感染期间产生的炎症细胞因子对病毒清除很重要^[95]。然而, 过度的炎症反应被认为是导致猪瘟相关发病率和死亡率的原因。*VEGF-A* 与 CSFV 感染时的血管通透性变化和出血有关。CSFV 石门株可引起典型出血热, 具有特定的免疫病理特征。弥散性血管内凝血是晚期特异性特征, 也可观察到点状出血, 最终导致血

循环停止、低血压和死亡。CSFV 石门株感染巨噬细胞上调 *VEGF-A* 的表达, 同时 Poly(I:C)抑制 CSFV 的复制, 那么 Poly(I:C)是否可以通过抑制 CSFV 的复制来抑制 *VEGF-A* 的表达。对 4.3.1 的 cDNA 样品使用 qPCR 检测 *VEGF-A* 的 mRNA 表达量。结果如图 4.7 所示, CSFV 石门株组和 CSFV 和 Poly(I:C)双加组 *VEGF-A* 的表达量分别随感染时间增加而增加, 但 CSFV 和 Poly(I:C)双加组的增长趋势明显低于 CSFV 石门株组, 通过统计学分析发现有显著性差异。而 Poly(I:C)单加组和 Mock 组的表达量基本保持不变。Poly(I:C)在一定程度上改善了 CSFV 石门株对巨噬细胞 *VEGF-A* 的上调作用。Poly(I:C)可以通过抑制 CSFV 的复制来抑制 *VEGF-A* 的上调表达。结合猪瘟的免疫病理学, 推断可以在一定程度上改善猪瘟的出血热和弥散性出血症状。

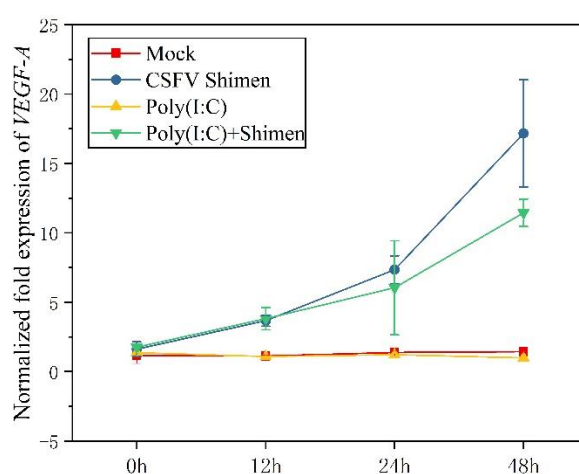


图 4.7 Poly(I:C)通过抑制 CSFV 复制抑制 CSFV 对 *VEGF-A* 的上调表达

小结

引入一种广谱的抗病毒药物 Poly(I:C), 在转录和翻译水平验证了 Poly(I:C)在细胞水平上对病毒复制有抑制作用。对获取的巨噬细胞对病毒响应的差异表达基因 *JAK2*、*STAT4* 和 *VEGF-A* 进行 qPCR 实验。研究结果表明 Poly(I:C)可以有效上调 *JAK-STAT* 的表达, 并且于 CSFV 石门株在 *JAK2*、*STAT4* 和 *VEGF-A* 的转录水平表达上产生拮抗作用。目前的研究数据表明, Poly(I:C)可能通过激活 *JAK/STAT* 信号通路, 从而抑制 CSFV 复制, *VEGF-A* 由于 CSFV 的复制被抑制, 上调表达的增长趋势放缓。*JAK-STAT* 的过表达可能是抑制了 CSFV 在巨噬细胞中复制的潜在机制。

结论

CSFV 感染是全球猪瘟的主要原因，目前没有较为有效的治疗药物。CSFV 持续存在的机制和发病机制尚不清楚。本课题采用生物信息学分析结合实验探讨了 CSFV 感染宿主细胞的机制。本文的主要结论如下：

(1) 通过巨噬细胞的高通量数据，通过 GO 富集分析，得到 CSFV 石门株感染影响细胞迁移、细胞生长、细胞增殖和细胞周期阻滞，改变炎症反应、NF- κ B 调控、凋亡调控、局灶性粘附和整合素复合物等特定因子的活性。GO-TREE 分析筛选了只受 CSFV 石门株影响的相关的基因，确定 JAK-STAT 通路和 *VEGF-A* 基因为本次的研究对象。对 JAKs 家族进行了差异基因表达分析，并通过 qPCR 和 Western blot 对其进行了验证，结果表明 CSFV 石门株的感染抑制巨噬细胞中 *JAK2* 的表达。进一步对 *JAK2* 的下游基因 STATs 进行检测，发现 CSFV 石门株的感染抑制巨噬细胞中 *STAT4* 的表达。推断 CSFV 通过抑制 JAK-STAT 通路实现免疫逃逸进而实现病毒持久性复制。

(2) 对 *VEGF-A* 基因进行生物信息学分析，发现 *VEGF-A* 可能与猪瘟的生理性病变机制有关。通过 qPCR、Western blot 和激光共聚焦分别检验感染 CSFV 石门株的巨噬细胞中 *VEGF-A* mRNA 和蛋白的表达量。发现 CSFV 石门株显著上调 *VEGF-A* 在巨噬细胞中的表达。研究结果表明，巨噬细胞中 *VEGF-A* 的高表达是 CSFV 石门株毒株形成出血热的重要途径，为进一步了解强毒株引起急性猪瘟的机制提供了新的思路。

(3) 引入一种广谱的抗病毒试剂 Poly(I:C)，验证了 Poly(I:C)对 CSFV 石门株在巨噬细胞中复制的抑制作用，通过 qPCR 检验了不同浓度梯度和不同时间梯度下 Poly(I:C)对 CSFV 核酸复制的抑制作用，结果表明 Poly(I:C)对 CSFV 的抑制作用在一定范围内随时间和浓度的增加而增加。通过免疫荧光证明 Poly(I:C)在蛋白水平同样对 CSFV 有抑制作用。通过 qPCR 分析了 Poly(I:C)对 CSFV 石门株诱导的细胞内信号转导的影响。Poly(I:C)在巨噬细胞细胞中逆转了 CSFV 石门株对于 JAK2-STAT4 通路信号转导的抑制作用。推断 Poly(I:C)通过激活 JAK2-STAT4 通路抑制 CSFV 的复制，JAK2-STAT4 通路可以作为抗病毒研究的靶点。同时对 Poly(I:C)对 *VEGF-A* 的作用进行了 qPCR 验证，发现 Poly(I:C)可以抑制 CSFV 石门株对 *VEGF-A* 的上调。推断 Poly(I:C)通过抑制病毒复制抑制 CSFV 石门株对 *VEGF-A* 的上调。

本文通过生物信息学分析，分子生物学及细胞生物学验证，探讨巨噬细胞中 JAK-STAT 通路对 CSFV 石门株感染的响应机制，并引入 Poly(I:C)推断 JAK2-STAT4 可能作为抗病毒的靶点进行的研究。本研究在 mRNA 和蛋白水平上提供了一种可能的机制，感染 CSFV 石门株造成免疫抑制，调控蛋白合成和降解，影响巨噬细胞的正常功能，

最终诱导宿主血管弥漫性病变。

在后续的工作中，可以检测 STAT4 下游 IFN- γ ，TNF- α ，IL2 的表达量，进一步确定 CSFV 石门株是通过抑制 STAT4 下游哪一条通路来达到免疫抑制的效果，以开展更深一步的探索。

参考文献

- [1] Schandock, Franziska, et al. Macromolecular antiviral agents against Zika, Ebola, SARS, and other pathogenic viruses. *Advanced healthcare materials*, 2017, 6: 1700748.
- [2] Zakaryan H, Revilla Y. African swine fever virus: current state and future perspectives in vaccine and antiviral research[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 185: 15-19.
- [3] Tlaxca JL, Ellis S, Remmele RL. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 93: 56-78.
- [4] Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, et al. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: Considerations for scientists and funding agencies[J]. *Virus Research*, 2018, 248: 53-62.
- [5] Berger C, Romero-Brey I, Radujkovic D, et al. Daclatasvir-Like Inhibitors of NS5A Block Early Biogenesis of Hepatitis C Virus-Induced Membranous Replication Factories, Independent of RNA Replication[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147: 1094-1105.
- [6] McGivern DR, Masaki T, Williford S, et al. Kinetic Analyses Reveal Potent and Early Blockade of Hepatitis C Virus Assembly by NS5A Inhibitors[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147: 453-462.
- [7] Kai Y, Hikita H, Morishita N, et al. Baseline quasispecies selection and novel mutations contribute to emerging resistance-associated substitutions in hepatitis C virus after direct-acting antiviral treatment[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41660.
- [8] Samji H, Cescon A, Hogg RS, et al. Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada[J]. *Plos One*, 2013, 8: e81355.
- [9] Sarah P, Frank M, Ann W, et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 3879-3884.
- [10] Rao VR, Ruiz AP, Prasad VR. Viral and cellular factors underlying neuropathogenesis in HIV associated neurocognitive disorders (HAND)[J]. *Aids Research & Therapy*, 2014, 11: 13.
- [11] Vanderlinden E, Vanstreels E, Vermeire K, et al. Mechanistic Studies on a Novel Hydrophobic Derivative of Aglycoristocetin with Potent and Broad Activity Against Influenza Viruses[J]. *Antiviral Research*, 2011, 90: A47-A47.
- [12] De Clercq E. Highlights in Antiviral Drug Research: Antivirals at the Horizon[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2013, 33: 1215-1248.
- [13] Zhao JN, Zhu MY, Jiang H, et al. Combination of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) agonist and antiviral drug: a potential therapy against pathogenic influenza virus[J]. *Scientific*

- Reports, 2019, 9: 5272.
- [14] Vanwalscappel B, Tada T, Landau NR. Toll-like receptor agonist R848 blocks Zika virus replication by inducing the antiviral protein viperin[J]. *Virology*, 2018, 522: 199-208.
- [15] Dong XN, Chen YH. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines[J]. *Vaccine*, 2007, 25: 205-230.
- [16] Rios L, Coronado L, Naranjo-Feliciano D, et al. Deciphering the emergence, genetic diversity and evolution of classical swine fever virus[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 17887.
- [17] van Rijn PA, Bossers A, Wensvoort G, et al. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge[J]. *The Journal of general virology*, 1996, 77: 2737-2745.
- [18] Neyts J, Leyssen P, De Clercq E. Infections with flaviviridae[J]. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*, 1999, 61: 661-697.
- [19] Depner KR, Hinrichs U, Bickhardt K, et al. Influence of breed-related factors on the course of classical swine fever virus infection[J]. *Veterinary Record*, 1997, 140: 506-507.
- [20] Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge[J]. *Veterinary Journal*, 2003, 165: 11-20.
- [21] Edwards S, Fukusho A, Lefevre PC, et al. Classical swine fever: the global situation[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 73: 103-119.
- [22] Phan AT, Goldrath AW, Glass CK. Metabolic and Epigenetic Coordination of T Cell and Macrophage Immunity[J]. *Immunity*, 2017, 46: 714-729.
- [23] Li Z, Weinman SA. Regulation of Hepatic Inflammation via Macrophage Cell Death[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2018, 38: 340-350.
- [24] Tang PM-K, Nikolic-Paterson DJ, Lan H-Y. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2019, 15: 144-158.
- [25] Zaffuto KM, Piccone ME, Burrage TG, et al. Classical swine fever virus inhibits nitric oxide production in infected macrophages[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88: 3007-3012.
- [26] Allard B, Panariti A, Martin JG. Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1777.
- [27] Ovchinnikov DA. Macrophages in the embryo and beyond: Much more than just giant phagocytes[J]. *Genesis*, 2008, 46: 447-462.
- [28] Ning P, An L, Liang W, et al. Identification of inhibition of protein disulphide isomerase expression related to classical swine fever virus infection by using real-time PCR analysis[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29: 564-569.
- [29] Wang J, Yuan S, Meng XY, et al. Comprehensive evaluation of the host responses to infection with

- differentially virulent classical swine fever virus strains in pigs[J]. *Virus Research*, 2018: 68-76.
- [30] Cao Z, Yang Q, Zheng MP, et al. Classical swine fever virus non-structural proteins modulate Toll-like receptor signaling pathways in porcine monocyte-derived macrophages[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 230: 101-109.
- [31] Li C, Zheng H, Wang Y, et al. Antiviral Role of IFITM Proteins in Classical Swine Fever Virus Infection[J]. *Viruses-Basel*, 2019, 11: 126.
- [32] Bianchi F, Pretto S, Tagliabue E, et al. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2017, 18: 747-756.
- [33] Zhao JJ, Xue YX, Pan YC, et al. Toll-like receptor 3 agonist poly I:C reinforces the potency of cytotoxic chemotherapy via the TLR3-UNC93B1-IFN-beta signaling axis in paclitaxel-resistant colon cancer[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234: 7051-7061.
- [34] Lin SF, Jiang PL, Tsai JS, et al. Surface assembly of poly(I:C) on polyethyleneimine-modified gelatin nanoparticles as immunostimulatory carriers for mucosal antigen delivery[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2019, 107: 1228-1237.
- [35] Zhang X, Ha TZ, Lu C, et al. Poly (I:C) therapy decreases cerebral ischaemia/reperfusion injury via TLR3-mediated prevention of Fas/Fadd interaction[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2015, 19: 555-565.
- [36] Chu Q, Gao Y, Xu G, et al. Transcriptome comparative analysis revealed poly (I: C) activated RIG-I/MDA5-mediated signaling pathway in miuiy croaker[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2015, 47: 168-174.
- [37] Ashok K, Jing Z, Yu FSX. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells[J]. *Insect Science*, 2010, 117: 11-21.
- [38] Azuma M, Sawahata R, Akao Y, et al. The Peptide Sequence of Diacyl Lipopeptides Determines Dendritic Cell TLR2-Mediated NK Activation[J]. *Plos One*, 2010, 5: e12550.
- [39] Chen Y, Hao X, Sun R, et al. Natural Killer Cell-Derived Interferon-Gamma Promotes Hepatocellular Carcinoma Through the Epithelial Cell Adhesion Molecule-Epithelial-to-Mesenchymal Transition Axis in Hepatitis B Virus Transgenic Mice[J]. *Hepatology*, 2019, 69: 1735-1750.
- [40] Tai LH, Ananth AA, Seth R, et al. Sepsis increases perioperative metastases in a murine model[J]. *Bmc Cancer*, 2018, 18: 277.
- [41] Jegaskanda S, Vandervan HA, Tan HX, et al. Influenza Virus Infection Enhances Antibody-Mediated NK Cell Functions via Type I Interferon-Dependent Pathways[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93: e02090-18.
- [42] Simonetti S, Seijas ABB, Natalini A, et al. Dendritic cells modulate c-kit expression on the edge between activation and death[J]. *European journal of immunology*, 2019, 49: 534-545.

- [43] Fotaki G, Jin C, Ramachandran M, et al. Pro-inflammatory allogeneic DCs promote activation of bystander immune cells and thereby license antigen-specific T-cell responses[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7: e1395126.
- [44] Ott PA, Henry T, Baranda SJ, et al. Inhibition of both BRAF and MEK in BRAF(V600E) mutant melanoma restores compromised dendritic cell (DC) function while having differential direct effects on DC properties[J]. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2013, 62: 811-822.
- [45] Yoshida S, Shime H, Takeda Y, et al. Toll-like receptor 3 signal augments radiation-induced tumor growth retardation in a murine model[J]. *Cancer Science*, 2018, 109: 956-965.
- [46] Toka FN, Dunaway K, Smaltz F, et al. Bacterial and viral pathogen-associated molecular patterns induce divergent early transcriptomic landscapes in a bovine macrophage cell line[J]. *Bmc Genomics*, 2019, 20: 15.
- [47] Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, et al. Synthetic double-stranded RNA poly (I: C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79: 2910-2919.
- [48] Zhao J, Wohlford-Lenane C, Zhao J, et al. Intranasal treatment with poly (I· C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections[J]. *Journal of virology*, 2012, 86: 11416-11424.
- [49] Li X-Q, Li XN, Liang J-J, et al. IRF1 up-regulates isg15 gene expression in dsRNA stimulation or CSFV infection by targeting nucleotides-487 to-325 in the 5 ' flanking region[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 94: 153-165.
- [50] Dong XY, Tang SQ. Classical swine fever virus NS5A protein changed inflammatory cytokine secretion in porcine alveolar macrophages by inhibiting the NF-kappa B signaling pathway[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 101.
- [51] Gladue DP, Zhu J, Holinka LG, et al. Patterns of gene expression in swine macrophages infected with classical swine fever virus detected by microarray[J]. *Virus Research*, 2010, 151: 10-18.
- [52] Hulst M, Loeffen W, Weesendorp E. Pathway analysis in blood cells of pigs infected with classical swine fever virus: comparison of pigs that develop a chronic form of infection or recover[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158: 325-339.
- [53] Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles[J]. *Genome Research*, 1997, 7: 986-995.
- [54] Brahma R, Gurumayum S, Naorem LD, et al. Identification of Hub Genes and Pathways in Zika Virus Infection Using RNA-Seq Data: A Network-Based Computational Approach[J]. *Viral Immunology*, 2018, 31: 321-332.
- [55] Zhang XL, Cao C, Liu Y, et al. Comparative liver transcriptome analysis in ducklings infected with duck hepatitis A virus 3 (DHAV-3) at 12 and 48 hours post-infection through RNA-seq[J]. *Veterinary*

- Research, 2018, 49: 52.
- [56] Ning P, Hu C, Li X, et al. Classical swine fever virus Shimen infection increases p53 signaling to promote cell cycle arrest in porcine alveolar macrophages[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 55938.
- [57] Ramoni MF, Sebastiani P, Kohane IS. Cluster analysis of gene expression dynamics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 9121-9126.
- [58] Ning P, Zhou Y, Gao L, et al. Unraveling the microRNA of *Caragana korshinskii* along a precipitation gradient on the Loess Plateau, China, using high-throughput sequencing[J]. *Plos One*, 2017, 12: e0172017.
- [59] Zhang B, Schmoyer D, Kirov S, et al. GOTree Machine (GOTM): a web-based platform for interpreting sets of interesting genes using Gene Ontology hierarchies[J]. *Bmc Bioinformatics*, 2004, 5: 16.
- [60] Lee B, Brown K, Hathout Y, et al. GOTreePlus: an interactive gene ontology browser[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24: 1026-1028.
- [61] Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, et al. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32: 158-168.
- [62] Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability[J]. *Nature*, 2005, 437: 497-504.
- [63] Corada M, Morini MF, Dejana E. Signaling Pathways in the Specification of Arteries and Veins[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2014, 34: 2372-2377.
- [64] Gou H, Zhao M, Fan S, et al. Autophagy induces apoptosis and death of T lymphocytes in the spleen of pigs infected with CSFV[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13577.
- [65] Zheng FY, Qiu CQ, Jia HJ, et al. Infection of mouse bone marrow-derived immature dendritic cells with classical swine fever virus C-strain promotes cells maturation and lymphocyte proliferation[J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95: 1268-1270.
- [66] Qian G, Lv H, Lin J, et al. FHC, an NS4B-interacting Protein, Enhances Classical Swine Fever Virus Propagation and Acts Positively in Viral Anti-apoptosis[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8318.
- [67] Pei J, Zhao M, Ye Z, et al. Autophagy enhances the replication of classical swine fever virus in vitro[J]. *Autophagy*, 2014, 10: 93-110.
- [68] Hu A, Li X, He J, et al. Classical swine fever virus-Shimen infection upregulates SH3GLB1 expression in porcine alveolar macrophages[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2019: 1-5.
- [69] Ning PB, Zhang YM, Guo KK, et al. Discovering up-regulated VEGF-C expression in swine umbilical vein endothelial cells by classical swine fever virus Shimen[J]. *Veterinary Research*, 2014, 45: 48.

- [70] O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. Mechanisms of disease JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2013, 368: 161-170.
- [71] He P, Zhang D, Li H, et al. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2013, 31: 1017-1029.
- [72] Li N, Luol F, Chen QZ, et al. IFN-lambda s inhibit Hantaan virus infection through the JAK-STAT pathway and expression of Mx2 protein[J]. Genes and Immunity, 2019, 20: 234-244.
- [73] Coskun M, Salem M, Pedersen J, et al. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Pharmacological Research, 2013, 76: 1-8.
- [74] Schindler H, Lutz MB, Röllinghoff M, et al. The production of IFN- γ by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4[J]. The Journal of Immunology, 2001, 166: 3075-3082.
- [75] Boughton RK, Joop G, Armitage S. Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists[J]. Functional Ecology, 2011, 25: 81-100.
- [76] Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses[J]. Virology, 2006, 344: 119-130.
- [77] Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: How viruses fight the interferon system[J]. Viral Immunology, 2004, 17: 498-515.
- [78] Schweizer M, Peterhans E. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis[J]. Journal of Virology, 2001, 75: 4692-4698.
- [79] Liu S, Liu L, Xu G, et al. Epigenetic Modification Is Regulated by the Interaction of Influenza A Virus Nonstructural Protein 1 with the De Novo DNA Methyltransferase DNMT3B and Subsequent Transport to the Cytoplasm for K48-Linked Polyubiquitination[J]. Journal of Virology, 2019, 93: e01587-18.
- [80] Kurokawa C, Iankov ID, Galanis E. A key anti-viral protein, RSAD2/VIPERIN, restricts the release of measles virus from infected cells[J]. Virus Research, 2019, 263: 145-150.
- [81] Chander V, Nandi S, Ravishankar C, et al. Classical swine fever in pigs: recent developments and future perspectives[J]. Animal Health Research Reviews, 2014, 15: 87-101.
- [82] Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease, 2007, 2: 251-275.
- [83] Argaw AT, Asp L, Zhang J, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 2012, 122: 2454-2468.
- [84] Jones D, Neff CP, Palmer BE, et al. Varicella zoster virus-infected cerebrovascular cells produce a proinflammatory environment[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2017, 4: e382.

- [85] Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance[J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 614.
- [86] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. *Nature*, 2013, 496: 445-455.
- [87] Feilim MG, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors[J]. *Microcirculation*, 2010, 15: 715-738.
- [88] Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113: 1040-1050.
- [89] Jones D, Neff CP, Palmer BE, et al. Varicella zoster virus-infected cerebrovascular cells produce a proinflammatory environment[J]. *Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 2017, 4: e382.
- [90] Suryawanshi A, Veiga-Parga T, Reddy PBJ, et al. IL-17A Differentially Regulates Corneal Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A and Soluble VEGF Receptor 1 Expression and Promotes Corneal Angiogenesis after Herpes Simplex Virus Infection[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 188: 3434-3446.
- [91] Sefikogullari M, Kaya A, Aydin H, et al. Increased Levels of VEGF-A and HIF-1 alpha in Turkish Children with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever[J]. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 2017, 11: 19-26.
- [92] Luquin E, Larrea E, Civeira MP, et al. HCV structural proteins interfere with interferon-alpha Jak/STAT signalling pathway[J]. *Antiviral Research*, 2007, 76: 194-197.
- [93] Chen JB, Xu W, Chen YN, et al. Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates Hepatitis B Virus Replication through Binding with Type I Interferon (IFN) Receptor 1 To Repress IFN/JAK/STAT Signaling[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91: e01824-16.
- [94] Raftery N, Stevenson NJ. Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74: 2525-2535.
- [95] Li LF, Yu J, Zhang Y, et al. Interferon-Inducible Oligoadenylate Synthetase-Like Protein Acts as an Antiviral Effector against Classical Swine Fever Virus via the MDA5-Mediated Type I Interferon-Signaling Pathway[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91: e01514-16.

致谢

三年的研究生学习生活在即将划上一个句号，而距离第一次进入实验室也已经有近五年的时间。这三年的实验生涯，从完全的懵懵懂懂、手忙脚乱到如今的独立自主、从容不迫，不仅收获了这些年来科研生活所带来的知识储备，更是学到了最为一名研究人员应该具备的品质和态度。同时我也看到了自己的进步和成长，更是怀着感激的心情想要感谢每一位出现在我生命中给予过我帮助和关怀的良师益友及亲友们。

首先，我要感谢我的导师张象涵老师和宁蓬勃老师从我在这研究生三年的时间里给予我的指导和帮助。张老师是一位在科研中严谨、认真、细心的人，她具有扎实的学术知识积累，并且勇于创新实践。在生活中她是一位活泼、亲切的年轻老师，给我们的为人处事树立了榜样，导师在各方面都有值得我去学习终生的地方。

本论文是在宁老师的悉心指导下完成的，从论文的选题到论文逐字逐句的修改，无不渗透着导师的心血。他严肃的科学态度，严谨的治学精神，精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我。值此论文完稿之际，谨对导师的辛勤培育、包容关心以及谆谆教诲表示最衷心的感谢。

感谢课题组的王忠良、张瑞丽、夏玉琼老师在有关学术知识方面给予的指导。感谢生命科学技术学院为我硕士的三年生涯给我提供了一个良好的生活、学习环境，感谢学院的其他老师帮助我在这里成长并留下了人生中非常珍贵的回忆。

感谢我的同门李雪鹏和吴中兴在实验上及生活中的热心协助，感谢高丽芳师姐，王俊惠师姐，王博师姐，赵娜师姐，李然师兄，周雨露师兄，刘泽昆师兄在学术上及做人做事方面提供的重要指导。感谢师妹龚小程在科研上提供的帮助。

感谢我的朋友蔡佳艳，贺聪，张澜，张凌雪在读研期间一直给我的鼓励和陪伴。最后要谢谢我的父母，感谢你们一如既往的支持我的选择并且毫无保留的付出。每一段旅程都是人生值得记忆的风景。

作者简介

1. 基本情况

胡傲雪，女，安徽马鞍山人，1994年9月出生，西安电子科技大学生命科学技术学院生物医学工程专业2016级硕士研究生。

2. 教育背景

2011.09~2015.07 东华大学，本科，专业：纺织工程

2016.08~至今 西安电子科技大学，硕士研究生，专业：生物医学工程

3. 攻读硕士学位期间的研究成果

3.1 发表学术论文

- [1] Hu A, Li X, He J., et al. Classical swine fever virus-Shimen infection upregulates SH3GLB1 expression in porcine alveolar macrophages[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2019: 1-5.
- [2] Gong X⁺, Hu A⁺, Li X., et al. Coordinated expression of vascular endothelial growth factor A and urokinase-type plasminogen activator contributes to classical swine fever virus Shimen infection in macrophages. BMC Veterinary Research[J]. 2019, 15:7.
- [3] Ning P*, Wu Z , Hu A., et al. Integrated genomic analyses of lung squamous cell carcinoma for identification of a possible competitive endogenous RNA network by means of TCGA datasets[J]. PeerJ, 2018, 6:e4254.
- [4] Gong X, Hu A, Li X, et al. Gene ontology tree analysis integrated with tendency cluster for deep sequencing database to interpret the mechanism of classical swine fever virus[C]. International Conference on Biological Information and Biomedical Engineering, 2018: 1-4.
- [5] 龚小程，胡傲雪，李雪鹏等.CSFVshimen 株侵染猪肺泡巨噬细胞与猪血管内皮细胞的转录组共表达基因分析[J].动物医学进展，2018.(12): 1-5.

3.2 参与科研项目及获奖

- [1] 国家自然科学基金面上项目，巨噬细胞微环境响应病毒株侵染的差异调控机制研究，2016.04-2018.12，已结题，分子及细胞实验。



西安電子科技大學
XIDIAN UNIVERSITY

地址：西安市太白南路2号

邮编：710071

网址：www.xidian.edu.cn