分类号： 密级：

UDC ： 编号：



硕士学位论文

**PRRSV 体外感染 PAMs 对 TLR3/NF-κB 信号通路的分子作用机制**

**The mechanism on TLR3/NF-κB Signaling Pathway in PRRSV**

**-infected PAMs**

**硕 士 研 究 生：臧雅婷**

**指** 导 教 **师：高** 洪 **教授 申 请 学 位 类 别 ：农学硕士**

**专** 业：基 **础 兽 医 学**

**培** 养 学 院： **动物科学技术学院二 O 一四年五月**

**独创性声明**

本人声明所呈交的学位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的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得云南农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志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。

研究生签名： 时间： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的声明**

本人完全了解云南农业大学有关保存、使用学位论文的管理办法及规定，即：云南农业大学有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意云南农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研究生签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |
| 导师签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |

**基** 金 项 目

**国家自然科学基金资助项目**

**（31160496，31360599）**

**云南省现代农业生猪产业技术体系建设**

**（云财农[2009]171 号）**

**云南省高校科技创新团队支持计划资助**

**（云教科[2011]14 号）**

摘 要

为探讨PRRSV感染猪肺泡巨噬细胞（PAMs）后TLR3/NF-κB信号通路的作用机制，从云南省某猪场购买PRRS阴性的6周龄健康仔猪，用灌洗法获得PAMs，给予氧化剂和抗氧化剂进行预处理，PRRSV感染后，于6h、12h、24h、48h和72h不同时间点收集细胞为实验组，以未感染PRRSV的PAMs为对照组。观察实验组与对照组各时间点的CPE；应用Real-time PCR法对不同组别PRRSV、TLR3、TRIF、TRAF6及NF-κB mRNA水平进行动态分析；应用Western Blotting分析不同组别TLR3、TRIF、TRAF6及NF-κB蛋白表达的动态变化。结果显示，1）随时间的延长及病毒的增殖，细胞中CPE有明显的变化，抗氧化剂NAC处理接毒组，与正常接毒组细胞形态相比，细胞变形、聚集数量及范围明显减少，而与对照组相比，只有少量细胞变形、聚集；氧化剂H2O2、OxPLs处理接毒组，与正常接毒组细胞形态相比，细胞变形、聚集数量及范围增多，而与对照组相比细胞形态不规则，变形严重，聚集成团块；2）Real-time

PCR结果显示，实验组PRRSV、TLR3、TRIF、TRAF6及NF-κB mRNA与对照组相比随时间明显上调（*P<0.05*），到48h达到最大值，抗氧化剂NAC处理接毒组，其虽有明显上调，但比正常接毒组同时间点有所下调，氧化剂H2O2、OxPLs处理接毒组，mRNA表达比正常接毒组相同时间点的表达量有所升高；3）Western Blotting结果显示，在PRRSV感染不同时间点明显上调TLR3、TRIF、TRAF6及NF-κB蛋白水平表达（*P<0.05*），而且其表达量与感染之间有时间依赖性关系；在抗氧化剂NAC干预后，进行PRRSV感染，TLR3、TRIF、TRAF6及NF-κB的蛋白表达虽有上调，但表达量都比正常接毒组同时间点明显下降；在氧化剂H2O2、OxPLs干预后，进行

PRRSV感染，TLR3、TRIF、TRAF6及NF-κB的蛋白表达比正常接毒组相同时间点的表达量明显升高（*P<0.05*）。以上结果表明TLR3/NF-κB信号通路中各因子mRNA转录水平与蛋白水平表达量趋势基本一致，PRRSV感染可启动TLR3-NF-κB信号通路，随着时间的延长，PRRSV mRNA转录水平与TLR3、NF-κB转录水平呈正相关；抗氧化剂和促氧化剂可引起PAMs氧化应激状态的改变，TLR3/ NF-κB信号传导通路是其调节的分子机制之一。

关键词：PRRSV； PAMs；氧化应激； TLR3； TRIF； TRAF6； NF-κB

**The mechanism on TLR3/NF-κB Signaling Pathway in PRRSV**

**-infected PAMs**

Zang Yating

Directed by Pro. Gao Hong

**Abstract**

To explore mechanism of TLR3/NF-κB signaling pathway in PRRSV-induced porcine alveolar macrophages (PAMs), the six-week-old piglets were purchased from a pig farm in Yunnan Province, getting the healthy PAMs with lavation, pretreated with oxidants and antioxidants, cells were harvested at the selected time points after PRRSV infection (6,12,24,48 and 72, respectively) as the experimental group. The uninfected PAMs were as nomal control group. The CPE was observed in the experimental group and the control group at all time points; The PRRSV, TLR3, TRIF, TRAF6, NF-κB mRNA transcription level of PRRSV-infected PAMs in different groups were analyzed by Real-time PCR; The PRRSV, TLR3, TRIF, TRAF6, NF-κB protein expression level of PRRSV-infected PAMs in different groups were analyzed by Western Blotting. The results show that a) with the growth of time and proliferation of the virus, there were significant CPE changes in the cell, inoculation antioxidant NAC treatment group, cells deformation and cells number and extent of cells aggregation were significantly reduced compared with the PRRSV-infected group, only a small number of cell deformation and aggregation compared with the normal control group; oxidant H2O2, OxPLs treatment group, cells deformation and cells number and extent of cells aggregation were increased compared with the PRRSV-infected group, cells irregular and cells deformed and extent of cells aggregation were increased significantly compared with the normal control group; 2) Real-time PCR results showed that the experimental group PRRSV, TLR3, TRIF, TRAF6 and NF-κB mRNA compared with the control group significantly increased over time *(P*

*<0.05)* and the maximum was 48h, pretreatment oxidative stress with specific inhibitor NAC, whereas, down-regulate the activation of PRRSV, TLR3, TRIF, TRAF6 and NF-κB, pretreatment oxidative stress with specific agonist H2O2 and OxPLs, the expression of PRRSV, TLR3, TRIF, TRAF6 and NF-κB were increased; 3) Western Blotting showed that PRRSV infection at different time points significantly upregulated TLR3, TRIF, TRAF6 and NF-κB protein levels *(P<0.05)*, and its expression level are in a time-dependent maner; pretreatment oxidative stress with specific inhibitor NAC, whereas, down-regulate the activation of PRRSV, TLR3, TRIF, TRAF6 and NF-κB, pretreatment oxidative stress with specific agonist H2O2 and OxPLs, the expression of PRRSV, TLR3, TRIF, TRAF6 and NF-κB were increased. These results suggest that each factor mRNA transcription and protein expression levels in signaling pathways of TLR3/NF-κB were in the consistent trends, TLR3-NF-κB signaling pathway can be started by PRRSV infection, PRRSV mRNA transcript levels and TLR3, NF-κB transcription levels were positively correlated with time; antioxidants and pro-oxidants can cause changes in PAMs oxidative stress, TLR3/NF-κB signaling pathway is the one of the molecular mechanisms of its regulation.

**Keywords**: PRRSV; PAMs; Oxidative stress; TLR3; TRIF; TRAF6; NF-κB

目 录

[摘 要](#_Toc686647922) 3

**[Abstract](#_Toc686647923)** 3

[符号及缩写语说明](#_Toc686647924) 4

[1 引 言](#_Toc686647925) 8

[1.1 PRRSV概述](#_Toc686647926) 8

[1.2 PRRSV与PAMs的关系](#_Toc686647927) 8

[1.2.1 PRRSV对PAMs的影响](#_Toc686647928) 8

[1.2.2 PRRSV感染PAMs的机制](#_Toc686647929) 8

[1.3 病毒感染与信号转导通路](#_Toc686647930) 8

[1.3.1 TLR信号通路](#_Toc686647931) 8

[1.3.2 NF-κB信号通路](#_Toc686647932) 9

[1.3.3 TLR3/NF-κB信号通路在PRRS中的作用](#_Toc686647933) 9

[1.4 本研究的目的及意义](#_Toc686647934) 9

[1.5 试验技术路线](#_Toc686647935) 9

[分别于 4、12、24、36、48 HPI 收集](#_Toc686647935)

[正常对照组 PAM](#_Toc686647935)

[PRRSV 感](#_Toc686647935)

[染正常的](#_Toc686647935)

[PAM](#_Toc686647935)

[PRRSV 感染](#_Toc686647935)

[经NAC 预处理的 PAM](#_Toc686647935)

[PRRSV 感](#_Toc686647935)

[染经 OxPLs](#_Toc686647935)

[预处理的](#_Toc686647935)

[PRRSV 感](#_Toc686647935)

[染经 H2O2](#_Toc686647935)

[预 处 理 的](#_Toc686647935)

[2 材料与方法](#_Toc686647936) 10

[2.1 主要试剂与仪器](#_Toc686647937) 10

[2.1.1 主要仪器设备](#_Toc686647938) 10

[2.1.2 主要试剂](#_Toc686647939) 10

[2.2 主要计算机应用软件DNAMAN 5.2.2查找基因的保守序列软件Primer 5.0引物设计软件](#_Toc686647940) 13

[2.3 统计与分析](#_Toc686647941) 13

[2.4 实验](#_Toc686647942) 14

[2.4.1 PAMs的获取](#_Toc686647943) 14

[2.4.2 PAMs细胞的培养](#_Toc686647944) 14

[2.4.3 PRRSV对PAMs细胞的氧化应激损伤TLR3/NF-κB信号通路各因子的测定](#_Toc686647945) 14

[3 结果](#_Toc686647946) 21

[3.1 感染PRRSV的PAMs出现CPE情况](#_Toc686647947) 21

[3.2 TLR3/NF-κB信号通路在PRRSV感染PAMs损伤作用分析](#_Toc686647948) 22

[3.2.1 细胞内PRRSV、TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB mRNA转录水平结果分析](#_Toc686647949) 22

[3.2.2 TLR3、NF-kB与PRRSV mRNA转录水平相关性分析](#_Toc686647950) 46

[3.2.3 细胞内TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB蛋白表达水平结果分析](#_Toc686647951) 47

[4. 讨论](#_Toc686647952) 65

[4.1 PRRSV对PAMs形态的影响及与信号效应分子TLR3、NF-κB的关](#_Toc686647953) 65

[4.2 TLR3/NF-κB信号通路在PRRSV致PAMs氧化应激损伤中的作用](#_Toc686647954) 65

[6 h、12h、24h、48h、72h TRIF蛋白相对表达量对照组分别为0.018、0.016、0.023、](#_Toc686647955) 66

[5 结论](#_Toc686647956) 66

[参考文献](#_Toc686647957) 66

# 符号及缩写语说明

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Akt/PKB | Protein kinase B | 蛋白激酶 B |
| ALI | Acute lung injury | 急性肺损伤 |
| AP | Ammonium persulphate | 过硫酸铵 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| CPE | Cell pathology effect | 细胞病变 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 二乙基焦碳酸酯 |
| DNA  marker/ladder | DNA marker/ladder | DNA 长度标准 |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附测定 |
| GSH | glutathione | 谷胱甘肽 |
| g | gram | 克 |
| IKK | IκB κinase | IκB 激酶复合体 |
| IL-6 | interleukins-6 | 白细胞介素-6 |
| IL-8 | interleukins-8 | 白细胞介素-8 |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin | 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 |
| M | mole | 摩尔 |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid | 信使核糖核酸 |
| mg | milligram | 毫克 |
| min | minute | 分 |
| mL | Milli Liter | 毫升 |
| Mm | Milliliter more | 毫摩尔 |
| NF-κB | Nuclear transcription factor κB | 核转录因子-κB |
| NO | Nitric oxide | 一氧化氮 |
| NOS | Nitric oxide synthase | 一氧化氮合酶 |
| OS | Oxidative Stress | 氧化应激 |
| OxPLs | Oxidation phospholipids | 氧化磷脂 |
| PAMs | Pulmonary alveolar macrophage | 肺泡巨噬细胞 |
| PBS | Phosphatic buffer solution | 磷酸盐缓冲液 |
| PRRSV | Porcine reproductive and respiratory  Syndrome virus | 猪繁殖与呼吸障碍综合征  病毒 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PRRS | Porcine reproductive and respiratory  syndrome | 猪繁殖与呼吸障碍综合征 |
| PMN | polymorphonuclear | 多形核白细胞 |
| RNS | Reactive nitrogen species | 活性氮 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧自由基 |
| Sec | second | 秒 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate,sodium salt | 十二烷基硫酸钠 |
| TRAF-6 | TNF receptor associated factor 6 | 肿瘤坏死因子受体活化因子 6 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine | N,N,N',N'-四甲基乙二胺 |
| TRIF | TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β | 转接蛋白 |
| Tm | Melting temperature | 熔解温度 |
| TNF | Tumor necrosis facter | 肿瘤坏死因子 |
| TLR4 | Toll-like receptor 4 | Toll 样受体 4 |
| μL | Micro Liter | 微升 |
| μg | microgram | 微克 |
| μM | micromore | 微摩尔 |
| V | voltage | 电压 |

# 1 引 言

近年来，猪繁殖与呼吸障碍综合征（Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS）在世界范围内广为流行，人们对猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒

（Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV）的研究不断深入。PRRSV是一种能引起妊娠母猪严重繁殖障碍及仔猪的呼吸困难和高死亡率的高传染性病毒，其对全球养猪产业带来了严重的损失。人们已从病原学、流行病学、免疫学、分子生物学等方面不断认识该病毒的致病机制，以期找到合适的防控手段。

## 1.1 PRRSV概述

PRRSV为单股正链RNA病毒，最早由荷兰中央兽医研究所从自然感染和实验感染PRRV猪中首先用猪肺泡巨噬细胞(Porcine Pulmonary Alveloar Macrophages, PAMs)分离培养的病毒，国际病毒分类委员会（ICTV）第七次报告将其归于套式病毒目

（Nidovirales）动脉炎病毒科（Arteriviridaefamily）动脉炎病毒属(Arterivirus)[1]. PRRSV对外界环境的抵抗力相对较弱，对脂溶剂、热、低于5.0或高于7.0的pH值较敏感。

PRRSV可引起怀孕母猪的早产、流产、死胎，导致猪肺部病变，使肺气体交换受到严重影响，并造成机体全身缺氧，从而临床表现为体温升高，食欲不振，各种年龄（尤其是仔猪）的呼吸障碍。PRRSV还可造成宿主系统的免疫抑制[2]、具有持续感染的特性。猪群一旦感染上PRRSV，很难根除，大多数猪群处于长期带毒，一旦其他病原侵入或猪群免疫力下降，就会暴发该病。PRRSV 的免疫学研究已证明，

PRRSV感染4周后才能检测到其诱导的细胞免疫反应[3, 4]，另外在PRRSV感染部位炎症细胞因子分泌量很少，几乎没有IFN-α产生，NK细胞等免疫递呈细胞的复活和激活不显著[5]。PRRSV诱导体内产生的抗体并不能有效的清除掉猪体内的PRRSV，反而形成复合物，协助PRRSV进入宿主细胞，躲避机体的免疫抑制[6]。

## 1.2 PRRSV与PAMs的关系

呼吸系统是PRRSV原发性靶器官，PRRSV主要是由呼吸道侵害PAMs，从而导致弥散性间质性肺炎，损害机体免疫机能，进一步对机体造成继发性感染[7]。PRRSV除感染巨噬细胞，也可在单核细胞、神经胶质细胞、猪睾丸细胞以及传代细胞(Marc-145、MA-104、CL2621)中增殖。尽管PRRSV能在许多组织中复制，但PAMs被认为是急性感染期病毒复制的主要位点[8]。

PAMs是机体重要的免疫细胞，在非特异性免疫方面，PAMs主要通过吞噬作用杀灭和清除病原体及异物，介导炎症反应；在特异性免疫方面，PAMs具有免疫调节功能，如抗原递呈、分泌各种细胞因子等。有关PRRSV与PAMs之间的相互作用以及该病毒感染引起的免疫抑制是近几年人们研究的重点之一，这对阐明PRRSV的致病性和致病机理具有极其重要的理论意义。

### 1.2.1 PRRSV对PAMs的影响

多数研究指出，猪受到PRRSV感染后，巨噬细胞会发生一系列的变化，且最先攻击的靶细胞是PAMs. PRRSV在感染机体后，可在局部易感淋巴细胞中复制和繁殖，造成PAMs数量下降和存活率降低、细胞形态改变、杀菌活性和吞噬功能下降、合成活性氧和一氧化氮的能力下降、PAMs凋亡、表达Fc受体和补体能力降低[9, 10]。感染PRRSV后PAMs内的其它许多细胞因子水平均可发生变化，包括PRR、IFN-α、IL-6、IL-8、SP-A等的mRNA转录受到不同程度抑制。通过检测PAMs凋亡情况和

PRRSV核酸动态变化发现，PRRSV感染早期巨噬细胞的外源性抗原加工和递呈能力均显著下降。它们从不同方面影响着巨噬细胞功能，共同造成免疫抑制[11]。

### 1.2.2 PRRSV感染PAMs的机制

PRRSV通过呼吸道粘膜和生殖道粘膜上皮进入猪体内，在鼻腔粘膜、呼吸系统的巨噬细胞和淋巴细胞中完成最初的复制，随着细胞的崩解，进入血液循环和淋巴循环，导致病毒血症的形成和全身淋巴结的感染。PRRSV侵入细胞的方式是首先和PAMs的受体结合。然后通过胞饮作用进入细胞，在PAMs和肺内皮细胞中进行复制，造成大量PAMs凋亡。Albina等[12]报道PRRSV感染猪后2h, PAMs的吞噬作用增强。但是，在感染后7 d, PAMs的吞噬作用显著减弱，其释放超氧阴离子的能力也下降，

PAMs依赖于超氧负离子而发挥杀菌作用的功能就下降，从而不能消灭细胞外细菌，机体防御机制破坏，易继发感染，使感染猪的免疫力降低，引发免疫抑制，造成多系统多器官疾病。

目前，已有研究者从氧化应激的角度去分析了PRRSV对细胞的损伤机理。然而，众多研究呈现不同的结论，体外培养的PAMs在受到PRRSV感染时，细胞的氧化应激状态存在差异，即细胞产生的超氧阴离子和过氧化氢等自由基的变化在不同的研究中存在争议，如Chiou[10]等认为PAMs 感染PRRSV 后自由基合成总量上升，而

Thanawongnuwech[13]等则认为PAMs合成自由基的能力下降，另有Lee等研究发现

PRRSV感染的PAMs和MARC-145细胞能产生大量活性氧自由基，最终导致细胞凋亡和坏死[14, 15]。

## 1.3 病毒感染与信号转导通路

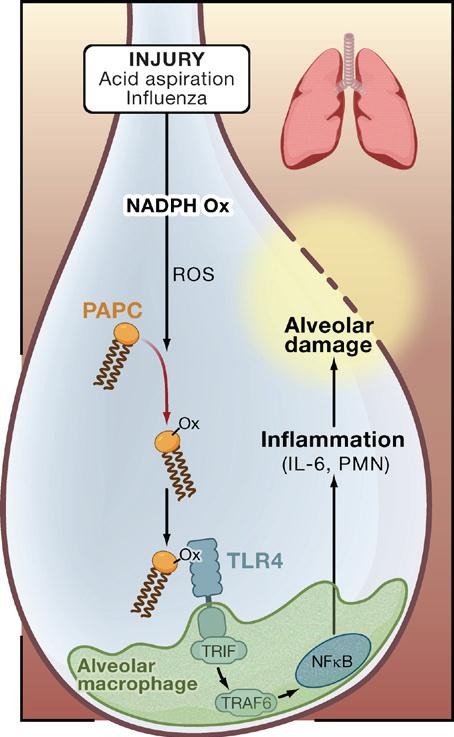
近年来发现，机体疾病的发生、发展与机体的氧化应激状态密切相关，氧化应激(Oxidative stress, OS)的概念最早源于人类对衰老的认识。1956年英国学者Harmna首次提出自由基衰老学说，该学说认为自由基攻击生命大分子造成组织细胞损伤是引起机体衰老的根本原因，也是诱发肿瘤等恶性疾病的重要起因。1990年，美国衰老研究的权威Sohal教授指出自由基衰老学说的种种缺陷，并首先提出氧化应激的概念。氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时，细胞内的活性氧（Reactive oxygen species，

ROS）如氧自由基（Oxygen free radicals, OFR）和氮中心自由基产生过多，超过机体抗氧化能力时的状态，氧化程度超出氧化物的清除能力，导致大量氧化中间产物的产生和聚集，氧化系统和抗氧化系统失衡，从而导致细胞和组织损伤。病毒感染的机体常处于慢性氧化应激状态，病毒诱导宿主细胞产生氧化应激，释放大量活性氧自由基[16]。氧化应激是病毒感染引起的病理进程中非常重要的一环，病毒感染后产生的ROS可在机体内引起氧化应激并增强宿主细胞对前氧化因子的敏感性，造成广泛的损伤作用，从而加重疾病进程。

机体在遭受各种有害刺激导致机体处于氧化应激状态时，其下游的信号通路也成为近几年研究的重要热点之一。有研究显示ROS激活Akt、NF-κB和mTOR信号通路[17]，朱宝益[18]等在前列腺癌组织中发现了miR-96参与前列腺癌细胞的氧化应激信号途径。澳大利亚科学院的有关研究人员通过制备无活性的H5N1禽流感病毒感染诱导急性肺损伤的模型[19]。此研究中，发现病毒感染引起的急性肺损伤可激活体内氧化应激反应，导致ROS的释放和氧化磷脂(Oxidation phospholipids, OxPLs)的产生；肺脏由于表面积很大且暴露于有氧环境中，因此是氧化应激产生的一个重要位点；

OxPLs(如OxPAPC)可直接或间接的激活TLR4信号级联反应，促进巨噬细胞释放细胞因子，通过TLR4-TRIF-TRAF6-NF-κB信号转导通路调节急性肺损伤的严重程度，这条信号通路是决定急性肺损伤易感性的主要遗传通路，发生在髓样细胞

（myeloidcells）中，特别是肺巨噬细胞中。因此，致炎因子导致的免疫反应和多种原因引起的急性肺损伤都依赖于氧化应激反应[20, 21]。下图是关于氧化磷脂活化造成急性肺损伤示意图（图1）[19]。



**图1** **氧化磷脂和急性肺损伤**

Figure 1 Oxidized phospholipids and acute lung injury

### 1.3.1 TLR信号通路

Toll样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)是近年来发现的一类进化保守的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)，是免疫系统抵抗病原微生物感染的天然受体[22, 23]。通过识别细菌、病毒等不同病原相关分子模式(pathogen associated molecular

pattern, PAMP），在启动天然免疫和炎症反应中起着核心作用[24]，并且被认为是治疗多种急、慢性疾病的有重大前景的新的药物靶点[25]。TLRs识别其相应的配体结合后激活信号转导途径诱导宿主防御功能基因的活化表达，包括促炎性细胞因子、抗炎性细胞因子、趋化因子、抗原提呈分子和共刺激分子等，从而发挥相应的清除病原微生物以及炎症免疫反应[26-29]. Toll样受体3 (Toll-like receptor 3, TLR3)是广泛表达于呼吸系统DC细胞、巨噬细胞和肺上皮细胞PRRs之一，其介导的天然免疫应答反应已被证实可以被感染的病毒所激活[30,31]（烟曲霉）。TLR3能特异性地识别病毒双股RNA(double-stranded RNA, dsRNA)而活化细胞，PRRSV在复制和转录过程中可产生大量dsRNA，因此被TLR3识别而活化[32, 33]。

TLRs信号传导主要包括2条途径：MyD88依赖性和TRIF依赖性途径。TLR3与其它TLRs信号传导的不同之处在于不依赖转接蛋白髓样分化因子88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)，而是依赖能诱导产生β干扰素的含

TIR 结构域的衔接蛋白（TIR-domain-containing adaptor inducinginterferon-β, TRIF），

即所谓的TRIF途径[34]。有研究发现，TRIF缺陷的小鼠TLR3信号转导通路会完全缺陷，与此同时，对TRIF基因进行化学诱导突变，也会引起TLR3信号转导通路的缺陷[35]。TLR3与病毒dsRNA结合后，TLR3募集TRIF，两者的TIR结构域相互结合引起一系列级联反应，最终导致NF-κB的活化，发挥其在天然免疫中的作用。

TLR3活化募集TRIF以后诱导的NF-κB活化途径是TRIF的氨基端能与肿瘤坏死因子受体相关因子6（tumour-necrosis-factor receptor-associated factor 6, TRAF6）的羧基端结合，通过TRAF6诱导NF-κB的活化（图2）。



**图2** **TLR介导的信号转导途径图示**

Figure 2 Overview of the TLR signalling pathway

### 1.3.2 NF-κB信号通路

1986年Sen和Baltimore首先发现NF-κB[36]。它是一类蛋白质，具有和某些基因上启动子区的固定核苷酸序列结合而启动基因转录的功能。最初是从B细胞的核抽提物中发现的一种能与免疫球蛋白κ链基因的增强子κB序列特异性结合的核蛋白因子，所以称为细胞核转录因子-κB (Nuclear transcription factors - kappa B, NF-κB)。在机体正常细胞中，NF-κB与其抑制因子IκB相互结合，以无活性的状态定位于细胞质中。当细胞受到细胞外信号如应激刺激、细菌脂多糖、病毒、氧自由基等刺激时，IκB

激酶复合体（IκBκinase，IΚΚ）活化，将IκB磷酸化，进而使NF-κB活化暴露核定位位点，后迅速移位到细胞核与特异性κB序列结合，继而启动或抑制相关基因的转录。在许多细胞中，NF-κB被发现是第一个可以对氧化应激应答的真核转录因子[37]。亦有研究给出一些证据来证明多种因子都能通过氧化应激来激活NF-κB：（1）在某些细胞株中，直接应用H2O2可以激活NF-κB；（2）在转基因小鼠的AD模型中，发现大量升高的氧化应激标志物；（3）Aβ的神经毒性可以被抗氧化剂减弱，比如VitE，拉扎洛依以及自由基清除剂；（4）那些影响细胞内ROS的抑制剂或酶的过分表达可以通过一些因子来调节NF-κB的激活。这些理论提出了H2O2可能是NF-κB激活的第二信使[38, 39]。目前的研究认为NF-κB的激活机制有两条途径[40]：（1）IκB磷酸化一泛素一降解途径：当细胞受到上述多种刺激后，使IκB被迅速磷酸化，经过短暂的泛素化修饰后进而被26S蛋白酶小体降解，从而解除了对核定位信号(NLS)的控制，NF-κB得以转位到核内并与含有基因转录序列的DNA结合，促进基因表达；IκB基因的启动子中含有多个κB结合位点，NF-κB活化后可上调IκB的基因表达，使NF-κB的激活被终止。（2）氧化刺激通路：NF-κB是一个氧化还原敏感的转录因子，在机体代谢过程中体内各种氧化酶如腺嘌呤二核甘酸磷酸酶(NADPH)、细胞色素450(P450)、脂质氧化酶、细胞氧化酶等参与的反应中产生的氧自由基(ROS)可激活NF-κB。另外有研究发现，一些病毒感染细胞时都可以诱导NF-κB活化，如乙型肝炎病毒（HCV）、免疫缺陷病毒（HIV）、H1N1流感病毒、脑肌炎病毒（EMCV）、腺相关病毒（AAV）、嗜异性鼠白血病病毒相关病毒（XMRV）、蓝舌病病毒(BTV)以及猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）等，然而不同的病毒诱导产生的NF-κB在生理效应上也不尽相同，或诱导一些炎性基因的转录引起炎症反应[41]、或阻碍细胞凋亡促进其自身在宿主细胞里的复制[42]、或促进某些原癌基因的表达使细胞癌化[43]等。

### 1.3.3 TLR3/NF-κB信号通路在PRRS中的作用

TLR3与配体结合激活信号转导通路，并诱导炎性细胞因子的转录，进一步激活细胞的免疫功能。PRRS发病的重要机制之一是大量炎性细胞因子的产生以及多种免疫细胞功能的紊乱，通过细胞信号转导途径诱导了相关基因表达的改变。

刘倩、黄慧等的前期实验发现：PRRSV感染仔猪后，仔猪血液中自由基含量增加，NF-κB mRNA及蛋白的表达水平显著升高，说明PRRSV感染后细胞内的NF-κB被激活了，最终通过NF-κB相关信号转导通路诱导了仔猪肺脏损伤；PRRSV感染可

诱导MARC-145细胞产生过多的自由基，改变细胞的氧化应激状态，还可显著上调MARC-145细胞内NF-κB基因的表达。然而，病毒感染细胞后所诱导的一系列反应是否与细胞内的氧化应激状态改变有关？在PRRSV造成的PAMs损伤机制中，ROS-TLR3-NF-κB是否也参与了这一过程？

## 1.4 本研究的目的及意义

为探讨PRRSV感染PAMs氧化应激状态的影响，本研究旨在PRRSV感染体外分离培养出仔猪PAMs，诱导氧化应激产生，并预先给予氧化应激的抑制剂和激动剂分别处理，用Real-time PCR法、Western-blotting法对TLR3/NF-κB信号传导通路中

TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB的mRNA及蛋白的测定，揭示PRRSV致PAMs氧化应激损伤中的作用机制，以期从氧化应激的角度阐明PRRSV感染导致肺损伤的分子机制，为抗氧化剂的开发及应用提供理论依据，同时对于有效控制PRRSV引起的继发感染和抗病毒辅助治疗具有积极的促进作用。

## 1.5

试验技术路线

分别于 4、12、24、36、48 HPI 收集

正常对照组 PAM

PRRSV 感

染正常的

PAM

PRRSV 感染

经NAC 预处理的 PAM

PRRSV 感

染经 OxPLs

预处理的

PRRSV 感

染经 H2O2

预 处 理 的

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 体外分离培养健康仔猪肺脏中的 | |  |
| PAM |  |
|  | |  | |

观察 PAM 的 CPE，Real-time

PCR 测定 PRRSV、TLR4/3、

TRIF 、 TRAF6 、 NF-kB

mRNA 转录的动态变化

Western-blotting 分析 TLR3、

TRIF、TRAF6、NF-kB 蛋白

表达的动态变化

# 2

材料与方法

揭示 TLR3/ NF-kB 信号传导在 PRRSV 致 PAM 氧化应激损伤中的作用及其机制

## 2.1 主要试剂与仪器

### 2.1.1 主要仪器设备

Thermo生物安全柜美国Thermo scientific公司

CO2培养箱美国Thermo scientific公司

XDS-2倒置显微镜重庆光电仪器总公司

HWS-20型恒温水浴箱江苏太仓市实验设备厂

PHB-3pH酸度计宁波石浦海天电子仪器厂

LD4-2A型低速离心机北京医用离心机厂

IHIY-99型微型高速离心机广州正仪生物技术有限公司

DANGERSJ-CJ-1F型超净工作台苏州苏洁净化设备有限公司

Beckman超速冷冻离心机美国贝克曼库尔特有限公司

UV755B紫外可见分光光度计上海分析仪器厂

BIO-RAD PCR仪美国BIO-RAD公司

YXQ-SG46-280不锈钢压力蒸汽灭菌器上海博迅实业有限公司医疗设备厂

FA1004N电子天平上海精密科学仪器有限公司

WD-9403F凝胶成像紫外仪北京六一仪器厂

DYCP-31BN电泳仪北京六一仪器厂

24DN蛋白制胶器北京六一仪器厂

HHW21.600型电子恒温水箱北京光明医疗仪器厂

BC/BD-230S-70℃低温冰箱青岛海尔特种电冰柜有限公司

BIO-RAD-CFX荧光定量PCR仪美国BIO-RAD公司

### 2.1.2 主要试剂

#### 2.1.2.1 细胞培养所用试剂及其配制

（1）胎牛血清(FBS)：56℃灭活30min, -20℃冻存。Hyclone公司。

（2）DMEM培养基：Hyclone公司。

（3）胰蛋白酶溶液(0.25% trypsin-EDTA): GIBICO公司。

（4）青霉素链霉素溶液（双抗）：Hyclone公司。

（5）Hepes贮存液：Hyclone公司。

（6）7.5%NaHCO3溶液：7.5g NaHCO3溶于100ml双蒸水中，120℃高压灭菌

15min，置4℃冰箱保存备用。

（7）10%DMEM营养液：于DMEM溶液中加入10%胎牛血清，按照1%比例加入双抗，用7.5% NaHCO3溶液调节PH值7.2左右。

（8）细胞冻存液（100mL）：DMEM培养液69mL, FBS 20mL, DMSO 9mL, L-

谷氨酰胺（3%）1mL，双抗（1000U/ml）1mL，HAT 1mL。

#### 2.1.2.2 氧化剂与抗氧化剂的配置

（1）抗氧化剂NAC：取0.23gNAC溶于2mL双蒸水中，六孔细胞培养板中，每孔30μL，使终浓度为10mmol/L。

（2）氧化剂H2O2：取10μL100% H2O2于84420μL双蒸水中，六孔细胞培养板中，每孔50μL，使终浓度为500mmol/L。

（3）氧化剂OxPLs：根据说明书配置，工作浓度：30μg/mL。

#### 2.1.2.3 RNA提取试剂及溶液

##### （1）高纯总RNA快速提取试剂盒：北京百泰克生物技术有限公司。

##### （1）DEPC（焦碳酸二乙酯）：北京百泰克生物技术有限公司

##### （2）Trizol：Invitrogen公司

##### （3）氯仿（分析纯）

##### （4）异丙醇（分析纯）

##### （5）75%乙醇：无水乙醇75ml

灭菌ddH2O 25ml

混匀，4℃保存备用。

#### 2.1.2.4 SDS-PAGE电泳试剂配制

##### （1） 1mol/L Tris-HCl：Tris 12.11g (pH6.8) ddH2O 至80ml

混匀，浓HCl调pH至6.8，ddH2O定容至100ml，混匀，高压灭菌，室温保存备用。放置过程中，若溶液出现黄色，应丢弃，并重新配制

##### （2） 1.5mol/L Tris-HCl：Tris 18.17g (pH8.8) ddH2O 80ml

混匀，浓HCl调pH至8.8，ddH2O定容至100ml，混匀，高压灭菌，室温保

存备用。放置过程中，若溶液出现黄色，应丢弃，并重新配制

##### （3）10%SDS：SDS 10 g

Dd H2O 90mL

混匀，ddH2O定容至100ml，4～8℃保存备用。

##### （4）10%过硫酸铵：过硫酸铵1g

Dd H2O 9mL

混匀，于棕色瓶中4～8℃保存，保存时间不宜超过2周，因需现用现配。

##### （5）30%丙烯酰胺混合液：丙烯酰胺29g N, N'-双丙烯酰胺 1g

Dd H2O 60mL

37℃充分搅拌使其溶解，待完全溶解后，ddH2O定容至100ml，用0.45mm

滤膜抽滤去杂质。于棕色瓶中4℃保存。

##### （6）5×SDS -PAGE电泳缓冲液：Tris 15.1g Glycine 94.0g

SDS 5.0g

Dd H2O 800mL

充分搅拌使其溶解，待完全溶解后，ddH2O定容至1000ml，室温保存。使用时，水稀释5倍即成1×SDS -PAGE电泳缓冲液工作液。

##### （7）考马斯亮蓝染色液： 考马斯亮蓝R-250 1g

甲醇 250mL

冰醋酸 100mL

dd H2O定容至1L充分溶解后，滤纸过滤去除颗粒物质后，室温保存。

##### （8）脱色液： 甲醇 250mL

冰醋酸 100mL

dd H2O 定容至1L

充分混匀后，室温保存备用。

##### （9）5%浓缩胶： 10%SDS 0.05mL

30%丙烯酰胺混合液 0.83mL 1mol/L Tris-HCl(pH 6.8) 0.63mL

10%过硫酸铵0.05mL

Dd H2O 5mL

TEMED 0.01mlL

##### （10）12%分离胶： 10%SDS 0.07mL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 30%丙烯酰胺混合液 | 2.8mL |
| 1.5Mol/L Tris-HCl(pH 8.8) | 1.82mL |
| 10%过硫酸铵 | 0.07mL |
| Dd H2O  TEMED | 2.24mL  0.028mL |
| （11） 5×蛋白上样缓冲液： | 1.5Mol/L Tris-HCl(pH 6.8) | 1.25mL |
|  | 甘油 | 2.5mL |
|  | SDS | 0.5g |
|  | 溴酚蓝 | 0.025g |
|  | Dd H2O | 5mL |

充分混匀使其溶解，待完全溶解后，小份（0.5 mL）分装，室温保存。使用时，将25μLβ-巯基乙醇加入每小份中。

#### 2.1.2.5 Western Blotting试剂及溶液配制

##### （1）10×转膜缓冲液：Glycine 14.4g Tris 30.3g

甲醇200mL

Dd H2O 700mL

充分搅拌使其溶解，待完全溶解后，ddH2O定容至1000ml，4℃保存。使用时，水稀释10倍即成1×转膜缓冲液工作液。加去离子水定容至1L

##### （2）10×TBS缓冲液：Tris 12.1g Nacl 40g

Dd H2O 1000mL

充分搅拌使其溶解，待完全溶解后，4℃保存。

##### （3）TBST 缓冲液： 10×TBS 缓冲液 100 mL

吐温-20 1 mL

Dd H2O 900mL

##### （4）封闭液： 脱脂奶粉 5g TBST 100 mL

充分搅拌使其溶解，待完全溶解后，4℃保存。

##### （5）一抗稀释液：脱脂奶粉2g

叠氮钠0.1g

TBST 100 mL

充分搅拌使其溶解，待完全溶解后，4℃保存。

##### （6）二抗稀释液：脱脂奶粉1g TBST 100 mL

充分搅拌使其溶解，待完全溶解后，4℃保存。

#### 2.1.2.6 所用试剂盒

PRRSV抗体ELISA检测试剂盒（北京爱德士元亨生物科技有限公司）

2xEasy Taq PCR Super Mix（北京百泰克生物有限公司）Trans2K DNA Marker（北京全式金生物技术有限公司）

One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix（北京全式金生物技术有限公司）

pEASY-T1 Cloning 试剂盒（北京全式金生物技术有限公司）

BCA蛋白质定量试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司）叠氮钠（碧云天生物技术研究所）

UltraPowerTM核酸染料（北京百泰克生物有限公司）

Trizol试剂、DEPC（北京百泰克生物有限公司）

SuperReal荧光定量预混试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司）总蛋白提取试剂盒（上海贝博生物试剂公司）

TLR3兔多克隆抗体（美国Santa公司出品）

TRIF鼠多克隆抗体（美国Acris公司出品）

TRAF6兔多克隆抗体（美国Santa公司出品）

NF-κB兔多克隆抗体（美国Abcom公司出品）

Actin鼠多克隆抗体（上海艾比玛特生物医药有限公司出品）

羊抗兔/鼠HRP标记二抗（上海艾比玛特生物医药有限公司出品）

增强型HRP-DAB底物显色试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司）双色预染蛋白质Marker（天根生化科技（北京）有限公司）

其他试剂均为国产分析纯

## 2.2 主要计算机应用软件DNAMAN 5.2.2查找基因的保守序列软件Primer 5.0引物设计软件

SPSS20.0数据分析软件

BIO-RAD-CFX荧光定量分析软件

Gel-PRO ANALYZER 凝胶定量分析软件

## 2.3 统计与分析

数据用社会统计学软件（Statistical program for social science, SPSS）进行统计分析，各组实验数据以均数±标准差（*x*±s）表示，用双因素方差分析比较各组均数相差的显著性，以P<0.05表示差异显著，P<0.01为差异极显著。

2-△△Ct表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数，使用这一方法

可以直接得到目的基因相对于管家基因的定量。

△△Ct=（目的基因Ct–管家基因Ct）实验组-（目的基因Ct–管家基因Ct）对照组

蛋白表达量表示的是各实验组目的基因的表达相对于管家基因表达的变化倍数，使用这一方法可以直接得到目的基因相对于管家基因的定量。



相对表达量=

## 2.4 实验

### 2.4.1 PAMs的获取

1. 将PRRSV阴性健康猪从颈动脉放血致死，剖开胸腔，结扎气管后连同心脏取出完整的肺脏，用无菌生理盐水充分漂洗肺表面，清除血块、污物。

2. 从气管注入灭菌PBS 50-100mL于肺脏，轻轻拍打肺表面，1-2min后，回收灌洗液，同上方法重复灌洗2-3次，直到共回收约100-200mL灌洗液。

3. 将回收的支气管肺泡灌洗液用吸管轻轻吹打，使细胞其团及粘液块打散，用单层无菌100目不锈钢筛过滤，收集全部灌洗液，1800r/min，离心5min，留沉淀。

4. 用无菌PBS重悬细胞，1800r/min，离心5min，留沉淀。

5. 同上方法重复洗涤1次。

6. 用10%RPMI-1640营养液重悬细胞，置细胞瓶，在37℃，5%CO2的培养箱中吸附2h。

7. 弃上清，用2%RPMI-1640营养液洗涤2次，出去非粘附细胞。

8. 用10%RPMI-1640营养液将细胞轻轻吹打下来并悬浮，进行细胞计数，将细胞稀释成106个/mL浓度后，以每孔2mL铺在6孔细胞培养板上培养24h待用。

### 2.4.2 PAMs细胞的培养

#### 2.4.2.1 细胞培养前的准备工作

（1）注意无菌实验室的使用规范；

（2）细胞培养常用实验器材（玻璃器皿、橡胶制品、塑料制品）的浸泡、清洗、包装和灭菌；

（3）细胞培养液的配制、灭菌和保存。

#### 2.4.2.2 细胞计数：采用血细胞计数器计数法

（1）用胰蛋白酶处理细胞，细胞重悬于细胞培养液中；

（2）用毛细吸管吸出欲计数的两份细胞标本，依靠毛吸管作用细胞悬液进入覆盖盖玻片的计数器；

（3）对细胞计数器两边的9个大方格中各5个格即共10个格进行计数；

（4）合计10个大方格的细胞数（每室5个，共2室），算出1×10－3ml中的细胞数（每个大方格1×10－4mL×10个大方格=10－3容积），细胞总数乘以1000即得每毫升计数细胞悬液的细胞数。

（5）计数完毕后立即用双蒸水清洗计数器和盖玻片，然后用70%乙醇清洗，用擦镜纸擦干。

### 2.4.3 PRRSV对PAMs细胞的氧化应激损伤TLR3/NF-κB信号通路各因子的测定

#### 2.4.3.1 Real-time法测定PRRSV对PAMs细胞内TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB、PRRSV mRNA转录水平的影响

##### （1）PRRSV感染PAMs

将取出的PAMs悬浮后，以约106个/ml的细胞密度转入六孔细胞培养板（Costar, Corning Incroporated, U. S. A），继续置37℃，5%CO2培养箱里培养过夜，形成80%左右的单层细胞。

取实验室分离PRRSV株的细胞混合培养物，反复冻融3次，12000r/min离心

10min，长成单层的PAMs的六孔细胞培养板加入离心后的上清液200μL/孔（TCID50：

10－4.853／0.1ml）感染，换细胞培养液，置37℃，5%CO2培养箱培养。

##### （2）实验分组与标本收集

整个实验分为5组：①未感染PRRSV的细胞为正常对照组；②感染PRRSV为正常接毒组；③NAC处理接毒组：加入10mmol/LNAC，置于37℃，5%CO2培养箱中预先孵育1h后，再行PRRSV感染；④H2O2处理接毒组：加入50μLH2O2，置于37℃，5%CO2培养箱中预先孵育1h后，再行PRRSV感染；⑤OxPLs处理接毒组：将OxPLs调整终浓度为30μg/ml加入六孔细胞培养板中，置于37℃，5%CO2培养箱中预先孵育1h后，再行PRRSV感染。分别于6h、12h、24h、48h、72h五个感染时间点，每组重复3个复孔。

标本收集处理：在各组感染时间点到达后，分批处理细胞。收集细胞和细胞培养上清分别置于无菌EP管中，-80℃保存备用。

##### （3）细胞总RNA的提取

用Invitrogen公司Trizol提取试剂盒提取细胞总RNA。在提取总RNA时，尽量防止空气中RNA酶的污染，所用器皿及消耗品均事先经0.1%DEPC处理或者为无

RNA酶产品，具体操作程序如下：

①取上述各时间点采集的细胞每管加入500ml Trizol试剂，剧烈震荡15s，室温孵育5min；

②加入100μl冷氯仿，振荡离心管数秒，室温静置3min。

③12000 rpm 4℃离心15min，此时样品分三层，无色的水相（上层）、中间层、

有机层（下层），RNA主要在上层水相中，吸取上清液至另一离心管中。

④没使用1ml Trizol试剂加入500μl异丙醇，轻微上下颠倒离心管数次，－20℃静置15min。

⑤12000 rpm 4℃离心10min，弃上清，加入lml预冷的75%乙醇（DEPC处理过的水配制），将管底RNA沉淀弹出，上下颠倒洗涤。

⑥12000 rpm 4℃离心5min后弃去乙醇，将离心管倒扣在吸水纸上，室温干燥。

⑦待管壁乙醇蒸发后，加入30～50μl DEPC无酶双蒸水溶解，55℃～60℃孵育

10min取RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳检测，10V/cm(正负电极之间距离) 20min左右电泳，凝胶成像系统下观察以检查其完整性，RNA样品置于－70℃保存备用。

注意事项：

a．所有的玻璃器皿均应在使用前于180℃的高温下干烤6h或更长时间。

b．所用的塑料材料，如洗头、离心管等需用0.1%DEPC水浸泡过夜。

c．配制溶液应尽可能用0.1%DEPC水，在37℃处理12h以上，然后用高压灭菌出去残留的DEPC。不能高压灭菌的试剂，应当用DEPC处理过的无菌双蒸水配制，然后经0.22μM虑膜过滤除菌。

d．操作人员需在超净工作台上操作，并戴一次性口罩、手套，实验过程中手套要勤换。

##### （4）起始RNA模板的定量及cDNA的合成

用紫外可见光核酸蛋白分析仪检测所提取RNA样品的A260/280值、A260/230值及RNA浓度（1.9<A260/280值>2.1及2.0<A260/230值>3.0时可判断RNA样品完整性良好），取完整性良好的RNA样品进行定量使其起始RNA模板量为2000ng，然后进行反转录，按照北京全式金One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis

SuperMix反转录试剂盒说明书步骤操作，具体步骤见表1：轻轻混匀，在PCR仪上按以下条件进行反转录反应：

①42℃，30min；

②85℃，5min；

之后随即冰上冷却，所得产物即cDNA，置于－20℃保存待用。

**表 1** cDNA**合成反应体系**

Table 1 Components of cDNA system

| Component | Volume |
| --- | --- |
| **Total RNA** | 2000ng |
| Anchored Oligo(dT)18Primer ( 0.5 μg/μl) | 1 μl |
| 2×TS Reaction Mix | 10 μl |
| RT/RI Enzyme Mix | 1 μl |
| GDNA Remover | 1 μl |
| RNase-free Water up to | 20 μl |

##### （5）Realtime-PCR引物设计

进入NCBI网站Genbank中查找公开发表的β-actin、TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB和PRRSV基因序列，遵循Real-time PCR引物设计原则进行引物设计，各引物均用灭菌去离子水配成100 M的母液-20℃长期保存，同时取少量配成10μM工作液50μL装于0.5mL灭菌Eppendorf管于4℃保存备用。引物设计结果表2所示。

**表 2** PRRSV**、TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB因和内参基因β-actin的引物设计结果**

Table 2 Result of Specific primers for PRRSV、TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB andβ-actin gene

| Name | Sequences | Primer  Length | Tm(℃) | Size(bp) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| β-actin | 5`→3`: GATGAGATTGGCATGGCTTT (F) | 20 | 53.35 | 100 |
| 5`→3`: CACCTTCACCGTTCCAGTTT (R) | 20 | 55.40 |
| PRRSV | 5`→3`: GGTGTATCGTGCCGTTCT (F) | 18 | 56.0 | 143 |
| 5`→3`: CTCCACTGCCCAATCAAA (R) | 18 | 54.0 |
| TLR3 | 5`→3`:AAAATCTCCAAGAGCTTCTATTAGCAA (F) | 27 | 56.34 | 119 |
| 5`→3`:TTGTATTTGATTTGATGACAACTCTAATCTTT (R) | 32 | 56.4 |
| TRIF | 5`→3`: ACTCGGCCTTCACCATCCT(F) | 19 | 60.0 | 87 |
| 5`→3`: GGCTGCTCATCAGAGACTGGTT(R) | 22 | 59.99 |
| TRAF6 | 5`→3`: GGAGCTGACTGCTAAAATGG(F) | 20 | 55.4 | 235 |
| 5`→3`: GCGCATGCACAGTTTGTACC(R) | 20 | 55.4 |
| NF-κB | 5`→3`:TGTGATCCTGAGCTCCGAGACTTT(F) | 24 | 60.4 | 143 |
| 5`→3`:TTGTAGTTGGTGGCCTGCAGAATG (R) | 24 | 60.4 |

引物合成由北京华大基因生物科技有限公司完成。

##### （6）Realtime-PCR反应体系及循环参数

目标基因片段及内参基因β-actin Realtime-PCR反应体系组成见表3。

**表 3** **基因25**μl **PCR反应体系的组成**

Table 3 Components of 25μl PCR system for gene

| Component | Volume |
| --- | --- |
| cDNA 模板 | 2 μl |
| Forward primer(10μM)  Reverse primer(10μM) | 0.75μl  0.75μl |
| 2×SuperReal PreMix Plus | 12.5 μl |
| Add RNase-free ddH2O up to | 25 μl |

将上述反应液加入0.2mL Realtime-PCR 专用八联排管中混匀，稍稍离心，在

Bio-rad Realtime-PCR仪上进行反应，反应程序设置如下：

**表 4 基因的 Real-time PCR反应程序**

Table 4 Real-time PCR reaction procedures of gene

| Phase | Circle | Temperature | Time | Content | Fluorescence signal  acquisition |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Predenaturation | 1× | 95℃ | 15min | Predenaturation | No |
|  |  | 95℃ | 20sec | denaturation | No |
| PCR reaction | 39× | 60℃ | 40sec | anneal | No |
|  |  | 72℃ | 30sec | extension | Yes |
|  |  | Melting Curve Stage | |  |  |

#### 2.4.3.2 Western Blotting法测定PRRSV对PAMs细胞内TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB蛋白水平的影响

##### （1）细胞总蛋白的提取

取事先保存在-80℃的各组样本，做好标记。采用上海贝博生物试剂公司总蛋白提取试剂盒，严格按照使用说明操作。

①提取液制备：每500μL冷的总蛋白提取液中加入2μL蛋白酶抑制剂混合物和

2μL磷酸酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

②取5×10 6个细胞，在4℃，1000rpm条件下离心10min，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞。

③用冷PBS洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。

④每5×10 6个细胞中加入500μL冷的总蛋白提取液，混匀后，在4℃条件下震荡

20min。

⑤在4℃，14000rpm条件下离心15min。

⑥快速将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到总蛋白。

⑦将上述蛋白提取物进行BCA定量后分装于-80℃冰箱保存备用。注意事项：

a．实验过程中的所有试剂须预冷；所有器具须放-20℃冰箱预冷。b．整个过程须保持样品处于低温。

c．操作人员需在超净工作台上操作，并戴一次性口罩、手套，实验过程中手套要勤换。

##### （2）BCA法蛋白定量

原理：BCA法是蛋白质分子中的肽键结构在碱性环境下能与Cu2+生成络合物，并将Cu2+还原成Cu2+，而BCA试剂可敏感特异地与Cu2+结合，形成稳定的有颜色的复合物，并在562nm处有最大吸收值，该复合物颜色深浅与蛋白质浓度成正比，可根据吸收值的大小来测定蛋白质的含量。

严格按照天根生化科技（北京）有限公司BCA蛋白定量试剂盒说明书进行操作。其中牛血清白蛋白（BSA）为标准溶液，测定范围为20~2000μg/ml。

①标准品的稀释：用与样品相同缓冲体系的稀释剂按表10对BSA标准品进行稀释：

**表 5** BSA**标准浓度配置表**

Table 5 BSA standard concentration Configuration Table

| 管号 | 稀释剂体积（μL） | BSA 体积（μL/来源） | BSA 终浓度（μg/mL） |
| --- | --- | --- | --- |
| A | 0 | 300/母液 | 2000 |
| B | 125 | 375/母液 | 1500 |
| C | 325 | 325/母液 | 1000 |
| D | 175 | 175/B 管 | 750 |
| E | 325 | 325/C 管 | 500 |
| F | 325 | 325/E 管 | 250 |
| G | 325 | 325/F 管 | 125 |
| H | 400 | 100/G 管 | 25 |
| I | 400 | 0 | 0（空白对照） |

②配制BCA工作液：依据样品数量，将试剂A和试剂B按体积比50: 1配制适

量BCA工作液，并充分混匀。

③标准比色杯测定方法：

a.吸取0.1mL的每种标准品和待测样品置于合适的管中。

b.加入2.0mL的BCA工作液，彻底混匀。

c.加盖，37℃孵育30min后冷却至室温或室温放置2h。

d.用紫外分光光度计于562nm处检测其吸光度。

e.根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

由待测样品所得的值A，查标准曲线，带入公式，求得待测样品的蛋白含量，乘以稀释倍数，即为待测样品的蛋白含量。

##### （3）Western blotting步骤

①SDS-PAGE电泳

将上述测得蛋白加5×上样缓冲液，100℃煮沸5min，冷却至室温，10000×g离心1min弃上清用做SDS-PAGE检测。

a. 分离胶选择：TLR3、TRIF、TRAF6、NF-кB蛋白大小分别为117KDa、57Kda、60 Kda、65 KDa，选择12%的分离胶和5%的浓缩胶。

b. 灌胶：分离胶在加入10% AP后应立即混均，加入到凝胶模具中，留出浓缩胶所需空间，用吸管沿玻璃板壁小心滴加约1 cm厚的无水乙醇。凝胶30 min左右聚合，倾出覆盖层乙醇，用双蒸水洗涤凝胶顶部数次，除去未聚合的丙烯酰胺，并用滤纸吸去残留的液体。

c. 将配好的浓缩胶溶液加入10% AP后快速混合后灌注在已聚合的分离胶上，并立即在浓缩胶溶液中插入干净的梳子，将凝胶垂直放置于室温下，避免移动。

d.浓缩胶聚合后，小心拨出梳子，将凝胶固定在电泳装置上，加入1×电泳缓冲液。

e.样品的准备：按样品缓冲液：样品= 4: 1入的比例加5×SDS上样缓冲液，混合均匀后在100°C 水溶中沸煮5 min，冷却离心后即可上样。根据样品的蛋白浓度上样。

f. 把电泳装置放在电泳槽内加入1×电泳缓解液，将电流设置在20mA，待样品进入分离胶后可将电流调至30 mA，继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部，关闭电源。从电泳装置上卸下玻璃板，取出凝胶。

染色与脱色：将电泳后的凝胶放置于5倍体积的染色液室温下振荡染色4 h，倒出

染色液以后备用，用双蒸水冲洗酌留的染色液。将凝胶浸入脱色液中，45℃脱色2 ~ 3

h，期间更换3 ~ 4次脱色液，至蛋白条带清晰，拍照保存。

②电转移

a.进行完SDS-PAGE的凝胶取出，戴上一次性手套，准备6张滤纸，1张NC膜，裁剪成与凝胶等大；将滤纸、NC膜与凝胶浸泡于预冷的转移液中，平衡10min。

b.打开转移盒，将用转移液浸没的海绵垫放在塑料板黑面上的多孔垫片上，再逐张叠放3张转移液平衡过的滤纸，精确对齐后用玻璃管作滚筒排出气泡。

c.凝胶对齐叠放于滤纸上，将NC膜放在凝胶上，用玻璃管滚动挤去气泡，再放上

3张滤纸，1层多孔垫片，用塑料板夹紧。

d.凝胶面阴极，NC膜阳极，组装好转移装置，将整个装置置于冰浴中，100V 1h转印。

e.转移结束后，取出NC膜晾干至室温风干10min，进入丽春红染色液染色5-10min，取出用蒸馏水漂洗至条带清晰，检测转印效果。

③免疫印迹（blot）

a.丽春红染色后，将所需蛋白膜剪下，标记好后，放入蒸馏水漂洗干净。b.封闭：将 NC 膜放入 5%脱脂奶粉中，室温震荡 2h. c.洗膜：用TTBS洗膜，每次8min，洗3次。

d.一抗：将NC膜放入一抗中孵育，4℃过夜。

e.洗膜：用TTBS洗膜，每次8min，洗3次，在一抗中加入防腐液，4℃保存。

f.二抗：将NC膜放入二抗中孵育，室温震荡2h。

g.洗膜：用TTBS洗膜，每次8min，洗3次。

h.显色：将膜放入DAB溶液中显色。

i.拍照：用Gel-pro分析灰度值。

# 3 结果

## 3.1 感染PRRSV的PAMs出现CPE情况

取出健康仔猪PAMs接于六孔细胞培养板中，经五种方式处理细胞，即五组实验组，于6h、12h、24h、48h、72h分别观察细胞出现的肉眼可见的CPE，图3至图7分别为PAMs为48h五组实验组的细胞状态，其余时间段CPE变化基本一致。



**图3** **未感染PRRSV的PAMs（400×）Figure 3** **PAMs noninfected with PRRSV（400×）**图中细胞无CPE出现，细胞呈圆形或椭圆形



**图4** **感染PRRSV的PAMs（400×）Figure 4** **PRRSV-infected PAMs（400×）**图中细胞出现CPE，细胞变形聚集



**图5** **NAC处理感染PRRSV的PAMs（400×）**

**Figure** **5** **PRRSV-infected PAMs with NAC treatment（400×）**

图中细胞出现CPE，少量细胞变形聚集



**图6** **H2O2处理感染PRRSV的PAMs（400×）**

**Figure** **6** PRRSV-infected **PAMs with H2O2 treatment（400×）**

图中细胞出现CPE，细胞大量变形聚集，甚至脱落



**图7** **OxPLs处理感染PRRSV的PAMs（400×）**

**Figure** **7** **PRRSV-infected PAMs with OxPLs treatment（400×）**

图中细胞出现CPE，细胞严重变形，大量细胞聚集、脱落

## 3.2 TLR3/NF-κB信号通路在PRRSV感染PAMs损伤作用分析

### 3.2.1 细胞内PRRSV、TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB mRNA转录水平结果分析

#### 3.2.1.1 RNA完整性检测

总RNA在琼脂糖凝胶电泳显示三条清晰的条带，分别为核糖体RNA的28S、18S、

5.8S和5S四个亚基的三条带，其中5.8S和5S条带是分不开的。提取的总RNA 用

1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果，见图8所示。

28S



18S

5S

**图 8** **部分样品提取总RNA**

**Fig 8** Isolation result of total **RNA**

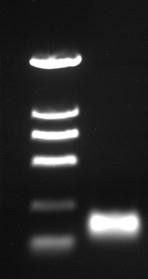
从图8可以看出，没有蛋白污染，且三条带比较清晰，测定A260/A280比值均在1.8～2.0之间，计算并且稀释RNA的浓度，进行后续试验。

#### 3.2.1.2 TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB、PRRSV和内参β-actin基因产物电泳结果

以cDNA为模板，RT-PCR反应产物经1.5%琼脂糖电泳，扩增结果，见图9所示。

M 1 M 1

100bp



(A)

(B)

143bp



119bp



(C) (D)



(E)



235bp

(F)

87bp

143bp

**图 9** PCR**电泳产物扩增结果**

**（M: 2000marker, 1：PCR产物）**

**Fig 9** The results of PCR **products**

**(M:2000marker,1: PCR products)**

从图9可以看出，显示与预期相符，良好的、目的条带。其中A、B、C、D、E和F代表内参β-actin、PRRSV、TLR3、TRIF、TRAF6和NF-kB基因，扩增片段大小分别为100bp、143bp、119bp、87bp、235bp和143bp，特异性条带较亮，无拖带现象，说明退火温度、循环数等反应条件较佳。

#### 3.2.1.3 β-actin基因Real-time RT-PCR标准曲线

用内参β-actin基因标准质粒为模板进行Real-time RT-PCR得到标准曲线，如图

10所示。



**图10** **β-actin标准质粒荧光定量RT-PCR反应的标准曲线**

**Fig 10 The real timeRT-PCR standard plasmid curve ofβ-actin**

从图10显示β-actin基因检测的标准曲线：相关系数R2=0.991，E=99.3%，斜率为-3.339，线性关系良好，在实验范围内能够进行相对定量。

#### 3.2.1.4 细胞中PRRSV转录水平结果分析

以参照基因β-actin作为标准进行相对定量的Real-time PCR，样品目的基因的动力学扩增曲线和熔解曲线如图11所示。



**图11** **PRRSV基因的扩增曲线和熔解曲线**

**Figure** **11** **Aamplification curve and Melting curve of PRRSV gene**

各时间点对照组和实验组Ct值如表6 所示，数据显示对照组和实验组细胞的

PRRSV基因表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与实验组之间PRRSV相对表达量差异较大。

根据各时间点Ct值，用2-△△Ct法来计算实验组PRRSV相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的mRNA表达差异如图12所示。从图12可以看出，各时间点实验组均显著高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中PRRSVmRNA的表达上调且具有感染时间依赖性，48h达到最大值。与对照组相比，正常接毒组PRRSVmRNA的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，6h起极显著升高具有统计学意义；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行PRRSV感染，PRRSVmRNA的表达量

**表6** **不同时间点细胞中PRRSV基因相对表达量（Ct值）**

Table 6 PRRSV gene relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | Ct Value |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | β-actin | 18.56±0.04 | 17.1±0.03 | 17.34±0.11 | 18.2±0.13 | 17.64±0.11 |
| 对照组 | PRRSV | 34.18±1.3 | 33.85±0.07 | 24.83±0.18 | 28.44±0.2 | 29.33±0.17 |
|  | △Ct | 15.62±0.15 | 16.75±0.1 | 7.49±0.07 | 10.24±0.06 | 11.59±0.06 |
|  | β-actin | 17.12±0.01 | 17.51±0.10 | 17.93±0.2 | 17.13±0.15 | 17.5±0.14 |
| 接毒组 | PRRSV | 26.81±0.11 | 27.72±0.04 | 18.44±0.19 | 19.18±0.12 | 20.99±0.13 |
|  | △Ct | 9.69±0.1 | 10.21±0.14 | 0.51±0.4 | 2.05±0.27 | 3.49±0.01 |
| △△Ct | | -5.93±0.25 | -6.54±0.04 | -6.98±0.33 | -8.19±0.2 | -8.1±0.06 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 60.97±10.52 B | 93.05±2.73 B | 126.24±28.59 A | 292.04±41.43 B | 274.37±13.02 B |
|  | β-actin | 18.34±0.02 | 18.18±0.01 | 18.3±0.10 | 18.02±0.03 | 17.16±0.04 |
| NAC 接  毒组 | PRRSV | 28.36±0.08 | 28.58±0.23 | 19.09±0.04 | 20.54±0.04 | 21.12±0.12 |
|  | △Ct | 10.02±0.1 | 10.45±0.23 | 0.79±0.14 | 2.52±0.01 | 3.96±0.08 |
| △△Ct | | -5.6±0.25 | -6.3±0.33 | -6.7±0.21 | -7.72±0.05 | -7.63±0.02 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 48.5±8.3 B | 78.79±18.17 B | 103.97±15.32 A | 210.84±7.21 B | 198.09±3.11 B |
|  | β-actin | 18.74±0.04 | 18.09±0.04 | 18.37±0.09 | 17.38±0.13 | 17.35±0.34 |
| H2O2 接  毒组 | PRRSV | 28.5±0.35 | 27.41±0.12 | 18.25±0.06 | 19.11±0.1 | 20.55±0.04 |
|  | △Ct | 9.76±0.39 | 9.32±0.07 | -0.12±0.04 | 1.73±0.23 | 3.2±0.37 |
| △△Ct | | -5.86±0.25 | -7.43±0.09 | -7.61±0.1 | -8.51±0.29 | -8.39±0.43 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 58.08±10.01 B | 172.45±11. 1 BB | 195.36±14.31 B | 364.56±73.26 B | 335.46±107.9 B |
|  | β-actin | 18.83±0.07 | 18.08±0.01 | 18.46±0.13 | 18.56±0.2 | 17.65±0.22 |
| OxPLs  接毒组 | PRRSV | 30.02±0.17 | 28.35±0.2 | 19.2±0.01 | 21.8±0.04 | 21.05±0.08 |
|  | △Ct | 11.19±0.1 | 10.27±0.19 | 0.74±0.12 | 3.24±0.16 | 3.4±0.13 |
| △△Ct | | -4.3±0.25 | -6.48±0.09 | -6.75±0.05 | -7±0.09 | -8.19±0.19 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 21.55±3.7 AA | 89.26±5.7 B | 107.63±46.13 A | 128±8.13 AA | 292.04±41.33 B |

注：A: *P＜0.05*；B: *P＜0.01*；a: *P> 0.05*

接毒组、NAC接毒组、H2O2接毒组、OxPLs接毒组与对照组比较；

NAC接毒组、H2O2接毒组、OxPLs接毒组与接毒组比较（下同）。

Note: group PRRSV-infected, group PRRSV-infected with NAC treatment, group PRRSV-infected with H2 O2 treatment, group PRRSV-infected with OxPLs treatment vs group control; group PRRSV-infected with NAC treatment, group PRRSV-infected with H2O2 treatment, group PRRSV-infected with OxPLs treatment vs group P RRSV-infected(The following as the same).

也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比有所降低；在氧化剂干预组，预先给予

H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，PRRSVmRNA的表达量与正常接毒组相比明显上调，12h有极显著差异，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，



PRRSVmRNA的表达量与正常接毒组相比明显下调，6h、48h有显著差异。（同对照组比较，*\*P<0.05*差异显著；*\*\*P<0.01*差异极显著）



**图 12** **不同时间点细胞中PRRSV mRNA对表达量的比较**

**Figure** **12** PRRSVmRNA expression comparison in cells of different time **points**

#### 3.2.1.5 细胞中TLR3转录水平结果分析

以参照基因β-actin作为标准进行相对定量的Real-time PCR，样品目的基因的动力学扩增曲线和熔解曲线如图13所示。







**图13** **TLR3基因的扩增曲线和熔解曲线**

**Figure** **13** Aamplification curve and Melting curve of TLR3 **gene**

各时间点对照组和实验组Ct值如表7所示，数据显示对照组和实验组细胞的

TLR3基因表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与实验组之间TLR3相对表达量差异较大。

**表7** **不同时间点细胞中TLR3基因相对表达量（Ct值）**

Table 7 TLR3 gene relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | Ct Value |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | β-actin | 18.56±0.04 | 17.1±0.03 | 17.34±0.11 | 18.2±0.13 | 17.64±0.11 |
| 对照组 | TLR3 | 24.48±0.26 | 24.4±0.55 | 26.47±0.12 | 26.21±0.02 | 27.35±0.04 |
|  | △Ct | 5.92±0.23 | 7.3±0.58 | 9.13±0.23 | 8.01±0.11 | 9.71±0.15 |
|  | β-actin | 17.12±0.01 | 17.51±0.10 | 17.93±0.2 | 17.13±0.15 | 17.5±0.14 |
| 接毒组 | TLR3 | 22.61±0.25 | 24.09±0.11 | 26.04±0.01 | 23.43±0.11 | 26.48±0.08 |
|  | △Ct | 5.49±0.08 | 6.58±0.01 | 8.11±0.22 | 6.36±0.04 | 8.98±0.23 |
| △△Ct |  | -0.43±0.15 | -0.72±0.59 | -1.02±0.45 | -1.71±0.15 | -0.73±0.08 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.35±0.13 A | 1.65±0.69 a | 2.03±0.64 a | 3.27±0.33 a | 1.66±0.09 A |
|  | β-actin | 18.34±0.02 | 18.18±0.01 | 18.3±0.10 | 18.02±0.03 | 17.16±0.04 |
| NAC 接毒组 | TLR3 | 23.29±0.06 | 24.72±0.16 | 26.52±0.01 | 24.41±0.02 | 26.19±0.21 |
|  | △Ct | 4.95±0.08 | 6.59±0.16 | 8.22±0.11 | 6.39±0.01 | 9.03±0.25 |
| △△Ct |  | -0.97±0.15 | -0.71±0.74 | -0.91±0.12 | -1.62±0.11 | -0.68±0.1 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.96±0.2 BA | 1.64±0.64 a | 1.88±0.16 a | 3.07±0.23 B | 1.6±0.11 A |
|  | β-actin | 18.74±0.04 | 18.09±0.04 | 18.37±0.09 | 17.38±0.13 | 17.35±0.34 |
| H2O2 接毒组 | TLR3 | 23.49±0.37 | 23.7±0.06 | 25.65±0.2 | 23.43±0.01 | 26.16±0.01 |
|  | △Ct | 4.75±0.33 | 5.61±0.36 | 7.28±0.11 | 6.05±0.11 | 8.81±0.35 |
| △△Ct |  | -1.17±0.32 | -1.69±0.22 | -1.85±0.35 | -1.96±0 | -0.9±0.2 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 2.25±0.16 BB | 3.23±0.49 A | 3.6±0.87 A | 3.89±0 B | 1.87±0.27 A |
|  | β-actin | 18.83±0.07 | 18.08±0.01 | 18.46±0.13 | 18.56±0.2 | 17.65±0.22 |
| OxPLs 接毒  组 | TLR3 | 24.11±0.29 | 24.37±0.29 | 26.21±0.07 | 25.36±0.08 | 26.74±0.12 |
|  | △Ct | 5.28±0.22 | 6.29±0.28 | 7.75±0.20 | 6.8±0.28 | 9.09±0.35 |
| △△Ct |  | -0.64±0.01 | -1.01±0.3 | -1.38±0.43 | -1.21±0.39 | -0.62±0.2 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.56±0.01 A | 2.01±0.43 a | 2.6±0.78 a | 2.31±0.63 B | 1.54±0.21 A |

根据各时间点Ct值，用2-△△Ct法来计算实验组TLR3相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的mRNA表达差异如图14所示。从图14可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中TLR3mRNA的表达上调且具有感染时间依赖性，48h达到最大值。与对照组相比，正常接毒组TLR3mRNA的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予

NAC处理后，再行PRRSV感染，TLR3mRNA的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比随时间增加而降低；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，TLR3mRNA的表达量与正常接毒组相比明显上调，6h有极显著差异，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，TLR3mRNA的表达量与正常接毒组相比有所下调。





**图 14** **不同时间点细胞中TLR3 mRNA相对表达量的比较**

**Figure** **14** TLR3 mRNA expression comparison in cells of different time **points**

#### 3.2.1.6 细胞中TRIF转录水平结果分析

以参照基因β-actin作为标准进行相对定量的Real-time PCR，样品目的基因的动力学扩增曲线和熔解曲线如图15所示。



**图15** **TRIF基因的扩增曲线和熔解曲线**

**Figure** **15** Aamplification curve and Melting curve of TRIF **gene**

各时间点对照组和实验组Ct值如表8所示，数据显示对照组和实验组细胞的

TRIF基因表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与实验组之间TRIF相对表达量差异较大。

**表8** **不同时间点细胞中TRIF基因相对表达量（Ct值）**

Table 8 TRIF gene relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | Ct Value |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | β-actin | 18.56±0.04 | 17.1±0.03 | 17.34±0.11 | 18.2±0.13 | 17.64±0.11 |
| 对照组 | TRIF | 23.02±0.22 | 22.08±0.08 | 22.81±0.07 | 24.67±0.3 | 23.86±0.1 |
|  | △Ct | 4.46±0.25 | 4.98±0.11 | 5.47±0.12 | 6.47±0.16 | 6.22±0.01 |
|  | β-actin | 17.12±0.01 | 17.51±0.10 | 17.93±0.2 | 17.13±0.15 | 17.5±0.14 |
| 接毒组 | TRIF | 21.12±0.27 | 21.53±0.01 | 22.33±0.03 | 22.54±0.2 | 23.16±0.02 |
|  | △Ct | 4±0.28 | 4.02±0.09 | 4.4±0.18 | 5.41±0.35 | 5.66±0.12 |
| △△Ct |  | -0.46±0.03 | -0.96±0.02 | -1.07±0.3 | -1.06±0.18 | -0.56±0.1 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.38±0.02 a | 1.95±0.03 a | 2.1±0.43 A | 2.08±0.27 a | 1.47±0.11 a |
|  | β-actin | 18.34±0.02 | 18.18±0.01 | 18.3±0.10 | 18.02±0.03 | 17.16±0.04 |
| NAC 接毒组 | TRIF | 22.47±0.02 | 22.18±0.08 | 22.79±0.06 | 23.67±0.9 | 22.96±0.47 |
|  | △Ct | 4.13±0.04 | 4.05±0.07 | 4.49±0.04 | 5.65±0.16 | 5.8±0.43 |
| △△Ct |  | -0.33±0.3 | -0.93±0.04 | -0.98±0.08 | -0.82±0 | -0.42±0.45 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.26±0.25 a | 1.9±0.06 a | 1.97±0.12 A | 1.77±0 a | 1.34±0.42 a |
|  | β-actin | 18.74±0.04 | 18.09±0.04 | 18.37±0.09 | 17.38±0.13 | 17.35±0.34 |
| H2O2 接毒组 | TRIF | 22.24±0.1 | 21.76±0.04 | 22.42±0.01 | 22.75±0.23 | 22.75±0.16 |
|  | △Ct | 3.5±0.06 | 3.67±0.16 | 4.05±0.08 | 5.37±0.35 | 5.4±0.5 |
| △△Ct |  | -0.96±0.32 | -1.31±0.04 | -1.42±0.04 | -1.1±0.52 | -0.82±0.49 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.95±0.43 a | 2.48±0.07 a | 2.68±0.08 B | 2.14±0.77 a | 1.77±0.6 a |
|  | β-actin | 18.83±0.07 | 18.08±0.01 | 18.46±0.13 | 18.56±0.2 | 17.65±0.22 |
| OxPLs 接毒  组 | TRIF | 22.67±0.02 | 22.65±0.44 | 23.23±0.1 | 24.62±0.07 | 23.33±0.08 |
|  | △Ct | 3.84±0.05 | 4.57±0.45 | 4.77±0.03 | 6.06±0.27 | 5.68±0.15 |
| △△Ct |  | -0.62±0.2 | -0.41±0.57 | -0.7±0.15 | -0.41±0.1 | -0.54±0.13 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.54±0.21 a | 1.33±0.53 a | 1.62±0.17 A | 1.33±0.09 a | 1.45±0.13 a |

根据各时间点Ct值，用2-△△Ct法来计算实验组TRIF相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的mRNA表达差异如图16所示。从图16可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中TRIFmRNA的表达上调且具有感染时间依赖性。与对照组相比，正常接毒组TRIFmRNA的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行

PRRSV感染，TRIFmRNA的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比有所降低；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，TRIFmRNA的表达量与正常接毒组相比有所上调，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，TRIFmRNA的表达量与正常接毒组相比有所下调。





**图 16** **不同时间点细胞中TRIF mRNA相对表达量的比较**

**Figure** **16** TRIF mRNA expression comparison in cells of different time **points**

#### 3.2.1.7 细胞中TRAF6转录水平结果分析

以参照基因β-actin作为标准进行相对定量的Real-time PCR，样品目的基因的动力学扩增曲线和熔解曲线如图17所示。







**图17** **TRAF6基因的扩增曲线和熔解曲线**

**Figure** **17** Aamplification curve and Melting curve of TRAF6 **gene**

各时间点对照组和实验组Ct值如表9 所示，数据显示对照组和实验组细胞的

TRAF6基因表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与实验组之间TRAF6相对表达量差异较大。

**表9** **不同时间点细胞中TRAF6基因相对表达量（Ct值）**

Table 9 TRAF6 gene relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | Ct Value |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | β-actin | 18.56±0.04 | 17.1±0.03 | 17.34±0.11 | 18.2±0.13 | 17.64±0.11 |
| 对照组 | TRAF6 | 24.95±0.14 | 23.1±0.07 | 26.53±0.19 | 27.48±0.52 | 23.28±0.05 |
|  | △Ct | 6.39±0.1 | 6±0.02 | 9.19±0.08 | 9.28±0.66 | 5.64±0.06 |
|  | β-actin | 17.12±0.01 | 17.51±0.10 | 17.93±0.2 | 17.13±0.15 | 17.5±0.14 |
| 接毒组 | TRAF6 | 22.79±0.38 | 22.52±0.18 | 26.09±0.5 | 25.01±0.01 | 21.74±0.39 |
|  | △Ct | 5.67±0.4 | 5.01±0.28 | 8.16±0.3 | 7.88±0.14 | 4.24±0.25 |
| △△Ct |  | -0.72±0.5 | -0.99±0.64 | -1.03±0.37 | -1.4±0.8 | -1.4±0.31 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.65±0.58 a | 1.99±0.36 A | 2.04±0.54 a | 2.64±1.5 a | 2.64±0.57 A |
|  | β-actin | 18.34±0.02 | 18.18±0.01 | 18.3±0.10 | 18.02±0.03 | 17.16±0.04 |
| NAC 接毒组 | TRAF6 | 24.23±0.04 | 23.15±0.18 | 26.57±0.32 | 26±0.18 | 21.59±0.08 |
|  | △Ct | 5.89±0.06 | 5.02±0.19 | 8.27±0.42 | 7.98±0.2 | 4.43±0.13 |
| △△Ct |  | -0.5±0.04 | -0.98±0.21 | -0.92±0.5 | -1.3±0.45 | -1.21±0.06 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.41±0.04 a | 1.97±0.28 A | 1.89±0.66 a | 2.46±0.77 a | 2.31±0.11 A |
|  | β-actin | 18.74±0.04 | 18.09±0.04 | 18.37±0.09 | 17.38±0.13 | 17.35±0.34 |
| H2O2 接毒组 | TRAF6 | 23.42±0.08 | 22.91±0.05 | 26.22±0.19 | 25.18±0.23 | 21.87±0.36 |
|  | △Ct | 4.68±0.04 | 4.82±0.07 | 7.85±0.1 | 7.8±0.1 | 4.52±0.01 |
| △△Ct |  | -1.71±0.06 | -1.18±0.05 | -1.34±0.02 | -1.48±0.76 | -1.12±0.08 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 3.27±0.14 a | 2.27±0.08 B | 2.53±0.04 a | 2.79±0.15 a | 2.17±0.13 A |
|  | β-actin | 18.83±0.07 | 18.08±0.01 | 18.46±0.13 | 18.56±0.2 | 17.65±0.22 |
| OxPLs 接毒  组 | TRAF6 | 24.82±0.05 | 23.05±0.04 | 26.61±0.33 | 26.94±0.21 | 22.46±0.05 |
|  | △Ct | 5.99±0.12 | 4.97±0.02 | 8.15±0.04 | 8.38±0.41 | 4.81±0.27 |
| △△Ct |  | -0.4±0.23 | -1.03±0 | -1.04±0.04 | -0.96±1.07 | -0.83±0.21 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.32±0.2 a | 2.04±0 A | 2.06±0.06 a | 1.95±1.44 a | 1.78±0.25 A |

根据各时间点Ct值，用2-△△Ct法来计算实验组TRAF6相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的mRNA表达差异如图18所示。从图18可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中TRAF6mRNA的表达上调且具有感染时间依赖性。与对照组相比，正常接毒组TRAF6mRNA的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行PRRSV感染，TRAF6mRNA的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比有所降低；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，

TRAF6mRNA的表达量与正常接毒组有所上调，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，TRAF6mRNA的表达量与正常接毒组有所下调。





**图 18** **不同时间点细胞中TRAF6 mRNA相对表达量的比较**

**Figure** **18** **TRAF6 mRNA expression comparison in cells of different time points**

#### 3.2.1.8 细胞中NF-κB转录水平结果分析

以参照基因β-actin作为标准进行相对定量的Real-time PCR，样品目的基因的动力学扩增曲线和熔解曲线如图19所示。



**图19** **NF-κB基因的扩增曲线和熔解曲线**

**Figure** **19** Aamplification curve and Melting curve of NF-κB **gene**

各时间点对照组和实验组Ct值如表15所示，数据显示对照组和实验组细胞的NF-κB基因表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与实验组之间NF-κB相对表达量差异较大。

**表10** **不同时间点细胞中NF-κB基因相对表达量（Ct值）**

Table 10 NF-κB gene relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | Ct Value |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | β-actin | 18.56±0.04 | 17.1±0.03 | 17.34±0.11 | 18.2±0.13 | 17.64±0.11 |
| 对照组 | NF-κB | 19.11±0.05 | 17.87±0.06 | 18.92±0.6 | 18.94±0.08 | 17.92±0.2 |
|  | △Ct | 0.55±0.14 | 0.77±0.11 | 1.58±0.48 | 0.74±0.05 | 0.28±0.08 |
|  | β-actin | 17.12±0.01 | 17.51±0.10 | 17.93±0.2 | 17.13±0.15 | 17.5±0.14 |
| 接毒组 | NF-κB | 17.18±0.11 | 17.12±0.13 | 18.07±0.08 | 16.41±0.17 | 16.41±0.24 |
|  | △Ct | 0.06±0.12 | -0.39±0.23 | 0.14±0.28 | -0.72±0.02 | -1.09±0.1 |
| △△Ct |  | -0.49±0.13 | -1.16±0.12 | -1.44±0.19 | -1.46±0.03 | -1.37±0.01 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.4±0.13 a | 2.23±0.18 B | 2.71±0.36 a | 2.75±0.06 a | 2.58±0.02 A |
|  | β-actin | 18.34±0.02 | 18.18±0.01 | 18.3±0.10 | 18.02±0.03 | 17.16±0.04 |
| NAC 接毒组 | NF-κB | 17.81±0.62 | 17.85±0.04 | 18.05±0.34 | 17.54±0.6 | 16.16±0.17 |
|  | △Ct | -0.53±0.64 | -0.28±0.05 | -0.25±0.24 | -0.48±0.6 | -1±0.21 |
| △△Ct |  | -1.08±0.62 | -1.05±0.31 | -1.33±0.92 | -1.22±0.55 | -1.28±0.3 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 2.11±0.93 a | 2.07±0.24 B | 2.51±1.75 a | 2.33±0.9 a | 2.43±0.5 A |
|  | β-actin | 18.74±0.04 | 18.09±0.04 | 18.37±0.09 | 17.38±0.13 | 17.35±0.34 |
| H2O2 接毒组 | NF-κB | 18.41±0.15 | 17.55±0.01 | 18.44±0.4 | 16.86±0.27 | 16.51±0.2 |
|  | △Ct | -0.33±0.11 | -0.54±0.13 | 0.22±0.1 | -0.52±0.4 | -0.84±0.14 |
| △△Ct |  | -0.54±0.03 | -1.31±0.02 | -1.51±0.58 | -1.26±0.35 | -1.12±0.23 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.63±0.04 a | 2.48±0.04 B | 2.85±1.42 a | 2.39±0.54 a | 2.17±0.34 A |
|  | β-actin | 18.83±0.07 | 18.08±0.01 | 18.46±0.13 | 18.56±0.2 | 17.65±0.22 |
| OxPLs 接毒  组 | NF-κB | 18.79±0.06 | 18.25±0.16 | 19.1±0.08 | 18.22±0.01 | 17.35±0.07 |
|  | △Ct | -0.04±0.01 | 0.17±0.18 | 0.64±0.04 | -0.34±0.2 | -0.3±0.16 |
| △△Ct |  | -0.4±0.23 | -0.6±0.29 | -0.94±0.44 | -1.08±0.25 | -0.58±0.24 |
| 表达量差异 (2-△△Ct) | | 1.32±0.2 a | 1.52±0.3 AA | 1.92±0.59 a | 2.11±0.37 a | 1.49±0.25 a |

根据各时间点Ct值，用2-△△Ct法来计算实验组NF-κB相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的mRNA表达差异如图20所示。从图20可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中NF-κBmRNA的表达上调且具有感染时间依赖性。与对照组相比，正常接毒组NF-κBmRNA的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，12h具有极显著差异，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行PRRSV感染，NF-κBmRNA的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比有所降低；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，NF-κBmRNA的表达量与正常接毒组相比有所上调，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，NF-κBmRNA的表达量与正常接毒组相比明显下调，12h有显著差异性。





**图 20** **不同时间点细胞中NF-κB mRNA相对表达量的比较**

**Figure** **20** NF-κB mRNA expression comparison in cells of different time **points**

### 3.2.2 TLR3、NF-kB与PRRSV mRNA转录水平相关性分析

#### 3.2.2.1 TLR3与PRRSV mRNA转录水平相关性分析

根据实验组各时间点TLR3与PRRSVmRNA相对表达量，以各实验组TLR3

mRNA相对表达量为纵坐标，PRRSV mRNA相对表达量为横坐标，作转录水平相关性分析，不同实验组之间的mRNA相关性分析如图21所示。



**图 21** **不同实验组TLR3与PRRSV转录水平相关性分析**

**Figure** **21** **TLR3 and PRRSV correlation with the transcription in different experimental groups**

从图21所显示各实验组散点图，得到各时间点线性回归方程及相关系数R2，正常接毒组R2=0.45, R=0.67，强相关；NAC处理接毒组R2=0.233, R=0.483，中等程度相关；H2O2处理接毒组R2=0.046, R=0.214，弱相关；OxPLs处理接毒组R2=0.049，负相关。

#### 3.2.2.2 NF-κB与PRRSVm RNA转录水平相关性分析

根据实验组各时间点NF-kB与PRRSVmRNA相对表达量，以各实验组NF-κB



mRNA相对表达量为纵坐标，PRRSV mRNA相对表达量为横坐标，作转录水平相关性分析，不同实验组之间的mRNA相关性分析如图22所示。



**图 22** **不同实验组NF-κB与PRRSV转录水平相关性分析**

**Figure** **22** **NF-κB and PRRSV correlation with the transcription in different experimental groups**

从图22所显示各实验组散点图，得到各时间点线性回归方程及相关系数R2，正常接毒组R2=0.503, R=0.709，强相关；NAC处理接毒组R2=0.342, R=0.585，中等程度相关；H2O2处理接毒组R2=0.068, R=0.261，弱相关；OxPLs处理接毒组R2=0.051，负相关。

### 3.2.3 细胞内TLR3、TRIF、TRAF6、NF-kB蛋白表达水平结果分析

#### 3.2.3.1 BCA蛋白定量标准曲线

按照如上诉述步骤测定标准品在590nm的OD值，以BSA标准品浓度为横坐标，

OD值为纵坐标，结果如表11所示。

表11 BSA标准品OD 值

Table 11 The OD values of BSA standard

| BSA 标准品浓度  （μg/mL） | 2000 | 1500 | 1000 | 750 | 500 | 250 | 125 | 25 | 0 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| OD 值 | 2.089 | 1.808 | 1.731 | 1.191 | 1.025 | 0.604 | 0.384 | 0.161 | 0.103 |



**图 23** **蛋白质标准曲线**

**Fig 23** Standard curve of **Protein**

从图23显示蛋白质标准曲线，得到很好的线性关系，线性回归方程为

y=0.001x+0.125，相关系数R2=0.996.

#### 3.2.3.2 蛋白质SDS-PAGE结果

据上述标准曲线计算实验组样品的蛋白浓度，乘以稀释倍数，以120μg/泳道上样，图24为部分样品经考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE电泳图。



100kD

**图24** **部分样品提取总蛋白质**

**Fig24 Isolation result of total Protein**

#### 3.2.3.3 Western Boltting丽春红染色结果

经电转移后，蛋白质会转移到NC膜上，丽春红染色可见蛋白质条带，如图25

所示。



100kD

**图25** **部分样品转膜结果**

**Fig25 Part of the sample transmembrane results**

#### 3.2.3.4 细胞中TLR3蛋白表达结果分析

以内参Actin作为标准进行半定量的western blotting各实验组不同时间点Actin、

TLR3蛋白表达结果如图26、27所示。



1

2

3

4

5

6h

12H  24h  48h



72h



**图 26** Actin **western blotting结果**

**（1.对照组2。正常接毒组3. NAC处理接毒组4. H2O2接毒组5. OxPLs处理接毒组）Fig 26The result of Actin western blotting**

**(1. Control group 2. Normal inoculation group 3. NAC treatment inoculation group**

**4. H2O2 treatment inoculation group 5. OxPLs treatment inoculation group)**

6H 12h 24h 48h

72h

1 2 3 4 5



**图27** **TLR3 western blotting结果**

**（1.对照组2。正常接毒组3. NAC处理接毒组4. H2O2接毒组5. OxPLs处理接毒组）Fig27 The result of TLR3 western blotting**

**(1. Control group 2. Normal inoculation group 3. NAC treatment inoculation group 4. H2O2**

**Treatment inoculation group 5. OxPLs treatment inoculation group)**

各时间点对照组和实验组组灰度值如表17所示，数据显示对照组和实验组细胞的TLR3蛋白表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与感染组之间TLR3蛋白相对表达量差异较大。

**表12 不同时间点细胞中TLR3蛋白相对表达量（灰度值）**

Table 12 TLR3 protein relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | 灰度值 |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | actin | 667.83±29.06 | 603.99±13.34 | 602.88±10.88 | 769.96±10.61 | 629.59±9.68 |
| 对照组 |  |  |  |  |  |  |
|  | TLR3 | 11.61±0.84 | 26.68±2.6 | 24.55±0.95 | 98.84±1.94 | 31.38±1.29 |
|  | TLR3/A | 0.018±0.002 | 0.044±0.003 | 0.041±0.001 | 0.13±0.001 | 0.05±0.003 |
|  | actin | 643.72±12.04 | 563.1±26.97 | 553.58±15.2 | 664.17±20.04 | 546.82±13.68 |
| 接毒组 |  |  |  |  |  |  |
|  | TLR3 | 26.1±2.22 | 31.67±2.5 | 40.66±2.69 | 125.83±6.05 | 46.3±2.79 |
|  | TLR3/A | 0.041±0.002 B | 0.056±0.001 a | 0.073±0.003 B | 0.19±0.004 B | 0.085±0.003 B |
|  | actin | 600.58±15.29 | 560.69±33.25 | 558.28±22.79 | 669.28±5.75 | 561.42±15.57 |
| NAC 接毒组 | TLR3 | 25.62±0.35 | 30.32±1.8 | 36.99±3.49 | 116.2±4.69 | 46.07±1.45 |
|  | TLR3/A | 0.043±0.01 B | 0.053±0.001 A | 0.067±0.009 B | 0.174±0.003 BA | 0.083±0.005 B |
|  | actin | 557.54±32.36 | 567.58±6.35 | 575.9±6.13 | 662.59±11.6 | 619.52±13.15 |
| H2O2 接毒组 | TLR3 | 25.73±0.6 | 35.8±2.76 | 39.49±1.99 | 160.4±6.96 | 38.36±1.21 |
|  | TLR3/A | 0.047±0.004 B | 0.063±0.004 B | 0.069±0.003 B | 0.242±0.005 BB | 0.062±0.003 AB |
|  | actin | 498.71±17.14 | 458.12±28.49 | 449.41±39.76 | 564.51±8.08 | 503.27±10.13 |
| OxPLs 接毒组 | TLR3 | 19.24±1.14 | 23.84±3.55 | 19.51±0.99 | 90.89±2.74 | 27.86±1.89 |
|  | TLR3/A | 0.038±0.001 B | 0.052±0.004 a | 0.044±0.002 B | 0.161±0.003 BB | 0.055±0.003 B |

根据各时间点灰度值，用比值法来计算实验组TLR3相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的蛋白表达差异如图28所示。从图28可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中TLR3蛋白的表达上调且具有感染时间依赖性，48h达到最大值。与对照组相比，正常接毒组TLR3蛋白的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行PRRSV感染，TLR3蛋白的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比明显降低，48h具有显著差异性；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，TLR3蛋白的表达量与正常接毒组相比明显上调，48h、72h具有极显著差异，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，TLR3蛋白的表达量与正常接毒组相比明显下调，24h、48h、72h具有极显著差异。





**图 28** **不同时间点细胞中TLR3蛋白相对表达量的比较**

**Figure** **28** **TLR3 protein** expression comparison in cells of different time **points**

#### 3.2.3.5 细胞中TRIF蛋白表达结果分析

以内参Actin作为标准进行半定量的western blotting各实验组不同时间点TRIF

蛋白表达结果如图29所示。

6H 12h 24h 48h 72h

1 2 3 4 5



**图29** **TRIF westernblotting结果**

**（1.对照组2。正常接毒组3. NAC处理接毒组4. H2O2接毒组5. OxPLs处理接毒组）Fig 29 The result of TRIF western blotting**

**(1. Control group 2. Normal inoculation group 3. NAC treatment inoculation group 4. H2O2**

**Treatment inoculation group 5. OxPLs treatment inoculation group)**

各时间点对照组和实验组组灰度值如表13所示，数据显示对照组和实验组细胞的TRIF蛋白表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与感染组之间TRIF蛋白相对表达量差异较大。

**表13 不同时间点细胞中TRIF蛋白相对表达量（灰度值）**

Table 13 TRIF protein relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | 灰度值 |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | actin | 667.83±29.06 | 603.99±13.34 | 602.88±10.88 | 769.96±10.61 | 629.59±9.68 |
| 对照组 |  |  |  |  |  |  |
|  | TRIF | 11.85±0.65 | 9.63±0.57 | 13.9±2.48 | 22.58±1.32 | 11.36±1.37 |
|  | TRIF/A | 0.018±0.001 | 0.016±0.001 | 0.023±0.004 | 0.029±0.001 | 0.018±0.003 |
|  | actin | 643.72±12.04 | 563.1±26.97 | 553.58±15.2 | 664.17±20.04 | 546.82±13.68 |
| 接毒组 |  |  |  |  |  |  |
|  | TRIF | 13.6±1.4 | 17.34±1.14 | 27.4±1.89 | 30.74±0.64 | 16±1.18 |
|  | TRIF/A | 0.021±0.003 a | 0.03±0.004 A | 0.049±0.001 B | 0.05±0.002 B | 0.029±0.001 B |
|  | actin | 600.58±15.29 | 560.69±33.25 | 558.28±22.79 | 669.28±5.75 | 561.42±15.57 |
| NAC 接毒组 | TRIF | 12.91±0.49 | 16.78±0.92 | 23.04±1.29 | 31.37±2.28 | 14.7±0.64 |
|  | TRIF/A | 0.021±0.001 a | 0.03±0.004 A | 0.04±0.004 B | 0.047±0.003 B | 0.027±0.002 BB |
|  | actin | 557.54±32.36 | 567.58±6.35 | 575.9±6.13 | 662.59±11.6 | 619.52±13.15 |
| H2O2 接毒组 | TRIF | 14.11±1.6 | 21.82±0.83 | 26.45±1.64 | 32.9±2.6 | 16.26±1.59 |
|  | TRIF/A | 0.025±0.001 a | 0.039±0.002 BA | 0.046±0.003 B | 0.05±0.005 B | 0.027±0.002 AB |
|  | actin | 498.71±17.14 | 458.12±28.49 | 449.41±39.76 | 564.51±8.08 | 503.27±10.13 |
| OxPLs 接毒组 | TRIF | 9.72±1.44 | 13.1±1.56 | 17.33±1.28 | 20.95±0.82 | 12.29±1.48 |
|  | TRIF/A | 0.02±0.002 a | 0.03±0.002 B | 0.039±0.001 B | 0.04±0.002 A | 0.025±0.002 A |

根据各时间点灰度值，用比值法来计算实验组TRIF相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的蛋白表达差异如图30所示。从图30可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中TRIF蛋白的表达上调且具有感染时间依赖性，48h达到最大值。与对照组相比，正常接毒组TRIF蛋白的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行PRRSV感染，TRIF蛋白的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比明显降低，72h具有极显著差异性；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，TRIF蛋白的表达量与正常接毒组相比明显上调，其中12h有显著差异性，72h有极显著差异，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，

TRIF蛋白的表达量与正常接毒组相比明显下调，72h有极显著差异性。



**图 30** **不同时间点细胞中TRIF蛋白相对表达量的比较**

**Figure** **30** TRIF protein expression comparison in cells of different time **points**

#### 3.2.3.6 细胞中TRAF6蛋白表达结果分析

以内参Actin作为标准进行半定量的western blotting各实验组不同时间点TRAF6

蛋白表达结果如图31所示。

6H 12h 24h 48h

72h

1 2 3 4 5



**图31** **TRAF6 western blotting结果**

**（1.对照组2。正常接毒组3. NAC处理接毒组4. H2O2接毒组5. OxPLs处理接毒组）Fig31 The result of TRAF6 western blotting**

**(1. Control group 2. Normal inoculation group 3. NAC treatment inoculation group 4. H2O2**

**Treatment inoculation group 5. OxPLs treatment inoculation group)**

各时间点对照组和实验组组灰度值如表14所示，数据显示对照组和实验组细胞的TRAF6蛋白表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与感染组之间TRAF6蛋白相对表达量差异较大。

**表14 不同时间点细胞中TRAF6蛋白相对表达量（灰度值）**

Table 14 TRAF6protein relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | 灰度值 |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | actin | 667.83±29.06 | 603.99±13.34 | 602.88±10.88 | 769.96±10.61 | 629.59±9.68 |
| 对照组 |  |  |  |  |  |  |
|  | TRAF6 | 4.3±0.45 | 16.34±0.98 | 13.5±0.71 | 25.32±2.02 | 21.51±1.41 |
|  | TRAF6/A | 0.007±0.001 | 0.027±0.001 | 0.023±0.001 | 0.033±0.002 | 0.034±0.001 |
|  | actin | 643.72±12.04 | 563.1±26.97 | 553.58±15.2 | 664.17±20.04 | 546.82±13.68 |
| 接毒组 |  |  |  |  |  |  |
|  | TRAF6 | 9.96±0.86 | 19.37±1.16 | 23.07±1.56 | 43.84±1.97 | 24.8±1.38 |
|  | TRAF6/A | 0.016±0.002 A | 0.035±0.001 A | 0.042±0.002 A | 0.066±0.001 B | 0.045±0.001 A |
|  | actin | 600.58±15.29 | 560.69±33.25 | 558.28±22.79 | 669.28±5.75 | 561.42±15.57 |
| NAC 接毒组 | TRAF6 | 11.12±2.07 | 17.22±2.21 | 21.1±2.55 | 39.59±1.7 | 24.47±1.47 |
|  | TRAF6/A | 0.018±0.003 a | 0.031±0.002 a | 0.038±0.003 B | 0.059±0.003 B | 0.043±0.004 A |
|  | actin | 557.54±32.36 | 567.58±6.35 | 575.9±6.13 | 662.59±11.6 | 619.52±13.15 |
| H2O2 接毒组 | TRAF6 | 6.88±2.1 | 23.85±1.52 | 23.23±2.25 | 39.14±2.38 | 23.13±0.56 |
|  | TRAF6/A | 0.012±0.003 a | 0.042±0.003 BB | 0.041±0.004 B | 0.059±0.004 B | 0.038±0.002 a |
|  | actin | 498.71±17.14 | 458.12±28.49 | 449.41±39.76 | 564.51±8.08 | 503.27±10.13 |
| OxPLs 接毒组 | TRAF6 | 5.44±1.6 | 13.38±0.59 | 13.41±1.6 | 23.38±2.45 | 19.33±0.77 |
|  | TRAF6/A | 0.011±0.003 a | 0.03±0.001 a | 0.03±0.001 AA | 0.042±0.004 AB | 0.039±0.001 a |

根据各时间点灰度值，用比值法来计算实验组TRAF6相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的蛋白表达差异如图32所示。从图32可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中TRAF6蛋白的表达上调且具有感染时间依赖性，48h达到最大值。与对照组相比，正常接毒组TRAF6蛋白的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行PRRSV感染，TRAF6蛋白的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比有所降低，但无统计学差异；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，TRAF6蛋白的表达量与正常接毒组相比明显上调，12h具有显著差异性，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，TRAF6蛋白的表达量与正常接毒组相比明显下调，其中24h具有显著差异性，48h具有极显著差异性。





**图32 不同时间点细胞中TRAF6蛋白相对表达量的比较**

**Figure** **32** TRAF6 protein expression comparison in cells of different time **points**

#### 3.2.3.7 细胞中NF-κB蛋白表达结果分析

以内参Actin作为标准进行半定量的western blotting各实验组不同时间点NF-κB

蛋白表达结果如图33所示。

6H 12h 24h 48h 72h

1 2 3 4 5



**图33** **NF-κB western blotting结果**

**（1.对照组2。正常接毒组3. NAC处理接毒组4. H2O2接毒组5. OxPLs处理接毒组）Fig33 The result of NF-κB western blotting**

**(1. Control group 2. Normal inoculation group 3. NAC treatment inoculation group 4. H2O2**

**Treatment inoculation group 5. OxPLs treatment inoculation group)**

各时间点对照组和实验组组灰度值如表15 所示，数据显示对照组和实验组细胞

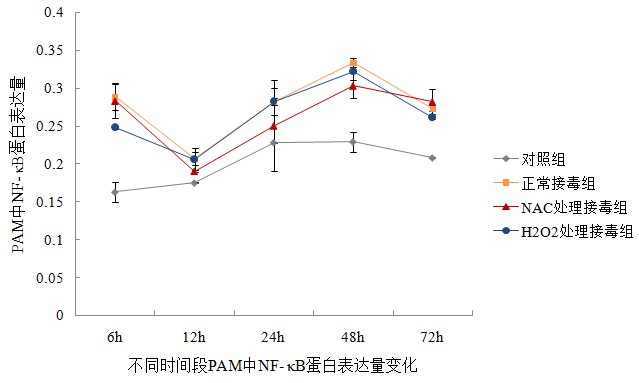
的NF-κB蛋白表达量存在一定的差异，不同时间点对照组与感染组之间NF-κB蛋白相对表达量差异较大。

**表15 不同时间点细胞中NF-κB蛋白相对表达量（灰度值）**

Table 15 NF-κB protein relative expression in cells at different time points

|  |  |  |  | 灰度值 |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 6h | 12h | 24h | 48h | 72h |
|  | actin | 667.83±29.06 | 603.99±13.34 | 602.88±10.88 | 769.96±10.61 | 629.59±9.68 |
| 对照组 |  |  |  |  |  |  |
|  | NF-κB | 108.73±3.52 | 105.69±6.3 | 136.87±2.23 | 176.49±7.33 | 130.75±2.27 |
|  | NF-κB/A | 0.163±0.001 | 0.175±0.007 | 0.228±0.008 | 0.229±0.013 | 0.208±0.001 |
|  | actin | 643.72±12.04 | 563.1±26.97 | 553.58±15.2 | 664.17±20.04 | 546.82±13.68 |
| 接毒组 |  |  |  |  |  |  |
|  | NF-κB | 185.56±7.17 | 116.41±10.47 | 156.06±6.59 | 221.46±2.95 | 149.39±1.83 |
|  | NF-κB/A | 0.288±0.017 B | 0.207±0.009 a | 0.282±0.004 A | 0.333±0.006 B | 0.273±0.004 B |
|  | actin | 600.58±15.29 | 560.69±33.25 | 558.28±22.79 | 669.28±5.75 | 561.42±15.57 |
| NAC 接毒组 | NF-κB | 169.78±8.87 | 109.45±0.84 | 138.58±2.34 | 202.81±8.5 | 157.76±4.71 |
|  | NF-κB/A | 0.283±0.022 B | 0.196±0.013 a | 0.249±0.006 a | 0.303±0.016 B | 0.282±0.016 B |
|  | actin | 557.54±32.36 | 567.58±6.35 | 575.9±6.13 | 662.59±11.6 | 619.52±13.15 |
| H2O2 接毒组 | NF-κB | 138.16±8.98 | 116.93±9.32 | 162.47±12.4 | 212.91±3.94 | 161.32±2.16 |
|  | NF-κB/A | 0.25±0.002 B | 0.206±0.014 a | 0.282±0.018 A | 0.322±0.012 B | 0.261±0.002 B |
|  | actin | 498.71±17.14 | 458.12±28.49 | 449.41±39.76 | 564.51±8.08 | 503.27±10.13 |
| OxPLs 接毒组 | NF-κB | 127.73±3.76 | 98±4.58 | 111.72±13.28 | 162.27±5.98 | 109.08±1.58 |
|  | NF-κB/A | 0.257±0.016 B | 0.214±0.003 a | 0.249±0.008 a | 0.288±0.006 B | 0.217±0.001 a |

根据各时间点灰度值，用比值法来计算实验组NF-κB相对表达量，不同时间点对照组与实验组之间的蛋白表达差异如图34所示。从图34可以看出，各时间点实验组均高于对照组，经PRRSV感染后，PAMs中NF-κB蛋白的表达上调且具有感染时间依赖性，48h达到最大值。与对照组相比，正常接毒组NF-κB蛋白的表达量随着感染时间的延长逐渐增加，48h后有下降趋势；而在抗氧化剂干预组，预先给予NAC处理后，再行PRRSV感染，NF-κB蛋白的表达量也上调，但与相同时间点的正常接毒组相比有所降低；在氧化剂干预组，预先给予H2O2处理后，再行相同PRRSV感染，NF-κB蛋白的表达量与正常接毒组相比有所上调，而预先给予OxPLs处理后，再行相同PRRSV感染，NF-κB蛋白的表达量与正常接毒组相比有所下调。





**图34 不同时间点细胞中NF-κB蛋白相对表达量的比较**

**Figure** **34** NF-κB protein expression comparison in cells of different time **points**

# 4. 讨论

PRRSV感染作用于机体的靶细胞为PAMs [44]。有研究表明，PRRSV感染可导致

PAMs数量下降和存活率降低，细胞形态改变，杀菌活性和吞噬功能下降[45, 46]。研究证实机体通过维持氧化物/抗氧化物平衡来保持正常状态，而病毒通过改变宿主细胞内氧化物/抗氧化物的平衡，影响细胞凋亡过程，从而引起机体状态的改变。

本研究利用抗氧化剂及氧化剂调节细胞氧化应激状态不同探讨细胞形态的变化及TLR3/NF-κB信号通路的作用机制。

## 4.1 PRRSV对PAMs形态的影响及与信号效应分子TLR3、NF-κB的关

系

随着对氧自由基的深入研究，自由基在病毒感染机体的作用逐步为人们所揭示，病毒可诱导宿主细胞产生氧化应激，释放大量ROS，在ROS的作用下病毒复制加强，对宿主细胞的损伤能力增强，进而引起机体的损伤，导致疾病的发生。Ruchi Srivastava等[47]于12日龄的小鼠脑部接种日本脑炎病毒，并在小鼠感染后至死亡的时间段对其

神经元中ROS、NO、OONO-的总量进行测定发现在感染后第六天ROS和OONO-的含量达到最高水平，NO的含量在感染后的第十天达到最高峰，而自由基的产生与对照组相比在感染后的第20天才逐渐减少。另有学者在研究流感病毒时发现流感病毒侵入机体后产生大量氧自由基（如O2.- ）的同时还可激活巨噬细胞产生大量一氧化氮

（NO）自由基，NO和O2-**.** 反应生成过氧亚硝酸盐，共同造成氧化应激水平升高[48]。

N-乙酰半胱氨酸（N-Acetyl-L-cysteine, NAC）是一种强有力的抗氧化剂，其自身具有自由基清除功能，清除ROS或其前体，抑制ROS形成，络合催化ROS生成金属离子而发挥保护作用，并且在进入细胞后去乙酰化生成半胱氨酸，能促进GSH的合成，是细胞对抗氧化应激损伤的主要力量[49]。研究表明，NAC具有干扰自由基生成、清除已生成的自由基、调节细胞代谢活性、预防DNA损伤、调整基因表达和信号传导系统、抗细胞凋亡等作用。NAC可以保护培养细胞的DNA的氧化损伤[50,51]。文献报道抗氧化剂可以抑制细胞凋亡和病毒激活，NAC可以阻断病毒激活过程和CD4细胞的死亡[52]。本研究设计实验组NAC干预，行PRRSV感染后，观察细胞CPE与正常接毒组细胞形态相比，细胞变形、聚集数量及范围明显减少，而与对照组相比，细胞形态无明显变化，或有少量细胞发生聚集。这与原红艳[53]等对NAC处理的耳蜗毛细胞的CPE描述基本一致，可判定NAC在这里起到保护PAMs的作用。

H2O2属于活性氧，在体内可转变成细胞毒性极强的˙OH，是一种膜易透性氧化剂，参与调节细胞信号转导和细胞的增殖、老化、凋亡、坏死等一系列生理病理过程[54]。曹纯章[55]等利用H2O2的强氧化性研究了其对心肌细胞损伤的作用，结果发现H2O2的作用时间和浓度存在互作效应。Qiang等[56]用100μmol/LH2O2处理PC12细胞10h，发现细胞凋亡率、LDH、MDA和ROS均极显著升高。Xu[57]等用100μmol/LH2O2作用于新西兰兔骨髓基质细胞24h，结果发现细胞中ROS活性极显著升高。H2O2在体外诱导动物肝细胞发生氧化应激的实验中应用较为普遍，但其作用PAMs的实验报道有限。本研究设计实验组H2O2干预，行PRRSV感染后，观察细胞CPE与正常接毒组细胞形态相比，细胞变形、聚集数量及范围增多，而与对照组相比细胞形态不规则，变形严重，聚集范围广。这与原红艳[53]等对H2O2处理的耳蜗毛细胞的CPE描述基本一致，本实验结果H2O2引起了PAMs 的CPE效应。

氧化磷脂（Oxidized Phospholipids, OxPLs）是轻微修饰低密度脂蛋白的活性成分，可诱导细胞产生氧自由基，能够增强脂质积聚和氧化，已知其具有与促进单核细胞向

内皮细胞黏附、聚集、诱导血管平滑肌细胞从收缩型向合成型转变[58]、促进血管平滑肌细胞迁移和胶原蛋白表达[59]、改变连接蛋白的表达水平和功能、增加异型细胞间通讯[60]等多种作用。澳大利亚科学院发现化学物质刺激和病毒感染引起的急性肺损伤均可激活体内氧化应激反应，导致ROS的释放和OxPLs的产生，并激活

TLR4-TRIF-TRAF6-NF-κB信号转导通路调节急性肺损伤的严重程度[61]。本研究设计实验组OxPLs干预，行PRRSV感染后，观察细胞CPE与正常接毒组细胞形态相比，细胞数量严重减少，并聚集成团块；而与对照组相比细胞形态极度不规则，变形严重，聚集成团块；与H2O2处理接毒组相比，细胞聚集成团块，且极度不规则，本实验结果显示OxPLs比H2O2氧化性强。

TLRs家族在调控细胞因子转录过程中起着非常重要的作用。TLR3是TLRs家族的重要成员之一，在识别RNA病毒、引发抗病毒免疫过程中扮演着重要角色。许多病原体的PAMP都依赖NF-κB信号通路，它是细胞核转录效应因子，从而调控宿主的天然免疫反应、炎症反应及细胞凋亡等[22, 23]。

本实验通过各实验组各时间点PRRSV与TLR3、NF-κBmRNA相对表达量相关性分析，根据统计学相关系数可知，PRRSV在正常接毒组与TLR3、NF-κB呈强相关，抗氧化剂NAC与氧化剂H2O2、OxPLs依次为中等程度相关与弱相关、负相关。由此可知，PRRSV感染可启动TLR3-NF-κB信号通路，随着时间的延长，PRRSV mRNA转录水平与信号分子TLR3、NF-κB转录水平呈正相关，而相关性依次减弱。这与吕伟伟[62]用呼吸道合胞病毒感染人肺上皮细胞所激活TLR3-NF-κB信号通路的结果相一致，且其信号通路效应分子TLR3、NF-κB的表达是由氧化应激这一因素调节的。PRRSV感染激活效应信号分子NF-κB，也与Luo等研究PRRSV感染PAMs能激活核转录因子NF-κB[63]的结论一致。

## 4.2 TLR3/NF-κB信号通路在PRRSV致PAMs氧化应激损伤中的作用

近年来研究发现病毒感染时导致多种疾病的直接原因，并与氧化损伤密切相关：一方面，病毒感染引起ROS释放；另一方面，感染使吞噬细胞活化并释放氧化性细胞因子，如TNF和IL-1. ROS引起细胞膜磷脂层的脂质过氧化，这一过程生成的产物可以跨越细胞膜并引起膜转运和线粒体呼吸链的功能紊乱。因此，ROS通常被视为病毒性疾病病理进程中引起细胞损伤的元凶。另外，ROS在病毒性疾病病理进程中也能激活机体免疫系统，在病毒清除和免疫导致的细胞损伤方面起到正面的调节作

用[64]。

目前国内有关氧化应激与病毒的研究主要集中在对RNA病毒、DNA病毒及逆转录病毒的研究，我们探讨的是PRRSV感染PAMs诱导氧化应激及氧化应激对TLR3/NF-κB信号通路的影响作用，在国内外尚未见报道。本实验室刘倩等的前期实验表明PRRSV感染可导致仔猪间质性肺炎，并可诱导机体产生过多自由基，改变机体的氧化应激状态。本实验用PRRSV体外感染猪肺泡巨噬细胞PAMs，深入探讨

PRRSV诱导氧化应激产生后对TLR3/NF-κB信号通路的影响。

TLR3是TLRs家族中主要识别病毒感染的信号分子之一，能识别多种病毒复制中间体dsRNA, PRRSV在复制和转录过程中可产生大量dsRNA，因此被TLR3识别而活化。TLR3下游信号分子TRIF在病毒介导的天然免疫中发挥着重要作用。TRIF 是

TLR3和TLR4下游的重要接头分子[65]，可通过激活下游信号通路释放细胞因子，参与病毒引起的急性肺损伤[19]。TRAF6是一种重要的细胞内多功能信号分子，它具有独特的受体结合特异性。在Toll样受体（TLR）介导的信号转导途径，TRAF6是激活NF-κB通路和丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路的交叉点。TRIF通过N端的T6BM结构域绑定TRAF6，介导了NF-κB活化。NF-κB作为一个细胞内普遍存在的细胞因子，参与多种细胞效应分子表达的调节，在细胞的免疫和炎症反应中起重要作用，调整机体的防御状态[66]。NF-κB是一种对氧化敏感的核转录因子，氧化刺激通常可以激活NF-κB[67]。氧化应激可以直接激活NF-κB，能够诱导NF-κB活化的刺激物均可被抗氧化剂阻断[68, 69]。

为证明氧化应激对TLR3/NF-κB信号通路的影响，本研究用Real-time PCR的方法从转录水平显示：6h、12h、24h、48h、72h TLR3 mRNA相对表达量对照组都为1，接毒组分别为1.35、1.65、2.03、3.27、1.66，NAC接毒组分别为1.96、1.64、1.88、

3.07、1.6，H2O2接毒组分别为2.25、3.23、3.6、3.89、1.87，OxPLs接毒组分别为1.56、

2.01、2.6、2.31、1.54; 6h、12h、24h、48h、72h TRIF mRNA相对表达量对照组都为1，接毒组分别为1.38、1.95、2.1、2.08、1.47，NAC接毒组分别为1.26、1.9、1.97、

1.77、1.34，H2O2接毒组分别为1.95、2.48、2.68、2.14、1.77，OxPLs接毒组分别为

1.54、1.33、1.62、1.33、1.45; 6h、12h、24h、48h、72h TRAF6 mRNA相对表达量对照组都为1，接毒组分别为1.65、1.99、2.04、2.64、2.64，NAC接毒组分别为1.41、

1.97、1.89、2.46、2.31，H2O2接毒组分别为3.27、2.27、2.53、2.79、2.17，OxPLs

接毒组分别为1.32、2.04、2.06、1.95、1.78; 6h、12h、24h、48h、72h NF-κB mRNA相对表达量对照组都为1，接毒组分别为1.4、2.23、2.71、2.75、2.58，NAC接毒组分别为2.11、2.07、2.51、2.33、2.43，H2O2接毒组分别为1.63、2.48、2.85、2.39、

2.17, OxPLs接毒组分别为1.32、1.52、1.92、2.11、1.49，实验数据表明，PRRSV感染PAMs后，随着病毒的迅速增殖，细胞内TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB mRNA表达量迅速上升，各实验组显著高于对照组(*P<0.01*)，48h各实验组表达量达到最大值；实验组中，NAC接毒组，TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB mRNA表达量较正常接毒组有所降低（6h、12h除外），H2O2接毒组，TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB mRNA表达量较正常接毒组有所升高，OxPLs接毒组TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB mRNA表达量与正常接毒组有所降低。由实验结果可判断，实验组TLR3/NF-κB信号通路各基因的转录表达随时间的增加呈先升高后降低的趋势。

为证明氧化应激对TLR3/NF-κB信号通路的影响，本研究用Western Blotting的方法从蛋白水平显示：6h、12h、24h、48h、72h TLR3 蛋白相对表达量对照组分别为0.018、0.044、0.041、0.13、0.05，接毒组分别为0.041、0.056、0.073、0.019、0.085，

NAC接毒组分别为0.043、0.053、0.067、0.174、0.083，H2O2接毒组分别为0.047、0.063、0.069、0.242、0.062，OxPLs接毒组分别为0.038、0.052、0.044、0.161、0.055;

# 6 h、12h、24h、48h、72h TRIF蛋白相对表达量对照组分别为0.018、0.016、0.023、

0.029、0.018，接毒组分别为0.021、0.03、0.049、0.05、0.029，NAC接毒组分别为

0.021、0.03、0.04、0.047、0.027，H2O2接毒组分别为0.025、0.039、0.046、0.05、

0.027, OxPLs接毒组分别为0.02、0.03、0.039、0.04、0.025; 6h、12h、24h、48h、

72h TRAF6蛋白相对表达量对照组分别为0.007、0.027、0.023、0.033、0.034，接毒组分别为0.016、0.035、0.042、0.066、0.045，NAC接毒组分别为0.018、0.031、0.038、0.059、0.043，H2O2接毒组分别为0.012、0.042、0.041、0.059、0.038，OxPLs接毒

组分别为0.011、0.03、0.03、0.042、0.039; 6h、12h、24h、48h、72h NF-κB蛋白相对表达量对照组分别为0.163、0.175、0.228、0.229、0.208，接毒组分别为0.288、0.207、0.282、0.333、0.273，NAC接毒组分别为0.283、0.196、0.249、0.303、0.282，H2O2

接毒组分别为0.25、0.206、0.282、0.322、0.261，OxPLs接毒组分别为0.257、0.214、0.249、0.288、0.217，实验数据表明，细胞内TLR3 、TRIF、TRAF6、NF-κB蛋白表达量逐渐上升，起初的变化并没有转录水平明显，但其表达量与感染时间变化的趋

势是一致的，各实验组明显高于对照组（*P<0.05*），48h各实验组表达量达到最大值；实验组中，NAC处理接毒组，TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB蛋白表达量较正常接毒组明显降低（*P<0.05*），H2O2处理接毒组，TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB蛋白表达量较正常接毒组明显升高（*P<0.05*），OxPLs处理接毒组TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB蛋白表达量与正常接毒组明显降低（*P<0.05*）。由实验结果可判断，实验组TLR3/NF-κB信号通路各基因的蛋白表达水平随时间的增加呈先升高后降低的趋势。

近年来，随着对病毒感染体外培养的细胞并激活TLR3-NF-κB信号通路的研究发现，TLR3-NF-κB信号通路各因子表达的升高在病毒性心肌炎病毒、乳腺癌发病中有着密切联系[70,71]，而本实验结果也表明，PRRSV感染PAMs能激活TLR3及下游信号通路各因子的表达；在通过用抗氧剂NAC和氧化剂H2O2、OxPLs进行干预后，提示氧化应激影响TLR3/NF-κB信号通路的表达变化，mRNA与蛋白表达量趋势基本一致，表明PRRSV感染引起TLR3/NF-κB信号通路的表达变化可能是通过氧化应激调节的，这与吕伟伟[62]的实验结果相似。

实验中，各基因与蛋白随着时间的推移，实验组细胞CPE逐渐明显，病毒从裂解的细胞中释放出来，以及培养基中的代谢产物浓度增高的过程中，病毒感染能力降低，细胞内TLR3、TRIF、TRAF6、NF-κB mRNA及蛋白表达量有所降低，但依然高于对照组；实验值得进一步研究之处在于，OxPLs处理接毒组作为强氧化剂致使各因子基因及蛋白的表达量明显低于正常接毒组，其原因可能是因为OxPLs浓度过高，在PRRSV感染之前细胞就已脱落崩解，或是感染PRRSV后激活体内氧化应激反应，释放的OxPLs，加剧了细胞的脱落崩解，最终导致TLR3/NF-κB信号通路在OxPLs处理接毒组表达量降低，为解决该问题，须进一步设计实验进行探讨。

机体抗氧化机制是个复杂过程，在抗氧化剂NAC处理接毒组显示的信号通路中各因子基因及蛋白的表达量较正常接毒组明显降低，PRRSVmRNA水平有所降低，在氧化剂H2O2处理接毒组显示的信号通路中各因子基因及蛋白的表达量较正常接毒组明显升高，PRRSVmRNA水平显著升高，表明氧化应激不利于细胞抗病毒状态建立而促进病毒复制。抗氧化剂NAC使病毒复制减弱，说明NAC可抑制病毒复制，有研究表明，NAC抑制HIV诱导的凋亡及病毒复制及宿主细胞的原癌基因Bcl-2通过抗氧化方式抑制凋亡[72]。结果显示H2O2接毒组PRRSVmRNA表达量高于对照组，表明在氧化应激过程中可能有其他炎性细胞介质的聚集，并进一步加重氧化应激，促

进病毒的复制，Staal等[73]研究发现，在细胞培养基中H2O2促进HIV复制，而抗氧化剂NAC则有相反的效果。平衡机体氧化应激可加强机体的抗病毒能力，所有具有抗氧化应激作用的物质有一定的抗病毒复制作用，因此抗氧化剂可作为辅助治疗，加强抗病毒药物的治疗作用。

尽管许多实验证明PRRSV确实可诱导细胞产生大量自由基，PRRSV感染产生大量自由基而导致的氧化应激激活TLR3/NF-κB通路也只是理论上的推测。本研究运用Real time-PCR法及Western Blotting法分析PRRSV感染PAMs后细胞内TLR3、TRIF、

TRAF6、NF-κB mRNA及蛋白表达量的动态变化，首次在PAMs上探索性证实PRRSV所诱导的细胞氧化应激损伤过程中TLR3/ NF-κB信号传导通路的重要作用机制，但激活该通路后产生的细胞因子、自由基的变化及抗病毒情况还不确定。推测：PRRSV感染后细胞内自由基的含量变化可能是由信号通路激活过程中产生的多种细胞因子决定的，具体结果还有待进一步的实验研究。



**图35 TLR3** **/ NF-κB信号通路作用机制**

**Figure 35 The mechanism of TLR3 / NF-κB signaling pathway**

本研究证实了TLR3/ NF-κB信号传导通路在PRRSV诱导的PAMs有重要作用（图

35）. PRRSV感染诱导的氧化应激，导致自由基的产生和肺部抗氧化防御系统之间的不平衡，可能是PRRSV相关肺部炎症性疾病机制中的基础性原因。因此通过体外实验研究可能为有效预防和治疗PRRSV疾病有着重要的理论和实际意义。

# 5 结论

(1) PRRSV感染可使PAMs产生明显CPE并可启动TLR3-NF-κB信号通路，随着时间的延长，PRRSV mRNA转录水平与TLR3、NF-κB转录水平呈正相关。

(2)抗氧化剂和促氧化剂可引起PAMs氧化应激状态的改变，从而导致PRRSV

mRNA转录及蛋白水平的变化，TLR3/ NF-κB信号传导通路是其调节的分子机制之一。

参考文献

[1] 冉智光, 杨汉春. 猪繁殖与呼吸综合征研究进展[J]. 猪业科学, 2006, 5: 21-22.

[2] Lager K M, Mengeling W L. PRRS: nature of the RNA virus and how it causes disease[J]. In Proceedings of the International Pig Veterinary Society, 2000, 56: 538-543.

[3] Bautista E M, Molitor T W. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine[J]. Viral Immunpol, 1997, 10: 83-94.

[4] Lopez Fuertes L, Domenech N, Alvarez B, Ezquer A, et a1. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection[J]. Virus Res, 1999, 64: 33-42.

[5] Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H, Pensaert M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlation with pathogenicity[J]. Res Vet Sci, 1999, 67: 47-52.

[6] Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et a1. Shared and unique functions of the DExD/H-Box helicases RIG-I MDA5 and LGP2 in antiviral innate immnity[J]. Immunol, 2005, 175: 2851-2858.

[7] Delputte P L, Vanderheijden N, Nauwynck H J, et a1. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparin-like receptor on porcine alveolar macrophages[J]. Virol, 2002, 76: 4312-4320.

[8] Lawson S R, Rossow KD, Collins J E, et a1. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection[J]. Virus Res, 1997, 51: 105-113.

[9] Molitor T W, Bautista E M, Choi C S. Immunity to PRRSV: double-edged sword[J]. Vet Microbiol, 1997, 55(1-4): 265-276.

[10] Chiou M Tdeng C R, Chueh L L, et a1. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro[J]. Vet Microbiol, 2000, 71(1-2): 9-25.

[11] 蒲静. PRRSV 对猪肺泡巨噬细胞天然免疫功能影响的分子机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.

[12] Albina E, Piriou L, Hutet E, et a1. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. [Vet Immunol Immunopathol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9613472) 1998, 61(1): 49-66.

[13] Thanawongnuwech, R., Thacκer, E. L., Halbur, P. G.. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs)[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1997, 59(3/4): 323-335.

[14] Lee S, Κleiboeκer S. Porcine arterivirus activates the NF-κB pathway through I-κB degradation[J]. Virology, 2005, 342(1): 47-59.

[15] Lee SM, Κleiboeκer SB. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway[J]. Virology, 2007, 365(2): 419-34.

[16] Valyi Nagy T, Olson SJ, Valyi, Nagy K, et al. Herpes simplex virus type I latency in the murine nervous system is associated with oxidative damage to neurons[J]. Virology, 2000, 278: 309- 321.

[17] Deeb D, Gao X, Jiang H, et al. Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism[J]. Biochem Pharmacol. 2010, 79(3): 350-360.

[18] 朱宝益, 李小娟, 黄怀球, 等. 前列腺癌miRNA表达谱及miR-96在氧化应激信号通路中的作用[J]. 中ft大学学报, 2012, 33(5): 567-570.

[19] Thomas R, Martin, MarκM. A TRIFfic perspective on acute lung injury[J]. Cell, 2008, 4 (6): 208-210.

[20] Hongmei Li. The key road of ALI is oxidative stress and TLR4 signal transduction pat-hway[J]. Cell, 2008, 133(2): 235-249.

[21] Κo MΚ, Saraswathy S, Pariκh JG, et al. The role of TLR4 activation in photoreceptor mitochondrial oxidative stress[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5824-35.

[22] Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease[J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 419-441.

[23] Chi H, Flavell RA. Innate recognition of non-self nucleic acids[J]. Genome Biol, 2008, 9(3): 211.

[24] Wissel H, Schulz C, Kohne P, et al. Chlamydophila pneumoniae induces expression of Toll-like receptor 4 and release of TNF-αand MIP-2 via an NF-кB pathway in rat typeⅡpneumocytes[J]. Respir Res, 2005, 6(1): 51-65.

[25] Hosakote YM, T Liu, Castro SM, et al. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(3): 348-357.

[26] Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors[J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15(4): 396-401.

[27] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335-376.

[28] Vasselon T, Detmers PA. Toll receptor: a central element in innate immune responses[J]. Infect Immun, 2002, 70(3): 1033-1041.

[29] Sabroe I, Read RC, Whyte MK, et al. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain[J]. Immunol, 2003, 171(4): 1630-1635.

[32] Kariko K, Ni H, Capodici J, et al. mRNA is an endogenous ligand for toll-like receptor 3[J]. Biol Chem, 2004, 279(13): 12542-12550.

[33] Shenghai Huang, Wei Wei, Yun Yun. Upregulation of TLR7 and TLR3 gene expression in the lung early after respitatory syncytial virus infection of mice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(2): 239-245.

[34] Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency[J]. Science, 2006, 314(5797): 308-312.

[35] Hoebe K, Du X, Georgel P, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signaling[J]. Nature, 2003, 424(6950): 743-748.

[36] Chytil M, Verdine G L. The Rel family of euaryotic transcription factors[J]. Curr Opin Struct Biol, 1996, 6: 91-100.

[37] SchrecκR, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-κappa B transcription factor and HIV -1[J]. EMBO J, 1999, 10: 2247-2258.

[38] Ennio Esposito, Domenico Rotilio, Vincenzo Di Matteo, et a1. Algeri, a review of specific dietary antioxidants and the efects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes[J]. Nerobiology of Aging, 2002, 23: 719-735.

[39] Qian Y, Guan T, Huang M et al. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF-κB activation in a cerebral ischemia mouse model[J]. Neurochem Int. 2012, Apr 3. [Epub ahead of print]

[40] Lee JL, Brucκar GT. Nuclear factorκappaB: important transcription factor and therapueutic target. J clin Pharmacol, 1998, 38: 99.

[41] 张宇, 孙瑞利. Toll样受体4信号转导研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(1): 32-36.

[42] 刘妍, 成军, 王建军, 等. 核转录因子Rel/NF-κB与乙型肝炎病毒[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(1): 145-148.

[43] M. Gabriella Santoro, Antonio Rossi, Carla Amici. NF-κB and virus infection: who controls whom[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(11): 2552-2560.

[44] 梁望旺, 杨克礼, 伍锐, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病原学研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(36): 11845-11846.

[45] Chiou M, Jeng C, Chueh L, et a1. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus(isolate Tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro[J]. Vet Microbiol, 2000, 71(1/2): 9-25.

[46] Miller LC, Lager KM, Kehrli ME Jr. Role of Toll-like receptors in activation of porcine alveolar macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome viurus[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(3): 360-365.

[47] Ruchi Srivastava, JayanteeΚalita, Mohammad YahiyaΚhan, et al. Free Radical Generation by Neurons in Rat Model of Japanese Encephalitis[J]. Neurochem Res, 2009, 34: 2141–2146.

[48] Xun-long Shi, Zhi-hui Shi, Hai Huang, et al. Therapeutic Effect of Recombinant Human Catalase on H1N1 Influenza-induced Pneumonia in Mice[J]. Inflammation, 2010, 33(3): 166-172.

[49] Lorber A, Baumgartner WA, Bovy RA, et a1. Clinical application for heavy metal-complexing potential of N-acetylcysteine[J]. J Clin Pharmaco, 1973, 13(8): 332-336.

[50] Hiraku Y, Inoue S, Oikawa S, et a1. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by certain tryptophan metabolites[J]. Carcinogenesis, 1995, 16(2): 349-356.

[51] Liu J, Yoshida Y, Yamashita U. DNA-binding activity of NF-kappaB and phosphorylation of p65 are induced by N-acetylcysteine through phosphatidylinositol(PI) 3-kinase[J]. Mol Immunol, 2008, 45(15): 3984-3989.

[52] Kinscherf R, Fischbach T, Mihm S, et a1. Effect of glutathione depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4+ and CD8+ cells[J]. FASEB J, 1994, 8(6): 448-451.

[53] 原红艳, 张淑香, 李兴启, 等. N-乙酰半胱氨酸对活性氧诱导耳蜗毛细胞凋亡的抑制作用的观察[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2012, 20(3): 266-268.

[54] Olguin-Martinez M, Mendieta-Condado E, Contreras-Zentella M, et al. Rate of oxidant stress regulates balance between rat gastric mucosa prolif-eration and apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(8): 1325-1327.

[55] 曹纯章. 心肌细胞死亡的氧化应激机制及其防治学的研究[D]. 长春: 白求恩医科大学, 2000.

[56] Qiang H, Wang K Z, Shi Z B, et al. Effects of Panax notoginseng saponins on hydrogen peroxide-induced apoptosis in cultured rabbit bone marrow atromal cells[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(2): 131-137.

[57] Xu D H, Zhou C H, Wu T, et al. Inhibitory effect of peaonol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2008, 22(6): 401-405.

[58] Cole AL, Subbanagounder G, Mukhopadhyay S, et al. Oxidized phospholipid-induced endothelial cell/monocyte interaction is mediated by a cAMP-dependent R-Ras/PI3-kinase pathway[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(8): 1384-1390.

[59] Cherepanova O A, Pidkovka NA, Sarmento OF, et al. Oxidized phospholipids induce typeⅤⅢcollagen expression and vascular smooth muscle cell migration[J]. Circ Res, 2009, 104(5): 609-618.

[60] Isakson B E, Kronke G, Kadl A, et al. Oxidized phospholipids alter vascular connexin expression,

Phosphorylation, and heterocellular communication[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(10):2216-2221.

[61] Yumiko Imai, Keiji Kuba, G Greg Neely, et al. Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury[J]. Cell, 2008, 133, 235-249.

[62] 吕伟伟. 呼吸道合胞病毒感染人肺上皮细胞诱导氧化应激对TLR3表达的影响[D]. 安徽: 安徽医科大学基础医学院, 2013.

[63] Luo R, Xiao S, Jiang Y, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway[J]. Immunol, 2008, 45: 2839-2846.

[64] Gruhne B, Kamranvar SA, Masud MG, et al. EBV and genomic instability-a new look at the role of the virus in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma[J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19(6): 394-400.

[65] KaishoT, AkiraS. Toll- like receptor function and signaling[J]. J AllergyClin Immunol, 2006, 117(5): 979- 987.

[66] Hegang Li a, b, Guojian Mab, Duan Guib et al. Characterization of the porcine p65 subunit of NF-κB and its association with virus antibody levels[J]. Molecular Immunology 2011, 48: 914–923.

[67] Shou Y, Li N, Li L, et al. NF-κappaB-mediated up-regulation of Bci-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis[J]. J Neurochem, 2002, 81: 842.

[68] Roscigno M, Sangalli M, Mazzoccoli B. Medical therapy of prostate cancer[J]. A review, Minerva Urol Nefrol, 2005, 57(2): 71.

[69] Lian-Κun Sun, Yoshihiκo Yoshii, Κoichi Miyagi. Cytotoxiceffect through Fas/APO-1expression due to VitaminΚin human glioma cells[J]. Journal of NEURO-Oncology, 2000, 47: 31.

[70] 刘婧, 成建定, 刘水平, 等. TLR3/TRIF 信号转导通路与病毒性心肌炎的研究进展[J]. 热带医学杂志. 2013(13): 259-261.

[71] 唐乐辉, 任国胜. Toll样受体TRIF信号因子在乳腺癌中的表达与临床关系[J]. 免疫学杂志. 2012(28): 427-431.

[72] 魏文青, 孙存普. 氧化应激与病毒感染[J]. 国外医学病毒学分册[J]. 1999(6): 41-45.

[73] Staal FJ, Roederer M, Herzenberg LA, et al. Intracellular tiols regulate activation of nuclear factor KCB and transcription of human immunodeficiency virus[J]. Proc Nati Acad Sci USA, 1990, 87(24): 9943-9947.

致 谢

三年的研究生生活即将结束，谨向所有悉心指导、帮助和关心我的老师、同学和朋友致以诚挚的谢意！

衷心感谢我的导师云南农业大学从事病理学与食品安全评价研究的高洪教授，在他的悉心教导下，本论文才得以顺利完成，特别是在本论文立题、实验设计和论文构思、撰写方面倾注了大量的心血，还有他独到的科研思路和教学方式，以及良好的社会口碑都深深地吸引着我，启迪着我，间接地教给我做人做事的方法。他严谨细致、一丝不苟的作风一直是我工作、学习中的榜样，在此向恩师表示深深的感谢和崇高的敬意！同时也非常感谢师母陈利平老师在学习和生活中无微不至的关怀！

再次要感谢我的实验指导老师严玉霖副教授对我学习和生活上的真诚热心的帮助。三年来，严老师为我提供了大量的学习锻炼机会，在提高了我的实验动手能力的同时，也锻炼了我为人处事的能力。严老师渊博的知识、高效的办事作风、灵活的处世方式、敏捷的科研思维都深深吸引着我，在以后的人生路上，我要加强这些方面的学习。对严老师和陈玲老师在学习上和生活上对我的关心和照顾，在此表示衷心的感谢。

此外还要感谢动物病理学教研室高利波老师、赵汝老师在学习和实验中给了我热情的支持和细心的指导，感谢寄生虫实验室的邹丰才老师在实验仪器方面给予的无私帮助，为我实验的顺利进行奠定了基础。

三年来，要感谢我的同学邵志勇、李祥峰、卢琴、崔艳艳，我的师兄陈冈、蒋欢，师姐刘倩、黄慧，师弟牛鑫、吴程华、谭锐、刘欢欢，师妹王微娜、汪霞、谢丽君、董骎，对于他们在实验和生活上给予的真诚帮助，在此深表谢意，并祝他们学业有成，前程似锦。

感谢我的好友冀斌、刘自立、贺晶晶、王熙、雷晓琴等的相互扶持和关怀。感谢同寝室的每个舍友，在这三年中我们相互促进，共同进步，共同度过了美好而又难忘的研究生生活。

特别感谢我的父母，感谢他们的养育之恩，他们的关爱让我更勇敢坚强地克服困难和挫折，在任何时候给予我精神上的鼓励和生活上的支持，让我努力完成自己的学业。

从云南农大起步，我会怀着一颗感恩的心和积极向上的信念，走好人生的每一步！

臧雅婷

2014年4月于云南农业大学