

辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯合成及 乳脂合成转录调节因子表达的影响

刘莉莉, 蒋倩倩, 李淑莲, 吴 涛, 丁常宏, 赵 波, 郭艳丽, 程玉鹏*

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 为研究辛酸钠对细胞甘油三酯合成能力及对乳脂合成关键转录调节因子固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP1)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)表达的影响,以体外培养的奶牛乳腺上皮细胞为模型,采用 CASY 细胞分析仪检测细胞活力和增殖能力,甘油三酯定量试剂盒检测培养液中甘油三酯浓度,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 SREBP1 和 PPAR γ 相对表达丰度,Western blot 检测 SREBP1 和 PPAR γ 蛋白相对表达水平。结果显示,与不添加辛酸钠组相比,4.0、8.0、12.0 mmol/L 的辛酸钠能显著抑制细胞活力和增殖能力;0.5~2.0 mmol/L 的辛酸钠以浓度依赖方式显著降低培养液中甘油三酯的浓度,且能降低或显著降低 SREBP1、PPAR γ 的表达。表明,辛酸钠能抑制奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯合成,并对乳脂合成关键转录调节因子的表达具有抑制作用。

关键词: 辛酸钠; 奶牛乳腺上皮细胞; 甘油三酯合成; 乳脂合成; 转录调节因子

中图分类号: S823.9 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)03-0133-06

Effects of Sodium Octanoate on Triglyceride Synthesis and Expression of Transcriptional Regulatory Factors in Milk Fat Synthesis in Mammary Epithelial Cells of Dairy Cows

LIU Li-li, JIANG Qian-qian, LI Shu-lian, WU Tao, DING Chang-hong, ZHAO Bo,
GUO Yan-li, CHENG Yu-peng*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of sodium octanoate on triacylglycerol (TAG) synthesis and expression level of key transcriptional regulatory factors SREBP1 and PPAR γ in milk fat synthesis of dairy cow mammary epithelial cells (DCMECs) cultured *in vitro*. Cell viability and proliferation ability were measured by CASY-technology. TAG contents in medium were detected by TAG quantitation kit. The mRNA and protein expression level of SREBP1 and PPAR γ were determined by qRT-PCR and Western blot, respectively. The results showed as follows: compared with the group without sodium octanoate, the cell viability and proliferation ability were significantly inhibited by 4.0, 8.0, 12.0 mmol/L sodium octanoate; the contents of TAG in medium were significantly decreased in concentration-dependent manner from 0.5 to 2.0 mmol/L sodium octanoate; the expression of SREBP1 and PPAR γ were reduced or significantly reduced by sodium octanoate in concentration-dependent manner from 0.5 to 2.0 mmol/L. This study suggests that sodium octanoate can inhibit TAG accumulation and the expression of key transcriptional regulatory factors of milk fat synthesis in DCMECs.

Key words: sodium octanoate; dairy cows mammary epithelial cells; triglyceride synthesis; milk fat synthesis; transcriptional regulatory factor

收稿日期: 2013-10-22

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究基金项目(12531638)

作者简介: 刘莉莉(1980-), 女, 黑龙江铁力人, 讲师, 博士, 主要从事生物技术制药研究。E-mail: liulili-liulili@163.com

* 通讯作者: 程玉鹏(1966-), 男, 黑龙江双城人, 副教授, 博士, 主要从事生物技术制药研究。E-mail: yupengcheng@msn.com

乳脂是牛奶的主要营养成分,生产具有优质乳脂组成的牛奶是健康食品的发展趋势。奶牛乳腺上皮细胞是乳脂合成的场所。乳脂合成涉及多个代谢途径,主要包括脂肪酸(FA)摄取和转运、内源合成、去饱和作用、酯化、脂滴形成和分泌等过程,在这个过程中需要多种参与乳脂合成的关键酶和蛋白发挥作用^[1]。近年来,研究人员将传统营养研究与分子生物学技术相结合,发现了大量与乳脂合成和分泌相关的基因,并揭示了其功能和相互之间的作用^[2-7]。

脂肪酸是一类重要的营养物质,研究^[8-10]发现,脂肪酸在细胞内可通过转录因子活化途径和细胞膜受体信号途径等调控基因的表达,对代谢、生长发育以及细胞分化发挥重要的调控作用。有研究^[11-14]报道,长链脂肪酸(LCFA)和短链脂肪酸(SCFA)能调控奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯合成,调控生脂基因和乳脂合成转录调控因子基因的表达。但目前中链脂肪酸(MCFA)对奶牛乳腺乳脂合成的影响及其调控机制尚不清楚。

辛酸钠是八碳饱和脂肪酸,属于典型的 MCFA,本研究以奶牛乳腺上皮细胞为模型,研究不同浓度的辛酸钠对细胞活力、增殖能力及甘油三酯合成能力的影响,检测辛酸钠对乳脂合成关键转录调节因子固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP1)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)表达的影响,为进一步研究 MCFA 对奶牛乳腺中 FA 转运及合成、甘油三酯合成以及对乳腺上皮细胞调控功能的影响提供参考,为研究奶牛乳脂合成调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

奶牛乳腺上皮细胞由东北农业大学动物生物化学实验室馈赠。

辛酸钠、去除脂肪酸的牛血清白蛋白、胰蛋白酶购自 Sigma 公司,DMEM/F12 培养基、胎牛血清

(FBS)购自 Gibco 公司,Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,甘油三酯定量试剂盒购自普利莱基因技术有限公司,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒 SYBR Primx Ex Taq、Prime Script RT 试剂盒购自 TaKaRa 公司,CASYton 缓冲液购自德国 Scharfe 公司,SREBP1 抗体(sc-365513)、PPAR γ 抗体(ab19481)购自 Invitrogen 公司。

1.2 奶牛乳腺上皮细胞培养

采用生长培养基(DMEM/F12+10% FBS)于 37℃、5% CO₂ 条件下培养奶牛乳腺上皮细胞,每隔 24 h 更换培养基。

1.3 奶牛乳腺上皮细胞活力和增殖能力检测

收集对数生长期乳腺上皮细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达到 70%~80%时,将细胞转入无脂无血清培养基(DMEM/F12+1 g/L BSA)培养 24 h,更换新鲜无脂无血清培养基,并添加不同浓度的辛酸钠,辛酸钠的终浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L,每处理重复 3 次,培养 48 h。消化不同处理组奶牛乳腺上皮细胞制成的单细胞悬液,取 100 μ L 细胞悬液加入装有 10 mL CASYton 缓冲液的 CASY 杯(对细胞悬液进行 100 倍稀释),颠倒 CASY 杯使细胞混匀,利用 CASY 细胞活力分析仪检测细胞活力和增殖能力。

1.4 细胞培养基中甘油三酯浓度的检测

取对数生长期乳腺上皮细胞等密度接种于 6 孔板中,待细胞融合度达到 70%~80%时,将细胞转入无脂无血清培养基培养 24 h,更换新鲜无脂无血清培养基,添加 0~2.0 mmol/L 的辛酸钠继续培养 48 h,选择使细胞生长增殖不受抑制即对细胞无毒性的辛酸钠浓度,用甘油三酯定量试剂盒测定培养基中甘油三酯的浓度。

1.5 引物设计

根据 GenBank 中 SREBP1、PPAR γ 基因和 β -actin(内参基因)的 mRNA 序列,使用 Primer 5.0 软件设计各基因 qRT-PCR 的上、下游引物(表 1)。

表 1 各基因的 qRT-PCR 引物序列

基因名称	GenBank 登录号	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
SREBP1	NM_001113302.1	F:AGTAGCAGCGGTGGAAGT R:GCAGCGGCTCTGGATT	82
PPAR γ	NM_181024.2	F:TCAAAGTGGAGCCTGTATC R:CATAGTGAACCTGACG	140
β -actin	NM_173979.3	F:AAGGACCTCTACGCCAACACG R:TTTGCGGTGGACGATGGAG	249

1.6 奶牛乳腺上皮细胞总 RNA 提取、cDNA 合成及各基因的 qRT-PCR 检测

奶牛乳腺上皮细胞的处理及辛酸钠的添加浓度同 1.4。采用 SYBR 染料法检测细胞 *SREBP1* 和 *PPAR γ* 基因表达。用 Trizol 试剂提取奶牛乳腺上皮细胞总 RNA。按照 Prime Script RT 试剂盒说明书进行逆转录,使用 SYBRPrimx Ex Taq 试剂盒进行各基因的 qRT-PCR 检测。各基因的 qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量的方法计算目的基因的 mRNA 表达丰度^[15]。

1.7 乳腺上皮细胞总蛋白提取

奶牛乳腺上皮细胞的处理及辛酸钠的添加浓度同 1.4。4℃预冷的 D-Hanks 洗涤细胞 2 次;每孔中加 100 μ L 2 \times SDS Sample Buffer,用枪头轻轻刮下细胞,转移到 0.5 mL 的 EP 管中;100℃煮沸 10 min使蛋白变性;超声波破碎 15 s,重复 3 次,分装,-20℃冻存备用。

1.8 Western blot 检测

配制浓缩胶和分离胶进行 SDS-PAGE 分析。电泳结束后将凝胶上的蛋白转印到硝酸纤维素膜上。室温用脱脂牛奶封闭,一抗 4℃孵育过夜,取出后洗 3 次,每次 5 min;二抗 37℃摇床孵育 1 h,洗 3 次,发光液显色,在暗室中曝光、显影。采用 Band-Scan 5.0 软件对 Western blot 图谱进行灰度扫描,X 光胶片上蛋白条带经扫描读取密度值后,与由同一转移膜所测得的 β -actin 蛋白比较得出蛋白的相对含量。

1.9 数据处理

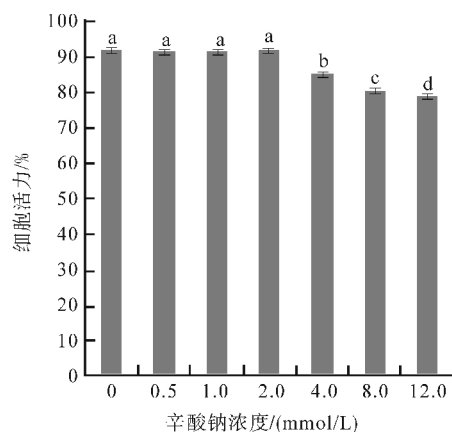
应用 SAS 9.1 统计学软件进行单因素方差分析,数据以平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞活力和增殖能力的影响

由图 1、2 可以看出,与对照组相比,奶牛乳腺上皮细胞添加浓度为 0.5~2.0 mmol/L 的辛酸钠,各处理组细胞活力和增殖能力无显著性差异;添加 4.0~12.0 mmol/L 的辛酸钠,各处理组细胞活力和增殖能力显著降低。表明,较高剂量(4.0、8.0、12.0 mmol/L)的辛酸钠显著抑制了细胞活力和增殖能力。

因此,选择添加对细胞生长增殖不受抑制即对细胞无毒性的辛酸钠浓度(0~2.0 mmol/L),来研究辛酸钠对细胞甘油三酯合成能力及对 *SREBP1* 和 *PPAR γ* 表达的影响。



标注不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同

图1 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响

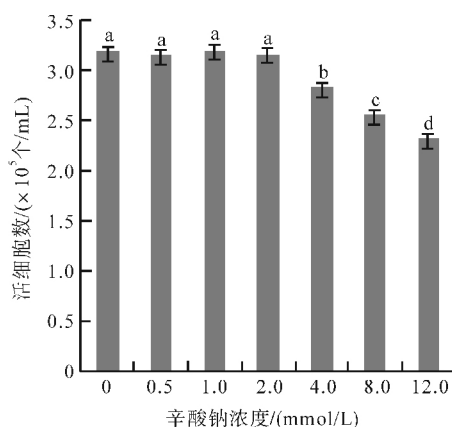


图2 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞增殖能力的影响

2.2 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞合成甘油三酯能力的影响

利用 0~2.0 mmol/L 的辛酸钠处理奶牛乳腺上皮细胞,采用甘油三酯测试盒测定培养基中甘油三酯的浓度。由图 3 可以看出,与未添加辛酸钠的乳腺上皮细胞相比,0.5~2.0 mmol/L 的辛酸钠以浓度依赖的方式显著降低细胞培养基中甘油三酯的浓度($P<0.05$)。

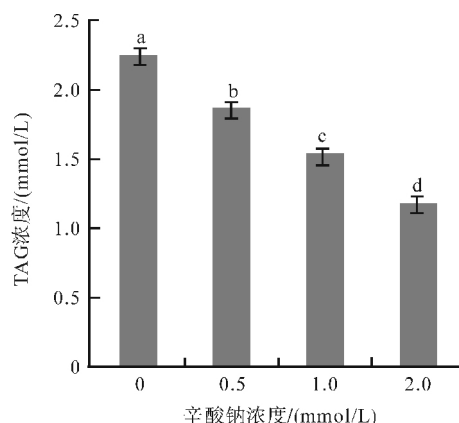


图3 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞合成甘油三酯能力的影响

2.3 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 *SREBP1* 和 *PPAR γ* 基因表达的影响

由图 4、5 可以看出,0~2.0 mmol/L 的辛酸钠处理奶牛乳腺上皮细胞后,辛酸钠以浓度依赖的方式降低或显著降低细胞 *SREBP1*、*PPAR γ* 基因的表达。

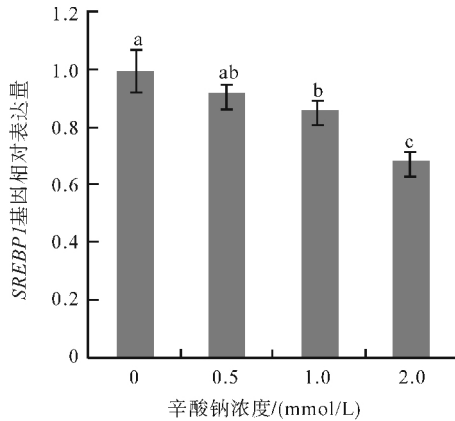


图 4 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 *SREBP1* 基因表达的影响

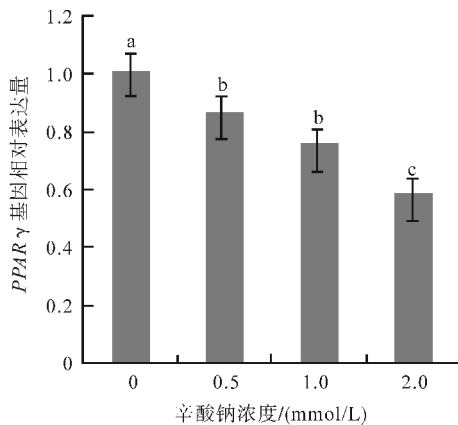
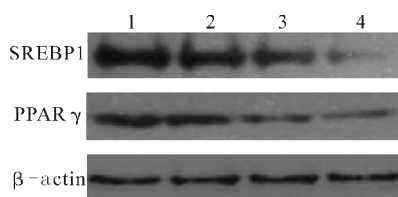


图 5 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 *PPAR γ* 基因表达的影响

2.4 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 *SREBP1* 和 *PPAR γ* 蛋白表达的影响

选择 0~2.0 mmol/L 的辛酸钠处理细胞,采用 Western blot 检测奶牛乳腺上皮细胞 *SREBP1* 和 *PPAR γ* 蛋白的相对表达量(图 6—8)。结果所示,与未添加辛酸钠的乳腺上皮细胞相比,0.5~2.0 mmol/L 辛酸钠以浓度依赖的方式显著降低细胞 *SREBP1* 和 *PPAR γ* 的蛋白表达。



1—4 分别为 0、0.5、1.0、2.0 mmol/L 辛酸钠

图 6 辛酸钠处理奶牛乳腺上皮细胞 *SREBP1* 和 *PPAR γ* 蛋白表达的 Western blot 结果

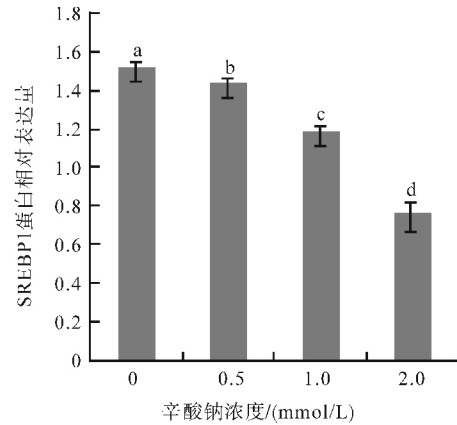


图 7 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 *SREBP1* 蛋白表达的影响

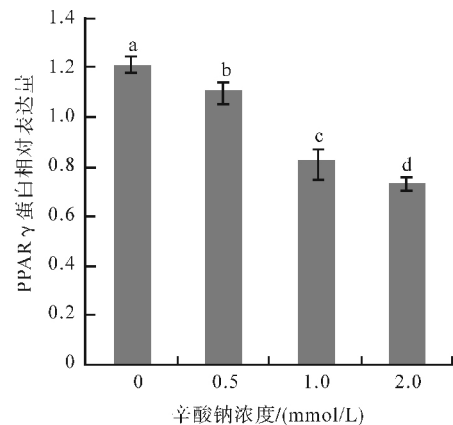


图 8 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 *PPAR γ* 蛋白表达的影响

3 讨论

脂肪酸是奶牛乳腺组织摄取的一种重要营养物质,其对奶牛乳腺上皮细胞的生长、增殖具有调节作用。齐利枝等^[16]研究发现,奶牛乳腺上皮细胞活力与乙酸添加浓度呈显著的剂量依赖关系,低浓度的乙酸可提高奶牛乳腺上皮细胞活力,高浓度则表现抑制作用。崔瑞莲^[17]证实,较高浓度(200、400 $\mu\text{mol/L}$)的亚油酸、亚麻酸、油酸和硬脂酸能抑制奶牛乳腺上皮细胞的增殖。本研究发现,添加较高剂量(4.0、8.0、16.0 mmol/L)的辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞的活力和增殖能力具有一定的抑制作用。但辛酸钠对细胞活力和增殖能力影响的具体机制需进一步深入研究。本研究通过 CASY 细胞活力分析仪检测不同浓度梯度辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响,确定辛酸钠对细胞的无毒添加剂量作为后续试验的浓度添加范围,即 0~2.0 mmol/L。

奶牛乳腺上皮细胞是乳脂合成的场所,合成的乳脂约 95% 为甘油三酯^[18]。乳腺上皮细胞内质网上,来自从头合成途径的脂酰辅酶 A 和外源摄取的

FA 能被酯化到甘油-3-磷酸骨架上,以形成甘油三酯^[19]。Bionaz 等^[20]研究奶牛从临产期到泌乳末期,乳腺组织与脂类合成和分泌有关的 45 个基因的表达变化,提出参与协调乳脂合成和分泌的基因网络,其中转录调控因子 SREBP 和 PPAR γ 在奶牛乳脂合成基因网络中具有主导作用,它们可以调控多数已知乳脂合成相关基因的表达。SREBP 属于核转录因子家族,是脂肪合成基因重要的转录调节因子^[21]。研究^[22-23]发现,奶牛乳腺 SREBP1 参与调控多种乳脂合成相关酶基因的转录激活过程。PPAR 属于核激素受体超家族成员,为配体激活转录因子,PPAR γ 能调节奶牛乳脂合成相关基因的表达^[24-25]。研究^[26-28]报道,辛酸盐能抑制脂肪细胞甘油三酯合成,抑制脂肪合成转录调控因子 PPAR γ 、SREBP-1c 及其他生脂基因的表达。这些研究表明,辛酸盐能参与脂肪细胞的脂肪合成,并调节相关生脂基因的表达,而辛酸盐对奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯合成及对生脂基因关键转录调节因子 PPAR γ 、SREBP1 的影响却不清楚。

本研究发现,外源添加 0.5~2.0 mmol/L 的辛酸钠能以浓度依赖的方式显著降低细胞培养基中甘油三酯的含量,说明辛酸钠能抑制奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成;且能以浓度依赖的方式降低或者显著降低 PPAR γ 、SREBP1 基因表达,显著降低 PPAR γ 、SREBP1 蛋白表达。推测辛酸钠可能通过降低乳脂合成转录调节因子 PPAR γ 、SREBP1 的表达,进而抑制乳脂合成代谢中 PPAR γ 、SREBP1 下游靶基因的表达。奶牛乳腺上皮细胞中辛酸钠通过降低转录调节因子 SREBP1、PPAR γ 的表达进而抑制甘油三酯合成。这与人用辛酸盐对其他细胞脂肪合成影响的研究结果基本一致^[26-28]。FA 对奶牛乳脂合成调控机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Bauman D E, Davis C L. Biosynthesis of milk fat[M]. New York: Academic Press, 1974: 31-75.
- [2] Bionaz M, Rodriguez-Zas S L, Everts R E, et al. MamOmicsTM: Transcript profiling of the mammary gland during the lactation cycle in Holstein cows[J]. J Dairy Sci, 2007, 90(1): 207-208.
- [3] Ollier S, Robert-Granie C, Bernard L, et al. Mammary transcriptome analysis of food-deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death[J]. J Nutr, 2007, 137(3): 560-567.
- [4] Bernard L, Leroux C, Chilliard Y. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 606: 67-108.
- [5] McManaman J L, Russell T D, Schaack J, et al. Molecular determinants of milk lipid secretion[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2007, 12(4): 259-268.
- [6] Palmquist D L. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon[M]. New York: Springer, 2006: 43-92.
- [7] Bionaz M, Loores J J. ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation[J]. J Nutr, 2008, 138(6): 1019-1024.
- [8] Georgiadi A, Kersten S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids[J]. Adv Nutr, 2012, 3(2): 127-134.
- [9] Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription[J]. J Biol Chem, 2000, 275(40): 30749-30752.
- [10] Sampath H, Ntambi J M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism[J]. Annu Rev Nutr, 2005, 25: 317-340.
- [11] 王红芳. 外源反-10、顺-12 共轭亚油酸对牛乳腺上皮细胞脂肪合成的影响及其分子机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [12] Peterson D G, Matitashvili E A, Bauman D E. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1[J]. J Nutr, 2004, 134(10): 2523-2527.
- [13] 齐利枝, 生冉, 闫素梅, 等. 乙酸浓度对奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯含量及瘦素和过氧化物酶增殖物激活受体 γ 基因表达量的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(7): 1519-1525.
- [14] 孔庆洋, 林叶, 李庆章. 乙酸钠和丁酸钠对奶牛乳腺脂肪酸合成相关基因的影响[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(3): 15-17.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] 齐利枝, 闫素梅, 生冉, 等. 乙酸对奶牛乳腺上皮细胞活力及 CD36 和 FABP3 基因表达的影响[J]. 饲料工业, 2013, 34(11): 49-52.
- [17] 崔瑞莲. 十八碳脂肪酸对泌乳奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯合成的影响及机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [18] Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge R M, et al. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids

- [J]. *Annales de Zootechnie*, 2000, 49(3): 181-205.
- [19] Liying M. Regulatory factors of milk fat synthesis in dairy cows[D]. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, 2012.
- [20] Bionaz M, Loores J J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 366-387.
- [21] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [22] Harvatine K J, Bauman D E. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14(S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA[J]. *J Nutr*, 2006, 136(10): 2468-2474.
- [23] Oppi-Williams C, Suagee J K, Corl B A. Regulation of lipid synthesis by liver X receptor α and sterol regulatory element-binding protein 1 in mammary epithelial cells[J]. *J Dairy Sci*, 2013, 96(1): 112-121.
- [24] Kadegowda A K G, Bionaz M, Piperova L S, *et al.* Lipogenic gene expression in MAC-T cells is affected differently by fatty acids and enhanced by PPAR- γ activation[J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91: 678.
- [25] Kadegowda A K, Bionaz M, Piperova L S, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(9): 4276-4289.
- [26] Guo W, Lei T, Wang T, *et al.* Octanoate inhibits triglyceride synthesis in 3T3-L1 and human adipocytes[J]. *J Nutr*, 2003, 133(8): 2512-2518.
- [27] Guo W, Xie W, Han J. Modulation of adipocyte lipogenesis by octanoate: Involvement of reactive oxygen species[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2006, 3: 30.
- [28] Han J, Farmer S R, Kirkland J L, *et al.* Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes[J]. *J Nutr*, 2002, 132(5): 904-910.
- ~~~~~
- (上接第 127 页)
- [9] Chen L, Xia Y H, Pan Z S, *et al.* Expression and functional characterization of classical swine fever virus E^{ms} glycoprotein[J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 55(2): 379-387.
- [10] Charleston B, Fray M D, Baigent S, *et al.* Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(8): 1893-1897.
- [11] Ruggli N, Tratschin J D, Schweizer M, *et al.* Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of Npro[J]. *J Virol*, 2003, 77(13): 7645-7654.
- [12] Schweizer M, Peterhans E. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis[J]. *J Virol*, 2001, 75(10): 4692-4698.
- [13] Ruggli N, Bird B H, Liu L, *et al.* Npro of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- α/β induction[J]. *J Virol*, 2005, 79(2): 265-276.
- [14] Bauhofer O, Summerfield A, McCullough K C, *et al.* Role of double-stranded RNA and Npro of classical swine fever virus in the activation of monocyte-derived dendritic cells[J]. *Virology*, 2005, 343(1): 93-105.
- [15] Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, *et al.* Role for bovine viral diarrhoea virus E^{ms} glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA[J]. *J Virol*, 2004, 78(1): 136-145.
- [16] Meyers G, Saalmüller A, Büttner M. Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E^{ms} of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation[J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 10224-10235.
- [17] Windisch J M, Schneider R, Stark R, *et al.* RNase of classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies[J]. *J Virol*, 1996, 70(1): 352-358.