

# 热应激诱导奶牛乳腺上皮细胞凋亡及其对 *HSP70* 基因表达的影响

张响英<sup>1,2</sup>,唐现文<sup>1</sup>,陈静波<sup>1</sup>,李腾腾<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏 泰州 225300; 2. 南京农业大学,江苏 南京 210095)

**摘要:** 为探讨热应激对乳腺上皮细胞凋亡的影响,以体外培养的奶牛乳腺上皮细胞为模型,取对数生长期的乳腺上皮细胞分别置于 39 ℃ 和 41 ℃ 热处理 1 h(以 37 ℃ 正常培养的细胞为对照),在 37 ℃ 恢复培养 0、6、12 h 后收集细胞,采用 MTT 法检测细胞生长抑制率,Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡,比色法分析 Caspase-3 活性,荧光定量 PCR 检测 *HSP70* 基因的表达水平。结果表明,39 ℃ 热应激组细胞生长抑制率和死亡率高峰期均发生在热修复 6 h,细胞死亡率为 15.42%,而 41 ℃ 热应激组发生在热修复 12 h,细胞死亡率高达 23.18%;高温处理后,Caspase-3 活性呈上升趋势;39 ℃ 热应激组在热恢复 6 h,*HSP70* 基因表达量显著高于对照组,41 ℃ 热应激组在热恢复 0、6、12 h,*HSP70* 基因的表达量分别为对照组的 3.53 倍、5.61 倍和 2.93 倍。综上可知,高温应激激活了 Caspase-3 活性,从而诱导乳腺上皮细胞凋亡,并随高温强度的增加而作用增强,同时高温诱导了 *HSP70* 基因过表达,协助细胞获得热耐受性。

**关键词:** 乳腺上皮细胞; 热应激; 细胞凋亡; *HSP70* 基因

**中图分类号:** S823;Q256      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2017)08-0142-05

## Effects of Heat Stress on Apoptosis and Expression of *HSP70* mRNA in Bovine Mammary Epithelial Cells

ZHANG Xiangying<sup>1,2</sup>,TANG Xianwen<sup>1</sup>,CHEN Jingbo<sup>1</sup>,LI Tengteng<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College,Taizhou 225300,China;  
2. Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

**Abstract:** To explore the effects of heat stress on the apoptosis of the bovine mammary epithelial cells and the expression of *HSP70* mRNA,the logarithmic growth phase mammary epithelial cells were exposed to 39 ℃ and 41 ℃ for 1 h(the control group was cultured at 37 ℃),and cells were collected in the recovery times at 0,6,12 h. Cell growth inhibition rate was detected by MTT method,cell apoptosis was measured by Annexin V/PI double staining method,Caspase-3 activity was detected by colorimetric assay and the expression level of *HSP70* was tested by RQ-PCR. The results showed that the highest growth inhibition rate and maximum death rate of mammary epithelial cells occurred in the recovery 6 h against 39 ℃ and the cell mortality rate was 15.42%,while they occurred in the recovery 12 h against 41 ℃ and the largest cell mortality rate was 23.18%. After high temperature treatment,the activity of Caspase-3 increased. The expression level of *HSP70* mRNA in the recovery 6 h against 39 ℃ was significantly higher than that in control. And it was 3.53 times,5.61 times and 2.93 times significantly higher than that of control in the recovery 0,6,12 h respectively against 41 ℃. This suggested that heat stress activated the activity of Caspase-3 in the mammary epithelial cells and induced cell apoptosis with the increase of temperature. At

收稿日期:2017-02-26  
基金项目:江苏省科技支撑计划项目(BE2008306-2);江苏农牧科技职业学院大学生创新创业项目(201612806053P)  
作者简介:张响英(1974-),女,山东烟台人,副教授,博士,主要从事动物遗传繁育与生物技术研究。  
E-mail:724673081@qq.com

the same time,the cells over-expressed *HSP70* by heat stress,and could acquire tolerance.

**Key words:** mammary epithelial cells; heat stress; cell apoptosis; *HSP70*

热应激是指机体应对环境高温所产生的非特异性免疫应答反应。奶牛耐寒畏热,环境温度过高时,便会出现热应激反应,导致机体代谢紊乱、产奶量下降、抗病力降低等,探索奶牛的热应激调控机制可提高奶牛生产性能。研究发现,热应激能降低细胞的活力,诱导细胞凋亡和热休克蛋白(HSPs)表达<sup>[1-3]</sup>。*HSP70* 作为最重要的 HSPs 成员,分布在各种细胞中,其在细胞内的聚集或消退与细胞耐热性的获得或丧失密切相关<sup>[4]</sup>。在正常状态下,细胞内存在一定量的 *HSP70*,无 DNA 结合活性的热休克转录因子 1(HSF-1)单体在胞浆内与 *HSP70* 结合形成复合体,当高温应激时,外界信号刺激 HSF-1 活化,与热休克元件(HSE)结合,诱导 HSP 表达,阻断 Caspase 级联反应,从而抑制细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>。不同种类细胞抵抗高温应激的能力,因热处理温度和时间不同而存在差异。研究报道,间断和持续高温处理均可诱导奶牛乳腺上皮细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。本研究以体外培养的奶牛乳腺上皮细胞为模型,探讨不同温度处理对细胞凋亡及 *HSP70* 基因表达的影响,进一步揭示乳腺的热应激调控机制,以期缓解奶牛热应激提供理论依据。

# 1 材料和方法

## 1.1 试剂和仪器

试剂:DMEM(Gibco 公司)、犊牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、MTT(Amresco 公司)、Caspase-3 活性检测试剂盒(上海哈灵生物科技有限公司)、荧光定量 PCR 试剂盒(Zoonbio 公司)、DEPC 水(Sigma 公司)、Trizol 试剂(大连宝生物工程有限公司)等。

仪器:CO<sub>2</sub> 培养箱、无菌操作台、高速低温离心机、WFJ7200 型可见分光光度计、酶联免疫仪、凝胶成像系统、FTC2000 荧光定量 PCR 仪等。

## 1.2 细胞培养及处理

采用组织块法培养奶牛乳腺上皮细胞<sup>[9]</sup>。取刚屠宰的健康荷斯坦奶牛乳腺组织,剔除脂肪,剪成 1~2 mm<sup>3</sup> 的小块进行接种培养,经纯化后取对数生长期细胞用于试验。试验分对照组(CK)、39℃热应激组和 41℃热应激组。(1)对照组:37℃培养乳腺上皮细胞 24 h,收集细胞;(2)39℃热应激组:将正常培养的乳腺上皮细胞置于 39℃处理 1 h,立即

放回 37℃恢复培养,分别在恢复培养的 0、6、12 h 收集细胞;(3)41℃热应激组:将正常培养的乳腺上皮细胞置于 41℃处理 1 h,立即放回 37℃恢复培养,分别在恢复培养的 0、6、12 h 收集细胞。

## 1.3 细胞生长抑制率检测

收集各组处理细胞,加入 MTT 试剂培养 4 h,吸弃上清,然后加入 DMSO,静置 30 min,在酶标仪上测定 490 nm 处的吸光值,计算抑制率。细胞生长抑制率=(对照组 OD 均值-试验组 OD 均值)/对照组 OD 均值×100%。

## 1.4 乳腺上皮细胞凋亡检测

收集各组处理细胞,采用 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡,按照试剂盒使用说明用流式细胞仪检测,统计细胞凋亡数,计算细胞死亡率。细胞死亡率=细胞早期凋亡率+细胞晚期凋亡率(坏死率)。

## 1.5 Caspase-3 活性检测

使用 Caspase-3 比色试剂盒,按照使用说明检测 Caspase-3 的活性。

## 1.6 荧光定量 PCR 检测 HSP70 基因表达量

从 GenBank 数据库中获得目的基因 mRNA 序列,运用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物,引物序列见表 1。

表 1 *HSP70* 和 *GAPDH* 基因的荧光定量 PCR 引物

基因名称	登录号	引物序列(5'—3')	产物大小/bp
<i>HSP70</i>	NM 203322	F:TGCGTAGGGGTGTTCCA	259
		R:CCTTAGGCTTGTCTCCGTC	
<i>GAPDH</i>	U85042.1	F:ACTTTGGCATCGTGGAGG	378
		R:GAAGAGTGACTGTCGCTGTTG	

用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测其纯度和浓度,然后反转录获取 cDNA,按照以下反应体系进行 PCR 扩增:SYBRMIX 12.5 μL,上、下游引物各 0.5 μL,ROX Dye 2.5 μL,cDNA 2.0 μL,用无菌去离子水补充体系至 25 μL。反应条件:95℃预变性 1 min;95℃变性 15 s,60℃退火 15 s,72℃延伸 45 s,共 40 个循环。样本基因 *HSP70* 的表达强度用其对应的 *GAPDH* 基因的量进行校正,即  $\Delta Ct = Ct(HSP70 \text{ 基因}) - Ct(GAPDH \text{ 基因})$ ,其相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行分析。

## 1.7 数据分析

数据以平均值±标准差表示,采用 SPSS17.0 软件中的 One-Way ANOVA 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 热应激对奶牛乳腺上皮细胞生长抑制率的影响

与对照组相比,39 ℃热应激组在热恢复 0、6、12 h 的细胞生长抑制率分别为 14.07% ( $P>0.05$ )、28.13% ( $P<0.05$ ) 和 22.02% ( $P<0.05$ ),41℃热应激组细胞生长抑制率显著增加,热恢复 0、6、12 h 分别为 17.13% ( $P>0.05$ )、39.76% ( $P<0.01$ ) 和 43.73% ( $P<0.01$ );与 39 ℃热应激组相比,41 ℃热应激组热恢复 0 h 细胞生长抑制率差异不显著,热恢复 6、12 h 细胞抑制率分别提高了 11.63 个百分

点( $P<0.05$ )和 21.71 个百分点( $P<0.01$ )。以上结果表明,热应激抑制了奶牛乳腺上皮细胞的生长增殖,温度越高抑制作用愈明显。

2.2 热应激对奶牛乳腺上皮细胞凋亡的影响

由表 2 可知,热应激诱导乳腺上皮细胞死亡,并随高温强度的增加而作用增强,39 ℃热应激组细胞死亡高峰期出现在热修复 6 h 左右,死亡率为 15.42%。与对照组相比,热恢复 6 h 时,39 ℃热应激组细胞晚期凋亡率(坏死率)提高了 6.49 个百分点( $P<0.05$ );41 ℃热应激组细胞死亡高峰期出现在热修复 12 h,死亡率高达 23.18%。

表 2 热应激对乳腺上皮细胞凋亡的影响

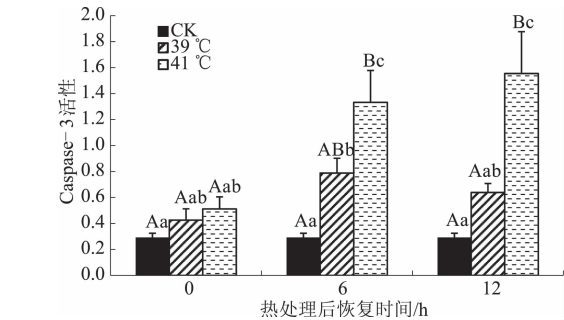
组别	恢复时间/h	早期凋亡率/%	晚期凋亡率(坏死率)/%	总死亡率/%
CK		1.86 ± 0.43 <sup>Aa</sup>	5.92 ± 1.14 <sup>Aa</sup>	7.78 ± 1.57 <sup>Aa</sup>
39 ℃	0	2.05 ± 0.62 <sup>Aa</sup>	7.23 ± 1.01 <sup>Aab</sup>	9.28 ± 1.65 <sup>Aab</sup>
	6	3.01 ± 0.71 <sup>Aa</sup>	12.41 ± 1.87 <sup>Ab</sup>	15.42 ± 4.72 <sup>Ab</sup>
	12	2.48 ± 0.89 <sup>Aa</sup>	10.02 ± 2.23 <sup>Aab</sup>	12.50 ± 3.25 <sup>Aab</sup>
41 ℃	0	2.16 ± 0.62 <sup>Aa</sup>	8.33 ± 1.85 <sup>Aab</sup>	10.49 ± 2.14 <sup>Aab</sup>
	6	6.40 ± 1.02 <sup>Aa</sup>	14.57 ± 2.52 <sup>Ab</sup>	20.97 ± 3.33 <sup>Bb</sup>
	12	6.26 ± 1.75 <sup>Aa</sup>	16.92 ± 1.98 <sup>Ab</sup>	23.18 ± 4.78 <sup>Bb</sup>

注:同列数据不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。

2.3 热应激对奶牛乳腺上皮细胞 Caspase-3 活性的影响

从图 1 可以看出,高温处理后,Caspase-3 活性呈上升趋势。与对照组相比,39 ℃和 41 ℃热应激组在热恢复 0 h 时,Caspase-3 活性变化均不明显,39 ℃热应激组在热恢复 6 h 时 Caspase-3 活性显著上升 ( $P<0.05$ ),41 ℃热应激组在热恢复 6、12 h,Caspase-3 活性分别为对照组的 4.55 倍 ( $P<0.01$ )、5.31 倍 ( $P<0.01$ );在热恢复 6、12 h,41 ℃热应激组 Caspase-3 活性显著高于 39 ℃热应激组。提示热应激反应激活了凋亡级联反应中的关键因子 Caspase-3 的活性,从而引发细胞凋亡。

在热恢复 6 h,*HSP70* 基因表达量显著高于对照组 ( $P<0.05$ ),41 ℃热应激组在热恢复 0、6、12 h,*HSP70* 基因的表达量分别为对照组的 3.53 倍 ( $P<0.05$ )、5.61 倍 ( $P<0.01$ ) 和 2.93 倍 ( $P<0.05$ );在热恢复 6 h,41 ℃热应激组 *HSP70* 基因的表达量显著高于 39 ℃热应激组。说明热应激可提高奶牛乳腺上皮细胞 *HSP70* 基因的转录水平,从而保护细胞免受伤害。



同一时间不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ ),下同

图 1 热应激对乳腺上皮细胞 Caspase-3 活性的影响

2.4 热应激对奶牛乳腺上皮细胞 HSP70 基因表达的影响

从图 2 可以看出,与对照组相比,39 ℃热应激组

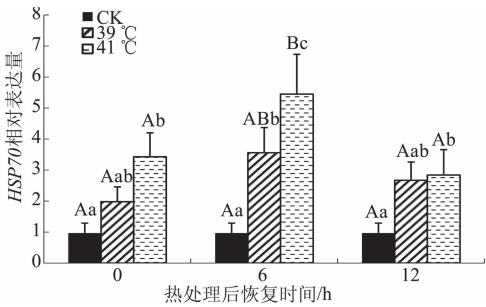


图 2 热应激对奶牛乳腺上皮细胞 HSP70 基因表达的影响

3 结论与讨论

乳腺细胞的增殖和凋亡共同处在动态平衡之中,这对乳腺的发育和功能的形成都有重要作用<sup>[10]</sup>。乳腺细胞凋亡是一个非常复杂的过程,不仅可自发产生,也受高温、缺氧、射线、感染、药物等多种因素的影响<sup>[11-13]</sup>。管英俊等<sup>[14]</sup>对原代培养神经细胞的研究表明,高温可使神经细胞的表面结构和内部微细结构发生明显变化,降低 LDH 活性,诱导 DNA 片段形成,从而诱发原代培养神经细胞凋亡。

杜娟等<sup>[3]</sup>报道,高温使细胞 G/M 期阻滞,诱导乳腺细胞凋亡,形态上表现为染色质浓缩、线粒体肿胀、空泡化、形成凋亡小体。热应激对细胞的死亡诱导是一个延迟、渐进的过程。本试验发现,39 ℃ 热应激组细胞生长抑制率和死亡率高峰期均发生在热修复 6 h,而 41 ℃ 热应激组细胞死亡高峰期则出现在热修复 12 h 左右,死亡率为 23.18%。O'Neill 等<sup>[15]</sup>将人淋巴细胞置于 43 ℃ 环境热处理 1 h,在热恢复 12 ~ 18 h 细胞凋亡达最高峰,提示高温诱导的细胞凋亡呈时间依赖性。人的白血病细胞系 HL-60 细胞 43 ℃ 热处理 1 h,热恢复 12 h 出现死亡最高峰<sup>[16]</sup>。可见,细胞死亡是细胞遭受应激的后续事件,不同的应激因素,不同的细胞类型,其高峰期出现的时间也不一致。

Caspase 家族是半胱氨酸依赖性细胞死亡蛋白酶,是细胞凋亡过程中的关键元件<sup>[17]</sup>,其中 Caspases-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,处于凋亡级联反应的下游,是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,是细胞程序性死亡的介导者和执行者<sup>[18]</sup>。本研究发现,高温处理后,Caspase-3 活性呈上升趋势,在热恢复 6 h 和 12 h,41 ℃ 热应激组 Caspase-3 活性均显著高于 39 ℃ 热应激组。正常情况下,Caspase-3 以无活性的酶原形式存在于胞浆中,而在细胞凋亡早期阶段,Caspase-3 被激活,裂解相应的胞浆胞核底物,最终引起细胞凋亡,Caspase-3 活化是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志。

HSP70 是细胞在应激状态下启动的一系列特殊基因编码合成的蛋白质,具有多种生物学功能,如参与分子伴侣功能,提高细胞的应激耐受性,参与细胞骨架的形成与修复等<sup>[19]</sup>。高热、缺氧、机械刺激、射线等多种有害因素刺激均可诱导 HSP70 的产生<sup>[20-21]</sup>。荧光定量 PCR 分析结果表明,奶牛乳腺上皮细胞在 41 ℃ 高温应激后 0 ~ 12 h 内引发 HSP70 基因过表达,细胞凋亡率明显增高,这与郭亮等<sup>[7]</sup>的报道相一致。这可能是因为损伤的细胞内蛋白质变性、聚集、错折叠等现象大大增多,通过一系列机制诱导 HSP70 基因表达量上升。热应激后,HSP70 高强度表达是评价组织细胞危险性的生物标志<sup>[22]</sup>,也提高了细胞的耐热能力。HSP 使细胞产生耐热性的分子机制可能与 HSP 可防止细胞内蛋白质的错误折叠或聚集有关。热应激条件下,细胞 DNA 合成、RNA 转录及翻译均会受到抑制,蛋白质发生变性、错误聚集甚至降解,细胞膜通透性改变<sup>[23]</sup>。Segal 等<sup>[24]</sup>研究发现,热应激状态下细胞内蛋白质变性导致功能丧失,HSP70 基因表达量升高,提高了细

胞对高温的耐受性。

#### 参考文献:

- [1] Santos M J,Carvalho O F,Sousa C,et al. Cytotoxicity and cell signaling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes[J]. *Toxicology*,2006,224:210-218.
- [2] Lacetera N,Bernabucci U,Scalia D,et al. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from Brown Swiss and Holstein cows[J]. *Journal of Dairy Science*,2006,89(12):4606-4612.
- [3] 杜娟,狄和双,郭亮,等. 高温对乳腺上皮细胞生长及凋亡的影响[J]. *动物学报*,2006,52(5):959-965.
- [4] Njemini R,Lambert M,Demanet C,et al. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: Use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*,2003,58(6):664-669.
- [5] Morano K A,Thiele D J. Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals[J]. *Gene Expression*,1999,7(4/6):271-282.
- [6] Hwang I Y,Quan J H,Ahn M H,et al. Toxoplasma gondii infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70[J]. *Parasitology Research*,2010,107(6):1313-1321.
- [7] 郭亮,杜娟,狄和双,等. 单一或连续高温处理对奶牛乳腺细胞的生长及凋亡的影响[J]. *南京农业大学学报*,2007,30(3):100-104.
- [8] 周振峰,崔瑞莲,王加启,等. 热应激对体外培养奶牛乳腺上皮细胞生长、凋亡及其热休克蛋白 mRNA 转录的影响[J]. *畜牧兽医学报*,2010,41(5):600-607.
- [9] 狄和双,杜娟,王利刚,等. 组织灌流与贴壁法体外培养奶牛乳腺组织的比较研究[J]. *生物工程学报*,2006,22(6):1040-1046.
- [10] Gteen K A,Atreuli C H. Apoptosisregulation in the mammary gland[J]. *Cell Mol Life Sci*,2004,61(15):1867-1883.
- [11] Park S,Matsumura F. Characterization of anti-apoptotic action of TCDD as a defensive cellular stress response reaction against the cell damaging action of ultra-violet irradiation in an immortalized normal human mammary epithelial cell line, MCF10A[J]. *Toxicology*,2006,217(2/3):139-146.
- [12] Du J,Di H S,Guo L,et al. Hyperthermia causes bovine mammary epithelial cell death by a mitochondrial-induced pathway[J]. *Journal of Thermal Biology*,2008,33(1):37-47.
- [13] Chen Z H,Na H K,Hurh Y J,et al. 4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: Possible protection by NF-kappaB and ERK/MAPK[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*,2005,208(1):46-56.

- [14] 管英俊,高英茂,隗兆东,等. 高温对元代培养的神经细胞的影响[J]. 解剖学杂志,2000,23(1):15-19.
- [15] O'Neill K L, Fairbairn D W, Smith M J, *et al.* Critical parameters influencing hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoid cell lines [J]. *Apoptosis*, 1998, 3(5):369-375.
- [16] Poe B S, O'Neill K L. Caffeine modulates heat shock induced apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60[J]. *Cancer Letters*, 1997, 121(1):1-6.
- [17] Gao C, Tsuchida N. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis [J]. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1999, 90(2):180-187.
- [18] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407(12):770-776.
- [19] Yenari M A, Liu J, Zheng Z, *et al.* Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1053:74-83.
- [20] 李莲,宋维龙,周磊,等. 不同应激对 HeLa 细胞增殖、凋亡及热休克蛋白 70 表达的影响[J]. 癌变·畸变·突变,2005,17(5):272-275.
- [21] Mosser D D, Caron A W, Bourget L, *et al.* Role of the human heat shock protein *HSP70* in protection against stress-induced apoptosis[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(9):5317-5327.
- [22] Khanolkar-Young S, Young D B, Colston M J, *et al.* Nerve and skin damage in leprosy is associated with increased intralosomal heat shock protein[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 1994, 96(2):208-213.
- [23] Sonna L A, Fujita J, Gaffin S L, *et al.* Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 92(4):1725-1742.
- [24] Segal G, Rone Z. Regulation of heat shock response in bacteria[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 851(1):147-151.

(上接第 141 页)

- [17] Roques E, Girard A, St-Louis M C, *et al.* Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed from replicating but nondisseminating adenovectors[J]. *Vet Res*, 2013, 44(1):17.
- [18] Cao Z X, Jiao P R, Huang Y M, *et al.* Genetic diversity analysis of the ORF5 gene in porcine reproductive and respiratory syndrome virus samples from South China [J]. *Acta Vet Hung*, 2012, 60(1):157-164.
- [19] Deng M C, Chang C Y, Huang T S, *et al.* Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated from 1991 to 2013 in Taiwan[J]. *Arch Virol*, 2015, 160(11):2709-2718.
- [20] Li J, Yin Y, Guo B, *et al.* Sequence analysis of the NSP2, ORF5, and ORF7 genes of 11 PRRS virus isolates from China[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(2):256-264.
- [21] Xie J, Cui T, Cui J, *et al.* Epidemiological and evolutionary characteristics of the PRRSV in Southern China from 2010 to 2013[J]. *Microb Pathog*, 2014, 75:7-15.
- [22] 范旭,李伟娟,刘玉松,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒河南分离株的遗传变异分析[J]. 河南农业大学学报,2010,44(2):172-176.
- [23] Arruda A G, Friendship R, Carpenter J, *et al.* Investigation of the occurrence of porcine reproductive and respiratory virus in swine herds participating in an area regional control and elimination project in Ontario, Canada [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(1):89-100.
- [24] 冷雪,李真光,王雪凤,等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因的变异分析[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(4):443-448.
- [25] 王小敏,何孔旺,周忠涛,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株的分离鉴定及遗传变异分析[J]. 华北农学报,2014,29(1):232-238.
- [26] 张明亮,张春杰,程相朝,等. 豫西地区 PRRSV 新近流行株 ORF5 基因变异及 Nsp2 基因特征分析[J]. 河南农业科学,2012,41(1):137-141.
- [27] 韩一超,刘文俊,姚敬明,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Shanxi-6 株全基因序列分析[J]. 华北农学报,2014,29(2):62-65.
- [28] 卢晓艳,周永辉,李伟娟,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒河南分离株 NSP2 和 GP5 基因遗传变异分析[J]. 华北农学报,2012,27(2):100-104.
- [29] 王凤雪,温永俊,刘准,等. 高致病性 PRRSV TJ 株和致弱毒 TJM 株 Nsp2 测序及结构分析[J]. 河南农业大学学报,2011,45(1):86-90.
- [30] 张显浩,陈瑞爱,李冰,等. 2012 年—2014 年我国东南地区 HP-PRRSV GP5 基因的遗传进化与变异分析[J]. 中国预防兽医学报,2015,37(1):71-74.