

# Poly(I:C)刺激下猪肺泡巨噬细胞 *TLR3* 基因及其信号通路基因表达变化分析

李聪聪<sup>1,2</sup>, 叶连萌<sup>1</sup>, 卢涛<sup>1</sup>, 吴姣<sup>1,2</sup>, 徐秋良<sup>1,2</sup>, 宋素芳<sup>1,2</sup>, 李婉涛<sup>1,2</sup>

(1.河南牧业经济学院 动物科技学院,河南 郑州 450046; 2.河南省畜禽遗传资源保护工程技术研究中心,河南 郑州 450046)

**摘要:** 为了探讨猪肺泡巨噬细胞(3D4/21 细胞)在聚肌胞苷酸 Poly(I:C)刺激下发生的免疫应答分子机制,通过 Poly(I:C)模拟病毒体外刺激 3D4/21 细胞,分别于不同处理时间(4、8、12、24 h)观察细胞形态变化,并采用 qPCR 方法检测 Toll 受体 3(Toll-like receptor 3,TLR3)基因及其信号通路相关基因的表达量变化。结果表明,Poly(I:C)能够刺激 3D4/21 细胞诱导 TLR3 信号通路相关基因表达量发生变化。试验组 *TLR3* 基因和干扰素调节因子 3(Interferon regulatory factor 3,IRF3)基因的表达量在 4 个处理时间均表现为先下调后上调的趋势,两者均在处理 24 h 时表达量最高,其表达量分别是对照组的 2.77 倍和 1.42 倍,*TLR3* 基因在 12 h 和 24 h 与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ),*IRF3* 基因在 4 个处理时间与对照相比均差异不显著;试验组干扰素  $\alpha$ (Interferon  $\alpha$ ,IFN $\alpha$ )基因在 4 个处理时间中呈现上调趋势,在 24 h 时表达量最高,其表达量是对照组的 2.91 倍,且差异显著( $P < 0.05$ );试验组共刺激分子 *CD86* 基因的表达量呈现先上升后下降的趋势,于 12 h 时表达量最高,表达量是对照组的 17.60 倍,且差异极显著( $P < 0.01$ )。因此,猪体内 *TLR3* 基因及其信号通路相关基因参与了 Poly(I:C)刺激并引起症状的过程,表明 *TLR3* 基因及其信号通路相关基因的表达水平对猪病毒性疾病存在一定调控作用。

**关键词:** 聚肌胞苷酸; *TLR3*; 细胞因子; 猪肺泡巨噬细胞

**中图分类号:** S852      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2019)05-0149-06

## Analysis of *TLR3* Gene and Its Signaling Pathway Gene Expression in Porcine Alveolar Macrophages Induced by Poly(I:C)

LI Congcong<sup>1,2</sup>, YE Lianmeng<sup>1</sup>, LU Tao<sup>1</sup>, WU Jiao<sup>1,2</sup>, XU Qiuliang<sup>1,2</sup>, SONG Sufang<sup>1,2</sup>, LI Wantao<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Livestock and Poultry Genetic Resources Protection Engineering Technology Research Center, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** In order to explore the molecular mechanism of immune response in pig alveolar macrophages (3D4/21 cells) infected by Poly(I:C), in this study, 3D4/21 cells were infected with Poly(I:C) *in vitro*, and different treatment times (4, 8, 12, 24 h) were designed, the morphological changes of the cells were observed, and qPCR was used to detect the expression change of TLR3 signaling pathway related genes. The results showed that Poly(I:C) stimulating 3D4/21 cells could induce the expression of TLR3 signaling pathway related genes. The expression trends of *TLR3* and *IRF3* genes were first down-regulated and then up-regulated at 4 treatment times, the expression levels of both genes were highest at 24 h, which were 2.77 times and 1.42 times higher than that of the control group, respectively; *TLR3* gene presented

收稿日期:2018-11-20  
基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31702102);河南省高等学校重点科研项目(18A230002);河南牧业经济学院博士启动  
资金项目(53000065);河南省科技攻关项目(172102110188)  
作者简介:李聪聪(1985-),女,河南郑州人,讲师,博士,主要从事动物抗病育种研究。E-mail:congcong\_925520@126.com  
通信作者:李婉涛(1964-),女,河南南阳人,教授,硕士,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:wantao1128@126.com

significant differences at 12 h and 24 h time points ( $P < 0.05$ ), while *IRF3* gene presented insignificant differences compared with the control group at 4 treatment times; the expression trend of *IFN $\alpha$*  gene in the experimental group was up-regulated at 4 treatment times, the its expression levels was highest at 24 h, which was 2.91 times ( $P < 0.05$ ) higher than that of the control group; the expression of *CD86* gene in the experimental group was first up-regulated and then down-regulated, and reached the highest at 12 h, and it was up-regulated by 17.60 times ( $P < 0.01$ ) compaved with that of the control group. The results of this study revealed that TLR3 signaling pathway related genes in pig were involved in the process of Poly (I:C) infection and symptoms, indicating that the pig viral diseases were regulated by the expression level of TLR3 signaling pathway related genes.

**Key words:** Poly(I:C); *TLR3*; Cytokine; Pig alveolar macrophages

疾病发生是我国生猪养殖业一直存在的问题,且近几年呈现出日益严重的趋势。目前,猪的疾病种类很多,并且表现出复杂化和典型化现象,给生猪养殖业带来巨大危害。其中,病毒性疾病传播速度快,病猪的死亡率高,防控形势严峻。病毒能够寄宿在宿主细胞内进行生存和繁殖,不易被消除,并且病毒的遗传物质极易发生突变,普通疫苗的防控难度大。因此,亟须深入探索与病毒致病相关的信号通路及其基因的调控机制,从而找到治疗猪病毒病的新思路。

巨噬细胞是动物机体内一类重要的免疫细胞,在固有免疫和适应性免疫中均发挥重要作用。当猪受到病毒(例如猪蓝耳病毒)感染后,首先被影响的便是巨噬细胞(例如肺泡巨噬细胞)。有数据表明,感染猪蓝耳病毒后,猪体内巨噬细胞的功能会受到抑制,形成严重的免疫抑制反应,从而导致猪体对其他病毒性和细菌性疾病的易感性明显增加<sup>[1]</sup>。

宿主细胞的抗病毒作用主要是 Toll 受体 3 (Toll-like receptor 3, *TLR3*) 与病毒双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 两者的特异性作用,其作用机制大致有 2 类:第一,当 dsRNA 与 *TLR3* 特异性结合后,会进入胞内并引起干扰素等抗病毒细胞因子的活化,从而抑制病毒的复制;第二,当 dsRNA 与 *TLR3* 特异性结合后,会激活特异性的 RNA 酶,从而分解病毒的 RNA,以调控非特异性抗病毒反应<sup>[2]</sup>。朱博等<sup>[3]</sup>研究表明, *TLR3* 能够同时介导 2 种免疫反应: *TLR3* 能够识别 dsRNA 并发生天然的抗病毒免疫反应; *TLR3* 通过活化髓样分化因子 88 (Myeloid differentiation factor 88, MyD88) 蛋白,并介导共刺激分子 *CD86*、*CD80* 等其他细胞因子的表达,继而发生炎症反应。 *TLR3* 可通过 MyD88 非依赖/TRIF 依赖型信号转导通路诱导产生 I 型干扰素 (Interferon, IFN),其中  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon  $\beta$ , TRIF) 是 *TLR3* 介导的 MyD88 非依赖信号通路中的关键蛋

白<sup>[4]</sup>。当 *TLR3* 识别 dsRNA 后,通过 TRIF 衔接蛋白促进 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 和 IKK 激酶  $\epsilon$  (Inhibitor- $\kappa$ B kinase  $\epsilon$ , IKK $\epsilon$ ) 等转录因子的生成,从而激活干扰素调节因子 3 (Interferon regulatory factor 3, *IRF3*)<sup>[5-8]</sup>,进而诱导共刺激分子 *CD40*、*CD80* 和 *CD86* 的表达<sup>[9-13]</sup>。

本研究使用 Poly (I:C) 模拟病毒,刺激体外培养的猪肺泡巨噬细胞 (3D4/21 细胞),设计不同的处理时间,观察 3D4/21 细胞形态的变化,采用 qPCR 方法检测 *TLR3* 基因及其信号通路相关基因表达量的变化,探讨 3D4/21 细胞在 Poly (I:C) 刺激下发生的免疫应答分子机制,旨在为猪病毒性疾病的抗病工作提供新的方法和思路。

1 材料和方法

1.1 试验材料

Poly (I:C) (tlrl - pic - 5) 购自 InvivoGen 公司。将 50 mL 无菌 Poly (I:C) 稀释液 PBS (购自 Gibco 公司) 与 50 mg 的 Poly (I:C) 粉末加入锥形瓶中,完全稀释至 1 mg/mL,分装后保存于 -20  $^{\circ}$ C 备用。

1.2 3D4/21 细胞培养及 Poly (I:C) 刺激

10% 的 FBS 和 89% 的 1640 培养基以及 1% 的 MEM 非必需氨基酸溶液 (MEM - NEAA) 构成了培养 3D4/21 细胞 (由华中农业大学赵书红课题组惠赠) 的完全培养基,其中 FBS、1640 培养基和 MEM - NEAA 均购自 Gibco 公司。将细胞置于 5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养,待细胞汇合度达到 90% 左右时,用 25  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[14]</sup> 的 Poly (I:C) 进行刺激,分别在刺激 4、8、12、24 h 时用倒置显微镜观察 3D4/21 细胞形态并于拍照后收集细胞,同时以加入等量稀释液 PBS 的 3D4/21 细胞作为阴性对照,每组设置 3 个重复。

1.3 3D4/21 细胞的总 RNA 提取、反转录及 qPCR

利用 Trizol (购自 Invitrogen 公司) 提取细胞的总 RNA,并用 NanoDrop 1000 (购自 Invitrogen 公司) 测

定质量浓度,并记录每个样品的总 RNA 质量浓度和  $OD_{260}/OD_{280}$  值。每个样品取 2  $\mu\text{g}$ ,加入 RNA 变性 Loading Buffer<sup>[15]</sup>,进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,检测 28S rRNA、18S rRNA 以及 5.8S rRNA 条带的完整性。

用 DNase I (购自 Invitrogen 公司)对提取的总 RNA 去除基因组 DNA,按照反转录试剂盒 K1622 (购自 Invitrogen 公司)的操作步骤进行反转录,反转录结束后,将 cDNA 置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

以所得 cDNA 为模板,对 *TLR3*、*IRF3*、*CD86*、*IFN $\alpha$*  基因的表达量进行检测分析,各基因检测引物见表 1,引物由上海生工生物工程有限公司进行合成。10  $\mu\text{L}$  的反应体系:5  $\mu\text{L}$  2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Green Real-time PCR Master Mix (购自 Toyobo 公司),25 pmol 引物,50 ng 模板 cDNA,补水至 10  $\mu\text{L}$ 。利用 ABI7500 Fast 系统进行实时荧光定量 PCR 检测。扩增程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,40 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  15 s,95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  15 s。

表 1 定量 PCR 引物信息  
Tab.1 The information of primers for qPCR

引物名称 Prime name	引物序列(5'—3') Sequence	来源文献 Source document
q <i>TLR3</i>	F:TGGCGGTCCTGTTCAGTTTC	王彦平等 <sup>[16]</sup>
	R:AGGCATCTGCTGGGATTTCAT	
q <i>IRF3</i>	F:CCCAAGGACAGGAAGGAG	LI 等 <sup>[14]</sup>
	R:CAGAGGGGTGTAGCGTGGTGAG	
q <i>CD86</i>	F:GGGCCGCATGGACTTGTTCCT	王继英等 <sup>[17]</sup>
	R:TGCACAGGTGGCTTTGCATCTAT	
q <i>IFN<math>\alpha</math></i>	F:ACTCCATCCTGGCTGTGAGGAAAT	王继英等 <sup>[17]</sup>
	R:ATCTCATGACTTCTGCCCTGACGA	
q <i>GAPDH</i>	F:AGGTCATCCATGACAACCTCCGGCA	
	R:AGCACCAGTAGAAGCAGGGATGAT	

1.4 数据处理

qPCR 数据用相对定量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行分析<sup>[18]</sup>,*GAPDH* 作为内参基因对各基因表达水平进行校正。*t* 检验分析数据差异显著性,结果以平均值  $\pm$  标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 Poly(I:C)刺激下不同处理时间 3D4/21 细胞形态变化

如图 1 所示,对照组的 3D4/21 细胞均呈现椭圆形和不规则形状,胞内浆液较为丰富,且细胞呈现均匀密集分布,贴壁良好。但在 Poly(I:C)刺激下,4 h 时试验组的 3D4/21 细胞大部分为贴壁细胞,大多数仍呈椭圆形,只有少量的圆形死细胞出现;8 h 时试验组的 3D4/21 细胞密度增大,圆形死细胞的

数量开始增多;12 h 时试验组的 3D4/21 细胞发生形态变化,出现较多菱形、星形的细胞,还有少部分细胞出现伪足和突起;24 h 时试验组的大部分 3D4/21 细胞出现清晰的伪足和突起,且出现大量的圆形死细胞,并且随着处理时间的延长,试验组死细胞越来越多。

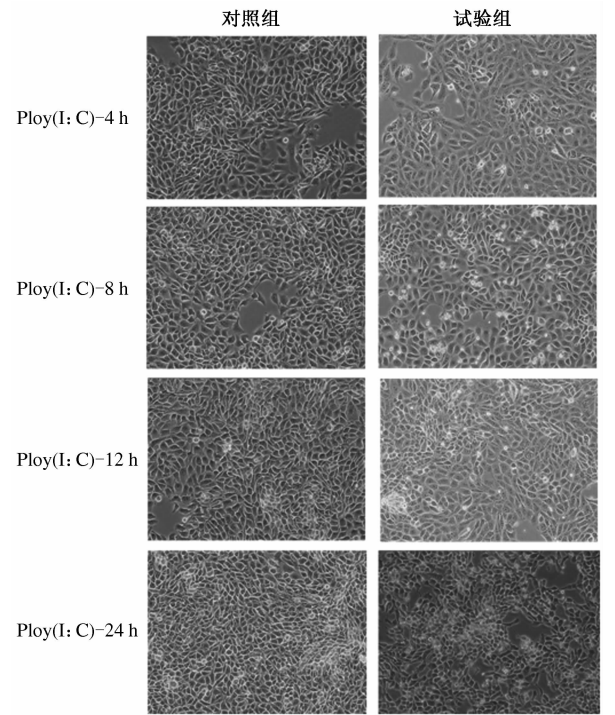


图 1 Poly(I:C)刺激下不同处理时间 3D4/21 细胞的形态 (  $\times 100$  )

Fig.1 The morphological changes of the 3D4/21 cells after stimulation with Poly(I:C) (  $\times 100$  )

2.2 3D4/21 细胞总 RNA 的提取及质量检测

琼脂糖凝胶电泳检测提取的 3D4/21 细胞总 RNA,共显示出 3 条亮带(28S rRNA、18S rRNA 和 5.8S rRNA),其中 28S rRNA 条带亮度接近 18S rRNA 条带亮度的 2 倍,并且点样孔附近没有其他条带的出现(图 2),说明所获得的细胞总 RNA 完整性及质量良好。

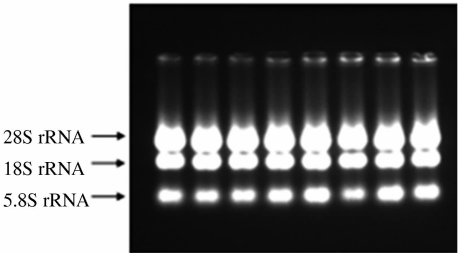


图 2 3D4/21 细胞总 RNA 琼脂糖凝胶电泳(部分)

Fig.2 Total RNA agarose gel electrophoresis of 3D4/21 cells (Section)

2.3 Poly(I:C)刺激下3D4/21细胞中TLR3基因及其信号通路相关基因表达量变化

在 Poly(I:C) 刺激下,4 个处理时间中试验组 *TLR3* 基因和 *IRF3* 基因的表达量均呈现先下调后上调趋势。与对照组相比,在 4 h 和 8 h 时,试验组 *TLR3* 基因表达量与对照组无显著差异;在 12 h 时,试验组 *TLR3* 基因的表达量是对照组的 1.63 倍,且差异显著( $P<0.05$ );在 24 h 时,试验组 *TLR3* 基因的表达量最高,是对照组的 2.77 倍,且差异显著( $P<0.05$ )(图 3);在 4 个处理时间中,试验组 *IRF3* 基因的表达量均高于对照组,但差异均不显著(图 3)。在 Poly(I:C) 刺激下,4 个处理时间中试验组 *IFN $\alpha$*  基因的表达量呈上调趋势。与对照组相比,4 h 时试验组 *IFN $\alpha$*  基因的表达量略有上升,但差异不显著;在 8 h 和 12 h 时,试验组 *IFN $\alpha$*  基因的表达量分别是对照组的 1.84 倍和 2.14 倍,且差异显著( $P<0.05$ );在 24 h 时,试验组 *IFN $\alpha$*  基因的表达量

最高,是对照组的 2.91 倍,且差异显著( $P<0.05$ )(图 3)。在 Poly(I:C) 刺激下,4 个处理时间中试验组 *CD86* 基因的表达量呈先上调后下调的趋势,在 4、8、12 h 时,试验组 *CD86* 基因表达量均较对照组大幅度上升。在 4 h 时,*CD86* 基因的表达量是对照组的 4.70 倍,差异显著( $P<0.05$ );在 8 h 时,*CD86* 基因的表达量是对照组的 7.92 倍,差异极显著( $P<0.01$ );在 12 h 时,*CD86* 基因的表达量最高,是对照组的 17.60 倍,差异极显著( $P<0.01$ );但在 24 h 时,试验组 *CD86* 基因的表达量较 8 h 和 12 h 呈现下调趋势,并且其表达量是对照组的 6.00 倍,差异极显著( $P<0.01$ )(图 3)。以上数据表明,当 Poly(I:C) 刺激 3D4/21 细胞时,能够诱导 *TLR3* 基因及其信号通路相关基因的表达量发生变化,其中 *TLR3* 和 *IRF3* 基因表达趋势均呈现波动上调,*IFN $\alpha$*  基因呈现持续上调的趋势,而 *CD86* 基因的表达则表现为先上调后下调的趋势。

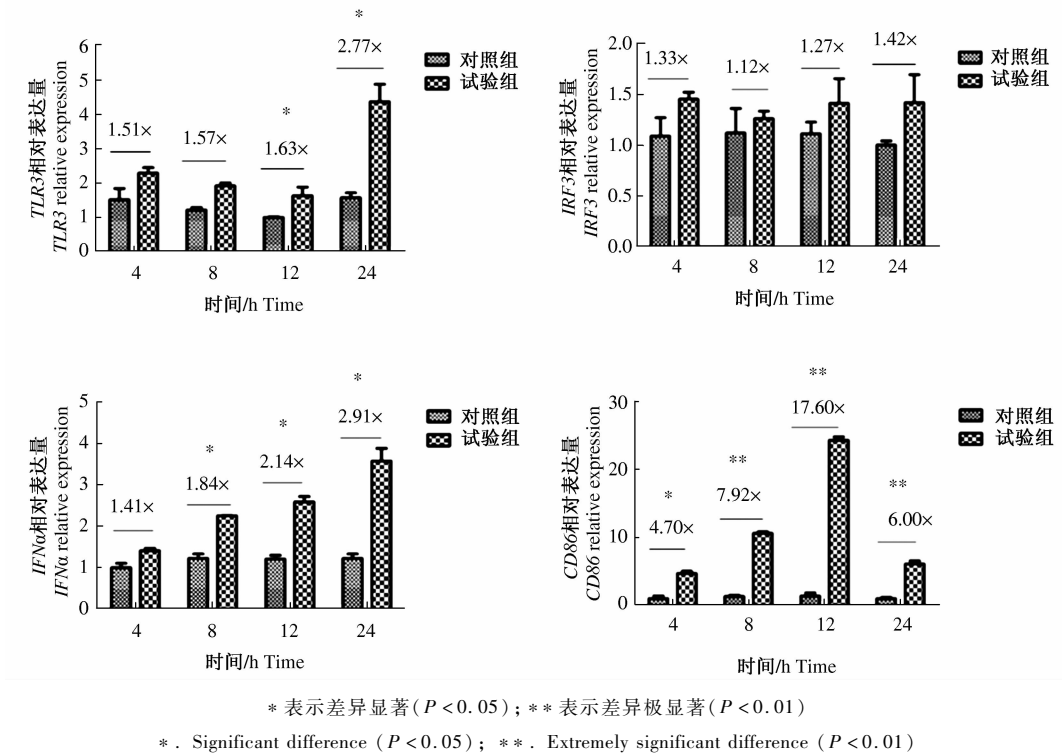


图 3 Poly(I:C)刺激下不同处理时间3D4/21细胞中TLR3信号通路相关基因表达水平变化  
Fig.3 The expression level of TLR3 signaling pathway related genes in 3D4/21 cells at different time points stimulated by Poly(I:C)

3 结论与讨论

3.1 Poly(I:C)刺激下3D4/21细胞形态的变化

一般情况下,3D4/21细胞呈现椭圆形或不规则形态,在 dsRNA 刺激下,3D4/21细胞会随着处理时间的延长发生悬浮,最终变为死细胞,此时 3D4/21

细胞形态主要呈现圆形,被 Poly(I:C)刺激后的 3D4/21 细胞形态会随着处理时间的推移,发生相应的变化<sup>[18]</sup>。最初,细胞主要呈现椭圆形或不规则形状,且胞浆丰富<sup>[19]</sup>;用 Poly(I:C)刺激 4 h 后,3D4/21细胞的贴壁性良好,但随着处理时间的延长,细胞密度会逐渐增大并出现钝形伪足和突起。

杨志梅等<sup>[20]</sup>报道,在一定剂量的病毒刺激下,随着时间的推移 3D4/21 细胞会变圆死亡,且在 24 h 时死亡数量最多,与本研究结果一致。

### 3.2 Poly(I:C)刺激下 *TLR3* 基因及其信号通路相关基因表达量的变化

本研究中,试验组受体基因 *TLR3* 和 *IRF3* 基因均呈现波动上调趋势,均在 24 h 达到最高表达量,在 24 h 时,试验组 *TLR3* 和 *IRF3* 基因的表达量分别是对照组的 2.77 倍和 1.42 倍;细胞因子 *IFN $\alpha$*  基因的表达量于 4 个处理时间呈上调趋势,在 24 h 时,试验组 *IFN $\alpha$*  基因的表达量是对照组的 2.91 倍;共刺激分子 *CD86* 的表达量于 4 个处理时间呈先上调后下调的趋势,在 12 h 时,试验组 *CD86* 基因的表达量是对照组的 17.60 倍。

王继英等<sup>[17]</sup>设置 4 种 Poly(I:C) 质量浓度(0、10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ )和 4 个处理时间(4、8、12、24 h)对猪的外周血单核细胞进行刺激,检测 *TLR3*、*IRF3*、*IFN $\alpha$*  基因的表达水平变化发现,在 Poly(I:C) 质量浓度为 20~40  $\mu\text{g/mL}$  时,*TLR3* 和 *IRF3* 基因的表达量随处理时间的延长逐渐增加,并在刺激 24 h 时的表达量最高,与本研究测定结果一致;在 Poly(I:C) 刺激 4 h 时 *IFN $\alpha$*  基因的表达量最高,但随着处理时间的延长其表达量逐渐降低,本研究中,*IFN $\alpha$*  基因的表达量在刺激 24 h 时达到最高,推测原因可能是单核细胞与 3D4/21 细胞类型的差异造成,并且供试 Poly(I:C) 可能也存在一定的差异。王彦平等<sup>[16]</sup>用 20  $\mu\text{g/mL}$  的 Poly(I:C) 刺激长白猪的外周血单核细胞 24 h,检测免疫应答过程中相关基因的表达变化,结果表明,*TLR3* 和 *IFN $\alpha$*  基因表达量均上调,但变化不大,刺激组的 *IRF3* 基因表达量较对照组下调,而本研究中,*IRF3* 基因的表达量波动上调,但差异不显著( $P>0.05$ ),推测可能的原因是细胞类型不同,且细胞来源存在个体差异。王海飞<sup>[21]</sup>用 20  $\mu\text{g/mL}$  的 Poly(I:C) 刺激长白猪的外周血单核细胞,分别选择 0、4、8、12、24 h 为处理时间,检测免疫应答过程中相关基因的表达水平变化,结果表明,在 Poly(I:C) 刺激 24 h 时,*TLR3* 和 *IRF3* 基因的表达量达到最高,与本研究结果一致;在 Poly(I:C) 刺激 4 h 时,*IFN $\alpha$*  基因的表达量最高,随后逐渐降低,而在本研究中,*IFN $\alpha$*  基因的表达量在 Poly(I:C) 刺激 24 h 时最高,与对照组相比差异显著( $P<0.05$ )。王冬梅等<sup>[22]</sup>用 100  $\mu\text{g/L}$  的 Poly(I:C) 与 200 个 TCID<sub>50</sub> 的猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染的猪肺泡巨噬细胞(PAM 细胞),分别在 12、24、36、48 h 时检测 *IRF3* 基因的表达量发现,12 h 时 *IRF3* 基因的

表达量最高,但在本研究中,*IRF3* 基因的表达量在 12 h 和 24 h 持续上调,推测原因可能是 PRRSV 存在一定的作用。WANG 等<sup>[23]</sup>用 1  $\mu\text{g/mL}$  的 Poly(I:C) 刺激鸡胚成纤维细胞(CEFs),并分别于 2、6、12、20 h 时检测 *IRF3* 基因的表达水平发现,在 Poly(I:C) 刺激 6 h 时,*IRF3* 基因表达量最高,随后 *IRF3* 基因的表达量下降。王冬梅等<sup>[24]</sup>用 PRRSV 感染 PAM 细胞 1 h,而后用 100  $\mu\text{g/mL}$  的 Poly(I:C) 刺激细胞,继续培养 12、24、36、48 h,收集细胞检测 PAM 细胞中的 *IFN $\alpha$*  基因表达水平变化发现,刺激组与对照组相比,*IFN $\alpha$*  基因的表达量显著上调,证明 PRRSV 和 Poly(I:C) 刺激 PAM 细胞后均能促进 *IFN $\alpha$*  基因的转录,与本研究结果一致。LI 等<sup>[14]</sup>用 25  $\mu\text{g/mL}$  的 Poly(I:C) 刺激猪 PK15 细胞,并分别在 0、4、12、24 h 时进行检测发现,于 Poly(I:C) 刺激 12 h 前,*CD86* 基因表达量基本无变化,但在 24 h 时表达量最高,而本研究中,在 Poly(I:C) 刺激 12 h 时,试验组 *CD86* 基因的表达量最高,但在 24 h 时其表达量较 12 h 时降低,与对照组相比差异均极显著( $P<0.01$ ),推测原因可能是供试细胞的类型不同。综上所述,不同类型或不同来源的细胞对不同批次 Poly(I:C) 的耐受力不同, Poly(I:C) 刺激的质量浓度和处理时间选择不同,另外还有个体差异的因素都会对结果产生影响。

本研究采用 Poly(I:C) 体外刺激 3D4/21 细胞, qPCR 检测 *TLR3* 基因及其信号通路相关基因的表达量变化,结果发现, Poly(I:C) 能够诱导 *TLR3*、*IRF3*、*IFN $\alpha$*  和 *CD86* 基因的上调表达,表明猪体感染病毒时 *TLR3* 信号通路发挥了重要调控作用,为猪病毒病的抗病育种防治提供新的方法和策略。

#### 参考文献:

- [1] 卓曲,武力,陈宝妮,等. 蓝耳病病毒对猪肺泡巨噬细胞的影响[J]. 养猪,2009(5):53-54.
- [2] JACK C, ARBOUR N, MANUSOW J, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes[J]. Journal of Immunology, 2005, 175(7): 4320-4330.
- [3] 朱博,冷静,王坤. TLR 信号转导通路及其抗病毒感染机制的研究现状[J]. 现代免疫学, 2012, 32(4): 348-353.
- [4] 钱程,安华章. Toll 样受体在适应性免疫中的作用与相关机制研究进展[J]. 国外医学(免疫学分册), 2005, 28(1):16-19.

- [5] 张蕾,代松宝,张丽琳,等. PCV2 逃逸宿主天然免疫的分子机制研究[J]. 华北农学报,2018,33(2):149-156.
- [6] DOYLE S E, VAIDYA S A, O'CONNELL R, *et al.* IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program[J]. *Immunity*,2002,17(3):251-263.
- [7] YAO C, HAN S, PARK C, *et al.* IRF3 signaling pathway serves an important role in Poly(I:C)-induced procollagen reduction in human skin fibroblasts[J]. *Molecular Medicine Reports*,2017,17(2):2581-2585.
- [8] YI L, SUN D, HAN Q, *et al.* Interferon regulatory factor 3 mediates Poly(I:C)-induced innate immune response and apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. *International Journal of Oncology*,2018,52(5):1623-1632.
- [9] YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway[J]. *Science*,2003,301(5633):640-643.
- [10] KAISHO T, TAKEUCHI O, KAWAI T, *et al.* Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells[J]. *Journal of Immunology*,2001,166(9):5688-5694.
- [11] ALEXOPOULOU L, HOLT A C, MEDZHITOY R, *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3[J]. *Nature*,2001,413(6857):732-738.
- [12] FLETCHER A L, LUKACSKOMEK V, REYNOSO E D, *et al.* Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions[J]. *Journal of Experimental Medicine*,2010,207(4):689-697.
- [13] SHIMADA M, ISHIMOTO T, LEE P Y, *et al.* Toll-like receptor 3 ligands induce CD80 expression in human podocytes via an NF- $\kappa$ B-dependent pathway[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*,2012,27(1):81-89.
- [14] LI C, HE H, ZHU M, *et al.* Molecular characterisation of porcine miR-155 and its regulatory roles in the TLR3/TLR4 pathways[J]. *Developmental and Comparative Immunology*,2013,39(1/2):110-116.
- [15] 谢胜松,李新云,苏立杰,等. 一种简易快速鉴定动物组织总 RNA 质量的方法[J]. 农业生物技术学报,2009,17(2):282-287.
- [16] 王彦平,王怀中,郭建凤,等. 聚肌胞免疫刺激下仔猪外周血单核细胞的基因表达分析[J]. 遗传,2015,37(1):63-69.
- [17] 王继英,王彦平,王怀中,等. 聚肌胞浓度和免疫刺激时间对猪外周血单核细胞基因表达的影响[J]. 中国农业科学,2015,48(3):583-593.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. *Methods*,2001,25(4):402-408.
- [19] 盛金良,陈创夫,郑永峰,等. 绵羊肺泡巨噬细胞的分离培养和形态学观察[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2007,25(1):51-54.
- [20] 杨志梅,符州,王莉佳,等. 人外周血单核巨噬细胞诱导、培养及鉴定[J]. 生物学杂志,2008,25(5):66-68.
- [21] 王海飞. 猪外周血单核细胞抗病毒反应的转录组及全基因组 DNA 甲基化调控研究[D]. 北京:中国农业大学,2016.
- [22] 王冬梅,郭嘉,张莹莹,等. SHP1 在 PRRSV 诱导的抗病毒免疫反应中的作用[J]. 中国兽医学报,2017,37(4):613-619.
- [23] WANG Y, YIN Y, LAN X, *et al.* Molecular characterization, expression of chicken TBK1 gene and its effect on IRF3 signaling pathway[J]. *PLoS One*,2017,12(5):e0177608.
- [24] 王冬梅,崔春晓,冯亚琼,等. Poly(I:C)对 PRRSV 诱导的抗病毒免疫反应的影响[J]. 中国兽医学报,2016,36(2):211-215.