



研究报告

临床疑似猪非典型瘟病毒感染仔猪小脑组织的转录差异

李雨濛¹ 杨晓宇¹ 朱玲^{*1,2}

1 四川农业大学动物医学院动物生物技术中心 四川 成都 611130

2 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130

摘要:【背景】猪非典型瘟病毒作为一种新发病毒,近几年在国内各省份中陆续被检出,目前针对猪非典型瘟病毒(atypical porcine pestivirus, APPV)的研究报道大多集中于基因组学和流行病学,而其感染宿主后的致病机制尚不清楚。【目的】利用高通量测序技术,对感染仔猪小脑组织进行转录水平差异研究,初步探索 APPV 致病机制。【方法】将实验组 3 份排除其余能引发仔猪先天性震颤和神经症状相关病原干扰的 APPV 感染仔猪的小脑组织,与对照组 3 份健康仔猪的小脑组织进行高通量测序,比较实验组和对照组之间转录水平的差异。【结果】构建了两个 cDNA 文库: APPV 感染小脑组织文库、健康小脑组织文库。在 $P \leq 0.05$, $|\text{Log}_2(\text{FC})| \geq 0.263$ 的筛选标准下,共筛选出差异表达基因(differentially expressed gene, DEG) 381 个,其中上调基因 163 个,下调基因 218 个;随机选取 8 个差异表达的基因,经 RT-qPCR 检测,以 β -actin 作为内参基因,结果显示 8 个差异基因的表达趋势与高通量测序一致。【结论】通过对临床感染 APPV 的仔猪小脑样本进行转录组研究,通过 GO、KEGG 对差异基因进行功能注释、分类,发现 *Pak4*、*Robo4*、*Sema3f*、*Wnt5a* 等参与轴突导向信号通路的基因转录水平显著下降,可能表明 APPV 感染可能会导致仔猪体内轴突导向过程受到抑制,进而使其中枢神经系统发育受到抑制,为 APPV 的致病机制等进一步研究提供了方向和指导。

关键词: 猪非典型瘟病毒, 转录组学, 差异表达基因, 轴突导向

Transcriptional differences in cerebellar tissue of clinically suspected atypical pestivirus infected piglets

LI Yu-Meng¹ YANG Xiao-Yu¹ ZHU Ling^{*1,2}

1 Animal Biotechnology Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

2 Sichuan Key Laboratory of Animal Diseases and Human Health, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: [Background] Atypical porcine pestivirus (APPV) as a new virus, it has been detected in various provinces in China in recent years. At present, most of the research reports on APPV focus on genomics and epidemiology. The pathogenic mechanism after infection of the host is unclear. [Objective] To investigate the pathogenicity of APPV in the cerebellum of infected piglets by high-throughput sequencing technology. [Methods] Three cerebellum of APPV-infected piglets of experimental group

Foundation item: Major Science and Technology Project of Sichuan Province (2018NZDZX0006)

***Corresponding author:** E-mail: abtcz172@126.com

Received: 17-10-2019; **Accepted:** 22-02-2020; **Published online:** 20-10-2020

基金项目: 四川省重大科技专项(2018NZDZX0006)

*通信作者: E-mail: abtcz172@126.com

收稿日期: 2019-10-17; 接受日期: 2020-02-22; 网络首发日期: 2020-10-20

excluded from pathogens which can cause congenial tremors (CT) or neurological symptoms were sequenced with 3 cerebellum of healthy piglets of control group, and compare the differences in transcription levels between experimental and control groups. **[Results]** Two cDNA libraries were constructed in this study: APPV infected cerebellum tissue library and healthy cerebellum tissue library. Under the screening criteria of $P \leq 0.05$, $|\text{Log}_2(\text{FC})| \geq 0.263$, a total of 381 differentially expressed genes (DEGs) were screened, including 163 up-regulated genes and 218 down-regulated genes; 8 differentially expressed genes were randomly selected. The gene was detected by RT-qPCR and β -actin was used as an internal reference gene. The expression trends of eight differential genes were consistent with high-throughput sequencing. **[Conclusion]** A transcriptome study was conducted on the cerebellum samples of clinically infected piglets with APPV. Based on the GO and KEGG, we performed the functional annotation and classification of DEGs. It was found that the transcriptional levels of *Pak4*, *Robo4*, *Sema3f*, *Wnt5a* and other genes involved in axon guidance signaling pathways had significantly decreased. This result indicates that APPV infection may inhibit the axon guidance process in piglets. Furthermore, it inhibits the development of the central nervous system, which provides direction and guidance for further research on the pathogenic mechanism of APPV.

Keywords: Atypical pestivirus, Transcriptomics, Differentially expressed gene, Axon guidance

仔猪先天性震颤(congenial tremors, CT), 俗称“仔猪抖抖病”或“仔猪跳跳病”, 又称“仔猪先天性肌阵挛”, 是造成初生仔猪由于脊髓水平以上的中枢神经系统髓鞘形成阻滞、致使全身肌肉阵发性挛缩或者后肢无法站立的一种疾病^[1]。1922年, Kinsley用“跳舞的猪”首次描述并报道了CT^[2]。1960年, 我国学者罗清生首次在国内报道了CT的发生^[3]。此后, 世界各地也陆续报道了CT的发生。近年来, CT的发病率和致死率不断增加, 给养猪行业造成了巨大的经济损失。先天性震颤主要可分为A、B两型, A型包括脑和脊髓中可见组织学病变的病例, 而B型病例则没有显示明显的病变^[4]。A-I型CT由经典猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起并以小脑发育不全为特征^[5-7], A-II型则病因较为复杂, 目前尚无十分确切的定论。

作为A-II型CT的主要病原之一, Atypical porcine pestivirus (APPV)会造成初生仔猪无法吮乳而死亡, 给生猪养殖行业造成了巨大的经济损失。然而对于APPV的研究一直在进行, 但是也很大程度处于起步阶段, 不论是从单个的毒力基因还是整体的宏观基因组学, 都几乎尚未涉及揭露APPV的致病机制。病毒和宿主之间的相互作用是病毒感染的基础, 病毒的致病性和组织嗜性与宿主中抗病

毒机制以及基因的调控密切相关。本研究采用高通量测序技术, 对初生患病仔猪排除其CT相关干扰病原后, 采取患病仔猪小脑组织后, 对感染仔猪及健康仔猪小脑组织的转录谱差异进行测序分析, 同时与GO、KEGG等数据库进行比对, 获得差异基因的注释信息, 探究APPV感染仔猪对比未感染仔猪基因转录谱水平上的差异, 以期对揭示APPV的致病机制具有参考意义。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料与样品准备

疑似APPV感染仔猪采自四川遂宁某规模化猪场, 采集2-3日龄疑似APPV阳性仔猪和健康仔猪的小脑等组织器官通过PCR实验对APPV及CT相似病原进行检测, 将APPV感染阳性且CT相似病原感染阴性的患病仔猪随机选取3头的小脑组织作为实验组, 并采取3只阴性猪的小脑组织作为对照组, 分别放于-80℃保存, 用于DNA、RNA提取; 获取组织后立即进行细菌的分离培养。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

RNA提取试剂Trizol、反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit)、2×Taq MasterMix、DL2000 DNA Marker、GoldViewTM染色剂、SYBR Green Premix *Ex Taq*, 宝生物工程(大连)有限公司;

氯仿-异戊醇、Tris 饱和酚, 上海化学试剂有限公司; 文库构建及检测使用的试剂 NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module、RiboZero Magnetic Gold Kit、KAPA Stranded RNA-Seq Library Prep Kit、TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS, 上海康成生物有限公司。

PCR 仪, ESCO 科技有限公司。本实验借助的测序平台为 Illumina HiSeq 4000, 上海康成生物有限公司。

10% 鲜血琼脂培养基: 称取 13.5 g 胰蛋白胨、54.5 g 大豆蛋白胨、4.5 g 氯化钠、11.7 g 琼脂, 加热溶解于 900 mL 蒸馏水中, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min, 冷却至 50–55 °C 时无菌操作加入 100 mL 无菌脱纤维兔血, 混匀, 倾倒入无菌平皿待用。

1.3 疑似 APPV 感染样品和健康仔猪样品的检测

通过在 NCBI 上对 APPV 序列进行比对, 筛选一段相对保守的区域设计一对特异性检测引物检 F (5'-TGGGCGATGCGGTAATAGAG-3') 和检 R (5'-AA TAATTCGCTGCAGGTTGGA-3'), PCR 扩增片段长度约为 408 bp。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 Trizol 对组织样品进行 RNA 提取, 并将 RNA 逆转录为 cDNA 作为检测模板用于 PCR 检测。

逆转录体系: 5×PrimeScript Buffer 2.0 μL,

PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer 0.5 μL (25 pmol), Random 6 mers 2.0 μL (50 pmol), RNA 模板 500 ng, ddH₂O 补足到 10.0 μL。

检测体系: PrimeSTAR Max Premix 25.0 μL, 检 F 和检 R (0.4 μmol/L) 各 2.0 μL, DNA 模板 200 ng, ddH₂O 补足到 50.0 μL。

1.4 排除其余干扰病原

将采集的所有组织样品按照测序分为实验组 (A) 和对照组 (B), 分别利用 Trizol 对组织进行 RNA 提取; 酚氯仿法对组织进行 DNA 提取; 并将组织接种于实验室常规的 10% 鲜血琼脂平板, 置于 37 °C 细菌培养箱中进行细菌分离培养, 24–48 h 后查看平板上的菌落情况, 以排除 CT 相关病毒(伪狂犬病毒、圆环病毒 2 型、圆环病毒 3 型、猪瘟病毒、猪乙脑病毒) 或细菌因素造成的干扰。所有 PCR 检测均使用实验室已建立的方法, 引物序列如表 1 所示, 逆转录及 PCR 体系如 1.3 所述。

1.5 RNA 提取与反转录

对 1.1 描述中保存于 -80 °C 的小脑组织使用 Trizol 进行 RNA 抽提, 分别采用 NanoDrop、Qubit 2.0、Agilent 2100、电泳方法检测 RNA 样品的纯度、浓度、完整性及是否有基因组 DNA 污染等, 以保证样品能满足转录组测序的要求。将质检通过的 RNA 样品按实验组和对照组各 3 个重复分别用 KAPA Stranded RNA-Seq Library Prep Kit 进行反转录及 cDNA 文库的构建。

表 1 检测引物序列

Table 1 Primers sequence

Primers name	Sequences (5'→3')	Fragment size (bp)	T _m (°C)
PRV-F	ATCTGGACGTTCTGCCC	534	60
PRV-R	GTAGATGCAGGGCTCGTACA		
PCV2-F	CGGATATGTAGTCTGGTCG	701	53
PCV2-R	ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA		
PCV3-F	TTACTTAGAGAACGGACTTGTAACG	651	56
PCV3-R	AAATGAGACACAGAGCTATATTCAG		
CSFV-F	GACACTAGYGCAGGCAAYAG	449	55
CSFV-R	AGTGGGTTCCAGGARTACAT		
JEV-F	CCGTGTCGGTCCAAA	465	55
JEV-R	GGGCTTCTCCAGTCGT		

1.6 文库构建及测序

总 RNA 使用 NEB Next Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module 进行 mRNA 富集。处理后产物 RNA 用 KAPA Stranded RNA-Seq Library Prep Kit 构建文库。构建好的文库通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行质检, 并通过 qPCR 方法进行文库的最终定量。根据定量结果和最终测序数据量要求混合不同样品的测序文库进入测序流程。将混合好的不同样品的测序文库, 通过 0.1 mol/L NaOH 变形生成单链 DNA, 稀释成 8 pmol/L 浓度后在 TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS 上进行原位扩增, 生成的片段末端使用 Illumina HiSeq 4000 测序仪测序 150 个循环。

1.7 差异表达基因的筛选及功能注释

对原始数据(raw data)进行数据过滤, 去除其中的接头序列及低质量 Reads, 获得高质量的 Clean data。使用 Bowtie 将 Clean data 与指定的 Sus scrofa 参考基因组进行序列比对, 获得比对上的数据(mapped data)。根据基因在 APPV 阳性仔猪和阴

性仔猪小脑组织中的表达量进行差异表达分析、差异表达基因功能注释和功能富集等高级分析。

1.8 RT-qPCR 验证

随机选取差异表达显著的 6 个基因对返还的测序样品 RNA 进行 RT-qPCR 验证, 其中 3 个为上调基因, 3 个为下调基因。RT-qPCR 结果通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量, 通过内参基因 β -actin 校正, GraphPad Prism 5 统计软件进行显著分析。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成(表 2)。

2 结果与分析

2.1 疑似 APPV 感染样品的检测和健康仔猪样品的检测

如图 1 所示, 3 个疑似感染样品均检测到 APPV 阳性, 3 个健康仔猪样品均为 APPV 阴性。经检测, 患病仔猪大脑、小脑、肠系膜淋巴结、脾脏等组织中伪狂犬病毒、圆环病毒 2 型、圆环病毒 3 型、猪瘟病毒、猪乙脑病毒核酸为阴性, 而且未分离出细菌。

表 2 荧光定量 RT-PCR 引物序列

Table 2 Primers used in RT-qPCR

Primers name	Sequences (5'→3')	Fragment size (bp)	T_m (°C)
TAC-F	ATCAGACGCAAGCGAAAGGA	160	60
TAC-R	ATTGCGGAGAAGGAGGTCAG		
FOSB-F	CTTCTAACGAGGGAGCGTGG	192	60
FOSB-R	CGAGGTGAAGCACAGGGAAA		
IGFBP3-F	TTCGACGTGAAGGGGAAAGG	171	58
IGFBP3-R	CAATTGCCACAAGGAGACA		
PCSK1-F	CTGACATCCTCCCACTGAGC	142	59
PCSK1-R	TAAAGCAACCTGCCAGAGCC		
IRF1-F	CTGCATGGACCGCCTACC	175	60
IRF1-R	CAGATAGCTGACGCCAGGAG		
NCAN-F	CCAGCATCCACTCACCTGAA	130	60
NCAN-R	TCATATTGCAGCCCCGTGTT		
RCN3-F	GTAGTTCTCTGGGTGCGAGG	146	59
RCN3-R	ACCAATGAGCGCTCCTGAC		
LAMB1-F	AGCACAGCAGAAACGAATCCTA	152	60
LAMB1-R	GGCCTATACCACTGCTCTGC		

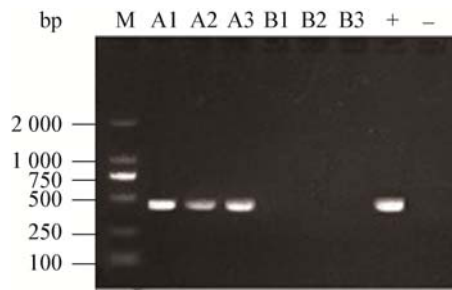


图1 样品检测电泳图

Figure 1 Results of agarose gel electrophoresis

注: M: DNA Marker; A1-A3: 3份疑似感染的样品; B1-B3: 3份健康仔猪的样品; +: 阳性对照样品; -: 阴性对照样品。

Note: M: DNA Marker; A1-A3: Three suspected infected samples; b1-b3: Three healthy piglets samples; +: Positive control samples; -: Negative control samples.

2.2 测序质控

Illumina 测序仪产生 FASTQ 各式的原始序列 (raw data), 使用 Q30 作为指标对测序数据进行质控, 一般来说, $Q30 \geq 80\%$ 即表示测序质量极高, 从表 3 结果看, 除了 Control-1 样品测序质量一般外, 其余 5 个样品测序质量均较高。

2.3 文库建立及 Mapping 结果统计

在 Illumina HiSeq 4000 高通量测序平台上建立了 APPV 感染仔猪的小脑组织以及健康仔猪的小脑组织共 2 个基因文库。比对结果中, 除对照组的一个样品外, 其余所有样品比对率均高于 70%, 比对率良好(表 4)。

表 3 测序质控结果

Table 3 The results of sequencing quality control

样本名称	Reads number	碱基总数	碱基数	Q30 (%)
Sample name		Total base number	Base number ($Q \geq 30$)	
Control-1	45 435 220	6 815 283 000	5 333 149 130	78.25
Control-2	40 908 304	6 136 245 600	5 018 857 256	81.79
Control-3	50 311 564	7 546 734 600	6 344 678 997	84.07
XN2	38 187 762	5 728 164 300	4 822 242 333	84.18
XN3	40 458 836	6 068 825 400	4 896 040 977	80.68
XN4	42 752 088	6 412 813 200	5 317 294 642	82.92

2.4 差异表达基因及富集分析

2.4.1 差异表达基因筛选

本次测序一共筛选到 381 个差异表达的基因, 其中显著上调的有 163 个, 显著下调的有 218 个, 筛选标准为 $P \leq 0.05$, $|\log_2(FC)| \geq 0.263$, 在分析过程中采用 Benjamini-Hochberg 矫正方法矫正 P 值 (P value)。

2.4.2 差异表达基因 GO 富集分析

如图 2 所示, 在最重要的 BP 过程中, 感染组内包括 β -淀粉样蛋白清除的负调节、信号调节、活化素受体信号通路、激素分泌、细胞通讯调节、信号转导调控、蛋白质输入、对细胞外刺激的反应、转运等生物学过程呈现显著上调; 而在多细胞生物发展、系统发育、发育进程、发育进程的调节、解剖结构发展、细胞分化、组织器官发育、多细胞生物发育的调控、解剖结构形态发生、细胞分化的调节等过程显著下调。

2.4.3 差异表达基因 KEGG 富集分析

通过 Fisher 精确检验方法计算富集显著性, 结果如图 3 显示, 在感染组中, 上调的差异基因主要集中在甘油酯代谢、导管酸分泌、TGF- β 信号通路、碳代谢、神经营养因子信号通路、长期抑郁症、突触小泡循环、肾素分泌、心肌细胞的肾上腺素转导等细胞信号通路中; 而下调的差异基因主要富集于轴突导向、黏附斑、癌症相关通路、Hioppo 信号通路、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化、唾液分泌、

表 4 映射定位结果

Table 4 The results of mapping

Samples	Raw pairs	Mapped ratio (%)
Control-1	22 717 610	65.57
Control-2	20 454 152	72.47
Control-3	25 155 782	76.55
XN2	19 093 881	75.99
XN3	20 229 418	70.75
XN4	21 376 044	74.11

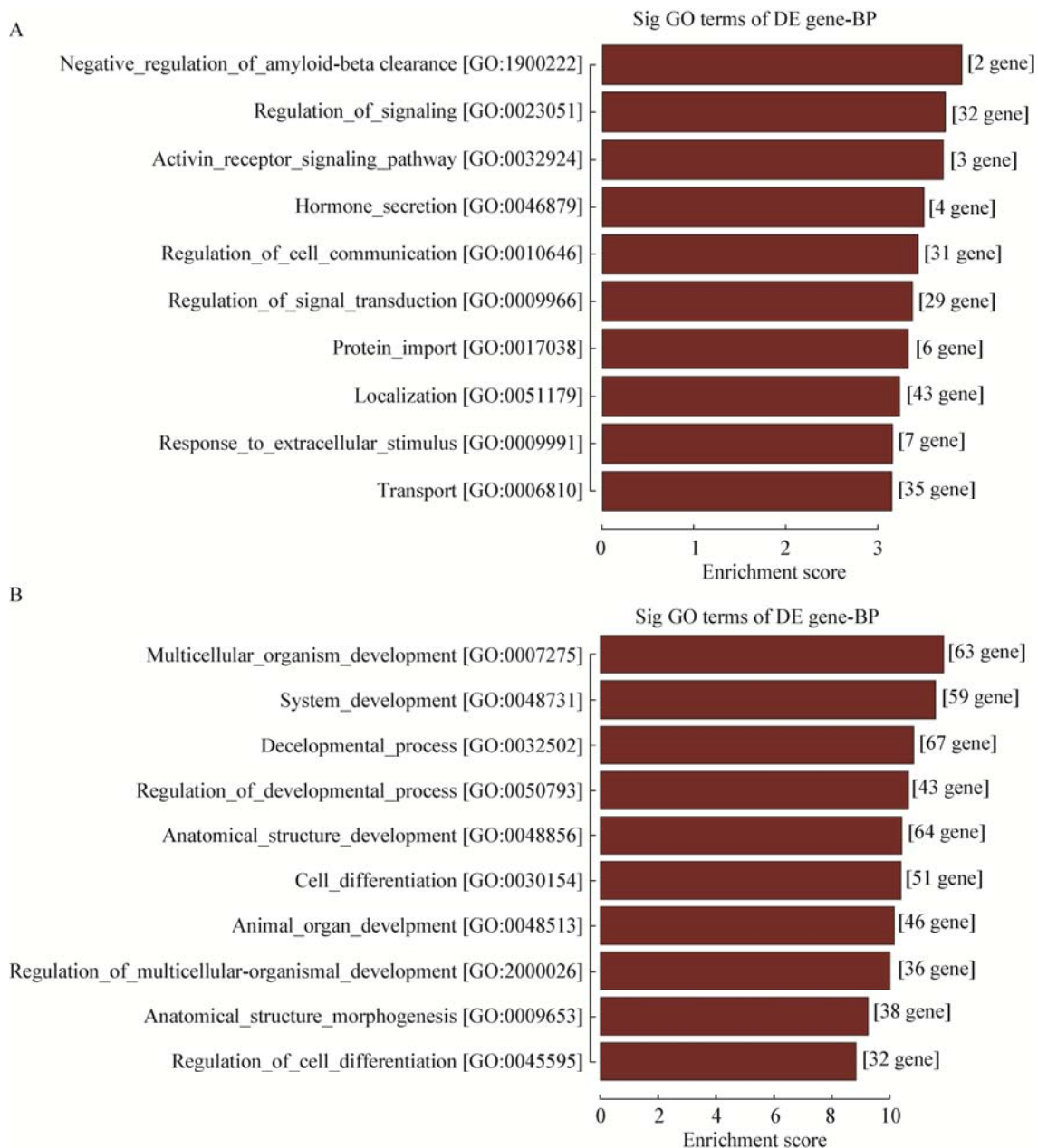


图2 差异表达基因的GO分类统计

Figure 2 Differentially expressed genes GO classification statistics

注: A: 上调基因的GO BP图; B: 下调基因的GO BP图。

Notes: A: GO BP map of up-regulated genes; B: GO BP map of down-regulated genes.

癌症中的蛋白聚糖、小细胞肺癌、间隙连接等细胞信号通路。

2.5 荧光定量PCR验证RNA-Seq测序结果

随机选取8个显著差异表达的基因,以 β -actin作为内参基因,根据荧光定量PCR结果,计算各个基因相对的表达量。PCR反应体系: SYBR Green

Premix *Ex Taq* II (2 \times) 5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L,模板1 μ L, ddH₂O补足至10 μ L。PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 各对引物的退火温度30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共40个循环。最终表达结果通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算结果呈现,验证结果和RNA-seq测序结果基本一致(表5,图4)。

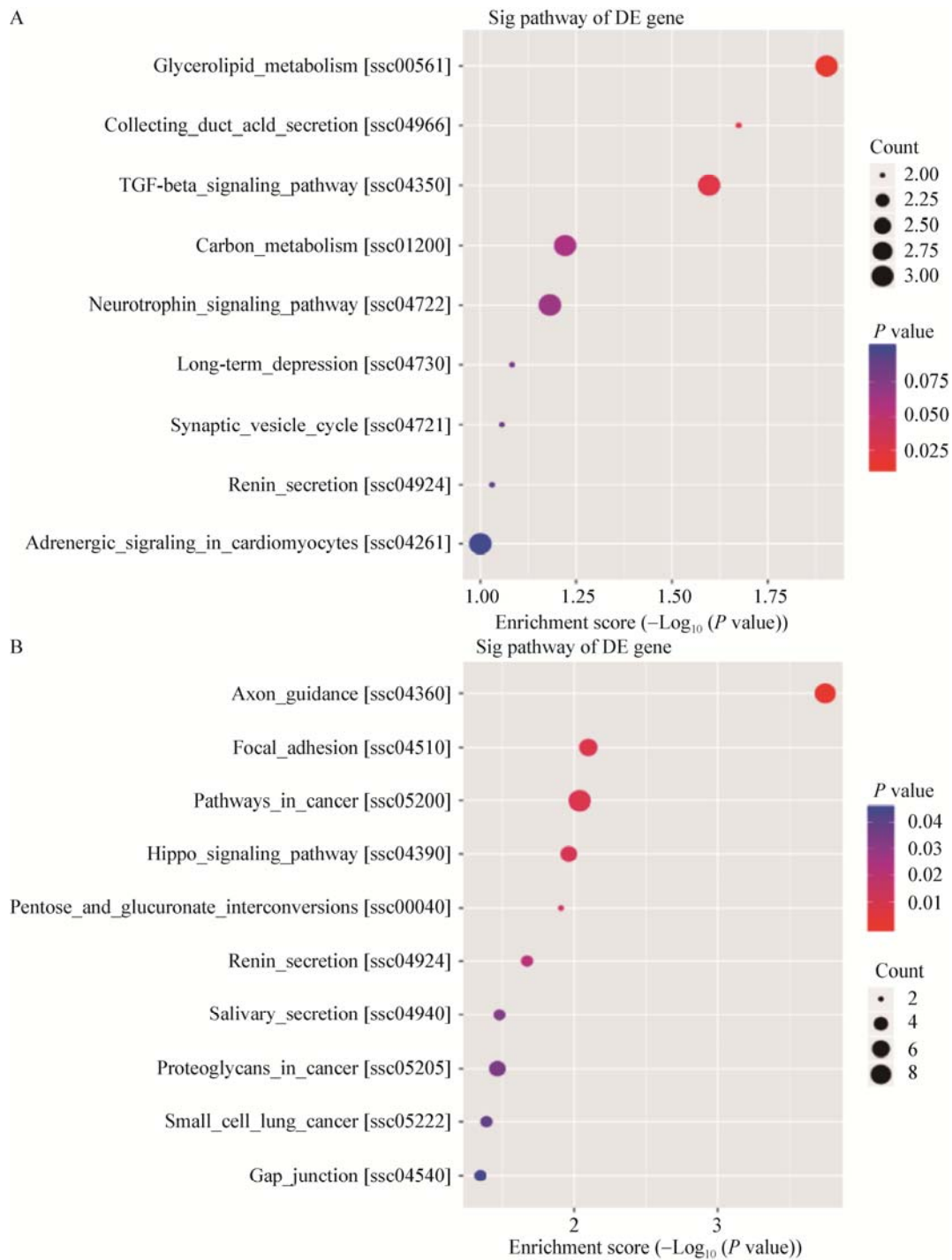


图3 差异表达基因 KEGG 注释分类

Figure 3 Differentially expressed genes KEGG taxonomy

注: A: 上调基因的 KEGG 注释点状图; B: 下调基因的 KEGG 注释点状图. 纵坐标为 KEGG 代谢通路的名称, 圆点大小表示该通路下被注释上的基因个数, 横坐标为富集分数.

Notes: A is the KEGG annotation dot map of the up-regulated gene, and B is the KEGG annotation dot map of the down-regulated gene. The abscissa is the enrichment fraction and the ordinate is the name of KEGG metabolic pathway. The dot size indicates the number of genes annotated under the pathway.

表 5 差异基因测序数据

Table 5 Sequencing data of differential genes

Gene_Name	Log ₂ FC	Fold_Change
SHISA7	1.971 476 713	3.921 693 301
TAC1	1.660 159 491	3.160 514 626
FOSB	1.426 481 13	2.687 903 102
IGFBP3	1.387 676 17	2.616 568 757
IRF1	-1.234 678 16	0.424 937 285
NCAN	-0.953 424 81	0.516 405 115
RCN3	-0.824 205 98	0.564 792 963
LAMB1	-0.744 567 47	0.596 846 784

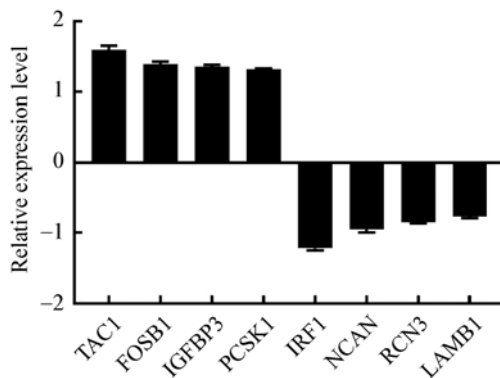


图 4 荧光定量 RT-qPCR 验证测序结果

Figure 4 Confirmation of sequencing results by RT-qPCR

3 讨论与结论

由于近年来 APPV 在世界各地陆续检出并造成疫情,对养猪业造成了一定的损失,尤其是其垂直传播的特性和对初生仔猪的高危害性更是值得重视。国内外学者利用多种途径对 APPV 展开了研究,虽然目前取得了一定的成绩,但是对于 APPV 这样一种新发病毒来说,距离彻底了解其致病机理和与宿主互作的机制仍有较大的差距。然而高通量测序技术的发展则使一次性获取不同试验样品的大量数据成为可能,更为进一步深入研究 APPV 致病机制和免疫应答通路等方面提供了一种快捷且准确的方法。

APPV 作为一种新发病毒,目前的研究水平还较为基础,而目前对其尚无成功的体外培养也为 APPV 的研究增加了难度,尤其是在动物模型的建立上。本研究设计尝试以 3 份排除干扰病原的 APPV

阳性小脑组织作为实验组,并以 3 份相同日龄的阴性仔猪小脑作为对照组进行转录组测序,以期在转录水平上初步探究感染 APPV 的仔猪和阴性仔猪之间存在的差异。一共筛选到 381 个差异表达的基因,其中显著上调的有 163 个,显著下调的有 218 个。通过 GO 注释这些差异基因,发现这些差异基因主要参与 β -淀粉样蛋白清除的负调节、信号调节、活化素受体信号通路、激素分泌、细胞通讯调节、信号转导调控、内涵体、细胞内部、空泡、髓鞘、分子功能调节器、酶结合、腺苷酸环化酶结合、胎结合等过程。根据 KEGG 注释结果显示,差异基因主要富集于甘油酯代谢、收集导管酸分泌、TGF- β 信号通路、碳代谢、神经营养因子信号通路、长期抑郁症、突触囊泡循环、轴突指导、黏附斑信号通路、癌细胞相关信号通路、HIPPO 信号通路、肾素分泌、癌症中的蛋白多糖等通路中,其中,多数参与轴突导向通路的基因转录水平显著下降,包括 *Pak4*、*Robo4*、*Sema3f*、*Wnt5a* 等基因,并对部分差异表达基因进行了验证,差异表达基因相对表达量与 RNA-Seq 测序结果基本一致。在神经发育的进程当中,轴突沿特定的路径延伸,到达将与其建立突触联系的靶细胞的胞体、树突或轴突^[8]。轴突的伸展和回缩受到生长锥的指导,而这种指导是通过其表面的受体选择性地识别胞外环境中的导向信号,经过一系列信号转导机制而实现的^[9]。一旦导向信号发生错误的变化,则会导致动作信号无法进一步传递,影响细胞骨架的构建甚至对神经系统的发育过程产生影响。目前的研究水平下,主要发现了 4 种高度保守的轴突导向分子家族,包括 NELTRINS、SLITS、SEMAPHORINS 和 EPHRINS^[10]。本研究中,通过测序发现显著低表达的 *Robo4* 即为 *Slits* 受体 *Robo* 家族中一员, *Slit/Robo* 主要功能在于对轴突的排斥性导向作用,并能促进轴突的分支和延伸及引导神经细胞迁移^[11]。*Robo4* 在实验组小脑组织中的显著低表达说明可能 APPV 感染后通过抑制受体 ROBO 家族而影响突触的导向作用。*Sema3f* 则是 SEMAPHORINS 家族中的一员,SEMAPHORINS

是一类分泌或结合于细胞表面的轴突导向分子, 该家族成员能使轴突远离不正确的位置, 或者引导他们通过排斥性的区域^[8]。本研究中, *Sema3f* 表达显著下调表明可能 APPV 可以通过抑制轴突导向分子家族的表达而抑制轴突导向这一过程。WNT 蛋白是一类富含半胱氨酸的分泌性糖蛋白家族, WNT 信号通路在神经发育过程中参与了神经发生、轴突导向、树突的发育等, 一旦此过程中的 WNT 信号转导发生了异常, 将造成神经系统发育缺陷, 引起诸多神经系统疾病^[12]。对于干细胞, WNT5A 可以促进 NSCs 向多巴胺能神经元分化, 调节脑多巴胺能神经元的发育功能, 为神经退行性疾病帕金森病的治疗提供依据^[13], 同样, 对于阿尔兹海默症, WNT 信号通路的低表达或者缺失与神经元形成能力下降有直接相关, 能使其病程加快^[14]。

综上所述, APPV 感染后可能通过抑制轴突导向这一生命进程来抑制中枢神经系统的相关功能和发育, 从而表现为其临床症状的全身肌肉震颤和四肢麻痹。本次研究通过对 APPV 感染仔猪小脑组织的转录组测序, 发现参与轴突导向的相关基因表达受到抑制, 可能证明 APPV 通过抑制轴突导向这一重要的神经系统发育过程, 从而对整个中枢神经系统的发育和功能造成影响, 进而造成一系列退行性变化, 最终体现在其整体肌肉震颤和四肢麻痹两个临床表现型上。本研究首次提出了 APPV 感染可能会导致仔猪体内轴突导向过程受到抑制, 为进一步研究 APPV 的致病机制等提供了方向和指导。

REFERENCES

- [1] Zhang WB, Wu SS, Deng SZ, et al. Preliminary study on a novel atypical congenital tremor of piglets and its etiology[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 44(7): 2147-2154 (in Chinese)
张文波, 吴松松, 邓舜洲, 等. 一种新型仔猪先天性震颤及其病原的初步研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(7): 2147-2154
- [2] Kinsley AT. Dancing pigs?[J]. *Veterinary Medicine*, 1922, 17: 123
- [3] Cai BX. *Lemology of Domestic Animals*[M]. 4th ed. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 80 (in Chinese)
蔡宝祥. *家畜传染病学*[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 80
- [4] Done JT, Harding JD. Congenital tremor in pigs (trembling disease of piglets): lesions and causes[J]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 1967, 74(13): 333-336
- [5] Bradley R, Done JT, Hebert CN, et al. Congenital tremor type AI: light and electron microscopical observations on the spinal cords of affected piglets[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 1983, 93(1): 43-59
- [6] Done JT, Woolley J, Upcott DH, et al. Porcine congenital tremor type AI: spinal cord morphometry[J]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 1984, 31(1/10): 81-90
- [7] Vannier P, Plateau E, Tillon JP. Congenital tremor in pigs farrowed from sows given hog cholera virus during pregnancy[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1981, 42(1): 135-137
- [8] Parish CL, Castelo-Branco G, Rawal N, et al. Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(1): 149-160
- [9] Inestrosa NC, Varela-Nallar L. Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2014, 6(1): 64-74
- [10] Ma ZL, Liu SJ. Progress in research on axon guidance cues[J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2006, 30(2): 180-183 (in Chinese)
马振莲, 刘少君. 轴突导向信号的研究进展[J]. *军事医学科学院院刊*, 2006, 30(2): 180-183
- [11] Liu L, Long DX. Advances in the role of Wnt signaling pathway in the development of nervous system[J]. *Medical Science Journal of Central South China*, 2017, 45(3): 304-307 (in Chinese)
刘丽, 龙鼎新. Wnt 信号通路在神经系统发育中的作用研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(3): 304-307
- [12] Mósená ACS, Weber MN, da Cruz RAS, et al. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 22-26
- [13] Schwarz L, Riedel C, Högl S, et al. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 1
- [14] Dessureault FG, Choinière M, Provost C, et al. First report of atypical porcine pestivirus in piglets with congenital tremor in Canada[J]. *Canadian Veterinary Journal*, 2018, 59(4): 429-432