

猪圆环病毒 2 型感染猪皮肤源树突状细胞炎性反应能力的变化

王振生¹, 聂晓华¹, 李焕荣^{1*}, 孙英健¹, 隋丽华², 崔德凤¹

(1. 北京农学院动物科学系, 北京 102206; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

摘要: 用 PCV2 B1 株经鼻腔接种 40 日龄 SPF 仔猪, 于接种后 3、7、14 d 宰杀, 收集皮肤源树突状细胞(DC)。利用实时荧光定量 PCR 技术对感染仔猪皮肤源 DC 的 IL-10、TNF- α 、IFN- α 、IL-8、趋化因子受体 1(CCR1)、CCR5 在 mRNA 转录水平的变化进行定量分析。结果表明, IFN- α 在接种后 3 d(3DPI)显著下调($P < 0.05$), TNF- α 、IL-10 在 7DPI 时显著上调($P < 0.05$); 趋化因子 IL-8 在 3、7、14 DPI 时均下调, 差异接近显著; MCP-1 在感染后 3、14DPI 下调, 7DPI 均上调, 但不显著; MIP-1 β 在 3、7DPI 明显上调, 14DPI 恢复正常; 趋化因子受体 CCR1、CCR5 在 3、7 和 14DPI 均上调, 且 7DPI 显著上调($P < 0.05$)。以上结果表明 PCV2 在感染早期可抑制 DC 炎性反应的能力, 免疫应答失调, 影响了动物机体的细胞和体液免疫功能的发挥。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; 皮肤源树突状细胞; 炎性因子; 趋化因子; 趋化因子受体

中图分类号: S852.659.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)12-1776-06

Changes of Inflammatory Reactions of Porcine Skin Dendritic Cells Infected with Porcine Circovirus Type 2 *in vivo*

WANG Zhen-sheng¹, NIE Xiao-hua¹, LI Huan-rong^{1*}, SUN Ying-jian¹, SUI Li-hua², CUI De-feng¹

(1. Department of Animal Science and Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Porcine dendritic cells(DCs) from forty-day-old SPF piglets inoculated oral-nasally with porcine circovirus type 2 (PCV2) B1 strain were collected at different days post inoculation (DPI). Real-time FQ-PCR was used to detect the kinetics of mRNAs of IL-10, TNF- α , IFN- α , IL-8, chemokine C-C motif receptor1 (CCR1) and CCR5 from skin DCs. The results showed that the transcriptions of proinflammatory cytokines mRNA decreased with significant levels of IFN- α at 3DPI, TNF- α and IL-10 mRNA were increased significantly at 7DPI($P < 0.05$). The transcriptions of chemokine IL-8 mRNA decreased with almost significant levels. MCP-1 mRNAs were down at 3DPI and 14DPI, up at 7DPI, while the transcriptions of MIP-1 β mRNA were up at 3DPI and 7DPI, and back to the normal levels at 14DPI. The transcriptions of CCR1 and CCR5 were up at 3DPI, 7DPI and 14DPI, with significant increase at 7DPI ($P < 0.05$). Taken together, PCV2 could significantly weaken the inflammatory reactions of porcine skin DC, and make its immune response out of control. These will affect the humoral immunity and cellular immunity of the animals.

收稿日期: 2009-06-09

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6062006); 北京市优秀人才资助项目(20061D0502100282)

作者简介: 王振生(1984-), 男, 硕士生, 主要从事动物分子病原学与免疫学研究, E-mail: wangzhensheng-2007@163.com

* 通讯作者: 李焕荣(1968-), E-mail: lihuanrong1@126.com

Key words: porcine circovirus type 2; skin dendritic cells; cytokine; chemotactic factor; chemokine C-C motif receptor

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)主要引起猪断奶后多系统衰竭综合征(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)^[1]。该病目前已在许多国家和地区发生、流行,严重威胁世界养猪业的发展。此外,PCV2 感染常会引起猪皮炎与肾病综合征(PDNS)^[2],42%的发病仔猪出现渗出性皮炎^[3]。

树突状细胞(Dendritic cell, DC)是已知效能最强的抗原递呈细胞,可有效刺激 T、B 淋巴细胞活化,将先天免疫和获得性免疫联系在一起^[4]。有关 PCV2 感染后对猪外周血单个核细胞(PBMC)以及肺泡巨噬细胞(PAM)细胞因子的影响已有报道^[5-8]。体外研究显示 PCV2 能够持续存在于 DC 中,不影响 DC 的抗原递呈功能,能够抑制自然干扰素生成细胞(NIPC)产生 IFN- α 和 TNF- α ^[9],而对 DC 其他细胞因子的影响尚未见报道。DC 在动物体内分化与功能是多变的^[10],仅体外诱导的 DC 并不能反映其在体内的免疫状态^[11]。本研究以 PCV2 人工感染健康 SPF 仔猪,通过检测不同感染时间的炎症因子、趋化因子及其受体的 mRNA 转录水平的动态变化,以分析 PCV2 感染对猪皮肤源树突状细胞炎症反应能力的影响。

1 材料与方 法

1.1 病毒与质粒

PCV2 B1 株第 2 代细胞毒,毒价为 $10^{5.2}$ TCID₅₀ · mL⁻¹^[12]。试验用各种基因阳性质粒由作者实验室扩增并鉴定。

1.2 试验用动物

40 日龄无特定病原体(SPF)大白仔猪,购自北京养猪育种中心 SPF 猪场,经 PCR 和 ELISA 检测,PCV2 核酸及其抗体均为阴性。

1.3 试剂

SYBR Green Real-time PCR Master Mix,日本 TOYOBO 公司产品;高纯度质粒小提中量试剂盒,购自 TIANGEN 公司;吉姆萨染液为实验室保存。

1.4 细胞因子、趋化因子及相关受体 Real-time FQ-PCR 标准曲线的建立

选择 IL-10、TNF- α 、IFN- α 、IL-8、MIP-1 β 、MCP-1、CCR1、CCR5 与 β actin 基因为检测对象,

按常规方法提取相应阳性重组质粒(作者实验室保存并提供)并测定 OD_{260 nm} 的吸收值,计算出各质粒的拷贝数。建立 20 μ L Real-time FQ-PCR 反应体系:SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10 μ L,25 μ mol · μ L⁻¹ 上、下游引物各 0.2 μ L,ROX 染料 0.1 μ L,1 μ L 10 倍系列稀释的各因子阳性质粒,加三蒸水至 20 μ L,引物与反应条件见表 1。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,50.5~62 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;95 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 30 s。55~95 $^{\circ}$ C 过程中全程读板收集荧光信号。PCR 反应结束后,将 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,确定 PCR 产物的片段大小和特异性。

1.5 动物试验

将 SPF 仔猪随机分为攻毒组 and 对照组,专人饲养,进出消毒,定期消毒环境,高床隔离饲养,自由采食与饮水。攻毒组经滴鼻接种 PCV2 B1 细胞毒各 10 mL;对照组接种 DMEM 营养液。分别在 0、3、7 和 14 DPI 各宰杀 2 头(14 DPI 时 1 头,故该时间点数据未进行差异显著性分析),参照 Bautista 等的方法^[13]稍加改动,获取其皮肤源树突状细胞,以未接毒的 2 头猪为对照组。用 RNA 提取试剂 Trizol 提取细胞的总 RNA,并反转录,以 cDNA 为模板扩增 β -actin,阳性的样品可用于细胞因子的 Real-time FQ-PCR 分析。

1.6 Real-time FQ-PCR 对试验样品的测定

用 6~7 个 10 倍系列稀释的阳性质粒作为模板,每个稀释度重复 2 孔,进行 PCR 扩增,获得 Real-time FQ-PCR 的标准曲线。在同一反应中,取不同时相皮肤源 DC 的 cDNA 为模板,按照表 1 中扩增所列的引物、退火温度和读板温度,进行 Real-time FQ-PCR,得到检测样本中细胞因子的 cDNA 拷贝数。每个因子的检测样品重复 3 孔。

1.7 数据处理和统计分析

经 Real-time FQ-PCR 反应后,获得每个样品中所测细胞因子和受体的部分基因以及看家基因 β -actin 的拷贝数。将各个细胞因子的 cDNA 拷贝数除以同一样品中看家基因的 cDNA 拷贝数,得到细胞因子与看家基因的一个相对比值,用以表示感染组皮肤源 DC 各种细胞因子 mRNA 水平的动态变化。采用 *t* 检验,对接毒后不同时间皮肤源 DC 不同细胞因子 cDNA 含量进行差异显著性分析。

表 1 扩增猪细胞因子、趋化因子受体等 Real-time FQ-PCR 的引物和 PCR 条件

Table 1 Primers to amplify partial genes of porcine cytokines and chemokine C-C motif receptor and conditions of PCR

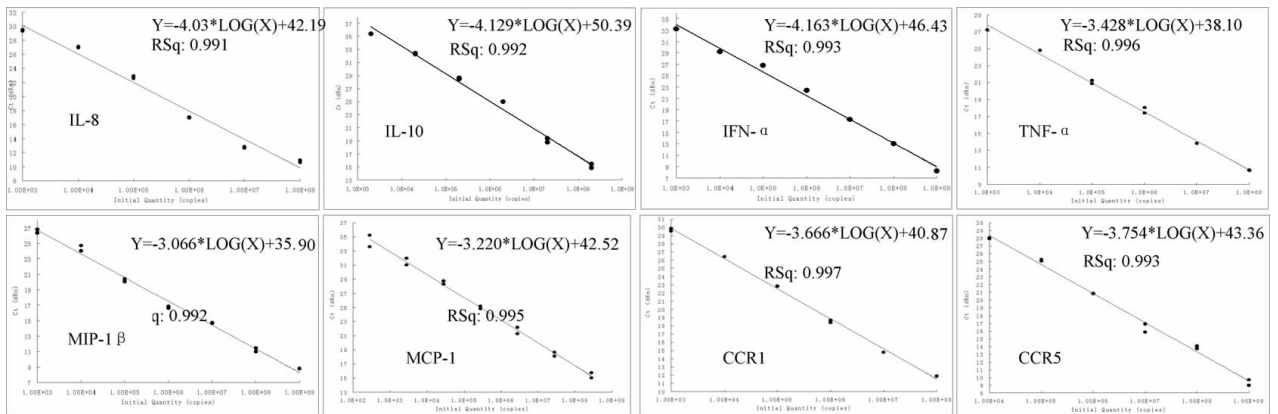
基因(来源或序列号) Gene (Source/ accession No.)	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Product
IL-10 (L20001)	Forward: GCATCCACTTCCAGGCCA	60	446
	Reverse: CTTCCTCATCTTCATCGTCA		
IFN- α (EU364896.1)	Forward: GGCACAAATGAGGAGAATC	56	307
	Reverse: CACAGCCAGGATGGAGTC		
TNF- α (X54859)	Forward: CGTTGTAGCCAATGTCAAAGCC	62	402
	Reverse: TGCCAGATTTCAGCAAAGTCCA		
IL-8 (M99367)	Forward: ACTGGCTGTTGCCTTCTT	52	278
	Reverse: CAGTTCTCTTCAAAAATATCTG		
MIP-1 β (AJ311717)	Forward: CTCCTCCAGCAAGACCAT	54	297
	Reverse: GCTCAGTTCAGTTCCAAGT		
MCP-1 (X79416)	Forward: CAGCCCTCCTGTGCCT	54	288
	Reverse: TTCAAGGCTTCGGAGTTT		
CCR1 (AB119268)	Forward: TGATGTAGGAGGTAGAGGAGGC	52	244
	Reverse: GTTGTCTTTGGGTAGTGGGATTA		
CCR5 (NM_001001618)	Forward: ATTCACCAACCTCCGTGTT	55	235
	Reverse: TCCTCTATGTTTCCCTACTTCA		
β -actin (U07786)	Forward: CTGGCATTGTCATGGACTCT	59	547
	Reverse: GCGATGATCTTGATCTTCAT		

2 结果

2.1 猪细胞因子、趋化因子以及其受体 Real-time FQ-PCR 标准曲线的建立

将含有目的基因片段的重组质粒进行 10 倍系列稀释 6~7 个梯度 ($10^8 \sim 10^3$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$), 进行 Real-time FQ-PCR 扩增, 获得了 IL-10、IFN- α 、TNF- α 、IL-8、MIP-1 β 、MCP-1、CCR1、CCR5 的标准曲线和直线回归方程(图 1)。所有标准曲线的线性

回归分析均存在高相关系数 ($\text{RSq} > 0.99$), 证明试验的过程和数据是可信的, 使用这些方程式可以计算出待测样本的初始模板量。对各产物溶解曲线及 PCR 产物琼脂糖电泳分析, 未出现杂峰, 且扩增的目的产物仅有单一条带, 说明引物的特异性好; 以 cDNA 为模板进行 Real-time FQ-PCR 扩增, 同样未有杂峰出现, 印证引物可用于检测。 β -actin 建立的标准曲线数据未显示。



横坐标为模板起始浓度; 纵坐标示循环数

The Ct were chose as ordinate and the initial copies as abscissa

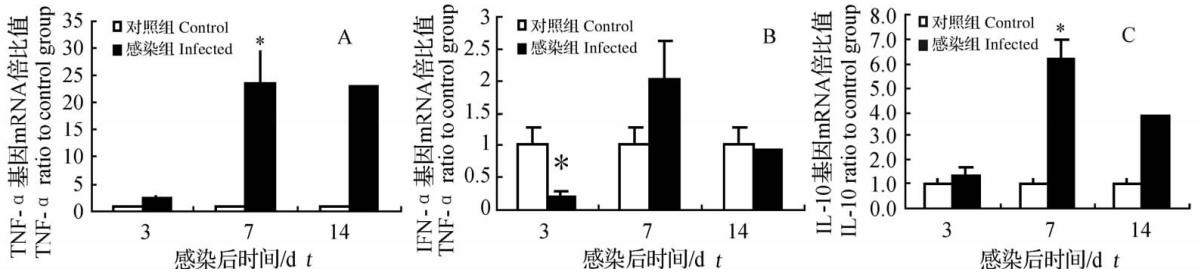
图 1 IL-10、IFN- α 、TNF- α 、IL-8、MIP-1 β 、MCP-1、CCR1 和 CCR5 的 Real-time PCR 标准曲线

Fig. 1 The Real-time PCR standard curve graphs of partial genes of IL-10, IFN- α , TNF- α , IL-8, MIP-1 β , MCP-1, CCR1, CCR5

2.2 PCV2 感染猪不同时相皮肤源 DC 的 IL-10、TNF- α 和 IFN- α mRNA 转录变化

获取 PCV2 感染仔猪皮肤源 DC 后,将不同时相收取的皮肤源 DC 所提取的 RNA 进行反转录后,取 1 μ L 作为模板进行看家基因 β actin 的检测,阳性的样品可用于各个炎症因子 Real-time FQ-PCR 的检测。检测结果经均一化处理,对照组皮肤源 DC 的炎症因子 mRNA 的拷贝数均以 1 表示,比较不同时相感染组与对照组样品中所测因子 mRNA

的拷贝数的倍比值变化。以感染仔猪后的时间为横坐标,以感染组与对照组的炎症因子 mRNA 倍比值为纵坐标(图 2A)。结果表明,PCV2 感染仔猪在 3DPI TNF- α 的 mRNA 转录有所上升,7DPI 显著上调($P < 0.05$),14DPI 也明显上调($P > 0.05$); IFN- α mRNA 的转录水平在 3DPI 显著下调($P < 0.05$),7DPI 上调,14DPI 接近对照组(图 2B); IL-10 mRNA 的转录水平在 3、7 和 14DPI 均上调,且 7DPI 时差异显著($P < 0.05$)(图 2C)。



*. $P < 0.05$

图 2 PCV2 感染猪皮肤源 DC 的 TNF- α 、IFN- α 、IL-10 mRNA 部分基因转录动态

Fig. 2 Dynamics of the transcription of TNF- α , IFN- α , IL-10 partial gene in skin DC from the piglets infected with PCV2

2.3 PCV2 感染猪不同时相皮肤源 DC 趋化因子 IL-8、MIP-1 β 、MCP-1 mRNA 转录变化

IL-8 在 14DPI 下调,且接近显著($P = 0.0782$) (图 3A); MIP-1 β mRNA 的转录水平在感染后 3、7

和 14DPI 均上调,且 3 和 7DPI 明显上调,14DPI 又恢复正常(图 3B); MCP-1 mRNA 的转录水平在感染后 3 和 14DPI 下调,7DPI 上调($P > 0.05$, 图 3C)。

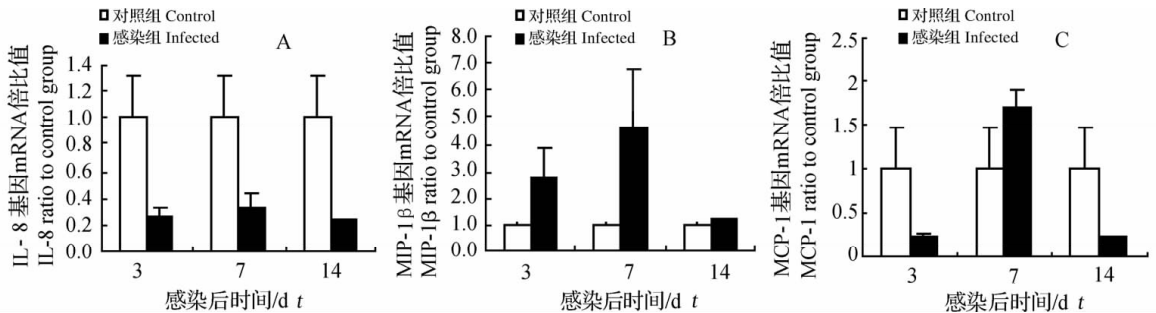


图 3 PCV2 感染猪皮肤源 DC 趋化因子 IL-8、MIP-1 β 和 MCP-1 的部分基因转录动态

Fig. 3 Dynamics of the transcription of IL-8, MIP-1 β and MCP-1 partial gene in skin DC from the piglets infected with PCV2

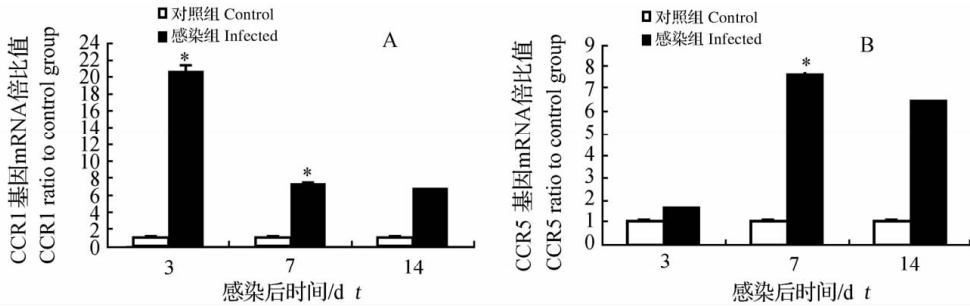
2.4 PCV2 感染猪不同时相皮肤源 DC 的 CCR1 和 CCR5 mRNA 转录变化

与对照组相比,PCV2 感染后,CCR1 和 CCR5 RNA 的转录水平在感染后 3、7 和 14DPI 均上调,且 7DPI 显著上调($P < 0.05$)(图 4)。

3 讨论

本研究利用 Real-time FQ-PCR 检测仔猪感染

PCV2 后不同时间皮肤源 DC 的炎症因子(IL-10、IFN- α 、TNF- α)、趋化因子(IL-8、MIP-1 β 、MCP-1)以及趋化因子受体(CCR1、CCR5)基因 mRNA 的动态变化。结果显示,IL-10 过量表达,IL-8 始终处于被抑制的状态,早期抑制机体产生 IFN- α ,表明在 3DPI DC 的炎症反应能力明显降低,CCR1 和 CCR5 在 7DPI 过量表达,导致向淋巴组织迁移细胞数量减少,影响了机体免疫应答的有效发挥。



*. $P < 0.05$

图4 PCV2感染猪皮肤源DC CCR1和CCR5 mRNA表达的动态

Fig. 4 Dynamics of the transcription of CCR 1 and CCR5 partial gene in skin DC from the piglets infected with PCV2

TNF- α 生物活性主要表现为活化巨噬细胞、粒细胞,增强其吞噬和杀伤活力,促进细胞IL-8的产生^[14]。而IFN- α 免疫调节活性主要通过激活免疫系统,促进杀伤病毒感染细胞,提高机体的体液免疫和细胞免疫水平。IL-10是一种多效性细胞因子,主要起抗炎作用和免疫抑制作用^[14]。体外研究表明,PCV2不会影响IFN- α /TNF- α 诱导DC成熟,PCV2的DNA却可以抑制NIPC产生IFN- α 和TNF- α ,损伤了其在天然免疫和杀伤免疫方面的有效功能^[9, 15]。本研究结果表明,TNF- α 在3DPI时无变化,IFN- α 却显著降低,表明病毒感染后未激发机体发生炎症反应。在7DPI时TNF- α mRNA转录水平显著升高,说明机体炎症反应增强;TNF- α 显著增高,可能促进了IFN- α 的上调,促进趋化因子的表达,吸引单核巨噬细胞进入皮肤^[16];DC中IL-10上调和TNF- α 的变化与PBMC以及PAM的变化基本一致^[5-8]。此外,作者发现PCV2感染后5d试验猪出现皮下渗出液体现象(数据未显示),皮肤DC是否参与渗出性皮炎的发生,有待进一步证实。

趋化因子在损伤或炎症部位的释放可直接介导单核细胞进入组织^[17]。MCP-1、MIP-1 β 、IL-8是DC的3种主要的趋化性细胞因子,MCP-1主要趋化激活单核细胞,MIP-1 β 对单核/巨噬细胞及其他多种类型细胞具有趋化作用,IL-8主要趋化中性粒细胞^[14]。PBMC在感染后早期IL-8表达上调^[5],但PAM IL-8和MCP-1的表达均下调^[18],而PMWS自然发病猪在淋巴细胞严重缺失的脾脏中IL-8 mRNA的表达下调,但差异不显著^[19]。本研究中,MCP-1、IL-8 mRNA表达在3DPI时减少,虽然MIP-1 β 在3DPI时上调,但是作用有限,因为其他2种趋化因子是下降的,所以在感染初期抑制单核/巨

噬细胞的趋化与激活,不利于清除病毒;在7DPI时,MCP-1、MIP-1 β 表达增加,可征募大量单核/巨噬细胞到炎症部位,促进炎症的发生,发挥抗病毒效应。而MCP-1 mRNA转录增加,可能在肉芽肿炎症的发生机理上起着重要作用,因为组织细胞浸润和多核巨细胞是PMWS的常见病变(肉芽肿)的主要特征^[20]。IL-8表达量始终低于对照组,说明皮炎发生时皮肤源DC可能并没有诱导中性粒细胞向皮肤游走。

迁移是DC区别于巨噬细胞的重要特点,本试验利用的就是DC的迁移特性,皮肤表皮的不成熟的DC在受到刺激后发生成熟并移动到培养液中^[13]。DC的迁移过程对于自身成熟十分重要,能参与DC迁移的分子除了趋化性因子诱导外,自身的趋化因子受体(Chemokine C-C motif receptor, CCR)必不可少。未成熟DC表达CCR1和CCR5,向病毒入侵部位迁移,吞噬抗原后逐渐成熟,成熟DC高表达CCR7,低表达CCR1和CCR5,离开病毒侵入部位向淋巴组织迁移^[21-23]。本研究结果显示,CCR1和CCR5的表达量在7DPI显著升高,说明在感染PCV2后,DC的成熟及其抗原递呈功能受到影响,向淋巴组织迁移数量也减少,从而影响了机体的免疫应答。

由此可见,PCV2感染后猪皮肤源DC炎症因子、趋化因子及其受体在基因水平发生变化,结合PCV2对PBMC和PAM相关因子影响的报道,表明PCV2感染早期可能通过影响PBMC、PAM以及皮肤源DC炎症反应能力,在PMWS或PDNS等病症中协同发挥作用。

参考文献:

[1] ALLAN G M, McNEILLY F, KENNEDY S, et al.

- Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10(1):3-10.
- [2] HARDING J C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus type 2 [J]. *Vet Microbiol*, 2004, 98(2):131-135.
- [3] HARMS P A, SORDEN S D, HALBUR P G, et al. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and Porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Pathol*, 2001, 38(5): 528-539.
- [4] CARRASCO C P, RIGDEN R C, VINCENT I E, et al. Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(6): 1633-1641.
- [5] 施开创,杨汉春,郭鑫,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪圆环病毒 2 型共感染对外周血单个核细胞促炎细胞因子 mRNA 表达影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(3):363-370.
- [6] 司奎奎,郭鑫,杨汉春. 猪圆环病毒 2 型感染后猪外周血淋巴细胞 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12p40、IFN- γ 和 TNF- α mRNA 转录的变化[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1):78-82.
- [7] SIPOS W, DUVIGNEAU J C, WILLHEIM M, et al. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 99(1-2): 63-71.
- [8] AASTED B, BACH P, NIELSEN J, et al. Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(6):1229-1234.
- [9] VINCENT I E, CARRASCO C P, GUZYLACK-PIROU L. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2[J]. *Immunology*, 2005, 115(3): 388-398.
- [10] JAMIN A, GORIN S, LE POTIER M F, et al. Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 114(3-4): 224-237.
- [11] VINCENT I E, CARRASCO C P, HERRMANN B, et al. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus [J]. *J Virol*, 2003, 77(24): 13288-13300.
- [12] 王振生,李焕荣,崔德凤,等. 疑似 PMWS 患猪中 PCV2 的分离及全基因组序列分析[J]. 北京农学院学报, 2007, 22(3):20-24.
- [13] BAUTISTA E M, GREGG D, GOLDE W T. Characterization and functional analysis of skin-derived dendritic cells from swine without a requirement for in vitro propagation [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 88(3-4): 131-148.
- [14] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 484.
- [15] VINCENT I E, BALMELLI C, MEEHAN B, et al. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA [J]. *Immunology*, 2007, 120(1): 47-56.
- [16] BASLER C F, GARCIA-SASTRE A. Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion [J]. *Int Rev Immunol*, 2002, 21(4-5): 305-337.
- [17] LIN C L, SURI R M, RAHDON R A, et al. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation [J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(12): 4114-4122.
- [18] 周双海,杨汉春,郭鑫,等. PCV2 感染对猪 MCP-1 和 IL-8mRNA 表达的影响[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(06):468-471.
- [19] DARWICH L, PIE S, ROVIRA A, et al. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(8): 2117-2125.
- [20] KIM J, CHUNG H K, CHAE C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex [J]. *Vet J*, 2003, 166(3): 251-256.
- [21] SALLUSTO F, SCHAERLI P, LOETSCHER P, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(9): 2760-2769.
- [22] IJIMA N, YANAGAWA Y, CLINGAN J M, et al. CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells[J]. *Int Immunol*, 2005, 17(9): 1201-1212.
- [23] JUNG I D, LEE J S, KIM Y J, et al. Sphingosine kinase inhibitor suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and impairing p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Immunology*, 2007, 121(4): 533-544.