

抗猪繁殖与呼吸障碍综合征基因编辑猪研究进展

李双喜 华进联

(西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100)

摘要: 猪繁殖与呼吸障碍综合征是由猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种病毒性传染病。该病是影响我国生猪产业健康发展的最重要的三大疫病之一。目前对于该病的防控主要依赖于养殖场内外部生物安全体系, 采取合理措施降低病毒的污染, 切断病毒传播途径。从保护易感动物的角度而言, 抗病育种也是疫病防控的重大策略之一。近年来, 随着基因编辑技术的发展和成熟, 分子育种作为猪抗病育种的核心技术, 已显示出其独特的优势。国内外多个研究团队已利用分子育种技术在抗 PRRS 育种方面取得很多突破性进展。本文以 PRRSV 受体为切入点, 综述当前猪抗 PRRS 育种的研究现状, 以期为 PRRS 的防控和猪的抗病育种研究提供参考和线索。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征; 猪; 抗病育种; CRISPR/Cas9; CD163

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-0373

Research Progress in Anti-porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Genetically Modified Pigs

LI Shuang-xi HUA Jin-lian

(Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100)

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome is a viral infectious disease caused by Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). The disease is one of the three most important diseases affecting the healthy development of pig industry in China. At present, the prevention and control of the disease mainly depends on the internal and external biosecurity system of the farm, taking reasonable measures to reduce the pollution of the virus, and cutting off the circulation and transmission of the virus among pigs. From the perspective of protecting susceptible animals, breeding for disease resistance is also one of the major strategies for disease prevention and control. In recent years, with the development and maturity of gene editing technology, molecular breeding, as the core technology of pig disease resistance breeding, has shown its unique advantages. Several teams have made many breakthroughs in PRRS resistance breeding by using molecular breeding technology. This article takes the PRRSV receptor as the entry point, and reviews the current research status of pig PRRS-resistant breeding, aiming to provide reference and clues for the prevention and control of PRRS and the research of pig disease-resistant breeding.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; pig; disease-resistant breeding; CRISPR/Cas9; CD163

国家生猪产业体系对我国生猪产业现状的调研显示, 非洲猪瘟 (African swine fever, ASF)、猪繁殖与呼吸障碍综合征 (porcine reproductive and

respiratory syndrome, PRRS) 和猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是影响我国生猪生产的最重要的三大疫病。其中, PRRS 是一种由猪繁殖

收稿日期: 2023-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072806), 陕西省重点科技创新团队项目 (2019TD-036), 陕西省畜牧专项 (20221086)

作者简介: 李双喜, 男, 博士研究生, 研究方向: 干细胞与胚胎工程; E-mail: lsx@126.com

通讯作者: 华进联, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 干细胞与胚胎工程; E-mail: jinlianhua@nwsuaf.edu.cn

与呼吸障碍综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起猪群发病的传染性病毒性疾病, 在临床上主要表现为母猪的繁殖障碍和生长育肥猪的呼吸系统紊乱。虽然近两年在田间流行的类 NADC30 和类 NADC34 毒株尚未造成大面积疫情暴发, 但对猪群健康的影响持续存在^[1]。此外, 从猪场经济学的角度来看, PRRS 是对猪场经济影响最重要的疾病。目前对于该病的防控主要依赖于养殖场内外生物安全体系, 采取合理措施降低病毒的污染, 切断病毒传播途径。

从保护易感动物的角度而言, 抗病育种也是疫病防控的重大策略之一。近年来, 随着基因编辑技术的发展和成熟, 分子育种作为猪抗病育种的核心技术, 已取得很多突破性进展。本文以 PRRSV 受体为切入点, 综述猪抗 PRRS 育种的研究现状, 以期对 PRRS 的防控和猪的抗病育种研究提供线索。

1 PRRS 流行和防控现状

猪繁殖与呼吸障碍综合征于 1987 年首次在美国报道, 该病在临床上的症状表现为母猪流产、早产、木乃伊胎等繁殖障碍, 断奶猪的呼吸道症状、生长迟缓以及死亡率增加。当时由于病因不明, 称其为“猪神秘病”。1991 年, 在欧洲首次分离到该病病原, 称为猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV), 并命名为 Lelystad^[2]。北美分离株 VR-2332 于 1999 年分离, 并进一步获得该毒株的全基因组序列^[3]。根据基因序列的差异, PRRSV 可分为欧洲株 (PRRSV-1, 代表毒株 Lelystad) 和美洲株 (PRRSV-2, 代表毒株 VR-2332) 两个基因型, 二者的核苷酸序列相似性为 50%–60%, 且均能够引起长期感染并且具有相似的临床症状^[4]。在 2020 年国际病毒命名委员会发布的最新病毒分类报告中, 这两个基因型作为两个种, 分别命名为猪 β 动脉炎病毒 1 型和 2 型^[5]。

我国于 1995 年底在华北地区规模化猪场首次暴发 PRRS^[6-7]。随后, PRRS 在我国猪群中不断传播^[8]。2006 年, 高致病性猪繁殖与呼吸综合征 (highly pathogenic PRRS, HP-PRRS) 在我国暴发, 在临床上表现为高热、高发病率和致死率, 造成大量猪只死亡, 重创当时的养猪产业。HP-PRRS 自 2006 年后成为我国猪只中流行的优势毒株^[9], 并传

入周边国家^[10]。2014 年, 我国相继出现类 NADC30 毒株^[11-12], 成为我国优势流行毒株之一, 且该毒株易与其他的毒株发生重组。同年, 美国首次报道 NADC34 毒株^[13], 而我国于 2017 年在东北部地区检测到与之相似的毒株——类 NADC34 毒株^[14], 之后中部地区多个省份也陆续检测到了该类毒株^[15-16]。与类 NADC30 毒株相似, 类 NADC34 毒株也易与其他毒株发生重组。PRRSV 极易变异和重组的特性, 致使新毒株层出不穷, 给该病的防控带来了严峻挑战。

疫苗是防控传染病最有效的措施之一。然而对于 PRRS 而言, 灭活疫苗基本无效, 减毒活疫苗目前在猪场免疫较为普遍, 可对同源毒株提供临床保护, 但是对异源毒株的交叉保护非常有限, 甚至是无效的^[17-18]。PRRS 治疗方法也大多停留在研究阶段, 尚未有可在临床上应用的有效治疗性药物。因此, 在生产实践中常采用完善和加强猪场生物安全、合理使用疫苗、剔除阳性猪只、驯化阳性场等多项举措并施来防控 PRRS, 使猪群处于相对稳态^[19]。抗病育种猪是 PRRS 防控的新策略。随着近年来 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展和成熟, 使得对动物基因组特定位置的编辑变得更加简便、精准和快速。国内外多个研究团队也利用该项技术对猪进行基因编辑, 进行抗 PRRS 育种研究和探索。

2 抗 PRRS 基因编辑猪研究进展

基因编辑是指利用基因编辑工具对细胞、植物或动物基因组中进行特定基因序列的插入、删除或突变, 从而改变该基因的表达。基因编辑工具以核酸酶为主要成分, 最初的基因编辑工具为锌指核酸酶 (ZFNs) 基因编辑系统, 该系统剪切效率低, 且易产生非特异性脱靶切割^[20]。2009 年出现转录激活因子样效应子核酸酶编辑系统 (TALENs), 与锌指核酸酶基因编辑系统相比, 该系统识别位点多、剪切效率高, 且操作简便, 节省时间^[21]。近年来 CRISPR/Cas9 基因编辑系统有了突飞猛进的发展, 已成功应用于体内外基因治疗、动植物抗病育种等多个方面^[22]。

目前, CRISPR/Cas9 基因编辑系统是在基因编辑猪中应用比较广泛的基因编辑技术。国内外针对

抗 PRRS 基因编辑猪的研究主要集中在改造 PRRSV 受体血红蛋白清道夫受体 (haemoglobin scavenger receptor) 分子。大量的研究证实, CD163 可以介导 PRRSV 入侵细胞, 且被认为是众多受体中最为重要的一个分子。CD169 虽然也可介导病毒内化, 但是研究表达该蛋白并非 PRRSV 感染所必需的, 且敲除该基因对 PRRSV 感染无明显影响^[23]。因此, 近年来国内外多项研究致力于 CD163 敲除或功能域缺失对 PRRSV 感染的影响。

2.1 CD163蛋白的结构与功能

PRRSV 在猪体内的靶细胞是猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophage, PAM)。研究发现多种细胞受体可介导 PRRSV 进入 PAMs, 包括 CD163 (cluster differentiation 163)、唾液酸黏附素 (sialoadhesin, Sn; CD169)、硫酸乙酰肝素 (heparin sulphate, HS)、波形蛋白 (vimentin)、CD151 分子、树突状细胞表面的 DC-SIGN (CD209) 以及肌球蛋白重链 9 (MYH9)。其中, CD163 分子研究最为广泛。

CD163 分子, 又称血红蛋白清道夫受体, 属于 I 型膜蛋白, 分子大小为 130 kD, 包含 9 个清道夫受体超家族 (scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) 结构域, 富含半胱氨酸^[24]。猪源 CD163 基因含有 7 个外显子, 编码的 CD163 蛋白包括 N 端信号肽, 9 个 SRCR 结构域、2 个脯氨酸-丝氨酸-苏氨酸 (PST) 域和 C 端胞内域, 其中 PST 结构域分别位于 SRCR6 和 SRCR9 之后^[25]。

CD163 蛋白可作为多种分子的受体, 参与维持机体的自身稳态。首先, 在机体受到病原感染或组织发生损伤后, CD163 蛋白发挥清道夫分子作用。CD163 蛋白可通过其 SRCR2-SRCR3 结构域结合血红蛋白-触珠蛋白复合物, 该复合物经内吞进入巨噬细胞内体和溶酶体, 最终清除游离血红蛋白, 从而维持机体处于健康状态^[26-28]。其次, CD163 分子可作为肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂 (TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) 受体, 与后者结合后参与调控肿瘤细胞的增殖或凋亡^[29]。同时, CD163 分子属于成红细胞黏附分子, 它与成红细胞相互作用, 在红细胞生成过程中发挥调节作用^[30]。此外, 2005 年 Fabriek 等^[31] 研究发现表达 CD163

的巨噬细胞或可溶性 CD163 在炎性组织中大量存在, 提示其通过巨噬细胞调节细胞因子的释放, 在机体防御中发挥作用。

除了发挥以上生理功能之外, CD163 分子还可作为 PRRSV 感染的受体。2007 年, Calvert 等^[32] 的研究首次发现 CD163 分子与 PRRSV 感染高度相关, 是基因 I 型和 II 型 PRRSV 的受体。CD163 主要介导 PRRSV 在细胞质中的脱衣壳和病毒基因组的释放, 并且已经确定 CD163 的病毒结合区为 SRCR5-SRCR9, 胞外 N 端的 SRCR1-3 不影响 CD163 与 PRRSV 结合的受体活性。2009 年, Van Gorp 等^[33] 在 CD163 之前的研究基础上, 通过构建缺失突变和嵌合突变体, 进一步鉴定受体结合区域。攻毒感染试验揭示了 SRCR5 结构域在 PRRSV 感染中是必需的, 而 N 端 4 个 SRCR 结构域和 C 端胞质区不参与病毒感染过程。除此之外, 其余的 CD163 蛋白区域需要保留, 但若将其替换为 CD163-L1 (CD163b) 的 SRCR 区域, 则可引起感染效率降低 (SRCR6 及域间区) 或不变 (SRCR7-SRCR9)。另外, 该项研究还证实, 识别 CD163-SRCR5 的特异性抗体可降低 PRRSV 的感染。随后的研究解析了 SRCR5 的晶体结构信息, 通过突变实验揭示在长环 (long loop) 区域的 561 位的精氨酸残基在 PRRSV 感染中发挥重要作用, 进一步分析得知很可能是在病毒入侵过程中其参与 CD163 与 PRRSV 的结合^[34]。病毒凋亡模拟 (viral apoptotic mimicry) 作为一种新型感染方式, 在 PRRSV 感染中发挥着重要作用。研究发现 PRRSV 囊膜表面暴露有磷脂酰丝氨酸 (PtdSer) 模拟凋亡, T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain, TIM) 等可通过该物质识别 PRRSV 感染, 进而通过 CD163 分子介导病毒入侵^[35]。

2.2 以CD163为靶标的基因编辑猪抗PRRS研究现状

CD163 分子在 PRRSV 复制周期的作用使其成为基因编辑猪抗 PRRS 研究的重要靶点。近年来国内外很多研究关注在缺失 CD163 受体的猪只对 PRRSV 的易感性。利用 CRISPR 系统结合体细胞移植技术, 对猪 CD163 基因进行有针对性的编辑。待获得基因

编辑猪后,利用猪只或者从猪只上分离 PAMs,分析其对不同 PRRSV 毒株的易感性。

2016 年,Whitworth 等^[36]首次使用 CRISPR/Cas9 编辑技术敲除已经报道的 PRRSV 受体发现,敲除 CD163 分子 SRCR5 结构域的猪能够完全抵抗 II 型 PRRSV 感染。随后,许多研究团队开始了针对 CD163 的抗 PRRSV 感染猪的基因编辑育种工作。次年,有研究发现完全敲除 CD163 分子或者缺失 SRCR5 结构域的猪只及其 PAMs 细胞对基因 I 型和 II 型 PRRSV 毒株均不易感,而利用人源类 CD163 分子(hCD 163L1) SRCR8 区域替换猪源 CD163 分子 SRCR5 区域,表达嵌合 CD163 分子的猪只和 PAMs,只对基因 I 型毒株耐受,对基因 II 型毒株仍然易感^[25]。然而,Chen 等^[37]发现 hCD 163L1 结构域替换猪源 CD163 分子 SRCR5 结构域的基因编辑猪对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(HP-PRRSV)不易感。另一研究团队的结果表明,CD163 分子 SRCR5 结构域缺失的猪只及 PAMs 和集落刺激因子因子 1 刺激的外周血单核细胞(PMMs)对基因 I 型高致病性毒株不易感。值得注意的是,除基因 I 型外,PMMs 对基因 II 型的毒株也不易感^[38-39]。

2018 年,Yang 等^[40]研究也发现用 HP-PRRSV TP 毒株感染 CD163 基因敲除猪后,猪只不表现出病毒血症、抗体反应、高热以及其他 PRRS 相关临床症状,提示其可完全抵御病毒感染。2019 年,Guo 等^[41]利用双荧光筛选的方法提高了基因编辑猪的阳性率,并发现只缺失 CD163 分子 SRCR5 结构域 41 个氨基酸(缺失区域包含病毒受体结合位点)即可使猪抵抗基因 II 型毒株 JXA1 和 MY 毒株的感染。多基因同时敲除从而获得抵抗几种病毒感染的猪只更能迎合当下疫病防控的需求。2020 年,Xu 等^[42]首次通过 CD163 和 pANP 双基因敲除获得了能同时抵抗基因 II 型 PRRSV、TGEV 和德尔塔冠状病毒的编辑猪,在肉质品质和繁殖性能上,与野生型无差异,但在双缺失型猪只的肌肉中检测到升高的铁。表 1 归纳总结了当前以 CD163 为靶标的基因编辑猪抗 PRRS 的主要进展。

除了靶向 PRRSV 受体 CD163 分子对猪抗 PRRS 进行探索之外,研究人员也在挖掘病毒感染过程中的关键宿主因子,以期筛选出新的靶标。利用全基

因组基因敲除的猪源 gRNA 文库及高通量基因筛选技术筛选并在细胞水平上鉴定 IL20RB、ATP6V0A1 和 STX10 均可显著抑制 PRRSV 感染,为抗 PRRS 育种的研究奠定基础^[43]。

在基因编辑方法上,近年来也取得一些重要进展。Xu 等^[44]开发了一种称为报告 RNA 富集的双引导 RNA 核蛋白(RE-DSRNP)编辑技术,可用于快速构建无外源 DNA 基因编辑的克隆猪。该技术可提高编辑效率,避免质粒 DNA 随机整合到目标细胞的基因组,同时无单克隆细胞选择过程,缩短体细胞培养时间,降低体细胞异常比例。本实验室通过比较不同 sgRNA 的表达策略发现,连续的 sgRNAs 表达盒策略可以显著提高猪源细胞的多基因编辑效率,并对仔猪全基因组测序,验证了该方法的安全性。近期,有研究团队通过把二元四环素诱导表达元件分别精确插入 Rosa26 和 Hipp11 位点,建立多四环素诱导 SpCas9 表达(DIC)猪模型。在该模型基础上,构建了一种基于 Cas9 条件敲除猪基因的方法。该方法可通过药物和 sgRNA 调控基因的沉默和过表达。DIC 猪模型也可作为开发单一转基因整合的基本工具,对猪进行时空基因敲除,从而对一些复杂的疫病进行复制,进而精准剖析蛋白功能。而且,DIC 猪 SpCas9 蛋白表达的可调控性对探究该蛋白的剂量及谱系示踪研究至关重要^[45]。

综上所述,关于抗 PRRS 猪育种已经取得许多重要研究进展,但是仍有一些问题是需要认真思考的。由于 CD163 的表达属于显性性状,遵循经典的孟德尔遗传定律,CD163^{-/-}的亲本与野生型 CD163^{+/+}杂交会产生杂合 CD163^{+/-}胎儿,该胎儿能够表达正常的 CD163 蛋白。可喜的是,研究发现 CD163 基因敲除的母猪可以充分地保护仔猪免受 PRRSV 感染。尽管 CD163 基因敲除母猪产出的表达 CD163 分子后代在出生后对病毒存在易感性,但在母体内存在针对 PRRSV 的保护能够很大程度上减少经济损失以及满足动物福利的要求^[46]。

3 展望

传染病防控三要素包括消灭传染源、切断传播途径以及保护易感动物这三方面,培育具有抗病基因的动物就是从保护易感动物这个角度入手进行研

表 1 以 CD163 为靶标的基因编辑猪抗 PRRS 的主要进展

Table 1 Advances in anti-PRRS gene-editing pigs targeting CD163						
编辑位点 Editing site	编辑类型 Editing type	CD163 分子表达情况 Expressing situation of CD163	对 PRRSV 毒株的易感性 Susceptibility to PRRSV strains	体外实验 <i>In vitro</i>	体内实验 <i>In vivo</i>	参考文献 Reference
猪源 CD163 分子第 7 外显子	插入或缺失		对基因 2 型毒株不易感		猪	[36]
		未检测到	对基因 1 型和 2 型毒株不易感	PAMs	猪	[25]
	人源类 CD163 蛋白 SRCR8 结构域编码基因替换猪源 CD163 分子第 7 外显子	表达嵌合 CD163 分子	对基因 1 型毒株不易感, 对基因 2 型毒株易感	PAMs	猪	[25]
			对高致病性毒株不易感		猪	[37]
	插入或缺失	表达缺失 SRCR5 结构域的 CD163	肺泡巨噬细胞 (PAMs) 和集落刺激因子 1 刺激的外周血单核细胞 (PMMs) 对基因 I 型第 1、2 和 3 亚型毒株不易感, PMMs 对基因 II 型毒株不易感	PAMs 和 PMMs		[38]
		表达缺失 SRCR5 结构域的 CD163	对基因 1 型第 2 亚型的高致病性毒株不易感		猪	[37]
		未检测到	对基因 2 型高致病性毒株不易感		猪	[39]
		表达截短的 CD163 蛋白 (SRCR5 结构域缺失 41aa, 缺失区域包含病毒受体结合位点)	对基因 2 型毒株 JXA1 和 MY 不易感	PAMs	猪	[40]
		未检测到	对基因 2 型高致病性毒株不易感		猪	[41]

究, 在农业领域, 具有抗虫性、抗寒性、抗盐碱性的作物, 如水稻、棉花等作物的生物措施已经得到了广泛的应用。植物与人的亲缘关系较远, 具有天然的遗传屏障, 相对较为安全, 而在动物上的转基因操作出于伦理、人兽共患病等方面的考虑, 科学界及社会则从未停止过争论。

近几年对于抗病猪的育种研究, 研究人员取得了大量突破性的进展, 包括抗 PRRSV (CD163) 单基因编辑猪、抗 PRRSV/TGE (CD163/pAPN) 的双基因编辑猪, 都为未来猪病的防控开辟了新的道路。此外, 一些特定品种的猪对某些疾病具有天然的抵抗能力, 通过分析比较基因组差异, 编辑差异位点也是抗病育种的一个思路。例如, 2020 年 McCleary 等^[47]通过对比易感非洲猪瘟病毒的家猪和不易感的非洲疣猪的基因组序列分析后发现, RELA 基因存在 3 个单核苷酸多态性位点差异, 通过基因编辑技术, 将非洲疣猪的 SNP 替换到家猪上获得基因编辑猪, 该猪感染非洲猪瘟病毒产生临床症状的

时间晚于野生型猪, 且排毒量也较低。2018 年 Xie 等^[48]应用 CRISPR/Cas9 为基础的定点整合 (knock-in) 平台, 结合 RNA 干扰技术, 将筛选出的能有效抑制猪瘟病毒复制的 shRNA 基因精确整合至猪内源 *Rosa26* 基因启动子区域的下游, 成功地筛选出能稳定表达抗病基因的细胞系。接着通过体细胞核移植技术和胚胎移植技术成功地获得抗猪瘟病毒的基因编辑猪。体内外攻毒实验均证实这些基因编辑猪能有效限制猪瘟病毒的感染并能显著地降低猪群中猪瘟疾病相关的临床症状和致死率。随后, 该团队又在猪基因组上发现另一外源基因整合位点 *miR-17-92* 基因簇, 通过将针对猪流行性腹泻病毒的 shRNA 整合到该位点可获得抗病基因编辑猪。这些研究都为抗 PRRS 基因编辑猪的探究提供了线索^[49]。综上所述, 基于基因编辑及多能干细胞手段赋予猪体抗病毒能力的方法是一种有效的抗病育种策略, 或者筛选更加有效的抗病靶标及策略^[50-52], 且其具有非常广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 刘小红, 陈瑶生. 2021 年生猪产业发展状况、未来发展趋势与建议 [J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58 (3) : 204-209.
Liu XH, Chen YS. Development status, future development trend and suggestions of pig industry in 2021 [J]. Chin J Anim Sci, 2022, 58 (3) : 204-209.
- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. Vet Q, 1991, 13 (3) : 121-130.
- [3] Benfield DA, Nelson E, Collins JE, et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332) [J]. J Vet Diagn Invest, 1992, 4 (2) : 127-133.
- [4] Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents [J]. J Virol, 1999, 73 (1) : 270-280.
- [5] The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy. 2020.
- [6] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1996, 18 (2) : 1-5.
Guo BQ, Chen ZS, Liu WX, et al. Isolation and identification of porcine reproductory and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS [J]. Chin J Prev Vet Med, 1996, 18 (2) : 1-5.
- [7] 杨汉春, 管山红, 尹晓敏, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与初步鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 33 (10) : 9-10.
Yang HC, Guan SH, Yin XM, et al. Isolation and preliminary identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Chin J Vet Med, 1997, 33 (10) : 9-10.
- [8] Gao ZQ, Guo X, Yang HC. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus [J]. Arch Virol, 2004, 149 (7) : 1341-1351.
- [9] Zhou L, Chen SX, Zhang JL, et al. Molecular variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. Virus Res, 2009, 145 (1) : 97-105.
- [10] Feng YJ, Zhao TZ, Nguyen T, et al. Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007 [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14 (11) : 1774-1776.
- [11] Zhou L, Wang ZC, Ding YP, et al. NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21 (12) : 2256-2257.
- [12] Zhao K, Ye C, Chang XB, et al. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. J Virol, 2015, 89 (20) : 10712-10716.
- [13] van Geelen AGM, Anderson TK, Lager KM, et al. Porcine reproductive and respiratory disease virus: evolution and recombination yields distinct ORF5 RFLP 1-7-4 viruses with individual pathogenicity [J]. Virology, 2018, 513: 168-179.
- [14] Zhang HL, Zhang WL, Xiang LR, et al. Emergence of novel porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (ORF5 RFLP 1-7-4 viruses) in China [J]. Vet Microbiol, 2018, 222: 105-108.
- [15] Xu H, Li C, Li WS, et al. Novel characteristics of Chinese NADC34-like PRRSV during 2020-2021 [J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69 (5) : e3215-e3224.
- [16] Xu H, Song SJ, Zhao J, et al. A potential endemic strain in China: NADC34-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67 (4) : 1730-1738.
- [17] Yu Y, Zhang QY, Cao Z, et al. Recent advances in porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like research in China: molecular characterization, pathogenicity, and control [J]. Front Microbiol, 2022, 12: 791313.
- [18] Zhou L, Yang BN, Xu L, et al. Efficacy evaluation of three modified-live virus vaccines against a strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like [J]. Vet Microbiol, 2017, 207: 108-116.
- [19] 杨汉春. 猪场蓝耳病的流行现状与防控对策 [J]. 兽医导刊, 2021 (1) : 7.
Yang HC. Epidemic situation and prevention and control countermeasures of blue ear disease in pig farms [J]. Vet Orientat, 2021 (1) : 7.
- [20] Geurts AM, Moreno C. Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome [J]. Clin Sci, 2010, 119 (8) : 303-311.
- [21] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14 (1) : 49-55.
- [22] Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20 (8) : 490-507.
- [23] Prather RS, Rowland RRR, Ewen C, et al. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/

- internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2013, 87 (17) : 9538-9546.
- [24] Liu SS, Zhang CQ, Maimela NR, et al. Molecular and clinical characterization of CD163 expression via large-scale analysis in glioma [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8 (7) : 1601478.
- [25] Wells KD, Bardot R, Whitworth KM, et al. Replacement of porcine CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a CD163-like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2017, 91 (2) : e01521-e01516.
- [26] Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor [J]. *Nature*, 2001, 409 (6817) : 198-201.
- [27] Andersen CBF, Torvund-Jensen M, Nielsen MJ, et al. Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex [J]. *Nature*, 2012, 489 (7416) : 456-459.
- [28] Nielsen MJ, Madsen M, Møller HJ, et al. The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 79 (4) : 837-845.
- [29] Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207 (1) : 103-110.
- [30] Fabrick BO, Polfliet MMJ, Vloet RPM, et al. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor [J]. *Blood*, 2007, 109 (12) : 5223-5229.
- [31] Polfliet MMJ, Fabrick BO, Daniëls WP, et al. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production [J]. *Immunobiology*, 2006, 211 (6/7/8) : 419-425.
- [32] Calvert JG, Slade DE, Shields SL, et al. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses [J]. *J Virol*, 2007, 81 (14) : 7371-7379.
- [33] Van Gorp H, Van Breedam W, Van Doorselaere J, et al. Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2010, 84 (6) : 3101-3105.
- [34] Ma HF, Jiang LG, Qiao SL, et al. The crystal structure of the fifth scavenger receptor cysteine-rich domain of porcine CD163 reveals an important residue involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. *J Virol*, 2017, 91 (3) : e01897-e01816.
- [35] Wei X, Li R, Qiao SL, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus utilizes viral apoptotic mimicry as an alternative pathway to infect host cells [J]. *J Virol*, 2020, 94 (17) : e00709-e00720.
- [36] Whitworth KM, Rowland RRR, Ewen CL, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34 (1) : 20-22.
- [37] Chen JY, Wang HT, Bai JH, et al. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of *CD163* [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15 (2) : 481-492.
- [38] Burkard C, Opriessnig T, Mileham AJ, et al. Erratum for burkard et Al., “pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection” [J]. *J Virol*, 2020, 94 (15) : e00951-e00920.
- [39] Burkard C, Lillico SG, Reid E, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13 (2) : e1006206.
- [40] Yang H, Zhang J, Zhang X, et al. CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Antiviral Res*, 2018, 151: 63-70.
- [41] Guo CH, Wang M, Zhu ZB, et al. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1846.
- [42] Xu K, Zhou YR, Mu YL, et al. *CD163* and *pAPN* double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance [J]. *eLife*, 2020, 9: e57132.
- [43] 王金玉. STX10 等基因敲除及其对 PRRSV 和 PEDV 增殖抑制作用的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- Wang JY. The knockout of STX10 and other genes and their inhibiting effect on the replication of PRRSV and PEDV [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [44] Xu K, Zhang XL, Liu ZG, et al. A transgene-free method for rapid

and efficient generation of precisely edited pigs without monoclonal selection [J] . Sci China Life Sci, 2022, 65 (8) : 1535-1546.

[45] Jin Q, Liu XY, Zhuang ZP, et al. Doxycycline-dependent Cas9-expressing pig resources for conditional *in vivo* gene nullification and activation [J] . Genome Biol, 2023, 24 (1) : 8.

[46] Prather RS, Wells KD, Whitworth KM, et al. Knockout of maternal CD163 protects fetuses from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J] . Sci Rep, 2017, 7 (1) : 13371.

[47] McCleary S, Strong R, McCarthy RR, et al. Substitution of warthog NF-κB motifs into RELA of domestic pigs is not sufficient to confer resilience to African swine fever virus [J] . Sci Rep, 2020, 10 (1) : 8951.

[48] Xie ZC, Pang DX, Yuan HM, et al. Genetically modified pigs are protected from classical swine fever virus [J] . PLoS Pathog, 2018, 14 (12) : e1007193.

[49] 陆超 . 基于猪 miR-17-92 簇制备抗 CSFV/PEDV 基因修饰猪的研究 [D] . 长春 : 吉林大学 , 2019.

Lu C. Preparation of anti-CSFV/PEDV genetically modified pigs based on porcine miR-17-92 cluster [D] . Changchun: Jilin University, 2019.

[50] 杨昕淳, 吴晓龙, 华进联 . 诱导多能干细胞向巨噬细胞分化研究进展 [J] . 生物工程学报, 2021, 37 (11) : 4001-4014.

Yang XC, Wu XL, Hua JL. Induction and differentiation of induced pluripotent stem cells into macrophages: a review [J] . Chin J Biotechnol, 2021, 37 (11) : 4001-4014.

[51] 岳威, 张炬庆, 吴晓龙, 等 . 携带 CD163 报告载体的猪诱导多能干细胞株的建立 [J] . 生物工程学报, 2023, 39 (1) : 192-203.

Yue W, Zhang JQ, Wu XL, et al. Development of porcine induced pluripotent stem cells with a CD163 reporter system [J] . Chin J Biotechnol, 2023, 39 (1) : 192-203.

[52] 岳威, 张炬庆, 杨昕淳, 等 . 超表达 CD163 的猪诱导性多能干细胞系构建 [J] . 农业生物技术学报, 2022, 30 (10) : 2036-2044.

Yue W, Zhang JQ, Yang XC, et al. Construction of porcine (*Sus scrofa*) induced pluripotent stem cell lines with over-expression of CD163 [J] . J Agric Biotechnol, 2022, 30 (10) : 2036-2044.

(责任编辑 张婷婷)