

miR-424 对非小细胞肺癌细胞株 A549 迁移及侵袭的影响

王 胜,熊 飞,开金丹*

(湖北省肿瘤医院胸外科,武汉 430079)

【摘要】 目的 探讨 miR-424 对非小细胞肺癌细胞株 A549 迁移及侵袭的影响。**方法** RT-PCR 法检测肺癌细胞 NCI-H460、NCI-H1975、NCI-H446、A549、NCI-H1299、NCI-H157 及人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中 miR-424 表达,脂质体 Lipofectamine™2000 将 miR-424 inhibitor 和 miR-424 NC 转入 A549 细胞中,48 h 后,RT-PCR 法检测 miR-424 表达,CCK-8 法检测细胞活力,划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力,western blot 检测基质金属蛋白酶 2(MMP2)、MMP9、转化生长因子-β1(TGF-β1)及 p-Smad3 的表达。**结果** miR-424 在肺癌细胞 NCI-H460、NCI-H1975、NCI-H446、A549、NCI-H1299、NCI-H157 中的 (1.78 ± 0.13) , (1.69 ± 0.10) , (1.89 ± 0.18) , (2.88 ± 0.27) , (2.52 ± 0.20) , (2.49 ± 0.23) 表达量显著高于 miR-424 在人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中的 (0.58 ± 0.05) 表达量 ($P < 0.01$)。与 miR-424 NC 组比较,miR-424 inhibitor 组 miR-424 表达量显著降低 ($P < 0.01$),细胞活力下降 ($P < 0.01$),细胞迁移及侵袭能力降低 ($P < 0.01$),MMP2、MMP9、TGF-β1 及 p-Smad3 表达量均显著下调 ($P < 0.01$)。**结论** miR-424 表达量下调后能通过抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路进而抑制 A549 细胞的迁移及侵袭。

【关键词】 miR-424;非小细胞肺癌;A549;迁移;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0074-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.10.015

Effect of miR-424 on migration and invasion of non-small cell lung cancer cells A549

WANG Sheng, XIONG Fei, KAI Jin-dan*

(Department of Thoracic Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China)

【Abstract】 Objectives To explore the effect of miR-424 on migration and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells. **Methods** Expression of miR-424 in NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H446, A549, NCI-H1299, NCI-H157 lung cancer cells and embryonic lung fibroblasts MRC-5 cells was examined by RT-PCR. miR-424 inhibitor and miR-424 NC were transfected into A549 cells with liposome Lipofectamine™2000. Cell viability was measured by MTT assay. Cell migration and invasion was measured by wound scratch assay and transwell migration assay, respectively. The expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9, transforming growth factor-β (TGF-β1), p-Smad3 was measured by western blot. **Results** The expression of miR-424 in NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H446, A549, NCI-H1299, NCI-H157 cells (1.78 ± 0.13) , (1.69 ± 0.10) , (1.89 ± 0.18) , (2.88 ± 0.27) , (2.52 ± 0.20) , (2.49 ± 0.23) was significantly higher than that in

[作者简介] 王胜(1980-),男,硕士生,主治医师,研究方向:胸部肿瘤的外科及综合治疗。E-mail: 13643651@qq.com

[通讯作者] 开金丹, E-mail: glucosecn@hotmail.com

MRC-5 cell 0.58 ± 0.05 ($P < 0.01$). Compared with the miR-424 NC group, the cell viability was reduced ($P < 0.01$), cell migration and invasion ability was decreased ($P < 0.01$), and the expression of MMP2, MMP9, TGF- β 1, p-Smad3 protein was down-regulated in miR-424 inhibitor group ($P < 0.01$). **Conclusions** miR-424 inhibitor can inhibit the migration and invasion in lung cancer A549 cells via inhibition of TGF- β 1/Smad3 signal pathway.

【Key words】 miR-424; Non-small cell lung cancer; A549; Migration; Invasion

肺癌是一种常见的呼吸道恶性肿瘤,在全世界范围内发病率及死亡率均居首位,且逐年成上升趋势。肺癌包括非小细胞肺癌及(non-small cell lung cancer, NSCLC)小细胞肺癌(SCLC),前者占了将近 85% 的比例。近些年来虽然随着外科手术、化疗、放疗等医学技术手段不断提高,肺癌患者术后 5 年生存率仍不足 5%,预后极差。造成这一结果的主要原因是肺癌的侵袭转移,因此探讨肺癌细胞的侵袭转移机制对于肺癌的治疗将具有重要意义^[1-3]。miRNA 是一种长度约为 21~23 nt 的高度保守的非编码小 RNA 分子,通过靶向调控靶基因 mRNA 表达,参与细胞的增殖、分化、凋亡、迁移及侵袭转移等生命过程^[4,5]。众多研究已经表明 miRNA 在包括肺癌在内的众多肿瘤组织中异常表达,miR-424 是其中一种^[5,6]。miR-424 是 miR-16 家族的一员,研究显示 miR-424 在不同的肿瘤组织中表达趋势不同,在 NSCLC、乳腺癌、肾癌等组织中表达量上调,在宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌中表达量下调^[7,8],但在肿瘤的发生过程中的具体作用机制尚未见报道,因此本研究将探讨 miR-424 在肺癌细胞株中的表达,及其对肺癌细胞迁移及侵袭的影响及相关机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人大细胞肺癌细胞 NCI-H460,人肺腺癌细胞 NCI-H1975,人小细胞肺癌细胞 NCI-H446,人非小细胞肺癌细胞 A549, H1299, NCI-157,人胚肺成纤维细胞 MRC-5 购于中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂和仪器

miR-424 inhibitor 和 miR-424 NC 均购自广州锐博技术有限公司。兔抗人 MMP2、MMP9、TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 多克隆抗体均购自美国 Abcam 公司。胎牛血清和 DMEM 培养基均购自美国 Hyclone 公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、BCA 试剂盒和 CCK-8 试剂盒均购自南京凯基生物技术有限公司。Trizol 法试剂盒、LipofectamineTM2000 脂质体和一步法 RT-PCR 试剂盒均购自大连宝生生物技术有限公司。Transwell

小室购自美国 Corning 公司。DYCZ-425D 型双垂直电泳仪和 DYCZ-40D 型转印电泳仪均购自北京六一仪器厂。GelDoc XR System 凝胶成像系统购自美国伯乐公司。FACSCalibur 型流式细胞仪和 168-1000XC 型酶标仪均购自美国 BD 公司。AF6000 型荧光显微镜购自德国莱卡公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR 法检测 miR-424 在细胞中的表达

使用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,并检测纯度;接着采用一步法 RT-PCR 将 RNA 逆转录为 cDNA 并进行扩增;最后利用琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 扩增产物。miR-424 上游引物:5'-CAGCAGCAAUUC AUGUUUGAA-3',下游引物:5'-CGCTTACGAATTTGCGTGT CAT-3'; GAPDH 上游引物:5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3',下游引物:5'-TGGA CTCCACGACGTACT-3'。上游引物和下游引物由上海生工合成。

1.3.2 细胞转染

当 A549 细胞生长至 50% 左右时,利用 LipofectamineTM2000 脂质体将 miR-424 inhibitor 和 miR-424 NC 转染到 A549 细胞中,6 h 后弃去培养液,换成含 10% 血清的 DMEM 培养基并继续培养 48 h。使用 RT-PCR 法检测细胞中 miR-424 表达。

1.3.3 CCK-8 法检测 A549 细胞活力

将 5×10^3 个 A549 细胞接种至 96 孔板,培养 24 h,按“1.3.2”进行转染,48 h 时每孔中均加入 CCK-8 试剂,继续孵育 4 h,然后利用酶标仪检测波长 570 nm 处的 OD 值,所测 OD 值即为细胞活力。

1.3.4 划痕实验检测细胞迁移能力

取按“1.3.2”进行转染的 A549 细胞接种到 6 孔板,继续培养 24 h 后,用 200 μ L 的枪头对 6 孔板内的细胞进行划痕,接着用 PBS 洗去脱落下来的细胞,继续培养 24 h,于倒置显微镜下进行拍照并每孔选取 4 个视野进行划痕距离的记录。

1.3.5 Transwell 法检测细胞侵袭能力

实验前将 Matrigel 胶均匀的平铺于 Transwell 小室微膜上,备用。将 1×10^4 个 A549 细胞接种于 6 孔板后,按“1.3.2”进行转染,继续培养 48 h 后,用

胰蛋白酶将细胞消化下来并制成单悬液,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬,并接种至 Transwell 上室,下室仅加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,48 h 后,将 Transwell 小室取出,用多聚甲醛固定细胞,接着结晶紫染色,并在倒置显微镜下进行观察,对 Transwell 下室 5 个视野中的细胞计数取平均值,即为细胞的侵袭数目。

1.3.6 Western blot 检测细胞 MMP2、MMP9、TGF- β 1、Smad3、p-Smad3 中表达

将 1×10^5 个细胞接种至 6 孔板,按“1.3.2”操作步骤进行转染,培养 48 h,在冰浴条件下将 6 孔板中的细胞刮取并离心收集,向其中加入细胞裂解液,30 min 后离心收取上清液即为总蛋白,总蛋白浓度测定及定量根据 BCA 试剂盒说明书进行,接着将蛋白煮沸变性,取大约 30 ng 左右蛋白样品上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳 2 h;接着湿法转膜 30 ~ 50 min。2% BSA 室温下孵育 1 h,一抗溶液(兔 MMP2、MMP9、TGF- β 1、Smad3、p-Smad3 多克隆抗体,稀释度为 1:100) 4℃ 过夜孵育。第二天在室温条件下,在二抗溶液(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)) 中孵育 1 ~ 2 h,凝胶成像系统中曝光。

1.4 统计学方法

所有数据均用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验分析两组之间数据差异性,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 miR-424 在肺癌细胞及胚肺成纤维细胞中的表达

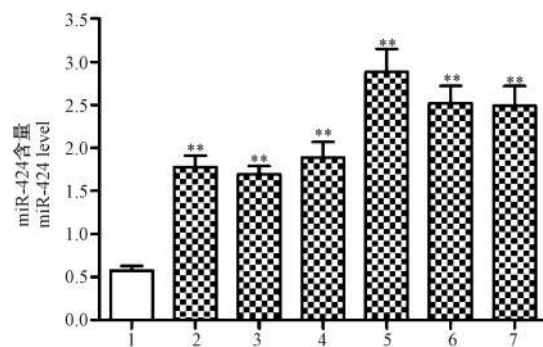
如图 1 所示,miR-424 在肺癌细胞 NCI-H460、NCI-H1975、NCI-H446、A549、NCI-H1299、NCI-H157 中[(1.78 $\pm$ 0.13)、(1.69 $\pm$ 0.10)、(1.89 $\pm$ 0.18)、(2.88 $\pm$ 0.27)、(2.52 $\pm$ 0.20)、(2.49 $\pm$ 0.23)]的表达量显著高于 miR-424 在人胚肺成纤维细胞 MRC-5 (0.58 $\pm$ 0.05) 中的表达量,差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.2 miR-424 inhibitor 转染效果的检测

如图 2 所示,与 miR-424 NC 组(2.89 $\pm$ 0.28) 比较,miR-424 inhibitor 组(0.74 $\pm$ 0.07) 中 miR-424 表达量下降 ($P < 0.01$)。

2.3 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞活力的影响

与 miR-424 NC 组(0.72 $\pm$ 0.07) 比较,miR-424

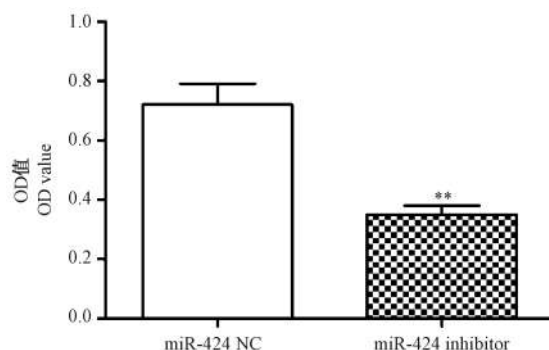


注:1: MRC-5; 2: NCI-H460; 3: NCI-H1975; 4: NCI-H446; 5: A549; 6: NCI-H1299; 7: NCI-H157; 与 MRC-5 比较, ** $P < 0.01$; miR-214 表达量即是 miR-214 的拷贝数。

图 1 miR-424 在肺癌细胞及胚肺成纤维细胞中的表达

Note. 1: MRC-5 cells; 2: NCI-H460 cells; 3: NCI-H1975 cells; 4: NCI-H446 cells; 5: A549 cells; 6: NCI-H1299 cells; 7: NCI-H157 cells; Compared with MRC-5, ** $P < 0.01$; The expression of miR-214 is miR-214 copy number.

Fig. 1 Expression of miR-424 in the lung cancer cells and embryonic lung fibroblasts



注:与 miR-424 NC 比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 miR-424 inhibitor 转染效果的检测

Note. Compared with the miR-424 NC, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Detection of transfection efficiency of miR-424 inhibitor

inhibitor 组(0.35 $\pm$ 0.03) 细胞活力均降低 ($P < 0.01$)。

2.4 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞迁移及侵袭能力的影响

如图 3 所示,与 miR-424 NC 组(25.34 $\pm$ 2.35) 比较,miR-424 inhibitor 组(4.78 $\pm$ 0.45) 细胞迁移距离降低 ($P < 0.01$)。如图 4 所示,与 miR-424 NC 组(156.49 $\pm$ 14.55) 比较,miR-424 inhibitor 组(39.76 $\pm$ 3.28) 细胞侵袭数目降低 ($P < 0.01$)。

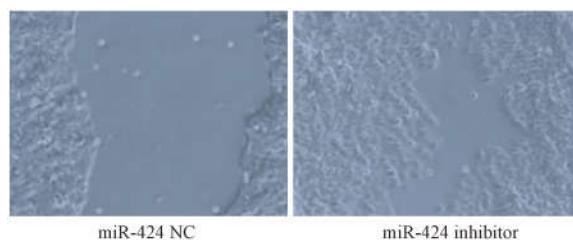


图 3 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞迁移能力的影响($\times 200$)

Fig. 3 Effect of miR-424 inhibitor on A549 cell migration ability

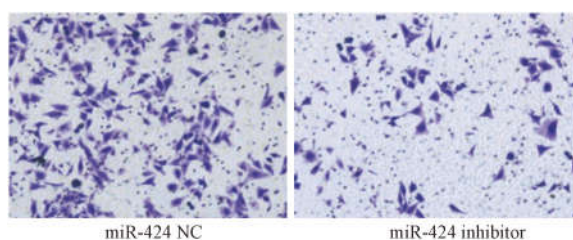


图 4 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞侵袭能力的影响($\times 200$)

Fig. 4 Effect of miR-424 inhibitor on A549 cell invasion ability

2.5 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 MMPs 表达量的影响

如图 5 所示,与 miR-424 NC 组比较,miR-424 inhibitor 组中 MMP2、MMP9 表达量显著下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.6 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 TGF- β 信号通路的影响

如图 6 所示,与 miR-424 NC 组比较,miR-424 inhibitor 组中 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3 表达量显著下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

3 讨论

相关学者于 1993 年在秀丽隐杆线虫中首次发现了 miRNA 的存在,即 lin-4;于 2000 年在秀丽隐杆线虫中又发现了第二个 miRNA,即 let-7。后续的十几年来在脊椎动物、植物及病毒中发现了近千种的 miRNA,并发现了 miRNA 不仅与生长发育、免疫调控有关,还发现 miRNA 所定位的基因组处于肿瘤相关的脆性区,提示了 miRNA 与肿瘤的发生可能密切相关^[4, 5]。相关学者于 2002 年证实了 miRNA 和肿瘤的关系,慢性淋巴细胞白血病患者中 miR-15 和 miR-16 表达量下调,并且这两个 miRNA 与白血病

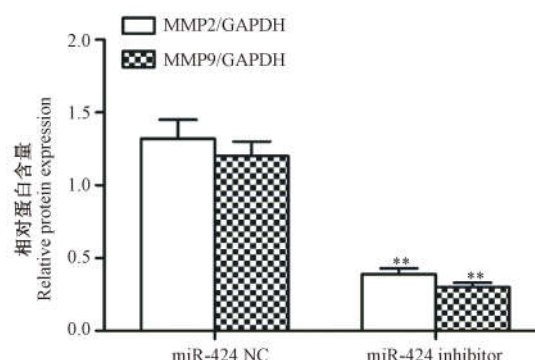
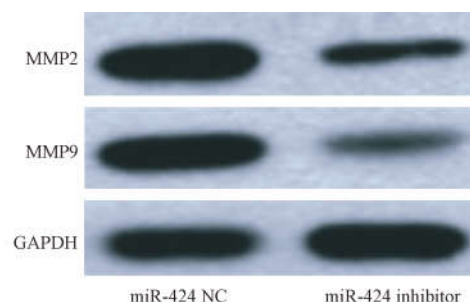


图 5 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 MMPs 表达量的影响

Fig. 5 Effect of miR-424 inhibitor on the expression of MMPs in A549 cells

的发生发展密切相关,引发了探讨 miRNA 在肿瘤发生过程中的作用的相关研究^[5, 6]。miR-15/16 家族包括了 miR-15a/b, miR-16, miR-195, miR-424 和 miR-497。其中 miR-424 定位于人类染色体 Xq26.3 上,但在鼠类中的同源物为 miR-322。研究显示 miR-424 在不同的生理和病理条件下其作用效果不一样。如 miR-424 在 NSCLC、乳腺癌、肾癌等组织中表达量上调,在宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌中表达量下调,但具体的作用机制尚未见报道^[7, 8]。因此本研究将探讨 miR-424 在肺癌中的作用机制。首先 Chen 等^[9]研究发现 miR-424 在肺癌患者病灶组织及肺癌细胞系中的表达量均显著提高。Donnem 等^[10]研究发现生存时间短的 NSCLC 患者中 miR-424 表达量显著的高于生存时间长的 NSCLC 患者,且这一过程可能与 miR-424 促血管生成有关。所以本研究首先利用 RT-PCR 法检测肺癌细胞 NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H446, A549, NCI-H1299, NCI-H157 及人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中 miR-424 的表达量,结果与 Chen 等^[9],Donnem 等^[10]研究一致,肺癌细胞中 miR-424 的表达量显著高于 MRC-5 细胞中的表达量,提示 miR-424 在肺癌的发生发展中起促进作用。同时 miR-424 在 A549 中的表达量

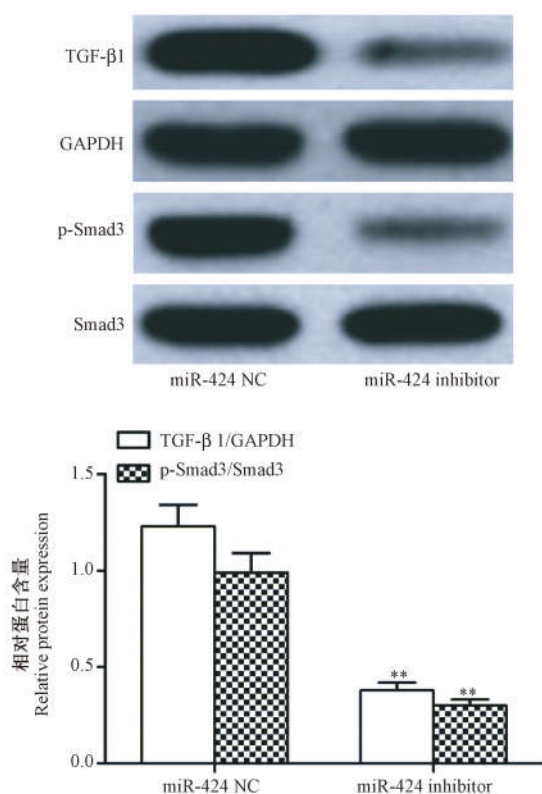


图6 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 TGF-β 信号通路的影响

Fig. 6 Effect of miR-424 inhibitor on TGF-β signal pathway in A549 cells

最高,所以本研究选取此细胞株作为后续研究对象。接着利用脂质体转染 miR-424 inhibitor 和 miR-424 NC, RT-PCR 法证明转染成功。进一步 CCK-8 法检测 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞活力的影响,结果表明 miR-424 inhibitor 能显著的降低 A549 活力,与 miR-424 在胃癌细胞中的作用一致^[11]。

研究已经显示肺癌细胞的侵袭转移是导致肺癌患者预后不良,5 年生存率低的主要原因^[1-3]。因此本研究进一步的探讨 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞迁移及侵袭能力的影响,结果表明 miR-424 inhibitor 能显著的抑制 A549 的迁移及侵袭能力。weel, Chk1, CYLD, Wn3a, BCL-2, E2F6 蛋白是目前已报道的 miR-424 的靶基因,但上述蛋白主要与细胞增殖、凋亡、细胞周期有关的,而与细胞的迁移及侵袭关系不大^[7, 8]。另外细胞外基质的降解是细胞迁移,侵袭及转移等过程中的必经过程, MMPs 是降解细胞外基质最为主要的蛋白水解酶。同时 MMPs 也是一组 Zn^{2+} - Ca^{2+} 依赖性蛋白酶,可以降解几乎所有的 ECM 成分。其中 MMP2 可以通过降解细胞外基质成分和诱导血管新生进而促进肿瘤细胞浸

润^[12]。MMP9 是 MMPs 中分子量最大的蛋白水解酶,几乎也能降解所有的细胞外基质成分,提高肿瘤细胞的运动能力^[13]。所以本研究进一步的探讨 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞迁移及侵袭的影响,结果表明 miR-424 inhibitor 能显著的下调 MMP2 及 MMP9 表达量,提示 miR-155 inhibitor 能通过下调 MMPs 进而抑制 A549 细胞的迁移及转移。

肿瘤细胞的迁移、侵袭等生物学过程受多种信号通路调控, TGF-β 就是其中一种^[14, 15]。TGF-β 包括 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3, 其中 TGF-β1 研究最为广泛。而 TGF-β1/Smad 信号通路也是 TGF-β1 介导的最为主要的信号通路, TGF-β1 与其下游受体 Smad2/3 结合后, 将信号传递到细胞核, 进而调控靶基因的转录。且有研究表明 miR-424 能通过抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路进而抑制胃癌细胞的增殖, 迁移等生物学行为^[11], 提示 miR-424 可能也可以通过调控 TGF-β1/Smad3 信号通路进而抑制 A549 细胞的迁移及侵袭。所以本研究继续探讨 miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 TGF-β1/Smad3 信号通路的影响, 结果表明 miR-424 inhibitor 能显著的下调 TGF-β1、p-Smad3 表达, 进而抑制 A549 细胞的迁移及侵袭。

综上所述, miR-424 在肺癌细胞中的表达量高于人胚肺成纤维细胞中的表达量, miR-424 inhibitor 能显著的抑制 A549 细胞的迁移及侵袭, 并下调 MMP2 及 MMP9 表达, 与抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Baker S, Dahele M, Lagerwaard FJ, et al. A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer[J]. Radiat Oncol, 2016, 11(1):115.
- [2] Paleiron N, Bylicki O, Andre M, et al. Targeted therapy for localized non-small-cell lung cancer: a review[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9:4099-4104.
- [3] Counago F, Rodriguez A, Calvo P, et al. Targeted therapy combined with radiotherapy in non-small-cell lung cancer: a review of the Oncologic Group for the Study of Lung Cancer (Spanish Radiation Oncology Society) [J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(1):31-43.
- [4] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation[J]. Genom Proteom Bioinform, 2009, 7(4):147-154.
- [5] Gambari R, Brognara E, Spandidos D A, et al. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in

- oncology (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(1):5-32.
- [6] 许文剑, 苏秀兰, 刘明. miRNA 与肿瘤关系的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(17):3120-3123.
- [7] 刘萍, 赵海苹, 罗玉敏. MicroRNA-424 在肿瘤发生中的作用和机制研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(5):529-534.
- [8] 赵海苹, 刘萍, 罗玉敏. MicroRNA-424 参与多种疾病发生发展的分子机制研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(9):76-82.
- [9] Chen B, Duan L, Yin G, et al. Simultaneously expressed miR-424 and miR-381 synergistically suppress the proliferation and survival of renal cancer cells—Cdc2 activity is up-regulated by targeting WEE1[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68(6):825-833.
- [10] Donnem T, Fenton CG, Lonvik K, et al. MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e29671.
- [11] Wei S, Li Q, Li Z, et al. miR-424-5p promotes proliferation of gastric cancer by targeting Smad3 through TGF-beta signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016.
- [12] Eklote A V, Danda S, Zankl A, et al. Patient with mutation in the matrix metalloproteinase 2 (MMP2) gene - a case report and review of the literature[J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2014, 6(1):40-46.
- [13] Gong L, Wu D, Zou J, et al. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14):18458-18468.
- [14] Sun N, Taguchi A, Hanash S. Switching roles of TGF-beta in cancer development: implications for therapeutic target and biomarker studies[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(12).
- [15] Barrett CS, Millena AC, Khan SA. TGF-beta effects on prostate cancer cell migration and invasion require FosB[J]. *Prostate*, 2017, 77(1):72-81.

[收稿日期] 2017-02-14

(上接第 73 页)

参考文献:

- [1] Wakeman DR, Crain AM, Snyder EY. Large animal models are critical for rationally advancing regenerative therapies[J]. *Regen Med*, 2006, 1:405-413.
- [2] Pan J, Min F, Wang X, et al. Establishment of a special pathogen free Chinese Wuzhishan minipigs colony[J]. *J Anim Sci Technol*, 2015, 57:7.
- [3] DB11/T 828.1-2011, 实验用小型猪第 1 部分:微生物学等级及监测[S].
- [4] DB11/T 828.2-2011, 实验用小型猪第 2 部分:寄生虫学等级及监测[S].
- [5] DB31/T 240-2001, 实验动物实验用小型猪[S].
- [6] DB45/T 546-2008, 实验动物小型猪[S].
- [7] 胡燕, 杨欣艳, 王传彬, 等. 我国实验用小型猪三个种群微生物感染状况调查[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(10):599-602.
- [8] 田维毅, 钱宁, 王平, 等. 贵州小型猪病原生物携带和感染状况的调查[J]. *实验动物科学*, 2007, 24(6):86-88.
- [9] 杨欣艳, 胡燕, 王传彬, 等. 国内不同地区实验用小型猪种群微生物感染状况调查[J]. *实验动物科学*, 2007, 24(1):21-24.
- [10] 王峰, 孙瑞萍, 刘涛, 等. 海南封闭群五指山小型猪病原微生物携带状况调查[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(7):200-201.
- [11] 2016 年国家动物疫病强制免疫计划[E]. 农医发[2016]10 号.
- [12] 孙倩. 实验动物学基础[M]. 北京:北京科学技术出版社. 2005:97-129.
- [13] 万庆文, 谢王韵, 温贤诚, 等. 广东东莞地区猪肺炎支原体感染的血清学调查[J]. *广东畜牧兽医科技*. 2014, 39(3):22-23.
- [14] 潘金春, 任柏桦, 闵凡贵, 等. 不同品系小型猪对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的敏感性筛选[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(6):14-17.

[收稿日期] 2017-03-21