

## 塞尼卡病毒 A VP1 基因遗传进化分析

杨彩娟<sup>1</sup>, 温肖会<sup>2</sup>, 任裕其<sup>1</sup>, 冼望强<sup>1</sup>, 刘暖华<sup>1</sup>, 谢乐新<sup>1\*</sup>

(1. 广东省动物防疫物资储备中心, 广东广州 510520; 2. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东广州 510640)

**摘要** [目的]研究塞尼卡病毒 A VP1 基因的遗传变异情况。[方法]通过 RT-PCR 方法从广东省 2 个猪场的病料中扩增出塞尼卡病毒 A 阳性样品, 并对其 VP1 基因进行了基因组扩增和序列分析。[结果]2 个塞尼卡病毒 A VP1 基因与 GenBank 公布的巴西、美国、中国等毒株的同源性为 92% ~ 99%, 与 2002 年美国分离株 SVV-001 的同源性分别为 92.8% 和 92.7%, 与我国分离株 CH-02-2015、CH-03-2015、CH-04-2015 的同源性最高达 99.1%。通过序列分析发现, 毒株 VP1 基因组存在散在突变点, 表明毒株可能存在一定程度的变异。[结论]研究结果可为我国塞尼卡病毒 A 的深入研究和猪水疱样症状病的鉴别诊断提供参考。

**关键词** 塞尼卡病毒 A; PCR 鉴定; VP1; 遗传变异分析**中图分类号** S855.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)26-0106-03**Phylogenetic Analysis of VP1 Gene of Senecavirus A**

**YANG Cai-juan<sup>1</sup>, WEN Xiao-hui<sup>2</sup>, REN Yu-qi<sup>1</sup>, XIE Le-xin<sup>1\*</sup> et al** (1. The Supplies Reserve Center for Animal Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510520; 2. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640)

**Abstract** [Objective] To study the genetic variation of senecavirus A VP1 gene. [Method] The positive samples of SVV in swine with vesicular symptom from two farms of Guangdong were amplified by RT-PCR method. The sequencing and phylogenetic analysis was made on Senecavirus A VP1. [Result] The homology between VP1 gene of these two strains and Brazil, USA and Chinese historical isolates on GenBank was 92% - 99%. The homology between VP1 of these two strains and USA isolate SVV-001 in 2002 were 92.8% and 92.7% respectively. The highest homology of SVA VP1 gene with Chinese isolates CH-02-2015, CH-03-2015 and CH-04-2015 reached 99.1%. Sequencing analysis results showed that the VP1 gene existed scatter point, which suggested that the virus had evolved. [Conclusion] The research results can provide references for further study and differential diagnosis of SVA.

**Key words** Senecavirus A; PCR identification; VP1; Genetic variation analysis

塞尼卡病毒 A (Senecavirus A, SVA), 曾被称为塞尼卡谷病毒 (Seneca Valley virus, SVV), 是无囊膜的单股正链 RNA 病毒, 是小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 塞尼卡病毒属 (Senecavirus) 的唯一成员, 与心肌炎病毒属遗传关系最近, 可引起猪出现水疱性变化和新生仔猪死亡, 成年猪感染通常呈亚临床症状, 引起繁殖母猪和公猪鼻吻和冠状带、蹄部出现水疱样病变, 偶见腹泻症状。1~3 日龄新生仔猪病死率可达 30%~70%<sup>[1]</sup>。2014 年秋, 巴西报道出现大量仔猪断奶前发病, 1~4 日龄仔猪病死率达 30%~70%, 送检病料排除了其他水疱性病毒病和细菌病, SVV 核酸阳性。截至 2015 年 9 月底, 美国已有 11 个州确诊猪只发生 SVV 感染<sup>[2]</sup>, 而加拿大、意大利和巴西出现疑似 SVV 感染病例<sup>[2]</sup>。我国关于该病的首次报道是在 2015 年, 并命名为 CH-01-2015, 该病毒与其他 8 株分离自加拿大、巴西和美国的 SVA 同源性高达 94.4%~97.1%<sup>[3]</sup>。尽管该病自身造成的损失有限, 但由于该病与口蹄疫 (FMD)、猪水疱病 (SVD)、猪水疱疹 (VES) 及水疱性口炎 (VS) 极为相似, 临床上很难区分。因此, 应加强该病与上述疾病的鉴别诊断。SVA 基因组全长约 7.2 kb, 编码 4 个结构蛋白 (VP1~4) 和 7 个非结构蛋白 (2A~C, 3A~D); 4 个结构蛋白的长度分别由 265、286、241、74 个残基组成<sup>[4]</sup>。其中, VP1 被公认为是小 RNA 病毒科免疫原性最强的蛋白<sup>[5]</sup>。笔者对实验室保存的有水疱样症状但口蹄疫、猪

水疱病、猪水疱疹及水疱性口炎等 4 种病原检测结果呈阴性的病料样品进行了 SVA 核酸检测, 并对检测到的 2 份阳性样品进行了 SVA VP1 基因扩增和分析, 研究广东省猪场 SVA VP1 遗传演化情况, 旨在为猪场水疱样症状病的综合防控提供试验依据。

**1 材料与方法**

**1.1 病料样品** 临床病料样品为 2016 年下半年广东省茂名、博罗地区提供的口蹄疫、猪水疱病、猪水疱疹及水疱性口炎鉴定结果呈阴性的病猪内脏、水疱拭子等病料。

**1.2 主要试剂** pMD18-T 载体、病毒基因组 RNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、DL2000 DNA Marker, 均购自大连 TaKaRa 公司; 小量质粒抽提试剂盒为 U-gene 公司产品。

**1.3 VP1 基因扩增引物** 根据 GenBank 中收录的 SVV-001 (DQ641257) 的基因组序列的 VP1 基因保守区设计 PCR 鉴定引物 P1、P2, 扩增目的片段为 429 bp。根据 GenBank 中收录的 SVV-001 (DQ641257) 的基因组序列 VP1 基因, 设计 SVA VP1 全基因序列扩增引物, 分别位于 VP3 和 2A 区域<sup>[6]</sup>, 扩增目的片段大小为 983 bp, 由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

SVA PCR 扩增引物序列为: P1 为 5' - GTTCCACTC-CACCGACAA - 3', P2 为 5' - AAACCACCCTACAGCAAAT - 3'。SVA VP1 全基因序列扩增引物序列为: SVA-1C556F 为 5' - TCGGTTTACTCCGCTGATGGTTGG - 3', SVA-2A22R 为 5' - AGGACCAGGATTGGTCTCGATATC - 3'。

**1.4 病毒 RT-PCR 扩增及鉴定** 用病毒基因组 RNA 提取试剂盒从保存的水疱液中提取病毒基因组 RNA。以基因组

**基金项目** 广东省技术交易体系与科技服务网络建设领域项目 (2016A040401012, 2015A030401067, 2014B040404061)。

**作者简介** 杨彩娟 (1983—), 女, 河南三门峡人, 兽医师, 硕士, 从事动物传染病的诊断与防治工作。\* 通讯作者, 高级兽医师, 硕士, 从事重大动物疫病的防控与质量评价工作。

**收稿日期** 2017-06-30

RNA 为模板,以 P1、P2 为引物,进行目的片段的扩增。RT-PCR 扩增过程(一步法):25  $\mu$ L 的反应体系中,PrimeScript One Step Enzyme Mix 1  $\mu$ L,2  $\times$  One Step Buffer 12.5  $\mu$ L,上、下游引物各 0.5  $\mu$ L,Template RNA 2  $\mu$ L,加 RNase Free dH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。PCR 反应程序如下:50  $^{\circ}$ C 反转录 30 min,94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,52.5  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共循环 35 次;72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。同时,采用 RT-PCR 方法检测 FMDV、猪水疱病病毒(SVDV)、水疱性口炎病毒(VSV)、猪水疱疹病毒(VESV)、猪 2 型圆环病毒(PCV2)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪蓝耳病病毒(PRRSV)和猪轮状病毒,并设置阴性对照。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。将经胶回收纯化的 PCR 产物克隆至 pMD19-T 中,重组质粒由英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

**1.5 VP1 基因的 PCR 扩增与克隆鉴定** 用病毒基因组 RNA 提取试剂盒从保存的水疱液中提取病毒基因组 RNA。以基因组 RNA 为模板,以 SVV-1C556F、SVV-2A22R 为引物<sup>[6]</sup>,进行目的片段的扩增。RT-PCR 反应体系(25  $\mu$ L): PrimeScript One Step Enzyme Mix 1  $\mu$ L,2  $\times$  One Step Buffer 12.5  $\mu$ L,上、下游引物各 0.5  $\mu$ L,Template RNA 2  $\mu$ L,补 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。PCR 反应程序如下:50  $^{\circ}$ C 反转录 30 min,94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,55  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,共循环 35 次;72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。将经胶回收纯化的 PCR 产物克隆至 pMD19-T 中,重组质粒由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成测序。

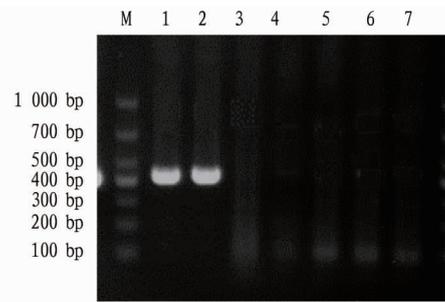
**1.6 基因序列遗传进化分析** 应用 NCBI 网站的 BLAST、生物学分析 DNASTar、ClustalX 2 和 MEGA 6.0 软件对扩增的核苷酸序列与 GenBank 中登录的 SVA 的 VP1 基因序列进行同源性比对,绘制系统进化树,并将所测序列登录至 GenBank 数据库。

## 2 结果与分析

**2.1 SVA 的 RT-PCR 扩增鉴定结果** 被检测的 2 份样本(L1、Q3)中均扩增显示阳性。扩增的目的片段大小约为 430 bp,与预期大小相符,而其他猪病病毒及阴性对照扩增结果均为阴性(图 1)。测序结果显示,L1 与我国分离到的毒株 SVA CH-02-2015(KX173339)、SVA CH-03-2015(KX17338)、SVA CH-04-2015(KX173340)相似性高,相似性在 98% 以上。因此,初步认定所扩增到的产物为 SVA。

**2.2 SVA VP1 基因的 RT-PCR 扩增鉴定结果** 从 2 份待检样品中提取 RNA,利用 SVV-1C556F/SVV-2A22R 引物进行 RT-PCR 检测,经扩增得到大小为 983 bp 的片段,与预期大小相符(图 2)。通过测序获得 2 个样本的 SVV VP1 基因序列,分别命名为 SVA CH-GDBL-2016 和 SVA CH-GDZJ-2016,并将其上传到 GenBank(登录号分别为 MF077351、MF077352)。

**2.3 VP1 基因同源性及遗传进化分析** VP1 基因序列比对结果(图 3)表明,CH-GDZJ-2016、CH-GDBL-2016 的 VP1 基因与 2002 年美国分离株的 SVV-001 相比,同源性分



注:M. DNA Marker DL1000;1. L1 样品 SVA RT-PCR 扩增产物;2. Q3 样品 SVA RT-PCR 扩增产物;3. 口蹄疫;4. 猪水疱疹;5. 猪水疱病;6. 水疱性口炎;7. 阴性对照

Note:M. DNA Marker DL1000;1. PCR product of L1;2. PCR product of Q3;3. FMDV;4. VESV;5. SVDV;6. VSV;7. Negative control

图 1 RT-PCR 检测组织样品中的 SVA

Fig. 1 RT-PCR detection of SVA in samples



注:M. DNA Marker DL1000;1. L1 SVA VP1 基因扩增产物;2. Q3 SVA VP1 基因扩增产物;3. 阴性对照

Note:M. DNA Marker DL1000;1. PCR product of L1 SVA VP1;2. PCR product of Q3 SVA VP1;3. Negative control

图 2 SVA VP1 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 RT-PCR amplification results of SVA VP1 gene

别为 92.8% 和 92.7%;CH-GDZJ-2016 的 VP1 基因与美国 2015 年的分离株 USA/IA46008/2015/Passage 1、SVVA/USA/IA40381/2015\_P1 和 SVVA/USA. IA40380/2015\_P1 的同源性分别为 96.3%、96.7% 和 96.7%,CH-GDBL-2016 与上述 3 个美国分离株的同源性分别为 96.8%、97.3% 和 97.3%;CH-GDZJ-2016、CH-GDBL-2016 的 VP1 基因与我国 2015 年的分离株 CH-01-2015 相比,同源性为 95.8% 和 95.9%;与 CH-02-2015、CH-03-2015、CH-04-2015 的同源性均在 98% 以上。CH-GDZJ-2016 与巴西分离株 BRA/UEL-SenV-B4/15 VP1、BRA/UEL-SVV-A1/15 VP1、BRA/UEL-SVV-B2/15 VP1 和 SVVA/BRA/UEL/SenV-E10/15 VP1 的同源性分别为 96.5%、96.5%、96.9% 和 96.7%,CH-GDBL-2016 与以上 4 个巴西分离株的同源性分别为 97.0%、97.0%、97.4% 和 97.2%。

从图 4 可以看出,试验中鉴定的 2 个毒株与我国 2015 年分离的毒株 CH-02-2015、CH-03-2015、CH-04-2015 在一个小分支上,而与 CH-01-2015 属于不同的小分支,与美国 2008 年的分离株 SVV-001 存在较大差异。

## 3 讨论与结论

SVA 最初分离自细胞培养基<sup>[7]</sup>。2002 年,由美国基因

		Percent Identity																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Divergence	1	■	89.2	97.0	97.0	97.4	96.8	98.0	98.0	97.9	96.3	96.8	96.7	96.0	93.9	96.0	97.2	97.8	99.0	96.8	98.9	1
	2	12.0	■	89.5	89.5	89.8	90.5	90.2	90.2	89.7	90.0	90.4	90.2	88.5	95.7	90.9	89.6	89.9	89.4	89.9	89.4	2
	3	3.0	11.7	■	100.0	99.6	97.4	97.4	97.4	96.9	96.5	97.2	97.0	98.9	92.8	98.2	99.4	97.0	97.0	97.0	97.0	3
	4	3.0	11.7	0.0	■	99.6	97.4	97.4	97.4	96.9	96.5	97.2	97.0	98.9	92.8	98.2	99.4	97.0	97.0	97.0	97.0	4
	5	2.7	11.3	0.4	0.4	■	97.8	97.8	97.8	97.2	96.9	97.6	97.4	99.3	93.2	98.5	99.8	97.4	97.4	97.4	97.4	5
	6	3.3	10.5	2.7	2.6	2.3	■	97.6	97.6	97.6	95.8	99.6	99.3	96.6	94.4	96.7	97.6	97.4	96.8	95.9	96.8	6
	7	2.0	10.8	2.7	2.7	2.3	2.5	■	99.9	99.8	98.6	97.5	97.2	97.2	94.4	96.6	97.6	99.5	98.0	99.1	98.0	7
	8	2.0	10.8	2.7	2.7	2.3	2.5	0.1	■	99.8	98.6	97.5	97.2	97.2	94.3	96.7	97.6	99.5	98.0	99.1	98.0	8
	9	2.2	11.4	3.2	3.2	2.9	2.5	0.2	0.2	■	98.2	97.5	97.2	96.8	94.2	96.5	97.0	99.3	97.9	98.7	97.9	9
	10	3.8	11.1	3.6	3.6	3.2	4.3	1.4	1.4	1.9	■	95.7	95.5	96.8	92.8	95.4	96.7	98.6	96.7	99.3	96.7	10
	11	3.3	10.6	2.8	2.8	2.5	0.4	2.6	2.5	2.5	4.4	■	99.2	96.4	94.4	96.6	97.4	97.4	96.8	95.8	96.8	11
	12	3.4	10.8	3.0	3.0	2.6	0.7	2.9	2.9	2.9	4.7	0.8	■	96.6	94.3	96.5	97.2	97.1	96.8	95.6	96.8	12
	13	4.1	12.9	1.1	1.1	0.7	3.5	2.9	2.9	3.3	3.3	3.7	3.5	■	91.7	95.5	99.3	96.8	96.8	96.8	96.8	13
	14	6.5	4.5	7.7	7.7	7.3	5.9	6.0	6.0	6.1	7.7	6.0	6.0	9.0	■	95.1	93.0	94.2	94.0	92.7	94.0	14
	15	4.2	9.9	1.9	1.9	1.5	3.4	3.4	3.4	3.6	4.8	3.5	3.6	4.7	5.1	■	98.3	96.4	96.1	95.9	96.1	15
	16	2.8	11.5	0.6	0.6	0.2	2.5	2.5	2.5	3.0	3.4	2.6	2.8	0.7	7.5	1.7	■	97.2	97.2	97.2	97.2	16
	17	2.2	11.2	3.0	3.0	2.7	2.7	0.5	0.6	0.7	1.4	2.7	3.0	3.3	6.1	3.6	2.8	■	97.8	99.1	97.8	17
	18	1.0	11.8	3.0	3.0	2.7	3.2	2.0	2.0	2.1	3.4	3.3	3.3	3.3	6.3	4.0	2.8	2.2	■	97.3	99.9	18
	19	3.2	11.2	3.0	3.0	2.7	4.2	0.9	0.9	1.3	0.7	4.3	4.6	3.3	7.8	4.2	2.8	0.9	2.8	■	97.3	19
	20	1.1	11.8	3.0	3.0	2.7	3.3	2.0	2.0	2.2	3.4	3.3	3.3	3.3	6.4	4.1	2.8	2.3	0.0	2.8	■	20

图3 SVA VP1 基因核苷酸序列相似性分析

Fig. 3 Homology analysis of the SVA VP1 gene according to nucleotide sequence

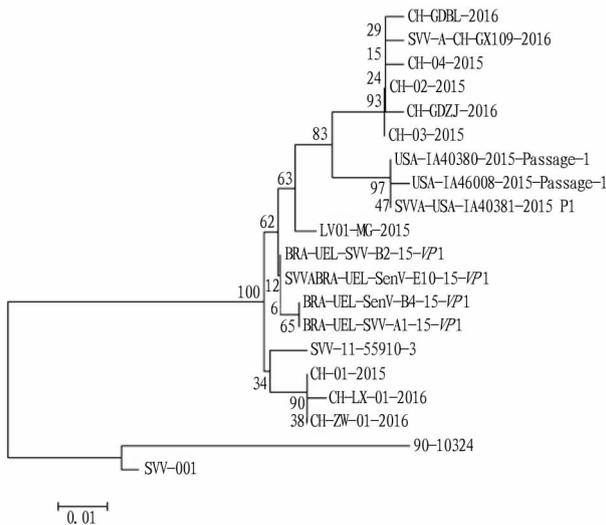


图4 SVA 的 VP1 基因分子进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis based on VP1 genomic sequences of SVA

治疗公司在使用 PER. C6 细胞 (转化的胎儿视网膜细胞) 培养腺病毒-5 (Ad5) 病毒载体时分离到塞尼卡病毒-001 (SVV-001)<sup>[8]</sup>。此后的十多年内,美国兽医服务实验室 (NVSL) 从不同州的猪样品中分离到 12 株与 SVV-001 相似的病毒株<sup>[9]</sup>。目前,全世界范围内多个国家已经有关于该病的报道。2015 年,我国首次报道有该病的发生。2016 年,在广东省湛江、惠州地区一些猪场相继发生水疱性疾病,感染猪临床表现为跛行,嗜睡,鼻吻、口腔黏膜出现水疱,冠状带和蹄壁周围发红,出现溃疡性病变,短暂时发热,传播速度快,但未出现死亡病例,发病时间持续 1~2 周,经检测排除口蹄疫、猪水疱病、猪水疱疹、水疱性口炎等疾病。从病料中扩增出 SVA 病毒核酸阳性,经测序证实为 SVA。

爱荷华州立大学兽医诊断实验室将 SVA 毒株 VP1 和全基因组测序发现,所有的新分离毒株间的同源性高达为 99%~100%,但与早期 SVA (1988—2001 年) 序列差异显著。美国 SVA 毒株与巴西 SVA 毒株的同源性为 97%~98%。

进化树分析表明,近 30 年来 SVA 已发生变异,致病性增强<sup>[10]</sup>。该试验中的 2 个毒株与 2015 年我国分离的 CH-01-2015 同源性较高,从进化树来看属于不同的小分支。它们与美国、巴西分离株在 VP1 基因上也都存在明显差异。这些变异是否会致毒株致病性增强,还有待进一步研究。

SVA 病毒大量存在于鼻吻、蹄冠等部位的水疱中,且在血清、粪便中也可检出该病毒,说明 SVA 病毒是一种泛嗜性病毒,可造成多系统性疾病<sup>[11]</sup>。虽然 SVA 不是一种新的病毒,但是短时间内可以引起大量的猪发生水疱性疾病是从未发生过的。是否与 SVA 的致病性增强有关,应该引起足够重视。应加强对该病的致病机理、病原学特点、鉴别诊断和预防控制方法的进一步研究和探讨。

#### 参考文献

- [1] VANNUCCI F A, LINHARES D, BARCELLOS D E S N, et al. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 589-593.
- [2] SINGH K, CORNER S, CLARK S G, et al. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease [J]. *Vet Sci Technol*, 2012, 3(6): 1-3.
- [3] WU Q W, ZHAO X Y, CHEN Y S, et al. Complete genome sequence of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China [J]. *Genome Announc*, 2016, 4(1): 1509-1515.
- [4] VENKATARAMAN S, REDDY S P, LOO J, et al. Structure of Seneca Valley virus-001: An oncolytic picornavirus representing a new genus [J]. *Structure*, 2008, 16(10): 1555-1561.
- [5] GIMENEZ - LIROLA L G, RADEMACHER C, LINHARES D, et al. Serological and molecular detection of Senecavirus associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(8): 2082-2089.
- [6] KNOWLES N J, HALES L M, JONES B H, et al. Epidemiology of Seneca Valley virus: Identification and characterization of isolates from pigs in the United States [EB/OL]. (2016-04-10) [2017-05-04]. [http://www.europec.org.uk/Europic2006/posters/Knowles\\_svv\\_01.pdf](http://www.europec.org.uk/Europic2006/posters/Knowles_svv_01.pdf).
- [7] FALLAUX F J, BOUT A, VAN DER VELDE I, et al. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(13): 1909-1917.

(下转第 128 页)

- 267.
- [3] 刘振祥,张胜. 食用菌栽培技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:145-147.
- [4] 潘崇环. 珍稀食用菌栽培与名贵野生菌的开发利用[M]. 北京:中国农业出版社,2004:21-36.
- [5] ROUT D,MONDAL S,CHAKRABORTY I,et al. The structure of a polysaccharide from Fraction-II of an edible mushroom,*Pleurotus florida*[J]. Carbohydrate research,2006,341(8):995-1002.
- [6] 陈媛媛. 灰树花多糖结构表征及其硫酸酯化多糖免疫活性研究[D]. 天津:天津科技大学,2015:1-3.
- [7] 吴彩云. 对羟基苯甲醛等天麻成分对灰树花多糖代谢的影响及其机理研究[D]. 贵阳:贵州大学,2016:3-7.
- [8] 唐玉琴,李长田,赵义涛. 食用菌生产技术[M]. 北京:化学工业出版社,2008:236-242.
- [9] SUZUKI I,HASHIMOTO K,OKAWA S,et al. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*[J]. Chemical & pharmaceutical bulletin,1989,37(2):410-413.
- [10] NANBA H. Activity of maitake D-fraction to inhibit carcinogenesis and metastasis[J]. Annals of the New York academy of sciences,1995,768(1):243-245.
- [11] MATSUI K,KODAMA N,NANBA H. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the carcinoma angiogenesis[J]. Cancer letters,2001,172(2):193-198.
- [12] 杜景卫,夏作理,李清初,等. 灰树花多糖抗S180肉瘤的实验研究[J]. 泰山医学院学报,2005,26(2):95-98.
- [13] 刘安,臧立华,孙庆济. 灰树花多糖抗肿瘤作用的临床观察[J]. 齐鲁工业大学学报,2008,22(2):43-45.
- [14] 陈石良,孙震. 灰树花深层发酵菌丝体多糖的酶法提取及其抗肿瘤作用[J]. 食品与生物技术学报,2000,19(4):336-339.
- [15] 侯晓青,程桂芝. 灰树花多糖抗荷瘤小鼠S180肉瘤的实验研究[J]. 中国药房,2007,18(3):180-181.
- [16] 孙震,陈石良,谷文英,等. 灰树花多糖体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 药物生物技术,2001,8(5):279-283.
- [17] 赵霏,马虎山,席思凡,等. 灰树花多糖诱导肿瘤细胞凋亡作用的Meta分析[J]. 兰州大学学报(医学版),2016,42(5):14-20.
- [18] 陈卓,吴克俭. 灰树花多糖生物活性的研究进展[J]. 广东医学,2016,37(5):785-788.
- [19] HONG L,XUN M W. Anti-diabetic effect of an alpha-glucan from fruit body of maitake (*Grifola frondosa*) on KK-Ay mice[J]. Journal of pharmacy & pharmacology,2007,59(4):575-582.
- [20] PREUSS H G,ECHARD B,BAGCHI D,et al. Enhanced insulin-hypoglycemic activity in rats consuming a specific glycoprotein extracted from maitake mushroom[J]. Molecular and cellular biochemistry,2007,306(1/2):105-113.
- [21] SHEN K P,SU C H,LU T M,et al. Effects of *Grifola frondosa* non-polar bioactive components on high-fat diet fed and streptozotocin-induced hyperglycemic mice[J]. Pharmaceutical biology,2015,53(5):705-709.
- [22] KONNO S,TORTORELLIS D G,FULLERTON S A,et al. A possible hypoglycaemic effect of maitake mushroom on Type 2 diabetic patients[J]. Diabetic medicine,2001,18(12):1010.
- [23] MANOHAR V,TALPUR N A,ECHARD B W,et al. Effects of a water-soluble extract of maitake mushroom on circulating glucose/insulin concentrations in KK mice[J]. Diabetes obesity & metabolism,2002,4(1):43-48.
- [24] 马迅,雷红,李谦,等. 灰树花子实体多糖的分子组成与降血糖作用[J]. 药物生物技术,2007,14(5):328-333.
- [25] 周伟,奚清丽,石根勇. 灰树花多糖对糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 江苏预防医学,2009,20(4):17-20.
- [26] 邢增涛,周昌艳,潘迎捷,等. 灰树花多糖研究进展[J]. 食用菌学报,1999,6(3):54-58.
- [27] MASUDA Y,TOGO T,MIZUNO S,et al. Soluble beta-glucan from *Grifola frondosa* induces proliferation and Dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway[J]. Journal of leukocyte biology,2012,91(4):547.
- [28] MASUDA Y,MURATA Y,HAYASHI M,et al. Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis:Involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells[J]. Biological & pharmaceutical bulletin,2008,31(6):1104-1108.
- [29] MASUDA Y,INOUE M,MIYATA A,et al. Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice[J]. International Immunopharmacology,2009,9(5):620-626.
- [30] KODAMA N,KAKUNO T,NANBA H. Stimulation of the natural immune system in normal mice by polysaccharide from maitake mushroom[J]. Mycoscience,2003,44(3):257-261.
- [31] 颜燕,杨非,姚文环,等. 灰树花多糖免疫调节及抗辐射损伤作用研究[J]. 中国辐射卫生,2010,19(1):6-8.
- [32] VETVICKA V,VETVICKOVA J. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts[J]. Annals of translational medicine,2014,2(2):14.
- [33] 李海花. 灰树花多糖的免疫作用实验研究[J]. 中华中医药学刊,2007,25(2):365-366.
- [34] 张立霞,邵一叶,高永,等. 灰树花多糖对甲醛中毒小鼠淋巴细胞的干预作用[J]. 安徽农业科学,2010,38(3):1254-1255.
- [35] 杨海,耿传信,周学锋. 灰树花活性多糖药理研究综述[J]. 中国执业药师,2012,9(3):30-33.
- [36] 王玉卓,谢珊珊,孙涛,等. 灰树花多糖对四氯化碳肝L-02细胞损伤的保护作用[J]. 山东大学学报(医学版),2010,48(8):32-37.
- [37] 曹小红,朱慧,王春玲,等. 灰树花胞外多糖对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(5):777-780.
- [38] 邢杰,李淑清,王力. 艾滋病研究现状[J]. 鸡西大学学报(综合版),2001(2):75-76,78.
- [39] 于荣利,张桂玲,秦旭升. 灰树花研究进展[J]. 上海农业学报,2005,21(3):101-105.
- [40] NANBA H,KODAMA N,SCHAR D,et al. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*), glucan in HIV-infected patients[J]. Mycoscience,2000,41(4):293-295.
- [41] AVTONOMOVA A V,KRASNOPOLSKAYA L M. Antiviral properties of basidiomycetes metabolites[J]. Antibiotiki i khimioterapiia,2014,59(7/8):41-48.
- [42] ZHANG Y J,MILLS G L,NAIR M G. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*[J]. J Agric Food Chem,2002,50(26):7581-7585.
- [43] 汪维云. 灰树花多糖的抗辐射作用研究[J]. 安徽农业大学学报,2003,30(2):210-212.
- [44] 袁德云,章克昌. 灰树花发酵液及其胞内纯化物的降血脂作用[J]. 中国药理学杂志,2003,38(7):507-508.
- [45] 杨杨. 灰树花 EST-SSR 引物开发及遗传多样性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2016.
- [46] 宋一鸣. 灰树花工厂化栽培技术研究[D]. 福州:福建农林大学,2016.
- [47] BARRETO S M,LÓPEZ M V,LEVIN L. Effect of culture parameters on the production of the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) in tropical weathers[J]. World journal of microbiology and biotechnology,2008,24(8):1361-1366.
- [48] 潘永明,赵佰莉,关石. 灰树花栽培模式比较研究[J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版),2010(4):37-38.
- [49] 潘春磊,王延锋,史磊,等. 东北地区矮棚覆土栽培灰树花技术研究[J]. 中国食用菌,2015,34(2):33-35.
- [50] 牟水元. 灰树花脱袋覆土立埋栽培技术[J]. 农村新技术,2005(7):11-12.

(上接第108页)

- [8] HALES L M,KNOWLES N J,REDDY P S,et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001,a novel oncolytic picornavirus[J]. J Gen Virol,2008,89(5):1265-1275.
- [9] KOPPERS-LALIC D,HOEBEN R C. Non-human viruses developed as therapeutic agent for use in humans[J]. Rev Med Virol,2011,21(4):227-239.
- [10] GUO B,RADEMACHER C,ZHENG Y,et al. Yoon Identification of novel Senecavirus a from pigs with vesicular disease in the US[C]//24th international pig veterinary society congress (IPVS). [s.l.]:[s.n.],2016:109.
- [11] LEME R A,OLIVEIRA T E,ALCANTARA B K,et al. Clinical manifestations of Senecavirus a infection in neonatal pigs,Brazil,2015[J]. Emerg Infect Dis,2016,22(7):1238-1241.