

中国荷斯坦牛 *CXCR1* 基因 SNPs 与白血病易感性的关联分析

王梦琦¹ 邢世宇¹ 倪炜¹ 杨奕² 张慧敏¹ 李明勋¹ 王成明² 杨章平¹ 毛永江^{1*}

¹ 扬州大学 动物科学与技术学院, 扬州 225009; ² 扬州大学 兽医学院, 扬州 225009

*通讯作者, cattle@yzu.edu.cn

摘要 牛白血病是由牛白血病病毒(*Bovine leukemia virus*, BLV)引起的牛(*Bos taurus*)、绵羊(*Ovis aries*)等动物的慢性肿瘤性疾病,是影响养牛业发展的重要传染病之一。为探索牛趋化因子受体1(chemokine (C-X-C motif) receptor 1, *CXCR1*)基因编码区(coding sequence, CDS)SNPs与牛白血病易感性之间的关系,本研究用荧光共振能量转移-定量多聚酶链式反应(fluorescence resonance energy transfer - quantitative polymerase chain reaction, FRET-qPCR)对某大型奶牛场866头中国荷斯坦牛牛白血病感染情况进行检测,同时用飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对*CXCR1*基因编码区*CXCR1*-c.642 A>G、*CXCR1*-c.816C>A、*CXCR1*-c.980A>G和*CXCR1*-c.1068G>A 4个SNPs位点进行检测,采用Logistic回归分析*CXCR1* SNPs基因型与牛白血病易感性之间的关系,结果表明:在866头奶牛中,患白血病的牛为42头,阳性率为4.85%;*CXCR1*-c.642 A>G、*CXCR1*-c.816C>A、*CXCR1*-c.980A>G和*CXCR1*-c.1068G>A 4个SNPs位点优势基因型分别为GG、CC、AA和GG型,频率分别为0.580、0.466、0.60和0.658。*CXCR1*-c.980 A>G位点对牛患白血病的相对风险影响达到显著水平($P=0.016$)。*CXCR1*-c.980 A>G位点GG型基因患白血病的概率为AA型基因的5.04倍。而*CXCR1*-c.642 A>G、*CXCR1*-c.816C>A、*CXCR1*-c.1068G>A和*CXCR1*单倍型对牛白血病易感性无显著影响($P>0.05$)。*CXCR1*-c.980A>G位点可作为奶牛白血病抗病育种的分子标记之一,筛选*CXCR1*-c.980A>G位点AA型个体有助于降低奶牛对牛白血病的易感性并提高生产效率。

关键词 荷斯坦牛, 牛白血病, *CXCR1* 基因, 关联分析, 单核苷酸多态性

中图分类号 S823 文献标识码 A

Association Analysis Between SNPs of *CXCR1* Gene and Susceptibility to Bovine Leukemia in Chinese Holstein (*Bos taurus*)

WANG Meng-Qi¹ XING Shi-Yu¹ NI Wei¹ YANG Yi² ZHANG Hui-Min¹ LI Ming-Xun¹ WANG Cheng-Ming² YANG Zhang-Ping¹ MAO Yong-Jiang^{1*}

¹ College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ² College of Veterinary Science, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

* Corresponding author, cattle@yzu.edu.cn

Abstract Bovine leukemia is a kind of chronic tumor disease caused by *Bovine leukemia virus* (BLV) in cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and other animals. In order to verify whether there is an association between BLV and SNPs of *CXCR1* gene coding sequence (CDS), bovine leukemia infection of 866 Chinese Holstein was detected by fluorescence resonance energy transfer - quantitative polymerase chain reaction (FRET-QPCR) in this study. The SNPs (*CXCR1*-c.642A>G, *CXCR1*-c.816C>A, *CXCR1*-c.980A>G and *CXCR1*-c.1068G>A) in the CDS of *CXCR1* gene were detected by MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/

ionization time of flight mass spectrometry). The relationship between genotype and haplotype of *CXCR1* SNPs and bovine leukemia infection was analyzed by Logistic regression. The results showed: 1) Of the 866 cows, 42 had bovine leukemia, with a positive rate of 4.85%. 2) The predominant genotypes of *CXCR1*-c.642 A>G, *CXCR1*-c.816C>A, *CXCR1*-c.980A>G and *CXCR1*-c.1068G>A were GG, CC, AA and GG, with frequencies of 0.580, 0.466, 0.60 and 0.658, respectively. The relative risk of leukemia was significantly affected by *CXCR1*-c.980A>G locus ($P=0.016$). The individual of GG genotype was 5.04 times suffering from leukemia than that of AA genotype. *CXCR1*-c.642A>G, *CXCR1*-c.816C>A, and *CXCR1*-c.1068G>A have no significant effects on the susceptibility to bovine leukemia. *CXCR1*-980 A>G can be used as a marker for disease resistance breeding of dairy cows, and selecting AA genotype individuals can help to reduce the susceptibility of bovine leukemia and improve productivity efficiency.

Keywords Holstein cattle (*Bos taurus*); Bovine leukemia; *CXCR1* gene; Association analysis; Single nucleotide polymorphism

牛(*Bos taurus*)白血病病毒(*Bovine leukemia virus*, BLV)是一种属于反转录病毒科“牛白血病-人嗜T细胞反转录病毒属”的外源性逆转录病毒。BLV慢性感染可导致牛产生持续性淋巴细胞增多,引起增生性肿,导致患畜逐渐消瘦,最后衰竭而死(张志等, 2001)。

牛趋化因子受体1基因(chemokine (C-X-C motif) receptor 1, *CXCR1*)定位于2号染色体上,研究证明其具有丰富的多态性。Pighetti等(2012)通过对*CXCR1*全基因组的多态性检测共发现36个SNPs,长约1 081 bp的外显子上有11个SNPs。*CXCR1*具有介导活化中性粒细胞的作用,可促进中性粒细胞脱颗粒、释放贮存酶,增强中性粒细胞的吞噬功能,启动超氧离子释放,导致机体局部炎症反应,达到杀灭病原菌的目的(Wolf et al., 1998; Paape et al., 2002)。因此牛*CXCR1*基因是激活天然免疫反应的重要因素之一,在调节炎症和免疫反应中发挥重要作用(Huo et al., 2001; Charo, Ransohoff, 2006)。

有研究表明趋化因子受体及其配体在多种类型肿瘤组织中呈高表达的状态,参与并影响肿瘤微环境,调节肿瘤细胞生存生长、血管新生、侵袭及转移(Raman et al., 2007; Payn, Cornelius, 2002; Wang et al., 1998)。*CXCR1*作为趋化因子受体家族中的成员,研究显示其表达与数种肿瘤(比如乳腺癌(Ginestier et al., 2010),黑色素瘤(Singh et al., 2009),胰腺癌等)的增殖、生长、血管新生、侵袭、转移以及耐药等有密切关系。

目前已有部分关于免疫相关基因突变与BLV易感性关联分析的报道。Bojarójc-Nosowicz等(2015)发现*TNF α* -824 A>G基因多态性和跨膜型肿瘤坏死因子(membrane-bound TNF alpha, mTNF α)

蛋白表达在牛流行性白血病发病机制中有重要作用; Satoru等(2006)研究发现*TNF- α* 基因启动子区的多态性影响BLV感染淋巴瘤; Forletti(2013)发现*BOLA DRB3*基因多态性和牛白血病病毒之间存在显著相关性; Miyasaka(2013)证实了*DRB3-DQA1*对白血病抗性和易感性存在相关性。目前,国内仅有*CXCR1*多态性及其与泌乳性能和乳房炎关联分析的报道(官永强等, 2009; 陈仁金等, 2010),尚未见有关*CXCR1*多态性与牛白血病易感性的相关研究。因此,本研究拟对江苏某大型奶牛场中国荷斯坦牛*CXCR1*基因编码区序列(coding sequence, CDS)SNPs与牛白血病进行关联分析,以期对牛白血病易感性的分子标记辅助育种提供参考依据

1 材料与方法

1.1 样本采集与DNA提取

于江苏某大型奶牛场随机选择866头中国荷斯坦牛(*Bos taurus*),尾静脉采血10 mL,肝素钠抗凝,-20℃保存备用。奶牛血液基因组DNA采用常规酚氯仿提取法,TE溶解,取部分DNA样品稀释至100 ng/ μ L,-20℃保存备用。

1.2 牛白血病检测

采用荧光共振能量转移-定量多聚酶链式反应(fluorescence resonance energy transfer - quantitative polymerase chain reaction, FRET-qPCR)对处理后的DNA样品进行检测。

根据GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)上公布的BLV基因序列(登录号: 2760848),使用Primer 5软件设计BLV FRET-qPCR

扩增 187 bp 的引物和探针,其序列如下:

上游引物:5'-CCTCAATTCCCTTTAAACTAGAACG-3';

下游引物:5'-ATGGGCTTTGTAAGAGCATTTGTA-3';

上游探针:5'-GACGGGCCAGGCAATAATCCAGT-(6-FAM)-3';

下游探针:5'-(LCRed640)-TTCCCGGTACGGAAAC-CAAATGG-phosphate-3'.

BLV FRET-qPCR 扩增体系如下:总体积 20 μ L 包括 10 μ L 样本和 10 μ L 反应预混液,热循环由 95 $^{\circ}$ C 的 2 分钟变性步骤组成,随后是 18 个高严格性逐渐降温的热循环,40 个低严格性的荧光采集循环,以及熔解曲线测定在 38~80 $^{\circ}$ C 之间。qPCR 的参数为:64 $^{\circ}$ C 6 $\times$ 12 s, 72 $^{\circ}$ C 8 s; 62 $^{\circ}$ C 9 $\times$ 12 s, 72 $^{\circ}$ C 8 s; 60 $^{\circ}$ C 3 $\times$ 12 s, 72 $^{\circ}$ C 8 s; 在 54 $^{\circ}$ C 下 40 $\times$ 8 s 荧光采集, 72 $^{\circ}$ C 8 s。

为保证检测结果的准确性,根据使用 FRET-qPCR 的检测结果,选择其中 BLV 阴性和阳性牛各 20 头,采血,分离血清,用爱德士公司(IDEXX, 美国)市售牛白血病血清抗体 X2 检测试剂盒,根据产品说明书用酶联免疫法进行测定。结果表明:2 种方法检测结果完全一致。

1.3 *CXCR1* 基因 CDS 区 SNP 检测

根据本课题组前期对牛 *CXCR1* 基因 CDS 区 SNPs 检测结果,发现 *CXCR1* 基因 CDS 区共有 13 个 SNP,共包括 4 个连锁群,且群内完全连锁(王梦琦等, 2017)。因此,直接挑选来自 CDS 区不同连锁群的 *CXCR1*-c.642A>G、*CXCR1*-c.816C>A、*CXCR1*-c.980A>G 和 *CXCR1*-c.1068G>A 四个 SNP 位点,用飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对各 SNP 进行检测。

1.4 生物信息学分析

根据 *CXCR1* 编码区碱基序列,用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件对各突变位点的蛋白质生物信息进行分析。使用在线软件 SignalP4. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对各位点突变前后蛋白信号肽以及氨基酸变化进行分析。使用 PrediVtProtein(<https://www.predict-protein.org/>)在线软件对 c.980 位点及与其完全连锁的各位点突变前后的蛋白质二级结构进行预测分析。

另据 Pighetti 等(2012)研究表明, *CXCR1* c.980

位点与 5'UTR 区 c-182(T>C)、c-465(T>A)和 c-481(T>C)在同一连锁群。因此,根据 *CXCR1* 基因 5'端序列,用软件 MatInspector 在线对这 3 个与 *CXCR1* c.980 位点完全连锁的 SNP 位点进行转录因子结合位点分析(Cartharius et al., 2005)。

1.5 统计分析

通过卡方检验(chi-square, χ^2)来检测对病例组 and 对照组之间的等位基因和基因型频率分布。

使用 SNPstats(Sole et al., 2006)软件中的 Logistic 回归法分析 *CXCR1* 基因 SNP 位点不同基因型和单倍型患牛白血病的概率,模型如下:

$$\log [p/(1-p)] = \beta_0 + \beta_1 H_c + \beta_2 V_a$$

式中, p 代表患有牛白血病的概率, H_c 表示杂合子, V_a 表示频率较低的纯合子, β_0 是常数项, β_1 和 β_2 是偏回归系数。

2 结果与分析

2.1 牛白血病检测结果

FRET-qPCR 检测结果显示,本实验的荷斯坦奶牛样本群(866 头)中共检测出牛白血病阳性个体 42 头,其阳性检出率为 4.85%。

2.2 牛 *CXCR1* 基因多态性

表 1 和表 2 列出了荷斯坦奶牛 *CXCR1* 基因 4 个多态位点的等位基因频率及基因型频率统计结果, *CXCR1*-c.642A>G、*CXCR1*-c.816C>A、*CXCR1*-c.980A>G 和 *CXCR1*-c.1068G>A 4 个 SNP 位点优势基因型分别为 GG、CC、AA 和 GG 型,频率分别为 0.580、0.466、0.607 和 0.658,优势基因分别为 G、C、A 和 G,频率分别为 0.760、0.688、0.784 和 0.811。 χ^2 检验表明:4 个 SNP 位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡。

2.3 生物信息学分析结果

生物信息学分析表明: *CXCR1* 蛋白在 c.980 A>G 突变前分子式是 $C_{1885}H_{2947}N_{463}O_{491}S_{21}$, 分子量是 40 625.20, 理论等电点(isoelectric point, PI) 值为 8.51, 突变后的分子式为 $C_{1886}H_{2954}N_{466}O_{491}S_{21}$, 分子量为 40 644.25, 理论 PI 值为 8.66。突变前正负电荷的比例分别为 30% 和 26%, 蛋白质不稳定指数为 31.06, 总平均亲水性为 0.561, 脂溶指数均为 118.61。而突变后正负电荷的比例分别为 31% 和 26%, 蛋白质不稳定指数为 32.01, 总平均亲水性

0.557,脂溶指数均为118.89。突变前后蛋白均不存在信号肽,并且都有6个跨膜区:56~78、85~107、127~149、161~183/217~239和252~274位氨基酸。PrediVtProtein分析结果表明,CXCR1-c.980A>G位点及与其高度连锁的各位点突变前后的蛋白质二级结构并未发生变化。蛋白质二级结构中螺旋(Helix)、链(Strand)和环(Loop)的比例分别为57.5%、6.9%和35.6%。

对CXCR1-5' UTR-500 bp内转录因子结合位点进行分析,结果发现-465 T>C位点突变导致转录因子结合位点发生变化:当由T突变为C时,转录

因子结合位点NF-1消失。

2.4 CXCR1 基因多态性与 BLV 易感性相对危险性的关联分析

CXCR1 基因CDS 区不同SNPs 位点基因型与奶牛 BLV 易感性的关联分析见表2。由表2可知:980 (G/A)位点对牛白血病的感染有显著关联 ($P=0.016$),而 CXCR1- 642(A>G)、CXCR1- 816(C>A)和 CXCR1-1068(G>A)这3个位点与牛白血病的易感性均无显著关联 ($P>0.05$)。其中980 (A>G)位点GG 基因型感染牛白血病的概率为AA 基因型的5.04 倍。

表1 牛白血病阳性与阴性群体CXCR1 基因的等位基因分布
Table 1 Distribution of allelic frequencies for CXCR1 gene in bovine leukemia positive and negative populations

SNPs	等位基因 Allele	样本数N Sample number	阳性 Positive cases	阴性 Negative cases	平衡检验 χ^2 值 χ^2 value
c.642(A>G)	G	131(0.76)	63(0.75)	1249(0.76)	0.698
	A	418(0.24)	21(0.25)	397(0.24)	
c.816(C>A)	C	1191(0.69)	62(0.74)	1129(0.69)	1.219
	A	539(0.31)	22(0.26)	517(0.31)	
c. 980(A>G)	A	1347(0.78)	58(0.69)	1289(0.79)	2.023
	G	371(0.22)	26(0.31)	345(0.21)	
c.1068(G>A)	G	1403(0.81)	71(0.85)	1332(0.81)	0.001
	A	327(0.19)	31(0.15)	314(0.19)	

括号中的数值为相应样本数所占频率
The value in parentheses is the frequency of the corresponding sample

表2 牛白血病阳性与阴性群体CXCR1 基因的基因型分布
Table 2 Genotypic Distribution of CXCR1 gene in bovine leukemia positive and negative populations

SNPs	基因型 Genotype	样本数N Sample number	阳性 Positive cases	阴性 Negative cases	P 值 P-value	比值比 (95% 置信区间) Odd ratio (95% CI)
c.642(A>G)	GG	502(58%)	24 (57.1%)	478 (58.1%)	0.98	1
	AG	308(35.6%)	15 (35.7%)	293 (35.6%)		1.02 (0.53~1.98)
	AA	55(6.4%)	3 (7.1%)	52 (6.3%)		1.15 (0.33~3.95)
c.816(C>A)	CC	403 (46.6%)	23 (54.8%)	380 (46.2%)	0.55	1
	AC	385 (44.5%)	16 (38.1%)	369 (44.8%)		0.72 (0.37~1.38)
	AA	77(8.9%)	3 (7.1%)	74 (9%)		0.67 (0.20~2.29)
c. 980(A>G)	AA	521(60%)	22 (52.4%)	499 (61.1%)	0.016	1
	AG	305 (35.3%)	14 (33.3%)	291 (35.6%)		1.09 (0.55~2.17)
	GG	33(4.7%)	6 (14.3%)	27 (3.3%)		5.04 (1.89~13.46)
c.1068(G>A)	GG	569 (65.8%)	30 (71.4%)	539 (65.5%)	0.69	1
	AG	265 (30.6%)	11 (26.2%)	254 (30.9%)		0.78 (0.38~1.58)
	AA	31(3.6%)	1 (2.4%)	30 (3.6%)		0.60 (0.08~4.54)

括号中的数值为相应样本数所占频率
The value in parentheses is the frequency of the corresponding sample

3 讨论

牛白血病几乎存在于世界各个养牛国家,是影响养牛业发展的重要传染病之一,许多学者对此病毒进行了广泛的研究,近年来已证明牛白血病病毒是一种细胞型病毒(徐之勇等, 2008)。这种牛白血病病毒接种绵羊等都可发生淋巴肉瘤或持续性淋巴细胞增生症,通过病理形态学研究对其做了一些分类,一般认为 98 % 是肿瘤型,几乎都是淋巴细胞型或成淋巴细胞型(Schwartz-Cornil et al., 1997)。近年来不同研究均表明牛群产奶量与牛白血病阳性率是呈显著负相关的(Erskine et al., 2012; Ott et al., 2003; Sargeant et al., 1997)。同时,长期以来,对奶牛高产奶量的选育增加了对该疾病的易感性(Koivula et al., 2005)。

在本研究中,中国荷斯坦牛 *CXCR1* 基因编码区 4 个 SNPs 中只有 *CXCR1*-980A>G 突变对患牛白血病的风险有显著的影响, *CXCR1*-c.642A>G、c.816C>A、*CXCR1*-c.1068G>A 这 3 个位点突变对牛白血病的感染均无显著影响。同时发现, *CXCR1*-980A>G 位点 GG 基因型感染牛白血病的概率为 AA 基因型的 5.04 倍。生物信息学分析表明, *CXCR1*-c.980 A>G 为错义突变,其突变导致 327 处赖氨酸突变为精氨酸(p.Lys 327 Arg),并且与其他 2 个错义突变(c.337G> A, p.Val 113 Ile; c.995A>G, p.His 332 Arg)和一个同义突变(c.333T> C)是完全连锁的(王梦琦等, 2017)。*CXCR1*-c.980A>G 位于 *CXCR1* 基因的编码区,其突变造成氨基酸改变可能会引起 *CXCR1* 基因编码的相关蛋白质的结构和功能发生改变,影响其免疫功能的发挥从而影响对牛白血病的易感性。Leyva-Baca 等(2007)对加拿大荷斯坦牛的研究表明 *CXCR1* 基因 CDS 区有 570、642、735、816 和 819 五个 SNPs 位点,并指出这些单核苷酸多态性中的至少有一个是与改变中性粒细胞功能相关的,这表明氨基酸变化具有影响 *CXCR1* 活性的能力。在黑色素瘤中, *CXCR1* 沉默能明显降低肿瘤细胞增殖能力及抑制迁移和侵袭能力,说明 *CXCR1* 参与了黑色素瘤的发展进程(Varney et al., 2003)。综合以上结果表明, *CXCR1*-c.980A>G 处的突变导致 *CXCR1* 基因编码区多处突变,蛋白序列发生改变,导致蛋白质正电荷比例、不稳定系数以及脂溶指数有所升高,总平均亲水性稍有下降,这可能会影响蛋白正常功能的发挥。

另外, Pighetti 等(2012)研究也表明, *CXCR1*-c.980 A>G 位点与 5'UTR 区 c-182(T>C)、c-465(T>A)和 c-481(T>C)在同一连锁群。本研究对 *CXCR1* 5'UTR 500 bp 内转录因子结合位点进行分析中,发现这三个位点中 c.465 T>C 位点突变导致转录因子结合位点发生变化:当由 T 突变为 C 时,转录因子结合位点 NF-1 消失。而转录因子 NF-1 的功能与抗病毒和炎症等作用相关。因此,与 *CXCR1*-c.980 A>G 位点完全连锁的 5'UTR 区突变导致转录因子结合位点的改变,也有可能是该位点突变对牛 BLV 易感性造成显著影响的因素之一。但这一假设有待通过实验进一步验证。

4 结论

对 *CXCR1* 基因 CDS 区 *CXCR1*-c.642 A>G、*CXCR1*- c.816C>A、*CXCR1*- c.980A>G 和 *CXCR1*-c.1068G>A 和牛白血病易感性进行关联分析,发现 *CXCR1*-c.980 A>G 基因型与牛白血病的易感性有显著的关联,可以在牛白血病易感性的分子标记辅助选择中加以利用。

参考文献

- 陈仁金, 杨章平, 毛永江, 等. 2010. 中国荷斯坦牛 *CXCR1* 基因遗传多态性与体细胞评分的关联分析[J]. 中国农业科学, 43(18): 3848-3856. (Chen R J, Yang Z P, Mao Y J, et al. 2010. Genetic polymorphism of *CXCR1* gene and its associations with somatic cell score in Chinese Holstein. Scientia Agricultura Sinica. 43(18): 3848-3856.)
- 官久强, 王洪梅, 王长法, 等. 2009. 中国荷斯坦牛 *CXCR1* 基因编码区的遗传多态性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 37(6): 47-52. (Guan J Q, Wang H M, Wang C F, et al. 2009. Genetic polymorphisms within the coding regions of *CXCR1* gene in Chinese Holstein cattle. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 37 (6): 47-52.)
- 王梦琦, 倪炜, 张慧敏, 等. 2017. 中国荷斯坦牛 *CXCR1* 基因编码区 SNP 多态与临床乳房炎和生产寿命的关联分析. 中国农业科学, 50 (12): 2359-2370. (Wang M Q, Ni W, Zhang H M, et al. 2017. Effects on the clinical mastitis and lifetime of SNPs in the CDS regions of *CXCR1* for Chinese Holstein. Scientia Agricultura Sinica, 50 (12): 2359-2370.)
- 徐之勇, 仲崇岳, 余燕. 2008. 牛白血病病毒对牛免疫系统功能影响的研究进展[J]. 中国奶牛, (8): 39-41. (Xu Z Y, Zhong C Y, Yu Y. 2008. The progress on the influence of bovine leukemia virus to bovine immune system function. China

- Dairy Cattle. (8): 39-41.
- 张志, 赵宏坤, 崔治中, 等. 2001. 牛白血病病毒分子致病机理研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 23(2): 154-156. (Zhang Z, Zhao H K, Cui Z Z, et al. 2001. Research progress on molecular pathogenesis of bovine leukemia virus. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 23(2) : 154-156.)
- Bojaróć-Nosowicz B, Kaczmarczyk E, Stachura A, et al. 2015. Tumor necrosis factor- α (*TNF α*) gene polymorphism and expression of membrane-bound *TNF α* protein on CD11b+ and IgM+ cells in cows naturally infected with bovine leukemia virus[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 3(18): 533-539.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. 2005. MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites[J]. Bioinformatics, 21(13): 2933-2942.
- Charo I F, Ransohoff R M. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation [J]. New England Journal of Medicine, 354(6): 610-621.
- Erskine R J, Bartlett P C, Byrem T M, et al. 2012. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds[J]. Journal of Dairy Science, 95:727-734.
- Forletti M A, Juliarena, Ceriani C, et al. 2013. Identification of cattle carrying alleles associated with resistance and susceptibility to the Bovine Leukemia Virus progression by real-time PCR[J]. Research in Veterinary Science, 95: 991-995.
- Ginestier C, Liu S, Diebel M E, et al. 2010. *CXCR1* blockade selectively targets human breast cancer stem cells *in vitro* and in xenografts[J]. Journal of Clinical Investigation, 120(2): 485-497.
- Huo Y, Weber C, Forlow S B, et al. 2001. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium[J]. Journal of Clinical Investigation, 108(9): 1307-1314.
- Koivula M, Mantysaari E A, Negussie E, et al. 2005. Genetic and phenotypic relationships among Milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis [J]. Journal of Dairy Science, 88(2): 827-833
- Leyva-Baca I, Schenkel F, Sharma B S, et al. 2007. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine *CCL2*, *IL8*, *CCR2* and *IL8RA* genes and their association with health and production in Canadian Holsteins[J]. Animal Genetics, 38(3): 198-202.
- Miyasaka T, Takeshima S N, Jimba M, et al. 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle[J]. Tissue Antigens, 81: 72-82.
- Ott S L, Johnson R, Wells S J. 2003. Association between bovine leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on U.S. dairy farms[J]. Preventive Veterinary Medicine, 61: 249-262.
- Paape M, Mehrzad J, Zhao X, et al. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorpho-nuclear neutrophil leukocytes. Journal of mammary gland biology and neoplasia. 7 (2): 109-121.
- Payne A S, Cornelius L A. 2002. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis [J]. Journal of Investigative Dermatology, 118(6): 915-922.
- Pighetti G M, Kojima C J, Wojakiewicz L, et al. 2012. The bovine *CXCR1* gene is highly polymorphic. Veterinary Immunology and Immunopathology, 145: 464-470.
- Raman D, Baugher P J, Thu Y M, et al. 2007. Role of chemokines in tumor growth[J]. Cancer Letter, 256(2): 137-165.
- Sargeant J M, Kelton D F, Martin S W, et al. 1997. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds[J]. Preventive Veterinary Medicine, 31: 211-221.
- Satoru K, Tatsufumi U, Manabu I, et al. 2006. Tumor necrosis factor- α genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection [J]. Microbes and Infection. 8(8): 2163-2171.
- Schwartz-Cornil I, Chevallier N, Belloc C, et al. 1997. Bovine leukaemia virus-induced lymphocytosis in sheep is associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis[J]. Journal of General Virology, 78 (Pt 1): 153-162.
- Singh S, Nannuru K C, Sadanandam A, et al. 2009. *CXCR1* and *CXCR2* enhances human melanoma tumorigenesis, growth and invasion [J]. British Journal of Cancer, 100(10): 1638-1646.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iñesta R, et al. 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies[J]. Bioinformatics, 22(15), 1928-1929.
- Varney M L, Li A, Dave B J, et al. 2003. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8(CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype [J]. Clinical and Experimental Metastasis. 20(8): 723-731.
- Wang J M, Deng X, Gong W, et al. 1998. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis [J]. Journal of Immunological Methods, 220(1-2): 1-17.
- Wolf M, Delgado M B, Jones S A, et al. 1998. Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL8 receptors, CXCR1 and CXCR2. European Journal of Immunology. 28(1): 164-170.