

miR373 和 miR542-5p 调控肠道病毒 71 型在人横纹肌肉瘤细胞中的复制

杨倬¹, 田波²

1 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050

2 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

杨倬, 田波. miR373 和 miR542-5p 调控肠道病毒 71 型在人横纹肌肉瘤细胞中的复制. 生物工程学报, 2014, 30(6): 943-953.

Yang Z, Tien P. miR373 and miR542-5p regulate the replication of Enterovirus 71 in rhabdomyosarcoma cells. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 943-953.

摘要: 研究发现 microRNAs (miRNAs) 可以参与调控病毒在宿主细胞内感染和复制的过程。为了揭示 miRNAs 是否参与肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 的感染与复制, 研究了 miRNAs 对 EV71 病毒在宿主细胞内复制的影响。构建 miRNAs 靶基因筛选系统, 在双荧光素酶报告体系的 pMIR 载体插入病毒基因, 如果插入的基因序列能被细胞内的 miRNAs 靶向调控, 报告基因的表达将发生变化。实验发现 EV71 病毒 5'-UTR 基因可能是 miRNAs 的作用靶标。随后利用 miRNAs 在线分析软件预测并验证可能作用于 5'-UTR 基因片段的 miRNAs。为了研究 miRNAs 分子对 5'-UTR 基因的调控作用是否可以体现在 EV71 病毒的复制过程中, 在人横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma, RD)细胞中转染 miRNAs mimics, 利用 Western blotting 和 real-time PCR 实验检验 EV71 病毒的复制和表达情况。实验结果表明, miR373 和 miR542-5p 可以通过作用于 EV71 病毒 5'-UTR 基因从而抑制病毒在 RD 细胞中的复制和表达。细胞内 miR373 和 miR542-5p 可以调控 EV71 在宿主细胞中的复制过程。研究 EV71 病毒与宿主 miRNAs 的相互作用机制为进一步阐明 EV71 病毒感染与复制机理奠定了基础。

关键词: miRNAs, 肠道病毒 71 型, 人横纹肌肉瘤细胞, 病毒复制

Received: November 1, 2013; **Accepted:** January 8, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31370201).

Corresponding author: Zhuo Yang. Tel: +86-10-83157181; E-mail: zhuoer8623@163.com

国家自然科学基金 (No. 31370201) 资助。

miR373 and miR542-5p regulate the replication of Enterovirus 71 in rhabdomyosarcoma cells

Zhuo Yang¹, and Po Tien²

1 National Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) play an important role in infection and replication of virus in host cells. To identify cellular miRNAs involved in the host response to enterovirus 71 (EV71) infection, we examined miRNAs effects on the replication of EV71 in rhabdomyosarcoma cells. We constructed target gene of miRNAs screening system. 3'untranslated region (UTR) dual luciferase reporter analysis was used to identify putative miRNA targets in the EV71 virus genome. First, 13 segments of EV71 virus genomes were inserted to the pMIR vector and the luciferase expression were assayed to identify the target gene of putative miRNA. The reporter gene expression of the cells transfected with the vector containing 5'-UTR was significantly downregulated. Then we screened the miRNAs that may target to 5'-UTR using online analysis programs. Furthermore, Western blotting and real-time PCR test were performed to investigate the effect of miRNAs on viral replication. The study showed that miR373 and miR542-5p could suppress the replication of EV71 virus through binding to the 5'-UTR gene. Cellular miRNAs could regulate the replication of EV71 virus in host cells, and our paper should report the role of miR373 and miR542-5p in this regulation for the first time. Our findings supported the notion that the cellular miRNAs might be essential in the host-pathogen interactions.

Keywords: miRNAs, Enterovirus 71, rhabdomyosarcoma cells, virus replication

miRNAs是近几年分子生物学研究方面的热点,它是一类长度大约为19–25个核苷酸的单链非编码小分子RNA,通过抑制靶基因mRNA的翻译过程或者降解靶基因的mRNA分子,介导转录后基因表达的调控过程。miRNAs首先是由基因组转录出初始产物,称为pri-miRNA, pri-miRNA在Drosha核酸内切酶的作用下剪切成长度约为60–70个核苷酸,具有茎环结构的miRNAs前体,称为pre-miRNA。pre-miRNA在转运蛋白的作用下从细胞核运输到细胞质中,被核酸内切酶Dicer剪切成19–25个核苷酸长的双链RNA,随即双链解旋,形成成熟的miRNAs。成熟的miRNAs与相关蛋白形成RNA诱导的沉默复合(RISC),结合到有互补序列的mRNA

上,抑制该mRNA的翻译或者使其降解,从而实现对该基因表达的转录后调控作用^[1]。

研究表明,miRNAs不但可以参与调控细胞中如细胞增殖、凋亡、分化等一系列的生理过程^[2-3],还可以参与调控病毒在宿主细胞内复制的过程。2005年,Charles-Henri Lecellier等报道在哺乳动物细胞中,miR32可以通过与病毒mRNA结合有效地抑制I型灵长类泡沫病毒(PFV-I)在细胞中的积累^[4];2008年,Henke和Chang等同时报道在肝组织特异性表达的miR122能通过与丙型肝炎病毒(HCV)基因组5'非编码区的相互作用,使病毒RNA在细胞中富集,诱导病毒基因转录,从而促进丙型肝炎病毒在肝癌细胞系(Huh-7细胞)中的复制,在非肝细胞(如

HEK-293 和 HeLa) 中过表达 miR122 也同样可以观察到这种作用^[5-7]。

手足口病 (Hand, foot and mouth disease, HFMD) 是由多种肠道病毒引起的, 以婴幼儿发病为主的常见传染病。肠道病毒是引发食源性疾病的主要病因, 主要经食物、水和环境进行传播。肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71) 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 肠道病毒属 (Enterovirus, EV) 是一类常见的经呼吸道和消化道感染人体的病毒, 是手足口病的主要病原体。RD 细胞支持 HFMD 的主要病原体 EV71 和 CVA16 等多种肠道病毒的复制, 均能在 RD 细胞培养中引起特殊的肠道病毒致细胞病变效应 (CPE)。本实验针对宿主细胞内 miRNAs 是否参与 EV71 病毒在细胞内的复制, 构建了 miRNAs 靶基因筛选系统, 利用双荧光素酶报告体系来研究 EV71 病毒基因表达是否受到 miRNAs 的调控。根据报告基因表达的变化, 发现作用在 EV71 病毒的 5'-UTR 基因上的 miR373 和 miR542-5p 可能会对 EV71 病毒的复制有影响。本文首次报道了 miR373 和 miR542-5p 对 EV71 病毒在 RD 细胞内复制的调控作用, 为 miRNAs 参与调节 EV71 病毒复制的相关研究提供了有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、质粒和细胞株

EV71 Hubei-09 (C4 亚型, GenBank Accession No. GU434678) 株由武汉大学病毒学国家重点实验室提供; 人横纹肌肉瘤细胞 (Rhabdomyosarcoma, RD) 为本实验室保存; pMIR 和 pRL-CMV 荧光素酶报告载体由本实验室保存。

1.1.2 miRNAs 的合成

miR373 和 miR542-5p mimics, miR-RiboTM mimics Negative control 由广州锐博生物有限公司进行合成。

1.1.3 试剂和仪器

核酸限制性内切酶 *Spe* I、*Hind* III, T4 DNA 连接酶及 Pyrobest 高保真性 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。鼠源 EV71 单克隆抗体 (MAB979) 购自 Millipore 公司。 β -actin 及辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中山金桥公司。RNA 提取 Trizol 试剂购自上海 Invitrogen 公司。反转录、Real time PCR、双荧光检测试剂盒购自 Promega 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司。Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco BRL 公司。蛋白电泳仪、PCR 仪及酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品。Real time PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

1.2 miRNAs 靶基因筛选系统的建立

1.2.1 重组载体的构建

用于 miRNAs 作用靶标筛选的 3'-UTR 分析系统包含两个荧光素酶报告基因载体, 一个为 pMIR 载体, 另一个为 pRL-CMV 载体。pMIR 载体可以表达萤火虫荧光素酶, 在萤火虫荧光素酶的 3'-UTR 区含有多克隆位点插入目的基因。pRL-CMV 载体能高效表达海肾荧光素酶, 作为内参。根据 EV71 Hubei-09 株的基因序列 (GenBank Accession No. GU434678.1), 以 EV71 全长 cDNA 为模板, 克隆得到 EV71 的 13 个基因片段 5'UTR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3BC、3D1、3D2、3'UTR, 以及 5'-UTR 的 3 个亚片段 5'-UTR-1、2、3。然后将以上的基因片段插入 pMIR 载体 3'-UTR 区的多克隆位点中的 *Spe* I/*Hind* 限制性酶切位点处。构建成

重组载体pMIR-EV71-(5'UTR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3BC、3D1、3D2、3'UTR、5'UTR-1、5'UTR-2、5'UTR-3)。实验中所用引物均由北京奥科生物公司合成，序列见表1。

表 1 EV71 病毒基因片段的 PCR 扩增引物

Table 1 Primer sequences of EV71 gene segments for PCR

Gene	Nucleotide location	Sequence (5'-3')
5'-UTR	1-743	Forward primer: GCACTAGT TAAAACAGC CTGTGGGTTGC Reverse primer: GCAAGCTT CGCTTCGTGTTCA GCAGTATAAT
VP4	744-950	Forward primer: GCACTAGT ATGGGCT CCCAGGTCTCC Reverse primer: GCAAGCTT CTTAAGGGCGCTGCCATT
VP2	951-1 712	Forward primer: GCACTAGT TCTCCCTCTGCTGAAGCATGTG Reverse primer: GCAAGCTT CTGCGTAACTGC CTGCCTG
VP3	1 713-2 438	Forward primer: GCACTAGT GGTTTCCCACTGAATTGAAAC Reverse primer: GCAAGCTT TTGAATAGTGGCCGTTTGCA
VP1	2 439-3 329	Forward primer: GCACTAGT GGGGACAGAGTG GCAGATGT Reverse primer: GCACGCGT GAGCGTAGTGATTGCCGTTT
2A	3 330-3 779	Forward primer: GCACTAGT GGGAAATTCGGTCAGCAGTCT Reverse primer: GCAAGCTT CTGCTCCATCGCTTCCTCAT
2B	3 780-4 076	Forward primer: GCACTAGT GGGGTATCTGATTACATCAAAGGTC Reverse primer: GCAAGCTT CTGTTTTTGTGCCATGGGAAT
2C	4 077-5 063	Forward primer: GCACTAGT AGTG CCTCATGGCTAAAGAAGTT Reverse primer: GCACGCGT TTGAAAGAGTGCTTCTATAGTATTC
3A	5 064-5 321	Forward primer: GCACTAGT GGACCCCTAAATTCAGGCCT Reverse primer: GCAAGCTT CTGGAACCCGGCAAACAG
3B+3C	5 322-5 936	Forward primer: GCACTAGT GGTGCTTACTCTGGAGCGC Reverse primer: GCAAGCTT TTGCTCGCTGGCAAAA TAAC
3D1	5 937-6 660	Forward primer: GCGAGCTC GGAGAGATCCAGTGGATGAAGC Reverse primer: GCACGCGT TAAGGCTTGCATCATATCCTGAG
3D2	6 661-7 325	Forward primer: GCACTAGT GTCCTGTGTGGTTCAGAGCTCT Reverse primer: GCAAGCTT AAATAACTCGAGCCAATTTCTTCTC
3'-UTR	7 326-7 408	Forward primer: GCACTAGT ACTTACAGCTCAATGCTGAAC Reverse primer: GCAAGCTT GCTATTCTGGTTATAACAAATTTAC
5'-UTR-1	1-270	Forward primer: GCACTAGT TAAAACAGC CTGTGGGTTGC Reverse primer: GCAAGCTTTCGTTACTAGGTTTCTCGAAGTAGTTAGCC
5'-UTR-2	250-530	Forward primer: GCACTAGTTTCGAGAAACCTAGTAACGCCATTG Reverse primer: GCAAGCTTAGTTGCCCGTTACGACACACTGCCA
5'-UTR-3	500-743	Forward primer: GCACTAGT CCAAAGGGCAGTGTGTCGTAAC Reverse primer: GCAAGCTT CGCTTCGTGTTCA GCAGTATAAT

1.2.2 miRNAs 结合靶点预测

ViTa数据库包括了已知病毒的miRNAs以及相应的由miRanda和TargetScan预测的宿主miRNAs靶基因。MicroInspector在线分析软件可以预测特定miRNAs的作用靶基因,也可以预测在已知序列上具有潜在作用靶点的miRNAs。而rna22和RNA Hybrid在线分析软件则主要针对两条已知的RNA序列的相互作用进行验证,通过二级结构和结合自由能来评价。我们利用MicroInspector和ViTa预测病毒基因片段上潜在结合位点的miRNAs,用rna22和RNA Hybrid验证预测结果。

1.2.3 双荧光素酶检测

RD 细胞接种于 24 孔板中,将构建好的重组 pMIR 载体和 pRL-CMV 载体利用转染试剂 Lipofectamine 2000 共转染 RD 细胞,转染 30 h 后收集细胞,用 PBS 洗一遍细胞,稀释 5×裂解液,24 孔板每孔加入 100 μL,冰上放置 10 min,12 000 r/min 离心 2 min,取上清采用 Promega 公司的双荧光检测试剂盒检测荧光素酶的表达。如果构建在 pMIR 载体上的病毒基因序列受到宿主细胞内的 miRNAs 的调控,将影响载体上荧光素酶的表达,通常以海肾荧光素酶活性作为内参,用测定的萤火虫荧光素酶的表达值比海肾荧光素酶的表达值,考察萤火虫荧光素酶活性的变化。

1.3 Western blotting 检测

RD 细胞用含 10%胎牛血清、100 μg/mL 氨苄青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱,饱和湿度条件下培养。当细胞融合达到 80%–90%时,用 2.5% 胰蛋白酶消化单层培养的 RD 细胞,用 DMEM 终止消化,4 °C、500 r/min 离心 5 min,用 DMEM

培养基调整细胞数为 2×10^5 /mL 的单细胞悬液,以 1 mL/孔接种于 12 孔板中,培养 24 h 细胞贴壁后,合成的 miRNAs mimics 及阴性对照 miR-RiboTM mimics Negative control 分别转染 RD 细胞,6 h 后接种 10 μL 的 TCID₅₀ 为 1×10^9 的 EV71 病毒。48 h 后收集细胞,用细胞裂解液冰上裂解细胞 20 min,12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液,15%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳后,利用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。10%脱脂奶粉封闭过夜。孵育特异性抗体,鼠源 EV71 单克隆抗体浓度为 1 2 000,β-actin 抗体为 1 2 000,二抗为辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG 浓度为 1 2 000,加 ECL 发光液,显影。

1.4 Real-time PCR 检测

取 2.5%胰蛋白酶消化单层培养的 RD 细胞,用 DMEM 培养基调整细胞数为 2×10^5 /mL 的单细胞悬液,以 1 mL/孔接种于 12 孔板中,培养 24 h 细胞贴壁后,合成的 miRNAs mimics 及阴性对照 miR-RiboTM mimics Negative control 分别转染 RD 细胞,6 h 后,每孔接种 10 μL 的 TCID₅₀ 为 1×10^9 的 EV71 病毒,48 h 后按照 Trizol 说明书提取细胞总 RNA,取 RNA 150 ng 进行逆转录合成 cDNA。采用引物设计软件 Primer 5.0,设计 EV71 病毒和 β-actin 基因的引物,Real-time PCR 引物由北京奥科生物公司合成(表 2)。按照 Promega Real-Time PCR 试剂盒说明书进行 Real-time PCR 检测,扩增条件为:95 °C 10 min,94 °C 10 s,60 °C 1 min,40 个循环。PCR 扩增后按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达值,分析实验组与对照组的差异。

1.5 数据分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 *t* 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果

2.1 双荧光素酶报告系统的构建

双荧光素酶报告系统包含两个荧光素酶报告基因载体, pMIR 载体可以表达萤火虫荧光素酶, 在萤火虫荧光素酶的 3'-UTR 区含有多克隆位点插入病毒基因。pRL-CMV 载体能高效表达海肾荧光素酶, 作为内参。如图 1 所示, 将 EV71

的 13 个基因片段 5'UTR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3BC、3D1、3D2、3'UTR 插入 pMIR 载体 3'-UTR 区的多克隆位点中的 *Spe I* / *Hind III* 限制性酶切位点处。构建成重组载体 pMIR-EV71-(5'UTR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3BC、3D1、3D2、3'UTR)。将构建好的重组双荧光素酶报告载体转染宿主细胞筛选 miRNAs 调控病毒基因的靶位点。

表 2 Real-time PCR 反应中用于扩增 EV 71 *vp1* 和 β -*actin* 的引物

Table 2 Primers used for detection of EV 71 *vp1* and β -*actin* in Real-time PCR assay

Gene name	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
EV71 <i>vp1</i>	AGTATGATTGAGACTCGGTG	GCGACAAAAGTGAAGCTCTGC
β - <i>actin</i>	ACCCACACTGTGCCATCTACGA	GCCGTGGTGGTGAAGCTGTAGCC

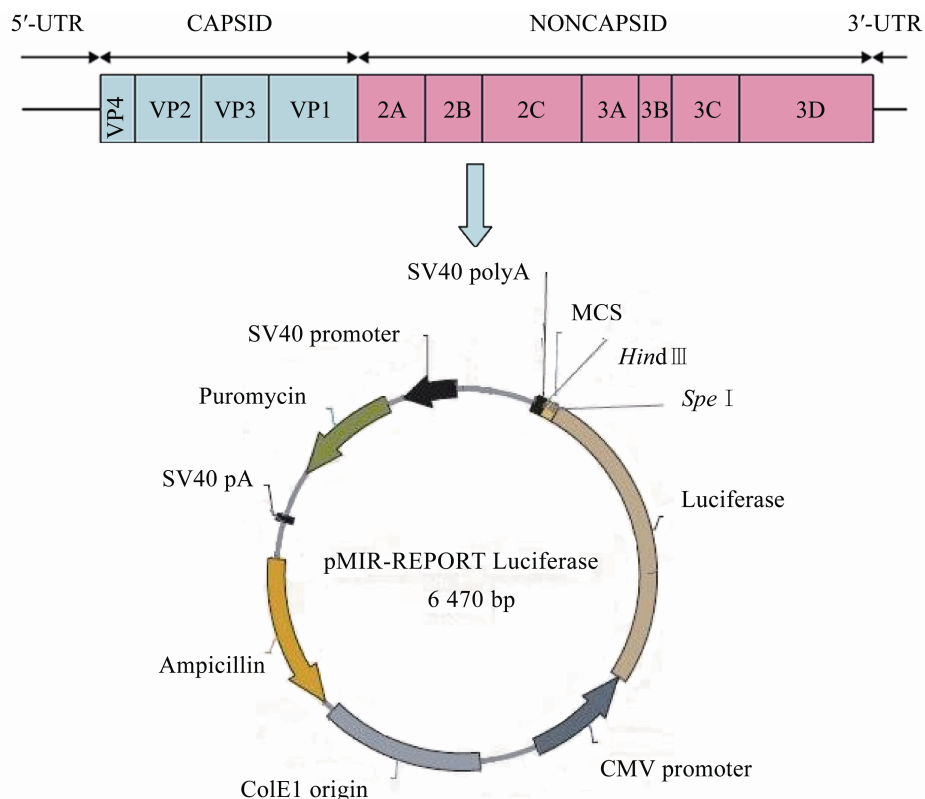


图 1 双荧光素酶报告系统构建

Fig. 1 Construction of Luciferase dual reporter analysis system for selection of miRNAs putative targets. Circular map of the pMIR vector. The EV71 genes were inserted into the *Spe I* / *Hind III* sites. pRL-CMV vector was used as control.

2.2 EV71 病毒的 5'-UTR 基因片段是宿主细胞 miRNAs 的作用靶点

将构建的重组 pMIR 载体和 pRL-CMV 载体共转染 24 孔板培养的 RD 细胞, 30 h 后进行 Luciferase 双荧光检测。如图 2 所示, 实验对照组为转染 pMIR 空载体的细胞, 结果发现与对照组相比, 转染 pMIR-5'UTR 重组载体的细胞的相对荧光素酶活性抑制最为显著。由此推测报告基因表达的下调可能是宿主 miRNAs 介导的抑制作用, 病毒 5'-UTR 基因可能是 miRNAs 的作用靶点。为了更加明确作用位点, 将 EV71 病毒 5'-UTR 基因片段分为 3 个亚片段连接到 pMIR 载体中, 构建重组载体 pMIR-EV71-(5'UTR-1、5'UTR-2、5'UTR-3)。图 3 结果显示, 与对照组相比, 转染 pMIR-5'UTR-1 重组载体的细胞的相对荧光素酶活性最低。以上结果说明 5'UTR-1 基因片段很有可能是宿主 miRNAs 的潜在的作用靶点从而能够抑制报告基因荧光素酶的表达。

2.3 靶向 5'UTR-1 基因片段的 miRNAs 的预测

为了确定宿主细胞 miRNAs 是否能够功能

性抑制 pMIR-5'UTR-1 重组载体的荧光素酶活性, 我们利用 MicroInspector 和 ViTa 预测 5'-UTR-1 基因片段上潜在结合位点的 miRNAs, 用 rna22 和 RNA 杂交在线程序 (Hybrid online program) 验证预测结果, 初步选定 miR373 和 miR542-5p 可能是潜在的能够靶向 EV71 病毒基因 5'-UTR-1 的 miRNAs, 其序列及与 5'-UTR-1 基因片段的互补配对模式见表 3。序列分析显示 miR373 和 miR542-5p 5' 端的种子序列与 5'-UTR-1 基因上的靶点序列完全匹配。

2.4 miR373 和 miR542-5p 对 pMIR-5'UTR-1 载体荧光素酶活性的影响

将合成的 miR373 和 miR542-5p mimics, miR-RiboTM mimics Negative control 为阴性对照, 分别同 pMIR-5'UTR-1 和 pRL-CMV 质粒共转染 RD 细胞, 30 h 后进行 Luciferase 双荧光检测。结果发现 miR373 和 miR542-5p 能在一定程度上下调荧光素酶的活性 (图 4)。这进一步验证了 miR373 和 miR542-5p 能够通过靶向 EV71 病毒基因 5'-UTR-1 发挥作用。

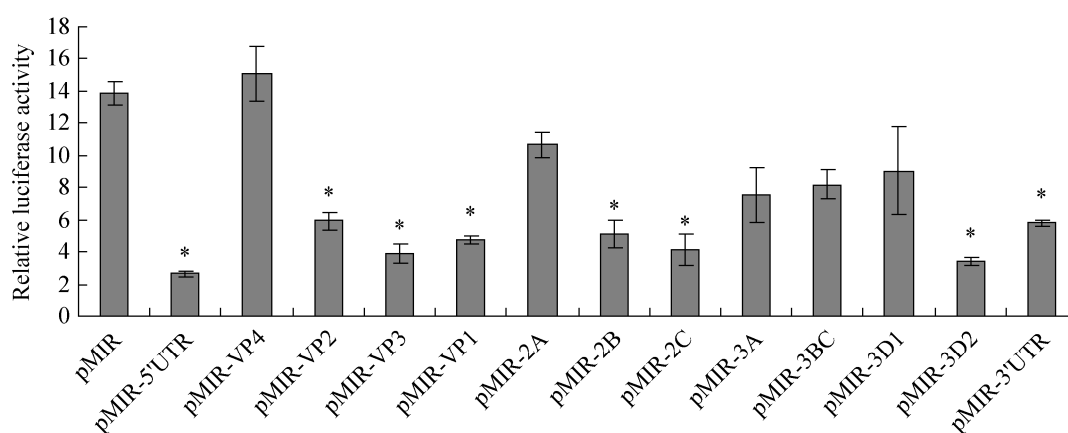


图 2 EV71 病毒 13 个基因片段重组 pMIR 载体的相对荧光素酶活性比较

Fig. 2 Relative luciferase activity from the pMIR reporter constructs carrying one of 13 fragments of EV71 and pRL-CMV vector. Both pRL-CMV and pMIR vector were transfected into RD cell, 30 h after transfection, dual luciferase activity were assayed. pMIR vector without gene inserted was used as control. $n=3$. * $P<0.05$.

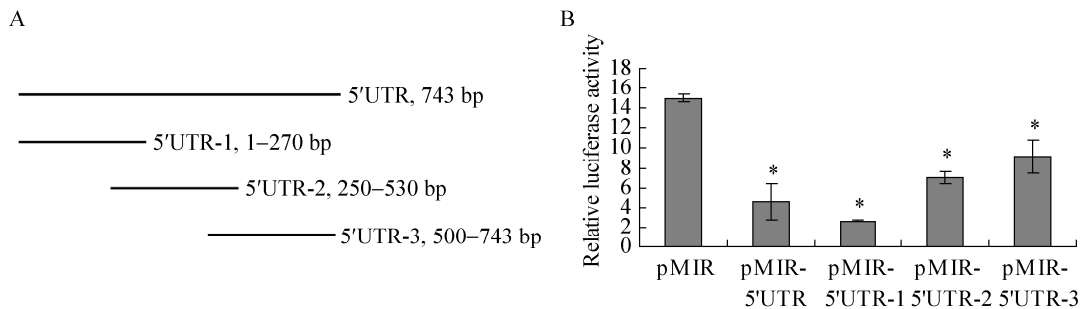


图3 EV71病毒5'-UTR 3个亚基因片段重组pMIR载体的相对荧光素酶活性比较

Fig. 3 Relative luciferase activity from the pMIR reporter constructs carrying fragments from the dissection of the 5'-UTR gene and pRL-CMV vector. Both pRL-CMV and pMIR vector were transfected into RD cell, 30 h after transfection, dual luciferase activity were assayed. pMIR vector without gene inserted was used as control. $n=3$. $*P<0.05$.

表3 miR373和miR542-5p序列及与5'-UTR-1基因片段的互补配对模式

Table 3 Model of hybridization between the miR373, miR542-5p and 5'UTR-1 mRNA were predicted using RNA Hybrid software

miRNAs	Sequence (5'-3')	Target location	Hybridization
miR-373	GAAGUGCUUCGAUUUGGGGUGU	155-176	uGUGGGGUUUUAGCUUCGUGAAG : : : tCGCATCTTGATC-AAGCACTTC
miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	159-187	gAGCACU-GUAC-U----AC-UAGGGGcu aTCTTGATCAAGCACTTCTGTATCCCCGg

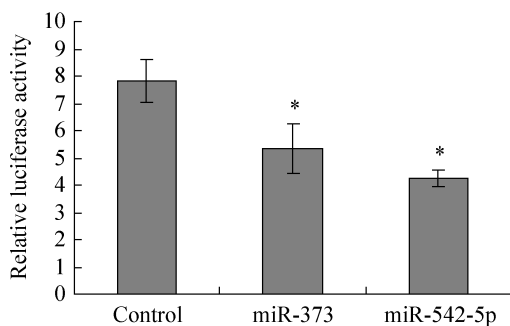


图4 miR373和miR542-5p对pMIR-5'UTR-1载体荧光素酶活性的影响

Fig. 4 The relative luciferase activity from pMIR-5'UTR-1 and pRL-CMV vector in RD cells with overexpressing miR373 and miR542-5p. miR-RiboTM mimics Negative control was used as control, $n=3$. $*P<0.05$.

2.5 miR373和miR542-5p调控EV71在RD细胞中病毒蛋白的表达

为了验证 miR373 和 miR542-5p 靶向病毒 5'-UTR-1 的调控作用能否影响 EV71 病毒在宿

主细胞中的复制,将合成的 miR373 和 miR542-5p mimics, miR-RiboTM mimics Negative control 为阴性对照,分别转染 12 孔板培养的 RD 细胞,感染病毒 48 h 后提取细胞蛋白,通过 Western blotting 检测 EV71 病毒蛋白表达水平,以 β -actin 为内参,对比各实验组和对照组 EV71 病毒蛋白的表达量,结果见图 5。结果表明与对照相比,miR373 和 miR542-5p 能够抑制 EV71 病毒蛋白在 RD 细胞中的表达。

2.6 miR373和miR542-5p调控EV71在RD细胞中病毒mRNA的表达

为了进一步验证 miR373 和 miR542-5p 能够调控 EV71 病毒在宿主细胞中的复制,将合成的 miR373、miR542-5p mimics 和 miR-RiboTM mimics Negative control 为阴性对照,分别转染 12 孔板培养的 RD 细胞,感染病毒 48 h 后用 Trizol

法提取总 RNA ,反转录成 cDNA 后 ,使用 Real-time PCR 分析 miR373 和 miR542-5p 对 EV71 病毒 mRNA 表达的影响 ,结果见图 6。结果表明与对

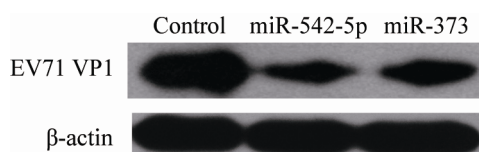


图 5 Western blotting 检测 miR373 和 miR542-5p 对 EV71 在 RD 细胞中病毒蛋白表达的影响

Fig. 5 Western blotting analysis of the effects of miR373 and miR542-5p on EV71 expression in RD cell. The lysates of total cells infected with EV71 were collected and analyzed for VP1 protein. Its decrease was determined using EV71 monoclonal antibody. The Beta-actin was used as an internal control and demonstrated equal loading of total protein. miR-RiboTM mimics Negative control was used as control.

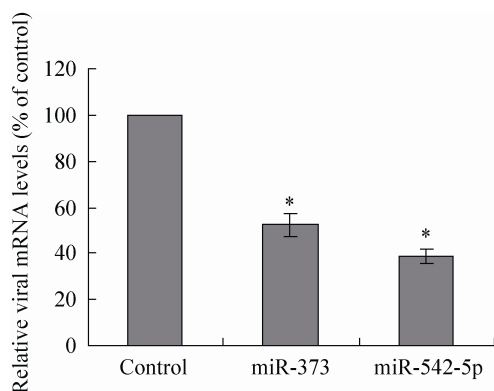


图 6 Real-time PCR 检测 miR373 和 miR542-5p 对 EV71 在 RD 细胞中病毒 mRNA 表达的影响

Fig. 6 Real-time PCR analysis of the effects of miR373 and miR542-5p on EV71 mRNA in RD cell. Cultured supernatants of RD cells infected with EV71 were taken off at 48 h post-infection and viral mRNA of the rest cells was extracted by means of TRIzol, and then subjected to a Real-time PCR relative quantification assay. The viral RNA transcripts level in control was set as 100%. miR-RiboTM mimics Negative control was used as control. The data shown represent the mean percentage of RNA transcripts $\pm s$ from three independent experiments. * $P < 0.05$.

照相比 ,转染 miR373 和 miR542-5p 的细胞中 EV71 病毒 mRNA 表达分别下调了 $47.59\% \pm 4.89\%$ 和 $61.41\% \pm 2.69\%$,说明 miR373 和 miR542-5p 能够促抑制 EV71 病毒 mRNA 在 RD 细胞中的表达。这一结果与 Western blotting 实验结果一致。

3 讨论

病毒感染细胞后 ,与宿主细胞发生复杂的相互作用 ,二者相互影响。病毒进入宿主细胞后 ,促使宿主细胞发生有利于病毒自身复制增殖的改变 ,包括 miRNAs 表达水平的变化。如在 Epstein-Barr 病毒感染细胞后能诱导宿主细胞产生 miR155 ,miR155 参与了 Epstein-Barr 病毒调控宿主基因表达的过程^[6]。而 EB 病毒的 LMP1 蛋白通过 NF- κ B 途径能诱导宿主细胞中 miR146a 的表达 ,miR146a 通过调节宿主细胞的天然免疫反应 ,在诱导和维持 EB 病毒的潜伏中起重要作用^[8]。病毒能影响细胞 miRNAs 的表达水平 ,而 miRNAs 也能对病毒蛋白的表达进行调控 ,影响病毒在宿主细胞中的复制。在宿主细胞受到病毒感染后 ,免疫系统也会针对病毒产生抗病毒反应 ,其中某些就是通过 miRNAs 的作用来实现的。如 HIV 感染后 ,宿主细胞编码的一系列靶向 HIV 蛋白的 miRNAs 能抑制病毒的复制 ,其中 miR29a 和 miR29b 可以靶向 *nef* 基因 ,miR149 可以靶向 *vpr* 基因 ,miR378 可以靶向 *env* 基因 ,而 miR324-5p 则可以靶向 *vif* 基因^[9]。哺乳动物的 miR32 则能抑制 I 型泡沫病毒 (PFV-I) 在宿主细胞中的积累。

病毒对于宿主细胞这种利用 miRNAs 分子抗病毒感染作用也有相应的拮抗方式 ,如 HCV 的核心蛋白能直接作用于 miRNAs 成熟的关键核酸酶 Dicer^[10] ,而 HIV-1 病毒编码的 Tat 蛋白也

能与Dicer酶相互作用抑制其功能^[11], 这些蛋白起到了RNA沉默抑制剂的作用。另外Haasnoot^[12]等在Vero细胞中也检测到NS1能抑制siRNA对Luciferase蛋白表达的下调, 表现出RNA沉默抑制剂的作用。

另外大多病毒基因组编码的 miRNAs 不仅可以靶向自身蛋白, 还可以调控宿主抗病毒通路, 如人巨细胞病毒 HCMV 编码的 miRUL112-1 能靶向病毒基因组的 3'非编码区, 调控包括即早期蛋白 IE72 在内的多个病毒蛋白的表达^[13]; 而 HIV-1 则能通过编码参与调控 CD4、CD28、IL-2、IL-12 等细胞因子的 miRNAs, 来抑制宿主的抗病毒作用^[14-15]。一般认为 miRNAs 是通过增强病毒蛋白表达、抑制宿主细胞抗病毒功能或抑制宿主细胞凋亡等几个途径来促进病毒复制的。Jopling 等^[16]的研究表明 miR122 通过与 HCV 基因组的 5'非编码区相互作用使病毒 RNA 在细胞中富集, 促进病毒基因的转录, 从而促进病毒的复制。Cui 等对感染 EV71 病毒后的 Hep2 细胞进行深度测序, 发现感染 EV71 病毒后 miRNAs 表达的变化^[17], 其中发现有 64 种 miRNA 的表达量增加超过了 2 倍, 并通过基因本体 (Gene ontology) 分析, 发现这其中大部分基因参与 EV71 感染相关的神经活动、免疫应答和细胞凋亡。其首次验证了 miRNA 与 EV71 感染的关系, 但是其中具体的作用机制还有待于深入研究。为本课题 miRNAs 的研究提供了有力的参考依据。Ho 等还发现肠道病毒诱导的 miR-141 能够通过靶向 eIF4E 进而抑制宿主蛋白的表达^[18]。RD 细胞感染 EV71 后, 通过定量 PCR 检测 miRNAs 的表达变化, 发现 miR-141 和 miR-146a 的表达增高, 其他还有 14 种 miRNAs 表达下调。这一发现是研究 miRNA 在调节病毒与宿主的间

的相互作用关系方面取得的又一进展。Zheng 等^[19]发现 EV71 感染的细胞中 miR-296-5p 表达水平显著上调, 并且 miR-296-5p 通过靶向病毒基因组抑制病毒的复制, 证明细胞 miRNAs 能够抑制病毒感染。根据研究报道病毒感染的细胞中 miR-23b 表达水平显著下调, Wen 等^[20]运用生物学软件预测 miR-23b 在 EV71 基因组上的靶位点, 并验证了 miR-23b 能够通过靶向 EV71 3'UTR 区下调 VP1 蛋白表达而抑制 EV71 的复制。Li 等^[21]研究表明 miRNA-548 靶向 IFN- λ 1 3'UTR 并下调 IFN- λ 1 的表达。miRNA-548 促进 EV71 的感染, 而且病毒感染可抑制 miRNA-548, 总之 miRNA-548 能够通过作用于 IFN- λ 1 而调节宿主抗病毒应答, 研究为抗病毒治疗提供了新的潜在治疗靶点。在本实验中筛选出的 miR373 和 miR542-5p, 经过初步验证其能通过靶向 EV71 基因组的 5'UTR 区发挥作用, 从而抑制 EV71 病毒的复制。但其具体的调控 EV71 病毒复制的作用机制还需要进一步的研究。

REFERENCES

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2009, 84(1): 55-71.
- [3] Schickel R, Boyerinas B, Park SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5959-5974.
- [4] Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 2005, 308(5721): 557-560.
- [5] Henke JI, Goergen D, Zheng J, et al.

- MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, 2008, 27(24): 3300–3310.
- [6] Yin Q, McBride J, Fewell C, et al. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J Virol*, 2008, 82(11): 5295–5306.
- [7] Chang J, Guo JT, Jiang D, et al. Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol*, 2008, 82(16): 8215–8223.
- [8] Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, et al. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1(LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol*, 2007, 4(3): 131–137.
- [9] Hariharan M, Scaria V, Pillai B, et al. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(4): 1214–1218.
- [10] Chen W, Zhang Z, Chen J, et al. HCV core protein interacts with Dicer to antagonize RNA silencing. *Virus Res*, 2008, 133(2): 250–258.
- [11] Bennasser Y, Jeang KT. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology*, 2006, 3: 95–100.
- [12] Haasnoot J, de Vries W, Geutjes EJ, et al. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*, 2007, 3(6): 794–803.
- [13] Grey F, Meyers H, White EA, et al. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog*, 2007, 3(11): 1593–1602.
- [14] Bennasser Y, Le SY, Yeung ML, et al. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology*, 2004, 1: 43–47.
- [15] Couturier JP, Root-Bernstein RS. HIV may produce inhibitory microRNAs (miRNAs) that block production of CD28, CD4 and some interleukins. *J Theor Biol*, 2005, 235(2): 169–184.
- [16] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 2005, 309(5740): 1577–1581.
- [17] Cui LB, Guo XL, Qi YH, et al. Identification of microRNAs involved in the host response to enterovirus 71 infection by deep sequencing approach. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 425939.
- [18] Ho BC, Yu SL, Chen JJ, et al. Enterovirus-induced miR-141 contributes to shutoff of host protein translation by targeting the translation initiation factor eIF4E. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(1): 58–69.
- [19] Zheng Z, Ke X, Wang M, et al. Human microRNA hsa-miR-296-5p suppresses enterovirus 71 replication by targeting the viral genome. *J Virol*, 2013, 87(10): 5645–5656.
- [20] Wen BP, Dai HJ, Yang YH, et al. MicroRNA-23b inhibits enterovirus 71 replication through downregulation of EV71 VP1 protein. *Intervirology*, 2013, 56(3): 195–200.
- [21] Li Y, Xie J, Xu X, et al. MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN- λ 1. *Protein Cell*, 2013, 4(2): 130–141.

(本文责编 陈宏宇)