

# 猪圆环病毒 2 型通过外泌体 miR-125a-5p 靶向 *Bcl-2* 诱导淋巴细胞凋亡

段滇宁<sup>1,2</sup>, 沈华伟<sup>1</sup>, 潘艳敏<sup>1</sup>, 冯睿<sup>1</sup>, 张霖<sup>1</sup>, 陆灵光<sup>1</sup>, 刘建奎<sup>1,3</sup>, 邱龙新<sup>1,2</sup>, 陈洪博<sup>1,4</sup>

- 1 龙岩学院 生命科学学院, 福建 龙岩 364012
- 2 福建省预防兽医学与生物技术高校重点实验室, 福建 龙岩 364012
- 3 动物源性人兽共患病防控福建省高校工程研究中心, 福建 龙岩 364012
- 4 福建省家畜传染病防治与生物技术重点实验室, 福建 龙岩 364012

段滇宁, 沈华伟, 潘艳敏, 冯睿, 张霖, 陆灵光, 刘建奎, 邱龙新, 陈洪博. 猪圆环病毒 2 型通过外泌体 miR-125a-5p 靶向 *Bcl-2* 诱导淋巴细胞凋亡. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2891-2901.

DUAN DN, SHEN HW, PAN YM, FENG R, ZHANG L, LU LG, LIU JK, QIU LX, CHEN HB. Porcine circovirus type 2 induces apoptosis by exosomal miR-125a-5p targeting *Bcl-2* in porcine lymphocytes. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2891-2901.

**摘要:** 为研究 miR-125a-5p 在猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 诱导淋巴细胞凋亡中的作用及其作用机制, 以 PCV2 感染 PK-15 细胞外泌体孵育的淋巴细胞为研究对象, 采用流式细胞术、蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 和实时荧光定量 PCR, 检测淋巴细胞凋亡率及凋亡相关 miRNA 表达; 合成 miR-125a-5p 模拟物和抑制物转染 PK-15 细胞, 检测 miR-125a-5p 过表达或抑制表达后细胞凋亡率; 采用生物信息学方法预测 miR-125a-5p 的靶基因, 双荧光素酶报告基因检测 miR-125a-5p 对靶基因的调控; Western blotting 检测外泌体孵育淋巴细胞的线粒体凋亡信号通路相关蛋白 *Bcl-2*、*Bax*、细胞色素 C 和 caspase-3 的表达。结果显示, 感染 PCV2 的 PK-15 细胞分泌的外泌体极显著提高淋巴细胞凋亡率, 在一定浓度范围内呈剂量依赖性; 与 PCV2 诱导细胞凋亡相关的 miRNA 中, miR-125a-5p 表达量极显著升高, miR-125a-5p 模拟物转染细胞后极显著提高细胞凋亡率; 利用 TargetScan 预测发现, miR-125a-5p 与 *Bcl-2* 3'UTR 区有结合位点, miR-125a-5p 模拟物极显著抑制 pmir-*Bcl-2* 3'UTR-WT 荧光素酶活性, 对 pmir-*Bcl-2* 3'UTR-MuT 的荧光素酶活性无明显改变; 外泌体孵育的淋巴细胞 *Bcl-2* 表达量显著降低, *Bax*、细胞色素 C 的释放和 caspase-3 表达量显著升高, *Bcl-2*/*Bax* 的比值极显著降低。这表明, PCV2 通过外泌体诱导淋巴细胞上调 miR-125a-5p

**Received:** March 29, 2022; **Accepted:** May 24, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (32102628); Special Projects for Local Science and Technology Development Guided by the Central Government, China (2019L3011); Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2021J01568); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students, China (S202111312033)

**Corresponding author:** CHEN Hongbo. Tel: +86-597-2797255; E-mail: 82014021@lyun.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (32102628); 中央引导地方科技发展专项项目 (2019L3011); 福建省自然科学基金 (2021J01568); 大学生创新创业训练项目 (S202111312033)

的表达, 进而抑制 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达, 激活淋巴细胞线粒体凋亡通路诱导细胞凋亡。

**关键词:** miR-125a-5p; 猪圆环病毒 2 型; 外泌体; 细胞凋亡

## Porcine circovirus type 2 induces apoptosis by exosomal miR-125a-5p targeting *Bcl-2* in porcine lymphocytes

DUAN Dianning<sup>1,2</sup>, SHEN Huawei<sup>1</sup>, PAN Yanmin<sup>1</sup>, FENG Rui<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>,  
LU Linguang<sup>1</sup>, LIU Jiankui<sup>1,3</sup>, QIU Longxin<sup>1,2</sup>, CHEN Hongbo<sup>1,4</sup>

1 College of Life Science, Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China

2 Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine and Biotechnology (Longyan University), Longyan 364012, Fujian, China

3 Engineering Research Center for the Prevention and Control of Animal Original Zoonosis, Longyan 364012, Fujian, China

4 Fujian Provincial Key Laboratory for the Prevention and Control of Animal Infectious Diseases and Biotechnology, Longyan 364012, Fujian, China

**Abstract:** In order to investigate the apoptosis triggered by porcine circovirus type 2 (PCV2) in lymphocytes and the underlying mechanism, the levels of apoptosis and the expression levels of miRNA were examined by flow cytometry, Western blotting and real-time PCR (qPCR). The mimics or inhibitors of miR-125a-5p, an apoptosis-related miRNA, were transfected into PK-15 cells, and the apoptosis rate was examined upon overexpression or inhibition of mir-125a-5p. The target gene of mir-125a-5p was predicted by bioinformatics method, and the regulation of mir-125a-5p on the target gene was analyzed by luciferase reporter assay. The expressions of Bcl-2, Bax, cytochrome C and caspase-3 were detected by Western blotting. The results showed that exosomes secreted by PK-15 cells infected with PCV2 significantly increased the lymphocyte apoptosis rate, which was dose-dependent in certain concentration range. The expression of miR-125a-5p was dramatically increased. The apoptosis rate was increased significantly in the cells transfected with miR-125a-5p. It was predicted that there were binding sites of miR-125a-5p at *Bcl-2* 3'UTR by TargetScan. The luciferase activity of wild-type pmir-*Bcl-2* 3'UTR was inhibited significantly by miR-125a-5p mimics, but that of mutant pmir-*Bcl-2* 3'UTR was not changed. By Western blotting, Bcl-2 was reduced significantly, while Bax, cytochrome C and caspase-3 increased significantly, and the ratio of Bcl-2/Bax was significantly decreased. These results showed that PCV2 up-regulated the expression of miR-125a-5p through exosomes, then inhibited the expression of Bcl-2 at both mRNA and protein level, activated mitochondrial apoptosis pathway and induced apoptosis in lymphocytes.

**Keywords:** miR-125a-5p; porcine circovirus type 2; exosomes; apoptosis

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 主要引起猪圆环病毒病 (porcine circovirus disease, PCVD), 包括断奶仔猪多系统衰竭综合

征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪皮炎-肾病综合征 (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)、繁殖障碍、

先天性震颤等<sup>[1-2]</sup>。PCV2 主要侵害免疫系统,主要表现为感染猪严重的淋巴组织(脾脏、淋巴结等)损伤,以外周血和免疫器官中淋巴细胞的大量凋亡坏死缺失和单核巨噬细胞浸润为主要特征,诱发猪群产生严重的免疫抑制状态,从而继发或并发其他细菌或病毒感染,给全世界的养猪业带来了严重的经济损失<sup>[3-4]</sup>。

外泌体(exosomes)是细胞分泌到胞外的一种囊泡(extracellular vesicles, EVs),其大小为 30–150 nm,具有双层膜结构和盘状囊泡形态,含有丰富的内容物(包括 mRNA、miRNA、非编码 RNA、蛋白和脂质等),通过传递携带的内容物参与细胞间的分子传递来调节受体细胞的生物学活性<sup>[5]</sup>。研究显示,miRNA 能稳定存在于血清、胆汁、乳汁和尿液等来源的外泌体中,通过外泌体转移到靶细胞从而在细胞信息交流中起重要作用<sup>[6]</sup>。miRNA 是一类非编码 RNA,大小长约 20–25 个核苷酸,能够调节细胞增殖和凋亡、病毒感染与增殖、发育、造血过程、器官形成和脂肪代谢等生物过程<sup>[7]</sup>。目前,关于 PCV2 在体内或体外感染的 miRNA 组学研究已有大量报道<sup>[8-11]</sup>,但 PCV2 感染所引起的差异 miRNA 是否通过外泌体影响淋巴细胞凋亡却尚未见报道,此问题的研究对阐明 PCV2 的免疫抑制机理具有重要意义。本研究以 PCV2 感染 PK-15 细胞外泌体孵育的淋巴细胞为研究对象,检测外泌体对淋巴细胞凋亡影响及相关 miRNA 的表达变化,选取差异最显著的 miR-125a-5p 验证其靶信号分子,进一步研究淋巴细胞凋亡的信号通路,为阐明 PCV2 的致病机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞、病毒和质粒

PK-15 细胞系(无 PCV 污染)和 PCV2-SH

(GenBank: AY686763)病毒滴度为  $10^{-5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL 由本实验室保存<sup>[12]</sup>; pmirGLO 质粒购自南京晶麦生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Biological Industries (BI); 转染试剂(Lipofectamine™ 3000)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Annexin V-FITC/PI Kit 凋亡检测试剂盒、Total RNA Extraction Reagent、HiScript III RT SuperMix 和 SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 小鼠抗 TSG101 抗体购自 Abcam 公司; 兔抗 PCV2 Cap 多克隆抗体、兔抗 CD81 多克隆抗体、兔抗 GRP78 多克隆抗体、兔抗 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗 Bax 多克隆抗体、兔抗细胞色素 C 多克隆抗体和兔抗 Caspase-3 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、山羊抗兔 IgG-HRP、SDS-PAGE 凝胶制试剂盒和 ECL 化学发光检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司; miR-125a-5p 模拟物(miR-125a-5p mimics)、模拟物对照(mimics control)、miR-125a-5p 抑制物(miR-125a-5p inhibitor)和抑制物对照(inhibitor control)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 外泌体提取试剂盒购自上海宇玫博(Umibio)生物科技有限公司; 猪淋巴细胞分离液购自北京达科为生物技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 外泌体的提取与鉴定

将胎牛血清 100 000×g 离心 90 min, 取上清液为无外泌体血清, 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用; PK-15 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中使用含 10% 无外泌体胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 收集空白对照组细胞上清液, 按试剂盒说明书提取外泌体, 标记为 N-Exo; 生长良好的 PK-15 细胞融合度达到 80% 时, 将 PCV2-SH 按

感染复数为 1 MOI 接种 PK-15 细胞, 孵育 1 h 后换为胎牛血清 (无外泌体) 含量为 2% 的 DMEM 维持液, 48 h 后收集细胞上清液, 按试剂盒说明书提取外泌体, 标记为 P-Exo; BCA 法测定外泌体浓度。取 50  $\mu$ L 外泌体滴在 2 mm 铜网片, 在室温下用醋酸双氧铀溶液染色 5 min, 干燥 10 min, 在 80 kV 下用透射电镜观察样品形态。

### 1.2.2 外周血淋巴细胞的分离培养

取 PCV2、PRRSV 抗原和抗体均为阴性的 35 日龄健康仔猪的新鲜抗凝血, 与 Hank's 液 1:1 混匀, 按分离液说明书分离淋巴细胞, 将细胞密度调整为  $10^6$  个/mL 备用, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中使用含 10% 无外泌体胎牛血清的 1640 培养液培养。将淋巴细胞加入 12 孔细胞培养板中, 每孔 2 mL, 随机分为: Mock 组、PCV2 组、N-Exo 组 (200 ng/mL)、P-Exo 组 (100、200 和 500 ng/mL) 和 Exo lysis 组 (P-Exo 与外泌体裂解液 1:1 混合), 培养 48 h 后收取样品。

### 1.2.3 Western blotting 分析

将样品与 5 $\times$ SDS 变性缓冲液按 4:1 混匀, 煮沸变性 10 min, 经 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到 0.22  $\mu$ m PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉在 37  $^{\circ}$ C 恒温箱封闭 2 h, 4  $^{\circ}$ C 冰箱孵育目的蛋白单克隆抗体或多克隆抗体 (1:1 000 稀释) 过夜, TBST 洗 10 min (3 次), 37  $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 HRP 标记的羊抗兔二抗 2 h (1:1 000 稀释),

TBST 洗 10 min (3 次), PVDF 膜加 ECL 化学发光试剂后检测结果, 用 Image J 对结果条带进行灰度分析。

### 1.2.4 细胞凋亡检测

收取细胞样品, 加入预冷的 1 $\times$ PBS (pH 7.4), 4  $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 10 min, 清洗两次, 100  $\mu$ L 1 $\times$ 结合缓冲液轻轻重悬细胞, 分别加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI, 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 再加入 400  $\mu$ L 1 $\times$ 结合缓冲液轻轻混匀, Invitrogen Attune NxT 流式细胞仪检测与分析。

### 1.2.5 实时荧光定量 PCR (qPCR)

用 TRIzol 方法提取淋巴细胞总 RNA, 根据茎-环序列 (5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC-3') 设计 miRNA 颈环引物 (表 1), 进行特异性逆转录。根据荧光定量 PCR 方法 (qPCR) 检测 miRNA 表达量, 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环。检测结果以 U6 作为内参照, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法计算 miRNA 的相对表达量。

### 1.2.6 细胞转染

PK-15 细胞以  $10^5$  个/mL 接种到 6 孔细胞培养板中, 每孔 2 mL, 细胞传代 12 h 后融合度达到 80%, 以 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 为转染载体, 按照转染试剂说明书将 miR-125a-5p mimics、mimics control (MC)、inhibitor 和 inhibitor control (IC) 转染细胞, 终浓度为 100 nmol/L, 转染 24 h

表 1 扩增 miRNA 的引物

Table 1 Primers for amplifying miRNA

miRNAs	Primers	Sequences (5'→3')
miR-125a-5p	miR-125a-5p-F	TGGTTGTTCCCTGAGACCCTTTA
miR-15b-5p	miR-15b-5p-F	TGGTTGTTAGCAGCACATCATGG
miR-140-5p	miR-140-5p-F	GAGACGTCAGTGGTTTTACCCTA
miR-132	miR-132-F	GAGACGTACCGTGGCTTTTCGATT
miR-92b-3p	miR-92b-3p-F	TGGTTGTTTATTGCACTCGTCCCG
miR-30b-3p	miR-30b-3p-F	TGGTTGTTGTAACATCCTACAC
reverse primer	UN-R	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
	U6-R	AACGCTTACGAATTTGCGT

后将 PCV2-SH 按感染复数为 1 MOI 接种 PK-15 细胞, 孵育 1 h 后换为胎牛血清 (无外泌体) 含量为 2% 的 DMEM 维持液, 48 h 后收集细胞流式细胞术检测细胞凋亡。

### 1.2.7 双荧光素酶报告基因试验

将 *Bcl-2* 3' 端非翻译区 (UTR) 序列与荧光素酶报告载体 pmirGLO 连接, 构建野生型 pmir-*Bcl-2* 3' UTR-WT (WT) 和突变型 pmir-*Bcl-2* 3' UTR-MuT (MuT)。PK-15 细胞在 24 孔细胞培养板中融合度达到 80% 左右, 采用 Lipofectamine™ 3000 分别将 500 ng 的 WT 或 MuT 质粒与终浓度为 100 nmol/L mimics 或 MC 共转染 PK-15 细胞, 转染后培养 48 h, 按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书, 使用多功能酶标仪检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性值, 以两者的比值评价 *Bcl-2* 基因的表达程度。

### 1.3 数据分析

试验数据用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析, 组间差异性采用单因素方差分析确定, 结果以平均值±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示;  $P < 0.05$  表示差异显著;  $P < 0.01$  表示差异极显著; ns 表示无显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 外泌体的鉴定

透射电镜观察 PK-15 细胞上清液中外泌体的形态结构, 结果如图 1A 所示, 外泌体具有杯状囊泡结构, 呈典型圆形或椭圆形, 直径在 30–150 nm 之间。为了进一步鉴定提取的外泌体, 排除细胞碎片污染, 采用 Western blotting 方法检测外泌体存在特异性标记蛋白 TSG101、CD81 和以及外泌体中不存在的内质网应激蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78), 结果如图 1B 所示, 在 45 kDa 和 26 kDa 处细胞裂解物、N-Exo 和 P-Exo 中能检测到目的条带, 表明提取的外泌体携带了 TSG101 和 CD81 蛋白。GRP78 只在细胞裂解物中检测出, 在 N-Exo 和 P-Exo 中未检出, 表明纯化提取的外泌体不存在细胞碎片污染。

### 2.2 外泌体对淋巴细胞凋亡的影响

外泌体诱导淋巴细胞凋亡结果如图 2A 所示, 与 Mock 组相比, N-Exo 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 P-Exo 组细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 Exo lysis 组细胞凋亡率与

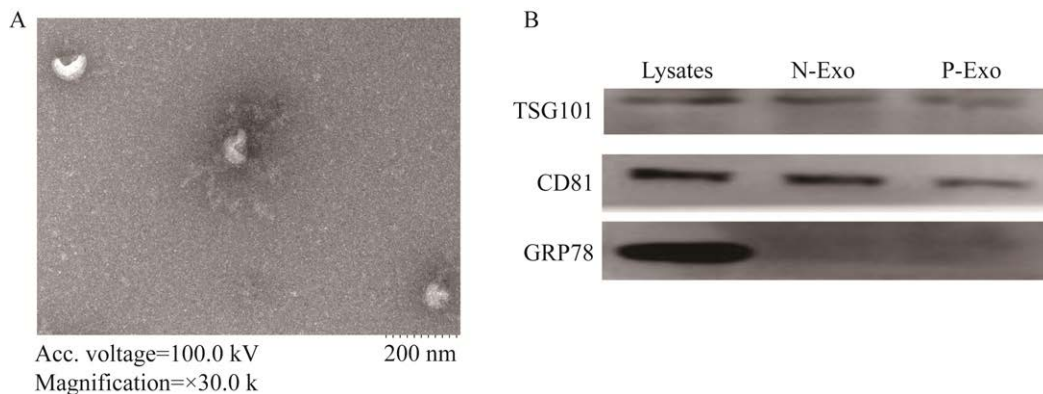


图 1 PCV2 感染 PK-15 细胞产生的外泌体的鉴定

Figure 1 Identification of exosomes isolated from PK-15 cells infected with PCV2. (A) Examination of exosome morphology and size by transmission electron microscopy. (B) The cell lysates and exosomes analyzed by Western blotting with antibody directed against TSG101, CD81 and GRP78.

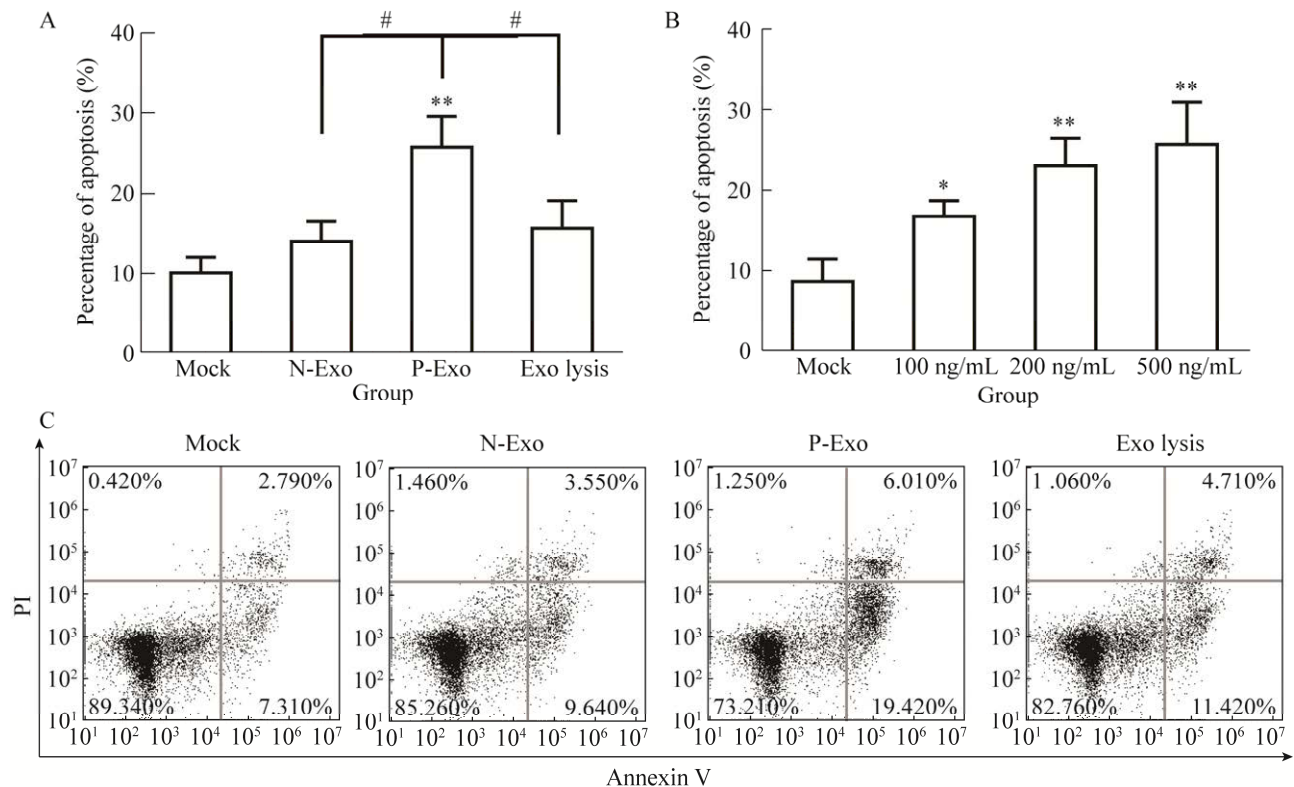


图2 外泌体对淋巴细胞凋亡的影响

Figure 2 The apoptosis of lymphocytes induced by exosomes. (A) The apoptosis of lymphocytes induced by various stimuli. (B) The apoptosis of lymphocytes induced by different concentrations of P-Exo. (C) The apoptosis of lymphocytes detected by flow cytometry. Compared with the mock group, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; compared with Exo lysis group, #:  $P < 0.05$ ; ##:  $P < 0.01$ . The same as below.

Mock 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 N-Exo 组和 Exo lysis 组相比, P-Exo 组细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ )。分别用 100、200 和 500 ng/mL P-Exo 孵育淋巴细胞, 细胞凋亡结果如图 2B 所示, 与 Mock 组相比, 100 ng/mL P-Exo 组淋巴细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 随着 P-Exo 浓度增加, 细胞凋亡率极显著升高 ( $P < 0.01$ )。上述结果表明, P-Exo 可诱导淋巴细胞凋亡, 在一定浓度范围内呈剂量依赖性, 后续试验选取 200 ng/mL P-Exo 作为试验浓度。

### 2.3 P-Exo 对淋巴细胞 miRNA 表达的作用

为进一步在 RNA 水平揭示 PCV2 诱导淋巴细胞凋亡机理, 查阅文献 PCV2 在体内或体外试验中差异表达的 miRNA<sup>[8-11]</sup>, 选取与细胞凋亡

相关 miRNA, 分别是 miR-125a-5p、miR-15b-5p、miR-140-5p、miR-132、miR-92b-3p 和 miR-30b-3p。外泌体孵育淋巴细胞后多种 miRNA 表达结果如图 3 所示, 与 N-Exo 组相比, P-Exo 组 miR-125a-5p 和 miR-15b-5p 表达量极显著升高 ( $P < 0.01$ ), miR-140-5p 和 miR-132 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), miR-92b-3p 和 miR-30b-3p 表达量升高, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), miR-125a-5p 的差异倍数最显著, 后续试验选取 miR-125a-5p 作为研究对象。

### 2.4 miR-125a-5p 对细胞凋亡影响

将 FAM mimics control 转染 PK-15 细胞, 流式细胞术检测转染效率, 试验结果如图 4A 所示, 转染效率达到 70% 左右, 满足试验需求。



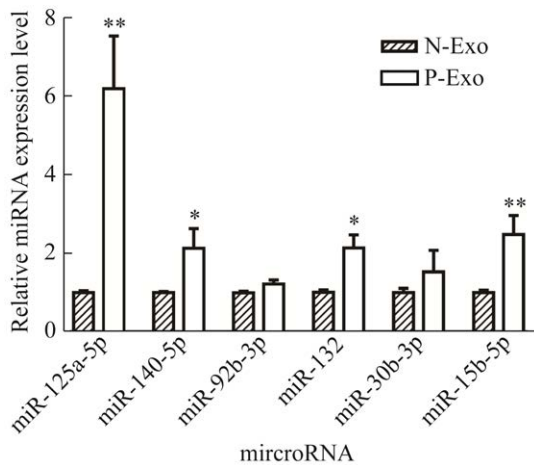


图 3 与细胞凋亡相关的 MIRNAS 的表达情况  
Figure 3 Expression of microRNAs related to apoptosis.

PK-15 细胞转染 MC、mimics、IC 或 inhibitor 后 24 h 感染 PCV2，继续培养 48 h 收取细胞样品，流式细胞术检测细胞凋亡，结果如图 4B 所示，与 MC 组相比，mimics 组中 miR-125a-5p 过表达后极显著提高 PCV2 诱导 PK-15 细胞凋亡率 ( $P < 0.01$ )；与 IC 组相比，inhibitor 组中 miR-125a-5p 抑制表达后显著降低 PCV2 诱导 PK-15 细胞凋亡率 ( $P < 0.05$ )。

### 2.5 miR-125a-5p 对靶基因 *Bcl-2* 的调控作用

为进一步确认 miR-125a-5p 调控的靶基因，

通过生物信息学预测，利用 TargetScan 网站预位点，如图 5A 所示。采用双荧光素酶报告基测发现，miR-125a-5p 与 *Bcl-2* 3'UTR 区有结合因实验检测 PK-15 细胞内 miR-125a-5p 对 *Bcl-2* 3'UTR 的调控，结果如图 5B 所示，与 MC 组相比，miR-125a-5p mimics 组极显著降低野生型报告基因质粒的荧光素酶活性 ( $P < 0.01$ )，而突变型报告基因质粒的荧光素酶活性无显著变化 ( $P > 0.05$ )，试验结果表明，miR-125a-5p 对 *Bcl-2* 基因具有调控作用；Western blotting 结果如图 5C 所示，与 MC 组相比，miR-125a-5p mimics 能够降低细胞内 *Bcl-2* 蛋白表达，转染 mimics 再感染 PCV2 使 *Bcl-2* 蛋白表达量进一步减低。

### 2.6 P-Exo 对淋巴细胞凋亡信号通路的影响

为进一步检测外泌体诱导淋巴细胞凋亡的信号通路，N-Exo 和 P-Exo 孵育淋巴细胞，Western blotting 检测淋巴细胞 *Bcl-2*、*Bax*、细胞色素 C 和 caspase-3 蛋白表达，试验结果如图 6 所示，与 Mock 组相比，P-Exo 组的 *Bcl-2* 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ )，*Bax*、细胞色素 C 和 caspase-3 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )，*Bcl-2/Bax* 值极显著降低 ( $P < 0.01$ )，结果表明，P-Exo 通过线粒体凋亡通路诱导淋巴细胞凋亡。

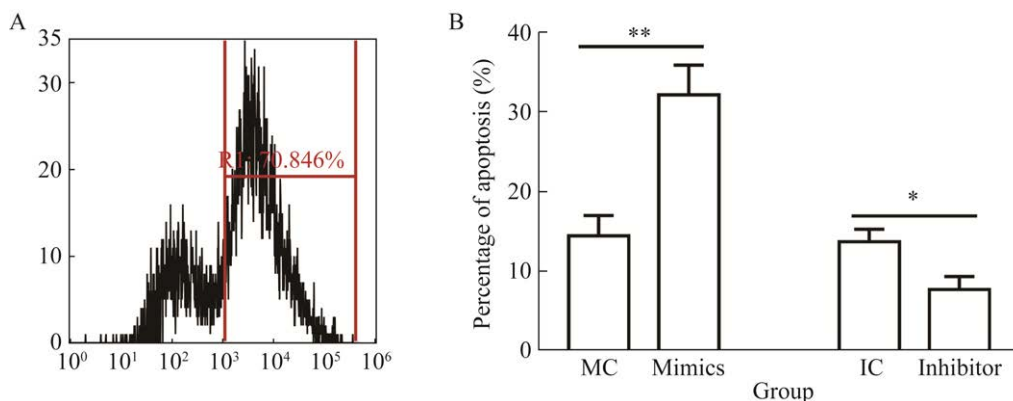


图 4 miR-125a-5p 对细胞凋亡的影响

Figure 4 The effect of miR-125a-5p on cells apoptosis. (A) miRNA transfection efficiency. (B) Effect of miRNA on apoptosis.

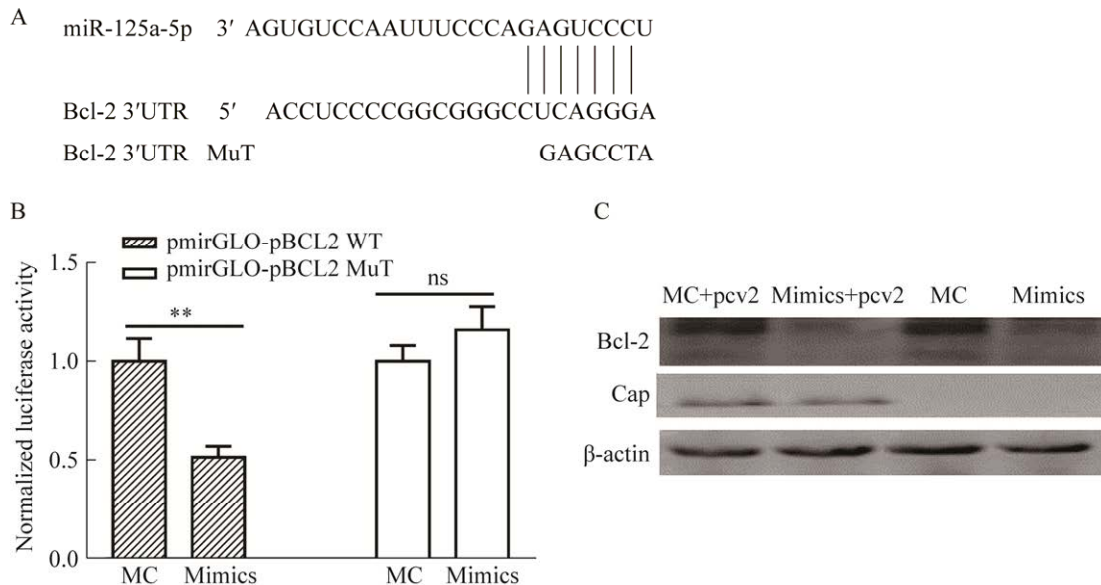


图5 miR-125a-5p对*Bcl-2* mRNA表达的影响

Figure 5 The effects of miR-125a-5p on *Bcl-2* mRNA expression. (A) The predicted target-binding site in the *Bcl-2* 3'UTR and miR-125a-5p. (B) The target relationship between miR-125a-5p and *Bcl-2* by dual luciferase reporter assay. (C) Western blotting analysis of *Bcl-2* expression in miR-125a-5p over-expressed PK-15 cells.

### 3 讨论

PCV2感染引起猪脾脏和淋巴结中淋巴细胞凋亡,使淋巴细胞严重缺失,机体细胞免疫和体液免疫功能受到影响,缺乏有效的免疫应答使猪呈现免疫抑制状态,从而诱发双重感染和多重感染<sup>[13]</sup>。PCV2在猪体内的靶细胞是单核细胞/巨噬细胞或树突状细胞,但在这些细胞中似乎没有复制。Vincent等研究报道显示,PCV2通过隐藏在巨噬细胞或树突状细胞内持续感染,PCV2可能利用这些细胞作为媒介在猪体内传播<sup>[14]</sup>。前期研究发现,PCV2感染PK-15细胞分泌的外泌体诱导脾脏淋巴细胞凋亡<sup>[12]</sup>,本研究显示,与N-Exo组和Exo lysis组相比,P-Exo能够显著诱导淋巴细胞凋亡,且随着P-Exo浓度升高细胞凋亡率也升高,表明P-Exo在诱导淋巴细胞凋亡中起重要作用。

近年来,外泌体的传递功能受到广泛关注,

外泌体含有丰富内容物,miRNA是重要的内容物之一,外泌体将miRNA运送到靶细胞发挥生物学活性。miRNA是一类由内源基因编码的非编码单链RNA分子,其长度约为19–25 nt,在生物发展进程中具有重要的调节作用<sup>[7,15–16]</sup>。目前关于PCV2感染猪后miRNA表达变化已有较多报道,Núñez-Hernández等研究显示,感染PCV2猪的淋巴结和扁桃体中存在大量差异变化miRNA,这些miRNA参与免疫系统相关的途径以及与PCV2发病机制相关的过程<sup>[17]</sup>;Zhang等通过高通量测序发现,PCV2感染LW猪或YL猪后差异miRNA与PCV2的蛋白表达、病毒DNA复制、T细胞活化、抑制宿主免疫系统相关基因表达相关<sup>[9]</sup>;Li等研究发现PCV2在体外感染PK-15细胞中不表达miRNA,鉴定的miRNA主要影响趋化因子、细胞因子表达和细胞凋亡<sup>[18]</sup>;Hong等研究发现PCV2的ORF1-3显著改变PK-15细胞内miRNA的表达,KEGG



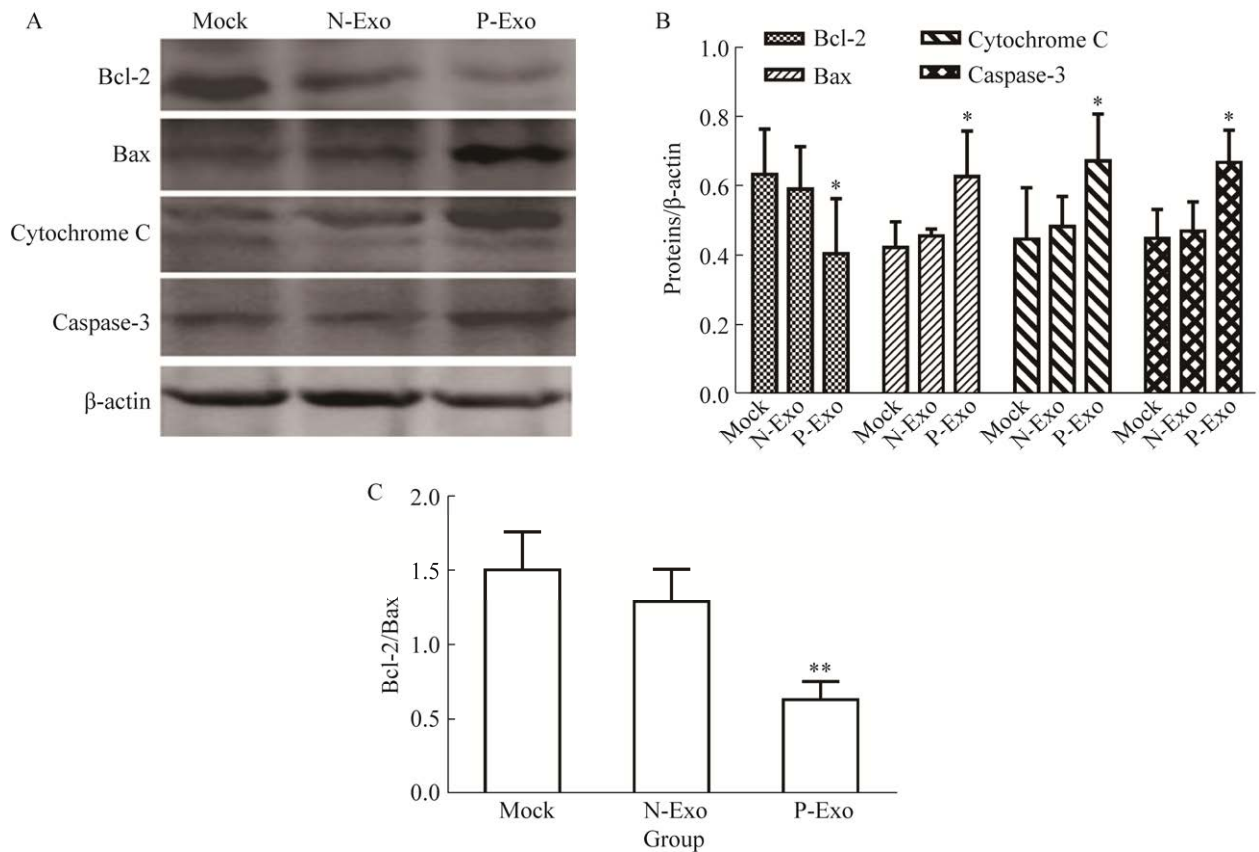


图 6 外泌体对细胞凋亡蛋白表达的影响

Figure 6 The effects of exosomes on the expression of apoptotic proteins. (A) Western blotting analysis of the expression of apoptotic proteins. (B) The mean gray value of apoptotic proteins in different groups. (C) The ratio of Bcl-2 to Bax.

通路分析显示,差异表达的 miRNA 显著富集在 MAPK 信号通路,这些 MAPK 通路的抑制显著阻碍了病毒转录、病毒蛋白合成、病毒子代释放和病毒诱导的凋亡<sup>[10]</sup>。上述分析表明,PCV2 感染猪或 PK-15 细胞后都可引起 miRNA 表达发生显著变化,这些 miRNA 促进病毒复制、细胞凋亡或炎症发生,影响细胞或机体的正常活动而引起疾病发生。为进一步从 RNA 水平揭示 PCV2 诱导淋巴细胞凋亡机理,本研究分析了已报道的 PCV2 在体内或体外试验中差异表达的 miRNA,选取与细胞凋亡相关 miRNA,分别是 miR-125a-5p<sup>[19]</sup>、miR-15b-5p<sup>[20]</sup>、miR-140-5p<sup>[21]</sup>、miR-132<sup>[22]</sup>、miR-92b-3p<sup>[23]</sup>和 miR-30b-3p<sup>[24]</sup>。本

研究发现,P-Exo 感染淋巴细胞诱导 miR-125a-5p、miR-15b-5p、miR-140-5p 和 miR-132 表达量显著升高,与 Zhang 等的研究结果<sup>[9]</sup>一致;miR-92b-3p 和 miR-30b-3p 表达量无明显变化,与 Li 等<sup>[18]</sup>、陈叶等<sup>[25]</sup>的研究结果不一致,分析原因可能是由不同细胞以及不同刺激物所引起。N-Exo 组和 P-Exo 组淋巴细胞中 miRNAs 种类差异较大,表明 PCV2 可能通过外泌体中 miRNAs 来改变靶细胞状态。

P-Exo 诱导淋巴细胞 miRNA 表达中 miR-125a-5p 的表达变化差异最显著,表明其可能在 P-Exo 诱导淋巴细胞凋亡中起重要作用,Tong 等研究发现,结肠癌组织中 miR-125a-5p

表达降低, miR-125a-5p 过表达抑制结肠癌细胞增殖和诱导细胞凋亡, 其直接靶点是抗凋亡基因 *Bcl-2* 和 *Mcl-1*<sup>[19]</sup>; Tang 等研究结果显示, 抑制 miR-125a-5p 表达后将促进 *caspase-2* 释放以增加癌细胞凋亡<sup>[26]</sup>; Li 等研究结果显示, 血浆中的 miR-125a-5p 通过抑制 MKK7 水平来调节 Bax/Bcl2 通路, 从而激活 *caspase-3*, 从而诱导 HUVECs 凋亡<sup>[27]</sup>。为验证 miR-125a-5p 在 PCV2 诱导细胞凋亡中的作用, 本试验通过将 miR-125a-5p 的模拟物和抑制物转染细胞检测细胞凋亡, 结果显示 miR-125a-5p 模拟物促进 PCV2 诱导细胞凋亡, 表明 miR-125a-5p 在淋巴细胞凋亡中起重要作用。

miRNAs 通过与靶 mRNA 的 3'UTR 互补结合, 导致靶 mRNA 降解或抑制翻译, 在转录后水平上调靶基因表达。为进一步验证 miR-125a-5p 的作用靶点, 在 TargetScan 等网站通过生物信息学预测发现, miR-125a-5p 与 *Bcl-2* 3'UTR 区有结合位点, *Bcl-2* 可以抑制由多种因素所引起的细胞凋亡, 过度表达 *Bcl-2* 能增强细胞对大多数细胞毒素的抵抗性<sup>[28]</sup>。本研究结果显示, miR-125a-5p 的模拟物抑制 *Bcl-2* 基因和 *Bcl-2* 蛋白的表达, 表明 miR-125a-5p 在细胞内对 *Bcl-2* 基因具有调控作用。*Bcl-2* 是一种癌基因, 它具有明显抑制细胞凋亡的作用, 通过控制线粒体通透性来调节细胞凋亡, *Bcl-2* 在线粒体外膜中抑制细胞色素 C 释放, Bax 在细胞质中, 接受信号转导后转位到线粒体中, 并促进细胞色素 C 释放, 通过作用于 *caspase-3* 来促进细胞凋亡<sup>[29-31]</sup>。研究结果显示, P-Exo 降低淋巴细胞 *Bcl-2* 表达量, 提高 Bax、细胞色素 C 和 *caspase-3* 表达量, 表明 P-Exo 通过靶向 *Bcl-2* 调控细胞色素 C 的释放和 *Caspase-3* 的激活, 使淋巴细胞凋亡率增加。

综上所述, PCV2 可通过外泌体诱导外周淋巴细胞凋亡, P-Exo 感染淋巴细胞后显著上调 miR-125a-5p, 而上调 miR-125a-5p 的表达可抑制靶基因 *Bcl-2* 的表达, 从而激活线粒体凋亡通路, 为阐明 PCV2 的免疫抑制机理提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Qiu XH, Li T, Zhang GR, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method to rapidly detect porcine circovirus genotypes 2a and 2b. *Virology*, 2012, 9: 318.
- [2] Zhou JW, Li HY, Yu TQ, et al. Protein interactions network of porcine circovirus type 2 capsid with host proteins. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1129.
- [3] Segalés J, Domingo M, Chianini F, et al. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol*, 2004, 98(2): 151-158.
- [4] Reiner G, Hofmeister R, Willems H. Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV<sub>2</sub>) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. *Vet Microbiol*, 2015, 180(1/2): 41-48.
- [5] Zhai MM, Zhu Y, Yang MY, et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes enhance cell-free bone regeneration by altering their miRNAs profiles. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(19): 2001334.
- [6] Li J, Zhang YJ, Ye YY, et al. Pancreatic  $\beta$  cells control glucose homeostasis via the secretion of exosomal miR-29 family. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(3): e12055.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [8] Núñez-Hernández F, Pérez LJ, Vera G, et al. Evaluation of the capability of the PCV<sub>2</sub> genome to encode miRNAs: lack of viral miRNA expression in an experimental infection. *Vet Res*, 2015, 46(1): 48.
- [9] Zhang P, Wang LY, Li YP, et al. Identification and characterization of microRNA in the lung tissue of pigs with different susceptibilities to PCV<sub>2</sub> infection. *Vet Res*, 2018, 49(1): 18.
- [10] Hong JS, Kim NH, Choi CY, et al. Changes in cellular microRNA expression induced by porcine C circovirus type 2-encoded proteins. *Vet Res*, 2015, 46(1): 39.
- [11] 李畅, 李静, 何启盖. 猪圆环病毒 2 型感染 PK-15 细

- 胞差异表达 miRNA 和 mRNA 互作网络. 畜牧兽医学报, 2019, 50(1): 115-125.
- Li C, Li J, He QG. Integrated analysis of miRNA and mRNA network of porcine circovirus 2 infecting porcine kidney cell line. *Chin J Animal Vet Sci*, 2019, 50(1): 115-125 (in Chinese).
- [12] 陈洪博, 段滇宁, 胡瑶, 等. 猪圆环病毒 2 型感染 PK-15 细胞中外泌体的鉴定及其对细胞增殖和凋亡的影响. 畜牧兽医学报, 2020, 51(7): 1688-1698.
- Chen HB, Duan DN, Hu Y, et al. Identification of exosomes in porcine circovirus type 2 infected PK-15 cells and its effects on cell proliferation and apoptosis. *Chin J Animal Vet Sci*, 2020, 51(7): 1688-1698 (in Chinese).
- [13] Lv YJ, Dai L, Han HL, et al. PCV<sub>2</sub> induces apoptosis and modulates calcium homeostasis in piglet lymphocytes *in vitro*. *Res Vet Sci*, 2012, 93(3): 1525-1530.
- [14] Vincent IE, Carrasco CP, Herrmann B, et al. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol*, 2003, 77(24): 13288-13300.
- [15] Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6): 1137-1141.
- [16] Barad O, Mann M, Chapnik E, et al. Efficiency and specificity in microRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(6): 650-652.
- [17] Núñez-Hernández F, Pérez LJ, Muñoz M, et al. Identification of microRNAs in PCV<sub>2</sub> subclinically infected pigs by high throughput sequencing. *Vet Res*, 2015, 46: 18.
- [18] Li C, Sun YM, Li J, et al. PCV<sub>2</sub> regulates cellular inflammatory responses through dysregulating cellular miRNA-mRNA networks. *Viruses*, 2019, 11(11): 1055.
- [19] Tong ZG, Liu N, Lin LQ, et al. miR-125a-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colon cancer *via* targeting BCL2, BCL2L12 and MCL1. *Biomed Pharmacother*, 2015, 75: 129-136.
- [20] Yang Y, Hou N, Wang XF, et al. miR-15b-5p induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human hepatocellular carcinoma, both *in vitro* and *in vivo*, by suppressing Rab1A. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 16227-16238.
- [21] Peng JS, Chen SY, Wu CL, et al. Amelioration of experimental autoimmune arthritis through targeting of synovial fibroblasts by intraarticular delivery of microRNAs 140-3p and 140-5p. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(2): 370-381.
- [22] Zhao JL, Yang MY, Li Q, et al. miR-132-5p regulates apoptosis and autophagy in MPTP model of Parkinson's disease by targeting ULK1. *Neuroreport*, 2020, 31(13): 959-965.
- [23] Li QF, Shen K, Zhao Y, et al. miR-92b inhibitor promoted glioma cell apoptosis *via* targeting DKK<sub>3</sub> and blocking the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Transl Med*, 2013, 11: 302.
- [24] Xu CY, He ZX, Lin C, et al. miR-30b-5p inhibits proliferation and promotes apoptosis of medulloblastoma cells *via* targeting MYB proto-oncogene like 2 (MYBL2). *J Investig Med*, 2020, 68(6): 1179-1185.
- [25] 陈叶. 猪圆环病毒 2 型遗传进化及影响 PK15 细胞 microRNA 差异表达的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- Chen Y. Genetic evolution of porcine *Circovirus 2* and its effects on PK15 cells using differential microRNA expression analysis[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [26] Tang L, Shen H, Li X, et al. miR-125a-5p decreases after long non-coding RNA HOTAIR knockdown to promote cancer cell apoptosis by releasing caspase 2. *Cell Death Dis*, 2016, 7(3): e2137.
- [27] Li ZY, Jiang J, Tian L, et al. A plasma mir-125a-5p as a novel biomarker for Kawasaki disease and induces apoptosis in HUVECs. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175407.
- [28] Green DR. A BH<sub>3</sub> mimetic for killing cancer cells. *Cell*, 2016, 165(7): 1560.
- [29] Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(6): 871-877.
- [30] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2): 41-58.
- [31] Pradelli LA, Bénateau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and-independent cell death. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(10): 1589-1597.

(本文责编 陈宏宇)