

研究报告

猪伪狂犬病毒 Fa 株感染对 PK-15 细胞 microRNAs 表达谱的影响

刘鹏娟^{1△} 乔小改^{1△} 李萍¹ 黄剑波¹ 卓秀萍¹ 方和俊¹ 邓益超¹
徐志文^{1,2} 朱玲^{1,2*}

- (1. 四川农业大学 动物生物技术中心 四川 成都 611130)
(2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130)

摘要: 【目的】分析猪伪狂犬病毒 Fa 株(PRV-Fa)感染对猪肾传代细胞 PK-15 microRNAs (miRNAs)表达谱的影响。【方法】利用 Illumina 高通量测序技术, 鉴定感染和非感染 PRV-Fa 的 PK-15 细胞的 miRNAs; 筛选并利用实时荧光定量 RT-PCR (RT-qPCR)验证差异表达 miRNAs; 对差异 miRNAs 进行靶基因预测和 Gene ontology (GO)分析。【结果】在感染和未感染 PK-15 细胞中分别检测到 384 个和 405 个 miRNAs, 其中感染 PRV-Fa 后差异表达的 miRNAs 共 127 个 (60 个上调, 67 个下调)。荧光定量结果显示差异 miRNAs 的表达趋势与高通量测序结果一致。GO 分析显示, miRNAs 广泛参与信号传导、细胞代谢、免疫反应、基因表达等生物学进程, 其中 miR-10b、miR-16、miR-18a、miR-19b、miR-20a、miR-145-5p、miR-146a、miR-181a、miR-499-5p 等 miRNAs 与免疫相关。在靶基因调控网络图中, ssc-miR-30a-5p 与 ssc-miR-30d 处于关键位置。研究鉴定出 5 个新的病毒编码 miRNAs, 其中 PRV-miR-LLT2 与 PRV-miR-LLT4 靶向 PRV 早期蛋白基因 EPO。【结论】伪狂犬病毒 Fa 株感染对 PK-15 细胞编码 miRNAs 有显著影响。

关键词: 猪伪狂犬病毒, microRNAs, 高通量测序, PK-15 细胞

Foundation item: Transformation Project on Scientific and Technological Achievements of Sichuan Province (No. 2013NC0014); Key Technologies R&D Program of Sichuan Province (No. 2013NZ0016)

*Corresponding author: Tel: 86-835-2885846; E-mail: abtcz172@126.com

△These authors equally contributed to this work

Received: October 27, 2015; Accepted: January 14, 2016; Published online (www.cnki.net): January 22, 2016

基金项目: 四川省科技成果转化项目(No. 2013NC0014); 四川省科技支撑计划(No. 2013NZ0016)

*通讯作者: Tel: 86-835-2885846; E-mail: abtcz172@126.com

△共同第一作者

收稿日期: 2015-10-27; 接受日期: 2016-01-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-22

Differential expression of microRNAs in PK-15 cells infected with Pseudorabies virus-Fa strain

LIU Peng-Juan^{1△} QIAO Xiao-Gai^{1△} LI Ping¹ HUANG Jian-Bo¹ ZHUO Xiu-Ping¹
FANG He-Jun¹ DENG Yi-Chao¹ XU Zhi-Wen^{1,2} ZHU Ling^{1,2*}

(1. Animal Biotechnology Center, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Key Laboratory of Animal Diseases and Human Health of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: [Objective] The aim was to analyze the microRNAs expression in PK-15 cells infected with Pseudorabies virus-Fa. [Methods] Illumina deep sequencing was used to identify and analyze the differentially expressed miRNAs in PK-15 cells with or without PRV-Fa infection. The sequencing results for selected miRNAs were confirmed with RT-qPCR. The host target genes were predicted and Gene Ontology (GO) analysis was done. [Results] We identified 384 and 405 miRNAs in the infected and uninfected cells, respectively. Overall, 127 miRNAs were expressed significantly differently after infected with PRV-Fa (60 upregulated and 67 downregulated). RT-qPCR showed that the expressions of miRNAs were consistent with the sequencing results. GO analysis showed that miRNAs were widely involved in signal transduction, cells metabolism, immune response, and gene expression. And miR-10b, miR-16, miR-18a, miR-19b, miR-20a, miR-145-5p, miR-146a, miR-181a and miR-499-5p were associated with immune response. In the regulatory network of target genes, ssc-miR-30d and ssc-miR-30a-5p were in the key positions. Moreover, five miRNAs encoded by PRV-Fa were identified, PRV-miR-LLT2 and PRV-miR-LLT4 were targeted to PRV EPO gene. [Conclusion] The infection of PRV-Fa has significant influence on PK-15 cells encoding miRNAs.

Keywords: Pseudorabies virus, microRNAs, Illumina deep sequencing, PK-15 cells

伪狂犬病是由 α -疱疹病毒甲亚科的伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起, 可导致母猪流产或产弱胎、死胎、木乃伊胎, 导致公猪睾丸炎等, 是危害我国养猪业的重大疾病之一。自 1813 年报道发生以来, 目前伪狂犬病已呈世界性分布。我国虽长期采取广泛的免疫、净化措施, 但该病仍呈局部流行, 种猪淘汰率较高^[1]。2011 年底, 由于抗原变异等原因, 一些免疫后猪场暴发严重的伪狂犬病并迅速蔓延到全国大部分猪场, 给养殖业带来巨大损失^[2]。

microRNA (miRNA) 是长度约为 22 nt 的生物源性非编码单链小 RNA, 广泛存在于动植物及病毒等多种有机体中^[3], 由具有茎环结构的长约 70 个碱基的单链前体 RNA 剪切而成。成熟的 miRNA 小分子通常与细胞内效应蛋白 Argonaute 等结合组成 RNA 诱导的沉默复合体(RISC), 之后与靶 mRNAs 3'端非翻译区(Untranslated region, UTR)、5'UTR 或翻译区的碱基特异性互补配对, 从而抑制靶 mRNA 翻译(部分配对)或直接降解 mRNA (完全配

对), 最终下调靶基因的表达水平, 发挥靶基因的转录后表达调控功能^[4]。在植物中, 多数 miRNAs 与其靶 mRNAs 的 3'UTR 完全互补配对, 导致切割与降解; 在动物中则多数为不完全配对, 从而抑制翻译^[5-6]。通常一个 miRNA 可调控多个靶 mRNAs, 多个 miRNAs 也可调控同一个靶 mRNA。研究显示, miRNA 通过与靶 mRNA 的作用, 参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、代谢和肿瘤转移等生物学过程^[7-9]。

大量研究表明, 病毒与宿主都可利用 miRNAs 调节自身及对方转录物, 从而实现免疫逃避和自我保护。病毒侵染可导致宿主 miRNAs 表达谱发生变化, 为其生存创造有利条件, 同时宿主也可利用 miRNAs 来实现免疫清除。目前关于 miRNAs 水平 PRV 与宿主的相互作用的研究较少, Huang 等^[10]通过 miRNA 芯片杂交筛选获得 PRV 感染 PK-15 细胞后差异表达的 miR-21, 并以小鼠肝癌细胞 Hepal-6 为模型, 经双荧光素酶报告基因结合 ELISA 实验证明干扰素- γ 诱导蛋白 10 (IFN- γ inducible

protein 10, IP10)是 miR-21 的靶基因; Anselmo 等^[11]经高通量测序研究 PRV 感染猪树突状细胞后宿主与病毒 miRNAs 的表达情况, 对差异表达 miRNAs 进行靶基因预测和 Pathway 通路分析, 表明病毒和宿主 miRNAs 调控对 PRV 的潜伏感染均起重要作用; Mahjoub 等^[12]研究表明, 当 PRV 病毒缺失位于潜伏期相关转录位点(Latency-associated-transcript locus, LAT)的 9 个 miRNAs 后, 会影响宿主三叉神经节对病毒潜伏感染的反应。

本研究拟阐明 PRV-Fa 株侵染后 PK-15 细胞 miRNAs 表达谱并对其进行深入分析, 为进一步揭示 miRNAs 在 PRV 感染过程中的作用及筛选抗 PRV 候选 miRNAs 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

猪肾传代细胞(PK-15), 由四川农业大学动物医学院动物生物技术中心提供; 伪狂犬病毒 Fa 株, 购自中国兽医药品监察所。

1.2 主要试剂和仪器

Trizol Reagent, Life Technologies 公司; 2×SYBR Green PCR master mix, Arraystar 公司; miRNA mimics 及其对照 mir-NC, 上海吉玛公司; Xfect™ MicroRNA Transfection Reagent Protocol-At-A-Glance, 成都天泰生物技术有限公司。NanoDrop ND-1000 分光光度计, Thermo Scientific 公司; Illumina HiSeq 2000 instrument, Illumina 公司; Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies 公司; ViiATM7 实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

1.3 细胞样品 RNA 的提取及鉴定

将长势良好的 PK-15 细胞传代至 3 个感染组细胞瓶和 3 个未感染组(对照组)细胞瓶中, 置培养箱中培养(37 °C, 5% CO₂)。待单细胞层长至约 85%, 感染组细胞接种 PRV-Fa (MOI 为 1)并于接毒后 24 h 收毒, 非感染组细胞不接毒且在相同时间点收取。依照细胞 RNA 抽提方法分别提取 RNA^[13], 并将每组的 3 个重复样品混合。用 NanoDrop ND-1000 对提取 RNA 进行浓度和纯度鉴

定, A_{260}/A_{280} 比值范围为 1.8–2.1 时则为合格。

1.4 总 RNA 的高通量测序

将合格 RNA 产品送上海康成生物工程有限公司, 采用 Illumina 高通量测序技术进行深度测序。

1.5 生物信息学分析

高通量测序原始序列存在许多没用信息, 经以下分析获得有效、高质量的小 RNA 序列: (1) 去除低质量 Reads; (2) 去除没有 3' 接头序列 Reads; (3) 去除 5' 接头有污染的 Reads; (4) 去除没有插入片段的 Reads; (5) 去除包含 Poly A 的 Reads; (6) 去除长度≤15 nt 和数量≤2 的 Reads。将剩余序列分别与 Rfam 数据库(<http://rfam.xfam.org/>)、Rebase 数据库(<http://www.girinst.org/rebase/>)和 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对, 去除可能存在的 mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 及重复序列。

1.6 差异 miRNAs 表达谱的构建

将两组样品 miRNAs 表达量分别采用 Transcripts per million (TMP)法标准化为同一量级(单一 miRNA 拷贝数×10⁶/总 miRNAs 拷贝数)。为排除 miRNA 表达量为 0 的计算干扰, 将每个 miRNA 的拷贝数加 10 再计算, 最终以 Fold Change (感染/非感染)≥2 或≤0.5 为标准, 建立 miRNAs 差异表达谱。

1.7 miRNAs 荧光定量验证

为验证高通量测序结果的准确性, 随机选取 10 个差异表达的 miRNAs (5 个上调和 5 个下调)。利用 Primer 5.0 软件设计 miRNAs 特异性反转录引物及荧光定量 PCR 引物(表 1), 并送英骏生物技术有限公司合成。

将高通量测序所用细胞样品依细胞 RNA 抽提方法提取 RNA^[13], 并保证其纯度与质量。对 RNA 模板依次进行加 Poly A 尾和 RT 反应, 获得 cDNA 保存于-20 °C 备用。

荧光定量反应体系: 2×SYBR Green PCR master mix 5 μL, 上游引物(10 μmol/L) 0.5 μL, 下游引物(10 μmol/L) 0.5 μL, cDNA 2 μL, RNase Free H₂O 2 μL。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s,

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 RT-qPCR primers

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')
ssc-miR-10a-5p-forward	TACCCTGTAGATCCGAATTTGT
ssc-miR-16-forward	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
ssc-miR-221-3p-forward	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT
ssc-miR-30d-forward	TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT
ssc-miR-378-forward	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
ssc-miR-146a-5p-forward	TGAGAAGTGAATTCATGGGTT
ssc-miR-152-forward	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA
ssc-miR-21-forward	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
ssc-miR-29a-forward	CTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
ssc-miR-novel-chr13_10861-forward	TTCAAGTAACCCAGGATAGGCT
miR-reverse	GTCGGTGTCTGGAGTTCG
U6-RT Primer	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT
U6-forward	TCGCTTTGGCAGCACCTAT
U6-reverse	AATATGGAACGCTTCGCAAA
miR-RT Primer	GTCGGTGTCTGGAGTTCGTTTCAATT GCACTGGATTTTTTTTTTTTTTTT

Note: V=A, G, C.

60 °C 60 s, 40 个循环, 且每个样品重复 3 次, 每个循环后检测体系中荧光信号。U6 基因作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各 miRNA 的相对表达量, 每组数据中以对照组中 miRNA 的表达量为标准进行相对表达分析。C_T 值为反应的实时荧光强度达到设定的阈值时所需要的扩增循环数, 即荧光定量 PCR 分析仪的直接读数。

1.8 差异表达 miRNAs 靶基因预测

整合 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)和 MiRanda (<http://microorna.sanger.ac.uk/sequences/>)两个数据库的算法, 对差异表达的 miRNAs 进行靶基因预测分析, 取这两个软件预测的交集作为差异表达 miRNAs 的靶基因。采用 Gene ontology (GO) 对靶基因的功能从细胞组成(Cellular component)、生物过程(Biological process)和分子功能(Molecular function) 3 个方面进行分析。

2 结果与分析

2.1 细胞样品 RNA 的提取及鉴定

提取感染和未感染 PK-15 细胞组总 RNA, 经

NanoDrop ND-1000 平台测定纯度及浓度, 结果显示感染组 A_{260}/A_{280} 值为 1.92, 非感染组 A_{260}/A_{280} 值为 1.97, 均符合高通量测序所用样品要求。

2.2 总 RNA 的高通量测序

PRV-Fa 株感染和未感染 PK-15 细胞经高通量测序所得原始数据, 经一系列去污染去低质量处理, 分别获得干净序列(Clean reads) 586 608 条和 3 987 148 条, 占各自测序总数的 91.27%和 85.42%。对所有 Clean reads 进行长度分布统计, 发现 2 个文库中 miRNAs 长度均主要分布在 21–24 nt, 符合 Dicer 酶剪切后产物长度。

2.3 病毒感染前后 PK-15 细胞的 miRNAs 表达谱

在 PRV-Fa 感染及未感染 PK-15 细胞样本中分别检测到 384 个和 405 个 miRNAs。两组样本除了分别包含 miRBase19.0 数据库公布的已知猪源成熟 miRNAs 218 个和 225 个外, 还分别鉴定出 166 个和 180 个新的成熟猪源 miRNAs, 但其大部分表达量极低。经比对分析, PRV-Fa 感染相对未感染细胞差异表达的 miRNAs 共 127 个, 其中 60 个表达水平上调(44 个已知的, 16 个新鉴定的), 67 个表达下调(47 个已知的, 20 个新鉴定的), 表达上调比上调多 7 个(3 个已知的, 4 个新鉴定的)。在表达上调的 miRNAs 中, 上调 5 倍以上的有 24 个, 上调 10 倍以上的有 10 个, 其中 ssc-miR-10b 上调幅度最大(61 倍)且表达水平也最高; 在表达下调的 miRNAs 中, 下调 10 倍以上的有 29 个, 下调 25 倍以上的有 13 个, 其中 ssc-miR-424-5p 下调幅度最大为 100 倍(表 2)。比对可知, PRV-Fa 感染 PK-15 细胞后, 大部分差异 miRNAs 表现为表达下调。

2.4 miRNAs 荧光定量验证

为验证高通量测序结果的准确性, 随机选取 10 个差异表达的 miRNAs 进行相对荧光定量 PCR 分析, 计算感染与非感染细胞组中各 miRNA 差异表达倍数。结果显示, 感染组细胞 ssc-miR-221-3p、ssc-miR-16、ssc-miR-30d、ssc-miR-10a-5p 和 ssc-miR-378 的表达水平相对非感染组表现为上调, 而 ssc-miR-152、ssc-miR-29a、

表 2 PRV-Fa 感染前后 PK-15 细胞差异表达显著性前 50 位的 miRNAs
Table 2 Top 50 miRNAs significantly upregulated or downregulated in PK-15 cells in order of fold change

microRNAs	长度 Length (nt)	样品归一化表达量		Fold change	类型 Type	靶基因个数 Numbers of target genes
		Normalized read counts				
		感染组 Infected	未感染组 Control			
ssc-miR-10b	22	248 415	4 009	61.81	Up	738
ssc-miR-192	21	20 198	363	54.18	Up	718
ssc-miR-146b	21	1 124	12	51.55	Up	1 139
ssc-miR-novel-chr2_20448	24	423	4	30.93	Up	2 280
ssc-miR-155-5p	22	7 223	340	20.67	Up	1 146
ssc-miR-424-3p	21	181	0	19.10	Up	597
ssc-miR-novel-chrX_40705	22	3 151	235	12.90	Up	811
ssc-miR-34a	22	1 519	119	11.85	Up	1 661
ssc-miR-novel-chr9_38959	22	668	52	10.94	Up	1 663
ssc-miR-221-3p	22	2 954	274	10.44	Up	811
ssc-miR-92b-3p	22	5 005	594	8.30	Up	1 757
ssc-miR-126-3p	22	249	22	8.09	Up	88
ssc-miR-486	22	418	44	7.93	Up	726
ssc-miR-30a-5p	22	134 532	17 235	7.80	Up	1 147
ssc-miR-7	24	12 266	1 594	7.65	Up	1 619
ssc-miR-450c-5p	22	197	18	7.39	Up	427
ssc-miR-novel-chr6_31692	22	121	8	7.28	Up	2 019
ssc-miR-17-5p	23	6 309	929	6.73	Up	1 443
ssc-miR-27b-3p	21	8 316	1 390	5.95	Up	1 146
ssc-miR-92a	22	30 702	5 186	5.91	Up	691
ssc-miR-16	22	32 269	5 779	5.58	Up	1 763
ssc-miR-novel-chr10_5602	25	186	26	5.44	Up	1 597
ssc-miR-27a	21	7 081	1 314	5.36	Up	1 146
ssc-miR-182	22	22 335	4 271	5.23	Up	1 446
ssc-miR-424-5p	22	29	2 998	0.01	Down	1 817
ssc-miR-novel-chr9_39041	23	38	3 840	0.01	Down	1 512
ssc-miR-novel-chr5_29857	19	26	2 081	0.02	Down	1 711
ssc-miR-194a	21	24	1 562	0.02	Down	842
ssc-miR-542-3p	22	155	7 368	0.02	Down	1 349
ssc-miR-novel-chrX_41190	21	2	491	0.02	Down	335
ssc-miR-novel-chr5_29676	23	0	392	0.02	Down	1 066
ssc-miR-152	21	384	14 934	0.03	Down	1 161
ssc-miR-542-5p	21	2	371	0.03	Down	732
ssc-miR-195	21	17	781	0.03	Down	1 786
ssc-miR-135	23	8	516	0.03	Down	1 602
ssc-miR-185	22	66	1 843	0.04	Down	2 285
ssc-miR-499-5p	21	26	760	0.05	Down	974
ssc-miR-24-3p	22	3 462	70 574	0.05	Down	1 988
ssc-miR-361-5p	22	70	1 465	0.05	Down	867
ssc-miR-29a	23	608	11 368	0.05	Down	1 079
ssc-miR-29c	22	28	689	0.05	Down	1 120
ssc-miR-19a	23	390	7 185	0.06	Down	1 436
ssc-miR-19b	23	2 781	48 991	0.06	Down	1 299
ssc-miR-193a-5p	22	4	227	0.06	Down	1 142
ssc-miR-142-3p	22	20	487	0.06	Down	887
ssc-miR-21	22	33 829	563 808	0.06	Down	789
ssc-miR-143-3p	21	55	912	0.07	Down	1 069
ssc-miR-145-5p	24	0	129	0.07	Down	1 475
ssc-miR-183	23	897	12 061	0.08	Down	1 087
ssc-miR-novel-chr6_30729	22	292	3 650	0.08	Down	1 083

ssc-miR-146a-5p、ssc-miR-21 和 ssc-miR-novel-chr13_10861 相对非感染组的表达水平下调, 与高通量测序分析结果一致(图 1)。

2.5 差异表达 miRNAs 靶基因的预测

整合 TargetScan 和 MiRanda 两个数据库, 对显著上调与下调的 miRNAs 进行靶基因预测, 取其预测交集作为 miRNAs 的靶基因, 统计获得各差异表达 miRNA 的靶基因个数(表 2)。选取 9 个差异表达 miRNAs (上调的 ssc-miR-10b、ssc-miR-16、ssc-miR-182、ssc-miR-30a-5p、ssc-miR-30d 和下调的 ssc-miR-21、ssc-miR-24-3p、ssc-miR-novel-chr6_30729、ssc-miR-novel-chr9_39041)和每个 miRNA 预测的所有靶基因中综合得分前 3%的靶基因作为研究对象, 按照四边形节点代表 miRNA, 圆形节点代表对应的靶基因, 箭头代表靶向关系, 箭头越多则靶向的节点越大的方式, 构建了 miRNA-Target 调控网络(图 2)。

此外, ssc-miR-30a-5p 与 ssc-miR-30d 拥有较多共同调控的靶基因(表 3), 且与其他 miRNAs 及靶基因形成联系密切的复杂网络, 处于核心位置, 影响调控网络的稳定性。进一步对 ssc-miR-30a-5p 与 ssc-miR-30d 共有靶基因进行 GO 分析可知, 其部分富集在各 GO 功能上的主要靶基因可相互协同行使一定功能, 其中包括在细胞内各种代谢过程

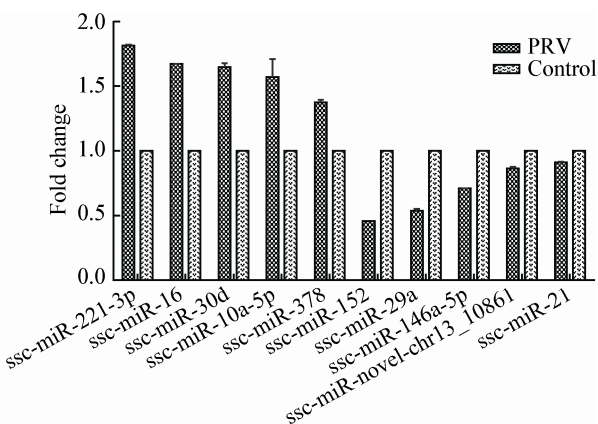


图 1 RT-qPCR 验证 miRNAs 表达水平
Figure 1 Validation of miRNAs expression by RT-qPCR

中起调节作用的 BM25、POLR3G、KLF10、CCNE2、GLCE、LRRK2、RUNX2、ZNF197、CHD1 等, 也包括细胞定位相关的 JPH4 等及免疫相关的 ITGA4。在整个调控网络中发现有 6 个靶基因可同时被几个不同的 miRNAs 调控(表 4)。

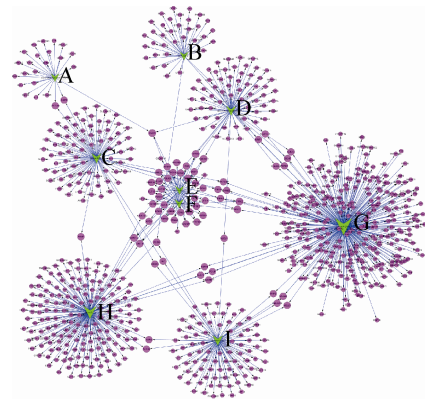


图 2 PRV-Fa 感染的 miRNA-Target 转录调控网络
Figure 2 miRNA-Target network of PRV-Fa infected
Note: A: ssc-miR-novel-chr6_30729; B: ssc-miR-21; C: ssc-miR-10b; D: ssc-miR-novel-chr9_39041; E: ssc-miR-30d; F: ssc-miR-30a-5p; G: ssc-miR-24-3p; H: ssc-miR-16; I: ssc-miR-182.

表 3 典型 miRNAs 及共有靶基因
Table 3 Typical miRNAs and common target genes

典型 miRNAs Typical miRNAs	共有靶基因 Common target genes
ssc-miR-30a-5p 与 ssc-miR-30d	SCN2A, ANKRA2, LHX8, KLHL20, GABRB1, ITGA4, RCC1, RBM25, POLR3G, GALNT7, DESI2, KLF10, CCNE2, IRAK1BP1, RAPGEF4, ZBTB11, FAM199X, GLCE, PDE7A, LRRK2, SOX9, SALL4, SRSF7, RUNX2, SERPINI1, CEP85L, VAT1L, UBE2J1, ZNF197, NSA2, NR4A2, FAM49A, JPH4, CHD1, OTUD6B

表 4 典型靶基因及其相关 miRNAs
Table 4 Typical targets genes and related miRNA

典型 miRNAs Typical miRNAs	共有靶基因 Common target genes
CHD1	ssc-miR-novel-chr9_39041, ssc-miR-30d, ssc-miR-30a-5p, ssc-miR-novel-chr6_30729
FAM91A1	ssc-miR-16, ssc-miR-30d, ssc-miR-30a-5p
LRRK2, RCC1	ssc-miR-30d, ssc-miR-30a-5p, ssc-miR-24-3p
IRAK1BP, CEP85L	ssc-miR-30d, ssc-miR-30a-5p, ssc-miR-novel-chr9_39041

2.6 PRV-Fa 病毒编码的 miRNAs

在 PRV-Fa 感染后 PK-15 细胞测序所得 miRNAs 中, 检测到 5 个 miRNAs 基因序列可比对到 PRV (NC-006151.1) 基因组中具有典型 miRNAs 式的发卡结构上, 它们均定位于大片段潜伏期转录物 (Large latency transcript, LLT), 按基因组顺序分别命名为 PRV-miR-LLT1、PRV-miR-LLT2、PRV-miR-LLT3、PRV-miR-LLT4、PRV-miR-LLT5。这 5 个 miRNAs 表达水平普遍非常低, 但也存在显著差异(表 5)。通过软件预测其靶基因, 共有 1 916 个宿主基因被这 5 个 miRNAs 靶标, GO 分析表明其参与细胞各种生命活动调节(图 3)。但严格预测只发现一个 PRV 基因(即早期蛋白 EPO)被 PRV-miR-LLT2 与 PRV-miR-LLT4 靶向, 其余 3 个均未预测到针对病毒自身的靶基因。

3 讨论

PRV 的潜伏感染是其难以根除的重要原因, 对养猪业的健康发展危害严重。miRNAs 在免疫系统功能调节中发挥重要作用, 包括免疫细胞的发育、分化和功能, 炎症介质的释放及调控细胞内

的信号通路等。因此, 鉴定 PRV 感染过程中与宿主免疫反应相关的候选 miRNAs 极为重要。

目前越来越多免疫相关 miRNAs 被发现, 包括 miR-10、miR-101、miR-106a、miR-126、miR-142-3p、miR-146、miR-150、miR-155、miR-181a、miR-196b、miR-21、miR-221、miR-223、miR-326、miR-34、miR-424、miR-9、miR-98、miR-17-92 家族和 let-7 家族等^[14-15]。本实验经高通量测序, 在 PRV-Fa 感染及未感染 PK-15

病毒 miRNAs	序列 Sequence (5'→3')	样品的归一化表达量 Normalized read counts
PRV-miR-LLT1	TCTCACCCCTGG GTCCGTCGC	809
PRV-miR-LLT2	CTCATCCCGTCA GACCTGCGCC	842
PRV-miR-LLT3	CGTACCGACCCG CCTACCAGGCA	37
PRV-miR-LLT4	ATGAGTGGATG GATGGAGGCCGA	307
PRV-miR-LLT5	ACCCGCGGATG GCGAGGATG	10

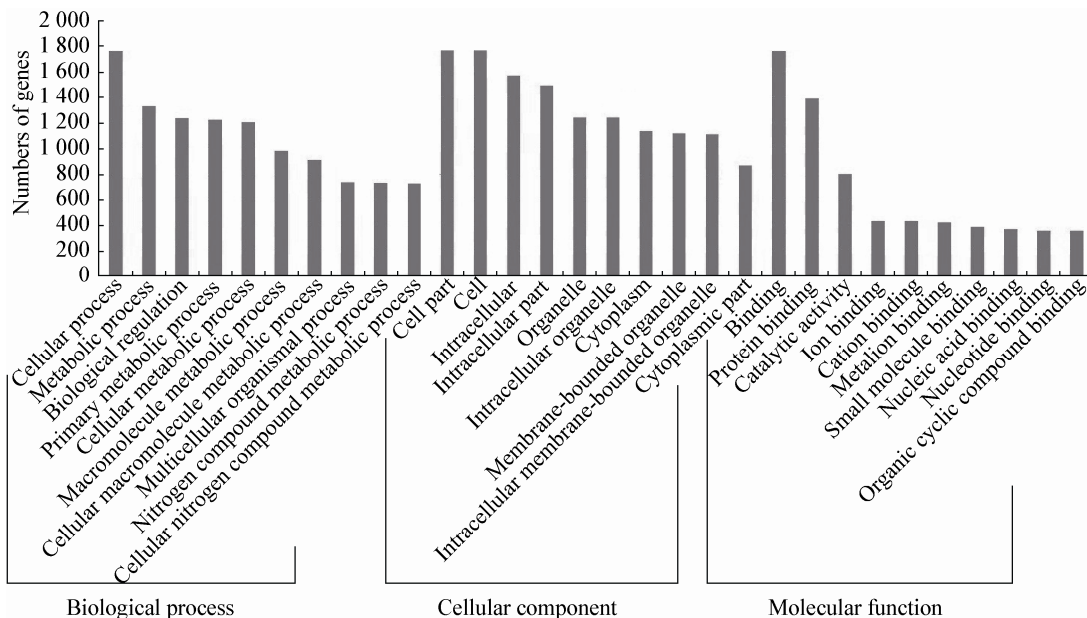


图 3 病毒编码 miRNAs 预测靶基因的 GO 注释

Figure 3 GO annotation on the target genes of miRNAs encoded by PRV-Fa

细胞中均检测到大量猪源成熟的 miRNAs, 其中免疫相关的差异 miRNAs 有 10 个表达上调 (ssc-miR-10b、ssc-miR-146b、ssc-miR-155-5p、ssc-miR-34a、ssc-miR-221-3p、ssc-miR-126-3p、ssc-miR-17-5p、ssc-miR-92a、ssc-miR-20a、ssc-let-7i), 9 个下调 (ssc-miR-424-5p、ssc-miR-19a、ssc-miR-19b、ssc-miR-142-3p、ssc-miR-18a、ssc-miR-146a-5p、ssc-let-7d-5p、ssc-let-7f、ssc-miR-21), 表明 PRV-Fa 可能影响这些 miRNAs 的正常表达, 从而造成持续感染。

经对比分析, PRV-Fa 感染 PK-15 细胞后有 34% miRNAs 表达有显著变化, 表明病毒侵染过程中对细胞编码 miRNAs 产生了较大影响。在感染与未感染细胞中, ssc-miR-21 的表达水平均非常高。研究报道 miR-21 在不同细胞类型及感染病毒状态下都有很高表达量, 这可能与 miR-21 参与细胞周期中的细胞分化有关^[11]。此外, miR-21 参与前 B 淋巴细胞瘤的形成, 既显著促进细胞增殖, 又可抑制细胞凋亡^[16]。PRV-Fa 感染细胞后, ssc-miR-21 的表达出现显著下调, 说明病毒的感染可能通过复杂的调控网络引起细胞凋亡。

细胞 miRNAs 除了直接靶向病毒基因组, 还可通过细胞因子引发免疫反应。例如, 本实验差异表达最显著的 miR-10b 能靶向同源异形盒基因 D10 并抑制其转录表达, 进而调控下游转移蛋白发挥其作用^[17]; 过表达的 miR-18a 能促进 T 细胞 Th1 型细胞分化, Th1 型细胞具有很强的 IFN- γ 分泌功能, 有利于宿主抗肿瘤免疫应答^[18]; miR-16 通过靶向细胞因子 IL-8、IL-6 等调节 NF- κ B 活性^[19]; miR-145-5p 通过靶向 SOCS7 调节 IFN- β 的表达^[20]; miR-499-5p 能靶向 FOXO4 和 PDCD4 从而加速细胞转移^[21]。miR-146a 可抑制有抗病毒复制作用的干扰素 IFN- β 的产生^[22], 从而达到抗细胞免疫作用。PRV-Fa 株感染 PK-15 细胞后 miR-146a 表达下调, 推测细胞可能通过干扰素对病毒复制产生抑制作用。

本研究筛选 PRV-Fa 感染组 9 个差异显著的 miRNAs, 并构建 miRNA-Target 调控网络图。结果

显示, 单个 miRNA 可同时调控多种靶基因, 单个靶基因也可同时受多个 miRNAs 调控, miRNAs 和靶基因都处于一个复杂的调控网络中。其中 ssc-miR-30a-5p 与 ssc-miR-30d 几乎共有所有靶基因, 推测可能是由于它们同源性极高且种子序列完全相同。种子序列位于 miRNA 5'端 2-8 个核苷酸, 是靶标结合的最关键位点^[23]。对 ssc-miR-30a-5p 与 ssc-miR-30 共有靶基因进行 GO 功能分析, 发现它们广泛参与细胞代谢、定位和免疫反应等。miR-30a-5p 有抑制细胞增殖促进其凋亡的作用^[24], 而 ssc-miR-30a-5p 与 ssc-miR-30d 在 PRV-Fa 感染后均表现为显著上调, 提示 miR-30 在病毒侵染过程中可能发挥负调控作用。此外, 二者也各自拥有自己独特的靶基因, 可与其他 miRNAs 协同作用于某些靶基因功能团, 行使调控作用: 如 ssc-miR-30d、ssc-miR-30a-5p 和 ssc-miR-24-3p 共同调控 LRRK2 (蛋白激酶)、RCC1 (染色体浓缩调控蛋白 1), GO 分析显示它们主要参与细胞代谢。在 miRNA-Target 网络图中, 调控靶基因最多的是 ssc-miR-24-3p。miR-24 在不同物种间是高度保守的, 可通过靶基因促进细胞扩散和抑制细胞凋亡^[25]。ssc-miR-24-3p 在未感染病毒的 PK-15 细胞中表达水平非常高, 位居所有 miRNAs 表达量前五, 但在感染 PRV-Fa 后表达水平显著下降, 提示 ssc-miR-24-3p 下调可能是由细胞调控, 通过促进自身凋亡来抑制病毒增殖。

通过与 PRV 病毒基因组对比, 本研究鉴定出 5 个新的病毒编码的 miRNAs 均定位于 LLT 区。预测其针对猪的靶基因有 1 916 个, GO 分析发现其参与多种复杂的细胞调控过程。而预测针对病毒自身的靶基因却只发现一个即早期蛋白基因 EPO, 且仅被 PRV-miR-LLT2 与 PRV-miR-LLT4 靶向。研究表明^[26], EPO 基因是伪狂犬病毒的早期基因, 可激活 IE180 的转录, 从而抑制 LLT 的神经特异性启动子 LAP1, 与病毒的潜伏感染相关, 但其在 PRV 中的定位及功能尚不清楚。病毒 miRNAs 主要通过调控宿主细胞凋亡, 细胞周期和免疫应答来促进自身的存活, 但是否与病毒逃避免疫、

促进潜伏感染有关,需进一步研究。

综上所述,本研究深入分析了猪伪狂犬病毒 Fa 株侵染对 PK-15 细胞 microRNAs 表达谱的影响,并检出大量免疫相关 miRNAs,证实了其在 PRV 感染过程中的重要作用。有助于深入了解 miRNAs 在宿主-病原体互作关系中的作用,为筛选抗 PRV 候选 miRNAs 和从 miRNAs 角度提出防控伪狂犬病新策略提供参考。

参 考 文 献

- [1] Verpoest S, Cay AB, de Regge N. Molecular characterization of Belgian pseudorabies virus isolates from domestic swine and wild boar[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(1/2): 72-77
- [2] Wu R, Bai CY, Sun JZ, et al. Emergence of virulent pseudorabies virus infection in Northern China[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2013, 14(3): 363-365
- [3] Lim LP, Glasner ME, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes[J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1540
- [4] Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(5): 376-385
- [5] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 19-53
- [6] Nielsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells[J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(5): 243-249
- [7] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(4): 1290-1297
- [8] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 147-152
- [9] Ha TY. The role of microRNAs in regulatory T cells and in the immune response[J]. *Immune Network*, 2011, 11(1): 11-41
- [10] Huang J, Ma G, Fu L, et al. Pseudorabies viral replication is inhibited by a novel target of miR-21[J]. *Virology*, 2014, 456: 319-328
- [11] Anselmo A, Flori L, Jaffrezic F, et al. Co-expression of host and viral microRNAs in porcine dendritic cells infected by the pseudorabies virus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17374
- [12] Mahjoub N, Dhorne-Pollet S, Fuchs W, et al. A 2.5-kilobase deletion containing a cluster of nine microRNAs in the latency-associated-transcript locus of the pseudorabies virus affects the host response of porcine trigeminal ganglia during established latency[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(1): 428-442
- [13] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Translated by Huang PT. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2005: 98-102 (in Chinese)
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2005: 98-102
- [15] Ou JT, Meng QG, Li Y, et al. Identification and comparative analysis of the *Eriocheir sinensis* microRNA transcriptome response to *Spiroplasma eriocheiris* infection using a deep sequencing approach[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(2): 345-352
- [16] Zhu QY, Liu Q, Chen JX, et al. MicroRNA-101 targets MAPK phosphatase-1 to regulate the activation of MAPKs in macrophages[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(12): 7435-7442
- [17] Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma[J]. *Nature*, 2010, 467(7311): 86-90
- [18] Liu Z, Zhu J, Cao H, et al. miR-10b promotes cell invasion through RhoC-AKT signaling pathway by targeting HOXD10 in gastric cancer[J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 40(5): 1553-1560
- [19] Trenkmann M, Brock M, Gay RE, et al. Tumor necrosis factor α -induced micromir-18a activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through a feedback loop in NF- κ B signaling[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2013, 65(4): 916-927
- [20] Zhou R, Li XQ, Hu GK, et al. miR-16 targets transcriptional corepressor SMRT and modulates NF- κ B-regulated transactivation of interleukin-8 gene[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30772
- [21] Noguchi S, Yamada N, Kumazaki M, et al. *Socs7*, a target gene of microRNA-145, regulates interferon- β induction through STAT3 nuclear translocation in bladder cancer cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(2): e482
- [22] Liu XQ, Zhang ZY, Sun L, et al. microRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(12): 1798-1805
- [23] Wu SY, He L, Li YY, et al. miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6[J]. *Journal of Infection*, 2013, 67(4): 329-341
- [24] Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation[J]. *RNA*, 2003, 9(3): 277-279
- [25] Dai H, Kang B, Zuo DY, et al. Effect of miR-30a-5p on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of SMCC-7721 human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2014, 22(12): 915-920 (in Chinese)
- [26] 代航, 康冰, 左的于, 等. MicroRNA-30a-5p 对肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖凋亡及侵袭转移的影响[J]. *中华肝病杂志*, 2014, 22(12): 915-920
- [27] Qin WM, Shi Y, Zhao BT, et al. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9429
- [28] Ou CJ, Wong ML, Huang C, et al. Suppression of promoter activity of the LAT gene by IE180 of pseudorabies virus[J]. *Virus Genes*, 2002, 25(3): 227-239