

MiR-107 对柯萨奇病毒 B3 感染细胞糖原合成酶激酶-3 β 蛋白及 β -连环蛋白表达的影响

王秀平¹, 吴娴¹, 张慧蓉¹, 周婷¹, 徐点点¹, 姚敏¹, 邵晨², 邵世和^{*1}

1 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013

2 江苏大学附属医院心内科, 江苏 镇江 212001

王秀平, 吴娴, 张慧蓉, 周婷, 徐点点, 姚敏, 邵晨, 邵世和. MiR-107 对柯萨奇病毒 B3 感染细胞糖原合成酶激酶-3 β 蛋白及 β -连环蛋白表达的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4281-4290

Wang Xiuping, Wu Xian, Zhang Huirong, Zhou Ting, Xu Diandian, Yao Min, Shao Chen, Shao Shihe. Effect of miR-107 on expression of glycogen synthase kinase-3 β and β -catenin in CVB3-infected cells[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4281-4290

摘要: 【背景】MiR-107 异常表达可引起肿瘤细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路主要蛋白表达发生改变, 但其能否在柯萨奇病毒 B3 (coxsackievirus B3, CVB3) 感染的人宫颈癌细胞(HeLa cells)中发挥同样作用却未见报道。【目的】探讨 miR-107 能否影响 CVB3 感染 HeLa 细胞中的糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 蛋白、P-GSK-3 β 蛋白和 β -连环蛋白(β -catenin)的表达水平。【方法】体外培养 HeLa 细胞, 感染 CVB3 不同时间, 通过显微镜观察 HeLa 细胞的形态学变化、实时荧光定量 PCR 实验检测 HeLa 细胞中 miR-107 表达量、免疫印迹实验检测 HeLa 细胞中的 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 、 β -catenin 蛋白及病毒衣壳蛋白(VP1)的表达水平。【结果】CVB3 感染 HeLa 细胞 6 h 后, 细胞病变效应明显, miR-107 表达量及 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 和 VP1 蛋白的表达水平随 CVB3 感染时间(0-8 h)的延长逐渐增加, 而 β -catenin 蛋白的表达水平逐渐减少。过表达 miR-107 的 CVB3 感染 6 h 的 HeLa 细胞死亡细胞增多, GSK-3 β 、P-GSK-3 β 和 VP1 蛋白表达水平增加($P < 0.05$), β -catenin 蛋白表达水平减少($P < 0.001$); 抑制 miR-107 的 CVB3 感染 6 h 的 HeLa 细胞 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 及 VP1 蛋白表达水平明显减少($P < 0.05$), β -catenin 蛋白表达水平明显增加($P < 0.05$)。【结论】MiR-107 异常表达可影响 CVB3 感染 HeLa 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白和病毒衣壳蛋白的表达水平。

关键词: 柯萨奇病毒 B3; 病毒性心肌炎; miR-107; Wnt/ β -catenin

基金项目: 镇江市重点研发计划(社会发展)项目(SH2019044)

Supported by: Zhenjiang Key Research and Development Program for Social Development (SH2019044)

*Corresponding author: E-mail: shaoshihe2013@ujs.edu.cn

Received: 2022-02-19; Accepted: 2022-05-23; Published online: 2022-06-25

Effect of miR-107 on expression of glycogen synthase kinase-3 β and β -catenin in CVB3-infected cells

WANG Xiuping¹, WU Xian¹, ZHANG Huirong¹, ZHOU Ting¹, XU Diandian¹, YAO Min¹, SHAO Chen², SHAO Shihe^{*1}

1 School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

2 Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Abnormal expression of miR-107 can change the expression of the main proteins of Wnt/ β -catenin signaling pathway in tumor cells, while miR-107 plays the same role in human cervical cancer cells (HeLa cells) infected with coxsackievirus B3 (CVB3) has not been reported. [Objective] To investigate whether miR-107 can affect the expression levels of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), P-GSK-3 β , and β -catenin in CVB3-infected HeLa cells. [Methods] The HeLa cells were cultured *in vitro* and infected with CVB3 for different time periods. The morphological changes of HeLa cells were observed by microscopy. The expression of miR-107 in HeLa cells was measured by real-time fluorescent quantitative PCR. The protein levels of GSK-3 β , P-GSK-3 β , β -catenin and viral capsid protein (VP1) in HeLa cells were determined by western blotting. [Results] After CVB3 infection for 6 h, the cytopathic effect was obvious. The expression level of miR-107 and the protein levels of GSK-3 β , P-GSK-3 β , and VP1 increased, while the protein level of β -catenin decreased, with the prolongation of CVB3 infection time (0–8 h). MiR-107 overexpression in the HeLa cells infected with CVB3 for 6 h increased the cell deaths, up-regulated the protein levels of VP1, GSK-3 β , and P-GSK-3 β ($P<0.05$), and down-regulated the protein level of β -catenin ($P<0.001$). The inhibition of miR-107 expression in the HeLa cells infected with CVB3 for 6 h reduced the cell deaths, down-regulated the protein levels of VP1, GSK-3 β , and P-GSK-3 β ($P<0.05$), and up-regulated the protein level of β -catenin ($P<0.05$). [Conclusion] Abnormal expression of miR-107 can affect the expression levels of proteins in the Wnt/ β -catenin signaling pathway and VP1 in CVB3-infected HeLa cells.

Keywords: coxsackievirus B3; viral myocarditis; miR-107; Wnt/ β -catenin

柯萨奇病毒 B3 (coxsackievirus B3, CVB3) 是引起病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC) 的主要病原体^[1], 为单股正链小 RNA 病毒, 基因组大小为 7.4 kb, 编码 4 种病毒结构蛋白(衣壳蛋白 VP1–VP4)、7 种非结构蛋白(2A–2C、3A–3D)及前体蛋白(2BC、3AB、3CD); 暴露在病毒表面的 VP1 是与受体特异性结合的部位, 具有维持病毒形态完整性活性^[2–3]。

MiR-107 定位于 10 号染色体, 由细胞代谢相关的泛酸激酶 (pantothenate kinase,

PANK)基因编码, 可通过调控不同的信号通路调节细胞代谢过程^[4], 在恶性肿瘤、缺血性脑损伤等疾病中异常表达^[5–6]。课题组前期研究结果表明 miR-107 可通过 NF- κ B 信号通路促进 CVB3 的复制^[7]。本研究以 HeLa 细胞为工具细胞, 初步探讨 miR-107 对 CVB3 感染的 HeLa 细胞中 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白的影响, 旨在明确 miR-107 对 CVB3 的调控作用, 为相关病毒性疾病的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病毒株

柯萨奇病毒 B3 毒株(CVB3)由上海复旦大学附属中山医院教授陈惠珍惠赠, 并保藏于江苏大学检验医学研究所。

1.2 细胞株

HeLa 细胞系由江苏大学检验医学研究所提供。

1.3 主要试剂和仪器

转染试剂 Lipofectamine 3000, Thermo Fisher Science 公司; miR-107 引物由上海桑尼生物技术有限公司合成; miR-107 mimics、miR-107 inhibitor、miR-NC 和 Inhibitor NC, 上海吉玛公司; VP1 抗体, Genetex 公司; GSK-3 β 抗体、P-GSK-3 β 抗体和 β -catenin 抗体, 万类生物公司; GAPDH 抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗, CST 公司; 细胞蛋白提取试剂 RIPA 和 PMSF, 上海碧云天生物技术有限公司; HRP-ECL 曝光液和荧光定量试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司。实时荧光定量 PCR 仪和 ABI StepOnePlus 荧光仪, 应用生物系统公司; 细胞培养箱, Eppendorf 公司; 显微镜, 尼康公司; NanoDrop 2000, Thermo Fisher 公司; Pierce ECL Western Blot Substrate, Pierce 公司; 凝胶

成像分析系统, Bio-Rad 公司。

1.4 HeLa 细胞培养及病毒感染

HeLa 细胞用含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的新鲜 DMEM 培养基常规培养于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中。取稳定培养的 HeLa 细胞按 2.5×10^5 个/孔转种于 6 孔板。当板内细胞生长至 70%–90%, 补充 1 mL 新鲜无血清培养液继续培养 1 h, 每孔加入 10 感染复数(multiplicity of infection, MOI)病毒液继续培养 1 h, 设立空白对照孔。磷酸缓冲盐(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞, 补充 2 mL 新鲜含 2% FBS 培养液, 放入培养箱内继续培养, 用于后续实验。

1.5 HeLa 细胞分组及细胞转染

实验分组见表 1。将生长状态良好的 HeLa 细胞按 2.5×10^5 个/孔转种于 6 孔板, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。次日细胞汇合度约达到 70% 时进行转染。根据 Lipofectamine 3000 操作说明书分别将 miR-107 mimics、miR-107 inhibitor、miR-NC、Inhibitor NC 转染到细胞中继续培养 48 h, 备用。

1.6 HeLa 细胞形态学变化观察

分别在光学显微镜下观察 6 孔板中空白组、病毒组、miR-CL+CVB3 组、miR-107+CVB3 组、CL-in+CVB3 组、107-in+CVB3 组 HeLa 细胞形态, 拍照并保存图像。

表 1 HeLa 细胞分组

Table 1 HeLa cell groupings

Group	Treatment
Mock group	Normal culture without CVB3 infection
CVB3 group	CVB3 was infected for 2, 4, 6, and 8 h, respectively
MiR-CL group	Transfection of miR-NC
MiR-107 group	Transfection of miR-107 mimics
CL-in group	Transfection of inhibitor NC
107-in group	Transfection of miR-107 inhibitor
MiR-CL+CVB3 group	CVB3 infection 6 h after transfection of miR-NC
MiR-107+CVB3 group	CVB3 infection 6 h after transfection of miR-107 mimics
CL-in+CVB3 group	CVB3 infection 6 h after transfection of miR-107 inhibitor NC
107-in+CVB3 group	CVB3 infection 6 h after transfection of miR-107 inhibitor

1.7 HeLa 细胞总蛋白提取及免疫印迹实验(Western blotting)

分别收集各组细胞,加入 100 μL 含 1% PMSF 的 RIPA 提取细胞蛋白。用 NanoDrop 2000 分光光度仪测量样品的浓度和纯度。加入蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 10 min。SDS-PAGE 分离蛋白,湿转法(恒流 300 mA, 100 min)转移到聚偏二氟乙烯膜上,室温封闭 2 h。加入浓度合适的一抗(VP1、GSK-3 β 、P-GSK-3 β 、 β -catenin 和 GAPDH),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。加入 HRP 标记的二抗(抗体稀释比为 1:2 000)孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。在 HRP-ECL 系统下进行显色,保存图片。蛋白灰度值分析以 GAPDH 为参照,使用 Imagine J 软件对信号强度进行量化。

1.8 HeLa 细胞总 RNA 提取及逆转录

分别收集空白组、病毒组、miR-CL 组、miR-107 组、CL-in 组和 107-in 组细胞。用 Trizol 试剂裂解细胞,异丙醇、氯仿、75%乙醇分离纯化 RNA, NanoDrop 2000 分光光度仪检测样品的浓度和纯度。根据 TaKaRa 公司提供的逆转录试剂盒(RR036)说明书进行逆转录。

1.9 实时荧光定量 PCR 实验

从 Pubmed 和 GenBank 数据库获取人 miR-107 和 U6 序列。由 Primer 软件设计引物序列。miR-107 上游引物序列(F): 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGATAGCC-3', 下游引物序列(R): 5'-ACACTCCAGCTGGGAGCAGCATTGTACAGGG-3'; U6 上游引物序列(F): 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物序列(R): 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 反应体系(20 μL): 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , TB Green Premix Ex Taq 10 μL , 模板 2 μL , 无 RNA 酶水补足至 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$

15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 45 个循环; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以 U6 为内参基因, 每组各 3 个复孔, 各组细胞中 mRNA 水平以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

1.10 统计学方法

选用 GraphPad Prism 8.0 软件处理数据。两组间比较用 t 检验, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 CVB3 在 HeLa 细胞中的复制

如图 1A 所示, 与空白组比较, CVB3 感染后 0-2 h 细胞形态无明显变化; 4 h 细胞出现轻微圆缩; 6 h 细胞出现不同程度的圆缩、脱落; 8 h 细胞圆缩、脱落明显。图 1B 的 Western blotting 结果显示, 病毒组 VP1 蛋白表达水平随感染时间(0-8 h)延长逐渐升高, 于 8 h 时表达水平最高。

2.2 MiR-107 在 CVB3 感染的 HeLa 细胞中的表达情况

如图 2 所示, 与空白组比较, 病毒组 miR-107 的表达量随病毒感染时间的延长逐渐增加, CVB3 感染后 6 h 时达最高值($P<0.01$)。

2.3 MiR-107 对 CVB3 复制的影响

如图 3 所示, 与 miR-CL 组比较, miR-107 组 miR-107 的表达量显著增加($P<0.01$); 与 CL-in 组比较, 107-in 组 miR-107 表达量显著减少($P<0.01$); 与 miR-CL+CVB3 组比较, miR-107+CVB3 组 VP1 蛋白表达水平升高($P<0.001$), 细胞明显圆缩和脱落, 细胞死亡数明显增加; 与 CL-in+CVB3 组比较, 107-in+CVB3 组 VP1 蛋白表达水平显著降低($P<0.001$), 细胞死亡数明显减少。

2.4 CVB3 感染 HeLa 细胞后 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达的变化

如图 4 所示, 与空白组比较, 病毒组细胞 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 蛋白表达水平随着 CVB3

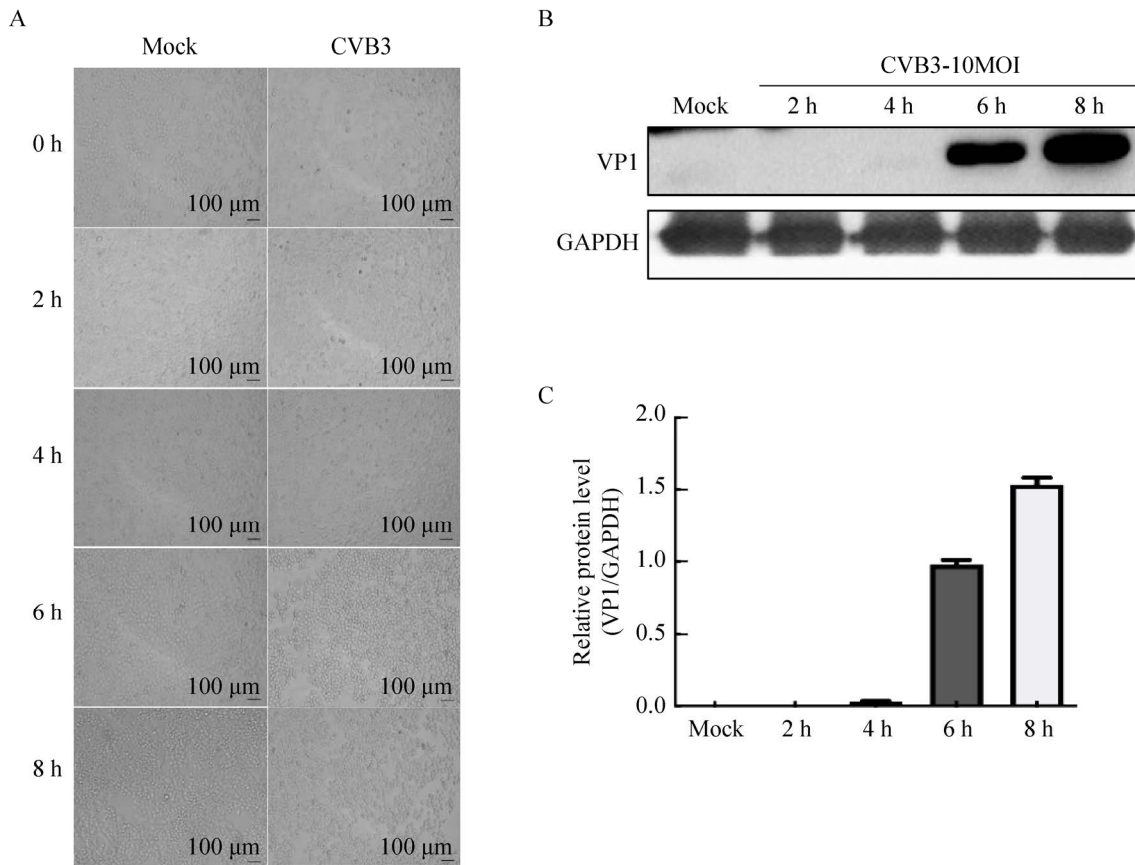


图 1 CVB3 感染所致 HeLa 细胞形态学变化特征(X100)及 VP1 蛋白表达 A: HeLa 细胞形态学变化; B: HeLa 细胞 VP1 蛋白表达水平; C: VP1 蛋白灰度扫描

Figure 1 Morphological changes (X100) and the protein level of VP1 in CVB3-infected HeLa cells. A: Morphological changes of HeLa cells; B: The protein level of VP1 in HeLa cells; C: Gray scanning of VP1 protein.

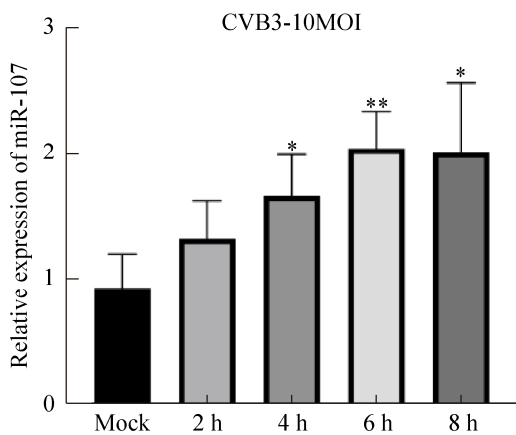


图 2 CVB3 感染对 miR-107 表达量的影响 Figure 2 Effect of CVB3 infection on miR-107 expression. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

感染时间延长而逐渐上升, β -catenin 蛋白表达水平逐渐下降, 其中感染后 8 h 时差异最显著 ($P<0.001$)。根据实验结果, 而且为了避免临界效应, 选择 6 h 进行后续实验。

2.5 MiR-107 对 CVB3 感染的 HeLa 细胞中 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与 miR-CL 组比较, miR-107 组细胞 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 蛋白表达水平均升高 ($P<0.001$), β -catenin 蛋白表达水平轻微降低 ($P<0.05$); 与 miR-CL+CVB3 组比较, miR-107+CVB3 组 GSK-3 β 蛋白表达水平轻微升高 ($P<0.05$),

P-GSK-3 β 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), β -catenin 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.001$); 与 CL-in 组比较, 107-in 组 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 蛋白表达水平均降低 ($P<0.001$), β -catenin 蛋白表

达水平明显升高 ($P<0.01$); 与 CL-in+CVB3 组比较, 107-in+CVB3 组 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.001$), β -catenin 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)。

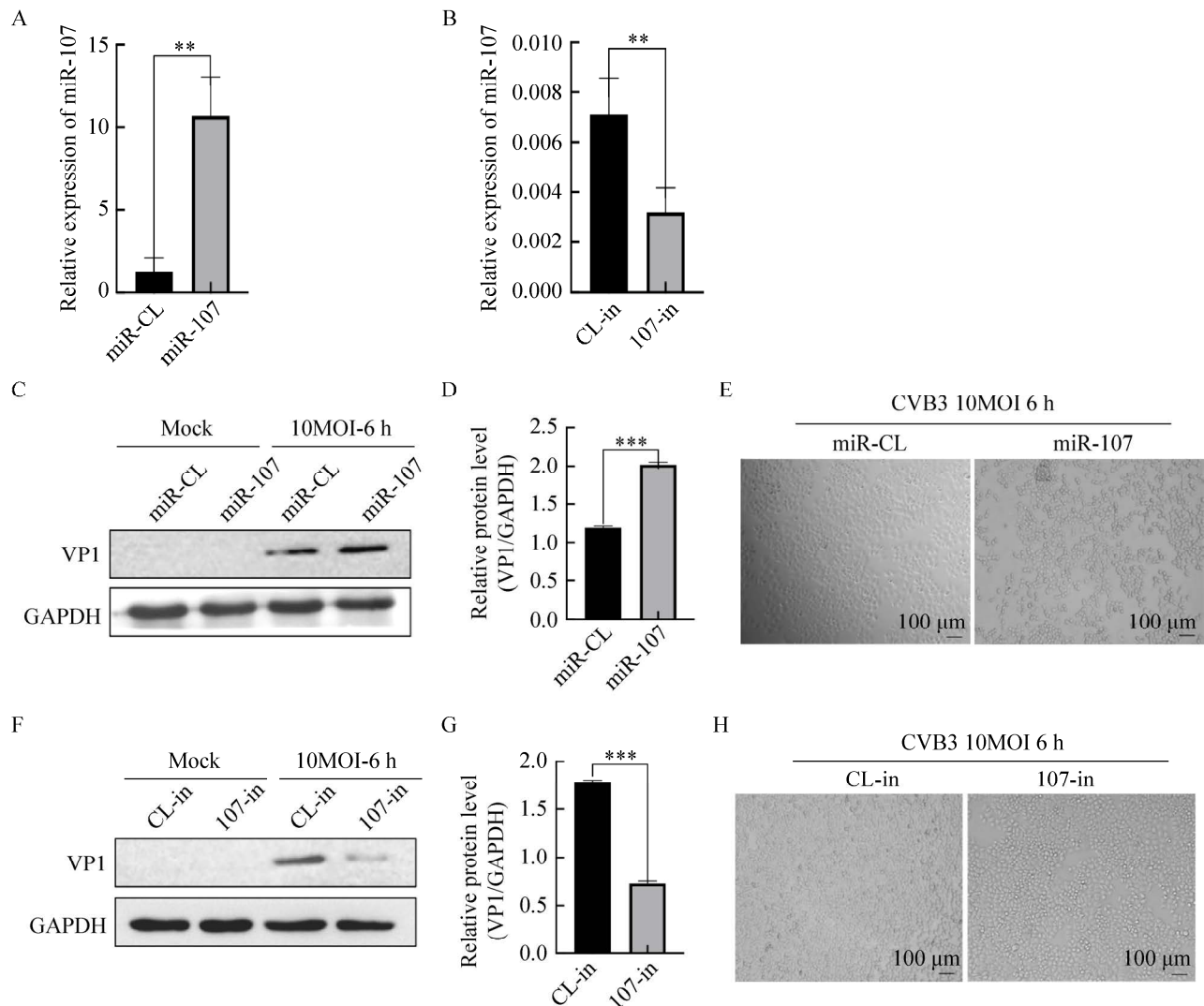


图3 MiR-107对CVB3复制的影响 A和B: qRT-PCR检测miR-107 mimics (A)和miR-107 inhibitor (B)的转染效率; C和F: 过表达miR-107 (C)和抑制miR-107 (F)后VP1蛋白表达水平; D和G: VP1蛋白灰度扫描; E和H: 过表达miR-107 (E)和抑制miR-107 (H)对CVB3诱导的细胞病变的影响。**: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 3 Effect of miR-107 on CVB3 replication. A, B: Transfection efficiency of miR-107 mimics (A) and miR-107 inhibitor (B) measured by qRT-PCR; C, F: The protein levels of VP1 after miR-107 overexpression (C) and miR-107 inhibition (F); D, G: Gray scanning of VP1 protein; E, H: Effect of miR-107 overexpression (E) and miR-107 inhibition (H) on CVB3-induced cytopathic effects. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

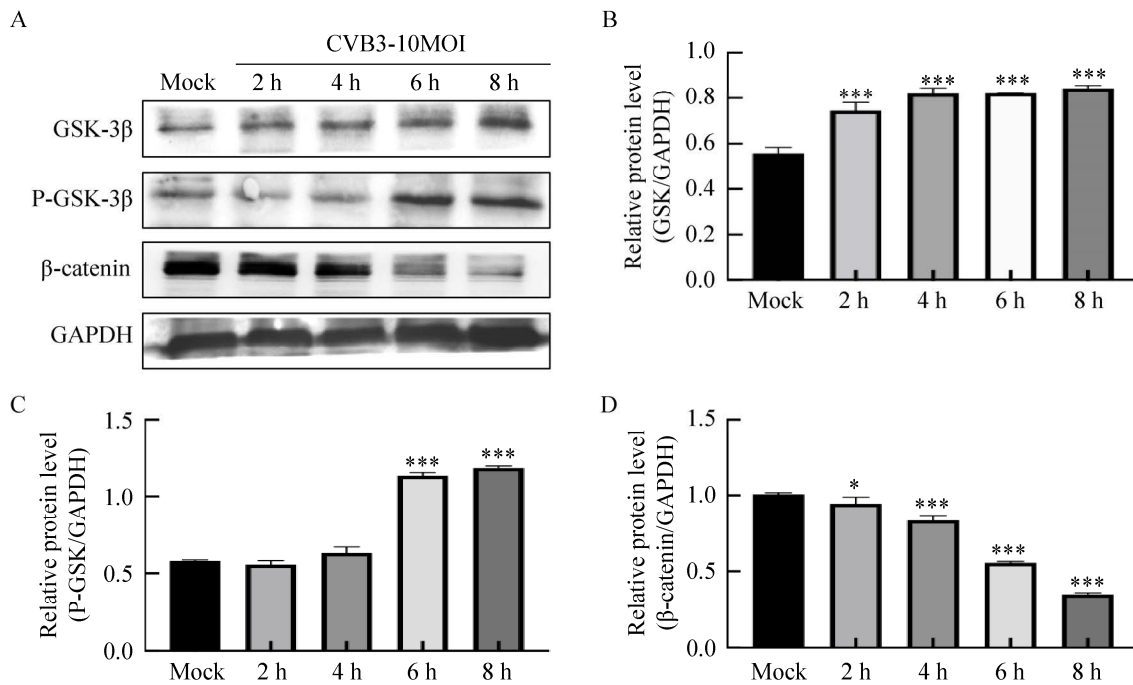


图 4 CVB3 感染对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 A: CVB3 感染 HeLa 细胞后 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达水平; B-D: GSK-3 β /GAPDH、P-GSK-3 β /GAPDH 和 β -catenin/GAPDH 灰度扫描。*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$

Figure 4 Effect of CVB3 infection on expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway-related proteins. A: Levels of Wnt/ β -catenin signaling pathway-related proteins in CVB3-infected HeLa cells; B-D: GSK-3 β /GAPDH, P-GSK-3 β /GAPDH and β -catenin/GAPDH gray scanning. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论与结论

MicroRNA (miRNA) 是一种长约 21 个核苷酸的非编码单链短 RNA, 通过与靶 mRNA 结合, 诱导靶 mRNA 降解或者影响靶 mRNA 翻译从而负调控基因的表达^[8]。近年的研究表明, miR-107 在多种肿瘤细胞中发挥着促癌或抑癌的作用, 包括胃癌细胞^[9]、宫颈癌细胞^[10]、鼻咽癌细胞^[11]等。然而 miR-107 在 CVB3 感染细胞中的作用及其机制的报道较少。本研究通过系列实验探讨了 miR-107 表达对 CVB3 感染的 HeLa 细胞糖原合成酶激酶-3 β 蛋白和 β -连环蛋白表达的影响。

细胞膜皱缩、细胞脱落、折光颗粒增加、细

胞破碎等细胞病变效应(cytopathic effect, CPE) 改变, 可以间接反映病毒在细胞中的复制情况。本研究中, CVB3 感染 HeLa 细胞 6 h 时, 显微镜下可见明显的细胞病变效应, 而且 VP1 蛋白大量表达, 提示 CVB3 在 HeLa 细胞中复制; miR-107 表达量随 CVB3 感染时间的延长而不断增加, 提示 miR-107 表达与 CVB3 感染相关。多种 miRNA 在 CVB3 复制中起到促进或抑制的作用。miR-30a 在 HeLa 细胞中高表达促进 CVB3 复制^[12], 而 miR-324-3p 在 HeLa 细胞和病毒性心肌炎模型小鼠组织中高表达则抑制 CVB3 复制^[13]。为了进一步证明 miR-107 对 CVB3 复制的影响, 本研究通过脂质体瞬时转染法分别在 HeLa 细胞中过表达、抑制 miR-107 后, Western

blotting 实验结果和细胞形态学变化显示, HeLa 细胞内过表达 miR-107 可促进病毒复制, 导致更严重的细胞病变。相反地, HeLa 细胞内抑制 miR-107 可抑制病毒复制, 细胞死亡数减少。以上实验结果提示 miR-107 表达量上调对 CVB3 复制具有正调控作用。值得注意的是, 过表达

miR-107 时 VP1 蛋白表达水平未显著上升, 而抑制 miR-107 后 VP1 蛋白表达水平显著下降。这可能与 CVB3 感染时 miR-107 表达量上调已经达到生物学功能的饱和有关, 因此, 过表达 miR-107 后 VP1 蛋白表达水平未呈现显著上升, 而抑制 miR-107 后 VP1 蛋白表达水平则显著下降。

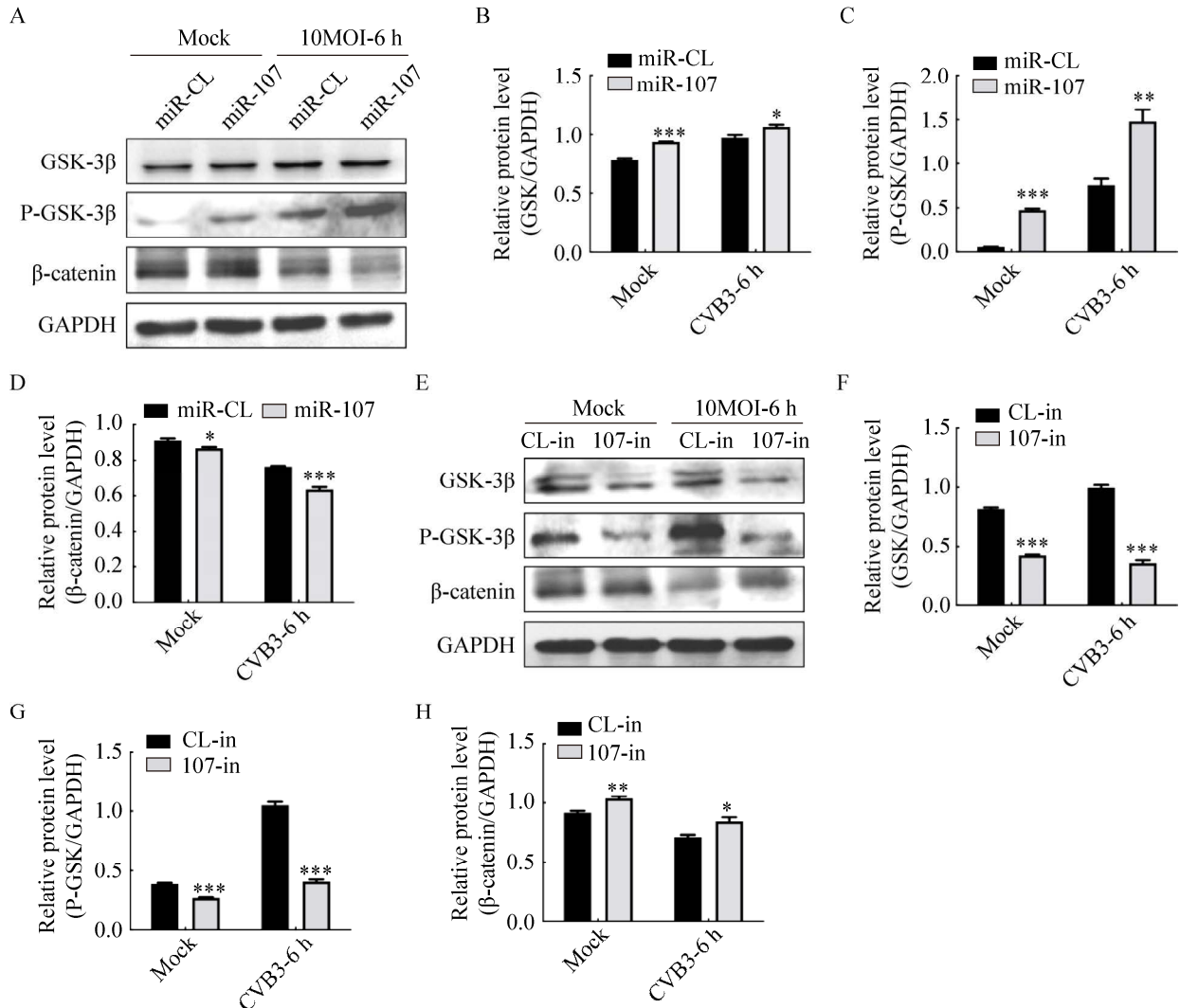


图 5 MiR-107 对 CVB3 感染细胞 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 A 和 E: 过表达 miR-107 (A)和抑制 miR-107 (E)后 Wnt/β-catenin 信号通路蛋白表达情况; B-D 和 F-H: GSK-3β/GAPDH、P-GSK-3β/GAPDH 和 β-catenin/GAPDH 灰度扫描。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 5 Effect of miR-107 on the expression of Wnt/β-catenin signaling pathway-related proteins in CVB3-infected cells. A, E: Expression of Wnt/β-catenin signal pathway proteins after miR-107 overexpression (A) and miR-107 inhibition (E); B-D and F-H: GSK-3β/GAPDH, P-GSK-3β/GAPDH and β-catenin/GAPDH gray scanning. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Wnt/ β -catenin 信号通路是一种复杂的蛋白网络调控系统,参与炎症、肿瘤等多种疾病过程^[14-16]。GSK-3 β 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的负调控因子, β -catenin 是 GSK-3 β 的下游底物,激活状态下的 GSK-3 β 能够磷酸化 β -catenin,促使 β -catenin 泛素化降解^[17-19]。既往研究证实, CVB3 感染后细胞中 GSK-3 β 的活性增加, β -catenin 蛋白的表达量减少, CVB3 感染通过酪氨酸激酶依赖机制增加 GSK-3 β 活性,使 β -catenin 积累和核易位减少,从而介导 CVB3 诱导的 CPE 和细胞凋亡^[20]。在本研究中,用 CVB3 感染 HeLa 细胞后,随着病毒感染时间的延长, Wnt/ β -catenin 信号通路中 GSK-3 β 和 P-GSK-3 β 蛋白的表达水平持续升高, β -catenin 蛋白表达水平持续降低,提示 CVB3 感染过程中伴随着 Wnt/ β -catenin 信号通路的改变。

miRNA 通过多种复杂的信号通路调控病毒的复制增殖过程。miR-126 可调控 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白的活性,从而促进 CVB3 的复制,导致严重的细胞病变效应^[21]。本研究关于 miR-107 调控 CVB3 复制中 GSK-3 β / β -catenin 级联反应的变化实验结果显示,在 CVB3 感染状态下,过表达 miR-107 后细胞的 GSK-3 β 蛋白表达轻度增加, P-GSK-3 β 蛋白的表达显著升高, β -catenin 蛋白的表达显著降低;而抑制 miR-107 后细胞 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 蛋白表达均显著降低, β -catenin 蛋白表达升高。此结果与在骨肉瘤细胞中转染 miR-107 mimics 后 β -catenin 的蛋白表达降低、GSK-3 β 蛋白的表达升高结果^[22]一致,提示 miR-107 在促进 CVB3 复制过程中可能影响了 GSK-3 β 蛋白及其磷酸化形式及 β -catenin 蛋白的表达。

综上所述,本研究阐明了 miR-107 异常表达可影响 CVB3 感染的 HeLa 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白和病毒衣壳蛋白的表达水平,但

其具体分子机制有待进一步探究。

REFERENCES

- [1] Hékimian G, Combes A. Myocardites[J]. *La Revue De Médecine Interne*, 2017, 38(8): 531-538
- [2] Wang TY, Yu BH, Lin LX, Zhai X, Han YL, Qin Y, Guo ZW, Wu S, Zhong XY, Wang Y, et al. A functional nuclear localization sequence in the VP1 capsid protein of coxsackievirus B3[J]. *Virology*, 2012, 433(2): 513-521
- [3] Garmaroudi FS, Marchant D, Hendry R, Luo HL, Yang DC, Ye X, Shi JY, McManus BM. Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis[J]. *Future Microbiology*, 2015, 10(4): 629-653
- [4] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(6): 720-728
- [5] Finnerty JR, Wang WX, Hébert SS, Wilfred BR, Mao GG, Nelson PT. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 402(3): 491-509
- [6] Fang H, Li HF, Pan Q, Yang M, Zhang FX, Wang RR, Wang QY, Zhang JP. Long noncoding RNA H19 overexpression protects against hypoxic-ischemic brain damage by inhibiting miR-107 and up-regulating vascular endothelial growth factor[J]. *The American Journal of Pathology*, 2021, 191(3): 503-514
- [7] Yao M, Xu C, Shen HX, Liu TJ, Wang XP, Shao C, Shao SH. The regulatory role of miR-107 in coxsackie B3 virus replication[J]. *Aging*, 2020, 12(14): 14467-14479
- [8] Achkar NP, Cambiagno DA, Manavella PA. MiRNA biogenesis: a dynamic pathway[J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(12): 1034-1044
- [9] 张肖雨, 张月晓, 陈健, 李炳庆. MiR-107 在胃癌中的表达及其对胃癌细胞生物学特性的影响[J]. *解剖学研究*, 2020, 42(1): 32-37
Zhang XL, Zhang YX, Chen J, Li BQ. Expression of miR-107 in gastric carcinoma and its effect on biological characteristics of gastric cancer cells[J]. *Anatomy Research*, 2020, 42(1): 32-37 (in Chinese)
- [10] 刘雅坤, 杜家宜, 赵运清. MiR-107 对宫颈癌细胞系 HeLa 生物学行为的影响[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2021, 35(10): 1001-1006
Liu YK, Du JY, Zhao YQ. Influence of miR-107 on biological behaviors of HeLa cell line[J]. *Journal of*

- Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2021, 35(10): 1001-1006 (in Chinese)
- [11] 刘桂超, 胡学锋, 郭建贵, 吴海军. MiR-107 靶向 FoxM1 对鼻咽癌细胞生长和侵袭及迁移影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(4): 269-275
- Liu GC, Hu XF, Guo JG, Wu HJ. MiR-107 affects the proliferation, invasion and migration of human nasopharyngeal carcinoma cells by targeting FoxM1[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2020, 27(4): 269-275 (in Chinese)
- [12] Li J, Xie YW, Li LW, Li XB, Shen L, Gong J, Zhang RF. MicroRNA-30a modulates type I interferon responses to facilitate coxsackievirus B3 replication via targeting tripartite motif protein 25[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 11: 603437
- [13] Liu TJ, Tong J, Shao C, Qu JY, Wang H, Shi Y, Lin YJ, Liu Y, Shao SH, Shen HX. MicroRNA-324-3p plays a protective role against coxsackievirus B3-induced viral myocarditis[J]. Virologica Sinica, 2021, 36(6): 1585-1599
- [14] Silva-García O, Valdez-Alarcón JJ, Baizabal-Aguirre VM. The Wnt/ β -catenin signaling pathway controls the inflammatory response in infections caused by pathogenic bacteria[J]. Mediators of Inflammation, 2014, 2014: 310183
- [15] Chen Z, Wu WJ, Huang YS, Xie LM, Li Y, Chen HX, Li WJ, Yin D, Hu KS. RCC₂ promotes breast cancer progression through regulation of Wnt signaling and inducing EMT[J]. Journal of Cancer, 2019, 10(27): 6837-6847
- [16] Li HX, Li JM, Han RB, Deng XY, Shi J, Huang HH, Hamad N, McCaughley A, Liu JP, Wang C, et al. Deletion of tetraspanin *CD151* alters the Wnt oncogene-induced mammary tumorigenesis: a cell type-linked function and signaling[J]. Neoplasia, 2019, 21(12): 1151-1163
- [17] Hong HY, Chen FH, Qiao YK, Yan Y, Zhang RK, Zhu Z, Li HB, Fan YP, Xu G. GSK-3 β activation index is a potential indicator for recurrent inflammation of chronic rhinosinusitis without nasal polyps[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2017, 21(12): 3633-3640
- [18] Du L, Li YC, Liu WF. Maresin 1 regulates autophagy and inflammation in human periodontal ligament cells through glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin pathway under inflammatory conditions[J]. Archives of Oral Biology, 2018, 87: 242-247
- [19] Lin JT, Song T, Li C, Mao WF. GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Molecular Cell Research, 2020, 1867(5): 118659
- [20] Yuan J, Zhang J, Wong BW, Si X, Wong J, Yang D, Luo H. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β suppresses coxsackievirus-induced cytopathic effect and apoptosis via stabilization of β -catenin[J]. Cell Death and Differentiation, 2005, 12(8): 1097-1106
- [21] Ye X, Hemida MG, Qiu Y, Hanson PJ, Zhang HM, Yang DC. MiR-126 promotes coxsackievirus replication by mediating cross-talk of ERK1/2 and Wnt/ β -catenin signal pathways[J]. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 2013, 70(23): 4631-4644
- [22] Yu M, Guo DQ, Cao ZL, Xiao LY, Wang G. Inhibitory effect of microRNA-107 on osteosarcoma malignancy through regulation of Wnt/ β -catenin signaling *in vitro*[J]. Cancer Investigation, 2018, 36(3): 175-184