

PK-15 细胞中与 CSFV 感染相关的 microRNAs 筛选及 miR-214 的功能研究

邓少锋, 叶佐东, 范双旗, 陈金顶, 张静远, 朱梦娇, 赵明秋

(华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

摘要: 【目的】利用制作的猪的 miRNA 表达谱芯片筛选猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 感染 PK-15 细胞后表达有差异的 miRNA, 并进一步探讨其中表达差异较明显的 miRNA 的作用和功能, 从 miRNA 的角度探究 CSFV 的致病机制, 为猪瘟 (classical swine fever, CSF) 的防控提供新依据。【方法】为了研究 CSFV 感染 PK-15 细胞后 miRNA 表达的变化情况, 根据 miRBase version 19.0 数据库中 326 条猪的 miRNA 合成探针, 采用原位合成技术制作表达谱芯片, 筛选得到 CSFV 感染 PK-15 细胞后表达有差异的 miRNA。挑选 CSFV 感染 PK-15 细胞后表达差异最明显的 miR-214 作为进一步研究对象, 研究 miR-214 在 CSFV 感染过程中的功能和作用。CSFV 感染 PK-15 细胞后, 用荧光定量 PCR 检测 miR-214 的 mRNA 表达水平。为了进一步研究 miR-214 对 CSFV 感染的影响, 合成 miR-214 模拟物及抑制物, 并分别转染 PK-15 细胞, 转染后 24 h 感染 CSFV, 感染后 48 h 用荧光定量 PCR 检测 CSFV 的基因拷贝数, 用间接免疫荧光方法检测 CSFV 的病毒滴度。为了进一步探究 miR-214 参与调控 CSFV 复制的机制, 通过生物信息学软件预测 miR-214 参与调控 CSFV 复制的靶蛋白, 并用荧光素酶报告基因系统进一步验证 miR-214 能够靶向作用于凋亡通路中重要分子 TNFR1 相关的死亡区域蛋白 (TNF Receptor-Associated Death Domain, TRADD), 因此猜测 miR-214 通过影响靶蛋白 TRADD 的表达水平从而影响 PK-15 细胞凋亡, 将 miR-214 模拟物及抑制物分别转染 PK-15 细胞, 转染后 24 h 感染 CSFV, 同步设立不感染 CSFV 的细胞对照, 感染后 48 h 用荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 TRADD 的 mRNA 和蛋白表达量的变化, 同时用流式细胞术检测 miR-214 对 CSFV 感染的 PK-15 细胞凋亡的影响。【结果】CSFV 感染 PK-15 细胞后, 通过表达谱芯片技术筛选得到 69 条表达有差异的 miRNA, 其中 miR-214 表达量上调且差异最明显。qRT-PCR 结果显示, CSFV 感染 PK-15 细胞后 miR-214 的 mRNA 表达量上调, 验证了表达谱芯片的结果。将 miR-214 模拟物转染 PK-15 细胞后再感染 CSFV, CSFV 的基因拷贝数及病毒滴度均显著下降; 转染 miR-214 抑制物后再感染 CSFV, CSFV 的基因拷贝数及病毒滴度均显著上升, 表明 miR-214 促进了 CSFV 的复制。为了进一步探究 miR-214 促进 CSFV 复制的机制, 用生物信息学软件预测 TRADD 为 miR-214 的靶蛋白, 荧光素酶报告基因系统验证了 miR-214 能够靶向作用于 TRADD。转染 miR-214 模拟物后, PK-15 细胞中 TRADD 的 mRNA 和蛋白表达量均显著上升, 而转染 miR-214 抑制物后, PK-15 细胞中 TRADD 的 mRNA 和蛋白表达量均显著下降, 表明 miR-214 抑制 TRADD 的表达。通过流式细胞术, 验证了 CSFV 感染 PK-15 抑制细胞凋亡, miR-214 抑制 CSFV 感染的 PK-15 细胞凋亡。【结论】CSFV 感染 PK-15 后, 上调细胞内 miR-214 的表达。miR-214 能通过靶向抑制 TRADD 蛋白的表达, 从而抑制 PK-15 细胞凋亡, 促进 CSFV 在细胞内的复制。

关键词: 猪瘟病毒; miRNA; 复制; TRADD; 凋亡

Screen of MicroRNAs in Classical Swine Fever Virus-Infected PK-15 Cells and the Regulation of Virus Replication by miR-214

DENG ShaoFeng, YE ZuoDong, FAN ShuangQi, CHEN JinDing, ZHANG JingYuan,
ZHU MengJiao, ZHAO MingQiu

收稿日期: 2018-04-18; 接受日期: 2018-09-07

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0501104, 2017YFD0500600)、广州市科技计划项目 (201803020005)、国家自然科学基金 (U1405216, 31472200, 31672590)

联系方式: 邓少锋, E-mail: dsf4530@126.com. 通信作者赵明秋, E-mail: zmingqiu@scau.edu.cn

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: 【Objective】 In this study, differential expression of miRNAs in CSFV-infected PK-15 cells were determined by miRNA expression array, and further explore the function of miRNAs in the pathogenic of Classical swine fever virus (CSFV), and provide some new basis for the prevention and control of Classical swine fever (CSF). 【Method】 In order to investigate the changes of the miRNAs expression in CSFV-infected PK-15 cells, we synthesized probes of 326 miRNAs of pig according to the miRBase database version 19.0, and screening of differential expression of miRNAs in CSFV-infected PK-15 cells using miRNA expression array. Then, miR-214, the most obvious difference in expression of CSFV-infected PK-15 cells, was selected as the further study object to investigate the function of miR-214 in the infection process of CSFV. We detected mRNA expression of miR-214 in CSFV-infected PK-15 cells using qRT-PCR. In order to further study the effect of miR-214 of CSFV infection, we synthesized miR-214 analog and inhibitor and transfected into PK-15 cells respectively, follow with CSFV infection at 24 h post-transfection, and then detected CSFV titers and quantity of CSFV genomic copies. In order to further explore the mechanism of miR-214 participate in the regulation of CSFV replication, we predicted the target protein of miR-214 using bioinformatics software and confirmed it by luciferase reporter gene system. Given TRADD can specific interacts with TNFR1 intracellular dead zones and participate in the programmed cell death, we assume that miR-214 influencing apoptosis of PK 15 cells by influencing expression level of target protein TRADD. PK 15 cells transfected with miR-214 and inhibitor respectively, follow with CSFV infection at 24 h post-transfection. At 48 h post-infection, the expression levels of TRADD were detected, and the effect of miR-214 on the apoptosis of CSFV-infected PK-15 cells was detected by flow cytometry. 【Result】 69 miRNAs with different expressions were screened by miRNA expression array in CSFV-infected PK-15 cells. Among which the expression changes of miR-214 were most obvious and up-regulated, and confirmed it by qRT-PCR. After transfected with miR-214 to PK-15 cells, CSFV titers and quantity of CSFV genomic copies decreased significantly, while transfected with miR-214 inhibitor, CSFV titers and quantity of CSFV genomic copies were increased significantly, which suggested that miR-214 promoted the replication of CSFV. In order to further explore the mechanism of miR-214 promoting CSFV replication, we confirmed TRADD is the target protein of miR-214. After transfected miR-214 to PK-15 cells, mRNA and protein expression of TRADD were increased significantly, while transfected with miR-214 inhibitor, that were decreased significantly, suggesting that miR-214.inhibits the expression of TRADD. And then, we verified that CSFV infection inhibits apoptosis of PK-15 cells, and miR-214 inhibits apoptosis of CSFV-infected PK-15 cells. 【Conclusion】 The expression of miR-214 in cells was up-regulated after CSFV infected PK-15. miR-214 inhibits the apoptosis of PK-15 cells and promote the replication of CSFV in cells by targeting inhibits the expression of TRADD protein.

Key words: CSFV; miRNA; replication; TRADD; apoptosis

0 引言

【研究意义】猪瘟 (classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 引起的猪的一种重大烈性传染性疾病^[1], 被世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 列为法定报告动物传染病之一^[2], 严重危害着我国养猪业的健康发展, 造成重大经济损失。CSFV 的致病机制十分复杂, 因此, 从不同角度深入研究其致病过程有利于促进对 CSFV 致病机制的认识。microRNA (miRNA) 是一类非编码单链小分子 RNA, 通过与其靶 mRNA 分子的 3'端非编码区域互补匹配抑制该 mRNA 分子的翻译, 从而对靶蛋白表达进行调控^[3]。miRNA 在病毒致病性以及病毒与宿主的相互作用方

面发挥重要作用, 但是对 CSFV 相关的 miRNA 研究较少。本研究通过生物信息学等试验方法筛选出可能与猪瘟病毒相关的 miRNA, 并对其进行功能研究, 从宿主细胞的角度研究猪瘟病毒与细胞之间相互作用的关系, 为猪瘟病毒的致病机理提供理论依据。

【前人研究进展】研究证实 miRNA 参与许多重要生物学过程, 包括调控信号通路^[4-6]、促进机体发育^[7]、诱导细胞凋亡^[8-10]、参与免疫反应^[11-13]以及在病毒感染中发挥作用。研究表明, 有些 miRNA 能够直接以病毒基因组为靶位, 调节病毒的复制^[14-15]。有些 miRNA 能介导宿主的抗病毒活性^[16-17]。目前对于 CSFV 相关的 miRNA 研究较少, 如 miRNA-let-7c 可下调 CSFV 的 RNA 复制水平^[18]。作为与 CSFV 同属黄病毒科的 HCV 的相关 miRNA 的研究已经十分深

入^[14, 19-20], 对研究 CSFV 相关 miRNA 的作用有很大指导意义。【本研究切入点】miRNA 在病毒感染中发挥重要作用, 但目前对于 CSFV 相关的 miRNA 研究较少, 而作为与 CSFV 同属黄病毒科的 HCV 的研究已十分成熟, 对研究 CSFV 相关 miRNA 的作用有很大指导意义。【拟解决的关键问题】通过生物信息学和试验方法筛选出可能与 CSFV 感染相关的 miRNA 及其功能研究, 从宿主细胞的角度来研究 CSFV 与细胞相互作用的关系, 为研究其致病机理提供有价值的科学资料。

1 材料与方法

试验于 2015 年 9 月至 2016 年 5 月在华南农业大学兽医学院完成。

1.1 试验材料

猪源肾脏细胞 (PK-15)、CSFV 石门株和大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保存。pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 由华南农业大学动物科学学院王翀教授惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒接种和滴度测定 PK-15 细胞传代于培养瓶中生长到 80%—90% 时, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 CSFV 病毒液, 置于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中孵育 4—6 h 后, 弃去病毒液, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入细胞维持培养基继续培养, 72 h 后收获病毒液, 于 -80℃ 保存备用。

用无血清无抗生素的 DMEM 将上述所获得的 CSFV 病毒液分别做 10 倍连续梯度稀释至 10⁻¹⁰, 再分别将每个梯度的病毒液按 0.1 mL/孔接种 4 孔细胞, 同时设空白细胞对照。接种 CSFV 后继续培养 5 d, 取出细胞培养板进行间接免疫荧光检测, 并计算 CSFV 感染滴度。

1.2.2 细胞总 RNA 的提取与检测 弃去细胞培养液, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加 1 mL 的胰酶消化并收集细胞至 1.5 mL 离心管中, 参考 Omega 公司的总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 再经过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定提取的总 RNA 的完整性, 并用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。

1.2.3 制作 miRNA 表达谱芯片 miRNA 表达谱芯片试验是由广州锐博公司完成。根据 miRBase version 19.0 数据库中 326 条猪 miRNA 合成探针, 采用原位合成技术制作表达谱芯片。miRNA 表达谱芯片制作完

成后进行扫描。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测基因的表达 分别采用相应的反应体系和条件, 根据 PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit 说明书和 PrimeScript® RT Master Mix 说明书进行反转录反应合成 miRNA cDNA 和病毒基因或蛋白基因 cDNA。然后根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书进行 qRT-PCR 检测基因的表达。

1.2.5 生物信息学预测 miRNA 的靶标蛋白 根据 miRNA 表达谱芯片筛选出来 CSFV 感染 PK-15 后表达变化的 miRNA, 用 Target Scan、RNA22、Pictar 等生物信息学软件预测 miRNA 的靶蛋白。

1.2.6 重组质粒的构建 提取 PK-15 细胞总 RNA 并反转录为 cDNA 作为模板, 以上游引物: 5'CCGCTCG AGGCGGCCGCCTGAGTACCAGAGAAAGAGG3', 下游引物: 5'TGCTCTAGA TCAGAGTACCAT ACTG AGTG3', 扩增 TRADD 3'UTR 基因。胶回收 PCR 产物和表达载体, 以 Xho I 和 Xba I 进行双酶切。酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收目的片段。按 T4 DNA 连接酶说明书进行目的片段与载体质粒的连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行菌落 PCR, 同时送测序公司测序。选取菌落 PCR 和测序正确的菌落, 按照 Omega 无内毒素质粒抽提试剂盒说明书进行质粒抽提。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测试验 将 PK-15 细胞接种至 24 孔培养板, 待细胞生长密度至 80% 左右时, 按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书进行转染。将合成的 miRNA 模拟物、模拟物对照、miRNA 抑制物、抑制物对照分别与 pmirGLO-TRADD 3'UTR 质粒共转染, 以单独转染 pmirGLO-TRADD 3'UTR 质粒重组质粒为对照。转染 24 h 后, 用 GloMax 生物化学发光仪检测荧光素酶活性。

1.2.8 免疫印迹试验 (Western blot) 裂解细胞提取总蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白样品进行定量。蛋白样品与含有 5% 的 β -巯基乙醇上样缓冲液充分混合后, 放入 95℃ 水浴锅中加热 5 min, 进行蛋白变性。变性后的蛋白 80 V 电泳 2 h, 采用湿法转膜 (200 mA、1 h) 将蛋白转印到 PVDF 膜上, 用含 5% 吐温的 PBS (PBST) 室温漂洗转印后的 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min, 加入含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭液 37℃ 摇床摇动封闭 1 h。用 PBST 洗涤 3 次后 4℃ 过夜孵育一抗, 次日取出孵育后的 PVDF 膜用 PBST 漂洗 3 次, 37℃ 条件下孵育 HRP 标记的荧光二抗 1 h, 漂洗 3 次后, 扫描 PVDF 膜。

1.2.9 流式细胞术 按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书方法,检测细胞凋亡率。用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入适量胰酶消化后,弃去胰酶,用 1 mL 细胞培养液吹打混匀细胞,转移到离心管内,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 5—10 万重悬的细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 200 μ L Annexin V-FITC 结合液和 10 μ L 碘化丙锭 (PI) 染色液,轻轻混匀,室温避光孵育 10—20 min,随后置于冰浴中。进行流式细胞仪检测,Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。

1.2.10 数据统计与分析 所有实验都至少重复 3 次,获得的数据用平均值 \pm 标准差表示,利用 GraphPad Prism 软件进行统计学作图和差异显著性分析。统计学分析采用 *t* 检验 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$),当 $P<0.05$ 时认为有统计学差异。

2 结果

2.1 PK-15 细胞中与 CSFV 感染相关的 miRNA 的初步筛选

为了检测 CSFV 体外感染 PK-15 细胞后 miRNA 表达的变化,用 CSFV 石门株感染 PK-15,24 h 后进行 miRNA 表达谱芯片试验。结果表明,CSFV 感染 PK-15 细胞后,诱导细胞 miRNA 差异表达。与未感染 CSFV 的对照组相比,CSFV 感染 PK-15 细胞共引起 69 条 miRNAs 表达变化,其中包括 39 条 miRNAs 表达量上调,30 条 miRNAs 表达量下调(表 1、表 2)。这表明 CSFV 感染 PK-15 细胞后,宿主细胞 miRNA 表达发生变化。

2.2 CSFV 上调 miR-214 的表达水平

miRNA 表达谱芯片的结果显示,在上调的 39 条 miRNAs 中,miR-214 表达差异最明显,故选取 miR-214 作为研究对象,研究其在 CSFV 体外感染中的功能与作用。为了验证基因芯片数据结果,采用 qRT-PCR 方法验证 miR-214 在 CSFV 感染的 PK-15 细胞中的表达情况。结果显示,CSFV 感染 PK-15 细胞后,随着时间推移,miR-214 表达水平逐渐升高(图 1),与表达谱芯片结果一致,表明 CSFV 感染促进了 miR-214 的表达。

2.3 miR-214 模拟物与抑制剂效果检测

根据 miRBase 下载 miR-214 的序列并合成其模拟物及对应的抑制剂。将 miR-214 模拟物和抑制剂分别转染 PK-15,24 h 后提取细胞总 RNA,qRT-PCR 检测

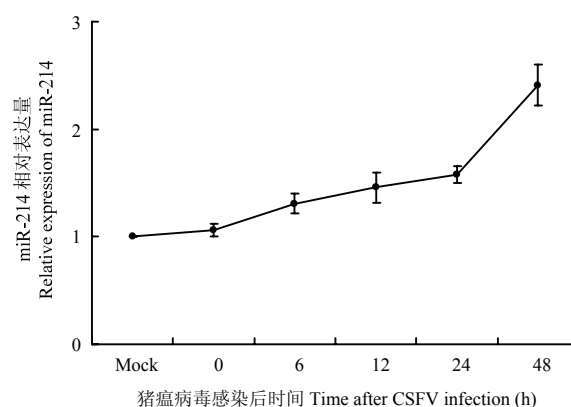


图 1 CSFV 感染 PK-15 细胞后 miR-214 的表达水平

Fig. 1 Relative expression of miR-214 in CSFV-infected PK-15 cells

细胞内 miR-214 的表达量。结果显示,miR-214 模拟物转染能够极显著提高细胞内 miR-214 的表达水平(图 2-A),抑制剂则相应的显著抑制 miR-214 的表达水平(图 2-B)。表明合成的 miR-214 模拟物及抑制剂可以进行后续试验。

2.4 miR-214 促进 CSFV 复制

为了确定 miR-214 对 CSFV 复制的影响,将 miR-214 模拟物和抑制剂分别转染 PK-15 细胞,转染后 24 h,以 MOI=0.1 接种 CSFV 石门株,继续培养 48 h 后,提取细胞总 RNA,用 qRT-PCR 方法检测 CSFV NS5B mRNA 表达水平。收集细胞培养液上清,间接免疫荧光 (IFA) 检测病毒滴度。结果表明,miR-214 模拟物能够显著促进 CSFV 的复制及病毒滴度(图 3-A),而 miR-214 抑制剂显著抑制了 CSFV 的复制及病毒滴度(图 3-B),表明 miR-214 促进了 CSFV RNA 复制。

2.5 荧光素酶报告基因系统验证 miR-214 的靶蛋白 TRADD

为了进一步确认 miR-214 能够靶向作用于 TRADD,将 TRADD 的 3'UTR 区域构建入荧光素酶报告基因表达载体。分别共转染重组质粒与 miR-214 模拟物和 miR-214 抑制剂,24 h 后检测荧光素酶活性。结果显示,转染 miR-214 模拟物能够显著下调荧光素酶报告基因的表达(图 4-A),而转染 miR-214 抑制剂能够显著上调荧光素酶报告基因的表达(图 4-B),表明 miR-214 能够靶向作用于 TRADD 的 3'UTR,进一步证明了 miR-214 对 TRADD 的靶向作用。

表 1 CSFV 感染 PK-15 细胞后表达量上调的 miRNA

Table 1 The up-regulated miRNAs in CSFV-infected PK-15 cells

编号 ID	miRNA 名称 Name	log ₂ 比率 log ₂ ratio	P 值 P-value
MIMAT0006786	ssc-miR-140-3p	0.48443	0.00026
MIMAT0002147	ssc-miR-214	0.42896	0.00001
MIMAT0013955	ssc-miR-335	0.38587	0.00001
MIMAT0002120	ssc-miR-125b	0.09519	0.00043
MIMAT0025368	ssc-miR-194a	0.31888	0.01203
MIMAT0013944	ssc-miR-342	0.31845	0.03668
MIMAT0010192	ssc-miR-215	0.30804	0.04995
MIMAT0022956	ssc-miR-202-3p	0.29007	0.00009
MIMAT0007759	ssc-miR-185	0.22220	0.00035
MIMAT0013912	ssc-miR-208b	0.21017	0.00771
MIMAT0013876	ssc-miR-191	0.20254	0.03214
MIMAT0025360	ssc-miR-31	0.20020	0.01347
MIMAT0002119	ssc-miR-122	0.19622	0.01318
MIMAT0007758	ssc-miR-130a	0.19402	0.02421
MIMAT0013916	ssc-miR-34c	0.19369	0.01302
MIMAT0017385	ssc-miR-1839-3p	0.19364	0.03377
MIMAT0013906	ssc-miR-664-5p	0.16827	0.00425
MIMAT0013880	ssc-miR-423-5p	0.16298	0.00001
MIMAT0002134	ssc-miR-24-3p	0.16088	0.01132
MIMAT0007757	ssc-miR-34a	0.16044	0.00131
MIMAT0017956	ssc-miR-382	0.15206	0.00146
MIMAT0013954	ssc-miR-1285	0.14589	0.04690
MIMAT0025356	ssc-let-7d-5p	0.14434	0.01134
MIMAT0017376	ssc-miR-365-5p	0.14349	0.03370
MIMAT0028156	ssc-miR-7140-3p	0.13804	0.00007
MIMAT0015300	ssc-miR-30a-3p	0.13721	0.02233
MIMAT0028144	ssc-miR-7134-3p	0.13182	0.00483
MIMAT0013956	ssc-miR-500	0.13164	0.02126
MIMAT0013910	ssc-miR-192	0.12760	0.00862
MIMAT0013922	ssc-miR-130b	0.12228	0.02580
MIMAT0013903	ssc-miR-885-3p	0.11877	0.00246
MIMAT0022921	ssc-miR-139-3p	0.11860	0.00302
MIMAT0028152	ssc-miR-7138-3p	0.11640	0.03755
MIMAT0006018	ssc-miR-99b	0.11097	0.01450
MIMAT0028155	ssc-miR-7140-5p	0.09369	0.00232
MIMAT0013920	ssc-miR-424-5p	0.09366	0.00090
MIMAT0022922	ssc-miR-30c-3p	0.08348	0.01393
MIMAT0013894	ssc-miR-193a-5p	0.08314	0.00302
MIMAT0010188	ssc-miR-450a	0.03115	0.00119

表 2 CSFV 感染 PK-15 细胞后表达下调的 miRNA
Table 2 The down-regulated miRNAs in CSFV-infected PK-15 cells

编号 ID	miRNA 名称 Name	log ₂ 比率 log ₂ ratio	P 值 P-value
MIMAT0025385	ssc-miR-1249	-2.15272	0.00001
MIMAT0013934	ssc-miR-361-3p	-1.95208	0.00001
MIMAT0017952	ssc-miR-296-5p	-1.05927	0.00001
MIMAT0013937	ssc-miR-1306-5p	-0.95394	0.00001
MIMAT0013941	ssc-miR-532-3p	-0.68756	0.00001
MIMAT0017980	ssc-miR-4339	-0.6224	0.00001
MIMAT0013871	ssc-miR-30d	-0.30603	0.00001
MIMAT0002165	ssc-miR-21	-0.27854	0.00001
MIMAT0025381	ssc-miR-671-5p	-0.2569	0.00001
MIMAT0017974	ssc-miR-484	-0.248	0.00001
MIMAT0020586	ssc-miR-129b	-0.22805	0.00008
MIMAT0018379	ssc-miR-149	-0.21029	0.00004
MIMAT0015708	ssc-miR-744	-0.20892	0.00386
MIMAT0017965	ssc-miR-1224	-0.18271	0.00033
MIMAT0013900	ssc-miR-345-3p	-0.17812	0.00828
MIMAT0025365	ssc-miR-150	-0.15152	0.00775
MIMAT0020596	ssc-miR-1343	-0.14743	0.00461
MIMAT0013935	ssc-miR-1277	-0.13761	0.00482
MIMAT0010186	ssc-miR-133a-3p	-0.13388	0.03942
MIMAT0013959	ssc-miR-129a	-0.12737	0.01689
MIMAT0013939	ssc-miR-339-5p	-0.11957	0.01352
MIMAT0025384	ssc-miR-874	-0.11957	0.00046
MIMAT0028147	ssc-miR-7136-5p	-0.11865	0.00367
MIMAT0013909	ssc-miR-92b-3p	-0.10387	0.02389
MIMAT0017962	ssc-miR-4332	-0.09669	0.03493
MIMAT0013918	ssc-miR-425-3p	-0.09066	0.00617
MIMAT0013869	ssc-miR-133b	-0.08309	0.00758
MIMAT0013904	ssc-miR-365-3p	-0.06645	0.03768
MIMAT0022958	ssc-miR-296-3p	-0.06567	0.04572
MIMAT0013947	ssc-miR-935	-0.05012	0.01506

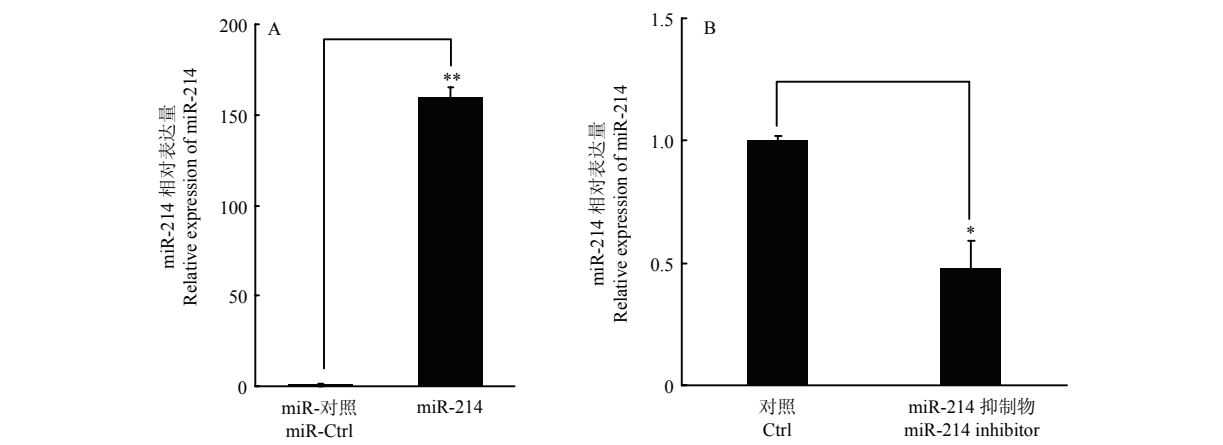
2.6 生物信息学软件预测 miR-214 的靶蛋白

通过 TargetScan、RNA22、Pictar 等生物信息学软件预测 miRNA 的靶蛋白，发现，TRADD 的 3'UTR 区域存在 miR-214 潜在作用靶点（图 5）。

2.7 miR-214 抑制 TRADD 的表达

通过上述试验，证明了 miR-214 对 TRADD 的靶向作用。为了进一步探究 miR-214 对 TRADD 表达的影响，将 miR-214 模拟物及其抑制剂转染细胞，24 h 后以 MOI=0.1 接种 CSFV 石门株，同步设立不感染组作为对照。48 h 后收集细胞提取总 RNA，用 qRT-PCR

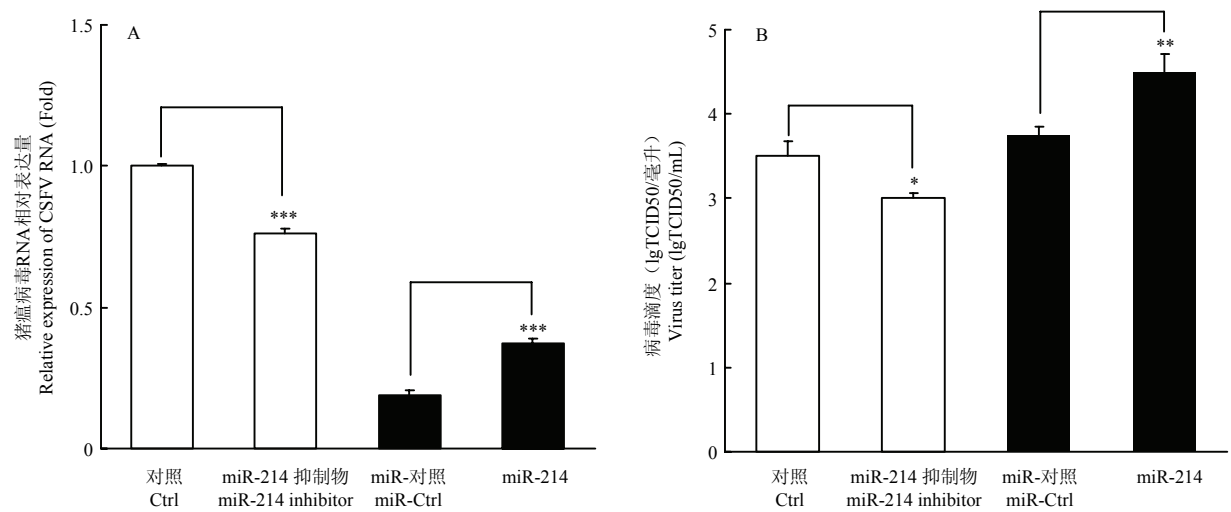
方法检测潜在靶蛋白 TRADD 的 mRNA 表达水平，验证 miR-214 对 TRADD 表达的影响。结果显示，miR-214 模拟物能够显著下调 TRADD mRNA 表达（图 6-A），而 miR-214 抑制剂则显著上调 TRADD mRNA 表达（图 6-B）。同时裂解细胞提取总蛋白，用鼠源 TRADD 单抗和鼠源 β -actin 单抗进行 Western blot，检测 TRADD 的蛋白表达水平。结果显示，miR-214 模拟物抑制了 TRADD 的蛋白表达水平，而 miR-214 抑制剂则促进了 TRADD 的蛋白表达（图 7）。综上所述试验结果表明，miR-214 能抑制 TRADD 的表达。



A. miR-214 模拟物转染细胞后 miR-214 的表达量; B. miR-214 抑制剂转染细胞后 miR-214 的表达量
A. The expression of miR-214 in cells after transfected with miR-214; B. The expression of miR-214 in cells after transfected with miR-214 inhibitor

图 2 miR-214 模拟物与抑制剂转染 PK-15 细胞后 miR-214 的表达

Fig. 2 The expression of miR-214 after transfection with miR-214 mimics or miR-214 inhibitor in PK-15 cells



A. miR-214 对 CSFV NS5B mRNA 表达量的影响; B. miR-214 对 CSFV 病毒滴度的影响
A. The influence of miR-214 on the expression of CSFV NS5B mRNA; B. The effect of miR-214 on the virus titer of CSFV

图 3 miR-214 对 CSFV 复制的影响

Fig. 3 The effects of miR-214 on CSFV replication

2.8 CSFV 体外感染抑制 PK-15 细胞凋亡

有研究表明, CSFV 在体外感染过程中通过抑制细胞凋亡实现持续感染^[21]。在本研究中, 首先验证 CSFV 对细胞凋亡的影响。PK-15 细胞在 6 孔板中培养生长至 80%, 接种 CSFV (MOI=1), 同步设立未感染为对照组, 感染 24 h 后, 收集细胞, 用流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示, 与对照组相比, CSFV

感染 PK-15 细胞后抑制了细胞的凋亡 (图 8)。

2.9 miR-214 抑制 PK-15 细胞凋亡

试验证明 CSFV 感染 PK-15 细胞后抑制细胞凋亡, 有研究表明, TRADD 与肿瘤坏死因子受体相互作用, 能诱导细胞凋亡^[22-23], 而 miR-214 能抑制 TRADD 的表达。为了验证在 CSFV 体外感染过程中, miR-214 是否参与调控细胞凋亡, PK-15 细胞

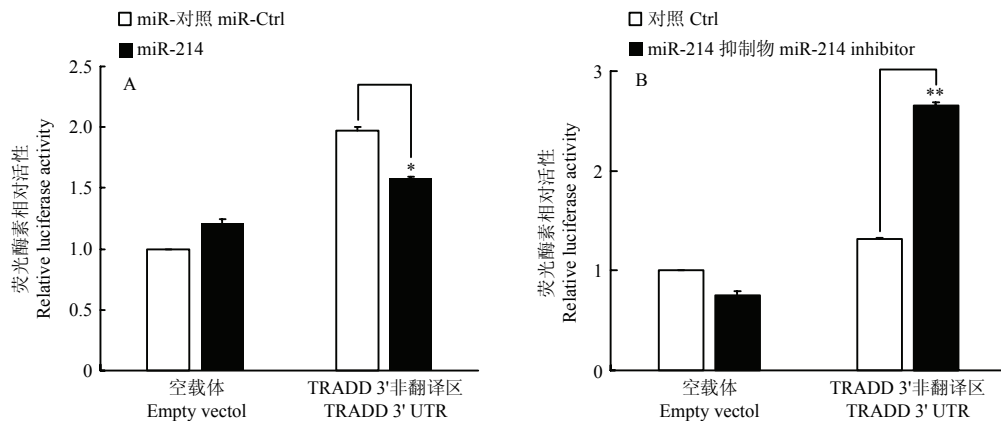
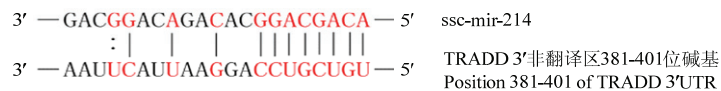


图 4 miR-214 对 pmirGLO-TRADD 3'UTR 荧光素酶活性的影响

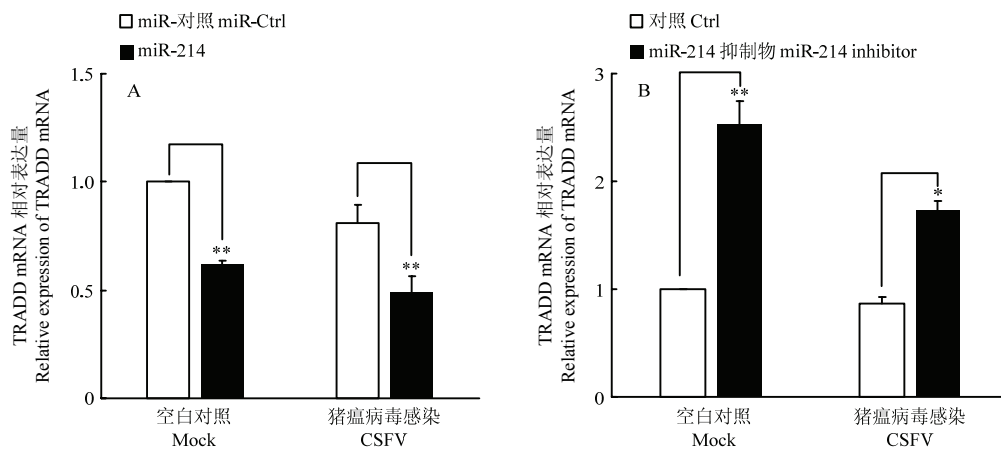
Fig. 4 The effects of miR-214 on luciferase activity of pmirGLO-TRADD 3'UTR



图中红色标注部分为 miR-214 与 TRADD 的 3'非翻译区互补配对的碱基对
The red labels in the figure is the complementary base pairing between mir-214 and TRADD 3'-UTR

图5 miR-214 与 TRADD 潜在作用位点

Fig. 5 The potential interaction site between miR-214 and TRADD



A.转染 miR-214 对 TRADD mRNA 表达的影响; B.转染 miR-214 抑制物对 TRADD mRNA 表达的影响

A. Effect of transfection of mir-214 on TRADD mRNA expression; B. Effect of transfection of mir-214 inhibitor on TRADD mRNA expression

图 6 miR-214 对 TRADD 表达的影响

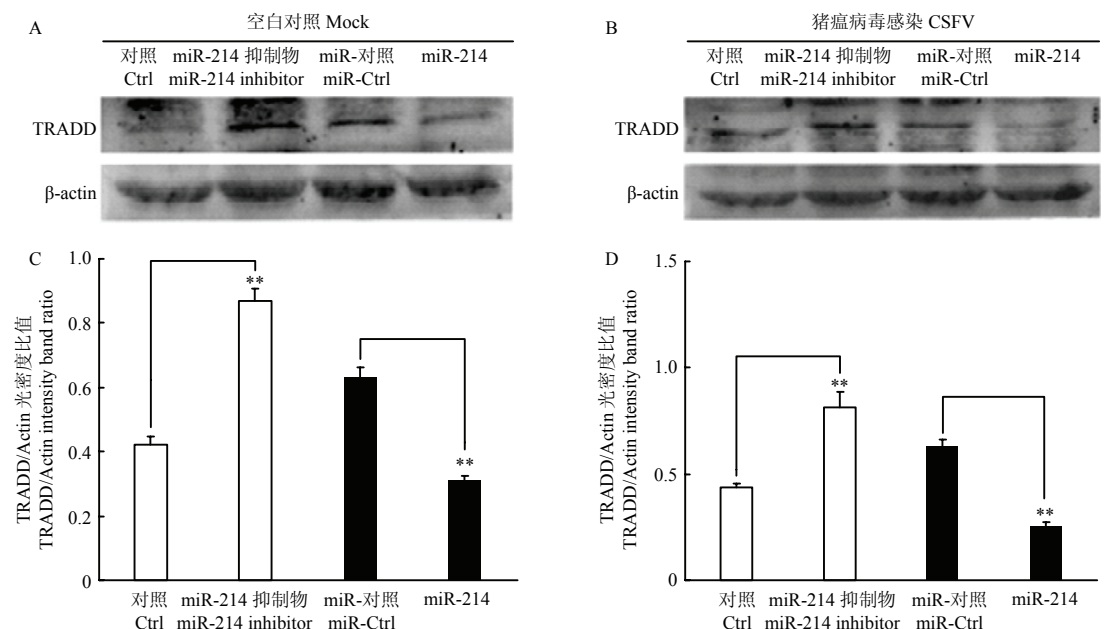
Fig. 6 The Effects of miR-214 on the expression of TRADD

转染 miR-214 模拟物, 用流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示, miR-214 模拟物能够抑制细胞凋亡 (图 9-A)。为了进一步验证在 CSFV 感染过程

中, miR-214 对凋亡的影响, 将 miR-214 模拟物和抑制剂及其相应的阴性对照转染 PK-15 细胞, 转染 24 h 后, 以 MOI=0.1 接种 CSFV 石门株, 48 h 后用

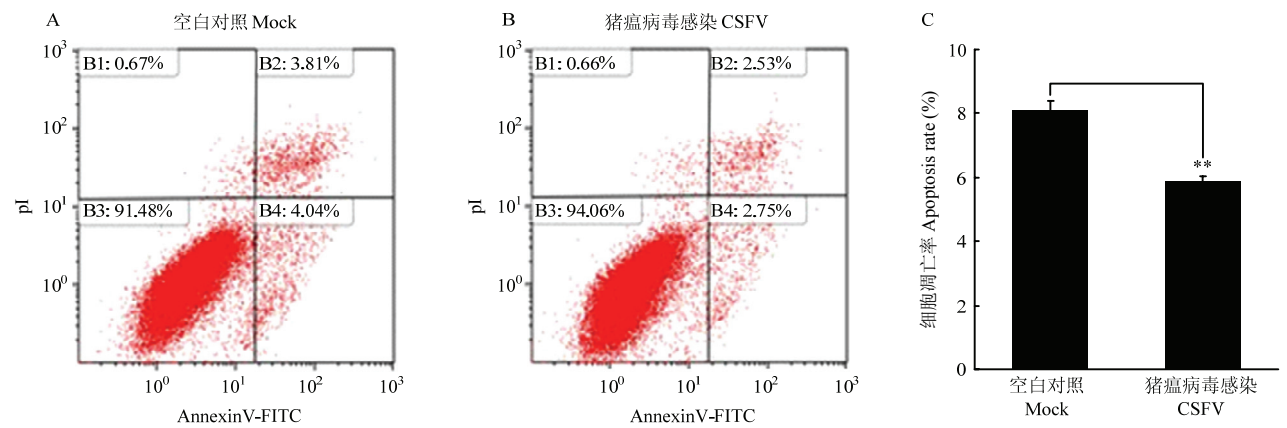
流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示,在未感染 CSFV 的 PK-15 细胞中,转染 miR-214 模拟物下调了细胞凋亡率,而转染 miR-214 抑制剂能够上调细胞凋亡率。同样,在 CSFV 感染组中,得到一致

的结果,即转染 miR-214 模拟物能够下调细胞凋亡率,而转染 miR-214 抑制剂能够上调细胞凋亡率(图 9-B、C)。由此推测,在 CSFV 感染过程中,miR-214 可能参与抑制细胞凋亡。



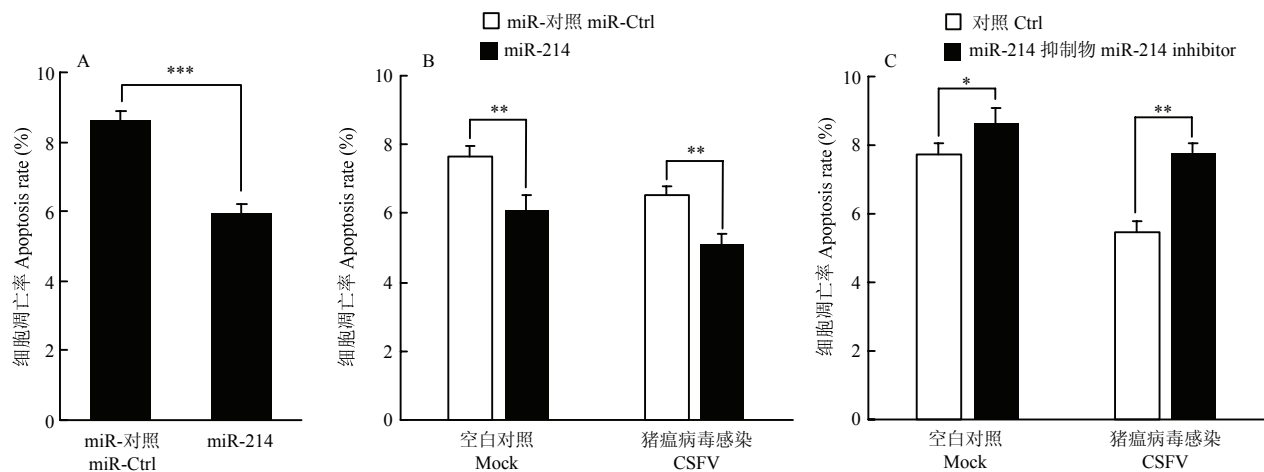
A.转染 miR-214 模拟物对 TRADD 蛋白表达的影响; B.转染 miR-214 抑制剂对 TRADD 蛋白表达的影响; C 和 D 分别为 A 和 B 光密度比值的统计学分析
A. Effect of transfection of mir-214 on TRADD protein expression; B. Effect of transfection of mir-214 inhibitor on TRADD protein expression; C and D are the statistical analysis of the intensity band ratio of A and B respectively

图 7 miR-214 对 TRADD 蛋白表达的影响
Fig. 7 The Effects of miR-214 on the expression of TRADD



A. PK-15 细胞未感染 CSFV 的凋亡率; B. PK-15 细胞感染 CSFV 的凋亡率; C.CSFV 感染组与对照组凋亡率的统计学分析
A. Apoptosis rate of PK-15 cells without infected with CSFV; B. Apoptosis rate of PK-15 cells infected with CSFV; C. Statistical analysis of apoptosis rate of CSFV infection group and control group

图 8 CSFV 感染 PK-15 细胞对细胞凋亡的影响
Fig. 8 The effect of CSFV infection on apoptosis in PK-15 cells



A. miR-214 对 PK-15 细胞凋亡的影响; B. miR-214 对在 CSFV 感染条件下 PK-15 细胞凋亡的影响; C. miR-214 抑制剂对在 CSFV 感染条件下 PK-15 细胞凋亡的影响

A. The effect of miR-214 on apoptosis of PK-15 cells; B. The effect of miR-214 on apoptosis of PK-15 cells infected with CSFV; C. The effect of miR-214 inhibitors on apoptosis of PK-15 cells infected with CSFV

图 9 miR-214 及其抑制剂对 PK-15 细胞凋亡的影响

Fig. 9 Effects of miR-214 and miR-214 inhibitors on apoptosis of PK-15 cells

3 讨论

miRNA 是一类调节性非编码 RNA 分子, 广泛存在于植物、动物以及动物病毒的基因组, 主要参与基因转录后调控。近年来大量研究表明, 细胞内的 miRNA 在调控宿主细胞基因及病毒复制中发挥重要作用^[20,24], 但是大部分研究都是基于人和小鼠等模式动物上, 对猪源 miRNA 的研究较少。此外, 对于 HCV 的 miRNA 的研究较为深入, 为 HCV 致病机理研究方面提供了很多理论支持。展开对 CSFV 相关 miRNA 的研究, 为揭示其致病机理开辟了新的方向, 也为防控 CSFV 及寻找药物靶位提供了新的策略。

本研究中, 以 PK-15 细胞为研究对象, 通过表达谱筛选出与 CSFV 密切相关的差异表达的细胞 miRNA, 为研究 miRNA 介导调控 CSFV 感染致病机制打下前期基础。表达谱试验共筛选出 69 条差异表达的 miRNA, 但是与未感染 CSFV 的细胞组相比, 大部分 miRNA 表达变化差异不大, 差异水平在 1.5 倍左右, 最多达到 4 倍, 与其他病毒的 miRNA 表达谱结果相比, 变化差异不是非常明显。推测其原因, 可能跟病毒及种属有关, 也可能细胞 miRNA 表达量相对较高, 导致病毒感染后表达虽然有变化, 但是变化比例较小。如果联合全基因组小 RNA 高通量测序, 得到的差异

结果可能更明显。另外, 也可能与 CSFV 病毒自身感染 PK-15 细胞的特性有关, miRNA 的调控水平可能较微弱。

本试验选择 miR-214 为研究对象, 因为在筛选 CSFV 上调的 39 条 miRNA 当中, miR-214 的表达差异最大。此外, miR-214 的靶蛋白 TRADD 对凋亡具有调节作用。前期的研究表明猪瘟疫病毒能够抑制凋亡, 达到持续感染的目的^[21,25]。已经有大量的研究报道 miR-214 参与调控细胞凋亡, 如 miR-214 能直接靶向于 Bcl2l2, 通过抑制 Bcl2l2 蛋白表达水平, 从而诱导凋亡^[26]; 在鼻咽癌组织或细胞系中高表达 miR-214, 而抑制 miR-214 表达, 能够上调 Bim 蛋白的表达, 从而促进细胞凋亡抑制癌细胞增殖^[27]。因此推测, 宿主 miR-214 在 CSFV 感染的 PK-15 细胞中参与调控细胞凋亡。

细胞凋亡是细胞 I 型死亡程序, 细胞凋亡启动细胞程序性死亡后不利于病毒在细胞内的存活和持续性感染^[28]。有研究表明, CSFV 感染细胞后, 可以通过抑制细胞凋亡从而促进病毒的复制^[21]。通过生物信息学手段预测 miR-214 的靶蛋白中, 发现 TRADD 存在 miR-214 结合位点, 推测可能是 miR-214 的靶蛋白之一。死亡受体介导的细胞凋亡包括 FASL-FAS、TRAIL-DR4 以及 TNF α -TNFR1 途径^[29-30], TRADD 作为 TNF α -TNFR1 途径中一个接头分子, 对

下游凋亡信号激活及分子招募至关重要。因此本试验对 TNF α -TNFR1 介导的凋亡进行探讨, 结果证明在 CSFV 感染中高表达 miR-214 能够一定程度上抑制 TRADD 表达, 抑制 PK-15 细胞凋亡。表明 CSFV 体外感染中抑制细胞凋亡的机制可能与 CSFV 上调的 miR-214 有关。

综上所述, 本研究筛选出 CSFV 感染诱导差异表达的 miRNA, 为以后研究 miRNA 介导调控 CSFV 感染和从 miRNA 方面揭示 CSFV 致病机理奠定了基础。此外, 细胞凋亡作为宿主抗病毒感染的第一道防线, 是宿主细胞自身受外界刺激下启动的死亡程序, 不利于病毒复制。但许多病毒却可以利用细胞某些调控机制延迟或者抑制细胞发生凋亡, 从而有利于自身复制。本试验初步揭示了 CSFV 诱导的 miR-214 的功能和作用, 表明在 CSFV 感染过程中 miR-214 可能参与调控细胞凋亡, 从而有利于 CSFV 在细胞内的复制和持续性感染, 为了解 CSFV 的致病机制提供新的方向, 也为防控 CSFV 感染寻找新的作用靶位提供一个新思路。

4 结论

利用 miRNA 表达谱芯片筛选 CSFV 感染 PK-15 细胞后差异表达的 miRNAs, 结果表明, CSFV 感染 PK-15 细胞诱导 69 条差异表达的猪源 miRNAs, 其中包括上调表达的 39 条, 下调表达的 30 条。

CSFV 感染 PK-15 细胞后上调 miR-214 表达, 且 miR-214 抑制 PK-15 细胞凋亡, 促进 CSFV RNA 的复制。miR-214 靶向于 TRADD 蛋白, 作用于 TRADD 3'UTR。即 CSFV 感染宿主细胞后, 通过促进 miR-214 的表达从而抑制 TRADD 的表达水平, 达到抑制细胞凋亡的目的, 使 CSFV 实现持续感染。

References

- [1] MOENNIG V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology*, 2000, 73 (2/3): 93-102.
- [2] STEGEMAN A, ELBERS A, DE SMIT H. The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 2000, 73 (2/3): 183-196.
- [3] BARTEL D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [4] FLYNT A S, LI N, THATCHER E J, SOLNICA-KREZEL L, PATTON J G. Zebrafish Mir-214 modulates hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nature Genetics*, 2007, 39(2): 259-263.
- [5] MICHAEL M Z, O' C S, VAN HOLST P N, YOUNG G P, JAMES R J. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research*, 2003, 1 (12): 882-891.
- [6] CAMERON J E, YIN Q, FEWELL C, LACEY M, MCBRIDE J, WANG X, LIN Z, SCHAEFER B C, FLEMINGTON E K. Epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces cellular microRNA mir-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *Journal of Virology*, 2008, 82(4): 1946-1958.
- [7] ZHAO H, WEN G, HUANG Y, YU X, CHEN Q, AFZAL T A, LUONG LE A, ZHU J, YE S, ZHANG L, XIAO Q. MicroRNA-22 regulates smooth muscle cell differentiation from stem cells by targeting methyl cpG-binding protein 2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2015, 35(4): 918-929.
- [8] YANG M, LIU R, LI X, LIAO J, PU Y, PAN E, YIN L, WANG Y. Mirna-183 suppresses apoptosis and promotes proliferation in esophageal cancer by targeting pdcd4. *Molecular Cells*, 2014, 37(12): 873-880.
- [9] XU P, VERNOOY S Y, GUO M, HAY B A. The drosophila microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology*, 2003, 13(9): 790-795.
- [10] BOUTLA A, DELIDAKIS C, TABLER M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in drosophila and the identification of putative target genes. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(17): 4973-4980.
- [11] NEILSON J R, ZHENG G X, BURGE C B, SHARP P A. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Development*, 2007, 21(5): 578-589.
- [12] LI Q J, CHAU J, EBERT P J, SYLVESTER G, MIN H, LIU G, BRAICH R, MANOHARAN M, SOUTSCHEK J, SKARE P, KLEIN L O, DAVIS M M, CHEN C Z. Mir-181a is an intrinsic modulator of cell sensitivity and selection. *Cell*, 2007, 129 (1): 147-161.
- [13] VIGORITO E, PERKS K L, ABREU-GOODGER C, BUNTING S, XIANG Z, KOHLHAAS S, DAS PP, MISKA E A, RODRIGUEZ A, BRADLEY A, SMITH KG, RADA C, ENRIGHT A J, TOELLNER K M, MACLENNAN I C, TURNER M. MicroRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, 2007, 27(6): 847-859.
- [14] KUMAR A. RNA interference: a multifaceted innate antiviral defense. *Retrovirology*, 2008, 5: 17.
- [15] LECCELLIER C H, DUNOYER P, ARAR K, LEHMANN-CHE J, EYQUEM S, HIMBER C, SAÏB A, VOINNET O. A Cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 2005, 308(5721): 557-560.

- [16] TILI E, MICHAILLE J J, CIMINO A, COSTINEAN S, DUMITRU C D, ADAIR B, FABBRI M, ALDER H, LIU C G, CALIN G A, CROCE C M. Modulation of Mir-155 and Mir-125B levels following lipopolysaccharide/Tnf-Alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *Journal of Immunology*, 2007, 179 (8): 5082-5089.
- [17] TAGANOV K D, BOLDIN M P, CHANG K J, BALTIMORE D. NF-kappab-dependent induction of microRNA mir-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (33): 12481-12486.
- [18] 张旭, 张彦明, 张倩, 程媛媛, 谭晓妮. 稳定表达猪 Mirna Let-7C 细胞株的建立及其对 CSFV 的调控作用. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2010(12): 1-6.
- ZHANG X, ZHANG Y M, ZHANG Q, CHENG Y Y, TAN X N. Establishment of cell line expressing miRNA let-7c and regulation on classical swine fever virus. *Journal of Northwest Agricultural and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2010(12): 1-6. (in Chinese)
- [19] CHEN Y, CHEN J, WANG H, SHI J, WU K, LIU S, LIU Y, WU J. Hcv-induced Mir-21 contributes to evasion of host immune system by targeting Myd88 and Irak1. *The Public Library of Science Pathogens*, 2013, 9(4): e1003248.
- [20] JOPLING C L, NORMAN K L, SARNOW P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA Mir-122. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2006, 71: 369-376.
- [21] BENSAUDE E, TURNER J L, WAKELEY P R M, SWEETMAN D A, PARDIEU C, DREW T W, WILEMAN T, POWELL P P. Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *Journal of General Virology*, 2004, 85 (Pt 4): 1029-1037.
- [22] HSU H, XIONG J, GOEDEL D V. The TNF Receptor 1-associated protein tradd signals cell death and NF-Kappa B activation. *Cell*, 1995, 81(4): 495-504.
- [23] MICHEAU O, TSCHOPP J. Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003, 114(2): 181-190.
- [24] SONG L, LIU H, GAO S, JIANG W, HUANG W. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza a virus in infected cells. *Journal of Virology*, 2010, 84(17): 8849-8860.
- [25] JOHNS H L, BENSAUDE E, LA ROCCA S A, SEAGO J, CHARLESTON B, STEINBACH F, DREW T W, CROOKE H, EVERETT H. Classical swine fever virus infection protects aortic endothelial cells from Pipc-Mediated apoptosis. *Journal of General Virology*, 2010, 91 (Pt 4): 1038-1046.
- [26] WANG F, LIU M, LI X, TANG H. Mir-214 reduces cell survival and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of Bcl2L2 in cervical cancer cells. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2013, 587(5): 488-495.
- [27] ZHANG Z C, LI Y Y, WANG H Y, FU S, WANG X P, ZENG M S, ZENG Y X, SHAO J Y. Knockdown of miR-214 promotes apoptosis and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma. *The Public Library of Science One*, 2014, 9(1): e86149.
- [28] GRIFFIN D E, HARDWICK J M. Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. *Annual Review of Microbiology*, 1997, 51: 565-592.
- [29] KROEMER G, GALLUZZI L, BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 2007, 87(1): 99-163.
- [30] KUOKAWA M, KORNBLUTH S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 2009, 138 (5): 838-854.

(责任编辑 林鉴非)