

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(10):1399–1405; 4 October 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

miR26a 和 miR939 调控 H1N1 型流感病毒在 MDCK 细胞中的复制

刘鹤¹, 宋丽萍¹, 黄文林^{1,2*}

(¹ 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫中心, 北京 100101)

(² 中山大学附属肿瘤医院, 广州 510060)

摘要:【目的】研究发现 microRNAs (miRNAs) 可以参与调控病毒在宿主细胞内感染和复制的过程。作者研究了两条 miRNAs 对 H1N1 型流感病毒在宿主细胞内复制的影响。【方法】构建 miR26a 和 miR939 的高效表达载体, 并将这两种表达载体转入 MDCK 细胞中, 24 h 后用 H1N1 型流感病毒感染转染后的 MDCK (Madin dardly canine kidney) 细胞, 接种 72 h 后, 检测流感病毒的复制情况, 研究 miR26a 和 miR939 对 H1N1 型流感病毒在 MDCK 细胞内复制的影响。【结果】实验结果表明, miRNAs 的表达载体可以在细胞内高效表达 miRNAs, 不同的 miRNAs 对流感病毒在 MDCK 细胞中复制的调控作用不同, miR26a 可以有效抑制流感病毒在 MDCK 细胞中的复制, 而 miR939 则促进流感病毒在 MDCK 细胞中的复制的作用。【结论】细胞内 miRNAs 可以调控 H1N1 型流感病毒在宿主细胞中的复制过程, 本文首次报导 miR26a 和 miR939 在流感病毒复制过程中的调控作用。

关键词: miRNA; H1N1 型流感病毒; MDCK 细胞; 病毒复制

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010)10-1399-07

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

的 mRNA 上, 抑制该 mRNA 的翻译或者使其降解, 从而实现对基因表达的转录后调控作用。至今已经从人类、水稻、拟南芥、线虫、果蝇、小家鼠等物种中鉴别出几千种 miRNAs。

研究表明, miRNAs 不但可以参与调控细胞中如细胞增殖、凋亡、分化等一系列的生理过程^[1–2], 还可以参与调控病毒在宿主细胞内复制的过程。2005 年, Charles-Henri Lecellier 等人报道在哺乳动物细胞中, miR32 可以通过与病毒 mRNA 结合有效的抑制 I 型灵长类泡沫病毒 (PFV-I) 在细胞中的积累^[3]; 2008 年, Jinhong Chang 等和 Jura Inga Henke 等同时报道在肝组织特异性表达的 miR122 能与丙型肝炎病毒 (HCV) 基因组 5' 非编码区的相互

基金项目: 国家自然科学基金 (30901759); 中国科学院创新基金 (KSCX1-YW-R-10)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807806; E-mail: wl_huang@hotmail.com

作者简介: 刘鹤 (1984–), 女, 江西莲花人, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒与分子免疫。

收稿日期: 2010-03-26; **修回日期:** 2010-05-04

作用,使病毒 RNA 在细胞中富集,诱导病毒基因转录,从而促进丙型肝炎病毒在肝癌细胞系(Huh 细胞)中的复制,在非肝细胞(如 HEK-293 和 HeLa)中过表达 miR122 也同样可以观察到这种作用^[4-6]。目前,细胞基因组编码的 miRNAs 是否会参与流感病毒在细胞内的复制过程,还未见相关报导。但 Vinod Scaria 等的研究指出,细胞中 miR507 和 miR136 可能分别靶向流感病毒的聚合酶 B2 (*pb2*) 和植物血凝素 (*ha*) 基因,并且各自的靶序列在不同的病毒株之间高度保守^[7],表明细胞 miRNAs 很有可能参与调控流感病毒在宿主细胞内的复制过程。

本文中所研究的两条 miRNAs 分别为 miR26a 和 miR939,是实验室其他成员筛选出来的可能会影响 H1N1 型流感病毒复制的 miRNAs (结果没发表)。miR26a 的序列为 5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3',编码基因位于 3 号染色体,2001 年 Mariana^[8] 等从人宫颈癌(HeLa)细胞,小鼠肾细胞,以及鱼细胞中克隆得到。miR939 的序列为 5'-UGGGGAGCUGAGGCUCUGGGGGUG-3',编码基因位于 8 号染色体,2007 年由 WO Lui^[9] 等从宫颈癌细胞中克隆得到。对于这两条 miRNAs 的生物学功能都还没有进行深入研究,本文将首次报道它们对 H1N1 型流感病毒在 MDCK 细胞内复制中的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒,菌株,细胞株:实验所用 H1N1 型流感

病毒为 WSN/33 毒株,是用 12 质粒反向重组系统包装得到,重组病毒的 12 质粒系统由微生物研究所高福研究员实验室惠赠。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由本实验室保存。细胞实验中所用的 293T 细胞株和 MDCK 细胞株均由本试验室保存(购于 ATCC)。

1.1.2 主要试剂和仪器:转染试剂 Effectene 购于美国 QIGEN 公司;Transfection Reagent PEI 购于南京探求生物技术有限公司;QuantiMir RT Kit Small RNA Quantitation System (QRSS) 购于 System Biosciences 公司;microRNA 表达载体 siSTRIKETM U6 Hairpin Cloning Systems (Human) 购于 Promega 公司;M-MLV 逆转录酶与 Random Primer 购于美国 Promega 公司;SBRY Premix Ex *Taq* PCR 试剂盒、各种核酸内切酶和 DNase I 购于 TaKaRa 公司;Trizol 试剂购自天根公司;鼠源 NP 抗体以及山羊抗小鼠 IgG-FITC 标记二抗购于 santa cruz 公司;超纯质粒小提试剂盒购于博大泰克公司;DMEM 培养基购于 GIBCO 公司;胎牛血清(FBS)购于 Hyclone 公司;其余试剂均为国产。细胞培养板购于 corning 公司;Real-Time PCR 仪为美国 BioRad 公司产品;倒置荧光显微镜为德国卡尔蔡司公司产品;细胞培养箱和病毒培养箱为日本 SANYO 公司产品。

1.1.3 引物:实验中所用引物均由北京奥科生物公司合成,序列见表 1。

表 1 用于载体构建和 Real-Time PCR 的引物
Table 1 Primers used in vector construction and Real-Time PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Length/bp
miR26a		
Forward:	5'-ACCGTTCAAGTAATCCAGGATAGGCTCTTCTCTGCAAGCCTATCCTGGATTACTTGAACCTTTTTC-3'	66
Reverse:	5'-TGCAGAAAAAGTTCAAGTAATCCAGGATAGGCTTGACAGGAAGAGCCTATCCTGGATTACTTGAA-3'	66
miR939		
Forward:	5'-ACCGGTGGGCACAGAATCTGGACTCTTCTGTCAAGTCCAGATTCTGTGCCACCTTTTTC-3'	61
Reverse:	5'-TGCAGAAAAAGGTGGGCACAGAATCTGGACTTGACAGGAAGAGTCCAGATTCTGTGCCAC-3'	61
miRcontrol		
Forward:	5'-ACCGTTTGTACTACACAAAAGTACTGCTTCTCTGTACAGTACTTTTGTGTAGTACAAATTTTTC-3'	64
Reverse:	5'-TGCAGAAAAATTTGTACTACACAAAAGTCATGTGACAGGAAGCAGTACTTTTGTGTAGTACAAA-3'	64
miR939:	5'-TGGGGAGCTGAGGCTCTGGGGGTG-3'	24
miR26a:	5'-TTCAAGTGCTCCAGGATAGGCT-3'	21
pb1		
Forward:	5'-GATGGACAACAAACACCGAAACTGGAGC-3'	28
Reverse:	5'-TTCAAATGCTTTGCCTGCTTTCGCT-3'	25
β -actin		
Forward:	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'	21
Reverse:	5'-CAGGTCCAGACCGAGGATGGC-3'	21

1.2 培养条件

1.2.1 培养基:LB 培养基用于大肠杆菌 DH5 α 的生长,培养温度 37 $^{\circ}$ C。添加 5% FBS 的 DMEM 培养基用于 293T 细胞和 MDCK 细胞的生长,培养温度 37 $^{\circ}$ C。

1.2.2 重组病毒实验:293T 细胞培养在 100 mm 的 dish 中,培养基为添加 5% FBS 的 DMEM。培养至细胞密度为 80% - 90% 时,用 PEI 转染试剂将重组病毒的 12 质粒系统转入细胞中,转染方法参照试剂使用说明。转染 48 h 后,取上清 300 μ L 接种 9 - 11 日龄的鸡胚,鸡胚接种后置于 35 $^{\circ}$ C 病毒培养箱培养。继续培养 48 h 后,将鸡胚取出,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 12 h,取出收集鸡胚尿囊液,并检测尿囊液血凝值。血凝检测参照文献[10]。

1.2.3 病毒接种实验:MDCK 细胞培养在添加 5% FBS 的 DMEM 中,培养温度 37 $^{\circ}$ C。接种前细胞用 PBS 洗涤 3 次,去除残余血清,用病毒培液(无血清 DMEM 添加终浓度 2 mg/L 的胰酶)将鸡胚尿囊液稀释至适当浓度,接种 200 μ L 毒液并使之均匀的平铺在细胞表面,35 $^{\circ}$ C 放置 60 min(每 15 min 摇晃一次孔板,使病毒液与细胞充分接触)。弃掉病毒液,PBS 洗涤 3 次,去除细胞表面未吸附的病毒,每孔加 1 mL 病毒培液,置于 35 $^{\circ}$ C 培养箱培养。

1.3 miRNAs 表达载体的构建

表达载体构建:根据由 siSTRIKETM U6 Hairpin Cloning Systems (Human)试剂盒所提供的说明书设计引物(实验中所用引物见表 1),并构建 miRNAs 表达载体,实验中所构建的 miR26a 和 miR939 的表达载体分别命名为 P-miR26a 和 P-miR939,阴性对照质粒命名为 P-miRcontrol。构建成功的表达载体按照试剂盒说明书所述用 *Pst* I 酶切法验证。

1.4 用 Real-Time PCR 定量分析 miRNAs 和病毒基因 *pb1* 的表达量

1.4.1 Real-Time PCR 定量分析 miRNAs:将 MDCK 细胞培养在六孔板中,待细胞密度达到 70% - 80% 时,用 effectene 试剂将 P-miR26a 和 P-miR939 和 P-miRcontrol 转入细胞中,转染后将细胞放置在细胞培养箱中继续培养。48 h 后提取总 RNA,联合使用 QRSS 试剂盒和 SBRY Premix Ex *Taq* PCR 试剂盒,对 miRNAs 的表达水平进行定量分析。实验中所用的 miR26a 和 miR939 的 5'端特异引物序列见表 1, U6 的表达量为内参。

1.4.2 Real-Time PCR 定量分析 *pb1* 的表达量:将 MDCK 细胞培养在六孔板中,待细胞密度达到 70%

- 80% 时,用 effectene 试剂将 P-miR26a 和 P-miR939 和 P-miRcontrol 转入细胞中,转染 24 h 后接种流感病毒。接种 72 h 后提取总 RNA,利用 Real-Time PCR 技术分析细胞中 *pb1* 基因的表达量,所用引物见表 1,实验以 β -actin 的表达量为内参。

1.5 病毒接种浓度的确定

将等量的 MDCK 细胞分别培养在六孔板中,当细胞密度达到 80% - 90% 的时候,将鸡胚扩增得到的流感病毒(血凝值为 2⁸)分别稀释 10 倍、100 倍和 1000 倍后接种至 MDCK 细胞,每个浓度接种两个孔。接种后 24 h,48 h,72 h 分别检测血凝值,确定最佳的病毒接种浓度。所有实验结果均由 3 次测得。

1.6 免疫荧光染色

MDCK 细胞分别培养在预先放置了玻片的六孔板中,待细胞密度达到 70% - 80% 时,用 effectene 试剂将 P-miR26a 和 P-miR939 和 P-miRcontrol 转入细胞中。转染 24 h 后接种流感病毒,待接种 72 h 后将玻片从细胞培养板中取出,PBS 洗 3 次,每次 5 min;用冷丙酮固定, - 20 $^{\circ}$ C,10 min;用 PBS 洗 3 次,每次 5 min;在室温下用 5% BSA 孵育玻片 1 h 后,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min;用 PBS 将 NP 抗体稀释 100 倍,与玻片孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜;一抗孵育结束后玻片用 PBS 洗 3 次,每次 5 min;用 PBS 按 1: 50 的比例稀释 FITC 标记的二抗,将玻片与二抗室温下孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,用指甲油封片后在荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 miRNAs 表达载体的构建

P-miR26a、P-miR939 和 P-miRcontrol 质粒电泳检测如图 1-A 所示,所获得的 3 个质粒的提取质量较好,每种质粒中超螺旋的质粒成分所占比重较大,在电泳中可见一条明显的亮带。3 种质粒的大小一

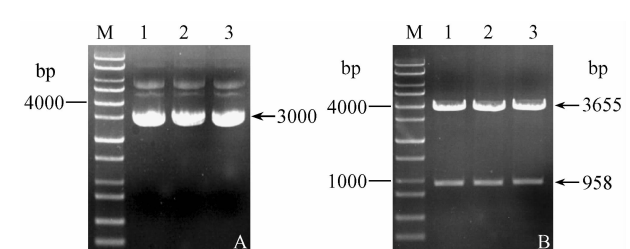


图 1 miRNA 表达载体质粒电泳 (A) 和 *Pst* I 酶切验证图 (B)

Fig. 1 Identification of miRNA vector with (B) or without (A) *Pst* I digestion. M. Marker; 1. miR26a; 2. miR939; 3. miRcontrol.

致,超螺旋带所处的位置在 3000 bp 左右。用 *Pst* I 酶切进行检测,质粒酶切产物电泳结果如图 1-B 所示,3 个质粒经 *Pst* I 酶切后都产生两条带,大小分别为在 1000 bp 和 3600 bp 左右,与 siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning Systems 说明书中所述的正确质粒酶切后产生的条带大小符合,证明质粒构建正确。

2.2 miR26a 和 miR939 的表达载体在细胞中可高效的表达这两种 miRNAs

如图 2 所示,总 RNA 的 28S、18S 和 5S 3 条带清楚分明,说明 RNA 的质量很好。Real-Time PCR 结果表明空对照 MDCK 细胞中 miR26a 和 miR939 两种 miRNAs 的内源表达较低(作图时,将两种 miRNAs 的内源表达设为 1,其它的均为相对值),转染对照质粒的细胞样品中,miR26a 和 miR939 的表达没有明显变化。而转了 P-miR26a 和 P-miR939 表达载体的细胞样品中,这两种 miRNAs 的水平分别

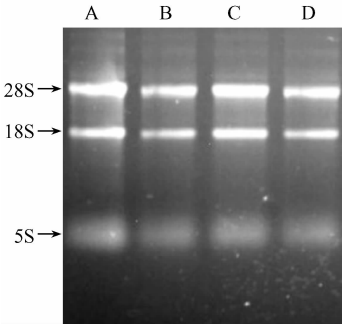


图 2 用于 Real-Time PCR 定量分析 miRNAs 表达的总 RNA

Fig.2 Total RNA used for Real-Time PCR. A: MDCK; B: Negative control; C: miR26a; D: miR939.

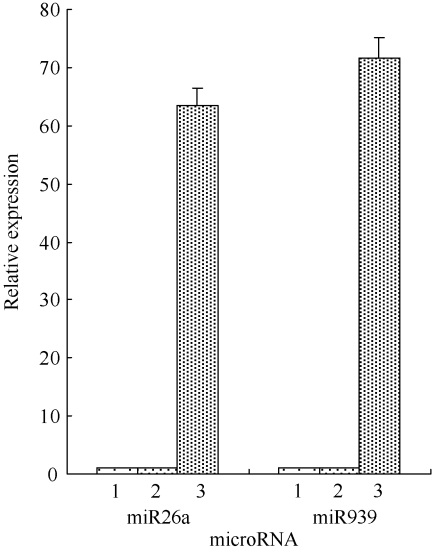


图 3 miR26a 和 miR939 的表达

Fig.3 The expression of miR26a and miR939. 1. MDCK cell; 2. negative control sample; 3. transfected samples.

上升了 63.4 和 71.6 倍(图 3)。结果说明构建的 P-miR26a 和 P-miR939 表达载体在 MDCK 细胞中能高效率的表达相应的 miRNAs。

2.3 病毒接种浓度的确定

鸡胚扩增获得的病毒液的血凝值为 2^8 ,按方法 1.5 所述确定最佳接种浓度,血凝实验结果如表 3 所示。结果表明在 100 倍的稀释浓度下,接种后 24 h、48 h 和 72 h 均检测不到血凝现象;10 倍稀释时,接种后 24 h、8 h 和 72 h 时的血凝值分别为 2^5 和 2^9 和 2^{11} ;而在 100 倍的稀释浓度下,接种后 24 h 没有检测到血凝现象,48 h 和 72 h 时的血凝值分别为 2^3 和 2^7 ;为了获得较好的实验敏感度,最终选用 100 倍的稀释浓度进行后续的实验。

表 2 不同稀释度不同时间点的血凝值
Table 2 Hemagglutination titer test to determine best infection concentration

t/h	Dilution ratio		
	10	100	1000
24	$2^5/2^5/2^5$	0/0/0	0/0/0
48	$2^8/2^9/2^9$	$2^3/2^2/2^3$	0/0/0
72	$2^{11}/2^{11}/2^{11}$	$2^8/2^7/2^7$	$2^0/0/0$

2.4 miR26a 和 miR939 对流感病毒复制的影响

从血凝实验的结果(图 4)可以看出,空对照样品(未经转染的 MDCK 样品)与阴性对照样品(转了 P-miRcontrol 的样品)的血凝值一致,均为 2^8 ,说明 P-miRcontrol 对病毒复制没有影响;而转了 P-miR26a 的样品血凝值为 2^7 ,是对照组中的 1/2,表明 miR26a 可以显著抑制流感病毒的复制;而转了 P-miR939 的样品血凝值达到了 2^9 ,相较于对照组上升了一倍,说明 miR939 可以显著促进流感病毒的复制。

荧光染色后,在荧光显微镜下观察细胞中病毒

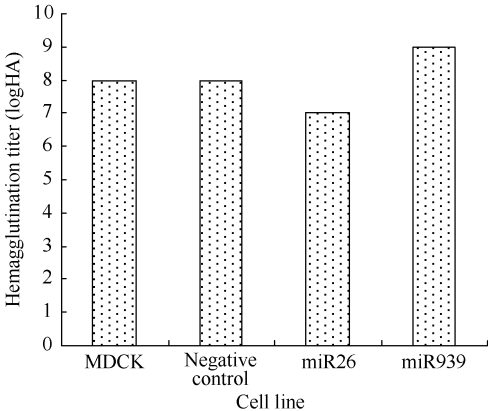


图 4 72 h 血凝实验结果

Fig.4 Result of hemagglutination titer test at 72 h

蛋白 HA 的表达情况。结果显示,空对照与阴性对照中,荧光阳性细胞,即有病毒的细胞在整个视野中所占比例相近,而 miR26a 的荧光细胞比例明显低

于对照组,miR939 的荧光细胞比例则明显高于对照组,说明了这两条 miRNAs 对病毒复制的不同作用,并与血凝实验结果相符(图 5)。

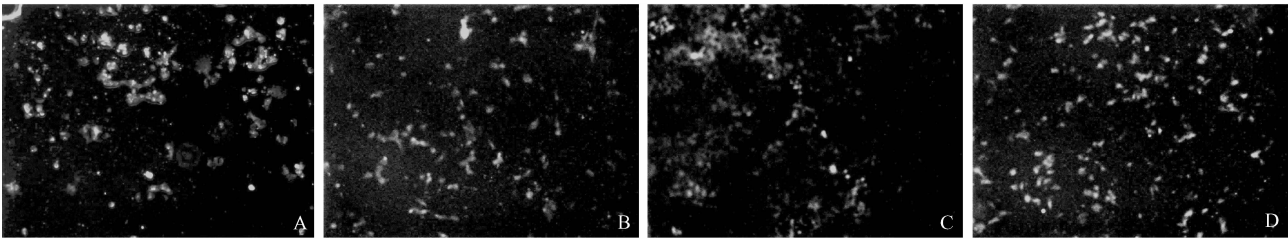


图 5 72 h 荧光染色检验病毒 HA 蛋白的表达
Fig.5 Analysis of immunofluorescence at 72 h. A: MDCK; B: Negative control; C: miR26a; D: miR939.

为了进一步验证上述结果,我们用 Real-Time PCR 技术分析了感染细胞中病毒 *pb1* 基因的表达,实验结果见图 6。结果表明,阴性对照样品与空对照 MDCK 细胞样品中,*pb1* 的表达量没有显著性差异($P < 0.01$),转染了 P-miR26a 的样品中 *pb1* 的表达约为对照组中的 0.5 倍,而转染 P-miR939 的样品中 *pb1* 的表达约为对照组中的 2 倍左右。这一结果与血凝实验结果和免疫荧光实验结果基本一致。

miRNAs 表达水平的变化。如在 Epstein-Barr 病毒感染细胞后能诱导宿主细胞产生 miR155,miR155 参与了 Epstein-Barr 病毒调控宿主基因表达的过程^[5]。而 EB 病毒的 LMP1 蛋白通过 NF- κ B 途径能诱导宿主细胞中 miR146a 的表达,miR146a 通过调节宿主细胞的天然免疫反应,在诱导和维持 EB 病毒的潜伏中起重要作用^[11]。病毒能影响细胞 miRNAs 的表达水平,而 miRNAs 也能对病毒蛋白的表达进行调控,影响病毒在宿主细胞中的复制。在宿主细胞受到病毒感染后,免疫系统也会针对病毒产生抗病毒反应,其中某些就是通过 miRNAs 的作用来实现的。如 HIV 感染后,宿主细胞编码的一系列靶向 HIV 蛋白的 miRNAs 能抑制病毒的复制,其中 miR29a 和 miR29b 可以靶向 *nef* 基因,miR149 可以靶向 *vpr* 基因,miR378 可以靶向 *env* 基因,而 miR324-5p 则可以靶向 *vif* 基因^[12]。哺乳动物的 miR32 则能抑制 I 型泡沫病毒(PFV-I)在宿主细胞中的积累。

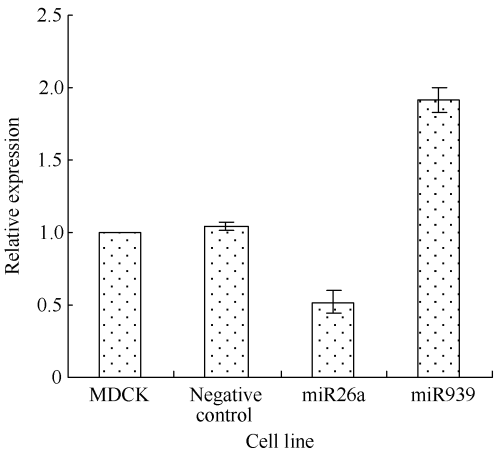


图 6 感染细胞中病毒 *pb1* 基因的表达

Fig.6 Expression of virus gene *pb1* in infected cells. MDCK cells were transfected with P-miRcontrol, P-miR26a and P-miR939 respectively, and infected by H1N1 influenza virus in 24 h after transfection. Tested the hemagglutination titer 72 h after infection, the results were MDCK/2⁸, Negative control/2⁸, miR26a/2⁷, miR939/2⁹ respectively, then extracted total RNA of infected cells, performed Real-Time PCR test. The results are presented as mean values \pm SD, * $P < 0.01$.

3 讨论

病毒感染细胞后,与宿主细胞发生复杂的相互作用,二者相互影响。病毒进入宿主细胞后,促使宿主细胞发生有利于病毒自身复制增殖的改变,包括

Ying Wang 等^[13]研究发现,在鸡的肺和气管中都检测到了 gga-miR26a 的表达,而且,研究还发现在被 H5N3 型流感病毒感染后,gga-miR26a 在肺组织中的表达由原来的 1326 个单位减少到了 98 个单位,推测这可能是 H5N3 型流感病毒抵御机体抗病毒反应的一个机制。而我们在实验中也观察到了人源 miR26a 能抑制 H1N1 型流感病毒在 MDCK 细胞中复制的现象,虽然所用病毒毒株与 Ying Wang 等的不同,但由于 miRNAs 功能进化的保守性,我们认为 Ying Wang 等的研究能在一定意义上支持我们实验结果的可信度。

病毒对于宿主细胞这种利用 miRNAs 分子抗病毒感染作用也有相应的拮抗方式,如 HCV 的核心蛋白能直接作用于 miRNAs 成熟的关键核酸酶 Dicer^[14],而 HIV-1 病毒编码的 Tat 蛋白也能与

Dicer 酶相互作用抑制其功能^[15], 这些蛋白起到了 RNA 沉默抑制剂的作用。另外 Joost Haasnoot^[16] 等在 Vero 细胞中也检测到 NS1 能抑制 siRNA 对 Luciferase 蛋白表达的下调, 表现出 RNA 沉默抑制剂的作用。

在流感病毒的整个生命周期中, 它的 8 条核酸序列共编码 10 个病毒蛋白。这 10 个蛋白参与了病毒复制的全过程, 减少其中任意一个蛋白的表达, 都能有效的阻碍流感病毒的复制。很多实验结果表明, miRNAs 可以通过调控病毒蛋白的表达水平来影响病毒的复制。在本实验中筛选出的能够抑制 H1N1 型流感病毒复制的 miR26a 是否也是通过这一方式起作用还有待深入研究。使用 RNAhybride 软件在线分析, 结果显示在 *pb1* 基因上存在了 miR26a 的潜在作用靶点, 并且这一靶点在不同毒株的流感病毒中高度保守。这表明 miR26a 很有可能是通过下调 PB1 蛋白的表达来抑制 H1N1 型流感病毒复制的, 但这还需要经过实验进一步验证。

一般认为 miRNAs 是通过增强病毒蛋白表达、抑制宿主细胞抗病毒功能或抑制宿主细胞凋亡等几个途径来促进病毒复制的。Jopling CL^[17] 等的研究表明 miR122 通过与 HCV 基因组的 5' 非编码区相互作用使病毒 RNA 在细胞中富集, 促进病毒基因的转录, 从而促进病毒的复制。另外大多病毒基因组编码的 miRNAs 不仅可以靶向自身蛋白, 还可以调控宿主抗病毒通路, 如人巨细胞病毒 HCMV 编码的 miRUL112-1 能靶向病毒基因组的 3' 非编码区, 调控包括即早期蛋白 IE72 在内的多个病毒蛋白的表达^[18]; 而 HIV-1 则能通过编码参与调控 CD4、CD28、IL-2、IL-12 等细胞因子的 miRNAs, 来抑制宿主的抗病毒作用^[19-20]。本文中所报道的 miR939 是否通过上述途径来增强 H1N1 型流感病毒在 MDCK 细胞中的复制还有待继续研究。

参考文献

- [1] Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2009, 84(1):55-71.
- [2] Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 2008, 27(45):5959-5974.
- [3] Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Che JL, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 2005, 308(5721):557-560.
- [4] Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song YT, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M. MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO Journal*, 2008, 27(24):3300-3310.
- [5] Yin Q, McBride J, Fewell C, Lacey M, Wang X, Lin Z, Cameron J, Flemington EK. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *Journal of Virology*, 2008, 82(11):5295-5306.
- [6] Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *Journal of Virology*, 2008, 82(16):8215-8223.
- [7] Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B, Brahmachari SK. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*, 2006, 3:68-76.
- [8] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York)*, 2001, 294(5543):853-858.
- [9] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Research*, 2007, 67(13):6031-6043.
- [10] Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen JZ. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(5):2718-2723.
- [11] Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grasser FA. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biology*, 2007, 4(3):131-137.
- [12] Hariharan M, Scaria V, Pillai B, Brahmachari SK. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 337(4):1214-1218.
- [13] Wang Y, Brahmakshatriya V, Zhu H, Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach. *BMC Genomics*, 2009, 10:512-531.

- [14] Chen W, Zhang Z, Chen J, Zhang J, Zhang J, Wu Y, Huang Y, Cai XF, Huang AL. HCV core protein interacts with Dicer to antagonize RNA silencing. *Virus Research*, 2008, 133(2):250-258.
- [15] Bennasser Y, Jeang KT. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology*, 2006, 3: 95-100.
- [16] Haasnoot J, de Vries W, Geutjes EJ, Prins M, de Haan P, Berkhout B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(6):0794-0803.
- [17] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 2005, 309(5740): 1577-1581.
- [18] Grey F, Meyers H, White EA, Spector DH, Nelson J. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(11):1593-1602.
- [19] Bennasser Y, Le SY, Yeung ML, Jeang KT. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology*, 2004, 1:43-47.
- [20] Couturier JP, Root-Bernstein RS. HIV may produce inhibitory microRNAs (miRNAs) that block production of CD28, CD4 and some interleukins. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, 235(2):169-184.

miR26a and miR939 regulate the replication of H1N1 influenza virus in MDCK cell

He Liu¹, Liping Song¹, Wenlin Huang^{1,2*}

(¹ Key Lab of Pathogenic Microorganisms and Immunity, Institute of Microbiology, CAS, Beijing 100101, China)

(² Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: [**Objective**] MicroRNAs (miRNAs) play an important role in the process of infection and replication of virus in host cells. In this study, we cloned two miRNAs expression vectors and examined their effects on the replication of H1N1 type influenza virus in MDCK (Madin dardy canine kidney) cells. [**Methods**] We constructed the plasmids expressing miR26a and miR939 and performed the transfection study in MDCK cells. Subsequently, the cells were infected with H1N1 type influenza virus 24 h after transfection. Then we tested the hemagglutination titer at 72 h time point to investigate the effect of miR26a and miR939 on the replication H1N1 type influenza virus in MDCK cells. [**Results**] The transfection study showed that miR26a and miR939 can achieve efficiently expression in MDCK cells. miR26a and miR939 can influence the replication of H1N1 influenza virus differently in two different ways. miR26a inhibits the replication, whereas miR939 stimulates the process. [**Conclusion**] Cellular miRNAs can regulate the replication of H1N1 influenza virus in host cells, and our paper should report the role of miR26a and miR939 in this regulation for the first time.

Keywords: miRNAs; H1N1 influenza virus; MDCK cell; virus replication

(本文责编:王晋芳)