

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (6) :679 - 687; 4 June 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.011

miR432^{*} 调控柯萨奇病毒 A16 型在人横纹肌肉瘤细胞中的复制

杨倬¹, 田波²

¹ 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050

² 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

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 miRNAs 对柯萨奇病毒 A16 型 (Coxsackievirus A16, CA16) 在宿主细胞内复制的影响。【方法】构建 miRNAs 靶基因筛选系统, 在双荧光素酶报告体系的 pMIR 载体插入病毒基因, 如果插入的基因序列能被细胞内的 miRNAs 靶向调控, 报告基因的表达将发生变化。通过实验, 发现 CA16 病毒 5'-UTR 基因可能是 miRNAs 的作用靶标。随后利用 miRNAs 在线分析软件, 预测可能作用于 5'-UTR 基因片段的 miRNAs, 检测 miRNAs 对 5'-UTR 基因片段的作用。为了研究 miRNAs 分子对 5'-UTR 基因的调控作用是否可以体现在 CA16 病毒的复制过程中, 在人横纹肌肉瘤 (Rhabdomyosarcoma, RD) 细胞中转染 miRNAs mimics 和 inhibitors, 利用 Western blot 和 real-time PCR 实验检验 CA16 病毒的复制和表达情况。【结果】实验结果表明, miR432^{*} 可以促进病毒在 RD 细胞中的复制和表达。反之, miR432^{*} inhibitor 有抑制病毒复制的作用。【结论】细胞内 miR432^{*} 可以调控 CA16 在宿主细胞中的复制过程, 本研究首次报导 miR432^{*} 在 CA16 病毒复制过程中的调控作用。研究 CA16 病毒与宿主 miRNAs 的相互作用机制为进一步阐明 CA16 病毒感染与复制机理奠定了基础。

关键词: miRNAs, 柯萨奇病毒 A16 型, 人横纹肌肉瘤细胞, 病毒复制

中图分类号: R387 **文章编号:** 0001-6209(2014)06-0679-09

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 premiRNA。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 (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

基金项目: 国家自然科学基金 (31370201)

作者简介: 杨倬 (1980 -), 女, 河北石家庄人, 助理研究员, 博士, 主要研究方向为病原微生物学。Tel: +86-40-83157181; E-mail: zhuoer8623@163.com

收稿日期: 2013-10-31; **修回日期:** 2014-01-22

对基因表达的转录后调控作用^[1]。

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^[2-3],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-1)在细胞中的积累^[4];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能通过丙型肝炎病毒(HCV)基因组5'非编码区的相互作用,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-7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^[5-7]。肠道病毒是引发食源性疾病的主要病因,主要经食物、水和环境进行传播。柯萨奇病毒是一种肠道病毒,是一类常见的经呼吸道和消化道感染人体的病毒。柯萨奇病毒A16型(Coxsackievirus A16, CA16)是手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)主要的病原体之一。目前有研究证明,手足口病人(感染CA16和/或肠道病毒71型后)血清中microRNA表达谱发生特征性变化,而且通过研究血清中microRNA表达谱的变化,可以区分这两种肠道病毒亚型的感染^[8]。本研究进一步探究细胞基因组编码的miRNAs是否会参与CA16在细胞内的复制过程。

本实验针对细胞内miRNAs是否参与CA16病毒在细胞内的复制,构建了miRNAs靶基因筛选系统,利用双Luciferase报告体系来研究CA16病毒基因表达是否受到miRNAs的调控。根据报告基因表达的变化,发现作用在CA16病毒的5'-UTR基因上的miR432*对CA16病毒的复制有影响。为miRNAs参与调节CA16病毒复制的相关研究提供了有价值的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒,质粒和细胞株:CA16 Shzh05-1株由中国医学科学院病原生物学研究所提供;人横纹肌肉瘤细胞(Rhabdomyosarcoma, RD)为本实验室保存;pMIR和pRL-CMV荧光素酶报告载体由本实验

室保存。

1.1.2 miRNAs的合成:miR432* mimics/inhibitor, miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control由广州锐博生物有限公司进行合成。

1.1.3 试剂和仪器:核酸限制性内切酶Mlu I、Sac I, T4 DNA连接酶及Pyrobest高保真性DNA聚合酶购自TaKaRa公司。鼠源CA16单克隆抗体(MAB979)购自Millipore公司, β -actin及辣根酶标记的山羊抗小鼠IgG购自北京中山金桥公司;RNA提取Trizol试剂购自上海Invitrogen公司;反转录、Real time PCR、双荧光检测试剂盒购自Promega公司;转染试剂Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司;DMEM和胎牛血清(FBS)购自Gibco BRL公司。蛋白电泳仪、PCR仪及酶标仪为美国Bio-Rad公司产品;Real time PCR仪为美国ABI公司产品。

1.2 miRNAs靶基因筛选系统的建立

1.2.1 重组载体的构建:用于miRNAs作用靶标筛选的3'-UTR分析系统包含2个荧光素酶报告基因载体,一个为pMIR载体,另一个为pRL-CMV载体。pMIR载体可以表达萤火虫荧光素酶,在萤火虫荧光素酶的3'-UTR区含有多克隆位点插入目的基因。pRL-CMV载体能高效表达海肾荧光素酶,作为内参。根据GenBank CA16 Shzh05-1株的基因序列(GenBank accession No. EU262658.1),以CA16全长cDNA为模板,克隆得到CA16的12个基因片段5'-UTR、1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、3AB、3C、3D、3'-UTR,以及5'-UTR的3个亚片段5'-UTR-1、2、3。然后将以上的基因片段插入pMIR载体3'-UTR区的多克隆位点中的sacI/MluI限制性酶切位点处。构建成重组载体pMIR-CA16-(5'-UTR、1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、3AB、3C、3D、3'-UTR、5'-UTR-1、5'-UTR-2、5'-UTR-3)。实验中所用引物均由北京奥科生物公司合成,序列见表1。

1.2.2 miRNAs结合靶位点预测:ViTa数据库包括了已知的病毒的miRNAs以及相应的由miRanda和TargetScan预测的宿主miRNAs靶基因。MicroInspector在线分析软件可以预测特定miRNAs的作用靶基因,也可以预测在已知序列上具有潜在作用靶点的miRNAs。而rna22和RNA Hybrid在线分析软件则主要针对两条已知的RNA序列的相互作用进行验证,通过二级结构和结合自由能来评价。我们利用MicroInspector和ViTa预测病毒基因片段

上潜在结合位点的 miRNAs,用 rna22 和 RNA Hybrid 验证预测结果。

1.2.3 双荧光素酶检测: RD 细胞接种于 24 孔板中,将构建好的重组 pMIR 载体和 pRL-CMV 载体利用转染试剂 Lipofectamine 2000 共转染 RD 细胞,转染 30 h 后收集细胞,用 PBS 洗一遍细胞,稀释 5 × Passive lysis buffer,24 孔板每孔加入 100 μL,冰上放

置 10 min, 12000 × g 离心 2 min, 取上清采用 Promega 公司的双荧光检测试剂盒检测荧光素酶的表达。如果构建在 pMIR 载体上的病毒基因序列受到宿主细胞内的 miRNAs 的调控,将影响载体上荧光素酶的表达,通常以海肾荧光素酶活性作为内参,用测定的萤火虫荧光素酶的表达值比海肾荧光素酶的表达值,考察萤火虫荧光素酶活性的变化。

表 1. CA16 病毒基因片段的 PCR 扩增引物

Table 1. Primer sequences of CA16 gene segments for PCR

gene	nucleotide location	sequence (5'→3')
5'-UTR	1-745	forward primer: GCCGAGCTCTTAAAACAGCCTGTGGGTTGT reverse primer: GCCACGCGTTTC TTA CAG TTA AGG AGC AAT ATA
1A	746-952	forward primer: GCCGAGCTCATGGGGTACAAGTCTCCACCC reverse primer: GCCACGCGTCTTGAGCGGTGGGGCCATC
1B	953-1714	Forward primer: GCCGAGCTCTCTCCAAGCGCTGAGGCATG Reverse primer: GCCACGCGTTTGCTTGACTGCCTGGCCG
1C	1715-2440	Forward primer: GCCGAGCTCGGCATACCAACAGAGCTTAAACCTG Reverse primer: GCCACGCGTTTGTATGTTGGCTGTCTGCTCAATG
1D	2441-3331	Forward primer: GCCGAGCTCGGGATCCTATTGCAGACATGATT Reverse primer: GCCACGCGTCAATGTTGTTATCTTGTCTCTACTAGTGCT
2A	3332-3781	Forward primer: GCCGAGCTCGGAAAGTTTGGACAACAATCAGCG Reverse primer: GCCACGCGTTTGTTCATTGCTTCTTCATCCAG
2B	3782-4078	Forward primer: GCCGAGCTCGGAGTATCTGACTATATCAAAGGCCT Reverse primer: GCCACGCGTCTGTTTTGCACTATAGGAATGCC
2C	4079-5065	Forward primer: GCCGAGCTCAGCGCTTATGGCTAAAGAAGTTT Reverse primer: GCCACGCGTTTGGAAAGAGGGCTTCTATGGTATTC
3AB	5066-5389	Forward primer: GCCGAGCTCTGGACCGCCTAAGTTCAGGCCTAT Reverse primer: GCCACGCGTTTG GAC TGT GGC TGT TCT TAG CA
3C	5390-5938	Forward primer: GCCGAGCTCGGACCGAGCTTAGACTTCGCCT Reverse primer: GCCACGCGTTTGTTCACTGGCAAAGTAACTCTC
3D	5939-7324	Forward primer: GCCGAGCTCGGAGAGATCCAATGGATGAAGCC Reverse primer: GCCACGCGTAAATAATTCGAGCCAATTTCTTCTCA
3'-UTR	7325-7410	Forward primer: GCCGAGCTCTAG TAT ACA GTT TAA AGC TGA AC Reverse primer: GCCACGCGTTGC TAT TCT GGT TAT AAC AAA TT
5'-UTR-1	1-275	Forward primer: GCCGAGCTCTTAAAACAGCCTGTGGGTTGT Reverse primer: GCCACGCGTCTGTTACTAGGTTTCTCGAAGTAGTTAGCC
5'-UTR-2	219 - 555	Forward primer: GCCGAGCTCTTCGAGAAACCTAGTAACGCCATTG Reverse primer: GCCACGCGTAGTTGCCCGTTACGACACACTGCCA
5'-UTR-3	517 - 745	Forward primer: GCCGAGCTC CCAAAGGGCAGTGTGTGTAAC Reverse primer: GCCACGCGTTTC TTA CAG TTA AGG AGC AAT ATA

1.3 Western blotting 检测

RD 细胞用含 10% 胎牛血清、100 μg/mL 氨苄青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 的培养箱,饱和湿度条件下培养。当细胞融合达到 80% - 90% 时,用 2.5% 胰蛋白酶消化单层培养的 RD 细胞,用 DMEM 终止消化,4℃、500 × g 离心 5 min,用 DMEM 培养基调整细胞数为 2 × 10⁵ /mL 的单细胞悬液,以 1 mL/孔接种于 12 孔

板中,培养 24 h 细胞贴壁后,合成的 miRNAs mimics/inhibitor 及阴性对照 miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control 分别转染 RD 细胞,6 h 后接种 10 μL 的 TCID₅₀ 为 1 × 10⁹ 的 CA16 病毒。48 h 后收集细胞,用细胞裂解液冰上裂解细胞 20 min, 12000 × g 离心 10 min 收集上清液,15% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳后,利用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。10% 脱脂奶粉封闭过夜。孵育特异性抗体,

鼠源 CA16 单克隆抗体浓度为 1:2000, β -actin 抗体为 1:2000, 二抗为辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG 浓度为 1:2 000, 加 ECL 发光液, 显影。

1.4 Real time PCR 检测

取 2.5% 胰蛋白酶消化单层培养的 RD 细胞, 用 DMEM 培养基调整细胞数为 2×10^5 /mL 的单细胞悬液, 以 1 mL/孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h 细胞贴壁后, 合成的 miRNAs mimics/inhibitor 及阴性对照 miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control 分别转染 RD 细胞, 6 h 后, 每孔接种 10 μ L 的 TCID₅₀ 为 1×10^9 的 CA16 病毒, 48 h 后按照 Trizol 说明书提取细胞总

RNA, 取 RNA 150 ng 进行逆转录合成 cDNA。采用引物设计软件 Primer 5.0, 设计 CA16 病毒 *vp1* (扩增位点 nt 2057 - 2274) 和 β -actin 基因的引物, Real time PCR 引物由北京奥科生物公司合成 (表 2)。按照 Promega Real-Time PCR 试剂盒说明书进行 real timePCR 检测, 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。PCR 扩增后按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达值, 分析实验组与对照组的差异。

1.5 数据分析

实验数据采用 $x \pm s$ 表示, 使用 *t* 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为显著差异。

表 2. Real-time PCR 反应中用于扩增 CA16 *vp1* 和 β -actin 的引物

Table 2. Primers used for detection of CA16 *vp1* and β -actin in Real-time PCR assay

gene name	forward primer sequence (5'→3')	reverse primer sequence (5'→3')
CA16 <i>vp1</i>	GGAAATGGGACTTGTTCCT	GGGACTGACACTTGAGCTG
β -actin	ACCCACACTGTGCCATCTACGA	GCCGTGGTGCTGAAGCTGTAGCC

2 结果

2.1 双荧光素酶报告系统的构建

如图 1 所示, 将 CA16 的 12 个基因片段 5'-UTR、1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D、3'-UTR 插入

荧光素酶报告基因载体 pMIR 3'-UTR 区的多克隆位点中的 *sacI/MluI* 限制性酶切位点处。构建成重组载体 pMIR-CA16-(5'-UTR、1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、3AB、3C、3D、3'-UTR)。将构建好的重组双荧光素酶报告载体转染宿主细胞筛选 miRNAs 调控病毒基因的靶位点。

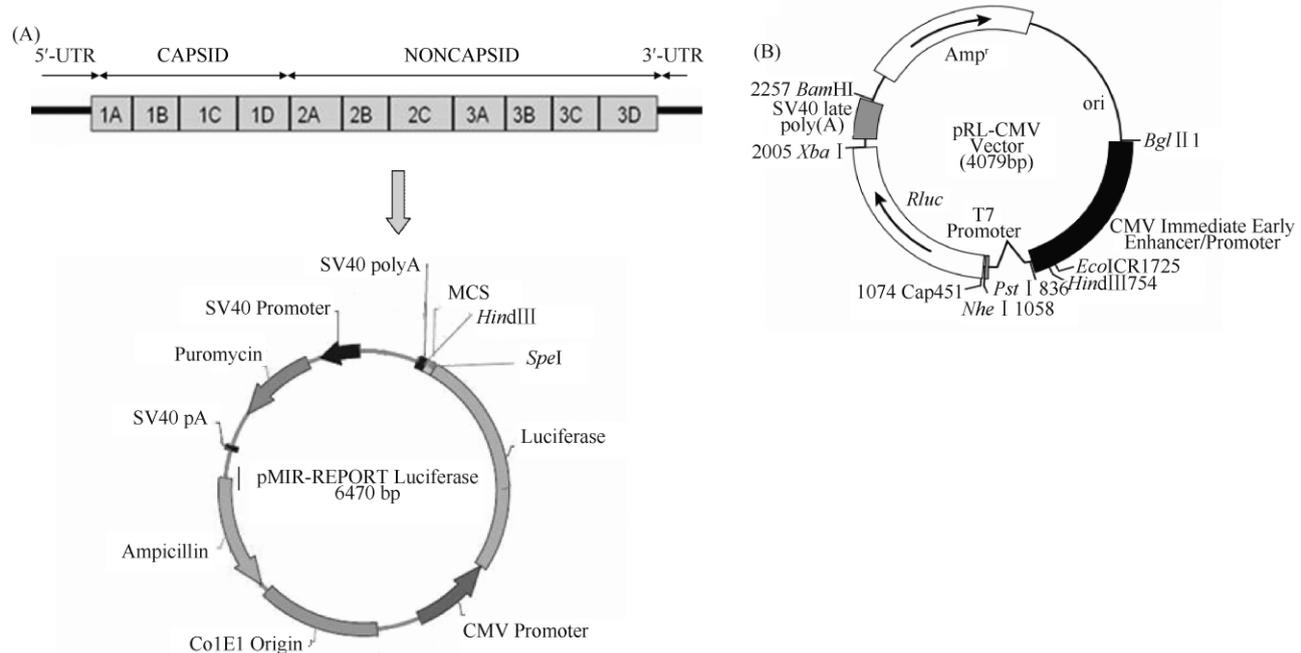


图 1. 双荧光素酶报告系统构建

Figure 1. Construction of Luciferase dual reporter analysis system for selection of miRNAs putative targets. A: circular map of the pMIR vector. The CA16 genes were inserted into the *sacI/MluI* sites. B: circular map of the pRL-CMV vector. pRL-CMV vector was used as control.

2.2 CA16 病毒的 5'-UTR 基因片段是宿主细胞 miRNAs 的作用靶点

将构建的重组 pMIR 载体和 pRL-CMV 载体共转染 24 孔板培养的 RD 细胞, 30 h 后进行 Luciferase 双荧光检测。如图 2 所示, 实验对照组为转染 pMIR 空载体的细胞, 结果发现与对照组相比, 转染 pMIR-5'UTR 重组载体的细胞的相对荧光素酶活性有显著下降。由此推测报告基因表达的下调可能是宿主 miRNAs 介导的抑制作用, 病毒 5'-UTR 基因可能是

miRNAs 的作用靶点。为了更加明确作用位点, 将 CA16 病毒 5'-UTR 基因片段分为 3 个亚片段连接到 pMIR 载体中, 构建重组载体 pMIR-CA16-(5'UTR-1、5'UTR-2、5'UTR-3)。图 3 结果显示, 与对照组相比, 转染 pMIR-5'UTR-3 重组载体的细胞的相对荧光素酶活性最低。以上结果说明 5'UTR-3 基因片段很有可能是宿主 miRNAs 的潜在的作用靶点从而能够抑制报告基因荧光素酶的表达。

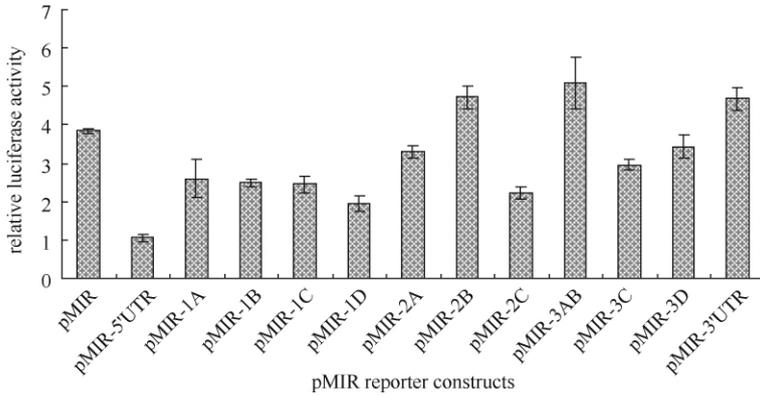


图 2. CA16 病毒 12 个基因片段重组 pMIR 载体的相对荧光素酶活性比较

Figure 2. Relative luciferase activity from the pMIR reporter constructs carrying one of 12 fragments of CA16 and pRL-CMV vector. Both pRL-CMV and pMIR vector were transfected into RD cell, 30 h after transfection, dual luciferase activity were assayed. pMIR vector without gene inserted was used as control. $n = 3$.

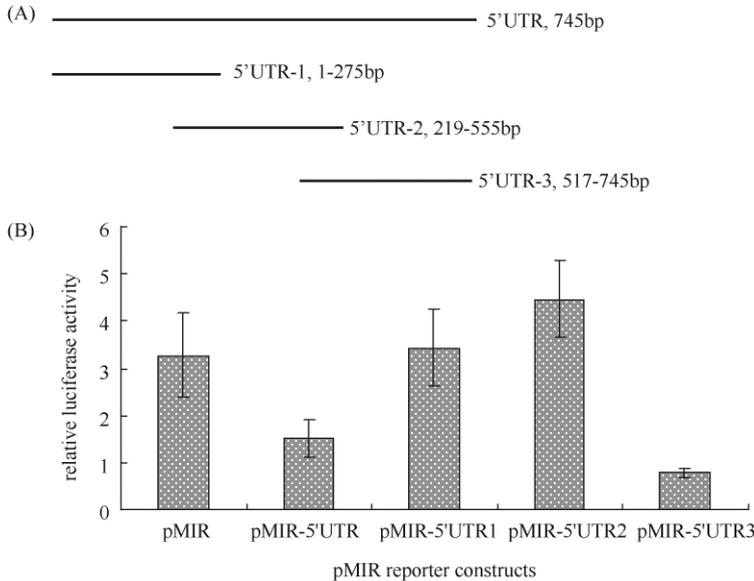


图 3. CA16 病毒 5'-UTR 3 个亚基因片段重组 pMIR 载体的相对荧光素酶活性比较

Figure 3. The 5'UTR-3 gene may harbor potential binding sites for miRNAs. A: schematic map of the 5'-UTR genome. Numbers in parentheses denote nucleotide positions spanned by fragments of the 5'-UTR gene that were inserted into the 3'UTR of the luciferase gene in pMIR. B: relative luciferase activity from the pMIR reporter constructs carrying fragments from the dissection of the 5'-UTR gene and pRL-CMV vector. Both pRL-CMV and pMIR vector were transfected into RD cell, 30 h after transfection, dual luciferase activity were assayed. pMIR vector without gene inserted was used as control. $n = 3$.

2.3 靶向 5'-UTR-3 基因片段的 miRNAs 的预测

为了确定宿主细胞 miRNAs 是否能够功能性抑制 pMIR-5'-UTR-3 重组载体的荧光素酶活性,我们利用 MicroInspector 和 ViTa 预测 5'-UTR-3 基因片段上潜在结合位点的 miRNAs,用 rna22 和 RNA Hybrid online program 验证预测结果,初步选定 miR432* 可能是潜在的能够靶向 CA16 病毒基因 5'-UTR-3 的 miRNA,其序列及与 5'-UTR-3 基因片段的互补配对模式见图 4。序列分析显示 miR432* 5'端的种子序列与 5'-UTR-3 基因上的靶点序列完全匹配。另外与 miR432* 相结合的 5'-UTR-3 基因上的位点序列

在部分 CA16 病毒株的基因组中高度保守(表 3)。

hsa-miR-432* 5'-CUGGAUGGCUCUCCAUGUCU-3'

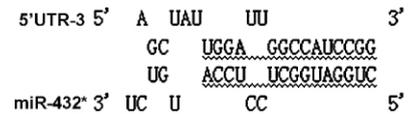


图 4. miR432* 序列及与 5'-UTR-3 基因片段的互补配对模式

Figure 4. The model of hybridization between the miR432* and 5' UTR-3 mRNA were predicted using RNAHybrid software.

表 3. miR432* 在部分 CA16 病毒株 5'-UTR-3 基因上保守的结合位点

Table 3. The conserved binding sites of miR-432* in the 5' UTR-3 gene compared across a selection of CA16 viral strains

virus type	sequence
Shzh05-1	AG...TTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTCT
Shzh00-1	AG...TTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTCT
G-10	AA.GATTGTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTCT..
FY18	AAAGATTGTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTCT..
SZ/HK08-3	AG...TTGTTACCATATAGCTACTGGATTGGCCATCCGGTGACC
SZ/HK08-7	AG...TTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTCT
XM-CA16-3560	AG...TTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTCT

Underlined sequences indicate conserved binding sites. Some CA16 viruses are not shown in the table.

2.4 miR432* 对 pMIR-5'-UTR-3 载体荧光素酶活性的影响

将合成的 miR432* mimics/inhibitor, miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control 为阴性对照,分别同 pMIR-5'-UTR-3 和 pRL-CMV 质粒共转染 RD 细胞,30 h 后进行 Luciferase 双荧光检测。结果发现 miR432* 能在一定程度上下调荧光素酶的活性,miR432* inhibitor 通过抑制细胞内 miR432* 从而使得荧光素酶活性增加(图 5)。这进一步验证了 miR432* 能够通过靶向 CA16 病毒基因 5'-UTR-3 发挥作用。

2.5 miR432* 调控 CA16 在 RD 细胞中病毒蛋白的表达

为了验证 miR432* 靶向病毒 5'-UTR-3 的调控作用能否影响 CA16 病毒在宿主细胞中的复制,将合成的 miR432* mimics/inhibitor, miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control 为阴性对照,分别转染 12 孔板培养的 RD 细胞,感染病毒 48h 后提取细胞蛋白,通过 Western blot 检测 CA16 病毒蛋白 VP1 表达水平,以 β -actin 为内参,对比各实验组和对照

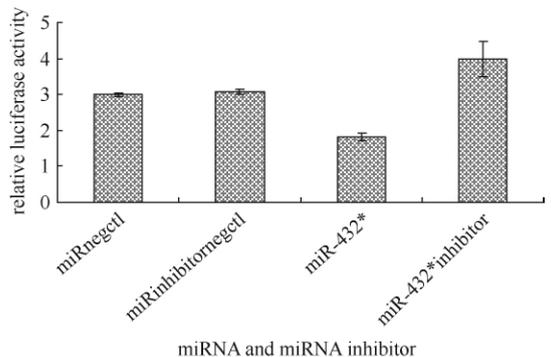


图 5. miR432* 对 pMIR-5'-UTR-3 载体荧光素酶活性的影响

Figure 5. The relative luciferase activity from pMIR-5'UTR-3 and pRL-CMV vector in RD cells with overexpressing miR432* or miR432* inhibitor. miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control were used as control, n = 3.

组 CA16 病毒蛋白 VP1 的表达量,结果见图 6。结果表明与对照相比,miR432* 能够促进 CA16 病毒蛋白 VP1 在 RD 细胞中的表达,而 miR432* inhibitor 显著抑制病毒蛋白 VP1 的表达。

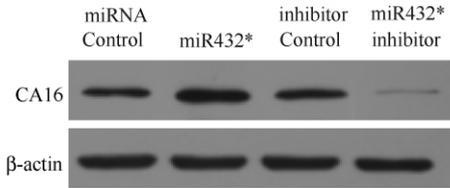


图 6. Western blot 检测 miR432^{*} 对 CA16 在 RD 细胞中病毒蛋白表达的影响

Figure 6. Western blot analysis of the effects of miR432^{*} on CA16 expression in RD cell. The lysates of total cells infected with CA16 were collected and analyzed for VP1 protein. Its decrease was determined using CA16 monoclonal antibody. The Beta-actin was used as an internal control and demonstrated equal loading of total protein. miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control were used as control.

2.6 miR432^{*} 调控 CA16 在 RD 细胞中病毒 mRNA 的表达

为了进一步验证 miR432^{*} 能够调控 CA16 病毒在宿主细胞中的复制, 将合成的 miR432^{*} mimics/inhibitor, miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control 为阴性对照, 分别转染 12 孔板培养的 RD 细胞, 感染病毒 48 h 后用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 使用 Real-time PCR 分析 miR432^{*} 对 CA16 病毒 mRNA 表达的影响, 结果见图 7。结果表明与对照相比, 转染 miR432^{*} 的细胞中 CA16 病毒 mRNA 表达上调了 2.2 倍, 说明 miR432^{*} 能够促进 CA16 病毒 mRNA 在 RD 细胞中的表达, 而转染 miR432^{*} inhibitor 的细胞中 CA16 病毒 mRNA 表达水平下调了 (70.0 ± 8.0)%, 说明 miR432^{*} inhibitor 能够抑制 CA16 病毒 mRNA 在 RD 细胞中的表达。这一结果与 Western blot 实验结果一致。

2.7 感染 CA16 病毒对宿主细胞内 miR432^{*} 的影响

将 CA16 病毒接种于 12 孔板培养的 RD 细胞, 感染病毒 24h 后用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 使用 Real-time PCR 分析病毒感染前后细胞内 miR432^{*} 的表达变化。miRNA qRT-PCR Primer 由广州锐博生物有限公司合成。如图 8 所示, RD 细胞感染 CA16 病毒后 miR432^{*} 表达量是未感染病毒细胞的 2 倍左右。miR432^{*} 表达量的上调反映了病毒感染宿主细胞后可引起宿主 miRNA 表达水平的变化, 推测 miR432^{*} 可能有协同病毒在宿主细胞中复制的作用。miRNA 表达水平的变化一定程度上反映了宿主细胞同病毒间相互作用关系。

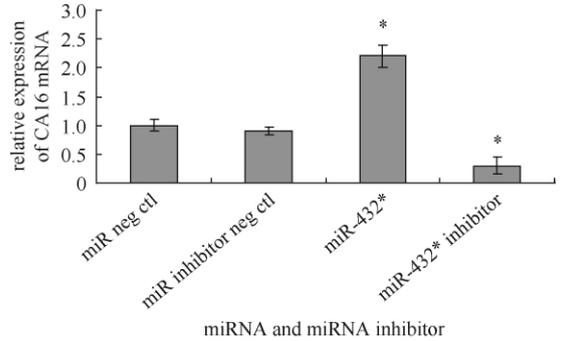


图 7. Real-time PCR 检测 miR432^{*} 对 CA16 在 RD 细胞中病毒 mRNA 表达的影响

Figure 7. Real-time PCR analysis of the effects of miR432^{*} on CA16 mRNA in RD cell. Cultured supernatants of RD cells infected with CA16 were taken off at 48 h post-infection and viral mRNA of the rest cells was extracted by means of TRIzol, and then subjected to a Real-time PCR relative quantification assay. The viral RNA transcripts level in control was set as 100%. miR-RiboTM mimics/inhibitor Negative control were used as control. The data shown represent the mean percentage of RNA transcripts ± SD from three independent experiments. * $P < 0.05$.

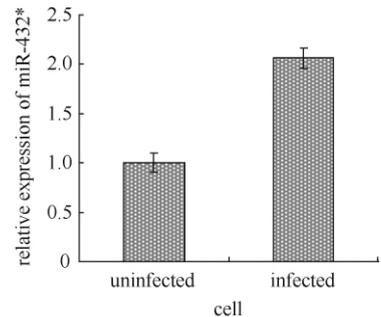


图 8. 感染 CA16 病毒前后 RD 细胞中 miR432^{*} 表达水平比较

Figure 8. The relative expression of miR432^{*} in RD cells with or without CA16 infection.

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 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^[6]。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^[9]。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^[10]。哺乳动物的 miR32 则能抑制 I 型泡沫病毒 (PFV-1) 在宿主细胞中的积累。

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^[11],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^[12],这些蛋白起到了 RNA 沉默抑制剂的作用。另外 Joost Haasnoot^[13] 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。

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^[14],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^[15-16]。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 等^[17] 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。在本实验中筛选出的 miR432*,经过初步验证其也可能通过靶向 CA16 基因组的 5' UTR 区发挥作用,促进 CA16 病毒的复制。它们的作用机制是否一致还有待深入研究。

CA16 病毒的基因组从 5'末端至 3'末端依次排列着含有 745 个核苷酸的 5'非编码区 (untranslated region, UTR)、编码区 1A (多肽 VP4)、1B (多肽 VP2)、1C (多肽 VP3)、1D (多肽 VP1)、2A (特异性蛋白酶)、2B、2C、3A、VPg (5'末端结合蛋白)、3C (特异性蛋白酶)、3D (RNA 多聚酶组分)、3'末端非编码

区 (85 个核苷酸) 以及多聚腺苷酸尾 (AAAn)。病毒 RNA 正链和负链的 5'末端和 3'末端非编码区中分别含有多肽翻译的起始信号以及 RNA 合成的起始信号。5'UTR 通常折叠成多个特异性的空间结构,这些结构通过与宿主细胞蛋白因子的结合在起始病毒基因组 RNA 的合成以及病毒蛋白的翻译过程中发挥重要作用,此外,5'UTR 结构还涉及病毒的宿主范围和病毒的毒力等多个方面的功能。因此研究 miRNA 调控病毒 5'UTR 的功能对于揭示病毒感染与复制机理具有重大意义。通过软件预测 miR432* 可能是潜在的能够靶向 CA16 病毒 5'UTR 的 miRNA,实验验证 miR432* 能够促进 CA16 病毒的复制。miR432* 是否通过靶向 CA16 病毒 5'UTR 而调控病毒复制这还需要经过实验进一步验证。

参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116 (2) : 281-297.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Cui L, Qi Y, Li H, Ge Y, Zhao K, Qi X, Guo X, Shi Z, Zhou M, Zhu B, Guo Y, Li J, Stratton CW, Tang YW, Wang H. Serum microRNA expression profile distinguishes enterovirus 71 and coxsackievirus 16

- infections in patients with hand-foot-and-mouth disease. *PLoS One*, 2011; 6 (11) : e27071.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Bennasser Y, Jeang KT. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology*, 2006, 3: 95-100.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Bennasser Y, Le SY, Yeung ML, Jeang KT. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology*, 2004, 1:43-47.
- [16] 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.
- [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.

miR432* regulate the replication of Coxsackievirus A16 in rhabdomyosarcoma cells

Zhuo Yang^{1*}, Po Tien²

¹National Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

²Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] MicroRNAs (miRNAs) play an important role in infection and replication of virus in host cells. In this study, we examined miRNAs' effects on the replication of Coxsackievirus A16 (CA16) in rhabdomyosarcoma cells. [Methods] We constructed target gene of miRNAs screening system. We used 3' untranslated region (UTR) dual luciferase reporter analysis to identify putative miRNA targets in the CA16 virus genome. First, 12 segments of CA16 virus genome were inserted to the pMIR vector and the luciferase expression were assayed to identify the target gene of putative miRNA. The reporter gene expression of the cells transfected with the vector containing 5'-UTR was significantly downregulated. Then, using online analysis programs we screened the miRNAs that may target to 5'-UTR. Furthermore, Western blot and real-time PCR test were used to study the effect of miRNAs on viral replication. [Results] The study showed that miR432* could stimulate the replication of CA16 virus. On the contrary, miR432* inhibitor could suppress CA16 virus replication. [Conclusion] Cellular miRNAs could regulate the replication of CA16 virus in host cells. Our findings support the notion that the cellular miRNAs play an important role in the host and virus infection.

Keywords: miRNAs, Coxsackievirus A16, rhabdomyosarcoma cells, virus replication

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Science Foundation of China (31370201)

* Corresponding author. Tel: +86-10-83157181; E-mail: zhuoer8623@163.com

Received: 31 October 2013/Revised: 22 January 2014