

## miRNA在乌鳢水泡病毒感染月鳢细胞(SSN-1)中的表达变化及其调控作用

伊丽竹<sup>1,2</sup>, 徐镇<sup>1</sup>, 林鑫<sup>1,2</sup>, 涂加钢<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430070;

2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东广州 510225)

**摘要:** 为了探究microRNA(miRNA)对乌鳢水泡病毒(snakehead vesiculovirus, SHVV)感染月鳢细胞(striped snakehead cell, SSN-1)的影响, 本研究对SHVV感染的SSN-1细胞及未感染的细胞进行miRNA高通量测序。分别用U6、 $\beta$ -actin和5S rRNA作为内参基因研究SHVV感染对细胞内22个高丰度(transcripts per million, TPM  $\geq$  1 000) miRNA表达水平的影响, 结果显示, U6基因作为内参时, SHVV感染对 $\beta$ -actin没有显著影响, 但是5S rRNA显著上调表达, 说明U6和 $\beta$ -actin基因适合作为内参基因研究SHVV感染对miRNA表达水平的影响。此外, 我们研究了14种miRNA对SHVV增殖的影响。结果发现, miR-27a-3p、miR-26a-5p、miR-30e-3p等11种miRNA显著促进SHVV增殖, miR-150和miR-216b显著抑制SHVV增殖。进一步研究发现高丰度的miR-100-5p在SHVV感染SSN-1细胞早期上调表达, 晚期下调表达。过表达miR-100-5p可以显著抑制SHVV的增殖, 而抑制表达miR-100-5p可以显著促进SHVV的增殖。本研究为开发抗SHVV的核酸药物提供了理论基础。

**关键词:** 乌鳢水泡病毒; SSN-1细胞; miR-100-5p; 抗病毒

**中图分类号:** S 941.41; Q 786

**文献标志码:** A

miRNA是一类高度保守、长度约为22 nt的单链非编码RNA, 通过与mRNA的3'或5'端非编码区<sup>[1]</sup>或编码区<sup>[2]</sup>结合实现转录后调控。miRNA参与细胞的生长、分化、发育、凋亡和免疫等多种生命活动<sup>[3-5]</sup>。miRNA在细胞核由RNA聚合酶II (RNA polymerase II, Pol II) 转录形成具有茎环结构的初级miRNA。随后初级miRNA被核酸酶Drosha切割成长度为60~70 nt的发卡结构, 即前体miRNA。前体miRNA在Exportin-5复合物的作用下由细胞核转运到细胞质, 被Dicer切割成长度约为22 nt的双链RNA, 在解旋酶作用下, 其中一条链被降解, 剩下的单链即为成熟的miRNA。成熟的miRNA和Argonaute蛋白结合形成RNA诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC识别并降解靶基因mRNA或抑制mRNA翻译<sup>[4, 6-7]</sup>。

大量研究发现, 细胞编码的miRNA与病毒感染密切相关。一方面, 病毒感染会改变细胞内miRNA的表达水平, 例如流行性乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 感染HeLa细胞后, miR-15b受到转录因子c-Rel和CREB的调节而表达上调<sup>[8]</sup>; 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 通过抑制GLD-2促进miR-122表达<sup>[9]</sup>。另一方面, 细胞编码的miRNA能通过靶向病毒基因调节病毒增殖<sup>[10-16]</sup>。研究发现, miR-122可以靶向博尔纳病毒 (Borna disease virus, BDV) 的P和N基因来抑制BDV增殖<sup>[17]</sup>; miR-155可以靶向BDV的P基因来抑制BDV的增殖<sup>[18]</sup>, 也可以靶向HCV基因组的5'非编码区促进HCV增殖<sup>[19]</sup>。

近年来, 乌鳢水泡病毒(snakehead vesiculovirus, SHVV)对乌鳢(*Channa argus argus*)的感染, 严重影响了乌鳢养殖业的健康发展, 造成了每年

收稿日期: 2017-12-18 修回日期: 2018-02-06

资助项目: 国家自然科学基金(31602195)

通信作者: 涂加钢, E-mail: tujiagang@mail.hzau.edu.cn

上亿元的经济损失,目前尚无有效的防治措施。SHVV是本实验室于2014年从广东顺德某渔场的患病乌鳢分离得到。SHVV属于弹状病毒科(*Rhabdoviridae*),其基因组为单股不分节段的负链RNA,长度约为11 kb。在其线性基因组上,主要编码5种结构蛋白,分别是核蛋白(nucleoprotein, N)、磷酸化蛋白(phosphoprotein, P)、基质蛋白(matrix protein, M)、糖蛋白(glycoprotein, G)和RNA依赖的RNA聚合酶蛋白(RNA-dependent RNA polymerase, L)<sup>[20]</sup>。SHVV在SSN-1细胞中可以高效复制,但对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎成纤维细胞(embryonic fibroblast, ZF4)不敏感<sup>[21]</sup>。本实验室前期对SHVV感染和未感染的SSN-1细胞进行了miRNA高通量测序,发现SHVV感染导致细胞内大量miRNA表达下调,推测细胞内miRNA可能在病毒感染的过程中发挥着重要的作用<sup>[22-23]</sup>。本研究发现,SHVV感染SSN-1细胞导致5S *rRNA*表达上调,而U6和 $\beta$ -actin在SHVV感染前后表达无显著变化。因此,本研究选择U6作为内参基因分析了SHVV感染对22种高丰度miRNA表达水平的影响,进一步对部分miRNA调节SHVV增殖进行研究,为有效防治乌鳢水泡病毒奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

MEM培养基(minimum Eagle's medium, MEM)、0.25% Trypsin-EDTA购自Gibco;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自GemCell™;青霉素-链霉素溶液(100×)购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;Lipofectamine 2000购自Invitrogen;miRNA反转录试剂盒(All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit)购自GeneCopoeia Inc.;HiScript II qRT SuperMix反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;AceQ qPCR SYBR-Green Master Mix荧光定量PCR试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;TRIzol试剂购自TaKaRa公司;miRNA类似物(miRNA mimic)和抑制剂(miRNA inhibitor)由上海吉玛制药技术有限公司合成。

核酸蛋白测定仪Nanodrop 2000、台式冷冻离心机、细胞培养箱购自Thermo Scientific;Light-Cycler 480 Real-time PCR Instrument实时荧光定量PCR仪购自Roche公司。

### 1.2 病毒和细胞

乌鳢水泡病毒(SHVV)分离自广东顺德某渔场的患病乌鳢,由本实验鉴定和保存。SSN-1细胞系来源于月鳢(*Channa asiatica*)的鱼苗,购买于深圳市出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心。SSN-1细胞使用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素的MEM培养基中置于25 °C恒温培养箱中培养。

### 1.3 病毒感染

SSN-1细胞正常传代至6孔细胞板中,待细胞密度达到80%~90%时,采用感染复数(multiplicity of infection, MOI)为1的SHVV孵育SSN-1细胞,对照组细胞加入等量MEM,于25 °C培养箱中孵育2 h后,移除孵育液,使用PBS缓冲液润洗细胞2次后,更换新鲜的含有5%胎牛血清的MEM培养基,置于25 °C培养箱中培养,分别收集感染后0、3、12和24 h的细胞样品。

### 1.4 Illumine Hiseq 2500高通量测序

收集SHVV感染或未感染的SSN-1细胞(24 h)样品,并送至上海欧易生物医学科技有限公司进行miRNA测序。

### 1.5 细胞转染

正常传代SSN-1细胞铺于12孔细胞板中,待细胞密度达到70%~80%,按Lipofectamine 2000的操作说明,将合成的miRNA类似物或抑制剂转染到细胞中,以转染negative control (NC) mimic或NC inhibitor作为对照组,6 h后更换新鲜的细胞培养基。转染后24 h,收取细胞样品或继续感染实验。

### 1.6 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

按照TRIzol说明书提取细胞样品的总RNA。按照miRNA反转录试剂盒和HiScript II qRT SuperMix反转录试剂盒的说明书分别对RNA进行反转录获得cDNA。qRT-PCR的反应条件:95 °C预变性5 min;95 °C变性10 s,60 °C退火10 s,72 °C延伸15 s,45个循环。以U6作为miRNA的内参基因, $\beta$ -actin作为细胞和病毒基因的内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分别计算不同样品间的表达差异。

### 1.7 病毒滴度测定

转染NC mimic、miRNA mimic、NC inhibitor、miRNA inhibitor后24 h,细胞继续感染SHVV,

24 h后收集细胞上清液。用MEM培养基将病毒作连续10倍梯度稀释,即 $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ ,加入至预先铺好SSN-1细胞的96孔板中,每个稀释梯度设立8个孔作为平行处理,以正常细胞为对照组,置于25℃培养箱中培养5~7 d。每天观察各孔细胞病变情况并记录,用Karber法测定半数细胞培养物感染量(50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>)。

## 1.8 统计学分析

应用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析,采用Graphpad Prism 6.0软件作图。采用 $t$ 检验进行统计学显著性差异比较,以 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 miRNA表达丰度分析

将1 MOI的SHVV感染SSN-1细胞,同时将未感染的细胞作为对照,每组设置2个重复。感染24 h后收集细胞样品,通过Illumine Hiseq2500进行miRNA高通量测序。未感染病毒的细胞样品命名为样品1和样品3,感染SHVV的细胞样品为样品2和样品4。表达丰度TPM $\geq 1\ 000$ 的miRNA被认为是高丰度的miRNA<sup>[24]</sup>。经测序分析显示,4个细胞样品中TPM $\geq 1\ 000$ 的miRNA分别有37、35、38和39个。在4个样品中TPM均大于1 000的miRNA有22个(表1),其中miR-100-5p和miR-21在4个样品中表达丰度均在前三。

### 2.2 SHVV感染对SSN-1细胞内miRNA表达量的影响

前期研究表明,SHVV感染SSN-1细胞导致143种差异表达的miRNA均表达下调,且以5S *rRNA*作为内参基因对部分miRNA进行qRT-PCR检测得到一致结果<sup>[23]</sup>。已有研究表明,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和HCV感染细胞导致细胞内tRNA表达上调<sup>[25]</sup>,因此,推测SHVV感染SSN-1细胞导致5S *rRNA*内参基因表达上调。

为验证此推测,本实验以U6基因作为内参,检测2个内参基因 $\beta$ -actin和5S *rRNA*的相对表达情况,结果显示,SHVV感染SSN-1细胞对 $\beta$ -actin表达水平无显著影响,而5S *rRNA*的表达水平上调了约3倍(图1-a)。因此,U6和 $\beta$ -actin基因适合作为检测SHVV感染SSN-1细胞内miRNA表达水平变化的内参基因。本研究对TPM $\geq 1\ 000$ 的22种

miRNA进行了qRT-PCR分析,定量结果显示,以U6基因作为内参,13种miRNA表达显著下调( $P<0.05$ ),其中miR-10b-5p和miR-26a-5p下调幅度约50%;5种miRNA表达显著上调( $P<0.05$ ),其中miR-19b-3p、miR-221-3p和miR-222a-3p上调表达超过200%;4种miRNA表达无显著变化(图1-b)。

### 2.3 14种miRNA对SHVV增殖的影响

我们挑选了14种miRNA进行研究,其中3种miRNA(miR-19b-3p、miR-26a-5p、miR-100-5p)的TPM $\geq 1\ 000$ ,其他11种miRNA TPM $<1\ 000$ 。将对应合成的14种miRNA类似物分别转染SSN-1细胞,转染后24 h验证细胞内各miRNA的表达水平。结果显示,14种miRNA类似物转染均导致细胞内相应miRNA表达上调(图2-a)。将1 MOI的SHVV感染过表达miRNA的SSN-1细胞,感染后24 h,通过qRT-PCR和Western Blot分别从mRNA和蛋白水平检测细胞内病毒的增殖情况。从G mRNA分析,过表达miR-143或miR-23b对G mRNA的表达水平无显著影响,但过表达miR-216b、miR-150和miR-100-5p极显著降低G mRNA的表达水平至50%以下( $P<0.01$ );过表达其他9种miRNA均显著上调表达病毒的G mRNA( $P<0.05$ ),其中过表达miR-26a-5p、miR-181c-5p、miR-15b-5p上调G mRNA达到3倍以上,而过表达miR-27a-3p上调表达G mRNA极显著( $P<0.01$ ),上调幅度约5倍(图2-b)。从G蛋白的水平分析发现,过表达miR-216b和miR-150降低G蛋白的表达,与G mRNA变化趋势一致;虽然过表达miR-100-5p降低G mRNA表达,但是对G蛋白的表达无明显影响;虽然过表达miR-143或miR-23b对G mRNA的表达无明显影响,但明显促进G蛋白的表达,可能调控了G基因的翻译过程;过表达其他miRNA对G蛋白的表达均具有促进作用且与mRNA的表达趋势大致一致,其中,过表达miR-26a-3p的促进作用最明显(图2-c)。

### 2.4 SHVV感染对miR-100-5p表达的影响

因为miR-100-5p导致G mRNA的下调表达,但是对G蛋白无显著影响(图2-b, c),且miR-100-5p在其他水生动物病毒增殖过程中起重要的调控作用<sup>[26-27]</sup>,因此,本实验进一步对miR-100-5p与SHVV之间的关系开展研究,一方面,用1 MOI的SHVV感染SSN-1细胞,分别于感染后0、3、12和24 h收集细胞样品;另一方面,分别以MOI为0、0.1、1、10的SHVV感染SSN-1细胞,感染后

表 1 四个样品中表达丰度超过1 000的miRNA  
Tab. 1 miRNAs with TPM higher than 1 000 in four samples

名称 name	miRNA的表达丰度 TPM of miRNA							
	样品1 sample 1	样品2 sample 2	样品3 sample 3	样品4 sample 4	样品1 sample 1	样品2 sample 2	样品3 sample 3	样品4 sample 4
let-7a	36 876.797	24 405.659	15 286.898	13 757.083				
let-7f	3 162.315	1 676.999	2 612.739	2 775.363				
miR-100-5p	277 843.646 *	376 634.817 *	114 376.406 *	87 503.441 *				
miR-10b-5p	42 001.720	49 435.085	11 733.973	15 468.848				
miR-125b-5p	12 927.131	14 438.041	12 228.947	9 720.093				
miR-128-3p	3 238.519	1 884.055	1 198.177	1 002.702				
miR-146a	11 702.710	32 605.331	421 662.094 *	484 666.626 *				
miR-181a-5p	94 985.298 *	57 156.744 *	8 502.261	7 475.587				
miR-199-3p	8 318.476	4 830.201	18 358.716	13 523.538				
miR-199-5p	2 219.198	3 509.910	16 152.848	15 644.813				
miR-19b-3p	1 716.489	2 064.416	1 773.913	2 505.764				
miR-21	348 399.397 *	301 734.226 *	218 767.463 *	201 381.036 *				
miR-221-3p	5 814.197	4 592.199	6 701.427	5 115.385				
miR-222a-3p	15 519.114	10 452.718	4 821.463	4 735.741				
miR-222a-5p	3 786.368	3 583.377	2 557.878	2 303.699				
miR-22a-3p	11 376.095	5 370.814	10 635.525	9 653.904				
miR-23a-3p	2 599.363	2 680.977	8 763.718	8 237.299				
miR-25-3p	2 336.080	1 837.281	1 815.314	1 453.736				
miR-26a-5p	6 550.840	7 611.340	2 030.884	1 716.877				
miR-27b-3p	4 630.453	4 689.762	3 272.705	2 779.937				
miR-27c-3p	24 831.509	28 217.353	38 439.340	27 479.457				
miR-92a-3p	32 558.370	20 642.275	7 089.738	6 816.119				

注: 表格中“\*”标记的数据代表miRNA在该样品中表达丰度排名前三  
Notes: the data with “\*” means the top 3 miRNAs in each sample

24 h收集细胞样品, 将上述细胞样品进行qRT-PCR验证。结果显示, miR-100-5p在病毒感染后3 h, 表达上调约13倍( $P<0.01$ ), 随后表达水平逐渐降低, 至感染后24 h, 其表达水平仅是感染前细胞的1%( $P<0.01$ )(图3-a)。而随着感染剂量的增加, SSN-1细胞中miR-100-5p的表达水平逐渐降低, 且较未感染细胞差异极显著( $P<0.01$ ), 表明细胞中miR-100-5p的表达水平对SHVV的感染具有剂量依赖性(图3-b)。

## 2.5 miR-100-5p抑制SHVV在SSN-1细胞中增殖

为了确定miR-100-5p对SHVV增殖的影响,

将合成的miR-100-5p的类似物、抑制剂或相应的negative control (NC)分别转染SSN-1细胞, 转染后24 h使用qRT-PCR检测细胞内miR-100-5p的表达水平。与NC类似物相比, 转染miR-100-5p类似物导致细胞内miR-100-5p表达水平极显著上升了约2倍( $P<0.01$ )(图4-a)。与NC抑制剂相比, 转染miR-100-5p抑制剂导致细胞内miR-100-5p表达水平极显著下调约100倍( $P<0.01$ )(图4-b)。进一步研究过表达或抑制表达miR-100-5p对SHVV增殖的影响, 与对照组相比, 过表达miR-100-5p导致细胞内病毒的G mRNA表达极显著下调( $P<0.01$ ), 抑制表达miR-100-5p导致细胞内病毒的G mRNA

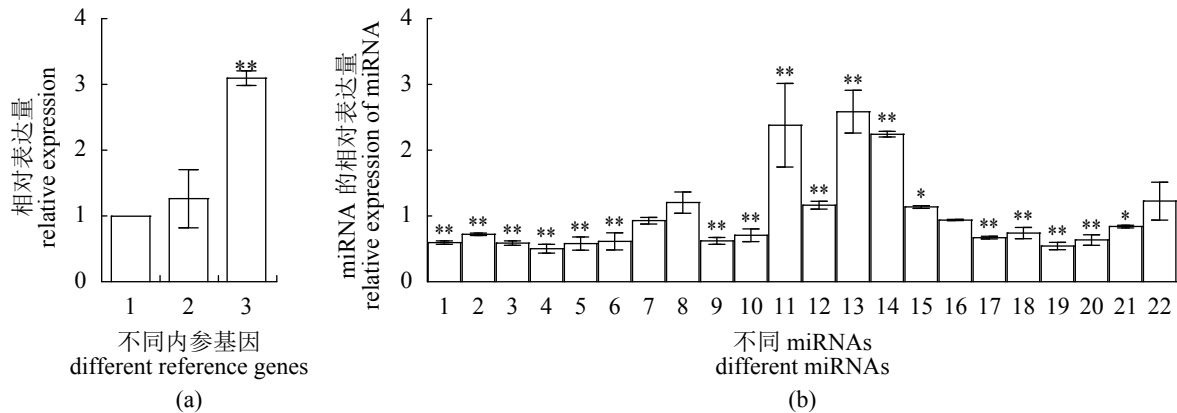


图1 SHVV感染对SSN-1细胞内miRNA表达水平的影响

(a) SHVV感染导致SSN-1细胞内5S rRNA表达上调, (b) 以U6基因为内参miRNA的表达水平; (a) 1. U6, 2.  $\beta$ -actin, 3. 5S rRNA; (b) 1. let-7a, 2. let-7f, 3. miR-100-5p, 4. miR-10b-5p, 5. miR-125b-5p, 6. miR-128-3p, 7. miR-146a, 8. miR-181a-5p, 9. miR-199-3p, 10. miR-199-5p, 11. miR-19b-3p, 12. miR-21, 13. miR-221-3p, 14. miR-222a-3p, 15. miR-222a-5p, 16. miR-22a-3p, 17. miR-23a-3p, 18. miR-25-3p, 19. miR-26a-5p, 20. miR-27b-3p, 21. miR-27c-3p, 22. miR-92a-3p; “\*”代表显著差异,  $P < 0.05$ , “\*\*”代表极显著差异,  $P < 0.01$

Fig. 1 Expression profiling of miRNAs in SSN-1 cells upon SHVV infection

(a) 5S rRNA was upregulated in SSN-1 cells upon SHVV infection, (b) expression of miRNAs with U6 as internal control; (a) 1. U6, 2.  $\beta$ -actin, 3. 5S rRNA; (b) 1. let-7a, 2. let-7f, 3. miR-100-5p, 4. miR-10b-5p, 5. miR-125b-5p, 6. miR-128-3p, 7. miR-146a, 8. miR-181a-5p, 9. miR-199-3p, 10. miR-199-5p, 11. miR-19b-3p, 12. miR-21, 13. miR-221-3p, 14. miR-222a-3p, 15. miR-222a-5p, 16. miR-22a-3p, 17. miR-23a-3p, 18. miR-25-3p, 19. miR-26a-5p, 20. miR-27b-3p, 21. miR-27c-3p, 22. miR-92a-3p; “\*” represents significant difference,  $P < 0.05$ , “\*\*” represents very significant difference,  $P < 0.01$

表达极显著上调( $P < 0.01$ )(图4-c)。收集的细胞上清液进行病毒滴度测定, 实验结果与病毒G mRNA表达变化一致(图4-d)。综上所述, miR-100-5p抑制SHVV在SSN-1细胞中的增殖。

### 3 讨论

近年来, 大量研究表明miRNA参与调控水产动物的免疫<sup>[28-29]</sup>、生长发育<sup>[30]</sup>、生殖代谢、细胞凋亡和自噬<sup>[26-27]</sup>等方面生理功能。此外, miRNA在病毒和宿主相互作用中同样发挥着重要的作用。病毒编码的miRNA可以通过调控宿主基因的表达来干扰宿主的免疫识别、调控细胞周期、抑制细胞凋亡等途径从而实现免疫逃逸<sup>[31]</sup>。新加坡石斑虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)编码的miR-13可以通过靶向病毒的衣壳蛋白, 降低宿主的免疫反应促进病毒增殖<sup>[32]</sup>。另外, 病毒可以利用宿主miRNA促进自身增殖。赤点石斑鱼神经坏死病毒(red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)感染所诱导表达的miR-1、miR-30b、miR-150和miR-184可以促进病毒增殖<sup>[33]</sup>。

内参基因的选择对于绝对定量miRNA的表达水平至关重要。本研究对3种内参基因(5S rRNA、U6和 $\beta$ -actin)进行分析, 发现SHVV感染导致5S rRNA

显著上调表达, 但是对U6和 $\beta$ -actin无显著影响。因此, 本研究确定了U6作为研究miRNA表达水平变化的内参基因。至于SHVV感染导致5S rRNA表达上调, 通过进一步分析miRNA测序结果发现, tRNA和rRNA的表达在SHVV感染后显著上调, 这可能和病毒感染相关<sup>[25]</sup>, 但具体机制有待进一步研究。

为了研究miRNA对SHVV增殖的影响, 挑选了14种被报道在其他病毒增殖中发挥重要调节作用的miRNA, 如miR-30e-3p通过促进I型干扰素的表达抑制登革热病毒(dengue virus, DENV)增殖<sup>[34]</sup>; miR-23通过靶向干扰素诱导因子1(interferon regulatory factor 1, IRF1)促进J型白血病病毒增殖<sup>[35]</sup>; miR-27a-3p通过负调控细胞内干扰素的表达抑制病毒增殖<sup>[2]</sup>。在14种miRNA调节SHVV增殖的实验中发现, miR-100-5p能显著降低病毒G mRNA的表达, 但是对G蛋白无显著影响。分析原因可能是miR-100-5p在SSN-1细胞内含量很高, 转染miR-100-5p类似物只能提高细胞内miR-100-5p的表达量约2倍, 而其他miRNA类似物能提高细胞内相应miRNA表达水平几十或几百倍, miR-100-5p在细胞内的少量提高对SHVV的蛋白表达水平未造成显著影响。因此, 为研究miR-100-5p对

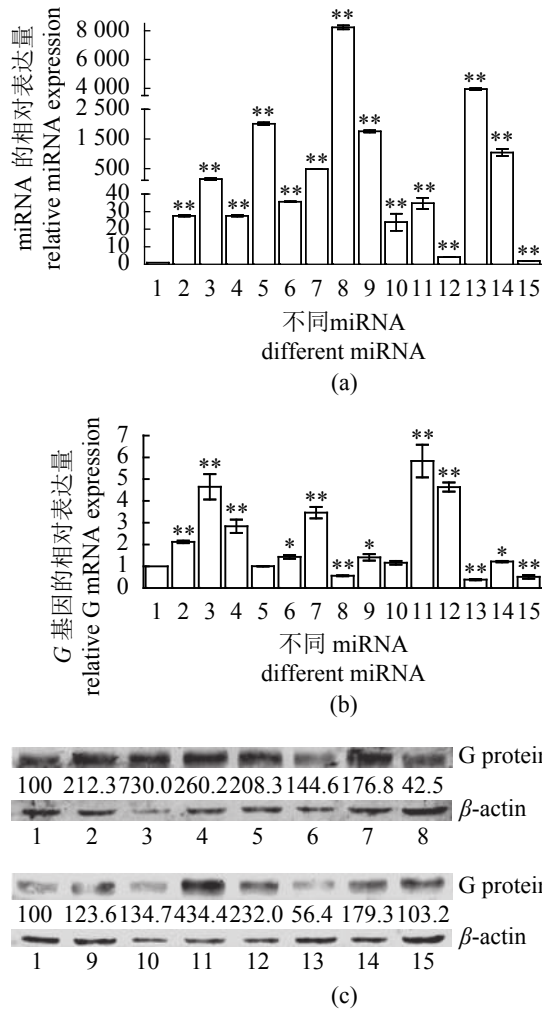


图2 14种miRNA对病毒增殖的影响

(a). 转染14种miRNA类似物检测SSN-1细胞中相应miRNA表达水平, (b) (c). 转染14种miRNA类似物对SHVV增殖的影响; 1. NC, 2. miR-19b-3p, 3. miR-26a-5p, 4. miR-29b, 5. miR-143, 6. miR-146b, 7. miR-181c-5p, 8. miR-216b, 9. miR-192, 10. miR-23b, 11. miR-27a-3p, 12. miR-15b-5p, 13. miR-150, 14. miR-30e-3p, 15. miR-100-5p; 对(c)图中蛋白条带的灰度值用Image-Pro Plus 6.0软件分析, 计算G蛋白的灰度值与β-actin灰度值的比值, 并将转染NC类似物的蛋白条带灰度值的比值设为100

Fig. 2 The effects of fourteen miRNAs on the replication of SHVV

(a). expression of miRNA in SSN-1 cells after transfection with 14 miRNA mimic, (b) (c). effects of transfection of 14 miRNAs overexpression on SHVV replication in SSN-1 cells; 1. NC, 2. miR-19b-3p, 3. miR-26a-5p, 4. miR-29b, 5. miR-143, 6. miR-146b, 7. miR-181c-5p, 8. miR-216b, 9. miR-192, 10. miR-23b, 11. miR-27a-3p, 12. miR-15b-5p, 13. miR-150, 14. miR-30e-3p, 15. miR-100-5p; the integrated optical densities of the protein bands in (c) were measured using Image-Pro Plus 6.0; the band value of G protein was normalized to that of β-actin; the value of NC mimic transfection was set at 100

SHVV增殖的影响, 采用miR-100-5p抑制剂降低细胞内miR-100-5p的表达水平。作为高度保守且

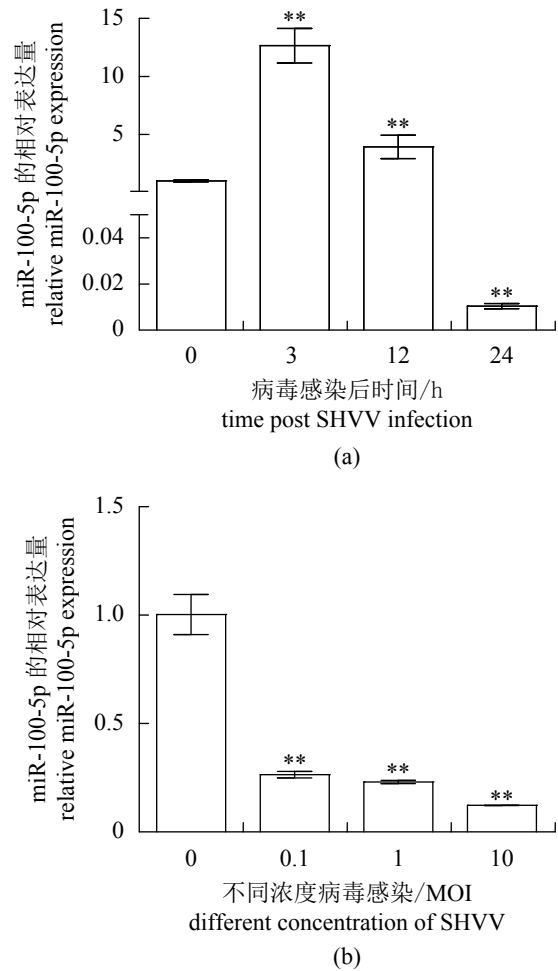


图3 病毒感染下调表达miR-100-5p

(a). miR-100-5p在SHVV感染细胞3、12、24 h的相对表达水平, (b). 不同剂量SHVV感染SSN-1细胞24 h后miR-100-5p的相对表达水平

Fig. 3 Viral infection downregulates miR-100-5p expression

(a). the expression of miR-100-5p in SSN-1 cells infected with SHVV at 3, 12, 24 h, (b). the expression of miR-100-5p in SSN-1 cells infected with SHVV at indicated MOI for 24 h

丰度较高的miRNA, miR-100-5p抑制剂显著促进SHVV增殖, 这从另一个方面证实miR-100-5p的抗病毒作用。此外, 研究发现SHVV感染SSN-1细胞后3 h, 可见miR-100-5p表达明显上调, 但随后miR-100-5p的表达量开始逐渐下降, 直至感染后24 h时, miR-100-5p较病毒感染前表达下调了约90%。至于miR-100-5p在病毒感染的早期表达上调, 而在病毒感染的晚期表达下调的原因, 有待于进一步研究。

天然免疫是机体对抗病毒感染的第一道防线, 干扰素是天然免疫反应中的重要组成部分。

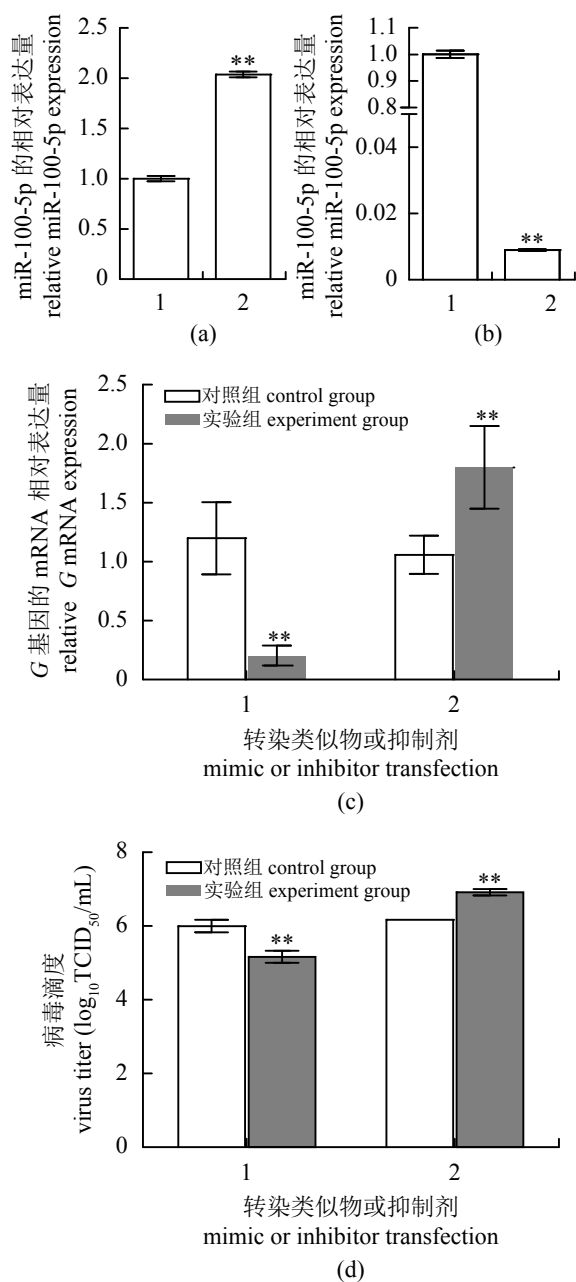


图4 miR-100-5p抑制SHVV在SSN-1细胞中增殖

(a) miR-100-5p 类似物增强miR-100-5p表达, (b) miR-100-5p 抑制剂抑制miR-100-5p表达, (c) 过表达或抑制表达miR-100-5p对SHVV病毒增殖的影响, (d) 过表达或抑制表达miR-100-5p对SHVV病毒滴度的影响; (a) 1. 阴性对照类似物, 2. miR-100-5p类似物; (b) 1. 阴性对照抑制剂, 2. miR-100-5p抑制剂; (c) (d) 1. 类似物, 2. 抑制剂

#### Fig. 4 miR-100-5p inhibits SHVV replication in SSN-1 cells

(a) miR-100-5p mimic promotes the expression of miR-100-5p, (b) miR-100-5p inhibitor decreases the expression of miR-100-5p, (c) effect of miR-100-5p overexpression or depletion on SHVV replication in SSN-1 cells, (d) effect of miR-100-5p overexpression or depletion on SHVV titers in SSN-1 cells; (a) 1. NC mimic, 2. miR-100-5p mimic; (b) 1. NC inhibitor, 2. miR-100-5p inhibitor; (c) (d) 1. mimic, 2. inhibitor

病毒感染宿主细胞后可以通过调节miRNA的表达来降低细胞的抗病毒免疫反应, 实现免疫逃逸。miR-155靶向细胞因子信号转导抑制因子1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)促进干扰素合成, 抑制水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)<sup>[22]</sup>和BDV的增殖<sup>[18]</sup>; miR-30c靶向Janus激酶1 (Janus kinase 1, JAK1) 促进猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)<sup>[36]</sup>。本研究发现, miR-100-5p抑制SHVV增殖, 但是干扰素的表达水平并无显著性变化, 表明miR-100-5p的抗病毒作用并不是通过调节干扰素的表达实现的。目前的研究表明, miR-100-5p主要参与调节肿瘤的发生和生长, 调控细胞凋亡或者自噬。在肝癌细胞中miR-100-5p促进细胞自噬, 抑制肿瘤生长<sup>[37]</sup>。HBV感染过程中, miR-100可以通过促进自噬的产生进而促进病毒增殖<sup>[38]</sup>。miR-100-5p调控细胞自噬, 抑制人巨细胞病毒 (human Cytomegalovirus, HCMV)增殖<sup>[39]</sup>。沉默miR-100-5p可以引起Trypsin表达上调, 促进细胞凋亡<sup>[27]</sup>, 抑制对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)增殖<sup>[26]</sup>。经过靶基因预测分析, miR-100-5p并不直接靶向SHVV的基因组, 但是由于乌鳢没有基因组序列, 无法进行宿主靶基因预测, 因此, 后期要通过转录组测序寻找与SHVV增殖密切相关miRNA的宿主靶基因, 阐明miRNA如何通过靶向宿主靶基因调节SHVV增殖。

综上所述, 本研究通过miRNA高通量测序分别研究了高丰度miRNA和低丰度miRNA对病毒增殖的影响, 发现miR-150、miR-216b和miR-100-5p具有抗病毒作用。目前针对乌鳃水泡病毒尚无有效的防治手段, 因此, 本研究为研制抗乌鳃水泡病毒的核酸类药物奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Lytle J R, Yario T A, Steitz J A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(23): 9667-9672.
- [2] Zheng Q L, Hou J, Zhou Y, *et al.* Type I IFN-inducible downregulation of microRNA-27a feedback inhibits antiviral innate response by upregulating siglec1/TRIM-27[J]. The Journal of Immunology, 2016, 196(3): 1317-

- 1326.
- [ 3 ] Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of micro-RNA function[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2007, 32(4): 189-197.
- [ 4 ] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [ 5 ] He L, Hannon G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5(7): 522-531.
- [ 6 ] Pasquinelli A E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13(4): 271-282.
- [ 7 ] Cullen B R. How do viruses avoid inhibition by endogenous cellular microRNAs?[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(11): e1003694.
- [ 8 ] Zhu B B, Ye J, Ashraf U, *et al.* Transcriptional regulation of miR-15b by c-Rel and CREB in Japanese encephalitis virus infection[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 22581.
- [ 9 ] Kim G W, Lee S H, Cho H, *et al.* Hepatitis C virus core protein promotes miR-122 destabilization by inhibiting GLD-2[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(7): e1005714.
- [10] Xu X P, Yuan J, Yang L W, *et al.* The Dorsal/miR-1959/cactus feedback loop facilitates the infection of WSSV in *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 56: 397-401.
- [11] Slonchak A, Shannon R P, Pali G, *et al.* Human MicroRNA miR-532-5p exhibits antiviral activity against west nile virus via suppression of host genes SESTD1 and TAB 3 required for virus replication[J]. Journal of Virology, 2015, 90(5): 2388-2402.
- [12] Kaewkascholkul N, Somboonviwat K, Asakawa S, *et al.* Shrimp miRNAs regulate innate immune response against white spot syndrome virus infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 60: 191-201.
- [13] Chen Z, Ye J, Ashraf U, *et al.* MicroRNA-33a-5p modulates Japanese encephalitis virus replication by targeting eukaryotic translation elongation factor 1A1[J]. Journal of Virology, 2016, 90(7): 3722-3734.
- [14] Zhu B, Ye J, Nie Y, *et al.* MicroRNA-15b modulates Japanese encephalitis virus-mediated inflammation via targeting RNF125[J]. The Journal of Immunology, 2015, 195(5): 2251-2262.
- [15] Zhang Q, Guo X K, Gao L, *et al.* MicroRNA-23 inhibits PRRSV replication by directly targeting PRRSV RNA and possibly by upregulating type I interferons[J]. Virology, 2014, 450-451: 182-195.
- [16] Ashraf U, Zhu B B, Ye J, *et al.* MicroRNA-19b-3p modulates Japanese encephalitis virus-mediated inflammation via targeting RNF11[J]. Journal of Virology, 2016, 90(9): 4780-4795.
- [17] Qian J, Zhai A X, Kao W P, *et al.* Modulation of miR-122 on persistently Borna disease virus infected human oligodendroglial cells[J]. Antiviral Research, 2010, 87(2): 249-256.
- [18] Zhai A X, Qian J, Kao W P, *et al.* Borna disease virus encoded phosphoprotein inhibits host innate immunity by regulating miR-155[J]. Antiviral Research, 2013, 98(1): 66-75.
- [19] Henke J I, Goergen D, Zheng J F, *et al.* microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA[J]. The EMBO Journal, 2008, 27(24): 3300-3310.
- [20] Liu X D, Wen Y, Hu X Q, *et al.* Breaking the host range: mandarin fish is susceptible to a vesiculovirus derived from snakehead fish[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(4): 775-781.
- [21] Wang W W, Asim M, Yi L Z, *et al.* Abortive infection of snakehead fish vesiculovirus in ZF4 cells was associated with the RLRs pathway activation by viral replicative intermediates[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(3): 6235-6250.
- [22] Wang P, Hou J, Lin L, *et al.* Inducible microRNA-155 feedback promotes type I IFN signaling in antiviral innate immunity by targeting suppressor of cytokine signaling 1[J]. The Journal of Immunology, 2010, 185(10): 6226-6233.
- [23] Liu X D, Tu J G, Yuan J F, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in snakehead fish cell line upon snakehead fish vesiculovirus infection[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(2): 154.
- [24] Mullokandov G, Baccarini A, Ruzo A, *et al.* High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries[J]. Nature Methods, 2012, 9(8): 840-846.
- [25] Selitsky S R, Baran-Gale J, Honda M, *et al.* Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C[J]. Scientific



- fic Reports, 2015, 5: 7675.
- [26] Wang Z, Zhu F. MicroRNA-100 is involved in shrimp immune response to white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio alginolyticus* infection[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42334.
- [27] Yang L, Yang G, Zhang X B. The miR-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 146-153.
- [28] Lu M, Zhang P J, Li C H, *et al.* MiR-31 modulates coelomocytes ROS production via targeting p105 in *Vibrio splendidus* challenged sea cucumber *Apostichopus japonicus* *in vitro* and *in vivo*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 293-299.
- [29] Li G X, Zhao Y L, Wen L, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in the spleen of common carp immune organ[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2014, 115(10): 1768-1778.
- [30] Nicoli S, Knyphausen C P, Zhu L J, *et al.* miR-221 is required for endothelial tip cell behaviors during vascular development[J]. Developmental Cell, 2012, 22(2): 418-429.
- [31] 项荣, 梁龙, 刘艳平. 病毒miRNA与免疫逃逸[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(9): 924-930.  
Xiang R, Liang L, Liu Y P. Viral miRNAs and immune evasion[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2012, 34(9): 924-930(in Chinese).
- [32] Yan Y, Guo C Y, Ni S W, *et al.* Singapore grouper iridovirus (SGIV) encoded SGIV-miR-13 attenuates viral infection via modulating major capsid protein expression[J]. Virus Research, 2015, 205: 45-53.
- [33] Chen W J, Yi L Z, Feng S S, *et al.* Characterization of microRNAs in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fin cells upon red-spotted grouper nervous necrosis virus infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 63: 228-236.
- [34] Zhu X, He Z J, Hu Y W, *et al.* MicroRNA-30e<sup>\*</sup> suppresses dengue virus replication by promoting NF- $\kappa$ B-dependent IFN production[J]. Virus Research, 2014, 8(8): e3088.
- [35] Li Z H, Chen B B, Feng M, *et al.* MicroRNA-23b promotes avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) replication by targeting IRF1[J]. Virus Research, 2015, 5: 10294.
- [36] Zhang Q, Huang C, Yang Q, *et al.* MicroRNA-30c modulates type I IFN responses to facilitate porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by targeting JAK1[J]. The Journal of Immunology, 2016, 196(5): 2272-2282.
- [37] Ge Y Y, Shi Q, Zheng Z Y, *et al.* MicroRNA-100 promotes the autophagy of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the expression of mTOR and IGF-1R[J]. Virus Research, 2014, 5(15): 6218-6228.
- [38] Lin Y, Deng W Y, Pang J K, *et al.* The microRNA-99 family modulates hepatitis B virus replication by promoting IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling-induced autophagy[J]. Cellular Microbiology, 2017, 19(5): e12709.
- [39] Wang F Z, Weber F, Croce C, *et al.* Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication[J]. Journal of Virology, 2008, 82(18): 9065-9074.

## Effects of miRNA on snakehead vesiculovirus (SHVV) infection in stripped snakehead (SSN-1) cells

YI Lizhu<sup>1,2</sup>, XU Zhen<sup>1</sup>, LIN Li<sup>1,2</sup>, TU Jiagang<sup>1\*</sup>

(1. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** In order to study the effects of miRNAs in stripped snakehead (SSN-1) cell line upon snakehead vesiculovirus (SHVV) infection, SHVV-infected and mock-infected SSN-1 cells were analyzed by miRNA high-throughput sequencing. The expression levels of twenty-two miRNAs with levels equal to or higher than 1 000 reads per million ( $TPM \geq 1\ 000$ ) were determined by qRT-PCR with *U6*,  *$\beta$ -actin*, and *5S rRNA* as internal control. When *U6* gene was used as internal control, no significant changes were observed for  *$\beta$ -actin* upon SHVV infection, while *5S rRNA* was upregulated in SSN-1 cells upon SHVV infection. The results showed that *U6* gene or  *$\beta$ -actin* could be used as internal control genes for miRNAs in SSN-1 cells. Furthermore, fourteen miRNAs were selected and their effects on SHVV replication were analyzed. The results showed that eleven miRNAs (miR-27a-3p, miR-26a-5p, miR-30e-3p, etc.) promoted, whereas miR-150 and miR-216b suppressed, SHVV replication. Next, we found that high-expression miR-100-5p was upregulated at early stage of SHVV infection, while downregulated at later stage. Overexpression of miR-100-5p exhibited significant suppression of SHVV replication, while inhibition of expression of miR-100-5p promoted SHVV replication. Our findings presented valuable information for the study of molecular drugs against SHVV.

**Key words:** snakehead vesiculovirus; SSN-1 cells; miR-100-5p; antiviral

**Corresponding author:** TU Jiagang. E-mail: tujiagang@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31602195)