

lncRNA 在乙脑病毒感染 PK15 细胞过程中的作用研究

杜程涛, 汪 涵, 杨松柏, 李向臣, 周晓龙*, 赵阿勇*

(浙江农林大学动物科技学院, 临安 311300)

摘要: 本研究旨在初步探索乙脑病毒(JEV)感染 PK15 细胞后的增殖情况, 筛选与病毒感染相关的 lncRNA, 并对其亚细胞定位及靶基因预测。通过免疫荧光试验来检测病毒结构蛋白 E 的表达情况, 采用 TCID₅₀ 法检测 PK15 细胞中病毒的增殖情况, 利用实时荧光定量 PCR 检测病毒感染后 lncRNA 的表达水平, 在 NONCODE 数据库对 lncRNA 进行亚细胞定位, 通过 starBase、NONCODE、KEGG 等数据库对其进行靶基因预测和信号通路分析。结果显示, JEV 感染 PK15 细胞后, 24~36 h 为病毒滴度指数增长期, 感染后 36 h 病毒滴度已达 $10^{-5.75}$ TCID₅₀/mL。PK15 细胞在感染 JEV 12 h 后, lncRNA A、B、C 表达水平均无显著变化 ($P > 0.05$), lncRNA D 表达水平极显著下降 ($P < 0.01$); 感染 JEV 24、36 和 48 h 后 lncRNA A、B、C 表达水平极显著上升 ($P < 0.01$), lncRNA D 表达水平极显著下降 ($P < 0.01$)。lncRNA A 主要定位在胞质溶胶, lncRNA B 在细胞核和细胞质中均有分布, lncRNA C 主要定位在细胞质中, 在细胞核中也有可能分布, lncRNA D 可能在细胞内呈现广泛性分布。通过靶基因预测和信号通路分析, lncRNA A、B、C 的靶基因主要为 *OAS1*、*OAS2*、*OASL*、*COX1* 等, lncRNA D 的靶基因主要为 *DST*、*ND1*、*ND2*、*ND4* 等。信号通路分析发现 lncRNA 可能通过肿瘤坏死因子(TNF)、NF- κ B 和 Toll 样受体(TLR)等信号通路参与病毒感染后的增殖过程。本研究为进一步探索宿主细胞 lncRNA 对病毒增殖的影响奠定一定的基础。

关键词: lncRNA; PK15 细胞; 乙脑病毒(JEV); 增殖

中图分类号: S828

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.07.020

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the Role of lncRNA in the Process of Japanese Encephalitis Virus Infecting PK15 Cells

DU Chengtao, WANG Han, YANG Songbai, LI Xiangchen, ZHOU Xiaolong*, ZHAO Ayong*

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University,

Lin'an 311300, China)

Abstract: The aim of this study was to initially explore the proliferation of Japanese encephalitis virus (JEV) infected with PK15 cells, screen the lncRNAs associated with viral infections, and predict its subcellular localization and target genes. The expression of viral structural protein E was detected by immunofluorescence, the proliferation of virus in PK15 cells was detected by TCID₅₀ method, and Real-time PCR was used to detect the expression level of lncRNA after viral infection. Subcellular localization of lncRNA was carried out in the NONCODE database, target gene prediction and signal pathway analysis were performed by starBase, NONCODE, KEGG and other databases. The results showed that after infection of PK15 cells by JEV, the viral titer increased exponentially from 24 to 36 h, and the virus titer reached $10^{-5.75}$ TCID₅₀/mL at 36 h after

收稿日期: 2019-01-23

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY19C170003、LY19C170002); 浙江农林大学启动基金(W20180043)

作者简介: 杜程涛(1994-), 男, 浙江临安人, 硕士生, 研究方向: 动物遗传育种, E-mail: 1135373859@qq.com

* 通信作者: 周晓龙(1983-), 男, 安徽淮北人, 博士, 讲师, 研究方向: 动物分子遗传育种和抗病育种, E-mail: zhouxiaolong@zafu.edu.cn

赵阿勇(1967-), 男, 安徽滁州人, 博士, 教授, 研究方向: 家禽家畜遗传育种, E-mail: zay503@zafu.edu.cn

infection. There was no significant change in the expression of lncRNA A, B and C in PK15 cells after 12 h of infection ($P > 0.05$), and the expression level of lncRNA D was extremely significantly decreased ($P < 0.01$). The expression levels of lncRNA A, B and C increased extremely significantly after 24, 36 and 48 h of infection ($P < 0.01$), and the expression level of lncRNA D extremely significantly decreased ($P < 0.01$). lncRNA A was mainly localized in the cytosol, lncRNA B was distributed in the nucleus and cytoplasm, lncRNA C was mainly located in the cytoplasm and might also be distributed in the nucleus, lncRNA D might be widely distributed in the cell. Through target gene prediction and signal pathway analysis, the target genes of lncRNA A, B and C were mainly *OAS1*, *OAS2*, *OASL* and *COX1*, etc. The target genes of lncRNA D were mainly *DST*, *ND1*, *ND2*, *ND4* and so on. Signal pathway analysis revealed that lncRNA might participate in the proliferation process after viral infection through signaling pathways such as TNF, NF- κ B and TLR. This study laid a foundation for further exploration of the effect of host cell lncRNA on viral proliferation.

Key words: lncRNA; PK15 cells; Japanese encephalitis virus (JEV); proliferation

流行性乙型脑炎是由乙脑病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 引起的蚊媒性人畜共患病, 主要在亚洲和环太平洋各国发生。猪是 JEV 最主要的自然增殖和越冬宿主, 在“猪—蚊—人”传播中扮演着十分重要的角色, 在中国感染猪群的 JEV 主要是基因 I 型和 III 型^[1]。目前, JEV 仍是影响猪繁殖力的重要因素之一, 猪不分品种和性别均易感, 以每年的 7~9 月份发生感染较多, 感染率高, 发病率 20%~30%。妊娠母猪感染 JEV 会导致流产, 产出死胎、弱胎和木乃伊胎; 染病公猪发生睾丸炎、睾丸缩小、变硬甚至丧失产精功能, 最终失去配种繁殖的能力而被淘汰; 仔猪也会因 JEV 引发的脑炎病死, 从而影响猪群数量的扩大, 造成巨大的经济损失, 严重影响养猪业的发展^[2-3]。由于大量使用疫苗和传统兽药在一定程度上对机体的抗病力和环境产生不利影响, 所以寻求抗病毒的分子试剂对于防治 JEV 引起的疾病具有重要意义。

JEV 是一种急性传染病毒, 属于黄病毒科黄病毒属。病毒基因组为单股正链 RNA, 全长 11 kb, 自 5' 至 3' 依次为结构蛋白 C、E、M 及非结构蛋白 NS1~NS5, 病毒 RNA 在宿主细胞的胞浆内直接作为 mRNA 翻译出结构蛋白和非结构蛋白, 并在胞浆粗面内质网装配成熟, 最终出芽释放^[4]。目前关于 JEV 入侵宿主细胞的分子机制已有了较系统的研究。研究发现, 在小鼠和大鼠神经元细胞中, JEV 进入细胞主要依赖于发动蛋白 (dynamin) 和膜穴样凹陷介导的胞吞作用^[5-6], 但在 C6/36、Vero、PK15 等细胞中 JEV 的入侵是依赖网格状蛋白的^[7-9]。Yang 等^[10]研究发现, 网格状蛋白介导的胞吞途径

在 JEV 入侵 PK15 细胞过程中发挥关键作用。Liu 等^[11]研究发现, 在 BHK21 细胞中网格状蛋白介导了 JEV 颗粒内吞进入细胞的过程, 之后经囊泡 Rab5 蛋白传递运输至循环囊泡 Rab11, 最后将病毒传递给溶酶体。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度 > 200 nt 的非编码 RNA, 起初被认为是基因组转录的“噪音”, 不具有生物学功能。近年来, 国内外学者对 lncRNA 的关注度日益增高, 研究表明, lncRNA 在转录水平调控、染色体修饰、表观遗传调控和核内运输等生命活动中发挥重要作用^[12-13]。lncRNA 作为一种功能多样性的非编码 RNA 也在抗病育种相关研究中受到广泛关注。越来越多证据表明, 病毒感染后宿主 lncRNA 的转录也随之发生较大变化, lncRNA 可在病毒感染引起的宿主反应和天然免疫等过程中发挥重要作用^[14-15]。本试验通过对 JEV 感染后 lncRNA 表达情况的研究和靶基因分析, 推测 lncRNA 可能在 JEV 感染细胞过程中发挥重要作用, 以期为进一步探索 lncRNA 对病毒感染增殖过程的影响提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及毒株 PK15 细胞购自 ATCC 细胞库, 所用的病毒为 JEV 弱毒株 SA14-14-2。

1.1.2 主要试剂和仪器 FBS (SH30087.02)、MEM 培养基 (SH30024.01)、PBS (SH30256.01) 均购自 HyClone 公司; BSA (NYBIO, Y4180C)、96 孔板和细胞培养皿均购自杭州诺扬生物技术有限公

司;鼠单克隆抗体 JE1(Abcam, ab41671)购自艾博抗(上海)贸易有限公司;Alexa Fluor 488 标记山羊抗鼠二抗(ThermoFisher, A28175)购自 Thermo 公司;反转录试剂盒(TaKaRa, RR036A)购自北京宝日生物技术有限公司;甲醇购自上海凌峰化学试剂有限公司;Tritonx-100(Aladdin, T109026)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;DAPI(Solarbio, C0060)、4%多聚甲醛(BBI life science)均购自北京索莱宝科技有限公司。

CO₂ 培养箱(Thermo Scientific)购自杭州宝诚生物技术有限公司;荧光显微镜(Nikon, C-SHG1)购自上海千欣仪器有限公司;实时荧光定量 PCR 仪(CFX96 Touch)购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 用含有 10% FBS、1% 双抗的 MEM 培养基培养 PK15 细胞,放入饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞长到 70% 汇合度时,加入 JEV 弱毒株 SA14-14-2 感染细胞 1 h,用 PBS 洗去未吸附的病毒,接着用含有 2% FBS 的 MEM 培养基继续培养至汇合度 80% 以上用于后续试验。

1.2.2 免疫荧光试验检测病毒结构蛋白 E 的表达 将培养至贴壁的细胞在 PBS 中清洗 3 次,然后加入含 4% 多聚甲醛的 PBS 中室温固定 30 min 或 4 °C 过夜,用 PBS 清洗 3 次,洗去多余多聚甲醛,每次 5 min;100% 甲醇处理 10 min, PBS 洗 2 遍后,每次 5 min;然后用含有 (0.3% Tritonx-100, 1% BSA) 的 PBS 封闭 1~2 h,用封闭液稀释一抗,然后

取适量滴在细胞上,贴上封口膜放入湿盒中 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min,用封闭液配制的相应二抗孵育 45~60 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min, DAPI 染色 15 min 检测 DNA,将盖玻片细胞面盖向 Vectashield 液滴中,用荧光显微镜观察并拍照。

1.2.3 病毒滴度检测 JEV 感染 PK15 细胞后在 12、24、36 和 48 h 后收集病毒,将病毒液连续 10 倍梯度稀释 (10⁻¹ 至 10⁻⁸),将稀释好的病毒接种到含有 PK15 细胞的 96 孔板中,每一梯度接种 8 孔, 100 μL/孔。逐日观察细胞病变情况,根据 Reed-Muench 两氏法计算病毒滴度,得到病毒的 TCID₅₀ 值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测病毒感染后 lncRNA 的表达水平 用 Primer Premier 5.0 对 NON-CODE 数据库获取的 lncRNA A、B、C 和 D 的转录本序列设计扩增引物,引物信息见表 1。以猪的 GAPDH 基因作为内参基因(上游引物:5'-GGAC-TCATGACCACGGTCCAT-3';下游引物:5'-TCA-GATCCACAACCGACACGT-3',预期扩增产物大小为 220 bp)。通过 Trizol 法提取总 RNA,利用反转录试剂盒反转录为 cDNA。用所设计的 lncRNA 扩增引物进行 lncRNA 的实时荧光定量 PCR 反应。反应体系 20 μL;SYBR Premix 10 μL,上、下游引物各 0.4 μL,Rox 0.4 μL,模板 2 μL,ddH₂O 6.8 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。熔解曲线分析:95 °C 5 s,然后以 0.5 °C/5 s 的速度从 65 °C 升到 95 °C。最终采用 2^{-ΔΔCt} 方法^[10] 计算 lncRNA 不同感染时间的表达情况。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences information

lncRNA	NONCODE 登录号 NONCODE accession No.	引物序列 Primer sequences (5'→3')	产物长度 Product length/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
lncRNA A	NONSUSG008652.1	F:CTCCTGGAGACAAGAATGCC R:GGATGTCTCCGATCCTAAA	187	58
lncRNA B	NONSUSG003879.1	F:CACCCGTTTCTTGCTGTC R:GTGAGTGTCCACCCTTGC	171	60
lncRNA C	NONSUSG012753.1	F:TGTCACCTCCTTTCACCAG R:TGTACCAGGCAGACAGAGC	156	57
lncRNA D	NONSUSG013927.1	F:GTGAGCATCTGGGATTGC R:TGGCAGAGGCTGTGAGAA	140	61

1.2.5 lncRNA 生物信息学分析 通过 NON-CODE 数据库获取目的 lncRNA 的转录本序列,把 lncRNA 的转录本序列输入 lncloactor 数据库,预测 lncRNA 在细胞中的定位。通过 starBase、NON-

CODE、ENSEMBL、NCBI、Uniprot、GO、KEGG 等数据库,结合 lncRNA ID 及序列进行靶基因预测,并分析靶基因相关的信号通路。

2 结果

2.1 JEV 感染猪 PK15 细胞后结构蛋白 E 的表达情况

JEV 感染 PK15 细胞后,用 4% 多聚甲醛固定细胞,通过免疫荧光试验检测 JEV 结构蛋白 E 的表达。结果显示,JEV 感染后 12 h 后 JEV 结构蛋白 E

(JE1) 表达量较低(图 1A);感染后 24 h 后 JE1 蛋白表达与 12 h 相比无明显上升(图 1B),说明此时病毒增殖处于相对静止期,感染后 36 和 48 h 后 JE1 的表达明显上升(图 1C、1D),说明此时病毒增殖不受宿主细胞控制,快速增殖。

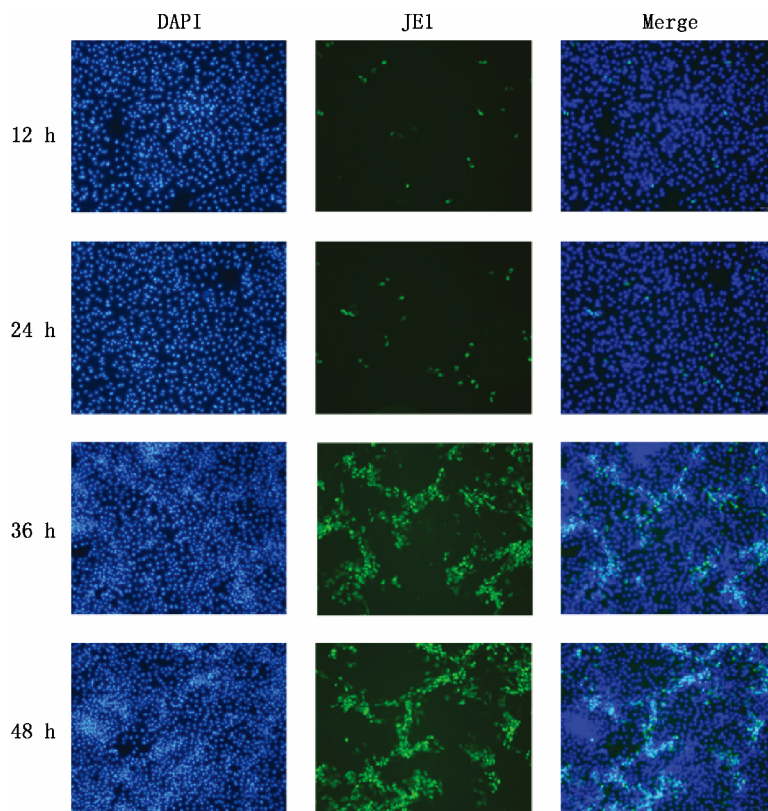


图 1 JEV 感染 PK15 细胞后结构蛋白 E 的表达情况(200×)

Fig. 1 Expression of structural protein E after JEV infecting PK15 cells (200×)

2.2 JEV 滴度检测

为确定 JEV 在 PK15 细胞中的增殖情况,在不同时间段收集病毒,通过 TCID₅₀ 法检测病毒滴度,

结果显示,JEV 感染 PK15 细胞 24~36 h 为病毒滴度指数增长期,在 JEV 感染后 36 h 病毒滴度已经达到较高的水平,为 $10^{-5.75}$ TCID₅₀/mL(图 2)。

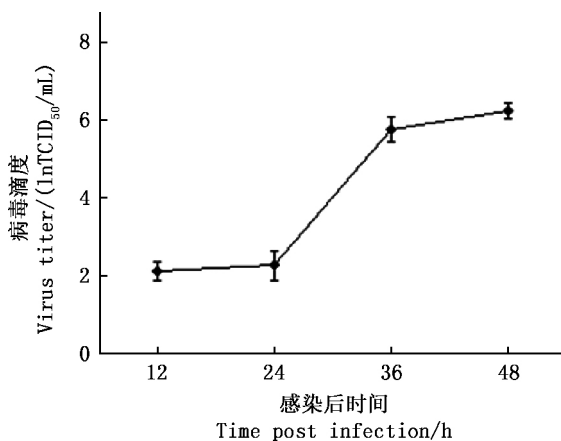


图 2 TCID₅₀ 法检测 JEV 滴度

Fig. 2 JEV titer detected by TCID₅₀ method

2.3 感染 JEV 后 lncRNA 的表达变化

利用实时荧光定量 PCR 技术检测 JEV 感染后 4 个 lncRNAs 表达水平的变化, 结果见表 2。由表 2 可知, 与对照组相比, JEV 感染后 12 h, lncRNA A、B、C 的表达水平无显著变化 ($P > 0.05$), lncRNA D 的表达水平极显著下降 ($P < 0.01$); JEV 感染后 24、36 和 48 h, lncRNA A、B、C 的表达水平均极显

著升高 ($P < 0.01$), lncRNA D 的表达水平极显著下降 ($P < 0.01$), 其中, JEV 感染后 36 h, lncRNA A、B、C 的表达水平极显著高于其他时间点 ($P < 0.01$), JEV 感染后 24 和 48 h 两个时间点 lncRNA A、B、C 的表达水平差异不显著 ($P > 0.05$); JEV 感染后 36 和 48 h, lncRNA D 的表达水平极显著低于其他时间点 ($P < 0.01$)。

表 2 JEV 感染 PK15 细胞后 lncRNA mRNA 的表达情况

Table 2 Expression of lncRNA mRNA after JEV infecting PK15 cells

时间 Time/h	lncRNA A	lncRNA B	lncRNA C	lncRNA D
0	1.6440 ± 0.1583 ^{Aa}	1.1750 ± 0.1462 ^{Aa}	1.1505 ± 0.1948 ^{Aa}	1.0361 ± 0.1066 ^{Aa}
12	1.8288 ± 0.1391 ^{Aa}	5.3637 ± 0.2983 ^{Aa}	1.2127 ± 0.2436 ^{Aa}	0.7697 ± 0.0156 ^{Bb}
24	10.9972 ± 1.0707 ^{Bb}	16.8138 ± 2.5147 ^{Bb}	3.1624 ± 0.3910 ^{Bb}	0.6448 ± 0.0643 ^{Bb}
36	21.3278 ± 3.8104 ^{Cc}	52.7228 ± 2.6425 ^{Cc}	16.8463 ± 1.3513 ^{Cc}	0.3180 ± 0.0147 ^{Cc}
48	13.1605 ± 0.3831 ^{Bb}	12.1553 ± 0.9465 ^{Bb}	3.5477 ± 0.3954 ^{Bb}	0.4687 ± 0.0258 ^{Cc}

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 肩标不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$); 肩标相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$); And with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$); While with the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$)

2.4 lncRNA 亚细胞定位分析

通过亚细胞定位发现, lncRNA A 主要定位在胞质溶胶 (细胞质基质), lncRNA B 在细胞核和细

胞质中均有分布, lncRNA C 主要定位在细胞质中, 细胞核中也有可能分布, lncRNA D 则可能在细胞内呈现广泛性分布 (表 3)。

表 3 lncRNA 在细胞中的分布

Table 3 The distribution of lncRNA in cells

lncRNAs	基因组定位 Genomic mapping	亚细胞富集区域 Subcellular enrichment region
lncRNA A	2+ : 140104129~140219380	胞质溶胶
lncRNA B	13+ : 111049457~111051173	细胞核和细胞质
lncRNA C	6- : 57881490~57882031	细胞核和细胞质
lncRNA D	7+ : 39210680~39218730	细胞核、细胞质、核糖体和胞质溶胶

+, lncRNA 定位于染色体正义链; -, lncRNA 定位于染色体反义链

+, lncRNA localizes to the chromosomal sense strand; -, lncRNA localizes to the chromosome antisense strand

2.5 靶基因预测和信号通路分析

通过 starBase、NONCODE、GO 和 KEGG 等数据库对筛选的基因进行靶基因预测和信号通路分析, 发现 lncRNA A、B 和 C 的靶基因主要为 OAS1、OAS2、OASL、COX1 和 ZBP1 等, lncRNA D 的靶

基因主要为 DST、ND1、ND2 和 ND4 等 (表 4)。信号通路分析发现, lncRNA 可能通过 TNF、NF- κ B 和 Toll 样受体 (TLR) 等信号通路参与病毒感染后的增殖过程。

表 4 靶基因预测和信号通路分析

Table 4 Target gene prediction and signal pathway analysis

lncRNAs	靶基因 Target genes
lncRNA A	OAS1、OAS2、OASL、PML、ARHGEF2、COX1、S100A14
lncRNA B	COX1、OAS1、OAS2、OASL、IL6、ZBP1、PML、ARHGEF2
lncRNA C	OAS1、OAS2、OASL、SOX9、IL6、ZBP1、IFIT1、PML、COX1
lncRNA D	ND1、ND2、ND4、FPGS、IFT140、ENSSSCG00000026691、ATG2B、DST

3 讨论

JEV 感染后一般会侵染中枢神经系统,病毒的大量复制会引发广泛的天然免疫,导致神经细胞坏死^[16]。JEV 引起的神经炎症主要与小胶质细胞的失控有关,小胶质细胞可释放炎症相关的细胞激素和趋化因子如白介素 1β (IL- 1β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1C(MCP1)等引起不可逆的炎症反应导致神经坏死,且小胶质细胞还可作为 JEV 的长期容器^[17]。miRNA 调控 JEV 复制和增殖的分子机制已有了较多的研究^[18-21],目前 lncRNA 对 JEV 增殖的影响研究相对较少。Bhattacharyya 等^[22]研究表明,lncRNA Malat1 通过 PERK 内质网应激信号通路在 JEV 感染的小鼠 Neuro2a 细胞中显著上调;Li 等^[23]研究发现,沉默 lncRNAE52329 和 N54010 可通过降低 JNK 和 MKK4 的磷酸化水平调节 JEV 引起的小鼠小胶质细胞(BV2)的炎症反应。

JEV 感染宿主细胞后,细胞可通过基因、miRNA 等表达调控抑制病毒的增殖。Yang 等^[24]在 JEV 感染小鼠脑组织后,通过基因表达芯片分析发现 1 119 个基因差异表达,这些基因几乎涉及所有细胞信号通路。研究者在人和小鼠的小胶质细胞中研究发现,宿主细胞内的 miRNA 在 JEV 感染后也发生不同程度的差异表达,同时发现 miR-29b 和 miR-155 在激活宿主天然免疫抑制 JEV 增殖过程中发挥十分重要的作用^[25-26]。lncRNA 是一类不具有编码蛋白质功能的长链 RNA 分子,近年来 lncRNA 调控病毒感染和增殖的研究逐渐成为热点。Tao 等^[27]研究发现,lncRNA MEG3 在呼吸道合胞病毒(RSV)感染后表达受到抑制,MEG3 可通过抑制 TLR4 依赖的 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路抑制 RSV 对呼吸道上皮细胞感染。Zhang 等^[28]发现 lncRNA 在猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的猪天然免疫过程中也担负着重要的角色。lncRNA 还可作为登革热病毒感染引起的肝损伤的诊断标记和治疗靶点^[29-30]。有研究证明一些病毒可通过激活 NF- κ B 信号通路劫持 lncRNA 改变细胞代谢相关的酶如 GOT2(GOT2 主要富集在线粒体中)促进病毒自身的复制和增殖^[31-32]。因此,lncRNA 在细胞中不仅扮演着抗病毒的角色,也有可能成为病毒的帮凶。本研究发现,筛选的 lncRNA A、B、C、D 均有可能参与调控 JEV 感染细胞后的复制增殖过程,但其具体作用机制还有待于进一步深

入探索。

本研究结果表明,PK15 细胞感染 JEV 后,病毒滴度逐渐升高,细胞内的 lncRNA 的表达也呈现显著差异,尤其是在感染 JEV 后 36 h,lncRNA 的表达变化最为显著。综合实时荧光定量 PCR 结果发现,JEV 感染后 36 h,lncRNA 的表达显著上升,但 JEV 感染 48 h 后 lncRNA 的表达显著下降,因此推测 JEV 感染 PK15 细胞后,lncRNA 由于病毒感染刺激先上调表达水平,而之后的 36~48 h 之间可能由于某种机制,与天然免疫相关的 lncRNA 开始大量降解,病毒的复制也开始不受控制大量增殖,最终导致细胞病变死亡。Chiyomaru 等^[33]研究证明 miR-34a 可直接与 lncRNA-HOTAIR 结合,抑制 lncRNA-HOTAIR 的表达水平。lncRNA-UCA1 作为 miR-216b 的“分子海绵”,与其靶 mRNA 竞争 miR-216b,降低了游离 miR-216b 的含量,从而实现对基因的表达调控。但 lncRNA-UCA1 自身也是 miR-216b 的一个靶基因,miR-216b 降低 lncRNA-UCA1 的稳定性,促进其降解^[34]。microRNA 不仅可以促进 lncRNA 降解,也可通过靶向 DNMT3B 抑制其表达的方式上调 lncRNA-MEG3 的表达^[35]。通过靶基因预测和信号通路分析发现,lncRNA A、B 和 C 的靶基因主要为 OAS1、OAS2、OASL 和 COX1 等,lncRNA D 的靶基因主要为 DST、ND1、ND2 和 ND4 等。研究发现,OAS 和 OASL 基因为天然免疫相关的基因,在 PK15 细胞中过表达对于 JEV 的复制和增殖有很显著的抑制效果^[36]。COX 家族基因也跟病毒感染后增殖有关,Swarup 等^[37]研究发现,在 JEV 感染后抑制 COX2 可显著降低因病毒感染而引起的炎症反应,减轻对小鼠细胞的损伤^[37]。而 Li 等^[23]研究结果显示,lncRNA 主要通过 JNK 信号通路而不是 NF- κ B 通路调控 JEV 增殖,这可能是由于研究的物种不同所致。本研究初步探索的 lncRNA 可能在猪 JEV 增殖调控中发挥作用,具体的调控机制和信号通路还有待进一步研究。

4 结论

本研究发现,在 JEV 感染 PK15 细胞 36 h 后,病毒开始大量增殖,且细胞内 lncRNA A、B、C、D 表达水平呈显著差异。通过靶基因预测发现,筛选的 lncRNA 的靶基因 OAS 和 OASL(天然免疫相关的基因)对 JEV 的复制和增殖有显著的抑制作用,通过信号通路分析发现筛选的 lncRNA 可能通过

TNF、NF- κ B 和 Toll 样受体等通路调控病毒增殖。本研究结果为进一步探索 lncRNA 在 JEV 增殖过程中调控机制的研究提供一定理论依据。

参考文献 (References):

- [1] CHAI C, WANG Q, CAO S, et al. Serological and molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus infections in swine herds in China[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2018, 19(1): 151-155.
- [2] ZHANG Y, JING J, LI X, et al. Integration analysis of miRNA and mRNA expression profiles in swine testis cells infected with Japanese encephalitis virus[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 32: 342-347.
- [3] FAN J M, LUO J, CHEN L, et al. Genetic analysis of strains of Japanese encephalitis virus isolated from swine in central China[J]. *Virus Genes*, 2010, 40(3): 357-361.
- [4] YUN S I, LEE Y M. Japanese encephalitis: The virus and vaccines[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(2): 263-279.
- [5] ZHU Y Z, XU Q Q, WU D G, et al. Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13407-13422.
- [6] KALIA M, KHASA R, SHARMA M, et al. Japanese encephalitis virus infects neuronal cells through a clathrin-independent endocytic mechanism[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(1): 148-162.
- [7] YANG S, HE M H, LIU X D, et al. Japanese encephalitis virus infects porcine kidney epithelial PK15 cells via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis[J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 258.
- [8] CHUANG C K, YANG T H, CHEN T H, et al. Heat shock cognate protein 70 isoform D is required for clathrin-dependent endocytosis of Japanese encephalitis virus in C6/36 cells[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(Pt 4): 793-803.
- [9] NAWA M. Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine[J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84(7): 1737-1741.
- [10] YANG S B, PEI Y, LI X, et al. miR-124 attenuates Japanese encephalitis virus replication by targeting DNMT2[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 105.
- [11] LIU C C, ZHANG Y N, LI Z Y, et al. Rab5 and Rab11 are required for clathrin-dependent endocytosis of Japanese encephalitis virus in BHK-21 cells[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(19): e01113-17.
- [12] LAURENT G S, WAHLESTEDT C, KAPRANOV P. The landscape of long noncoding RNA classification[J]. *Trends in Genetics*, 2015, 31(5): 239-251.
- [13] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
- [14] LIU W W, CHAN D. Roles of lncRNAs in viral infections[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 205.
- [15] CARPENTER S, AIELLO D, ATIANAND M K, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. *Science*, 2013, 341(6147): 789-792.
- [16] CHEN C J, CHEN J H, CHEN S Y, et al. Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(22): 12107-12119.
- [17] SMITH J A, DAS A, RAY S K, et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases[J]. *Brain Research Bulletin*, 2012, 87(1): 10-20.
- [18] CHEN Z, YE J, ASHRAF U, et al. Modulates Japanese encephalitis virus replication by targeting eukaryotic translation elongation factor 1A1[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(7): 3722-3734.
- [19] ASHRAF U, ZHU 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.
- [20] CARDOSO A L, GUEDES J R, LIMA M C P D. Role of microRNAs in the regulation of innate immune cells under neuroinflammatory conditions[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2016, 26: 1-9.
- [21] RASTOGI M, SRIVASTAVA N, SINGH S K. Exploitation of microRNAs by Japanese encephalitis virus in human microglial cells[J]. *Journal of Medical Virology*, 2017, 90(4): 648-654.
- [22] BHATTACHARYYA S, VRATI S. The malat1 long non-coding RNA is upregulated by signalling through the PERK axis of unfolded protein response during flavivirus infection[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(11): 17794.
- [23] LI Y, ZHANG H, ZHU B, et al. Microarray analysis identifies the potential role of long non-coding RNA in regulating neuroinflammation during Japanese encephalitis virus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1237.
- [24] YANG Y, YE J, YANG X, et al. Japanese encephalitis

- virus infection induces changes of mRNA profile of mouse spleen and brain[J]. *Virology Journal*, 2011, 8:80.
- [25] PAREEK S, ROY S, KUMARI B, et al. miR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2014, 11(1):97.
- [26] THOUNAOJAM M C, KAUSHIK D K, KUNDU K, et al. MicroRNA-29b modulates Japanese encephalitis virus-induced microglia activation by targeting tumor necrosis factor alpha-induced protein 3[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2014, 129(1):143-154.
- [27] TAO X W, ZENG L K, WANG H Z, et al. LncRNA MEG3 ameliorates respiratory syncytial virus infection by suppressing TLR4 signaling[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(3):4138-4144.
- [28] ZHANG J, SUN P, GAN L, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA profiling in PRRSV-infected PAM cells by RNA sequencing[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):4952.
- [29] WANG X J, JIANG S C, WEI H X, et al. The differential expression and possible function of long noncoding RNAs in liver cells infected by dengue virus[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2017, 97(6):1904-1912.
- [30] FU N, ZHAO S X, KONG L B, et al. LncRNA-ATB/microRNA-200a/ β -catenin regulatory axis involved in the progression of HCV-related hepatic fibrosis[J]. *Gene*, 2017, 618:1-7.
- [31] KOTZIN J J, MOWEL W K, HENAOMEJIA J. Viruses hijack a host lncRNA to replicate[J]. *Science*, 2017, 358(6366):993-994.
- [32] WANG P, XU J, WANG Y, et al. An interferon-independent lncRNA promotes viral replication by modulating cellular metabolism[J]. *Science*, 2017, 358(6366):1051-1055.
- [33] CHIYOMARU T, YAMAMURA S, FUKUHARA S, et al. Genistein inhibits prostate cancer cell growth by targeting miR-34a and oncogenic HOTAIR[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e70372.
- [34] 郑 伟. LncRNA-miRNA-mRNA 相互作用初步研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- ZHENG W. Preliminary study on the interaction of LncRNA-miRNA-mRNA[D]. Beijing: Chinese Academy of Military Medical Sciences, 2017. (in Chinese)
- [35] JIA L F, WEI S B, GAN Y H, et al. Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 135(10):2282-2293.
- [36] LIU K, LIAO X, ZHOU B, et al. Porcine alpha interferon inhibit Japanese encephalitis virus replication by different ISGs *in vitro* [J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95(3):950-956.
- [37] SWARUP V, GHOSH J, GHOSH S, et al. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(9):3367-3370.

(责任编辑 董晓云)