

孙媛, 唐晓钰, 白杨, 等. MicroRNA-1285 及其靶标 DDX3X 对猪塞内卡病毒感染 PK-15 细胞的调控作用 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 357-366.
SUN Yuan, TANG Xiaoyu, BAI Yang, et al. Regulation effects of microRNA-1285 and its target DDX3X on Senecavirus A infected PK-15 cells[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 357-366.

MicroRNA-1285 及其靶标 DDX3X 对猪塞内卡病毒感染 PK-15 细胞的调控作用

孙媛[✉], 唐晓钰, 白杨, 陈雨琪, 郑瑶瑶, 吴佼玲, 蓝天, 马静云[✉]

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探究 MicroRNA-1285(miR-1285) 及其靶标 DDX3X 在猪塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 感染 PK-15 细胞中的调控作用。【方法】利用 qRT-PCR、双荧光素酶活性及 Western blot 等方法研究 miR-1285 和 DDX3X 对 I 型干扰素 (IFN- β) 分泌及 RIG-I 信号通路的作用, 分析 miR-1285 及 DDX3X 对 SVA 3C 蛋白基因表达的影响。【结果】SVA 感染 PK-15 细胞后, miR-1285 表达量显著升高, 并且 miR-1285 与 DDX3X 存在负靶向关系, 二者可促进 IFN- β 转录及蛋白水平的表达。miR-1285 通过靶向 DDX3X 对 RIG-I 信号通路中的 MAVS、TRAF3 信号分子起调控作用。对于 SVA 3C 蛋白基因, DDX3X 可以显著抑制其转录, 并且可以逆转 miR-1285 所诱导的上调趋势。【结论】SVA 感染 PK-15 细胞后, 宿主 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 IFN- β 及病毒 3C 蛋白的表达具有调控作用, 研究结果将为明确 miRNAs 调控 SVA 感染的分子机制奠定基础, 并为 SVA 的防控和诊断提供新的科学依据。

关键词: MicroRNA-1285; DDX3X; 猪塞内卡病毒; IFN- β ; RIG-I 信号通路

中图分类号: S852.42; S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0357-10

Regulation effects of microRNA-1285 and its target DDX3X on Senecavirus A infected PK-15 cells

SUN Yuan[✉], TANG Xiaoyu, BAI Yang, CHEN Yuqi, ZHENG Yaoyao, WU Jiaoling, LAN Tian, MA Jingyun[✉]
(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To explore the regulation roles of microRNA-1285 (miR-1285) and its target DDX3X in Senecavirus A (SVA) infected PK-15 cells. 【Method】By qRT-PCR, double luciferase activity and Western blot, the effects of miR-1285 and its target DDX3X on IFN- β secretion and the RIG-I signaling pathway were studied, and their effects on the expression of SVA 3C protein gene were analyzed. 【Result】In SVA infected PK-15 cells, the expression of miR-1285 increased significantly, and there was a negative targeting relationship between miR-1285 and DDX3X. Both miR-1285 and DDX3X promoted the transcription and protein expression of IFN- β . MiR-1285 regulated MAVS and TRAF3 signaling molecules in the RIG-I signaling pathway by targeting DDX3X. For SVA 3C protein, DDX3X significantly inhibited the transcription of 3C and reversed the

收稿日期: 2022-05-19 网络首发时间: 2023-03-08 17:26:10

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230307.1759.004.html>

作者简介: 孙媛, 讲师, 博士, 主要从事动物健康养殖与疫病防控研究, E-mail: sunyuan@scau.edu.cn; 通信作者: 马静云, 教授, 博士, 主要从事动物健康养殖与综合防控研究, E-mail: majy2400@scau.edu.cn

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2020A1515010295, 2022A1515012473)

up-regulation trend induced by miR-1285. 【Conclusion】 After infecting PK-15 cells with SVA, host miR-1285 and its target DDX3X can regulate the expression of IFN-β and the viral 3C protein, which will lay a foundation for clarifying the molecular mechanism of miRNAs regulating SVA infection, and provide a new scientific basis for the prevention, control and diagnosis of SVA.

Key words: MiRNA-1285; DDX3X; Senecavirus A; IFN-β; RIG-I signal pathway

MicroRNA(miRNA) 是一类长度为 20~24 bp 的内源性非编码小 RNA, 广泛参与各种生理和病理过程, 包括抗病毒天然免疫反应^[1] 等。对大多数细胞来说, 干扰素 (Interferon, IFN) 免疫反应是宿主抵御病毒感染的第 1 道防线。许多研究指出, miRNA 可以靶向抗病毒天然免疫反应的关键信号分子, 以调节 IFN 的表达^[2-3]。MiRNA-1285 (miR-1285) 于 2008 年首次在人类胚胎干细胞中被发现^[4], 并于 2014 年在猪的 1 号染色体中被记录^[5]。目前, 关于 miR-1285 的研究主要集中在肿瘤方面。如在肺鳞状细胞癌^[6] 和甲状腺肿瘤^[7] 中, miR-1285 可以作为潜在的生物标记物; 在肝细胞癌^[8] 和胰腺癌^[9] 中, miR-1285 具有抑癌作用。除了肿瘤方面, 最近的 1 项研究还发现, 在暴露于铜离子环境的空肠上皮细胞中, 线粒体定位的 miR-1285 具有调控线粒体功能障碍和有丝分裂吞噬的重要作用^[10]。X 染色体编码的 DDX3X 属于 DEAD-box RNA 解旋酶超家族 2 成员, 在各种组织中广泛表达^[11]。DDX3X 参与众多细胞生理过程, 包括细胞周期调节^[12]、先天免疫反应^[13]、凋亡^[14] 和肿瘤发生^[15] 等。在抗病毒先天免疫中, DDX3X 可以与 RIG-I/MDA5、NF-κB 等信号通路的许多重要信号分子相互作用, 以诱导 IFN 表达^[16-19]。

猪 A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 隶属于小 RNA 病毒科 Picornaviridae 塞内卡病毒属 *Senecavirus*, 是该属唯一成员^[20]。SVA 是一种新近出现的传染性病原, 能引发猪特发性水疱病, 临床表现与口蹄疫症状极为相似^[21-24]。自 2015 年巴西^[25] 报道 SVA 感染导致大规模仔猪死亡以来, 美国^[26]、加拿大^[27]、中国^[28]、泰国^[29]、哥伦比亚^[30]、越南^[31] 等多个国家陆续出现了 SVA 疫情, 给全球养猪业造成了巨大的经济损失。SVA 感染在我国华南^[32]、华中^[33]、东南^[34]、东北^[35] 等多个地区的猪场均有报道。上述 SVA 的研究主要集中于临床症状、传播途径、检测方法、分子流行病学等内容, 有关 SVA 与宿主 miRNAs 互作的研究鲜见报道。因此, 本研究拟从 miRNAs 角度, 探究 miR-1285 及其靶标 DDX3X 在抗 SVA 感染天然免疫应答中的作用, 为

SVA 感染的诊断和防控提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒株、质粒及菌种 本研究涉及的猪传代肾细胞 PK-15 由华南农业大学健康养殖与生物安全研究室 (本实验室) 保存, SVA CH-01-2015 分离株 (KT321458) 由本实验室分离鉴定并保存。pmirGLO 载体、pET-32a(+) 载体、大肠埃希菌感受态细胞 DH5α、BL21(DE3) 由本实验室保存, pMD[®]19-T 载体购自广州瑞真生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂与用品 细胞与病毒培养相关试剂: 胎牛血清、DMEM、0.25%(w) 胰蛋白酶购自 GIBCO 公司, 转染试剂 jetPRIME[®] 购自 Polyplus 公司, miRNA mimics 及 inhibitor、siRNA 由上海吉玛公司合成。

分子生物学相关试剂: RNAiso Plus、PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、2×Ex Taq[®]、dNTP Mixture、10× Loading Buffer、T4 DNA 连接酶、蛋白 Marker 等购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *Xho* I、*Sal* I、*Eco*R I 等购自 NEB 公司; Dual-Glo[®] Luciferase Assay System、GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 2× 购自 Promega 公司; E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit、E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I 购自 Omega 公司; ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit 购自 TOYOBO 公司; Zero Background TA TOPO Cloning Kit 为 Clone Smarter 产品, 购自中美泰和生物技术有限公司; Ni-NTA Beads 购自常州天地人和生物技术有限公司; 2× RealStar Green Fast Mixture、RIPA 细胞裂解液和 BCA 法总蛋白测定试剂盒购自北京 GenStar 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; Bulge-Loop[™] miRNA qRT-PCR Starter Kit、Bulge-Loop[™] miRNA Forward Primer 购自广州锐博生物科技有限公司。

蛋白抗体与 IFN-β 检测试剂盒—— Anti-His(mouse)、Anti-β-actin(rabbit) 单克隆抗体、Goat-

anti-mouse(HRP) 酶标二抗购自 Proteintech 公司, Goat-anti-mouse(Alexa Fluor 594) 荧光二抗购自 abcam 公司, Anti-DDX3X(pig) 多克隆抗体购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 以每孔 1×10^6 个细胞的密度将 PK-15 细胞接种至适合的培养皿中, 在含 10%(φ) 胎牛血清的 DMEM 培养液中于 37℃、5%(φ) CO₂ 条件下培养。当 PK-15 细胞聚合密度大于 90% 时进行传代, 吸出培养液后用无菌、pH 7.2 的 PBS 缓冲液清洗 2 遍, 加入含 0.25%(w) 胰蛋白酶的 EDTA, 放置培养箱中消化 2 min 左右, 在显微镜下观察, 细胞变圆、分散时弃去胰蛋白酶终止消化, 加入含 10%(φ) 胎牛血清的细胞培养液继续培养。

1.2.2 SVA 感染 取细胞聚合密度大于 80%~90%、生长状态良好的细胞, 吸出培养液, PBS 缓冲液清洗 2 遍, SVA CH-01-2015 病毒液接毒, 感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)=1.5, 2 h 后用 PBS 缓冲液清洗并更换为含有 2%(φ) 胎牛血清的培养液, 在不同时间点分别收取细胞 RNA 与细胞培养上清液, 设未感染 SVA 组为阴性对照组 (CK), 每组 3 次重复, 3 个平行, 装入 2 mL 离心管于 -80℃ 保存。

1.2.3 转染 以每孔 1×10^6 个细胞的密度将 PK-15 细胞接种至 6 孔细胞培养板, 在含 10%(φ) 胎牛血清的 DMEM 培养液中于 37℃、5%(φ)CO₂ 条件下培养, 当细胞聚合密度达 50%~60% 时转染 100 pmol miR-1285mimics、inhibitor 或 pEGFP-DDX3X-p、si-DDX3X 质粒至 PK-15 细胞, 转染 24 h 后以 1 MOI 剂量 SVA 接种 PK-15 细胞, 24 h 后收集细胞总 RNA, 48 h 收集细胞总蛋白, 72 h 收集病毒液。所用寡核苷酸序列分别为: miR - 1285 mimics 正链 5' - CUGGGCAACAUAGCGAGACCCCGU - 3'、负链 5' - GGGGUCUCGCUAUGUUGCCAGUU - 3'及 miR - 1285 inhibitor 5' - ACGGGGUCUCGCUAUGUUGCCAG - 3'; DDX3X 正链 5' - ACAGCAGTTTTGGATCCCGT - 3'、负链 5' - GTCACCTTCGTCCACGGTCAT - 3'及 si-DDX3X 正链 5' - GCUGAUGGAUGUUGGAUATT - 3'、负链 5' - UAUCCAACAUCCGAUCAGCTT - 3'。

1.2.4 RNA 提取及 qRT-PCR 采用 RNAiso Plus 抽提 PK-15 细胞样品中总 RNA。弃去培养液, 用 PBS 缓冲液清洗细胞, 按 0.1~0.2 mL/cm² 的剂量加入 RNAiso Plus 后轻微晃动, 将内含细胞的裂解

液转移至离心管中, 室温静置 5 min 后依次加入三氯甲烷等, 具体方法参照 RNAiso Plus RNA 提取试剂说明书。将抽提出的 RNA 白色沉淀用 30 μ L DEPC 水溶解, 用核酸蛋白测定仪测定总 RNA 质量浓度, 记录 RNA 质量浓度和 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$, 分装后 -80℃ 保存或直接用于反转录。miRNA qRT-PCR 反应参照 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (加尾法) 说明书, 具体反应程序: 95℃ 预变性 10 min, 以 95℃ 变性 2 s、60℃ 退火 20 s、70℃ 延伸 10 s 进行 40 个循环。每个反应设置 3 次重复, 并设立阴性对照 (CK)。mRNA qRT-PCR 反应: 参照 HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 说明书进行。qRT-PCR 反应程序: 95℃ 预变性 2 min, 以 95℃ 变性 15 s、各温度退火 20 s、72℃ 延伸 30 s 进行 40 个循环。每个反应设置 3 次重复, 并设立阴性对照 (CK)。各基因引物序列见表 1。

1.2.5 双荧光素酶活性检测 在 6 孔细胞培养板中培养细胞, 待细胞聚合密度达到 60%~80% 时进行转染试验。根据试验需要在 1.5 mL 离心管中加入 2 μ g DNA 和 80 pmol miR-1285 mimics 或者 inhibitor 以及 200 μ L jetPRIME[®] buffer, 涡旋震荡混匀。在混合试剂中加入 4~6 μ L jetPRIME[®], 涡旋震荡 10 s, 室温孵育 10 min。将转染混合物逐滴加入含 2%(φ) 胎牛血清细胞培养基的细胞培养 6 孔板中, 轻柔摇匀, 根据需要在转染 4 h 后进行换液。将 5 $\times$ Passive Lysis Buffer (PLB) 用双蒸水稀释为 1 $\times$ PLB, 4℃ 条件下储存。细胞转染 24 h 后, 观察细胞状态是否良好, 用预冷的 PBS 清洗细胞 3 遍, 吸尽 PBS 加入 500 μ L PLB。室温下在摇床上裂解细胞 15 min。在 96 孔板中每孔加入 20 μ L PLB 裂解液, 随后加入 100 μ L LAR II, 检测萤火虫荧光素酶活性。检测结束后, 加入 100 μ L Stop & Glo[®] Reagent, 测量海肾荧光素酶活性。

1.2.6 Western blot 转染 48 h 后提取细胞总蛋白, 具体步骤参照 RIPA 强裂解液说明书进行。使用 BCA 法测定蛋白质质量浓度, 然后将样品分装, -20℃ 条件下保存。组装电泳装置, 加入电泳液, 以 70 V 电泳 40 min, 再以恒压 140 V 电泳, 使蛋白充分分离。裂解产物通过 100 g/L 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 并转移到 Immobilon-P 膜 (EMD Millipore, USA) 上。在含 0.1%(φ) 吐温 20 的 TBST(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0、150 mmol/L NaCl) 中用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h。封闭后使用稀释好的一抗孵育 1 h 后使用

表 1 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of genes

基因名称 Gene name	引物/探针序列(5'→3') Primer/Probe sequence	$\theta_{退火}/\text{ }^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	产物大小/bp Product size	文献 Reference
<i>RIG-I</i>	F: ATCCCAGCAACGAGAA R: GCCACGTCCAGTCAAT	60	188	[36]
<i>MDA5</i>	F: GAGGAATCAGCACGAGGAA R: GTCAGTAATCCACTGGGA	58	73	[37]
<i>MAVS</i>	F: ATAGCCAGCCTTTCTCGG R: TAGCCTCAGTCTTGACCTCTTC	60	237	[36]
<i>TRAF3</i>	F: GTGTCAAGAAGGCATCG R: CCTCAAACCTGGCAATCA	60	164	[36]
<i>TANK</i>	F: GGACGCCTTGAACACCTGT R: GCCTGCCGAAAGGCTTCATA	60	119	
<i>TBK1</i>	F: GCCTTTCTCGGGGTCTTCAA R: ACACTTTTCCTGATCCGCCT	60	74	
<i>IRF3</i>	F: CCAGTGGTGCCTACACTCCT R: AGAGGTGTCTGGCTCAGGAA	61	191	[38]
<i>IRF7</i>	F: CGCCTCCTGAAAAACCAA R: CCCTGAGTTGTCCTGCAACA	60	76	[37]
<i>IFN-β</i>	F: GCTAACAAGTGCATCCTCCAAA R: AGCACATCATAGCTCATGGAAAGA	60	77	[39]
<i>GAPDH</i>	F: ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA R: GATCGAGTTGGGGCTGTGACT	60	106	[40]
<i>SVA-3C</i>	F: GAGCTTCAATCTCCTAGA R: GTGTCATCATTCCTCGTTAG	59	115	
探针 Probe	CAGACATTCGAGCCAAGCAACAA	69		

TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 5 min。将 PVDF 膜放入稀释好的二抗中孵育 30 min 后洗涤 3 次, 每次 5 min。避光配制发光液, 将发光液加至 PVDF 膜表面后放入化学发光仪中显影。

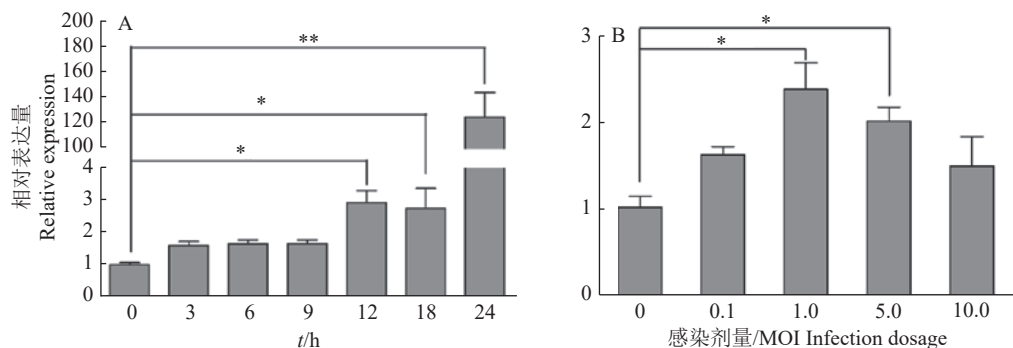
1.2.7 数据分析 试验所得数据使用统计软件 SPSS 19.0 进行分析。针对干扰试验中的 3 组数据进行单因素方差分析, 若差异显著, 则对组间进行 Duncan’s 多重比较; 其他数据之间进行独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 视为差异显著, 数据用平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 SVA 感染 PK-15 细胞后 miR-1285 表达显著上调

本研究前期转录组学分析发现, SVA 感染

PK-15 细胞后 miR-1285 显著上调。为了确定 miR-1285 在 SVA 感染中的潜在作用, 本研究首先利用 qRT-PCR 检测了 miR-1285 在 SVA 感染的 PK-15 细胞中的表达。如图 1A 所示, 1.5 MOI SVA 感染 PK-15 细胞后, miR-1285 的表达随着时间的延长逐渐增加, 在感染 24 h 时极显著增加 (*P* < 0.01)。当 SVA 分别以 0.1 MOI、1.0 MOI、5.0 MOI 和 10.0 MOI 的剂量感染 PK-15 细胞后, miR-1285 基因拷贝数在 1.0 MOI 时达到最高水平; 之后, 随着病毒接毒剂量的增加, miR-1285 的表达逐渐减少, 但当 SVA 感染量为 5.0 MOI 时, 差异仍然显著 (*P* < 0.05)(图 1B)。上述结果表明, 在 SVA 感染的 PK-15 细胞中 miR-1285 的表达上调, 并且其表达在一定范围内随着病毒剂量和感染时间的增加而增加。



“*” “**” 分别表示处理与对照在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平差异显著 (Duncan's 法)
“*” and “**” represented statistical difference in comparison with control group at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels respectively (Duncan's method)

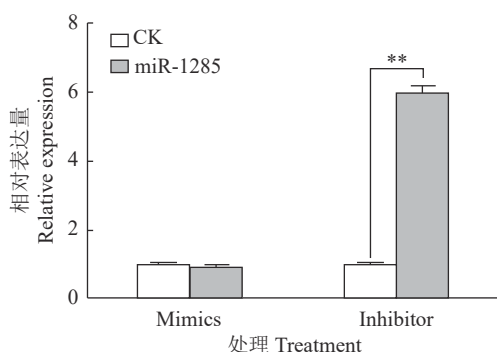
图 1 不同 SVA 感染时间 (A) 和感染剂量 (B) 条件下 PK-15 细胞中 miR-1285 的表达量

Fig. 1 Expression of miR-1285 in PK-15 cells infected by SVA at different infection time (A) and dosages (B)

2.2 miR-1285 靶基因预测及验证

为了进一步探讨 miR-1285 在 SVA 感染中的作用, 利用 MiRanda 软件预测 PK-15 细胞中 miR-1285 的潜在靶点。基于生物信息学分析, miR-1285 在 DDX3X 的 3'-UTR 中具有靶向位点 (图 2)。为了验证预测结果, 将 miR-1285 mimics、inhibitor 分别转染 PK-15 细胞, 检测细胞中 DDX3X 的 mRNA 和蛋白表达。Western blot 结果显示, 转染 miR-1285 mimics 的细胞与阴性对照组相比, DDX3X 蛋白的表达没有变化; 但转染 miR-1285 inhibitor 的 PK-15 细胞中, DDX3X 蛋白的表达显著增加 (图 3), 且与荧光定量检测结果 ($P < 0.01$) (图 4) 一致。为了进一步确定 miR-1285 和 DDX3X 之间的靶向关系, 将 DDX3X 野生型质粒、缺失及突变质粒分别转染到 PK-15 细胞。双荧光素酶分析显示, 与对照组相比, 在含有 DDX3X 野生型质粒的细胞中, miR-1285 mimics 的相对荧光素酶活性被显著抑制 ($P < 0.05$) (图 5)。上述结果说明, miR-1285 通过

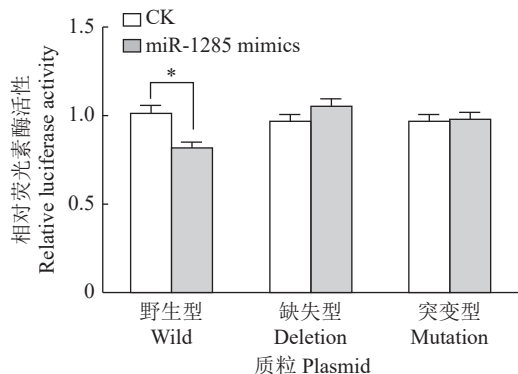
结合 PK-15 细胞中的 3'-UTR 靶向 DDX3X, 并且 miR-1285 和 DDX3X 之间存在负靶向关系。



“**”表示处理与对照在 $P < 0.01$ 水平差异显著 (Duncan's 法)
 “***” represented statistical difference in comparison with control group at
 $P < 0.01$ level (Duncan's method)

图4 转染 miR-1285 mimics、inhibitor 至 PK-15 细胞后 DDX3X 的 mRNA 相对表达量

Fig. 4 The relative expression of DDX3X mRNA after transfection of miR-1285 mimics and inhibitor into PK-15 cells



“*”表示处理与对照在 $P < 0.05$ 水平差异显著 (Duncan's 法)
 “*” represented statistical difference in comparison with control group at $P < 0.05$ level (Duncan's method)

图5 转染不同 DDX3X 重组载体质粒至 PK-15 细胞后 miR-1285 双荧光素酶活性

Fig. 5 The relative dual-luciferase activity of miR-1285 after transfection of different DDX3X recombinant vector plasmids into PK-15 cells

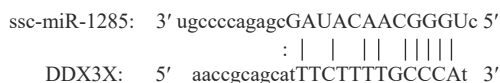


图 2 miR-1285 与 DDX3X 的靶向结合位点

Fig.2 Targeted binding site between miR-1285 and DDX3X

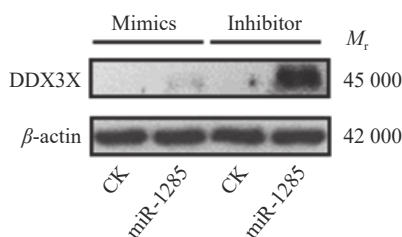


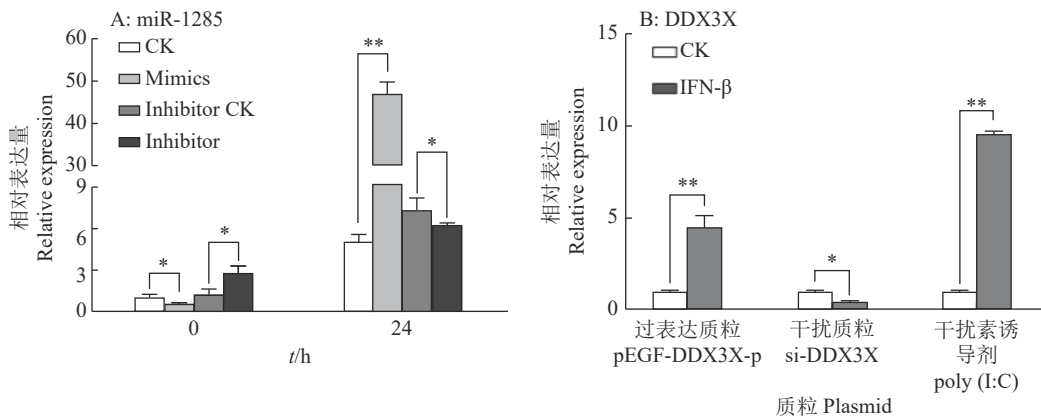
图3 转染 miR-1285 mimics、inhibitor 至 PK-15 细胞后 DDX3X 蛋白的表达

Fig. 3 DDX3X protein expression after the transfection of miR-1285 mimics, inhibitor into PK-15 cells

2.3 miR-1285 及其靶标 DDX3X 促进 IFN-β 表达

为了探究 miR-1285 与 SVA、IFN-β 的关系, 将 miR-1285 mimics、inhibitor 转染至 PK-15 细胞, 24 h 后感染 1 MOI SVA。qRT-PCR 结果如图 6A 所示, 与对照组相比, 过表达 miR-1285 后 IFN-β mRNA 转录水平显著下调, 干扰 miR-1285 时 IFN-β 则显著上调 ($P < 0.05$); 然而当 PK-15 受到 SVA 病毒感染后, 过表达 miR-1285 可极显著促进 IFN-β 的转录 ($P < 0.01$), 干扰 miR-1285 时 IFN-β mRNA 转录水平显著下调 ($P < 0.05$)。同样, 为了研究 DDX3X 对 SVA 感染 PK-15 细胞后 IFN-β 表达的影响, 将 DDX3X 过表达和干扰质粒分别转染细胞, 24 h 后以 1 MOI SVA 攻毒细胞, 检测

IFN-β 表达情况, 结果如图 6B 所示, 过表达 DDX3X 可极显著促进 IFN-β 的转录水平 ($P < 0.01$), 干扰 DDX3X 可明显抑制 IFN-β 的表达 ($P < 0.05$)。Western blot 分析结果与荧光定量结果一致, 在 SVA 感染 48 h 的 PK-15 细胞中, 过表达 miR-1285 可促进 IFN-β 蛋白的表达, 当 miR-1285 被抑制时, IFN-β 的蛋白水平与对照组细胞中的蛋白水平相似 (图 7A); 同样过表达 DDX3X 能够促进 IFN-β 蛋白的表达, 干扰 DDX3X 的 INF-β 表达量与对照组相似 (图 7B)。上述结果表明, SVA 感染 PK-15 细胞后 miR-1285 及其靶标 DDX3X 都能促进 IFN-β 分泌。



“*” 和 “**” 分别表示处理与对照在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平差异显著 (Duncan’s 法)
“*” and “**” represented statistical difference in comparison with control group at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels respectively (Duncan’s method)

图 6 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 IFN-β mRNA 表达的调控作用

Fig. 6 Regulation effects of miR-1285 and its target DDX3X on the mRNA expression of IFN-β

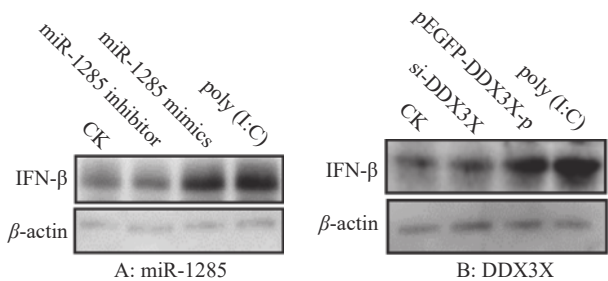


图 7 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 IFN-β 蛋白表达的调控作用

Fig. 7 Regulation effects of miR-1285 and its target DDX3X on the protein expression of IFN-β

2.4 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 RIG-I 信号通路中关键信号分子的影响

为了探究 miR-1285 及其靶标 DDX3X 与 RIG-I 信号通路的关系, 分别转染 miR-1285 mimics、inhibitor 或将 si-DDX3X 转染至 PK-15 细胞, qRT-PCR 检测 RIG-I 信号通路关键信号分子 mRNA 相

对表达量, 结果如图 8、9 所示。相比于对照组, 转染 miR-1285 mimics 后 MAVS、TRAF3、IRF3、IRF7 表达量显著降低 ($P < 0.05$), 其他分子转录无明显差异。转染 miR-1285 inhibitor 后 IRF3 转录水平显著上调 ($P < 0.05$), 其他分子的转录水平则无明显变化。当沉默 DDX3X 时, 与对照组相比, 接头分子中 MDA5、TANK、TBK1 表达量显著上调 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 而 MAVS、TRAF3 表达量显著下调 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$), 其他分子无明显变化 (图 9)。

2.5 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 SVA 3C 表达的调控

为了更好地理解 miR-1285、DDX3X 和 SVA 之间的关系, 将 miR-1285-mimics、inhibitor, si-DDX3X 和 DDX3X 过表达质粒转染 PK-15 细胞, 24 h 后 SVA 感染细胞, 分析 SVA 3C 的表达情况。结果 (图 10) 显示, 在转染 miR-1285 mimics、inhibitor 的细胞中, 3C mRNA 的表达分别略有增加

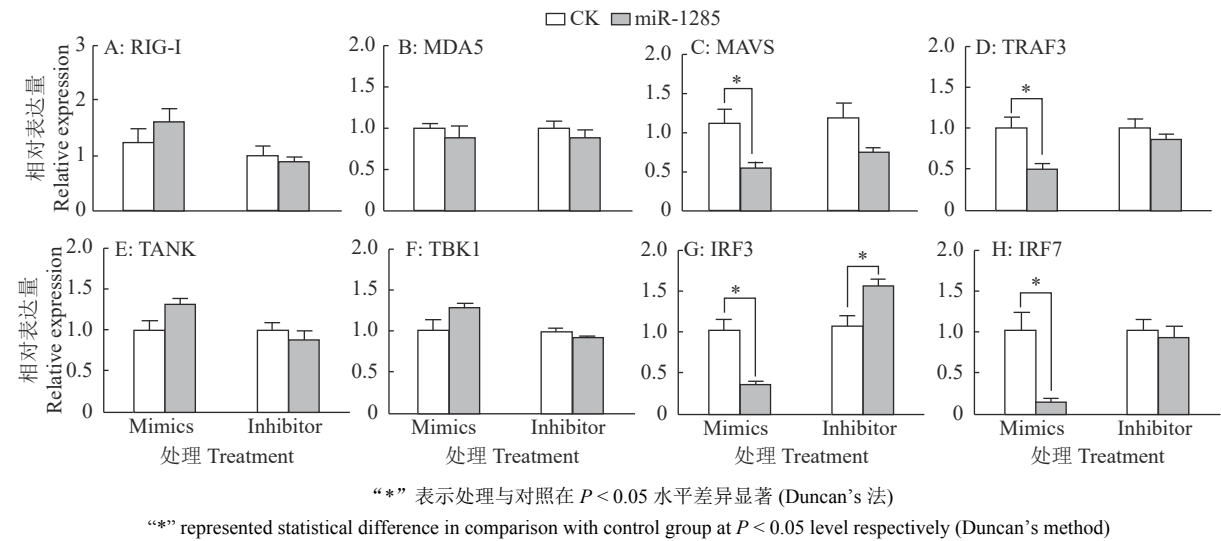


图 8 miR-1285 对 RIG-I 通路信号转导分子的影响

Fig. 8 Effects of miR-1285 on signal transduction molecules of the RIG-I pathway

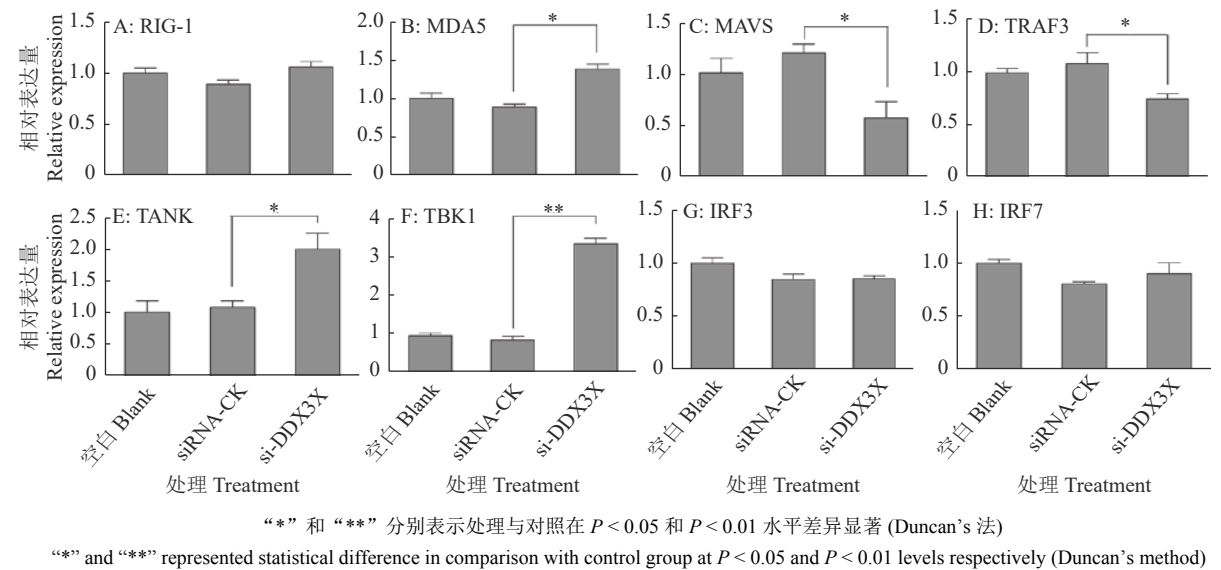


图 9 DDX3X 沉默对 RIG-I 通路信号转导分子的影响

Fig. 9 Effects of DDX3X silencing on signal transduction molecules of the RIG-I pathway

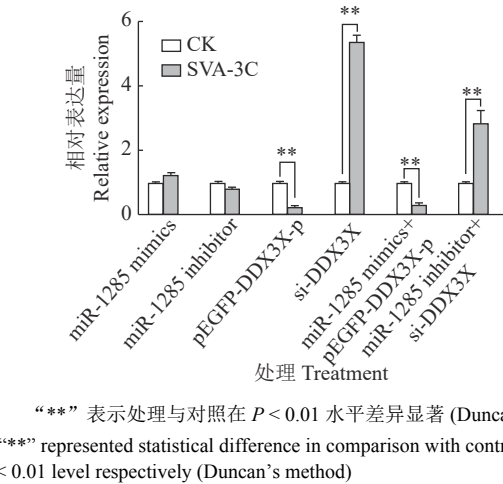


图 10 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 SVA 3C 表达的影响
Fig. 10 Effects of miR-1285 and its target DDX3X on the expression of SVA 3C

和减少。然而,在 DDX3X 过表达的细胞中, SVA 3C 的产生被极显著阻断 ($P < 0.01$), 当 DDX3X 沉默时, 病毒表达极显著增加 ($P < 0.01$)。更重要的是, 当 miR-1285 mimics 和 DDX3X 过表达质粒共同转染细胞时, SVA 3C 表达极显著下调 ($P < 0.01$), 当 miR-1285 inhibitor 和 si-DDX3X 质粒一起转染细胞时, 3C 生成极显著增加 ($P < 0.01$)(图 10)。总之, miR-1285 可以促进 SVA 3C 的产生, 但这种趋势在统计学上并不显著, 而 DDX3X 能显著阻断 3C 的表达, 并能逆转 miR-1285 诱导的表达增加趋势。

3 讨论与结论

3.1 SVA 感染 PK-15 细胞诱发 miR-1285 高表达
作为小 RNA 病毒科新发现的成员, 宿主

miRNAs 在 SVA 感染中的作用尚不明确。本研究试验结果显示 miR-1285 的表达在 SVA 感染 PK-15 细胞后被激活, 并且 miR-1285 的表达量随着 SVA 感染时间的延长和接毒剂量的提高而增加。大量报道表明, miR-1285 在肺癌、胰腺癌、非侵入性滤泡性甲状腺肿瘤等肿瘤细胞和肝硬化、沙眼患者组织中均有差异性表达, 提示 miR-1285 可能在肿瘤细胞行为中起关键作用^[7, 41-45], 而 SVA 早期主要作为溶瘤细胞进行研究, 可有效治疗一些神经内分泌肿瘤, 如非小细胞肺癌等^[45]。在 SVA 感染的 PK-15 细胞里发现显著差异表达的 miR-1285, 揭示二者具有潜在的联系。同时, 本试验还发现, miR-1285 与 DDX3X 存在着负靶向调控关系, miR-1285 可通过与 DDX3X 的 3'-UTR 序列结合而抑制后者转录和蛋白水平的表达。在 SVA 感染的 PK-15 细胞中发现高表达的 miR-1285 及其靶标 DDX3X, 揭示了 SVA 与宿主 miRNAs 的互作关系。

3.2 miR-1285 及其靶标 DDX3X 在先天免疫应答中的作用

先天免疫是宿主抵抗病毒感染的第一道防线, 而 I 型 IFN 在抗病毒免疫应答中起着重要作用^[46]。对于大多数 RNA 病毒而言, 双链 RNA(dsRNA) 是一种复制中间产物, 先天免疫反应中主要被宿主的 RIG-I 和 MDA5 蛋白基因识别, 从而激活下游 IFN 的产生^[47-48]。本研究结果表明, 在 SVA 感染的 PK-15 细胞里, miR-1285 及其靶标 DDX3X 均能在转录和蛋白水平显著促进 IFN-β 的分泌。进一步探究二者对 RIG-I 信号通路关键分子的作用, 发现当过表达 miR-1285 时, RIG-I 信号通路中 MAVS、TRAF3 转录水平显著降低, 此结果与干扰 DDX3X 时一致, 提示 miR-1285 可能通过靶向 DDX3X 作用于 MAVS、TRAF3, 从而调控 IFN 的表达。本试验结果还显示, 当干扰 DDX3X 时, MDA-5、TANK、TBK1 表达量显著上调。众多报道表明, DDX3X 与 RIG-I 信号通路关系密切。例如, DDX3X 可通过影响 MAVS 而上调 IFN-β 的表达^[18]。Chen 等^[49]发现, DDX3X 与 MAVS、TBK1、IKKε 共定位, 过表达 DDX3X 可抑制 PRRSV 复制。其他研究则表明, PRRSV 的 Nsp2 蛋白能阻碍 DDX3X 激活 MAVS 诱导的 IFN-β 启动子, 从而促进病毒复制^[50]。本研究揭示了在 SVA 感染的 PK-15 细胞中, miR-1285 及其靶标 DDX3X 在先天免疫应答中的潜在作用机制, 丰富了对 miR-1285 及 DDX3X 功能的认识。

3.3 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 SVA 3C 蛋白基因复制的影响

小 RNA 病毒的 3C 蛋白对促进病毒 mRNA 的

翻译和复制有重要的作用^[51]。有关 SVA 3C 的研究表明, 3C 蛋白可以通过切割 MAVS、TRIF 和 TANK 以及具有蛋白酶活性的 IRF3/7 来抑制宿主的先天免疫反应^[52]。还有报道发现, 3C 可诱导细胞凋亡^[53] 或作为一种病毒性二肽酶促进病毒复制^[54]。上述研究提示, SVA 3C 蛋白在病毒感染过程中发挥重要功能。因此, 本研究分析了 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 SVA 3C 表达的影响。结果显示, 相对于对照组, 过表达 miR-1285 对 SVC 3C 的转录有促进作用, miR-1285 受抑制时 SVC 3C 的表达量下调, 但上述作用均不明显。相反, DDX3X 过表达可以显著抑制 SVA 3C 的表达; 并且, 同时过表达 miR-1285 及其靶标 DDX3X, SVA 3C 表达量仍然显著下调; 说明, DDX3X 可以逆转 miR-1285 诱导的上调趋势。虽然 DDX3X 对 SVA 的复制有抑制作用, 但推测 SVA 感染后, 这种作用被 miR-1285 阻断, 因为 miR-1285 负靶向调控 DDX3X, 即抑制其表达。本研究探究了 miR-1285 及其靶标 DDX3X 对 SVA 3C 蛋白基因复制的作用, 以期 SVA 的防控提供参考。

3.4 结论

SVA 感染 PK-15 细胞后, miR-1285 表达量显著上调, miR-1285 可显著促进 IFN-β 转录和蛋白水平的表达。miR-1285 通过靶向 DDX3X 对 RIG-I 信号通路发挥作用。DDX3X 对 SVA3C 蛋白的表达有抑制作用, 并且可逆转 miR-1285 诱导的上调趋势。本研究探究了 SVA 感染 PK-15 细胞后, 宿主 miR-1285 及其靶标 DDX3X 的作用, 研究结果将为 SVA 的防控提供新的思路和方法。

参考文献:

[1] YATES L A, NORBURY C J, GIBERT R J C. The long and short of microRNA[J]. *Cell*, 2013, 153(3): 516-519.
[2] CHENG J, WU R, LONG L, et al. MiRNA-451a targets IFN regulatory factor 8 for the progression of systemic lupus erythematosus[J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 676-687.
[3] WANG L, ZHOU L, HU D, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses post-transcriptionally the protein expression of IFN-β by upregulating cellular microRNAs in porcine alveolar macrophages in vitro[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 15(1): 115-126.
[4] MORIN R D, O'CONNOR M D, GRIFFITH M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells[J]. *Genome Research*, 2008, 18(4): 610-621.
[5] ANTHON C, TAHER H, HAVGAARD J H, et al. Structured RNAs and syntenic regions in the pig genome[J].

- BMC Genomics*, 2014, 15: 459. doi: 10.1186/1471-2164-15-459.
- [6] GAO X, WANG Y, ZHAO H, et al. Plasma miR-324-3p and miR-1285 as diagnostic and prognostic biomarkers for early stage lung squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 59664-59675.
- [7] BORRELLI N, DENARO M, UGOLINI C, et al. MiRNA expression profiling of ‘noninvasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features’ compared with adenomas and infiltrative follicular variants of papillary thyroid carcinomas[J]. *Modern Pathology*, 2017, 30(1): 39-51.
- [8] LIU J, YAN J, ZHOU C, et al. MiR-1285-3p acts as a potential tumor suppressor miRNA via down regulating JUN expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36: 219-225.
- [9] HUANG H, XIONG G, SHEN P, et al. MicroRNA-1285 inhibits malignant biological behaviors of human pancreatic cancer cells by negative regulation of YAP1[J]. *Neoplasma*, 2017, 64(3): 358-366.
- [10] LIAO J, LI Q, HU Z, et al. Mitochondrial miR-1285 regulates copper-induced mitochondrial dysfunction and mitophagy by impairing IDH2 in pig jejunal epithelial cells[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 422: 126899. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126899.
- [11] VENKATARAMANNAN S, GADEK M, CALVIELLO L, et al. DDX3X and DDX3Y are redundant in protein synthesis[J]. *RNA*, 2021, 27(12): 1577-1588.
- [12] VAN VOSS M R H, KAMMERS K, VESUNA F, et al. Global effects of DDX3 inhibition on cell cycle regulation identified by a combined phosphoproteomics and single cell tracking approach[J]. *Translational Oncology*, 2018, 11(3): 755-763.
- [13] HEATON S M, BORG N A, DIXIT V M. Ubiquitin in the activation and attenuation of innate antiviral immunity[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(1): 1-13.
- [14] HATHAICHOTI S, VISITNONTACHAI D, NGAM-SIRI P, et al. Paraquat induces extrinsic pathway of apoptosis in A549 cells by induction of DR5 and repression of anti-apoptotic proteins, DDX3 and GSK3 expression[J]. *Toxicology in Vitro*, 2017, 42: 123-129.
- [15] LIN T C. DDX3X multifunctionally modulates tumor progression and serves as a prognostic indicator to predict cancer outcomes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 21(1): 281. doi: 10.3390/ijms21010281.
- [16] SOULAT D, BÜRKSTÜMMER T, WESTERMAYER S, et al. The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response[J]. *EMBO Journal*, 2008, 27(15): 2135-2146.
- [17] SCHRÖDER M, BARAN M, BOWIE A G. Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation[J]. *EMBO Journal*, 2008, 27(15): 2147-2157.
- [18] OSHIUMI H, SAKAI K, MATSUMOTO M, et al. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- β -inducing potential[J]. *European Journal of Immunology*, 2010, 40(4): 940-948.
- [19] SZAPPANOS D, TSCHISMAROV R, PERLOT T, et al. The RNA helicase DDX3X is an essential mediator of innate antimicrobial immunity[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(11): e1007397.
- [20] ADAMS M J, LEFKOWITZ E J, KING A M Q, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(10): 2921-2949.
- [21] VANNUCCI F A, LINHARES D C L, BARCELLOS D E S N, et al. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil[J]. *Transboundary Emerging Disease*, 2015, 62: 589-593.
- [22] CANNING P, CANON A, BATES J L, et al. Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with Senecavirus A in a U. S. sow farm[J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2016, 63(4): 373-378.
- [23] ZHANG X L, ZHU Z X, YANG F, et al. Review of Seneca Valley virus: A call for increased surveillance and research[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 940. doi: 10.3389/fmicb.2018.00940.
- [24] FERNANDES M H V, MAGGIOLI M F, OTTA J, et al. Senecavirus A 3C protease mediates host cell apoptosis late in infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 363. doi: 10.3389/fimmu.2019.00363.
- [25] LEME R A, OLIVEIRA T E S, ALFIERI A F, et al. Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with Senecavirus A-induced lesions in neonatal piglets[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2016, 155(2/3): 145-155.
- [26] HAUSE B M, MYERS O, DUFF J, et al. Senecavirus A in pigs, United States, 2015[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(7): 1323-1325.
- [27] XU W, HOLE K, GOOLIA M, et al. Genome wide analysis of the evolution of Senecavirus A from swine clinical material and assembly yard environmental samples[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176964.
- [28] WU Q, ZHAO X, BAI Y, et al. The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China[J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2017, 64(5): 1633-1640.
- [29] SAENG-CLUTO K, RODTIAN P, TEMEEYASEN G, et al. The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016[J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2018, 65(1): 285-288.
- [30] SUN D, VANNUCCI F, KNUTSON T P, et al. Emergence and whole-genome sequence of Senecavirus A in

- Colombia[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(5): 1346-1349.
- [31] ARZT J, BERTRAM M R, VU L T, et al. First detection and genome sequence of Senecavirus A in Vietnam[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(3). doi: 10.1128/MRA.01247-18.
- [32] SUN Y, CHENG J, WU R T, et al. Phylogenetic and genome analysis of 17 novel Senecavirus A isolates in Guangdong Province, 2017[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 314. doi: 10.3389/fvets.2018.00314.
- [33] QIAN S, FAN W, QIAN P, et al. Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 173. doi: 10.1186/s12985-016-0631-2.
- [34] ZHU Z, YANG F, CHEN P, et al. Emergence of novel Seneca Valley virus strains in China, 2017[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1024-1029.
- [35] WANG H, LI C, ZHAO B, et al. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of Senecavirus A isolated in Northeast China in 2016[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(10): 3173-3176.
- [36] ZHANG J, MIAO J, HOU J, et al. The effects of H3N2 swine influenza virus infection on TLRs and RLRs signaling pathways in porcine alveolar macrophages[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 61. doi: 10.1186/s12985-015-0284-6.
- [37] 谢立兰. 伪狂犬病毒和猪传染性胃肠炎病毒诱导 β 干扰素产生的分子机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [38] ISLAM M A, GROBE-BRINKHAUS C, PRÖLL M J, et al. Deciphering transcriptome profiles of peripheral blood mononuclear cells in response to PRRSV vaccination in pigs[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 641. doi: 10.1186/s12864-016-2849-1.
- [39] 王荡. 口蹄疫病毒 L^{pro} 和 $3C^{pro}$ 调控宿主抗病毒天然免疫反应的分子机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [40] 王国庆. 口蹄疫病毒 2B 蛋白拮抗 RIG-I 抗病毒作用研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- [41] DERRICK T, ROBERTS C H, RAJASEKHAR M, et al. Conjunctival microRNA expression in inflammatory trachomatous scarring[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, 7(3): e2117.
- [42] KAUR S, KRISHN S R, RACHAGANI S, et al. Significance of microRNA-based biomarkers for pancreatic cancer[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2015, 3(18): 277.
- [43] LIU Y, XU X, XU X, et al. MicroRNA-193a-3p inhibits cell proliferation in prostate cancer by targeting cyclin D1[J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(5): 5121-5128.
- [44] MORGUL M H, KLUNK S, ANASTASIADOU Z, et al. Diagnosis of HCC for patients with cirrhosis using miRNA profiles of the tumor-surrounding tissue: A statistical model based on stepwise penalized logistic regression[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2016, 101(2): 165-171.
- [45] POIRIER J T, DOBROMILSKAVA I, MORIARTY W F, et al. Selective tropism of Seneca Valley virus for variant subtype small cell lung cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013, 105(14): 1059-1065.
- [46] ZHOU Z H, SUN Y, YAN X L, et al. Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) antagonizes interferon- β production via blocking IPS-1 and RIG-I[J]. *Virus Research*, 2020, 278: 197843. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197843.
- [47] ANDREJEVA J, CHILDS K S, YOUNG D F, et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(49): 17264-17269.
- [48] CAO L, GE X, GAO Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon-beta production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 127. doi: 10.1186/s12985-015-0345-x.
- [49] CHEN Q, LIU Q, LIU D, et al. Molecular cloning, functional characterization and antiviral activity of porcine DDX3X[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 443(4): 1169-1175.
- [50] ZHAO X, WU Q, BAI Y, et al. Phylogenetic and genome analysis of seven Senecavirus A isolates in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(6): 2075-2082.
- [51] THOMPSON S R, SARNOW P. Regulation of host cell translation by viruses and effects on cell function[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(4): 366-370.
- [52] QIAN S, FAN W, LIU T, et al. Seneca Valley virus suppresses host type I interferon production by targeting adaptor proteins MAVS, TRIF, and TANK for cleavage[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(16): e00823-17.
- [53] LIU T, LI X, WU M, et al. Seneca Valley virus 2C and $3C^{pro}$ induce apoptosis via mitochondrion-mediated intrinsic pathway[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1202. doi: 10.3389/fmicb.2019.01202.
- [54] XUE Q, LIU H, ZHU Z, et al. Seneca Valley Virus 3C protease negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase[J]. *Antiviral Research*, 2018, 160: 183-189.