



MiR-130c-5p 靶向乌鳢水泡病毒 *g* 基因抑制病毒增殖

季艳^{1,2}, 周旋³, 于永耀⁴, 刘晓丹⁵, 张驰^{2*}, 林强^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室,

广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 武汉轻工大学动物科学与营养工程学院, 湖北 武汉 430000;

3. 武汉海关技术中心, 湖北 武汉 430050;

4. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

5. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225000)

摘要: 为了研究 miR-130c-5p 在乌鳢水泡病毒 (snakehead vesiculovirus, SHVV) 感染中潜在靶基因 *g* 的靶向关系以及对病毒复制的影响, 本研究以斑点叉尾鲷卵巢 (channel catfish ovary, CCO) 为实验材料, 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和免疫印迹 (Western blot) 技术测定 SHVV 不同感染时间和感染剂量条件下, 病毒基因水平和蛋白水平以及 miR-130c-5p 变化情况。此外, 将 SHVV 的 *g* 基因上 miR-130c-5p 对应的靶序列克隆到质粒 pmirGLO, 构建质粒 pmirGLO-G 用于双荧光素酶报告实验进行靶基因验证。结果显示, 随着 SHVV 感染时间及剂量的不断增加, miR-130c-5p 和 *g* 基因的表达水平都显著上调。进一步实验证明, miR-130c-5p 类似物和 pmirGLO-G 质粒共转染可显著抑制荧光素酶活性强度, 而转染 miR-130c-5p 抑制剂则明显上调了 pmirGLO-G 报告载体的荧光信号。此外, miR-130c-5p 的过表达显著降低了病毒 *g* 基因的 mRNA 及蛋白表达, 而抑制 miR-130c-5p 的表达则上调了 *g* 基因的 mRNA 及蛋白的表达水平。研究结果表明, miR-130c-5p 通过靶向 SHVV 的 *g* 基因, 引起 G 蛋白的降解, 从而抑制 SHVV 的增殖。本研究结果为理解 microRNA 调控 SHVV 的致病机制提供了重要基础, 为抗 SHVV 疫苗等药物的研发提供了理论支持。

关键词: MiR-130c-5p; 乌鳢水泡病毒 (SHVV); 靶向; G 蛋白; 弹状病毒

中图分类号: Q 786; S 942.5

文献标志码: A

乌鳢 (*Channa argus*) 是我国重要的淡水经济养殖鱼类^[1], 因其刺少, 肉味鲜美, 具有去瘀生新、促进伤口愈合等^[2]功效, 受到大众青睐。据统计, 截至 2022 年, 乌鳢养殖产量已经达到 55.32 万 t^[3]。然而, 限制乌鳢养殖业发展的因素众多, 其中包括乌鳢水泡病毒 (snakehead vesicu-

lovirus, SHVV) 引起的病毒性疾病。近年来, 我国的乌鳢养殖业因乌鳢水泡病毒而造成了严重的经济损失, 目前针对这种病毒病尚无有效的防控与治疗措施^[4]。乌鳢水泡病毒是一种鱼类弹状病毒^[5], 其基因组为单链不分节的负链 RNA, 约 11 kb。乌鳢水泡病毒主要编码 5 种结构蛋白^[6]: 核蛋白

收稿日期: 2024-01-06 修回日期: 2024-04-06

资助项目: 中国水产科学研究院珠江研究所重点实验室开放课题 (20220103); 武汉海关科研项目 (2023WK11); 国家自然科学基金 (32303068)

第一作者: 季艳 (照片), 从事鱼类病害与免疫研究, E-mail: 2893504656@qq.com

通信作者: 张驰, 从事鱼类病毒学与免疫学研究, E-mail: zhch@whpu.edu.cn;

林强, 从事水产动物病害防控研究, E-mail: lin9902057@163.com



(nucleoprotein, N)、磷蛋白 (phosphoprotein, P)、基质蛋白 (matrix protein, M)、糖蛋白 (glycoprotein, G)、RNA 依赖性 RNA 聚合酶蛋白 (RNA dependent RNA polymerase, L)。其中, G 蛋白的三聚体组成弹状病毒表面的钉状突起, 主要参与病毒的感染过程^[7], 包括病毒吸附、进入宿主细胞以及病毒组装和释放等。此外, 某些糖蛋白还可影响病毒的免疫逃逸能力, 从而帮助病毒逃避宿主免疫系统的攻击。人类巨大细胞 (HCMV) 的糖蛋白可能是一种有病毒编码的全身性抑制剂^[8], UL4 编码的一种分泌型重度糖基化蛋白 (gpUL4) 能抑制自然杀伤细胞 (NK 细胞) 对异源病毒的反应, 其通过抑制可溶性凋亡诱导配体 (TRAIL) 诱导的细胞凋亡, 并以 TRAIL 依赖性方式与 NK 细胞表面结合, 阻止 NK 细胞脱颗粒和细胞因子分泌。近年来, 有研究表明, 非编的 RNA 在病毒发生过程中发挥着重要的调节作用^[9]。因此, 本研究讨论了宿主 miR-130c-5p 在乌鳢水泡病毒增殖机制中的作用。

MicroRNA 是一类能够调节基因表达的短链内源性非编码 RNA (约 22 nt)^[10], 可以通过靶向病毒相关的宿主因子间接调节病毒的感染性。其主要依靠 5' 末端的第 2~8 个核苷酸 (种子序列) 来识别其靶基因的 mRNA, 通过碱基互补配对的方式结合, 起到降解或抑制靶基因翻译的作用^[11]。利用 CRISPR/Cas9 敲除 miR-29a 降解甲型流感病毒 (IAV) 的 mRNA 并抑制病毒蛋白质翻译, 进而抑制 IAV 感染^[12]。另外, 还有一些 microRNA 可以正向调控病毒的复制。Patil 等^[13]证明了 miR-214 可直接与戊型肝炎病毒 (HEV) 的 RNA 相互作用, 正向调节 HEV 复制的机制。一些 microRNA 也可以特异性结合长链非编码 RNA (lncRNA)^[14-15]、环状 RNA (circRNA)^[16-18] 来调控其功能。总之, 病毒可以通过调节宿主 microRNA 的表达, 进而调节细胞免疫反应和病毒复制。但是对宿主 microRNA 在 SHVV 复制中的互作机制的研究鲜有报道。

基于前期 SHVV 感染多种鱼类细胞的研究, 我们发现斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 卵巢 (Channel catfish ovary, CCO) 可支持 SHVV 高效复制^[19]。此外, 我们对宿主细胞的 microRNA 表达谱进行了测序分析和研究, 以筛选出促进 SHVV 复制的新 miRNA, 发现 SHVV 感染后会改变宿主 miR-130c-5p 的表达。因此, SHVV 是否通过调控宿主 miRNAs 以调节细胞免疫应答引起了我们的关注。本研究发现, miR-130c-5p 在 SHVV

感染的 CCO 细胞中下调表达, 而过表达 miR-130c-5p 类似物发现能显著促进 SHVV 的增殖。此外, 基于 G 蛋白在病毒感染中的关键作用, 我们通过双荧光素酶报告系统对靶基因进行进一步验证发现, SHVV 的 g 基因是 miR-130c-5p 的靶基因。综上所述, miR-130c-5p 靶向 SHVV 的 g 基因引起病毒 G 蛋白降解可以显著抑制 SHVV 的复制。这一机制的发现将为后续 microRNA 调控 SHVV 的致病机制的功能研究奠定基础, 同时为以 g 基因为靶标来研发新型抗 SHVV 疫苗等药物提供理论基础。此外, 实验推测 miR-130c-5p 通过减弱靶标与宿主免疫的识别数量, 来帮助病毒进行免疫逃逸, 目前对其机制尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

研究对象选用对 SHVV 具有更高的敏感性和稳定性的斑点叉尾鲷卵巢细胞 (channel catfish ovary, CCO), 并由本实验室放置液氮中长期保存。CCO 细胞使用含有 10% 胎牛血清 (FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 MEM 完全培养基, 并置于 25 °C 恒温培养箱中传代培养。

SHVV 分离自广东顺德某渔场的患病乌鳢, 并由本实验保存于 -80 °C 冰箱。实验过程中操作人员严格遵守动物实验伦理规范, 并按照相关的规章制度执行。

1.2 引物与抗体

本实验中所使用的所有引物 (表 1) 皆购自于武汉勤达创新生物科技有限公司并在 4 °C 冰箱进行保存。Negative Control (NC) mimic、NC inhibitor、miR-130c-5p 类似物 (miR-130c-5p mimic) 和抑制剂 (miR-130c-5p inhibitor) 皆购自于上海吉玛制药技术有限公司。SHVV 的 G 蛋白一抗为 SHVV-G 抗体 (兔抗) 由本实验室制备并保存。β-actin 和二抗 HRP (兔抗) 购自于武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 质粒构建

表达 SHVV-G 的质粒 pCDNA3.1-G 是通过 PCR 扩增将 SHVV 的 g 基因的 cDNA 克隆到 pCDNA3.1 中, 同时使用表 1 所列的引物构建出来的。根据 miR-130c-5p 的靶向 SHVV g 基因的靶序列 (GenBank 登录号: KT921777.1) 设计出引物 (表 1) 并进行扩增, 获得了含有目的基因的扩增片

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

应用 application	引物名称 primer name	序列(5'→3') sequences (5'→3')	
实时荧光定量PCR real-time quantitative PCR	SHVV-G-FW	ACACCATACATGCCAGAGGC	
	SHVV-G-BW	GCCTCGCTGGGTATCCAAAT	
	<i>β-actin</i> -FW	CACTGTGCCCATCTACGAG	
	<i>β-actin</i> -BW	CCATCTCCTGCTCGAAGTC	
	NC mimic-FW	TTCTCCGAACGTGTCACGTTT	
	NC mimic-BW	ACGTGACACGTTTCGGAGAATT	
	miR-130c-5p mimic-FW	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	
	miR-130c-5p mimic-BW	AACATCAGTCTGATAAGCTATT	
	NC inhibitor	CAGTACTTTTGTGTAGTACAA	
	miR-130c-5p inhibitor	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA	
	miR-130c-5p-FW	GCCCTTTTCTGTTGTACTACT	
	U6-FW	CTCGTTCGGCAGCACA	
	U6-BW	AACGCTTCACGAATTTGCGT	
	质粒表达 expression plasmids	G-FW	CGGAATTCATGAAATCAATCATTGCACCTA
		G-BW	CGGGATCCCAGTTCACCCACTCACCCA
<i>Nhe</i> I *		CTAGCTAGCTAGCCCAGTGTGTTTCCAACCAGACTT	
<i>Xho</i> I *		CCGCTCGAGCGGTGTCTCTAGCTCATCTTGGATGCT	

注: *Nhe* I *为酶切反应的引物, 是由该内切酶的保护碱基序列(标红部分)和miR-130c-5p与SHVV *g*基因靶序列的上游引物序列构成; *Xho* I *为酶切反应的内切酶引物, 是由该内切酶的保护碱基序列(标红部分)和miR-130c-5p与SHVV *g*基因靶序列的下游引物序列构成。
Notes: *Nhe* I * is the primer for the enzymatic reaction, which is composed of the protected base sequence of the endonuclease (red part) and the upstream primer sequence of miR-130c-5p and the target sequence of SHVV *g* gene; *Xho* I * is the primer for the endonuclease of the enzymatic reaction, which is composed of the protected base sequence of the endonuclease (red part) and the downstream primer sequence of miR-130c-5p and the target sequence of SHVV *g* gene.

段。在本实验中, 扩增片段和表达载体 pmir-GLO 分别使用表 1 中的 *Nhe* I 和 *Xho* I 这两种内切酶进行双酶切。随后酶切产物经过回收后, 使用 T4 DNA 连接酶进行连接, 得到连接产物。将连接产物克隆到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 细胞中, 在含有氨苄青霉素 (Ampicillin) 的培养皿进行培养, 经过菌落 PCR 后, 挑选出合适的菌液送至擎科生物科技有限公司进行测序。测序结果使用 MegAlign 软件进行序列比对后, 提取质粒即可得到荧光素酶报告基因质粒 pmirGLO-G。

1.4 细胞转染与病毒感染细胞

CCO 细胞正常传代至 12 孔细胞板中, 待细胞密度达到 80%~90% 时, 将合成的 miRNA 类似物或抑制剂使用 Lipofectamine 2000 室温下孵育 30 min 后转染到细胞中, 以 negative control(NC) mimic 和 NC inhibitor 作为对照组, 置于 25 °C 培养箱中培养。转染 4~6 h 后, 细胞可进行换液。细胞转染培育 24 h 后, 收取细胞样品并做好标记进行后续实验。

CCO 细胞正常传代至 12 孔细胞板中, 待细胞长满单层后, 采用感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 的 SHVV 孵育 1 h, 每孔加入 400 μ L, 置于 25 °C 培养箱中培养, 分别收集感染后 0、3、6、12 和 24 h 的细胞样品并做好标记; 按照 MOI (=0.1、1.0、10.0、100.0), 孵育 1 h, 每孔加入 400 μ L, 置于 25 °C 培养箱中培养 24 h 后收取样品并做好标记。

1.5 双荧光素酶报告基因实验

双荧光素酶报告基因实验参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司] 试剂盒说明书。MiR-130c-5p mimic、NC mimic、miR-130c-5p inhibitor、NC inhibitor 与构建好的双荧光质粒 pmirGLO-G 共转染进入 CCO 细胞, 24 h 后收取细胞样品, 检测荧光素酶活性, 记录的数据为萤火虫荧光/海参荧光。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

根据 TRIzol (Vazyme) 说明书提取细胞样品的总 RNA, 并用核酸浓度检测仪进行 RNA 浓度检

测。按照 miRNA 反转录试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司)和 HiScript II qRT Super Mix 反转录试剂盒(Vazyme Biotech Co.,Ltd)的说明书分别对 RNA 进行反转录获得 cDNA。所获的 cDNA 需要用 ddH₂O 分别稀释 5 倍和 20 倍后,才可以用于后续实验。qRT-PCR 的反应体系: 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix: 5 μL; FW(10 μmol/L): 0.2 μL; BW(10 μmol/L): 0.2 μL; ddH₂O: 3.6 μL; cDNA: 1 μL。qRT-PCR 的反应条件: 预变性 95 °C-30 s; 循环反应 95 °C-10 s, 60 °C-30 s, 45 个循环; 熔解曲线 95 °C-15 s, 60 °C-60 s, 95 °C-15 s。β-actin 作为细胞和病毒基因的内参基因, U6 作为 miRNA 的内参基因, 采用 2^{-ΔΔC_T} 法分别计算基因和 miRNAs 的表达差异。

1.7 免疫印迹 (Western blot)

使用 40~100 μL 的预冷的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 重悬细胞沉淀, 加入相应体积的 5×十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液, 沸水煮 12 min 收取蛋白样品, 用 SDS-PAGE 凝胶进行蛋白分离, 使用蛋白转印系统将蛋白转移到硝酸纤维素 (PVDF) 膜上。将转印好的 PVDF 膜使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (加入 Tween-20 的 Tris 盐缓冲液) 浸没, 放置 4 °C 进行封闭过夜处理。使用 SHVV 的 G 蛋白一抗 SHVV-G 抗体与 β-actin 分别在 4 °C 下孵育过夜或者在室温下孵育 2 h 后, 用 TBST 进行清洗 3 次, 每次 5 min。将处理过的 PVDF 膜在室温条件下用二抗 HRP 孵育 1 h 后, 用 TBST 进行清洗 3 次, 每次 5 min。最后, 通过 ECL 化学发光试剂盒和化学发光成像系统进行成像。

1.8 统计分析

所有统计分析均使用 Graphpad Prism 9.0 (GraphPad SoftwareSan, CA) 软件绘图, 数据的统计学意义采用 Student's *t* 检验, 当 $P < 0.05$ 时有显著性差异且具有统计学意义。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 SHVV 感染 CCO 细胞对 G 和 miR-130c-5p 表达的影响

前期对 SHVV 感染 miRNAs 的研究表明, miR-130c-5p 在病毒感染宿主细胞中发生明显改变^[20], 因此, 将其选作研究对象。此外, 在对

SHVV 反向遗传系统研究时, 发现 CCO 细胞支持 SHVV 的高效复制^[21]。为了探究 miR-130c-5p 在 SHVV 感染中的作用, 实验选择不同感染时间 (3、6、12 和 24 h) 和不同感染剂量 (MOI=0.1、1.0、10.0 和 100.0) 的 SHVV 对 CCO 细胞进行攻毒, 采用 qRT-PCR 对病毒 G 蛋白基因 (*g*) 的 mRNA 表达水平测定。结果显示, SHVV 感染后的 3 h 内即开始表达病毒 *g* 基因 mRNA。相比之下, 24 h 内病毒 *g* 基因 mRNA 的表达显著上调 (图 1-a)。此外, 随着病毒感染剂量的增加, SHVV 的 *g* 基因 mRNA 表达量也显著增加 (图 1-b), 表明 SHVV 能够在 CCO 细胞中进行有效复制。此外, 在不同感染时间和剂量下检测 miR-130c-5p 的水平。结果显示, 在 SHVV 感染 CCO 细胞后的 24 h 内, 细胞中 miR-130c-5p 的表达相对于 3 h 对照组明显上调 (图 1-c)。此外, miR-130c-5p 的表达水平与病毒感染剂量呈正相关 (图 1-d)。实验表明, 在上述条件下, SHVV 感染 CCO 细胞后的 24 h 内会引起细胞内 miR-130c-5p 的表达量上调。

2.2 MiR-130c-5p 类似物和抑制剂对 miR-130c-5p 表达水平的影响

为了确定 miR-130c-5p 是否与 SHVV 复制有关, 我们将合成的 miR-130c-5p 的类似物、抑制剂或相应的 NC 分别转染 CCO 细胞, 以过表达或抑制细胞 miR-130c-5p, 继而被 SHVV 感染转染后 24 h 使用 qRT-PCR 检测细胞内 miR-130c-5p 的表达水平。与 NC 类似物相比, 转染 miR-130c-5p 类似物导致细胞内 miR-130c-5p 表达水平极显著上升了 ($P < 0.001$) (图 2-a)。与 NC 抑制剂相比, 转染 miR-130c-5p 抑制剂导致细胞内 miR-130c-5p 表达水平显著下调 ($P < 0.01$) (图 2-b)。

2.3 MiR-130c-5p 靶向 SHVV 病毒 *g* 基因

根据“种子序列”配对的序列查找靶基因的方法^[22], 在 NCBI 中从 SHVV 的全基因序列 (NCBI: KP876483) 中搜索到 miR-130c-5p 靶基因并进行预测 (图 3-a)。为了验证 *g* 基因是否确实是 miR-130c-5p 的靶基因, 实验进行了双荧光素酶报告基因分析。将双荧光素酶报告质粒 pmirGLO-G 分别与 miR-130c-5p 的类似物、抑制剂及其对照共转染 CCO 细胞, 转染后 24 h, 双荧光素酶报告系统验证 miR-130c-5p 与 *g* 基因 mRNA 的靶序列的结合。结果显示, 转染 miR-130c-5p mimic 所检测到的荧光素酶活性降低 (图 3-b), 而转染 miR-130c-5p inhibitor 则明显上调了 pmirGLO-G 荧光素酶报告

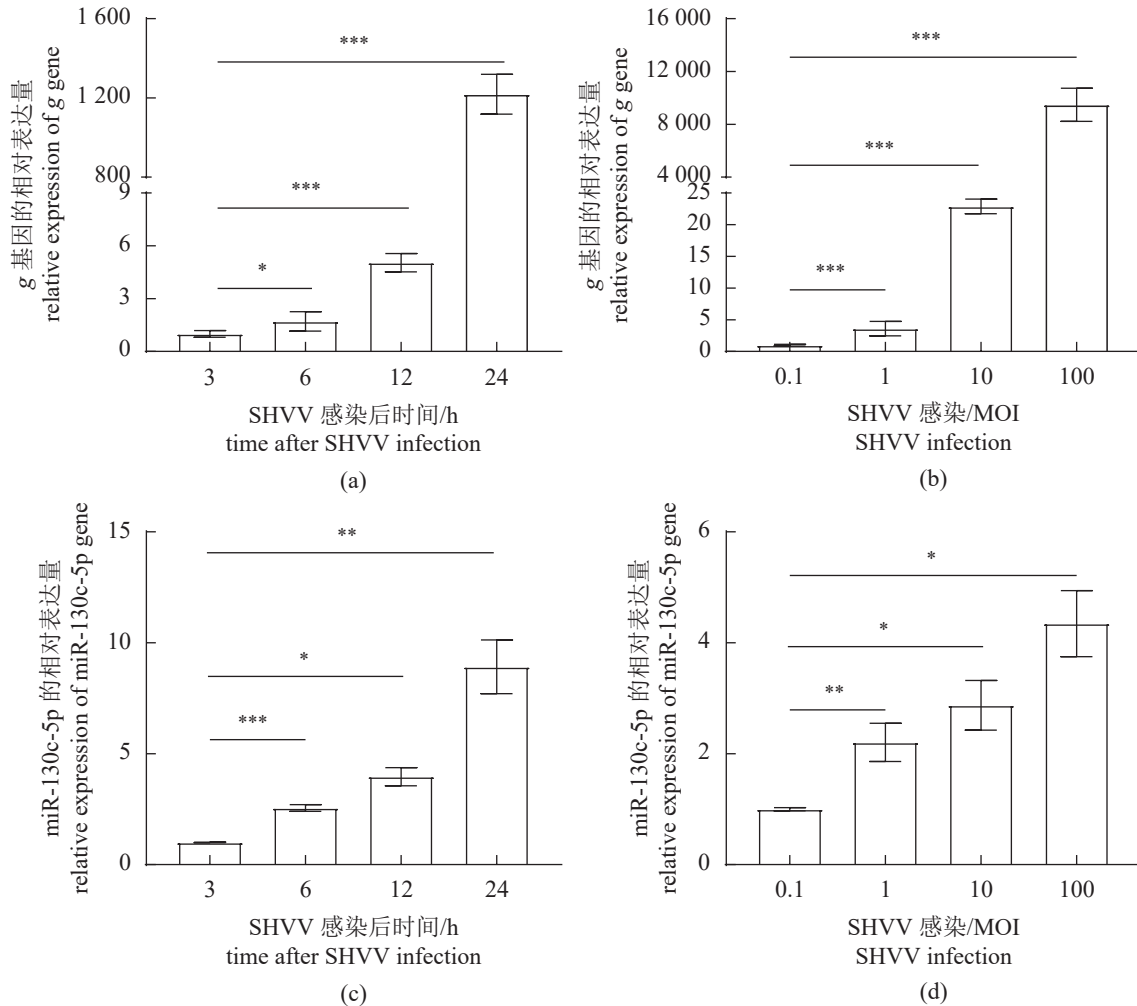


图1 SHVV感染CCO细胞对*g*和胞内miR-130c-5p表达的影响

(a) SHVV(MOI=1)感染CCO细胞后, 3 h、6 h、12 h、24 h细胞内的病毒*g*基因的表达水平, β -actin作为内参; (b) SHVV(MOI=0.1、1、10、100)感染CCO细胞24 h后细胞内的病毒*g*基因的表达水平, β -actin作为内参; (c) SHVV(MOI=1)感染CCO细胞后, 3 h、6 h、12 h、24 h细胞内的miR-130c-5p表达水平, U6作为内参; (d) SHVV(MOI=0.1、1、10、100)感染CCO细胞24 h后细胞内的miR-130c-5p表达水平, U6作为内参。实验至少重复2次, 每次3个重复(*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$); 下同。

Fig. 1 Effects of SHVV-infected CCO cells on the expression of *g* and miR-130c-5p

(a) The expression level of *G* mRNA in CCO cells at 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h after SHVV (MOI=1) infection with β -actin as the internal reference; (b) *G* mRNA levels in CCO cells after 24 h infection with SHVV (MOI=0.1, 1, 10, 100), β -actin as the internal reference; (c) The expression level of miR-130c-5p in CCO cells at 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h after SHVV (MOI=1) infection, with U6 as the internal reference; (d) The expression level of miR-130c-5p in CCO cells after 24 h infection by SHVV (MOI=0.1, 1, 10, 100), with U6 as the internal reference. The experiment was repeated at least two times with three replicates each time (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$); the same below.

载体的荧光信号(图3-c), 表明*g*基因确实是miR-130c-5p的靶基因, 且G蛋白的编码区具有miR-130c-5p的靶序列。

2.4 MiR-130c-5p对SHVV的*g*基因表达的影响

为了进一步验证miR-130c-5p对SHVV的G蛋白表达的影响, 实验将miR-130c-5p的类似物、抑制剂及其对照与构建的质粒pCDNA3.1-G分别共转染CCO细胞, 转染后24 h, 通过qRT-PCR

检测细胞内*g*基因的mRNA表达, 同时用Western blot测定G蛋白的表达水平。结果显示, CCO细胞中过表达miR-130c-5p显著降低*g*基因mRNA表达水平, 反之, 抑制其表达则上调*g*基因mRNA表达(图4-a)。此外, 过表达miR-130c-5p后, Western blot检测G蛋白的蛋白条带变细, 反之, 抑制其表达蛋白条带变粗(图4-b)。这些数据表明, miR-130c-5p可以下调病毒G的表达, 这将会抑制SHVV的复制。

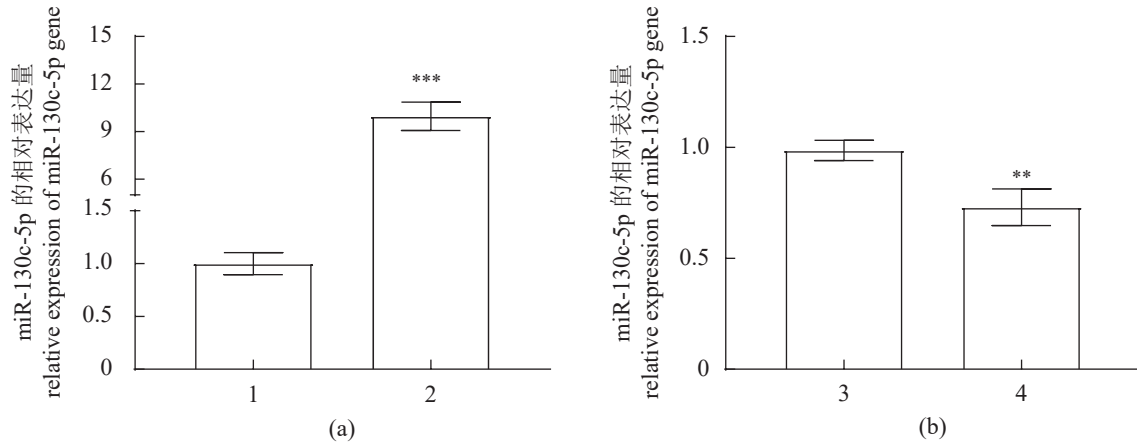


图2 转染后 miR-130c-5p 的表达量

(a) miR-130c-5p 类似物及其对照, (b) miR-130c-5p 抑制剂及其对照, U6 作为内参。1. NC-mimic, 2. miR-130c-5p mimic, 3. NC-inhibitor, 4. miR-130c-5p inhibitor; 实验至少重复 2 次, 每次 3 个重复 (**表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$); 下同。

Fig. 2 Expression of miR-130c-5p after transfection

(a) MiR-130c-5p mimic and its control, (b) miR-130c-5p inhibitor and its control, U6 was used as an internal control. 1. NC-mimic, 2. miR-130c-5p mimic, 3. NC-inhibitor, 4. miR-130c-5p inhibitor; the experiment was repeated at least two times with three replicates each time ($P < 0.01$, ***; $P < 0.001$); the same below.

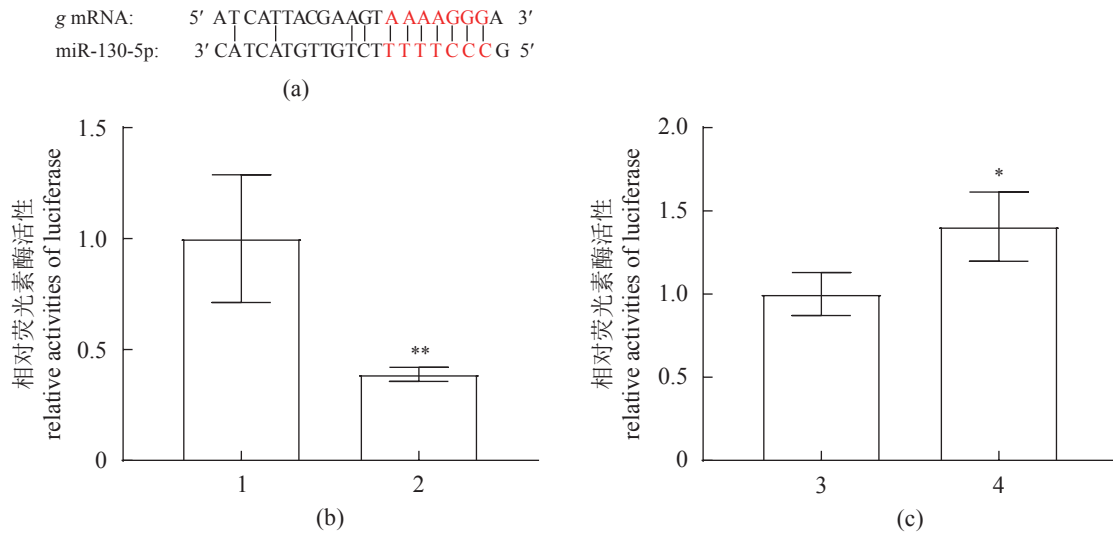


图3 MiR-130c-5p 靶向病毒 SHVV 的 g 基因

(a) g mRNA 的编码区预测的靶向序列的碱基互补配对图; (b) (c) miR-130c-5p 类似物、miR-130c-5p 抑制剂和其对照与 pmirGLO-G 质粒共转染 CCO 细胞 24 h 后, 细胞的荧光强度。1. NC-mimic, 2. miR-130c-5p mimic, 3. NC-inhibitor, 4. miR-130c-5p inhibitor; 实验至少重复 2 次, 每次 3 个重复 (**表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$); 下同。

Fig. 3 The g gene of SHVV is targeted by miR-130c-5p

(a) base complementary pairing maps of targeted sequences predicted by the coding region of g mRNA; (b) (c) fluorescence intensity of CCO cells after 24 h of co-transfection with the pmirGLO-G plasmid of miR-130c-5p mimic, miR-130c-5p inhibitor, and their controls. 1. NC-mimic, 2. miR-130c-5p mimic, 3. NC-inhibitor, 4. miR-130c-5p inhibitor; the experiment was repeated at least two times with three replicates each time ($P < 0.01$, ***; $P < 0.001$); the same below.

3 讨论

乌鳢水泡病毒 (SHVV) 是于 2014 广州某乌鳢

养殖场的患病的乌鳢中分离出来并进行命名^[23], 该病毒属弹状病毒科, 其致死率最高可达 90% 以上^[24], 目前暂无有效的治疗方法。然而, 有研究

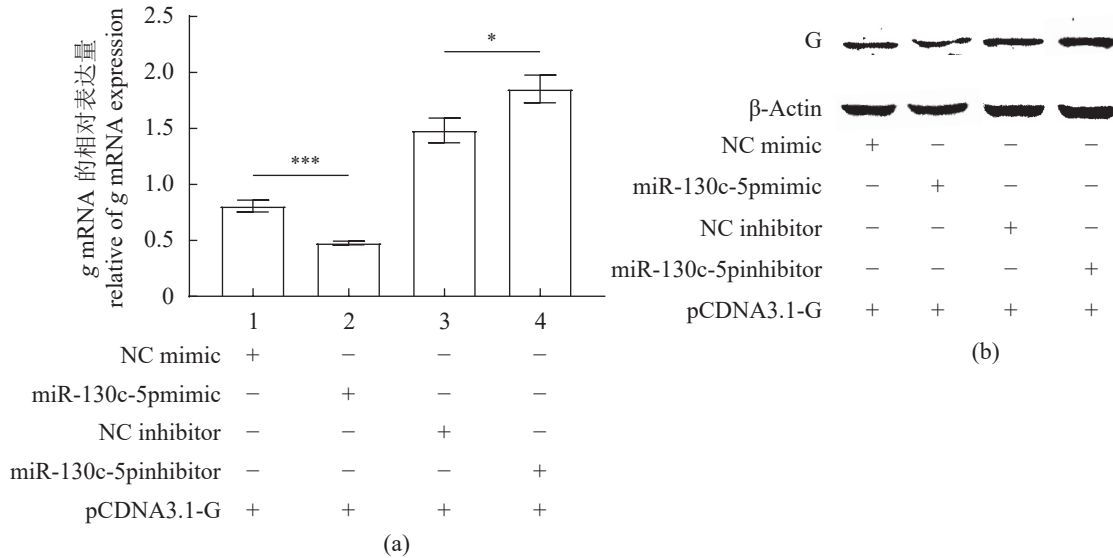


图 4 MiR-130c-5p 对病毒 G 蛋白表达量的影响

(a) 利用荧光定量 PCR 检测 CCO 细胞内的 *g* mRNA 表达水平, β -actin 作为内参, **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$; (b) 利用蛋白免疫印迹检测 G 蛋白表达水平; β -Actin 作为内参; 实验至少重复 2 次。

Fig. 4 Influence of miR-130c-5p on the expression of viral G protein

(a) relative expression of *g* mRNA in CCO cells detected by fluorescence quantitative PCR with β -actin as an internal reference (** means $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$); (b) relative expression of G protein detected by Western blot with β -Actin as an internal reference; the experiment was repeated at least twice.

表明^[25]miRNA 在病毒感染防治上具有更高的耐药性屏障、泛基因型活性和更广泛的用药范围等诸多优势。microRNA(miRNA) 不仅作为转录后重要的调节因子调控病毒复制, 也在参与细胞增殖、发育、分化代谢以及细胞凋亡等真核生物的各种生物学过程发挥重要作用^[26]。例如, miR-505 可介导自噬的高迁移率族蛋白 B1(HMGB1), 通过下调 HMGB1 的表达来抑制自噬激活, 并最终抑制博尔纳病病毒 (BoDV-1) 的复制^[27]; miR-34a 和 miR-361 通过刺激 IFN- β 启动子活性并激活干扰素刺激的反应元件 (ISRE) 进而激活 PK-15 细胞免疫应答来抑制口蹄疫病毒 (FMDV) 复制^[28]; Shi 等^[29]发现 miR-541-3p 能通过靶向干扰素调节因子 7(IRF7) 负调控 I 型干扰素的转录, 促进猪繁殖和呼吸障碍综合征病毒 (PRRSV) 繁殖, 从而抑制宿主免疫应答。总之, miRNAs 可以通过直接或间接的方式参与调控病毒的复制, 在病毒感染与宿主防御过程中发挥重要作用。

基于前期研究发现, SHVV 感染条纹鳃细胞 (SSN-1) 后细胞的 miR-130c-5p 能够显著抑制 SHVV 增殖^[20], 但其抑制作用的确切机制有待进一步研究。在本项研究中, 实验选用对 SHVV 敏感性更高的 CCO 细胞作为实验细胞, 探讨了 miR-130c-

5p 对 SHVV 感染细胞的作用机制。SHVV 感染 CCO 细胞后, miR-130c-5p 的表达存在着时间和剂量依赖性的上调, 且 SHVV 在细胞中的增殖情况也同样有感染时间和剂量的依赖性, 这表明细胞产生 miR-130c-5p 可能是一种抗病毒反应。MiR-130c-5p 的过表达可以有效抑制 SHVV 的增殖, 反之抑制其表达则会促进病毒增殖, 说明宿主产生的 miR-130c-5p 不利于 SHVV 的生存, 且在控制病毒感染过程发挥关键作用。同时, 双荧光素酶实验结果表明, miR-130c-5p 作为一种新型的抗病毒因子可以有效靶向调控 *g* 基因来抑制病毒复制, 此外, 它可能成为开发针对 SHVV 感染的新型治疗策略的潜在靶点。为进一步验证 miR-130c-5p 是否起到抑制 SHVV 复制的作用, 实验通过 qRT-PCR 和 Western blot 实验, 得出 miR-130c-5p 确实对病毒的复制起到抑制效应。已有研究证明, miRNA 主要通过与其互补的 mRNA 选择性结合发挥其调控功能^[30], 包括成熟的 miRNA 与转录本部分结合后直接抑制蛋白翻译, 导致转录水平下降; 与转录本几乎完全结合, 影响病毒 mRNA 的稳定性导致蛋白降解。本实验的研究结果与后者相符, 即 SHVV 在基因水平和蛋白水平的表达皆表现下调, miR-130c-5p 是通过影响 SHVV 病毒 mRNA

的稳定性而导致 G 蛋白发生降解。G 蛋白是通过内质网-高尔基体 (ER-Golgi) 途径合成后, 与 M 蛋白相互结合被转运至细胞膜附近与 RNP(以 N 蛋白代表) 相互作用, 从而完成子代病毒粒子装配和出芽^[31]。因此, miR-130c-5p 确实可以靶向 SHVV 的 g 基因使 G 蛋白降解, 进而导致宿主细胞对病毒的感染和增殖产生抑制作用。miR-130c-5p 可能通过多种机制抑制病毒的复制和参与调控病毒的感染。首先, 在病毒感染宿主的过程中, 病毒基因的表达调控是病毒复制的第一道防线, 对于 miRNAs 通过靶向病毒基因组影响病毒在宿主细胞中增殖已在多项研究中被证实^[32]。例如, miR-214 可以靶向 SHVV 的 N 和 P 蛋白, 其过表达后将增加 IFN- α , 从而抑制病毒复制^[33]; 柯萨奇病毒 B3(CVB3) 诱导劫并持宿主 miR-19a/19b 靶向病毒基因组 RdRp 编码区促进病毒复制^[34]; miR-196a 靶向丙型肝炎病毒 (HCV) 的 NS5 A 基因在抑制 HCV 复制中发挥重要作用^[35]。本研究证实了 miR-130c-5p 通过靶向 SHVV 基因组的 g 基因, 抑制病毒 G 蛋白的表达, 从而有效抑制病毒的增殖, 这一结论与前期研究结论一致^[33]。此外, miR-130c-5p 可能通过调节宿主细胞的炎症因子及免疫相关基因表达, 影响宿主细胞的免疫应答, 进而抑制病毒的增殖。有研究表明, miRNA 不仅可以靶向病毒基因组和调控宿主细胞因子^[36]来参与病毒复制的调控, 还可以通过调控机体的天然免疫应答^[37]、抗病毒适应性免疫应答^[38]来参与病毒复制。MiR-130c-5p 可能通过靶向调控病毒感染细胞受体^[39]、干扰素介导的信号通路^[40]、白细胞介素介导的信号通路^[41]以及调控 T 淋巴细胞^[42]和 B 淋巴细胞^[43]等多种方式来调节宿主免疫反应, 从而影响宿主对 SHVV 的抵抗能力, 最终抑制病毒的增殖。那么, SHVV 的 G 蛋白作为病毒的主要抗原位于病毒表面, 不仅能够诱导机体产生抗体进行抗原中和, 还能刺激机体产生免疫应答。因此, 通常选择病毒的 g 基因作为抗原基因来构建疫苗^[44]。此外, G 蛋白是诱导 SHVV 发生自噬的主要蛋白^[45], 它可以与自噬相关蛋白 VDAC2 的相互作用, 并借助自噬基因 (Beclin-1、ATG 家族、AMPK) 转录水平上调以及激活 mTOR 信号通路、溶酶体 (Isosome) 和内吞作用 (endocytosis) 等与细胞代谢相关的通路, 进而有效刺激细胞发生自噬及抑制病毒增殖。实验结果表明, CCO 细胞被 SHVV 感染后的 24 h 内, miR-130c-5p 的表达水平

上调, 而且 miR-130c-5p 能够通过靶向 SHVV 的 g 基因显著抑制 SHVV 的复制。这是由于 miR-130c-5p 通过影响病毒 mRNA 的稳定性而导致 G 蛋白的降解, 会影响病毒与宿主细胞受体结合并干扰 SHVV 病毒基因组的复制, 从而抑制了 SHVV 的增殖。然而, SHVV 的 G 蛋白降解也会使得宿主免疫应答反应变弱, 存在促进病毒的免疫逃逸的可能。因此, 进一步的研究可以拓展到 miR-130c-5p 对宿主免疫系统的影响以及确定 miR-130c-5p 在其他病毒中的作用。

综上所述, 本研究证实了 miR-130c-5p 靶向 SHVV 的 g 基因, 使得病毒 G 蛋白降解, 干扰介导 SHVV 进入宿主细胞, 进而抑制病毒增殖。但本研究中, 只对病毒感染 24 h 后的 CCO 细胞内 miR-130c-5p 变化趋势进行研究, 须进一步扩大样本数量和感染时间等用于后续研究。综合前人研究与本研究的结果, 可以深入研究 miR-130c-5p 在病毒感染过程中的作用机制和调节网络, 加深对弹状病毒感染的分子机制的了解, 为研发新型抗 SHVV 药物提供理论基础和新的靶点。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Tang X L, Fu J H, Yao Y, *et al.* Identification and characterization of immune-related microRNAs in hybrid snakehead (*Channa maculata*♀ × *Channa argus*♂) after treated by *Echinacea purpurea* (Linn.) Moench[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 135: 108653,
- [2] Qin X M, Feng S S, Zhang Y W, *et al.* Leader RNA regulates snakehead vesiculovirus replication via interacting with viral nucleoprotein[J]. *RNA Biology*, 2021, 18(4): 537-546,
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.
Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, Chinese Society of Fisheries. 2023 China fisheries statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023(in Chinese).
- [4] Qin X M, Jiang N Y, Zhu J J, *et al.* Snakehead vesiculovirus hijacks SH3RF1 for replication via mediating K63-linked ubiquitination at K264 of the phosphopro-

- tein[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 255: 128201,
- [5] Hegazy A M, Chen N, Lin H Z, *et al.* Induction of apoptosis in SSN-1cells by snakehead fish vesiculovirus (SHVV) via matrix protein dependent intrinsic pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 113: 24-34,
- [6] Zhang C, Li N Q, Fu X Z, *et al.* MiR-214 inhibits snakehead vesiculovirus (SHVV) replication by targeting host GS[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 299-303,
- [7] Bergeron H C, Tripp R A. RSV replication, transmission, and disease are influenced by the RSV G protein[J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2396,
- [8] Vlachava V M, Seirafian S, Fielding C A, *et al.* HCMV-secreted glycoprotein gpUL4 inhibits TRAIL-mediated apoptosis and NK cell activation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(49): e2309077120.
- [9] 刘力, 李健, 乔文涛, 等. MicroRNA 在病毒感染调控作用中的研究进展 [J]. *病毒学报*, 2009, 25(6): 485-489.
Liu L, Li J, Qiao W T, *et al.* Research progress on the regulational role of MicroRNA in virus infection[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2009, 25(6): 485-489 (in Chinese).
- [10] Zhang L W, Xu S N, Zhang Z L, *et al.* Transcriptomic profiling and characterization of microRNAs in *Macrobrychium rosenbergii* potentially involved in immune response to *Enterobacter cloacae* infection[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 183: 106291,
- [11] Donnelly B F, Yang B, Grimme A L, *et al.* The developmentally timed decay of an essential microRNA family is seed-sequence dependent[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(6): 111154,
- [12] Yang X Y, Liang Y R, Bamunuarachchi G, *et al.* miR-29a is a negative regulator of influenza virus infection through targeting of the frizzled 5 receptor[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(2): 363-373,
- [13] Patil R N, Karpe Y A. Uncovering the roles of miR-214 in hepatitis E virus replication[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(19): 5322-5342,
- [14] Wang J C, Yin G, Bian H, *et al.* LncRNA XIST upregulates TRIM25 via negatively regulating miR-192 in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Molecular Medicine*, 2021, 27(1): 41,
- [15] Zhang L, Ma J F, Pan X H, *et al.* LncRNA MIR99AHG enhances adipocyte differentiation by targeting miR-29b-3p to upregulate PPAR γ [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2022, 550: 111648,
- [16] Shi N, Zhang S, Guo YD, *et al.* CircRNA_0050463 promotes influenza A virus replication by sponging miR-33b-5p to regulate EEF1A1[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 254: 108995,
- [17] Yang QR, Li YH, Wang Y, *et al.* The circRNA circ-SIAE inhibits replication of coxsackie virus B3 by targeting miR-331-3p and thousand and one amino-acid kinase 2[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 11: 779919,
- [18] Zeng Z, Xia L X, Fan S Y, *et al.* Circular RNA CircMAP3K5 acts as a MicroRNA-22-3p sponge to promote resolution of intimal hyperplasia Via TET2-mediated smooth muscle Cell differentiation[J]. *Circulation*, 2021, 143(4): 354-371,
- [19] Feng S S, Su J G, Lin L, *et al.* Development of a reverse genetics system for snakehead vesiculovirus (SHVV)[J]. *Virology*, 2019, 526: 32-37,
- [20] 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,
- [21] Qin X M, Zhang Y A, Tu J G. p38MAPK- and GSK3-mediated phosphorylation of snakehead vesiculovirus phosphoprotein at threonine 160 facilitates viral replication[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(5): e0040423,
- [22] Kiel C, Strunz T, Hasler D, *et al.* Seed sequence polymorphism rs2168518 and allele-specific target gene regulation of hsa-miR-4513[J]. *Human Molecular Genetics*, 2022, 31(6): 875-887,
- [23] 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,
- [24] Yi S F, Wu Y J, Gu X, *et al.* Infection dynamic of *Micropterus salmoides* rhabdovirus and response analysis of largemouth bass after immersion infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 139: 108922,
- [25] Saenz-Pipaon G, Dichek D A. Targeting and delivery of microRNA-targeting antisense oligonucleotides in cardiovascular diseases[J]. *Atherosclerosis*, 2023, 374: 44-54,

- [26] Su Y H, Lin T, Liu C, *et al.* microRNAs, the link between dengue virus and the host genome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 714409,
- [27] Guo Y J, Xu X Y, Tang T, *et al.* miR-505 inhibits replication of Borna disease virus 1 via inhibition of HMGB1-mediated autophagy[J]. *Journal of General Virology*, 2022, 103(1),doi: 10.1099/jgv.0.001713.
- [28] Gao Y, Yong F, Yan M L, *et al.* MiR-361 and miR-34a suppress foot-and-mouth disease virus proliferation by activating immune response signaling in PK-15 cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 280: 109725,
- [29] Shi X B, Yang Y H, Zhang X Z, *et al.* miR-541-3p promoted porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) replication by targeting interferon regulatory factor 7[J]. *Viruses*, 2022, 14(1): 126,
- [30] Sun P F, Wang J Q, Ilyasova T, *et al.* The function of miRNAs in the process of kidney development[J]. *Non-coding RNA Research*, 2023, 8(4): 593-601,
- [31] Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann K K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(1): 242-250,
- [32] Chen S Y, Deng Y, Pan D L. MicroRNA regulation of human herpesvirus latency[J]. *Viruses*, 2022, 14(6): 1215,
- [33] Zhang C, Yi L Z, Feng S S, *et al.* MicroRNA miR-214 inhibits snakehead vesiculovirus replication by targeting the coding regions of viral N and P[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(7): 1611-1619,
- [34] Wu Y C, Yue Y, Xiong S D. Cardiac miR-19a/19b was induced and hijacked by CVB3 to facilitate virus replication via targeting viral genomic RdRp-encoding region[J]. *Antiviral Research*, 2023, 217: 105702,
- [35] Shafaati M, Jamalidoust M, Kargar M, *et al.* Downregulation of hepatitis C virus replication by miR-196a using lentiviral vectors[J]. *Microbiology and Immunology*, 2021, 65(4): 161-170,
- [36] Liang R Y, Liang L, Zhao J J, *et al.* SP1/miR-92a-1-5p/SOCS5: a novel regulatory axis in feline panleukopenia virus replication[J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 273: 109549,
- [37] Jafarzadeh A, Naseri A, Shojaie L, *et al.* MicroRNA-155 and antiviral immune responses[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 101: 108188,
- [38] Lv J N, Li J Q, Cui Y B, *et al.* Plasma MicroRNA signature panel predicts the immune response after antiretroviral therapy in hiv-infected patients[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 753044,
- [39] Liu X, Guo J W, Lin X C, *et al.* Macrophage NFATc3 prevents foam cell formation and atherosclerosis: evidence and mechanisms[J]. *European Heart Journal*, 2021, 42(47): 4847-4861,
- [40] Bouvet M, Voigt S, Tagawa T, *et al.* Multiple viral microRNAs regulate interferon release and signaling early during infection with epstein-barr virus[J]. *mBio*, 2021, 12(2): e03440-20,
- [41] Xian X, Cai L L, Li Y, *et al.* Neuron secrete exosomes containing miR-9-5p to promote polarization of M1 microglia in depression[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 122,
- [42] Zhang Y, Yang Y J, Guo J, *et al.* miR-146a enhances regulatory T-cell differentiation and function in allergic rhinitis by targeting STAT5b[J]. *Allergy*, 2022, 77(2): 550-558,
- [43] Zhao C X, Yan Z X, Wen J J, *et al.* CircEAF2 counteracts Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma progression via miR-BART19-3p/APC/ β -catenin axis[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 153,
- [44] McGinnes Cullen L, Luo B, Wen Z Y, *et al.* The respiratory syncytial virus (RSV) G protein enhances the immune responses to the RSV F protein in an enveloped virus-like particle vaccine candidate[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(1): e0190022,
- [45] 朱曜良. 乌鳢水泡病毒 G 蛋白的胞内相互作用蛋白筛选及其功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- Zhu Y L. Screening and function analysis of intracellular interaction protein for snakehead fish vesiculovirus glycoprotein[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).

MiR-130c-5p targets the snakehead vesicular virus *g* gene to inhibit viral proliferation

JI Yan^{1,2}, ZHOU Xuan³, YU Yongyao⁴, LIU Xiaodan⁵, ZHANG Chi^{2*}, LIN Qiang^{1*}

(1. Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immunity and Green Breeding, Key Laboratory of Fishery Drug Creation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Institute of Aquatic Research, Guangzhou 510380, China;

2. School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430050, China;

3. Wuhan Customs District P. R. China, Wuhan 430050, China;

4. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

5. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Abstract: In order to investigate the targeting relationship of miR-130c-5p to the potential target gene *g* in snakehead vesiculovirus (SHVV) infection and its effect on viral replication, the changes of viral gene and protein levels and miR-130c-5p in SHVV were determined in this study by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot techniques using channel catfish ovary (CCO) as experimental materials. In addition, the target sequence corresponding to miR-130c-5p on the *g* gene of SHVV was cloned into the plasmid pmirGLO, and the plasmid pmirGLO-G was constructed for dual luciferase reporter assay for target gene verification. The results showed that the expression levels of miR-130c-5p and *g* genes were significantly up-regulated with the increasing time and dose of SHVV infection. Further experiments showed that co-transfection of miR-130c-5p mimic and pmirGLO-G plasmid significantly inhibited luciferase activity, while transfection of miR-130c-5p inhibitor significantly up-regulated the fluorescence signal of pmirGLO-G reporter vector. In addition, overexpression of miR-130c-5p significantly reduced the mRNA and protein expression of the viral *g* gene, while inhibition of miR-130c-5p up-regulated the mRNA and protein expression levels of the *g* gene. The results showed that miR-130c-5p inhibited the proliferation of SHVV by targeting the *g* gene of SHVV and causing the degradation of G protein. The results of this study provide an important basis for understanding the pathogenic mechanism of microRNA regulation of SHVV, and provide theoretical support for the development of anti-SHVV vaccines and other drugs.

Key words: MiR-130c-5p; snakehead vesiculovirus (SHVV); targeting; G protein; rhabdovirus

Corresponding authors: ZHANG Chi. E-mail: zhch@whpu.edu.cn;

LIN Qiang. E-mail: lin9902057@163.com

Funding projects: Pearl River Fisheries Research Institute Key Laboratory Open Project (20220103); Wuhan Customs Scientific Research Project (2023WK11); National Natural Science Foundation of China (32303068)