

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.06.003

miR let-7f 对流行性乙型脑炎病毒 在神经元细胞中复制的调控作用*

李文娟¹ 聂尚丹¹ 亚白柳² 王春梅^{3△}(¹ 济宁医学院法医学与医学检验学院; ² 济宁医学院基础医学院; ³ 济宁医学院神经生物学研究所, 济宁 272067)

摘要 **目的** 探讨 miR let-7f 对流行性乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 在神经元细胞中复制的影响。**方法** 培养人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞, miRNA 芯片检测 SH-SY5Y 细胞感染 JEV 后 miRNA 表达谱, 荧光定量 RT-PCR 检测确认 miR let-7f 表达情况; 实验随机分为 miR let-7f mimics 组、miR let-7f inhibitor 组和 miRNA control 组, 分别将 miR let-7f mimics、inhibitors 和 miRNA control 转染 SH-SY5Y 细胞后感染 JEV, 荧光定量 RT-PCR 和空斑法检测病毒复制变化情况。**结果** SH-SY5Y 细胞感染 JEV 后差异表达的 miRNA 有 37 个, 上调的有 28 个, 下调的有 9 个, 其中 miR let-7f 表达明显升高 (3.51 倍); SH-SY5Y 细胞感染 JEV 12h 后 miR let-7f 表达明显上升 (3.67 倍), 与 miRNA control 组和 miR let-7f inhibitor 组相比, miR let-7f mimics 组细胞培养上清中病毒滴度降低, 细胞内 JEV RNA 也显著减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.025$)。**结论** miR let-7f 在神经元细胞中能够有效抑制 JEV 复制, 在开发 JEV 感染的分子治疗方面具有潜在应用价值。

关键词 流行性乙型脑炎病毒; miR let-7f; 神经元; SH-SY5Y 细胞

中图分类号: R373.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2019)12-390-05

miR let-7f inhibited Japanese encephalitis virus replication in neurons

LI Wenjuan¹, NIE Shangdan¹, YA Bailiu², WANG Chunmei³(¹ School of Forensic and Laboratory Medicine, Jining Medical University,² College of Basic Medicine, Jining Medical University;³ Neurobiology Key Laboratory of Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To analyze the role of miR let-7f on Japanese encephalitis virus (JEV) infection and replication in neurons. **Methods** SH-SY5Y cells were cultured, and miRNA chip was used to detect differentially expressed miRNAs between SH-SY5Y cells after JEV infection and normal cells. The relative expression level of miR let-7f related to JEV infection was determined by qRT-PCR. SH-SY5Y cells were divided into three groups randomly which transfected with miR let-7f mimics, inhibitors, and miRNA control respectively, and then infected with JEV. Infected cells and supernatant were harvested and then qRT-PCR and plaque forming test were used to detect the levels of virus replication. **Results** A total of 28 miRNAs were up-regulated while 9 miRNAs down-regulated in SH-SY5Y cells infected with JEV compared with non-infected cells, of which miR let-7f up-regulated 3.51 folds. miR let-7f was confirmed to be up expressed 3.67 folds in SH-SY5Y cells after JEV infection 12h. After miR let-7f mimics were transfected, JEV RNA in cells and virus titer in supernatant was lower than miR let-7f inhibitors/miRNA control groups, and the differences showed statically significant ($P < 0.025$). **Conclusion** miR let-7f could inhibit JEV replication in neurons which might be as a potential molecular target for novel therapy.

Keywords: Japanese encephalitis virus; miR let-7f; Neuron; SH-SY5Y cells

* [基金项目] 山东省自然科学基金 (ZR2017LH056, ZR2015PH026); 国家自然科学基金 (81501018, 81703490)

△ [通信作者] 王春梅, E-mail: wangchunmei410@mail.jnmc.edu.cn

流行性乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)隶属于黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus),为单股正链 RNA 病毒。JEV 感染能够引起严重的中枢神经系统疾病,即流行性乙型脑炎(Japanese encephalitis, JE),简称乙脑。作为蚊媒病毒,JEV 可被多种蚊虫携带和传播,鸟被认为是 JEV 的传播宿主,病毒可通过候鸟迁徙进行远距离播散^[1]。据世界卫生组织报道,目前在亚洲和西太平洋地区的 24 个国家或地区存在乙脑的流行,全世界约 30 亿人生活在乙脑流行区,每年乙脑病例发生约 50000 例,其中死亡 15000 例^[2]。随着全球变暖以及旅游和贸易的发展,全球每年出现大量乙脑非流行地区的输入性病例。因此,乙脑成为国际关注的严重公共卫生问题。

目前,对乙脑的控制主要依赖监测和疫苗接种,尚无特异性疗法。因此,阐明 JEV 感染发生过程中神经元损伤以及基因表达与调控机制尤为重要。miRNA 作为一类具有调控功能的非编码 RNA 分子,可能是影响宿主免疫反应和病毒复制过程的关键因素,在病毒与宿主相互作用过程中发挥重要的调控作用。我们在前期研究中利用 miRNA 芯片检测了 SH-SY5Y 细胞感染 JEV 后 miRNA 表达谱。在此基础上,我们选择表达差异显著的 miR let-7f 作为研究对象,探索其对 JEV 在神经元细胞中复制的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SH-SY5Y 细胞为本实验室保存培养。细胞培养所需 DMEM 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,青霉素和链霉素购自 Hyclone。miRNA 表达谱检测采用 Affymetrix miRNA 表达谱芯片,由上海吉凯公司完成检测。细胞总 RNA 提取所需 Trizol 试剂和转染试剂 Lipofectamine 2000 均购自 Invitrogen 公司。miRNA 检测所需 All-in-one miRNA qRT-PCR Detection Kit 购自美国 Genecopoeia 公司。特异性引物 his-miRlet-7f primers、miR let-7f mimics、miR let-7f inhibitor 和 miRNA control 均购自 GenePharma 公司。反转录试剂盒 Ready to Go™ You prime First Strand Beads 购自 GE Healthcare 公司。实时荧光定量检测试剂 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)购自天根公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和病毒感染 SH-SY5Y 细胞培养采用 DMEM 培养基,加入 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 10% 胎牛血清。细胞置于 37℃,5% CO₂ 培养箱进行培养。待 SH-SY5Y 细胞生长至约 90% 单层时,对照组加入病毒稀释液,JEV 感染组将 JEV 以 MOI = 1 感染细胞,分别于感染后不同时间分别收获细胞和上清用于后续检测。

1.2.2 miRNA 芯片检测 采用 Affymetrix miRNA 表达谱芯片进行 miRNA 表达谱检测。以 Trizol 法进行总 RNA 抽提,抽提所得总 RNA 经 NanoDrop 2000 和 Agilent Bioanalyzer 2100 质检合格后,按照标准操作规程进行芯片实验。miRNA 表达有显著差异的筛选标准为表达量变化倍数在 2 倍以上($P < 0.05$)^[3]。

1.2.3 miR let-7f 表达检测 采用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,采用 All-in-one miRNA qRT-PCR Detection Kit 和特异性引物 his-miRlet-7f primers 检测 let-7f 表达水平,以 U6 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法进行 miR let-7f 表达相对定量。

1.2.4 miR let-7f 的过表达和抑制表达 为明确 miR let-7f 对病毒复制的影响,设置 miR let-7f mimics 组、miR let-7f inhibitor 组和 miRNA control 组进行检测。使用转染试剂 Lipofectamine 2000 分别将 miR let-7f mimics、miR let-7f inhibitor 和 miRNA 阴性对照转入 SH-SY5Y 细胞,具体操作按照说明书进行。转染后 24h,以 MOI = 1 感染 JEV,感染后 12h 分别收获细胞和上清用于后续检测。

1.2.5 JEV RNA 检测 利用反转录试剂盒 Ready to Go™ You prime First Strand Beads 将总 RNA 逆转录成 cDNA,采用安捷伦 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪和 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 进行 qRT-PCR 对 JEV 进行核酸定量。所用引物和 PCR 条件参考文献^[4]。实验重复 3 次,结果以 3 次实验结果的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.2.6 病毒滴度测定 采用空斑形成试验测定细胞培养上清中的病毒滴度。将 BHK-21 细胞传至 6 孔板,37℃ 5% CO₂ 培养至细胞达 90% 融合。将待测细胞上清进行 10 倍系列稀释,感染 6 孔板内细胞,吸附 60min 后每孔加入 3ml 营养琼脂覆盖,待琼脂完全凝固后继续培养。当观察到细胞病变时,覆盖添加 0.75% 中性红的第二层营养琼脂。通过观察计数空斑数量计算病毒滴度。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

使用 SPSS19.0 统计学软件进行统计分析。采用方差分析进行多组间总体比较,采用 *SNK-q* 检验作进一步地两两比较, $P < 0.025$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA 芯片结果

与对照组相比,SH-SY5Y 细胞感染 JEV 后有 37 个 miRNA 呈现显著表达差异,其中上调的 miRNA 有 28 个,下调的 miRNA 有 9 个,表达差异最大的 10 个 miRNA 见表 1。JEV 感染引起了 miRNA 表达谱变化。其中 miR let-7f 的表达上升了 3.67 倍,提示 miR let-7f 参与了 JEV 感染过程。

表 1 miRNA 芯片检测 SH-SY5Y 细胞感染 JEV 后 miRNA 表达变化

miRNA 名称	JEV 感染组	对照组	Fold Change	表达变化
miR-3074-3p	3.93507	1.95644	3.94	上调
miR-3921	1.22535	3.14033	3.77	下调
miR-34a-3p	2.60085	0.69909	3.74	上调
miR-2277-3p	2.12559	3.95192	3.55	下调
miR-let-7f-5p	5.26615	3.45351	3.51	上调
miR-1299	2.80569	1.04292	3.39	上调
miR-3064-5p	2.14606	0.52956	3.07	上调
miR-4688	4.39101	2.84068	2.93	上调
miR-181c-3p	2.67261	4.19488	2.87	下调
miR-4668-5p	3.55529	2.04978	2.84	上调

2.2 SH-SY5Y 细胞感染 JEV 后 miR let-7f 表达升高

将 JEV 以 $MOI = 1$ 感染 SH-SY5Y 细胞,分别在感染 0、6、12、24h 收集细胞。以 U6 为内参对照,利用 qRT-PCR 检测细胞内 miR let-7f 相对表达量,发现 SH-SY5Y 细胞感染 JEV 6h miR let-7f 表达升高 2.79 倍,感染 12h 升至 3.67 倍,达最高水平。见图 1。

2.3 miR let-7f 对 JEV 病毒 RNA 的影响

与 miRNA control 组和 miR let-7f inhibitor 组相比,miR let-7f mimics 组细胞内 JEV 病毒 RNA 拷贝数明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.025$)。见图 2。

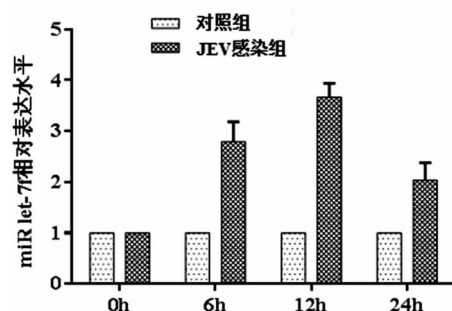
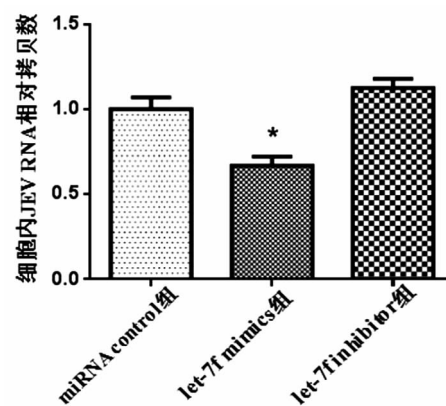


图 1 SH-SY5Y 细胞感染 JEV 后 miR let-7f 表达变化

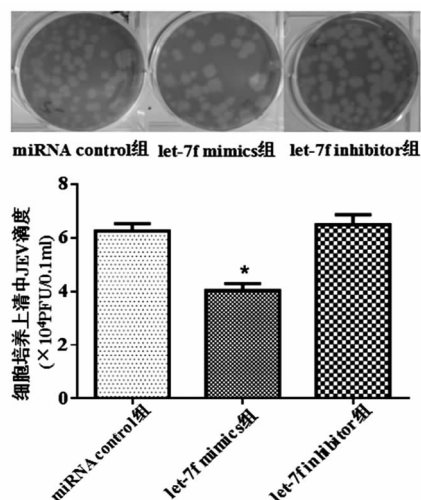


注:3 组间比较, $F = 45.95, P < 0.05$;
与 miRNA control 组及 miR let-7f inhibitor 组比较, * $P < 0.025, n = 6$

图 2 miR let-7f 对 JEV 感染 SH-SY5Y 细胞内病毒 RNA 的影响

2.4 miR let-7f 对 JEV 病毒滴度的影响

与 miRNA control 组和 miR let-7f inhibitor 组相比,miR let-7f mimics 组细胞上清中 JEV 滴度明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.025$)。见图 3。



注:3 组间比较, $F = 76.11, P < 0.05$;
与 miRNA control 组及 miR let-7f inhibitor 组比较, * $P < 0.025, n = 6$

图 3 miR let-7f 对 JEV 感染 SH-SY5Y 细胞培养上清中病毒滴度的影响

3 讨论

乙脑是世界最严重的病毒性脑炎,病死率高达 35% ~ 40%, 20% ~ 70% 的患者会留下永久性神经系统后遗症,给国家和家庭带来严重疾病负担。目前,乙脑尚无特异性疗法,探索乙脑发生过程的分子机制成了重要的科学问题。在乙脑感染过程中,JEV 突破血脑屏障后首先靶向神经元,引起神经元损伤和死亡,从而导致一系列神经系统临床症状。考虑到 JEV 的嗜神经性,以及神经元细胞损伤和死亡在乙脑发生中的重要作用,本研究选用人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞作为模型进行相关研究。

miRNA 在 JEV 感染和乙脑的发生发展过程中发挥重要作用。JEV 感染后 miR-155 可以抑制 SHIP1 表达,增强 IFN- β 和前炎性细胞因子的产生和释放,促进中枢神经系统损伤中的炎症反应和氧化应激^[5];人小胶质细胞 CHME3 中过表达 miR-155 会显著抑制 JEV 的增殖^[6];JEV 感染神经胶质细胞后,通过上调 miR-146a 抑制 NF- κ B 活性,破坏 Jak-STAT 信号传导通路,有利于病毒逃脱细胞免疫,促进病毒复制^[7]。上述研究主要集中于 miRNA 在 JEV 感染神经胶质过程中的作用,关于 JEV 感染神经元细胞后 miRNA 的差异表达谱则鲜有报道。本研究利用 miRNA 芯片,将感染 JEV 的 SH-SY5Y 细胞和未感染的 SH-SY5Y 细胞进行 miRNA 表达比较,发现差异表达超过 2 倍的 miRNA 有 37 个,其中上调的有 28 个,下调的有 9 个。这表明在 JEV 感染神经元细胞过程中的确存在 miRNA 的参与。

本研究发现的 37 个差异表达 miRNA 中,miR let-7f 表达显著上调,并采用 qRT-PCR 加以验证。let-7 最早在肿瘤学领域被广泛研究,肺癌、卵巢癌、乳腺癌中均有不同程度的表达,通过与 RAS^[8]、HMGA2^[9]、c-MYC^[10] 这些原癌基因的 3'-UTR 结合,抑制肿瘤的发生和发展。let-7 家族在许多病毒感染过程也发挥重要的调控作用,如 let-7b 通过与丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)基因组相互作用抑制 HCV 的感染性^[11];let-7a 通过靶向 MAP4K4 信号通路抑制卡波西肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)的

复制^[12];let-7g 能够抑制乙肝病毒(inhibits hepatitis B virus, HBV) preS2 蛋白表达和病毒增殖^[13]。尤其值得关注的是,let-7a 和 let-7b(let-7a/b)在感染 JEV 的神经胶质细胞中表达上调,通过外泌体释放到细胞外的 let-7a/b 可以转入神经元细胞,通过活化 caspases 促进神经元损伤^[14]。因此,let-7 家族在乙脑的发生过程中可能发挥重要的调控作用,let-7f 在 JEV 感染神经元细胞中的作用值得进一步探索。

在病毒感染过程中,宿主 miRNA 参与包括 JEV 在内的许多病毒的生命周期^[4,6,10-12]。本文将 let-7f mimics 转染 SH-SY5Y 细胞后感染 JEV,细胞内 JEV 病毒 RNA 拷贝数明显减少,释放至细胞上清中的病毒颗粒数量也明显降低,表明 let-7f 对 JEV 复制具有抑制作用。miRNA 对于病毒复制的调控主要有以下途径:通过直接与病毒基因组结合,影响病毒的复制;通过调控宿主自身基因的表达,尤其是固有免疫相关基因表达,从而间接影响病毒复制^[15]。那么 let-7f 通过何种机制影响 JEV 复制仍是重要的科学问题。后续可以采用生物信息软件预测 JEV 与 let-7f 之间是否存在结合位点并加以验证,以明确 let-7f 是否通过与病毒基因组结合抑制病毒复制。此外,JEV 需要依赖细胞内膜结构进行病毒的复制和组装,而神经元细胞感染 JEV 后产生内质网压力和活性氧可诱导细胞凋亡和炎症反应,这些与细胞自噬和病毒复制密切相关^[16]。let-7 家族参与中枢神经系统炎症的发生发展^[17];let-7a/b 在 JEV 感染过程中可以转入神经元细胞活化 caspases 促进神经元损伤^[13]。在 JEV 感染神经元细胞过程中,let-7f 是否参与神经元细胞的损伤凋亡以及细胞自噬需要进一步的工作进行阐释。

综上所述,miRNA 作为一种重要的转录后调控机制,在 JEV 感染过程中具有重要地位,miR let-7f 在感染 JEV 的神经元细胞中呈现差异表达,并对病毒复制具有显著的抑制作用,进一步阐释其具体作用机制将为开发分子治疗靶点提供基础数据。

参考文献:

- [1] 高晓艳,周海卫,刘红,等. 乙脑病毒的空间播散及迁

- 徙事件研究[J]. 病毒学报, 31(3):264-268. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002694.
- [2] Borthakur A, Das N, Bora B. Data from the World Health Organization (WHO) National Network laboratory for Japanese Encephalitis [J]. J Glob Infect Dis, 2013, 5(2):76-79. DOI:10.4103/0974-777X.112294.
- [3] Munagala R, Aqil F, Vadhanam MV, et al. MicroRNA 'signature' during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention. [J]. Cancer Lett, 2013, 339(2):175-184. DOI:10.1016/j.canlet.2013.06.012.
- [4] Shao N, Li F, Nie K, et al. TaqMan real-time RT-PCR assay for detecting and differentiating Japanese encephalitis virus [J]. Biomed Environ Sci, 2018, 31(3):208-214. DOI:10.3967/bes2018.026.
- [5] Thounaojam MC, Kundu K, Kaushik DK, et al. MicroRNA 155 regulates Japanese encephalitis virus-induced inflammatory response by targeting Src homology2-containing inositol phosphatase 1 [J]. J Virol, 2014, 88(9):4798-810. DOI:10.1128/JVI.02979-13.
- [6] 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]. J Neuroinflammation, 2014(11):97. DOI:10.1186/1742-2094-11-97.
- [7] Sharma N, Verma R, Kumawat KL, et al. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12(1):30. DOI:10.1186/s12974-015-0249-0.
- [8] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene [J]. Genes Dev, 2007, 21(9):1025-1030. DOI:10.1101/gad.1540407.
- [9] Sampson VB, Rong NH, Han J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in burkitt lymphoma cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(20):9762-9770. DOI:10.1158/0008-5472.can-07-2462.
- [10] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family [J]. Cell, 2005, 120(5):635-647. DOI:10.1016/j.cell.2005.01.014.
- [11] Cheng JC, Yeh YJ, Tseng CP, et al. Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication [J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(15):2621-2633. DOI:10.1007/s00018-012-0940-6.
- [12] Tan X, Gao Y, Nan Y, et al. Cellular MicroRNA let-7a suppresses KSHV replication through targeting MAP4K4 signaling pathways [J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0132148-. DOI:10.1371/journal.pone.0132148.
- [13] Takata A, Otsuka M, Ohno M, et al. Mutual antagonism between hepatitis B viral mRNA and host microRNA let-7 [J]. Sci Rep, 2016, 6:23237. DOI:10.1038/srep23237.
- [14] Mukherjee S, Akbar I, Kumari B, et al. Japanese encephalitis virus-induced let-7a/b interacted with the NOTCH-TLR7 pathway in microglia and facilitated neuronal death via caspase activation [J]. J Neurochem, 2019, 149(4):518-534. DOI:10.1111/jnc.14645.
- [15] 魏建春, 安静. 微小 RNA 在病毒与宿主相互作用中的功能 [J]. 微生物与感染, 2017(1):57-64. DOI:10.3969/j.issn.1673-6184.2017.01.011.
- [16] 刘娜, 李文娟. 自噬与中枢神经系统疾病及小胶质细胞活化相关研究进展 [J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(5):635-647. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.05.04.
- [17] Dhahri, Wahiba, Dussault, et al. Reduced expression of let-7f activates TGF- β /ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure [J]. J Cell Mol Med, 2019, 21(9):2211-2222. DOI:10.1111/jcmm.13144.

(收稿日期 2019-03-26)

(本文编辑:石俊强)