



# 猪流行性腹泻病毒通过 miR-133c-3p/ BCL2L2 轴调控细胞凋亡

郑红青<sup>1</sup>, 吴旭锦<sup>1\*</sup>, 朱小甫<sup>1</sup>, 尹宝英<sup>1</sup>, 高军花<sup>2</sup>, 李艳芝<sup>3</sup>, 植婵萍<sup>4</sup>

(1. 咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 咸阳市动物疫病分子生物学诊断技术研究重点实验室, 咸阳 712000;  
2. 邢台市农业农村局, 邢台 054001; 3. 衡水职业技术学院, 衡水 053000; 4. 广东茂名农林科技职业学院, 茂名 525000)

**摘要:** 旨在探讨 miR-133c-3p 在猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起的细胞凋亡过程中所起的作用, 并探讨其发挥作用的机制。以 PEDV 感染 MARC-145 细胞为模型, 检测 PEDV 感染过程中细胞的凋亡情况以及 6 个与凋亡相关 miRNAs 的表达差异, RT-qPCR 检测 PEDV 感染过程中与凋亡相关 miRNAs 的表达差异, 合成 miR-133c-3p 的模拟物和抑制剂, 转染 MARC-145 细胞, 采用流式细胞术检测 PEDV 感染 MARC-145 细胞的凋亡情况, 流式细胞术检测过表达和敲低 miR-133c-3p 后细胞的凋亡情况, 采用生物信息学方法预测 miR-133c-3p 的靶基因, 荧光素酶报告基因检测了 miR-133c-3p 和靶基因的结合情况, Western blot 检测了过表达 miR-133c-3p 对 BCL-w 和 PEDV 蛋白表达水平的调控, 用 siRNA 敲低 BCL-w 蛋白检测细胞凋亡情况。结果显示, PEDV 的感染可以诱导 MARC-145 细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ), 与凋亡相关的 miRNAs, 如 miR-133c-3p 和 miR-149-5p 的表达上调 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ), miR-138-3p 的表达下调 ( $P < 0.05$ )。其中, miR-133c-3p 在病毒感染后升高了约 5 倍 ( $P < 0.01$ )。过表达 miR-133c-3p 后, 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ ); 敲低 miR-133c-3p 后, 细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ )。用生物信息学方法预测 miR-133c-3p 与 BCL2L2 的 3'UTR 区域有结合位点, 荧光素酶报告基因试验显示 miR-133c-3p 可以和 BCL2L2 基因靶向结合 ( $P < 0.01$ ), 过表达 miR-133c-3p 后细胞内 BCL-w 蛋白的表达明显下调, 且病毒的感染可以降低 BCL-w 的表达水平, 敲低 BCL-w 后细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ )。PEDV 感染后可以通过上调 miR-133c-3p 的表达来下调 BCL2L2 的表达, 从而促进细胞的凋亡。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; 微小 RNA133c-3p; BCL2 样蛋白; 凋亡

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)08-2233-11

## Porcine Epidemic Diarrhea Virus Regulates Cell Apoptosis by miR-133c-3p/BCL2L2 Axis

ZHENG Hongqing<sup>1</sup>, WU Xujin<sup>1\*</sup>, ZHU Xiaofu<sup>1</sup>, YIN Baoying<sup>1</sup>,  
GAO Junhua<sup>2</sup>, LI Yanzi<sup>3</sup>, ZHI Chanping<sup>4</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology in Xianyang City, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang 712000, China; 2. Xingtai Agricultural Information Center, Xingtai 054001, China; 3. Hengshui College of Vocational Technology, Hengshui 053000, China; 4. Guangdong Maoming Agriculture & Forestry Technical College, Maoming 525000, China)

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 咸阳职业技术学院科研基金重大项目(2020KJA01); 咸阳市科技计划项目(2019k02-64); 陕西省教育厅专项科学研究计划项目(18JK1208); 陕西科技计划一般青年项目(2021JQ-900); 咸阳职业技术学院博士启动基金(2021BK04); 陕西省科技计划项目(2021NY-037)

作者简介: 郑红青(1983-), 女, 河北枣强人, 博士, 主要从事病毒感染调控机制研究, E-mail: huagaiyuxiang3@126.com; Tel: 029-33680109

\* 通信作者: 吴旭锦, 主要从事病毒感染调控机制研究, E-mail: yaoyuanwxj@163.com

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate the role of miR-133c-3p in the process of cell apoptosis caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection, and to explore its mechanism. In this study, PEDV-infected MARC-145 cells were used as a model to detect the expression differences of 6 apoptosis-related microRNAs during PEDV infection. The expression levels of 6 apoptosis-related microRNAs were measured by RT-qPCR during PEDV infection. The apoptosis of PEDV-infected, miR-133c-3p transfected MARC-145 cells was detected by flow cytometry. The effect of miR-133c-3p on cell apoptosis was determined by flow cytometry. The target gene of miR-133c-3p was predicted by bioinformatics method. The binding of miR-133c-3p and the 3'UTR of target gene was determined by the luciferase reporter gene. The expression levels of BCL-w and PEDV protein were determined by Western blot when miR-133c-3p was over-expressed. The cell apoptosis rate was determined by flow cytometry when knock-down of BCL-w. The results showed that PEDV infection could induce apoptosis of MARC-145 cells, and the expression of microRNAs related to apoptosis, such as miR-133c-3p and miR-149-5p, were up-regulated ( $P < 0.05$  or  $P < 0.001$ ), the expression of miR-138-3p was down-regulated ( $P < 0.05$ ). The apoptosis-related microRNAs miR-133c-3p and miR-149-5p were up-regulated ( $P < 0.05$  or  $P < 0.001$ ), and miR-138-3p was down-regulated ( $P < 0.05$ ). Among these, the expression of miR-133c-3p was upregulated almost 5 folds ( $P < 0.01$ ). The cell apoptosis rate was significantly increased after overexpression of miR-133c-3p ( $P < 0.01$ ) and the cell apoptosis rate was reduced after knock-down of miR-133c-3p ( $P < 0.05$ ). Bioinformatics methods were used to predict the binding sites between the miR-133c-3p and the 3'UTR of *BCL2L2* gene. The result of luciferase reporter gene experiment showed that miR-133c-3p could bind to 3'UTR of *BCL2L2* gene ( $P < 0.01$ ). The expression of BCL-w in cells was significantly down-regulated after over-expression of miR-133c-3p ( $P < 0.01$ ). PEDV could inhibit the expression level of BCL-w. Knock-down of BCL-w could induce cell apoptosis. PEDV infection could down-regulate the expression of BCL-w by up-regulating the expression level of miR-133c-3p, thereby promoting cell apoptosis.

**Key words:** porcine epidemic diarrhea virus; miR-133c-3p; BCL2L2; apoptosis

\* **Corresponding author:** WU Xujin, E-mail: yaoyuanwxj@163.com

猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 最早于 1971 年发现于英国<sup>[1]</sup>, 2010 年之前的毒株由于有疫苗毒株的保护, 以零星发病为主要特征。习惯上把 2010 年之前的 PEDV 毒株分到 G1a 组<sup>[2]</sup>。在 2010 年 10 月, 我国南方几个省发现了新的变异毒株, 这些毒株主要危害 7 日龄以内的仔猪, 仔猪发病率和死亡率可高达 90%<sup>[3]</sup>。PEDV 属于冠状病毒科  $\alpha$  冠状病毒属, 是有膜的单股正义 RNA 病毒, 核酸长约 28 kb, 包括 5' 端帽子结构和 3' 的 poly A 尾。基因组有 6 个开放阅读框, 分别为 ORF1a/1b, 分别编码 S、M、E、N 和 ORF3, 其中 ORF1a/1b 又被切割成 16 个非结构蛋白<sup>[4]</sup>。这些非结构蛋白对于病毒基因的复制至关重要。S 基因可被切割成 S1 和 S2 亚单位, 与病毒的进入和膜融合有关。由于 RNA 病毒的易突变决定了 PED

疫苗研发的难度<sup>[5]</sup>, 目前 PEDV 突变毒株已经在世界范围内进化了 4 个主要的组群, 给我国和世界养猪业造成了重大经济损失<sup>[3]</sup>。

微小 RNA (microRNA, miRNAs) 是非编码 RNA, 长 18~25 bp, 不编码蛋白质。成熟的 miRNAs 是单链的, 通过与靶蛋白 mRNA 3'UTR 区域的结合, 导致靶蛋白 mRNA 被切割, 从而调控基因的转录水平, 甚至影响蛋白翻译的水平, 调控蛋白的表达, 进而调控细胞内多种生物学过程<sup>[6]</sup>。近年来的研究表明, miRNAs 也可以通过直接与病毒基因组 RNA 结合或者通过改变细胞的转录谱来影响 RNA 病毒的复制和致病性<sup>[7]</sup>。在关于 miR-133c-3p 的研究中发现, 它在多种细胞中发挥着调控细胞凋亡和增殖的作用。体内试验发现, miR-133c-3p 可抑制心肌细胞的纤维化和心肌肥大<sup>[8]</sup>。

另外,在癌细胞的研究中发现,miR-133c-3p 可抑制细胞的增殖和迁移<sup>[9-11]</sup>。

BCL2 蛋白家族整合了触发细胞存活或凋亡的信号,BCL-w 蛋白(又称为 BCL2 样蛋白 2),属于 BCL2 家族的成员,由 BCL2L2 基因编码<sup>[12]</sup>。研究表明,BCL-w 的 BH1 结构域的 Gly94 残基可以抑制 BAK 的活性,BCL-w 的抗凋亡作用主要通过 BAK、BAX 相互作用发挥抑制细胞凋亡的作用<sup>[13]</sup>。非刺激情况下,BCL-w 蛋白通常通过其疏水结构域与线粒体、内质网和核膜的脂质双分子层结合,在静息细胞中,BCL-w 的 c 端结构域在疏水囊内折叠,仅松散地附着在线粒体膜上,当接收到凋亡信号时,BCL-w 的 c 端臂通过促凋亡 BH3-only 蛋白的连接释放,从而促进 BCL-w 与线粒体之间的紧密相互作用发挥抗凋亡的作用<sup>[14-15]</sup>。

关于 PEDV 感染引起细胞凋亡的机制,有研究对 PEDV 感染细胞转录组测序发现,感染前后与凋亡相关信号通路分子表达水平差异显著<sup>[16]</sup>,并且 PEDV 也可以通过 p53 和线粒体凋亡通路促进细胞凋亡<sup>[17-18]</sup>。PEDV 感染诱导 Vero 细胞凋亡<sup>[19]</sup>,那么 PEDV 是否也诱导 MARC-145 细胞的凋亡,这种凋亡是否由于 microRNAs 的表达丰度改变影响凋亡相关蛋白的表达,而凋亡蛋白表达量的改变抑制或促进了细胞凋亡呢?对这个问题的研究将对阐明 PEDV 致病机制具有重要意义。

本研究首先以 PEDV 感染 MARC-145 细胞为模型,分析了在 PEDV 感染过程中与细胞凋亡相关的 microRNAs 表达丰度的变化,选取差异表达最明显的 miR-133c-3p 进一步探究 PEDV 感染诱导细胞凋亡的可能机制,以期明确 PEDV 的胞内复制机制及抵抗 PEDV 感染提供新的参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

MARC-145 细胞(非洲绿猴肾上皮细胞)(咸阳市动物疫病分子生物学诊断技术研究重点实验室)实验室保存,Vero 细胞为实验室保存,高糖 DMEM 细胞培养液购自美国 Hyclone 公司;减血清培养基 OPTI-MEM、胰蛋白酶、转染试剂 Lipofectamine 2000、microRNA 模拟物(miR-133-3p mimics)、模拟物对照(mimics control)、抑制剂(inhibitor)和抑制剂对照(inhibitor control)、SC、siBCL-w-1、siBCL-w-2、siBCL-w-3、CO<sub>2</sub> 培养箱、生物安全柜均

购自美国 Thermo 公司;胎牛血清购自德国 PAN-Biotech 公司;荧光定量试剂盒、microRNA 第一股 RNA 合成试剂盒、总 RNA 提取试剂 RNAiso 均购自宝生物工程(大连)有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(货号:bs-0295G-HRP)和 HRP 标记羊抗小鼠 IgG(货号:bs-40296G-HRP)购自北京博奥森生物技术有限公司;引物由北京擎科生物公司合成,引物序列见表 1;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自碧云天公司;PEDV N 蛋白单克隆抗体由上海兽医研究所董光志研究员馈赠;细胞内参  $\beta$ -actin 和 BCL-w 蛋白的抗体购于细胞信号通路技术公司;pmirGLO 质粒购自普洛麦格公司。anti-BCL-w (2724)购自 Cell Signaling Technology (CST)。

### 1.2 病毒和细胞培养

本研究使用的 PEDV 毒株为 CH/HBTS/2017 (GenBank 收录号:MH581489.1),作者于 2018 年分离自河北唐山某暴发猪流行性腹泻猪场的病料中。MARC-145 细胞用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞传代时用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。

### 1.3 猪流行性腹泻病毒感染 MARC-145 细胞

用 Vero 细胞扩增病毒,待细胞病变 80% 时收毒,TCID<sub>50</sub> 测病毒滴度,细胞长到 80% 融合度,用 PBS 缓冲液清洗 3 遍,配制含 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  胰酶的 DMEM 感染液,将病毒加到 MARC-145 细胞上,轻轻摇匀,孵育 1.5 h 后弃掉毒液,换液在 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养。

### 1.4 免疫荧光试验

MARC-145 长成单层细胞后,用含 2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  胰酶的 DMEM 培养液感染 CH/HBTS/2017 毒株,感染复数为 0.1 MOI。12 h 后留样用 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 30 min,再用 1% Triton 100 室温通透 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 PEDV N 蛋白抗体过夜孵育,PBS 洗 3 次,每次 5 min。FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(货号:bs-0296G-FITC)室温孵育 1 h,Hoechst 33258 染核 5 min,封片观察。

### 1.5 TCID<sub>50</sub> 的测定

经过 24 h 培养生长状态良好的 MARC-145 细胞,消化后将浓度稀释到  $2 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  左右,铺到 96 孔板,每孔加 100  $\mu\text{L}$  细胞混悬液,将培养板放到细胞培养箱培养 24 h 长成单层细胞。用 10 支 1.5 mL 离心管,每管 900  $\mu\text{L}$  含 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  胰酶

的 DMEM 培养基依次将病毒倍比稀释(从  $10^{-1}$  稀释到  $10^{-10}$ ),将 96 孔板培养的单层细胞用 PBS 洗 3 遍后,按照 96 孔板上的列数从第 1~10 列将病毒稀释液依次加入,剩余只加培养基作对照。第 3 天用 Reed-Muench 方法计算 TCID<sub>50</sub>。

### 1.6 细胞转染

将 MARC-145 细胞以  $2 \times 10^5$  个·孔<sup>-1</sup>的密度接种至 12 孔板,待细胞长到 80% 融合度时进行转染。按照 Lipofectamine™2000 转染试剂使用说明书,将 mimics control (MC)、miR-133c-3p、inhibitor、inhibitor control (IC) 和 Lipofectamine™2000 分别跟 OPTI-MEM 混合,室温静置 5 min 后,将合成的模拟物和抑制剂的混合液及其对照分别跟 Lipofectamine 混合液混合,轻轻混匀,静置 15 min 后,轻轻滴到细胞培养液上。

### 1.7 荧光定量 PCR(RT-qPCR)

培养细胞处理后用 PBS 冲洗 3 遍,加 RNAiso 到细胞表面,静置 5 min,按照厂家说明书提取细胞的总 RNA。用 500 ng 的细胞总 RNA 用逆转录试剂盒得到 cDNA,按照 microRNA 逆转录试剂盒说明书所示,合成 microRNA 的 cDNA,使用定量 PCR 试剂盒和特异性引物(表 1)进行荧光定量 PCR 的反应体系配制,使用荧光定量 PCR 仪在反应条件:95 °C 5 min,95 °C 20 s,62 °C 30 s,40 个循

环,72 °C 3 min 条件下进行反应。

其中 microRNA 内参使用试剂盒中的 U6 small RNA 引物,BCL2L2 内参为 GAPDH,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 miRNA 和 BCL2L2 mRNA 表达。

### 1.8 MTT 试验

每孔约  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板,到 80% 融合度时将模拟物对照按照 0、20、50 nmol·L<sup>-1</sup> 转染 MARC-145 细胞,6 h 后更换新鲜培养基,24 h 后移除培养基,每孔加 20 μL 5 mg·mL<sup>-1</sup> 无菌的 MTT 染料,37 °C 培养 4 h,每孔加 150 μL 的 DM-SO,读取 490 nm 的吸光值。

### 1.9 流式细胞术

经过不同处理的细胞用胰酶消化下来,用 PBS 洗 1 遍,用 FACS buffer 重悬,单细胞悬液在 Annexin V 中室温孵育 30 min 上机检测。

### 1.10 荧光素酶报告基因试验

将含有 miR-133c-3p 结合位点的 BCL2L2 3' UTR 区域的野生型(WT)和突变型(MuT)连接到 pmirGLO 荧光素酶报告基因质粒,分别命名为 pmir-BCL2L2-WT 和 pmir-BCL2L2-MuT,将 miR-133c-3p 模拟物和模拟物对照(MC)跟上述 2 个质粒分别转染进 MARC-145 细胞,48 h 后,按照荧光素酶报告基因试剂盒使用说明使用多功能酶标仪检测荧光素酶活性。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列(5'→3')
Gene	Primer sequence
mml-miR-7	F:CGGTGGAAGACTAGTGATTTTGGTTGT
mml-miR-138-5p	F:AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG
mml-let-7a-5p	F:GTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
mml-miR-149-5p	F:TCTGGCTCCGTGTCTTCACTC
mml-miR-210-3p	F:CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGAA
mml-miR-133c-3p	F:TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG
mml-miR-155	F:TTAATGCTAATCGTGATAGGGGTG
mml-miR-25	F:CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
mml-miR-17-3p	F:ACTGCAGTGAAGCACTTGT
mml-miR-186-5p	F:CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT
<i>βactin</i>	F:ATCGTGCGTGACATTAAG R:ATTGCCAATGGTGATGAC
<i>BCL2L2</i>	F:ATGAGTTCGAGACCCGCTTC R:CTTTGTCTTTGGGGCTGCAC
siBCL-w-1	CACTGAAGCTGAGATGGCTGATGAA
siBCL-w-2	GAGATGGCTGATGAAGTAATTTGCA
siBCL-w-3	GGCTGATGAAGTAATTTGCAGTGAA

### 1.11 Western blot

将含蛋白酶抑制剂的 RIPA 加到处理细胞表面,冰上孵育 30 min,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,吸取上清提取细胞的总蛋白。提取的总蛋白用蛋白定量试剂盒定量,SDS-PAGE 电泳时每孔加相同的蛋白量,电泳完毕转到 PVDF 膜,转膜完成后用 5%的脱脂奶粉液封闭,然后用一抗[PEDV N 蛋白抗体或 anti-BCL-w (2724)]4 °C 孵育过夜,再用 HRP 标记二抗(羊抗小鼠 IgG 或羊抗兔 IgG)室温孵育 2 h, TBST 洗 3 遍,使用曝光显影液进行曝光。

### 1.12 统计分析

用 Graphpad Prism 6 进行统计分析,图表使用 Unpaired *t*-test、one-way ANOVA 和 two-way ANOVA 统计方法。用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析,数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PEDV 感染 MARC-145 细胞并诱导细胞凋亡

将 PEDV 毒株 CH/HBTS/2018 株以 0.1 和 1 MOI 感染 MARC-145 细胞,细胞在 0、12 和 24 h 后细胞病变如图 1a 所示,在感染 12 h 后细胞也出现了融合的现象,但融合细胞数量比较少,在感染 24 h 后 1 MOI 感染的细胞病变出现了片状融合。12 和 24 h 病毒的滴度如图 1b 所示,1 MOI 感染后 24 h 病毒滴度在 6.5 lgTCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 左右,0.1 MOI 感染 24 h 后病毒滴度在 4.2 lg TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 左右。由结果可知,病毒可以在 MARC-145 细胞高效增殖。在病毒感染 12 h 后留样,间接免疫荧光示踪病毒,检测病毒感染细胞的情况,如图 1c 所示,病毒以 0.5 和 0.1 MOI 感染可以在 MARC-145 细胞内高效复制。分别以 0.0、0.1、0.5、1.0 MOI 感染 MARC-145 细胞,流式细胞术检测 PEDV 感染 MARC-145 细胞 24 h 后细胞的凋亡情况,如图 1e 所示,与对照组相比,感染 0.1 MOI 病毒 12 h 后,细胞凋亡率显著升高(图 1d)( $P < 0.05$ ),随着感染复数的增大,细胞凋亡率显著增加( $P < 0.01$ )。

### 2.2 PEDV 感染引起 miR-133c-3p 显著上调

为了进一步探究 PEDV 感染引起细胞凋亡的原因,进一步从 RNA 水平揭示 PEDV 诱导细胞凋亡的机制,选择了 6 个文献中报道的影响细胞凋亡

的 microRNAs,分别是 miR-133c-3p、miR-7、miR-186-5p、miR-155、miR-149-5p、miR-138-5p。使用 RT-qPCR 方法检测在 PEDV 感染前后它们的表达差异。如图 2 所示,miR-133c-3p 的表达显著上调( $P < 0.01$ ),miR-149-5p 略有升高( $P < 0.05$ ),miR-138-5p 表达下调( $P < 0.05$ ),miR-7、miR-186-5p 和 miR-155 的表达在 PEDV 感染前后差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.3 过表达 miR-133c-3p 促进了细胞凋亡

将合成的 miR-133c-3p 的模拟物对照(MC)转染细胞后,用 MTT 试验检测细胞活性,结果表明 0、20、30、50 nmol·L<sup>-1</sup> 的转染浓度不影响细胞活性(图 3a)。转染 miR-133c-3p 后 6 h 感染 PEDV,继续感染 18 h 后收样,流式细胞术检测细胞凋亡,结果显示,miR-133c-3p 过表达并感染 PEDV 后细胞凋亡率显著升高( $P < 0.001$ )(图 3)。

### 2.4 敲低 miR-133c-3p 抑制了病毒感染引起的细胞凋亡

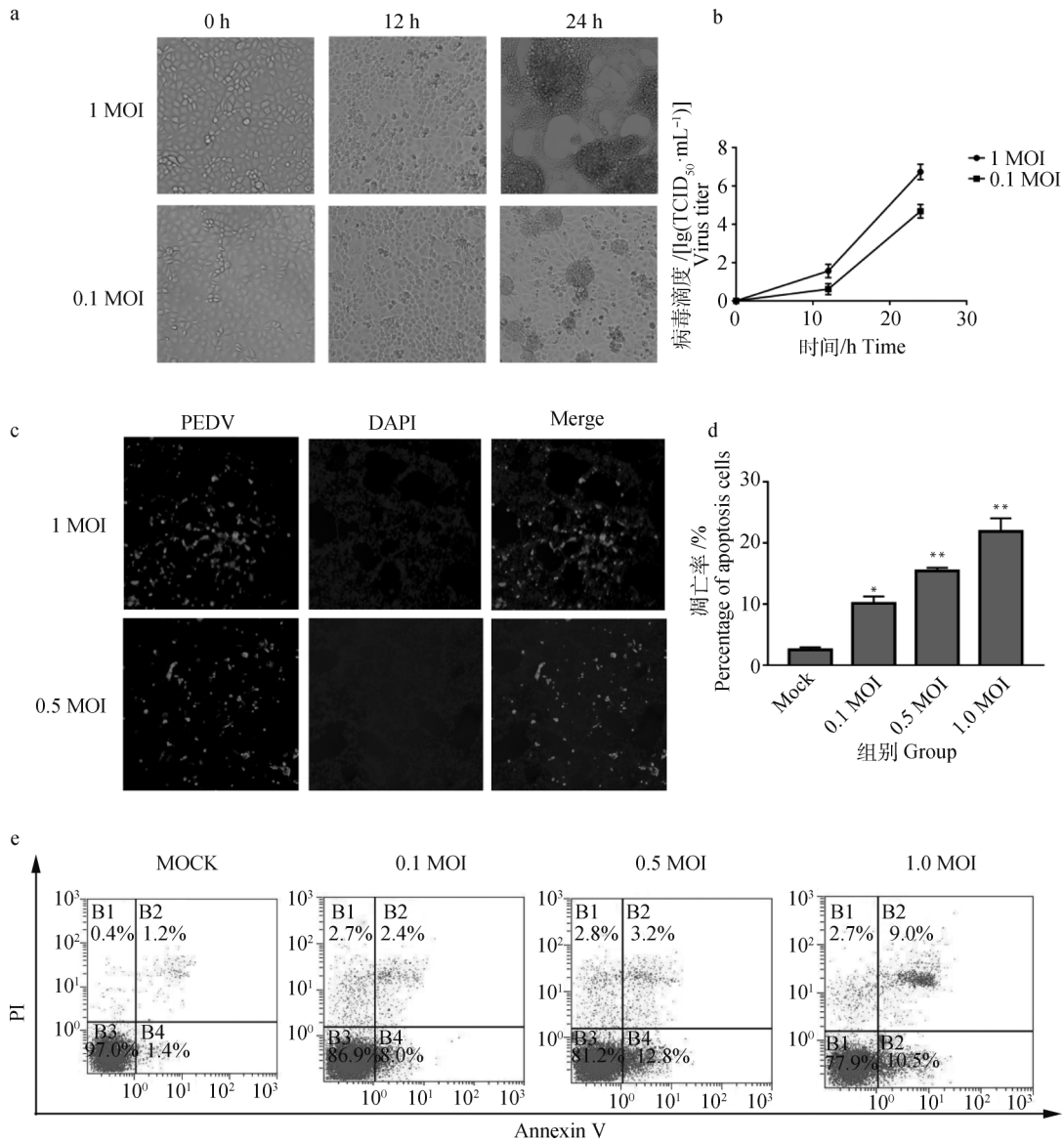
将 miR-133c-3p 的抑制剂转染 MARC-145 12 h 换液后感染 1 MOI 病毒,继续培养 12 h 后收取细胞样品,流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果显示,敲低 miR-133c-3p 后细胞凋亡率明显下降( $P < 0.01$ )(图 4)。

### 2.5 PEDV 感染后下调了 miR-133c-3p 的靶基因 BCL-w 的表达

为了进一步确认 miR-133c-3p 调控的靶基因,使用生物信息学在线预测网站([http://www.targets.org/vert\\_72/](http://www.targets.org/vert_72/))预测其靶基因,荧光素酶报告基因用来验证 miR-133c-3p 和 BCL2L2 3' UTR 区域的结合。结果发现,BCL2L2 基因的 3' UTR 区域有 miR-133c-3p 的结合位点(图 5a),进一步检测了 miR-133c-3p 的模拟物(mimic)和模拟物对照(MC)转染组的荧光素酶活性,结果发现,miR-133c-3p 可以显著降低野生型报告基因质粒的荧光素酶活性,而对突变型质粒没有影响( $P < 0.01$ ),这表明 miR-133c-3p 可以与 BCL2L2 靶基因区域的结合(图 5b)。Western blot 检测了细胞内转染 miR-133c-3p 24 h 时 BCL-w 蛋白的表达,结果发现,miR-133c-3p 可以在细胞内下调 BCL-w 基因的表达水平,并且 PEDV 感染也可以下调 BCL-w 的表达水平( $P < 0.001$ )(图 5c)。

### 2.6 敲低 BCL-w 可以促进细胞凋亡

为了检测 BCL-w 是否影响细胞凋亡,合成 3 条



a. 不同感染复数 PEDV 感染 MARC-145 细胞的病变; b. 不同感染复数感染 MARC-145 细胞后 12 和 24 h 后病毒的滴度; c. IFA 检测 PEDV 感染 MARC-145 细胞的感染情况; d. 不同剂量 PEDV 导致细胞凋亡百分比柱状图; e. 流式细胞仪检测 PEDV 诱导 MARC-145 细胞凋亡程度; 与 Mock 组比较, \**P* < 0.05 和 \*\**P* < 0.01 表示显著差异。下同

a. Cytopathy infected with 0.1 and 1 MOI virus in MARC-145 cells. b. Virus titer infected with 0.1 and 1 MOI virus in MARC-145 cells; c. Results of of MARC-145 cells apoptosis that are detected by flow cytometry after 0, 0.1, 0.5, 1 MOI of the PEDV infected; d. Histogram of apoptotic rate in different dose of PEDV; e. The apoptosis of Marc-145 cells induced by PEDV detected by flow cytometry. Compared with Mock group, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001 indicate significant difference at 0.05, 0.01 and 0.001 level, separately, the same as below

图 1 流式细胞术检测猪流行性腹泻病毒感染 MARC-145 细胞的凋亡率

Fig. 1 The apoptotic rate of MARC-145 cells was measured after PEDV infection by using flow cytometry

siRNAs, 分别将 siRNA control (SC)、siBCL-w-1、siBC-Lw-2、siBCL-w-3 (序列见表 1) 转染 MARC-145, Western blot 检测细胞内 BCL-w 的表达水平, 由图 6a 可知, siBCL2L2-3 敲除效率最高。将 SC 和 siBCL-w-3 转染细胞后流式细胞术检测细胞凋亡情况, 结果显示, 敲低 BCL-w 的表达水平促进了细胞

凋亡(图 6b)。

### 3 讨论

PEDV 感染仔猪后能引起仔猪尤其是 7 日龄以内的仔猪严重的腹泻, 给我国和世界养猪业造成了严重的经济损失<sup>[20-21]</sup>。由于 RNA 病毒易突变的特

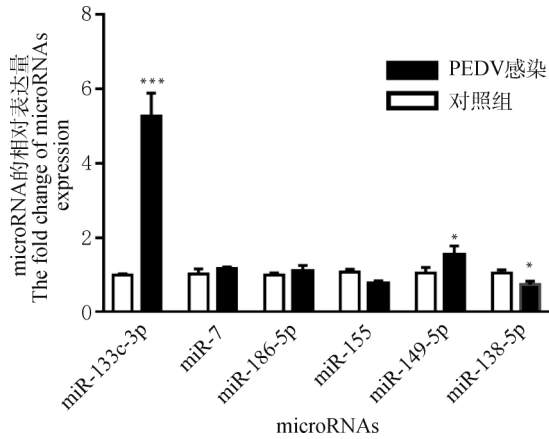
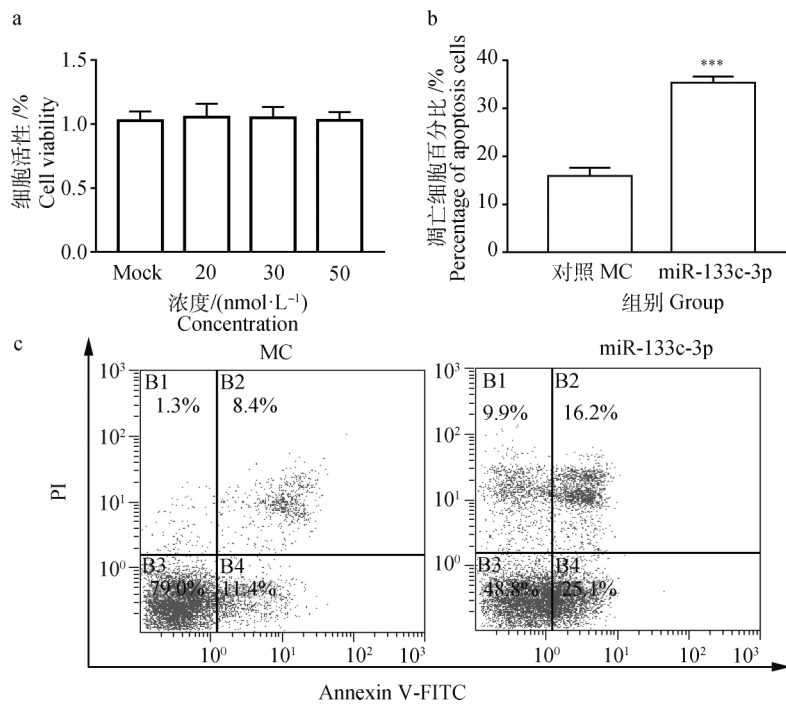


图 2 与凋亡相关的 microRNAs 表达情况  
Fig. 2 Expression of microRNAs related to apoptosis



a. 转染不同浓度的模拟物对照, MTT 检测细胞活性的影响; b. 凋亡率的柱状图; c. 流式细胞术检测过表达 miR-133c-3p 后细胞的凋亡率  
a. MTT to detect the effect of cell viability after transfection of different concentrations of mimic control; b. Histogram of apoptotic rate; c. The cell apoptosis rate after over-express of miR-133c-3p and then analyzed by flow cytometry

图 3 过表达 miR-133c-3p 对细胞凋亡的影响  
Fig. 3 Effect of over-expression of miR-133c-3p on cells apoptosis

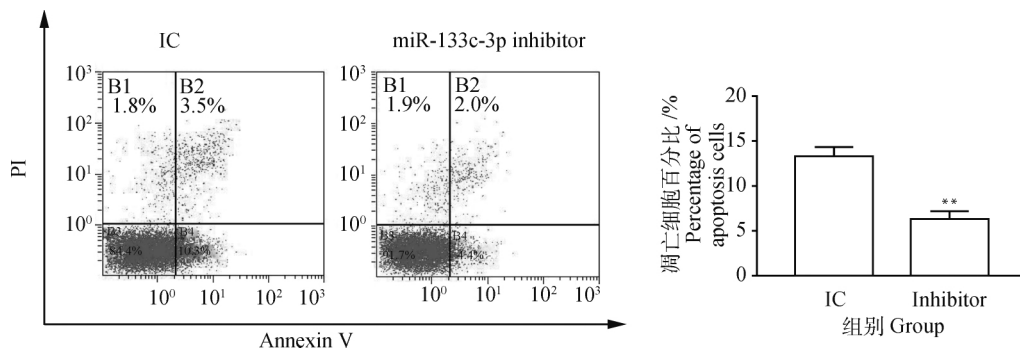
miR-133c-3p 后发现细胞内 BCL-w 的表达水平下调。

凋亡是细胞为了适应外界刺激发生的程序性的死亡,病毒感染诱导细胞凋亡,而细胞凋亡会抑制病毒持续感染和扩散,从而防止组织进一步损伤<sup>[22]</sup>。研究表明,许多冠状病毒可以诱导细胞凋亡,如中东呼吸道综合征冠状病毒(MERS)和 SARS 冠状病毒感染都可以诱导感染细胞的凋亡<sup>[23-24]</sup>,传染性胃肠

炎病毒可以诱导 PK-15 细胞的凋亡<sup>[25]</sup>,而 PEDV 可以诱导 Vero 细胞凋亡<sup>[18]</sup>,本研究结果显示, PEDV 感染可诱导 MARC-145 细胞的凋亡,并且随着感染复数的增大凋亡率也相应增加。病毒可以通过诱导凋亡促进病毒释放,也可以在病毒感染的前期抑制细胞凋亡促进病毒的复制<sup>[26-27]</sup>,这可能也意味着凋亡在病毒感染的不同阶段发挥不同的作用。

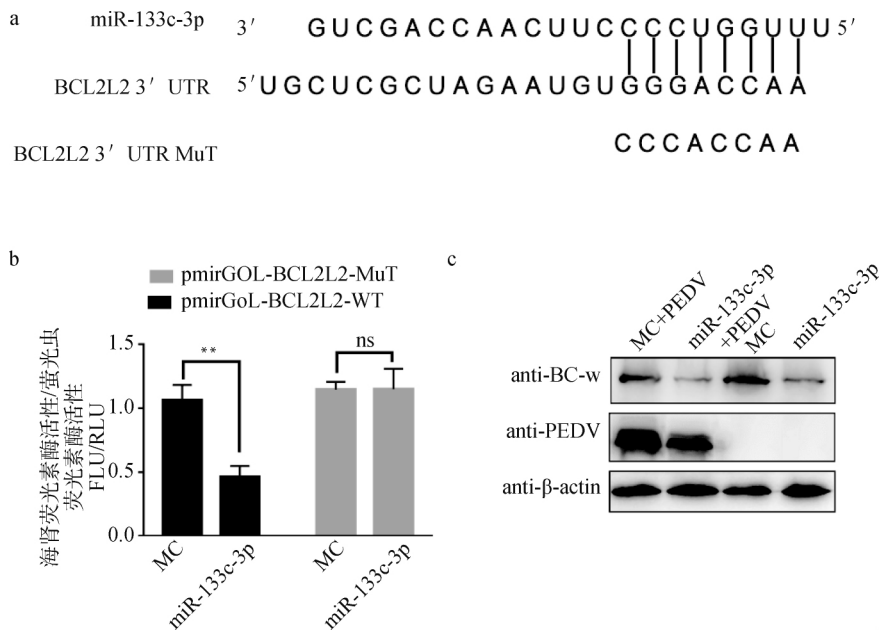
性,至今没有有效的疫苗可用,因此急需对病毒感染细胞的机制进行深入研究。  
本试验通过检测 PEDV 感染细胞时凋亡相关 microRNAs 的表达差异,发现了与 PEDV 感染关系密切的 miR-133c-3p,为了进一步研究 miR-133c-3p 在 PEDV 感染过程中所起的作用,过表达 miR-133c-3p 后发现 miR-133c-3p 抑制了 PEDV 的复制,并且促进了感染细胞的凋亡。为了确定 miR-133c-3p 调控的主要靶点,用生物信息学的方法预测,发现在 BCL2L2 的 3'UTR 区域有其结合位点,荧光素酶报告基因试验证明 miR-133c-3p 可以在体外与 BCL2L2 3'UTR 区域结合,在过表达

microRNAs 是一类很短的 RNA 分子,在细胞



与 IC 组比较, \*\* .  $P < 0.01$  表示显著差异  
 Compared to IC group, \*\* .  $P < 0.01$  indicate a significant difference

图 4 敲低 miR-133c-3p 后细胞的凋亡率  
 Fig. 4 The apoptosis rate of cells after knock-down of miR-133c-3p



a. 生物信息学方法预测在 BCL2L2 3'UTR 的靶向结合位点; b. miR-133c-3p 可以下调野生型质粒的荧光素酶活性; c. 过表达 miR-133c-3p 下调细胞内 BCL-w 和 PEDV 蛋白的表达的水平; 与 MC 组比较, \*\* .  $P < 0.01$  和 \*\*\* .  $P < 0.001$  表示显著差异

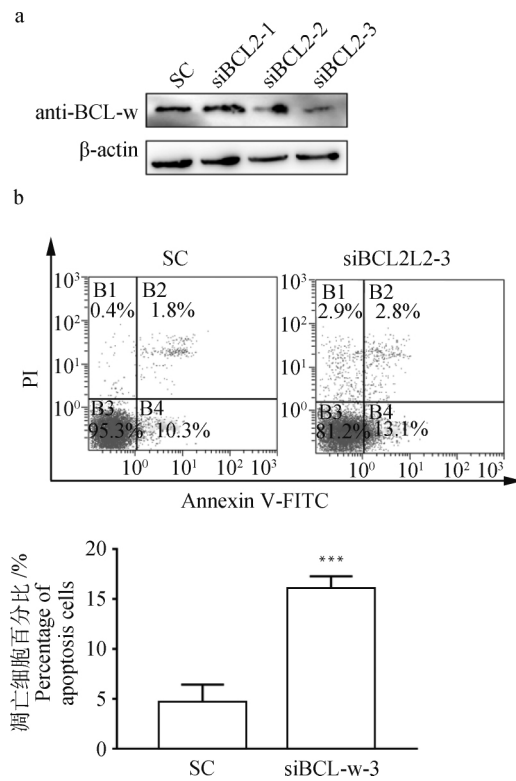
a. Bioinformatics methods to predict the target binding site in BCL2L2 3'UTR; b. miR-133c-3p down-regulate the luciferase activity of wild-type plasmids; c. Overexpression of miR-133c-3p down-regulates the level of BCL-w and PEDV in cells; \*\* .  $P < 0.01$  and \*\*\* .  $P < 0.001$  indicate significant difference

图 5 BCL2L2 是 miR-133c-3p 的靶基因  
 Fig. 5 BCL2L2 is the target gene of miR-133c-3p

增殖、分化、死亡和发育这些生物过程中发挥重要的作用,它发挥作用的机制是通过调控基因转录后水平而影响相应蛋白表达水平<sup>[22]</sup>。病毒在感染细胞的过程中会改变细胞内 microRNAs 的表达谱,而这些 microRNAs 会靶向重要的细胞元件,导致细胞生理过程的改变。A 型流感病毒感染 A549 细胞后, miR-34a 的表达显著下降<sup>[28]</sup>,而另一篇报道称 A 型

流感病毒引起 miR-29c 的表达上调<sup>[29]</sup>,我们先前在 MARC-145 细胞的研究中发现 PEDV 的感染能引起 miR-671-5p 表达的上调<sup>[30]</sup>,本研究发现 PEDV 的感染能引起细胞 miR-133c-3p 表达的上调,该结果说明病毒感染可能通过改变 microRNAs 表达的丰度来改变细胞的生理状态。从 microRNAs 水平解释 PEDV 感染细胞时对凋亡的调控,这将为阐明





a. Western blot 检测 siRNAs 的敲除效率; b. 流式细胞术检测检测敲低 BCL-w 后细胞的凋亡情况, \* \* \*,  $P < 0.001$  表示显著差异

a. The level of BCL-w after know-down of siRNAs; b. The cell apoptosis rate after transfection of siBCL-w and then analyzed by flow cytometry; \* \*,  $P < 0.01$  and \* \* \*,  $P < 0.001$  indicate a significant difference

图 6 敲低 BCL-w 诱导细胞凋亡

Fig. 6 Know-down of BCL-w promote the cell apoptosis

病毒和细胞互作的分子机制提供依据,从而为抗 PEDV 新方法的开发提供理论基础。

病毒感染引起的 microRNA 变化有可能影响病毒的复制,很可能病毒存在多种促进和抑制自身复制的机制,这些机制受多种因素的影响处于动态变化中。一方面, microRNAs 通过下调凋亡抑制蛋白的表达水平诱导细胞凋亡,如 miR-15/16 通过下调 BCL2 促进细胞凋亡<sup>[31]</sup>, miR-186-5p 通过下调 IGF-1(胰岛素样生长因子)促进细胞凋亡<sup>[32]</sup>, miR-146a 通过下调 BCL2 诱导细胞凋亡<sup>[33]</sup>,另一方面, miRNAs 通过下调凋亡激活通路的蛋白抑制细胞凋亡,如 miR-C12 通过抑制细胞凋亡促进疱疹病毒的复制<sup>[34]</sup>,并且,先前研究表明, miR-133c-3p 可以通过靶向几个凋亡抑制蛋白诱导细胞凋亡,如在狼疮肾炎中 miR-133c-3p 通过靶向 LASP1 抑制细胞增殖,促进细胞凋亡<sup>[35]</sup>;在胶质母细胞瘤细胞的研究

中发现, miR-133c-3p 可以通过抑制 EGF 的表达水平促进细胞凋亡,从而抑制了细胞增殖<sup>[11]</sup>。而在本研究中, PEDV 感染上调了 miR-133c-3p 的水平,而上调的 miR-133c-3p 又促进了细胞凋亡,而且敲低 BCL-w 后诱导细胞凋亡,但是凋亡率没有过表达 miR-133c-3p 所引起的凋亡率高,这可能提示, miR-133c-3p 可能靶向多个凋亡抑制蛋白或通过多种途径影响细胞凋亡。本研究不仅证明了 miR-133c-3p 诱导凋亡的作用,而且进一步丰富了 miR-133c-3p 的调控凋亡的机制。

BCL2L2 作为 BCL2 家族蛋白的分子,是重要的凋亡抑制剂, miR-335c-5p 通过下调 BCL2L2 的水平促进了卵巢癌细胞的凋亡,从而促进了化疗的敏感性<sup>[36]</sup>, miR-126a-5p 通过下调 BCL2L2 促进宫颈癌细胞的凋亡<sup>[37]</sup>, BCL2L2 是 microRNA 影响细胞凋亡的过程中一个很重要的靶基因,本研究中, miR-133c-3p 靶向调控 BCL2L2。该结果提示, miR-133c-3p 通过靶向 BCL2L2 调控细胞凋亡机制有可能是 PEDV 感染 MARC-145 细胞引起凋亡很重要的因素。

综上所述, PEDV 的感染诱导 MARC-145 细胞的凋亡,进一步研究发现, PEDV 的感染显著上调了 miR-133c-3p 的表达,而 miR-133c-3p 通过下调其靶基因下调了凋亡抑制蛋白 BCL-w 的表达进而诱导了细胞凋亡,本研究为抵抗 PEDV 新方法的研究提供了理论依据。

## 4 结 论

PEDV 的感染上调了 miR-133c-3p 的表达,导致 BCL-w 表达水平降低,从而促进了细胞凋亡。

## 参考文献 (References):

- [1] WOOD E N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. *Vet Rec*, 1977, 100(12):243-244.
- [2] CHEN P F, WANG K, HOU Y X, et al. Genetic evolution analysis and pathogenicity assessment of porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in part of China during 2011-2017 [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 69:153-165.
- [3] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(1):161-163.
- [4] KOCHERHANS R, BRIDGEN A, ACKERMANN

- M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. *Virus Genes*, 2001, 23(2):137-144.
- [5] SONG D S, OH J S, KANG B K, et al. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain[J]. *Res Vet Sci*, 2007, 82(1):134-140.
- [6] BARTEL D P. microRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136 ( 2 ): 215-233.
- [7] TROBAUGH D W, KLIMSTRA W B. microRNA regulation of RNA virus replication and pathogenesis [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(1):80-93.
- [8] CARÈ A, CATALUCCI D, FELICETTI F, et al. microRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5):613-618.
- [9] WANG D S, ZHANG H Q, ZHANG B, et al. miR-133 inhibits pituitary tumor cell migration and invasion via down-regulating FOXC1 expression[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1):gmr. 15017453.
- [10] LI W, LIU M M, ZHAO C F, et al. miR-1/133 attenuates cardiomyocyte apoptosis and electrical remodeling in mice with viral myocarditis[J]. *Cardiol J*, 2020, 27(3):285-294.
- [11] XU F L, LI F, ZHANG W F, et al. Growth of glioblastoma is inhibited by miR-133-mediated EGFR suppression [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36 ( 12 ): 9553-9558.
- [12] LEE E F, FAIRLIE W D. The structural biology of Bcl-x<sub>L</sub>[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2234.
- [13] KU B, LIANG C Y, JUNG J U, et al. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX[J]. *Cell Res*, 2011, 21(4):627-641.
- [14] WILSON-ANNAN J, O' REILLY L A, CRAWFORD S A, et al. Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity[J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(5):877-887.
- [15] HINDS M C, LACKMANN M, SKEA G L, et al. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity[J]. *EMBO J*, 2003, 22(7):1497-1507.
- [16] SHEN X H, YIN L, PAN X C, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infection blocks cell cycle and induces apoptosis in pig intestinal epithelial cells[J]. *Microb Pathog*, 2020, 147:104378.
- [17] XU X G, XU Y, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infections induce apoptosis in Vero cells via a reactive oxygen species (ROS)/p53, but not p38 MAPK and SAPK/JNK signalling pathways[J]. *Vet Microbiol*, 2019, 232:1-12.
- [18] KIM Y, LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. *Virology*, 2014, 460-461:180-193.
- [19] ZHANG X Y, ZHENG P C, ZHENG Q S, et al. *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein-mediated inhibition of PEDV-induced apoptosis of Vero cells [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 229:159-167.
- [20] DORTMANS J C F M, LI W, VAN DER WOLF P J, et al. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) introduction into a naive Dutch pig population in 2014 [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221:13-18.
- [21] WANG D, FANG L R, XIAO S B. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Res*, 2016, 226:7-13.
- [22] ZHOU X C, JIANG W B, LIU Z S, et al. Virus infection and death receptor-mediated apoptosis[J]. *Viruses*, 2017, 9(11):316.
- [23] YEUNG M L, YAO Y F, JIA L L, et al. MERS coronavirus induces apoptosis in kidney and lung by upregulating Smad7 and FGF2[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(3):16004.
- [24] KRÄHLING V, STEIN D A, SPIEGEL M, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus triggers apoptosis via protein kinase R but is resistant to its antiviral activity[J]. *J Virol*, 2009, 83(5):2298-2309.
- [25] DING L, LI J W, LI W H, et al. P53-and ROS-mediated AIF pathway involved in TGEV-induced apoptosis[J]. *J Vet Med Sci*, 2018, 80 ( 11 ): 1775-1781.
- [26] GALLUZZI L, BRENNER C, MORSELLI E, et al. Viral control of mitochondrial apoptosis[J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(5):e1000018.
- [27] AMPOMAH P B, LIM L H K. Influenza a virus-induced apoptosis and virus propagation [J]. *Apoptosis*, 2020, 25(1-2):1-11.
- [28] FAN N N, WANG J T. microRNA 34a contributes to virus-mediated apoptosis through binding to its target gene Bax in influenza a virus infection [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83:1464-1470.
- [29] GUAN Z H, SHI N, SONG Y, et al. Induction of the cellular microRNA-29c by influenza virus

- contributes to virus-mediated apoptosis through repression of antiapoptotic factors BCL2L2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(3): 662-667.
- [30] ZHENG H Q, XU L, LIU Y Z, et al. microRNA-221-5p inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication by targeting genomic viral RNA and activating the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11):3381.
- [31] PEKARSKY Y, BALATTI V, CROCE C. BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1):21-26.
- [32] WANG R, BAO H B, ZHANG S H, et al. miR-186-5p promotes apoptosis by targeting IGF-1 in SH-SY5Y OGD/R model[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(13):1791-1799.
- [33] ZHANG B, YI J, ZHANG C L, et al. miR-146a inhibits proliferation and induces apoptosis in murine osteoblastic MC3T3-E1 by regulating Bcl2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17):3754-3762.
- [34] LU J F, SHEN Z Y, LU L Q, et al. Cyprinid herpesvirus 2 miR-C12 attenuates virus-mediated apoptosis and promotes virus propagation by targeting Caspase 8[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:2923.
- [35] HUANG Z M, PANG G Z, HUANG Y G, et al. miR-133 inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting LASP1 in lupus nephritis[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 114:104384.
- [36] CAO J, CAI J, HUANG D, et al. miR-335 represents an invasion suppressor gene in ovarian cancer by targeting Bcl-w[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2):701-706.
- [37] WANG C L, ZHOU B, LIU M, et al. miR-126-5p restoration promotes cell apoptosis in cervical cancer by targeting Bcl2l2[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(4):463-470.

(编辑 白永平)