

乙肝病毒编码 miRNA 的预测及鉴定

陈周伟¹, 朱丽敏¹, 朱 聪², 张思泉³, 符遥杰¹, 沈建宇¹, 郭江峰¹, 丁先锋¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 浙江天科高新技术发展有限公司, 杭州 310012;
3. 杭州市西溪医院, 杭州 310023)

摘 要: 为探究乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是否能够编码 microRNA(miRNA),与宿主 mRNA 靶向结合来参与病毒感染的调控机制,实验通过 Vir-Mir 数据库预测乙肝病毒编码的 pre-miRNA,并结合 miRNA 测序和实时荧光定量 PCR 方法验证成熟体 miRNA。结果显示:乙肝病毒 DNA 阳性的肝癌血清样本中存在六条 pre-miRNA,并成功验证其中一条成熟体命名为 hbv-miR-15467,为肝病治疗提供新的思路。

关键词: 乙型肝炎病毒; miRNA; 预测

中图分类号: Q52 **文献标志码:** A

0 引 言

MicroRNAs 是近年来在多种真核细胞及病毒中发现的一类内源性的,长度约为 22 nt 的非编码 RNA。病毒 miRNA 产生过程类似于宿主细胞 miRNA,成熟的 miRNA 大小和结构也与其他生物的 miRNA 类似^[1],miRNA 在 RNA 聚合酶 II 或 III 作用下进行核内转录,经过加工形成初级转录产物 pri-miRNA,随后经核糖核酸内切酶 III (Drosha) 剪切形成 pre-miRNA,这些 pre-miRNA 依赖于运输蛋白 Exportin-5 从细胞核转运到细胞质,由另一类核糖核酸内切酶 III (Dicer) 切除其茎环结构,最终形成了成熟的 miRNA^[2]。miRNA 能作用于靶基因 mRNA 3'-UTR 区,以干扰 mRNA 翻译的方式来负向调控基因的表达。miRNAs 作为基因分子领域的研究热点,已有实验证实 miRNA 参与多种病毒性疾病,可通过影响病毒的复制、宿主免疫应答来改变病毒复制能力^[3]。Sam 等^[4]研究发现病毒也能编码部分 miRNA,目前已有超过 250 条病毒来源的 miRNA 得到证实^[5],病毒 miRNAs 已经成为新的研究热点。

乙肝病毒相关性疾病包括由乙肝病毒引起的病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化及肝细胞癌等,严重威胁着人类的健康。我国约有 1.2 亿乙肝病毒携带者,约占我国总人口的 9.8%,慢性乙肝和肝硬化患者有 3000 万之多,乙型肝炎发展为肝硬化和肝癌的风险非常高,每年因肝硬化和肝癌死亡人数也超过 30 万^[6]。HBV 是一种部分环化的双链 DNA 病毒,属嗜肝 DNA 病毒科,基因组长约 3.2 kb^[7]。病毒 DNA 的长链为负链,较短链为正链,两链 DNA 的 5' 端有长达 250~300 个互补的碱基,通过碱基配对构成环状 DNA 结构。HBV 感染宿主后,宿主本身 miRNA 对病毒起作用,同时病毒编码的 miRNA 也可以作用于宿主基因^[8]。本实验通过预测 HBV 基因组编码的 miRNA 分子,寻找到新的 miRNA 并预测其靶基因,探究 HBV 病毒与宿主之间 miRNA 的调控机制,以助于阐释 HBV 相关肝病发生发展中的致病机理。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所使用的肝癌患者血清和健康人血清样

收稿日期: 2014-05-21

基金项目: 浙江省公益技术研究社会发展项目(2012C23072)

作者简介: 陈周伟(1988-),女,浙江温州人,硕士研究生,主要从事核酸方面的研究。

通信作者: 丁先锋, E-mail: bdd114@163.com

本均来自杭州西溪医院,肝癌血清样本来自 20 例未接受任何治疗的肝癌患者,包括 12 例 HBV DNA 阳性患者和 8 例阴性患者,健康人血清样本来自 10 例体检志愿者。miRNeasy Serum/Plasma Kit 购自 Qiagen 公司,PCR 引物由上海生工公司合成,逆转录试剂盒及 SYBR Premix Ex TaqTM II 均购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒 miRNA 预测

利用 Vir-Mir 数据库(<http://alk.ibms.sinica.edu.tw/cgi-bin/miRNA/miRNA.cgi>)预测 HBV 基因组编码的 pre-miRNA,通过 Genebank 检索 HBV 全基因序列(序列号为 NC_003977)。Vir-Mir 数据库提供预测的病毒 miRNA 的候选发夹结构序列设定参数条件为:GC 含量 38%~65%;核心最小自由能 37.5~19.5;发夹结构最小自由能 50.9~28.2,得分在 50 分以上^[9]。

1.2.2 样本制备

收集 5 mL 全血置于血清收集管;温和颠倒收集管 5~8 次;常温下静置 30 min;然后将收集管置于离心机,4 300 r/min,常温离心 10 min;将获得的上清转移至 1.5 mL 离心管;11 600 r/min,离心 2 min;分离到的血清置于-80℃冰箱保存。按照 miRNeasy Serum/Plasma Kit 使用说明书,取 200 μ L 血清提取总 RNA,避免基因组 DNA 污染,洗脱得到 50 μ L 的 RNA 溶液,置于-80℃冰箱备用。

1.2.3 候选 pre-miRNA 的初步验证

使用 PCR 方法对经 Vir-Mir 数据库筛选的候选前体分子进行初步验证,样本为 HBV DNA 阳性的肝癌患者血清与健康人血清。使用软件 Primer Premier 5 设计候选 pre-miRNA 的扩增引物,提取样本的总 RNA,逆转录合成 cDNA,通过 PCR 方法验证预测的前体分子是否存在。

1.2.4 成熟体 miRNA 的定位

利用二代测序方法对 HBV DNA 阳性肝癌患者的血清样本进行 miRNA 测序,测序结果得到的小分子片段与候选 pre-miRNA 序列进行比对,分析数据,对成熟体 miRNA 定位。设计候选成熟体 miRNA 的特异扩增引物,通过实时荧光定量 PCR 来验证其能否成为成熟体 miRNA。

1.2.5 miRNA 靶基因预测

首先使用 RNAhybrid 软件(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)预测 HBV 编

码的 miRNA 作用于人类的潜在靶基因,设定参数条件为:螺旋限制在 2~7 个核苷酸;最小自由能比例在 85%以上^[10]。RNAhybrid 是一种用于寻找一条长链 RNA 和一条短链 RNA 的最小配对自由能的工具,例如预测一条短链序列结合到长链的最佳位置上,适用于未命名的 miRNA 预测其靶基因位点。其次,通过 MicroInspector 软件(<http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/>)验证 miRNA 及其预测的靶基因是否存在结合可能性^[11]。MicroInspector 软件允许用户输入 miRNA 序列或序列片段,从不同的数据库中选择 miRNA,同时也允许自定义 miRNA 和靶基因二聚体杂交温度和自由能等参数^[12],适用于未知序列的靶基因预测。

2 结果

2.1 HBV 编码的 miRNA 前体分子的预测

将 HBV 基因序列号 NC_003977 输入 Vir-Mir 数据库,HBV 基因组中共预测到 6 条候选 miRNA 前体分子,其中正向序列中有 4 条(15464、15465、15466 和 15467),反向序列中有 2 条(15468、15469)(表 1)。上述 6 条序列经 RNAstructure5.3 软件分析,得到二级结构(图 1),显示这 6 条候选序列均能形成典型的发夹结构,这提示 HBV 可能编码病毒来源的 microRNA 分子。

表 1 HBV 基因组中的候选 miRNA 前体分子

名称	方向	起始位置	长度/nt	sRNA 茎环得分	最小自由能/(kcal/mol)
15464	正向	130	90	19	-25.7
15465	正向	1152	89	21	-26.7
15466	正向	1390	90	21	-21.0
15467	正向	1834	89	22.5	-24.9
15468	反向	2444	90	19	-19.7
15469	反向	3114	89	21	-23.5

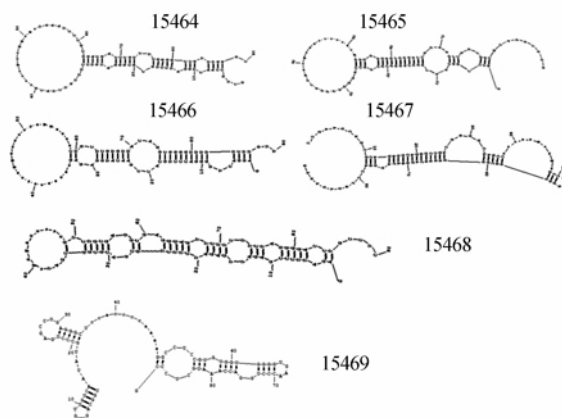


图 1 候选 miRNA 前体分子的发夹结构

2.2 miRNA 前体分子的初步验证

为了进一步验证 6 条候选 pre-miRNA 是否存在于肝癌患者血清,设计 pre-miRNA 的 PCR 引物(表 2),通过 PCR 扩增目的片段。聚丙烯酰胺凝胶电泳发现 HBV DNA 阳性肝癌血清样本中检测到目的片段,健康人血清未检测到(图 2)。为进一步确定序列准确性,将目的片段割胶回收,使用 TA 克隆法与 pMD18-T Vector 连接,筛选与鉴定重组质粒,发现 6 条目的片段的 Sanger 测序结果与预测的候选前体序列基本匹配,存在 1~4 个碱基错配。这表明机体内含有大量乙肝病毒,复制比较活跃,传染性较强的 HBV DNA 阳性肝癌患者血清样本中的确存在预测的候选 miRNA 前体分子,HBV 编码的 miRNA 与肝癌发生发展可能存在一定的联系。

表 2 候选 miRNA 前体分子的 PCR 引物序列	
Primer 名称	序列(5'-3')
15464 Primer	F:GAGGACTGGGGACCCCTGCA
	R:AACAAGAAAAACCCCGCCTGT
15465 Primer	F:TGCCCCGCAACGGTCA
	R:ACGCATGCGCCGATGG
15466 Primer	F:GCTGCCAACTGGATCCTGCG
	R:GCCCCAACGGCCCCGAGA
15467 Primer	F:CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCC
	R:CTTTATACGGGTCAATGTCCAT
15468 Primer	F:GAGATTCCCGAGATTGAGATCTT
	R:GAGGCAGGTCCCCTAGAAGA
15469 Primer	F:TGGCAGTGTTGTCAATATGCC
	R:CGGGAGCATTTGGTCCAG

注:F:Forward primer;R:Reverse primer。

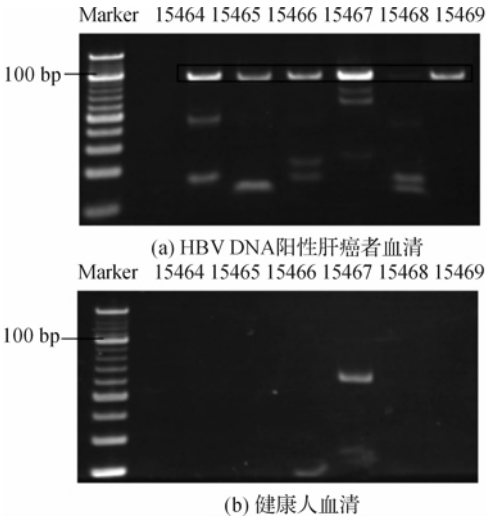


图 2 不同样本 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

2.3 成熟 miRNA 的定位

通过二代测序方法对 HBV DNA 阳性的肝癌血清样本进行 miRNA 测序,将测序结果得到的小分子片段与候选 pre-miRNA 序列进行比对后,发现有 4 条候选前体分子即 15464—15467 有比对结果,不同位置的候选成熟体有不同的 reads 数,结果见图 3。笔者将选取 reads 数相对高,二级结构具有形成成熟 miRNA 潜力的序列(图 3 中截取部分),设计实时荧光定量 PCR 扩增引物,以肝癌血清总 RNA 为样本,进一步用实时荧光定量 PCR 方法验证。实验结果显示仅 15467:ugccuuggguggcuuuggggca 成熟 miRNA 的扩增曲线平滑且随着循环数的增加,荧光信号具有明显的对数扩增期,而空白对照无连续曲线生成,并且溶解曲线出现明显的单峰,说明扩增产物具有特异性(图 4),因此验证了 15467 前体分子可剪切形成成熟 miRNA,将该成熟体 miRNA 命名为 hbv-miR-15467。

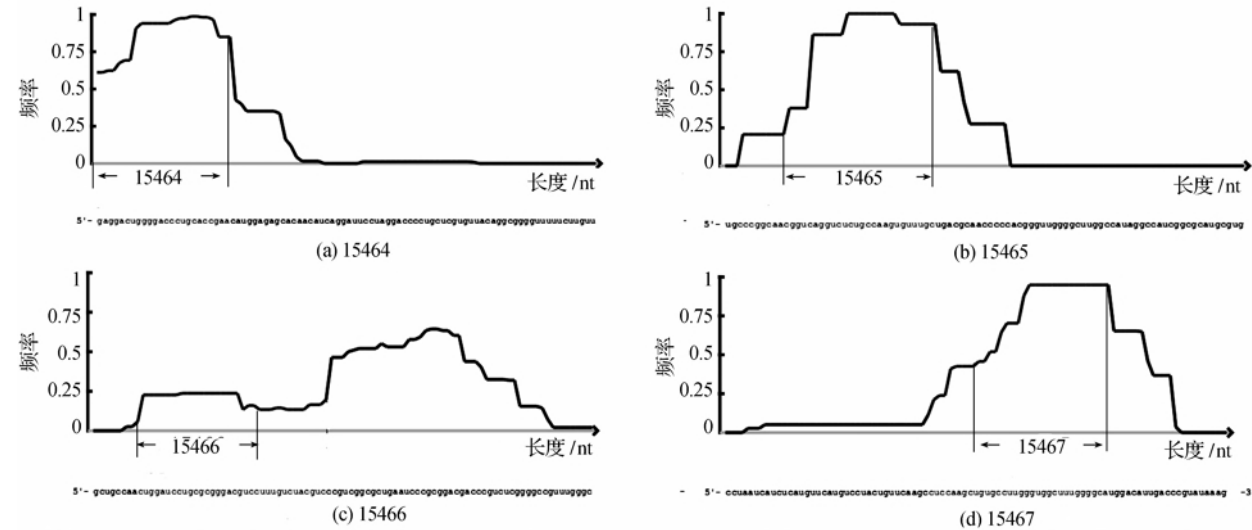


图 3 不同位置的候选成熟体所占 read 比例

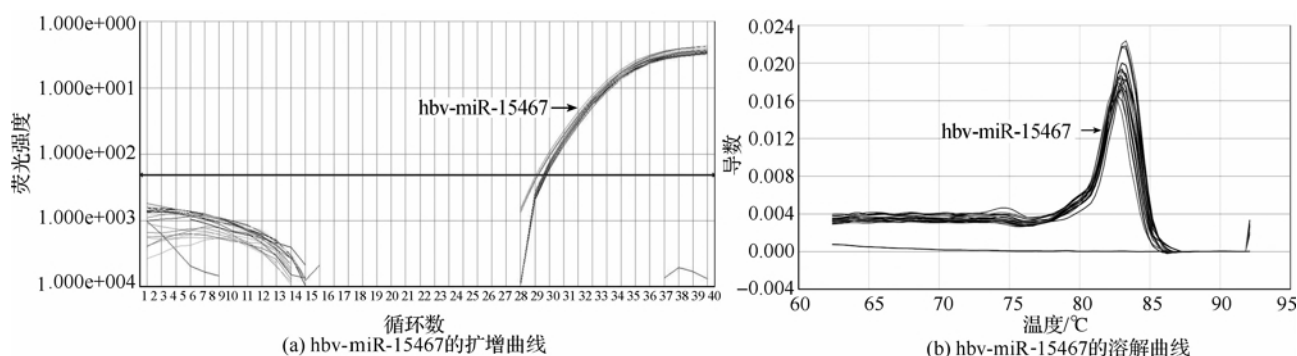


图 4 hbv-miR-15467 的扩增曲线与溶解曲线

2.4 miRNA 的靶基因预测

使用 RNAhybrid 软件预测成熟体 miRNA 的靶基因, hbv-miR-15467 预测到 3 个靶基因, 包括软骨相关蛋白 (CRTAP), 细胞分裂周期相关因子 1 (FZR1) 及转化生长因子 (TGFB1) (表 3)。此外,

本实验还使用 MicroInspector 软件预测 miRNA 及其靶标的结合情况, 靶基因的预测结果和 RNAhybrid 类似。这表明 CRTAP、FZR1 及 TGFB1 基因具有一定的验证价值, 可能有助于探究 HBV 病毒与宿主之间进行的 miRNA 调控机制。

表 3 成熟 miRNA 的靶标预测

靶基因	靶序列位点	最小自由能/(kcal/mol)	结合的靶基因序列
CRTAP	5330	-51.5	TGTCCAGCCCCATTGCCACTCAGGGCA
FZR1	2174	-48.3	ACCAGCCCCAAGGCCAGACCAAGGCA
TGFB1	2154	-48.2	CCCGTGCCCCAAGCCCACCTGGGGCC

3 讨论

我国作为肝病大国, 导致肝癌高发生率的一部分原因是由于乙病毒感染, 超过 8% 的肝癌患者都遭受病毒感染^[13], 因此探究乙肝病毒的致病机理至关重要。抗病毒治疗无疑是阻止肝硬化进程及肝癌发生的重要途径, 而目前的重组干扰素及核苷类似物等抗病毒治疗手段疗效不够满意^[6]。HBV 的复制及其致病的分子机制尚未完全阐明, 本研究为病毒感染研究提供了新的思路。

MicroRNA 作为普遍存在于动植物体内的一类内源性基因表达调控因子, 在各种生理病理过程中发挥的重要作用使其迅速成为生命科学的前沿领域。病毒编码的 miRNA 的作用一般可分为三类: 延长感染细胞的寿命; 逃避免疫反应; 调节宿主或病毒基因^[5]。病毒可利用自身编码的 miRNA 与自身基因序列结合来逃避宿主免疫系统的监督和维持潜伏状态^[14]。例如, 疱疹病毒^[15-16] (Epstein Barr virus, EBV), 卡波氏疱疹病毒^[17] (KSHV) 和马尔克斯病毒^[18] (MDV1) 编码的病毒 miRNA 能够通过作用于宿主细胞的促凋亡因子来抑制细胞凋亡。由于病毒基因组较小且紧致, 形成茎环结构的背景片段数量很小, 因此尽管基于序列和结构特征打分的预测方法较为简单, 但仍然在病毒 miRNA 预测中

取得了较好的效果^[19]。Vir-Mir 是专门用于预测病毒编码 miRNA 的数据库, 并已成功预测出 5 种病毒的 64 条已知前体 miRNA^[9]。目前约有 26% 的已知病毒 miRNAs 类似于宿主 miRNA 通过种子序列结合靶基因发挥调控作用^[5]。因此, 使用 RNAhybrid 软件预测 hbv-miR-15467 的靶标, 并使用 MicroInspector 软件验证了 miRNA 及其潜在靶基因 CRTAP、FZR1 和 TGFB1 确实存在结合可能性。其中 CRTAP 为软骨相关蛋白, 主要与成骨不全相关; FZR1 为细胞分裂周期相关因子 1, 是细胞周期末期促进复合物的调节亚基, 与胎盘发育相关, 目前无资料显示 CRTAP 和 FZR1 与病毒感染或肝癌生成相关; 而 TGFB1 是一个与肿瘤发生相关的重要因子, 在组织再生、细胞分化, 胚胎发育及免疫系统调节等生命活动中起重要作用^[20]。本实验预测的病毒 miRNA 及其靶基因的相互作用还需通过一系列实验验证, 可能为抗乙肝病毒感染提供新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] 贾万忠, 李 志, 伦照荣. 病毒微小 RNA 的发现及其功能[J]. 科学通报, 2007, 52(23): 2705-2714.
- [2] Claudine L B, Gregory J T. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer[J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 623-631.
- [3] 李 莉, 洪晓绿, 李 刚. MicroRNAs 与病毒性肝炎的

- 研究进展[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(7): 848-850.
- [4] Sam G J, Harpreet K S, Stijn V D, et al. MiRBase: tools for microRNA genomics[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(S1): D154-D158.
- [5] Rodney P K, Christopher S S. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future[J]. Plos Pathogens, 2012, 8(12): e1003018.
- [6] 杜 锐. microRNA 在乙肝病毒复制中的作用及机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2009.
- [7] 鲍春暘, 李军锋, 周育森. 肝炎病毒感染相关 microRNA 调控作用的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(35): 3756-3760.
- [8] 李 晨, 万漠彬, 王慧芬. microRNA 在 HBV 相关肝病中的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010, 19(8): 774-776.
- [9] Sung C L, Cheng K S, Wen C L. Vir-Mir db: prediction of viral microRNA candidate hairpins [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(S1): D184-D189.
- [10] Julius B, Alexander S, Robert B R, et al. Principles of microRNA-target recognition[J]. Plos Biology, 2005, 3(3): e85.
- [11] Ventsislav R, Vesselin B, Ivan N M, et al. MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(S2): W696-W700.
- [12] 茹松伟, 申卫红, 杨鹏程, 等. microRNA 靶基因预测算法研究概况及发展趋势[J]. 生命科学, 2007, 19(5): 562-567.
- [13] Ahmedin J, Freddie B, Melissa M C, et al. Global cancer statistics[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011, 61(2): 69-90.
- [14] Jennifer L U, Bryan R C. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity[J]. Genes & Development, 2009, 23(10): 1151-1164.
- [15] Elizabeth Y C, Kam L S, Kin H K, et al. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival [J]. The Journal of Experimental Medicine, 2008, 205(11): 2551-2560.
- [16] Aron R M, Anuja M, Cyd S N, et al. The Epstein-Barr virus BART microRNAs target the pro-apoptotic protein Bim[J]. Virology, 2011, 412(2): 392-400.
- [17] Guillaume S, Georg M, Jean H, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis[J]. Plos Pathogens, 2011, 7(12): e1002405.
- [18] Xu S, Xue C Y, Li, J P, et al. Marek's disease virus type 1 microRNA miR-M3 suppresses cisplatin-induced apoptosis by targeting Smad2 of the transforming growth factor beta signal pathway[J]. Journal of Virology, 2011, 85(1): 276-285.
- [19] 侯妍妍, 应晓敏, 李伍举. microRNA 计算发现方法的研究进展[J]. 遗传, 2008, 30(6): 687-696.
- [20] Peter M, Florian S, Jennifer H, et al. Circulating transforming growth factor- β in Marfan syndrome[J]. Circulation, 2009, 120(6): 526-532.

Prediction and Identification of HBV-Encoded miRNA

CHEN Zhou-wei¹, ZHU Li-min¹, ZHU Cong², ZHANG Si-quan³, FU Yao-jie¹,

SHEN Jian-yu¹, GUO Jiang-feng¹, DING Xian-feng¹

(1. School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Tianke High-Tech Development Co., Ltd., Hangzhou 310012, China;

3. Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310023, China)

Abstract: To explore whether the hepatitis B virus (HBV) can encod microRNA (miRNA) and involve in regulation of virus infection by targeting the host mRNA, Vir-Mir database was used to predict HBV-encoded pre-miRNA. The mature miRNA was validated by miRNA sequencing and real-time fluorescence quantitative PCR method. The results show that six pre-miRNAs exist in lover cancer serum sample with positive HBV DNA level. A mature miRNA named hbv-miR-15467 was validated successfully. This paper provides new thoughts for liver cancer treatment.

Key words: hepatitis B virus; miRNA; prediction

(责任编辑: 许惠儿)