

DOI:10.16515/j.cnki.32-1722/n.2018.02.0017

# 流感病毒 H5N1 的小 RNA 表达谱研究

臧新源<sup>1,2</sup>, 李稀罕<sup>1,2</sup>, 张长青<sup>3\*</sup>, 王 进<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京大学医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210023;  
3. 金陵科技学院研究生处, 江苏 南京 211169)

**摘 要:** H5N1 病毒是一种对人高致死性的流感病毒亚型。为探索 H5N1 病毒高毒性原因, 对 H5N1 病毒感染细胞开展了病毒源小 RNA 研究。结果显示, H5N1 感染细胞中病毒源小 RNA 比例高; H5N1 病毒小 RNA 的分布没有末端偏好; 病毒源小 RNA 中存在 1 条定位于颈环结构的 sRNA; H5N1 病毒 NS1 蛋白 5 个关键氨基酸缺失可能与 H5N1、H1N1 小 RNA 谱的差异有关。它们为揭示 H5N1 病毒的高致死性机制提供了重要遗传基础, 为高致死性流感的预防提供了参考靶点。

**关键词:** 流感病毒; H5N1; H1N1; 小 RNA

中图分类号: R373.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-755X(2018)02-0070-05

## Study on the Small RNA Expression Profile of Influenza Virus H5N1

ZANG Xin-yuan<sup>1,2</sup>, LI Xi-han<sup>1,2</sup>, ZHANG Chang-qing<sup>3\*</sup>, WANG Jin<sup>1,2\*</sup>

(1. Nanjing University, Nanjing 210023, China;  
2. Nanjing University State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing 210023, China;  
3. Jinling Institute of Technology, Nanjing 211169, China)

**Abstract:** H5N1 virus is a highly lethal subtype of human influenza virus. In order to explore the causes of H5N1's high virulence, an analysis of small RNA profile from virus was carried out against cells infected by H5N1. The results showed high proportion of small RNA in H5N1 infected cells and the sRNAs derived from H5N1 do not have the preference to locate on the terminal of the RNA segment of the virus. There was 1 sRNA located in a stem-loop structure. The difference of small RNA profiles between H5N1 and H1N1 may relate to a deficiency of 5 amino acids of H5N1. These results provide an important genetic basis for revealing the highly lethal mechanism of H5N1 virus, and provide a potential target for the prevention of highly lethal influenza.

**Key words:** influenza virus; H5N1; H1N1; small RNA

流感病毒是常见的呼吸道致病病原体, 有 A、B、C 三种亚型。流感病毒是负链 RNA 病毒, 有 8 个基因片段, 一般编码 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1、NEP 10 种蛋白<sup>[1]</sup>。根据病毒表面的血细胞凝集素 HA 和神经氨酸酶 NA 的抗原特征将流感病毒分为不同亚型, 现在共发现 18 个 HA 和 11 个 NA 亚型<sup>[2]</sup>。

H5N1 病毒在 1997 年被首次报道, 是一种高致死性的流感病毒亚型。截至 2014 年 7 月 27 日, H5N1

收稿日期: 2018-03-20

作者简介: 臧新源(1991—), 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事生物信息学研究。

通信作者: 张长青(1974—), 男, 山西运城人, 教授, 博士, 主要从事园艺生物信息学研究。

王进(1963—), 女, 江苏盐城人, 教授, 博士, 主要从事生物信息学研究。

病毒已经在 16 个国家造成了 667 例感染,其中 393 例死亡<sup>[3]</sup>。H5N1 病毒相比于 H1N1 会诱发更多的炎症细胞因子表达,尤其是干扰素  $\beta$  和细胞凋亡因子  $\alpha$ ,而过量炎症细胞因子的表达是引发患者急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的重要原因<sup>[4]</sup>。

近年来,小 RNA(sRNA)的作用日益受到关注。病毒来源的小 RNA 譬如病毒编码的 miRNA 可以靶向宿主基因和病毒自身基因,在宿主细胞内创造一个更适合病毒增殖的环境<sup>[5]</sup>,同时宿主 miRNA 也可以靶向作用病毒的转录本来抵御病毒的感染<sup>[6-7]</sup>。因此在病毒与宿主细胞构成的复杂基因调控系统中,小 RNA 具有广泛而重要的作用。本研究试图通过分析比较 H5N1 病毒感染中的小 RNA 谱,在全基因组尺度上研究 H5N1 病毒来源 sRNA 的表达特征,从小 RNA 角度认识 H5N1 高毒性的分子机制。

## 1 数据来源与方法

### 1.1 H1N1、H5N1 病毒感染 MDCK 细胞的小 RNA 测序数据

分别以 H1N1(毒株 A/Nanchang/16A/1999,简称 NC99)和 H5N1(毒株 A/Jiangsu/1/2007,简称 JS07)病毒感染 MDCK 细胞,得到 H1N1 感染组、H5N1 感染组和 MOCK 组(未感染组)样本。然后对三组样本进行 solexa 小 RNA 测序。

### 1.2 H1N1(NS1 敲除)病毒感染 A549 细胞的小 RNA 测序数据

该数据来源于 GEO 数据库(编号 GSM2375061)。敲除 H1N1(毒株 A/PuertoRico/8/34,简称 PR8)病毒 NS 基因片段的 57 至 528 位碱基后,以该毒株(简称 PR8delNS1)感染 A549 细胞,然后对样本进行小 RNA 深度测序。该处理称为 H1N1 delNS1 组。

### 1.3 测序数据分析

对测序结果进行质控,包括去接头,去除低质量序列和含 N 序列后,使用 Bowtie1<sup>[8]</sup>软件,以病毒的基因组为模板进行同源比对分析。用 Mirdeep2<sup>[9]</sup>软件预测 H5N1 病毒基因组中潜在的 miRNA 前体式的茎环结构,并对预测出的小 RNA 用 Targetscan<sup>[10]</sup>软件进行靶点预测。

### 1.4 NS1 蛋白序列比对

使用 clustalX2<sup>[11]</sup>软件对本研究中涉及到的三个毒株和毒株 A/Vietnam/1203/2004(H5N1)的 NS1 蛋白序列进行序比对,分析 H5N1 病毒 NS1 蛋白的特性。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒感染细胞小 RNA 测序分析

分别以 H1N1 病毒和 H5N1 病毒感染 MDCK 细胞,并对两组感染细胞和一组 MDCK 细胞测序分析。结果发现,病毒来源的 sRNA(简称病毒源 sRNA)在三组细胞中存在的比例存在差异。如图 1 所示,H5N1 组与 H1N1 delNS1 组中都产生了大量的病毒源 sRNA,分别为 1.7% 和 1.42%。H1N1 delNS1 组病毒源 sRNA 的表达量明显高于 H1N1 野生型组。H5N1 组中病毒源 sRNA 亦较 H1N1 明显升高,暗示了 H5N1 组中病毒源 sRNA 的高比例可能与 H5N1 的 NS1 蛋白特性有关。

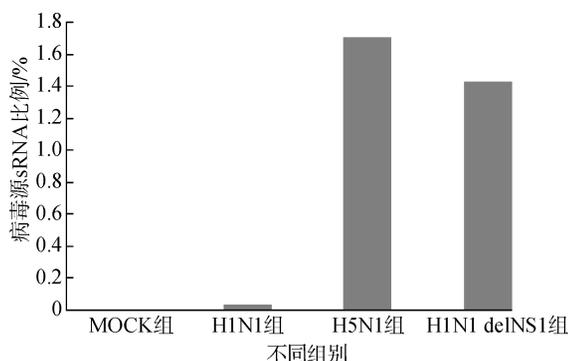


图1 受流感病毒感染细胞中病毒源的小 RNA 所占的比例

### 2.2 病毒源 sRNA 的基因分布

鉴于功能性 sRNA 长度多集中于 22 nt 附近<sup>[12]</sup>,笔者进一步比较了 H5N1 组和 H1N1 delNS1 组中 20~25 nt 长的病毒源 sRNA 在流感病毒 8 个基因片段的分布。

如图 2 所示,H5N1 组和 H1N1 delNS1 组中,病毒源 sRNA 在 8 个基因片段均有分布,且在 NA 基因上分布较少。但 H5N1 组中病毒源 sRNA 更倾向于分布在基因片段内部,而 H1N1 delNS1 组中则更倾

向于分布在基因片段两端 150 nt 内。它们分别占到了病毒源 sRNA 的 76.1% 和 66.7%，表明 H5N1 组和 H1N1 delNS1 组中病毒源 sRNA 存在大量的个体差异。

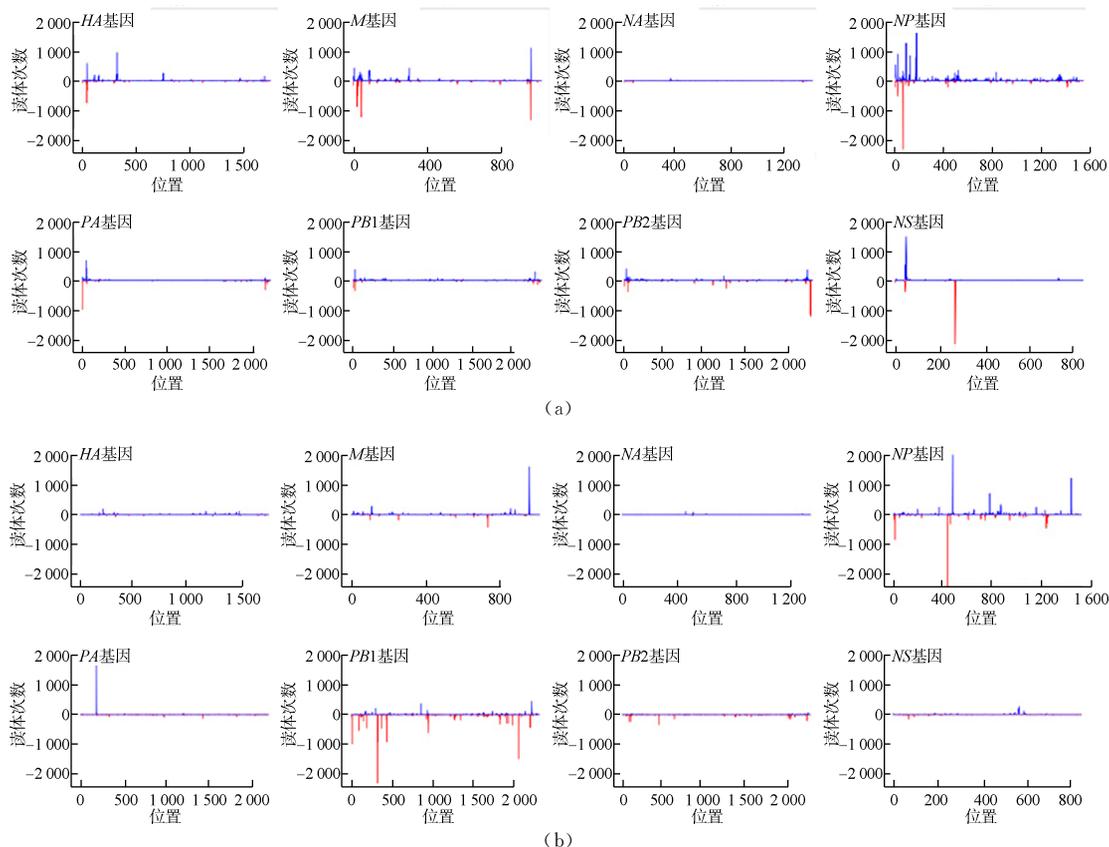


图 2 vsRNA 在病毒基因组上的分布

注:(a)为 H1N1 delNS1 组病毒源 sRNA 在病毒基因组上的分布;(b)为 H5N1 组病毒源 sRNA 在病毒基因组上的分布。蓝色为来自于病毒正链的 sRNA,红色为来自于病毒负链的 sRNA。图 a-NS 基因纵坐标为其它图的 10 倍。

### 2.3 病毒源 sRNA 中的 miRNA 预测

已有报道,病毒源 sRNA 能通过 RNA 干扰机制发挥抗病毒作用<sup>[13]</sup>,所以,为识别病毒源 sRNA 中的功能性 sRNA,笔者首先从 H5N1 组中筛选出了表达丰度在前 10 的 sRNA(表 1)。

分析 10 条 sRNA 在流感病毒基因片段上的分布发现,它们集中在 NP、PB1、PA、M 4 个基因片段上,其中 PB1 基因片段和 NP 基因片段上各有 4 条 sRNA,其它两个基因片段则各 1 条。分析它们的基因位置发现,7 条 sRNA 位置在基因片段内部,3 条在基因片段两端 150 bp 内。它们的读体测序数均超过了 900 次。

进一步利用 Mirdeep2 软件对高丰度 sRNA 基因组位置两边序列进行颈环结构预测发现, sRNA1 处于一个颈环结构之中(图 3)。该颈环结构位于 H5N1 病毒的 NP 基因片段负链上,对应着图 2b 中 NP 基因片段负链上的最高峰位置。进一步预测 sRNA1 的靶基因发现,CLCN6(氯离子电压门控通道基因)、CRP(C 反应蛋白基因)和 VIL1(绒毛蛋白基因)均可成为其调控靶点。

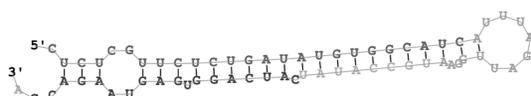


图 3 sRNA1 序列在基因组中包含于 miRNA 前体式的颈环结构

表 1 H5N1 病毒感染中高表达的 vsRNA

名称	基因	位置	链	读体次数	序列
sRNA1	NP	middle	-	2 933	CUCUCGUUCUCUGAU AUGUGGCAUC
sRNA2	PB1	middle	-	2 382	CAAUUCCAUCGUUCAAGACACG
sRNA3	NP	middle	+	2 046	AAUGGACCCAGGAUGUGCUC
sRNA4	PA	middle	+	1 699	AUUGUAGAACCUGGCGAUCCGAU
sRNA5	M	turminal	+	1 641	CAGAAUGCUGUGGAUGUUGACG
sRNA6	PB1	middle	-	1 535	AAUUCUUUUGACUCGUAUUG
sRNA7	NP	turminal	+	1 251	AACCCGAUCGUGCCUCCUUUGAC
sRNA8	NP	middle	+	1 194	GAAUGGACCCAGGAUGUGCUCUC
sRNA9	PB1	turminal	-	1 020	UCAAGAAAAGUAAAGUCGGAUUG
sRNA10	PB1	middle	-	955	AAGAUUUCUAUAGUGUUGGCC

注: turminal 表示 sRNA 序列来自基因片段末端 150 nt 区域, middle 表示来自非末端 150 nt 区域。

### 2.4 H5N1 病毒的 NS1 蛋白分析

已有研究报道, NS 基因具有减弱流感病毒致病能力的作用<sup>[14]</sup>, 故推测 H5N1 病毒的高毒性与其独特的 NS 基因有关。为此, 笔者在蛋白层次上, 分析了 H5N1 病毒和 H1N1 病毒不同毒株间 NS1 序列差异(图 4)。结果发现, H5N1 病毒在 NS1 蛋白的 80~84 位保守性地缺失了 5 个氨基酸残基, 而这 5 个氨基酸残基位置正是前人报道的 RNA 结合结构域与效应子结构域之间的连接区域<sup>[15]</sup>。可见, H5N1 病毒中 NS1 蛋白氨基酸的缺失与其高致病性存在着功能上的关联。



图 4 不同流感病毒毒株的 NS1 蛋白的序列比对结果

### 3 结论与讨论

病毒源 sRNA 通过 RNA 干涉机制发挥抗病毒作用的研究早在 10 年前就已经开始<sup>[13]</sup>, 然而在多种病毒感染的细胞中都难以检测出显著量的病毒源 sRNA<sup>[16]</sup>。最近研究发现, H1N1 病毒的 NS1 蛋白会显著抑制宿主 Dicer 酶的功能, 但删除 NS 基因片段使其 NS1 蛋白丧失功能后, 病毒源 sRNA 的量会显著增加<sup>[12]</sup>。所以推测本研究中发现的 H5N1 病毒感染细胞中病毒源 sRNA 高丰度现象与发现的 NS1 蛋白关键氨基酸缺失现象相关, 前者可能是后者功能缺失的表现。另外, 埃博拉病毒编码的 VP35 蛋白可以通过抑制 Dicer 的功能有效地抑制病毒源 sRNA 的产生<sup>[12,17]</sup>, 而其对 Dicer 功能的抑制是通过与 Dicer 的辅助蛋白 TARBP2 和 PRKRA 的蛋白质互作来实现的<sup>[17]</sup>。在 IntAct<sup>[18]</sup> 数据库中检索 NS1 蛋白与宿主蛋白的互作关系, 发现 NS1 与 TARBP2 和 PRKRA 的互作关系有多次报道。所以, NS1 对病毒源 sRNA 的抑制功能很有可能也是通过与 TARBP2 和 PRKRA 的作用抑制了 Dicer 功能来实现的。而 H5N1 病毒的 NS1 蛋白因为在两个结构域的连接部位缺少了 5 个氨基酸残基, 有可能影响了两个结构域的相对位置, 进而影响了 NS1 和 TARBP、PRKRA 的蛋白质互作。

H1N1 delNS1 中, 病毒源 sRNA 主要分布在基因片段两端 150 nt 范围内, 这主要与病毒基因片段末端的双链 RNA 切割有关。而在 H5N1 病毒中, 虽然基因片段末端双链依然是重要的小 RNA 来源, 但病毒基因组的其它位置通过折叠成颈环结构等方式对病毒源 sRNA 产生的贡献较之更大。我们推测, 病毒基因片段末端产生的小 RNA 或许是病毒基因片段失去了 NS1 保护后的被动物, 而 H5N1 病毒可能在协同进化中, 获得了更为主动地产生小 RNA 的功能。

另外,NS1 对流感病毒的致病力至关重要。H1N1 病毒的 NS 基因片段重组到 H5N1 病毒基因组上, H5N1 病毒的致病性会明显下降<sup>[14]</sup>。故推测,本研究发现的 NS1 蛋白关键氨基酸缺失现象极可能是 H5N1 病毒高毒性关键性机制。

#### 参考文献:

- [1] Bouvier N M, Palese P. The biology of influenza viruses[J]. *Vaccine*, 2008, 26: D49 – D53
- [2] Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(10): e1003657
- [3] 孙洪磊, 刘金华. H5N1 亚型禽流感病毒的流行与致病性[J]. *生命科学*, 2015, 27(5): 525 – 530
- [4] Li X, Fu Z, Liang H, et al. H5N1 influenza virus-specific miRNA-like small RNA increases cytokine production and mouse mortality via targeting poly (rC)-binding protein 2[J]. *Cell Research*, 2018(3): 117 – 125
- [5] Gottwein E. Roles of microRNAs in the life cycles of mammalian viruses[J]. *Intrinsic Immunity: Springer*, 2013(6): 201 – 227
- [6] Ingle H, Kumar S, Raut A A, et al. The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate anti-viral immunity and restrict viral replication[J]. *Sci. Signal.*, 2015, 406(8): ra126 – ra131
- [7] Obińska A, Kowalski M L. MicroRNAs and the immune response to respiratory virus infections[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2014, 10(7): 963 – 971
- [8] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25
- [9] Friedl M R, Mackowiak S D, Li N, et al. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 40(1): 37 – 52
- [10] Agarwal V, Bell G W, Nam J W, et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. *Elife*, 2015(4): 98 – 106
- [11] Larkin M A, Blackshields G, Brown N, et al. Clustal W and clustal X version 2. 0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947 – 2948
- [12] Li Y, Basavappa M, Lu J, et al. Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(3): 16250
- [13] Haasnoot J, Westerhout E M, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(12): 1435
- [14] Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses[J]. *Nature Medicine*, 2002, 8(9): 950
- [15] Bornholdt Z A, Prasad B V. X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus[J]. *Nature*, 2008, 456: 985
- [16] Parameswaran P, Sklan E, Wilkins C, et al. Six RNA viruses and forty-one hosts; viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems[J]. *PLoS Pathogens*, 2010(2): e1000764
- [17] Fabozzi G, Nabel C S, Dolan M A, et al. Ebola virus proteins suppress the effects of small interfering RNA by direct interaction with the mammalian RNA interference pathway[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(6): 2512 – 2523
- [18] Orchard S, Ammari M, Aranda B, et al. The MIntAct project-IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42(D1): D358 – D363

(责任编辑:谭彩霞)