

草鱼长链非编码RNA1153应对GCRV感染的调控功能

刘帅 张烨煊 胡旭东 曹宏

FUNCTIONAL ANALYSIS OF LONG NON-CODING RNA1153 IN RESPONSE TO GCRV INFECTION IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

LIU Shuai, ZHANG Ye-Xuan, HU Xu-Dong, CAO Hong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0289>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

草鱼感染GCRV后血液中淋巴细胞变化及*BCL10*表达分析

LYMPHOCYTES AND *BCL10* EXPRESSION IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*) AFTER THE INFECTION OF GCRV

水生生物学报. 2022, 46(4): 514–520 <https://doi.org/10.7541/2021.2021.044>

感染GCRV的草鱼miRNA测序与比较分析

SEQUENCING AND ANALYSIS OF MIRNAS OF GRASS CARP AFTER GCRV CHALLENGE

水生生物学报. 2022, 46(2): 238–247 <https://doi.org/10.7541/2021.2021.070>

GCRV感染存活草鱼的血清蛋白表达特性

EXPRESSION CHARACTERISTICS OF SERUM PROTEIN IN GRASS CARPS SURVIVING GCRV INFECTION

水生生物学报. 2024, 48(2): 304–314 <https://doi.org/10.7541/2023.2023.0043>

抗菌肽Hepcidin诱导草鱼肾细胞miRNA表达分析

ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION PROFILES IN *CTENOPHARYNGODON IDELLA* KIDNEY CELLS INDUCED BY THE ANTIBACTERIAL PEPTIDE HEPCIDIN

水生生物学报. 2023, 47(11): 1827–1837 <https://doi.org/10.7541/2023.2023.0038>

草鱼两个细胞因子信号抑制因子3基因序列及表达分析

TISSUE DISTRIBUTION OF TWO SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALING 3 (*SOC3*) GENES AND THEIR ROLE IN BACTERIA-INDUCED INNATE IMMUNE RESPONSE IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

水生生物学报. 2020, 44(2): 283–288 <https://doi.org/10.7541/2020.034>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0289

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0289

草鱼长链非编码RNA1153应对GCRV感染的调控功能

刘 帅^{1,2} 张烨焯^{2,3} 胡旭东^{2,3} 曹 宏^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了解长链非编码RNA在GCRV感染草鱼过程中的分子调控机制, 对GCRV攻毒的草鱼肾脏细胞(CIK)进行长链非编码RNA组学测序, 在此基础上, 筛选出在GCRV攻毒前后差异表达明显的lncRNA1153(PP712057)。利用qRT-PCR技术对lncRNA1153在草鱼CIK细胞中的时空表达水平进行检测, 发现在GCRV感染细胞后, lncRNA1153的表达水平在稳步上升至32h达到峰值。在CIK细胞内对lncRNA进行过表达实验, 发现在lncRNA1153过表达的细胞系中, 在GCRV攻毒后, 干扰素的mRNA表达水平上调。同时, 通过在CIK细胞内进行过表达及RNA pull-down实验, 将富集的蛋白质进行质谱分析, 从中筛选出P62蛋白进行深入研究。qRT-PCR验证发现, 在草鱼肝脏、肾脏等组织及CIK细胞中, lncRNA1153与P62的表达趋势大致相同。进一步的研究发现, GCRV感染CIK细胞后, 过表达lncRNA1153与P62都对GCRV病毒蛋白的复制起到抑制作用。研究表明长链非编码RNA在草鱼拮抗GCRV感染的先天性免疫机制中发挥重要作用, 为未来设计针对GCRV感染的lncRNA靶向治疗提供参考。

关键词: 长链非编码RNA1153; GCRV; CIK细胞; P62; 草鱼

中图分类号: S941.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)06-062502-09



我国是世界水产养殖大国, 淡水养殖规模和产量占世界淡水养殖产量的70%以上。其中, 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)作为我国重要的淡水鱼类养殖品种, 占全国淡水鱼类养殖产量的18.1%, 是全球产量和消费量最大的养殖鱼类之一^[1]。但是长期以来, 草鱼养殖业面临一个主要的问题, 即受到由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)所引起的草鱼出血病的危害。传染性高且防治困难, 给我国的草鱼养殖业造成了巨大的损失。

草鱼呼肠孤病毒隶属于呼肠孤病毒科, 水生呼肠孤病毒属, 是我国从水生动物中发现的第一个病毒病原体^[2]。作为一种双链RNA病毒, 其主要通过引起鱼体肝脏和肠道出现显著的出血症状, 进而导致鱼体死亡, 给草鱼养殖行业带来了重大的经济损失^[2-4]。迄今为止, 学术界已经报道了超过20种GCRV毒株, 其中十余种已完成基因组测序, 并公布了其完整的基因组序列信息^[5]。这些具有完整基

因组序列毒株包括GCRV-873、AGCRV^[6]、GCRV-HZ08^[2]、GCRV-HuNan794、GCRV-106、GCRV-GD108、GCRV-918、GCRV-HeNan988、HGDRV^[7](之前称为GCRV-104)、GCRV-109^[8]、GCRV-DY197^[9]、GCRV-AH528^[10]、GCRV-GZ1208^[11]及GCRV-Huan1307^[12], 这些数据为深入研究GCRV在宿主体内的具体作用机制提供了宝贵的信息资源。

长链非编码RNA (Long non-coding RNA, lncRNA)是指长度大于200个核苷酸, 结构上与mRNA类似但缺乏编码蛋白能力的RNA^[13]。lncRNAs广泛分布在细胞核和细胞质中, 而lncRNAs行使的功能与其在细胞内的定位息息相关^[14]。虽然许多核内lncRNA与染色质之间的相互作用是通过蛋白质介导的, 但lncRNA也能直接与DNA接触, 形成能够改变染色质可及性的RNA-DNA-DNA杂交结构(R-loops)。这种由序列互补性驱动的R-loops结构被认为对lncRNA的功能至关重要, 尤其是在促进基因

收稿日期: 2024-07-24; 修订日期: 2024-09-27

基金项目: 国家自然科学基金(32270532)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32270532)]

作者简介: 刘帅(1998—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类分子遗传学研究。E-mail: liushuai@ihb.ac.cn

通信作者: 曹宏, E-mail: regancao@ihb.ac.cn

激活或沉默方面^[15–18]。与其类似,在鱼类的先天性免疫反应过程中,RIG-I样受体(RLRs)的功能同样可以受到一些长链非编码RNA (lncRNA)的调节^[19]。例如,有文献报道,RIG-I可作为单体结合到lnc-Lsm3b上,当发生dsRNA病毒入侵时,lnc-Lsm3b不仅可与其竞争RIG-I配体,同时亦可阻止RIG-I的寡聚和激活^[20–22]。

近年来,关于lncRNAs的研究日益增多,并陆续揭示了其在先天免疫和免疫信号通路调控中的重要作用。但是,其在鱼类先天性免疫方面的具体作用机制研究目前仍然相对较少。本实验室在之前的研究工作中^[23],对草鱼肾脏细胞(CIK, Grass carp kidney cells)进行了GCRV攻毒,从中筛选出lncRNA 1153 (PP712057)进行深入研究。该长链非编码RNA在GCRV攻毒后的CIK细胞中较对照组出现明显的表达上调趋势。在本项研究中,通过qRT-PCR、过表达与RNA敲降等实验,发现lncRNA1153对GCRV的复制有着一定的拮抗作用。同时,本文还通过RNA pull-down及质谱分析实验,筛选出P62蛋白,发现其表达趋势与lncRNA1153基本同步,相关结论在细胞与组织层面上进行了验证。本研究初步探索了lncRNA在GCRV感染草鱼细胞过程中发挥的潜在功能,为后续深入研究lncRNA特别是lncRNA1153在鱼类拮抗GCRV感染时的分子调控机制提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用草鱼肾脏细胞系(CIK)来自中国科学院水生生物研究所,用含10%胎牛血清(FBS)的M199细胞培养基在28℃、5% CO₂培养箱中培养。本研究使用中国科学院水生生物研究所官桥实验基地提供的6月龄草鱼[(15±3) cm, (40±10) g],在26—28℃的充气淡水中养殖,实验用鱼选取体型相似,且均为同批次相同规格的个体。在实验前12h停止投喂,并在实验用水中暂养后进行实验。I型草鱼呼肠孤病毒(GCRV-0901, 10⁶ TCID₅₀/mL)和II型草鱼呼肠孤病毒(GCRV-HZ08, 2.97×10³ RNA copy/μL)制备方法参照文献^[24]。

1.2 细胞或组织中的RNA提取与qRT-PCR检测

使用TRIzol试剂(Invitrogen; AG21101)提取CIK细胞和草鱼肝脏、肠道、肾脏、脾脏、鳃和肌肉等组织样本的总RNA,方法参照文献^[25]。提取后通过测定A₂₆₀/A₂₈₀比率来检测RNA质量,1.8—2.0表示高质量,检测完成后-80℃存放。cDNA合成步骤分为两步法,合成的cDNA在-20℃下存放。在

Applied Biosystems StepOne™实时荧光定量PCR系统上使用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix预混液(Q712-02)进行实时荧光定量PCR (qRT-PCR)检测。cDNA合成与qRT-PCR实验具体步骤参考文献^[23]。qRT-PCR及实验中所用的所有引物序列均列于表1(引物均由“武汉擎科科技有限公司”合成)。每个样品包括3个重复,并使用β-actin基因作为基因表达标准化的内部对照。qRT-PCR产物的长度约为100—200 bp。如前所述,通过qRT-PCR进行基因表达差异的数据分析^[25]。

1.3 RNA pull-down与质谱分析

本次RNA pull-down所用试剂盒为骏辉生物的F2-RNA pull-down试剂盒(FI88702),利用F2标签与其特异性配体的强亲和力高效调取目标RNA及其结合蛋白。简而言之,根据目标RNA序列设计带有T7启动子(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')和

表1 实验所用引物及序列

Tab. 1 Primers and sequences used in this experiment	
引物Primer	序列Sequence (5'—3')
GClncl153-F	GGCTGGAAGGCTGTAATAATGG
GClncl153-R	CTCCTCTGCAGAACTCTGGT
qPCR-GC-β-actin-F	AGCCATCCTTCTTGGGTATG
qPCR-GC-β-actin-R	GGTGGGGCGATGATCTTGAT
qPCR-GC-lnc1153-F	GGCTGGAAGGCTGTAATAATGG
qPCR-GC-lnc1153-R	CTCCTCTGCAGAACTCTGGT
qPCR-GC-IFN1-F	AAGCAACGAGTCTTTGAGCCT
qPCR-GC-IFN1-R	GCGTCCTGGAAATGACACCT
qPCR-GC-IFN2-F	TCTTTTCTCTCGTGAATGCTTG
qPCR-GC-IFN2-R	TCACAACGATGTTCTGACTGGA
qPCR-GC-IFN3-F	TACATTTATAGAGACTGCGGGTGG
qPCR-GC-IFN3-R	TGGAGTGTCTGGTAAACAGCCTT
qPCR-GC-IFN4-F	TCCCTCCATCCTCCTTGTTCA
qPCR-GC-IFN4-R	GTTCGTCATTCAGGCTCTGGTAG
qPCR-GCRV-VP2-F	ATCAAGGATCCCATTCCGCCCTCA
qPCR-GCRV-VP2-R	TTAGAGGATCGTGCCATTGAGGGT
qPCR-GCRV-VP7-F	ACCACCAACTTTGATCACGCTGAG
qPCR-GCRV-VP7-R	AGCGTGGGAGTCTTGAATGGTCTT
qPCR-GC-P62-F	CCCCGATTACGACTTGTGCT
qPCR-GC-P62-R	TCCTGGTTTGTCTGGTCTCC
k-lnc1153-Sense-F	TAATACGACTCACTATAGGGGGCTGGAAGGCTGTAATAATGG
k-lnc1153-Sense-R	GGCGCTTTGTGTCAGCGCCCTCTCTGCAGAACTCTGGT
k-lnc1153-Antisense-F	GGCGCTTTGTGTCAGCGCCGGCTGGAAGGCTGTAATAATGG
k-lnc1153-Antisense-R	TAATACGACTCACTATAGGGCTCCTCTGCAGAACTCTGGT

注: GC-β-actin (DQ211096.1)、GC-IFN (DQ357216.1)、VP2 (MT543211)、VP7 (AF403396)、P62 (MK370058.1)

F2标签序列(5'-GGCGCTGACAAAGCGCC-3')的引物(引物具体序列见表1),以lncRNA1153的序列为模版合成正义链与反义链,再经过体外转录得到带F2标签的正义链与反义链RNA,保存于-80℃,后续步骤则根据试剂盒步骤依次进行,直至得到含lncRNA-蛋白的混合物后取部分样品进行银染检测,银染试剂盒(P0017S)购自碧云天公司,检测合格的样品交由武汉谱度众合生物公司进行质谱分析。

1.4 过表达与si-RNA介导的敲降

首先,本文构建了进行lncRNA1153与P62蛋白过表达实验所需的质粒。具体步骤是先根据长链非编码RNA组学测序得到的lncRNA1153的序列,以及NCBI上获得的P62蛋白的mRNA序列,设计引物并进行PCR扩增,扩增产物进行测序验证。然后分别通过限制性内切酶HindⅢ和EcoRⅠ、EcoRⅠ和SalⅠ对pcDNA3.1(华中农业大学张永安教授提供)和pCMV-flag(Clontech)载体双酶切。经过重组、转化与菌落PCR鉴定等步骤,将筛选得到的质粒分别命名为pcDNA3.1-lncRNA1153和pCMV-flag-P62。并在CIK细胞中进行质粒转染,细胞经过复苏与传代后,转染时一般以细胞密度70%—80%为宜,具体步骤以Neofect™转染试剂(TF201201)要求进行。

本次实验的siRNA序列由武汉擎科科技有限公司设计,共合成3个siRNA序列,si-lncRNA1153#1: CCUCGGUGCUGUGUGAUUA, si-lncRNA1153#2: GGUAAUAAUGUCUUUACUA, si-lncRNA1153#3: GGGCACUGCUCUGCACUAA(均为5'—3'),3组siRNA分别靶向lncRNA1153的不同区域。使用Lipofectamine 2000转染试剂(Invitrogen; 11668019)用siRNA转染CIK细胞。然后通过qRT-PCR评估候选siRNA的沉默效率,并与供应商提供的阴性对照siRNA(si-NC)进行比较,筛选出敲低效率最高的siRNA进行后续的敲降实验。

1.5 核质分离实验

本实验使用的是NORGEN的Cytoplasmic&Nuclear RNA Purification Kit试剂盒(NGB-21000)。根据试剂盒实验步骤在裂解细胞后分别提取到细胞核和细胞质组分RNA。通过实时qPCR测定lncRNA1153与P62在每个组分中的表达。分析数据以确定其分别在细胞核和细胞质的表达水平。

1.6 抗病毒活性实验

为了研究P62蛋白在GCRV感染过程中的抗病毒活性,将CIK细胞接种到24 cm²的培养皿中,并用同样规格的pCMV-flag-P62与pCMV-flag(阴性对

照)转染24h。用10⁶ TCID₅₀/mL的I型GCRV感染每孔细胞24h。用PBS洗涤感染的细胞,用30%甲醛固定30min,用1%(w/v)结晶紫染色30min,并观察细胞病变效应(Cytopathic Effect, CPE)。如Kremer等^[26]所述,通过标准菌斑测定法检测病毒菌斑形成单位(PFU)。通过qRT-PCR检测GCRV的VP2(GenBank ID: MT543211)和VP7(GenBank ID: AF403396)^[27]基因。

1.7 数据分析

qRT-PCR数据报告为3个独立实验的平均值±SE。使用GraphPad Prism 9.5(GraphPad Software股份有限公司)进行统计分析(非配对t检验)。P<0.05被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA pull-down与质谱结果分析

为了探究其在GCRV感染草鱼过程中的功能,我们采用RNA pull-down技术来富集其在GCRV感染过程中的互作蛋白(图1)。实验组为正义链组(S),对照组为反义链组(AS),在与探针结合之后通过银染检测,发现相对于正义链组,反义链组有明显特异条带(图2),并将得到的RNA-蛋白混合物送去公司进行质谱分析。质谱结果对比两组结果后,

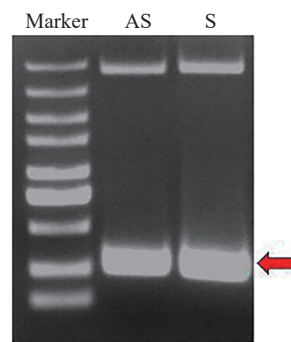


图1 lncRNA1153的探针合成和PCR鉴定

Fig. 1 Probe synthesis and PCR identification of lncRNA1153

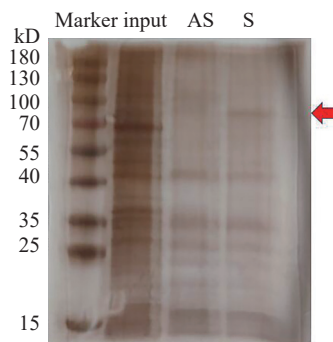


图2 RNA pull-down试验的SDS-PAGE分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of RNA pull-down experiment

共筛选得到27个差异表达蛋白,其中6个蛋白的表达趋势呈上调状态,其余21个蛋白的表达趋势呈下调状态(表2)。通过利用蛋白差异聚类图对蛋白进行筛选,并且结合文献调研后选择P62蛋白(P62/Sequestosome 1)进行进一步的实验分析。细胞核和细胞质组分的RNA分离实验显示lncRNA1153主要在细胞核中,而P62主要分布在细胞质中(图3)。

2.2 lncRNA1153和P62应答GCRV感染草鱼组织与草鱼CIK细胞后表达变化

如图4A和4B所示,lncRNA1153在草鱼肌肉组织中相对表达量最高,而在肠道中最低;P62则是在

表2 lncRNA1153互作蛋白相关信息表

Tab. 2 The information table of interaction protein with lncRNA1153

登录号 Accession	基因Gene	Mw (kD)	Diff Sig
A0A5A4CYN7	<i>Keratin</i>	14.636	+
A0A7L5BSB8	<i>Sequestosome 1</i>	51.257	+
C1KH73	<i>hsp60</i>	42.504	+
E7D7N6	<i>HSP70</i>	61.260	+
F4YAX3	<i>Tollip</i>	70.594	+
I4AY76	<i>Ckbeta</i>	30.491	+
A0A076PUA2	<i>SH3</i>	10.695	-
A0A0D3R0V5	<i>ADAR1</i>	53.958	-
A0A0U2QVN5	<i>prkra</i>	107.239	-
A0A142EHR3	<i>tarbp2</i>	32.178	-
A0A142EHR4	<i>ADAR2</i>	37.444	-
A0A1B3IIH3	<i>Cold inducible RNA</i>	76.999	-
A0A2I6QR50	<i>colec12</i>	20.079	-
A0A3Q9U464	<i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>	79.987	-
A0A4D6K9B0	<i>ppp1c-beta</i>	46.876	-
A0A6B9XWC4	<i>Importin alpha 4</i>	31.422	-
A0A8K0Y7P9	<i>CNBP</i>	28.060	-
B3GN92	<i>RNA helicase</i>	17.983	-
C5MR43	<i>EF-1a</i>	72.719	-
F8QMS8	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	45.625	-
K4HRD3	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	18.759	-
Q5UBZ7	<i>QM</i>	24.527	-
Q7T3N8	<i>rpl15</i>	24.064	-
X2IW00	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2</i>	36.096	-
X2J253	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2</i>	36.192	-
A0A2S0DT35	<i>Sp1</i>	68.932	-
K4MMY6	<i>PKR</i>	77.892	-

注: Accession登录号为差异蛋白在Uni Prot数据库中的登录号;“+”表示呈上调趋势,“-”表示呈下调趋势

Note: The Access login number is the login number of the differential protein in the Uni Prot database; “+” indicates an upward trend, “-” indicates a downward trend

草鱼肌肉组织中相对表达量最高,而在肾脏中最低。由于肾脏亦是鱼类的主要免疫器官,因此,我们选取肾脏组织,在GCRV感染草鱼后0—8d,按时间点对其进行取样分析,并检测了感染GCRV后lncRNA1153与P62在草鱼肾脏组织中的表达水平。结果发现,lncRNA1153(图4C)在第1天没有显著变化,而P62则表达上调了6.5倍(图4D),但是P62在2—4d和lncRNA1153类似,其相对表达量较对照组均为呈现出显著差别(图4C—D)。从攻毒后第5天开始,鱼体开始出现出血症状,而lncRNA1153和P62的相对表达量则分别上调了7.1和7.3倍,后续几天伴随着微量的下调后,在攻毒后的第8天鱼体分别达到最高的8.2与11.7倍。同时横向对比lncRNA与P62的表达模式,lncRNA1153与P62的整体呈现相似的表达上调趋势。

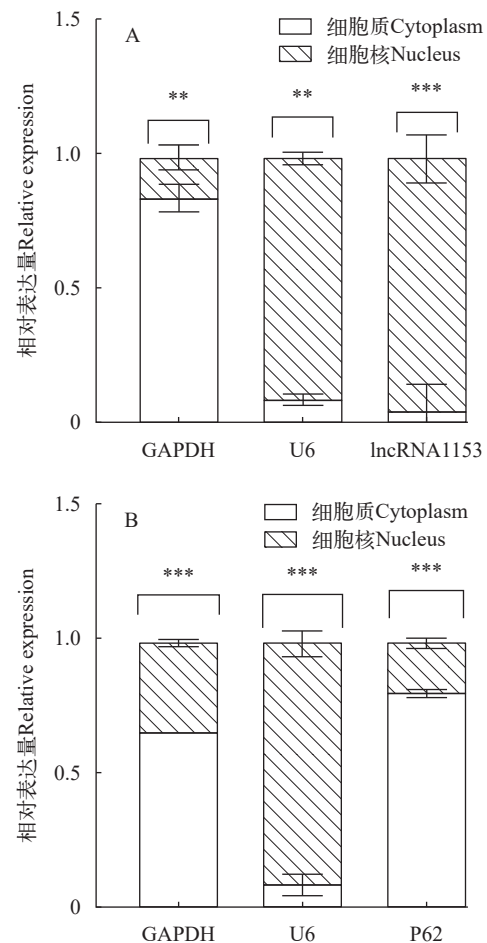


图3 lncRNA1153 (A)和P62 (B)在核质中的表达分布

Fig. 3 Expression distribution of lncRNA1153 (A) and P62 (B) in the nucleus and cytoplasm

GAPDH用作细胞质内参; U6用作细胞核内参($n=3$); $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

GAPDH is used as an intracellular reference; U6 used as a nuclear reference ($n=3$); $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

同时, 本文在草鱼的CIK细胞中亦进行了GCRV感染实验, 在CIK细胞中加入同规格的 I 型GCRV-0901, 此后的48h内以每2h的时间梯度进行取样(图 4E)。在感染GCRV后的48h内, lncRNA1153与P62呈相同的表达模式, 且都在32h时达到峰值(8.9和7.2倍)。

2.3 lncRNA1153的过表达与敲降

为了探究lncRNA1153在抗GCRV免疫反应中的作用, 本文通过qRT-PCR检测病毒蛋白VP2、VP7、P62及CtIFN1-4的表达变化。结果表明, 与对照组相比, lncRNA1153的过表达能显著促进P62的表达(1.8倍), 并对VP2 (0.8倍)、VP7 (0.7倍)有较为明显的抑制效果, 同时相较于对照组能显著性上调CtIFN1-4 (6.2、7.4、4.4、2.0倍)的表达(图 5)。

为探究敲降lncRNA1153对GCRV病毒复制的影响, 使用靶向lncRNA1153的siRNA序列转染CIK

细胞, 然后通过qRT-PCR对比3种siRNA对lncRNA1153的敲降效率(图 6A), si-lncRNA1153#2组相较于对照组(NC), 表现出显著的敲降效果(0.35倍)。为研究lncRNA1153在GCRV复制过程中发挥的作用, 对CIK细胞分别用对照siRNA (NC)与si-lncRNA1153#2进行处理, 在24h后感染 I 型GCRV-0901。研究发现, 与对照细胞相比, 转染si-lncRNA1153#2的CIK细胞中VP7病毒mRNA的表达量上调(2.4倍), 这表明lncRNA可以在一定程度上抑制GCRV的病毒复制。同时, 敲降lncRNA1153后P62蛋白的表达同步下调(0.6倍), 结合过表达的实验结果, 这表明lncRNA1153和P62在CIK内, 呈现相同的表达趋势。

2.4 抗病毒活性实验

为了研究P62在宿主抗病毒免疫中的作用, 利用pCMV-flag-P62转染CIK细胞, 并以pCMV-flag组为对照组。同时将两组细胞分别感染相同滴度的 I 型GCRV-0901。在注射GCRV 24h后, 与对照组相比, 过表达P62的实验组中, CPE呈现出明显的弱化(图 7A)。同时, 在GCRV感染CIK细胞后, 转染pCMV-flag-P62的病毒滴度明显低于转染pCMV-flag的NC组细胞(图 7B), 这与CPE测定结果一致。此外, 与转染pCMV-flag的细胞相比, 转染pCMV-flag-P62的实验组中, 其VP2和VP7蛋白mRNA的表达量均受到显著抑制, 与对照组相比较, 大约为其0.3倍(图 7C), 表明P62可以一定程度上抑制GCRV的病毒复制。因此, 本文的数据表明, P62在草鱼CIK细胞内的抗病毒先天免疫反应中起着重要的作用。

3 讨论

3.1 lncRNA1153与P62的初步分析及细胞内的表达分布

近年来, 我国的淡水鱼类养殖产业不断发展, 草鱼是其中最大的养殖品种, 为全球产量和消费量最大的养殖鱼类之一^[1]。但是长期以来, 我国的草鱼养殖产业一直深受草鱼出血病的危害, 其病原就是GCRV^[28]。近年来, 越来越多的研究揭示, 长链非编码RNA(lncRNA)在多种生物过程中扮演着重要角色。为了探究其在鱼类拮抗病毒感染的先天免疫反应过程中的作用机制, 本研究在前期工作的基础上^[23], 选用 I 型GCRV-0901感染CIK细胞, 后续从lncRNA组学分析中得到lncRNA1153, 并深入研究了lncRNA1153在GCRV感染草鱼肾脏细胞过程中分子调控的作用及其在草鱼体内的表达特征。

本文研究发现, 在草鱼的组织及CIK细胞中, 当样本受到GCRV感染后, lncRNA1153的表达呈上调

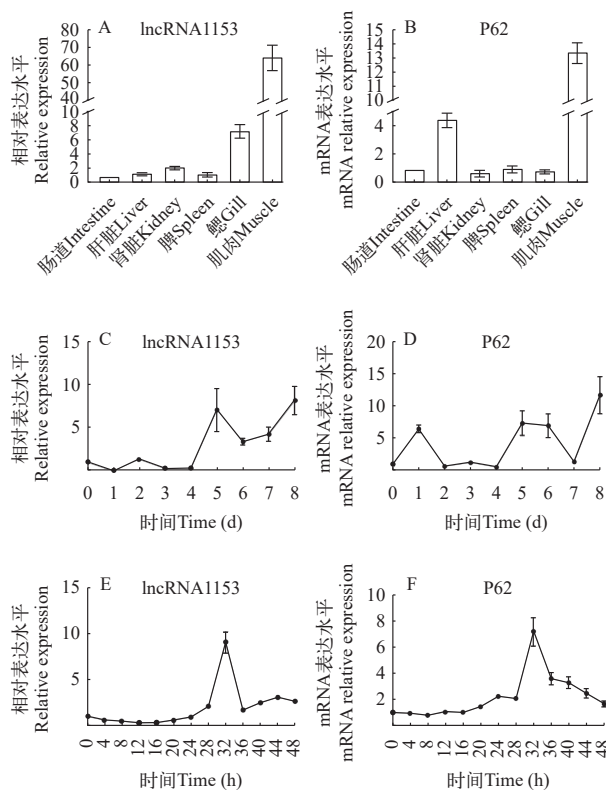


图4 lncRNA1153与P62的表达水平

Fig. 4 The expression levels of lncRNA1153 and P62

lncRNA1153 (A)与P62 (B)在草鱼各组织中的表达水平; lncRNA1153 (C)和P62 (D)在草鱼感染GCRV后0—8d的表达变化; GCRV感染CIK细胞后, lncRNA1153 (E)与P62 (F)在0—48h内的表达变化

The expression levels of lncRNA1153 (A) and P62 (B) in various tissues of grass carp; The expression changes of lncRNA1153 (C) and P62 (D) in grass carp infected with GCRV from 0 to 8 after infection; (E) Expression changes of lncRNA1153 (E) and P62 (F) within 0—48h after GCRV infection of CIK cells

趋势,这一结果与之前的组学分析结果相吻合。通过对lncRNA1153进行RNA pull-down实验和质谱分析,本文重点筛选得到P62蛋白,并进行了后续的细胞与组织实验。据报道,P62蛋白全称为Sequestosome 1,作为一种多功能支架蛋白,主要参与各种信号通路的调节及自噬^[29]。特别是,P62可作为识别特定细胞器和蛋白质聚集体并将其递送至自噬体进行降解的重要衔接子,这一过程称为选择性自噬。P62蛋白在自噬及相关免疫信号传递路径中发挥着核心作用,它作为一个信号转导的枢纽,能够调节TNF- α 和NF- κ B,进而促进细胞的自噬过程^[30];同时,P62亦可通过识别TRAF6并促使其选择性降解,有效抑制TRAF6所介导的NF- κ B激活及干扰素(IFNs)的生成,从而在免疫调节中发挥关键功能^[31]。此外,P62通过促进IRF3的去泛素化作用,加速其降解,从而在调控I型干扰素(IFNs)信号传递中发挥作

用^[32–34]。研究也显示,P62的磷酸化能够特异性地靶向STING,导致其通过自噬体被降解,这进一步表明了P62在免疫调节中的复杂机制^[35]。本研究还通过细胞核质分离实验探究了lncRNA1153与P62蛋白在草鱼CIK细胞内的表达分布情况。研究发现,lncRNA1153主要在细胞核中,而P62主要分布在细胞质中,这说明lncRNA1153与P62蛋白之间可能存在某种转运途径。

3.2 lncRNA1153与P62在草鱼组织与CIK中的时空表达分析

通过对lncRNA1153与P62在草鱼各组织及CIK细胞内进行时空表达特征分析,lncRNA1153与P62在草鱼的组织中普遍表达,并在肌肉中相对表达量最高。研究发现,lncRNA1153与P62蛋白在肾脏组织与CIK细胞系中的表达模式相似,且其在CIK细胞内的表达水平在GCRV感染后均呈现上调趋势。

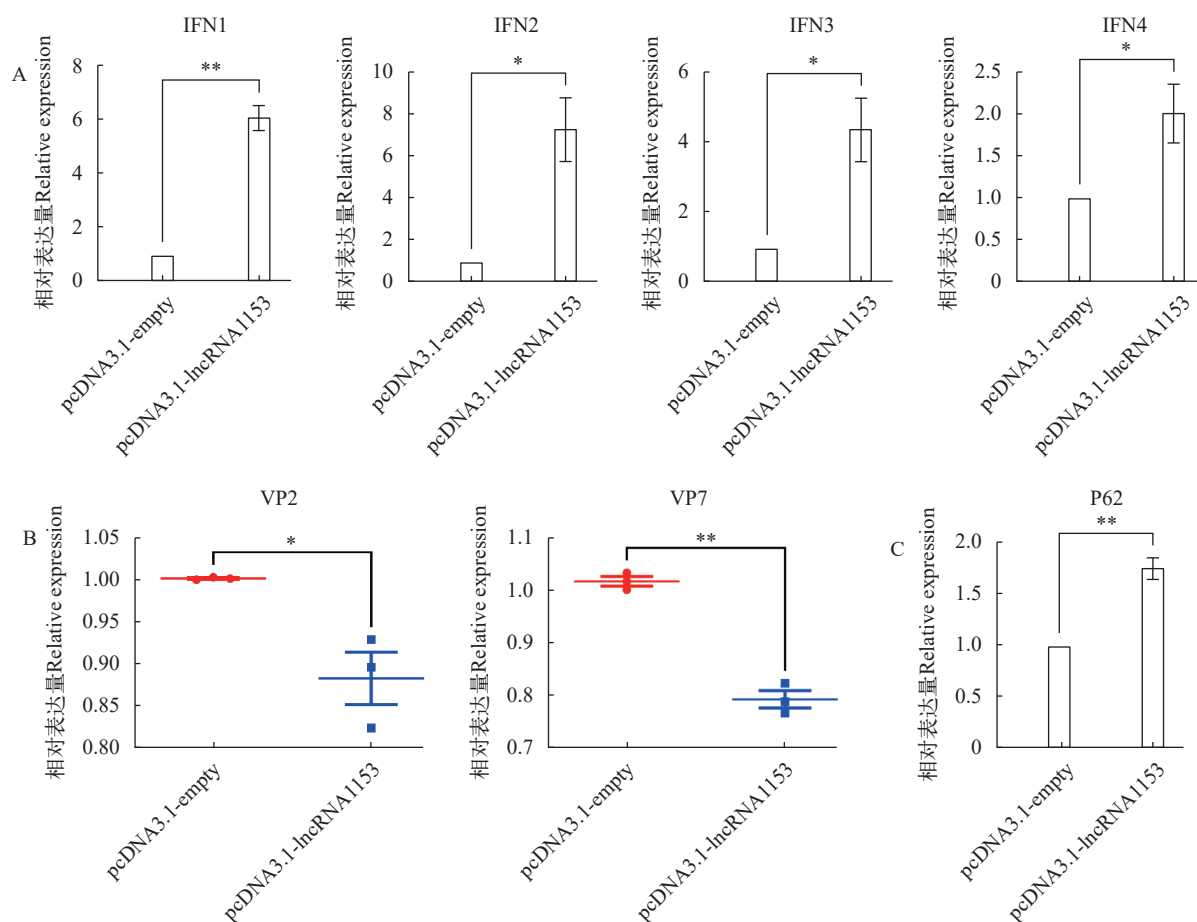


图5 lncRNA1153过表达实验结果图

Fig. 5 Results of lncRNA1153 overexpression experiment

A. CIK细胞中过表达24h后IFN1-4的表达变化; B. VP2、VP7的表达变化; C. P62的表达变化数据为3个独立实验的平均值 $\pm$ SE, 每个实验1式3份; 使用GraphPad Prism 9.5 (非配对 t 检验)进行统计分析, $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

A. Changes in IFN1-4 expression after overexpression in CIK cells for 24h; B. Changes in the expression of VP2 and VP7; C. Changes in the expression of P62. Data are shown as mean $\pm$ SE of three independent experiments, each performed in triplicate; the statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9.5 (unpaired t -test), $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

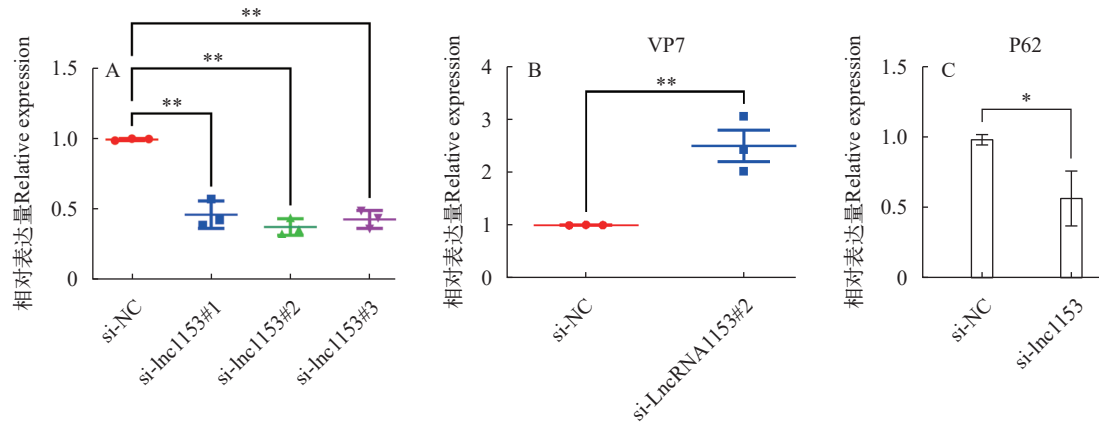


图6 lncRNA1153敲降实验结果图

Fig. 6 Figure of lncRNA1153 knockdown experiment results

A. 3种靶向敲低lncRNA1153的siRNA敲低效率对比图; B. 敲低lncRNA1153后VP7的表达情况; C. 敲低lncRNA1153后P62的表达情况
数据为3个独立实验的平均值 $\pm$ SE, 每个实验1式3份; 使用GraphPad Prism 9.5 (非配对 t 检验)进行统计分析, $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

A. Comparison of siRNA knockdown efficiency of three targeted knockdown lncRNA1153; B. Knocking down lncRNA1153 results in the expression of VP7; C. Expression of P62 after knocking down lncRNA1153. Data are shown as mean $\pm$ SE of three independent experiments, each performed in triplicate; the statistical analysis is performed using GraphPad Prism 9.5 (unpaired t -test), $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

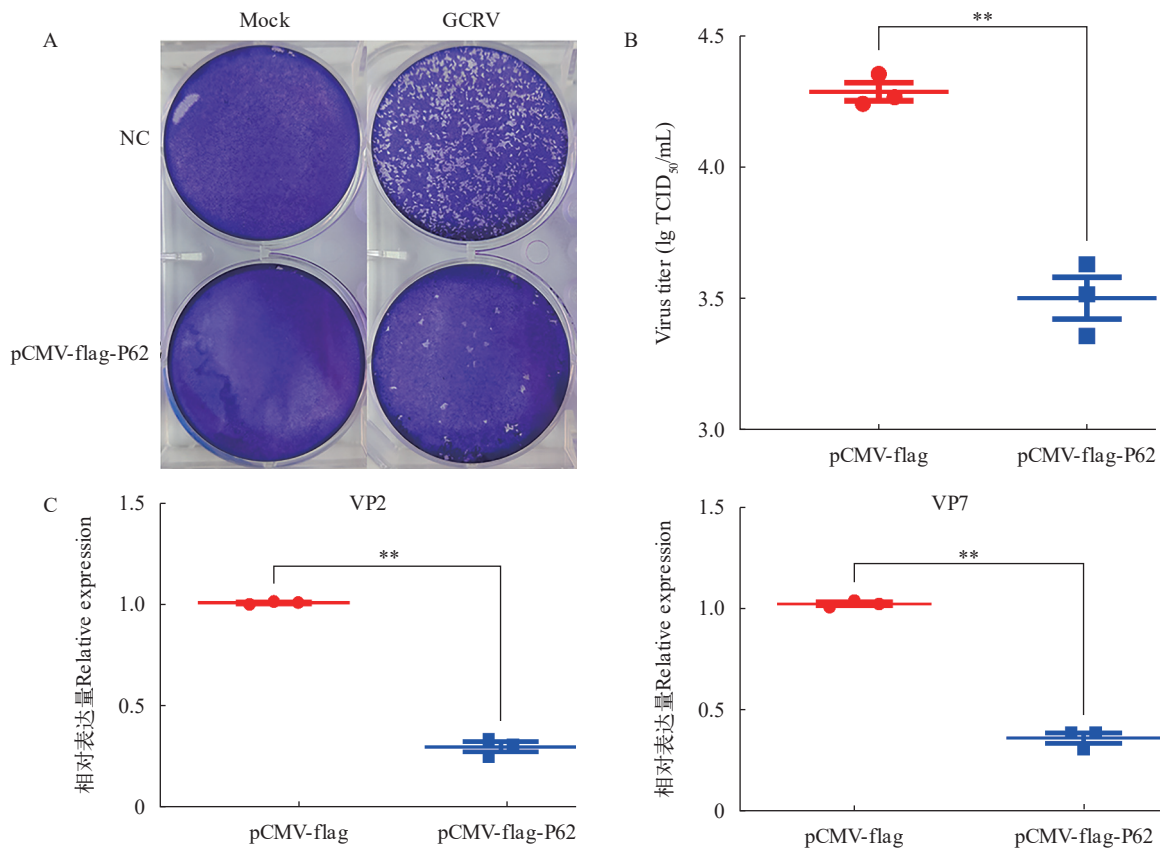


图7 P62抗病毒活性实验结果图

Fig. 7 P62 antiviral activity experiment results

A. 相同滴度病毒水平下细胞病变效应结果图; B. TCID₅₀法测定CIK细胞中培养基的病毒滴度; C. 过表达P62后VP2、VP7的表达水平; 数据为三个独立实验的平均值 $\pm$ SE, 每个实验1式3份; 使用GraphPad Prism 9.5 (非配对 t 检验)进行统计分析, $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

A. Results of cytopathic effects at the same titer virus level; B. TCID₅₀ method is used to determine the viral titer in the culture medium of CIK cells; C. Expression levels of VP2 and VP7 after overexpression of P62; Data are shown as mean $\pm$ SE of three independent experiments, each performed in triplicate; the statistical analysis is performed using GraphPad Prism 9.5 (unpaired t -test), $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$

3.3 lncRNA1153与P62在抗GCRV免疫反应中的作用分析

通过在细胞水平上对lncRNA1153进行的过表达及RNA敲降实验分析, 本研究发现, 相比较于对照组, 过表达lncRNA1153后, IFN1-4与P62蛋白的表达情况呈显著上升趋势, IFNs干扰素的上升表明能够提高机体的抗病毒能力^[36]。同时发现, 过表达的lncRNA1153可对GCRV的VP2和VP7蛋白的表达产生一定的抑制效果。lncRNA1153的敲降实验结果则表明, 在lncRNA1153低表达的情况下, 虽然VP2无明显变化, 但VP7蛋白的表达水平大幅度上升。同时, P62的相对表达量亦呈下调, 两组结果共同表明, lncRNA1153可以提高机体的抗病毒能力, 在GCRV对草鱼机体的感染过程中扮演着正调控因子的角色。

为进一步研究与lncRNA1153相关的P62蛋白在宿主抗病毒免疫中的作用, 本研究在CIK细胞内过表达了P62蛋白, 并同时注射相同滴度的I型GCRV病毒。结果表明, P62蛋白的高表达导致因GCRV而产生的CPE现象减弱, 且VP2与VP7蛋白的mRNA表达水平也被抑制。这表明P62蛋白同样可以抑制GCRV的复制, 这与lncRNA1153相同, 表明它们可能共同在GCRV复制中发挥重要的作用。

4 结论

本项研究发现, 在GCRV感染机体过程中lncRNA1153与P62蛋白均能够抑制GCRV病毒的复制, 以此来共同拮抗GCRV的感染。本研究初步表明lncRNA1153在GCRV感染草鱼细胞过程中可发挥重要作用, 这为未来设计针对GCRV感染的lncRNA靶向治疗策略提供了一定的参考。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] China Fisheries Statistical Yearbook (2022) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 24-35. [中国渔业统计年鉴(2022) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 24-35.]
- [2] Wang Q, Zeng W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. *Journal of Virology*, 2012, **86**(22): 12466.
- [3] Cheng L, Fang Q, Shah S, *et al.* Subnanometer-resolution structures of the grass carp reovirus core and virion [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, **382**(1): 213-222.
- [4] Rao Y, Ji J, Liao Z, *et al.* GCRV hijacks TBK1 to evade IRF7-mediated antiviral immune responses in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(93): 492-499.
- [5] Rao Y, Su J. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. *Journal of Immunology Research*, 2015(2015): 670437.
- [6] Mohd Jaafar F, Goodwin A E, Belhouchet M, *et al.* Complete characterisation of the American grass carp reovirus genome (Genus *Aquareovirus*: Family Reoviridae) reveals an evolutionary link between aquareoviruses and coltivirus [J]. *Virology*, 2008, **373**(2): 310-321.
- [7] Fan Y, Rao S, Zeng L, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China [J]. *The Journal of General Virology*, 2013, **94**(Pt 10): 2266-2277.
- [8] Pei C, Ke F, Chen Z Y, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution [J]. *Archives of Virology*, 2014, **159**(9): 2435-2440.
- [9] Liu M, Xu C, Zhou Y, *et al.* Biochemical profiling of the protein encoded by grass carp reovirus genotype II [J]. *iScience*, 2024, **27**(8): 110502.
- [10] Wu M, Li H, Jiang H, *et al.* Structure and function of S9 segment of grass carp reovirus Anhui strain [J]. *Virusdis-ease*, 2017, **28**(1): 26-32.
- [11] Zeng W, Bergmann S M, Dong H, *et al.* Identification, virulence, and molecular characterization of a recombinant isolate of grass carp reovirus genotype I [J]. *Viruses*, 2021, **13**(5): 807.
- [12] Zeng W, Wang Q, Wang Y, *et al.* Immunogenicity of a cell culture-derived inactivated vaccine against a common virulent isolate of grass carp reovirus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(54): 473-480.
- [13] Iyer M K, Niknafs Y S, Malik R, *et al.* The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome [J]. *Nature Genetics*, 2015, **47**(3): 199-208.
- [14] Bridges M C, Daulagala A C, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2021, **220**(2): e202009045.
- [15] Schmitz K M, Mayer C, Postepska A, *et al.* Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes [J]. *Genes & Development*, 2010, **24**(20): 2264-2269.
- [16] Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, *et al.* Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript [J]. *Nature*, 2007, **445**(7128): 666-670.
- [17] Kuo C C, Hänzelmann S, Sentürk Cetin N, *et al.* Detection of RNA-DNA binding sites in long noncoding RNAs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, **47**(6): e32.
- [18] Blank-Giwojna A, Postepska-Igielska A, Grummt I. lncRNA KHPS1 activates a poised enhancer by triplex-dependent recruitment of epigenomic regulators [J]. *Cell Reports*, 2019, **26**(11): 2904-2915.
- [19] Liu J, Ji Q, Cheng F, *et al.* The lncRNAs involved in regulating the RIG-I signaling pathway [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022(12): 1041682.
- [20] Garcin D. UntrIG(er)ing lncRNAs [J]. *Molecular Cell*, 2018, **71**(1): 6-7.
- [21] Bird L. Reigning in RIG-I [J]. *Nature Reviews Immunology*

- logy, 2018, **18**(6): 357.
- [22] Jiang M, Zhang S, Yang Z, *et al.* Self-Recognition of an inducible host lncRNA by RIG-I feedback restricts innate immune response [J]. *Cell*, 2018, 173(4): 906-919. e13.
- [23] Zhang Y, Hu X, Liu S, *et al.* Identification and analysis of long non-coding RNAs that are involved in response to GCRV infection in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023(134): 108623.
- [24] Zhou M, Wang B, Lin Y, *et al.* Molecular cloning, functional characterization and expression analysis of P65 subunit in response to GCRV infection in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020(113): 103786.
- [25] Lin Y, Wang B, Wang N, *et al.* Transcriptome analysis of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) infected by the grass carp reovirus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(89): 337-344.
- [26] Kremer M, Volz A, Kreijtz J H C M, *et al.* Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012(890): 59-92.
- [27] Ma J, Zeng L, Fan Y, *et al.* Significant inhibition of two different genotypes of grass carp reovirus in vitro using multiple shRNAs expression vectors [J]. *Virus Research*, 2014(189): 47-55.
- [28] Zhang Q, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals [J]. *Science China Life Sciences*, 2015, **58**(2): 156-169.
- [29] Kumar A V, Mills J, Lapierre L R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022(10): 793328.
- [30] Cuyler J, Murthy P, Spada N G, *et al.* Sequestosome-1/p62-targeted small molecules for pancreatic cancer therapy [J]. *Drug Discovery Today*, 2022, **27**(1): 362-370.
- [31] Deng T, Hu B, Wang X, *et al.* TRAF6 autophagic degradation by avibirnavirus VP3 inhibits antiviral innate immunity via blocking NFKB/NF- κ B activation [J]. *Autophagy*, 2022, **18**(12): 2781-2798.
- [32] Xie W, Tian S, Yang J, *et al.* OTUD7B deubiquitinates SQSTM1/p62 and promotes IRF3 degradation to regulate antiviral immunity [J]. *Autophagy*, 2022, **18**(10): 2288-2302.
- [33] Wu Y, Jin S, Liu Q, *et al.* Selective autophagy controls the stability of transcription factor IRF3 to balance type I interferon production and immune suppression [J]. *Autophagy*, 2021, **17**(6): 1379-1392.
- [34] Jiang L Q, Xia T, Hu Y H, *et al.* IFITM3 inhibits virus-triggered induction of type I interferon by mediating autophagosome-dependent degradation of IRF3 [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2018, **15**(9): 858-867.
- [35] Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, *et al.* Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1 [J]. *The EMBO Journal*, 2018, **37**(8): e97858.
- [36] Huang S, Hendriks W, Althage A, *et al.* Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor [J]. *Science*, 1993, **259**(5102): 1742-1745.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF LONG NON-CODING RNA1153 IN RESPONSE TO GCRV INFECTION IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

LIU Shuai^{1,2}, ZHANG Ye-Xuan^{2,3}, HU Xu-Dong^{2,3} and CAO Hong^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Long non-coding RNAs (lncRNAs) are involved in many biological processes including the immune response against virus infection. Based on our previous study, the lncRNA1153 (PP712057) was selected for functional analysis following of GCRV infection in grass carp, both *in vivo* and *in vitro*. Quantitative Real-time PCR analysis revealed that lncRNA1153 was expressed in all examined organs, with particularly high level in muscle tissue. Temporal expression analysis *in vitro* showed a gradual increase in lncRNA1153 expression levels in CIK cells in response to GCRV infection whereas reached a peak at 32h post infection. In addition, *in vivo* analysis indicated that the expression levels of lncRNA1153 was significantly up-regulated in the kidney starting from 5d post infection, reaching its peak at 8d post infection. Furthermore, overexpression of lncRNA1153 activated several interferon (IFN) promoters and significantly decreased GCRV proliferation, while knockdown of P65 produced opposite effects. We also conducted RNA-protein pull-down assays to analyze lncRNA-protect interactions, identifying P62 as a candidate. Similar to lncRNA1153, P62 was expressed in all examined tissues, particularly at high levels in muscle. Our study suggests that P62 may play a critical role in the innate immune response to GCRV infections. In summary, our research preliminarily explores the innate immune mechanisms of lncRNA1153 in grass carp against GCRV infection.

Key words: lncRNA1153; GCRV; CIK cells; P62; *Ctenopharyngodon idella*