



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R373.3

U D C 578

密 级 公开

# 硕士学位论文

**lncRNA NEAT1 调控宿主抗汉滩病毒  
固有免疫应答分子机制的初步研究**

马宏伟

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 生物学

二级学科(专业) 微生物学

研 究 方 向 病毒感染与免疫

指 导 教 师 张芳琳 教授

培 养 单 位 基础部微生物学教研室

二〇一七年五月

## 独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_

## 保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：\_\_\_\_\_导师签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_

# 目 录

缩略语表 .....	1
中文摘要 .....	5
ABSTRACT .....	9
前 言 .....	15
文献回顾 .....	17
正 文 .....	37
第一部分 NEAT1 正向调控 I 型 IFN 信号通路活化进而抑制 HTNV 感染的作用确定 .....	37
1 材料 .....	37
2 方法 .....	44
3 结果 .....	53
4 讨论 .....	83
第二部分 NEAT1-2 与 RIG-I 信号通路交互作用调控 I 型 IFN 信号通路活化的分子机制研究 .....	92
1 材料 .....	92
2 方法 .....	95
3 结果 .....	98
4 讨论 .....	115
第三部分 HFRS 患者外周血单核细胞中 NEAT1-2 表达水平与疾病进展的相关性研究 .....	118
1 材料 .....	118
2 方法 .....	119
3 结果 .....	120
4 讨论 .....	122
小 结 .....	125
参考文献 .....	127
个人简历和研究成果 .....	137
致 谢 .....	140

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ANDV	Andes virus	安第斯病毒
BUN	blood urea nitrogen	血尿素氮
Co-IP	co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
CK	cytokine	细胞因子
DC	dendritic cell	树突状细胞
DGE	digital gene expression	数字基因表达谱
DENV	Dengue virus	登革病毒
DOBV	Dobrava-Belgrade virus	多布拉伐-贝尔格莱德病毒
dpi	days post infection	感染后第...天
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
ECGS	endothelial cell growth supplement	内皮细胞生长添加剂
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
eRNA	enhancer-like lncRNA	增强子样 lncRNA
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FCM	flow cytometry	流式细胞技术
FDR	false discovery rate	假阳性发现率
FISH	fluorescence in situ hybridization	荧光原位杂交
GP	envelope glycoprotein	包膜糖蛋白

HCMV	Human cytomegalovirus	人巨细胞病毒
HE 染色	hematoxylin eosin stain	苏木精-伊红染色
HFRS	hemorrhagic fever with renal syndrome	肾综合征出血热
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA	核不均一 RNA
hpi	hours post infection	感染后第...小时
HPS	hantavirus pulmonary syndrome	汉坦病毒肺综合征
HSV	Herpes simplex virus	单纯疱疹病毒
HTNV	Hantaan virus	汉滩病毒
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells	人脐静脉血管内皮细胞
HMVEC-L	human microvascular endothelial cells-lung	人肺微血管内皮细胞
HVS	Herpesvirus Saimiri	猴疱疹病毒
ICW	in-cell western	细胞内 Western
IFA	immunofluorescence assay	免疫荧光法
IFN	interferon	干扰素
ISG	interferon stimulated gene	干扰素刺激基因
KSHV	Kaposi's sarcoma virus	卡波奇肉瘤病毒
lincRNA	intergenic long noncoding RNA	基因间 lncRNA
lncRNA	long noncoding RNA	长链非编码 RNA
MECs	microvascular endothelial cells	微血管内皮细胞
miRNA	microRNA	微小 RNA
Mo	monocyte	单核细胞
MONO %	monocyte percentage	单核细胞百分比

M $\phi$	macrophage	巨噬细胞
NAT	natural antisense transcript	天然反义转录本
NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1 /nuclear enriched abundant transcript 1	核旁斑组装转录物 1 /核内富集转录物 1
ncRNA	noncoding RNA	非编码 RNA
NONO	containing nucleotide octamer-binding protein without POU domain	不含 POU 结构域的 八聚核苷酸结合蛋白
NP	nucleocapsid protein	核衣壳蛋白
NYV	New York virus	纽约病毒
ORF	open reading frame	开放阅读框
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	病原体相关分子模式
PFU	plaque forming unit	蚀斑形成单位
PHV	Prospect hill virus	希望山病毒
PLT	platelets	血小板
PRC	polycomb repressive complex	多梳抑制复合物
PRR	pattern-recognition receptor	模式识别受体
PUUV	Puumala virus	普马拉病毒
qRT-PCR	quantitative real-time PCR	实时定量 PCR
RBP	RNA binding protein	RNA 结合蛋白
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
RIP	RNA-binding protein immunoprecipitation	RNA 结合蛋白免疫共沉淀
RLR	RIG-I like receptor	RIG-I 样受体
RNA-pol II	RNA polymerase II	RNA 聚合酶 II

RBP	RNA-binding protein	RNA 结合蛋白
SCID	severe combined immune deficiency	重症联合免疫缺陷
Scr	serum creatinine	血肌酐
SEOV	Seoul virus	汉城病毒
SFPQ	splicing factor proline and glutamine rich	脯氨酸及谷氨酰胺富集 剪接因子
SLE	systemic lupus erythematosus	系统性红斑狼疮
snoRNA	small nucleolar RNA	核仁小 RNA
snRNA	small nuclear RNA	核内小 RNA
SNV	Sin Nombre virus	辛诺柏病毒
TCID <sub>50</sub>	50% tissue culture infectious dose	半数组织感染量
TF	transcription factor	转录因子
TLR	Toll-like receptor	Toll 样受体
TULV	Tula virus	图拉病毒
vRNA	viral RNA	病毒 RNA
WBC	white blood cells	白细胞
WNV	West Nile virus	西尼罗病毒
YFV	Yellow fever virus	黄热病毒

# 长链非编码 RNA NEAT1 调控抗 HTNV 固有免疫应答 分子机制的初步研究

硕士研究生：马宏伟

导师：张芳琳 教授

辅导教师：雷迎峰 副教授

叶伟 讲师

第四军医大学基础部微生物学教研室，西安 710032

资助基金：国家 973 计划项目（No.2012CB518905）

国家重点研究和发展项目（No.2016YFC1200400）

## 中文摘要

### 【研究背景】

汉滩病毒（Hantaan virus, HTNV）属于布尼亚病毒目（*Bunyavirales*）汉坦病毒科（*Hantaviridae*），是我国重症肾综合征出血热（hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS）的主要病原体。HFRS 死亡率为 0.1%-15%，迄今尚无针对 HTNV 感染的特异性药物。以干扰素（interferon, IFN）为核心的固有免疫应答在机体抵御 HTNV 感染的过程中发挥重要作用，而 RIG-I 作为宿主细胞的模式识别受体（pathogen recognition receptor, PRR）能够识别病毒的病原体相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern, PAMP），促进机体产生 IFN。目前尚不清楚 HTNV 感染后宿主细胞中 RIG-I 信号通路的调控机制。近期研究表明长链非编码 RNA（long noncoding RNA, lncRNA）可调控 PRR 等多种固有免疫相关基因的表达，与病毒感染增殖及其所致疾病的发生发展关系密切，但尚无文献报道 HTNV 感染后宿主 lncRNA 表达变化及其作用。



## 【研究目的】

本研究旨在通过数字基因表达谱 (digital gene expression, DGE) 分析 HTNV-宿主细胞相互作用过程中宿主 lncRNA 的表达变化, 从中筛选出具有抗病毒作用的分子并明确其抗 HTNV 感染的分子机制, 为抗 HTNV 药物的研发提供理论基础。

## 【方法与结果】

### 1. NEAT1 正向调控 I 型 IFN 信号通路活化进而抑制 HTNV 感染的作用确定

#### 1.1 NEAT1 在 HTNV 感染后表达上调, 且其表达与感染时间及感染剂量相关

为研究 HTNV 感染后宿主细胞 lncRNA 表达变化, 将 HTNV 以 MOI=1 感染人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 同时设置 Mock 组 (纯细胞组)、Co<sup>60</sup>-HTNV 组 (Co<sup>60</sup> 灭活病毒处理组), 24hpi 提取 RNA 进行 DGE 分析, 结果表明与 Mock 组或 Co<sup>60</sup>-HTNV 组相比, HTNV 组中 NEAT1、GAS5、IPW 等多种 lncRNA 分子表达变化具有统计学意义, 其中 lncRNA NEAT1 表达上调显著。荧光原位杂交 (FISH) 和实时定量 PCR (qRT-PCR) 等实验结果证实 HTNV 感染可在 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等多种细胞系中诱导 NEAT1 表达上调, 且 NEAT1 表达上调趋势与感染时间、感染剂量在一定范围内呈正相关。

#### 1.2 体外干预 NEAT1-2 表达可影响宿主细胞 IFN 产生及 HTNV 复制

为明确 NEAT1 在汉坦病毒感染过程中的作用, 在 HUVECs 中分别转染敲减 NEAT1 的 siRNA 或过表达 NEAT1 的质粒, 转染 24h 后以 MOI=0.1 或 1 感染 HTNV, 48hpi 进行相关实验。qRT-PCR、Western Blot 及 in-cell western 等实验结果表明, 敲减 NEAT1-2 可促进 HTNV S 片段复制及 HTNV NP 表达, 而过表达 NEAT1-2 可抑制 HTNV 感染。qRT-PCR 及 ELISA 等实验结果表明, 敲减 NEAT1-2 可抑制 HTNV 感染后宿主细胞 IFN $\beta$ 、IL-8、CCL5 的产生, 而过表达 NEAT1-2 则促进 HTNV 感染后宿主细胞 IFN $\beta$ 、IL-8、CCL5 的产生。NEAT1-2 敲减条件下使用 IFN $\beta$  处理细胞可抑制 HTNV 感染, 而 NEAT1-2 过表达条件下使用 IFN $\beta$  中和抗体可抑制 HTNV 感染。上述实验结果提示 NEAT1-2 可通过正向调控宿主细胞 IFN $\beta$  产生进而抑制 HTNV 复制。

#### 1.3 体内敲减 NEAT1-2 可在 HTNV 感染早期抑制机体 IFN 产生并加重 HTNV 感染

为进一步研究 NEAT1-2 在体内对 HTNV 感染的影响, 通过尾静脉注射 siRNA 的方式在 C57BL/6J 小鼠体内敲减 NEAT1-2 分子, 之后感染 HTNV, 于 3dpi 进行

ELISA、qRT-PCR、HE 染色、流式细胞实验 (FCM) 等实验, 结果表明, 与 NC+HTNV 组相比, Si-NEAT1-2+HTNV 组小鼠外周血 IFN $\beta$  水平降低, 肝、脾、肾等脏器中 HTNV S 片段及 NP 表达升高、病毒滴度增加, 各脏器炎症细胞浸润减少但病理损伤加重, 其中脾脏中 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> M $\phi$ 、及 CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>T 细胞数目减少。

## 2. NEAT1-2 与 RIG-I 信号通路交互作用调控 I 型 IFN 信号通路的分子机制研究

### 2.1 HTNV 感染通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导 NEAT1-2 表达上调

上述实验利用细胞及动物感染模型明确了 NEAT1-2 抗 HTNV 感染的作用, 但尚不清楚 HTNV 诱导 NEAT1 上调的分子机制。qRT-PCR 实验结果表明, 在 HUVECs 中过表达 HTNV NP/Gn/Gc, 或使用 IFN $\alpha/\beta/\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  等不同细胞因子刺激 HUVECs 均不能诱导 NEAT1-2 上调; 在 HUVECs 中敲减 TLR3/4 或 MDA5 亦不能阻遏 HTNV 感染后 NEAT1-2 表达, 而在 HUVECs 中敲减 RIG-I 或 IRF7, 或在 RIG-I 敲除的细胞系 Huh 7.5 中, HTNV 感染不能诱导 NEAT1-2 表达, 上述实验结果提示 HTNV 主要通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导宿主细胞 NEAT1-2 表达。

### 2.2 NEAT1-2 正向调控 HTNV 感染后 RIG-I 及 DDX60 表达间接促进 IFN $\beta$ 表达

为了明确 NEAT1 调控 IFN $\beta$  表达的作用机制, 在 HUVECs 中敲减 NEAT1-2 后感染 HTNV, qRT-PCR 及 Western Blot 实验结果表明 NEAT1-2 敲减后宿主细胞的 RIG-I 及 DDX60 分子显著下调。为明确 RIG-I 及 DDX60 分子在 HTNV 感染中的作用, 在 HUVECs 中单独敲减 RIG-I 或 DDX60, 或共同敲减两者后感染 HTNV, qRT-PCR、Western Blot 等实验结果表明与 NC 对照组或单独敲减组相比, 共同敲减组 IFN $\beta$  产生减少, HTNV 复制增加; 在 HUVECs 中单独过表达 RIG-I 或 DDX60, 或共同过表达两者后感染 HTNV, qRT-PCR、Western Blot 等实验结果表明与 Vector 对照组或单独过表达组相比, 共同过表达组 IFN $\beta$  产生增加, HTNV 复制减少。上述实验结果提示 HTNV 感染诱导 NEAT1 上调, NEAT1 可促进 RIG-I 及 DDX60 表达, 两者协同调控 HTNV 感染后宿主细胞 IFN $\beta$  产生, 抑制 HTNV 感染增殖。

### 2.3 NEAT1-2 通过募集 SFPQ 调控 RIG-I 及 DDX60 表达间接发挥抗 HTNV 作用

既往生物信息预测结果表明脯氨酸及谷氨酰胺富集剪接因子 (the splicing factor proline-glutamine rich, SFPQ) 可能结合与 RIG-I 及 DDX60 启动子区域进而抑制其转录, 而 NEAT1-2 结合 SFPQ 解除其转录抑制作用。为研究 NEAT1-2 调控 RIG-I 及 DDX60 表达的分子机制, 通过 RNA 免疫共沉淀技术 (RIP) 检测 HTNV 感染前后

NEAT1-2 与蛋白 SFPQ 的结合变化,结果提示 HTNV 感染后 NEAT1 与 SFPQ 结合增加。通过 Western Blot、免疫荧光技术 (IFA) 分别检测 SFPQ 在 HTNV 感染前后的蛋白表达量及亚细胞定位变化,结果表明 SFPQ 在 HTNV 感染前后表达量并无变化,而在感染前其弥散分布于核内,感染后在核内形成斑点。通过免疫共沉淀技术 (Co-IP) 检测 SFPQ 与核旁斑形成蛋白 NONO 在 HTNV 感染前后的结合情况,结果显示 HTNV 感染后 SFPQ 和 NONO 结合增加,上述结果提示 HTNV 感染后核旁斑形成增加。通过 qRT-PCR 等技术检测 SFPQ 敲减条件下 HUVECs 中 RIG-I、DDX60 分子表达变化及 HTNV 病毒复制情况,结果表明敲减 SFPQ 可促进 RIG-I 及 DDX60 表达,抑制 HTNV 感染后 S 片段复制。上述实验结果提示 HTNV 感染后 NEAT1-2 可募集 SFPQ 形成核旁斑,解除其对 RIG-I 及 DDX60 的转录抑制作用,间接发挥抗 HTNV 感染的功能。

### 3. HFRS 患者外周血单核细胞中 NEAT1-2 表达水平与疾病进展的相关性研究

为明确 NEAT1-2 与 HFRS 疾病进展的关系,本研究利用阴性选择法分离 HFRS 患者外周血中的单核细胞 (monocytes, Mo),通过 qRT-PCR 检测 NEAT1-2 的表达水平,分析其与疾病病程及病情严重程度的关系,结果表明与健康人或 HFRS 恢复期患者相比,HFRS 发热期、低血压休克期及少尿期患者外周血 Mo 中的 NEAT1-2 水平明显升高。将外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与患者血清病毒载量、血肌酐(Scr)最高值、血小板数目 (PLT) 最低值及血白细胞数 (WBC) 进行回归分析,结果提示 NEAT1-2 表达水平与外周血病毒载量、Scr 最高值呈负相关,与 PLT 最低值呈正相关,与 WBC 不存在回归关系。

#### 【实验结论】

综上,HTNV 感染通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导宿主细胞上调 lncRNA NEAT1,而 NEAT1 通过募集 SFPQ 形成核旁斑,解除 SFPQ 对 RIG-I、DDX60 等分子的转录抑制作用,从而使 RIG-I 及 DDX60 协同促进 HTNV 感染后 IFN $\beta$  产生,抑制 HTNV 感染复制。

#### 【关键词】

汉滩病毒,长链非编码 RNA,NEAT1,RIG-I 信号通路,干扰素,固有免疫

# **Study on function and mechanism of lncRNA NEAT1 in host anti-hantaviral innate immune responses**

Candidate for master: Ma Hongwei

Supervisor: Pro. Zhang Fanglin

Tutor: Associate Pro. Lei Yingfeng

Lecturer Ye Wei

Department of Microbiology, School of Preclinical Medicine

Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Sponsored Programs:

Major State Basic Research Development Program (No. 2012CB518905)

National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1200400)

## **Abstract**

### **Background**

Hantaan virus (HTNV), belonging to *Bunyavirales* and *Hantaviridae*, is the major causative agent for severe hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in China. Since there is no effective therapeutic medicine against HTNV infection, the fatality rate of HFRS can reach 15%. The innate immune system, characterized by interferon (IFN) responses, provides the initial defense against viral invasion. Cellular pathogen recognition receptors (PRRs), including Toll like receptors (TLRs) and RIG-I like receptors (RLR), can detect distinct pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and trigger IFN responses. RIG-I has been shown to recognize hantaviral invasion, but its regulatory process remains unclear. Over the past decades, accumulating evidence suggests that long noncoding RNAs (lncRNAs) play key regulatory roles in innate

immune system. However, the involvement of host lncRNAs in hantaviral control remains uncharacterized. In the present work, a new unexplored function of lncRNA NEAT1 in suppressing HTNV replication was found. NEAT1 promoted interferon (IFN) responses by acting as positive feedback for RIG-I signaling.

## **Objective**

Our study focus on the the function and mechanism of lncRNA in the host innate immune response against HTNV infection. The potential antiviral lncRNA was selected based on the digital gene expression (DGE) analysis, whose role during HTNV-host interaction was investigated by overexpressing and silencing experiments. We hope our study could provide new therapeutic targets for clinical treatment to limit the HTNV infection and promote the HFRS convalescence.

## **Methods and Results**

### **1. lncRNA NEAT1 suppresses HTNV infection by modulating type I IFN signaling**

#### **1.1 lncRNA NEAT1 is upregulated by HTNV in a time- and dose-dependent manner**

To study the relationship between HTNV infection and host lncRNA expression, HUVECs were infected with HTNV at an MOI 1, with the mock and Co<sup>60</sup>-inactivated virus (Co<sup>60</sup>-HTNV) infection as control groups. DGE was applied at 24 hpi to analyze the differentially expressed genes. DGE results indicate that there is a significant alteration of lncRNA expression after HTNV infection, including lncRNA NEAT1, GAS5 and IPW etc. The FISH and qRT-PCR results hint that lncRNA NEAT1 was indeed upregulated by HTNV at an MOI of 1 in HUVECs, HEK293, A549 and HeLa cells on a time-dependent manner, whose elevation at 72 hpi occurred in an HTNV dose-dependent manner.

#### **1.2 Alteration of NEAT1 expression affects HTNV replication by modulating IFN responses in human cells**

In order to clarify the role of NEAT1 in the process of HTNV infection, HUVECs were transfected with different small interfering RNAs (siRNAs) or plasmids targeted for NEAT1, and then infected with HTNV at an MOI of 0.1 or 1. Related experiments were

performed at 48hpi. The knockdown or overexpression efficiencies of NEAT1 with relevant siRNAs or plasmids were confirmed by qRT-PCR and FCM. The results of qRT-PCR and other experiments further demonstrate that NEAT1-2 knockdown suppressed IFN $\beta$  expression but promoted the HTNV replication, whereas NEAT1 overexpression inhibited IFN $\beta$  expression but promoted HTNV replication. Notably, the anti-hantaviral effects of NEAT1-2 could be blocked by applying type I IFN neutralizing antibodies. Additionally, qRT-PCR and ELISA results showed that silencing NEAT1-2 could promote IL-8 and CCL5 expression.

### **1.3 NEAT1 silencing has profound effects on innate immune responses after HTNV infection in mice**

Although cell-based experiments revealed that NEAT1-2 is a crucial regulator of innate anti-hantaviral responses, its *in vivo* function remains unclear. In order to study the effect of NEAT1-2 on the innate immune response against HTNV infection *in vivo*, Si-NEAT1-2 was injected to C57BL/6J mice through the tail veins, and the NC group mice were treated with scrambled siRNAs (negative control, NC). Mice were challenged with HTNV by intramuscular injection on the second day after injection of siRNA. NEAT1-2 expression levels in liver, kidney and spleen were reduced at 2 dpi as measured by qRT-PCR after intravenously injecting Si-NEAT1-2. Following experiments were performed at 3dpi to detect mice immune responses in different groups. Compared with NC+HTNV group, body weight loss of Si-NEAT1-2+ HTNV group was observed from 2 dpi to 5 dpi. Likewise, NEAT1-2 knockdown mice showed considerably lower serum IFN $\beta$  production but higher HTNV levels in the liver, spleen and kidney at 3 dpi as assessed by qRT-PCR or ELISA. Moreover, the virus titers in related organs were higher in the NEAT1-2 silenced group compared with the NC group as detected by ELISA. In addition, reduced inflammatory cell filtration but anabatic tissue injury was found in NEAT1-2 knockdown mice during the early stage of infection by HE staining. Moreover, as FCM results shown, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> M $\phi$  and CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells were reduced in the spleen of NEAT1-2 knockdown mice in comparison to the NC group at 3 dpi.

## **2. Study on the interaction between NEAT1-2 and RIG-I signaling**

## 2.1 RIG-I signaling is crucial for NEAT1 expression after HTNV infection

NEAT1 expression could suppress HTNV infection, while it is still opaque that how HTNV activated NEAT1 transcription. Interestingly, qRT-PCR results suggest overexpression of the S or M segment of HTNV in HUVECs failed to induce NEAT1-2 expression, suggesting that NEAT1 transcription was closely related to live viral replication. Meanwhile, NEAT1-2 expression could not be induced by stimulation with different types of IFNs or cytokines. Using RIG-I and TLR4 deficient cell lines, RIG-I was confirmed to be indispensable for NEAT1-2 induction after HTNV infection. Additionally, silencing IRF7 also inhibited the HTNV-induced NEAT1-2 transcription.

## 2.2 NEAT1-2 regulates HTNV-induced IFN $\beta$ production by promoting RIG-I and DDX60 expression

To investigate the regulatory mechanisms of NEAT1-2 on IFN $\beta$  expression, we examined the effects of NEAT1-2 knockdown on the expression of multiple PRRs (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, RIG-I, DDX60, MDA5) upon HTNV infection through qRT-PCR or Western Blot. Both qRT-PCR and Western Blot results indicate that NEAT1-2 knockdown or overexpression remarkably suppressed or promoted RIG-I and DDX60 expression, respectively. RIG-I and DDX60 were knocked down or overexpressed in HUVECs, and then qRT-PCR and dual luciferase reporter assay were performed to assess IFN $\beta$  mRNA transcription and IFN $\beta$  promoter activation after HTNV infection, respectively. Ectopic expression of either RIG-I or DDX60 promoted IFN $\beta$  expression and inhibited viral replication, whereas overexpression of both resulted in superior antiviral effects as assessed by qRT-PCR, indicating that efficient anti-HTNV responses might depend on the interactive effects of DDX60 and RIG-I. More importantly, RIG-I or/and DDX60 overexpression enhanced HTNV-induced IFN $\beta$  expression as measured by Western Blot or dual luciferase reporter assay, showing that they had synergistic effects on IFN $\beta$  production. In addition, we designed a series of siRNAs targeting RIG-I and DDX60, and we selected the si-RIG-I-2 and siRNA-DDX60-1 with the highest knockdown efficiency by qRT-PCR in HUVECs. Silencing RIG-I or DDX60, or both of them could suppress IFN $\beta$  and promote HTNV replication with similar experiments as foresaid.

### **2.3 NEAT1-2 promotes RIG-I and DDX60 expression by relocating SFPQ after HTNV infection**

NEAT1 was found to interact with SFPQ (the splicing factor proline-glutamine rich) by RIP after HTNV infection, indicating that the modulatory effects of NEAT1 might be involved in SFPQ. Interestingly, the protein level of SFPQ, as well as another paraspeckle-forming constituent, NONO, remained unchanged after HTNV infection or after NEAT1 overexpression and knockdown as detected by Western Blot. However, IFA results showed that SFPQ became centralized rather than diffused in the nucleus after HTNV infection. The Co-IP results indicated enhanced interaction of SFPQ and NONO, showing excess formation of paraspeckles in the nucleus and re-localization of SFPQ. The qRT-PCR results showed that SFPQ knockdown could inhibit HTNV replication, which might have been related to the increasement of RIG-I and DDX60.

### **3. NEAT1-2 expression in patients' monocytes is inversely correlated with HFRS severity**

In order to study the relationship between NEAT1-2 and HFRS disease process, we collected the blood samples from 86 HFRS patients of different disease stages or severity, with 24 healthy human blood samples as control. The NEAT1-2 expression levels in the peripheral blood mononuclear cells were measured through qRT-PCR. The qRT-PCR results showed that NEAT1 levels in the acute (febrile/ hypotensive/ oliguric) stage were overtly higher than those in the diuretic/convalescent stage or in healthy individuals. In the early disease stage, HFRS patients in the mild/moderate group maintained higher NEAT1 levels compared with those in the severe/critical group.

The relationship between NEAT1-2 level and patients' serum viral loads, peak serum creatinine values, lowest platelet counts, and peripheral white blood cells were analyzed. Here, statistical analysis revealed significant negative associations of NEAT1 with the plasma viral load and peak creatine level. In addition, the NEAT1 level was clearly positively correlated with the lowest platelet count. These data suggested that patients with higher NEAT1 levels tended to have less tissue injury and better outcomes. Nevertheless, no relationship of NEAT1 levels with the peak white blood cell count was found.



## **Conclusion**

In this study, we identified the lncRNA, NEAT1, as a vital antiviral modulator. HTNV infection activated NEAT1 transcription through the RIG-I-IRF7 pathway, whereas NEAT1 removed the transcriptional inhibitory effects of SFPQ by relocating SFPQ to paraspeckles, thus promoting the expression of RIG-I and DDX60. RIG-I and DDX60 had synergic effects on IFN $\beta$  production, inhibiting HTNV infection and replication. Additionally, IL-8 or CCL5 was also secreted in response to NEAT1, which influenced immunocyte activation after HTNV infection. Notably, NEAT1 levels in peripheral blood monocytes were closely related with disease development and severity. Taken together, our findings demonstrate that NEAT1 modulates the innate immune response against HTNV infection, providing another layer of information about the role of lncRNAs in controlling viral infections.

## **Key Words**

Hantaan virus; Long noncoding RNA; NEAT1; RIG-I signaling; Interferons; Innate immunity

## 前 言

肾综合征出血热 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) 是由汉坦病毒感染引起的自然疫源性疾病, 疫源地遍布五大洲近 80 个国家, 其流行广、发病急、病死率高、危害极大。我国是世界上 HFRS 疫情最严重的国家, 每年发病人数占世界的 85% 以上, 汉滩病毒 (Hantaan virus, HTNV) 是我国重症 HFRS 的主要病原体<sup>[1]</sup>。HFRS 死亡率高达 15%<sup>[2]</sup>, 迄今缺乏针对汉坦病毒感染的特效药物。目前我国的双价灭活疫苗、韩国使用的灭活疫苗均存在免疫后中和抗体效价低、人群免疫保护效果不确定等诸多问题<sup>[3]</sup>, 而在国际上尚无美国 FDA 批准的相关疫苗<sup>[4]</sup>。HFRS 传染源和宿主动物广泛 (目前世界上已查明能携带汉坦病毒动物包括啮齿类等百余种动物), 传播途径多样, 主要危害对象为青壮年; 此外, 汉坦病毒还是一种潜在的生物战剂, 已被列入国际《禁止生物武器公约》议定书核查清单。因此, 研究汉坦病毒与宿主细胞的相互作用, 明确汉坦病毒感染机体后的发病机制, 对于汉坦病毒感染的防治具有重要意义。

固有免疫是机体抵抗病原体入侵的第一道防线, 也是宿主适应性免疫应答的调节器。汉坦病毒感染细胞后产生的核酸或蛋白质等病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 可激活 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、RIG-I 样受体 (RIG-I like receptor, RLR) 等多种模式识别受体 (pattern-recognition receptor, PRR), PRR 识别 PAMP 后激活相关转录因子 (如 IRF3/7、NF- $\kappa$ B), 促进干扰素 (interferon, IFN) 及 IL-8 等细胞因子 (cytokine, CK) 产生。IFN 作用于自身或邻近细胞的 IFN 受体, 转录产生多达数百种的干扰素刺激基因 (interferon stimulated gene, ISG) 和促炎细胞因子 (pro-inflammation cytokine), IL-8 可活化巨噬细胞 (macrophage, M $\phi$ ) 等固有免疫细胞, 促使机体处于抗病毒状态。值得注意的是, 在自然感染进程中, 致病性汉坦病毒可在感染早期拮抗宿主 I 型 IFN 的产生, 且宿主后续产生的 IFN 也不能有效抑制致病性汉坦病毒复制<sup>[5]</sup>。那么, 汉坦病毒-宿主细胞相互作用过程中, I 型 IFN 信号通路存在哪些调控机制, 其又是如何影响汉坦

病毒感染与复制？

RIG-I 是细胞感知大多数病毒侵染的重要 PRR，主要识别 RNA 病毒在宿主细胞复制过程中形成的 dsRNA 结构<sup>[6]</sup>；其诱导干扰素（IFN）表达的过程一直是细胞抗病毒固有免疫研究的热点<sup>[7]</sup>。已有文献报道汉坦病毒感染可以激活 RIG-I 信号通路，促进宿主细胞产生 IFN $\beta$ 、CXCL10 等抗病毒分子<sup>[8;9]</sup>。然而，既往研究报道，汉坦病毒感染后在宿主细胞中并不能检测到 dsRNA 的存在，因此，尚需深入研究汉坦病毒是如何被 RIG-I 识别，RIG-I 信号通路在宿主细胞中又存在怎样的反馈调节作用。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 能够在转录或转录后水平调控多种固有免疫相关基因的表达，与病毒感染性疾病的发生和发展有着密切的联系<sup>[10-12]</sup>。本研究利用数字基因表达谱 (digital gene expression, DGE) 技术分析了 HTNV 感染人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 后宿主细胞 lncRNA 表达谱的变化，发现 lncRNA NEAT1 表达显著上调。通过在细胞水平敲减和/或过表达 NEAT1-2，我们发现 NEAT1-2 可正向调控 IFN $\beta$  产生，抑制 HTNV 感染复制，并进一步通过体内敲减实验验证了上述机制。同时，我们发现 HTNV 感染激活 RIG-I-IRF7 信号通路上调 NEAT1-2，而 NEAT1-2 通过募集 SFPQ 促进 RIG-I 及 DDX60 表达，对 RIG-I 信号具有正反馈作用。本研究揭示了 lncRNA NEAT1 与 RIG-I 信号通路交互作用调控宿主抗 HTNV 固有免疫应答的分子机制，为深入研究 HTNV-宿主相互作用过程及开发相关抗病毒药物奠定了理论基础。

## 文献回顾

从 1944 年 Avery 等<sup>[13]</sup>通过肺炎链球菌 (*Pneumococcus*) 致病性转化实验证实 DNA 为遗传物质,到 1961 年 Jacob 等<sup>[14]</sup>通过放射性核素追踪蛋白质合成实验首次提出“信使 RNA (mRNA)”的假说,再到 1980 年以“DNA-mRNA-Protein”为核心的中心法则 (central dogma) 在生物学界得到广泛认可<sup>[15]</sup>,在过去的半个多世纪里,基因表达及其调控规律的研究几乎均围绕 mRNA 及其编码蛋白而展开。直到 1993 年 Ambros 等<sup>[16]</sup>首次发现线虫体内微小 RNA (microRNA, miRNA) 可结合 LIN-4 蛋白 mRNA 3'UTR 促进其降解,人们才逐渐认识到调控性非编码 RNA 在细胞生命活动过程中的重要性。

本世纪初,人类基因组计划 (human genome project) 意外发现人体内仅有约 2.5 万个基因,即在庞大的基因组中只有不到 3% 的片段可编码蛋白质,而约有 85% 的基因组转录成为非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA)<sup>[17]</sup>。在细胞内组成性表达的 ncRNA 称管家 ncRNA,如核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA)、核仁小 RNA (small nucleolar RNA, snoRNA) 等,参与真核细胞核不均一 RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA) 剪接、tRNA 修饰等基本细胞生物学过程;外界刺激诱导产生的 ncRNA 称调节性 ncRNA,包括 miRNA、环状 RNA (circRNA) 及长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA),其可通过多种方式调控蛋白编码基因的表达。

近年来随着高通量测序技术的应用及发展,越来越多的 lncRNA 被发现,其具有细胞特异性和时空表达特异性,能与 DNA、RNA 或者相关蛋白质直接作用,可通过表观遗传修饰等方式参与细胞的发育、分化及增殖等过程,而最新研究提示 lncRNA 在病毒感染与宿主抗病毒免疫应答中发挥了关键的调节作用<sup>[12]</sup>。

### 1. lncRNA 的表达特点及其生物学功能

#### 1.1 lncRNA 的表达特点

##### 1.1.1 lncRNA 的定义与分类

lncRNA 是一类转录本长度大于 200nt 的非编码 RNA 的总称,多数由 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNA-pol II) 转录产生,可有 5'-m7G 帽及 poly-A 尾,可

结合核糖体但是不能翻译出有功能的蛋白质,部分 lncRNA 在物种进化过程中具有高度保守性<sup>[18]</sup>。lncRNA 亚细胞定位多样,其命名没有统一规则;和其他 ncRNA 相比,其种类繁多、功能更为复杂。

根据 lncRNA 在基因组中的转录起始点与编码基因的关系可将 lncRNA 分为 3 大类,即重叠型 (overlapping) lncRNA、基因间 (intergenic) lncRNA 和反向 (divergent) lncRNA (如图 1)<sup>[19]</sup>。①重叠型 lncRNA: 转录位点与编码基因的内含子 (intron) 或外显子 (exon) 重叠,依据其转录方向又可分为顺义 (sense) lncRNA、反义 (antisense) lncRNA 及内含型 (intronic) lncRNA。②基因间 lncRNA (lincRNA) 的转录位点位于两个编码基因间。③反向 lncRNA 又称双向 (bidirectional) lncRNA,其转录方向与编码基因完全相反<sup>[20]</sup>。lncRNA 可由蛋白质编码基因的主要启动子或次要启动子序列转录产生,其中由主要启动子转录而来的 lncRNA 又称为 pncRNA (promoter-associated ncRNA)。当次要启动子位于蛋白质编码基因内,且转录方向与主要启动子相反时,其转录产生的 lncRNA 是蛋白质编码基因的反义 RNA,此类 lncRNA 又称为天然反义转录本 (natural antisense transcript, NAT)<sup>[21]</sup>。目前人体基因组中已有 15,767 个 lncRNA 被发现并鉴定 (GENCODE 第 25 版)<sup>[12]</sup>。

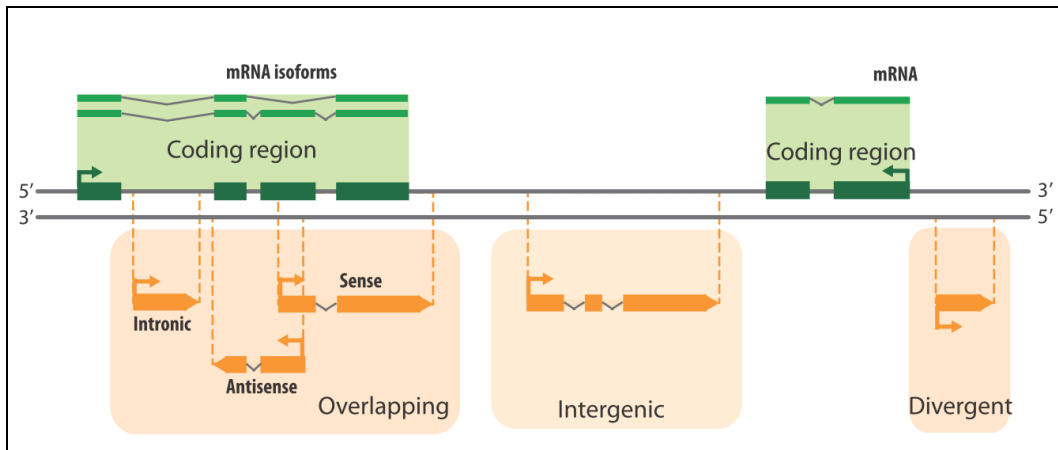


图 1 依据 lncRNA 与编码基因转录位点的关系对 lncRNA 分类<sup>[19]</sup>

Fig. 1 lncRNA classification according to its transcription locus

lncRNA 自身转录的调控过程较为复杂,其稳定性也受多种因素影响。lncRNA 对基因转录的调控可分为两大类,即对邻近的基因进行直接调控 (顺式调节) 或对较远的基因间接激活/抑制 (反式调节)<sup>[19]</sup>。lncRNA 作用方式复杂,可在 mRNA 合成过程、蛋白质翻译过程等环节,扮演诱饵分子 (decoy)、支架分子 (scaffold) 及

引导分子 (guide) 的角色, 与多种 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 或者 miRNA、mRNA、DNA 等核酸片段相互作用, 通过染色质重塑、遗传印记、组蛋白及 DNA 修饰等表观遗传方式调控转录, 或者通过结合核糖体、mRNA 及 miRNA 直接影响蛋白质翻译过程。在病毒感染及抗病毒免疫应答过程中, 宿主编码的 lncRNA 可通过影响干扰素或者 NF- $\kappa$ B 等炎症信号通路相关基因表达、促进树突状细胞 (dendritic cell, DC)、T/B 淋巴细胞等免疫细胞的发育与成熟等方式, 调节宿主固有及适应性抗病毒免疫应答。值得注意的是, 某些病毒编码的 lncRNA 可通过调控其生活周期或者抑制宿主的抗病毒反应等方式, 促进病毒感染与复制。

### 1.1.2 lncRNA 的表达调控与稳定性

目前已鉴定出的 lncRNA 中, 大部分的转录调控机制尚不清楚。多数 lncRNA 基因的启动子受蛋白编码基因的转录因子调控, 如 Oct3/4、CREB、Sox2、NF- $\kappa$ B 及 p53 等; 部分 lncRNA 转录受外界刺激影响, 如离子辐射或者 DNA 损伤可诱导 cyclin D1-pncRNA 表达<sup>[22]</sup>。

稳定性是影响 lncRNA 表达的重要因素之一。部分 lncRNA 的 3'-末端可形成三螺旋结构 (triple helix) 从而保护其免受 3'→5'核酸外切酶的破坏<sup>[23]</sup>。有些 lncRNA 的稳定性与特定的 RBP 有关并受 miRNA 调控。例如 miRNA let-7b 可识别结合 lincRNA-21, 募集 RBP HuR 及 AGO2, 促进 miRNA 诱导的沉默复合体 (miRNA-inducible silencing complex, miRISC) 形成降解 lincRNA-21<sup>[24]</sup>。值得注意的是, 上述机制只能解释部分 lncRNA 的稳定性调控, 大部分 lncRNA 降解机制尚不清楚。

## 1.2 lncRNA 调控基因表达的作用机制

### 1.2.1 lncRNA 调控 mRNA 的合成

#### ① lncRNA 调控染色质的结构

染色质的结构变化包括区域结构重塑、组蛋白修饰及 DNA 修饰等, 是影响蛋白质编码基因转录起始的关键因素。早在 1975 年 Paul 等<sup>[25]</sup>就发现染色质所结合的 RNA 是 DNA 的两倍, 提示 RNA 可能通过影响染色质结构变化决定基因表达的开放和关闭。近年来研究发现 Xist<sup>[26]</sup>、Air<sup>[27]</sup>、H19<sup>[28]</sup>等多种 lncRNA 可通过调节异染色质形成 (heterochromatin formation)、遗传印记 (imprinting)、组蛋白及 DNA 甲基化修饰等过程, 参与基因表达的表观遗传调控 (epigenetic regulation)。

lncRNA 促进异染色质形成的经典例子是雌性哺乳动物中 X 染色体的剂量补偿 (dosage compensation) 效应。Xist 是 *Xist* 基因转录的长约 17kb 的 lncRNA, 其通过重复 A (Repeat A, RepA) 结构域结合多梳抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2), 并将其募集到两条 X 染色体中的一条并促进其形成致密结构, 同时对 H3K27 进行甲基化修饰, 最终导致此条 X 染色体的失活<sup>[29; 30]</sup>。植物中感受气温变化的花期调节基因 *FLC* 受 lncRNA COLDAIR 的调控机制与 Xist 类似<sup>[31]</sup>。遗传印记属非经典的孟德尔遗传现象, 即子代细胞中亲本的等位基因经过特异性加工修饰后差异表达, 在该过程中 lncRNA 具有识别等位基因位点、调控遗传印迹过程的功能<sup>[32]</sup>。例如, lncRNA Air<sup>[33]</sup>及 *Kcnq1ot1*<sup>[34]</sup>由沉默的亲代等位基因转录, 其可结合 H3K9 甲基化酶 G9a 反式负向调节 *Kcnq1* 及 *Igf2r* 基因表达。此外, 某些 lncRNA 受遗传印记的调控。例如, lncRNA H19 序列在啮齿类动物和人类中具有高度保守性, 其活性转录本来自亲代母方的等位基因位点; 过表达 H19 的转基因小鼠会在胚胎期死亡, 提示遗传印记所致的剂量调控效应至关重要<sup>[28]</sup>。

越来越多的研究表明 lncRNA 主要通过影响组蛋白不同位点的甲基化修饰调控哺乳动物目的基因表达。冠心病相关 lncRNA ANRIL 与 PRC1 复合物组成蛋白 CBX7 相互作用促进 H3K27me3, 进而抑制 *Ink4a* 基因表达<sup>[35]</sup>。增强子样 lncRNA (enhancer-like lncRNA, eRNA) 如 HOTTIP 可以结合 MLL/Trx 复合物组成蛋白 WDR5, 对 H3K4 位点进行甲基化修饰, 增强相关基因表达<sup>[36; 37]</sup>。另一类 eRNA 如 lncRNA SRA 可通过募集 CTCF 蛋白, 促进染色体形成高度有序的环化结构 (chromosomal looping), 将特定基因序列从复杂的基因组结构中隔离出来, 利于其转录<sup>[38]</sup>。这些 eRNA 多为反向 lncRNA, 缺乏 polyA 尾, 且其基础表达量较低<sup>[39]</sup>。lncRNA 调控 DNA 甲基化修饰的功能在植物中普遍存在<sup>[40]</sup>, 而近期研究中发现哺乳动物中存在 150-250nt 长的 lncRNA, 其与 rRNA 基因编码位点的重复序列区 (rDNA) 形成三链结构 (triplex), 并将 DNA 甲基转移酶 DNMT3b 募集至 rDNA 对其进行甲基化修饰, 抑制 rDNA 转录<sup>[41]</sup>。

## ② lncRNA 调控转录因子的功能

lncRNA 可结合转录因子 (transcription factor, TF) 或者转录调控蛋白, 作为转录共激活因子 (coactivator) 或共阻遏因子 (corepressor) 调节相关基因表达。部分 eRNA 由基因组中增强子元件转录产生, 可促进转录激活因子与增强子序列结合, 在转录

调节过程中作为关键蛋白的共激活因子。例如, lncRNA Evf-2 由 *Dlx-5/6* 基因远端的增强子元件转录产生, 可作为辅因子结合并募集同源盒转录因子 DLX-2 至 *Dlx-5/6* 基因增强子区域, 促进该位点基因的表达; lncRNA Evf-2 缺失的条件下 DLX-2 无转录激活作用<sup>[42]</sup>。

lncRNA 亦可通过不同方式抑制 TF 功能。lncRNA 分子内形成的双链可模拟顺式作用元件竞争性结合相应的转录调控蛋白, 例如 lncRNA GAS5 在饥饿环境中被诱导表达, 其可结合糖皮质激素受体抑制下游靶基因的转录<sup>[43]</sup>。从蛋白质编码基因次要启动子转录的 lncRNA 可以直接与通用 TF 相互作用, 抑制其结合主要启动子。例如二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因次要启动子转录产生的 DHFR pncRNA 可形成三链结构结合到 DHFR 顺式作用元件区, 同时其又可直接结合通用 TFIIB, 阻止 TFIIB 与 *Dhfr* 基因主要启动子结合, 抑制转录起始复合物形成, 阻碍 *Dhfr* 基因表达<sup>[44]</sup>。lncRNA 还可与转录调控蛋白结合调控其活性。例如, cyclin D1-pncRNA 在 DNA 损伤后上调, 其可结合 TLS 蛋白, 解除其自身的自我抑制作用, 并将其募集至 *Ccnd1* 基因启动子位点, 而活化的 TLS 作用于 CBP/p300-CREB 复合物, 抑制 CBP/p300 的组蛋白乙酰化酶 (HAT) 活性而对 *Ccnd1* 基因表达产生转录抑制作用<sup>[45]</sup>。此外, lncRNA 还可通过调控 TF 亚细胞定位进而抑制靶基因表达, 例如 lncRNA NRON (noncoding repressor of NFAT) 与输入蛋白 (importin) 相互作用可阻止去磷酸化的 NFAT (nuclear factor of activated T cell) 入核从而抑制相关基因转录<sup>[46]</sup>。

### ③ lncRNA 影响 RNA 聚合酶 II 的转录功能

人类基因组中存在许多短散的核元件序列 (short interspersed element, SINE) 如 Alu 序列, 可在应激条件下 (如热刺激) 诱导由 RNA-pol III 转录产生的 lncRNA, 此类 lncRNA 可模拟反式作用因子结构与 RNA-pol II 结合进而抑制转录前活性复合物的形成, 阻止转录起始<sup>[47; 48]</sup>。此外, 当 NAT 与其邻近基因同时转录时, 相向移动的 RNA-pol 可因碰撞而导致转录终止, 故 NAT 可对蛋白质编码基因产生转录干扰, 如 lncRNA AS-IL1 $\alpha$  可抑制促炎细胞因子 *Il-1 $\alpha$*  基因的转录表达<sup>[49]</sup>。

### ④ lncRNA 调控 mRNA 转录后加工修饰

蛋白质编码基因由 hnRNA 到 mRNA 的剪接过程是基因表达的重要环节, 不同的剪接位点和剪接方式可产生不同的 mRNA。lncRNA 可封闭剪接位点抑制 hnRNA 剪接过程, 例如 *ZEB2* 基因的 NAT 可与 *ZEB2* mRNA 的 5'UTR 结合抑制剪接体



(spliceosome) 形成<sup>[50]</sup>。lncRNA 还可通过影响剪接调控因子影响 hnRNA (mRNA 前体) 的剪接。如 SR 蛋白是 hnRNA 选择性剪接的调节因子, 当其大量表达且处于非磷酸化状态时, 可识别并结合所有剪接位点; 当其少量表达且处于磷酸化状态时, 含有弱剪接位点 (weak splice site) 的外显子不能被 SR 蛋白识别因而在剪接过程中被除去。lncRNA MALAT1 在细胞核内大量表达, 是哺乳动物进化过程中高度保守的 lncRNA, 其可结合 SR 蛋白并促进其磷酸化, 因而调控 hnRNA 的选择性剪接<sup>[51]</sup>。mRNA 细胞核质转运是基因表达的可控环节, 也可被 lncRNA 影响。如 lncRNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1), 即核旁斑组装转录物 1, 又称细胞核富集转录物 1 (nuclear enriched abundant transcript 1), 其主要分布于细胞核, 可以募集 SFPQ、NONO 及 PSPC1 等蛋白在细胞核内形成核旁斑 (paraspeckles), 调控 mRNA 腺苷-肌酐转换 (adenosine-to-inosine editing) 使 mRNA 滞留于细胞核 (nuclear retention), 抑制基因表达<sup>[52]</sup>。

### 1.2.2 lncRNA 调控蛋白质的合成

#### ① lncRNA 直接干扰 mRNA 翻译抑制蛋白合成

lncRNA 主要通过两大类方式干扰 mRNA 翻译。一方面, lncRNA 可抑制翻译相关蛋白与 mRNA 结合, 如 lncRNA BC1 的 3'-端茎环结构可以直接与翻译起始因子 eIF-4E 结合, 且 lncRNA BC1 序列中富含 A 的区域模拟 poly A 尾竞争性结合 PABP (poly A binding protein), 从而抑制 eIF-4E 及 PABP 与 mRNA 结合, 抑制翻译起始复合物的组装<sup>[53]</sup>。另一方面, lncRNA 可结合 mRNA 并募集阻遏蛋白, 例如 lincRNA-p21 通过碱基互补的方式结合 *Ctnnb1* mRNA (编码  $\beta$ -catenin) 和 *Junb* mRNA (编码 JUNB) 形成局部双链, 募集翻译阻遏蛋白 Rck 及 Fmrp 从而抑制上述 mRNA 翻译<sup>[54]</sup>。

#### ② lncRNA 通过促进 mRNA 降解抑制蛋白合成

lncRNA 主要通过两种机制促进 mRNA 降解: ① lncRNA 可募集特定蛋白质因子促进 mRNA 降解, 例如, lncRNA 可通过其自身含有的 Alu 元件与部分 mRNA 3'-UTR 中的 Alu 元件通过不完全碱基配对的方式结合, 产生被 Staufen 1 蛋白识别的结合位点, 而 Staufen 1 可促进 mRNA 降解, 此类 lncRNA 又称为 1/2-sbsRNA (1/2-Staufen 1-binding site lncRNA)<sup>[55]</sup>; ② lncRNA 也可以通过竞争结合 RNA 稳定蛋白来促进 mRNA 降解, 例如, DNA 损伤后可诱导 lncRNA gadd7 表达, 其可竞争

结合 RBP TDP-43, 导致 TDP-43 不能结合 *Cdk6* mRNA, 加速 *Cdk6* mRNA 降解, 降低细胞内 CDK6 水平, 导致细胞周期停滞<sup>[56]</sup>。值得注意的是, lncRNA 对蛋白合成具有双向调控作用, 即除了通过以上两种方式抑制蛋白合成, 在某些条件下还可促进蛋白合成。

### ③ lncRNA 结合 mRNA 促进其翻译

lncRNA 主要通过三种方式促进 mRNA 翻译: ①lncRNA 可促进 mRNA 与核糖体的相互作用, 例如 lncRNA AS-UCHL1 是由泛素羧基端水解酶 L1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, UCHL1) 基因反向转录而产生, 其与 *Uchl1* mRNA 结合并通过自身的 SINEB2 元件促进核糖体与 *Uchl1* mRNA 结合, 利于翻译起始<sup>[56]</sup>; ②lncRNA 封闭 mRNA 中 miRNA 的结合位点抑制 mRNA 降解, 例如, lncRNA BACE1-AS 由  $\beta$  淀粉样裂解酶 1 (*Bace1*) 基因反向转录产生, 其可结合并稳定 *Bace1* mRNA, 抑制 RNA 酶对此 mRNA 降解, 与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) 的发病关系密切<sup>[57]</sup>; ③lncRNA 吸收 miRNA 抑制其结合 mRNA, 如 lncRNA BACE1-AS 可像海绵一样吸附 miR-485-5p, 抑制 miR-485-5p 引导 miRISC 结合 *Bace1* mRNA; 部分 lncRNA 有多个 miRNA 识别位点, 如 lncRNA HULC 可同时吸附 miR-372 和 miR-613 并促进其降解<sup>[57]</sup>。

### 1.3 lncRNA 的基本作用方式

越来越多的研究表明 lncRNA 可以在基因选择性转录、转录后剪接修饰及翻译等基因表达的各个过程中起调控作用, 故 lncRNA 的功能具有多层次性和复杂性。尽管现阶段对 lncRNA 复杂调控作用的认识有限, 以下三种 lncRNA 的基本作用方式逐渐在分子生物界得到认可, 即 lncRNA 可作为诱饵分子、支架分子和引导分子调控基因表达<sup>[32]</sup> (如图 2)。

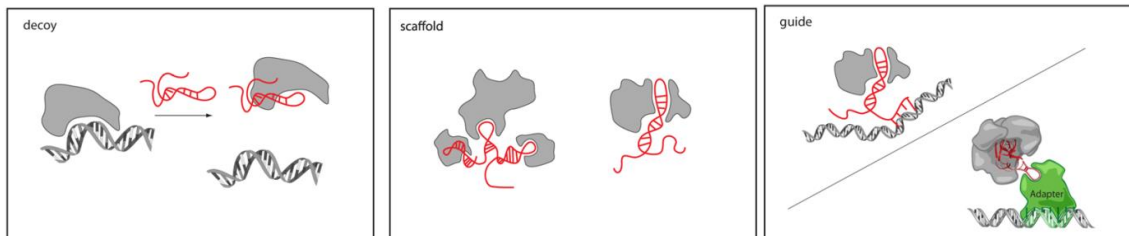


图 2 lncRNA 调控基因表达基本作用方式总结<sup>[32]</sup>

Fig. 2 The working pattern of lncRNA to regulate gene expression

作为诱饵分子, lncRNA 可以结合转录调控蛋白并阻止其结合 DNA, 最终起到抑制基因表达的作用, 如前述的 lncRNA GAS5。近期研究发现 p53 下游 lncRNA PANDA 作为诱饵分子可以结合转录因子 NF-Y 进而抑制 p53 介导的细胞凋亡<sup>[58]</sup>。作为支架分子, lncRNA 可将两种或两种以上蛋白衔接在一起组成独立且离散分布的复合物, 如端粒酶 RNA TERC 及前述的 lncRNA ANRIL、Kcnq1ot1 等。作为引导分子, lncRNA 可通过将相应蛋白募集到特定区域而发挥调控作用, 如前述的 lncRNA Xist、Air 等。另外, lincRNA-p21 可在 DNA 损伤后被 p53 诱导上调, 其可直接结合核因子 hnRNP-K 并将其引导至多个基因的启动子区域, 阻遏转录起始<sup>[59]</sup>。值得注意的是, 同一种 lncRNA 既可以作为支架分子, 又可以作为诱饵分子或者引导分子, 如 lncRNA HOTAIR 作为支架分子可以募集 PRC2 及 G9a, 同时其作为引导分子, 将上述蛋白导向至靶基因位点, 催化 H3K27 的甲基化修饰及 H3K4me2 的去甲基化修饰, 最终导致相关基因沉默<sup>[60]</sup>。

## 2. 宿主编码 lncRNA 调控抗病毒免疫应答

宿主依靠自身的免疫系统抵抗外界各种病原微生物入侵。哺乳动物的免疫系统由固有免疫系统 (innate immune system) 和适应性免疫系统 (adaptive immune system) 组成。固有免疫应答涉及多种固有免疫细胞和固有免疫分子, 即宿主细胞通过模式识别受体 (pathogen-recognition receptor, PRR) 识别病原微生物的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 激活下游干扰素 (interferon, IFN) 及炎症等一系列信号通路, 诱导机体产生一种非特异的抗病原体反应。适应性免疫包括细胞免疫和体液免疫, 是宿主 T/B 淋巴细胞识别特定的病原微生物表位 (epitope) 后活化、增殖, 并分化为成熟的效应细胞, 产生有记忆的抗病原体反应。近年来研究发现, 宿主编码的 lncRNA 可通过促进免疫细胞发育<sup>[12]</sup>, 或者调控 PRR、IFN、细胞因子等基因表达, 调节机体抗病毒免疫应答; 与此同时, 病毒编码的 lncRNA 可通过多种方式调控自身的生活周期<sup>[61]</sup>。

### 2.1 lncRNA 与固有免疫应答

#### 2.1.1 lncRNA 调控固有免疫分子的表达

在固有免疫应答过程中, Toll 样受体 (TLR)、RIG-I 样受体 (RLR) 等 PRR 识别病毒 PAMP 后, 通过 TLR-TRIF 通路、RLR-MAVS-TBK 通路等促进 I 型 IFN 表达并分泌, I 型 IFN 与邻近细胞上的相应受体结合, 激活 JAK-STAT 信号通路促进多种

具有抗病毒效应的干扰素相关基因（interferon stimulated genes, ISGs）及具有活化免疫细胞作用的促炎细胞因子（pro-inflammatory cytokines）表达，上述过程最终导致机体处于一种抗病毒状态。现在比较公认的具有广谱抗病毒作用的 ISG 分子包括 MxA、OAS、PKR 等，其在病毒生活周期的不同环节起到关键的抗病毒作用，而病毒也可编码蛋白、lncRNA 等方式抑制宿主抗病毒固有免疫反应。

### ① lncRNA 与 TLR2 信号通路

lncRNA 可作为模式识别信号通路的下游分子，调控多种细胞因子和趋化因子表达，并与免疫稳态失调的临床疾病关系密切。利用 TLR2 激动剂 Pam3CSK4 在鼠源巨噬细胞（macrophage, M $\phi$ ）激活 TLR1/2，或利用 LPS 在鼠源 DC 激活 TLR4，可活化下游 MyD88 依赖的 NF- $\kappa$ B 信号通路，诱导 lincRNA-COX2 转录上调，而 lincRNA-COX2 可以激活或者抑制特定的免疫相关基因表达<sup>[11]</sup>。lincRNA-COX2 因转录位点位于鼠源环氧合酶基因（*Cox2 gene*）上游而得名，其在 TLR4 信号通路活化后上调约 1000 倍，而 TLR3 信号通路激活后其上调并不显著<sup>[11; 62; 63]</sup>。在静息态 M $\phi$  中，lincRNA-COX2 作为支架分子结合 RBP hnRNP-A/B 及 A2/B1，抑制 700 多种基因表达，包括趋化因子基因（如 *Ccl5*、*Cx3cl1* 等）和 ISG（如 *Irf7*、*Isg15*、*Ifi204*、*Oas2* 等）；而在活化态 M $\phi$  中，lincRNA-COX2 可以促进 IL-6、Tlr1 及 IL-23 $\alpha$  表达（如图 3-A）。lncRNA PACER 转录位点位于人源 *Cox2* 基因上游，作为引导分子，其通过结合转录因子 NF- $\kappa$ B 的同源二聚体 p50/p50 并将此转录抑制复合物从 *Cox2* 基因启动子区域移除，进而活化 *Cox2* 基因转录，在人单核巨噬细胞系或原代乳腺上皮细胞中顺式调控 *Cox2* 基因表达<sup>[11]</sup>。

另有研究小组表明，利用 Pam3CSK4 在人源单核巨噬细胞中激活 TLR1/2 可诱导 lncRNA THRIL 转录<sup>[64]</sup>。THRIL 作为引导分子，结合 hnRNP-L 并将其募集至肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 启动子，促进 TNF $\alpha$  产生；高表达的 TNF $\alpha$  又可负反馈调控 THRIL 产生（如图 3-B）。有研究表明 THRIL 与儿童炎症性疾病川崎病（Kawasaki disease）发病相关，其在患儿外周血表达量于川崎病急性期明显降低，提示 THRIL 失调与炎症因子紊乱关系密切<sup>[64]</sup>。

### ② lncRNA 与 TLR3 信号通路

通过 polyI:C 激活 TLR3 信号通路，或者单纯疱疹病毒（herpes simplex virus, HSV）、流感病毒（influenza virus）、人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus,

HIV) 感染均可诱导 lncRNA NEAT1 上调<sup>[65; 66]</sup>。lncRNA NEAT1 位于 11 号染色体, 有 3.7kb 的 NEAT1-1 (又称 MEN $\epsilon$ ) 及 23kb 的 NEAT1-2 (又称 MEN $\beta$ ) 两个转录本, 主要位于细胞核内, 是核旁斑的重要组成部分, 其在除胚胎干细胞外的所有哺乳动物细胞中均表达<sup>[67; 68]</sup>。NEAT1 可以将核旁斑组成蛋白 SFPQ 从部分基因的启动子区域募集至核旁斑, 解除其转录抑制作用, 促进 IL-8 等多种固有免疫相关基因的表达<sup>[66]</sup> (如图 3-D)。NEAT1 亦参与 mRNA 核滞留过程抑制基因转录, 其可通过抑制 HIV INS 转录本的核质转运起到抗 HIV 复制和感染的作用<sup>[65]</sup>。

### ③ lncRNA 与 TLR4 信号通路

利用 LPS 活化 TLR4 信号通路可上调 IL1 $\beta$ -RBT46、IL1 $\beta$ -eRNA、Lnc-IL7R、AS-IL1 $\alpha$  等多种 lncRNA<sup>[69]</sup>。IL1 $\beta$ -RBT4 及 IL1 $\beta$ -eRNA 正向调控 IL1 $\beta$ 、CXCL8 等细胞因子表。Lnc-IL7R 的序列与 IL7R 3'UTR 重叠, 其可通过促进 H3K27 甲基化修饰抑制 IL-7 受体、IL-8、VCAM-1 及 E-selection 表达<sup>[70]</sup>。AS-IL1 $\alpha$  调控 IL-1 $\alpha$  的机制已述于前。除此之外, 细胞因子刺激诱导转录的 lncRNA 在调节炎性免疫应答过程中也发挥重要作用。TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  或者地塞米松等糖皮质激素刺激小鼠胚胎成纤维细胞可诱导功能性假基因 (pseudogene) Rps15a-ps4 编码的 lncRNA Lethe 转录<sup>[71]</sup>。Lethe 阻遏转录活化因子 p65 (RelA) 结合靶基因启动子, 抑制 IL-6、IL-8 及超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 的表达, 负向调控 NF- $\kappa$ B 信号通路, 并可促进 HCV 感染<sup>[71; 72]</sup>。

### ④ lncRNA 可调控 IFN 及其下游 ISG 基因表达

lncRNA NeST (又称 *Tmevpg1*) 位于小鼠 10 号染色体 *IFN $\gamma$*  基因附近, 其作为引导分子结合接头蛋白 (adaptor protein) WDR5/MLL 并将其募集至 *IFN $\gamma$*  基因启动子, WDR5 具有甲基转移酶功能可增强 H3K4me3, 从而促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞分泌 IFN $\gamma$ <sup>[73; 74]</sup>。通过 SJL/J 及 B10.S 小鼠, 即 NeST 过表达和 NeST 突变小鼠的感染实验发现, NeST 的表达可导致泰勒病毒 (Theiler's virus) 持续感染, 但也能促进机体清除沙门菌 (*Salmonella*) (如图 3-C)。此外, 据报道 I 型 IFN 刺激 Huh7 细胞可诱导 lncISG15、lncBST2 等 lncRNA 转录, 后者调控 ISG15、BST2 等 ISG 分子, 促进宿主抗 HSV、HCV 及流感病毒感染的固有免疫应答<sup>[75]</sup>。另一方面, 流感病毒感染可以抑制 lncRNA NRAV 表达, 而 NRAV 可以结合多功能转录因子 ZONAB 等方式对 H3K27 等位点进行甲基化修饰, 抑制 MxA、IFITM3 等关键抗病毒 ISG 表达<sup>[76]</sup>。

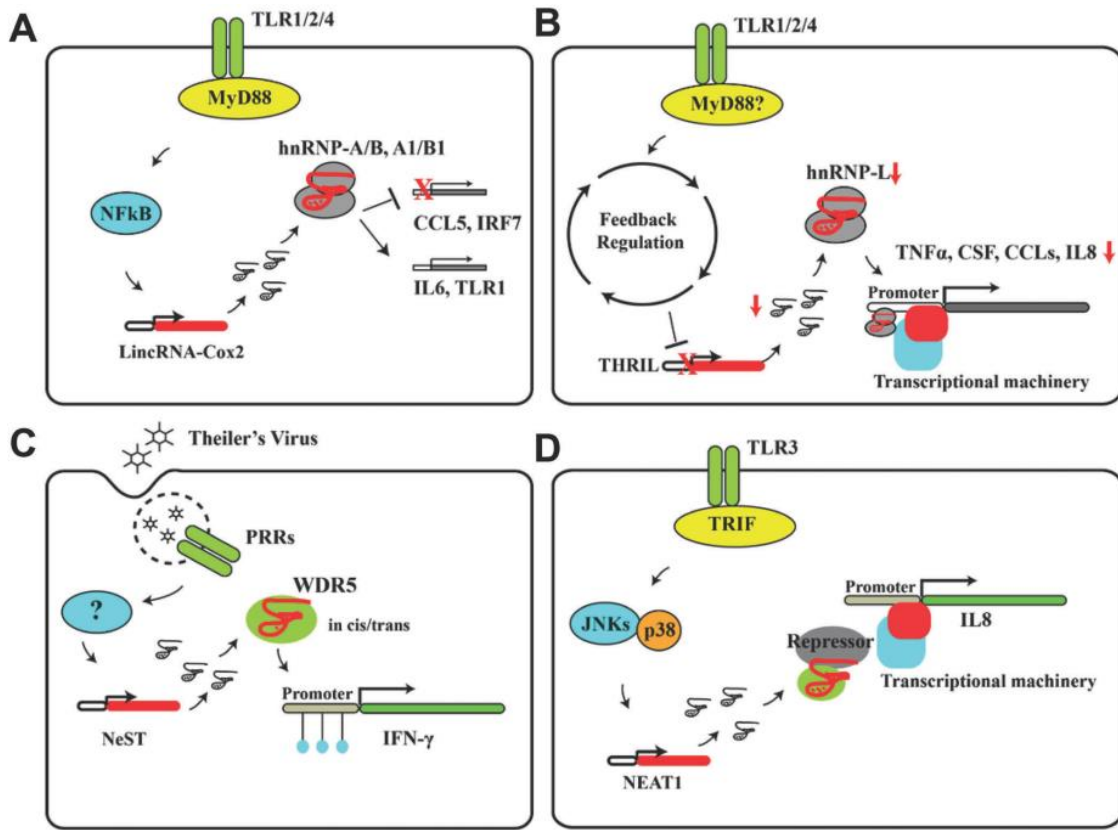


图 3 部分 lncRNA 调控固有免疫应答的分子机制<sup>[10]</sup>

Fig. 3 Regulation of innate immune responses by lncRNAs

### 2.1.2 lncRNA 调控固有免疫细胞发育

lncRNA 在髓系细胞发育，如 DC、Mφ 等固有免疫细胞的分化、成熟及活化过程中发挥重要作用（如图 4-a）。如 lnc-DC 促进传统 DC（conventional dendritic cell）分化，敲减 lnc-DC 可阻碍 DC 成熟，并抑制 DC 活化 T 细胞的功能<sup>[77]</sup>。lnc-DC 3'端与信号转导及转录活化分子 STAT3 的羧基端相互作用，保护 STAT3 的 Y705 位点磷酸化不被磷酸酶 SHP1 破坏，使 STAT3 信号持续活化，对 DC 分化发育、抗原递呈与免疫激活功能起到至关重要的作用<sup>[77]</sup>。值得注意的是，lnc-DC 在基因组中的转录位点位于 *Wdnl-like*，而该位点已被证明为蛋白质编码基因位点；进一步研究发现只有人源 DC 可产生 lnc-DC，而其他哺乳动物在该位点的转录本均为蛋白质编码基因，故 lnc-DC 在其他物种中的保守性及其相关功能仍需进一步验证<sup>[78; 79]</sup>。

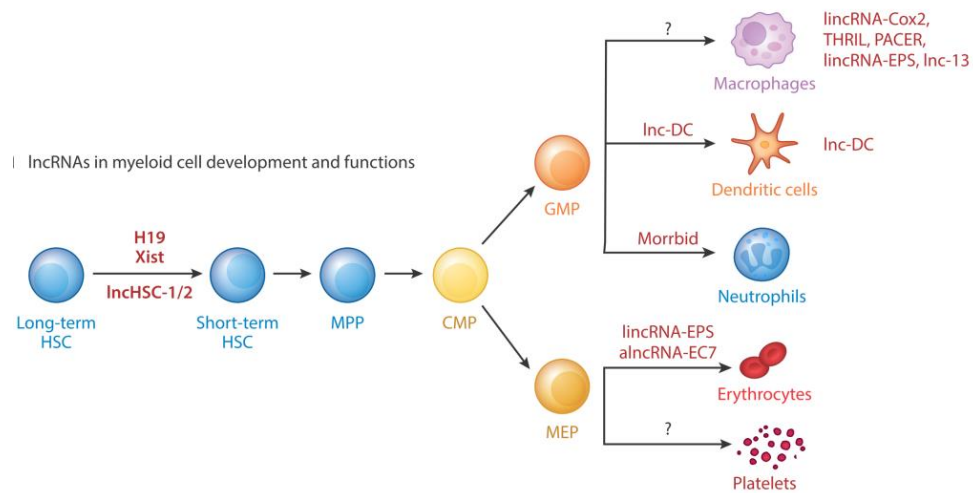
图 4 lncRNA 介导髓系细胞发育分化<sup>[12]</sup>

Fig. 4 LncRNAs in the development and functions of myeloid cells

## 2.2 lncRNA 与适应性免疫应答

### 2.2.1 lncRNA 调控 T 淋巴细胞的功能

lncRNA 在  $CD4^+$  T 细胞的分化过程中扮演重要角色。lncRNA NRON 在机体外周淋巴细胞中高表达，其可通过影响静息态 T 淋巴细胞中 NFAT 信号通路调控  $CD4^+$  T 细胞的分化。磷酸化 NFAT 处于无活性状态，钙离子依赖的钙调磷酸酶可以将 NFAT 去磷酸化，NFAT 以活化状态入核激活 T 细胞并促进其向 Th 方向分化<sup>[80]</sup>。NRON 可与 importin- $\beta$  家族蛋白 KPNB1 相互作用抑制 NFAT 入核；后续研究发现 NRON 在胞浆中可以通过募集 NFAT、GTP 酶活化蛋白 IQGAP、蛋白酶 LRRK2 等形成复合物将无活性的 NFAT 阻滞在胞浆中<sup>[46]</sup>。亦有研究表明 NRON 可以促进 HIV 的潜伏感染<sup>[81]</sup>。

在 T 细胞由 Th0 向 Th1、Th2 或 Th17 分化的过程中，lncRNA 也发挥着重要的调节作用。lncRNA NeST 及 linRNA-MAF-4 可调控 Th1 细胞分化及功能（如图 5-a 及 5-b），其中 NeST 作用机制已述于前。linRNA-MAF-4 作为支架分子和引导分子，可结合转录抑制因子 LSD1 及 EZH2 并将其募集至 MAF 启动子区，促进 H3K27 甲基化，抑制 Th0 细胞中 MAF 表达，阻止 Th0 向 Th2 分化，促进 Th0 向 Th1 分化<sup>[82]</sup>。敲减 linRNA-MAF-4 可诱导 MAF 表达促进 Th0 向 Th2 细胞分化（如图 5-a 及 5-c）。lincR-Ccr2-5'AS 是 *Ccr2* 基因的反向转录本，选择性在 Th2 细胞中表达。敲减 lincR-Ccr2-5'AS 并不影响 Th2 细胞发育，但可导致多种趋化因子基因表达受阻，如 *Ccr1*、*Ccr2*、*Ccr3* 及 *Ccr5*，进而抑制 Th2 细胞本身的免疫调节功能<sup>[83]</sup>（如图 5-a）。

Th17 细胞调控机体黏膜免疫，与多种人体自身免疫疾病的发病机制密切相关<sup>[84]</sup>。IL-6 及 TGFβ 刺激 Th 细胞可诱导核激素受体 RORγt (retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γt) 表达，RORγt 在 RNA 解旋酶 DDX5 等活化因子的作用下促进 IL-17A、IL-17F 及 IL-22 等炎症调节因子产生，激活 Th17 细胞<sup>[85; 86]</sup>。lncRNA RMRP (the RNA component of the mitochondrial Rnase complex) 作为引导分子，可以结合 DDX5 并促进其与 RORγt 的相互作用，在 Th17 细胞分化成熟的过程中扮演重要角色<sup>[87]</sup> (如图 5-a 及 5-d)。

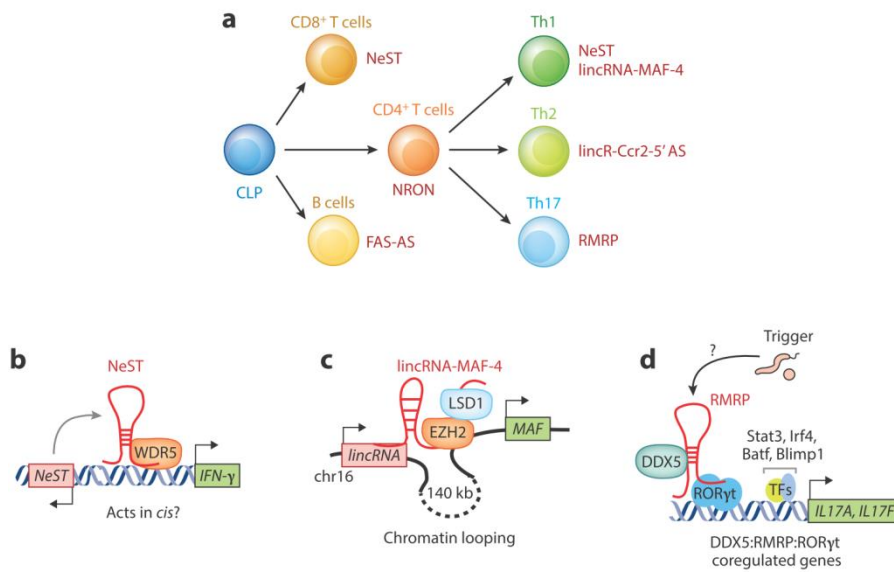


图 5 lncRNA 调控 T 淋巴细胞分化成熟<sup>[12]</sup>

Fig. 5 lncRNAs in the development and functions of T lymphoid cells

### 2.2.2 lncRNA 调控 B 淋巴细胞的功能

B 淋巴细胞可产生高度特异性的抗体，介导针对不同病原体的长效适应性免疫应答，其发育成熟、活化增殖受 miR-150、miR-155 等多种 microRNA 调控<sup>[88]</sup>，而 lncRNA 对 B 细胞功能的调控作用机制尚不明确。鼠源或者人源 B 细胞发育的不同阶段有不同的 lncRNA 表达谱<sup>[89; 90]</sup>，其中转录因子 PAX5 可促进鼠源 B 细胞分化成熟，且可诱导多种 lncRNA 转录<sup>[89]</sup>。B 细胞通过 V(D)J 重排的方式产生免疫球蛋白，在感染状态或者炎症环境中通过 AID (activation-induced deaminase) 酶介导的体细胞高频突变 (somatic hypermutation) 和抗体类型转换 (class switch recombination) 产生覆盖范围更广、特异性更高的抗体。现研究表明 B 细胞中 lncRNA 转录活化<sup>[91; 92]</sup> 及外泌体依赖的 lncRNA 表达丰度变化<sup>[93]</sup> 可调控 AID 介导的高频突变与类型转换，



影响抗体产生。lncRNA 对 B 细胞本身的增殖亦有调节作用，且与 B 细胞淋巴瘤关系密切。如反义 lncRNA FAS-AS1 结合 RNA 结合蛋白 RBM5 阻碍 FAS pre-mRNA 剪接，抑制可溶性 FAS (sFAS) 产生，而 sFAS 通过结合受体诱导 B 细胞凋亡，故 lncRNA FAS-AS1 可抑制 B 细胞增殖<sup>[94]</sup>。有研究表明外周血 sFAS 表达量与非霍奇金淋巴瘤预后相关，sFAS 高提示预后差<sup>[95]</sup>，因此 lncRNA FAS-AS1 可作为潜在的药物靶点。

值得注意的是，lncRNA 并非只能由宿主细胞编码，病原生物，例如病毒、细菌、寄生虫等亦可根据自身的核酸编码相应的 lncRNA，在其自身生活周期调控及对抗宿主免疫应答过程中发挥重要作用。

### 3. 病毒编码 lncRNA 调控病毒及宿主的基本生物进程

为适应生存，病原微生物与宿主在共同进化并不断增强对抗对方的能力。宿主免疫系统通过快速激活炎症反应可识别并抑制病毒感染，而病毒则可通过多种机制逃避并破坏宿主免疫系统，在确保宿主细胞存活的同时利于自身的复制及子代产生。近期研究发现部分病毒，尤其是以 DNA 为遗传物质且基因组较大的病毒，可编码 lncRNA 调控自身生活周期、抑制宿主免疫应答（如表 1）。

#### 3.1 腺病毒科及疱疹病毒科病毒编码 lncRNA

据报道，人腺病毒（Human adenovirus）编码的 lncRNA VAI<sup>[96]</sup>及 EB 病毒（Epstein-Barr virus, EBV）编码的 lncRNA EBER<sup>[97]</sup>可结合宿主细胞 ISG 分子 PKR 抑制其抗病毒功能。人巨细胞病毒（Human cytomegalovirus, HCMV）编码的 2.7kb 长的 lncRNA  $\beta$ 2.7，在感染初期表达丰度占 CMV 转录谱的 20% 以上，其可结合线粒体酶复合物 I 并稳定线粒体膜电位，抑制被感染的宿主细胞凋亡，从而间接促进 CMV 完成自身生活周期产生子代病毒<sup>[98]</sup>。猴疱疹病毒（Herpesvirus *Saimiri*, HVS）编码的 HSUR 作为支架分子吸附 miR-16、miR-27、miR-142-3p 等 microRNA 并促进其降解，间接调控 T 细胞增殖与活化<sup>[99; 100]</sup>。

卡波奇肉瘤病毒（Kaposi's sarcoma virus, KSHV）编码的多聚腺苷核 RNA（Polyadenylated nuclear, PAN）既可以调控 KSHV 基因表达又可以抑制宿主细胞的抗病毒免疫反应。PAN 作为支架分子结合去甲基化酶 UTX 及 JMJD3，并作为引导分子将其募集至 KSHV 基因 H3K23me2 位点促进其去甲基化；同时 PAN 作为诱饵分子，与潜伏感染相关核抗原（latency associated nuclear antigen, LANA）相互作用并阻碍其结合 KSHV 基因<sup>[99; 100]</sup>。通过上述两种机制，PAN 可活化 KSHV 基因表达，使之

由潜伏感染状态进入溶细胞周期。PAN 还可以募集 PCR2 抑制宿主细胞内抗病毒免疫分子基因的表达。

### 3.2 黄病毒科病毒核酸不完全降解片段形成 lncRNA

西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV)、登革病毒 (Dengue virus, DENV)、黄热病毒 (Yellow fever virus, YFV) 等黄病毒科病毒感染宿主细胞后, 其基因组可被宿主 5'→3' 核酸外切酶 XRN1 切割降解为长约 500nt 的 RNA 片段, 称之为亚基因组黄病毒 RNA (subgenomic flavivirus RNA, sfRNA), 其亦属于 lncRNA 的范畴<sup>[101; 102]</sup>。由于 sfRNA 本身来自病毒基因组, 其可与未被宿主细胞降解的病毒基因片段的 3'-UTR 结合, 并形成一种称为假节 (pseudoknot) 的茎环结构, 从而抑制宿主细胞内 XRN1 对病毒核酸的降解作用。近期 sfRNA 晶体结构解析结果提示其可直接结合 XRN1 并抑制其解旋酶活性<sup>[103]</sup>。sfRNA 可抑制 I 型 IFN 信号通路并增强病毒毒力, 但其具体机制尚不清楚。

### 3.3 逆转录病毒科病毒编码 lncRNA

Kobayashi-Ishihara 等<sup>[104]</sup>发现并鉴定了由 HIV DNA 的 env 区 3'-LTR U3 区域编码的反向 RNAs, 并将其命名为 ASP-L (ASP RNA-Long variant), 包括高表达转录本 ASPL-1 及低表达转录本 ASP-L2, 其亦符合 lncRNA 的定义。ASP-L 转录本长约 2.6kb, 主要分布于宿主细胞核内; 敲减 ASP-L 可促进 HIV 基因表达, 提示其功能为抑制 HIV 复制。Saayman 等<sup>[105]</sup>进一步研究发现 HIV 5'-LTR 启动区亦可编码反向 lncRNA, 此 lncRNA 可募集 Dnmt3a、HDAC1 及 EZH2 形成转录抑制复合物, 抑制 HIV 基因表达。

表 1 病毒编码 lncRNA 的基本生物学特征<sup>[61]</sup>

Table 1. Basic biological characteristics of viral lncRNAs

Viral family (subgroup)	Virus	RNA	Abundance (copies per cell)	Length	RNA polymerase	Associated proteins	References
Adenoviridae	Human adenovirus	VAI	10 <sup>7</sup>	~160 nt	III	La, PKR, Dicer	Mathews and Shenk 1991; Lu and Cullen 2004; Andersson et al. 2005; Aparicio et al. 2006
		VAII	5 × 10 <sup>6</sup>	~160 nt	III	La, Dicer	Andersson et al. 2005; Aparicio et al. 2006
Herpesviridae (α-herpesvirus)	HSV-1	LAT	?	~2000 nt	II	?	Stevens et al. 1987; Farrell et al. 1991
		sRNA1 sRNA2	? ?	65 nt 36 nt	? ?	? ?	Shen et al. 2009 Shen et al. 2009
Herpesviridae (β-herpesvirus)	HCMV	β-2.7	? <sup>a</sup>	~2700 nt	II	GRIM-19, La, Ro, Sm, mito. complex I	Greenaway and Wilkinson 1987; Lord et al. 1989; Spector 1996; Reeves et al. 2007; Stern-Ginossar et al. 2012
		5-kb immediate-early sisRNA	?	~5000 nt	II	?	Kulesza and Shenk 2004
Herpesviridae (γ-herpesvirus)	EBV	EBER1	10 <sup>6</sup>	167 nt	III	La, L22, hnRNPD	Lerner and Steitz 1981; Toczyski et al. 1994; Fok et al. 2006; Moss and Steitz 2013
		EBER2	2.5 × 10 <sup>5</sup>	172 nt	III	La, nucleolin, PAX5	Lerner and Steitz 1981; Toczyski et al. 1994; Moss and Steitz 2013; Lee et al. 2015
Herpesviridae (γ-herpesvirus)	EBV	ebv-sisRNA-1 ebv-sisRNA-2 v-snoRNA1	10 <sup>6</sup> ? ?	81 nt 2971 nt 65 nt	II II II	? ? Fibrillarin, Nop56, Nop58	Moss and Steitz 2013 Moss and Steitz 2013 Hutzinger et al. 2009
		BHLF1	? <sup>b</sup>	~2500 nt	II	?	Jeang and Hayward 1983; Rennekamp and Lieberman 2011
Herpesviridae (γ-herpesvirus)	HVS	HSURs 1, 2, 5	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	114-143 nt	II	Sm, Ago2 (HuR, hnRNP D) <sup>c</sup>	Lee et al. 1988; Myer et al. 1992; Cook et al. 2004; Cazalla et al. 2010
		HSURs 3, 4, 6, 7	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	75-106 nt	II	Sm	Lee et al. 1988; Albrecht and Fleckenstein 1992
Herpesviridae (γ-herpesvirus)	KSHV	PAN	5 × 10 <sup>5</sup>	1060 nt <sup>d</sup>	II	hnRNP C1, PABPC1, LANA, ORF57	Sun et al. 1996; Conrad and Steitz 2005; Sahin et al. 2010; Borah et al. 2011; Campbell et al. 2014
		MHV68	tRNA1-7	?	72-84 nt	III	?
Flaviviridae	WNV	sfRNA	? <sup>c</sup>	520 nt	Viral	XRN1	Pijlman et al. 2008; Roby et al. 2014
Rhabdoviridae	VSV	leRNA	300	~50 nt	Viral	Viral N protein	Leppert et al. 1979; Blumberg et al. 1981
Orthomyxoviridae	Influenza A	svRNA (leRNA)	>100,000	18-27 nt	Viral	Viral RNA polymerase	Perez et al. 2010; Umbach et al. 2010

#### 4. 汉坦病毒与宿主细胞的相互作用

近年来随着埃博拉疫情在非洲国家蔓延，急性病毒感染所致的出血热类疾病逐渐受到人们关注。在该类疾病中，肾综合征出血热（hemorrhagic fever with renal

syndrome, HFRS) 是由汉坦病毒感染引起的自然疫源性疾​​病, 疫源地遍布五大洲近 80 个国家, 其流行广、发病急、病死率高、危害极大<sup>[1]</sup>。我国是世界上 HFRS 疫情最严重的国家, 每年发病人数占世界的 85% 以上<sup>[1]</sup>; 其中汉滩病毒 (Hantaan virus, HTNV) 是引起我国重症 HFRS 的主要病原体, 其属于布尼亚病毒目汉坦病毒科。迄今尚无针对 HTNV 感染的有效治疗药物, 其重要原因是宿主抗 HTNV 的免疫机理还未得到深入理解和阐明。因此, 研究汉坦病毒与宿主细胞的相互作用, 明确汉坦病毒感染机体后的发病机制, 对相关抗病毒药物的研发有着重要意义。

#### 4.1 汉坦病毒的基本生物学特征

根据国际病毒命名委员会 (international committee on taxonomy of viruses, ICTV) 既往命名规则, HTNV 属布尼亚病毒科 (*Bunyaviridae*) 汉坦病毒属 (*Hantavirus*), 而布尼亚病毒科由 5 个病毒属组成, 包括 4 个动物病毒属及 1 个植物病毒属, 即布尼亚病毒属 (*Bunyavirus genus*)、汉坦病毒属 (*Hantavirus genus*)、内罗病毒属 (*Nairovirus genus*)、白蛉病毒属 (*Phlebovirus genus*) 和番茄斑萎病病毒属 (*Tospovirus genus*)。近期 ICTV 重新定义了布尼亚病毒科, 将该病毒科 (family) 升级为病毒目 (order), 其下病毒属 (genus) 升格为病毒科 (family), 故现汉坦病毒 (*Hantavirus*) 属布尼亚病毒目 (*Bunyavirales*) 汉坦病毒科 (*Hantavirade*) (详见 <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>)。

汉坦病毒是有包膜、分节段的单负链 RNA 病毒, 基因组分为三个节段, 即 1.7-2.0kb 长的 S 片段、3.6-3.7kb 长的 M 片段、约 6.5kb 长的 L 片段, 分别编码核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, NP)、包膜糖蛋白 (envelope glycoprotein, GP) 和病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)<sup>[106]</sup>。NP 是汉坦病毒感染过程中含量最多的蛋白质, 主要功能是通过形成 NP 六聚体, 包绕病毒的 RNA 基因组起到保护作用。GP 在翻译完成后即被切割为 Gn 及 Gc 两个蛋白片段, 其中 Gn 介导与细胞表面受体的结合, 而 Gc 在病毒入胞阶段发挥膜融合的作用; RdRp 分别锚定在 L、M、S 三个片段上, 参与病毒的复制和转录<sup>[107]</sup>。汉坦病毒科各病毒属致病特点如表 2, 其中汉滩病毒 (Hantaan virus, HTNV) 是我国重症肾综合征出血热的主要病原体。

表 2 各型汉坦病毒的致病特点

Table 2 Pathogenic characteristics of different *Hantaviruses*

致病特点	名称		所致疾病
非致病	希望山病毒 (PHV)、图拉病毒 (TULV)		—
致病	旧大陆汉坦病毒	普马拉病毒 (PUUV) 多布拉伐-贝尔格莱德病 (DOBV) 汉滩病毒 (HTNV) 汉城病毒 (SEOV)	肾综合征出血热 (HFRS)
	新大陆汉坦病毒	安第斯病毒 (ANDV) 辛诺柏病毒 (SNV) 纽约病毒 (NYV)	汉坦病毒肺综合征 (HPS)

## 4.2 汉坦病毒的致病机制

汉坦病毒感染所致 HFRS 的临床表现包括发热、出血和肾功能损害三大主症，其典型病程可分为发热期、低血压休克期、少尿期、多尿期和恢复期等五期。低血压休克期和少尿期是病情最凶险的阶段，其基本病理变化包括全身广泛的炎症反应及血管渗漏<sup>[107]</sup>。当前多数学者认为病毒感染对机体造成的直接损伤是发病的始动因素，而致病过程中机体的免疫病理损伤则起了重要作用，相关机制包括固有免疫细胞活化及细胞因子介导的免疫损伤、抗体介导的免疫损伤和 CTL 细胞介导的免疫损伤等<sup>[1]</sup>。固有免疫是机体抵御病原微生物入侵的第一道防线，近年来，越来越多的研究表明，固有免疫在汉坦病毒感染致病过程中发挥重要作用<sup>[9; 108; 109]</sup>。

### 4.2.1 汉坦病毒感染诱导固有免疫细胞活化加重病理损伤

汉坦病毒感染所致的免疫损伤与多种固有免疫细胞的活化有关，这些固有免疫细胞不表达特异性抗原识别受体，而是通过 PRR 识别病毒 PAMP 而活化。有研究表明汉坦病毒感染可激活 NK 细胞，促进 IFN $\gamma$  等细胞因子分泌，且 NK 细胞活化程度与 HFRS 病情严重程度成正相关，提示 NK 细胞可能与 HFRS 病理损伤相关<sup>[110]</sup>；汉坦病毒可诱导 DC 分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  加重血管渗漏，同时成熟 DC 激活 T 细胞加重 CTL 细胞介导的免疫损伤<sup>[110]</sup>。

#### 4.2.2 汉坦病毒感染与细胞因子风暴

已有研究表明汉坦病毒可以激活 TLR3、TLR4、RIG-I、MDA5 等多种 PRR 介导的信号通路,诱导多种细胞因子分泌,若调节失控则引起细胞因子风暴,参与 HFRS 发病过程<sup>[107; 111]</sup>。多项研究发现 HFRS 患者外周血中多种促炎细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IP-10、IL-12、IFN- $\gamma$  等)含量显著增加<sup>[8; 112-114]</sup>,重症患者中抗炎因子(如 TGF- $\beta$  等)含量明显减少,这些变化与机体炎症反应、血管渗漏等病理变化息息相关。TNF- $\alpha$  在 HFRS 中可引起寒战、发热、头痛、肌痛、血压下降等临床表现<sup>[115]</sup>; IL-1 $\beta$ 、VEGF、IP-10 与汉坦病毒感染所致血管渗漏管相关<sup>[107]</sup>; IL-6 和 IL-8 可以活化单核(monocyte, Mo)-巨噬细胞(macrophage, M $\phi$ )等多种免疫细胞,有助于清除汉坦病毒,但过量释放则会使机体免疫系统持续激活,加重病理损伤<sup>[116]</sup>; TGF- $\beta$  对免疫应答有重要的调控作用,它通过 Smad 等分子抑制 T-bet 和 GATA-3 转录,分别抑制 Th0 向 Th1 和 Th2 分化而促进其向 Treg 分化,同时它还可以抑制 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等多种促炎因子的产生,有强大的抗炎作用,其可能是影响 HFRS 患者病情发展的重要因素<sup>[117]</sup>;也有研究发现急性期 HFRS 患者 IFN- $\lambda$  含量比康复期明显下调<sup>[118]</sup>,而 IFN- $\lambda$  可以刺激 Mo 产生 IL-10,具有免疫调节作用。

#### 4.2.3 汉坦病毒感染与 I 型 IFN 信号通路

尽管上述固有免疫细胞活化及细胞因子风暴在汉坦病毒感染所致出血热类疾病的发病过程中发挥着重要作用,但病毒感染及其复制是病毒性疾病的始动因素;汉坦病毒感染后病毒血症与疾病严重程度相关,亦提示及时识别并清除病毒可以减少机体病理损伤并缓解病情<sup>[119; 120]</sup>。多项研究表明,以 I 型 IFN 信号通路为主体的机体固有免疫应答在宿主抵抗病毒感染、清除病毒的过程发挥关键作用。在急性病毒感染早期,宿主细胞主要通过 RIG-I 等 PRR 分子介导的 I 型 IFN 信号通路活化,进而产生强烈的抗病毒固有免疫反应,促进机体清除病毒<sup>[111]</sup>。已有研究表明 IFN 诱导表达的多种 ISG 分子,如 MxA<sup>[121]</sup>、IFITM3<sup>[122]</sup>等可有效抑制汉坦病毒的感染及复制。

RIG-I 是最早发现且公认最为重要的识别病毒 RNA(viral RNA, vRNA)的 PRR,其通过 CTD 结构识别 vRNA,借助自身 CARD 区域与位于线粒体膜上的接头分子 MAVS 相互作用,通过 TRAF3-TBK1-IRF3/7 及 TRAF6-IKK-NF- $\kappa$ B 等信号通路,分别促进 I 型 IFN 及多种促炎因子分泌<sup>[123]</sup>。RIG-I 识别 ssRNA 去帽结构的 5'-三磷酸盐端或 dsRNA 突出端,故正黏病毒科(如甲型流感病毒)、副黏病毒科(如新城疫病毒)

毒、仙台病毒、麻疹病毒)、黄病毒科(如丙型肝炎病毒)、弹状病毒科(如水泡性口炎病毒)均可激活 RIG-I 信号通路<sup>[6]</sup>;而近期的研究也显示,呼肠孤病毒的 5'-二磷酸(5'pp) dsRNA 基因组或合成的 5'pp-dsRNA 也可以被 RIG-I 识别<sup>[6]</sup>。有研究指出汉坦病毒感染的细胞中未检出 dsRNA 的存在,因此,理论上讲汉坦病毒不能被 RIG-I 识别<sup>[124]</sup>;同时,汉坦病毒产生的 Gn 在感染早期可通过抑制 TRAF3-TBK1 形成、阻断 IRF3 磷酸化等方式拮抗 IFN 产生<sup>[113;114]</sup>。然而,另有研究表明汉坦病毒感染可活化 RIG-I 信号通路促进 CXCL10 等细胞因子释放<sup>[8]</sup>。然而,尚不清楚是否存在 RIG-I 的正向或负向反馈调控机制,RIG-I 在发挥作用过程中是否存在协同或拮抗分子,这些问题的阐明对研究汉坦病毒与宿主细胞的相互作用有重要意义。

### 4.3 汉坦病毒感染与宿主非编码 RNA

已有研究表明 HTNV 感染内皮细胞、表皮细胞、Mo-M $\phi$  等均可引起宿主细胞内 miRNA 表达谱的明显变化,且不同 miRNA 分子发挥不同的作用<sup>[125]</sup>。Pepini T 等<sup>[126]</sup>研究发现,汉坦病毒 NP 结合 miRNA 并定位于内皮细胞 P body 中,提示汉坦病毒可能参与 miRNA 成熟过程并调控其相关功能;致病性 ANDV 可感染诱导内皮细胞产生 miR-410、miR-126、miR-218 等多种 miRNA,调控内皮细胞迁移及通透性,而非致病性 TULV 则不能诱导上述 miRNA 改变,提示上述 miRNA 可能参与了汉坦病毒感染致病的过程。Shin OS 等<sup>[126]</sup>将 HTNV 等分别感染内皮细胞、表皮细胞及 Mo-M $\phi$ ,利用测序技术检测 miRNA 表达谱变化,发现宿主细胞 miRNA 的改变有细胞特异性及病毒特异性,而信号通路分析(pathway analysis)结果提示差异 miRNA 与炎症反应及 PRR 介导的信号通路关系密切。

值得注意的是,目前国内外尚无研究报道 HTNV 感染后宿主细胞 lncRNA 谱的变化,及宿主 lncRNA 在抗 HTNV 固有免疫应答过程中的作用机制。但多项研究表明 lncRNA 对宿主细胞中多种抗病毒分子的表达具有重要的调控作用,因此,我们试图通过高通量测序技术检测宿主细胞感染 HTNV 后基因转录表达谱的变化,筛选差异表达的 lncRNA,并进一步研究其在 HTNV-宿主相互作用过程中所扮演的角色,为 HTNV 感染发病机制的研究及抗 HTNV 药物的研发奠定理论基础。

# 正 文

## 第一部分 NEAT1 正向调控 I 型 IFN 信号通路活化进而抑制 HTNV 感染的作用确定

在 HTNV 的感染过程中,固有免疫尤其是 IFN 系统是抵抗其感染的第一道防线。有研究表明,在 HTNV 感染前或者感染初期使用 I 型 IFN 处理细胞可有效阻止 HTNV 感染,而在感染后期使用 IFN 则不能起到抗病毒作用<sup>[127]</sup>。为此,研究 HTNV 感染过程中宿主细胞 I 型 IFN 信号通路活化的调控机制,有助于深入了解 HTNV 与宿主的相互作用,并对抗病毒药物研发具有重要意义。目前,尽管 IFN 及部分 ISG 抗 HTNV 感染的分子机制已有报道,但尚不清楚宿主 lncRNA 在 HTNV 与宿主相互作用中所扮演的角色。本部分研究以原代人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为研究对象,在 HTNV 感染 24h 后进行数字基因表达谱(Digital Gene Expression, DGE)分析,结果提示 lncRNA NEAT1 表达明显上调。为明确 NEAT1 表达与 HTNV 感染的关系,本研究通过实时定量 PCR (qRT-PCR)、荧光原位杂交(FISH)等技术,在 HUVECs、A549、HeLa、HEK293 等多个细胞系中验证了 HTNV 感染后 NEAT1 的变化情况,明确了 NEAT1 的抗病毒作用,探索了 NEAT1 与 I 型 IFN 信号通路活化的关系;并在动物水平研究了其对 HTNV 感染及宿主固有免疫应答的影响。

### 1 材料

#### 1.1 细胞、病毒株与菌株

##### 1.1.1 细胞

HEK293 细胞(Human Embryonic Kidney Cell 293, 人胚肾细胞)、A549 细胞(人肺腺癌细胞)、HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)、Vero-E6 细胞(非洲绿猴肾细胞)及 THP-1 细胞(人单核细胞)均购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture



Collection, CCTCC) (中国武汉), 人脐静脉血管内皮细胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) 购自 ScienCell 公司。

上述细胞均培养于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 孵箱, 其中 HEK293、A549、HeLa 及 Vero-E6 所用培养基为 DMEM(含 10%或 2% FBS), THP-1 所用培养基为 RPMI 1640(含 15% FBS), HUVECs 所用培养基为 ECM (含 5% FBS 及 1% ECGS)。

### 1.1.2 病毒株

所用 HTNV 病毒株为 76-118 株 (国际标准株), 由中国疾病预防控制中心杭长寿研究员惠赠, 后由本实验室保存并扩增。HTNV 经鼠脑增毒后感染 Vero-E6 细胞, Vero-E6 细胞扩增所得病毒经病毒滴度测定后用于本研究。

### 1.1.3 菌株

分子克隆实验所用大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、JM109 由本实验室保存。

## 1.2 引物序列

NEAT1 位于哺乳动物 11 号染色体, 有 NEAT1-1 及 NEAT1-2 两个转录本, 可募集 SFPQ、NONO、PSPC1 等蛋白在细胞核内形成核旁斑 (paraspeckles) (如图 1.1)。为在多种细胞系中验证 HTNV 感染后 NEAT1 表达变化情况, 针对 NEAT1-1 及 NEAT1-2 分别设计相应 qRT-PCR 引物 (如图 1.1)。本部分研究所用实时定量 PCR (qRT-PCR) 引物 (由北京奥科公司设计并合成, 并经 pubmed-BLAST 及 qRT-PCR 验证) 如表 1.1, 以 GAPDH mRNA 为内参。

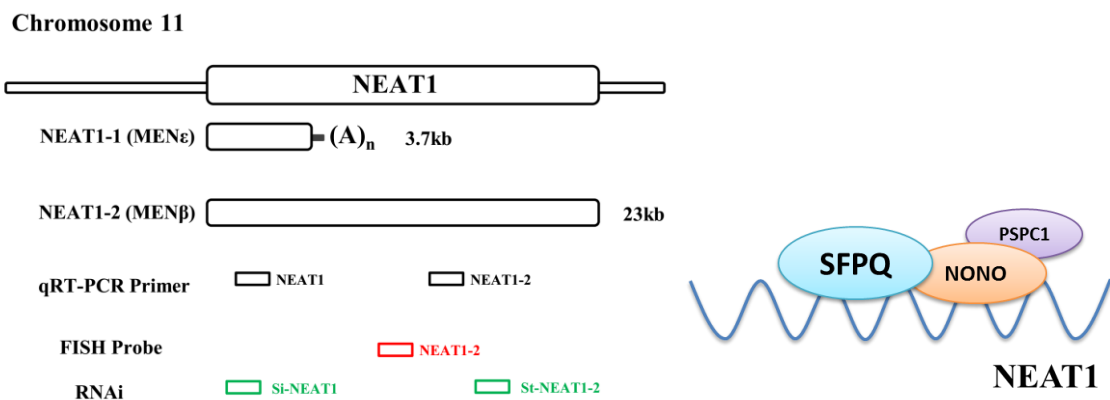


图 1.1 NEAT1 转录本及相应 qRT-PCR 引物、siRNA 及 FISH 探针设计位点

Fig. 1.1 Design of primers for quantitative real time PCR, siRNA targets and FISH probes to detect the transcripts of NEAT1

表 1.1 qRT-PCR 引物

Table1.1 qRT-PCR primer sequences

Gene Name ( <i>Homo</i> )	Primer sequences (5'-3')
NEAT1-F	TTGTTCCAGAGCCCATGAT
NEAT1-R	TGAAAACCTTTACCCCAGGA
NEAT1-2-F	GATCTTTTCCACCCCAAGAGTACATAA
NEAT1-2-R	CTCACACAAACACAGATTCCACAAC
HTNV-S-F	TCTAGTTGTATCCCCATCGACTG
HTNV-S-R	ACATGCGGAATACAATTATGGC
IFN $\beta$ -F	CGACACTGTTTCGTGTTGTCA
IFN $\beta$ -R	GAAGCACAACAGGAGCAA
IL-8-F	AGACAGCAGAGCACACAAGC
IL-8-R	ATGGTTCCTTCCGGTGGT
CCL5-F	TGCCCACATCAAGGAGTATTT
CCL5-R	CTTTCGGGTGACAAAGACG
IL-1 $\beta$ -F	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA
IL-1 $\beta$ -R	GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA
IL-6-F	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG
IL-6-R	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
TNF $\alpha$ -F	GTGCTTGTTCCTCAGCCTCTT
TNF $\alpha$ -R	ATGGGCTACAGGCTTGTCCT
iNOS-F	TGCTTCTGTGCTAATGCGGA
iNOS-R	TCAGAGTCTGCCATTGCTG
IL-10-F	ACCTGCCTAACATGCTTCGAG
IL-10-R	CTGGGTCTTGGTTCTCAGCTT
Arg-1-F	TCCTTAGAGATTATCGGAGCGCCT
Arg-1-R	TTCCAGCAGACCAGCTTTCCTCA
Ym-1-F	CATTCAGTCAGTTATCAGATTCC
Ym-1-R	AGTGAGTAGCAGCCTTGG
CD206-F	CGTTTACCAAATGGCTTCGT
CD206-R	CCTTGGCTTCGTGATTTTCAT
GAPDH-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH-R	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

### 1.3 小干扰 RNA (siRNA) 序列及荧光原位杂交 (FISH) 探针

#### 1.3.1 靶向 NEAT1 (*Homo*) 的 siRNA

为检测 NEAT1 在 HTNV-宿主相互作用过程中的分子机制, 根据已有文献分别针对人源 NEAT1 (包括 NEAT1-1 及 NEAT1-2) 及 NEAT1-2 设计 siRNA, 即 Si-NEAT1 和 Stealth siRNA NEAT1-2 (St-NEAT1-2) (如图 1.1), 并由上海吉玛公司合成。

Si-NEAT1 正义序列为：5'-Phos-GUGAGAAGUUGCUUAGAAACUUUdCdC-3'

反义序列为：5'-UCUGCGACUAGUCAGGUACGG-3'

St-NEAT1-2 正义序列为：5'-GAGUACACAGAGAACUGCCCUCAUU-3'

反义序列为：5'-AAUGAGGGCAGUUCUCUGUGUACUC-3'

小鼠体内敲减实验所用 Si-NEAT1-2 由上海吉玛公司设计并合成,其正义序列为：5'-CAGCUGUACUGUGAGAUCAUGUUCU-3'。

### 1.3.2 靶向 NEAT1-2 (*Homo*) 的 FISH 探针

由于已有研究表明 NEAT1-2 在核旁斑形成及基因表达调控中起主要作用,为观察 NEAT1-2 亚细胞定位情况,针对人源 NEAT1-2 (红色荧光标记)由广州锐博生物科技有限公司设计并合成。

### 1.4 质粒载体

pCMV-NEAT1-1 及 pCMV-NEAT1-2 由日本理化学院 Nakagawa Shinichi 教授(现单位为北海道大学)惠赠<sup>[66; 128]</sup>,质粒图谱如图 1.3。报告基因质粒 pIF (-Δ116)为 Steve Goodbourn 教授惠赠<sup>[129]</sup>。

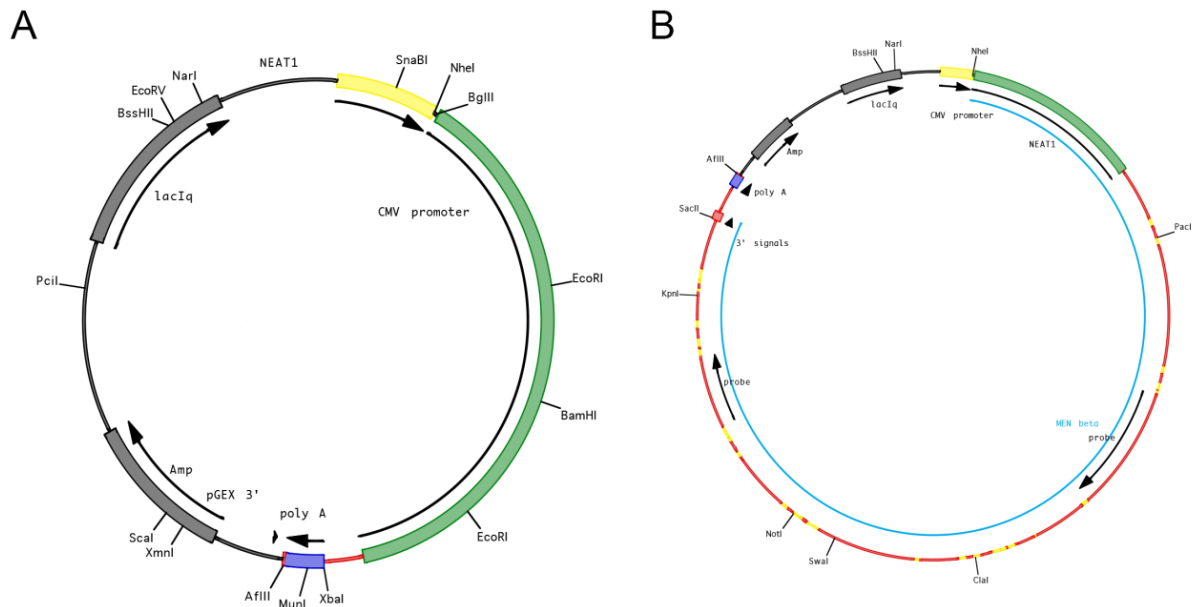


图 1.2 pCMV-NEAT1-1 (A) 及 pCMV-NEAT1-2 (B) 质粒图谱

Fig. 1.2 The map of the plasmids of pCMV-NEAT1-1 (A) and pCMV-NEAT1-2 (B)

## 1.5 主要试剂

### 1.5.1 分子克隆实验相关试剂

2×YT 培养基	Invivogen 公司
LB 固体培养基	Invivogen 公司
卡那或氨苄霉素	Invivogen 公司
稻瘟菌素	Invivogen 公司
质粒小提试剂盒	Axygen 公司
质粒大提试剂盒	Axygen 公司

### 1.5.2 实时定量 PCR (qRT-PCR) 实验相关试剂

RNA fast 1000 试剂盒	先锋科技有限公司
逆转录试剂盒 Prime Script RT reagent Kit	TaKaRa 公司
实时定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix EX Taq	TaKaRa 公司

### 1.5.3 免疫荧光 (IFA) 及荧光原位杂交 (FISH) 实验相关试剂

4%多聚甲醛 (PFA)	索莱宝公司
Triton X-100	MP 公司
牛血清白蛋白 (BSA) (粉剂)	MP 公司
DAPI	碧云天生物技术研究所以
甘油	碧云天生物技术研究所以
去 RNA 酶 PBS (粉剂)	武汉博士德生物工程有限公司
4×SSC (溶液)	武汉博士德生物技术有限公司
NEAT1 FISH 检测试剂盒	广州锐博生物科技有限公司

### 1.5.4 In-cell Western (ICW) 及 Western Blot 实验相关器材

ICW 专用 96 孔板	Falcon 公司
Odessey Blocking Solution (封闭液)	LI-COR 公司
蛋白裂解液 (RIPA)	碧云天生物技术研究所以
蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂	Roche 公司
蛋白上样缓冲液 (5×)	ProteinTech 公司

预染蛋白质 Marker	Fermentas 公司
Western Blot 电泳缓冲液及电转移缓冲液	ProteinTech 公司
TBS 及 TBST 缓冲液	ProteinTech 公司
<b>1.5.5 抗体</b>	
抗 HTNV NP 鼠单抗 1A8 (用于 Western Blot/IFA/ELISA)	本实验室制备保存
HRP-1A8 (用于 ELISA)	本实验室制备保存
抗 GAPDH 鼠单抗 (用于 Western Blot)	ProteinTech 公司
抗 Tubulin 兔多抗 (用于 Western Blot)	ProteinTech 公司
IRDye 700/800CW-山羊抗鼠抗体 (用于 Western Blot/ICW)	LI-COR 公司
IRDye 700/800CW-山羊抗兔抗体 (用于 Western Blot/ICW)	LI-COR 公司
FITC 或 Cy3 标记的山羊抗鼠 IgG (用于 IFA)	上海生工生物工程公司
FITC 或 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG (用于 IFA)	上海生工生物工程公司
Cy3 标记的山羊抗驴 IgG (用于 IFA)	上海生工生物工程公司
Cy5 标记的山羊抗兔 IgG (用于 IFA)	上海生工生物工程公司
兔抗人 IFN $\alpha$ 抗体 (用于中和 IFN $\alpha$ )	CST 公司
兔抗人 IFN $\beta$ 抗体 (用于中和 IFN $\beta$ )	CST 公司
PE 标记的抗鼠 F4/80 抗体 (用于 FCM)	BD 公司
FITC 标记的抗鼠 CD11b 抗体 (用于 FCM)	BD 公司
PerCP 标记的抗鼠 CD8 抗体 (用于 FCM)	BD 公司
PE 标记的抗鼠 IFN $\gamma$ 抗体 (用于 FCM)	BD 公司
<b>1.5.6 其他试剂</b>	
DMEM 培养液	Thermo 公司 (Hyclone)
RIPA 1640 培养液	Thermo 公司 (Hyclone)
ECM 培养液	ScienCell 公司
胎牛血清 (FBS)	Thermo 公司 (Hyclone)

100×青链霉素	索莱宝公司
胰蛋白酶/EDTA-胰蛋白酶	索莱宝公司
DMSO	Sigma 公司
DPBS (溶液)	Thermo 公司 (Hyclone)
FAM-siRNA	上海吉玛公司
pGFP 质粒	Lonza 公司
polyI:C	Sigma 公司
Amaxa™ 4D-Nucleofector HUVECs 电转试剂盒 (P5 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Solution)	Amaxa 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	碧云天生物技术研究所
人源 IL-8/CCL5/IFN $\beta$ ELISA 试剂盒	R&D 公司
鼠源 IFN $\beta$ ELISA 试剂盒	R&D 公司
流式固定透膜液 (eBioscience Fixation & Permeabilization Kit)	Biolegend 公司
双荧光素酶报告检测试剂盒 (Dual Luciferase Reporter Assay System)	Promega 公司

## 1.6 实验动物

用于扩增 HTNV 实验的昆明小鼠乳鼠 (3d 龄)、HTNV 攻毒实验的 C57BL/6J 小鼠乳鼠 (7w 龄, 18-22g) 及所用标准饲料均购自第四军医大学实验动物中心。小鼠实验遵照第四军医大学伦理委员会规定, 符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

## 1.7 主要仪器

Amaxa™ 4D-Nucleofector Lonza 电转仪	Amaxa 公司
Epoch 分光光度计	Bio-tek 公司
Take3 Micro-Volume Plate	Bio-tek 公司
Synergy 2 多功能微孔板检测仪	Bio-tek 公司
PTC-200 梯度 PCR 扩增仪	MJReserach 公司
LightCycler96 实时定量 PCR 仪	Roche 公司
IX71 倒置荧光显微镜	奥林巴斯公司

BX60 正置荧光显微镜	奥林巴斯公司
微型蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司
Western Blot 电转仪	Tanon 公司
Odyssey 红外扫描仪	LI-COR 公司
Sorvall 台式离心机	Kendro 公司
Scout 生物安全柜	Ohaus 公司
HEV-50 高压蒸汽灭菌器	Hirayama 公司
二氧化碳细胞培养箱	Thermo 公司
超纯水仪	中国 Rephile/瑞枫公司

## 2 方法

### 2.1 HTNV 的增殖及细胞感染实验

#### 2.1.1 HTNV 的乳鼠脑内接种

- 1) 动物实验中心领取 1~2 d 龄的昆明窝鼠，处死雄鼠，保留雌鼠。
- 2) 在实验台铺一块浸有 3~5% 的来苏液纱布，左手捏乳鼠两耳及颈部使其侧卧于纱布上，酒精消毒眼耳连线中点处，右手持注射器刺入眼耳连线中点略偏耳侧硬脑膜下，进针 2~3 mm，注入 HTNV 病毒悬液 0.02~0.03 ml，注射完毕用酒精消毒局部。
- 3) 将注射完的乳鼠放回笼之前，需要用酒精棉球擦拭母鼠鼻部，以破坏其嗅觉，以免母鼠吃掉乳鼠，接种后的乳鼠仍然与母鼠一起喂养。逐日观察，48h 内死亡者为非特异性死亡。

#### 2.1.2 乳鼠脑内增毒 HTNV 的获取

- 1) 正常情况下接种病毒的乳鼠一般在 10d 左右发病，发病乳鼠的特征主要有离群、颤抖、抽动等；一旦乳鼠发病，应立即取出母鼠，以免母鼠吃掉乳鼠，并尽快进行取鼠脑操作。
- 2) 待小鼠发病垂死前，应立即杀死，取出鼠脑传代或-80℃保存。取鼠脑的方法为：用无菌的手术剪刀剪乳鼠颈动脉放血，使乳鼠死亡。酒精消毒乳鼠脑部皮肤，

用无菌的手术剪刀剪开乳鼠脑部皮肤，再用另一副眼科剪剪开硬脑膜，并朝上翻起，暴露鼠脑。换一套无菌剪刀、镊子，镊子夹住皮肤和硬脑膜，用剪刀的弯头挑起鼠脑，放入无菌的容器（本实验使用的一般为无菌的青霉素小瓶）。

- 3) 全部鼠脑取完后，按 1 g 换算 1 ml 计算，加 9 倍体积的双无 1640 培养液（不含双抗和血清）进行匀浆，尽量将鼠脑组织研磨充分，并注意全程操作应在冰上进行。
- 4) 将匀浆好的鼠脑悬液移至 50 ml 离心管（圆底），冻融三次，之后 4℃ 13,000g×30 min。
- 5) 将离心后的上清用钟罩过滤器过滤，之后再用 0.22 μm 小滤器过滤至 2 ml EP 管中，-80℃保存。

### 2.1.3 HTNV 在 Vero-E6 细胞中的扩增

- 1) T-75 培养的 Vero-E6 待到汇合度在 70%左右时接种鼠脑扩增的 HTNV 病毒（1 瓶 T-75 加入 300 μl HTNV，并补充 3 ml 无血清 DMEM 培养基），感染 2h 后弃去上清，换用 2% FBS DMEM；
- 2) T-75 继续培养 3~4 天换液（2% FBS DMEM）
- 3) 继续培养 4~5d 后，将培养瓶冻入-80℃冰箱待处理；
- 4) 将 T-75 培养瓶中的 Vero-E6 细胞反复冻融三次（37℃/-80℃）后将上清转移至 50 ml 离心管，13,000g 离心×10 min。上清即为扩增好的病毒液，冻入-80℃冰箱备用。部分密封好的病毒液送本校辐照中心进行 Co<sup>60</sup> 辐照灭活。

### 2.1.4 夹心 ELISA 法检测 HTNV 病毒滴度（TCID<sub>50</sub>/ml）

- 1) 将 Vero-E6 细胞以 10<sup>4</sup>/孔接种于 96 孔板，使用 10% FBS DMEM 培养基，于 37℃ 孵箱中进行细胞培养。
- 2) 用 DMEM 培养液梯度稀释上述 Vero-E6 细胞中扩增所得 HTNV（10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>），待 96 孔板中细胞汇合度达到 70%时感染 Vero-E6 细胞（每个稀释度的 HTNV 感染 8 个孔，每孔加入 100 μl HTNV），2h 后换液（2% FBS DMEM 培养基）。
- 3) 于 4dpi、8dpi 换液，于 10dpi 将 96 孔板反复冻融三次待用。
- 4) 包被 1:1000 的 1A8 和 Sp2/0 纯化腹水，100 μl/孔，4℃过夜。同时，每块平板设空白对照孔（只加 100 μl 包被液）；



- 5) 洗涤 3 次，每孔加入 3% BSA-PBS 封闭 30~60min;
- 6) 洗涤 3 次，每孔加入上述 Vero-E6 细胞上清 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，同时设阳性对照 HTNV 病毒鼠脑抗原 (HTNV-Ag)，空白孔只加稀释液;
- 7) 洗涤 3 次，每孔加 100  $\mu$ l 1:4000 稀释的 HRP-1A8，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，空白孔只加稀释液;
- 8) 洗涤 3 次，每孔加 100  $\mu$ l TMB 底物液，显色 30min;
- 9) 直接加终止液，50  $\mu$ l/孔，迅速在酶标仪上在 OD<sub>490</sub> /OD<sub>492</sub> 处读数，所得读数 (positive) 比 Sp2/0 读数 (negative) (P/N 值) 大于/等于 2.1 时记为阳性孔，同时 Sp2/0 孔的数值应小于 0.10。计数每个稀释梯度病毒的阳性、阴性孔数。
- 10) 根据 Reed-Meunch 公式计算 HTNV 的病毒滴度 (TCID<sub>50</sub>/ml)。

### 2.1.5 HTNV 感染细胞实验

按照以下细胞数将不同细胞接种于培养板：10<sup>4</sup>/孔-96 孔板、5 $\times$ 10<sup>4</sup>/孔-24 孔板、2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔-6 孔板。利用测得的病毒滴度 TCID<sub>50</sub>/ml，结合公式 PFU=0.7 $\times$ TCID<sub>50</sub>/ml<sup>[130]</sup>，MOI=PFU/细胞数，并根据不同实验目的所需的 MOI 量计算每孔所需的病毒体积。

HTNV 感染前将细胞按上述要求接种于不同培养板，带细胞汇合度达 60%~70%，弃去原有培养液并用 DPBS 洗涤 2 次后加入所需病毒量，并补加无血清培养液 (96 孔板每孔补加至 100  $\mu$ l，24 孔板每孔补加至 500  $\mu$ l，6 孔板每孔补加至 2500  $\mu$ l)，37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 2h 后换液 (含 2% FBS 的培养基)，之后根据不同研究目的进行下一步实验。

### 2.2 测序样本制备与 DGE 分析

HUVECs 按上述要求接种于 6 孔板并以 MOI=1 感染 HTNV (HTNV 组)，或加入等体积 Co<sup>60</sup> 灭活的 HTNV (Co<sup>60</sup>-HTNV 组)、无血清 ECM (Mock 组)。24h 后弃去上清，Trizol 裂解细胞，送华大公司进行 DGE 分析，结果已上传至 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库，编号为 GSE89950。

### 2.3 siRNA 或质粒的转染

HUVECs 从培养板中消化离心后，使用 P5 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Solution 重悬并计数细胞，按照如下体系加入 siRNA 或质粒并进行电转：

		100 $\mu$ l Single Nucleocuvette™
Cells		$5 \times 10^5$
Substrate*	pmaxGFP™ Vector	2 $\mu$ g
	or plasmid DNA (in H <sub>2</sub> O or TE)	0.5–5 $\mu$ g
	or siRNA	30–300nM siRNA (3–30 pmol/sample)
P5 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Solution		100 $\mu$ l
Program		CA-167

电转方法按照 Amaxa™ 4D-Nucleofector HUVECs 电转试剂盒的说明书进行，电转结束后依据实验目的选择合适细胞数铺于培养板中，培养方法见 1.1.1。

## 2.4 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 HTNV 感染细胞中不同分子 mRNA 的表达

### 2.4.1 细胞总 RNA 的提取

采用先锋生物的 RNA fast 1000 试剂盒提取各组细胞总 RNA，参照说明书进行实验操作，具体如下：

- 1) 实验前准备：第一次使用前在漂洗液 RW 中加入 45 ml 无水乙醇；
- 2) 各组细胞弃去培养基，PBS 漂洗 3 次；
- 3) 6 孔板中每个孔加入 1ml Trizol 裂解液，置于冰上低温裂解 5 min；
- 4) 用移液器轻轻吹打 6 孔板底壁，吹打至底壁光滑干净；
- 5) 转移细胞裂解悬液于 1.5 ml 去 RNA 酶 EP 管中，加入氯仿 200  $\mu$ l，充分颠倒混匀 1 min，冰上低温静置 5 min；
- 6) 4℃、12,000 rpm 离心 5 min，转移上层无色透明溶液 400  $\mu$ l 于新的去 RNA 酶 EP 管中；
- 7) 加入等体积聚合液 RB2，充分颠倒混匀 1 min，转移入带有 RNase-free 吸附柱的收集管中，4℃、13,000 rpm 离心 1 min；
- 8) 弃去收集管中的液体，在吸附柱内加入漂洗液 RW 500  $\mu$ l，4℃、13,000 rpm 离心 1 min，此过程重复两次；
- 9) 弃去收集管中的液体，不加漂洗液 RW，再次 4℃、13,000 rpm 离心 1 min；
- 10) 弃去收集管，将吸附柱转移至新的去 RNA 酶 EP 管中，在吸附柱中央过滤膜上加入 30  $\mu$ l 的 RNase-free H<sub>2</sub>O，4℃冰箱静置 5 min 后，4℃、13,000 rpm 离心 1min；

11) 收集离心后的液体即为提取的各组细胞总 RNA 溶液, 标记并置于-80℃超低温冰箱保存备用。

#### 2.4.2 RNA 浓度测定

采用 Take3 Micro-Volume Plate 和 Epoch 2 多功能微孔板检测仪进行 RNA 浓度的测定, 具体如下:

- 1) 采用 ddH<sub>2</sub>O 反复清洗 Take3 Micro-Volume Plate 测量孔, 并用滤纸吸干多余水分;
- 2) 分别在测量孔内加入 ddH<sub>2</sub>O 作为本底和待测总 RNA 溶液;
- 3) 将 Take3 Micro-Volume Plate 放入 Epoch 2 多功能微孔板检测仪进行 RNA 浓度 (ng/μl) 测定, 保存并记录结果。

#### 2.4.3 反转录反应

采用 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 反转录试剂盒进行总 RNA 的反转录。反应体系如下:

试剂	体积 (μl)
5×PrimeScript Buffer	2
总 RNA 溶液	体积= (1000 ng/浓度)
RNase Free dH <sub>2</sub> O	补齐总体积
总体积	20

反应条件如下:

37℃,	15min
85℃,	5s
4℃,	forever

所得反应液即为反转录液, 标记并置于-80℃超低温冰箱保存备用。

#### 2.4.4 实时定量 PCR

(A) 20 μl 实时定量 PCR 反应体系如下:

试剂	用量 (μl)
SYBR Premix Ex Taq II	10
Forward Primer	1.6
Reverse Primer	1.6
反转录液	1
ddH <sub>2</sub> O	5.8

**(B) 实时定量 PCR 反应条件:**

95℃,	3min;	
95℃,	3s	} 35 个循环
60℃,	20s	
10℃,	forever	

**(C) 获取各组 CT 值, 进行统计学分析。**

**2.5 免疫荧光法 (IFA) 检测 HTNV 感染细胞中不同蛋白的表达及亚细胞定位**

实验前将细胞铺于小圆片 (玻片, 一片可铺于 24 孔板一孔), 根据不同研究目的处理细胞, 于预期时间点进行 IFA 实验:

- 1) 吸弃培养基, PBS 洗涤玻片 3 次, 每次 5 min;
- 2) 固定: 在每张玻片上轻轻滴加 200  $\mu$ l 的 4% 多聚甲醛, 使玻片完全没入多聚甲醛中, 室温固定 15 min;
- 4) 透膜: 吸弃多聚甲醛溶液, PBS 洗涤玻片 3 次, 每次 5 min, 随后每张玻片上轻轻滴加 300  $\mu$ l 0.5% Triton X-100, 室温透膜 20 min;
- 5) 封闭: 吸弃 Triton X-100, PBS 洗涤玻片 3 次, 每次 5 min, 每张玻片滴加 200  $\mu$ l 封闭液 (3% BSA-DPBS), 室温封闭 30 min;
- 6) 孵育一抗: 吸弃封闭液, 不洗, 每张玻片滴加足量一抗, 湿润环境 4℃ 孵育过夜;
- 7) 孵育二抗: PBST 洗涤玻片 3 次, 每次 5 min, 加入相应荧光二抗, 避光湿润环境 37℃ 孵育 1h, 避光 PBST 再次清洗 3 次, 每次 5 min;
- 8) 染核: 用稀释后的 DAPI 避光孵育 5 min, 染核; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min;
- 9) 保存与结果观察: 甘油封片于盖玻片上, 做好标记, -80℃ 冰箱保存, 择期使用激光共聚焦扫描显微镜观察目的蛋白在细胞核内的分布情况。

**2.6 荧光原位杂交 (FISH) 检测 HTNV 感染细胞中 NEAT1-2 的表达及亚细胞定位**

细胞爬片后进行不同处理, 于预期时间点通过 FISH 技术在激光共聚焦扫描显微镜下观察 NEAT1-2 的表达。具体实验操作如下:

- 1) 固定: PBS 洗涤细胞后 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 并用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min;
- 2) 透膜: 每孔加入 300  $\mu$ l 0.5% Triton X-100, 置于 4℃ 冰箱 5 min, 随后用 PBS 洗涤

- 细胞 3 次，每次 5 min；
- 3) 预杂交与杂交：每孔加入 200  $\mu$ l 预杂交液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后，避光下加入已 37 $^{\circ}$ C 预热的杂交液，37 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜；
  - 4) 洗涤：避光条件下用 42 $^{\circ}$ C 预热的 4 $\times$ SSC 洗涤 3 次，每次 5 min，随后分别用 42 $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$ SSC 和 1 $\times$ SSC 各洗涤 1 次，每次 5 min；
  - 5) 避光下 PBS 洗涤细胞 5 min；
  - 6) 染核：用稀释后的 DAPI 避光孵育 5 min，染核；PBST 洗涤 3 次，每次 5 min；
  - 7) 结果观察与保存：甘油封片于盖玻片上，做好标记，-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存，择期使用激光共聚焦扫描显微镜观察 NEAT1-2 在细胞核内的表达情况。

## 2.7 In-cell Western (ICW) 及 Western Blot 检测 HTNV 感染细胞后不同蛋白的表达

### 2.7.1 In-cell Western 检测 HTNV 感染细胞后不同蛋白的表达

将细胞铺于 ICW 专用 96 孔板，进行处理后于预期时间点进行 ICW 实验：

- 1) 固定：向每孔中加入 4 $^{\circ}$ C 预冷 4% 多聚甲醛 100  $\mu$ l 进行固定，静置于室温条件孵育 20 min。加固定缓冲液时，小心地用移液器沿管壁加入，避免细胞脱落。
- 2) 透膜：吸弃固定缓冲液，用 1% Triton X-100 100  $\mu$ l/孔分 3 次洗脱细胞，每次 5 min，以保证完全渗透细胞。
- 3) 封闭：吸弃透膜缓冲液，沿管壁向每孔加入 150  $\mu$ l 封阻液，在摇床上缓慢摇动室温下孵育 1.5 h。
- 4) 孵育一抗：吸弃封阻液，沿管壁向每孔加入 50  $\mu$ l 一抗，一抗是两种不同抗体的混合液，包括抗 HTNV NP 的鼠单抗 1A8 及抗 Tubulin 兔多抗。4 $^{\circ}$ C 不摇动孵育过夜。
- 5) 洗涤：吸弃一抗，沿管壁向每孔加入洗涤缓冲液 (0.1% Tween-20)，300  $\mu$ l/孔，室温下缓慢摇动 5 min，洗涤 5 次以上。
- 6) 孵育二抗：吸弃洗涤缓冲液，沿管壁向每孔加入二抗 50  $\mu$ l。二抗是两种抗体的混合液，包括 Goat anti-rabbit IRDye<sup>TM</sup> 680 和 Goat anti-mouse IRDye<sup>TM</sup> 800CW，均按照 1:5000 稀释。室温下避光缓慢摇动，孵育 1 h。
- 7) 洗涤：沿管壁向每孔加入洗涤缓冲液 200  $\mu$ l，室温下避光缓慢摇动，洗脱 5 min。洗涤 5 次以上。

8) 结果判读及保存: 微孔板采用 Odyssey 近红外双色荧光成像系统进行扫描, 使用 700 nm 和 800 nm 两个通道同时扫描, 选择中等质量、169  $\mu\text{m}$  分辨率、3.0 nm 焦距、亮度 5。一台 Odyssey 扫描仪可同时扫描 8 块 96 孔板。

### 2.7.2 Western Blot 检测 HTNV 感染细胞后不同蛋白的表达

将细胞铺于 6 孔板, 处理后于预期时间点进行 Western Blot 实验:

#### (A) 提取各实验组细胞总蛋白:

- 1) 弃去细胞培养液, PBS 润洗 3 次并吸干;
- 2) 将每孔加入 100  $\mu\text{l}$  含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 置于冰上裂解 10 min;
- 3) 用干净的细胞刮将细胞刮下, 使用移液器将含有细胞碎片的裂解液转移至 1.5 ml EP 管中。
- 4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13,000 rpm 离心 30 min, 弃去沉淀, 所得上清即为提取的各组细胞总蛋白;
- 5) 将各组上清分装并做好标记, 置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

#### (B) BCA 法测蛋白浓度:

- 1) 配置 BCA 测定标准品, 测量并绘制标准品浓度梯度标准曲线;
- 2) 按 A 液:B 液比例为 50:1 和待测样本数准备工作液;
- 3) 分别在 96 孔板中加入各组待测样本和工作液, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;
- 4) 将孵育后的 96 孔板置于 Synergy 2 多功能微孔板检测仪中测定 562 nm 吸光度值;
- 5) 结合标准曲线计算得出待测样本的蛋白浓度。

#### (C) Western Blot 检测目的蛋白表达情况:

- 1) 样本准备: 实验中蛋白上样量 10  $\mu\text{g}$ , 根据测出的蛋白浓度吸取适量体积的蛋白, 加入 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白加样缓冲液, 水浴煮沸 10 min;
- 2) 上样: 组装 SDS-PAGE 电泳系统, 将蛋白 Marker 和煮好的蛋白样本加入电泳槽内;
- 3) 电泳: 170V 恒压 1 h 进行电泳;
- 4) 转膜前准备: 剪裁好 PVDF 膜并用甲醇激活, 将滤纸、PVDF 膜及电泳完成的凝胶按照负极-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-正极的顺序组装;
- 6) 转膜: 0.2A 恒流 2h 进行转膜;

- 7) 封闭: 取出 PVDF 膜, 放入 3%BSA 中封闭 1 h;
- 8) 孵育一抗: 将封闭好的 PVDF 膜置于一抗中, 4℃孵育过夜;
- 9) 洗涤: 回收抗体, 并将 PVDF 膜置于 1×TBST 中洗涤 3 次, 每次 5 min;
- 10) 孵育二抗: 将 PVDF 膜置于 1:200 稀释的抗兔红外二抗中, 室温避光孵育 2 h;
- 11) 洗涤: 回收抗体, 再次用 1×TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 避光;
- 12) 结果分析: 使用 Odyssey 扫描仪对 PVDF 膜扫描并分析图像。

## 2.8 双荧光素酶报告系统检测 IFN $\beta$ 启动子活性

使用双荧光素酶报告检测试剂盒 (Dual Luciferase Reporter Assay System) 进行相关操作, 方法如下: 在转染前一天将细胞铺于 24 孔板, 转染体系为: Opti-MEM 150  $\mu$ l, Luciferase plasmid 1500ng, Renilla plasmid (pRL-TK) 30 ng, 待测质粒或者 siRNA 3  $\mu$ g, 转染试剂 (PEI-MAX) 9  $\mu$ l, 孵育 30 min 后等量加入 3 个复孔, 6 h 换液, 24h 后感染 HTNV, 在 48hpi, 细胞用 DPBS 洗涤 3 次, 每孔加入 100  $\mu$ l 被动裂解液 (PLB), 低速震荡 20 min, 取一支 1.5 ml EP 管加入 100 $\mu$ l LARII 与 20  $\mu$ l 裂解液共作用后在 Promega GloMax 20/20 发光检测仪上检测萤火虫荧光素酶值, 后加入 100  $\mu$ l 终止液, 读取海肾荧光素酶值, 取两者之比 (ratio)。

## 2.9 C57BL/6J 小鼠体内 HTNV 攻毒实验及组织病理损伤等指标的检测

### 2.9.1 小鼠体内 HTNV 攻毒实验

在 C57BL/6J 小鼠大腿内侧肌注 HTNV 400  $\mu$ l (1000TCID<sub>50</sub>), 对照组注射等体积 RPMI-1640。从 0dpi 至 10dpi 监测各组小鼠体重变化。在预期时间点脱臼处死小鼠, 取肝、脾、肾等脏器, 称重后加入适量的无血清 DMEM 或 Trizol, 研磨后取上清用于 ELISA、Western Blot、qRT-PCR、病毒滴度检测等实验。在预期时间点眼球取血用于 ELISA 实验。

### 2.9.2 ELISA 法检测血清细胞因子

使用 R&D 公司提供的各细胞因子试剂盒检测 IL-8 等细胞因子的浓度, 方法如下: 梯度稀释标准品, 按照 1:1 比例在酶标板每孔加入包被反应液、标准品或者样品各 50  $\mu$ l (样品 1:10 稀释), 37℃孵育 1h, 洗涤后加入二抗, 37℃孵育 1min, 洗涤后加入底物显色液, 37℃孵育 15min, 加入终止液, 用酶标仪检测 450nm 处吸光度值,

根据标准品绘制的标准曲线计算各细胞因子浓度。

### 2.9.3 各组织 HE 染色

小鼠经水合氯醛麻醉后打开胸腔，将生理盐水注入左心室灌注 3~5min，取脾脏、肝脏、肾脏，经固定后，常规石蜡包埋，4  $\mu\text{m}$  切片。切片常规用二甲苯脱蜡，经各级乙醇至水洗：二甲苯（I）5min→二甲苯（II）5min→100%乙醇 2min→95%的乙醇 1min→80%乙醇 1min→75%乙醇 1min→蒸馏水洗 2min。苏木素染色 5min，自来水冲洗；盐酸乙醇分化 30s；自来水浸泡 15min 后置伊红液 2min。常规脱水，透明，封片：95%乙醇（I）1min→95%乙醇（II）1min→100%乙醇（I）1min→100%乙醇（II）1min→二甲苯石碳酸（3:1）1min→二甲苯（I）1min→二甲苯（II）1min→中性树脂封固。

### 2.9.4 流式细胞技术检测脾脏中巨噬细胞聚集及 T 细胞活化

提取脾脏细胞用 0.14 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  裂解红细胞后进行细胞计数。取  $5 \times 10^5$  个细胞离心沉降，重悬于 100  $\mu\text{l}$  流式细胞仪用缓冲液中，用抗 F4/80 及 CD11b 抗体进行表面抗原染色，4  $^\circ\text{C}$  染色 30 min，再用缓冲液洗涤 3 次后上机检测巨噬细胞数目；或重悬先用抗 CD8 抗体进行表面抗原染色，染色洗涤后尽量弃去上清，加 100  $\mu\text{l}$  固定液，然后室温下保存于黑暗中 20 min。洗涤后加 1 ml 穿膜液重悬，4  $^\circ\text{C}$ 、1300 rpm 离心 5 min，再重悬于 50  $\mu\text{l}$  穿膜液，加入抗  $\text{IFN}\gamma$  抗体进行胞内染色，4  $^\circ\text{C}$  染色 30 min，洗涤后上机分析活化的 T 细胞数。

## 2.10 统计分析方法

使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析，两组组间比较采用 Student's *t* 检验（非配对），三组及三组以上的组间比较采用 One-Way ANOVA， $P < 0.01$  视为组间差异有统计学意义，\* $P < 0.01$ ，\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\* $P < 0.0001$ 。利用 GraphPad Prism 6 软件处理数据并作图，结果以均值  $\pm$  标准差（mean  $\pm$  SD）形式表示。

## 3 结果

### 3.1 HTNV 感染 HUVECs 诱导 NEAT1 表达水平上调

为检测 HTNV 感染后宿主 lncRNA 表达情况及相关特点，利用 illumina 测序技术对感染 HTNV 的 HUVECs 进行 DGE 分析，找出差异表达基因（含 lncRNA）。将



HUVECs 分为 Mock 组 (纯细胞组)、Co<sup>60</sup>-HTNV 组 (Co<sup>60</sup> 灭活病毒处理组) 及 HTNV 组 (将 HTNV 以 MOI=1 感染细胞)。Co<sup>60</sup> 辐照可以有效破坏病毒核酸, 使其失去复制及转录能力, 但对病毒蛋白的结构及功能并无影响。在感染后第 24h 提取各组 RNA, 送华大公司进行 DGE 分析, 在  $P$  值小于 0.001 的基础上, 以假阳性发现率 (False Discovery Rate, FDR) 小于等于 0.001, 且  $\log_2$ Ratio 绝对值大于等于 1 为标准筛选差异基因。结果如图 1.3 所示, 与 Mock 组相比, HTNV 组有 1224 个基因表达上调, 516 个基因表达下调; 与 Co<sup>60</sup>-HTNV 组相比, HTNV 感染组有 689 个基因表达上调, 825 个基因表达下调; 与 Mock 组相比, Co<sup>60</sup>-HTNV 感染组有 881 个基因表达上调, 282 个基因表达下调。

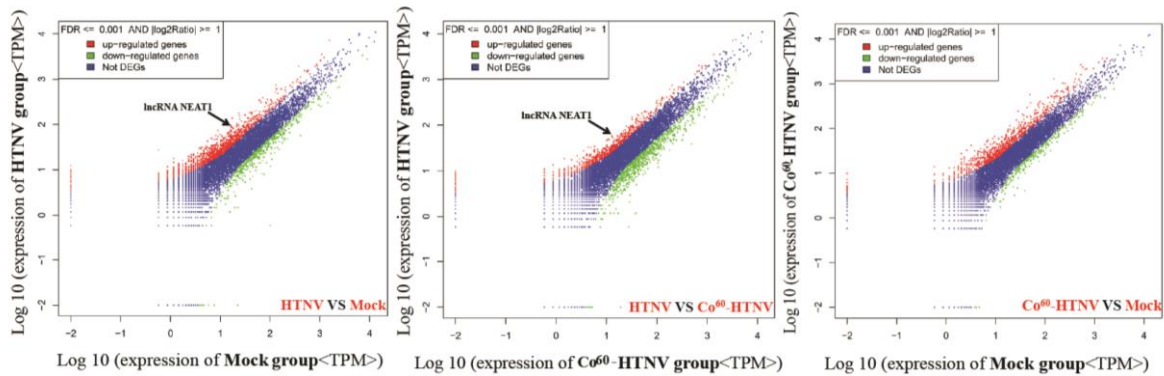


图 1.3 DGE 分析各组 HUVECs 差异基因的比较结果

Fig. 1.3 Differential genes of different groups based on DGE analysis

如图 1.4 所示, 与 Mock 组相比, Co<sup>60</sup>-HTNV 感染组及 HTNV 感染组的 PRR (如 TLR2 等)、I 型 IFN 信号通路相关转录因子 (如 IRF3 等)、IFN $\beta$  及多种 ISG (如 IFIT1 等) 具有不同程度表达上调; 值得注意的是, 与 Mock 组及 Co<sup>60</sup>-HTNV 组相比, HTNV 组 lncRNA NEAT1 表达分别上调 6.09 倍 ( $P=6.86 \times 10^{-13}$ ,  $FDR=9.75 \times 10^{-12}$ ) 及 3.54 倍 ( $P=1.75 \times 10^{-14}$ ,  $FDR=3.10 \times 10^{-13}$ ); 与 Mock 组相比, Co<sup>60</sup>-HTNV 组 lncRNA NEAT1 表达变化无统计学意义 ( $P=0.21034$ ,  $FDR=0.58211$ ), 上述实验结果提示宿主细胞 lncRNA NEAT1 的表达与 HTNV 病毒复制相关。

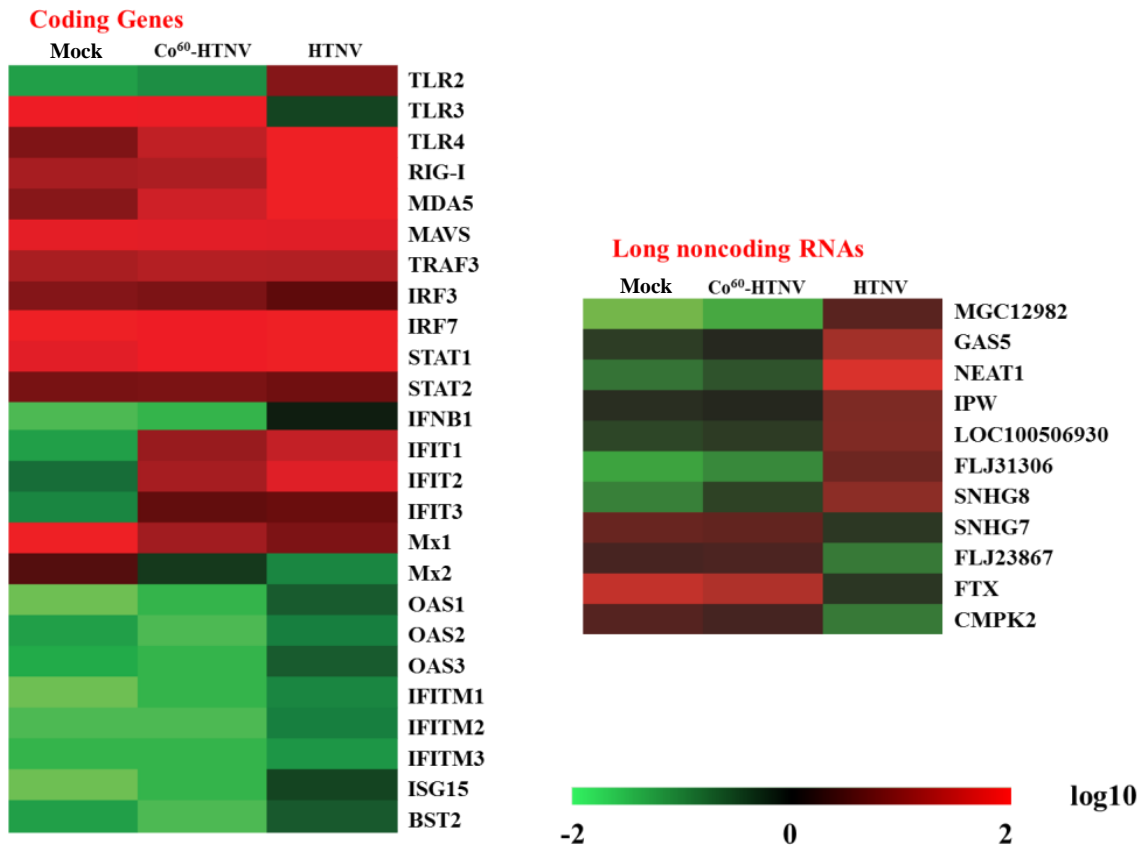


图 1.4 DGE 分析各组 HUVECs 固有免疫相关基因及 lncRNA 差异表达情况

Fig. 1.4 Innate immunity related differential genes shown by heat map

为进一步观察 HTNV 感染对宿主细胞 NEAT1 转录水平的影响，以 MOI=1 感染 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞，于 72hpi 检测 HTNV 感染复制及子代病毒产生情况，IFA 结果提示 HTNV 可有效感染上述细胞并在其中复制，感染效率均在 80% 以上（如图 1.5-A）；将上述细胞先置于 -80℃ 上冻存后于 37℃ 后融化，反复冻融 3 次后取上清感染 Vero-E6 细胞，10dpi 进行 ELISA 计算 HTNV 滴度，结果显示 HTNV 病毒滴度均高于  $3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml，提示 HTNV 可在上述细胞产生子代病毒（图 1.5-B）。在保证 HTNV 有效感染且可产生子代病毒的情况下检测 NEAT1 表达情况，qRT-PCR 结果提示，与 Control 组相比，HTNV 感染可上调 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞中 NEAT1 及 NEAT1-2 的转录水平（3dpi）；NEAT1 及 NEAT1-2 的表达在 HUVECs 及 HEK293 细胞中上调 5 倍以上，A549 及 HeLa 细胞中上调 2 倍以上（如图 1.5-C）。

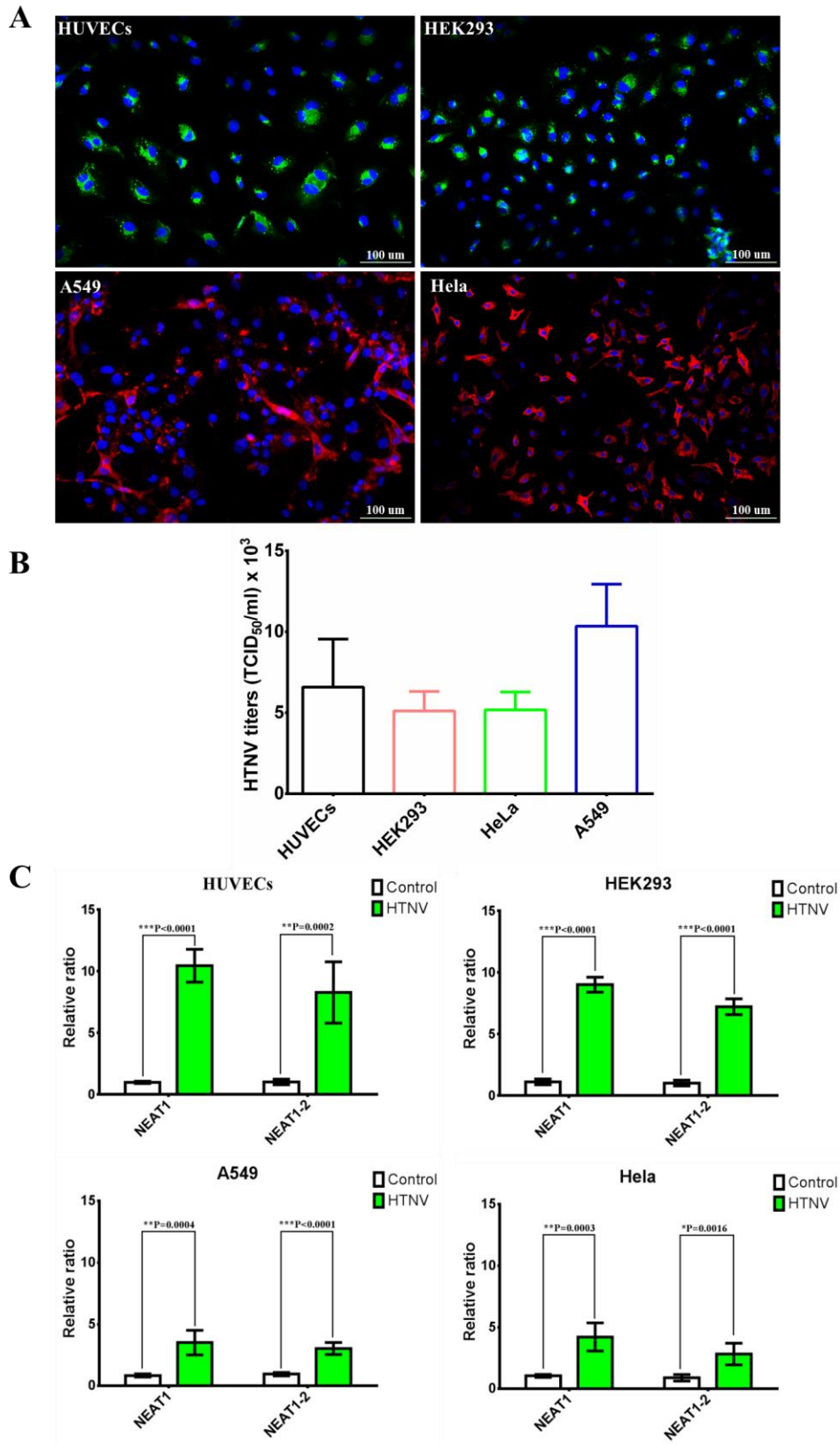


图 1.5 HTNV 感染后病毒感染效率及 NEAT1 转录水平

Fig. 1.5 HTNV infection efficiency and NEAT1 transcription level in different cell lines

(A. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞后于 74hpi 通过 IFA 检测 HTNV NP 表达,其中 HUVECs 及 HEK293 细胞中使用 FITC 标记的荧光二抗,即绿色显示 HTNV NP,而 A549 及 HeLa 细胞中使用 Cy3 标记的荧光二抗,即红色显示 HTNV NP。B. HTNV 感染上述细胞 72hpi,反复冻融 3 次后取上清感染 Vero-E6 细胞,7dpi 进行 ELISA,利用 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>/ml,以此评估 HTNV 病毒滴度。C. HTNV 感染上述细胞 72hpi 进行 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2,其中 Control 组使用等量的 Co<sup>60</sup> 灭活 HTNV 刺激 HUVECs 作为对照, \**P*<0.01, \*\**P*<0.001, \*\*\**P*<0.0001; Student's *t* 检验。此部分实验及后续实验结果均设生物学重复,若无特殊说明则 n=3。)

已有研究表明 NEAT1 中长为 23kb 的转录本 NEAT1-2 在核旁斑形成及基因表达调控过程中起到主要作用,且其在 polyI:C 刺激后表达水平明显升高<sup>[66]</sup>。为检测 HTNV 感染后 NEAT1-2 的亚细胞定位,针对其设计并合成 FISH 探针(如图 1.1)。在 HeLa 细胞中,以 Co<sup>60</sup> 灭活 HTNV 处理为 Control 组,以 polyI:C 刺激为阳性对照组,以 HTNV 感染为实验组,观察 HTNV 感染后 NEAT1-2 的表达情况及其亚细胞定位。FISH 结果提示,与 Control 组相比,在 HeLa 细胞中, polyI:C 刺激或 HTNV 感染(72hpi)均能有效诱导 NEAT1-2 表达,且诱导产生的 NEAT1-2 主要分布于细胞核,聚集成片状(图 1.6-A)。在 HUVECs 中,以 Co<sup>60</sup> 灭活 HTNV 处理为 Control 组,以 HTNV 感染为实验组,观察 24hpi、72hpi 等不同时间点 NEAT1-2 的表达情况, FISH 及 IFA 结果提示随着 HTNV NP 表达增多, NEAT1-2 转录水平上调,且其同样定位于细胞核,聚集成片状(图 1.6-B)。值得注意的是, HeLa 细胞中细胞核核周围可见少量红色荧光,而 HUVECs 中仅在核内可见红色荧光。提示 NEAT1-2 在不同细胞系中的亚细胞定位可能不同。

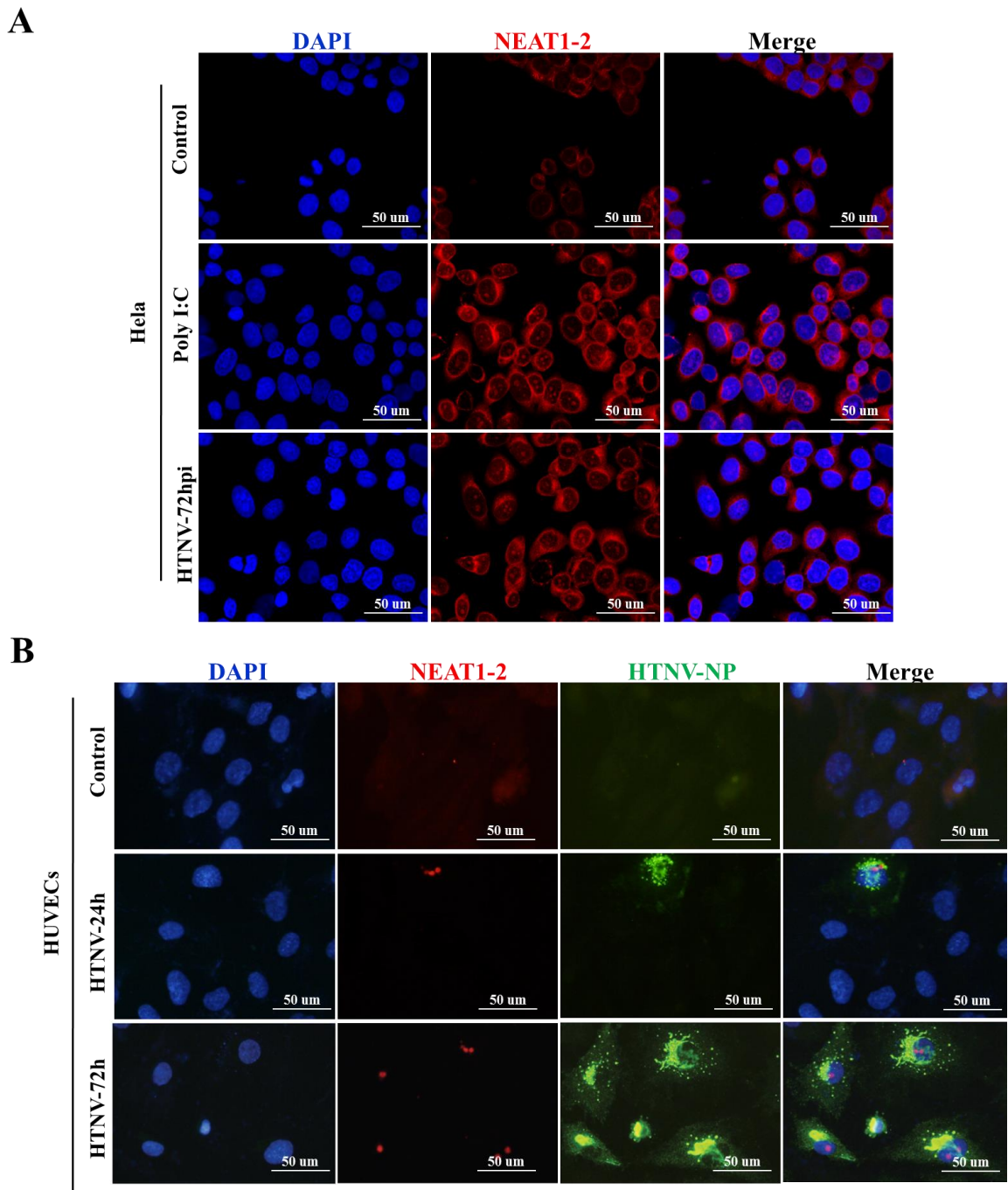


图 1.6 FISH 检测 HTNV 感染 HeLa 及 HUVECs 中 NEAT1-2 的表达水平及亚细胞定位

Fig. 1.6 NEAT1-2 expression and intracellular location shown by FISH in HeLa cells (A) and HUVECs (B) with different treatments

(A. HTNV 以 MOI=1 感染 HeLa 细胞，在 72hpi 进行 FISH 检测 NEAT1-2 表达及亚细胞定位，其中以等量的 Co<sup>60</sup> 灭活 HTNV 刺激 HeLa 细胞 24h 作为 Control 组，以 20 μg polyI:C 刺激 12h 为阳性对照组。B. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs，在 24hpi、72hpi 进行 FISH 检测 NEAT1-2 表达

及亚细胞定位,其中以等量的 Co<sup>60</sup> 灭活 HTNV 刺激 HUVECs 24h 作为 Control 组。)

### 3.2 NEAT1 表达水平在一定范围内与 HTNV 感染时间及感染剂量呈正相关

通过上述实验初步证实 HTNV 感染可诱导 lncRNA NEAT1 表达,但尚不明确 NEAT1 转录水平与 HTNV 感染时间及感染剂量的关系。HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞,分别于 0hpi、2hpi、6hpi、12hpi、24hpi、48hpi、72hpi、96hpi、120hpi 等时间点进行 qRT-PCR 检测细胞内病毒复制、IFN $\beta$  及 NEAT1 表达水平。随着感染时间的延长,可见细胞内 HTNV 病毒载量逐步上升并于 96hpi 进入平台期(图 1.7-A);在 HTNV 感染 12h 内未见上述细胞产生 IFN $\beta$ ( $P>0.05$ ),直至 24hpi 方可见 HUVECs 产生少量 IFN $\beta$  ( $P<0.05$ ),而 48hpi 后上述细胞均可产生大量 IFN $\beta$  (图 1.7-B); NEAT1 及 NEAT1-2 的表达在感染 12h 以内并无明显变化,而在 24h 后随感染时间延长而逐渐增加,并于 96hpi 进入平台期(图 1.7-C)。NEAT1 在 2hpi 有一过性上调,可能与 HTNV 作用初期刺激所导致的细胞应激反应有关,而并非病毒本身感染及复制所致(图 1.7-C)。为研究 NEAT1 表达水平与感染剂量的关系,分别将 HTNV 以 MOI=0.1、1、5 感染 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞,于 72hpi 进行 qRT-PCR 检测不同 MOI 感染后 NEAT1 的表达情况,结果提示 MOI=0.1、1、5 感染上述细胞均能诱导 NEAT1 及 NEAT1-2 转录上调,且在 MOI=0.1 及 1 时 NEAT1 表达呈递增趋势,而在 MOI=1 及 5 时 NEAT1 表达进入平台期(图 1.7-D)。上述结果提示 NEAT1 在 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞中的表达水平在一定范围内与 HTNV 感染时间及感染剂量呈正相关,进一步提示 NEAT1 有可能在 HTNV 与宿主细胞的相互作用中扮演重要角色。

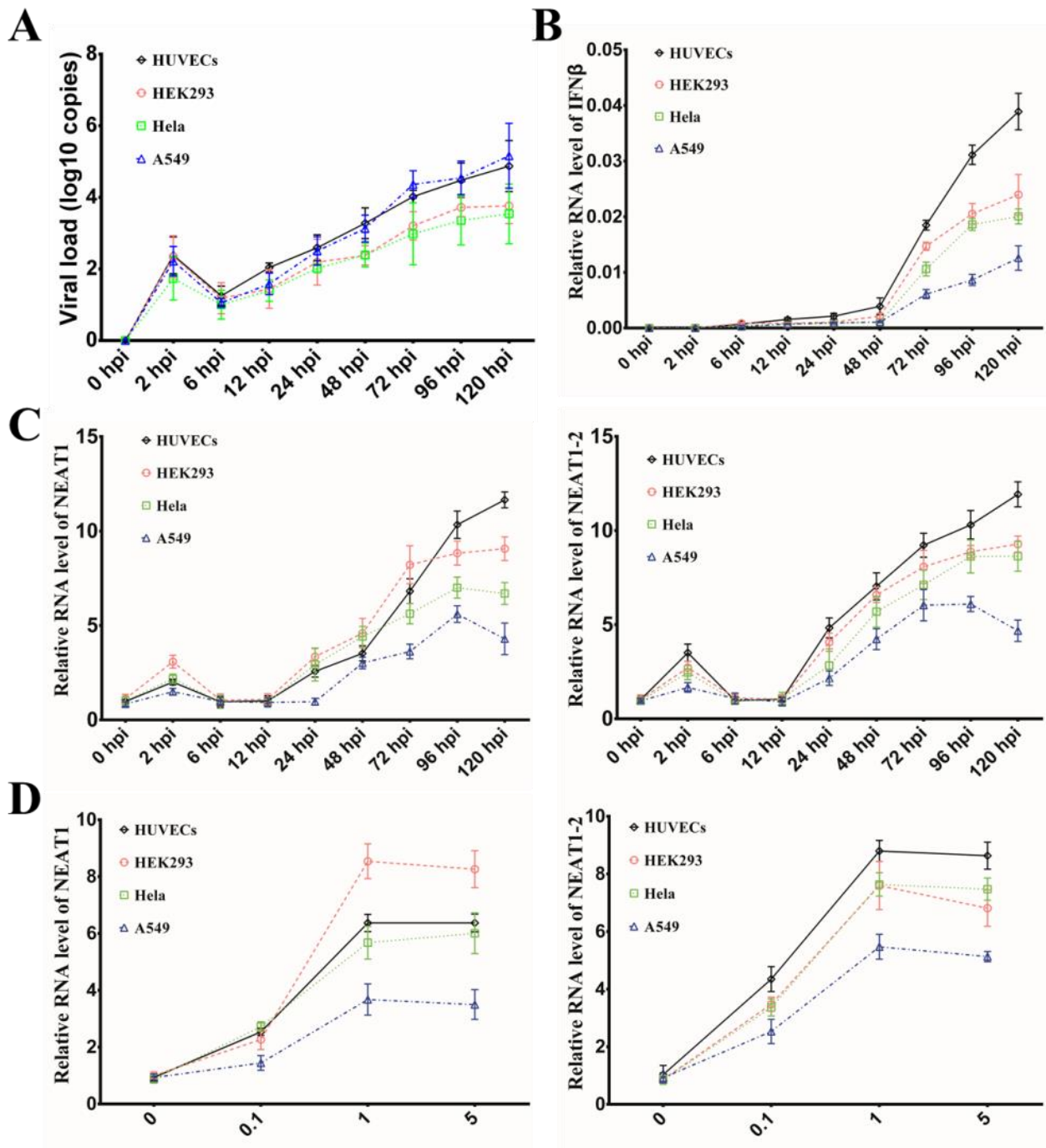


图 1.7 NEAT1 表达水平在一定范围内与 HTNV 感染时间及感染剂量呈正相关

Fig. 1.7 NEAT1 expression is time- and dose-dependent upon HTNV infection

(A-C 图, HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞。A. 通过 qRT-PCR 技术检测不同时间点 HTNV S 片段的 Ct 值, 利用前期通过绝对定量 PCR 技术建立标准曲线, 计算 HTNV 病毒载量。B. GAPDH 为内参, 通过 qRT-PCR 检测 IFN $\beta$  mRNA 的表达, 以 GAPDH mRNA 的表达水平为标准, 图示不同时间点 IFN $\beta$  mRNA 的绝对表达量。C. GAPDH 为内参, 通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 表达, 以 0hpi 的 NEAT1 及 NEAT1-2 转录水平为 1, 图示不同时间点

NEAT1-1 及 NEAT1-2 的相对表达量，后续实验结果均按照此法进行计算和展示。D. GAPDH 为内参，通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 表达，图示不同 MOI 感染后 NEAT1 及 NEAT1-2 的相对表达量，其中 MOI=0 为使用 Co<sup>60</sup> 灭活 HTNV 刺激。）

### 3.3 在 HUVECs 中敲减或过表达 NEAT1-2 可分别促进或抑制 HTNV 感染

HTNV 感染可诱导宿主细胞 lncRNA NEAT1 表达，且其转录水平与病毒感染时间、感染剂量关系密切，因此我们推测 NEAT1 可能参与病毒复制的相关过程。为验证 NEAT1 在 HTNV-宿主互作过程中的作用，我们首先通过 siRNA 敲减 NEAT1 检测 HTNV 病毒复制情况。HUVECs 为原代细胞，化学转染效率低，本研究采用电转技术转染 siRNA，流式细胞技术结果提示 FAM 标记 siRNA 的转染效率为 52.7%，满足后续实验需求（如图 1.8 左）；qRT-PCR 结果提示 Si-NEAT1 可有效敲减 NEAT1-1 及 NEAT1-2（敲减效率接近 80%），而 St-NEAT1-2 则可特异性敲减 NEAT1-2（敲减效率效率大于 60%）（如图 1.8 右），与预期设计相符，且与以往文献报道一致<sup>[66]</sup>。

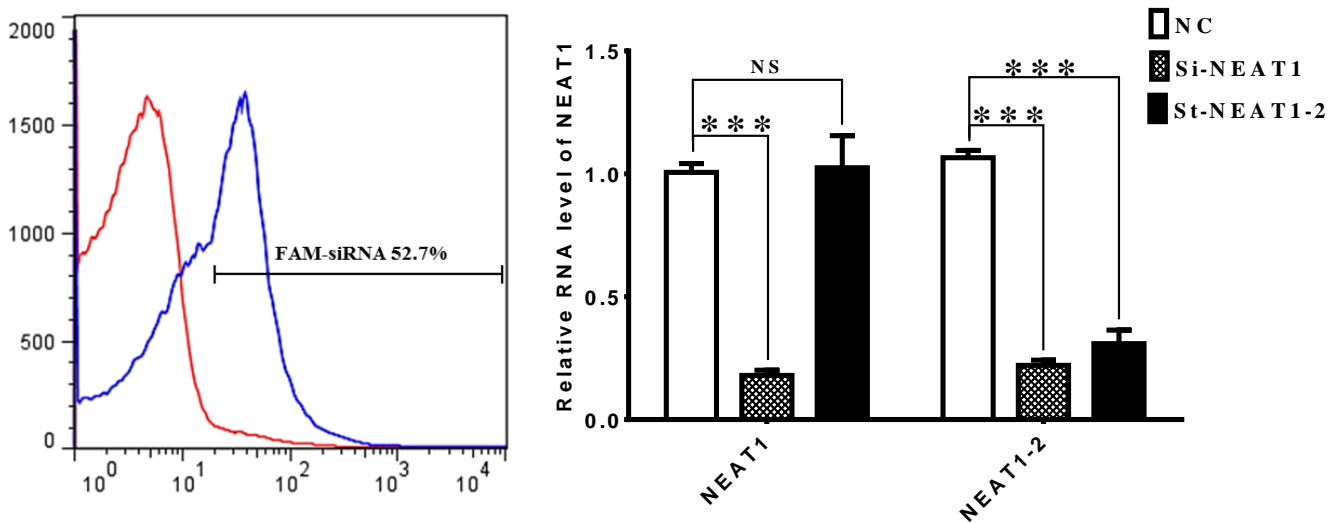


图 1.8 HUVECs 中 siRNA 转染效率（左）及敲减效率（右）

Fig. 1.8 The siRNA transfection efficiency (left) and silencing efficiency (right) in HUVECs

（铺有 HUVECs 的 6 孔板每孔转染 3  $\mu$ g FAM-siRNA、Si-NEAT1 或 St-NEAT1-2，电转 72h 检测以下指标：左，通过流式细胞技术检测 FAM-siRNA，计数 10 万 HUVECs 并计算荧光阳性细胞数，评价 siRNA 转染效率；右，通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 转录水平。）

在 HUVECs 中梯度增加 Si-NEAT1 转染剂量，转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV，分别于 2hpi、48hpi 提取细胞总蛋白，检测 HTNV NP 的表达量。Western Blot 结果提



示,随着 Si-NEAT1 转染剂量的增加,在 2hpi (冰上),HTNV NP 的吸附量并无明显变化,提示敲减并不影响 HTNV 吸附过程;NEAT1 而在 48hpi,HTNV NP 的表达呈递增趋势,提示敲减 NEAT1 可促进 HTNV 在宿主细胞内的复制(如图 1.9)。

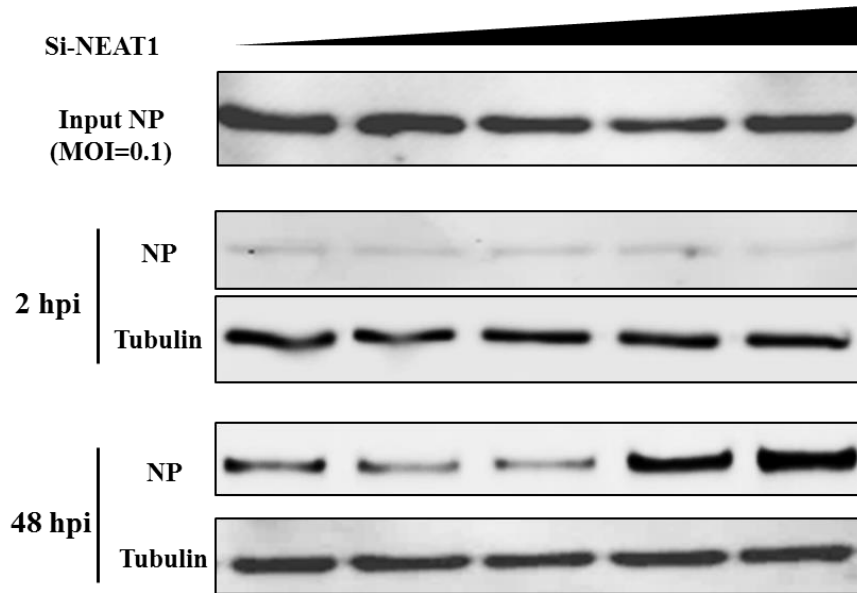


图 1.9 Western Blot 检测敲减 NEAT1 对 HTNV 复制的影响

Fig. 1.9 The HTNV NP expression detected by Western Blot after silencing NEAT1

(按照 0  $\mu\text{g}$ 、0.1  $\mu\text{g}$ 、0.5  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$ 、3  $\mu\text{g}$  的递增浓度在 HUVECs 中电转 Si-NEAT1,转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV,冰上吸附 2h 后,收集上清并提取细胞蛋白分别进行 Western Blot,上清中 NP 量即为 Input NP,2hpi 细胞上 NP 量为吸附的 HTNV NP;重复上述过程,48hpi 提取蛋白进行 Western Blot,检测 HTNV NP 表达量。)

敲减 NEAT1 促进 HTNV NP 在 HUVECs 中表达,提示 NEAT1 具有潜在的抗 HTNV 作用,但仍不清楚是转录本 NEAT1-1 还是转录本 NEAT1-2 发挥主要的抗病毒作用。通过在 HUVECs 中分别转染 Si-NEAT1 及 St-NEAT1-2,转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV,48hpi 利用 In-cell Western (ICW) 技术检测 HTNV NP 的表达,结果显示与阴性对照 (Negative Control, NC) 组相比,Si-NEAT1 组及 St-NEAT1-2 组 HTNV NP 表达明显增加 ( $P < 0.001$ ),而 Si-NEAT1 组和 St-NEAT1-2 组之间 HTNV NP 的表达量无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (如图 1.10-A)。通过 qRT-PCR 进一步检测各组 HTNV 复制水平,结果显示与 NC 组相比,Si-NEAT1 组和 St-NEAT1-2 组 HTNV S 片段增加约 1 倍 ( $P < 0.01$ ) (如图 1.10-B);利用 ELISA 法检测 HTNV 滴度,结果显示与 NC 组相比,Si-NEAT1 组和 St-NEAT1-2 组 HTNV 滴度增加约 1 倍 (如图 1.10-C);

而 Si-NEAT1 组和 St-NEAT1-2 组 HTNV S 片段产生水平及病毒滴度无统计学差异( $P > 0.05$ ) (如图 1.10-B 及 1.10-C)。上述结果提示敲减 NEAT1-2 与同时敲减 NEAT1-1 及 NEAT1-2 有类似的作用,即 NEAT1-2 可能在宿主抗病毒感染过程中发挥主要作用。

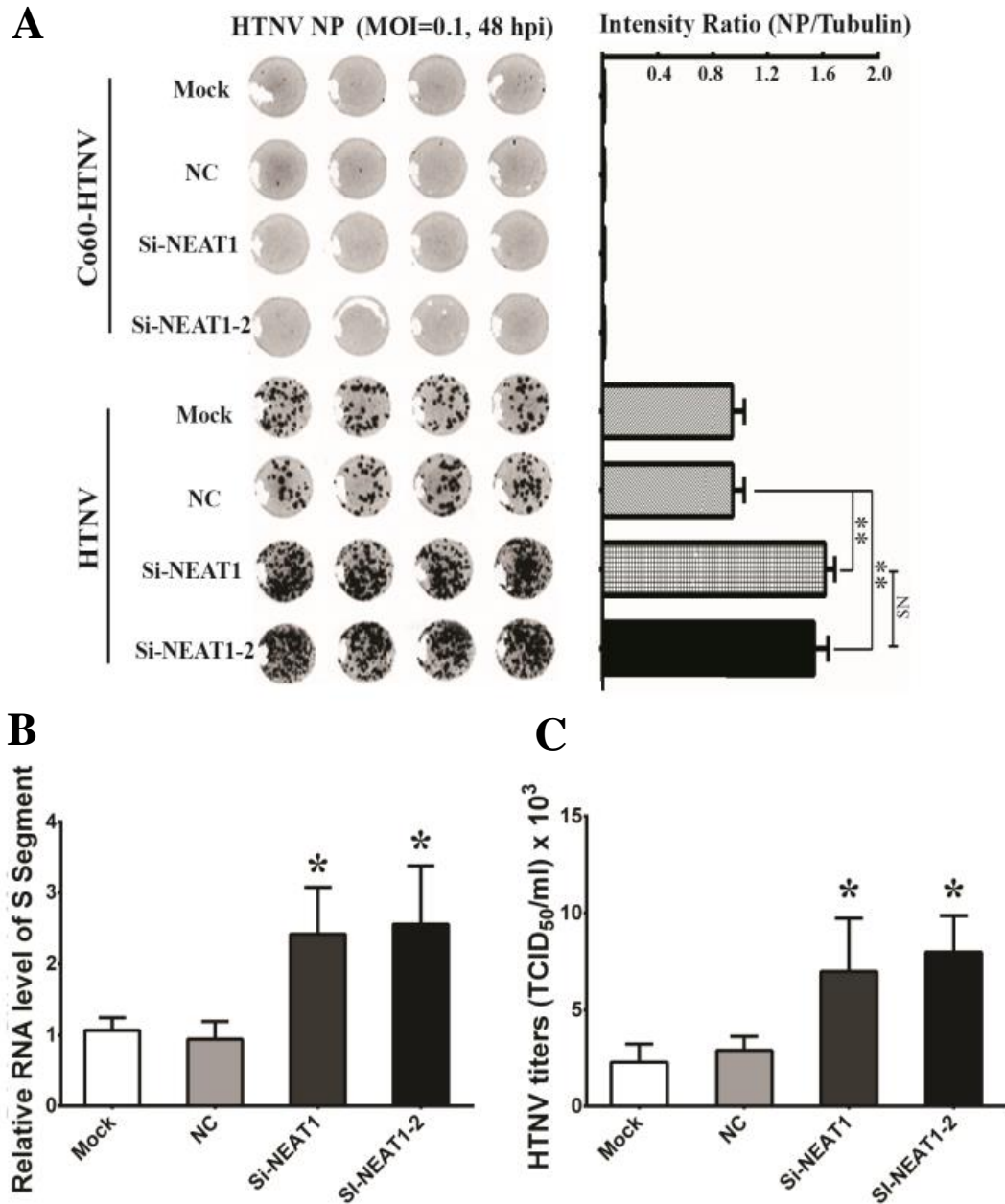


图 1.10 敲减 NEAT1-2 对 HTNV 复制的影响

Fig. 1.10 The effects of silencing NEAT1-2 on HTNV infection in HUVECs

(A.铺有 HUVECs 的 ICW 专用 96 孔板每孔转染 0.25  $\mu\text{g}$  Si-NEAT1 或 St-NEAT1-2, NC 组转染 0.25  $\mu\text{g}$  scrambled siRNA, Mock 组不做任何处理, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 同时平行设 Co<sup>60</sup> 灭活病毒组, 48hpi 进行 ICW 检测 HTNV NP 表达量。左图为 ICW 扫描后 NP 在各孔

细胞中的分布；右图为以 Tubulin 为内参计算 NP 相对荧光强度后的比较结果。 $*P<0.01$ ,  $**P<0.001$ ,  $***P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。B. 铺有 HUVECs 的 24 孔板每孔转染 1  $\mu\text{g}$  Si-NEAT1 或 St-NEAT1-2, NC 组转染 1  $\mu\text{g}$  scrambled siRNA, Mock 组不做任何处理, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 48hpi 进行 qRT-PCR 检测 HTNV S 片段的表达量。 $*P<0.01$ ,  $**P<0.001$ ,  $***P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。C. 铺有 HUVECs 的 6 孔板每孔转染 3  $\mu\text{g}$  Si-NEAT1 或 St-NEAT1-2, NC 组转染 3  $\mu\text{g}$  scrambled siRNA, Mock 组不做任何处理, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 72hpi 将其先置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存后于  $37^{\circ}\text{C}$  融化, 反复冻融 3 次后取上清感染 Vero-E6 细胞, 10dpi 进行 ELISA, 计算 HTNV 滴度。 $*P<0.01$ ,  $**P<0.001$ ,  $***P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。)

为进一步明确 NEAT1-2 的抗病毒作用, 通过在 HUVECs 中分别转染质粒 pCMV-NEAT1-1 及 pCMV-NEAT1-2, 检测过表达 NEAT1-1 及 NEAT1-2 对 HTNV 复制的影响。流式细胞技术结果提示 HUVECs 中质粒电转效率为 48.1% (如图 1.11 左); qRT-PCR 结果提示转染 pCMV-NEAT1-1 后 NEAT1 整体表达水平升高 ( $P<0.0001$ ), 而 NEAT1-2 表达下调 ( $P<0.01$ ); 转染 pCMV-NEAT1-2 后 NEAT1-2 及 NEAT1 整体转录水平升高 ( $P<0.0001$ ) (如图 1.11 右)。

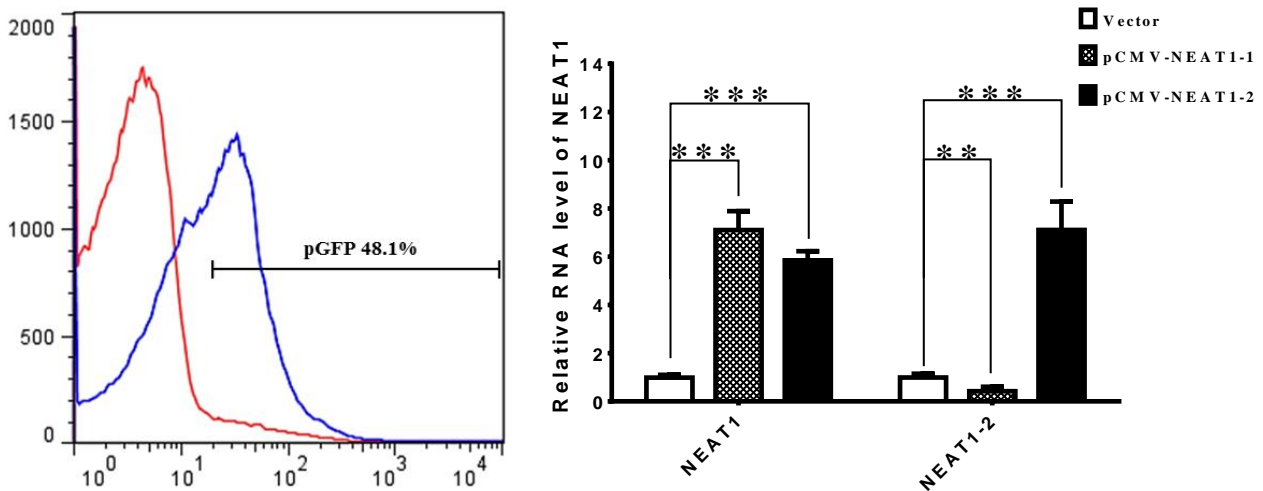


图 1.11 HUVECs 中质粒转染效率 (左) 及过表达效率 (右)

Fig. 1.11 The plasmid transfection efficiency (left) and overexpression efficiency (right) in HUVECs

(铺有 HUVECs 的 6 孔板每孔转染 3  $\mu\text{g}$  pGFP、pCMV-NEAT1-1 或 pCMV-NEAT1-2, 电转 72h 检测以下指标: 左, 通过流式细胞技术检测 pGFP, 计数 10 万 HUVECs 并计算荧光阳性细胞数, 评价质粒转染效率; 右, 通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 转录水平。)

将 pCMV-NEAT1-1 及 pCMV-NEAT1-2 共转染后以 MOI=1 感染 HTNV，分别于 2hpi、48hpi 提取细胞总蛋白，检测 HTNV NP 的表达量。Western Blot 结果提示，随着质粒转染剂量的增加，在 2hpi，HTNV NP 的表达水平并无明显变化，而在 48hpi，HTNV NP 的表达呈递减趋势，提示过表达 NEAT1 可抑制 HTNV 在宿主细胞内的复制，但并不影响 HTNV 吸附过程（如图 1.12）。

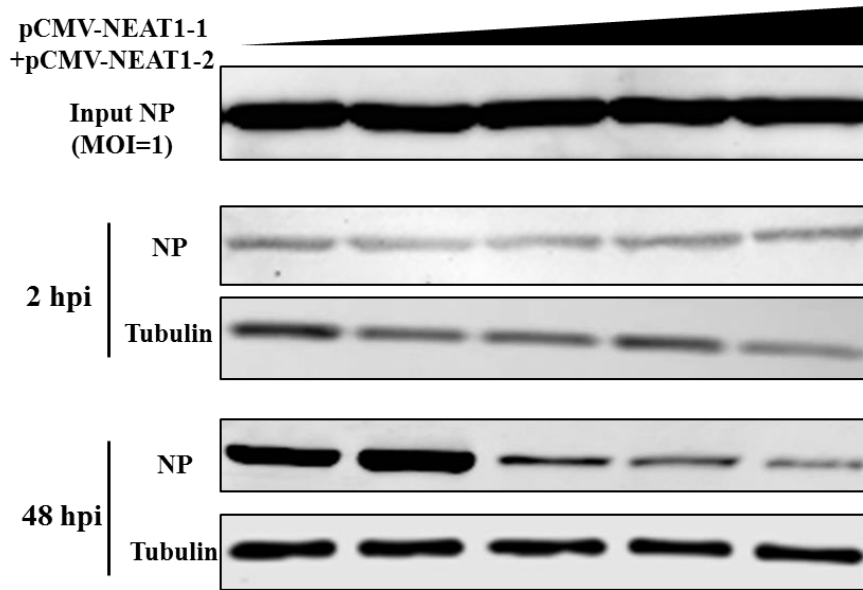


图 1.12 Western Blot 检测过表达 NEAT1 对 HTNV 复制的影响

Fig 1.12 The HTNV NP expression detected by Western Blot after overexpressing NEAT1

（按照 0  $\mu\text{g}$ 、0.1  $\mu\text{g}$ 、0.5  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$ 、3  $\mu\text{g}$  的递增浓度在 HUVECs 中电转 pCMV-NEAT1-1+pCMV-NEAT1-2，转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV，冰上吸附 2h 后，收集上清并提取细胞蛋白分别进行 Western Blot，上清中 NP 量即为 Input NP，2hpi 细胞上 NP 量为吸附的 HTNV NP；重复上述过程，48hpi 提取蛋白进行 Western Blot，检测 HTNV NP 表达量。）

在 HUVECs 中分别转染质粒 pCMV-NEAT1-1 及 pCMV-NEAT1-2，转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV，48hpi 利用 ICW 技术检测 HTNV NP 的表达，结果显示与空载体组相比，pCMV-NEAT1-1 组 NP 表达量增加 ( $P<0.001$ )，而 pCMV-NEAT1-2 组 HTNV NP 表达明显减少 ( $P<0.001$ )（如图 1.13-A）。通过 qRT-PCR 进一步检测各组 HTNV 复制水平，结果显示与空载体组相比，pCMV-NEAT1-1 组 HTNV S 片段复制拷贝数升高 1.5 倍以上 ( $P<0.001$ )，而 pCMV-NEAT1-1 组则降低 0.5 倍 ( $P<0.01$ )（如图 1.13-B）；利用 ELISA 法检测 HTNV 滴度，结果显示与空载体组相比，pCMV-NEAT1-1 组 HTNV 滴度明显升高 ( $P<0.01$ )，pCMV-NEAT1-1 组 HTNV 滴度

显著降低 ( $P < 0.01$ ) (如图 1.13-C)。上述结果提示过表达 NEAT1-1 可抑制 NEAT1-2 转录, 进而促进 HTNV 在 HUVECs 中复制并产生子代病毒, 而过表达 NEAT1-2 则可显著抑制 HTNV 感染。综合 HUVECs 中敲减及过表达 NEAT1-2 的实验结果, 本部分研究发现宿主编码的 lncRNA NEAT1-2 在 HTNV-宿主细胞相互作用的过程中起抗 HTNV 感染的作用。

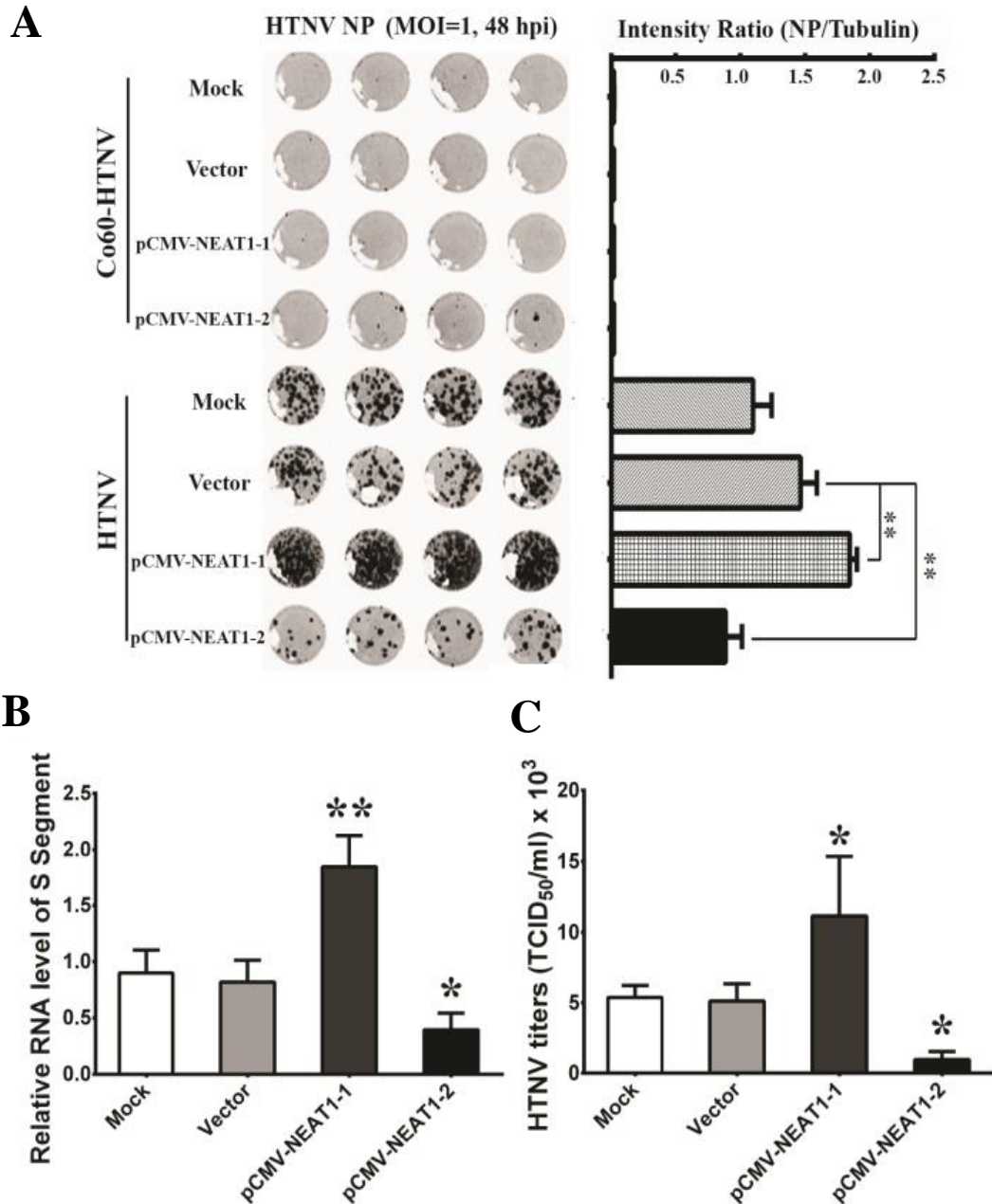


图 1.13 过表达 NEAT1-2 对 HTNV 复制的影响

Fig. 1.13 The effects of overexpressing NEAT1-2 on HTNV infection in HUVECs

(A.铺有 HUVECs 的 ICW 专用 96 孔板每孔转染 0.25  $\mu\text{g}$  pCMV-NEAT1-1 或 pCMV-NEAT1-2, Vector 组转染 0.25  $\mu\text{g}$  空质粒, Mock 组不做任何处理, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 同时平行设 Co<sup>60</sup> 灭活病毒组, 48hpi 进行 ICW 检测 HTNV NP 表达量。左图为 ICW 扫描后 NP 在各孔细胞中的分布; 右图为以 Tubulin 为内参计算 NP 相对荧光强度后的比较结果。\* $P<0.01$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。B. 铺有 HUVECs 的 24 孔板每孔转染 1  $\mu\text{g}$  pCMV-NEAT1-1 或 pCMV-NEAT1-2, Vector 组转染 1  $\mu\text{g}$  空质粒, Mock 组不做任何处理, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 48hpi 进行 qRT-PCR 检测 HTNV S 片段的表达量。\* $P<0.01$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。C. 铺有 HUVECs 的 6 孔板每孔转染 3  $\mu\text{g}$  pCMV-NEAT1-1 或 pCMV-NEAT1-2, Vector 组转染 3  $\mu\text{g}$  空质粒, Mock 组不做任何处理, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 72hpi 将其先置于 -80 $^{\circ}\text{C}$  冻存后于 37 $^{\circ}\text{C}$  融化, 反复冻融 3 次后取上清感染 Vero-E6 细胞, 10dpi 进行 ELISA 计算 HTNV 滴度。\* $P<0.01$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。)

### 3.4 NEAT1-2 正向调控 I 型 IFN 信号通路促进宿主抗 HTNV 固有免疫应答

HTNV 感染可诱导宿主细胞上调 NEAT1-2 表达水平, 而在 HUVECs 中敲减 NEAT1-2 促进 HTNV 复制, 过表达 NEAT1-2 则可有效抑制 HTNV 感染, 提示 NEAT1-2 在宿主细胞抗 HTNV 固有免疫应答中扮演重要角色。已有研究表明 HTNV 的包膜糖蛋白 Gn 可在 HTNV 感染早期抑制宿主细胞 I 型 IFN 信号通路的活化<sup>[131]</sup>, 而本部分研究发现 HUVECs 在 MOI=0.1 的感染条件下, 直至 12hpi 方可见 IFN $\beta$  mRNA 表达 ( $P<0.0001$ ) (如图 1.14-A 左) 及 IFN $\beta$  大量分泌 ( $P<0.0001$ ) (如图 1.14-A 右), 在 MOI=1 的感染条件下, 直至 24hpi 方可检测到 IFN $\beta$  的产生和分泌 ( $P<0.0001$ ) (如图 1.14-A), 且在相同时间点, MOI=1 组 IFN $\beta$  的产量低于 MOI=0.1 组 (如图 1.14-A), 提示不同剂量 HTNV 对感染早期 IFN $\beta$  的产生有不同的抑制作用。有趣的是, 我们发现在 MOI=0.1 的感染条件下, HUVECs 中 NEAT1-2 转录水平于 8hpi 显著上调 ( $P<0.001$ ), 在 MOI=1 的感染条件下, NEAT1-2 转录水平于 20hpi 显著上调 ( $P<0.01$ ) (如图 1.14-B), 即 NEAT1-2 表达水平升高的时间点恰好早于 IFN $\beta$  mRNA 增加的时间点, 提示 NEAT1-2 有可能正向调控 IFN $\beta$  的表达。

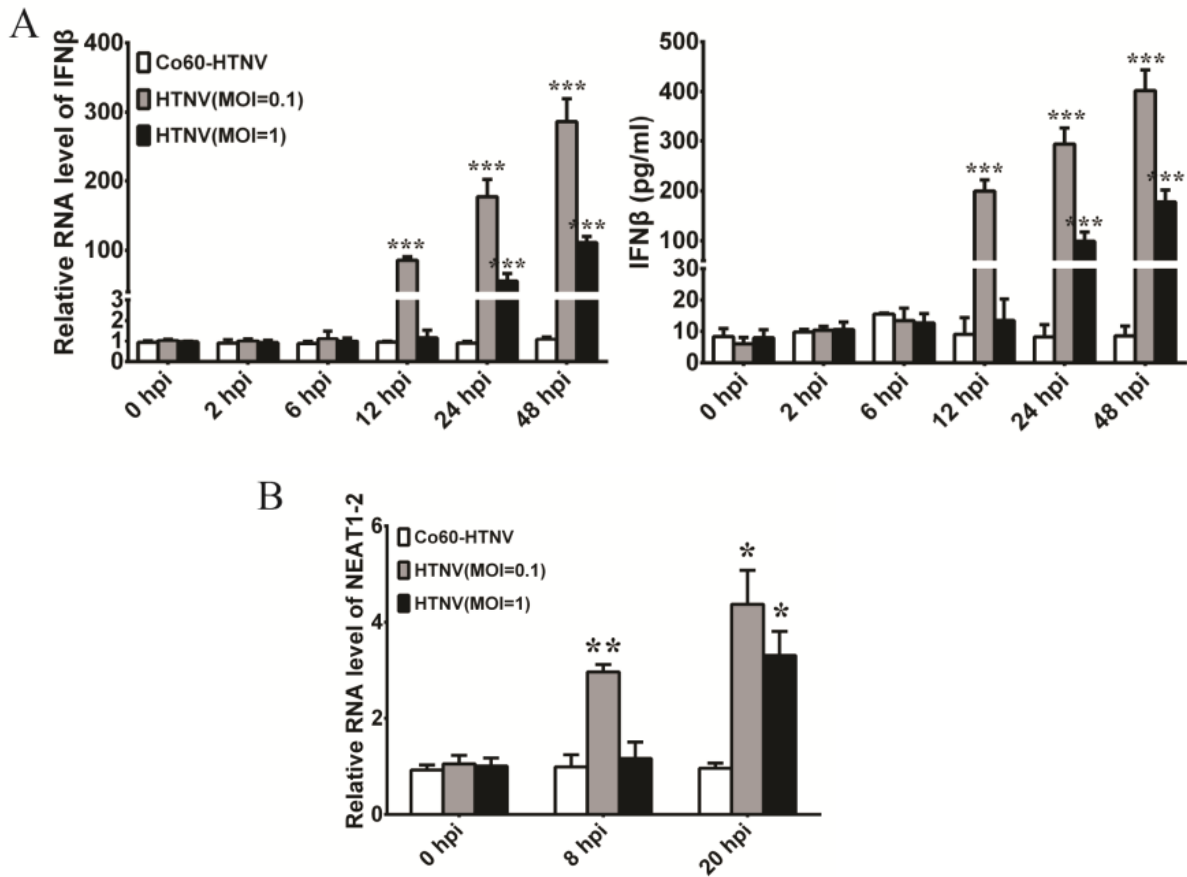


图 1.14 HTNV 感染后不同时间点 IFNβ 及 NEAT1-2 表达变化

Fig. 1.14 The expression of IFNβ and NEAT1-2 at different time post HTNV infection

(HTNV 以 MOI=0.1 或 1 感染 HUVECs, 以等量 Co<sup>60</sup> 灭活病毒处理为对照组。A. 左, 在感染后不同时间点通过 qRT-PCR 检测 IFNβ mRNA 表达水平, 右, 取细胞上清通过 ELISA 法检测 IFNβ 产生量; B. 在感染后不同时间点通过 qRT-PCR 检测 NEAT1-2 转录水平。与 Co<sup>60</sup>-HTNV 组相比, \**P*<0.01, \*\**P*<0.001, \*\*\**P*<0.0001; One-Way ANOVA。)

为明确 NEAT1-2 是否影响 HTNV 感染后 IFNβ 的产生, 本部分研究通过分别敲减或过表达 NEAT1-2, 检测其在不同感染条件下对 IFNβ 分泌的影响。在 HUVECs 中转染 St-NEAT1-2 特异性敲减 NEAT1-2, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV 并于 12hpi、24hpi 进行 qRT-PCR, 结果提示 St-NEAT1-2 组 IFNβ mRNA 表达量比 NC 组减少约 1/2 (*P*<0.01) (如图 1.15-A); 以 MOI=1 感染 HTNV 并于 24hpi、48hpi 进行 qRT-PCR, 结果提示 St-NEAT1-2 组 IFNβ mRNA 表达量比 NC 组减少一半以上 (*P*<0.01) (如图 1.15-B)。在 HUVECs 中转染 pCMV-NEAT1-2 特异性过表达 NEAT1-2, 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV 并于 0hpi、2hpi、6hpi、12hpi、24hpi、48hpi 进行

qRT-PCR, 结果显示与 Vector+HTNV 组相比, pCMV-NEAT1-2+HTNV 组 IFN $\beta$  mRNA 于 12hpi 显著上调 ( $P<0.0001$ ) (如图 1.15-C), 即与 HTNV 自然感染状态相比, 过表达 NEAT1-2 可提前诱导 IFN $\beta$  产生 (MOI=1, 自然感染下直至 24hpi 方可检测到 IFN $\beta$  mRNA 上调, 如图 1.14-A, 而过表达 NEAT1-2 后则可于 12hpi 可检测到 IFN $\beta$  mRNA 上调, 如图 1.15-C)。

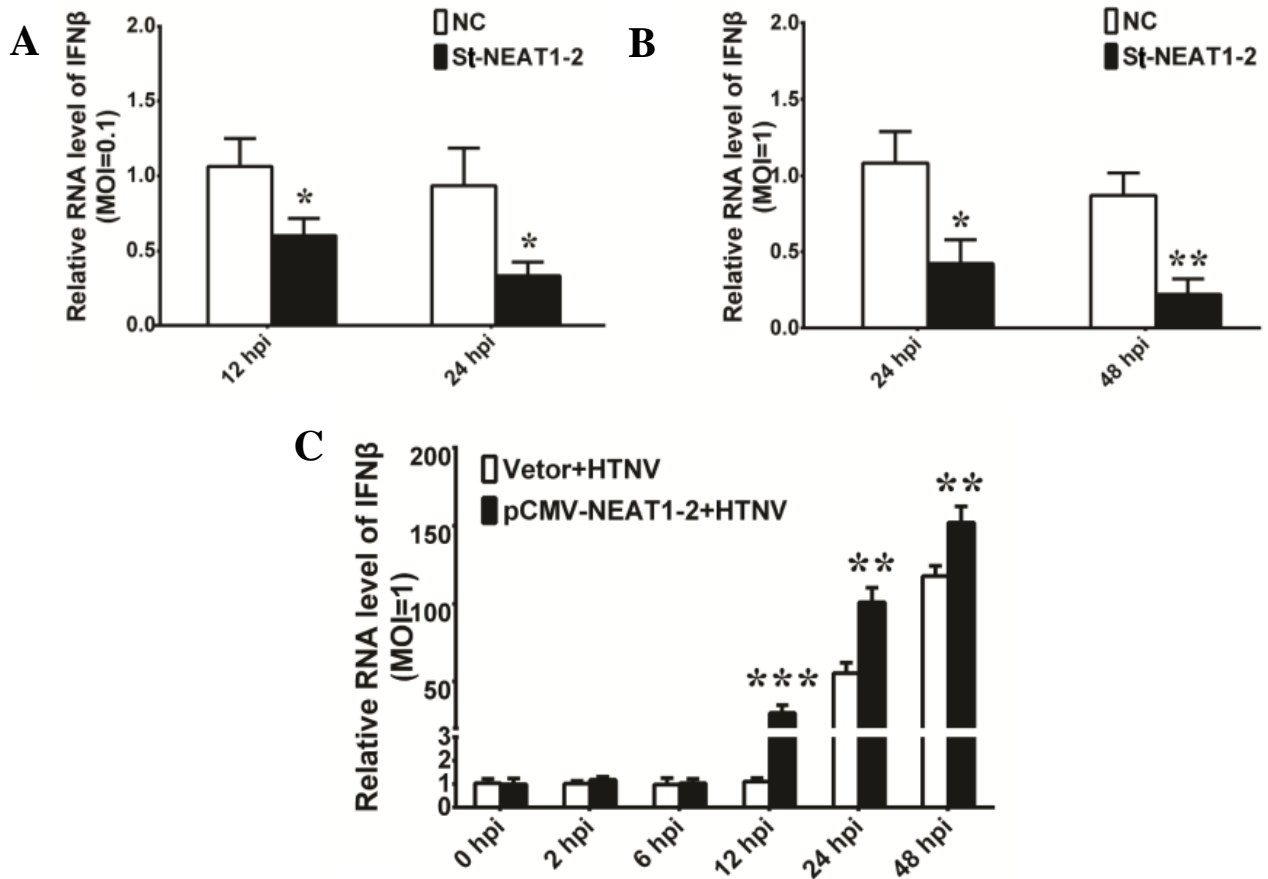


图 1.15 敲减或过表达 NEAT1-2 对 HTNV 感染后 IFN $\beta$  产生的影响

**Fig. 1.15** The effects of silencing or overexpressing NEAT1-2 on HTNV-induced IFN $\beta$  production

(A. 转染 St-NEAT1-2, 以 MOI=0.1 感染 HTNV, 在 12hpi、24hpi 检测 IFN $\beta$  mRNA; B. 转染 St-NEAT1-2, 以 MOI=1 感染 HTNV, 在 24hpi、48hpi 检测 IFN $\beta$  mRNA; C. 转染 pCMV-NEAT1-2, 以 MOI=0.1 感染 HTNV, 在 12hpi、24hpi 检测 IFN $\beta$  mRNA。)

为进一步证实 NEAT1-2 对 I 型 IFN 信号通路的正向调节作用, 本研究在 NEAT1-2 敲减或过表达条件下, 通过双荧光素报告体系检测 IFN $\beta$  启动子的活化情况。在 HUVECs 中转染含有 IFN $\beta$  启动子的双荧光素报告质粒, 同时转染 St-NEAT1-2 特异性敲减 NEAT1-2, NC 组转染对照 siRNA, 转染 72h 裂解细胞直接检测 IFN $\beta$  启动子



活化情况，或转染 24h 后以 MOI=5 感染 HTNV，48hpi 裂解细胞检测 IFN $\beta$  启动子活化情况。双荧光素报告结果提示与 NC+HTNV 组相比，St-NEAT1-2+HTNV 组 IFN $\beta$  启动子活性显著下降 ( $P<0.0001$ )，而与 NC 组相比，St-NEAT1-2 组 IFN $\beta$  启动子活性变化无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (如图 1.16)。在 HUVECs 转染含有 IFN $\beta$  启动子的双荧光素报告质粒，同时转染 pCMV-NEAT1-2 过表达 NEAT1-2，Vector 组转染对照质粒，转染 72h 裂解细胞直接检测 IFN $\beta$  启动子活化情况，或转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV，48hpi 裂解细胞检测 IFN $\beta$  启动子活化情况。双荧光素报告结果提示与 Vector+HTNV 组相比，pCMV-NEAT1-2+HTNV 组 IFN $\beta$  启动子活性显著增加 ( $P<0.0001$ )，而与 Vector 组相比，pCMV-NEAT1-2 组 IFN $\beta$  启动子活性变化无统计学意义 ( $P>0.05$ )。上述结果进一步证实 NEAT1-2 可正向调控 HTNV 诱导的 IFN $\beta$  转录表达；值得注意的是，单独过表达 NEAT1-2 而不感染 HTNV 并不能有效活化 IFN $\beta$  启动子 (如图 1.16)，提示 NEAT1-2 并非直接调控 IFN $\beta$  表达，其可能促进 I 型 IFN 信号通路上游分子的表达或活化间接影响 IFN $\beta$  的产生。

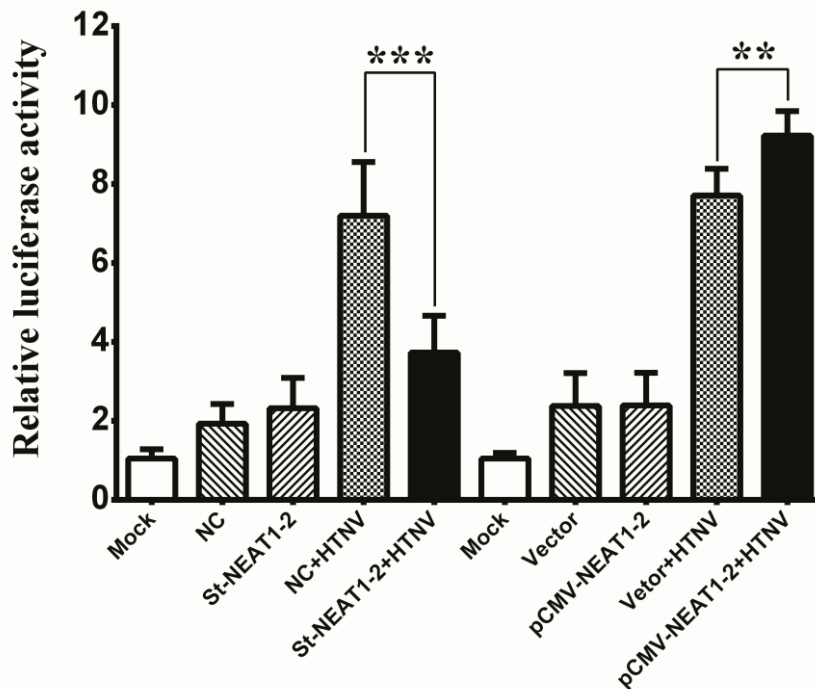


图 1.16 敲减或过表达 NEAT1-2 对 IFN $\beta$  启动子活性的影响

**Fig. 1.16 The effects of silencing or overexpressing NEAT1-2 on the activation of IFN $\beta$  promoter**

(在 HUVECs 中转染含有 IFN $\beta$  启动子的双荧光素报告质粒，同时转染 St-NEAT1-2 或 pCMV-NEAT1-2，平行设置 NC 组或 Vector 组作为对照，非 HTNV 感染组于转染后 72h，HTNV

感染组于 48hpi 检测相对荧光强度。与 NC 组或 Vector 组相比, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ; Student's  $t$  检验。)

上述实验初步明确了 NEAT1-2 对 IFN $\beta$  产生的促进作用, 且有研究表明感染早期 IFN $\beta$  处理细胞可有效抑制 HTNV 感染<sup>[5]</sup>, 提示 NEAT1-2 抗 HTNV 感染的分子机制很可能与 NEAT1-2 对 IFN $\beta$  的调控作用有关。为进一步证实 NEAT1-2 通过活化 I 型 IFN 信号通路参与宿主抗 HTNV 固有免疫应答, 我们通过 NEAT1-2 敲减状态下补偿 IFN $\beta$ , 或在 NEAT1-2 过表达状态下使用 IFN $\beta$  中和抗体封闭 IFN $\beta$  作用, 之后检测 HTNV 复制情况。在 HUVCEs 中转染 St-NEAT1-2 特异性敲减 NEAT1-2, 在转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV 并于 12hpi 加入不同浓度的 IFN $\beta$ , 48hpi 提取蛋白进行 Western Blot 检测 HTNV NP 表达, 结果提示在 NEAT1-2 敲减状态下补偿 IFN $\beta$  可有效抑制 HTNV 复制, 且其抑制作用与 IFN $\beta$  浓度呈正相关 (如图 1.17)。

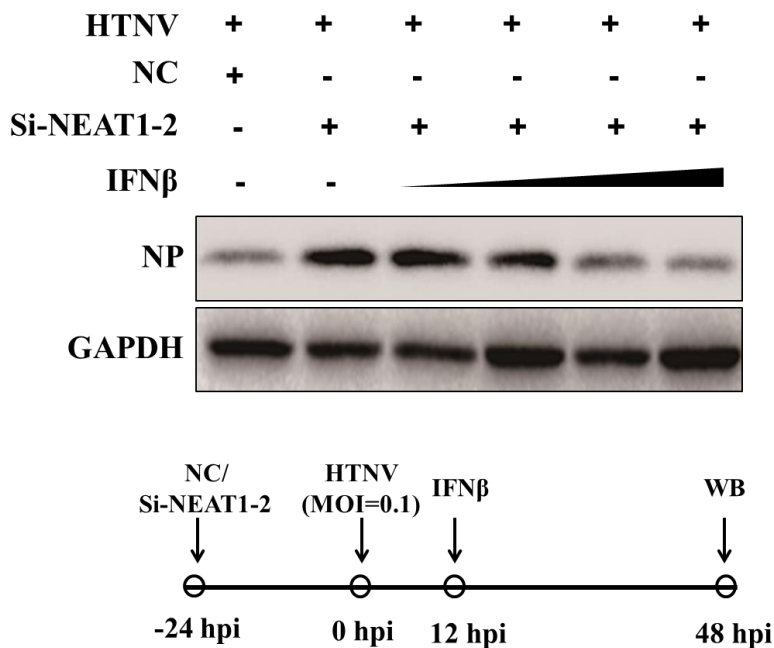


图 1.17 敲减 NEAT1-2 条件下补偿 IFN $\beta$  可抑制 HTNV 复制

**Fig. 1.17 Compensating IFN $\beta$  with NEAT1-2 knockdown could inhibit HTNV replication**

(在 HUVCEs 中转染 St-NEAT1-2, 在转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV 并于 12hpi 加入浓度梯度递增的 IFN $\beta$ , 48hpi 提取蛋白进行 Western Blot 检测 HTNV NP 表达。)

相应地, 在 HUVCEs 中转染 pCMV-NEAT1-2 过表达 NEAT1-2, 在转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV 并于 12hpi 加入不同浓度的 IFN $\beta$  中和抗体, 48hpi 提取蛋白进行



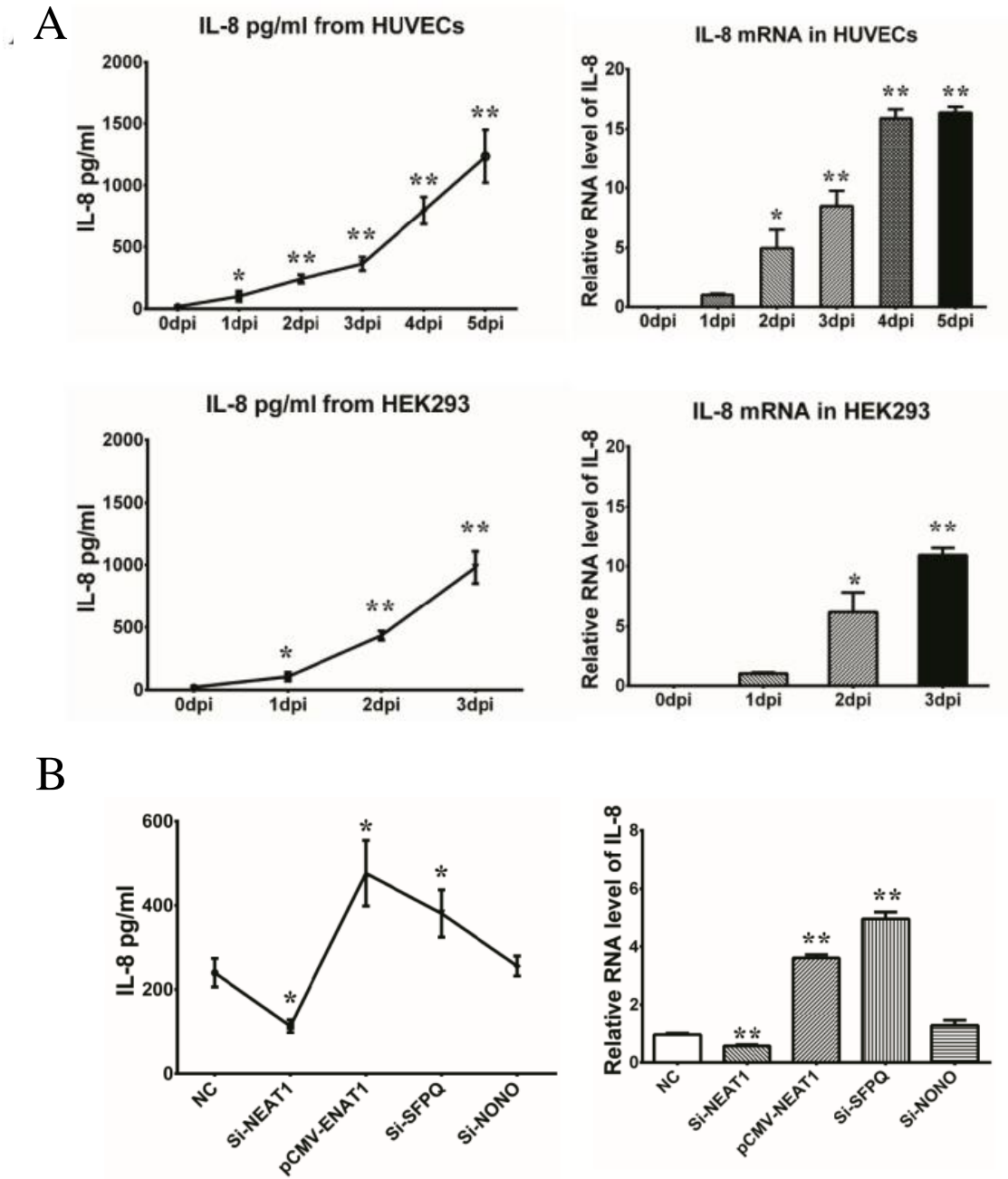


图 1.19 NEAT1 正向调控 HTNV 感染后 IL-8 表达

Fig. 1.19 NEAT1 promotes IL-8 expression post HTNV infection

(A. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs 或 HEK293 细胞, 在不同时间点通过 ELISA 或 qRT-PCR 分别检测细胞上清 IL-8 浓度及细胞内 IL-8 mRNA 表达水平; 与 0dpi 相比, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ; Student's *t* 检验。B. 在 HUVECs 中转染 Si-NEAT1、Si-SFPQ、Si-NONO 或 pCMV-NEAT1-1+pCMV-NEAT1-2, 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 在 3dpi 通过 ELISA 或 qRT-PCR 分别检测细胞上清 IL-8 浓度及细胞内 IL-8 mRNA 表达水平; 与 NC 组相比, \* $P < 0.01$ ,

\*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ; One-Way ANOVA.)

类似地, HTNV 感染 HUVECs 及 HEK293 细胞可诱导其分泌 CCL5, 且 CCL5 分泌量随感染时间延长而增加 (如图 1.20-A)。在 HUVECs 中敲减 NEAT1 可抑制 CCL5 mRNA 表达及 CCL5 分泌, 过表达 NEAT1 可促进 CCL5 产生, 而敲减 SFPQ 或 NONO 不影响 CCL5 表达 (如图 1.20-B)。

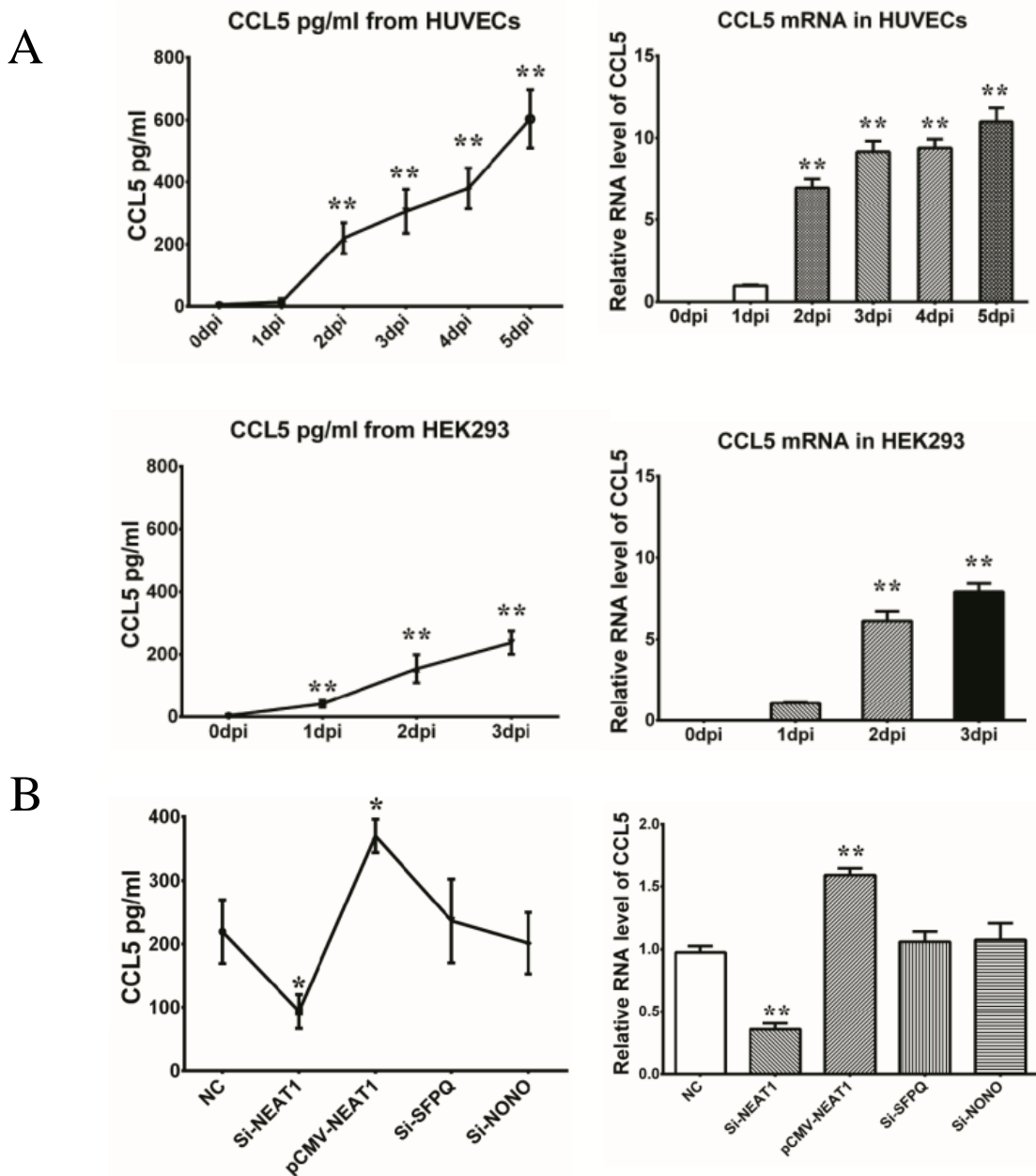


图 1.20 NEAT1 正向调控 HTNV 感染后 CCL5 表达

Fig. 1.20 NEAT1 promotes CCL5 expression post HTNV infection

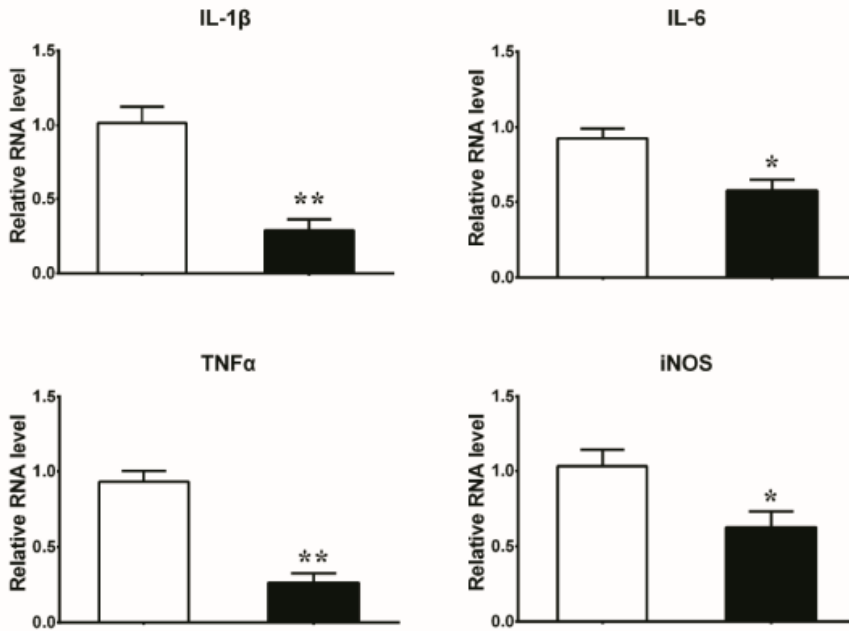
(A. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs 或 HEK293 细胞, 在不同时间点通过 ELISA 或 qRT-PCR 分

别检测细胞上清 CCL5 浓度及细胞内 CCL5 mRNA 表达水平; 与 0dpi 相比,  $*P<0.01$ ,  $**P<0.001$ ,  $***P<0.0001$ ; Student's *t* 检验。B. 在 HUVECs 中转染 Si-NEAT1、Si-SFPQ、Si-NONO 或 pCMV-NEAT1-1+pCMV-NEAT1-2, 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 在 3dpi 通过 ELISA 或 qRT-PCR 分别检测细胞上清 CCL5 浓度及细胞内 CCL5 mRNA 表达水平; 与 NC 组相比,  $*P<0.01$ ,  $**P<0.001$ ,  $***P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。)

收集 NC+HTNV 组及 Si-NEAT1+HTNV 组上清并用其刺激 THP-1 细胞, 刺激 48h 后通过 qRT-PCR 检测巨噬细胞 M1 极化及 M2 极化情况, 结果提示与 NC+HTNV 组上清相比, Si-NEAT1+HTNV 组上清刺激 THP-1 后可下调 THP-1 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 、iNOS 等分子 mRNA 表达 (如图 1.21-A), 而 IL-10、Arg-1、Ym-1、CD206 等分子 mRNA 表达水平变化无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (如图 1.21-B), 提示 NEAT1 敲减后的细胞上清不能有效诱导 M1 极化, 但并不影响 M2 极化。上述实验结果提示 NEAT1 不仅可以激活 IFN 信号通路, 还可通过正向调控 HTNV 感染后 IL-8、CCL5 等细胞因子产生, 进而促进 M1 活化, 辅助机体清除 HTNV。值得注意的是, HTNV 感染后 IL-8 的产生与 SFPQ 有关, 而 CCL5 的产生则不受 SFPQ 及 NONO 等核旁斑组成蛋白的影响。

A

□ NC+HTNV supernatant  
 ■ Si-NEAT1+HTNV supernatant



B

□ NC+HTNV supernatant  
 ■ Si-NEAT1+HTNV supernatant

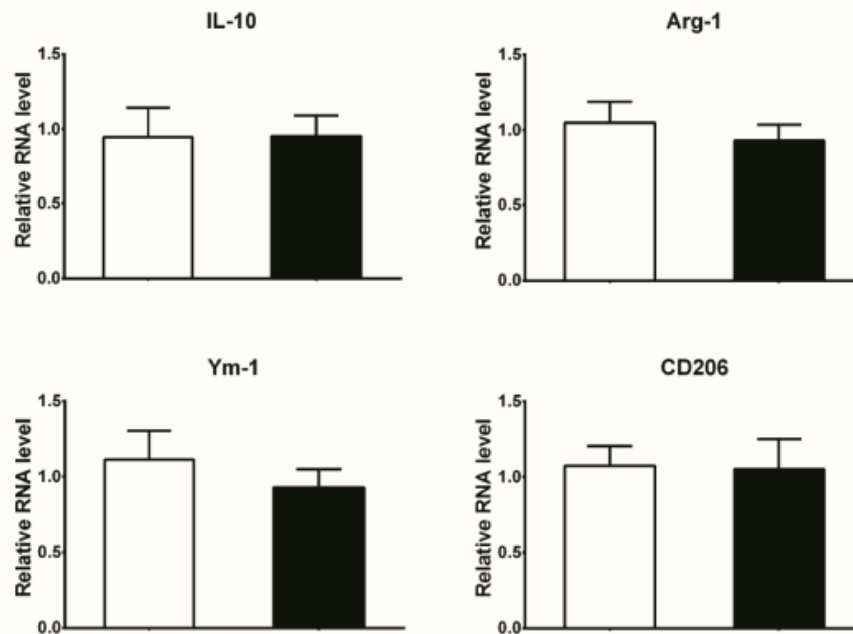


图 1.21 HTNV 感染后 NEAT1 表达与 M1 极化关系密切

Fig. 1.21 NEAT1 induced by HTNV infection was related with M1 polarization

(于 3dpi 收集 NC+HTNV 组及 Si-NEAT1+HTNV 组 HUVECs 的细胞上清, 使用等量的上清刺激 THP-1 细胞, 刺激 48h 后通过 qRT-PCR 检测不同分子 mRNA 变化。与 NC+HTNV 组上清刺激组相比,  $*P<0.01$ ,  $**P<0.001$ ,  $***P<0.0001$ ; Student's *t* 检验。A. qRT-PCR 检测 L-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 、iNOS 等分子 mRNA 表达; B. qRT-PCR 检测 IL-10、Arg-1、Ym-1、CD206 等分子 mRNA 表达。)

### 3.6 体内敲减 NEAT1-2 可在 HTNV 感染早期抑制机体 IFN 产生并加重 HTNV 感染

体外细胞实验结果提示 NEAT1-2 通过促进 IFN $\beta$ 、IL-8、CCL8 等细胞因子可增强抗 HTNV 的固有免疫应答, 但 NEAT1-2 在体内的抗病毒作用有待进一步证实。由于 HTNV 目前尚无疾病动物模型, 仅有感染动物模型, 因此本部分实验通过在 C57BL/6J 小鼠体内敲减 NEAT1-2, 检测 HTNV 感染后小鼠体内病毒复制水平、各脏器病理损伤情况等指标, 来探索 NEAT1-2 在体内的抗病毒作用及相关分子机制。通过尾静脉注射 Si-NEAT1-2 (小鼠每 g 体重注射 1  $\mu$ g siRNA), 2 天后肌肉注射 HTNV (1000TCID<sub>50</sub>) 400  $\mu$ l, HTNV 攻毒后每隔 2d 加强注射 Si-NEAT1-2 一次。尾静脉注射 Scrambled siRNA 作为对照。通过 qRT-PCR 检测 3dpi 各组小鼠肝、脾、肾脏等脏器中 NEAT1 及 NEAT1-2 表达水平, 结果显示与 PBS 组相比, PBS+HTNV 组及 NC+HTNV 组中上述脏器中 NEAT1 及 NEAT1-2 表达均上调; 与 NC+HTNV 组相比, Si-NEAT1-2+HTNV 组 NEAT1-2 表达下调, 提示尾静脉注射 Si-NEAT1-2 可在体内特异敲减 NEAT1-2 (如图 1.22)。

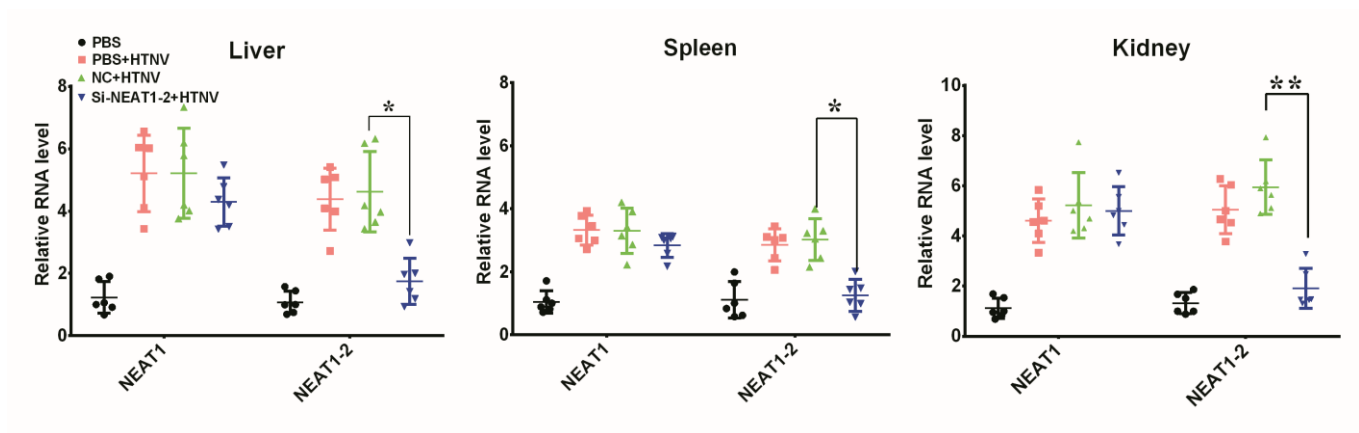


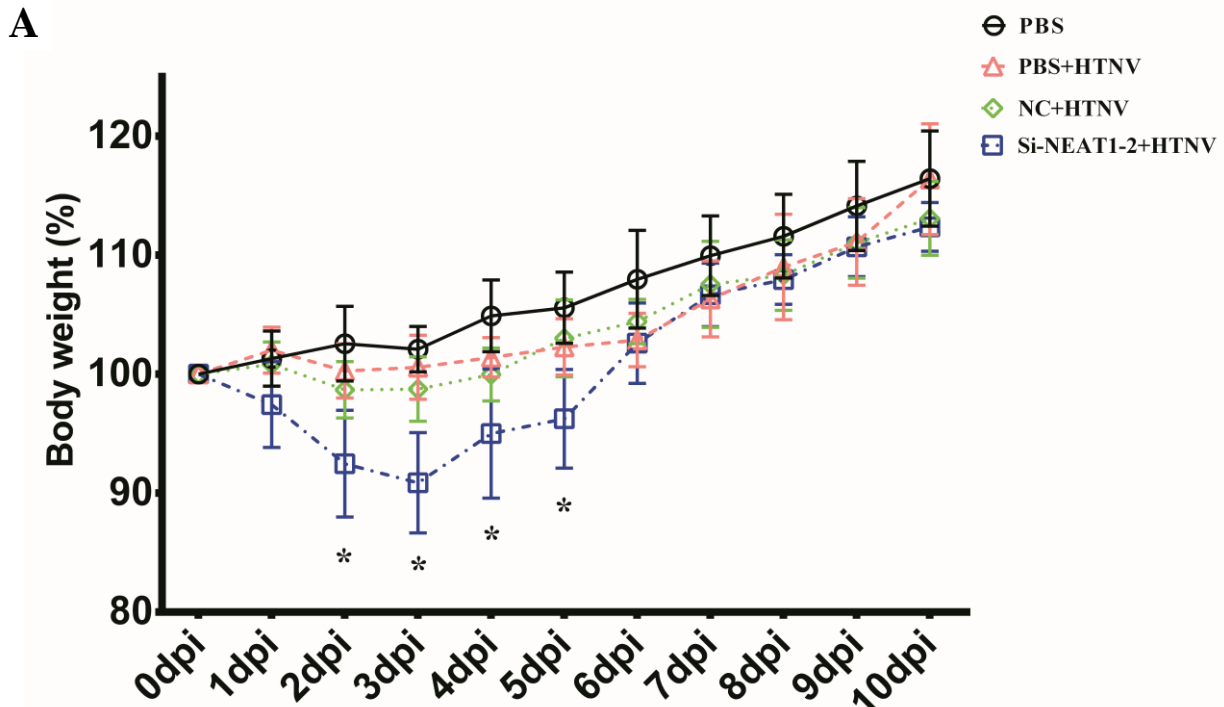
图 1.22 尾静脉注射 siNEAT1-2 后各脏器 NEAT1-2 表达水平

Fig. 1.22 NEAT1-2 expression as measured by qRT-PCR after intravenously injecting Si-NEAT1-2



(将 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组, Si-NEAT1+HTNV 组尾静脉注射 Si-NEAT1, 每 2 天加强一次, 且在首次注射后第 2 天进行 HTNV 攻毒实验; NC+HTNV 组注射 Scrambled siRNA, PBS+HTNV 组、PBS 组均注射 PBS 作为阴性对照; NC+HTNV 组及 PBS+HTNV 组感染同等剂量 HTNV, PBS 组注射同等量 PBS 作为阴性对照。\* $P<0.01$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。下同。在 3dpi 脱臼处死小鼠取肝、脾、肾, 研磨后提取 RNA 进行 qRT-PCR 检测各组 NEAT1 及 NEAT1-2 表达情况,  $n=6$ 。)

与 PBS 组相比, PBS+HTNV 组 C57BL/6J 小鼠在 HTNV 攻毒后 10d 内体重并无降低 (如图 1.23-A), 且 3dpi 可在 PBS+HTNV 组中检测出 IFN $\beta$  浓度显著升高 (如图 1.23-B), 提示 HTNV 自然感染可有效诱导 C57BL/6J 小鼠 I 型干扰素应答, HTNV 并不影响小鼠生理功能; 而与 NC+HTNV 组相比, Si-NEAT1-2+HTNV 组 C57BL/6J 小鼠在 2dpi、3dpi、4dpi 及 5dpi 出现一过性体重下降 ( $P<0.01$ ) (如图 1.23-A), 且在 3dpi 取小鼠外周血, ELISA 检测 IFN $\beta$  浓度, 结果显示 Si-NEAT1-2+ HTNV 组 IFN $\beta$  浓度明显降低 ( $P<0.001$ ) (如图 1.23-B), 提示体内敲减 NEAT1-2 可抑制 HTNV 感染后 IFN $\beta$  的产生, 且可影响小鼠正常生理功能, 导致小鼠体重下降。



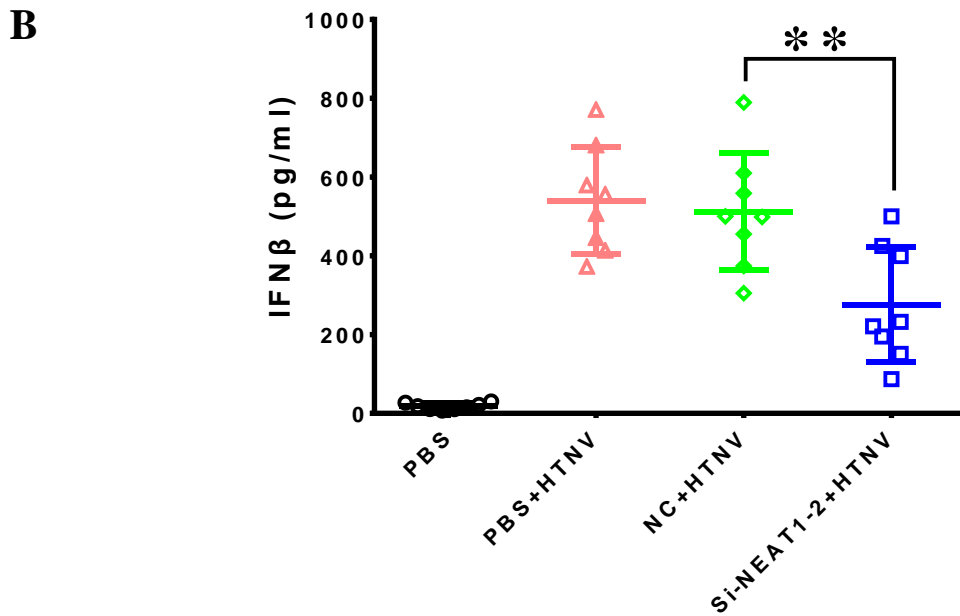


图 1.23 HTNV 攻毒后各组小鼠体重变化 (A) 及外周血 IFN $\beta$  产生量 (B)

Fig. 1.23 The body weight change (A) and serum IFN $\beta$  production (B) of different groups

(A. 观察 HTNV 攻毒后不同组小鼠体重变化, n=10; B. 在 3dpi 通过眼球取血方式获得各组小鼠外周血, 通过 ELISA 法检测 IFN $\beta$  浓度, n=8。)

为进一步检测 NEAT1-2 敲减后 HTNV 在 C57BL/6J 各脏器中感染复制及子代病毒产生情况, 在 3dpi 取小鼠肝、脾、肾等脏器, 分别通过 ELISA 及 qRT-PCR 法检测 HTNV NP 的表达情况及 HTNV S 片段的复制情况, 结果提示与 NC+HTNV 组相比, Si-NEAT1-2+HTNV 组各脏器中 HTNV 的复制水平均有不同程度的升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ) (如图 1.24-A); 值得注意的是, 与 PBS 组相比, PBS+HTNV 组的肾脏中几乎检测不出 HTNV 复制, 提示 HTNV 感染正常 C57BL/6J 后并不在小鼠肾脏中复制增殖, 而在 Si-NEAT1-2+HTNV 组 C57BL/6J 小鼠的肾脏中可检出 HTNV NP 及 HTNV S 片段表达, 提示 HTNV 可在 NEAT1-2 敲减小鼠的肾脏中复制增殖 (如图 1.24-B)。将各组小鼠的脏器研磨后反复冻融 3 次, 取上清感染 Vero-E6 细胞, 按照前述方法计算 HTNV 滴度, 结果显示与 NC+HTNV 组相比, Si-NEAT1-2+HTNV 组各脏器中 HTNV 滴度均显著升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ) (如图 1.14-C)。上述实验结果提示在体内敲减 NEAT1-2 可促进 HTNV 在肝、脾、肾等脏器中增殖。

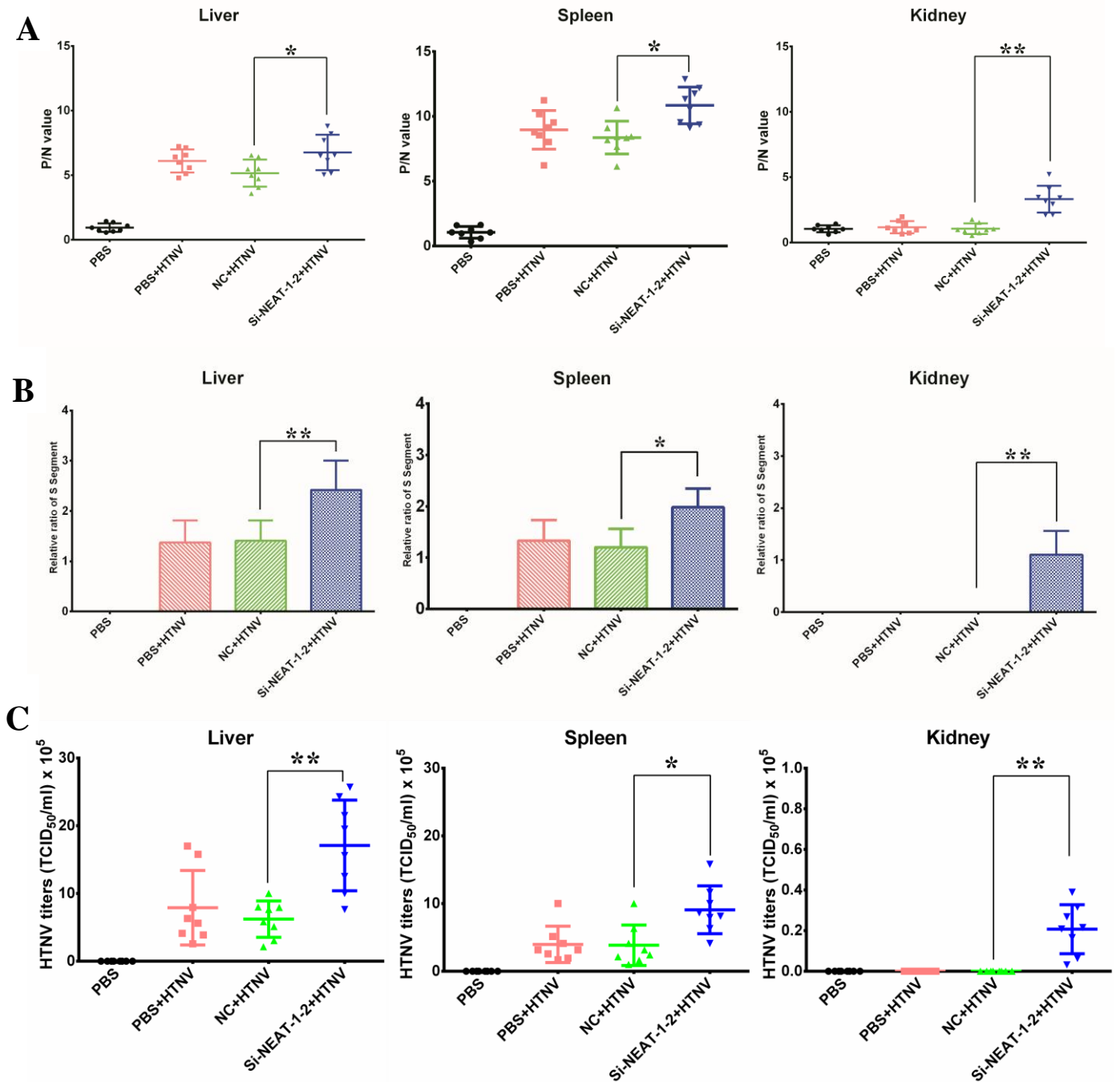


图 1.24 各组小鼠肝、脾、肾等脏器病毒复制水平及病毒滴度

Fig. 1.24 The HTNV replication and viral titer in livers, spleens and kidneys of different groups

( A-B. 在 3dpi 脱白处死小鼠取肝、脾、肾，研磨后收集上清或提取 RNA，进行 ELISA (A) 或 qRT-PCR (B)，分别检测各组 HTNV NP 表达情况或 HTNV S 片段转录情况，n=8。C. 在 3dpi 脱白处死小鼠取肝、脾、肾，研磨后收集上清感染 Vero-E6 细胞，按前述方法检测 HTNV 病毒滴度，n=8。)

感染早期炎症细胞的浸润及活化在机体识别并清除 HTNV 过程中发挥重要作用。上述各组小鼠脏器 HE 染色结果提示，与 PBS 组相比，3dpi NC+HTNV 组肝、肾等脏器均有不同程度的炎症细胞浸润，脾脏中淋巴小结增生（如图 1.25 中 NC+HTNV 组箭头所示），而 Si-NEAT1-2+HTNV 组各脏器未见明显的炎症细胞浸润，但可见典型的病毒性感染、脾脏出血、肾细胞凋亡坏死等病理表现（如图 1.25 中 Si-NEAT1-2+HTNV 组箭头所示），提示体内敲减 NEAT1-2 抑制了 HTNV 感染所致的炎性细胞浸润与活化，进而加重了 HTNV 感染初期各脏器的病理损伤。

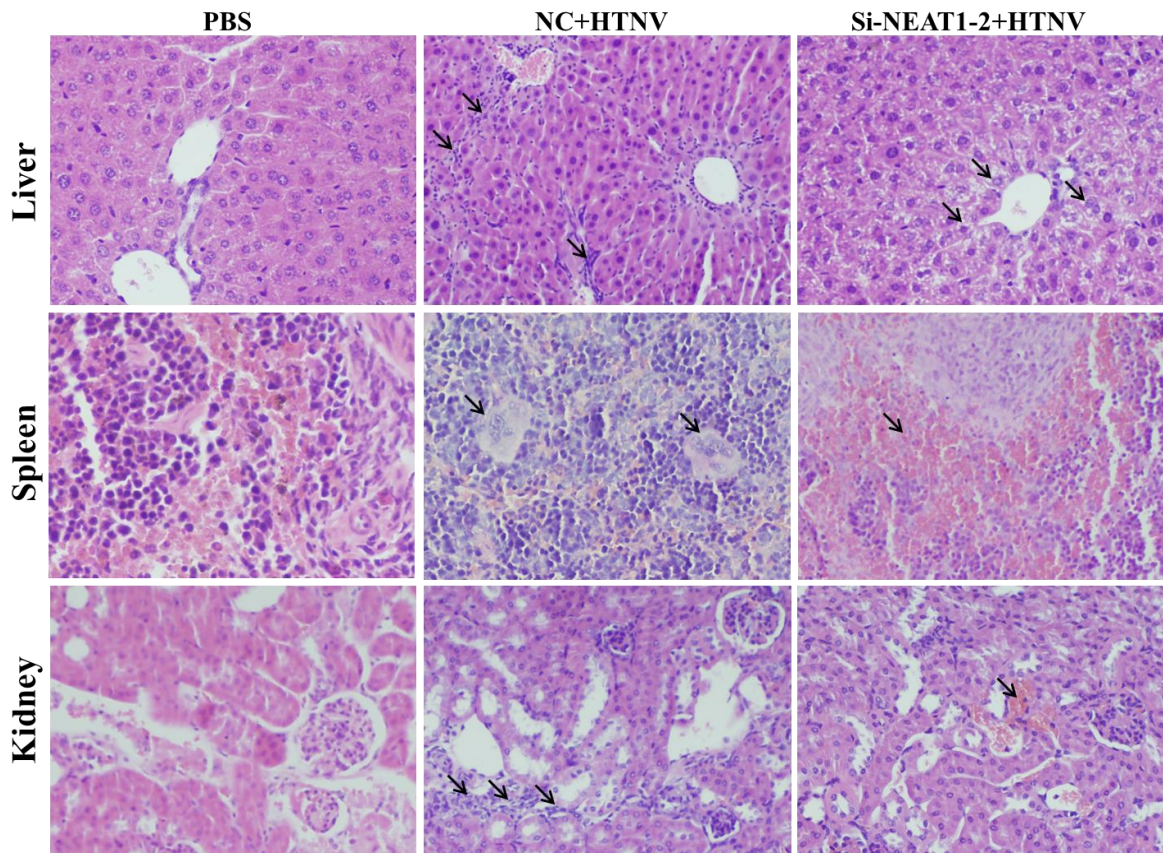


图 1.25 各组小鼠肝、脾、肾等脏器 HE 染色结果

Fig. 1.25 The HE staining results of different groups

（在 3dpi 脱白处死小鼠，取肝、脾、肾，切片石蜡固定后进行 HE 染色，；400×）。

通过流式细胞技术检测各组小鼠脾脏中  $CD11b^+F4/80^+$  的  $M\phi$  浸润情况，结果显示，与 PBS 组脾脏中  $M\phi$  数目（3.03%、3.6%、3.09%、4.97%）相比，NC+HTNV 组  $M\phi$  数目明显增多（7.84%、9.6%、13.2%、10.9%），而 Si-NEAT1-2+HTNV 组未见明显  $M\phi$  浸润（5.59%、6.59%、5.56%、4.26%）（如图 1.26）。

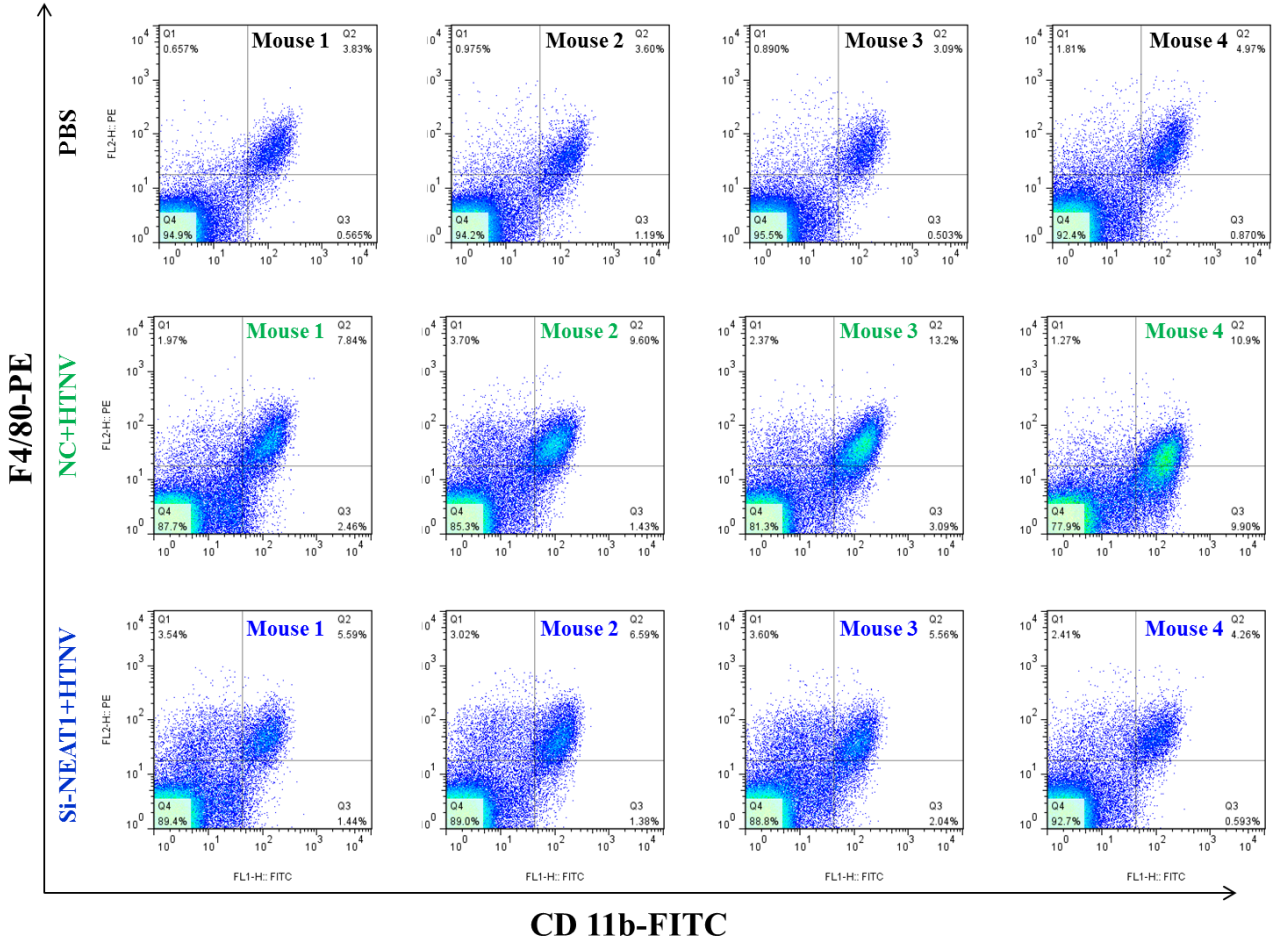


图 1.26 各组小鼠脾脏巨噬细胞浸润情况

Fig. 1.26 The macrophage filtration in spleens of different groups

（在 3dpi 脱臼处死小鼠取脾脏，研磨成单细胞悬液通过流式细胞技术计数 10 万细胞，计算  $CD11b^+F4/80^+$   $M\phi$  的数目）

进一步研究发现，与 PBS 组脾脏中  $CD8^+IFN\gamma^+$  的 T 细胞数目（1.49%、1.94%、1.36%）相比，NC+HTNV 组 T 细胞活化数目明显增多（3.36%、5.84%、11.6%），而 Si-NEAT1-2+HTNV 组活化 T 细胞数增加并不明显（2.27%、2.57%、2.33%）（如图 1.27）。上述结果提示体内敲减 NEAT1-2 可能影响 HTNV 感染后  $M\phi$  及 T 细胞的活化过程。

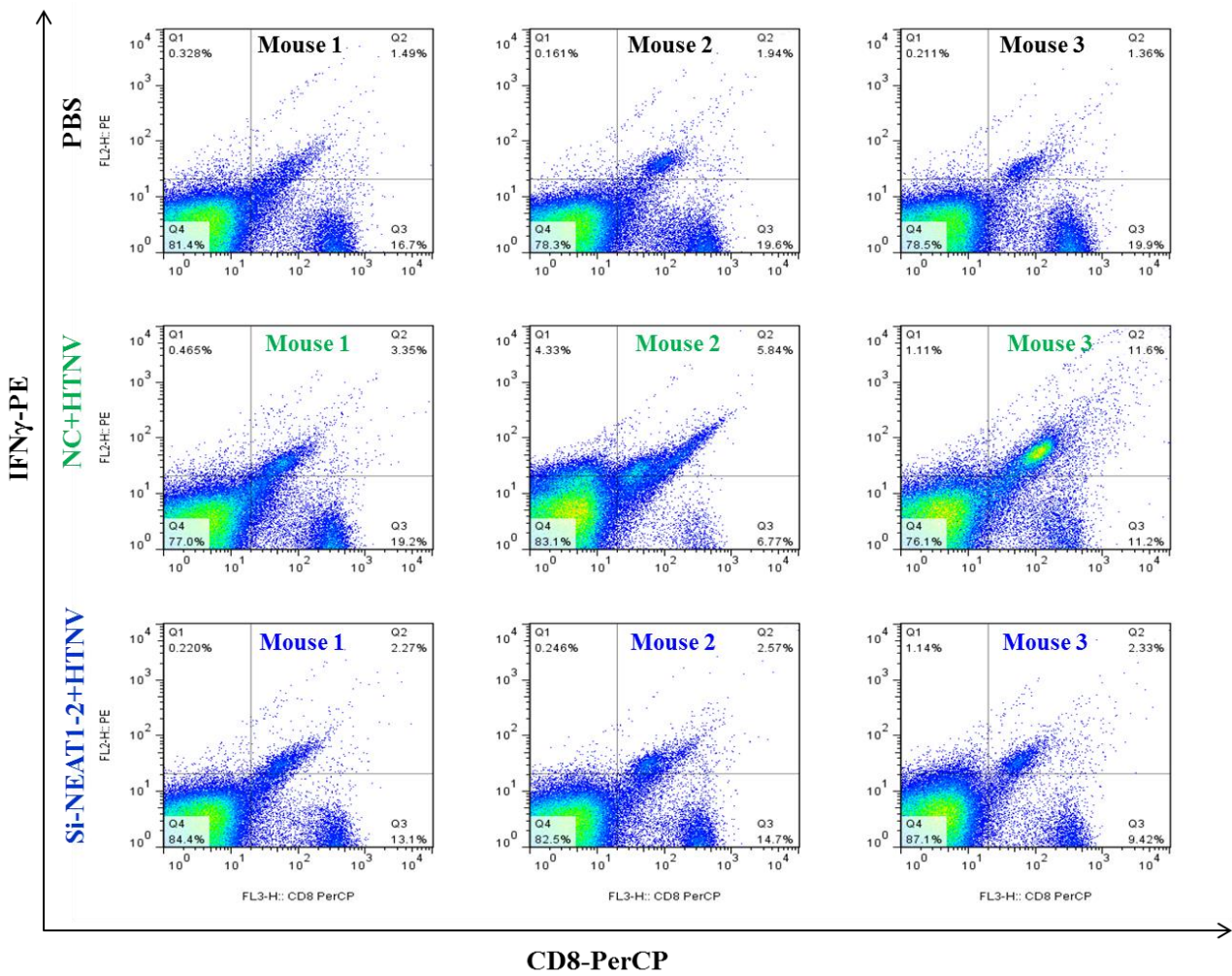


图 1.27 各组小鼠脾脏 CD8<sup>+</sup>T 细胞活化情况

Fig 1.27 The activated CD8<sup>+</sup> T cell in spleens of different groups

(在 3dpi 脱臼处死小鼠取脾脏，研磨成单细胞悬液通过流式细胞技术计数 10 万细胞，计算 CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞的数目)

## 4 讨论

在病毒-宿主相互作用的过程中，宿主细胞产生的以 I 型 IFN 信号通路为核心的固有免疫应答是机体抵御病毒感染的首要环节。近期研究表明 lncRNA 对多种固有免疫分子的表达起到关键的调节作用，但尚无研究报道 lncRNA 在 HTNV 感染过程中的作用。因此，本研究以目前公认的 HTNV 靶细胞 HUVECs 为研究对象，通过 DGE 测序技术分析 HTNV 感染后宿主细胞 lncRNA 表达谱变化，并利用 HTNV 的细胞和动物模型，初步明确了 lncRNA NEAT1 正向调控 IFN 信号通路、促进机体抗 HTNV

固有免疫反应的作用。

在病毒-宿主相互作用的研究中，合适的细胞模型及动物模型是研究病毒-宿主相互作用的基础。病毒在吸附过程中需要特定受体，故不同病毒易感细胞不同。在体外细胞实验筛选获得的具有潜在抗/促病毒感染功能的分子需要进一步在体内动物实验中进行验证，因此还需要有适合动物模型。

## 4.1 汉坦病毒研究模型

### 4.1.1 汉坦病毒体外细胞模型

已有研究表明致病性汉坦病毒的受体为  $\alpha_v\beta_3$ ，其在体内感染的靶细胞是血管内皮细胞，经由 Mo 扩散至机体全身<sup>[111]</sup>，提示内皮细胞、Mo-M $\phi$  等是较为理想的体外细胞感染模型。同时亦有研究报道 Huh7<sup>[124]</sup>等细胞系可被汉坦病毒感染，提示汉坦病毒具有广泛嗜性。

#### ① 已报道的细胞模型

目前在汉坦病毒感染研究领域应用最为广泛、最为认可的细胞是血管内皮细胞。以血管内皮细胞（如 HUVECs、EVC 等）为研究对象，通过内皮细胞迁移实验、VEGF 分泌实验、内皮细胞通透性实验等，可研究 HTNV 感染导致血管渗漏的分子机制。Gorbunova EE 等<sup>[133]</sup>研究发现 ANDV 体外感染微血管内皮细胞（microvascular endothelial cells, MECs）后，其产生的 NP 可选择性结合结节硬化症相关复合物（tuberous sclerosis complex, TSC）TSC2/TSC1/TBC1D7 中的 TSC2，解除内源性 TSC2 对 Rheb-mTOR-pS6K 通路的抑制作用，进而激活 GTP 酶 RhoA，促进细胞形变，导致 MECs 通透性增加。张宇丝等<sup>[8]</sup>研究发现 HTNV 感染 HUVECs 后可激活 TLR3、RIG-I 及 MDA5 信号通路，促进 CXCL10 表达分泌，与 HFRS 疾病发生及病情进展关系密切。

除血管内皮细胞外，Markotić A 等<sup>[134]</sup>研究还发现汉坦病毒体外感染 HEK293（人胚肾细胞）后可产生细胞病变，诱导细胞凋亡。尽管 HUVECs、HEK293 是体外研究汉坦病毒与宿主细胞相互作用的理想细胞模型，但由于其属于原代细胞，分离、培养条件较为严格，且其传代次数有限、转染效率低，故其应用受到很大限制。多项研究表明汉坦病毒具有广泛嗜性，即其在体外可感染 A549（人肺腺癌细胞）、Huh7（人肝癌细胞）、HaCaT（人皮肤角质细胞永生化细胞系）等多种细胞系。Handke W

等<sup>[112]</sup>研究发现 HTNV 感染 A549 后激活 TLR3 信号通路诱导 I 型 IFN 产生, 促进 MxA 等 ISG 分子表达。Min-Hi Lee 等<sup>[124]</sup>发现在 Huh7.5 中过表达 RIG-I 可显著抑制 HTNV 的感染复制。本课题组前期研究也发现 HTNV 可感染 HaCaT 细胞并诱导 TLR3、RIG-I、MDA5 等 PRR 分子上调, 转录因子 IRF3 入核促进 IFN $\beta$  表达<sup>[9]</sup>。

本课题组前期研究发现 HTNV 感染 THP-1 (人源 Mo) 可通过活化 NLRP3 炎症小体诱导 IL-1 $\beta$  产生, 参与 HFRS 发病过程<sup>[135]</sup>; 而 Markotić A 等<sup>[136]</sup>研究发现 THP-1 及人原代 Mo/M $\phi$  感染汉坦病毒后可产生不同的免疫应答, THP-1 主要分泌  $\alpha$  亚家族 (CXC) 趋化因子及相应受体, 而人原代 Mo/M $\phi$  则主要分泌  $\beta$  亚家族 (CC) 趋化因子及相应受体, 提示 THP-1 并不能模拟汉坦病毒感染后 Mo/M $\phi$  所产生的免疫应答, 即 THP-1 是否能作为 HTNV 体外细胞感染模型尚存在争议。

## ② 本研究所用细胞模型

本部分研究以 HUVECs 为主要研究对象, 而 HUVECs 作为原代细胞其转染效率极低, 在实验初期我们尝试通过脂质体转染等技术转染 siRNA 或者质粒, 转染效率均低于 20%。虽然目前研究多使用慢病毒感染的方式在 HUVECs 中对相应基因进行敲减或过表达, 但是慢病毒质粒构建、病毒包装、滴度检测等步骤繁琐、准备周期长且费用昂贵, 难以大规模应用。同时, 本研究所关注的 lncRNA NEAT1-2 分子长达 23kb, 不能直接包装慢病毒。经过多次摸索, 我们发现利用 Ionza 电转技术可大幅度提高 siRNA 及质粒在 HUVECs 中的转染效率, 且该方法操作简单、准备时间短、价格便宜, 可应用于本研究实验。

同时, 我们通过 IFA、qRT-PCR、ELISA 等实验证实 HTNV 可感染 HEK293、A549、HeLa 等多种细胞系, 复制并产生具有感染能力的子代病毒, 为后续实验奠定了基础。值得注意的是, HTNV NP 在不同细胞中分布不同, 其在原代细胞 HUVECs 及 HEK293 中主要分布于核周, 且多偏居于核旁的一侧, 有部分 NP 在胞浆呈散在的点状分布; 而 HTNV NP 在细胞系 A549 及 HeLa 中则散在分布于整个细胞胞浆 (如图 1.5-A), 其原因可能与原代、传代细胞中内质网分布不同有关。

### 4.1.2 汉坦病毒体内动物模型

病毒感染的动物模型分为两大类, 即感染模型和疾病模型。某种动物可自然或人工感染某病毒, 可发病甚至死亡, 但动物所发病时的症状与人不同, 称为某病毒的



感染模型。HTNV 等病毒感染成年 C57BL/6J 小鼠并不能引起明显的临床表现, 仅可在肝脏、脾脏等脏器中检测到病毒蛋白的一过性表达, 小鼠不发病亦不死亡<sup>[137]</sup>, 此类病毒动物模型为感染动物模型。若某种动物可自然或人工感染某病毒, 感染后发病甚至死亡, 且发病时的症状与人相同, 则称为某病毒的疾病模型。如流感病毒可通过气溶胶、腹腔注射等方式感染 C57BL/6J 小鼠, 小鼠发病并死亡, 发病时有病毒性肺炎的症状<sup>[76]</sup>, 此类病毒动物模型为疾病动物模型。

### ① 新大陆汉坦病毒的动物模型

汉坦病毒是布尼亚病毒目各病毒科中唯一的非虫媒传播病毒, 其在自然界中主要以隐性感染的方式存在于啮齿类动物, 通过平行传播和垂直传播两种方式在啮齿类动物中传播扩散, 人类进入自然疫源地后接触含汉坦病毒的动物排泄物而感染发病<sup>[138]</sup>。新大陆汉坦病毒包括 ANDV、SNV 等超过 15 种病毒, 主要分布于美洲大陆, 所致疾病为 HPS<sup>[138]</sup>。Hooper 等<sup>[139; 140]</sup>首次报道叙利亚黄金仓鼠 (Syrian golden hamsters) 对 ANDV 易感, 感染方式包括皮下/肌肉注射、腹腔/静脉注射、鼻腔内气溶胶感染等; 进一步研究表明 ANDV 感染后仓鼠表现为呼吸困难、肺水肿、低血压休克等, 与人类 HPS 临床表现类似, 故 ANDV 感染叙利亚黄金仓鼠为疾病动物模型<sup>[141; 142]</sup>。然而, SNV 感染仓鼠后则无上述临床表现, 亦无病毒血症, 提示 SNV 尚无相应的疾病动物模型<sup>[141]</sup>。但研究发现提前使用免疫抑制剂如环磷酰胺等处理仓鼠, 或在联合重症免疫缺陷 (severe combined immune deficiency, SCID) 小鼠中, SNV 感染可诱导 HPS 样的表现并导致小鼠死亡, 但是在免疫抑制或者免疫缺陷的动物中无法评价病毒疫苗的效价及抗病毒药物的疗效, 故上述两种 SNV 疾病动物模型的应用价值有限<sup>[143]</sup>。

### ② 旧大陆汉坦病毒的动物模型

不同于 ANDV 等新大陆汉坦病毒, PUUV、HTNV、SEOV 等旧大陆汉坦病毒主要分布于亚欧大陆, 感染所致疾病为 HFRS。目前尚无旧大陆汉坦病毒感染啮齿类动物的疾病动物模型, 仅存在相应的感染模型<sup>[138]</sup>。虽然有研究证实 HTNV 可感染乳鼠并致乳鼠死亡, 但是乳鼠死因是神经系统病变 (表现为下肢瘫痪、角弓反张等) 而非 HFRS 的临床表现<sup>[144]</sup>。还有研究表明, HTNV 或 SEOV 均可感染 SCID 小鼠并致其死亡<sup>[145]</sup>, 但其在疫苗及抗病毒药物研究领域的应用价值有限。值得注意的是, 食蟹猴感染 PUUV 后可有类似于轻型 HFRS 的临床表现<sup>[146]</sup>; 利用该动物模型,

Klingstrom J 等<sup>[147]</sup>进行了被动免疫在 PUUV 感染过程中的相关研究。但是，灵长类动物不易获取，且其饲养及后期管理需到大量的人力、物力及财力，其在实验研究中难以推广。

### ③ 本研究所用动物模型

目前尚无 HTNV 感染啮齿类动物的疾病动物模型，仅存在相应的感染模型<sup>[138]</sup>。本研究在细胞层次初步证实 lncRNA NEAT1 的抗 HTNV 作用后，利用 siRNA 尾静脉注射法敲减小鼠体内 NEAT1-2，并通过 HTNV 的感染模型探索敲减 NEAT1-2 对 HTNV 体内感染的影响。本研究发现与 PBS 组相比，PBS+HTNV 组小鼠在感染后 1dpi 至 10dpi 期间并未出现明显的体重变化（如图 1.23-A）；于 3dpi 可在小鼠肝脏及脾脏中检出 HTNV NP 及 S 片段表达（如图 1.24），HE 染色可见明显的组织出血及脏器的炎性细胞浸润（如图 1.25），与以往文献报道一致<sup>[4]</sup>。此外，本研究还发现 HTNV 感染可诱导小鼠产生大量 IFN $\beta$ ，提示 HTNV 的动物感染模型可用作 IFN 相关抗病毒固有免疫应答的研究模型。

在该感染模型中，本研究发现与 PBS+HTNV 组小鼠相比，Si-NEAT1-2+HTNV 组在 2dpi~5dpi 出现明显的体重下降，IFN $\beta$  产生显著减少，提示 NEAT1-2 可调控 HTNV 感染小鼠的 IFN 免疫应答，进而影响病毒感染的发病过程。值得注意的是，Si-NEAT1-2+HTNV 组小鼠在 6dpi 出现体重回升，且并无小鼠死亡，提示即便在 NEAT1-2 敲减抑制宿主固有免疫的条件下，机体仍可能通过细胞免疫、体液免疫等方式限制并清除病毒，但其具体分子机制尚需通过检测不同组小鼠中和抗体效价等实验进一步验证。

## 4.2 lncRNA 在宿主抗汉坦病毒固有免疫应答中的作用

### 4.2.1 lncRNA 研究技术

以往 lncRNA 作为“遗传噪音”并不受到人们关注，而近年来随着测序技术的发展，越来越多的 lncRNA 分子被发现并被证实对基因表达具有重要的调控作用。lncRNA 测序分析多基于第二代高通量测序平台进行，该平台不像基因芯片技术受芯片容量的限制，其具有覆盖基因谱广、可发现新剪接体等优势。测序所发现的新型 lncRNA 需要通过多方面实验证实其不具有编码蛋白的功能方可列入长链非编码 RNA 的范畴。常用的方法包括鉴定新型 lncRNA 的亚细胞定位（核内/胞浆）、与核

糖体结合能力分析（有结合则说明具有潜在编码蛋白的能力）、不存在开放阅读框（open reading frame, ORF）或仅有较短的 ORF 等<sup>[18]</sup>。lncRNA 多与相应蛋白结合发挥功能，故通常通过 RIP 实验与质谱分析去确定 lncRNA 的结合蛋白，进而预测其相关功能<sup>[78; 79]</sup>。为进一步分析 lncRNA 在细胞生物学进程中所起的作用，一般需要构建其过表达质粒或相应的敲减 siRNA/shRNA，或者构建过表达/敲除的转基因小鼠，结合疾病的体内外模型，探索其在某一疾病发生、发展过程中所起到的作用<sup>[76]</sup>。

本研究对 HTNV 感染的 HUVECs 进行了 DGE 测序分析，其具有定量准确、可重复性高、检测范围广、分析可靠等特点，与芯片技术相比，可以得到较为全面的差异表达基因。DGE 分析结果显示 HTNV 可诱导 NEAT1、MGC12982 等多种 lncRNA 表达发生显著变化（如图 1.4），本研究之所以挑选 NEAT1 作为研究对象，是因为其为已知 lncRNA 分子中上调倍数最高的 lncRNA 分子，且已有研究报道提示 NEAT1 具有抗 HIV 感染<sup>[65]</sup>、调控 IL-8<sup>[66]</sup>等固有免疫应答分子表达的作用，因此我们推测 NEAT1 可能参与宿主抗 HTNV 感染的过程。值得注意的是，由于 DGE 分析是基于 Tag 探针技术进行测序，故其只能检测到含有 polyA 尾的 lncRNA 分子，因此其应用亦存在一定的局限性<sup>[148; 149]</sup>，若要深入探索 HTNV 感染后宿主 lncRNA 表达谱变化，还需要通过去核糖体测序技术等方法进一步进行相关研究。

在对 NEAT1-2 分子的研究中，由于该分子长达 23kb，使用普通的 siRNA 会引起非特异性的细胞压力反应（stress response），导致细胞的死亡或改变许多基因的正常表达水平，致使对 RNA 干涉结果的分析变的很困难，且容易造成脱靶效应。为高效、精确敲减 NEAT1-2 分子，本研究使用了 stealth siRNA，其为经过特殊化学修饰的、钝末端双链 25 聚体（25mer），有效地消除了细胞的压力反应，确保只有反义链进入 RNAi 通路，使实验的结果更加清晰，而这种修饰也提高了其靶向特异性及其稳定性<sup>[66]</sup>。为过表达 NEAT1 分子，本研究从 Nakagawa Shinichi 教授研究小组<sup>[66]</sup>获得质粒 pCMV-NEAT1 -1 及 pCMV-NEAT1-2，并且发现过表达 NEAT1-1 可以抑制细胞本身 NEAT1-2 的表达（如图 1.11），提示 NEAT1 分子在转录过程中存在相应的负反馈调控机制。

#### 4.2.2 HTNV 感染后宿主 lncRNA 表达谱变化

近年来多项研究结果表明 lncRNA 在宿主抗病毒固有免疫应答中发挥重要的调

控作用，而目前尚无研究报道汉坦病毒感染后宿主 lncRNA 表达谱变化及其相关功能。本研究通过对各组 HUVECs 进行 DGE 分析，明确了 HTNV 感染后 GAS5、NEAT1、CMPK2 等 lncRNA 的变化（如图 1.4）。

lncRNA GAS5 在非小细胞肺癌、肝癌、胃癌、膀胱癌、肾细胞癌、前列腺癌、乳腺癌及卵巢癌等肿瘤组织中均呈低表达，其表达低表达患者的预后和生存时间较高表达患者差<sup>[150; 151]</sup>；进一步研究发现 lncRNA GAS5 是 p53 信号通路的下游分子，可通过促进 CDK6、PTEN 等基因表达，抑制 miR-103 表达等机制抑制癌细胞的增殖及转移，并促进癌细胞凋亡<sup>[152; 153]</sup>。HTNV 感染后，与 Mock 组相比，HTNV 组 lncRNA GAS5 升高约 4 倍（如图 1.4），提示 HTNV 可能通过上调 lncRNA GAS5 诱导 HUVECs 细胞凋亡。

lncRNA CMPK2 是 I 型 IFN 的下游分子，研究表明，IFN $\alpha$  刺激人源或鼠源肝细胞可通过 JAK-STAT 信号通路诱导 CMPK2 上调，而 CMPK2 可负向调控 ISG15、CXCL10、IFIT3、IFITM1 等 ISG 分子的表达，但并不影响宿主细胞 IFN $\beta$  的表达，敲减 CMPK2 可促进 HCV 的感染及复制<sup>[154]</sup>，上述结果提示 CMPK2 通过抑制多种 ISG 分子产生促进病毒感染。HTNV 感染后，与 Mock 组相比，HTNV 组 CMPK2 下调约 1.5 倍（如图 1.4），提示 HUVECs 通过抑制 CMPK2 表达促进 ISG15、IFIT3 等 ISG 分子表达，进而抑制 HTNV 感染。

#### 4.2.3 lncRNA NEAT1 与抗汉坦病毒固有免疫

lncRNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1)，即核旁斑组装转录物 1，又称细胞核富集转录物 1 (nuclear enriched abundant transcript 1)，是核旁斑的重要组成部分，而核旁斑 (Paraspeckles) 是哺乳动物细胞核内特殊的亚核结构，参与应激反应和细胞分化多种生命活动的调控过程。已有多项研究表明 NEAT1 的高表达与甲状腺癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、胰腺癌等多种肿瘤的发生及发展相关<sup>[155-159]</sup>，其具体分子机制可能与 NEAT1 拮抗 p53 信号通路有关<sup>[128]</sup>。近期研究表明 NEAT1 可通过抑制 HIV mRNA 出核<sup>[65]</sup>、解除 SFPQ 转录抑制进而增强 IL-8 等细胞因子分泌<sup>[66]</sup>等机制参与抗病毒固有免疫应答。

检测 NEAT1-2 的 FISH 实验结果显示，HeLa 细胞中，Control 组细胞核周围可见 NEAT1-2 分布，细胞核内几乎无 NEAT1-2 表达，而 polyI:C 组及 HTNV 组细胞核内

NEAT1-2 表达明显增加 (如图 1.6-A); HUVECs 中, Control 组细胞核核周及核内均未见 NEAT1-2 表达, HTNV 组细胞核核内 NEAT1-2 表达随感染时间延长而增加 (如图 1.6-B), 提示不同细胞中基础表达 NEAT1-2 的亚细胞定位不同, 但诱导表达的 NEAT1-2 则主要分布于细胞核。同时, 我们发现 HTNV 感染后 NEAT1 上调表达的时间点恰好早于 IFN $\beta$  产生的时间点, 提示 NEAT1 可能对宿主细胞 IFN 反应具有调控作用, 而后续 NEAT1 的敲减及过表达实验亦证实了此猜测。

本研究在细胞水平初步证实了 lncRNA NEAT1 的抗 HTNV 作用后, 利用 siRNA 尾静脉注射法敲减小鼠体内 NEAT1-2, 并通过 HTNV 的感染模型探索敲减 NEAT1-2 对 HTNV 体内感染的影响。siRNA 体内注射法多用于肿瘤相关的体内研究, 即 SCID 小鼠荷瘤后, 通过尾静脉或者肿瘤区域注射 siRNA 以研究某分子的促肿瘤作用, 此法已被多个研究小组采用并受到国际学术界认可<sup>[160-162]</sup>; 本研究动物实验结果亦提示尾静脉注射 Si-NEAT1-2 可有效敲减肝、脾、肾等脏器组织中的 NEAT1-2 分子 (如图 1.22)。实验中我们观察到, Si-NEAT1-2+HTNV 组小鼠出现了一过性体重下降 (如图 1.23-A)、IFN $\beta$  产生降低 (如图 1.23-B) 等表现, 提示 NEAT1-2 敲减后机体固有免疫受损, 但 6dpi 后小鼠体重回升 (如图 1.23-A), 且 Si-NEAT1-2+HTNV 组并无小鼠死亡, 提示在感染后期, 机体可能通过中和抗体产生等适应性免疫应答的方式抑制 HTNV 感染并清除 HTNV, 最终自愈。通过实验我们证实了 NEAT1 在体内发挥重要的固有免疫调节作用, 但实验仍有可改进的地方, 如研究动物实验 NC+HTNV 组小鼠所用对照 siRNA (scrambled siRNA) 序列为公司设计的随机序列, 若使用 Si-NEAT1-2 序列的反向序列或者 Si-NEAT1-2 序列的点突变序列, 则实验设计和结果将更加严谨、可靠。此外, 如使用基因敲除小鼠进行相关实验, 将可进一步说明 NEAT1 分子在抗病毒免疫应答中所发挥的作用。目前 Nakagawa Shinichi 教授研究小组已成功构建 NEAT1 敲除的 C57BL/6J 的转基因小鼠<sup>[163]</sup>, 并被用于研究 NEAT1 在肿瘤发生及进展中所起的作用<sup>[128]</sup>; NEAT1 敲除的转基因小鼠也将为研究 NEAT1 分子在机体抗病毒固有免疫应答过程中的作用提供了可靠的动物模型。

#### 4.2.4 汉坦病毒与 IFN 信号通路

以往国外学者发现, 非致病性汉坦病毒在感染早期即可诱导宿主细胞 IFN 相关转录因子磷酸化和转位入核, 最终激活 IFN 信号通路。例如, Spiropoulou CF 等<sup>[164]</sup>

研究发现 PHV 感染人肺静脉内皮细胞 (human microvascular endothelial cells-lung, HMVEC-L) 12h 即可检测到 IRF3 二聚体形成及 STAT1 磷酸化。与之相反, 致病性汉坦病毒可抑制宿主细胞在感染初期产生 IFN, 阻碍 IFN 信号通路活化。例如, Mackow ER 研究组<sup>[131; 165]</sup>发现 NYV 产生的 GnT 可与 TRAF3 共沉淀, 阻断 TBK1-TRAF3 复合体形成进而抑制 RIG-I 信号通路所诱导的 IFN 产生; Wiebke Handke 等<sup>[112]</sup>报道称 HTNV 感染 A549 2h 至 48h 均未见 STAT1 入核, Spiropoulou CF 等<sup>[164]</sup>亦报道 ANDV 感染 HMVEC-L 24h 仍未见 STAT1 入核, 上述结果均提示 IFN 信号通路活化受到抑制; 有研究表明过表达 ANDV 的 GP 可抑制 STAT1 入核, 但不能阻断 IRF3 入核<sup>[164]</sup>, 提示致病性汉坦病毒的 GP 可能是逃逸宿主 I 型 IFN 信号通路的重要因素。

在自然感染进程中, HTNV 可在感染早期拮抗宿主 I 型 IFN 的产生, 而宿主后续产生的 IFN 并不能有效抑制 HTNV 复制<sup>[5]</sup>; 而在感染初期或感染前使用 IFN 预处理细胞则可有效阻止致病性汉坦病毒感染复制, 提示明确致病性汉坦病毒感染宿主细胞 IFN 产生的调控机制对研发抗病毒药物有重要意义。在本研究第一部分, 我们发现过表达 NEAT1 可在 HTNV 感染早期有效诱导 IFN 产生并抑制 HTNV 复制, 通过体内外实验我们初步明确了 NEAT1 分子通过正向调控 I 型 IFN 分泌增强机体抗 HTNV 感染的作用, 但尚不清楚 HTNV 是如何诱导宿主细胞 NEAT1 分子转录, 以及 NEAT1 通过怎样的方式调控 IFN $\beta$  的表达。因此, 我们进一步探索了 NEAT1-2 与 RIG-I 信号通路交互作用调控 I 型 IFN 信号通路活化的分子机制。

## 第二部分 NEAT1-2 与 RIG-I 信号通路交互作用调控 I 型 IFN 信号通路活化的分子机制研究

第一部分实验研究分别在体外及体内明确了 HTNV 感染可诱导宿主上调 lncRNA NEAT1 表达, 且 NEAT1-2 可通过正向调控 I 型 IFN 信号通路促进 IFN $\beta$ 、IL-8、CCL5 等细胞因子产生, 激活宿主 M $\phi$ 、CD8<sup>+</sup> T 细胞等方式增强机体抗 HTNV 固有免疫应答, 然而尚不清楚 HTNV 通过何种方式诱导 NEAT1-2 表达, 以及 NEAT1-2 通过怎样的分子机制调控宿主 IFN $\beta$  产生。已有研究表明 HTNV 可激活宿主细胞 TLR3、TLR4、RIG-I、MDA5 等 PRR 促进 IFN $\beta$  表达<sup>[107; 111]</sup>, 提示 NEAT1-2 的转录可能与上述信号通路关系密切; 亦有研究结果提示敲减 NEAT1-2 可抑制 polyI:C 刺激诱导上调 RIG-I 及 DDX60 的作用<sup>[66]</sup>, 而近期有多项研究显示 DDX60 可协同 RIG-I 促进病毒感染后 I 型 IFN 信号通路的活化<sup>[166-168]</sup>, 因此我们推测 NEAT1-2 可能通过调控 RIG-I 及 DDX60 表达发挥抗 HTNV 感染作用。本部分研究在细胞水平, 通过 siRNA 敲减、IFA、RIP 等技术手段, 进一步探究了 NEAT1-2 与 RIG-I 信号通路交互作用调控 I 型 IFN 信号通路活化的分子机制。

### 1 材料

#### 1.1 细胞、病毒株与菌株

##### 1.1.1 细胞

Huh7 细胞 (人肝癌细胞)、Huh7.5 细胞 (RIG-I 缺陷的人肝癌细胞)、EVC304 (Endothelial vein cells, 人静脉血管内皮细胞) 购自中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC) (中国武汉), EVC304 TLR4<sup>-</sup> (TLR4 缺陷株) 由唐都医院传染科白雪帆教授惠赠<sup>[66]</sup>。其他细胞参见本论文第一部分 1.1.1。

### 1.1.2 病毒株

HTNV 76-118 株，参见本论文第一部分 1.1.2。

### 1.1.3 菌株

参见本论文第一部分 1.1.3。

## 1.2 引物序列

如表 2.1

表 2.1 qRT-PCR 引物

Table 2.1 qRT-PCR primer sequences

Gene Name ( <i>Homo</i> )	Primer sequences (5'-3')
SFPQ-F	AGGAGAGAGAAACCCCTCCTC
SFPQ-R	AAACGTTGTCAGTCTGCTTGTG
RIG-I-F	CCATGTAAGACTTGCCTGCTT
RIG-I-R	AAGAGGCTTAATAGATTCACAGTTCC
DDX60-F	AGAGGATGCCAAGGCAA
DDX60-R	TCCATGACTCTGGGTTGCTT
TLR1-F	TCTGTTTTTGTGGCCAGGGT
TLR1-R	GGAACGTGGATGAGACCGTT
TLR2-F	GAGTTCTCCCAGTGTTTGGTG
TLR2-R	GTGTTGGAAACTCGAGGCAG
TLR3-F	ACATACTCAACCTAACCA
TLR3-R	AAAGGAGTTCCTAGTCAG
TLR4-F	CAGTGCTTCCTGCTCTTT
TLR4-R	GGTTTCTTCTCCCATCCT
MDA5-F	AGGCACCATGGGAAGTGAT
MDA5-R	ATTTGGTAAGGCCTGAGCTG

其他引物序列参见本论文第一部分 1.2。

## 1.3 小干扰 RNA (siRNA) 序列

### 1.3.1 靶向宿主细胞 NEAT1 (*Homo*) 的 siRNA

参见本论文第一部分 1.3.1。

### 1.3.2 靶向宿主细胞不同 PRR 分子 mRNA (*Homo*) 的 siRNA

通过 ThermoFisher 官网中 BLOCK-iT™ RNAi Designer 板块在线设计针对人源 TLR3、TLR4、MDA5 等分子 mRNA 的 siRNA，并送由上海吉玛公司合成。

NC (对照 siRNA) 的正义序列为：5'-UUCUUCGAACGUGUCACGUTT-3'；



Si-TLR3 (969) 正义序列为: 5'-GGUAACGAUCCUUUGCUU-3',

Si-TLR4 (667) 正义序列为: 5'-GGAUUUAUCCAGGUGUGAA-3',

Si-MDA5 (1845) 正义序列为: 5'-CCUCAGAUACUGGGACUAA-3'。

靶向人源 RIG-I 及 DDX60 分子 mRNA 的 siRNA 由上海吉玛公司设计并合成, 即 Si-RIG-I-1、Si-RIG-I-2、Si-RIG-I-3 及 Si-DDX60-1、Si-DDX60-2、Si-DDX60-3。

Si-RIG-I-1 正义序列为: 5'-GCCCAUUUAAACCAAGAAATT-3',

Si-RIG-I-2 正义序列为: 5'-GGUGGAGGAUAAUUGAACUTT-3',

Si-RIG-I-3 正义序列为: 5'-CCCAACGAUAUCAUUUCUTT-3',

Si-DDX60-1 (1832) 正义序列为: 5'-GUCCAGGUGUCAGUUUGAUTT-3',

Si-DDX60-2 (2255) 正义序列为: 5'-CCGAAGUGAAGAAGGUAATT-3',

Si-DDX60-3 (3488) 正义序列为: 5'-GAUGGAUGCUAGGAAAUATT-3'。

根据以往文献<sup>[66]</sup>设计 Si-SFPQ 并送上海吉玛公司合成。

Si-SFPQ 正义序列为: 5'-CUUUCUGUUCGUAAUCUUUCA-3'

## 1.4 质粒载体

Flag-RIG-I、pcDNA3.1-HTNV-S、pcDNA3.1-HTNV-Gn 及 pcDNA3.1-HTNV-Gc 由本实验室构建并鉴定, pcDNA3.1 空载体 (vector) 由本实验室保存。pUNO-DDX60 购自 Invitrogen 公司。

## 1.5 主要试剂

### 1.5.1 分子克隆实验相关试剂

参见本论文第一部分 1.5.1。

### 1.5.2 实时定量 PCR (qRT-PCR) 实验相关试剂

参见本论文第一部分 1.5.2。

### 1.5.3 免疫荧光 (IFA) 实验相关试剂

参见本论文第一部分 1.5.3。

### 1.5.4 Western Blot 实验相关器材

参见本论文第一部分 1.5.4。

### 1.5.5 抗体

抗 RIG-I 兔多抗（用于 Western Blot）	ProteinTech 公司
抗 RIG-I 驴多抗（用于 IFA）	上海生工生物工程公司
抗 DDX60 兔多抗（用于 Western Blot/IFA）	Sigma 公司
抗 SFPQ 兔多抗（用于 Western Blot/Co-IP）	ProteinTech 公司
抗 NONO 兔多抗（用于 Western Blot/Co-IP）	ProteinTech 公司
抗 IRF7 兔多抗（用于 IFA）	Abcam 公司
抗 IRF3 兔多抗（用于 IFA）	Abcam 公司
抗 NF-B/p65 兔多抗（用于 IFA）	Abcam 公司
抗 STAT1 兔多抗（用于 IFA）	Abcam 公司
其他抗体参见本论文第一部分 1.5.5。	

### 1.5.6 其他试剂

纯化细胞因子 IFN $\alpha$	PeptoTech 公司
纯化细胞因子 IFN $\beta$	PeptoTech 公司
纯化细胞因子 IFN $\gamma$	PeptoTech 公司
纯化细胞因子 TNF $\alpha$	PeptoTech 公司
RNA 结合蛋白免疫沉淀（RIP）试剂盒 （Magna RIP™ RNA-binding protein immunoprecipitation Kit）	Millipore 公司
免疫沉淀试剂盒（KIP-1）	ProteinTech 公司
其他试剂参见本论文第一部分 1.5.6。	

### 1.6 主要仪器

参见本论文第一部分 1.6。

## 2 方法

### 2.1 HTNV 的增殖及细胞感染实验

参见本论文第一部分 2.1。

## 2.2 siRNA 或质粒的转染

参见本论文第一部分 2.3。

## 2.3 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测细胞中不同分子 mRNA 的表达

参见本论文第一部分 2.4。

## 2.4 免疫荧光法 (IFA) 检测细胞中不同蛋白的表达及亚细胞定位

参见本论文第一部分 2.5。

## 2.5 Western Blot 检测细胞中不同蛋白的表达

参见本论文第一部分 2.7。

## 2.6 双荧光素酶报告系统检测 IFN $\beta$ 启动子活性

参见本论文第一部分 2.8。

## 2.7 RNA 结合蛋白免疫共沉淀 (RNA-binding protein immunoprecipitation, RIP) 检测 NEAT1 与 SFPQ 相互作用

- 1) 在 HTNV 感染后不同时间点收集 HUVECs 并使用 RIP 试剂盒内 RIP Lysis Buffer 裂解细胞。
- 2) 取免疫共沉淀磁珠 A+G 50  $\mu$ l 加入 RNA 酶灭活的 EP 管中, 再加入 RIP Wash Buffer 500  $\mu$ l 洗 2 次, 在磁性分离器上弃上清。加入 Wash Buffer 100  $\mu$ l 重悬磁珠, 及 5  $\mu$ g 兔抗 SFPQ 多抗, 对照组加等体积兔血清 IgG, 室温摇床上孵育 30 min, 再加入 Wash Buffer 500  $\mu$ l 洗 2 次, 在磁性分离器上将上清弃去。
- 3) 每个 EP 管中加入 RIP Immunoprecipitation Buffer 900  $\mu$ l 重悬沉淀。将 1) 中细胞裂解液 12,000g 离心 10 min, 分别吸取 100  $\mu$ l 上清至各 EP 管中, 终体积为 1 ml。
- 4) 将 EP 管置摇床上 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 在磁性分离器上将上清弃去。加入 Wash Buffer 500  $\mu$ l 清洗免疫共沉淀, 共洗涤 6 次, 在磁性分离器上将上清弃去; 每 EP 管中加入 150  $\mu$ l 蛋白酶 K Buffer 重悬沉淀。
- 5) 所有 EP 管置于 55 $^{\circ}$ C 摇床混匀 30 min, 让蛋白质消化完全。把 EP 管放在磁性分离器上, 吸取上清于新 EP 管中, 加入 Wash Buffer 250  $\mu$ l, 终体积为 400  $\mu$ l。每 EP 管中再加入苯酚: 氯仿: 异戊醇(体积比 125: 24: 1) 400  $\mu$ l, 振荡 15s 后, 12,000g 离心 10 min。

- 6) 吸出上层水相 350  $\mu\text{l}$  于新 EP 管中, 加入氯仿 400  $\mu\text{l}$ , 振荡 15s 后, 12,000g 离心 10 min。吸出上层水相 300  $\mu\text{l}$  于新 EP 管中, 每管加入 Salt Solution I 液 50  $\mu\text{l}$ , Salt Solution II 液 15  $\mu\text{l}$ , 沉淀增强剂 5  $\mu\text{l}$ , 无水乙醇 850  $\mu\text{l}$ , 充分混匀,  $-80^{\circ}\text{C}$  使 RNA 沉淀, 12,000g 离心 30 min, 弃上清。
- 7) 加入 80% 乙醇 1 ml 洗涤沉淀, 12,000g 离心 30min, 弃上清, 风干沉淀; 加入 RNase-free 双蒸水 10  $\mu\text{l}$  溶解沉淀, 测定 RNA 纯度与浓度, qRT-PCR 法检测 NEAT1 的表达情况。

## 2.8 免疫免疫共沉淀 (Co-IP) 检测 SFPQ 与 NONO 相互作用

使用免疫共沉淀试剂盒进行如下操作:

- 1) 细胞制备: Mock 组及 HTNV 组 HUVECs 在冰上使用预冷 1  $\times$  PBS 洗涤三次, 每  $10^6$  个细胞加入 100  $\mu\text{l}$  预冷的 IP lysis buffer (含有 1  $\times$  Protease inhibitor)。在 IP lysis buffer 中重悬细胞, 冰上裂解 30 min, 期间每 10 min 轻柔颠倒一次。
- 2) 裂解: 在 180 W 功率下超声 10 s 停 10 s, 超声 1 min,
- 3) BCA 法测定裂解物的总蛋白浓度: 参见本论文第一部分 2.7.2。
- 4) Protein A sepharose beads 的准备: 旋转储存 Protein A sepharose beads slurry 的管子, 取出所需数量的 Protein A sepharose beads slurry, 以其 10 倍体积的 1  $\times$  PBS 通过瞬时离心洗涤 Protein A sepharose beads slurry, 并将 Protein A sepharose beads slurry 重悬至原体积。
- 5) 免疫沉淀: 吸取含有 1~3 mg 总蛋白的裂解物 350  $\mu\text{l}$ , 加入下端带有 End caps 的 Spin columns 中, 同时加入 4  $\mu\text{g}$  特异性抗体 (抗 SFPQ 兔多抗) 以及 300  $\mu\text{l}$  Incubation buffer。向相同数量的裂解物与 Incubation buffer 中加入同种属相同数量的 Control IgG 作为阴性对照。 $4^{\circ}\text{C}$  下, 旋转孵育过夜。向 Spin columns 中加入 50  $\mu\text{l}$  重悬的 Protein A sepharose beads slurry 以沉淀免疫复合物,  $4^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 4 h。取下 End caps, 弃除上清, 必要时, 可以通过重悬 Protein A sepharose beads slurry 以提高上清的流速。
- 6) 洗涤: 用 800  $\mu\text{l}$  1  $\times$  Washing buffer (纯水稀释 20  $\times$  Washing buffer; 含有 1  $\times$  Protease inhibitor) 洗涤沉淀复合物 5 次。洗涤结束后, 在  $4^{\circ}\text{C}$ , 500 rpm 下将 Spin columns 置入 Collection tubes 中离心 30 s, 弃 Collection tubes 以及离心产物。

- 7) 洗脱: 将 Spin columns 置入新的 1.5 ml EP 管中以收集洗脱产物, 用 40  $\mu$ l Elution buffer 洗脱沉淀复合物, 并在 4  $^{\circ}$ C、10,000 rpm 下离心 1 min 收集产物, 重复洗脱一次。向洗脱产物中加入 10  $\mu$ l Alkali neutralization buffer 以及 30  $\mu$ l 5  $\times$ Sample Buffer, 沸水浴加热 5 min。
- 8) Western Blot 分析: 取 40  $\mu$ l IP 样品进行 Western Blot 检测 NONO 蛋白。

## 2.10 统计分析方法

参见本论文第一部分 2.10。

## 3 结果

### 3.1 HTNV 感染通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导 NEAT1-2 上调

HTNV 感染可促进宿主细胞表达 NEAT1, 且 NEAT1 上调水平与 HTNV 感染时间及感染剂量在一定范围内呈正相关, 提示 HTNV 自身的病毒蛋白可能直接刺激 NEAT1 表达, 或者通过刺激细胞产生 IFN $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  等细胞因子间接活化 NEAT1 转录。然而, 通过在 HUVECs 中分别过表达 HTNV NP、Gn 及 Gc 等病毒蛋白后进行 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 转录情况, 结果提示其并不能诱导 NEAT1 及 NEAT1-2 上调 (如图 2.1-A)。以 MOI=0.1 感染 HTNV 的同时, 使用 IFN $\alpha$  及 IFN $\beta$  中和抗体处理 HUVECs, 在 12hpi、24hpi、48hpi 通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 表达, 结果提示 NEAT1 及 NEAT1-2 的转录上调并未受到抑制 (如图 2.1-B), 初步提示 NEAT1 及 NEAT1-2 并非 I 型 IFN 的下游分子; 使用不同剂量的 IFN $\alpha$  (如图 2.1-C)、IFN $\beta$  (如图 2.1-D)、IFN $\gamma$  (如图 2.1-E) 刺激 HUVECs 均不能诱导 NEAT1 及 NEAT1-2 上调, 进一步提示 NEAT1 及 NEAT1-2 不属于 ISG 家族。通过不同浓度 IL-1 $\beta$  (如图 2.1-F)、TNF $\alpha$  (如图 2.1-G) 刺激 HUVECs 均不能诱导 NEAT1 及 NEAT1-2 上调, 提示 NEAT1 及 NEAT1-2 并非 IL-1 $\beta$  及 TNF $\alpha$  等炎性细胞因子信号通路下游分子。

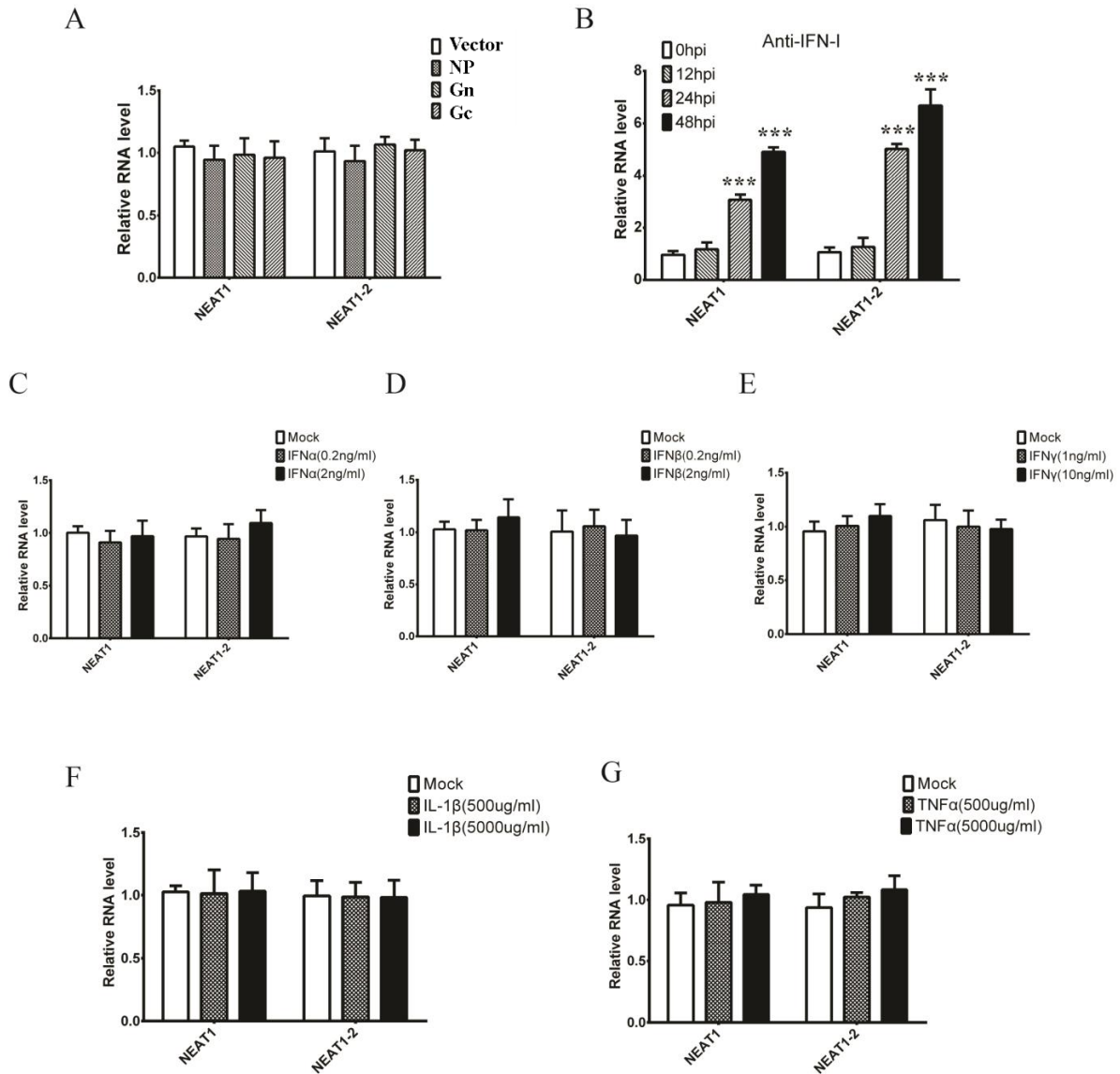


图 2.1 HTNV 病毒蛋白及多种细胞因子刺激 HUVECs 均不能诱导 NEAT1 表达

**Fig. 2.1 NEAT1 upregulation is dependent on live viral replication instead of the overexpression of viral proteins or the stimulation of different cytokines**

(HUVECs 经过以下不同处理后通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 表达水平: A. 在铺有 HUVECs 的 6 孔板中按 3 μg/孔分别转染质粒 pcDNA3.1-NP、pcDNA3.1-Gn、pcDNA3.1-Gc、Vector 组转染 pcDNA3.1 的对照质粒, 转染 48h 后提取 RNA 进行检测; B. 以 MOI=0.1 感染 HTNV, 同时加入 IFNα 及 IFNβ 中和抗体, 在感染后不同时间点提取 RNA 进行检测; C-G. 不同浓度 IFNα (C)、IFNβ (D)、IFNλ (E)、IL-1β (F)、TNFα (G) 刺激 HUVECs 24h 后提取 RNA 进行检测。)

上述实验结果初步排除了 HTNV 自身病毒蛋白及部分细胞因子对 NEAT1 转录的诱导作用, 因此我们推测 NEAT1 可能作为某些 PRR 信号通路的下游分子。利用 siRNA

技术对 TLR3、TLR4、RIG-I、MDA5 等多种 PRR 分子进行敲减, 在 siRNA 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 于 3dpi 通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 表达水平, 结果提示与 NC+PBS 组相比, NC+HTNV 组细胞中上述 PRR 分子均有不同程度上调, 提示 HTNV 感染可活化上述 PRR, 与既往报道一致; 而与 NC+HTNV 组相比, 敲减 TLR4 及 RIG-I 均能抑制 NEAT1 及 NEAT1-2 转录上调 ( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ), 且敲减 RIG-I 的抑制作用更为明显 (如图 2.2)。

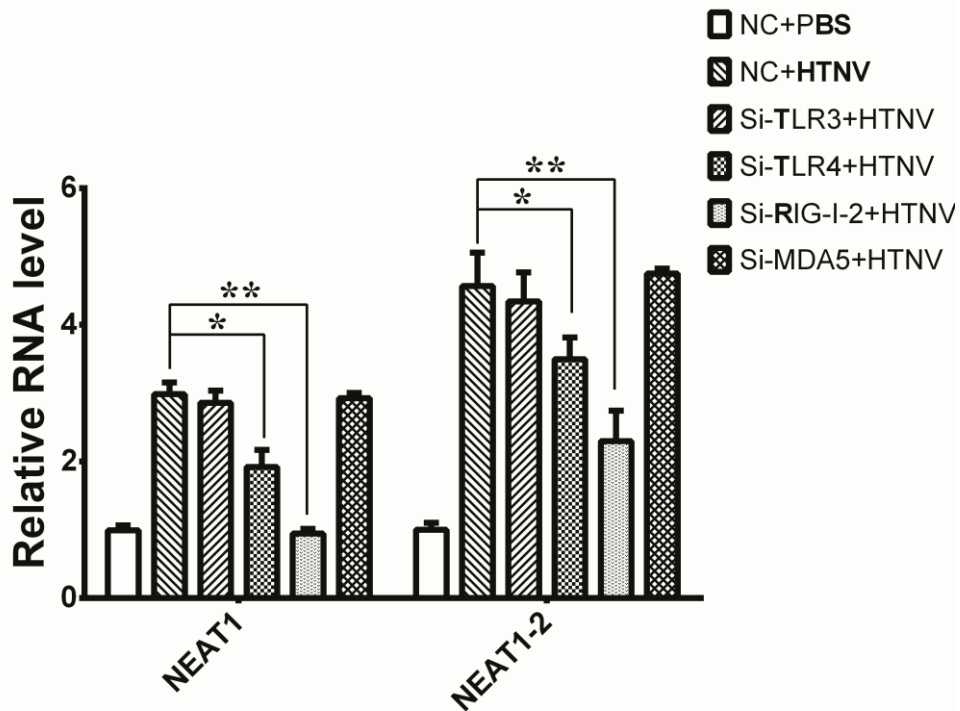


图 2.2 敲减不同 PRR 分子对 HTNV 感染后 NEAT1 表达的影响

Fig. 2.2 The effects of silencing different PRRs on HTNV-induced NEAT1 expression

(通过不同 siRNA 干扰 TLR3、TLR4、RIG-I、MDA5 等 PRR 分子表达, NC 组转染等量 Scrambled siRNA; 在 siRNA 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 于 3dpi 通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 表达水平。\* $P<0.01$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.0001$ ; One-Way ANOVA。)

为进一步明确 RIG-I 及 TLR4 在 HTNV 诱导 NEAT1 上调过程中的作用, 我们检测了上述分子稳定敲除的细胞系中 HTNV 感染后 NEAT1 的表达水平。HTNV 以 MOI=1 感染 Huh 7、Huh 7.5 (RIG-I)、EVC304、EVC304 (TLR4) 等细胞系, IFA 结果提示 HTNV 在 Huh 7 及 EVC304 细胞系中的感染效率大于 60%, 在 Huh 7.5 (RIG-I) 及 EVC304 (TLR4) 稳转细胞系中的感染效率大于 80% (如图 2.3-A)。在 3dpi 通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 表达, 结果提示 RIG-I 敲除后, HTNV

感染不能诱导 NEAT1 上调；而敲除 TLR4 后，NEAT1 及 NEAT1-2 在 HTNV 感染后虽然上调水平显著下降后，但其表达量仍可增加（如图 2.3-B），提示 RIG-I 信号通路在 HTNV 感染诱导宿主细胞表达 NEAT1 的过程中扮演重要角色。

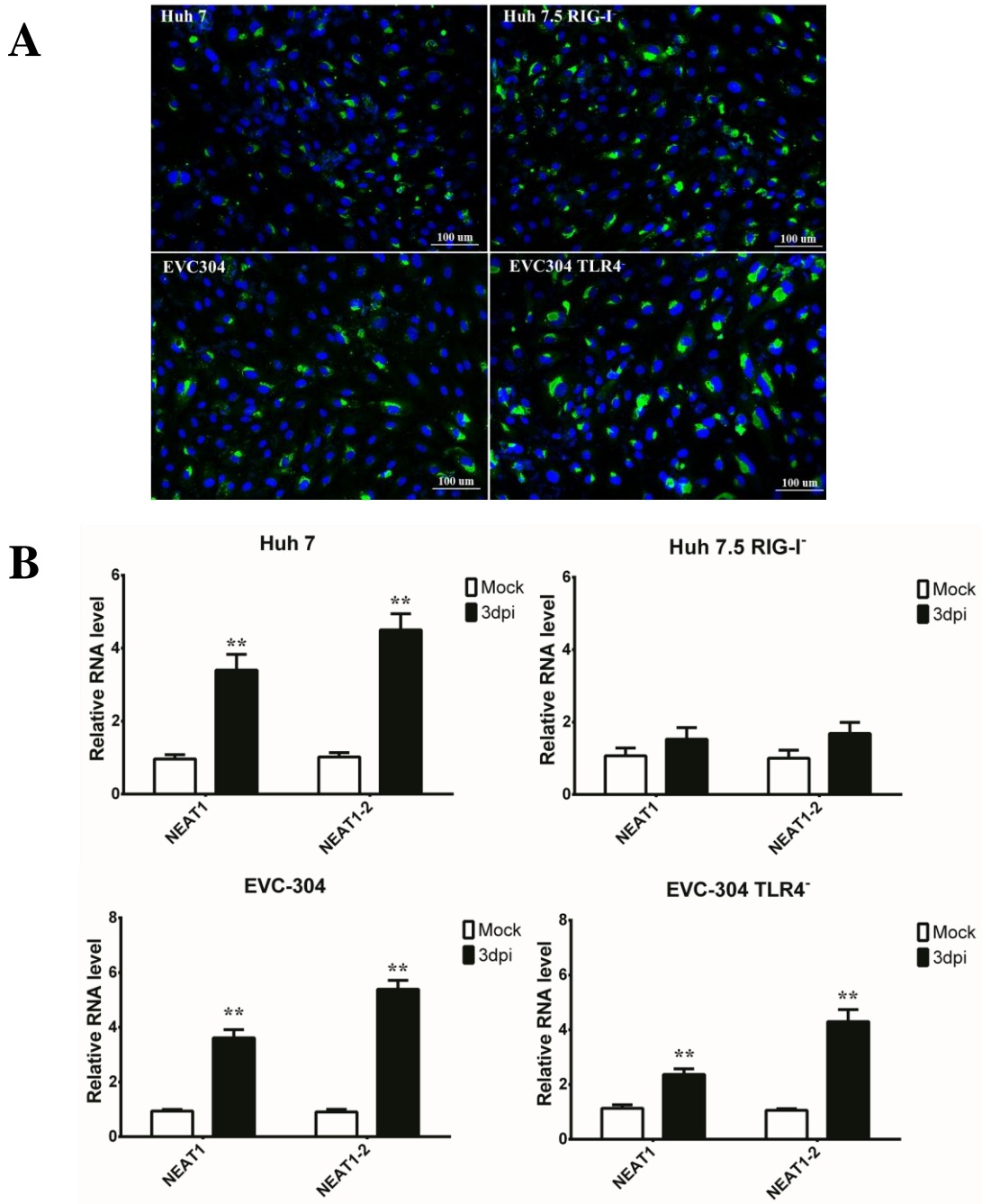


图 2.3 HTNV 感染不同细胞系后 NEAT1 表达变化

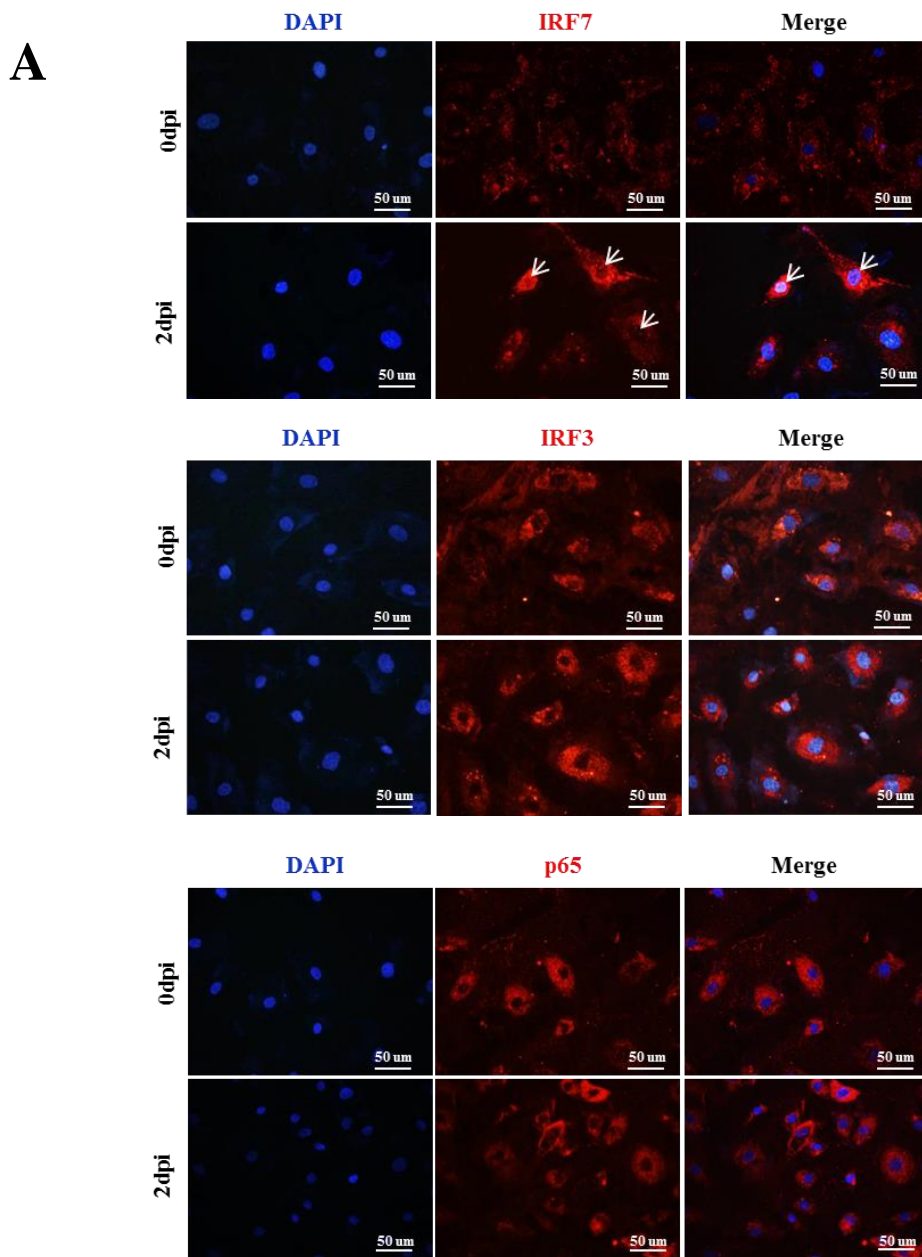
Fig. 2.3 The NEAT1 expression in different cell lines after HTNV infection

（HTNV 以 MOI=1 感染 Huh 7、Huh 7.5（RIG-I）、EVC304、EVC304（TLR4<sup>-/-</sup>）等细胞系，于 3dpi 进行 IFA 检测 HTNV NP 表达情况（A），并通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 表达水



平 (B), \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ; Student's  $t$  检验)

RIG-I 信号通路活化后可通过 IRF3 或 IRF7 等转录因子入核进而诱导下游分子表达。HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs, 于 1dpi 通过 IFA 检测 IRF3、IRF7、p65 (NF- $\kappa$ B 信号通路下游转录因子)、STAT1 (IFN 信号通路下游转录因子, 阳性对照) 入核情况, 结果显示 IRF7 及 STAT1 入核 (如图 2.4-A); 敲减 IRF7 可明显抑制 HTNV 感染后 NEAT1 及 NEAT1-2 上调 ( $P < 0.001$ ) (如图 2.4-B)。上述实验结果提示 HTNV 感染通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导 NEAT1 上调。



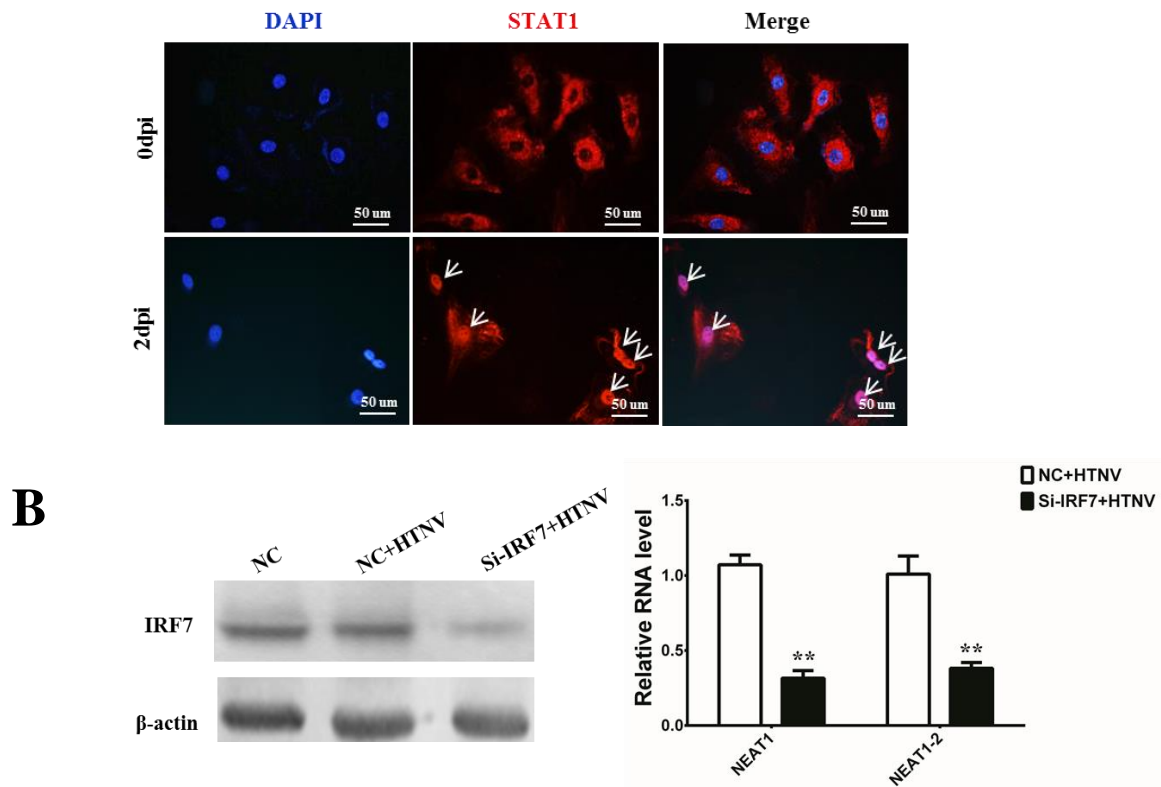


图 2.4 HTNV 感染通过 IRF7 信号通路诱导 NEAT1 上调

Fig. 2.4 IRF7 signaling is crucial for NEAT1 expression after HTNV infection

(A. 通过 IFA 检测 3dpi 不同转录因子入核情况; B. 通过转染 siRNA 敲减 IRF7, 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 于 3dpi 进行如下实验: 左, 通过 Western Blot 检测 IRF7 敲减效率; 右, 通过 qRT-PCR 检测 NEAT1 及 NEAT1-2 表达水平, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ; Student's  $t$  检验。)

### 3.2 NEAT1-2 正向调控 HTNV 感染后 RIG-I 及 DDX60 表达间接促进 IFN $\beta$ 产生

NEAT1-2 可正向调控 HTNV 感染后 I 型 IFN 信号通路活化, 但其具体的分子机制尚不清楚。第一部分 3.4 中实验结果显示过表达 NEAT1-2 可促进 HTNV 感染后 IFN $\beta$  表达, 但在非 HTNV 感染条件下单独过表达 NEAT1-2 并不能直接激活 IFN $\beta$  启动子, 提示 NEAT1-2 间接调控 I 型 IFN 信号通路活化。近期有研究提示敲减 NEAT1-2 可抑制 polyI:C 对 RIG-I 及 DDX60 表达的诱导作用<sup>[66]</sup>, 因此我们推测 NEAT1-2 有可能通过调控相关 PRR 分子的表达进而间接影响 HTNV 感染后 IFN $\beta$  的产生。在 HUVCEs 中敲减 NEAT1-2 后感染 HTNV, 在 48hpi 通过 qRT-PCR 检测 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、RIG-I、DDX60 及 MDA5 等 PRR 分子的表达情况, 结果显示敲减

NEAT1-2 可抑制 HTNV 感染后 RIG-I 及 DDX60 的上调 ( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ) (如图 2.5)。

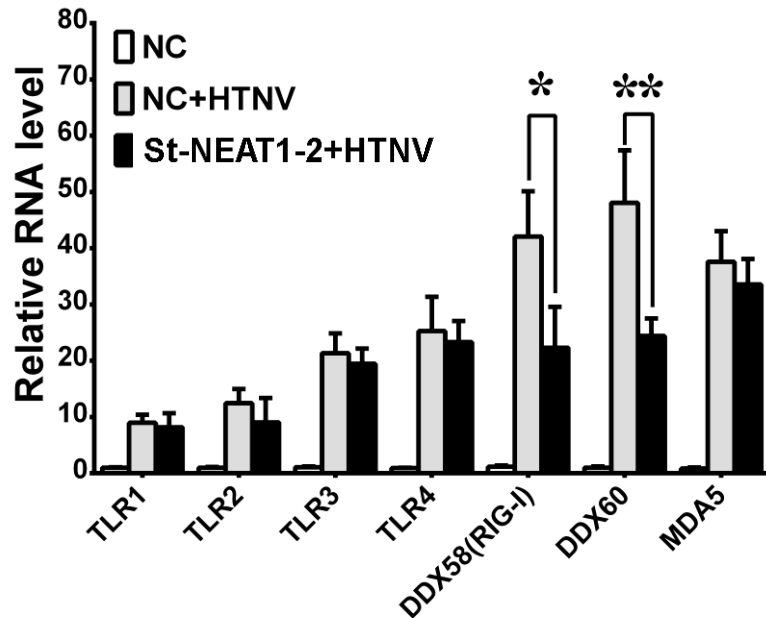


图 2.5 敲减 NEAT1-2 对 HTNV 感染后不同 PRR 分子的影响

Fig. 2.5 The effects of silencing NEAT1-2 on PRRs expression after HTNV infection

(在 HUVECs 中转染 St-NEAT1-2, NC 组转染等量 Scrambled siRNA, 转染 24 后以 MOI=1 感染 HTNV, 于 48hpi 通过 qRT-PCR 检测 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、RIG-I、DDX60 及 MDA5 等 PRR 分子的表达情况。\* $P<0.01$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.0001$ ; Student's *t* 检验。)

为进一步明确 NEAT1-2 对 RIG-I 及 DDX60 的调控作用, 在 HUVECs 中转染不同浓度 St-NEAT1-2, 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 于 48hpi 通过 Western Blot 检测 RIG-I 及 DDX60 表达水平, 结果提示敲减 NEAT1-2 可明显抑制 RIG-I 及 DDX60 表达, 且其抑制程度与 St-NEAT1-2 转染剂量呈正相关 (如图 2.6-A); 在 HUVECs 中转染不同浓度 pCMV-NEAT1-2, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 于 48hpi 通过 Western Blot 检测 RIG-I 及 DDX60 表达水平, 结果提示过表达 NEAT1-2 可显著促进 RIG-I 及 DDX60 表达, 且其促进程度与 pCMV-NEAT1-2 转染剂量呈正相关 (如图 2.6-B)。上述结果初步证实 NEAT1-2 在 HTNV 感染后对 RIG-I 及 DDX60 的表达具有正向调控作用。

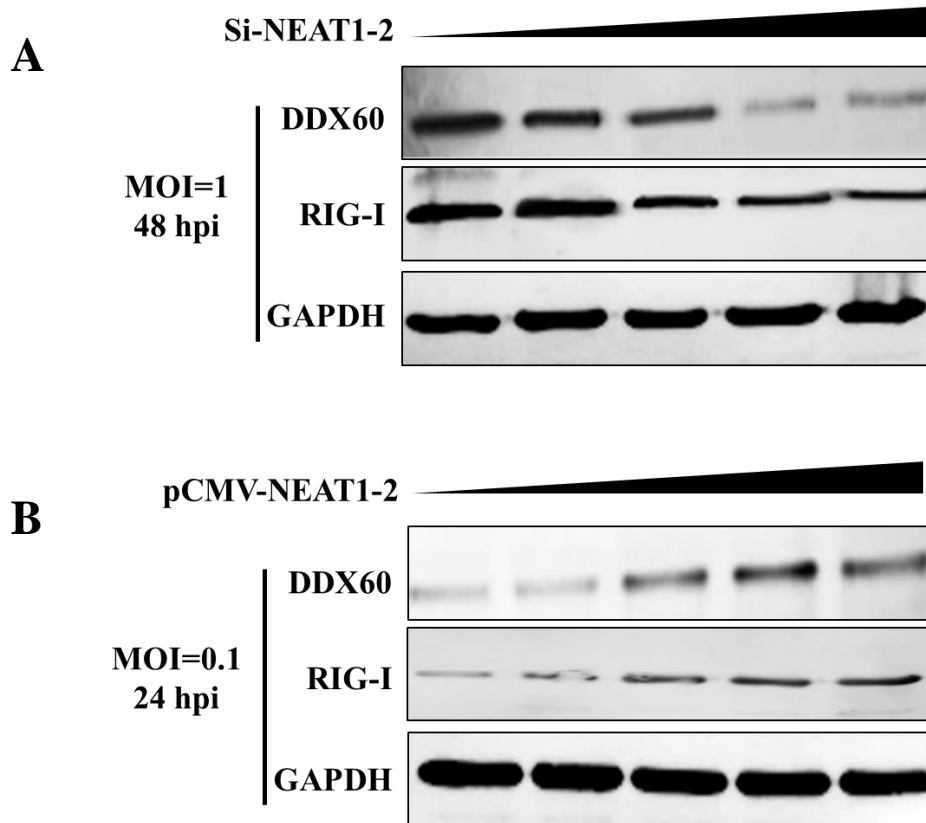


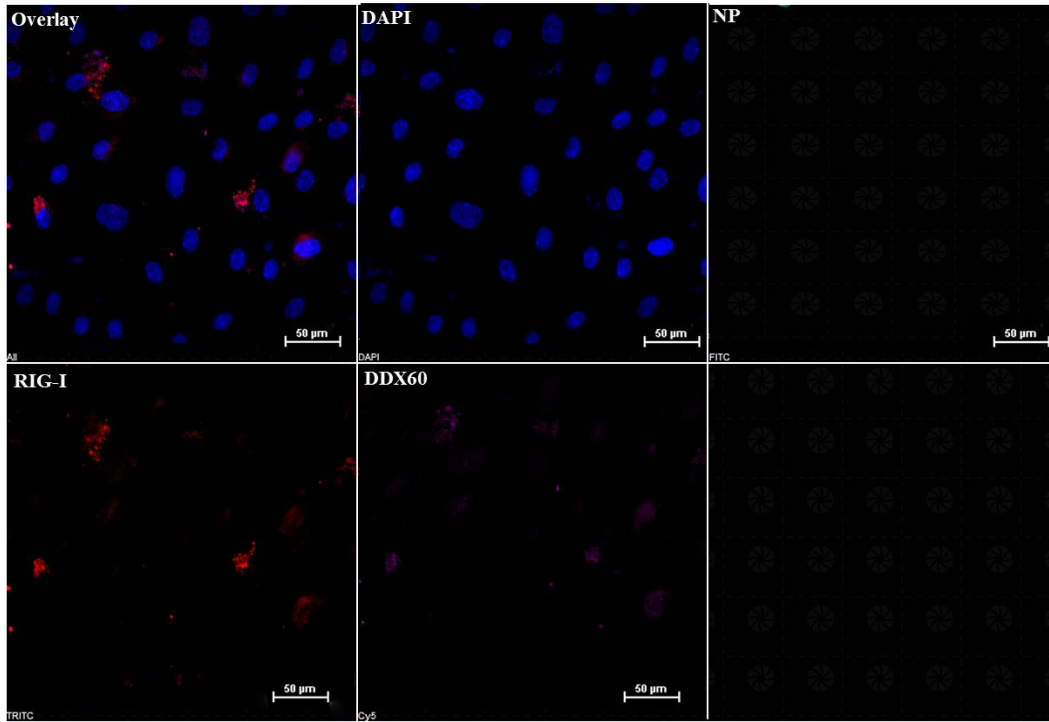
图 2.6 敲减或过表达 NEAT1-2 对 HTNV 感染后 RIG-I 及 DDX60 的调控作用

Fig. 2.6 The effects of NEAT1-2 on RIG-I and DDX60 expression after HTNV infection

(A. 在 HUVECs 中转染 St-NEAT1-2, NC 组转染等量 Scrambled siRNA, 转染 24 后以 MOI=1 感染 HTNV, 于 48hpi 通 Western Blot 检测 RIG-I 及 DDX60 表达情况; B. 在 HUVECs 中转染 pCMV-NEAT1-2, Vector 组转染等量对照质粒, 转染 24 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 于 48hpi 通 Western Blot 检测 RIG-I 及 DDX60 表达情况。)

近期有研究表明 DDX60 作为协同分子与 RIG-I 相互作用, 促进 RIG-I 信号通路活化及 I 型 IFN 分泌, 增强机体抗病毒固有免疫应答<sup>[166-168]</sup>, 但对于 DDX60 是否具有广谱抗病毒作用, 目前研究尚存在争议。通过 IFA 实验检测 HTNV 感染 HUVECs 后 RIG-I 及 DDX60 的表达情况及其亚细胞定位, 结果显示 HTNV 感染可显著诱导 RIG-I 及 DDX60 表达, 且在 HTNV NP 阳性的细胞中, RIG-I 及 DDX60 在胞浆中有共定位 (如图 2.7), 提示 HTNV 感染后 RIG-I 及 DDX60 之间存在相互作用。

### HUVECs 0dpi



### HUVECs 48hpi

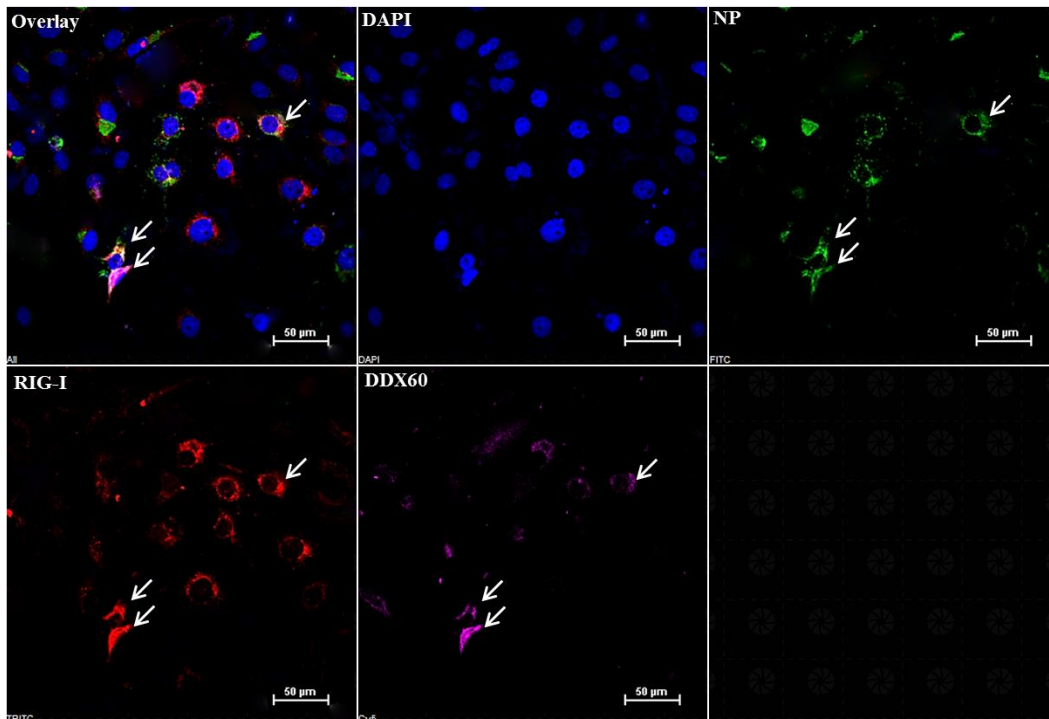


图 2.7 HTNV 感染 HUVECs 后 RIG-I 及 DDX60 的亚细胞定位

Fig. 2.7 The intracellular location of RIG-I and DDX60 in HUVECs after HTNV infection (HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs, 于 0hpi、48hpi 通过 IFA 检测 RIG-I (红)、DDX60 (紫)、

HTNV NP (绿) 的表达情况及亚细胞定位。)

为进一步明确 RIG-I 及 DDX60 是否协同促进 IFN $\beta$  产生进而发挥抗 HTNV 感染的作用, 我们分别敲减 RIG-I 和/或 DDX60, 或过表达 RIG-I 和/或 DDX60, 并在此条件下检测 HTNV 感染及 IFN $\beta$  表达的相关指标。分别设计并合成三组敲减 RIG-I 及 DDX60 的 siRNA, 通过 qRT-PCR 在 mRNA 水平初步筛选出具有较高敲减效率的 Si-RIG-I-2 及 Si-DDX60-1 (如图 2.8-A), 并通过 Western Blot 进一步在蛋白水平证实上述 siRNA 的敲减作用 (如图 2.8-B)。

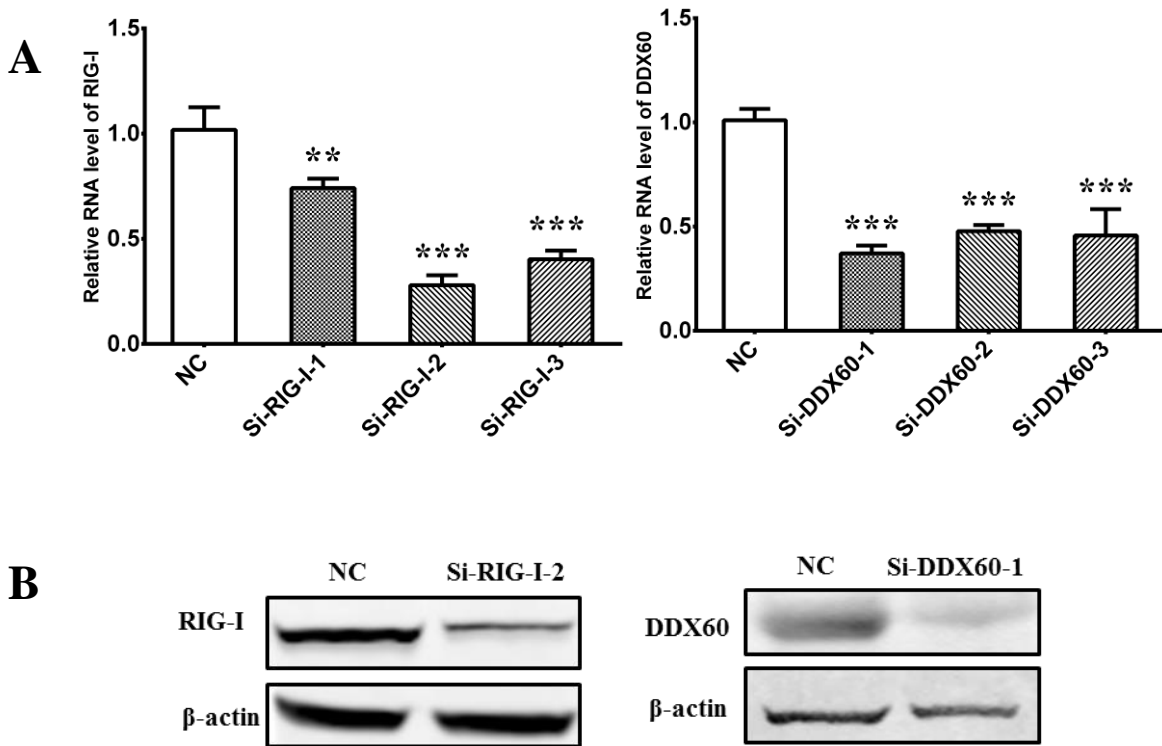


图 2.8 靶向 RIG-I 及 DDX60 mRNA 的 siRNA 的筛选

Fig. 2.8 The interfering efficiency of different siRNAs targeting at RIG-I or DDX60 mRNA

(在 HUVECs 中转染不同 siRNA 分子, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 于 48hpi 通过 qRT-PCR 检测 RIG-I 及 DDX60 mRNA 的水平 (A), 通过 Western Blot 检测 RIG-I 及 DDX60 表达 (B)。)

在 HUVECs 中分别转染 Si-RIG-I-2、Si-DDX60-1、Si-RIG-I-2+Si-DDX60-1, 转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV, 于 48hpi 通过 Western Blot 检测 HTNV NP 的表达, 结果提示同时敲减 RIG-I 及 DDX60 可有效促进 HTNV NP 表达, 且其效果优于单独敲减 RIG-I 或 DDX60 (如图 2.9-A); 通过 qRT-PCR 检测细胞内 IFN $\beta$  mRNA 表达情况, 结果提示与 NC 组相比, 单独敲减 RIG-I 或 DDX60 均可抑制 IFN $\beta$  产生, 而同

时敲减二者的抑制作用更为明显（如图 2.9-B）。在 HUVECs 中进行双荧光素报告实验，检测敲减 RIG-I 和/或 DDX60 对 HTNV 感染后 IFN $\beta$  启动子活性的影响，可得到与上述实验一致的结果，即同时敲减 RIG-I 及 DDX60 比单独敲减二者之一对 IFN $\beta$  启动子的活性具有更为明显的抑制作用（如图 2.9-C）。

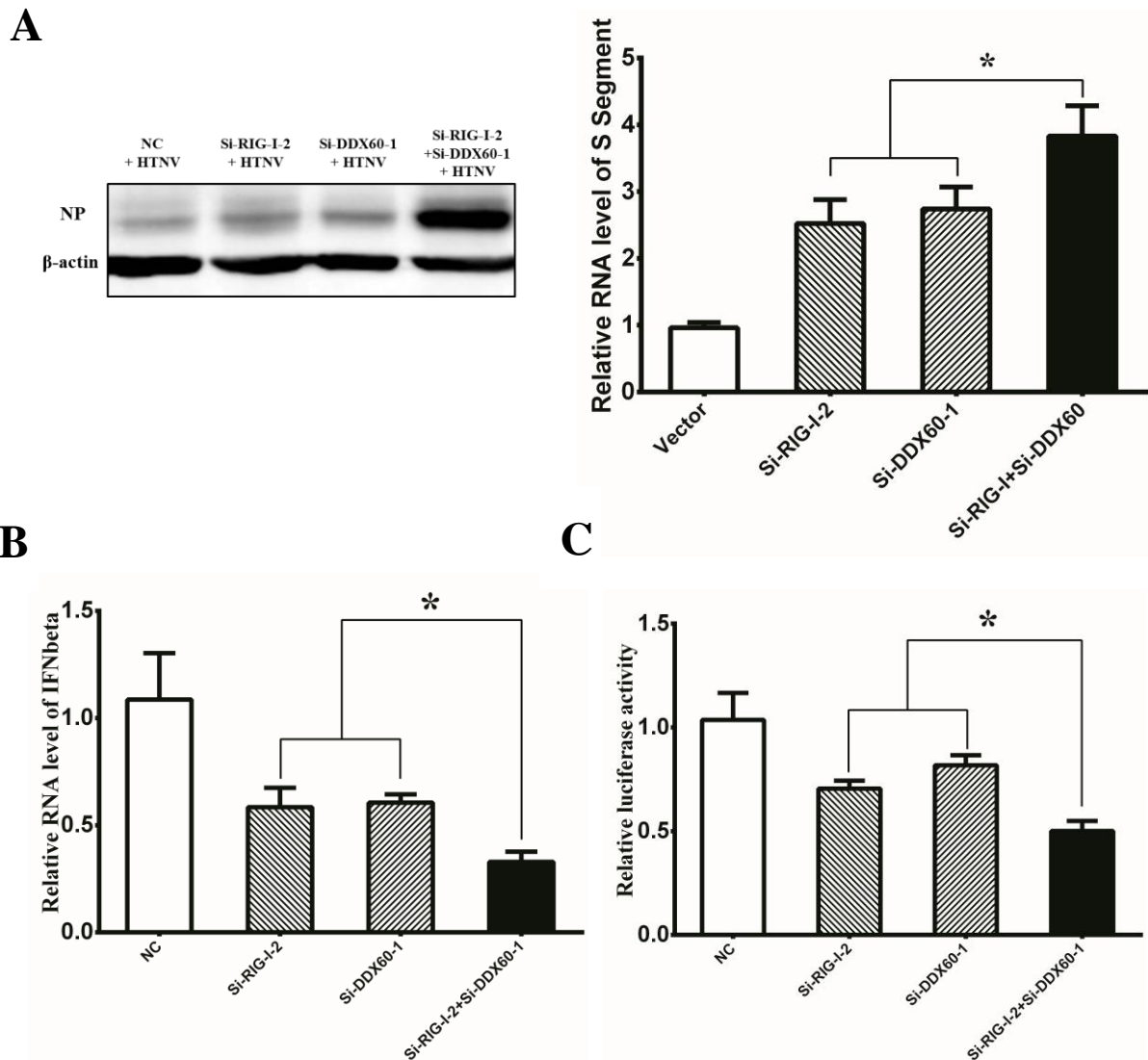


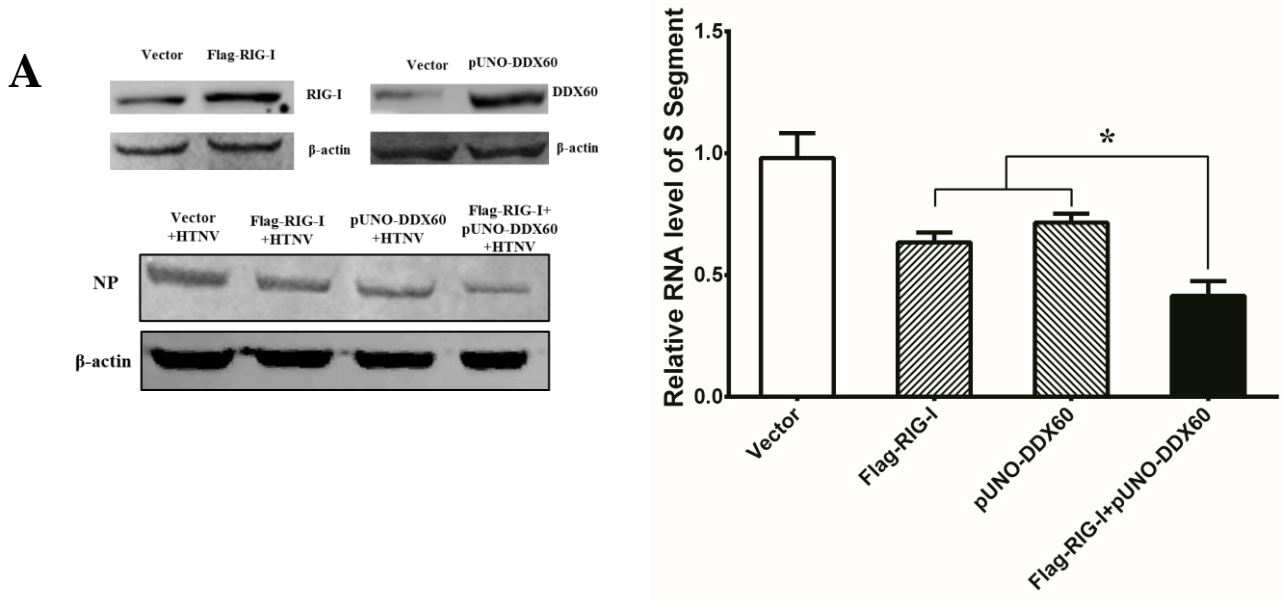
图 2.9 敲减 RIG-I 及 DDX60 对 HTNV 复制及 IFN $\beta$  产生的影响

Fig. 2.9 The effects of silencing RIG-I and DDX60 on HTNV replication and IFN $\beta$  production

（在 HUVECs 中转染 Si-RIG-I-2、Si-DDX60-1、Si-RIG-I-2+Si-DDX60-1，转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV，于 48hpi 通过 Western Blot 检测 HTNV NP 表达（A，左），通过 qRT-PCR 检测 HTNV S 片段（A，右）、IFN $\beta$  mRNA 的表达水平（B）；在 HUVECs 中转染含有 IFN $\beta$  启动子的双荧光素报告质粒，同时转染 Si-RIG-I-2、Si-DDX60-1、Si-RIG-I-2+Si-DDX60-1，转染 24h 后以 MOI=0.1

感染 HTNV，通过检测相对荧光强度评价 IFN $\beta$  启动子活性 (C)。\* $P$ <0.01, \*\* $P$ <0.001, \*\*\* $P$ <0.0001; One-Way ANOVA。)

在 HUVECs 中分别转染 Flag-RIG-I、pUNO-DDX60、Flag-RIG-I+pUNO-DDX60，转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV，于 48hpi 通过 Western Blot 检测 HTNV NP 表达，结果提示同时过表达 RIG 及 DDX60 可有效抑制 HTNV NP 的产生，且其效果优于单独过表达 RIG-I 或 DDX60 (如图 2.10-A)，且同时过表达 RIG-I 及 DDX60 对 IFN $\beta$  产生的促进作用 (如图 2.10-B)，以及对 IFN $\beta$  启动子的活化作用 (如图 2.10-C) 均优于单独过表达二者之一。上述结果提示 HTNV 感染可通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导 NEAT1-2 转录，而 NEAT1-2 可通过正向调控 RIG-I 及 DDX60 表达促进 I 型 IFN 产生，即 NEAT1-2 与 RIG-I 信号通路交互作用参与宿主细胞抗 HTNV 的固有免疫应答。





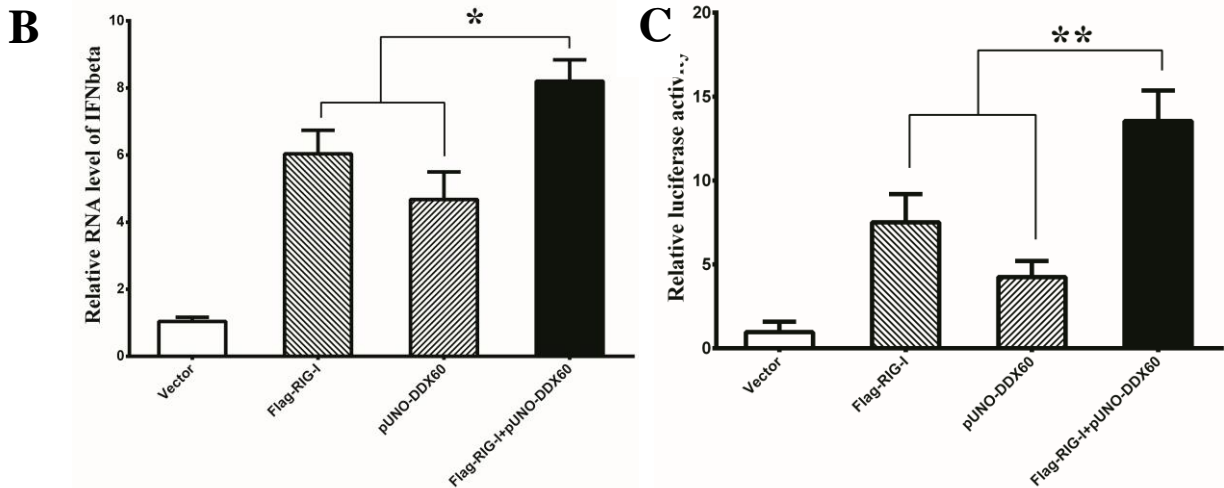


图 2.10 过表达 RIG-I 及 DDX60 对 HTNV 复制及 IFN $\beta$  产生的影响

Fig. 2.10 The effects of overexpressing RIG-I and DDX60 on HTNV replication and IFN $\beta$  production

(在 HUVECs 中转染 Flag-RIG-I、pUNO-DDX60、Flag-RIG-I+pUNO-DDX60，转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV，于 48hpi 通过 Western Blot 检测 HTNV NP 表达 (A, 左)，通过 qRT-PCR 检测 HTNV S 片段 (A, 右)、IFN $\beta$  mRNA 的表达水平 (B)；在 HUVECs 中转染含有 IFN $\beta$  启动子的双荧光素报告质粒，同时转染 Flag-RIG-I、pUNO-DDX60、Flag-RIG-I+pUNO-DDX60，转染 24h 后以 MOI=0.1 感染 HTNV，通过检测相对荧光强度评价 IFN $\beta$  启动子活性 (C)。\* $P$ <0.01, \*\* $P$ <0.001, \*\*\* $P$ <0.0001；One-Way ANOVA。)

### 3.3 NEAT1 通过募集 SFPQ 调控 RIG-I 及 DDX60 表达间接发挥抗 HTNV 作用

NEAT1-2 是哺乳动物核旁斑的重要组成部分，已有研究表明应激刺激诱导上调的 NEAT1-2 可募集 SFPQ、NONO 等蛋白，在细胞核内形成斑片结构，即核旁斑<sup>[68]</sup>；Imamura K 等<sup>[66]</sup>通过生物信息学软件预测 SFPQ 的 DNA 结合位点，结果提示其可结合 IL-8、CCL5、RIG-I、DDX60 等与固有免疫相关分子基因的启动子区域 (如表 2.2)，且该研究小组已证实 SFPQ 结合 IL-8 启动子抑制 IL-8 mRNA 转录。我们推测 HTNV 感染诱导的 NEAT1-2 可通过类似机制调控 RIG-I 及 DDX60 的表达。

为检测 HTNV 感染诱导上调的 NEAT1 是否结合 SFPQ，在 HUVECs 感染 HTNV 后不同时间点进行 RIP 实验，结果显示与 0dpi 相比，感染后第一天 SFPQ 结合 NEAT1 的量并无显著变化 ( $P$ >0.05)，但随着感染时间的延长 (2dpi、3dpi)，SFPQ 结合 NEAT1 及 NEAT1-2 的量逐渐增加 ( $P$ <0.01 或  $P$ <0.001) (如图 2.11-A)。值得注意

是，HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs 或 HeLa 细胞，在不同时间点提取细胞蛋白进行 Western Blot 检测 NEAT1 结合蛋白 SFPQ 及 NONO 的表达水平，结果提示 HTNV 感染并不影响 SFPQ 及 NONO 在细胞中的表达量（如图 2.11-B）；在 HUVECs 或 HeLa 细胞中过表达 NEAT1-2 或者敲减 NEAT1-2 亦不影响 SFPQ 及 NONO 在细胞中的表达量（如图 2.11-C），上述实验可基本排除 HTNV 感染后宿主细胞通过改变 SFPQ 表达量进而影响调控下游分子表达的可能。

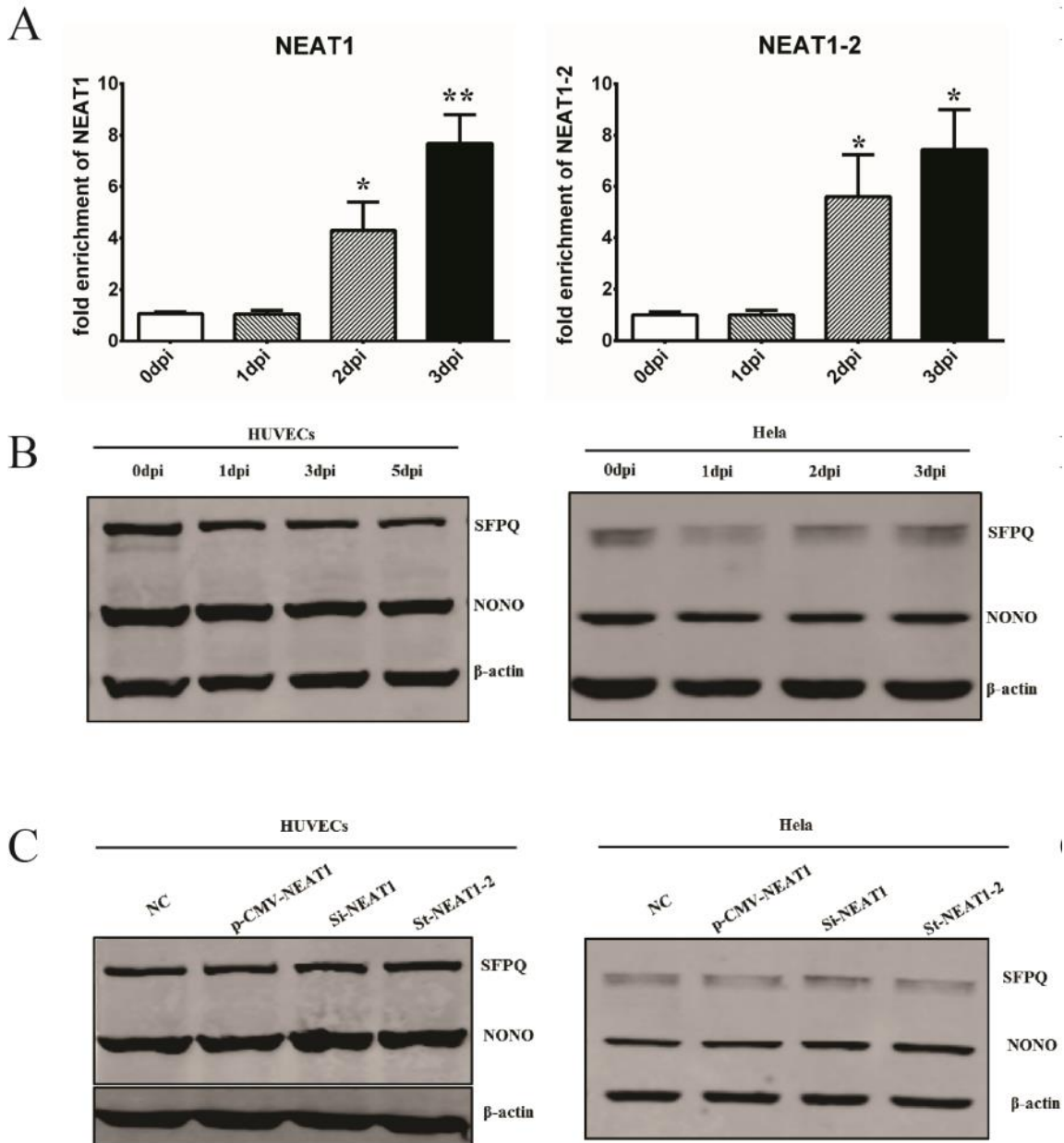
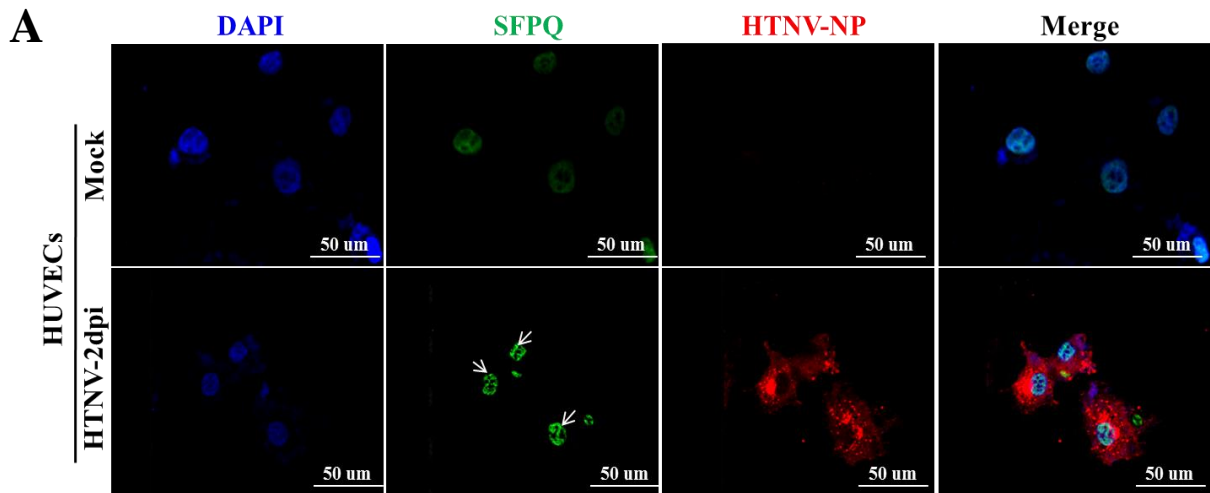


图 2.11 不同条件下 SFPQ 与 NEAT1 的相互作用

Fig. 2.11 The interaction between SFPQ and NEAT1 under different conditions

(A. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs, 分别于 0dpi、1dpi、2dpi、3dpi 进行 RIP 实验, 即利用 SFPQ 抗体捕捉 SFPQ, 通过 qRT-PCR 法检测 SFPQ 所结合的 NEAT1 及 NEAT1-2, 以 0dpi 组的 NEAT1 或 NEAT1-2 结合量设为 1, 计算 1dpi、2dpi、3dpi 组 NEAT1 或 NEAT1-2 的相对结合量。 $*P<0.01$ ,  $**P<0.001$ ,  $***P<0.0001$ ; Student's *t* 检验。B. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs 或 HeLa 细胞, 感染后不同时间点提取细胞蛋白进行 Western Blot, 检测 SFPQ 及 NONO 表达量的变化。C. 在 HUVECs 中分别转染 pCMV-NEAT1-2、Si-NEAT1 及 St-NEAT1-2, 转染 48h 后提取细胞蛋白进行 Western Blot, 检测 SFPQ 及 NONO 表达量的变化。)

为进一步明确 HTNV 感染后 SFPQ 亚细胞定位的变化, 以 MOI=1 感染 HUVECs 及 HeLa 细胞, 于 2dpi 通过 IFA 观察细胞内 HTNV NP 及 SFPQ 表达及分布情况, 结果提示在 HTNV NP 阳性的细胞中, SFPQ 在细胞核内由原来的散在分布 (0dpi) 变为聚集的点状分布 (2dpi) (如图 2.12-A, HUVECs; B, HeLa 细胞); HTNV 感染 HUVECs 后的 Co-IP 结果显示, 与 Mock 组相比, SFPQ 和 NONO 结合明显增加 (如图 2.12-B)。上述实验结果提示 HTNV 感染后 NEAT1-2 募集 SFPQ、NONO 等分子, 促进核旁斑形成。



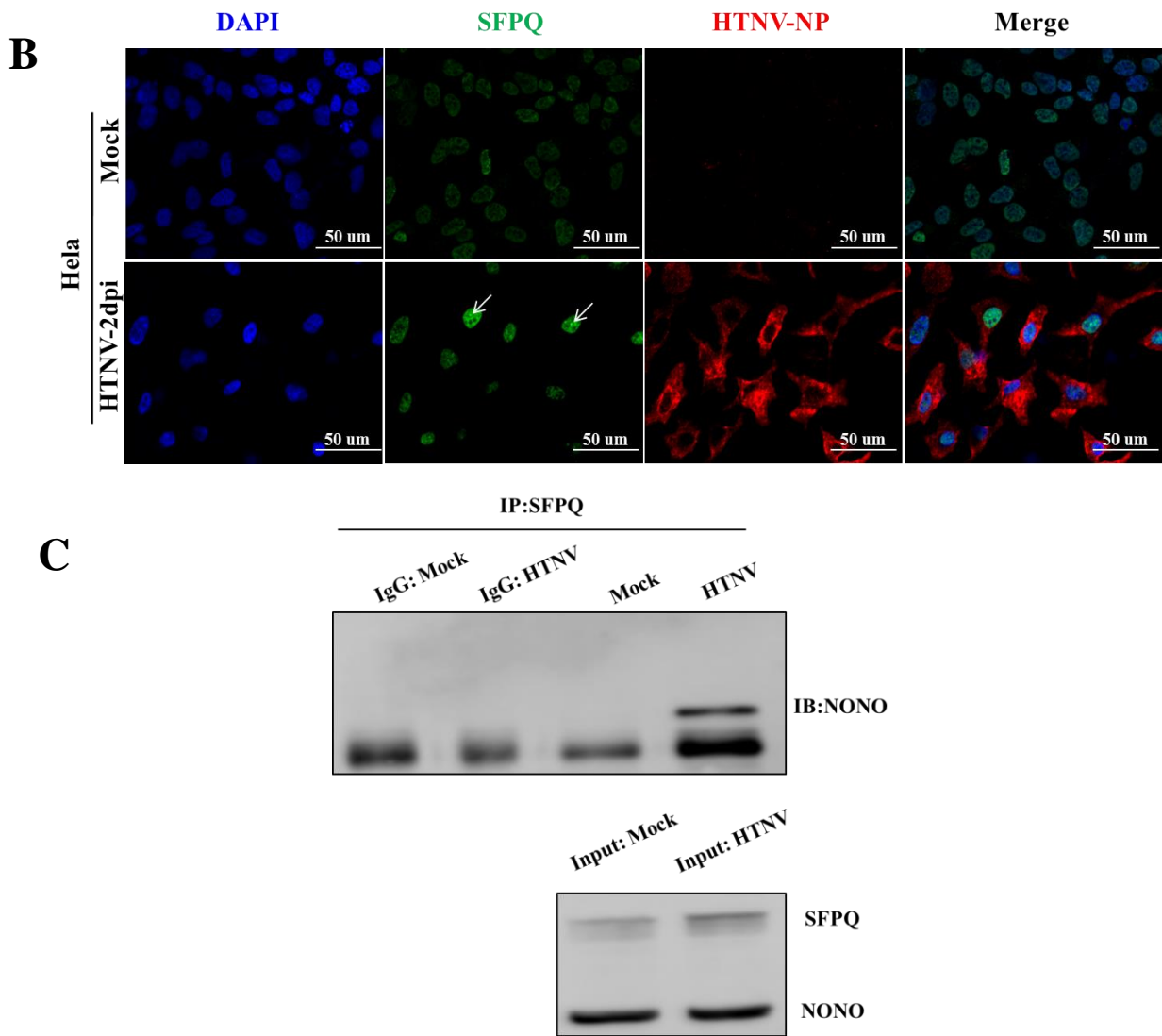


图 2.12 HTNV 感染后 SFPQ 亚细胞定位 (A, B) 及其与 NONO 相互作用 (C)

**Fig. 2.12 The intracellular location of SFPQ (A, B) and the interaction between SFPQ and NONO (C)**

(A-B. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs (A) 或 HeLa 细胞 (B), 于 2dpi 通过 IFA 检测 HTNV NP (红) 及 SFPQ (绿) 在细胞内的表达及分布情况。C. HTNV 以 MOI=1 感染 HUVECs, 于 2dpi 通过免疫共沉淀法检测 SFPQ 是否结合 NONO。)

为明确 SFPQ 在宿主细胞抗 HTNV 固有免疫中的作用, 以 NEAT1-2 敲减为对照, 检测 SFPQ 敲减后 HTNV 感染复制水平、宿主细胞 RIG-I 及 DDX60 分子的表达变化。结果显示, HUVECs 中转染 Si-SFPQ 可有效敲减 SFPQ 的表达 (如图 2.13-A 上); 在 NEAT1-2 或 SFPQ 敲减条件下以 MOI=1 感染 HTNV, 2dpi 进行 Western Blot 检测 HTNV NP 表达, 结果显示, 与 NC 组相比 St-NEAT1-2 组 HTNV NP 表达显著上调,

Si-SFPQ 组 HTNV NP 表达显著下调 (如图 2.13-A 下); 同时, 通过 qRT-PCR 检测 HTNV S 片段复制情况、RIG-I 及 DDX60 mRNA 表达情况, 结果显示, 与 NC 组相比, St-NEAT1-2 组 HTNV S 片段显著上调 ( $P < 0.001$ , 如图 2.13-B), RIG-I 及 DDX60 mRNA 表达下调 ( $P < 0.01$ , 如图 2.13-C、D); 而与 NC 组相比, Si-SFPQ 组 HTNV S 片段显著下调 ( $P < 0.001$ , 如图 2.13-B), RIG-I 及 DDX60 mRNA 表达上调 ( $P < 0.001$ , 如图 2.13-C、D), 提示敲减 SFPQ 可促进 RIG-I 及 DDX60 表达, 抑制 HTNV 感染复制。本部分实验结果提示 HTNV 感染后 NEAT1 通过募集 SFPQ, 解除其对 RIG-I 及 DDX60 分子的转录抑制作用, 促进 RIG-I 及 DDX60 表达, 最终起到抑制 HTNV 感染的作用。

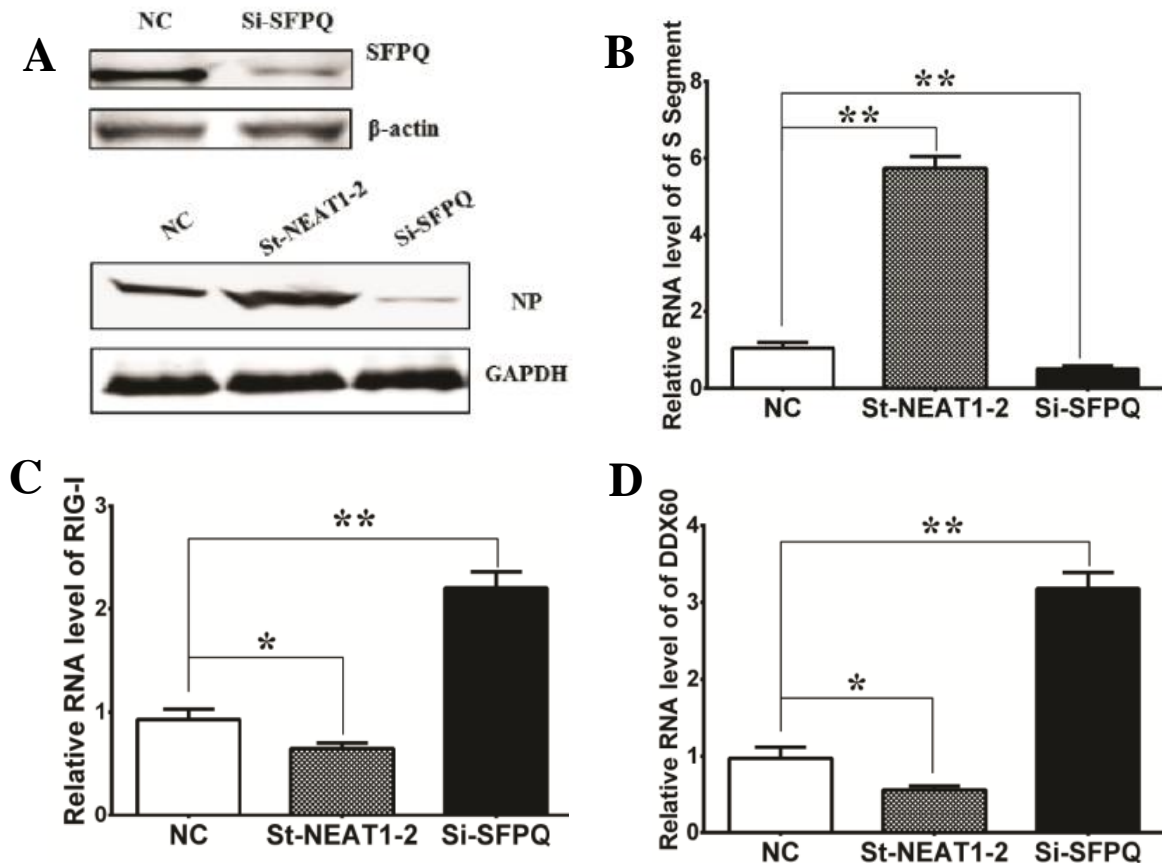


图 2.13 SFPQ 调控 RIG-I 及 DDX60 表达发挥抗 HTNV 作用

Fig. 2.13 SFPQ regulates the expression of RIG-I and DDX60 and inhibits HTNV infection

(A. 上, 在 HUVECs 中转染 Si-SFPQ 通过 Western Blot 检测敲减效率; 下, 在 HUVECs 中分别转染 St-NEAT1-2 及 Si-SFPQ, 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 2dpi 通过 Western Blot 检测

HTNV NP 表达量。B-D. 在 HUVECs 中分别转染 St-NEAT1-2 及 Si-SFPQ, 转染 24h 后以 MOI=1 感染 HTNV, 于 2dpi 通过 qRT-PCR 分别检测 HTNV S 片段(B)、RIG-I mRNA(C)、DDX60 mRNA (C) 的表达水平, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ; Student's  $t$  检验。)

## 4 讨论

哺乳动物细胞核精细复杂, 具有高度的组织性, 由多种无膜结构的细胞核小体 (nuclear bodies) 构成。这些核小体中包含具有 RNA 加工处理功能的特殊蛋白或者 RNA, 其可以调控某些特殊基因的表达, 并可作为大分子核糖核蛋白 (macromolecular ribonucleoprotein) 的装配车间促进核糖体 (ribosomes) 及剪接体 (spliceosomes) 的形成。许多 lncRNA 被发现定位于这些核小体结构内。核旁斑 (paraspeckles) 即邻近细胞核核斑结构 (nuclear speckles), 直径约为 360nm, 主要由 lncRNA NEAT1 及 40 多种 RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein, RBP) 组成, 其中的 RBP 包括黑腹果蝇行为及人剪接 (*Drosophila melanogaster* behavior and human splicing, DBHS) 蛋白即核旁斑组成蛋白 (Paraspeckle component 1)、不含 POU 结构域的八聚核苷酸结合蛋白 (containing nucleotide octamer-binding protein without POU domain, NONO) 和脯氨酸及谷氨酰胺富集剪接因子 (splicing factor proline and glutamine rich, SFPQ) 等蛋白<sup>[68]</sup>。lncRNA NEAT1 通过介导核旁斑形成参与多种应激反应、细胞凋亡等多种生物学进程, 已有多项研究报道 lncRNA NEAT1 通过拮抗 p53 信号通路参与与肿瘤的发生及进展<sup>[128]</sup>, 而其在固有免疫领域的研究则较少。

我们研究发现 HTNV 感染后可诱导 RIG-I 及 DDX60 表达, 且 IFA 结果显示两者有共定位, 提示其两者存在相互作用; 进一步的过表达及敲减实验显示两者协同促进 HTNV 感染后 IFN $\beta$  的表达。同时, 本部分研究发现 HTNV 感染通过 RIG-I-IRF7 信号通路上调 lncRNA NEAT1, NEAT1 可将 SFPQ 募集至细胞核核旁斑位置, 而生物信息软件预测 SFPQ 在正常条件下可能结合于 RIG-I、DDX60 等固有免疫相关分子的启动子区域, 起到转录抑制作用。NEAT1 可能通过解除 SFPQ 对上述分子的转录抑制作用, 促进 RIG-I 及 DDX60 表达, 进而正反馈 HTNV 感染后 RIG-I 信号通路, 增强机体 IFN $\beta$  的产生, 辅助宿主识别并清除 HTNV。

### 4.1 lncRNA NEAT1 调控机体固有免疫反应

已有研究表明流感病毒、polyI:C 刺激等方式可激活 TLR3-p38 信号通路诱导

NEAT1 转录表达, 而 NEAT1 募集原本结合于 IL-8 启动子区域的 SFPQ, 进而促进 IL-8 等促进 M $\phi$  活化的细胞因子产生, 辅助机体清除病毒<sup>[66]</sup>。有趣的是, Imamura K 等<sup>[66]</sup> 研究人员通过基因芯片技术发现在 HeLa TO 细胞中敲减或过表达 NEAT1, 可分别抑制或促进 RIG-I、DDX60、IL-8、CCL5 等分子表达; 但使用 polyI:C 直接刺激敲减 NEAT1 分子的 HeLa TO 细胞, 与对照组相比, NEAT1 敲减组细胞的 IFN $\beta$  产生水平并不受影响, 但 RIG-I、DDX60、IL-8、CCL5 等分子表达下调, 提示在该条件下 NEAT1 不调控 IFN 信号而只影响 IL-8 等分子表达。我们的研究也发现, 单独过表达或者抑制 NEAT1 表达并不会直接影响 IFN $\beta$  产生, 与上述报道一致; 但在 HTNV 感染条件下, lncRNA 可正向调控宿主细胞 IFN $\beta$  的产生, 与上述结果矛盾的原因有可能为所用细胞系不同, 或者使用的刺激物不同因而所激活的信号通路不同。

Imamura K 等<sup>[66]</sup> 研究表明 polyI:C 刺激是通过 TLR3-p38 信号通路诱导 NEAT1 上调, 而本研究发现 HTNV 是通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导 NEAT1 表达, 其差异的主要原因可能有两点, 一是所用细胞不同, Imamura K 等实验细胞为 HeLa 细胞, 即肿瘤细胞系, 而我们实验细胞为 HUVECs, 即原代细胞; 二是所用刺激不同, Imamura K 等实验刺激为人工合成的 dsRNA, 即 polyI:C, 可激活 TLR3、RIG-I 等信号通路以促进 I 型 IFN 产生, 而我们实验刺激为 HTNV 感染, HTNV 感染可激活 RIG-I、TLR4 等信号通路从而促进 I 型 IFN 产生。

既往研究结果提示 IRF3 是诱导 IFN 的主要转录因子, 而 IRF7 很少作为独立的转录因子, 多以配体形式与 IRF3 共同入核发挥作用, 但我们发现 HTNV 感染后 IRF7 入核而未见 IRF3 入核, 且敲减 IRF7 可抑制 HTNV 感染后 NEAT1 的上调, 提示 IRF7 可能是促进 NEAT1 表达的重要转录因子。

#### 4.2 DDX60 协同 RIG-I 促进机体产生 IFN

DDX60 与 RIG-I (DDX58) 同属于 DExD/H 盒解旋酶 (DexD/H-box helicase) 家族, 该家族成员还包括 DDX1、DDX3、DDX7、DDX9、DDX36、DDX50 等分子。最近越来越多研究表明 DExD/H 盒解旋酶家族成员参与细菌、病毒核酸的识别过程<sup>[167]</sup>; 另有部分研究提示多种 DDX 分子可通过协同病毒核酸的解旋、核衣壳蛋白的转运、病毒核酸的组装等促进病毒的复制及装配过程<sup>[171]</sup>。

Miyashita M 等<sup>[172]</sup> 首次报道 DDX60 在 polyI:C 刺激或者仙台病毒 (sendai virus,

SeV) 等病毒感染后上调, 其定位于细胞浆。DDX60 结合 RIG-I、MDA5, 辅助其识别病毒 dsRNA, 促进 RIG-I 及 MDA5 信号通路的活化; 沉默 DDX60 可抑制 polyI:C 转染或 SeV、水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV)、脊髓灰质炎病毒 (poliovirus)、HSV-1 等感染后宿主细胞 IFN $\beta$  及 CXCL-10 的产生。该课题组后续又发现 DDX60 除协同 RIG-I 辅助 IFN 产生外, 其自身亦可作为抗病毒分子直接识别并降解病毒核酸, 但是病毒可通过活化细胞表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 进而将 DDX60 磷酸化, 使之失去抗病毒作用<sup>[168]</sup>。与之相反, Goubau D 研究小组<sup>[166]</sup>通过构建 DDX60 缺陷的转基因小鼠发现, 使用流感病毒、脑心肌炎病毒、辛德毕斯病毒、牛痘病毒、HSV-1 感染 DDX60 缺陷小鼠本身或其细胞, 均未发现其与野生型小鼠存在差异, 提示 DDX60 可能并不影响机体抗病毒免疫应答; DDX60 缺失情况下, 使用 RIG-I 激动剂刺激小鼠成纤维细胞, 其 I 型 IFN 信号应答并未受到影响, 提示 DDX60 可能并非 RIG-I 必须的协同分子。上述研究表明不同病毒感染条件下 DDX60 的功能不同, 其抗病毒谱及其抗病毒的具体分子机制尚不清楚。

有研究指出汉坦病毒感染的细胞中未检出 dsRNA 的存在, 因此, 理论上讲汉坦病毒不能被 RIG-I 识别<sup>[124]</sup>; 同时, 汉坦病毒产生的 Gn 在感染早期可通过抑制 TRAF3-TBK1 形成、阻断 IRF3 磷酸化等方式拮抗 IFN 产生<sup>[113; 114]</sup>。然而, 另有研究表明汉坦病毒感染可活化 RIG-I 信号通路促进 CXCL10 等细胞因子释放<sup>[8]</sup>。我们研究发现 HTNV 感染后 NEAT1 可正向调控 DDX60 及 RIG-I 表达, 而 DDX60 与 RIG-I 起到协同抗 HTNV 感染的作用, 且两者共同促进宿主细胞 IFN 的产生, 因此, 我们推测 DDX60 可能参与辅助 RIG-I 识别 HTNV 病毒核酸的过程, 但此推测仍需进一步实验研究证实。



## 第三部分 HFRS 患者外周血单核细胞中 NEAT1-2 表达水平与疾病进展的相关性研究

前两部分实验通过敲减和/或过表达实验,分别在细胞及动物层次验证了 lncRNA NEAT1-2 抗 HTNV 感染的作用,并在细胞水平明确了 NEAT1-2 与 RIG-I 信号通路相互作用的分子机制。上述实验结果为 NEAT1-2 抗 HTNV 研究提供了理论基础,本部分研究拟从临床样本出发,检测肾综合征出血热(HFRS)患者外周血单核细胞中 NEAT1-2 的表达水平,探索其与 HFRS 疾病病程、病情严重程度的相关性,并通过最高值秩相关检验(the rank correlation test)分析 NEAT1-2 表达量与血清病毒载量(serum viral load)、血肌酐最高值(serum creatinine)、血小板计数最低值(platelet count)及白细胞计数(white blood cell count)的关系,明确检测外周血单核细胞 NEAT1-2 在 HFRS 发病过程中的作用,为 HFRS 疾病的发病机制研究奠定基础,同时为相关抗病毒药物的研发提供新靶点。

### 1 材料

#### 1.1 标本和病历资料

经第四军医大学伦理委员会批准收集唐都医院感染病科 2015 年 9 月~2016 年 3 月 HFRS 患者血液标本 86 份,同时收集西京医院输血科健康志愿献血者(24~35 岁)健康对照血浆 20 份。患者基本资料及相关临床信息见表 3.1。

表 3.1 研究样本的临床特点及实验室相关检测指标

Table 3.1 Clinical and laboratory characteristics of the study population

	轻型/中型患者	重型/危重型患者	P 值
年龄	42.91 ± 1.881	41.28 ± 1.549	0.5073
性别(女/男)	10/22	8/24	0.7816
WBC (×10 <sup>9</sup> )	14.09 ± 2.190	17.59 ± 1.418	0.1842
MONO %	10.97 ± 0.5358	9.739 ± 0.8122	0.2094
异型淋巴细胞百分比	9.539 ± 0.8992	10.54 ± 0.8366	0.4186

PLT ( $\times 10^9$ )	106.0 $\pm$ 7.198	81.16 $\pm$ 6.535	0.0132*
BUN, mmol/l	10.34 $\pm$ 0.9818	22.27 $\pm$ 1.340	< 0.0001**
Scr, $\mu$ mol/l	206.6 $\pm$ 22.84	302.6 $\pm$ 26.01	0.0073**

WBC, 白细胞数; PLT, 血小板数; MONO %, 单核细胞百分比; BUN, 血尿素氮; Scr, 血肌酐. 结果以均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE) 形式表示。组间比较采用非配对 *t* 检验, 其中各组年龄的比较采用 Fisher's 精确检验校正。\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01。

## 1.2 试剂及器材

人外周血淋巴细胞分离液	索莱宝公司
人单核细胞分离试剂盒 (负选) (EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit)	StemCell 公司
EDTA 抗凝管	湖北金杏科技发展有限公司
其他实时定量 PCR (qRT-PCR) 实验相关试剂参见本论文第一部分 1.5.2	

## 1.3 仪器

参见本论文第一部分 1.7

## 2 方法

### 2.1 HFRS 患者外周血 Mo 的分离

#### 1) 外周血单个核细胞的分离 (白膜层细胞)

取新鲜抗凝血 1ml 与注射用生理盐水 1:1 混匀后小心加于 2ml 的细胞分离液之液面上。以 400g 离心 (半径 15cm 水平转子) 20min, 此时离心管中由上至下细胞分四层: 第一层为血浆层, 第二层为环状乳白色淋巴细胞层, 第三层为透明分离液层, 第四层为红细胞层。收集第二层细胞放入含注射用生理盐水 4~5 ml 的试管中充分混匀后 400g 离心 20min。沉淀经反复洗 2 次即得所需白膜层细胞。

#### 2) 从白膜层细胞阴性筛选 (负筛) Mo

使用无血清 RIPA 1640 培养基以  $5 \times 10^7$ /ml 重悬白膜层细胞, 取 2ml 重悬细胞加入 5ml EP 管, 并加入 100  $\mu$ l 试剂盒中 Isolation Cocktail 及 100  $\mu$ l Platelet Removal Cocktail, 混匀后室温静置 5min。握旋磁珠 30s, 将 100  $\mu$ l 磁珠混匀后加入上述 EP 管中, 混匀后室温静置 5min, 最后补加试剂盒推荐补充液至 2.5ml, 温和摇晃并用移液枪混匀 2~3 次。将 EP 管放置于磁力架室温静置 5min 后吸取上清, 1000 rpm 离心 5min 即可获得 Mo。

## 2.2 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 HFRS 患者外周血 Mo 中 NEAT1 的表达

参见本论文第一部分 2.4。

## 2.3 统计分析方法

使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 通过 Mann-Whitney *U* 检验分析各组间 NEAT1-2 表达水平的差异; 通过最高值秩相关检验 (the rank correlation test) 分析 NEAT1-2 表达与临床实验室指标的线性回归关系。  $P < 0.05$  则认为差异有统计学意义。利用 GraphPad Prism 6 软件处理数据并作图。

# 3 结果

## 3.1 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与疾病病程及病情严重程度关系

根据中华人民共和国卫生部 2008 年颁布的流行性出血热诊断标准 (diagnostic criteria for epidemic hemorrhagic fever, WS278-2008), 按照 HFRS 疾病病程分类, 将 86 份患者外周血分为五组, 即发热期组 (febrile stage,  $n=14$ )、低血压休克期组 (hypotensive stage,  $n=14$ )、少尿期组 (oliguric stage,  $n=24$ )、多尿期 (diuretic stage,  $n=24$ )、恢复期组 (convalescent stage,  $n=10$ ); 按照 HFRS 病情严重程度分类, 将上述血样分为轻型/中型组 (mild/moderate,  $n=54$ ) 及重型/危重型组 (severe/critical,  $n=32$ )。分离外周血单个核淋巴细胞, 并通过阴性筛选试剂盒筛选 Mo, 通过 qRT-PCR 计算 Mo 中 NEAT1-2 相对 GAPDH mRNA 的表达量。分析外周血 Mo 中 NEAT1-2 与 HFRS 疾病病程的关系, 结果显示, 与健康人相比 HFRS 发热期 NEAT1-2 表达显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与发热期相比, 低血压休克期及少尿期 NEAT1-2 变化无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但多尿期及恢复期 NEAT1-2 表达水平显著下降 ( $P < 0.001$ ) (如图 3.1-A), 提示外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平在 HFRS 发病早期升高, 但随病程的进行而逐渐下降至正常水平。值得注意的是, 轻型/中型组 HFRS 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平高于重型/危重型 (如图 3.1-B), 即 NEAT1-2 的高表达提示 HFRS 患者预后较好。

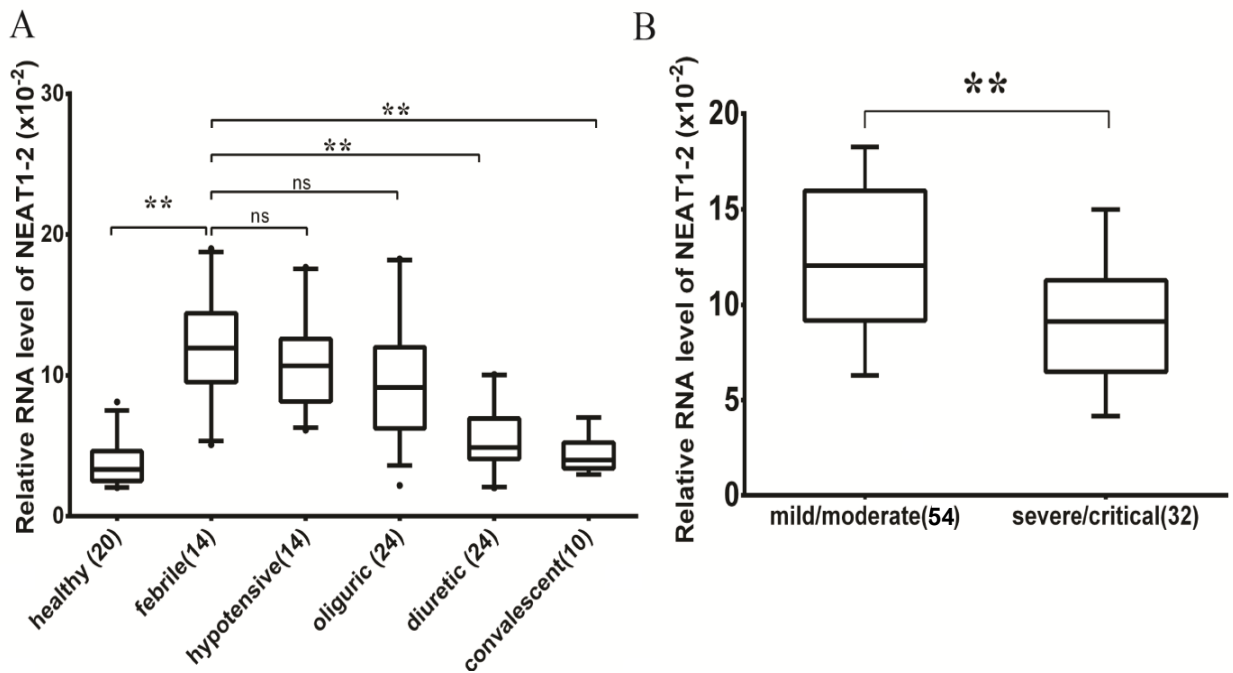


图 3.1 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与疾病病程 (A) 及病情严重程度 (B) 的关系

Fig. 3.1 The relationship between NEAT1-2 expression and the stage (A) or severity (B) of HFRS

### 3.2 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与临床部分实验室检测指标的关系

已有研究表明 HFRS 外周血病毒载量与 HFRS 病情严重程度呈正相关, 血肌酐升高提示 HFRS 患者肾功能受损, 外周血血小板数目与 HFRS 病情严重程度呈负相关<sup>[175]</sup>; 多数 HFRS 患者外周血白细胞数升高, 但其升高水平与疾病严重程度并无关系<sup>[175]</sup>。通过最高值秩相关检验 (the rank correlation test) 分析 NEAT1-2 表达量与上述临床实验室指标的关系, 结果提示, NEAT1-2 表达水平与 HFRS 患者外周血病毒载量呈负相关 ( $R^2=0.114$ ,  $P=0.0022$ , 如图 3.2-A), 与 Scr 最高值呈负相关 ( $R^2=0.1279$ ,  $P=0.001$ , 如图 3.2-B), 与 PLT 最低值呈正相关 ( $R^2=0.0878$ ,  $P=0.0069$ , 如图 3.2-C), 但与 WBC 无线性回归关系 ( $R^2=0.0008480$ ,  $P=0.7951$ , 如图 3.2-D)。

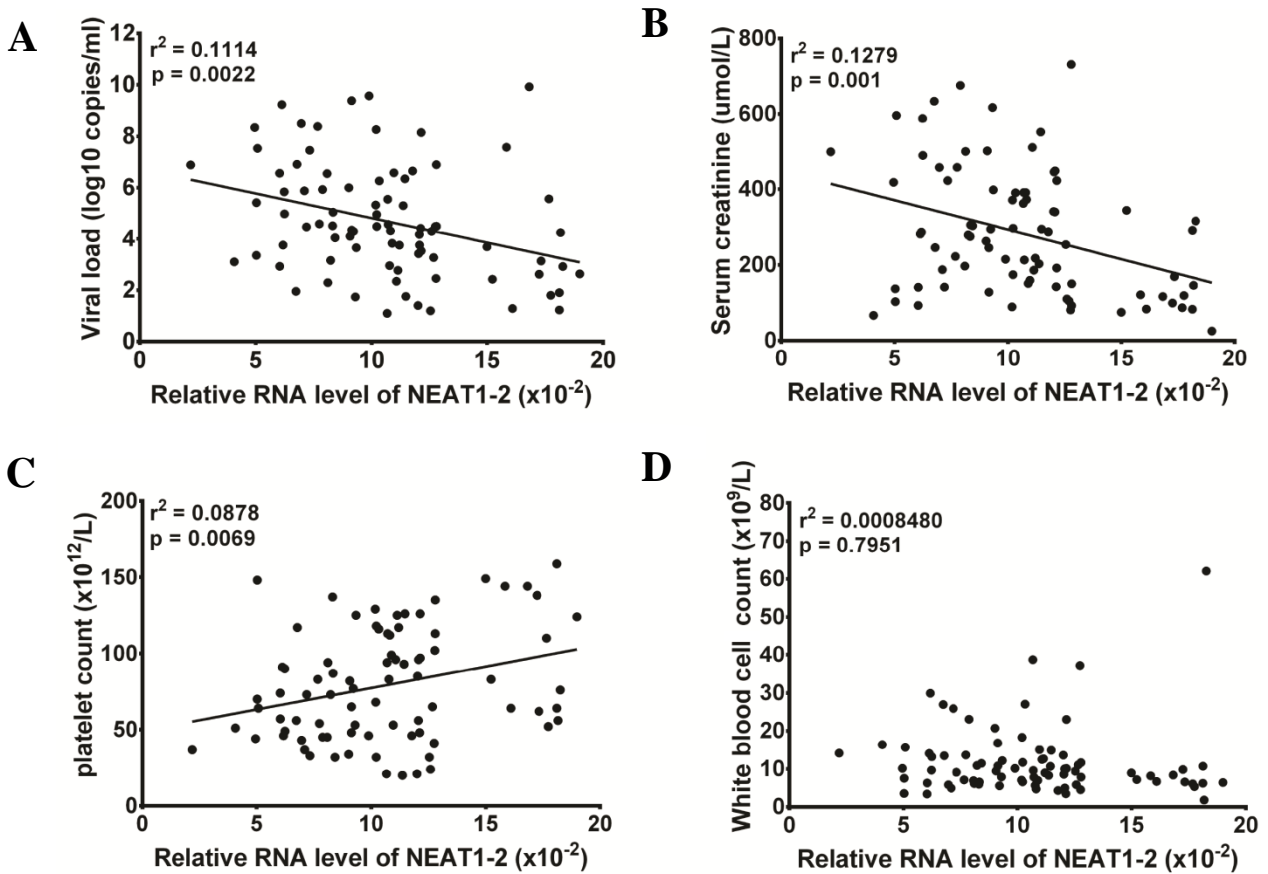


图 3.2 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与临床实验室检测指标的关系

Fig. 3.2 The relationship between NEAT1-2 expression and different clinical parameters

## 4 讨论

肾综合征出血热（hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS）是由布尼亚病毒目汉坦病毒科各型病毒引起的自然疫源性疾病，在我国其致病病毒类型为汉滩型和汉城型，主要传染源为黑线姬鼠、褐家鼠等啮齿类动物<sup>[176]</sup>。作为 HFRS 主要疫区，我国每年发病人数为 5~10 万人，约占全球总病例数的 85%<sup>[127]</sup>。该病以男性青壮年为主要发病人群，成人 HFRS 患者有典型的三大主症，即发热、出血和肾脏损害，同时，“三痛”（头痛、腰痛、眼眶痛）和“三肿”（球结膜水肿、眼睑、颜面浮肿）表现突出。

HFRS 发病机制与病毒直接作用和自身免疫病理损害有关<sup>[177]</sup>。病毒本身的作用可直接损害毛细血管内皮细胞，造成广泛性的小血管损害，进而导致各脏器的病理损害和功能障碍；病毒抗原刺激机体免疫系统，引起 I 型和 III 型超敏反应。病程早

期可能有 I 型变态反应参与, 表现为血清中 Ig E 抗体增高, 在病毒抗原诱导下, 嗜碱性粒细胞和肥大细胞释放组织胺, 由此引起小血管扩张、通透性增加、血浆外渗, 形成早期充血、水肿等症状。III 型变态反应在疾病的发生发展中起着重要作用。免疫复合物形成并广泛沉积于小血管壁、肾小球、肾小管基底膜以及红细胞和血小板表面, 激活补体系统, 致全身小血管内皮细胞损伤, 导致血管通透性增加, 从而引起血浆外渗、血液浓缩、组织水肿、低血压、休克和急性肾功能不全。

汉坦病毒感染机体后, 无论通过哪种致病机制引起疾病的发生, 病毒都是诱导疾病发生的始动因素, 因此病毒载量的高低与疾病进展及病情严重程度息息相关。一方面, 病毒血症导致病毒全身播散, 感染靶细胞并在其中大量复制, 直接损伤血管内皮细胞, 使之通透性增加, 加重疾病病情。另一方面, 血液中的病毒成分, 或者感染细胞所表达病毒抗原均可刺激机体免疫细胞 (如 Mo-M $\phi$ 、NK 细胞、CTL 细胞等) 活化, 或者诱导 IL-1 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  等多种促炎细胞因子释放, 引起细胞因子风暴加重病理损伤, 或者免疫细胞直接攻击损害血管内皮细胞, 引起血管渗漏和出血。已有多项研究表明 HFRS 或 HPS 患者外周血病毒载量与疾病的病程及病情严重程度相关, 如 Saksida 等<sup>[178]</sup>检测了 DOBV 感染引起的 HFRS 患者外周血的病毒载量, 也发现病情重的患者病毒载量高。Xiao 等<sup>[179]</sup>检测了 SNV 感染引起的 HPS 患者的外周血病毒载量, 发现病毒载量随着病情发展由高逐渐变低, 重症患者早期外周血病毒载量显著高于轻型患者, 差异具有统计学意义。Yi J 等<sup>[175]</sup>检测了 HTNV 感染引起的 HFRS 患者急性期外周血病毒载量, 发现重型/危重型 HFRS 患者病毒载量明显高于轻型/重型 HFRS 患者, 差异有统计学意义; 且 HFRS 患者发热期/休克期病毒载量与血小板计数最低值呈负相关, 与肌酐最高值呈正相关, 提示病毒复制以及病毒直接损害作用可能是 HFRS 的重要致病机制之一。

本研究前期体内外实验结果均提示 lncRNA NEAT1 具有抗 HTNV 感染的作用; 本部分临床样本检测结果表明, HFRS 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与患者外周血病毒载量呈负相关, 我们还发现轻型/中型组 NEAT1-2 表达水平显著高于重型/危重型, 差异有统计学意义, 提示 HTNV 感染早期 NEAT1 的高表达有助于 HTNV 的清除, 进而有助于病情缓解。血清肌酐最高值反应临床患者肾脏损伤情况, 外周血血小板数目最低值反应临床患者出血倾向。HFRS 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与血清肌酐最高值呈负相关, 提示 NEAT1-2 表达高的患者肾脏损伤小; HFRS

患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与外周血血小板数目最低值呈正相关，提示 NEAT1-2 表达高的患者出血倾向低，血凝状态较好。

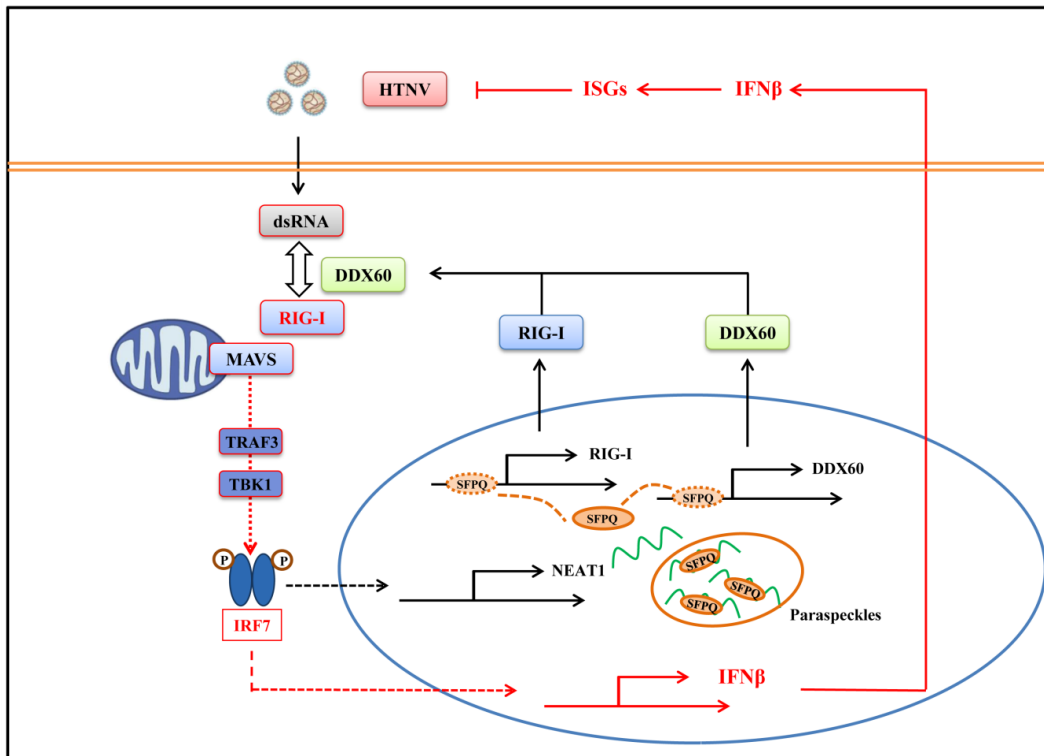
值得注意的是，最新研究发现 NEAT1 与自身免疫性疾病关系密切。Zhang F 等<sup>[180]</sup>研究发现体外使用 LPS 刺激单核细胞可活化 p38 信号通路进而诱导 NEAT1 表达，而 NEAT1 在系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus, SLE）的患者外周血单核细胞中高表达，其与 IL-6、CXCL-10 等细胞因子的产生呈正相关，亦与 SLE 患者病情的严重程度呈正相关，因此 NEAT1 可作为评价 SLE 预后的重要指标之一。由此可见 NEAT1 的持续活化可能导致细胞因子风暴和免疫紊乱，而 HFRS 患者 NEAT1 表达自感染早期升高（发热期、低血压休克期、少尿期），到晚期下降（多尿期、恢复期），并未出现持续升高的趋势，故 NEAT1 在 HTNV 感染早期发挥作用，即感染早期 NEAT1 的表达可以促进机体清除 HTNV，其亦可作为判断 HFRS 预后的指标之一。在 HFRS 疾病早期（发热期/低血压休克期），通过检测患者外周血 Mo 中 NEAT1 的表达水平可初步判断疾病病情，若 NEAT1 表达低，提示患者未能有效抑制 HTNV 在体内的感染复制，可能为重型或危重型 HFRS，应及时进行抗病毒、补液、透析等治疗手段以降低死亡率，改善预后。

## 小 结

1. DGE 结果显示 HTNV 感染 HUVECs 后可诱导 NEAT1、GAS5、IPW 等 lncRNA 表达上调, CMPK2、FTX 等 lncRNA 表达下调, 其中 lncRNA NEAT1 变化显著。HTNV 感染 HUVECs、HEK293、A549、HeLa 等细胞可诱导宿主细胞 lncRNA NEAT1 的表达上调, 且其上调趋势与 HTNV 感染时间和感染剂量在一定范围内呈正相关。
2. 在细胞水平敲减 NEAT1 可促进 HTNV 复制, 而过表达 NEAT1 可明显抑制 HTNV 复制, 其中转录本 NEAT1-2 起主要的抗 HTNV 作用。HTNV 感染后, NEAT1-2 表达上调早于 IFN $\beta$ , 进一步研究表明 NEAT1-2 对 HTNV 感染后宿主细胞 IFN $\beta$ 、IL-8、CCL5 等细胞因子的产生具有正向调控作用。使用 IFN $\beta$  中和抗体可以拮抗过表达 NEAT1-2 的抗 HTNV 感染作用; 使用 IFN $\beta$  可抑制 NEAT1-2 敲减对 HTNV 复制的促进作用。
3. 在小鼠体内敲减 NEAT1-2 可以抑制 HTNV 感染后小鼠 IFN $\beta$  的分泌, 抑制小鼠脾脏 M $\phi$  的聚集活化及 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化, 促进 HTNV 感染, 加重小鼠各脏器病理损伤。
4. 过表达 HTNV NP 或者 GP 均不能上调 NEAT1, 使用不同类型的细胞因子刺激亦不能诱导 NEAT1 表达。HTNV 主要通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导 NEAT1 上调。
5. HTNV 感染后 NEAT1-2 可正向调控 RIG-I 和 DDX60 的表达, 而 RIG-I 和 DDX60 协同促进 HTNV 感染后干扰素的产生, 进而抑制 HTNV 感染。
6. HTNV 感染后 NEAT1 与 SFPQ 结合形成核旁斑, 从而解除 SFPQ 对 RIG-I 及 DDX60 的转录抑制作用, 抑制 HTNV 感染复制。
7. HFRS 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达水平与疾病进展相关。HFRS 发热期、低血压休克期、少尿期患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 水平显著高于恢复期患者及健康人。HFRS 患者外周血 Mo 中 NEAT1-2 表达量与外周血病毒载量、Scr 最高值呈负相关, 而与 PLT 最低值呈正相关。



综上,本研究通过体内外实验初步明确了 HTNV 感染后宿主细胞 lncRNA NEAT1 通过正反馈调控 RIG-I 信号通路促进 IFN $\beta$  产生,进而发挥抗 HTNV 感染的分子机制(如下图),即 HTNV 感染后通过 RIG-I-IRF7 信号通路诱导 lncRNA NEAT1 表达,而 NEAT1 通过结合 SFPQ 形成核旁斑结构,解除 SFPQ 对 RIG-I、DDX60 等固有免疫相关分子的转录抑制作用,促进上述分子表达;而 RIG-I 及 DDX60 协同作用,促进 IFN $\beta$  产生进而发挥抗 HTNV 感染的作用。



**【小结】** NEAT1 通过正反馈调控 RIG-I 信号通路发挥抗 HTNV 作用

*Summary* NEAT1 exerts anti-hantaviral effects by acting as  
a positive feedback for RIG-I signaling

## 参考文献

- [1] Jiang H, Zheng X, Wang L, et al. Hantavirus infection: a global zoonotic challenge[J]. *Virol Sin*, 2017, 32(1): 32-43.
- [2] Ma Y, Yuan B, Zhuang R, et al. Hantaan virus infection induces both Th1 and ThGranzyme B+ cell immune responses that associated with viral control and clinical outcome in humans[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(4): e1004788.
- [3] Song J Y, Woo H J, Cheong H J, et al. Long-term immunogenicity and safety of inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax) in healthy adults[J]. *Vaccine*, 2016, 34(10): 1289-95.
- [4] Cheng L F, Wang F, Zhang L, et al. Incorporation of GM-CSF or CD40L Enhances the Immunogenicity of Hantaan Virus-Like Particles[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 185.
- [5] Rang A. Modulation of innate immune responses by hantaviruses[J]. *Crit Rev Immunol*, 2010, 30(6): 515-27.
- [6] Kell A M, Gale M, Jr. RIG-I in RNA virus recognition[J]. *Virology*, 2015, 479-480: 110-21.
- [7] Chan Y K, Gack M U. RIG-I-like receptor regulation in virus infection and immunity[J]. *Curr Opin Virol*, 2015, 12: 7-14.
- [8] Zhang Y, Liu B, Ma Y, et al. Hantaan virus infection induces CXCL10 expression through TLR3, RIG-I, and MDA-5 pathways correlated with the disease severity[J], 2014, 2(23): 697837.
- [9] Ye W, Xu Y, Wang Y, et al. Hantaan virus can infect human keratinocytes and activate an interferon response through the nuclear translocation of IRF-3[J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 29: 146-55.
- [10] Li Z, Rana T M. Decoding the noncoding: prospective of lncRNA-mediated innate immune regulation[J]. *RNA Biol*, 2014, 11(8): 979-85.
- [11] Carpenter S, Aiello D, Atianand M K, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. *Science*, 2013, 341(6147): 789-92.
- [12] Atianand M K, Caffrey D R, Fitzgerald K A. Immunobiology of Long Noncoding RNAs[J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35:177-198.
- [13] Avery O T, Macleod C M, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944[J]. *Mol Med*, 1995, 1(4): 344-65.
- [14] Monod J, Jacob F. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1961, 26: 389-401.
- [15] Crick F. Central dogma of molecular biology[J]. *Nature*, 1970, 227(5258): 561-3.
- [16] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-54.
- [17] Hangauer M J, Vaughn I W, Mcmanus M T. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(6): e1003569.
- [18] Bonasio R, Shiekhhattar R. Regulation of transcription by long noncoding RNAs[J]. *Annu Rev Genet*, 2014, 48: 433-55.

- [19] Guttman M, Rinn J L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 339-46.
- [20] Pagani M, Rossetti G, Panzeri I, et al. Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4(+) T-cell differentiation[J]. *Immunol Rev*, 2013, 253(1): 82-96.
- [21] Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, et al. Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat[J]. *Nature*, 2012, 491(7424): 454-7.
- [22] Yoneda R, Suzuki S, Mashima T, et al. The binding specificity of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1[J]. *Cell Biosci*, 2016, 6: 4.
- [23] Morris K V, Mattick J S. The rise of regulatory RNA[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(6): 423-37.
- [24] Bikle D D, Jiang Y, Nguyen T, et al. Disruption of Vitamin D and Calcium Signaling in Keratinocytes Predisposes to Skin Cancer[J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 296.
- [25] Paul J, Duerksen J D. Chromatin-associated RNA content of heterochromatin and euchromatin[J]. *Mol Cell Biochem*, 1975, 9(1): 9-16.
- [26] Brown C J, Ballabio A, Rupert J L, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome[J]. *Nature*, 1991, 349(6304): 38-44.
- [27] Barlow D P, Stoger R, Herrmann B G, et al. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus[J]. *Nature*, 1991, 349(6304): 84-7.
- [28] Bartolomei M S, Zemel S, Tilghman S M. Parental imprinting of the mouse H19 gene[J]. *Nature*, 1991, 351(6322): 153-5.
- [29] Wutz A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(8): 542-53.
- [30] Zhao J, Sun B K, Erwin J A, et al. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome[J]. *Science*, 2008, 322(5902): 750-6.
- [31] Heo J B, Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA[J]. *Science*, 2011, 331(6013): 76-9.
- [32] Rinn J L, Chang H Y. Genome regulation by long noncoding RNAs[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 145-66.
- [33] Nagano T, Mitchell J A, Sanz L A, et al. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin[J]. *Science*, 2008, 322(5908): 1717-20.
- [34] Pandey R R, Mondal T, Mohammad F, et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2): 232-46.
- [35] Yap K L, Li S, Munoz-Cabello A M, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a[J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 662-74.
- [36] Wang K C, Yang Y W, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 120-4.
- [37] Orom U A, Derrien T, Beringer M, et al. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells[J]. *Cell*, 2010, 143(1): 46-58.
- [38] Yao H, Brick K, Evrard Y, et al. Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(22): 2543-55.

- [39] Kim T K, Hemberg M, Gray J M, et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers[J]. *Nature*, 2010, 465(7295): 182-7.
- [40] Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 204-20.
- [41] 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 Dev*, 2010, 24(20): 2264-9.
- [42] Feng J, Bi C, Clark B S, et al. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(11): 1470-84.
- [43] Hudson W H, Pickard M R, De Vera I M, et al. Conserved sequence-specific lincRNA-steroid receptor interactions drive transcriptional repression and direct cell fate[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5395.
- [44] 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): 666-70.
- [45] Wang X, Arai S, Song X, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription[J]. *Nature*, 2008, 454(7200): 126-30.
- [46] Sharma S, Findlay G M, Bandukwala H S, et al. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(28): 11381-6.
- [47] Daniel C, Behm M, Ohman M. The role of Alu elements in the cis-regulation of RNA processing[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(21): 4063-76.
- [48] Kim E Z, Wespiser A R, Caffrey D R. The domain structure and distribution of Alu elements in long noncoding RNAs and mRNAs[J]. *Rna*, 2016, 22(2): 254-64.
- [49] Chan J, Atianand M, Jiang Z, et al. Cutting Edge: A Natural Antisense Transcript, AS-IL1alpha, Controls Inducible Transcription of the Proinflammatory Cytokine IL-1alpha[J]. *J Immunol*, 2015, 195(4): 1359-63.
- [50] Beltran M, Puig I, Pena C, et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 756-69.
- [51] Tripathi V, Ellis J D, Shen Z, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 925-38.
- [52] Chen L L, Carmichael G G. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA[J]. *Mol Cell*, 2009, 35(4): 467-78.
- [53] Kim M Y, Hwang Do W, Li F, et al. Detection of intra-brain cytoplasmic 1 (BC1) long noncoding RNA using graphene oxide-fluorescence beacon detector[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22552.
- [54] Yoon J H, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(4): 648-55.
- [55] Gong C, Maquat L E. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements[J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 284-8.
- [56] Liu X, Li D, Zhang W, et al. Long non-coding RNA gadd7 interacts with TDP-43 and regulates Cdk6 mRNA decay[J]. *Embo j*, 2012, 31(23): 4415-27.

- [57] Faghihi M A, Modarresi F, Khalil A M, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase[J]. *Nat Med*, 2008, 14(7): 723-30.
- [58] Imbriano C, Gnesutta N, Mantovani R. The NF-Y/p53 liaison: well beyond repression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(2): 131-9.
- [59] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response[J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409-19.
- [60] Tsai M C, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. *Science*, 2010, 329(5992): 689-93.
- [61] Tycowski K T, Guo Y E, Lee N, et al. Viral noncoding RNAs: more surprises[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(6): 567-84.
- [62] Hu G, Gong A Y, Wang Y. LincRNA-Cox2 Promotes Late Inflammatory Gene Transcription in Macrophages through Modulating SWI/SNF-Mediated Chromatin Remodeling[J], 2016, 196(6): 2799-808.
- [63] Tong Q, Gong A Y, Zhang X T, et al. LincRNA-Cox2 modulates TNF-alpha-induced transcription of Il12b gene in intestinal epithelial cells through regulation of Mi-2/NuRD-mediated epigenetic histone modifications[J]. *Faseb j*, 2016, 30(3): 1187-97.
- [64] Li Z, Chao T C, Chang K Y, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNFalpha expression through its interaction with hnRNPL[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(3): 1002-7.
- [65] Zhang Q, Chen C Y, Yedavalli V S, et al. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression[J]. *MBio*, 2013, 4(1): e00596-12.
- [66] Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, et al. Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli[J]. *Mol Cell*, 2014, 53(3): 393-406.
- [67] Yu X, Li Z. NEAT1: A novel cancer-related long non-coding RNA[J], 2017, 50(2).
- [68] Zheng H, Chan M T, Wu W K, et al. Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs[J]. *Cell Prolif*, 2013, 10(3): 456-61.
- [69] Ne I I, Heward J A, Roux B, et al. Long non-coding RNAs and enhancer RNAs regulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3979.
- [70] Cui H, Xie N, Tan Z, et al. The human long noncoding RNA Inc-IL7R regulates the inflammatory response[J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(7): 2085-95.
- [71] Rapicavoli N A, Qu K, Zhang J, et al. A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics[J]. *Elife*, 2013, 2: e00762.
- [72] Xiong Y, Yuan J, Zhang C, et al. The STAT3-regulated long non-coding RNA Lethe promote the HCV replication[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 72: 165-71.
- [73] Cullen B R. Making a NeST for a persistent virus[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(3): 241-2.
- [74] Gomez J A, Wapinski O L, Yang Y W, et al. The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon-gamma locus[J]. *Cell*, 2013, 152(4): 743-54.
- [75] Barriocanal M, Carnero E, Segura V, et al. Long Non-Coding RNA BST2/BISPR is Induced by IFN and Regulates the Expression of the Antiviral Factor Tetherin[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 655.
- [76] Ouyang J, Zhu X, Chen Y, et al. NRAV, a long noncoding RNA, modulates antiviral responses through suppression of interferon-stimulated gene transcription[J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(5):

616-26.

- [77] Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation[J]. *Science*, 2014, 344(6181): 310-3.
- [78] Dijkstra J M, Ballingall K T. Non-human lnc-DC orthologs encode Wdm1-like protein[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2014, 3: 160.
- [79] Zhang W, Zhou Y, Ding Y. Lnc-DC mediates the over-maturation of decidual dendritic cells and induces the increase in Th1 cells in preeclampsia[J], *Am J Reprod Immunol*, 2017 (Epub ahead of print).
- [80] Liu Z, Lee J, Krummey S, et al. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(11): 1063-70.
- [81] Li J, Chen C, Ma X, et al. Long noncoding RNA NRON contributes to HIV-1 latency by specifically inducing tat protein degradation[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11730.
- [82] Ranzani V, Rossetti G. The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4[J], 2015, 16(3): 318-25.
- [83] Hu G, Tang Q, Sharma S, et al. Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(11): 1190-8.
- [84] Patel D D, Kuchroo V K. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions[J]. *Immunity*, 2015, 43(6): 1040-51.
- [85] Campa M, Menter A. A review of emerging IL-17 inhibitors in the treatment of psoriasis focusing on preclinical through phase II studies[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2016, 25(11): 1337-1344.
- [86] Eberl G. RORgammat, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces[J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1): 27-34.
- [87] Huang W, Thomas B, Flynn R A, et al. DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 517-22.
- [88] Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(5): 279-94.
- [89] Brazao T F, Johnson J S. Long noncoding RNAs in B-cell development and activation[J], 2016, 128(7): e10-9.
- [90] Bonnal R J, Ranzani V, Arrigoni A, et al. De novo transcriptome profiling of highly purified human lymphocytes primary cells[J], 2015, 2: 150051.
- [91] Bolland D J, Wood A L, Afshar R, et al. Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(15): 5523-33.
- [92] Verma-Gaur J, Torkamani A, Schaffer L, et al. Noncoding transcription within the Igh distal V(H) region at PAIR elements affects the 3D structure of the Igh locus in pro-B cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(42): 17004-9.
- [93] Pefanis E, Wang J, Rothschild G, et al. RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity[J]. *Cell*, 2015, 161(4): 774-89.
- [94] Sehgal L, Mathur R, Braun F K, et al. FAS-antisense 1 lncRNA and production of soluble versus membrane Fas in B-cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2014, 28(12): 2376-87.
- [95] Niitsu N, Sasaki K, Umeda M. A high serum soluble Fas/APO-1 level is associated with a poor outcome of aggressive non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Leukemia*, 1999, 13(9): 1434-40.
- [96] Wilson J L, Vachon V K, Sunita S, et al. Dissection of the adenoviral VA RNAI central domain

- structure reveals minimum requirements for RNA-mediated inhibition of PKR[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(33): 23233-45.
- [97] Clarke P A, Sharp N A, Clemens M J. Translational control by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1. Reversal of the double-stranded RNA-induced inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates[J]. *Eur J Biochem*, 1990, 193(3): 635-41.
- [98] Charley P A, Wilusz J. Standing your ground to exoribonucleases: Function of Flavivirus long non-coding RNAs[J]. *Virus Res*, 2016, 212: 70-7.
- [99] Albrecht J C, Fleckenstein B. Nucleotide sequence of HSUR 6 and HSUR 7, two small RNAs of herpesvirus saimiri[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(7): 1810.
- [100] Cazalla D, Yario T, Steitz J A. Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA[J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1563-6.
- [101] Roby J A, Pijlman G P, Wilusz J, et al. Noncoding subgenomic flavivirus RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses[J]. *Cell Microbiol*, 2014, 6(2): 404-27.
- [102] Cumberworth S L, Clark J J, Kohl A, et al. Inhibition of type I interferon induction and signalling by mosquito-borne flaviviruses[J]. *Cell Microbiol*. 2017; 19(5).
- [103] Chapman E G, Costantino D A, Rabe J L, et al. The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sfRNA) production[J]. *Science*, 2014, 344(6181): 307-10.
- [104] Kobayashi-Ishihara M, Yamagishi M, Hara T, et al. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period[J]. *Retrovirology*, 2012, 9: 38.
- [105] Saayman S, Ackley A, Turner A M, et al. An HIV-encoded antisense long noncoding RNA epigenetically regulates viral transcription[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(6): 1164-75.
- [106] Guardado-Calvo P, Bignon E A. Mechanistic Insight into Bunyavirus-Induced Membrane Fusion from Structure-Function Analyses of the Hantavirus Envelope Glycoprotein Gc[J], 2016, 12(10): e1005813.
- [107] Jiang H, Du H, Wang L M, et al. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Pathogenesis and Clinical Picture[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 1.
- [108] Cimica V, Dalrymple N A, Roth E, et al. An innate immunity-regulating virulence determinant is uniquely encoded by the Andes virus nucleocapsid protein[J]. *MBio*, 2014, 5(1).
- [109] Prescott J, Safronetz D, Haddock E, et al. The adaptive immune response does not influence hantavirus disease or persistence in the Syrian hamster[J]. *Immunology*, 2013, 140(2): 168-78.
- [110] Braun M, Bjorkstrom N K, Gupta S, et al. NK cell activation in human hantavirus infection explained by virus-induced IL-15/IL15Ralpha expression[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(11): e1004521.
- [111] Ermonval M, Baychelier F, Tordo N. What Do We Know about How Hantaviruses Interact with Their Different Hosts?[J]. *Viruses*, 2016, 8(8).
- [112] Handke W, Oelschlegel R, Franke R, et al. Hantaan virus triggers TLR3-dependent innate immune responses[J]. *J Immunol*, 2009, 182(5): 2849-58.
- [113] Jiang H, Wang P Z, Zhang Y, et al. Hantaan virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha[J]. *Virology*, 2008, 380(1): 52-9.
- [114] Yu H T, Jiang H, Zhang Y, et al. Hantaan virus triggers TLR4-dependent innate immune responses[J]. *Viral Immunol*, 2012, 25(5): 387-93.
- [115] Kyriakidis I, Papa A. Serum TNF-alpha, sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in hemorrhagic

- fever with renal syndrome[J]. *Virus Res*, 2013, 175(1): 91-4.
- [116] Krautkramer E, Zeier M. Old World hantaviruses: aspects of pathogenesis and clinical course of acute renal failure[J]. *Virus Res*, 2014, 187: 59-64.
- [117] Sadeghi M, Lahdou I, Ettinger J, et al. Association of low serum TGF-beta level in hantavirus infected patients with severe disease[J]. *BMC Immunol*, 2015, 16: 19.
- [118] Stoltz M, Ahlm C, Lundkvist A, et al. Lambda interferon (IFN-lambda) in serum is decreased in hantavirus-infected patients, and in vitro-established infection is insensitive to treatment with all IFNs and inhibits IFN-gamma-induced nitric oxide production[J]. *J Virol*, 2007, 81(16): 8685-91.
- [119] Bellomo C M, Pires-Marczeski F C, Padula P J. Viral load of patients with hantavirus pulmonary syndrome in Argentina[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(11): 1823-30.
- [120] Yi J, Zhang Y, Zhang Y, et al. Increased plasma cell-free DNA level during HTNV infection: correlation with disease severity and virus load[J]. *Viruses*, 2014, 6(7): 2723-34.
- [121] Frese M, Kochs G, Feldmann H, et al. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein[J]. *J Virol*, 1996, 70(2): 915-23.
- [122] Xu-Yang Z, Pei-Yu B, Chuan-Tao Y, et al. Interferon-Induced Transmembrane Protein 3 Inhibits Hantaan Virus Infection, and Its Single Nucleotide Polymorphism rs12252 Influences the Severity of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 535.
- [123] Kim N, Now H, Nguyen N T, et al. Multilayered regulations of RIG-I in the anti-viral signaling pathway[J]. *J Microbiol*, 2016, 54(9): 583-7.
- [124] Lee M H, Lalwani P, Raftery M J, et al. RNA helicase retinoic acid-inducible gene I as a sensor of Hantaan virus replication[J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 9): 2191-200.
- [125] Shin O S, Kumar M, Yanagihara R, et al. Hantaviruses induce cell type- and viral species-specific host microRNA expression signatures[J]. *Virology*, 2013, 446(1-2): 217-24.
- [126] Pepini T, Gorbunova E E, Gavrilovskaya I N, et al. Andes virus regulation of cellular microRNAs contributes to hantavirus-induced endothelial cell permeability[J]. *J Virol*, 2010, 84(22): 11929-36.
- [127] Jonsson C B, Figueiredo L T, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(2): 412-41.
- [128] Adriaens C, Standaert L, Barra J, et al. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity[J], 2016, 22(8): 861-8.
- [129] Childs K, Stock N, Ross C, et al. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins[J]. *Virology*, 2007, 359(1): 190-200.
- [130] Venter G J, Groenewald D M, Paweska J T, et al. Vector competence of selected South African Culicoides species for the Bryanston serotype of equine encephalosis virus[J]. *Med Vet Entomol*, 1999, 13(4): 393-400.
- [131] Matthys V S, Cimica V, Dalrymple N A, et al. Hantavirus GnT elements mediate TRAF3 binding and inhibit RIG-I/TBK1-directed beta interferon transcription by blocking IRF3 phosphorylation[J]. *J Virol*, 2014, 88(4): 2246-59.
- [132] Sang Y, Miller L C, Blecha F. Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions[J]. *J Clin Cell Immunol*, 2015, 6(2).
- [133] Gorbunova E E, Simons M J, Gavrilovskaya I N, et al. The Andes Virus Nucleocapsid Protein Directs Basal Endothelial Cell Permeability by Activating RhoA[J]. *MBio*, 2016, 7(5).
- [134] Markotic A, Hensley L, Geisbert T, et al. Hantaviruses induce cytopathic effects and apoptosis in continuous human embryonic kidney cells[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 8): 2197-202.



- [135] Ye W, Lei Y, Yu M, et al. NLRP3 inflammasome is responsible for Hantavirus inducing interleukin-1beta in THP-1 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(6): 1633-40.
- [136] Markotic A, Hensley L, Daddario K, et al. Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells[J]. *Coll Antropol*, 2007, 31(4): 1159-67.
- [137] Ying Q, Ma T, Cheng L, et al. Construction and immunological characterization of CD40L or GM-CSF incorporated Hantaan virus like particle[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 63488-63503.
- [138] Gowen B B, Hickerson B T. Hemorrhagic fever of bunyavirus etiology: disease models and progress towards new therapies[J]. *J Microbiol*, 2017, 55(3): 183-195.
- [139] Hooper J W, Larsen T, Custer D M, et al. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome[J]. *Virology*, 2001, 289(1): 6-14.
- [140] Hooper J W, Ferro A M, Wahl-Jensen V. Immune serum produced by DNA vaccination protects hamsters against lethal respiratory challenge with Andes virus[J]. *J Virol*, 2008, 82(3): 1332-8.
- [141] Wahl-Jensen V, Chapman J, Asher L, et al. Temporal analysis of Andes virus and Sin Nombre virus infections of Syrian hamsters[J]. *J Virol*, 2007, 81(14): 7449-62.
- [142] Safronetz D, Ebihara H, Feldmann H, et al. The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome[J]. *Antiviral Res*, 2012, 95(3): 282-92.
- [143] Brocato R L, Hammerbeck C D, Bell T M, et al. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome in immunosuppressed Syrian hamsters infected with Sin Nombre virus[J]. *J Virol*, 2014, 88(2): 811-9.
- [144] Golden J W, Hammerbeck C D, Mucker E M, et al. Animal Models for the Study of Rodent-Borne Hemorrhagic Fever Viruses: Arenaviruses and Hantaviruses[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 793257.
- [145] Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, et al. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice[J]. *J Virol*, 2014, 88(13): 7178-88.
- [146] Pettersson L, Boman J, Juto P, et al. Outbreak of Puumala virus infection, Sweden[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(5): 808-10.
- [147] Klingstrom J, Stoltz M, Hardestam J, et al. Passive immunization protects cynomolgus macaques against Puumala hantavirus challenge[J]. *Antivir Ther*, 2008, 13(1): 125-33.
- [148] Kato D, Suzuki Y, Haga S, et al. Utilization of digital differential display to identify differentially expressed genes related to rumen development[J]. *Anim Sci J*, 2016, 87(4): 584-90.
- [149] Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017, 8(1).
- [150] Li T, Mo X, Fu L, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8601-12.
- [151] Ma C, Shi X, Zhu Q, et al. The growth arrest-specific transcript 5 (GAS5): a pivotal tumor suppressor long noncoding RNA in human cancers[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 1437-44.
- [152] Mazar J, Rosado A, Shelley J, et al. The long non-coding RNA GAS5 differentially regulates cell cycle arrest and apoptosis through activation of BRCA1 and p53 in human neuroblastoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6589-6607.
- [153] Shi X, Sun M, Liu H, et al. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54 Suppl 1: E1-e12.

- [154] Kambara H, Niazi F, Kostadinova L, et al. Negative regulation of the interferon response by an interferon-induced long non-coding RNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(16): 10668-80.
- [155] Chen T, Wang H, Yang P, et al. Prognostic role of long noncoding RNA NEAT1 in various carcinomas: a meta-analysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 993-1000.
- [156] Huang B, Liu C, Wu Q, et al. Long non-coding RNA NEAT1 facilitates pancreatic cancer progression through negative modulation of miR-506-3p[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 828-834.
- [157] Li J H, Zhang S Q, Qiu X G, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes malignant progression of thyroid carcinoma by regulating miRNA-214[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2): 708-716.
- [158] Ning L, Li Z, Wei D, et al. LncRNA, NEAT1 is a prognosis biomarker and regulates cancer progression via epithelial-mesenchymal transition in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2017 (Epub ahead of print).
- [159] Peng W, Wang Z, Fan H. LncRNA NEAT1 Impacts Cell Proliferation and Apoptosis of Colorectal Cancer via Regulation of Akt Signaling[J]. *Pathol Oncol Res*, 2016(Epub ahead of print).
- [160] Perepelyuk M, Shoyele O, Birbe R, et al. siRNA-Encapsulated Hybrid Nanoparticles Target Mutant K-ras and Inhibit Metastatic Tumor Burden in a Mouse Model of Lung Cancer[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 6: 259-268.
- [161] Wagner K W, Alam H, Dhar S S, et al. KDM2A promotes lung tumorigenesis by epigenetically enhancing ERK1/2 signaling[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(12): 5231-46.
- [162] Zhang G, Miyake M, Lawton A, et al. Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 310.
- [163] Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, et al. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice[J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(1): 31-9.
- [164] Spiropoulou C F, Albarino C G, Ksiazek T G, et al. Andes and Prospect Hill hantaviruses differ in early induction of interferon although both can downregulate interferon signaling[J]. *J Virol*, 2007, 81(6): 2769-76.
- [165] Alff P J, Gavrillovskaia I N, Gorbunova E, et al. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses[J]. *J Virol*, 2006, 80(19): 9676-86.
- [166] Goubau D, Van Der Veen A G, Chakravarty P, et al. Mouse superkiller-2-like helicase DDX60 is dispensable for type I IFN induction and immunity to multiple viruses[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(12): 3386-403.
- [167] Oshiumi H, Kouwaki T, Seya T. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 200.
- [168] Oshiumi H, Miyashita M, Okamoto M, et al. DDX60 Is Involved in RIG-I-Dependent and Independent Antiviral Responses, and Its Function Is Attenuated by Virus-Induced EGFR Activation[J]. *Cell Rep*, 2015, 11(8): 1193-207.
- [169] Prasanth K V, Prasanth S G, Xuan Z, et al. Regulating gene expression through RNA nuclear retention[J]. *Cell*, 2005, 123(2): 249-63.
- [170] Miyagawa R, Tano K, Mizuno R, et al. Identification of cis- and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles[J]. *Rna*, 2012, 18(4): 738-51.
- [171] Xu Z, Anderson R, Hobman T C. The capsid-binding nucleolar helicase DDX56 is important for infectivity of West Nile virus[J]. *J Virol*, 2011, 85(11): 5571-80.

- [172] Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, et al. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(18): 3802-19.
- [173] Grunvogel O, Esser-Nobis K, Reustle A, et al. DDX60L Is an Interferon-Stimulated Gene Product Restricting Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture[J]. *J Virol*, 2015, 89(20): 10548-68.
- [174] Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, et al. Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 335.
- [175] Yi J, Xu Z, Zhuang R, et al. Hantaan virus RNA load in patients having hemorrhagic fever with renal syndrome: correlation with disease severity[J]. *J Infect Dis*, 2013, 207(9): 1457-61.
- [176] Wang W, Wang M R, Lin X D, et al. Ongoing spillover of Hantaan and Gou hantaviruses from rodents is associated with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in China[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(10): e2484.
- [177] Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(8): 539-50.
- [178] Saksida A, Duh D, Korva M, et al. Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(5): 681-5.
- [179] Xiao R, Yang S, Koster F, et al. Sin Nombre viral RNA load in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome[J]. *J Infect Dis*, 2006, 194(10): 1403-9.
- [180] Zhang F, Wu L, Qian J, et al. Identification of the long noncoding RNA NEAT1 as a novel inflammatory regulator acting through MAPK pathway in human lupus[J]. *J Autoimmun*, 2016, 75: 96-104.

# 个人简历和研究成果

## 个人简历

马宏伟，男，汉族，1991年7月出生，中国共产党党员。第四军医大学2009级五年制临床医学专业学员。2014年经免试推荐进入第四军医大学微生物学教研室攻读硕士学位，导师：张芳琳教授，辅导老师：雷迎峰副教授、叶伟讲师。研究方向为汉坦病毒感染与免疫。攻读学位期间，以第一或共同第一作者发表SCI论文3篇，以第一作者在核心期刊发表论文5篇，申请专利1项（导师第一本人第二），参编专著1部。科研成果曾获第三届全国大学生基础医学实验设计大赛暨创新论坛二等奖（2014年，上海）、全国临床微生物及免疫学学术年会青年英语学术论坛报告三等奖（2016年，广西南宁）。

### 学习经历：

2009年9月~2014年6月	第四军医大学	临床医学专业	医学学士学位
2014年9月 至今	第四军医大学	微生物学专业	攻读硕士学位

### 所获荣誉：

第四军医大学硕士研究生军训优秀教官（2014年）

第四军医大学校庆阅兵嘉奖（2014年）

第四军医大学硕士研究生二等奖学金（2016年）

## 研究成果

### 一、学术论文（第一/共一）

(1) **Hongwei Ma**, Wei Ye, He-Song Chen, Tie-Jian Nie, Lin-Feng Cheng, Liang Zhang, Pei-Jun Han, Xing-an Wu, Zhikai Xu, Ying-Feng Lei, Fanglin Zhang. In-Cell Western Assays to Evaluate Hantaan Virus Replication as a Novel Approach to Screen Antiviral Molecules and Detect Neutralizing Antibody Titers[J]. *Frontiers in Cellular and Infection*

Microbiology. Manuscript ID: 257847. (Accepted, *IF* 5.22)

(2) **Hong-Wei Ma**, Pei-jun Han, Wei Ye, He-Song Chen, Xu-Yang Zheng, Lin-Feng Cheng, Liang Zhang, Lan Yu, Xing-An Wu, Zhikai Xu, Ying-Feng Lei, Fang-Lin Zhang. The Long Noncoding RNA NEAT1 Exerts Anti-Hantaviral Effects by Acting as a Positive Feedback for RIG-I Signaling [J]. J Virol. 2017 Feb 15. doi: 10.1128/JVI.02250-16. [Epub ahead of print]. (*IF* 4.61)

(3) Tiejian Nie, Shaosong Yang, **Hongwei Ma (Co-First Author)**, Lei Zhang, Fangfang Lu, Kai Tao, Ronglin Wang, Ruixin Yang, Lu Huang, and Zixu Mao. Regulation of ER stress- induced autophagy by GSK3 $\beta$ -TIP60-ULK1 pathway[J]. Cell Death Dis. 2016, 29; 7(12):e2563. (*IF* 5.38)

(4) **MA Hong-Wei**, WU Ya-Qiong, ZHANG Hai-Feng. Oral administration of hyper-oxygenated solution for prophylaxis of gastric ulceration induced by stress or Helicobacter pylori[J]. 医学争鸣. 2015;6(6): 28-34.

(5) **Hongwei Ma**, Dunquan Xu, Yaqiong Wu, Yongtao Ma, Zhichao Li. To decipher the hypoxic pulmonary hypertension: Vascular heterogeneity and the hypothesis of hypoxic responsive threshold[J]. Journal of Medical Hypotheses and Ideas. 2015, 9(1): 29-37.

(6) **马宏炜**, 吴亚琼, 张海锋. Notch 信号通路与骨形成和骨疾病[J]. 中华医学遗传学杂志. 2015, 32(2) : 274-279.

(7) **马宏炜**, 刘丽辉, 徐数娜, 胡文青, 马永涛, 张永清. HLA 单倍体相合造血干细胞移植治疗 Wiskott-Aldrich 综合征 1 例报告及文献复习[J]. 中华血液学杂志. 2014, 35(11): 1027-1029.

(8) **马宏炜**, 乜铁建, 马永涛, 吴亚琼, 贾战生, 白雪帆. 小儿肾综合征出血热临床特征分析[J]. 中国当代儿科杂志. 2014, 16(11) :1091-1095.

## 二、国家专利

名称：一种高通量快速检测汉滩病毒（HTNV）中和抗体效价的方法

（申请号：201610125321.6）

发明人：张芳琳；**马宏炜**；雷迎峰；张亮；程林峰；陈何嵩；石静琦；韩佩君；叶伟；吴兴安；徐志凯

## 三、参编专著

《埃博拉出血热》 张永生, 李谨革 主编, 第四军医大学出版社, 2015 年

#### 四、参加会议

1. 2014 年 第三届全国大学生基础医学实验设计大赛暨创新论坛  
感染与免疫组创新论坛二等奖（上海）  
mDC 中 A20 失调促使 HCV 感染慢性化
2. 2016 年 全国微生物学学术年会 墙报交流（西安）  
Long Noncoding RNA NEAT1 Exerts Anti-hantaviral Effects through  
Modulating Innate Responses
3. 2016 年 全国临床微生物及免疫学学术年会  
青年英语学术论坛报告三等奖（南宁）  
The Long Noncoding RNA NEAT1 Exerts Anti-Hantaviral Effects by  
Acting as a Positive Feedback for RIG-I Signaling

## 致 谢

“我是宇宙间的尘埃/漂泊在这茫茫人海  
若你是我必然的存在/多想从此不再离开  
是什么 让我遇见这样的你  
是什么 让我不再怀疑自己  
是什么 让我不再害怕失去  
在这茫茫人海里 我不要变得透明”

又是凌晨，在基础部通往研究生管理大队的小道中踽踽独行。天空划过一丝细雨，带着春夏之交的清爽气息，却掩饰不住毕业前夕的淡淡忧伤。回眸从指尖偷偷溜走的八年韶华，蹒跚的脚印一步步深深地烙在四医大这片钟灵之地。或悲或喜的泪水都已随风而逝，只有那些人，那些事，在这阑珊的夜色中叩击着我别样的心扉……

世界上有太多的意外。有人说，意外多是令人黯然神伤的悲情事件，但总有一些美丽的意外，它如晶莹剔透的雪花一般从天而降，悄然无声地带来一段奇妙的“姻缘”。

十六年前，当我带着 Claire 在 Biohazard2 世界中的 Raccoon City 胆战心惊地对抗着感染 T virus 的 Walking Dead 时，没想到有一天我会真正成为研究病毒感染与免疫的一线斗士；七年前，当我在分子生物学讨论课上阐述自己对 Junk DNA 表观遗传调控基因表达的想法时，没想到有一天我会在 lncRNA 领域中研究相似的内容；三年前，当我获得免试攻读硕士研究生资格后，在收拾库房时偶然间拾到一本徐志凯教授主编的《分子病毒学》研究生教材，没想到这竟成为我为之奋斗三年乃至终身的事业。

研究生入学后，在填写导师申请表时，我脑海中第一个浮现的身影是曾精彩讲

授“出血热病毒”课程的张芳琳教授。当我在申请表上认真地填下她的名字时，一场遨游于病原微生物世界的奇妙之旅就此拉开序幕……

“小马，自噬与 lncRNA 两个领域，你对哪个更感兴趣？”

“虽然自噬方面有叶师兄前期的研究基础，但我还是对 lncRNA 更感兴趣，因为我在本科时就曾想研究 JunK DNA 的功能意义，两者有很多相似点。”

仿佛就是在昨天，导师张芳琳教授和蔼地征询我关于选题的意见。lncRNA 相关研究较为复杂，但您毅然支持我在该领域的选题，并悉心指导我的实验研究。衷心感谢导师您在专业知识领域给予我的谆谆教导，您精益求精的学术态度和严谨求是的工作风格敦促我在学术研究的漫漫长路中上下而求索；衷心感谢导师您在实验过程中给予我充分的支持及帮助，您兼容并包的学术思想和因材施教的教育理念不断地激发着我的科研潜力、启迪着我的科研思路；衷心感谢导师您在日常生活中给予我无微不至的关怀，您如亲人般地呵护陪伴、如朋友般地理解支持使我三年硕士生活温馨而绚丽。自己今天取得的点滴成绩无不凝聚着导师您的心血，您作为我科研工作的引路人以及生活中为人处世的榜样将深刻影响着我今后的工作和生活。

衷心感谢辅导老师雷迎峰副教授，感谢您对本研究进行悉心指导并提出宝贵意见，实验中每每遇到瓶颈之处，您都凭借着自己丰富的实践经验和扎实的理论知识帮助我化险为夷，给我前进的勇气和动力。衷心感谢辅导老师叶伟讲师，感谢您手把手教我细胞培养、分子克隆等基本实验技术，您对实验室的严格管理为本研究提供了良好的工作环境，您慷慨地分享自己的实验经验及前期的科研成果，这使我在本研究中能少走弯路、事半功倍。

衷心感谢徐志凯教授在实验过程中对我的点播和教导，是您让我明晰并深刻理解了 HFRS、流行性肾病 (nephropathia epidemica, NE) 等出血热基本概念，并在研究的关键环节及时提出问题和解决方案。衷心科室主任吴兴安教授在工作学习中给予我的热心支持和真诚鼓励，是您把微生物大家庭紧紧团结在一起，为我们的科研工作保驾护航。

感谢帅气师兄程林峰讲师及其夫人张明明讲师，本研究的动物实验是在您的指导下完成，而每当需要其他科室帮助时，您们总能及时找到“外援”。感谢温柔师姐韩佩君博士，本研究的 PCR 及 Western Blot 等实验都离不开您的帮助，尤其是刚入科时，在寒冬腊月凌晨三点，看到您依然在会议室裹着大衣等待收样的场景，使



我意识到科研之路无捷径，唯有脚踏实地、勤奋努力。感谢美女师姐张亮实验师，本研究相关实验的保障离不开您的帮助，您在科室新年晚会中精彩的小提琴表演使我脱离科研的苦闷，逐渐学会体验生活的乐趣。感谢热心同窗陈何嵩硕士，本研究 HFRS 患者外周血单核细胞分离等实验是在你的帮助下完成，而在课余时间，我们曾一起在“王者荣耀”的排位赛中齐心协力，共同打拼铂金、钻石称号，曾一起在学校游泳馆中强身健体，共同学习蛙泳、自由泳，我们的欢声笑语将成为永不磨灭的美好回忆。感谢勤快师弟刘赫硕士，是你在我最忙碌的考博期间帮我照看小鼠、打理部分实验，本研究的成绩也有你的功劳。

感谢遗传教研室秦鸿雁主任及赵阳实验员在 FCM 技术方面给予的细心指导和无私帮助；感染病理教研室叶菁副主任在百忙中抽出时间帮我分析小鼠各组织的病理切片；感谢口腔医院儿牙科袁帅硕士、杜样硕士与我共同熬夜摸索并优化 FISH、Western Blot 的实验条件；感谢唐都医院传染科贾战生主任、郑旭阳博士、叶传涛博士及边培育硕士在本研究临床样本收集及病史采集过程中给予的热心帮助。这里尤其要感谢我的挚友，唐都医院神经外科乜铁建硕士，本研究每一个实验细节的完善都离不开你对实验经验的无私分享，更重要的是，我们每一次关于课题设计的探讨都能碰撞出创新的火花，每一次关于人生意义的讨论都能帮对方重塑前进的自信，我们成为彼此夜空中那颗最亮的星。

感谢本教研室马铁军硕士及马瑞雪硕士帮我完成小鼠眼球取血等实验，感谢王芳讲师、刘蓉蓉讲师在 FlowJo 分析软件使用过程中对我的帮助，特别感谢你们放在办公室的零食水果，请原谅我悄悄偷吃，因为它们是吃货熬夜工作的“精神支柱”。感谢吕欣副教授、丁天兵副教授、黎志东副教授、柏银兰副教授、王丽梅讲师、宁唤唤硕士、秦岭硕士、张晓晓硕士、刘梓榆硕士、王媛实验师、康健实验师、惠倩倩实验员、高欢实验员、罗亚妮实验员、胡佳敏实验员、王冬玲阿姨、陈瑞敏阿姨等教研室全体同仁给予我的关心、帮助和鼓励。硕士三年，有你们的陪伴，是我这一生最大的福分。

如果把科研比作战场，作为战士的我之所以能英勇地冲锋，是因为后方有为我默默奉献的家人。在这里我要向父母致谢，感谢你们一如既往对我的坚定支持，感谢你们通过生活的点点滴滴教会我如何做一个坚强的男子汉；更要感谢我的爱人吴亚琼硕士及我们的宝贝儿子，感谢你们在我实验最艰难时的陪伴与理解，感谢你们

在我考博复习时对我的支持和鼓励，每当我工作懈怠时，每当我想要放弃时，每当我犹豫不决时，你们是我坚持下去的动力。

谨以此文献给关心我的每一个人。

冰花未有情 冷彻不似卿  
劝君杯莫停 与君同醉醒  
揭帘映红镜  
一笑倾城天下名  
多情太招摇 长情催人老  
痴情人肠断 无情最逍遥  
只是年犹少  
夜来霜尽梦醒时  
竟被花香侵扰