

肖春婷, 廉传江, 易 诚, 等. Gga-miR-7b 和靶基因 *SNCA* 在两品系鸡脾脏中的表达分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 874-879. doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.04.018

## Gga-miR-7b 和靶基因 *SNCA* 在两品系鸡脾脏中的表达分析

肖春婷<sup>1,2</sup>, 廉传江<sup>2</sup>, 易 诚<sup>3</sup>, 陈洪岩<sup>1,2</sup>

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所/兽医生物技术国家重点实验室/黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069; 3. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** 为确定 gga-miR-7b 与 *SNCA* 的靶向关系以及检测他们在 MDV 超强毒株 Md5 感染 SPF 抗性鸡 (B21 单倍型) 和易感鸡 (B19 单倍型) 后 5 d、14 d、25 d 脾脏中的表达量。利用 TargetScan、miRBD 软件预测 gga-miR-7b 的靶基因, 通过双荧光素酶报告基因检测系统体外验证 gga-miR-7b 与 *SNCA* 之间的靶向关系。qRT-PCR 检测 *SNCA* 和 gga-miR-7b 在 B21、B19 感染 Md5 脾脏中的表达量。荧光素酶活性结果显示, gga-miR-7b 与 *SNCA*-wt-3'UTR 共转染后显著抑制萤火虫荧光素酶活性 ( $P < 0.05$ ), 对 *SNCA*-mut-3'UTR 活性无显著影响。qRT-PCR 结果显示, *SNCA* 在 B21、B19 中, Md5 感染 5 d 均显著上调表达 ( $P < 0.05$ ), Md5 感染 25 d 时 *SNCA* 在 B21 中极显著上调表达 ( $P < 0.01$ ), 在 B19 中极显著下调表达 ( $P < 0.01$ )。gga-miR-7b 在 Md5 感染 14 d, 在 B21 中显著上调表达而在 B19 中显著下调表达 ( $P < 0.05$ ), Md5 感染 25 d, gga-miR-7b 在 B21、B19 中均极显著上调表达 ( $P < 0.01$ )。综上所述, *SNCA* 是 gga-miR-7b 的靶基因。gga-miR-7b 和 *SNCA* 可能与 MD 抗性/易感性以及 MD 肿瘤转化有关。

**关键词:** gga-miR-7b; *SNCA*; 靶向关系; 表达分析

**中图分类号:** Q786      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2019)04-0874-06

## Expression analysis of Gga-miR-7b and target gene *SNCA* in spleen of two strains of chicken

XIAO Chun-ting<sup>1,2</sup>, LIAN Chuan-jiang<sup>2</sup>, YI Cheng<sup>3</sup>, CHEN Hong-yan<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin 150069, China; 3. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The aim of this study was to determine the targeting relationship between gga-miR-7b and *SNCA* and to detect their expression in the spleen of SPF resistant chickens (B21 haplotype) and susceptible chickens (B19 haplotype) infected with MDV supervirus strain Md5 at 5 d, 14 d, and 25 d after infection. The target gene of gga-miR-7b was predicted by TargetScan and miRBD software, and the targeting relationship between gga-miR-7b and *SNCA* was verified *in vitro* by the dual luciferase reporter gene detection system. qRT-PCR was used to detect the expression levels of *SNCA* and gga-miR-7b in the spleen of B21 and B19 infected with Md5. The results of luciferase activity showed that the co-transfection of gga-miR-7b and *SNCA*-wt-3'UTR significantly inhibited firefly luciferase activity ( $P < 0.05$ ), but had no significant

收稿日期: 2018-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31500997)

作者简介: 肖春婷 (1992-), 女, 贵州六盘水人, 硕士研究生, 研究方向为动物免疫遗传学。(E-mail) 1063989121@qq.com

通讯作者: 陈洪岩, (E-mail) sydw2014@163.com; 廉传江, (E-mail) lcj121916@163.com

effect on *SNCA*-mut-3'UTR activity. The results of qRT-PCR showed that the expression of *SNCA* was significantly up-regulated in B21 and B19 on the 5th day after Md5 infection ( $P < 0.05$ ), and the expression of *SNCA* in B21 was highly up-regulated on the 25th day after Md5 infection ( $P < 0.05$ ), and significantly down-regulated in

B19 ( $P<0.01$ ). The expression of gga-miR-7b was significantly up-regulated in B21 and down-regulated in B19 on the 14th day after Md5 infection ( $P<0.05$ ), and the expression of gga-miR-7b was highly up-regulated in B21 and B19 on the 25th day after Md5 infection ( $P<0.01$ ). In summary, SNCA is the target gene of gga-miR-7b. The gga-miR-7b and SNCA may be related to MD resistance/susceptibility and MD tumor transformation.

**Key words:** gga-miR-7b; SNCA; targeting relationship; expression analysis

鸡马立克氏病(Marek's disease, MD)是鸡的一种淋巴组织增生性传染性疾病,该病是由马立克氏病毒(Marek's disease virus, MDV)引起,给世界各国养禽业造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。近年来,尽管能用商业上可获得的疫苗来保护鸡免受 MD 的影响,但随着 MD 爆发,MDV 会发生变异进化,从而导致毒力增强,其致病性也逐渐增大,MD 仍然是一个严重的威胁<sup>[2]</sup>。因此非常需要增强现有疫苗控制措施的辅助策略。

miRNA(microRNA, miRNA)是一类存在于动物、植物及病毒等多种生物体内,长度约为 22 bp 的单链非编码小 RNA<sup>[3]</sup>。通过与靶 mRNA 的 3'端非编码区(3'UTR)相互作用影响 mRNA 的翻译,在转录后对基因发挥调控作用,在多种肿瘤疾病中发挥生物学功能<sup>[4]</sup>。gga-miR-26a 和 gga-miR-181a 通过对其靶基因 NEK6 和 ANP32A 的调控从而参与鸡马立克氏病肿瘤形成过程<sup>[5]</sup>。mmu-miR-7b 在鼠下丘脑上调表达并在体内抑制其靶基因 Fos 转录<sup>[6]</sup>。gga-miR-7b 在传染性支气管炎病毒(IVB)感染鸡肾脏中高表达<sup>[7]</sup>。因此,本课题组前期自主培育了 MHC-B 易感(B19)和抗性(B21)SPF 鸡,利用高通量技术全面构建了 B19 和 B21 SPF 鸡在 MDV 感染的 3 个关键时期(前期溶细胞期、潜伏期、后期溶细胞期)脾脏组织 miRNA 的差异表达谱<sup>[8]</sup>。发现 gga-miR-7b 在 B19 和 B21 单倍型鸡脾脏组织中差异表达。因此将 gga-miR-7b 作为本试验研究对象。

$\alpha$ -突触核蛋白(SNCA)是一种中枢神经系统突触前表达的可溶性蛋白质,它的异常聚集被认为是疾病发生的分子机制中一个关键的步骤,目前的证据表明,SNCA 基因的遗传变异在帕金森病(Parkinson's disease, PD)的病因学中起着重要的作用<sup>[9]</sup>。miR-153-3p 和 miR-205-5p 下调 SNCA 和富含亮氨酸的重复激酶 2 基因(LRRK2)的表达<sup>[10]</sup>。本试验利用生物信息学软件在线预测到 SNCA 是鸡 gga-miR-7b 的候选靶基因,使用双荧光素酶报告基因检测系统对 SNCA 基因进行体外验证,结合实时

定量 PCR 技术检测 gga-miR-7b 和 SNCA 在 B19、B21 单倍型 SPF 鸡脾脏组织中的表达情况,旨在为进一步揭示 gga-miR-7b 调控靶基因的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

MDV 的 Md5 毒株、HEK293T 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物与比较医学创新团队保存,B21 和 B19 MHC-B 单倍型 SPF 鸡由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽类实验动物种子中心[许可证号:SYXK(黑)2011-007]提供。

本试验所用的反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、Ex Taq DNA 聚合酶、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq TM II 购自 TaKaRa 大连有限公司,Sac I、Xba I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自英国 NEB 公司,感受态 DH5 $\alpha$ 、Fast Mutagenesis Kit V2 购自南京诺维赞生物有限公司,pmirGLO 载体、Dual-GLO Luciferase Assay System、Fugene HD 转染试剂购自美国 promega 公司,总 RNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自康宁生命科学有限公司,青霉素、链霉素购自哈尔滨牧乐生物有限公司,胎牛血清(FBS)、RPMI-1640 购自美国 GIBCO 公司,胰蛋白胍、琼脂糖、酵母提取物购自德国 OXOID 公司。鸡 gga-miR-7b 模拟物,模拟物阴性对照(Agomir, agomir NC)购自上海吉玛公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 鸡 gga-miR-7b 候选靶基因预测 根据 miRbase(<http://www.mirbase.org>)搜索 gga-miR-7b 成熟体并下载其序列,利用 TargetScan(<http://www.targetscan.org>)和 miRBD(<http://mirdb.org>)预测其候选靶基因,其预测标准是靶基因 3'UTR 区存在与 miRNA 大约 2~7 bp 的碱基互补区“GTCTCC”种子结合位点。

1.2.2 引物设计与合成 根据 NCBI Nucleotide 查询鸡 SNCA、GAPDH 基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计

荧光定量引物和 *SNCA* 3'UTR 扩增引物, *SNCA* 3'UTR 突变引物是运用南京诺维赞公司 CE Design V1.04 软件的单点突变功能进行引物设计, 引物均由哈尔滨博

士生物公司合成。鸡 *gga-miR-7b* 荧光定量引物和 U6 引物由上海吉玛公司设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物名称	序列(5'→3')	产物大小 (bp)
<i>SNCA</i> -3'UTR-F	GTGAGCTCCTGAAATCTACTAACAAGACGTCC	500
<i>SNCA</i> -3'UTR-R	GTTCTAGATTACAGACACAAGTTAATAAAACAC	
<i>SNCA</i> -qPCR-F	GCAGGAAGGAATGGTGAATAATAC	106
<i>SNCA</i> -qPCR-R	TCATGCTTCAGGTTTCATAATCTTG	
<i>GAPDH</i> -qPCR-F	TAGTGAAGGCTGCTGCTGCTGATG	104
<i>GAPDH</i> -qPCR-R	AAAGGTGGAGGAATGGCTGC	
<i>SNCA</i> -mut-F	TGAACAGAAGGATCAGCAATGATTGGAGTATCTGTG	7 850
<i>SNCA</i> -mut-R	GCTGATCCTTCTGTTCAAAATACACTGTAAAACTGTAAAAA	

1.2.3 cDNA 合成和 *SNCA*-3'UTR 扩增 称取 B19 单倍型 SPF 鸡脾脏组织, 使用 AXYGEn 总 RNA 提取试剂盒抽提总 RNA, 使用超微量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, 并根据 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书先将 2  $\mu$ g RNA 去除 DNA 污染, 然后再进行反转录成 cDNA, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

以 cDNA 为模板, *SNCA* 3'UTR 引物, 使用 *Ex Taq* DNA 聚合酶扩增鸡 *SNCA* 基因 3'UTR 目的片段。

1.2.4 *SNCA* 野生型和突变型双荧光素酶报告质粒构建 将结果正确的 *SNCA*-3'UTR 目的产物使用胶回收试剂盒割胶纯化, 构建 *SNCA* 野生型重组质粒。纯化产物和 pmirGLO 载体经 *Sac* I/*Xba* I 双酶切, 酶切鉴定后经割胶回收目的片段。将酶切纯化产物进行 16  $^{\circ}$ C 连接, 然后转化至 DH5 $\alpha$  菌株中, 在含有氨苄抗性的固体 LB 琼脂糖培养基上培养 12~15 h。挑取单菌落接种在氨苄抗性的液体 LB 培养基的试管中, 37  $^{\circ}$ C 培养 9~16 h。经菌液 PCR 及双酶切鉴定为阳性后, 送库美生物(长春)有限公司测序。测序结果经 MEGA6 序列比对, 结果正确的菌液根据 AXYGEn 小提质粒试剂盒说明书提取质粒, 获得野生型双荧光素酶报告基因质粒, 命名 *SNCA*-wt-3'UTR。

以测序正确的 *SNCA*-wt-3'UTR 质粒为模板, 用同源重组突变的方法构建 *SNCA* 突变型重组质粒, 运用突变引物(表 1), 使 *SNCA*-wt-3'UTR 质粒与 *gga-miR-7b* 种子结合位点突变。按照 Fast

Mutagenesis Kit V2 试剂盒说明书进行反应产物转化, 涂板, 克隆鉴定, 测序, 最终获得突变型双荧光素酶报告基因质粒, 命名 *SNCA*-mut-3'UTR。

1.2.5 双荧光素酶报告基因检测 荧光素酶报告试验在 HEK293T 细胞系中进行。HEK293T 细胞生长在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 放入 37  $^{\circ}$ C, 95% 湿度和 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。将 HEK293T 细胞在转染前 1 d 以每孔 3.14 $\times$ 10<sup>4</sup> 个细胞铺于 96 孔细胞培养板中, 然后按照 Fugene HD 转染试剂说明书将 *gga-miR-7b* agomir, agomir NC (100 nmol/L) 和 *SNCA*-wt-3'UTR、*SNCA*-mut-3'UTR (1  $\mu$ g) 共同转染到 HEK293T 细胞中。在转染 48 h 后通过双荧光素酶测定系统分析萤火虫荧光素/海肾荧光素酶活性比值(海肾荧光素酶为内参, 用来标准化萤火虫荧光素酶活性)。

1.2.6 qRT-PCR 用 MDV 超强毒株 Md5 感染 SPF 抗性鸡(B21 单倍型)和易感鸡(B19 单倍型)5 d、14 d、25 d, 各时间点脾脏组织按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA, 根据 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书先将 2  $\mu$ g RNA 去除 DNA 污染, 然后再反转录成 cDNA, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

以 cDNA 为模板, 鸡 *GAPDH* 和 *U6* 作为内参基因, 用设计好的引物(表 1)按照 SYBR Premix *Ex Taq*TM II 试剂盒说明书进行荧光定量分析。所有反应均设置 3 个重复, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 的方法进行分析。

1.2.7 统计分析 数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。所有数据均使用 SPSS Student's t-test 进行分析。当

$P < 0.05$  时认为差异显著,  $P < 0.01$  认为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡gga-miR-7b候选靶基因预测

利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 与

miRBD (<http://mirdb.org>) 生物信息学在线软件预测 gga-miR-7b 的靶基因, 分别有 178 和 227 个基因, 取交集并根据得分高低以及结合研究重点, 筛选得到包括 *VDAC1*、*SNCA*、*SATB1*、*TCF12* 等多个靶基因 (表 2), 优先选取 *SNCA* 进行验证分析。

表 2 gga-miR-7b 与候选靶基因 mRNA 的结合位点和背景信息

Table 2 Background information and the binding sites of candidate target gene mRNA and gga-miR-7b

基因名称	登录号	种子结合信息	靶位点 (bp)
<i>SNCA</i>	NM_204673	5'...AACUCCCUUCUCUUUGUCUCCA... 3' 3' UUGUUUUUAGUGAUCAGAAGGU 5'	125~131
<i>VDAC1</i>	NM_001033869	5'...GGGUACAUUUUUAGAGUCUCCA... 3' 3' UUGUUUUUAGUGAUCAGAAGGU 5'	678~685
<i>SATB1</i>	NM_001199644	5'...UGAUGUUUGCAAUGUGUCUCCU... 3' 3' UUGUUUUUAGUGAUCAGAAGGU 5'	1 003~1 009
<i>TCF12</i>	NM_205375	5'...ACUCCAUGGAAACUGUCUCCA... 3' 3' GUUGUUUUAGUGAUCAGAAGGU 5'	1 334~1 341

### 2.2 双荧光素酶报告基因重组质粒构建及鉴定

将限制性酶切位点 (*Sac* I/*Xba* I) 添加到引物里, 扩增含有 gga-miR-7b 与 *SNCA* 3' UTR 的种子结合位点 (GTCTTCC) 的目的片段, 产物大小为 500 bp。将目的产物插入到 PmirGLO 载体 (含 2 个报告基因, 萤火虫荧光素酶基因 *Luc2* 和海肾荧光素酶基因 *Rluc*) *Luc2* 后的 *Sac* I/*Xba* I 酶切位点内构建野生型

重组质粒。为了证实 GTCTTCC 是 gga-miR-7b 与候选靶基因 *SNCA* 之间的靶位点, 我们构建了突变型重组质粒, 将 GTCTTCC 突变成 CAGAAGG。经测序结果显示, 我们成功构建了 *SNCA*-wt-3' UTR, *SNCA*-mut-3' UTR 双荧光素酶报告基因重组质粒 (图 1) 可用于后续研究。

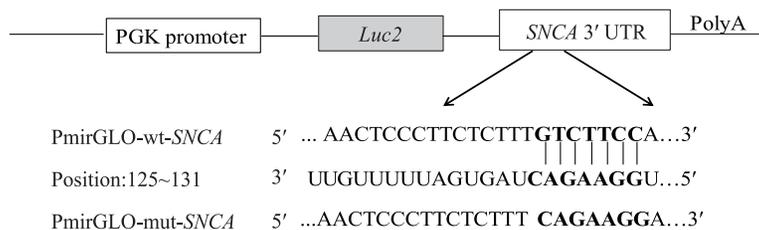


图 1 *SNCA* 双荧光素酶报告基因质粒的构建

Fig.1 Construction of *SNCA* dual luciferase reporter plasmid

### 2.3 双荧光素酶活性

用 TargetScan 和 miRBD 共同预测了 gga-miR-7b 在 *SNCA* 3' UTR (125~131 bp) 有 1 个推定的结合位点。利用 HEK293T 细胞, 使用双荧光素酶报告基因检测试验来证实 *SNCA* 是 gga-miR-7b 的靶基因。我们将 gga-miR-7b 模拟物 agomir、模拟物阴性对照 agomir NC 与 *SNCA*-wt-3' UTR、*SNCA*-mut-3' UTR 双

荧光素酶报告基因重组质粒共同转染 HEK293T 细胞, 在转染后 48 h 检测萤火虫荧光素酶活性。结果显示, 当加入 gga-miR-7b 模拟物 agomir, 与 agomir NC 相比, *SNCA*-wt-3' UTR 萤火虫荧光素酶活性显著下调 ( $P < 0.05$ )。为了进一步证实 *SNCA* 是 gga-miR-7b 的靶基因, 我们将种子结合位点突变的 *SNCA*-mut-3' UTR 重组质粒与 gga-miR-7b 模拟物 agomir、agomir

NC 共同转染 HEK293T 细胞,萤火虫荧光素酶活性无显著变化。上述结果证实, *gga-miR-7b* 与 *SNCA* 的 mRNA 3'UTR 在 125~131 bp 发生特异性结合从而显著抑制萤火虫荧光素酶基因活性(图 2)。

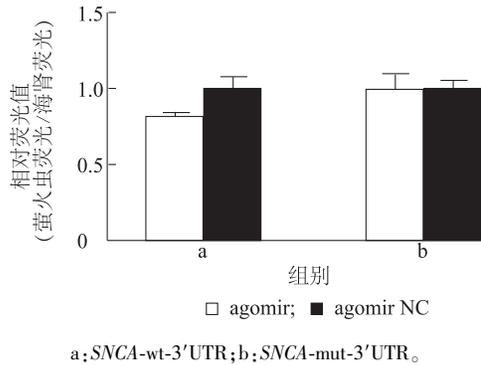
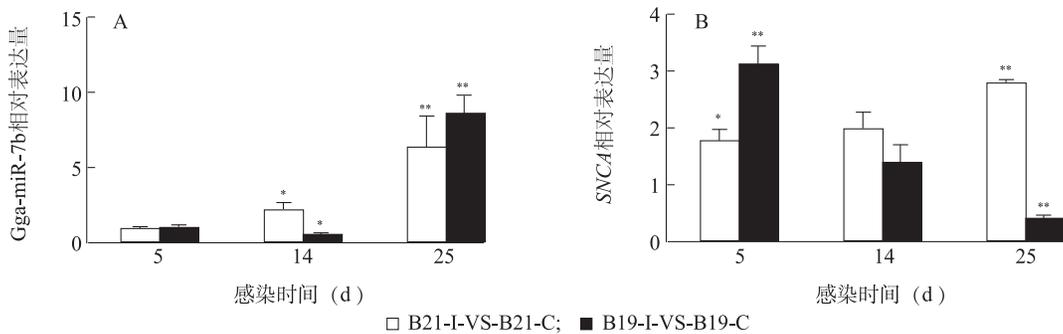


图 2 *SNCA* 荧光素酶检测结果

Fig.2 Detection results of *SNCA* luciferase



B21-I-VS-B21-C 表示马立克氏病抗性鸡攻毒组对比正常对照组; B19-I-VS-B19-C 表示马立克氏病易感鸡攻毒组对比正常对照组; \* 表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 3 *gga-miR-7b* 和 *SNCA* 荧光定量结果

Fig.3 Quantitative fluorescence results of *gga-miR-7b* and *SNCA*

### 3 讨论

MD 的发病特征是免疫抑制、神经疾病和 CD4+ T 细胞淋巴瘤。MDV 是一种疱疹病毒,它的靶细胞为 T 细胞,以形成肿瘤为特征<sup>[11]</sup>。MD 的发病机理可以分为 3 个不同的阶段:早期溶细胞感染、潜伏感染、后期溶细胞感染与免疫抑制。因此,阐明 MD 的发病机制十分重要<sup>[12]</sup>。不少证据表明 miRNA 在神经和肿瘤疾病中发挥功能,特别是在癌症中,miRNA 表达水平的异常与各种类型癌症的发生和发展有关<sup>[13]</sup>。近年来,已有大量的研究报道了与 MD 肿瘤发生的宿主和病毒 miRNA。MDV 编码的 miR-M12-5p 能够在体内下调 *HVCN1* 基因的表达水平<sup>[4]</sup>。miR-150、miR-223 在 MDV 转化的细胞系中下

### 2.4 qRT-PCR

通过 qRT-PCR 方法检测 *gga-miR-7b* 和 *SNCA* 基因在 Md5 感染 B21、B19 SPF 单倍型鸡(5 d、14 d、25 d)脾脏中的表达水平。如图 3A 所示, *gga-miR-7b* 在 Md5 感染 14 d,在 B21 中显著上调表达而在 B19 中显著下调表达( $P < 0.05$ ), Md5 感染 25 d, *gga-miR-7b* 在 B21、B19 中均极显著上调表达( $P < 0.01$ )。如图 3B 所示, *SNCA* 在 B21 单倍型鸡脾脏中与正常组对比, Md5 感染 5 d、14 d、25 d 上调表达,其中在 5 d、25 d 达到显著水平( $P < 0.05$ )。 *SNCA* 在 B19 单倍型鸡脾脏中与正常组对比, Md5 感染 5 d 时极显著上调表达( $P < 0.01$ ),在 14 d、25 d 表达量逐渐降低,其中在 25 d 极显著下调表达( $P < 0.01$ )。综上所述, *gga-miR-7b* 和靶基因 *SNCA* 可能与 MD 抗性/易感性以及肿瘤转化有关。

调<sup>[14]</sup>。在 MDV 感染的敏感鸡系 7<sub>2</sub> 中, *gga-miR-15b* 减少了鸡的脾脏肿瘤,调节激活转录因子 2 (ATF2) 的表达, *gga-miR-15b* 可能与 MD 抗性/易感性有关<sup>[15]</sup>。有研究报道,主要组织相容性复合物 (MHC) B 单倍型鸡 (B19) 在 MDV 超强毒感染 30 d,能引起 100% MD 肿瘤发生率,而 B21 单倍型鸡观察到 55% 肿瘤发生率,表现对 MD 具有抗性<sup>[11]</sup>。

本研究从宿主角度探讨 *gga-miR-7b* 可能介导 MD 遗传抗性/易感性差异的潜在分子机制。本研究利用双荧光素酶报告基因检测系统初次证明 *SNCA* 是 *gga-miR-7b* 的靶基因。荧光定量 PCR 方法检测 *gga-miR-7b* 的表达对 *SNCA* 在抗性鸡 (B21) 和易感鸡 (B19) 感染 MDV 不同时期的表达是否有影响。结果显示, *gga-miR-7b* 在前期溶细胞期(感染 5

d) 抗性鸡和易感鸡中 gga-miR-7b 的表达量无显著变化, 而 SNCA 则显著上调表达。这可能说明 gga-miR-7b 对前期溶细胞期 MDV 半自主复制不起作用, 此时对 SNCA 表达没有影响; 潜伏期(感染 14 d) 和后期溶细胞期(感染 25 d), gga-miR-7b 在抗性鸡中的表达情况和 SNCA 的表达情况相同, 存在一定的规律性。有文献报道了 miRNA 可以正向调控靶基因的表达<sup>[16]</sup>, 因此可能是 gga-miR-7b 正向调控 SNCA 的结果。而 gga-miR-7b 在易感鸡中的表达与 SNCA 的表达恰好相反, 这可能是 gga-miR-7b 在易感鸡中负向调控 SNCA, 抑制了 SNCA 表达。由于 MDV 在感染 18 d 左右可在 CD4+T 细胞内活化启动再次溶细胞感染, 并导致免疫抑制, 最后在感染后 28 d 左右进入 CD4+T 细胞的转化增殖阶段, 并在病鸡多种内脏中产生肿瘤<sup>[17]</sup>。为此我们联想 SNCA 可能与 MD 抗性/易感性以及肿瘤转化有关。

SNCA 基因多态性位点(rs356186)与 PD 易感性有关<sup>[9]</sup>。目前关于 miRNA 与 SNCA 的研究主要集中在神经系统变性疾病 PD 研究中。Junn 等<sup>[18]</sup>研究发现 miR-7 可以抑制 SNCA 的表达, 通过结合到 SNCA mRNA 的 3' UTR 区域, 保护细胞免受氧化应激介导的细胞死亡。此外, 在 MPTP 诱导培养的细胞和小鼠的 PD 神经毒素模型中 miR-7 表达降低有助于增加 SNCA 的表达, 并提出 miR-7 可作为 PD 和其他  $\alpha$ -突触核蛋白病的治疗靶点<sup>[18]</sup>。miR-7b 和 miR-7 与 SNCA 具有相同碱基互补配对的种子区, 然而关于 miR-7b 与 SNCA 基因的互作关系并未报道。由于 MD 是神经型和内脏肿瘤型并发的禽类疾病, 本试验首次将 SNCA 与鸡 gga-miR-7b 联系在一起, 为寻找治疗 MD 的新药物靶点以及培育 MD 遗传抗性/易感 SPF 鸡提供了新思路。

#### 参考文献:

- [1] KHEIMAR A, PREVIDELLI R L, WIGHT D J, et al. Role in Marek's disease virus pathogenesis, integration and tumorigenesis [J]. *Viruses*, 2017, 9(7): 173.
- [2] BROWN A C, BAIGENT S J, SMITH L P, et al. Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek's disease virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(6): 1687-1692.
- [3] 陈蓉, 应诗家, 陈哲, 等. 两品系种鸭下丘脑 miRNA 的鉴定及其表达验证分析 [J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(5): 1093-1098.
- [4] 李会珍, 滕蔓, 党露, 等. 马立克氏病毒编码的 miR-M12-5p 对鸡 HVCN1 基因表达的靶向调控 [J]. *河南农业科学*, 2016, 45(6): 121-125, 129.
- [5] 李新. miR-26a 和 miR-181a 在鸡马立克氏病肿瘤形成过程中的作用机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [6] LEE H J, PALKOVITS M, YONNG W S. miR-7b, a microRNA up-regulated in the hypothalamus after chronic hyperosmolar stimulation, inhibits Fos translation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(42): 15669-15674.
- [7] YANG X, GAO W, LIU H, et al. MicroRNA transcriptome analysis in chicken kidneys in response to differing virulent infectious bronchitis virus infections [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(11): 3397-3405.
- [8] 易诚. gga-miR-21-5p 靶向调控 SATB1 基因及其对马立克氏病肿瘤细胞增殖与迁移的影响 [D]. 牡丹江: 牡丹江师范学院, 2017.
- [9] 韩薇.  $\alpha$ -突触核蛋白(SNCA)基因多态性与帕金森病易感性的 meta 分析 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [10] PATIL K S, BASAK I, PAL R, et al. A proteomics approach to investigate miR-153-3p and miR-205-5p targets in neuroblastoma cells [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0143969.
- [11] DONG K, CHANG S, XIE Q, et al. Comparative transcriptomics of genetically divergent lines of chickens in response to Marek's disease virus challenge at cytolitic phase [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e0178923.
- [12] GURUN A, KAMBLE N, KANFER B B, et al. Association of Marek's disease induced immunosuppression with activation of a novel regulatory T cells in chickens [J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(12): e1006745.
- [13] PALMERO E I, CAMPOS M. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2011, 34(3): 363-370.
- [14] YAO Y, ZHAO Y, SMITH L P, et al. Differential expression of microRNAs in Marek's disease virus-transformed T-lymphoma cell lines [J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90(7): 1551-1559.
- [15] TIAN F, LUO J, ZHANG H, et al. miRNA expression signatures induced by Marek's disease virus infection in chickens [J]. *Genomics*, 2012, 99(3): 152-159.
- [16] CORDES K R, SHEEHY N T, WHITE M P, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity [J]. *Nature*, 2009, 460: 350-356.
- [17] 孙国荣. MDV 分离毒株生物学特性及其在宿主染色体整合的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [18] JUNN E, LEE K W, JEONG B S, et al. Repression of  $\alpha$ -synuclein expression and toxicity by MicroRNA-7 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(31): 13052.

(责任编辑: 陈海霞)