

# 人 miRNA-埃博拉病毒相互作用的生物信息学研究



刘涛<sup>1</sup>, 王江<sup>1</sup>, 王正<sup>1</sup>, 郑晓飞<sup>2</sup>, 李伍举<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 初步探讨人微小 RNA (miRNA) 与埃博拉病毒基因组 5'尾标 (trailer) 序列相互作用, 为防治埃博拉病毒提供可能的靶向 miRNA。方法 运用 Pita 和 RNAhybrid 软件预测与埃博拉病毒 5'尾标序列相互作用的人 miRNA, 并对其注释和分析。结果与结论 发现人 miRNA 可能与埃博拉病毒 5'尾标序列存在复杂的相互作用。根据以前关于宿主 miRNA 与病毒基因组相互作用的报道, 我们认为, 人 miRNA 与埃博拉病毒基因组 5'尾标的相互作用可能会影响埃博拉病毒在人体内的复制以及人体细胞的正常功能。该研究将为埃博拉病毒的防治提供新的思考。

**[关键词]** miRNA; 埃博拉病毒; 相互作用; 生物信息学

**[中图分类号]** Q527.5; R373.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1674-9960(2015)01-0006-06

**DOI:** 10.7644/j.issn.1674-9960.2015.01.002

## Bioinformatics study on human miRNA-Ebola virus interaction

LIU Tao<sup>1</sup>, WANG Jiang<sup>1</sup>, WANG Zheng<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-fei<sup>2</sup>, LI Wu-ju<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Basic Medical Sciences 2. Institute of Radiation Medicine Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

\* Corresponding author, E-mail: liwj@nic.bmi.ac.cn

**[Abstract]** **Objective** To study the interaction between human microRNA (miRNA) and 5'-trailer regions of Ebola virus genome from the perspective of bioinformatics so as to facilitate prevention and treatment of Ebola virus. **Method** The miRNA target prediction software Pita and RNAhybrid were used to predict the human miRNAs which could bind the 5'-trailer regions of Ebola virus genomes before the miRNAs were annotated by g:Profiler web server. **Results and Conclusion** There may be complex interactions between human miRNAs and the 5'-trailer regions of Ebola virus. Previous reports about the interaction between host miRNA and 5'-trailer region of virus genome suggest that the interaction between human miRNA and 5'-trailer region of Ebola virus may have effect on replication of Ebola virus and human cells. This work may provide new ideas on prevention and treatment of Ebola virus.

**[Key words]** miRNA; Ebola virus; interaction; bioinformatics

埃博拉病毒 (Ebola virus) 是长约 19 kb 的单股负链 RNA 病毒, 属于丝状病毒科, 呈长丝状体, 是引起人类及灵长类动物产生埃博拉出血热的烈性传染性病毒, 主要通过汗液、唾液或血液等途径感染。人感染埃博拉病毒后通常出现发热、头痛、呕吐、腹泻、肾功能障碍和体内外大出血等症状, 并在短期内死亡, 致死率为 50% ~ 90%。最近在西非暴发的埃博拉病毒已造成近 7000 人死亡。由于埃博拉病毒致死率极高, 严重威胁公共健康与公共安全, 是一种潜在的生物武器。目前仍无有效的防治策略。本研究旨在利用生物信息学工具, 开展人微小 RNA (miRNA) -

埃博拉病毒相互作用研究, 为防治埃博拉病毒提供新的思考。

目前已发现 5 种埃博拉病毒, 即扎伊尔埃博拉病毒 (Zaire ebolavirus, EBOV)、苏丹埃博拉病毒 (Sudan ebolavirus, SUDV)、本迪布焦埃博拉病毒 (Bundibugyo ebolavirus, BDBV)、塔依森林埃博拉-科特迪瓦型 (Tai Forest ebolavirus, TAFV) 和埃博拉-雷斯顿型 (Reston ebolavirus, RESTV)。其中 EBOV、SUDV 和 BDBV 对人类和非人类灵长动物的致病性和致死率均很高; RESTV 对人类不致病, 但对非人类灵长类动物具有致死性作用; TAFV 对人类有明显的致病性, 但一般不致死, 对黑猩猩的致死率很高<sup>[1]</sup>。为探讨埃博拉病毒 miRNA 对人的作用, Liang 等<sup>[2]</sup> 利用生物信息学工具预测了埃博拉病毒可能产生的 miRNA, 结果表明, 基于 EBOV 和 SUDV 序列, 预测出 2 个 pre-miRNA 及由此生成的 3 个成

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (31271404, 31300093, 31471244)

**[作者简介]** 刘涛, 男, 副研究员, 研究方向: 生物信息学, E-mail: liutaobj001@126.com

**[作者单位]** 1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

**[通讯作者]** 李伍举, E-mail: liwj@nic.bmi.ac.cn

熟体 miRNA ,并进一步分析证明这些 miRNA 在不同埃博拉病毒序列中高度保守。最后,利用 miRNA 靶标预测软件预测了这 3 个 miRNA 的人靶标 mRNA ,GO 注释表明这些靶标具有 T 和 B 细胞激活、自然杀伤细胞介导的细胞毒性以及黏附连接等功能。因此,埃博拉病毒通过 miRNA 对这些靶标的抑制可能导致人免疫系统对埃博拉病毒的免疫逃逸及其组织溶解等病症。另外,Sheng 等<sup>[3]</sup>用埃博拉病毒的 GP 蛋白感染人脐静脉内皮细胞,发现有 3 个 miRNA 表达升高 (hsa-miR-1246、hsa-miR320a 和 hsa-miR-196b-5p) ,并观察到这些 miRNA 的一些靶标显著下调,如胱天蛋白酶(caspase) 8 和 FADD 样细胞凋亡调控因子等。进一步发现降低这些 miRNA 的表达能在体外降低埃博拉病毒 GP 蛋白引起的细胞毒性。但目前未见到人 miRNA 与埃博拉病毒相互作用的系统报道。

研究表明,人 miRNA 在人-病毒相互作用中发挥重要作用。例如,hsa-miR-296-5p 通过结合肠道病毒 EV71 的基因组抑制病毒的复制<sup>[4]</sup>; hsa-miR-122 通过结合乙肝病毒 HBV 基因组的高度保守区域抑制 HBV 复制<sup>[5]</sup>。值得注意的是,人肝组织特异表达的 miRNA hsa-miR-122 通过与 HCV 基因组 5'非翻译区结合可促进 HCV 复制,而抑制 miR-122 表达水平可降低 HCV 的复制,使得靶向 miR-122 的

HCV 治疗成为可能<sup>[6]</sup>。受此启发,我们通过观察埃博拉病毒的 5'非翻译尾标(trailer)序列,发现与非致病性的 RESTV 相比 4 种致病性埃博拉病毒具有明显更长的 5'尾标序列,但 5 种病毒的前 25~28 位序列高度相似,其余序列则相似性很低(图 1),推测这些 5'尾标很可能通过与入 miRNA 的相互作用在对人致病和致死过程中发挥某种作用。为此,我们利用生物信息学工具系统探索了人 miRNA 与埃博拉病毒基因组 5'端尾标区域的可能相互作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 人 miRNA 序列 从 2014 年 6 月发布的第 21 版 miRBase 数据库<sup>[7]</sup>下载,共有 2588 条 miRNA 序列。

1.1.2 埃博拉病毒基因组序列 从 NCBI 数据库下载,分别为 EBOV (NC\_002549)、SUDV (NC\_006432)、BDBV (NC\_014373)、TAFV (NC\_014372)和 RESTV (NC\_004161)。另外,基于这些序列的注释提取病毒基因组反义链 5'尾标序列,其长度分别为 677 (EBOV)、381 (SUDV)、475 (BDBV)、474 (TAFV)和 25 (RESTV),这些尾标序列的多序列比较如图 1 所示。

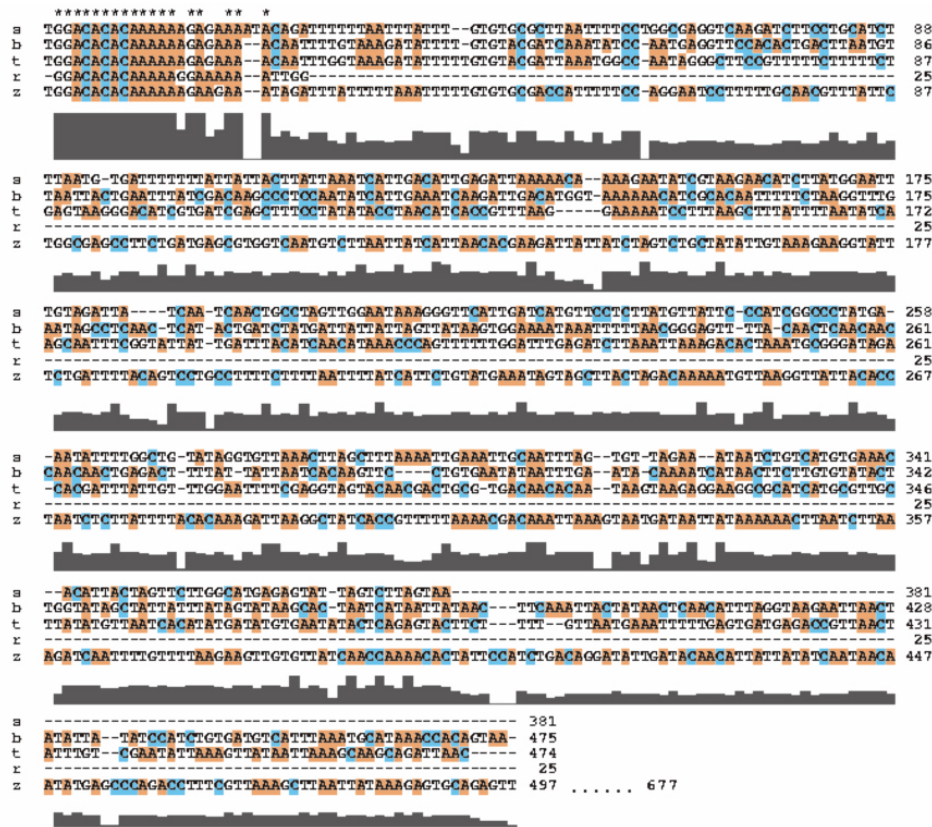


图 1 5 种埃博拉病毒 5'端尾标序列的 Clustal 比较

s. SUDV; b. BDBV; t. TAFV; r. RESTV; z. EBOV。其中,第 497 位之后只有 EBOV 的序列,因此略去

## 1.2 方法

**1.2.1 人 miRNA 与埃博拉病毒 5'尾标序列相互作用的预测** 采用 RNAhybrid v2.1.1<sup>[8]</sup>和 Pita v6<sup>[9]</sup>软件预测人 miRNA 与埃博拉病毒基因组反义链 5'尾标序列的相互作用。RNAhybrid 是基于能量最低原理来预测 miRNA-靶标 mRNA 相互作用,不考虑 miRNA 与靶标 mRNA 自身的碱基配对结构,并假定 miRNA 结合靶标 mRNA 结合位点的自由能符合极值分布。在给定 miRNA 前提下,通过靶标数据库的随机化策略来获取极值分布参数,于是,对每个 miRNA 的结合位点,均有一个概率  $P$  值与之对应。在本研究中,我们设定 miRNA 种子区为 2~7、3~8 和 4~9,不限定种子区的 G:U 不稳定配对、错配和环区,并以最小自由能  $< -10$  kcal/mol ( $-41.86$  kJ/mol) 和  $P \leq 0.02$  来选取靶标序列。而 Pita 首先扫描符合种子区匹配参数的靶标序列,然后折叠靶标序列上下游各一定范围内的序列,计算解开折叠进而将靶标序列暴露给 miRNA 的能耗,以及可能靶标序列与 miRNA 形成双链结构所获得的自由能,得到两者的差值  $\Delta\Delta G$ 。默认参数是:种子区长度 6~8;种子区长度为 7 或 8 时允许一个 G:U 不稳定配对;种子区长度为 8 时允许一个错配,不允许出现环区;对靶标序列上下游各 70 nt 范围内的序列进行折叠计算。本研究采用默认参数并以  $\Delta\Delta G < -9$  kcal/mol 来选取靶标序列。

**1.2.2 靶标基因的注释分析** 为探讨人 miRNA 与病毒基因组序列相互作用对人细胞的功能影响,首先从 miRTarBase 检索文献报道的这些 miRNA 的靶基因信息,对没有文献报道靶基因的重要 miRNA,用 miRSearch V3.0<sup>[10]</sup>进行预测,然后利用 g:Profiler 在线工具<sup>[11]</sup>对这些靶基因进行注释,参数设置选择不采用电子注释的内容,其他为默认参数。依据注释进而解释这些 miRNA 与病毒基因组相互作用对宿主细胞可能的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 人 miRNA 与埃博拉病毒 5'尾标序列的可能相互作用

Pita 和 RNAhybrid 软件预测表明,人 miRNA 与 5 种埃博拉病毒的 5'尾标序列可能存在相互作用。其中与对致病性病毒(EBOV、SUDV、BDBV 和 TAFV)相互作用的 miRNA 数目明显多于非致病性病毒 RESTV。Pita 和 RNAhybrid 评价 miRNA 与靶标 RNA 相互作用的方法不同,因此其交集可以同时满足更多的评价标准,因此也更加可信。结果表明,对 4 种致病性病毒,满足这两种标准的 miRNA 仍较

多,而对 RESTV 而言则无(表 1)。这些数据表明,人 miRNA 作用于 5 种埃博拉病毒的方式彼此不同,比较复杂。

表 1 不同方法预测的作用于埃博拉病毒 5'尾标区的人 miRNA 数目

病毒	Pita	RNAhybrid	Both
EBOV	125	127	37
SUDV	104	152	43
BDBV	118	64	29
TAFV	53	102	12
RESTV	1	10	0
U1	0	0	0
U2	3	1	0
U3	40	83	10

U1 为同时作用于 EBOV、SUDV、BDBV 和 TAFV 而不与 RESTV 相互作用的 miRNA 数目;U2 为同时作用于 EBOV、SUDV 和 BDBV 而不与 TAFV 和 RESTV 相互作用的 miRNA 数目;U3 为特异地与 TAFV 相互作用的 miRNA 数目;Both 是指 Pita 和 RNAhybrid 两种方法预测结果的交集

用 Pita 预测到的只作用于 EBOV、SUDV 和 BDBV 的 miRNA 为 3 个: hsa-miR-2467-5p、hsa-miR-5088-5p 和 hsa-miR-6797-5p;只作用于 TAFV 的较多,为 40 个。用 RNAhybrid 预测到的只作用于 EBOV、SUDV 和 BDBV 的为 1 个: hsa-miR-3127-5p;只作用于 TAFV 的同样较多,为 83 个。有 10 个只作用于 TAFV 的 miRNA 同时满足 Pita 和 RNAhybrid 两种标准,它们是 hsa-miR-423-3p、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-3667-3p、hsa-miR-5008-5p、hsa-miR-6124、hsa-miR-6827-5p、hsa-miR-433-3p、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-5694 和 hsa-miR-302b-5p。而在同时满足 Pita 和 RNAhybrid 两种标准的 miRNA 中,没有只作用于 EBOV、SUDV 和 BDBV 的,也没有只作用于 EBOV、SUDV、BDBV 和 TAFV 的。只作用于对人致死率高的病毒(EBOV、SUDV 和 BDBV)以及只作用于不致死病毒 TAFV 的 miRNA,可能分别在病毒的高致死性和非致死性机制中发挥某种作用,尤其值得深入研究。

### 2.2 可能作用于埃博拉病毒 5'尾标序列的人 miRNA 的生物信息学分析

埃博拉病毒 5'尾标序列与人 miRNA 相互作用的后果目前未见报道。文献报道,人 miRNA 作用于病毒基因组 5'非翻译区,有的有利于病毒复制<sup>[6]</sup>,有的不利于病毒复制<sup>[4,5,12,13]</sup>,其具体机制并不清楚。为了进一步探讨这种作用对宿主细胞的影响,我们对这些 miRNA 在宿主细胞的靶基因进行了注释分析,探讨病毒基因组富集 miRNA 对宿主细胞可能产生的影响。具体数据见 <http://ccb.bmi.ac.cn/ebola-human-miRNA/>。

RNAhybrid 预测到 hsa-miR-3127-5p 只作用于

EBOV、SUDV 和 BDBV 其靶标基因 SLC22A23 是一个跨膜有机离子转运蛋白,与节段性回肠炎和溃疡性结肠炎的发病相关<sup>[14]</sup>,可能与埃博拉病毒引起的腹泻有关。

Pita 预测到 hsa-miR-2467-5p、hsa-miR-5088-5p 和 hsa-miR-6797-5p 只作用于 EBOV、SUDV 和 BDBV,但它们的靶基因未见文献报道。鉴于这 3 个 miRNA 只与高致死性病毒相互作用,我们对它们的靶基因进行了预测和注释分析。miRSearch 共预测到 1327 个靶基因,对其进行 g: Profiler 注释(表 2),发现 560 个靶基因编码符合转录调控因子 LRF 序列特征的蛋白,LRF 是 POK (POZ/BTB 和 Kruppel) 转录抑制因子家族成员,可促进上皮向间充质转变<sup>[15]</sup>,是肿瘤细胞迁移、浸润和转移过程中的重要调控事件,可能与埃博拉病毒引起的血管内皮细胞失稳和破坏有关;9 个靶基因 (COMT、DDHD2、GFAP、HIRA、HPSE2、SALL1、SCN4A、UFD1L、ZFYVE26) 与大便失禁有关,可能与埃博拉病毒引起的腹泻有关;33 个靶基因与咽喉异常有关,可能

与埃博拉病毒引起的咽喉痛有关;还有 5 个靶基因 (ARID1A、CARM1、SMARCC2、SMARCD1 和 SMARCE1) 参与核小体甲基化激活复合物 (nucleosomal methylation activator complex, NUMAC) 的构成,其中甲基化酶 CARM1 专司对核小体组蛋白进行甲基化修饰<sup>[16]</sup>。

Pita 和 RNAhybrid 共同预测到 12 个 miRNA 作用于 TAFV,其中 10 个特异性地作用于 TAFV,有文献报道靶基因信息的为 4 个,报道的靶基因达 252 个,对其进行 g: Profiler 注释(表 3)。64 个位于细胞浆,64 个位于细胞核,53 个可与 mRNA 结合,11 个参与 RNA 的运输,尤其是细胞核与细胞质间的运输。值得注意的是,其中 23 个靶基因参与病毒与宿主的相互作用过程,其中 6 个出现于 HIV Vpr 蛋白与宿主蛋白相互作用所涉及的过程。此外,这些靶基因主要参与大分子代谢正调控、细胞内运输、蛋白质代谢、mRNA 代谢、脱腺苷化依赖性 mRNA 降解、蛋白质翻译、蛋白质复合物的拆解和膜的组织等生物学过程。3 个蛋白 HDAC1、MTA2 和 RBBP4 是 PID 复合物(共有 5 个组分)的组分,该复合物可部分通过 TP53 羧基端的脱乙酰化而抑制 TP53 的转录活性,参与调控 TP53 介导的细胞生长停滞和凋亡<sup>[18]</sup>。

基于软件 Pita 和 RNAhybrid,预测到 37 个 miRNA 作用于 EBOV,其中 10 个 miRNA 报道了靶基因信息,涉及的靶基因数目为 79 个,g: Profiler 注释结果显示(表 4) 4 个参与 TP53 介导的细胞凋亡信号途径,其中 SIRT1 可直接与 TP53 结合并对其羧基端脱乙酰化<sup>[19]</sup>,而 EP300 则可使 TP53 羧基端乙酰化<sup>[20]</sup>。9 个基因出现于 EB 病毒 (Epstein-Barr virus) 感染所涉及的过程。

表 2 特异性地作用于 EBOV、SUDV 和 BDBV 的 miRNA 的靶基因注释

数据库注释 ID	数据库注释	靶基因数目	靶基因
CORUM: 86	NUMAC 复合物	5	ARID1A, CARM1, SMARCC2, SMARCD1, SMARCE1
HP: 0001600	喉异常	33	见文献[22]
HP: 0002607	大便失禁	9	COMT, DDHD2, GFAP, HIRA, HPSE2, SALL1, SCN4A, UFD1L, ZFYVE26
TF: M01100_1	LRF 转录因子基序 VNNRMCCCC	560	见文献[22]

CORUM. CORUM 蛋白质复合物数据库; HP. 人表型本体数据库 HPO (human phenotype ontology)<sup>[17]</sup>; TF. transfac 转录因子数据库

表 3 特异性地作用于 TAFV 的 miRNA 的靶基因注释

数据库注释 ID	数据库注释	靶基因数目	靶基因	数据库注释 ID	数据库注释	靶基因数目	靶基因
GO: 0010604	巨分子代谢过程的 正调控	47	见文献[22]	GO: 0006412	翻译	20	见文献[22]
GO: 0046907	细胞内运输	36	见文献[22]	GO: 0044802	单生物膜组织	21	见文献[22]
GO: 0032268	细胞蛋白代谢过程 的调控	35	见文献[22]	GO: 0043241	蛋白质复合物的分解	15	见文献[22]
GO: 0016071	mRNA 代谢过程	31	见文献[22]	GO: 1900153	细胞核转录 mRNA 的正调控	4	AGO2, CNOT1, PABPC1, ZFP3612
GO: 0016032	病毒过程	23	AP2M1, CCNT2, CDK7, HDAC1, HMGAI, NUP210, NUPL1, PML, POLR2L, POM121, PSMB5, PSMD1, PSMD8, RANBP2, RPL23A, RPL26, RPL3, RPL4, RPLP1, RPS2, RXRA, SLC25A6, XRCC6	GO: 0005829	细胞浆	64	见文献[22]
				GO: 0044428	细胞核	64	见文献[22]
				GO: 0044822	poly( A) RNA 结合	53	见文献[22]
				CORUM: 1495	PID 复合物	3	HDAC1, MTA2, RBBP4
				KEGG: 03013	RNA 运输	11	见文献[22]
				REAC: 176033	Vpr 与宿主细胞蛋白 的相互作用	6	HMGAI, NUP210, NUPL1, POM121, RANBP2, SLC25A6

GO. Gene Ontology 数据库; CORUM. 蛋白质复合物数据库; KEGG. KEGG pathway 数据库; REAC. REACTOME pathway 数据库

表4 作用于 EBOV 的 miRNA 的靶基因注释

数据库注释 ID	数据库注释	靶基因数目	靶基因
GO: 0042771	p53 类分子介导的 DNA 损伤应答的内部调亡信号途径	4	CD44 ,EP300 ,SIRT1 ,TP53
CORUM: 2821	hSIR2-p53 复合物	2	SIRT1 ,TP53
CORUM: 98	p300-MDM2-p53 复合物	2	EP300 ,TP53
KEGG: 05169	EB 病毒感染	9	CD44 ,CSNK2A1 ,EP300 ,HSPA8 , ICAM1 ,NCOR2 ,PTMA ,STAT3 , TP53

GO. Gene Ontology 数据库; CORUM. 蛋白质复合物数据库; KEGG. KEGG pathway 数据库

另外,基于 Pita 和 RNAhybrid,预测到 43 个 miRNA 作用于 SUDV,其中 10 个 miRNA 报道了靶基因信息,涉及的靶基因数目为 980 个,g: Profiler 注释结果显示(表 5) 229 个可参与形成大分子复

合物,其中 17 个是核糖体结构组分; 144 个可与 mRNA 结合; 5 个可形成反体(逆运复合体,retromer)是胞内体到高尔基体网络逆向囊泡运输的重要参与者<sup>[21]</sup>; 参与 Fc-ε 受体信号途径、成纤维细胞生长因子受体信号途径、表皮生长因子受体信号途径、T 细胞受体信号途径、FoxO 信号途径、ErbB 信号途径、神经营养因子信号途径、PI3K-Akt 信号途径、p53 信号途径、细胞的焦点粘连、细胞蛋白代谢和细胞内运输等过程; 27 个出现于流感病毒感染宿主细胞所涉及的过程,其中包括病毒的转录、复制和蛋白质翻译合成; 28 个出现于乙肝病毒感染宿主细胞所涉及的过程。

表5 作用于 SUDV 的 miRNA 的靶基因注释

数据库注释 ID	数据库注释	靶基因数目	靶基因	数据库注释 ID	数据库注释	靶基因数目	靶基因
GO: 0038095	Fc-epsilon 受体信号途径	31	见文献[22]	KEGG: 04115	p53 信号途径	14	CASP3 ,CASP8 ,CASP9 ,CCNB2 , CCND1 ,CCND2 ,CCNG1 ,CDK6 , CDKN1A ,RRM2 ,SESN1 ,SESN2 , SHISA5 ,THBS1
GO: 0044344	成纤维细胞生长因子刺激的细胞反应	31	见文献[22]	KEGG: 05161	乙型肝炎	28	AKT2 ,BCL2 ,BIRC5 ,CASP3 , CASP8 ,CASP9 ,CCND1 ,CDK6 , CDKN1A ,E2F1 ,E2F2 ,EGR3 , FADD ,GRB2 ,JL6 ,JAMTOR5 , MAP2K2 ,MAP3K1 ,MAPK9 , MYC ,NFKB1 ,NRAS ,PIK3CB , PIK3R1 ,RAF1 ,RELA ,TGFBF1 , YWHAQ
GO: 0044267	细胞蛋白质代谢	226	见文献[22]	REAC: 112399	胰岛素受体底物介导的信号传输	11	AKT2 ,EIF4E ,GRB2 ,JRS1 , IRS2 ,MAP2K2 ,NRAS ,PIK3CB , PIK3R1 ,RAF1 ,RPS6
GO: 0046907	细胞内运输	109	见文献[22]	REAC: 168273	流感病毒的 RNA 转录和复制	27	DHX9 ,HNRNPA2B1 ,HNRNPU ,HNRNPUL1 , NCBP1 ,POLR2D ,POLR2E ,RPL15 , RPL18A ,RPL3 ,RPL30 ,RPL31 , RPL35A ,RPL4 ,RPL9 ,RPS10 , RPS13 ,RPS15A ,RPS19 ,RPS24 , RPS4X ,RPS4Y1 ,RPS6 ,RPSA , HNRNPC ,SRSF2 ,UBA52
GO: 0007173	表皮生长因子信号途径	29	见文献[22]	REAC: 192823	病毒 mRNA 翻译	18	RPL15 ,RPL18A ,RPL3 ,RPL30 , RPL31 ,RPL35A ,RPL4 ,RPL9 , RPS10 ,RPS13 ,RPS15A ,RPS19 , RPS24 ,RPS4X ,RPS4Y1 ,RPS6 , RPSA ,UBA52
GO: 0032991	巨分子复合物	229	见文献[22]				
GO: 0003735	核糖体的结构组成	17	见文献[22]				
GO: 0044822	poly(A) RNA 结合	144	见文献[22]				
CORUM: 1059	反体复合物	4	SNX1 ,SNX2 ,VPS26A ,VPS29				
KEGG: 04660	T 细胞受体信号途径	16	AKT2 ,CBL ,GRB2 ,MAP2K2 , MAPK11 ,MAPK9 ,NFKB1 ,NRAS , PAK1 ,PAK4 ,PIK3CB ,PIK3R1 , RAF1 ,RELA ,FYN ,VAV2				
KEGG: 04068	FoxO 信号途径	24	见文献[22]				
KEGG: 04510	焦点粘连	28	ACTN2 ,ACTN4 ,AKT2 ,BCL2 , CAPN2 ,CAV1 ,CCND1 ,CCND2 , EGFR ,FLNA ,FLNB ,GRB2 , IGF1R ,JTGAI0 ,JAMC2 ,MAPK9 , PAK1 ,PAK4 ,PDGFA ,PDGFC , PIK3CB ,PIK3R1 ,PTK2 ,RAF1 , FYN ,THBS1 ,VAV2 ,ZYX				
KEGG: 03010	核糖体	21	见文献[22]				
KEGG: 04012	ErbB 信号途径	16	见文献[22]				
KEGG: 04722	神经营养因子信号途径	18	见文献[22]				
KEGG: 04917	催乳激素信号途径	15	见文献[22]				
KEGG: 04151	PI3K-Akt 信号途径	42	见文献[22]				

GO. Gene Ontology 数据库; CORUM. 蛋白质复合物数据库; KEGG. KEGG pathway 数据库; REAC. REACTOME pathway 数据库

最后,基于 Pita 和 RNAhybrid,预测到 29 个 miRNA 作用于 BDBV,其中有 7 个 miRNA 报道了靶基因信息,涉及的靶基因数目为 17 个,g: Profiler 注释结果显示(表 6) 这些靶基因主要参与细胞的焦点粘连、PI3K-Akt 信号途径、酪氨酸磷酸化修饰以及内皮细胞趋化性的正调控。

在本研究中,我们分别采用了 RNAhybrid 和 Pita 软件来研究人 miRNA 与埃博拉病毒 5' 尾标区的相

表6 作用于 BDBV 的 miRNA 的靶基因注释

数据库注释 ID	数据库注释	靶基因数目	靶基因
GO: 0090037	蛋白质激酶 C 信号传输的正调控	2	CD40 ,VEGFA
GO: 0018108	肽基酪氨酸磷酸化	5	CD40 ,JGF1R ,MET ,TP53 ,VEGFA
GO: 2001028	内皮细胞趋化性的正调控	2	MET ,VEGFA
KEGG: 04151	PI3K-Akt 信号途径	5	COL6A2 ,JGF1R ,MET ,TP53 , VEGFA
KEGG: 04510	焦点粘连	4	COL6A2 ,JGF1R ,MET ,VEGFA

GO. Gene Ontology 数据库; KEGG. KEGG pathway 数据库

互作用。从原理上讲, RNAhybrid 是以如下两个假设为基础, 首先, miRNA 5'端与靶标 mRNA 之间存在种子区( seed regions); 其次, 与随机背景比较, miRNA与靶标 mRNA 之间具有较低的最小结合能, 由  $P$  值来衡量  $P$  值越小获得的结果越少。为了便于验证, 我们取  $P \leq 0.02$  来选取与埃博拉病毒 5'尾标区相互作用的 miRNA。而 Pita 软件也是基于两个假设来预测 miRNA 靶标, 首先是 miRNA 与靶标 mRNA 之间存在种子区, 但不限定种子区在 miRNA 中的位置, 其次是考虑靶标 mRNA 上 miRNA 结合位点的可接近性( site accessibility), 此时不仅考虑位点的结合自由能, 还考虑靶标位点局部序列在两种状态下的二级结构自由能之差, 一种状态为基于位点局部序列直接计算二级结构自由能, 另一种状态是在限制位点为单链情况下的二级结构自由能。因此, 从原理上 Pita 软件考虑的因素更多, 似乎更为合理。然而, RNA-RNA 相互作用发生过程非常复杂, 常有多种蛋白参与其中, 所以, 不同预测软件是从不同角度反映预测结果, 应均有一定程度可靠性。此外, 为了便于后续的实验验证, 选取了较为严格的参数来选择与埃博拉病毒 5'尾标区相互作用的 miRNA。

本研究在选取靶基因以及靶基因的注释时主要考虑有文献依据的, 而相当一部分 miRNA 的靶基因信息并不明确, 因此没有包括在本研究的分析和结果之中。因此, 上述分析只是从一个有限的范围反映了 5 种病毒在与人 miRNA 相互作用这个层面上的可能异同点, 但仍然从一定程度上说明埃博拉病毒 5'尾标序列具有与人 miRNA 进行复杂多样的相互作用的理论可能; 由于与对人致病的 RESTV 相比 4 种对人致病的埃博拉病毒具有明显更长的 5'尾标序列, 推测这种相互作用很可能与病毒的对人致病性和致死性有一定关系; 由于未见 TAFV 的对人具有致死性报道, 而且与其他埃博拉病毒的基因组尾标序列相比, 有的人 miRNA 只作用于 TAFV, 推测这种独有的相互作用可能会有利于 TAFV 患者的治愈。此外, 由于 4 种对人致病的埃博拉病毒的尾标序列高度不同, 它们与人 miRNA 的相互作用具有相当的多样性和复杂性。值得注意的是, 4 个人 miRNA 只与 3 种高致死性病毒相作用, 而且它们的靶基因许多与病程发展相关, 值得深入研究。基于文献报道的其他病毒的研究结果, 本研究得出的这些相互作用可能影响到病毒的复制与扩散, 也可能对宿主细胞产生复杂的影响, 具体有待实验研究证实, 希望本研究为埃博拉病毒实验研究带来新的思路。

#### 【参考文献】

[1] Centers for Disease Control and Prevention. About Ebola virus

disease. 2014 [EB/OL], <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/about.html>.

- [2] Liang HW, Zhou Z, Zhang SY, *et al.* Identification of Ebola virus microRNAs and their putative pathological function [J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(10): 973-981.
- [3] Sheng MM, Zhong Y, Chen Y, *et al.* Hsa-miR-1246, hsa-miR-320a and hsa-miR-196b-5p inhibitors can reduce the cytotoxicity of Ebola virus glycoprotein *in vitro* [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2014, 57(10): 959-972.
- [4] Zheng Z, Ke X, Wang M, *et al.* Human microRNA hsa-miR-296-5p suppresses enterovirus 71 replication by targeting the viral genome [J]. *J Virol*, 2013, 87(10): 5645-5656.
- [5] Chen Y, Shen A, Rider PJ, *et al.* A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication [J]. *FASEB J*, 2011, 25(12): 4511-4521.
- [6] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, *et al.* Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA [J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1577-1581.
- [7] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [DB]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(1): D68-D73.
- [8] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, *et al.* Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes [J]. *RNA*, 2004, 10(10): 1507-1517.
- [9] Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, *et al.* The role of site accessibility in microRNA target recognition [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(10): 1278-1284.
- [10] Garcia DM, Baek D, Shin C, *et al.* Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(10): 1139-1146.
- [11] Reimand J, Arak T, Vilo J. g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39( Web Server issue): W307-W315.
- [12] Wang Q, Ji X, Gao Y, *et al.* Overexpression of microRNA gga-miR-1650 decreases the replication of avian leukosis virus subgroup J in infected cells [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt10): 2287-2296.
- [13] Cheng JC, Yeh YJ, Tseng CP, *et al.* Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(15): 2621-2633.
- [14] Serrano LA, Amir SM, Yurkova N, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in SLC22A23 are associated with ulcerative colitis in a Canadian white cohort [J]. *Am J Clin Nutr*, 2014, 100(1): 289-294.
- [15] Guo C, Zhu K, Sun W, *et al.* The effect of Pokemon on bladder cancer epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(4): 1226-1231.
- [16] Xu W, Cho H, Kadam S, *et al.* A methylation-mediator complex in hormone signaling [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(2): 144-156.
- [17] Köhler S, Doelken SC, Mungall CJ, *et al.* The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data [DB]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D1): D966-D974.
- [18] Luo J, Su F, Chen D, *et al.* Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 377-381.
- [19] Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, *et al.* hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase [J]. *Cell*, 2001, 107(2): 149-159.
- [20] Kobet E, Zeng X, Zhu Y, *et al.* MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(23): 12547-12552.
- [21] Shi H, Rojas R, Bonifacino JS, *et al.* The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(6): 540-548.
- [22] <http://ccb.bmi.ac.cn/ebola-human-miRNA/>.

(杨兆弘 编辑 2014-11-05 收稿)