

吴俊静, 乔 木, 武华玉, 等. 调控 *CD163* 基因表达的 miRNA 鉴定及其在 PRRSV 感染中的作用分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 16–19.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.004

# 调控 *CD163* 基因表达的 miRNA 鉴定及其在 PRRSV 感染中的作用分析

吴俊静, 乔 木, 武华玉, 彭先文, 梅书棋

(动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室/湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北武汉 430064)

**摘要:**猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染引起的一种危害大、控制难的猪传染性疾病。PRRSV 必须通过特异性受体诱导才能入侵宿主细胞, 而 *CD163* 就是其中一个关键受体。在获得靶向作用 *CD163* 基因 miRNA 的基础上, 进一步研究发现过表达 miR-181c、miR-4262 可极显著抑制细胞内 *CD163* mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ); 且在 Marc-145 细胞中证实 miR-181c、miR-23b、miR-4262 均具有极显著抑制 PRRSV 增殖的功能 ( $P < 0.01$ ), 其中 miR-4262 抑制效果最佳。3 个 miRNA 抗 PRRSV 增殖的分子机制比较复杂, miR-181c、miR-4262 可通过靶向抑制受体 *CD163* 发挥抗 PRRSV 增殖作用, 而 miR-23b 是通过其他途径发挥作用。并首次发现 miR-4262 具有抑制 PRRSV 增殖的作用, 但其具体的分子作用机制还有待进一步深入研究。

**关键词:**猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS); *CD163* 基因; miRNA; 抗病

**中图分类号:** S858.285.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0016-03

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染引起的一种危害极大的传染性免疫抑制性疾病, 以妊娠母猪的繁殖障碍 (流产、死胎、木乃伊胎) 及各种年龄猪特别是仔猪的呼吸道疾病为特征。1987 年猪繁殖与呼吸综合征首次在美国暴发, 几年之内 PRRS 便席卷了北美洲、欧洲、亚太地区, 至今仍在世界范围内流行。特别是近年来由高致病性 PRRSV 引起的突发疫情高热病在我国很多省份暴发和流行, 仔猪致死率高, 给我国养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。由于 PRRSV 具有变异快且复杂、免疫抑制、存在抗体依赖性增强作用等特征, 目前采用疫苗等手段未能取得满意的效果, 防治 PRRS 仍然是养猪业的重大难题之一。

PRRSV 有一个典型的生物学特征就是具有严格的宿主和细胞嗜性, 它只感染猪, 不感染其他物种, 且主要感染单核巨噬细胞系中分化完全的细胞, 尤其是猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophages, PAM)。在体外, PRRSV 可在 PAM 和猴肾细胞系及其衍生细胞系 (Marc-145、MA-104 等) 中增殖。宿主细胞膜上的一些特异性受体的存在与否决定了该细胞对 PRRSV 的易感性, 而 *CD163* 就是 PRRSV 感染

宿主细胞的最关键受体之一, 它参与介导病毒的内吞和增殖<sup>[2]</sup>。例如, 在 PRRSV 非易感细胞系 (BHK-21、PK-15、NLK) 中转染 *CD163* 真核表达质粒可以使这些细胞系感染 PRRSV 并在细胞内产生子代病毒粒子<sup>[3-4]</sup>。采用 *CD163* 的抗体处理 PAM 可以有效阻止 PRRSV 的感染<sup>[3]</sup>, 且永生化的 PAM 细胞系因无法正常表达 *CD163* 而变为 PRRSV 非易感细胞<sup>[5]</sup>。不仅如此, *CD163* 的表达量与 PRRSV 复制效率呈正相关, 上调 *CD163* 表达会增加病毒增殖, 而下调 *CD163* 表达可降低病毒增殖<sup>[6]</sup>。

MicroRNA (miRNA) 是一类长约 22 个碱基、高度保守的内源性非编码 RNA 分子, 能够互补或部分互补地与靶 mRNA 结合, 使 mRNA 降解或介导其翻译抑制, 作为重要的转录后调节因子调控基因的表达<sup>[7]</sup>, miRNA 几乎参与调控了各个领域的所有细胞生命活动的发生, 在哺乳动物中可能负责调控约 50% 的编码基因<sup>[8]</sup>。在病毒感染和宿主天然免疫中, miRNA 也发挥着重要作用, 参与病毒与宿主的互作, 一方面, 宿主 miRNA 可以作用于病毒基因组 RNA 抑制病毒增殖<sup>[5,9]</sup>, 另一方面, 病毒释放的 miRNA 可作用于宿主基因抑制天然免疫<sup>[10-11]</sup>。

在前期工作中, 笔者利用双荧光素酶报告系统筛选获得了 3 个可靶向作用 *CD163* 基因 3' 非翻译区的 miRNA, 分别为 miR-181、miR-23、miR-4262<sup>[12]</sup>, 本研究将进一步分析其对 *CD163* 基因表达调控效应及对 PRRSV 感染增殖的抑制效果, 为进一步获得抗 PRRSV 增殖的功能 miRNA 奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和病毒

Marc-145 细胞系, 来源于华中农业大学, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (购自 HyClone) 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。PRRSV-WUH3 毒株, 由华中农业大学分离保存,

收稿日期: 2016-03-18

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31501924); 湖北省自然科学基金 (编号: 2015CFA105); 湖北省技术创新重大项目 (编号: 2016ABA117); 湖北省科技支撑计划 (编号: 2014BBB010); 湖北省农业科技创新中心创新团队项目 (编号: 2016-620-000-001-022); 湖北省农业科学院竞争性计划项目 (编号: 2016jzxjh029)。

作者简介: 吴俊静 (1984—), 女, 湖北武汉人, 博士, 助理研究员, 主要从事猪遗传育种研究。Tel: (027) 87389516; E-mail: jeanne1106@126.com。

通信作者: 梅书棋, 硕士, 研究员, 主要从事猪遗传育种研究。E-mail: msqfle@163.com。

用于细胞感染试验。

## 1.2 miRNA 模拟物和抑制物

miRNA 模拟物由上海吉玛制药技术有限公司人工合成,其序列如表 1 所示。

表 1 miRNA 模拟物序列

miRNA 模拟物	序列(5'→3')
miR-181c 模拟物	AACAUUC AACUGUCGUGAGU
miR-23b 模拟物	AUCACAUUGCCAGGAUUAACC
miR-4262 模拟物	GACAUUCAGACUACCG
miR-NC 模拟物阴性对照	UUCUCGGAACGUGUCACGUTT

## 1.3 miRNA 模拟物转染和 PRRSV 感染

转染 24 h 前,消化 Marc-145 细胞,并通过细胞计数板对细胞悬浮液进行计数,以  $1 \times 10^5$  个/孔细胞进行均匀地铺板,细胞长满 80% 的计数板时开始转染。各 miRNA 模拟物按一定浓度(20、50、60、100 nmol/L)稀释后与脂质体 Lipofectamine 2000(购自 Invitrogen)共孵育制备混合液,将混合液加入细胞培养基中,然后在 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 条件下培养 24 h 后收集细胞或细胞上清液,进行病毒感染。同时设置各种对照,Mock 组为转染空白对照组,仅加入了转染试剂处理细胞,为转染 miRNA 模拟物;NC 组为 miR-NC 模拟物阴性对照组;NTC 组为病毒感染空白对照组,采用 PBS 处理细胞。

## 1.4 PRRSV 感染

接种病毒前,先将病毒原液置于冰上慢慢融化。Marc-145 转染 24 h 后,用 PRRSV-WUH3 感染细胞[感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.1],感染 24 h 后收集细胞或细胞上清液。

## 1.5 RNA 提取及 RT-PCR

细胞或细胞培养液总 RNA 采用 Trizol(购自 Invitrogen)提取。反转录采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(购自 Thermo Scientific),荧光定量 PCR 采用 SYBR® Select Master Mix for CFX(购自 Applied Biosystems)染料,相对定量 PCR 采用 GAPDH 基因做内参。病毒 RNA 的绝对定量,采用

含有 PRRSV 病毒基因组片段(138 bp)的 pMD-18T 载体(购自 TaKaRa)作为标准品制作标准曲线。每个试验至少重复 3 次。定量 PCR 所用引物的详细信息如表 2 所示。

表 2 定量 PCR 所用引物

引物	序列(5'→3')	退火温度(°C)	产物大小(bp)
CD163 上游引物	TCAGGAAACCAGTCCCAAAAC	55	103
CD163 下游引物	CACTCTCTATGCAGGCCACA		
PRRSV 上游引物	CGCCAGTGTACATCACCATC	55	138
PRRSV 下游引物	CATTGCCAAACACCACTTTG		
GAPDH 上游引物	GTCTGGAAAAACCTGCCAAG	55	100
GAPDH 下游引物	ACCTGGTGCTCACTGTAGCC		

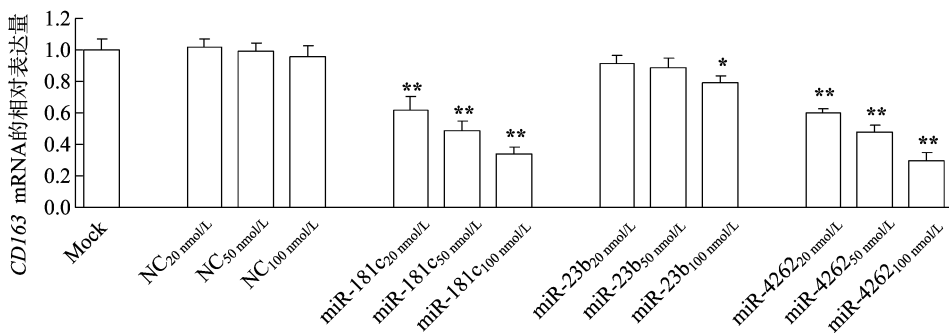
## 1.6 统计分析

数据用“平均值 ± 标准差”表示;采用 Student's *t* 检测统计数据, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  分别表示差异达到显著、极显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 调控 CD163 基因 mRNA 表达的 miRNA 验证

在前期研究中发现 miR-181、miR-23、miR-4262 均可靶向与 CD163 基因的 3' 非翻译区结合<sup>[12]</sup>,为了验证这 3 个 miRNA 是否能调控 CD163 基因 mRNA 表达,本研究通过转染 miR-181c、miR-23b、miR-4262 的模拟物在细胞内过表达各 miRNA,检测 CD163 基因 mRNA 表达量的变化情况,进一步验证候选 miRNA 对 CD163 的靶向调控作用。由图 1 可知,与转染空白对照组相比,转染不同浓度梯度(20、50、100 nmol/L)的 miR-181c、miR-4262 均可极显著抑制 CD163 基因 mRNA 表达量( $P < 0.01$ ),而只有转染高浓度剂量(100 nmol/L)的 miR-23b 才能显著抑制 CD163 基因的表达( $P < 0.05$ )。转染各浓度梯度的阴性对照 miR-NC 组的 CD163 基因 mRNA 表达水平与空白对照 Mock 组无显著差异( $P > 0.05$ )。可见 miR-181、miR-4262 均可靶向作用 CD163 基因抑制其 mRNA 表达,且 miR-4262 的抑制效果最佳。



“\*”、“\*\*”分别表示与 Mock 组(空白对照)相比在 0.05、0.01 水平上差异显著。图 2 同

图 1 过表达 miR-181c/23b/4262 对 CD163 基因 mRNA 表达量的影响

## 2.2 miRNA 抑制病毒增殖的效应检测

CD163 是 PRRSV 感染宿主细胞的关键受体,而 miR-181、miR-4262 又可在一定程度上抑制 CD163 基因表达,因此,进一步在 Marc-145 细胞中检测了 miRNA 抑制病毒增殖的效应。细胞转染 60 nmol/L 的各 miRNA 模拟物 24 h 后,再用 PRRSV 感染(MOI = 0.1),感染 24 h 后分别检测细胞内和细胞培养液中 PRRSV RNA 的含量。由图 2、图 3 可知,与转

染阴性对照 NC 组相比,转染 miR-181c、miR-23b、miR-4262 均能极显著地抑制细胞内和细胞培养液中的 PRRSV RNA 含量( $P < 0.01$ ),其中 miR-4262 的抑制效果最好,可使细胞内病毒含量下降 87%。

## 3 讨论与结论

研究表明,miRNA 在病毒与宿主的互动中扮演着重要的

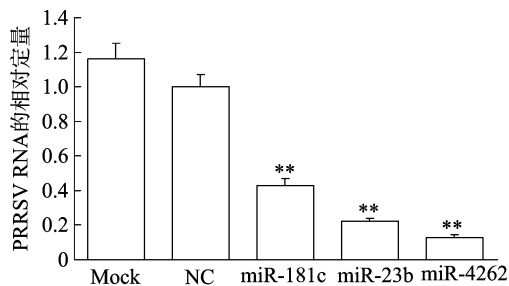
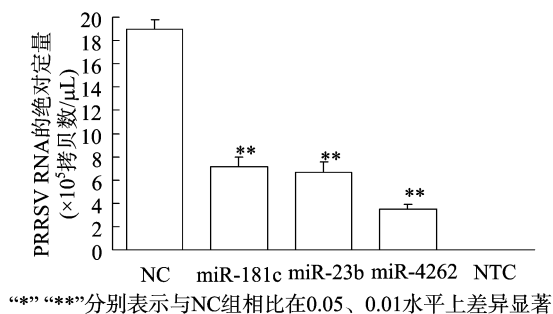


图2 转染miR-181c/23b/4262对细胞内 PRRSV RNA 含量的影响



“\*”“\*\*”分别表示与NC组相比在0.05、0.01水平上差异显著

图3 转染miR-181c/23b/4262对细胞培养液中 PRRSV RNA 含量的影响

角色,它们可以靶向作用病毒入侵的细胞关键因子<sup>[13-14]</sup>,或是直接作用于病毒基因组<sup>[15-16]</sup>。鉴于 PRRSV 入侵靶细胞必须依赖宿主细胞的特异性受体表达这一典型生物学特性,从 *CDI63* 这个关键受体入手,筛选鉴定获得调控 *CDI63* 基因表达的 miRNA,从而找到抑制 PRRSV 感染增殖的功能 miRNA。在前期的研究工作中,通过生物信息学预测和双荧光素酶报告系统发现 miR-181c、miR-23b、miR-4262 均可靶向作用 *CDI63* 基因<sup>[12]</sup>,本研究进一步证实 miR-181c、miR-23b、miR-4262 均可显著抑制 PRRSV 在细胞中复制增殖,但是这 3 个 miRNA 抗 PRRSV 增殖的分子机制可能不完全相同。

2013 年,Guo 等首次发现 miR-181 可以直接作用于 PRRSV 基因组 RNA,使病毒基因组降解发挥抗病毒效应<sup>[17]</sup>。同年,Gao 等研究发现 miR-181 可以靶向作用受体基因 *CDI63* 的 3'UTR,抑制受体基因 *CDI63* 的表达,从而阻止 PRRSV 增殖<sup>[18]</sup>,本研究结果与之相符。但是,值得关注的一个问题是本研究发现 miR-4262、miR-181c 对 *CDI63* 基因 mRNA 水平抑制效果相当(图 1),但是 miR-4262 对细胞内和细胞液中释放的病毒含量的抑制效果却显著高于 miR-181c( $P < 0.05$ ),这暗示着这 2 个 miRNA 抑制 PRRSV 的分子机制并不完全相同。通过生物信息学预测分析发现,miR-4262 除了可靶向作用 *CDI63* 基因外,还能靶向调控另外一个 PRRSV 的关键受体基因 *CDI69*。miR-4262 可能可以同时靶向作用 *CDI63*、*CDI69* 这 2 个 PRRSV 的关键受体基因,进而提高了阻断 PRRSV 增殖的能力;另外一个原因可能是 miR-4262 还参与调节天然免疫信号通路,促进 I 型干扰素的表达,从而提高抗病毒增殖效应。在细胞中转染 60 nmol/L 的 miR-4262,同时用 5  $\mu\text{g/mL}$  Poly(I:C)(聚肌苷酸胞苷酸,购自 InvivoGen 公司)处理,15 h 后用 MOI=0.1 剂量的 PRRSV 感染 24 h,发现与转染 miR-NC 对照组相比,

过表达 miR-4262 可显著上调 I 型干扰素 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  的表达,说明 miR-4262 可一定程度解除 PRRSV 对 I 型干扰素的抑制,然而具体分子机制还有待进一步深入研究。

转染低浓度剂量(20、50 nmol/L)的 miR-23b 并不显著抑制 *CDI63* 基因 mRNA 的表达,即使是转染 100 nmol/L 剂量的 miR-23b 也只能抑制 11% 的 *CDI63* 基因 mRNA 表达量(图 1),然而 miR-23b 却能大幅度抑制 PRRSV 在细胞内的复制与病毒的释放(图 2、图 3)。因此,miR-23b 的抗 PRRSV 增殖效应并不是通过抑制受体 *CDI63* 基因实现的。Zhang 等研究发现,PRRSV 基因组 RNA 中含有 miR-23b 的作用靶点,表明 miR-23b 可能与 PRRSV RNA 靶向结合抑制病毒增殖<sup>[19]</sup>。同时,Zhang 等还发现 PRRSV 感染后,miR-23 能通过激活 IRF3/IRF7 诱导产生 I 型干扰素,进一步抑制病毒感染<sup>[19]</sup>。

PRRSV 具有严格的细胞嗜性,入侵靶细胞依赖宿主细胞上特异性受体的表达,而 *CDI63* 就是 PRRSV 入侵的一个关键受体基因。在获得靶向作用 *CDI63* 基因的 miRNA 的基础上,进一步在细胞水平证实了 miR-181c、miR-23b、miR-4262 具有抑制 PRRSV 增殖的效应,其中 miR-4262 抑制效果最佳。3 个 miRNA 抑制 PRRSV 增殖的分子机制不尽相同。miR-181c 是同时通过靶向作用 PRRSV 基因组 RNA 和抑制 PRRSV 关键受体 *CDI63* 发挥抗病毒作用;miR-4262 是通过靶向抑制 PRRSV 关键受体 *CDI63* 和 *CDI69*,同时参与诱导产生 I 型干扰素抑制病毒增殖;miR-23b 则可能是直接通过激活 IRF3/IRF7 诱导产生 I 型干扰素抑制病毒感染。本研究首次发现 miR-4262 具有抑制 PRRSV 增殖的作用,其具体分子作用机制还有待更进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Neumann E J, Kliebenstein J B, Johnson C D, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2005, 227: 385-392.
- [2] Zhang Q, Yoo D. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 177(3/4): 229-241.
- [3] Calvert J G, Slade D E, Shields S L, et al. *CDI63* expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses[J]. Journal of Virology, 2007, 81(14): 7371-7379.
- [4] Welch S K, Calvert J G. A brief review of *CDI63* and its role in PRRSV infection[J]. Virus Research, 2010, 154(1/2): 98-103.
- [5] Lee Y J, Park C K, Nam E, et al. Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 163(2): 410-415.
- [6] Patton J B, Rowland R R, Yoo D, et al. Modulation of *CDI63* receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages[J]. Virus Research, 2009, 140(1/2): 161-171.
- [7] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655.
- [8] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. Nature Reviews

刘笑尘,高 爽,许 伟,等. 产反式-4-羟脯氨酸重组大肠杆菌的构建及优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):19-23.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.005

# 产反式-4-羟脯氨酸重组大肠杆菌的构建及优化

刘笑尘<sup>1</sup>,高 爽<sup>1</sup>,许 伟<sup>2</sup>,戴良英<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学植物保护学院,湖南长沙 410128; 2. 布莱尼斯生物科技有限公司,江苏无锡 214100)

**摘要:**反式-4-羟脯氨酸为手性亚氨基酸,是一种被广泛应用于医疗、美容、化工、畜牧领域的生产原料。通过以下工作构建了 1 株能够高效表达反式-4-脯氨酸羟化酶基因的重组大肠杆菌:(1)使用 JCAT 软件优化反式-4-脯氨酸羟化酶的编码区基因序列,改变 141 个碱基(替换了 138 个同义密码子),使其 CAI 指数由 0.396 5 优化至 0.927 7,C/G 由 73.626 3% 优化至 59.706 9%,优化 mRNA 延伸效率;(2)优化非编码区序列,选择色氨酸启动子并进行简化,使 RBS 区包含 SD 序列,在 RBS 区前添加 g10-L 翻译增强子,使用 RNAstructure 软件优化起始区序列的二级结构,增强 mRNA 的起始效率;(3)构建重组大肠杆菌 DH5 $\alpha$ /pUC-19-pH,优化宿主及质粒载体,最终得到的重组菌 DH5 $\alpha$ /pUC-19-pH 比酶活达到 0.010 8 U/mg。

**关键词:**反式-4-羟脯氨酸;重组大肠杆菌;起始效率;延伸效率;优化

**中图分类号:**S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)13-0019-05

羟基脯氨酸(Hyp)是一种手性亚氨基酸,被广泛应用于医疗保健、美容、化工、畜牧等领域<sup>[1]</sup>。最初人们通过水解哺乳动物的胶原蛋白<sup>[2]</sup>来获取反式-4-羟脯氨酸,但此法有许多弊端<sup>[3]</sup>。

收稿日期:2016-03-19

基金项目:湖南省现代柑橘产业技术体系专项(编号:2015137)。

作者简介:刘笑尘(1990—),男,湖南武冈人,硕士研究生,主要从事微生物发酵和植物与微生物分子互作研究。E-mail:373709368@qq.com。

通信作者:许 伟,博士,主要从事微生物发酵研究,E-mail:49385395@qq.com;戴良英,博士,教授,主要从事植物与微生物分子互作研究,E-mail:daily@hunau.net。

1999 年,研究人员筛选得到指孢囊菌 RH1,从该菌中提取到能高效表达的反式-4-脯氨酸羟化酶,并获得反式-4-脯氨酸羟化酶基因序列,之后该研究团队又将获得的基因序列和脯氨酸代谢过程中的关键酶基因成功导入大肠杆菌质粒中获得重组工程菌,在以葡萄糖为碳源的发酵体系中,发酵 4 d 后可得 25 g/L 的反式-4-羟脯氨酸,大大提高了反式-4-羟脯氨酸的发酵效率<sup>[4-6]</sup>。日本协和发酵生物技术公司也确立了反式-4-羟脯氨酸的高效微生物发酵生产法<sup>[7]</sup>。

但该技术在国内仍有待优化。本研究为构建 1 株能够高效表达反式-4-脯氨酸羟化酶基因的重组大肠杆菌,尝试优化反式-4-脯氨酸羟化酶的编码区基因序列,并通过添加 g10-L 翻译增强子、SD 序列、优化 mRNA 起始区二级结构、

Genetics,2010,11(9):597-610.

[9]Nathans R,Chu C Y,Serquina A K,et al. Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions[J]. Molecular Cell, 2009,34(6):696-709.

[10]Nachmani D,Lankry D,Wolf D G,et al. The human cytomegalovirus microRNA miR-UL112 acts synergistically with a cellular microRNA to escape immune elimination[J]. Nature Immunology, 2010,11(9):806-813.

[11]Kim S, Lee S, Shin J, et al. Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8<sup>+</sup> T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1[J]. Nature Immunology, 2011, 12(10): 984-991.

[12]吴俊静,彭先文,乔 木,等. 利用双荧光素酶报告系统鉴定靶向作用猪 CD163 基因的 miRNA[J]. 湖北农业科学,2015,54(19):4854-4858.

[13]Sung T L,Rice A P. miR-198 inhibits HIV-1 gene expression and replication in monocytes and its mechanism of action appears to involve repression of cyclin T1[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(1):e1000263.

[14]Chiang K,Sung T L,Rice A P. Regulation of cyclin T1 and HIV-1

replication by microRNAs in resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes[J]. Journal of Virology,2012,86(6):3244-3252.

[15]Lecellier C H,Dunoyer P,Arar K,et al. A cellular MicroRNA mediates antiviral defense in human cells[J]. Science,2005,308(5721):557-560.

[16]Song L P,Liu H,Gao S J,et al. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells[J]. Journal of Virology,2010,84(17):8849-8860.

[17]Guo X K,Zhang Q,Gao L,et al. Increasing expression of microRNA 181 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and has implications for controlling virus infection[J]. Journal of Virology,2013,87(2):1159-1171.

[18]Gao L,Guo X K,Wang L,et al. MicroRNA 181 suppresses porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection by targeting PRRSV receptor CD163[J]. Journal of Virology,2013,87(15):8808-8812.

[19]Zhang Q,Guo X K,Gao L,et al. MicroRNA-23 inhibits PRRSV replication by directly targeting PRRSV RNA and possibly by upregulating type I interferons[J]. Virology, 2014, 450/451: 182-195.