

蔡锦顺,关立增,娄鞍钢,等. 猪乳外胞体总 miRNAUnit 对猪繁殖与呼吸综合征病毒复制抑制的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):144-146. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.038

# 猪乳外胞体总 miRNAUnit 对猪繁殖与呼吸综合征病毒复制抑制的研究

蔡锦顺,关立增,娄鞍钢,胡楠

(延边大学农学院,吉林延吉 133002)

**摘要:**通过对猪乳汁 Exosome 中总 miRNA 进行分离提取,以验证其对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的抑制作用。首先提取猪乳汁中的 Exosome,并将提取的 Exosome 对感染 PRRSV 的 MARC-145 细胞进行初步处理,于 24、48 h 后进行病毒滴度测定,并在 MARC-145 细胞上接种 PRRSV 病毒 96 h 后对细胞形态进行观察;随后对猪乳 Exosome 中的总 miRNA 进行进一步提取,用提取的总 miRNA 处理感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞,于 24、48 h 后进行病毒滴度测定,同时也在 MARC-145 细胞上接种 PRRSV 病毒 96 h 后对细胞形态进行观察。结果表明,转染猪乳 Exosome 和转染猪乳 Exosome 总 miRNA 细胞中的 PRRSV 滴度都显著低于转染 PBS(阴性对照);同时相对于阴性对照组,转染猪乳 Exosome 和转染猪乳 Exosome 总 miRNA 的细胞形态排列较紧密,边缘较清晰整齐。说明猪乳 Exosome 中存在与抑制 PRRSV 复制有密切关系的 miRNA,本研究将为 PRRS 的预防和治疗提供新的理论依据和途径。

**关键词:**猪乳 Exosome;miRNA;PRRSV;病毒复制抑制

**中图分类号:**S858.285.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)05-0144-03

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS),又称猪蓝耳病,是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种高传染性的疾病,给养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[1-2]</sup>。研究发现,许多 miRNA 与抑制 PRRSV 复制也有密切的关系<sup>[3]</sup>。miRNA 是一类小分子非编码单链 RNA,大小为 18~25 bp,广泛存在于动物和植物中,并作为重要转录后调节因子调控基因的表达<sup>[4]</sup>。

最近,研究证明 miRNA 可以通过外胞体(Exosome)进入循环系统而发挥生物学作用<sup>[5]</sup>。Exosome 是一类由细胞通过内吞作用形成直径为 30~100 nm 的小囊泡,它通过融合细胞内的多泡体而释放到细胞外环境,在细胞间行使信号交流,是一种新型的细胞间信息交流方式<sup>[6]</sup>。同时,研究发现 miRNA 可包裹于母乳 Exosome 中,母畜可以通过乳 Exosome 将 miRNA 传递给仔畜,并发挥生物学作用<sup>[7]</sup>。

目前,关于猪乳 Exosome 中与抑制 PRRSV 复制有关的 miRNA 的研究还未见报道,因此本研究将以延边地区的长白猪为材料,分离猪乳 Exosome 并提取总 miRNA,在细胞水平上验证其对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的抑制作用。本研究将为 PRRS 的预防和治疗提供新的理论依据和途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 Marc-145 细胞和 PRRSV,由延边大学

动物传染病实验室保存。

1.1.2 主要试剂 无水乙醇、CHCl<sub>3</sub> 和异丙醇,购于北京佳兰生物科技公司;Trizol 试剂,购于 Omega 公司;Ribonuclease Inhibitor,购于大连 TAKARA 公司;DMEM 液体培养基、胰蛋白酶和青霉素、链霉素,购于 GIBCO 公司;胎牛血清,购于浙江杭州四季青生物工程材料有限公司;细胞培养耗材,购于北京佳兰生物科技公司;miRNA 提取试剂盒,购于北京佳兰生物科技公司。

1.1.3 主要仪器 高速大容量冷冻离心机、核酸蛋白测定仪、紫外/可见光分光光度计(Eppendorf 公司);细胞培养 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 公司),-80℃超低温冰箱(REVCO 公司);普通冰箱(SANYO 公司);倒置生物显微镜(Olympus 公司);分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);超高速离心机(美国贝克曼公司);超净工作台(江苏苏州净化公司);超纯水系统(广东广州誉维生物科技仪器有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 猪乳 Exosome 的分离 收集 200~300 mL 延边地方长白母猪(6 头)分娩后初乳和常乳的混合样,立即放入 -80℃冰箱储存。后将 -80℃冰箱的乳样解冻,3 000 r/min 4℃离心 40 min,取上清,去掉乳腺细胞碎片和乳脂蛋白等杂质;之后 12 000 r/min 4℃离心 40 min,取上清,进一步去掉乳脂蛋白、酪蛋白和一些细胞碎片;最后 150 000 r/min 4℃超高速离心 3 h,获得猪乳 Exosome。

1.2.2 猪乳 Exosome 中总 miRNA 的分离 根据 miRNA 提取试剂盒步骤(北京佳兰生物科技公司)进行 miRNA 提取,最后用核酸蛋白测定仪测定总 RNA 浓度,放入 -30℃备用。

1.2.3 细胞水平验证猪乳 Exosome 对 PRRSV 复制的影响

1.2.3.1 Marc-145 细胞的培养 从液氮罐中取出保存的 Marc-145 细胞,迅速放入预热好的 37℃水浴锅中,反复摇

收稿日期:2016-09-22

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(编号:0120150710)。

作者简介:蔡锦顺(1968—),女,吉林通化人,博士,副教授,从事动物传染病与免疫学研究。E-mail:caijinshun0815@sina.com。

动,使管中液体快速融化。后在离心机中 1 500 r/min 离心, 5 min 后在超净台中吸去上清液,加入 1 mL 含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,用玻璃吸管轻轻吹打形成细胞悬液。最后将细胞悬液转移至 25 mL 细胞培养瓶中,补加含有 10% FBS 的 DMEM 培养基至 7 mL,放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。待细胞铺满细胞瓶底后进行传代,在超净台中吸弃旧的培养基,加入 2 mL PBS 缓冲液洗涤细胞,弃去,然后向细胞瓶中加入 1 mL 细胞消化液,轻轻摇匀使消化液润到所有细胞,在 37 °C 培养箱作用 3 min 后显微镜下观察,在细胞变圆并有少量细胞脱落漂浮时,立即吸取消化液,加入 3 mL 含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,用玻璃吸管反复吹打,使细胞完全脱离瓶底,最后根据细胞的量将细胞转移到新的细胞培养瓶中,补充培养基至 5 mL,盖好瓶盖,放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。

**1.2.3.2 Exosome 对 MARC-145 的转染** 按“1.2.3.1”节传代方法将 MARC-145 细胞传代到 6 孔细胞培养板上,将铺好细胞小心置于 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中,当细胞生长至密度约 70% 时,开始进行转染;取 2 mL EP 管,加入 50 μL DMEM 和 10 μL Exosome (20 ng/100 μL),轻微混匀;之后将混合液体加入到 MARC-145 细胞中,置于 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养,另设阴性对照组,阴性对照组所用试剂为 PBS,转染过程与前述相同。

**1.2.3.3 PRRSV 的接毒试验和滴度测定** 按“1.2.3.2”节方法进行 Exosome 转染 24 h 后,加入 MOI 为 0.5 的 PRRSV 病毒液,放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 24、48 h,收集上清,进行病毒滴度测定。取出细胞瓶,−20 °C 反复冻融 3~4 次,转移细胞培养物至大离心管中,3 000 r/min 离心 5 min 收集上清液,将收集得到病毒悬液,以 10 倍稀释(10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>)后,将各稀释度的病毒液接种于 96 孔板中的 MARC-145 细胞,按 Reed-Muench 的方法进行病毒 TCID<sub>50</sub> 滴度测定。同时,在 96 h 后利用倒置显微镜进行细胞病变效应观察。

**1.2.4 细胞水平验证猪乳 Exosome 中总 miRNA 对 PRRSV 病毒复制的影响**

**1.2.4.1 Marc-145 细胞的培养** 细胞的培养方法见“1.2.3.1”节。

**1.2.4.2 总 miRNA 对 MARC-145 的转染** 取 2.0 mL EP 管,加入不含血清的 DMEM 和 500 ng 的总 miRNA,配制成为 miRNA 终浓度为 50 nmol/L 的混合液,之后按“1.2.3.2”节方法进行转染。之后将混合液体加入到 MARC-145 细胞中,置于 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养,另设阴性对照组,试剂采用 PBS。

**1.2.4.3 PRRSV 接毒试验和滴度测定** PRRSV 接毒试验和滴度测定方法同“1.2.3.3”节。

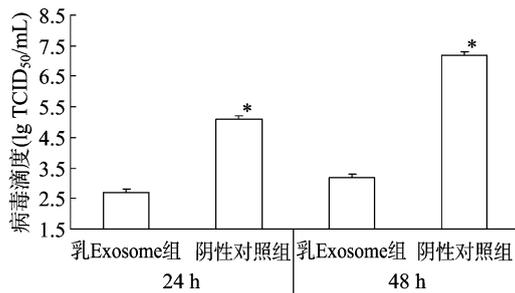
## 2 结果与分析

### 2.1 猪乳 Exosome 对 PRRSV 病毒复制抑制结果

本试验在 6 孔板上对 MARC-145 细胞进行培养,之后用 Exosome 和 PBS 进行转染,24 h 后感染 PRRSV,并在 PRRSV 感染后 24、48 h 时收集上清,测定其 TCID<sub>50</sub>。结果表明,转染猪乳 Exosome 细胞中的 PRRSV 滴度显著低于转染 PBS(阴性对照)细胞中的 PRRSV 滴度。结果初步说明猪乳

Exosome 对 PRRSV 的复制起到了抑制作用(图 1)。

同时,本试验在 MARC-145 细胞上接种 PRRSV 96 h 后,在显微镜下对 MARC-145 细胞的形态进行观察。由图 2、图 3 可知,猪乳 Exosome 组中 MARC-145 细胞的形态仍呈不规则的多边形,排列较紧密,边缘较清晰整齐。而阴性对照组(PBS 组)中 MARC-145 细胞形态消失,皱缩、塌陷,边缘不清晰,贴壁细胞出现灶状聚集,大量细胞脱落悬浮。进一步说明,猪乳 Exosome 抑制了 PRRSV 在 Marc-145 细胞上产生的病变反应。证明猪乳 Exosome 与抑制 PRRSV 复制有密切的关系。



“\*”表示处理间差异显著( $P < 0.05$ ); 图4同

图1 MARC-145 细胞上验证猪乳 Exosome 对 PRRSV 复制的影响

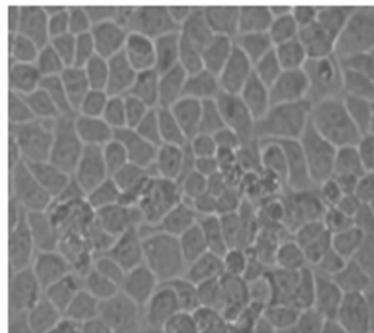


图2 猪乳 Exosome 组 MARC-145 细胞形态(200×)

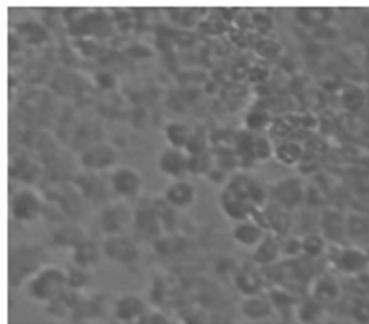


图3 阴性对照组 MARC-145 细胞形态(200×)

### 2.2 猪乳 Exosome 中总 miRNA 对 PRRSV 病毒复制抑制结果

本试验对猪乳 Exosome 总 miRNA 进行进一步提取,同样按上述方法在 6 孔板对 MARC-145 细胞进行培养,后用提取的总 miRNA 和 PBS 对细胞进行转染,24 h 后感染 PRRSV,分别在 24、48 h 时收集上清,测定其 TCID<sub>50</sub>。由图 4 可知,miRNA 处理组中的 PRRSV 滴度显著低于阴性对照组(PBS 处理组)的 PRRSV 滴度,说明猪乳 Exosome 中的 miRNA 对

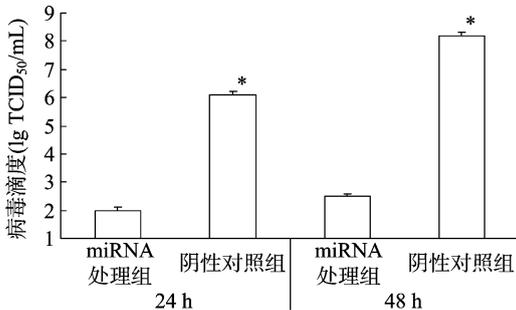


图4 MARC-145 细胞上验证猪乳 Exosome 总 miRNA 对 PRRSV 复制的影响

PRRSV 的复制起抑制作用。

同样本试验在 MARC-145 细胞上接种 PRRSV 病毒 96 h 后,在显微镜下对 MARC-145 细胞的形态进行观察。由图 5、图 6 可知,miRNA 处理组中 MARC-145 细胞的形态仍呈不规则的多边形,排列较紧密,边缘较清晰整齐;而阴性对照组(PBS 处理组)中 MARC-145 细胞形态开始变形或消失,细胞边缘不清晰,贴壁细胞出现灶状聚集,大量细胞脱落悬浮。此结果也进一步说明,猪乳 Exosome 中的某些 miRNA 抑制了 PRRSV 在 Marc-145 细胞上产生的病变反应。证明猪乳 Exosome 中存在与抑制 PRRSV 复制有密切的关系 miRNA。

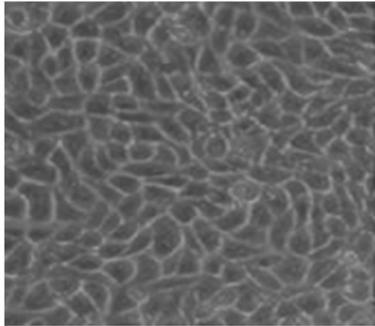


图5 总 miRNA 处理组 MARC-145 细胞形态(200×)

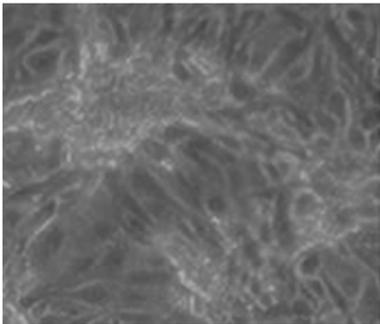


图6 阴性对照组 MARC-145 细胞形态(200×)

### 3 结论与讨论

miRNA 对病毒调节作用是人们广泛关注的热点之一,其实 miRNA 几乎参与调控了各个领域的所有细胞生命活动的发生<sup>[4]</sup>。成熟的 miRNA 一般是长度约为 22 bp 单链 RNA,成熟的 miRNA 与 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,然后与靶基因的 3'端非编码区(3'-UTR)互补,调节基因表达,发挥相应的调节功能<sup>[8]</sup>。miRNA 从发现开始就受到病毒学研究者的高度重视,被认为

是抗病毒感染的最有效方法之一。而研究表明,miRNA 可包裹于母乳的 Exosome 中,母猪可以通过乳 Exosome 将 miRNA 传递给仔猪并发挥生物学作用<sup>[7]</sup>。如 Zhou 等在猪乳外胞体中发现了大量免疫相关的 miRNA,这些 miRNA 约有 59 种,其中 miR-148a、30b、182 和 200b 的丰度排在前 10 位,并且初乳中的数量要高于常乳,而且可抵抗恶劣的环境<sup>[9]</sup>。因此,关于乳 Exosome 中 miRNA 功能的研究正成为国内外研究的一个新的热点。但关于猪乳 Exosome 中与抑制 PRRSV 复制有关的 miRNA 的研究还未见报道,因此本试验首次对猪乳外胞体总 miRNA 对猪繁殖与呼吸综合征病毒复制抑制作用进行了研究。

本试验首先对猪乳 Exosome 进行提取并在 MARC-145 细胞上初步验证 Exosome 是否对 PRRSV 的复制有抑制作用。通过病毒滴度测定和细胞病变观察,证实 Exosome 能显著抑制 PRRSV 的复制。为了验证 Exosome 对 PRRSV 复制的抑制是否通过其含有 miRNA 起作用,本试验对 Exosome 的 miRNA 进行了进一步提取,并通过病毒滴度测定和细胞病变观察证实,提取 miRNA 能显著抑制 PRRSV 的复制。综合上述,通过猪乳 Exosome 中 miRNA 可以抑制 PRRSV 复制。本试验结果将为下一步采用生物信息及分子生物学等方法对猪乳 Exosome 中的具体 miRNA 的挖掘并进行功能验证、在细胞水平和活体水平上分析具体抑制 PRRSV 复制的 miRNA 功能及确定猪乳 Exosome 中 miRNA 抑制 PRRSV 病毒复制的机理提供实验基础,将为 PRRS 的防治和药物开发提供一个新思路。

### 参考文献:

- [1] Meng X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus; implications for current vaccine efficacy and future vaccine development[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74(4): 309-329.
- [2] 张银田. 我国高致病性猪蓝耳病疫情及防控情况[J]. *畜牧市场*, 2007(7): 49.
- [3] 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.
- [4] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [5] van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, et al. Exosomes: a common pathway for a specialized function[J]. *Journal of Biochemistry*, 2006, 140(1): 13-21.
- [6] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Current Protocols in Cell Biology*/Editorial Board, 2006(3): unit3.22.
- [7] Sun Q, Chen X, Yu J X, et al. Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum[J]. *Protein & Cell*, 2013, 4(3): 197-210.
- [8] Kim S, Hwang D W, Lee D S. A study of microRNAs in silico and *in vivo*: bioimaging of microRNA biogenesis and regulation[J]. *FEBS Journal*, 2009, 276(8): 2165-2174.
- [9] Zhou Q, Li M, Wang X, et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2012, 8(1): 118-123.