

DOI:10.13350/j.cjpb.230603

• 论著 •

# 野鸟源 H9N2 亚型流感病毒感染小鼠的 ceRNA 调控机制研究<sup>\*</sup>

刘慧珍<sup>1</sup>, 姚秋成<sup>1</sup>, 高玉伟<sup>2</sup>, 葛叶<sup>1\*\*</sup>

(1. 广东海洋大学滨海农业学院, 广东湛江 524088; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所)

**【摘要】** 目的 禽流感是由禽流感病毒(AIV)引起的一种从轻微呼吸道症状到急性、败血性传染病综合征。非编码RNA在禽流感病毒复制中的联合作用尚不清楚,尤其是circRNA表达谱及其对AIV感染发病机理的影响尚有很多空白。本研究旨在明确野鸟源H9N2亚型流感病毒感染小鼠的ceRNA调控机制。**方法** 利用RNA高通量测序和生物信息学方法分析野鸟源H9N2亚型AIV感染小鼠后其肺脏组织circRNAs水平的变化,并以circRNA为ceRNA调节靶标构建circRNA-miRNA-mRNA调控网络。**结果** 通过系统分析AIV感染小鼠肺脏中的circRNA及miRNA和mRNA表达谱,共鉴定到5335个不同的circRNAs,并分别筛选到654,85和1387个差异表达的circRNA、miRNAs和mRNAs。基于基因本体(GO)及京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析表明,差异表达circRNAs的宿主基因主要参与先天免疫反应,细胞生长和死亡、信号转导、免疫系统、免疫疾病。此外,对circRNA-miRNA-mRNA调控网络的整体分析显示,在H9N2亚型AIV感染中存在许多circRNA-miRNA-mRNA相互作用,其中筛选出的144个过表达circRNA可能存在通过吸附miR-185-5p和miR-34c-5p使其表达下调,从而使下游的功能基因表达上调,诱导宿主细胞钙离子信号通路,进而促进H9N2病毒感染的潜在发病机制。**结论** 通过鉴定circRNA的表达谱和构建circRNA相关的调控网络,揭示了一个丰富的circRNAs和ceRNA网络参与H9N2病毒感染的调控,为H9N2病毒与宿主的相互作用及发病机制提供了新的见解。

**【关键词】** H9N2 亚型禽流感病毒; circRNA; miRNA; mRNA; ceRNA 调控网络**【中图分类号】** S852.65**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)06-0630-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jun;18(6):630-636.]

**Regulatory mechanism of ceRNA in mice infected with wild bird-originated H9N2 subtype influenza virus**  
 LIU Huizhen<sup>1</sup>, YAO Qiucheng<sup>1</sup>, GAO Yuwei<sup>2</sup>, GE Ye<sup>1</sup> (1. College of Coastal Agricultural Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences)<sup>\*\*\*</sup>

**【Abstract】** **Objective** Avian influenza is an infectious disease syndrome ranging from mild respiratory symptoms to acute, septicemia caused by avian influenza virus. The joint role of non-coding RNAs in avian influenza virus replication is unclear, especially the circRNA expression profile and its impact on the pathogenesis of AIV infection are still many gaps. The aim of this study was to clarify the mechanisms of ceRNA regulation in mice infected with wild bird-derived H9N2 subtype influenza viruses. **Methods** In this study, we utilized RNA high-throughput sequencing and bioinformatics methods to investigate the alteration of circular RNAs (circRNAs) in the lung tissues of mice infected with avian influenza virus (AIV) subtype H9N2 from wild birds. Furthermore, we constructed a circRNA-miRNA-mRNA regulatory network based on the ceRNA hypothesis, in which circRNAs function as competing endogenous RNAs to regulate the expression of their target mRNAs by sponging miRNAs. **Results** The expression profiles of circRNAs, miRNAs, and mRNAs were investigated in the lungs of mice infected with avian influenza virus (AIV) subtype H9N2 using high-throughput sequencing, resulting in a total of 5335 differentially expressed circRNAs, along with 654,85, and 1387 differentially expressed miRNAs, circRNAs, and mRNAs, respectively. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses revealed that the host genes of differentially expressed circRNAs were mainly involved in innate immune response, cell growth and death, signal transduction, immune system and immune diseases. Additionally, a global analysis of the circRNA-miRNA-mRNA regulatory network indicated that numerous interactions existed among them during H9N2 AIV infection, where 144 over-expressed circRNAs were found to potentially

<sup>\*</sup> 【基金项目】 广东海洋大学博士启动项目(No. R17090);广东省教育厅特色创新强校项目(No. 230420055, 230420057)。<sup>\*\*</sup> 【通讯作者】 葛叶, E-mail: geye\_perfect@126.com

【作者简介】 刘慧珍(1997-),女,福建宁德人,硕士研究生,主要从事病毒感染机制和分子诊断等方面的研究。E-mail: 1327311323@qq.com

downregulate miR-185-5p and miR-34c-5p, leading to the upregulation of downstream functional genes, induction of host cell calcium ion pathway, and consequently promoting the potential pathogenesis of H9N2 infection. **Conclusion** By identifying the expression profiles of circRNAs and constructing circRNA-related regulatory networks, an abundant network of circRNAs and ceRNAs was revealed to be involved in the regulation of H9N2 virus infection, thus providing new insights into the pathogenesis of H9N2 virus-host interactions.

**【Key words】** H9N2 subtype AIV; circRNA; miRNA; mRNA; ceRNA regulatory network

流感病毒属于正粘病毒科、单股负链 RNA 病毒，根据其核蛋白的抗原性不同分为 A、B、C 和 D 型<sup>[1]</sup>。A 型流感病毒( *Influenza A virus*, IAV) 变异频繁易发生跨物种传播，在人和动物中广泛流行，对全球公共卫生造成威胁。

禽流感(avian influenza, AI)由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的一种从轻微呼吸道症状到急性、败血性传染病综合征，几乎所有禽类均可感染<sup>[2]</sup>。流感病毒基因组包含了由 RNA 组成的 8 个独立基因片段，这 8 个基因片段又可编码 12~14 种蛋白质<sup>[3]</sup>。根据致病性差异，可将 AIV 分为高致病性禽流感病毒(Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, HPAIV)和低致病性禽流感病毒(Low Pathogenic Avian Influenza Virus, LPAIV)<sup>[4]</sup>。在 LPAIV 中，H9N2 亚型是最广泛流行和最具破坏性的。家禽对 H9N2 亚型 AIV 易感，该病毒于 1966 年首次从美国火鸡中分离出来<sup>[5]</sup>，之后通过野鸟传播到欧亚大陆、中东和非洲等地区<sup>[6]</sup>。20 世纪 90 年代，在我国广东省首次爆发了 H9N2 流感病毒引起的禽流感，导致肉鸡死亡，产蛋率下降<sup>[7]</sup>。另外，H9N2 亚型 AIV 是其他 AIV 内部基因的主供体，并能与共循环的 AIV 重组而导致病毒的跨种传播，如 H5N2 AIV 和人的 H3N8、H7N9、H10N8 AIV，以及亚欧类禽 H1N1 猪流感病毒<sup>[8-10]</sup>。H9N2 亚型 AIV 也可直接感染人，截至 2022 年 6 月共有 112 例人感染 H9N2 亚型 AIV 的报道<sup>[11]</sup>。由此可见，H9N2 亚型 AIV 对动物以及人类的健康构成一定威胁，但关于该病毒介导异常宿主反应的机制仍不十分清楚。

环状 RNA(circRNAs)是一种具有环状结构并且广泛分布在真核生物的非编码 RNA(ncRNA)。与传统的线性 RNA 不同，circRNAs 无 5' 帽子结构和 3' poly(A)结构，这种从头到尾连接形成的环状结构增强了 circRNAs 的稳定性和对大多数外切核糖核酸酶的抗性<sup>[12]</sup>，在 1970 年首次发现 circRNAs 之后的一段时间一直被认为是病毒基因组或信使 RNA 前体选择性剪接的副产物，并未受到太多关注<sup>[13]</sup>。由于高通量测序技术和微阵列技术的发展，人们对 circRNAs 的丰度、组成、表达谱和分子功能进行了全面分析，并在真核细胞中检测到广泛的 circRNAs，意味着

circRNAs 是代表 lncRNA 家族不可或缺的一部分<sup>[14-15]</sup>。

研究发现，circRNAs 参与多种生物过程，并作为 miRNA 海绵、转录模板、特殊的蛋白质结合位点和宿主基因的调节剂发挥广泛作用<sup>[16]</sup>。已有多种 circRNAs 被证明参与流感病毒的发病过程。例如，circRNAs 和上调的 circRNA\_0082633 在 PR8 感染 A549 细胞中的表达谱通过促进 I 型 IFN 信号通路抑制 IAV 感染<sup>[17]</sup>。Yu 等<sup>[18]</sup>的研究发现 H1N1 诱导 circ-GATAD2A 表达，并且 circ-GATAD2A 的异位表达通过降低自噬促进 H1N1 的复制。Qu 等<sup>[19]</sup>报道 circRNAs AIVR 可充当 miR-330-3p 海绵，释放 CREBBP mRNA，加速 IFN-β 的产生，拮抗 IAV 复制。另有研究报道，在通过用 LPAIV、HPAIV 以及人类 IAV 感染 A549 细胞中，确定了许多特异性上调的 circRNAs 在 AIV 感染中起重要作用，并预测上调的 circRNAs 可能通过影响“范可尼贫血通路”“内吞作用”通路和“细胞周期过程”调节亲本基因或充当 miRNA 的海绵<sup>[20]</sup>。circRNAs 在 AIV 感染中起重要作用，然而关于全面分析 circRNAs、miRNAs 和 mRNAs 在 H9N2 亚型 AIV 感染中表达的报道仍然较少。

本研究用野鸟源 H9N2 亚型 AIV 感染 6 周龄 BALB/c 小鼠，在感染 3 d 后采集小鼠肺脏，提取总 RNA 进行测序，分析其变化，鉴定、表征 circRNAs 的表达谱，对不同表达的 circRNAs 来源基因进行功能富集分析，并构建 circRNA-miRNA-mRNA 网络，为 H9N2 亚型 AIV 与宿主间的相互作用和感染的致病机制提供新的见解。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 毒株** A/Anser fabalis/China/HuBS428/2014 (H9N2) 为本实验室保存。

**1.2 主要试剂和仪器** TRIzol 试剂购自美国 Ambion 公司；氯仿购自衡阳市凯信化工试剂有限公司；异丙醇购自广州化学试剂厂；RNase-free Water 购自北京全式金生物技术股份有限公司；BeyoRT™ First Strand cDNA Synthesis Kit(RNase H minus) 和

RNase R 购自上海碧云天生物技术有限公司;多样品组织研磨仪 Tissuelyser-24 购自上海净信实业发展有限公司。

## 2 方法

**2.1 病毒感染** H9N2 野鸟源禽流感病毒经过滤除菌处理后以  $10^6$  EID<sub>50</sub> 的剂量接种感染 4~6 周龄 BALB/c 小鼠,于感染后第 3 d 处死小鼠,无菌条件下取小鼠的肺脏用于 RNA 提取。

### 2.2 RNA 提取、文库构建及测序

**2.2.1 RNA 提取** 取适量小鼠肺组织,加入 1.5 mL TRIzol 裂解液,用组织研磨机研磨 30 s,取出静置 5 min,使组织细胞充分裂解。将研磨/破碎后的组织样品于 4 ℃、12 000 g 离心 5 min。将上清转入加有 300 μL 氯仿的 EP 管中,震荡混匀,同上离心 8 min,若中间层较厚,水相较浑浊,可用与上清等体积的氯仿再抽提一次。吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管,加入 2/3 上清体积的异丙醇,轻轻颠倒混匀,置于 -20 ℃ 冰箱静置 2 h 以上,4 ℃、17 500 g 离心 25 min,弃上清。用 0.9 mL 75% 乙醇洗涤沉淀,颠倒混匀后 4 ℃、17 500 g 离心 3 min,弃上清,再经短暂离心后吸去残留液体,晾干(3~5 min)。用 20~200 μL RNase-free 水溶解沉淀,即为 RNA。

**2.2.2 文库构建及测序** 使用 RNase H 试剂盒去除 RNA 样品中的 rRNA,并用 RNase R 消化线性 RNA,将 RNA 片段化。将片段化的 RNA 合成一链 cDNA 再配制含 dUTP 的二链合成反应体系合成第二链 cDNA。配制反应体系并设置反应程序,修复双链 cDNA 末端,并在 3' 末端加上 A 碱基;配制接头连接反应体系,并设置反应程序,使接头与 cDNA 连接。配制 PCR 反应体系,并设置反应程序,对产物进行扩增。将 PCR 产物变性为单链后,配制环化反应体系,并设置反应程序,得到单链环形产物,消化掉未被环化的线性 DNA 分子。单链环状 DNA 分子通过滚环复制,形成一个包含多个拷贝的 DNA 纳米球(DNB)。将得到的 DNBs 采用高密度 DNA 纳米芯片技术加到芯片上的网状小孔内,通过联合探针锚定聚合技术(cPAS)进行测序。

**2.3 circRNA 的鉴定** 使用 SOAPnuke 过滤去除 rRNA,低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads。再利用 HISAT 和 Bowtie2 将得到的高质量数据分别与参考基因组和参考基因序列比对。在 circBase 数据库中比对获得的 circRNAs,并使用 circAnno 对 circRNAs 注释。

**2.4 差异基因的表达分析** 使用 Bowtie2 将 clean reads 比对到参考序列,再使用 RSEM 计算基因和转录本的表达量。为了使样本间的表达量能够相互比

较,对基因的表达量进行标准化处理。RSEM 使用的标准方法是 FPKM。FPKM 计算公式:  $FPKM = 10^6 C / (NC / 10^3)$ 。FPKM 法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响,计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因差异表达。使用 DEGseq 筛选差异表达的 circRNAs、mRNAs 和 miRNAs,其筛选标准为  $Q \leq 0.001$  和  $|\log_2 FC| \geq 1$ 。

**2.5 差异 circRNA 的 GO 和 KEGG 富集性分析** 将产生 20 种 circRNAs 候选物或显著差异表达的 circRNA 来源基因的所有基因置于基因本体论(GO)数据库或京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库中,使用超几何检验进行功能富集分析。根据 KEGG pathway 注释分类,使用 R 软件中的 phyper 函数进行富集分析,计算  $P$  值,然后对  $P$  值进行 FDR 校正得到  $Q$  值,通常  $Q \leq 0.05$  的功能视为显著富集,GO 项或 KEGG 途径被识别为显著富集的途径。

**2.6 circRNA-miRNA-mRNA ceRNA 调控网络的构建** 使用 RNAhybrid, miRanda 和 TargetScan 软件预测差异表达的 circRNAs 和 mRNAs 与差异表达 miRNAs 的靶关系。利用 Pearson 相关系数( $R$ )计算差异表达 miRNAs 与其靶基因的表达相关性。选择  $P < 0.05$  以及  $|R| > 0.8$  的对作为候选 circRNA-miRNA 或 miRNA-mRNA 对。利用 Cytoscape v3.9.1 软件构建 circRNA-miRNA-mRNA 网络

## 结 果

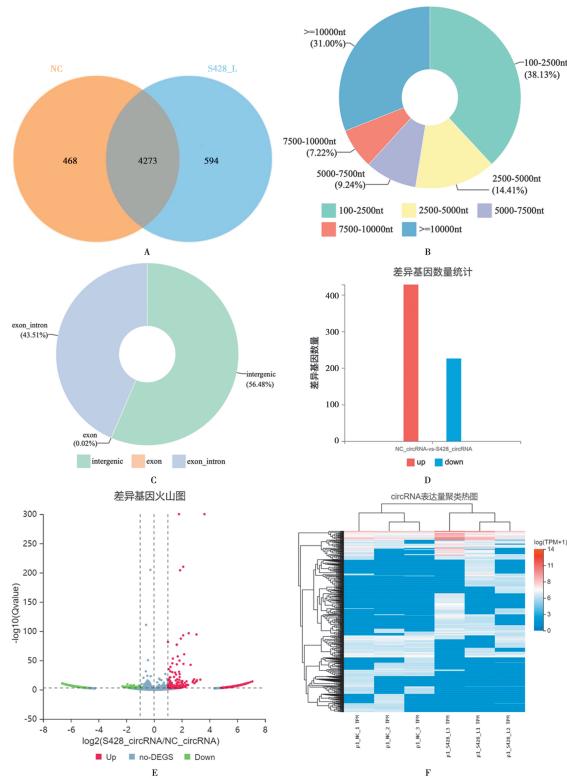
### 1 circRNAs 表达的鉴定

为了确定 H9N2 亚型 AIV 感染小鼠后肺脏内 circRNAs 水平的变化,对 3 个对照组和 3 个实验组进行高通量测序。过滤掉低质量读数后共鉴定 5 335 个不同的 circRNAs,其中对照组中有 4 741 个 circRNAs,感染组有 4 867 个 circRNAs,感染组和对照组共表达 4 273 个 circRNAs(图 1A)。与 circbase 中的数据进行比对,有 3 013 个为新鉴定的 circRNAs,其余 2 322 个已有报道。基因注释显示,这些不同的 circRNAs 共来自 3 个基因组区域:在全部 circRNAs 中,有 43% 是外显子和内含子共存的 circRNA,只有 0.02% 来自内含子(图 1B)。circRNAs 的长度从 200 到 10 000 个核苷酸不等,其中绝大多数小于 2500 nt(图 1C)。差异表达的 circRNA 也有类似分布。在 654 个差异表达的 circRNA 中上调 428 个,下调 226 个(图 1D)。火山图和热图也展示了这些显著差异表达的 circRNAs(图 1E,1F)。

### 2 差异 circRNAs 宿主基因功能富集分析

利用 GO 分析探索差异表达的 circRNAs 宿主基

因的潜在功能作用。结果表明,与这些差异表达的 circRNAs 宿主基因相关的前 20 个生物学过程包括主要参与蛋白质结合、神经系统发育和 RNA 聚合酶 II 转录的负调控等生物学过程(图 2A)。同时,与这些 circRNAs 宿主基因相关的前 20 个分子功能和细胞成分如图 2B 所示。此外,KEGG 分析还揭示了 322 条信号通路,其中包括 MAPK 信号通路、癌症中的信号通路、RAS 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路等,表明这些基因与细胞生长和死亡、信号转导、免疫系统、免疫疾病等有关。



A 对照组(NC 组)和感染组(S428\_L 组)中的 circRNAs 差异数量 B circRNAs 长度分布 C circRNAs 种类分布 D NC 组和 S428\_L 组上调和下调表达 circRNAs 数目 E NC 组和 S428\_L 组差异表达 circRNAs 火山图 F NC 组和 S428\_L 组差异表达 circRNAs 热图分析

图 1 测序分析小鼠肺脏中 circRNAs 的表达

A Differential number of circRNAs in the NC and S428\_L groups  
B Length distribution of circRNAs C Distribution of circRNAs species D Number of up- and down-regulated expression circRNAs in the NC and S428\_L groups E Volcano plot analysis of differentially expressed circRNAs in the NC group and S428\_L group F Heat map analysis of differentially expressed circRNAs in the NC and S428\_L groups

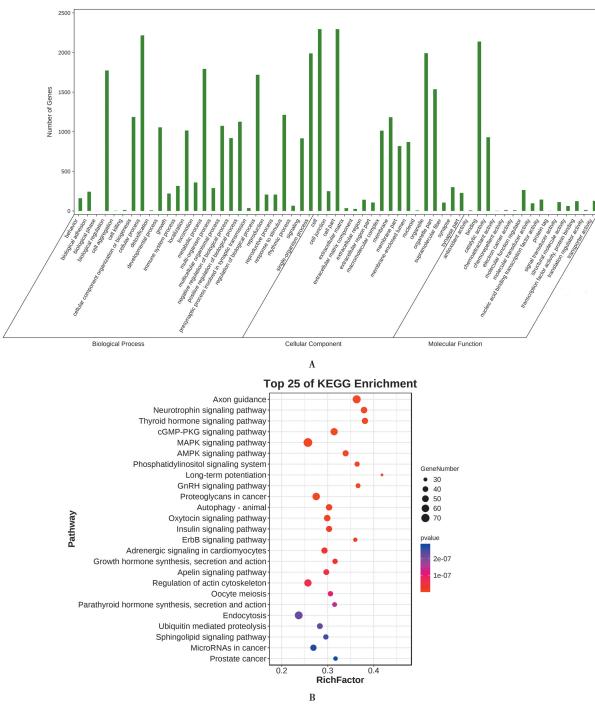
Fig. 1 RNA sequencing analysis of circRNAs expression in mouse lungs

### 3 差异表达 miRNAs 和 mRNAs 的筛选

利用 DEGseq 软件筛选感染组和对照组中差异表达的 mRNAs 和 miRNAs。基于 RNA-Seq 和 miRNA-Seq 数据,共鉴定出 85 个差异表达 miRNAs(图 3A)和 1 387 个差异表达 mRNAs(图 3B)。

### 4 ceRNA 网络的构建

研究表明 circRNA 可充当 miRNA 的海绵来抑制其活性,进而调控下游的 mRNA。为了研究 circRNA 的参与情况,对差异表达的 miRNA 和其靶向的 circRNA 及 mRNA 之间的相互作用进行综合分析,以阐明这些核酸之间的功能联系。根据皮尔逊相关系数  $R < -0.8, P < 0.05$  筛选到差异 miRNA 与 circRNA 共 434 个关系对,与 mRNA 共 17 个关系对;此外,根据皮尔逊相关系数  $R > 0.8, P < 0.05$  筛选到差异 miRNA 与 mRNA 之间 441 个关系对(图 4A、4B)。将靶基因预测结果和表达相关性结果取交集,选择共有差异表达的 mRNA 和 circRNA 作为候选 ceRNA 构建与 H9N2 亚型 AIV 相关的 ceRNA 网络,其中包含了 144 个 ceRNA 关系对,144 个 circRNA、2 个 miRNA 和 17 个 mRNA(图 4C)。



A circRNAs 宿主基因 CC、MF、BP 前 20 条 GO 分析图 MF 分子功能 CC 细胞成分 BP 生物过程 B circRNAs 宿主基因前 20 条 KEGG 富集分析图

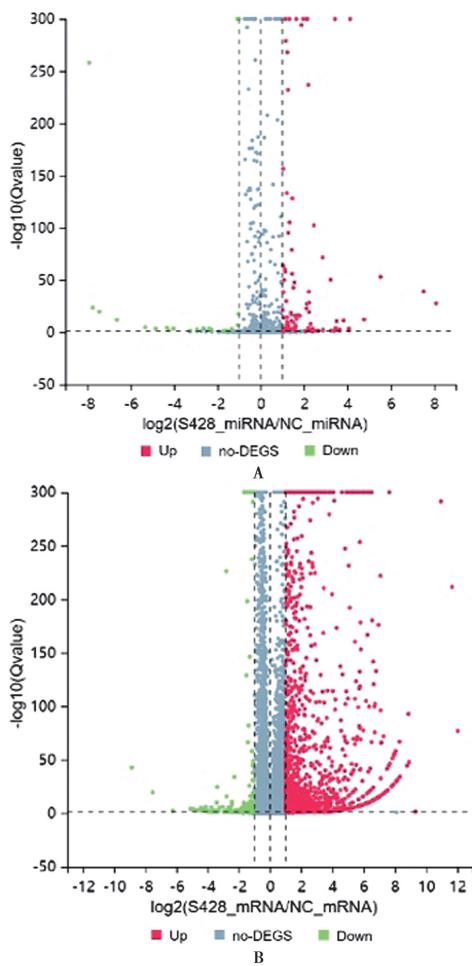
图 2 差异表达 circRNAs 宿主基因的 GO 分析以及 KEGG 富集分析

AGO analysis of the first 20 circRNAs host genes CC, MF and BP MF Molecular function CC Cellular component BP Biological process B Graphs of the first 20 KEGG enrichment analyses of circRNAs host genes

Fig. 2 GO analysis of differential circRNAs host genes and KEGG enrichment analysis

为了进一步探究 circRNA 相关的 ceRNA 调控网络的功能,对 ceRNA 网络中的 mRNAs 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 分析表明,参与 ceRNA 网络的基因与免疫系统过程以及通讯、代谢、转运、信号转导、外界刺激应答可能是 circRNA 调控抗流感病毒反应的主要机制(图 4D)。KEGG 信号通路富集分析显示,基因显著富集到钙信号通路、丙氨酸-天冬氨酸-

谷氨酸代谢、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢途径等信号通路(图 4E)。



A NC 组和 S428\_L 组差异表达 miRNAs 火山图 B NC 组和 S428\_L 组差异表达 mRNA 火山图

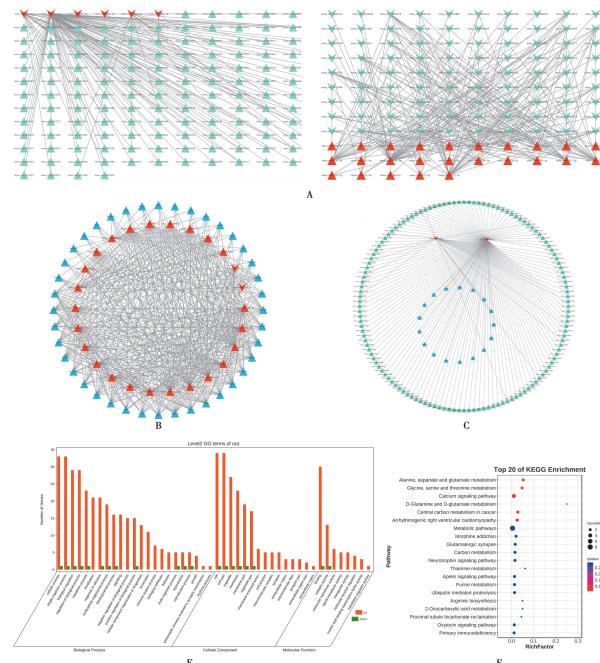
图 3 差异表达 miRNAs 和 mRNAs 火山图分析

A Volcano map analysis of differentially expressed miRNAs in the NC and S428\_L groups B Volcano map analysis of differentially expressed mRNAs in the NC and S428\_L groups

Fig. 3 Overview of differentially expressed miRNAs and mRNAs

## 讨 论

近年来随着高通量 RNA 测序和生物信息学工具的发展,越来越多的研究发现 circRNAs 具有多种功能,包括作为蛋白质支架、miRNA 海绵以及被翻译成多肽<sup>[20-22]</sup>。circRNAs 独特的结构为其提供了比线性 RNAs 更长的半衰期和更强的 RNase R 抗性,使其成为诊断生物标志物和治疗靶点的潜在候选物。大量研究揭示了 circRNAs 在多种疾病中的独特表达特征和重要生物学作用,如癌症<sup>[23-25]</sup>、心血管疾病<sup>[26]</sup>、神经疾病<sup>[27]</sup>和自身免疫性疾病<sup>[28]</sup>。但关于 circRNAs 在病毒感染中的表达谱、功能和机制等的研究尚少。一些研究已经涉及病毒感染期间 circRNA 的鉴定、表征和功能<sup>[29-31]</sup>,但在 AIV 感染期间 circRNA 的特性和潜在作用仍不明确。



A 差异 circRNA-miRNA 相关网络图 B 差异 miRNA-mRNA 相关网络图 C 与 H9N2 亚型 AIV 相关的 circRNA-miRNA-mRNA 相关网络图 DceRNA 中差异 mRNAs 的 CC、MF、BP 前 20 条 GO 分析图 MF 分子功能 CC 细胞成分 BP 生物过程 EceRNA 中差异 mRNAs 前 20 条 KEGG 富集分析图。网络图中红色代表 miRNA, 绿色代表 circRNA, 蓝色代表 mRNA, 三角形代表上调基因, V 形代表下调基因。

图 4 差异 miRNAs 靶基因的 GO 分析、KEGG 富集分析及 circRNA-miRNA-mRNA 网络图

A Differential circRNA-miRNA correlation network diagram B Differential miRNA-mRNA correlation network diagram C Network diagram of circRNA-miRNA-mRNA correlation associated with H9N2 subtype AIVD Top 20 GO analysis maps of CC, MF, BP of differential mRNAs in ceRNAMF Molecular function CC Cellular component BP Biological process E Top 20 KEGG enrichment analysis plots of differential mRNAs in ceRNA. Red in the network diagram represents miRNA, green represents circRNA, blue represents mRNA, triangle represents up-regulated genes and V-shape represents down-regulated genes.

Fig. 4 GO analysis, KEGG enrichment analysis and circRNA-miRNA-mRNA network diagram of the target genes of differential miRNAs

本研究系统分析了 AIV 感染小鼠肺脏中的 circRNA 及 miRNA 和 mRNA 表达谱,结果显示 AIV 感染对 circRNA 表达谱有显著影响。共鉴定到 5 335 个不同的 circRNAs,其中与对照组的小鼠肺脏相比鉴定出 654 个差异 circRNA,包括上调 428 个,下调 226 个。为了预测 circRNAs 功能,对 circRNA 宿主基因进行了功能富集分析,结果显示宿主基因显著富集在 MAPK、PI3K-AKT 等与天然免疫相关的信号通路上,表明鉴定到的 circRNAs 与 H9N2 亚型 AIV 存在高度潜在相关性。同时还鉴定了 85 个差异表达 miRNAs 和 1387 个差异表达 mRNAs,即 1 282 个上调的 mRNA、105 个下调的 mRNA、70 个上调的 miRNA 和 15 个下调的 miRNA。在 AIV 感染后大多

数差异表达的 circRNA、miRNA 和 mRNA 都出现了上调的情况。

越来越多的研究表明 circRNAs 可作为 ceRNAs 通过竞争性结合 miRNAs 间接调节 mRNAs 表达发挥生物学功能。circ\_0050463 作为内源性 miR-33b-5p 海绵螯合和抑制 miR-33b-5p 活性, 导致真核翻译延伸因子 EEF1A1 表达增加, 进而促进 IAV 复制<sup>[32]</sup>。还研究了一种新的内含 circRNA, AIVR, 可作为一个 miRNA 海绵起作用, AIVR 吸收的 miRNAs 与 CREBBP 的 mRNA 结合, 加速  $\beta$  干扰素(IFN-B) 的产生而发挥其抗病毒作用<sup>[33]</sup>。为探究 circRNA 相关的 ceRNA 调控网络在 H9N2 中的功能, 本研究通过靶向预测和表达相关分析, 成功构建了 H9N2 亚型 AIV 相关的 ceRNA 网络, 包含了 144 个 ceRNA 关系对, 144 个 circRNA、2 个 miRNA 和 17 个 mRNA 调控网络。其中 miR-185-5p 已被鉴定为人类某些癌症的抑癌基因, 包括肝癌、前列腺癌、黑色素瘤以及肺癌等。另有研究发现, miR-185-5P 参与细胞凋亡和坏死并可通过调节 FADD/Caspase-8 途径促进肺泡 II 型细胞坏死, 表明 miR-185-5p 可能是一个强有力生物标志物<sup>[34-38]</sup>。同样的, miR-34c-5p 与上皮细胞增殖和分化的调节也密切相关<sup>[39]</sup>。因此, miR-185-5p 和 miR-34c-5p 可能在 H9N2 中发挥潜在的调控作用。根据 ceRNA 网络图可知, 在 H9N2 感染过程中 miR-185-5p 和 miR-34c-5p 表达下调, mmu\_circ\_0001777、mmu\_circ\_0005915、mmu\_circ\_0001485 等 circRNA 可能通过吸附 miR-185-5p 和 miR-34c-5p 从而上调下游的靶基因。miR-185-5p 和 miR-34c-5p 所靶向差异 mRNA 的富集分析结果表明其显著富集在钙离子信号通路。流感病毒的致病机制依赖于病毒与宿主细胞蛋白之间的相互作用以及信号转导通路的激活<sup>[40-41]</sup>。宿主细胞蛋白和信号通路可能通过劫持病毒生命周期所需的宿主分子机制来促进病毒复制, 或者触发宿主先天免疫防御来抑制病毒<sup>[41]</sup>。而钙离子作为细胞内的第二信使参与细胞生长增殖、能量代谢、信息传递、细胞死亡和免疫应答等多种生理生化过程。病毒劫持宿主细胞后充分利用钙离子信号通路, 改变钙离子的稳态, 建立持续感染, 并且病毒感染引起的病理性钙离子信号积累可触发细胞抗病毒反应和细胞死亡。因此, 钙离子信号通路已成为治疗病毒感染的一个重要而有效的靶点<sup>[42]</sup>。钙离子内流可能在流感进入和感染的调节中起重要作用。已有研究表明感染甲型流感病毒会诱导宿主细胞内的钙离子发生内流, 并通过钙离子螯合抑制感染<sup>[43]</sup>。在感染早期, 流感病毒糖蛋白血凝素(HA)与宿主细胞表面电压依赖性钙离子通道结合, 诱导细胞内钙离子内流, 介导 IAV 的进入, 进而

诱发宿主细胞钙离子信号通路, 起到促进流感病毒感染的作用<sup>[44]</sup>。

上述生物信息学数据结果表明, 在构建的与 H9N2 亚型 AIV 相关的 ceRNA 网络中筛选出的 144 个过表达的 circRNA 可能存在通过吸附 miR-185-5p 和 miR-34c-5p 使其表达下调从而使下游的功能基因表达上调, 诱导宿主细胞钙离子信号通路, 进而促进 H9N2 病毒感染的潜在发病机制。虽然本研究筛选到多个调控 H9N2 病毒后潜在发病机制的 circRNA-miRNA-mRNA 关系对, 但是上述 ceRNA 关系对在 H9N2 病毒感染中的具体功能仍待进一步实验验证。本研究通过鉴定 circRNA 的表达谱和构建 circRNA 相关的调控网络, 揭示了一个丰富的 circRNAs 和 ceRNA 网络参与 H9N2 感染的调控, 为阐明 H9N2 的发病机制提供了新的思路。

#### 【参考文献】

- [1] Ferguson L, Eckard L, Epperson WB, et al. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle[J]. Virology, 2015(486):28-34.
- [2] 宿春虎, 王慧, 程小果. H9N2 亚型禽流感的流行现状与防控措施[J]. 家禽科学, 2017, 38(12):29-31.
- [3] Te Velthuis AJ, Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis[J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(8):479-493.
- [4] Lycett SJ, Ward MJ, Lewis FI, et al. Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data[J]. J Virol, 2009, 83(19):9901-9910.
- [5] Homme PJ, Easterday BC. Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus[J]. Avian Dis, 1970, 14(1):66-74.
- [6] Alexander DJ. Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997-2002 [J]. Avian Dis, 2003, 47 (3 Suppl):792-797.
- [7] Sun Y, Liu J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern [J]. Protein Cell, 2015, 6(1):18-25.
- [8] Gu M, Chen H, Li Q, et al. Enzootic genotype S of H9N2 avian influenza viruses donates internal genes to emerging zoonotic influenza viruses in China[J]. Vet Microbiol, 2014, 174 (3-4): 309-315.
- [9] Li P, Niu M, Li Y, et al. Human infection with H3N8 avian influenza virus: A novel H9N2-original reassortment virus[J]. J Infect, 2022, 85(6):e187-e189.
- [10] Sun W, Cheng SSM, Lam KNT, et al. Natural reassortment of Eurasian Avian-Like Swine H1N1 and Avian H9N2 influenza viruses in pigs, China[J]. Em Infect Dis, 2022, 28 (7): 1509-1512.
- [11] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza. Avian influenza overview December 2021 - March 2022[J]. EFSA J, 2022, 20(4):e07289.

- [12] Zhou Z, Sun B, Huang S, et al. Roles of circular RNAs in immune regulation and autoimmune diseases[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7):503.
- [13] Lyu D, Huang S. The emerging role and clinical implication of human exonic circular RNA[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(8):1000-1006.
- [14] Bossi L, Figueroa-Bossi N. Competing endogenous RNAs: a target-centric view of small RNA regulation in bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(12):775-784.
- [15] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6):2846-2858.
- [16] Gu J, Su C, Huang F, et al. Past, present and future: the relationship between circular RNA and immunity[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:894707.
- [17] Guo Y, Yu X, Su N, et al. Identification and characterization of circular RNAs in the A549 cells following influenza A virus infection[J]. *Vet Microbiol*, 2022, 267:109390.
- [18] Yu T, Ding Y, Zhang Y, et al. Circular RNA GATAD2A promotes H1N1 replication through inhibiting autophagy[J]. *Vet Microbiol*, 2019, 231:238-245.
- [19] Qu Z, Meng F, Shi J, et al. A novel intronic circular RNA antagonizes influenza virus by absorbing a microRNA that degrades CREBBP and accelerating IFN- $\beta$  production[J]. *mBio*, 2021, 12(4):e0101721.
- [20] Zhang Y, Zhang H, An M, et al. Crosstalk in competing endogenous RNA networks reveals new circular RNAs involved in the pathogenesis of early HIV infection[J]. *J Trans Med*, 2018, 16(1):332.
- [21] Shi J, Hu N, Mo L, et al. Deep RNA sequencing reveals a repertoire of human fibroblast circular RNAs associated with cellular responses to herpes simplex virus 1 infection[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(5):2031-2045.
- [22] Wang S, Cui S, Zhao W, et al. Screening and bioinformatics analysis of circular RNA expression profiles in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomarkers*, 2018, 22(4):631-640.
- [23] Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer[J]. *Cell*, 2019, 176(4):869-881.
- [24] Li J, Sun D, Pu W, et al. Circular RNAs in cancer: Biogenesis, function, and clinical significance[J]. *Trend Cancer*, 2020, 6(4):319-336.
- [25] Ju HQ, Zhao Q, Wang F, et al. A circRNA signature predicts postoperative recurrence in stage II/III colon cancer[J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(10):e10168.
- [26] Aufiero S, Reckman YJ, Pinto YM, et al. Circular RNAs open a new chapter in cardiovascular biology[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(8):503-514.
- [27] Mehta SL, Dempsey RJ, Vemuganti R. Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases[J]. *Progress Neurobiol*, 2020, 186:101746.
- [28] Zhou Z, Sun B, Huang S, et al. Roles of circular RNAs in immune regulation and autoimmune diseases[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7):503.
- [29] Chen LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8):475-490.
- [30] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. *Nat Rev Gene*, 2019, 20(11):675-691.
- [31] Xiao MS, Ai Y, Wilusz JE. Biogenesis and functions of circular RNAs come into focus[J]. *Trend Cell Biol*, 2020, 30(3):226-240.
- [32] Shi N, Zhang S, Guo Y, et al. CircRNA\_0050463 promotes influenza A virus replication by sponging miR-33b-5p to regulate EEF1A1[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 254:108995.
- [33] Qu Z, Meng F, Shi J, et al. A novel intronic circular RNA antagonizes influenza virus by absorbing a microRNA that degrades CREBBP and accelerating IFN- $\beta$  production[J]. *mBio*, 2021, 12(4):e0101721.
- [34] Niu Y, Tang G. miR-185-5p targets ROCK2 and inhibits cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Let*, 2019, 17(6):5087-5093.
- [35] Tian C, Deng Y, Jin Y, et al. Long non-coding RNA RNCR3 promotes prostate cancer progression through targeting miR-185-5p[J]. *Am J Trans Res*, 2018, 10(5):1562-1570.
- [36] Chen X, Gao J, Yu Y, et al. Retraction notice to "Long non-coding RNA UCA1 targets miR-185-5p and regulates cell mobility by affecting epithelial-mesenchymal transition in melanoma via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway" [Gene 676 (2018) 298-305][J]. *Gene*, 2021, 795:145778.
- [37] Li O, Kang J, Zhang JJ, et al. Circle RNA FOXP1 promotes cell proliferation in lung cancer by regulating miR-185-5p/Wnt1 signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacological Sci*, 2020, 24(12):6767-6778.
- [38] Carnino JM, Lee H, He X, et al. Extracellular vesicle-cargo miR-185-5p reflects type II alveolar cell death after oxidative stress [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 6:82.
- [39] Taka S, Tzani-Tzanopoulou P, Wanstall H, et al. MicroRNAs in asthma and respiratory infections: Identifying common pathways [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2020, 12(1):4-23.
- [40] Dai X, Zhang L, Hong T. Host cellular signaling induced by influenza virus[J]. *Life Sci*, 2011, 54(1):68-74.
- [41] Zhao M, Wang L, Li S. Influenza A virus-host protein interactions control viral pathogenesis[J]. *Intern J Mol Sci*, 2017, 18(8):1673.
- [42] Wang R, Zhu Y, Lin X, et al. Influenza M2 protein regulates MAVS-mediated signaling pathway through interacting with MAVS and increasing ROS production[J]. *Autophagy*, 2019, 15(7):1163-1181.
- [43] Fujioka Y, Tsuda M, Nanbo A, et al. A Ca<sup>2+</sup>-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection[J]. *Nat Communication*, 2013, 4:2763.
- [44] Fujioka Y, Nishide S, Ose T, et al. A Sialylated voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel binds hemagglutinin and mediates influenza A virus entry into mammalian cells[J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(6):809-818.