

• 论著 •

miR-4454通过靶向LRPAP1激活 I 型干扰素信号通路抑制寨卡病毒复制*

韦芊芊 陈利民 李玉佳 李世林

中国医学科学院北京协和医学院输血研究所, 四川成都 610052

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2025.03.009

*本课题受四川省自然科学基金(面上)项目(No.2025ZNSFSC0678)资助

作者简介: 韦芊芊, 主要从事输血传播病原体的致病机制研究, (E-mail) 916157386@qq.com。

通信作者: 李世林, 主要从事输血传播病原体的致病机制研究, (E-mail) shilin-li@hotmail.com。

共同通信作者: 李玉佳, 主要从事输血传播病原体研究, (E-mail) lily83630@163.com。

【摘要】 目的 本研究探讨miR-4454对寨卡病毒(ZIKV)复制的调节作用及其潜在分子机制。**方法** 将miR-4454的模拟物(mimic)或inhibitor转染至细胞后, 用ZIKV感染, qRT-PCR或western blot分别检测ZIKV NS5 mRNA及NS1蛋白的表达。使用生物信息学软件对miR-4454可能的靶基因进行预测, 并验证miR-4454下游靶基因LRPAP1-低密度脂蛋白受体相关蛋白1(low-density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1, LRPAP1)。将LRPAP1质粒或si-LRPAP1转染至细胞后, 再用ZIKV感染, qRT-PCR检测ZIKV NS5 mRNA、干扰素刺激基因的表达, Western blot检测ZIKV NS1蛋白、IFNAR1和STAT1磷酸化水平, 探究LRPAP1表达改变对ZIKV复制和 I 型干扰素信号通路的影响。**结果** 在细胞中高表达miR-4454抑制ZIKV NS5 mRNA的复制或NS1蛋白的表达。预测得到miR-4454潜在靶基因LRPAP1, 其与病毒感染和 I 型干扰素信号通路有关, 双荧光素酶报告基因实验证实LRPAP1是miR-4454直接作用的靶基因之一。过表达LRPAP1促进ZIKV复制和抑制 I 型干扰素信号通路, 而敲低LRPAP1抑制ZIKV复制以及激活 I 型干扰素信号通路。**结论** miR-4454通过固有免疫通路调控ZIKV感染, 揭示了其作为潜在靶点的可能性, 为相关治疗策略的开发提供了新思路。

参考文献

- [1] DZIERZAK E, PHILIPSEN S. Erythropoiesis: development and differentiation[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013, 3(4):a011601.
- [2] LIANG R, MENON V, QIU J J, et al. Mitochondrial localization and moderated activity are key to murine erythroid enucleation[J]. Blood Adv, 2021, 5(10):2490-2504.
- [3] LIANG N X, JIAO Z C, ZHANG C, et al. Mature red blood cells contain long DNA fragments and could acquire DNA from lung cancer tissue[J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(7):e2206361.
- [4] DOSS J F, CORCORAN D L, JIMA D D, et al. A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes[J]. BMC Genomics, 2015, 16:952.
- [5] SUN L P, YU Y, NIU B F, et al. Red blood cells as potential repositories of microRNAs in the circulatory system[J]. Front Genet, 2020, 11:442.
- [6] REGEV-RUDZKI N, WILSON D W, CARVALHO T G, et al. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles[J]. Cell, 2013, 153(5):1120-1133.
- [7] MANTEL P Y, HJELMQVIST D, WALCH M, et al. Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria[J]. Nat Commun, 2016, 7:12727.
- [8] WANG Z S, XI J M, HAO X, et al. Red blood cells release microparticles containing human argonaute 2 and miRNAs to target genes of *Plasmodium falciparum*[J]. Emerg Microbes Infect, 2017, 6(8):e75.
- [9] AZZOUZI I, MOEST H, WOLLSCHIED B, et al. Deep sequencing and proteomic analysis of the microRNA-induced silencing complex in human red blood cells[J]. Exp Hematol, 2015, 43(5):382-392.
- [10] WU C W, CAO X M, BERGER C K, et al. Novel approach to fecal occult blood testing by assay of erythrocyte-specific microRNA markers[J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(8):1985-1994.
- [11] CHEN S Y, WANG Y L, TELEN M J, et al. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases[J]. PLoS One, 2008, 3(6):e2360.

(收稿日期: 2024-12-16)

(本文编辑: 马超)

【关键词】 寨卡病毒 非编码RNA miR-4454 I型干扰素信号通路

【中图分类号】 R373.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-2587(2025)03-0329-11

MiR-4454 Inhibits Zika Virus Replication by Targeting LRPAP1 and Activating the Type I Interferon Signaling Pathway

WEI Qianqian, CHEN Limin, LI Yujia, LI Shilin. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Chengdu 610052

【Abstract】 Objective This study aims to investigate the specific regulatory effect of miR-4454 on ZIKV replication and reveal its potential molecular mechanisms, providing new ideas and targets for the treatment of ZIKV infection. **Methods** Cells were transfected with miR-4454 mimics or inhibitors and subsequently infected with ZIKV. The expression of ZIKV NS5 mRNA and NS1 protein was measured using qRT-PCR and Western blot analyses. Bioinformatics tools were employed to predict potential target genes of miR-4454, focusing on the validation of LRPAP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1) as a downstream target. Following the transfection of LRPAP1 plasmid or si-LRPAP1 into cells, ZIKV infection was performed, and qRT-PCR was used to detect ZIKV NS5 mRNA and interferon-stimulated gene expression, while Western blotting assessed the levels of ZIKV NS1 protein, IFNAR1, and phosphorylated STAT1, to explore the effect of LRPAP1 expression changes on ZIKV replication and the Type I interferon signaling pathway. **Results** Overexpression of miR-4454 in cells inhibited the replication of ZIKV NS5 mRNA and expression of NS1 protein. Bioinformatics prediction identified LRPAP1 as a potential target of miR-4454, which is related to viral infection and the Type I interferon signaling pathway. Dual-luciferase reporter assays confirmed that LRPAP1 is a direct target of miR-4454. Overexpression of LRPAP1 promoted ZIKV replication and suppressed the Type I interferon signaling pathway, while knockdown of LRPAP1 inhibited ZIKV replication and activated this signaling pathway. **Conclusion** miR-4454 modulates ZIKV infection through the intrinsic immune pathway, suggesting its potential as a therapeutic target and providing new insights for the development of related treatment strategies.

【Key words】 Zika virus Non-coding RNA MiR-4454 Type I interferon signaling pathway

寨卡病毒 (zika virus, ZIKV) 首次于1947年在乌干达的猴子身上发现^[1]。2007年在雅浦岛首次爆发, 感染约5 000人^[2], 2013年在法属波利尼西亚再次大规模暴发^[3-5]。2016年, WHO将其列为国际关注的公共卫生紧急事件^[6]。尽管疫情已控制, 寨卡病毒仍是公共卫生威胁^[7]。ZIKV为黄病毒科黄病毒属单正链RNA病毒, 其基因组编码三种结构蛋白 (衣壳蛋白, 前膜蛋白和包膜蛋白) 及七种非结构蛋白 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5)^[8]。有报道称寨卡病毒感染可能导致少数人出现神经系统和自身免疫系统并发症, 孕妇感染寨卡病毒可能导致新生儿小头畸形^[9]。目前ZIKV的药物开发主要集中在E蛋白、NS2B-NS3蛋白和NS5蛋白上, 但是还没有针对ZIKV的药物被批准上市^[10]。

成熟的microRNA (miRNA) 是由内源基因编码长度约为21或23个核苷酸 (nt) 的短RNA单链分子, 通过靶向特定mRNA的3'UTR调节基因表达。miRNA在很多生物过程中起着至关重要的作用, 包括细胞分化, 细胞凋亡, 免疫功能及通过介导基因表达调节抗病毒宿主防御^[11-13]。在不同的病毒感染中, miRNA数量和种类的变化都可能通过调控抗感染机制从而影响病毒复制^[14]。因此, 深入解析miRNA在病毒感染中

的作用有助于抗病毒药物的研发^[15]。根据已有研究, ZIKV感染可显著上调miR-4454的表达^[16], 然而其在ZIKV感染中的具体功能及相关分子机制仍需深入探索。

LDL受体相关蛋白关联蛋白1 (low-density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1, LRPAP1) 与脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 具有高亲和力, 促进其在内质网和高尔基体中的转运, 使LRP能够顺利到达细胞膜表面^[17-18]。I型干扰素信号通路是固有免疫的重要组成部分, 在病毒感染时起着重要作用。干扰素与受体 (如IFNAR1/IFNAR2) 结合后, 活化JAK/STAT信号通路, 磷酸化转录因子STAT1和STAT2, 最终促使多种干扰素刺激基因 (IFN stimulated genes, ISGs) 表达, 从而发挥抗病毒或免疫调节的作用。有报道称病毒蛋白酶可促进LRPAP1分泌到细胞外, 促使IFNAR1的降解, 以促进病毒逃避细胞先天性免疫^[19]。但LRPAP1与ZIKV感染的关系还缺乏相关研究。

本研究中, 我们证明了miR-4454在调控抗病毒固有免疫反应中的重要作用。我们发现ZIKV感染上调miR-4454, 而高表达的miR-445能够通过抑制LRPAP1的表达, 激活I型干扰素信号通路, 进而抑

制ZIKV病毒的复制。这一发现为深入了解ZIKV的发病机制及病毒与宿主之间的相互作用提供了新的分子机制。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞与病毒株

所用细胞包括A549（人非小细胞肺癌细胞），U5A（干扰素受体缺失的人成纤维细胞），2fTGH（人成纤维细胞），HEK293T（人胚胎肾细胞）和U251（人胶质瘤细胞）。此外，ZIKV病毒为GZ01毒株，属于亚洲型分支，由中国北京微生物流行病学研究所的秦成峰教授惠赠。

1.2 仪器和试剂

逆转录试剂盒（批号：FSQ201，日本Toyobo公司）；Rfect V2 siRNA转染试剂盒（批号：11042，百代生物科技有限公司）；离心机（型号：Centrifuge 5424R，德国Eppendorf公司）；SYBR Green荧光定量试剂盒（批号：E096-01B，上海近岸蛋白公司）；细胞培养瓶（批号：F605102，上海生工生物工程股份有限公司）；显影液（批号：WBKLS0500，美国Millipore公司）；GAPDH特异性一抗（批号：60004-1-Ig，武汉三鹰生物技术有限公司）；化学发光成像仪（型号：ChemiDoc，美国Bio-Rad公司）；DMEM高糖培养基（批号：KGL1211-500，凯基生物技术有限公司）；胎牛血清（批号：04-002-1A，Biological Industries公司）；ZIKV NS1特异性一抗（批号：GTX133307，GeneTex公司）；12孔细胞培养板（批号：F603202，上海生工生物工程股份有限公司）；BCA蛋白浓度测定试剂盒（批号：KGL-2101，凯基生物技术有限公司）；RNA提取试剂盒（批号：R91107，北京全式金生物技术有限公司）；支原体预防试剂（批号：DI201-02，北京全式金生物技术有限公司）；RIPA（radioimmune precipitation assay）强蛋白裂解液（批号：P0013B，中国碧云天生物技术有限公司）；5% CO₂细胞培养箱（型号：DRP-9082，美国赛默飞世尔科技公司）；蛋白电泳仪（型号：PowerPac™，美国Bio-Rad公司）；鼠二抗（批号：SA00001-1，武汉三鹰生物技术有限公司）；兔二抗（批号：SA00001-2，武汉三鹰生物技术有限公司）；琼脂糖（批号：A620014，上海生工生物工程股份有限公司）；PMSF蛋白酶抑制剂（批号：329986，中国索莱宝科技有限公司）；磷酸酶

抑制剂（批号：520903，北京全式金生物技术有限公司）；荧光定量PCR仪（批号：CFX96，美国Bio-Rad公司）；miR-4454 mimic和Negative mimic，miR-4454 inhibitor和Negative inhibitor均购于湖州河马生物科技有限公司；si-LRPAP1和nc购于上海生工生物工程股份有限公司；LRPAP1特异性一抗（批号：24662-1AP，武汉三鹰生物技术有限公司）；IFNAR1特异性一抗（批号：83002-4-RR，武汉三鹰生物技术有限公司）；PSTAT1特异性一抗（批号：9167s，Cell Signaling Technology公司）；STAT1特异性一抗（批号：82016-1-RR，武汉三鹰生物技术有限公司）；萤火虫、海肾双荧光素酶检测报告基因试剂盒（批号：S41022，北京全式金生物技术有限公司）；CCK8（批号：BS350A，biosharp公司）；PBS（批号：KGL220-500，凯基生物技术有限公司）；强化RNA提取试剂盒（批号：R91107，北京全式金生物技术有限公司）；PEI（批号：24765-1，Polysciences公司）；Lipofectamine 3000（批号：L3000-015，美国Invitrogen公司）；pPGK-LRPAP1-3UTR-hRluc（批号：G49929）、pPGK-Fluc-LRPAP1（human）-3UTR-mut-hRluc（批号：G49930）和pmirGLO均购于武汉森灵生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养与病毒感染

用含有10%胎牛血清和1%支原体预防试剂的DMEM高糖培养基37℃ 5% CO₂的培养箱进行细胞培养。细胞在37℃用ZIKV感染4 h后吸出培养基。用磷酸盐缓冲盐水（PBS）洗涤细胞后更换新鲜培养基。具体感染量根据实验不同有所变化，具体描述见后文。

2.2 细胞转染

以12孔细胞培养板为例。待细胞密度达到40%~60%时即可开始转染。按照Rfect V2 siRNA转染试剂盒说明书进行操作，miR-4454 mimic和阴性对照Negative mimic使其终浓度为40 nmol/L，miR-4454 inhibitor和阴性对照Negative inhibitor使其终浓度为40 nmol/L，si-LRPAP1和阴性对照si-nc使其终浓度为20 nmol/L。质粒待细胞密度达到80%~90%时开始转染，按照PEI转染说明书进行操作，使得质粒LRPAP1转染的终浓度为1 μg/mL，按照lipo 3000转染说明书进行操作，使得pPGK-Fluc-LRPAP1（human）-3UTR-wt-hRluc、pPGK-Fluc-LRPAP1（human）-3UTR-mut-hRluc和pmirGLO转染的终浓度为100 ng/mL，miR-4454 mimic和阴性对照

Negative mimic使其终浓度为40 nmol/L。

2.3 RNA分离、逆转录和基因定量

使用核酸提取试剂盒从细胞中提取总RNA，逆转录试剂盒用于合成cDNA，并用无核酸酶水稀释。

使用SYBR Green荧光定量试剂盒进行qPCR，荧光信号的采集仪器为CFX96。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算每个基因的mRNA水平，以GAPDH或U6为内参。本研究使用的引物序列如表1所示。

表1 qRT-PCR引物序列

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
U6	CGCTTCGGCAGCACATATAC	TTCACGAATTTGCGTGTTCAT
GAPDH	GCCTCCTGCACCACCAACTG	ACGCCTGCTTCACCACCTTC
miR-4454 RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACTGGTGC	
miR-4454	TTAGGATCCGAGTCACGG	GCAGGGTCCGAGGTATTC
ZIKV-NS5	GCAGAGCAACGGATGGGATA	ATGGTGGGAGCAAAACGGAA
ISG15	ATGGGCTGGGACCTGACG	GCCAATCTTCTGGGTGATCTG
OASL	TCCACCTGCTTCACAGAACTACA	TGGGCTGTGTTGAAATGTGTTT
MxA	GTGCATTGCAGAAGGTCAGA	CTGGTGATAGGCCATCAGGT
LRPAP1	CGGAGGGTCAGGTCGTTTC	CAACTTCTCCATGCGGAAGTC
DENV	CATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCA	CAGATCTCTGATGAATAACCAACG

2.4 Western blot

使用含有PMSF和磷酸酶抑制剂的强裂解缓冲液（RIPA）提取细胞总蛋白后，15 ℃ 12 000×g离心15 min，吸弃沉淀物保留上清并使用BCA蛋白检测试剂盒定量蛋白质浓度。将30 μg样品99 ℃煮沸5 min，随后上样于SDS-PAGE凝胶并转移至PVDF膜。在室温下用5%牛血清白蛋白（BSA）封闭2 h，过夜孵育特异性一抗，包括抗GADPH、抗ZIKV NS1、抗LRPAP1，抗IFNAR1，抗PSTAT1，抗STAT1抗体，随后用辣根过氧化物酶（HRP）二抗孵育1 h。使用ChemiDoc成像系统检测蛋白质条带，并通过ImageJ软件分析条带的深浅程度，以GAPDH作为对照进行标准化。重复相似流程提取不同蛋白，确保实验结果的可靠性和一致性。

2.5 细胞活力检测

将A549细胞接种在96孔板中，转染miR-4454 mimic、miR-4454 inhibitor、LRPAP1质粒、si-LRPAP1及阴性对照。24 h后使用细胞计数试剂盒，具体方法是在每个孔中加入10 μL CCK8溶液，37 ℃孵育30 min。随后，使用EnSpire多功能酶标仪在450 nm波长下测定样品吸光度。通过以下公式计算细胞活力：

细胞活力=（OD实验-OD空白）/（OD对照-OD空白）×100%细胞活力

2.6 ZIKV吸附和内吞检测

对于吸附测定，将细胞在4 ℃下感染1 h，用PBS洗涤以去除未与细胞表面结合的游离病毒，并裂解用于核酸提取。对于内吞测定，将细胞在37 ℃下孵育1 h，并裂解用于核酸提取。

2.7 miR-4454靶基因的生物信息学分析

预测miR-4454靶标通过三种不同的数据库进行预测，包括miRwalk、TargetScan和miRTarbase，Venn图由Venny2.1.0绘制。

2.8 荧光素酶报告基因检测

通过Targetscan预测LRPAP1 3'UTR与miR-4454种子序列的结合位点，将包含结合位点的野生型或突变型LRPAP1 3'UTR构建于双荧光素酶报告基因载体pmirGLO中。使用Lipofectamine 3 000转染试剂将该报告质粒与miR-4454 mimic或阴性对照共同转染至293T细胞中。转染48 h后，按照制造商说明，使用双荧光素酶报告基因测定法裂解细胞并测量萤火虫和海肾荧光素酶的活性，通过EnSpire多功能酶标仪获取结果。通过计算萤火虫/海肾荧光素酶活性比来评估miR-4454与LRPAP1之间的结合。

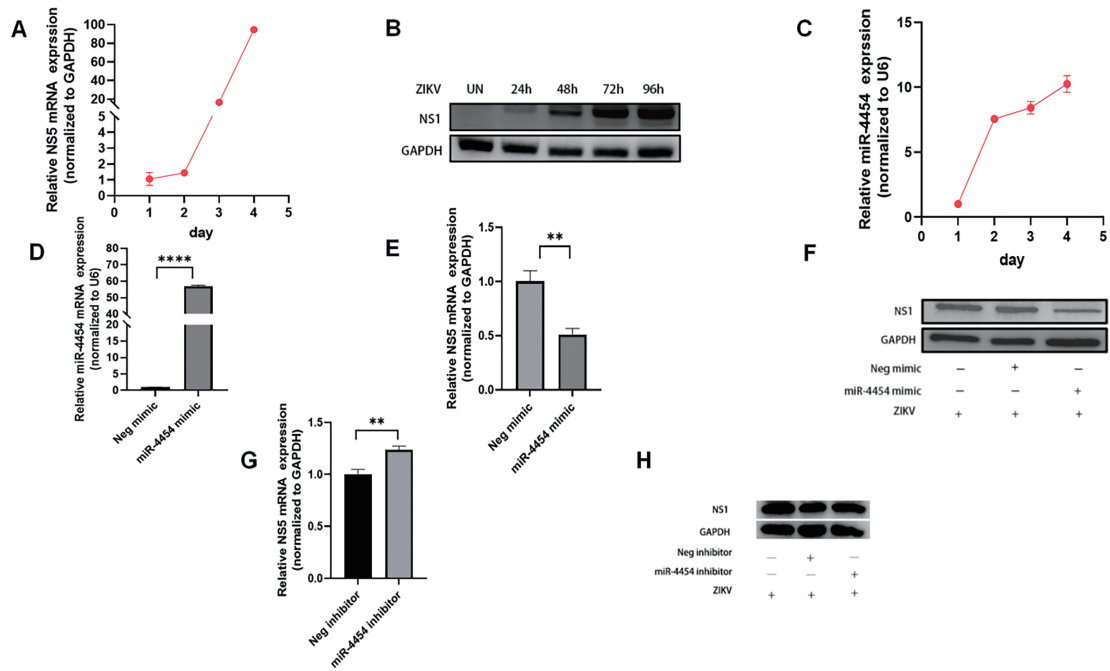
2.9 统计学分析

统计分析和计算采用GraphPad Prism 9软件进行。通过两独立样本t检验评估组间差异，显著性水平设置为P<0.05，以确定差异的统计学意义。每组实验均设置3个生物学重复（n=3）。

结 果

1 miR-4454抑制ZIKV的复制

我们首先在核酸水平和蛋白水平验证了ZIKV可以感染A549细胞，并进行复制（图1A-1B）。以往研究表明miR-4454在ZIKV感染后的A549细胞中上调^[16]，我们的结果也显示随着ZIKV感染时间增加，miR-4454的表达呈上升趋势（图1C）。转染miR-4454 mimic与对照组Negative mimic相比则显著的



注：（A-B）ZIKV感染A549细胞后不同时间点ZIKV NS5 mRNA和ZIKV NS1蛋白的表达情况；（C）ZIKV感染后上调A549细胞中miR-4454的表达；（D）miR-4454转染效率（E-F）转染miR-4454 mimic分别抑制ZIKV NS5 mRNA和ZIKV NS1蛋白表达；（G-H）转染miR-4454 inhibitor分别在RNA和蛋白水平促进ZIKV的复制。*: $P<0.01$, ****: $P<0.0001$ 。

图1 高表达miRNA抑制ZIKV（MOI=1）在A549细胞中的复制

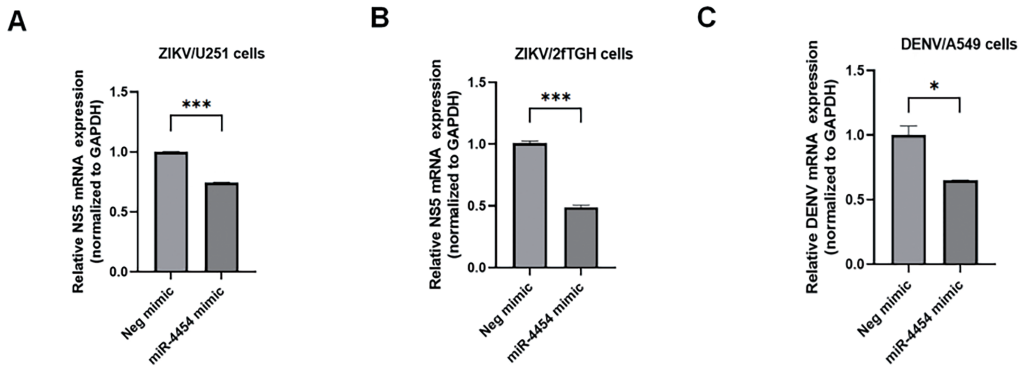
抑制了ZIKV NS5 mRNA复制和ZIKV NS1蛋白表达（图1D-1F），而转染miR-4454 inhibitor与对照组 Negative inhibitor相比则促进了ZIKV NS5 mRNA复制和ZIKV NS1蛋白表达（图1G-H）。

由于ZIKV能够感染神经细胞和神经胶质细胞^[20]，且部分miRNA可通过激活先天性免疫反应发挥抗病毒作用^[21-22]，因此，我们选用了人胶质瘤细胞U251、干扰素受体缺失的人成纤维细胞U5A以及人成纤维细胞2fTGH，验证miR-4454是否在不同细胞中均能发挥抗病毒作用，并探究其潜在的抗病毒机制。我们的研究表明，miR-4454在U251和2fTGH细胞中都能够抑制ZIKV的复制（图2A-2B），并且在

A549细胞中也显示出了抑制其他黄病毒，登革病毒（DENV）的效果（图2C）。

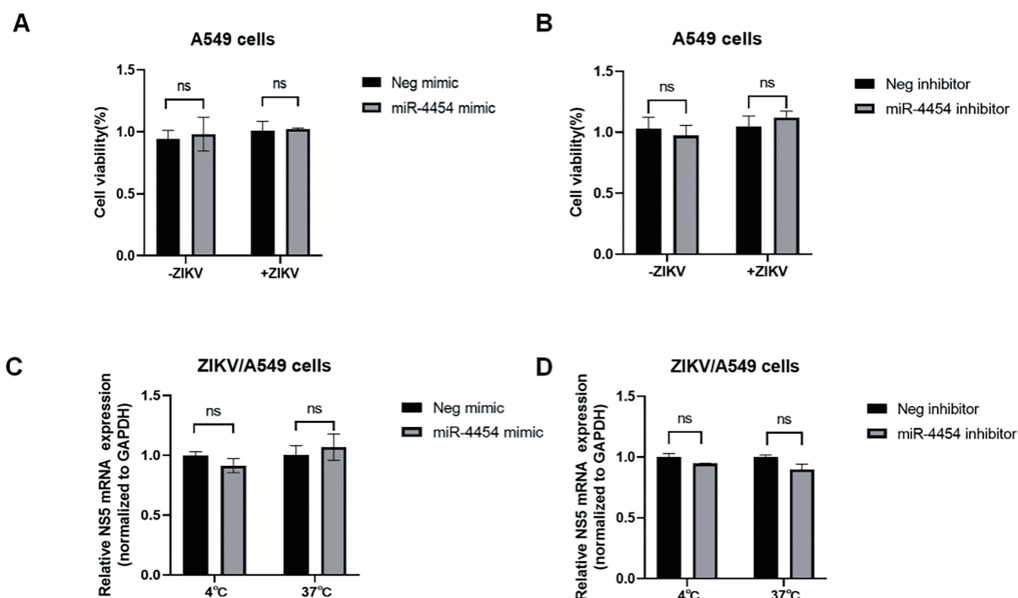
2 miR-4454可能通过 I 型干扰素信号通路影响 ZIKV 的复制

病毒复制与细胞增殖及病毒入胞密切相关。有报道显示miR-4454影响宫颈癌细胞的迁移和增殖^[23]，那么miR-4454是否通过影响A549细胞的增殖，从而影响ZIKV的复制呢？为此我们检测了miR-4454对A549细胞活力的影响，CCK8结果显示，当转染miR-4454 mimic或miR-4454 inhibitor时，感染或不感染ZIKV的A549细胞活力均没有受到明显影响（图3A-3B）。为进一步探究miR-4454是否会



注：（A-B）U251和2fTGH细胞转染miR-4454 mimic后，抑制ZIKV NS5 mRNA的表达；（C）A549细胞转染miR-4454 mimic后，抑制DENV RNA的表达。*: $P<0.05$, ***: $P<0.001$ 。

图2 高表达miR-4454在不同的细胞中均抑制ZIKV（MOI=1）的复制



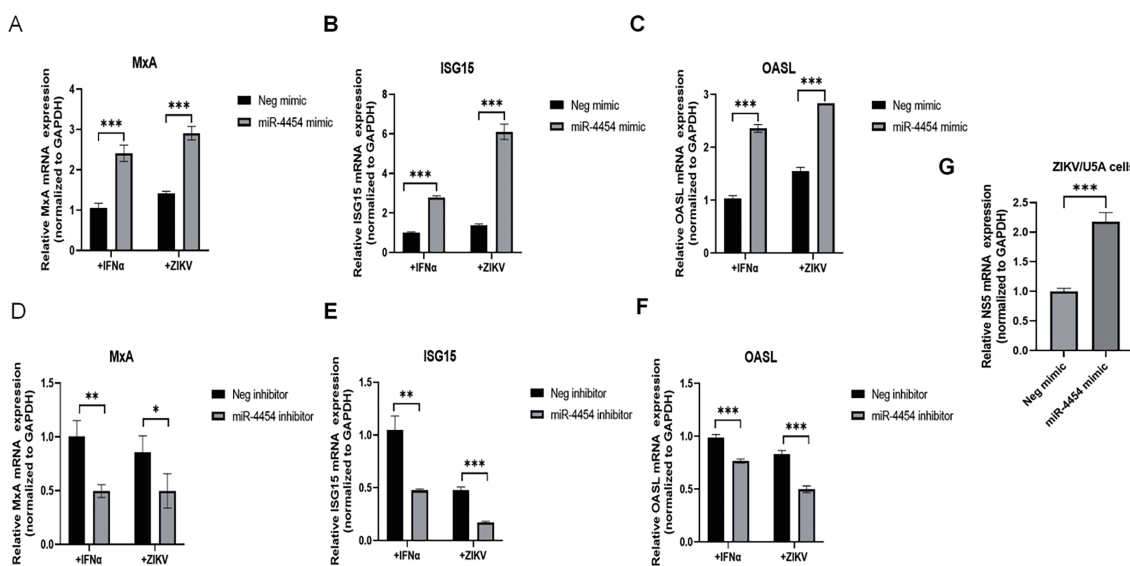
注：（A-B）转染miR-4454 mimic或miR-4454 inhibitor在ZIKV感染或不感染情况下都不影响A549细胞的活力；（C-D）转染miR-4454 mimic或miR-4454 inhibitor后感染ZIKV，分别放置4℃和37℃中孵育1 h，提取细胞内总RNA，qPCR的方法检测细胞内ZIKV NS5 mRNA的表达无显著性差异，miR-4454不影响病毒入胞。ns：P>0.05。

图3 miR-4454在感染或不感染ZIKV的情况下（MOI=1）不影响A549细胞活力，miR-4454不影响ZIKV病毒（MOI=20）入胞

影响ZIKV的入胞，我们将转染了miR-4454 mimic或者miR-4454 inhibitor的细胞分别放置于4℃和37℃孵育1 h观察病毒的吸附和内吞情况，结果显示miR-4454对ZIKV NS5 mRNA的表达没有影响，表明miR-4454对ZIKV的吸附和内吞没有显著影响（图3C-3D）。

一些miRNA可以通过启用抗病毒感染机制来抵御病毒的入侵^[24]，在抵御黄病毒复制的ISGs中，

MxA、ISG15和OASL等发挥着重要作用^[25-26]，因此我们检测了这些ISGs的表达情况。转染miR-4454 mimic促进了：ISG15、OASL、MxA的表达（图4A-4C），转染miR-4454 inhibitor抑制了ISGs的表达（图4D-4F），且在干扰素受体缺失的U5A细胞中显示出促进ZIKV复制的效果（图4G），说明miR-4454可能通过影响I型干扰素信号通路从而影响病毒的表达。



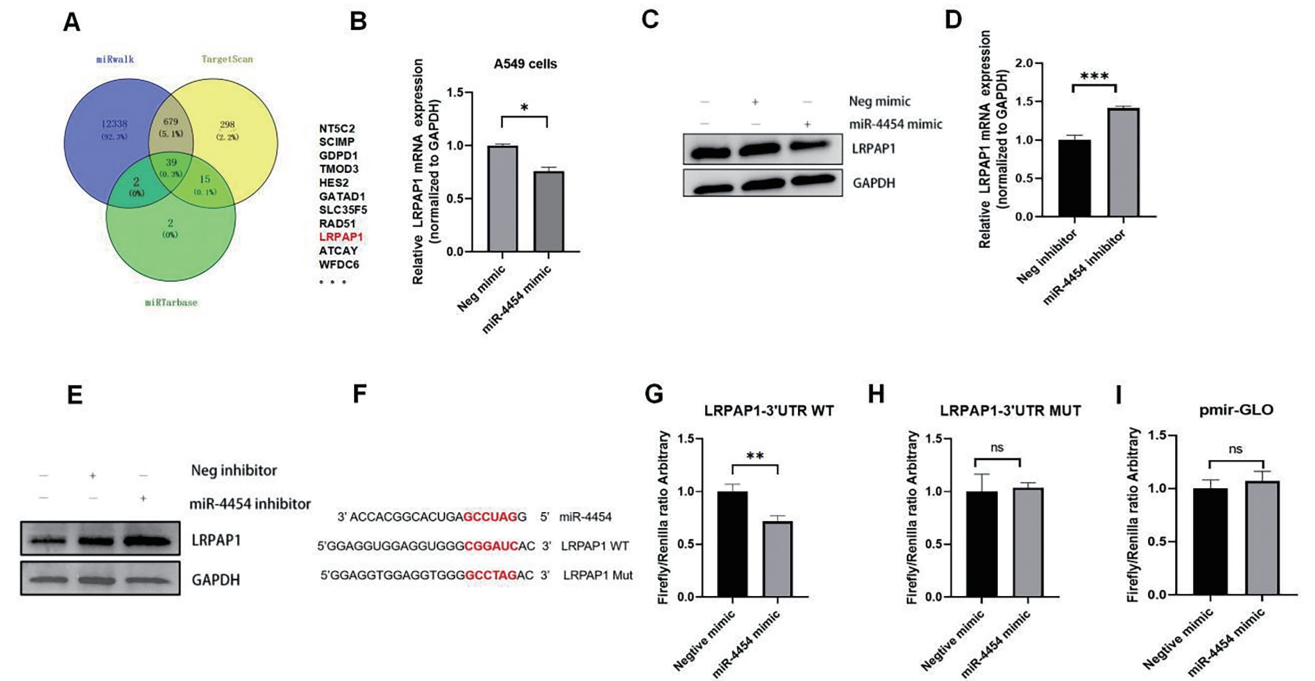
注：（A-C）转染miR-4454 mimic可以提高A549细胞中ISG15、MxA和OASL的表达；（D-F）转染miR-4454 inhibitor降低A549细胞中ISG15、MxA和OASL的表达；（G）U5A细胞转染miR-4454 mimic后，促进ZIKV NS5 mRNA的表达。*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001。

图4 miR-4454在干扰素IFNα处理（100 IU/mL）或感染ZIKV（MOI=1）的情况下均能上调ISGs的表达

3 LRPAP1是miR-4454的下游靶基因

我们通过三个数据库miRwalk、TargetScan、miRTarbase进一步预测了miR-4454的下游靶基因（图5A），在这39个靶基因中，LRPAP1在转染miR-4454 mimic或miR-4454 inhibitor时在RNA和蛋白水平分别表现出了下调和上调的趋势（图5B–5E），并且通过TargetScan我们预测得知LRPAP1的3'UTR区域有一个miR-4454可能结合的位点（图5F）。进一步的通过双荧光素酶报告基因实验，我们发现共转染miR-4454 mimic和野生型

LRPAP1 3'UTR 质粒的细胞中荧光素酶活性显著降低（图5G），然而共转染miR-4454 mimic和突变型LRPAP1 3'UTR质粒或共转染miR-4454 mimic与质粒空载的细胞中，荧光素酶活性没有差异（图5H–5I）。这些结果表明miR-4454和LRPAP1之间存在直接相互作用的结合位点。有相关的文献报道LRPAP1与 I 型干扰素信号通路有关^[19]，而 I 型干扰素信号通路被证实与ZIKV的复制有关，因此我们选择LRPAP1进一步的探究。



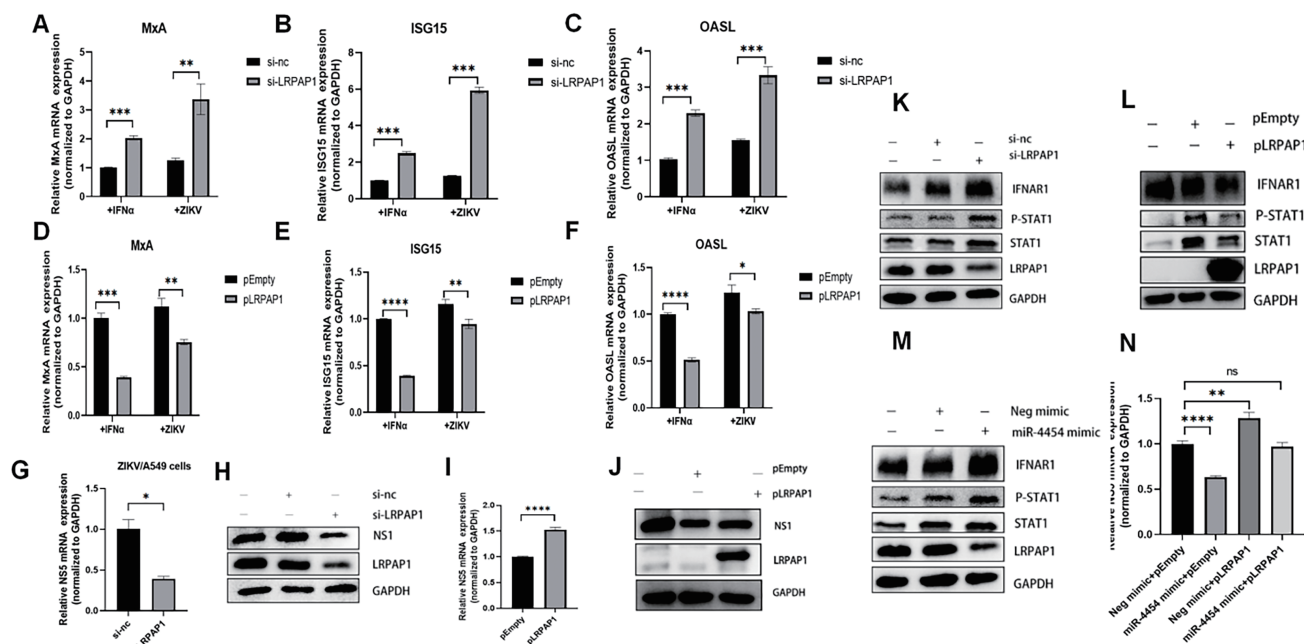
注：（A）基于miRwalk、TargetScan、miRTarbase网站预测得到39个miR-4454下游靶基因；（B–C）在转染miR-4454 mimic时，LRPAP1在RNA和蛋白水平均下调；（D–E）在转染miR-4454 inhibitor时，LRPAP1在RNA和蛋白水平均上调；（F）miR-4454与LRPAP1在3'UTR潜在结合位点；（G–I）双荧光素酶报告基因实验验证miR-4454与LRPAP1的相互作用。ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

图5 LRPAP1是miR-4454的下游靶基因

4 LRPAP1通过调控 I 型干扰素信号通路影响ZIKV的复制

ISGs作为IFN信号通路的最终效应分子，在控制病毒感染方面具有重要的调控作用。因此，我们检测LRPAP1对于 I 型干扰素信号通路的细胞因子的影响，发现当敲低LRPAP1时：ISG15、MxA、OASL均显示上调（图6A–6C），过表达LRPAP1时这三种细胞因子均显示下调（图6D–6F）。接着，我们评估LRPAP1对ZIKV复制的影响，将si-LRPAP1转染至A549细胞，随后感染ZIKV，结果显示ZIKV NS5 mRNA和ZIKV NS1蛋白均下调，敲低LRPAP1显著抑制了病毒的复制（图6G–6H）。我们过

表达LRPAP1进一步验证了LRPAP1促进ZIKV复制的作用，过表达LRPAP1增强了ZIKV在A549细胞中的NS5 mRNA和NS1蛋白水平的表达（图6I–6J）。根据文献报道LRPAP1是通过影响IFNAR1从而影响 I 型干扰素信号通路^[19]，因此我们敲低了LRPAP1以及过表达miR-4454，通过Western blot实验来观察IFNAR1的表达，以及STAT1的磷酸化水平，发现这三种蛋白的表达均有所上升，说明 I 型干扰素信号通路被激活了（图6K、6M）。当过表达了LRPAP1时，通过Western blot实验发现IFNAR1的表达，STAT1的磷酸化水平的表达均下调（图6L），说明 I 型干扰素信号通路被抑制。



注：(A-C) 敲低LRPAP1上调ISG15, MxA和OASL的表达；(D-F) 过表达LRPAP1下调ISG15, MxA和OASL的表达；(G-H) 敲低LRPAP1分别在RNA和蛋白水平抑制ZIKV的复制；(I-J) 过表达LRPAP1分别在RNA和蛋白水平促进ZIKV的复制；(K-M) 敲低LRPAP1以及过表达miR-4454均能过表达IFNAR1, 激活STAT1磷酸化水平；(L) 过表达LRPAP1抑制IFNAR1, 抑制STAT1磷酸化水平；(N) miR-4454抑制LRPAP1对ZIKV复制的促进作用。ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。

图6 敲低LRPAP1激活了I型干扰素信号通路并抑制了ZIKV (MOI=1) 的复制, 过表达LRPAP1抑制了I型干扰素信号通路并促进了ZIKV (MOI=10) 的复制

我们之前研究表明LRPAP1是miR-4454的直接作用靶基因, 并且LRPAP1敲低后通过激活I型干扰素信号通路抑制ZIKV复制, 这些作用与miR-4454高表达后对ZIKV复制和I型干扰素信号通路的影响一致。为了进一步的证实miR-4454是通过调控靶基因LRPAP1影响I型干扰素信号通路和ZIKV复制。我们将miR-4454 mimic和LRPAP1质粒共同转染至A549细胞中, 发现当miR-4454 mimic与空载质粒共转时, miR-4454能够显著抑制ZIKV NS5 mRNA复制; 当LRPAP1质粒与miR-4454 Negative mimic共转时, LRPAP1显著促进ZIKV NS5 mRNA复制, 这些结果也与前面的研究结果一致。但是, 当miR-4454 mimic与LRPAP1质粒共转染时, miR-4454抑制了LRPAP1对ZIKV复制的促进作用。以上结果提示, miR-4454高表达抑制LRPAP1对ZIKV复制的作用, 表明miR-4454是通过作用于LRPAP1调控I型干扰素信号通路从而影响ZIKV复制(图6N)。

5 miR-4454通过LRPAP1调控I型干扰素信号通路, 影响ZIKV的复制

讨论

病毒感染导致上调的miRNA中, miR-155、

miR-203和miR-29b在病毒入侵和抗病毒免疫中起关键作用^[27-29]。在这项研究中ZIKV感染后的诱导细胞上调miR-4454^[16], 但miR-4454在调控ZIKV复制方面的机制尚不清楚。目前miR-4454的报道集中在生物标志物、癌症进展方向^[23, 30-31], 与病毒感染相关的研究较少。在本研究中我们发现miR-4454能够通过靶向LRPAP1促进I型干扰素信号通路, 提示了miR-4454在固有免疫反应中的重要调节作用, 为深入理解miRNA复杂的调节网络积累了证据。

病毒入侵后, 宿主细胞会启动先天性防御机制^[15], 尤其是与I型干扰素相关的基因, 与此同时病毒也会通过利用宿主分子来调节免疫通路, 提高其在宿主中的复制效率。乙型肝炎病毒(HBV)通过组蛋白乙酰转移酶1(HAT1)调控cGAS-STING通路和I型干扰素(IFN-I)信号传导, 从帮助病毒逃避宿主的先天免疫反应^[32]。此外, 丙型肝炎病毒(HCV)的病毒包膜蛋白通过增强岩藻糖基转移酶(FUT8)的表达, 抑制宿主的抗病毒I型干扰素反应^[33]。DENV的NS5蛋白则通过与宿主因子UBR4相互作用, 抑制I型干扰素信号传导, 促进DENV的复制^[34]。ZIKV也可以迅速采取应对机制, 利用NS蛋

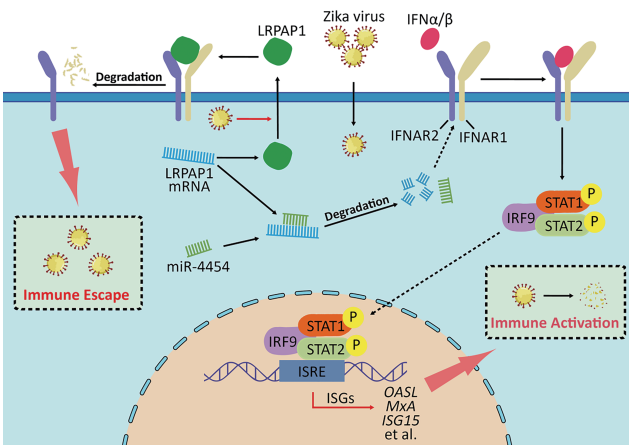
白来抑制 I 型IFN信号转导通路关键组分STAT1的磷酸化^[8]，以促进在细胞内的复制。这些研究表明了病毒和宿主之间复杂的相互作用关系。ZIKV感染可促进多种干扰素诱导的抗病毒基因表达，包括ISG15、OASL和MXA^[15, 35-36]，这些ISGs被证明可以限制ZIKV，DENV和西尼罗河病毒等黄病毒的感染^[37-38]。我们的qPCR结果显示在施加外源性干扰素或感染ZIKV的情况下过表达miR-4454可以上调 I 型干扰素信号通路的ISGs：ISG15，OASL，MxA的表达。

2fTGH细胞是信号通路完整的人成纤维细胞，U5A是由2fTGH敲除了IFNAR1的细胞。我们研究发现在U251，2fTGH过表达miR-4454，可以抑制ZIKV的复制（图2A-2B），这说明miR-4454在不同的细胞均能发挥抗病毒作用。有趣的是，在U5A中过表达miR-4454显示促进了病毒复制的作用（图4G），这说明了miR-4454发挥抗病毒作用与 I 型干扰素信号通路密切相关，而显示出促进病毒复制的效果可能是因为miRNA通常可以调控多个下游靶基因^[39-40]，当 I 型干扰素信号通路受到抑制时，miR-4454调控的其他下游靶基因可能就会占据主导作用，导致显示出促进病毒复制的效果。此外，在A549细胞中过表达miR-4454能够显著抑制DENV的复制，这表明miR-4454具有广泛的抗病毒活性，可能通过调控固有免疫发挥其抗病毒作用（图2C）。

miRNA通常通过下调其靶基因来发挥作用，从而参与多种生物过程，包括病毒感染。我们使用了三种不同的预测网站：miRwalk、TargetScan和miRTarbase来预测miR-4454的下游靶基因，共预测得到39个下游靶基因（图5A），其中LRPAP1被证明可以通过降解IFNAR1来抑制 I 型干扰素信号通路^[19]，其他的基因分别和细胞增殖与凋亡、免疫与炎症、糖代谢与离子转运等有关。过表达miR-4454可以促进ISGs的表达（图4A-4C），这表明miR-4454与 I 型干扰素信号通路有关，因此与调节免疫反应有关的LRPAP1有可能是miR-4454的下游靶基因。通过双荧光素酶报告基因实验，我们能够确认LRPAP1确实是miR-4454的靶基因之一（图5G-5I）。miRNA可以通过靶向干扰素信号通路中的关键分子（如STAT1和STAT2），调控 I 型干扰素的产生和信号传导，还可以通过调控ISGs的表达，影响宿主的抗病毒免疫反应^[22, 41]。我们假设过表达miR-4454通过下调LRPAP1，抑制了IFNAR1的降解从而激活 I 型干扰素信号通路，研究结果发现沉默LRPAP1和过表达miR-4454时可以激活 I 型干扰素信号通路，Western

blot的结果为IFNAR1、STAT1的磷酸化水平以及ISGs的表达增强（图6K、6M），而过表达LRPAP1时，结果则相反，以上结果说明miR-4454通过调控LRPAP1从而激活 I 型干扰素信号通路。文献^[19]首次揭示了LRPAP1通过结合并降解IFNAR1来抑制 I 型干扰素通路的分子机制，而本研究则进一步发现miR-4454可通过靶向调控LRPAP1表达来影响这一过程。在实验验证方面，文献主要在外源性干扰素刺激条件下证实了LRPAP1对ISGs的调控作用，而本研究通过更系统的实验设计（包括ZIKV感染、LRPAP1敲低和过表达等），不仅验证了文献的核心发现，还拓展了该调控通路在不同条件下的普适性。特别值得指出的是，本研究首次将miRNA调控网络引入到这一机制中，为理解宿主与病毒的相互作用提供了新的视角。

我们的研究结果表明，ZIKV感染诱导miR-4454表达，而高表达的miR-4454可以通过靶向LRPAP1激活 I 型干扰素信号通路，抑制ZIKV复制（图7）。这一发现揭示了miRNA可以通过调节 I 型干扰素信号通路来应对病毒感染，为寨卡病毒疫苗的研发提供了新的研究方向。



注：miR-4454通过靶向LRPAP1，下调LRPAP1的表达，阻滞LRPAP1对IFNAR1的降解，从而激活 I 型干扰素信号通路，抑制ZIKV的复制。靶向LRPAP1可能是治疗ZIKV感染的潜在新策略。

图7 miR-4454靶向LRPAP1调节 I 型干扰素信号通路的作用模式图

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] DICK G A,KITCHEN S F,HADDOW A J. Zika virus. I. isolations and serological specificity[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg,1952,46(5):509-520.

- [2] GRARD G,CARON M,MOMBO I M,et al. Zika virus in Gabon (central Africa)—2007:a new threat from *Aedes albopictus*?[J]. PLoS Negl Trop Dis,2014,8(2):e2681.
- [3] CAO-LORMEAU V M,ROCHE C,TEISSIER A, et al. Zika virus,French *Polynesia*,south Pacific,2013[J]. Emerg Infect Dis,2014,20(6):1085-1086.
- [4] BESNARD M,LASTERE S,TEISSIER A,et al. Evidence of perinatal transmission of zika virus,French *Polynesia*,December 2013 and February 2014[J]. Euro Surveill,2014,19(13):20751.
- [5] MUSSO D,BOSSIN H,MALLET H P,et al. Zika virus in French *Polynesia* 2013-14:anatomy of a completed outbreak[J]. Lancet Infect Dis,2018,18(5):e172-e182.
- [6] WHO.WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome[EB/OL]. [2025-01-20]. <https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barré-syndrome>.
- [7] MUSSO D,KO A I,BAUD D. Zika virus infection-after the pandemic[J]. N Engl J Med,2019,381(15):1444-1457.
- [8] FERNANDEZ-GARCIA M D,MAZZON M, JACOBS M,et al. Pathogenesis of flavivirus infections:using and abusing the host cell[J]. Cell Host Microbe,2009, 5(4):318-328.
- [9] KHARWADKAR S,HERATH N. Clinical manifestations of dengue,zika and chikungunya in the Pacific Islands:a systematic review and meta-analysis[J]. Rev Med Virol, 2024,34(2):e2521.
- [10] FENG Y Q. Recent advances in the study of zika virus structure,drug targets,and inhibitors[J]. Front Pharmacol,2024,15:1418516.
- [11] GARLEY M,NOWAK K,JABŁOŃSKA E. Neutrophil microRNAs[J]. Biol Rev Camb Philos Soc,2024,99(3): 864-877.
- [12] LI H Y,WANG X F,MU H B,et al. miR-484 contributes to diminished ovarian reserve by regulating granulosa cell function *via* YAP1-mediated mitochondrial function and apoptosis[J]. Int J Biol Sci,2022,18(3):1008-1021.
- [13] LU S,ZHU N,GUO W W,et al. RNA-seq revealed a circular RNA-microRNA-mRNA regulatory network in hantaan virus infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020,10:97.
- [14] BAHJOB MAHDAVI S Z,JEBELLI A,AGHBASH P S, et al. A comprehensive overview on the crosstalk between microRNAs and viral pathogenesis and infection[J]. Med Res Rev,2025,45(2):349-425.
- [15] AZOUZ F,ARORA K,KRAUSE K,et al. Integrated microRNA and mRNA profiling in zika virus-infected neurons[J]. Viruses,2019,11(2):162.
- [16] YE H Y,KANG L,YAN X P,et al. miR-103a-3p promotes zika virus replication by targeting OTU deubiquitinase 4 to activate p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Front Microbiol,2022,13:862580.
- [17] BU G,SCHWARTZ A L. RAP,a novel type of ER chaperone[J]. Trends Cell Biol,1998,8(7):272-276.
- [18] WILLNOW T E,ROHLMANN A,HORTON J,et al. RAP,a specialized chaperone,prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors[J]. EMBO J,1996,15(11):2632-2639.
- [19] LI H C,WANG X,WANG Y R,et al. Secreted LRPAP1 binds and triggers IFNAR1 degradation to facilitate virus evasion from cellular innate immunity[J]. Signal Transduct Target Ther,2023,8(1):374.
- [20] SHEREEN M A,BASHIR N,SU R,et al. Zika virus dysregulates the expression of astrocytic genes involved in neurodevelopment[J]. PLoS Negl Trop Dis,2021, 15(4):e0009362.
- [21] WU W J,WANG C,XIA C L,et al. microRNA let-7 suppresses influenza A virus infection by targeting RPS16 and enhancing type I interferon response[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12:904775.
- [22] JAFARZADEH A,NASERI A,SHOJAIE L,et al. microRNA-155 and antiviral immune responses[J]. Int Immunopharmacol,2021,101(Pt A):108188.
- [23] WANG H,HU H,LUO Z Z,et al. miR-4454 up-regulated by HPV16 E6/E7 promotes invasion and migration by targeting ABHD2/NUDT21 in cervical cancer[J]. Biosci Rep,2020,40(9):BSR20200796.
- [24] 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]. J Virol,2013,87(2):1159-1171.
- [25] SCHNEIDER W M,CHEVILLOTTE M D,RICE C M. Interferon-stimulated genes:a complex web of host defenses[J]. Annu Rev Immunol,2014,32:513-545.
- [26] SCHOGGINS J W,WILSON S J,PANIS M,et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. Nature,2011, 472: 481-485.
- [27] PAREEK S,ROY S,KUMARI B,et al. miR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate

- immune responses[J]. J Neuroinflammation,2014,11:97.
- [28] THOUNAOJAM M C,KAUSHIK D K,KUNDU K, et al. microRNA-29b modulates Japanese encephalitis virus-induced microglia activation by targeting tumor necrosis factor alpha-induced protein 3[J]. J Neurochem, 2014,129(1):143-154.
- [29] BUGGELE W A,HORVATH C M. microRNA profiling of Sendai virus-infected A549 cells identifies miR-203 as an interferon-inducible regulator of IFIT1/ISG56[J]. J Virol,2013,87(16):9260-9270.
- [30] FENG L X,FENG Z A,HU J,et al. Identification of hsa-miR-619-5p and hsa-miR-4454 in plasma-derived exosomes as a potential biomarker for lung adenocarcinoma[J]. Front Genet,2023,14:1138230.
- [31] LIN H M,ZHANG R,WU W R,et al. miR-4454 promotes hepatic carcinoma progression by targeting Vps4A and Rab27A[J]. Oxid Med Cell Longev,2021,2021:9230435.
- [32] ZHAO L N,YUAN H F,WANG Y F,et al. HBV confers innate immune evasion through triggering HAT1/ acetylation of H4K5/H4K12/miR-181a-5p or KPNA2/ cGAS-STING/IFN-I signaling[J]. J Med Virol,2023, 95(7): e28966.
- [33] PAN Q,XIE Y,ZHANG Y,et al. EGFR core fucosylation,induced by hepatitis C virus,promotes TRIM40-mediated-RIG-I ubiquitination and suppresses interferon-I antiviral defenses[J]. Nat Commun,2024, 15(1):652.
- [34] MORRISON J,LAURENT-ROLLE M,MAESTRE A M,et al. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling[J]. PLoS Pathog,2013,9(3):e1003265.
- [35] SINGH P K,GUEST J M,KANWAR M,et al. Zika virus infects cells lining the blood-retinal barrier and causes chorioretinal atrophy in mouse eyes[J]. JCI Insight, 2017,2(4):e92340.
- [36] SINGH P K,SINGH S,FARR D,et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) restricts Zika virus replication in primary human corneal epithelial cells[J]. Ocul Surf,2019,17(3):551-559.
- [37] ESPADA C E,DA ROCHA E L,RICCIARDI-JORGE T, et al. ISG15/USP18/STAT2 is a molecular hub regulating IFN I-mediated control of Dengue and Zika virus replication[J]. Front Immunol,2024,15:1331731.
- [38] DAI J F,PAN W,WANG P H. ISG15 facilitates cellular antiviral response to dengue and west Nile virus infection *in vitro*[J]. Virol J,2011,8:468.
- [39] LIU H C,YAN L,LI X K,et al. microRNA expression in osteoarthritis:a meta-analysis[J]. Clin Exp Med,2023, 23(7):3737-3749.
- [40] ZHOU C,ZHAO X,DUAN S W. The role of miR-543 in human cancerous and noncancerous diseases[J]. J Cell Physiol,2021,236(1):15-26.
- [41] BAUER A N,MAJUMDAR N,WILLIAMS F,et al. microRNAs:small but key players in viral infections and immune responses to viral pathogens[J]. Biology (Basel), 2023,12(10):1334.

(收稿日期: 2025-02-28)

(本文编辑: 马超)