



评述

马立克氏病病毒编码的 microRNA: 从基因组学到功能研究

罗俊^①, 滕蔓^①, 樊剑鸣^{①②}, 王方雨^①, 周玲^①, 邓瑞广^①, 张改平^{①*}^① 河南省农业科学院, 农业部动物免疫学重点开放实验室, 河南省动物免疫学重点实验室, 郑州 450002;^② 郑州大学公共卫生学院毒理学教研室, 郑州 450001

* 联系人, E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-17; 接受日期: 2009-09-14

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB523200)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 30730068)和国家科技支撑计划(批准号: 2006BAD06A04-6)资助

摘要 microRNA 在多种生物学过程中发挥重要的基因转录后调控功能. 近期发现, 疱疹病毒也编码大量的 miRNA. 对包括马立克氏病病毒在内的疱疹病毒编码 miRNA 的初步研究表明, 它们可能在病毒复制、潜伏感染、细胞转化及肿瘤发生发展中发挥重要调控作用. MDV 是疱疹病毒甲亚科的重要成员, 其感染自然宿主鸡后可诱发典型的马立克氏病, 该病可用抗病毒疫苗有效预防, 这是目前已知肿瘤病中第一个可用疫苗预防的病毒性肿瘤病. 因此, MDV 感染对于研究 miRNA 调控肿瘤发生和发展的生物学、遗传学及免疫学等都提供了极好的动物模型. 本文综述了 MDV 编码 miRNA 的发现与鉴定、基因组结构、表达谱及功能研究的进展, 并探讨了今后深入研究其生物学功能的技术及前景.

关键词

miRNA

MDV

疱疹病毒

肿瘤

肿瘤发生机制

microRNA(miRNA)是一类长度介于 22~25 nt 的非编码小分子 RNA, 在细胞发育与分化、细胞凋亡、肿瘤发生等许多生物学过程中发挥重要的转录后基因调控功能^[1,2]. 1993 年, Lee 等人^[3]和 Wightman 等人^[4]在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中首次发现 lin-4, 一个长度为 22 nt 的 RNA 小分子能够时序性调控其细胞发育过程, 这是人类发现的第一个 miRNA 分子. 此后, 数以万计的 miRNA 分子在包括人类在内的所有已研究过的动物、植物和部分病毒基因组中得以发现和鉴定^[5]. 在最近的 10 年中, 对 miRNA 的研究取得了巨大进展. 令人吃惊的是, 在已发现的 700 多种人类 miRNA 中, 很多分子可能在多种疾病

尤其是肿瘤发生过程中发挥重要调控功能. 有些 miRNA 被鉴定为原癌基因, 另一些则可能是抑癌基因^[6,7]. 深入研究这些 miRNA 的功能, 已成为 21 世纪生命科学研究领域最前沿的热点之一, 它对于揭示生命科学本质、了解肿瘤发生等人类疾病的发生发展过程及生物治疗等均具有重要的理论和现实意义.

1 多种疱疹病毒编码 miRNA

最新研究发现, 部分病毒基因组中也编码数量不等的 miRNA, 这些病毒大多属于疱疹病毒属的成员, 也有一些属于多瘤病毒属和逆转录病毒属^[5,8]. 疱

英文版见: Luo J, Teng M, Fan J M, et al. Marek's disease virus (MDV)-encoded microRNAs: genomics, expression, and function. Sci China Life Sci, 2010, 53, in press

疹病毒是一大类直径较大、有囊膜的双链 DNA 病毒, 其基因组 DNA 长度一般介于 120~240 kb. 根据宿主和组织特异性及病毒复制特性, 疱疹病毒可分为甲、乙、丙 3 个亚科. 至今, 在疱疹病毒基因组中发现的 miRNA 基因已多达 140 余种^[9], 其中从非洲淋巴瘤病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、卡波济肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma herpesvirus, KSHV)、鼠 γ 疱疹病毒 68(murine herpesvirus 68, MHV68)、人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)、马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)、火鸡疱疹病毒(herpesvirus of turkeys, HVT)及禽传染性喉气管炎病毒(infectious laryngotracheitis virus, ILTV)中分别发现了 25, 13, 9, 9, 11, 32, 19 和 7 个 miRNA 基因, 这些 miRNA 中的绝大部分分子已得到鉴定. 利用生物信息学方法, 少数病毒自身编码的基因和很多宿主基因如细胞因子、趋化因子、细胞凋亡因子、生长因子及信号传导因子等被预测为病毒 miRNA 的靶分子. 然而与真核生物相似, 由于 miRNA 靶基因筛选验证和信号通路研究的复杂性, 绝大多数病毒 miRNA 的功能目前尚不清楚.

2 MDV 及其编码的 miRNA

MDV 在分类上归属于甲亚科疱疹病毒, 病毒基因组全长约 180 kb^[10]. 与 EB 病毒相似, MDV 是少数几种疱疹病毒在其自然宿主中可诱导产生肿瘤的一种肿瘤性病毒. MDV 感染其自然宿主鸡诱发马立克氏病(Marek's disease, MD), 以淋巴组织增生和肿瘤形成成为主要特征, 1907 年匈牙利人 Marek^[11]首次报道该病. 此后研究发现, MDV 共有 3 种血清型: 血清 I 型(MDV-1)、II 型(MDV-2)和 III 型(MDV-3)^[10]. 血清 I 型 MDV 包括对宿主具有毒力或致癌性的强毒分离株及它们的致弱变异株, 血清 II 型 MDV 包括能产生小型蚀斑但无致病性的毒株, 血清 III 型 MDV 则包括无致病力的 HVT 及其变异株. 根据致病性的不同, 血清 I 型野毒分离株又可以分为温和 MDV(mild MDV, m MDV)、强毒 MDV(virulent MDV, v MDV)、超强毒 MDV(very virulent MDV, vv MDV)及超超强毒 MDV(very virulent plus MDV, vv+ MDV). 与其他致癌性疱疹病毒一样, MDV 入侵宿主后可建立和保持终身性潜伏感染, 最终导致淋巴细胞转化诱发肿瘤. 一直以来, 生物学家们一直致力于 MDV 致癌的分子

机制研究, 并且发现在血清 I 型 MDV 编码的近百种病毒基因中, *Meq* 基因可能是 MDV 致癌的主要致癌基因^[12,13], 而其他的一些基因, 如 *pp38*, *vIL-8*, *ICP4* 相关转录物及病毒编码的端粒酶 RNA 等也可能在 MDV 潜伏感染及肿瘤发生中发挥重要作用.

令人意外的是, 随着对 miRNA 研究的深入, 最新发现在 MDV 基因组中也存在着大量 miRNA 的表达^[14~18]. 最近几年, 利用构建 cDNA 文库及传统的克隆测序方法、或者最新的 454 高通量基因组测序技术, 有学者先后从 MDV-1 超强毒株 RB1B 感染的鸡胚成纤维细胞(chicken embryo fibroblasts cells, CEFs)和 MDV-1 诱导的 T 淋巴肿瘤细胞系 MSB-1 中发现了 14 个血清 I 型 MDV miRNA 基因(共计编码 22 种 MDV-1-miRNA)和 18 个血清 II 型 MDV miRNA 基因(共计编码 36 种 MDV-2-miRNA)^[14~17], 从血清 III 型 MDV 毒株 HVT 感染的 CEFs 中发现了 18 个火鸡疱疹病毒 miRNA 基因(共计编码 29 种 HVT-miRNA)^[17,18]. 在 3 种不同血清型的 MDV 基因组中, 目前已发现了近百种禽类疱疹病毒 miRNA, 初步研究发现血清 I 型 MDV 编码的一些 miRNA 可能参与调控病毒的致病和致癌过程^[19,20], 这为研究疱疹病毒的分子致病机制和肿瘤发生机制提供了全新的研究课题.

3 MDV-miRNA 的基因组结构

MDV 基因组为线性双股 DNA, 全基因组主要由一个长独特序列区(unique long, U_L)和一个短独特序列区(unique short, U_S)构成, 在两个独特序列区两侧分别是两个序列完全相同的反转重复序列区, 长末端重复序列(terminal repeat long, TR_L)和长内部重复序列(internal repeat long, IR_L)或是短末端重复序列(terminal repeat short, TR_S)和短内部重复序列(terminal repeat short, IR_S)^[21], 独特序列区中编码的病毒基因与其他疱疹病毒具有高度保守性, 而 MDV 特异性的病毒基因则主要位于反转重复序列区 TR/IR 中^[22]. 研究发现, 尽管 3 种不同血清型 MDV 编码的 miRNA 在基因序列上没有同源性, 但它们的基因座位在病毒基因组中具有高度保守性, 并形成典型的 miRNA 基因簇(图 1)^[14~18].

血清 I 型 MDV 编码的 14 个 miRNA 基因全部位于病毒基因组的反转重复序列区中, 并形成 3 个明显的 miRNA 基因簇^[14,16]. MDV1-miR-M2, MDV1-miR-

M3, MDV1-miR-M4, MDV1-miR-M5, MDV1-miR-M9 和 MDV1-miR-M12 组成第一个基因簇, 这些 miRNA 位于 TR_L/IR_L 重复序列区中、紧邻 *Meq* 基因上游、与 R-LORF8 转录物反向, 且 miRNA 前体之间间距很短(少则数 10 个、最多不超过 220 nt), 因此该基因簇被命名为 Meq-cluster. MDV1-miR-M6, MDV1-miR-M7, MDV1-miR-M8, MDV1-miR-M10 和 MDV1-miR-M13 组成第 2 个基因簇, 这些 miRNA 主要位于 IR_S/TR_S 重复序列与病毒潜伏感染相关基因转录物 (latency-associated transcript, LAT) 的内含子中, 它们的前体分子紧密相联甚至相互交错, 因此被命名为 LAT-cluster. 另外 3 个 miRNA 分子 MDV1-miR-M1,

MDV1-miR-M11 和 MDV1-miR-M32 位于 L1/LORF5a 可读框中, 这几个 miRNA 的分子间距介于 200~300 nt 之间, 且位于 Meq-cluster 和 LAT-cluster 中间, 或许因此将其命名为 Middle-cluster(Mid-cluster).

与血清 I 型 miRNA 相比, 血清 II 型 MDV 编码的绝大部分 miRNA(包括 miR-1~miR-16, 共计 16 个前体分子)都位于 TR_L/IR_L 重复序列一段长约 4.2 kb 的区域中, 聚集形成一个较大的基因簇, 而 MDV2-miR-17 则单独位于 IR_S/TR_S 重复序列中 ICP4 的 ORF 中, 但转录方向正好与之相反^[15,17]. 有趣的是, HVT(血清 III 型 MDV)编码的 miRNA 的基因组织形式与血清 II 型 miRNA 非常相似, 几乎全部位于 TR_L/IR_L 重复序

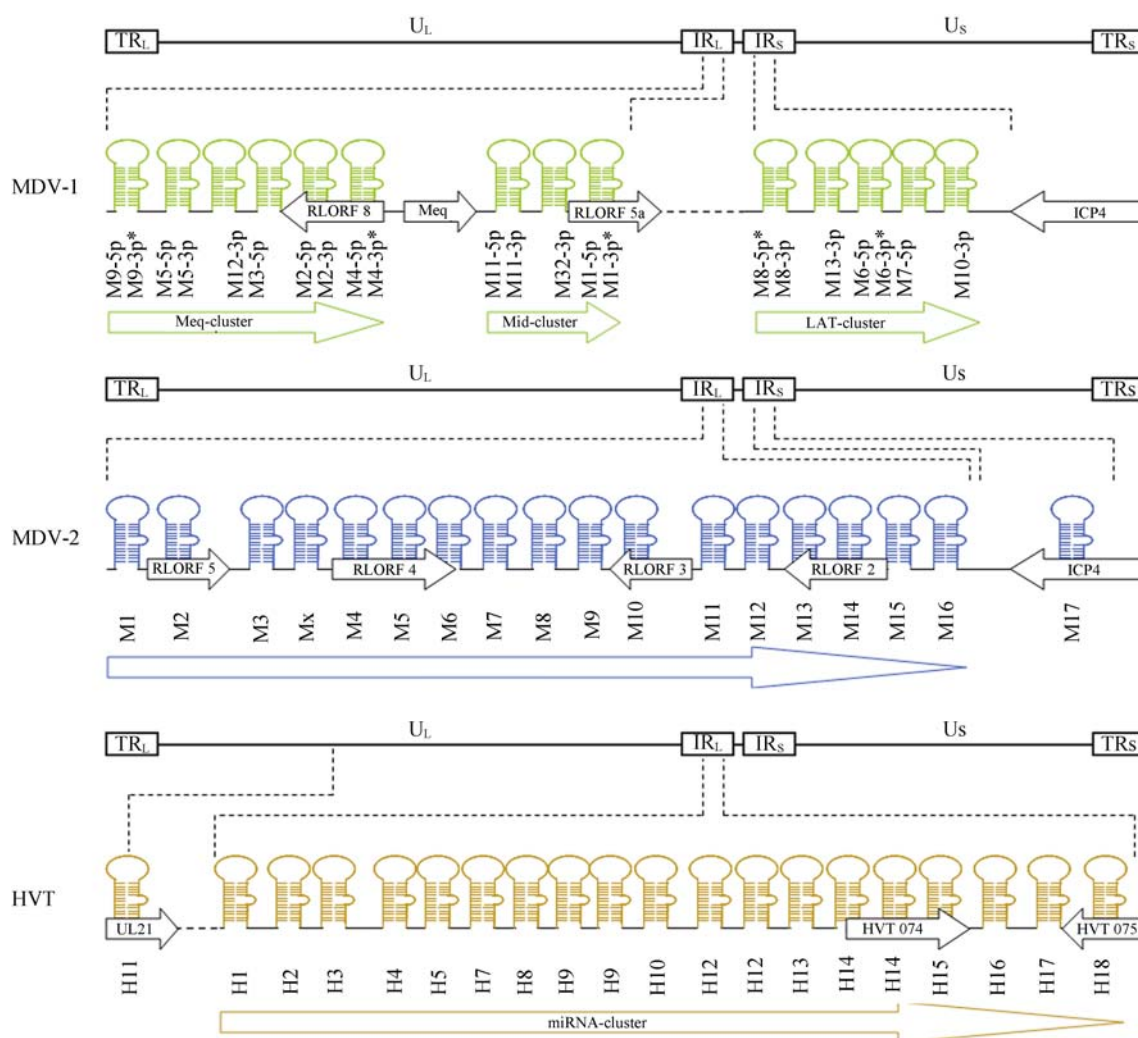


图 1 MDV 编码的病毒 miRNA 的基因组结构

绿色、蓝色和棕色发夹分别示 MDV-1, MDV-2 和 HVT 编码的病毒 miRNA 前体; 虚线示其在基因组中的相对位置

列区中, 形成一个明显的 miRNA 基因簇^[17,18]. 仔细分析不同血清型 MDV 编码的 miRNA, 可以发现它们中的绝大部分都位于禽类疱疹病毒基因组中与病毒进化密切相关的反转重复序列区域中, 表明它们在 MDV 的致病和致瘤中可能具有重要的调控作用.

4 MDV-miRNA 的表达

经克隆测序发现的 MDV 编码的 miRNA 中, 绝大部分分子已利用 Northern blot 分析得以被证实. 仔细分析 MDV-1, MDV-2 及 HVT 编码的病毒 miRNA 发现, 它们最大的共同点就是绝大部分成员在病毒基因组的反转重复序列区中聚集形成基因簇, 因此推测它们很可能是由不同病毒基因组中同一启动子起始转录产生一个长的初级转录本(primary miRNA, pri-miRNA), 然后剪切加工产生 miRNA 成熟体^[14-18]. 这一推测在 MDV-1 编码的 miRNA 中已得到证实, 利

用 RT-PCR 技术, 已经检测到一个同时转录 Meq-cluster 内编码的全部 miRNA 的转录本^[14]. 理论上讲, 同一转录本剪切加工成熟的 miRNA 似乎应该具有较一致的表达水平, 然而克隆测序及 Northern blot 结果表明, 这些 miRNA 的表达水平存在很大差异, 这可能是由于它们在加工成熟、miRNA 稳定性及生物学功能等方面的差异所致.

由于血清 I 型 MDV 具有高致病性及致瘤性, 研究 MDV-1 编码 miRNA 的表达情况对进一步深入研究其功能具有重要的参考意义. 此前研究表明, 首批发现的 MDV-1 miRNA 在 vv MDV 毒株 RB1B 感染的 CEF 细胞中, MDV1-miR-M4-5p 和 MDV1-miR-M8-3p 表达量最高, 其次为 MDV1-miR-M6-3p, MDV1-miR-M3-5p, MDV1-miR-M2-5p, MDV1-miR-M1-5p 和 MDV1-miR-M5-3p, 而 MDV1-miR-M7-3p 表达量最低(表 1). 但在 RB1B 诱发的脾脏肿瘤中, 除 MDV1-miR-M7-3p 未检测到表达外, 其他不同 miRNA 分子

表 1 Northern blot 分析 MDV-1 编码的 miRNA 在体内相对表达水平

编号	miRNA 名称	所属基因簇	不同毒株 MDV 诱导脾脏肿瘤中 miRNA 的相对表达水平				
			GX0101	RB1B ^[16]	RB1B ^[14]	RB1B ^[23]	615K ^[23]
1	MDV1-miR-M2-5p	Meq	高	较高	较高	较高	高
2	MDV1-miR-M2-3p	Meq	高	较高	低	低	较高
3	MDV1-miR-M3-5p	Meq	高	高	较高	较高	高
4	MDV1-miR-M4-5p	Meq	高	高	较高	较高	高
5	MDV1-miR-M4-3p	Meq	无表达	低	低	未测	未测
6	MDV1-miR-M5-5p	Meq	无表达	低	未测	未测	未测
7	MDV1-miR-M5-3p	Meq	无表达	高	较高	较高	较高
8	MDV1-miR-M9-5p	Meq	较高	高	未测	未测	未测
9	MDV1-miR-M9-3p	Meq	无表达	低	未测	未测	未测
10	MDV1-miR-M12-3p	Meq	较高	高	未测	高	高
11	MDV1-miR-M1-5p	Mid	低	未测	低	高	高
12	MDV1-miR-M1-3p	Mid	无表达	低	未测	未测	未测
13	MDV1-miR-M11-5p	Mid	无表达	低	未测	未测	未测
14	MDV1-miR-M11-3p	Mid	无表达	低	未测	未测	未测
15	MDV1-miR-M32-3p	Mid	低	未测	未测	未测	未测
16	MDV1-miR-M6-5p	LAT	低	高	未测	较高	较高
17	MDV1-miR-M6-3p	LAT	无表达	未测	低	低	低
18	MDV1-miR-M7-5p	LAT	高	高	未测	较高	较高
19	MDV1-miR-M8-5p	LAT	无表达	较高	未测	较高	较高
20	MDV1-miR-M8-3p	LAT	高	未测	高	高	高
21	MDV1-miR-M10-3	LAT	较高	低	未测	未测	未测
22	MDV1-miR-M13-3p	LAT	无表达	低	未测	未测	未测

之间的相对表达水平虽然与 CEF 感染细胞基本一致, 但它们在脾脏肿瘤组织中的整体表达水平则明显高于 CEF 感染细胞^[14]。此后, 对 MDV-1 编码的 21 种 miRNA 在 RB1B 同批感染的 CEF 细胞及诱发的脾脏肿瘤及肿瘤细胞系 MSB-1 中的表达进行分析, 也发现了类似现象^[16], 这很可能与 MDV-1 在 CEF 细胞和肿瘤细胞内的适应能力、复制速度以及病毒量差异有关。分析 20 多种具有不同毒力的 MDV-1 毒株基因组, 发现 MDV-1 编码的同一 miRNA 分子在基因序列上具有高度保守性。然而令人意外的是, 位于 Meq-cluster 内的 MDV1-miR-M2-5p, MDV1-miR-M2-3p, MDV1-miR-M3-5p, MDV1-miR-M4-5p, MDV1-miR-M5-3p 及 MDV1-miR-M12-3p 在 vv+ MDV 毒株 615K 诱导的脾脏肿瘤中的表达量要高于 vv MDV 毒株 RB1B 诱导的脾脏肿瘤数倍, 但位于 LAT-cluster 内的 miRNA 的表达水平则未发现明显差异^[23](表 1)。目前尚不清楚这些 miRNA 是否与 MDV 的复制或毒力有关, 但似乎表明 Meq-cluster 内编码的 miRNA 可能在 MDV 的致病机制方面具有更重要的作用。

最近, 对 MDV-1 强毒株 GX0101 编码的 miRNA 在宿主体内的动态表达谱进行了系统研究, 结果发现 MDV-1 miRNA 的表达在病毒感染全程中具有明显的时序性和组织差异性(结果未发表)。根据这些 miRNA 在 MDV 感染不同阶段的表达谱, 将 22 种 MDV-1 miRNA 中的 12 种稳定表达的成熟体 miRNA 归类为感染早期表达的 miRNA(early-expressed miRNAs, 包括 MDV1-miR-M1-5p, MDV1-miR-M3-5p, MDV1-miR-M4-5p, MDV1-miR-M7-5p, MDV1-miR-M8-3p 和 MDV1-miR-M12-3p)或感染晚期表达的 miRNA(late-

expressed miRNAs, 包括 MDV1-miR-M2-5p, MDV1-miR-M2-3p, MDV1-miR-M6-5p, MDV1-miR-M9-5p, MDV1-miR-M10-3p 和 MDV1-miR-M32-3p); 另外 5 种 miRNA(包括 MDV1-miR-M1-3p, MDV1-miR-M4-3p, MDV1-miR-M6-3p, MDV1-miR-M8-5p 和 MDV1-miR-M9-3p)被鉴定为 miRNA 成熟体的星号序列; 其余的 5 种 miRNA(包括 MDV1-miR-M5-5p, MDV1-miR-M5-3p, MDV1-miR-M11-5p, MDV1-miR-M11-3p 和 MDV1-miR-M13-3p)在体内虽然检测到前体表达, 但均未检测到成熟体表达(图 2)。虽然大部分 MDV-1 miRNA 在体内的表达与此前在 CEF 感染细胞或 MSB-1 细胞系中的研究结果基本相似, 但新鉴定的 miRNA 星号序列, MDV1-miR-M5-5p, MDV1-miR-M5-3p, MDV1-miR-M11-5p, MDV1-miR-M11-3p 和 MDV1-miR-M13-3p 在体内的表达则具有显著差异。此外, 感染早期表达的 miRNA 在 MDV 感染后 18 和 36 天均具有明显的脾脏和肺脏特异性表达特征, 但在感染后 90 天肉眼肿瘤发生期, 虽然没有观察到 miRNA 的肿瘤特异性表达但却存在着明显的组织差异性, 其中以脾脏、肺脏或胸腺中的表达量最高。与早期表达 miRNA 相比, 晚期表达 miRNA 虽然只在肉眼肿瘤发生期表达, 但它们在不同组织脏器中的表达差异性更显著, 这意味着两类不同表达模式的 miRNA 在 MDV-1 的入侵、复制、潜伏、诱导肿瘤发生及肿瘤转移中可能具有不同的调控作用。

5 MDV-miRNA 的功能

在病毒潜伏感染阶段及肿瘤发生细胞中, MDV

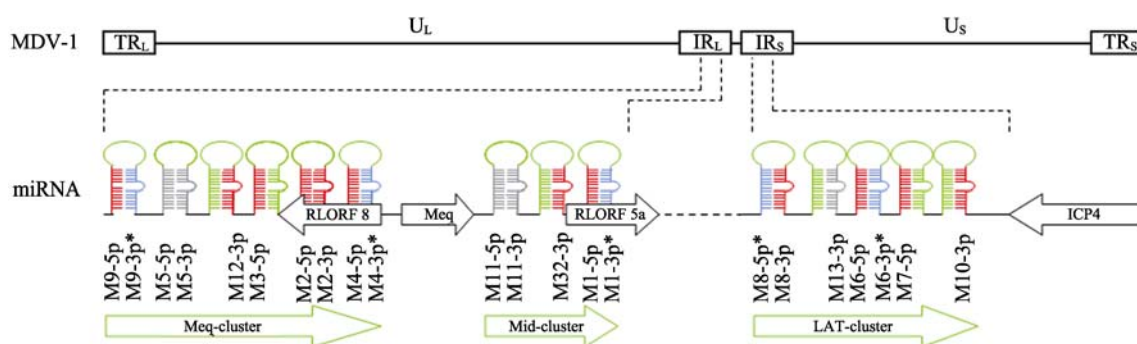


图 2 MDV-1 编码的 miRNA 体内表达模式图

miRNA 前体发夹结构中, 红色、蓝色和灰色分别示稳定表达的 miRNA 成熟体、miRNA 星号序列及未加工成熟的 miRNA

编码的绝大部分基因是不转录的, 但与病毒进化密切相关的反转重复序列区域却处于激活状态^[24-26]. 血清 I 型 MDV 编码的绝大部分 miRNA 位于病毒基因组的反转重复序列区域中, 而且在病毒诱发的宿主肿瘤及肿瘤细胞系中的表达量远高于 CEF 感染细胞, 这表明这些 miRNA 中的全部或部分分子可能在病毒诱导的肿瘤发生中发挥重要调控功能. 为了进一步研究 MDV 编码的全部 miRNA 分子的功能, 已经建立了 MDV 病毒基因 cDNA 序列及宿主基因 3' 端非编码序列数据库, 并利用相关生物学软件对部分 MDV-1 miRNA 潜在的靶基因进行了预测^[23]. 然而, 由于 miRNA 靶分子预测及鉴定的困难性, 绝大部分 MDV-1 miRNA 的调控功能尚不清楚.

有研究认为, 或许 Meq-cluster 内编码的 miRNA 在 MDV 致病性方面具有更重要的调控作用, 因为该基因簇的绝大部分 miRNA 在毒力更强的 MDV 毒株诱导的肿瘤中表达量更高^[23]. 事实上, 位于同一基因簇内的 miRNA 尽管由同一初级转录本剪切加工而成, 但它们的表达丰度却存在着显著差异^[16], 因此它们的功能可能要比想象的更加复杂. 在所有已研究过的肿瘤细胞系及实质肿瘤中, MDV1-miR-M4-5p 是表达量最高的 MDV-1 miRNA 之一. 最近研究证实, MDV1-miR-M4-5p 是 miR-155 的同功分子, 调控淋巴细胞特异性转录因子 *Pu.1* 的表达^[19], 可能在恶性淋巴瘤发生及免疫调节方面具有重要作用. 体内动态表达谱表明, 除了 MDV1-miR-M4-5p 在感染早期(18 dpi)即开始大量表达外, MDV1-miR-M3-5p, MDV1-miR-M12-3p 以及位于 LAT-cluster 中的 MDV1-miR-M7-5p 和 MDV1-miR-M8-3p 都具有相似的表达规律, 并且表达量更高, 它们是否与 MDV1-miR-M4-5p 具有相似的功能尚不清楚. 而其他一些晚期表达的 miRNA(如 MDV1-miR-M2-5p, MDV1-miR-M2-3p, MDV1-miR-M6-5p, MDV1-miR-M9-5p, MDV1-miR-M10-3p 及 MDV1-miR-M32-3p)与早期表达的 miRNA 具有明显不同的表达时序性, 因此基本可以排除同一基因簇内编码的 miRNA 具有相似功能的可能性.

作为 Mid-cluster 中的一员, MDV1-miR-M1-5p 位于 MDV L1/RLORF5a 的可读框中, 而且其表达与 L1/RLORF5a 相似, 因此 MDV1-miR-M1-5p 很有可能是该转录物剪切加工而成. 但值得注意的是敲除 L1/RLORF5a 并不影响病毒的复制、潜伏感染及致癌性^[27,28], 因此有学者认为, MDV1-miR-M1-5p 可能不

是上述这些功能所必需的^[14]. 对 MDV1-miR-M1-5p 在体内的动态表达分析亦显示, 尽管在感染后 30 天即可检测到低水平表达, 但在整个致病及致癌过程中它是早期表达 miRNA 中表达水平最低的. 先前发现, 在肿瘤细胞系 MSB-1 中, MDV1-miR-M11 表达量极低, 而本研究组在宿主体内却没有检测到成熟体的动态表达, 表明它可能并不具备重要的生物学功能. 有意思的是, 作为 Mid-cluster 的另一个成员, 体内表达谱发现 MDV1-miR-M32-3p 只在肿瘤发生期表达, 其表达量与 MDV1-miR-M1-5p 相当, 且是晚期表达 miRNA 中表达丰度最低的一个. 利用生物信息学分析发现, MDV1-miR-M32-3p 与宿主 miRNA miR-221 可能具有保守的功能, 调控宿主蛋白 p27Kip1 的表达^[23], 该蛋白是细胞周期的关键抑制因子, 该蛋白的下调表达可促进肿瘤细胞的生长及增殖^[29,30].

LAT-cluster 内编码的 MDV-1 miRNA 可能由一个长约 10 kb, 与病毒潜伏感染相关转录物转录加工成熟, 这些转录物在病毒潜伏感染的后期^[31]、肿瘤转化细胞系及实体肿瘤内大量表达^[32,33]. 从转录方向看, 该基因簇的 miRNA 可能是 MDV ICP4 的反义 RNA^[23], 由于 ICP4 转录本尚未测通, 这些 miRNA 是否调控该基因的蛋白表达尚难以确定. 此外, 体内动态表达谱显示该基因簇内 miRNA 的表达也存在显著差异, 其中 MDV1-miR-M7-5p 和 MDV1-miR-M8-3p 表达丰度最高, 在感染后 30 天即可检测到大量表达, 而其他一些分子如 MDV1-miR-M6-5p 和 MDV1-miR-M10-3p 只能在肿瘤发生阶段检测到较低水平的表达, 它们在融细胞性感染、潜伏感染及诱发肿瘤过程中是否具有不同的功能仍需进一步研究.

6 展望

作为疱疹病毒甲亚科的重要成员, MDV 感染可以诱发其自然宿主产生肿瘤, 并且肿瘤的发生可以用 HVT 或致弱的、非致病性的 MDV-1 毒株制备疫苗进行有效的免疫预防, 这是世界上首个用疫苗来预防致癌性病毒引发癌症的成功例子. 因此, MDV 感染对于研究肿瘤发生和发展的生物学、遗传学及免疫学等都提供了极佳的动物模型^[22]. 尽管已发现大量的疱疹病毒 miRNA 在融细胞性复制、潜伏感染、以及肿瘤发生中表达, 但只有极少数的一些分子的靶基因得以被确定, 研究它们的生物学功能仍极其艰

巨^[9]。然而, 目前 miRNA 靶基因预测、筛选及鉴定技术已日趋成熟, 对部分 MDV-1 病毒 miRNA 的靶基因也已进行了预测(<http://mdvmicrona.dbi.udel.edu>)^[23], 尤其是细菌人工染色体技术(bacterial artificial chromosome, BAC)及 Rec E/T 同源重组技术在研究疱疹病毒基因功能方面的成功应用, 或许为揭示 MDV miRNA 的功能提供了可能。利用细菌人工染色体技术, 多个 MDV 毒株如 RB1B, CVI988, HVT, GX0101 等已被成

功拯救成传染性克隆, 并在 MDV 疫苗及分子致病机制研究中发挥了重要作用^[34-37]。在 MDV 传染性 BAC 克隆的基础上, 利用 Rec E/T 同源重组技术构建 miRNA 单基因或单基因簇敲除的毒株, 可为进一步研究 miRNA 基因缺失对 MDV 的复制、致病性、致癌性等致病表型的影响及其分子调控机制奠定良好的基础。MDV miRNA 调控功能的阐明, 将可能为人们最终了解肿瘤的发生发展机制提供重要线索。

参考文献

- 1 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281—297
- 2 Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 102—114
- 3 Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843—854
- 4 Wightman B, Ha I, Ruvkun G, et al. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75: 855—862
- 5 Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucl Acids Res*, 2004, 32: D109—D111
- 6 Fabbri M, Garzon R, Andreaff M, et al. MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. *Leukemia*, 2008, 22: 1095—1105
- 7 Lee Y S, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4: 199—227
- 8 Sullivan C S, Ganem D. MicroRNAs and viral infection. *Mol Cell*, 2005, 20: 3—7
- 9 Boss I W, Plaisance K B, Renne R. Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology. *Trends Microbiol*, 2009, 17: 544—553
- 10 Witter R L, Schat K. Marek's Disease. In: Saif Y M, ed. *Diseases of Poultry*, 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. 407—464
- 11 Marek J. Multiple Nervenentzündung (polyneuritis) bei Hühnern. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 1907, 15: 417—421
- 12 Lupiani B, Lee L F, Cui X, et al. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 11815—11820
- 13 Nair V, Kung H J. Marek's disease virus oncogenicity: molecular mechanisms. In: Davison F N, ed. *Marek's Disease, an Evolving Problem*. Oxford: Elsevier Academic Press, 2004. 32—48
- 14 Burnside J, Bernberg E, Anderson A, et al. Marek's disease virus encodes microRNAs that map to meq and the latency-associated transcript. *J Virol*, 2006, 80: 8778—8786
- 15 Yao Y, Zhao Y, Xu H, et al. Marek's disease virus type 2 (MDV-2)-encoded microRNAs show no sequence conservation with those encoded by MDV-1. *J Virol*, 2007, 81: 7164—7170
- 16 Yao Y, Zhao Y, Xu H, et al. MicroRNA profile of Marek's disease virus-transformed T-cell line MSB-1: predominance of virus-encoded microRNAs. *J Virol*, 2008, 82: 4007—4015
- 17 Waidner L A, Morgan R W, Anderson A S, et al. MicroRNAs of Gallid and Meleagrid herpesviruses show generally conserved genomic locations and are virus-specific. *Virology*, 2009, 388: 128—136
- 18 Yao Y, Zhao Y, Smith L P, et al. Novel microRNAs (miRNAs) encoded by herpesvirus of turkeys: evidence of miRNA evolution by duplication. *J Virol*, 2009, 83: 6969—6973
- 19 Zhao Y, Yao Y, Xu H, et al. A functional MicroRNA-155 ortholog encoded by the oncogenic Marek's disease virus. *J Virol*, 2009, 83: 489—492
- 20 Lambeth L S, Yao Y, Smith L P, et al. MicroRNAs 221 and 222 target p27Kip1 in Marek's disease virus-transformed tumour cell line MSB-1. *J Gen Virol*, 2009, 90: 1164—1171
- 21 Cebrian J, Kaschka-Dierich C, Berthelot N, et al. Inverted repeat nucleotide sequences in the genomes of Marek's disease virus and the herpesvirus of the turkey. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 555—558
- 22 Osterrieder N, Kamil J P, Schumacher D, et al. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 283—294

- 23 Morgan R, Anderson A, Bernberg E, et al. Sequence conservation and differential expression of Marek's disease virus microRNAs. *J Virol*, 2008, 82: 12213—12220
- 24 Jones D, Lee L, Liu J L, et al. Marek's disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4042—4046
- 25 Lee L F, Nazerian K, Boezi J A. Marek's disease virus DNA in a chicken lymphoblastoid cell line (MSB-1) and in virus-induced tumours. In: de Thé G, Epstein M A, Zur Hausen H, eds. *Oncogenesis and Herpesviruses II*. Lyon: IARC, 1975. 199—204
- 26 Sugaya K, Bradley G, Nonoyama M, et al. Latent transcripts of Marek's disease virus are clustered in the short and long repeat regions. *J Virol*, 1990, 64: 5773—5782
- 27 Jarosinski K W, Osterrieder N, Nair V K, et al. Attenuation of Marek's disease virus by deletion of open reading frame RLORF4 but not RLORF5a. *J Virol*, 2005, 79: 11647—11659
- 28 Schat K A, Hooft van Iddekinge B J L, Boerrigter H, et al. Open reading frame L1 of Marek's disease herpesvirus is not essential for *in vitro* and *in vivo* replication and establishment of latency. *J Gen Virol*, 1998, 79: 841—849
- 29 Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2008, 27: 5651—5661
- 30 Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*, 2007, 282: 23716—23724
- 31 Morgan R W, Xie Q, Cantello J L, et al. Marek's disease virus latency. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255: 223—243
- 32 Cantello J, Anderson A, Morgan R. Identification of latency-associated transcripts that map antisense to the ICP4 homolog gene of Marek's disease virus. *J Virol*, 1994, 68: 6280—6290
- 33 Cantello J, Parcells M, Anderson A, et al. Marek's disease virus latency-associated transcripts belong to a family of spliced RNAs that are antisense to the ICP4 homolog gene. *J Virol*, 1997, 71: 1353—1361
- 34 Schumacher D, Tischer B K, Fuchs W, et al. Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 Mutant. *J Virol*, 2000, 74: 11088—11098
- 35 Petherbridge L, Homes K, Baigent S J, et al. Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines. *J Virol*, 2003, 77: 8712—8718
- 36 Petherbridge L, Brown A C, Baigent S J, et al. Oncogenicity of virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes. *J Virol*, 2004, 78: 13376—13380
- 37 Sun A J, Petherbridge L, Zhao Y G, et al. A BAC clone of MDV strain GX0101 with REV-LTR integration retained its pathogenicity. *Chinese Sci Bull*, 2009, 54: 2641—2647