

张晓婷, 郑一青, 曾亦然, 等. 甲型流感病毒 A/WSN/1933 (H1N1) 感染 A549 细胞的 circRNA 表达谱分析与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 102-111.

ZHANG X T, ZHENG Y Q, ZENG Y R, et al. Expression profiling analysis and characterization of circRNA in A549 cells infected by influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1) [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 102-111.

甲型流感病毒 A/WSN/1933 (H1N1) 感染 A549 细胞的 circRNA 表达谱分析与鉴定

张晓婷, 郑一青, 曾亦然, 常丽凤, 陈纳, 卢渊录, 罗皓炜, 高紫荷, 平继辉*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 环状 RNA (circRNA) 已被证明在众多生物过程中起着重要的调控作用, 而 circRNA 在甲型流感病毒 (IAV) 复制过程中的功能尚不清楚。本研究旨在利用高通量测序分析 IAV 感染 A549 细胞后的 circRNA 表达谱变化来挖掘能够影响病毒复制的 circRNAs 并对其初步功能鉴定。利用测序结果, 对全部 circRNAs 进行特征分析、差异表达筛选; 对差异 circRNAs 进行 GO 分析、KEGG 分析; 对候选 circRNAs 进行 qPCR、RT-PCR 验证及 Sanger 测序鉴定, 并通过空斑试验确定影响病毒复制的 circRNAs。结果: 本试验共筛选到 11 630 条差异表达 circRNAs, 对其中 6 条 circRNA 进行了鉴定, 最终确定 novel_circ_007428 具有抗病毒作用。本研究对甲型流感病毒感染 A549 细胞后的 circRNA 表达谱进行了分析与鉴定, 为进一步研究 circRNA 在流感病毒感染中发挥的调控作用奠定了基础。

关键词: 环状 RNA; 甲型流感病毒; 基因芯片测序; A549; 表达谱; novel_circ_007428

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)07-0102-10

Expression profiling analysis and characterization of circRNA in A549 cells infected by influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1)

ZHANG Xiaoting, ZHENG Yiqing, ZENG Yiran, CHANG Lifeng, CHEN Na,

LU Yuanlu, LUO Haowei, GAO Zihe, PING Jihui*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Circular RNA (circRNA) has been shown to play an important role in the regulation of various biological processes. However, the function of circRNA in influenza A virus (IAV) replication is unknown and remains to be investigated. Therefore, the aim of this study was to utilize high-throughput sequencing to analyze the changes in circRNA expression profiles in A549 cells infected by IAV to find the circRNAs that can affect the viral replication. All circRNAs obtained by RNA sequencing were characterized, and were screened for differentially expressed circRNAs. The differentially expressed circRNAs were analyzed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Candidate circRNAs were selected for qPCR, RT-PCR validation and Sanger sequencing validation, and circRNAs affecting viral replication were identified by knockdown experiments. The results showed that a total of 11 630 candidate circRNAs were screened out; six of the circRNAs were experimentally confirmed to be correctly formed into circular RNAs; and novel_circ_007428 was confirmed to have antiviral effects. In conclusion, this study analyzed and characterized the circRNA expression profile in A549 cells infected by IAV, which provided a basis for further research on the molecular mechanisms of circRNAs in influenza virus infection.

Keywords: circRNA; influenza A virus; gene chip sequencing; A549; expression profile; novel_circ_007428

流感病毒属于正黏病毒科, 是单股、负链且分节段的 RNA 病毒, 可以分为甲、乙、丙、丁 4 个型,

是引起人类和动物呼吸道疾病的主要病原之一。甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 是最主要的人畜共患病病原之一, IAV 根据其表面 (HA 和 NA) 结构及其基因特性的不同又分为 18 个 HA 亚型和 11 个 NA 亚型, 其中 H1N1 和 H3N2 在人群中传播最为广泛, 能够引起季节性流行, 造成较高死亡率, 带来巨大经济损失^[1]。多年来人们在流感病毒致病力、疫苗开发、宿主蛋白与病毒互作中投入了许多精力, 但

收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-04-20

基金项目: “十四五”国家重点研发计划 (2021YFD1800205)

第一作者: 张晓婷, 女, 硕士研究生

*通信作者: 平继辉, 教授, 博士生导师, 主要从事流感病毒的遗传进化, 抗原变异机制、致病机理等方面的研究, E-mail: jihui.ping@njau.edu.cn.

由于流感病毒的易突变性和病毒宿主谱的广泛性给防控工作带来了巨大挑战^[1-3]。

1976年,环状RNA(circRNA)首次发现于电镜观察的植物类病毒中^[4]。起初circRNA只被认为是基因错误剪切的产物,但随着高通量测序技术、微阵列技术等RNA测序技术的出现和生物信息学分析的成熟,人们逐渐发现circRNAs是一大类具有调控作用的动物RNA分子,并且可以作为microRNA海绵发挥作用^[5-6]。在随后的研究中,circRNA被发现在各类细胞代谢、生物调控、先天免疫等生物过程中发挥重要作用^[7-8],可以作为一些疾病预测或诊断的潜在生物标志物,如癌症、神经系统疾病和自身免疫性疾病等^[9-11],并且由于其稳定性,极有潜力成为新型疫苗进而推广应用^[12]。

迄今为止,已有许多研究发现circRNA在调控宿主抗病毒免疫应答中发挥重要作用。circ-ATP5H通过调控miR-138-5p/TNFAIP3轴诱导乙型肝炎病毒的复制和表达^[13];乙型肝炎病毒编码的circRNA HBV_circ_1通过与CDK1相互作用介导肝细胞癌^[14];circMORC3编码的新型蛋白通过与宿主基因MORC3协同作用负调节抗病毒免疫^[15]。circRNAs同样能够影响流感病毒复制,如circRNA_0050463、circMerTK和circRNA GATAD2A可以促进IAV的复制^[16-18],而circVAMP3、circAIVR则具有抗病毒的作用^[19-20]。关于circRNAs在流感病毒感染过程中的产生、异常调控、生物学功能及其具体机制还未被完全阐明,因此有必要深入探究circRNA与流感病毒间的作用关系,这不仅可以为挖掘circRNA成为鉴定流感病毒的潜在生物标志物奠定理论基础,也为抗流感病毒药物的研发提供新思路。

本研究对A/WSN/1933(WSN,H1N1)流感病毒感染的人类非小细胞肺癌细胞(A549)进行了全转录组测序,分析了流感病毒感染对A549细胞circRNA表达谱的影响,并通过生物信息学分析初步筛选并鉴定了在流感病毒感染过程中影响流感病毒复制且存在潜在功能的circRNA,为circRNA调控流感病毒致病机制的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RNA isolater Total RNA Extraction Reagent, AceQ qPCR SYBR Green Master Mix、T4 DNA Ligase、HiS-crypt II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)和TRIzol试剂均购自Vazyme公司;LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司;4-2-羟乙基-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)购自AVT公司;低熔点琼脂糖购自

Lonza公司;胰蛋白酶购自Hyclone公司;DMEM高糖培养基和Opti-MEM购自Gibco公司;T载体购自TaKaRa公司;胎牛血清(FBS)购自Sbjbio公司。

1.2 细胞与病毒

犬肾细胞(MDCK)、A549均由本实验室保存,用含有10% FBS血清、0.2% NaHCO₃、100 μg/mL链霉素和100 U/mL青霉素的DMEM培养基于37℃、5% CO₂培养箱中培养;A/WSN/1933(WSN,H1N1)由本实验室保存,通过细胞增殖法获得。

1.3 测序样品制备

A549细胞接种到大皿中,密度在100%左右时以感染比(MOI)=3感染WSN病毒,37℃吸附1h后弃去病毒液,加入含有0.4~0.5 μg/mL TPCK胰酶、0.3% BSA以及25 nmol/L HEPES的DMEM培养基继续培养12h;对照组不感染病毒,其余操作相同。感染组(WSN)和对照组(MOCK)各3个生物学重复。

1.4 circRNA 转录组测序

将WSN和MOCK组的A549细胞样品使用TRIzol试剂盒中提取总RNA,并使用无RNase琼脂糖凝胶电泳进行检查。去除rRNA后,总富集RNA的一半用于circRNA和mRNA文库构建,另一半通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行大小选择,富集18~30 nt的RNA用于构建小RNA文库。筛选测序得到的reads以获得clean reads,使用short reads比对工具Bowtie2将clean reads比对到rRNA数据库以去除能比对的reads片段^[21]。将剩下的reads使用HISAT2(2.1.1版本)与参考基因组比对^[22]。

结合find_circ给出的circRNAs的信息和参考基因组的转录组注释对鉴定到的circRNAs进行类型判定^[5]。能比对到circBase则定义为已存在的circRNAs,反之则为新型circRNAs^[23]。筛选 $P < 0.05$ 且 $\log_2[FC] > 1$ 的circRNAs为显著差异circRNAs(FC为差异倍数)。对这些显著差异的circRNAs进行GO和KEGG分析。以上工作由广州基迪奥有限公司完成。

1.5 差异 circRNAs 的验证

从显著差异的circRNAs中分别随机挑选上调或下调各3条circRNAs进行qPCR验证。以总RNA为模板,使用随机引物反转录得到cDNA,然后以cDNA为模板,使用跨接头引物扩增circRNAs,2^{-ΔΔCt}法计算表达差异。

另外,分别以cDNA和gDNA为模板,使用跨接头(divergent)和会聚(convergent)引物进行PCR,PCR产物胶回收后连接到T载体,送上海生工公司Sanger测序,鉴定circRNAs的反向剪切位点。引物

由通用生物系统（安徽）公司合成，引物序列信息见表 1。

表 1 部分差异 circRNAs 验证的相关引物

引物名称	序列 (5'→3')
GAPDH-divergent-F	GAAACTGTGGCGTGATGGC
GAPDH-divergent-R	CCTCCACGATACCAAAGTTGT
GAPDH-convergent-F	ACAACITTTGGTATCGTGGAAGG
GAPDH-convergent-R	GCCATCACGCCACAGTTTC
novel_circ_001572-divergent-F	GCCTACAGGAGTATGATGCAAGGTC
novel_circ_001572-divergent-R	CACCCATAACCAGCTTCTTTGGC
novel_circ_001572-convergent-F	CACAGCAAGCTGCCGATAAG
novel_circ_001572-convergent-R	TTGAGGCTGGCTGGCTCAAAG
novel_circ_004511-divergent-F	CTCACTAGGCTCATCGACTTCT
novel_circ_004511-divergent-R	CTGTACCAAAGGATCGAACAAACAC
novel_circ_004511-convergent-F	TTCGATCCTTTGGTACAGAAG
novel_circ_004511-convergent-R	ACTGTACTCCAACGACTCTG
novel_circ_007428-divergent-F	GACGAAAATGAAGAAATTCAGGTA
novel_circ_007428-divergent-R	TGATGGTTCACGGTGCT
novel_circ_007428-convergent-F	TCCAACCGATGAACCCACCACC
novel_circ_007428-convergent-R	GTATTAGCAGCAACGTTGATTGG
novel_circ_009534-divergent-F	CTATGAGGAAGGCTGGCTGG
novel_circ_009534-divergent-R	GCCCTGGAGTCTTACAAATCTCG
novel_circ_009534-convergent-F	AAGCAGACGCTTCGTATGGC
novel_circ_009534-convergent-R	CTCTCAAGTGTGCACAAGAATG
novel_circ_009707-divergent-F	TAATGTGGTTGCGTGAGAG
novel_circ_009707-divergent-R	GGTCTAACAGTGTAACCTTTGTC
novel_circ_009707-convergent-F	TAATGTGGTTGCGTGAGAG
novel_circ_009707-convergent-R	CTTGTCTTGGTTATCTTTATTC
novel_circ_011503-divergent-F	CTACTGCAATGGCCATGCTTG
novel_circ_011503-divergent-R	CACCTGTGCACAGGTTAGCAC
novel_circ_011503-convergent-F	ACCTGTGACAAGTGTCCAGC
novel_circ_011503-convergent-R	TGGCTGACTACAGTCATGGC

1.6 siRNA 转染

抑制 circRNAs 表达的小干扰 RNA (siRNA) 序列由上海吉玛公司制备合成，引物序列信息见表 2。参照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书进行 siRNA 转染，通过荧光显微镜观察和 qPCR 检测转染效率。

1.7 病毒滴度测定

MDCK 细胞接种到 12 孔板中，当密度在 100% 左右时进行空斑试验。PBS 洗涤后，每孔分别加入 100 μL 用空白培养基 10 倍比稀释的病毒液，待病毒吸附 1 h 后弃去病毒液，PBS 洗涤后加入 1 mL 终浓度 1.8% 的低熔点琼脂糖溶液 (1 μg/mL TPCK 胰酶+2×DMEM+0.3% BSA)，待其凝固后倒置放入培养箱 36~48 h。用甲醛结晶紫溶液染色，读取空斑数并计算病毒滴度。

表 2 部分差异 circRNAs 的 siRNA 序列

引物名称	序列 (5'→3')
novel_circ_001572-Si-1	GAGUAUGAUGCAAGGUCCUTT
novel_circ_001572-Si-2	GAUGCAAGGUCCUGGCUAUTT
novel_circ_004511-Si-1	CUGUUGGUGUUGUUCGAUUCTT
novel_circ_004511-Si-2	GUUGGUGUUGUUCGAUCCUTT
novel_circ_007428-Si-1	GAAGAAAUUCAGGUAUCCCTT
novel_circ_007428-Si-2	AGAAAUUCAGGUAUCCCTT
novel_circ_009534-Si-1	GCCACAUAAGCGAGAUUUGTT
novel_circ_009534-Si-2	AUAGCGAGAUUUGUAAGACTT
novel_circ_009707-Si-1	AUAACCAAGACAAGAGUUUATT
novel_circ_009707-Si-2	CCAAGACAAGAGUUACACUTT
novel_circ_011503-Si-1	GCAAUGGCCAUGCUUGGAUTT

1.8 数据统计与分析

试验组之间差异统计显著性使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件 Student's t 检验确定，数据以“平均数±标准误”表示， $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 测序数据统计

取任意 2 个样品中的表达量，计算彼此之间的皮尔森相关系数 (r)，由图 1 可见组内重复样本之间的重复性较好。数据下机后过滤掉接头序列和低质量原始序列，MOCK 组 (MOCK-1、MOCK-2、MOCK-3) 和 WSN 组 (WSN-1、WSN-2、WSN-3) 分别平均得到 101 608 891 和 96 211 403 条有效 Reads，6 个样本的 Q20 均大于 95%，Q30 均大于 89%，表明测序结果可信度高 (表 3)。MOCK 组和 WSN 组平均有 93.58% 和 64.13% 的有效 reads 线性比对到参考基因组，对无法线性比对到参考基因组的 anchors reads 进行环形鉴定，MOCK 组和 WSN 组平均得到 10 278 542 条和 30 390 423 条 circRNAs (表 3)。

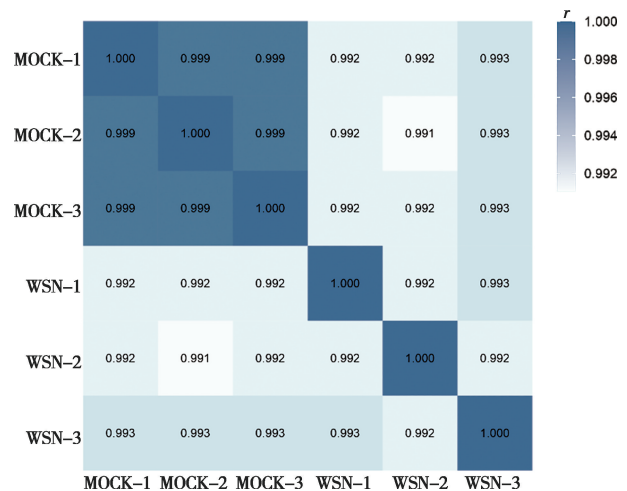


图 1 样本相关性热图

表 3 circRNA 的数据质控

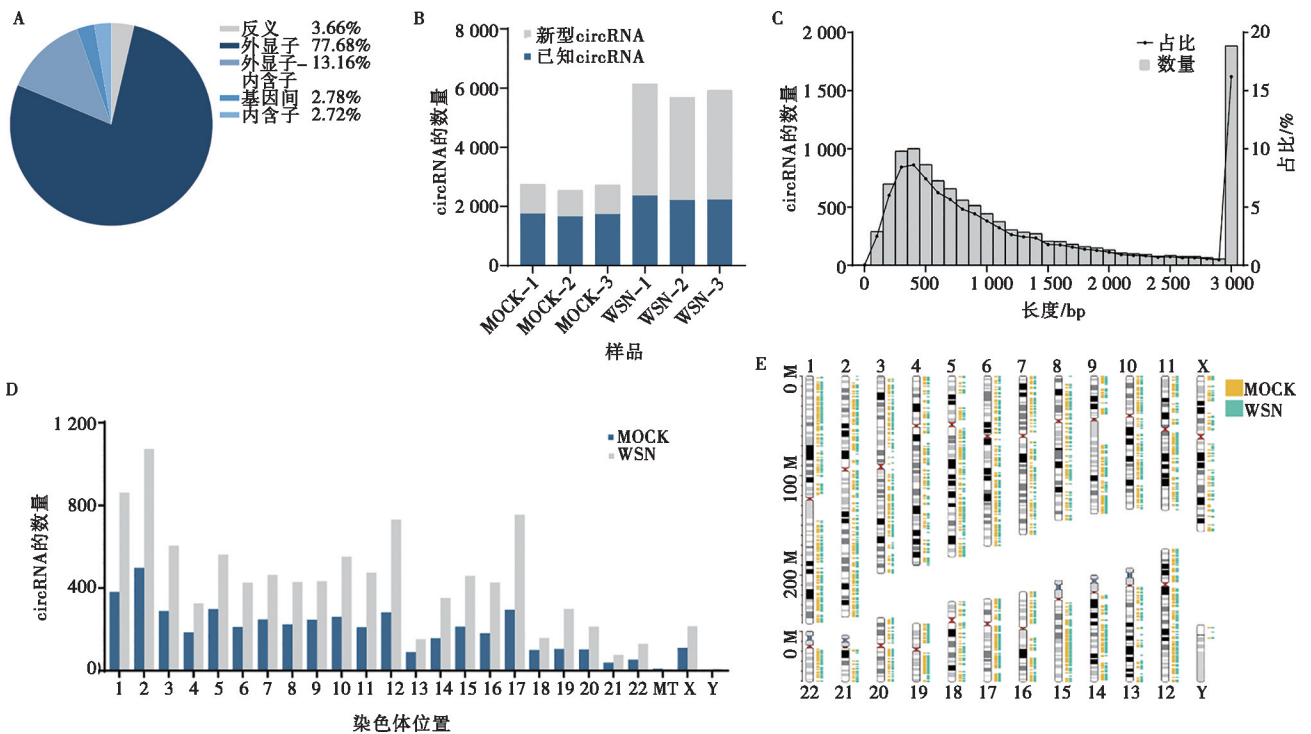
样品	raw reads	clean reads	AF_Q20/%	AF_Q30/%	mapped reads/%	anchors reads	total_mapped
MOCK-1	104 763 382	104 235 914	95.78	89.77	93.54	13 369 292	10 568 337
MOCK-2	91 906 202	91 507 614	96.00	90.13	93.86	11 161 192	8 894 442
MOCK-3	109 571 154	109 083 146	95.76	89.73	93.34	14 403 012	11 372 847
WSN-1	95 168 208	94 811 244	95.45	89.12	62.73	70 464 562	32 062 569
WSN-2	91 684 874	91 323 296	95.52	89.30	65.52	62 774 868	28 857 077
WSN-3	102 988 614	102 499 668	95.50	89.20	67.80	65 709 078	30 251 623

注: raw reads: 下机原始 reads 数目; clean reads: 高质量 reads 数目; AF_Q20 和 AF_Q30: 过滤后样本碱基质量值达到 Q20 和 Q30 以上水平占 Raw Data (或 Clean Data) 的百分比; mapped reads: 全部可以定位到基因组上的 reads 数量占有有效 reads 比例; anchors reads: 比对不上参考的 reads, 称为有效 reads; total_mapped: 全部可以定位到基因组上的 anchor reads 数量。

2.2 circRNA 的鉴定及特征分析

对于上述环状 RNA 的鉴定结果进行过滤得到高度可信的 circRNAs, 共预测到 11 630 个 circRNAs。其中, 3 930 个 (33.8%) 属于 circBase 数据库中已存在的 circRNAs, 7 700 个 (66.2%) 属于新预测的 circRNAs, MOCK 组和 WSN 组中已存在的 circRNAs 数量基本一致, 但 WSN 组新预测的 circRNAs 数量远大于 MOCK 组, 说明流感病毒感染 A549 细胞之后能够引起 circRNAs 的变化且存在许多可供研究的新 circRNAs (图 2B)。此外, circRNAs 按照其来源基因主要分为 5 个类型, 包括反义 (Antisense) 类型、外

显子 (Exonic) 类型、外显子-内含子 (Exon intron) 类型、基因间 (Intergenic) 类型和内含子 (Intronic) 类型。在所有 circRNAs 中, 来源于外显子的 circRNAs 最多, 占比 77.68%, 来源于内含子的 circRNAs 最少, 占比 2.72%, 剩余的 circRNAs 来源于外显子-内含子、反义和基因间, 分别占比 13.16%、3.66% 和 2.78% (图 2A)。这些 circRNAs 的长度主要集中在 100~2 000 bp (图 2C)。在各个染色体中均有分布, 其中 WSN 组在染色体 1、2、12 和 17 中分布较多 (图 2D、E)。



A. 所有 circRNAs 的基因来源; B. 各样品中 circRNAs 数量; C. 各样品 circRNAs 染色体数量分布; D. 所有 circRNAs 的长度分布; E. 各样品 circRNAs 染色体位置分布。

图 2 所有 circRNAs 的特征鉴定

2.3 circRNAs 的差异表达分析

使用 edgeR 软件对 circRNAs 表达量进行差异分析, 设置 circRNAs 的筛选阈值为: $|\log_2[FC]| > 1$, $P < 0.05$ 。如图 3 所示, 最终筛选出 794 个表达上调的 circRNAs, 313 个表达下调的 circRNAs。结果表明 IAV 感染能引起大量 circRNAs 的表达水平发生显著改变, 预示着极有可能存在对病毒复制发挥调控功能的 circRNA。

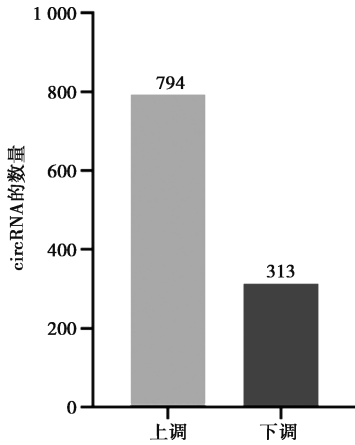


图 3 差异表达 circRNAs 的数量统计

2.4 差异 circRNAs 的 GO 富集分析

鉴于 circRNAs 的功能与其亲本基因密切相关, 我们对差异 circRNAs 的亲本基因进行了 GO 富集分析。图 4 显示, WSN 感染 A549 细胞后差异表达的 circRNAs 参与的生物过程主要是细胞过程 (cellular process)、代谢过程 (metabolic process)、生物调节 (biological regulation); 从细胞组分来看, 主要分布于细胞 (cell)、细胞器 (organelle)、细胞膜 (membrane); 分子功能主要包括结合 (binding) 和催化活性 (catalytic activity)。

2.5 差异 circRNAs 的 KEGG 通路分析

通过 Pathway 显著性富集能确定差异表达蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径, 因此我们对差异 circRNAs 的亲本基因进行了 KEGG 信号通路富集分析。取 q 值最小的前 20 个通路, 结果如图 5 所示, 差异 circRNAs 主要富集在泛素介导的蛋白水解 (ubiquitin mediated proteolysis)、丙型肝炎 (Hepatitis C)、赖氨酸降解 (lysine degradation) 和 RNA 转运 (RNA transport) 通路。

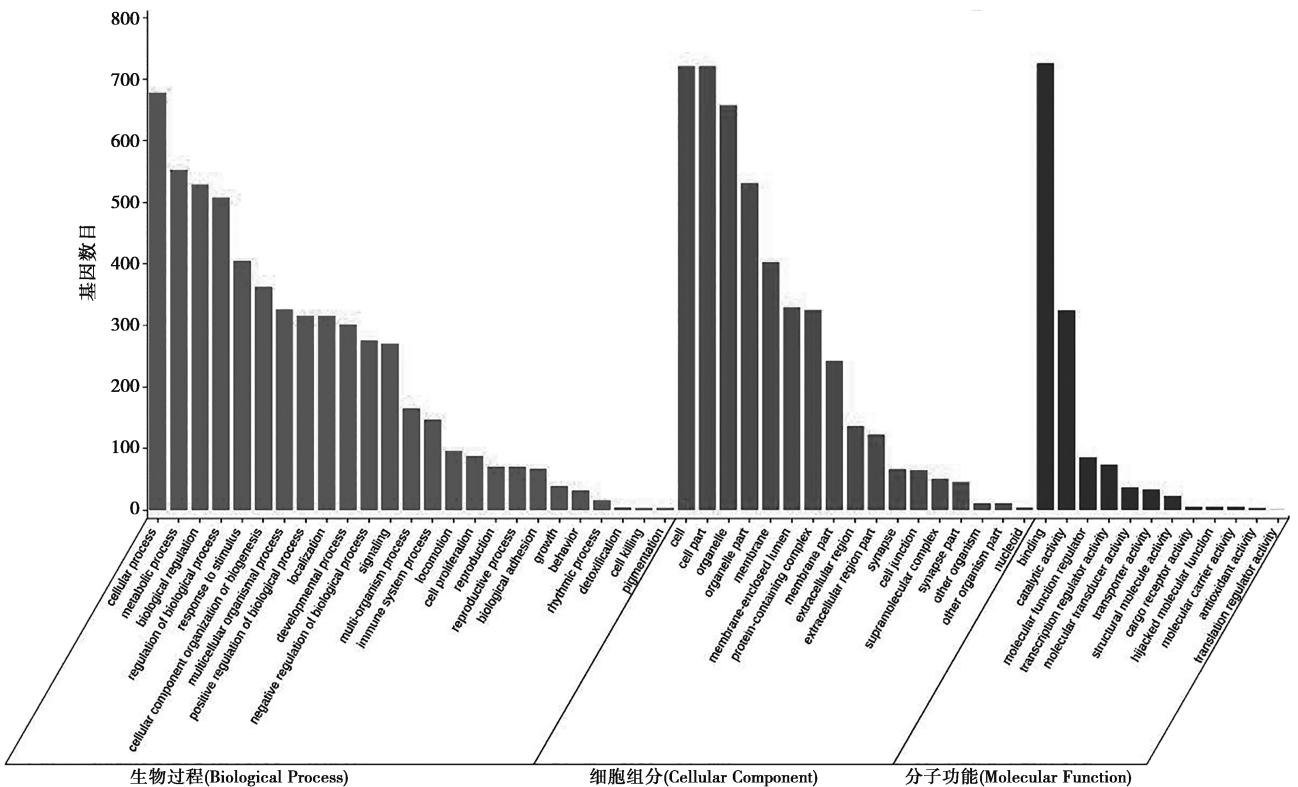


图 4 差异表达 circRNAs 的 GO 富集分类

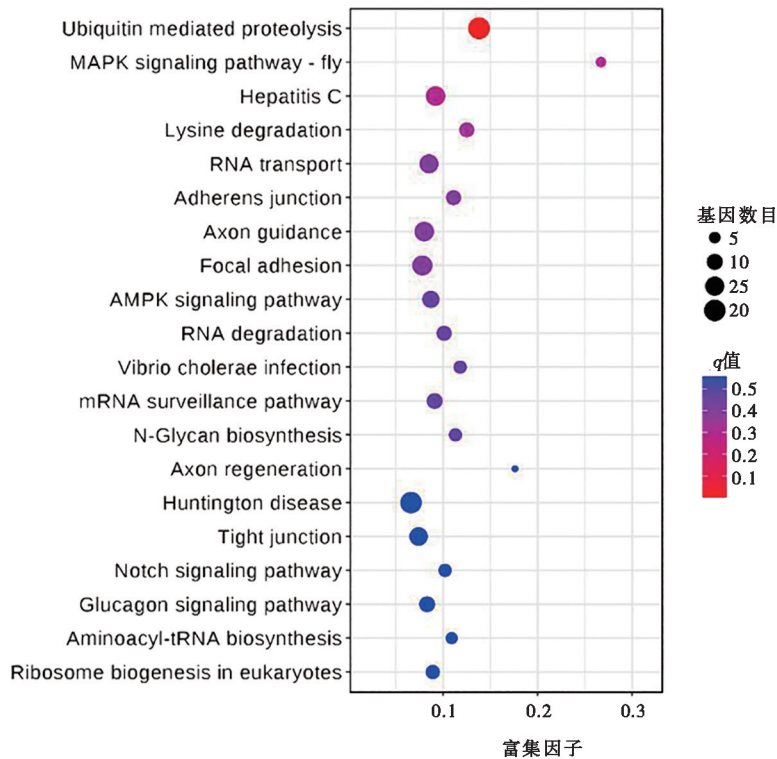


图5 差异表达 circRNAs 的 KEGG 富集

2.6 部分差异 circRNAs 的验证

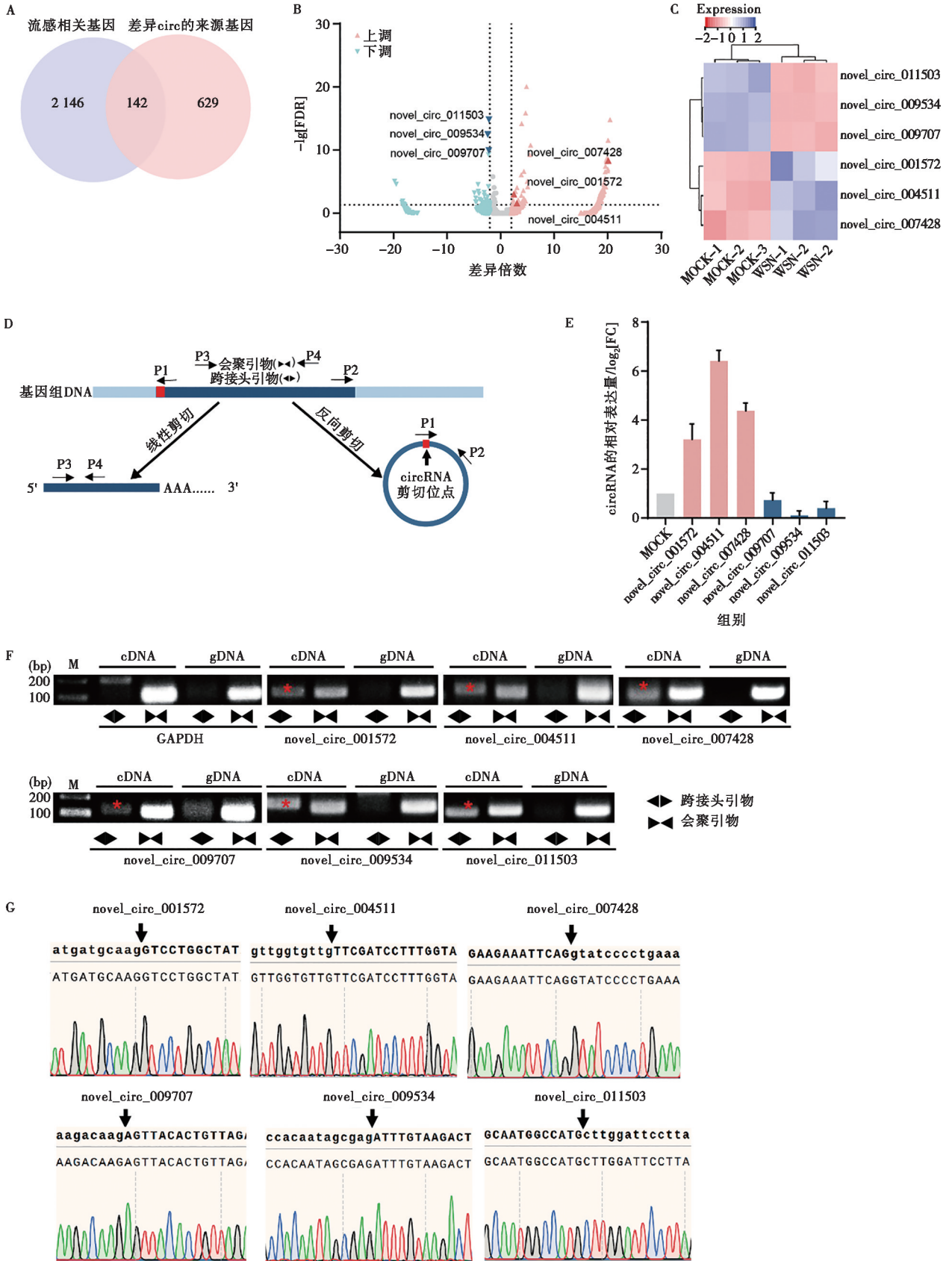
上述 GO 和 KEGG 的结果显示 circRNAs 参与众多生物调控的过程, 由图 6A 可知差异 circRNAs 的来源基因中有 18.4% 与流感相关基因相交 (<https://www.genecards.org/>), 为得到与流感病毒复制相关的 circRNAs 进一步严格筛选条件: $|\log_2[FC]| > 2$ 且 FDR (伪发现率) < 0.05 , 相对高表达且 3 个生物学重复中至少在 2 个样本中鉴定到的差异 circRNAs。从中随机挑选 3 条表达上调的 circRNAs (novel_circ_001572、novel_circ_004511、novel_circ_007428) 和 3 条表达下调的 circRNAs (novel_circ_009534、novel_circ_009707、novel_circ_011503) (图 6B、C)。根据图 6D 设计跨接头和会聚引物, 首先对这 6 条候选 circRNAs 进行测序结果验证, 结果表明 novel_circ_001572、novel_circ_004511 和 novel_circ_007428 表达上调, novel_circ_009534、novel_circ_009707 和 novel_circ_011503 表达下调, 与测序结果一致, 说明测序结果可信 (图 6E)。

为进一步明确这 6 条候选的 circRNAs 是否为环形 RNA, 分别以 A549 细胞的 cDNA 和 gDNA 为模板, 使用跨接头和会聚引物进行扩增, 其中跨接头引物扩增 circRNA 跨剪接点位置的序列, 而会聚引物则扩增剪接点之外的序列。结果表明, 使用会聚引物时, 在

cDNA 和 gDNA 中均能扩增出 circRNA 对应的线性转录本; 使用跨接头引物时, 只能在 cDNA 中扩增得到 circRNA 片段 (* 表示) (图 6F)。将跨接头引物扩增得到的 circRNA 片段产物胶回收后连接到 T 载体上, 送上海生工公司进行 Sanger 测序, 比对结果显示 6 条 circRNAs 的反向剪切位点均正确 (箭头表示) (图 6G)。表 4 可知, 除 novel_circ_009534 外, 其余 5 条 circRNAs 均为数据库 circBase 已收录的。

2.7 筛选对病毒复制有调控作用的 circRNA

上述结果表明所筛选的 6 条 circRNAs 均为环形 RNA 且能正确成环, 因此, 针对每个 circRNA 的反向剪切位点合成了 siRNA, 对 circRNA 进行敲低并验证其对病毒复制是否存在影响 (图 7A、表 2)。图 7B 显示 siRNA 的转染剂量为 50 nmol/L 时, 转染效率能达到理想状态。之后对合成的 siRNA 的沉默效率进行了验证, 除了 novel_circ_001572-si-2, 其余敲减效率均在 50% 以上 (图 7C)。挑选敲减效率较高的一条 siRNA 转染 A549 细胞, 24 h 后以 MOI=1 的 WSN 病毒感染细胞, 24 h 后收集细胞上清液通过空斑检测其病毒滴度, 如图 7D、E 所示, novel_circ_007428 在干扰后能增加病毒滴度, 约 1.92 倍, 其余 5 条 circRNAs 对病毒滴度无明显影响。

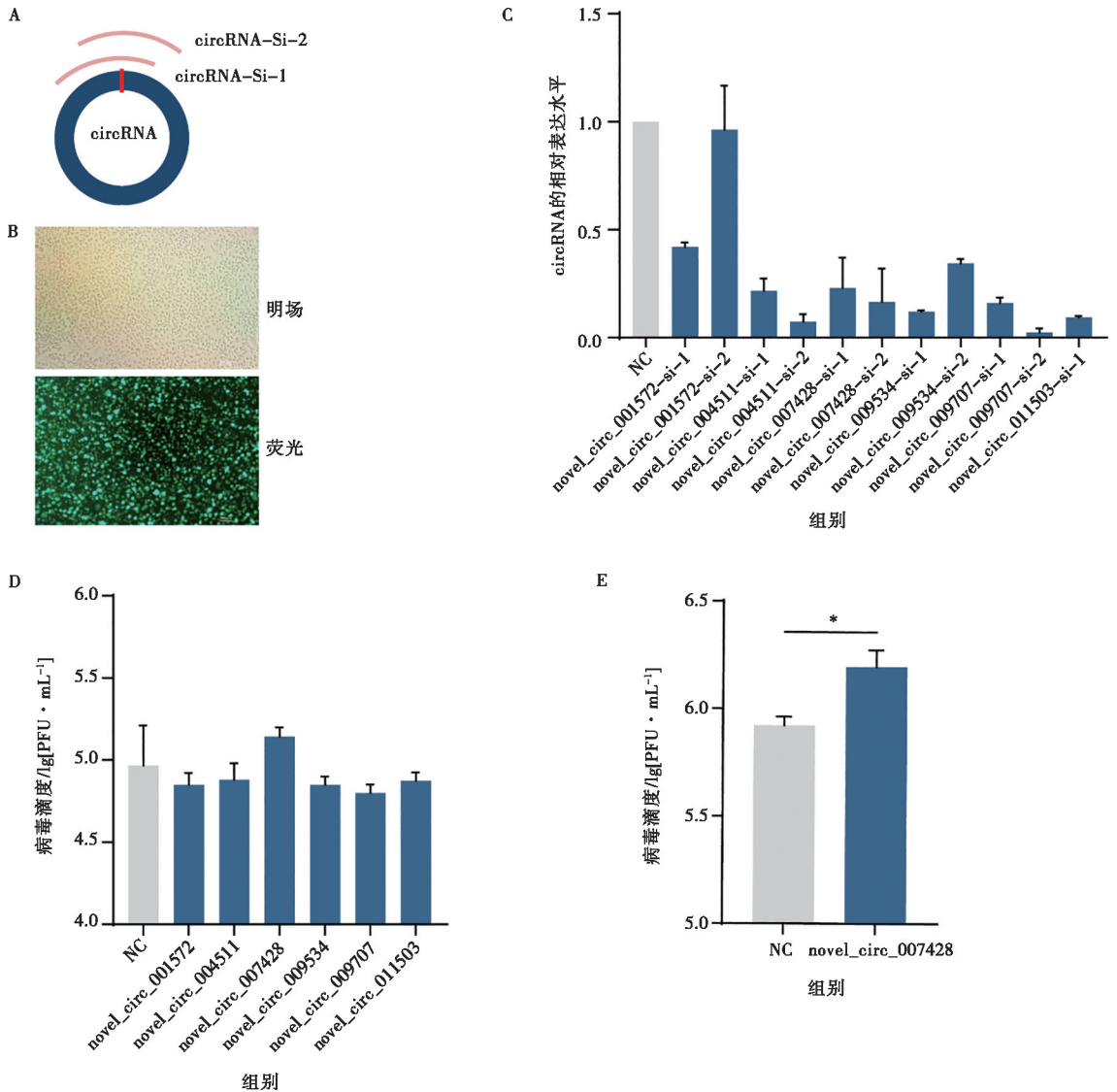


A. 差异 circRNAs 来源基因与流感相关基因 Venn 图; B. 部分 circRNAs 火山图; C. 部分 circRNAs 聚类热图; D. 会聚和跨接头引物设计模式图; E. 部分 circRNAs 的 qPCR 验证; F. 以 gDNA 和 cDNA 为模板，分别使用会聚和跨接头引物扩增的电泳图; G. circRNAs 反向剪切位点的 Sanger 测序结果 (箭头表示反向剪切位点)。

图 6 部分 circRNAs 差异表达验证和环状验证

表 4 部分差异表达 circRNAs

circRNA_id	circBase_id	log ₂ [FC]	FDR	染色体	长度/bp	类型	来源基因
novel_circ_001572	hsa_circ_0004470	3.03	0.03	22	509	annot_exons	MYH9
novel_circ_004511	hsa_circ_0006446	2.47	0.00	19	396	annot_exons	LSM14A
novel_circ_007428	hsa_circ_0102548	20.10	0.00	14	917	one_exon	ZFYVE1
novel_circ_009534	novel	-2.39	0.00	6	2218	one_exon	TULP4
novel_circ_009707	hsa_circ_001589	-2.18	0.00	22	557	annot_exons	ATXN10
novel_circ_011503	hsa_circ_001713	-2.20	0.00	6	1147	annot_exons	TNFRSF21



A. siRNAs 设计模式图; B. 转染效率验证; C. siRNAs 的干扰效率检测; D. circRNAs 干扰后对病毒复制的影响; E. novel_circ_007428 干扰后对病毒复制的影响, * 表示 $P < 0.05$ 。

图 7 筛选对病毒复制有调控作用的差异 circRNA

3 讨论

circRNA 是一大类广泛存在于细胞中的分子^[5], 本研究通过对 6 个样本中的 circRNAs 进行鉴定, 共

预测到 11 630 个 circRNAs, 其中 66.2% 属于新预测的 circRNAs, 来源于外显子的 circRNAs 最多, 占比 77.68%, 测序数据表明 circRNAs 表达水平在流感病毒感染后发生显著变化, 大多数环状 RNA 在 IAV 感

染中的生物遗传过程、潜在功能和潜在机制有待深入研究。GO 和 KEGG 分析显示差异表达的 circRNAs 分布广泛,参与众多的生物调控过程。其中富集最多的分子功能是 binding,而在流感病毒与 circRNA 的研究中,已有学者证明, circVAMP3 可以通过减少 NP 与 PB1、PB2 或 vRNA 的相互作用来干扰病毒核糖核蛋白复合物的活性,并通过减轻 NS1 对 RIG-I 或 TRIM25 的抑制作用来恢复干扰素 β (IFN- β) 的激活,从而抑制 IAV 的复制; circRNA_0050463 通过吸附 miR-33b-5p 调节 EEF1A1 促进 IAV 复制^[16]; 上调的 circAIVR 通过吸附降解 CREBBP 的 miR-330-3p 加速 IFN- β 的产生从而发挥其抗病毒的作用^[19]。这预示着我们将挖掘的差异 circRNA 中可能也存在着与 miRNA 或者 RNA 结合蛋白的结合情况,进而发挥抑制或促进病毒复制的作用。

对筛选 circRNA 进行验证及功能鉴定,结果表明 6 个候选 circRNAs 都能正确成环,但只有一条 circRNA 敲低后能增强病毒复制,猜想可能是有些 circRNA 的表达量较低,敲减后对于病毒复制的作用不明显,所以在后期的深入研究中我们将同时采取敲减和过表达的试验策略进行全面筛选。测序结果显示 novel_circ_007428 位于 14 号染色体上,为一个单一外显子剪切环化形成的 circRNA,长度为 917 bp。来源于单一外显子的 circRNAs 大量存在于真核细胞的细胞质中,而位于细胞质中的 circRNA 大多发挥着微小 RNA (miRNA) 分子海绵的功能^[6],许多 miRNA 已被证实与流感病毒复制相关,例如 miR-302a、miR-93 等^[24-25],所以 novel_circ_007428 也可能存在吸附某种 miRNA 发挥抗病毒作用的功能。novel_circ_007428 的母源基因为 ZFYVE1,该蛋白含有 2 个串联的锌结合 FYVE 结构域,GO 分析显示 ZFYVE1 参与宿主对病毒基因组复制的正调控,有文献报道 ZFYVE1 通过促进 TLR3 的配体结合,在 TLR3 介导的先天免疫和炎症反应中发挥重要作用^[26]; ZFYVE1 负向调节 MDA5 介导的先天抗病毒反应,但不负向调节 RIG-I 介导的先天抗病毒反应^[27]。而与先天免疫相关的 circRNA 也陆续被发现,如 IAV 感染后显著上调的 hsa_circ_0070421、hsa_circ_004389 均被证明是 I 型干扰素 (IFN) 相关抗病毒免疫应答的产物,能够抑制 IAV 的复制和增殖^[28-29]。circ_0082633 表达通过 IFN 刺激反应元件 (ISRE) 启动子活性和 Irfn1 的 mRNA 水平增强 I 型 IFN 信号的传导^[30]; circMerTK 可以通过影响 IFN- β 的产生及其下游信号传导从而抑制先天免疫信号通路上的抗病毒因子的产生从而增强 IAV 复制^[17]。此外,ZFYVE1 与细胞自噬密切相关^[31],且已有文献报道与自噬相关的环状

RNA GATAD2A 通过抑制自噬促进 H1N1 复制^[18],因此来源于 ZFYVE1 的 novel_circ_007428 极有可能通过先天免疫或自噬通路发挥抗病毒的作用,具有深入研究的意义。

目前研究表明, circRNA 参与调控宿主抗病毒天然免疫,但 circRNA 影响病毒-宿主相互作用的机制尚未阐明,人们对其认识仍极为有限。本研究发现大多数 circRNA 的表达水平在 IAV 感染后发生了显著变化,并对流感病毒复制有调控作用,因此 circRNA 在 IAV 感染中的生物遗传过程、潜在功能和潜在机制亟待研究。综上,本研究对 IAV 感染 A549 细胞后 circRNA 表达谱进行了分析与初步鉴定,为研究 circRNA 在调控 IAV 感染宿主过程中的作用提供了依据,为进一步研究 IAV 感染的分子机制奠定基础。

参考文献:

- [1] PETROVA V N, RUSSELL C A. The evolution of seasonal influenza viruses [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16 (1): 47-60.
- [2] JAVANIAN M, BARARY M, GHEBREHEWET S, et al. A brief review of influenza virus infection [J]. *Journal of Medical Virology*, 2021, 93 (8): 4638-4646.
- [3] TAUBENBERGER J K, KASH J C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation [J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 7 (6): 440-451.
- [4] SANGER H L, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1976, 73 (11): 3852-3856.
- [5] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495 (7441): 333-338.
- [6] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495 (7441): 384-388.
- [7] WANG M, YU F, WU W, et al. Circular RNAs: a novel type of non-coding RNA and their potential implications in antiviral immunity [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2017, 13 (12): 1497-1506.
- [8] HE L, ZHANG A, XIONG L, et al. Deep circular RNA sequencing provides insights into the mechanism underlying grass carp reovirus infection [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (9): 1977.
- [9] LI J, SUN D, PU W, et al. Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance [J]. *Trends In Cancer*, 2020, 6 (4): 319-336.
- [10] MEHTA S L, DEMPSEY R J, VEMUGANTI R. Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases [J]. *Progress in Neurobiology*, 2020, 186: 101746.

- [11] VERDUCI L, TARCITANO E, STRANO S, et al. CircRNAs: role in human diseases and potential use as biomarkers [J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12 (5): 468.
- [12] NIU D, WU YLIAN J. Circular RNA vaccine in disease prevention and treatment [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8 (1): 341.
- [13] JIANG W, WANG L, ZHANG Y, et al. Circ-ATP5H induces hepatitis B virus replication and expression by regulating miR-138-5p/*TNFAIP3* axis [J]. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 11031-11040.
- [14] ZHU M, LIANG Z, PAN J, et al. Hepatocellular carcinoma progression mediated by hepatitis B virus-encoded circRNA HBV_circ_1 through interaction with CDK1 [J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2021, 25: 668-682.
- [15] WANG L, ZHENG W, LV X, et al. circMORC3-encoded novel protein negatively regulates antiviral immunity through synergizing with host gene MORC3 [J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19 (12): e1011894.
- [16] SHI N, ZHANG S, GUO Y, et al. CircRNA_0050463 promotes influenza A virus replication by sponging miR-33b-5p to regulate *EEF1A1* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 254: 108995.
- [17] QIU H, YANG B, CHEN Y, et al. Influenza A virus-induced circRNA circMerTK negatively regulates innate antiviral responses [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11 (2): e0363722.
- [18] YU T, DING Y, ZHANG Y, et al. Circular RNA GATAD2A promotes H1N1 replication through inhibiting autophagy [J]. *Veterinary Microbiology*, 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- β production [J]. *Microbiology*, 2021, 12 (4): e0101721.
- [20] MIN J, LI Y, LI X, et al. The circRNA circVAMP3 restricts influenza A virus replication by interfering with NP and NS1 proteins [J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19 (8): e1011577.
- [21] LANGMEAD BSALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nature Methods*, 2012, 9 (4): 357-359.
- [22] KIM D, LANGMEAD BSALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, 12 (4): 357-360.
- [23] GLAŽAR P, PAPAVALSILEIOU P, RAJEWSKY N. circBase: a database for circular RNAs [J]. *RNA*, 2014, 20 (11): 1666-1670.
- [24] CHEN X, ZHOU L, PENG N, et al. MicroRNA-302a suppresses influenza A virus-stimulated interferon regulatory factor-5 expression and cytokine storm induction [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292 (52): 21291-21303.
- [25] GUO M, LI F, JI J, et al. Inhibition of miR-93 promotes interferon effector signaling to suppress influenza A infection by upregulating JAK1 [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 86: 106754.
- [26] ZHONG X, FENG L, XU W H, et al. The zinc-finger protein ZFYVE1 modulates TLR3-mediated signaling by facilitating TLR3 ligand binding [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 17 (7): 741-752.
- [27] ZHONG X, FENG L, ZANG R, et al. ZFYVE1 negatively regulates MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral response [J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16 (4): e1008457.
- [28] 张舒, 于小航, 张乐, 等. 环状 RNA hsa_circ_004389 对甲型流感病毒复制的影响 [J]. *广东农业科学*, 2022, 49 (2): 135-142.
- [29] 张玳宁, 于秀华, 张舒, 等. 环状 RNA hsa_circ_0070421 对甲型流感病毒复制的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41 (5): 6.
- [30] GUO Y, YU X, SU N, et al. Identification and characterization of circular RNAs in the A549 cells following influenza A virus infection [J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 267: 109390.
- [31] NÄHSE V, SCHINK K O, STENMARK H. ATPase-regulated autophagosome biogenesis [J]. *Autophagy*, 2024, 20 (1): 218-219.