

研究报告

## miR-34b 调控肠道病毒 71 型在人横纹肌肉瘤细胞中的复制及机制

杨倬<sup>1\*</sup> 田波<sup>2</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所 北京 100050)

(2. 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室 北京 100101)

**摘要:** 【背景】研究发现 microRNAs (miRNAs) 可以参与调控病毒在宿主细胞内感染和复制的过程。【目的】研究 miR-34b 对肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)在宿主细胞内的复制及其可能机制。【方法】在人横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma, RD)细胞中转染 miR-34b mimics 和 Inhibitor, 通过 Western blot 和 Real-time PCR 实验检验 EV71 病毒的复制和表达情况。随后利用双荧光素酶报告系统验证 miR-34b 与潜在靶点 eIF4E 的相互作用, 并检测 miR-34b 对 RD 细胞中 eIF4E mRNA 表达水平的影响。【结果】miR-34b 可以促进病毒在 RD 细胞中的复制和表达, 而 miR-34b 抑制剂有抑制病毒复制的作用, 细胞内 miR-34b 可以通过作用于靶基因 eIF4E 调控 EV71 在宿主细胞中的复制过程。【结论】揭示了 miR-34b 在 EV71 病毒复制过程中的调控作用及机制, 研究 EV71 病毒与宿主 miRNAs 的相互作用机制为进一步阐明 EV71 病毒感染与复制机理奠定了基础。

**关键词:** miR-34b, 肠道病毒 71 型, 人横纹肌肉瘤细胞, 病毒复制

## miR-34b regulates the replication of Enterovirus 71 in rhabdomyosarcoma cell

YANG Zhuo<sup>1\*</sup> TIAN Bo<sup>2</sup>

(1. National Institute of Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

(2. Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** [Background] MicroRNAs (miRNAs) play an important role in the process of infection and replication of virus in host cells. [Objective] In this study, we examined miR-34b effect on the replication of Enterovirus 71 in RD (rhabdomyosarcoma) cells. [Methods] Western blot and real-time PCR test were performed to investigate the effect of miRNAs on viral replication. Furthermore, dual-luciferase reporter assay was used to detect the interaction between miR-34b and potential target eIF4E, and the expression of eIF4E at mRNA levels was tested by real-time PCR. [Results] The study showed that miR-34b can stimulate the replication of EV71 virus. On the

\*Corresponding author: Tel: 86-10-66237243; E-mail: yangzhuo@ninh.chinacdc.cn

Received: May 24, 2018; Accepted: July 25, 2018; Published online: September 11, 2018

\*通信作者: Tel: 86-10-66237243; E-mail: yangzhuo@ninh.chinacdc.cn

收稿日期: 2018-05-24; 接受日期: 2018-07-25; 网络首发日期: 2018-09-11

contrary, miR-34b inhibitor can suppress EV71 virus replication. Cellular miR-34b can regulate the replication of EV71 virus through binding to eIF4E in host cells. **[Conclusion]** Our paper should report the role of miR-34b in this regulation for the first time. Our findings support the notion that the cellular miRNAs play an important role in the host and virus infection.

**Keywords:** miR-34b, Enterovirus 71, RD cell, Virus replication

手足口病(Hand, foot and mouth disease, HFMD)是由多种肠道病毒引起的,以婴幼儿发病为主的常见传染病。肠道病毒是引发食源性疾病的主要病因,主要经食物、水和环境进行传播。肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71) 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 肠道病毒属 (Enterovirus, EV), 是一类常见的经呼吸道和消化道感染人体的病毒,是手足口病的主要病原体<sup>[1-5]</sup>。近年来,肠道病毒感染呈现常年流行的态势。在中国,手足口病已经成为常见的儿童感染疾病,并且成为一个重要的公共健康问题。儿童感染 EV71 可引起发热、口腔黏膜溃疡性疱疹和四肢末端水疱样皮疹,还可引起脑炎、无菌性脑膜炎、急性迟缓性麻痹等严重的神经系统并发症,严重者可能致残或致死<sup>[6-9]</sup>。因此,认识 EV71 的致病机制,寻找新的治疗方法迫在眉睫。

miRNAs 是近几年分子生物学研究方面的热点,它是一类长度大约为 19–25 个核苷酸的单链非编码小分子 RNA,通过抑制靶基因 mRNA 的翻译过程或者降解靶基因的 mRNA 分子,介导转录后基因表达的调控过程<sup>[10]</sup>。研究表明,miRNAs 不但可以参与调控细胞中如细胞增殖、凋亡、分化等一系列的生理过程<sup>[11-12]</sup>,还可以参与调控病毒在宿主细胞内复制的过程<sup>[13-14]</sup>。miRNAs 可能是控制哺乳动物细胞病毒感染的关键因素。

前期研究利用 miRNA 芯片筛选出了 EV71 感染人横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma, RD)细胞的差异表达 miRNAs,本实验在此基础上,挑选表达差异显著的 miR-34b 进行深入研究。近年来研究证明,miR-34b 与病毒如乙肝病毒(HBV)、禽类白血病病毒(ALV)、呼吸道合胞病毒(RSV)等感染的发生发展有重要关系<sup>[15-17]</sup>。本实验针对宿主细胞内 miR-34b 是否参与 EV71 病毒在细胞内的复制,利用过表达和

干预技术研究 miR-34b 对 EV71 复制的影响,双荧光素酶报告实验研究 miR-34b 与靶基因真核细胞翻译起始因子 4E (eIF4E)的相互作用,探讨 miR-34b 影响 EV71 复制的可能机制。本文首次报道 miR-34b 对 EV71 病毒在 RD 细胞内复制的调控作用,为 miRNAs 参与调节 EV71 病毒复制的相关研究提供了有价值的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒、质粒和细胞株

EV71 Hubei-09 株由武汉大学提供;人横纹肌肉瘤细胞(Rhabdomyosarcoma, RD)为本实验室保存;pMIR 和 pRL-CMV 荧光素酶报告载体由本实验室保存。

#### 1.1.2 miRNAs 的合成

miR-34b mimics/inhibitor 和 miR-RiboTM mimics/inhibitor negative control 由广州锐博生物有限公司进行合成。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

核酸限制性内切酶 *Spe* I、*Hind* III 和 T4 DNA 连接酶及 Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;鼠源 EV71 单克隆抗体(MAB979)购自 Millipore 公司; $\beta$ -actin 及辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中山金桥公司;反转录、Real-time PCR、双荧光检测试剂盒购自 Promega 公司;RNA 提取 Trizol 试剂和转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;DMEM 和胎牛血清(FBS)购自 Gibco BRL 公司。蛋白电泳仪、PCR 仪及酶标仪购自 Bio-Rad 公司;Real-time PCR 仪购自 ABI 公司。

### 1.2 miR-34b 在 RD 细胞中的表达检测

按照每孔 10  $\mu$ L TCID<sub>50</sub> 为  $1 \times 10^9$  将 EV71 病毒接种于 12 孔板培养的 RD 细胞,感染病毒 24 h 后

用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 使用 Real-time PCR 分析病毒感染前后细胞内 miR-34b 的表达变化。miRNA qRT-PCR primer 由广州锐博生物有限公司合成。按照 Real-time PCR 试剂盒说明书进行 Real-time PCR 检测, 反应条件: 95℃ 10 min; 95℃ 2 s, 60℃ 20 s, 70℃ 10 s, 40 个循环。PCR 扩增后按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达值, 分析实验组与对照组的差异。

1.3 Western blot 检测 EV71 病毒蛋白的表达

RD 细胞加入含 10%胎牛血清、100 μg/mL 氨苄青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱、饱和湿度条件下培养。当细胞融合达到 80%–90%时, 用 2.5%胰蛋白酶消化单层培养的 RD 细胞, 用 DMEM 终止消化, 4℃、500 r/min 离心 5 min, 用 DMEM 培养基调整细胞数为  $2\times 10^5$  个/mL 的单细胞悬液, 以 1 mL/孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h 细胞贴壁后, 合成的 miRNAs mimics/inhibitor 及阴性对照 miR-RiboTM mimics/inhibitor negative control 分别转染 RD 细胞, 6 h 后接种 10 μL 的 TCID<sub>50</sub> 为  $1\times 10^9$  的 EV71 病毒。48 h 后收集细胞, 用细胞裂解液冰上裂解细胞 20 min, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 15% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳后, 利用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。10%脱脂奶粉封闭过夜。孵育特异性抗体, 鼠源 EV71 单克隆抗体浓度为 1:2 000, β-actin 抗体为 1:2 000, 二抗为辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG 浓度为 1:2 000, 加 ECL 发光液显影。

1.4 Real-time PCR 检测 EV71 病毒 mRNA 的表达

取 2.5%胰蛋白酶消化单层培养的 RD 细胞, 用 DMEM 培养基调整细胞数为  $2\times 10^5$  个/mL 的单细胞

悬液, 以 1 mL/孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h 细胞贴壁后, 合成的 miRNAs mimics/inhibitor 及阴性对照 miR-RiboTM mimics negative control 分别转染 RD 细胞, 6 h 后, 每孔接种 10 μL 的 TCID<sub>50</sub> 为  $1\times 10^9$  的 EV71 病毒, 48 h 后按照 Trizol 说明书提取细胞总 RNA, 取 RNA 150 ng 进行逆转录合成 cDNA。采用引物设计软件 Primer 5.0 设计 EV71 病毒和 β-actin 基因的引物, Real-time PCR 引物由北京奥科生物公司合成(表 1)。按照 Real-time PCR 试剂盒说明书进行 Real-time PCR 检测, 反应条件: 95℃ 10 min; 94℃ 10 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。PCR 扩增后按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达值, 分析实验组与对照组的差异。

1.5 pMIR-eIF4E-3'UTR 重组载体的构建

用于 miRNAs 作用靶标筛选的 3'-UTR 分析系统包含 2 个荧光素酶报告基因载体, 一个为 pMIR 载体, 另一个为 pRL-CMV 载体。pMIR 载体可以表达萤火虫荧光素酶, 在萤火虫荧光素酶的 3'-UTR 区含有多克隆位点插入目的基因。pRL-CMV 载体能高效表达海肾荧光素酶, 作为内参。将 eIF4E 3'UTR 基因片段克隆至 pMIR 载体 3'UTR 区多克隆位点中的 *Spe* I/*Hind* III 限制性酶切位点处, 构建成重组载体 pMIR-eIF4E-3'UTR。

1.6 双荧光素酶检测

RD 细胞接种于 24 孔板中, 将构建好的重组载体 pMIR-eIF4E-3'UTR 和 pRL-CMV 载体利用转染试剂 Lipofectamine 2000 共转染 RD 细胞, 转染 30 h 后收集细胞, 用 PBS 洗一遍细胞, 24 孔板每孔加入 100 μL Passive lysis buffer, 冰上放置 10 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清采用双荧光检测试剂盒检测荧光素酶的表达。如果构建在 pMIR 载体上

表 1 Real-time PCR 所需引物

Table 1 Primers used for real-time PCR assay

基因名称 Gene name	上游引物序列 Forward primers sequence (5'→3')	下游引物序列 Reverse primers sequence (5'→3')
EV71 <i>vp1</i>	AGTATGATTGAGACTCGGTG	GCGACAAAAGTGAAGTCTGCG
<i>β-actin</i>	ACCCACACTGTGCCATCTACGA	GCCGTGGTGGTGAAGCTGTAGCC
<i>eIF4E</i>	AGGATGGTATTGAGCCTATGTGG	CACAGAAGTGTCTCTAGCCAAAA

的病毒基因序列受到宿主细胞内 miRNAs 的调控, 将影响载体上荧光素酶的表达。通常以海肾荧光素酶活性作为内参, 用测定的萤火虫荧光素酶表达值和海肾荧光素酶表达值的比值考察萤火虫荧光素酶活性的变化。

### 1.7 Real-time PCR 检测 eIF4E mRNA 的表达

RD 细胞接种于 12 孔板中, 将合成的 miRNAs mimics 及阴性对照 miR-RiboTM mimics negative control 分别转染 RD 细胞, 48 h 后按照 Trizol 说明书提取细胞总 RNA, 取 RNA 150 ng 进行逆转录合成 cDNA。使用 Real-time PCR 分析 eIF4E mRNA 的表达。采用引物设计软件 Primer 5.0 设计 eIF4E 基因的引物, Real-time PCR 引物由北京奥科生物公司合成(表 1)。

### 1.8 数据分析

实验数据采用平均值 $\pm$ SD 表示, 使用 *t* 检验进行组间比较,  $P < 0.05$  为显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 miR-34b 在 RD 细胞中的差异表达

前期研究工作筛选出 EV71 感染 RD 细胞差异表达的 miRNAs, 在此基础上, 选取 miR-34b 进一步验证。如图 1 所示, RD 细胞感染 EV71 病毒后

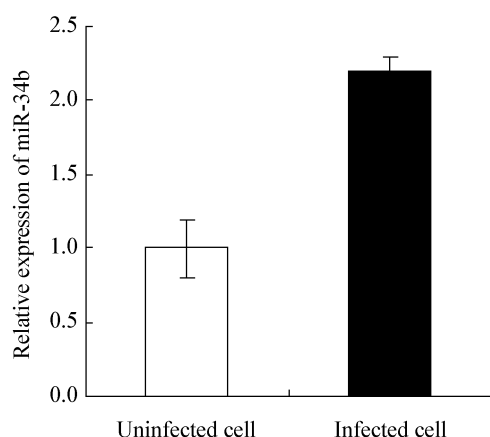


图 1 感染 EV71 病毒前后 RD 细胞中 miR-34b 表达水平比较

Figure 1 The relative expression of miR-34b in RD cells with or without EV71 infection

miR-34b 表达量是未感染病毒细胞的 2 倍以上。miR-34b 表达量的上调反映了 miRNA 有协助病毒感染宿主细胞的作用。miRNA 表达水平的变化一定程度上反映了宿主细胞同病毒间相互作用的关系。

### 2.2 miR-34b 调控 EV71 在 RD 细胞中病毒蛋白的表达

为了验证 miR-34b 能否影响 EV71 病毒在宿主细胞中的复制, 将合成的 miR-34b mimics/inhibitor 和 miR-RiboTM mimics/inhibitor negative control 作为阴性对照, 分别转染 12 孔板培养的 RD 细胞, 感染病毒 48 h 后提取细胞蛋白, 通过 Western blot 检测 EV71 病毒的蛋白表达水平, 以  $\beta$ -actin 为内参, 对比各实验组和对照组 EV71 病毒蛋白的表达量, 结果见图 2。结果表明与对照相比, miR-34b 能够促进 EV71 病毒蛋白在 RD 细胞中的表达, 而 miR-34b inhibitor 显著抑制病毒蛋白的表达。

### 2.3 miR-34b 调控 EV71 在 RD 细胞中病毒 mRNA 的表达

为了进一步验证 miR-34b 能够调控 EV71 病毒在宿主细胞中的复制, 将合成的 miR-34b mimics/inhibitor 和 miR-RiboTM mimics/inhibitor negative control 作为阴性对照, 分别转染 12 孔板培养的 RD 细胞, 感染病毒 48 h 后用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 使用 Real-time PCR 分析 miR-34b 对 EV71 病毒 mRNA 表达的影响, 结果见图 3。结果表明与对照相比, 转染 miR-34b 的细

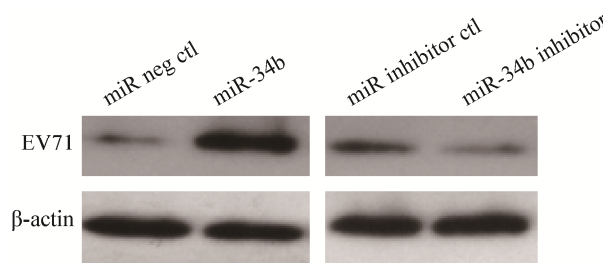


图 2 Western blot 检测 miR-34b 对 EV71 在 RD 细胞中病毒蛋白表达的影响

Figure 2 Western blot analysis of the effects of miR-34b on EV71 expression in RD cell

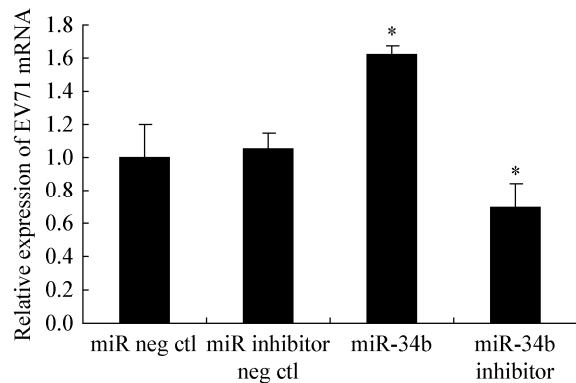


图3 Real-time PCR 检测 miR-34b 对 EV71 在 RD 细胞中病毒 mRNA 表达的影响

Figure 3 Real-time PCR analysis of the effects of miR-34b on EV71 mRNA in RD cell

Note: \*:  $P < 0.05$ .

胞中 EV71 病毒 mRNA 的表达上调了  $62.0\% \pm 5.02\%$ , 说明 miR-34b 能够促进 EV71 病毒 mRNA 在 RD 细胞中的表达; 而转染 miR-34b inhibitor 的细胞中 EV71 病毒 mRNA 表达水平下调了  $31.0\% \pm 15.0\%$ , 说明 miR-34b inhibitor 能够抑制 EV71 病毒 mRNA 在 RD 细胞中的表达。这一结果与 Western blot 实验结果一致。

#### 2.4 miR-34b 对 pMIR-eIF4E-3'UTR 载体荧光素酶活性的影响

利用 Targetscan 和 miRDB 分析软件发现 eIF4E 基因是 miR-34b 潜在靶点之一(图 4), eIF4E 是一种帽结合蛋白, 可以特异性地识别 mRNA 的 5'端帽子结构, 它在真核翻译的起始过程中发挥重要作用。研究表明几乎所有的病毒都依赖于宿主翻译机制完成它们的生命周期。病毒感染可能导致宿主蛋白质合成的关闭, 特别是小 RNA 病毒<sup>[18-23]</sup>。因此, 推测 miR-34b 可能通过下调 eIF4E 基因实现对 EV71 病毒复制和蛋白表达的调控作用。将 miR-34b mimics 和 miR-RiboTM mimics negative control 作为阴性对照, 分别同 pMIR-eIF4E-3'UTR 和 pRL-CMV 质粒共转染 RD 细胞, 30 h 后进行 Luciferase 双荧光检测。结果发现 miR-34b 能在一定程度上下调荧光素酶的活性(图 5), 验证了 miR-34b 能够通过靶向 eIF4E 基因 3'-UTR 发挥作用。

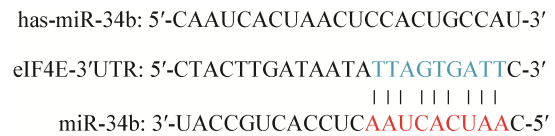


图4 miR-34b 与 eIF4E 3'-UTR 互补配对模式

Figure 4 The model of hybridization between miR-34b and eIF4E 3'-UTR

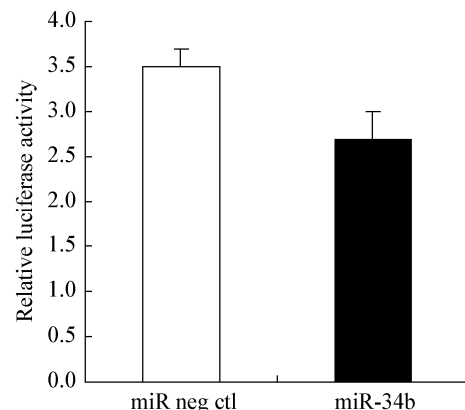


图5 miR-34b 对 pMIR-eIF4E-3'UTR 载体荧光素酶活性的影响

Figure 5 The relative luciferase activity from pMIR-eIF4E-3'UTR vector in RD cells with overexpressing miR-34b

#### 2.5 miR-34b 对 eIF4E mRNA 表达水平的影响

将 miR-34b mimic 转染 RD 细胞, 48 h 后用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 使用 Real-time PCR 分析 miR-34b 对 eIF4E mRNA 表达的影响, 结果见图 6, 实验组 eIF4E mRNA 表达水平较对照组

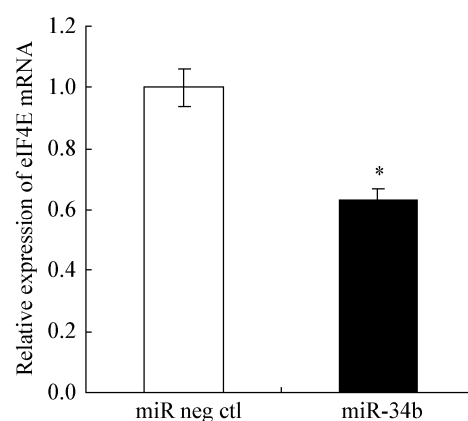


图6 Real-time PCR 检测 miR-34b 对 RD 细胞中 eIF4E mRNA 表达的影响

Figure 6 Real-time PCR analysis of the effects of miR-34b on eIF4E mRNA in RD cell

Note: \*:  $P < 0.05$ .

明显下调,提示 miR-34b 可能通过作用于 eIF4E 调控 EV71 病毒复制。

### 3 讨论与结论

病毒感染细胞后,与宿主细胞发生复杂的相互作用,二者相互影响。病毒进入宿主细胞后,促使宿主细胞发生有利于病毒自身复制增殖的改变,包括 miRNAs 表达水平的变化。Cui 等<sup>[24]</sup>对感染 EV71 病毒后的 Hep2 细胞进行深度测序,发现感染 EV71 病毒后 miRNAs 表达的变化,其中有 64 种 miRNA 的表达量增加了 2 倍多,并通过基因本体(Gene ontology)分析,发现这其中大部分基因参与 EV71 感染相关的神经活动、免疫应答和细胞凋亡,他们首次验证了 miRNA 与 EV71 感染的关系。随后,越来越多的研究表明 miRNAs 通过多途径参与调控 EV71 感染和发病机制,如 miR-16-5p、miR-21 和 miR-197 等<sup>[25-27]</sup>,这些研究均证实了 EV71 感染与 miRNA 有着密切的联系。

本研究利用前期研究工作筛选出 EV71 感染 RD 细胞差异表达的 miRNAs,选取 miR-34b 进一步验证。实验结果表明, RD 细胞感染 EV71 病毒后 miR-34b 表达量上调, miR-34b 可以促进病毒在 RD 细胞中的复制和表达;同时, miR-34b inhibitor 有抑制病毒复制的作用,这反映了 miR-34b 有协助病毒感染宿主细胞的作用。利用 Targetscan 和 miRDB 分析软件发现 eIF4E 基因是 miR-34b 潜在靶点,研究结果发现 miR-34b 能在一定程度上下调 eIF4E-3'UTR 荧光素酶的活性,验证了 miR-34b 能够通过靶向 eIF4E 基因 3'-UTR 发挥作用;进一步研究 miR-34b 对 eIF4E 转录水平的影响,发现 miR-34b 可以抑制 eIF4E mRNA 表达水平。

综上所述,本研究证实细胞内 miR-34b 可以通过作用于靶基因 eIF4E 调控 EV71 在宿主细胞中的复制过程,为基于从 miRNA、宿主、病毒三者关系认识 EV71 的致病机制奠定了实验基础。

### REFERENCES

[1] Xu MH, Su LY, Cao LF, et al. Enterovirus genotypes causing

- hand foot and mouth disease in Shanghai, China: a molecular epidemiological analysis[J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13: 489
- [2] Wu JS, Zhao N, Pan H, et al. Patterns of polymorphism and divergence in the VP1 gene of enterovirus 71 circulating in the Asia-Pacific region between 1994 and 2013[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 193(2): 713-728
- [3] Li W, Yi L, Su J, et al. Seroepidemiology of human enterovirus71 and coxsackievirusA16 among children in Guangdong province, China[J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13: 322
- [4] Bible JM, Pantelidis P, Chan PKS, et al. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications[J]. Reviews in Medical Virology, 2007, 17(6): 371-379
- [5] Nadel S. Hand, foot, mouth, brainstem, and heart disease resulting from enterovirus 71[J]. Critical Care Medicine, 2013, 41(7): 1821-1822
- [6] Yang BY, Liu FF, Liao QH, et al. Epidemiology of hand, foot and mouth disease in China, 2008 to 2015 prior to the introduction of EV-A71 vaccine[J]. Eurosurveillance, 2017, 22(50): pii=16-00824
- [7] Chen MM, Ju Y, Chen M, et al. Epidemiological and genetic characteristics of EV71 in hand, foot, and mouth disease in Guangxi, southern China, from 2010 to 2015[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0188640
- [8] Nelson R. Outbreaks of enterovirus D68 continue across the USA[J]. The Lancet Respiratory Medicine, 2014, 2(10): 791
- [9] Xu W, Liu CF, Yan L, et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications[J]. Virology Journal, 2012, 9: 8
- [10] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [11] Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis[J]. Biological Reviews, 2009, 84(1): 55-71
- [12] Schickel R, Boyerinas B, Park SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death[J]. Oncogene, 2008, 27(45): 5959-5974
- [13] Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells[J]. Science, 2005, 308(5721): 557-560
- [14] Henke JI, Goergen D, Zheng JF, et al. MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA[J]. The EMBO Journal, 2008, 27(24): 3300-3310
- [15] Singh AK, Rooge SB, Varshney A, et al. Global microRNA expression profiling in the liver biopsies of hepatitis B virus-infected patients suggests specific microRNA signatures for viral persistence and hepatocellular injury[J]. Hepatology, 2018, 67(5): 1695-1709
- [16] Li ZH, Luo QB, Xu HP, et al. MiR-34b-5p suppresses melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) signaling pathway to promote avian leukosis virus subgroup J (ALV-J)-infected cells proliferation and ALV-J replication[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 17

- [17] Inchley CS, Sonerud T, Fjærli HO, et al. Nasal mucosal microRNA expression in children with respiratory syncytial virus infection[J]. BMC Infectious Diseases, 2015, 15: 150
- [18] Fraser CS, Doudna JA. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(1): 29-38
- [19] Belsham GJ, Sonenberg N. Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins[J]. Trends in Microbiology, 2000, 8(7): 330-335
- [20] Schneider RJ, Mohr I. Translation initiation and viral tricks[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(3): 130-136
- [21] Kuyumcu-Martinez NM, Van Eden ME, Younan P, et al. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff[J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24(4): 1779-1790
- [22] Sukarieh R, Sonenberg N, Pelletier J, et al. Nuclear assortment of eIF4E coincides with shut-off of host protein synthesis upon poliovirus infection[J]. Journal of General Virology, 2010, 91(5): 1224-1228
- [23] Ho BC, Yu SL, Chen JJW, et al. Enterovirus-induced miR-141 contributes to shutoff of host protein translation by targeting the translation initiation factor eIF4E[J]. Cell Host & Microbe, 2011, 9(1): 58-69
- [24] Cui LB, Guo XL, Qi YH, et al. Identification of microRNAs involved in the host response to enterovirus 71 infection by a deep sequencing approach[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010: Article ID 425939
- [25] Zheng CS, Zheng ZH, Sun JH, et al. MiR-16-5p mediates a positive feedback loop in EV71-induced apoptosis and suppresses virus replication[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 16422
- [26] Feng N, Zhou ZZ, Li YX, et al. Enterovirus 71-induced has-miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1[J]. Virus Research, 2017, 237: 27-36
- [27] Tang WF, Huang RT, Chien KY, et al. Host microRNA miR-197 plays a negative regulatory role in the enterovirus 71 infectious cycle by targeting the RAN protein[J]. Journal of Virology, 2016, 90(3): 1424-1438

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！