

马立克氏病病毒编码的 miR - M12 - 5p 对 鸡 *HVCN1* 基因表达的靶向调控

李会珍^{1,2},滕 蔓²,党 露²,冯丽丽³,马圣明⁴,赵 朴²,罗 俊^{2,4},张改平^{1,2*}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室/农业部动物免疫学重点实验室/河南省动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002; 3. 河南省农业科学院 农业经济与信息研究所,河南 郑州 450002; 4. 河南科技大学 动物科学学院,河南 洛阳 471003)

摘要:为研究 miR - M12 - 5p 在马立克氏病病毒(Marek's disease virus,MDV)感染过程中的调控作用,利用生物信息学方法对其候选靶基因进行预测分析,发现 4 个 miR - M12 - 5p 的结合靶点。体外双荧光素酶报告试验结果表明,miR - M12 - 5p 可结合宿主鸡的氢离子电压门控通道 1(*HVCN1*) 基因 mRNA 的 3'-UTR 相应位点并发生特异性相互作用。实时荧光定量 PCR 分析进一步证实,miR - M12 - 5p 能够在体内下调 *HVCN1* 基因的表达水平。上述结果表明,miR - M12 - 5p 可以靶向调控宿主基因 *HVCN1* 的表达。

关键词:马立克氏病病毒; miRNA; miR - M12 - 5p; 靶基因; *HVCN1* 基因

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2016)06 - 0121 - 06

Targeted Regulation of Host Gene *HVCN1* by Viral microRNA miR-M12-5p Encoded by Marek's Disease Virus

LI Huizhen^{1,2},TENG Man²,DANG Lu²,FENG Lili³,
MA Shengming⁴,ZHAO Pu²,LUO Jun²,ZHANG Gaiping^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Zhengzhou 450002, China; 3. Institute of Agricultural Economics and Information, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 4. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: In order to study the regulatory role of miR-M12-5p, we predicted the host target genes utilizing bioinformatics method and obtained four candidate mRNA targets for miR-M12-5p. Dual luciferase reporter assay (DLRA) showed that miR-M12-5p could *in vitro* interact with the 3'-UTR of the mRNA of hydrogen voltage gated channel 1 (*HVCN1*) gene. Further analysis results of the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) showed that the expression level of *HVCN1* gene was *in vivo* down-regulated by miR-M12-5p. These data suggested that miR-M12-5p could regulate the expression of host chicken gene *HVCN1*.

Key words: MDV; miRNA; miR-M12-5p; target gene; *HVCN1* gene

马立克氏病病毒(Marek's disease virus,MDV) 感染自然宿主鸡后可引发鸡马立克氏病(Marek's disease,MD),临床上以实质器官恶性肿瘤为特

是双链 DNA 病毒,有囊膜,基因组大小约 180 kb,在

收稿日期:2016 - 01 - 30
基金项目:国家自然科学基金面上项目(31372445);河南省农业科学院优秀青年科技基金项目(2013YQ28)
作者简介:李会珍(1990 -),女,河南郑州人,在读硕士研究生,研究方向:动物疫病分子致病机制。
E - mail:lihuizhen01@163.com
* 通讯作者:张改平(1960 -),男,河南内黄人,研究员,博士,主要从事动物免疫学及重大疫病快速检测技术研究。
E - mail:zhanggaiping2003@163.com

征^[1]。MD 是第 1 个可用病毒疫苗免疫预防的肿瘤性疾病^[2],因此,MDV 感染对于研究肿瘤的发生发展机制提供了极好的动物模型^[3]。MDV 共有 3 个血清型:血清 I 型(MDV-1)、血清 II 型(MDV-2)、血清 III 型(即火鸡疱疹病毒,herpesvirus of turkeys,HVT)^[1]。疫苗免疫接种对该病的有效防控贡献巨大,但在过去几十年中,MDV-1 流行毒株的毒力因免疫压力选择而逐渐增强。因此,深入研究 MDV 的致病致瘤机制对 MD 的防控具有非常重要的意义。

微 RNA(microRNA,miRNA)是一类长度为 22~25 nt 的内源性小分子非编码 RNA,存在于包括动物、植物、病毒在内的多种生物体中^[4-6]。miRNA 通过与 mRNA 相应的靶点结合抑制蛋白质翻译,从而发挥其转录后水平的基因调控作用^[7-8]。此前研究表明,MDV 编码的 miRNA 在病毒复制^[9]、维持潜伏感染^[10]、介导细胞凋亡^[11]、激活原癌基因表达^[12]等方面发挥重要调控作用。MDV-1 基因组共编码 26 个病毒 miRNA,这些 miRNA 在 MDV 致病及致瘤过程中可能发挥重要调控作用。此前,笔者所在课题组通过基因缺失 Meq 基因簇中各个 miRNA 单基因研究其与 MDV 致病表型的关系时发现,miR-M12-5p 的前体基因缺失毒株与其亲本毒株 GX0101 相比,致肿瘤率显著降低,表明 miR-M12-5p 在调控 MDV 致瘤作用中可能发挥重要作用^[13]。基于此,利用生物信息学方法对 miR-M12-5p 的宿主靶基因进行了预测和分析,并利用双荧光素酶报告试验(DLRA)和实时荧光定量 PCR(qRT-pCR)对 miR-M12-5p 的候选靶基因进行了体内外试验验证,旨在为进一步揭示 miR-M12-5p 调控 MDV

致病致瘤的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞

MDV 超强毒株 GX0101,由山东农业大学崔治中教授馈赠;GXΔmiR-M12 毒株(miR-M12-5p 前体基因缺失的 MDV 毒株),由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室构建并保存;HEK 293T 细胞由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存;鸡胚成纤维细胞(chicken embryoi broblast,CEF)取自 7~9 日龄 SPF 鸡胚。

1.2 试剂和载体

Premix Taq™(TaKaRa Taq™ Version 2.0)、DNA 限制性内切酶 *Xho*I、*Not*I 和 *Eco*RI、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、2×SYBR Premix Ex Taq、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 和 pMD19-T (Simple) vector,均购自宝生物工程(大连)有限公司;Lipofectamine 2000 和 TRIzol Reagent,购自 Invitrogen 公司;DLRA 系统购自 Promega 公司;Annealing Buffer for DNA Oligos (5×),购自碧云天生物技术公司;psiCHECK-2、pcDNA-6.2 和 pcDNA-miR-neg 载体,由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存;pcDNA6.2-miR-M12 菌种及质粒,由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室构建并保存。

1.3 引物设计与合成

本研究所使用的 DNA 引物均使用 Premier Primer 5.0 软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物名称、序列及用途等相关信息见表 1。

表 1 供试引物的背景信息

引物对 编号	引物名称	用途	序列(5'—3')	产物大小/ bp
1	HVCN1-3'-UTR-F	3'-UTR 的 PCR 扩增	CCTCGAGTGTGGGCTACCGAGTCATC	549
	HVCN1-3'-UTR-R		TTGCGGCCCGCGCAGGCAGAAAGGGAAGGAG	
2	HVCN1-mut-3'-UTR-F	3'-UTR 突变载体构建	TCGAGCAGGCTTCTCCAATTGATTTCAGCT-	58
	HVCN1-mut-3'-UTR-R		GCAGCCAGCTCCTCCCAGCACTGAGCGC- GGCCGCGCTCAGTGCTGGGAGGAGCTGGC- TGCAGCTGAAATCAATTGGAGAAGCCTGC	
3	mut-miR-M12-5p-F	3'-UTR 突变载体构建	AATTCATTAAAGAAGTATAATGTAAATGTCC-	59
	mut-miR-M12-5p-R		AAAGGTTTGCATAATACGGAGGGTTCTC TCGAGAGAACCCTCCGTATTATGCAAAACCT- TTGGACATTTACATTATACTTCTTTAATG	
4	HVCN1-qPCR-F	qRT-PCR	TGAGGAGGAGGACAATGGAGAGA	111
	HVCN1-qPCR-R		TGAAACCTGCGTGAAGTGAAGAG	
5	GAPDH-qPCR-F	qRT-PCR	AAGTCCCTGAAAATTGTCTAGCAAT	119
	GAPDH-qPCR-R		ATGGCATGGACAGTGGTCATAAG	

1.4 miR - M12 - 5p 候选靶基因生物信息学预测

分析挑选出 30 个在 MDV 感染过程中表达下调的宿主基因,利用 miRNA 靶基因生物信息学预测软件 RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)在线预测 miR - M12 - 5p 的候选靶基因。根据 miRNA:mRNA 杂合配对的特异性及预测软件的特点,设定筛选条件为允许 G:U 配对,miRNA 2—8 位种子区域匹配,匹配区域位于 mRNA 的 3' - UTR 序列中。

1.5 双荧光素酶报告载体构建

以 CEF 基因组 cDNA 为模板,扩增鸡 HVCN1 基因 3' - UTR 目的片段。PCR 反应体系包括:Ex Taq 10 μ L、引物对 1 的上下游引物(表 1)各 1 μ L (10 μ mol/L)、CEF cDNA 1 μ L (100 ng/ μ L) 和 ddH₂O 7 μ L。PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min;98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。割胶回收目的片段,将其和 psiCHECK - 2 质粒进行双酶切。同上电泳分析,割胶回收目的片段。将纯化后的目的片段与载体连接,然后直接转化大肠杆菌 JM109,涂琼脂平板培养过夜,挑取单克隆菌落经 PCR 及双酶切鉴定阳性后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

将引物对 2 和 3(表 1)合成的寡核苷酸分别用 ddH₂O 溶解至终浓度为 50 μ mol/L,进行退火反应。反应体系包括:Nuclease - Free Water 40 μ L,Annealing Buffer for DNA Oligos (5 \times) 20 μ L,正、反寡核苷酸链各 20 μ L (50 μ mol/L)。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 2 min,然后每 90 s 下降 1 $^{\circ}$ C 直至 25 $^{\circ}$ C。将退火形成的双链 DNA 同上构建人工突变型报告基因载体。

1.6 DLRA

psiCHECK2 - HVCN1 - 3' - UTR 和 pcDNA6.2 - miR - M12 - 5p 质粒各取 300 ng,均匀混于 12.5 μ L 无血清培养基中,按照 48 孔细胞板每孔 1 μ g Lipofectamine 2000 和 12.5 μ L 质粒的比例均匀混合,按 Lipofectamine 2000 说明书,将孵育后的 Lipofectamine 2000 和混合质粒(25 μ L/孔)共转染融合度为 80% ~ 90% 的 HEK 293T 细胞。以 pcDNA6.2 - miR - neg 为阴性对照组,每组均设 3 个重复,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中静置培养。

转染 48 h 后,将 HEK 293T 细胞培养基弃去,用 PBS 洗 2 次,然后用 DLRA 系统进行报告基因检测。

首先用 20 μ L ddH₂O 稀释细胞裂解液,裂解细胞,室温孵育 15 min。然后将细胞裂解液转移至 96 孔白色底透酶标板中,每孔加入 100 μ L LAR II,轻柔混合均匀后用 Ω 酶标仪(BMG Labtech)测定萤火虫荧光素酶数值。最后向每孔中加入 100 μ L Stop & Glo Reagent,轻柔混合均匀后,同上测定海肾荧光素酶数值。最后统计分析海肾荧光素酶/萤火虫荧光素酶活性比值。

1.7 qRT - PCR

用 MDV 亲本毒株 GX0101 和 miR - M12 - 5p 前体基因缺失株 GX Δ miR - M12 分别感染 CEF 细胞,分别于感染后 96 h 和 120 h 收集细胞样品,同时以 CEF 细胞为阴性对照,按照 TRIzol 操作说明书提取总 RNA。取上述 RNA 样品各 1 μ g,按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 操作说明书去除基因组 DNA,反应体系包括:5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ L、gDNA Eraser 1 μ L、RNA 1 μ g、RNase - free H₂O 补足至 10 μ L,42 $^{\circ}$ C 反应 2 min。向上述 10 μ L 反应体系中加入:5 \times Primer Script Buffer 4 μ L、Primer Script RT Enzyme Mix I 1 μ L、RT Primer Mix 1 μ L 和 RNase - free H₂O 4 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min,然后 85 $^{\circ}$ C 反应 5 s 进行 cDNA 合成反应,合成的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

以 CEF 阴性细胞为对照,以鸡 GAPDH 为内参基因进行 qPCR 分析,每个反应体系均设置 3 个重复。20 μ L qPCR 反应体系包括:cDNA 模板(1.4 μ g/ μ L)2 μ L、引物对 4 或 5 的上下游引物(表 1)各 0.8 μ L (10 μ mol/L)、ROX Dye II 0.4 μ L、2 \times SYBR Premix Ex Taq 10 μ L 和 ddH₂O 6 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 34 s。溶解曲线生成条件为荧光定量 PCR 仪(7500 Fast,ABI)默认参数。所有 qRT - PCR 试验数据均采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

2 结果与分析

2.1 miR - M12 - 5p 候选靶基因的预测结果

利用 RNAhybrid 在线预测软件对 miR - M12 - 5p 的候选靶基因进行预测分析,从 MDV 感染过程中下调表达的 30 个基因中,预测出 4 个位于 mRNA 3' - UTR 的匹配靶点(表 2),包括 HVCN1、P2RX5、CD79B、SLC22A16 基因。HVCN1 基因为多个 MDV - 1 编码的 miRNA 的共同候选靶基因,故优先选取 HVCN1 进行下一步试验分析。

的 CEF 细胞中,*HVCN1* 的表达水平与 miR - M12 - 5p 的表达水平呈显著的负相关关系,进一步证实 miR - M12 - 5p 在体内抑制 *HVCN1* 的表达。

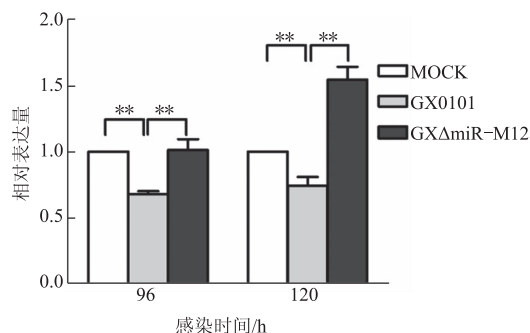


图 3 MDV 感染 CEF 细胞中 *HVCN1* 的表达变化

3 讨论

MDV 对鸡不仅具有致病性,而且 MDV - 1 强毒株的感染最终还诱发其自然宿主发生多组织脏器的 T 淋巴肿瘤,是少数几个可以导致肿瘤发生的代表性疱疹病毒之一。因此,深入研究 MDV - 1 编码的病毒基因的结构与功能,对于揭示其他致瘤性疱疹病毒的感染及致病机制也具有重要的科学意义。MDV - 1 病毒共编码 14 个 miRNA 前体基因,表达 26 个成熟的 miRNA 分子,并且在基因组中形成 3 个 miRNA 基因簇^[14-15]。其中 miRNA 前体基因 miR - M2、miR - M3、miR - M4、miR - M5、miR - M9 和 miR - M12 组成第 1 个基因簇,即 Meq 基因簇;miR - M6、miR - M7、miR - M8、miR - M10 和 miR - M13 组成第 2 个基因簇被称为 LAT 基因簇;另外 3 个前体基因 miR - M1、miR - M11 和 miR - M31 组成第 3 个 miRNA 基因簇,位于上述 2 个基因簇之间,因此之前又被称为 Mid 基因簇^[15]。这些病毒 miRNA 在 MD 的发生、发展过程中,如在病毒复制^[9]、维持潜伏感染^[10]、介导细胞凋亡^[11]、激活原癌基因表达^[12]等方面都可能发挥极其重要的作用,其中位于 Meq 基因簇中的 miR - M4 - 5p,此前已被鉴定为宿主的原癌基因 miR - 155 类似物,笔者所在课题组研究发现,miR - M4 - 5p 可在感染宿主体内靶向调控宿主基因 *LTBP1* 的表达,影响 TGF - β 1 的成熟及向胞外分泌的过程,进而抑制 TGF - β 信号通路来激活原癌蛋白 c - Myc 的表达,最终促进诱导 MD 的肿瘤发生^[12]。动物攻毒试验数据也显示,缺失 miR - M4 前体基因的 MDV 突变毒株与其亲本毒株相比致瘤率显著下降^[9]。miR - M3 - 5p 是位于 Meq 基因簇中的另外一个病毒 miRNA,此前有国内学者研究发现,miR - M3 - 5p 可通过靶向下调宿主基因 *SMAD2* 的表达,从而抑制 TGF - β 信号通路、促进细胞存活、抑制细胞凋亡,为 MDV 的病

毒复制提供空间^[11]。

除了 miR - M4 - 5p 和 miR - M3 - 5p 之外,Meq 基因簇中编码的其他多个 miRNA 在 MDV - 1 的致病及致瘤过程中也可能发挥重要的调控作用。miR - M12 - 5p 也位于 Meq 基因簇中,笔者所在课题组通过逐一基因缺失该基因簇中各病毒 miRNA 的前体单一基因研究其对 MDV 致病表型的影响,结果发现,miR - M12 - 5p 的前体基因缺失也可使 MDV 的致瘤率显著下降^[13]。为了进一步研究 miR - M12 - 5p 在 MDV 致病过程中的调控作用,本研究首先利用生物信息学软件对 miR - M12 - 5p 的宿主候选靶基因进行预测分析,然后通过 DLRA 对 miRNA 与候选靶基因 3' - UTR 的体外相互作用进行验证,经过 qRT - PCR 对 MDV 感染细胞中候选基因的表达水平进行了分析,最终证实 miR - M12 - 5p 可靶向调控宿主基因 *HVCN1* 的表达。*HVCN1* 的作用主要在于调节电压依赖型质子,兴奋细胞膜的渗透性,可能与肿瘤转移存在相关性。近年来研究发现,电压门控性通道基因在多种肿瘤细胞中过表达,并通过影响细胞膜电压、改变细胞体积等方式影响肿瘤细胞的周期和增殖^[16-17]。此外,*HVCN1* 还参与调节机体的免疫反应,可调控多种免疫细胞产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)^[18],ROS 在肿瘤细胞的迁移和入侵过程中发挥重要作用^[19]。本研究发现,miR - M12 - 5p 可靶向调控鸡 *HVCN1* 基因的表达,预示氢电压门控通道可能在 MD 肿瘤的发生、发展过程中发挥重要调控作用,但其分子机制仍有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Calnek B W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2001, 255: 25-55.
- [2] Churchill A E, Payne L N, Chubb R C. Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus[J]. Nature, 1969, 221: 744-747.
- [3] Osterrieder N, Kamil J P, Schumacher D, et al. Marek's disease virus: From miasma to model[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(4): 283-294.
- [4] Lee Y S, Dutta A. MicroRNAs in cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2009, 4: 199-227.
- [5] Sullivan C S, Ganem D. MicroRNAs and viral infection[J]. Molecular Cell, 2005, 20(1): 3-7.
- [6] Boss I W, Plaisance K B, Renne R. Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(12): 544-553.

(下转第 129 页)

根、大青叶(质量比 2:1)水煎液进行醇沉(乙醇最终体积分数 60% 和 70%)处理间差异不显著。最终将莲蓝口服液的最佳提取工艺确定为:穿心莲粗粉加 10 倍量 85% 乙醇浸泡 12 h 后渗漉,得渗漉液;板蓝根和大青叶以质量比 2:1 进行水煎浓缩,浓缩液中加入穿心莲渗漉液使乙醇最终体积分数为 60% 进行醇沉,回收乙醇调节至每 1 mL 相当于 1 g 原药材,制备莲蓝口服液。

穿心莲、板蓝根、大青叶三者的质量比为 1:2:1,并将穿心莲渗漉液用作板蓝根和大青叶水提液的醇沉溶液,制得的莲蓝口服液各标示成分含量较高。用穿心莲的含醇渗漉液对板蓝根和大青叶提取液进行醇沉,不仅节省乙醇的使用量,而且减少乙醇的回收次数,简化了提取工艺,降低了生产成本,更利于临床的推广应用。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:第 2 部[S]. 北京:中国农业出版社,2011:4.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:第 1 部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:1.
- [3] 徐丽华,黄芳,陈婷,等. 板蓝根中的抗病毒活性成分

- [J]. 中国天然药物,2005,3(6):359-360.
- [4] 江冬青,罗晓红,谢智颖,等. 穿心莲临床药理研究概况[J]. 国际中医中药杂志,2013,35(11):1030-1032.
- [5] 肖树雄,王晓钰,郑剑红. 穿心莲的成分及其分析方法研究概况[J]. 中国药师,2002,5(11):693-694.
- [6] 张玲,尚立霞,单卫华,等. 穿心莲的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2003,14(8):458-460.
- [7] 吴爱群,张国强. 穿心莲内酯提取工艺研究[J]. 河池学院学报,2009,29(5):66-68.
- [8] 张建强,张玲,王欢,等. 穿心莲提取工艺研究[J]. 食品与药品,2005,7(1):37-40.
- [9] 尹秀莲,游庆红,王振华. 穿心莲中穿心莲内酯的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(15):6988-6989.
- [10] 和翀翼,刘文,吴晨晨,等. 大青叶中靛玉红提取工艺的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2008(3):53-54.
- [11] 莫迎. 不同的提取方法对板蓝根中(R,S)-告依春的影响[J]. 中医药导报,2011,17(6):89-91.
- [12] 张叶,张蕾,王玉. RP-HPLC 法测定板蓝根药材中腺苷和表告依春的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1848-1850.
- [13] 刘蕾,许笑笑,韩光. 均匀设计法优化穿心莲的提取工艺[J]. 河南大学学报(医学版),2006,25(4):33-35.

(上接第 125 页)

- [7] Bartel D P. MicroRNA: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [8] Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? [J]. Nature Reviews Genetics,2008,9(2):102-114.
- [9] Yu Z H, Teng M, Sun A J, et al. Virus-encoded miR-155 ortholog is an important potential regulator but not essential for the development of lymphomas induced by very virulent Marek's disease virus[J]. Virology,2014,448(1):55-64.
- [10] Strassheim S, Stik G, Rasschaert D, et al. mdv1-miR-M7-5p, located in the newly identified first intron of the latency-associated transcript of Marek's disease virus, targets the immediate-early genes ICP4 and ICP27[J]. The Journal of General Virology,2012,93(Pt 8):1731-1742.
- [11] Xu S, Xue C, Li J, et al. Marek's disease virus type 1 microRNA miR-M3 suppresses cisplatin-induced apoptosis by targeting Smad2 of the transforming growth factor beta signal pathway[J]. Journal of Virology,2011,85(1):276-285.
- [12] Chi J Q, Teng M, Yu Z H, et al. Marek's disease virus-encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting LTBP1 and suppressing the TGF- β signaling pathway[J]. Virology,2015,476:72-84.

- [13] Teng M, Yu Z H, Sun A J, et al. The significance of the individual Meq-clustered miRNA of Marek's disease virus in oncogenesis[J]. Journal of General Virology,2015,96(pt 3):637-649.
- [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]. Journal of Virology,2006,80(17):8778-8786.
- [15] 罗俊,滕蔓,樊剑鸣,等. 马立克氏病病毒编码的 microRNA:从基因组学到功能研究[J]. 中国科学(生命科学),2010,40(6):476-483.
- [16] Li M, Wang B, Lin W. Cl-channel blockers inhibit cell proliferation and arrest the cell cycle of human ovarian cancer[J]. European Journal of Gynaecological Oncology,2008,29(3):267-271.
- [17] Zhang H N, Zhou J G, Qiu Q Y, et al. ClC-3 chloride channel prevents apoptosis induced by thapsigargin in PC12 cells[J]. Apoptosis,2006,11(3):327-336.
- [18] Capasso M. Regulation of immune responses by proton channels[J]. Immunology,2014,143(2):131-137.
- [19] Lee J L, Kang S W. Reactive oxygen species and tumor metastasis[J]. Molecules and Cells,2013,35(2):93-98.