

靶向猪 *CLTC* 基因 miRNA 的预测与验证

王亚莉, 何珂, 于静, 杨松柏, 赵阿勇

(浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 网格蛋白介导的胞吞是病毒侵入细胞的重要途径, 网格蛋白重链(clathrin heavy chain, *CLTC*)是形成网格蛋白小窝结构的重要组成部分。针对 *CLTC* 基因的转录后调控特别是调控猪 *Sus scrofa CLTC* 的 miRNA 目前还不太清楚。本研究旨在筛选出调控猪 *CLTC* 基因的 miRNA。利用生物信息学方法预测出 6 个靶向猪 *CLTC* 基因的 miRNA, 将猪 *CLTC* 基因 3'UTR 克隆至双荧光素酶报告基因载体 psiCHECK₂ 中获得双荧光素酶报告基因重组载体 psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR。将预测得到的 miRNA 分别和重组载体 psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR 共转染到细胞中, 以乱序序列作为阴性对照(NC), 检测 miRNA 对重组质粒荧光素酶活性的影响。结果发现 miR-205, miR-1, miR-129-5p 和 miR-206 均能够显著抑制荧光素酶活性($P<0.05$)。在猪肾上皮细胞系 PK15 细胞中超表达 miR-1 和 miR-129-5p 后, 定量 PCR (q-PCR)结果显示: 猪 *CLTC* 基因的表达量显著下调。突变了 psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR 载体中这 4 个 miRNA 的种子序列的结合位点发现: miR-1 对突变质粒中的荧光素酶无显著抑制作用。表明 miR-1 与猪 *CLTC* 基因有直接的靶向关系, 并通过其种子序列抑制 *CLTC* 基因的表达。图 6 表 2 参 23

关键词: 猪; *CLTC*; miRNA; 胞吞; 双荧光素酶报告基因载体

中图分类号: S852

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2017)03-0389-06

Prediction and validation of miRNA targeting the porcine *CLTC* gene

WANG Yali, HE Ke, YU Jing, YANG Songbai, ZHAO Ayong

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Clathrin heavy chain (*CLTC*), an important component of clathrin-coated pits, plays an important role with virus invasion of cells; however, post-transcriptional gene regulation of the *CLTC* gene, especially porcine *CLTC* gene regulation by miRNA has not yet been clearly elucidated. This study aimed to screen miRNAs that target the *CLTC* gene. First, bioinformatics predicted that miR-205, miR-1, miR-129-5p, miR-206, miR-19a, and miR-19b targeted the porcine *CLTC* gene. Then porcine *CLTC* 3'UTR was cloned into the psiCHECK₂ vector, and the dual luciferase reporter recombinant vector psiCHECK₂-3'UTR was constructed. The prediction of miRNA and the recombinant vector psiCHECK₂-3'UTR were co-transfected into cells, respectively, with the scramble sequence of miRNA as a negative control (NC); then the luciferase activity was detected. A quantitative PCR (q-PCR) was also used to determine the expression of *CLTC* mRNA levels. Then to verify whether miRNA regulated the porcine *CLTC* gene through seed sequences, binding sites of psiCHECK₂-3'UTR with seed sequence were mutated. Results showed that miR-205, miR-1, miR-129-5p, and miR-206 were able to significantly inhibit luciferase activity ($P<0.05$). At the same time there was an overexpression of miR-1 and miR-129-5p in PK15 cells, and the q-PCR showed that the expression of *CLTC* mRNA level was significantly reduced ($P<0.05$). Verification of whether the four miRNA (miR-205, miR-1,

收稿日期: 2016-05-31; 修回日期: 2016-07-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31501921); 浙江省自然科学基金青年基金资助项目(LQ15C170001); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2014FR068)

作者简介: 王亚莉, 从事猪分子育种研究。E-mail: wangyali19890204@163.com。通信作者: 赵阿勇, 教授, 博士, 从事动物数量遗传与分子育种研究。E-mail: zay503@zafu.edu.cn。杨松柏, 博士, 从事分子生物学与猪育种研究。E-mail: sbyang@zafu.edu.cn

miR-129-5p, and miR-206) regulated the porcine *CLTC* gene through seed sequences showed that miR-1 mutant plasmid did not inhibit the luciferase activity. Thus, the results demonstrated that miR-1 inhibited porcine *CLTC* gene expression through its seed sequence binding with *CLTC* 3'UTR. [Ch, 6 fig. 2 tab. 23 ref.]

Key words: porcine; *CLTC*; miRNA; endocytosis; dual luciferase reporter gene vector

miRNA 是一类小的单链非编码核糖核酸序列, 长度为 22~24 个核苷酸, 通过与靶基因 3'UTR 区域结合进而抑制靶基因的表达^[1-3]。miRNA 具有高度的保守性、时序性和组织特异性, 能够调控生物体特定的生理功能, 在生物体生长、发育和疾病发生等过程中发挥着重要的作用^[4]。网格蛋白(clathrin)介导的胞吞是信号分子进入细胞的主要途径, 也是病毒进入细胞的重要途径。病毒侵入细胞是病毒增殖最为关键的一步, 而网格蛋白介导的胞吞是病毒侵入细胞最主要也是最为典型的一种细胞胞吞途径。网格蛋白又称笼形蛋白^[5], 由 PEARSE 在 1975 年首次分离得到并命名^[6]。网格蛋白的 1 个重链(clathrin heavy chain, *CLTC*)和 1 个轻链组成一个二聚体, 3 个二聚体组成三联体骨架结构, 多个三联体骨架结构组成五边形或六边形网格结构的包被亚基, 最后由这些包被亚基构成多面体的网格蛋白包被的囊泡结构-小窝, 病毒即是通过与小窝蛋白上的病毒受体结合进入细胞的^[7]。如登革病毒(dengue virus, DNV)^[8-9], 猴出血热病毒(simian hemorrhagic fever virus, SHFV)^[10], 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)^[11-13], 乙型肝炎病毒(japanese encephalitis virus, JEV)^[14], 蓝耳病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRSV)^[15], 肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV-71)^[16]等。该途径的抑制能够有效阻止病毒的感染, 如用 siRNA 敲低 *CLTC* 基因, 能够有效阻断乙脑病毒对猪 *Sus scrofa* 肾上皮细胞 PK15 的感染^[14]。本研究旨在筛选出一批能够靶向猪 *CLTC* 基因 miRNA, 从而为筛选广谱抗病毒因子提供基础。鉴于双荧光素酶报告分析法的常规性和荧光定量的灵敏性, 本研究结合 2 种方法, 以增加基因筛选的可靠性。利用双荧光素酶报告系统获得靶向猪 *CLTC* 基因的 miRNA: miR-205, miR-1, miR-129-5p 和 miR-206, 并以点突变实验鉴定出 miR-1 通过种子区结合靶向作用于猪 *CLTC* 基因 3'UTR。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和载体

幼小仓鼠 *Mesocricetus auratus* 肾细胞系(BHK-21)和猪肾上皮细胞系(PK15)购自中国典型培养物保藏中心; 双荧光素酶检测试剂盒和 psiCHECK2 载体均购自 Promega; miRNA 模拟物(miRNA mimics)购自上海吉玛制药技术有限公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; T4 DNA 连接酶, DNA 片段, 限制性内切酶 *Xho*I 和 *Not*I 购自 Fermentas 公司; SYBR Green 试剂购自 TOYOBO 公司; HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; 引物由上海博尚生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 靶向猪 *CLTC* 基因 miRNA 的预测 根据 miRBase(<http://www.mirbase.org>)数据库公布的猪 miRNA (Release 21, 2014), 利用 Targetscan(<http://www.targetscan.org>), BioGps(<http://www.biogps.org>)软件进行 miRNA 的靶向分析; 使用 miRNAmap(<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw>)软件鉴定 miRNA 的表达特异性, 筛选出靶向猪 *CLTC* 基因 3'UTR 序列的 miRNA, 并合成相应的猪 miRNA 模拟物(上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2.2 重组质粒的构建 利用美国生物技术信息中心(NCBI)数据库中猪 *CLTC* 基因序列, 设计引物并扩增猪 *CLTC* 基因 3'UTR 序列; 采用 *Xho*I 和 *Not*I 酶切位点, 与 psiCHECK2 载体连接获得双荧光素酶报告载体, 命名为 Wild Type(WT)。设计 miRNA 种子区和猪 *CLTC* 基因 3'UTR 结合区的突变引物(表 1), 使用引物重叠聚合酶链式反应(PCR)的方法, 以猪 *CLTC* 基因 3'UTR 片段为模板, 扩增得到 *CLTC* 基因 3'UTR 的上下游片段; 再以上下游同源臂的混合物作为模板, PCR 扩增得到含有突变结合位点的 *CLTC* 基因 3'UTR 目的片段; 与 psiCHECK2 载体连接, 经测序验证后获得 *CLTC* 靶位点突变报告载体, 命名为 Mutant Type(MT)。

1.2.3 双荧光素酶报告基因实验 用含 10%胎牛血清(体积分数)的 MEM(minimum essential media)培养基于体积分数为 5%二氧化碳, 37 °C 的环境条件下培养 BHK-21 细胞, 并进行细胞传代。转染前一天将

表 1 构建含猪 *CLTC*-3'UTR 突变序列的双荧光素酶载体的突变引物

Table 1 Primers for constructing luciferase reporter gene vectors containing porcine <i>CLTC</i> mutation 3'UTR area		
引物名称	引物序列 (5'→3')	对应的 miRNA
MT1-R	CGAAAAGTAGTCCAAGTAGAAATAAAGGTTACAAGAACA	miR-205
MT1-F	TTTCTACTTGGACTACTTTTCGTTTCTAACTGTAAACTTGGA	
MT2-F	TCTGTAACCGTATCATTTTAGAATTTATTTTCAAAGGG	
MT2-R	TAAAATGATACGGTTACAGAAATAAGCTTTTAACATAGGT	miR-1/206
MT3-F	TAAACGTTTAATATTGGTATGTGACCATGCAAGACTGT	
MT3-R	CATACCAATATTAAACGTTTAGCTTTTCTTTGAATAAAAG	miR-129-5p
<i>Xho</i> I -F	CCCTCGAGGACGGGAAGCTGATCCTGTAGT	
<i>Not</i> I -R	ATTTGCGGCGCTTCCACAAACAAACTGAAGAACAG	

细胞接种至 24 孔板，接种密度为 2.5×10^5 个·孔⁻¹，培养过夜后按照 Lipofectamine 2000 的说明书进行细胞瞬时转染。设置 8 个实验组：①无 miRNA 无转染试剂的空白对照；②阴性对照(NC)，WT；③ miR-205，WT；④ miR-1，WT；⑤miR-129-5p，WT；⑥miR-206，WT；⑦miR-19a，WT；⑧miR-19b，WT。转染 24 h 后，收集细胞，按照双荧光检测试剂盒说明书进行荧光检测，计算萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值，确定不同样品之间报告基因的激活程度。同时测定每组 3 个平行孔之间的相对发光比率(RLU)，计算标准误差，统计不同转染组之间的差异。

1.2.4 荧光定量 PCR 以猪 cDNA 为模板设计扩增 *CLTC* 基因的定量引物，12 孔板培养 PK15 细胞，接种密度为 5×10^5 个·孔⁻¹，培养过夜后对细胞进行转染。设置 8 个实验组：①NC，WT；②miR-205，WT；③miR-1，WT；④miR-129-5p，WT；⑤miR-206，WT；⑥miR-19a，WT；⑦miR-19b，WT；⑧无 miRNA 无转染试剂的空白对照。转染 48 h 后收集细胞，Trizol 试剂提取细胞总 RNA，并反转录成 cDNA，定量 PCR 检测 *CLTC* 基因的 mRNA 的表达变化，统计每组 *CLTC* 基因的表达差异。

1.2.5 点突变双荧光素酶报告基因检测 用双荧光素酶检测试剂盒检测 miRNA 对点突变重组载体荧光素酶活性值的影响，实验组设置如下：①无 miRNA 无转染试剂的空白对照；②NC，WT；③miR-205，WT；④miR-205，MT；⑤miR-1，WT；⑥miR-1，MT；⑦miR-206，WT；⑧miR-206，MT；⑨miR-129-5p，WT；⑩miR-129-5p，MT。按照 1.2.3 进行双荧光素酶报告基因检测实验。

1.3 数据分析

所有数据均以“平均数±标准差”表示。统计学分析方法采用 SAS 8.0 的 *t* 检验和 GLM 方差分析，*P*<0.05 表示差异显著，*P*<0.01 表示差异极显著。为消除误差，设置重复 3 次·实验组⁻¹，取平均值。

2 结果与分析

2.1 生物信息学预测靶向猪 *CLTC* 基因的 miRNA

利用生物信息学分析软件，初步预测出与猪 *CLTC* 基因 3'UTR 有互补结合位点的 6 条 miRNA：miR-205，miR-1，miR-129-5p，miR-206，miR-19a，miR-19b(表 2)，进行后续实验验证。

2.2 猪 *CLTC* 基因 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体与突变载体的构建

将猪 *CLTC* 基因 3'UTR 片断和 *CLTC*-3'UTR 点突变片断分别克隆至双荧光酶报告基因载体 psiCHECK₂ 中，获得重组质粒 psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR(图 1)，并以鉴定引物进行菌液 PCR 鉴定。检测长度为 1 200 bp 的猪 *CLTC* 基因 3'UTR 的双荧光素酶载体(图 2)和猪 *CLTC* 基因 3'UTR 的双荧光素酶靶标突变载体 psiCHECK₂-3'UTR-MT(图 3)，测序验证后提取质粒备用。

2.3 靶向猪 *CLTC*-3'UTR 的 miRNA 的筛选

双荧光酶报告基因载体

表 2 与猪 *CLTC* 基因 3'UTR 可能结合的 miRNA

Table 2 Potential miRNA targeting 3'UTR of porcine <i>CLTC</i> gene			
miRNA 模拟物	<i>CLTC</i> -3'UTR 碱基位置	表达特异性	miRNA 成熟序列 (5'→3')
miR-205	111~119	胸腺	UCCUUAUCCACCGGAGUCUG
miR-1	173~181	肌肉	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA
miR-206	173~181	肌肉	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGA
miR-129-5p	437~443	肌肉	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
miR-19a	303~310	脾脏	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA
miR-19b	303~310	卵巢	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA

(WT)分别与 6 种 miRNA 模拟物共转染 BHK-21 细胞,以 NC 为阴性对照,细胞培养 24 h 以后,双荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性(图 4)。结果显示:miR-205,miR-1,miR-206 和 miR-129-5p 能显著降低荧光素酶活性值。miRNA 模拟物转染 PK15 细胞以后,荧光定量 PCR 检测 *CLTC* 基因的表达量(图 5),结果显示:miR-1 和 miR-129-5p 能够显著降低 *CLTC* 基因 mRNA 的表达水平,而 miR-205 和 miR-206 与对照组相比,差异不显著。

2.4 靶向猪 *CLTC*-3'UTR 的 miRNA 的进一步确认

为了进一步验证各 miRNA 与猪 *CLTC*-3'UTR 结合的靶位点,我们选取筛选出的 miR-205,miR-1,miR-206,miR-129-5p 做下一步的点突变实验。将 miRNA 对猪 *CLTC* 基因 3'UTR 靶位点进行突变,其中 miR-206 和 miR-1 的靶位点相同,所以突变载体相同,分别构建 miR-205,miR-129-5p,miR-1/ssc-miR-206 对应 *CLTC* 靶点的突变载体。miRNA 与突变载体(MT)或双荧光报告基因载体(WT)共转染 BHK-21 细胞后检测荧光素酶活性。结果显示:突变质粒 psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR 和 miR-1 共转染细胞后,与对照组相比,其荧光素酶活性得以恢复(图 6),说明 miR-1 通过种子区域作用于猪 *CLTC* 基因的 3'UTR 抑制其表达。

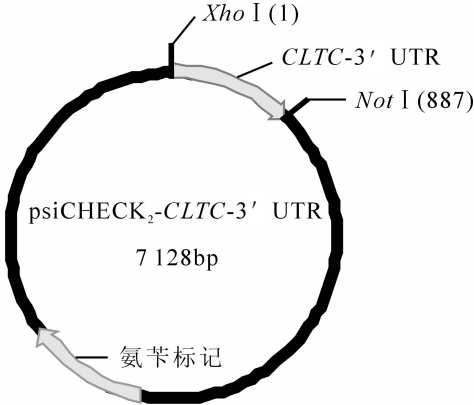
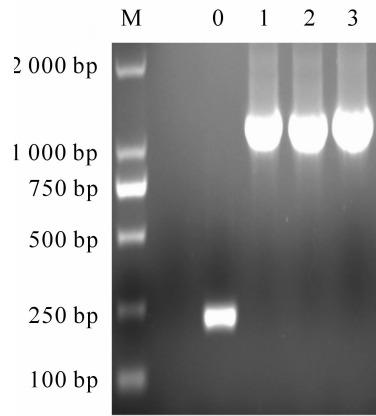


图 1 *CLTC*-3'UTR 双荧光素酶报告基因载体的构建图谱

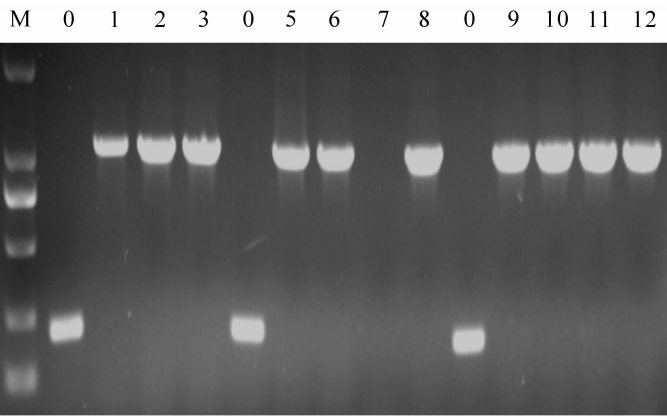
Figure 1 Constructing of luciferase reporter gene vectors or porcine *CLTC*-3'UTR vectors



M. DNA 标记物;
0. psiCHECK₂ 空载;
1~3. psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR 载体。

图 2 菌液 PCR 验证猪 *CLTC*-3'UTR 双荧光素酶报告基因载体

Figure 2 Microbial validation of luciferase reporter gene vectors



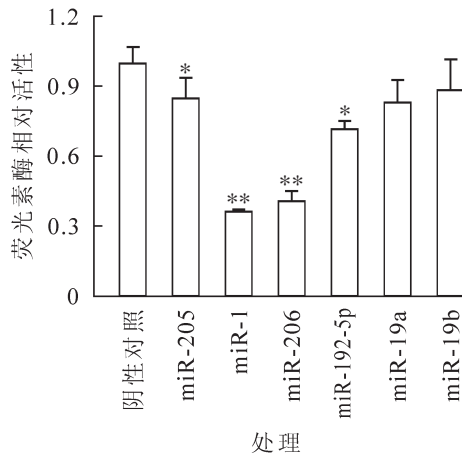
M. DNA 标记物; 0. psiCHECK₂ 空载;
1~3. psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR-MT-miR-205 载体;
5~8. psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR-MT-miR-1/206 载体;
9~12. psiCHECK₂-*CLTC*-3'UTR-MT-miR-129-5p 载体。

图 3 菌液 PCR 鉴定猪 *CLTC*-3'UTR 双荧光素酶靶位点突变载体

Figure 3 Microbial validation of porcine *CLTC*-3'UTR mutation vectors

3 结论与讨论

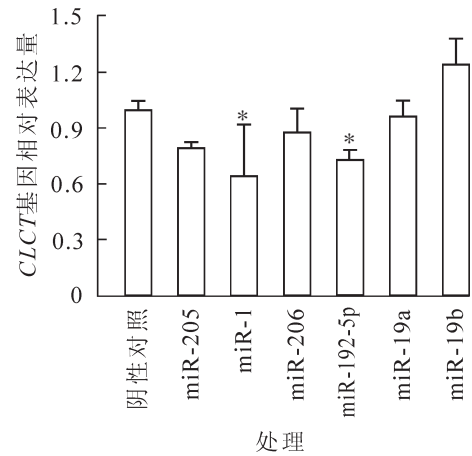
miRNA 广泛存在于生物体内,对生物体的转录后基因表达调控起着关键的作用^[17]。在植物细胞中,成熟的 miRNA 先与一种称为 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的复合物结合,再特异性地与目标 mRNA 结合,引起 mRNA 的降解;动物细胞中,大部分的 miRNA 与其靶 mRNA 不完全互补,miRNA 则通过与对应的 mRNA 的 3'端非翻译区(3'UTR)结合阻止转录后的翻译,起到调节基因表达的作用^[18]。愈来愈多的研究证实,miRNA 一般通过 2 种方式调控病毒在宿主细胞内的增殖,一种是 miRNA 直接靶向病毒的 mRNA 序列,抑制病毒相关基因的表达,这类 miRNA 已有相关的研究报道,如 miR-323,miR-491,miR-654 靶向甲型 H1N1 流感病毒(H1N1 subtype influenza A virus)^[20],



** 表示 $P < 0.01$, 差异极显著; * 表示 $P < 0.05$, 差异显著。

图 4 miRNA 模拟物与 psiCHECK₂-*CLTC*-3' UTR 共转染 BHK-21 细胞的相对荧光素酶活性

Figure 4 Relative luciferase activity of psiCHECK₂-*CLTC*-3' UTR reporter cotransfected with miRNA mimics in BHK-21 cells



* 表示 $P < 0.05$, 差异显著。

图 5 定量 PCR 检测 miRNA 模拟物转染 PK15 细胞后 *CLTC* 基因的表达量

Figure 5 *CLTC* gene expression was detected by q-PCR method after transfecting with miRNA mimics in PK15 cells

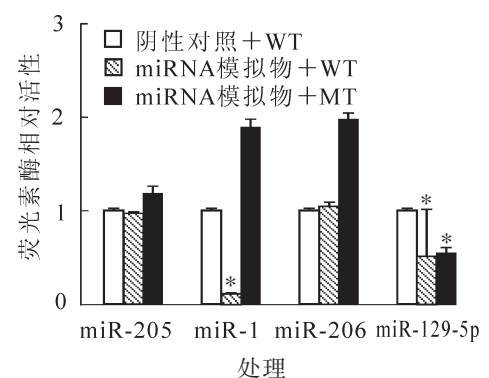
miR-24 和 miR-93 靶向水泡口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV)^[21]。另一种是 miRNA 通过靶向宿主基因调节细胞内的信号通路进而阻止病毒的增殖, 这类 miRNA 的研究集中在脂质代谢方面, 如 miR-27a 通过靶向控制脂质合成和运输的基因维甲酸 X 受体 α (RXR α) 和 ATP 结合盒转运子 A1 (ABCA1) 调控脂质代谢, 从而抑制丙型肝炎病毒的复制^[22]。截至目前, 在 miRBase 数据库软件中已鉴定出的人类 miRNA 有 1 881 种, 小鼠的有 1 193 种^[19], 猪的有 382 种, 但对猪 miRNA 的生物学功能尚不清楚。本研究利用生物信息学软件预测出能够与猪 *CLTC* 基因 3' UTR 靶向结合的 6 条 miRNA: miR-205, miR-1, miR-206, miR-129-5p, miR-19a, miR-19b, 利用双荧光素酶报告基因法和荧光定量 PCR 法进一步筛选出能够靶向配对的 miRNA。结果显示: miR-129-5p, miR-1 在双荧光报告基因实验和荧光定量 PCR 中都能够显著降低 *CLTC* 基因的表达量, 而 miR-205, miR-206 在双荧光报告基因实验中能够显著降低

CLTC 基因的表达量, 但在荧光定量 PCR 中差异不显著。为进一步验证靶向猪 *CLTC* 基因的 miRNA, 我们设计了点突变载体, 将 miRNA 和其对应点突变载体共转染细胞检测荧光素酶表达活性。结果显示: miR-1 通过种子区的结合而抑制靶基因猪 *CLTC* 基因的表达, miR-129-5p 能够抑制 *CLTC* 基因的表达, 但突变载体的荧光活性并没有得到恢复, 说明 miR-129-5p 可能不是因为靶基因种子区的结合而抑制 *CLTC* 基因的表达, 推测可能存在其他的靶作用位点。截至目前, 有关 miR-129-5p 对病毒侵入细胞的研究鲜有报道, 前期研究发现虾 miR-1 通过抑制 *CLTC* 基因的表达调控细胞的吞噬作用^[23], 推测本研究鉴定出的 miR-129-5p 可能在病毒侵入细胞过程中发挥重要作用。

本研究成功构建了包含猪 *CLTC* 基因 3' UTR 的双荧光酶报告基因载体和不同 miRNA 种子区域所对应的点突变报告载体, 成功筛选出靶向猪 *CLTC* 基因的 miR-1 和 miR-129-5p, 利用点突变实验最终确定 miR-1 通过种子区靶向结合猪 *CLTC* 基因并抑制其表达, 研究结果为探究 miRNA-*CLTC* 基因-clathrin 胞吞通路在抵抗病毒侵入宿主细胞的研究打下基础, 也为抗病候选基因的筛选提供了新的素材。

4 参考文献

[1] WANG Yang, STRICKER H M, GUO Deming, et al. MicroRNA: past and present [J]. *Front BioSci*, 2007, 12(6): 2316



* 表示 $P < 0.05$, 差异显著。

图 6 种子区突变前后 4 种 miRNA 模拟物对荧光素酶表达的影响

Figure 6 Relative luciferase activity of different reporters in the presence or absence of miRNA seed sequence in BHK-21 cell

– 2329.

- [2] MOORE M J, SCHEEL T K, LUNA J M, *et al.* miRNA-target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity [J]. *Nat Commun*, 2015, **6**: 8864. doi: 10. 1038/ncomms 9864.
- [3] ROY-CHAUDHURI B, VALDMANIS P N, ZHANG Y, *et al.* Regulation of microRNA-mediated gene silencing by microRNA precursors [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(9): 825 – 832.
- [4] KETTING R F. MicroRNA biogenesis and function: an overview [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, **700**: 1 – 14.
- [5] BRODSKY F M. Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, **28**(1): 309 – 336.
- [6] PEARSE B M. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1976, **73**(4): 1255 – 1259.
- [7] McMAHON H T, BOUCROT E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, **12**(8): 517 – 533.
- [8] ACOSTA E G, CASTILLA V, DAMONTE E B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis [J]. *J Gen Virol*, 2008, **89**(Pt 2): 474 – 484.
- [9] PICCINI L E, CASTILLA V, DAMONTE E B. Dengue-3 virus entry into vero cells: role of clathrin-mediated endocytosis in the outcome of infection [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(10): e0140824. doi: 10. 1371/journal. pone. 0140824.
- [10] CAI Yingyun, POSTNIKOVA E N, BERNBAUM J G, *et al.* Simian hemorrhagic fever virus cell entry is dependent on CD163 and uses a clathrin-mediated endocytosis-like pathway [J]. *J Virol*, 2015, **89**(1): 844 – 856.
- [11] BLAISING J, LÉVY P L, GONDEAU C, *et al.* Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking [J]. *Cell Microbiol*, 2013, **15**(11): 1866 – 1882.
- [12] BENEDICTO I, GONDAR V, MOLINA-JIMÉNEZ F, *et al.* Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress [J]. *J Virol*, 2015, **89**(8): 4180 – 4190.
- [13] BLANCHARD E, BELOUZARD S, GOUESLAIN L, *et al.* Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis [J]. *J Virol*, 2006, **80**(14): 6964 – 6972.
- [14] YANG Songbai, HE Minhui, LIU Xiangdong, *et al.* Japanese encephalitis virus infects porcine kidney epithelial PK15 cells via clathrin-and cholesterol-dependent endocytosis [J]. *Virol J*, 2013, **10**(1): 258. doi: 10. 1186/1743-422X-10-258.
- [15] HUANG Li, ZHANG Yuanpeng, YU Yaling, *et al.* Role of lipid rafts in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in MARC-145 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **414**(3): 545 – 550.
- [16] HUSSAIN K M, LEONG K L, NG M M, *et al.* The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71 [J]. *J Biol Chem*, 2011, **286**(1): 309 – 321.
- [17] HUNTZINGER E, IZAURRALDE E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, **12**(2): 99 – 110.
- [18] 姜雪鸥, 钟金城. miRNA 的研究进展及其展望[J]. 中国草食动物, 2011, **31**(4): 63 – 67.
JIANG Xueou, ZHONG Jincheng. Progress in miRNA research and its prospect [J]. *China Herbivore Sci*, 2011, **31**(4): 63 – 67.
- [19] 戴丽荷, 褚晓红, 路伏增, 等. 靶向猪 *ATGL* 基因的 miRNA 预测及鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2015, **46**(8): 1281 – 1289.
DA Lihe, CHU Xiaohong, LU Fuzeng, *et al.* Prediction and validation of miRNA targeting porcine *ATGL* gene [J]. *Acta Vet Zootech Sin*, 2015, **46**(8): 1281 – 1289.
- [20] SONG Liping, LIU He, GAO Shijuan, *et al.* Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells [J]. *J Virol*, 2010, **84**(17): 8849 – 8860.
- [21] OTSUKA M, JING Qing, GEORGEL P, *et al.* Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression [J]. *Immunity*, 2007, **27**(1): 123 – 134.
- [22] SHIRASAKI T, HONDA M, SHIMAKAMI T, *et al.* MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells [J]. *J Virol*, 2013, **87**(9): 5270 – 5286.
- [23] LIU Cuilian, WANG Jiajia, ZHANG Xiaobo. The involvement of miR-1-clathrin pathway in the regulation of phagocytosis [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(6): e98747. doi: 10. 1371/journal. pone. 0098747.