

外泌体包裹的 miR-19b 抑制 EV71 复制的影响

李艳梅¹,程侠菊¹,王燕²

(1.苏州大学 生物医学研究院,江苏 苏州 215123;2.苏州市立医院,江苏 苏州 215008)

摘要:[目的]探讨外泌体包裹的 miR-19b 对 EV71 病毒复制的影响,为 EV71 病毒的 miRNA 防治药物的开发提供参考.[方法]将游离的 miR-19b-cy3.5 分子和转染 miR-19b-cy3.5 的 HT29 细胞分泌的外泌体分别处理 T98G 细胞,观察进入细胞的效率;分别提取未处理的、转染 mimic-n.c.和转染 miR-19b 的 HT29 细胞分泌的外泌体,并给予 T98G 细胞孵育后,检测细胞内 miR-19b 的表达;分别以 60 mg/L 转染 mimic-n.c.的 HT29 细胞分泌的外泌体、60 mg/L 和 40 mg/L 转染 miR-19b 的 HT29 细胞分泌的外泌体孵育 T98G 细胞并感染 EV71 病毒,检测病毒 RNA 载量;将携带包裹的 miR-19b-cy3.5 的 HT29 细胞来源的外泌体,通过尾静脉注射小鼠检测 miR-19b 在小鼠各个器官中的表达.[结果] miR-19b-cy3.5 能够通过外泌体的形式进入 T98G 细胞中,而游离的 miR-19b-cy3.5 无法进入细胞;转染 miR-19b 的 HT29 细胞分泌的外泌体在处理 T98G 细胞后,胞内 miR-19b 高表达,同时,外泌体处理后的 T98G 细胞中 EV71 病毒 RNA 复制量显著降低;动物实验中,外泌体包裹的 miR-19b 能够在小鼠的脑、肝及肺有效表达.[结论]外泌体包裹的 miR-19b 能够有效进入靶细胞中,并且可以抑制靶细胞中 EV71 病毒的复制;同时,外泌体包裹的 miR-19b 能够有效进入小鼠脑、肝以及肺等组织中并表达。

关键词:miR-19b;EV71;外泌体;microRNA

中图分类号:R392

文献标志码:A

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)病毒属于 A 型肠道病毒,是无包膜正向单链 RNA 病毒,衣壳为二面体立体对称,对中枢神经系统有极高的感染性.EV71 主要引起 5 岁以下儿童手足口病(hand-foot and mouth disease, HFMD),重症感染常导致急性脑损伤(Acute brain injury, ABI),临床症状包括脑炎(encephalitis)、无菌性脑膜炎(aseptic meningitis)、急性无力肢体麻痹(acute flaccid paralysis)等,据统计约 0.2%~1% EV71 感染的儿童发展为神经系统综合征^[1].由于肠道病毒的传染性强,HFMD 经常于夏秋季在幼儿园或小学生发生小规模流行^[2].目前在临床上尚无有效的抗病毒特效药物,对 EV71 感染的患者主要以对症和支持治疗为主。

外泌体是由细胞释放到细胞外基质中的一种双层膜结构的囊泡,内含的核酸及蛋白质在病毒的持续性感染及扩散中起到了重要作用.2013 年,SHTAM 等^[3]发现了细胞囊泡运输的调节机制,为外泌体作为基因和药物递送的载体提供了理论依据,具有重要的临床意义.相对于脂质体制剂来说,外泌体是天然存在的分泌性信息载体,毒性较低,生物相容性好、具有高通透性和滞留效应、能透过血脑屏障。

miRNA 是外泌体中含量最丰富的一种 RNA,是一类长度为 19~24 个核苷酸的非编码 RNA,通过加速 mRNA 降解或者抑制 mRNA 翻译调控基因表达^[4],进而参与细胞生长、增殖、凋亡和信号转导的半蛋白编码基因的表达^[5-6].有证据表明,病毒感染可以影响 miRNA 的表达,改变 miRNA 的表达可以抑制或增强抗病毒反应^[7].研究发现人类免疫缺陷病毒(HIV-1)受体 CD4 蛋白受 miR-221 和 miR-222 的调控^[8],miR-34a 是黄病毒复制的有效抑制剂^[9],miRNA-221 具有增强 IFN-I 抗丙型肝炎病毒(HCV)的作用^[10].较多证据表明 miRNA 与 EV71 感染复制有关.miR-197 的过表达会抑制 EV71 的复制,而抑制 miR-197 表达后 EV71

收稿日期:2022-01-06;修回日期:2022-04-23.

基金项目:国家自然科学基金(81902913);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD).

作者简介:李艳梅(1984-),女,山西吕梁人,苏州大学助理研究员,研究方向为生物显微技术与感染免疫,E-mail:yanmeili1031@163.com.

通信作者:王燕,E-mail:wooyan@yeah.net.

复制水平将显著升高^[11].EV71 感染细胞分泌的外泌体选择性地包装了高水平 miR-146a,miR-146a 可通过抑制 I 型干扰素应答功能转移到受体细胞并促进外泌体 EV71 RNA 在受体细胞中复制^[12].在 EV71 感染过程中 hsa-miR-17(~92)的表达显著下调,过表达 hsa-miR-17(~92) EV71 的复制受到抑制,而抑制内源性 hsa-miR-17(~92)促进了 EV71 复制^[13].microRNA-23b 通过下调 EV71 VP1 蛋白抑制肠病毒 71 复制^[14].

miR-19b 是一个与细胞分化和生长等有关的 miRNA 分子,与心肌分化以及肿瘤侵袭迁移等有关^[15-16].有研究报道 gga-miR-19b-3p 促进新城疫病毒(NDV)诱导的炎症细胞因子的产生抑制 NDV 的复制,而抑制内源性 miR-19b 表达则有相反的效果上调 miR-19b 可以抑制 NDV 的复制^[17].还有研究发现 miR-19b 是调控人类免疫缺陷病毒(HIV)感染期间 CD8+T 细胞功能的“磷酸酶和紧张素同源物”,可以直接抑制体外感染 HIV 的 T 细胞中的病毒产生^[18].目前,miR-19b 是否影响 EV71 病毒的复制尚未有报道.本研究以期为 EV71 的以外泌体为载体的 miRNA 防治药物的开发提供新的参考与策略,探讨了外泌体包裹的 miR-19b 对 EV71 复制的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞株 HT-29, EV71、人脑胶质瘤细胞 T98G 以及 miR-19b-cy3.5 质粒由生物医学研究院保存;DMEM、1640 培养液、胎牛血清购自 Gibco 公司;ExoQuickTC 外泌体提取试剂盒(美国 SBI);超滤管(美国 Millipore);Trizol 试剂(北京天漠生物科技有限公司);miRNA 反转录试剂盒(广州锐博科技生物有限公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞转染实验

HT29 细胞接种至 24 孔板中,待细胞生长至 50%~70%,将细胞分为空白对照组、转染 mimic-n.c.对照组和转染 miR-19b 组.转染方式如下,A 管:将 20 pmol siRNA 溶于 25 μ L 无血清培养基中;B 管:将 1.5 μ L Lipofectamine 3000 溶于 25 μ L 无血清培养基中混匀;将 A 和 B 两管混合,放置 5 min,将混合液加入 24 孔板对应孔中.

1.2.2 外泌体提取

将 HT29 细胞培养上清以 10 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 45 min,去除死细胞及细胞碎片,并通过 0.22 μ m 过滤器进行过滤.使用 Exoquick-TC(美国 System Bioscience 公司)提取细胞培养上清中的外泌体,将培养基与 Exoquick-T 试剂混匀,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置过夜,以 1 500 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,去掉上清,将离心管底部的外泌体沉淀用 PBS 悬浮.

1.2.3 荧光定量 PCR

将 T98G 细胞接种至 12 孔板中,待细胞生长至 70%~80%后分为 3 组,其中空白对照组加入正常的 HT29 分泌的外泌体,mimic-n.c.对照组加入转染 mimic-n.c.的 HT29 分泌的外泌体,处理组加入转染 miR-19b 的 HT29 分泌的外泌体,培养 48 h.

将 T98G 细胞接种至 12 孔板中,待细胞生长至 70%~80%后分为 3 组,60 mg/L 转染 mimic-n.c.的 HT29 分泌的外泌体、40 mg/L 转染 miR-19b 的 HT29 分泌的外泌体以及 60 mg/L 转染 miR-19b 的 HT29 分泌的外泌体分别与 MOI=2 的 EV71 混匀共培养 T98G 细胞 48 h.

收集以上 6 组细胞,使用 Trizol 法(InvitrogenTM TRIzol)提取细胞总 RNA,使用反转录试剂盒(First Strand cDNA Synthesis)分别将总 RNA 分别逆转录成对应的 cDNA,再利用荧光定量 PCR (Quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术以 GAPDH 为内参基因,检测 EV71 病毒 RNA 以及 miR-19b 的表达量.反应程序设置为 95 $^{\circ}$ C,10 min,95 $^{\circ}$ C,15 s,60 $^{\circ}$ C,1 min,共计 40 个循环.引物序列如下:

EV71 viral RNA:

Forward: 5'-GCTCTATAGGAGATAGTGTGAGTAGGG-3'

Reverse: 5'-ATGACTGCTCACCTGCGTGTT-3'

miR-19b:

Forward: 5'-CCTGTCGCCCAATCAAA-3'

Reverse: 5'-CAACCTGTGTAGAAAGGGGTT-3'

GAPDH:

Forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'

Reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

1.2.4 外源性外泌体包裹的 miR-19b-cy3.5 在小鼠体的分布

尾静脉注射 BALB/c 小鼠转染 miR-19b-cy3.5 的 HT29 细胞分泌的外泌体,对照组注射 PBS.48 h 后取脑、肺、肝组织置于 4% 多聚甲醛固定 8 h;冷冻切片机切片 5 μm ,室温放置 30 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;免疫组化笔画圈,2% BSA 室温封闭 1 h;一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min;二抗室温避光孵育 1 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min;DAPI 染色,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加防淬灭剂,封片,在激光共聚焦显微镜下观察 miR-19b-cy3.5 的表达情况.

1.2.5 细胞的固定及免疫荧光

在培养板中培养好细胞后,吸除培养基,使用 PBS 轻洗细胞 2 次,然后加入 4% 多聚甲醛(PBS 配制)固定 15 min;除去多聚甲醛,PBS 轻洗细胞 3 次,每次 5 min.用 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min,除去 Triton X-100,使用 PBS 轻洗细胞 3 次,每次 5 min;用 3% H_2O_2 孵育 15 min,除去 H_2O_2 ,PBS 轻洗细胞 3 次,每次 5 min;用 10% 的与二抗同源的血清封闭 30 min;滴加足够量适宜浓度的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,除去一抗,使用 PBS 轻洗细胞 3 次,每次 5 min;滴加足够量适宜浓度的二抗,室温避光孵育 60 min,除去二抗,使用 PBS 轻洗细胞 3 次,每次 5 min;用 0.5 mg/L DAPI 避光孵育 5 min,PBS 轻洗细胞 3 次,每次 5 min,将爬片轻轻勾起,用小镊子取出,用吸水纸吸干爬片上的液体,封片液封片,用激光共聚焦采集图像.

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,上述实验均重复 3 次,组间差异比较采用 t 检验. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

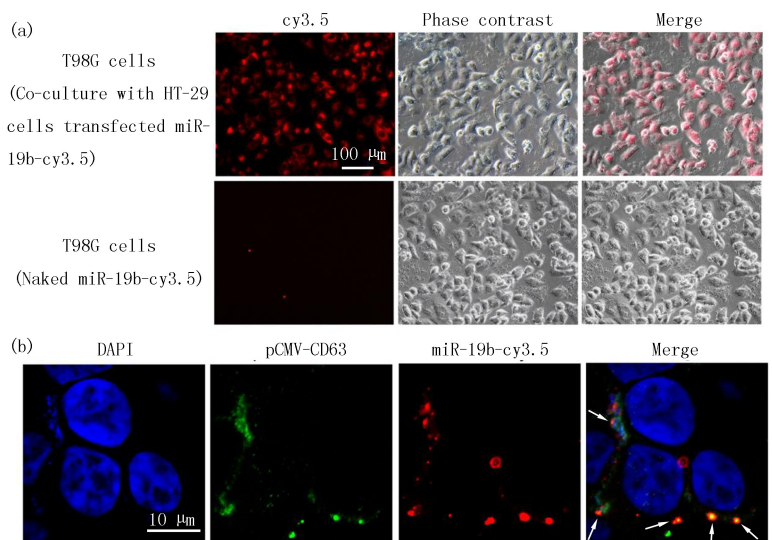
2 结 果

2.1 外泌体携带包裹的 miR-19b 可以有效地形式进入靶细胞

将 miR-19b-cy3.5 分子转染 HT29 细胞,提取分泌的外泌体并加入 T98G 细胞中,外泌体包裹的 miR-19b-cy3.5 可以有效进入 T98G 细胞,而游离的 miR-19b-cy3.5 分子无法进入 T98G 细胞(图 1(a)).另外,我们在 T98G 细胞中过表达外泌体的分子标志物 CD63,发现 miR-19b 与 CD63 发生共定位,这说明 miR-19b 随外泌体一同进入 T98G 细胞(图 1(b)).

2.2 外泌体包裹的 miR-19b 在靶细胞中可有效抑制 EV71 病毒复制

T98G 细胞分别与未处理的 HT29 细胞、转染 mimic-n. c. 的 HT29 细胞以及转染 miR-19b 的 HT29 细胞分泌的外泌体共孵育,



(a) miR-19b-cy3.5 分子以及转染 miR-19b-cy3.5 的 HT29 细胞分泌的外泌体分别加入 T98G 细胞; (b) T98G 细胞中过表达外泌体的分子标志物 CD63 与 miR-19b 共定位.

图 1 miR-19b 以外泌体的形式进入 T98G 细胞(在线彩图)

Fig. 1 Exosome mediated miR-19b co-localization and entry into T98G cells (colour online)

48 h 后检测发现,与转染 miR-19b 的 HT29 细胞分泌的外泌体共孵育的 T98G 细胞中的 miR-19b 表达显著增加(图 2(A)).另外,转染 miR-19b 的 HT-29 细胞分泌的外泌体,使其携带 miR-19b 后并处理 T98G 细胞(40 mg/L),T98G 胞内的病毒 RNA 复制载量显著低于转染 mimic-n.c. 的 HT29 细胞分泌的外泌体处理组,同时,60 mg/L 的携带 miR-19b 外泌体处理 T98G 细胞后,其病毒 RNA 复制载量显著低于 40 mg/L 外泌体处理组,说明外泌体携带的 miR-19b 在抑制靶细胞中病毒复制过程中显示出剂量依赖性(图 2(B)).

2.3 外泌体携带包裹的 miR-19b 在小鼠组织内的分布

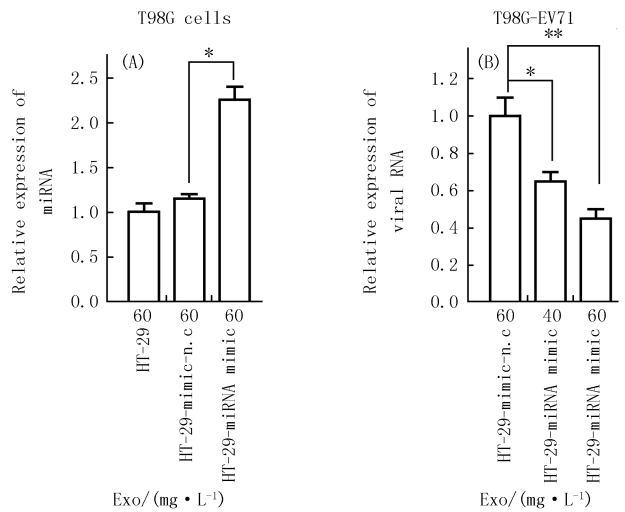
小鼠尾静脉分别注射转染 miR-19b-cy3.5 的 HT29 细胞分泌的外泌体,对照组给予 PBS 处理,48h 后共聚焦分析组织切片,结果显示,外泌体携带的 miR-19b-cy3.5 能够有效进入小鼠脑、肝以及肺并表达(图 3).

3 结 论

外泌体是细胞分泌的一种胞外囊泡,直径为 30~150 nm,由包括 T 细胞、上皮细胞、少突胶质细胞等多种细胞分泌,广泛分布于血液、唾液、脑脊液等生物体液中^[19-20].研究证实,外泌体中含有 DNA,miRNA,4 次跨膜蛋白超家族(CD9,CD63,CD81,CD82)以及与病毒感染复制有关的分子等^[5,20-22],是细胞间信号

传递和信息交流的重要方式,可参与机体免疫应答、抗原提呈、细胞迁移、细胞分化、肿瘤侵袭等^[23].近年来,一些研究表明外泌体中还包含有 STING 蛋白,miR-H5,miR-H3 和 miR-H6 等 miRNA 参与病毒的复制和传播^[24].HIV 感染后通过 DC 信号将病毒粒子与外泌体一起释放并增强了病毒的感染能力^[25-26].丙型肝炎病毒(HCV)的 RNA 可在感染细胞的外泌体中检测到,并可以作为感染颗粒发挥作用^[27-28].不同病原体感染不同细胞产生的外泌体具有不同的表面分子,可作为后期药物及疫苗研发的重要靶点.

miR-19b 是 miR-17-92 基因簇中重要的致癌成员之一,可能与血小板聚集和活化密切相关,在非小细胞肺癌、前列腺癌等多种肿瘤中高表达,能够调控肿瘤细胞的侵袭和迁移能力^[15,29-31],也参与 NDV 和 HIV 病毒的感染与复制^[17-18].miR-19b 与 EV71 的感染复制是否有关系还没有相关研究.本研究利用不同质量浓



(A) T98G细胞分别与正常HT29细胞、转染mimic-n.c. 的HT29细胞以及转染miR-19b的HT29细胞分泌的外泌体共培养,48 h后检测miR-19b的表达量;(B) 60 μg/mL转染mimic-n.c. 的HT29细胞分泌的外泌体、60 μg/mL转染miR-19b的HT29细胞分泌的外泌体、40 μg/mL转染miR-19b的HT29细胞分泌的外泌体处理T98G细胞,48 h后检测病毒RNA的表达量.

图2 外源性miR-19b在T98G细胞内的表达以及对EV71复制的影响

Fig.2 The expression of miR-19b and affection on replication of EV71

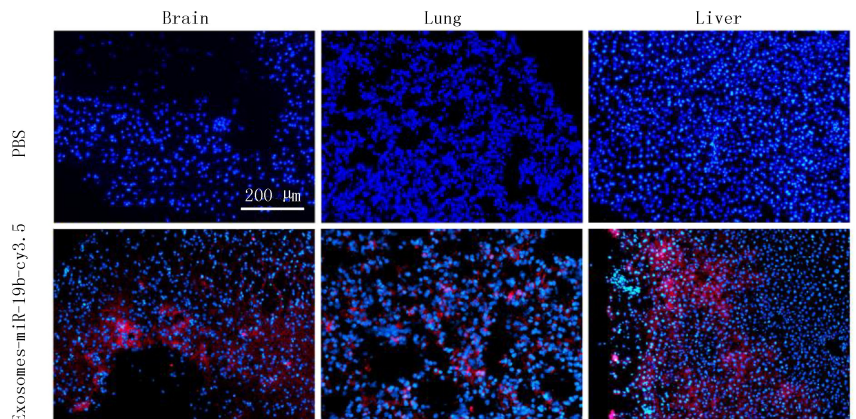


图3 外源性外泌体miR-19b小鼠组织内的表达

Fig.3 The expression of miR-19b in mice was detected by intravenous injection of exosomes secreted by miR-19b-cy3.5 transfected HT29 cells

度的外泌体包裹的 miR-19b 处理 EV71 感染的 T98G 细胞,通过检测病毒 RNA 的表达量,发现 miR-19b 可以浓度依赖性抑制 EV71 在 T98G 细胞内的复制。

miR-19b 可以抑制 EV71 的具体机制还不清楚,有待于进一步研究。据目前报道,miR-221 可以通过靶向 IFN/JAK/STAT 通路中的抑制因子 SOCS1 和 SOCS3 增强 IFN 的抗 HCV 作用^[10];miR-34 家族成员通过加强干扰素调节因子 3 (IRF3)磷酸化和核易位发挥抗黄病毒作用^[9];EV71 感染细胞分泌的外泌体选择性地包装高水平的 miR-146a,可以通过抑制 I 型干扰素反应,功能上转移到并促进外泌体 EV71 RNA 在受体细胞中复制^[12];DNA 甲基化也可能是 hsa-miR-17 92 调控 EV71 病毒感染的一种新机制^[13];miR-23b 和 miR-23b 的上调可通过靶向 EV71 3' UTR 保守序列直接抑制 EV71 的复制^[14]。由此可见,miRNA 可以通过多种途径参与病毒感染与复制。

目前在临床上对 EV71 感染的患者主要以对症和支持治疗为主,外泌体包裹的 miR-19b 在体内是否也可以如进入 T98G 细胞顺利在机体组织中表达?本实验将外泌体包裹的 miR-19-cy3.5 尾静脉注射 BALB/c 小鼠后,冷冻切片观察发现小鼠脑、肝以及肺组织均可检测到 miR-19b-cy3.5。

综上,外泌体包裹的 miR-19b 可以浓度依赖性抑制 EV71 在 T98G 细胞内的复制,也可以在体内的脑、肝及肺组织在表达;这为 EV71 的以外泌体为载体的 miRNA 防治药物的开发提供了理论依据。我们将会对外泌体包裹的 miR-19b 可以抑制 EV71 复制的具体机制做进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] KLEIN M H.EV71 vaccines;a first step towards multivalent hand,foot and mouth disease vaccines[J].Expert Review of Vaccines,2015,14(3):337-340.
- [2] OOI M H,WONG S C,LEWTHWAITE P,et al.Clinical features,diagnosis,and management of Enterovirus 71[J].The Lancet Neurology,2010,9(11):1097-1105.
- [3] SHTAM T A,KOVALEV R A,VARFOLOMEEVA E Y,et al.Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro[J].Cell Communication and Signaling,2013,11:88.
- [4] 秦建平,陶娟,李迎迎,等.血清 miR-25、miR-223 和 miR-373 作为食管鳞癌生物标志物的评价[J].河南师范大学学报(自然科学版),2017,45(1):65-70.
QIN J P,TAO J,LI Y Y,et al.Predictive value of serum miR-25,miR-223,and miR-373 as promising biomarkers in esophageal squamous cell carcinoma[J].Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition),2017,45(1):65-70.
- [5] VALADI H,EKSTRÖM K,BOSSIOS A,et al.Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J].Nature Cell Biology,2007,9(6):654-659.
- [6] BARTEL D P.microRNAs:genomics,biogenesis,mechanism,and function[J].Cell,2004,116(2):281-297.
- [7] TROBAUGH D W,KLIMSTRA W B.microRNA regulation of RNA virus replication and pathogenesis[J].Trends in Molecular Medicine,2017,23(1):80-93.
- [8] LODGE R,BARBOSA J A F,LOMBARD-VADNAIS F,et al.Host microRNAs-221 and-222 inhibit HIV-1 entry in macrophages by targeting the CD4 viral receptor[J].Cell Reports,2017,21(1):141-153.
- [9] SMITH J L,JENG S,MCWEENEY S K,et al.A microRNA screen identifies the Wnt signaling pathway as a regulator of the interferon response during Flavivirus infection[J].Journal of Virology,2017,91(8):e02388-e02316.
- [10] XU G,YANG F,DING C L,et al.miR-221 accentuates IFN's anti-HCV effect by downregulating SOCS₁ and SOCS₃[J].Virology,2014,462/463:343-350.
- [11] TANG W F,HUANG R T,CHIEN K Y,et al.Host microRNA miR-197 plays a negative regulatory role in the Enterovirus 71 infectious cycle by targeting the RAN protein[J].American Journal of Translational Research,2016,90(3):1424-1438.
- [12] FU Y,ZHANG L,ZHANG F,et al.Exosome-mediated miR-146a transfer suppresses type I interferon response and facilitates EV71 infection[J].PLoS Pathogens,2017,13(9):e1006611.
- [13] FU Y,ZHANG L,ZHANG R,et al.Enterovirus 71 suppresses miR-17-92 cluster through up-regulating methylation of the miRNA promoter[J].Frontiers in Microbiology,2019,10:625.
- [14] WEN B P,DAI H J,YANG Y H,et al.microRNA-23b inhibits Enterovirus 71 replication through downregulation of EV71 VP1 protein [J].Intervirology,2013,56(3):195-200.
- [15] LAI Y J,HE S,MA L M,et al.HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate PTEN expression by inhibiting miR-19 in cardiac hypertrophy[J].Molecular and Cellular Biochemistry,2017,432(1/2):179-187.
- [16] LIU D T,YAO H R,LI Y Y,et al.microRNA-19b promotes the migration and invasion of ovarian cancer cells by inhibiting the PTEN/

- AKT signaling pathway[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(1): 559-565.
- [17] CHEN Y, LIU W, XU H X, et al. Gga-miR-19b-3p inhibits Newcastle disease virus replication by suppressing inflammatory response via targeting RNF11 and ZMYND11[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2006.
- [18] YIN L B, SONG C B, ZHENG J F, et al. Elevated expression of miR-19b enhances CD8⁺ T cell function by targeting PTEN in HIV infected long term non-progressors with sustained viral suppression[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 3140.
- [19] BLANCHARD N, LANKAR D, FAURE F, et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/ ζ complex[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 168(7): 3235-3241.
- [20] VLASSOV A V, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2012, 1820(7): 940-948.
- [21] PEINADO H, ALEČKOVIC M, LAVOTSHKIN S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a prometastatic phenotype through MET[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(6): 883-891.
- [22] 余国营, 韩棕远, 王棋文. 细胞外囊泡来源的 miRNA 的生物学功能及临床应用[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 49(4): 98-105.
- YU G Y, HAN Z Y, WANG Q W. The biological function and clinical application of miRNA derived from extracellular vesicles[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2021, 49(4): 98-105.
- [23] YOSHIZAKI T, KONDO S, WAKISAKA N, et al. Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Letters*, 2013, 337(1): 1-7.
- [24] KALAMVOKI M, DESCHAMPS T. Extracellular vesicles during Herpes simplex virus type 1 infection: an inquire[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 63.
- [25] PIGUET V, STEINMAN R M. The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways[J]. *Trends in Immunology*, 2007, 28(11): 503-510.
- [26] WILEY R D, GUMMULURU S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection[J]. *PNAS*, 2006, 103(3): 738-743.
- [27] LONGATTI A, BOYD B, CHISARI F V. Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(5): 2956-2961.
- [28] RAMAKRISHNAIAH V, THUMANN C, FOFANA I, et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells[J]. *PNAS*, 2013, 110(32): 13109-13113.
- [29] OSIP'YANTS A I, KNYAZEVA E N, GALATENKO A V, et al. Changes in the level of circulating hsa-miR-297 and hsa-miR-19b-3p miRNA are associated with generalization of prostate cancer[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, 162(3): 379-382.
- [30] BAUMGARTNER U, BERGER F, HASHEMI GHEINANI A, et al. miR-19b enhances proliferation and apoptosis resistance via the EGFR signaling pathway by targeting PP2A and BIM in non-small cell lung cancer[J]. *Molecules cancer*, 2018, 17(1): 44.
- [31] WILLEIT P, ZAMPETAKI A, DUDEK K, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation[J]. *Circulation Research*, 2013, 112(4): 595-600.

Exosome mediated miR-19b effect on the replication of EV71

Li Yanmei¹, Cheng Xiaju¹, Wang Yan²

(1. Institute of Biology and Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China;

2. Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215008, China)

Abstract: [Objective] The paper aims to examine exosome mediated miR-19b effect on the replication of Enterovirus 71 in T98G cells. [Methods] T98G cells were treated with miR-19b molecules and exosomes secreted by miR-19b-cy3.5 transfected HT29 cells to determine their entry mode. T98G cells were respectively treated with exosomes secreted by normal HT29 cells, mimic-n.c. transfected HT29 cells and miR-19b transfected HT29 cells to detect miR-19b expression. 60 mg/L exosomes secreted by mimic-n.c. transfected HT29 cells, 60 mg/L and 40 mg/L exosomes secreted by miR-19b transfected HT29 cells were respectively co-cultured with EV71 to detect the expression of viral RNA. [Results] The expression of miR-19b in mice was detected by intravenous injection of exosomes secreted by miR-19b-cy3.5 transfected HT29 cells. miR-19b mediated by exosomes could enter T98G cells. miR-19b was highly expressed in T98G cells treated with exosomes secreted by miR-19b transfected HT29 cells. The virus RNA significantly decreased in T98G cells treated with the exosomes secreted by miR-19b transfected HT29 cells. [Conclusion] miR-19b mediated by exosomes was expressed in the brain, liver and lungs of mice. exosomes mediated miR-19b was highly expressed in T98G cells, and concentration dependent inhibition of EV71 replication. It is expressed in mice brain, liver and lung.

Keywords: miR-19b; EV71; exosomes; microRNA

[责任编辑 刘洋 杨浦]