

病毒 siRNA 介导的 RNA 干扰途径与机制

申东亮¹, 李用芳²

1 武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072

2 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

申东亮, 李用芳. 病毒 siRNA 介导的 RNA 干扰途径与机制. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1237-1248.

Shen DL, Li YF. Pathways and mechanisms of RNA interference mediated by viral siRNA. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1237-1248.

摘要: RNA 干扰 (RNAi) 是真核生物体内重要的基因表达调控方式之一。RNAi 的一种原始的作用是帮助生物体抵抗病毒, 早期的研究表明无脊椎动物可以利用 RNAi 抵抗病毒, 但是哺乳动物是否存在这一机制一直存在争议。最新的研究发现了哺乳动物 RNAi 抗病毒的强有力的证据, 并且研究人员认为, 这是一种之前被忽视的、全新的免疫途径。值得注意的是, 病毒也可以利用 RNAi 加强其在动物细胞中的感染和免疫逃逸。文中总体介绍了动物细胞抗病毒 RNAi 免疫的研究历程, 综述了这一领域的主要发现, 最后提出了关于这一领域尚未解决的疑问, 探讨了这一途径与其他天然免疫机制的联系。病毒介导的动物细胞 RNAi 途径不仅是基础的生物学问题, 而且对于抗病毒药物的开发有重要指导意义。

关键词: RNA 干扰, 病毒, 免疫, 基因表达调控, 小 RNA, 抗病毒药物

Pathways and mechanisms of RNA interference mediated by viral siRNA

Dongliang Shen¹, and Yongfang Li²

1 College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China

2 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

Abstract: RNA interference (RNAi) is one of the important mechanisms to regulate gene expression in eukaryotes. One of the original functions of RNAi is to facilitate the antiviral strategy of host. Early studies reveal that invertebrates can use RNAi to resist viruses. However, if this mechanism exists in mammals is still controversial. The latest studies confirm that mammals do have the RNAi-based immunity, and researchers believe that RNAi-based antiviral immunity is a brand-new immunological mechanism that was neglected in the past. It is worthy to note that virus can also use RNAi to enhance its infectivity and immune escape in host cells. This review introduces the research history of RNAi-based antiviral immunity in animals and summarizes the main findings in this field. Last but not least, we indicate a series of unresolved questions about RNAi-based antiviral immunity, and explore the relationship between RNAi-based antiviral immunity and other innate

Received: October 17, 2020; **Accepted:** December 21, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31771703).

Corresponding author: Yongfang Li. Tel: +86-373-3326340; E-mail:li_yongfang@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 31771703) 资助。

网络出版时间: 2021-01-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210111.1116.003.html>

immunological pathways. The virus-mediated RNAi pathway in animal is not only an interesting basic biology question, but also has important guiding roles in the development of antiviral drugs.

Keywords: RNA interference, virus, immunity, gene expression regulation, small RNA, antiviral drug

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象最早发现于矮牵牛 (*Petunia*) 中。研究者向细胞内注入某种色素基因片段, 就会引发该基因的失活, 然而当时并不明晰其机制, 推测与 mRNA 下调有关^[1]。之后 Fire 等^[2]的研究证实这是一种基于小 RNA (Small RNA, sRNA) 的基因表达调控方式, 并且在真核生物 (如拟南芥、线虫、果蝇、小鼠等) 中广泛存在。RNAi 及其应用研究方兴未艾, 基于 RNAi 原理的基因沉默技术逐渐成熟, 现有的研究表明 RNAi 效应不仅涉及转录后水平 mRNA 的降解调控, 还与染色质调节、肿瘤的发生和转移、代谢类疾病、病原与宿主间的相互作用等领域密切相关。本文旨在介绍由病毒介导的动物细胞的 RNAi 的研究进展, 主要分为宿主细胞通过 RNAi 行使抗病毒免疫功能和病毒利用 RNAi 强化感染效率两个方面。

1 小 RNA 介导的基因沉默

小 RNA 是生物体内一类广泛存在的重要的非编码小分子调控 RNA。依据其结构特征、来源和产生方式, 动物中的 sRNA 可分为 microRNA (miRNA)、small interfering RNA (siRNA) 和 PIWI-interacting RNA (piRNA)。miRNA 和 siRNA 均为 21-24 nt 的单链小 RNA, siRNA 是由完全互补的长的双链 RNA 经 Dicer 剪切加工而来, RNA 可以是内源的也可以是外源的, 而 miRNA 是由内源的能形成发卡结构的单链 RNA 经一系列加工产生。染色体上的 miRNA 基因 (如最早发现的 *lin-4*^[3], *let-7*^[4]) 由 RNA 聚合酶 II (Polymerase II, Pol II) 转录成原初前体 (Primary miRNA, pri-miRNA), 在核内经 Drosha 等剪切形成 pre-miRNA 后出核, 在细胞质内经 Dicer 酶切割产生 miRNA (图 1)。piRNA 的长度为 29-30 nt, 由

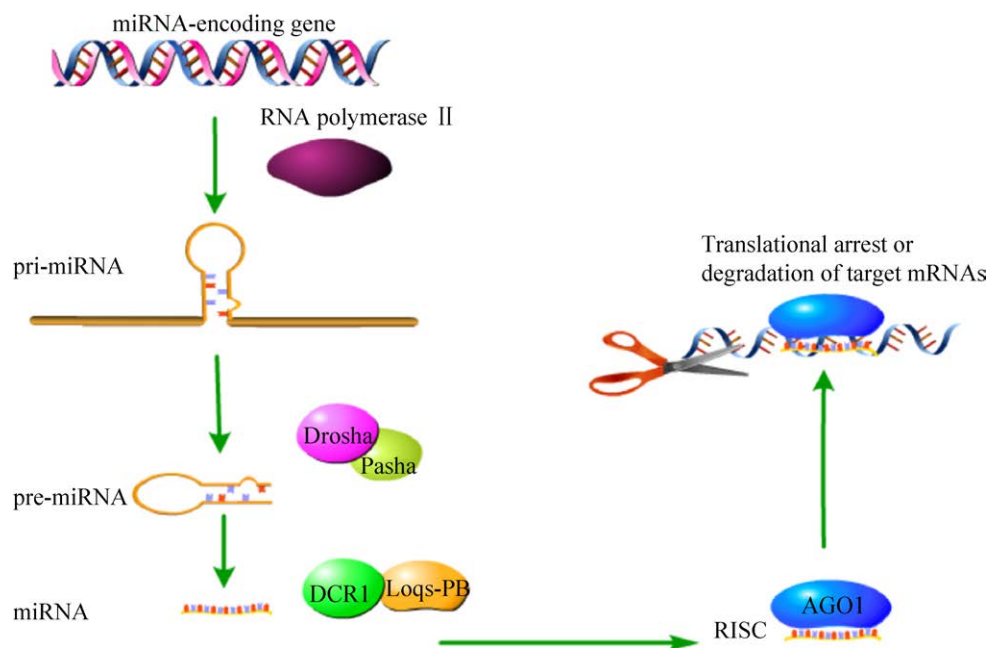


图 1 动物细胞经典 miRNA 的产生和沉默途径

Fig. 1 Typical miRNA biogenesis and silencing pathway in animal cells.

基因组序列转录加工而来,但不是由 Dicer 剪切产生。

尽管 miRNA、siRNA 和 piRNA 的产生方式不同,但它们的作用方式相似,均通过与不同的 AGO (Argonaute) 蛋白结合装配成 RNA 介导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC),才可以起到靶向目标 RNA 的切割作用。AGO 是一个很大的蛋白家族,这一类蛋白具有两个典型的结构域: PIWI (P-element induced wimpy testis) 结构域和 PAZ (PIWI, AGO and Zwiille) 结构域。其中 PIWI 结构域具有 RNA 酶的活性以执行切割功能^[5]。RISC 复合体中的 sRNA 通过碱基互补配对方式结合目标 RNA,通过 RNA 的降解、切割或翻译抑制等不同的方式实现基因沉默。

经典的 RNAi 主要指由 siRNA 诱发的目标基因 RNA 沉默,一般认为,AGO2 在 RNAi 途径中起主要作用^[6]。广义的基因沉默则涵盖了由 miRNA、siRNA 和 piRNA 介导的通过 AGO 进行的沉默机制。

2 无脊椎动物通过 RNAi 对病毒的免疫

RNAi 介导的抗病毒免疫的研究始于 21 世纪初,早期的奠基性工作主要以无脊椎动物为模式生物,逐步探明了无脊椎动物通过 RNAi 对病毒的免疫机制。华人学者丁守伟实验室首先以果蝇为研究对象,发现禽兽棚病毒 (Flock house virus, FHV) 的基因组 RNA 可被宿主细胞降解为 siRNA^[7],这种机制在当时被认为是一种新的抗病毒免疫机制,进而拉开了相关研究的序幕。

目前无脊椎动物中 RNAi 介导的抗病毒免疫途径已经基本阐明,主要分为 3 个阶段:双链 RNA (dsRNA) 的产生、Dicer 切割作用、RISC 降解作用。第一阶段是病毒基因组 RNA 复制产生 dsRNA。以 FHV 为例^[7],病毒进入宿主细胞后,病毒的基因组 RNA (Viral genomic RNA) 首先作为 mRNA 翻译出病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶

(RdRP)^[8],然后以病毒的基因组 RNA 作为模板在 RdRP 的作用下合成新的基因组 RNA。在 RdRP 对模板进行复制期间,旧链和新链会形成中间体 dsRNA,这时 dsRNA 诱发第二阶段的切割^[9]。第二阶段是 Dicer (在果蝇中又称 DCR) 将 dsRNA 切割成 21nt 的病毒来源的 siRNA (vsRNA)。首先 Dicer 的保守 dsRNA 结合结构域可以识别 dsRNA,在 Loqs-PD (Loquacious-isoform PD) 的辅助结合作用下,Dicer-Loqs-PD 复合物得以紧密结合 dsRNA,Dicer 的 RNaseIII 活性可以把病毒的 dsRNA 切割成 vsRNA。可见 Dicer 既是 dsRNA 感受器,又是 dsRNA 加工器。果蝇中产生内源 siRNA 的 Dicer 称为 DCR2,产生 miRNA 的 Dicer 称为 DCR1,需要注意的是 vsRNA 的产生依赖于 DCR2 而不是 DCR1。第三阶段是 vsRNA 与 AGO2 装配形成 RISC,然后靶向降解病毒的基因组 RNA。在 RISC 装配前,甲基化酶 HEN1 先对 vsRNA 的 3' 末端进行甲基化修饰,然后在 R2D2-DCR2 复合物辅助作用下,vsRNA 和 AGO2 才能装配成有功能的 RISC 复合体。RISC 复合体需要 AGO2 和 vsRNA 协调发挥功能,单链的 vsRNA 作为分子向导,靶向结合与之互补配对的病毒基因组 RNA,进而 AGO2 利用自身 PIWI 结构域的 RNA 酶活性将病毒基因组 RNA 降解为核苷酸碎片。至此,宿主细胞利用自身固有的 RNAi 相关蛋白,经过一系列分子过程,成功地将病毒的 RNA 降解,实现了对病毒的清除 (图 2)。这样的抗病毒机制不同于抗原抗体的识别机制,而是基于 RNA 分子的互补配对来实现特异性的病毒免疫,我们可称之为无脊椎动物的“抗病毒 RNAi 免疫途径”。

在病毒感染后,果蝇、线虫、蚊子、家蚕等无脊椎动物细胞内都可以检测到 vsRNA,其涉及的 RNAi 抗病毒免疫机制基本遵循上述的经典原则,都需要各自的 Dicer、AGO 蛋白相继发挥功能来降解病毒的 RNA^[10-11]。显然 Dicer 和 AGO

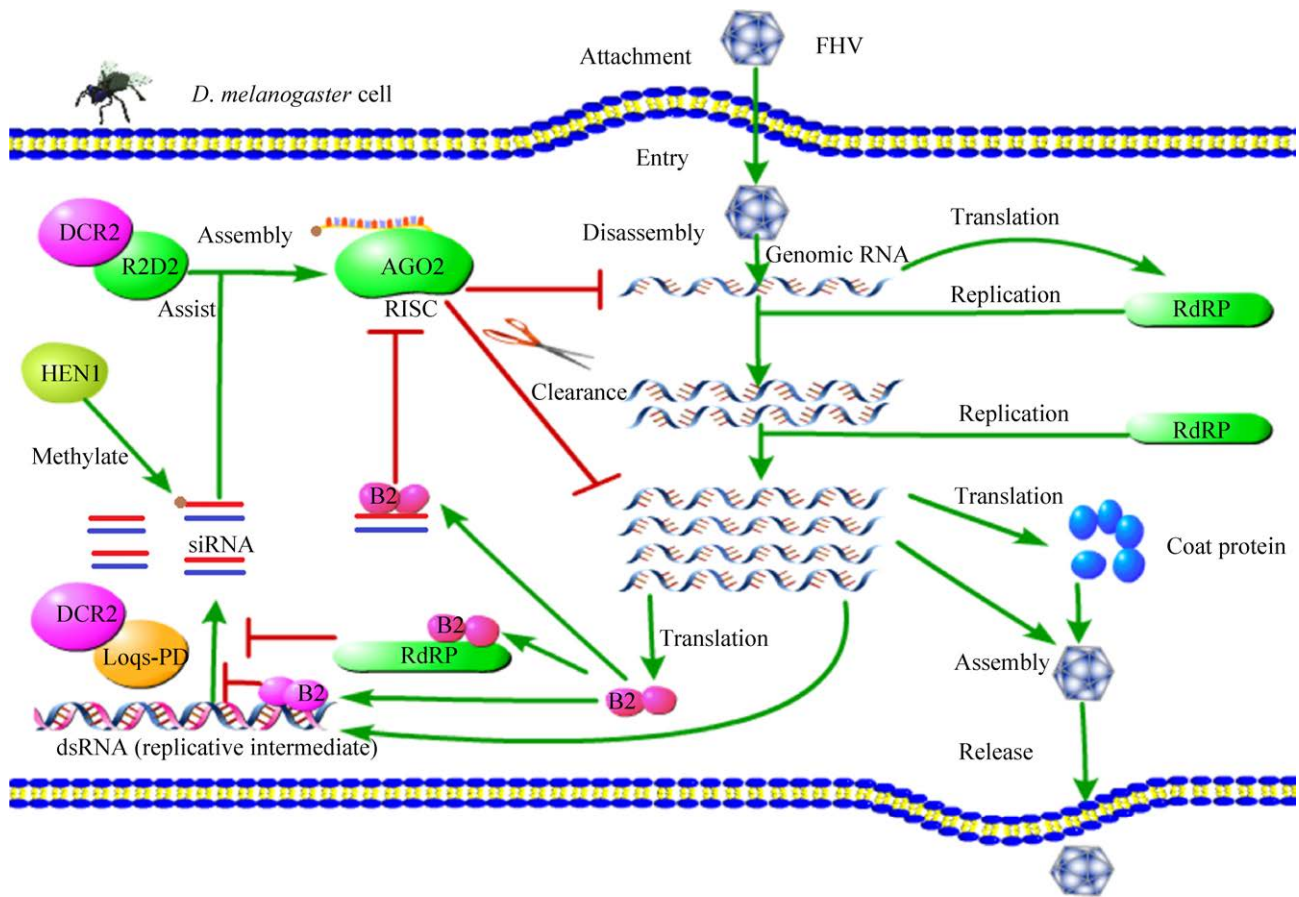


图 2 果蝇感染 FHV 之后表现出的以 RNA 为基础的抗病毒免疫主要过程

Fig. 2 Main process in RNA-based antiviral immunity induced in *Drosophila melanogaster* by infection of FHV.

两种关键的蛋白质使得“抗病毒 RNAi 免疫途径”和“宿主细胞经典 RNAi 基因表达调控途径”联系起来。vsRNA 本质上是一种特殊的 siRNA，所以从另一个角度来说，两条途径也因 siRNA 而联系起来。可以说这两条途径是一套系统 (RNAi 系统) 的两种功能模式，二者都走向靶向降解 RNA 的最终效应，前者是靶向降解病毒基因组 RNA，后者是靶向降解宿主自身的 mRNA。值得注意的是，vsRNA 和经典 siRNA 的分子来源不同，vsRNA 的分子来源是病毒基因组复制产生的 dsRNA，而宿主细胞经典的 siRNA 的分子来源是宿主细胞核基因组转录后形成的长 dsRNA。

此外值得一提的是，病毒蛋白也可以对宿主 RNAi 免疫途径进行调控和抑制。FHV 编码一种

称为 B2 的病毒蛋白^[7]，它是一种 RNAi 免疫途径的抑制物，可加强病毒的侵染效率。B2 可通过两种方式发挥作用 (图 2)，一种是 B2 通过结合病毒的 dsRNA 或 RdRP 从而阻止 siRNA 的产生；另一种是 B2 通过结合 siRNA 双链二聚体阻止 RISC 的装配^[9]。B2 对于 FHV 的存活是必要的，如果 B2 蛋白缺失或者突变，FHV 就会引发宿主细胞强烈的 RNAi 免疫效应，病毒会快速被宿主细胞清除^[8]。可见 B2 是病毒和宿主长期斗争的共进化产物。

抗病毒 RNAi 免疫途径如何在无脊椎动物细胞内快速扩大影响是一个值得关注的问题。研究表明无脊椎动物的 RNAi 免疫应答涉及到信号放大的过程，即次级 siRNA 的产生。对于线虫来说，

由 dsRNA 诱导的 RNAi 免疫活性很大程度上取决于次级 siRNA 产生的多少,也就是说,在 RdRP 的帮助下,病毒来源的 siRNA 从头合成实现了 siRNA 丰度的放大,进而显著提高了靶标 mRNA 被降解的效率^[10-11]。在线虫模型中,初级的病毒来源的 siRNA 和次级 siRNA 分别结合不同的 AGO 蛋白,也就是说次级 siRNA 与特定的 AGO 蛋白结合也可能是另一个层面的 RNA 沉默效率的放大机制^[12]。

3 哺乳动物细胞 RNAi 的抗病毒机制

尽管早在 RNAi 抗病毒机制刚刚在果蝇细胞中发现的时候,研究人员就已经预测了哺乳动物(如小鼠、人类)也应该存在相应的机制,但是其发现和探索过程是曲折且争议不断的。Watanabe 等^[13]最早在鼠卵母细胞中发现内源性的 siRNA,这些 siRNA 来源于内源的 dsRNA,而且具有转录调节功能。利用脑心肌炎病毒(EMCV)感染鼠胚胎干细胞就会产生大量病毒来源的 siRNA,但是这些胚胎干细胞一旦发生分化,它产生病毒来源的 siRNA 的能力就会丧失^[14]。这种在哺乳动物胚胎干细胞中表现出的现象让人怀疑哺乳动物的成体是否具有 RNAi 的抗病毒免疫机制。

用甲型流感病毒(Influenza A virus, IAV)或者小 RNA 病毒(Picornavirus)感染一系列的哺乳动物的体细胞,对宿主细胞内的核酸进行深度测序(Deep sequencing)依然检测不到典型的病毒来源的 siRNA 或者只能检测到极少的病毒来源的 siRNA,并且这些被检测到的 siRNA 还带有过度的正负链偏好性^[15-17]。此外, *Dicer* 或者 *AGO2* 基因缺失突变也不能显著增加病毒在哺乳动物细胞中的复制^[18]。由此可见,哺乳动物的成体细胞可能不具有 RNAi 的抗病毒免疫机制。

Ding 等^[19]利用野田村病毒(NoV)的 B2 蛋白缺失突变体感染哺乳期的小鼠,即可在哺乳期小鼠的体细胞内检测到稳定存在的 NoV 来源的

siRNA,这个发现与 Ding 之前在果蝇和线虫模型中的实验结果是一致的。虽然 NoV 是一种昆虫病毒,不足以充分证明哺乳动物体细胞存在抗病毒 RNAi 免疫途径,但是这至少说明寻找病毒编码的 RNAi 抑制子(Viral suppressors of RNAi, VSR)是至关重要的。在体外实验方面,甲型流感病毒(IAV)的 NS1 蛋白,以及埃博拉病毒(EBOV)的 VP35 蛋白都被证实是 RNAi 的抑制蛋白^[20-21]。

中国科学家周溪和秦成峰等的出色工作很大程度上解决了这个争议,他们利用人类肠道病毒 EV71(Enterovirus 71)进行感染试验,揭示了哺乳动物 RNAi 抗病毒免疫的机制^[22]。研究证实, EV71 编码的 3A 蛋白是一种典型的 VSR 蛋白,把 3A 蛋白突变,即可在受 EV71 感染的体细胞中检测到丰富且稳定存在的 EV71 来源的 siRNA。分子和生化实验证实这些病毒来源的 siRNA 是来源于 EV71 复制时的 dsRNA,并且这些 siRNA 的确具有靶向同源序列实现 RNA 降解的免疫功效。EV71 的野生型 3A 蛋白以二聚体形式结合 dsRNA,从而屏蔽了 *Dicer* 的切割作用,突变的 3A 蛋白不能与 dsRNA 结合,因此可以产生 siRNA。siRNA 通过经典的 RNAi 模式,即与 AGO 蛋白等形成 RISC 沉默复合体而执行降解 EV71 病毒基因组的免疫功能。在 3A 突变体感染试验中,若敲除体细胞中 *AGO2* 或者敲除 *Dicer* 即可拯救 EV71 基因组被降解的命运。此外研究人员还将 I 型干扰素(Type I interferon) 响应的影响排除在外,这进一步证实了哺乳动物基于 RNAi 的病毒免疫模式是真实可靠的。这项研究正式建立了一条清晰的 *Dicer*、*AGO2* 依赖的,干扰素非依赖的哺乳动物 RNAi 免疫通路,同时为人类相关抗病毒药物开发提供了潜在的靶点(图 3)。

2019 年周溪实验室、秦成峰实验室和胡宝洋实验室进一步合作研究了寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)引发的人类神经前体细胞(Human neural

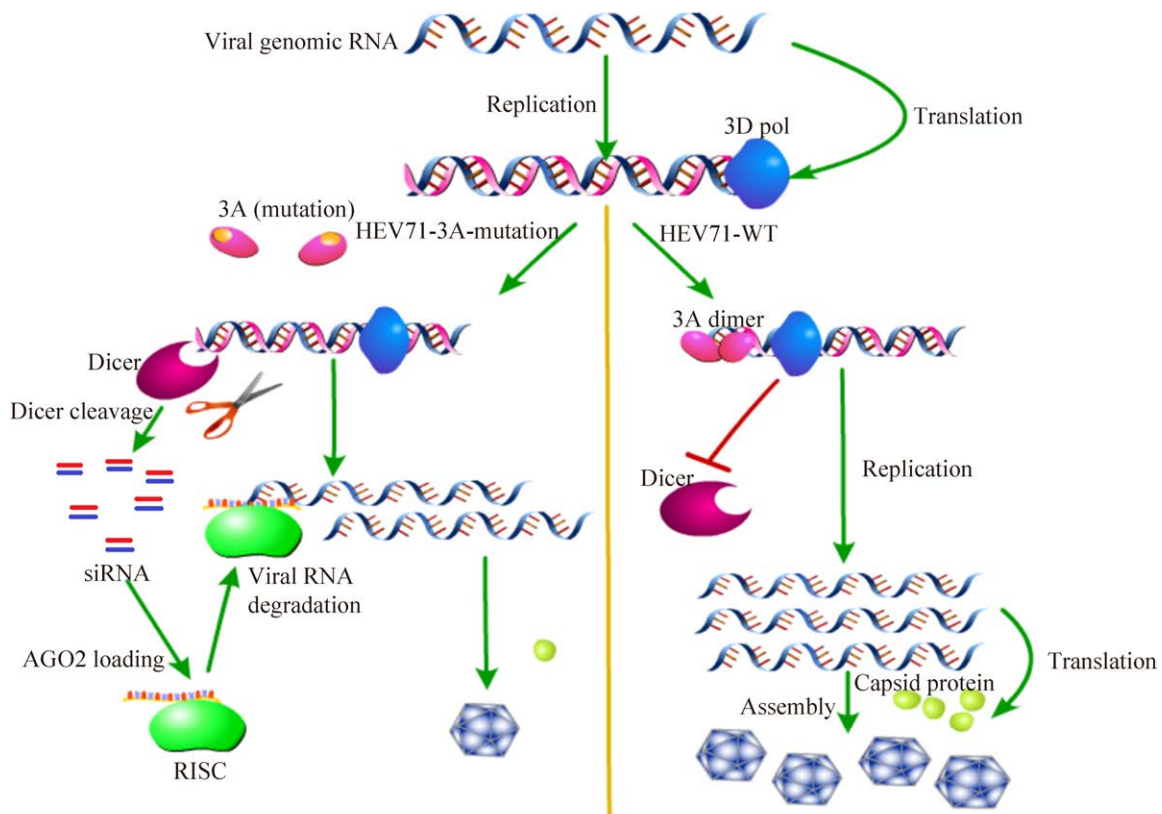


图3 EV71病毒小RNA介导的EV71抗病毒免疫机理^[22]

Fig. 3 Mechanism of antiviral immunity mediated by small RNAs of EV71^[22].

progenitor cells, hNPCs) 的 RNAi 机制。先前的 EV71 只能在 3A 基因突变的情况下才能在体细胞中检测到病毒来源的 siRNA^[22]，而现有的证据表明，被野生型 ZIKV 自然侵染的 hNPCs 的细胞质内可以检测到 ZIKV 来源的 siRNA，这并不涉及到病毒基因组的突变，但是在进一步分化的神经细胞中就很难检测到 ZIKV 相关的 siRNA^[23]，该研究给我们一个启示，激活分化的神经细胞中的 RNAi 机制是防止 ZIKV 感染的有效途径。感染 ZIKV 会引起婴儿神经系统发育疾病即小头症，事实上 hNPCs 是 ZIKV 的主要侵染对象，hNPCs 的大量坏死导致的发育异常是婴儿小头症的主要病理原因之一^[24-25]。研究表明，ZIKV 全球化蔓延过程中，其嗜 hNPCs 性显著增强，使得 ZIKV 的致病能力和婴儿小头症的发病率显著上升^[26-27]。研究者利用类器官模型证实了药物依诺沙星

(Enoxacin) 可以防止 ZIKV 的感染和婴儿小头症的发病^[23]，这是因为在药理层面上依诺沙星是 RNAi 途径的增强剂，靶向增强 RNA 的沉默^[28-29]，从而强化了神经细胞的 RNAi 免疫通路，最终达到抗病毒的效果。考虑到先前 hNPCs 的抗病毒免疫的相关研究非常缺乏，这一发现揭示了 hNPCs 的 RNAi 免疫机制，对 ZIKV 感染的防治有重要的指导意义。另一方面，在人类神经细胞中发现典型的病毒来源的 siRNA，并且阐明了人类神经细胞的 RNAi 免疫机制，这无疑是在相关领域基础研究中的重要突破。

值得注意的是，宿主细胞来源的 miRNA 可能也有 RNAi 抗病毒免疫的功能。Chen 等^[30]发现乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 的前基因组 RNA (pgRNA) 以及病毒 mRNA 可以被人类肝脏细胞自身产生的特异性 miRNA——miR-122

所抑制。miR-122 在正常肝脏细胞中表达水平非常高, 占总 miRNA 表达的 70% 以上^[31-32], 但是在肝癌情况下 miR-122 含量会明显下调^[33]。miR-122 在正常肝脏细胞中发挥重要调控作用, 比如调控肝细胞的生长、脂肪酸代谢、胆固醇代谢等^[34-36]。尽管 miR-122 与靶基因 3' 端非编码区的配对结合效应对丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 的复制是至关重要的^[37], 但是对于 HBV, miR-122 显然是可以起到抗病毒的抑制作用, 因为 miR-122 可直接互补配对 pgRNA, 或者互补配对 HBV 聚合酶的 mRNA 的 5' 端非编码区保守序列, 从而下调了病毒的基因复制和病毒蛋白表达。显然 miR-122 的表达量和 HBV 的病毒载量呈负相关^[30], 这说明宿主的 miRNA 可以通过经典 RNAi 途径抑制病毒复制, 也许刺激 miR-122 的表达是一种潜在的治疗乙肝疾病的新疗法。

4 病毒利用 RNAi 加强对宿主的感染效率

在漫长的病毒-宿主共同进化过程中, 二者之间的“军备竞赛”从来没有停息, 可谓是“道高一尺, 魔高一丈”。实际上, 不仅是动物细胞可以利用 RNAi 途径来对抗病毒, 病毒也可以利用 RNAi 途径来加强自身对于宿主细胞的感染效率。早期关于疱疹病毒科的 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 的研究就发现 EBV 的基因组编码一些与宿主同源的 miRNA, EBV 利用这些病毒基因组携带的 miRNA 可以干扰宿主细胞的凋亡从而达到自身潜伏、繁殖的目的^[38]。EBV 病毒基因组中至少携带了两类有功能的 miRNA, 一类是 miR-BHRF1 (miRNA-BamHI fragment H rightward open reading frame 1), 另一类是 miR-BART (miRNA-BamHI-A region rightward transcript)^[39]。miR-BHRF1 具有和凋亡相关基因 *Bcl-2* (B-cell lymphoma 2) 同源序列, 进而利用 RNAi 途径干扰宿主细胞、操纵宿主细胞。Pfeffer 等认为, EBV 编码的 miRNA 可能干预了宿主细胞的分裂、凋亡、细胞因子和

趋化因子的释放、信号转导等过程, 间接增强了病毒的繁殖性和适应性^[38]。人类巨细胞病毒 (Human cytomegalovirus, HCMV) 编码的 miRNA——miR-UL148D 可以以类似的机制靶向抑制 *IER5* 基因 (Immediate early response gene 5)^[40]。因为 *IER5* 是 p53 的一种靶基因, 有抑制细胞分裂的功能, HCMV 即可利用 RNAi 途径干涉宿主细胞的细胞周期调控轴, 从而实现病毒的潜伏并延长其生命周期。

动物病毒不仅可以利用 RNAi 来潜伏, 还可以利用 RNAi 来逃逸动物体的免疫系统监视。Bauman 等^[41]利用多瘤病毒 (Human polyoma virus) 感染模型发现, 人类多瘤病毒 JCV 和 BKV 所编码的 miRNA 可以靶向抑制应激配体基因 *ULBP3* (UL16-binding protein 3)。因为 *ULBP3* 蛋白的受体是自然杀伤 (Nature killer, NK) 细胞表面的 NKG2D (Natural killer group 2, member D)^[42], 所以 *ULBP3* 的下调就会导致 NK 细胞的免疫杀伤作用降低, 从而出现了病毒的免疫逃逸现象。

5 总结与展望

综上所述, 病毒诱导的动物细胞 RNAi 途径至少包括 3 类 (表 1)。第一类^[9,22]: 病毒基因组 RNA 被宿主动物细胞所识别, 然后切割产生 siRNA, 最后进入靶向降解途径从而起到抗病毒免疫的作用, 这一机制从低等无脊椎动物到高等哺乳动物保守存在, 是一种长久以来未受到足够关注的内在免疫机制, 这一类型也是本文论述的重点。第二类^[30]: 宿主细胞编码的、固有的胞内 miRNA 直接结合病毒 RNA, 利用经典 RNAi 途径 (Dicer-miRNA-AGO) 切割病毒的遗传物质。第三类^[38,42]: 病毒基因组编码了宿主 miRNA 相关基因的序列, 这些 miRNA 从病毒的遗传物质中转录出来, 进而干扰了宿主细胞的细胞凋亡、分裂分化、免疫调控等通路, 以此加强病毒侵染效率和存活机会。可见三类途径的区别主要是小 RNA 的性质和来源不同, 引发的生物学效应不同。

表 1 病毒介导的三类 RNAi 途径比较

Table 1 Comparison of 3 types of RNAi pathways mediated by viruses

Classification	Type 1	Type 2	Type 3
Function	Enhance host immunity	Enhance host immunity	Facilitate virus survival
sRNA	siRNA	miRNA	miRNA
Source of sRNA	Viral genomic RNA	Transcripts from host miRNA genes	Transcripts from viral genome
Protein effector	RdRP, HEN1, Loqs-PD, Dicer, AGO2	Drosha, Loqs-PB, Dicer, AGO1	Dicer, AGO1
Virus	FHV, EV71, Zika virus	HBV	EBV, JCV, BKV
Reference	[7-11, 22-23]	[30]	[38-42]

三类途径在同一条轴线上 (Dicer-AGO-RNAi), 却展现出两种力量 (病毒和宿主) 的斗争角力。这启示我们对于经典的生物学途径需要进一步发掘其独特的内涵, 既要从正向的思路去阐释机制, 又要探索截然相反的拮抗效应。众所周知, 目前特异的、可靠的、高效的抗病毒药物少之又少, 解析病毒介导的动物细胞 RNAi 途径与机制, 有助于寻找新的靶点开发抗病毒药物, 推动生物医药和人类健康事业的发展。基于上述分析, 我们认为该领域还有以下生物学问题需要解决, 这些展望可能成为未来探索的方向。

5.1 动物病毒介导 RNAi 的广泛性

动物病毒介导 RNAi 是否具有广泛性和保守性是一个值得探讨的问题。实际上目前的研究只确认了非常有限的几种病毒可以诱导宿主细胞的 RNAi 应答, 然而是否所有的动物病毒都会引发宿主细胞 RNAi 抗病毒响应? 如果不是, 造成这种差异的原因是什么? 动物病毒的种类繁多, DNA 病毒、RNA 病毒、逆转录病毒等不同病毒分类单元之间没有明显的进化关系, 而且各自的生活周期、复制模式都有着极大的差异性。之前关于病毒 RNAi 途径的研究对象多是 RNA 病毒, 那么 DNA 病毒和逆转录病毒是否会引发宿主细胞的 RNAi 抗病毒机制还需要进一步的研究确认^[43-44]。理论上来说 DNA 病毒和逆转录病毒的侵染和繁殖都要涉及到相应的 RNA 分子, 那么可以推测 RNAi 对 DNA 病毒和逆转录病毒很可能也起作用。

动物病毒的基因组和宿主细胞的基因组之间

有着重要的联系^[45], 宿主细胞基因组的 miRNA 原始基因也有迁移到病毒基因组当中的可能性。那么病毒基因和宿主基因之间的 RNAi 途径就像是一种桥梁, 它在进化当中起到了中介作用, RNAi 在病毒和宿主之间的双向调节是很有意思的科学问题。

5.2 动物 RNAi 抗病毒通路与其他免疫机制的关系

早期的研究证明了一些宿主的 miRNA 分子能够激活 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 从而开启 TLR 介导的抗病毒天然免疫途径。人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的 ssRNA40 和哺乳动物的 miRNA let-7b 有一定的同源性, TLR7 可以特异性识别 miRNA let-7b 的 GU 富集的结构域^[46-48], 由此, 我们可以大胆推测病毒来源的 siRNA 也可能激活 TLR 免疫途径从而抑制病毒的复制。此外维甲酸诱导基因 I (Retinoic acid-inducible gene 1, RIG-I) 样受体 (RIG-I-like receptors) 介导的 RLH (RIG-I-like helicase) 信号通路也可以识别双链 RNA 而触发抗病毒免疫反应^[49-53], cGAS-STING 通路也有类似的功能^[54-56]。RNAi 抗病毒通路源自古老的机制, 但它绝对不是孤立的机制。我们知道, 抗病毒免疫也是一个极其复杂的多组分参与的过程, 所以 RNAi 抗病毒通路与 RLH 通路、cGAS-STING 通路的关系也值得探讨。

5.3 病毒 siRNA 是否具有血液循环性和胞间扩散性

实际上, RNAi 途径不是仅仅局限在细胞内,

Chen 等^[57]首先在血清中发现了循环 miRNA, 循环 miRNA 一般通过细胞破裂、外泌体释放、RNA 结合蛋白释放等途径进入动物体的体液内环境, 血浆的循环 miRNA 可以通过血液循环被远距离的体细胞再摄取, 从而远距离调控靶细胞^[58-59]。进一步研究发现, 循环 miRNA 不仅可以跨细胞传递, 还可以跨物种传递, 植物的 miRNA 可以被人类的消化道吸收进入血液进而调控人类的体细胞的基因表达^[60]。例如中草药忍冬, 俗名金银花 *Lonicera japonica* 的 miR2911 就可以被人体吸收进入血液循环系统, 而 miR2911 则可以靶向抑制多种病毒的 mRNA 翻译^[61-63]。2020 年的最新研究表明 miR2911 可抑制新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的复制, 加快感染病人转阴进程^[64]。近年来的研究表明循环系统中的 RNA 不仅可以作为病毒性疾病的诊断标志物, 而且也是潜在的治疗靶点^[65-69]。这一系列研究具有独特的启示, 这暗示病毒来源的 siRNA 很可能可以在胞间扩散传输, 病毒入侵的信号可以通过 siRNA 传输到其他组织或器官, 并实现动物体系统性的 RNAi 免疫应答, 我们认为, 这是一个非常有价值的假说, 可能是未来研究的热点问题。

5.4 piRNA 与抗病毒机制

piRNA 在早期被误认为是 miRNA, 后来证实, piRNA 与 miRNA 有完全不同的基因来源, 但是二者最终都会与具有 PIWI 结构域蛋白 (AGO 家族蛋白) 装配形成复合体以降解与之互补配对的 RNA, 目前认为, piRNA 在动物的生殖系细胞中比较丰富, 并且抑制转座子活性^[70]。最新的研究发现 piRNA 的功能不局限于抑制基因转座^[71-75], 宿主细胞的 piRNA 也可以发挥抵御病毒的作用。2017 年 Sun 等^[76]首次发现, 鸡精巢细胞中 piRNA 可以与禽白血病病毒 (Avian leukosis virus, ALV) 的 RNA 互补以抵抗病毒的入侵。2019 年 Yu 等^[77]利用考拉 (Koala) 模型揭示了哺乳动物细胞利用 piRNA 抵御逆转录病毒的机制,

值得注意的是, 这些抗病毒的 piRNA 并非来源于宿主细胞基因组的 PIWI 簇, 而是来源于病毒的转录本。综上所述, piRNA 的抗病毒机理值得探讨, 研究 piRNA 与 siRNA 抗病毒机制的关联与差异都是非常有价值的科学问题。已知 piRNA 对于逆转录转座子有抑制作用, 而逆转录转座子的转座机制与逆转录病毒入侵宿主基因组的机制是非常类似的, 甚至很多转座子序列在进化上来源于逆转录病毒, 因此可以推测 piRNA 可能是对抗逆转录病毒的有效方式。目前抗病毒 piRNA 的来源存在争议^[78]。piRNA 抗病毒途径是否独立于其他经典途径尚属未知, 动物细胞利用 piRNA 的抗病毒机理尚需要深入研究。

REFERENCES

- [1] Napoli CA, Lemieux C, Jorgensen RA, et al. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279-289.
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [3] Wightman B, Ha I, Ruvkun G, et al. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75(5): 855-862.
- [4] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- [5] Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*, 2005, 19(24): 2979-2990.
- [6] Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, et al. Human argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 2004, 15(2): 185-197.
- [7] Li H, Li WX, Ding S, et al. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus.

- Science, 2002, 296(5571): 1319-1321.
- [8] Lu R, Maduro MF, Li F, et al. Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2005, 436(7053): 1040-1043.
- [9] Aliyari R, Wu Q, Li H, et al. Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(4): 387-397.
- [10] Kim VN, Han J, Siomi MC, et al. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 126-139.
- [11] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 642-655.
- [12] Yigit E, Batista PJ, Bei Y, et al. Analysis of the *C. elegans* argonaute family reveals that distinct argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, 2006, 127(4): 747-757.
- [13] Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 2008, 453(7194): 539-543.
- [14] Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, et al. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science*, 2013, 342(6155): 235-238.
- [15] Kennedy EM, Whisnant AW, Kornepati AV, et al. Production of functional small interfering RNAs by an amino-terminal deletion mutant of human Dicer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(50): E6945-E6954.
- [16] Parameswaran P, Sklan EH, Wilkins C, et al. Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog*, 2010, 6(2): e1000764.
- [17] Weng KF, Hung CT, Hsieh PT, et al. A cytoplasmic RNA virus generates functional viral small RNAs and regulates viral IRES activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(20): 12789-12805.
- [18] Bogerd HP, Skalsky RL, Kennedy EM, et al. Replication of many human viruses is refractory to inhibition by endogenous cellular microRNAs. *J Virol*, 2014, 88(14): 8065-8076.
- [19] Li Y, Lu J, Han Y, et al. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science*, 2013, 342(6155): 231-234.
- [20] Haasnoot J, de Vries W, Geutjes E, et al. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*, 2007, 3(6): 794-803.
- [21] Li Y, Basavappa M, Lu J, et al. Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells. *Nat Microbiol*, 2016, 2(3): 1-9.
- [22] Qiu Y, Xu Y, Zhang Y, et al. Human virus-derived small RNAs can confer antiviral immunity in mammals. *Immunity*, 2017, 46(6): 780-781.
- [23] Xu Y, Qiu Y, Zhang B, et al. Zika virus infection induces RNAi-mediated antiviral immunity in human neural progenitors and brain organoids. *Cell Res*, 2019, 29(4): 265-273.
- [24] Wu KY, Zuo GL, Li XF, et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell Res*, 2016, 26(6): 645-654.
- [25] Li C, Xu D, Ye Q, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(1): 120-126.
- [26] Yuan L, Huang XY, Liu Z, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, 2017, 358(6365): 933-936.
- [27] Liu Z, Shi W, Qin C, et al. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 131-139.
- [28] Shan G, Li Y, Zhang J, et al. A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(8): 933-940.
- [29] Zhang Q, Zhang C, Xi Z, et al. Enhancement of RNAi by a small molecule antibiotic enoxacin. *Cell Res*, 2008, 18(10): 1077-1079.
- [30] Chen Y, Shen A, Rider P, et al. A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *FASEB J*, 2011, 25(12): 4511-4521.
- [31] Lagosquintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735-739.
- [32] Chang J, Nicolas E, Marks DS, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from *hcr* mRNA and may downregulate the high

- affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol*, 2004, 1(2): 106-113.
- [33] Kutay H, Bai S, Datta J, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006, 99(3): 671-678.
- [34] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(2): 94-108.
- [35] Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, 2009, 457(7228): 413-420.
- [36] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-689.
- [37] Lanford RE, Hildebrandteriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 2010, 327(5962): 198-201.
- [38] Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 2004, 304(5671): 734-736.
- [39] Middeldorp JM, Brink AA, Den Brule AJ, et al. Pathogenic roles for Epstein /Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, 45(1): 1-36.
- [40] Pan C, Zhu D, Wang Y, et al. Human cytomegalovirus miR-UL148D facilitates latent viral infection by targeting host cell immediate early response gene 5. *PLoS Pathog*, 2016, 12(11): e1006007.
- [41] Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, et al. An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(2): 93-102.
- [42] Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(10): 781-790.
- [43] Flisiak R, Jaroszewicz J, Lucejko M. siRNA drug development against hepatitis B virus infection. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18(6): 609-617.
- [44] Jamali A, Mottaghitlab F, Abdoli A, et al. Inhibiting influenza virus replication and inducing protection against lethal influenza virus challenge through chitosan nanoparticles loaded by siRNA. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, 8(1): 12-20.
- [45] Vignuzzi M, López CB. Defective viral genomes are key drivers of the virus-host interaction. *Nat Microbiol*, 2019, 4(7): 1075-1087.
- [46] Chen X, Liang H, Zhang J, et al. microRNAs are ligands of Toll-like receptors. *RNA*, 2013, 19(6): 737-739.
- [47] Lehmann SM, Kruger C, Park B, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 2012, 15(6): 827-835.
- [48] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004, 303(5663): 1526-1529.
- [49] Kato H, Takeuchi O, Mikamosatoh E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene- I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, 2008, 205(7): 1601-1610.
- [50] Lee NR, Ban J, Lee NJ, et al. Activation of RIG- I -mediated antiviral signaling triggers autophagy through the MAVS-TRAF6-Beclin-1 signaling axis. *Front Immunol*, 2018, 9: 2096.
- [51] Fan X, Jin T. Structures of RIG- I -like receptors and insights into viral RNA sensing. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1172: 157-188.
- [52] Urcuqui-Inchima S, Cabrera J, Haenni AL. Interplay between dengue virus and Toll-like receptors, RIG- I /MDA5 and microRNAs: implications for pathogenesis. *Antiviral Res*, 2017, 147: 47-57.
- [53] Chazal M, Beauclair G, Gracias S, et al. RIG- I recognizes the 5' region of dengue and Zika virus genomes. *Cell Rep*, 2018, 24(2): 320-328.
- [54] Chen Q, Sun L, Chen ZJ, et al. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol*, 2016, 17(10): 1142-1149.
- [55] Ma Z, Damania B. The cGAS-STING defense pathway and its counteraction by viruses. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(2): 150-158.
- [56] Margolis SR, Wilson SC, Vance RE. Evolutionary origins of cGAS-STING signaling. *Trends Immunol*, 2017, 38(10): 733-743.
- [57] Chen X. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006.
- [58] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al.

- The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691.
- [59] Han B, Chao J, Yao H. Circular RNA and its mechanisms in disease: from the bench to the clinic. *Pharmacol Ther*, 2018, 187: 31-44.
- [60] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, 2012, 22(1): 107-126.
- [61] Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res*, 2015, 25(1): 39-49.
- [62] Huang Y, Liu H, Sun X, et al. Honeysuckle-derived microRNA2911 directly inhibits varicella-zoster virus replication by targeting IE62 gene. *J Neurovirol*, 2019, 25(4): 457-463.
- [63] Li X, Huang Y, Sun M, et al. Honeysuckle-encoded microRNA2911 inhibits Enterovirus 71 replication via targeting VP1 gene. *Antiviral Res*, 2018, 152: 117-123.
- [64] Zhou LK, Zhou Z, Jiang XM, et al. Absorbed plant MIR2911 in honeysuckle decoction inhibits SARS-CoV-2 replication and accelerates the negative conversion of infected patients. *Cell Discov*, 2020, 6(1): 1-4.
- [65] Huang J, Chen J, Gong L, et al. Identification of virus-encoded circular RNA. *Virology*, 2019, 529: 144-151.
- [66] Yu J, Ding W, Wang M, et al. Plasma circular RNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a large-scale, multicenter study. *Int J Cancer*, 2020, 146(6): 1754-1763.
- [67] Zhao J, Lee EE, Kim J, et al. Transforming activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1-12.
- [68] Liu S, Zhou B, Valdes JD, et al. Serum hepatitis B virus RNA: a new potential biomarker for chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1816-1827.
- [69] Yu T, Ding Y, Zhang Y, et al. Circular RNA GATAD2A promotes H1N1 replication through inhibiting autophagy. *Vet Microbiol*, 2019, 231: 238-245.
- [70] Siomi MC, Sato K, Pezic D, et al. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(4): 246-258.
- [71] Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, et al. piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. *Annu Rev Genet*, 2018, 52: 131-157.
- [72] Ophinni Y, Palatini U, Hayashi Y, et al. piRNA-guided CRISPR-like immunity in eukaryotes. *Trends Immunol*, 2019, 40(11): 998-1010.
- [73] Shen EZ, Chen H, Ozturk AR, et al. Identification of piRNA binding sites reveals the argonaute regulatory landscape of the *C. elegans* germline. *Cell*, 2018, 172(5): 937-951. e18.
- [74] Zhang D, Tu S, Stubna M, et al. The piRNA targeting rules and the resistance to piRNA silencing in endogenous genes. *Science*, 2018, 359(6375): 587-592.
- [75] Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, et al. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2): 89-108.
- [76] Sun YH, Xie LH, Zhuo X, et al. Domestic chickens activate a piRNA defense against avian leukosis virus. *eLife*, 2017, 6: e24695.
- [77] Yu T, Koppetsch BS, Pagliarani S, et al. The piRNA response to retroviral invasion of the koala genome. *Cell*, 2019, 179(3): 632-643.
- [78] Wang Y, Jin B, Liu P, et al. piRNA profiling of dengue virus type 2-infected Asian tiger mosquito and midgut tissues. *Viruses*, 2018, 10(4): 213.

(本文责编 陈宏宇)