

病毒逃避 RNAi 的策略 *

郑玉姝 ** 赵 朴 刘兴友

(河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003)

摘要 将病毒逃避 RNAi 策略的最新进展做一综述. RNA 干扰(RNAi)是一个有效的抗病毒系统, 并且病毒特异性小干扰 RNA (siRNA) 是非常有希望的抗病毒抑制剂. 然而, 许多病毒已经进化出了高超的策略来干扰 siRNA 和微 RNA(miRNA)介导的沉默通路. 深入理解病毒利用的逃避策略将为开发避免病毒逃逸的有效 RNAi 疗法奠定基础.

关键词 RNAi, 病毒, 逃避, 策略

学科分类号 R392.1, Q939.9

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)或微 RNA (microRNA, miRNA)所引起的以序列特异性方式介导靶 mRNA 降解或翻译抑制的基因调控方式. 越来越多的证据表明, RNAi 是生物体内一种古老而保守的抗病毒免疫形式. 在宿主细胞的“敌对”环境中, 病毒必须对抗宿主细胞 RNAi 的抑制作用才能生存. 最新研究表明, 病毒已进化出种种策略来逃避 RNAi 这种基于核酸的免疫系统, 这进一步证明 RNAi 确实在抗病毒感染过程中发挥重要作用.

近年来, 模仿体内 RNAi 机制开发的 RNAi 疗法, 在抑制病毒复制方面已经取得了令人振奋的成绩. 然而, 病毒能利用种种策略逃避 RNAi. 因此, 揭示病毒逃避 RNAi 的分子机制将为开发高效抗病毒小 RNA 药物奠定基础. 本文就将病毒逃避宿主 RNAi 策略的最新研究进展做以综述, 为完善 RNAi 抗病毒疗法提供参考.

1 RNA 病毒逃避 RNAi 的策略

不同病毒逃避宿主 RNAi 的机制不尽相同, 但一般来说, RNA 病毒主要通过靶区域的突变或编码病毒抑制子来逃避 RNAi 介导的抑制, 或两者兼有, 而 DNA 病毒则倾向于利用病毒抑制子逃避宿主 RNAi.

1.1 RNAi 靶区域突变

RNA 病毒在复制时, 由病毒依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase,

RDRP)催化产生双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA). 由于 RDRP 缺乏校正活性, 每大约合成 10^4 个核苷酸就会掺入一个突变, 因此可以想象, RNA 病毒在选择压力下必然会通过靶区域的突变逃避 siRNA 介导的抑制, 这种设想已经得到研究证实.

在脊髓灰质炎病毒强毒感染前, Gitlin 等^[1] (2002 年)利用针对衣壳蛋白或病毒聚合酶的 siRNA 处理 HeLa 细胞, 仅产生了对照细胞中 1%~3% 的病毒滴度, 并且没有病毒噬斑形成. 然而, 脊髓灰质炎病毒通过在靶区域产生单一点突变就轻易逃避了高度有效的 siRNA. 进一步分析这些抗性突变表明, RNAi 识别对靶 RNA 中部区和 3' 端的突变敏感. 甚至一个导致 G:U 错配的单一点突变就足以使病毒逃避 siRNA 抑制.

先前, Boden 等 (2003 年)和 Das 等 (2004 年)分别发现, 在稳定表达针对 *tat* 或 *nef* 的 siRNA 双链体人 T 细胞上, HIV-1 长时间“适应”能产生抗性突变株. 已经鉴定, RNAi 抗性 HIV-1 变异株的 siRNA 靶区域内有序列缺失或核苷酸替换. 通过这些突变, HIV-1 消除了作为靶标的 RNA, 并逃避 RNAi 介导的抑制. 近来, Westerhout 等 (2005 年)对 RNAi 抗性 HIV-1 变异株的研究表明, 有些突变能诱导 RNA 选

* 河南科技学院博士启动基金 (6002) 资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0373-3040718, E-mail: yszheng2003@163.com

收稿日期: 2007-04-23, 接受日期: 2007-08-26

择性折叠, 改变局部RNA的二级结构, 以避免siRNA结合, 从而导致RNAi效力下降。

植物病毒中也有类似的例子。洋李痘疱病毒(Plum pox virus, PPV)嵌合体通过在miRNA靶序列内突变能迅速逃避RNAi, 并且主要突变与miRNA 5'端配对的核苷酸^[2]。

1.2 编码病毒抑制子

葡萄无味果病毒(Grapevine virus A, GVA)蛋白P10能抑制瞬时表达的单链有意义RNA所诱导的局部和整体沉默, 且对转基因和外源GFP的mRNA均有抑制活性。马铃薯X病毒载体异位表达的GVA P10增强了病变的严重程度。P10显著降低siRNA的水平及重组P10能结合单链和双链形式的siRNA及miRNA, 表明P10是RNAi抑制子^[3]。Merai等^[4]报道, 甜菜黄化病毒P21、花生丛簇病毒P15、大麦条斑花叶病毒γB、烟草蚀纹病毒HC-Pro、芜菁皱叶病病毒CP和番茄矮矮病毒属P19等病毒沉默抑制子都结合dsRNA, 干扰siRNA和miRNA, 这表明结合dsRNA可能是植物RNA病毒抑制RNAi的常见策略。

HIV-1不仅通过靶序列的突变逃避RNAi, 还能编码RNAi抑制子逃避RNAi。HIV-1在基因组中编码siRNA前体, 且HIV-1自然感染引起人细胞基于核酸的免疫。为抵制RNAi, HIV-1在Tat蛋白中进化出了RNAi抑制子。进一步试验证实, Tat能阻断Dicer将dsRNA加工成siRNA而消除细胞的RNAi防御^[5]。

最近, 发现负责miRNA加工的RNase III Dicer和Drosha抑制HIV-1在HIV-1感染患者外周血单个核细胞和潜伏感染细胞中复制, 由此, HIV-1积极地依次抑制多顺反子miRNA簇miR-17/92的表达。研究发现, 这种抑制是病毒有效复制所必需的, 并且依赖于组蛋白乙酰转移酶Tat辅因子PCAF^[6]。这些数据表明, 在复制过程中HIV-1积极抑制miRNA沉默通路, 这也进一步证明miRNA沉默通路参与了HIV-1复制和潜伏。

2 DNA病毒逃避RNAi的策略

相对于RNA病毒, DNA病毒的基因组比较稳定, 因此倾向于编码RNA或蛋白质抑制子干扰RNAi。

人腺病毒5型编码2个大约160nt的非翻译病毒相关(virus-associated, VA)RNA: VA RNA I和VA RNA II。Lu等(2004年)证明, VA I在腺病毒感染细胞内高水平表达, 能有效抑制小发夹RNA(short

hairpin RNA, shRNA)或人miRNA前体诱导的RNAi。这种抑制是由于VA I一方面竞争核输出因子Exportin 5, 导致shRNA或miRNA前体的核输出抑制, 另一方面直接结合Dicer并抑制Dicer功能。随后, Andersson等(2005年)进一步研究发现, 在腺病毒感染细胞抽提液中, Dicer活性的抑制能由增加底物浓度克服, 表明VA RNA作为竞争性底物起作用。由于VA RNA在腺病毒感染晚期达到10⁸拷贝/细胞, 数量远超过任何异常形成的dsRNA, 因此结合Dicer的单纯竞争抑制足以解释VA RNA对RNAi的抑制效应。

痘苗病毒E3L是dsRNA结合蛋白。Li等(2004后)研究表明, 在果蝇细胞中E3L是RNAi的功能性抑制子, 它能钝化细胞对兽棚病毒感染的RNAi抗病毒反应。最新研究发现, E3L在功能上与HIV-1 Tat相似, 能代替HIV-1 Tat的RNAi抑制功能, 并有助于Tat缺失HIV-1复制^[7]。这进一步表明了E3L是RNAi抑制子。

3 展 望

RNAi技术是近年发展起来的一项沉默靶基因的新技术, 在抗病毒治疗研究中, 显示了良好的应用前景, 但遗憾的是病毒进化了种种策略逃避RNAi的抑制作用。通过对病毒逃避RNAi分子机制的理解, 大大丰富了我们调节RNAi的知识, 为我们设计避免病毒产生抗性的高效RNAi奠定了基础。在这方面也取得较好的效果。例如, Dave等(2006年)证明, 靶向痘苗病毒dsRNA结合蛋白E3L RNAi抑制子的siRNA产生了有效的抗天花病毒及相关痘病毒的效应。针对HIV多变的特点, 在一个载体上同时表达分别针对gag、env和nef基因的siRNA, 这样即使一个位点发生突变, 另外2个位点的siRNA还能干涉靶序列, 从而可有效地防止病毒突变引起的逃逸, 获得了良好的抑制效果^[8,9]。最近, Lee等^[10]以人肠道病毒B(human enterovirus B, HEB)高度保守的顺式作用编码区设计的siRNA, 对HEB表现出了广谱、持久的抗病毒活性。这种策略能成功用于开发其他具有类似保守元件病毒群的广谱抗病毒siRNA。相信随着病毒逃避RNAi机制研究的深入, RNAi这一崭新的抗病毒技术将会不断得到完善。

参 考 文 献

- 1 Gitlin L, Stone J K, Andino R. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and

- implications for therapeutic approaches. *J Virol*, 2005, **79** (2):1027~1035
- 2 Simon-Mateo C, Garcia J A. MicroRNA-guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *J Virol*, 2006, **80**(5):2429~2436
 - 3 Zhou Z S, Dell'Orco M, Saldarelli P, *et al.* Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A. *J Gen Virol*, 2006, **87**(Pt 8):2387~2395
 - 4 Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, *et al.* Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol*, 2006, **80**(12):5747~5756
 - 5 Bennasser Y, Le S Y, Benkirane M, *et al.* Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, 2005, **22**(5):607~619
 - 6 Triboulet R, Mari B, Lin Y L, *et al.* Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*, 2007, **315**(5818):1579~1582
 - 7 Haasnoot J, de Vries W, Geutjes E J, *et al.* The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*, 2007, **3**(6): 794~803
 - 8 魏玲, 刘萱, 曹诚. siRNA抑制HIV基因表达的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(10):1007~1013
Wei L, Liu X, Cao C. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(10):1007~1013
 - 9 Konstantinova P, Ter Brake O, Haasnoot J, *et al.* Trans-inhibition of HIV-1 by a long hairpin RNA expressed within the viral genome. *Retrovirology*, 2007, **4**:15
 - 10 Lee H S, Ahn J, Jee Y, *et al.* Universal and mutation-resistant anti-enteroviral activity: potency of small interfering RNA complementary to the conserved *cis*-acting replication element within the enterovirus coding region. *J Gen Virol*, 2007, **88** (7): 2003~2012

Strategies Exploited by Viruses for Evading The RNAi*

ZHENG Yu-Shu**, ZHAO Pu, LIU Xing-You

(Department of Animal Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract RNAi is an efficient antiviral system, and viral gene-specific siRNAs are very promising antiviral inhibitors. However, many viruses have evolved highly sophisticated mechanisms that interfere with both siRNA- and miRNA-guided silencing pathways. Deeper understanding the strategies exploited by viruses provides the basis for the development of effective RNAi-based therapies that prevent viral evading. Therefore, the latest progress on the strategies exploited by viruses for evading the RNAi is reviewed.

Key words RNAi, virus, evading, strategies

* This work was supported by a grant from Doctoral Fund of Henan Institute of Science and Technology (6002).

**Corresponding author. Tel: 86-373-3040718, E-mail: yszheng2003@163.com

Received: April 23, 2007 Accepted: August 26, 2007