



# RNA病毒：从RNA加工与互作机制到防控新策略

张峰峰<sup>1†</sup>, 唐垚<sup>1†</sup>, 贾煜<sup>1</sup>, 周宇<sup>1,2\*</sup>

1. 武汉大学生命科学学院, 高致病性病毒与生物安全国家重点实验室, 武汉 430072

2. 武汉大学, 泰康生命医学中心, 武汉 430072

† 同等贡献

\* 联系人, E-mail: [yu.zhou@whu.edu.cn](mailto:yu.zhou@whu.edu.cn)

收稿日期: 2024-07-08; 接受日期: 2025-02-26; 网络版发表日期: 2025-06-23

国家重点研发计划(批准号: 2023YFC2307802)和国家自然科学基金(批准号: 82341023)资助

**摘要** RNA病毒是一类以核糖核酸(RNA)为基因组遗传物质的病毒, 包括一些重要的人类和动物病原体, 如流感病毒、新冠病毒、埃博拉病毒等强致病性病毒. RNA病毒的感染会影响宿主细胞的RNA加工调控, 如可变剪接、多聚腺苷酸化、RNA修饰、RNA降解等. 这些改变反过来也会影响病毒自身RNA的复制和翻译及其免疫逃逸和致病性等. 在病毒入侵的细胞内, 病毒RNA利用宿主分子机器产生病毒自身编码的蛋白质, 这些病毒RNA和蛋白大分子之间, 同时与宿主蛋白和RNA之间形成复杂的相互作用网络, 进而调控病毒的复制和宿主的响应. 本文系统介绍了RNA病毒的种类和特征、其中的代表性病毒及其危害; 总结了近年来RNA病毒在感染细胞后的分子事件和机制, 包括RNA病毒与宿主RNA的加工调控、病毒RNA-蛋白质等大分子互作等; 最后介绍了基于RNA治疗方法(mRNA疫苗和ASO药物)在防治RNA病毒方面的新进展和挑战.

**关键词** RNA病毒, RNA加工, RNA-蛋白质互作, mRNA疫苗

RNA病毒是一类具有高度变异性和适应性的病毒, 它们的基因组由单链或双链RNA组成, 表明其遗传信息载体是RNA而不是DNA. RNA病毒能够引起从轻微的感冒到致命的出血热等多种疾病, 对全球的公共卫生和经济发展构成了严重的威胁. 尤其是在经济全球化的背景下, 病毒的跨物种传播和新型病毒的出现增加了疫情的暴发和扩散的风险. 目前, 对于RNA病毒感染的防治仍然面临着许多挑战, 如病毒的变异、药物的耐受性、疫苗的保护效力和安全性等. 因此, 深入理解RNA病毒的生物学特性和其与宿主的相互作用机制, 进而开发有效的防治手段, 这对于控制

RNA病毒引起的疫情和保障人类生命健康具有重要的意义.

## 1 RNA病毒分类

RNA病毒指的是一类遗传物质为RNA的病毒, 它们是由RNA分子及蛋白质外壳构成的病原体. RNA病毒在包括动物、植物和细菌在内的很多宿主中都存在, 并引起多种不同的疾病. 通过RNA病毒的复制和传播, 它们可以感染宿主细胞并使用宿主细胞的机制来复制自己. 根据病毒宿主的不同, 病毒可以分为四

**引用格式:** 张峰峰, 唐垚, 贾煜, 等. RNA病毒: 从RNA加工与互作机制到防控新策略. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1851–1876

Zhang F F, Tang Y, Jia Y, et al. RNA viruses: from RNA processing and interaction mechanisms to new prevention and control strategies (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1851–1876, doi: [10.1360/SSV-2024-0100](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0100)

种类型,即动物病毒、真菌病毒、植物病毒、噬菌体。另外,为了更准确地描述病毒,大卫·巴尔的摩(David Baltimore)根据信使RNA (message RNA, mRNA)合成方式的不同建立了一个病毒分类方案,即巴尔的摩病毒分类系统,该方法极具实用性,也是目前最常见的一种病毒分类方法(表1)<sup>[1-3]</sup>。该系统将RNA病毒分为双链RNA (double-stranded RNA, dsRNA)、正链RNA (positive-sense single-stranded RNA, +ssRNA)、负链RNA (negative-sense single-stranded RNA, -ssRNA)、单链RNA逆转录病毒(single-stranded RNA retroviruses, ssRNA-RT)<sup>[4]</sup>。

### 1.1 双链RNA病毒

双链RNA病毒的基因组由两条互补的RNA分子组成,形成双螺旋结构。在进入宿主细胞后,首先利用依赖RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp),例如轮状病毒的VP1蛋白,以自身正负链为模板合成相应的互补链,其中基于负链RNA合成的正链RNA可以作为mRNA翻译出所需蛋白质,最后组装形成新的子代病毒(图1A)<sup>[1,2]</sup>。病毒通常包含10~12个节段的双链RNA,具有双层衣壳结构,表面无包膜包裹。dsRNA病毒的一个显著特征是它们能够在衣壳内进行dsRNA片段的转录,所需的酶是病毒粒子结构的一部分<sup>[5,6]</sup>。dsRNA病毒是一类广泛分布的病毒,可以感染动物、植物、真菌和原生生物等多种生物。有些dsRNA病毒可以引起重要的疾病,例如轮状病毒(rotavirus)通过感染小肠上皮细胞可引起肠胃炎进而导致严重的婴幼儿腹泻<sup>[7]</sup>;哺乳动物呼肠孤病毒(mammalian orthoreovirus)可以引起人呼吸道感染、肠炎以及鼻炎<sup>[8]</sup>。

### 1.2 正链RNA病毒

正链RNA病毒是一类包括小核糖核酸病毒科、黄病毒科、冠状病毒科等多个病毒科的广泛分布的病原体。它们以正义RNA单链作为遗传物质,编码几种或最多几十种蛋白质<sup>[9]</sup>,是数量最多和致病性最强的病毒类别之一。其正义链RNA进入细胞后可直接作为mRNA翻译蛋白,或经RdRp合成双链RNA;随后以负链为模板,在RdRp作用下复制产生新的正链基因组RNA,从而完成病毒基因组的复制(图1B)<sup>[3]</sup>。这些过程被认为发生在病毒诱导的、膜结合的微型细胞器双膜

囊泡(double-membrane vesicles, DMVs)中,它们组织了RNA复制过程并保护双链RNA复制中间体免受先天性免疫识别<sup>[10]</sup>。

最典型的正链RNA病毒之一为冠状病毒,包括引起严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome)的SARS病毒、引起中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome)的MERS病毒和引起2019新型冠状病毒疾病大流行的新冠病毒(SARS-CoV-2)<sup>[11]</sup>。SARS-CoV-2病毒的基因组约为30000 nt,是单链正义RNA病毒中已知最大的基因组。基因组中超过70%的RNA编码两个多蛋白pp1a和pp1ab,这些多蛋白对于RNA复制和冠状病毒的不连续亚基因组mRNA (sg-mRNA)的转录是必需的。这些多蛋白质通过两种病毒编码的蛋白酶加工成16种单独的非结构蛋白(nonstructural proteins, NSPs),在病毒的感染和复制中发挥作用<sup>[12]</sup>。

这些病毒经常对人类健康造成威胁,并带来巨大经济损失和社会问题。例如,SARS-CoV-2在世界范围内的传播,严重危害了患者的生命健康,导致了数百万人的死亡;黄病毒科的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染人数每年增加近200万人,其感染将诱发肝硬化、肝细胞癌、肝功能衰竭甚至死亡;肠道病毒(enterovirus)的大范围暴发也威胁着人类健康<sup>[13]</sup>,其中脊髓灰质炎病毒(poliovirus)可侵入人中枢系统脊髓,损伤脊髓运动神经细胞,进而引起急性麻痹性脊髓灰质炎<sup>[14]</sup>。

### 1.3 负链RNA病毒

负链RNA病毒以负链RNA为遗传物质,以流感病毒为例,其在进入宿主细胞后,先利用自身的RdRp以负链vRNA为模板合成mRNA,即正链RNA;再以正链RNA为模板合成互补链RNA (cRNA),同时以正链RNA为转录本进行翻译产生结构蛋白,最后组装形成新的子代病毒(图1C)<sup>[15,16]</sup>。负链RNA病毒的基因组不以自由RNA的形式存在,而是由核蛋白(nucleocapsid, N)的许多拷贝组装而成,形成高度稳定的核糖核蛋白复合体(vRNP)<sup>[17]</sup>。负链RNA病毒根据其病毒基因组是否分节段划分为两类:非节段目(non-segmented, nsNSV)和多节段目(segmented, sNSV)。非节段病毒目包含四个科:横纹肌病毒科(如狂犬病毒)、副黏液病毒科(如麻疹病毒和仙台病毒)、博纳病毒科(如博纳病

表 1 RNA病毒分类  
Table 1 Classification of RNA viruses

| 种类       | 代表性病毒                    | 病毒科      | 基因组大小<br>(kb) | 代表性蛋白             | 宿主          | 传播途径                    | 危害                                                         |
|----------|--------------------------|----------|---------------|-------------------|-------------|-------------------------|------------------------------------------------------------|
| dsRNA    | 轮状病毒                     | 呼肠孤病毒科   | 18.5          | 内层衣壳蛋白<br>(VP2)   | 哺乳动物        | 粪口途径                    | 引起婴幼儿严重腹泻和脱水, 是全球5岁以下儿童死亡的主要原因之一 <sup>[7]</sup>            |
|          | 哺乳动物呼肠孤病毒                | 呼肠孤病毒科   | 23.5          | 细胞附着蛋白<br>(σ1)    | 脊椎动物        | 粪口途径                    | 引起人呼吸道感染、肠炎以及鼻炎 <sup>[8]</sup>                             |
| +ssRNA   | 严重急性呼吸道<br>综合征冠状病毒<br>2型 | 冠状病毒科    | 29.9          | 刺突蛋白(S)           | 人类          | 飞沫传播、<br>接触传播、<br>气溶胶传播 | 感染人体呼吸系统, 导致发热、咳嗽、味觉嗅觉丧失、肺炎, 具有极强传染性 <sup>[1]</sup>        |
|          | 丙型肝炎病毒                   | 黄病毒科     | 10.0          | 非结构蛋白5A<br>(NS5A) | 人类          | 血液传播、<br>性传播、<br>母婴传播   | 感染可造成急性或慢性肝炎, 严重时诱发肝硬化、肝细胞癌、肝功能衰竭 <sup>[1]</sup>           |
|          | 脊髓灰质炎病毒                  | 小核糖核酸病毒科 | 7.4           | 衣壳蛋白(VP1)         | 哺乳动物、<br>鸟类 | 粪口途径、<br>飞沫传播           | 病毒进入脊髓中会破坏运动神经元, 引起急性麻痹性脊髓灰质炎 <sup>[14]</sup>              |
| -ssRNA   | 甲型流感病毒                   | 正黏液病毒科   | 13.6          | 血凝素(HA)           | 人类、鸟类       | 飞沫传播、<br>接触传播           | 感染人体呼吸系统, 造成鼻塞流涕、咽喉疼痛、毛细支气管炎和间质性肺炎 <sup>[2]</sup>          |
|          | 埃博拉病毒                    | 丝状病毒科    | 18.9          | L聚合酶(L)           | 人类、<br>灵长类  | 接触传播、<br>体液传播           | 引起埃博拉出血热, 患者具有极高的死亡率, 最终因休克或器官衰竭而死亡 <sup>[20]</sup>        |
|          | 狂犬病病毒                    | 弹状病毒科    | 11.9          | 磷蛋白(NS)           | 哺乳动物        | 动物咬伤、<br>唾液传播           | 感染初期患者伤口部位异常疼痛, 随着病程发展渐渐陷入昏迷, 最后死亡 <sup>[21]</sup>         |
| ssRNA-RT | 人类免疫缺陷<br>病毒             | 逆转录病毒科   | 9.7           | 包膜糖蛋白<br>(ENV)    | 人类          | 血液传播、<br>性传播、<br>母婴传播   | 攻击T细胞, 破坏人体的免疫系统, 最终失去所有免疫力的患者将很快死于感染或恶性肿瘤 <sup>[28]</sup> |
|          | 禽白血病毒                    | 逆转录病毒科   | 7.8           | 包膜糖蛋白<br>(ENV)    | 鸟类          | 唾液传播、<br>接触传播           | 感染后导致鸡生长迟缓、性成熟延迟、产蛋能力下降, 同时使其死亡率增加 <sup>[3]</sup>          |

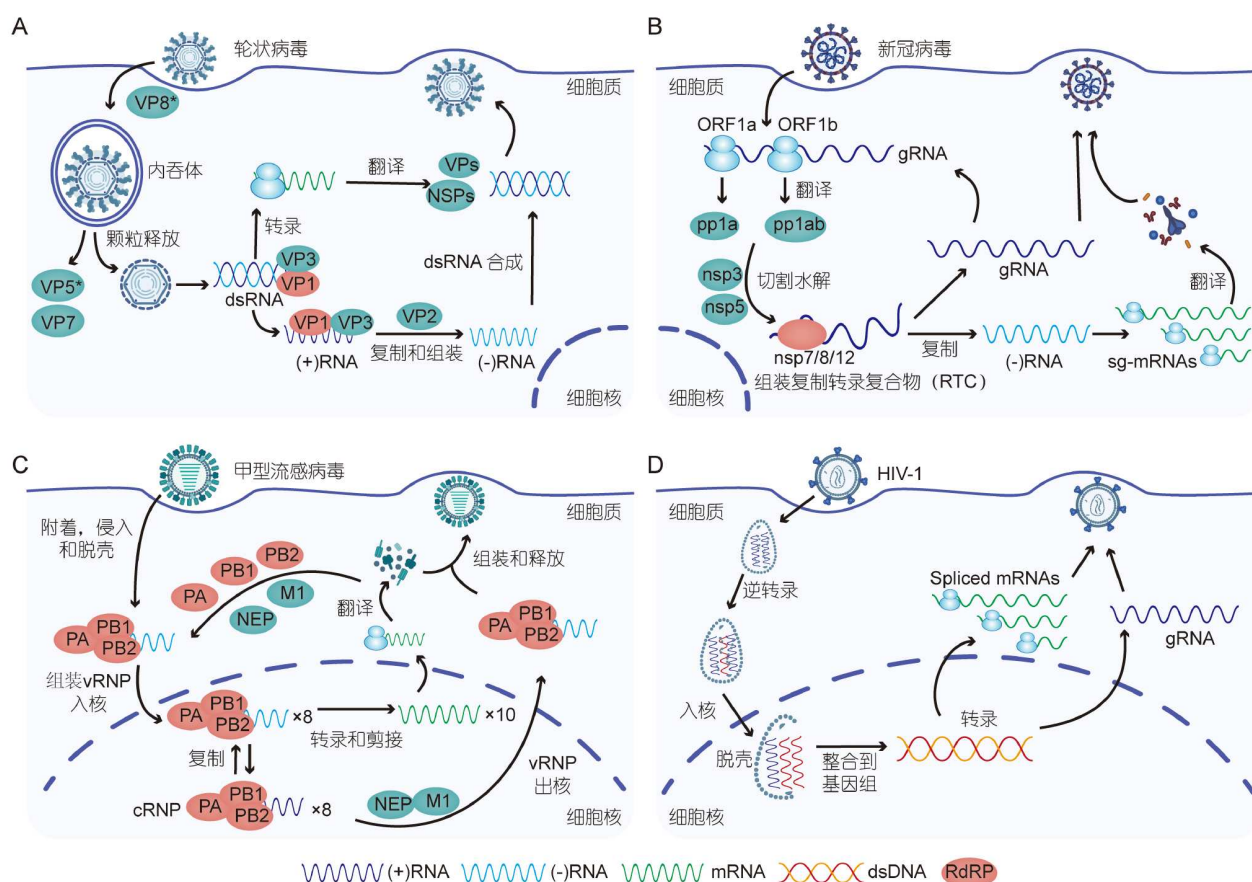
病毒)和丝状病毒科(如马尔堡病毒)。这些病毒有一个单一的长RNA基因组, 编码至少5种蛋白质, 顺序通常为3'-核蛋白(N)-磷蛋白(P)-基质(M)-糖蛋白(G)-大蛋白(L)-5', L编码RNA依赖的RNA聚合酶。多节段病毒目包含3个科, 其中沙粒病毒科有两个节段(如拉沙热病毒), 布尼亚病毒科有3个片段(如裂谷热病毒), 正黏液病毒科有6~8个基因组片段(如流感病毒)<sup>[18,19]</sup>。

非节段负链RNA病毒能够感染人类和动物, 导致不同程度的临床症状, 如呼吸道感染、出血热和脑炎等疾病。其中, 埃博拉病毒(Ebola virus)是一种高致死性的出血热病毒, 能够导致人类和非人灵长类动物的大规模死亡<sup>[20]</sup>; 狂犬病毒(rabies virus)是一种神经系统病毒, 能够通过动物咬伤或唾液传播, 引起人类和动物的致命性脑炎<sup>[21]</sup>; 人呼吸道合胞病毒和肺病毒是两种常见的呼吸道病毒, 会引起婴幼儿和免疫抑制者的下呼吸道感染, 甚至导致呼吸衰竭<sup>[22]</sup>。植物负链

RNA病毒可以侵染多种农作物, 危害农业生产, 造成严重的经济损失。其中, 番茄斑萎病毒属和纤丝病毒属的病毒感染植物能引起斑点、枯萎、坏死、减产等病症, 在农业生产上的危害尤为严重<sup>[23]</sup>。它们具有广泛的宿主范围、多样的传播媒介、复杂的基因组结构和高度的变异性, 深入解析这些病毒的致病机制和宿主抗病机制, 进而开发有效的检测和防治方法, 对于保障农业生产和食品安全具有重要意义。

1.4 单链RNA逆转录病毒

单链RNA逆转录病毒是一类以两条相同的单股正链RNA作为遗传物质的病毒, 它们的复制依赖于逆转录过程, 即将RNA逆转录为DNA, 然后将DNA整合到宿主细胞的染色体上<sup>[24]</sup>。其基因组包含三个主要的编码基因: *gag*, *pol*和*env*。 *gag*基因编码病毒的核心蛋白, 包括衣壳蛋白、核衣壳蛋白和核蛋白等; *pol*基因



**图1** 四类RNA病毒的基因组复制和转录过程。A: 轮状病毒作为典型的dsRNA病毒, 其基因组由多节段的互补dsRNA分子组成, 通过负链RNA转录合成mRNA, 正链RNA亦可作为mRNA翻译病毒蛋白, 依靠RdRp合成子代双链RNA<sup>[1,2]</sup>。B: 新冠病毒属于(+)-ssRNA病毒, 其基因组RNA (gRNA)从病毒颗粒释放后, 翻译成两种复制酶多聚蛋白, pp1a和pp1ab。Nsp3和nsp5蛋白酶将pp1a和pp1ab切割成16种非结构蛋白, 组装成复制转录复合物, 其中nsp12亚基具有RdRp结构域, 在nsp7和nsp8的协助下催化RNA合成。RTCs进一步复制产生子代gRNA和转录产生sg-mRNA以翻译多种结构蛋白<sup>[3]</sup>。C: IAV属于(-)-ssRNA多节段病毒, 具有8个节段, 在细胞核内复制和转录, 其中两个片段M和NS可发生可变剪接, 共产生10种mRNAs, 编码17种病毒蛋白, 在细胞质内翻译<sup>[15,16]</sup>。D: HIV-1作为代表性的(+)-ssRNA-RT病毒, 其基因组为两个相同或近似的正链RNA分子, 可通过逆转录酶将其基因组RNA逆转录为cDNA并通过整合酶将其整合到宿主基因组中<sup>[27]</sup>。

**Figure 1** The genomic replication process of four types of RNA viruses. A: Rotavirus, as a typical dsRNA virus, has a genome composed of multiple segments of complementary dsRNA molecules. It synthesizes mRNA through the transcription of negative-strand RNA, and the positive-strand RNA can also serve as mRNA to translate viral proteins, relying on RdRp to synthesize progeny dsRNA<sup>[1,2]</sup>. B: The SARS-CoV-2 belongs to the (+)-ssRNA viruses. Its genomic RNA (gRNA) is released from the viral particle and translated into two replicase polyproteins, pp1a and pp1ab. Proteases nsp3 and nsp5 cleave pp1a and pp1ab into 16 non-structural proteins, which assemble into replication-transcription complexes (RTCs). Among these, the nsp12 subunit, featuring the RdRp domain, catalyzes RNA synthesis with the assistance of nsp7 and nsp8. The RTCs further replicate to produce progeny gRNA and transcribe to produce sg-mRNA for the translation of various structural proteins<sup>[3]</sup>. C: Influenza A virus (IAV) belongs to the segmented (-)-ssRNA viruses, with 8 segments replicating and transcribing in the cell nucleus. Two of the segments, M and NS, undergo alternative splicing, and 8 segments collectively produce 10 kinds of mRNAs encoding 17 viral proteins, which are translated in the cytoplasm<sup>[15,16]</sup>. D: HIV-1, as a representative (+)-ssRNA-RT virus, has a genome consisting of two identical or nearly identical positive-strand RNA molecules. It reversely transcribes its genomic RNA into cDNA through reverse transcriptase and integrates it into the host genome by integrase<sup>[27]</sup>.

负责表达逆转录酶、整合酶及蛋白酶等多种功能性蛋白; *env*基因则负责表达表面糖蛋白和跨膜糖蛋白等包膜蛋白。病毒进入宿主细胞后, 先利用自身的逆转录酶将基因组单链RNA逆转录为cDNA, 再依靠宿主细胞

的DNA聚合酶合成双链DNA, 并整合进入宿主细胞基因组, 最后借助宿主细胞的RNA聚合酶从DNA转录和加工出mRNA, 翻译合成所需蛋白, 进而组装形成新的子代病毒(图1D)<sup>[25-27]</sup>。

引起获得性免疫缺陷综合征的人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)<sup>[28]</sup>是代表性的逆转录病毒. HIV可以通过性接触、血液和母婴途径传播, 其感染会破坏人体的免疫系统, 使得人体容易受到各种感染和肿瘤侵袭, 目前尚无有效的疫苗和根治方法. 艾滋病自1981年首次发现以来, 已经造成了约3500万人死亡, 目前仍有约3800万人感染HIV. 艾滋病的流行不仅威胁着人类的健康和生命, 也给社会和经济带来了巨大的负担和损失<sup>[25,29]</sup>. 禽白血病病毒(avian leukosis virus)主要感染鸡<sup>[30]</sup>, 感染后会引起其生长迟缓, 影响生殖系统发育造成产蛋能力下降, 严重时可引起多种白血病, 使鸡的死亡率增加, 给养禽业带来经济损失.

## 2 病毒RNA的加工及其对宿主RNA的影响

在真核生物中, 由RNA聚合酶II产生的pre-mRNA在经过5'末端加帽、可变剪接(alternative splicing, AS)以及3'末端切割和聚腺苷酸化等一系列步骤后, 生成成熟的mRNA. 此外, 许多转录本还会通过RNA编辑来改变RNA的序列, 或进行RNA修饰. 最终, 经过核质运输和定位, mRNA才能进行翻译合成蛋白质. 此外, RNA的降解在调控特定转录本的水平中也发挥着重要作用.

RNA病毒的基因组及其转录本可能会受到宿主细胞中进行的各种RNA加工过程的影响. 同时, 病毒会通过多种机制调节宿主基因表达, 以便于病毒复制并逃避抗病毒反应. 已有大量研究揭示了不同病毒如何影响细胞转录、mRNA加工和核输出、mRNA降解和翻译的机制<sup>[31]</sup>. 深入理解病毒RNA及病毒蛋白如何参与这些细胞过程, 对于病毒生物学和细胞生物学的研究, 特别是病毒的免疫逃逸机制和宿主的抗病毒免疫方式的研究, 都具有重要的启示意义. 因此, 本节旨在重点概述RNA病毒感染宿主时在RNA加工调控过程中产生的变化以及受到的影响.

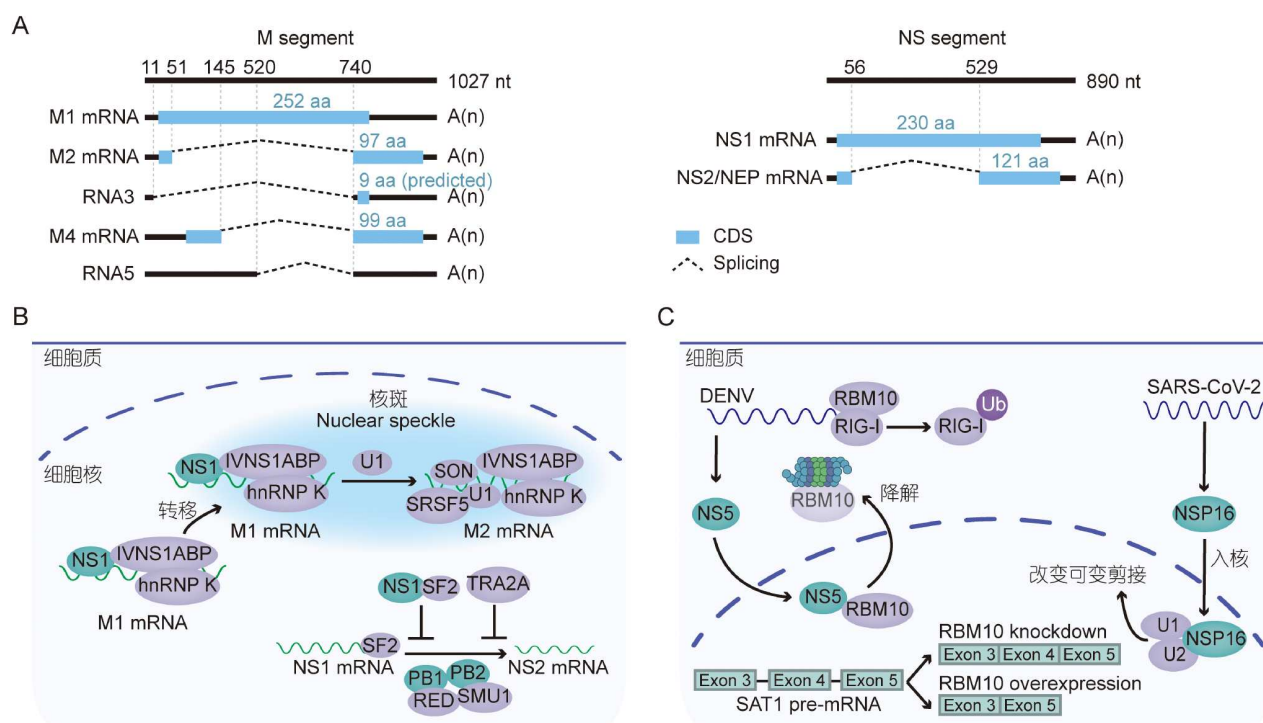
### 2.1 RNA病毒与可变剪接

除了逆转录病毒, 大部分RNA病毒基因组不会进入宿主细胞核. 因此, 它们自身所产生的转录本不会经历可变剪接加工; 然而, 流感病毒和博尔纳病毒是少数利用宿主剪接加工机制产生成熟转录本的入核

RNA病毒<sup>[32]</sup>.

以甲型流感病毒(influenza A viruses, IAV)为例, 其基因组由8个单链负义RNA片段组成, 编码10种主要病毒蛋白和许多辅助蛋白. 其中, M和NS两种病毒RNA片段会进行剪接, 分别生成M1和M2 mRNA, 以及NS1和NS2 mRNA (图2A)<sup>[33]</sup>. M1编码M1基质蛋白, M2编码离子通道蛋白. M1 mRNA会被剪接成少量的RNA3和M4 mRNA, 分别编码未知功能的短肽和M2的蛋白亚型M42<sup>[34,35]</sup>. 此外, 在禽流感病毒中发现了M片段的第五种转录本RNA5<sup>[36]</sup>. NS1 mRNA编码非结构蛋白NS1, 作为干扰素拮抗剂对抗细胞的抗病毒反应, 并通过多种机制影响mRNA的剪接和3'末端加工. NS2 mRNA编码NS2/NEP蛋白, 它在病毒基因组复制和病毒RNP核输出方面发挥作用<sup>[31,33]</sup>.

IAV mRNA的剪接依赖于宿主的剪接系统, 目前已鉴定出多种参与调节IAV mRNA剪接的剪接调节因子, 包括剪接因子2 (splicing factors 2, SF2)、核内不均一核糖核蛋白K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP K)和流感病毒NS1结合蛋白(influenza virus NS1A binding protein, IVNS1ABP). NS1蛋白可结合M1 mRNA, 并招募NS1结合蛋白, 后者与hnRNP K结合, 将M1 mRNA转运到核斑(nuclear speckle)中. 该复合物定位到核斑时, NS1解离, hnRNP K招募U1核小核糖核蛋白(U1 snRNP)<sup>[37]</sup>, 与SON蛋白共同促进M1 mRNA剪接成M2 mRNA (图2B)<sup>[33]</sup>. SRSF5的RRM2结构域可直接结合M1 mRNA, 并与U1 snRNP互作以促进M2 mRNA的产生, 而阿尼芬净(anidulafungin)是一种已批准的抗真菌药物, 作为SRSF5的抑制剂, 可有效阻断IAV在体外和体内的复制<sup>[38]</sup>. 目前研究认为NS片段的剪接过程不在核斑中, SF2与NS1 mRNA上新鉴定的535~541位置的外显子剪接增强子(exonic splicing enhancer, ESE)结合, 促进了NS2 mRNA的产生, 并且A540G突变显著增强SF2与ESE的结合, 导致更多的NS2蛋白在感染早期表达. 有趣的是, NS1蛋白与SF2蛋白直接互作并结合NS1 mRNA, 抑制其剪接, NS1蛋白能以剂量依赖性方式降低NS2/NS1 mRNA的比例. 在病毒感染早期, 细胞核中较高水平的NS1可能进一步调节病毒蛋白表达并抑制宿主抗病毒基因表达, 从而促进病毒复制<sup>[33,39]</sup>. NS1蛋白的抑制作用与SF2蛋白的促进作用相互竞争, 以此影响NS2和NS1 mRNA的相对比例, 这种平衡可能会根据病毒复制周期的不同



**图 2** 流感病毒的可变剪接和宿主应激中的剪接变化。A: 流感病毒基因组的M和NS的不同剪接亚型(根据文献[35,36]修改)。B: 流感病毒RNA剪接的调控。NS1蛋白可结合M1 mRNA, 并招募NS1结合蛋白, 后者与hnRNP K结合, 将M1 mRNA转运到核斑中。该复合物定位到核斑时, NS1解离, hnRNP K招募U1 snRNP, 与SON蛋白共同促进M1 mRNA剪接成M2 mRNA。NS1蛋白与剪接因子SF2存在直接相互作用, 可能阻碍NS1 mRNA的剪接。RED-SMU1复合物促进而TRA2A抑制NS1 mRNA的剪接。C: 感染DENV和SARS-CoV-2的宿主细胞中的剪接变化。DENV编码的NS5诱导RBM10通过蛋白酶体降解, 从而改变SAT1的剪接方式。SARS-CoV-2编码的NSP16可结合剪接体U1和U2, 从而干扰宿主全局的可变剪接

**Figure 2** Alternative splicing of the influenza virus and the splicing changes of host cells in response to viral stress. A: Different isoforms of the influenza virus genome's two segments, M and NS. Modified from refs [35,36]. B: The regulation of RNA splicing of IAV. The NS1 protein binds to M1 mRNA and recruits the NS1-binding protein. The latter binds to hnRNP K and translocates M1 mRNA to the nuclear speckles. When the complex is located in the nuclear speckles, NS1 dissociates. The hnRNP K recruits U1 snRNP and promotes the splicing of M1 mRNA into M2 mRNA together with SON. The NS1 protein directly interacts with the splicing factor SF2, which might hinder the splicing of NS1 mRNA. The RED-SMU1 complex promotes, while TRA2A inhibits, the splicing of NS1 mRNA. C: Splicing changes in host cells infected with DENV and SARS-CoV-2. The NS5 encoded by DENV induces the degradation of RBM10 via the proteasome, thereby altering the splicing of SAT1. The NSP16 encoded by SARS-CoV-2 can bind to the spliceosome U1 and U2, thereby interfering with the global alternative splicing of the host

阶段有所变化。此外, 病毒RNA聚合酶PB1和PB2招募RED-SMU1复合物调节NS1 mRNA剪接, SMU1或RED敲低会抑制剪接, 造成NS2蛋白水平下降, 影响了病毒RNP的出核, 减少了病毒颗粒的产生(图2B)[32]。NS1和NS2蛋白的相对水平可能反映了病毒在生命周期的不同阶段达到的精细平衡, 以适应宿主细胞内的环境变化。

TRA2A也是IAV mRNA剪接的调节因子, 能够通过识别IAV M1和NS1 mRNA上的内含子剪接沉默子(intronic splicing silencer, ISS)抑制剪接, 从而影响M2和NS2蛋白的表达。有趣的是, 禽源IAV通过突变M1 mRNA上的ISS元件, 增强了M1 mRNA的剪接和M2蛋

白的表达; 而人源IAV通过突变NS1 mRNA上的ISS元件, 降低了NS1 mRNA的剪接和NS2蛋白的表达, 从而抑制病毒聚合酶的活性和病毒的复制[40]。

宿主基因mRNA的剪接也可调控病毒的复制。例如, 参与RNA核质转运的ANP32A蛋白的不同剪接异构体亚型在增强IAV聚合酶功能以及与其互作能力上存在着显著的差异, 这些差异进一步影响了IAV的复制和传播。它不仅是IAV聚合酶的关键协同因子, 也是推动IAV跨物种传播和适应的主要因素[41]。尽管RNA病毒中的可变剪接现象较为少见, 但许多病毒感染的一个共同特征是改变了宿主细胞的剪接。各种不同的病毒家族通常会针对核小核糖核蛋白、富含丝氨酸/

精氨酸的蛋白以及核内不均一核糖核蛋白等mRNA剪接机器的组成因子进行攻击, 从而引起宿主全局的可变剪接变化<sup>[42-44]</sup>。然而, 如何将观察到的剪接体或剪接调控蛋白的相互作用、定位变化和丰度差异与病毒蛋白对宿主可变剪接的全面影响联系起来是一大挑战。

在感染过程中观察到的剪接改变可能是由两种机制共同引起的: 一方面, 可能是由病毒对剪接因子的加工、结合、亚细胞定位改变所引起; 另一方面, 可能与病毒诱导的细胞损伤或免疫反应有关, 多种病毒通过靶向基因转录、翻译和蛋白降解过程来改变剪接因子的水平, 从而使宿主抗病毒反应失效<sup>[45]</sup>。例如, RBM10作为一种抗病毒的剪接因子, 可以调节SAT1的选择性剪接, 限制DENV的增殖。过表达登革病毒NS5, 其与RBM10相互作用, 通过蛋白酶体依赖性方式降低RBM10蛋白水平, 改变SAT1剪接模式, 可以促进病毒增殖。RBM10还通过与病毒RNA和RIG-I互作, 促进RIG-I泛素化, 激活干扰素和炎症因子表达, 发挥抗病毒作用<sup>[46]</sup>。越来越多的证据表明, 可变剪接是一种调节病原体免疫反应的机制, 并且与细胞凋亡、DNA损伤反应有关。

最近一项工作使用基于紫外交联的方法, 全面鉴定了SARS-CoV-2编码的27种蛋白与人类RNA的相互作用, 发现10种病毒蛋白能够特异性地结合到人类的mRNA或非编码RNA, 包括分别参与mRNA剪接、翻译和蛋白质运输的剪接体snRNA、核糖体rRNA和信号识别颗粒7SL RNA。其中, NSP16能够结合到剪接体RNA的U1和U2的mRNA识别位点, 从而干扰mRNA的剪接过程(图2C)。通过新生RNA测序的方法, 作者证明了NSP16的表达或SARS-CoV-2的感染能够导致宿主全局性的mRNA剪接异常, 还发现NSP16的剪接抑制作用能够降低宿主细胞对病毒感染的干扰素反应<sup>[47]</sup>。值得注意的是, 这些CLIP-seq实验是在单独表达特定病毒蛋白的情况下进行的, 可能与真实病毒感染的系统存在差异, 有待进一步研究。整合RNA-seq, CLIP-seq, GRO-seq等多组学数据分析, 观察由于病毒感染而新发生的剪接事件及其动态变化, 识别RNA结合蛋白与RNA之间的互作, 有助于理解病毒蛋白如何干预宿主mRNA的剪接过程。例如, 病毒蛋白可能会改变剪接因子的活性, 或与相关RNA结构互作, 从而影响剪接的选择性。这种多维度的分析方法可能是探究病

毒感染对细胞剪接机制的直接或间接影响以及揭示宿主细胞剪接改变的分子机制的关键途径之一, 也可能揭示新的抗病毒治疗靶点。

## 2.2 RNA病毒与多聚腺苷酸化

真核生物pre-mRNA的3'末端加工是一种与转录终止密切相关的加工步骤, 主要由切割和多聚腺苷酸化特异性因子(cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF)复合物催化的3'末端切割反应和RNA末端的多聚腺苷酸化组成<sup>[48]</sup>。CPSF复合物通过识别多聚腺苷酸化信号(polyadenylation signal, PAS)等RNA顺式元件起始加工过程。可变多聚腺苷酸化(alternative polyadenylation, APA)通过选择不同的PAS位点切割和添加polyA尾巴, 从而调节mRNA长度, 产生不同长度的3' UTR, 进而影响其稳定性、定位或翻译效率。研究表明, 多种病毒可以改变宿主mRNA的多聚腺苷酸化水平和位点选择。

水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)感染后, 大多数3'加工因子的表达水平下降, 包括CPSF30, CFIm25, CFIm68, CPSF160, CstF50, PABPC4等, 从而导致全基因组范围内的3'端选择发生变化<sup>[49]</sup>。寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)感染使得JEG3细胞中229个基因的3' UTR延长(包括与宿主免疫反应相关的基因)、269个基因的3' UTR缩短(其中富集了与mRNA剪接和加工相关的基因), 这表明APA可能是转录组响应寨卡病毒感染的重要方式<sup>[50]</sup>; 然而, 病毒蛋白如何参与多聚腺苷酸化过程尚不清楚。对RSV感染的人小气道上皮细胞的RNA-seq分析显示, 905个基因发生了APA变化, 这些基因富集在细胞周期调控和天然免疫反应途径中<sup>[51]</sup>。辛德毕斯病毒感染导致细胞HuR蛋白从细胞核到细胞质的重定位, 由核HuR蛋白调控的pre-mRNA的可变多聚腺苷酸化和剪接模式均发生了变化<sup>[52]</sup>。COVID-19患者中, CPSF2, PAPOLG, FIP1L1和PCF11等3'加工因子表达显著上升, 产生APA的基因与天然免疫反应过程有关, 包括中性粒细胞激活、MAPK级联反应的调节和细胞因子的产生<sup>[53,54]</sup>。这可能是SARS-CoV-2逃避宿主免疫的策略之一, 但病毒因子在其中的作用尚不清楚。

部分病毒感染造成APA变化的分子机制近期得到了解析。肠道病毒71 (enterovirus, EV71)的3C蛋白酶(3C<sup>pro</sup>)可引起CstF-64降解, 未切割的宿主pre-mRNA水

平升高, 多聚腺苷酸化的mRNA水平降低, 表明EV71感染利用3C<sup>pro</sup>对CstF-64的降解来抑制宿主mRNA的3'端加工<sup>[55]</sup>. IAV的NS1蛋白的效应结构域(effector domain, ED)被报道能够单独诱导APA, 而NS1的RNA结合结构域(RNA binding domain, RBD)则不能. NS1的ED中的一个保守甘氨酸残基(G184)是与CPSF4结合并引起APA的关键位点, 而NS1的ED中的另外两个氨基酸残基(F103和M106)则影响与CPSF4的亲和力, 导致转录终止缺陷, 产生通读长转录本<sup>[56,57]</sup>. NS1还通过ED与PABP2结合来干扰多聚腺苷酸化, 其中这种相互作用导致PABP2的核质分布改变, 使宿主转录本的多聚腺苷酸化水平降低, 并且抑制转录本出核<sup>[58]</sup>. 在流感病毒毒株A/Udorn/72中, NS1与CPSF30结合会抑制干扰素反应调节因子IFN- $\beta$ mRNA的3'末端加工<sup>[59]</sup>.

这些发现揭示了不同病毒感染对转录后调控的影响, 为理解病毒与宿主相互作用提供了新视角. 病毒是否利用这种机制特异性地抑制某些基因, 例如抗病毒基因的mRNA的转录后加工及翻译, 值得进一步探究. 更多病毒感染导致的APA变化的分子机制和生物学功能有待解析.

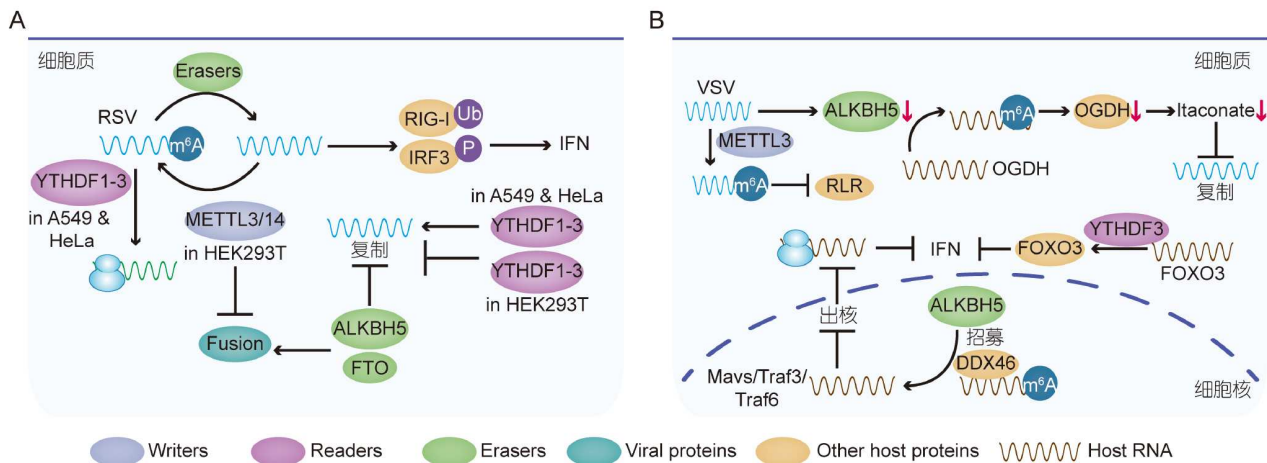
## 2.3 RNA病毒与m<sup>6</sup>A修饰

RNA的m<sup>6</sup>-甲基腺苷(m<sup>6</sup>A)修饰是一个动态、可逆的过程, 是最常见的RNA内部修饰. 这种修饰由三类蛋白质调控: 甲基转移酶(writers)、去甲基化酶(erasers)和m<sup>6</sup>A阅读器蛋白(readers). 有两项独立的工作相继总结了参与m<sup>6</sup>A修饰的蛋白家族, m<sup>6</sup>A修饰对可变剪接、mRNA出核、翻译、稳定性的影响, 以及m<sup>6</sup>A修饰对抗病毒免疫反应和免疫逃逸的作用. m<sup>6</sup>A修饰在多种不同DNA或RNA病毒感染时发挥不同功能, 主要涉及猿猴空泡病毒40(SV40)、乙型肝炎病毒(HBV)、卡波西病毒肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、SARS-CoV-2、ZIKV、HCV和HIV-1<sup>[60,61]</sup>. 本节在此基础上总结了近期关于m<sup>6</sup>A修饰如何影响其他RNA病毒感染过程的研究进展(图3).

近期有多项研究报道了RSV病毒中的m<sup>6</sup>A修饰在其感染中的功能. 与野生型病毒RNA相比, 缺乏m<sup>6</sup>A修饰的重组RSV和在METTL3敲除细胞中复制的RSV能诱导更高的RIG-I表达, 并增强RIG-I泛素化和IRF3磷酸化, 从而增强II型IFN的产生<sup>[62]</sup>. 这表明抑制RSV RNA m<sup>6</sup>A修饰可增强先天性免疫反应, 进而促进适应

性免疫. 另外研究表明, m<sup>6</sup>A相关蛋白对RSV感染的影响存在细胞特异性因素. 一项工作发现, 在HEK293T细胞中, METTL3/METTL14抑制了HRSV的融合蛋白F (fusion protein)的合成, 从而降低了病毒滴度和感染性; 而m<sup>6</sup>A去甲基化酶FTO和ALKBH5则促进F蛋白的合成; YTHDF1-3蛋白能够结合HRSV的基因组RNA, 导致其在细胞内外的水平下降, 从而抑制病毒复制<sup>[63]</sup>. 在RSV感染BEAS-2B细胞24 h后观察到FTO的mRNA水平显著上升<sup>[64]</sup>. 有趣的是, 另一项工作证明, 在HeLa细胞和A549细胞中, YTHDF1-3蛋白可以促进RSV的复制、基因表达和子代病毒的产生. 过表达METTL3/METTL14对RSV的复制有正向调节作用, 能够提高vRNA的m<sup>6</sup>A水平以逃避模式识别受体; 过表达ALKBH5和FTO抑制RSV的复制和基因表达, 使病毒的F蛋白和黏附蛋白G (glycoprotein)的表达水平大幅降低. 以上蛋白的敲低则有相反的效果. 敲低单个YTHDF1-3蛋白显著减少F和G蛋白的合成. 敲低METTL3/METTL14可使病毒RNA中的m<sup>6</sup>A含量减少70%, 这表明靶向甲基转移酶会改变vRNA的m<sup>6</sup>A丰度, 进而影响病毒复制和基因表达. 敲低ALKBH5和FTO可提高F蛋白和G蛋白水平(图3A). 该研究还发现RSV的G基因片段有最高的m<sup>6</sup>A修饰水平, 对G基因的m<sup>6</sup>A保守位点突变形成的重组病毒的m<sup>6</sup>A丰度降低, 重组病毒在动物实验中的复制能力下降, 但仍保持较高的免疫原性. 病毒的m<sup>6</sup>A修饰可能是设计和制备RSV或其他肺病毒的减毒活疫苗的有效靶点<sup>[65,66]</sup>.

在VSV感染中, 过表达METTL3会增加病毒转录本上的m<sup>6</sup>A修饰, 抑制病毒双链RNA生成, 从而抑制RIG-I和MDA5等RIG样受体(RIG-I like receptors, RLR)对病毒RNA的感应, 进一步干扰抗病毒免疫信号通路, 这表明病毒RNA的m<sup>6</sup>A修饰负调控dsRNA先天感应通路<sup>[67]</sup>. 可能的机制是, m<sup>6</sup>A修饰通过招募RNA结合蛋白来阻止RIG-I激活, 这些蛋白抑制dsRNA形成或直接阻碍RIG-I结合而不完全改变RNA结构. 另一方面, METTL3/14的m<sup>6</sup>A甲基转移酶复合物对某些抗病毒的干扰素刺激基因(interferon-stimulated genes, ISGs)的mRNA进行m<sup>6</sup>A修饰, 如IFITM1. YTHDF1通过m<sup>6</sup>A依赖的方式提高IFITM1的蛋白表达, 增强了I型干扰素的抗病毒效应<sup>[68]</sup>. 此外, 有研究发现, IFNB mRNA在其终止密码子附近存在m<sup>6</sup>A修饰, 敲除METTL3或YTHDF2会使IFNB mRNA稳定性增加并



**图 3** m<sup>6</sup>A相关蛋白在病毒感染中的调控。A: RSV感染中的m<sup>6</sup>A修饰相关调控。缺乏m<sup>6</sup>A修饰的RSV RNA能促进RIG-I的泛素化和IRF3的磷酸化, 从而增强II型IFN的产生。m<sup>6</sup>A相关蛋白对RSV感染的影响存在细胞特异性, 在HEK293T细胞中, METTL3/METTL14抑制RSV的融合蛋白F的合成, 从而降低病毒滴度和感染性; 而FTO和ALKBH5则促进F蛋白的合成。YTHDF1~3蛋白能够结合RSV的基因组RNA, 抑制病毒复制。在HeLa细胞和A549细胞中, YTHDF1~3蛋白可以促进RSV的复制和基因表达。B: VSV感染中的m<sup>6</sup>A修饰相关调控。VSV感染会导致ALKBH5酶活降低, 进而维持了酮戊二酸脱氢酶(OGDH) mRNA的高水平m<sup>6</sup>A修饰, 致使其mRNA稳定性降低、蛋白表达减少, 进而减少衣康酸生成, 最终抑制病毒复制。METTL3会增加病毒转录本上的m<sup>6</sup>A修饰, 减少病毒dsRNA的形成, 从而抑制RIG-I样受体对病毒RNA的感应。DDX46招募ALKBH5去除参与抗病毒反应的Mavs, Traf3和Traf6转录本上的m<sup>6</sup>A修饰, 导致这些RNA在细胞核内滞留, 阻止其翻译和I型干扰素的产生。YTHDF3能够促进FOXO3 mRNA的翻译, 进而抑制IFN诱导的抗病毒基因的表达

**Figure 3** m<sup>6</sup>A-related proteins in the regulation of viral infection. A: m<sup>6</sup>A modification-related regulation during RSV infection. RSV RNA lacking m<sup>6</sup>A modification can promote ubiquitination of RIG-I and phosphorylation of IRF3, thereby enhancing the production of type II IFN. The impact of m<sup>6</sup>A-related proteins on RSV infection is cell-specific. In HEK293T cells, METTL3/METTL14 inhibit the synthesis of RSV's fusion protein F, reducing viral titers and infectivity; whereas FTO and ALKBH5 promote the synthesis of the F protein. YTHDF1-3 proteins can bind to the genomic RNA of RSV, inhibiting viral replication. In HeLa and A549 cells, YTHDF1-3 proteins can promote the replication and gene expression of RSV. B: Regulation related to m<sup>6</sup>A modification during VSV infection. VSV infection leads to decreased ALKBH5 enzyme activity, thereby maintaining a high level of m<sup>6</sup>A modification on OGDH mRNA, reducing its stability and protein expression. The reduction in OGDH decreases the concentration of the metabolite itaconate required for viral replication, limiting the virus's infection in the host. METTL3 increases m<sup>6</sup>A modification on viral transcripts, reducing the formation of viral dsRNA, thus inhibiting the RIG-I-like receptor's sensing of viral RNA. DDX46 recruits ALKBH5 to remove m<sup>6</sup>A modifications from transcripts involved in antiviral responses such as Mavs, Traf3, and Traf6, causing these RNAs to be retained in the nucleus, preventing their translation and the production of type I interferons. YTHDF3 can promote the translation of FOXO3 mRNA, thereby inhibiting the expression of antiviral genes induced by IFN

持续产生IFN- $\beta$ , 从而促进更强的抗病毒反应, 阻止HCMV传播。作者还观察到在IAV、腺病毒或VSV感染细胞中METTL3或YTHDF2的缺失伴随着IFNB和ISG15 mRNA水平升高<sup>[69]</sup>。YTHDF3能够促进FOXO3 mRNA的翻译, FOXO3能够抑制IFN诱导的抗病毒基因的表达, 并且YTHDF3敲除的细胞和小鼠对VSV等多种病毒具有更强的抵抗力<sup>[70]</sup>。YTHDF1~3本身具有不同的功能, YTHDF1可以促进翻译<sup>[71]</sup>, YTHDF2可以调节含m<sup>6</sup>A的mRNA的稳定性来调节基因表达<sup>[72]</sup>, 而YTHDF3作为增强YTHDF1和YTHDF2作用的辅助因子<sup>[73]</sup>, 它们共同在天然免疫反应的多个阶段中发挥着相应的调控功能, 突显了m<sup>6</sup>A修饰在抗病毒反应中的重要性(图3B)。

WTAP蛋白在VSV感染或I型干扰素信号激活后会通过泛素化-蛋白酶体途径降解。随着WTAP的降解, IFN调节因子3 (IRF3)和干扰素 $\alpha/\beta$ 受体亚基1 (IFNAR1) mRNA的m<sup>6</sup>A水平降低, 导致IRF3的翻译抑制和IFNAR1 mRNA的不稳定。因此, WTAP-IRF3/IFNAR1途径可能是微调I型干扰素信号激活的负反馈机制, 这突出了在抗病毒反应中, m<sup>6</sup>A决定与IFN-I信号相关mRNA的命运的功能<sup>[74]</sup>。

VSV感染后, ALKBH5蛋白的R107去甲基化会导致ALKBH5酶活性降低, 因此维持了酮戊二酸脱氢酶(OGDH) mRNA的高水平m<sup>6</sup>A修饰, 从而导致其mRNA的稳定性下降, 蛋白表达减少, 进而引起衣康酸的浓度下降, 最终抑制病毒在宿主细胞内的增殖<sup>[75]</sup>。

此外, DDX46通过其DEAD螺旋酶结构域招募ALKBH5, 去除参与抗病毒反应的Mavs, Traf3和Traf6转录本上的m<sup>6</sup>A修饰, 促使这些转录本滞留核内, 从而抑制其蛋白表达及I型干扰素生成. 在小鼠模型中, DDX46的减少能够增强抗病毒反应, 提示DDX46可能作为调节宿主抗病毒免疫反应的作用靶点[图3B]<sup>[76]</sup>.

人类偏肺病毒(HMPV)的基因组、反基因组(anti-genome)和部分mRNA都含m<sup>6</sup>A修饰, 而且可以被m<sup>6</sup>A相关蛋白调控. m<sup>6</sup>A缺失的病毒RNA能够更有效地激活RIG-I介导的信号通路, 引发免疫应答<sup>[66,77]</sup>. METTL3使埃博拉病毒mRNA的3'非翻译区甲基化, 与埃博拉病毒核蛋白和转录激活因子VP30相互作用, 促进病毒RNA合成. 这种相互作用也在其他出血热病毒如克里米亚-刚果出血热病毒中观察到<sup>[78]</sup>.

在IAV复制的早期阶段, 较多的NEP会抑制IAV聚合酶活性和病毒复制效率. YTHDC1能识别NS片段中的一个保守位点GG(m<sup>6</sup>A)C(528~531), 该位点与NS mRNA的3'剪接位点重合, 对IAV的剪接和复制十分重要. YTHDC1通过识别A530的m<sup>6</sup>A修饰来抑制剪接, 从而促进病毒复制. 点突变A530C减弱了YTHDC1对NS1 mRNA的结合, 导致生成更多NEP蛋白, 反而抑制了病毒聚合酶活性<sup>[79]</sup>.

轮状病毒感染通过NSP1介导ALKBH5的表达下调来逃避免疫反应. 另一方面, IRF7 (IFNs和ISGs上游的一个关键转录因子)是轮状病毒感染过程中m<sup>6</sup>A修饰的靶标之一, 并且是介导METTL3缺乏引起的抗轮状病毒免疫反应升高的关键. 基于此, 该研究提出了双重激活模型. 在METTL3缺失的情况下, dsRNA的增加将诱导IFN反应, 而作为IFN和ISG表达关键转录因子的IRF7 mRNA稳定性的增加进一步促进该反应<sup>[80]</sup>. 此外, 病毒RNA基因组的m<sup>6</sup>A修饰也会影响天然免疫的信号激活<sup>[81]</sup>, 轮状病毒基因组上的m<sup>6</sup>A修饰减少可能会直接激活先天感应器, 诱导更高的IFN反应.

感染黄病毒科病毒同样会改变宿主的m<sup>6</sup>A修饰水平, 利用MeRIP-seq技术分析DENV, ZIKV, WNV和HCV感染后的m<sup>6</sup>A表观转录组, 鉴定了58个共同改变的m<sup>6</sup>A位点, 涉及51个基因. 其中, 感染后R10K3的m<sup>6</sup>A增加促进了其翻译, 而CIRBP的m<sup>6</sup>A减少促进了其可变剪接, 以此调节抗病毒反应, R10K3的m<sup>6</sup>A增加依赖于IRF3介导的天然免疫应答, 而CIRBP的m<sup>6</sup>A减少依赖于巯基嘌呤诱导的ER应激反应<sup>[82]</sup>.

这些研究结果进一步表明m<sup>6</sup>A修饰广泛地参与病毒-宿主互作. 有趣的是, 本团队<sup>[83]</sup>最近的研究工作表明, IGF2BP3作为m<sup>6</sup>A阅读器蛋白可将高m<sup>6</sup>A修饰水平的mRNA分流到P小体(processing body, P-body), 从而抑制这类mRNA的翻译. 该机制是否在不同病毒感染条件下发挥生物学作用值得深入研究.

### 3 病毒与宿主的分子互作

#### 3.1 病毒RNA与病毒蛋白质相互作用

病毒RNA与病毒蛋白质的相互作用在病毒的复制、转录、翻译、组装等过程中起着重要的作用. 例如, 病毒的RdRp是病毒复制的关键酶, 它与病毒RNA的特定结构域或序列相互作用, 以识别病毒RNA的模板和启动位点. 病毒RNA也与病毒的结构蛋白或非结构蛋白相互作用, 以形成病毒颗粒或复制复合体. 病毒核衣壳蛋白是一类结构蛋白, 它们与病毒RNA基因组结合, 形成核衣壳结构, 保护病毒RNA免受核酸酶的降解, 同时也为病毒的复制和转录提供模板. 病毒核衣壳蛋白是病毒生命周期中的关键因子, 也是病毒与宿主相互作用的重要介质<sup>[84,85]</sup>. 病毒RNA与病毒非结构蛋白(NSP)的相互作用还可以影响病毒RNA的结构和功能. NSP中的一部分参与形成复杂的RNA复制复合体. 黄病毒属的RNA复制复合物的形成和功能需要多种NSP和宿主因子的协同作用, 其中NSP1, NSP4和NSP5在诱导膜重塑和锚定复制复合物中起到关键作用, NSP2, NSP3和NSP5在参与RNA合成和修饰中发挥重要作用<sup>[86]</sup>.

RNA-蛋白质相互作用可以调节病毒颗粒的形成速率、大小和形状, 以及病毒RNA的包装效率和选择性. RNA-蛋白质相互作用可以通过改变RNA的二级结构和柔性, 影响RNA的折叠和组织方式, 从而导致不同形态的病毒颗粒的产生. 此外, RNA-蛋白质相互作用可以使病毒颗粒在不同的环境条件下, 如温度、离子浓度等, 表现出不同的稳定性和可逆性<sup>[87]</sup>.

蛋白质翻译后修饰(post-translational modification, PTM)会影响病毒蛋白质与RNA的结合, SARS-CoV-2的多种蛋白质, 如核衣壳蛋白、膜蛋白、刺突蛋白以及非结构蛋白, 都可以发生不同类型的PTM, 如磷酸化、泛素化、乙酰化、甘氨酸化等. 这些PTM可以影响病毒蛋白质的结构、功能、稳定性、相互作用、定

位等, 从而调节病毒的复制、转录、组装、释放等过程。例如, SARS-CoV-2的N蛋白的磷酸化可以影响其与病毒RNA的结合, 从而影响病毒RNA的稳定性和复制效率<sup>[88]</sup>。

RNA沉默抑制子(RNA silencing suppressor, RSS)是一类可以抑制宿主细胞的RNA干扰(RNA interference, RNAi)途径的病毒蛋白质或RNA分子, 从而增强病毒的感染和复制。不同的RNA病毒, 如丝状病毒、花叶病毒、烟草花叶病毒等, 都可以编码或包装不同的RSS, 如P19, P21, P25, P38等。这些RSS可以通过与宿主细胞中的小干扰RNA或微小RNA结合, 阻断RNAi途径的关键步骤, 如Dicer切割、RISC装配、AGO切割等, 使病毒可以逃避宿主细胞的抗病毒防御, 增加病毒RNA的稳定性和翻译效率, 促进病毒的复制和传播<sup>[89]</sup>。

### 3.2 病毒RNA之间的相互作用

病毒RNA之间也存在着复杂的相互作用, 包括短程和长程的RNA-RNA相互作用。这些相互作用可以影响病毒RNA的折叠、稳定性、复制效率、亚基因组RNA的产生等。日本脑炎病毒的5'和3'端区域可以发生远程的相互作用, 这种相互作用可以形成一个环状的RNA结构, 促进RNA聚合酶的识别和结合, 因而对病毒的复制和转录是必需的<sup>[90]</sup>。

丙型肝炎病毒RNA在翻译和复制过程中, 需要通过不同的RNA-RNA相互作用实现环化和结构调控。这些相互作用主要发生在HCV RNA的5'和3'非编码区, 这两个区域含有多个保守的结构域, 如IRES, 5BSL3.2, 3'X等。这些结构域可以与自身或者其他结构域发生互补配对, 形成假结或者环状结构, 这类结构有助于IRES与宿主翻译因子结合, 促进HCV RNA的复制。此外, HCV在复制过程中其3'端会形成互补的回文序列来实现同源二聚化, 这种二聚化在HCV RNA的封装中发挥了重要作用<sup>[91]</sup>。

亚基因组RNA (sgRNA)是冠状病毒生命周期中的重要组成部分, 它们编码了病毒的结构蛋白和辅助蛋白。亚基因组RNA的产生需要病毒基因组RNA的负链模板在不同的转录调节序列(transcript regulatory sequence, TRS)之间进行模板切换(template switch)。SARS-CoV-2基因组中S蛋白基因和ORF8之间的RNA-RNA相互作用可能介导5'UTR的TRS和N基因的TRS

互相靠近, 从而促进N基因亚基因组RNA的合成, 这可能影响了病毒的复制和致病性<sup>[92]</sup>。本团队<sup>[93]</sup>在之前的研究中, 采用NGS short-read和Nanopore long-read测序技术系统地构建了新冠病毒感染的sgRNA图谱, 发现模板切换不仅存在于负向(-)sgRNA合成中, 也存在于正向(+)sgRNA合成过程中; 发现模板切换可独立于TRS而发生, 关键的调控元件不是TRS序列, 而是新生RNA与模板的RNA-RNA互作强度和模式, 它们是特定模板切换事件发生的关键决定因素。此外, 还发现由模板切换产生的sgRNA可以进一步作为模板发生二次模板切换而产生更小的sgRNA, 这种连续的模板切换事件可以产生多样化的SARS-CoV-2亚基因组。这些发现为理解冠状病毒RNA转录提供了新的分子基础。

### 3.3 病毒RNA与宿主蛋白质相互作用

病毒RNA和宿主蛋白质相互作用是病毒感染和复制的重要环节, 可以影响病毒和宿主的转录、翻译、信号转导、免疫反应等(图4)。病毒RNA和宿主蛋白质互作的方式和功能多种多样, 既有利于病毒的适应和逃避宿主的免疫反应, 也可以引发宿主的抗病毒应答和信号转导<sup>[94]</sup>。

病毒RNA的翻译是病毒感染的重要过程, 也是病毒与宿主竞争的关键环节。病毒RNA可以通过多种方式调控自身的翻译, 如利用IRES、RNA假结等结构, 与宿主的翻译因子、RNA结合蛋白、核糖体等相互作用, 从而增强或抑制病毒RNA的翻译效率。狂犬病毒和登革热病毒RNA的5'端和内部存在两个结构保守的元件5' UTR stem-loop 1 (SL1)和IRES, 它们可以协同地与eIF4F的两个亚基eIF4A和eIF4G相互作用, 招募核糖体并启动病毒RNA的翻译<sup>[95]</sup>。病毒RNA可以通过多种方式实现自身的核-质转运, 如利用自身的蛋白质或与宿主的转运蛋白相互作用, 从而穿越核孔或膜结构, 进入或离开细胞核。这些核-质转运的RNA具有不同的功能, 如调节病毒RNA的复制、组装、释放、免疫识别等<sup>[96,97]</sup>。病毒RNA的降解和稳定性是病毒感染的重要因素, 影响着病毒的复制效率和适应性。无义介导的mRNA降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)是一种高度保守的RNA质量控制机制, 它可以识别并降解含有早期终止密码子的mRNA, 从而防止错误蛋白的产生, 宿主细胞可以通过NMD途径阻碍病

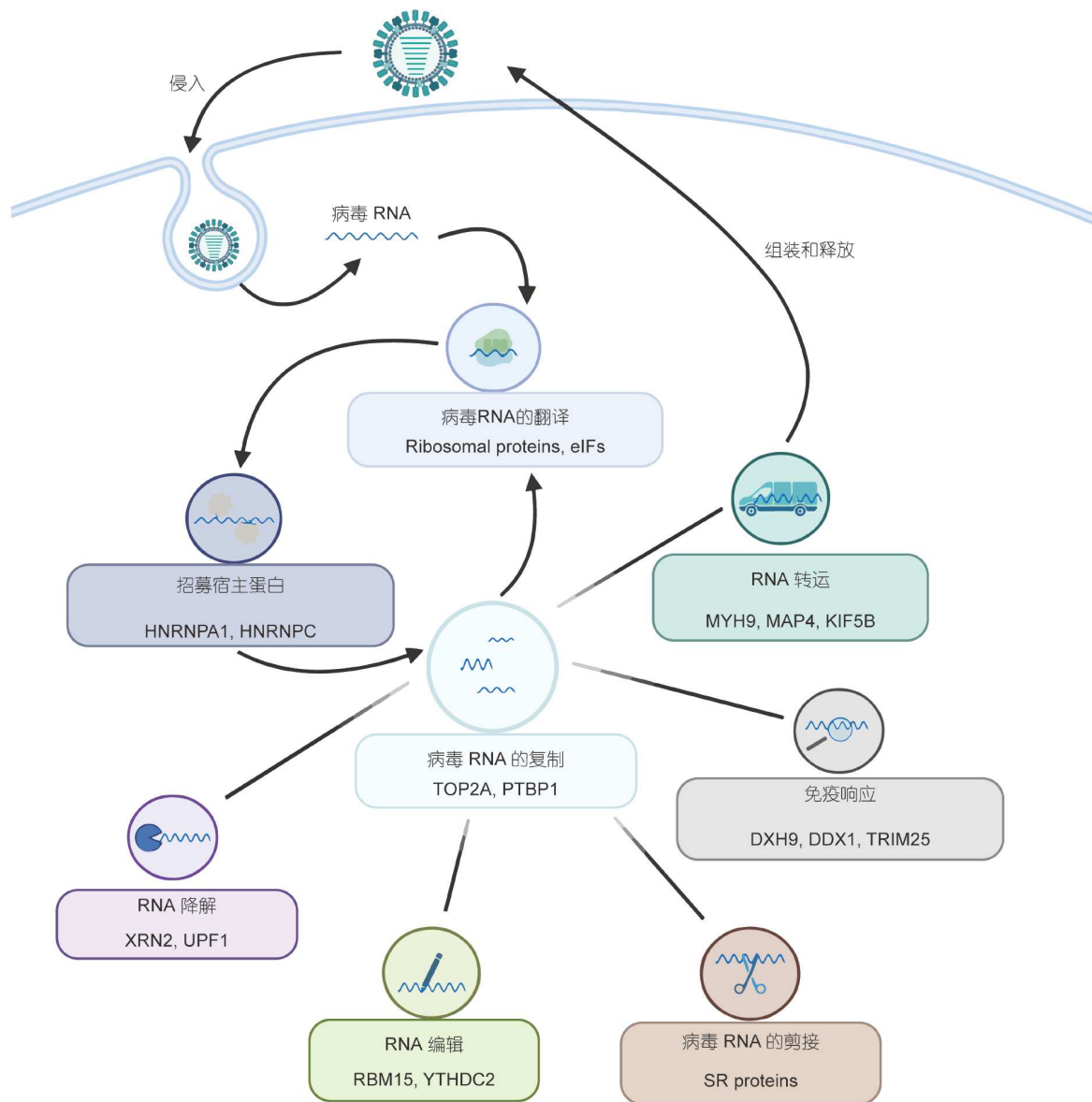


图 4 RNA病毒复制周期中病毒RNA与宿主的相互作用。病毒感染后释放的RNA在其转运、翻译、复制、降解、编辑、剪接、免疫响应等多个层面与不同的宿主因子互作。不同的过程仅列举了一些代表性的宿主因子

Figure 4 Interactions between viral RNA and the host during the replication cycle of RNA virus. The RNA released after viral infection interacts with various host factors at multiple levels, including transport, translation, replication, degradation, editing, splicing, and immune response. Only a few representative host factors are listed in the different processes

毒的增殖<sup>[98]</sup>。

病毒RNA的识别和信号转导是病毒感染引发的宿主免疫反应的重要环节，病毒RNA可以通过多种方式被宿主的RNA感受器识别，从而激活宿主的信号转导途径。cGAS-STING信号通路是一种细胞内DNA感受器，但其不仅可以抑制DNA病毒的复制，也可以响应RNA病毒的感染。一方面，RNA病毒可以通过损伤

线粒体或细胞核，导致DNA泄漏到细胞质，被cGAS感知；另一方面，RNA病毒也可以通过与其他RNA感受器(如RIG-I，MDA5等)的相互作用，或通过病毒蛋白(如蛋白酶，非结构蛋白等)的作用激活或抑制STING<sup>[99]</sup>。宿主细胞可以利用ISG来干扰或降解病毒RNA，此外病毒同样可以利用自身的RNA或蛋白质来拮抗ISG的作用<sup>[100]</sup>。病毒可以利用自身的RNA聚合酶

或与宿主的RNA环化酶相互作用, 从而产生具有不同功能的circRNA, 调节病毒RNA的翻译、复制、稳定性、免疫识别<sup>[101]</sup>.

为了系统鉴定参与SARS-CoV-2与宿主细胞相互作用的宿主蛋白, 本团队<sup>[102]</sup>收集并重新分析了与SARS-CoV-2相关的RNA-蛋白质相互作用的所有可用数据集, 通过相互作用网络分析确定了病毒蛋白可能的亚细胞定位, 如内质网中的ORF8和内质网膜中的ORF7A/B. 通过整合蛋白质和RNA相互作用组, 本团队发现SARS-CoV-2 RNA及其N蛋白与应激颗粒中约40个核心因子有密切相互作用, 并使用RIP和Co-IP实验对其中的G3BP1, IGF2BP1和MOV10进行了特异性验证. 结合CRISPR筛选结果, 进一步鉴定出86种抗病毒因子和62种促病毒因子及相关药物. 我们将所有数据通过AIMaP数据库(<https://mvip.whu.edu.cn/aimap>)提供给用户, 可供用户方便地探索SARS-CoV-2大分子与宿主相互作用图谱.

### 3.4 病毒RNA与宿主RNA相互作用

病毒RNA和宿主RNA相互作用是病毒感染和宿主反应的重要调控机制, 涉及多种类型和功能的RNA分子, 包括微小RNA (miRNA)、长非编码RNA (lncRNA)、病毒来源的小RNA (vsRNA)和RNA沉默抑制子 (RSS). 这些RNA相互作用可以影响病毒的复制、转录、翻译、组装、释放和致病性, 也可以影响宿主的免疫、细胞周期、凋亡、分化和转化.

宿主miRNA是一类长度约为22个核苷酸的单链RNA分子, 通过与靶RNA的3'非翻译区或编码区的互补序列结合, 抑制或促进病毒的复制、翻译和致病性. 宿主miRNA与病毒RNA的3' UTR结合, 可以抑制病毒的复制或释放. 例如, 人类miR-122可以与丙型肝炎病毒的3'UTR结合, 促进病毒的复制和稳定性, miR-122与HCV的3'UTR的结合是HCV感染肝脏的关键因素, 也是HCV治疗的潜在靶点<sup>[103]</sup>; 人类miR-29可以与HIV的3'UTR结合, 抑制病毒的释放<sup>[104]</sup>.

宿主lncRNA是一类长度超过200个核苷酸的非编码RNA分子, 通过与其他RNA、DNA或蛋白质结合, 参与基因表达的调控和细胞功能的执行. 宿主lncRNA可以与病毒RNA结合, 影响病毒的复制和致病性. 宿主lncRNA与病毒RNA的3'UTR结合, 抑制病毒的复制或释放. 例如, 人类lncRNA-BISPR可以与HIV的3'UTR

结合, 抑制病毒的释放. 宿主lncRNA与病毒RNA的编码区结合, 抑制病毒的翻译或增强病毒的变异. 例如, 人类lncRNA-NEAT1可以与HIV的gag-pol基因的编码区结合, 增加gag-pol的变异频率<sup>[105]</sup>.

SARS-CoV-2 RNA与宿主因子的相互作用可以抑制干扰素反应, 同时诱导细胞因子释放. 然而, SARS-CoV-2如何劫持宿主RNA以引发这种不平衡的免疫反应长期是一个谜. 在2024年最近的一项研究中, 研究者使用RIC-seq分析了SARS-CoV-2 RNA在感染细胞和患者肺样本中的原位结构和相互作用, 发现SARS-CoV-2 RNA通过在A549细胞中募集RNA结合蛋白YBX3, 与205个宿主mRNA的3' UTR形成2095个潜在的双链, 以增加其稳定性. 破坏SARS-CoV-2-宿主RNA双链或敲除YBX3会降低宿主mRNA的稳定性并减少病毒复制. 此外, 在SARS-CoV-2的稳定宿主靶标中, NFKBIZ对促进细胞因子产生和减少干扰素反应至关重要, 可能有助于细胞因子风暴诱导. 该研究揭示了RNA-RNA相互作用在SARS-CoV-2等RNA病毒的免疫发病机制中的关键作用, 并为药物开发提供了潜在的宿主靶点<sup>[106]</sup>.

### 3.5 病毒蛋白质与宿主蛋白质相互作用

病毒蛋白质和宿主蛋白质的相互作用也是病毒感染和复制的关键步骤, 可以影响病毒的复制过程以及病毒和宿主的蛋白质翻译、修饰、降解、信号转导等, 是研究病毒致病机制和寻找抗病毒药物的重要方向.

冠状病毒与宿主蛋白质的相互作用涉及了病毒的所有蛋白质和宿主的多个信号通路和细胞器. 例如, 冠状病毒的表面S蛋白可与宿主细胞膜上的ACE2受体特异性结合, 介导病毒侵入细胞; 冠状病毒的核衣壳蛋白能够与宿主的核糖核酸结合蛋白结合, 影响病毒的转录和复制; 冠状病毒的膜蛋白能够与宿主的细胞骨架蛋白结合, 参与病毒的组装和释放. 这些相互作用不仅揭示了冠状病毒的感染机制, 也为寻找抗病毒的药物靶点提供了依据<sup>[107]</sup>.

埃博拉病毒的基因组编码了7个蛋白质, 其中核衣壳蛋白是最丰富的蛋白质, 与病毒的转录、复制、组装和释放密切相关. 埃博拉病毒的感染会导致宿主细胞内出现包含病毒蛋白质和RNA的包涵体(inclusion bodies), 这些包涵体的形成和功能尚不清楚. Wendt等

人<sup>[97]</sup>发现, 埃博拉病毒的核衣壳蛋白能够与宿主的细胞核RNA输出因子NXF1结合, 并招募NXF1进入包涵体. NXF1是一种参与宿主mRNA的出核和稳定的蛋白质, 与埃博拉病毒的核衣壳蛋白的相互作用可能会干扰宿主的基因表达, 从而有利于病毒的复制. 此外, NXF1也可能在包涵体内促进病毒RNA的出核和病毒的组装和释放.

流感病毒能够利用宿主的Pol II转录机器, 实现病毒的转录和复制, 同时干扰宿主的基因表达, 从而增加病毒的适应性和致病性. 流感病毒的聚合酶能够与宿主的Pol II CTD (carboxy-terminal domain)结合, 抢夺宿主的mRNA 5'端帽子, 作为病毒mRNA的引发子. 其聚合酶和核衣壳蛋白能够与宿主的Pol II和转录因子TFIIH结合, 抑制宿主的基因表达, 从而减少与病毒竞争的RNA和蛋白质, 也能够与宿主的Pol II和转录因子P-TEFb结合, 促进病毒mRNA的延伸和加工, 从而增加病毒的转录效率<sup>[108]</sup>.

RNA颗粒是细胞质中可见的非膜结合的核糖核蛋白结构, 通过控制RNA的翻译和稳定性来调节细胞的稳态和应激反应, RNA颗粒的两种主要类型是应激颗粒(stress granule, SG)和细胞质加工小体(P-body, PB). RNA病毒在感染宿主后会采用各种策略来阻断SG和PB的形成, 以便有效地感染和增殖. HIV-1的Tat蛋白能够与宿主的SG相关的蛋白质TIA-1和G3BP结合, 阻止SG形成; 疱疹病毒的ICP27蛋白能够与宿主的PB相关的蛋白质GW182和DCP1a结合, 破坏PB的形成; 乙型肝炎病毒的HBx蛋白能够与宿主的SG和PB相关的蛋白质eIF2a和XRN1结合, 抑制SG和PB的形成<sup>[109]</sup>. 本团队<sup>[102]</sup>通过对SARS-CoV-2相关的蛋白质-蛋白质相互作用的所有可用数据集进行了系统收集和分析, 鉴定到23050个高可信的蛋白质相互作用, 并预测了SARS-CoV-2编码蛋白的亚细胞位置, 发现SARS-CoV-2的RNA和N蛋白可能与应激颗粒的很多因子有相互作用, 这些信息被整合到了AIMaP数据库中.

## 4 RNA病毒治疗

### 4.1 mRNA疫苗

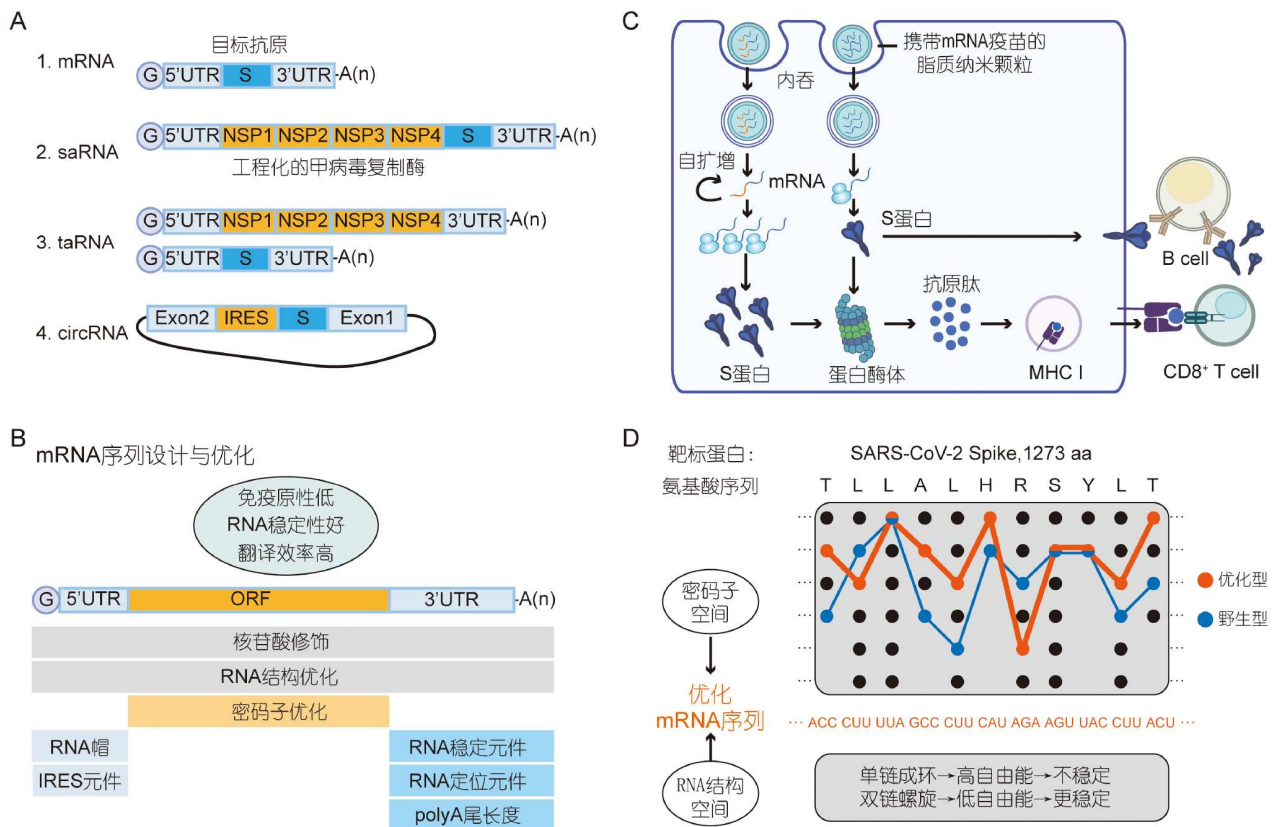
疫苗是预防、控制和根除传染病的重要工具, 在威胁人类健康的卫生危机中, 疫苗接种已成为保卫人类健康的最有效方法之一<sup>[110]</sup>. 2019冠状病毒病(COV-

ID-19)是由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型(SARS-CoV-2)引起的高传染性、致病性和变异性的全球性流行病, 截至2023年12月17日, WHO已报道了772838745例COVID-19确诊病例(<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>), 严重影响了公共卫生和世界经济的发展, 研制安全有效的疫苗对预防和控制流行病至关重要<sup>[111]</sup>.

mRNA疫苗是一种新型疫苗, 其核心是利用合成的mRNA分子来表达目标抗原蛋白, 从而引发机体的免疫反应<sup>[112]</sup>. mRNA分子由三部分组成: 5'端帽(cap)、开放阅读框和3'端多聚A尾巴(poly(A) tail). 5'端帽和3'端多聚A尾巴可以保护mRNA免受核酸酶的降解, 增强其稳定性和翻译效率, 编码区则决定了mRNA所表达的抗原蛋白的种类和性质<sup>[112,113]</sup>. 目前mRNA疫苗的设计主要有四类结构: 非复制型RNA, 自扩增型mRNA (self-amplifying RNA, saRNA), 反式扩增型mRNA

(trans-amplifying RNA, taRNA), 环状RNA (图5A).

mRNA的不稳定性和先天免疫激活是mRNA作为药物发展的重要问题. 将修饰的核苷掺入mRNA可以显著提高mRNA的生物稳定性和翻译能力, 同时减少先天免疫反应<sup>[114]</sup>. 2023年诺贝尔生理学或医学奖被授予Katalin Karikó和Drew Weissman, 以表彰他们“发现核苷碱基修饰, 从而开发出有效的抗COVID-19 mRNA疫苗”(https://www.nature.com/collections/bie-heeeddf). 为了优化mRNA疫苗的稳定性和免疫原性, 需要对mRNA进行一系列的优化, 除了使用非自然的核苷酸修饰(如1-甲基假尿苷酸)<sup>[112]</sup>外, 还可以增加5'端帽的复杂度(如使用Cap1或Cap2)<sup>[115,116]</sup>, 调整编码区的密码子偏好<sup>[117]</sup>, 插入Kozak序列<sup>[118]</sup>, 增强RNA二级结构, 延长3'端poly(A)尾巴等. 这些优化可以降低mRNA的免疫原性, 减少其引起的炎症反应, 增强其在细胞内的稳定性和翻译效率, 提高其表达的抗原蛋白的数量和质量(图5B). 另外, 由于裸露的mRNA分子容易被核酸酶降解, 且难以跨越细胞膜, 因此需要借助递送系统来保护和输送mRNA到目标细胞. 目前常用的递送系统是基于脂质的纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)<sup>[119]</sup>, LNPs是一种由阳离子脂质、中性脂质、胆固醇和聚乙二醇(PEG)脂质组成的双层膜结构, 可以通过静电作用将mRNA包裹在内部, 形成稳定的纳米颗粒. LNPs具有高效的转染能力、低毒性、低免疫原



**图 5** mRNA疫苗的设计、递送和序列优化简述。以新冠病毒刺突蛋白为例来进行说明。A: 主要的四类mRNA疫苗设计结构: 1. 非复制型RNA, 仅包含目标抗原基因S。2. 自扩增型mRNA, 含有启动子、工程化的甲病毒复制酶(nsp1~4)和目标抗原蛋白S。3. 反式扩增型mRNA使用两个转录本实现复制酶和抗原的扩增。4. 环状RNA, 通过内部核糖体进入位点IRES启动S的翻译。G表示5'端帽结构。B: mRNA的序列设计目标和优化策略。C: mRNA疫苗的递送过程。LNP传递的mRNA疫苗通过内吞作用进入细胞, 从内体中释放后, 直接由核糖体翻译成蛋白质, 或以自我扩增方式增加mRNA的丰度, 再翻译成蛋白质。抗原蛋白被蛋白酶降解为短肽, 由MHC I类分子呈递给T细胞, 激活免疫应答; 或抗原蛋白结合B细胞受体激活B细胞。D: mRNA编码序列的计算优化示意图

**Figure 5** Brief summary of mRNA vaccine design, delivery, and sequence optimization. The spike protein of the SARS-CoV-2 is taken as an example. A: The main four types of mRNA vaccine design structures. 1. Non-replicating RNA, which only contains the target antigen gene S. 2. saRNA, containing promoters, engineered alphavirus replicase (nsp1~4), and the target antigen protein S. 3. taRNA, using two transcripts to amplify the replicase and antigen. 4. Circular RNA, which initiates the translation of S through the internal ribosome entry site (IRES). G represents the 5' cap structure. B: The goals and strategies in mRNA vaccine sequence design. C: The delivery process of mRNA vaccines. The mRNA vaccine delivered by the LNP enters the cell through endocytosis. After being released from the endosome, the mRNA is directly translated into protein by ribosomes, or increases its amount through self-amplification before translation. The antigen protein is degraded into short peptides by the proteasome, presented to T cells by MHC class I molecules, activating the immune response; or the antigen binds to the B cell receptor to activate B cells. D: The schematic illustration of computational optimization of the mRNA coding sequence

性等优点, 已经被广泛应用于COVID-19 mRNA疫苗的开发<sup>[120]</sup>。

新冠病毒的S蛋白介导病毒与ACE2受体结合进入宿主细胞, 因此被认为是防止感染和病毒增殖的主要疫苗靶标(图5C)<sup>[121]</sup>。目前, 由BioNTech-Pfizer生产的BNT162b2和Moderna生产的mRNA-1273疫苗已经在多个国家和地区获得了紧急使用授权或批准, BNT162b2和mRNA-1273编码了SARS-CoV-2 的刺突

蛋白, 使用了1-甲基假尿苷(m<sup>1</sup>Ψ)的mRNA被包裹在脂质纳米颗粒中, 以确保其传递和稳定性, 总体上可以安全有效地预防COVID-19<sup>[122~125]</sup>。在新冠病毒大流行期间, 一些国家依赖它们来抵御新冠病毒的流行。最近, 一种针对SARS-CoV-2 D614G变体的saRNA疫苗ARCT-154, 取得了不错的成果。根据临床试验结果, ARCT-154显示出与BNT162b2 相当的免疫原性和安全性, 可能提供更长的保护时间<sup>[126,127]</sup>, 为未来应对

SARS-CoV-2及其他可能的病毒威胁提供了新的选择。Hussain等人<sup>[128]</sup>、Hogan和Pardi<sup>[129]</sup>、Yang等人<sup>[130]</sup>、Silva-Pilipich等人<sup>[131]</sup>先后总结了全球范围内针对RNA病毒(尤其是新冠病毒)的mRNA疫苗开发策略及临床进展。本节总结了目前针对部分RNA病毒设计的一些mRNA疫苗(表2)<sup>[132-138]</sup>。

新冠病毒出现之前, mRNA技术主要用于新型癌症治疗药物的开发<sup>[139,140]</sup>。新冠肺炎大流行促进了mRNA疫苗的发展, mRNA疫苗由于具有开发周期快、不需要细胞培养、免疫原性高等优点, 并可将来自几种变体的序列组合起来以应对病毒基因组中的新突变, 受到了越来越多的关注。值得一提的是, 一种新开发的二价mRNA疫苗, 可同时表达SARS-CoV-2的刺突蛋白和RSV的融合蛋白, 保护小鼠免受RSV感染以及仓鼠免受SARS-CoV-2感染, 并为二价疫苗的抗原竞争问题提供了解决方案<sup>[141]</sup>。COVID-19 mRNA疫苗在限制此次大流行的传播方面发挥了关键作用。虽然mRNA疫苗在对抗COVID-19方面显示出了巨大的潜力, 但其稳定性和降解问题是mRNA疫苗存储、分发和效能的主要障碍。

最近的一项研究<sup>[142]</sup>表明, SARS-CoV-2在演化过程中, 展现出与人类相异的密码子使用偏好, 主要选择人类非优势性的密码子, 并且这种趋势并未随着病毒的变异而向更适应人类的方向改变, 可能与病毒在传播过程中的突变偏好有关。该研究同时提出了基于人类密码子偏好性的mRNA疫苗序列优化方案, 通过

密码子优化可以显著提高疫苗蛋白的表达效率, 为疫苗开发中的密码子优化提供了科学依据。另一项研究<sup>[143]</sup>也揭示了猴痘病毒(MPXV)的蛋白质序列和密码子使用的演化规律, 在MPXV的演化过程中, 其基因偏好使用在人类基因中不常见的密码子, 不同进化分支中MPXV致死率的下降可能与这种密码子使用的去优化有关。这些发现对于理解病毒的适应性和演化具有重要意义, 并可能对疫苗设计和优化提供新的视角。

mRNA疫苗在COVID-19大流行中迅速展现出其价值, 不仅在快速响应新兴病原体方面证明了其能力, 而且为未来传染病的预防提供了新的思路。然而, mRNA疫苗设计仍面临挑战, 包括提高稳定性、优化递送效率、确保长期安全性以及应对病毒变异等。为了克服这些挑战, 研究者们正在探索新策略, 例如利用人工智能和生物信息学工具来预测和设计更有效的mRNA序列, 增强mRNA的二级结构可以延长其半衰期, 使用优化的最佳密码子可以提高蛋白质表达。最近, 百度通过将AI与疫苗研发相结合, 开发了一种名为LinearDesign的算法, 该算法运用计算语言学中的网格解析(lattice parsing)概念, 结合RNA二级结构预测, 能够在极大的候选mRNA序列空间中, 包括密码子空间和mRNA二级结构空间, 快速找到最优的mRNA序列。这一算法在11分钟内找到了SARS-CoV-2刺突蛋白的最佳mRNA设计, 同时优化了mRNA稳定性和密码子的使用(图5D)。与新冠病毒和水痘带状疱疹病毒mRNA疫苗的传统密码子优化策略相比, LinearDesign

**表 2** 针对RNA病毒设计的mRNA疫苗  
**Table 2** mRNA vaccine designed for RNA viruses

| 名称                                  | 疫苗类型  | 适应证             | 靶点                      | 实验模型   | 临床进展*             |
|-------------------------------------|-------|-----------------|-------------------------|--------|-------------------|
| H5 mRNA-LNP <sup>[132]</sup>        | 非复制型  | IAV (H5N1)      | HA                      | 小鼠, 雪貂 | NA                |
| E80-mRNA; NS1-mRNA <sup>[133]</sup> | 非复制型  | DENV            | E80; NS1                | 小鼠     | NA                |
| mRESVIA <sup>[134]</sup>            | 非复制型  | RSV             | Fusion                  | 临床试验   | Phase 3<br>已上市    |
| SF-LNP <sup>[141]</sup>             | 非复制型  | SARS-CoV-2; RSV | Spike; Fusion           | 小鼠, 仓鼠 | NA                |
| SYS6006 <sup>[135]</sup>            | 非复制型  | SARS-CoV-2      | Spike                   | 临床试验   | Phase 3<br>紧急使用授权 |
| ARCT-154 <sup>[126,127,136]</sup>   | 自扩增型  | SARS-CoV-2      | Spike                   | 临床试验   | Phase 3<br>已上市    |
| GEMCOVAC-OM <sup>[137]</sup>        | 自扩增型  | SARS-CoV-2      | Spike                   | 临床试验   | Phase 3<br>紧急使用授权 |
| mLNP-circRNA-RBD <sup>[138]</sup>   | 环状RNA | SARS-CoV-2      | Receptor-binding domain | 小鼠     | NA                |
| mLNP-circRNA-G <sup>[138]</sup>     | 环状RNA | Rabies virus    | Glycoprotein            | 小鼠     | NA                |

\* NA, not available, 当前没有临床试验信息

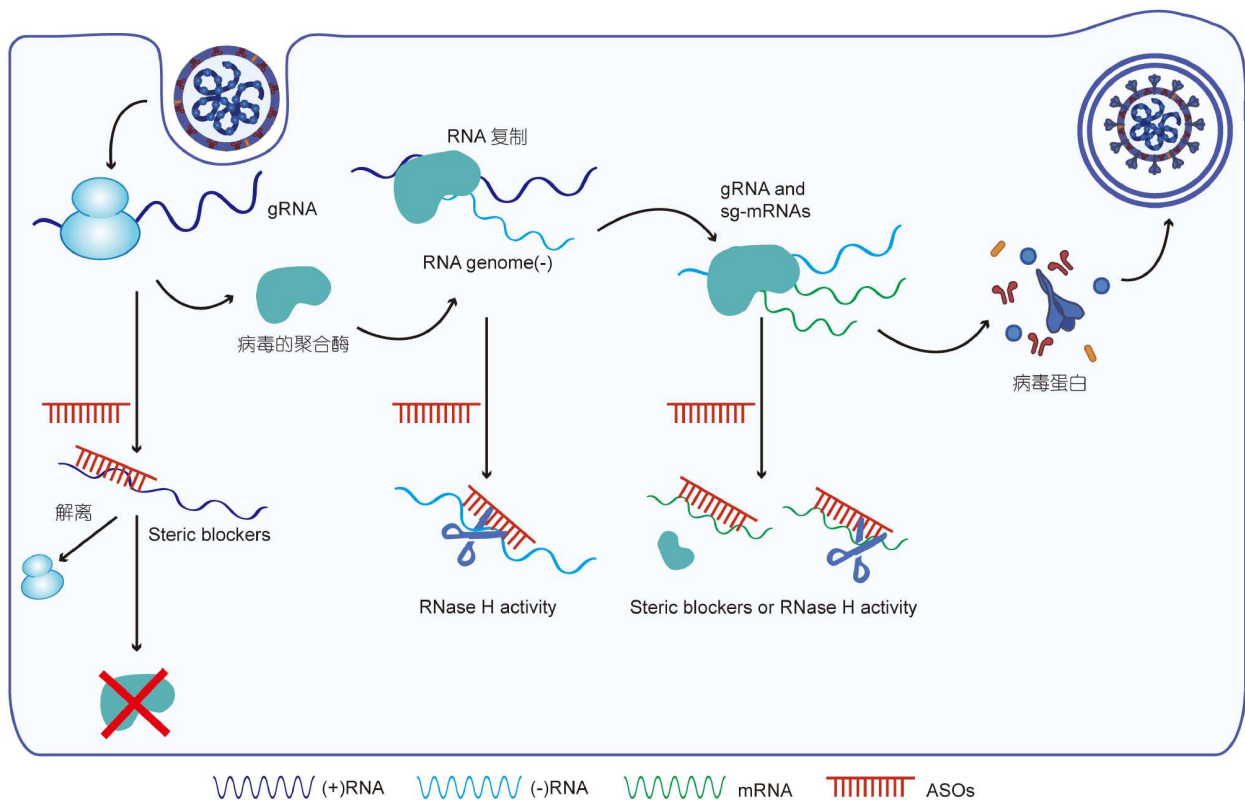
显著提高了mRNA半衰期和蛋白质表达, 将小鼠的抗体滴度显著提高了128倍<sup>[144]</sup>. 这一工作不仅为疫苗开发提供了工具, 也为包括单克隆抗体和抗癌药物在内的其他基于mRNA的药物编码治疗蛋白质提供了方法基础.

## 4.2 ASO药物

COVID-19危机和mRNA疫苗的开发及成功应用突显了基于RNA的治疗策略在开发新药方面的广阔前景. 除RNA疫苗外, 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASOs)是一种新的、非常有前景的RNA靶向治疗方法<sup>[145]</sup>. ASO是一类可以识别RNA的单链核苷酸, 平均长度为12~25 nt, 通过碱基互补配对特异性结合其同源RNA靶标. 裸露的ASO无法穿透细胞膜, 并且对内切酶和外切酶有很高的敏感性. 第一代ASO通

过将磷酸二酯键中的非桥接氧原子替换为硫基而产生的磷硫酸盐(PS)ASO提高了对核酸酶的抗性, 同时可以激活RNase H. 当ASO结合到目标RNA序列之后, 会引起目标RNA被RNase H降解, 从而阻止致病蛋白质的产生. 然而, 生物修饰的ASO具有毒性, 会与蛋白质产生非特异性结合. 第二代ASO在核糖引入烷基修饰, 减轻毒性的同时提高了对靶标的亲和力. 这种修饰的ASO无法引起RNase H的招募和切割, 而是作为空间阻滞剂通过空间位阻来抑制目标RNA的翻译. 第三代ASO的修饰进一步提高了结合亲和力以及对核酸酶的抗性, 使得ASO与目标RNA形成稳定的杂交, 从而干扰其加工或翻译(图6)<sup>[146,147]</sup>.

1978年, Stephenson和Zamecnik<sup>[148]</sup>首次将ASO用于治疗目的. 他们使用与劳斯肉瘤病毒核糖体RNA互补的13 nt核苷酸DNA分子来抑制其翻译, 从而在体外



**图 6** 靶向SARS-CoV-2的ASO药物设计简述. ASO药物可以设计成靶向SARS-CoV-2复制周期中不同阶段的保守RNA序列, 包括病毒基因组、负链RNA中间体和亚基因组sg-mRNA, 从而阻断病毒颗粒的产生. ASOs结合目标序列后, 可作为空间阻滞剂阻断RNA的合成或蛋白翻译, 或者招募RNase H对目标序列进行切割和降解

**Figure 6** Brief overview of ASO drug design targeting SARS-CoV-2. ASO drugs can be designed to target conserved RNA sequences at different stages of the SARS-CoV-2 replication cycle, including the viral genome, negative-strand RNA intermediates, and sg-mRNA, thereby blocking the production of viral particles. Once ASOs bind to the target sequence, they can act as steric blockers to halt RNA synthesis or protein translation, or recruit RNase H to cleave and degrade the target sequence

阻止劳斯病毒感染的鸡成纤维细胞的致癌转化, 这一开创性的研究为ASO药物对抗病毒感染开辟了道路. 获得FDA批准的首个ASO药物Formivirsen用于治疗获得性免疫缺陷综合征患者的巨细胞病毒视网膜炎, Formivirsen是一种硫代寡脱氧核苷酸, 特异性靶向编码即时早期2蛋白(IE-2)的病毒mRNA, 从而特异性抑制IE2的表达和必需病毒蛋白的产生<sup>[149]</sup>.

已有多种ASO药物针对乙型肝炎病毒的不同靶点进行了研究, 包括病毒的反转录酶、表面抗原和X蛋白等<sup>[150]</sup>. 其中最具代表性的是针对反转录酶的ASO药物, 如ARC-520和ARC-521, 它们能够有效地抑制乙型肝炎病毒的RNA和表面抗原的水平<sup>[151]</sup>. 此外, 多种针对流感病毒的RNA聚合酶、血凝素、神经氨酸酶、M2离子通道和核蛋白的ASO药物也被研发出来, 例如针对M2离子通道的ASO药物, AVI-7100和AVI-7537, 它们能够有效地抑制各种亚型的流感病毒感染<sup>[152]</sup>. 目前靶向SARS-CoV-2的进入临床试验阶段的ASO药物研究还比较少, 最早针对SARS-CoV的ASO药物靶向病毒RNA基因组5'端的病毒复制多肽开放阅读框1a(ORF1a)和转录调控序列, 它们在体外显示出高抗病毒活性, 突显了ASO作为抗冠状病毒和用于抗SARS-CoV-2治疗的潜力<sup>[145]</sup>. 本节总结了目前针对部分RNA病毒设计的一些ASO药物(表3)<sup>[153-163]</sup>.

目前, ASO药物的稳定性和递送效率是药物研究的主要难点. ASO分子在体内的半衰期较短, 容易被

核酸酶降解, 且由于其负电荷和大分子特性, 难以穿透细胞膜<sup>[164]</sup>. 为了提高ASO药物的稳定性和疗效, 研究人员采用了多种化学修饰技术, 如磷酸骨架、核糖、核糖五元环改造等, 这些修饰可以提高ASO对核酸酶降解的抵抗力. 此外, 高效安全的递送系统, 如脂质纳米颗粒等, 可以提高ASO药物的细胞摄取效率和靶向性<sup>[165]</sup>. 尽管ASO药物在开发中面临诸多挑战, 但它们在治疗某些疾病方面展现出巨大潜力, 特别是在用于治疗病毒感染方面的ASO药物远少于其他疾病类型. 利用现代生物信息学工具和结构生物学方法, 针对保守的病毒RNA序列进行设计, 是提高ASO序列设计准确性和效率的有效手段; 加强临床研究, 探索其作为联合治疗手段的可能性, 以减少耐药性的产生<sup>[164,166]</sup>, 可以期待ASO药物在未来的抗病毒治疗中发挥更大的作用.

## 5 展望和讨论

RNA病毒的研究具有重要的理论意义和应用价值, 可以揭示病毒的起源、进化、复制、致病机制和免疫逃逸等方面的规律, 为病毒的防治和利用提供依据和策略. 高致病性新发突发病毒以RNA病毒为主, 如流感、登革和寨卡病毒等. 埃博拉、尼帕病毒等RNA病毒具有境外输入风险, 需提前阐明其RNA生成加工机制及功能. RNA病毒类型多样、突变率高, 发

表 3 针对RNA病毒设计的ASO药物

Table 3 ASO drugs designed for RNA viruses

| 药物名称                                                        | 适应证        | 靶点                | 实验模型 | 临床进展*                 |
|-------------------------------------------------------------|------------|-------------------|------|-----------------------|
| PB1-AUG <sup>[153]</sup>                                    | IAV (H7N7) | PB1-AUG           | 小鼠   | NA                    |
| NP-AUG <sup>[153]</sup>                                     | IAV (H7N7) | NP-AUG            | 小鼠   | NA                    |
| NP-v3 <sup>[153]</sup>                                      | IAV (H7N7) | NP-v3'            | 小鼠   | NA                    |
| 68-11L, 167-15L, 187-14L, 404-14L, 867-14L <sup>[154]</sup> | IAV (H1N1) | vRNA8             | 细胞   | NA                    |
| 883-11L, 474-21M, 1253-13M <sup>[155]</sup>                 | IAV (H1N1) | vRNA5             | 细胞   | NA                    |
| LNA9/14 <sup>[156]</sup>                                    | IAV (H1N1) | PSL2              | 小鼠   | NA                    |
| gapmers 2/5 <sup>[157]</sup>                                | SARS-CoV-2 | stem-loop 2 motif | 细胞   | NA                    |
| AS_1-75 <sup>[158]</sup>                                    | SARS-CoV-2 | 5'UTR             | 细胞   | NA                    |
| chimera-S4 <sup>[159]</sup>                                 | SARS-CoV-2 | RNaseL            | 细胞   | NA                    |
| 5'-ASO#26 <sup>[160]</sup>                                  | SARS-CoV-2 | 5'leader          | 小鼠   | NA                    |
| S-ON <sup>[161]</sup>                                       | SARS-CoV-2 | ORF1b             | 细胞   | NA                    |
| ASO-ORF1b <sup>[162]</sup>                                  | SARS-CoV-2 | ORF1b             | 细胞   | NA                    |
| Miravirsen <sup>[163]</sup>                                 | HCV        | miR-122           | 临床试验 | Phase 2 (NCT01727934) |

\* NA, not available, 当前没有临床试验信息

现新的抗病毒靶点,是主动应对病毒性传染病的关键。目前, RNA病毒的研究已经取得了一些重要的进展,如病毒的结构、基因组、变异、基因表达、分子互作、宿主响应等方面的认识,以及病毒的检测、诊断、疫苗、药物等方面的技术和方法。然而, RNA病毒的研究仍然面临着一些挑战和难题,例如,不断有新的 RNA病毒被发现<sup>[167]</sup>, RNA病毒的RNA复制场所的形成机制尚不明确,病毒基因组RNA和其mRNA的生成加工调控机制还有很多尚不清楚,病毒与宿主的竞争与共进化机制尚不深入等。RNA病毒的基础和防控研究相辅相成,在如下两个方面还需进一步深入探究。

**RNA病毒分子机器的功能和机制。** RNA病毒的种类繁多,基因组大小和结构各异,变异速率高,存在着不同的复制策略和生命周期,与宿主的相互作用也各有不同。RNA病毒分子机器的功能不仅取决于其编码的蛋白质,还取决于其本身的结构、序列、修饰和亚细胞定位、宿主分子互作等因素,这些因素都可能影

响病毒感染后的复制、转录、翻译、组装、释放和致病等过程。目前对于RNA病毒分子机器的功能和机制的研究还不够深入和全面,尤其是对于一些新发现的 RNA病毒。

**RNA病毒的防治。** RNA病毒的防治和利用需要考虑病毒的特性、宿主的反应、环境的影响等多方面的因素,需要综合运用多种手段和策略,如病毒的监测、预防、控制、治疗、疫苗、药物等。然而,目前对于一些RNA病毒的防治和利用还存在着一些问题和困难,如病毒的快速变异、耐药性、免疫逃逸等,以及药物或疫苗的安全性和有效性等。

RNA病毒的研究也是一个学科前沿和热点领域,具有重要的学术价值和社会意义。以高致病性病毒 RNA生成加工机制为对象,从基础研究入手,揭示新机制、发现新靶标,将有望为人类的健康和公共安全做出重要贡献。

## 参考文献

- 1 Trask S D, McDonald S M, Patton J T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10: 165–177
- 2 Papa G, Borodavka A, Desselberger U. Viroplasm: assembly and functions of rotavirus replication factories. *Viruses*, 2021, 13: 1349
- 3 Malone B, Urakova N, Snijder E J, et al. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 21–39
- 4 Yuan W G, Liu G F, Shi Y H, et al. A discussion of RNA virus taxonomy based on the 2020 International Committee on Taxonomy of Viruses report. *Front Microbiol*, 2022, 13: 960465
- 5 Borodavka A, Desselberger U, Patton J T. Genome packaging in multi-segmented dsRNA viruses: distinct mechanisms with similar outcomes. *Curr Opin Virol*, 2018, 33: 106–112
- 6 Lawton J A, Estes M K, Venkataram Prasad B V. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res*, 2000, 55: 185–229
- 7 Greenberg H B, Estes M K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 2009, 136: 1939–1951
- 8 Arnaboldi S, Righi F, Filipello V, et al. Mammalian orthoreovirus (MRV) is widespread in wild ungulates of Northern Italy. *Viruses*, 2021, 13: 238
- 9 Ahlquist P, Noueiry A O, Lee W M, et al. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol*, 2003, 77: 8181–8186
- 10 Roingear P, Eymieux S, Burlaud-Gaillard J, et al. The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79: 425
- 11 Brant A C, Tian W, Majerciak V, et al. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci*, 2021, 11: 136
- 12 Nishikiori M, den Boon J A, Unchwaniwala N, et al. Crowning touches in positive-strand RNA virus genome replication complex structure and function. *Annu Rev Virol*, 2022, 9: 193–212
- 13 Wang J, Sun D, Wang M, et al. Multiple functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the positive single-stranded RNA virus life cycle. *Front Immunol*, 2022, 13: 989298

- 14 Mueller S, Wimmer E, Cello J. Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. [Virus Res](#), 2005, 111: 175–193
- 15 Zhu Z, Fodor E, Keown J R. A structural understanding of influenza virus genome replication. [Trends Microbiol](#), 2023, 31: 308–319
- 16 Chauhan R P, Gordon M L. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. [Virus Genes](#), 2022, 58: 255–269
- 17 Sabsay K R, te Velthuis A J W, Perlman S. Negative and ambisense RNA virus ribonucleocapsids: more than protective armor. [Microbiol Mol Biol Rev](#), 2023, 87: e0008223
- 18 Ruigrok R W, Crépin T, Kolakofsky D. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. [Curr Opin Microbiol](#), 2011, 14: 504–510
- 19 Julkunen I. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. [Cytokine Growth Factor Rev](#), 2001, 12: 171–180
- 20 Malvy D, McElroy A K, de Clerck H, et al. Ebola virus disease. [Lancet](#), 2019, 393: 936–948
- 21 Fooks A R, Cliquet F, Finke S, et al. Rabies. [Nat Rev Dis Primers](#), 2017, 3: 17091
- 22 Ouizougoun-Oubari M, Fearn R. Structures and mechanisms of nonsegmented, negative-strand RNA virus polymerases. [Annu Rev Virol](#), 2023, 10: 199–215
- 23 Zhu M, van Grinsven I L, Kormelink R, et al. Paving the way to tospovirus infection: multilined interplays with plant innate immunity. [Annu Rev Phytopathol](#), 2019, 57: 41–62
- 24 Chameettachal A, Mustafa F, Rizvi T A. Understanding retroviral life cycle and its genomic RNA packaging. [J Mol Biol](#), 2023, 435: 167924
- 25 Frankel A D, Young J A T. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. [Annu Rev Biochem](#), 1998, 67: 1–25
- 26 Olson E D, Musier-Forsyth K. Retroviral Gag protein-RNA interactions: implications for specific genomic RNA packaging and virion assembly. [Semin Cell Dev Biol](#), 2019, 86: 129–139
- 27 Arhel N J. Early HIV replication revisited. [Nat Microbiol](#), 2020, 5: 1065–1066
- 28 Bekker L G, Beyrer C, Mgodini N, et al. HIV infection. [Nat Rev Dis Primers](#), 2023, 9: 42
- 29 Coffin J M, Fan H. The discovery of reverse transcriptase. [Annu Rev Virol](#), 2016, 3: 29–51
- 30 Tang S, Li J, Chang Y F, et al. Avian leucosis virus-host interaction: the involvement of host factors in viral replication. [Front Immunol](#), 2022, 13: 907287
- 31 Cross S T, Michalski D, Miller M R, et al. RNA regulatory processes in RNA virus biology. [WIREs RNA](#), 2019, 10: e1536
- 32 Fournier G, Chiang C, Munier S, et al. Recruitment of RED-SMU1 complex by influenza A virus RNA polymerase to control viral mRNA splicing. [PLoS Pathog](#), 2014, 10: e1004164
- 33 Esparza M, Bhat P, Fontoura B M. Viral-host interactions during splicing and nuclear export of influenza virus mRNAs. [Curr Opin Virol](#), 2022, 55: 101254
- 34 Jackson D, Lamb R A. The influenza A virus spliced messenger RNA M mRNA3 is not required for viral replication in tissue culture. [J Gen Virol](#), 2008, 89: 3097–3101
- 35 Wise H M, Hutchinson E C, Jagger B W, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. [PLoS Pathog](#), 2012, 8: e1002998
- 36 Bogdanow B, Wang X, Eichelbaum K, et al. The dynamic proteome of influenza A virus infection identifies M segment splicing as a host range determinant. [Nat Commun](#), 2019, 10: 5518
- 37 Thompson M G, Muñoz-Moreno R, Bhat P, et al. Co-regulatory activity of hnRNP K and NS1-BP in influenza and human mRNA splicing. [Nat Commun](#), 2018, 9: 2407
- 38 Li Q, Jiang Z, Ren S, et al. SRSF5-mediated alternative splicing of M gene is essential for influenza A virus replication: a host-directed target against influenza virus. [Adv Sci](#), 2022, 9: 2203088
- 39 Huang X, Zheng M, Wang P, et al. An NS-segment exonic splicing enhancer regulates influenza A virus replication in mammalian cells. [Nat Commun](#), 2017, 8: 14751
- 40 Zhu Y, Wang R, Yu L, et al. Human TRA2A determines influenza A virus host adaptation by regulating viral mRNA splicing. [Sci Adv](#), 2020, 6: eaaz5764
- 41 Domingues P, Eletto D, Magnus C, et al. Profiling host ANP32A splicing landscapes to predict influenza A virus polymerase adaptation. [Nat Commun](#), 2019, 10: 3396

- 42 Ashraf U, Benoit-Pilven C, Lacroix V, et al. Advances in analyzing virus-induced alterations of host cell splicing. *Trends Microbiol*, 2019, 27: 268–281
- 43 Mann J T, Riley B A, Baker S F. All differential on the splicing front: host alternative splicing alters the landscape of virus-host conflict. *Semin Cell Dev Biol*, 2023, 146: 40–56
- 44 Boudreault S, Roy P, Lemay G, et al. Viral modulation of cellular RNA alternative splicing: a new key player in virus-host interactions? *WIREs RNA*, 2019, 10: e1543
- 45 Sehrawat S, Garcia-Blanco M A. RNA virus infections and their effect on host alternative splicing. *Antiviral Res*, 2023, 210: 105503
- 46 Pozzi B, Bragado L, Mammi P, et al. Dengue virus targets RBM10 deregulating host cell splicing and innate immune response. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 6824–6838
- 47 Banerjee A K, Blanco M R, Bruce E A, et al. SARS-CoV-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses. *Cell*, 2020, 183: 1325–1339.e21
- 48 Vijayakumar A, Park A, Steitz J A. Modulation of mRNA 3'-end processing and transcription termination in virus-infected cells. *Front Immunol*, 2022, 13: 828665
- 49 Jia X, Yuan S, Wang Y, et al. The role of alternative polyadenylation in the antiviral innate immune response. *Nat Commun*, 2017, 8: 14605
- 50 Sotcheff S L, Chen J Y C, Elrod N, et al. Zika virus infection alters gene expression and poly-adenylation patterns in placental cells. *Pathogens*, 2022, 11: 936
- 51 Xu X, Mann M, Qiao D, et al. Alternative mRNA processing of innate response pathways in respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Viruses*, 2021, 13: 218
- 52 Barnhart M D, Moon S L, Emch A W, et al. Changes in cellular mRNA stability, splicing, and polyadenylation through HuR protein sequestration by a cytoplasmic RNA virus. *Cell Rep*, 2013, 5: 909–917
- 53 An S, Li Y, Lin Y, et al. Genome-wide profiling reveals alternative polyadenylation of innate immune-related mRNA in patients with COVID-19. *Front Immunol*, 2021, 12: 756288
- 54 Chang J J Y, Gleeson J, Rawlinson D, et al. Long-read RNA sequencing identifies polyadenylation elongation and differential transcript usage of host transcripts during SARS-CoV-2 *in vitro* infection. *Front Immunol*, 2022, 13: 832223
- 55 Sun D, Chen S, Cheng A, et al. Roles of the picornaviral 3C proteinase in the viral life cycle and host cells. *Viruses*, 2016, 8: 82
- 56 Bauer D L V, Tellier M, Martínez-Alonso M, et al. Influenza virus mounts a two-pronged attack on host RNA polymerase II transcription. *Cell Rep*, 2018, 23: 2119–2129.e3
- 57 Bergant V, Schnepf D, de Andrade Krätzig N, et al. mRNA 3'UTR lengthening by alternative polyadenylation attenuates inflammatory responses and correlates with virulence of Influenza A virus. *Nat Commun*, 2023, 14: 4906
- 58 Chen Z, Li Y, Krug R M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J*, 1999, 18: 2273–2283
- 59 Twu K Y, Noah D L, Rao P, et al. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J Virol*, 2006, 80: 3957–3965
- 60 Zhang X, Peng Q, Wang L. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine modification—a key player in viral infection. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28: 78
- 61 Wang Y, Zhou X. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine and its implications in viruses. *Genomics Proteomics Bioinf*, 2023, 21: 695–706
- 62 Xue M, Zhang Y, Wang H, et al. Viral RNA *N*<sup>6</sup>-methyladenosine modification modulates both innate and adaptive immune responses of human respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog*, 2021, 17: e1010142
- 63 Figueroa F, Vega-Gibson A, Catrileo J, et al. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine negatively regulates human respiratory syncytial virus replication. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 739445
- 64 Li Z, Liu Y, Zhang L, et al. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine modification contributes to respiratory syncytial virus infection. *Heliyon*, 2023, 9: e15307
- 65 Xue M, Zhao B S, Zhang Z, et al. Viral *N*<sup>6</sup>-methyladenosine upregulates replication and pathogenesis of human respiratory syncytial virus. *Nat Commun*, 2019, 10: 4595
- 66 Feng Q, Zhao H, Xu L, et al. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine modification and its regulation of respiratory viruses. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 699997
- 67 Qiu W, Zhang Q, Zhang R, et al. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine RNA modification suppresses antiviral innate sensing pathways via reshaping double-stranded RNA. *Nat Commun*, 2021, 12: 1582
- 68 McFadden M J, McIntyre A B R, Mourelatos H, et al. Post-transcriptional regulation of antiviral gene expression by *N*<sup>6</sup>-methyladenosine. *Cell*

- Rep, 2021, 34: 108798
- 69 Winkler R, Gillis E, Lasman L, et al. m<sup>6</sup>A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons. *Nat Immunol*, 2019, 20: 173–182
- 70 Zhang Y, Wang X, Zhang X, et al. RNA-binding protein YTHDF3 suppresses interferon-dependent antiviral responses by promoting FOXO3 translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 976–981
- 71 Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388–1399
- 72 Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117–120
- 73 Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315–328
- 74 Ge Y, Ling T, Wang Y, et al. Degradation of WTAP blocks antiviral responses by reducing the m<sup>6</sup>A levels of IRF3 and IFNAR1 mRNA. *EMBO Rep*, 2021, 22: e52101
- 75 Liu Y, You Y, Lu Z, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA modification-mediated cellular metabolism rewiring inhibits viral replication. *Science*, 2019, 365: 1171–1176
- 76 Zheng Q, Hou J, Zhou Y, et al. The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m<sup>6</sup>A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus. *Nat Immunol*, 2017, 18: 1094–1103
- 77 Lu M, Zhang Z, Xue M, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modification enables viral RNA to escape recognition by RNA sensor RIG-I. *Nat Microbiol*, 2020, 5: 584–598
- 78 Wendt L, Pickin M J, Bodmer B S, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine is required for efficient RNA synthesis of Ebola virus and other haemorrhagic fever viruses. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12: 2223732
- 79 Zhu Y, Wang R, Zou J, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine reader protein YTHDC1 regulates influenza A virus NS segment splicing and replication. *PLoS Pathog*, 2023, 19: e1011305
- 80 Wang A, Tao W, Tong J, et al. m<sup>6</sup>A modifications regulate intestinal immunity and rotavirus infection. *eLife*, 2022, 11: e73628
- 81 Kim G W, Imam H, Khan M, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modification of hepatitis B and C viral RNAs attenuates host innate immunity via RIG-I signaling. *J Biol Chem*, 2020, 295: 13123–13133
- 82 Gokhale N S, McIntyre A B R, Mattocks M D, et al. Altered m<sup>6</sup>A modification of specific cellular transcripts affects flaviviridae infection. *Mol Cell*, 2020, 77: 542–555.e8
- 83 Shan T, Liu F, Wen M, et al. m<sup>6</sup>A modification negatively regulates translation by switching mRNA from polysome to P-body via IGF2BP3. *Mol Cell*, 2023, 83: 4494–4508.e6
- 84 Ding B, Qin Y, Chen M. Nucleocapsid proteins: roles beyond viral RNA packaging. *WIREs RNA*, 2016, 7: 213–226
- 85 Zhou Y, Routh A. Mapping RNA-capsid interactions and RNA secondary structure within virus particles using next-generation sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: e12
- 86 Brand C, Bisailon M, Geiss B J. Organization of the *Flavivirus* RNA replicase complex. *WIREs RNA*, 2017, 8: e1437
- 87 Garmann R F, Goldfain A M, Tanimoto C R, et al. Single-particle studies of the effects of RNA-protein interactions on the self-assembly of RNA virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2206292119
- 88 Cheng N, Liu M, Li W, et al. Protein post-translational modification in SARS-CoV-2 and host interaction. *Front Immunol*, 2022, 13: 1068449
- 89 Zhao J H, Hua C L, Fang Y Y, et al. The dual edge of RNA silencing suppressors in the virus-host interactions. *Curr Opin Virol*, 2016, 17: 39–44
- 90 Mrozowich T, Park S M, Waldl M, et al. Investigating RNA-RNA interactions through computational and biophysical analysis. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51: 4588–4601
- 91 Romero-López C, Berzal-Herranz A. The role of the RNA-RNA interactome in the hepatitis C virus life cycle. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 1479
- 92 Omoru O B, Pereira F, Janga S C, et al. A putative long-range RNA-RNA interaction between ORF8 and spike of SARS-CoV-2. *PLoS One*, 2022, 17: e0260331
- 93 Wang D, Jiang A, Feng J, et al. The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features. *Mol Cell*, 2021, 81: 2135–2147.e5
- 94 Iselin L, Palmalux N, Kamel W, et al. Uncovering viral RNA-host cell interactions on a proteome-wide scale. *Trends Biochem Sci*, 2022, 47: 23–38
- 95 Imai S, Suzuki H, Fujiyoshi Y, et al. Dynamically regulated two-site interaction of viral RNA to capture host translation initiation factor. *Nat Commun*, 2023, 14: 4977

- 96 Lucic B, de Castro I J, Lusic M. Viruses in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2021, 13: a039446
- 97 Wendt L, Brandt J, Bodmer B S, et al. The Ebola virus nucleoprotein recruits the nuclear RNA export factor NXF1 into inclusion bodies to facilitate viral protein expression. *Cells*, 2020, 9: 187
- 98 Ahmed M R, Du Z. Molecular interaction of nonsense-mediated mRNA decay with viruses. *Viruses*, 2023, 15: 816
- 99 Amurri L, Horvat B, Iampietro M. Interplay between RNA viruses and cGAS/STING axis in innate immunity. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1172739
- 100 Yang E, Li M M H. All about the RNA: interferon-stimulated genes that interfere with viral RNA processes. *Front Immunol*, 2020, 11: 605024
- 101 Zhang X, Liang Z, Wang C, et al. Viral circular RNAs and their possible roles in virus-host interaction. *Front Immunol*, 2022, 13: 939768
- 102 Li G, Tang Z, Fan W, et al. Atlas of interactions between SARS-CoV-2 macromolecules and host proteins. *Cell Insight*, 2023, 2: 100068
- 103 Sarnow P, Sagan S M. Unraveling the mysterious interactions between hepatitis C virus RNA and liver-specific microRNA-122. *Annu Rev Virol*, 2016, 3: 309–332
- 104 Trobaugh D W, Klimstra W B. MicroRNA regulation of RNA virus replication and pathogenesis. *Trends Mol Med*, 2017, 23: 80–93
- 105 Liu W, Ding C. Roles of lncRNAs in viral infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 205
- 106 Zhao H, Cai Z, Rao J, et al. SARS-CoV-2 RNA stabilizes host mRNAs to elicit immunopathogenesis. *Mol Cell*, 2024, 84: 490–505.e9
- 107 Perrin-Cocon L, Diaz O, Jacquemin C, et al. The current landscape of coronavirus-host protein-protein interactions. *J Transl Med*, 2020, 18: 319
- 108 Walker A P, Fodor E. Interplay between influenza virus and the host RNA polymerase II transcriptional machinery. *Trends Microbiol*, 2019, 27: 398–407
- 109 Zhang Q, Sharma N R, Zheng Z M, et al. Viral regulation of RNA granules in infected cells. *Virol Sin*, 2019, 34: 175–191
- 110 Pollard A J, Bijker E M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 83–100
- 111 Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 141–154
- 112 Fang E, Liu X, Li M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7: 94
- 113 Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, et al. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol*, 2012, 9: 1319–1330
- 114 Karikó K, Muramatsu H, Keller J M, et al. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol Ther*, 2012, 20: 948–953
- 115 To K K W, Cho W C S. An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, 16: 1307–1317
- 116 Kwon H, Kim M, Seo Y, et al. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*, 2018, 156: 172–193
- 117 Hanson G, Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 20–30
- 118 Nance K D, Meier J L. Modifications in an emergency: the role of *N*<sup>1</sup>-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines. *ACS Cent Sci*, 2021, 7: 748–756
- 119 Tenchov R, Bird R, Curtze A E, et al. Lipid nanoparticles—from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. *ACS Nano*, 2021, 15: 16982–17015
- 120 Buschmann M D, Carrasco M J, Alishetty S, et al. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines. *Vaccines*, 2021, 9: 65
- 121 Wang F, Kream R M, Stefano G B. An evidence based perspective on mRNA-SARS-CoV-2 vaccine development. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e924700
- 122 Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 384: 403–416
- 123 Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2603–2615
- 124 Verbeke R, Lentacker I, De Smedt S C, et al. The dawn of mRNA vaccines: the COVID-19 case. *J Control Release*, 2021, 333: 511–520
- 125 Teo S P. Review of COVID-19 mRNA vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273. *J Pharmacy Pract*, 2022, 35: 947–951
- 126 Wayne C J, Blakney A K. Self-amplifying RNA COVID-19 vaccine. *Cell*, 2024, 187: 1822–1822.e1
- 127 Oda Y, Kumagai Y, Kanai M, et al. Immunogenicity and safety of a booster dose of a self-amplifying RNA COVID-19 vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*, 2024, 24: 351–360
- 128 Hussain A, Yang H, Zhang M, et al. mRNA vaccines for COVID-19 and diverse diseases. *J Control Release*, 2022, 345: 314–333

- 129 Hogan M J, Pardi N. mRNA vaccines in the COVID-19 pandemic and beyond. *Annu Rev Med*, 2022, 73: 17–39
- 130 Yang L, Tang L, Zhang M, et al. Recent advances in the molecular design and delivery technology of mRNA for vaccination against infectious diseases. *Front Immunol*, 2022, 13: 896958
- 131 Silva-Pilipich N, Beloki U, Salaberry L, et al. Self-amplifying RNA: a second revolution of mRNA vaccines against COVID-19. *Vaccines*, 2024, 12: 318
- 132 Furey C, Scher G, Ye N, et al. Development of a nucleoside-modified mRNA vaccine against clade 2.3.4.4b H5 highly pathogenic avian influenza virus. *Nat Commun*, 2024, 15: 4350
- 133 Zhang M, Sun J, Li M, et al. Modified mRNA-LNP vaccines confer protection against experimental DENV-2 infection in mice. *Mol Ther- Methods Clin Dev*, 2020, 18: 702–712
- 134 Mullard A. FDA approves mRNA-based RSV vaccine. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23: 487
- 135 Zhou C, Qiu Y, Wang J, et al. The safety, immunogenicity, and efficacy of heterologous boosting with a SARS-CoV-2 mRNA vaccine (SYS6006) in Chinese participants aged 18 years or more: a randomized, open-label, active-controlled phase 3 trial. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13: 2320913
- 136 H N T, Hughes S G, Ta V T, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of the self-amplifying mRNA ARCT-154 COVID-19 vaccine: Pooled phase 1, 2, 3a and 3b randomized, controlled trials. *Nat Commun*, 2024, 15: 4081
- 137 Saraf A, Gurjar R, Kaviraj S, et al. An Omicron-specific, self-amplifying mRNA booster vaccine for COVID-19: a phase 2/3 randomized trial. *Nat Med*, 2024, 30: 1363–1372
- 138 Wan J, Wang Z, Wang L, et al. Circular RNA vaccines with long-term lymph node-targeting delivery stability after lyophilization induce potent and persistent immune responses. *mbio*, 2024, 15: e0177523
- 139 van den Brand D, Gorris M A J, van Asbeck A H, et al. Peptide-mediated delivery of therapeutic mRNA in ovarian cancer. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 141: 180–190
- 140 Papachristofilou A, Hipp M M, Klinkhardt U, et al. Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 38
- 141 Wu N, Zhang J, Shen Y, et al. A potential bivalent mRNA vaccine candidate protects against both RSV and SARS-CoV-2 infections. *Mol Ther*, 2024, 32: 1033–1047
- 142 Wu X, Shan K, Zan F, et al. Optimization and deoptimization of codons in SARS-CoV-2 and related implications for vaccine development. *Adv Sci*, 2023, 10: 2205445
- 143 Shan K J, Wu C, Tang X, et al. Molecular evolution of protein sequences and codon usage in monkeypox viruses. *Genomics Proteomics Bioinf*, 2024, 22: qzad003
- 144 Zhang H, Zhang L, Lin A, et al. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity. *Nature*, 2023, 621: 396–403
- 145 Quemener A M, Galibert M. Antisense oligonucleotide: a promising therapeutic option to beat COVID-19. *WIREs RNA*, 2022, 13: e1703
- 146 Geary R S, Norris D, Yu R, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87: 46–51
- 147 Quemener A M, Bachelot L, Forestier A, et al. The powerful world of antisense oligonucleotides: from bench to bedside. *WIREs RNA*, 2020, 11: e1594
- 148 Stephenson M L, Zamecnik P C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 285–288
- 149 Vitracene Study Group. Safety of intravitreal fomivirsen for treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Am J Ophthalmol*, 2002, 133: 484–498
- 150 Vaillant A. Oligonucleotide-based therapies for chronic HBV infection: a primer on biochemistry, mechanisms and antiviral effects. *Viruses*, 2022, 14: 2052
- 151 Schluep T, Lickliter J, Hamilton J, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ARC-520 injection, an RNA interference-based therapeutic for the treatment of chronic hepatitis B virus infection, in healthy volunteers. *Clin Pharm Drug Dev*, 2017, 6: 350–362
- 152 Wong K H, Lal S K. Alternative antiviral approaches to combat influenza A virus. *Virus Genes*, 2023, 59: 25–35
- 153 Gabriel G, Nordmann A, Stein D A, et al. Morpholino oligomers targeting the PB1 and NP genes enhance the survival of mice infected with

- highly pathogenic influenza A H7N7 virus. *J Gen Virol*, 2008, 89: 939–948
- 154 Lenartowicz E, Nogales A, Kierzek E, et al. Antisense oligonucleotides targeting influenza A segment 8 genomic RNA inhibit viral replication. *Nucleic Acid Ther*, 2016, 26: 277–285
- 155 Michalak P, Soszynska-Jozwiak M, Biala E, et al. Secondary structure of the segment 5 genomic RNA of influenza A virus and its application for designing antisense oligonucleotides. *Sci Rep*, 2019, 9: 3801
- 156 Hagey R J, Elazar M, Pham E A, et al. Programmable antivirals targeting critical conserved viral RNA secondary structures from influenza A virus and SARS-CoV-2. *Nat Med*, 2022, 28: 1944–1955
- 157 Lulla V, Wandel M P, Bandyra K J, et al. Targeting the conserved stem loop 2 motif in the SARS-CoV-2 genome. *J Virol*, 2021, 95: 10.1128
- 158 Pfafenrot C, Schneider T, Müller C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 coronavirus proliferation by designer antisense-circRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 12502–12516
- 159 Su X, Ma W, Feng D, et al. Efficient inhibition of SARS-CoV-2 using chimeric antisense oligonucleotides through RNase L activation. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 21662–21667
- 160 Zhu C, Lee J Y, Woo J Z, et al. An intranasal ASO therapeutic targeting SARS-CoV-2. *Nat Commun*, 2022, 13: 4503
- 161 Stincarelli M A, Rocca A, Antonelli A, et al. Antiviral activity of oligonucleotides targeting the SARS-CoV-2 genomic RNA stem-loop sequences within the 3'-end of the ORF1b. *Pathogens*, 2022, 11: 1286
- 162 Dhone-Pollet S, Fitzpatrick C, Da Costa B, et al. Antisense oligonucleotides targeting ORF1b block replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Front Microbiol*, 2022, 13: 915202
- 163 Gebert L F R, Rebhan M A E, Crivelli S E M, et al. Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 609–621
- 164 Babalola B A, Akinsuyi O S, Folajimi E O, et al. Exploring the future of SARS-CoV-2 treatment after the first two years of the pandemic: a comparative study of alternative therapeutics. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115099
- 165 Dai J, Jiang X, da Silva-Júnior E F, et al. Recent advances in the molecular design and applications of viral RNA-targeting antiviral modalities. *Drug Discov Today*, 2024, 29: 104074
- 166 Le T K, Paris C, Khan K S, et al. Nucleic acid-based technologies targeting coronaviruses. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46: 351–365
- 167 Ni X B, Cui X M, Liu J Y, et al. Metavirome of 31 tick species provides a compendium of 1,801 RNA virus genomes. *Nat Microbiol*, 2023, 8: 162–173

# RNA viruses: from RNA processing and interaction mechanisms to new prevention and control strategies

ZHANG FengFeng<sup>1†</sup>, TANG Yao<sup>1†</sup>, JIA Yu<sup>1</sup> & ZHOU Yu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, State Key Laboratory of Virology and Biosafety, Wuhan University, Wuhan 430072, China

<sup>2</sup> TaiKang Center for Life and Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

† Contributed equally to this work

\* Corresponding author, E-mail: [yu.zhou@whu.edu.cn](mailto:yu.zhou@whu.edu.cn)

RNA viruses are a class of viruses with ribonucleic acid (RNA) as genomic genetic material, including some important human and animal pathogens, such as influenza, SARS-CoV-2, Ebola, and other highly pathogenic viruses. RNA virus infection affects the regulation of RNA processing in host cells, such as alternative splicing, polyadenylation, RNA modification, and RNA degradation. These changes affect the replication and translation of the virus's own RNA, as well as its immune escape and pathogenicity. In the invaded cells, viral RNAs use the host molecular machine to produce the proteins encoded by the virus itself. These viral RNA and protein macromolecules form a complex interaction network with host proteins and RNAs in regulating the replication of the virus and the host response. In this review, we systematically examine the types and characteristics of RNA viruses, including the representative viruses and the harm they cause. We also summarize recent progress on the molecular events and mechanisms of RNA viruses after infecting cells, including the regulated RNA processing of viral and host RNAs, viral RNA-protein, and other macromolecular interactions. Finally, we introduce the new progress and challenges of RNA-based therapeutic methods, such as mRNA vaccines and ASO drugs, in preventing and treating RNA viruses.

**RNA viruses, RNA processing, RNA-protein interactions, mRNA vaccines**

doi: [10.1360/SSV-2024-0100](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0100)