

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00526

## 抗流感病毒小 RNAs 研究进展

郑维豪, 林志强, 卓敏, 杜红丽, 王小宁

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

**摘要:** 流行性感冒是一类由流感病毒引起的呼吸道传染病, 通过季节性流行或全球性爆发严重威胁着人类健康。目前防治流感的主要方法是疫苗和药物, 但存在神经毒性、肠胃副作用、易耐药等诸多限制因素。新的技术特别是小 RNAs 介导的 RNA 干扰(RNAi)技术, 因其具有高效、特异、快速等特点, 已成为抗病毒治疗的候选方法之一。随着近年来流感病毒的流行, 应用小 RNAs 抗流感病毒的报导越来越多, 其中靶向 PA、NP 和 M2 的 PA-2087, NP-1496 和 M-950 是目前报道的抑制流感病毒效果最好的 siRNA。靶向不同流感病毒基因保守区域的 siRNA 具有更广泛的病毒毒株抑制效果, 靶向不同基因的 siRNAs 联合使用可取得更好的病毒抑制效果。文章就目前 siRNAs 和 miRNAs 在抗流感病毒方面的研究进展及 RNAi 治疗的前景和问题进行了综述。

**关键词:** 流感病毒; 小 RNAs; siRNAs; miRNAs; RNAi

## Research progress on influenza antiviral small RNAs

ZHENG Wei-Hao, LIN Zhi-Qiang, ZHUO Min, DU Hong-Li, WANG Xiao-Ning

*School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China*

**Abstract:** Worldwide influenza caused by influenza virus is a respiratory disease which threatens the public health by seasonal epidemics or global influenza outbreak. Vaccines and drugs are current therapies, but there are many restricted factors such as neurotoxicity, side effects of gastrointestinal, and drug resistance. New technologies, particularly RNAi mediated by small RNAs, has become a potential and robust method in influenza antiviral research for its high efficiency, specific, and speedy. Following the spread and epidemic of the influenza virus, application of small RNAs into influenza antiviral research has been reported increasingly. The small RNAs, PA-2087, NP-1496, and M-950, which targets PA, NP, and M2 genes, respectively, are the most effective anti-influenza siRNAs up to now. siRNA of targeting conservative region of different influenza viral genes has broader effect on virus inhibition. The combination of siRNAs of targeting different genes can achieve better virus inhibition. In this review, we mainly described the progress of siRNAs and miRNAs for anti-influenza virus, and the prospects and hurdles of influenza RNAi therapy as well.

**Keywords:** influenza virus; small RNAs; siRNAs; miRNAs; RNAi

收稿日期: 2011-09-01; 修回日期: 2011-11-16

基金项目: 十二五“重大新药创制”专项项目(编号: 2011ZX09307-303-03), 广东省科技计划项目(编号: 2010B060200007)和国家大学生创新性实验计划项目(编号: 091056153)资助

作者简介: 郑维豪, 在读本科生, 专业方向: 生物工程。E-mail: weihao\_zheng@163.com

林志强, 在读本科生, 专业方向: 生物工程。E-mail: limcc321@gmail.com

郑维豪和林志强同为第一作者。

通讯作者: 杜红丽, 博士, 副教授, 研究方向: 基因组学。E-mail: hldu@scut.edu.cn

网络出版时间: 2012-3-16 03:52:02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120316.1552.013.html>

流感病毒是一类大规模流行于人类和其他动物的呼吸道病原体, 严重威胁着人类生命健康。据估算, 全世界每年会有 250 000~500 000 人丧生于季节性流感<sup>[1,2]</sup>。

流感病毒(Influenza virus)属于正黏液病毒科, 根据NP蛋白(Nuclear protein)和M蛋白(Matrix protein)的不同可分为 3 个类型: 甲型流感病毒、乙型流感病毒和丙型流感病毒。甲型流感病毒和乙型流感病毒是季节性流行感冒的主要起因, 而甲型流感病毒对人类致病性最高, 多次引起世界大流行。如 1918~1919 年的西班牙流感就造成了世界 5 千万人死亡<sup>[3]</sup>。流感病毒的变异方式主要有两种形式, 即抗原性转变(Antigenic shift)和抗原性漂移(Antigenic drift), 变异一般都集中在抗原HA(Hemagglutinin)和NA(Neuraminidase)。此外, 还有较少见的重组, 不同的流感病毒感染相同的细胞, 病毒基因组发生重组, 形成新的毒株或新的亚型<sup>[4]</sup>, 如 2009 年流行的猪流感H1N1 就是原禽流感H1N1、传统猪流感(欧亚和北美)H1N1 和季节性流感病毒H3N2 基因组重组的结果<sup>[5]</sup>。由于流感病毒这种特殊的变异方式, 随时都可能会出现新的流感病毒。

目前, 流感主要的防治方法是疫苗和药物。至今, 只有 4 个抗流感病毒药物通过美国FDA批准, 根据作用机制不同分为M2 离子通道蛋白抑制剂和NA抑制剂<sup>[6,7]</sup>。M2 离子通道蛋白抑制剂包括金刚烷胺和金刚乙胺, NA抑制剂包括扎那米韦和奥司他韦<sup>[8]</sup>。这些抗流感病毒药物已应用于临床, 但存在着不可小视的毒副作用, 如M2 离子通道蛋白抑制剂具有一定的神经毒性, 会引起失眠、局促不安、精神集中困难、头昏眼花等<sup>[9,10]</sup>, 而NA抑制剂也会引起一定的恶心呕吐、反胃等副作用<sup>[11]</sup>。相比这些药物, 疫苗则主要起着预防作用, 但疫苗也存在着一些安全性问题和常见的副作用如发烧、疲劳等, 也有少数人因接种疫苗而猝死<sup>[12]</sup>。另外, 流感病毒的高突变性会使一些药物和疫苗失效, 达不到广谱、持久的保护, 导致药物开发和疫苗研制成了一个无止境的过程。由小RNAs介导的RNA干扰(RNA interference, RNAi)为我们提供了一种全新有效的抗病毒策略, RNAi治疗已广泛应用于抗病毒领域, 包括HIV(Human immunodeficiency virus)、HCV(Hepatitis C virus)、HBV(Hepatitis B virus)、HPV(Human papilloma

virus)、SARS(Severe acute respiratory syndromes)等多种病毒。RNAi治疗作为抗流感病毒治疗的候选方法之一, 小RNAs如siRNAs和miRNAs作为抗流感病毒的候选药物之一受到越来越多关注。本文就目前siRNAs和miRNAs在抗甲型流感病毒方面的研究进展、前景和存在的问题给予综述。

## 1 小RNAs基本特征和作用机制

### 1.1 小RNAs基本特征

小RNAs是一类长度为 20~30nt的小分子RNAs, 有 5'磷酸基团和 3'羟基末端, 与庞大的蛋白质家族 Argonaute(AGO)联系紧密, 其和特定AGO蛋白的紧密结合决定了其生物学功能<sup>[13,14]</sup>。第一个小RNA——lin-4, 属于miRNA, 是 1993 年在线虫中发现的。同年, 受lin-4 调节的lin-14 也被发现, 表明了小RNA具有转录后调节功能<sup>[15,16]</sup>。随后, 越来越多的小RNAs被发现。根据小RNAs的来源、作用机制和来源, 主要可分为 3 大类: 小干扰RNAs (Small-interfering RNAs, siRNAs)、微RNAs (microRNAs, miRNAs)和与piwi蛋白相互作用RNAs (Piwi-interacting RNAs, piRNAs)<sup>[17,18]</sup>。一般来说, miRNAs是内源性的<sup>[19]</sup>, 而siRNAs则可是内源性或外源性的<sup>[20]</sup>。小RNAs在调节细胞通路、发育和抗病毒中起着至关重要的作用, 在植物、昆虫、线虫、真菌中, 病毒的入侵能够诱发自然RNAi实现抗病毒免疫作用。在哺乳动物中, 一直没有有力的证据能够证明哺乳动物确实有诱发自然RNAi从而起抗病毒作用的能力, 虽然Lecellier等<sup>[21]</sup>和Li等<sup>[22]</sup>的研究为这一问题提供了一定的证据。

### 1.2 小RNAs作用机制

由小RNAs介导的RNAi是指双链RNA(Double strand RNA, dsRNA)诱发的同源mRNA高效特异性降解的转录后基因沉默现象<sup>[23,24]</sup>, 该现象于 1998 年首次发现于线虫中。siRNAs和miRNAs作为RNA干扰的主要参与分子, 其作用机制已初步阐明。siRNA的作用机制可以分为两个阶段<sup>[25,26]</sup>: (1)起始阶段, 在ATP参与下, 较长dsRNA被类核糖核酸酶(RNase )特异切割加工成 21~23nt的双链siRNA, siRNA的两条单链末端为 5'-磷酸和 3'-羟基, 且 3'端均有 2~3 个突出的单核苷酸; (2)效应阶段, siRNA整

合进核糖核苷酸酶复合物形成RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC在ATP参与下将双链siRNA解旋成单链从而活化,反义链指导活化的RISC识别互补的mRNA,并在核酸内切酶作用下从siRNA 3'端 12nt的位置切割靶mRNA,使目标mRNA降解。

miRNA是细胞内源性的具有发夹结构的基因转录产物,是通过RNA聚合酶的作用,转录出miRNA初级产物(Primary microRNA, pri-miRNA);然后在RNA酶(RNase) Drosha及辅助因子的作用下,被切割成大约 60nt、茎环状的miRNA前体(Precursor microRNA, pre-miRNA)<sup>[27]</sup>。pre-miRNA在Ran-GTP依赖的核质/细胞质转运蛋白Exportin 5的作用下,从核内运输到胞质中。细胞质中的Pre-miRNA在RNase 即Dicer的作用下,被剪切成21~22nt的miRNA:miRNA\*双螺旋结构。随后,双螺旋解旋,其中一条结合到RISC上,形成非对称RISC复合物,该复合物会结合到靶mRNA上,当RISC上的miRNA与靶mRNA完全或不完全互补配对时,会降解靶mRNA或抑制该mRNA的翻译<sup>[28]</sup>。

对于流感病毒,选择其保守且重要的基因设计siRNA或miRNA,并通过一定的给药途径,在上述小RNAs作用机制下,可达到抗流感病毒的效果。

## 2 siRNAs与抗流感病毒

Bitko等<sup>[29]</sup>利用合成的siRNA成功抑制了呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus)的增殖,首次证明了合成的siRNA可用于抗病毒。之后,siRNA被成功地应用于抗更多的病毒,目前,已有一些siRNAs分子进入了临床二期和三期实验阶段<sup>[30]</sup>。

流感病毒有8个RNA片段,编码11个蛋白,其中各个蛋白对流感病毒的复制和感染都有着重要作用<sup>[31]</sup>,因此干扰这8个片段的mRNA都应该能抑制流感病毒的复制<sup>[32]</sup>,但因HA和NA具有高突变率的特点,一般不作为靶基因,而NP、PA、PB1、PB2、M、NS较为保守而成为研究者常用的靶基因<sup>[33]</sup>。

2003年,Ge等<sup>[34]</sup>首次用siRNA成功地抑制了流感病毒的复制,他们设计的20条特异性靶向NP、PA、PB1、PB2、M和NS基因的siRNAs都能不同程度地抑制H1N1病毒在MDCK细胞和鸡胚中的复制。在MDCK细胞水平上,当感染复数为0.01时,

NP-1496、PB1-2257和PA-2087可使病毒滴度降低达200倍,而在感染复数为0.1时, NP-1496还可保持抑制200倍的效力。在鸡胚水平上, NP-1496、PB1-2257和PA-2087在20条siRNA中抑制效果最好,减少病毒滴度达200倍。另外,实验发现, NP-1496除了抑制靶基因的mRNA、vRNA和cRNA外,还可以抑制M、NS、PB1、PB2和PA基因的mRNA、vRNA和cRNA, PA-2087也有类似的广泛抑制效果。

在此基础上,Ge等<sup>[32]</sup>和Tompkins等<sup>[35]</sup>发现PA-2087和NP-1496也能抑制病毒在小鼠体内的增殖,小鼠肺部流感病毒滴度减少倍数为9~56倍。小鼠分别预注射PA-2087、NP-1496和PA-2087+NP-1496的siRNA,16~24h后感染H1N1,18d后只有注射PA-2087+NP-1496的小鼠全部存活。此外,PA-2087+NP-1496也可使感染H5N1、H7N7的小鼠存活率达87.5%和50%。Zhou等<sup>[36]</sup>设计的靶向M2和NP基因的siRNAs,也能抑制小鼠体内H5N1、H1N1和H9N2等多种流感病毒复制。这些研究表明siRNAs在体内抗流感病毒具有初步的可行性。最近,Zhang等<sup>[37]</sup>设计了靶向H5N1 PA基因的3条siRNA: ps-PA496, ps-PA1116和ps-PA1473,实验结果显示3条siRNA均能抑制病毒在MDCK细胞中的复制,其中ps-PA496抑制效果最为明显,可降低病毒滴度达78倍。用ps-PA496治疗感染流感病毒的小鼠后,小鼠的存活率达到37.5%,而对照组的小鼠全部死亡。此外,Wu等<sup>[38]</sup>、Abrahamyan等<sup>[39]</sup>都报导了siRNAs可有效抑制流感病毒的复制。

综合已有文献报道,PA-2087和NP-1496是目前报道的抑制流感病毒效果最好的siRNA,并且PA-2087和NP-1496还能抑制H1N1、H5N1、H7N7和H9N2等多种流感病毒亚型毒株的增殖<sup>[35]</sup>。此外,Sui等<sup>[40]</sup>研究发现M-950 siRNA抑制病毒的效果与NP-1496类似甚至稍好(表1)。利用DNAMAN分析它们靶序列的保守性,结果显示靶序列在所有实验用毒株中完全保守,与PA-2087或NP-1496的同源性为100%,说明在基因保守区域设计siRNA可以达到更广泛的病毒抑制效果。给小鼠注入PA-2087和NP-1496混合siRNAs时,得到的抑制效果更明显,说明多靶点联合抑制可能取得更好的抑制效果<sup>[35]</sup>。基于现有报道,siRNA运输方式是否影响抑制流感病毒的效果,目前还不能下结论。此外,我们分析了

表 1 已报道的抗流感病毒效果最好的 siRNA

siRNA	siRNA 序列	抑制/预防的病毒类型	参考文献
PA-2087	GCAATTGAGGAGTGCCTGA	A/WSN/1933(H1N1); A /Puerto/ Rico/ 8/ 34(H1N1);	[32,34,35]
NP-1496	GGATCTTATTTCTTCGGAG	A /Hong Kong/ 156/ 97 (H5N1); A /NL/ 219/ 03 ( H7N7); A /Hong Kong/ 1073/ 99 (H9N2)	
M-950	ACAGCAGAATGCTGTGGAT	A/New Caledonia/20/1999 (H1N1); A/Hong Kong/486/97 (H5N1)	

注：以上 3 种 siRNA 的靶序列在实验所用毒株中完全保守，即每种 siRNA 与对应靶序列同源性 100%。

Ge等<sup>[34]</sup>文献中抑制流感病毒效果好的siRNA和效果差的siRNA序列特征以及靶序列的特征，除了发现所有siRNA序列与靶序列 100%同源的特征外，没有发现siRNA设计规律特征中AA(N19)TT、AA(N21)、NA(N21)及GC含量等因素对siRNA抑制病毒效果的影响。利用文献<sup>[34]</sup>所用靶基因序列在网站(<http://sivirus.rnai.jp/>)上去设计siRNA，网站也没有给出与文献完全相同的siRNA。因此，在siRNA设计时，满足 100%同源性可能是首要条件，得到效果好的siRNA具有一定的随机性。

3 miRNAs 与抗流感病毒

miRNAs是长度约 22nt的一类小RNAs，在细胞生长、分化、凋亡、迁移等过程起着重要的调节作用<sup>[41,42]</sup>。此外，miRNAs还调控着病毒和宿主的相互作用，如miR-125b和miR-223通过直接靶向HIV-1型病毒的mRNA来抑制病毒在CD4<sup>+</sup>T细胞中的增殖<sup>[43]</sup>。

Scaria等<sup>[44]</sup>研究发现细胞中miR-507和miR-136可能分别靶向H5N1 PB2 和HA基因，且各自的靶序列在不同病毒株间高度保守，而鸡的基因组不编码这两个miRNA，这可能是鸡容易感染H5N1 的原因。2010 年，Li等<sup>[45]</sup>在感染H1N1 的小鼠中首次发现了 18 个差异表达的miRNAs，这些miRNAs靶向的靶基因调节着免疫反应和细胞死亡通路。其中，miR-200a表达下调调控I型干扰素反应，miR-223 表达上调抑制转录因子CREB(cAMP responsive element binding protein)活性导致细胞死亡。此外，miR-323、miR-491 和miR-654能够通过靶向流感病毒的PB1 基因而抑制流感病毒在MDCK细胞中的复制<sup>[46]</sup>；miR26a可以有效抑制流感病毒在MDCK细胞中的复制，而miR939 则促进流感病毒在MDCK细胞中的复制<sup>[47]</sup>。Brahmachari等<sup>[48]</sup>申请的专利表明分别靶向

PB2 和HA基因的has-miR-507、has-mir-136 能有效抑制H5N1 的复制。这些研究都表明细胞内miRNAs参与调控流感病毒在宿主细胞中的复制过程，有可能成为潜在的抗流感病毒候选药物。

4 流感病毒小 RNAs 的新发现和抗流感病毒的新策略

在H1N1(Influenza A/PR/34)感染的肺上皮细胞中，Perez等<sup>[49]</sup>利用深度测序技术分析发现 90%以上的小RNAs是细胞miRNAs，约 0.12%直接来源于流感病毒，而在这些直接来源于流感病毒的小RNA中约有 30%为svRNAs(Virus-encoded short vRNAs)，由病毒RNA编码，长度为 22~27nt，这些svRNAs可能通过与病毒聚合酶的相互作用调控病毒的转录和复制。Umbach等<sup>[50]</sup>采用同样的方法分析由病毒RNA编码的、长度为 18~27nt的和高水平表达的leRNAs (Small viral leader RNAs)，发现这些leRNAs可能在病毒复制中起着重要作用。新发现的这些小RNAs可能成为抗流感病毒的新靶标，或者本身就是抗流感病毒的候选药物，但其作用机制和功能仍有待进一步研究。

与其他病毒一样，流感病毒需要依赖宿主细胞才能进行正常的感染和增殖<sup>[51]</sup>。因此，另一个可选的抗流感病毒策略就是通过降低宿主与流感病毒复制相关蛋白的功能来抑制病毒的复制。近几年，利用全基因组高通量siRNA筛选方法，在果蝇细胞<sup>[52]</sup>和人源A549 细胞<sup>[53,54]</sup>中发现了不少流感病毒复制所必须的宿主因子。这些因子包括：SON(SON DNA binding protein)，CLK1(CDC-like kinase 1)，ATP6V0D1 (Vacuolar ATPase)，COPG(COPI coated vesicle transport)，eIF4A3，FGFR(Fibroblast growth factor receptor proteins)，GSK3-β(Glycogen synthase kinase 3-β)和



CAMK2B(Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\beta$ )等等。虽然细胞基因在细胞功能中起着重要作用,但有些并不是细胞所必需的或短期内细胞非必需的。如血管扩张刺激磷蛋白(Vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)和斑联蛋白(Zyxin),是培养的细胞生长非必需的<sup>[55]</sup>。通过利用 siRNA 敲低 VASP、Zyxin 和 profilin(肌动蛋白抑制蛋白)可以很好抑制呼吸道合包病毒的复制<sup>[56,57]</sup>。现在还没有通过 siRNA 敲低宿主细胞因子来抑制流感病毒感染或复制的报道,但随着这些细胞因子的深入研究和更多流感病毒复制相关因子的发现,其中一些细胞非必需的细胞因子将成为 siRNA 抗流感病毒的新靶标。

## 5 问题与展望

虽然小 RNAs 治疗作为一种抗病毒治疗方法,具有高效、特异、快速等优点,显示出广阔的应用前景,但还存在着不少问题。首先,是如何设计有效的小 RNAs。对于流感病毒,设计的小 RNAs 应该尽量靶向那些功能重要且保守的基因区域,其两个主要原则:(1)应尽量靶向多种类型的流感病毒;(2)不能与人类基因存在同源序列。值得注意的是虽然设计的小 RNAs 是针对基因的保守区域,仍然存在突变的可能,因此也较难达到广谱、持久的保护。另外,如脱靶效应、低稳定性、欠缺理想的给药载体、合适的给药剂量等等<sup>[58-61]</sup>都是实际应用中出现的一些问题。其中有效的小 RNAs 给药载体是小 RNAs 治疗的最大瓶颈<sup>[60]</sup>,科学家们正在研发安全可靠的非病毒载体和病毒载体给药载体。非病毒载体包括脂质体、阳离子聚合物纳米颗粒、抗体、胆固醇等,而病毒载体则包括慢病毒载体、腺病毒载体等。此外,还有人利用大肠杆菌<sup>[62]</sup>、伤寒沙门氏菌的微细胞<sup>[63]</sup>作为给药载体。相对于病毒载体,非病毒载体具有更低的毒性和更高的安全性,因此,未来 RNAi 给药载体的研发仍主要集中在非病毒载体,但病毒载体的高效率和持久性也会吸引研究者继续开发更安全的病毒载体。目前,病毒载体、脂质体载体和纳米载体系统的开发已处于临床试验阶段<sup>[64]</sup>。

流感病毒通常感染上呼吸道和肺部上皮细胞,因此局部给药可能是有效的给药方式。在小鼠体内试验中,Ge 等<sup>[32]</sup>利用针对流感病毒的 siRNA 和聚乙烯亚胺多聚阳离子(Polyethyleneimine, PEI)通过静脉

注射或鼻内滴入,可使小鼠肺部病毒滴度降低 1~2 个数量级。Tompkins 等<sup>[35]</sup>通过水压注射和鼻内滴入混合有转染试剂的同一条 siRNA,可使小鼠免于受高致病性 A 型流感病毒感染。这表明在将来,经鼻内吸入 siRNA 进入肺部,在肺部沉默目标基因,可能是临床应用的有效措施。

综上所述,尽管小 RNAs 治疗存在着上述问题,但相比于抗流感病毒药物和疫苗,小 RNAs 药物具有不可比拟的优点。在小 RNAs 治疗瓶颈还未解决之前,疫苗和药物仍是流感治疗的主要方式,但随着 RNAi 的基础研究和临床研究的进行,小 RNAs 应用于抗流感病毒领域具有广阔的发展前景。

## 参考文献(References):

- [1] Tsai KN, Chen GW. Influenza genome diversity and evolution. *Microbes Infect*, 2011, 13(5): 479-488. DOI
- [2] Ginsberg J, Mohebbi MH, Patel RS, Brammer L, Smolinski MS, Brilliant L. Detecting influenza epidemics using search engine query data. *Nature*, 2008, 457(7232): 1012-1014. DOI
- [3] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 2009, 459(7249): 931-939. DOI
- [4] Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(3): 196-205. DOI
- [5] Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JSM, Guan Y, Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009, 459(7250): 1122-1125. DOI
- [6] Zhang J, Xu WF. Recent advances in anti-influenza agents with neuraminidase as target. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(4): 429-448. DOI
- [7] De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(12): 1015-1025. DOI
- [8] Lagoja IM, De Clercq E. Anti-influenza virus agents: Synthesis and mode of action. *Med Res Rev*, 2008, 28(1): 1-38. DOI
- [9] Sugrue RJ, Tan BH, Yeo DS, Sutejo R. Antiviral drugs for the control of pandemic influenza virus. *Ann Acad Med*, 2008, 37(6): 518-524. DOI
- [10] Moss RB, Davey RT, Steigbigel RT, Fang F. Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals and drug resistance. *J Antimicrob Chemoth*, 2010, 65(6):

- 1086–1093. [DOI](#)
- [11] Fuyuno I. Tamiflu side effects come under scrutiny. *Nature*, 2007, 446(7134): 358–359. [DOI](#)
- [12] Bridges CB, Harper SA, Fukuda K Uyeki TM, Cox NJ, Singleton JA, Advisory Committee on Immunization Practices. Prevention and control of influenza recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, 2008, 57(RR-8): 1–34. [DOI](#)
- [13] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2009, 10(2): 126–139. [DOI](#)
- [14] Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*, 2010, 12(1): 19–31. [DOI](#)
- [15] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854. [DOI](#)
- [16] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75(5): 855–862. [DOI](#)
- [17] Liu QH, Paroo Z. Biochemical principles of small RNA pathways. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79(1): 295–319. [DOI](#)
- [18] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(2): 94–108. [DOI](#)
- [19] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23(1): 175–205. [DOI](#)
- [20] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 642–655. [DOI](#)
- [21] Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 2005, 308(5721): 557–600. [DOI](#)
- [22] Li WX, Li HW, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EWA, Johnson KL, García-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(5): 1350–1355. [DOI](#)
- [23] Carthew RW. Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(2): 244–248. [DOI](#)
- [24] Ryther RCC, Flynt AS, Phillips JA III, Patton JG. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther*, 2005, 12(1): 5–11. [DOI](#)
- [25] Ma Y, Chan CY, He ML. RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroentero*, 2007, 13(39): 5169–5179. [DOI](#)
- [26] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101(1): 25–33. [DOI](#)
- [27] Umbach JL, Cullen BR. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Gene Dev*, 2009, 23(10): 1151–1164. [DOI](#)
- [28] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. [DOI](#)
- [29] Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol*, 2001, 1(1): 34–44. [DOI](#)
- [30] Vaishnav AK, Gollob J, Gamba-Vitalo C, Hutabarat R, Sah D, Meyers R, de Fougères T, Maraganore J. A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, 2010, 1(1): 14–27. [DOI](#)
- [31] Cheung TKW, Poon LLM. Biology of influenza A virus. *Ann Ny Acad Sci*, 2007, 1102(1): 1–25. [DOI](#)
- [32] Ge Q, Filip L, Bai AL, Nguyen T, Eisen HN, Chen JZ. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8676–8681. [DOI](#)
- [33] Ge Q, Eisen HN, Chen JZ. Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection. *Virus Res*, 2004, 102(1): 37–42. [DOI](#)
- [34] Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen JZ. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2718–2723. [DOI](#)
- [35] Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8682–8686. [DOI](#)
- [36] Zhou HB, Jin ML, Yu ZJ, Xu XJ, Peng YP, Wu HY, Liu JL, Liu H, Cao SB, Chen HC. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antivir Res*, 2007, 76(2): 186–193. [DOI](#)
- [37] Zhang W, Wang CY, Yang ST, Qin C, Hu JL, Xia XZ. Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene. *Biochem Bioph Res Co*, 2009, 390(3): 421–426. [DOI](#)
- [38] Wu ZQ, Yang YW, Yang F, Yang J, Hu YF, Zhao LN, Wang JW, Jin Q. Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antivir Res*, 2010,

- 85(3): 559–561. [DOI](#)
- [39] Abrahamyan A, Nagy É, Golovan SP. Human H1 promoter expressed short hairpin RNAs (shRNAs) suppress avian influenza virus replication in chicken CH-293T and canine MDCK cells. *Antivir Res*, 2009, 84(2): 159–167. [DOI](#)
- [40] Sui HY, Zhao GY, Huang JD, Jin DY, Yuen KY, Zheng BJ. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS ONE*, 2009, 4(5): e5671. [DOI](#)
- [41] Budhu A, Ji J, Wang XW. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol*, 2010, 3: 37. [DOI](#)
- [42] Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5959–5974. [DOI](#)
- [43] Huang JL, Wang FX, Argyris E, Chen KY, Liang ZH, Tian H, Huang WL, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Nat Med*, 2007, 13(10): 1241–1247. [DOI](#)
- [44] Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B, Brahmachari SK. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*, 2006, 3(10): 68–76. [DOI](#)
- [45] Li Y, Chan EY, Li JN, Ni C, Peng XX, Rosenzweig E, Tumpey TM, Katze MG. MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice. *J Virol*, 2010, 84(6): 3023–3032. [DOI](#)
- [46] Song LP, Liu H, Gao SJ, Jiang W, Huang WL. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *J Virol*, 2010, 84(17): 8849–8860. [DOI](#)
- [47] 刘鹤, 宋丽萍, 黄文林. miR26a和miR939 调控 H1N1 型流感病毒在MDCK细胞中的复制. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1399–1405. [DOI](#)
- [48] Brahmachari SK, Hariharan M, Scaria V, Pillai B. Targets for human micro RNAs in avian influenza virus (H5N1) genome: US 2010/0016414 A1, 2009.
- [49] Perez JT, Varble A, Sachidanandam R, Zlatev I, Manoharan M, García-Sastre A, tenOever BR. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(25): 11525–11530. [DOI](#)
- [50] Umbach JL, Yen HL, Poon LLM, Cullen BR. Influenza A virus expresses high levels of an unusual class of small viral leader RNAs in infected cells. *mBio*, 2010, 1(4): e00204–e00210. [DOI](#)
- [51] Hirsch AJ. The use of RNAi-based screens to identify host proteins involved in viral replication. *Future Microbiol*, 2010, 5(2): 303–311. [DOI](#)
- [52] Hao LH, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature*, 2008, 454(7206): 890–893. [DOI](#)
- [53] Karlas A, Machuy N, Shin YJ, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, Becker D, Khalil H, Ogilvie LA, Hess S, Mäurer AP, Müller E, Wolff T, Rudel T, Meyer TF. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463(7282): 818–822. [DOI](#)
- [54] König R, Stertz S, Zhou YY, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, Alamares JG, Tschernke DM, Ortigoza MB, Liang YH, Gao QS, Andrews SE, Bandyopadhyay S, De Jesus P, Tu BP, Pache L, Shih C, Orth A, Bonamy G, Miraglia L, Ideker T, García-Sastre A, Young JAT, Palese P, Shaw ML, Chanda SK. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463(7282): 813–817. [DOI](#)
- [55] Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 2001, 114(24): 4557–4566. [DOI](#)
- [56] Musiyenko A, Bitko V, Barik S. RNAi-dependent and -independent antiviral phenotypes of chromosomally integrated shRNA clones: role of VASP in respiratory syncytial virus growth. *J Mol Med*, 2007, 85(7): 745–752. [DOI](#)
- [57] Harpen M, Barik T, Musiyenko A, Barik S. Mutational analysis reveals a noncontractile but interactive role of actin and profilin in viral RNA-dependent RNA synthesis. *J Virol*, 2009, 83(21): 10869–10876. [DOI](#)
- [58] Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang DN, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(4): 457–462. [DOI](#)
- [59] Paroo Z, Corey DR. Challenges for RNAi *in vivo*. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(8): 390–394. [DOI](#)
- [60] Perrimon N, Ni JQ, Perkins L. *In vivo* RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(8): a003640. [DOI](#)
- [61] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 635–637. [DOI](#)
- [62] Xiang SL, Fruehauf J, Li CJ. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(6): 697–702. [DOI](#)

- 
- [63] MacDiarmid JA, Amaro-Mugridge NB, Madrid-Weiss J, Sedliarou I, Wetzel S, Kochar K, Brahmbhatt VN, Phillips L, Pattison ST, Petti C, Stillman B, Graham RM, Brahmbhatt H. Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(7): 643–651. [DOI](#)
- [64] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(2): 129–138. [DOI](#)