

RNAi 在抗蚊媒病毒感染中的研究进展

魏勇, 何玉兰, 郑学礼

南方医科大学公共卫生学院病原生物学系, 广州 510515

摘要: 蚊媒病因具有较高的发病率和传播率使其成为全球关注的重要公共卫生问题。蚊虫作为蚊媒病的传播媒介, 研究其与蚊媒病毒两者之间的相互作用机制将有助于蚊媒病的防控。蚊虫抵御蚊媒病毒的先天免疫降低和病毒成功逃避蚊虫免疫屏障为病毒在蚊虫体内的持续感染和蚊媒病的暴发流行造成了潜在风险。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 途径作为蚊虫体内强大的抗病毒防御屏障, 通过产生多种小 RNA 降解病毒 RNA, 从而达到抑制病毒复制和传播的目的。本文对小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA)、Piwi 蛋白相互作用 RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA) 等 3 种小分子 RNA 在蚊虫体内发挥抗蚊媒病毒感染的先天免疫机制的相关研究进行了综述, 以期对蚊媒病的防控提供理论参考。

关键词: 蚊虫; 蚊媒病毒; siRNA; miRNA; piRNA

Research progress in RNA interference against the infection of mosquito-borne viruses

Yong Wei, Yulan He, Xueli Zheng

Department of Pathogen Biology, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Mosquito-borne diseases have become an important public health issue of global concern because of their high incidence and transmission rate. As a vector for mosquito-borne diseases, studying the interaction mechanism between mosquitoes and mosquito-borne viruses will help control mosquito-borne diseases. The impaired innate immunity and immune barriers evasion caused by mosquito-borne viruses in mosquitoes pose a potential risk for the persistent infection of the virus in mosquitoes and the outbreak of mosquito-borne diseases. The RNA interference (RNAi) pathway, as a powerful antiviral defense barrier in mosquitoes, can inhibit viral replication and transmission by producing a variety of small RNAs to degrade viral RNA. In this review, we summarize the related studies on the innate immune mechanism against mosquito-borne virus infection in mosquitoes about small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA), and Piwi-interacting RNA (piRNA), aiming to provide a theoretical reference for the prevention and control of mosquito-borne diseases.

收稿日期: 2019-10-15; 修回日期: 2019-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31630011), 广东省自然科学基金项目(编号: 2017A030313625)和广州市科技计划项目(编号: 201804020084)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31630011), Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (No. 2017A030313625), Science and Technology Planning Project of Guangzhou City (No. 201804020084)]

作者简介: 魏勇, 在读博士研究生, 研究方向: 传染病预防与控制。E-mail: smuweiyong@163.com

通讯作者: 郑学礼, 博士, 教授, 研究方向: 传染病预防与控制。E-mail: zhengxueli2001@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-262

网络出版时间: 2020/1/2 18:34:26

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20191231.1147.003.html>

Keywords: Mosquito; Mosquito-borne viruses; siRNA; miRNA; piRNA

蚊媒病是一类由病媒蚊虫传播的自然疫源性疾病,常见的有流行性乙型脑炎、登革热、黄热病等。随着全球气候变暖、交通运输便捷和旅游业发展,蚊虫在全球范围内快速扩张,这为蚊媒病的暴发流行和传播扩散构成了潜在风险。绝大多数蚊媒病毒以及在全球发病率和死亡率占较大比重的均是 RNA 病毒,如黄病毒科黄病毒属(正链 RNA 病毒)、披膜病毒科甲病毒属(正链 RNA 病毒)、布尼亚病毒科白蛉病毒属(负链 RNA 病毒)^[1,2]。黄病毒科黄病毒属包括黄热病病毒(yellow fever virus, YFV)、登革病毒(Dengue virus, DENV)、乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、西尼罗河病毒(West Nile virus, WNV)和寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)等^[3],披膜病毒科甲病毒属包括基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SINV)、塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus, SFV)、罗斯河病毒(Ross river virus, RRV)等^[4],布尼亚病毒科白蛉病毒属包括托斯卡纳病毒(Toscana virus, TOSV)、裂谷热病毒(Rift Valley fever virus, RVFV)等^[5]。在过去的几十年间,登革热至少在 128 个国家或地区暴发流行,每年平均有 3.9 亿人口感染登革热,登革热一直是重点关注的全球公共卫生问题^[6]。寨卡病毒病是近年来新兴的蚊媒传播性疾病,2016 年 2 月世界卫生组织(WHO)宣布将寨卡疫情列为全球紧急公共卫生事件。自从 2015 年巴西发生大规模寨卡病毒感染疫情后,目前已有 64 个国家和地区报告了寨卡疫情^[7]。寨卡病毒感染引起的成人格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)和新生儿出生缺陷,如产前感染所致的小头畸形,在近年来引发了全球广泛关注^[8]。因目前缺乏蚊媒病相应的有效疫苗,抑制病毒在蚊虫体内复制和阻断病毒传播将是控制蚊媒病暴发流行的有效途径^[9]。因此,研究蚊虫体内抗蚊媒病毒感染的先天免疫机制将有助于制定相应的蚊媒病控制策略。本文将对目前蚊虫体内 3 大主要抗病毒的 RNAi 途径的相关研究进行综述,以期对蚊媒病的防控提供理论参考。

1 蚊虫体内三大主要的 RNAi 途径

蚊虫的先天免疫屏障和蚊媒病毒的免疫逃避机制是影响病毒在蚊虫体内成功复制和传播的关键因素。蚊虫体内抗病毒的效应分子(抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和酚氧化酶级联反应的组分等),以及效应分子所依赖的信号通路(JAK-STAT、Toll 和 Imd 等信号通路)是蚊虫体内免疫防御的重要方面^[10-12]。此外, RNA 干扰(RNAi)途径是蚊虫体内最为强大的抗病毒防御体系^[13]。RNAi 是指由双链 RNA(dsRNA)诱发的具有高度保守的小 RNA 片段可高效特异性降解同源 mRNA 的现象,是转录后水平的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。RNAi 途径主要包含 3 种类型的小 RNA: 小干扰 RNA (siRNA)、微小 RNA (miRNA)和 Piwi 蛋白相作用 RNA (piRNA),其中 siRNA 为蚊虫体内抗病毒免疫的主要小 RNA 分子^[13-15]。RNAi 具有高度的序列特异性,严格按照碱基互补配对原则与同源基因的 mRNA 结合并进行降解,从而实现针对目的基因的精准沉默; RNAi 具有高效抑制基因表达的特性,表型可达到缺失突变体表型的程度; RNAi 还具有可遗传性和可传播性, RNA 干扰效应能稳定遗传给下一代,也可穿过细胞界限,传播至扩散处细胞乃至整个机体^[16,17]。利用 RNAi 特性发展的 RNAi 技术可广泛地应用于基因功能的探索、传染性疾病和恶性肿瘤的治疗领域^[18-21]。

2 siRNA 在蚊虫体内的抗病毒作用

siRNA 途径可分为内源性通路和外源性通路。内源性 siRNA 一般由细胞内基因双向转录形成的部分互补配对或由 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP)进行的 RNA 链复制等形成的 dsRNA 经剪切修饰而产生,在生物体不同生长发育时期发挥调控作用。外源性 siRNA 一般

是由转基因技术或病毒感染细胞后产生的复制中间体—dsRNA 经过核糖核酸酶 III(RNase III)家族中的 Dicer-2 核酸内切酶剪切成长度约为 21~25 nt 的双链小 RNA 分子^[22,23]。细胞内 siRNA 通过与 AGO、TRBP 和 PACT 等蛋白分子结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), siRNA 的随从链被降解, 引导链通过碱基互补配对的方式找到靶基因的 mRNA 或同源的病毒 RNA, 然后 RISC 中的 Ago-2 蛋白降解其 mRNA 或病毒 RNA, 阻止翻译表达或病毒复制(图 1)^[24,25]。

Li 等^[26]首次在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)

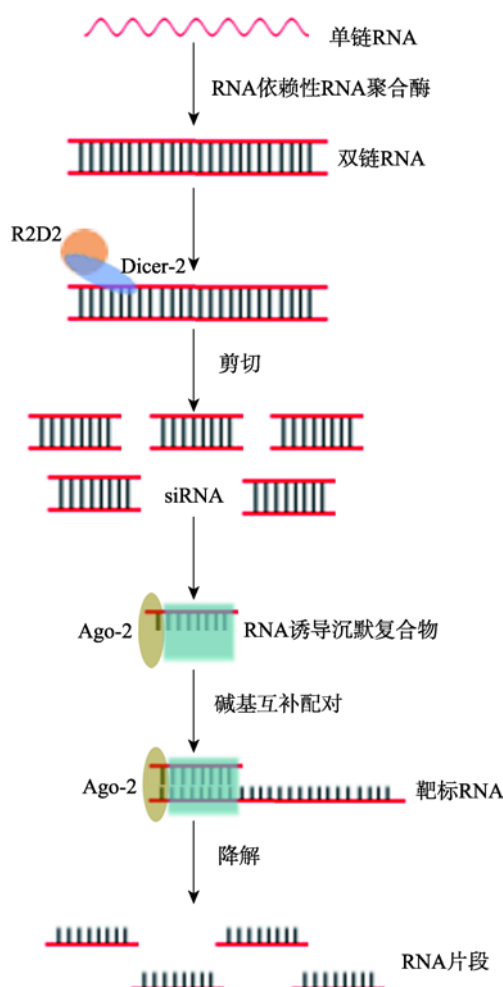


图1 siRNA 的生物合成和作用机制

Fig. 1 The mechanism of siRNA biogenesis and functions

单链 RNA 逆转录形成双链 RNA, 经 Dicer-2 核酸内切酶剪切成双链小 RNA 分子, 其引导链与 Ago-2 等相应蛋白组成 RNA 诱导沉默复合物, 通过碱基互补配对的方式结合靶标 RNA, 并将该靶标 RNA 降解。

细胞系中验证了 siRNA 的抗病毒作用, 并表明其抑制效应依赖于 Ago-2 蛋白。Sánchez-Vargas 等^[27]研究发现沉默埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) siRNA 通路会增加蚊虫体内登革 2 型病毒的复制, 这表明 siRNA 通路在蚊虫体内病毒复制过程中发挥抑制作用。Khoo 等^[28]通过转基因技术破坏埃及伊蚊中肠的 siRNA 通路, 发现这样会增加中肠内辛德毕斯病毒(SINV)的复制和播散率。Basu 等^[29]通过基因敲除抑制埃及伊蚊 Dcr-2 酶的表达, 发现蚊虫体内抗辛德毕斯病毒的免疫反应下降; 另外, Dcr-2 基因突变型的埃及伊蚊较野生型的蚊虫体内具有显著增加的黄热病毒复制水平^[30]。多项研究表明, 在敲除 siRNA 通路的相关成分后, 成蚊体内或培养的蚊虫细胞系中的病毒复制水平会显著升高^[27,31]。成蚊或不同细胞系感染蚊媒病毒后会导致该病毒来源的 siRNA (virus-derived small interfering RNA, vsiRNA)产生^[32,33]。Myles 等^[34]研究表明 vsiRNA 对蚊虫体内抗甲病毒感染具有重要调控作用。能够表达 dsRNA 结合蛋白和病毒 RNA 沉默抑制因子(viral suppressors of RNA silencing, VSRs)的重组甲病毒感染埃及伊蚊和冈比亚按蚊后, 蚊虫体内的 vsiRNA 显著下降, 从而导致病毒复制量和蚊虫死亡率显著增加。

蚊媒病毒在受到蚊虫宿主先天免疫消除的同时, 也在不断进化适应宿主的生理环境, 并对抗媒介蚊虫的抗病毒免疫途径。通过鉴别蚊媒病毒基因组中编码的病毒 RNA 沉默抑制因子(VSRs), 了解病毒蛋白对蚊虫免疫途径的拮抗作用, 将有助于理解蚊媒病毒在蚊虫体内长期感染和传播的机制, 并应用于蚊媒病的防控^[35]。布尼亚维拉病毒(Bunyamwera virus, BUNV)S 片段上的非结构蛋白(non-structure proteins, NSs)是 VSRs, NSs 缺陷性 BUNV 在 Dcr-2 缺陷性的蚊虫细胞系中的复制水平要高于在正常蚊虫细胞系中的复制水平, NSs 缺陷性 BUNV 在埃及伊蚊体内的感染能力要低于野生型 BUNV^[36]。Kakumani 等^[37]通过体外实验证明登革热病毒(DENV) NS4B 蛋白能够干扰 Dicer 对 siRNA 的加工处理过程。哺乳动物细胞中的基因沉默实验显示 NS4B 蛋白的跨膜结构域 3 (transmembrane domain 3, TMD3)和 TME5 参与 VSRs 抑制病毒增殖的活性, 其具体机制目前尚不明确。Samuel 等^[38]研究发现在 Dcr-2 缺陷性的蚊虫细胞系中表达黄病毒衣壳蛋白(yellow fever

virus capsid, YFC)的 SINV 与不表达 YFC 的 SINV 的增殖能力和毒力相似, 并且验证了 YFC 作为 VSRs 拮抗 siRNA 途径。YFC 对 siRNA 途径拮抗作用可能是非特异性结合双链 RNA(dsRNA), 干扰 Dicer 产生 vsRNA。虽然 VSRs 有多种不同的蛋白, 但它与 dsRNA 非特异性结合是探讨其拮抗作用的主要内容。

3 miRNA 在蚊虫体内的抗病毒作用

miRNA 是一类内源性的非编码小 RNA (18~25 nt), 通过降解 mRNA 或抑制 mRNA 翻译来调控靶基因转录后表达水平^[39]。与 siRNA 途径相似, miRNA 途径也始于 dsRNA 剪切成小的双链 RNA, 其中一条引导链加载到 RISC 中, 然后 RISC 中 Ago-2 蛋白降解靶基因的 mRNA 或同源的病毒 RNA^[40]。miRNA 与 siRNA 途径的主要区别在于所发生的亚细胞结构位置和所参与的效应蛋白分子^[41]。siRNA 的转录、剪切和加工过程主要发生在细胞质中, 而编码 miRNA 的基因在宿主 RNA 聚合酶 II 的作用下转录成 miRNA 初始转录物(primary miRNA, pri-miRNA), 然后由 Drosha 剪切加工成 miRNA 前体物(precursor miRNA, pre-miRNA), 这一过程均是在细胞核内完成。pre-miRNA 输出到细胞质后, 由 Dicer-1 进一步加工至成熟的 miRNA, 并加载到 RISC 中发挥 RNA 干扰作用(图 2)^[42]。

多种蚊媒病毒均利用宿主 miRNA 通路来逃避宿主的抗病毒免疫反应, 从而增加病毒复制和致病力^[43]。Hussain 等^[44]在西尼罗河病毒(WNV)RNA 序列的 3'端非编码区发现了类似 miRNA 的小 RNA 片段, 并通过 Northern 印记杂交的方法检测到感染 WNV 的埃及伊蚊和白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)细胞系中存在一种病毒来源的成熟 miRNA, 命名为 KUN-miR-1。KUN-miR-1 通过上调转录因子 GATA4 的表达来促进病毒在蚊虫细胞内的增殖。Hussain 等^[45]通过二代测序技术发现感染登革 2 型病毒(DENV-2)的埃及伊蚊体内含有 6 种病毒来源的 miRNA 样的小 RNA, 称为 vsRNA 1~6; 其中 vsRNA5 已证实与病毒增殖有关。蚊虫体内 miRNA 通路关键分子的功能丧失性突变将有助于鉴定其分子特性, 并确定 KUN-miR-1 和 DENV-2-vsRNA 1~6 的生物发生机制和抗病毒免疫机制。

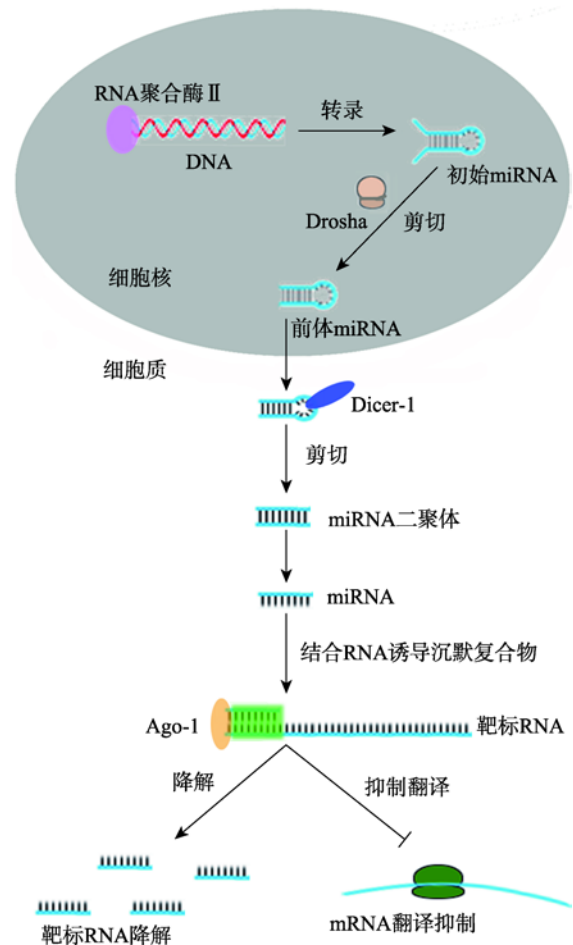


图 2 miRNA 的生物合成和作用机制

Fig. 2 The mechanism of miRNA biogenesis and functions

含 miRNA 序列的 DNA 经过转录后形成初始 miRNA, 然后经 Drosha 和 Dicer-1 等蛋白剪切加工修饰后形成成熟的 miRNA, 成熟的 miRNA 与 Ago-1 等相应蛋白组成 RNA 诱导沉默复合物, 通过碱基互补配对的方式结合靶标 RNA, 并将该靶标 RNA 降解或抑制 mRNA 翻译。

当蚊虫感染蚊媒病毒后体内会出现多种 miRNA 差异性表达^[46,47]。Su 等^[48]利用含 DENV-2 的血餐以及不含 DENV-2 的血餐分别喂食白纹伊蚊, 鉴定蚊虫中肠内差异性表达的 miRNA, 相比于喂食不含 DENV-2 血餐的白纹伊蚊, 一共有 43 个 miRNA 上调, 4 个 miRNA 下调; 并且上调的 miRNA 中 aal-miR-4728-5p 瞬时转入 C6/36 蚊虫细胞后能够增强 DENV-2 在细胞内的复制。Su 等^[49]再次利用含 DENV-2 的血餐喂食白纹伊蚊, 将感染上 DENV-2 与未感染上 DENV-2 的白纹伊蚊中肠内 miRNA 进行差异性分析, 发现感染上 DENV-2 的白纹伊蚊中肠内有 15 个

miRNA 上调, 2 个 miRNA 下调。其中 miR-1767 和 miR-276-3p 能够增强 DENV-2 在 C6/36 细胞内的复制, 而 miR-4448 抑制 DENV-2 在 C6/36 细胞内的复制。

4 piRNA 在蚊虫体内的抗病毒作用

piRNA 途径可在 siRNA 途径缺陷的条件下进行抗病毒免疫, 是 RNAi 介导的抗病毒免疫应答的相互补充^[50]。与 siRNA/miRNA 相比, piRNA 的生成不依赖 Dicer, 而依赖 PIWI 亚家族蛋白; piRNA 的长度约为 26~32 nt, piRNA 基因簇主要分别在转座子和重复序列等区域; piRNA 的 3'端会出现甲基化修饰, 可能与其稳定性或功能有关^[51~53]。piRNA 的

生成涉及 3 种 PIWI 蛋白, 包括 Piwi、Aub 和 Ago-3, 共同形成 piRNA 诱导的沉默复合物(piRNA-induced silencing complex, piRISC)^[54]。对于 piRNA 的生成, 目前提出了“乒乓”循环扩增模型, piRNA 从转录前体物中循环扩增^[55]。反义链 piRNA 与 Aub 和 Piwi 结合形成具有核酸酶活性的 piRNA 复合物(piRNA complex, piRC), piRC 能结合正义链前体 piRNA 并将其剪切加工成具有成熟 5'端的前体 piRNA, 然后该正义链前体 piRNA 经 Zuc 等酶剪切 3'末端形成成熟的正义链 piRNA; 反之, 正义链 piRNA 与 Ago-3 结合形成 piRC, 然后以同样的方式形成反义链 piRNA (图 3)^[56]。piRNA 途径在生殖遗传、配子形成、胚胎发育、基因转座、基因沉默和病毒增殖等方面均有调控作用。

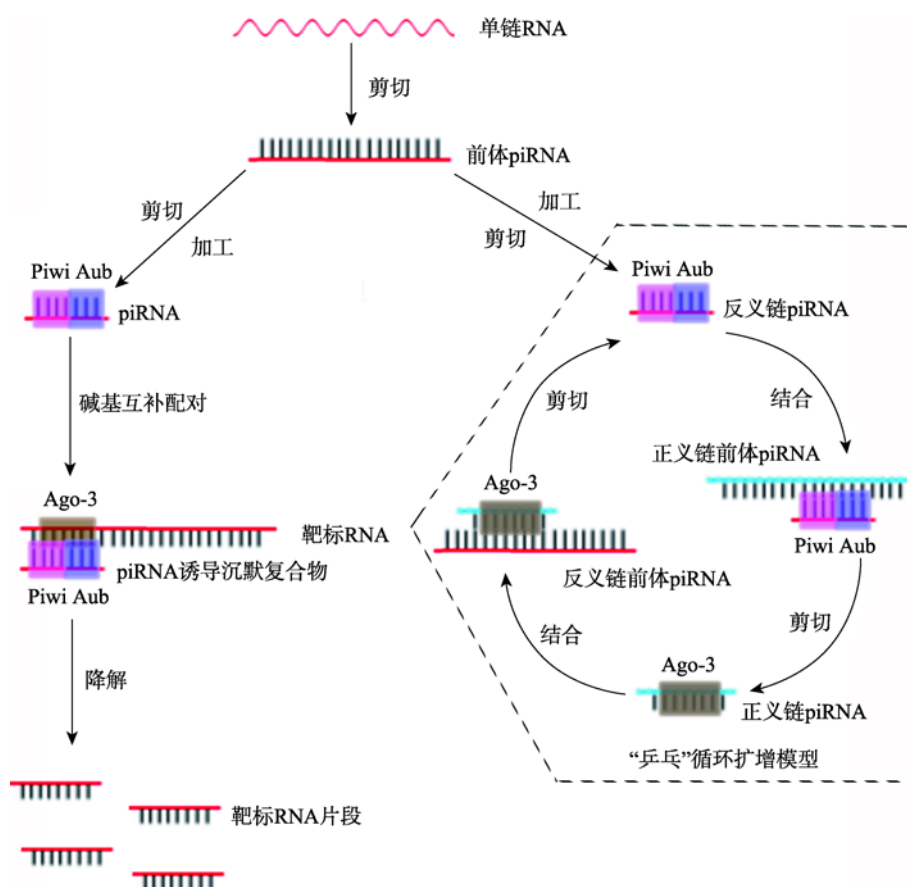


图 3 piRNA 的生物合成和作用机制

Fig. 3 The mechanism of piRNA biogenesis and functions

单链 RNA 经剪切形成前体 piRNA, 然后经 Zuc 等酶剪切加工后形成成熟的 piRNA, 成熟的 piRNA 与 Piwi、Aub 和 Ago-3 等蛋白组成 piRNA 诱导沉默复合物, 通过碱基互补配对的方式结合靶标 RNA, 并将该靶标 RNA 降解。虚线框内为 piRNA 的“乒乓”循环扩增模型。

蚊虫或蚊虫细胞系感染蚊媒病毒后, 能够产生一类依赖“乒乓”模型的病毒来源的 piRNA (virus-derived piRNA, vpiRNA), 这些 vpiRNA 不同于以往研究中来源于重复序列元件或 piRNA 簇的 piRNA^[57,58]。Morazzani 等^[57]在感染有基孔肯亚热病毒(CHIKV)的埃及伊蚊和白纹伊蚊体内检测到 vpiRNA。Miesen 等^[59]用 SINV 感染埃及伊蚊细胞系后, 通过免疫沉淀反应和小 RNA 的 Northern 免疫印迹检测到了 Ago-3 和 Piwi-5 蛋白特异性富集的 vpiRNA。通过对这类 vpiRNA 测序分析, 显示反义链 vpiRNA 倾向于与 Piwi-5 结合, 而正义链 vpiRNA 倾向于与 Ago-3 结合, 这也表明了这两种蛋白在“乒乓”模型中的作用机制。抑制 vpiRNA 在 siRNA 途径缺陷的蚊虫细胞系中表达, 将会加重受病毒感染细胞的病变程度, 这体现了 piRNA 途径在 siRNA 途径缺陷的蚊虫细胞系中的抗病毒作用^[57]。Schnettler 等^[60]通过深度测序检测到塞姆利基森林病毒(SFV)来源的 piRNA, 敲除 Piwi-4 基因后会导致 Aag2 埃及伊蚊细胞内 SFV 复制增加, 表明了 piRNA 途径在抗病毒免疫中的重要作用。

5 结语与展望

每年全球均有大量的蚊媒病暴发流行, 并且目前大部分的蚊媒病缺乏有效的疫苗进行预防, 所以阻止蚊媒病毒传播一直是蚊媒病预防控制的重要任务。目前有关化学杀虫剂和 *Wolbachia* 生物防治等方面的防控措施主要是通过控制蚊虫数量来控制蚊媒病的暴发流行。病毒感染和蚊虫防御机制以及两者动态平衡的演变过程一直是科研工作者关注和探索的问题, 深入了解蚊虫先天免疫系统如何抵御病毒感染, 病毒如何在蚊虫体内持续稳定增殖, 以及不同蚊虫种类或病毒株如何影响疾病暴发流行等方面内容, 将有助于提高现有策略的有效性, 并提出新的蚊媒控制策略。RNAi 途径作为蚊虫体内主要的抗病毒防御体系, 目前我国科研工作者对蚊虫 RNAi 途径的研究主要集中在相关小 RNA 分子的作用机制, 然而通过基因编辑加强蚊虫 RNAi 抗病毒免疫的相关研究较少, 将转基因蚊广泛有效地应用于蚊媒病防控也是任重道远。

参考文献(References):

- [1] Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 951: 13–24. [DOI]
- [2] Beckham JD, Tyler KL. Arbovirus infections. *Continuum (Minneapolis)*, 2015, 21: 1599–1611. [DOI]
- [3] Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus receptors: diversity, identity, and cell entry. *Front Immunol*, 2018, 9: 2180. [DOI]
- [4] Lim EXY, Lee WS, Madzokere ET, Herrero LJ. Mosquitoes as suitable vectors for alphaviruses. *Viruses*, 2018, 10(2): E84. [DOI]
- [5] Wuerth JD, Weber F. Phleboviruses and the type I interferon response. *Viruses*, 2016, 8(6): 174. [DOI]
- [6] Dash AP, Bhatia R, Sunyoto T, Mourya DT. Emerging and re-emerging arboviral diseases in Southeast Asia. *J Vector Borne Dis*, 2013, 50(2): 77–84. [DOI]
- [7] Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz OG, Honório NA, Kuper H, Carvalho MS. The Zika virus epidemic in Brazil: From discovery to future implications. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(1): 96. [DOI]
- [8] Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, Shi PY, Vasilakis N. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*, 2016, 130: 69–80. [DOI]
- [9] Pang T, Mak TK, Gubler DJ. Prevention and control of dengue-the light at the end of the tunnel. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(3): e79–e87. [DOI]
- [10] Xi ZY, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*, 2008, 4(7): e1000098. [DOI]
- [11] Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(42): 17841–17846. [DOI]
- [12] Liu XM, Yuan ML. Progress in innate immunity-related genes in insects. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(6): 451–466. 刘小民, 袁明龙. 昆虫天然免疫相关基因研究进展. *遗传*, 2018, 40(6): 451–466. [DOI]
- [13] Ding SW, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 2007, 130(3): 413–426. [DOI]
- [14] Nandety RS, Kuo YW, Nouri S, Falk BW. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered*, 2015, 6(1): 8–19. [DOI]
- [15] Lee WS, Webster JA, Madzokere ET, Stephenson EB, Herrero LJ. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1): 165. [DOI]

- [16] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811. [DOI]
- [17] Saleh MC, Tassetto M, van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, Jacquier C, Antoniewski C, Andino R. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 2009, 458(7236): 346–350. [DOI]
- [18] Puglise JM, Estep AS, Becnel JJ. Expression profiles and RNAi silencing of inhibitor of apoptosis transcripts in *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 2016, 53(2): 304–314. [DOI]
- [19] Kang S, Hong YS. RNA interference in infectious tropical diseases. *Korean J Parasitol*, 2008, 46(1): 1–15. [DOI]
- [20] Gandhi NS, Tekade RK, Chougule MB. Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: current progress and advances. *J Control Release*, 2014, 194: 238–256. [DOI]
- [21] Zheng WH, Lin ZQ, Zhuo M, Du HL, Wang XN. Research progress on influenza antiviral small RNAs. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(5): 526–532.
郑维豪, 林志强, 卓敏, 杜红丽, 王小宁. 抗流感病毒小 RNAs 研究进展. *遗传*, 2012, 34(5): 526–532. [DOI]
- [22] Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, Hoffmann JA, Imler JL. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nat Immunol*, 2006, 7(6): 590–597. [DOI]
- [23] Wang XH, Aliyari R, Li WX, Li HW, Kim K, Carthew R, Atkinson P, Ding SW. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*, 2006, 312(5772): 452–454. [DOI]
- [24] Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 2005, 123(4): 607–620. [DOI]
- [25] Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Slicer function of *Drosophila* argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2837–2848. [DOI]
- [26] Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, 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]
- [27] Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AW, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog*, 2009, 5(2): e1000299. [DOI]
- [28] Khoo CC, Piper J, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Franz AW. The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 130. [DOI]
- [29] Basu S, Aryan A, Overcash JM, Samuel GH, Anderson MA, Dahlem TJ, Myles KM, Adelman ZN. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(13): 4038–4043. [DOI]
- [30] Samuel GH, Wiley MR, Badawi A, Adelman ZN, Myles KM. Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(48): 13863–13868. [DOI]
- [31] Keene KM, Foy BD, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(49): 17240–17245. [DOI]
- [32] Brackney DE, Beane JE, Ebel GD. RNAi targeting of West Nile virus in mosquito midguts promotes virus diversification. *PLoS Pathog*, 2009, 5(7): e1000502. [DOI]
- [33] Myles KM, Morazzani EM, Adelman ZN. Origins of alphavirus-derived small RNAs in mosquitoes. *RNA Biol*, 2009, 6(4): 387–391. [DOI]
- [34] Myles KM, Wiley MR, Morazzani EM, Adelman ZN. Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19938–19943. [DOI]
- [35] Schuster S, Zirkel F, Kurth A, van Cleef KWR, Drosten C, van Rij RP, Junglen S. A unique nodavirus with novel features: mosinovirus expresses two subgenomic RNAs, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral RNA interference pathway. *J Virol*, 2014, 88(22): 13447–13459. [DOI]
- [36] Szemiel AM, Failloux AB, Elliott RM. Role of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein in infection of mosquito cells. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(9): e1823. [DOI]
- [37] Kakumani PK, Ponia SS, S RK, Sood V, Chinnappan M, Banerjee AC, Medigeshi GR, Malhotra P, Mukherjee SK, Bhatnagar RK. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *J Virol*, 2013, 87(16): 8870–8883. [DOI]
- [38] Samuel GH, Wiley MR, Badawi A, Adelman ZN, Myles KM. Yellow fever virus capsid protein is a potent

- suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(48): 13863–13868. [DOI]
- [39] Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(7): 421–433. [DOI]
- [40] Pedersen IM, Cheng GF, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, 2007, 449(7164): 919–922. [DOI]
- [41] Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 2004, 117(1): 69–81. [DOI]
- [42] Xia MM, Shen XY, Niu CM, Xia J, Sun HY, Zheng Y. MicroRNA regulates Sertoli cell proliferation and adhesion. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(9): 724–732. 夏蒙蒙, 申雪沂, 牛长敏, 夏静, 孙红亚, 郑英. MicroRNA 参与调控睾丸支持细胞的增殖与粘附功能. *遗传*, 2018, 40(9): 724–732. [DOI]
- [43] Trobaugh DW, Klimstra WB. MicroRNA regulation of RNA virus replication and pathogenesis. *Trends Mol Med*, 2017, 23(1): 80–93. [DOI]
- [44] Hussain M, Torres S, Schnettler E, Funk A, Grundhoff A, Pijlman GP, Khromykh AA, Asgari S. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(5): 2210–2223. [DOI]
- [45] Hussain M, Asgari S. MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(7): 2746–2751. [DOI]
- [46] Campbell CL, Harrison T, Hess AM, Ebel GD. MicroRNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue-2. *Insect Mol Biol*, 2014, 23(1): 132–139. [DOI]
- [47] Slonchak A, Hussain M, Torres S, Asgari S, Khromykh AA. Expression of mosquito microRNA Aae-miR-2940-5p is downregulated in response to West Nile virus infection to restrict viral replication. *J Virol*, 2014, 88(15): 8457–8467. [DOI]
- [48] Su JX, Li CX, Zhang YM, Yan T, Zhu XJ, Zhao MH, Xing D, Dong YD, Guo XX, Zhao TY. Identification of microRNAs expressed in the midgut of *Aedes albopictus* during dengue infection. *Parasit Vectors*, 2017, 10(1): 63. [DOI]
- [49] Su JX, Wang G, Li CX, Xing D, Yan T, Zhu XJ, Liu QM, Wu Q, Guo XX, Zhao TY. Screening for differentially expressed miRNAs in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) exposed to DENV-2 and their effect on replication of DENV-2 in C6/36 cells. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1): 44. [DOI]
- [50] Varjak M, Maringer K, Watson M, Sreenu VB, Fredericks AC, Pondeville E, Donald CL, Sterk J, Kean J, Vazeille M, Failloux AB, Kohl A, Schnettler E. *Aedes aegypti* Piwi4 is a noncanonical PIWI protein involved in antiviral responses. *mSphere*, 2017, 2(3): e00144–17. [DOI]
- [51] Yin H, Lin HF. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 2007, 450(7167): 304–308. [DOI]
- [52] Kirino Y, Mourelatos Z. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(4): 347–348. [DOI]
- [53] Liu QP, An N, Cen S, Li XY. Molecular mechanisms of genetic transposition inhibition by piRNA. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(6): 445–450. 刘启鹏, 安妮, 岑山, 李晓宇. piRNA 抑制基因转座的分子机制. *遗传*, 2018, 40(6): 445–450. [DOI]
- [54] Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(4): 246–258. [DOI]
- [55] Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 128(6): 1089–1103. [DOI]
- [56] Hayashi R, Schnabl J, Handler D, Mohn F, Ameres SL, Brennecke J. Genetic and mechanistic diversity of piRNA 3'-end formation. *Nature*, 2016, 539(7630): 588–592. [DOI]
- [57] Morazzani EM, Wiley MR, Murreddu MG, Adelman ZN, Myles KM. Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathog*, 2012, 8(1): e1002470. [DOI]
- [58] Miesen P, Joosten J, van Rij RP. PIWIs go viral: arbovirus-derived piRNAs in vector mosquitoes. *PLoS Pathog*, 2016, 12(12): e1006017. [DOI]
- [59] Miesen P, Girardi E, van Rij RP. Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in *Aedes aegypti* mosquito cells. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(13): 6545–6556. [DOI]
- [60] Schnettler E, Donald CL, Human S, Watson M, Siu RW, McFarlane M, Fazakerley JK, Kohl A, Fragkoudis R. Knockdown of piRNA pathway proteins results in enhanced Semliki Forest virus production in mosquito cells. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 7): 1680–1689. [DOI]