



• 学术动态 •

水痘-带状疱疹病毒编码 circRNA 的鉴定与表征

摘要 在真核生物中, 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种重要的转录本。该研究证明了水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 感染过程中可产生病毒来源的 circRNA。该研究通过联合二代与三代深度 circRNA 测序, 绘制了高分辨率的细胞和病毒 circRNA 图谱。接着, 在 VZV 感染的细胞以及带状疱疹病人组织样品中, 通过多种实验技术手段进一步验证 VZV 感染可产生大量病毒 circRNA。此外, 该研究发现了许多与 VZV 潜伏相关转录本同源的 circRNA (circVLT_{Slytic})。为了分析这些 circVLT_{Slytic} 的生物学功能, 利用细菌人工染色体系统在基因组 DNA 水平, 对 circVLT 进行突变。结果发现, circVLT 是 VZV 复制的非必需分子, 但 circVLTs_{Slytic} 外显子 5 下游的突变可导致 VZV 对阿昔洛韦敏感性增加。该研究首次证明了 VZV 感染可产生具有生物学功能的病毒来源 circRNA, 这为带状疱疹的防治提供了新的思路。

一、主要研究背景

水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 是一种人类嗜神经疱疹病毒, 属于 α 疱疹病毒亚家族。VZV 感染人类可出现两种症状: 裂解性感染和潜伏再次激活感染。VZV 初次感染人体的症状为躯干、头部或面部出现水泡性瘙痒皮疹, 称为水痘 (varicella), 常见于 10 岁以下儿童。初次感染后, VZV 在背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 和三叉神经节 (trigeminal ganglia, TG) 中终身潜伏。当机体免疫力下降时, 潜伏的 VZV 可重新激活; 大量复制并沿感觉神经纤维向所支配的皮节扩散引起水痘皮疹, 称为带状疱疹。由于这个过程 VZV 破坏其神经元, 导致神经元功能紊乱、异位放电、外周及中枢敏化, 导致带状疱疹病人在出疱疹期间及疱疹愈合后出现神经痛, 称为带状疱疹相关性神经痛。VZV 病毒基因组大小约为 124 kb, 传统认为其大约编码 71 个开放阅读框 (open reading frame, ORFs)。在 VZV 激活阶段 (即裂解性感染, Lytic infection), 71 个 ORFs 均可转录大量病毒 RNA。但在潜伏期间, 几乎所有基因均处于静息状态, 仅在 ORF61 附近表达 VZV 潜伏相关转录本 (VZV latency-associated transcript, VLT)。近年来研究者发现了许多新的 VZV 转录物、转录物异构体和未知的剪接事件, 表明 VZV 的基因转录结构非常复杂。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类通过反向拼接首尾共价闭合环状结构的单链 RNA 分子。与 mRNA 相比, 因 circRNA 具有更加稳定的优势,

已成为继 mRNA 疫苗之后下一代治疗方法的新兴关注焦点。近年的研究发现多种人类病毒可编码病毒衍生的 circRNA, 例如丙型肝炎病毒和默克尔细胞多瘤病毒。然而, 这些病毒 circRNA 的形成机制及生物学功能尚不清楚。前期该团队已率先报道了人巨细胞病毒和冠状病毒 (SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS-CoV) 可产生病毒来源的 circRNA。该研究首次充分证明了 VZV 的感染过程可产生具有重要生物学功能的病毒来源 circRNA。

二、研究结果

1. 宿主环状 RNA 响应 VZV 感染的动态特征

对 VZV 感染神经母胶质瘤细胞样品进行 circRNA-seq。通过两种主流的 circRNA 算法对细胞 circRNA 进行定量。两种算法在每个生物学重复平均鉴定到 1.5~2.2 万个细胞 circRNA, 但随着通过合并相同条件样品测序数据以提高测序深度, 鉴定到的 circRNA 数量可提高 1 倍, 且鉴定到更多的未被 circBank 数据库收录的细胞 circRNA。对细胞 circRNA 进行差异分析, 发现 VZV 感染期间, 大多数细胞 circRNA 的产生不受影响。少数 VZV 相关细胞 circRNAs 的亲本基因与细胞生长调控、染色体分离、纺锤体、GTPase 调节活性、核苷-三磷酸酶调节活性信号通路、轴突导向甲状腺激素信号通路有关。

2. VZV 编码 circRNA 的鉴定与表征

为了绘制高分辨率的 VZV circRNA 图谱, 本文作者采用 BGISEQ 短读测序和 ONT 长读测序两



种平台。结果表明病毒 circRNA 随 VZV 感染时间而增加, 较长的 circRNA 表达水平较低; 大部分 VZV circRNA 为局部近端拼接, 在 ORF9 和 ORF61 附近产生更多的 circRNA。接着, 分别对两种平台的数据进行 circRNA 全长组装。对于短读测序, CIRI-full 重建了 42,563 个人类全长 circRNA 和 71 个全长 VZV circRNA。而长读测序 CIRI-long 鉴定出 1,2407 个人类全长 circRNA 和 1358 个全长 VZV circRNA; 这体现了 ONT 滚环长读序列检测病毒 circRNA 中更高的效率和可靠性。进一步分析发现, 大部分的 VZV 和细胞 circRNA 都含有多个环状外显子; VZV circRNA 平均长度比细胞短; VZV circRNA 无链偏好性。有趣的是, 本文作者发现一类含有多种异构体的 VZV circRNA, 且与 VZV 潜伏期相关转录本 (VLTs) 同源, 将其命名为 circVLT_{Slytic}。

3. VZV 感染细胞中病毒 circRNA 的实验鉴定

为了验证 VZV 编码的 circRNA 是否真实存在, 本文作者精心设计一系列特异靶向 circRNA 的反向引物, 利用 RT-PCR、TA 克隆、Sanger 测序、RNase R 耐受性测试和链式反应原位杂交 (Amp-FISH) 等多项实验技术充分证实 VZV 感染体外细胞可编码 circRNA。更重要的是根据该流程进行了大规模 VZV circRNA 实验验证, 总共鉴定到 200 个 VZV circRNAs。这为病毒 circRNA 算法开发提供了强大的训练数据集。

4. 带状疱疹病人组织和临床毒株中 VZV circRNA 的鉴定

为了进一步确定 VZV circRNA 在体感染过程中是否存在, 共收集了 6 名被诊断为带状疱疹病人的水疱液组织样品, 与此同时还从病人水疱液组织中分离到 VZV 临床株。经过 RT-PCR 和 Sanger 测序证明带状疱疹病人水疱液和临床 VZV 毒株感染中均存在 VZV circRNA, 其中 circVLT_{Slytic} 在以上两种样本中均存在。至此, 该研究证实了 VZV 感染过程中可产生病毒来源的 circRNA。

5. circVLTs 的 DNA 侧翼 5' 剪接供体是 VZV circVLT_{Slytic} 形成的重要顺式元件

当前已有多种 DNA/RNA 病毒被报道可产生病毒 circRNA, 然而目前这些 circRNA 在病毒致病过程是否具有生物学功能尚未确定。分析 circVLT_{Slytic} 在基因组的位置发现, 只有 5 号外显子不与 VZV

经典基因 (ORF 基因) 发生重叠。因此, 该研究利用细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 系统在 pOka 株 (该病毒株已经插入了 GFP 和 luciferase 双荧光报告基因) 基因组 DNA 水平进行 20 个随机碱基替换突变, 并产生 pOka-M1 (5' 剪接供体下游突变) 和 pOka-M2 (5' 剪接供体上游突变) 突变 VZV 株。结合 RNA-seq 和 qPCR 检测, 结果表明 circVLT_{Slytic} 外显子 5 突变轻微抑制了 RNA 转录, 且外显子 5 与外显子 1 有相互作用; DNA 侧翼 5' 剪接供体附近序列对 VZV circVLT_{Slytic} 剪接形成起关键作用, 是 VZV 感染细胞后 circVLT_{Slytic} 生物发生和表达所必需的顺式作用元件。

6. circVLT_{Slytic} 外显子 5 的突变使 VZV 对阿昔洛韦更敏感

通过病毒生长曲线分析和荧光素酶报告基因检测发现 circVLT_{Slytic} 外显子 5 突变不影响 VZV 的生长。有趣的是, 用 IFN- β 、ACV 或 RDT 三种抗病毒药物处理感染细胞给予 VZV 生长压力, 却发现 pOka-M1 对 ACV 的敏感性增加。进一步的补救实验以及体外培养的人类皮肤、DRG 以及人皮肤组织移植小鼠模型的感染均与上述结果一致。这些结果表明, circVLT_{Slytic} 是 VZV 复制的非必需分子, 但其存在有助于 VZV 抵抗抗病毒药物。进一步的研究表明, circVLT_{Slytic} 可能通过调控 VZV 基因的表达, 从而响应抗病毒治疗。

三、总结

circRNA 是转录组中一种新的重要成分, 该研究报道了 VZV 感染的细胞和带状疱疹病人组织中可产生病毒来源的 circRNA。此外, VZV 编码 circVLT_{Slytic} 参与 VZV 抵抗阿昔洛韦的抗病毒作用。该研究扩展了人们对 VZV 转录组成分的认识, 为带状疱疹的临床诊断以及下一代带状疱疹 circRNA 疫苗的开发奠定基础。

(Yang SM, Cao D, Jaijyan DK, et al. Identification and characterization of Varicella Zoster Virus circular RNA in lytic infection. Nat Commun, 2024, 15(1):4932. 深圳大学医学部生物医学工程学院, 医学超声关键技术国家地方联合工程实验室, 广东省生物医学信息检测与超声成像重点实验室; 深圳大学第六附属医院 (南山医院) 疼痛医学重点实验室, 杨少敏 译, 深圳大学第六附属医院 (南山医院) 疼痛医学重点实验室, 肖礼祖 校)