

# 调控基因表达的 miRNA

陈芳 殷勤伟\*

(中国科学院生物物理研究所, 系统生物学研究中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; 中国科学院研究生院, 北京 100049. \* 联系人, E-mail: [jqwyin@sun5.ibp.ac.cn](mailto:jqwyin@sun5.ibp.ac.cn))

**摘要** 近年来, 在小分子 RNA 中发现了一类与调节基因表达密切相关的分子 micro RNA (miRNA). miRNA 由内源性基因编码, 可通过诱导 mRNA 的切割降解, 翻译抑制或者其他形式的调节机制抑制靶基因的表达. 寻找这类调节分子及其靶基因已成为研究的热点. 我们试图回顾 miRNA 的研究历史, 简介 miRNA 分子的检测方法, 介绍 miRNA 在基因组中的位置、miRNA 靶基因的搜寻、miRNA 生物功能的鉴定, 并探讨 miRNA 的作用机制, 最后展望 miRNA 在调控生命体的发生、生长、发育和分化等方面的重要作用. 可以预测, 全部 miRNA 基因功能的鉴定必将给人们对生命体的研究带来新的理念、方法和思路.

**关键词** miRNA RNA 干扰 生物信息学 基因调控

micro RNAs (miRNAs) 是一类长约 22 核苷酸的非编码的单链 RNA 分子, 它们广泛存在于从植物、线虫到人类的细胞中<sup>[1]</sup>. 最早发现的是 *lin-4* 和它的靶 mRNA, 即 *lin-14*<sup>[2]</sup>. 1993 年, Lee 等人<sup>[2]</sup>用经典的定位克隆的方法在线虫 (*C. elegans*) 中克隆了 *lin-4* 基因, 并通过定点突变发现 *lin-4* 并不编码蛋白, 而是产生一种小 RNA 分子. 这种小 RNA 分子能以不完全互补的方式与其靶 mRNA 的 3' 非翻译端的特定区域相互作用来抑制 *lin-14* 的表达, 最终导致 *lin-14* 蛋白质合成的减少, 这种现象叫做转译抑制. 通过转译抑制, *lin-4* 控制着 *C. elegans* 幼虫由 L1 期向 L2 期的转化. 为什么一个只有 22 nt 的 RNA 分子起着如此重要的调节作用? 当时人们无法解释, 只能认为是一种稀少的个别现象. 但是, 2000 年第 2 个 miRNA *let-7*<sup>[3]</sup> 及其人类和果蝇中同源物的发现改变了人们的看法, miRNA 可能是一类进化上保守的、在生命中起着重要调控作用的分子. 它们能有效地抑制相关蛋白质的合成, 导致靶 mRNA 的降解, 或者其他形式的调节机制来抑制靶基因的表达, 产生基因沉默<sup>[4,5]</sup>. 近年来发现 miRNA 可能在基因表达调控领域中起着超乎想象的重要作用, miRNA 序列、结构、丰度和表达方式的多样性, 使其可能作为蛋白质编码 mRNA 的强有力的调节子. miRNA 的发现丰富了人们对蛋白质合成控制的认识, 补充了在 RNA 水平对靶 mRNA 分子进行更迅速和有效的调节, 展现了细胞内基因表达调控全方位多层次的网络系统<sup>[6]</sup>. miRNA 的发现也是对中心法则中 RNA 次要的中介角色的重要补充,

它将促使生物学家重新思考细胞遗传调控及其发育等方面的重要问题.

## 1 miRNA 的产生

迄今为止, 在植物、线虫、果蝇和哺乳动物中已发现了一千多个 miRNA 基因 (表 1). 这些 miRNA 基因首先在细胞核内转录成前体转录本 (pri-miRNA), 并被加工成前体 pre-miRNA, 然后被转运到细胞质被加工成成熟的 miRNA (图 1). Lee 等人<sup>[7]</sup>第一次证明一大类 miRNA 由多聚酶 (Pol ) 转录, 而且一些 miRNA 的转录本 (如 *let-7*) 具有 5' 帽和 3' poly(A) 的结构, Pol 的抑制剂能够抑制 pri-miRNA 的积累, 而 Pol 能与 miRNA 的启动子免疫共沉淀. Rodriguez 等人<sup>[8]</sup>在基因组水平对 miRNA 的转录也进行了分析, 哺乳动物中由内含子编码的 miRNA, 其转录酶应该是 Pol , Rodriguez 等人<sup>[8]</sup>检测的 miRNA 与 90 个蛋白编码基因有关. 但是并不能排除 miRNA 还有其他多聚酶, 寻找与 miRNA 相关的其他聚合酶还有待进一步的研究. Pri-miRNA 在核内被 RNase 核酸酶 Drosha 加工成长约 70 nt 的发夹状的 pre-miRNA<sup>[9]</sup>. 最近的报道指出<sup>[10,11]</sup>, Drosha 和另外的一些成分 (如人类中的 DGCR8 蛋白、果蝇中的 Pasha 蛋白) 构成一个微小 RNA 处理器 (microprocessor) 的复合体, pri-miRNA 在这个 microprocessor 中被加工成 pre-miRNA. 关于在 pri-miRNA 之前 miRNA 基因的转录本是如何加工的, 人们所知甚少. 线虫 miRNA 基因 *let-7* 前体是一个相对较长, 且具有 poly(A) 结构, Bracht 等人<sup>[12]</sup>

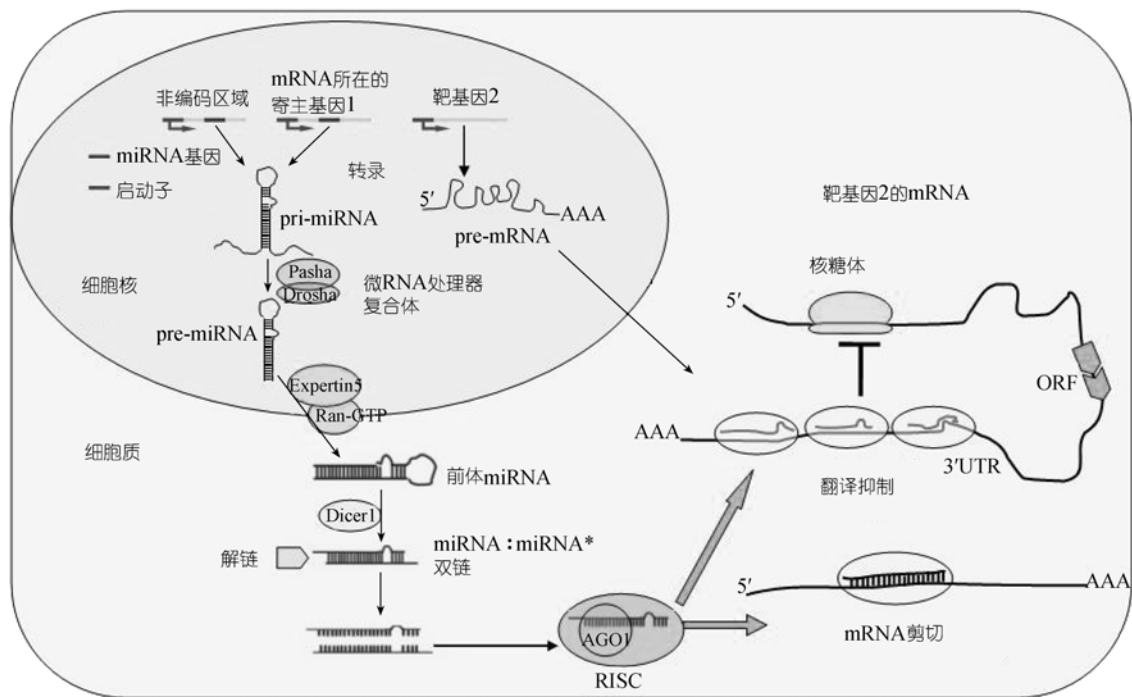


图 1 miRNA 基因的发生和作用机制

表 1 最新的已确认miRNA数量(来自Rfam, 经实验数据证明)<sup>[56]</sup>

| 物种                              | 数量  | 物种                                               | 数量  |
|---------------------------------|-----|--------------------------------------------------|-----|
| 黑腹果蝇( <i>D. melanogaster</i> )  | 78  | 非洲爪蟾( <i>X. laevis</i> )                         | 7   |
| 拟暗果蝇( <i>D. pseudoobscura</i> ) | 73  | 斑马鱼( <i>D. rerio</i> )                           | 33  |
| 冈比亚按蚊( <i>A. gambiae</i> )      | 38  | 拟南芥( <i>A. thaliana</i> )                        | 114 |
| 意蜂( <i>A. mellifera</i> )       | 25  | 栽培稻( <i>O. sativa</i> )                          | 173 |
| 秀丽隐杆线虫( <i>C. elegans</i> )     | 116 | 两色蜀黍( <i>S. bicolor</i> )                        | 64  |
| 桅杆线虫( <i>C. briggsae</i> )      | 79  | 玉蜀黍( <i>Z. mays</i> )                            | 40  |
| 茶花鸡( <i>G. gallus</i> )         | 122 | EB 病毒( <i>Epstein Barr virus</i> )               | 5   |
| 人( <i>H. sapiens</i> )          | 227 | 卡波西肉瘤相关疱疹病毒                                      | 11  |
| 小鼠( <i>M. musculus</i> )        | 230 | ( <i>Kaposi sarcoma-associated herpesvirus</i> ) |     |
| 大鼠( <i>R. norvegicus</i> )      | 191 | 人巨细胞病毒( <i>H. cytomegalovirus</i> )              | 9   |
| 狗( <i>C. familiaris</i> )       | 6   | 鼠 γ 疱疹病毒 68 ( <i>M. gammaherpesvirus 68</i> )    | 9   |

发现*let-7* 转录本经历一个反式剪辑(trans-splicing)的过程, 生成一个叫做SL1RNA(spliced leader1)的中间体. pre-miRNA在Exportin5的帮助下从核进入胞质内<sup>[13~15]</sup>, 这个过程还需要一个G蛋白因子Ran参与<sup>[13]</sup>. 能与exportin5结合的pre-miRNA必须具有大于16 nt配对的茎和3'末端有2个悬垂碱基的结构特点, 末端如果是5'悬垂碱基将会抑制exportin5对它的转运<sup>[15]</sup>. 胞质中pre-miRNA在Dicer酶的作用下, 被切割成双链的miRNA-miRNA\*配对分子, 然后成熟的miRNA分子被解链, 单链的miRNA进入一个核糖蛋白复合

体miRNP(也叫RISC), miRNA通过与靶基因的3'UTR区互补配对, 指导miRNP复合体对靶基因mRNA进行切割或者翻译抑制<sup>[16~18]</sup>.

2 寻找 miRNA 基因

2.1 克隆方法寻找 miRNA 基因

2001 年 miRNA 研究开始飞速发展. Lagos-Quintana等人<sup>[19]</sup>设计出一种专门克隆小片段RNA的方法(图1(a)), 在2 h的果蝇胚胎的裂解液里和Hela细胞的总RNA中克隆了37个新的miRNA基因. Lau等人

[20]用稍微改进的克隆方法在线虫中找到了 55 个 miRNA 基因。Lee 等人 [21] 运用生物信息学和 cDNA 文库相结合的方法找到了 13 个 miRNA。随后掀起了寻找 miRNA 基因的热潮。Lagos-Quintana 等人 [20,23] 继续他们寻找 miRNA 基因的工作, 2002 年和 2003 年用同样的方法分别在小鼠和人特异组织中克隆了 34 和 31 个新的 miRNA, 并提出由于在克隆中已知的 miRNA 重复出现和 rRNA 的干扰, 用同样的克隆方法找到新的 miRNA 会越来越难, 这与后来 Lim 等人 [24,25] 用 MiRscan 计算机程序估计人类中只剩下 40 个未知 miRNA 基因的结论一致。近来, 寻找 miRNA 的方法越来越成熟, Ambros 等人 [26] 对克隆寻找 miRNA 的方法进行了总结。

继而, 人们将寻找 miRNA 基因的目光转向特异的组织和发育的特异阶段 [27~31]。Mourelatos 等人 [32] 用小片段克隆的方法在 HeLa 细胞中克隆了 31 个 miRNA, Houbavity 等人 [29] 在小鼠 ES 细胞中克隆了 15 个 miRNA, Dostie 等人 [28] 和 Kim 等人 [30] 在哺乳动物神经细胞中分别找到了 53 和 40 个 miRNA, Ambros 等人 [33] 在线虫中又找到 21 个 miRNA, Aravin 等人 [27] 在果蝇的不同发育阶段找到了 63 个 miRNA, Wang 等人 [34] 人在籼稻中找到了 20 个 miRNA 基因。Pfeffer 等人 [35] 在 EB 病毒的基因组中, 找到 5 个编码 miRNA 的基因, 这为 miRNA 基因家族添加了病毒中的成员。最近研究人员又在另 3 种病毒中找到了 29 个病毒 miRNA [36]。Suh 等人 [37] 在人胚胎干细胞中找到了 36 个 miRNA 基因, 这些 miRNA 随着胚胎的发育表达量逐渐减少。Seitz 等人 [38] 在人的 14q32 区域找到 46 个 miRNA 基因, 发现它们多数在人的胚胎中表达, 只由母性染色体表达, 并且受到上游 200 kb 处的一个甲基化区域 (IG-DMR) 调节。Kasashima 等人 [39] 运用克隆的方法检测了 TPA 诱导人白血病细胞 HL-60 分化前后 miRNA 表达谱的变化, 找到了 3 个新的 miRNA, 并发现不同 miRNA 在分化前后表达量不同。现在科学家们已在不同的种属中克隆了大量的新 miRNA 基因。

## 2.2 检测 miRNA 表达的方法

检测 miRNA 最常用和直接的方法是 Northern 杂交, 除此之外, 还有 RT-PCR, 液相杂交和基因芯片技术等。Lee 等人 [7] 通过 Droscha-siRNA 下调 Droscha, 抑制 pri-miRNA 的加工, 再用 RT-PCR 的方法检测 miRNA 的表达。Sempere 等人 [40] 通过 Northern 杂交的方法对已知的 119 个 miRNA 基因的表达做了检测, 发现有一

些是在特异的组织表达, 有一些只是在不同组织的表达量不一样, 而在脑组织表达的 miRNA 的作用方式表明这些 miRNA 与脑神经元的分化相关。Allawi 等人 [41] 将荧光方法引入 miRNA 的研究中, 设计出一种新的方法叫“Modified Invader”分析, 可快速而灵敏地分析 miRNA, 能从 50~100 ng 总 RNA 或者是 1000 个细胞的裂解液中检测到目的 miRNA。

miRNA 基因芯片技术是一种更理想的快速有效的检测 miRNA 表达图谱的方法。这一方法被 Liu 等人 [42] 首次报道用来检测 miRNA 在不同肿瘤细胞中的表达图谱, 245 个哺乳动物的 miRNA 被检测了, 结果的重复性很好, 而且被 Northern 杂交、RT-PCR 所证实。之后, Esau 等人 [43] 运用 miRNA 芯片技术, 检测细胞内的 miRNA 表达图谱, 并且找到了 miR-143 和它的靶基因。Calin 等人 [44] 通过 miRNA 芯片技术, 比较了哺乳动物中 B 细胞淋巴瘤和正常细胞中 miRNA 的表达图谱, 为 miRNA 在肿瘤临床应用中, 提出了新的思路。Miska 等人 [45] 运用 miRNA 芯片检测了小鼠脑发育中 138 个 miRNA 基因的表达图谱。在芯片的基础上, Nelson 等人 [46] 发展出一种叫做 RAKE (RNA-primed, array-based Klenow enzyme assay) 的方法能够在特定的细胞和肿瘤中同时检测所有的 miRNA 的表达图谱。

原位杂交技术 [47,48] 用来检测 miRNA, 更直观的展示出 miRNA 的表达方式, 是了解 miRNA 的时空表达谱更方便的方法。Johnson 等人 [49] 通过在 *let-7* 启动子后加 GFP 基因来跟踪检测线虫中 *let-7* 的时空表达。Mansfield 等人 [50] 根据 miRNA 的作用机制设计出一种带 Laz 报告基因的检测方法, 被叫做“miRNA sensor”, 能特异的从原位检测到 miRNA 的表达。

## 2.3 计算机软件预测 miRNA 基因

miRNA 是由一个约 70 nt 的茎环结构前体而来, 并且在进化上是保守的, 因此可用计算机的方法来识别。

MiRscan [24,25] 是一个能特异的识别 2 个物种间的同源序列的程序。Lim 等人 [25] 用它在 *C. elegans* 和 *C. briggsae* 中寻找同源的发卡结构, 通过已知 miRNA 的训练后, 它去给那些发卡结构片段打分, 以预测线虫中的 miRNA。Lim 等人 [24] 用同样的方法, 在脊椎动物里寻找 miRNA 基因, 并预测出人的 miRNA 基因数在 200~255 之间, 这个数字大约是人类基因组的 1%。2004 年, MiRscan 程序又被用来检测了线虫中 miRNA 基因上下游序列的同源性 [51], 和内含子中产生

miRNA的寄主基因的同源性(host gene), 并且找到了一个非常一致的序列模块, 运用这个不断改进的MiRscan, 又在线虫中发现了9个miRNA, 并被PCR实验所证实<sup>[51]</sup>.

MiRseeker<sup>[52]</sup>是根据miRNA的3个特点开发出来的: ( ) miRNA的保守性, 需要形成一个70~100 nt的前体; ( ) 在相似的物种中, miRNA是很保守的; ( ) 在相距较远的物种间, miRNA是有一定的分歧的. 它包括以下3个步骤: ( ) 通过AVID寻找果蝇中基因间的保守的序列; ( ) 通过mfold辨认此序列是否能形成保守的茎环结构, 并给这个结构打分评价; ( ) 评价miRNA在不同物种中的分歧模式. 最后, miRseeker也需要通过生物化学的方法, 加以验证.

Legendre等人<sup>[53]</sup>用“ERPIN”代替“blast”从基因组中搜寻与已知miRNA类似的miRNA基因, 输入已知miRNA软件可以根据已知miRNA的结构从基因组中搜寻到结构类似的候选miRNA基因.

除了专门用于寻找miRNA基因的程序和软件外, 象mfold和Srnaloop是RNA折叠中常用的软件. Hofacher等人<sup>[54]</sup>报道在维也纳RNA网站(<http://rna.tbi.univie.ac.at/>)提供了一个界面能够调用多个常用的RNA二级结构预测软件.

## 2.4 miRNA的命名及Rfam数据库

miRNA种类越来越多, 而且在研究中发现, 很多miRNA是同源的, 为了防止miRNA的混淆, 最初的研究者就给发现的miRNA作了命名规则<sup>[19]</sup>:

( ) miRNA 简写成 miR-No., 它的基因简写成 mir-No.;

( ) 高度同源的 miRNA 在 No.其后加英文字母(小写, 一般从a开始);

( ) 多基因拷贝的再在后面加 -No. (如 miR-2a-1).

之后人们又对命名规则作了补充<sup>[55,56]</sup>. 不同物种中同源的miRNA最好用同一个名字; 如果一个前体的2个臂分别产生1个miRNA, 则根据克隆实验, 看看哪个是主要的成熟产物, 次要的在后面加“\*”号, 如miR-56 和miR-56\*(\*表示量少的); 如果不能区分表达量的多少, 可以如下表达, 如: miR-142-5p(表示在5'端的臂, 以前有人用miR-142-s)和miR-142-3p(表示3'端的臂, 以前有人用miR-142-as). 在Rfam数据库中, 在每个miRNA名称前加上了物种的名称, 如: hsa-miR-138. 植物中miRNA的基因用斜体表示, 如*MIR156*.

为了更好地管理 miRNA, 方便人们查询, 研究者们建立了 miRNA 的数据库 <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>. 现在这个数据库已经更新到了6.0版本(2005年4月), 共有1650个miRNA(表1). Rfam 只有在文章发表后才给新发现的 miRNA 一个确定的名字, 在发表前作者可以用一个临时的名字命名送审.

## 3 miRNA的靶基因

虽然现在已经找到了过千个miRNA, 并提出它们在细胞增殖、分化、代谢与死亡中发挥着重要的调节作用, 但是至今为止, 真正确认功能的miRNA还是微乎其微<sup>[1,57,58]</sup>. 从1993年发现第1个miRNA到现在, 在动物中发现的确认功能的miRNA不超过10个<sup>[59-67]</sup>(表2).

### 3.1 基因筛选和定位克隆寻找 miRNA 靶基因

通观科学家们寻找 miRNA 及其靶基因的方法发现, 现在已知靶基因的 miRNA 多是通过传统的基因

表2 已知功能的 miRNA 基因

| miRNA         | 物种   | 靶基因                           | 生物学作用          | 文献       |
|---------------|------|-------------------------------|----------------|----------|
| <i>Lin-4</i>  | 线虫   | <i>Lin-14</i> 和 <i>lin-28</i> | 时序发育           | [2]      |
| <i>Let-7</i>  | 线虫   | <i>Lin-41</i> 和 <i>hbl-1</i>  | 时序发育           | [3]      |
| <i>lsy-6</i>  | 线虫   | <i>Cog-1</i> 转录因子             | 调节化学感受器的左右不对称性 | [61]     |
| miR-273       | 线虫   | <i>die-1</i> 转录因子             | 调节化学感受器的左右不对称性 | [64]     |
| <i>Bantam</i> | 果蝇   | <i>Hid</i> 前凋亡基因              | 发育中调节细胞增殖与凋亡   | [59, 60] |
| miR-14        | 果蝇   | 未知                            | 凋亡和脂类代谢        | [63]     |
| miR-181       | 哺乳动物 | 未知                            | 造血系统的分化        | [62]     |
| miR-196       | 哺乳动物 | <i>HOXB8</i>                  | 脊椎动物发育         | [50, 65] |
| miR-143       | 哺乳动物 | <i>ERK5</i>                   | 脂肪细胞的分化        | [43]     |
| miR-375       | 哺乳动物 | <i>Mtpn</i>                   | 胰岛素分泌的调节       | [66]     |
| miR-430       | 斑马鱼  | 待定                            | 脑的形态发生         | [67]     |

筛选(gene screen)和定位克隆的方法发现的<sup>[2,3,59~61]</sup>(图 2). Brennecke等人<sup>[59,60]</sup>发现**bantam**基因及其靶基因**hid**, 包括典型的如下几个过程: ( ) **Bantam**基因表达miRNA的证据: (1) 通过插入突变, 找到**bantam**这个位点, 能够促进组织过度生长; (2) **bantam**缺陷的个体, 具有生长缺陷或者是蛹化期致死; (3) 在 2 个物种间比对(在*Drosophila*与*Anopheles*用Clustal W程序比对), 发现一个约 90 nt的区域非常相似, 有 30/31 nt是相同的, 再用mfold进行预测发现 2 个物种内的这段区域能形成相似的稳定的发卡结构; (4) 用这 31nt作探针, 通过Northern 杂交在野生和Gal4 诱导表达的L3 期中找到这个 21 nt RNA和它的更大的前体. ( ) 证明**hid**是**bantam**的靶基因的过程: (1) 用计算机预测的方法找到前凋亡基因**hid**的 3' UTR区, 有 3 个能与**bantam**作用的靶点, 而且直接观察发现还有 2 个靶点; (2) 对比这些 3' UTR区在 2 个物种的同源性(*D. pseudoobscura*与*D. melanogaster*), 发现它们高度同源; (3) 表达报告基因tubulin-EGFP, 在它的末尾连上**hid**的 3' UTR区的靶点, 同时转入EP表达的**bantam**, 发现GFP荧光明显下降, 而且 5 个靶

点同时存在的效果要比单个的好; (4) 同时表达**bantam**和**hid**, 通过原位杂交, 能检测内源表达的**hid**也能被**bantam**抑制. 根据一个miRNA可能调节多个靶基因的观点<sup>[1]</sup>, 发现**bantam**能够促进细胞的增殖, 很可能**bantam**还具有一个细胞增殖负调控的靶基因.

Chen等人<sup>[62]</sup>的方法略有不同. 他们先用miRNA的cDNA克隆的方法在鼠骨髓中克隆了 100 多个miRNA, 并且特别的研究了其中 3 个的功能. 结果发现在造血干细胞中异位表达miR-181 能够促进造血干细胞的定向分化, 但是没有找到它的靶基因. Xu等人<sup>[63]</sup>通过P插入元件找到突变子, 发现具有死亡抑制的功能, 并证明编码miR-14. 通过功能缺失和异位表达的方法, 证明miR-14 有着抑制reaper导致的细胞死亡和参与脂肪代谢的功能. 实验提出miR-14 可能的靶点是Drice, 但没有直接的证据证明.

### 3.2 计算机程序对靶基因的预测

从已有的资料看来, 传统的方法寻找 miRNA 的靶基因比较艰难, 由于目标不明确, 效率较低. 研究人员想到用生物信息学的方法来取代大量的分子克隆的工作, 并且获得很好的目的性.

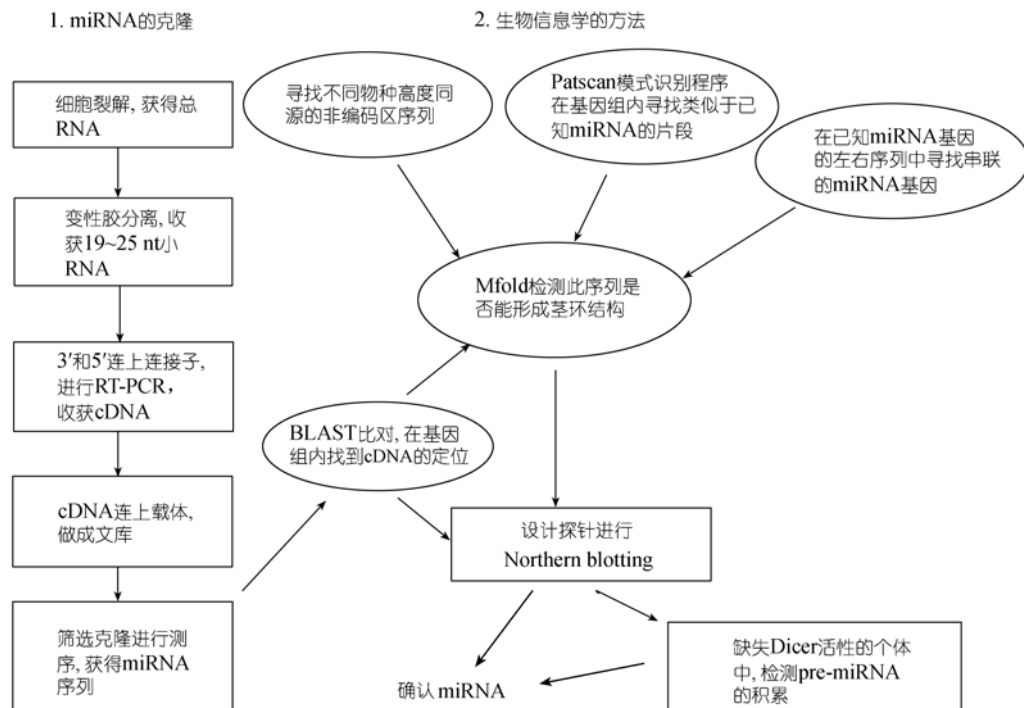


图 2 cDNA 克隆与生物信息学相结合的方法寻找 miRNA 基因

方形框为分子生物学方法, 椭圆形框为生物信息学方法; 每条路线都可以确定一个 miRNA

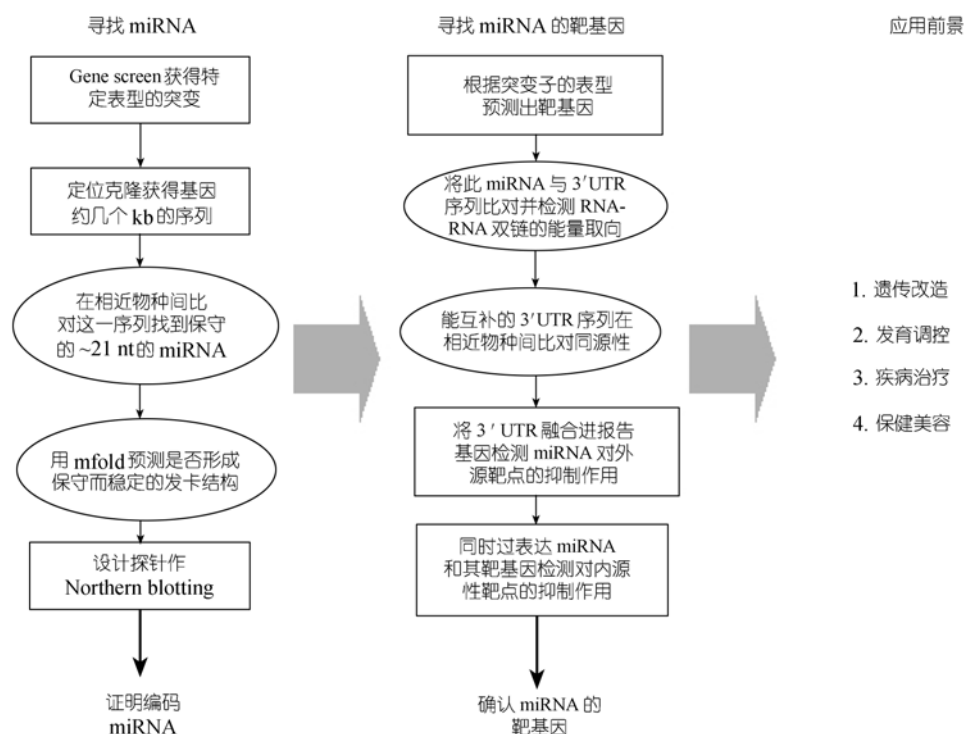


图3 miRNA 功能解析

方形框为分子生物学方法, 椭圆形框为生物信息学方法

Stark等人<sup>[68]</sup>的方法是首先构建一个在*D. melanogaster*和*D. pseudoobscura*中保守的3' UTR数据库, 能覆盖*D. melanogaster*三分之二的基因。用HMMer比对程序, 找到能与miRNA前8个碱基配对的3' UTR靶序列; 然后再用mfold对整个miRNA-mRNA靶序列进行动力学检测, 并给出 $\Delta G$ 值; 最后计算Z值, 取 $Z \geq 3$ 作为筛选靶序列的阈值。通过这一程序成功的在数据库里找到5个已知的miRNA和它们的靶基因, 同时预测出3个新的miRNA和它们的靶基因: miR-7和Notch, miR-2和前凋亡基因、miR-277和代谢酶类(但随后的生物学实验证据并不强)。结果可在<http://www.russell.embl.de/miRNAs>查询。

Enright等人<sup>[69]</sup>开发出一种计算机预测的方法: 先从*D. melanogaster*和*D. pseudoobscura*中通过blastn和AVID比对构建出3' UTR序列库; 然后用MiRanda算法评价, MiRanda是一个类似于Smith-Whatman的算法, 但它是用来检测互补配对的(其中允许G-U配对), 此外这一算法还加入了RNA二级结构预测的程序(来源于RNAlib), 能够从动力学角度预测miRNA-靶mRNA的稳定性; 再将前面的结果在3种

生物中检验保守性(*D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*和*A. gambiae*), 最后给出S值和 $\Delta G$ 值。这个方法考虑了以下几个特点: ( ) 局部位置的互补比对; ( ) RNA-RNA双链自由能的预测; ( ) 靶位点的保守性。结果显示, 靶基因多是发育阶段特异表达的、与细胞分化、形态、发育协调相关的基因, 而且有很多是转录因子。其中, 作者提出3' UTR调节很类似于转录中的5' promoter的调节, 这说明在这2个机制之间可能有一定的联系。结果可在<http://www.microrna.org>查询。

Lewis等人<sup>[70]</sup>开发了一个计算机预测的方法——TargetScan法, 用来预测哺乳动物内miRNA的靶基因。这一方法基于2点考虑: ( ) 考虑miRNA-mRNA(靶向基因mRNA片段)双链结构的稳定性; ( ) 检测这些靶向基因mRNA的3' UTR区在不同物种间的保守性。此搜索方法重点强调了miRNA的第2~8个碱基, 将这段序列作为搜索的“种子序列”, 必须严格配对; 然后用RNAfold程序向两边延展寻找配对的序列; 通过RNAeval给出自由能G值; 最后给出Z值和R值, Z值越大, R值越小, 靶向的可能性就越大。通

过对在人、小鼠、大鼠中保守的miRNA的搜索,找到了 451 个可能的miRNA靶向序列;通过对人、小鼠、大鼠、河豚 4 种动物中保守的miRNA搜索,找到了 115 个可能的靶向序列. 结果可在网上查询 <http://genes.mit.edu/targetscan>.

Kiriakidou 等人 [71] 开发一个“DIANA-microT”的程序,通过计算机的方法来预测哺乳动物中miRNA的靶基因. Rehmsmeier 等人 [72] 开发了一个“RNA-hybrid”的程序,来预测果蝇的miRNA的靶基因,他们的信息公布在互联网上(<http://bibiserv.tech-fak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>). PicTar是由 Krek 等人 [73] 开发的预测miRNA靶基因的软件,他们搜索了 8 个脊椎动物物种的基因组和现有的miRNA,它对靶基因预测具有较高的准确性.

John 等人 [74] 运用miRanda软件预测了 218 个哺乳动物的miRNA基因的靶基因,发现有 2000 个的哺乳动物的基因有着保守的 3' UTR靶点,这些蛋白多数涉及转录因子、miRNA机制本身相关的蛋白、泛素机制相关的蛋白,这些可能的靶蛋白说明miRNA的作用构建了一个反馈调控网络,并且根据他们的预测,占基因组数量 1%的miRNA基因可能调控着 10% 的基因组蛋白. 预测软件在互联网上 (<http://www.microrna.org>).

综合人们用计算机的方法预测 miRNA 的工作,发现各种计算方法都具有如下的特点: ( ) miRNA 及其靶向序列的保守性; ( ) miRNA 靶 mRNA 配对中 5'端非常重要,其他位置允许 G U 配对; ( )

miRNA 与靶向基因可能是一对多的关系. 通过计算机预测出的 miRNA 靶基因,如表 3 所示.

4 miRNA 的作用机制及功能

4.1 miRNA 的作用机制

miRNA 转录前体 (Pri-miRNA) 首先在核内被 Rnase 核酸酶 Drosha加工成约 70 个核苷酸长的发夹状的RNA,在Exportin5 的帮助下从核内进入胞质内,然后在Dicer酶的作用下,单链的miRNA进入一个核糖蛋白复合体miRNP, David [1] 将其与RISC等同. miRNA通过与靶基因的 3' UTR区互补配对,指导miRNP复合体对靶基因mRNA进行切割或者翻译抑制 [18-20]. MiRNA到底是抑制还是切割取决于miRNA与靶序列互补配对的程度,互补配对高的可能进行切割,而配对低的就是抑制. 植物的miRNA与靶基因配对程度高多数是进行切割,而动物中miRNA与靶序列的配对性不好,多数进行翻译抑制.

线虫中, *lin-4* RNA并不降低*lin-14* 和*lin-28* 的 mRNA水平,但能降低它们的蛋白水平 [2]. *Let-7* 也通过与*lin-41* 的 3' UTR区配对,来抑制mRNA的表达,并不进行切割 [3]. 现在普遍认为,细胞中的miRNA能与靶基因mRNA的 3' UTR部分配对,指导miRNP对其翻译的抑制. 这与现在所知的真核基因的翻译调控主要是在 3' UTR区域的思想一致 [75]. 最近 Xie 等人 [76] 在人、小鼠、大鼠和狗的基因组比对分析指出,在 3' UTR区域存在大量的调节结构域,而近一半的这些调节结构域与miRNA的调节有关. 其中 miRNA的 5'端的 2~8 个核苷酸对于miRNA与 3' UTR

表 3 预测的 miRNA 及其可能的靶基因

| miRNA          | 物种 | 靶基因                                                       | 生物学功能                     | 文献   |
|----------------|----|-----------------------------------------------------------|---------------------------|------|
| <i>miR-7</i>   | 果蝇 | <i>HLHm3</i> , <i>hairy</i> 类的 HLH 转录因子, <i>m4 Brd</i> 家族 | Notch 介导的神经分化             | [68] |
| <i>miR-14</i>  | 果蝇 | <i>grim</i> , <i>reaper</i> , <i>sickle</i>               | 促凋亡                       | [68] |
| <i>MiR-1</i>   | 人类 | <i>BDNF</i><br><i>G6PD</i>                                | 生长因子神经发育<br>抗氧化性          | [70] |
| <i>MiR-19a</i> | 人类 | <i>PTEN</i>                                               | 肿瘤抑制基因                    | [70] |
| <i>MiR-23a</i> | 人类 | <i>SDF-1</i><br><i>BRN-3b</i> POU-domain 转录因子             | 造血前体细胞的生长和定位<br>神经发育      | [70] |
| <i>MiR-26a</i> | 人类 | <i>SMAD-1</i>                                             | TGF- $\beta$ 通路           | [70] |
| <i>MiR-34</i>  | 人类 | <i>Delta-1</i> 跨膜蛋白<br>Delta 的 <i>Notch 1</i> 跨膜受体        | 激活 Notch<br>在分化中决定细胞的命运   | [70] |
| <i>MiR-101</i> | 人类 | <i>ENX-1</i> polycomb 基因<br><i>N-MYC</i> 类的 HLH 转录因子      | 造血细胞的增殖<br>前癌基因, 细胞的分化和增殖 | [70] |
| <i>MiR-130</i> | 人类 | <i>MCSF</i>                                               | 单核吞噬细胞的调节                 | [70] |

的配对非常重要。首先, miRNA的 2~8 个核苷酸能很好的与靶序列配对<sup>[77]</sup>; 其次, 靶序列在不同物种中通常保守<sup>[68]</sup>; 再次, miRNA的 2~8 碱基在同源的 miRNA中保守<sup>[70]</sup>。因此, 人们用此来预测miRNA的靶基因。miRNA抑制mRNA的翻译机制至今为止是个谜<sup>[1]</sup>。David<sup>[1]</sup>提出 2 种可能性: ( ) 在mRNA起始翻译后, miRNA通过与 3' UTR作用抑制翻译的进行, 这样可能可以通过检测mRNA上的核糖体的密度而加以证实; ( ) mRNA的翻译并不被阻止, 但是翻译的多肽不断的被miRNP复合体, 或者再结合别的蛋白复合体切割, 当然这需要肽酶参与。这些机制的研究可以和 siRNA 的作用结合起来, 近来关于 Argonaute蛋白PAZ结构域晶体结构的测定揭示了 RISC与RNA结合的作用机制<sup>[78-80]</sup>。当然miRNA抑制机制的揭示有待于miRNA领域的深入研究。

## 4.2 miRNA 的功能

miRNA是一种广泛存在的对基因表达进行微调的分子。在人类基因组中miRNA基因占据大约 1%的数量, 虽然在不同的时空发育阶段, 它们的表达量不同, 但是多种miRNA在同一个细胞中的表达使得细胞处在一种内在的miRNA环境中, 这个环境控制着成千上万的编码基因的mRNA水平, 使得各种蛋白的表达处在一个适合的水平。Bartel等人<sup>[57]</sup>将这些miRNA比作微型电阻, 根据miRNA与靶基因互补的程度, 执行从切割(100%抑制)到微弱抑制的不同的抑制作用。象*lin-4* 作用于*lin14*和*lin28*; *let-7* 作用于*lin41*和*hbl-1*, 起着明显的表型改变, 是在miRNA家族中为数较少的, 更多的则是起着微调的作用。像miR-7 和miR-14 有着多个靶基因, 它们从一个整体上起着介导某一功能的作用。由于有多个靶点, 有些miRNA会有大量的表达, 比如miR-2 在一个细胞内有约 50000 个拷贝, 这远多于普通mRNA的表达量。通过芯片技术 Lee等人<sup>[81]</sup>研究了通过导入某些miRNA能够导致上百个基因mRNA水平的下调, 虽然并不能完全肯定所有的这些下调基因是由miRNA直接导致, 但这给出了直接证据证明一个miRNA可以调控多个靶基因。另一些则是多个miRNA作用于一个靶基因上, 而最近开发的同时检测所有miRNA的表达图谱的技术<sup>[46]</sup>, 使研究者能更方便地从整体上掌握特定的时空阶段miRNA产生的生物学效应。miRNA这种转录后微调的优点有如下几点:

( ) 比从蛋白水平的调节更节省能量;

( ) 相对于转录调节, miRNA 的效果更快而且是可逆的;

( ) 对于一些只需微量蛋白改变的现象, 只有通过 miRNA 来达到。比如对某种蛋白来说, 1~2 个 mRNA 拷贝就足以过量表达, 这时就需要 miRNA 来调节控制蛋白的水平;

( ) 内含子中编码的 miRNA 是一种细胞内资源的高效利用。

就像前面提到的一样, miRNA主要通过抑制它的靶基因来起调控作用, 至今为止没有发现有上调能力的miRNA。从表2和表3可以看出, miRNA的作用遍及生命体的发生、生长、发育、分化和死亡的过程。Lewis等人<sup>[70]</sup>的预测结果发现, 预测的miRNA的靶基因多数是参与转录、信号转导、肿瘤发生的基因。虽然miRNA的作用也是特异的, 特别是 5'端的 2~8 个碱基, 特异性的靶向与它的靶基因, 但是与 siRNA 不同的是 miRNA的特异性并不是那么强, 在生物体内往往一个 miRNA作用于多个靶基因, 如*lin-4* 作用于*lin14* 和*lin28*<sup>[2]</sup>, *let-7* 作用于*lin41* 和*Hbl-1*<sup>[3]</sup>(表2), 这就是人们提出的“多个靶点”的假说。人们也提出可能多个 miRNA调控一个靶基因<sup>[3,82]</sup>。因此, miRNA的调控作用很可能是一种调控网络, 它需要接受某些信号的刺激, 从整体上调控有机体的生命活动。

miRNA的研究现在还处在理论水平上, 讨论关于miRNA的应用还为时过早, 但miRNA作为体内正常表达的基因, 是否与人类疾病<sup>[83]</sup>和植物培育相关, 还有待进一步的研究。以miRNA为靶点或者以miRNA为治疗手段的设想<sup>[83]</sup>, 以后可能会成为焦点。而Calin等人<sup>[44]</sup>报道的miRNA基因芯片技术也很可能成为肿瘤诊断的工具。Suh等人<sup>[37]</sup>报道, 在人胚胎干细胞中表达的miRNA与其他细胞类型的miRNA有很大的不同, miRNA作为人器官定向分化的调节子, 为以后人器官体外培植带来促进作用。miRNA作用和功能的揭示必定给miRNA的应用带来广阔前景。

## 5 展望

自从在四膜虫中发现核酶以来, 引起了整个生物学界对RNA及其作用的关注, 也让人们就生命起源的问题争论了十几年。在人们对生命由RNA起源的争论降温的时候, 1998 年, Fire等人报道在线虫中发现了RNAi的现象, 重新又将人们的视线转到RNA上来。RNAi是一个强大而特异的基因沉默机制, 可成为研究基因功能<sup>[84]</sup>和疾病治疗<sup>[85]</sup>的有用工具, 这

是生物研究领域里的一个突破性研究成果。miRNA 研究的飞速发展也得益与 RNAi 的发现。但与此不同的是, miRNA 是生物体内源的小 RNA 分子, 研究表明它们在生物体内不仅仅是代谢的产物, 而是机体有目的编码的重要的调控分子。它们参与生物体的生长、发育、衰老、死亡的调控。随着研究的深入, miRNA 将在生命起源和物种进化、基因表达调控的复杂性、疾病发生和发展的机制等方面起到更为深远的作用。同时, miRNA 的研究亦将为 RNAi 技术的应用提供新的依据、思路 and 空间。现在, 欧美等发达国家已将有关 miRNA 的研究广泛而深入地运用到组织器官的定向发育、细胞生长分化的时空调节、信号通路的开启和关闭、细胞周期的监测与调控、学习与记忆、肿瘤的逆分化、肥胖、衰老和死亡, 疾病的防治以及有目的的基因表达调控上。

寻找调控的 miRNA 基因以及 miRNA 的靶基因, 揭示 miRNA 具体的作用机制是非常重要的。就目前的研究来看, 虽然在各个物种中发现的 miRNA 数量不少, 但是能给出直接证据证明 miRNA 的靶基因及其功能的 miRNA 很少, 而且多数是通过筛选突变子获得的, 这说明现在寻找 miRNA 基因的研究与它功能的研究是脱节的, 也证明人们通过现有方法得出的 miRNA 的一些观点可能存在问题(如人类 miRNA 上限为 255 个的报道)。现在摆在科学家们面前的两大问题就是: 在各种生物中找齐这些 miRNA 和找到它们的靶基因并揭示它们的功能, 这也可以说是后基因组时代需要解决的问题之一。当然结合 RNAi 和生物信息学的方法会使 miRNA 功能的研究更简便, 而且有可能开辟一条共同的研究路线, 逐一找到 miRNA 的靶基因并揭示它们的功能。由于 miRNA 基因对于生物的生长、发育、分化非常重要, 而且具有特异的时空表达的特点, 人们可以设计出 miRNA 的检测芯片, 在不同的生物、不同的发育时期、不同的组织细胞内, 检测 miRNA 的表达图谱, 更精确地掌握生命发展调控的过程。全部 miRNA 基因功能的揭示可能将会给人们对生命现象的理解带来一场新的革命。

## 参 考 文 献

- 1 David P B. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281~297[DOI]
- 2 Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic

- gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843~854[DOI]
- 3 Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403: 901~906[DOI]
- 4 Yin J Q, Wang Y. siRNA-mediated gene regulation system: Now and the future. *Int J Mol Med*, 2002, 10: 355~365
- 5 Tan F L, Yin J Q. Application of RNAi to cancer research and therapy. *Front Biosci*, 2005, 10: 1946~1960
- 6 Yin J Q, Jiang L. MiRNA-directed gene intertalk. *Chin Acad Forum*, 2004, 11(20): 1~4
- 7 Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase . *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051~4060[DOI]
- 8 Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J L, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 2004, 14(10A): 1902~1910[DOI]
- 9 Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425: 415~419[DOI]
- 10 Denli A M, Tops B B J, Plasterk R H A, et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, 2004, 432: 231~235[DOI]
- 11 Gregory R I, Yan K, Amuthan G, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 2004, 432: 235~240[DOI]
- 12 Bracht J, Hunter S, Eachus R, et al. Trans-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. *RNA*, 2004, 10(10): 1586~1594[DOI]
- 13 Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, 303: 95~98[DOI]
- 14 Kim V N. MicroRNA precursors in motion: Exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(4): 156~159[DOI]
- 15 Zeng Y, Cullen B R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(16): 4776~4785[DOI]
- 16 Hutvagner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002, 297: 2056~2060[DOI]
- 17 Zeng Y, Yi R, Cullen B R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9779~9784[DOI]
- 18 Doench J G, Peterson C P, Sharp P A. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, 2003, 17: 438~442 [DOI]
- 19 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294: 853~858[DOI]
- 20 Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294: 858~862[DOI]

- 21 Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294: 862~864[DOI]
- 22 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2002, 12: 735~739[DOI]
- 23 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 2003, 9: 175~179[DOI]
- 24 Lim L P, Glasner M E, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes. *Science*, 2003, 299: 1540[DOI]
- 25 Lim L P, Lau N C, Weinstein E G, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 2003, 17: 991~1008[DOI]
- 26 Ambros V, Lee R C. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. *Methods Mol Biol*, 2004, 265: 131~158
- 27 Aravin A A, Lagos-Quintana M, Yalcin A, et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, 2003, 5: 337~350[DOI]
- 28 Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, 2003, 9: 180~186[DOI]
- 29 Houbaviy H B, Murray M F, Sharp P A. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Dev Cell*, 2003, 5: 351~358[DOI]
- 30 Kim J, Krichevsky A, Grad Y, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 360~365[DOI]
- 31 Michael M Z, O'Connor S M, van Holst Pellekaan N G, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 82~91
- 32 Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 2002, 16: 720~728[DOI]
- 33 Ambros V, Lee R C, Lavanway A, et al. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, 2003, 13: 807~818[DOI]
- 34 Wang J F, Zhou H, Chen Y Q, et al. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. *Nucl Acids Res*, 2004, 32(5): 1688~1695[DOI]
- 35 Pfeffer S, Zavolan M, Grasser F A, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 2004, 304(5671): 734~736[DOI]
- 36 Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2005, 2: 269~276[DOI]
- 37 Suh M R, Lee Y, Kim J Y, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 2004, 270(2): 488~498[DOI]
- 38 Seitz H, Royo H, Bortolin M L, et al. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res*, 2004, 14(9): 1741~1748[DOI]
- 39 Kasashima K, Nakamura Y, Kozu T. Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(2): 403~410[DOI]
- 40 Sempere L F, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, 2004, 5(3): R13[DOI]
- 41 Allawi H T, Dahlberg J E, Olson S, et al. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay. *RNA*, 2004, 10(7): 1153~1161[DOI]
- 42 Liu C G, Calin G A, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9740~9744[DOI]
- 43 Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52361~52365[DOI]
- 44 Calin G A, Liu C G, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11755~11760[DOI]
- 45 Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol*, 2004, 5(9): R68[DOI]
- 46 Nelson P T, Baldwin D A, Searce L M, et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods*, 2004, 1: 155~161[DOI]
- 47 Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 2004, 303: 2022~2025[DOI]
- 48 Juarez M T, Kui J S, Thomas J, et al. MicroRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, 2004, 428(6978): 84~88[DOI]
- 49 Johnson S M, Lin S Y, Slack F J. The time of appearance of the *C. elegans let-7* microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev Biol*, 2003, 259(2): 364~379[DOI]
- 50 Mansfield J H, Harfe B D, Nissen R, et al. MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet*, 2004, 36(10): 1079~83. [DOI]
- 51 Ohler U, Yekta S, Lim L P, et al. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA*, 2004, 10(9): 1309~1322[DOI]
- 52 Lai E C, Tomancak P, Williams R W, et al. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*, 2003, 4: R42, 1~20[DOI]
- 53 Legendre M, Lambert A, Gautheret D. Profile-based detection of microRNA precursors in animal genomes. *Bioinformatics*, 2005, 21(7): 841~845[DOI]
- 54 Hofacker I L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucl Acids*

- Res, 2003, 31: 3429~2431[DOI]
- 55 Ambros V, Bartel B, Bartel D P, et al. A uniform system for microRNA annotation. RNA, 2003, 9: 277~279[DOI]
- 56 Griffiths-Jones S. The microRNA registry. Nucl Acids Res, 2004, 32: D109~D111[DOI]
- 57 Bartel D P, Chen C Z. Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan microRNAs. Nat Rev Genet, 2004, 5(5): 396~400[DOI]
- 58 He L, Hannon G J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet, 2004, 5(7): 522~531[DOI]
- 59 Hipfner D R, Weigmann K, Cohen S M. The bantam gene regulates *Drosophila* growth. Genetics, 2002, 161: 1527~1537
- 60 Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, et al. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. Cell, 2003, 113: 25~36[DOI]
- 61 Johnston R J, Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003, 426: 845~849[DOI]
- 62 Chen C Z, Li L, Lodish H F, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science, 2004, 303: 83~86[DOI]
- 63 Xu P, Vernooys S Y, Guo M, et al. The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. Curr Biol, 2003, 13: 790~795[DOI]
- 64 Chang S, Johnston R J Jr, Frokjaer-Jensen C, et al. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. Nature, 2004, 430(7001): 785~789[DOI]
- 65 Yekta S, Shih I H, Bartel D P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science, 2004, 304(5670): 594~596[DOI]
- 66 Poy M N, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. Nature, 2004, 432: 226~230[DOI]
- 67 Giraldez A J, Cinalli R M, Glasner M E, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in Zebrafish. Science, 2005, 308(5723): 833~838[DOI]
- 68 Stark A, Brennecke J, Russell R B, et al. Identification of *Drosophila* microRNA targets. PLOS Biol, 2003, 1: E60[DOI]
- 69 Enright A J, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in *Drosophila*. Genome Biol, 2003, 5: R1[DOI]
- 70 Lewis B P, Shih I, Jones-Rhoades M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets. Cell, 2003, 115: 787~798[DOI]
- 71 Kiriakidou M, Nelson P T, Kouranov A, et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. Genes Dev, 2004, 18(10): 1165~1178[DOI]
- 72 Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. RNA, 2004, 10(10): 1507~1517[DOI]
- 73 Krek A, Grun D, Poy M N, et al. Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genetics, 2005, 37: 495~500[DOI]
- 74 John B, Enright A J, Aravin A, et al. Human microRNA Targets. Plos Biol, 2004, 2(11): e363[DOI]
- 75 Kuersten S, Goodwin E B. The power of the 3' UTR: Translational control and development. Nat Rev Genet, 2003, 4: 626~663[DOI]
- 76 Xie X, Lu J, Kulbokas E J, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3'UTRs by comparison of several mammals. Nature, 2005, 434: 338~345 [DOI]
- 77 Lai E C. MicroRNAs are complementary to 3' UTR motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. Nat Genet, 2002, 30: 363~364[DOI]
- 78 Lingel A, Simon B, Izaurralde E, et al. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. Nature, 2003, 426: 465~469[DOI]
- 79 Song J J, Liu J, Tolia N H, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. Nat Struct Biol, 2003, 10: 1026~1032[DOI]
- 80 Yan K S, Yan S, Farooq A, et al. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. Nature, 2003, 426: 468~474[DOI]
- 81 Lim L P, Lau N C, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature, 2005, 433: 769~773[DOI]
- 82 Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature, 2004, 431(7006): 350~355[DOI]
- 83 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res, 2004, 64(11): 3753~3756
- 84 徐颖, 朱成钢, 金勇丰, 等. dsRNA对家蚕核多角体病毒(BmNPV)复制的抑制作用. 科学通报, 2004, 49(11): 1073~1078 [摘要] [PDF]
- 85 唐霓, 张秉强, 闫歌, 等. 干扰介导对乙型肝炎病毒复制的抑制作用. 科学通报, 2004, 49(12): 1145~1150[摘要] [PDF]

(2005-04-25 收稿, 2005-06-03 收修改稿)