

非编码 RNA 与动物发育

黄守均, 朱大海*

北京协和医学院基础学院/中国医学科学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

* 联系人, E-mail: dhzhu@pumc.edu.cn

收稿日期: 2008-09-24; 接受日期: 2008-11-28

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB946903)资助项目

摘要 非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)是指不翻译产生蛋白质的 RNA。近年来, 对 ncRNA 在基因表达调控中的功能进行了广泛的研究, ncRNA 在发育、代谢和疾病等生命活动中都起着重要的作用。本文总结了 ncRNA 在胚胎发育、干细胞维持和器官发生等动物发育过程中的作用。

关键词

ncRNA 发育

干细胞

基因印记

非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)是指不翻译产生蛋白质的 RNA。ncRNA 对基因的表达调控是近年来的研究热点。各类 ncRNA 分子参与调节了胚胎发育、干细胞的维持、细胞的增殖分化、器官发生、剂量补偿、表观遗传调控和基因印记等基本的发育生物学事件。遗传学、分子生物学和生物信息学等学科的发展和相应技术方法的应用使人们能更深入地了解 ncRNA 的功能。本文拟从发育的角度, 阐述 ncRNA 在动物发育过程中的作用。

1 ncRNA 的主要分类和特征

ncRNA 按照分子的大小可简单分为小 ncRNA、中等 ncRNA 和大 ncRNA。小 ncRNA 主要包括 21 nt 左右的 microRNA(miRNA)、small interfering RNA (siRNA) 和 24~30 nt 左右的 piwi-interacting RNA (piRNA)。小 ncRNA 主要与 Argonaute 蛋白家族的不同成员结合形成 RNP 复合物, 在转录或转录后水平沉默基因的表达。目前 ncRNA 领域的研究主要集中于小 ncRNA^[1]。50~500 nt 的 ncRNA 分子为中等 ncRNA, 包括 tRNA, small nuclearRNA(snRNA), 核仁小分子 RNA(snoRNA) 和 scRNA 等经典而且研究得较为深入的 ncRNA。中等 ncRNA 往往可按结构归类,

同一类 ncRNA 发挥功能的机制一致, 如 tRNA 主要参与蛋白质合成; snRNA 主要调节 pre-mRNA 的可变剪接; snoRNA 调节 rRNA 的化学修饰; scRNA 调节 mRNA 的编辑和运输等。这些已知的中等 ncRNA 主要执行基本的生命活动功能, 往往广泛地表达于各种组织中。目前还发现许多新的尚不能按其结构或功能归类的中等 ncRNA, 这类 ncRNA 的研究将成为今后几年的主要内容^[2,3]。500 nt 以上的大 ncRNA 广泛存在于各个物种中^[1], 绝大多数由 RNA 聚合酶 转录并经可变剪接而来, 它们同样具有 G 帽子和 poly(A) 尾结构, 这些 ncRNA 被称为 mRNA-like 的 ncRNA。许多此类 ncRNA 具有时空表达特异性, 提示它们在特定的生物学过程中起作用。大 ncRNA 种类极多, 结构各异, 定位独特, 并且发挥功能的机制十分多样。对这类 ncRNA 的认识尚处于起步阶段, 大 ncRNA 的研究将是今后 RNA 组学研究领域里最有吸引力的方向之一^[4]。

2 ncRNA 调节胚胎发育过程

胚胎发育是一个极为复杂的生命活动, 受精卵经过卵裂、囊胚和原肠胚等发育阶段完成动物个体发育的基本布局, 使动物具有基本的三维构架并为后

续的器官发生做准备。胚胎发育涉及到细胞的增殖、迁移和细胞命运的决定；干细胞潜能的维持、局限和细胞分化；体轴形成和器官发生等基本的过程。目前的研究发现，ncRNA 能参与胚胎发育各个过程的调节。本文将分部分介绍 ncRNA 调节的一些经典的发育生物学事件。

miRNA 的前前体(pri-miRNA)转录后经 Dorsha 和 DGCR8 等蛋白组成的复合物剪切加工，形成具有茎环结构的 miRNA 前体 (pre-miRNA) 并运输出核，pre-miRNA 再由 Dicer 加工产生成熟的 miRNA，成熟的 miRNA 与 Argonaute2 结合形成 RISC 复合物，通过碱基互补识别靶 mRNA 分子，并使之降解或抑制其翻译。miRNA 在胚胎发育过程中具有非常重要的作用。lin-4 是第一个发现的 miRNA。lin-4 下调 lin-28 的表达，是秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 从幼虫发育为成虫所必需的^[5]。bantam 是在果蝇胚胎发育时表达的一个 miRNA，bantam 促进细胞的增殖并通过下调 hid 的表达而抑制细胞的凋亡，bantam 本身的时空表达受各种形态发生因子的严格控制^[6]。miR-430 家族在斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 的早期胚胎发育中起着重要作用。受精卵的早期胚胎发育由母源效应因子控制，发育到一定的阶段之后受精卵的基因才开始表达，并清除原有的母源效应因子。Giraldez 等人^[7]使斑马鱼受精卵缺失母源性的 Dicer，该受精卵能正常地完成体轴形成并产生多种分化类型的细胞，但突变胚胎不能完成后续的发育。注射 miR-430 能部分地恢复突变胚胎的脑的发育。miR-430 的靶基因中大多数为母源效应因子。*nanos* 是胚胎前-后轴建立和生殖系细胞发育所必需的基因。*Nanos* 蛋白在完成前-后体轴建立之后需要被清除，而在原始生殖脊细胞中则需要维持 *Nanos* 蛋白的表达。miR-430 对 *nanos* mRNA 的降解导致 *Nanos* 的清除。生殖系细胞也表达 miR-430，但一种生殖系细胞特异表达的 RNA 结合蛋白 Dnd1 能结合到 *nanos* mRNA 的 3-UTR 并阻断 miR-430 的功能^[8,9]。

细胞信号转导在胚胎发育过程中十分重要，各种形态发生素来自于胚胎的不同部位，经信号转导调节胚胎特定部位的发育。NOTCH, TGF-β, EGF 和 SHH 等是发育过程中关键性的信号分子，这些分子所介导的信号通路上的很多基因都具有特定 miRNA 的作用靶点，miRNA 调节这些信号通路的机理及其在

胚胎发育上的意义已经得到了阐明^[10~14]。

3 ncRNA 与 *Hox* 基因的表观遗传调控

Hox 基因在双侧对称动物的发育过程中对于身体特征的决定非常重要。*Hox* 基因非常保守，在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中 *ANT-C* 和 *BX-C* 两个基因簇分别编码 5 个和 3 个 *Hox* 基因。哺乳动物具有 4 个 *Hox* 基因簇，共编码几十个 *Hox* 基因。*Hox* 基因簇前端的基因表达于身体的前端或近端；后端的基因则表达于身体的后端或远端。后端的 *Hox* 基因对前端基因的表达具有抑制作用。果蝇 *BX-C* 基因簇里 *Ubx*, *Abd-A* 和 *Abd-B* 的表达和功能是研究 *Hox* 基因最经典的模型^[15]。在不同物种的 *Hox* 基因簇，发现了许多位于基因间区的 mRNA-like 的 ncRNA 和少数 miRNA。这些 ncRNA 分子通过多种机制参与了 *Hox* 基因的表达调控。

Sanchez-Elsner 等人^[16]研究了果蝇中 mRNA-like 的 ncRNA 调节 *Ubx* 在成虫盘的表达情况。*Ubx* 基因上游 22 kb 左右的一段 DNA 序列 bxd 是 *Ubx* 的表观遗传调节所必需的，Ash1 等 TrX 蛋白结合到 bxd 区域维持 *Ubx* 的表达。而 PcG 蛋白结合 bxd 区域则抑制 *Ubx* 的表达。已知 bxd 区域能产生数条 ncRNA，Ash1 的 SET 结构域又能结合单链 RNA。通过 RNA 干扰技术抑制这几条 ncRNA 的表达能解除 Ash1 和 bxd 区域的相互作用并抑制 *Ubx* 的表达。而异位表达这几条 ncRNA 能使 Ash1 募集到 bxd 区域并激活 *Ubx*。RNase 酶降解实验证明，ncRNA 与 bxd 区域的碱基互补相互作用是 ncRNA 发挥功能所必需的。他们提出模型认为，ncRNA 通过 RNA-DNA 和 RNA-蛋白相互作用把 Ash1 募集到 bxd 区域，从而激活 *Ubx* 的表达。Petruk 等人^[17]观察到，胚胎发育时 bxd 区域产生的 ncRNA 与 *Ubx* 并不表达于同一细胞中，提示 ncRNA 不是促进而是抑制了 *Ubx* 的表达。他们认为 ncRNA 的转录干扰了 TAC1 等表观激活因子募集到 *Ubx* 启动子区域，导致 *Ubx* 被抑制。Lempradl 和 Ringrose^[18] 详细讨论了这两个看似非常矛盾的结果，并指出不同发育阶段，ncRNA 对 *Hox* 基因的调节机制可能不一样。Rinn 等人^[19] 在人的 *Hox* 基因簇里发现了 200 多条 ncRNA，其中一条来自于 *HoxC* 基因簇 反义链的 ncRNA — HOTAIR，能与表观遗传抑制性复合物 PRC2 中的

EZH2(具有 SET 结构域)相互作用, HOTAIR 募集该复合物并特异性地抑制 *HoxD* 基因簇的表达。

miRNA 也参与调节 *Hox* 基因的表达, *Hoxb7* 和 *Hoxb8* 在小鼠的肢体发育过程中非常重要, 这两个 *Hox* 基因在小鼠的前肢而不在后肢表达, miR-196 在后肢直接沉默了 *Hoxb7* 和 *Hoxb8* 的表达。 *Dicer* 敲除的小鼠不能产生成熟的 miR-196, 但能检测到 *Hoxb7* 和 *Hoxb8* 在后肢的表达^[19]。 果蝇 *BX-C* 基因簇里的数个 iab 元件对于调节该区 *Hox* 基因在腹部的表达非常重要, 其中 iab-4 区域的两条链都可以转录, 一条链产生的 miR-iab-4-5p 可以直接调节 *Ubx*, 另一条链产生的 miR-iab-8-5p 可以同时调节 *Ubx* 和 *Abd-A*, 这两个 miRNA 的异位表达可导致果蝇肢体结构发育异常^[20]。 iab-4 区域的转录受表观遗传调控, P_cG 复合物成员编码基因的突变导致 miR-iab-4-5p 的表达谱出现异常^[21]。

4 非编码 RNA 与干细胞生物学

干细胞是动物发育过程中, 既能自我更新, 又能产生终末分化细胞的细胞类型, 干细胞的维持、增殖和分化是产生和修复动物体各个组织器官的关键。 干细胞按其特征可分为多能胚胎干细胞、组织干细胞和生殖系干细胞等类型, 基因突变和不适当信号刺激等因素可导致机体产生具有干细胞特征的癌细胞, 这种细胞被称为癌症干细胞, 癌症干细胞的理论和发现是近年来癌症研究领域里取得的最有影响的突破之一。 干细胞的研究具有重大的理论和临床意义。 非编码 RNA 在干细胞的生物学过程中也起着非常重要的作用。

miRNA 可以调节胚胎干细胞的增殖和分化。 *Dicer* 基因全身敲除小鼠的胚胎在发育早期致死, 胚胎干细胞标志分子 Oct4 的表达明显减少, 胚胎干细胞不能分化^[22]。 *Dgcr8* 敲除小鼠的表型与 *Dicer* 敲除小鼠类似, 但表型没有那么严重, 提示一些在发育早期起作用的 miRNA 的产生可能不需要 DGCR8 所参与的核内加工步骤^[23]。 最近在果蝇等多个物种中发现了一类具有另一种核内加工机制的 miRNA——Mirtron, 其可能参与了动物的早期胚胎发育调节^[24,25]。 6 种 miRNA 在小鼠胚胎干细胞中的表达占了整个 miRNA 的 75% 左右, 这几种 miRNA 的预测靶基因主

要参与了细胞周期调控^[22,26]。 miR-302 家族几乎特异表达于人的胚胎干细胞, miR-302 与斑马鱼的 miR-430 家族同源^[27,28]。 miR-302 转染人皮肤癌细胞, 可以使细胞具有胚胎干细胞的一些特征^[29]。 let-7 家族的 miRNA 在动物向成体发育过程中非常重要, let-7 最经典的靶基因是原癌基因 ras。 Yu 等人^[30] 研究了一种具有癌症干细胞特征的乳腺癌细胞, 发现这种癌细胞里面的 let-7 表达缺失, 重新导入 let-7 或 RNAi 抑制 ras 能使癌症干细胞丧失自我更新能力。

piRNA 在生殖系干细胞的维持和精子发生过程中起着非常重要的作用。 piRNA 直接结合 Piwi 亚家族蛋白形成 piRC 复合物, Piwi 亚家族蛋白和 piRNA 特异表达于动物的生殖系细胞中。 果蝇有 3 个 Piwi 蛋白: Piwi, Aub 和 Ago3, 小鼠中的 3 个成员为 Miwi, Miwi2 和 Mili, 它们都属于 Argonaute 家族的成员。 piwi 和 aub 突变果蝇的配子发生过程出现异常, piwi 突变果蝇的生殖干细胞不能进行不对称分裂实现自我更新, 导致成年果蝇没有生殖干细胞且不育。 aub 突变的雄性果蝇不育, 雌性果蝇的卵子出现形态异常^[31]。 小鼠 piwi 亚家族 3 个基因的敲除都导致雄性不育, 而雌性小鼠的表型正常, 其中 miwi2 基因敲除的雄性小鼠丧失了生殖干细胞^[32~34]。 piRNA 主要来源于基因组上的逆转座元件、端粒和着丝粒附近的重复序列以及功能未知的基因间区。 Brennecke 等人^[35] 证明 piRNA 抑制了逆转座元件在生殖细胞中的扩增, 从而有利于维持基因组的稳定性和物种的世代遗传。 piRNA 的这种功能可能依赖于碱基互补从而介导逆转座元件转录产物的降解。 mili 和 miwi2 基因敲除小鼠中逆转座元件的启动子区域的 DNA 甲基化水平降低, 提示 piRNA 也可能通过某种机制参与了表观遗传调节, 进而影响 DNA 的甲基化修饰^[34,36]。 Brower-Toland 等人^[37] 发现, 果蝇的 Piwi 和 HP1 α 具有直接相互作用, Piwi 及其结合的 RNA 有利于 HP1 α 募集到即将形成异染色质的区域, piRNA 可能通过这种机制影响着丝粒和端粒的形成, 进而影响细胞的分裂行为。 不排除 piRNA 对细胞分裂的影响具有其他方式, Rodriguez 等人^[38] 报道海胆 (*Sea urchin*) 的 Piwi 蛋白与细胞内的微管-RNA 复合物具有相互作用, 这可能会影响微管的功能进而影响细胞分裂。

piwi 蛋白非常保守, 在其他低等动物的发育和再

生过程中也非常重要。原生生物四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)体细胞核内DNA的消除是该物种发育所必需的, 该过程需要Piwi蛋白参与。DNA清除的一种方式需要基因组上一种IES元件的介导, 发现IES元件与piRNA密切相关: IES是基因组上一些重复序列; IES能转录产生24 nt左右的ncRNA (scnRNA); scnRNA与piwi蛋白结合并募集该复合物到IES位点并调节组蛋白H3K9位的甲基化。可以说scnRNA就是四膜虫中的piRNA^[39]。扁形涡虫(*Schmidtea mediterranea*)受伤后具有极强的再生能力, 这种再生是由伤口处产生的全能干细胞——neoblast所控制的, 涡虫的piwi蛋白只表达于neoblast之中, RNAi抑制piwi基因导致neoblast丧失自我更新能力。可见, piwi调节干细胞自我更新的功能在进化上十分保守^[40]。

5 非编码 RNA 与剂量补偿效应

性别分化控制是发育生物学中最吸引人的研究领域之一, 果蝇和哺乳动物的性别分化由X和Y两个性染色体控制, 雄性具有XY染色体, 而雌性具有XX染色体, 雄性和雌性X染色体上的基因要求处于大致相同的表达量。这个调控过程被称为剂量补偿效应。哺乳动物的剂量补偿依靠雌性个体中一条X染色体的随机失活而实现, 而果蝇则依靠雄性个体X染色体上基因的加倍表达而实现, 这两种不同的剂量补偿方式都是由非编码RNA所起始的, 然后募集表观遗传调节因子并最终导致染色体的结构出现稳定的改变。

雄性果蝇中单个X染色体上基因的表达量必须加倍, 否则导致雄性果蝇胚胎死亡, 果蝇的剂量补偿由一个大的RNP复合物——MSL所控制, 它包含组蛋白H4K16乙酰转移酶MOF, 组蛋白H3磷酸激酶JIL, RNA解旋酶MLE, RNA结合蛋白MSL3, 其他一些蛋白和两个来自于X染色体的ncRNA——roX1和roX2, 转录产生的roX1和roX2通过某种机制将MSL募集到X染色体上的大约35个进入位点, 其中两个正是roX的编码基因, MSL复合物开始对局部染色质进行修饰, 然后扩散到整个X染色体, 组蛋白乙酰化和磷酸化等修饰使X染色体处于开放结构状态, 整个染色体上的基因转录活动加倍。roX募集MSL依赖于RNA——蛋白相互作用, 体外和体内实验都证明

MOF, MLF和MSL3等因子都具有RNA结合能力。roX1和roX2的功能具有冗余性, 缺失单个roX并不影响雄性果蝇的剂量补偿效应^[41,42]。

哺乳动物的剂量补偿效应依赖于雌性个体其中一条X染色体的失活。这有两种情况: 早期胚胎发育时的胚胎外组织选择性基因印记并失活父源的X染色体; 胚胎内组织则随机选择失活一条X染色体形成巴氏小体。哺乳动物的X染色体失活由X染色体上的Xic区域控制, 这个区域转录产生一个约17 kb大小, 定位于细胞核的ncRNA——Xist。Xist包裹表达其自身的X染色体并募集一系列表观遗传调节因子, 如组蛋白H3和H4的去乙酰化酶, G9a, Ezh2和EED等组蛋白H3K9, H3K27和H4K20位的甲基转移酶, 这些因子对X染色体进行广泛的抑制性修饰, 同时引发更加稳定的抑制性修饰, 如DNA的甲基化和特殊组蛋白macroH2A的替换。这些修饰使X染色体处于抑制状态。Xist是起始X染色体失活所必需的, 但在之后的过程中作用不大。没有失活的另一条X染色体的Xic区能产生另一条ncRNA——Tsix。Tsix是Xist基因反义链的转录产物, 它抑制了Xist的产生, 从而使这条X染色体不失活。目前对于X染色体选择表达哪个ncRNA的机制还不清楚^[42,43]。

6 ncRNA 与基因印记

基因印记是指在发育过程中, 来自亲本的等位基因产生专一性的加工修饰, 导致后代体细胞中两个亲本来源的等位基因有不同的表达模式。基因印记异常将导致严重遗传性疾病。印记区域基因表达模式的建立由基因间区的差异DNA甲基化位点(differential methylation region, DMR)所控制。迄今为止, 在人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)等哺乳动物的基因组中已发现了数十个基因印记区域, 在这些区域里发现了很多miRNA, C/D box snoRNA, 反义链RNA和其他大ncRNA, 其中有些ncRNA具有基因印记现象, 另一些ncRNA可能在基因印记模式的建立过程中起着非常重要的作用^[44]。

人的染色体15q11~13区域(Prader-Willi区域)具有基因印记现象并和两种发育缺陷的疾病密切相关, 该区域编码一些蛋白、70多个C/D box snoRNA和少数miRNA, 这些基因具有独特的父源表达和母源表

达模式。Prader-Willi综合征(PWS)患者表现为发育迟缓、行为异常、肌无力、肥胖和智障, 在患者体内发现该区域里一些父源表达的基因不表达。Angelman综合征(AS)患者表现为智能低下、面部僵直、多动和癫痫, 在患者体内发现该区域里一些母源表达的基因如 *Ube3a* 不表达^[45]。Prader-Willi区域里的绝大多数C/D box snoRNA集中在*HBII-85* 和*HBII-52* 两个基因簇并具有父源表达特征。在一些Prader-Willi综合征患者体内检测到了*HBII-85* 基因簇的微缺失^[46]。小鼠中对应的基因簇 *MBII-85* 的敲除也导致出现Prader-Willi综合征类似的表型^[47], 说明Prader-Willi综合征跟*HBII-85* 基因簇里的snoRNA的功能有关。*HBII-52* 基因簇的缺失没有明显的病理特征, 提示它对PWS的发生没有主要作用。*HBII-52* 中snoRNA的一个作用靶点是 5-羟色胺受体(5-HT2C)的mRNA, 该mRNA特定位点被*HBII-52* snoRNA的 2-氧-甲基化修饰, 抑制了该mRNA的另一种修饰——RNA编辑^[48]。这两个基因簇里的snoRNA作用的靶基因还不明确, 所以被称为孤儿snoRNA, 并且都来自于一个非常大的ncRNA基因的内含子, 这个名为UBE3A- ATS的ncRNA也是父源表达的并含有与*Ube3a* 基因互补的序列, UBE3A-ATS可能调节了*Ube3a*基因的父源印记^[49]。一些miRNA定位于基因印记区, 有些正好位于DMR区的CpG岛, 这些miRNA往往表达于印记基因的反义链, 生物信息学预测难以发现它们的靶mRNA^[50]。miRNA和siRNA也可以在转录水平调节基因的表达^[51,52], 这些反义链来源的miRNA有可能通过顺式相互作用抑制了同一条染色体上印记基因的表达。

H19 是最早发现的mRNA-like的ncRNA之一, *H19* 具有父源表达特征, 同区域的IGF2 则为母源表达, 这两个基因的印记表达特征是由基因间区域的印记控制区(imprinting control region, ICR)所控制的, ICR的甲基化在基因印记的建立过程中起非常重要的作用。母源染色体上的ICR没有甲基化修饰, 可以募集一种抑制因子CTCF而阻断附近增强子对*H19* 的激活; 父源染色体上的ICR经DNA甲基化后不能再结合CTCF, 导致*H19* 表达^[53]。Schoenfelder等人^[54] 将ICR区连接报告基因后制备转基因果蝇, 发现ICR区能产生ncRNA, 并抑制了下游报告基因的活性,

RNAi抑制ICR区产生的ncRNA之后能激活报告基因的活性, 提示ICR产生的ncRNA可能与ICR的甲基化有关。小鼠的IGF2 受体具有母源印记特征, 该基因的反义链编码的ncRNA——Air(antisense of IGF2R)控制*Igf2r*的印记状态, 抑制Air的表达破坏了*Igf2r*的母源印记。灵长类动物的*Igf2r*没有基因印记, 也没有Air的同源分子^[55]。*Kcnq1* 基因的母源印记状态也是由反义链编码的ncRNA——*Kcnq1ot1* 所控制的^[56]。

ncRNA 和基因印记可以互相调控。有些 ncRNA 需要保持特定的印记状态, 对于这些 ncRNA 的功能还不了解; 有些 ncRNA 则通过转录或转录后水平调节其他基因的印记。基因印记是研究 ncRNA 功能及作用机制的良好模型。

7 ncRNA 调节细胞分化和器官形成

许多 ncRNA 具有特异的时空表达谱, 这些 ncRNA 分子对特定组织的发育起重要的作用。这里仅以神经和肌肉组织为例简要说明。

神经系统是哺乳动物最复杂的一个系统, 神经系统的基因表达需要极为严格得调控, 已发现的 miRNA 有约 70% 在神经系统中能表达。miR-124 是哺乳动物脑中表达量最高的miRNA, 生物信息预测了大量的miR-124 靶基因。HeLa细胞转染miR-124 后, 有 132 个预测的靶基因表达量下调, 大多数下调的靶基因确实在脑中有表达, 并且表达量比其他组织低, 表明 miR-124 在脑中调节了大量基因的表达^[57]。NRSF/REST是维持神经干细胞特性所必需的转录抑制因子, 它通过结合神经元分化关键基因上游的 NRSE元件而抑制基因的表达。Kuwabara等人^[58] 在神经元分化过程中发现了一种 20 bp 大小的双链小 ncRNA——NRSE dsRNA, 它在序列上与NESE元件同源。研究表明NESE dsRNA并不通过碱基互补机制发挥功能, 而是直接与NRSF/REST结合, 使之转变为转录激活因子并激活神经元分化相关基因的表达。

FMRP 是一个主要表达于脑和睾丸组织的 RNA 结合蛋白, FMRP 能抑制数百种 mRNA 的翻译。FMRP 功能的缺失导致哺乳动物出现脆性X位点综合征, 该病主要表现为智障和巨睾症状。以前认为FMRP 主要通过自身的一个或多个RNA结合结构域直接识别靶 mRNA 分子发挥作用^[59]。然而最近的研究^[60] 表明,

FMRP 也可以通过调节 ncRNA 的功能而发挥作用。BC1 RNA 是在小鼠中发现的一种表达于脑和睾丸组织中的 ncRNA, BC200 是 BC1 RNA 在人中的同功但不同源的分子, BC200 同样只表达于脑和睾丸组织中。BC1 和 BC200 能通过碱基互补识别一些靶 mRNA 分子。Zalfa 等人^[60] 研究发现小鼠中的 FMRP 在神经元树突区与 BC1 RNA 结合在一起并抑制了 BC1 RNA 识别的 mRNA 分子的翻译, 阻断 BC1 RNA 导致 FMRP 不能再抑制这些 mRNA 分子的翻译。FMRP 还能调节 miRNA 复合物的功能。哺乳动物的 FMRP 和 FXR1 (FMRP 家族的另一成员) 能直接与 RISC 复合物中的 Argonaute2 相互作用。在饥饿等应激条件下, FXR1 与 RISC 复合物的结合能使 miRNA 促进某些靶 mRNA 的翻译^[61]。果蝇中 FMRP 和 AGO1 (哺乳动物 Argonaute 2 的同源分子) 同样具有相互作用, 敲低 AGO1 的表达可以部分抑制由于过表达 FMRP 所导致的神经细胞凋亡。在 400 多个能被 FMRP 调节的靶基因中, 有 75% 的基因是预测的 miRNA 作用靶点^[62,63]。

对 miRNA 在肌肉组织里的功能研究较为清楚, miR-1, miR-133 和 miR-206 是 3 个从线虫到人都特异表达于肌肉中的 miRNA, 它们的表达都受到肌源性转录因子的调节, 这些“肌肉 miRNA”在肌肉发育、肌细胞凋亡、肌肉组织代谢和肌肉肥大等方面都起着非常重要的作用。miR-1 和 miR-133 在早期促进了中胚层的发育, 许多在外胚层和内胚层中高表达的基因在中胚层中被这两个 miRNA 所抑制^[101]。然而在肌肉细胞命运决定之后, miR-1 和 miR-133 的功能则相反: HDAC4 能抑制 MEF2 的促分化活性, miR-1 通过下调 HDAC4 的表达促进骨骼肌细胞的分化。而 miR-133 通过下调 SRF 的表达而抑制细胞分化^[64]。心肌细胞的凋亡也受到肌肉 miRNA 的调节: miR-1 通过降低 HSP60 和 HSP70 的蛋白水平促进心肌细胞的凋亡, 而 miR-133 通过抑制 caspase9 的表达抑制细胞凋亡^[65]。肌肉组织里的很多离子通道都是 miR-1 和 miR-133 的直接靶基因, miRNA 对离子通道的调节影响了肌细胞的电生理和功能^[1,66]。在小鼠的骨骼肌肥大和心肌肥大模型中, miR-1 和 miR-133 的表达都下调。过表达 miR-133 能抑制心肌细胞的肥大, 而抑制 miR-133 的表达能诱导心肌细胞的肥大, *RhoA*, *Cdc42* 和 *Nelf-A/WHSC2* 等能够促进心肌肥大的基因都是 miR-

133 的预测靶基因^[67]。miR-206 与 miR-1 属于同一 miRNA 家族, 它也能促进肌细胞的分化。miR-206 的靶基因包括 DNA 聚合酶 p180 亚单位和间隙连接因子 connexin43。前者的抑制使肌细胞退出细胞周期开始分化, 后者的抑制则有利于肌细胞的融合^[68]。

8 ncRNA 与动物进化

高等生物比低等生物具有更复杂的表型和生命活动, 但是进化上不同层次的物种间蛋白编码基因的数量和功能差别极小, 而基因组转录产生的 ncRNA 的差别却很大, 即越高等的动物编码 ncRNA 的基因组 DNA 所占的比例越高。提示 ncRNA 在物种进化中起着非常重要的作用。动物的特定组织器官的发生一般由非常保守的主控基因所控制, 然而不同物种里的基因表达调控网络可以具有很大的差异, 从而导致不同物种出现特征性的器官并行使独特的功能。ncRNA 可以通过改变基因的表达模式而对物种的进化起作用。

miRNA 能调节许多靶基因的表达, 通过产生新的 miRNA, 或者改变原有 miRNA 的表达模式, 或者改变基因被 miRNA 调节的靶点序列, 可以产生新的基因表达调控网络, 从而影响动物发育。有些 miRNA 在进化上极为保守。let-7 是最早发现的 miRNA 之一, 也是最为保守的 miRNA 之一。let-7 几乎存在于所有的双侧对称动物中。let-7 的表达谱也极为保守, 在早期胚胎发育过程中不表达, 在成体组织器官发生时才开始表达, 如线虫的 let-7 表达于幼虫-成虫转换期, 果蝇的 let-7 表达开始于变态发育, 小鼠的 let-7 表达开始于器官发生时期。let-7 对一些发育关键性的靶基因的调节也很保守。*lin-41* 是 let-7 在线虫中发现的靶基因之一, *lin-41* 的抑制是线虫成体发育所必需的。小鼠和鸡中 *lin-41* 的同源基因依然受 let-7 的调节。许多物种的原癌基因 *ras* 都受 let-7 的调节, Ras 作为促进增殖的信号分子, 它的抑制是很多组织的分化所必需的。在肺癌和乳腺癌等多种癌症中都观察到 let-7 表达的减少和 Ras 活性的上升。更低等的生物往往不需要高度分化的组织器官, 它们的生理活动和物种延续更依赖于细胞的增殖。进化产生的 let-7 最基本的功能就是通过抑制细胞增殖而促进分化, let-7 的出现有利于生物向更高层次进化^[69]。miR-1 是另一

个极为保守的miRNA, 从线虫到果蝇都特异地表达于肌肉组织中, miR-1 的出现使对肌肉发育的调节变得更加复杂。线虫、果蝇和哺乳动物的肌肉组织的特征具有很大的不同, miR-1 在这些物种中通过调节不同的靶基因, 促进了各物种形成各自所特有的肌肉^[170]。基因突变产生新的miRNA作用靶点在物种特性的形成中也起重要作用, Texel绵羊的GDF8 基因突变产生了新的miR-1 作用位点, 使GDF8 被抑制而表现出双倍肌肉的表型^[171]。通过比较基因组学分析, 可以研究ncRNA来自于进化的哪个阶段, 在新的种属产生时, 往往产生一些新的ncRNA基因, 这些ncRNA在决定新物种特征的关键性发育步骤中起作用^[169]。黑猩猩(*Pan troglodytes*)是已进行了基因组测序的生物中与人类亲缘关系最近的物种。人和黑猩猩最显著的差异表现在大脑的功能上。比较基因组学分析发现了 49 个在人的基因组中加速进化的区域(human accelerated regions, HARs), 96%的HARs位于转录调节区, 24%的HARs附近的基因与神经系统发育有关。其中进化最快的区域HAR1 属于一个ncRNA基因——*HAR1F*的一部分。*HAR1F*特异表达于Cajal-Retzius 神经元中^[172]。生殖与进化密切相关, 生殖系统对环境的不适应可能导致物种的灭绝。目前发现一些与生殖有关的ncRNA。Wang^[173]和Dai等人^[174]发现一个黑腹果蝇特有的ncRNA——sphinx。*Sphinx*被敲除后, 雄性果蝇选择向同性求爱的比例增加。黑腹果蝇的祖先比黑腹果蝇具有更高比例的雄性间求爱行为, 进化产生的*sphinx* 调节了果蝇的求爱行为。人的17q(12;17)染色体转位异常, 导致病人出现性反转。Ninomiya等人^[175]在该突变位点鉴定出了一个睾丸组织特异表达的ncRNA, 该突变位点附近的Sox9 基因在性别决定中起非常重要的作用, 此ncRNA可能通过某种机制参与 Sox9 的调节。

ncRNA 在进化中产生的机制也是一个重要的研

究方向。实验验证和生物信息学分析在各个物种中鉴定了大量的反义链ncRNA(NAT), 包括来源于正义链编码基因同一位点的cis-NAT和来源于基因组其他位点的trans-NAT。绝大多数此类ncRNA参与了正义链编码基因的转录或转录后水平的调节。遗传重组、转座和基因重复等改变基因组结构的事件显著影响了NAT转录必需元件的获取或自身的序列特征, 导致NAT在不同物种间的保守性和表达谱极不相同^[176]。ncRNA往往在新的种属进化之初产生。Lu等人^[177]的研究表明, miRNA基因快速地产生和凋亡, 只有少部分在进化中获得功能并固定下来。进化新产生的功能性ncRNA的表达量往往较低。而越保守的ncRNA往往表达量越高。基因组上的各种序列都可以作为ncRNA基因进化的材料, 果蝇的*sphinx*来源于两个不同蛋白编码基因外显子的融合^[173]。小鼠的BC1 RNA来源于一个tRNA基因的进化^[178]。小鼠的B2 RNA和人的Alu RNA都来源于SINE元件^[179,180]。ncRNA在进化中被固定下来的机制在于自然选择, 它的产生使新物种具有了对环境更好的适应性。

9 总结和展望

ncRNA具有 3 种基本的作用方式来发挥其功能: 自身的催化活性、碱基互补和调节蛋白质的功能^[81]。基因表达调控网络中, DNA、蛋白质和RNA三者之间能互相调控。近年来, ncRNA通过与DNA, RNA和蛋白质分子相互作用参与基因的表达调控, 越来越为人们所关注。今后的研究将会更加深入揭示ncRNA调节ncRNA的机制和意义。ncRNA不但参与调节正常的动物发育过程, 在动物的代谢、衰老等其他生命活动和癌症、糖尿病及神经系统疾病等病理发生、发展过程中也具有非常重要的作用。此类研究将有助于更深入地了解ncRNA的功能和生命的本质, 并有利于疾病的诊断、预防和治疗。

参考文献

- 1 Stefani G, Slack F J. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 219—230 [[DOI](#)]
- 2 Deng W, Zhu X, Skogerbo G, et al. Organization of the *Caenorhabditis elegans* small non-coding transcriptome: genomic features, biogenesis, and expression. *Genome Res*, 2006, 16(1): 20—29 [[DOI](#)]
- 3 Eddy S R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(12): 919—929 [[DOI](#)]
- 4 Griffiths-Jones S. Annotating noncoding RNA genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 279—298 [[DOI](#)]

- 5 Moss E G, Lee R C, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell*, 1997, 88(5): 637—646[\[DOI\]](#)
- 6 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(1): 25—36[\[DOI\]](#)
- 7 Giraldez A J, Mishima Y, Rihel J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 2006, 312(5770): 75—79[\[DOI\]](#)
- 8 Mishima Y, Giraldez A J, Takeda Y, et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol*, 2006, 16(21): 2135—2142[\[DOI\]](#)
- 9 Kedde M, Strasser M J, Boldajipour B, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, 2007, 131(7): 1273—1286[\[DOI\]](#)
- 10 Ivey K N, Muth A, Arnold J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 219—229[\[DOI\]](#)
- 11 Martello G, Zacchigna L, Inui M, et al. MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature*, 2007, 449(7159): 183—188[\[DOI\]](#)
- 12 Li X, Carthew R W. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell*, 2005, 123(7): 1266—1277
- 13 Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA. *Int J Mol Med*, 2008, 22(3): 271—275
- 14 Hansson E M, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(5): 320—328[\[DOI\]](#)
- 15 Duboule D. The rise and fall of Hox gene clusters. *Development*, 2007, 134(14): 2549—2560[\[DOI\]](#)
- 16 Sanchez-Elsner T, Gou D, Kremmer E, et al. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit *Drosophila* Ash1 to Ultrabithorax. *Science*, 2006, 311(5764): 1118—1123[\[DOI\]](#)
- 17 Petruk S, Sedkov Y, Riley K M, et al. Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. *Cell*, 2006, 127(6): 1209—1221[\[DOI\]](#)
- 18 Lempradl A, Ringrose L. How does noncoding transcription regulate Hox genes? *Bioessays*, 2008, 30(2): 110—121[\[DOI\]](#)
- 19 Hornstein E, Mansfield J H, Yekta S, et al. The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development. *Nature*, 2005, 438(7068): 671—674[\[DOI\]](#)
- 20 Tyler D M, Okamura K, Chung W J, et al. Functionally distinct regulatory RNAs generated by bidirectional transcription and processing of microRNA loci. *Genes Dev*, 2008, 22(1): 26—36[\[DOI\]](#)
- 21 Chopra V S, Mishra R K. "Mir" acles in hox gene regulation. *Bioessays*, 2006, 28(5): 445—448[\[DOI\]](#)
- 22 Kanellopoulou C, Muljo S A, Kung A L, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 2005, 19(4): 489—501[\[DOI\]](#)
- 23 Wang Y, Medvid R, Melton C, et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 380—385[\[DOI\]](#)
- 24 Okamura K, Hagen J W, Duan H, et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 130(1): 89—100[\[DOI\]](#)
- 25 Berezikov E, Chung W J, Willis J, et al. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*, 2007, 28(2): 328—336[\[DOI\]](#)
- 26 Houbaviy H B, Murray M F, Sharp P A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, 2003, 5(2): 351—358[\[DOI\]](#)
- 27 Barroso-Deljesus A, Romero-Lopez C, Lucena-Aguilar G, et al. Embryonic stem cell specific miR302-367 cluster: Human hene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol*, 2008
- 28 Calabrese J M, Seila A C, Yeo G W, et al. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(46): 18097—18102[\[DOI\]](#)
- 29 Lin S L, Chang D C, Chang L S, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*, 2008, 14(10): 2115—2124[\[DOI\]](#)
- 30 Yu F, Yao H, Zhu P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 2007, 131(6): 1109—1123[\[DOI\]](#)
- 31 Seto A G, Kingston R E, Lau N C. The coming of age for Piwi proteins. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 603—609[\[DOI\]](#)
- 32 Deng W, Lin H. Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell*, 2002, 2(6): 819—830[\[DOI\]](#)
- 33 Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri T W, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, 131(4): 839—849[\[DOI\]](#)

- 34 Carmell M A, Girard A, van de Kant H J, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2007, 12(4): 503—514[\[DOI\]](#)
- 35 Brennecke J, Aravin A A, Stark A, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 128(6): 1089—1103[\[DOI\]](#)
- 36 Aravin A A, Sachidanandam R, Girard A, et al. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*, 2007, 316(5825): 744—747[\[DOI\]](#)
- 37 Brower-Toland B, Findley S D, Jiang L, et al. *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev*, 2007, 21(18): 2300—2311[\[DOI\]](#)
- 38 Rodriguez A J, Seipel S A, Hamill D R, et al. Seawi-a sea urchin piwi/argonaute family member is a component of MT-RNP complexes. *RNA*, 2005, 11(5): 646—656[\[DOI\]](#)
- 39 Mochizuki K, Gorovsky M A. Small RNAs in genome rearrangement in Tetrahymena. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(2): 181—187[\[DOI\]](#)
- 40 Reddien P W, Oviedo N J, Jennings J R, et al. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science*, 2005, 310(5752): 1327—1330[\[DOI\]](#)
- 41 Nusinow D A, Panning B. Recognition and modification of seX chromosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(2): 206—213[\[DOI\]](#)
- 42 Bernstein E, Allis C D. RNA meets chromatin. *Genes Dev*, 2005, 19(14): 1635—1655[\[DOI\]](#)
- 43 Payer B, Lee J T. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 733—772[\[DOI\]](#)
- 44 Royo H, Bortolin M L, Seitz H, et al. Small non-coding RNAs and genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 113(1-4): 99—108[\[DOI\]](#)
- 45 Nicholls R D, Knepper J L. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001, 2: 153—175[\[DOI\]](#)
- 46 Sahoo T, del Gaudio D, German J R, et al. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet*, 2008, 40(6): 719—721[\[DOI\]](#)
- 47 Skryabin B V, Gubar L V, Seeger B, et al. Deletion of the MBII-85 snoRNA gene cluster in mice results in postnatal growth retardation. *PLoS Genet*, 2007, 3: e235[\[DOI\]](#)
- 48 Kishore S, Stamm S. Regulation of alternative splicing by snoRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 329—334[\[DOI\]](#)
- 49 Landers M, Calciano M A, Colosi D, et al. Maternal disruption of Ube3a leads to increased expression of Ube3a-ATS in trans. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(13): 3976—3984[\[DOI\]](#)
- 50 Berezikov E, Guryev V, van de Belt, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 2005, 120(1): 21—24[\[DOI\]](#)
- 51 Place R F, Li L C, Pookot D, et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5): 1608—1613[\[DOI\]](#)
- 52 Ting A H, Schuebel K E, Herman J G, et al. Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet*, 2005, 37(8): 906—910[\[DOI\]](#)
- 53 Edwards C A, Ferguson-Smith A C. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(3): 281—289[\[DOI\]](#)
- 54 Schoenfelder S, Smits G, Fraser P, et al. Non-coding transcripts in the H19 imprinting control region mediate gene silencing in transgenic *Drosophila*. *EMBO Rep*, 2007, 8(11): 1068—1073[\[DOI\]](#)
- 55 Regha K, Latos P A, Spahn L. The imprinted mouse Igf2r/Air cluster--a model maternal imprinting system. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 113(1-4): 165—177[\[DOI\]](#)
- 56 Mancini-Dinardo D, Steele S J, Levorse J M, et al. Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev*, 2006, 20(10): 1268—1282[\[DOI\]](#)
- 57 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(7027): 769—773[\[DOI\]](#)
- 58 Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, et al. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*, 2004, 116(6): 779—793[\[DOI\]](#)
- 59 Penagarikano O, Mulle J G, Warren S T. The pathophysiology of fragile X syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 109—129[\[DOI\]](#)

- 60 Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, et al. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, 2003, 112(3): 317—327[\[DOI\]](#)
- 61 Vasudevan S, Tong Y, Steitz J A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 2007, 318(5858): 1931—1934[\[DOI\]](#)
- 62 Jin P, Zarnescu D C, Ceman S, et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci*, 2004, 7(2): 113—117[\[DOI\]](#)
- 63 Duan R, Jin P. Identification of messenger RNAs and microRNAs associated with fragile X mental retardation protein. *Methods Mol Biol*, 2006, 342: 267—276
- 64 Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 228—233[\[DOI\]](#)
- 65 Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci*, 2007, 120(17): 3045—3052[\[DOI\]](#)
- 66 Zhao Y, Ransom J F, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, 129(2): 303—317[\[DOI\]](#)
- 67 Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 2007, 13(5): 613—618[\[DOI\]](#)
- 68 McCarthy J J. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779: 682—691
- 69 Niwa R, Slack F J. The evolution of animal microRNA function. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(2): 145—150[\[DOI\]](#)
- 70 Brennecke J, Stark A, Cohen S M. Not miR-ly muscular: microRNAs and muscle development. *Genes Dev*, 2005, 19(19): 2261—2264[\[DOI\]](#)
- 71 Clop A, Marcq F, Takeda H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813—818[\[DOI\]](#)
- 72 Pollard K , Salama S R, Lambert N, et al. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature*, 2006, 443(7108): 167—172[\[DOI\]](#)
- 73 Wang W, Brunet F G, Nevo E, et al. Origin of sphinx, a young chimeric RNA gene in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4448—4453[\[DOI\]](#)
- 74 Dai H, Chen Y, Chen S, et al. The evolution of courtship behaviors through the origination of a new gene in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(21): 7478—7483[\[DOI\]](#)
- 75 Ninomiya S, Isomura M, Narahara K, et al. Isolation of a testis-specific cDNA on chromosome 17q from a region adjacent to the breakpoint of t(12;17) observed in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(1): 69—72[\[DOI\]](#)
- 76 Werner A, Berdal A. Natural antisense transcripts: sound or silence? *Physiol Genomics*, 2005, 23(2): 125—131[\[DOI\]](#)
- 77 Lu J, Shen Y, Wu Q, et al. The birth and death of microRNA genes in *Drosophila*. *Nat Genet*, 2008, 40(3): 351—355[\[DOI\]](#)
- 78 Rozhdestvensky T S, Kopylov A M, Brosius J, et al. Neuronal BC1 RNA structure: evolutionary conversion of a tRNA(Ala) domain into an extended stem-loop structure. *RNA*, 2001, 7(5): 722—730[\[DOI\]](#)
- 79 Allen T A, Von Kaenel S, Goodrich J A, et al. The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(9): 816—821[\[DOI\]](#)
- 80 Mariner P D, Walters R D, Espinoza C A, et al. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol Cell*, 2008, 29(4): 499—509[\[DOI\]](#)
- 81 Costa F F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene*, 2005, 357(2): 83—94[\[DOI\]](#)