

微小 RNA 在动物上的功能研究进展*

苏小茜¹, 江培勇², 张峰¹, 曾养志^{1**}

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

摘要: 微小 RNA (miRNA) 是一种长约 22 nt 的非编码 RNA, 通过与 mRNA 碱基互补配对来靶基因进行转录后调控。在众多多细胞生物中已经鉴别出数百种 miRNAs, 而且大多数在进化上高度保守。虽然绝大多数 miRNAs 的生物学功能还不清楚, 但是预测结果显示 miRNAs 对人类 30% 的基因具有表达调控作用。随着研究的深入, 不断知道 miRNAs 的功能及其作用机制。本文就 microRNAs 在动物上的作用机制及其功能的研究进展作一综述。

关键词: 微小 RNA; 调控; 功能

中图分类号: [Q 752] **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2008) 04-0545-07

Advances in Research on MicroRNA Function in Animal

SU Xiao-xi¹, JIANG Pei-yong², ZHANG Feng¹, ZENG Yang-zhi¹

(1. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that post-transcriptionally regulate gene expression by base-pairing to mRNAs. Hundreds of miRNAs have been identified in various multicellular organisms and many miRNAs are evolutionarily conserved. Although the biological functions of most miRNAs are unknown, miRNAs are predicted to regulate up to 30% of the genes of the human genome. The functions and active mechanism of miRNAs were gradually revealed with the more and more further studies. In this paper, the recent advances in miRNA biological functions and active mechanism in animals were reviewed.

Key words: microRNA; regulate; function

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长约 22 nt 的非编码的单链 RNA 分子, 其通过碱基配对的方式结合到靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR), 从而抑制其翻译^[1]。1993 年 LEE 等^[2,3] 利用遗传分析的方法在秀丽隐杆线虫中发现一个 22 个核苷酸的小分子非编码 RNA lin-4, 并发现 lin-4 识别的靶基因 mRNA lin-14。这种单链 RNA 通过碱基配对的方式结合到靶 mRNA lin-14 的 3' 末端非翻译区 (3' UTR), 从而抑制 lin-14 的翻译, 但并不影响其转

录。lin-4 或 lin-14 发生突变后造成线虫形态发育改变。随后的研究发现, 此类 RNA 广泛存在于从植物、线虫到人类的细胞中, 科学家们将这一类非编码的小分子 RNA 称为 microRNA (miRNA)。这些小分子 RNA 参与基因转录后水平的表达调控, 通过诱导 mRNA 的切割降解、翻译抑制或其他形式的调节机制抑制靶基因的表达。其主要功能是调节生物体内与机体生长、发育、疾病发生过程有关的基因的表达, 而且研究人员推测人类

收稿日期: 2007-10-22 修回日期: 2007-11-02

* 基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39830190) ** 通讯作者 E-mail: zengyangzhi@sina.com

作者简介: 苏小茜 (1983-), 女, 浙江温州人, 在读硕士生, 主要研究方向为动物分子遗传学。

E-mail: suxx82@126.com

中三分之一的基因都受到 miRNA 的调控。随着 miRNA 的深入研究,有利于对生长发育调控机理和致病机理的理解。

1 miRNA 形成过程和作用机制

动物体中成熟的 miRNA,需要两大生物加工过程:核内加工和在细胞质浆中的成熟加工。①核内加工:miRNA 基因首先在多聚酶 II (Pol II) 的作用下转录出长的初级转录物,这个初级转录物被称为 pri-miRNA。在 Drosha 的作用下把 pri-miRNA 切割成为约 70 bp 的小茎环结构的 pre-miRNA (precursor miRNA),同时在茎环结构的根部产生出 5' 磷酸末端以及 3' 末端核苷酸的突出。pre-miRNA 在 Ran-GTP 和 exportin-5 的作用下转运到胞浆^[4]。②细胞质的成熟加工:Dicer 对茎环前体一端 5' 磷酸,一端 3' 2 个悬垂的结构有特殊亲和力,在茎干 2 个螺旋转弯处切割复式结构的 2 个链,也就是成熟的 miRNA 单链以及与之配对的互补链 miRNA 即 miRNA: miRNA * 复式结构,然后此复式结构在解旋酶 (helicase) 的作用下,一条链进入核蛋白复合体形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)^[5-7]。miRNA 指导 RISC 对 mRNA 进行切割和翻译抑制。

miRNA 指导 RISC 下调基因表达可通过两种转录后机制:mRNA 切割和翻译抑制。这两种机制的选择取决于靶位点的识别。如果 miRNA 与靶位点互补配对高的可能进行切割,而配对低的就是抑制^[8]。在大多数的动物中,miRNA 形成的 RISC 与目标 mRNA 3' UTR 进行非精确互补,对 mRNA 的翻译产生抑制性信号,蛋白表达受到抑制。这种情况发生在绝大部分的动物 miRNA 中。同时,miRNA 也可以通过类似 siRNA 的 RNA 干扰途径,对基因表达进行抑制性调控。miRNA 通过与目标 mRNA 的精确配对,介导互补区域的 mRNA 切割作用,从而达到对 mRNA 降解的作用。miRNA 形成过程和作用机制如图 1^[9]。

2 miRNA 特点

2.1 miRNA 基因排列特点

一些 miRNAs 有自己独立的启动子和增强子。不同的 miRNA 位于基因组的不同座位。研究发现,人类和老鼠约有 40% 的 miRNAs 是位于内含

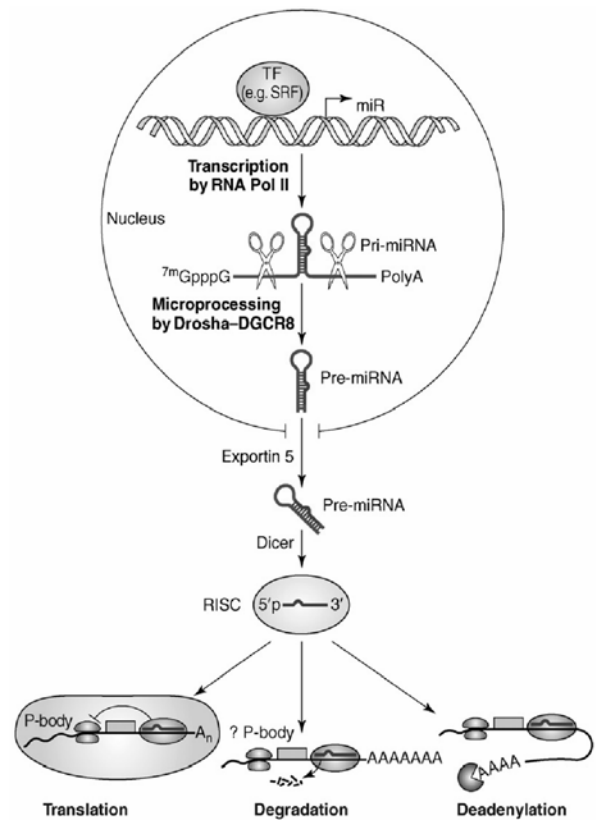


图 1 miRNA 形成过程和作用机制

Fig. 1 Biogenesis pathway and mechanism of miRNA

子之中,这些内含子可以位于蛋白编码基因,也可以位于是非编码基因的转录单元,而只有 10% 的 miRNAs 位于外显子中。当 miRNA 与相邻的基因转录方向一致,那么此 miRNA 所在的转录区先转录成一个长的转录本,然后经过剪切而形成 miRNA。而且有些 miRNA 基因是成簇的,而且簇生排列的基因常常协同表达。

2.2 生物学特点

首先是保守性。miRNAs 的基因在进化上呈保守趋势。在已经克隆成功的 miRNAs 中,几乎所有的 miRNAs 的基因存在于相近动物中克隆到的 miRNAs 中,几乎所有的 miRNAs 的基因存在于相近动物中,例如, *C. elegans* 中多于 1/3 的 miRNAs 与人类同源^[10]。其次是基因簇集现象。miRNA 基因可以聚集在一个基因簇中,可能这些 miRNA 之间有着功能上的相互协同作用。在 *C. elegans* 中, LAU 等^[11]也证实 miR-35 和 miR-41 是由基因簇转录形成一条 RNA 前体链,进而被加工形成 miR-35 和 miR-41。最后是时空特异性和组织特异性。目前研究较清楚的 lin-4 与 let-7 呈时间特异性表达,还有 mir-290 和 mir-295 只在鼠

胚胎干细胞中表达^[12], 而在成体时主要在胸腺和骨髓中表达^[13]。

3 miRNA 的功能研究进展

近年来, 关于 miRNA 的研究已经从识别 miR-

NA, 阐明其作用机制, 转移到鉴定其功能。并且, 随着生物信息学的预测方法、原位杂交、过量表达、基因沉默技术等的发展, 一些 miRNA 的功能已经得到确认。表 1 列出一些功能确定的 miRNAs。

表 1 已知功能的 miRNA
Tab. 1 Functions of animal miRNA

miRNA	靶基因 target genes	生物学作用 biological function	文献 references
线虫 (Nematodes)			
Lin-4	Lin-14, Lin-28	调控早期时序发育 Early developmental timing	[2], [3]
Let-7	Lin-41, hbl-1, daf-12, pha-4, ras	调控晚期时序发育 Late developmental timing	[14]
lsy-6	cog-1	调节化学感受器的左右不对称性 Left/right neuronal asymmetry	[18]
miR-273	die-1	调节化学感受器的左右不对称性 Left/right neuronal asymmetry	[18], [19]
果蝇 (Flies)			
Bantam	hid	调控细胞凋亡 Programming cell death	[20]
miR-14	(Drice)?	调控细胞凋亡和脂肪代谢 Programming cell death and fat metabolism	[21]
哺乳动物 (Mammalians)			
miR-1	Hand2	调节心肌细胞分化和增殖 Cardiomyocyte differentiation and proliferation	[17]
miR-181	?	造血系统分化 Hematopoietic lineage differentiation	[13]
miR-206	GDF8	调节肌肉发育 Muscle developmen	[17], [16]
癌症 (Cancer)			
miR-15/miR-16	(BCL2)?	慢性 B 型淋巴细胞性白血病 Down-regulating in B-cell chronic lymphocyte leukemia	[24]
miR-17	?	B 性细胞瘤上调表达 Up-regulating in B-cell lymphoma	[26]
let-7	Ras	肺癌细胞中下调表达 Down-regulating in lung cell carcinoma	[29]
病毒感染 (Viral infection)			
EBV-miRNA	?	下调病毒基因表达 Down-regulating the expression of virus	[31]
miR-s1	?	下调 T 抗原基因表达 Down-regulating the expression of T-antigen	[33]
miR-N367	?	下调 nef 基因表达 Down-regulating the expression of nef	[34]

注: “?” 代表靶基因未确定。
Note: “?” Target gene is not sure.

3.1 miRNA 与个体发育

miRNA 是胚胎正常发育不可缺少的因素。缺失 Dicer 的小鼠, 理论上就不存在 miRNA 对基因表达的调节作用, 实验也证实缺失 Dicer 的小鼠在 7.5 d 的时候出现死亡。1993 年, LEE 的研究小组在线虫中发现了第一个 miRNA-lin-4^[2], 随后 Reinhart 等^[1,14] 又发现了 let-7, 其作用目标 mRNA

分别是 lin-4, lin-8 和 lin-41, hb1-1。它们通过与目标 miRNA3'UTR 的非精确互补, 抑制 mRNA 的翻译, 从而从时间和空间上控制线虫的发育进程。还有 Dicer-缺失的胚胎干细胞无论在体内还是体外都不能正常分化成 3 个胚层。根据组织特异性 Dicer 的编码基因进行突变处理的研究, 发现 miRNA 参与调控器官和神经系统的正常形成基因

表达过程。

心脏是重要的功能器官,心血管系统是否正常也是影响胚胎在发育过程存活率的关键因素。研究表明,miR-1 家族包括 miR-1-1 和 miR-1-2,在心肌、骨骼肌中特异表达。并且还发现 miR-1-1 和 miR-1-2 在处于发育心脏中含量比较多。miR-1 能够靶向 Hand2 基因的 mRNA。而 Hand2 基因是心脏形成的一种关键调节因子,miRNA 适时关闭 Hand2 蛋白制造,以促使心脏正常发育^[15]。miR-1 和 miR-133a 处于同一个双顺反子,因此它们具有相同的调控过程。在心肌细胞中,转率过程都受 SRF 调控。而在骨骼肌细胞则受 MyoD 和 Mef2 的调控。miR-206 是 miR-1 的类似物但只在骨骼肌中表达,并且受 MyoD 正调控。研究证实 miR-1 和 miR-206 同样促进骨骼成肌细胞分化。而 miR-133a 的作用相反,抑制肌细胞分化,促进成肌细胞扩增。ALEX CLOP 等^[16]研究 Texel 绵羊时发现 miR-1 和 miR-206 引起 myostatin 浓度在转录后降低而造成肌肉肥大;CHEN 等^[17]证实,miR-1 通过作用于 HDAC4 而促进成肌细胞分化为成熟的肌肉细胞,抑制细胞扩增,miR-133a 则通过抑制 SRF 而促进成肌细胞扩增,抑制其分化。

3.2 miRNA 与神经细胞的分化

近年来,关于神经模式发生有关的 miRNA 研究中,发现 Lsy-6 和 mir-273 在神经细胞的分化中起着十分关键的作用。对 *C. elegans* 研究发现这两种 miRNA 存在一个串联基因内,分别控制左侧 ASE 味觉受体细胞 (ASEL) 和右侧 ASE 味觉受体细胞 (ASER) 的感受神经元的表达。在这两种神经元能检测到不同的物质,共同控制着动物对刺激的反应,ASEL 表达感受基因 *gcy-7*, ASER 表达感受基因 *gcy-5*。这两种基因分别由转录因子 *cog-1*, *die-1* 调节。miRNAlsy-6 在 ASEL 表达并与 *cog-1*mRNA 3'端 UTR 互补来调节转录因子 COG-1 水平。最终促使 GCY-7 在 ASEL 表达。而 mir-273 与 *lsy-6* 作用途径相同,在 ASER 中 mir-273 与 *die-1* 的 mRNA 结合,抑制其翻译。DIE-1 是一个锌指结构转录因子,调节 *lsy-6* 转录。由于 mir-273 大量表达而抑制 *lsy-6* 转录,最终使 GCY-5 在 ASER 表达^[18-19]。因此证据已经表明,*lsy-6* 和 mir-273 能影响左右神经系统内某一特定化学感受器受体的水平,这部分解释了神经系统功能的非对称性。

3.3 miRNA 与细胞凋亡和增殖

在对发育的苍蝇的细胞程序性死亡和细胞增殖的突变的筛查中,发现了 *bantam* 基因和 miR-14 基因。将这两个基因克隆后,发现其分别编码 miRNA-*bantam* 和 miR-14。*bantam* 过度表达导致组织过度生长,抑制了增殖诱导的细胞凋亡。相反,如果缺失 *bantam* 的个体也不能存活。因此 *bantam* 的靶基因无疑是调控细胞凋亡途径的相关基因,用此法鉴定了 *hid* 基因是其作用基因之一,并在体内实验中也已经证实了 *bantam* 的确可控制 *hid* 蛋白质的合成,进一步抑制依赖 *hid* 细胞凋亡发生^[20]。XU 等^[21]通过研究 miR-14 缺型的果蝇,发现 miRNA-14 缺失促进了 Reaper 依赖的细胞凋亡的发生,尽管果蝇仍能存活,但对压力反应过敏,生存期缩短。miRNA-14 潜在的靶标是细胞凋亡效应子半胱天冬酶 Drice。Drice 受 miR-14 负调控,miR-14 直接或间接抑制 *drice* mRNA 翻译,阻止半胱天冬酶的合成。其它对细胞程序性死亡途径有调控作用的 miRNAs 是 miR-2 和 miR-13。他们都能调节促凋亡基因 *reaper*, *grim* 和 *sickle* 表达。体内体外实验都证实 miR-2 通过与促凋亡基因的 3'UTRs 互补结合从而抑制其表达^[22]。而且,如果 miR-2 或 miR-13 含量降低个体将会出现发育缺陷^[23]。

3.4 miRNA 在恶性肿瘤中的研究

研究表明 miRNA 参与细胞增殖和细胞死亡、细胞分化以及在基因表达调控中的作用。而细胞增殖及凋亡等异常导致肿瘤及其它病症的发生,因此推测 miRNA 的异常缺失、突变或过表达将导致人类疾病的发生。尽管 miRNA 和人类癌症之间的联系还没有确切建立,但研究表明,miRNA 与某些癌症的发生、发展和预后有关。Croce 的小组在研究慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemias, CLL) 中发现在染色体 13q14 区域有两个 miRNA 基因 (mir15 和 mir16),与 CLL 的发病有关。基因分析结果表明 miR-15a 和 miR-16-1 基因位于人类染色体 13q14 中约 30 kb 的更小的缺失区域,这 2 种 miRNAs 基因在约 68% 的慢性淋巴细胞性白血病病例中发生缺失或表达下调。miRNAs 缺失的具体机制尚不清楚,但有报道 miR-15a 和 miR-16-1 可能是通过抑制其靶基因抗凋亡基因 BCL2 的作用,而启动细胞凋亡,从而发挥其肿瘤抑制作用^[24]。从这个角度来看,

miR-15a 和 miR-16-1 可能起抑癌基因的作用。多形性恶性胶质瘤是高度恶性的原发性脑组织肿瘤,具有高侵袭性及难治愈性。CIAFRE 等^[25]利用微点阵的分析方法检测了 245 种 miRNAs 的整体表达水平,鉴定了一组在高度恶性的原发性脑组织肿瘤中其表达谱发生改变的 miRNAs,其中 miR-21 在恶性胶质瘤中的表达大幅度上调,而 miRNA-128, miR-181a, miR-181b 以及 miR-181C 表达下调。与 miR-21 一样,miR-17 家族是另一种在癌组织中发现其表达上调的 miRNAs。HE 等^[26]研究发现 miR-17 家族在 B 细胞淋巴瘤样本及细胞系中高度表达。C-Myc 调控 miR-17 家族转录,在多细胞模型中,诱导 C-Myc 的表达可以增加 miR-17 的水平。C-Myc 通过结合在编码 miR-17 的基因部位而激活它们的转录。除了 miR-15, miR-16, miR-21 及 miR-17 家族被证实与肿瘤有关外。另外也有报道在儿童 Burkitt S 淋巴瘤中检测到高表达的 miRNA-55/BIC 前体^[27]。MICHAEL 等^[28]通过对结直肠癌与正常黏膜的比较发现 miR-143 及 miR-145 在结直肠癌中持续低表达。随着对 miRNAs 的功能以及其与癌症关系研究的深入,将会发现更多与癌症相关的 miRNA。最近,JOHNSON^[29]等在人类肺癌研究过程中发现,在正常的肺组织中 let-7 microRNA 高度表达,而在肺癌细胞中表达量很少,或者几乎不表达。细胞周期和细胞分裂是由多基因调控,而 let-7 microRNA 通过调控这些基因来控制细胞分裂终止,进而抑制细胞增殖。如果 let-7 在癌细胞中过度表达会使细胞分裂速度减慢,这也进一步证明 let-7 能够抑制肺癌的发生。

3.5 miRNA 在病毒感染性疾病中的研究

在一些哺乳动物病毒中已经证实存在 miRNAs,包括疱疹病毒家族^[30],比如 EB 病毒^[31]、卡波氏肉瘤相关的疱疹病毒 (KSHV)^[32]、猴病毒 (SV40)^[33] 和人免疫缺陷病毒 (HIV)^[34]。虽然大多数这些 miRNAs 的功能还不清楚,但是科学家们确信它们通过调控病毒和宿主基因的表达而达到自身在感染细胞中生存及繁衍的目的。例如,SV40 编码 miRNA 在感染晚期积累,与主要早期 mRNA 序列(编码病毒 T 抗原)完全互补,将那些 mRNA 作为裂解的靶标,从而降解 T 抗原的表达。因此认为 SV40 编码的 miRNA 可以调控病毒基因的表达,且降低了对细胞毒 T 细胞的敏

感性,这对其生存是有益的^[33]。研究表明细胞 miRNA 还能负调控病毒复制。PFV-1 是一种与人免疫缺陷病毒 HIV 类似的逆转录病毒,Lecellier 等^[35]首次证实哺乳动物细胞的 miR-32 抑制 I 型泡沫病毒 PFV-1 病毒的富集。然而,PFV-1 编码的蛋白-Tas 却能干扰 RNA 介导的基因沉默机制,从而使 PFV-1 富集。由此可见,miRNA 在人类病毒感染方面的作用是受各种因素影响。

4 miRNA 基因鉴定和 miRNA 靶标基因鉴定

4.1 miRNA 基因鉴定

最初的 miRNA 基因是通过分离和克隆细胞内小分子 RNA 而获得的。从而 cDNA 文库构建法成为 miRNA 基因鉴定的第一种策略。即从总 RNA 中富集大约 22 nt 的小 RNA 分子,制备一个小 RNA 的 cDNA 文库。将文库中的小 RNA 序列与基因组数据库中 BLAST 比对,排除非 miRNA 序列后,通过 Northern 印迹得到最终确认^[36-37]。但对表达丰度低、且具有组织和阶段表达特异性的 miRNA 很难通构建文库的方法得到的 miRNA。随着不同生物全基因组的测序完成和生物信息学的发展,生物信息学分析成为 miRNA 基因鉴定的新策略。生物信息学分析不仅提高了基因鉴定的效率,而且可以避免直接克隆法在面对低浓度 miRNA 无法获得结果的缺陷。此策略就是根据目前已知的 miRNA 基因序列总结它们的特征和规律,利用这些得出的规律性结论来编程,对生物基因组数据库进行搜索,可以得到一个疑似的 miRNA 基因序列集合。根据这些疑似 miRNA 序列设计探针,进行 Northern 印迹来筛选真实的 miRNA 基因。目前这种方法的识别率在 74% 左右。LAI 等^[38]在研究果蝇 miRNA 中,依据 miRNA 的 3 个特点(具有 1 个可形成发卡结构的 70~100nt 前体;编码 miRNA 的序列在近缘物种间高度保守;miRNA 进化过程中就有趋异性),建立起一个被称为“miRseeker”的计算机程序,然后对果蝇的全基因组进行搜索,成功地识别了 75% (18/24) 的已知果蝇 miRNA,预测出 48 个高分值的可能 miRNA 基因,并且其中 32 个已通过杂交验证。

4.2 miRNA 靶标基因鉴定

研究 miRNA 功能的过程中,靶基因的鉴定是至关重要又十分困难的环节。在动物中,miRNA 与靶基因 mRNA 以不精确的碱基互补配对结合于

3'端非翻译区; miRNA 又是大约 22nt 的小分子; 1 个 mRNA 可以有多个不同 miRNA 的靶位点, 1 个 miRNA 在调控某一基因时可有多个结合位点。因此希望通过序列相似性来鉴定动物体内的 miRNA 结合位点是相当困难的。2003 年, BOUTLA 等^[39]首次结合计算机和分子生物学方法成功分离果蝇 miR-13 的靶基因。他们将分离得到的可能的靶标基因的 3'UTR 和荧光素酶基因连接重组, 再将 miR-13 作用于该重组基因, 分析荧光素酶的表达是否被抑制。经过一系列实验证实, CG10222 即为 miR-13 的靶基因。最近科学家根据 miRNA 与靶标的互作特性进行编程, 利用这些程序对 miRNA 靶基因的筛选。编程的 3 个主要依据是: miRNA 和靶标之间的互补性, 尤其是第 2-8 个核苷酸的精确配对; RNA 和 RNA 结合形成双联体的自由能值的大小; 靶位点在进化上呈保守性。ENRIGHT 根据上述原理建立了一种方法, 称为 miranda。首先判断 miRNA 和可能靶标间的互补性, 然后计算 miRNA 和靶标形成双联体的自由能, 再用在进化上是否存在保守性做最后的筛选。此外, Enright 还给出该方案预测靶基因的错误率大概有 35%^[40]。

5 总结

自从发现 lin-4 和 let-7 以后, miRNA 已经被认为是多细胞生物转录后调节的重要元件。科学家已经发现动物编码上百种 miRNAs, 但是只是处于理论探讨阶段, 对其中绝大多数的功能都不清楚。然而数量有限的但功能确定的 miRNA 就可以说明 miRNA 参与各种各样的生物学过程。miRNAs 在生理功能上的不断发现, 是科学家推测, miRNAs 在高级的真核生物体内对基因的调控作用可能和转录因子一样重要。miRNAs 对基因表达的调控, 能否代表在核酸层次的基因表达调控方式, 还有待不段的研究和实验验证。随着越来越多的 miRNAs 通过生物化学和计算机信息学方法被鉴定出来, 更加迫切的需要了解: miRNA 的确切功能是什么? 它们各自的靶基因是什么? 采用怎样的机制? 我们能否在 miRNA 对基因表达调控方式的启发下, 为疾病治疗引入新的方法? 这些都有待我们改进研究方法, 不断地探索发现。

[参考文献]

- [1] ZARNORE PD, HALEY B. The big world of smallRNAs [J]. Science, 2005, 309: 1519 - 1524.
- [2] LEE RC, FEINBAUM RI, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes sinail RNAs with anti-sense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75 (5): 843 - 854.
- [3] WIGHTMAN B, HA I, RUVKUN G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans* [J]. Cell, 1993, 75 (5): 855 - 862.
- [4] LEE Y, KIM M, HAN J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. EMBOJ, 2004, 23 (20): 4051 - 4060.
- [5] HUTVANER G, ZZMORE PD. A microRNA in a multipie-turnover RNAi enzyme complex [J]. Science, 2002, 297: 2056 - 2060.
- [6] ZENG YI, CULLEN BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100: 9779 - 9784.
- [7] DOENCH JG, PETERSON C, SHARP PA. siRNAs can function as miRNAs [J]. Genes & Development, 2003, 17: 438 - 442.
- [8] ZELLY Y, CULLEN BR. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells [J]. RNA, 2003, (9): 112 - 123.
- [9] ZHAO Y, SRIVASTAVA D. A developmental view of microRNA function [J]. Trends Biochem Sci, 2007, 32 (4): 189 - 197.
- [10] LIM LP, LAU NC. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genes Dev, 2003, (17): 991 - 1008.
- [11] LAU NC, LIM LP, WEINSTEIN EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2001, (294): 858 - 862.
- [12] HOUBAVIY HB, MURRAY MF, SHARP PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs [J]. Dev Cell, 2003, 5 (2): 351 - 358.
- [13] CHEN CZ, LI L, LODISH HF. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. Science, 2004, (303): 83 - 86.
- [14] REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, et al. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 2000, 403 (6772): 901 - 906.
- [15] ZHAO Y, SAMAL E, SRIVASTAVA D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that

- targets Hand2 during cardiogenesis [J]. *Nature*, 2005, 436 (7048): 214–220.
- [16] 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 [J]. *Nature Genetics*, 2006, 38 (7): 813–818.
- [17] CHEN JF, MANDEL EM, THOMSON JM, et al.. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. *Nature Genetics*, 2006, 38 (2): 228–233.
- [18] JOHNSTON RJ, HOBERT OA. MicroRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2003, 426 (6968): 845–849.
- [19] CHANG S, LOCKERY S, HOBERT O. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode [J]. *Nature*, 2004, 430: 785–789.
- [20] BRENNECKE J, HIPFNER DR, STARK A, et al.. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2003, 113 (1): 25–36.
- [21] XU P, VERNOOY SY, GUO M, et al.. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism [J]. *Current Biology*, 2003, 13 (9): 790–795.
- [22] STARK A, BRENNECKE J, RUSSELL RB, et al.. Identification of *Drosophila* microRNA targets [J]. *PLoS Biol*, 2003, 1 (3): 1–13.
- [23] BOUTLA A, DELIDAKIS C, TABLER M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of microRNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 4973–4980.
- [24] CIMMINO A, CALIN GA, FABBRI M, et al.. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (39): 13944–13949.
- [25] CIAFRE SA, GALARDI S, MANGIOLA A, et al.. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334 (4): 1351–1358.
- [26] HE L, THOMSON JM, HEMANN MT, et al.. A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. *Nature*, 2005, 435 (7043): 828–833.
- [27] METZLER M, WILDA M, BUSCH K, et al.. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, 39 (2): 167–169.
- [28] MICHAEL MZ, OCONNOR SM, VAN HOLST PELLEKAAN NG, et al.. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1 (12): 882–891.
- [29] JOHNSON CD, ESPUELA-KERSCHER A, STEFANI G, et al.. The let-7 MicroRNA Represses Cell Proliferation Pathways in Human Cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67, 7713–22.
- [30] PFEFFER S, SEWER A, LAGOS-QUINTANA M, et al.. Identification of microRNAs of the herpesvirus family [J]. *Nat Methods*, 2005, 2 (4): 269–276.
- [31] PFEFFER S, ZAVOLAN M, GRASSER FA, et al.. Identification of virus-encoded microRNAs [J]. *Science*, 2004, 304, 734–736.
- [32] CAI X, LU S, ZHANG Z, et al.. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (15): 5570–5575.
- [33] SULLIVAN CS, GRUNDHOFF AT, TEVETHIA S, et al.. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells [J]. *Nature*, 2005, 435: 682–686.
- [34] OMOTO S, ITO M, TSUTSUMI Y, et al.. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA [J]. *Retrovirology*, 2004, 15, 1: 44.
- [35] LECOLLIER CH, DUNOYER P, ARAR K, et al.. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells [J]. *Science*, 2005, 308 (5721): 557–560.
- [36] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, et al.. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294: 853.
- [37] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, YALCIN A, et al.. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 735
- [38] LAI EC, TOMANCAK P, WILLIAMS RW, et al.. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes [J]. *Genome Biol*, 2003, 4 (7): R42.
- [39] BOUTLA A, DELIDAKIS C, TABLER M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of microRNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31: 4973.
- [40] ENRIGHT AJ, JOHN B, GAUL U, et al.. MicroRNA targets in *Drosophila* [J]. *Genome Biol*, 2003, 5 (1): R1.