

# RNAi 3 种分子加工机制研究进展

肖稳, 周玮\* (湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128)

**摘要** RNAi(RNA interference, RNA 干扰)是一种高度保守的由小分子 RNA 介导的基因沉默过程。根据介导 RNAi 的小 RNA 长度以及结合 Argonaute (AGO) 蛋白家族成员的不同, 将小 RNA 分为 miRNA (microRNA)、siRNA (small interfering RNA) 和 piRNA (Piwi-interacting RNA) 3 类。根据近年来取得的研究进展, 系统地阐述了这 3 类小 RNA 的基因组来源及其加工产生机制, 归纳总结了这 3 类小 RNA 之间的区别和联系, 并结合当前 RNAi 应用于疾病治疗存在的问题提出了自己的看法。RNAi 机制的完善对于生物进化、生长发育及癌症等重大疑难疾病治疗具有重要的应用价值。

**关键词** RNAi; miRNA; siRNA; piRNA

中图分类号 S188; Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)06-0133-04

## Research Progress of Processing Mechanisms of Three Molecules of RNAi

XIAO Wen, ZHOU Wei\* (College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

**Abstract** RNAi is a highly conserved gene silencing process mediated by small RNA. Based on the differences of small RNA length and its combined Argonaute (AGO) family members, small RNA is divided into 3 categories: miRNA (microRNA), siRNA (small interfering RNA) and piRNA (Piwi-interacting RNA). Accordingly the reviews, we systematically expound the three small RNA genomic origin and the mechanisms of their production and processing. Furthermore, we summarize the connections among these three small RNAs. Finally, the authors offer a view on problems hindered in RNAi applications on disease treatment of the humans. The perfection of RNAi mechanisms is important to biological revolution, growth and development and treatment of critical illnesses like cancer.

**Key words** RNAi; miRNA; siRNA; piRNA

自 1998 年 Fire 和 Mello 首次提出 RNAi (RNA interference, RNA 干扰) 概念以来<sup>[1]</sup>, 越来越多的人开始重视小 RNA 的研究, 之后 RNAi 在基因功能的研究中也得到广泛应用。RNAi 是一种存在于真核生物中的转录后基因沉默现象, 在生物进化过程中能够抵御病毒感染及防止基因组中由于逆转座子元件扩增引起的不稳定。在 miRNA (microRNA)、siRNA (small interfering RNA) 及 piRNA (Piwi-interacting RNA) 等小 RNA 的介导下, RNAi 能够特异性地调控 mRNA 基因在表观遗传学水平、转录水平及转录后水平的表达。笔者阐述了 miRNA、siRNA、piRNA 这 3 类小 RNA 的基因组来源及其加工产生机制研究现状, 归纳和总结这 3 类小 RNA 之间的区别和联系, 以期深入了解小 RNA 在生物进化、生长发育以及各种疾病治疗等方面的应用, 进一步完善 RNAi 机制。

## 1 miRNA

**1.1 miRNA 简介** miRNA 是一类长度约为 22 nt, 在大多数体细胞中都广泛存在的内源单链小 RNA, 由较长的含有茎环结构的前体加工而来。1993 年 Lee 等<sup>[2]</sup>在秀丽隐杆线虫中发现的 *lin-4*, 是第 1 个被人们所确认的 miRNA。2000 年 Reinhart 等<sup>[3]</sup>又在线虫中发现了 *let-7*, 该 miRNA 在进化过程中非常保守, 从而引起人们的重视, 开启了一个全新的 miRNA 时代。之后在植物、动物、单细胞真核生物、病毒等多类物种中陆续发现了 miRNA<sup>[4-8]</sup>。目前在 miRBase 中收录了 223 个物种的 35 828 个成熟 miRNA, 28 645 个前体 miRNA (version 21), 其中人类成熟 miRNA 有 2 588 种, 小鼠有 1 982

种。在 miRNA 介导的 mRNA 沉默过程中, miRNA 与靶标 mRNA 碱基部分互补配对, 而与之结合的 Argonaute 蛋白 (AGO, AGO1 ~ AGO4) 通过招募脱腺苷酸化酶, 导致靶标 mRNA 发生脱腺苷反应, 进一步发生降解<sup>[9]</sup>, 或者通过招募翻译抑制因子, 引起该 mRNA 翻译抑制。miRNA 与靶标 mRNA 的结合位点通常位于 mRNA 的 3'UTR 区<sup>[10]</sup>, 但也有报道位于 5'UTR 区和编码区的情况<sup>[11-12]</sup>。

**1.2 miRNA 加工机制** 大部分 miRNA 是由 RNA 聚合酶 II 从基因组上转录形成含有茎环结构的初始转录本 (pri-miRNA), 该转录本带有类似 mRNA 的 5'端帽子和 3'端 polyA 尾巴。细胞核内存在一种叫作“微处理器”的复合物 (Microprocessor complex), 包含核糖核酸酶 III (RNaseIII) 家族内切酶 Drosha 和辅助蛋白 DGCR8 (在哺乳动物中是 DGCR8, 在果蝇中是 Pasha)。其中 Drosha 能够识别 pri-miRNA 位于茎环基部的基序 5'-UG-3', DGCR8 能够识别 pri-miRNA 位于茎环顶部的基序 5'-GUG-3' 或 5'-UGU-3', 因此“微处理器”能够识别 pri-miRNA 并准确在距离基底结 (basal junction) 约 11 bp 处剪切, 将 pri-miRNA 加工成长度约为 70 bp 的前体 miRNA (pre-miRNA), 此外, 存在于茎的第 7~9 位碱基处的“错配基序”-GHG (其中 H 指除了 G 之外的任意碱基) 能够加快 pre-miRNA 的加工过程。另外, 在两侧对称动物 (bilaterian animals) 中还发现一类位于基底结下游的基序 CNNC, 它和辅助蛋白 SRp20 结合, 同样能够有效地提高 pri-miRNA 的加工效率<sup>[13-16]</sup>。加工产生的 pre-miRNA 的 3'端有 2 个碱基的悬垂, 这种结构在 Ran-GTP 的介导下, 被细胞核内的转运蛋白 Exportin-5 识别, 将其转运到细胞质中。在细胞质中, pre-miRNA 被另一种核酸内切酶 Dicer 及其辅助蛋白 TRBP (The HIV transactivating response RNA-binding protein, 在哺乳动物中是 TRBP, 在果蝇中是

**基金项目** 国家自然科学基金青年项目 (31301388); 中国博士后科学基金第八批特别资助项目 (2015T80870)。

**作者简介** 肖稳 (1995—), 女, 湖南宁乡人, 本科生, 专业: 生物信息学。  
\* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事生物信息学研究。

**收稿日期** 2016-11-25

Loqs)切割并加工成大约 22 bp 的双链 miRNA<sup>[17]</sup>,通常双链 miRNA 中 5'末端碱基配对稳定性较差的那条链会被 AGO 蛋白结合,组装形成 miRNA 介导的沉默复合体<sup>[18]</sup>(RNA-induced silencing complex, RISC)。在动物中,成熟 miRNA 主要通过种子区域(即从 miRNA 的 5'端起 2~7 nt 碱基处)识别靶标 mRNA,并通过其他位置部分互补配对方式招募下游因子 TNRC6 和 CCR4-NOT 复合物促使 mRNA 降解或招募翻译抑制因子抑制 mRNA 的翻译,调控靶标基因的表达<sup>[10-19]</sup>。

pri-miRNA 还存在一些特殊的加工方式。2007 年,David P. Bartel 实验室以及 Eric C. Lai 实验室分别在果蝇中发现了 miRNA 成熟的另一种途径<sup>[20-21]</sup>。他们发现有些内含子在被剪接复合体切下来后会具有 pre-miRNA 的结构特征,使其直接被 Dicer 加工成为双链 miRNA 而不需要 Drosha 介导的切割,这类来源于内含子的 miRNA 被称为“mirtron”。2010 年,有 3 个实验室分别在斑马鱼、小鼠以及人类细胞中发现 miR-451 这个高度保守的 miRNA 的发生不依赖于 Dicer 的切割,而是 pri-miR-451 在核内被 Drosha/DGCR8 复合物加工后产生 pre-miR-451(其双链区相对于普通的 pre-miRNA 要短,只有 18 bp),后者出核后直接被 AGO2 蛋白在一个特异的位点切割并进一步被细胞内的 PARN 蛋白剪切<sup>[22]</sup>,生成大约 23 个核苷酸的成熟 miR-451<sup>[23-25]</sup>。

此外,miRNA 在动物体内广泛存在成簇的现象,多个成熟的 miRNA 由同一个 miRNA 初始转录本加工合成,且这些来自相同基因簇的 miRNA 多具有较强的同源性<sup>[26]</sup>。另外,单一 miRNA 基因座可以通过 miRNA 加工成熟过程产生一系列亚型 miRNA,称为 isomiR,它们在长度、在 pre-miRNA 上的 5'端起始位置以及 3'端终止位置存在差异<sup>[27]</sup>。生物体通过多样化的加工方式,使得 miRNA 的产生形成一个复杂的调控网络,以适应越来越复杂的生物多样性及环境多样性。

## 2 piRNA

### 2.1 piRNA 简介

piRNA 是一类与 Argonaute 家族的 PIWI 亚家族蛋白特异结合的长度为 25~32 nt 的内源性小 RNA,5'端多具有 1 U 偏好性,具有组织特异性,多存在于动物生殖细胞中,在成年期小鼠的大脑中也发现了 piRNA<sup>[28]</sup>。果蝇 PIWI 家族成员有 Piwi、AGO3、Aub;小鼠 PIWI 家族成员包括 Miwi、Mili、Miw2;而人类 PIWI 家族含有 4 个成员,分别命名为 Hili、Hiwi、Hiwi2、Hiwi3。2001 年 Aravin 等<sup>[29]</sup>在果蝇 Y 染色体上发现由 Stallate 同源的假基因 *Su(Ste)* 编码的一类小 RNA,就是现在的 piRNA,能够和 PIWI 家族的 Aub 相互作用。2006 年 Girard、Aravin、Grivna、Lau 等所在的实验室几乎同时在人、小鼠、大鼠、果蝇等生物的生殖细胞中发现了 piRNA<sup>[30-33]</sup>。迄今为止,piRNA 种类是非编码小 RNA 中最多的,piRBase 中收录的 piRNA 超过 7 700 万种(version 1.0),其中黑腹果蝇达 21 027 419 种,并且它的 piRNA 超过 80% 来源于转座子;小鼠 piRNA 达 51 664 769 种,主要是粗线期 piRNA,这些 piRNAs 约 93% 来源于基因组单个位点<sup>[34]</sup>。piRNA 在沉默转座子、调控编码基因、调节生育能力等方面

发挥重要功能。

### 2.2 piRNA 加工机制

piRNA 序列主要来源于基因组上的基因编码区、转座子以及基因间隙等,且成簇分布,这些区域被称为 piRNA 簇<sup>[35]</sup>。piRNA 簇是由长的单链转录本加工而来,根据初始转录本方向又可分为单向 piRNA 簇和双向 piRNA 簇。单向 piRNA 簇是具有单一方向转录本加工产生的簇;双向 piRNA 簇是由两端转录形成 2 条互补的转录本加工产生<sup>[35]</sup>。在果蝇卵泡细胞中(Follicular Cells),piRNA 只有初级加工途径,并在 Yb 小体中进行。Yb 小体是胞浆中一种靠近细胞核的无膜细胞器,它包含 Yb 蛋白、Tudor 结构域蛋白 Vreteno (Vret)、SDE 结构域蛋白 Armitage (Armi)、FKBP 家族蛋白 shu 等多种组分。这些初始转录产物被转运到胞浆后,经 Yb 小体加工<sup>[36-39]</sup>,然后被线粒体外膜上的核酸外切酶 Zuc 及其辅助因子切割形成 5'端成熟的 piRNA 前体<sup>[40-41]</sup>,该前体可与 Piwi 蛋白结合,再由 Trimmer 蛋白以及辅助因子 papi 去掉 3'端多余的碱基形成成熟的 piRNA,最后 Hen1 作用于 piRNA 3'端,使其形成 2-O-甲基化,形成成熟的初级 piRNA<sup>[42-43]</sup>。

在生殖细胞中,piRNA 的形成包括初级加工途径和次级加工途径。以果蝇为例,初级加工途径与卵泡细胞中类似,首先转录产物转运出核,由于生殖细胞没有 Yb 小体和 Yb 蛋白,所以由 1 个与 Yb 小体类似的细胞器 nuage 代替,nuage 存在 2 个 Yb 家族的蛋白,Brother of Yb (BoYb) 和 Sister of Yb (SoYb),取代 Yb 蛋白参与 piRNA 的初级加工<sup>[44]</sup>。初级 piRNA 的成熟可能有 2 种途径:一种是在 Spindle-E 的协助下转录本结合 Aub 蛋白,再由 Trimmer 蛋白以及辅助因子 papi 剪切 3'端多余的碱基形成成熟长度的 piRNA,最后 Hen1 甲基化 piRNA 3'端,形成成熟的初级 piRNA;另一种是 Aub 蛋白结合转录本之后,Piwi 蛋白结合在 3'端,然后由 Zuc 剪切成两段,两者 3'端分别被 Hen1 甲基化后形成 2 种初级 piRNA:Aub-piRNA 和 Piwi-piRNA<sup>[43,45]</sup>。目前对生殖细胞中 piRNA 初级加工的具体途径研究尚未明了。

结合 Aub 蛋白的初级 piRNA 进入次级加工途径,Aub-piRNA 通过碱基互补配对结合到反转座子 RNA 上,靶标 RNA 被具有 Slicer 活性的 Aub 剪切,其 3'端产物在 Vasa 的协助下与 AGO3 结合<sup>[46-47]</sup>,通过 Zuc 或者 trimmer 剪切,再由 Hen1 甲基化形成 AGO3 结合的成熟 piRNA,AGO3-piRNA 又识别、结合、剪切与之互补配对的 piRNA 簇,其 3'端产物加工成新的 Aub-piRNA,Aub-piRNA 进入新一轮的循环产生新的 AGO3-piRNA。此途径既沉默了反转座子,又形成了大量的次级 piRNAs,这就是著名的“乒乓循环”模型(ping-pang model)。

“乒乓循环”模型产生的 piRNA 普遍有以下特点:Aub 主要与反义链 piRNA 结合,第 1 个碱基一般是 U,所以大部分 piRNA 的 5'端有 1U 偏好性;而 AGO3 结合正义链 piRNA,且与 Aub 结合的反义 piRNA 的 5'端有 10 个碱基的互补配对,所以这部分 piRNA 第 10 个碱基有 A 偏好性<sup>[48]</sup>。

在哺乳动物中,piRNA 的合成加工更加复杂。在小鼠精

子发生过程中, piRNA 主要分为 3 类: ①主要来自基因组重复序列的出生前 piRNA (prenatal piRNA), 这部分 piRNA 能够与 Miwi2、Mili 这 2 种蛋白结合, 长度为 26 ~ 28 nt。Mili 蛋白出现在 12.5 dpc (day post coitum), 主要分布在细胞质中, Miwi2 蛋白出现在 14.5 ~ 15.5 dpc, 主要分布在细胞核内。Mili - piRNAs 能自身发生“乒乓循环”, 产生的 piRNAs 可以传递给 Miwi2, Miwi2 携带这部分 piRNAs 入核, 招募 DNMT3L 进行甲基化从而在转录水平抑制转座子; ②来源于编码基因的 3'UTR 区域的 mRNA 衍生 piRNA (mRNA - derived piRNA), 出生后的 piRNA 和大多数前粗线期 piRNA 是 mRNA - derived piRNA, 这类 piRNA 也是与 Miwi2、Mili 这 2 种蛋白结合, 长度为 26 ~ 28 nt, 但其功能还是未知的; ③来源于长非编码转录本的粗线期 piRNA, 长度为 29 ~ 31 nt, 这部分 piRNA 的初始转录本在 A - MYB 的协助下从基因间隙转录, 其加工过程也需要 Tudor 蛋白、Armi 蛋白、核酸外切酶 Zuc 的参与。这类 piRNA 主要结合的 Miwi 蛋白出现在 12.5 dpp (days post partum) 之后。有报道称 Miwi - piRNA 与脱腺苷酸酶 CAF1 形成的 pi - RISC 复合物通过与靶 mRNA 不完全互补配对, 诱导靶 mRNA 脱腺苷酸而降解<sup>[49-50]</sup>。

### 3 siRNA

**3.1 siRNA 简介** siRNA 是一类经 RNase III 核酶家族的 Dicer 剪切后生成的长度约为 21 bp 的单链小 RNA 分子, 特异性的与 AGO 蛋白家族中的 AGO2 结合, 并利用 AGO2 的切割活性, 介导靶标 mRNA 切割, 并导致靶标 mRNA 的最终降解。Dicer 加工过程中, 形成 19 bp 碱基互补配对区, 3'端有 2 个碱基悬垂的双链 siRNA 前体。siRNA 双链中能够与目标 mRNA 完全互补配对的那条链称为向导链 (guide strand), 另一条则称为 passenger 链 (passenger strand)。siRNA 分子根据来源不同, 分为外源性 siRNA (exo - siRNA) 和内源性 siRNA (endo - siRNA): 体外人为导入形成的 siRNA 称为外源性 siRNA, 细胞内转录加工产生的 siRNA 称为内源性 siRNA。1998 年, Fire 等<sup>[1]</sup>用秀丽隐杆线虫进行反义 RNA 抑制试验时发现, 对照组中加入的双链 RNA (double - strand RNA, dsRNA) 相比正义或反义 RNA 显示更强的基因表达抑制, 并首次将这种现象命名为 RNA 干扰。siRNA 在作为小分子药物治疗疾病方面具有巨大的潜力。

**3.2 siRNA 加工机制** 内源 siRNA 由双链 RNA (dsRNA) 前体加工形成。在植物、真菌、线虫及果蝇等低等动物体内存在一种特殊的 RNA 聚合酶 RDRP (RNA - dependent RNA polymerase), 在其作用下可将单链 RNA 转变成 dsRNA, 然后被细胞内的 Dicer 识别并在协助蛋白 TRBP 的作用下切割加工产生双链 siRNA, 但大部分动物体内没有这种酶。后来发现动物虽然不能通过 RDRP 形成 dsRNA, 但可以通过反转座子转录、天然反义转录等方式产生形成 dsRNA 前体, 从而产生内源 siRNA<sup>[51]</sup>。

内源性 siRNA 主要来源于反转座子。序列相同的 2 个转座子基因沿相反方向转录产生的单链 RNA 可以形成互补的 dsRNA, dsRNA 出核后进入细胞质, 再经 Dicer 酶剪切成

siRNA<sup>[52-53]</sup>。研究发现, 不同物种在 siRNA 加工产生的区域上区别很大, 比如在果蝇体内, 1 个转座子的整个转录产物都能形成 siRNA<sup>[54]</sup>; 而在日本血吸虫体内, siRNA 只来源于转座子转录产物的部分区域<sup>[55]</sup>。因此, 物种不同 siRNA 的产生机制可能也不完全相同。

另外某些基因在基因组上存在反义链转录本, 当 2 条链同时被转录出来后<sup>[54]</sup>, 正义链与反义链 RNA 形成 dsRNA, 该双链 RNA 进入细胞质后经过 Dicer 酶剪切加工后可以形成 siRNA。

外源 siRNA 有以下几种来源: ①由短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 加工形成, 外源性 shRNA 一般采用 H1、U6 等启动子, 在细胞内 RNA 聚合酶 III 的作用下转录产生 shRNA。shRNA 有 21 ~ 25 bp 的碱基互补配对区域, 在转运蛋白 Exportin - 5 和协助因子 Ran - GTP 的作用下转运出核, 在细胞质中被 Dicer 和协助蛋白 TRBP 识别并剪切, 形成双链 siRNA<sup>[56-57]</sup>; ②由 shRNAmir 加工形成, 参照 miRNA 的加工途径, 把 pri - miRNA 中的 miRNA 序列改为 siRNA 序列, 在 RNA 聚合酶 II 启动子 (CMV、EF1、CAG、TRE 等) 的作用下转录产生类似 pri - miRNA 结构的 siRNA 前体 shRNAmir。这类前体可通过类似 miRNA 加工合成途径, 经 Drosha 及 Dicer 酶加工剪切后最终形成双链 RNA<sup>[58-59]</sup>; ③体外直接合成, 在体外可以人工直接合成 siRNA, 然后通过转染的方法将 21 bp 的 siRNA 导入哺乳动物体细胞也能够导致靶基因的沉默。这类 siRNA, 可通过碱基修饰的方法增加在细胞内的稳定性。

不管是外源导入还是细胞内加工形成的 siRNA 在细胞质内都与 AGO 家族的 AGO2 结合, 其中 siRNA 的 3'端结合 AGO2 蛋白的 PAZ 结构域, 5'端结合 AGO2 蛋白的 MID 结构域<sup>[60]</sup>, 形成 RISC 复合物 (RNA - induced silencing complex, RISC)。RISC 复合物通过 siRNA 与靶标 mRNA 完全互补配对, 在镁离子和 ATP 的作用下, AGO2 利用自身的核酸内切酶活性切割靶标 RNA, 产生的 RNA 片段受到 5'或 3'核酸外切酶的攻击而迅速降解, 从而达到转录后水平沉默靶基因的目的<sup>[61-62]</sup>。

### 4 3 类小 RNA 之间的联系与区别

虽然 3 类小 RNA 转录本长度都不超过 40 nt, 且都需要与 AGO 蛋白家族相互作用才能发挥功能, 但三者之间还是存在一些区别: ①在来源上, miRNA 是由不完全配对的发夹结构前体, 经 Drosha 和 Dicer 酶加工而成; siRNA 是由完全互补的长双链 RNA 或发夹 RNA, 直接经 Dicer 酶剪切而成; piRNAs 是由单条长链 RNA 前体加工形成, 其过程不需要 Drosha 和 Dicer 酶的参与, 其加工过程相比于前两者更为复杂; ②piRNA 目前只在动物界发现, 而 siRNA、miRNA 在动物和植物体内均存在; ③在特征上, 多数 miRNA 具有很强的保守性、组织特异性和时序性; siRNA 在序列识别方面具有高度特异性; piRNA 的表达具有组织特异性, 但其保守性较差, 这一特性可能是为了更好地适应其抑制转座子的功能; ④在结合位点上, miRNA 主要结合 mRNA 的 3'UTR 区; siRNA 可

结合在 mRNA 的任何部位,并且与 mRNA 完全互补配对; piRNA 主要作用于转座子序列;⑤在作用方式上,miRNA 可以抑制 mRNA 的翻译,也可以导致靶标 RNA 降解;siRNA 主要导致靶标 RNA 的快速降解,也可以通过表观遗传水平,抑制靶标 RNA 的转录;而 piRNA 可在转录水平和转录后水平同时沉默转座子等基因组自私性遗传元件。

之前认为 miRNA、piRNA 和 siRNA 三者作用途径没有联系,并且它们之间存在明显的区别。但近年来的研究表明,这些作用途径之间有一部分存在交互影响(reference),从而构成了一个高度复杂的 RNA 调控网络,在表观遗传学水平、转录水平、转录后水平调控基因表达,保证有机体的正常生命活动。

## 5 问题及展望

曾经普遍认为基因组上的大量非编码序列都是没有任何功能的“垃圾序列”,在过去很长的一段时间内,这些序列始终没有得到科学界足够的重视,miRNA、siRNA 以及 piRNA 等小 RNA 的发现,推翻了人们之前对非编码区序列的认知,成为了 RNA 研究领域的一项重大突破。这一突破打开了小分子 RNA 的大门,小 RNA 调控生命活动成为一种新的重要调控机制,这也使得基因的表达调控网络变得更加复杂,为复杂的生物进化提供了基础。

目前随着对小 RNA 研究的不断深入,新的类型小 RNA 分子不断出现在大家的视野中,已知的小 RNA 的功能与作用机制也在不断地更新完善。与 siRNA 和 piRNA 相比,miRNA 的发现相对较早,因此 miRNA 的作用机理也相对比较清楚,但仍有很多 miRNA 的功能是不清楚的。随着对 miRNA 作用机制研究的不断深入,结合现有高通量测序技术等手段,人们对生物基因表达调控网络的认识也在不断加深,这也为疾病的诊断、预后与治疗提供理论依据和应用基础;对于 siRNA,随着对 RNA 干扰技术的深入了解,siRNA 的作用机制被不断完善,其作为基因靶向沉默治疗的潜力也在被不断挖掘,但就目前来看,依旧存在一些问题,例如由于 miRNA 和 siRNA 在加工成熟时都要用到细胞内源的 Droscha、Dicer 和 Exportin-5 等蛋白因子,细胞内过表达 siRNA 时就会对 miRNA 的表达造成竞争压力,因此如何协调两者之间的关系成为 RNA 载体设计的挑战之一。其次,由于 RNAi 存在脱靶现象,可能会对细胞内很多非靶向基因的表达造成影响,虽然已经存在一些技术能够减少脱靶所带来的副作用,但如何更大程度甚至完全消除毒副作用,还有待于进一步研究。另外 piRNA 的发现无疑是为小 RNA 的研究开辟了一片新领域。迄今为止,尽管关于 piRNA 的研究已经取得了相当大的进展,但由于 piRNA 发现较晚,其生物合成途径及调控机制仍然有待于进一步完善,比如初级加工途径与次级加工途径中的具体加工细节,piRNA 如何调控基因表达等。

小 RNA 的发现与功能补充和完善了中心法则,促使科研人员重新思考细胞的调控与发育问题。随着对这些小 RNA 认识不断深入,RNA 干扰技术也越来越完善,为新型 RNAi 治疗提供新的理论基础,对于小 RNA 在生命起源与进

化、生长发育、疾病治疗等方面也将有更加深入的了解与把握。总而言之,在之后的研究当中通过结合小 RNA 的加工机制改造 RNAi 载体等 RNA 分子机器以提高效率,减少或消除对机体的副作用,从而能够将 RNAi 技术运用到更广泛的领域当中。

## 参考文献

- [1] FIRE A, XU S Q, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [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* [J]. Cell, 1993, 75: 843-854.
- [3] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [4] BEREZIKOV E, CUPPEN E, PLASTERK R H. Approaches to microRNA discovery [J]. Nat Genet, 2006, 38(S1): 2-7.
- [5] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. Science, 2001, 294(5543): 853-858.
- [6] LAU N C, LIM L P, WEINSTEIN E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2001, 294(5543): 858-862.
- [7] LEE R C, AMBROS V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2001, 294(5543): 862-864.
- [8] RUBY J G, JAN C, PLAYER C, et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans* [J]. Cell, 2006, 127(6): 1193-1207.
- [9] HUNTZINGER E, IZAUURRALDE E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay [J]. Nature reviews genetics, 2011, 12(2): 99-110.
- [10] BARTEL D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [11] LYTLE J R, YARIO T A, STEITZ J A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2007, 104(23): 9667-9672.
- [12] TAY Y, ZHANG J, THOMSON A M, et al. MicroRNAs to *Nanog*, *Oct4* and *Sox2* coding regions modulate embryonic stem cell differentiation [J]. Nature, 2008, 455(7216): 1124-1128.
- [13] FANG W, BARTEL D. The menu of features that define primary MicroRNAs and enable de novo design of microRNA genes [J]. Molecular cell, 2015, 60(1): 131-145.
- [14] NGUYEN T A, JO M H, CHOI Y G, et al. Functional anatomy of the human microprocessor [J]. Cell, 2015, 161(6): 1374-1387.
- [15] KWON S C, NGUYEN T A, CHOI Y G, et al. Structure of human DROSHA [J]. Cell, 2016, 164(1/2): 81-90.
- [16] AUYEUNG V C, ULITSKY I, MCGEARY S, et al. Beyond secondary structure: Primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing [J]. Cell, 2013, 152(4): 844-858.
- [17] AMERES S L, ZAMORE P D. Diversifying microRNA sequence and function [J]. Nature reviews molecular cell biology, 2013, 14(8): 475-488.
- [18] KIM N. Regulation of microRNA biogenesis [J]. Nature reviews molecular cell biology, 2014, 15(8): 605-610.
- [19] WU L, BELASCO J G. Let me count the ways: Mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs [J]. Molecular cell, 2008, 29(1): 1-7.
- [20] RUBY J G, JAN C H, BARTEL D P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing [J]. Nature, 2007, 448(7149): 83-86.
- [21] RUBY J G, STARK A, JOHNSTON W K, et al. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs [J]. Genome Res, 2007, 17: 1850-1864.
- [22] OKAMURA K, HAGEN J W, DUAN H, et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila* [J]. Cell, 2007, 130(1): 89-100.
- [23] YODA M, CIFUENTES D, IZUMI N, et al. Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of argonaute2-cleaved precursor microRNAs [J]. Cell rep, 2013, 5(3): 715-726.

- [J]. 应用生态学报, 1997, 8(S1): 71-74.
- [9] 王宝荣, 苏文华, 闫海忠, 等. 西双版纳勐养自然保护区种植砂仁对重点保护植物的影响及对策[J]. 应用生态学报, 1997, 8(S1): 75-81.
- [10] 郭贤明, 赵新坤, 付双福, 等. 砂仁种植对西双版纳自然保护区植物物种多样性的影响[J]. 林业调查规划, 2007, 32(2): 63-67.
- [11] 高雷, 刘宏茂. 西双版纳热带雨林下砂仁拔除后的生态恢复研究[J]. 植物生态学报, 2003, 27(3): 366-372.
- [12] 郭贤明, 张培松, 付双福, 等. 西双版纳自然保护区热带季节雨林破坏后的恢复状况调查[J]. 林业调查规划, 2006, 31(6): 66-70.
- [13] 沈庆仲. 浅析西双版纳自然保护区生态旅游[J]. 林业调查规划, 2006, 31(S1): 22-25.
- [14] 王巧燕, 杨云中, 陶永祥. 西双版纳勐养子保护区党片区域大红菌可持续利用现状及管理对策[J]. 林业调查规划, 2011, 36(5): 53-55.
- [15] 曾清苹, 何丙辉, 秦华军, 等. 西南山地不同林下经济模式对植物多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(5): 660-667.
- [16] 赖庆奎, 晏青华. 澜沧江流域主要混农林业类型及其评价[J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(2): 38-43.
- [17] 王兰新, 郭贤明, 何顺强. 村寨集体林下空间利用模式的探讨[J]. 林业调查规划, 2006, 31(S1): 44-46.
- [18] 庞家平, 陈明勇, 唐建维, 等. 橡胶-大叶千斤拔复合生态系统中的植物生长与土壤水分养分动态[J]. 山地学报, 2009, 27(4): 433-441.
- (上接第136页)
- [24] YANG J S, LAI E C. Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates[J]. Cell cycle, 2010, 9(22): 4455-4460.
- [25] CHELOUFI S, DOS SANTOS C O, CHONG M M W, et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis[J]. Nature, 2010, 465(7298): 584-589.
- [26] CIFUENTES D, XUE H, TAYLOR D W, et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity[J]. Science, 2010, 328(5986): 1694-1698.
- [27] 江舸, 金由辛. 微RNA - Science 杂志 2002 年十大科技突破第一名[J]. 生命的化学, 2003, 23(1): 1-3.
- [28] GUO L, CHEN F. A challenge for miRNA: Multiple isomiRs in miRNAs[J]. Gene, 2014, 544(1): 1-7.
- [29] ARAVIN A A, NAUMOVA N M, TULIN A V, et al. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline[J]. Current biology, 2001, 11(13): 1017-1027.
- [30] GIRARD A, SACHIDANANDAM R, HANNON G J, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins[J]. Nature, 2006, 442(7099): 199-202.
- [31] ARAVIN A, GAIDATZIS D, PFEFFER S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes[J]. Nature, 2006, 442(7099): 203-207.
- [32] GRIVNA S T, BEYRET E, WANG Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells[J]. Genes & development, 2006, 20(13): 1709-1714.
- [33] LAU N C, SETO A G, KIM J, et al. Characterization of the piRNA Complex from rat testes[J]. Science, 2006, 313(5785): 363-367.
- [34] LI X Z, ROY C K, MOORE M J, et al. Defining piRNA primary transcripts[J]. Cell cycle, 2013, 12(11): 1657-1658.
- [35] BRENNECKE J, ARAVIN A A, STARK A, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*[J]. Cell, 2007, 128(6): 1089-1103.
- [36] CZECH B, PREALL J, MCGINN J, et al. A transcriptome-wide RNAi screen in the *Drosophila* ovary reveals factors of the germline piRNA pathway[J]. Molecular cell, 2013, 50(5): 749-761.
- [37] HANDLER D, MEIXNER K, PIZKA M, et al. The genetic makeup of the *Drosophila* piRNA pathway[J]. Molecular cell, 2013, 50(5): 762-777.
- [38] MA L, BUCHOLD G M, GREENBAUM M P, et al. GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline[J]. Plos genetics, 2009, 5(9): 1000635.
- [39] VAGIN V V, YU Y, JANKOWSKA A, et al. Minotaur is critical for primary piRNA biogenesis[J]. Rna-a publication of the rna society, 2013, 19(8): 1064-1077.
- [40] IPSARO J J, HAASE A D, KNOTT S R, et al. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis[J]. Nature, 2012, 491(7423): 279-283.
- [41] NISHIMASU H, ISHIZU H, SAITO K, et al. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis[J]. Nature, 2012, 491(7423): 284-287.
- [42] KAWAOKA S, IZUMI N, KATSUMA S, et al. 3' end formation of PIWI-interacting RNAs *in vitro*[J]. Molecular cell, 2011, 43(6): 1015-1022.
- [43] HAN B W, WANG W, LI C, et al. Noncoding RNA. piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production[J]. Science, 2015, 348(6236): 817-821.
- [44] HANDLER D, OLIVIERI D, NOVATCHKOVA M, et al. A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors[J]. Embo journal, 2011, 30(19): 3977-3993.
- [45] MOHN F, HANDLER D, BRENNECKE J. Noncoding RNA. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis[J]. Science, 2015, 348(6236): 812-817.
- [46] WEBSTER A, LI S, HUR J K, et al. Aub and Ago3 are recruited to nuage through two mechanisms to form a Ping-Pong complex assembled by krimper[J]. Molecular cell, 2015, 59(4): 564-575.
- [47] XIOL J, SPINELLI P, LAUSSMANN M, et al. RNA clamping by vasa assembles a piRNA amplifier complex on transposon transcripts[J]. Cell, 2014, 157(7): 1698-1711.
- [48] 赵爽, 刘默芳. piRNA 和 PIWI 蛋白的功能机制研究进展[J]. 生命科学, 2010(7): 623-627.
- [49] HAN B W, ZAMORE P D. piRNAs[J]. Current biology, 2014, 24(16): 730-733.
- [50] GOU L T, DAI P, YANG J H, et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis[J]. Cell research, 2014, 24(6): 680-700.
- [51] WATANABE T, TOTOKI Y, TOYODA A, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes[J]. Nature, 2008, 453(7194): 539-543.
- [52] GHILDIAL M, ZAMORE P D. Small silencing RNAs: An expanding universe[J]. Nature reviews genetics, 2009, 10(2): 94-108.
- [53] CARTHEW R W, SONTHEIMER E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655.
- [54] GHILDIAL M, SEITZ H, HORWICH M D, et al. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells[J]. Science, 2008, 320(5879): 1077-1081.
- [55] 郝力力, 李锐, 郑威. 日本血吸虫内源性 siRNAs 的研究[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(15): 71-73.
- [56] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.
- [57] PADDISON P J, CAUDY A A, BERNSTEIN E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. Genes & development, 2002, 16(8): 948-958.
- [58] DICKINS R A, HEMANN M T, ZILFOU J T, et al. Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors[J]. Nature Genetics, 2005, 37(11): 1289-1295.
- [59] STEGMEIER F, HU G, RICKLES R J, et al. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2005, 102(37): 13212-13217.
- [60] FRANK F, SONENBERG N, NAGAR B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2[J]. Nature, 2010, 465(7299): 818-822.
- [61] MEISTER G, TUSCHL T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA[J]. Nature, 2004, 431(7006): 343-349.
- [62] SIOMI H, SIOMI M C. On the road to reading the RNA-interference code[J]. Nature, 2009, 457(7228): 396-404.