评述

军事医学科学院近年 RNA 研究进展

军事医学科学院

收稿日期: 2011-07-18; 接受日期: 2011-08-28

doi: 10.1360/052011-605

摘要 RNA 研究一直是生命科学最重要的领域之一. 军事医学科学院在 RNA 研究方面主要集中在 RNA 病毒的基础研究、RNA 相关技术平台的建立和应用、核酶研究及反义核酸等几个方面. 在非编码微小 RNA (miRNA) 和 RNA 的生物信息学方面也开展了许多工作, 取得了较好的成绩. 多种功能 RNA 组学研究中的关键技术平台在军事医学科学院建立并得到广泛应用, 培养了一批 RNA 研究专业技术人才, 为进一步深入开展功能 RNA 研究奠定良好基础.

关键词RNA
军事医学科学院
基础研究
平台建立

有关 RNA 的研究一直是生命科学最重要的领域之一. 自 20 世纪 80 年代以来, RNA 科学领域取得了一系列突破性进展. 核酶的发现首次揭示了 RNA 具有催化功能的本质, 从根本上冲击了蛋白质是生命起源的学说. RNA 本身可以作为遗传物质的模板, 还可具有独立于蛋白质的生命活性. 在这个基础上, 生命起源于 RNA 的“RNA 世界”的假说, 已被科学界广泛接受. 随后在各种生物中发现的大量不同类型的 RNA, 特别是具有结构和功能高度多样性的非编码 RNA, 进一步表明 RNA 的功能不再局限为蛋白质合成过程中遗传信息传递的中间体, 它们也可以是基因的最终产物, 大量地参与对遗传信息表达的调控, 并与多种疾病的发生发展密切相关.

在近期生命科学研究中, 很少有其他领域获得比 RNA 研究更出人意料的众多重大突破以及对传统观点的诸多冲击. 首先, 许多严重危害和威胁人类健康的传染病原体, 如艾滋病的 HIV 病毒、丙肝病毒、戊肝病毒和 SARS 病毒, 都是以 RNA 为遗传信息载体. 显然, 对人类和其他生物中非编码 RNA 的研究将是医疗卫生和人类健康事业的迫切需要, 因为它有可能提供新的理论和更有效的手段来控制 and 预防

由 RNA 介导和与 RNA 相关的细胞病变和传染性病害. 其次, 许多研究表明, RNA 的异常与多种疾病相关, 如恶性肿瘤、红斑狼疮、斯耶格伦综合征、家族性生长激素缺陷 II 型病、Frasier 综合征、额颞叶失智征、帕金森氏征、脊髓肌肉萎缩征、萎缩性肌强直、囊性纤维化、地中海贫血、致死性新生儿线粒体肌病、亚急性坏死性脑脊髓综合病等. RNA 研究不仅可以促进生命科学基础研究, 更重要的是能够帮助人们认识生命现象和重大疾病的机理. 最后, 围绕 RNA 研究产生的多种 RNA 相关技术, 如 RNA 干扰技术、随机 RNA 文库技术、核酶技术、反义核酸技术、RNA 生物信息学及其数据库等将在医药研究领域有广泛的应用前景. 其中核酶, 反义 RNA, RNAi, SELEX 等 RNA 技术已被广泛应用于医疗和药物筛选. 特别是 RNA 干涉的理论和应用正在引起一场新的生物技术革命.

国外有关 RNA 研究的进展相当迅速, 主要集中在 RNA 的转录调控、非编码 RNA 的结构与功能及 RNA 研究相关技术方面. 从 1999 年开始, 连续 6 年, RNA 的研究都入选 *Science* 的年度 10 大科技进展. 特别是 2004 年的第 5 大进展, *Science* 以“隐蔽的 DNA

引用格式: 军事医学科学院. 军事医学科学院近年 RNA 研究进展. 中国科学: 生命科学, 2011, 41: 796-799, doi: 10.1360/052011-605

宝藏”为题,指出在占人类基因组 90%以上的所谓“无用 DNA”(junk DNA)中存在大量的 DNA 调控元件、转座子和非编码 RNA 基因.在基因组和蛋白质组计划相继提出后,欧盟启动了有 18 个欧洲国家参加的“RNA 调控网络与健康与疾病”(RNA in health and disease “Ribonet”)计划.2003 年,美国国家人类基因研究所提出了“DNA 百科全书”(encyclopedia of DNA elements)计划,其主要目标也是研究非蛋白质编码 DNA (ncDNA)的功能.

虽然中国在 tRNA 研究方面曾经走在世界前列,有着良好的基础,但是国内 RNA 研究整体上还比较薄弱.近几年已经有了相当大的发展,研究领域主要集中在 miRNA, siRNA, snoRNA, RNA 适配子,核酶及 RNA 病毒等几个方面,但就研究的规模、深度与宽度与国际水平仍然有较大差距.为此,中国科学家在 109 次香山科学会议上提出了尽快组织中国 RNA 组学研究的建议,2005 年国家正式批准国家重点基础研究发展计划项目“人类非编码 RNA 及其介导的基因表达调控”立项,反映出中国对 RNA 的研究已经高度重视.目前国家科技部已经立项支持多个有关 RNA 研究的重大科技项目.

军事医学科学院在 RNA 研究方面起步较晚,“十五”期间才开始这方面的研究,近几年工作主要集中在 RNA 病毒的基础研究、RNA 相关技术平台的建立和应用、核酶研究及反义核酸等几个方面.在非编码微小 RNA (miRNA)和 RNA 的生物信息学方面也开展了许多工作,取得了较好的成绩.军事医学科学院 2004 年举办了北京地区 RNA 进展学术研讨会,2005 年承办了第 4 届全国 RNA 进展学术研讨会.军事医学科学院多个课题组参加了分别由中山大学屈良鹄教授和宋尔卫教授领衔的有关非编码 RNA 及其调控网络机制研究的多项国家重点基础研究发展计划课题,培养了一批 RNA 研究专业技术人才,为进一步深入开展功能 RNA 研究奠定了良好基础.

1 主要研究结果

1.1 miRNA 及其他非编码 RNA 的研究

miRNA 是由基因组编码,从具有特定二级结构的前体剪切而来的约 22 nt 大小的非编码 RNA,具有重要的生物学意义.

我们建立了一种新的 miRNA 基因克隆分析方法,

该方法被 *Nature Genetics* 的 miRNA 专刊总结为克隆 miRNA 的三种方法之一,利用此方法在衰老小鼠肝组织和人胎肝中获得了多条新的 miRNA 序列.建立了基于 polyA 加尾的 RT-PCR miRNA 检测分析方法,该方法已成为 miRNA 检测和功能研究的重要工具,并已获得国家发明专利.

针对 miRNA 研究中靶基因确定的瓶颈问题,利用生物信息学预测和生物学实验技术,我们建立了一种可以快速、准确鉴别 miRNA 在某一细胞中功能靶基因的策略,并发现细胞中 miRNA 功能性靶标是动态可变的(dynamic switching),由此提出了 miRNA 功能性靶标(functional target)的概念.

在 miRNAs 生物学功能及调控机制研究方面,我们发现一批 miRNA 调控靶基因及其生物学功能,包括发现了 miR-16 家族、miR-193b, miR-34a, miR-200b 等能够通过调控细胞周期影响肿瘤细胞的凋亡和侵袭转移(图 1), miR-101 调控 *fos* 表达和 miR-34a 下调 *c-met* 抑制肝癌细胞侵袭和转移, miRNA-24 在 TGF- β 信号调节的成肌分化中发挥重要生物学功能,多种 miRNA 在低氧状态下与神经祖细胞生长发育有密切关系以及发现一批辐射诱导表达的 miRNA 分子;在国内外率先开展了辐射诱导 RNA 损伤修复的研究,建立了辐射诱导 RNA 断裂损伤的检测方法,观察到内含子 miR-301 反馈调节主基因 *SKA2* 表达和功能,内含子 miRNA 与其祖基因之间的相互调控作用是一种普遍现象,对深入理解 miRNA 产生调控机制具有重要帮助.在其他非编码 RNA 研究方面,发现应激诱导真核细胞生成 half-tRNA,发现血管生成素(angiotensin)是应激导致细胞内 half-tRNA 生成的核酶,证实金黄色葡萄球菌 *SsrA* RNA (tmRNA)能够作为反义 RNA 结合色素合成酶基因 *crtMN* 调节色素合成, RNAIII 作为反义 RNA 结合 map 蛋白(major histocompatibility complex class II analogous protein)影响金黄色葡萄球菌毒力因子表达.

1.2 RNA 的生物信息学研究

关于 RNA 二级结构预测方面,军事医学科学院在国内也处于较高的水平,建立了一种基于螺旋区分布的 RNA 二级结构预测方法,并建立了 RNA 二级机构预测的网站(RDfolder);在选择反义核酸的预测方面,提出了一种新的基于多种预测的 mRNA 机构进行反义核酸选择的方法,而且还建立了反义核酸

图1 肝癌相关 miRNA 及其靶基因的调控网络

的数据库 AOBase. 在国际上首先提出了 miRNA 稳健性是折叠自由能演化副产品的证据(图 2), 反驳了前人提出的稳健性直接进化假说. 之后, 又通过重建 miRNA 的演化历史方法, 观测到 miRNA 的折叠自由能在演化中受到强烈选择、并会直接影响稳健性的现象. 尽管目前国际上对这一问题仍存在争议, 深入研究必将对理解 miRNA 的起源和进化过程产生积极意义.

在研究中, 军事医学科学院科研人员发展了多种和 RNA 相关的算法和软件, 提出了一种可以精细刻画 RNA 高级结构的数学模型, 以此为基础提出了多种新的描述 RNA 高级结构的拓扑指数, 可以反映 RNA 二级结构之间的微小差异并将该算法应用于核糖体功能域的识别和分类, 取得了良好效果; 提出了一系列 RNA 有害突变预测和结构稳健性评估算法, 开发了国际上第一个 RNA 有害突变预测 Web 计算程序 RDMAS, 目前已提供了 1000 次以上的计算服务, 发布了 RNA 稳健性评估软件包 RSRE 和 RNA 稳健性演化模拟和分析软件包 EvoRSR, 为 RNA 稳健性研究提供了软件平台; 开发了国际上第一个多稳态 RNA 分子设计平台的 Web 计算 MSRMD, 提供在线的多稳态 RNA 分子设计. 这些工作在非编码 RNA 研究领域中具有广阔的应用前景.

在细菌 sRNA 靶标预测研究方面, 军事医学科学院也做了大量工作. 首先, 提出了 RNA 二级结构谱

图2 在多点突变下 miRNA 结构稳健性示例

(A), (B), (C)分别为多点突变稳健序列 hsa-mir-559, 单点突变稳健序列 hsa-mir-614, 不稳健型序列 rno-mir-349. 颜色柱为 η 值同颜色的映射关系, 每个突变体的 η 值按照此映射关系被映射为一个色点. 具有同样突变位点数目的突变体色点按照 η 值从大到小逆时针排列在同心圆上, 同心圆的半径大小同突变位点数目线性正相关, 并由多纳圈彩图零度角位置的数值轴标出

概念和 Tclass 分类系统, 并以此构建了细菌 sRNA 靶标预测模型, 开发了 sRNA 靶标预测服务器 sRNATarget (<http://ccb.bmi.ac.cn/srnatarget/>). 到目前

为止, 已为 20 多个国家提供了 2000 余次的 sRNA 靶标预测服务. 其次, 文献上系统收集了实验证实的 sRNA 靶标数据, 构建了 sRNA 靶标数据库 sRNATarBase (<http://ccb.bmi.ac.cn/srnatarbase>), 基于该数据库, 不仅可以查看 sRNA-mRNA 之间的结合位点和突变信息, 还提供了 sRNA-mRNA 相互作用在相近细菌基因组中的保守性分析功能. 目前该数据库包含了 sRNA 诱导靶标 11 例、抑制靶标 129 例和无相互作用靶标 252 例, 为 sRNA 靶标预测提供了很好的支持. 以之为基础, 开发了新的 sRNA 靶标预测模型 sTarPicker (<http://ccb.bmi.ac.cn/starpicker/>), 为今后深入研究 sRNA 功能提供了重要支持.

2 RNA 相关技术平台的建立和应用

2.1 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术

早在 2003 年 5 月, 军事医学科学院科研人员完成了利用 RNAi 技术抑制 SARS 病毒的初步研究, 并申请了国家发明专利, 2005 年该专利获得授权. 利用 RNAi 技术, 近几年在抗病毒、抗肿瘤等疾病治疗以及一些基础研究方面均取得了良好进展.

2.2 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技术

军事医学科学院是国内较早开展 SELEX 技术的研究和应用的单位之一, 并取得了较好的研究成果. 在引进经典 SELEX 技术的同时, 建立了以完整细胞

为靶的消减 SELEX、临床肿瘤组织病理切片 SELEX 及毛细管电泳 SELEX 等技术手段, 并筛选获得了牛凝血酶、人乙酰胆碱脂酶, 分化 PC12 细胞、肿瘤病理组织及某些微生物与毒素等的寡核苷酸配基分子, 在疾病治疗、防生以及基础研究方面均有一定的应用前景. 其中, 以完整细胞或肿瘤组织切片为靶的消减 SELEX 技术为国际上首先报道, 受到国际同行好评.

3 结论

纵观分子生物学发展史, 可以发现, 每当 DNA 研究取得理论或技术上的重大进展, RNA 研究都会出现一个高潮. 国内外科学家普遍认为, 20 世纪是蛋白质和 DNA 研究的时代, 而 21 世纪将会是 RNA 的时代.

重新全面认识 RNA 生物功能的多样性是目前国际上有关 RNA 研究热点, 也是今后发展趋势, 具体体现在 RNA 的组学的研究. 这将对生命现象的揭示具有重要帮助. 重点领域是, 发现更多新的 RNA 基因及其功能, 探讨非编码 RNA 及其介导的基因表达调控与疾病发生发展的关系, 将一些关键 RNA 技术平台应用于医药研究领域.

回顾过去, 军事医学科学院有关 RNA 的研究为推动军事医学科学院军事医学的发展起到了重要作用. 展望未来, 结合军事医学科学院军事医学特点, 开展功能 RNA 组学及其关键技术平台建立与应用研究也将是军事医学科学院 RNA 研究的发展方向.

撰稿人: 邵宁生