

DOI: 10.13376/j.cblls/2016088

文章编号: 1004-0374(2016)06-0686-09



王正荣 (1955-), 教授, 博士生导师。主要从事生物医学工程、时间生物学、时间药理学和时间治疗学的研究。先后主持完成国家自然科学基金、省部基金课题、国家“九五”攻关和“973”子课题 20 多项。发表论文 200 余篇, 其中 SCI 论文 60 余篇, 出版专著 4 本, 申请国家发明专利四项, 获四川省科技进步奖三项。

非编码RNA在近日节律中的作用

后 望, 杨淑红, 王正荣*, 应俊杰, 杨振华, 徐 涛, 丁 璐, 汪宇辉, 江 舟, 成姝婷
(四川大学卫生部时间生物学重点实验室, 四川大学华西基础医学与法医学院生物医学工程研究室, 成都 610041)

摘 要: 生物节律系统作为生物体的基本系统之一在稳态维持、新陈代谢、睡眠与觉醒和癌症的发生与治疗等生理及病理领域发挥了重要影响。而针对节律调节机制本身的研究也是生物研究的热点领域之一。作为生物研究的“新大陆”, 非编码 RNA (ncRNA) 与节律系统和核心节律基因的相互作用日益为人所重视, 已成为时间生物学领域最具潜力的研究课题之一。将综合国内外对非编码 RNA 与生物钟相互作用的研究现状, 对参与其中的非编码 RNA 成员和机制做逐一综述。

关键词: 近日节律; microRNA; lncRNA; 节律基因

中图分类号: Q41; Q522 **文献标志码:** A

The function of non-coding RNA in circadian rhythm system

HOU Wang, YANG Shu-Hong, WANG Zheng-Rong*, YING Jun-Jie, YANG Zhen-Hua,
XU Tao, DING Lu, WANG Yu-Hui, JIANG Zhou, CHENG Shu-Ting
(Health Ministry Key Laboratory of Chronobiology, Sichuan University,
Pre-clinic and Forensic Medical School, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Circadian rhythm system affect a variety of physiological and pathological processes like homeostasis, metabolism, sleep-wake and the occurrence and treatment of cancer. Furthermore, the regulatory mechanisms for the circadian rhythm are one of the hottest areas in biological research. As a new world of biological research, the relationship between the non-coding RNA (ncRNA) and circadian rhythm system has become one of the most promising research projects in the field of chronobiology. In this review, we will summarize our current knowledge about the interaction between the ncRNA and circadian rhythm system, then pay close attention to the members of ncRNA and the mechanisms in this field.

Key words: circadian rhythm; microRNA; lncRNA; circadian gene

收稿日期: 2015-07-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371180)

*通信作者: E-mail: wangzhengrong@126.com, Tel: 028-85501287

地球上几乎所有的生物体都具有周期约为 24 h 的近日节律。近日节律能够帮助生物体预测每日外界环境的变化, 影响生物体的行为和生理过程^[1-2]。现有研究认为, 哺乳动物的近日钟系统具有等级结构, 位于下丘脑的视交叉上核区域 (SCN) 是中枢起搏点, 在近日节律的产生、维持和调控中起主要作用, 其他位于外周组织的为次起搏点, 受到中枢起搏点的调节和控制^[3-4]。哺乳动物中枢和外周起搏点均由一系列近日钟基因的转录和转录后调控产生的分子振荡构成^[5]。引起分子振荡的基本结构包括正性过程和负性过程。正性过程: BMAL1 和 CLOCK 形成异二聚体, 通过结合节律基因 *Pers* 和 *Crys* 上游的 E-box 启动区, 促进 *Pers* 和 *Crys* 基因的转录。负性过程: 当细胞质中的 CRYs 和 PERs 的蛋白浓度升高到一定的程度, 发生磷酸化, 形成核复合物进入细胞核, 干扰 BMAL1 : CLOCK 的转录活性, 从而抑制 *Pers* 和 *Crys* 等基因的转录。正性过程和负性过程形成的负反馈环路, 构成近日节律分子振荡的基本结构。但近日节律的分子机制研究还不完善, 随着节律研究的不断深入, 越来越多的基因和一些新的调控模式被发现参与其中, 人们对整个节律系统和节律活动也有了全新的认识。ncRNA 与节律系统的相互作用就是其中一例。

2012年, 人类DNA元件百科全书计划 (ENCODE) 发现, 大约 80% 的 DNA 都能转录成 RNA, 其中非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 占细胞总 RNA 的绝大部分, 种类也很多 (图 1)。这些非编码 RNA

在 RNA 水平上各自行使其生物学功能, 在很多生命活动中起着举足轻重的作用, 与疾病的发生、发展、诊断和治疗有密切的关系, 是当今分子生物学最热门的前沿研究领域之一。

大量研究表明, 非编码 RNA 与近日节律有着密切的联系, 本文结合国内外非编码 RNA 的研究现状, 对其分类、调控机制以及对近日节律作用逐一综述。

1 miRNA调控近日钟系统

miRNA 是一种由高等真核生物基因组编码的片段较短的 ncRNA (<22 nt)。miRNA 通过和靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合体 (RISC) 降解 mRNA 或阻碍其翻译。目前, 越来越多的研究发现 miRNA 对近日钟系统有非常重要的调节作用, 即生物体内的 miRNA 通过和靶 mRNA 碱基配对对导致诱导沉默复合体 (RISC) 降解 mRNA 或阻碍其翻译, 调控近日钟基因转录后的表达过程。目前研究已经发现了多种具有近日节律振荡特征的 miRNA 直接或者间接地参与调控生物体的近日节律 (表 1), 提示 miRNA 可能是近日钟的重要组成部分。本文将从 miRNA 对不同物种近日钟系统中枢的调控、对近日钟系统输入的作用和对近日钟系统的输出作用这三个方面综述 miRNA 对近日节律的作用。

1.1 miRNA调控不同物种近日钟系统中枢

1.1.1 miRNA调控哺乳动物的核心近日钟基因

小鼠的 SCN 组织中表达 miR-219 和 miR-132, 其中 miR-219 属于钟控基因, 参与调节小鼠的运动

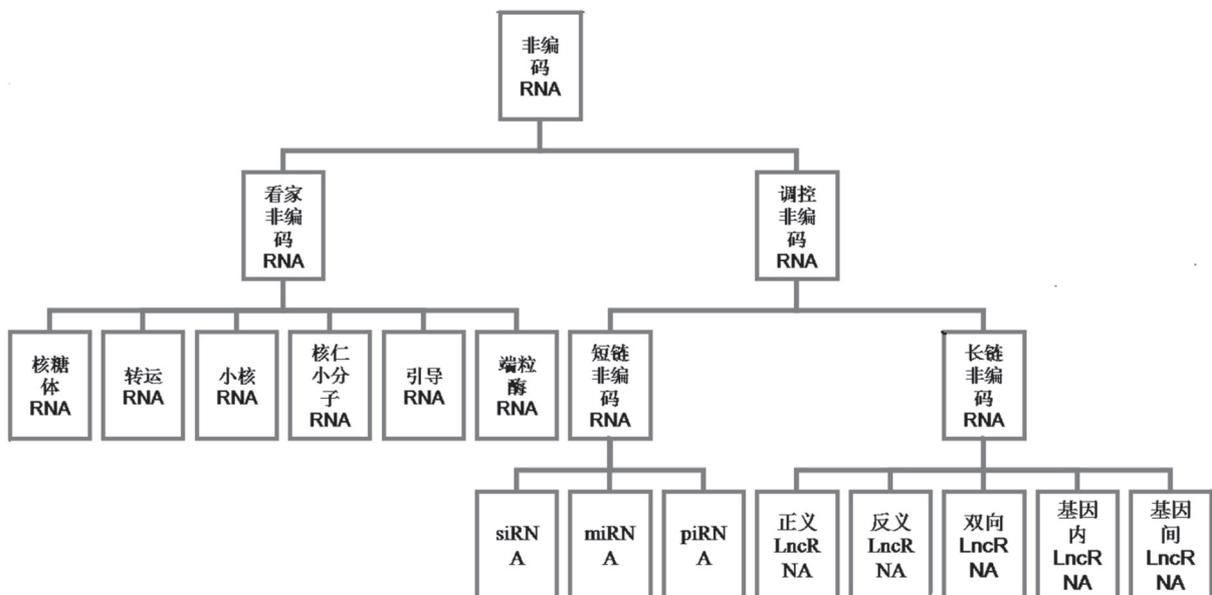


图1 非编码RNA的分类

表1 调控近日节律的miRNA分子的靶基因及功能

miRNA	种属	预测靶基因	功能
miR-142-3p、miR-494	小鼠	<i>bmal1</i>	在外周近日振荡中调节 <i>bmal1</i> 的转录 ^[10]
Bantam	黑腹果蝇	Clock	调节周期长短和运动节律 ^[13]
miR-192/194	人类、小鼠	<i>Per1</i> 、 <i>Per2</i> 、 <i>Per3</i>	调节 <i>per</i> 基因转录和近日周期长度 ^[11]
miR-219	小鼠	<i>bmal1</i> 、 <i>CaMKIIγ</i>	调节近日周期长短和速度, 通过下调CaMKII γ 负调控NMDA受体功能 ^[6]
miR-132	小鼠	<i>Mecp2</i> 、 <i>Ep300</i> 、 <i>Jarid1</i> 、 <i>Btg2</i> 、 <i>Paip2a</i>	参与染色质重塑, 调节近日钟基因的表达和光诱导重置近日节律的过程 ^[6, 16]
miR-96、miR-182、miR-183	小鼠	Adenylyl cyclase 6	近日调节视网膜内的靶基因Adenylyl cyclase 6 ^[29]
miR-26a	原鸡	L-VGCC α 1C	负性调控细胞膜视锥受体L-VGCC α 1C的表达 ^[28]
miR-122	小鼠	<i>Pparβ/δ</i> 、 <i>Smarcd1</i> / <i>Baf60a</i> 、 <i>nocturnin</i>	调节各种近日代谢调节因子参与肝脏的脂肪代谢 ^[17, 19]
miR-279	黑腹果蝇	——	通过调节JAK/STAT的活性和STAT92E的水平调控近日运动行为的输出 ^[30]
miR-185	小鼠	<i>mCry1</i>	参与调控 <i>mCry1</i> 转录后的表达过程 ^[12]
let-7	黑腹果蝇	<i>Cwo</i>	参与调控 <i>mCry1</i> 转录后的表达过程 ^[14]
miR-132、miR-138、let-7b、miR-125a C	大鼠	——	改变大鼠的睡眠结构, 调控睡眠/觉醒节律 ^[23-25]
miR-182		<i>Clock</i>	可能通过调节 <i>Clock</i> 参与抑郁症患者夜间失眠过程 ^[33]
miR-181d、miR-191	小鼠	<i>Clock</i> 、 <i>bmal1</i>	调控肝的近日节律 ^[34]
miR-29a/b/c	人类	<i>hPer1</i>	调控 <i>hPer1</i> 的转录后表达, 参与近日节律的调控 ^[35]
miR-263a	黑腹果蝇	<i>Clock</i> 、 <i>Doubletime</i> 、 <i>ck1ϵ</i> 、 <i>twins</i>	参与近日协调转录和转录后通路微调机制 ^[36]
miR-263b	黑腹果蝇	<i>Clock</i> 、 <i>clockwork orange</i>	参与近日协调转录和转录后通路微调机制 ^[36]

节律的周期; miR-132 属于光诱导基因, 参与调节小鼠的光相位反应。Cheng 等^[6]研究发现, miR-219 和 miR-132 参与调控小鼠的近日节律与它们参与调节细胞的兴奋性相关。也有研究发现, miR-219 通过下调钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II γ (CaMKII γ) 负性调节 NMDA 受体级联信号通路, 参与调控小鼠的运动行为, 阐述了 miR-219 参与调节小鼠运动节律的分子机制^[7]。

小鼠的 SCN 组织也表达具有近日节律的 miR-142-3p, 研究发现 miR-142-3p 能够直接作用于 *Bmal1* 的 3'UTR 区域抑制 *Bmal1* 的表达, 且 miR-142-3p 的表达受到 CLOCK/BMAL1 异二聚体的调控, 说明 miRNAs 和核心近日钟基因之间存在潜在的负反馈环路^[8-9]。同样, 血液循环系统也发现了可以调控 *Bmal1* 的 miRNA, miR-494、miR-152 和 miR-142-3p, 推测这些 miRNA 可能参与中枢节律系统与外周组织的对应系统同步化的过程^[10]。

研究发现 miR-192/194 基因簇可以负性调节 *per1*、*per2* 和 *per3* 的表达^[11]。这三种基因的 3'UTRs

均含有一个或者数个 miR-192 以及 miR-194 的靶标结合位点, 这些位点的突变会导致 miR-192/194 的调节作用消失。相反, NIH3T3 细胞过表达 miR-192/194, 可以显著地缩短细胞的近日节律周期, 这个可能与 miR-192/194 抑制 *per* 基因的表达相关。

Lee 等^[12]研究发现, miR-185 可以结合在 *mCry1* 的 3'UTR 区域, 参与调控 *mCry1* 转录后的表达过程。细胞质中, miR-185 的表达水平与 mCRY1 蛋白的表达水平呈负相关, 敲除 miR-185 会增强 mCRY1 蛋白的振幅, 这表明 miR-185 通过调控 *mCry1* 的 mRNA 翻译效率参与微调 mCRY1 蛋白的表达。

1.1.2 miRNA 调控果蝇的核心近日钟基因

果蝇的中枢近日钟系统位于头部的生物钟神经元。Kadener 等^[13]研究发现, 果蝇头部的核心近日钟基因 *clock (clk)*、*vri* 和 *clockwork orange (cwo)* 受到 miRNA 的调控。其中一种 miRNA *bantam*, 可以结合在 *clk* 3'UTR 区域的三个进化保守的靶标结合位点, 调控 *clk* 的表达, *bantam* 过表达可以快速地延长果蝇的运动节律周期约 2~3 小时。miRNA

let-7 抑制 CWO 的表达, 参与调节果蝇的近日节律, let-7 突变的果蝇头部 CWO 蛋白表达升高, PER 蛋白表达节律异常^[14]。这表明 miRNA bantam 和 let-7 可以调控核心近日钟基因的表达, 在产生和维持果蝇的近日节律中起到非常重要的作用。

1.2 miRNA调控近日钟的输入

中枢近日钟系统产生的节律可受多种授时因子 (Zeitgeber), 如光暗周期、环境温度、社交刺激、身体运动、饮食等因素的影响, 这些授时因子通过导引作用 (entrainment) 使生物钟调整自身的相位, 与外界环境保持同步^[15]。作为最重要的授时因子, 光信号可刺激视网膜产生兴奋, 通过直接或间接途径传至 SCN, 调节相关基因表达, 使之与外界光暗环境同步。

研究发现 miRNA 可以调节光照对近日钟的导引作用, 参与近日钟的输入过程。Cheng 等^[6] 通过筛选转录因子结合位点发现, miR-132 是 cAMP 响应结合元件 (CREB) 蛋白的潜在靶基因, 是光诱导重置 SCN 近日钟过程中的关键因子。计算机软件分析发现, miR-132 基因 5' 端的启动子区域存在两个 cAMP 应答元件基序。miR-132 的表达受到光照强烈的诱导, 需要激活 ERK/MAPK 级联信号通路, 证实了 miR-132 本身就是近日钟输入通路的组成部分。更重要的是, 反义修饰敲除 SCN 中的 miR-132 会增强光重置节律的作用, 证明 miR-132 是光重置节律的负性调节因子。值得注意的是, miR-132 是第一个被发现的可以影响光照诱导哺乳动物生物钟的 miRNA, 它的上调可以减弱光照重置 SCN 近日节律的作用。

Alvarez-Saavedra 等^[16] 利用计算机软件分析预测 miR-132 可以直接调控三个染色质相关的基因 (*Mecp2*、*Jarid1a* 和 *Ep300*) 和两个翻译相关的靶基因 (*Btg2* 和 *Paip2a*) 的表达。*Per1* 和 *Per2* 启动子中含有 MeCP2 的结合位点。体外 MeCP2 的过表达引发了 CREB 依赖性 *Per1* 和 *Per2* 的活化。因此, SCN 中 miR-132 通过直接作用于下游靶基因协调染色质重塑和蛋白质翻译过程, 从而参与微调近日钟的重置过程。Alvarez-Saavedra 等^[16] 的研究进一步表明, miRNAs 可以作用于共同承担生物功能的基因亚群来协调和紧密调控细胞特异性的生理过程。

1.3 miRNA调控生物钟的输出

1.3.1 miRNA调控肝脏的代谢

在肝脏组织表达的成熟 miR-122 没有近日节律, 但是它的主要转录物和前体都具有近日节律。

miR-122 的启动子区域具有两个进化保守的视黄酸相关孤核受体响应元件, 在 *Rev-erba* 敲除的肝脏组织中, miR-122 主要的转录物表达水平持续升高, 且没有节律振荡, 说明 REV-ERB α 可以驱动 miR-122 产生近日节律转录。特异性敲除肝脏组织的 miR-122, 可以上调和下调多种的基因, 其中大部分基因在肝组织中具有近日节律^[17]。肝脏脂代谢相关的基因 *Ppar β/δ* 来 (过氧化物酶体增生物激活受体 β/δ) 的 3'UTR 区域含有四个 miR-122 结合位点, 说明肝脏组织中受到核心近日钟 REV-ERB α 调控的 miR-122 可以控制 *Ppar β/δ* 来调节肝脏的脂肪代谢过程^[18]。

Noctumin 是一种去腺苷化酶, 可以催化 poly(A) 末端缩短靶基因的转录产物, 有研究发现 Noctumin 是 miR-122 的直接靶基因^[19]。小鼠肝脏中 Noctumin 的表达具有明显的近日节律^[20]。缺乏 Noctumin 的小鼠在肝脏组织脂肪稳态和对葡萄糖的响应方面具有严重缺陷^[21]。敲除肝脏组织 miR-122 会增加 Noctumin 近日节律振幅。故推测, 依赖 miR-122 调节 Noctumin 可能是近日钟 miRNA 和肝脏脂肪代谢之间的重要衔接因素^[22]。

1.3.2 miRNA调控睡眠结构

哺乳动物的睡眠-觉醒具有明显的近日节律, 受到中枢近日钟的调控。Davis 等^[23-25] 研究发现, 剥夺睡眠的大鼠, 即睡眠-觉醒节律紊乱, 会改变大鼠大脑组织某些 miRNAs 的表达水平, 如 miR-132、miR-138、let-7b 和 miR-125a C, 相反, 改变大脑中某些 miRNA 的表达水平也会影响大鼠的睡眠结构, 从而影响其节律。在大鼠脑室分别注射 miR-132、miR-138、let-7b 以及 miR-125a 的特异性抑制剂, 发现 miR-132 抑制剂会抑制大鼠的非快速动眼睡眠 (NREMS) 的持续时间和 NREMS EEG SWA, 同时增加快速动眼睡眠 (REMS) 的持续时间。miR-138 抑制剂则抑制大鼠的睡眠和非快速动眼睡眠 (NREMS) EEG δ 波, let-7b 抑制剂仅降低非快速动眼睡眠 (NREMS) EEG δ 波, 而 miR-125a 抑制剂在三天后才影响睡眠, 且并不改变非快速动眼睡眠 (NREMS) EEG δ 波。总之, miRNA 会不同程度地调控大鼠的睡眠节律。

1.3.3 miRNA调控视觉功能

Ko 等^[26-27] 研究发现, 鸡的视锥光感受器里的 L-型电压门控钙离子通道 (L-VGCCs) 的活性和表达受到近日节律调控。miR-26a 可以特异性地结合并负性调节 L-VGCC α 1C 的表达^[28], 鸡的视锥细胞的光感受器 miR-26a 的过表达可以导致 L-VGCC α 1C 蛋白

剧烈减少,并且导致 L-VGCCs 夜间振幅降低。相反,敲除了 miR-26a 的视锥细胞光感受器会增加 L-VGCCs 的近日节律振幅。有趣的是,体内 miR-26a 的表达受到 CLOCK 和 CREB 的调控,miR-26a 的振荡与视锥细胞光感受器受体 L-VGCC α 1C 的表达呈负相关,意味着 miR-26a 可以改变 L-VGCC α 1C 的近日节律振荡波形。这些研究表明,脊椎动物视网膜表达的特异性 miRNA 可以调节视觉功能^[29]。

1.3.4 miRNA 调控运动活动

在最近的研究中,Luo 和 Sehgal^[30]首次发现 miR-279 可以特异性地影响近日节律的运动输出过程而不会影响核心近日钟的功能。过表达 miR-279 会严重地破坏果蝇的运动节律,但是并不影响果蝇核心近日钟细胞中 PER 的节律振荡和色素分散因子的表达水平,说明 miR-279 可以作用于近日钟核心基因下游来调节运动节律。miR-279 通过直接作用于 Upd (JAK/STAT 信号通路的配体)来调节运动节律,敲除果蝇头部 miR-279,Upd 的表达水平上调。Upd 敲除可以引起果蝇行为节律的异常,更重要的是,Upd 敲除后 miR-279 果蝇突变体的行为节律异常现象消失,故 miR-279 通过 JAK/STAT 信号通路参与调控果蝇的运动节律输出过程。

1.3.5 miRNA 调控近日节律紊乱引起的病理过程

miRNAs 可以调控近日节律紊乱引起的神经系统疾病。研究报道,一些特殊的 miRNAs 在抑郁症、孤独症和智力迟缓等疾病中发挥一定的作用。临床研究证明,miR-182 前体的多态性参与抑郁症患者夜间失眠过程^[31]。有趣的是,Clock 的多态性也与失眠症相关^[32]。有体外研究实验发现,Clock 是 miR-182 的直接靶基因,故 miR-182 可能通过调节 Clock 参与抑郁症患者夜间失眠过程。也有研究发现,孤独症患者和正常人体内 miR-139-5p、miR-219-5p、miR-29b 和 miR-103 的表达水平具有显著的差异,说明 miRNA 的失调可能会导致疾病,尤其是自闭症的产生^[33]。

2 LncRNA 与节律基因的相互作用及其影响

目前,针对节律系统以及节律基因与 microRNA 的相互作用的研究方兴未艾,已经在理论研究层面和临床应用层面取得了一系列令人激动的研究成果,并形成了一套行之有效的研究方法^[37-38]。于是,研究人员很自然地会将 ncRNA 这个 RNA 家族研究的新热点和近日节律系统及其核心节律基因这一生物体内稳态的基础系统相互联系起来。当前研究人

员主要将精力集中在以下三个方向:(1)部分 lncRNA 参与脊椎动物节律系统发挥作用;(2)特定 lncRNA 对特定具有节律性的生理活动的影响;(3)特定 lncRNA 通过与部分节律基因相互作用,进而对癌症等重大疾病产生影响。

2.1 节律系统对 lncRNA 的调节,并使其成为节律活动的一个环节

Coon 等^[39]以大鼠为实验对象,对与节律系统存在相互作用的 lncRNA 进行了筛选,并对功能进行了初步探索。实验中,研究人员通过生物信息学手段,在大鼠的松果体区域成功筛选出了 112 个 lncRNA。首先,其中部分 lncRNA 与环境时间存在明显的关联性,80% 的 lncRNA 昼夜表达量出现差异,其中 59% 的 lncRNA 在夜间表达升高。然后,研究人员在其中选取 8 个昼夜表达差异最为明显的 lncRNA,采用 Northern blot 法进行进一步研究,结果显示上述 lncRNA 尽管彼此表达量不同,但是表达水平昼夜差异明显(即使其中差距最小者也达到 2 倍以上),其普遍在夜间达到表达高峰。原位杂交显示上述 lncRNA 均可在松果体内发现,与其他含有这些 lncRNA 的组织相比,夜间大部分 lncRNA 的表达水平显著高于其他非松果体组织,而日间则刚好与此相反,且上述 8 个 lncRNA 中有 7 个在松果体以外的组织中没有发现随着昼夜变化 lncRNA 表达量出现差异,这都提示了这些 lncRNA 与中心节律调节系统存在密切联系。有研究报道,大鼠体内的 SCN- 松果体神经通路是调节松果体节律活动的上级神经通路(SCG)。因此,研究人员发现,在实验中将该通路进行阻断处理可以使 8 个 lncRNA 中有 7 个丧失了昼夜表达水平差异,这一结果是对节律系统与 lncRNA 存在相互作用这一假说的直接而有力地证明。

已有研究报道,对于 SCN- 松果体通路而言,SCN 通过控制交感神经分泌去甲肾上腺素(NE)激活该通路。因此,用去甲肾上腺素激动剂异丙肾上腺素对大鼠体内和体外松果体组织进行处理发现,8 种 lncRNA 中有 2 种在日间就出现了表达水平提高的现象,而在夜间,8 种之中有 4 种 lncRNA 表达量大幅调高,表达速率明显加快。以上发现对 NE 在夜间调解激活松果体内 lncRNA 表达这一假说提供了有力的支持。从现有文献中得知,NE 在松果体内最先与之互动的第二信使是 cAMP,用 cAMP 类似物,能透过细胞膜的连丁酰基-cAMP 模拟 NE 的影响,对体外培养的松果体进行处理,得

到的结果与之前实验中所观察到的结果一致。这就建立了一种机制,即NE是通过cAMP来激活松果体内的lncRNA表达。

松果体在人体生理活动中,特别是褪黑素节律表达中扮演了重要角色,而其中表达的lncRNA则受到节律系统的调控,这对lncRNA参与到生物节律活动调节这一假说提供了有力支持。

2.2 保守的lncRNA, *yar*对果蝇睡眠行为的影响

如前文所述,已有研究证实lncRNA可能参与到节律生物活动中来,且对下游生理活动构成调控。Soshnev等^[40]以果蝇为研究对象,发现了一种保守的,参与果蝇体内*yellow (y)*和*achaete (ac)*基因转录调控的lncRNA, *yellow-achaete intergenic RNA (yar)*。

实验中,将含有不同*yar*基因表型的实验组和对照组的雌性果蝇置于监视用培养管内,在最初三天培养环境中进行12:12光暗循环处理,之后在第四天对果蝇进行睡眠剥夺处理,然后对果蝇在睡眠剥夺前后的日间睡眠状况进行评估。结果发现:在睡眠剥夺发生后,*yar*野生型的日间睡眠总时间和全天睡眠的时间都出现延长,而不同的*yar*突变组大多无此现象发生,唯一表现出日间睡眠延长的突变种其睡眠时间长度也低于野生型。针对这种突变种,实验人员研究发现其睡眠时间的延长是由于其自身还有少量可被正常翻译的*yar*基因表达的缘故。而后,研究人员向*yar*基因突变的果蝇体内转入外源的*yar*基因,发现睡眠缺陷得到明显修复,这些实验结果证明了*yar*基因的突变可以显著影响睡眠-觉醒稳态的转换。

表型分析证明*yar*基因对于维持果蝇睡眠的稳态具有重要意义。研究人员进一步发现,对于*yar*基因功能缺失的突变型,其夜间睡眠时间显著缩短,从而也导致了总的睡眠时间的缩短。同时,有研究确定*yar*基因在果蝇脑中存在表达。研究人员认为*yar*基因转录产物可能直接参与了睡眠模式的调控,而lncRNA *yar*又可对其转录直接进行调控,故为lncRNA参与具有节律特征的生理活动调控提供了理论支持。上述实验提示了lncRNA可能在节律生理活动的变化中扮演了重要角色,在果蝇身上所得到的发现也会激发人们就该类问题在更高等的动物上进行类似探索的热情。

2.3 lncRNA通过对肝癌细胞内节律基因产生影响进而促进肝癌发生

肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌中一种主要的组织亚型,在各国肝癌中占比达到70%~85%,具

有较高的死亡率^[41-42]。已有研究报道在HCC细胞中有节律基因表达^[43],这提示了对于HCC的日常生理活动而言,节律基因存在是十分必要的。但究竟节律基因在其中发挥了哪些作用,人们尚不得而知。

分裂、分化、周期改变等每一个细胞活动中几乎都有lncRNA的参与,且与其他ncRNA相比,其在参与过程的数量上,调节手段的丰富程度上,发挥的作用上都达到了一个新的高度。已有研究证实,有lncRNA通过与RNA连接蛋白相结合导致发生神经退行性改变,并最终癌变^[44-45]。因此,有研究人员将研究重点放在lncRNA在HCC中的作用上,最终发现节律基因在其中扮演了重要角色。

Cui等^[46]以HCC细胞为对象,对lncRNA HULC (high upregulated in live cancer)在肝癌中的作用机制进行了研究。将HULC转入HCC细胞内,采用qPCR和Western blot方法验证*clock*基因和蛋白表达量变化发现,*clock*表达水平和其对应蛋白的表达量出现显著提高;而后,采用siRNA干扰手段降低HCC内的HULC水平,采用与上文相同的验证手段可发现*clock*及其蛋白表达水平显著降低。上述了两个结果从正反两个方面证实了,在HCC细胞中,HULC对*clock*基因表达具有正向调控作用,且根据转录-翻译负反馈环路模型,对下游*mPer*和*mCry*基因进行验证,发现二者的表达也出现升高。在确定了HULC对*clock*的调控作用之后,研究人员以4小时为间隔,观察*clock*基因表达情况,发现在过表达HULC情况下,细胞内*clock*的节律性表达被干扰,导致表达周期内峰值的出现时间发生改变。这一结果为HULC参与HCC内节律活动这一假说提供了有力证明。

通过MTT和RNA干扰技术验证发现,在成功干扰*clock*表达情况下,HCC细胞增殖能力显著下降,其表现与细胞内HULC水平较低时呈现的现象相同。后续的动物实验也得出了几乎一致的结论。过表达HULC组的小鼠肝脏的肿瘤明显大于对照组,而进一步添加了*clock*的siRNA的实验组肿瘤又恢复了和对照组相当的大小,更是直接说明了HULC对肝脏肿瘤的增殖有着明显的促进作用,而*clock*更是作为下游基因直接促进了肝脏肿瘤细胞的生长。综上所述,所有这些结果证实了在HCC细胞中,lncRNA HULC通过调控*clock*基因表达改变了HCC内节律性生理活动,最终促进HCC细胞增殖。该研究为节律基因参与癌症过程的研究提供了新的思路,同时也拓展了人们对于致癌机理和节

律活动参与遗传调控的认识。

3 总结与展望

随着人们对节律系统研究的不断深入, microRNA 和 lncRNA 已经逐渐成为继节律相关分子机制研究之后的又一热门领域^[47]。作为极具研究潜力的“新大陆”, 研究人员发现, 从二者的合成方式、调控方法、调控对象和参与生理及遗传活动的多样性等方面来看, 它们都具有极大的研究潜力^[48], 随着对其研究的不断深化, 必然会对生物的遗传、免疫、能量代谢和稳态维持等领域产生全新的认识^[49-52], 同时在抗癌、抗炎症等临床应用方面取得重大突破^[53-54]。

但是, 目前的研究现状笔者认为还有几点不足: 对于 microRNA 来说, 现有研究主要将目光集中于 microRNA 对于节律调节的影响, 方法以前期生物信息学和高通量筛选为主, 辅以人为基因突变或基因敲除的验证, 而针对节律系统对 microRNA 调节的研究较少。这显然与研究中所采用的研究方法有关。

而对于 lncRNA 来说, 首先, 针对 lncRNA 与节律系统本身互动的研究还停留在初级阶段, 没有形成一套能够从遗传层面到生理活动层面将二者的各个作用过程统一起来的机制理论。其次, 现有研究主要集中于筛选可能与节律基因相互作用的 lncRNA 上, 所采用方法与 microRNA 类似。但是, lncRNA 的调控手段要较 microRNA 更为丰富, 调控对象更为多样化, 所以除了直接与核心节律基因相互作用之外, 其他各种调节方式尚有待发现。最后, 从上面的研究案例可以看出, 现有研究主要集中在脑组织和中心节律系统, 而对外周节律系统中二者是否发挥作用的研究较少。但已知外周节律系统具有一定的自主性, microRNA 及 lncRNA 是否会在其中发挥作用以及是否会涉及中心和外周节律系统的相互协调, ncRNA 与节律系统的互动是否会形成反馈环路或具有剂量效应, 都是一个令人感兴趣的问题。

但我们也应该看到: ncRNA 调节方式多, 参与诸如转录后过程、染色体重构、形成强启动子功能的结构等, 故有在多层面参与调控节律系统的潜力; 现有癌症和节律生理活动研究都证明了, 节律系统通过与 ncRNA 作用参与了临床病理过程。这些都提示我们, 该领域的研究大有可为, 相信随着研究的不断深入, 必然为相关领域的理论建设和临床应用带来新的曙光。

[参 考 文 献]

- [1] Loudon ASI. Circadian biology: a 2.5 billion year old clock. *Curr Biol*, 2012, 22: R570-1
- [2] Mohammed S, Harrison DA. The clocks that time us are not the same: a theory of temporal diversity, task characteristics, and performance in teams. *Organiz Behav Hum Decision Processes*, 2013, 122: 244-56
- [3] Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4: 649-61
- [4] Saini C, Suter DM, Liani A, et al. The mammalian circadian timing system: synchronization of peripheral clocks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011, 76: 39-47
- [5] Wilkins AK, Barton PI, Tidor B. The Per2 negative feedback loop sets the period in the mammalian circadian clock mechanism. *PLoS Comput Biol*, 2007, 3: e242
- [6] Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, et al. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*, 2007, 54: 813-29
- [7] Kocerha J, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, et al. MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 3507-12
- [8] Shende VR, Neuendorff N, Earnest DJ. Role of miR-142-3p in the post-transcriptional regulation of the clock gene Bmal1 in the mouse SCN. *PLoS One*, 2013, 8: e65300
- [9] Tan X ZP, Zhou L, Yin B, et al. Clock-controlled miR-142-3p can target its activator, Bmal1. *BMC Mol Biol*, 2012, 13: 27
- [10] Shende VR, Goldrick MM, Ramani S, et al. Expression and rhythmic modulation of circulating microRNAs targeting the clock gene Bmal1 in mice. *PLoS One*, 2011, 6: e22586
- [11] Nagel R, Clijsters L, Agami R. The miRNA-192/194 cluster regulates the *Period* gene family and the circadian clock. *FEBS J*, 2009, 276: 5447-55
- [12] Lee KH, Kim SH, Lee HR, et al. MicroRNA-185 oscillation controls circadian amplitude of mouse Cryptochrome 1 via translational regulation. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 2248-55
- [13] Kadener S, Menet JS, Sugino K, et al. A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev*, 2009, 23: 2179-91
- [14] Chen W, Liu Z, Li T, et al. Regulation of *Drosophila* circadian rhythms by miRNA let-7 is mediated by a regulatory cycle. *Nat Commun*, 2014, 5: 5549
- [15] Oishi K, Shiota M, Sakamoto K, et al. Feeding is not a more potent Zeitgeber than the light-dark cycle in *Drosophila*. *Neuroreport*, 2004, 15: 739-43
- [16] Alvarez-Saavedra M, Antoun G, Yanagiya A, et al. miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum Mol Genet*, 2011, 20: 731-51
- [17] Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, et al. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev*, 2009, 23: 1313-26
- [18] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of

- lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab*, 2006, 3: 87-98
- [19] Kojima S, Gatfield D, Esau CC, et al. MicroRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver. *PLoS One*, 2010, 5: e11264
- [20] Wang Y, Osterbur DL, Megaw PL, et al. Rhythmic expression of *Nocturnin* mRNA in multiple tissues of the mouse. *BMC Dev Biol*, 2001, 1: 9
- [21] Green CB, Douris N, Kojima S, et al. Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 9888-93
- [22] Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, et al. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell*, 2009, 35: 868-80
- [23] Davis CJ, Bohnet SG, Meyerson JM, et al. Sleep loss changes microRNA levels in the brain: a possible mechanism for state-dependent translational regulation. *Neurosci Lett*, 2007, 422: 68-73
- [24] Davis CJ, Clinton JM, Krueger JM. MicroRNA 138, let-7b, and 125a inhibitors differentially alter sleep and EEG δ -wave activity in rats. *J Appl Physiol*, 2012, 113: 1756-62
- [25] Davis CJ, Clinton JM, Taishi P, et al. MicroRNA 132 alters sleep and varies with time in brain. *J Appl Physiol*, 2011, 111: 665-72
- [26] Ko ML, Liu Y, Dryer SE, et al. The expression of L-type voltage-gated calcium channels in retinal photoreceptors is under circadian control. *J Neurochem*, 2007, 103: 784-92
- [27] Ko ML, Jian K, Shi L, et al. Phosphatidylinositol 3 kinase-Akt signaling serves as a circadian output in the retina. *J Neurochem*, 2009, 108: 1607-20
- [28] Shi L, Ko ML, Ko GY. Rhythmic expression of microRNA-26a regulates the L-type voltage-gated calcium channel $\alpha 1C$ subunit in chicken cone photoreceptors. *J Biol Chem*, 2009, 284: 25791-803
- [29] Xu S, Witmer PD, Lumayag S, et al. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem*, 2007, 282: 25053-66
- [30] Luo W, Sehgal A. Regulation of circadian behavioral output via a microRNA-JAK/STAT circuit. *Cell*, 2012, 148: 765-79
- [31] Saus E, Soria V, Escaramis G, et al. Genetic variants and abnormal processing of pre-miR-182, a circadian clock modulator, in major depression patients with late insomnia. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 4017-25
- [32] Serretti A, Benedetti F, Mandelli L, et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2003, 121B: 35-8
- [33] Sarachana T, Zhou R, Chen G, et al. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med*, 2010, 2: 23
- [34] Na YJ, Sung JH, Lee SC, et al. Comprehensive analysis of microRNA-mRNA co-expression in circadian rhythm. *Exp Mol Med*, 2009, 41: 638-47
- [35] Zhao X, Zhu X, Cheng S, et al. MiR-29a/b/c regulate human circadian gene *hPER1* expression by targeting its 3'UTR. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46: 313-7
- [36] Yang M, Lee JE, Padgett RW, et al. Circadian regulation of a limited set of conserved microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics*, 2008, 9: 83
- [37] Mehta N, Cheng HY. Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping. *J Mol Biol*, 2013, 425: 3609-24
- [38] Pegoraro M, Tauber E. The role of microRNAs (miRNA) in circadian rhythmicity. *J Genet*, 2008, 87: 505-11
- [39] Coon SL, Munson PJ, Cherukuri PF, et al. Circadian changes in long noncoding RNAs in the pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13319-24
- [40] Soshnev AA, Ishimoto H, McAllister BF, et al. A conserved long noncoding RNA affects sleep behavior in *Drosophila*. *Genetics*, 2011, 189: 455-68
- [41] Su JC, Tseng PH, Wu SH, et al. SC-2001 overcomes STAT3-mediated sorafenib resistance through RFX-1/SHP-1 activation in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*, 2014, 16: 595-605
- [42] Schmieder R, Puehler F, Neuhaus R, et al. Allosteric MEK1/2 inhibitor refametinib (BAY 86-9766) in combination with sorafenib exhibits antitumor activity in pre-clinical murine and rat models of hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*, 2013, 15: 1161-71
- [43] Lin YM, Chang JH, Yeh KT, et al. Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinogenesis*, 2008, 47: 925-33
- [44] Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 354-61
- [45] Gutschner T, Hämmerle M, Eissmann M, et al. The non-coding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res*, 2013, 73: 1180-9
- [46] Cui M, Zheng M, Sun B, et al. A long noncoding RNA perturbs the circadian rhythm of hepatoma cells to facilitate hepatocarcinogenesis. *Neoplasia*, 2015, 17: 79-88
- [47] Ernst C, Morton CC. Identification and function of long non-coding RNA. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 168
- [48] Nakagawa S, Kageyama Y. Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators—Beyond skepticism. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839: 215-22
- [49] Novikova IV, Hennelly SP, Tung CS, et al. Rise of the RNA machines: exploring the structure of long non-coding RNAs. *J Mol Biol*, 2013, 425: 3731-46
- [50] Sigdel KR, Cheng A, Wang Y, et al. The emerging functions of long noncoding RNA in immune cells: autoimmune diseases. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 848790
- [51] Kornfeld JW, Brüning JC. Regulation of metabolism by long, non-coding RNAs. *Front Genet*, 2014, 5: 57
- [52] Podkolodnaia OA. Molecular and genetic aspects of inter-

- actions of the circadian clock and the energy-producing substrate metabolism in mammals. *Genetika*, 2014, 50: 125-37
- [53] Morlando M, Ballarino M, Fatica A. Long non-coding RNAs: new players in hematopoiesis and leukemia. *Front Med*, 2015, 2: 23
- [54] Heward JA, Lindsay MA. Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response. *Trends Immunol*, 2014, 35: 408-19