

DOI: 10.13376/j.cblls/2018097

文章编号: 1004-0374(2018)08-0822-09

斑马鱼长链非编码RNA的研究进展

乔嘉凯¹, 张丹燕¹, 周胜利², 郭江峰^{1*}

(1 浙江理工大学生命科学院, 杭州 310016; 2 浙江省环境监测中心, 杭州 310015)

摘要: 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 通常被定义为长度在 200 nt 以上、无蛋白质编码功能的 RNA 分子, 在基因表达调控中起着关键作用。但近几年研究发现, 部分 lncRNA 也具有编码多肽或蛋白质的能力。研究表明, 斑马鱼 lncRNA 的异常表达会引起其神经系统、免疫系统和循环系统功能的显著变化。现从 lncRNA 的调控机制与生物学功能、斑马鱼 lncRNA 在不同发育阶段和不同组织中的表达差异, 及其与斑马鱼生理功能的关系等方面进行综述, 旨在为斑马鱼长链非编码 RNA 的研究提供参考。

关键词: 长链非编码 RNA; 斑马鱼; 高度保守性; 组织特异性; 胚胎发育

中图分类号: Q752; Q959.4 **文献标志码:** A

Research progress in long non-coding RNAs of zebrafish

QIAO Jia-Kai¹, ZHANG Dan-Yan¹, ZHOU Sheng-Li², GUO Jiang-Feng^{1*}

(1 College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310016, China;

2 Environmental Monitoring Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310015, China)

Abstract: Long non-coding RNAs (lncRNAs) are usually defined as a class of RNA molecule, which play key roles in the regulation of gene expression, with a length of over 200 nucleotides and without protein-coding function. However, in recent years, it has been found that some lncRNAs also have the ability to encode polypeptides or proteins. It is revealed that dysregulated expression of lncRNAs in zebrafish (*Danio rerio*) can elicit significant changes in the nervous system, immune system, and circulatory system. In this paper, the regulatory mechanisms and biological function of lncRNAs, the diversity of lncRNAs in different developmental stages and tissues of zebrafish, and the relationship between lncRNAs and physiological function of zebrafish are reviewed in order to provide reference for the research of lncRNAs in zebrafish.

Key words: long non-coding RNA; zebrafish; high conservatism; tissue specificity; embryonic development

斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为生命科学研究的经典模式生物, 具有成本低、易观察、发育快等特点, 其基因组与人类基因组相似度高, 与已知人类疾病基因的同源性达 80% 以上^[1], 因此被广泛应用于发育生物学、遗传毒理学、医学、药理学和环境毒理学等领域^[2]。1981 年, 美国 Oregon 大学著名遗传学家 Streisinger 开始研究斑马鱼的养殖方法, 观察其胚胎发育过程, 培育了斑马鱼的纯合品系, 并建立了相关的遗传学研究方法^[3]。1996 年, 第一个斑马鱼基因连锁图发表, 约有 4 000 种斑马鱼突变体被鉴定^[4-5]。随着基因组测序技术的发展, lncRNA 成为生命科学的研究热点, 它被证明与人类多种疾

病的发生有关^[6-11]。然而, 斑马鱼作为研究人类疾病理想的模式生物, 其 lncRNA 的研究还相对较少。本文综述了斑马鱼 lncRNA 的研究进展, 旨在为斑马鱼 lncRNA 的研究提供参考。

1 长链非编码RNA概况

长链非编码 RNA 通常是指长度大于 200 nt 且不具有编码蛋白质功能的一类 RNA 分子^[12], 但近

收稿日期: 2018-02-26; 修回日期: 2018-04-16

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY15B070012)

*通信作者: E-mail: jfguo@zstu.edu.cn

几年研究发现部分线性和环状 lncRNA 也具有编码多肽或蛋白质的能力^[13-17]。为便于研究, 通常根据 lncRNA 与编码基因间的相对位置, 将其分为正义 lncRNA、反义 lncRNA、双向 lncRNA、基因间 lncRNA、内含子 lncRNA、3'-UTR 区转录本和启动子相关转录本^[18-19]。大多数 lncRNA 和 mRNA 相似, 利用 RNA 聚合酶 II 转录, 经过剪切加工后, 形成相对稳定的二级和更高级结构^[20]。lncRNA 主要分布在细胞核中, 但在细胞质和细胞器中也均有发现^[21-23]。2010 年, 还发现了增强子 RNA 等新类型的 lncRNA^[24]。

2 长链非编码RNA的生物学功能

lncRNA 主要在转录、转录后、翻译, 以及表观遗传学水平参与基因表达调控^[25], 从而影响生物体的生长发育。同时, lncRNA 在维持染色体数目和保持基因组稳定方面具有重要作用, 且与恶性肿瘤等疾病的发生有关, 对 lncRNA 作用机制的研究对人类疾病的诊断和治疗有着重要的影响^[26-29]。

2.1 长链非编码RNA在转录水平的调控

lncRNA 可通过与 DNA、转录因子或 RNA 聚合酶的结合等方式调控基因转录的过程 (图 1A)。二氢叶酸还原酶基因上游启动子转录成的 lncRNA 与下游的启动子序列碱基互补配对形成 lncRNA-DNA 三聚体, 抑制下游启动子的转录^[30], 而由酿酒酵母半乳糖基因 (GAL) 转录成的 lncRNA 在 GAL 基因启动子上形成 lncRNA-DNA 复合物, 诱导激活 GAL 基因的表达^[31]。小鼠 lncRNA-Evf2 可与转录因子 DLX2 形成转录复合体, 并结合到增强子上, 从而诱导邻近蛋白质编码基因 DLX6 的表达^[32]。lncRNA CRG 可以招募 RNA 聚合酶与 CASK 基因上游启动子区域结合, 从而调节 CASK 基因的表达^[33]。

2.2 长链非编码RNA在转录后水平的调控

在转录完成后, lncRNA 可以通过选择性剪接等 RNA 编辑过程调节 mRNA 的加工^[34] (图 1B)。人类 sat III 或果蝇热休克 RNA ω 基因的转录物通过隔离细胞核中的剪接因子, 调控 mRNA 前体的剪接^[35]。lncRNA MALAT1 可以招募丝氨酸/精氨酸 (serine/arginine, SR) 剪接因子, 影响其在 mRNA 前体剪接位点附近的分布, 从而对 mRNA 前体进行选择剪接^[36]; lncRNA MALAT1 还可与剪接因子反式激活应答 DNA 结合蛋白 -43 (transactive response DNA binding protein-43, TDP-43) 相互作用, 影响 mRNA 前体的选择性剪接^[37]。

2.3 长链非编码RNA在翻译水平的调控

lncRNA 可作为竞争性内源 RNA 与 miRNA 相互作用, 或者直接与 mRNA 结合, 来参与靶基因的表达调控。lincRNA-P21 的稳定性不仅受到 RNA 结合蛋白的调控, 还直接受到 miRNA let-7b 的调节, miRNA let-7b 的过表达将促进 lincRNA-P21 降解, 从而影响相关蛋白的表达水平^[38] (图 1C)。线性 lncRNA linc-MD1 通过与 miR-133 和 miR-135 结合, 促进肌肉分化相关基因的表达^[39]。环状 lncRNA CDR1as 含有 70 多个高度保守的 miR-7 结合位点^[40], 它是 miR-7 的环状抑制剂, 对 miR-7 起到负调控作用^[41] (图 1D)。lncRNA BACE1-AS 通过与 mRNA 碱基互补配对增强 mRNA 的稳定性, lncRNA BACE1-AS 表达水平的下降会减少细胞中 mRNA 的表达^[42] (图 1E)。

2.4 长链非编码RNA对表观遗传的调控

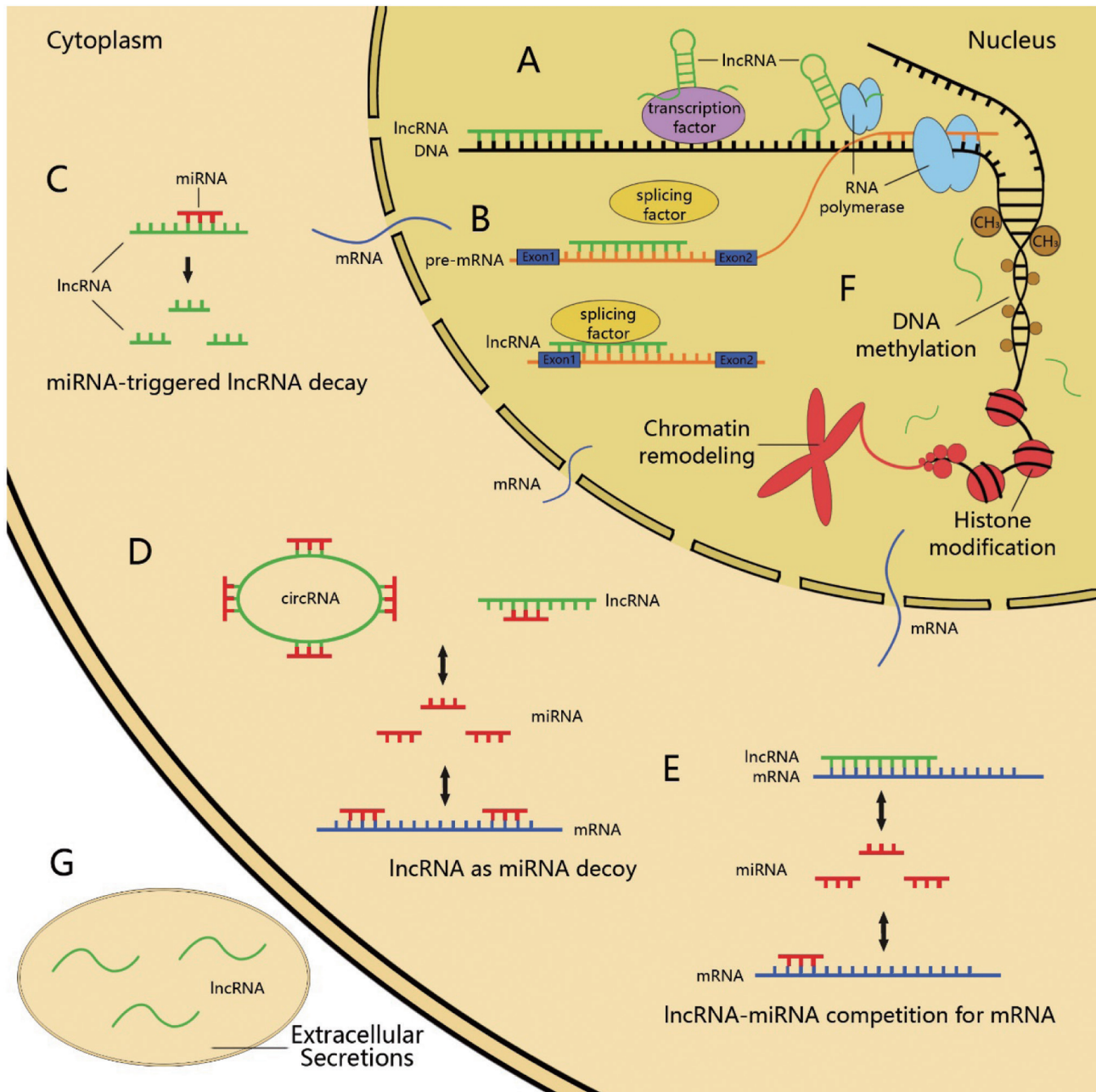
lncRNA 可以通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑等修饰形式, 对生物体的表观遗传进行调控^[43] (图 1F)。lncRNA Xist 可以引起 X 染色体上的 CpG 岛启动子甲基化, 从而抑制 X 染色体的基因表达, 使 X 染色体失活^[44]。lncRNA HOTAIR 通过 5' 结构域结合多梳蛋白抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2), 3' 结构域结合 LSD1/CoREST/REST 复合物的方式, 与 PRC2、LSD1 复合物相互作用, 招募两者至靶基因, 从而介导组蛋白 H3K27 的甲基化和组蛋白 H3K4 的去甲基化, 影响相关基因的表达^[45]。而 lncRNA HOTTIP 通过增强组蛋白 H3K4 甲基化, 促进基因转录激活^[46]。在拟南芥中, lncRNA IGN22 可以通过与其他分子的相互作用, 募集 SWI/SNF 染色质重塑复合体, 使得核小体发生转位, 进而抑制 RNA 聚合酶 II 的转录, 引起基因沉默^[47]。

2.5 长链非编码RNA在细胞外的调控

lncRNA 可以通过包裹在细胞外分泌物中在细胞之间转移^[48] (图 1G)。这些含有 lncRNA 的细胞外分泌物可以在局部微环境中作为细胞间信号传递分子^[49]。虽然有研究认为细胞外分泌物中片段化的 lncRNA 仅仅表明可能存在一种新的 RNA 降解机制^[48], 但 2015 年, Enderle 等^[50]研究表明, 细胞外分泌物中的 lncRNA 与一些疾病的发生有关, 可以用作非侵入性生物标志物或治疗靶点。

3 斑马鱼长链非编码RNA

近年来, 随着基因组、转录组测序技术的日益



(A) lncRNA通过与DNA、转录因子或RNA聚合酶的结合等方式调控基因的转录；(B) lncRNA通过隔离或招募细胞核中的剪接因子，影响mRNA前体的选择性剪接；(C) miRNA与lncRNA结合影响lncRNA的稳定性，介导lncRNA降解；(D) lncRNA通过吸附miRNA，抑制其对mRNA的进一步作用，调控基因表达；(E) lncRNA可以作为miRNA竞争性内源分子，直接与mRNA结合，调控基因表达；(F) lncRNA通过DNA甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑等修饰形式，对生物体的表观遗传进行调控；(G) lncRNA可以通过包裹在细胞外分泌物中在细胞之间转移。

图1 长链非编码RNA的作用机制

成熟，越来越多的斑马鱼 lncRNA 被发现，它们的生物学功能也逐渐被验证 (表 1^[51-65])。Dhiman 等^[68]通过比较 3 个不同的数据库，创建了斑马鱼 lncRNA 的在线资源分析数据库，注释了 2 267 条斑马鱼 lncRNA，包括 86 条内含子 lncRNA、309 条启动子

相关的 lncRNA、485 条与编码基因重叠的 lncRNA 和 1 386 条基因间的 RNA。Pasquier 等^[69]开发的 PhyloFish 数据库收录了含斑马鱼在内的 23 种硬骨鱼类转录组，以研究不同物种在进化过程中的基因表达差异。

表1 部分斑马鱼长链非编码RNA的研究情况

LncRNA	发育阶段	表达部位	相关基因	相关基因的表达	相关功能	参考文献
5S-OT			5S rDNA			[51]
cyrano	早期胚胎	眼部 脑部	oip5		影响神经系统和脊索发育	[52]
megamind	早期胚胎	眼部 脑部	birc6		影响脑部和视网膜发育	[52]
hoxAa_lncRNA	早期胚胎	卵裂期胚胎 细胞的细胞核			影响染色质的结构和功能	[53]
myo18a_lncRNA	早期胚胎	肌隔	myo18a		影响细胞间的接触与黏附	[53]
mprip	早期胚胎	细胞核			与早期胚胎发育有关	[53]
miR-9-7_lncRNA	早期胚胎	胚胎细胞			与早期神经发育有关	[53]
st18_lncRNA	早期胚胎	胚胎细胞			与早期神经发育有关	[53]
slincR	早期胚胎	耳泡 眼部 脑部	sox9b	上调(lncRNA抑制)	影响运动神经反射	[54]
TUNA	早期胚胎	眼部 脑部	Sox1 Fgf4	上调(lncRNA过表达)	影响早期胚胎神经系统发育	[55]
Sox2ot	早期胚胎	鳃部、神经管	Sox2		影响中枢神经系统发育	[56]
tie-1AS	早期胚胎	胚胎轴向血管	tie-1	上调(lncRNA抑制)	影响胚胎血管发育	[57]
zY1 RNA	早期胚胎				启动染色体DNA复制	[58]
linc-arid4a	胚胎				与中枢神经系统发育有关	[52]
linc-gtf2f2b	胚胎				与中枢神经系统发育有关	[52]
linc-mipep	胚胎				与中枢神经系统发育有关	[52]
linc-tbx2b	胚胎				与中枢神经系统发育有关	[52]
durga	胚胎	脑部	Kalirin	上调(lncRNA过表达)	影响神经细胞树突的长度和密度	[59]
cat7l	胚胎	头部、眼部	CAT7		过低表达会导致小头畸形	[60]
lncHBI_017	成鱼	血液组织				[61]
lncH_007	成鱼	心脏组织				[61]
lncM_001	成鱼	肌肉组织				[61]
TCONS_00017790	成鱼	肝脏 脾脏	plk3 syt10		与免疫调节系统有关	[62]
TCONS_00027240	成鱼	肝脏 脾脏	plk3 syt10		与免疫调节系统有关	[62]
TCONS_00129029	成鱼	肝脏 脾脏	plk3 syt10		与免疫调节系统有关	[62]
sp1bas	成鱼		Rag2	上调(lncRNA抑制)	影响免疫调节相关因子的产生	[63]
uc.4			CASZ1		影响心脏发育	[64]
fam60al-AS			fam60al		与斑马鱼体细胞核的全能性有关	[65]

3.1 斑马鱼长链非编码RNA的特性

斑马鱼的 lncRNA 具有一定的保守性。5S-OT 是一条从 5S rDNA 基因座转录并含有超保守的 5S rRNA 序列的 lncRNA, 其序列在真核生物, 包括裂殖酵母、果蝇、斑马鱼、小鼠和人类中相对保守^[51]。同时, Ulitsky 等^[52]发现, 在斑马鱼 935 个蛋白质编码基因间, 有 113 条 lncRNA 至少与一个在脊椎动物中保守的蛋白质编码基因邻近, 其中有 29 条 lncRNA 在二级结构和基因组位置上具有高度保守

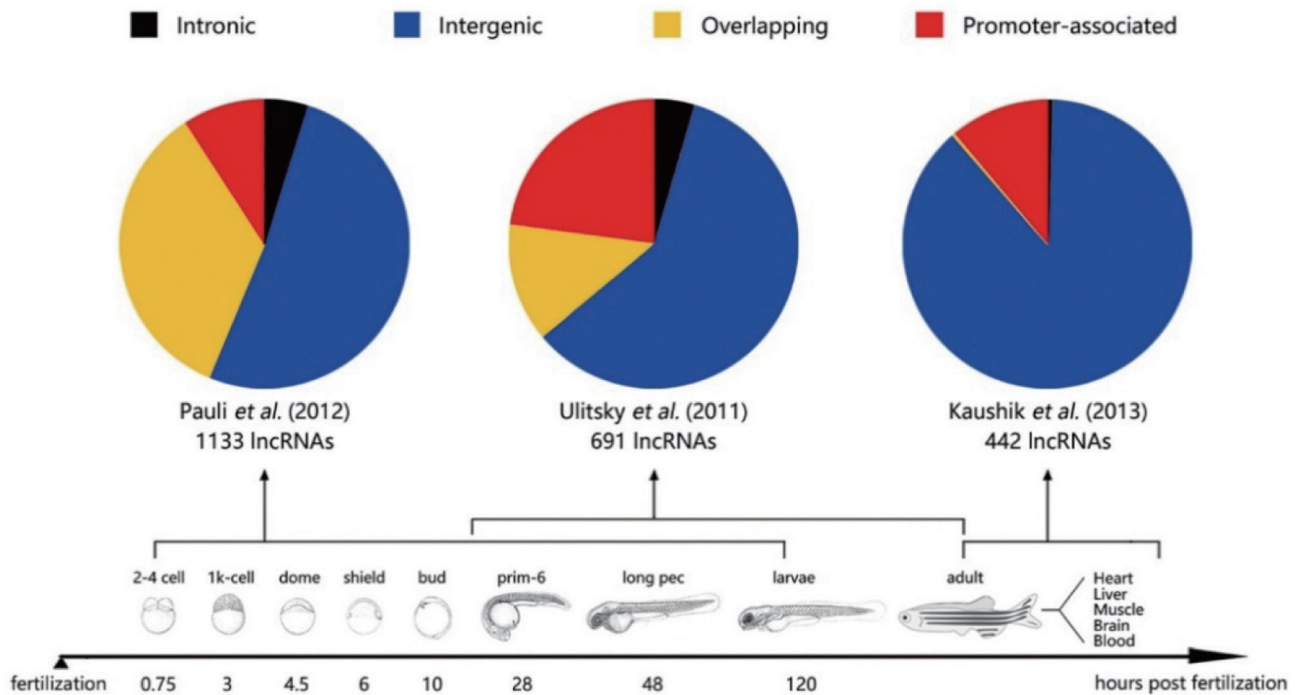
性, 与哺乳动物同源基因转录产物的序列有部分相同, 如斑马鱼 lncRNA cyrano 与人和小鼠同源基因 oip5 的转录产物存在 67 nt 的高度保守序列。Zheng 等^[66]发现, 在 deepBase v2.0 数据库包含的 851 条斑马鱼 lncRNA 中, 有 55 条 lncRNA 与人类同源基因转录产物具有高度保守性。

斑马鱼的 lncRNA 的表达具有一定的时空特异性。在不同发育阶段和不同组织中, 斑马鱼 lncRNA 的表达有所不同^[67](图 2A)。Pauli 等^[53]利

用高通量测序技术,分别在卵裂期、桑椹胚、囊胚、原肠胚以及受精后 28 h、48 h、120 h 等时期检测斑马鱼的 lncRNA 的表达,发现 1 133 条 lncRNA,包括 397 条基因间 lncRNA、184 条内含子 lncRNA、566 条反义 lncRNA。其中, lncRNA *hoxAa* 集中分布在卵裂期胚胎细胞的细胞核中,可能与有丝分裂过程中染色质的结构和功能相关; lncRNA *myo18a* 在受精后 28 h 的早期胚胎肌隔中表达水平较高,与抗肌萎缩蛋白的转录位点重叠,可能与细胞间接触与黏附有关。Ulitsky 等^[52]分别检测了受精后 24 h 和 72 h 的斑马鱼胚胎以及成年斑马鱼中 lncRNA 的表达情况,发现了 691 条 lncRNA,并筛选出 550 条与其相邻蛋白编码基因之间的表达具有相关性的 lncRNA,通过转录组测序技术和 phastCons 分析,

发现 *linc-mipep*、*linc-tbx2b*、*linc-gtf2f2b* 和 *linc-arid4a* 等 lncRNA 在中枢神经系统的不同部位特异性表达;而 *linc-trpc7* 和 *linc-cldn7a* 则只在非神经组织中表达。Kaushik 等^[61]在 442 条成年斑马鱼 lncRNA 中,筛选出 77 条具有组织特异性的 lncRNA,分别表达于心脏组织、肾脏组织、肌肉组织、脑组织和血液组织(图 2B)。其中, *lincHBI_017* 只在血液组织中表达; *lincL_001* 和 *lincLBr_003* 在肝组织中普遍表达,但 *lincLBr_003* 在肌肉和脑组织中也有较少表达; *lincH_005* 和 *lincH_007* 在心脏组织中表达较多,而在肝、肌肉、脑等组织中则只有微量表达; *lincBrM_002* 和 *lincBrM_028* 主要在脑中表达,在其他组织中只有微量表达; *lincM_001* 仅在肌肉中特异性表达,而 *lincM_003* 在脑和心脏组织中也具有

A



B

Tissue	Heart	Liver	Muscle	Brain	Blood
LncRNAs restricted expressed	12 (15.58%)	2 (2.59%)	4 (5.19%)	47 (61.03%)	12 (15.58%)

(A) 斑马鱼 lncRNA 在不同发育阶段的表达存在差异; (B) Kaushik 等^[61]发现 77 条具有组织特异性的斑马鱼 lncRNA, 分别只表达于心脏组织、肾脏组织、肌肉组织、脑组织和血液组织。

图2 斑马鱼的长链非编码RNA的表达具有时空特异性

中等程度表达。

3.2 斑马鱼长链非编码RNA的生物学功能

3.2.1 与神经发育相关的斑马鱼长链非编码RNA

Kalirin 基因在神经突触的重建中起着重要的作用, 且与亨廷顿氏病、精神分裂症、抑郁症和阿尔茨海默病等神经性疾病有关^[70]。durga 是一条在斑马鱼 Kalirin 基因上游发现的 lncRNA。Kalirin 的转录产物和 lncRNA durga 在斑马鱼胚胎发育早期几乎检测不到, 但随着大脑发育, 在受精后 24 h 两者都稳步增加。在单细胞斑马鱼胚胎中注入体外转录的 lncRNA durga, 并采用实时荧光定量 PCR 和原位杂交实验分析 Kalirin 的相对表达差异, 发现 lncRNA durga 的过表达使 Kalirin 的表达有明显的上调, 且集中在斑马鱼早期胚胎的脑部。同时, 相应神经元细胞树突的平均数目和长度均减少。因此, lncRNA durga 与 Kalirin 的共表达影响了斑马鱼的树突长度和密度, 从而在更高水平上调节大脑的功能^[59]。

研究表明, 在哺乳动物中 Sox9 基因与神经细胞分化有关, 影响神经元和神经胶质细胞的发育^[71]。Sox9a 和 Sox9b 是斑马鱼基因组中存在的两个与 Sox9 直系同源的基因^[72]。Garcia 等^[54]将斑马鱼胚胎暴露于 1 ng/mL 的四氯二苯-p-二恶英 (Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) 中, 发现其芳香烃受体 2 (aryl hydrocarbon receptor 2, AHR2) 被活化, 从而抑制靶器官中 sox9b 基因的表达水平。lncRNA SlincR 作为 AHR2 信号转导途径的中间体, 转录位点位于 sox9b 基因附近。SlincR 的表达具有 AHR2 依赖性, 当 AHR2 配体增多时, SlincR 表达上调。在正常情况下, SlincR 的反义敲低会提高 sox9b 基因的表达水平。在 AHR2 活化期间, SlincR 表达水平的降低缓解了靶器官中 sox9b 基因的表达抑制。同时, 在胚胎发育过程中, SlincR 在耳泡、眼睛和脑部表达量较高, 降低 SlincR 的水平会影响运动神经反射。

Lin 等^[55]通过构建短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 文库, 筛选出斑马鱼 lncRNA TUNA。TUNA 转录位点位于 Tcf1 基因位点上游约 13.8 kb 处, 其中约有 200 bp 的基因序列在脊椎动物中高度保守。当 TUNA 过表达时, 与胚胎干细胞多功能性相关的基因 Oct4 表达水平降低, Nestin、Sox1、Fgf4 等在早期胚胎神经系统中表达量较高的基因表达水平上调。结合 shRNA 文库, 在 TUNA 基因敲除后的不同时间点, 对斑马鱼转录组进行分析, 发现有 990 个基因具有 3 倍以上的表达差异, 其中 530 个基因上调, 460 个基因下调。上调的基因主

要与细胞发育、神经元凋亡有关; 下调的基因主要与神经组织发育、神经分化、细胞增殖和神经元识别有关。采用 RNA pull-down 实验、染色质免疫共沉淀和实时荧光定量 PCR 实验分析, 发现 lncRNA TUNA 是通过与 PTBP1、hnRNP-K 和 NCL 蛋白结合, 形成 RNA 结合蛋白 TUNA-RBP, 作为激活剂激活靶基因 Sox2、Fgf4 的表达。这一结果建立了 lncRNA TUNA 与靶基因之间的联系, 说明了 lncRNA TUNA 诱导斑马鱼胚胎干细胞向神经细胞分化的机制。

此外, lncRNA cat7l 的大量敲低会导致斑马鱼胚胎产生脑部发育不良和小头畸形的表型, 这与 lncRNA cat7l 和多梳蛋白抑制复合物 1 (polycomb repressive complex 1, PRC1) 相互作用, 共同调节与神经发育相关的靶基因有关^[60]。lncRNA cyrano 和 lncRNA megamind 与斑马鱼胚胎脑部和眼部的发育有关^[52]。lncRNA Sox2ot 在斑马鱼胚胎发育过程中, 与中枢神经系统的构建有关^[56]。

3.2.2 与免疫功能相关的斑马鱼长链非编码RNA

Wang 等^[62]分别用 0、6.25、12.5 mg/L 的 β -二酮类抗生素 (β -diketone antibiotic, DKA) 处理斑马鱼, 采用实时荧光定量 PCR 实验筛选出相对表达差异较大的 lncRNA。通过原位杂交技术, 发现 TCONS_00129029、TCONS_00027240 和 TCONS_00017790 这 3 条 lncRNA 在肝脏和脾脏中相对表达差异较大。同时证明, 由它们共同调控的靶基因 plk3 和 syt10 与免疫相关。该结果表明, DKA 处理会导致一些斑马鱼 lncRNA 及其靶基因的异常表达, 这些基因可能在斑马鱼的免疫功能中发挥作用。

PU.1 是一种参与骨髓淋巴样分化的转录因子, 在生物体获得性免疫中起着关键作用^[73]。在斑马鱼胚胎中, PU.1 AS lncRNA 是由 PU.1 基因位点反义转录的一条 lncRNA^[74]。Wei 等^[63]通过向斑马鱼中注射 PU.1 shRNA 来抑制 PU.1 基因的表达, 发现 PU.1 和 6 个免疫调节系统相关基因 mRNA 的表达水平显著降低; 通过注射 PU.1 AS shRNA 来抑制 PU.1 AS lncRNA 的表达, 发现 PU.1 和 6 个免疫调节系统相关基因 mRNA 的表达水平显著升高。结果表明, PU.1 在获得性免疫中起正调控作用, 而 PU.1 AS lncRNA 起负调控作用。同时, PU.1 转录物包括 mRNA 和 AS lncRNA 在介导斑马鱼免疫调节系统相关基因中起着关键作用。

3.2.3 与循环系统相关的斑马鱼长链非编码RNA

tie-1 基因在斑马鱼胚胎轴向血管中有较高的表

达^[75]。Li等^[57]发现 *tie-1* 的反义转录产物 *tie-1AS lncRNA* 也在轴向血管中有表达, 但与 *tie-1* 相比, 其表达水平较弱。采用实时荧光定量PCR实验分析, 发现 *tie-1AS lncRNA* 与 *tie-1* 的表达水平呈正相关性, 且 *tie-1AS lncRNA* 的表达水平总低于 *tie-1*。*tie-1* 基因敲除和 *tie-1AS lncRNA* 过表达均能使斑马鱼胚胎主动脉或主静脉血管壁细胞黏附性降低, 造成轴向血管的不对称分布, 说明 *tie-1AS lncRNA* 在血管壁的生成中起负调控的作用。同时, 研究表明, *tie-1AS lncRNA* 在体内选择性结合 *tie-1 mRNA*, 并调节 *tie-1* 转录物水平, 导致内皮细胞间黏附性的变化。这些结果说明 *tie-1AS lncRNA* 可介导 *tie-1* 基因表达, 从而调控斑马鱼血管发育的基本机制。

Cheng等^[64]利用 P19 细胞对 *CASZ1* 基因的反义转录产物 *uc.4* 进行研究, 发现 *uc.4* 是一条长度为 359 nt 的 *lncRNA*, 且具有高水平的进化保守性。*uc.4* 的过表达会抑制 TGF- β 信号通路, 影响细胞分化并抑制斑马鱼心脏发育, 导致心脏畸形。同时, *uc.4* 的过表达导致 1 078 个基因上调和 687 个基因下调。这些基因都与心肌的发育、心室和冠状动脉的形成、心脏神经细胞的分化等心脏发育相关过程有关。此外, *uc.4* 在小鼠中的同源 *lncRNA* 主要表达于肺组织中。这表明 *uc.4* 不仅在心脏发育中起作用, 也可以在其他组织或细胞系中表达。

3.2.4 其他

fam60al 是现仅在斑马鱼和爪蟾 (*Xenopus laevis*) 中发现的编码基因。*lncRNA fam60al-AS* 作为 *fam60al* 的反义转录产物, 与 *fam60al* 基因有一段长约 405 bp 的反向重叠序列。*fam60al-AS* 在球形期到受精后 24 h 表达量上升, 在受精后 48~120 h 表达量下降, 而同时期 *fam60al* 的表达量呈下降趋势, 但远高于 *fam60al-AS* 的表达量。同时, *fam60al-AS* 被证明通过与 *mRNA* 形成双链 *RNA* 的方式负调控 *fam60al* 的表达。而在进行体细胞核移植的斑马鱼胚胎中, 随着 *fam60al* 表达的下降, 出现了胚胎发育停滞的现象。上述结果表明, *lncRNA fam60al-AS* 可能与斑马鱼体细胞核的全能性有关^[69]。

4 总结与展望

近年来, 随着高通量测序技术的广泛应用, 越来越多的 *lncRNA* 被发现。*lncRNA* 作为人类基因组的重要组成部分, 参与人体各类生理生化活动, 同时在细胞增殖、凋亡、侵袭与转移等恶性肿瘤发生的过程中发挥了重要的作用。研究表明, *lncRNA*

可通过与 *DNA*、*RNA* 聚合酶、*mRNA* 或转录因子的结合, 或者作为竞争性内源 *RNA* 与 *miRNA* 相互作用等方式来参与靶基因的表达调控。此外, *lncRNA* 作为一种表观遗传因子, 在生物体对环境胁迫的反应中起重要作用, 各种环境化合物会干扰 *lncRNA* 在体外和体内表达。然而, 斑马鱼作为经典的模式生物, 对其 *lncRNA* 的生物学功能和作用机制的研究还相对较少。部分斑马鱼 *lncRNA* 可以在受精卵有丝分裂和胚胎发育过程中表达, 诱导具有相同遗传组成的子细胞分化成为不同的组织。同时, 斑马鱼 *lncRNA* 为研究环境因素对遗传物质的损害及其毒理效应提供了一条新的思路。深入研究斑马鱼 *lncRNA* 的结构与功能, 有助于分子遗传学、发育遗传学和毒理遗传学等学科的研究, 有利于人们了解人类各类疾病的发生机制, 为恶性肿瘤等人类疾病的治疗和诊断提供新的研究方向。相信随着科学技术的发展, 已经建立的斑马鱼 *lncRNA* 数据库也会更加系统完善, 越来越多斑马鱼 *lncRNA* 的功能会被人们了解, 为生命科学的研究开辟一条崭新的道路。

[参 考 文 献]

- [1] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013, 496: 498-503
- [2] Peterson RT. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 35-44
- [3] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 1981, 291: 293-6
- [4] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 1996, 123: 37-46
- [5] Haffter P, Granato M, Brand M, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996, 123: 1-36
- [6] Swiezewski S, Liu F, Magusin A, et al. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 2009, 462: 799-802
- [7] Houseley J, Rubbi L, Grunstein M, et al. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Mol Cell*, 2008, 32: 685-95
- [8] Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*, 2013, 10: 924-33
- [9] Knauss JL, Sun T. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs in vertebrate central nervous system development and function. *Neuroscience*, 2013, 235: 200-14
- [10] Lee C, Kikyo N. Strategies to identify long noncoding

- RNAs involved in gene regulation. *Cell Biosci*, 2012, 2: 37-42
- [11] Peng X, Gralinski L, Armour CD, et al. Unique signatures of long noncoding RNA expression in response to virus infection and altered innate immune signaling. *MBio*, 2010, 1: e00206-10
- [12] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 2002, 420: 563-73
- [13] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, et al. Translation of CircRNAs. *Mol Cell*, 2017, 66: 9-21
- [14] Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science*, 2016, 351: 271-5
- [15] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine. *Cell Res*, 2017, 27: 626-41
- [16] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66: 22-37
- [17] Anderson DM, Anderson KM, Chang CL, et al. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, 2015, 160: 595-606
- [18] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 155-9
- [19] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 2009, 136: 629-41
- [20] 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
- [21] Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 2012, 489: 101-8
- [22] Guttman M, Russell P, Ingolia NT, et al. Ribosome profiling provides evidence that large non-coding RNAs do not encode proteins. *Cell*, 2013, 154: 240-51
- [23] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 2012, 22: 1775-89
- [24] Kim TK, Hemberg M, Gray JM, et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, 2010, 465: 182-7
- [25] Fitzgerald KA, Caffrey DR. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 2014, 26: 140-6
- [26] Lee S, Kopp F, Chang TC, et al. Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins. *Cell*, 2016, 164: 69-80
- [27] Gong Z, Zhang S, Zeng Z, et al. LOC401317, a p53-regulated long non-coding RNA, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the nasopharyngeal carcinoma cell line HNE2. *PLoS One*, 2014, 9: e110674
- [28] Yang Y, Umetsu J, Lu ZJ. Global signatures of protein binding on structured RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 22-35
- [29] Zhang W, Huang C, Gong Z, et al. Expression of LINC00312, a long intergenic non-coding RNA, is negatively correlated with tumor size but positively correlated with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *J Mol Histol*, 2013, 44: 545-54
- [30] Martianov I, Ramadass A, Barros AS, et al. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature*, 2007, 445: 666-70
- [31] Cloutier SC, Wang SW, Ma WK, et al. Regulated formation of incRNA-DNA hybrids enables faster transcriptional induction and environmental adaptation. *Mol Cell*, 2016, 61: 393-404
- [32] Morris KV, Santoso S, Turner AM, et al. Bidirectional transcription directs both transcriptional gene activation and suppression in human cells. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000258
- [33] Li MX, Wen SY, Guo XQ, et al. The novel long non-coding RNA CRG regulates *Drosophila* locomotor behavior. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 11714-27
- [34] Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 637-43
- [35] Jolly C, Lakhota SC. Human sat III and *Drosophila* hsr ω transcripts: a common paradigm for regulation of nuclear RNA processing in stressed cells. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 5508-14
- [36] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 2010, 39: 925-38
- [37] Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 452-8
- [38] Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell*, 2012, 47: 648-55
- [39] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 2011, 147: 358-69
- [40] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, 495: 333-4
- [41] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res*, 2013, 73: 5609-12
- [42] Faghihi MA, Zhang M, Huang J, et al. Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol*, 2010, 11: R56
- [43] Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*, 2011, 90: 430-40
- [44] Simon MD, Pinter SF, Fang R, et al. High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature*, 2013, 504: 465-9
- [45] Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 2010, 329: 689-93

- [46] Wang KC, Yang YW, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, 2011, 472: 120-4
- [47] Zhu YY, Rowley MJ, Bohmdorfer G, et al. A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol Cell*, 2013, 49: 298-309
- [48] Huang XY, Yuan TZ, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14: 319-32
- [49] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654-9
- [50] Enderle D, Spiel A, Coticchia CM, et al. Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. *PLoS One*, 2015, 10: e0136133
- [51] Hu S, Wang X, Shan G. Insertion of an Alu element in a lncRNA leads to primate-specific modulation of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23: 1011-9
- [52] Ulitsky I, Al E. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*, 2011, 147: 1537-50
- [53] Pauli A, Valen E, Lin MF, et al. Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. *Genome Res*, 2012, 22: 577-91
- [54] Garcia GR, Goodale BC, Wiley MW, et al. *In vivo* characterization of an AHR-dependent long noncoding RNA required for proper *sox9b* expression. *Mol Pharmacol*, 2017, 91: 609-19
- [55] Lin N, Chang KY, Li Z, et al. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Mol Cell*, 2014, 53: 1005-19
- [56] Amaral PP, Neyt C, Wilkins SJ, et al. Complex architecture and regulated expression of the *Sox2ot* locus during vertebrate development. *RNA*, 2009, 15: 2013-27
- [57] Li K, Blum Y, Verma A, et al. A noncoding antisense RNA in *tie-1* locus regulates *tie-1* function *in vivo*. *Blood*, 2010, 115: 133-9
- [58] Collart C, Christov CP, Smith JC, et al. The midblastula transition defines the onset of Y RNA-dependent DNA replication in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 3857-70
- [59] Sarangdhar MA, Chaubey D, Bhatt A, et al. A novel long non-coding RNA, *durga* modulates dendrite density and expression of *kalirin* in zebrafish. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 95
- [60] Ray MK, Wiskow O, King MJ, et al. *CAT7* and *cat7l* long non-coding RNAs tune polycomb repressive complex 1 function during human and zebrafish development. *J Biol Chem*, 2016, 291: 19558-72
- [61] Kaushik K, Leonard VE, Kv S, et al. Dynamic expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) in adult zebrafish. *PLoS One*, 2013, 8: e83616
- [62] Wang XD, Lin JB, Li FH, et al. Screening and functional identification of lncRNAs under β -diketone antibiotic exposure to zebrafish (*Danio rerio*) using high-throughput sequencing. *Aquat Toxicol*, 2017, 182: 214-25
- [63] Wei N, Pang W, Wang Y, et al. Knockdown of PU.1 mRNA and AS lncRNA regulates expression of immune-related genes in zebrafish *Danio rerio*. *Dev Comp Immunol*, 2014, 44: 315-9
- [64] Cheng Z, Zhang Q, Yin A, et al. The long non-coding RNA *uc.4* influences cell differentiation through the TGF- β signaling pathway. *Exp Mol Med*, 2018, 50: e447
- [65] Hu H, Tao B, Chen J, et al. *Fam60a1* as a novel factor involved in reprogramming of somatic cell nuclear transfer in zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 78-86
- [66] Zheng LL, Li JH, Wu J, et al. deepBase v2.0: identification, expression, evolution and function of small RNAs, lncRNAs and circular RNAs from deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: D196-202
- [67] Haque S, Kaushik K, Leonard VE, et al. Short stories on zebrafish long noncoding RNAs. *Zebrafish*, 2014, 11: 499-508
- [68] Dhiman H, Kapoor S, Sivadas A, et al. *zfnRNApedia*: a comprehensive online resource for zebrafish long non-coding RNAs. *PLoS One*, 2015, 10: e0129997
- [69] Pasquier J, Cabau C, Nguyen T, et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics*, 2016, 17: 368-77
- [70] Mandela P, Ma XM. *Kalirin*, a key player in synapse formation, is implicated in human diseases. *Neural Plast*, 2012, 2012: 728161
- [71] Chew LJ, Gallo V. The Yin and Yang of Sox proteins: activation and repression in development and disease. *J Neurosci Res*, 2009, 87: 3277-87
- [72] Chiang EF, Wyatt M, Yan YL, et al. Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol*, 2001, 231: 149-63
- [73] Turkistany SA, Dekoter RP. The transcription factor PU.1 is a critical regulator of cellular communication in the immune system. *Arch Immunol Ther Ex*, 2011, 59: 431-40
- [74] Pang WJ, Lin LG, Xiong Y, et al. Knockdown of PU.1 AS lncRNA inhibits adipogenesis through enhancing PU.1 mRNA translation. *J Cell Biochem*, 2013, 114: 2500-12
- [75] Lyons MS, Bell B, Stainier D, et al. Isolation of the zebrafish homologues for the *tie-1* and *tie-2* endothelium-specific receptor tyrosine kinases. *Dev Dynam*, 1998, 212: 133-40