

## 学术争鸣

## 反义 RNA 网络——一种新假说

房德兴

(华东医学生物技术研究所, 南京 210002)

**摘要** 根据核酸的基本特性和最新研究成果, 提出了一种新的假说——反义 RNA 网络。生物体内存在着许许多多小分子的基因组反义 RNA 以及与之互补的反反义 RNA 片段, 由于机体的自身修饰作用(或其它机理), 它们彼此不发生复性或杂交。这种反义 RNA 网络一方面参与调控特定基因在特定部位、特定时间的启动和关闭, 维持机体各种功能活动的相对稳定, 另一方面对体内突变核酸和体外侵入核酸发挥特异性识别和排斥作用。

**关键词** RNA, 反义 RNA, 网络

自从发现核酸为遗传物质以来, 以核酸研究为基础的技术及其相关技术迅速发展, 极大地丰富了人们对这种生物大分子的认识, 仔细考察核酸的某些基本特性和最新研究成果, 发现 RNA 在生命活动中的作用引人注目, 已完全有理由提出一种新的假说——反义 RNA 网络。

## 1 核酸的某些基本特性

核酸是生物有机体遗传信息的物质基础, 虽然不同生物基因组的大小和复杂性有很大差异, 但具有许多共同的特征。

a. 原核生物基因组存在基因重叠现象, 功能相关的基因形成操纵元(operon)结构; 真核生物基因组中含重复序列, 基因以单拷贝分散形式存在, 且有内元(intron)将相应编码区——外元(exon)隔开。

b. 基因组中有一些序列参与基因表达的调控作用, 启动子(promoter), 操作子(operator), 增强子(enhancer), 衰减子(attenuator)和终止子(terminator)为最典型的代表。

c. 以碱基配对为基础, DNA 分子多呈双

链螺旋结构, RNA 分子也常因内部序列互补而形成茎-环结构。

d. 核酸可自我复制, 碱基之间形成氢键是核酸复制的主要动力。DNA 复制时, 需合成一段小分子 RNA 作为引物。

e. 单链 DNA 或 RNA 遇到碱基序列互补的分子, 在适当条件下可发生复性或杂交。

f. 基因产物可以是蛋白质, 也可以是 RNA。

g. mRNA 5' 端起始密码子 AUG 前的 SD 序列正好与核糖体 30S 小亚基的 16S rRNA 3' 端部分序列互补, 保证了核糖体正确选择 AUG 而起始翻译。

h. tRNA 上的反密码子与 mRNA 上的密码子互补, 保证了正确的氨基酸加入到 mRNA 编码的位置。

核酸的这些基本特性以及相互识别、相互作用已成为人们的常识, 也构成了反义 RNA 网络的理论基础。

## 2 反义 RNA 网络假说

最初, 人们用反义 RNA (antisense RNA)

或 mRNA 干扰性互补 RNA (mic RNA) 这一术语描述与 mRNA 互补的 RNA 片段, 由于它能够通过复制、转录、翻译等所需相应酶的结合位点相互作用, 或与复制引物相互作用, 或与 mRNA、rRNA、tRNA 结合形成二聚体而控制特定基因的表达, 因而越来越受到重视。

反义 RNA 的发现以及生物体内自然存在反义 RNA 的事实, 丰富了人们对核酸的认识。随着研究的深入, 人们开始发现反义 RNA 本身也有“意义”, “反义”仅仅是相对于靶序列而言。1986 年 Williams 和 Fried<sup>[1]</sup>报道, 同一基因组 DNA 位点的两条链可分别转录, 形成彼此互补的两种 mRNA 分子, 它们互为反义 RNA。这似乎向传统的“正义”(sense)和“反义”(antisense)概念提出了挑战。传统概念认为基因组 DNA 携带信息并将信息转移到 mRNA 中的那条链为信息链或有意义链或正链, 与之互补的另一条链为模板链或反义链或负链。如果两条链都有意义, 则由其转录的 RNA 与之互补, 应称之为反义链, 因此所有的 RNA 似乎都是反义 RNA。随着研究水平的提高和研究方法的改进, 肯定会发现更多的 RNA 片段, 它们或者是这条 DNA 链的反义 RNA, 或者是那条 DNA 链的反义 RNA, 从整个机体而言, 也就构成了一种反义 RNA 网络, 可以这样描述: 生物体内存在着许许多多小分子的基因组反义 RNA 以及与之互补的反义 RNA 片段, 由于机体的自身修饰作用(或其它机理), 它们彼此不发生复性或杂交。这种反义 RNA 网络一方面参与调控特定基因在特定部位、特定时间的启动和关闭, 维持机体各种功能活动的相对稳定, 另一方面对体内突变核酸和体外侵入核酸发挥特异性识别和排斥作用。

### 3 反义 RNA 网络的解释和证据

一般认为, 作为遗传物质的核酸主要通过蛋白质具体行使各种功能, 然而近年来的一些发现表明 RNA 本身直接参与许多活动, 除了众所周知的 tRNA、rRNA 外, 甚至 RNA 的某

些行为令人十分惊奇(见下述)。对于反义 RNA 网络抵抗核酸突变和外核酸来侵入的特异性识别、排斥作用, 可做如下分析: 核酸和蛋白质是生物体内最重要、也是最值得保护的大分子, 机体(高等生物尤其如此)不允许外来的异源分子进入而打乱自体的平衡, 因而建立起一系列自我稳定机理。抵抗外源性蛋白质的侵入依赖于某些系统(如动物的免疫系统), 而对抗核酸的侵入(更具有威胁性)则可能在某种程度上依赖于反义 RNA 网络。当外来核酸进入机体时, 不论其分子大小和序列如何, 反义 RNA 网络内肯定会有与其互补的反义 RNA 片段, 它们发生识别和结合(杂交)后, 可依靠自身作用(如 ribozyme)并充分调动体内各种非特异性因素将其破坏。就基因突变而言, 如果说免疫系统是在细胞水平上清除癌变, 则反义 RNA 网络就在分子水平上更早、更及时地减少突变发生的频率。下面的这些研究成果可作为反义 RNA 网络中多功能 RNA 的证据。

#### 3.1 RNA 作为 DNA 复制的抑制因子

大肠杆菌质粒 ColE1 DNA 的复制时, 首先由起始位点上游 555bp 处转录出一段 RNA I, 它自动折叠后与 DNA 模板形成杂交分子, RNaseH 将杂交的 RNA I 裂解形成引物, 开始合成 DNA。而由起始位点上游 445bp 处以另一条 DNA 链为模板反向转录的 RNA I', 恰好与 RNA I 5' 端互补, RNA I' 与 RNA I 的结合可抑制引物的形成, 从而终止复制过程<sup>[2]</sup>。RNA 的类似作用也见于金黄色葡萄球菌质粒 pT181 中<sup>[3]</sup>。

#### 3.2 RNA 作为转录因子

RNA 的合成需要 RNA 聚合酶和转录因子, 它们作为一个整体起作用, 一般认为转录因子为蛋白质。1991 年 Young 等<sup>[4]</sup>在蚕的 III 类基因的体外转录体系中发现一种新型的 III 类因子, TF III R, 分析表明它是 RNA。这为以蛋白质为主要组分的转录因子家族增添了一位异质成员。

#### 3.3 胞外“通讯 RNA”

这一概念的提出基于 RNase 及其同系物

的各种特殊的生物学作用. Benner 推测, 作为胞外 RNase 底物的胞外 RNA 在血管形成、神经生物学及其它生命活动中发挥作用, 它们在细胞间短距离传递信息. 这与某些血管形成因子含有 RNA 成分的事实相符合. 而且从纯化学的角度看, 类固醇作为长距离-长效胞外信使, 多肽作为中距离-中效胞外信使, RNA 作为短距离-短效胞外信使, 似乎是化学性质和生物学功能的恰当配合<sup>[5,6]</sup>.

### 3.4 Ribozyme

真核生物的基因是间断的, 其转录形成的 RNA 前体需经过剪接、加工才能成为成熟 RNA. 人们对剪接的机制已有了一定了解, 而近年来发现的 ribozyme 进一步丰富了对这一事件的认识. 现在已知的这种具有催化活性的 RNA 分子绝大部分参与 RNA 的加工与成熟. 同时 ribozyme 有其它多种催化活性, 1992 年 Mörl 等<sup>[7]</sup>利用酵母线粒体 COB 基因第一个内元 b I 1 证明了 ribozyme 催化的三种新的反应: a. 剪接反应第一步颠倒, 即已形成的 5' 外元与内元-3' 外元的重新连接; b. 使单链 DNA 分子与 RNA 分子相连形成杂合分子; c. 裂解单链 DNA 分子. 根据 1993 年 Deudna 等<sup>[8]</sup>的最新报道, ribozyme 可以三核苷酸为引物催化 RNA 的复制. 目前人们对 ribozyme 二级结构已有所了解, 且可用人工方法制备 ribozyme, 试验表明只要满足其二级结构, 小至 13 个核苷酸的 RNA 分子便具有催化活性<sup>[9]</sup>. 携带 ribozyme 基因的痘苗病毒感染的小鼠细胞释放 ribozyme 可使靶 mRNA 的水平特异性降低 80% 以上<sup>[10]</sup>.

### 3.5 基因剪

在 1988 年 5 月举行的澳大利亚和新西兰科学促进会 (ANZAAS) 年会上, 联邦科学和工业研究组织 (CSIRO) 宣布了一项可关闭高等生物的基因、或阻止病毒感染的新技术, 即能切割其它 RNA 分子的小分子 RNA, 称为基因剪 (gene shears)<sup>[11]</sup>. 这一概念是 Haselhoff 等在研究能阻止普通病毒对烟草感染的天然存在的 RNA 分子时提出来的, 他们认识到有关

的特殊机理可用来专一性地破坏其它病毒的 RNA 以及植物和动物病毒基因的 mRNA. 基因剪象酶一样在剪接 mRNA 过程中不消耗, 因而一个分子可破坏许多 RNA 分子.

### 3.6 gRNA 与 RNA 编辑

1986 年 Benne 等<sup>[12]</sup>在锥虫体内发现一种新的 RNA 加工方式, 即在 mRNA 的前体上增加某些尿苷酸, 称为 RNA 编辑. 研究几种 mRNA 的编辑发现, 这一事件可以构建或删除起始密码子, 可以扩充遗传信息, 使成熟转录物比其基因长, 还可以构成终止密码子, 使转录物截短. 编辑的信息来自何处呢? 1990 年 Blum 等<sup>[13]</sup>用计算机对利什曼原虫的线粒体 DNA 序列进行了查寻, 发现由大环 DNA 的基因间序列转录出的七个小分子 RNA (14—51bp), 它们可分别作为细胞色素 b (CYb) 等编辑区的模板, 称其为 gRNA (guide RNA). 用这些 gRNA 制备寡核苷酸探针, 对总线粒体 RNA 进行 Northern 印迹分析, 发现了电泳迁移至 tRNA 之前的 gRNA, 其分子大小不超过 80 个核苷酸, 过去曾把它们作为 tRNA 制剂中的污染物对待. 虽然大多数研究是围绕质体原虫进行的, 但几年来已在病毒、植物以及动物体内发现了 RNA 编辑现象, 而且这一事件不仅仅涉及 U 的加入或删除, 还有其它碱基的插入或删除以及碱基的调换. RNA 编辑泛指任何导致生成的 mRNA 分子编码区核苷酸序列不同于模板序列的过程 (经典的 RNA 剪接过程除外)<sup>[14]</sup>.

### 3.7 反义 RNA 抗病毒感染

天然存在反义 RNA 以及用人工合成的反义 RNA 调控细菌基因表达的成功使 Coleman 等联想到用反义 RNA 抑制病毒基因的表达. 病毒感染的一般过程是: 病毒进入细胞释放病毒基因组, 经复制、转录、翻译, 装配成病毒子. 如果细胞能产生与病毒 mRNA 互补的反义 RNA, 就能阻断病毒 mRNA 的翻译, 终止病毒子的形成. 这种带有产生抗病毒 mRNA 反义 RNA 基因的细胞就具有了抗病毒的“免疫力”. 1985 年 Coleman 等<sup>[15]</sup>首次利用大肠杆

菌噬菌体 SP 的反义 RNA 构建的质粒使宿主菌产生了对噬菌体 SP 的抵抗力. 之后反义 RNA 对病毒复制和转录的抑制作用已通过大量的动物和人类病毒(如 Rous 肉瘤病毒、腺病毒、牛白血病毒)的试验验证<sup>[16-18]</sup>.

### 3.8 反义 RNA 抗肿瘤发生

肿瘤的发生是一个十分复杂的过程, 受各种各样因素的控制. 反义 RNA 是否为控制癌基因表达和细胞转化的因素呢? 1986 年 Amini 等<sup>[19]</sup>研究发现反义 RNA 可抑制多瘤病毒转化的大鼠细胞中 pp660c-src 的激酶活性, 使细胞生长速度减慢, 且对小鼠的致瘤性降低. 而 1988 年 Mercola 等<sup>[20]</sup>的试验表明反义 RNA 可降低 c-fos 基因 mRNA 的含量和翻译水平, 减弱其致瘤性. 这些资料表明, 反义 RNA 较早地阻断了癌基因的活性. 如果细胞已发生癌变, 它们的清除将是免疫系统的任务.

## 4 小 结

综上所述, 反义 RNA 网络假说是在目前仅有的一些科学事实和现象的基础上提出来的, 这里没有深入细致地分析各参考文献的具体内容, 而且有更多的文献没有被引用, 因为本文所讨论的重点不同. 正象 1989 年 Benner 和 Allemann<sup>[6]</sup>在论述胞外“通讯 RNA”时所指出的那样, “这些数据是分散的, 在某些情况下掩藏于主要论点为其它事件的论文之中, 结果很容易作为生物医学研究中常见的不可解释的奥秘被遗忘”, 反义 RNA 网络确实存在于诸多论文的字里行间. 众所周知, 生物细胞, 尤其是真核生物细胞的核和胞质内含有许多不同于已知 tRNA 和 5S rRNA 的功能不清的小

RNA 分子, 值得人们去探讨, 或许从中获得的资料正是反义 RNA 网络的证据.

## 参 考 文 献

- 1 Williams T, Fried M. *Nature*, 1986; **322**: 275
- 2 Tomizawa J, Itoh T, Selzer G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; **78**: 1421
- 3 Chandra C, Novick R P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; **82**: 638
- 4 Young L S, Dunstan H M, Witte P R *et al.* *Science*, 1991; **252**: 542
- 5 Benner S A. *FEBS letters*, 1988; **233**: 225
- 6 Benner S A, Allemann R K. *TIBS*, 1989; **14**: 396
- 7 Mörli M, Niemer I, Schmelzer C. *Cell*, 1992; **70**: 803
- 8 Doudna J A, Usman N, Szostak J W. *Biochemistry*, 1993; **32**: 2111
- 9 Jeffries A C, Symon R H. *Nucleic Acids Res*, 1989; **17**: 1371
- 10 L' Huillier P J, Davis S R, Bellamy A R. *EMBO J*, 1992; **11**: 4411
- 11 Genetic "scissors" revolutionise bioengineering. *New Scientist*, May 26, 1988: 33
- 12 Benne R, Van Den Burg J, Brakenhoff J P J *et al.* *Cell*, 1986; **46**: 819
- 13 Blum B, Bakalara N, Simpson L. *Cell*, 1990; **60**: 189
- 14 Simpson L, Shaw J. *Cell*, 1989; **57**: 355
- 15 Coleman J, Hirashima A, Inokuchi Y *et al.* *Nature*, 1985; **315**: 601
- 16 Chang L-J, Stoltzfus M. *J Virol*, 1987; **61**: 921
- 17 Miroshichenko O I, Ponomareva T I, Tikchonenko T I. *Gene*, 1989; **84**: 83
- 18 Borisenko A, Miroshnickhenko O, Tikchonenko T I. *Virus Res*, 1992; **23**: 89
- 19 Amini S, DeSeau V, Reddy S *et al.* *Mol Cell Biol*, 1986; **6**: 2305
- 20 Mercola D, Westwick J, Rundell A Y K *et al.* *Gene*, 1988; **72**: 253

**Key words** human primary brain tumor. p53 gene. Rb gene. c-myc gene. expression

**Antisense RNA Network—A New Hypothesis.** Fang Dexing. (*Laboratory of Biomedicine, Huadong Research Institute for Medical Biotechnics, Nanjing 210002*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 178

On the basis of the nature of nucleic acids and recent research achievements or findings about the macromolecules, such as DNA-replication-repressor RNA, transcription-factor RNA, extracellular "communicator RNA", ribozyme, gene shears, RNA editing, anti-virus and anti-tumor activities of antisense RNA, a new hypothesis, antisense RNA network, is advanced. i. e. There are many kinds of small

antisense RNAs and their complementary anti-antisense RNAs from genomic DNA within the organism. Because of self-modification (or other mechanism), the antisense RNAs and the anti-antisense RNAs base-pair, but do not reanneal or hybridize with each other. This antisense RNA network, on the one hand, participates in regulating the expression of certain genes in particular tissues at particular time, keeps relative balance of various functional activities. On the other hand, the network plays an important role in specifically recognizing and eliminating the nucleic acids mutated within the body or invaded into the body from the outside.

**Key words** RNA, antisense RNA, network

## Brief Introduction to

# PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

ISSN 1000-3282 CN 11-2161/Q Code number BM 408

(Period of periodical; bimonthly; Date of issue; the 20th of every other month beginning February; Number of pages;96)

Sponsored by the Institute of Biophysics, Academia Sinica and Biophysical Society of China, published by Science Press, *Progress in Biochemistry and Biophysics*, a academic periodical, started publication in 1974. It mainly reports on the latest developments of biochemistry, molecular biology, biophysics and neuroscience both in China and abroad; and it contains reviews and monographs, research papers, techniques and methods, rapid and short communications, exchange experiences, academic discussions, scientific informations, informations and services, and advertisements.

This periodical may serve as a good reference for the scientific research workers, college teachers and students, medical personnels, industrial and agricultural scientists in the fields mentioned above.

**Foreign Distribution:** China International Book Trading Corporation (P. O. BOX 399, Beijing 100044, China).

**Address of the Editorial Staff:** 15 Datun Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China.