

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00790

长链非编码 RNA 的研究进展

高原^{1,2}, 惠宁^{1,2*}, 刘善荣^{2,3*}

- 1. 第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433
- 2. 第二军医大学计划生育优生优育技术研究所, 上海 200433
- 3. 第二军医大学长海医院临床实验中心, 上海 200433

[摘要] 长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类转录本长度超过 200 nt(核苷酸单位)的功能性 RNA 分子,可在表观遗传水平、转录水平和转录后水平调控基因的表达,广泛参与机体的生理和病理过程。目前发现的参与哺乳动物基因活动的 lncRNA 已有上千个,但有关 lncRNA 的功能机制及其与疾病的关系尚不完全明了。本文就 lncRNA 的功能研究进展及 lncRNA 在临床疾病发生发展中的作用作一综述。

[关键词] 长链非编码 RNA;表观遗传学;转录调控;转录后调控;基因组印记;X 染色体失活

[中图分类号] R 394.32 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0790-05

Long non-coding RNA: research progress

GAO Yuan^{1,2}, HUI Ning^{1,2*}, LIU Shan-rong^{2,3*}

- 1. Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 2. Institute of Family Planning Technique, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 3. Clinical Experiment Center, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Long non-coding RNA (lncRNA) is a functional RNA segment longer than 200 nucleotides, with little or no protein-coding capacity. LncRNAs can regulate gene expression at epigenetic, transcription and post-transcription level, and widely participate in various physiological and pathological processes. More than one thousand lncRNAs have been found participating in the gene regulation of mammals. However, the functions and mechanism of lncRNA and its relation with disease remain poorly understood. This paper reviews the progress in lncRNA function study and the role of lncRNA in the development and progression of clinical disease.

[Key words] long non-coding RNA; epigenetics; transcriptional regulation; post-transcriptional regulation; genomic imprinting; X chromosome inactivation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7): 790-794]

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, 即 lncRNA)种类众多,但目前功能明确的 lncRNA 数量极少。lncRNA 可在表观遗传水平、转录水平和转录后水平调控基因的表达,广泛参与机体几乎所有生理和病理过程,与临床上许多肿瘤及非肿瘤疾病关系密切。本文就 lncRNA 的功能研究进展及 lncRNA 在临床疾病发生发展中的作用作一综述。

1 lncRNA 的结构特点

2002 年 Okazaki 等^[1]在对小鼠全长互补 DNA(cDNA)文库的大规模测序过程中首次发现了一类新的转录物,即 lncRNA。lncRNA 是一类转录本长度超过 200 nt(核苷酸单位)的功能性 RNA 分子^[2],它们缺乏编码蛋白的能力,位于细胞核或胞质内,以 RNA 形式在多种层面上(如表观遗传学、转录调控及转录后调控等)调控基因的表达水平。

lncRNA 主要有以下 5 种来源^[3]:(1)蛋白编码基因的结构中断从而形成一段 lncRNA;(2)染色质重组:即两个未转录的基因与另一个独立的基因串联,从而产生含多个外显子的 lncRNA;(3)非编码基因在复制过程中的反移位产生 lncRNA;(4)局部的复制子串联产生 lncRNA;(5)基因中插入一个转座成分而产生有功能的非编码 RNA。虽然 lncRNA 来源不一,但研究显示它们在基因表达的调控方面有相似的作用^[4]。

2 lncRNA 对基因的调控机制及功能研究

lncRNA 起初被认为是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物,不具有生物学功能,是基因转录的“噪音”^[5]。然而,近年研究表明,众多 lncRNA 具有生物学功能,如:(1)参与 X 染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要调控过程^[6-7]。(2)以多种模式保护蛋白编

[收稿日期] 2010-12-02 **[接受日期]** 2011-03-07

[作者简介] 高原,硕士生。E-mail: gaoyuan_324@yhaoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81873592, E-mail: Huin1956@yahoo.com.cn; Tel: 021-81873620, E-mail: liushanrong@hotmail.com

码基因;如受到严格的功能限制以保护编码基因的开放式可读框(ORF);或表现为基因序列的较短延伸,以保护功能域和结构^[8]。(3)LncRNA 含有高效的关键序列,类似于启动子等调控因素,具有比蛋白质更敏感的结构功能限制。(4)一些进化后的人类基因保守区域可被转录成 lncRNA,如 HAR1^[9],在大脑皮质发育阶段早期神经元内表达。(5)研究显示,哺乳动物基因组序列中 1%产生的转录本是可编码蛋白,而有 4%~9%产生的转录本是 lncRNA,其中许多 lncRNA 仅在特定的发育阶段出现^[10],或具有组织或细胞特异性^[6],还有很多 lncRNA 具有保守的二级结构、剪切形式以及精确的亚细胞定位^[11]。(6)lncRNA 既有顺式调控作用^[12],又有反式调控作用^[13]。

现有研究表明 lncRNA 的作用方式如下(图 1):(1)在编码蛋白基因的上游启动子区转录,从而干扰邻近蛋白编码基因的表达(如酵母中的 SER3 基因);(2)抑制 RNA 聚合酶 II,或介导染色质重构和组蛋白修饰,而影响基因表达;(3)与编码蛋白基因的转录本形成互补双链,进而干扰 mRNA 的剪切,产生不同的剪切形式;(4)与编码蛋白基因的转录本形成互补双链,在 Dicer 酶作用下产生内源性的 siRNA(小干扰 RNA),调控基因的表达水平;(5)结合在特定蛋白质上调节相应蛋白的活性;(6)作为结构组分与蛋白质形成核酸蛋白质复合物;(7)结合在特定蛋白上从而改变该蛋白的胞质定位;(8)可作为小分子 RNA(如 miRNA、piRNA、mas-cRNA^[14])的前体分子^[15]。

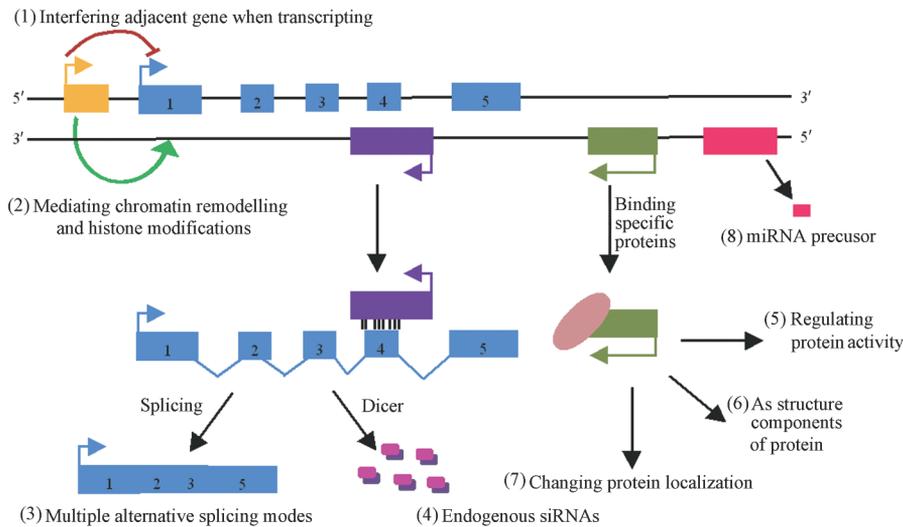


图 1 lncRNA 的作用方式
Fig 1 Action mode of lncRNA

目前发现的参与哺乳动物基因活动的 lncRNA 已有上千个^[16],其调控基因表达的机制存在共性。一般来说,lncRNA

主要从表观遗传学、转录调控及转录后调控等 3 个层面实现对基因表达的调控(图 2)^[17]。

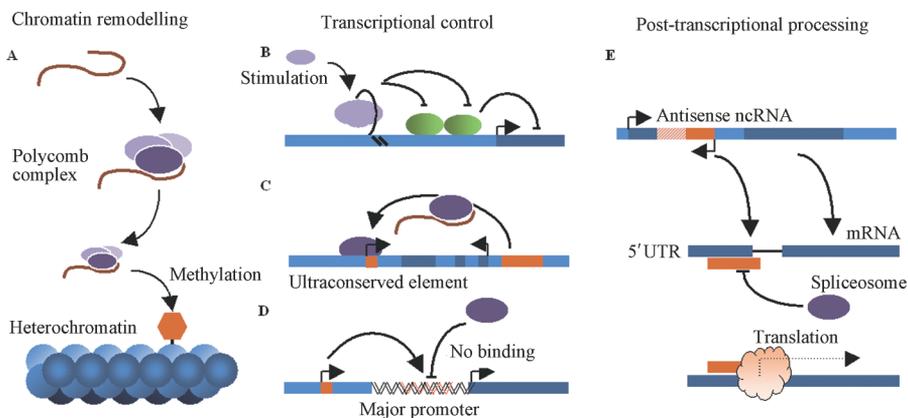


图 2 lncRNA 在 3 个层面上实现对基因表达的调控^[17]

Fig 2 LncRNAs regulate gene expression at epigenetic level, transcription and post-transcription level^[17]

A: LncRNAs can recruit chromatin modifying complexes to specific genomic loci to impart their catalytic activity, inducing heterochromatin formation and repressing gene expression; B: LncRNAs can regulate the transcriptional process through a range of mechanisms; C: An ultraconserved enhancer is transcribed as a lncRNA, which subsequently acts as a co-activator to the transcription factor, to regulate gene transcription; D: LncRNA can form a triple complex at the major promoter to occlude the binding of the general transcription factor, and thereby silencing gene expression; E: An antisense lncRNA can mask the 5' splice site of the zinc finger homeobox mRNA from the spliceosome, resulting in intron retention

2.1 表观遗传调控 哺乳动物 lncRNA 介导的表观遗传改变的研究最早源于基因组印记(genomic imprinting)和 X 染色体失活(X chromosome inactive)两个方面,分别与 H19 和 Xist RNA 密切相关^[18](图 2A)。近十年研究证实 lncRNA 与表观遗传调控密切相关^[7, 19],并且发现了许多新的与基因调控有关的 lncRNA^[20]。

2.1.1 基因组印记 基因组印记,通常为共价标记的 DNA 甲基化(也可以是非共价标记,如 DNA-蛋白质和 DNA-RNA 交互作用,核基因组定位等),还包括组蛋白乙酰化、甲基化等修饰。虽然印记基因只占人类基因组的不到 5%,但在胚胎、胎儿的生长和出生后的发育中却起着至关重要的调节作用,对行为和大脑的功能也有很大的影响。

DNA 甲基化参与基因印记的建立和维持,它发生在生殖细胞的印记控制区(ICR)。目前对这一领域的研究基本上是针对两个基因印记区:17 号染色体近端的 IGF2 受体(Igf2r)区和 7 号染色体远端的 Kcnq1 区,lncRNA 在这些印记位点发挥重要作用^[21]。lncRNA 在印记区介导等位基因沉默。目前已知的是,高达半数的哺乳动物基因都能转录,而其中大部分转录产物是非编码 RNA^[22](包括 lncRNA),已有个别 lncRNA 被证明参与调控印记基因表达^[23]。

小鼠 17 号染色体的 Igf2r 区是第一个被证实的可转录为 lncRNA 的位点。母源性 Igf2r 的第二个内含子包含一个 ICR,参与母系的 DNA 甲基化。而父系染色体的 Igf2r 基因印记是中断的,这是由于存在一未拼接的 lncRNA——Airn(即 Air^[24]),它能够以顺式作用堆积在染色质上,来介导胎盘组织的两个关闭的父源性基因 Slc22a2 和 Slc22a3 的印记^[25]。

7 号染色体远端的 Kcnq1 区在结构上与 Igf2r 位点类似。Kcnq1 区的一个内含子存在 ICR,介导母源性等位基因的 DNA 甲基化,并产生由父源性非甲基化等位基因转录而成的一条 lncRNA——Kcnq1ot1 或称 Lit1。该 ICR 约 900 kb 大小,被称为 KcDMR1^[26],它对于父系等位基因的印记很重要。胎盘组织的 ICR 介导的印记涉及十个以上的基因,其染色质抑制需要 Kcnq1ot1^[27]。而在胚胎组织,只有位于 ICR 中央的基因才被印记,包括 Kcnq1 基因本身,其远端和近端的基因并没有被印记。这些组织特异性的印记差异使我们产生这样的疑问:KcDMR1 调控中央部位的印记表达是否与调控远端近端基因的机制不同?这一疑问还有待进一步研究。

2.1.2 X 染色体失活 X 染色体失活的选择和起始发生在胚胎发育的早期,这一过程被 X 失活中心(X-inactivation center, XIC)所控制,是一种反义链转录调控模式。XIC 是一个顺式作用位点,包含辨别 X 染色体的数目的信息和 Xist 基因,前者可保证仅有一条染色体有活性,但机制尚不明确,后者缺失将导致 X 染色体失活失败。

X 染色体失活是由标志性的约 17 kb 大小的 lncRNA——Xist 顺式作用介导,它在哺乳动物的 X 染色体失活中非常重要^[28]。和大多数转录本不同的是,Xist 并不输送至胞质,其位点上一段 1.6 kb 的内部非编码转录本——RepA 可募集 Polycomb 抑制性复合物 2(PCRC2),即染色质重构复

合体,并包裹在合成它的 X 染色体的某个 RNA 结构域上,在即将失活的染色体表面形成“外套(coating)”。随着 Xist 在 X 染色体上的扩展,大量组蛋白甲基化(如 H3K27 三甲甲基化)即刻发生(这对 X 染色体失活的建立和维持有重要的作用),从而使 X 染色体失活^[16, 29],但由于反义转录本 Tsix 可以限制 Xist 的活性,使剩余的活化 X 染色体还存在有 PRC2。Xist 介导的 X 染色体失活的特征总结来说就是丧失激活性的组蛋白修饰(如乙酰化)而获得抑制性的组蛋白修饰(如 H3K27 的三甲甲基化),最后,导致失活染色体上的许多 CpG 岛启动子甲基化,失活的染色体依旧持续合成 Xist,以维持本身的失活状态,但有活性的 X 染色体如何阻止 XistRNA 的结合机制还不明确。有意思的是,即使在细胞分裂中期,该“外套”始终以顺式方式与失活的染色体相连,经多次细胞分裂后,X 染色体失活始终存在^[30],表明该 RNA “外套”与组蛋白修饰及 DNA 甲基化共同构成表观遗传学的记忆,从而使失活的染色体进行有丝分裂。但在体细胞,Xist 基因的缺失并不影响基因沉默,说明一旦建立了记忆,lncRNA 诱导的沉默结构域就不再是必需的了。再如,一转录自 HOXC 基因座的 lncRNA——HOTAIR^[13]具有类似的机制,它能够募集染色质重构复合体 2(PCRC2)并将其定位到 HOXD 位点,进而诱导 HOXD 基因座上长达 40 kb 的转录本发生表观遗传沉默^[31](图 2A)。同样,Air,Kcnq1ot1 这些 lncRNA 都能够通过募集相应的重构复合体,利用甲基转移酶 Ezh2,G9a,Mll 或 PcG 等实现表观遗传沉默^[10, 25, 27, 32]。这一机制将染色质重构复合物与发育相关的修饰联系起来。

另有研究报道:X 染色体失活尚存在另一机制,即与一种调控性小非编码 RNA 有关^[15]。Xist 和反义链转录本 Tsix 退火复性后可形成一 RNA 二聚体,在 Dicer 酶作用下,被加工剪切成约 24~42 nt 大小的调控性 siRNA,这一机制对于失活的 X 染色体上的抑制性异染色质的修饰是必需的,因为 X 染色体失活过程中组蛋白、赖氨酸和三甲基色氨酸等都需要这些 siRNA,并且 X 染色体激活时 Xist 启动子区的 CpG 岛甲基化也需要它们^[15, 29]。这一机制或许可以推测 lncRNA 和小 RNA 在染色质重塑方面的作用与联系,同时提示 RNA 调控存在着一个更为复杂的、交互的网络。

2.2 转录调控 LncRNA 能够通过多种机制在转录水平进行调控,表现在如下几个方面。

LncRNA 的转录可以干扰邻近基因的表达。例如,酵母的 SER3 基因受到上游一段 lncRNA——SRG1 的干扰。近端启动子转录的 lncRNA 可将 RNA 结合蛋白定位至基因启动子区域从而调控基因表达。如,人类细胞中的细胞周期蛋白 D1(CCND1)的表达,DNA 损伤信号诱导该基因启动子上游一段 lncRNA 的表达,它可调节 RNA 结合蛋白——TLS 的活性,接着 TLS 抑制 CREB 结合蛋白——组蛋白乙酰基转移酶和 p300 的活动,进而使 CCND1 基因的表达沉默^[12](图 2B)。

LncRNA 可作为共因子调节转录因子的活性,例如,小鼠的一段 lncRNA——Evl2 转录自一段超保守的远端增强子,它可与转录因子 DLX2 形成转录复合体,并结合至一个增强子上,从而诱导邻近蛋白编码基因 DLX6 的表达^[33](图

2C)。通过与影响启动子选择的抑制性复合物相互作用,封锁启动子区域来调控RNA聚合酶(RNAP) II的活动从而干扰基因表达,这可能是存在于真核细胞染色体上的上千种三倍体复合物结构控制启动子作用的普遍机制^[34]。

再如,小鼠17号染色体的Igf2r区是第一个被证实的可转录为lncRNA的位点,父系染色体上一未拼接的lncRNA——Airm^[24]从母源性Igf2r上的ICR区域开始转录,方向与Igf2r相反。这一反义链转录的RNA规模较大,跨越整个Igf2r启动子,并越过基因间区抵达邻近基因,属于一种转录干扰机制^[25](图2D)。

2.3 转录后调控 LncRNA在转录后水平可与mRNA形成双链RNA复合物,以掩盖mRNA的主要顺式作用元件,从而调控基因表达。例如,lncRNA-Zeb2(即Sip1)能够和HOX位点转录的mRNA的一个内含子的5'端剪切位点形成双链^[36],从而防止该内含子被剪切(图2E)。该区域含有对于Zeb2蛋白表达所必须的核糖体结合位点,Zeb2通过这种方式能够提高Zeb2蛋白的表达量。这一例子说明lncRNA可以指导mRNA亚型的选择性剪接。

另外,lncRNA的复性(退火)具有靶向作用,使蛋白受体复合物能够识别正义链mRNA转录本,这一租用类似于RNA诱导的沉默复合物(RISC)通过siRNA靶向作用于mRNA。来自于互补转录本甚至是lncRNA的双链RNA,结合延长的内部发夹结构,能够被加工成内源性siRNA以使基因表达沉默^[15](图2E)。

3 LncRNA与临床疾病的关系

LncRNA能够调节与之相关的蛋白编码基因,lncRNA的不当表达可能导致疾病的发生,这一发现开拓了对病因学上lncRNA作用机制研究的新领域。例如,从p15抑癌基因转录而来的一条反义lncRNA可以诱导局部异染色质和DNA甲基化,从而使该lncRNA及相关蛋白发生逆表达,最终导致白血球增多症的发生。2008年Yu等^[37]的研究表明,包括p15在内的许多因表观遗传机制而发生基因沉默的抑癌基因都可转录相应的lncRNA,从而诱导相关疾病的发生。LncRNA参与诱导疾病的发生,这一机制也可能还与疾病相关基因的多态性和非编码区的染色体改变有关^[38]。例如,一段反义链转录的lncRNA若发生易位和诱导表达,便可导致邻近的 α -globin基因的表现沉默,从而导致 α -地中海贫血^[39]。再如大量的研究所示,肿瘤细胞中某些特定lncRNA的表达水平发生异常改变。这种表达水平的变化能够作为癌症诊断的标志物(如前列腺癌中的DD3)和潜在的药物靶点^[40]。

近来在对阿尔茨海默病的研究中发现一个lncRNA——BACE1AS,它转录自 β 分泌酶编码基因BACE1的反义链。 β 分泌酶能够产生 β 淀粉样蛋白,后者的累积是阿尔茨海默病的主要诱因。BACE1AS能够防止BACE1 mRNA受核酸酶降解,以增加BACE1 mRNA的稳定性,从而诱导更多的 β 淀粉样蛋白累积,并促进BACE1AS的表达,这个正反馈循环将会加速阿尔茨海默病的发展。当实验中加入特异性针对BACE1AS的siRNA后,发现BACE1AS的表达水平降低, β 淀粉样蛋白的表达水平也同时下降,这表明BACE1AS是一

个非常理想的治疗阿尔茨海默病的药物靶点^[41]。

2003年就已表明,另一个lncRNA——MALAT1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)广泛存在于人类和小鼠的正常组织中^[42]。虽然早期的非小细胞癌中MALAT1的表达无特异性,但在癌症转移之后,MALAT1的表达水平较未转移者高,说明MALAT1在肿瘤转移中具有提示的价值,MALAT1的高表达与患者的低生存率密切相关。另外,MALAT1在其他许多人类肿瘤中被异常调控,从而发生过表达,如乳腺、胰腺、肺、结肠、前列腺和肝脏的肿瘤^[43]。以上实验结果都证明,MALAT1的异常调控在许多肿瘤的发展过程中起重要作用。有关MALAT1在肿瘤发生发展中的机制可能是MALAT1上存在与肿瘤相关的染色体易位点^[44]。另外,MALAT1特异性位于细胞核小体的核心,这一区域参与聚集、修饰和(或)储存、加工mRNA前体,从而调控肿瘤发生机制,所以这种定位关系说明MALAT1在基因表达的组织和调控上很重要^[45]。

4 展望

相对于蛋白编码序列以及小分子RNA来说,lncRNA的研究还仅仅处于起步阶段,随着对lncRNA在哺乳动物进化及疾病发生发展中作用的关注,lncRNA的机制已成为现代遗传学研究的热点问题。然而,迄今为止,人们对于哺乳动物细胞内lncRNA调控机制的认识仍存在许多障碍,包括它们的数量比例及它们的作用机制。因此提高对lncRNA等非编码转录本的关注,对真核细胞基因编程中进化更新和功能性RNA家族的扩大是很重要的^[46]。比如,最初认为lncRNA的作用途径是独立的,且有明显区别。但近年研究报道这些作用途径的界限已开始模糊,其中有些lncRNA之间存在交互作用,并构成一基因调控网络。如果大部分非编码RNA被证明是有功能的,那么它们的特性将对我们认识复杂有机体的基因编程有很大影响,也会带给我们关于进化、发育和疾病等老问题的新的答案。

[参考文献]

- [1] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs[J]. *Nature*, 2002, 420:563-573.
- [2] Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix D A, Dutttagupta R, Willingham A T, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription[J]. *Science*, 2007, 316: 1484-1488.
- [3] Ponting C P, Oliver P L, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136:629-641.
- [4] Cao X, Yeo G, Muotri A R, Kuwabara T, Gage F H. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2006, 29:77-103.
- [5] Struhl K. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14:103-105.
- [6] Prasad K V, Spector D L. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the "genome complexity" conundrum[J]. *Genes Dev*, 2007, 21:11-42.
- [7] Amaral P P, Dinger M E, Mercer T R, Mattick J S. The eukaryotic

- genome as an RNA machine[J]. *Science*, 2008, 319: 1787-1789.
- [8] 于红. 表观遗传学: 生物细胞非编码 RNA 调控的研究进展[J]. *遗传*, 2009, 31: 1077-1086.
- [9] Pollard K S, Salama S R, Lambert N, Lambot M A, Coppens S, Pedersen J S, et al. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans[J]. *Nature*, 2006, 443: 167-172.
- [10] Dinger M E, Amaral P P, Mercer T R, Pang K C, Bruce S J, Gardiner B B, et al. Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation[J]. *Genome Res*, 2008, 18: 1433-1445.
- [11] Mercer T R, Dinger M E, Sunkin S M, Mehler M F, Mattick J S. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 716-721.
- [12] Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription[J]. *Nature*, 2008, 454: 126-130.
- [13] Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, Squazzo S L, Xu X, Bruggmann S A, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2007, 129: 1311-1323.
- [14] Wilusz J E, Freier S M, Spector D L. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA[J]. *Cell*, 2008, 135: 919-932.
- [15] Ogawa Y, Sun B K, Lee J T. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways[J]. *Science*, 2008, 320: 1336-1341.
- [16] Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin M F, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J]. *Nature*, 2009, 458: 223-227.
- [17] Mercer T R, Dinger M E, Mattick J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 155-159.
- [18] Yang P K, Kuroda M I. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression[J]. *Cell*, 2007, 128: 777-786.
- [19] Probst A V, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 192-206.
- [20] Mattick J S. The genetic signatures of noncoding RNAs[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000459.
- [21] Kacem S, Feil R. Chromatin mechanisms in genomic imprinting[J]. *Mamm Genome*, 2009, 20(9-10): 544-556.
- [22] Brosnan C A, Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21: 416-425.
- [23] Umlauf D, Fraser P, Nagano T. The role of long non-coding RNAs in chromatin structure and gene regulation: variations on a theme[J]. *Biol Chem*, 2008, 389: 323-331.
- [24] Braidotti G, Baubec T, Pauler F, Seidl C, Smrzka O, Stricker S, et al. The Air noncoding RNA: an imprinted cis-silencing transcript[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2004, 69: 55-66.
- [25] Pauler F M, Koerner M V, Barlow D P. Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer[J]? *Trends Genet*, 2007, 23: 284-292.
- [26] Nagano T, Mitchell J A, Sanz L A, Pauler F M, Ferguson-Smith A C, Feil R, et al. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin[J]. *Science*, 2008, 322: 1717-1720.
- [27] Shin J Y, Fitzpatrick G V, Higgins M J. Two distinct mechanisms of silencing by the KvDMR1 imprinting control region[J]. *EMBO J*, 2008, 27: 168-178.
- [28] Pandey R R, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation[J]. *Mol Cell*, 2008, 32: 232-246.
- [29] Masui O, Heard E. RNA and protein actors in X-chromosome inactivation[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 419-428.
- [30] Collins L J, Chen X S. Ancestral RNA: the RNA biology of the eukaryotic ancestor[J]. *RNA Biol*, 2009, 6: 495-502.
- [31] Jonkers I, Monkhorst K, Rentmeester E, Grootegeod J A, Grosveld F, Gribnau J. Xist RNA is confined to the nuclear territory of the silenced X chromosome throughout the cell cycle[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 5583-5594.
- [32] Brock H W, Hodgson J W, Petruk S, Mazo A. Regulatory noncoding RNAs at Hox loci[J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87: 27-34.
- [33] Morris K V, Santoso S, Turner A M, Pastori C, Hawkins P G. Bidirectional transcription directs both transcriptional gene activation and suppression in human cells[J]. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000258.
- [34] Feng J, Bi C, Clark B S, Mady R, Shah P, Kohtz J D. The Evt-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator[J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 1470-1484.
- [35] Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript[J]. *Nature*, 2007, 445: 666-670.
- [36] Beltran M, Puig I, Peña C, García J M, Alvarez A B, Peña R, et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Genes Dev*, 2008, 22: 756-769.
- [37] Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg A P, et al. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA[J]. *Nature*, 2008, 451: 202-206.
- [38] Hindorf L A, Sethupathy P, Junkins H A, Ramos E M, Mehta J P, Collins F S, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 9362-9367.
- [39] Tufarelli C, Stanley J A, Garrick D, Sharpe J A, Ayyub H, Wood W G, et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease[J]. *Nat Genet*, 2003, 34: 157-165.
- [40] Bussemakers M J, van Bokhoven A, Verhaegh G W, Smit F P, Karthaus H F, Schalken J A, et al. DD3, a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 5975-5979.
- [41] Faghghi M A, Modarresi F, Khalil A M, Wood D E, Sahagan B G, Morgan T E, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of β -secretase expression[J]. *Nat Med*, 2008, 14: 723-730.
- [42] Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider P M, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22: 8031-8041.
- [43] Lin R, Maeda S, Liu C, Karin M, Edgington T S. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 851-858.
- [44] Rajaram V, Knezevich S, Bove K E, Perry A, Pfeifer J D. DNA sequence of the translocation breakpoints in undifferentiated embryonal sarcoma arising in mesenchymal hamartoma of the liver harboring the t(11; 19)(q11; q13.4) translocation[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007, 46: 508-513.
- [45] Hutchinson J N, Ensminger A W, Clemson C M, Lynch C R, Lawrence J B, Chess A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 39.
- [46] Taft R J, Pheasant M, Mattick J S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity[J]. *Bioessays*, 2007, 29: 288-299.