

小分子 RNA 及其在化学品毒理学中应用的展望*

徐 挺^{1, 2} 尹大强^{1**}

(1. 同济大学环境科学与工程学院长江水环境教育部重点实验室, 上海, 200092 2. 安徽大学资源与环境工程学院, 合肥, 230039)

摘 要 小分子 RNA, 包括 sRNA、mRNA、pRNA 等, 在基因表达调控过程中扮演了至关重要的角色. 对小分子 RNA 生物发生和功能的认知将有助于促进基因沉默的机制研究和基因治疗. 本文归纳了近些年关于小分子 RNA 的重大研究成果以及应用于毒理学研究的案例, 并对毒理学未来研究小分子 RNA 的重点和方向作出展望.

关键词 小分子 RNA, RNA 干扰, 基因调控网络.

化学品毒性与机制研究正从传统视角向基因调控水平发展. RNA 干扰 (RNAi) 和其中起核心作用的一大类小分子非编码 RNA 在彻底改变人类对于基因表达调控认识的同时, 也已引起了毒理学界的关注.

小分子 RNA 是指一类长度约在 20—30 个核苷酸、不能编码为蛋白质的 RNA. 它们在基因表达过程中具有举足轻重的调控作用, 影响范围从胚胎干细胞到成熟个体的器官和组织, 涉及的生物包括原生动植物、植物、哺乳动物等, 最近又在芽殖酵母中有重大突破^[1]. 关于小分子 RNA 的研究在近年内形成井喷, Pubmed 数据库中的相关各类文献记录至今已逾 25000 篇, 十年来六度入选《Science》评比的“十大科技突破”, 成为新世纪以来分子生物学中最活跃的领域之一.

1 小分子 RNA 类型与形成过程

迄今为止, 绝大部分的小分子 RNA 可以分为三类: sRNA (small interfering RNA)、mRNA (microRNA) 和 pRNA (piwi interacting RNA). 与 mRNA 始终为内源性不同, 早期发现的 sRNA 都是外源性的; 直至本世纪初, 才在拟南芥 *Arabidopsis*^[2] 和秀丽线虫 *C. elegans*^[3] 体内发现了内源性 sRNA (endo-sRNA), 并进一步划分出 casRNA、tasRNA 和 natsRNA 三种亚类^[4]; 随后动物内源性 sRNA 也得以发现^[5]. 此外还有一些其它类型的小分子 RNA, 如 prRNA^[6]、qRNA^[7] 等, 对它们的了解暂时比较缺乏.

各类小分子 RNA 在生物发生中都呈现出一个共同特征, 即需要与 Argonaute (AGO) 蛋白家族相结合, 形成具有切割活性的复合体 RISC (RNA-induced silencing complex). 它也是鉴别小分子 RNA 的重要依据之一. AGO 家族的成员几乎全部参与基因沉默过程, 常见的搭配包括 sRISC 和 AGO2 mRISC 和 AGO1 pRISC 和 AGO3. 不过参与的 AGO 蛋白也可能影响到小分子 RNA 的调控效果. 在从前体到成熟的转变过程中, 源自双链 RNA 的 sRNA 和 mRNA 需要依赖于 RNaseIII 酶 Dicer 家族; 而 pRNA 没有征用 Dicer, 因为它起源于转录得到的单链 RNA. 裂殖酵母 *S. pombe* 体内缺乏 Dicer 时, 其转录组的降解产物里可观察到一种原始小 RNA (prRNA)^[6], 它的生物发生过程有些类似于 pRNA. qRNA 则来自于 DNA 损伤的诱导, 它兼有单链或双链形态, 这意味着除了 Dicer 外它似乎还需要其它外切酶的帮助. mRNA 的形成最为复杂: 它起初处于单链状态, 由于有部分序列互补而自身折叠成双链的茎环结构, 还必须经历一次 RNaseIII 酶 Drosha 的剪切^[7]. 内源性 sRNA、mRNA 从基因组上转录出来, 这一过程可能需要 RNA 聚合酶 Pol II、IV 等介导, 其后通过 Ran-GTP 及其受体 Exportin-5 转运出细胞核, 再进行 Dicer 切割和 RISC 的装配. 然而最近的两项研究显示, Dicer 对于 mRNA 的生物形成可能并非必需^[8, 9].

2010 年 7 月 5 日收稿.

* 国家自然科学基金 (20777055) 资助.

** 通讯联系人, Tel 021-65982688; E-mail yindq@tongji.edu.cn

小分子 RNA 的形成过程暗示出其生物意义的深度和广度: 无论起源于核内核外, 是单链抑或双链 RNA, 配合适当的酶和结合蛋白后都可变成功能强大的调节者. 虽然细节上有所不同, 但几种小分子 RNA 的相似之处更能给人留下深刻的印象. 事实上, 鉴于 sRNA 和 m RNA 之间众多的相似性, 一些学者认为二者很可能是同源的.

2 小分子 RNA 的生物学功能和意义

2.1 RNA 干扰的参与者

在 RISC 的配合下, 小分子 RNA 成为单链的成熟形式后与靶 mRNA 互补结合, 其调控效果同其与靶 mRNA 的互补程度相关, 与 mRNA 高度互补时可以降解 mRNA, 存在部分序列互补时则只能抑制 mRNA 的翻译过程. 这构成了经典的 RNA 干扰 (RNA i) 途径. 然而随着研究的不断深入, 经典理论几乎被冲击得面目全非. 一项关于拟南芥的研究发现, 高度互补的 m RNA 或 sRNA 也可以仅起到翻译抑制的作用而不降解 mRNA^[10]. sRNA^[11]和 m RNA^[12]先后被证明可通过调节 DNA 甲基化而实现转录水平的基因沉默, 扩充了小分子 RNA 的影响范围. Ago 蛋白一度被认为可在双链前体中选择引导 (guide) 链保护, 并放任过客 (passenger) 链被降解. 但最近发现过客链不仅没有降解, 还可能与 AGO2 相结合参与调控. 这种结合依赖 m RNA 的因子 DCR1, sRNA 的因子 DCR2 和 R2D2^[13-14]. 更令人惊异的是, 有研究表明 m R-36-9-3_p 在细胞周期停滞时可上调其靶基因 TNF α 的表达^[15]. 这也说明小分子 RNA 对于基因表达的调控影响将是深刻且全方位的, 很可能远远超出我们目前的认知.

2.2 被调控的调控者

小分子 RNA 的积累需要经历转录、加工和衰退一系列过程, 所以其成熟和稳定也会受到转录因子、结合蛋白或酶等因素的控制^[16-18]. 其中围绕 Lin-28 (高度保守的 RNA 结合蛋白) 对 let-7 (m RNA 家族之一) 的调控展开的研究较为丰富^[19]. 在 TUTase 的配合下, Lin-28 通过对 let-7 前体 RNA 终端的尿嘧啶化, 阻断 Dicer 的切割而阻止 let-7 的成熟^[20]. p53 则是另一种受到高度关注的转录因子, 以及关键的肿瘤抑制因子. DNA 损伤时 p53 可强化包括 m R-16-1, m R-143 和 m R-145 多种 m RNA 的成熟^[21]. 同时, 一种脑部富集的 m RNA, m R-125b 和另一种 m RNA, m R-504, 又可介导 p53 基因表达的下调^[22-23]. 这使得 p53 和 m RNA 之间构成了相互调控的关系.

小分子 RNA 间的相互关联也可以看作一类特殊的调控. 尤其是 sRNA, 与其它多种类型的小分子 RNA 的交联常见诸文献. 譬如, m RNA (拟南芥)^[24-25]、p RNA (秀丽线虫)^[26]都可能诱导内源性 sRNA 的生物形成; 内源性 sRNA 则可能抑制 p RNA (果蝇)^[27]. 最新的例证在于前述的 prRNA 与 sRNA, 发现者 Halic 和 Moazed 称二者的微妙关系为“转录组监督机制”^[6]. 虽然细节还存有一定疑问, 但目前可确定 prRNA 与 sRNA 扩增引发的关系十分密切.

2.3 小分子 RNA 与基因治疗

果蝇体内的 m R-7 可帮助幼虫在温度变化时保持 A to 和 Yan 等基因的正常表达^[28], 这表明小分子 RNA 具有减缓环境变化冲击, 保证生物机体维持稳态, 抑制机体生长失调的重要作用, 很容易使人将小分子 RNA 关联于癌症的基因治疗. 而已在众多癌症案例中观察到 m RNA 的异常表达, 更印证了小分子 RNA 与肿瘤发生过程必然存在密切的关联^[29]. 其机理大致为抑制癌基因表达, 如 let-7 家族的肿瘤抑制作用至少部分归功于它们抑制 RAS 癌基因的能力^[30]; 又如 let-7 通过抑制细胞因子 IL6 影响可能导致癌症的正反馈环^[31]. 有时亦可表现为抑制癌细胞的转移, 如 m R-17/20 和 m R-31^[32-33]. 最近一项基因组规模的 sRNA 筛选中发现, SMCX、EP400 和 Brd4 等 sRNA 可抑制乳头瘤病毒癌基因 E6 和 E7 的表达^[34]. 不过当小分子 RNA 运用于基因治疗时, 需引入包含 shRNA (short hairpin RNA, 小分子 RNA 前体) 的表达载体, 并由之产生一定的毒性^[35].

部分 m RNA 则在胰腺癌、大肠癌等案例中被怀疑为癌基因^[36-37]. He 等更是发现 m R-17-92 簇和癌基因 *c-myc* 一起, 可能加速小鼠 B 细胞淋巴瘤的肿瘤发生^[38]. 而当 m R-21 失活后, 肿瘤又被以凋亡等形式完全抑制^[39]. 其实通过基因芯片的高通量筛选可以看出, 癌症发生的微观表现总是众多 m RNA 的上调和下调, 并没有统一变化的趋势^[40-41]. m RNA 水平的某些变化必然属于次级效应, 但机理尚未完全明晰.

1986年, Gilbert在 Crick, Cech等前人的工作基础上提出了著名的“RNA 世界”学说, 树立起 RNA 在生物进化中的首要地位^[42]. 暨 II 型内含子、反转座子之后, 小分子 RNA 和 RNA 干扰成为“RNA 世界”学说一次影响深远的扩展, 赋予了“RNA 世界”全新的存在方式. 生命活动的高度复杂性不是仅靠静态的基因序列可以阐明, 仅仅依赖于 mRNA 建立起的表达图谱也无法体现出存在于转录水平、后转录水平上的多种调控作用. 各类小分子非编码 RNA, 以及后来发现的长非编码 RNA (如 XIST^[43]) 一起, 不仅覆盖于全部生命信息传递过程, 而且使得这一过程充满了未知和变数.

3 小分子 RNA 对毒理学机制研究的影响和前景展望

目前, 小分子 RNA 的调控与生物学作用受到毒理学家高度关注, 开展的研究也取得了一定成果. Wang 等通过 mRNA 芯片技术筛选了出生前小鼠脑中在乙醇暴露后出现差异表达的 mRNA, 建立了 mR-10 过表达与乙醇诱导出生缺陷的关联, 以及 mR-10a 与其主要靶基因 Hoxa1 表达的负相关^[44]. 在两项关于小鼠的致癌剂暴露研究中, 致癌剂 (乙基亚硝基脲) 和非致癌剂暴露分别导致 mRNA 表达紊乱和仅小部分的 mRNA 表达变化的结果; 而使用非遗传毒性的致癌物苯巴比妥暴露时, 致癌剂量和非致癌剂量下的 mRNA 表达谱也体现出显著的不同^[45-46]. 研究结果同时建议, mRNA 表达可作为致癌剂暴露的生物标志物. 非化学暴露的表现类似, 低 LET 辐射也能造成人类成纤维细胞中 mRNA 表达谱的变化^[47]. 2010年, Cho 等应用 Agilent 基因芯片技术, 对比分析了双酚 A (BPA) 诱导下小鼠 mRNA 和 mRNA 表达谱变化的情况^[48]. 这是文献首次报道将小分子 RNA 应用于环境内分泌干扰物 (EDCs) 的研究, 也是首度进行 mRNA 和 mRNA 表达水平的联合研究. 结果表明, 24h 的 BPA 暴露造成多种 mRNA 显著下调, 功能分析显示变化的 mRNA 主要参与繁殖和代谢过程.

总体而言, 毒理学现在对于小分子 RNA 的研究还比较初步, 涉及化学品较少、受试对象集中于啮齿类、对分析得到的数据也没有太好的处理手段. 为了更精确地研究小分子 RNA 在化合物暴露中所扮演的角色, 我们认为二者间的相互作用需要划分为两个角度来理解. 首先, 小分子 RNA 响应于化合物的暴露, 并对化合物的遗传毒性效应进行调节. 这可能也是某种化合物对基因组的效应几乎总是与蛋白组的效应不尽相同的主要原因. 相比于中心法则 DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ 蛋白质的简单路径, 小分子 RNA 的调控过程体现了高度的弹性和多向性, 无疑加大了机制研究的难度, 更需要全面、谨慎的整体把握. 前例中, mRNA-mRNA 表达谱的联合研究不仅发现 mRNA 水平没有统一变化的趋势, 更发现了存在 mRNA 及其靶基因 mRNA 同时上调或下调的情况. 它表面上有悖于经典的小分子 RNA 调控理论, 实则暗示出 mRNA 的作用很可能呈现为一种多层级的网状结构. 其次, 小分子 RNA 的调控过程可能也会受到外源化合物的干扰. 这实质上是一种发生于调控层面的毒性效应, 姑且称之为化合物的“调控毒性”. 鉴于小分子 RNA 牵涉到错综复杂的调控关系, 有理由相信这种情形绝不罕见. 然而识别并表征它显然有一定难度, 因为按现有的理论和测试手段, 小分子 RNA 多数时候并不能直接表现为某种效应. 那么, 通过检测参与调控的协同因子来间接指示小分子 RNA 水平或许是种思路, 但难度可想而知, 方法的操作性和通用性都很难保证. 因此上述两点均指向一个终点——基因调控网络^[49]. 将小分子 RNA (不仅仅是 mRNA)、靶基因 mRNA、调控因子等都包含进一个网络状的整体, 其间所有元素看作网络上相互作用的节点, 每个节点既可能受到多个上游节点的调控, 又要对下游节点进行直接或间接的控制. 这样才可能真正理解小分子 RNA 的变化规律及其与 mRNA 水平的相互关系.

最后必须指出的是, 尽管调控基因组的时代已经来临, 对小分子 RNA 的认识却仍处于完善时期, 许多谜团亟待解开, 任何颠覆性研究成果也不会让人备感意外. 所以, 一方面我们看好小分子 RNA 的毒理学研究前景; 另一方面, 我们也在期待小分子 RNA 基础研究的继续突破.

参 考 文 献

- [1] Drinnenberg I A, Weinberg D E, Xie K T, et al. RNA i in budding yeast[J]. Science, 2009, 326(5952): 544-550
- [2] Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing[J]. EMBO Journal, 2002, 21(17): 4671-4679
- [3] Ambros V, Lee R C, Lavanway A, et al. MicroRNAs and other tiny endogenous RNA s in C-elegans[J]. Current Biology, 2003, 13(10): 807-818

- [4] Ghildiyal M, Zamore P D. Small silencing RNAs: an expanding universe[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(2): 94-108
- [5] Yang N, Kazazian H H. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13(9): 763-771
- [6] Halic M, Moazed D. Dicer-independent pri-miRNA trigger RNAi and heterochromatin formation[J]. *Cell*, 2010, 140: 504-516
- [7] Lee H C, Chang S S, Choudhary S. qRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage[J]. *Nature*, 2009, 459: 274-277
- [8] Cheloufi S, Dos Santos C O, Chong M M W, et al. A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis[J]. *Nature*, 2010, 465(7298): 584-586
- [9] Cifuentes D, Xue H L, Taylor D W, et al. A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires argonaute2 catalytic activity[J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1694-1698
- [10] Brøderson P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, et al. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs[J]. *Science*, 2008, 320(5880): 1185-1190
- [11] Chan S W L, Zilberman D, Xie Z X, et al. RNA silencing genes control de novo DNA methylation[J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1336-1336
- [12] Khnawish B, Arif M A, Seumel G J, et al. Transcriptional control of gene expression by miRNAs[J]. *Cell*, 2010, 140: 111-122
- [13] Okamura K, Liu N, Lai E C. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by drosophila argonautes[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(3): 431-444
- [14] Czech B, Zhou R, Erlich Y, et al. Hierarchical rules for argonaute loading in drosophila[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(3): 445-456
- [15] Vasudevan S, Tong Y C, Steitz J A. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation[J]. *Science*, 2007, 318: 1931-1934
- [16] Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, et al. An evolutionarily conserved mechanism for miRNA-223 expression revealed by miRNA gene profiling[J]. *Cell*, 2007, 129(3): 617-631
- [17] Treiber T, Meister G. SMADs stimulate miRNA processing[J]. *Molecular Cell*, 2010, 39(3): 315-316
- [18] Das S K, Sokhi U K, Bhutia S K, et al. Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades miRNA-221 in human melanoma cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11948-11953
- [19] Viswanathan S R, Daley G Q. Lin28: A miRNA regulator with a macro role[J]. *Cell*, 2010, 140(4): 445-449
- [20] Heo J, Joo C, Kim Y K, et al. TUT4 in concert with Lin28 suppresses miRNA biogenesis through pre-miRNA uridylation[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 696-708
- [21] Suzuki H, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of miRNA processing by p53[J]. *Nature*, 2009, 460(7254): 529-531
- [22] Le M T N, Teh C, Shyh-Chang N, et al. miR-125b is a novel negative regulator of p53[J]. *Genes & Development*, 2009, 23(7): 862-876
- [23] Hu W W, Chan C S, Wu R, et al. Negative regulation of tumor suppressor p53 by miRNA miR-504[J]. *Molecular Cell*, 2010, 38(5): 689-699
- [24] Yoshikawa M, Peragine A, Park M Y, et al. A pathway for the biogenesis of transacting siRNAs in Arabidopsis[J]. *Gene & Development*, 2005, 19(18): 2164-2175
- [25] Cupenis J T, Carbonell A, Fahlgren N, et al. Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(8): 997-1001
- [26] Batista P J, Ruby J G, Claycomb J M, et al. PRG-1 and 21U-RNA interact to form the piRNA complex required for fertility in C. elegans[J]. *Molecular Cell*, 2008, 31(1): 67-78
- [27] Ghildiyal M, Seitz H, Howich M D, et al. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in Drosophila somatic cells[J]. *Science*, 2008, 320(5879): 1077-1081
- [28] Li X, Cassidy J J, Reinke C A, et al. A miRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development[J]. *Cell*, 2009, 137: 273-282
- [29] Ryan B M, Robles A I, Harris C C. Genetic variation in miRNA networks: the implications for cancer research[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10(6): 389-402
- [30] Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. *Cell*, 2005, 120(5): 635-647
- [31] Iliopoulos D, Hirsch H A, Stuhlik K. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation[J]. *Cell*, 2009, 139(4): 693-706
- [32] Yu Z R, Wilhelm N E, Zhou J E, et al. miRNA-17/20 inhibits cellular invasion and tumorigenesis in breast cancer by heterotypic signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(18): 8231-8236
- [33] Vakstyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1032-1046
- [34] Smith J A, White E A, Sowam E, et al. Genomewide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brl4 as E2-dependent regulators of

- human papillomavirus oncogene expression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010 107(8): 3752-3757
- [35] Grimm D, Streetz K L, Jopling C L, et al Fatality in mice due to oversaturation of cellular miRNA / short hairpin RNA pathways[J]. Nature 2006 441(7092): 537-541
- [36] Dillhoff M, Liu J, Frankel W, et al MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival[J]. Journal of Gastrointestinal Surgery 2008, 12(12): 2171-2176
- [37] Yang L D, Belaguli N, Berger D H. MicroRNA and colorectal cancer[J]. World Journal of Surgery 2009, 33(4): 638-646
- [38] He L, Thomson J M, Hemann M T, et al A miRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. Nature 2005, 435(7043): 828-833
- [39] Medina P P, Nolle M, Slack F J. Oncomir addiction in an in vivo model of miRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma[J]. Nature 2007, 447(7111): 86-89
- [40] Yanahara N, Caplen N, Bowman E, et al Unique miRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. Cancer Cell 2006 9(3): 189-198
- [41] Schetter A J, Leung S Y, Sohn J J, et al MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. JAMA- Journal of the American Medical Association 2008 299(4): 425-436
- [42] Gilbert W. Origin of life: The RNA World[J]. Nature 1986, 319(6055): 618
- [43] Ng K, Pullirsch D, Leeb M, et al Xist and the order of silencing[J]. EMBO Reports 2007, 8(1): 34-39
- [44] Wang L L, Zhang Z F, Li Q, et al Ethanol exposure induces differential miRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation[J]. Human Reproduction 2009 24(3): 562-579
- [45] Chen T. MicroRNA biomarkers for carcinogen exposure in rodents[J]. Toxicology Letters 2009 189(Suppl. S1): S151-S151
- [46] Koufaris C, Wright J, Currie R, et al Carcinogenic and non-carcinogenic doses of phenobarbital cause distinct miRNA profiles in male Fischer rats after 14 days of dietary exposure[J]. Toxicology 2009, 262(1): 16-17
- [47] Maes O C, An J, Saejin H, et al Changes in miRNA expression patterns in human fibroblasts after Low-LET radiation[J]. Journal of Cellular Biochemistry 2008, 105(3): 824-834
- [48] Cho H, Kim S J, Park H W, et al A relationship between miRNA and gene expression in the mouse Sertoli cell line after exposure to bisphenol A[J]. Biotech Journal 2010 4(1): 75-81
- [49] Davidson E H. The regulatory genome: gene regulatory networks in development and evolution[M]. New York: Academic Press 2006 127-127

THE PERSPECTIVE OF SMALL RNAs AND THEIR APPLICATION IN TOXICOLOGY OF CHEMICALS

XU Ting^{1,2} YN Daqiang¹

(1 Key Laboratory of Yangtze River Water Environment Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering
Tongji University, Shanghai 200092, China; 2 School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

ABSTRACT

Small RNAs, including siRNA, miRNA, piRNA and so on, play key roles during the processes of regulating the gene expression. The comprehension about the biogenesis and function of small RNAs will help to improve mechanistic study of gene silencing and gene therapy application, and can also contribute to toxicology in future. This review summarizes significant achievements in the recent years on small RNAs and some cases of toxicological applications. It also provides outlook for the research directions and focus of small RNAs in toxicology studies in the future.

Keywords small RNAs; RNA interfering; gene regulatory network