

环状RNA的研究进展

曾奇虎¹,翁静飞¹,李小林¹,张艳¹,易登良²,范忠才²,白雪¹

1.西南医科大学附属中医医院心脑血管病科,四川 泸州 646000;

2.西南医科大学附属中医医院心内科,四川 泸州 646000

【摘要】 环状RNA (circular RNA, circRNA)是以共价封闭环为特征,广泛存在于真核细胞转录的一类新型RNA分子,具有结构稳定、高度保守性、表达量丰富的特点,并且在不同组织的各发育阶段具有表达特异性。目前已在哺乳动物、植物中发现成千上万circRNA。环状RNA有充当微小RNA (microRNA, miRNA)海绵、剪切和转录的调控,亲代基因修饰的功能。与许多疾病密切相关,可能成为疾病诊断或预测的生物学标志物。同miRNA和长链非编码RNA(long non-coding RNA, lnc RNA)类似,环状RNA已经成为RNA研究领域新的热点,可能同生命进程息息相关。本文就其形成、特征、功能及在疾病潜在意义进行综述。

【关键词】 环状RNA;基因表达调控;生物学标志物;微小RNA海绵体

【中图分类号】 R394 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)18-2427-04

Research advances on circular RNAs. ZENG Qi-hu¹, WENG Jing-fei¹, LI Xiao-lin¹, ZHANG Yan¹, YI Deng-liang², FAN Zhong-cai², BAI Xue¹. 1. Department of Cardio-cerebrovascular Diseases, the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, CHINA; 2. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, CHINA

【Abstract】 Circular RNAs (circRNAs) are a novel type of RNA that form a covalently closed continuous loop and are highly represented in the eukaryotic transcriptome. They are characterized by stable structure, high conservativeness, and abundant expression, and show the expression specificity at different stages of development in different tissues. So far, thousands of endogenous circRNAs have been discovered in mammalian cells and plants. circRNAs can function as microRNA (miRNA) sponges, regulators of splicing and transcription, and modifiers of parental gene expression. They are involved in many diseases and can serve as diagnostic or predictive biomarkers of some diseases. Similar to miRNAs and long noncoding RNAs (lncRNAs), circRNAs have become a new research hotspot in the field of RNA and could be widely involved in the processes of life. Herein, we review the formation, properties of circRNAs, their functions and their potential significance in diseases.

【Key words】 Circular RNA; Gene expression regulation; Biomarker; MiRNA sponge

circRNA是一类不具有5'末端帽子和3'末端 poly (A) 尾巴特殊非编码RNA,以共价键形成环形结构的RNA分子,已成为RNA领域研究热点。20世纪70年代首次在病毒RNA中发现circRNA^[1]。由于其低水平表达,circRNA曾被认为是RNA错误剪接或者剪接过程中产生的副产物。但是随着高通量测序技术和生物信息学技术发展,在哺乳动物细胞中发现大量环状RNA,充分表明其具有内源性、丰富性、保守性、稳定性的特征^[2]。circRNA除在人类、老鼠转录组中丰富表达之外,在其他的多细胞动物(包括果蝇、蠕虫),以及植物中被大量发现^[3]。已经证实形成circRNA必须要有包含反向重复ALU (IRAlus)和外显子跳跃的反向互补序列^[4]。此外,RNA结合蛋白(RNAbinding proteins, RBPs)参与调控circRNA的形成^[5]。最近研究表明,circRNA可以作为miRNA海绵,调节可变剪接,调节亲代基因表达^[6]。circRNA可以在人类血浆中被检测到,其细胞外稳定性的潜力可能成为疾病的生物学

标志物,使circRNA研究成为当前热点。近年来,有学者研究发现circRNA同动脉粥样硬化性血管疾病、神经系统疾病、朊病毒疾病、肿瘤密切相关^[7-9]。本文主要叙述circRNA的形成、特征、潜在功能以及同疾病的关系。

1 circRNA的形成

circRNA通过back-splicing方式和经典剪接方式之间调控和竞争而形成,这种形成方式与长链RNA的经典剪接方式有显著区别。circRNA由特殊的pre-mRNA经可变剪接产生,其形成方式可归结为两大类:外显子环化(exon circularization)和内含子环化(intron circularization)。

环状外显子RNA主要存在于细胞质中,由pre-mRNA的索尾插接产生,由下游外显子的剪接供体(splice donor, SD)连接到上游外显子的剪接受体(splice acceptor, SA)形成^[10]。环状外显子RNA的形成主要有直接的反式剪接(direct backsplicing)和外显子

基金项目:四川省科学技术厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研专项资助资金(编号:0903-100020802)

通讯作者:白雪,主任医师,教授,硕士生导师,E-mail:bx7246@163.com

跳读(exon skipping)两个机制。JECK 等^[2]提出外显子 circRNA 形成的两种模型:套索驱动环化(lariat-driven circularization)模型和内含子配对驱动环化(intron-pairing-driven circularization)模型。套索驱动环化模型中,pre-mRNA 的下游外显子 SD 的 3'端连接到上游外显子的 SA 的 5'端,形成套索,切除内含子后形成由 2 外显子组成的 circRNA。内含子配对驱动环模型中,pre-mRNA 中的 2 个内含子通过碱基互补配对形成套索,再切除内含子形成 circRNA。KELLY 等^[11]发现外显子环化现象存在普遍性,在人脐静脉内皮细胞、肿瘤坏死因子和肿瘤生长因子中同外显子跳读密切相关。

内含子环化主要存在于细胞核中,形成依赖于含有邻近 5'剪接位点的核苷酸 GU 富集元件以及含有邻近分支点的核苷酸 C 富集元件,具有少量 miRNA 靶点。内含子环状 RNA(circular intronic RNA, ciRNA)仅由内含子构成的环状 RNA,同时具有外显子与内含子序列的环状 RNA 称为外显子-内含子环状 RNA(exon-intron circ RNA or Eici RNA)。LI 等^[12]发现外显子-内含子环状 RNA 伴随侧翼互补序列高表达,但形成机制仍然未知,很大程度增加人类转录调控的复杂性。目前证据可以证明内含子配对驱动环化模型可能比套索驱动环化常见,但从一些研究表明反向互补序列对于环状内含子 RNA 合成可能更重要^[4,10,13-14]。

此外,RBPs 可能为 circRNA 形成的激活剂或抑制剂。有研究者发现同位于内含子侧翼的 circMBL 与盲肌样蛋白(muscleblind protein, MBL)结合,RBPs 桥接两个侧翼内含子,刺激 circRNA 合成^[13]。同样,有研究者报道另外一种 circRNA 合成模型:RBPs 之间相互作用于侧翼内含子之间形成桥接,导致剪接受体与剪接供体相互靠近而促进 circRNA 合成^[15]。

ZHANG 等^[10]首次提出选择性环化模型:发现在单个侧翼内含子范围内以互补序列方式配对的 RNA 之间的竞争可能影响剪接选择和外显子环化,单个侧翼内含子之间的互补序列可充分促进长链 mRNA 产生。相反,横跨侧翼内含子之间的互补序列可能对外显子环化有意义。反向互补序列之间的竞争可能导致单个基因 circRNA 形成成倍增加。选择性环化可因不同物种互补序列分布差异而存在种群特异性。因此,这种模型表明选择性环化机制是复杂的,且很可能受其他因素调控,如 RBPs^[16]。已有的研究增加了人们对 circRNA 产生机制的了解。尽管如此,仍然有许多问题待解决,如这种剪接机制如何与正常的剪接活动分开,什么样空间结构可以促进或者限制这种旁路剪接途,circRNA 是否对表观遗传有益等。

2 circRNA 的特征

通过 back-splicing 产生的 circRNA 有几个显著的性质。首先,环状 RNA 不具有 5'末端帽子和 3'末端

poly(A)尾巴,以共价键形成环形结构,不易被核酸外切酶降解,比线性 RNA 更稳定^[17]。有研究者从健康人群的唾液中验证出了 400 多种 circRNA,表明环状 RNA 可在细胞外液情况下进行检测^[18]。第二,circRNA 数量丰富。在一些研究中,circRNA 分子含量超过线性 mRNA 10 倍之多^[2]。第三,circRNA 主要由外显子构成,主要存在于细胞质,存在 miRNA 应答元件(MREs)^[2]。此外,circRNA 在 miRNA 靶位点上形态结构明显减少^[19]。少部分 ciRNA 则存在于真核生物细胞核中,可能参与基因表达^[20]。第四,circRNA 具有组织特异性和发育阶段表达特异性^[21]。例如,hsa_circRNA_2149 可在 CD19⁺的白细胞中检测到,而在中性粒细胞或 HEK293 细胞这类 CD34⁺白细胞中不能检测到。一些线虫 circRNA 看起来是卵母细胞中表达,但根据测序数据库了解到 1 或 2 个胚胎细胞中并不存在 circRNA^[22]。第五,大量 circRNA 是内源性非编码 RNA,仅少量为外源性 circRNA。若 circRNA 结构中含有内部核糖体进入位点(internal ribosome entry sites, IRES),真核细胞核糖体可在 circRNA 上启动翻译机制,如 Hepatitis δ (HDV)的环形 RNA 分子可编码一个病毒相关蛋白,并与肝炎的发生相关^[23-24]。以上特点均表明 circRNA 在转录及翻译中扮演重要角色,可能成为疾病诊断的生物学标志物。

3 circRNA 的功能

3.1 作为 miRNA 海绵体(microRNA sponge)及竞争性内源 RNA(ceRNA) 竞争性内源 RNA 包括 miRNA 应答元件,如信使 RNA、长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lnc RNA)、假基因(pseudogene)转录物及环状 RNA,可以通过竞争性地结合相同的 miRNA,实现对靶 RNA 的丰度或翻译活性的调控^[25]。最新研究表明,circRNA 可以作为 miRNA 海绵体,这一机制是 ceRNA 假说的重要组成部分^[6,26]。ceRNA 已经证实在植物^[27]和哺乳动物^[28-39]中可以抑制 miRNA 的活性,作为 miRNA 海绵体发挥作用,在真核生物中调节 miRNA 的活性。例如,CDR1as (antisense to the cerebellar degeneration related protein 1 transcript)是小脑变性相关蛋白 1(CDR1)基因的环状天然反义转录物(natural antisense transcript, NAT),也被称为 miR-7 的环状 RNA 海绵体(circular RNA sponge for miR-7, ciRS-7)。ciRS-7 作为 miR-7 的环状抑制剂,结合 miR-7 的能力比其他已知的转录物高 10 倍。当 ciRS-7 高表达时,它能有效结合大量 miR-7 而使 miR-7 的活性下降,导致 miR-7 靶基因表达水平增加;而当 ciRS-7 低表达时,miR-7 的靶基因表达水平也相应降低^[14,26]。研究人员在斑马鱼胚胎中注射能表达 ciRS-7 的质粒,观察到这些斑马鱼的中脑体积明显减小,并可以通过注射 miR-7 前体得到部分恢复,说明人或小鼠 ciRS-7 转录

物在生物体内是具有生物活性的,可产生类似 miR-7 被抑制的作用,引起中脑发育的异常,表明 ciRS-7 表达的生物学效应至可能通过其与 miR-7 的相互作用而产生的^[22]。2014年, GUO 等^[30]发现来源于 ZNF91 (zinc finger protein 91) 基因座的 circRNA (circRNA-ZNF91) 可能同样发挥着 miRNA 海绵体作用。LI 等^[9]发现 cir-ITCH 可以延长 E3 泛素蛋白连接酶,可能为 miR-7、miR-17 and miR-214 的海绵体。

3.2 参与转录和翻译 研究表明 circRNA 同选择性剪接或转录密切相关。BURD 等^[7]发现 circRNA 形成与 pre-RNA 的经典剪接相互竞争, circRNA 形成与线性 RNA 呈负性相关,这表明 circRNA 可以通过与线性剪接相互竞争来调控相关线性 RNA 的形成而调节基因表达。CHAO 等^[31]发现老鼠 Formin 基因可通过 backsplicing 产生 circRNA, 这些 circRNA 在组织中有较高的表达。外显子 circRNA 可能作为 mRNA 陷阱(mRNA trap), 隔离转录起始位点, 不能被翻译而形成功能性 Fmn 蛋白产物, 导致 Fmn 蛋白的表达异常。此外, JECK 等^[32]发现在人类成纤维细胞中许多单个外显子来源的 circRNA 包含一个翻译起始位点。circRNA 可以调控亲本基因的表达^[33], 极少数 circRNA 可被翻译成蛋白质^[34-35]。一些 circRNA 可以作转录的模板, 但这些结果需要进一步研究证明。

4 circRNA 与人类疾病

众所周知, miRNA 可能涉及到环状 RNA 功能的各个方面, 在疾病的始动及进展起关键性作用^[36]。circRNA 同 miRNA 相互作用调控靶基因, 与 miRNA 相关的疾病同 circRNA 密不可分。circRNA 在疾病的起始及进展方面起重要作用, 可能是潜在的生物学标志物。

HEK293 细胞中 ciRS-7/CDR1 as 的表达受到朊病毒蛋白 PrPC 过表达的诱导^[37]。因此, CDR1as 可能在朊病毒疾病中起作用。circMBL 可能通过它侧翼的内含子序列同 MBL 相结合。MBL 水平变化影响 Circ-Mb 生物合成。circRNA 产物同经典的 mbl pre-mRNA 剪接相竞争。MBL 不足可导致肌强直性营养不良, 因此推测 circMBL 可能在强直性肌营养不良的发生及进展方面起重要作用。

CDR1as 在脑中大量表达, 包含有与 miR-7 结合的 60 个碱基结合位点。而 miR-7 又同多种疾病和通路相关。现已证实 CDR1as 参与了 Parkinson disease, Alzheimer's disease 和脑发育。同时, miR-7 有致癌和抑制肿瘤的特性, CDR1as/miR-7 很可能与肿瘤的发生和发展密切相关^[40-41]。

circRNA 参与多种心血管疾病的发病机制。有的 circRNA 保护心肌作用。WANG 等^[42]发现 circRNA (HRCR) 充当 miR-223 海绵抑制心肌肥厚和改善心力

衰竭。但有的 circRNA 可能加重心肌病的发展。CDR1as 可作为 miR-7a 海绵, 抑制 miR-7a 的作用, 加重心肌损伤^[43]。BURD 等^[7]发现环状 ANRIL 是长链非编码 RNA ANRIL 的环状拼接形式, 其在人类细胞中的表达与该位点上几个可能影响 ANRIL 拼接的单核苷酸多态性有关, 能调节 INK4/ARF 的水平, 增加动脉粥样硬化的风险。这项研究充分证明 circRNA 与疾病的发生存在关联, 并能很好地作为疾病新型生物学标志物。由此可见, circRNA 与疾病的发生密切相关, 是未来疾病诊断和治疗的潜在靶点。

5 结论

目前已发现 circRNA 在动脉粥样硬化、神经退行性疾病、朊病毒疾病和肿瘤疾病中发挥着重要作用。随着高通量测序技术和生物信息学技术发展, 相关 circRNA 数据库已经建立并逐渐完善, 相信越来越多的 circRNA 被发现, circRNA 与 miRNA、基因、疾病的关系将更清晰明了。

参考文献

- [1] SANGER HL, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73: 3852-3856.
- [2] JECK WR, SORRENTINO JA, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157.
- [3] WANG PL, BAO Y, YEE MC, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life [J]. PLoS One, 9(6): e90859.
- [4] PETKOVIC S, MÜLLER S. RNA circularization strategies in vivo and in vitro [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(4): 2454-2465.
- [5] CONN SJ, PILLMAN KA, TOUBIA J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs [J]. Cell, 2015, 160(6): 1125-1134.
- [6] HANSEN TB, JENSEN TI, CLAUSEN BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-388.
- [7] BURD CE, JECK WR, LIU Y, et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk [J]. PLoS Genet, 2010, 6(12): e1001233.
- [8] HANSEN TB, KJEMS J, DAMGAARD CK. Circular RNA and miR-7 in cancer [J]. Cancer Res, 2013, 73(18): 5609-5612.
- [9] LI F, ZHANG L, LI W, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 6001-6013.
- [10] ZHANG XO, WANG HB, ZHANG Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization [J]. Cell, 2014, 159(1): 134-147.
- [11] KELLY S, GREENMAN C, COOK PR, et al. Exon skipping is correlated with exon circularization [J]. J Mol Biol, 2015, 427(15): 2414-2417.
- [12] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3): 256-264.

- [13] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing [J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66.
- [14] DUBIN RA, KAZMI MA, OSTRER H. Inverted repeats are necessary for circularization of the mouse testis Sry transcript [J]. *Gene*, 167(1-2): 245-248.
- [15] LASDA E, PARKER R. Circular RNAs: diversity of form and function [J]. *RNA*, 2014, 20(12): 1829-1842.
- [16] CHEN L, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis [J]. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381-388.
- [17] SUZUKI H, TSUKAHARA T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 9331-9342.
- [18] BAHN JH, ZHANG Q, LI F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, ancircular RNA in human saliva [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1) 221-230.
- [19] THOMAS LF, SÆTROM P. Circular RNAs are depleted of polymorphisms at microRNA binding sites [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2243-2246.
- [20] ZHANG Y, ZHANG XO, CHEN T, et al., Circular intronic long non-coding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792-806.
- [21] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22 (3): 256-264.
- [22] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. CircularRNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [23] CHEN CY, SARNOW P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs [J]. *Science*, 268(5209): 415-417.
- [24] PERRIMAN R, ARES M JR. Circular mRNA can direct translation of extremely long repeating-sequence proteins *in vivo* [J]. *RNA*, 1998, 4(9): 1047-1054.
- [25] SHI X, SUN M, LIU H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases [J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2): 159-166.
- [26] TAULLI R, LORETELLI C, PANDOLFI PP. From pseudo-ceRNAs to circ-ceRNAs: a tale of cross-talk and competition [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(5): 541-543.
- [27] FRANCO-ZORRILLA JM, VALLI A, TODESCO M, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(8): 1033-1037.
- [28] CESANA M, CACCHIARELLI D, LEGNINI I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 358-369.
- [29] KARRETH FA, TAY Y, PERNA D, et al. *In vivo* identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF induced mouse model of melanoma [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 382-395.
- [30] GUO JU, AGARWAL V, GUO H, et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(7): 409.
- [31] CHAO CW, CHAN DC, KUO A. The mouse formin (Fmn) gene: abundant circular RNA transcripts and gene-targeted deletion analysis [J]. *Mol Med*, 1998, 4(9): 614-628.
- [32] JECK WR, SHARPLESS NE. Detecting and characterizing circular RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 453-461.
- [33] ZHANG Y, YANG L, CHEN LL. Life without A tail: new formats of long noncoding RNAs [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 54: 338-349.
- [34] WANG Y, WANG Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs [J]. *RNA*, 2015, 21(2): 172-179.
- [35] ABBAS Z, AFZAL R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: a review [J]. *World J Hepatol*, 2013, 5(12): 666-675.
- [36] ESQUELA-KERSCHER A, SLACK FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 259-269.
- [37] SATOH J, YAMAMURA T. Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2004, 24(6): 793-814.
- [38] LUKIWI WJ. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD) [J]. *Front Genet*, 2013, 4: 307.
- [39] MEZA-SOSA KF, PÉREZ-GARCÍA EI, CAMACHO-CONCHA N, et al. MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e103987.
- [40] SUTO T, YOKOBORI T, YAJIMA R, et al. MicroRNA-7 expression in colorectal cancer is associated with poor prognosis and regulates cetuximab sensitivity via EGFR regulation [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(3): 338-345.
- [41] HAO Z, YANG J, WANG C, et al. MicroRNA-7 inhibits metastasis and invasion through targeting focal adhesion kinase in cervical cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1): 480-487.
- [42] WANG K, LONG B, LIU F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223 [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(33): 2602-2611.
- [43] GENG HH, LI R, SU YM, et al. The Circular RNA Cdr1as promotes myocardial infarction by mediating the regulation of miR-7a on its target genes expression [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151753.

(收稿日期:2017-03-28)