

DOI: 10.13376/j.cbls/2015155

文章编号: 1004-0374(2015)09-1125-08

环形RNA研究进展

陈学英, 许萍萍, 代娟娟, 田 聆*

(上海交通大学附属第一人民医院实验中心, 上海 201620)

摘要: 环形 RNA (circular RNA, circRNA) 广泛存在于各种生物细胞中, 并且具有结构稳定、表达量丰富以及在不同组织及其不同发育阶段具有表达特异性等特征。目前认为, circRNA 可以在转录后水平调控基因表达, 但是 circRNA 的产生机制及其代谢途径仍然不是很清楚。迄今研究认为, circRNA 的主要生物学作用是作为微小 RNA (microRNA, miRNA) 海绵体调控 miRNA 的表达。此外, circRNA 在肿瘤、动脉粥样硬化、糖尿病、帕金森病等多种疾病的发生发展中发挥了一定的作用。深入了解 circRNA 的作用机制及其功能, 有助于深入了解疾病的发生、发展机理, 设计更好的预防、诊断和治疗疾病新策略。

关键词: 环形 RNA; 微小 RNA; 微小 RNA 海绵体; 肿瘤

中图分类号: Q52; R730.231.3

文献标志码: A

Research advances on circular RNAs

CHEN Xue-Ying, XU Ping-Ping, DAI Juan-Juan, TIAN Ling*

(Experimental Research Center, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201620, China)

Abstract: Circular RNA (circular RNA, circRNA) was in a large number of different species, and they are stable, rich and often show tissue-/developmental-stage-specific expression. However, the detailed mechanisms of their biogenesis and regulation have remained elusive although some evidence suggest that circRNAs regulate gene expression at the post-transcriptional level. The major function of circRNA is considered as microRNA (miRNA) sponges. Currently, circRNAs have been found to be involved in the occurrence, development and progression of human diseases, such as tumor, atherosclerosis, diabetes, and Parkinson's disease. To investigate the biogenesis and functions of circular RNAs in depth will help us to find new strategies for the better treatment of those diseases.

Key words: circular RNA; microRNA; miRNA sponge; cancer

环形 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类不具有 5' 末端帽子和 3' 末端 poly(A) 尾巴, 并以共价键形成环形结构的 RNA 分子, 广泛存在于真核转细胞中^[1-2]。circRNA 被发现已经超过了 30 年, 但是直到最近几年才逐渐为科学家们所重视。在早期, circRNA 仅仅被认为是 RNA 错误剪接或者剪接过程中产生的副产物^[3], 或者是一些特定的病原体, 如肝炎 δ 病毒^[4] 和一些植物类病毒^[5]。近几年的研究表明, circRNA 普遍存在于人类细胞内^[6], 并且其序列在人类和小鼠的进化上是高度保守的^[7-9]。由于缺乏 3' 和 5' 末端, circRNA 可以抵抗核酸外切酶的消化作用, 具有高度稳定性^[7,10]。根据其序列构成的不同, circRNA 可分为两大类: 外显子来源

的环形 RNA (exonic circRNA)^[6-8] 和内含子来源的环形 RNA (intronic circRNA, ciRNA)^[11-12]。此外, Salzman 等^[9] 在实验中还发现了一种新的 circRNA, 它由外显子与内含子共同组成, 研究人员将其称之为保留内含子来源的环形 RNA (retained-intron circRNA)。绝大多数 circRNA 的内含子在形成过程中被剪掉, 只有少部分 circRNA 保留内含子^[13], 因而猜测这种 circRNA 可能仅仅是实验过程中产生的中间产物, 或者是一类新的独立存在的 circRNA。2015 年,

收稿日期: 2015-01-16; 修回日期: 2015-05-08

基金项目: 上海交通大学医学院大学生创新性实验项目(2014059); 国家自然科学基金面上项目(81172030)

*通信作者: E-mail: tl09168@hotmail.com

Li 等^[14] 最新的研究显示, 在人类细胞中存在一类与人类 RNA 聚合酶 II 相关的 circRNA, 这些 circRNA 由外显子和内含子共同组成。与以往发现的 circRNA 不同, 这些 circRNA 主要定位在细胞核而不是细胞质中, 研究人员将其命名为外显子-内含子 circRNA (exon-intron circular RNA, ElicircRNA), ElicircRNA 可以通过与 U1 snRNP 相互作用促进亲本基因 (parental gene) 的转录。鉴于目前发现的大部分的 circRNA 主要是由外显子序列构成的, 并且对外显子 circRNA 的研究也相对较多, 本文将主要叙述外显子来源的 circRNA 的生物学作用及其与疾病的关系。

1 circRNA的发现

1976 年, 研究人员首先在植物类病毒中发现 circRNA, 这些环形单链的 RNA 分子以共价键形成闭合环状结构, 并具有高度的热稳定性^[5,15]。1979 年, Hsu 和 Coca-Prados^[1] 利用电子显微镜第一次观察到 RNA 以环状结构的形式存在于真核细胞的细胞质中。1990 年, 人们首次在真菌中发现了 circRNA 的踪迹^[16]。1991 年, 在人类细胞进行的 DCC 转录研究中首次发现了内源性 circRNA 的存在^[17]。此后, 一些 circRNA 在人类、小鼠和大鼠的某些基因中相继被确认, 如 ETS-1 (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1)^[18]、SRY (sex-determining region Y)^[19]、细胞色素 P450 2C24 (cytochrome P450 family 2 subfamily c polypeptide 24, CYP2C24)^[20] 和环状 *INK4* 基因座中反义非编码 RNA (circular antisense non-coding RNA in the *INK4* locus, cANRIL)^[21] 等。在人类、小鼠、果蝇、线虫、斑马鱼、古细菌等生物体内陆续发现有大量环形 RNA 分子的存在, 并认为环形 RNA 分子是古老的、在真核基因中保守表达的一类分子^[2]。

circRNA 不同于 miRNA 和其他的小 RNA 分子, 不容易根据相对分子质量大小和电泳迁移率从其他种类的 RNA 中分离出来。通常使用的分子生物学技术需要经过扩增或分段化破坏环形结构, 并且由于 circRNA 没有游离的 3' 或 5' 端, 从而不能被依赖腺苷酸化游离 RNA 末端的分子技术识别^[22]。因此, 在相当长的时间里只有少数的 circRNA 被人们所发现。随着技术的进步, 越来越多的 circRNA 被进一步发现^[23]。如 Jeck 等^[7] 在人类成纤维细胞中检测出了高达 2.5 万多种的 circRNA; Memczak 等^[8] 通过 RNA-seq 数据结合人白细胞数据库鉴定出 1

950 种人类 circRNA、1 903 种小鼠 circRNA (其中 81 种与人类 circRNA 相同) 和 724 种线虫 circRNA。2015 年, Gao 等^[24] 采用一种新的鉴定方法 CIRI 发现了比以往更多的 circRNA, 并且他们发现细胞共有的 circRNA 往往具有较高的表达水平, 提示着这些 circRNA 可能具有重要的生理功能。

2 外显子circRNA的产生机制

选择性剪接 (alternative splicing) 是生成成熟 RNA 的关键步骤, 除了线性 RNA, 前体 RNA 剪接还产生其他 3 种形式的 RNA, 分别为套索内含子 (lariat intron)、Y 结构内含子 (Y-structure intron) 和 circRNA^[10]。虽然有大量的 circRNA 不断被发现, 但是其产生机制并不是十分清楚。在单细胞生物中, circRNA 往往来自核糖体前体 RNA 内含子的自我剪接^[25], 但在古细菌中也可以通过编码蛋白质的基因产生^[26]。在人类 DCC^[17] 以及 EST-1^[18] 基因的研究中, 研究人员认为这些 circRNA 是通过外显子干扰 (exon scrambling, ExScram) 作用形成的。Salzman 等^[6] 发现含有 scamb exon 的 RNA 异构体是几乎都是环形的。Dixon 等^[27] 将任何非线性的剪接外显子顺序命名为 RREO 事件 (rearrangements or repetition in exon order, RREO), 在 mRNA 转录物的序列分析实验中, 在约 1% 的哺乳动物基因中观察到了 RREO 事件, 意味着 RREO 事件可能来自基因组的一个基因子集, 同时提示这些非线性产物可能具有一定的生物学功能。Exon scrambling (ExScram)、Exon repetition (ExRep) 和 Trans-splicing (TransSpl) 均可以导致 mRNA 外显子非线性排列。Shao 等^[28] 通过研究认为, 只有一小部分 ExRep 事件可能具有生理基础, 而其他的 ExScram、ExRep 和 TransSpl 事件对于生物体来说可能是没有意义的。Al-Balool 等^[29] 认为剪接外显子的非线性排列是转录后外显子重排 (post-transcriptional exon shuffling, PTES) 的结果。大多数 PTES 转录物可以在人类多种组织中高表达, 并且这些转录物可以是多聚腺苷酸化的, 但是实验中发现的 circRNA 几乎都是非聚腺苷酸化的^[6,13], 由此可以认为通过 PTES 事件形成的转录物不一定是 circRNA。

由于 circRNA 表达量低, 在相当长的一段时间内 circRNA 都只被认为是 mRNA 错误剪接的产物^[3]。随后有人提出真核生物的 circRNA 来自剪接体介导的前体 mRNA (pre-mRNA) 剪接, 即所谓的 back-splicing, 由上游的 5' 剪接位点——剪接供体

(splice donor) 连接到下游的剪接位点——剪接受体 (splice acceptor), 从而产生一个 circRNA^[12]。目前普遍认为大部分 circRNA 都是通过 back-splicing 形成的。

2013年, Jeck 等^[7]提出了外显子 circRNA 发生的两种新模型: 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。这两种模型生成 circRNA 的第一步是不同的: 套索驱动环化是由外显子组成的剪接供体和剪接受体共价结合, 而内含子配对驱动环化则是由 2 个内含子互补配对结合而形成环状结构。这两种模型在此后的环化过程则基本一致, 即剪接体 (spliceosome) 切除剩余内含子并形成 circRNA。由于外显子 circRNA 在细胞中广泛存在, 所以其生成机制仍然处于推测阶段, Jeck 等提出的上述两种产生 circRNA 的模型目前还缺乏足够的实验证据支持。

2.1 套索驱动环化模型

Zaphiropoulos^[20] 研究发现, circRNA 可以通过外显子跳跃 (exon skipping) 事件形成, 即所谓的 circRNA 形成的外显子跳跃机制, 该机制认为一个外显子跳跃事件可以产生一个包含外显子的套索结构 (lariat structure), 随后这种套索结构通过内部剪接除去内含子序列, 从而产生 circRNA。理论上每个外显子跳跃事件都可以产生一个外显子 circRNA。Jeck 等^[7]由此提出了外显子 circRNA 形成的套索驱动环化模型, 他们认为 pre-mRNA 通过一个经典的外显子跳跃事件, 使剪接受体和剪接供体共价结合形成一个套索结构, 再通过 Intralariat 剪接产生一个由外显子构成的 circRNA。他们在 45% 的外显子 circRNA 中观察到了外显子跳跃事件。

2.2 内含子配对驱动环化

外显子 circRNA 的形成并不总依赖于外显子跳跃事件。在内含子配对驱动环化模型中, Jeck 等^[7]认为 circRNA 是由于内含子区域的反向互补序列, 如 ALU 或其他 RNA 二级结构等导致了内含子区域配对从而触发外显子 back-splicing, 形成 circRNA 分子。他们发现这些侧翼内含子的 ALU 序列与人类 circRNA 的形成高度相关。

1993年, Capel 等^[19]首次提出环形 Sry 的形成与侧翼内含子的重复序列有关。他们认为这些重复序列可以形成一个分子内茎环结构, 使剪接供体更加靠近剪接受体, 从而有利于环形 Sry 的形成。Dubin 等^[30]在实验中观察到, 如果敲除内含子反向

重复序列, 可以导致 Sry 基因的外显子无法环化, 该实验进一步验证了 Capel 等提出的理论。

为了揭示环形 RNA 的产生机制, Liang 等^[31]将人类 ZKSCAN1 (zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 1)、HIPK3 (homeodomain-interacting protein kinase 3) 和 EPHB4 (ephrin type B receptor 4) 基因的 pre-mRNA 克隆到容易操作的表达载体中。通过广泛诱变这些载体, 在细胞内确定了一个足以产生 circRNA 的微小区域。通过实验发现短的内含子反向重复序列可以促进外显子 circRNA 的形成, 并且这些内含子重复序列都含有剪接位点, 在环化过程中, 这些内含子重复序列通过碱基配对使彼此之间的剪接位点更为接近, 从而促发外显子的 back-splicing, 形成 circRNA。但是, 并不是所有的重复序列都可以促进外显子的环化, 如在重复序列之间加强的发夹结构、G-U 摆动配对以及 poly(A) 结构等可以抑制 circRNA 的形成。除此之外, 研究人员发现外显子环化还需要一个功能性 3' 末端以及内含子重复序列与外显子之间的协作。

2014年, Zhang 等^[32]利用全基因组分析和 circRNA 重演的方法, 证实外显子环化依赖于其两侧的内含子互补序列。与 Liang 等^[31]的研究结果不同的是, Zhang 等^[32]发现侧翼内含子两旁的重复或非重复互补序列都可以促进外显子的环化。该研究还发现, 不同区域间互补序列的竞争性配对可以选择性地产生线性 RNA 或环形 RNA, 即内含子内部形成的互补序列配对可以促进线性 RNA 的产生, 而跨内含子间的互补序列配对则更有利于环形 RNA 的产生。研究发现, 外显子环化效率受到跨侧翼内含子或单个内含子内的 RNA 配对间的竞争所调控。此外, 反向重复 Alu 配对 (inverted repeated Alu pairs, IRAlus) 的选择性形成和它们之间的相互竞争能够造成选择性环化, 导致单个基因产生多个环状 RNA 转录物。Jeck 等^[7]发现环化外显子的侧翼内含子比随机选择的侧翼内含子更长 (2~5 倍), 但是 Zhang 等^[32]发现在这些长的侧翼内含子中 ALU 元件的密度与对照组并无明显区别^[32]。因此, 长的侧翼内含子并不是 circRNA 形成所必需的^[9,13], 但是长的侧翼内含子可以引入更多的 ALU 元件而更有利于 circRNA 的形成。

Ashwal-Fluss 等^[33]通过实验发现 circRNA 是通过协同转录产生, 并且 circRNA 的产生效率强烈依赖于两侧的内含子序列。侧翼外显子的线性剪接与 circRNA 的生物合成之间相互竞争, 并且这种竞

争作用相当强烈,它可以使 circRNA 的生成量呈数量级减少。

此外, Ivanov 等^[34]发现内含子包围的 circRNA (introns bracketing circRNA) 与线性对照组相比,具有更加丰富的反向互补序列,并且这些内含子高度富集 RNA 编辑或超编辑 (RNA editing or hyper-editing) 事件。内含子的 ALU 序列被认为对于人类 circRNA 的形成具有至关重要的作用^[7],但是 ALU 重复序列只特定存在于一小部分的脊椎动物中,这仍然无法解释为何其他动物细胞中也广泛存在 circRNA。为此, Ivanov 等^[34]选用秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 基因组 circRNA 进行研究。与 Jeck 等^[7]当初的实验结果一致,秀丽隐杆线虫 circRNA 的侧翼内含子序列比其他非线性 RNA 内含子序列要长,并且这些包围 circRNA 的内含子含有丰富的反向互补配对 (reverse complementary match, RCM), RCM 可以通过诱导侧翼内含子的碱基配对从而促进外显子环化。在人类细胞中同样富含 RCM,并且 88% 的 RCM 与 ALU 序列重叠。Ivanov 等^[34]还发现,敲除双链 RNA 编辑酶 ADAR1 可以明显并特异性地上调 circRNA 的表达。

这些已有的研究增加了人们对 circRNA 的产生机制的了解。尽管如此,仍然有许多问题等待解决,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是限制这种旁路剪接途径; circRNA 是否有助于表观遗传等^[35]。

3 外显子 circRNA 的生物学功能

3.1 作为 miRNA 海绵体 (microRNA sponge)

miRNA 海绵体的作用是竞争性结合 miRNA 位点,调节成熟 miRNA 的活性,它可以导致 miRNA 功能的丧失并伴随着 miRNA 靶基因表达水平的提高^[36],这一机制也是竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 假说的重要组成部分。内源表达的线性 RNA 已经证实在植物^[37]和哺乳动物^[38-39]中可以抑制 miRNA 的活性,作为 miRNA 海绵体发挥作用,这表明 miRNA 海绵体可以在真核生物中调节 miRNA 的活性。近年来的研究也显示,外显子 circRNA 亦可以作为 miRNA 海绵体或者是竞争内源性 RNA 在哺乳动物中起作用^[36,40]。

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,包含了超过 70 个 miR-7 结合位点,并且其结合 miR-7 的能力比其他已知的转录物高 10 倍^[8,40]。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 靶基因表达水平的增加;而当 ciRS-7 低表达时,miR-7 的靶基因表达水平也相应降低。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,并且这种作用可以通过注射 miR-7 前体得到部分恢复,说明人/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,从而引起中脑发育的异常。这也同时表明 ciRS-7 表达的生物学效应至少部分是通过其与 miR-7 的相互作用而产生的^[8]。

此外,环形的睾丸特异性 RNA 分子 SRY 含有 16 个 miR-138 结合位点,可以通过竞争性结合 miR-138 位点减弱 miR-138 的抑制作用^[40]。2014 年, Guo 等^[13]发现来源于 *ZNF91* (zinc finger protein 91) 基因座的 circRNA (circRNA-ZNF91) 含有 24 个 miR-23 位点,且其中的 19 个位点为 8 核苷酸位点,超过了已知的 miRNA 海绵体—SRY 基因,因此,由该基因座产生的 circRNA 也可能同样发挥着 miRNA 海绵体作用。

3.2 参与转录调控

人类和小鼠的 *HIPK2* 和 *HIPK3* 基因座的第二个外显子均可发生环化生成 circRNA,这个外显子包含经典的 ATG 序列 (翻译起始点)。研究发现, *HIPK2/3* 区的外显子 circRNA 比相关的线性转录物更丰富,也更稳定;并且, *HIPK2/3* 环化可阻碍普通的编码蛋白质产生 (由于缺少 ATG 序列和明显的 N-末端序列)。因此,外显子环化被认为是“选择性剪接”的一种新的形式,可调控基因的表达^[7]。Jeck 等^[7]观察了 69 个鼠类 circRNA 以及与之相对应的人类基因,认为 circRNA 可能是调控这些基因表达的一个保守机制。

此外, Ashwal-Fluss 等^[33]发现 circRNA 的形成与 pre-RNA 的规范剪接相互竞争, 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,从而调节基因的表达。他们证明外显子环化和线性剪接可以以组织特异性的方式相互竞争,并且发现剪接因子 MBL/MBNL1 (muscleblind-like) 的第二个外显子在人类和果蝇中可以通过环化作用形成 circRNA (circMbl)。circMbl 和它的侧翼内含子中都

含有保守的 MBL 结合位点, 通过调节 MBL 的水平可以显著影响 circMbl 的生物合成, 且这种作用依赖于 MBL 结合位点。

Chao 等^[41]在对 Formin (Fmn) 蛋白的 cDNA 分析中发现了一类新的 circRNA, 这些 circRNA 在组织中有较高的表达。Fmn 蛋白被认为是小鼠肢体发育所必需的, 如果敲除 Fmn 蛋白外显子 4 或 5, 小鼠虽然有正常的肢体发育, 但却出现肾脏发育不良的情况, 并且在这些基因敲除小鼠中没有检测到其环形 RNA 的存在, 而是产生线性 RNA, 这些环形的 Fmn RNA 可能与小鼠的肾脏发育有关。他们认为这些外显子 circRNA 可能作为 mRNA 陷阱 (mRNA trap) 作用隔离转录起始位点, 从而不能被翻译形成功能性 Fmn 蛋白产物, 导致 Fmn 蛋白的表达异常。与之相类似, 杜氏肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 基因也可通过选择性剪接引起外显子跳跃而产生一些环形的肌营养不良 RNA, 缺失突变可破坏正常的外显子结构而导致这些环形 RNA 的消失^[42]。DMD 外显子 circRNA 的形成可导致相应 mRNA 的缺损, 从而导致可被翻译 mRNA 的量降低^[43], 因此认为这些肌营养不良 circRNA 与疾病之间存在着一定的联系。circRNA 的形成被认为是选择性剪接的一种形式, 目前, 剪接调控已经成为治疗人类疾病的一个新靶点, 如利用反义核苷酸对抗某些外显子可以导致外显子跳跃和恢复开放阅读框 (open reading frame, ORF)^[44]。

如上文所述, Ivanov 等^[34]发现如果敲除双链 RNA 编辑酶 ADAR1, 可以明显并特异性地上调 circRNA 的表达。ADAR 是高度保守的 RNA 编辑酶, 它可以与双链 RNA 结合; 在人类细胞中, ADAR1 和 ADAR2 可以与 ALU 重复序列相互作用而调节 circRNA 的表达水平。通过 ADAR 调节 circRNA 的生物形成, 而 circRNA 又可以与线性 RNA 的形成相互竞争, 这意味着可以通过 ADAR 间接调节线性 RNA 的表达, 进而调控基因的表达。

3.3 与RNA结合蛋白之间的相互作用

已知一些线性非编码 RNA 可与 RNA 结合蛋白结合发挥作用, 同样 circRNA 可能也具有类似的作用。Memczak 等^[8]发现 circRNA 可以稳定地与 AGO (argonaute) 蛋白紧密结合, 并且他们认为 circRNA 也有可能像其他低复杂性分子一样参与较大的 RNA 复合物或者是蛋白质的组装。此外, 外显子 circRNA 可能通过结合多种蛋白质充当 RNA 结合蛋白的“脚手架 (scaffolding)”, 为蛋白质与

RNA、蛋白质与 DNA、蛋白质与蛋白质之间的相互作用提供平台^[22]。

3.4 参与蛋白质翻译

circRNA 分子除可在 RNA 水平发挥作用外, 也有报道称一些 circRNA 还可能被翻译成蛋白质。Chen 和 Sarnow^[45]研究表明, 若 circRNA 结构中含有内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES), 真核细胞核糖体就可在 circRNA 上启动翻译机制, 如肝炎病毒 δ 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^[4]。研究发现与水稻黄斑病毒相关的高度结构化的长度为 220 nt 的类病毒共价闭合环状 RNA (covalently closed circular RNA, cccRNA) 用新的编码、翻译和基因表达方式编码了一个相对分子质量为 1.6×10^4 的高度碱性蛋白。cccRNA 是目前已知类病毒和拟病毒中最小的, 并且也是唯一可以编码蛋白质的 circRNA, 它的起始密码子和终止密码子相互重叠 (UGAUGA)。cccRNA 序列具有一个 IRES, 通过 2 个 (或 3 个) 完全重复的 ORF 直接被翻译^[46]。不过这种 circRNA 的翻译机制是非典型的, 可能只特异存在于某些病毒中, 尽管已经证实 circRNA 在多种真核生物中表达^[2,12]。HIPK3 circRNAs 包含一个 AUG 翻译起始密码子, 但是它和其他外显子 circRNA 一样不能与核糖体结合, 从而不能被翻译为蛋白质^[7]。通常, circRNA 被认为是不可以被翻译的^[7,13], 进而被定义为一类新的非编码 RNA。

4 circRNA与人类疾病

4.1 circRNA与肿瘤

前文已指出, ciRS-7 是 CDR1 基因的天然环状反义转录物, 且在脑组织中高表达, 但在非神经组织中低表达或不表达, 发挥着 miRNA 海绵体作用^[8,40]。在 HEK293 细胞中稳定表达肌蛋白 PrPc 可诱导 ciRS-7 的表达, 而不是最初认为的 CDR1^[47]。因此, PrPc 可能参与了 ciRS-7 的调控, 同时也意味着 ciRS-7 在朊病毒相关疾病中可能发挥了一定的作用^[48]。

miR-7 在癌症相关的信号转导途径直接针对并下调某些致癌因子, 如表皮生长因子受体 (EGFR)^[49]、胰岛素受体底物 1/2 (insulin receptor substrate $\frac{1}{2}$, IRS-1/2)^[49]、Pak1 (p21 protein-activated kinase 1)^[50]、Raf1^[51]、PIK3CD^[52] 等, 这表明 miR-7 有明确的肿瘤抑制作用。不过, 也有报道指出肺癌的预后差与 miR-7 的过度表达相关^[53], 因此,

miR-7 的高表达并不一定对肿瘤有抑制作用。

ciRS-7 招募 miR-7 并与其相互作用被认为是它主要的功能,它可能通过间接调控 miR-7 靶基因的表达,从而参与疾病的发生和发展。miR-7 在不同肿瘤中发挥着抑癌或促癌作用,这也意味着 ciRS-7 可通过与 miR-7 相互作用,调节 miR-7 的表达水平,进而在癌症的发生发展中起着抑癌或促癌作用^[48]。

Li 等^[54]首次发现与癌旁组织相比, circRNA-Hsa_circ_002059 在胃癌组织中的表达显著下调。类似地,他们还发现与周围组织相比, circRNA ITCH 在食管癌鳞状细胞癌 (sophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 中的表达量也较低;通过进一步的生化实验表明, circRNA ITCH 可能可以作为 miRNA-7、miR-17 和 miR-214 的海绵发挥作用,从而提高体内 ITCH 的表达水平,而 ITCH 的过度表达可以促进泛素化和 Dvl2 的磷酸化降解,从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路^[55]。这些结果表明, circRNA ITCH 也许可以通过调节 Wnt 通路来抑制食管鳞状细胞癌。

此外, Bachmayr-Heyda 等^[56]发现大肠癌组织中 circRNA 和线性 RNA 的比值总是低于正常的大肠黏膜标本,并且这个比值与细胞的增值呈负相关。通过对特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)、永生正常卵巢表面上皮 (immortalised normal ovarian surface epithelial, IOSE) 及正常组织的研究,发现增殖可能是 circRNA 表达下降的一个驱动因素,这也许暗示着 circRNA 与增殖性疾病有关。

4.2 circRNA 与其他疾病

大量实验表明, miR-7 与多种疾病相关联。如 miR-7 作为 α -突触核蛋白的直接调节因子,可能在帕金森病中起作用^[57];在胰腺中,抑制胰岛 β 细胞中的 miR-7 不仅可以激活 mTOR 信号通路,同时也可以刺激 β 细胞的增殖^[58]。因此, miR-7 可能是低 β 细胞增殖糖尿病的一个新的治疗靶点。ciRS-7 通过与 miR-7 的相互作用,还可能与帕金森病、糖尿病、阿茨海默病^[59] 等有一定关系。

环形 RNA cANRIL 是细胞周期素依赖性激酶 4 抑制蛋白 (cyclin-dependent kinase inhibitor 4A, CDK4A/INK4A) 及其可变读码框 (alternative reading frame, ARF) (INK4A/ARF) 基因的反义转录物^[9],其在人类细胞中的表达与其所在位点上几个可能影响 ANRIL 剪接的 SNP (single nucleotide polymorphisms) 有关,从而调节 INK4/ARF 的水平并增加动脉粥样硬化的风险^[21]。RNA 结合蛋白 muscleblind 对肌肉和眼睛的

发育具有重要的作用,其功能缺陷可以引起强直性肌营养不良。通过调节 MBL 结合位点可以调节相关的 circRNA 的合成,并且这些 circRNA 在神经相关性基因中表达丰富,这也许为 RNA 结合蛋白与脑功能之间提供了一条通路,从而推测 circMbl 可能与强直性肌营养不良有关^[33]。

此外,如前文前所述, RNA 环化可调控转录。外显子 circRNA 的 mRNA 陷阱作用可提高某些疾病的患病风险,如 circRNA 可能与肌营养不良有关^[43]。

5 展望

尽管 circRNA 已经发现了超过 30 年,但迄今为止仍然只有少数的 circRNA 在哺乳动物中被发现。随着新一代技术的不断进步,人们对不同来源的环形 RNA 分子有了更加深入的认识。目前发现的大部分 circRNA 都是由外显子序列构成的,在不同的物种中具有保守性,同时存在组织及不同发育阶段的表达特异性^[8]。circRNA 最初被认为只是 RNA 错误剪接的产物,目前有多种 circRNA 产生机制的假说,但都缺乏足够的实验数据支持,还有待进一步研究。

circRNA 具有多种生物学功能,主要是发挥着 miRNA 海绵作用。circRNA 可能通过与 miRNA 的相互作用进而与人类疾病相关联。circRNA 由于对核酸酶不敏感,因而比线性 RNA 更为稳定,这使得 circRNA 在作为新型临床诊断标记物的开发应用上具有明显优势。2015 年, Bahn 等^[60]研究表明,可以通过测定人体体液中的细胞外 RNA (extracellular RNA, exRNA) 来检测疾病。Li 等^[54]发现 circRNA-Hsa_circ_002059 在胃癌组织中表达明显下调,其术前术后的血浆表达水平明显不同,其表达水平还与肿瘤远处转移、TMN 分期、性别和年龄有一定的关系。这意味着 circRNA-Hsa_circ_002059 可能是一类可以用于胃癌诊断的新的潜在稳定生物标志物。同时,由于 circRNA 的高度稳定性及作为 miRNA 海绵体发挥作用,若可以通过稳定表达 circRNA 水平,从而稳定调节体内 miRNA 的表达,则有可能达到治疗或预防疾病的作用,因而 circRNA 具有广泛的临床应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature*, 1979, 280(5720): 339-40
- [2] Wang PL, Bao Y, Yee MC, et al. Circular RNA is

- expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90859
- [3] Cocquerelle C, Mascrez B, Héтуin D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J*, 1993, 7(1):155-60
- [4] Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, et al. The hepatitis δ (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature*, 1986, 323(6088): 558-60
- [5] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(11): 3852-6
- [6] Salzman J, Gawad C, Wang PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733
- [7] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, 19(2): 141-57
- [8] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-8
- [9] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003777
- [10] Suzuki H, Zuo Y, Wang J, et al. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(8): e63
- [11] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792-806
- [12] Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA*. 2014, 20(12): 1829-42
- [13] Guo JU, Agarwal V, Guo H, et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol*, 2014, 15(7): 409
- [14] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-Intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256-64
- [15] Kolakofsky D. Isolation and characterization of Sendai virus DI-RNAs. *Cell*, 1976, 8(4): 547-55
- [16] Matsumoto Y, Fishel R, Wickner RB. Circular single-stranded RNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(19): 7628-32
- [17] Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, et al. Scrambled exons. *Cell*, 1991, 64(3): 607-13
- [18] Cocquerelle C, Daubersies P, Majérus MA, et al. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *EMBO J*, 1992, 11(3): 1095-8
- [19] Capel B, Swain A, Nicolis S, et al. Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis. *Cell*, 1993, 73(5): 1019-30
- [20] Zaphiropoulos PG. Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: correlation with exon skipping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(13): 6536-41
- [21] 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. *PLoS Genet*, 2010, 6(12): e1001233
- [22] William RJ, Norman ES. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 453-61
- [23] Glažar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA*, 2014, 20(11): 1666-70
- [24] Gao Y, Wang J, Zhao F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for denovo circular RNA identification. *Genome Biol*, 2015, 16: 4
- [25] Grabowski PJ, Zaugg AJ, Cech TR. The intervening sequence of the ribosomal RNA precursor is converted to a circular RNA in isolated nuclei of *Tetrahymena*. *Cell*, 1981, 23(2): 467-76
- [26] Danan M, Schwartz S, Edelheit S, et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): 3131-42
- [27] Dixon RJ, Eperon IC, Hall L, et al. A genome-wide survey demonstrates widespread non-linear mRNA in expressed sequences from multiple species. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5904-13
- [28] Shao X, Shepelev V, Fedorov A. Bioinformatic analysis of exon repetition, exon scrambling and trans-splicing in humans. *Bioinformatics*, 2006, 22(6): 692-8
- [29] Al-Balool HH, Weber D, Liu Y, et al. Post-transcriptional exon shuffling events in humans can be evolutionarily conserved and abundant. *Genome Res*, 2011, 21(11): 1788-99
- [30] Dubin RA, Kazmi MA, Ostrer H. Inverted repeats are necessary for circularization of the mouse testis *Sry* transcript. *Gene*, 1995, 167(1-2): 245-8
- [31] Liang D, Wilusz JE. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes Dev*, 2014, 28(20): 2233-47
- [32] Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 2014, 159(2): 134-47
- [33] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66
- [34] Ivanov A, Memczak S, Wyler E, et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep*, 2015, 10(2): 170-7
- [35] Vicens Q, Westhof E. Biogenesis of circular RNAs. *Cell*, 2014, 159(1): 13-4
- [36] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*, 2007, 4(9): 721-6
- [37] Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, 2007, 39(8): 1033-7
- [38] 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(4): 358-69
- [39] 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. *Cell*, 2011, 147(2):

- 382-95
- [40] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-8
- [41] Chao CW, Chan DC, Kuo A, et al. The mouse formin (Fmn) gene: abundant circular RNA transcripts and gene-targeted deletion analysis. *Mol Med*, 1998, 4(9): 614-28
- [42] Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, et al. Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(3): 493-500
- [43] Gualandi F, TrabANELLI C, Rimessi P, et al. Multiple exon skipping and RNA circularisation contribute to the severe phenotypic expression of exon 5 dystrophin deletion. *J Med Genet*, 2003, 40(8): e100
- [44] Spitali P, Aartsma-Rus A. Splice modulating therapies for human disease. *Cell*, 2012, 148(6): 1085-8
- [45] Chen CY, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*, 1995, 268(5209): 415-7
- [46] AbouHaidar MG, Venkataraman S, Golshani A, et al. Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(40): 14542-7
- [47] Satoh J, Yamamura T. Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. *Cell Mol Neurobiol*, 2004, 24(6): 793-814
- [48] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res*, 2013, 73(18): 5609-12
- [49] Kefas B, Godlewski J, Comeau L, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3566-72
- [50] Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, et al. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8195-200
- [51] Webster RJ, Giles KM, Price KJ, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem*, 2009, 284(9): 5731-41
- [52] Fang YX, Xue JL, Shen Q, et al. miR-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the PI3K/AKT pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1852-62
- [53] Chou YT, Lin HH, Lien YC, et al. EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8822-31
- [54] Li P, Chen S, Chen H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 132-6
- [55] Li F, Zhang L, Li W, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 6001-13
- [56] Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation-exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Sci Rep*, 2015, 5: 8057
- [57] Junn E, Lee KW, Jeong BS, et al. Repression of α -synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 13052-7
- [58] Wang Y, Liu J, Liu C, et al. MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic cells. *Diabetes*, 2013, 62(3): 887-95
- [59] Lukiw WJ. Circular RNA(circRNA) in Alzheimer's disease (AD). *Front Genet*, 2013, 4: 307
- [60] Bahn JH, Zhang Q, Li F, et al. The landscape of microRNA, piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 221-30