

环状 RNA 与人类疾病研究进展

吕玲双 王建明

摘要 环状 RNA(circRNA)是有调节功能的非编码 RNA,具有结构稳定、丰度高和组织特异性等特征。circRNA 作为 miRNA 的“海绵体”,可以调节其表达,在肿瘤、神经系统疾病、骨骼肌肉系统疾病以及心血管病的发生、发展中有着重要作用。本文对 circRNA 的形成、功能及其与人类疾病的关系进行了综述。

关键词 非编码 RNA 环状 RNA 疾病

中图分类号 R730

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.006

非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)是不能编码蛋白质的 RNA,包括 miRNA、lncRNA 以及 circRNA 等,曾经被认为是“垃圾序列”。随着研究的不断深入,人们发现 ncRNA 可以抑制 mRNA 的翻译过程,调节特定基因表达,参与细胞生长、胚胎形成、基因调节、信号转导、受体激活等过程,影响人类疾病的发生^[1,2]。

环状 RNA(circular RNA, circRNA)是区别于传统 mRNA 的一类有调节功能的非编码 RNA,最早于 20 世纪 70 年代在 RNA 病毒中被发现^[3]。但在过去 30 余年里, circRNA 一度被认为是由外显子转录本错误剪接而形成的低丰度 RNA 分子。随着高通量检测技术和生物信息学的发展,人们发现 circRNA 在不同物种中普遍存在且具有重要的生理功能,具有组织和发育阶段特异性^[3,4]。与 mRNA 的典型剪接不同, circRNA 通过反向剪接形成一个无 5'和 3'极性的闭合环状结构,不易受 RNA 外切酶的影响^[5]。circRNA 最为突出的功能是具有 miRNA 海绵作用或者作为竞争性内源性 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA),通过调控 miRNA 靶标而发挥作用^[3]。本文主要介绍 circRNA 的形成、功能及其与人类疾病的关系。

一、circRNA 的形成

circRNA 形成模式具有多样性,主要有以下 5 种方式。(1)套锁驱动环化(lariat-driven circularization)(图 1A):由一个外显子的剪接供体(splice donor)和另一个外显子的剪接受体(splice acceptor)共

价结合,然后在剪接体的作用下去除内含子而形成 circRNA^[5]。(2)内含子配对驱动的环化(intron-pairing-driven circularization)(图 1B):由 2 个内含子通过碱基互补配对结合,然后切除内含子而形成 circRNA^[5]。内含子配对驱动的环化也可形成保留内含子的外显子环化 circRNA,即外显子内含子环化的 circRNA(exonintron circRNAs, EIciRNAs),但形成机制还不明确^[6]。(3)RBP 驱动的环化:盲肌结合蛋白(muscleblind protein, MBL)可以作为 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)与 circMbl 以及其侧翼内含子结合, RBP 在侧翼内含子之间建立一个桥梁,促进 circRNA 或者 EIciRNAs 的生成(图 1C)^[7,8]。在一定条件下, RBP 在 circRNA 形成过程中可以作为促进剂或者抑制剂,如 Quaking 能促进 circRNA 的形成,而 RNA 编辑酶(RNA-editing enzyme, ADAR1)能抑制 circRNA 的形成^[9,10]。(4)内含子环化:Zhang 等^[11]在人类细胞中发现内含子环化的 RNA(circular intronic RNAs, ciRNA), ciRNA 的形成要求 5'剪接位点富含 7-nt GU 序列,分枝点富含 11-nt C 序列(图 1D)。(5)来源于染色体异位:最新的研究发现, circRNA 可以像蛋白基因一样受到基因重排的影响,发生异常融合而产生融合 circRNA(fusion-circRNAs, f-circRNAs)(图 1E)^[12]。现阶段对 circRNA 的形成模式仍不完全清楚,尚需进一步研究。

二、circRNA 的功能

1. 作为竞争性内源性非编码 RNA:现有研究已经证实 miRNA 几乎与所有的细胞功能相关,在疾病发生、发展中有重要作用。circRNA 分子富含 miRNA 应答元件(miRNA response element, MRE),可以竞争性结合 miRNA,在细胞中起到 miRNA 海绵体的作用,可以解除 miRNA 对其靶基因的抑制作用,升高靶

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81473027, 81172268);江苏省重点研发计划-社会发展(BE2015694)

作者单位:211166 南京医科大学公共卫生学院流行病学系

通讯作者:王建明,教授,电子信箱:jmwang@njmu.edu.cn

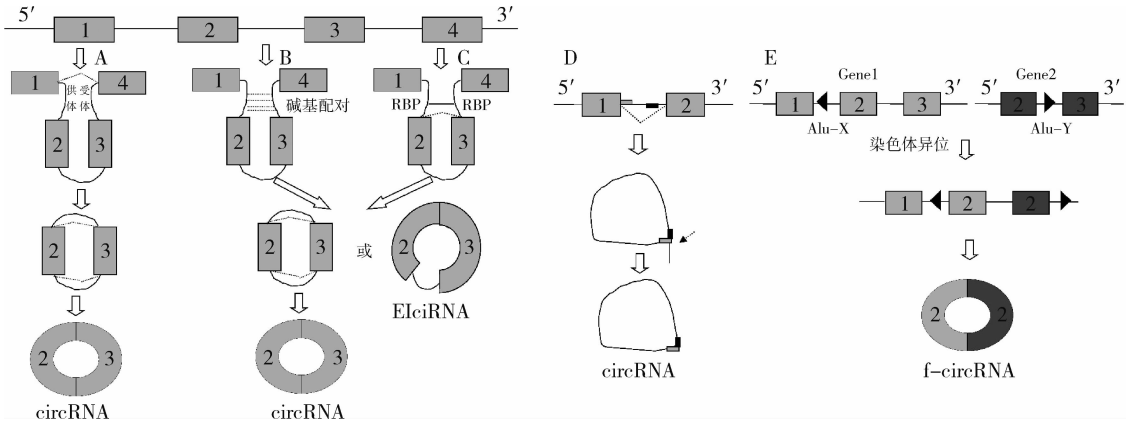


图 1 circRNA 的形成模式

A. 套索驱动的内化,外显子 1 (3'的剪接供体)和外显子 4(5'的剪接受体)共价联合形成外显子跳跃的套索环;B. 内含子配对驱动的内化,内含子 1 和 3 通过碱基配对形成环状结构,内含子被移除形成 circRNA,内含子被保留形成 EIciRNA;C. RBP 驱动的内化,RBP 可以驱动侧翼内含子紧密连接,内含子被移除形成 circRNA,内含子被保留形成 EIciRNA;D. 内含子环化形成 ciRNA;E. 融合 circRNA 来源于染色体异位

基因的表达水平(图 2A)^[3,13,14]。如睾丸特异性 circRNA (sex determining region Y, Sry), 具有 16 个

miR - 138 结合位点,可通过与 miRNA 的相互结合影响人体多种生理学和病理学过程^[14]。

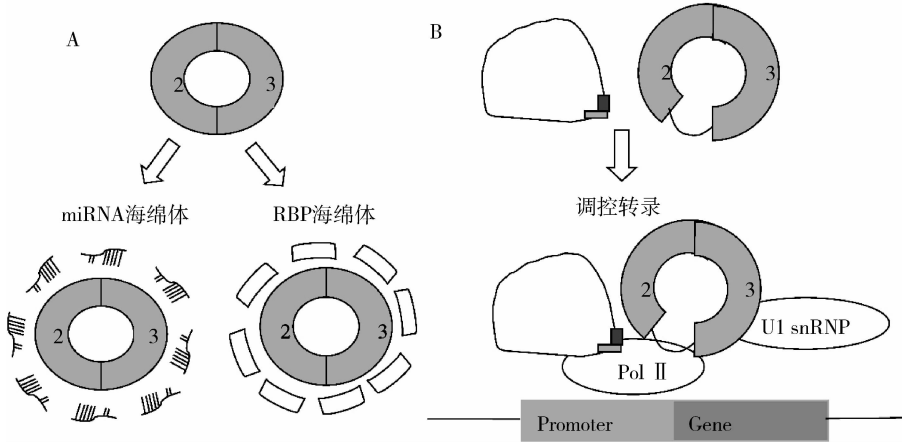


图 2 circRNA 的功能

A. circRNA 可以作为 miRNA 的海绵体和 RBP 的海绵体;B. ciRNA 与 Pol 结合,EIciRNA 与 U1 snRNP 结合形成 EIciRNA - U1 snRNP 复合体,复合体与 Pol II 结合,调控宿主基因转录

2. 调控亲代基因的表达:ciRNA 大量存在于细胞核,可与聚合酶 II (Pol II) 结合,调控转录过程^[13]。如锚蛋白重复结构域 52 (ci - ankyrin repeat domain 52,ci - ankrd52) 主要定位于转录位点附近,影响 RNAPol II 复合体的延长,是 Pol II 复合体的正调节因子,对其亲代基因发挥顺式调控作用^[11]。EIciRNA 通过特殊的 RNA - RNA 结合方式与 U1 snRNP 结合形成 EIciRNA - U1 snRNP 复合体,复合体可与 Pol II 结合,通过顺式调控作用增强其亲代基因转录能力(图 2B)^[6]。

白开放阅读框的 circRNA 导入大肠杆菌,在大肠杆菌体内可以检测到绿色荧光蛋白^[15]。然而到目前为止,只在丁型肝炎病毒中发现了能翻译蛋白的 circRNA 分子。circRNA 通过与阿格蛋白 (argonaute, AGO) 紧密结合或直接与其他 RNA 配对,影响 mRNA 的转录和翻译;也可以反转录产生假基因,影响细胞分化和肿瘤进展^[13]。

三、circRNA 与疾病的研究进展

1. circRNA 与肿瘤:人类肿瘤的发病原因和发生机制复杂,寻找特异性生物标志物是肿瘤防制研究的重要方向。circRNA 具有组织及发育阶段特异性,一

3. circRNA 的其他功能:将 1 个包含绿色荧光蛋

些 circRNA 对肿瘤的发生和发展起到重要的调节作用^[15]。有研究者应用芯片或测序技术对癌组织样本中 circRNA 的表达谱进行分析,发现异常调节现象在肿瘤中普遍存在^[16]。circRNA 在肿瘤中的异常表达与肿瘤类别有关,不同肿瘤具有特异性的 circRNA 表达谱,如 hsa_circ_002059 表达量与胃癌有关^[17]。Li 等^[18]在 684 对食管癌及癌旁组织的研究中发现, circ - ITCH 在食管癌组织中的表达显著下调。Zhang 等^[19]在泌乳大鼠乳腺中检测到 1314 个 circRNA,同时发现 4 个可以转录高水平 circRNA 的乳腺癌相关蛋白质编码基因(Rev31、IGSF11、MAML2 和 LPP),提示 circRNA 可能与乳腺癌发病相关。此外,研究者在人类血清外泌体中发现大量完整而稳定的 circRNA,且 circRNA 表达谱在癌症患者和正常人血清中存在很大差异。与正常组织相比,结直肠癌患者血清中有 67 个 circRNA 缺失,同时新产生了 257 个在正常人血清中不存在的 circRNA,如 circ - KLDHC10 的表达在结直肠癌患者与正常人血清外泌体中存在显著差异^[20]。在白血病研究中发现, f - circRNA 可以促进细胞过度增殖,具有促癌作用;在白血病小鼠模型中, f - circM9 可以促进肿瘤的发展且具有一定的耐药作用^[12]。

circRNA 作为 miRNA 的海绵体,可调节相关代谢通路,目前研究较多的是小脑变性相关蛋白反义转录物(antisense to the cerebellar degeneration - related protein 1 transcript, CDR1as)。CDR1as 有 74 个 miR - 7 结合位点,能竞争性抑制 miR - 7 活性,上调靶基因的表达水平, CDR1as/miR - 7 轴可能参与肿瘤相关生物学过程^[3, 14]。CDR1as 可以促进表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)和胰岛素受体底物 2(insulin receptor substrate - 2, IRS2)的表达,也可以抑制核转录因子(Krüppel - like factor 4, KLF4)表达,与宫颈癌、乳腺癌和肝癌等有关^[16, 21]。此外, CDR1as 的结合物 miR - 7 还可通过靶向局灶黏附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和胰岛素样生长因子(insulin - like growth factor 1 receptor, IGF1R)间接上调 E - 降钙素,抑制上皮间质转化(epithelial - to - mesenchymal transition, EMT),延缓肿瘤的生长和转移^[15]。circ - ITCH 作为 miR - 7, miR - 1 和 miR - 214 的海绵体,可以上调 ITCH 的水平, ITCH 高表达促进泛素化和磷酸化降解 Dvl2,抑制典型的 Wnt 信号通路,而 Wnt 通路失控与肝癌、卵巢癌以及食管癌的发生有密切联系。

2. circRNA 与神经系统疾病:在果蝇体内,具有神经调节功能的基因通常具有较长的内含子区,表达相对较高水平的 circRNA;在人类大脑中, circRNA 水平也高于相应的线性 RNA^[10, 22]。这些发现对 circRNA 与神经系统疾病的研究具有重要意义。Rybak - Wolf 等^[23]和 You 等^[24]报道了上千种存在于哺乳动物大脑中的保守 circRNA 目录,与相应的线性 RNA 亚型相比,这些 circRNA 多数在神经形成时上调,在突触联合过程中富集。circRNA 在神经纤维网中的富集程度超过 mRNA 且可以调节突触的功能,这些 circRNA 部分来自编码突触蛋白的宿主基因。Lin 等^[25]通过建立葡萄糖剥夺/再复氧(oxygen - glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)的 HT22 细胞模型,发现 mmu - circRNA - 015947 的表达在 HT22 细胞模型中高于正常细胞,表明 circRNA 表达改变可能与 OGD/R 诱发神经损伤有关。

miR - 7 作为 α - 突触核蛋白和泛素化蛋白连接酶 A(ubiquitin protein ligase A, UBE2A)的调节剂,与神经退行性疾病存在直接关联。circRNA 调节的 miRNA - mRNA 系统可能是疾病的一种表观控制方式。在斑马鱼中表达人 CDR1as 和敲除 miR - 7 均可导致斑马鱼脑体积减小^[3]。阿尔茨海默病患者的受损脑细胞中 CDR1as 的缺乏提高了 miR - 7 的水平,最终抑制靶基因如 UBE2A 表达。UBE2A 是 1 个自噬泡,可以清除淀粉酶,但在阿尔茨海默病和其他中枢神经系统进行性炎性退化疾病中被耗尽。circRNA 在神经系统中的机制尚不清楚,但 circRNA 表达特异性和稳定性使其在神经系统疾病中具有重要的研究价值。

3. circRNA 与其他疾病:软骨细胞外基质相关 circRNA[chondrocyte extracellular matrix (ECM) - related circRNAs, circRNA - CER]可能是骨关节炎治疗的 1 个潜在靶点。研究者通过 circRNA 芯片在骨关节炎和正常关节中发现 71 个差异 circRNA,进一步实验发现 circRNA - CER 通过与竞争性结合 miR - 136 来调控 MMP13 的表达,并参与软骨细胞 ECM 降解过程。Ashwal - Fluss 等^[7]发现了可能与肌强直性营养不良的发生和发展相关的 circRNA 转录本 circMbl, circMbl 和其侧翼内含子序列包含保守的盲肌结合位点,可以结合盲肌,盲肌的缺乏可引起肌强直性营养不良。因此, circMbl 可能是肌强直性营养不良的治疗靶点。

circRNA 紊乱与心血管疾病相关。心脏相关 cir-

cRNA(heart-related circRNA, HRCR)作为 miR-223 的海绵体可以抑制心脏肥大和心力衰竭。miR-223 转基因小鼠易发生心脏肥大和心力衰竭,而 miR-223 缺失的小鼠没有相应病症。研究发现了包含 HRCR、miR-223 和 ARC 的心脏肥大调控模式,这一通路可能是心脏肥大和心力衰竭治疗的靶点。血管内皮细胞中存在一系列受低氧环境调控的 circRNA,这些 circRNA 的失调可能参与心血管疾病的发病过程。Burd 等在动脉粥样硬化心血管疾病(atherosclerotic vascular disease, ASVD)中发现 circRNA 转录本环状反义非编码 RNA(circular antisense noncoding RNA in the INK4 locus, cANRIL), cANRIL 可通过特异的多梳家族(Polycomb-group proteins, PcG)募集以抑制 INK4/ARF 的表达,间接调控 ASVD 的发生。

四、circRNA 在疾病筛查和治疗中的应用和展望

circRNA 具有普遍性、保守性、特异性、稳定性以及高丰度表达等特征,这些特征使 circRNA 作为标志物在疾病筛查与治疗上具有巨大潜力。多数 circRNA 的检测需要组织样本,在临床应用上有一定的困难。最近研究发现,血液中 circRNA 的表达水平高于肝脏组织和小脑组织,血清外泌体中 circRNA 的丰度高于癌症细胞系,肿瘤中血清外泌体 circRNA 的富集程度与肿瘤的体积有关^[20]。这些研究表明人外周血循环 circRNA 的改变与疾病发生、发展关系密切,有望成为疾病筛查和治疗的一种重要分子标志物。

虽然 circRNA 仍是一个新兴的研究靶点,但其为人类基因组“暗物质”的研究提供了新的视角。随着人类对 circRNA 研究热情的日益提高,加之 RNA 高通量技术和生物信息技术的发展, circRNA 在人体生理和病理功能中的奥秘将被逐步揭示。

参考文献

- Li Z, Ender C, Meister G, *et al.* Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(14):6787-6799
- Place RF, Noonan EJ. Non-coding RNAs turn up the heat: an emerging layer of novel regulators in the mammalian heat shock response[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2014, 19(2):159-172
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441):333-338
- Danan M, Schwartz S, Edelheit S, *et al.* Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7):3131-3142
- 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
- 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

- Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, *et al.* circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1):55-66
- Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function[J]. *RNA*, 2014, 20(12):1829-1842
- Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, *et al.* The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. *Cell*, 2015, 160(6):1125-1134
- Ivanov A, Memczak S, Wyler E, *et al.* Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(2):170-177
- Zhang Y, Zhang XO, Chen T, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6):792-806
- Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, *et al.* Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations[J]. *Cell*, 2016, 165(2):289-302
- Qu S, Yang X, Li X, *et al.* Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2):141-148
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441):384-388
- Li J, Yang J, Zhou P, *et al.* Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(2):472-480
- Peng L, Yuan XQ, Li GC. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6):2669-2674
- Li P, Chen S, Chen H, *et al.* Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444:132-136
- Li F, Zhang L, Li W, *et al.* Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8):6001-6013
- Zhang C, Wu H, Wang Y, *et al.* Expression patterns of circular RNAs from primary kinase transcripts in the mammary glands of lactating rats[J]. *J Breast Cancer*, 2015, 18(3):235-241
- Li Y, Zheng Q, Bao C, *et al.* Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. *Cell Res*, 2015, 25(8):981-984
- Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(18):5609-5612
- Westholm JO, Miura P, Olson S, *et al.* Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(5):1966-1980
- Rybák-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, *et al.* Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(5):870-885
- You X, Vlatkovic I, Babic A, *et al.* Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(4):603-610
- Lin SP, Ye S, Long Y, *et al.* Circular RNA expression alterations are involved in OGD/R-induced neuron injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(1):52-56

(收稿日期:2016-05-09)

(修回日期:2016-05-11)