

circRNA 在眼部新生血管性疾病的研究进展

马 严 姚牧笛 蒋 沁 曹国凡

摘 要 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种共价闭合环状非编码 RNA, 广泛存在于多种物种中。近年来, 随着生物信息学工具及 RNA 高通量测序技术的快速发展, circRNA 被广泛研究。研究表明, circRNA 能充当 microRNA (miRNA) 和蛋白质分子海绵调节基因表达, 并且参与表观遗传修饰系统的构成, 在调节生物体胚胎发育、组织分化等方面具有重要作用。CircRNA 异常表达与多种疾病的发生、发展密切相关, 包括肿瘤、心血管疾病、神经退行性疾病等, 并可能成为多种疾病生物学标志物和治疗靶标。本文就 circRNA 的生物合成和功能, circRNA 在眼部新生血管性疾病中的调控, 以及在眼部新生血管性疾病模型中的作用进行综述。

关键词 circRNA 非编码 RNA miRNA 分子海绵 眼部新生血管性疾病

中图分类号 R774

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.04.033

circRNA 是信使 RNA (message RNA, mRNA) 反向剪接而成的闭合环状非编码 RNA, 其异常表达与多种疾病的发生、发展密切相关, 包括肿瘤、心血管疾病、神经退行性疾病等^[1]。在非编码 RNA 领域, circRNA 成为继 miRNA 和长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 之后的又一研究热点。眼部新生血管性疾病主要是指眼部异常血管生成从而导致严重视力障碍的一类疾病, 是中老年人不可逆视力丧失的重要原因, 其核心过程是病理性血管新生, 涉及血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 的选择性出芽、增殖和周细胞的募集及管腔重建等。根据异常新生血管生长的解剖部位, 眼部新生血管可分为角膜新生血管、视网膜新生血管和脉络膜新生血管等^[2]。近年来研究发现 circRNA 在眼部新生血管性疾病的发病机制和调控中起着重要作用。

一、circRNA 概述

1. circRNA 的来源和形成: circRNA 是一类在真核细胞中含量丰富且保守的内源性非编码 RNA, 由前体 RNA (pre-mRNA) 经反向首尾剪接或者基因重排形成, 通过 5' 和 3' 端共价连接, 形成没有 PolyA 尾巴的闭合环状 RNA, 不易被核酸外切酶降解, 可在组织或体液中稳定存在^[3]。早期人们对 circRNA 的功能知之甚少, 被认为是线性 RNA 的副产品^[4]。近年

来, 随着基因测序等相关技术的发展, circRNA 的重要生物学功能逐渐被挖掘。circRNA 的来源主要有: ①来源于外显子的 circRNA (exon circRNA, ecircRNA); ②来源于外显子-内含子 circRNA (exon-intron circRNA, EicRNA); ③来源于内含子的 circRNA (circular intronic RNA, ciRNA); ④来源于 tRNA 的 circRNA (tricRNA)^[4,5]。

circRNA 形成模式主要有: ①内含子配对介导的环化 (又叫直接反剪接); ②套索机制驱动的环化 (又叫外显子跳跃); ③套索内含子的直接环化; ④RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein, RBP) 驱动的环化; ⑤tRNA 剪接过程环化^[4,5]。目前, 真核细胞中 circRNA 主要来自外显子, 外显子 circRNA 的形成主要包括两种机制: 第 1 种机制是直接反剪接, 由于环化外显子两侧的内含子序列互补配对, pre-mRNA 下游 5' 剪接供体位点直接与上游 3' 剪接受体位点接合形成 circRNA, 从而产生循环转录本; 第 2 种机制是外显子跳跃, 当前体 mRNA 进行经典的 GU/AG 剪接时, 外显子跳跃产生一个包含外显子和内含子的套索中间体, 随后经过反向剪接, 套索中的内含子被移除, 形成 ecircRNA^[4]。除了上述的形成方式, 目前还存在其他 circRNA 形成机制: ①内含子套索驱动环化: 由前体 RNA 在经典套索驱动环化形成的, 内含子套索中的 5' 剪接位点的重复 7nt GU 基因序列和分支位点的丰富 11nt C-rich 基因序列转录形成套索内含子并共价连接环化, 形成 ciRNA^[6]; ②RBP 驱动的环化: RBP 通过互补序列与侧翼内含子序列相互作用, 使两个侧翼内含子相互靠近, 进而促进环化, 并通过

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81870679); 江苏省卫生健康委员会医学科研项目 (114)

作者单位: 210029 南京医科大学附属眼科医院

通讯作者: 曹国凡, 副教授, 硕士生导师, 主任医师, 电子信箱: caoguofan587@163.com

反向剪接使其头尾连接,形成 ecirc RNA 或 EIciRNA^[4];③tRNA 剪接过程环化:通过识别前 tRNA 中的凸起-螺旋-凸起基序并切割,从而产生 tRNA 和 tricRNA^[5]。

2. circRNA 的功能:竞争内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)假说^[7]:指信使 RNA (mRNA)、lnc RNA、假基因转录物等含有与 miRNA 反应元件(microRNA response element, MRE)相同的结合位点,可以竞争 miRNA 结合位点,降低 miRNA 对靶基因的抑制作用,从而上调 miRNA 目标基因表达,调节细胞内稳态,该过程又叫 miRNA 的“海绵作用”。目前研究最为透彻的两个是 CDR1as/CIRS-7 和 Sry 基因。CIRS-7/CDR1as 在脑组织中高度表达,含有 70 多个选择性 miR-7 靶位点,并与 miR-7 结合,抑制 miR-7 活性来增加 miR-7 靶基因的水平,在斑马鱼中,miR-7 的敲除或 CIRS-7/CDR1as 的表达损害了中脑的发育。睾丸组织中的 circRNA 性别决定区域 circRNA-Sry,也具有可以与 miR-138 相互作用的结合位点,参与功能活动的调控^[3]。这两项研究是 circRNA 的首次功能及机制研究,使 circRNA 成为 RNA 领域的一颗新星。目前,还有很多 circRNA 被证明具有 miRNA 分子海绵的作用。

circRNA 还可与 RBP 相互作用,通过作为竞争位点来阻断蛋白质效应,在转录和转录后水平上控制基因表达^[4]。例如 circ-Foxo3 主要在细胞质中表达,能够与衰老相关蛋白 ID1 (inhibitor of DNA binding 1)、转录因子 E₂F₁ 和低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit α , HIF-1 α) 结合,并抑制蛋白进入细胞核中,阻断其抗衰老功能,促进心肌细胞衰老。此外, circ-Foxo3 还可以通过结合细胞分裂蛋白激酶 2 (cell division protein kinase 2, CDK2) 和 P21 蛋白形成 circ-Foxo3-p21-CDK2 三元复合物来抑制细胞周期进程,进而结束细胞进程导致细胞凋亡^[8]。circRNA 还具有编码蛋白质和多肽的功能,一种方式是通过内部核糖体进入位点 IRES (internal ribosome entry sites) 序列促进起始因子或核糖体与可翻译 circRNA 直接结合,如 circZNF609^[9] 等。此外, circRNA 在缺乏 IRES、polyA 和 5'帽结构的条件下,也可以通过 RCA (rolling circle amplification) 机制翻译蛋白质^[10]。研究还发现大量的 circRNA 富含 m⁶A 甲基化修饰,驱动 circRNA 从而启动翻译^[11]。

circRNA 存在于体液及血液中,占总 RNA 的 1%,含量相对丰富。与 lncRNA 和 miRNA 比较, cir-

cRNA 因其特殊环状结构具有独特的抗 RNA 酶降解能力,更容易获得和检测。不同类型的细胞中 circRNA 差异性表达,因此具有组织特异性^[12]。circRNA 丰度高,稳定性好,特异性高。原则上,可以在人类全血、血浆、唾液和外泌体中检测到 circRNA,作为特定的生物学标志物。

二、CircRNA 与眼部新生血管性疾病

1. 角膜新生血管:主要是由病原体感染或物理、化学损伤及内源性调节因子的异常表达引起,导致角膜缘血管在角膜中异常生长,使角膜失去正常透明度,严重可导致失明^[13]。Zhou 等^[14]对 NaOH 碱烧伤诱导的角膜新生血管小鼠模型进行 circRNA 微阵列分析,鉴定出 174 个上调 55 个下调共 229 个差异表达的 circRNA, cKifap3 和 cZNF609 的异常表达与角膜新生血管的发生、发展密切相关,其中 cKifap3 通过 ceRNA 机制作为 miR-184 的分子海绵,作用于 Akt、VEGF 通路调节角膜新生血管的形成。Wu 等^[15]进一步利用角膜缝线诱导的角膜新生血管大鼠模型阐述 cZNF609 在角膜新生血管形成中进一步的作用和机制。研究提示, cZNF609 作为 miR-184 海绵隔离 miR-184 活性,提高下游 Akt 和 VEGF 表达水平,促进人角膜上皮角质形成细胞的体外增殖、迁移和成管。干预 cZNF609 的表达可能为角膜新生血管性疾病开创新的治疗理念。

2. 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR):糖尿病严重的微血管并发症,是视网膜血管疾病的代表性疾病,位居中老年致盲性眼病第 1 位。高血糖引起视网膜 ECs 失衡,血-视网膜屏障功能受损,血管通透性增加,DR 可导致微血管功能障碍和神经胶质变性为表现的神经-血管单元病变,晚期可出现新生血管和增殖膜等^[2]。目前临床治疗方法主要针对晚期视力严重受损的患者,需反复多次注射或手术,组织创伤大^[16]。因此,进一步寻找相关诊断标志物和治疗靶标对眼部新生血管性疾病的早期防治具有重要的战略性意义。

circHIPK3 是由 HIPK3 基因的 2 号外显子产生,在肺、视网膜、胃肠道、卵巢等不同的组织中均有所表达,参与多种癌症的发病机制^[17]。Shan 等^[18]研究发现, circHIPK3 在链脲佐菌素诱导的 DR 小鼠模型和高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞 (human retinal vascular endothelial cells, HRVECs) 中表达显著上调。沉默 circHIPK3 抑制 HRVECs 活力、增殖、迁移和成管等能力,减少视网膜无细胞毛细血管、血管渗漏、炎

症和水肿,保护视网膜功能。circHIPK3 作为内源性 miR - 30a - 3p 分子海绵,通过 ceRNA 机制导致下游 VEGF - C、FZD4 和 WNT2 表达增加,调控血管内皮病变。此外,临床上对 DR 患者的房水标本检测发现,circHIPK3 表达明显上调。上述研究提示,circHIPK3 可通过多种调控通路调节内皮细胞功能,circHIPK3/miR - 30a - 3p/VEGF - C、FZD4、WNT2 轴可能在 DR 的发生、发展中起重要作用,为认知 DR 病因和发病机制提供了全新的分子信息,为糖尿病微血管病变研究提供了新的机制和视角。

Liu 等^[19]研究发现,在高糖和低氧应激下 cZNF609 表达显著上调,敲低 cZNF609 可以减少视网膜血管丢失和病理性血管新生,荧光素酶报告基因测定证实 cZNF609 可能与 miR615 - 5p 相互作用,cZNF609 可能通过 cZNF609/miR615 - 5p/MEF - 2A 网络调节 DR 血管功能,参与眼部新生血管性疾病的发生,并可能作为其潜在治疗靶标。circHIPK3 和 cZNF609 的研究激起了血管领域对非编码 RNA 研究的热情,为非编码 RNA 在血管领域的研究做出了重要突破,同时也促进了不同学科的交叉。Zhang 等^[20]通过微阵列分析了 DR 患者血浆、玻璃体纤维血管中 circRNA 表达情况,检测出 356 个上调和 173 个下调的 circRNA,提示糖尿病微血管病变可能与多个 circRNA 的异常表达相关。其中,circ - 0005015 可作为内源性 miR - 519d - 3p 海绵,抑制 miR - 519d - 3p 活性,促进 MMP - 2、STAT3 及 XIAP 蛋白的表达,调节 ECs 功能,促进血管生成。Zhu 等^[21]研究发现 CircDNMT3B 通过调节 miR - 20b - 5p,靶向作用于 BAMBI 参与调控内皮稳定和维持血管动态平衡。CircDNMT3B 的高表达可调节 ECs 功能,减少糖尿病视网膜渗漏和视功能损伤,逆转视网膜电图 a、b 波振幅下降。circCOL1A2 作为 miR - 29b 海绵,提高 VEGF、MMP - 2、MMP - 9 表达水平,沉默 circCOL1A2 可能减少血管新生,减少高糖刺激下的视网膜结构和功能损害。以上研究表明,circRNA 可通过多个致病途径介导 DR 中新生血管的发展,有望成为 DR 的潜在诊断、预后生物学标志物及抗新生血管治疗靶标。

周细胞是血管成熟和视网膜屏障的重要组成部分,周细胞丢失是 DR 的早期病理特征,异常的周细胞 - 内皮细胞串扰可导致视网膜血管渗漏、闭塞和成熟障碍。有研究发现,在临床标本及 STZ 诱导的 DR 小鼠视网膜组织中 circRNA 表达异常,糖尿病相关应激源刺激可上调周细胞中 cPWWP2A、cZNF532 的表

达,而在内皮细胞表达不受影响。进一步研究发现,cPWWP2A 过表达使周细胞覆盖率增加,周细胞可通过旁分泌作用影响 HRVECs 的增殖、迁移和成管能力,间接调节内皮细胞的功能,使视网膜血管渗漏减轻,无细胞毛细血管及微动脉瘤减少。研究表明,cPWWP2A 通过竞争性结合 miR - 579,调节视网膜 Ang1、occludin、SIRT1 的表达水平,增强周细胞的表达及募集,保护视网膜。SP1 是在糖尿病应激条件下激活的一种转录因子,可与 cZNF532 的启动子结合并增强 cZNF532 的表达。在周细胞中 cZNF532 通过作为 miR - 29a - 3p 分子海绵,靶向提高 NG2、LOXL2 和 CDK2 的表达从而调节周细胞生物学活性,增强周细胞活力,增殖和分化并增强周细胞向内皮细胞募集,减轻糖尿病应激条件下的细胞凋亡。通过对 cPWWP2A、cZNF532 的研究,发现血管周细胞病变的表观调控新机制,挖掘了视网膜病变干预治疗的潜在靶标。因此,基于周细胞 - 内皮细胞串扰调控的治疗干预将为预防和保护糖尿病视网膜血管损伤提供一种新的方法,周细胞保护的 DR 治疗有望成为抗新生血管之外的又一新的治疗方向。

3. 早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP): 一种以视网膜缺氧继发新生血管增殖为特点的早产儿眼底疾病^[2]。随着医疗技术水平的发展,早产儿成活率增高,ROP 成为儿童失明的重要原因^[22]。氧诱导视网膜病变 (oxygen - induced retinopathy, OIR) 小鼠模型是模拟 ROP 视网膜血管病变的主要动物模型。Zhou 等^[14]对 OIR 视网膜进行测序发现,大量差异表达的 circRNA 在血管生成等生物学过程中富集。OIR 小鼠视网膜中 circRNA 水平改变与细胞进程、细胞内酶活性、MAPK 信号通路和肾素 - 血管紧张素系统调节相关,并可能参与 OIR 病理性血管新生。此外,Liu 等^[19]研究发现在 OIR 模型中,cZNF609 表达显著上调,cZNF609 可能通过 cZNF609/miR615 - 5p/MEF - 2A 轴调节宿主基因,参与眼部新生血管性疾病的发生。敲低 cZNF609 可以减少视网膜血管丢失和病理性血管新生,作为其潜在治疗靶标。然而,circRNA 对 ROP 血管新生过程及其具体分子机制仍然缺乏了解,需要加大这方面的研究来全面验证结果并阐明其中潜在分子机制。

4. 脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV): 一种累及 RPE - 脉络膜 - 巩膜复合体的常见眼部疾病^[2]。年龄相关性黄斑变性 (age - related macular degeneration, AMD)、病理性近视、弱视等是

引起 CNV 的主要原因,常导致视力丧失。Liu 等^[23]对 CNV 小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体进行微阵列分析,发现大量异常表达的 circRNA, circRNA 可能在 CNV 的发病机制中发挥至关重要的作用。渗出型 AMD 的特征是 CNV 形成。有研究发现,在缺氧应激后的 ECs 及激光诱导的 CNV 小鼠模型中 cZBTB44 的表达明显上调, cZBTB44 作为 miR-578 分子海绵,抑制 miR-578 活性,导致 VEGFA 和 VCAM1 表达增加。敲低 cZBTB44 可降低内皮细胞的活力、增殖、迁移和成管能力,延缓 CNV 的发生、发展。敲低 cZBTB44 联合眼内抗 VEGF 类药物贝伐珠单抗注射可增加抗 VEGF 药物疗效,进一步抑制 CNV 的发展。综上所述, AMD 有可能通过 cZBTB44/miR-578/VEGFA/VCAM1 轴调节脉络膜新生血管,并与贝伐珠单抗具有协同抗 VEGF 作用。此外,在渗出性 AMD 患者的临床样品中检测到 cZBTB44 表达失调,提示 cZBTB44 可能成为 AMD 的标志物并有助于 AMD 的临床诊断。

三、展 望

circRNA 可通过多种生物学机制调节基因的表达,参与眼部新生血管性疾病的发生、发展。对 circRNA 的研究可能丰富对生物机体遗传调控网络的认识,揭示了潜在的疾病发病机制,提供更多诊疗思路、判断预后及转归情况。目前, circRNA 的研究主要集中在其生理病理过程中的表达变化,大多数研究仅局限于动物模型,且 circRNA 的功能研究及具体调控机制并未完全明了。因此,未来需要进一步研究基于人体标本中的 circRNA 在新生血管性疾病中的详细作用机制,并积极进行临床转化研究。积极进行相关检测试剂盒的研制,使 circRNA 在眼部新生血管性疾病的诊疗方面发挥无限的价值。此外,靶细胞的特异性 circRNA 敲除技术也存在着广阔的研究空间。目前,针对 circRNA 的研究广度已经铺开,而研究深度还远远不够,仍需研究者开展深入探索。

参考文献

- 李乐, 吴金亮, 徐明, 等. 环状 RNA 的生物特征及其功能研究进展[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(2): 10-13
- Bharadwaj AS, Appukuttan B, Wilmarth PA, *et al.* Role of the retinal vascular endothelial cell in ocular disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 32: 102-180
- 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
- Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, *et al.* The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691
- Schmidt CA, Giusto JD, Bao A, *et al.* Molecular determinants of metazoan tricRNA biogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(12): 6452-6465
- Zhang Y, Zhang XO, Chen T, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792-806
- Salmena L, Poliseno L, Tay Y, *et al.* A ceRNA hypothesis: the rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358
- Du WW, Yang W, Liu E, *et al.* Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846-2858
- Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, *et al.* Circ-ZNF609 Is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22-37, e29
- Mohsen MG, Kool ET. The Discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription [J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49(11): 2540-2550
- Yang Y, Fan X, Mao M, *et al.* Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine [J]. *Cell Res*, 2017, 27(5): 626-641
- 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
- Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, *et al.* Current and emerging therapies for corneal neovascularization [J]. *Ocul Surf*, 2018, 16(4): 398-414
- Zhou YF, Shi LJ, Yao J, *et al.* Microarray analysis of circRNA expression pattern in corneal neovascularization [J]. *Cornea*, 2019, 38(11): 1443-1449
- Wu P, Zhang D, Geng Y, *et al.* Circular RNA-ZNF609 regulates corneal neovascularization by acting as a sponge of miR-184 [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 192: 107937
- 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014 年) [J]. *中华眼科杂志*, 2014, 50(11): 851-865
- 张军军, 干翼超, 黄钧涛, 等. CircHIPK3 在肿瘤中的研究进展 [J]. *现代实用医学*, 2020, 32(7): 879-882
- Shan K, Liu C, Liu BH, *et al.* Circular noncoding RNA HIPK3 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Circulation*, 2017, 136(17): 1629-1642
- Liu C, Yao MD, Li CP, *et al.* Silencing of circular RNA-ZNF609 ameliorates vascular endothelial dysfunction [J]. *Theranostics*, 2017, 7(11): 2863-2877
- Zhang SJ, Chen X, Li CP, *et al.* Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in diabetes retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(14): 6500-6509
- Zhu K, Hu X, Chen H, *et al.* Downregulation of circRNA DMNT3B contributes to diabetic retinal vascular dysfunction through targeting miR-20b-5p and BAMBI [J]. *E Bio Medicine*, 2019, 49: 341-353
- 方思文, 马翔. 早产儿视网膜病变的治疗 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(1): 77-80
- Liu X, Zhang L, Wang JH, *et al.* Investigation of circRNA expression profiles and analysis of circRNA-miRNA-mRNA networks in an animal (mouse) model of age-related macular degeneration [J]. *Curr Eye Res*, 2020, 45(9): 1173-1180

(收稿日期: 2020-11-11)

(修回日期: 2020-12-06)