



环状 RNA 在儿童肾母细胞瘤中的表达谱、生物学功能和临床意义*

田小毛 向彬 刘丰** 魏光辉

(重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科, 儿童泌尿生殖发育与组织工程重点实验室, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘要 肾母细胞瘤 (Wilms 瘤) 是儿童时期最常见的肾脏恶性肿瘤。传统的分层诊疗方案无法实现指导精准风险分层的目标, 尤其是对于那些没有高危因素的患儿。例如, 具有相同临床表型并接受相同治疗的患儿可能存在明显不同的预后, 这表明该疾病比以前认识的要复杂得多。这种个体异质性需要更深入的分子表型研究来确定新的标志物和靶点。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类新发现的非编码 RNA。大量研究报道, 失调的环状 RNA 主要依赖 miRNA “海绵” 机制调节癌细胞的多种表型, 包括增殖、侵袭、迁移、周期阻滞或化疗耐药等。该分子也有希望成为癌症诊断标志物和治疗靶点。与成人癌症相比, 对肾母细胞瘤中环状 RNA 的研究仍处于起步阶段。本文基于现有文献, 系统综述了环状 RNA 在肾母细胞瘤中的表达模式、生物学功能和临床意义等方面的最新进展, 并探讨了目前研究的局限性和今后的研究方向。

关键词 Wilms 瘤, 肾母细胞瘤, 环状 RNA, 竞争内源性 RNA

中图分类号 R726.9

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0301

人类基因组测序结果表明, 仅有 2%~3% 的基因组被注释为蛋白质编码基因, 大部分转录为非编码 RNA^[1]。众所周知, 基因表达紊乱是癌症的主要标志。近年来, 许多研究发现非编码 RNA 的失调与多种恶性肿瘤的发生、发展有关^[2]。环状 RNA (circRNA) 是一大类非编码 RNA, 主要通过基因调控发挥生物学作用。该分子广泛存在于生物体内, 比线形 RNA 更稳定和保守。自从 2013 年连续发表两篇阐明环状 RNA 海绵功能的文章以来^[3-4], 越来越多的研究报道环状 RNA 在竞争内源性 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) 网络中的关键作用。环状 RNA 含有极其丰富的微 RNA (microRNA, miRNA) 结合位点, 因此可以像海绵一样与 miRNA 结合, 在转录后水平调节下游靶基因的表达^[5]。现有证据表明, 环状 RNA 在肿瘤中异常表达, 并在肿瘤发展过程中发挥不可或缺或抑制的致癌或抑癌作用。此外, 在体液中检测到环状 RNA 相对稳定的表达, 使该分子成为潜在的肿瘤生物标志物。儿童肾母细胞瘤 (Wilms tumor, WT) 罕见的基因突变率不允许效仿成人肿瘤开发

靶向治疗药物。针对环状 RNA 的异常表达或许是一种潜在的治疗手段。随着高通量测序技术的快速发展, 通过探索 WT 肿瘤组织和正常组织的表达谱, 研究人员已发现越来越多的差异表达环状 RNA。最近的研究表明, 失调的环状 RNA 在 WT 进展中起着关键的调节作用。本综述系统回顾了环状 RNA 在 WT 中的表达模式、生物学功能和临床意义的最新研究进展, 并讨论了当前机制研究的局限性和未来的研究方向。

1 环状 RNA 的研究背景

自从发现环状 RNA 在人体组织中广泛表达以来, 研究人员越来越重视其与疾病的相关性和潜在功能。现有的研究大多集中在肿瘤中的作用, 失调

* 重庆市自然科学基金 (cstc2021jcyj-msxmX0345), 重庆医科大学附属儿童医院临床医学研究一般项目 (NCRC-2019-GP-08) 和重庆市科卫联合医学科研 (2022GDRC009) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15320339257, E-mail: liufeng@hospital.cqmu.edu.cn

收稿日期: 2022-06-25, 接受日期: 2022-07-26

的环状RNA可以作为癌基因或者抑癌基因发挥调控功能。此外,环状RNA的表达水平往往与临床病理特征和预后相关。该分子也稳定存在于血液或唾液中。因此,环状RNA有可能成为肿瘤的非侵入性诊断和预后标志物。这一节简要回顾了环状RNA的主要特征以及其在泛癌中的作用和机制。

1.1 环状RNA的产生、分类和亚细胞定位

环状RNA主要由前mRNA的外显子和/或内含子序列通过“反向剪接”机制产生。该机制将亲本基因序列的5'剪接位点与上游的3'剪接位点连接起来,形成共价闭环。根据组成序列的类型分为3大类:外显子环状RNA、外显子+内含子环状RNA和内含子环状RNA^[6]。迄今发现的绝大多数分子属于外显子环状RNA。环状RNA在细胞核产生,但大多数定位于细胞质中^[7]。

1.2 环状RNA的生物学特征

随着研究的进展,环状RNA的诸多生物学特征已经得到证实。以下是目前公认的重要特征。

a. 多样性,高通量RNA测序和生物信息学分析已经在真核生物中注释了大量环状RNA。最新的circBase和circBank数据库已经注释超10万个人类环状RNA分子^[8]。b. 高丰度,随着高通量测序和生物信息学的发展,研究人员发现环状RNA在真核生物中大量表达^[9]。c. 结构稳定性,环状RNA呈现单链共价闭环结构。因此,这类分子不容易被核糖核酸酶R降解。与具有5'“帽子”和3'聚腺苷酸“尾巴”的线性RNA相比,结构更加稳定^[10]。d. 序列保守,目前表征的大多数环状RNA在不同物种间高度保守。最近的研究表明,在小鼠或大鼠基因组中可以检测到约15 000个人类环状RNA分子^[11]。e. 特异性,大量的文献证明环状RNA的表达具有组织或细胞特异性^[12]。

1.3 环状RNA在肿瘤中的作用机制

诸多研究阐明了环状RNA在肿瘤中发挥主要作用的主要机制,其中大多数研究阐述了miRNA“海绵”功能。环状RNA的功能机制大致可分为4类(图1)。

a. 作为miRNA“海绵”。Hansen等^[13]于2013年首次提出环状RNA可以作为miRNA“海绵”发挥功能调控作用。miRNA是基因表达的重要转录后调节因子,通过与mRNA非翻译区的靶点直接碱基配对诱导转录后基因沉默^[14-15]。环状RNA具有多个miRNA结合位点,能够“结合并封闭”miRNA从而减弱其介导的基因抑制^[13]。例如,

CDR1as含有60多个miR-7结合位点,并与Ago蛋白紧密结合导致miR-7靶基因表达上调^[16]。大多数环状RNA位于细胞质,表明它们在转录后调控中的广泛作用^[17]。

b. 调节mRNA转录。环状RNA能够直接或间接调控基因转录。例如,circEIF3J和circPAIP2与U1 snRNP、Pol II和亲本基因启动子相互作用促进EIF3J和PAIP2的转录^[18]。此外,环状RNA与亲本基因共享相同的“剪接位点库”^[19]。一般情况下,“反向剪接”效率明显低于“线性剪接”。然而,当标准的剪接机制受到抑制时,“反向剪接”效率会以牺牲“线性剪接”效率为代价间接增加。不同剪接机制的平衡被打破有可能导致病理效应^[19]。例如,circYap能与Yap mRNA及翻译起始相关蛋白eIF4G和PABP结合形成四元复合物,通过“干预”eIF4G、PABP与Yap mRNA的相互作用而抑制Yap翻译启动^[20]。

c. 形成蛋白质相互作用复合体。环状RNA除了充当miRNA“海绵”外,还可以充当蛋白“支架”,也称蛋白“诱饵”。例如,circACC1通过与AMPK β 和 γ 亚基结合形成三元复合体来稳定和促进AMPK全酶的活性^[21];circFoxo3与p21和CDK2形成三元复合体来抑制细胞周期的进展^[22]。这种作用方式很容易与miRNA“海绵”混淆。前者强调与蛋白质直接相互作用形成RNA-蛋白复合物发挥功能。后者强调miRNA的竞争性结合引起量变到质变的过程。

d. 翻译。生物信息学分析表明,一些环状RNA具有开放阅读框(open reading frame, ORF)和核糖体结合位点,表明它们具有翻译潜力^[23]。环状RNA的翻译机制可分为内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)依赖性和非依赖性。例如,circSHPRH以IRES依赖的方式翻译成SHPRH-146aa蛋白^[24]。此外,一些环状RNA不依赖IRES编码多肽。例如,YTHDF3是一种m6A阅读蛋白,与具有m6A修饰位点的环状RNA结合,通过m6A修饰促进蛋白质翻译^[25-26]。

1.4 环状RNA作为肿瘤的诊断和预后标志物

环状RNA的高丰度、稳定性及其与肿瘤进展和预后相关的表达特征突出了其作为诊断和预后生物标志物的潜力。与正常组织相比,环状RNA在肿瘤中具有独特的表达模式,可作为组织活检的潜在生物标志物。例如,在结直肠癌中,与癌旁非肿瘤组织相比,circCCDC66在结直肠癌组织中明显

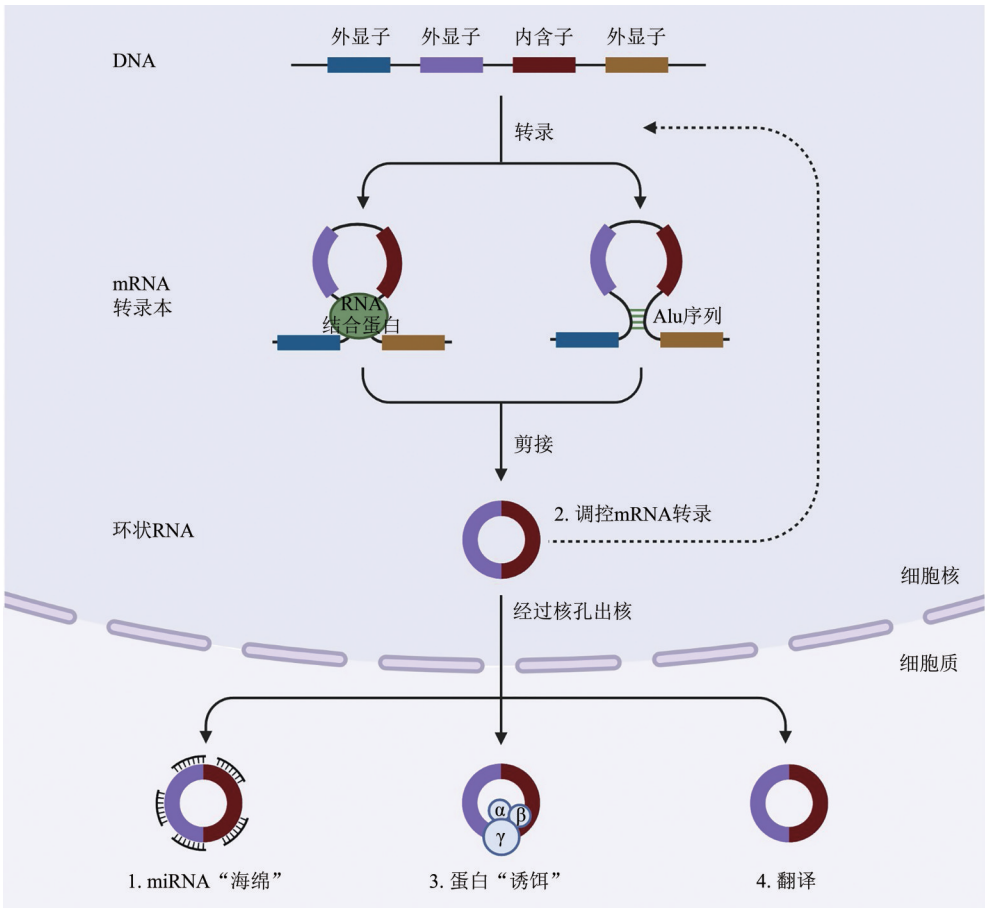


Fig. 1 The main mechanism of circRNA function in tumor cells
图1 环状RNA发挥功能调控作用的主要机制

上调，受试者工作特征曲线（receiver operator characteristic curve, ROC）显示出一定的诊断能力^[27]。除了常见的肿瘤组织，环状RNA还可以在各种体液中检测到，比如血液、唾液和外泌体^[28-30]。例如，通过比较乳腺癌患者和健康献血者血浆中的环状RNA水平发现，circ0001785在乳腺癌中上调，ROC提示其对乳腺癌患者有潜在的诊断价值^[31]。此外，环状RNA也是一种有价值的预后标志物。例如，circPRKCI在肺腺癌组织中表达上调。Kaplan-Meier生存曲线显示，circPRKCI高表达的患者总生存时间更短^[32]。

1.5 环状RNA作为肿瘤治疗的靶点

环状RNA在癌细胞中表达失调，并在肿瘤发展过程中发挥不同的调控作用。纠正这些环状RNA在体内的表达水平是一种潜在的治疗方法。一些环状RNA在癌细胞中表达上调并促进肿瘤进展。目前最常用的沉默这些环状RNA的方法是针对剪接位点的短发夹RNA（shRNA）或小干扰RNA（siRNA）。其他环状RNA在癌细胞中表达下

调并具有抗癌作用。这些环状RNA可以通过质粒或慢病毒进行过表达构造。裸鼠荷瘤模型研究显示（比如使用特异性过表达或者沉默目标环状RNA的稳转细胞用于皮下成瘤模型或者腹腔转移灶模型），沉默或者过表达目标环状RNA能促进或者抑制小鼠肿瘤生长或转移。例如，过表达抑癌环状RNA分子circDIDO1的细胞荷瘤小鼠模型表现出明显更小的肿瘤体积和更少的转移灶^[33]。

此外，小鼠异种移植（patient-derived xenograft, PDX）模型研究表明，特异性针对致癌环状RNA的siRNA或shRNA还能有效抑制人源肿瘤生长^[32]。例如，Zhang等^[34]在PDX小鼠体内注射circNRIP1-siRNA可明显抑制胃癌的生长，特异性靶向circPTK2的shRNA可明显抑制PDX模型中的肿瘤转移^[35]。以上结果表明，环状RNA分子可能是一个很有前景的肿瘤治疗靶点，然而，这些靶点的治疗效果尚未在临床试验中进一步验证。

1.6 环状RNA数据库

尽管高通量测序已经发现了大量具有潜在功能

的环状RNA,但其基本特征和作用机制尚未完全阐明。近年来,越来越多的环状RNA研究工具被

开发出来,为环状RNA的研究提供了极大的便利。表1总结了有代表性的环状RNA数据库。

Table 1 circRNA related database

表1 环状RNA相关数据库

数据库	网址	主要功能	参考文献
circBase	http://www.circbase.org/	提供环状RNA特征注释	[36]
CircBank	http://www.circbank.cn/index.html	提供人类环状RNA特征注释	[8]
circAtlas	http://circatlas.biols.ac.cn/	提供环状RNA特征及功能注释	[37]
CircularRNA Interactome*	https://circinteractome.nia.nih.gov/index.html	引物及siRNA设计, miRNA、RBP靶点预测	[38]
CSCD 2.0*	http://geneyun.net/CSCD2/#	癌症相关环状RNA特征及功能注释	[39]
circMine	http://www.biomedical-web.com/circmine/home	整合环状RNA转录组与人类疾病特征, 支持临床相关性分析	[40]
ENCORI	https://starbase.sysu.edu.cn/	癌症ceRNA互作网络预测	[41]
CircNet 2.0	https://awi.cuhk.edu.cn/~CircNet/php/index.php	癌症ceRNA互作网络预测	[42]
circPrimer2.0*	https://www.bio-inf.cn/	环状RNA结构可视化	[43]
RNAhybrid*	https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid	基于序列预测ceRNA结合潜力, 适用于未被数据库注释的环状RNA分子	[44]
RNA22*	https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/	基于序列预测ceRNA结合潜力, 适用于未被数据库注释的环状RNA分子	[45]

*指该网站支持结果可视化。

2 环状RNA在WT中的作用

随着高通量测序、生物芯片和生物信息学的快速发展,通过探索WT肿瘤和正常组织的表达谱,在WT中发现了越来越多的差异表达环状RNA。新的证据表明,失调的环状RNA与WT生物学行为密切相关,包括细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、细胞周期阻滞和肿瘤生长抑制。在WT中研究的环状RNA主要通过miRNA“海绵”机制调节肿瘤生物学行为。环状RNA也与WT的诸多临床病理特征显著相关,包括肿瘤大小和临床分期。此外,小鼠荷瘤模型研究表明,特异性沉默致癌环状RNA可有效抑制细胞荷瘤的生长。本节简要总结了环状RNA在WT中的表达情况、生物学功能和机制,以及其在WT诊断、预后和靶向治疗中的潜在临床应用。

2.1 环状RNA在WT中的表达

凭借高通量测序技术,已发现数万条环状RNA在WT中特异性表达,可能具有潜在的功能。Zhou等^[46]通过深度测序发现circCDYL在WT组织中明显下调。Cao等^[47]用3对配对的WT瘤组织和癌旁正常组织进行环状RNA芯片筛选,分别鉴定出20个显著上调和下调的环状RNA。随后,作者进一步检测了前5个上调环状RNA在10个配对

WT肿瘤组织中的表达水平,其中circ0093740在所有配对肿瘤组织中均明显上调。此外,与肾胚胎细胞系293T相比, circ0093740在WT细胞系G401和SK-NEP-1中高表达。遗憾的是,上述测序结果的完整表达谱尚未公开。

为了进一步描述WT组织中环状RNA的完整表达谱,本课题组前期利用4对配对的临床WT样本进行环状RNA深度测序^[48]。测序前使用RNase R酶消化去处线性转录本然后进行环状RNA测序建立文库。在8个测序样品中,每个样品的测序产率均大于11 Gb,深度为30 M或以上。因此,认为所有样本的测序质量和结果都符合标准。最终鉴定的23 978 343条环状RNA与已知的数据库circBase (<http://www.circbase.org/>) 进行比较,有10 884条环状RNA已获得注释。根据序列来源,大多数(84.18%)是外显子,11.72%是内含子,4.10%定位于基因间区域。根据默认筛选参数($|\log_2FC|>1$ 和 $P<0.05$),共鉴定出1 755个差异表达的环状RNA,其中749个上调,1 006个下调。在此,总结了排名靠前的差异表达环状RNA的基本特征(表2)。差异环状RNA的GO注释显示,亲本基因位于细胞质和外泌体,参与细胞分裂、细胞增殖和细胞周期等过程。

Table 2 Basic characteristics of 19 differently expressed circRNAs in Wilms tumor
表2 WT中19个差异表达环状RNA的基本特征

名称	位点	成环 方向	基因组长 度/bp	剪接长 度/bp	亲本基因ID	基因符号	表达 趋势
circZNF208	chr19: 21974729-21988909	-	14 181	302	ENSG00000160321	ZNF208	下调
circ_0006549	chr8: 124392768-124392917	-	149	149	ENSG00000156802	ATAD2	上调
circEYA1	chr8: 71244603-71271897	-	27 295	314	ENSG00000104313	EYA1	上调
circ_0009035	chr12: 49991998-49992655	-	658	375	ENSG00000161800	RACGAP1	上调
circPKHD1	chr6: 52010309-52035721	-	25 413	638	ENSG00000170927	PKHD1	下调
circNPNT	chr4: 105911149-105911732	+	584	584	ENSG00000168743	NPNT	下调
circ_0002563	chr1: 44757556-44758140	+	585	247	ENSG00000142945	KIF2C	上调
circ_0005620	chr10: 103622470-103661114	-	38 646	4 865	ENSG00000107957	SH3PXD2A	下调
circ_0085465	chr8: 123337625-123339446	-	1 822	333	ENSG00000156802	ATAD2	上调
circ_0008122	chr19: 23134080-23136043	+	1 964	223	ENSG00000183850	ZNF730	上调
circ_0001900	chr9: 135881633-135883078	-	1 446	425	ENSG00000130559	CAMSAP1	上调
circ_0001495	chr5: 69174877-69175537	+	661	378	ENSG00000134057	CCNB1	上调
circ_0044833	chr17: 59197544-59197789	+	246	157	ENSG00000068489	PRR11	上调
circ_0006151	chr10: 68468123-68470163	-	2 041	367	ENSG00000138346	DNA2	上调
circ_0004425	chr9: 100498765-100516771	+	18 007	364	ENSG00000241697	TMEFF1	上调
circ_0072391	chr5: 43295752-43297166	-	1 415	331	ENSG00000112972	HMGCS1	下调
circ_0006357	chr7: 148846470-148847305	-	836	253	ENSG00000106462	EZH2	上调
circ_0005015	chr8: 121628714-121629340	-	627	627	ENSG00000170961	HAS2	上调
circ_0001821	chr8: 127890589-127890998	+	410	410	ENSG00000249859	PVT1	上调

测序结果存储在NCBI-GEO数据库中, 支持公开获取, 网址<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE197046>。

2.2 环状RNA通过ceRNA机制调控WT进展

2.2.1 ceRNA机制及WT中潜在的circRNA-miRNA-mRNA网络

ceRNA假说是Salmena等在2011年正式提出的一种以前未知的基因表达调控模式^[49]。该假说认为, miRNA可通过与靶基因结合而影响靶mRNA的稳定性或在转录后水平促进降解(图2a)。在miRNA和mRNA结合的机制中, 有一个概念叫做miRNA应答元件(microRNA response elements, MREs)。正是由于mRNA上存在相关的MREs才能与miRNA结合。随着转录组研究的深入, 研究人员发现MREs不仅存在于mRNA上也存在于环状RNA上^[5]。具有相同MREs的RNA分子可以竞争性结合miRNA。因此, 高丰度的环状RNA可作为miRNA“海绵”, 阻止或抑制miRNA与靶基因结合。近年来, 越来越多的证据表明环状RNA通过ceRNA机制调节WT的进展(图2b)。例如WT中的circSLC7A6/miR-107/ABL2轴^[50]、circCDYL/miR-145-5p/TJP1轴^[46]、circ0093740/miR136/145-DNMT3A轴^[47]或circEYA1/miR-619-5p/TP53轴^[48]。值得注意的是, 单个环状RNA可

能含有多种miRNA结合位点。例如circ0093740可以分别结合miR136和miR145^[47]。因此, 针对环状RNA比针对单个miRNA或基因具有更大的治疗优势。通过全面分析WT组织中环状RNA、miRNA和mRNA表达谱, Tian等^[48]在WT中构建了一个以环状RNA为中心的调控网络。网络中的关键基因显示出明显的预后相关性, 但网络中环状RNA分子的生物学功能仍需要进一步验证。

2.2.2 环状RNA的ceRNA机制在WT中的生物学功能

环状RNA的ceRNA机制在WT中的研究越来越多。最新的文献表明, 失调的环状RNA在WT发展过程中发挥肿瘤抑制或致癌作用, 从而影响许多细胞生物学功能, 如维持细胞增殖、促进迁移和侵袭、诱导细胞周期阻滞等(图2b)。例如, circSLC7A6、circ0093740和circEYA1在肿瘤组织中表达上调, 通过miRNA“海绵”机制发挥致癌作用, 而circCDYL在肿瘤组织中表达下调, 通过miR-145-5p/TJP1轴抑制WT细胞在体外和体内的进展。表3总结了参与调控WT细胞生物学过程的环状RNA。与miRNA和lncRNA(long non-coding

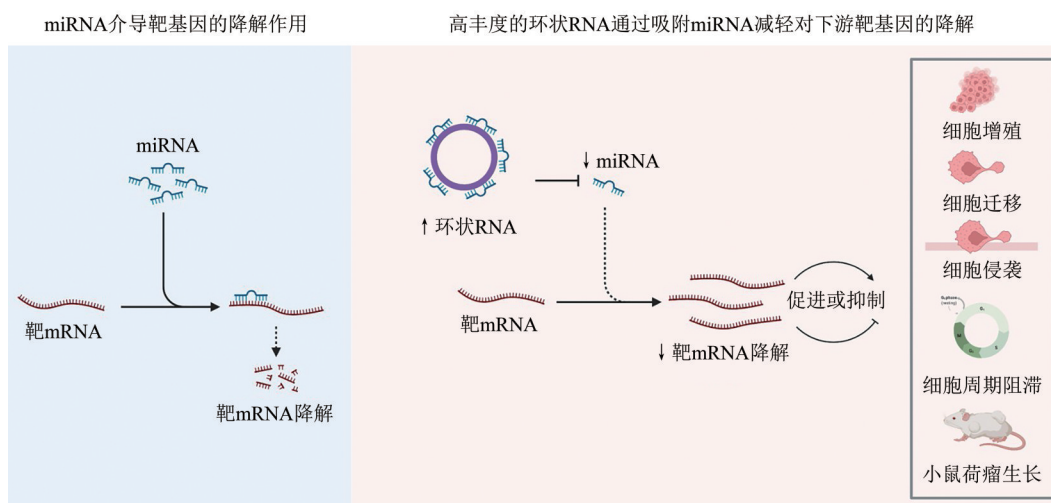


Fig. 2 circRNAs act as miRNA sponges to participate in Wilms tumor progression

图2 环状RNA通过“海绵”miRNA (ceRNA机制) 调控WT进展

RNA, 长非编码RNA) 相比, 关于环状RNA的研究较少。对参与调控WT进展的miRNA和lncRNA

的全面回顾可参考文献 [51-52]。

Table 3 circRNA regulated the malignant biological behavior through a competitive endogenous RNA (ceRNA) mechanism in Wilms tumor

表3 WT中环状RNA通过ceRNA机制调控恶性生物学行为

环状RNA	表达	海绵基因	细胞系	功能	模型	参考文献
circSLC7A6	上调	miR-107/ABL2	HFWT、WiT49和17-94	促进细胞增殖、迁移、侵袭和抵抗凋亡	体外细胞实验、6周BALB/c裸鼠	[50]
circCDYL	下调	miR-145-5p/TJP1	SK-NEP-1和G401	抑制细胞增殖、迁移、侵袭和细胞周期阻滞	体外细胞实验、4周BALB/c裸鼠	[46]
circ0093740	上调	miR136/145/DNMT3A	SK-NEP-1和G401	促进细胞增殖、迁移和侵袭	体外细胞实验、4周BALB/c裸鼠	[47]
circ0017247	-	miR-145	-	转移	-	[53]
circEYA1	上调	miR-619-5p/TP53	WT-CLS1	促进细胞增殖、迁移、侵袭、细胞周期阻滞	体外细胞实验	[48]

2.3 环状RNA作为WT潜在的诊断和预后标志物

细胞内环状RNA的丰度受到其生物发生和降解之间的平衡调控, 然而确切的机制仍不清楚^[6]。此外, 有研究报道环状RNA可通过外泌体途径分泌到细胞外液中^[54]。凭借环状RNA高稳定性、高丰度和高度保守的独有特征, 疾病相关的环状RNA是很有潜力的生物标志物。随着测序技术和生物技术的不断发展, 在人类唾液、胃液、血浆等人体成分中也发现了高丰度的环状RNA, 可用于液体活检^[55-56]。一些环状RNA还被证明具有单独或与已知的癌症标志物协同预后价值^[57]。在缺乏传统生物标记物的WT中, 环状RNA可能具有潜

在的应用价值。在WT中, circSLC7A6在肿瘤组织和细胞系中表达上调^[50]。对其他肿瘤的研究表明, circSLC7A6在结直肠癌组织中表达上调, 并与较高的总生存率相关^[58]。circSLC7A6在非小细胞肺癌组织中表达下调并与较大的肿瘤体积、淋巴结转移、晚期临床分期和不良预后密切相关^[59]。Zhou等^[46]通过测序分析发现circCDYL (hsa_circ_0008285)在WT组织中表达下调。随后用qPCR检测25例WT组织及其癌旁正常组织中circCDYL的表达。结果与测序数据呈现一致的趋势, 并且circCDYL的高表达与较小的肿瘤体积、肿瘤直径和低临床分期有关, 提示该分子与WT的生长有

关。该环状RNA分子在其他肿瘤中研究非常广泛。在结直肠癌中, 该分子表达下调, 其低表达水平与肿瘤大小、淋巴结转移和高TNM分期有关^[60]; 在乳腺癌中, circCDYL在肿瘤组织和血清中的高表达与高肿瘤负荷、短生存期和临床反应较差有关^[61]; circCDYL在套细胞淋巴瘤患者血浆中高表达, ROC曲线显示其具有诊断价值^[62]; circCDYL在三阴性乳腺癌组织和细胞中低表达, 其表达水平与患者生存率呈正相关^[63]; circCDYL与非肌肉浸润性膀胱癌患者的无进展生成期相关^[64]。尽管有报道称WT中的环状RNA具有诊断潜力, 但由于标本数量有限, 环状RNA检测的重复性和特异性尚未在较大的研究中得到证实。此外, 还没有关于环状RNA与WT预后相关性的报道。

2.4 环状RNA作为WT潜在的治疗靶点

作为非编码RNA, 环状RNA不同于传统的小分子药物。环状RNA的质量为数千道尔顿并携带多种负电荷, 因此具有良好的组织相容性。与大分子抗体药物相比, 更容易穿透组织屏障进入肿瘤细胞。由于这些原因, 环状RNA和其他非编码RNA具有明显的治疗优势^[65]。另外, 由于环状RNA的稳定性和长半衰期, 诱导癌细胞中致癌环状RNA分子的表达可能具有良好的抗癌作用。根据前述结果, circSLC7A6、circ0093740和circEYA1参与调控WT细胞的恶性进展, 沉默这些环状RNA分子在体内和体外产生了相反的作用。胃癌、膀胱癌和前列腺癌中的PDX小鼠模型研究表明, 靶向致癌环状RNA的siRNA或shRNA能有效抑制肿瘤生长和转移^[34, 66-67]。遗憾的是, WT中的体内研究依赖裸鼠的细胞模型, 这限制了环状RNA的治疗说服力。鉴于环状RNA在WT进展过程中的重要作用, 相信环状RNA将来作为WT新治疗靶点的巨大潜力。

3 目前研究局限性

尽管目前的研究揭示了环状RNA在WT进展中的功能, 并提示这些分子在肿瘤治疗中的潜在作用。然而, 与其他非编码RNA相比, 这些分子的研究刚刚触及表面。首先, 尽管miRNA“海绵”被认为是环状RNA发挥功能的常见机制, 但目前的研究似乎过度“依赖”。研究者应深入研究环状RNA的上游机制以及其他下游机制, 如lncRNA“海绵”、蛋白“支架”、编码能力、甲基化修饰等。其中一些RNA结合蛋白(RNA binding

proteins, RBPs)也被认为可以调节环状RNA的生物发生^[19, 68]。其次, 在阐明“海绵”机制时应考虑环状RNA的表达丰度。低丰度环状RNA即使含有丰富的miRNA结合位点, 其“海绵”吸附效率也会很低。此外, 目前对WT中环状RNA的功能探索仅限于传统的细胞表型。事实上, 大量研究已经阐述了环状RNA在肿瘤免疫微环境中的作用^[69]。例如, circMET通过miR-30-5p/snail/DPP4轴驱动肝癌免疫抑制和抗PD1治疗耐药^[70], circ0020710通过调节黑色素瘤中miR-370-3p/CXCL12轴驱动肿瘤进展和免疫逃逸^[71]。因此, 进一步探索环状RNA在WT免疫微环境中的作用, 并通过靶向环状RNA调节免疫应答可能是未来免疫治疗很有前景的方向。值得注意的是, 最近一项全外显子测序研究揭示WT中新易感基因^[72], 如TRIM28、FBXW7、NYNRIN和KDM3B, 探索环状RNA与经典分子如WT1和TP53以及这些关键基因之间的相互作用将是一项有意义的工作。最后, 目前关于环状RNA在WT中表达的研究主要利用肿瘤组织和肿瘤细胞, 在血液、体液和外泌体等方面还缺乏研究。有必要进一步研究环状RNA作为WT的诊断标志物和预后标志物。总之, 环状RNA在临床实践中的应用还需要更全面和深入的研究。

4 总结与展望

近年来, 许多研究证实环状RNA参与WT进展的诸多生物学过程, 如细胞增殖、迁移、侵袭、周期阻滞和凋亡等。利用外周血环状RNA的检测便利性, 该分子可能成为具有临床应用潜力的理想标志物。但现有研究局限于ceRNA功能, 而临床和体内研究较少。应进一步深入研究环状RNA在WT中的潜在机制和临床意义。最近兴起的新的测序方法——单细胞测序, 可以探索特定细胞类型中感兴趣的基因表达模式, 另一种有前途的技术——空间转录组测序, 可以表征高纬度空间中感兴趣的基因或蛋白质。期待这些技术在将来被应用于环状RNA的精准分析。

参 考 文 献

- [1] Guttman M, Amit I, Garber M, *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 2009, **458**(7235): 223-227
- [2] Anastasiadou E, Jacob L, Slack F. Non-coding RNA networks in

- cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018, **18**(1): 5-18
- [3] Hansen T, Jensen T, Clausen B, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, **495**(7441): 384-388
- [4] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, **495**(7441): 333-338
- [5] Zhong Y, Du Y, Yang X, *et al.* Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression. *Mol Cancer*, 2018, **17**(1): 79
- [6] Li J, Sun D, Pu W, *et al.* Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance. *Trends Cancer*, 2020, **6**(4): 319-336
- [7] Salzman J, Gawad C, Wang P, *et al.* Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e30733
- [8] Liu M, Wang Q, Shen J, *et al.* Circbank: a comprehensive database for circRNA with standard nomenclature. *RNA Biol*, 2019, **16**(7): 899-905
- [9] Wang Y, Mo Y, Gong Z, *et al.* Circular RNAs in human cancer. *Mol Cancer*, 2017, **16**(1): 25
- [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] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, *et al.* Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol Cell*, 2015, **58**(5): 870-885
- [12] Salzman J, Chen R E, Olsen M N, *et al.* Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet*, 2013, **9**(9): e1003777
- [13] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, **495**(7441): 384-388
- [14] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, **438**(7068): 685-689
- [15] Luo X, Dong J, He X, *et al.* MiR-155-5p exerts tumor-suppressing functions in Wilms tumor by targeting IGF2 *via* the PI3K signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 2020, **125**: 109880
- [16] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, **495**(7441): 333-338
- [17] Barrett S P, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development*, 2016, **143**(11): 1838-1847
- [18] Li Z, Huang C, Bao C, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, **22**(3): 256-264
- [19] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti N, *et al.* circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2014, **56**(1): 55-66
- [20] Wu N, Yuan Z, Du K, *et al.* Translation of yes-associated protein (YAP) was antagonized by its circular RNA *via* suppressing the assembly of the translation initiation machinery. *Cell Death Differ*, 2019, **26**(12): 2758-2773
- [21] Li Q, Wang Y, Wu S, *et al.* CircACC1 regulates assembly and activation of AMPK complex under metabolic stress. *Cell Metab*, 2019, **30**(1): 157-173.e7
- [22] Du W, Yang W, Liu E, *et al.* Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression *via* forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(6): 2846-2858
- [23] Pamudurti N, Bartok O, Jens M, *et al.* Translation of CircRNAs. *Mol Cell*, 2017, **66**(1): 9-21.e7
- [24] Zhang M, Huang N, Yang X, *et al.* A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene*, 2018, **37**(13): 1805-1814
- [25] Di Timoteo G, Dattilo D, Centrón-Broco A, *et al.* Modulation of circRNA metabolism by m6A modification. *Cell Rep*, 2020, **31**(6): 107641
- [26] Yang Y, Fan X, Mao M, *et al.* Extensive translation of circular RNAs driven by N-methyladenosine. *Cell Res*, 2017, **27**(5): 626-641
- [27] Hsiao K, Lin Y, Gupta S, *et al.* Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res*, 2017, **77**(9): 2339-2350
- [28] Li Y, Zheng Q, Bao C, *et al.* Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res*, 2015, **25**(8): 981-984
- [29] Bahn J, Zhang Q, Li F, *et al.* The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem*, 2015, **61**(1): 221-230
- [30] Vo J, Cieslik M, Zhang Y, *et al.* The landscape of circular RNA in cancer. *Cell*, 2019, **176**(4): 869-881.e13
- [31] Yin W, Yan M, Fang X, *et al.* Circulating circular RNA hsa_circ_0001785 acts as a diagnostic biomarker for breast cancer detection. *Clin Chim Acta*, 2018, **487**: 363-368
- [32] Qiu M, Xia W, Chen R, *et al.* The circular RNA circPRKCI promotes tumor growth in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2018, **78**(11): 2839-2851
- [33] Zhang Y, Jiang J, Zhang J, *et al.* CircDIDO1 inhibits gastric cancer progression by encoding a novel DIDO1-529aa protein and regulating PRDX2 protein stability. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 101
- [34] Zhang X, Wang S, Wang H, *et al.* Circular RNA circNRIP1 acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression *via* the AKT1/mTOR pathway. *Mol Cancer*, 2019, **18**(1): 20
- [35] Yang H, Li X, Meng Q, *et al.* CircPTK2 (hsa_circ_0005273) as a novel therapeutic target for metastatic colorectal cancer. *Mol Cancer*, 2020, **19**(1): 13
- [36] Maass P, Glažar P, Memczak S, *et al.* A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues. *J Mol Med*, 2017, **95**(11): 1179-1189
- [37] Wu W, Ji P, Zhao F. CircAtlas: an integrated resource of one million highly accurate circular RNAs from 1070 vertebrate transcriptomes. *Genome Biol*, 2020, **21**(1): 101
- [38] Dudekula D, Panda A, Grammatikakis I, *et al.* CircInteractome: a web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biol*, 2016, **13**(1): 34-42
- [39] Xia S, Feng J, Chen K, *et al.* CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**: D925-D929

- [40] Zhang W, Liu Y, Min Z, *et al.* circMine: a comprehensive database to integrate, analyze and visualize human disease-related circRNA transcriptome. *Nucleic Acids Res*, 2022, **50**: D83-D92
- [41] Li J, Liu S, Zhou H, *et al.* starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**: D92-7
- [42] Liu Y, Li J, Sun C, *et al.* CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**: D209-D215
- [43] Zhong S, Feng J. CircPrimer 2.0: a software for annotating circRNAs and predicting translation potential of circRNAs. *BMC Bioinformatics*, 2022, **23**(1): 215
- [44] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, *et al.* Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 2004, **10**(10): 1507-1517
- [45] Miranda K, Huynh T, Tay Y, *et al.* A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, 2006, **126**(6): 1203-1217
- [46] Zhou R, Jia W, Gao X, *et al.* CircCDYL acts as a tumor suppressor in Wilms' tumor by targeting miR-145-5p. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 668947
- [47] Cao J, Huang Z, Ou S, *et al.* circ0093740 Promotes tumor growth and metastasis by sponging miR-136/145 and upregulating DNMT3A in Wilms tumor. *Front Oncol*, 2021, **11**: 647352
- [48] Tian X, Xiang B, Zhang Z, *et al.* The regulatory network and role of the circRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in the progression and the immune response of Wilms tumor based on RNA-Seq. *Front Genet*, 2022, **13**: 849941
- [49] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, *et al.* A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *Cell*, 2011, **146**(3): 353-358
- [50] Xu J, Hao Y, Gao X, *et al.* CircSLC7A6 promotes the progression of Wilms' tumor via microRNA-107/ABL proto-oncogene 2 axis. *Bioengineered*, 2022, **13**(1): 308-318
- [51] De Sá Pereira B, Montalvão De Azevedo R, Da Silva Guerra J, *et al.* Non-coding RNAs in Wilms' tumor: biological function, mechanism, and clinical implications. *J Mol Med*, 2021, **99**(8): 1043-1055
- [52] Liu Q. The emerging landscape of long non-coding RNAs in Wilms tumor. *Front Oncol*, 2021, **11**: 780925
- [53] Du A. Circ_0017247 induces Wilms' tumor metastasis through targeting miR-145. *Minerva Med*, 2021, **112**(6): 826-828
- [54] Dai J, Su Y, Zhong S, *et al.* Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct Tar*, 2020, **5**(1): 145
- [55] Beilerli A, Gareev I, Beylerli O, *et al.* Circular RNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2022, **83**: 242-252
- [56] Wang S, Zhang K, Tan S, *et al.* Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 13
- [57] Weng W, Wei Q, Toden S, *et al.* Circular RNA ciRS-7-A promising prognostic biomarker and a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2017, **23**(14): 3918-3928
- [58] Gu C, Lu H, Qian Z. Matrine reduces the secretion of exosomal circSLC7A6 from cancer-associated fibroblast to inhibit tumorigenesis of colorectal cancer by regulating CXCR5. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **527**(3): 638-645
- [59] Wang Y, Zheng F, Wang Z, *et al.* Circular RNA circ-SLC7A6 acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer through abundantly sponging miR-21. *Cell Cycle*, 2020, **19**(17): 2235-2246
- [60] Wang J, Luo J, Liu G, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0008285 inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration via the miR-382-5p/PTEN axis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **527**(2): 503-510
- [61] Liang G, Ling Y, Mehrpour M, *et al.* Autophagy-associated circRNA circCDYL augments autophagy and promotes breast cancer progression. *Mol Cancer*, 2020, **19**(1): 65
- [62] Mei M, Wang Y, Wang Q, *et al.* CircCDYL serves as a new biomarker in mantle cell lymphoma and promotes cell proliferation. *Cancer Manag Res*, 2019, **11**: 10215-10221
- [63] Wang S, Liu F, Ma H, *et al.* circCDYL acts as a tumor suppressor in triple negative breast cancer by sponging miR-190a-3p and upregulating TP53INP1. *Clin Breast Cancer*, 2020, **20**(5): 422-430
- [64] Okholm T L H, Nielsen M M, Hamilton M P, *et al.* Circular RNA expression is abundant and correlated to aggressiveness in early-stage bladder cancer. *NPJ Genom Med*, 2017, **2**: 36
- [65] He A, Liu J, Li F, *et al.* Targeting circular RNAs as a therapeutic approach: current strategies and challenges. *Signal Transduct Tar*, 2021, **6**(1): 185
- [66] Zhang H, Xiao X, Wei W, *et al.* CircLIFR synergizes with MSH2 to attenuate chemoresistance via MutSa/ATM-p73 axis in bladder cancer. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 70
- [67] Ding T, Zhu Y, Jin H, *et al.* Circular RNA circ_0057558 controls prostate cancer cell proliferation through regulating miR-206/USP33/c-Myc axis. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 644397
- [68] Conn S, Pillman K, Toubia J, *et al.* The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*, 2015, **160**(6): 1125-1134
- [69] Zhang Q, Wang W, Zhou Q, *et al.* Roles of circRNAs in the tumour microenvironment. *Mol Cancer*, 2020, **19**(1): 14
- [70] Huang X, Zhang P, Wei C, *et al.* Circular RNA circMET drives immunosuppression and anti-PD1 therapy resistance in hepatocellular carcinoma via the miR-30-5p/snail/DPP4 axis. *Mol Cancer*, 2020, **19**(1): 92
- [71] Wei C, Zhu M, Lu N, *et al.* Circular RNA circ_0020710 drives tumor progression and immune evasion by regulating the miR-370-3p/CXCL12 axis in melanoma. *Mol Cancer*, 2020, **19**(1): 84
- [72] Mahamdallie S, Yost S, Poyastro-Pearson E, *et al.* Identification of new Wilms tumour predisposition genes: an exome sequencing study. *Lancet Child Adolesc*, 2019, **3**(5): 322-331

Expression Profiles, Biological Functions and Clinical Significance of circRNAs in Pediatric Wilms Tumor*

TIAN Xiao-Mao, XIANG Bin, LIU Feng**, WEI Guang-Hui

(Department of Urology, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Children Urogenital Development and Tissue Engineering, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract Wilms tumor (WT) is the most common renal malignant tumor in children. The traditional clinical hierarchical diagnosis and treatment scheme cannot achieve the clinical goal of guiding precise risk stratification, especially in patients without high-risk factors. For example, patients with the same clinical phenotype and receiving the same treatment may have significant differences in prognosis, indicating that the disease is much more complex than previously recognized. This individual heterogeneity requires more in-depth molecular phenotypic studies to determine new markers and targets. Circular RNA (circRNA) is a newly discovered non-coding RNA. A large number of studies have reported that dysregulated circRNA mainly plays the role of miRNA sponges to regulate multiple phenotypes of cancer cells, including proliferation, invasion, migration, cycle arrest, and chemotherapy resistance. This molecule may also become a promising marker and target for cancer diagnosis and treatment. Compared with adult cancers, the study of circRNA in WT is still in its infancy. Based on the existing literature, this paper systematically reviewed the latest progress in the expression pattern, biological function, and clinical value of circRNA in WT, and discussed the limitations of current research and future directions.

Key words Wilms tumor, nephroblastoma, circRNA, ceRNA

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0301

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2021jcyj-msxmX0345), General Project of Clinical Medicine Research of Children's Hospital of Chongqing Medical University (NCRC-2019-GP-08), and Chongqing Science and Health Joint Medical Research Project (2022GDRC009).

** Corresponding author.

Tel: 86-15320339257, E-mail: liufeng@hospital.cqmu.edu.cn

Received: June 25, 2022 Accepted: July 26, 2022