

环状 RNA: 新型生物标记物与治疗靶点

赵明 谢浩 胡志迪 汪嘉诚 丁先锋*

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘要 环状 RNA(circular RNAs, circRNAs)是一类在真核细胞中广泛存在的非编码 RNA, 具有结构稳定、丰度高及细胞或组织特异性表达等特征, 可能通过多种作用方式参与基因表达调控. 例如, 有些 circRNA 富含微小 RNA(miRNAs)结合位点, 可充当竞争性内源 RNA(ceRNA)结合 miRNA 并阻断其对靶基因表达的抑制作用. 自 2013 年以来, circRNA 逐渐成为 RNA 领域的研究热点并得到广泛关注. 最新研究表明, circRNA 的表达及作用与多种疾病的发生发展、生物组织发育及细胞衰老等相关. circRNA 在不同生物样本中的表达差异使其可能成为用于疾病诊断、组织发育鉴定等方面理想的生物标记物, 其在疾病中作用方式的逐步阐明, 使之具有成为有效治疗靶点的潜力. circRNA 数据库的构建、预测工具的开发及对其作用方式的更深入研究, 必将使之具有更广阔的应用前景.

关键词 环状 RNA, 竞争性内源 RNA, 微小 RNA, 基因表达调控

学科分类号 Q522

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0037

人类基因组计划产生的大量数据显示, 人体中具有编码蛋白质功能的基因仅占总基因组序列的约 1%^[1], 其余的序列转录产物均为不具有蛋白质编码功能的 RNA, 经典中心法则中对 RNA 的定义正逐渐被完善. 近年来, 非编码 RNA (non-coding RNAs, ncRNAs)已成为分子生物学领域的研究热点. 其中, 研究已较为成熟的微小 RNA (microRNAs, miRNAs)^[2]及尚处于初期阶段的长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs)^[3], 已向人类揭示了 ncRNA 调控基因表达的多种作用机制, 其中一些已成为临床中使用的生物标记物或治疗靶点.

环状 RNA (circular RNAs, circRNAs)是一类由前体 RNA 可变剪接产生, 一般由 1 个以上外显子构成的环形非编码 RNA^[4]. circRNA 最早于 1976 年在仙台病毒(Sendai virus)中被发现^[5], 1980 年, Arnberg 等^[6]在酵母线粒体中检测出了 circRNA, 并在 1993 年首次于人体细胞中被观察到^[7]. 此后的很长一段时间, 人们对于 circRNA 的研究基本基于 RNA 病毒^[8-9], 在真核细胞中的研究并未引起太多关注. 随着转录组学基因测序技术的发展, 近年来的研究表明, circRNA 在动物细胞、植物细胞^[10]、

原生动物^[11]、真菌及古生菌^[12]中均有大量表达, 可能是真核生物基因表达程序进化过程中古老且保守的一部分^[13]. 研究表明, 数以百计的人类基因可能与 circRNA 的表达相关^[14]. Jeck 等^[4]在人类成纤维细胞中检测出超过 25 000 种 circRNA; Memczak 等^[15]从 RNA 测序数据中鉴定出 1 950 种人类 circRNA、1 903 种小鼠 circRNA 及 724 种线虫 circRNA; Guo 等^[16]则通过 RNA 测序检测出 7 112 种人类 circRNA 及 635 种小鼠 circRNA, 二者中 20%的 circRNA 为直系同源关系.

进一步的研究提示, circRNA 在真核细胞中不仅大量存在, 对于基因表达也发挥着重要的调控作用. 例如, CDR1as 及 SRY 为两种天然、高效且稳定的 miRNA 分子“海绵”, 可充当竞争性内源 RNA(ceRNA)结合 miRNA 并阻断其对靶基因表达的抑制作用^[17]. 由于 circRNA 具有重要的生物学功能, 同种 circRNA 在不同生物组织样本中的表达量存在显著差异, 包括人类病理样本及组织发育样

* 通讯联系人.

Tel: 0571-86843516, E-mail: xfding@zstu.edu.cn

收稿日期: 2016-02-04, 接受日期: 2016-05-31

本等. 基于其表达差异与作用机制, circRNA 将可能成为新一代的生物标记物或治疗靶点, 应用于包括人类疾病诊断、治疗、组织发育鉴定等各方面的研究.

1 circRNA 的产生机制

选择性剪接是 RNA 转录后加工的关键步骤, 也是基因表达系统产生成熟 RNA 的前提, circRNA 即是在此过程中与线性 RNA、套锁内含子(lariat intron)、Y 结构内含子(Y-structure intron)同时产生^[18]. Jeck 等^[4]的研究首次提出并详细描述了 circRNA 的产生机制. 其中, 套索驱动的内化

(lariat-driven circularization)与外显子跳读(exon skipping)有关, 外显子组成的剪接供体(splice donor)与剪接受体(splice acceptor)共价结合, 形成环状结构; 内含子配对驱动的内化(intron-pairing-driven circularization)主要通过 ALU 序列互补, 使 2 个内含子自身环化形成环状结构. 之后, 剪接体(spliceosome)切除两种环状模型中剩余的内含子, circRNA 由此形成. 在核区形成后, circRNA 可经核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)运输至细胞质并在其中稳定存在, 特别地, 外显子 circRNA 与内含子 circRNA 分别具有脱支酶与 RNA 外切酶抗性(图 1)^[19].

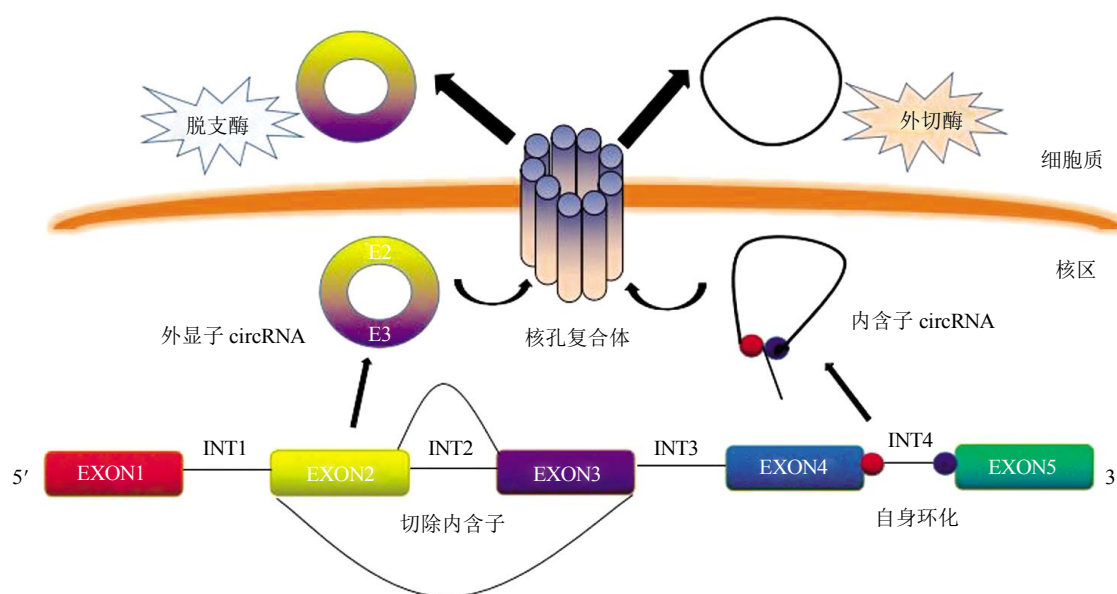


Fig. 1 Possible mechanisms for formation of circRNA^[19]

图 1 circRNA 的产生机制^[19]

外显子 circRNA: 由套索驱动的内化形成, 可经核孔复合体运输至胞质, 具脱支酶抗性; 内含子 circRNA: 由内含子配对驱动的内化形成, 可经核孔复合体运输细胞质, 具 RNA 外切酶抗性.

circRNA 形成的具体机制尚未得到实验验证, 更多的研究表明, circRNA 的产生可能是一种比较复杂的机制, 受到多种因素的共同影响. Zhang 等^[20]发现, circRNA 的加工存在“可变环化(alternative circularization)”现象, 即 ALU 重复序列的不同配对方式, 将导致同一个基因产生多种 circRNA. Ashwal-Fluss 等^[21]的研究表明, circRNA 两侧包含剪接因子 *muscleblind* (MBL/MBNL1) 结合位点, 可与 MBL 紧密结合, MBL 的突变会明显影响 circRNA 的生物合成. 此外, circRNA 的产生过程

与前体 mRNA 的剪接存在竞争现象, 将影响线性 RNA 的产生. 研究提示, 内含子重复序列在 circRNA 产生中可能扮演多重角色, 部分内含子形成的二级结构反而抑制 circRNA 的产生^[22]. Barrett 等^[23]的研究证实, circRNA 可由含有外显子的套索前体剪接产生, 且外显子长度会影响 RNA 环化, 剪接过程中不产生内含子二级结构.

2 circRNA 的作用机制

目前, 关于 circRNA 的作用机制, 研究最为

成熟的是其作为 miRNA 分子“海绵”发挥的作用。小脑退化相关蛋白 1 反义转录物(antisense to the cerebellar degeneration-related protein1 transcript, CDR1as)由 Hansen 等^[24]于 2011 年首次发现, 其含有 74 个 miR-7 的 miRNA 应答元件(miRNA response element, MRE), 可通过“吸附”作用充当 miRNA 的抑制剂, 其负调控作用明显强于线性 RNA 分子“海绵”。另有研究发现, 在斑马鱼胚胎中, 注入含有 CDR1as 序列的质粒产生与药物敲低 miR-7 相同的影响, 即胚胎脑容量减少。再次注入 miR-7 前体, 其脑容量均可得以恢复^[25]。此研究进一步证实, CDR1as 具有较强的 miR-7 分子“海绵”作用。SRY 基因相关的睾丸特异性 circRNA 是另一种具有代表性的 miRNA 分子“海绵”, 包

含 16 个 miR-138 的 MRE, 可反向调控其表达水平^[26]。

此外, circRNA 还被发现可能具有影响 RNA 聚合酶延长并调控基因转录、与 RNA 结合蛋白相互作用调控翻译过程的作用^[26]。特别地, 不同于绝对意义上的 ncRNA, circRNA 还可能参与蛋白质翻译, 此已被发现在人类骨肉瘤细胞中进行低效率翻译^[16]。然而, Abe 等^[27]研究发现, circRNA 可通过滚环扩增机制在细胞外 *E. coli* 翻译系统中被大量翻译, 这提示含有外显子的 circRNA 在人类细胞中的翻译频率可能远远高于之前的预测。以上结论尚需研究验证, 但基本可以说明 circRNA 具有除 miRNA 分子“海绵”外更多的生物学功能(图 2)。

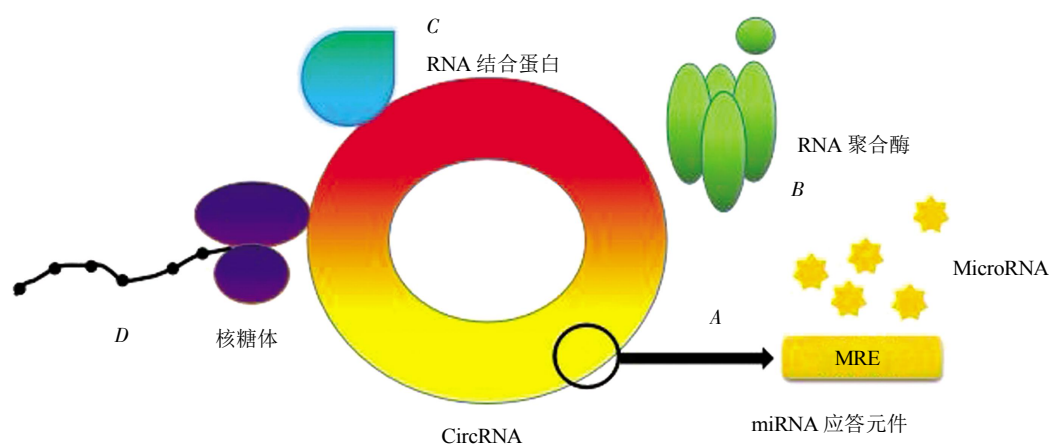


Fig. 2 Possible action mechanisms of circRNA

图 2 circRNA 的作用机制

A: miRNA 分子“海绵”作用; B: 影响 RNA 聚合酶延长并调控基因转录; C: 与 RNA 结合蛋白相互作用调控翻译过程; D: 在核糖体中被翻译为蛋白质。

3 circRNA 的表达与作用

3.1 circRNA 与人类疾病

基于 circRNA 的 miRNA 分子“海绵”作用, 其表达与多种疾病的发生发展相关, 在病理样本中可观察到显著的表达差异。已有的研究表明, miR-7 在神经系统疾病、糖尿病以及多种癌症中发挥重要作用^[28], 因此, circRNA 与这些疾病的关系也具有较高的研究价值。其中, 部分研究已经证实 Cdr1as 通过调控 miR-7 的表达影响相关疾病的发生发展。除 miR-7 外, circRNA 还被发现在疾病中

与其他 miRNA 相互作用。此外, 另有多项研究也发现 circRNA 在疾病中存在明显的表达差异。

3.1.1 circRNA 与肿瘤

非编码 RNA 在肿瘤发生发展中的角色及作用是目前分子生物学领域的研究热点之一, 关于 microRNA 及 lncRNA 与肿瘤的相关性研究已取得大量成果。同样地, circRNA 在肿瘤中的研究也成为被关注的焦点。基于 circRNA 的 miRNA 分子“海绵”作用, Li 等^[29]研究发现, 在食管鳞状细胞癌中, circRNA-ITCH 可通过海绵作用“吸附”miR-7、miR-17 及 miR-214, 提升 ITCH 基因的表

达水平. ITC 的过表达可促进磷酸化 Dvl2 蛋白的泛素化与降解, 从而抑制 Wnt 信号通路, 进而抑制癌症的发生发展. Liu 等^[30]设计出一种 circRNA, 可充当 miR-21 和 miR-221 的分子“海绵”, 并发现其在恶性黑色素瘤中具有显著的抗癌效果, 此研究同时证明了 circRNA 作为治疗靶点的可行性. Sand 等^[31]在基底细胞癌样本中鉴定出 23 种表达上调及 48 种表达下调的 circRNA, 共含有 354 个 MRE, 这些 circRNA 可能参与基底细胞癌的发生发展.

有研究表明, Foxo3 circRNA(circRNA-Foxo3) 与 Foxo3 假性基因通过结合 8 种 miRNA, 共同调控转录因子 Foxo3 的合成, 并且, Foxo3 circRNA、Foxo3P、Foxo3 mRNA 均能发挥抑制肿瘤生长和增殖的作用^[32]. 之后, circ-Foxo3 被发现在非癌细胞中高表达, 并通过与相关蛋白 P21 及 CDK2 形成三聚体的方式参与细胞周期的调控, 沉默 circ-Foxo3 的表达将促进细胞增殖. 由此推测, circ-Foxo3 的表达缺失可能是导致癌症发生的原因^[33].

Bachmayr-Heyda 等^[34]研究发现, 与正常组织细胞相比, circRNA 丰度与结肠癌、卵巢癌及特发性肺纤维化细胞的增殖均呈现显著的负相关. 换言之, circRNA 仅在不具有增殖能力的细胞中稳定存在. 研究表明, circRNA “hsa_circ_0001649” 在肝细胞癌中的表达明显下调, 可能成为肝细胞癌的一种潜在的生物标记物, 在肿瘤的发生与迁移中发挥作用^[35]. 此外, 大量 circRNA 在人类胰腺导管癌样本中呈现高表达, 具有作为临床诊断的生物标记物的潜能^[36]. 特别地, Zhang 等^[37]在大鼠模型中发现, 部分转录 circRNA 的基因(如 *Rev3l*、*IGSF11*、*MAML2*、*LPP*)已被发现在乳腺癌中呈现高表达, 推测这些 circRNA 可能与乳腺癌的发生存在关联.

3.1.2 circRNA 与心脏疾病

众多研究结果已经揭示 miRNA 在心脏疾病发生发展中的作用, 由此推测, circRNA 的 miRNA 分子“海绵”作用很可能对心脏疾病产生影响, 已有研究证实此推测. Geng 等^[38]研究表明, Cdr1as 在心肌细胞中通过对 miR-7a 的分子“海绵”作用, 调控 miR-7a 靶基因 *PARP* 与 *SPI* 的表达, 从而促进了心肌梗塞的发生发展. 在小鼠模型中, 随着心肌梗塞的体积增大, Cdr1as 与 miR-7a 均呈现表达上调. 另外, 过表达 Cdr1as 可使心肌梗塞的体积增大, 此时 miR-7a 靶基因 *PARP* 与 *SPI* 表达明显上调, 过表达 miR-7a 则会产生相反的影响. Wang

等^[39]研究发现, 存在一种 circRNA 可通过与 miRNA-223 结合, 阻断其对基因表达的调控, 并将其命名为心脏相关 circRNA (heart-related circRNA, HRCR). 若降低 HRCR 的表达, 将导致病理性心肌肥厚与心力衰竭. 另外, 在阿霉素诱导产生心脏疾病的小鼠中, 异位表达 circ-Foxo3 将使症状加重, 反之, 沉默 circ-Foxo3 的表达可使症状得到缓解. 另外, 该研究同时发现沉默 circ-Foxo3 将抑制心脏衰老, 异位表达 circ-Foxo3 则可诱导心脏衰老. 经进一步分析, 推测 circ-Foxo3 主要存在于细胞质, 可能与抗衰老蛋白 ID-1 及 E2F1 等相互作用, 并使其失去抗衰老功能^[40].

3.1.3 circRNA 与神经系统疾病

研究表明, Cdr1as 在阿尔茨海默病患者样本中的表达量仅为正常对照样本的 0.18, 说明 miR-7 可能在该疾病的发病机制中发挥一定作用, 且 Cdr1as 的含量下降是其表达失控的原因之一^[41]. Zhang 等^[42]研究发现, circ_101222 在先兆子痫患者血细胞中的表达量明显高于健康女性, 经检测其与内皮蛋白结合的敏感度达到 0.7073, 特异性达到 0.8049. 因此, circRNA 与血浆蛋白的相互作用可能对于预测子痫的发生具有一定潜在价值. Lin 等^[43]在脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 大鼠模型中, 检测出 15 种较对照组显著差异性表达的 circRNA, 其中 3 种表达上调, 12 种表达下调. 经深度分析, mmu-circRNA-015947 被发现可作为 mmu-miR-188-3p、mmu-miR-329-5p、mmu-miR-3057-3p、mmu-miR-5098 及 mmu-miR-683 的分子“海绵”, 调控其靶基因的表达, 可能影响细胞凋亡、新陈代谢及免疫应答等生理过程. 此研究提示, mmu-circRNA-015947 可能在 CIRI 中发挥关键作用, 并有望应用于此类神经损伤的临床治疗.

3.1.4 circRNA 与糖尿病

胰岛 B 细胞的功能失常是造成糖尿病的重要原因, miR-7 已被证实在胰腺的分化发育过程中起着作用, 其异常高表达可能导致糖尿病的发生. 而近期研究表明, 在胰岛细胞中, Cdr1as 通过海绵作用“吸附”miR-7 并阻断其功能, 其过表达可使胰岛素的转录及分泌水平明显上升. 因此, Cdr1as/miR-7 系统可能成为一个新的治疗靶点, 在糖尿病中提升或恢复胰岛 B 细胞的功能^[44].

3.1.5 circRNA 与骨关节炎

骨关节炎是一种退行性病变, 软骨退化损伤是

其主要病症之一。Liu 等^[45]在骨关节炎细胞中发现, circRNA-CER 可充当 miR-136 的分子“海绵”, 调控其靶基因 MMP13 的表达, 从而影响软骨胞外基质(chondrocyte extracellular matrix, ECM)的形成, 进而造成软骨退化。若沉默 circRNA-CER 将同时抑制 MMP13 的表达并促进 ECM 形成, 因此, circRNA-CER 有望作为骨关节炎治疗中的一个理想靶点。

3.2 circRNA 与组织发育

Westholm 等^[46]最早发现, 果蝇体内 circRNA 及其线性异构体的表达量与其中枢神经系统的发育程度显著相关, 随着虫体发育 circRNA 表达量明显上升。此后的研究表明, circRNA 不仅与果蝇的发育相关, 且很可能在哺乳动物组织发育中发挥重要作用。Fan 等^[47]通过单细胞转录组 RNA 测序在小鼠植入前胚(preimplantation embryos)中检测出 2 891 种 circRNA 及 913 种新的线性转录本, 进一步的研究表明, 这些 circRNA 可能在小鼠早期胚胎中的染色体组织、细胞周期调控及 DNA 修复中发挥作用。该研究结果表明, circRNA 在哺乳动物早期胚胎发育中扮演重要角色。有研究表明, 来自 2 195 个基因的 4 634 种 circRNA 在胎猪大脑组织中表达, 基因组中约 20% 的剪切位点参与了 circRNA 的产生。这些 circRNA 存在着明显的时空特异性, 可能在哺乳动物大脑发育的过程中发挥重要作用^[48]。通过 RNA 测序分析, Abdelmohsen 等^[49]在恒河猴(Rhesus)骨骼肌组织中检测并鉴定出大量 circRNA, 超过 12 000 种与人类细胞中的 circRNA 一致。其中, 一些 circRNA 的表达呈现高度的年龄相关性, 即随着年龄增长其表达量将降低。可以推测, 这些 circRNA 可能在组织发育中发挥作用。另外, Szabo 等^[50]检测 circRNA 在人类胎儿发育过程中的表达状况。结果显示, circRNA 在样本中呈现较高的组织特异性, 包括心脏、肺部等。特别地, 在胎儿大脑组织中存在大量的 circRNA 异构体。以上数据提示, circRNA 可能在人类发育过程中发挥重要作用。

以上研究表明, circRNA 在生物组织发育中发挥作用, 但其具体作用尚需进一步研究, 在该方面作为生物标记物或其他形式的应用仍有待开发。

3.3 circRNA 的其他表达与作用

更多研究提示, circRNA 在人体中存在更广泛的表达与作用, 具有更为广阔的应用空间。研究表

明, circRNAs 在人类血小板中的表达量是对应有核组织的 17~188 倍, RNA 测序数据显示血小板中 circRNAs 外显子含量是对应有核组织的 12.7 倍, 经验证确定此为无核细胞的共同特征。由此推测, 血小板等无核细胞的转录组可能已失去超过 90% 的 mRNA 前体^[51]。Wang 等^[52]研究发现, circRNA100783 在 CD8(+)T 细胞中过表达, 并可能通过调控磷酸蛋白相关信号通路, 使 CD8(+)T 细胞失去 CD28 受体, 从而在其细胞衰老过程中发挥作用, 进一步的研究将验证 circRNA100783 是否适合作为免疫衰老过程中的生物标志物。此外, Kino 等^[53]对人类外周全血中的 RNA 进行测序, 结果显示超过 100 种 circRNA 的表达量明显高于对应的 mRNA, 说明其可能适合作为临床血液样本中的生物标记物。目前, 已有研究在人类唾液中发现 circRNA, 这提示 circRNA 亦可能具有细胞外功能, 甚至可以作为此类样本中的生物标记物^[54]。

4 circRNA 的研究策略

目前, 关于 circRNA 表达及功能的研究虽然尚处于起步阶段, 但人们对于基因表达的研究已开发出一些较为成熟的技术手段, 可以应用于检测 circRNA 表达的深入研究。例如, 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)、基因芯片分析(genechip analysis)、RNA 印迹(Northern blot)、荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)及生物素偶联 circRNA 捕获(biotin-coupled circRNA capture)等^[55]。除检测 circRNA 自身的表达外, 使用这些表达分析技术同时检测 circRNA 与相关 miRNA 的表达量, 深入研究 circRNA 的 miRNA 分子“海绵”作用, 也是相关研究需要关注的一个方向。此外, 利用过表达或基因敲低的方法, 可探究 circRNA 在组织或机体中起到的作用, 但相关方法的研究尚需补充。

4.1 circRNA 的定量方法

与其他非编码 RNA 类似, circRNA 的定量方法主要采用 qRT-PCR 技术。特别之处在于, 线性 RNA 的检测是围绕目的片段的上下游分别设计 PCR 引物, 需扩增的片段位于上下游引物之间。但由于 circRNA 为闭合的环状结构, 需针对其特异的索尾插接位点(back splicing)设计特异性引物, 即引物设计位于该位点两侧。除此步骤之外, circRNA 与线性 RNA 的定量检测过程基本一致。

4.2 circRNA 的过表达

构建 circRNA 过表达载体的原理, 主要基于其独特的产生机制, 即侧翼 Alu 序列特征. PCR 扩增含侧翼 Alu 序列的目标 DNA 序列, 随后以对应限制性内切酶位点进行酶切, 进而连接 pEGFP-C1 载体. 连接载体进而转染对应细胞样本, 转染后的细胞即可合成相应的 circRNA, 实现过表达的目的.

4.3 circRNA 数据库的建立

随着相关研究的不断进行, 大量的 circRNA 将被陆续发现并鉴定. 关于 circRNA 的功能、作用及其与其他分子间的关系尚需进一步研究, 因此, 建立有价值的 circRNA 数据库可为相关研究提供一定的参考, 推动相关研究的进行与深入. 目前, 已建立的 circRNA 数据库包括: a. circBase (<http://www.circbase.org/>), 合并与统一了来自多种真核生物的 circRNA 测序数据^[56]. b. Base v2.0 (<http://biocenter.sysu.edu.cn/deepBase/>), 包含 101 739 个 circRNA 转录本序列^[57]. c. Circlet(<http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/>), 来源于 464 个 RNA 序列样本, 不仅包含已发现的 circRNA 序列, 而且整合了 circRNA、miRNA 及基因之间的调控网络^[58]. d. Circ2Traits (<http://gyanxet-beta.com/circdb/>), 一个整合与人类疾病相关 circRNA 的数据库, 其纳入的 circRNA 可与疾病相关 microRNA 相互作用, 或含有疾病相关 SNPs 位点^[59].

4.4 circRNA 检测工具的开发

从 RNA 测序数据中快速、灵敏及精确地检测并筛选出 circRNA, 是 circRNA 研究的另一关键步骤. 因此, circRNA 检测工具的开发是奠定其研究基础的重要工作. 目前, 已有的 circRNA 检测工具包括 find circ^[25]、MapSplice^[60]、CIRCexplorer^[20]、circRNA_finder^[39]、CIRI^[61]、segemehl^[62]及 CircTest^[63]等. Hansen 等^[64]通过检测已知 RNA 序列比较 find circ、MapSplice、CIRCexplorer、circRNA_finder 及 CIRI 对其中 circRNA 的识别作用, 结果显示, 5 种检测工具的准确率分别为 59.4%、73.1%、69.9%、60.4%及 56.0%, 均呈现较高的假阳性水平. 其中, CIRI 具有最高的灵敏度, 但速度与精确度均不理想; find circ 与 circRNA_finder 检测速度较快, 但精确度较低, 且 find circ 的灵敏度较差; CIRCexplorer 与 MapSplice 的精确度较高, 灵敏度也比较理想, 但检测速度慢且需要基因注释(gene annotation). 总之, 目前的 circRNA 检测方法虽能

满足相关研究的基本要求, 但更加快速、灵敏及精确的检测工具尚需进一步开发.

5 问题与展望

circRNA 是真核细胞中广泛表达的一大类 RNA 分子, 众多研究提示, 其在调节和影响真核生物乃至人体的生理活动中发挥着重要作用. 随着生物信息学和分子检测技术的快速发展, circRNA 这种曾经被忽略的“副产物”, 现已成为分子生物学领域最新的研究热点. 但是, circRNA 的相关研究仍然有许多难关需要攻克. 目前, circRNA 研究尚处于起步阶段, 人们对于其除 miRNA 分子“海绵”外的生物学功能还知之甚少, 虽有研究提示 circRNA 具有多种生物学功能, 但研究结论均尚需实验验证. 此外, circRNA 研究的基础性工作尚需完善, 建立高质量的数据库、开发快速精确的检测工具及丰富研究技术手段等工作均有待进一步改进.

在实验方法上, miRNA 与 lncRNA 的研究已相对较为成熟, 可为 circRNA 的相关研究提供全面的参考^[65]. 首先, 通过高通量测序方法筛选相关 circRNA, 并由转染细胞实验观察目标 circRNA 的相应功能, 利用生物信息学软件获得预测的目标 circRNA 的靶基因, 经样本验证后可初步阐明其在某种疾病或生理状态中的作用. 再通过 Real-time PCR 等技术检测验证目标 circRNA 在样本中的表达量, 最终结合样本信息得出研究结论. 基于此研究策略, 可能会进一步阐明 circRNA 在不同生理活动中的作用机制, 并发掘其作为生物标记物或治疗靶点的潜在价值.

近年来, 关于 ncRNA 的研究已经取得了一定的成果, 其在人体中的表达与作用已经为人类疾病诊断及治疗等方面提供了新的方向. 相比于 miRNA 与 lncRNA, circRNA 明显具有更高的稳定性, 这或许可以成为其充当生物标记物或治疗靶点的关键优势. 目前, 关于 circRNA 与人类疾病及组织发育的研究已经初步展现了潜在的应用价值. 虽然相关研究尚有很多不足, 尚不能断言 circRNA 一定可以被应用于疾病的诊断与治疗及其他领域, 但 circRNA 无疑是非常有价值的研究对象, 或许可以为 ncRNA 的研究与应用带来突破性进展.

参 考 文 献

- [1] Venter J C, Adams M D, Myers E W, *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, 2001, **291**(5507): 1304–1351
- [2] Ding X, Ding J, Ning J, *et al.* Circulating microRNA-122 as a

- potential biomarker for liver injury. *Molecular Medicine Reports*, 2012, **5**(6): 1428–1432
- [3] Ding X, Zhu L, Ji T, *et al.* Long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) identified by RNA-seq in breast cancer. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e103270
- [4] Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, **19**(2): 141–157
- [5] Kolakofsky D. Isolation and characterization of Sendai virus DI-RNAs. *Cell*, 1976, **8**(4): 547–555
- [6] Arntberg A C, Van Ommen G J, Grivell L A, *et al.* Some yeast mitochondrial RNAs are circular. *Cell*, 1980, **19**(2): 313–319
- [7] Cocquerelle C, Mascres B, Hetuin D, *et al.* Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB Journal*, 1993, **7**(1): 155–160
- [8] Wilusz J E, Sharp P A. Molecular biology: A circuitous route to noncoding RNA. *Science*, 2013, **340**(6131): 440–441
- [9] Wu Q, Wang Y, Cao M, *et al.* Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(10): 3938–3943
- [10] Lu T T, Cui L L, Zhou Y, *et al.* Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. *RNA*, 2015, **21**(12): 2076–2087
- [11] Broadbent K M, Broadbent J C, Ribacke U, *et al.* Strand-specific RNA sequencing in *Plasmodium falciparum* malaria identifies developmentally regulated long non-coding RNA and circular RNA. *BMC Genomics*, 2015, **16**(7): 454–476
- [12] Danan M, Schwartz S, Edelheit S, *et al.* Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in *Archaea*. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(7): 3131–3142
- [13] Wang P L, Bao Y, Yee M, *et al.* Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e90859
- [14] Salzman J, Gawad C, Wang P L, *et al.* Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e30733
- [15] 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
- [16] Guo J U, Agarwal V, Guo H, *et al.* Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, 2014, **15**(7): 409–423
- [17] Hentze M W, Preiss T. PCircular RNAs: splicing's enigma variations. *The EMBO Journal*, 2013, **2013**(32): 923–925
- [18] 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 Research*, 2006, **34**(8): e63
- [19] Li J, Yang J, Zhou P, *et al.* Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications. *American Journal Cancer Research*, 2015, **5**(2): 472–480
- [20] Zhang X O, Wang H B, Zhang Y. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 2014, **159**(1): 134–147
- [21] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti N R, *et al.* circRNA biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 2014, **56**(1): 55–66
- [22] Liang D, Wilusz J E. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes and Development*, 2014, **28**(20): 2233–2247
- [23] Barrett S P, Wang P L, Salzman J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. *eLife*, 2015, **2015**(4): e07540
- [24] 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
- [25] 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
- [26] Zhang Y, Zhang X O, Chen T, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular Cell*, 2013, **51**(6): 792–806
- [27] Abe N, Matsumoto K, Nishihara M, *et al.* Rolling circle translation of circular RNA in living human cells. *Scientific Reports*, 2015, **2015**(5): 16435
- [28] Horsham J L, Ganda C, Kalinowski F C, *et al.* MicroRNA-7: A miRNA with expanding roles in development and disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2015, **2015**(69): 215–224
- [29] 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): 6001–6013
- [30] Liu Y, Cui H, Wang W, *et al.* Construction of circular miRNA sponges targeting miR-21 or miR-221 and demonstration of their excellent anticancer effects on malignant melanoma cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2013, **45**(11): 2643–2650
- [31] Sand M, Bechara F G, Sand D, *et al.* Circular RNA expression in basal cell carcinoma. *Epigenomics*, 2016, **8**(4): 429–439
- [32] Yang W, Du W W, Li X, *et al.* Foxo3 activity promoted by non-coding effects of circular RNA and Foxo3 pseudogene in the inhibition of tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, 2015, **34**(17): 2121–2128
- [33] Du W W, Yang W, Liu E, *et al.* Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(6): 2846–2858
- [34] Bachmayr-Heyda A, Reiner A T, Auer K, *et al.* Correlation of circular RNA abundance with proliferation-exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Scientific Reports*, 2015, **2015**(5): 8057
- [35] Qin M, Liu G, Huo X, *et al.* Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomarkers*, 2016, **16**(1): 161–169
- [36] Qu S, Song W, Yang X, *et al.* Microarray expression profile of circular RNAs in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genomics Data*, 2015, **2015**(5): 385–387
- [37] Zhang C L, Wu H, Wang Y H, *et al.* Expression patterns of circular RNAs from primary kinase transcripts in the mammary glands of

- lactating rats. *Journal of Breast Cancer*, 2015, **18**(3): 235–241
- [38] Geng H H, Li R, Su Y M, *et al.* The circular RNA Cdr1as promotes myocardial infarction by mediating the regulation of miR-7a on its target genes expression. *PLoS One*, 2016, **11**(3): e0151753
- [39] Wang K, Long B, Liu F, *et al.* A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223. *European Heart Journal*, 2016, **2016**(1): ehv713
- [40] Du W W, Yang W, Chen Y, *et al.* Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses. *European Heart Journal*, 2016, **37**(2): ehw001
- [41] Lukiw W J. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD). *Frontiers in Genetics*, 2013, **4**(12): 307–309
- [42] Zhang Y G, Yang H L, Long Y, *et al.* Circular RNA in blood corpuscles combined with plasma protein factor for early prediction of pre-eclampsia. *BJOG*, 2016, **123**(4): 541–548
- [43] Lin S P, Ye S, Long Y, *et al.* Circular RNA expression alterations are involved in OGD/R-induced neuron injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, **471**(1): 52–56
- [44] Xu H, Guo S, Li W, *et al.* The circular RNA Cdr1as, *via* miR-7 and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells. *Scientific Reports*, 2015, **2015**(5): 12453
- [45] Liu Q, Zhang X, Hu X, *et al.* Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 'Sponge' in human cartilage degradation. *Scientific reports*, 2016, **6**(3): 22572–22583
- [46] Westholm J O, Miura P, Olson S, *et al.* Genome-wide analysis of *Drosophila* circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. *Cell Reports*, 2014, **9**(5): 1966–1980
- [47] Fan X, Zhang X, Wu X, *et al.* Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos. *Genome Biology*, 2015, **16**(7): 148
- [48] Ven M T, Hansen T B, Ven S T, *et al.* Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development. *Genome Biology*, 2015, **16**(11): 245
- [49] Abdelmohsen K, Panda A C, De S, *et al.* Circular RNAs in monkey muscle: age-dependent changes. *Aging*, 2015, **7**(11): 903–910
- [50] Szabo L, Morey R, Palpant N J, *et al.* Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biology*, 2015, **16**(6): 126
- [51] Alhasan A A, Izuogu O G, Al-Balool H H, *et al.* Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation. *Blood*, 2015, **127**(9): e1–e11
- [52] Wang Y, Yu X, Luo S, *et al.* Comprehensive circular RNA profiling reveals that circular RNA100783 is involved in chronic CD28-associated CD8(+)T cell ageing. *Immunity and Aging*, 2015, **2015**(12): 17–27
- [53] Kino T, Hurt D E, Ichijo T, *et al.* Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood. *PLoS One*, 2015, **10**(10): e0141214
- [54] Lin X, Lo H C, Wong D T W, *et al.* Noncoding RNAs in human saliva as potential disease biomarkers. *Frontiers in Genetics*, 2015, **6**(3): 175
- [55] 张燕燕, 任国诚, 张 暄. 环状 RNA: 潜在的新型 miRNA 活性调控分子. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, **31**(11): 1158–1163
- Zhang Y Y, Ren G C, Zhang L. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, **31**(11): 1158–1163
- [56] Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA*, 2014, **20**(11): 1666–1670
- [57] Zheng L L, Li J H, Wu Jie, *et al.* deepBase v2.0: identification, expression, evolution and function of small RNAs, lncRNAs and circular RNAs from deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(1): 196–202
- [58] Liu Y C, Li J R, Sun C H, *et al.* CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(1): 209–215
- [59] Ghosal S, Das S, Sen R, *et al.* Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits. *Frontiers in Genetics*, 2013, **4**(12): 283
- [60] Wang K, Singh D, Zeng Z, *et al.* MapSplice: Accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. *Nucleic Acids Research*, 2014, **15**(1): 868–889
- [61] Guo Y, Wang J, Zhao F, *et al.* CIRI: an efficient and unbiased algorithm for *de novo* circular RNA identification. *Genome Biology*, 2015, **16**(3): 4–20
- [62] Hoffmann S, Otto C, Doose G, *et al.* A multi-split mapping algorithm for circular RNA, splicing, trans-splicing and fusion detection. *Genome Biology*, 2014, **15**(2): R34–R45
- [63] Cheng J, Metge F, Dieterich C, *et al.* Specific identification and quantification of circular RNAs from sequencing data. *Bioinformatics*, 2015, **10**(11): 1–3
- [64] Hansen T B, Venø M T, Damgaard C K, *et al.* Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(12): 1–8
- [65] Wang F, Zheng Z, Ding X, *et al.* Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecologic Oncology*, 2010, **119**(3): 586–593

Circular RNA: New Type of Biomarkers and Therapeutic Targets

ZHAO Ming, XIE Hao, HU Zhi-Di, WANG Jia-Cheng, DING Xian-Feng*

(College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Circular RNAs (circRNAs) represent a class of non-coding RNA widely spreading in eukaryotic cells, with the features of structural stability, high abundance, cell or tissue-specific expression and so on. They involve in the regulation gene expression by multiple acting mechanisms. For example, several circRNAs contain microRNAs (miRNAs) competition sites, acting as competing endogenous RNAs (ceRNAs) to sequester microRNAs and terminate their suppression of targets genes. Ever since 2013, circRNAs analysis has been a popular research in RNA fields. Recent studies show, circRNAs' expression and action are related to the occurrence or progression of various diseases, development of biologic tissue and cell aging. Their different expression probably make them to be ideal biomarkers in disease diagnosis or identification tissue development. And the clarity of their mechanisms in diseases also make them to be with the potential of effective therapeutic targets. The construction of circRNA database, the development of prediction tools and the deeply studies of their mechanisms will give a more widely application foreground for circRNAs.

Key words circular RNAs, competing endogenous RNA, microRNA, gene expression regulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0037

*Corresponding author.

Tel: 86-571-86843516, E-mail: xfding@zstu.edu.cn

Received: February 4, 2016 Accepted: May 31, 2016