

环状RNA的特性、生物合成和主要功能

郭健民¹ 陈 熙^{1,2} 邹 军^{3*}

(¹上海体育学院运动科学学院, 上海 200438; ²温州医科大学体育科学学院, 温州 325035;

³上海体育学院发展规划处, 上海 200438)

摘要 环状RNA(circular RNAs, circRNAs)是非编码RNA的一种, 与线性RNA不同, 其主要特征为通过反式剪接使3'端与5'端以共价键相连接, 形成一个闭环结构。CircRNAs主要来源于外显子或内含子, 分别通过反式剪接和套索内含子产生。CircRNAs广泛存在于生物体内, 它们种类丰富、进化保守并且可以稳定存在。这些特点使circRNAs具有许多潜在的功能, 例如充当微RNA(microRNA, miRNA)海绵、与RNA结合蛋白相结合形成RNA蛋白复合物、调控基因转录等。该文综述了国内外相关最新报道, 旨在阐述circRNAs的特性、生物合成及其主要功能。

关键词 环状RNA; 特性; 生物合成; 功能

The Feature, Biosynthesis and Main Function of Circular RNAs

Guo Jianmin¹, Chen Xi^{1,2}, Zou Jun^{3*}

(¹School of Kinesiology, Shanghai University of Sports, Shanghai 200438, China; ²School of Sports Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ³Development and Planning Office, Shanghai University of Sports, Shanghai 200438, China)

Abstract The circular RNAs (circRNAs) are a class of non coding RNA which are different from the liner RNA, characterized by the presence of a covalent bond linking the 3' and 5' ends generated by backsplicing. The circRNAs mainly arise from exons or introns, and differentially generated by backsplicing or lariat introns. CircRNAs are widely existed in all kinds of organisms, and they are abundant, conserved and stable. These features confer numerous functions to circRNAs, such as acting as microRNA sponges, binding to RNA-associated proteins to form RNA-protein complexes and regulating gene transcripction. The present article reviewed the latest reports, and explained the feature, biosynthesis and functions of the circRNAs.

Keywords circRNAs; feature; biosynthesis; function

长链非编码RNAs(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一种由基因组转录而来, 却不能翻译成蛋白质的长度大于200 nt的RNA^[1], 具有调控编码蛋白质基因表达的功能^[2-3]。最新研究发现, circRNAs(circular RNAs)也是lncRNAs的一员。1976年, Sanger等^[4]发现, 具有某些高等植物致病性的类

病毒是共价键闭合的单链环状RNA分子, 并由此首次提出circRNAs的概念。CircRNAs在各类真核生物中广泛存在, 并且早在20多年前就在人类细胞中发现了circRNAs^[5], 但直到最近, circRNAs在人类细胞中的广泛存在及其种类的丰富性才得到了证明^[6]。与线性RNA不同的是, circRNAs的3'端和5'端

收稿日期: 2015-11-11 接受日期: 2016-01-08

国家自然科学基金(批准号: 81572242)和上海市人类运动能力开发与保障重点实验室(上海体育学院)(批准号: 11DZ2261100)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-51253129, E-mail: zoujun777@126.com

Received: November 11, 2015 Accepted: January 8, 2016

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81572242) and Shanghai Key Lab of Human Sport Competence Development and Maintenance (Shanghai University of Sports) (Grant No.11DZ2261100)

*Corresponding author. Tel: +86-21-51253129, E-mail: zoujun777@126.com

网络出版时间: 2016-03-15 11:39:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160315.1139.004.html>

连接在一起并存在于同一个核糖核酸分子中。它的这一特性使得许多circRNAs在近期才被检测到; circRNAs在调控人类基因中所展现出的巨大潜能^[7], 使其成为当下的研究热点。本文综述国内外有关报道, 旨在阐述circRNAs的特征、生物合成及其主要功能, 为进一步研究circRNAs提供理论基础。

1 环状RNA的来源与生物合成

1.1 环状RNA的来源

环状RNA是一种由共价键形成闭环结构的RNA分子, 早期的研究认为, 环状RNA是正常的编码RNA剪接发生错误而导致的产物^[8-9], 但随着研究的深入, 这种观点已经发生改变。有研究证明, 环状RNA主要通过称之为反式剪接的过程产生, 在此过程中下游的外显子同上游的外显子发生反向剪接^[10], 换句话说, 就是一个剪接受体与主转录本上游的剪接供体相结合, 形成一个环形的副本。Wilusz等^[10]的研究证明, 在各种不同类型的动物和植物细胞中, 环状RNA来源于蛋白质编码基因和非编码基因。Guo等^[11]的研究证明, 在哺乳动物中, 环状RNA来源于蛋白质编码基因的外显子并且发挥miRNA(microRNA)海绵的作用。Zhang等^[12]发现了一类来源于蛋白编码基因内含子的环状RNA, 并且证明这类环状RNA可以增强本位基因的转录。最新的研究发现, 在动物体内RNA的环化与前体mRNA的剪接存在竞争抑制的关系, 以此来保持组织特异性基因的表达^[13]。尽管众多的环状RNA已经被发现, 但其主要的作用仍不清楚。

1.2 环状RNA的生物合成

在真核生物中主要是通过一种反向的可变剪

接, 使得基因的外显子序列反向首尾连接形成环状RNA。CircRNAs由特殊的前体mRNA经可变剪接产生, 其形成方式可归结为两大类: 外显子环化(exon circularization)和内含子环化(intron circularization)。

1.2.1 外显子来源的环状RNA的合成 在真核细胞初级转录中通过剪接行为去除内含子的机制主要分为两个步骤: 第一步是内含子的一个限定腺苷的2'羟基基团与5'端的剪接位点相结合, 在外显子的5'端和套索中间产生一个自由的3'羟基基团; 第二步是通过亲核攻击3'端剪接位点上的3'羟基基团, 产生最终的产物即一个被切除的套索内含子和一个由两个外显子组成的线性RNA^[14]。外显子circRNAs是由剪接反应产生的, 并且在1991年第一次被发现^[15]。自此以后, 有成千上万种内源性circRNAs在哺乳动物细胞中被发现, circRNAs种类丰富并且在进化上高度保守^[16]。详细的环状RNA生物合成机制仍需要不断探索, 目前外显子circRNAs的形成主要分为两大机制(图1): 直接的反式剪接(direct backsplicing)和外显子跳读(exon skipping)。直接的反式剪接是由同一个外显子下游的3'尾端和外显子上游的5'头部相结合, 使下游的供体与上游的配体配对, 最终使外显子环化形成circRNAs^[8]; 外显子跳读需要通过内含子跳读产生一个包含外显子的套索, 随后套索进行内部的拼接, 将内含子切除并产生circRNAs^[17]。

除此之外, 不排除有其他的机制参与circRNAs的形成, 最新的研究表明, 外显子的环化依赖于侧翼内含子。RNA通过侧翼内含子与个体内含子形成配对竞争, 以保证外显子环化的效率^[18]。这证明环化剪接和线性剪接之间存在竞争, 从而使circRNAs具

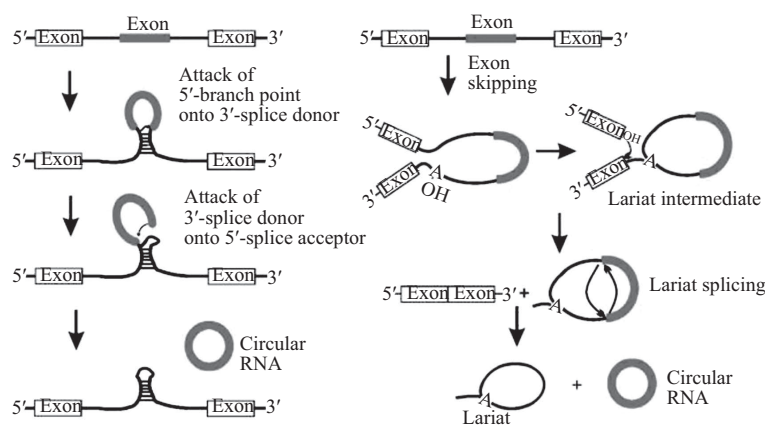


图1 外显子来源的环状RNA的合成(根据参考文献[14]修改)

Fig.1 Formation of the exonic circRNAs (modified from reference [14])

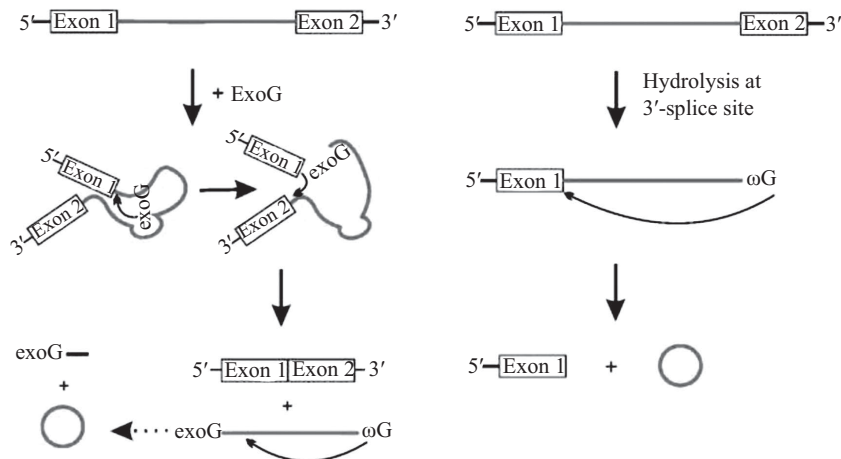


图2 内含子来源的环状RNA的合成(根据参考文献[14]修改)

Fig.2 Formation of the intronic circRNAs (modified from reference [14])

有基因调控的功能^[19]。

1.2.2 内含子来源的环状RNA的合成 根据内含子剪接机制的不同,可将其分为自我剪接内含子以及酶促剪接内含子、核mRNA前体内含子。其中,自我剪接内含子可分为I类内含子、II类内含子,机体内的内含子circRNAs主要由这两类内含子剪接而成。I类内含子circRNAs的形成(图2):一个外源性鸟苷(exogenous guanosine, exoG)作为亲核攻击的5'剪接位点,嵌入到内含子的结构中;在第一次反应中,5'外显子被切除,并且exoG与内含子变成线性连接,随后5'外显子末端的3'羟基基团攻击3'剪接位点,两个相邻的外显子连接在一起同时释放一个线性的内含子;最终以磷酸二酯键的形式亲核攻击内含子末端的2'羟基基团,形成一个环状RNA和一个3'尾端^[20-21]。II类内含子circRNAs的形成(图2):环化的发生需要3'外显子的提前释放,内含子末端的2'羟基基团攻击5'剪接位点,通过形成2',5'-磷酸二酯键产生一个5'外显子和一个circRNAs^[22-23]。

2 环状RNA的特性

在早期的研究中由于技术的限制,只在少数的基因转录中发现了环状RNA,那时它们被认为是错误剪接的产物,并且丰富性较低。但在最新的研究中发现,环状RNA广泛存在各种生物中,并且具有丰富性高、在进化上高度保守和结构稳定等特性。(1)丰富性:通过RNA测序(RNA-Seq),Salzman等^[24]在正常的细胞和癌细胞中发现了大量的环形转录副本,10%以上的人类基因可以转录产生环状

RNA,这一数量与典型的线性转录副本相当。Jeck等^[6]通过高通量测序在人的成纤维细胞中发现了超过25 000种环状RNA,这一数量是线性mRNA的10倍。Memczak等^[7]在人的白细胞中发现了1 950种环状RNA,在小鼠中发现了1 903种环状RNA,在线虫中发现了724种环状RNA。与线性的mRNA相比,环状RNA更为丰富。(2)保守性:作为非编码RNA的一种,环状RNA保留了相似的RNA结构。内含子来源的环状RNA的主要特点是以一个2',5'-磷酸二酯键使首尾相连,而外显子来源的环状RNA则以一个3',5'-磷酸二酯键连接首尾两端。这些特点揭示了特殊的反式剪接具有高度的保守性,同时这两种产物在进化上也是高度保守的。(3)稳定性:无论是在细胞核中还是在细胞质中,环状RNA都是稳定存在的,这是因为由于没有游离的poly(A)末端,使它们对RNA核酸外切酶和脱支酶存在一定的抗性^[25]。有研究表明,外显子来源的环状RNA在细胞中是非常稳定的,大多数环状RNA的半衰期在48 h以上^[6],而mRNA的平均半衰期只有10 h左右^[26]。由于环状RNA核酸内切酶的作用,内含子来源的环状RNA在血清中是很不稳定的,其半衰期不超过15 s^[27]。由于环状RNA特有的稳定性,一些外显子来源的环状RNA产生水平远远高于线性RNA。此外,大约有9 000多种套索内含子RNA在卵母细胞的细胞质中产生并且稳定存在^[28]。

环状RNA的这些特性显示出它们具有重要的生物功能的可能性,但环状RNA的性质和发挥作用的机制仍需要不断地探索。

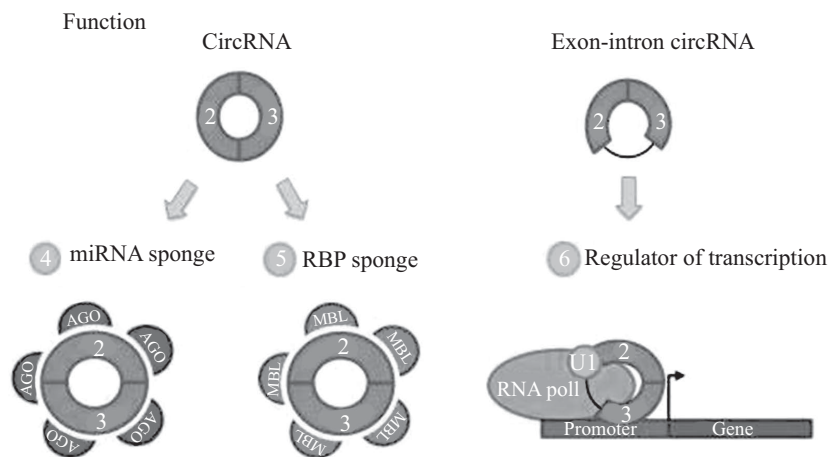


图3 环状RNA的主要功能(根据参考文献[38]修改)

Fig.3 The main functions of circRNAs (modified from reference [38])

3 环状RNA的主要功能

尽管人们已经认识到了环状RNA的丰富性,但环状RNA的作用以及生物功能仍需要不断地探索。目前,我们所认识到环状RNA的功能主要有以下几个方面。(1)miRNA海绵作用(图3)。miRNAs是一类长度在21 nt左右的RNA,它们可以通过碱基互补配对直接与mRNA靶标相结合,从而起到抑制mRNA翻译的作用^[29]。由于环状RNA拥有miRNA海绵结合位点,环状RNA可以通过吸附特定的miRNA,以竞争性抑制剂的形式抑制miRNA与靶标结合的能力^[30-31]。目前,ciRS-7/CDR1as和Sry circRNA这两个环状RNA在这一方面的功能已经得到证实,ciRS-7/CDR1as和Sry circRNA都可以通过与特定的miRNA结合,起到抑制miRNA功能的作用^[7,32]。ciRS-7/CDR1as拥有超过70个miR-7的结合位点,并通过将miR-7吸附到ciRS-7/CDR1as上,使miR-7的活性大大降低。ciRS-7/CDR1as在哺乳动物的大脑中的表达是非常丰富的,尤其是在小脑中^[33]。Sry circRNA是在小鼠睾丸中发现的一个高表达的环状RNA,拥有16个miR-138结合位点,通过体外荧光素酶基因报告实验证实,Sry circRNA可以抑制miR-138的活性^[32]。Guo等^[11]的研究证明,大多数环状RNA具有多个miRNA结合位点,但环状RNA是否普遍具有miRNA海绵作用还有待进一步验证。(2)调节转录、参与蛋白质合成(图3)。环状RNA除了能够调控miRNA外,还可以与RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)相结合形成RNA蛋白复合物(RNA-protein complexes, RPCs),对RNA结合蛋白和小RNA起调节作用或者通过部分碱基互补配对直接作用于

靶基因^[10,34]。此外,通过对人工合成的环状RNA进行测试发现,合成的环状RNA包含一个可以有效地进行翻译的内部核糖体进入位点,这证明环状RNA具有编码蛋白质的功能^[35]。由于环状RNA没有poly(A)尾结构,使它不易从尾端被降解,从而证明环状RNA在调控RNA转录和蛋白质合成上可能具有关键性的作用^[36]。此外,最新研究发现,环状RNA还具有存储、定位RNA结合蛋白的功能^[37]。

4 小结

环状RNA可以通过调控与癌症相关的miRNAs或信号通路以控制肿瘤的发生发展^[39]。miR-7可以直接下调与肿瘤相关的信号转导通路的关键因子,如EGFR(epidermal growth factor receptor)、RS-1、Raf1(serine/threonine kinase 1)、IGF1R(insulin-like growth factor 1R)、mTOR(mammalian target of rapamycin)等,发挥抑制肿瘤发生的作用^[40]。miR-7与肝癌^[41]、乳腺癌^[42]、肾癌^[43]等癌症存在关联;miR-7也可直接调控 α -突触核蛋白的表达并在帕金森病的发病中发挥作用。此外,在阿尔兹海默症患者中,ciRS-7表达降低^[44]。这些研究表明,环状RNA直接或间接与肿瘤、神经系统疾病等人类疾病存在关联。

miRNA应用于人类疾病的治疗已进入临床二期阶段,而环状RNA的临床实验仍面临着众多的挑战。环状RNA的组织特异性表达和稳定的环形结构,使它可以作为肿瘤诊断标志物;环状RNA的miRNA海绵作用,可以起到药物治疗的作用。目前,检测鉴定环状RNA的方法还是比较有限的,对环状RNA的功能的研

究、环状RNA在众多人类疾病中作用机制的研究以及环状RNA生物合成技术的研究都需要不断地探索。

参考文献 (References)

- Yang L, Froberg JE, Lee JT. Long noncoding RNAs: Fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(1): 35-43.
- Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 2011; 43(6): 904-14.
- Yoon JH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J Mol Biol* 2013; 425(19): 3723-30.
- Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. 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.
- Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS One* 2010; 6(12): e1001233.
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* 2013; 19(2): 141-57.
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 2013; 495(7441): 333-8.
- Cocquerelle C, Mascrez B, Hetuin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J* 1993; 7(1): 155-60.
- Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, *et al.* Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 1993; 73(5): 1019-30.
- Wilusz JE, Sharp PA. Molecular biology. A circuitous route to noncoding RNA. *Science* 2013; 340(6131): 440-1.
- Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol* 2014; 15(7): 409.
- Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell* 2013; 51(6): 792-806.
- Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, *et al.* circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2014; 56(1): 55-66.
- Petkovic S, Muller S. RNA circularization strategies *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(4): 2454-65.
- Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, Kern SE, Ruppert JM, Oliner JD, *et al.* Scrambled exons. *Cell* 1991; 64(3): 607-13.
- Lasda E, Parker R. Circular RNAs: Diversity of form and function. *RNA* 2014; 20(12): 1829-42.
- 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.
- Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* 2014; 159(1): 134-47.
- Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *Rna* 2015; 21(2): 172-9.
- Cech TR. Self-splicing of group I introns. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 543-68.
- Brehm SL, Cech TR. Fate of an intervening sequence ribonucleic acid: Excision and cyclization of the Tetrahymena ribosomal ribonucleic acid intervening sequence *in vivo*. *Biochemistry* 1983; 22(10): 2390-7.
- Li-Pook-Than J, Bonen L. Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(9): 2782-90.
- Molina-Sanchez MD, Martinez-Abarca F, Toro N. Excision of the Sinorhizobium meliloti group II intron RmInt1 as circles *in vivo*. *J Biol Chem* 2006; 281(39): 28737-44.
- Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One* 2012; 7(2): e30733.
- Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol* 2014; 32(5): 453-61.
- Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011; 473(7347): 337-42.
- Haupenthal J, Baehr C, Kiermayer S, Zeuzem S, Piiper A. Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(5): 702-10.
- Talhouarne GJ, Gall JG. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of *Xenopus tropicalis* oocytes. *RNA* 2014; 20(9): 1476-87.
- Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: Progress and possibilities. *RNA* 2010; 16(11): 2043-50.
- Ebert MS, Sharp PA. Emerging roles for natural microRNA sponges. *Curr Biol* 2010; 20(19): R858-61.
- Thomas LF, Saetrom P. Circular RNAs are depleted of polymorphisms at microRNA binding sites. *Bioinformatics* 2014; 30(16): 2243-6.
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 2013; 495(7441): 384-8.
- Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, *et al.* miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. A-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J* 2011; 30(21): 4414-22.
- Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature* 2014; 505(7483): 344-52.
- Chen CY, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* 1995; 268(5209): 415-7.
- Wilusz JE, JnBaptiste CK, Lu LY, Kuhn CD, Joshua-Tor L, Sharp PA. A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev* 2012; 26(21): 2392-407.
- Hentze MW, Preiss T. Circular RNAs: Splicing's enigma variations. A-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J* 2013; 32(7): 923-5.

- 38 Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB. Circular RNAs: Identification, biogenesis and function. *Biochim Biophys Acta* 2015; 20(12): 1829-42.
- 39 Li J, Yang J, Zhou P, Le Y, Zhou C, Wang S, *et al.* Circular RNAs in cancer: Novel insights into origins, properties, functions and implications. *Am J Cancer Res* 2015; 5(2): 472-80.
- 40 Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res* 2013; 73(18): 5609-12.
- 41 Fang Y, Xue JL, Shen Q, Chen J, Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 55(6): 1852-62.
- 42 Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer research* 2008; 68(20): 8195-200.
- 43 Yu Z, Ni L, Chen D, Zhang Q, Su Z, Wang Y, *et al.* Identification of miR-7 as an oncogene in renal cell carcinoma. *J Mol Histol* 2013; 44(6): 669-77.
- 44 Lukiw WJ. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD). *Front Genet* 2013; 4: 307.