

环状RNA及其在胃癌中作用的研究进展

杨平^{1,2} 倪超^{1,2} 陈思¹ 叶孟^{1*} 郭俊明^{2*}

(¹宁波大学医学院附属医院肿瘤内科, 宁波 315020;

²宁波大学医学院生物化学与分子生物学研究所, 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 环状RNA(circular RNA, circRNA)是具有闭环结构的RNA。circRNA由于具有分布广泛、序列保守、性能稳定和表达的时空特异性等特征,很有可能成为新型的诊治疾病、判断预后的生物标志物和靶点,并具有研发药物的潜在价值。胃癌居全球癌症发病率第5位。我国是胃癌的高发地区,每年胃癌新发病例占全球的近半数。在胃癌早期筛查方面,我们目前尚无简单、高效的手段。该综述就circRNA领域研究的新成果及其在胃肿瘤的作用进行探讨。

关键词 环状RNA; 微小RNA; 基因表达; 胃癌; 生物标志物

Advances in Circular RNAs and Their Roles in Gastric Cancer

Yang Ping^{1,2}, Ni Chao^{1,2}, Chen Si¹, Ye Meng^{1*}, Guo Junming^{2*}

(¹Department of Medical Oncology, the Affiliated Hospital, Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315020, China;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Ningbo University School of Medicine, Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology, Ningbo 315211, China)

Abstract Circular RNAs (circRNAs) are special RNAs with a closed loop structure. Though known as non-coding RNAs, some of them are able to translate proteins directly. Because of their characteristics of wide distribution, conservative sequence, stable property, temporal and spatial expression, and so on, it is very likely that circRNAs will be novel biomarkers and targets for the diagnosis, or prognosis of diseases, and new targets of treatment. Gastric cancer is the fifth most common cancer in the world, and the third leading cause of death among cancer patients. In general, incidence rates are highest in China. Each year, the number of new cases of gastric cancer in China accounts for nearly half of the world. There is no simple and effective method for early screening of gastric cancer at present. Therefore, the fight against gastric cancer is very grim in China. In this article, we summarized recent progress of circRNAs and their roles in gastric cancer.

Keywords circular RNA; miRNA; gene expression; gastric cancer; biomarker

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤, 是最常见的恶性肿瘤之一, 在全球总的癌症发病率中居第5位, 是癌症病人死亡的第3大原因^[1]。每年逾70%的新发胃癌患者在欠发达国家, 约50%的病例在东亚, 中国是高发地区^[2]。我国每年确诊胃癌患者达40万, 占世界的42%, 死亡约30万^[3]。对于早期诊

治的胃癌患者, 其5年生存率超过90%^[4]。而进展期胃癌患者即使接受了以根治术为主的综合治疗, 5年生存率还不到30%^[5]。由此可见, 早期及时诊治胃癌, 不仅能延长患者的生存期, 提高生存质量, 还能有效减轻疾病负担。早期诊断是胃癌根治的前提, 然而, 我国在胃癌早期筛查方面, 目前尚无简单、高效的

收稿日期: 2017-05-25 接受日期: 2017-08-29

浙江省自然科学基金(批准号: LY16H160005)、浙江省公益类社会发展项目(批准号: 2016C33177)和宁波市科技创新团队(批准号: 2017C110019)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87035866, E-mail: yemeng@nbu.edu.cn; Tel: 0574-87600758, E-mail: guojunming@nbu.edu.cn

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY16H160005), the Applied Research Project on Nonprofit Technology of Zhejiang Province (Grant No. 2016C33177) and the Scientific Innovation Team Project of Ningbo (Grant No. 2017C110019)

*Corresponding authors. Tel: +86-574-87035866, E-mail: yemeng@nbu.edu.cn; Tel: +86-574-87600758, E-mail: guojunming@nbu.edu.cn

网络出版时间: 2017-12-04 16:59:40 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1659.034.html>

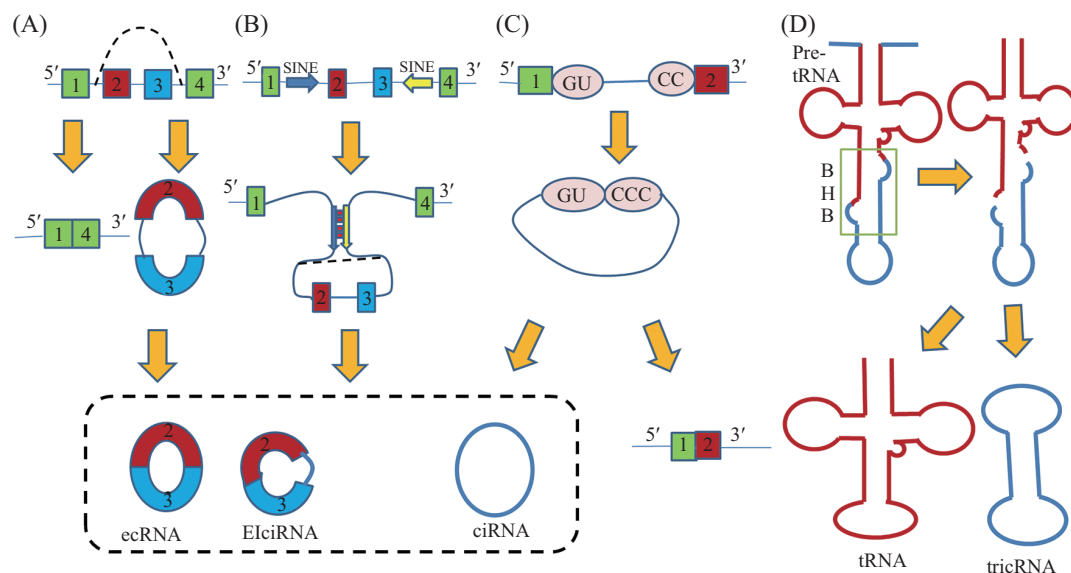
手段^[6]。现有用于临床的肿瘤生物标志物的灵敏度和特异性均有待提高^[7]。目前,胃镜是早期诊断胃癌的重要手段,但是为侵入性检查。因此,寻找非侵入性、简便可行的新型肿瘤生物标志物对于胃癌早期诊断及治疗意义重大。

目前普遍认为,环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类具有稳定闭环结构的内源性非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)。circRNA的发现已经有40多年的历史。Sanger等^[8]在1976年首次在高等植物的类病毒发现单链circRNA。1979年, Hsu等^[9]通过电镜观察,在宫颈癌HeLa细胞、猴肾CV-1细胞和中国仓鼠卵巢细胞等不同物种细胞中发现了circRNA;在HeLa细胞中, circRNA含量约占总RNA的1%~2%。Nigro等^[10]于1991年在人体细胞中发现circRNA。但当时circRNA被认为是转录本在剪接时发生错误而形成的副产品,因而没有引起人们的过多关注,直到上世纪末,才发现少数几种circRNA,如在*cANRIL*^[11]、*ETS-1*^[12]、肌萎缩蛋白^[13]、细胞色素*P-450 2C18*^[14]和*DCC*^[10]等基因中检测到circRNA。基于高通量测序技术的发展,人们得以深入研究并发现circRNA大量且广泛地存在于真核生物中^[15-17]。Zhang等^[18]经统计认为,在现有的研究中,在人体细胞中已发现多达148 701种circRNA,这提示circRNA可能是人体细胞中最大的一类转录本。目前, circRNA研究已经成为非编码RNA研究的一个热点领域。

circRNA可由DNA的各段序列转录剪接而成,而一个基因位点也可以剪接出多种circRNA,这种现象被称为可变剪接(alternative splicing)。例如,人*HIPK3*基因可以转录出5种circRNA,在H9细胞中*CAMSAP1*基因可产生7种不同circRNA,但是,大部分circRNA来源于外显子序列^[17-20]。最新研究证实, circRNA的形成受多种因素的影响^[18,21-22]。其表达也呈现出组织特异性和细胞分化发育阶段特异性,例如,在线虫胚胎的不同生长发育时期, circRNA的种类和含量差别明显^[17,19]。此外, circRNA还具有高度保守性、高度稳定性等特征^[16,23]。上述特征说明, circRNA在基因表达调控等方面发挥着重要作用,可能参与了多种疾病的发生、发展,有可能成为新一代疾病诊治的生物标志物^[24-27]。本综述就circRNA的存在形式、形成及调控机制、降解、生物学功能及其在胃癌中的作用进行探讨。

1 circRNA的存在形式及其形成过程

真核细胞circRNA是一类没有游离的5'端帽和3'端poly(A)尾的单链环状结构RNA,绝大部分是由外显子构成,一般含有1~5个外显子,有的还可包含1~2个内含子,同时也可含有基因间区或非编码区成分^[16,18,28-29]。根据circRNA所含外显子和内含子的来源,一般将真核生物的circRNA分为以下几类(图1和表1):只含有外显子的circRNA(exonic circRNA,



A: 套索驱动环化; B: 内含子配对驱动环化; C: 内含子环化途径; D: tricRNA的形成。

A: lariat-driven circularization; B: intron-pairing driven circularization; C: intron cyclization pathway; D: the formation of tricRNA.

图1 circRNA的形成过程(根据参考文献[43]修改)

Fig.1 The formation of circRNAs (modified from reference [43])

表1 几种circRNA的特征
Table 1 Features of circRNAs

环状RNA circRNA	来源 Derivation	分布 Distribution	序列特征 Sequence feature	作用 Role
ecRNA	Exon of pre-mRNA	Cytoplasm	The intronic long flanks of circularized exons contain opposite complementary SINE, and the competition between the SINE can facilitate RNA circularization.	Sponging miRNA, binding RBP, translating proteins, regulating gene expression
ciRNA	Intron of pre-mRNA	Cell nuclear	There are consensus motifs, containing a 7 nt GU-rich element near the 5' splice site and an 11 nt C-rich element close to the branchpoint site of ciRNA, and almost no miRNA binding site.	Binding RNA polymerase II complex, regulating gene transcription
ElciRNA	Exon & intron of pre-mRNA	Cell nuclear	The intronic long flanks of circularized exons contain opposite complementary SINE, and the competition between the SINE can facilitate RNA circularization.	Binding RNA polymerase II complex, regulating gene transcription
tricRNA	Intron of pre-tRNA	Cytoplasm	BHB (bulge-helix-bulge) motifs.	Unknown

ecRNA: 外显子来源的circRNA; ciRNA: 内含子来源的circRNA; ElciRNA: 外显子-内含子来源的circRNA; tricRNA: tRNA来源的circRNA; RBP: RNA结合蛋白; SINE: 短散在元件; miRNA: 微RNA。

ecRNA: exon circRNA; ciRNA: intron circRNA; ElciRNA: exon-intron circRNA; tricRNA: circRNA derived from tRNA; RBP: RNA binding protein; SINE: short interspersed element; miRNA: microRNA.

ecRNA)^[21], 只含有内含子的circRNA(circular intronic RNA, ciRNA)^[30], 同时含有外显子和内含子的circRNA(exon-intron circRNA, ElciRNA)^[31], 以上3种是由前体mRNA(pre-mRNA)经过反向剪接(back splicing)形成的; 此外, 还有由前体tRNA(pre-tRNA)经过剪接产生的tRNA内含子circRNA(tRNA intronic circular, tricRNA)^[32-33]。circRNA是基因可变剪接的产物, 但是在circRNA分子内部同样存在广泛的可变剪接, 相当多的circRNA所含的外显子是其特有的, 在mRNA中无法检测到这些特殊的外显子^[34]。研究者通过生物信息学分析发现, circRNA的种类会随着物种进化程度的增高而增多^[35]。以上这些都说明, circRNA的种类可能非常繁多。目前, 对其形成过程和机制的了解, 恐怕只是其冰山一角。根据现已发表的研究成果, 将上述各类circRNA的形成及调控机制、降解简述如下。

1.1 ecRNA

ecRNA主要分布在细胞质中, 由外显子环化途径产生^[28]。有研究表明, 绝大部分外显子来源的circRNA长度少于1 500核苷酸(nucleotide, nt), 中位数长度为500 nt^[18]。目前普遍认可由Jeck等^[28]提出的两种外显子环化机制, 即套索驱动环化(lariat-driven circularization)和内含子配对驱动环化

(intron-pairing driven circularization)。在套索驱动环化过程中, 真核生物在pre-mRNA转录后加工时, 发生外显子跳跃(exon skipping), 拉近原本不相邻的外显子, 经过反向剪接(back splicing), 将下游外显子剪接供体(splice donor)的3'端与上游外显子的剪接受体(splice acceptor)的5'端共价结合, 形成套索中间体, 接着切除内含子, 形成circRNA。而在内含子配对驱动环化过程中, 位于circRNA外显子侧翼的内含子区域内的短散在元件(常见的有Alu和B1)发生互补配对, 促进外显子构成环化结构, 再将环中内含子剪切掉并连接外显子, 从而形成ecRNA。

1.2 ciRNA

ciRNA主要分布在细胞核中, 由内含子环化途径产生^[30]。内含子在剪接过程中形成的套索结构, 通常情况下经过脱分支后很快被脱分支酶降解^[36]。然而在HeLa细胞和人类胚胎干细胞中发现一些这样的套索结构可以不被降解。研究证明, 当内含子位于5'剪接位点处含有7核苷酸的富集GU的基序(motif)和3'分支位点处含有11核苷酸的富集C的基序这种特定的序列时, 这种特定的序列能够抵抗脱分支酶降解作用, 因此在剪接后能形成环状结构ciRNA。pre-mRNA中的这种特定序列, 是真核生物合成ciRNA

的前提条件^[30]。

1.3 EIciRNA

EIciRNA主要位于细胞核中,研究发现,在宫颈癌HeLa细胞的细胞核中反向剪接形成ecRNA的过程中, RNA分子所含的内含子并没有被切除且被稳定保留下来,因而形成了EIciRNA^[31,37]。目前, EIciRNA的形成机制还不清楚,是什么原因导致内含子没被切除还有待进一步研究。

1.4 tricRNA

tricRNA在细胞核中合成,分布于细胞质。研究发现,在真核细胞的前体tRNA(pre-tRNA)加工过程中, tRNA剪接核酸内切酶(tRNA splicing endonuclease, TSEN)复合物能识别前体tRNA中典型的隆起-螺旋-隆起(bulge-helix-bulge, BHB)基序,在反密码子环内剪切掉tRNA基因的内含子序列,随后通过RNA连接酶RtcB将tRNA外显子连接,形成成熟的tRNA。被剪切掉的内含子序列也通过连接酶RtcB酶作用将头尾两端相连形成一个稳定的circRNA,称之为tricRNA。tricRNA的合成需要保守的tRNA序列基序,且具有时间和组织特异性。虽然目前还未在人类发现内源性的tricRNA,但是,利用人类的前体tRNA,已经在HeLa、HEK293T和U87细胞观察到了tricRNA的表达^[32,38]。由此可见, tricRNA的形成并不依赖反向互补的序列,这与ecRNA的形成机制不同。

2 circRNA生成的调控机制

目前, circRNA生成的调控机制尚未研究透彻,本文就已公开报道的机制作一简单介绍。circRNA的生成受众多因素调控,比如内含子互补序列长度、特定的核酸序列、RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)等,其中最主要受内含子序列的调控^[25]。目前认为,绝大部分circRNA来源于能编码蛋白质的外显子序列,并且包括完整的外显子,这表明反向剪接也需要RNA聚合酶II(RNA pol II)等pre-mRNA经典的剪接信号,并且受剪接体(spliceosome)的调控。当经典的剪接位点(canonical splice sites)突变后,野生型的circRNA的环化效率将降低。此外,环化和mRNA的经典剪接之间存在竞争关系,这影响着circRNA的生成^[25,39]。

在形成circRNA外显子两侧的不同内含子间的反向互补的SINE元件能构成特殊的双链RNA结构,

影响线性RNA的加工修饰和circRNA的形成。它们之间的相互竞争还能形成可变成环,使同一个基因形成不同的circRNA^[21,28,40]。研究还发现,侧翼内含子的序列越长,外显子越容易环化^[41]。但是,如果互补序列之间形成的发夹结构过于稳定,则可能会抑制circRNA的形成^[42]。可见,侧翼内含子序列对circRNA形成的影响取决于它们所形成的双键的稳定性。

RNA编辑酶(RNA-editing enzyme)腺苷脱氨酶1(adenosine deaminase 1, ADAR1)能结合侧翼内含子互补配对的区域,解除双链间的相互作用,抑制外显子的环化^[43]。RNA解旋酶DHX9通过与ADAR的一种剪切变体ADAR(p150)相互作用,识别并促进由SINE元件所形成的RNA双链结构解链,抑制circRNA的形成,精确调控基因转录后水平的加工修饰^[40]。

RBP也参与了circRNA形成的调控过程。例如, FUS在神经元中介导RNA反向拼接活动,进而控制circRNA的形成^[44]。这属于STAR蛋白家族的震动蛋白(quaking, QKI)在上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)过程中能结合侧翼内含子的特定基序,促进此过程中超过1/3的circRNA的形成^[45]。人和果蝇的盲肌蛋白(muscleblind protein, MBL)能够结合RNA两侧翼内含子上的MBL结合位点,维持侧翼内含子序列的环状结构,从而促进环化^[25],但circMbl又反过来结合MBL,降低MBL有效含量,从而减少自身的合成,构成负反馈调节机制。

关于tricRNA生成的调控机制尚未见相关报道。

3 circRNA的降解

有关circRNA降解机制的报道还较少。由于circRNA没有5'端帽和3'端poly(A)尾,因而能抵抗RNase R的降解,所以比线性RNA更稳定^[23]。由此可知, circRNA必定通过其他途径被降解。

研究发现,依赖阿格蛋白(argonaute protein, AGO)介导, miR-671能直接对ciRS-7(circular RNA sponge for miR-7)进行降解^[46],而ciRS-7又称Cdr1as(antisense to the cerebellar degeneration-related protein 1 transcript)。还有实验表明,从细胞培养液回收的外体(exosome)和微泡(microvesicle)等细胞外小泡(extracellular vesicle, EV)中,发现了比相应的线性

RNA更高浓度高的circRNA^[47]。这说明, 通过细胞外小泡向细胞外排出, 可能是细胞清除circRNA的机制之一。

4 circRNA的功能

目前的研究表明, circRNA的功能主要在分子海绵、调控基因表达以及翻译蛋白质等方面。竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)假说认为, 假基因(pseudogene)、长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)和mRNA等RNA能经过miRNA应答元件(miRNA response element, MRE)竞争性结合miRNA, 从而调控基因表达^[48]。circRNA含有丰富的miRNA结合位点^[17,49-50], 能竞争性结合miRNA, 解除miRNA对靶mRNA翻译的抑制及降解, 从而调控基因的表达; 同时也能竞争性与RBP结合, 进行蛋白质翻译。

4.1 具有miRNA海绵体的作用

miRNA可与mRNA的非翻译区特异性结合, 在转录后水平调控基因表达。而许多circRNA富含MRE, 能结合相应的miRNA, 并解除miRNA对靶基因表达的负调控作用, 此即circRNA的miRNA海绵作用^[48,51]。现在已经研究得比较清楚的两个ecRNA为小鼠性别决定基因(sex-determining region Y, SRY)转录的circSry和上文提及的Cdr1as。研究发现, circSry包含16个miR-138的结合位点, 可通过竞争性结合miR-138, 抑制miR-138对基因表达的负调控; 而Cdr1as包含的miR-7保守结合位点多达74个; 当下调Cdr1as/ciRS-7或circSry的表达水平, 相应miRNA靶基因的表达水平降低, 反之亦然^[17,49]。在真核生物中发现越来越多的circRNA具有多个miRNA结合位点。例如, circHIPK3是众多miRNA的分子海绵^[18]。Liu等^[26]发现, circRNA-CER竞争结合miR-136。在果蝇脑组织内也发现大量含有miRNA结合位点的circRNA^[52]。Wang等^[53]发现, 心脏相关circRNA(HRCR)能结合miR-233而抑制心肌肥厚和心力衰竭。研究者通过芯片和生物信息学数据分析发现, 同一miRNA可与不同的circRNA相互作用^[54]。值得一提的是, 有研究者认为, circRNA的miRNA海绵作用可能只是部分circRNA特有的功能, 而不是所有circRNA都具有的功能^[30,55]。这说明, circRNA的miRNA海绵体的作用还需要更多的实验验证。

4.2 调控基因的表达

circRNA可顺式或反式调控基因的转录过程^[56]。分布在细胞核的ciRNA和EiCiRNA能结合RNA聚合酶II复合物, 促进亲本基因的转录^[30-31]。例如, ci-ankrd52大量分布在亲本基因的转录位点, 通过结合RNA聚合酶II复合物, 上调亲本基因的转录, 且ci-ankrd52能调控RNA聚合酶II转录活性^[30]。Li等^[31]发现, 在细胞核中基因启动子区域, EiCiRNA circEIF3J和circPAIP2能与核内小RNA(small nuclear RNA, snRNA)U1互补配对, 再与核内小核糖核蛋白颗粒(small nuclear ribonucleo protein particle, snRNP)相互作用, 促进U1 snRNP复合物与RNA聚合酶II结合, 进而增强基因转录。来源于外显子的circANRIL可能降低了ANRIL蛋白质的含量, 减弱了ANRIL抑制编码基因*INK4/ARF*转录的作用, 进而调控*INK4/ARF*表达^[11]。可见, circRNA可通过结合RNA聚合酶II复合物及转录相关的蛋白质等方式调控基因的表达。

4.3 与RNA结合蛋白相互作用

circRNA分子可以直接或者通过RNA间接与蛋白相互结合。ecRNA可稳固地和一些蛋白质分子特异结合, 再经碱基互补配对的方式与DNA或者RNA结合, 成为RNA结合蛋白、RNA和DNA三者之间相互作用的桥梁。如上所述, Cdr1as和circSry可与miRNA效应因子阿格蛋白相结合, 从而被miR-671切割和降解; ciRNA和RNA聚合酶II复合物相互结合^[17,30]。circFOXO3、激酶抑制蛋白(p21)和细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)构成复合物, 抑制CDK2的促进细胞分裂作用^[24]。实验验证了可与胰岛素样生长因子2结合蛋白3(insulin-like growth factor 2 binding protein 3, IMP3)形成circRNA蛋白质复合物(circRNA-protein complexes, circRNPs)的几种circRNA, 将它们归入一个亚类, 并推测同一亚类的circRNA可能具有共同的生物学功能和合成途径^[57]。这为circRNA的分类和功能研究提供了一种新方法。

4.4 circRNA的翻译作用

科研工作者曾经认为, 由于circRNA没有5'端帽和3'端多聚(A)尾结构, 缺少合适的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES), 所以不可能翻译蛋白质。然而, Chen等^[58]于1995年在体外构建的环状mRNA可特异地依赖IRES结合核糖体, 从而启动蛋白质翻译。研究者在人骨肉瘤细胞U2OS

中发现, circRNA可以低效率地翻译蛋白质^[55]。这表明,有些circRNA可依靠IRES进行翻译。现有研究已经分别从B型肝炎病毒^[59]、大肠杆菌^[60]等物种中发现了能翻译蛋白质的circRNA。其他研究进一步证实,内源性circRNA开始翻译后,其特殊结构能使核糖体更容易循环参与多肽链的延长^[61]。研究还发现,体外合成的circRNA,在特定的条件下,可在人类活体细胞中通过滚环扩增机制进行翻译,而且比相应mRNA翻译速率快2个数量级^[62]。最近, Pamudurti等^[63]基于果蝇大脑中核糖体印迹分析(ribosome footprinting)发现,大量的circRNA能翻译成蛋白质或多肽。Legnini等^[64]发现, circRNA circ-ZNF609可直接翻译蛋白质。越来越多的实验证据表明, circRNA可以直接翻译成蛋白质。虽然circRNA被归为非编码RNA,但是最近的一系列研究结果说明,仍将其视为非编码RNA似乎不太准确^[9,55,58,60-64]。

4.5 circRNA的其他功能

circRNA还能与其他分子相互作用,如上文提到的circEIF3J和circPAIP2与核内小RNA U1之间的RNA-RNA相互结合。果蝇母系遗传内含子来源circRNA sisR-4调节发育进程^[65]。circRNA促进肿瘤形成、增殖和转移等^[18,66]。如上文所述,因为circRNA能抵抗RNase R的降解,比线性RNA更稳定,此外, circRNA能进入外体而排出细胞外,所以Hsa_circ_002059可作为胃癌诊断的稳定生物标志物^[67],而ciRS-7可作为结直肠癌的标志物和治疗靶标^[68]。更为重要的是,已在唾液、血液等体液中检测到了circRNA^[47,69],这提示, circRNA应用于临床的巨大可能性。在其他领域, circRNA也发挥着重要作用。近期研究发现, circFOXO3通过调节众多与应急和衰老相关的因子促进心脏衰老^[70]。与动脉粥样硬化相关的circANRIL具有调控核糖体RNA成熟的作用^[71]。

现在已发现的circRNA就多达十几万种,有理由相信还有更多的circRNA未被发现。因此,上述几点不可能概括circRNA的所有功能。上文可见,有的circRNA(如ciRS-7)几乎作用于基因表达的全过程,而有的circRNA作用范围局限于细胞的某一部位。由此可见, circRNA的序列和结构特征以及与之相互作用的其他分子, circRNA在细胞和体内分布情况等基本特征与circRNA的功能密切相关。

5 circRNA与胃部肿瘤

已有报道circRNA在许多癌症中都差异表达并能影响癌症的发生、发展和转移^[18,72]。同样, circRNA在胃癌的发生、发展以及转移、预后等方面都起着重要作用。

5.1 circRNA可作为胃癌生物标志物

为筛选与胃癌相关的差异表达的circRNA, Sui等^[73]利用芯片结果进行分析,发现1 285种差异表达的circRNA。其中, 69种circRNA具有miRNA结合位点,推测它们能通过竞争结合相应的miRNA,调控CD44、CXXC5、MYH9、MALAT1和其他基因的表达而影响胃癌发生、发展,并具有成为新的胃癌分子生物标志物的潜能^[73]。

有研究者检测胃癌和配对癌旁组织以及患者手术前后血浆的hsa_circ_002059水平^[67]。结果发现, hsa_circ_002059水平在胃癌组织细胞中明显下调,在手术前后的血浆中也差异明显。受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)统计的结果表明,曲线下面积(area under curve, AUC)达到0.73。更重要的是, hsa_circ_002059低表达水平与远处转移、TNM分期、性别和年龄等病理因素之间的相关性都存在统计学意义^[67]。这些结果证明, hsa_circ_002059可作为胃癌诊断的潜在生物标志物。

Li等^[74]研究发现, hsa_circ_0000096影响胃癌细胞的增殖和迁移,也可作为胃癌潜在的新型生物标志物。研究表明,当沉默hsa_circ_0000096时,与细胞周期相关的细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、CDK6的含量明显减少,细胞被阻滞在G₀/G₁期,无法进入S期,细胞周期进程被阻断。与细胞迁移相关的基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的含量也明显减少,从而减弱了细胞的迁移能力。

还有研究发现,胃癌组织hsa_circ_0000190水平较癌旁组织为低,因此,认为hsa_circ_0000190也可作为潜在的胃癌诊断标志物^[75]。他们进一步发现,血浆和组织circRNA联合测定可提高诊断的准确性。

Li等^[76]检测了患者胃癌和配对癌旁组织手术前后血清样本中hsa_circ_0001649的水平,发现该circRNA在癌组织以及术后血清中的水平显著降低, AUC值达到0.834。他们还发现该circRNA水平和临床病理因素相关。因而研究者认为, hsa_circ

_0001649是诊断胃癌的潜在生物标志物。

5.2 作为分析胃癌患者预后的指标

circPVT1可作为分析胃癌患者预后的独立参数^[77]。在胃癌组织的一系列差异表达的circRNA研究中,发现circPVT1水平最显著地上调^[77]。经过预测分析和实验证明, circPVT1可竞争性结合miR-125家族及let-7, 调控这些miRNA靶基因(如*E2FE*)的表达, 进而促进胃癌细胞增殖。研究还发现, circPVT1高水平的患者其生存率更高, 这可能与具有抑癌作用的miR-125相关。circPVT1可独立于肿瘤大小、TNM分期等临床病理指标, 单独作为总体存活和无病生存的预后指标。结合circPVT1水平分析预后比单独用TNM分期更准确^[77]。

此外, circRNA可用于III期胃癌根治术后早期复发的预测。为了建立能评估III期胃癌根治术后早期复发风险的临床预测指标, 研究者从circRNA芯片中筛选出46种差异表达的circRNA, 并进一步从中筛选出与早期复发有关的8种, 将它们分成两组, 并构建了基于4种circRNA的评估早期复发风险的临床预后评价体系^[78]。该体系在低表达组和高表达组的AUC值分别达到0.763和0.711, 而与TNM分期结合后, 新的评价体系的相应的AUC值则分别达到了0.866和0.818^[78], 这说明该体系能够预测III期胃癌根治术后癌症的早期复发。

6 展望

虽然, circRNA的研究热潮已经持续了数年, 但是circRNA这座金矿才仅仅被开采了冰山一角, 对于circRNA的形成、降解、特征和功能等方面仍然知之甚少。在circRNA形成方面, 随着tricRNA和circRNA所特有的外显子被发现, 可以推测circRNA来源、形成、降解、种类、特征和功能等方面的多样性。仅在人类组织中发现的circRNA就已达惊人的十万多种, 由此可见, 简单的几个模型难以涵盖circRNA的全貌。随着研究的深入, 人们发现, circRNA的功能与其分子本身所具有的独特的特征密切相关, 不同的circRNA分子可能具有完全不同功能。因此, 关于circRNA的功能以及与疾病的关系等问题的研究, 可能要针对具体circRNA作具体分析。circRNA由于其种类多样、分布广泛、序列保守、性能稳定和表达的时空特异性等特征, 其很有可能成为新型的诊治疾病、判断预后的生物标志物

和靶点, 为新的治疗方法和药物研发指明方向。

参考文献 (References)

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- 2 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359-86.
- 3 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 4 Isobe Y, Nashimoto A, Akazawa K, Oda I, Hayashi K, Miyashiro I, *et al.* Gastric cancer treatment in Japan: 2008 annual report of the JGCA nationwide registry. *Gastric Cancer* 2011; 14(4): 301-16.
- 5 Ajani JA, Bentrem DJ, Besh S, D'Amico TA, Das P, Denlinger C, *et al.* Gastric cancer, version 2.2013: featured updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11(5): 531-46.
- 6 邹文斌, 杨帆, 李兆申. 中国胃癌诊治关键在于提高早期诊断率. *浙江大学学报医学版*(Zou Wenbin, Yang Fan, Li Zhaoshen. How to improve the diagnosis rate of early gastric cancer in China. *Journal of Zhejiang University, Medical Sciences*) 2015; 44(1): 9-14,53.
- 7 何燕娟, 刘检, 史梅. 癌胚抗原糖类抗原72-4和糖类抗原19-9对胃癌的诊断价值. *检验医学与临床*(Diagnostic value of CEA, CA72-4 and CA19-9 in gastric cancer. *Lab Med Clin* January) 2012; 9(1): 20-1,3.
- 8 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.
- 9 Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature* 1979; 280(5720): 339-40.
- 10 Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, Kern SE, Ruppert JM, Oliner JD, *et al.* Scrambled exons. *Cell* 1991; 64(3): 607-13.
- 11 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 Genet* 2010; 6(12): e1001233.
- 12 Cocquerelle C, Daubersies P, Majerus MA, Kerckaert JP, Bailleur B. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *EMBO J* 1992; 11(3): 1095-8.
- 13 Saad FA, Vitiello L, Merlini L, Mostacciolo ML, Oliviero S, Danieli GA. A 3' consensus splice mutation in the human dystrophin gene detected by a screening for intra-exonic deletions. *Hum Mol Genet* 1992; 1(5): 345-6.
- 14 Zaphiropoulos PG. Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis. *Mol Cell Biol* 1997; 17(6): 2985-93.
- 15 Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol* 2014; 32(5): 453-61.

- 16 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.
- 17 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.
- 18 Zheng Q, Bao C, Guo W, Li S, Chen J, Chen B, *et al.* Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat Commun* 2016; 7: 11215.
- 19 You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, *et al.* Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci* 2015; 18(4): 603-10.
- 20 Zhang XO, Dong R, Zhang Y, Zhang JL, Luo Z, Zhang J, *et al.* Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res* 2016; 26(9): 1277-87.
- 21 Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* 2014; 159(1): 134-47.
- 22 Wilusz J. Circular RNA and splicing: Skip happens. *J Mol Biol* 2015; 427(15): 2411-3.
- 23 Suzuki H, Zuo Y, Wang J, Zhang MQ, Malhotra A, Mayeda A. 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.
- 24 Du WW, Yang W, Liu E, Yang Z, Dhaliwal P, Yang BB. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(6): 2846-58.
- 25 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.
- 26 Liu Q, Zhang X, Hu X, Dai L, Fu X, Zhang J, *et al.* Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a miR-136 'Sponge' in human cartilage degradation. *Sci Rep* 2016; 6: 22572.
- 27 Panda AC, Grammatikakis I, Kim KM, De S, Martindale JL, Munk R, *et al.* Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(7): 4021-35.
- 28 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.
- 29 Danan M, Schwartz S, Edelheit S, Sorek R. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in *Archaea*. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(7): 3131-42.
- 30 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.
- 31 Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(3): 256-64.
- 32 Lu Z, Filonov GS, Noto JJ, Schmidt CA, Hatkevich TL, Wen Y, *et al.* Metazoan tRNA introns generate stable circular RNAs *in vivo*. *RNA* 2015; 21(9): 1554-65.
- 33 Englert M, Sheppard K, Aslanian A, Yates JR, 3rd, Soll D. Archaeal 3'phosphate RNA splicing ligase characterization identifies the missing component in tRNA maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(4): 1290-5.
- 34 Gao Y, Wang J, Zheng Y, Zhang J, Chen S, Zhao F. Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs. *Nat Commun* 2016; 7: 12060.
- 35 Dong R, Ma XK, Chen LL, Yang L. Increased complexity of circRNA expression during species evolution. *RNA Biol* 2016; 1-11.
- 36 Rodriguez-Trelles F, Tarrío R, Ayala FJ. Origins and evolution of spliceosomal introns. *Annu Rev Genet* 2006; 40: 47-76.
- 37 Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet* 2013; 9(9): e1003777.
- 38 Schmidt CA, Noto JJ, Filonov GS, Matera AG. A Method for expressing and imaging abundant, stable, circular RNAs *in vivo* using tRNA splicing. *Methods Enzymol* 2016; 572: 215-36.
- 39 Starke S, Jost I, Rossbach O, Schneider T, Schreiner S, Hung LH, *et al.* Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep* 2015; 10(1): 103-11.
- 40 Aktas T, Avsar Ilik I, Maticzka D, Bhardwaj V, Pessoa Rodrigues C, Mittler G, *et al.* DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. *Nature* 2017; 544(7648): 115-9.
- 41 Shen T, Han M, Wei G, Ni T. An intriguing RNA species—perspectives of circularized RNA. *Protein Cell* 2015; 6(12): 871-80.
- 42 Liang D, Wilusz JE. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes Dev* 2014; 28(20): 2233-47.
- 43 Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, Jens M, Pino N, Giusti S, *et al.* Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol Cell* 2015; 58(5): 870-85.
- 44 Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, Colantoni A, Legnini I, Capauto D, *et al.* FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun* 2017; 8: 14741.
- 45 Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmanidis M, Phillips CA, *et al.* The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* 2015; 160(6): 1125-34.
- 46 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. *EMBO J* 2011; 30(21): 4414-22.
- 47 Lasda E, Parker R. Circular RNAs Co-Precipitate with extracellular vesicles: A possible mechanism for circRNA clearance. *PLoS One* 2016; 11(2): e0148407.
- 48 Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell* 2011; 146(3): 353-8.
- 49 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.
- 50 Peng L, Yuan XQ, Li GC. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer. *Oncol Rep* 2015; 33(6): 2669-74.
- 51 Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat*

- Methods 2007; 4(9): 721-6.
- 52 Westholm JO, Miura P, Olson S, Shenker S, Joseph B, Sanfilippo P, *et al.* Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. *Cell Rep* 2014; 9(5): 1966-80.
- 53 Wang K, Long B, Liu F, Wang JX, Liu CY, Zhao B, *et al.* A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223. *Eur Heart J* 2016; 37 (33): 2602-11.
- 54 Lan PH, Liu ZH, Pei YJ, Wu ZG, Yu Y, Yang YF, *et al.* Landscape of RNAs in human lumbar disc degeneration. *Oncotarget* 2016; 7(39): 63166-76.
- 55 Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol* 2014; 15(7): 409.
- 56 Chen LL. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(4): 205-11.
- 57 Schneider T, Hung LH, Schreiner S, Starke S, Eckhof H, Roszbach O, *et al.* CircRNA-protein complexes: IMP3 protein component defines subfamily of circRNPs. *Sci Rep* 2016; 6: 31313.
- 58 Chen CY, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* 1995; 268(5209): 415-7.
- 59 Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, van der Meide PH, Schellekens H. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature* 1986; 323(6088): 558-60.
- 60 Abe N, Hiroshima M, Maruyama H, Nakashima Y, Nakano Y, Matsuda A, *et al.* Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52(27): 7004-8.
- 61 Perriman R, Ares M Jr. Circular mRNA can direct translation of extremely long repeating-sequence proteins *in vivo*. *RNA* 1998; 4(9): 1047-54.
- 62 Abe N, Matsumoto K, Nishihara M, Nakano Y, Shibata A, Maruyama H, *et al.* Rolling circle translation of circular RNA in living human cells. *Sci Rep* 2015; 5: 16435.
- 63 Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, *et al.* Translation of circRNAs. *Mol Cell* 2017; 66(1): 9-21.e7.
- 64 Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, *et al.* Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell* 2017; 66(1): 22-37.e9.
- 65 Tay ML, Pek JW. Maternally inherited stable intronic sequence RNA triggers a self-reinforcing feedback loop during development. *Curr Biol* 2017; 27(7): 1062-7.
- 66 Hsiao KY, Lin YC, Gupta SK, Chang N, Yen L, Sun HS, *et al.* Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 2017; 77(9): 2339-50.
- 67 Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, *et al.* Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2015; 444: 132-6.
- 68 Weng W, Wei Q, Toden S, Yoshida K, Nagasaka T, Fujiwara T, *et al.* Circular RNA ciRS-7-A promising prognostic biomarker and a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23(14): 3918-28.
- 69 Wang F, Nazarali AJ, Ji S. Circular RNAs as potential biomarkers for cancer diagnosis and therapy. *Am J Cancer Res* 2016; 6(6): 1167-76.
- 70 Du WW, Yang W, Chen Y, Wu ZK, Foster FS, Yang Z, *et al.* Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses. *Eur Heart J* 2017; 38(18): 1402-12.
- 71 Holdt LM, Stahringer A, Sass K, Pichler G, Kulak NA, Wilfert W, *et al.* Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat Commun* 2016; 7: 12429.
- 72 Qin M, Liu G, Huo X, Tao X, Sun X, Ge Z, *et al.* Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark* 2016; 16(1): 161-9.
- 73 Sui W, Shi Z, Xue W, Ou M, Zhu Y, Chen J, *et al.* Circular RNA and gene expression profiles in gastric cancer based on microarray chip technology. *Oncol Rep* 2017; 37(3): 1804-14.
- 74 Li P, Chen H, Chen S, Mo X, Li T, Xiao B, *et al.* Circular RNA 0000096 affects cell growth and migration in gastric cancer. *Br J Cancer* 2017; 116(5): 626-33.
- 75 Chen S, Li T, Zhao Q, Xiao B, Guo J. Using circular RNA hsa_circ_0000190 as a new biomarker in the diagnosis of gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2017; 466: 167-71.
- 76 Li WH, Song YC, Zhang H, Zhou ZJ, Xie X, Zeng QN, *et al.* Decreased expression of Hsa_circ_00001649 in gastric cancer and its clinical significance. *Dis Markers* 2017; 2017: 4587698.
- 77 Chen J, Li Y, Zheng Q, Bao C, He J, Chen B, *et al.* Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer. *Cancer Lett* 2017; 388: 208-19.
- 78 Zhang Y, Li J, Yu J, Liu H, Shen Z, Ye G, *et al.* Circular RNAs signature predicts the early recurrence of stage III gastric cancer after radical surgery. *Oncotarget* 2017; 8(14): 22936-43.