

环状RNA研究进展及其在HBV相关肝病中的作用

颜兴艳¹, 向天新¹, 张守华² (1.南昌大学第一附属医院 感染科, 南昌 330006; 2.江西省儿童医院 普外科, 南昌 330006)

摘要: 环状RNA (circRNAs) 是内源性非编码RNA (non-coding RNA, ncRNA) 和竞争性内源RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 家族的新兴成员。circRNAs通过特殊的前体mRNA可变剪接, 以外显子或内含子环化的形式将3'端和5'端通过共价键连接起来, 形成一个闭合环状结构。目前研究表明circRNAs广泛存在于生物体中, 可通过与miRNA和蛋白质等其他分子相互作用调控基因的表达并参与疾病的发生和发展, 其有望在疾病的预防、诊断及治疗中发挥重要的作用。本文就目前circRNAs研究进展及其在HBV相关肝病中的作用进行综述。

关键词: 环状RNA; 微小RNA; 竞争内源性RNA; 肝炎病毒, 乙型

Research progress of circular RNA and its role in HBV-related liver diseases

YAN Xing-yan¹, XIANG Tian-xing¹, ZHANG Shou-hua² (1.Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2.Department of Forensic Surgery, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China)

Abstract: Circular RNA (circ RNAs) is a novel type of non-coding RNA (ncRNA) and competing endogenous RNA (ceRNA), who forms covalently closed loop structure by jointing 3' and 5' ends together via exon circularization and intron circularization. Current studies have discovered that circRNAs are widely expressed in eukaryocyte and act as regulator of gene expression by interacting with miRNA, proteins and other molecules. Emerging evidence indicates that circRNA plays the essential role in the development of some diseases and may serve as diagnostic or predictive biomarkers. Herein, we reviewed the current available outcomes and progress of researches concerning circRNAs and the potential relationship between HBV-related liver diseases and circRNAs.

Key words: Circular RNA; MicroRNA; Competing endogenous RNA; Hepatitis B virus

环状RNA (circular RNAs, circRNAs) 是一类特殊的非编码内源性RNA (noncoding RNA, ncRNA), 与线性RNAs (liner RNA) 不同, circRNAs是由3'端及5'端头尾相连形成的共价闭合环状分子, 研究表明其广泛存在于人体细胞内并且在所有组织及真核生物中均有表达^[1]。早在1970年, 研究人员就已在RNA病毒中发现了环状RNA, 但由于其在组织中的表达水平低, 仅被认为是在转录过程中发生错误剪接形成的产物而未被重视^[2]。直至近几年, 随着RNA测序及生物信息学等技术的发展, circRNAs的普遍性及重要性才引起学者们的注意。Salzman等^[3,4]研究发现大量的人类基因

可表达circRNA, 并且在许多人类基因亚型中, 环状RNA的亚型实际上是具有主导作用的。2013年Memczak等^[5]通过RNA测序技术结合人白细胞数据库对人、线虫及小鼠的环状RNA进行测定, 发现人类circ RNAs有1950种, 线虫circRNA有724种, 小鼠circ RNAs有1903种, 并且其中一些circRNAs具有microRNA海绵样作用 (microRNA sponge), 参与基因表达的转录后调控。此外, circRNAs作为竞争内源性RNA家族中的新兴成员, 可与编码蛋白质的信使RNA及其他非编码RNA成员通过竞争共同microRNA的结合位点而相互调节, 从而对基因进行转录后的表达调控, 在体内具有一定的生物学功能并在疾病的发生及发展中起着关键作用^[6]。

HBV感染仍是全球健康问题的一大挑战, 由于乙肝疫苗及其他预防措施的普及, HBV感染率正

逐渐下降,但我国作为一个乙型肝炎大国,目前慢性乙型肝炎患者的数量仍十分庞大。该部分患者如不及时进行治疗,会有发展成肝硬化、重型肝炎及肝癌的风险,乙型肝炎的完全治愈仍是一个有待解决的重大难题^[7]。有研究表明,部分miRNA表达异常在HBV相关肝病的发生与发展中发挥着重要的作用,而circRNAs具有miRNA海绵样作用,并且可作为竞争内源性RNAs(competing endogenous RNAs, ceRNA)在病毒与宿主之间发挥作用,因此, circRNAs在HBV相关肝病中具有重要的意义^[8-10]。本文现对目前circRNAs的最新研究进展及其在HBV相关肝病中的作用进行综述。

1 环状RNA的形成

环状RNA是由3'-5'磷酸二酯键(内含子套索RNA成环处为2'-5'磷酸二酯键)构成的一类环状基因转录产物。其中仅由内含子构成的环状RNA称为内含子环状RNA(circular intronic RNA, ciRNA),仅由外显子构成的环状RNA称为外显子环状RNA(circular exonic RNA),同时具有外显子和内含子序列的环状RNA称为外显子-内含子环状RNA(exon-intron circRNA或ELciRNA)^[11]。随着RNA测序技术的发展,目前有数千种环状RNA的序列已被阐明,但是其生成机制仍未完全明确。现阶段认为环状RNA的生成主要存在3种通路形式:内含子配对驱动的环化(intron pairing-driven circularization)、RNA结合蛋白配对驱动的环化(RBP pairing driven circularization)以及套索驱动的环化(lariat-driven circularization)。内含子配对驱动的环化是内含子两侧的碱基互补序列相互配对形成环状结构,使合适剪接位点之间的距离拉近,然后切除内含子,最后形成circ RNAs或ELciRNA;RNA结合蛋白配对驱动的环化主要是由于结合在内含子两侧的互补序列上的RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)相互作用形成环状结构,促进头尾两端的末端连接,最后形成circ RNAs或者ELciRNA;套索驱动形成的环状结构主要是通过外显子跳读,即pre-mRNA下游外显子SD的3'端连接到上游外显子的5'端,形成套索,再切除内含子,形成由两个外显子组成的circ RNAs或ELciRNA^[12-16]。

2 环状RNA的特性

circRNAs具有以下特征:①共价闭合环状结构,无5'-3'极性和多聚腺苷酸尾,因此circRNAs比线性RNA更加稳定且不易被RNA核酸外切酶降解^[17,18];②circRNAs具有多样性^[15];③多数来源于

外显子环化并且定位于细胞质,某些circRNAs具有miRNA应答元件(miRNA response elements, MREs),具有miRNA海绵样作用;少数circRNAs来源于内含子或由内含子与外显子共同组成,定位于细胞核并且可调节亲本基因的表达^[4,5,19-21];④具有一定的组织和时序特异性^[12];⑤大多数circRNAs是内源性的非编码RNA,但HDV和一些人工合成的circ RNAs具有翻译功能^[11];⑥不同种类间具有高度保守性^[11,19]。这些特性使得circRNAs可在转录水平或转录后水平发挥调控作用,并且可作为疾病诊断的一个理想的分子标记物。

3 环状RNA的功能

3.1 作为竞争内源性RNA或miRNA海绵样分子 可编码蛋白质的mRNAs分子以及非编码的RNAs(如长链非编码RNA、假性基因和circRNA分子)均含有miRNA应答元件,可通过竞争性结合miRNA,作为miRNA海绵样分子,抑制miRNA的生物学功能,调节miRNA的活动,充当ceRNA的成员来调控基因表达。尽管目前关于环状RNA的生物学功能尚未完全明确,但两种环状RNA即小脑变性相关蛋白1反义转录物(antisense to the cerebellar degeneration-related protein 1 transcript, CDR1as) ciRS-7/CDR1as和Sry circRNA的功能已经被阐明。ciRS-7/CDR1as和Sry circRNA通过与微小RNA-7(microRNA-7, miR-7)和微小RNA-138(microRNA-138, miR-138)的相互结合均可作为miRNA功能的抑制剂,在ciRS-7/CDR1as上有超过70个与miR-7相结合的保守位点,而Sry circRNA上有近16个与miR-138相结合的保守位点^[13-15,22,23]。此外,AGO蛋白(argonaute protein, AGO)能与ciRS-7/CDR1as上的保守位点相结合,从而阻止miR-7与ciRS-7/CDR1as的相互作用,增加了ciRS-7/CDR1as的含量,而miR-671可直接裂解ciRS-7/CDR1as^[15]。circRNA是无5'末端和3'末端的闭合环状结构,比线性RNA更稳定,因此circRNA作为ceRNA比一般的线性ceRNA具有更稳定的miRNA应答元件^[17,18],可更加持续并稳定地在基因表达的调控中发挥作用。由于目前仅有少数circRNAs被证实含有miRNA的结合位点, circRNAs的miRNA海绵样作用及充当ceRNA成员的这一功能仍有争议。

3.2 作为RNA结合蛋白海绵分子 circRNAs不仅可与miRNA分子相结合发挥miRNA海绵样作用,还可与RBPs结合形成RNA蛋白复合物(RNA-protein complexes, RPCs),影响蛋白质的功能。如RNA剪切因子MBL可结合其亲本基因的第2外显子,促

进其环化形成circMbl;同时,circMbl能与MBL结合,降低MBL的有效浓度,减少circMbl的生成。此外, RNA编辑修饰酶ADAR1也可作为一种RBP与circRNAs相互作用进而调控circRNA的产生,使circRNAs的产量减少^[13-15,17]。

3.3 其他功能 来源于外显子的环状RNA定位于细胞质中,外显子-内含子环状RNA(ElciRNA)主要定位于细胞核内。ElciRNA可通过与Pol II、U1小核糖核蛋白(U1snRNP)及基因启动子的相互作用调控亲本基因的转录,即U1snRNP和ElciRNA通过相互作用形成ElciRNA-U1snRNP复合物,此复合物在亲本基因启动子上再与Pol II相互作用,从而促进亲本基因的表达。研究表明circ-ITCH可与miR-7、miR-17和miR-214等相互作用从而增加ITCH的水平。因此,只有外显子来源的环状RNA可能在细胞质中参与调节功能,而内含子来源的环状RNA(如ciRNAs和ElciRNAs)可能在细胞核的转录调节过程中发挥作用。此外,还有少量的环状RNA可作为模板参加翻译过程^[13-15,17,20,21]。

4 circRNAs 与 HBV 相关肝病

研究表明,各种RNA间存在复杂且精细的网络系统,其中包括可编码蛋白质的mRNAs分子以及非编码的RNAs,如长链非编码RNA、假性基因和环状RNA分子^[6]。这些RNA转录子可充当竞争内源性RNA分子或者天然的miRNAs海绵分子而相互作用,共同调节基因的表达,并且在基因表达的转录后调控中起着重要的作用。在这个竞争内源性RNA调控网络当中,miRNA充当核心枢纽,在正常生理状态下,各分子间处于平衡状态,一旦平衡被破坏,就会导致疾病的发生与发展^[24,25]。研究表明,在被病毒感染的人类细胞中,也存在这样一种竞争内源性调控网络^[8]。miRNAs参与细胞内各种生物过程的调控,如细胞生长、分化、免疫激活、凋亡和宿主与病毒间的相互作用。miRNAs是宿主与病毒间相互作用的关键调节分子,宿主和病毒间的miRNA相互作用所形成的复杂关系为病毒提供了一个特殊的环境。在病毒与宿主细胞相互作用的过程中,宿主本身的miRNA分子能够作用于病毒,而病毒编码的miRNA也能够作用于宿主。在被病毒感染的细胞中,除了编码蛋白质的mRNAs分子,环状RNA也可能是宿主或病毒miRNAs作用的分子靶点,病毒可以利用宿主miRNA分子基因调控网络中的竞争内源性RNA效应发挥作用;病毒的miRNAs也可作用于非编码转录子如长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)和环状RNA^[8,10]。环

状RNA拥有大量的miRNA结合位点,可有效发挥miRNA海绵样作用,抑制miRNA的功能。Ghosal等^[8]发现一些环状RNA具有大量的可与病毒miRNAs结合的位点,例如hsa-circ-002048拥有36个EBV编码的miRNA结合位点。HBV作为病毒的一种,这种宿主与病毒间RNA的竞争内源性调控网络也必定在其宿主免疫及相关病理状态中发挥作用。已有研究显示miRNA与HBV在体内外存在一定的联系,如Chen等^[26]在体外研究中发现miR-122可下调HBV基因的表达。贾音等^[27]研究表明,在慢性乙型肝炎肝功能损伤患者的血浆样品中miR-199a、miR-125b和miR-122表达量的变化具有统计学差异,其中以miR-122的变化最显著。虽然目前尚无环状RNA与乙型肝炎关系的相关报道,但随着对circ RNAs功能的日益重视以及相关研究的不断深入,越来越多新的circ RNAs被发现, circ RNAs作为天然miRNA海绵样分子及新型的竞争内源性RNA分子在病毒性疾病的发生发展中发挥着重要的作用,环状RNA在HBV相关肝病中的作用机制及重要性值得进一步探索。

5 circRNAs 与原发性肝癌

miRNA在肿瘤发生机制中的作用可主要概括为以下3个方面:①作为癌基因:此类miRNA在肿瘤组织中呈高表达状态,在正常组织中表达下调,可通过作用于抑癌基因,抑制其活性,促进肿瘤的发生与发展,其中具有代表意义的miRNA有miR-17-92簇和miR-21;②作为抑癌基因:这类miRNA在肿瘤组织中的表达一般是下调的,而在正常组织中则是高表达状态,如let-7家族、miR-15a和miR-16-1簇;③一些致癌病毒编码的miRNA可能参与相关肿瘤的发生及发展^[28]。由此可见,沉默或抑制具有原癌基因活性的miRNA或恢复具有抑癌作用的miRNA的功能,都可为肿瘤的靶向治疗提供新的思路和途径。

circRNAs可作为一种竞争性内源RNA,具有miRNA海绵样作用,可与miRNA相互作用,通过阻断miRNA对其靶mRNA的抑制作用,参与靶基因的表达调控,从而在肿瘤的发生、发展及转移等方面发挥一定的作用^[27,29-31]。有研究表明,ciRS-7与miR-7的相互作用可影响miR-7靶基因(EGFR、PIK3CD和mTOR等)的表达,从而与肝癌的发生和发展相关联^[22]。此外,Florian等^[32]在HepG2模型的研究中确认其含有634种环状RNA,而miR-181家族成员在HepG2细胞中均呈高表达状态;作者还预测BaP可先通过过表达mir-181a-1-3p,再通过抑制MGMT DNA修复酶促进肝癌的发生,在此过程

中,环状RNA可通过miRNA海绵样作用抑制mir-181a-1-3p的过表达,从而调节癌症的发生。Qin等^[33]采用实时定量PCR技术检测89例肝癌及其邻近正常肝脏组织hsa_circ_0001649的差异性表达后发现,hsa_circ_0001649在肝癌组织中是显著下调的,并且其表达量与肝肿瘤的体积和癌栓发生率显著相关,因此认为hsa_circ_0001649可作为肝癌的一种新型标记物并可能参与了肝癌的发生与转移。Shang等^[34]研究发现hsa_circ_0005075的表达量在肝癌组织与正常肝组织中存在显著差异,可作为一个良好的肝癌预测指标;其还认为hsa_circ_0005075可与miR-23b-5p、miR-93-3p、miR-581、miR-23a-5p以及其相应的mRNA分子相互作用,构成一个基因调控网络系统。

circRNAs不仅可作为一种竞争内源性RNA或miRNA海绵分子与miRNA相互作用间接参与肝癌的发生与发展,而且还可直接作为染色体易位或基因重排等改变后生成的产物参与肿瘤的发生与调控。Guarnerio等^[35]研究表明,异常的染色体易位和染色体重排与许多肿瘤的发生有关,而染色体易位后的基因可在RNA的加工或成熟过程中通过反式剪接形成一种新的异常环状RNA,即f-circRNAs。异常的f-circRNAs与癌症的发生及发展具有相关性。此外,癌细胞中的f-circRNAs与癌细胞的维持及赋予它们对治疗的抵抗力也是非常重要的,当沉默内源性f-circRNAs后,癌细胞就会出现凋亡。虽然目前还没有关于f-circRNAs和肝癌相关的研究,但这为肝癌的治疗靶点提供了一个新的方向,可通过阻断f-circRNAs或其下游的效应位点达到消灭肿瘤的目的。

6 展望

环状RNA作为一种新型的竞争内源性RNA分子或miRNA海绵分子,在病毒性疾病及肿瘤的发生和发展过程中均发挥着重要的作用。但目前对环状RNA的研究仍处于起步阶段,关于环状RNA的生成、特性及功能等尚未完全明确,尤其是环状RNA在HBV相关肝病中的研究几乎还处于空白阶段。我国目前仍是一个乙型肝炎大国,探寻HBV相关肝病新的治疗靶点和预测指标具有重要意义。

关于环状RNA与HBV相关肝病仍有诸多问题值得探讨:①环状RNA在HBV相关肝病中表达谱的变化趋势;②HBV相关肝病进展过程中环状RNA表达谱的变化情况;③环状RNA在肝癌发生机制中的作用、角色与地位,以及找寻肝癌中特征性的环状RNA从而在肝癌的预测及治疗中提供更有价值的指

标;④环状RNA在HBV相关肝病的具体发病机制以及发挥的具体作用;⑤环状RNA在核苷类似物或干扰素治疗过程中,其表达谱是否会发生变化,以及是否可作为临床用药的指导指标。

综上,探寻环状RNA在HBV相关肝病中的作用具有深远的意义,对于环状RNA的研究仍任重而道远。

参考文献

- [1] 夏世金,高文,胡明冬,等.环状RNA的研究现状及展望[J/CD].中华肺部疾病杂志(电子版),2014,7(6):670-673.
- [2] Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1976,73(11):3852-3856.
- [3] Salzman J, Gawad C, Wang PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. Plos One,2012,7(2):e30733.
- [4] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression[J]. Plos Genet,2013,9(9):e1003777.
- [5] Memezak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature,2013,495(7441):333-338.
- [6] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. Nature,2014,505(7483):344-352.
- [7] Poland GA, Jacobson RM. Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine[J]. N Engl J Med,2004,351(27):2832-2838.
- [8] Ghosal S, Das S, Sen R, et al. Human ViCe: host ceRNA network in virus infected cells in human[J]. Front Fgene,2014,5:249-261.
- [9] Sumazin P, Yang X, Chiu H S, et al. An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma[J]. Cell,2011,147(2):370-381.
- [10] Ghosh Z, Mallick B, Chakrabarti J. Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction[J]. Nucleic Acids Res,2009,37(4):1035-1048.
- [11] QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Lett,2015,365(2):141-148.
- [12] CHEN L, HUANG C, WANG X, et al. Circular RNA in eukaryotic cells[J]. Current Genomics,2015,16(5):312-318.
- [13] Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB, et al. Circular RNA: Identification, biogenesis and function[J]. Biochim Biophys Acta,2016,1859(1):163-168.
- [14] Petkovic S, Müller S. RNA circularization strategies in vivo and in vitro[J]. Nucleic Acids Research,2015,43(4):2454-2465.
- [15] Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function[J]. RNA,2016,20(12):1829-1842.
- [16] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. Mol Cell,2014,56(1):55-66.
- [17] Liu YC, Li JR, Sun CH, et al. CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data[J]. Nucleic Acids Res,2016,44(D1):D209-D215.
- [18] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R

- resistant RNAs[J]. *Int J Mol Sci*,2014,15(6):9331-9342.
- [19] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*,2013,19(2):141-157.
- [20] ZHANG Y, ZHANG XO, CHEN T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*,2013,51(6):792-806.
- [21] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2015,22(3):256-264.
- [22] PENG L, YUAN XQ, LI GC, et al. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer[J]. *Oncol Rep*,2015,33(6):2669-2674.
- [23] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*,2013,495(7441):384-388.
- [24] Bahn JH, Zhang Q, Li F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva[J]. *Clin Chem*,2015,61(1):221-230.
- [25] Thomas LF, Sætrum P. Circular RNAs are depleted of polymorphisms at microRNA binding sites[J]. *Bioinformatics*,2014,30(16):2243-2246.
- [26] CHEN S, NI M, YU B, et al. Construction and identification of a human liver specific microRNA eukaryotic expression vector[J]. *Cell Mol Immunol*,2007,4(6):473-477.
- [27] 贾音, 张毅, 费明钰, 等. 慢性乙肝患者外周血microRNAs的表达变化[J]. *第二军医大学学报*,2010,31(12):1381-1383.
- [28] 刑茜, 陈思宇. microRNA与肝癌研究进展[J]. *肿瘤基础与临床*,2014,27(5):447-451.
- [29] Poliseno L, Salmena L, Zhang J, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology[J]. *Nature*,2010,465(7301):1033-1038.
- [30] Tay Y, Kats L, Salmena L, et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs[J]. *Cell*,2011,147(2):344-357.
- [31] Karreth FA, Pandolfi PP. ceRNA cross-talk in cancer: when ce-bling rivalries go awry[J]. *Cancer Discov*,2013,3(10):1113-1121.
- [32] Caiment F, Gaj S, Claessen S, et al. High-throughput data integration of RNA-miRNA-circRNA reveals novel insights into mechanisms of benzo[a]pyrene-induced carcinogenicity[J]. *Nucleic Acids Research*,2015,43(5):2525-2534.
- [33] Qin M, Liu G, Huo X, et al. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomarkers*,2016,16(1):161-169.
- [34] SHANG X, LI G, LIU H, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals that hsa_circ_0005075, a new circular RNA biomarker, is involved in hepatocellular carcinoma development[J]. *Medicine (Baltimore)*,2016,95(22):e3811.
- [35] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, et al. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations[J]. *Cell*,2016,165(2):289-302.

收稿日期: 2016-07-15

颜兴艳, 向天新, 张守华. 环状RNA研究进展及其在HBV相关肝病中的作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2016,8(4):6-10.