

综述

环状 RNA 与心血管疾病的研究进展

刘国围综述, 石蓓审校

摘要 非编码 RNA (ncRNA) 是一种基因组转录产生的且不编码蛋白质的 RNA, 它包括环状 RNA (circRNA)、微小 RNA(miRNA)、长链 ncRNA (lncRNA) 和小干扰 RNA (siRNA) 等多种 RNA, 它们之间网状结构的动力平衡是调节内稳态所需要的, 其中一种的异常调节就可能导致疾病的发生。circRNA 是天然生成的内源性 ncRNA 家族中的一员, 具有特殊的环状结构, 不易被核酸酶降解、分布广泛、多样化、稳定和高度保守等特点使其逐渐成为 ncRNA 研究的热点。已有研究表明 circRNA 与人类疾病密切相关, 其中就包括心血管疾病, 并在疾病中起着重要作用。本文旨在对 circRNA 在心血管某些疾病方面的研究进展以及面临的问题进行综述。

关键词 环状 RNA; 心血管疾病

近几十年以来, 心血管疾病已成为导致全球死亡的主要原因之一^[1], 心血管疾病也是当今社会危害人类健康和生命最主要的疾病之一, 且其发病率在不断上升, 发病年龄也有所提前。尽管心血管疾病的治疗手段在不断进步, 但仍有部分患者远期获益较小, 因此积极探寻有效的预测及治疗的分子靶点对心血管疾病具有重要意义。

1 环状 RNA (circRNA) 的发现及其形成机制

越来越多的研究发现遗传因素和表观遗传学因素对心血管疾病的进展有着重要影响。目前, 非编码 RNA (ncRNA) 已成为研究心血管疾病及相关异常发生发展机制的新热点, 既往普遍认为 circRNA 表达丰度低, 很可能是在剪接中错误表达^[2]。通过高通量测序和新颖的计算方法说明了他们广泛大量的存在于真核细胞转录组内^[3-5]。circRNA 是既没有 5' 到 3' 极性也没有多聚腺苷酸(A)尾的共价闭环环状结构, 其长约 100 个核苷酸^[5], 广泛多样地存在于哺乳动物中, 尤其是人和小鼠, 且具有调控基因表达的作用, 在各种细胞进程中扮演重要角色。circRNA 最早于 20 世纪 70 年代在 RNA 病毒中发现, 随后, 在多种生物中检测到 circRNA, 其中, Jeck 等^[4]在人类成纤维细胞中就检测了大于 25 000 多种 circRNA, 其在真核转录组高度表达且在外泌体中含量丰富^[6]。circRNA 通过非经典剪接方式进行反向剪接形成。2013 年, Jeck 等^[4]提出了 circRNA 发生的两种模型, 即套索驱动的内含子配对驱动的内含子, 第一种模型认为 pre-RNA 的转录过程中由于 RNA 发生了部分折叠, 拉近了原本非相邻的外显子, 从而发生了外显子跳跃, 使得被跨越的区域形成了环形 RNA 中间体, 进一步通过套索剪接形成由外显子构成的环形 RNA 分子。另一种模型认为, 位于内含子区域的反向互补序列导致了内含子区域配对介导反向剪接从而形成环形 RNA 分子。大部分的 circRNA 是由外显子序列构成^[4], 在不同的物种中具有保守性, 同时存在组织及不同发育阶段的表达特异性, 同时也表明了 circRNA 是丰富、保守的, 在某些情况下, circRNA 分子的丰度超过其线性 mRNA 分子的 10 倍。与

同源的线性 RNA 相比, 其在活体内高度稳定, 尤其是在细胞质中, 并且能够被外泌体分泌^[7], 可能是由于降低了核酸外切酶的敏感性, circRNA 比线性 RNA 分子有更长的半衰期^[5]。circRNA 其主要分布在细胞质中, 并在活体内高度稳定表达, 由于 circRNA 对核酸酶不敏感, 所以比同源线性 RNA 更为稳定, 这使得 circRNA 在作为新型临床诊断标记物的开发应用以及心血管疾病分子靶向治疗上具有明显优势。

2 环状 RNA 的作用机制

过去一直认为 circRNA 无蛋白编码能力, 不能通过编码功能性蛋白质实现其生物学功能。然而, 2017-03 在 Cell Research 杂志在线发表了一篇论文, 该文介绍了 circRNA 中 m⁶A 修饰, 并且该修饰能促进 circRNA 翻译, 首次证明了 circRNA 表达多肽的现象^[8]。紧接着, 又有两篇 circRNA 翻译蛋白的文章发表, 一篇发现了 circ-ZNF609 可以直接翻译蛋白, 而且该蛋白参与肌肉的发生过程^[9], 另一篇介绍了在果蝇大脑中发现大量的 circRNA 翻译多肽或蛋白的情况^[10]。circRNA 与长链 ncRNA (lncRNA)、mRNA 一样, 也含有大量的微小 RNA (miRNA) 结合位点, 现较为明确的是 circRNA 作为竞争性内源 RNA (ceRNA), 通过碱基互补海绵样吸附 miRNA 调控 miRNA 下游靶基因的表达^[11], 从而发挥其作用。1990 年, Koopman 等^[12]在小鼠中发现了最具特征的 circRNA, 即性别决定基因 Sry, 它含有 miR-138 的 16 个结合位点, 能与 miR-138 海绵样结合并抑制其活性, 使 miR-138 靶基因水平升高^[13]。

2013 年, Memczak 等^[5]发现另一种充当“海绵”的人类 circRNA, 即小脑变性相关蛋白 1 反义转录物 (Cdr1as/ciRS-7), 来源于 Cdr1 蛋白编码基因反义转录^[14], 它含有 miR-7 的 63 个结合位点并能够高强度地与 miRNA 效应复合物结合^[5], 从而抑制 miRNA-7 的活性。Hansen 等^[13]的研究也说明了 ciRS-7 能海绵样吸附 miR-7, 并以一种依赖 miR-7 的方式与 argonaute (AGO) 蛋白高度结合。Zheng 等^[2]证明了来源于 HIPK3 基因 Exon2 的 circRNA (circHIPK3), 可以结合 9 种 miRNA 潜在的 18 个结合位点, 且能够直接结合 miR-124 并

作者单位: 563003 贵州省遵义市, 遵义医学院附属医院 心血管内科

通讯作者: 石蓓 Email: shibei2147@163.com

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2018) 05-0501-03 DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2018.05.019

抑制其活性。

有文献表明, circRNA 同其他 RNA 一样, 可以与某些 RNA 结合蛋白相互作用, 从而直接调控这些蛋白的功能。比如 circRNA 通过与磷酸化 Pol II 结合影响基因转录^[14], circRNA 也能够与 AGO 蛋白结合。

3 环状 RNA 与心脏疾病

3.1 环状 RNA 与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是很多心血管疾病共同的病理基础, 是导致人类死亡的主要原因。环状的 INK4 基因座中反义非编码 RNA (circANRIL) 在人类血管组织、平滑肌细胞、单核/巨噬细胞都有表达, 而这些组织细胞都参与动脉粥样硬化发生发展的过程。2010 年, Holdt 等^[15]的研究结果给位于 INK4 基因座上的反义 ncRNA ANRIL 与动脉粥样硬化有关提供了强有力的证据。也有研究表明 circANRIL 可能通过调控细胞周期素依赖性激酶 4 (CDK4) 蛋白/可变阅读框抑制因子 (INK4/ARF) 的表达参与动脉粥样硬化发生发展的过程^[16]。后来, Holdt 等又发现了 circANRIL 能引起核仁压力和 P53 的激活, 通过调节在动脉粥样硬化疾病中起关键作用的血管组织和细胞, 发挥保护作用。circANRIL 和核糖体 RNA (rRNA) 属于 lncRNA 的不同家族, 但有序列同源性, 都能结合雌激素受体共同调节因子抗体同系物 1 (PES1), 其中 circANRIL 在动脉粥样硬化心血管疾病相关的染色体 9P21 位点转录, 通过竞争性抑制前核糖体 RNA (pre-rRNA) 与 PES1 结合, 影响 rRNA 的生成并诱导核仁压力, 从而调控动脉粥样硬化形成通路发挥抗动脉粥样硬化作用。

3.2 环状 RNA 与心肌梗死

心肌梗死及其并发症是社会与医疗保健体系巨大的经济负担^[17], 虽然大量研究证实心脏干细胞移植到缺血心脏后可改善心功能^[18], 但其治疗心肌梗死仍处于初级阶段^[19], 因而对心肌梗死发生机制的研究和找到更多的治疗手段极为重要。2016 年, Geng 等^[20]关于 circRNA 与心肌梗死的研究说明了小脑变性相关蛋白 1 反义转录物 (Cdr1as) 与心肌梗死有关。建立心肌梗死的小鼠模型, 发现在心肌细胞中存在 Cdr1as/miR-7a 通路, 且两者的水平都是上调的。过表达的 Cdr1as 能诱导细胞凋亡, Cdr1as 与 miR-7a 结合后降低 miR-7a 的活性, 从而上调 miR-7a 靶基因多聚(ADP-核糖)聚合酶 (PARP) 和转录因子特化蛋白 1 (SP1), 最终加重心肌梗死的发展。其中 SP1 是转录因子特化蛋白/Kruppel 样转录因子 (SP/KLF) 家族中的一员^[21], 已被证明在心肌梗死的发生发展中 (包括心肌纤维化、凋亡和血管再生) 扮演重要角色^[22], PARP 也有着相似的功能。然而, miR-7a 的过表达可以显著抑制 Cdr1as 引起的改变, 从而得以保护心肌梗死引起的细胞凋亡。

3.3 环状 RNA 与心肌肥厚和心力衰竭

心力衰竭是全世界死亡的主要原因之一, 心肌肥厚与增加心力衰竭风险之间有着密切的联系。通常, 心肌肥厚最终会发展成为心力衰竭^[11]。众所周知, 影响心功能和参与心肌肥厚的因素有很多, 如 G 蛋白耦联受体、肾上腺素、血管紧张素等。2007 年, Carè 等^[23]发表了关于 miRNA-133 调控心肌肥厚的文献, 说明了 miRNA 参与心肌肥厚的调节, 但对 miRNA 上下游的调节因子尚不是很清楚, 调控其上下游调节因子很有可能阻断心脏发生病理性肥厚的通路, 最终抑制心肌肥厚发展成为心力衰竭。2015 年, Wang 等^[11]提出了

一种由心脏相关性 circRNA (HRCR)、miR-223 和细胞凋亡蛋白酶募集域抑制剂 (ARC) 组成的新的调节心脏肥大和心力衰竭的途径, 为心肌肥厚和心力衰竭的治疗提供了一个新靶点。其中, miR-223 是心肌肥厚和心力衰竭的内源性调节因子, 可以促进心肌细胞肥大。ARC 是 miR-223 下游的靶基因, 对病理性心肌肥厚和心力衰竭具有保护作用, 由于 miR-223 能特异性调控 ARC, 还是会引起心脏的肥大或衰竭。然而, HRCR 作为 miR-223 的内源性因子直接结合 miR-223 并抑制其活性, 使 miR-223 对 ARC 的调控作用减弱, ARC 的表达增加, 最终达到保护心脏的作用。

3.4 环状 RNA 与心肌纤维化

心肌纤维化是指间质性心肌胶原网络中的多种定量和定性变化, 这些变化是针对心脏缺血性损伤, 全身疾病, 药物或影响循环系统或心脏本身的任何其他有害刺激而发生的。心肌纤维化改变心肌的结构, 促进心脏功能障碍的发展, 也诱发心律失常, 影响心力衰竭患者的临床过程和结果^[24]。已有文献报道, circRNA-010567 是 miR-141 的内源性竞争性 ceRNA, 可抑制 miR-141 的表达, 后者又可通过内皮细胞细胞间黏附分子-1 的表达减轻心肌缺血再灌注损伤^[25]。而在 2017 年, Zhou 等^[26]发现 circRNA-010567 能促进心肌的纤维化。该团队先利用芯片法分析了糖尿病 db/db 小鼠模型的心肌中环状 RNA, 发现 circRNA-010567 在血管紧张素 II (Ang II) 处理的心肌和心脏成纤维细胞中是显著上调的。然后信息学分析发现 circRNA-010567 可竞争性地结合 miR-141, 并通过荧光素酶报告基因试验确定了这一预测结果。敲除 circRNA-010567 后, miR-141 升高, 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 下调, 从而抑制纤维化相关蛋白 Col I、col II 和 α -SMA 的表达。总之, circRNA-010567 通过 miR-141/TGF- $\beta 1$ 轴促进纤维相关蛋白的表达, 进而促进心肌纤维化的这一发现为 circRNA 在心血管疾病中的研究又提供了新的视野。

3.5 环状 RNA 与心脏衰老

衰老是身体机能的逐渐退化, 可以分为生理性衰老和病理性衰老, 可以发生在细胞水平或有机体水平^[27]。Du 等^[28]在 2015 年的研究发现形成于叉形头转录因子家族中 Foxo3 的 circRNA 即 circ-Foxo3 是通过调节与压力、衰老相关的多重因素促进心脏的衰老。circ-Foxo3 在心脏组织中高度表达并且主要分布在细胞质中, 在胞质内过表达的 circ-Foxo3 与抗衰老蛋白 DNA 结合抑制蛋白-1 (ID-1)、转录因子 E2F-1 (转录因子 E2F1 是由人类 E2F1 基因编码的蛋白质, 属于转录因子的一种, 该蛋白质具有额外的周期蛋白结合结构域)、抗压力蛋白黏着斑激酶 (FAK) 和缺氧诱导因子 1- α (HIF1- α) 相互作用, 降低这些抗衰老蛋白在胞质中的水平, 从而影响它们参与的压力和衰老反应相关通路的调控, 最终引起衰老。其中 ID-1、E2F1 和 HIF1- α 都是转录因子, 正常情况下进入细胞核发挥作用。

4 展望

随着研究者们不断对 circRNA 的深度研究, 才逐渐对 circRNA 的形成机制、类型、特征和生物学功能得到认识。虽然 circRNA 的发现已有几十年了, 并且在多种人类疾病的发生发展过程中发挥着至关重要的作用, 但对其在疾病中的作用机制还需要更进一步的探索。已有研究表明 circRNA 作为中枢神经系统障碍潜在的临床生物标记物, 加上 circRNA 比线性 RNA 更为稳定^[6], 因此, circRNA 有望成为诊断疾病

和判断预后的生物学标志,这就可能为人们提供疾病治疗的新靶点。今年, Zhao 等^[29]研究团队发现冠心病患者外周血中 circRNA 表达谱与冠脉正常的患者存在显著差异,其中以 has-circ-0124644 表达变化最明显,被认为是冠心病的分子标记。此外,由于 circRNA 对核酸酶高度耐受且比线性 RNA 稳定,那么在胞浆中富集的 circRNA 是怎样清除的呢?近来, Lasda 等^[30]提出了一种可能,即细胞可以通过胞外囊泡的释放来清除 circRNA 从而降解它们,并在研究中证实了这一可能。有文献报告, circRNA 含有丰富的 miRNA 应答元件(MREs),能够与 AGO 蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合体(RISC)的催化核心,最终导致 circRNA 的降解。也可能存在其他降解 circRNA 的机制,可能是涉及其他囊泡的相互交换,亦可能是由核酸内切酶清除^[30],因此探索与发现 circRNA 与外泌体的相关性研究在未来显得尤为重要。尽管 circRNA 有其独特的性质及特点,在心血管疾病中具有重要作用,但目前有关研究仍处于起步阶段,探索与发现更多 circRNA 的作用机制及调控网络显得任重而道远。

参考文献

- [1] Jakobi T, Czaja-Hasse LF, Reinhardt R, et al. Profiling and validation of the circular RNA repertoire in adult murine hearts[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(4): 216–223. DOI: 10.1016/j.gpb.2016.02.003.
- [2] Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 11215. DOI: 10.1038/ncomms11215.
- [3] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 453–461. DOI: 10.1038/nbt.2890.
- [4] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *Rna*, 2012, 19(2): 141–157. DOI: 10.1261/rna.035667.112.
- [5] Memczak 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. DOI: 10.1038/nature11928.
- [6] Lu D, Xu AD. Mini review: circular RNAs as potential clinical biomarkers for disorders in the central nervous system[J]. *Front Genet*, 2016, 7: 53. DOI: 10.3389/fgene.2016.00053.
- [7] Li Y, Zheng Q, Bao C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. *Cell Res*, 2015, 25(8): 981–984. DOI: 10.1038/cr.2015.82.
- [8] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine[J]. *Cell Res*, 2017, 27(5): 626–641. DOI: 10.1038/cr.2017.31.
- [9] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.02.017.
- [10] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, et al. Translation of circRNAs[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 9–21. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.02.021.
- [11] Wang K, Long B, Liu F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(33): 2602–2611. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv713.
- [12] Koopman P, Münsterberg A, Capel B, et al. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation[J]. *Nature*, 1990, 348(6300): 450–452. DOI: 10.1038/348450a0.
- [13] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384–388. DOI: 10.1038/nature11993.
- [14] Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA[J]. *EMBO J*, 2011, 30(21): 4414–4422. DOI: 10.1038/emboj.2011.359.
- [15] Holdt LM, Beutner F, Scholz M, et al. ANRIL Expression is Associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(3): 620–627. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.196832.
- [16] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(12): e1001233. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001233.
- [17] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 301–312. DOI: 10.1016/j.scr.2013.01.002.
- [18] 李玲, 石蓓. 心脏干细胞移植治疗缺血性心脏病的研究进展[J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(3): 290–292. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2015.03.023.
- [19] 王艳, 石蓓. 微小核糖核酸与干细胞移植治疗心肌梗死的研究进展[J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(9): 916–918. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2015.09.022.
- [20] Geng HH, Li R, Su YM, et al. The circular RNA cdrlas promotes myocardial infarction by mediating the regulation of miR-7a on its target genes expression[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151753. DOI: 10.1371/journal.pone.0151753.
- [21] Suske G. The Sp-family of transcription factors[J]. *Gene*, 1999, 238(2): 291–300. DOI: 10.1016/S0378-1119(99)00357-1.
- [22] Zhang G, Shi H, Wang L, et al. MicroRNA and transcription factor mediated regulatory network analysis reveals critical regulators and regulatory modules in myocardial infarction[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135339. DOI: 10.1371/journal.pone.0135339.
- [23] Carè A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 613–618. DOI: 10.1038/nm1582.
- [24] Gyöngyösi M, Winkler J, Ramos I, et al. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside[J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(2): 177–191. DOI: 10.1002/ehf.696.
- [25] Wu HJ, Zhang CY, Zhang S, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in heart tissue of mice with myocardial infarction-induced heart failure[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1): 205–216. DOI: 10.1159/000445617.
- [26] Zhou B, Yu JW. A novel identified circular RNA, circRNA_010567, promotes myocardial fibrosis via suppressing miR-141 by targeting TGF- β 1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(4): 769–775. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.044.
- [27] Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, et al. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence[J]. *Nature*, 2001, 409(6823): 1067–1070. DOI: 10.1038/35059131.
- [28] Du WW, Yang W, Chen Y, et al. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(18): 1402–1412. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw001.
- [29] Zhao Z, Li X, Gao C, et al. Peripheral blood circular RNA hsa_circ_0124644 can be used as a diagnostic biomarker of coronary artery disease[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39918. DOI: 10.1038/srep39918.
- [30] Lasda E, Parker R. Circular RNAs co-precipitate with extracellular vesicles: a possible mechanism for circRNA clearance[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148407. DOI: 10.1371/journal.pone.0148407.

(收稿日期: 2017-06-01)

(编辑: 王宝茹)