

隐秘的未知宇宙:心血管环状 RNA 研究*

邹云增^{1,2} 王晓燕^{1,2}

[摘要] 经典的基因表达理论认为,所有 RNA 分子都是线性结构,测序方法只能分离具有特征性分子尾巴的那些分子。环状 RNA 的末端连接在一起,缺乏这些尾巴,因此被普遍忽略掉了。所以环状 RNA 一直飞行于雷达之下,鲜被发觉。最新研究证明,环状 RNA 不仅存在,而且广泛存在于人体细胞内外,包括血液、唾液及心脏,提示环状 RNA 或可作为心血管疾病的新型治疗靶点和生物标记物。

[关键词] 环状 RNA;心血管疾病;生物标记物

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2017.08.001

[中图分类号] R54 **[文献标志码]** C

Circular RNA: a novel biomarker of cardiovascular disease

ZOU Yunzeng^{1,2} WANG Xiaoyan^{1,2}

(¹Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China; ²Cardiovascular Institute in Shanghai)

Corresponding author: ZOU Yunzeng, E-mail: zou.yunzeng@zs-hospital.sh.cn

Summary Recently, circular RNAs (circRNAs) are identified as competing endogenous noncoding RNAs that sponge microRNAs or proteins by complementary base pairing. The function of circRNAs is only now beginning to be understood. Unlike typical linear RNAs, the circRNAs lack the typical 5' cap and poly(A) tail. They are extraordinarily stable due to the lack of exposed terminal ends which are susceptible to degradation by exoribonucleases (RNases). They are present in whole blood, plasma and extracellular vesicles. The latest findings disclose that the circRNAs may constitute a novel reservoir of therapeutic targets and biomarkers of cardiovascular diseases.

Key words circular RNA; cardiovascular disease; biomarker

环状 RNA 是特殊的非编码 RNA 分子,与传统的线性 RNA 不同,环状 RNA 不具有 5' 末端帽子和 3' 末端 poly(A) 尾巴,以共价键连接首尾,形成封闭环状结构。这一结构使其不易被核酸外切酶降解,故而比线性 RNA 更加稳定。目前认为,环状 RNA 是由前体 RNA (pre-mRNA) 通过反向剪接反应 (back-splicing) 这一特殊的选择性剪接产生的。环状 RNA 多数源于外显子 (exon), 少数由内含子 (intron) 直接环化形成,一般来说,环状 RNA 具有高度的保守性。这种高度的稳定性和保守性,为其成为心血管疾病治疗和诊断的生物标志物提供了条件。环状 RNA 分子富含 microRNA 结合位点,在细胞中通过海绵分子的形式结合 microRNA 和相关蛋白,进而解除 microRNA 对其靶基因的抑制作用,升高靶基因的表达水平,这一机制被称为竞争性内源 RNA 机制,也参与心血管疾病的调控。

1 环状 RNA 的发现

环状 RNA 被发现虽有 40 年,但作为未知领域一直不被重视。直到近几年才逐渐被研究者关注,并展开研究。

1976 年, Sanger 等^[1] 利用电镜首先在植物感染的类病毒中发现了这些以共价键形成的闭合环状 RNA 分子,并且具有高度的热稳定性。

1990 年, Mastsumoto 等^[2] 在酿酒酵母中发现 20sRNA 没有自由的 5' 端和 3' 端,电镜下发现这也是环状 RNA 分子。

2012 年, Miri 等^[3] 在古生菌中发现环状 RNA 大量存在并具有一定生物学功能,研究者的注意力也逐渐转向这种特殊的 RNA。

近年来,针对环状 RNA 在生物体中的存在,生物学合成及生物学功能的研究已亮相于《Nature》、《Science》杂志,显示人类、动物、植物、真菌和原生生物中的环状 RNA 也存在明显差异^[4]。

2 环状 RNA 具有哪些功能

Li 等^[5] 对环状 RNA 的调控模式进行了系统描述,主要包括:①环状 RNA 通过海绵效应,竞争性吸附和结合 microRNA,从而抑制 microRNA 行

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(No: 30930043)

¹ 复旦大学附属中山医院心内科(上海,200032)

² 上海市心血管病研究所

通信作者:邹云增, E-mail: zou.yunzeng@zs-hospital.sh.cn

使功能。②通过与 RNA 结合蛋白(RBP)结合,形成复合物,对 RNA 的转录过程进行调控。③通过内部核糖体进入位点(IRES)序列,与核糖体结合,环状会开环呈线性,然后重新发挥翻译蛋白质的功能。见图 1。

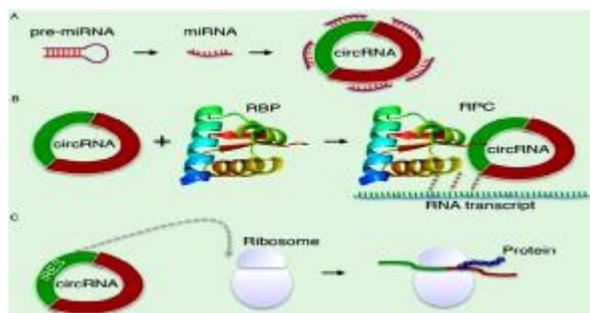


图 1 环状 RNA 的调控模式

Figure 1 Regulation pattern of circular RNA

3 环状 RNA 参与心血管疾病调控

由上可知,环状 RNA 通过结合 microRNA,调节靶基因表达;或结合蛋白,阻止蛋白行使功能,来产生生物学效应。

3.1 环状 RNA-microRNA 结合调节

已经发现具有调节心脏功能的环状 RNA,见表 1^[6]。

第 1 个被发现的具有调节心脏功能的环状 RNA,被称之为心脏相关环状 RNA(heart related circRNA, HRCR)。WANG 等^[7]研究揭示了一条包含 HRCR、miR-223 以及 ARC 蛋白(带有 caspase 富集功能域的凋亡抑制因子)的心肌肥厚通路。在这一通路中,ARC 通路过表达可促进心肌肥厚发展,miR-223 可通过调节 ARC 蛋白发挥作用。miR-223 是心肌肥厚和心力衰竭的正向调控因子,HRCR 则是这一通路上游调控分子,通过作用于 miR-223 发挥作用。

在小鼠急性心肌梗死心脏发现 CDR1AS 表达。CDR1AS 能持续性结合有促凋亡作用的

microRNA-7。CDR1AS 通过抑制 microRNA-7,同时上调 microRNA-7 的下游蛋白 PARP (poly ADP-ribose polymerase, DNA 修复酶)和 SP1 (在低氧或缺血环境下可发挥保护作用),抑制心肌梗死导致的心肌细胞凋亡,从而发挥保护作用。

NT-proBNP 作为心力衰竭的生物标志物,并不适用于所有心力衰竭人群。microRNA-423-5p 被认为有可能成为心力衰竭的生物标志物。在高血压诱导的心力衰竭中,血液中 microRNA-423-5p 增加。心肌梗死相关环状 RNA(myocardial infarction associated circRNA, MICRA)被认为能预测急性心肌梗死后左室重构。

主动脉瘤是一种病死率极高且预后较差的一类心血管疾病。ZHENG 等^[8]发现,环状 RNA hsa-circ-000595 在主动脉瘤患者的动脉组织以及低氧条件下的主动脉平滑肌细胞中表达显著增加。此外,hsa-circ-000595 可降低人主动脉平滑肌细胞的凋亡比例。这项研究显示,microRNA-19a 是 hsa-circ-000595 的作用靶点。

糖尿病患者出现糖尿病性纤维化的风险显著增加。TANG 等^[9]发现在糖尿病性小鼠心脏组织以及血管紧张素-II 中表达显著增加。CircRNA_000203 含有与 microRNA-26p-5p 结合的两个位点,而 microRNA-26p-5p 可通过与 Colla2 和 CTGF 结合发挥抗纤维化作用。过表达 circRNA_000203 可降低 miR-26b-5p 在心肌纤维化中的抗纤维化作用。此外,阻断 miR-26b-5p 可产生与过表达 circRNA-000203 一致的保护心肌纤维化作用。

其他与心功能相关的环状 RNA 有 circ-Foxo3 和 cZNF292。cZNF292 表达于缺氧心脏的内皮细胞上,能调节内皮功能。circ-Foxo3 将在后文继续阐述。

3.2 环状 RNA-蛋白结合调节

此前研究显示,ANRIL 是 9p21 位点内引起动脉粥样硬化的首要候选基因^[10]。长链非编码 RNA ANRIL 与动脉粥样硬化风险增加存在相关性^[11]。

表 1 心血管系统的环状 RNAs

Table 1 CircRNAs in the cardiovascular system

环状 RNA	CircBase ID	Host gene	功能	作用机制
HRCR	mmu_circ_0000254	Pwwp2a	抑制心肌肥厚和心衰	海绵状结合 microRNA-223
CDR1AS	hsa_circ_0001946	CDR1	促凋亡	海绵状结合 microRNA-7
Circ-Foxo3	hsa_circ_0006404	Foxo3	促衰老	细胞质中结合衰老因子
cZNF292	hsa_circ_0004383	ZNF292	促血管生成	诱导内皮细胞
MICRA	hsa_circ_0000615	ZNF609	未知	未知
CircRNA -000595	hsa-circ-000595	未知	降低人主动脉平滑肌细胞的凋亡比例	结合 microRNA-19a ^[8]
CircRNA_000203	hsa-circ-000203	未知	保护心肌纤维化	结合 microRNA-26p-5p ^[9]

此外, ANRIL 也可反转录为环状 RNA, 即 circANRIL。Holdt 等^[12]发现 circANRIL 可通过调控核糖体突变和动脉粥样硬化形成的通路发挥动脉粥样硬化保护作用。CircANRIL 可与 PES1 蛋白(一种 60s-前核糖体聚集因子)结合, 从而修复核酸外切酶介导的 rRNA 前体修复过程以及血管平滑肌细胞和巨噬细胞的核糖体产生过程。总而言之, circANRIL 可参与核糖体产生过程, 并发挥动脉粥样硬化保护作用。

Circ-Foxo3 在老年患者和高龄小鼠心脏组织中表达较高, 并与细胞衰老的标志物存在相关性。Circ-Foxo3 表达增加可加重阿霉素诱导的心肌病, 同时沉默内源性 circ-Foxo3 可缓解阿霉素诱导的心肌病。Circ-Foxo3 可通过与抗衰老蛋白 ID-1、转录因子 E2F1 以及抗衰老蛋白 FAK、HIF1 α 等蛋白结合诱导细胞衰老。此外, 在这项研究中, 向小鼠胚胎成纤维细胞以及原代心肌细胞中转染 circ-Foxo3 的 siRNA, 可下调 circ-Foxo3 的表达, β -半乳糖苷酶染色(细胞衰老染色), 提示 circ-Foxo3 可能是保护心肌的潜在治疗靶点。

4 环状 RNA 可作为心血管疾病的生物标记物

环状 RNA 在人体中广泛存在, 包括病理组织、血液、唾液以及精液中, 因此, 环状 RNA 还可作为心血管疾病的新型生物标记物。VAUSORT 等^[13]进行了一项研究来评价 circRNA 分子来预测缺血再灌注预后情况。这项研究入选了心肌梗死合并或未合并左室功能不全患者, 并最终确定环状 RNA-MICRA, 可预测再灌注后 3~4 个月的左室功能障碍。DENG 等^[14]进行的一项研究显示, circRNA_081881 可作为 miR-548 的竞争性内源性 RNA 分子, 从而调节 PPAR γ 表达。circRNA_081881 可在血浆中检测, 因此可作为急性心肌梗死的潜在标记物和治疗靶点。ZHAO 等^[15]的研究显示, hsa_circ_0124644 与冠状动脉疾病存在相关性, 这提示 hsa_circ_0124644 或可参与冠状动脉疾病的病理生理过程。由于 hsa_circ_0124644 可在外周血中检测出来, 因此可作为潜在生物标记物, 此外, 当引入 hsa_circ_0098964 时, 两者诊断心血管疾病的特异性和敏感度显著增加。

5 展望

在精准医疗计划起步阶段, 选取环状 RNA 进行研究是很好的思路。由于环状 RNA 的稳定性和保守性, 所以在作为心血管疾病的生物标志物方面, 其比线性 RAN 或者 microRNA 更具有优势。从血液样本或心脏组织中检测的环状 RNA 分子是稳定和易于检测的, 可以用于心血管疾病的诊断和治疗靶点。

参考文献

[1] SANGER H L, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Vir-

oids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73: 3852-3856.

[2] MATSUMOTO Y, FISHEL R, WICKNER RB. Circular single stranded RNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 7628-7632.

[3] MIRI D, SCHRAGA S, SARIT E, et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: 3131-3142.

[4] WANG PL, BAO Y, YEE MC, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life [J]. PLoS One, 2014, 9: e90859.

[5] LI J, YANG J, ZHOU P, et al. Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5: 472-480.

[6] DEVAUX Y, CREEMERS E E, BOON R A, et al. Circular RNAs in heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2017, 19: 701-709.

[7] 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: 2602-2611.

[8] ZHENG C, NIU H, LI M, et al. Cyclic RNA hsa_circ000595 regulates apoptosis of aortic smooth muscle cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12: 6656-6662.

[9] TANG C M, ZHANG M, HUANG L, et al. CircRNA_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40342.

[10] Cunnington M S, Mayosi B M, Burn J, et al. Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression [J]. PLoS Genetics, 2010, 6: e1000899.

[11] HOLDT L M, BEUTNER F, SCHOLZ M, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21 [J]. Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol, 2010, 30:620-627.

[12] HOLDT L M, STAHRINGER A, SASS K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12429-12429.

[13] VAUSORT M, SALGADO-SOMOZA A, ZHANG L, et al. Myocardial infarction-associated circular rna predicting left ventricular dysfunction[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68: 1247-1248.

[14] DENG Y Y, SHE J Q, ZHANG L S, et al. Circular RNA related to PPAR γ function as ceRNA of microRNA in human acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(16S): C51-C2.

[15] 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: 39918-39918.

(收稿日期: 2017-07-21)