

环状 RNA: 心血管疾病新型标志物*

王晓燕^{1,2} 邹云增^{1,2}

[摘要] 环状 RNA 是新型非编码 RNA, 可以“海绵分子”的形式结合 microRNA 和相关蛋白, 参与心血管疾病的调控。环状 RNA 广泛存在于细胞内或细胞外, 包括血液、唾液和精液, 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。本文对环状 RNA 的产生机制和表达特征、环状 RNA 与心血管疾病的关系、环状 RNA 作为新型生物标记物和治疗靶点的可能性进行综述。

[关键词] 环状 RNA; 心血管疾病; 生物标记物

doi: 10.13201/j.issn.1001-1439.2017.11.024

[中图分类号] R54 **[文献标志码]** A

Circular RNA: Biomarker of cardiovascular disease

WANG Xiaoyan^{1,2} ZOU Yunzeng^{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 Circular RNAs (circRNAs) as a class of newly discovered endogenous noncoding RNAs, have been implicated in the evolution of CVD by sponge-like regulation of microRNAs and proteins, indicating that circRNAs are promising therapy targets and potential biomarkers for CVD. In this review, we characterize the biogenesis and expression of circular RNA, highlight the regulatory role of circular RNA in different models of CVD. We also present perspectives of circular RNAs as novel biomarkers and therapeutic targets for the treatment of CVD.

Key words circular RNA, cardiovascular disease, biomarker

近年来, 心血管疾病的诊断和治疗有了很大进展^[1-3], 基础研究向临床研究的转化医学在其中发挥重要作用, 但是心血管疾病的并发症和死亡率仍然较高, 因此尚需要新型生物标记物或新型治疗手段辅助心血管疾病的诊断和精准治疗。

环状 RNA 是非编码 RNA 领域的新星, 可参与胚胎发育^[4], 老化^[5] 以及疾病相关病理生理过程。此外, 环状 RNA 不仅存在于不同的组织^[6-7], 器官^[8-9] 中, 还广泛存在与体液中^[10-12], 如血液、外泌体、唾液、精液中, 提示环状 RNA 或可作为心血管疾病的新型生物标志物和治疗靶点。此外, 环状 RNA 在人类^[9,13], 大鼠^[13] 和小鼠^[13-14] 心脏中广泛存在, 并且有研究证明环状 RNA 与很多心血管疾病存在相关性。

本文对环状 RNA 的产生机制和表达特征、环状 RNA 与心血管疾病的关系、环状 RNA 作为新型生物标记物和治疗靶点的可能性进行综述。

1 环状 RNA 的产生机制和表达特征

在真核生物中, 环状 RNA 大多是从 mRNA 前体剪切而来^[15-16], 此外, 也可来源于古生菌的编码基因^[15]。在目前已知的动物来源的环状 RNA 中,

环状 RNA 大多来源于外显子, 通过索尾插接的方式连接 5' 和 3' 端。尽管剪切体参与到 mRNA 的剪切过程中^[17], 环状 RNA 的环化过程仍未完全揭开。

目前环状 RNA 的形成过程主要包含两种机制: ①直接索尾插接和②外显子跳跃^[18-19]。直接索尾插接是指, 外显子按照非传统剪切方式剪切, 将下游 5' 端和上游 3' 端连接, 形成环状结构^[20]。外显子跳跃, 是指先形成包含外显子的环状中间体, 然后环状中间体的内含子被剪切形成成熟的外显子环状 RNA^[21]。这两种形成机制均是在体内进行, 同时与传统的剪切体相关, 在外显子环状 RNA 的形成机制中, 直接索尾插接更为常见^[22]。近期研究显示, RNA 环状结构的形成可能与基因的重复序列^[23] 或互补序列相关^[15]。此外, RNA 结合蛋白, 如 ADAR、MBL 以及 QKI 等也参与 RNA 的环化过程^[24-26], 这 3 种蛋白多与 RNA 的选择性剪切相关。此外, 外显子的长度也可能与环状 RNA 的形成相关^[6, 23]。

按照环状 RNA 序列来源不同, 环状 RNA 可分为 6 类: ①外显子环状 RNA, 仅包含外显子结构; ②内含子环状 RNA, 仅包含剪切体的内含子结构; ③外显子-内含子 RNA, 既包含外显子也包含内含子; ④反义链环状 RNA, 来源于线性剪切体的反义链; ⑤基因间环状 RNA, 来源于 2 个基因间的

* 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血管内科 (上海, 200032)

² 上海市心血管研究所

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

DNA 序列;⑥基因内环状 RNA,来源于线性剪切体的基因序列,但不能属于编码序列或内含子序列。

尽管部分环状 RNA 的表达量较低,但是也有部分环状 RNA 的表达量较高,其表达量是线性 RNA 的 10 倍^[7,23] 以上。此外,研究显示,在神经细胞分化以及神经系统发育的不同阶段,环状 RNA 的表达量并不相同,同时,环状 RNA 在同一神经元的不同部位,比如突触前和突触后的表达量也不相同^[8,27-28]。这些研究提示,环状 RNA 可能在组织器官的生长分化过程中发挥重要作用。此外,和对应的线性 RNA 相比,环状 RNA 结构更加稳定,既存在于细胞质内,也可分泌到外泌体中^[11],还广泛存在于唾液^[10]或精液中^[12],因此可有望作为心血管疾病的生物标志物。

2 环状 RNA 与心血管疾病:广泛参与心血管疾病的调控

2.1 环状 RNA-mRNA 调节链

环状 RNA 多被认为是 microRNA 海绵分子,许多研究显示 circRNA 在心血管疾病的病理生理调节过程中发挥重要作用。

2.1.1 心力衰竭 Wang 等^[29] 的研究显示,心脏相关的环状 RNA(HRCR)可与 miRNA-223、ARC(带有 caspase 富集功能域的凋亡抑制因子)结合从而促进心脏肥厚和心力衰竭。这项研究揭示了一条包含 HRCR、miR-223 以及 ARC 蛋白的心肌肥厚通路。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。

2.1.2 心肌梗死 在小鼠心梗模型中,Cdr1as(or CiRS-7)和 miR-7^[30]在心梗组织区域或低氧条件下的心肌细胞中表达增加。Cdr1as 通过抑制 miR-7,同时上调 miR-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^[31]),发挥作用,抑制心梗导致的心肌细胞凋亡,从而发挥保护作用。

2.1.3 主动脉瘤 主动脉瘤是一种死亡率极高且预后较差的一类心血管疾病。Zheng 等^[33]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,ÇAμI 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,miR-19a 是 has-circ-000595 的作用靶点。

2.1.4 心脏纤维化 糖尿病患者出现糖尿病性纤维化的风险显著增加。Tang 等^[34]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。

2.2 心血管疾病中的 circRNA-蛋白通路

2.2.1 冠脉粥样硬化 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^[35-36]。长链非编码 RNA ANRIL 与动脉粥样硬化风险增加存在相关性^[37]。此外,ANRIL 也可反转录为环状 RNA,即 circANRIL。Lesca M. Holdt 等^[38]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。

2.2.2 心肌病 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^[39]。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、HIF1α 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。

2.3 心血管疾病相关的其他 circRNA

除了以上被报道过的与 miRNA 或蛋白结合的环状 RNA 分子以外,还有一些环状 RNA 分子与心血管疾病存在相关性,但目前尚未报道其作用机制^[14,40]。cZNF292 是一种与低氧环境相关的环状 RNA 分子^[40],但目前尚未发现 cZNF292 的 microRNA 结合位点,这提示 cZNF292 不能作为 microRNA 的海绵分子。Tobias Jakobi 等^[14]利用 DCC 软件分析了心脏组织中表达的环状 RNA 分子,其中部分环状 RNA 分子主基因与心血管疾病存在相关性。对于这些环状 RNA 分子,目前还需更多研究去探索它们是否参与心血管疾病的调节以及可能机制。

3 环状 RNA 可作为心血管疾病的生物标志物

环状 RNA 在人体中广泛存在,包括病理组织^[41-42]、血液^[43-44]、唾液^[45]以及精液^[12]中,因此,环状 RNA 还可作为心血管疾病的新生物标志物^[46-47]。Vausort 等^[46]进行了一项研究来评价 cir-

cRNA 分子来预测缺血再灌注预后情况。这项研究入选了心梗合并或未合并左室功能不全,并最终确定环状 RNA,可预测再灌注后 3~4 个月的左室功能障碍。Deng 等^[47]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,因此可作为急性心梗的潜在标记物和治疗靶点。Zhao 等^[48]的研究显示, has_circ_0124644 与冠状动脉疾病存在相关性,这提示 has_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^[49]。

4 环状 RNA 作为心血管疾病生物标记物的特征

环状 RNA 分子在血液、唾液、精液中广泛存在,并且由于环状结构,它们稳定性更佳,此外,环状 RNA 的表达存在组织特异性和时序特异性,提示环状 RNA 有望作为人类疾病的新型生物标记物。

但是,环状 RNA 作为生物标记物仍有一些局限性。首先,一些环状 RNA 分子的表达仅在组织中存在差异,但在血液中并无差异,因此这种环状 RNA 分子作为生物标记物,可能导致有创检查。其次,环状 RNA 的表达水平与心血管疾病的严重程度之间是否存在相关性,目前尚未可知,因此暂时不能根据环状 RNA 的表达水平判断心血管疾病的严重程度。再次,尽管环状 RNA 有望作为新型生物标记物,但仍需临床研究进行验证。

5 小结

环状 RNA 分子在人类、大鼠以及小鼠心脏中广泛表达,并可作为 microRNA 或相关蛋白的海绵分子,参与心血管疾病的调节过程,或可作为心血管疾病新型治疗靶点。此外,环状 RNA 分子不仅存在于心脏组织中,还广泛存在于血液、唾液、精液等体液中,有望成为心血管疾病的新型生物标记物。综上,环状 RNA 分子在心血管疾病中发挥重要作用,或有助于心血管疾病的诊断和精准治疗。

参考文献

- [1] NIOI P, SIGURDSSON A, THORLEIFSSON G, et al. Variant ASGR1 associated with a reduced risk of coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374: 2131—2141.
- [2] ABRAHAM G H A, BHALALA O G, et al. Genomic prediction of coronary heart disease[J]. *European Heart Journal*, 2016, 37: 3267—3278.
- [3] YUSUF S, BOSCH J, DAGENAIS G, et al. Cholesterol lowering in intermediate-risk persons without cardiovascular disease[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374: 2021—2031.
- [4] FAN X, ZHANG X, WU X, et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 148—150.
- [5] WANG Y H, YU X H, LUO S S, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals that circular RNA100783 is involved in chronic CD28-associated CD8(+)T cell ageing[J]. *Immunity & ageing : I & A*, 2015, 12: 17—20.
- [6] SALZMAN J G C, WANG P L, LACAYO N, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e30733.
- [7] SALZMAN J, CHEN R E, OLSEN M N, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9: e1003777.
- [8] RYBAK-WOLF A, STOTTMEISTER C, GLAZAR P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58: 870—885.
- [9] TAN W L, LIM B T, ANENE-NZELU C G, et al. A landscape of circular RNA expression in the human heart[J]. *Cardiovascular Research*, 2017, 33: 150—160.
- [10] BAHN J H, ZHANG Q, LI F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva[J]. *Clinical Chemistry*, 2015, 61: 221—230.
- [11] LI Y, ZHENG Q, BAO C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. *Cell Research*, 2015, 25: 981—984.
- [12] DONG W W, LI H M, QING X R, et al. Identification and characterization of human testis derived circular RNAs and their existence in seminal plasma[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39080—39085.
- [13] WERFEL S, NOTHJUNGE S, SCHWARZMAYR T, et al. Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2016, 98: 103—107.
- [14] JAKOBI T, CZAJA-HASSE L F, REINHARDT R, et al. Profiling and validation of the circular RNA repertoire in adult murine hearts[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2016, 14: 216—223.
- [15] ZHANG X O, WANG H B, ZHANG Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, 159: 134—147.
- [16] CHEN L L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17: 205—211.
- [17] WAHL M C, WILL C L, LUHRMANN R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine[J]. *Cell*, 2009, 136: 701—718.
- [18] BARRETT S P W P, SALZMAN J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor[J]. *Elife*, 2015, 4: e07540.
- [19] WANG Y, WANG Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs[J]. *RNA*, 2015, 21: 172—179.
- [20] COCQUERELLE C, HÉTUIN D, BAILLEUL B. Mis-splicing yields circular RNA molecules [J].

- FASEB J, 1993, 7: 155—160.
- [21] PG Z. Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: correlation with exon skipping[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93: 6536—6541.
- [22] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32: 453—461.
- [23] JECK W R SJ, WANG K, SLEVIN M K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19: 426—430.
- [24] IVANOV A, MEMCZAK S, WYLER E, et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals[J]. Cell Reports, 2015, 10: 170—177.
- [25] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI N R, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. Molecular Cell, 2014, 56: 55—66.
- [26] CONN S J, PILLMAN K A, TOUBIA J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. Cell, 2015, 160: 1125—1134.
- [27] VENO M T, HANSEN T B, VENO S T, et al. Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development[J]. Genome Biology, 2015, 16: 245—250.
- [28] YOU X, VLATKOVIC I, BABIC A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. Nature Neuroscience, 2015, 18: 603—610.
- [29] 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]. European Heart Journal, 2016, 37: 2602—2611.
- [30] GENG H H, LI R, SU Y M, et al. The Circular RNA cdlras promotes myocardial infarction by mediating the regulation of miR-7a on its target genes expression[J]. PLoS One, 2016, 11: e0151753.
- [31] ELTZSCHIG H K, ECKLE T, KONG T, et al. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection[J]. Blood, 2009, 113: 224—232.
- [32] LI B, LI R, ZHANG C, et al. MicroRNA-7a/b protects against cardiac myocyte injury in ischemia/reperfusion by targeting poly(ADP-ribose) polymerase[J]. PLoS One, 2014, 9: e90096.
- [33] ZHENG C, NIU H, LI M, et al. Cyclic RNA hsa_circ000595 regulates apoptosis of aortic smooth muscle cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12: 6656—6662.
- [34] 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]. Scientific Reports, 2017, 7: 40342—40345.
- [35] BROADBENT H M, PEDEN J F, LORKOWSKI S, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p[J]. Human Molecular Genetics, 2008, 17: 806—814.
- [36] 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.
- [37] HOLDT L M, BEUTNER F, SCHOLZ M, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21 [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010, 30: 620—627.
- [38] HOLDT L M, STAHRINGER A, SASS K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans [J]. Nature Communications, 2016, 7: 12429—12430.
- [39] DU W W, YANG W, CHEN Y, et al. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses[J]. European Heart Journal, 2016, 33: 150—160.
- [40] BOECKEL J N, JAE N, HEUMULLER A W, et al. Identification and characterization of hypoxia-regulated endothelial circular RNA [J]. Circulation Research, 2015, 117: 884—890.
- [41] LI F, LI W, DENG J, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6: 6001—6013.
- [42] 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: 161—169.
- [43] ZHAO Z, JIAN D, HAO P, et al. Hsa_circ_0054633 in peripheral blood can be used as a diagnostic biomarker of pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus[J]. Acta Diabetol, 2016, 30: 150—160.
- [44] CUI X, KONG L, HE M, et al. Hsa_circRNA_103636: potential novel diagnostic and therapeutic biomarker in Major depressive disorder [J]. Biomark Med, 2016, 10: 943—952.
- [45] LIN X, LO H C, WONG D T, et al. Noncoding RNAs in human saliva as potential disease biomarkers [J]. Frontiers in Genetics, 2015, 6: 175—177.
- [46] VAUSORT M, SALGADO-SOMOZA A, ZHANG L, et al. Myocardial infarction-associated circular RNA predicting left ventricular dysfunction[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2016, 68: 1247—1248.
- [47] 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]. Journal of the American College of Cardiology, 2016, 68: C51—C52.
- [48] 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]. Scientific Reports, 2017, 7: 39918—39920.
- [49] 邹云增, 王晓燕. 隐秘的未知宇宙: 心血管环状 RNA 研究[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(8): 719—721.