生殖生理与胚胎着床 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001331

环状 RNA 在生殖和围产领域的研究进展

张 爽，丁裕斌，高茹菲
（重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室，重庆 400016）

【摘 要】环状 RNA（circular RNAs，circRNAs）是一类新发现的内源性非编码 RNA，是 RNA 领域的研究热点。circRNAs 呈闭合环状结构，具有结构稳定、高度保守以及组织和发育阶段特异表达等特征。circRNAs 参与多种生物学功能，除了 miRNA 海绵吸附功能，更多新的功能正逐渐被发现，如调节基因转录和剪切以及翻译蛋白质等。目前已有大量研究表明，circRNAs 与疾病和发育等生理病理过程密切相关。本文重点对 circRNAs 的生物学功能以及其在生殖、围产领域的研究进展进行综述。

【关键词】环状 RNA；生物学功能；生殖；围产期
【中图分类号】R394.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-06-20

Research progress of circular RNA in the area of reproduction and perinatal stage

Zhang Shuang, Ding Yubin, Gao Rufei
(*Laboratory of Reproductive Biology, Department of Public Health and Management, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Circular RNAs (circRNAs) are recently discovered as new endogenous non-coding RNAs, and have become a hotspot in the area of RNA research. CircRNAs, a structure of closed loop, are stable, conserved between species, and often exhibit tissue, developmental stage and disease specific expression. CircRNAs have many biological functions. In addition to acting as miRNA sponges, many other functions are being revealed, including regulator of gene transcription, and splicing and protein translation. Some researches have showed that circRNAs are involved with a series of pathological and physiological processes associated with diseases and development. In this review, we focus on their biological functions and the present research status of circRNAs in the area of reproduction and perinatal stage.

【Key words】circular RNA; biological function; reproduction; perinatal stage

环状 RNA（circular RNA，circRNAs）是新发现的一类内源性非编码 RNA，是 RNA 领域的研究热点。与线性 RNA 不同，circRNAs 呈闭合环状，无 5'帽子和 3'多聚尾 A 结构，不易被核酸外切酶降解[1]。其实早在 1976 年人们就已经在植物来源的病毒中发现了 circRNAs[2]，但是由于 circRNAs 特殊的环状结构，传统测序手段不能检测，研究中往往被遗漏。近年来随着生物信息学、高通量测序等技术的飞速发展，circRNAs 研究进展迅速，人们逐渐认识到 circRNAs 并非错误剪切的产物，而是稳定存在于生物体内的、高度保守的、具有组织和发育阶段特异性的 RNA[3]。根据来源不同，circRNAs 主要分为仅由外显子构成的 circRNAs、仅由内含子构成的 circRNAs 以及外显子-内含子 circRNAs 三类。此外，基因间区、3'UTR 区或 5'UTR 区均能产生 circRNAs[4]。CircRNAs 具有多种功能，在疾病和发育中扮演重要角色[5]。本文主要对 circRNAs 生物学功能以及在生殖、围产领域方面的研究进行综述。

作者介绍：张 爽，Email：AngAng8011@sina.com，研究方向：胚胎植入。
通信作者：高茹菲，Email：24846179@qq.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81300486）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1638.046.html（2017-06-22）

1 CircRNAs 生物学功能

1.1 CircRNAs 与 miRNA 相互作用

CircRNAs 是一类内源性竞争 RNA，富含 miRNA 应答元件，能发挥 miRNA 海绵吸附体功能，竞争结合 miRNA，降低

或解除 miRNA 靶基因的抑制作用，从而上调靶基因的表达[6]（图 1）。例如，小脑变性相关蛋白 1 反义转录物（cerebellar degeneration-related protein 1 antisense，CDR1as）具有 miR-7 吸附能力[6]，cir-SRY 具有 miR-138 吸附能力[6]，cir-ITCH 具有 miR-7、miR-17 和 miR-214 吸附能力[7]等。

目前研究最广最具代表性的 circRNAs 是 CDR1as，含有 70 多个 miR-7 结合位点，能特异性吸附 miR-7，间接调控 miR-7 靶基因。CDR1as 通过 CDR1as/miR-7 轴，作用于 miR-7 靶基因，参与多种生理及病理过程，如癌症[8]、糖尿病[9]、老年痴呆和帕金森等脑组织疾病[8]。

1.2 CircRNAs 与蛋白质相互作用

研究报道，circRNAs 可以通过 RNA-RNA 作用间接结合蛋白质和直接结合一种或多种蛋白质等方式，参与调节亲本基因转录、pre-mRNA 剪切、调节核糖体成熟，以及调控细胞周期、衰老、凋亡等多种生物学过程（图 1）。

1.2.1 调节亲本基因的转录 外显子-内含子 circRNAs 和内含子 circRNAs 主要定位于细胞核，参与调控亲本基因的转录，其作用机制不同。外显子-内含子 circRNAs，如 cir-cEIF3J 和 circPIAP2，通过 RNA-RNA 相互作用与 U1-小核糖体核结合形成复合物，然后在基因启动子区域与 RNA 聚合酶Ⅱ相互作用，调控亲本基因的转录活性[10-11]。而内含子 cir-cRNAs，如 ci-ankrd52，直接结合 RNA 聚合酶Ⅱ相互作用，调控亲本基因的转录活性[12]。

1.2.2 调节 pre-mRNA 的剪接 CircMbl 是盲肌蛋白（muscleblind，MBL）编码基因第二个外显子环化产生的 circRNAs。CircMbl 及其侧翼内含子序列中均含有 MBL 结合位点。Pre-mRNA 与 MBL 结合，能促进 circRNA 的外显子环化过程和抑制线性剪接。而 circMbl 与 MBL 结合可抑制外显子环化过程，反向调节 circMbl 的合成，使 circMbl 与 MBL mRNA 的生成处于动态平衡[13]。

1.2.3 调控核糖体成熟 CircANRIL 和 pre-rRNA 均含有 PES1 蛋白的结合位点。CircANRIL 能竞争性结合 PES1 蛋白，抑制 PES1 蛋白结合 pre-rRNAs 后介导的核酸外切酶对 pre-rRNAs 加工作用，影响核糖体成熟，从而阻碍蛋白质的翻译并导致细胞凋亡[14]。

1.2.4 调节细胞周期、衰老与凋亡 Foxo3 基因编码的 Circ-Foxo3 可以与周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1（cyclin-dependent kinase inhibitor 1，P21）和周期蛋白依赖性激酶 2（cyclin-dependent kinase 2，CDK2）结合形成复合体，P21 作为 CDK2 的抑制剂，阻止 CDK2 与周期蛋白 A、周期蛋白 E 结合，从而阻碍细胞进入细胞周期[15]。Circ-Foxo3 能在细胞质中，与抗衰老相关蛋白分化抑制因子 1（inhibitor of differentiation-1，

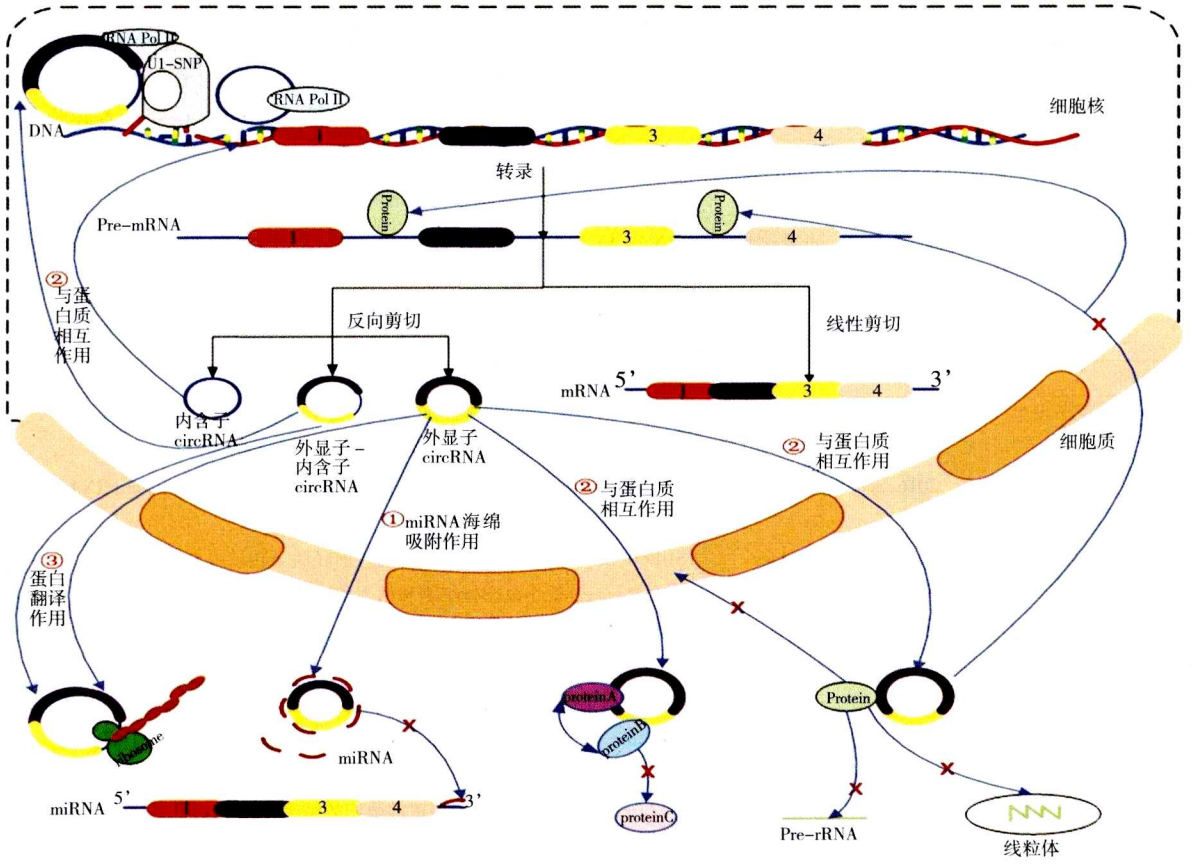


图 1 CircRNAs 生物学功能示意图

Fig.1 Biological function of circRNAs

ID1）、E2F 转录因子 1（E2F transcription factor 1，E2F1）及抗应激蛋白黏着斑激酶（facal adhesion-associated protein kinase，FAK）、HIFa 结合，使 ID1、E2F1、FAK、HIFa 滞留在细胞质内，不能进入细胞核或线粒体发挥抗衰老的功能，从而促进心肌细胞衰老[16]。此外，Circ-Foxo3 还能调控细胞凋亡敏感性。研究表明，Circ-Foxo3 能与 MDM2 和 p53 形成复合物，促进MDM2 对 p53 的泛素化修饰和降解，降低 MDM2 对 Foxo3 蛋白的泛素化修饰和降解，从而导致细胞 p53 水平下调而 Foxo3 蛋白上调，增加了细胞凋亡的敏感性[17]。

1.3 翻译蛋白

CircRNAs 普遍被认为是一种非编码 RNA，仅有少数 circRNAs，如丁型肝炎病毒[18]能编码蛋白（图 1）。近期研究发现，circ-ZNF609[19]、circMbl[20]能不依赖 5'帽子结构，而结合核糖体并编码蛋白质。目前报道的 circRNAs 翻译机制有 2 种：依赖内部核糖体进入位点[20]和依赖 m6A 修饰位点[21]。部分 circRNAs虽没有内部核糖体进入位点，仍能结合核糖体启动翻译过程，其机制可能是依赖 N6-甲基腺苷（N6-methyladenosine，m6A）修饰，这些 circRNAs 在起始密码子上有含有 RRACH 的序列（R=G 或 A；H=A、C 或 U），该序列中的 A 碱基，可被甲基化酶复合体 METTL3/14 催化而发生甲基化，促使 YTHDF3 结合到甲基化位点介导 eIF4 复合物的形成，驱使核糖体结合启动翻译过程。

2 CircRNAs 与生殖发育

2.1 CircRNAs 与配子发生

对生殖器官或生殖干细胞进行 circRNAs 组学数据挖掘，有助于了解配子发生机制（表 1）。研究表明，circRNAs 与生殖干细胞的分化以及精子发送密切相关。Li 等[22]对小鼠雄性生殖干细胞和雌性生殖干细胞进行全转录组分析，在 2 种生殖干细胞中共发现 18 822 种 circRNAs，其中 921 种存在性别差异，245 种为雄性生殖干细胞特有，676 种为雌性生殖干细胞特有，对性别特异的 circRNAs 亲本基因进行 GO 和 KEGG 分析，发现这些亲本基因主要与生殖干细胞分化以及性别决定相关，提示 circRNAs 可能在生殖干细胞的分化中发挥调控作用。Dong 等[23]采用对人类睾丸组织的高通量测序技术，发现了 15 996 种 circRNAs，67%为新发现的 circRNAs。对新发现的 circRNAs 亲本基因进行 GO 分析发现，这些亲本基因主要与精子发生、精子运动和受精作用相关。此外，鉴于 circRNAs 具有不易降解的特性，是较好的生物诊断分子，研究者还分析了 20 种睾丸来源的 circRNAs 在精液中表达，发现大部分 circRNAs 均能在精液中稳定。该研究为探究 circRNAs 在精子发生中的作用和为男性不育疾病寻找无创诊断标志物奠定基础。

2.2 CircRNAs 与早期胚胎发育

胚胎发育过程复杂，研究着床前胚胎中转录组对阐明胚胎发育分子机制具有重要意义。PolyA+mRNA 在胚胎中的表达已有较多研究，但由于技术手段的限制，对 PolyA 的 circRNAs 研究并不透彻。近年来，随着深度测序、生物信息学等科学技术的发展，人或小鼠胚胎中的 circRNAs 组学数据正不断被完善[24-25]。Dang 等[24]采用 SUPeR-seq 技术对人成熟卵母细胞和着床前不同发育阶段的胚胎 polyA-RNA 进行测序，生物信息学分析发现大量 circRNAs 会随着胚胎发育进程呈现较大幅度的动态变化。平均每种基因产生的 circRNA/转录产物比例，由成熟卵母细胞期至 4 细胞期较为稳定，约为9%，从 8 细胞期开始逐渐上升，至桑葚胚时期达到峰值 25%，随

表 1 circRNAs 在生殖、围产领域研究文献汇总

Tab.1 Literature summary of circRNAs in the area of reproduction and perinatal stage

研究方向	文章	研究内容	文献编号
CircRNAs与配子发生	2017，Oncotarget	高通量测序研究小鼠雌性和雄性生殖干细胞的 mRNAs、lncRNA 和 circRNAs 表达	22
	2016，Scientific Reports	高通量测序研究人睾丸组织 circRNAs 表达以及睾丸来源的 circRNAs 在精液中的稳定性	23
CircRNAs与早期胚胎发育	2016，Genome Biology	SUPeR-seq分析人类卵母细胞和植入前胚胎全转录组分析	24
	2015，Genome Biology	SUPeR-seq分析小鼠卵母细胞和植入前胚胎全转录组分析	25
CircRNAs与子痫前期	2016，Cellular Physiology and Biochemistry	芯片分析子痫前期患者和正常早产孕妇的胎盘组织 circRNAs 表达	27
	2016，BJOG	芯片分析子痫前期孕妇和正常孕妇的血细胞中 circRNAs 表达，以及建立 has_circ_101222 联合血浆蛋白内皮糖蛋白的早期诊断子痫前期的方法	28
CircRNAs与习惯性流产	2017，Biomedicine & Pharmacotherapy	芯片分析习惯性流产孕妇和正常孕妇的绒毛膜组织 circRNAs 表达以及分析差异 circRNAs 分子的诊断效率。	29
CircRNAs与卵巢癌	2016，Oncotarget	RNA测序分析上皮性卵巢癌ⅢC 期患者原位病灶、腹膜和淋巴结病灶的 mRNA 和 circRNAs 表达变化	30

后逐渐下降。平均每个基因产生的 circRNA/线性转录产物比例约为 10%，然而 PRDM2、SETD2、MLLT3、MLLT4、KIT 等少数基因产生 circRNAs 产物超过线性转录产物，而这些基因主要参与组蛋白甲基化和转录调节等生物学进程，提示 circRNAs 可能调控胚胎发育过程。对着床前胚胎 circRNAs 转录组学的分析有助于进一步筛选出其调控作用的关键 circRNAs，并探究其在胚胎发育中的功能和机制，从而进一步完善胚胎发育调控网络。

3 CircRNAs 与生殖、围产期相关疾病

3.1 CircRNAs 与子痫前期

子痫前期是妊娠期高血压的一种特殊的、严重的临床表现，一旦发生，母婴并发症和死亡率明显增高[26]。因此，对子痫前期早预测和提前干预，是减低疾病风险的重要手段。circRNAs 稳定、保守，其组织和发育阶段具特异性，以 circRNAs 作为子痫前期诊断标志物具有良好的前景（表 1）。Qian 等[27]发现子痫前期患者和正常早产孕妇的胎盘组织 circRNAs 呈现差异表达，暗示 circRNAs 在子痫前期疾病诊断中有重要价值。此外，Zhang 等[28]也发现子痫前期孕妇和正常孕妇对照组的血细胞中有 12 种 circRNAs 呈现明显的差异表达（FC>5.0，$P<0.001$），其 circ_101222 差异明显达 10 倍左右，且生物信息学预测其含有与 miR-181 应答元件，已有研究证实miR-181 与子痫前期密切相关，提示 has_circ_101222 可能作为子痫前期的诊断标志物。因此，作者随后研究了has_circ_101222 诊断子痫前期的效率。结果表明，相对于常规的血浆蛋白内皮糖蛋白（endoglin，ENG）诊断方法（灵敏度为 68.3%，特异性为 73.2%），血液的血细胞中has_circ_101222 联合 ENG 检测明显提高了子痫前期的诊断效率，诊断灵敏度达 70.7%，特异性达 80.5%。

3.2 CircRNAs 与习惯性流产

习惯性流产是临床上复杂的病因不明的疾病。持续性的流产给孕妇的身心带来巨大的伤害。Qian 等[29]将习惯性流产孕妇和正常孕妇的绒毛膜组织进行芯片分析，发现两样本 circRNAs 有较大差异，上调或下调表达 4 倍以上的 circRNAs 分别为 12 个和 21 个，提示 circRNAs 可能与习惯性流产病因有关。对差异表达较大的 circRNAs 进行 ROC 曲线分析，发现circRNA_104948、circRNA_104547、hsa_circRNA_101319 等 8 个 circRNAs 作为习惯性流产诊断标志物，具有较好特异性和灵敏度。此外，作者还预测了 hsa_circRNAs_104792/miRNA-133a/HLA-G 等几个可能的调控途径，以供进一步研究。

3.3 CircRNA 与卵巢癌

卵巢癌是妇科肿瘤中常见的一种恶性肿瘤，其病死率居妇科恶性肿瘤之首，发病率仅次于宫颈癌和子宫内膜癌，位居第三，是严重威胁妇女健康的最大疾患。有研究报道 circRNAs 与卵巢癌转移侵袭相关[30]。采集上皮性卵巢癌ⅢC 期的患者的原位肿瘤以及腹膜和淋巴结病灶进行 RNA 测序，通过原位病灶与转移瘤之间的比较，转移瘤中癌症相关信号通路分子如 NFkB，PI3k/AKT and TGF-β 等所对应 mRNA 上调而 circRNAs 下调。此外，作者还发现多种包含 miR-24/let-7 结合位点的 circRNAs，在转移瘤中呈现上调的趋势，提示 circRNAs 可能通过其环化过程竞争性抑制 mRNA 线形剪接或 miRNA 海绵作用，调节癌症转移相关基因的表达，从而影响卵巢癌转移侵袭。

4 展 望

生殖领域的研究主要包括配子发生、胚胎发育、胚胎植入等发面。在生殖发育方面，目前的配子、胚胎等组织在高通量研究方面丰富了 circRNAs 转录组学数据，为探究配子发生和胚胎发育的机制提供了宝贵的资源，但目前的研究大多仅停留在组学阶段，筛选出生殖发育中起关键调控作用的 circRNAs 分子并进行机制研究是下一步研究的方向。此外，胚胎植入作为生殖过程中最重要的步骤之一，涉及诸多分子参与，是决定妊娠成功与否的关键。胚胎着床是一个极其复杂的过程，目前其机制尚不清楚，但已有研究大量研究报道，miRNA 在胚胎植入期子宫容受性建立中发挥重要作用，而 circRNAs 作为 miRNAs 海绵吸附体，其是否参与其中，目前并没有相关的研究报道。

在生殖、围产期疾病的研究中，如子痫前期等往往具有发病迅速、预后较差、危害较大等特征，寻找疾病的早期诊断标志物是治疗的关键。CircRNAs 作为一类新型 RNA，区别于传统线性 RNA 的，具有闭合环状结构，对核酸外切酶不敏感，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，在作为新型临床诊断标记物的开发应用上具有明显优势。如寻找疾病相关的特异性 circRNAs，就能为临床提供新的早期诊断、预后以及治疗方案。总之，随着研究的推进，生殖以及围产期领域中 circRNAs 的角色将越来越清晰。

参 考 文 献

[1] Danan M，Schwartz S，Edelheit S，et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea[J]. Nucleic Acids Res，2011，40(7)：3131-3142.

[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] Chen W，Schuman E. Circular RNAs in brain and other tissues：a functional enigma[J]. Trends Neurosci，2016，39(9)：597-604.

[4] Floris G,Zhang L,Follesa P,et al. Regulatory role of circular RNAs and neurological disorders[J]. Mol Neurobiol,2016. Epub ahead of print.

[5] Liu J,Liu T,Wang X,et al. Circles reshaping the RNA world: from waste to treasure[J]. Mol Cancer,2017,16:58.

[6] Hansen TB,Jensen TI,Clausen BH,et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature,2013,495(7441):384-388.

[7] Li F,Zhang L,Lu J. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/β-catenin pathway[J]. Oncotarget,2016,6(8):6001-6013.

[8] Chen Y,Li C,Tan C,et al. Circular RNAs:a new frontier in the study of human diseases[J]. J Med Genet,2016,53(6):359-365.

[9] Xu H,Guo S,Li W,et al. The circular RNA Cdr1as,via miR-7 and its targets,regulates insulin transcription and secretion in islet cells[J]. Sci Rep,2015,5:12453.

[10] 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.

[11] Huang C,Shan G. What happens at or after transcription:insights into circRNA biogenesis and function[J]. Transcription,2015,6(4):61-64.

[12] Zhang Y,Zhang X,Chen T,et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. Mol Cell,2013,51(6):792-806.

[13] Ashwal-Fluss R,Meyer M,Pamudurti NR,et al. CircRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. Molecular Cell,2014,56(1):55-66.

[14] Holdt LM,Stahringer A,Sass K,et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans[J]. Nat Commun,2016,7:124-129.

[15] Du WW,Yang W,Liu E,et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. Nucleic Acids Res,2016,44(6):2846-2858.

[16] 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,2016,38(18):1402-1412.

[17] Du WW,Fang L,Yang W,et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity[J]. Cell Death Differ,2016,24(2):357-370.

[18] 付丽云,胡耀仁,郭俊明. 环状 RNA 与人类疾病[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2015,31(8):771-778.

[19] 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.

[20] Pamudurti NR,Bartok O,Jens M,et al. Translation of CircRNAs [J]. Mol Cell,2017,66(1):9-21.

[21] 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.

[22] Li X,Ao J,Wu J. Systematic identification and comparison of expressed profiles of lncRNAs and circRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in mouse germline stem cells[J]. Oncotarget,2017,8(16):26573-26590.

[23] Dong WW,Li HM,Qing XR,et al. Identification and characterization of human testis derived circular RNAs and their existence in seminal plasma[J]. Sci Rep,2016,6:39080.

[24] Dang Y,Yan L,Hu B,et al. Tracing the expression of circular RNAs in human pre-implantation embryos[J]. Genome Biology,2016,17:130.

[25] 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 Biol,2015,16:148.

[26] López-Alarcón M,Montalvo-Velarde I,Vital-Reyes VS,et al. Serial determinations of asymmetric dimethylarginine and homocysteine during pregnancy to predict pre-eclampsia:a longitudinal study[J]. BJOG,2015,122(12):1586-1592.

[27] Qian Y,Lu Y,Rui C,et al. Potential significance of circular RNA in human placental tissue for patients with preeclampsia[J]. Cell Physiol Biochem,2016,39(4):1380-1390.

[28] Zhang YG,Yang HL,Long Y,et al. Circular RNA in blood corpuscles combined with plasma protein factor for early prediction of pre-eclampsia[J]. BJOG,2016,123(13):2113-2118.

[29] Qian Y,Wang X,Ruan H,et al. Circular RNAs expressed in chorionic villi are probably involved in the occurrence of recurrent spontaneous abortion[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2017,88:1154-1162.

[30] Ikhlak A,Thasni K,Simeon SA. Altered expression pattern of circular RNAs in primary and metastatic sites of epithelial ovarian carcinoma[J]. Oncotarget,2016,7:36366-36378.

（责任编辑：张辉洁）