

环状 RNAs 翻译功能在结直肠癌中的研究进展

甘钰^{1,2}, 方炜丹^{1,2}, 张凌^{1,2*}

1.南昌大学第一附属医院 肿瘤科,江西 南昌 330000

2.南昌大学第一附属医院 医学创新中心,江西 南昌 330000

【摘要】 环状 RNAs(circRNAs)是一种新型的内源性非编码 RNA,具有丰富性、稳定性、保守性和特异性等特点,可通过多种机制发挥生物学作用。circRNAs 在结直肠癌(CRC)的发生发展中起到重要作用。随着高通量测序技术及蛋白组学的发展,人们不仅发现 circRNAs 具有编码蛋白的潜能,并且其编码的蛋白质与人类疾病的发生发展密切相关。因此,本文概述了 circRNAs 的形成、特性、生物学功能,并重点介绍了 circRNAs 的翻译起始机制及 circRNAs 通过翻译机制,在 CRC 中所发挥的作用。

【关键词】 环状 RNAs; 结直肠癌; 蛋白翻译

The progress on translation function of circular RNAs in colorectal cancer

Gan Yu^{1,2}, Fang Weidan^{1,2}, Zhang Ling^{1,2*}

1.Department of Medical Oncology, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi, China

2.Medical Innovation Center, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi, China

Corresponding author: Zhang Ling; E-mail: zhang_l202@163.com

【Abstract】 As a new kind of RNA, circular RNAs (circRNAs) are endogenous non-coding RNA, which have the characteristics of universality, stability, conservatism and specificity, and can play a biological role through a variety of mechanisms. The study found that circRNAs play an important role in the development of colorectal cancer(CRC). With the rapid development of high-throughput sequencing technology and proteomics, people have discovered that circRNAs can be translated into proteins, whose function is closely related to the occurrence and development of human diseases. Thus, in this review, we systematically summarize the biogenesis, features and biological functions of circRNAs, and highlight the translation initiation mechanism of circRNAs and the role of circRNAs in CRC through translation mechanism.

【Key words】 Circular RNA; Colorectal cancer; Protein translation

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。流行病学调查显示,结直肠癌发病率在全球所有恶性肿瘤中位居第3位,死亡率位居第2位^[1]。近年来,尽管结直肠癌的诊断和治疗取得了很大进展,但由于结直肠癌早期无明显症状,确诊时已经处于中期或晚期,并且因个体差异大,化疗敏感性不同,导致结直肠癌治疗效果并不理想^[2,3]。因此,探讨结直肠癌的发病机制对于治疗结直肠癌是迫切而必要的。

环状 RNAs(circular RNAs, circRNAs)是一种新型的内源性非编码 RNA(non-coding RNAs, ncRNAs),于 1976 年

Sanger 在类病毒中发现^[4],最初被人们认为是错误剪接的结果。但随着生物信息学和高通量测序技术的发展, circRNAs 被发现广泛存在于病毒、真菌、植物和动物中^[5]。研究表明, circRNAs 在调节生物过程和疾病进展方面有很大的潜力^[6]。其中, circRNAs 参与了肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等多种生理病理过程,与结直肠癌的发生发展密不可分^[7]。目前对于 circRNAs 的研究主要集中于竞争性内源 RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA)机制,关于 circRNAs 翻译功能的研究鲜有报道。因此,本文概述了 circRNAs 的形成、特性和生物学功能,并重点介绍了 circRNAs 通过翻译蛋白质在结直肠癌中的作用。同时,我们希望基于对 circRNAs 的认识,为结直肠癌的诊断及治疗提供新思路。

基金项目:国家自然科学基金(81760431)、江西省自然科学基金(20161BAB205243)

*通信作者:张凌, E-mail: zhang_l202@163.com

1 circRNAs 产生与特性

circRNAs 是一种经可变剪接产生的前体 RNA, 以 5' 末端和 3' 末端反向共价键结合的内源性环状 RNA 分子, 是生物体生命过程中重要的功能调控分子。根据 circRNAs 来源不同, 可分为 5 种类型: 外显子 circRNAs (exonic circRNAs, ecircRNAs)^[8]、内含子 circRNAs (circular intronic RNAs, ciRNAs)^[9]、外显子内含子 circRNAs (exon-intron circRNAs, EIciRNAs)^[10]、前体 tRNA 来源的 circRNAs (tRNA intronic circulars, ricRNAs)^[11] 和基因间 circRNAs (intergenic circRNAs)^[12]。目前, 已经有 6 种 circRNAs 反向剪接形成模型提出, 包括外显子跳跃、内含子配对、内含子直接环化、RNA 结合蛋白介导环化、tRNA 剪接驱动环化及 tRNA 剪接驱动环化^[13]。

circRNAs 具有以下几个特点。①丰富性: 随着高通量测序的发展, 目前已在人成纤维细胞中发现超过 25 000 种 circRNAs^[14]。②稳定性: circRNAs 是一个共价闭合的环状结构, 没有 5' 端帽子结构和 3' 端多聚 poly A 尾, 不易被核酸外切酶降解, 因此稳定性远优于线性 mRNA^[15]。③保守性: circRNAs 具有序列保守性, 极大提升了干扰疾病相关 circRNAs 表达水平的可行性^[16]。④特异性: circRNAs 通常在不同的组织及发育阶段存在特异性表达^[17]。

2 circRNAs 的生物学功能

迄今为止, 研究发现 circRNAs 通过以下 4 种功能调控机体多种生理病理过程。①作为 miRNAs 的“分子海绵”: 通过与 miRNA 应答元件(miRNA response elements, MREs) 相互作用负性调控 miRNAs 的表达^[18], 进而调控细胞内信号传导通路以及下游基因的表达, 即 ceRNA 机制。目前, miRNAs 海绵作用被认为是 circRNAs 参与肿瘤发生、发展的主要机制^[19]。②调控基因转录: EIciRNAs 和 ciRNAs 通过转录或转录后调控蛋白质的生物合成^[20]。ciRNAs 可与 RNA pol II 相互作用, 这表明 ciRNAs 对其亲本基因转录具有顺式调控作用^[21]。另一项研究发现, EIciRNA 通过形成 EIciRNA-U1-snRNP 复合物, 促进亲本基因转录^[10]。③与蛋白质结合: circRNAs 可以与不同的蛋白质结合, 形成特定的 circRNAs-蛋白质复合物(circRNA-protein complexes, circRNPs), 进而影响相关蛋白表达^[22]。④翻译作用: circRNAs 的翻译可以不依赖于 m7G 帽结构进行独立翻译^[23], 并且其翻译的蛋白在细胞应激^[24]、控制肌生成^[25]和肿瘤进展^[26]中发挥重要的生物学作用。

3 circRNAs 的翻译起始机制

circRNAs 作为 ncRNAs, 长期以来被认为不具备蛋白质翻译功能。随着人们对 circRNAs 的不断探索, Kos 等^[27]在丁型肝炎病毒中发现了第 1 个由 circRNAs 翻译而来的蛋白质, 这极大地扩展了我们对 circRNAs 生物学功能的理解, 并为癌症治疗提供了新的视角。目前, 关于 circRNAs

的翻译起始机制主要有 3 种。

3.1 核糖体介入位点介导的翻译 核糖体介入位点(internal ribosome entry site, IRES)是 RNA 调控元件, 它可以招募核糖体, 完成核糖体组装和蛋白翻译^[28]。IRES 介导的翻译可以选择性调控细胞增殖、分化、凋亡和应激反应等生理病理过程^[29]。2016 年, Chen 等^[30]建立了 circRNAs 数据库 circRNADb, 他们初步探索发现, 约 1/2 的 circRNAs 具有开放阅读框(open reading frame, ORF), 并且其中 7170 个 circRNAs 具有 IRES。这提示 IRES 介导的 circRNAs 独立翻译机制的重要性和普遍性。Feng 等^[31]研究表明 circFBXW7 通过 IRES 介导 FBXW7-185aa 蛋白的翻译, 通过增加 FBXW7 的丰度并诱导 c-Myc 降解来抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖和迁移能力。Liang 等^[32]发现 circ β -catenin 在肝癌组织中高表达, 通过生物信息学分析发现 circ β -catenin 含有一个 IRES。通过 IP 实验及质谱分析, 证实了其可以编码蛋白质 β -catenin-370aa, 并且 β -catenin-370aa 通过竞争性抑制 GSK3 β 对 β -catenin 磷酸化, 进而抑制 β -catenin 的泛素化降解。

3.2 m6A 修饰介导的翻译 在 mRNA 中, m6A 修饰是 RNA 最常见的转录后修饰, 可以调控 RNA 的转录、剪切、出核、翻译和降解等^[33]。circRNAs 的 m6A 甲基化是由甲基转移酶 METTL3 和 METTL14 组成的异二聚体实现, 并可以通过去修饰酶 FTO 和 ALKBH5 可逆性去除。Yang 等^[34]发现一些 circRNAs 内部含有丰富 m6A 修饰位点, 而单个 m6A 位点足以驱动翻译起始。m6A 依赖的翻译起始包括起始因子 eIF4G2、eIF3A 以及结合蛋白 YTHDF3。Zhao 等^[35]在致癌的人乳头状瘤病毒 16(human papilloma virus, HPV16) 发现了 circE7, 它可以翻译癌蛋白 E7。此外, circE7 翻译的启动可能与 m6A 修饰有关。

3.3 滚环扩增翻译 滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)是指环状 DNA 分子(如病毒、质粒)进行自我复制的方式, 后被发展成为一种核酸扩增方法。Abe 等^[36]构建了一种含有无限阅读框架的 circRNAs, 结果发现 circRNAs 能够通过 RCA 模式在原核生物中进行翻译, 并在真核生物中得到了验证^[37]。

4 circRNAs 翻译作用在结直肠癌中的作用和意义

circRNAs 被发现可作为结直肠癌的癌基因或抑癌基因, 调控结直肠癌多种恶性肿瘤表型, 如细胞增殖、侵袭和转移。但这些研究主要是围绕 circRNAs 作为分子海绵机制展开的。近年来, 人们发现 circRNAs 可通过编码功能小肽调节生物学过程, 影响结直肠癌的发生发展。

4.1 circFNDC3B-218aa circFNDC3B 在结直肠癌中显著低表达, 并且与预后关系密切^[38]。该研究还发现了 circFNDC3B 具有 ORF, 可以编码 218 个氨基酸。并且, circFNDC3B-218aa 通过 Snail-FBP1-EMT 轴, 促进细胞代谢由糖酵解向氧化磷酸化的转换, 从而抑制结直肠癌细胞上皮间充质转化的进程。

4.2 circPPP1R12A - 73aa circPPP1R12A 在结直肠癌组织中中高表达。通过 circRNADb 数据库, 发现了一个 216 nt 的 ORF。Zheng 等^[39]构建了带有不同标签的载体转染至细胞中,证实了 circPPP1R12A 编码了 circPPP1R12A-73aa。并通过体内外实验验证了是 circPPP1R12A 编码的 circPPP1R12A-73aa 促进了结直肠癌细胞的增殖、侵袭和转移,而不是 circPPP1R12A。此外,KEGG 通路分析及细胞功能实验发现,circPPP1R12A-73aa 通过激活 Hippo-YAP 信号通路促进结直肠癌的增殖、迁移和侵袭能力。

4.3 circLgr4 Zhi 等^[40]发现 circLgr4 在结直肠癌中高表达,并与转移密切相关研究者通过蛋白质印迹法和共聚焦显微技术发现,circLgr4 具有编码肽的潜力。作者构建了 2 个无编码肽潜力的 circLgr4 突变体,发现结直肠癌干细胞自我更新能力受损,表明 circLgr4 翻译的 circLgr4-肽在结直肠癌的发生发展过程中起关键作用。此外,circLgr4-肽可与 Lgr4 相互作用,进而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进结直肠癌干细胞的自我更新和肿瘤发生。

4.4 hsa_circ_0006401 研究发现 hsa_circ_0006401 与结直肠癌转移密切相关,通过体内外实验发现 hsa_circ_0006401 能显著促进结直肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力^[41]。并且 hsa_circ_0006401 中存在一个 594 nt ORF,作者通过构建载体明确该分子可编码 198 个氨基酸的短肽,功能实验发现 hsa_circ_0006401 是通过编码 hsa_circ_0006401-肽来促进结直肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭。此外,通过 GO 富集分析及放线菌素 D 实验,发现 hsa_circ_0006401-肽促进亲本基因 col6a3 的稳定性。

5 研究展望

随着高通量测序技术及蛋白组学的不断发展,circRNAs 作为编码功能小肽的作用逐渐被人们发现。目前研究发现 circRNAs 编码的功能肽与结直肠癌、肝癌^[32]、乳腺癌^[31]、膀胱癌^[42]、胶质瘤^[43,44]等发生发展密切相关,有望成为临床治疗的新靶点。当然,我们对 circRNAs 翻译机制研究尚有许多问题,仍需进一步探索。比如:circRNAs 是否具有其他翻译机制? circRNAs 编码的肽是否以类似于 mRNA 的方式进行翻译后修饰?有哪些因素和条件会影响 circRNAs 的翻译? circRNAs 的翻译是否存在组织及疾病特异性?总之,随着对 circRNAs 的深入研究及蛋白组学的不断发展,circRNAs 有望为结直肠癌的治疗新靶点。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] MINA LA, SLEDGE GW, JR. Rethinking the metastatic cascade as a therapeutic target[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(6): 325-332.
- [3] SANOFF H, GOLDBERG R. How we treat metastatic colon cancer in older adults [J]. J Geriatr Oncol, 2013, 4(4): 295-301.
- [4] 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 U S A, 1976, 73(11): 3852-3856.
- [5] WANG M, YU F, LI P. Circular RNAs: Characteristics, Function and Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2018, 10(8).
- [6] ZHANG Z, YANG T, XIAO J. Circular RNAs: Promising Biomarkers for Human Diseases [J]. EBioMedicine, 2018, 34: 267-274.
- [7] GHAFOURI-FARD S, TAHERI M, HUSSEN BM, et al. Function of circular RNAs in the pathogenesis of colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 140: 111721.
- [8] 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.
- [9] TALHOUARNE GJ, GALL JG. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of *Xenopus tropicalis* oocytes [J]. RNA, 2014, 20(9): 1476-1487.
- [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] LU Z, FILONOV GS, NOTO JJ, et al. Metazoan tRNA introns generate stable circular RNAs in vivo [J]. RNA, 2015, 21(9): 1554-1565.
- [12] GENG Y, JIANG J, WU C. Function and clinical significance of circRNAs in solid tumors [J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 98.
- [13] CHAICHIAN S, SHAFABAKHSH R, MIRHASHEMI SM, et al. Circular RNAs: A novel biomarker for cervical cancer [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 718-724.
- [14] 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.
- [15] SUZUKI H, ZUO Y, WANG J, et al. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(8): e63.
- [16] ABOUHAIIDAR MG, VENKATARAMAN S, GOLSHANI A, et al. Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(40): 14542-14547.
- [17] WESTHOLM JO, MIURA P, OLSON S, et al. Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation [J]. Cell Rep, 2014, 9(5): 1966-1980.
- [18] SHI X, SUN M, LIU H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases [J]. Cancer Lett, 2013, 339(2): 159-166.
- [19] LIMB C, LIU DSK, VENO MT, et al. The Role of Circular

- RNAs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Biliary-Tract Cancers [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11):3250.
- [20] ZHANG X, LU N, WANG L, et al. Circular RNAs and esophageal cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 362.
- [21] ZHANG Y, ZHANG XO, CHEN T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792–806.
- [22] 王家立, 叶孟. 环状 RNA 的功能及其在结直肠癌中的作用 [J]. *生命的化学*, 2020, 40(4): 520–527.
- [23] MIAO Q, NI B, TANG J. Coding potential of circRNAs: new discoveries and challenges [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10718.
- [24] DIALLO LH, TATIN F, DAVID F, et al. How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms? [J]. *Biochimie*, 2019, 164: 45–52.
- [25] 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.e9.
- [26] PAMUDURTI N R, BARTOK O, JENS M, et al. Translation of CircRNAs [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 9–21.e7.
- [27] KOS A, DIJKEMA R, ARNBERG AC, et al. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA [J]. *Nature*, 1986, 323(6088): 558–560.
- [28] KING HA, COBBOLD LC, WILLIS AE. The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(6): 1581–1586.
- [29] KOMAR AA, HATZOGLU M. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(2): 229–240.
- [30] CHEN X, HAN P, ZHOU T, et al. circRNADB: A comprehensive database for human circular RNAs with protein-coding annotations [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34985.
- [31] YE F, GAO G, ZOU Y, et al. circFBXW7 Inhibits Malignant Progression by Sponging miR-197-3 p and Encoding a 185-aa Protein in Triple-Negative Breast Cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 88–98.
- [32] LIANG WC, WONG CW, LIANG PP, et al. Translation of the circular RNA circbeta-catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 84.
- [33] ROIGNANT JY, SOLLER M. m(6)A in mRNA: An Ancient Mechanism for Fine-Tuning Gene Expression [J]. *Trends Genet*, 2017, 33(6): 380–390.
- [34] YANG Y, FAN X, MAO M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine [J]. *Cell Res*, 2017, 27(5): 626–641.
- [35] ZHAO J, LEE EE, KIM J, et al. Transforming activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2300.
- [36] ABE N, HIROSHIMA M, MARUYAMA H, et al. Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(27): 7004–7008.
- [37] ABE N, MATSUMOTO K, NISHIHARA M, et al. Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16435.
- [38] PAN Z, CAI J, LIN J, et al. A novel protein encoded by circFND3B inhibits tumor progression and EMT through regulating Snail in colon cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 71.
- [39] ZHENG X, CHEN L, ZHOU Y, et al. A novel protein encoded by a circular RNA circPPP1R12A promotes tumor pathogenesis and metastasis of colon cancer via Hippo-YAP signaling [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 47.
- [40] ZHI X, ZHANG J, CHENG Z, et al. circLgr4 drives colorectal tumorigenesis and invasion through Lgr4-targeting peptide [J]. *Int J Cancer*, 2019.
- [41] ZHANG C, ZHOU X, GENG X, et al. Circular RNA hsa_circ_0006401 promotes proliferation and metastasis in colorectal carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 443.
- [42] GU C, ZHOU N, WANG Z, et al. circGprc5 a Promoted Bladder Oncogenesis and Metastasis through Gprc5 a-Targeting Peptide [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 633–641.
- [43] ZHANG M, ZHAO K, XU X, et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4475.
- [44] BEGUM S, YIU A, STEBBING J, et al. Novel tumour suppressive protein encoded by circular RNA, circ-SHPRH, in glioblastomas [J]. *Oncogene*, 2018, 37(30): 4055–4057.