

植物环状 RNA 研究进展

赵佳明¹, 樊二勤^{1,2}, 王智³, 王军辉^{2*}, 曲冠证¹

(1. 东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 楸树国家创新联盟, 北京 100091; 3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

摘要 环状 RNA(circular RNA, circRNA) 主要是真核细胞通过反向剪接作用使 3' 末端和 5' 末端共价结合而形成的一条单链非编码 RNA 分子, 它是一种特殊的非编码 RNA(noncoding RNA, ncRNA), 在多种生物体中广泛存在。综述了植物中 circRNA 鉴定方法、分子特征以及潜在的生物学功能等方面, 表明 circRNA 可能在生物胁迫、非生物胁迫以及生长和发育中发挥重要作用, 并以动物中 circRNA 的研究进展为基础, 对植物中 circRNA 的局限性和应用前景进行讨论。

关键词 环状 RNA; 非编码 RNA; circRNA 鉴定; 分子特征; 生物学功能

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)15-0004-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.15.002



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress of Plant Circular RNA

ZHAO Jia-ming¹, FAN Er-qin^{1,2}, WANG Zhi³ et al (1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry Sciences, State Key Laboratory of Grassland Forest Cultivation, Catalpa National Innovation Alliance, Beijing 100091; 3. China Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176)

Abstract Circular RNA (circRNAs) is mainly a single-stranded non-coding RNA molecule formed by covalent binding of 3' and 5' ends by reverse splicing of eukaryotic cells. It is a special non-coding RNA (non-coding RNA, ncRNA), which exists widely in many organisms. In this paper, the identification methods, molecular characteristics and potential biological functions of circRNA in plants were reviewed. It was indicated that circRNA may play an important role in biological stress, abiotic stress, growth and development. Based on the research progress of circRNA in animals, the limitations and application prospects of circRNA in plants were discussed.

Key words circRNA; Non-coding RNA; circRNA identification; Molecular characteristics; Biological function

在植物细胞中,除了可编码蛋白的信使 RNA(mRNA) 以外,还存在着诸多类型的非编码 RNA,包含核糖体 RNA(rRNA)、转运 RNA(tRNA)、反式作用 siRNA(tasiRNA)、小干扰 RNA(siRNA)、小核仁 RNA(snoRNA)、小核 RNA(snRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)、微小 RNA(miRNA) 和环状 RNA(circRNA) 等^[1]。随着高通量测序技术的发展,环状 RNA(circRNA) 在非编码 RNA 的研究中渐渐成为热点。以共价闭合构成的环状 RNA 主要由数千种真核生物基因外显子的前体 mRNA 的 3' 和 5' 末端的反向剪接形成,它是一类区别多数线性 RNA 的非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)^[2]。

更多的研究表明, circRNA 结构稳定、种类丰富、序列保守、在细胞和组织中特异性表达。 circRNA 具备很多潜在功能,通过发挥 miRNA 海绵功能、干扰可变剪切以及结合蛋白等方式调控线性 mRNA 的表达。高通量测序结果表明, circRNA 广泛存在于多种植物体中,通过细胞和组织特异性表达参与花的发育、果实的成熟、逆境响应等生长发育进程^[3-4]。笔者总结近年来对植物 circRNA 的研究现状,结合动物中最前沿的研究内容,对植物中 circRNA 潜在的功能进行借鉴研究,为植物 circRNA 的进一步研究发展提供重要理论基础,并讨论未来的研究方向。

1 植物中 circRNA 的鉴定

环状 RNA 是一种呈环形闭合的非编码 RNA 分子,在剪切复合体作用下,它由基因的一个或多个外显子连接组成,且具备 miRNA 海绵体的功能,研究表明它的构成依赖于两侧的内含子互补序列。在动物和人类中已经鉴定出许多环状 RNA,但是在植物上的大规模鉴定信息鲜有报道,几乎关注度很低^[5]。环状 RNA 一直被认为是剪切错误的产物,直到 20 世纪 70 年代, Sanger 等^[6] 在植物病毒中发现了闭合的环状 RNA 分子,并且在真核生物中验证了环状 RNA 的存在。随着高通量测序技术的发展, Salzman 等^[7] 第一次提出 circRNA 是由 mRNA 前体可变剪切而来,是真核生物中普遍存在的一类 3' 和 5' 共价闭合 RNA 分子,涉及转录后调控过程。自 2014 年植物 circRNA 第一次在模式植物拟南芥中发现以来^[1], 目前已经在玉米、水稻、小麦、大麦等单子叶植物和大豆、猕猴桃、辣椒、拟南芥、马铃薯、沙棘、番茄、棉花、枸橼、茶树和梨等双子叶植物约 15 个物种中涉及 circRNA 的研究报道。由于取样组织、识别软件和测序深度不同,所以报道物种间 circRNA 数量存在较大差异,例如,在拟南芥的叶组织和水稻的根部中鉴定出 circRNA 分别是 6 012 和 12 037 个^[8]; 在水稻的花序中和成熟叶组织中鉴定出 circRNA 仅 2 354 个^[3]。截至目前,为植物 circRNA 研究提供了极大的便利,已经建立起 4 个针对植物 circRNA 分析和检索数据库^[9], 该研究首次整理了 circRNA 的鉴定信息史(表 1)。

有研究表明, circRNA 同样参与开花过程。目前,关于开花调控的小 RNA 研究主要还集中于 microRNA(miRNAs)

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目“楸树特异性状形成的分子解析”(CAFYBB2017ZY002)。

作者简介 赵佳明(1995—),男,黑龙江绥化人,硕士研究生,研究方向:林木遗传育种。*通信作者,研究员,博士,博士生导师,从事云杉、楸树遗传育种研究。

收稿日期 2020-11-18

上,miRNA 是一类长度为 21~23 nt 的 RNA 分子,在转录后调控功能^[23],主要利用引导效应蛋白 AGO (Argonaute) 来抑制 mRNA 表达^[24]。例如,在拟南芥和水稻中,miR172 和 miR156 在营养生长到生殖生长过程中起着重要的作用;拟南芥中的 miR172 和金鱼草、玉米中的 miR169 在初期花发育时调控花型及相关靶基因的表达,miR139、miR159、miR164 和 miR167 主要在花发育后期发挥作用^[25]。

circRNA 的预测分析是其功能机制研究的基础。截至目前,有 7 种以上的 circRNA 预测软件被公开发表,其中 PcircRNA_finder 是针对植物较特异的 circRNA 预测软件。依据算法不同,软件可以分为 2 种类型:第 1 种是利用内含子驱动下的反向可变剪切接头序列而设计的预测软件,例如,MapS-pllice、CIRI、CIRCexplorer、find_circ 等^[26];第 2 种是利用基因组注释信息预测可变剪切接头反向序列,并与注释的

外显子序列进行匹配来推测新的 circRNA 软件,例如, NCLscan、KNIFE 等都是针对人类和动物 circRNA 进行研究开发,不太适用于植物 circRNA 的鉴定^[27-28]。此外不同软件运行速度和准确度各有差异,根据预测软件的计算速度和准确度对同一样本数据进行分析,KNIFE 和 CIRCexplorer 的准确度就会很高;find_circ 准确度也比较高;PcircRNA_finder 更有利于对植物 circRNA 的鉴定^[28]。但是关于这个软件的可靠性和可应用性还需要进一步探讨。该研究整理了 circRNA 的相关预测方法(表 2),在实际应用中可使用多个 circRNA 识别工具,进行共同预测可取得满意的结果。但是,由于植物 circRNA 的丰度较低,还是给 circRNA 的鉴定带来一定困难,虽然已有报道在多种植物中含有很多的 circRNA,但其实际数量可能被严重低估,因此更加可靠性和灵敏度高的鉴定软件开发仍迫在眉睫。

表 1 circRNA 来源鉴定信息

Table 1 Identification information of circRNA source

发现者 Discoverer	年份 Year	来源 Source	鉴定情况 Identification	文献 Literature
Rizzetto 等	1977	RNA 病毒	首次发现 circRNA 的存在	[10]
Hsu 等	1979	真核生物细胞质中	发现了 circRNA,进一步表明了环状 RNA 可能是一类普遍存在于真核生物和病毒之中的物质	[11]
Arnberg 等	1980	酵母线粒体中	发现了非编码的 circRNA	[12]
Matsumoto 等	1990	酿酒酵母中	circRNA 也被证明存在于酿酒酵母中,且发现其特性与肝炎病毒有相似性	[13]
Nigro 等	1991	人体细胞中	研究人体细胞 DCC 基因时首次发现了内源性的 circRNA	[14]
Cocquerelle 等	1993	人体细胞	在人体细胞原癌基因 ets-1 转录本中发现 circRNA	[15]
Salzman 等	2012	人类基因	利用高通量测序技术发现数百个人类基因可以表达 circRNA	[7]
Jeck 等	2013	人类纤维细胞中	发现人类成纤维细胞中存在 25 000 多种 circRNA	[16]
Memczak 等	2013	HEK293 细胞中、小鼠脑组织、线虫体内	报道在 HEK293 细胞中存在 1 950 种、小鼠脑组织存在 1 903 种、线虫体内表达 724 种 circRNA	[17]
Ye 等	2015	拟南芥根部	在拟南芥中鉴定出 6 012 个 circRNA	[8]
Lu 等	2015	水稻	在水稻中鉴定出 2 354 个 circRNA	[3]
Wang 等	2016,2017	小麦、大麦、番茄、猕猴桃、大豆	小麦鉴别出 88 个 circRNA、大麦中鉴别出 62 个 circRNA、番茄中鉴别出 854 个 circRNA、猕猴桃中鉴别出 3 582 个 circRNA、大豆中鉴别出 5 372 个 circRNA	[18-22]

表 2 circRNA 预测方法

Table 2 Prediction method of circRNA

工具名称 Tool name	网址 URL	比对方法 Comparison method	比对程序 Comparison program	编写语言 Writing language	准确度 Accuracy	计算速度 Calculation speed	特点 Features	文献 Literature
circRNA-finder	https://github.com/orzechoj/circRNA_finder.git	无参	STAR	Perl	低	慢	准确度高,独立于基因注释信息运行	[29]
CIRI	https://sourceforge.net/projects/ciri/files/CIRI	无参	BWA-MEM	Perl	低	慢	基于多种子匹配策略、最大估计模型,识别反向剪接读段,能过滤重复序列和映射误差的错误报告	[30]
finder-circ	https://github.com/marvinjens/find_circ	无参	Bowtie2	Python	低	快	独立于基因注释信息运行	[17]
CIRCexplorer	https://github.com/Yang-Lab/CIRCexplorer	有参	TopHat/STAR	Python	高	快	结合不同比对算法,侦测 circRNA 的选择性剪接,能拼装环状 RNA 全长转录本	[30]
pcircRNA-finder	http://ibi.zju.edu.cn/bioinplant/tools/manual.htm	有参	Tophat-Fusion	Perl	高	慢	双末端交叉映射,精准预测植物中外显子	[28]
KNIFE	https://github.com/lindaszabo/KNIFE	有参	Bowtie1&2	Python&Perl	高	慢	依靠 Bowtie2 软件进行多阶段对比,结合读段映射和比对质量进行 circRNA 的静态建模	[27]
Mapsplice	http://www.netlab.uky.edu/p/bioinfo/MapSplice	有参	Bowtie1	Python	高	慢	标记校对和剪接推理的两步方法	[26]

2 植物 circRNA 的特征

2.1 植物中 circRNA 的来源和保守性

一般来说,植物 circRNA 的丰度较低,主要是通过细胞类型和组织特异性表达发挥调控功能^[31]。除了核基因组序列能够生成植物 circ-

cRNA 之外,线粒体和叶绿体的质基因组序列也可产生植物 circRNA,这表明 circRNA 可能参与呼吸和光合作用的调控^[32]。同时,circRNA 通过与 miRNA 相互作用、与蛋白质结合等方式来调控基因的表达,从而有效地提高植物转录调控的复杂性和多样性^[28]。植物 circRNA 来源于外显子和内含子或由两者共同组成,并且 circRNA 的功能性表达与组织特异性密切相关^[29]。

目前,对于 circRNA 的研究大部分都集中在动物身上,对于植物 circRNA 的研究还不够深入。目前只有单子叶植物水稻、玉米、小麦、大麦等物种,双子叶植物拟南芥、番茄、毛竹、猕猴桃等物种涉及 circRNA 的研究报道^[1,32]。与动物中 circRNA 一样,植物中的 circRNA 也通过选择性反向拼接和选择性剪接产生多种类型。更有研究报道 circRNA 的植物物种之间存在保守性。Ye 等^[8]研究发现拟南芥和水稻之间有 700 个来源基因具有同源性,而且其中有 300 个同源基因在相似部位生成 circRNA,表明 circRNA 在不同的植物中具有高度保守。通过对水稻、拟南芥和大豆分别产生 circRNA 的 9 385、8 362 和 1 995 个亲本基因进行保守性分析,得出大豆和拟南芥、水稻分别有 685、1 095 个高度同源,3 个物种中一共存在 551 个高度同源^[9]。

2.2 植物中 circRNA 的可变化化和结构稳定性 circRNA 是非线性的单链非编码 RNA 的一种,与常见的线性 RNA 是有区别的,它没有 5'帽状结构和 3'多聚腺苷酸化,使 circRNA 对核酸外切酶具有抗性,因此 circRNA 有一定的稳定性和保守性^[33],研究还表明 circRNA 具备组织特异性、种属特异性、发育阶段相关特异性和疾病特异性^[28]。同时一个基因能够产生不同类型的 circRNA,甚至某些 circRNA 的表达量的水平会比相应的线性 RNA 高。然而,相关研究表明影响 circRNA 形成的重复和反向互补序列在拟南芥、水稻中都是非常少,这表示在植物中除了反向互补内含子序列之外,可能还有其他影响植物 circRNA 形成的因素^[3,8]。有研究报道,在水稻中鉴定到近 2 806 个全长 circRNA,但是只有 206 个存在经典的 GU、AG 剪接信号,这表明在水稻中大部分 circRNA 的形成可能不依赖于经典的 GU、AG 剪接信号^[34]。可变环化的生成方式有很多,例如,对于内含子间的竞争性配对,将会导致包含多个外显子的一个基因座产生多种 circRNA。另一方面,一个基因座可以通过是否保留外显子间的内含子而产生多种 circRNA,并且同一基因座能够通过可变环化产生多种 circRNA。通过可变环化这一现象,加深了对反向剪切机制的了解,但可变环化产生和调控机制非常复杂,需要进一步探究。

3 植物 circRNA 的功能

3.1 作为 miRNA 的海绵体 越来越多的研究证明,circRNA 是具备多种生物学功能的生物大分子,circRNA 最典型的一种作用机制是作为 miRNA 海绵体(sponge)^[35],miRNA 是生物体最短的具有生物学功能的非编码 RNA,长为 22 bp 左右,在调控生长发育、分化、生殖和逆境耐受等生命过程中发挥作用,人类有 1/3 以上基因受 miRNA 调控^[36]。

circRNA 通过竞争性结合的模式抑制 miRNA 靶标结合的能力。例如,Hansen 等^[37]研究表明,小脑变性关联蛋白 1 反义转录物 ciRS-7 中含有约 70 个 miR-7 保守结合位点,通过两者相互作用可以负向调控 miR-7 的活性,进而调控下游目的基因的表达,改变 circRNA 的丰度能够调控 miRNA 对其目的基因的作用。例如,矽肺是比较典型的肺疾病类型,其特征是纤维细胞异常增殖和细胞外基质沉积,研究发现,在 circRNA 小脑变性关联蛋白 1 的反义转录物(CDR1as)上有多个 miR-7 的结合位点,在 SiO₂ 刺激后,CDR1as 可以利用海绵化 miR-7 释放目标基因转化生长因子受体 2,从而增强 A549 细胞上皮-间充质转化过程,引起肺纤维化病症^[38]。

Lu 等^[3]在水稻中发现过表达 Os08circ16564,其靶标关系的 OsmiR172 的表达没有发生变化,但在一些植物 circRNA 的研究中,依然将它作为 miRNA 海绵体来研究。例如,Wang 等^[39-40]在番茄中发现 102 个 circRNA 可以作为 24 个 miRNA 的潜在靶标,在小麦中报道 6 个 circRNA 可以作为 26 个 miRNA 的潜在靶标。但是截至目前,在不同植物物种中具备潜在吸附能力的 circRNA 所占比例较小。例如,Ye 等^[8]研究发现水稻和拟南芥中少部分的 circRNA(6.0%和 5.0%)被猜测为 miRNA 的潜在靶标。在拟南芥中,Chen 等^[41]报道比例更低,为 0.67%。在成熟和熟绿番茄 2 个发育时期,Yin 等^[42]共鉴定出 340 个差异表达的 circRNA,其中只有 19 个可能是 miRNA 的潜在靶标。因为 circRNA 缺失 5'端和 poly(A)尾巴,因此核糖核酸酶(RNase)不能将它降解,在脱帽和降解过程通常会结合 miRNA,参加转录后调控。Hansen 等^[37]研究发现在植物生长发育过程中 circRNA 作为 miRNA 海绵具备调控功能,成为 circRNA 早期功能钻研的重点。在线虫中 circRNA 可作为分子海绵的数量和功能有限,在目前已报道的 circRNA 中,也仅有 CDR1as 和 SRY 这 2 个 circRNA 被证实具备分子海绵作用,因而 miRNA 分子海绵不是 circRNA 的普遍特点,可能只有极少数的 circRNA 可以结合大量 miRNA 分子^[43]。

3.2 circRNA 的表达模式 circRNA 在植物体中普遍存在,对生长发育进程起着重要作用。例如,circRNA 主要利用叶绿素代谢和激素信号转导等途径参加花的发育、果实的成熟、叶片的衰老相关调控^[31],同时,circRNA 在应对不同胁迫时会表现出差异现象。例如,甜椒果实低温胁迫下,检测到有 36 个 circRNA 差异表达现象^[44];水稻在磷胁迫下,检测到有 27 个 circRNA 的表达量发生变化^[8];小麦幼苗在干旱胁迫下,检测到有 62 个 circRNA 差异表达现象;在梨中经干旱胁迫后,检测到有 33 个 circRNA 出现差异表达,而且其中发现 11 个来源基因参与了氧化还原过程^[45]。番茄经低温胁迫,发现 163 个 circRNA 中,包括 138 个上调和 25 个下调^[40]。另外,拟南芥在光强胁迫后,与大麦在经历微量元素锌和铁处理后,circRNA 均发生显著表达变化^[8,32]。因为 circRNA 是一类没有 5'端和 3'端的闭环结构,所以核酸外切酶不容易将它降解,circRNA 对生物与非生物胁迫应答时有较长的响应周期,并且在植物长距离传递信号中发挥相应功

能^[16]。目前, circRNA 的研究主要基于人类和其他动物, 主要研究思路可以分为 2 种类型, 首先就是以 circRNA 为切入点来寻找有相同结合位点的 miRNA, 通过 miRNA 寻找控制相关表型特性的靶基因, 建立 circRNA-miRNA-靶基因的调控网络; 其次是以 miRNA 为切入点, 由 miRNA 寻找相关的上游和下游相关靶基因, 并最终建立调控网络。

3.3 circRNA 与蛋白互作 目前, circRNA 除了可作为 miRNA 海绵体(miRNA sponges)之外, 还发挥着其他生物功能, 包括蛋白质分子海绵(protein sponges)、蛋白质招募(protein recruiters)、蛋白质支架(protein scaffolds)、蛋白诱捕陷阱(protein decoys)、翻译产生蛋白质(protein translates)等。circRNA 可识别、存储和运输各种蛋白质, 并将它们运送到特定的位置, 通过调节靶 mRNA 或核糖体生成, 从而发挥作用^[46]。如 ciR-7/CDR1as 能利用 AGO2 蛋白完成竞争性结合 miR-7^[37]; 同时, circRNA 利用蛋白互作, 参与泛素化、细胞周期、细胞衰老等生命进程, circRNA 和蛋白质的相互作用影响其 circRNA 合成降解, 并对蛋白质的功能和表达都会影响, 有研究表明 circRNA 的生物合成过程受到转录因子、RBPs、反式剪切因子和顺式调控元件的混合调控^[47]。

目前最常用的 circRNA-蛋白质相互作用研究技术主要有 5 种, 包括 RNA pull-down、RNase 酶保护试验、抗体依赖的 RIP、荧光原位杂交法(FISH)和电泳迁移分析法(EMSA)等, 且通过荧光原位杂交和 RNase 的 2 种方法可以精确得到互作 circRNA 的序列。Zhang 等^[48]探究发现针对前期筛选出的一个肺腺癌组织高表达 circ_0007766 进行体外了解分析和生物学功能性验证, 从而证实 circ_0007766 利用上调细胞周期关联蛋白 CyclinD1/CyclinE1/CDK4 的表达增强肺腺癌细胞增殖。最新发现某些 circRNA 能在体内产生相应蛋白质, 而这一重要发现拓展了转录组和蛋白组的领域^[49]。

当前对 circRNA 的研究还有诸多的争论与困难, 希望以后有更多人投入 circRNA 研究中, 因为它极有可能作为新一代的疾病治疗靶点和分子标志物在临床上发挥功能。

3.4 circRNA 潜在翻译功能 在正常情况下, 由于 circRNA 不具有翻译的功能, 因此它被定义为新型的非编码 RNA。但是, 近些年对 circRNA 密切研究, 在特定条件下, circRNA 具备被翻译成蛋白质的功能^[50]。最先发现 δ 肝炎病毒的单链环状 RNA 基因组, 在哺乳动物细胞中被翻译成与病毒相关蛋白, 并在产生肝炎过程中发挥相应功效^[50-51]。在人细胞中, circRNA 显示可以通过 N6-甲基腺苷(m6A)途径翻译蛋白; Zhou 等^[52]研究发现 eIF4G2 能直接参与 m6A 修饰调控其 circRNA 翻译, 并证明 m6A 修饰直接影响 circRNA 翻译。由于 circRNA 编码的多肽的功能尚不明确, 但生物细胞中 circRNA 的翻译水平在应激条件下会发生变化^[38]。Yang 等^[53]研究发现在人类细胞中的 circRNA 上存在大量一致性的 m6A 基序, 并且在多种蛋白参与下, 一个 m6A 位点便能够启动对 circRNA 的翻译。

当前, 对于拟南芥中 m6A 修饰有一定的了解, 它修饰部

位一般在 mRNA 的起始密码子与终止密码子处, 但其他植物 circRNA 中有关 m6A 修饰的研究还没有^[23]。王琮等^[54]在 bioRxiv 经过大面积地搜集和整理目前试验验证的 IRES (internal ribosome entry site) 文献材料, 开发出了 IRESbase 数据库, IRES 是一种 RNA 功能性元件, 可以招募核糖体启动翻译。除了一些非帽依赖的 mRNA 通过 IRES 招募核糖体启动翻译, 目前发现一些 circRNA 也能利用 IRES 启动翻译。其中包括不少 circRNA 与 lncRNA 有关联的 IRESs。circRNA 已被发现可以翻译成蛋白质并且展现重要的生物学功能, 例如, circ β -catenin 经 IRES 介导的翻译能够激活 Wnt 信号通路促进肝癌细胞的增殖, IRESbase 的工作必然能为探究 circRNA 翻译提供一些帮助^[55]。

3.5 circRNA 参与开花调控 花是被子植物的繁殖器官, 对于生产而言具有较大经济价值。成花诱导是植物生命周期中一个主要变化, 也被认为是幼年期到成年期显著的标志。不同植物的成花转变时间一般不同, 相对来说, 木本植物的营养生长时期更长^[23]。

关于开花调控的研究主要还集中在 miRNAs 上, miRNA 是一类长度为 21~23 nt 的 RNA 分子, 在转录后调控功能^[23], 主要利用引导效应蛋白 AGO (Argonaute) 来抑制 mRNA 表达^[24]。例如, 在拟南芥和水稻中, miR172 和 miR156 在营养生长到生殖生长过程中起着重要的作用; 拟南芥中的 miR172 和金鱼草、玉米中的 miR169 在初期花发育时调控花型及相关靶基因的表达, miR139、miR159、miR164 和 miR167 主要在花发育后期发挥作用^[9, 25]。2017 年, Conn 等^[56]报道一条来源 SEPALLATA3 基因的外显子 circRNA 对来源 mRNA 具有反向作用, 从而可以调控花型, 说明 circRNA 同样参与开花过程。Liang 等^[57]在水稻中共鉴定出 31 个差异表达 circRNA, 47 个差异表达 miRNAs 和 4 779 个差异表达 mRNAs。应用 Cytoscape 构建了 miRNA 介导的调控网络和 CERNA 网络, 猜测认为 CircRNA A02:23507399|23531438 是在转录后一定程度上调控花药发育的重要 circRNA。Zeng 等^[58]为了鉴定柑橘 circRNA 并研究其功能作用, 对早熟三叶橙(早花三叶橙突变体)进行了高通量测序, 并对其野生型进行了分析。利用生物信息学分析, 共鉴定出 558 个潜在的 circRNA, 其中 86.02% 是正义重叠的 circRNA。对它们的序列特性、交替环化等特点进行了分析。与野生型相比, 在早熟三叶橙中共鉴定出 176 个差异表达的 circRNA, 其中 61 个显著上调, 115 个显著下调, 表明它们可能在早花过程中起重要作用。Cheng 等^[59]通过对拟南芥中 17 个在野生型植物中积累的 laciRNAs (套索结构驱动的 circRNA) 进行测序。为了确定这些 laciRNAs 的生物学功能, 分别为每个 laciRNA 构建了一对转基因植株, 其中有或没有内含子的局部基因分别在野生型植物中过表达。通过比较两类转基因植物的形态表型和转录谱, 结果表明, 从 At5g37720 的第 1 个内含子获得的 laciRNA 过表达会导致叶卷曲、簇生, 开花延迟和繁殖力下降, 大约 800 个基因的表达量改变, 说明 circRNA 与开花过程相关。

4 植物 circRNA 局限性

目前,对于 circRNA 的认识仍比较浅显,有许多问题有待阐明,主要表现在以下 5 个方面:①在 circRNA 命名机制方面,其命名机制有待于完善。当前,circRNA 的命名没有进行统一,由于每个人的研究角度不同,导致命名的不一致^[60],因此,需要构建一个公认的、恰当的和适合的 circRNA 命名体系,以防止 circRNA 命名混乱现象的发生;②circRNA 的形成方面,植物中 circRNA 的形成机制可能与动物中有所区别,但二者具体形成机制存在的差异还需要进一步研究。此外,在反向剪接过程中,剪接体是怎样发挥作用的,如何进行组装的还不够清楚。circRNA 究竟是产生于转录后还是共转录过程中以及其依靠于什么样的动力学模型等都需要进一步深入研究^[61];③circRNA 功能、翻译和表达方面,虽然有研究表明,circRNA 在病毒中存在翻译功能^[51]。然而,截至目前还没有证据能够表明在真核生物中内源 circRNA 可以翻译成蛋白质。因此关于 circRNA 的翻译能力还存在着一定的争议,除了该研究介绍的 circRNA 的一些的功能之外,可能还存在一些未知的生物学功能。circRNA 在组织细胞中进行时空特异性表达的调控机制目前还不是很清楚,Ye 等^[8]对植物中单子叶和双子叶植株进行 circRNA 的研究,结果发现 circRNA 同样具有时空组织表达的特异性,其表达与来源基因有关,并且序列保守。但是在 circRNA 的形成模式上,植物和动物之间的相关特性并不一样,例如内含子的长度、侧翼序列的重复片段等方面^[8]。在植物生长过程中 circRNA 同样有很重要的作用,值得进行深入研究;④circRNA 运输降解方面,circRNA 在细胞质和细胞核之间进行怎样的运输,并涉及到哪些蛋白或者酶的参与,和相关的信号通路都不是很清楚,这都需要进一步探究^[62]。与 circRNA 形成机制比较,circRNA 如何被降解的相关研究非常稀少,circRNA 降解过程涉及到相关信号通路,以及蛋白或者酶的参与等问题,都需要解决;⑤circRNA 研究方法方面,截至目前,circRNA 的鉴定主要依赖将试验方法鉴定和生物信息学预测相结合 2 个方面。比如,在试验方法中,普遍利用 RNA-seq 技术来鉴定,例如像反转录过程可能存在一些由于技术上的错误连接,产生一些人为的 circRNA,这些 circRNA 可能会影响测序的准确性。RNA-seq 已经在不同的组织和疾病中发现了数千种 circRNA,然而多数还没有得到其他技术手段的验证或者功能研究^[62]。在生物信息学中,为了降低假阳性,普遍算法采取的策略是利用经典的 U2 剪接信号和基因注释,但是这样就会降低其敏感性,因为基因注释并不完整,况且部分基因不适用于经典剪接信号,所以对 circRNA 的检测算法需要进一步探究。

5 展望

相比于动物,植物中 circRNA 的研究进展较缓慢,需要进一步研究其转录、翻译调控生物学功能和形成机制等方面。即使在动物中,circRNA 的生物学功能研究也不够全面。相比较 mRNA、lncRNA 和 miRNA 等,对于 circRNA 的探究仍处于初级阶段,这些研究将有助于提高对基因组中非编码序

列的认识。circRNA 在生物体内动态表达,通过与 mRNA、miRNA 和 lncRNA 三者形成调控网络,从而实现宿主基因转录和转录后的相关调控。它是具备重要调控功能的 RNA 分子,而不是错误剪接的副产物。现在,关于 circRNA 的生物学功能研究大多集中于 circRNA 的海绵状体功能上,其翻译功能是主要的被忽视的方向。虽然大多数都在探究可预测性 circRNA 的翻译功能,但是需要进一步提高其准确性。

关于近年来植物 circRNA 研究获得的成果,结合动物中最前沿研究,分析植物 circRNA 的潜在功能,进一步表明 circRNA 在开花调控领域进展缓慢,关于木本植物开花发育的研究逐渐成为热点,对楸树提早开花机制研究的比较少,因此探究 circRNA 对楸树提早开花相关的影响也是一个重要方向。目前,虽然对于 circRNA 的研究取得了一些成果,但植物 circRNA 的研究仍然是一个漫长的过程。circRNA 分子研究正在进入一个极速发展的新时代,所以要对这一领域进行不断研究。circRNA 的深入研究可能会为解释植物遗传现象及理解遗传调控提供一种新的思路,因此,对植物 circRNA 的认识仍是一个漫长的过程。

参考文献

- [1] 骆甲,王型力,孙志超,等.植物环状 RNA 研究进展[J].遗传,2018,40(6):467-477.
- [2] 刘旭庆,高宇帮,赵良真,等.环状 RNA 的产生、研究方法及其功能[J].遗传,2019,41(6):469-485.
- [3] LU T T, CUI L L, ZHOU Y, et al. Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice[J]. RNA, 2015, 21(12):2076-2087.
- [4] WANG P L, BAO Y, YEE M C, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life[J]. PLoS One, 2014, 9(3):1-10.
- [5] 陈力.植物非编码环化 RNA 的鉴定与分析[D].杭州:浙江大学,2016.
- [6] SANGER H L, 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.
- [7] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. PLoS One, 2012, 7(2):1-12.
- [8] YE C Y, CHEN L, LIU C, et al. Widespread noncoding circular RNAs in plants[J]. New Phytol, 2015, 208(1):88-95.
- [9] 高振.葡萄 circRNA 鉴定分析及 Vv-circATS1 的抗冷功能研究[D].上海:上海交通大学,2019.
- [10] RIZZETTO M, CANESE M G, ARICÒ S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system(delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers[J]. Gut, 1977, 18(12):997-1003.
- [11] HSU M T, COCA-PRADOS M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells[J]. Nature, 1979, 280(5720):339-340.
- [12] ARNBERG A C, VAN OMMEN G J B, GRIVELL L A, et al. Some yeast mitochondrial RNAs are circular[J]. Cell, 1980, 19(2):313-319.
- [13] MATSUMOTO Y, FISHEL R, WICKNER R B. Circular single-stranded RNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87(19):7628-7632.
- [14] NIGRO J M, CHO K R, FEARON E R, et al. Scrambled exons[J]. Cell, 1991, 64(3):607-613.
- [15] COCQUERELLE C, MASCREZ B, HÉTUIN D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules[J]. FASEB J, 1993, 7(1):155-160.
- [16] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2):141-157.
- [17] 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.
- [18] WANG Y X, YANG M, WEI S M, et al. Identification of circular RNAs

- and their targets in leaves of *Triticum aestivum* L. under dehydration stress [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 7: 1–10.
- [19] DARBANI B, NOEPARVAR S, BORG S. Identification of circular RNAs from the parental genes involved in multiple aspects of cellular metabolism in barley [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1–8.
- [20] ZUO J H, WANG Q, ZHU B Z, et al. Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479 (2): 132–138.
- [21] WANG Z P, LIU Y F, LI D W, et al. Identification of circular RNAs in kiwifruit and their species-specific response to bacterial canker pathogen invasion [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1–11.
- [22] ZHAO W, CHENG Y H, ZHAO C, et al. Genome-wide identification and characterization of circular RNAs by high throughput sequencing in soybean [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1–11.
- [23] 骆甲. 山核桃成花相关 circRNA 的挖掘与功能探究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
- [24] BARTEL D P. MicroRNAs; Target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [25] SERIVICHYASWAT P T, SUSILA H, AHN J H. Elongated hypocotyl 5-homolog (HYH) negatively regulates expression of the ambient temperature-responsive MicroRNA Gene *MIR169* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8 (8): 1–16.
- [26] WANG K, SINGH D, ZENG Z, et al. MapSplice: Accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(18): 1–14.
- [27] SZABO L, MOREY R, PALPANT N J, et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 1–26.
- [28] CHEN L, YU Y Y, ZHANG X C, et al. PcircRNA_finder: A software for circRNA prediction in plants [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3528–3529.
- [29] ZHANG Y, XUE W, LI X, et al. The biogenesis of nascent circular RNAs [J]. *Cell Rep*, 2016, 15(3): 611–624.
- [30] GAO Y, ZHAO F Q. Computational strategies for exploring circular RNAs [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(5): 389–400.
- [31] ZHANG G Y, DUAN A G, ZHANG J G, et al. Genome-wide analysis of long non-coding RNAs at the mature stage of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* Linn) fruit [J]. *Gene*, 2017, 596: 130–136.
- [32] 高振, 骆萌, 王磊, 等. 植物环状 RNA 研究进展 [J]. *园艺学报*, 2019, 46 (1): 171–181.
- [33] LI Z Y, 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.
- [34] YE C Y, ZHANG X C, CHU Q J, et al. Full-length sequence assembly reveals circular RNAs with diverse non-GT/AG splicing signals in rice [J]. *RNA Biol*, 2016, 14(8): 1055–1063.
- [35] 张淑霞, 霍文博, 苏莹, 等. 环状 RNA 与疾病的关系 [J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(12): 2203–2205.
- [36] 王猛. 玉米小斑病菌 O 小种分化鉴定与非编码 RNA 效应物研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- [37] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384–388.
- [38] 靳也, 郭杰, 魏福兰. 环状 RNA 的研究进展 [J]. *口腔医学*, 2019, 39 (5): 450–454.
- [39] WANG Z P, LIU Y F, LI D W, et al. Identification of circular RNAs in kiwifruit and their species-specific response to bacterial canker pathogen invasion [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1–11.
- [40] ZUO J H, WANG Q, ZHU B Z, et al. Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479 (2): 132–138.
- [41] CHEN L, ZHANG P, FAN Y, et al. Circular RNAs mediated by transposons are associated with transcriptomic and phenotypic variation in maize [J]. *New Phytol*, 2018, 217(3): 1292–1306.
- [42] YIN J L, LIU M Y, MA D F, et al. Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2018, 136: 90–98.
- [43] 刘骏武. 线虫和水稻中环状 RNA 的预测及分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [44] ZUO J H, WANG Y X, ZHU B Z, et al. Analysis of the coding and non-coding RNA transcripts in response to bell pepper chilling [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1–15.
- [45] WANG J X, LIN J, WANG H, et al. Identification and characterization of circRNAs in *Pyrus betulifolia* Bunge under drought stress [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): 1–13.
- [46] DU WW, ZHANG C, YANG W N, et al. Identifying and characterizing circRNA-protein interaction [J]. *Theranostics*, 2017, 7(17): 4183–4191.
- [47] HUANG A Q, ZHENG H X, WU Z Y, et al. Circular RNA-protein interactions: Functions, mechanisms, and identification [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (8): 3503–3517.
- [48] ZHANG S, XIA W J, DONG G C, et al. Cyclic RNA molecule circ_0007766 promotes the proliferation of lung adenocarcinoma cells by up-regulating the expression of cyclin D1/CyclinE1/CDK4 [J]. *Chinese journal of lung cancer*, 2019, 22(5): 271–279.
- [49] 孟宪文, 陈铭. CircPro: 一个识别具有蛋白编码潜能性环状 RNA 的工具 [C]// 内蒙古民族大学, 浙江省生物信息学学会. “农业健康与环境” 组学大数据整合生物信息学研讨会论文集. 杭州: 浙江省科学技术协会, 2019; 1.
- [50] 陈文武, 马海明. 环状 RNA 的研究思路及在猪中的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(3): 27–31.
- [51] KOS A, DIJKEMA R, ARNBERG A C, et al. The hepatitis delta (δ) virus possesses a circular RNA [J]. *Nature*, 1986, 323(6088): 558–560.
- [52] ZHOU C, MOLINIE B, DANESHVAR K, et al. Genome-wide maps of m6A circRNAs identify widespread and cell-type-specific methylation patterns that are distinct from mRNAs [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(9): 2262–2276.
- [53] YANG Y, FAN X J, MAO M W, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine [J]. *Cell Res*, 2017, 27(5): 626–641.
- [54] 王琮, 赵健, 宋晓峰. 真核生物环状 RNA 编码蛋白的研究进展 [J]. *生物信息学*, 2020, 18(1): 1–7.
- [55] DIALLO L H, TATIN F, DAVID F, et al. How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms? [J]. *Biochimie*, 2019, 164(164): 45–52.
- [56] CONN V M, HUGOUIVIEUX V, NAYAK A, et al. A circRNA from *SEPALATA3* regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation [J]. *Nat Plants*, 2017, 3(5): 17053.
- [57] LIANG Y W, ZHANG Y Z, XU L A, et al. CircRNA expression pattern and ceRNA and miRNA-mRNA networks involved in anther development in the CMS line of *Brassica campestris* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 1–21.
- [58] ZENG R F, ZHOU J J, HU C G, et al. Transcriptome-wide identification and functional prediction of novel and flowering-related circular RNAs from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) [J]. *Planta*, 2018, 247 (5): 1191–1202.
- [59] CHENG J P, ZHANG Y, LI Z W, et al. A lariat-derived circular RNA is required for plant development in *Arabidopsis* [J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(2): 204–213.
- [60] 夏世金, 高文, 胡明冬, 等. 环状 RNA 的研究现状及展望 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2014, 7(6): 670–673.
- [61] 尹军良, 马东方, 刘乐承, 等. 环状 RNA 的生物特征及其在植物中的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2017, 37(12): 2510–2518.
- [62] 周凤燕, 杨青, 朱熙春, 等. 环状 RNA 的分子特征、作用机制及生物学功能 [J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(3): 485–501.

(上接第 3 页)

- [42] 刘占德, 郁俊谊, 安成立, 等. 中国猕猴桃主产区的冻害调查及其应对措施 [J]. *北方园艺*, 2012(12): 64–65.
- [43] 安成立, 刘占德, 刘旭峰, 等. 猕猴桃不同树龄冻害调研报告 [J]. *北方园艺*, 2011(18): 44–47.
- [44] 齐秀娟, 方金豹, 赵长竹. 2009 年郑州地区猕猴桃冻害调查与原因分析 [J]. *果树学报*, 2011, 28(1): 55–60.