环状寡聚核苷酸的研究进展

经男男, 王静*, 汤新景*

北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

*通讯作者, E-mail: wangjing1988@bjmu.edu.cn; xinjingt@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-10; 接受日期: 2018-06-14; 网络版发表日期: 2018-10-10

重大新药创制科技重大专项(编号: 2017ZX09303013)和国家自然科学基金(编号: 21672015, 21708001)资助项目

摘要 环状结构的核酸因其首尾相连的特殊结构, 可提高其对核酸外切酶的稳定性, 并且其环状结构可使其具有特殊的功能。早期由于检测技术的限制, 研究者对环状核酸的研究相对较少。近年来, 随着科学技术的进步, 研究者发现生物体内存在各种环状核酸, 并具有独特的生理调节功能。对于较小的环状寡聚核苷酸(几十个碱基)在生命体中是否存在以及其可能的功能仍未知晓。本文综述了环状核酸(特别是较小环的寡聚核苷酸)主要的两类合成法(酶合成法和化学合成法), 并比较了它们各自的优缺点。同时阐述了各种环状功能核酸的结构特性以及它们对特定生物活性和基因功能的特异性调控, 为阐明环状核酸在生物体内的产生及其作用机制的化学生物学研究提供了新的研究工具。

关键词 环核酸, 反义核酸, 小干扰RNA, 适配体, 基因沉默

1 引言

核酸作为最重要的生物大分子之一, 承载着几乎全部生物体的遗传物质。核酸分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。DNA主要以双螺旋结构形式存在, 并且具有储存、复制和传递遗传信息的功能。RNA存在多种形式, 包括信使RNA (mRNA)、转运RNA (tRNA)、核糖体RNA (rRNA)、小分子RNA、端粒酶RNA、反义RNA和非编码RNA等。近年来, 一类具有首尾相连、封闭成环的特殊结构的环状RNAs受到核酸研究人员的关注。由于其在经典的RNA测序方法中不具有特征性“分子尾巴”而被人们无意忽视, 但随着新仪器和新的检测技术的发展, 环状结构RNAs已成为了RNA研究领域的新热点。

早在1976年, 人们在一种植物病毒中发现了环状RNAs^[1], 后来在肝炎δ病毒中也发现有环状RNAs^[2]的存在。在20世纪90年代, 研究者发现了人类的Ets-1基因^[3,4]和老鼠的Sry基因^[5]可以由mRNA前体(pre-mRNAs)产生内源性环状RNAs。目前, 根据环状RNAs的来源不同, 大致可以分为3类^[6]: 外显子来源的环状RNA (exonic circRNAs)^[7]、内含子来源的环状RNA (circular intronic RNAs, ciRNAs)^[8]以及由外显子和内含子共同组成的环形RNA分子(retained-intron circRNAs, EIciRNAs)^[9,10]。如图1所示, 几种环状RNA的合成可以由单个基因产生, 而且在基因转录翻译的过程中环状RNAs的反向剪切环化与mRNAs的拼接形成是竞争关系^[11]。

受研究手段的限制, 早期人们并不了解环状RNAs

引用格式: Jing N, Wang J, Tang X. Research progress of circular oligonucleotides. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 1293–1306, doi: 10.1360/N032018-00090

图 1 3类环状RNAs的来源与形成机制: (1) 内含子来源的环状RNA(ciRNAs); (2) 外显子来源的环状RNA (exonic circRNAs); (3) 由外显子和内含子共同组成的环状RNA分子(EIciRNAs)^[6] (网络版彩图)

Figure 1 Three kinds of circular RNAs and their forming mechanism. (1) Intron-derived circular RNA (ciRNAs). (2) Exon-derived circular RNA (circRNAs). (3) Circular RNAs composed of exons and introns (EIciRNAs) ^[6] (color online).

的生理功能。当时只发现少数的pre-mRNAs可以产生环状RNAs, 而且产量非常低, 研究人员甚至怀疑它们是无意义的副产物^[12]。近几年, 人们发现来源于INK4/ARF基因和CDR1基因的环状RNAs可以影响人类动脉粥样硬化的患病风险和调节基因的表达, 因而逐渐开始研究环状RNAs的生理功能^[13,14]。随着核酸高通量测序技术的出现与发展, 研究者在人类细胞中发现了成千上万的环状RNAs分子, 而且这些内源的环状RNA分子对基因表达有明显的影晌^[15~17]。这主要与环状RNAs中含有外显子序列有关^[18]。进一步的研究表明, 环状RNA主要有3种功能^[19]。(1) 环状RNAs是一种微小RNA (microRNA, 或miRNA)抑制剂, 可以高效而且大量地与miRNA结合, 起到类似miRNA的海绵作用, 从而使大部分miRNA不能与如信使RNA等靶分子结合发挥作用, 上调mRNA的表达水平(图2(a))^[14]。(2) 环状RNAs可以与RNA结合蛋白(RBP)作用形成RNA蛋白复合物RPC, 调控RBP功能(图2(b))^[20,21]。例如, 与多种癌症和神经性疾病发生相关的环状RNA分子CDR1as可以与AGO蛋白(argonaute)紧密结合^[18]。(3) 含有核糖体(ribosome)结合位点(IRES)的人工合成的环状RNAs能够在体外高效地翻译出相应肽链(图2(c))^[22]。目前, 环状RNA的大量生物功能还需要进一步研究与验证, 还有许多新的未知功能有待研究者去

图 2 环状RNAs的功能示意图. (a) 环状RNAs作为mRNA抑制剂; (b) 环状RNAs与RBP作用形成RPC, 调控RBP功能; (c) 含有IRES的人工合成环状RNAs能在体外高效地翻译出相应肽链^[19] (网络版彩图)

Figure 2 Functional diagram of circular RNAs. (a) CircRNAs as a miRNA inhibitor. (b) CircRNA binds to RBP to form RPC for the regulation of RBP function. (c) The synthetic circRNA that contains an IRES can function as the template for *in vitro* protein translation ^[19] (color online).

发现。

目前, 环状RNA以多种多样的形式广泛存在于真核细胞中, 是生命体的一种重要的内源RNA。多项研究表明, 天然生成的环状RNA分子对基因表达有调控作用。很多生命过程中都可能有环状RNAs的身影, 其

可能扮演了许多未知的重要角色。由于环状RNA特殊的结构,赋予了其许多特殊的性质,如环状核RNAs可以有效地避免核酸外切酶的降解,相较于线性核酸,在某些方面环状核酸更有优势。但是天然的环状RNAs的环很大,有几百甚至上千个碱基,人工合成非常困难,而且没有发现天然的环状DNA。目前人们逐渐尝试合成较小的环状RNA或DNA,甚至将一些线性的功能核酸进行直接环化,开展对其功能调控的研究。本文主要在天然环状RNAs的研究基础上重点介绍了相对较小的环状寡聚核苷酸的合成、性质及其功能调控的研究进展。

2 环状核酸的人工合成方法

天然存在的环状核酸(基因组质粒除外)基本都是环状RNAs,碱基数少则几百多达上千,基本上都是通过高通量筛选测序得到^[23],很难人工合成。至今发现只有环状RNA,没有天然环状DNA。研究者为了进一步研究环状核酸的各种性质与功能,利用环状核酸的各种优势,对天然环状核酸进行修饰与改造,开展了许多环状寡聚核苷酸(包括DNA和RNA及其不同修饰寡聚核苷酸)合成方法的研究。目前,环状核酸的合成主要分为酶合成法和化学合成法^[24-26]。

2.1 环状核酸酶合成法

酶合成法是利用生物体内的核酸连接酶(如T4 DNA连接酶或T4 RNA连接酶)将核酸链的5'-PO₄⁻与3'-OH首尾连接生成磷酸二酯键。T4 RNA连接酶(T4 RNA ligase)是经常用到的一种ATP依赖核酸连接酶,可以催化单链RNA、单链DNA或单核苷酸的分子内5'-磷酸末端与3'-羟基末端之间形成磷酸二酯键。这种方法有许多优点,由于选用的是生命体中存在的连接酶,因此具有很好的生物相容性,并且条件温和、应用广泛。

利用核酸连接酶可以直接使核酸进行环化。例如,将RNA环化连接时,可直接使用T4 RNA ligase进行连接^[27]。为提高核酸连接酶进行核酸环化的效率,研究人员经常会加入一些辅助核酸链,如图3所示。通过不同的结构设计,引入相应核酸序列作为桥,使5'-PO₄⁻与3'-OH距离拉近,更有利于分子内的环化连接,减少分

图3 酶法环合的几种桥辅助环合策略。(a) 与核酸两端互补的桥辅助环合,可适用于T4 DNA连接酶;(b) 与核酸两端互补的桥,中间有2个或3个碱基不配对;(c) 利用发卡结构或者线性序列辅助环合;(d) 利用哑铃结构辅助环合。(b~d)策略有利于T4 RNA连接酶环合^[28](网络版彩图)

Figure 3 Nucleic acid circularization strategies with two juxtaposing reactive ends of oligonucleotides for enzymatic ligation. (a) Using a complementary splint oligonucleotide, this strategy can be used for ligation with T4 DNA ligase. (b) Using gap splint that unpaired terminal two or three nucleotides of both ends of single stranded oligonucleotide. (c) Using hairpin or linear helper oligonucleotides. (d) Using favorable intrinsic structures such as dumb-bell shape. Strategies (b~d) are better for circular ligation with T4 RNA ligase ^[28] (color online).

子间的线性聚合,提高环化的产率^[28]。此外,核酸序列可能产生的二级结构或核酸环的张力等因素也会对核酸环合的效率产生很大影响。

因此,研究人员采取很多方法进行优化来提高环合产率。例如,梁兴国课题组^[29]设计改善了一种新的环合方法。因为Mg²⁺浓度是影响环合的关键因素之一,所以通过降低DNA T4连接酶缓冲液中Mg²⁺离子的浓度,建立了逐步加入线性寡聚核苷酸的环化方法,增加了核酸分子内环合,有效减少分子间的线性聚合,以较高的产率合成了不同大小的环状寡聚核苷酸。尽管酶法环合是研究人员合成环状核酸的常用方法,但是这种方法只能环化天然核酸,对短链的寡聚核苷酸的环合效率相对较低,而对修饰的寡聚核苷酸几乎没有环合可能。

2.2 环状核酸化学合成法

化学合成法是利用简单高效、条件温和的化学反应将核酸两端首尾相连。环状核酸的化学合成法弥补了生物合成法的不足,可实现修饰的核酸序列或者核酸类似物的环合。同时,化学环合法可利用的反应种类很多,常见的化学反应包括酰胺键形成、点击反应以及溴化氰催化5'端和3'端的磷酸二酯键连接等。

2.2.1 羧基和氨基酰胺化反应成环

酰胺反应是非常成熟的一类反应, 广泛用于合成环状核酸. 同时, 有许多催化剂组合, 如1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/1-羟基苯并三唑(HOBT)、EDC/*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、*O*-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)等可以在水相中活化羧基, 促进酰胺键的形成, 实现末端修饰核酸的环合. 寡聚核苷酸的3'端修饰氨基可以利用带氨基的固相通过DNA/RNA固相合成直接引入. 5'端修饰羧基的方法有很多, 比较简单的是在固相合成时在5'端直接连接一个含有羧基的连接分子, 这样使核酸链的一端含有羧基, 一端含有氨基, 从而可在缩合剂的作用下连接成环. 本课题组前期利用C6氨基修饰的CPG合成了3'端有一个游离的氨基反义核酸序列, 5'端则在偶联上C6氨基连接臂后再与丁二酸酐反应来引入一个游离的羧基. 寡聚核苷酸经脱保护和纯化后, 再在HOBT和EDC催化下氨基和羧基反应成环, 环合效率

能达到30%~50%, 如图4所示. 利用相同的策略, 本课题组^[30-32]还实现了2-甲氧基硫代修饰RNA以及吗啡啉结构等非天然骨架的寡聚核苷酸的环合及功能评价.

2.2.2 叠氮-炔基点击化学反应成环

叠氮和炔基的点击化学(click chemistry)反应是一个效率高、条件相对温和的生物正交反应, 广泛地用于各种生物大分子和细胞的标记. 点击化学反应也可用于环状寡聚核苷酸的合成. 根据核酸的功能和修饰位点的需求, 采用不同的修饰策略在不同位置引入炔基和叠氮基团, 再通过点击化学反应将它们连接, 构建具有特殊结构和功能的环状核酸. 如图5所示, 在寡聚核苷酸两个末端引入碱基修饰含有炔基的核苷酸, 从而使核酸链末端具有两个炔基官能团, 再利用含两个叠氮官能团的连接分子进行双重点击化学反应将核酸序列连接成环^[33]. 如果连接分子具有3个叠氮基团, 利用同样的双点击化学反应合成环状核酸的基础上, 在环状核酸上还引入了一个叠氮活性位点. 这样可以通过点击化学反应来对环状核酸进行进一步修饰, 如

图4 利用酰胺反应合成环状寡聚核苷酸

Figure 4 Synthesized method of cyclic oligonucleotides through amide bond formation.

连接荧光分子、其他核酸序列和功能分子等^[34].

这种环合方法具有很大的灵活性, 也可以利用这种双重或多重的叠氮-炔点击化学反应在核酸序列的中间而非两端引入多个带炔基基团的碱基, 合成两端带尾的环状核酸以及合成含有双环或多环结构的环状核酸. 在引入炔基的同时, 还可以引入某些环境响应的基团(如光敏感基团)作为环的开关. 例如, 将C10适配体序列中某些特殊位点引入3个含光敏感基团的炔基分

子, 通过与含3个叠氮的连接基团的点击化学反应, 合成了两端带尾的双环核酸, 实现对C10核酸适配体的光控功能调控(图6)^[35].

2.2.3 其他核酸环合反应

核酸的化学环合方法还有很多. 例如, 可以利用化学催化剂(如BrCN/EDC)催化5'端磷酸和3'端羟基直接缩合生成磷酸二酯键成环. 这种环合方法不需要对核

图5 利用双重点击化学反应合成环状核酸的反应示意图^[33,34]

Figure 5 Schematic synthetic strategy of circular oligonucleotide using "Bis-Click" ligation of DNA intrastrand circularization ^[33,34].

图6 (a) 利用双重点击化学反应合成带尾环状核酸的示意图; (b) 利用多重点击化学反应合成环状核酸适配体C10的示意图^[35]

Figure 6 (a) Scheme of tailed circular nucleic acids using "Bis-Click" ligation reaction. (b) Scheme of cyclic nucleic acid aptamer C10 using multiple click reaction ^[35].

酸序列进行修饰即可以实现对天然寡聚核苷酸和某些修饰寡聚核苷酸的环合(图7(a)). 另外, 也可利用寡聚核苷酸的3'端硫代磷酸与5'端对甲基苯磺酸酯或5'端基为碘取代基之间发生SN2反应生成硫代磷酸二酯键来进行核酸环化. 这种策略有可能实现硫代磷酸修饰的核酸序列可以不用引入连接分子直接环合(图7(b, c)). 还可以利用一些在寡聚核苷酸环合反应中不常用的反应来实现环化, 如寡聚核苷酸3'端醛基与5'端氧胺成肟的环化(图7(d)); Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等与寡聚核苷酸两端修饰的螯合剂(如三联吡啶)形成金属螯合物来环化寡聚核苷酸(图7(e))等^[36]. 这些多样化的化学反应策略可使核酸、修饰核酸以及核酸类似物在多种不同条件下环合, 满足研究者的不同需求.

图 7 核酸环化的化学合成方法. (a) BrCN/EDC催化磷酸二酯键成环; (b) 3'端硫代磷酸与5'端对甲苯磺酸酯的SN2反应形成硫代磷酸二酯键成环; (c) 3'端为硫代磷酸与5'端基为碘取代基的SN2反应形成硫代磷酸二酯键成环; (d) 3'端醛基与5'端氧胺形成肟键成环; (e) Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等与寡聚核苷酸两端修饰的螯合剂(如三联吡啶)形成金属螯合物成环^[37]

Figure 7 Chemical synthetic strategies for oligonucleotide circularization. (a) Chemical ligation of a terminal phosphate and hydroxyl groups using coupling agent BrCN/EDC to form phosphodiester bond. (b) SN2 ligation of a 3'-thiophosphoric acid with 5'-p-toluenesulfonate of a oligonucleotide to form thiophosphodiester bond. (c) SN2 ligation of a 3'-thiophosphate with an iodinated 5'-end of a oligonucleotide to form thiophosphodiester bond. (d) Oxime formation of a 3'-aldehyde with a 5'-oxoamine of a oligonucleotide. (e) Circularization through metal chelation formation (such as Zn^{2+} or Fe^{2+} and terpyridine) of a oligonucleotide ^[37].

3 环状核酸的功能与应用

3.1 环状反义核酸

反义核酸(antisense oligonucleotides)是指可以与靶RNA(多为mRNA)特异性互补配对的寡聚核苷酸序列. 反义核酸能够通过与mRNA的长效配对或配对后使mRNA被核糖核酸酶H (RNase H酶)剪切来调控基因的表达^[37]. 反义核酸一直是基因功能调控中常用和有效的研究工具, 也是核酸药物研究的功能寡聚核苷酸. 目前已有多个反义核酸药物上市, 如福米韦生Vitravene (Fomivirsen)、米泊美生钠Kynamro (Mipomersen sodium)、Exondys 51 (Eteplirsen)、Defitelio (Nusinersen), 而且还有许多反义核酸药物进入临床研究. 随着对反义核酸的研究逐渐加深, 反义核酸药物开启了基因治疗的“大门”. 由于天然反义核酸是单链结构, 存在各种各样的缺陷, 如生物不稳定性、脱靶效应、转运困难等, 研究人员对反义核酸进行各种精准修饰(如骨架修饰、碱基修饰, 5'端和3'端缀合修饰等)使反义核酸能够更好地发挥作用. 自环状RNAs发现以来, 研究者认识到环状核酸的优势(特别是稳定性和特殊的结构特征), 将其应用到反义核酸, 使之成为一种重要的修饰方法来调控基因功能.

环状反义核酸是将反义寡聚核苷酸的5'端和3'端首尾连接成环. 由于其环状结构, 没有5'端和3'端, 因此不会被核酸外切酶剪切而具有更高的稳定性. 而环的形状与大小也会影响环状反义核酸的作用效果. 本课题组^[30]前期设计了5种不同大小和不同结构的环状寡聚脱氧核苷酸(图8(a)), 其中H40和H30是具有发卡结构的寡聚核苷酸并具有与目标序列40mer RNA完全互补配对的环状反义核酸, 而没有稳定二级结构的C20、C30和C40则是只含有20个碱基序列可与目标序列40mer RNA中间20个碱基互补配对的环状反义DNA. 研究发现, C30或C40由于没有二级结构, 仍能与目标40mer RNA有效结合, 尽管结合力较线性反义核酸有所降低. 设计的H30和H40, 由于环内具有5个碱基长度的双链结构, 环状核酸的热稳定性比C30和C40更好, 与目标序列RNA结合力也较C30和C40弱. 但是C20与40mer的目标RNA基本不结合. 因此, 环状反义核酸的环大小是影响其与目标序列结合的关键因素. 同时, 环状反义核酸的二级结构对其结合力也有一定影响, 如在环核酸连接处引入一个光敏基团邻硝基苄

图8 (a) 不同结构的光敏感环状反义核酸; (b) 光敏寡聚核苷酸C20对目标RNA在RNase H酶作用下的酶降解^[30]

Figure 8 (a) Caged circular asODNs with different structure. (b) Denaturing PAGE (20%) analysis of target RNA digestion by RNase H with caged circular asODN C20 [30].

基基团(PL)连接臂可构建光敏感型的环状反义寡聚核苷酸. 通过光照诱导光敏感基团连接臂的断裂, 使环状反义寡聚核苷酸恢复为线性结构, 进而与目标40mer RNA发生互补配对结合, 从而导致目标RNA序列被RNase H酶剪切. 比较它们光解前后目标RNA被RNase H酶剪切的效率结果显示, 20个碱基长度的环对目标RNA序列酶降解的光调控作用最佳. 因此, 小的环状反义核酸或者长的靶标RNA序列有助于增加RNA被RNase H酶剪切的光调控效率^[30].

最近, 研究者也逐渐将各种特殊修饰的反义寡聚核苷酸应用到环状反义核酸, 如环状的吗啡啉代反义核酸, 以及磷酸骨架硫代修饰2-甲氧代反义核酸等^[31,32,38,39], 并且均可实现以引入光敏感基团(或其他激活因子)的方式来使环状反义核酸发挥刺激响应性的调控作用. 吗啡啉代反义核酸被广泛地用于斑马鱼特定基因的研究中, 本课题组^[31]早期构建了不同序列的25个碱基长度的环状吗啡啉反义核酸. 分别对斑马鱼的 β -catenin-2基因和no tail基因表达进行光调控, 这两个基因在胚胎发育期沉默会造成斑马鱼的头部和尾部等发育畸形. 在环状核酸中引入光敏感基团邻硝基苄基连接臂, 使光照后发生光致裂解恢复线性结构而与靶mRNA结合发挥反义核酸的基因调控作用, 如图9(a)所示. 不论是 β -catenin-2基因还是no tail (ntla)基因, 在体外实验中环状光敏感反义核酸能够实现光照前几乎与靶标序列不结合而光照后恢复与靶标序列的结合能

图9 (a) 环状光敏感吗啡啉反义寡核苷酸对基因沉默示意图; (b) 不同样品注射的斑马鱼24-hpf胚胎表型的侧视图和俯视图(β -catenin-2基因)^[31] (网络版彩图)

Figure 9 (a) Scheme of controlling gene expression using a light-activated circular morpholino oligomers. (b) Phenotypes of 24-hpf zebrafish embryos with side view and top view (β -catenin-2 gene) [31] (color online).

力, 如图9(b)所示. 在斑马鱼胚胎实验中注射环状吗啡啉光敏感反义核酸且给予光照的斑马鱼与注射线性吗啡啉反义核酸的阳性对照组都出现了相同的基因缺失

表型; 而注射环状吗啡啉反义核酸而未给予光照的斑马鱼胚胎则发育正常. Yamazoe等^[38]也合成了光敏基团为4,5-二甲氧基-2-硝基苄基(DMNB)的环状光敏感吗啡啉代反义核酸, 实现了在斑马鱼胚胎期对其no tail基因的光控基因沉默. 在此基础上, 他们还改变了环状反义核酸的激活因子, 将DMNB连接分子替换为4-硝基苄基(4-NB)连接分子, 合成了硝基还原酶激活的环状反义核酸^[39]. 这类环状可激活的修饰方式适用于不同的基因, 稳定性好且可以通过外界刺激来控制基因的沉默, 同时降低了脱靶效应, 具有很好的发展前景.

此外, Dmochowski课题组^[40]设计合成了3'端和5'端之间有4-6mer的互补序列配对的茎环结构的光敏感环状反义核酸, 如图10(a)所示. 这种设计的环状核酸方法由于茎环结构将两个末端拉近, 可以大大提高两端快-叠氮的点击化学反应环合的效率, 产率高达60%~70%. 同时在反义核酸两端分别引入可发生荧光能量共振转移(FRET)效应的Cy3和Cy5荧光基团来检测环状反义核酸的结构改变与位置(图10(b)). 这种稳定的、高效的光敏感环状寡聚反义DNA可以在光刺激下发生开环成线性核酸, 实现对目标mRNA的结合,

诱导胶质纤维酸性蛋白(GFAP蛋白)基因的沉默, 使星形胶质细胞中减少了10倍左右的GFAP蛋白, 如图10所示.

3.2 环状小干扰RNA

小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)是一类长为21~25个碱基的双链RNA, 主要通过RNA干扰(RNAi)实现对目标靶mRNA进行高效和高特异性的结合, 并触发对靶mRNA的特异性降解, 从而调节基因的表达^[41~43]. siRNA是双链结构, 相对于单链RNA稳定性大大提高, 但是仍然存在核酶降解不稳定性、正义链的脱靶效应以及细胞摄取效率低等不足^[44~46]. 为了克服上述siRNA的不足, 研究者对siRNA进行了多种精准的化学修饰和结构改造. 由于环状核酸在结构上的突出特点, 本课题组^[27]尝试了将环状结构应用到siRNA的结构改造. siRNA由互补配对的正义链和反义链两条链组成, 因此可将正义链和反义链分别环合构建环状正义链/线性反义链(c-S/AS)以及环状反义链/线性正义链(c-AS/S)的环状siRNA, 结构如图11(a)所示. 相对于线性siRNA, 两种环状siRNA由于环状的结构

图10 (a) 带茎的环状光敏感反义核酸作用原理及光控裂解示意图; (b) 带茎的环状光敏感反义核酸的细胞实验结果^[40] (网络版彩图)

Figure 10 (a) Scheme of photoactivation of caged circular oligonucleotide with hairpin-stem structure. (b) Cellular photoactivation of gene expression with the caged circular oligonucleotide^[40] (color online).

图 11 (a) c-S/AS和c-AS/S的结构示意图; (b) HEK 293T细胞中不同环状siRNA (GSC/GAS和GASC/GS)对GFP的基因沉默效果(以RFP为参照基因)^[27](网络版彩图)

Figure 11 (a) Schematic of circular siRNA (c-S/AS and c-AS/S) with circular sense strand or antisense strand RNA. (b) Gene knockdown of GFP using these different circular siRNAs (GSC/GAS and GASC/GS) in HEK 293T cells (RFP as the reference gene) ^[27] (color online).

提高了对血清等抗降解能力. 在HEK 293T细胞中对绿色荧光蛋白(GFP)和荧光蛋白酶(firefly luciferase)两种不同的靶基因沉默实验结果显示, 上述两种设计的正义链和反义链分别为环的环状siRNA具有不同的调控效果. 如图11(b)中的GFP基因调控实验, 环状正义链与线性反义链配对构建的双链siRNA (GSC/GAS)可以显著降低GFP在细胞中的表达水平, 而环状反义链与线性正义链配对的双链siRNA (GASC/GS)则和阴性对照实验一样, 没有降低GFP的表达水平. 进一步研究表明, 环状反义链由于首尾相连, 不能被Ago2蛋白识别和/或与其结合组装成RISC复合物, 因而GASC/GS不能进行基因沉默; 相反, 在GSC/GAS中, 由于反义链GAS仍然是线性结构, 在细胞中可竞争性地与目标mRNA结合以及形成RISC复合物, 进而发挥沉默基因功能. 同时, 由于正义链GSC的环状结构, 还可以降低由于正义链引起的脱靶效应. 因此, 环状siRNA的修饰策略不仅可以获得与线性siRNA相当的沉默效果, 提高了siRNA的稳定性, 而且可以降低正义链引起的脱靶效应^[27].

环状反义链/线性正义链构建的siRNA对siRNA功能具有非常好的抑制效果. 基于此, 如果将环状反义链RNA中引入光敏基团邻硝基苄基连接臂, 将有可能对

siRNA的基因沉默功能暂时封闭, 进而在光作用下实现对siRNA沉默基因的时间、空间甚至浓度上的光调控. 本课题组^[47]最近报道了一类新型的环状光敏感siRNA分别作用于不同的靶基因(绿色荧光蛋白和荧光素酶). 图12中的GFP基因的光调控实验结果表明, 光照前环状光敏感siRNA由于环状结构无法发挥基因沉默作用; 光照后光敏基团发生光致裂解化学键断裂, 恢复为线性结构, 可以达到线性的阳性siRNA的基因沉默水平, 实现对靶基因GFP沉默的调控. 由于光的可操作性强, 可在特定时间和空间内激活环状光敏感siRNA从而实现对特定基因表达在空间上的光调控. 在此基础上, 本课题组也实现了在稳转GFP的U87细胞构建的小鼠肿瘤模型中对目标靶基因GFP表达水平的特异性光调控. 这种环状光敏感siRNA的设计策略能够实现基因沉默在特定时间、位置的特异性时空调控, 使基因沉默变成一个可控的过程, 对基因调控和靶向治疗的研究具有很重要的意义.

3.3 环状核酸适配体

核酸适配体(aptamer)是一段DNA或RNA的寡聚核苷酸序列. 其通常是通过体外筛选技术——指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)从核酸分子序列库中筛选出的能与靶标(如金属离子、生物大分子、小分子等)特异性结合的核酸序列, 是一种类抗体的寡聚核苷酸^[48]. 核酸适配体能够通过碱基互补配对作用、氢键作用、静电作用等形成如发卡、G-四链体等三维空间结构^[49]. 其空间构象与靶标识别作用息息相关, 改变核酸适配体三维结构可能使其丧失靶标识别功能. 核酸适配体具有很多优势^[50,51]. (1) 高亲和力和高特异性: 可以与特定靶标稳定结合. (2) 结构稳定性: 由于核酸适配体具有其特定的三维结构, 相较于其他单链核酸和双链核酸更稳定; 形成三维结构的驱动力强, 不易变性. (3) 低毒性和较好的组织渗透性. (4) 可修饰性: 可以对核酸适配体进行碱基或糖环的精准修饰, 以及缀合修饰等. (5) 普适性: 与反义核酸、siRNA相比, 核酸适配体由于通过高通量筛选得到, 靶标多种多样, 可用于肿瘤靶向检测探针、药物载体靶头基团和核酸药物等. 自1990年核酸适配体发现^[52,53]以来, 关于核酸适配体的研究越来越多, 目前上市的核酸适配体药物(哌加他尼, Macugen)是血管内皮生长因子(VEGF)的

图 12 (a) 光敏感环状c-AS/S结构示意图(锁代表光敏分子邻硝基苄基); (b) HEK 293T细胞中环状光敏感siRNA对GFP基因时间和空间上的沉默效果(以RFP为参照基因); (c) 裸鼠肿瘤实验GFP基因沉默结果^[47] (网络版彩图)

Figure 12 (a) Schematic diagram of caged circular siRNA c-AS/S (the lock represents the photosensitive molecule *o*-nitrobenzyl linker). (b) The temporal and spatial silencing effect of caged circular siRNA in HEK 293T cells on GFP gene expression (RFP as a reference gene). (c) Photomodulation of GFP expression in xenograft nude mice tumor model *in vivo* [47] (color online).

拮抗剂, 可以用来治疗退行性黄斑病变。

G-四链体结构是核酸适配体的常见结构之一, 其通常是由富含串联重复鸟嘌呤(G)序列的DNA或者RNA折叠形成的高级结构, 对很多目标分子有较高的亲和力与选择性, 因而被广泛地应用于核酸、酶、生物分子、小分子与离子的检测中。通过合成富含G碱基的环状核酸适配体, 可以更有效地避免核酸外切酶的剪切。根据设计核酸序列中G的位置与数量, 可以构建单个/两个环状核酸形成G-四链体, 如图13所示。由于G-四链体受构象、碱离子、pH、金属离子特别是钾离子的影响, 所以这些因素也可能影响环合过程以及构建的环状G-四链体结构和性质^[54]。

由于核酸适配体三级结构直接影响其靶标识别作用, 因此某些环状核酸适配体可能会干扰特定的三级结构的形成, 从而影响靶标识别的位点。如果在其中引用光敏基团, 可实现基于光响应的核酸适配体的三维结构恢复, 实现核酸适配体的功能调控^[35]。Heckel等^[35]将线性的90个碱基长度C10核酸适配体利用三重点击化学反应在适配体三级结构形成的关键位点

7-37-73形成了一个双环结构的核酸适配体, 如图14(a)所示。这种环状结构核酸适配体改变了原有C10核酸适配体的三维结构, 使其无法再识别Burkitt's淋巴瘤细胞。他们同时在每个连接位置都引入了邻硝基苄基光敏感基团, 从而构建了光敏感的环状核酸适配体C10。通过光照, 光敏的连接基团断裂, 恢复C10核酸适配体的原有三维结构, 实现对细胞靶向作用的光调控。利用原子力显微镜(AFM)观察到, 有双环的C10核酸适配体具有高度紧密的环状结构, 光照后环打开使C10适配体恢复正常C10核酸适配体的三级结构(图14(b))。因此利用此环状光敏感核酸适配体可以对特定的Burkitt's淋巴瘤细胞进行选择性的细胞标记(图14(c))。

4 总结与展望

环状核酸是一类具有特征三级结构的核酸分子。尽管环状核酸的发现至今有近半个世纪的时间, 但真正开展环状核酸研究的时间并不长, 其仍然是一个非常新的研究领域。由于检测技术的限制, 早期人们对

图 13 环状G-四链体的两种结构类型^[54]

Figure 13 Two typical structures of cyclic G-quadruplexes [54].

图 14 (a) 光敏感双环环状核酸适配体结构; (b) 光照前后光敏感双环环状核酸的AFM图; (c) 光敏感标记Burkitt's淋巴瘤细胞示意图^[35]

Figure 14 (a) Photosensitive aptamer C10 with bi-circular structure. (b) AFM images of the C10 bicircularized aptamer before and after irradiation. (c) The binding interaction of bicircularized C10 aptamer towards Burkitt's lymphoma cells after light activation [35].

其在生物体内存在环状核酸的普遍性认识不足。近年来, 随着科学技术的进步, 研究者发现生物体内存在各种环状核酸, 并具有独特的生理调节功能, 且研究结果显示环状核酸能够从多方面对基因的表达进行调控。目前, 环状核酸已成为核酸研究领域的新热点。相

对于线性核酸, 环状核酸更耐受核酸外切酶的降解, 因而在体内具有更好的稳定性。同时, 环状核酸由于其结构的特殊性可能具有特殊性质和生物活性。至今, 人们对许多天然环状核酸的产生及其在细胞中的详细作用机制还不是十分清楚。近些年来关于天然环状核酸的

机制与功能的研究也越来越多。人工设计合成出相应的环状核酸并研究其化学生物学功能将有助于深入了解它们在生命体中的重要意义。

环状功能寡聚核苷酸的合成可以通过酶合成法和化学合成法得到。酶合成法的特点是利用酶的高效性连接核酸,但对修饰的寡聚核苷酸或者特殊结构导致核酸两末端无法接近的寡聚核苷酸则无能为力。而化学合成法最大优点是不受修饰寡聚核苷酸的限制。核酸的环合必然带来其结构的改变,从而可能导致其生物活性和功能的变化,这给核酸的研究带来了新的思路和方法,也为核酸药物设计提供了新的研究方向。

环状核酸由于其对于体内外切酶具有更高的耐受性和更长的半衰期,使其在成药性方面较线性核酸具有更好的优势,且不用进行高度复杂的结构修饰。

环状核酸的组成单元大多是天然或简单修饰的核苷酸,在体内具有更好的生物相容性和低毒性。而且环状核酸可以通过一定的手段来人为控制恢复线性结构,这有利于基因疾病治疗的人为控制。已有很多研究表明,人们可以在动物水平上实现对基因的人为调控,这对于疾病的治疗非常有利。疾病模型等研究显示,一些内源性的环状核酸对于很多癌症如膀胱癌、肝癌、肺癌、宫颈癌等恶性肿瘤的增殖和转移,恶性胶质瘤以及心血管疾病等都有抑制作用,可以诱导肿瘤细胞凋亡,具有更好的稳定性和调控功能、安全性良好、具有较高的开发转化价值,有希望开发转化为环状核酸药物。因此,环状寡聚核苷酸可为疾病的精准治疗带来新的希望,值得我们更深入的研究与探讨。

参考文献

- 1 Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73: 3852–3856
- 2 Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, van der Meide PH, Schellekens H. *Nature*, 1986, 323: 558–560
- 3 Cocquerelle C, Al E. *EMBO J*, 1992, 11: 1095–1098
- 4 Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, Kern SE, Ruppert JM, Oliner JD, Kinzler KW, Vogelstein B. *Cell*, 1991, 64: 607–613
- 5 Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R. *Cell*, 1993, 73: 1019–1030
- 6 Qu S, Yang X, Li X, Wang J, Gao Y, Shang R, Sun W, Dou K, Li H. *Cancer Lett*, 2015, 365: 141–148
- 7 Chen LL, Yang L. *RNA Biol*, 2015, 12: 381–388
- 8 Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, Zhu S, Yang L, Chen LL. *Mol Cell*, 2013, 51: 792–806
- 9 Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22: 256–264
- 10 Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. *Cell*, 2014, 159: 134–147
- 11 Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evtantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. *Mol Cell*, 2014, 56: 55–66
- 12 Cocquerelle C, Mascres B, Hétauin D, Bailleul B. *FASEB J*, 1993, 7: 155–160
- 13 Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001233
- 14 Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. *Nature*, 2013, 495: 384–388
- 15 Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. *RNA*, 2013, 19: 141–157
- 16 Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. *Nature*, 2013, 495: 333–338
- 17 Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003777
- 18 Kulcheski FR, Christoff AP, Margis R. *J Biotech*, 2016, 238: 42–51
- 19 Li J, Yang J, Zhou P, Le Y, Zhou C, Wang S, Xu D, Lin HK, Gong Z. *Am J Cancer Res*, 2015, 5: 472–480
- 20 Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. *PLoS ONE*, 2012, 7: e30733
- 21 Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. *Nature*, 2010, 465: 1033–1038
- 22 Chen CY, Sarnow P. *Science*, 1995, 268: 415–417
- 23 Jeck WR, Sharpless NE. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 453–461
- 24 Hartmann RK. *Handbook of RNA Biochemistry*. New York: Wiley, 2005

- 25 Remaut E, Tsao H, Fiers W. *Gene*, 1983, 22: 103–113
- 26 Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Ruger W. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 86–156
- 27 Zhang L, Liang D, Chen C, Wang Y, Amu G, Yang J, Yu L, Dmochowski IJ, Tang XJ. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2018, 10: 237–244
- 28 Petkovic S, Müller S. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: 2454–2465
- 29 An R, Li Q, Fan Y, Li J, Pan X, Komiyama M, Liang X. *Nucl Acids Res*, 2017, 45: e139
- 30 Tang XJ, Su M, Yu LL, Lv C, Wang J, Li ZJ. *Nucl Acids Res*, 2010, 38: 3848–3855
- 31 Wang Y, Wu L, Wang P, Lv C, Yang Z, Tang XJ. *Nucl Acids Res*, 2012, 40: 11155–11162
- 32 Wu L, Wang Y, Wu J, Lv C, Wang J, Tang XJ. *Nucl Acids Res*, 2013, 41: 677–686
- 33 Yang H, Seela F. *Chem Eur J*, 2016, 22: 1435–1444
- 34 Yang H, Seela F. *Chem Eur J*, 2017, 23: 3375–3385
- 35 Seyfried P, Eiden L, Grebenovsky N, Mayer G, Heckel A. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 359–363
- 36 Müller S, Appel B. *RNA Biol*, 2017, 14: 1018–1027
- 37 Kurreck J. *FEBS J*, 2003, 270: 1628–1644
- 38 Yamazoe S, Liu Q, McQuade LE, Deiters A, Chen JK. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 10114–10118
- 39 Yamazoe S, McQuade LE, Chen JK. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1985–1990
- 40 Yang L, Kim HB, Sul JY, Yeldell SB, Eberwine JH, Dmochowski IJ. *ChemBioChem*, 2018, 19: 1250–1254
- 41 Lee SK, Kumar P. *Adv Drug Deliver Rev*, 2009, 61: 650–664
- 42 Aagaard L, Rossi JJ. *Adv Drug Deliver Rev*, 2007, 59: 75–86
- 43 Haussecker D. *J Control Release*, 2014, 195: 49–54
- 44 Bumcrot D, Manoharan M, Kotliansky V, Sah DWY. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 711–719
- 45 Sarret P, Doré-Savard L, Beaudet N. *Methods Mol Biol*, 2010, 623: 383–395
- 46 Burnett JC, Rossi JJ. *Chem Biol*, 2012, 19: 60–71
- 47 Zhang L, Liang D, Wang Y, Li D, Zhang J, Wu L, Feng M, Yi F, Xu L, Lei L, Du Q, Tang XJ. *Chem Sci*, 2018, 9: 44–51
- 48 Zhou J, Rossi JJ. *Aptamer-targeted RNAi for Hiv-1 Therapy*. New York: Humana Press, 2011
- 49 Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. *Biomol Eng*, 2007, 24: 381–403
- 50 Song KM, Lee S, Ban C. *Sensors*, 2012, 12: 612–631
- 51 Han K, Liang Z, Zhou N. *Sensors*, 2010, 10: 4541–4557
- 52 Ellington AD, Szostak JW. *Nature*, 1990, 346: 818–822
- 53 Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505–510
- 54 Zhou T, Chen G, Wang Y, Zhang Q, Yang M, Li T. *Nucl Acids Res*, 2004, 32: e173

Research progress of circular oligonucleotides

Nannan Jing, Jing Wang^{*}, Xinjing Tang^{*}

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

^{*}Corresponding authors (email: wangjing1988@bjmu.edu.cn; xinjingt@bjmu.edu.cn)

Abstract: Circular nucleic acids with cyclic structure can greatly improve their stability towards exonucleases, which may endow special functions due to their cyclic structure. Limited by detection technology and instruments in early stage, researchers have relatively few studies on circular nucleic acids. In recent years, various kinds of circular nucleic acids have been discovered with the progress of science and technology and shown many unique physiological regulation functions in living organisms. However, it is still not clear whether the smaller ring oligonucleotides (dozens of bases) exist in life and have the potential functions. Here, we summary the two main kinds of synthesis methods (enzyme synthesis and chemical synthesis) of circular nucleic acid (especially smaller ring oligonucleotides), and compare their advantages and disadvantages. We also review the structural characteristics of various circular functional oligonucleotides and their effects on specific biological activities, especially the regulation of gene functions, which may provide a new tool to explore the chemical biology of circular nucleic acids in biological systems.

Keywords: circular oligonucleotides, antisense oligonucleotides, siRNA, aptamer, gene regulation

doi: [10.1360/N032018-00090](https://doi.org/10.1360/N032018-00090)