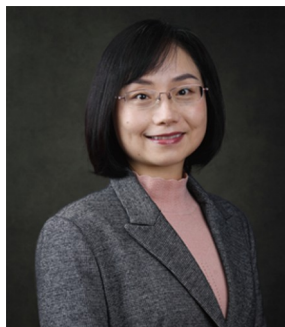


## 综述



陈玲玲, 核糖核酸功能与应用重点实验室主任, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员, 国家基金委杰出青年基金获得者、首届新基石研究员和首届上海杰出人才获得者。从事RNA生物学研究, 创建并利用新技术体系发现多种新型非编码RNA分子家族, 在揭示其生成规律、生物学功能以及与人类疾病的关联等方面取得多项原创发现, 为相关转化应用提供了理论基础。相关研究发表于*Nature*、*Science*、*Cell*及其子刊, 累计发表论文百余篇, 引用超2.8万次, 同行专评30余次。受邀担任*Cell*、*Science*等期刊编委, 美国冷泉港实验室、国际RNA学会、欧洲分子生物学会等多个会议大会主席、主旨报告人。先后获国家自然科学基金二等奖、亚洲及大洋洲生物化学家与分子生物学家联盟卓越研究奖、国际RNA学会Mid-Career Res Award、中国青年科技奖特别奖、科学探索奖和中国青年女科学家奖等学术奖励。

## 长非编码RNA与环形RNA基础研究现状与展望

乌 皓<sup>1</sup>, 曹诗梦<sup>1</sup>, 陈玲玲<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 核糖核酸功能与应用重点实验室, 上海 200031;

<sup>2</sup>新基石科学实验室, 深圳 518054)

**摘要:** 核糖核酸(RNA)是现代分子生物学“中心法则”的三大核心分子之一, 是生命遗传信息的承载者与传递者, 也是生命活动的重要调控者。细胞内RNA分子超过95%为非编码RNA, 其种类与结构类型繁多, 生成与代谢途径多样, 在生命活动各个环节发挥重要作用。本文着眼于长非编码RNA和环形RNA, 系统总结了它们的生成加工与功能作用机制, 深入探讨了RNA领域底层共性技术的发展对于长非编码RNA和环形RNA研究领域的帮助和亟待解决的问题, 以期为基于长非编码RNA和环形RNA的相关应用提供新思路。

**关键词:** 非编码RNA; 长非编码RNA; 环形RNA; RNA生成加工; RNA功能机理

## Current understanding and prospects of long noncoding RNA and circular RNA

WU Hao<sup>1</sup>, CAO Shimeng<sup>1</sup>, CHEN Lingling<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of RNA Innovation, Science and Engineering, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai 200031, China; <sup>2</sup>New Cornerstone Science Laboratory, Shenzhen 518054, China)

**Abstract:** As the core biomacromolecule of the “central dogma”, RNA plays key roles in carrying genetic information and serves as the important regulator of life. Over 95% of the RNA molecules are noncoding

收稿日期: 2024-07-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFA1300501, 2021YFA1100203); 中国科学院战略性先导科技专项B类(XDB0570000); 上海市生物医药定向项目(23DX1900100); 新基石科学基金项目(NC1202232)

第一作者: E-mail: wuhao2021@sibcb.ac.cn

\*通信作者: E-mail: linglingchen@sibcb.ac.cn

RNAs, which are diverse in type and structure, and have various modes of biogenesis, metabolism, and cellular roles. Here, we review the current understanding of long noncoding RNA and circular RNA, including their biogenesis, processing, and key modes of action. Meanwhile, we highlight how the recent technical advances benefits the long noncoding RNA and circular RNA studies and discuss existing challenges in the field. These efforts will inform new ideas for the long noncoding RNA and circular RNA-based biotechnological and biomedical applications.

**Key Words:** noncoding RNA; long noncoding RNA; circular RNA; RNA biogenesis and processing; RNA functional modes

核糖核酸(RNA)是生命起源的最初形式,在现代生物学的“中心法则”中,RNA是遗传信息的承载者与解读者,也是生命活动的重要调控者。随着人类基因组计划的完成和新一代深度测序技术的应用,人们发现哺乳动物细胞转录组中超过95%的转录序列为非编码RNA(noncoding RNA, ncRNA)<sup>[1]</sup>。这些非编码RNA包括:“管家”非编码RNA,如转运RNA(transfer RNA, tRNA)、核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)和小核RNA(small nuclear RNA, snRNA)等;小非编码RNA,如微小RNA(microRNA, miRNA)和PIWI蛋白结合RNA(PIWI-interacting RNA, piRNA)等;以及更多尚未被深入研究的长非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)<sup>[2]</sup>。lncRNA是一类含有200个以上核苷酸但不具备蛋白质编码能力的长链RNA分子。自上世纪80年代末,首条lncRNA *H19*被发现以来<sup>[3]</sup>,大量lncRNA被人们报道。目前,人类GENCODE数据库显示了超过17万条lncRNA编码基因<sup>[4]</sup>,另有报道预测人体内有超过100万种lncRNA分子<sup>[5,6]</sup>。

多数lncRNA与信使RNA(messenger RNA, mRNA)类似,由RNA聚合酶II(RNA polymerase II, Pol II)转录生成,具有5'端m<sup>7</sup>G帽子和3'端poly(A)尾巴结构,并具备与mRNA相似的剪接成熟机制与出核过程<sup>[7]</sup>。然而,由于lncRNA生成机制多样,真核生物体内还存在多种非经典结构的lncRNA分子。例如,转录组测序发现,人体内有超过25%的lncRNA缺少经典的poly(A)尾巴结构<sup>[8,9]</sup>。这些lncRNA能够以顺式或反式的形式参与细胞内重要功能结构域的组装,并在染色质水平、转录水平和转录后水平参与多个生物学过程

的复杂调控。更为有趣的是,无poly(A)尾RNA测序在发现多种新型非经典结构lncRNA分子外<sup>[10-12]</sup>,还揭示了多途径来源的环形RNA(circular RNA, circRNA)分子,包括内含子来源的环形内含子RNA(circular intronic RNA, ciRNA)和外显子来源的circRNA<sup>[13,14]</sup>。其单链闭合环状的独特结构使circRNA拥有相较于线性RNA更高的稳定性,也赋予其重要的生物学功能。随着研究的深入,lncRNA与circRNA在生命过程中的调控作用越来越得到重视,然而相关研究也面临瓶颈。多数lncRNA与circRNA表达量低,且表达具有组织细胞特异性;转录产生的RNA分子结构具有很强的柔性,高级结构容易受到温度、pH、结合蛋白与生理病理刺激等外界环境的影响。这些问题瓶颈制约了lncRNA与circRNA领域的进一步发展。

近年来,得益于高通量测序、长读测序、基因编辑和高分辨率显微成像等技术的发展与物理生物、化学生物等多学科的交叉融合,lncRNA与circRNA的研究取得了突破性进展。lncRNA与circRNA生成加工、折叠转运、动态结构、理化性质、生物学功能与生理病理学意义被深入解析,相关基础研究进入了超微化、动态化、在体化的新时代。人工智能技术在RNA结构预测、分子设计与计算分析中的应用进一步催化了RNA生物学在生物医药领域的转化应用,其中lncRNA与circRNA也扮演着重要的角色。多种lncRNA在重大疾病的诊断、监测与治疗中显示了巨大的潜力<sup>[15]</sup>,人工合成circRNA在蛋白替代疗法和治疗银屑病、阿尔兹海默症等免疫炎症方面也表现了巨大的应用价值<sup>[16-18]</sup>。未来对于lncRNA与circRNA的持续研究将会为其高效使能提供更多的应用场

景, 助力生物医药领域实现跨越式发展。

本综述从生成加工和功能机制的角度系统整理了近年来lncRNA与circRNA领域的研究进展, 阐述了RNA底层共性技术的发展对于lncRNA与circRNA功能研究与应用的推动作用。在此基础上, 本文讨论了lncRNA与circRNA研究所面临的机遇与挑战, 旨在为未来的高效使能提供新的思路和方向。

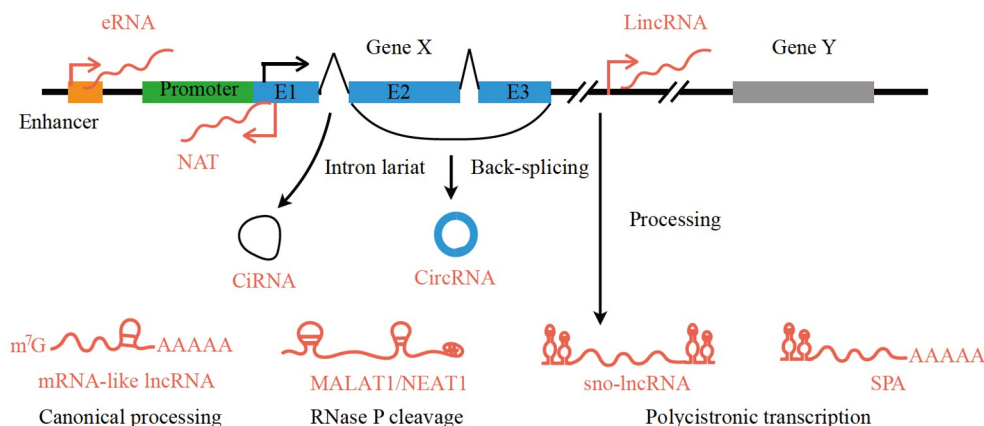
## 1 长非编码RNA与环形RNA的生成与加工

与mRNA类似, 多数lncRNA是由Pol II 转录产生的, 然而lncRNA转录起始位点可选择性更多, 能产生具有不同细胞命运与功能的lncRNA分子: 由基因间非编码区域转录产生的长基因间非编码RNA(long intergenic noncoding RNAs, lincRNA), 由编码基因互补序列转录产生的非编码反义转录本(natural antisense transcript, NAT)以及由启动子、增强子和启动子上游序列转录产生的lncRNA等<sup>[19]</sup>。同时, 由于加工机制多样, 长非编码RNA的种类被进一步丰富, 形成多种非经典结构lncRNA、lncRNA异构体与circRNA(图1)。这些lncRNA分子进化保守性弱, 具有独特的成熟、转运、定位与降解过程, 并与它们在细胞中的命运与功能息息相关。

### 1.1 mRNA-like lncRNA

大多数lncRNA分子与mRNA分子共享转录与

加工机器, 具有m<sup>7</sup>G帽子结构和poly(A)尾巴, 经历剪接与折叠, 并被运送到细胞质中。近年来的研究显示, lncRNA相较于mRNA具有更少且更长的外显子, 更弱的内含子剪接和较弱的多聚腺苷酸化效率。同时, 大量的lncRNA转录区域位于转录抑制区, 并由磷酸化的Pol II 介导<sup>[20-22]</sup>。因此, lncRNA表达丰度较低, 内含子剪接经常不完全, 并具有核滞留的趋势<sup>[23]</sup>。这些加工不完全的lncRNA容易在细胞核中被核酸外切酶捕获降解<sup>[24]</sup>。在细胞核内生成后, 大部分lncRNA被转运到细胞质中。lncRNA的出核机制与mRNA基本相似, 因其具有较少的外显子数量, 推测其主要通过NXF1途径进行转运<sup>[25]</sup>。到达细胞质后, 这些lncRNA可能被分配到特定的细胞亚结构, 或在细胞质中弥散分布以执行其功能。核糖体密度梯度分析显示, 大约一半的细胞质lncRNA附着在核糖体上, 通过竞争性结合mRNA在核糖体上的进入位点抑制翻译<sup>[26]</sup>。另有研究发现, 约30%的lncRNA上含有小开放阅读框, 具有翻译小肽的可能性, 关于lncRNA的翻译机制目前尚不清楚<sup>[27]</sup>。此外, 对人类线粒体转录组的分析表明, 部分出核的lncRNA被运送到线粒体中<sup>[28]</sup>, 人类血液外泌体的RNA测序也发现了大量的lncRNA<sup>[29]</sup>。这些lncRNA的转运机制还有待进一步挖掘, 但这一过程大多依赖于RNA结合蛋白对特定序列基序的结合与调控。此外, 胞质中的lncRNA在半衰期和降解机制



RNA转录位点的差异选择形成不同种类的lncRNA分子, 包括增强子RNA(eRNA)、非编码反义转录本(NAT)和长基因间非编码RNA(lincRNA)等。非编码转录本的复杂加工机制进一步丰富了RNA类型。多数非编码转录本使用mRNA类似的加工机制形成mRNA-like lncRNA。同时, 细胞内还存在经RNase P剪切加工形成的具有3'端三螺旋结构的MALAT1与NEAT1和多顺反子转录本复杂加工形成的snoRNP末端修饰的sno-lncRNA与SPA等lncRNA分子。此外, 外显子反向剪接与内含子套索结构可以加工生成不同类型的环形RNA

图1 lncRNA和circRNA的生成



上与mRNA基本相似<sup>[30]</sup>。

## 1.2 非经典结构lncRNA

除了与mRNA相似的lncRNA之外,细胞中还存在多种非经典结构的lncRNA分子。例如,无poly(A)尾RNA测序发现了两端由snoRNP修饰的sno-lncRNA<sup>[11,13,14]</sup>。Sno-lncRNA的形成依赖于转录本两端的小核仁RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)结构。在核酸外切酶剪切转录本时,snoRNA招募结合蛋白形成snoRNP复合物,对中间的转录本序列进行保护<sup>[11]</sup>。值得一提的是,人类15号染色体上一段与小胖威利综合征(Prader Willi Syndrome, PWS)发病高度相关的区域(15q11-q13, PWS区)转录的多顺反子转录本能够加工形成sno-lncRNA。这些sno-lncRNA定位于转录位点附近,通过与Fox家族剪接因子相互作用调控选择性剪接,其表达水平与PWS的发病高度相关<sup>[11]</sup>。这些研究提示,sno-lncRNA具有重要的生物学功能。有趣的是,进一步对这一段多顺反子转录本进行分析发现,其在sno-lncRNA之外还能加工形成5'端snoRNP、3'端poly(A)的SPA lncRNA<sup>[12]</sup>。尽管与sno-lncRNA的定位相似,SPA的生成机制与sno-lncRNA却并不相同,而是由转录区段上游基因的弱poly(A)转录终止信号和快速转录的Pol II共同作用产生的。在上游基因转录本剪切结束后,核酸外切酶XRN2继续剪切下游序列,直到遇到snoRNP复合物,从而形成5'端snoRNP结构<sup>[12]</sup>。对于SPA的功能目前还知之甚少,但其能够与TDP43、RBFox2和hnRNPM等剪接因子相互作用,提示可能参与了多个靶基因的剪接调控<sup>[11,12]</sup>。此外,细胞内还存在多种其他类型的末端修饰非经典lncRNA分子。如由单个外显子转录产生、3'端由RNase P切割加工形成与tRNA相似的稳定U·A·U三螺旋结构的MALAT1与NEAT1 lncRNA等<sup>[31,32]</sup>。这些RNA由于缺乏经典的帽子结构或poly(A)尾巴,难以被细胞内的RNA降解机器捕获,因此相较于mRNA具有更长的半衰期。

随着研究手段的更新迭代与研究精度的深入,近年来多种新型非经典lncRNA被发现。例如,在受到外界刺激时,异染色质区段的一些重复序列会大量转录,形成重复序列lncRNA<sup>[33]</sup>;部分RNA会与糖苷连接,形成糖基化RNA<sup>[34]</sup>。这些RNA的

生成机制与功能还有待挖掘,但对lncRNA新种类的探索无疑将会极大地丰富对于RNA生物学的认知,为潜在的使能应用扩充候选池。

## 1.3 环形RNA

环形RNA是一类单链闭合环状结构的非编码RNA分子的统称,在线虫、果蝇、植物、动物和人类等多个物种中广泛表达<sup>[14]</sup>。相较于mRNA,环形RNA的表达量较低,但由于其结构稳定,能够在神经细胞等终末分化细胞中累积<sup>[35]</sup>。目前发现的环形RNA主要有两类——由前体mRNA(pre-mRNA)的外显子反向剪接(back-splicing)而成的circRNA和内含子套索结构来源的ciRNA。

取决于其生成方式,circRNA在除反向剪接位点(back-splicing junction site, BSJ site)外的序列与同源线性RNA相同,这也使得对circRNA的研究很难排除同源线性RNA的影响。对能够形成circRNA的基因组序列分析发现,反向剪接的发生需要5'和3'端的剪接位点和经典RNA剪接机器的参与,受到两侧Alu等内含子重复序列(intronic complementary sequences, ICSs)和ICS结合蛋白的调控<sup>[36-38]</sup>,并且与Pol II转录和pre-mRNA正向剪接同时发生,这一机制提示circRNA的生成对于同源线性RNA的表达可能具有调控作用<sup>[39]</sup>。尽管circRNA的生成没有明显的序列偏好性,但是绝大多数人体内源的circRNA含有多个外显子<sup>[14]</sup>。在细胞核内转录生成后,circRNA需要经过复杂的折叠与修饰来完成成熟过程,并且大多数最终被转运到细胞质中。目前对于circRNA的加工与转运机制还知之甚少。有研究显示,一些参与转运mRNA(如DDX39A/B)和蛋白质(如XPO2、XPO4)出核的因子也参与了circRNA的出核转运<sup>[40,41]</sup>。同时,在特定细胞类型中,circRNA的出核具有序列依赖性。例如,在胚胎干细胞中,腺苷酸富集的circRNA滞留在细胞核中,并随着向神经元分化的过程出核<sup>[42]</sup>。值得一提的是,circRNA的生成、转运机制与功能高度耦联,除前述能够顺式调控同源线性RNA的表达外,还能够通过反式方式与线性RNA竞争性结合蛋白质而发挥作用<sup>[42-44]</sup>。

相较于circRNA,ciRNA在细胞内的含量较少且定位于细胞核中,由RNA成熟过程中产生的内含子套索结构通过逃避去分支(debranching)的过程

形成<sup>[13]</sup>。尽管目前对其生成加工机制还所知甚少, 但形成ciRNA的内含子套索结构通常在5'端含有7 nt的GU富集基序, 在分支位点附近含有11 nt的C富集序列<sup>[13]</sup>。

## 2 长非编码RNA的生物学功能

与mRNA不同, lncRNA的功能发挥高度依赖其重要功能基序与关键的高级结构, 因此多维结构解析对于分析lncRNA的功能显得尤为重要。有研究显示, lncRNA能够通过与DNA分子互补配对, 或者招募、锚定、结合蛋白质与RNA分子, 通过顺式或反式作用参与染色质结构重塑和细胞核亚结构组装, 并能够在转录或转录后水平调控基因表达<sup>[7,45]</sup>(图2)。我们在此讨论lncRNA参与的具有代表性的生物学功能调控机理。

### 2.1 调控染色质结构

lncRNA的生成加工机制赋予其较强的核定位偏好性。多项研究成果表明, 细胞核内的lncRNA能够参与染色质结构的重塑, 并在胚胎发育和肿瘤细胞的基因表达, 重编程过程中发挥重要作用。例如, 雌性生物在胚胎发育早期, 通过使一条X染色体失活来平衡X染色体上的基因表达。lncRNA *Xist*参与了对这一过程的调控: 一方面通

过在失活X染色体周围形成*Xist*云<sup>[46,47]</sup>, 招募多种组蛋白修饰酶、染色体重塑蛋白和转录抑制蛋白来抑制染色体上的基因表达<sup>[48-50]</sup>; 另一方面通过与细胞核仁外围的lamin B受体结合<sup>[49,51]</sup>, 将失活X染色体形成的巴氏小体易位到核仁周围<sup>[51,52]</sup>。基因间长非编码RNA FIRRE序列上含有多个长度在67~804 bp的重复序列, 能够通过结合核基质蛋白hnRNPU作为分子支架调控X、2、9、15、17号染色体的空间定位<sup>[53]</sup>。CCAT1-L是一条来源于超级增强子的lncRNA, 在结肠癌中特异性高表达。与其他低表达的增强子lncRNA不同, CCAT1-L具有特定的转录方向和poly(A)尾巴, 定位在其转录位点附近, 通过特异性结合染色质结构维持蛋白CTCF, 参与维持染色质高级结构, 实现对MYC基因转录的调控<sup>[54]</sup>。此外, lncRNA还可以直接与DNA互补配对, 在染色体局部形成R-loop结构。这一DNA-RNA杂交结构能够改变附近DNA的开放程度, 影响基因组的稳定性或改变基因转录时的Pol II的转录速度<sup>[7,55]</sup>。另有报道显示, 短时形成的R-loop结构能够招募互作蛋白调控基因表达。如在小鼠胚胎干细胞中, lncRNA TARID在TCF21基因启动子的CpG岛区形成R-loop, 招募GADD45A蛋白与DNA去甲基酶TET1, 从而促进TCF21的表达<sup>[56]</sup>。

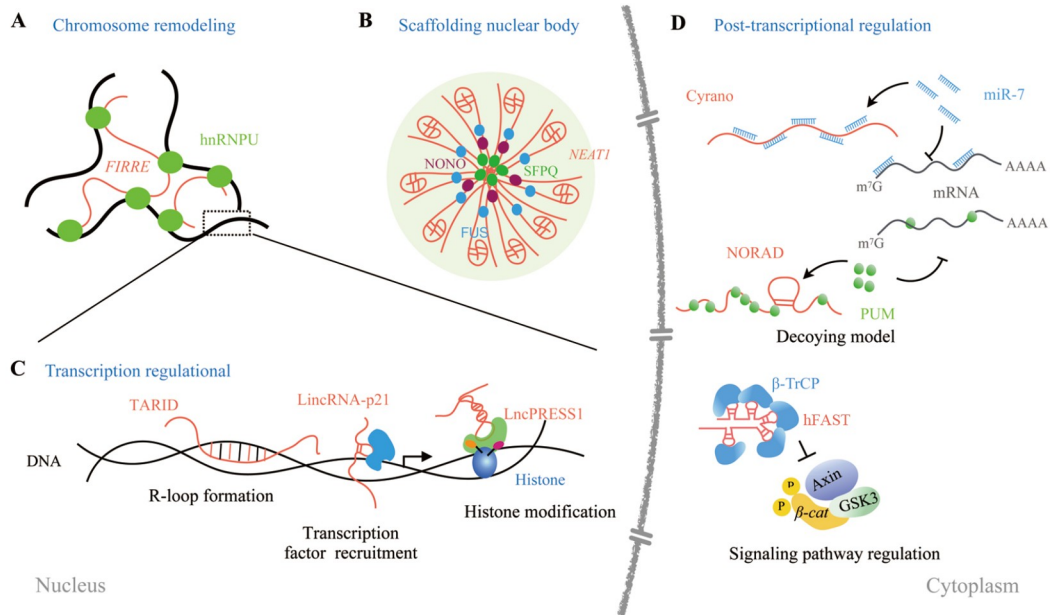


图2 LncRNA的代表性功能机理  
A: 参与染色体结构重塑; B: 参与细胞核亚结构组装与功能调控; C: 通过形成R-loop结构、招募转录因子、调控组蛋白修饰等方式参与基因转录调控; D: 以与mRNA竞争性结合RNA结合蛋白或miRNA, 通过调控细胞内信号通路等方式参与转录后基因表达调控

## 2.2 调控细胞核亚结构组装

真核生物细胞核高度组织化,在复杂的基因组结构的基础上,还会形成包括细胞核仁、核斑、旁斑、Cajal小体、PWS区域等在内的多种无膜亚结构域,它们与三维基因组互作,共同维持细胞核结构与功能稳态。研究显示,lncRNA参与了多种细胞核亚结构的有序组装与功能调控。

LncRNA NEAT1是核旁斑结构的重要组织者<sup>[57-59]</sup>。在加工过程中,NEAT1被选择性剪接成短异构体NEAT1\_1和长异构体NEAT1\_2两种形式<sup>[57-59]</sup>。NEAT1\_2的3'端具有U-A-U三螺旋结构,通过其中间区域(8~16.6 kb),尤其是12~13 kb和15.4~16.6 kb的区域招募旁斑的核心蛋白NONO和SFPQ,参与核斑的组装<sup>[60]</sup>。值得一提的是,NEAT1参与的核旁斑组装与线粒体功能具有交叉调控机制,提示lncRNA可能具有跨区域调控的功能<sup>[61]</sup>。此外,Sno-lncRNA与SPA是PWS区的重要组分,参与招募多个剪接因子调控基因表达<sup>[11,12]</sup>;细胞核斑中的MALAT1通过与PTBP1、PSF等剪接因子互作,招募多个转录因子定位于核斑中,参与pre-mRNA的剪接加工<sup>[62]</sup>;细胞核仁中的SLERT通过招募DDX21解旋酶,以分子伴侣的形式调控DDX21结构由开放状态变为闭合状态,帮助维持细胞核仁结构并促进RNA聚合酶I(RNA polymerase I, Pol I)介导的核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)转录<sup>[63,64]</sup>。有研究显示,细胞受到的外界刺激能够诱导SAT III等重复序列lncRNA表达,通过形成核应激小体参与炎症反应抑制,相关功能机理还有待进一步解析。

## 2.3 基因表达的转录调控

尽管前述的在染色质重塑与细胞核亚结构组装中的功能都显示了lncRNA重要的基因转录调控作用,但其转录水平的调控机制远不止于此。很多基因编码区域能够转录反义非编码转录本,通过招募重要蛋白质来调控邻近编码基因的表达。这一机制在p53介导的肿瘤抑制中发挥重要作用,p53的表达能够激活长基因间非编码RNA lincRNA-p21的转录,后者通过招募异质核糖核蛋白hnRNP K到p21的启动子区域顺式调控p21的表达,从而抑制肿瘤细胞生长并启动细胞凋亡<sup>[65,66]</sup>。得益于这种邻近基因表达调控机制,尽管lncRNA的序

列保守性相对于mRNA较低,部分lncRNA因为保留了相似的转录位点从而仍然具有进化保守的功能调控机制。同时,lncRNA转录产生后能够易位到细胞核其他位置,通过招募功能蛋白反式调控基因转录。如同样在p53调控网络中,胚胎干细胞特异性表达的lncPRESS1通过将组蛋白去乙酰化酶SIRT6招募到一些干性相关基因的启动子上,上调这些基因的表达来帮助胚胎干细胞维持干性<sup>[67]</sup>。此外,有研究还发现,lncRNA能够竞争性结合转录因子,通过调控转录因子在细胞核内的局部丰度来影响基因转录<sup>[12]</sup>。这些复杂调控机制协同作用,共同维持了细胞内基因的有序表达。

## 2.4 基因表达的转录后调控

转运出核的lncRNA能够在转录后水平反式调控基因表达。目前解析最多的调控机制主要是基于竞争模型来实现的。除了前述竞争性结合核糖体中mRNA进入位点抑制翻译外,还能通过竞争性结合mRNA结合蛋白或miRNA,调控mRNA的功能与稳定性。需要注意的是,lncRNA的表达量通常远低于其互作因子和mRNA分子,因此这种竞争机制的解析需要充分考虑lncRNA与调控因子的相对表达量与拷贝数。除一些高表达的lncRNA外,多数lncRNA通过多价结合互作因子来发挥功能。例如,胞质中lncRNA NORAD通过其序列上的Pumilio结合元件结合大量的Pumilio蛋白形成局部的相分离结构,从而影响Pumilio依赖的RNA翻译,调控基因组稳定性并阻止有丝分裂发生异常<sup>[68,69]</sup>。lncRNA在细胞信号转导中也发挥了重要的作用。lncRNA FAST是FOXO3基因的反义转录本,在胚胎干细胞中高表达。人、猴来源的胚胎干细胞hFAST定位在细胞质内,通过结合泛素连接酶 $\beta$ -TrCP蛋白,使 $\beta$ -TrCP不能降解重要信号通路Wnt中的关键蛋白 $\beta$ -catenin,从而维持Wnt信号通路持续激活以及干细胞的自我更新<sup>[70]</sup>。值得一提的是,尽管FAST基因的基因组位置在进化上保守,但其定位与功能却并不保守。鼠源胚胎干细胞中mFast定位在细胞核内,不能结合 $\beta$ -TrCP,也不参与Wnt信号通路<sup>[70]</sup>。

## 3 环形RNA的生物学功能

尽管目前基于pre-mRNA反向剪接与内含子套



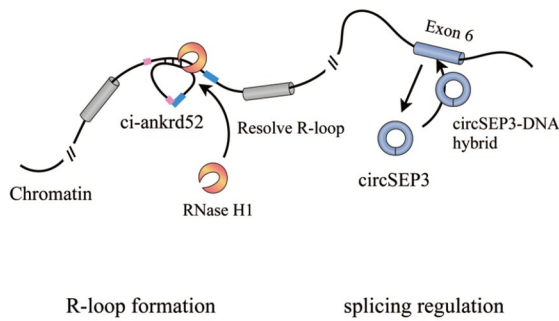
索结构来源的环形RNA生成机制已得到充分研究,但其加工成熟与折叠转运机制的认知不足仍然制约了对其生物学功能和具体分子机制的解析。相较于线性RNA,环形RNA的生成加工特殊、结构复杂、种类多样、稳定性强。近年来研究发现,环形RNA在多个物种和多种生命过程中发挥重要作用,涵盖了免疫调控、肿瘤代谢、神经功能和生殖发育等方面。我们在此讨论环形RNA的代表性生物学功能及机制(图3)。

### 3.1 转录加工水平调控

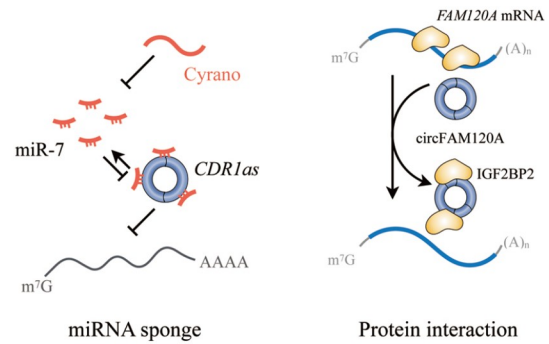
与lncRNA的核滞留偏好性不同,环形RNA在完成折叠加工后绝大多数会被转运到细胞质中,核内环形RNA的含量很少。尽管如此,细胞核里

的ciRNA与少量circRNA在生成过程中仍然能够通过亲本DNA互作,在基因转录与加工过程中发挥重要作用。例如,内含子来源的ci-ankrd52环形RNA能够与亲本基因在其转录位点处形成R-loop结构,诱导核酸内切酶RNase H1切割ci-ankrd52来提高转录区域的DNA开放性,从而促进亲本基因的转录延伸<sup>[13,44]</sup>;外显子反向剪接形成的环形RNA circSEP3与其转录位点处DNA形成R-loop后,会使该处转录产生的mRNA在剪接过程中发生外显子跳跃<sup>[71]</sup>。这种对于基因转录与加工的调控也能通过分子海绵形式吸附互作蛋白质来进行。例如,环形RNA circMbl序列中包含多个多功能盲肌蛋白MBL的结合位点,通过与MBL蛋白结合形成反馈

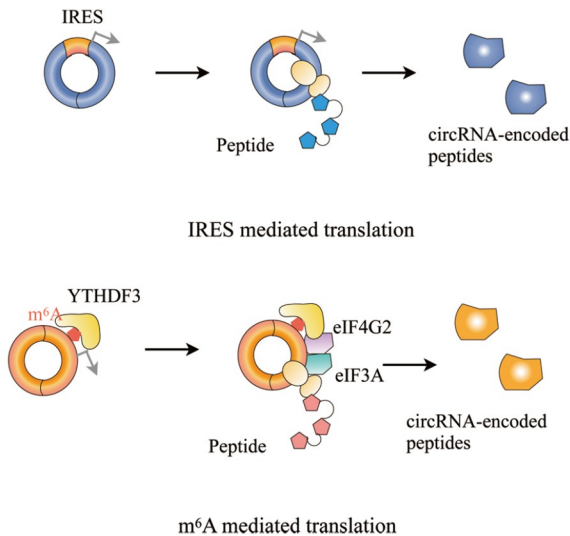
#### A Transcriptional regulation



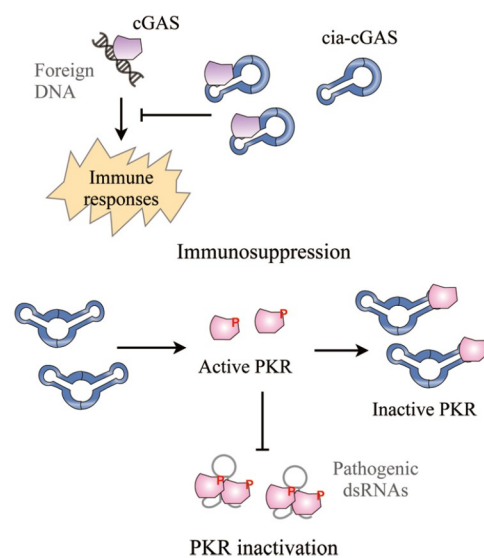
#### B Post-transcriptional regulation



#### C Translation



#### D Innate immune regulation



A: 通过形成R-loop结构参与基因转录与剪接; B: 通过分子海绵或与mRNA竞争性结合蛋白质参与转录后调控; C: 部分环形RNA可以利用IRES或m<sup>6</sup>A修饰进行翻译; D: 环形RNA可以通过结合免疫因子如cGAS、PKR等参与天然免疫调控

图3 环形RNA代表性功能机理

调节通路。一方面, MBL表达升高会促进circMbl的反向剪接, 诱导circMbl的产生; 另一方面, 高表达的circMbl会吸附隔离MBL蛋白, 影响其行使正常的生物学功能<sup>[39]</sup>。

### 3.2 转录后水平调控

得益于环形RNA的高稳定性与细胞质定位的偏好性, 这种分子海绵的功能机理在转录后水平更为常见。与lncRNA的竞争模型类似, circRNA作为分子海绵也通常是通过一对多的形式进行的。例如, 通过吸附大量的miRNA, 抑制miRNA对靶mRNA的降解作用<sup>[72]</sup>。一个很好的例子是CDR1as, 一种在哺乳动物大脑中广泛表达的环形RNA, 其序列中含有超过70个miR-7保守结合位点, 能够作为miR-7的分子海绵, 阻断miR-7对下游基因的表达抑制<sup>[73]</sup>。动物实验表明, Cdr1as缺陷小鼠中miR-7和miR-671都被错误调控, 表现出兴奋性突触传递功能障碍, 并伴随脉冲前惊恐反应抑制功能严重受损<sup>[73]</sup>。此外, 睾丸特异性表达的circSRY含有16个miR-138结合位点, 通过竞争性结合miR-138调控精子细胞内H2AX mRNA的表达, 从而参与精子发生。CircSRY缺失会造成精子细胞凋亡, 附睾内精子数量减少<sup>[72,74]</sup>。

环形RNA也能够通过直接与mRNA互作, 或竞争性结合mRNA互作蛋白来参与转录后调控。作为已报道可翻译的环形RNA之一, circZNF609不仅可以通过翻译产生多肽来调控成肌细胞增殖, 还被证明可以与CKAP5、UPF2、SRRM1等基因的多个mRNA互作, 通过将ELAVL1蛋白运载到互作mRNA上, 帮助维持mRNA的稳定性与翻译效率。这一功能被认为参与了癌细胞中微管功能的维持<sup>[75,76]</sup>。由FAM120A mRNA前体的第2-第5个外显子反向剪接而成的circFAM120A, 通过与FAM120A mRNA竞争性结合翻译抑制因子IGF2BP2, 促进FAM120A蛋白的翻译和细胞增殖<sup>[43]</sup>。值得注意的是, circFAM120A和FAM120A mRNA与IGF2BP2的竞争性结合主要发生在单体核糖体上, circFAM120A上的m<sup>6</sup>A修饰增加了其与IGF2BP2结合的亲和力<sup>[43]</sup>。

### 3.3 环形RNA的翻译

除了上述的非编码功能, 部分环形RNA还被报道可以通过翻译多肽来发挥功能。环形RNA不含帽子结构, 因此使用非帽依赖的翻译机制。目

前报道的环形RNA翻译机制有两种。一种是内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)介导的翻译机制。IRES序列能够不依赖于帽子结构, 直接插入核糖体进入位点启动翻译。前述的circZNF609就是利用这一机制翻译多肽的。有趣的是, 在细胞发生热休克应激后, circZNF609的IRES活性能够被显著上调, circZNF609翻译的多肽产量增加。这一现象表明, 环境压力和环形RNA翻译启动之间可能存在相关性<sup>[75]</sup>。另外一个证据是, 在热休克条件下, circFGFR1可以翻译出多肽circFGFR1p, 通过负调控FGFR1的功能抑制细胞增殖<sup>[77]</sup>。此外, 将IRES元件引入体外合成的环形RNA也能够启动蛋白质翻译, 这为开发基于环形RNA的药物和蛋白质替代疗法提供了可能性。另一种环形RNA的翻译机制是由m<sup>6</sup>A修饰介导的。这种环形RNA的翻译机制依赖于eIF4G2和eIF3A等翻译因子和m<sup>6</sup>A阅读器YTHDF3。虽然m<sup>6</sup>A启动翻译的具体机制尚未完全清楚, 但已知需要甲基转移酶METTL3、METTL14和肿瘤相关蛋白Wilm的参与<sup>[78]</sup>。

### 3.4 调控天然免疫

近年来对环形RNA的研究发现, 其在天然免疫调控方向上具有独特的功能。环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)是调控天然免疫的重要蛋白质因子, 能够通过识别病原微生物的DNA来激活I型干扰素的表达。细胞核内的环形RNA cia-cGAS是cGAS的拮抗剂, 能够与DNA竞争性结合cGAS蛋白, 使细胞在生理状态下表现为免疫沉默状态<sup>[79]</sup>。此外, 通过解析环形RNA降解和折叠的机理发现, 内源环形RNA易形成16~26 bp双链茎环结构, 在细胞被双链RNA病毒感染时可被核酸内切酶RNase L降解<sup>[80]</sup>。进一步研究发现, 其可以通过结合免疫因子PKR, 抑制PKR的磷酸化激活, 从而参与天然免疫调控<sup>[80]</sup>。更重要的是, 环形RNA-PKR通路在自身免疫疾病系统性红斑狼疮病人中失调, 而增加环形RNA表达可降低系统性红斑狼疮病人外周血单核细胞中的PKR异常激活及下游免疫信号通路, 为利用环形RNA开展自身免疫疾病的诊疗提供了新理论基础<sup>[80]</sup>。另外, 有研究证明, 体外合成的环形RNA具有低免疫原性<sup>[16]</sup>, 在治疗银屑病、阿尔兹海默症等PKR



异常激活相关的炎症疾病中具有很好的应用价值<sup>[17,18]</sup>。这些研究成果为利用环形RNA作为核酸适配体开展疾病治疗的新型药物开发奠定了理论基础和技术依据。

## 4 LncRNA与环形RNA的基础研究瓶颈与展望

得益于测序与成像技术的发展迭代和多学科交叉手段的应用, lncRNA与环形RNA的研究进入了新时期, 同时促进了RNA生物学在生物医药领域的应用。近年来, 人工智能技术的出现进一步催化了这一进程。在深入挖掘lncRNA、环形RNA代谢与功能机理的同时, 也产生了一系列新的问题。我们从信息解码、在体追踪、结构解析、功能探索角度总结了lncRNA与环形RNA目前的研究现状与瓶颈, 并展望了未来的发展方向。

### 4.1 LncRNA与环形RNA的信息解码

LncRNA多转录自基因组中进化速度快的非编码区域, 序列信息相较于mRNA更为复杂, 常包含长串的功能重复序列, 选择性剪接产生的异构体数量也更多<sup>[81,82]</sup>, 这一特点使得常规RNA测序很难准确读取lncRNA序列信息。近年来, 长读测序的出现为解决重复序列lncRNA的解码问题提供了可能性<sup>[83]</sup>, 但目前为止这一技术仍然很难分析无poly(A)尾的lncRNA, 需要进一步优化。对于环形RNA来说, 其序列信息很难与同源线性RNA准确区分, 同时反相剪接位点的选择差异会造成同一基因位点转录产生多个环形RNA分子<sup>[36]</sup>。这些难点的攻克亟需针对环形RNA的测序分析技术的开发与优化。目前如CIRCexplorer2等环形RNA解析算法的开发很好地解决了环形RNA的序列信息注释, 但准确性还有待进一步优化<sup>[84]</sup>。此外, lncRNA与环形RNA的表达量低, 组织细胞差异性大, 如何进一步提高微量RNA的测序准确性, 发展针对lncRNA与环形RNA的单细胞测序技术也是目前技术上需要解决的难题。

在表观遗传信息领域, 目前对于lncRNA与环形RNA的研究还很有限。这一方面归因于大多数RNA修饰类型难以被有效捕捉, 另一方面在于这些非编码RNA的表达量较低, 难以同时进行RNA分子类型与修饰类型的富集。RNA修饰被证明在改变RNA的折叠结构、调控RNA互作功能和影响

RNA免疫原性等方面发挥重要作用<sup>[85,86]</sup>。而这些也正是lncRNA与环形RNA作为细胞功能调控因子发挥功能的关键元素, 因此深入解析其修饰信息至关重要。未来这一问题的解决需要结合化学生物学手段, 实现对修饰分子的高效富集。

### 4.2 LncRNA与环形RNA的在体追踪

RNA的精准亚细胞定位决定了其功能的正确行使。由于lncRNA与环形RNA在细胞内的拷贝数低, 定位随生成与代谢过程动态变化, 因此很难精准追踪。特别是环形RNA的序列在除反向剪接位点外与同源线性RNA完全相同, 如何去除同源线性RNA的影响仍然是领域内的一个难题。近年来, 多种RNA追踪技术的建立在显著放大了RNA信号的同时提高了信噪比, 大大提高了RNA追踪的精准度<sup>[87]</sup>。如滚环扩增技术通过原位扩增RNA分子, 提高局部RNA的表达量来实现对于弱RNA信号的标记; RNAscope技术通过酶促反应放大RNA标记探针的信号<sup>[87]</sup>。值得一提的是, 近几年发展起来的膨大显微成像技术能够通过水凝胶膨胀实现对多种细胞内生物信号的放大<sup>[88]</sup>, 其在RNA示踪中的应用有望进一步提高成像分辨率。

尽管如此, 上述成像技术都基于固定细胞, 难以实现RNA的在体动态追踪。前期的RNA动态追踪主要利用MS2-MCP、PP7-PCP等基于适配体的技术, 然而这些技术需要在目标位点插入大片段重复序列, 可能会对RNA的表达与定位产生影响<sup>[87]</sup>。近年来, Broccoli、pepper等小片段荧光RNA分子探针和基于CRISPR-Cas系统的RNA标记技术进一步丰富了RNA动态示踪的方法<sup>[87]</sup>。特别是CRISPR-dCas13系统的建立与优化能够实现对多类型RNA的多色成像<sup>[89,90]</sup>与在体成像<sup>[91]</sup>。然而, 目前这一技术对于非重复序列RNA的追踪分辨率还不理想, 引入的外源蛋白与标记探针对于RNA定位的影响还有待进一步分析。未来充分挖掘新型RNA动态示踪方法、优化标记探针的标记效率、筛选小分子标记蛋白、降低标记系统的细胞毒性实现对于环形RNA的精准标记将是RNA动态追踪领域的重要工作。

### 4.3 LncRNA与环形RNA的结构解析

对lncRNA与环形RNA的结构解析目前主要利用X射线晶体衍射、核磁共振、冷冻电镜等生物物

理学方法。然而, 由于这些RNA分子的结构受外界环境的影响很大, 目前完成结构解析的lncRNA与环形RNA分子数量还十分有限, 多数RNA分子的高级结构依赖于在特定环境下的结构预测。如何提高结构预测的准确性是下一步需要考虑的问题。SHAPE-MaP技术能够利用化学修饰探针通过检测亲电试剂对不同状态碱基的修饰活性差异来预测RNA二级结构, 但是预测准确性需要结合实验来验证<sup>[92]</sup>。更高维度的RNA结构预测需要基于计算机的深度学习与建模来实现。近年来, 人工智能技术在RNA高级结构的预测中展现出了巨大的潜力。例如, 斯坦福大学研究团队基于AI开发的ARES算法能够通过学习少量已知的RNA结构在一定程度上预测RNA的三维结构<sup>[93]</sup>。下一步需要将lncRNA与环形RNA的高级结构与功能机制挖掘结合起来, 让结构信息帮助理解这些RNA分子的功能机理。

#### 4.4 lncRNA与环形RNA的功能探索

目前, 对于lncRNA与环形RNA的功能解析多局限于单个分子的研究, 而作为生命活动的重要调控因子, lncRNA与环形RNA的功能与其所在的生理环境密不可分。如何综合研判RNA与三维基因组、RNA与互作因子、RNA与所处局部理化环境的动态空间关系是解码这些非编码RNA在体真实功能的重要基础。近十年来, 基于抗原抗体反应的RNA免疫共沉淀实验提供了海量的RNA互作数据, 未来需要进一步对其进行分析与验证, 挖掘真实可信的互作信息。进一步, Hi-C等空间转录组学的应用在更高分辨率上提供了RNA与三维基因组的位置关系<sup>[94]</sup>; 将基于CRISPR-Cas的RNA、DNA标记技术与蛋白免疫染色联用可以将这一空间关系可视化<sup>[95]</sup>。如何在体动态观测这些因子的空间位置变化、提高互作关系解析的分辨率将是下一步的研究重点。

## 5 总结

近年来对lncRNA与环形RNA的研究产生了很多的突破性进展, 它们的生成加工、细胞定位、折叠代谢与生物学功能被大量挖掘, 在生命活动的几乎所有过程发挥重要的调控作用。然而, 目前对于lncRNA与环形RNA的认知仅是冰山一角。受限于其表达量低、组织细胞差异大、折叠复

杂、动态结构多变, 对于这两类非编码RNA的研究在技术上存在很大的挑战。尽管如此, 我们仍然看到研究技术的革新, 特别是多学科交叉的研究手段的使用和人工智能的开发对于领域的推动作用。越来越多新类型、新变体、新修饰的lncRNA与环形RNA被挖掘, 并展现了独特的生物学特性。值得一提的是, 多种lncRNA、环形RNA和基于他们的功能结构域人工合成的RNA元件在临床重大疾病的诊疗上展现出了重要的应用潜力, 能够靶向蛋白药物与小分子药物不能触及的致病位点。虽然在RNA分子的稳定性、递送方法、免疫原性等方面还有待进一步优化, 但基于RNA的新型药物无疑将在生物医药领域发挥重要的作用。未来, 我们需要在这一领域持续深耕, 在全面认知lncRNA与环形RNA代谢与功能的同时, 让其更好地服务于人民生命健康发展。

## 参考文献

- [1] Pennisi E. Shining a light on the genome's 'dark matter'. *Science*, 2010, 330(6011): 1614
- [2] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1775-1789
- [3] Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, et al. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(1): 28-36
- [4] Frankish A, Diekhans M, Jungreis I, et al. Gencode 2021. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D916-D923
- [5] Uszczynska-Ratajczak B, Lagarde J, Frankish A, et al. Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(9): 535-548
- [6] Fang SS, Zhang LL, Guo JC, et al. NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D308-D314
- [7] Statello L, Guo CJ, Chen LL, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 96-118
- [8] Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*, 2005, 308(5725): 1149-1154
- [9] Wu Q, Kim YC, Lu J, et al. Poly A-transcripts expressed in heLa cells. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2803
- [10] Yang L, Duff MO, Graveley BR, et al. Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome Biol*, 2011, 12(2): R16

- [11] Yin QF, Yang L, Zhang Y, et al. Long noncoding RNAs with snoRNA ends. *Mol Cell*, 2012, 48(2): 219-230
- [12] Wu H, Yin QF, Luo Z, et al. Unusual processing generates SPA lncRNAs that sequester multiple RNA binding proteins. *Mol Cell*, 2016, 64(3): 534-548
- [13] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792-806
- [14] Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 2014, 159(1): 134-147
- [15] Moráňová L, Bartošík M. Long non-coding RNAs—current methods of detection and clinical applications. *Klin Onkol*, 2019, 32(S3): 65-71
- [16] Liu CX, Guo SK, Nan F, et al. RNA circles with minimized immunogenicity as potent PKR inhibitors. *Mol Cell*, 2022, 82(2): 420-434.e6
- [17] Guo SK, Liu CX, Xu YF, et al. Therapeutic application of circular RNA aptamers in a mouse model of psoriasis. *Nat Biotechnol*, 2024. Doi: 10.1038/s41587-024-02204-4
- [18] Feng X, Jiang B, Zhai SN, et al. Circular RNA aptamers ameliorate Alzheimer's disease-relevant phenotypes by targeting PKR. *bioRxiv*, 2024
- [19] Wu H, Yang L, Chen LL. The diversity of long noncoding RNAs and their generation. *Trends Genet*, 2017, 33(8): 540-552
- [20] Melé M, Mattioli K, Mallard W, et al. Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs. *Genome Res*, 2017, 27(1): 27-37
- [21] Schlackow M, Nojima T, Gomes T, et al. Distinctive patterns of transcription and RNA processing for human lincRNAs. *Mol Cell*, 2017, 65(1): 25-38
- [22] Lagarde J, Uszczynska-Ratajczak B, Carbonell S, et al. High-throughput annotation of full-length long noncoding RNAs with capture long-read sequencing. *Nat Genet*, 2017, 49(12): 1731-1740
- [23] Guo CJ, Xu G, Chen LL. Mechanisms of long noncoding RNA nuclear retention. *Trends Biochem Sci*, 2020, 45(11): 947-960
- [24] Nair L, Chung H, Basu U. Regulation of long non-coding RNAs and genome dynamics by the RNA surveillance machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(3): 123-136
- [25] Zuckerman B, Ron M, Mikl M, et al. Gene architecture and sequence composition underpin selective dependency of nuclear export of long RNAs on NXF1 and the TREX complex. *Mol Cell*, 2020, 79(2): 251-267
- [26] Carlevaro-Fita J, Rahim A, Guigó R, et al. Cytoplasmic long noncoding RNAs are frequently bound to and degraded at ribosomes in human cells. *RNA*, 2016, 22(6): 867-882
- [27] Patraquim P, Magny EG, Pueyo JI, et al. Translation and natural selection of micropeptides from long non-canonical RNAs. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6515
- [28] Rackham O, Shearwood AMJ, Mercer TR, et al. Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins. *RNA*, 2011, 17(12): 2085-2093
- [29] Li S, Li Y, Chen B, et al. exoRBase: a database of circRNA, lncRNA and mRNA in human blood exosomes. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D106-D112
- [30] Tani H, Mizutani R, Salam KA, et al. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res*, 2012, 22(5): 947-956
- [31] Wilusz JE, Freier SM, Spector DL. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell*, 2008, 135(5): 919-932
- [32] Wilusz JE, JnBaptiste CK, Lu LY, et al. A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev*, 2012, 26(21): 2392-2407
- [33] Jolly C, Metz A, Govin J, et al. Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol*, 2004, 164(1): 25-33
- [34] Zhang N, Tang W, Torres L, et al. Cell surface RNAs control neutrophil recruitment. *Cell*, 2024, 187(4): 846-860.e17
- [35] Zhang Y, Xue W, Li X, et al. The biogenesis of nascent circular RNAs. *Cell Rep*, 2016, 15(3): 611-624
- [36] Liu CX, Chen LL. Circular RNAs: characterization, cellular roles, and applications. *Cell*, 2022, 185(12): 2016-2034
- [37] Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer. *Cell*, 2019, 176(4): 869-881
- [38] Starke S, Jost I, Rossbach O, et al. Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep*, 2015, 10(1): 103-111
- [39] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66
- [40] Huang C, Liang D, Tatomer DC, et al. A length-dependent evolutionarily conserved pathway controls nuclear export of circular RNAs. *Genes Dev*, 2018, 32(9-10): 639-644
- [41] Ngo LH, Bert AG, Dredge BK, et al. Nuclear export of circular RNA. *Nature*, 2024, 627(8002): 212-220
- [42] Cao SM, Wu H, Yuan GH, et al. Altered nucleocytoplasmic export of adenosine-rich circRNAs by PABPC1 contributes to neuronal function. *Mol Cell*, 2024, 84(12): 2304-2319
- [43] Li S, Li X, Xue W, et al. Screening for functional circular RNAs using the CRISPR-Cas13 system. *Nat Methods*,



- 2021, 18(1): 51-59
- [44] Li X, Zhang JL, Lei YN, et al. Linking circular intronic RNA degradation and function in transcription by RNase H1. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(11): 1795-1809
- [45] Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(6): 430-447
- [46] Engreitz JM, Pandya-Jones A, McDonel P, et al. The xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science*, 2013, 341(6147): 1237973
- [47] Markaki Y, Chong JG, Wang Y, et al. Xist nucleates local protein gradients to propagate silencing across the X chromosome. *Cell*, 2021, 184(25): 6212
- [48] Jeon Y, Lee JT. YY1 tethers xist RNA to the inactive X nucleation center. *Cell*, 2011, 146(1): 119-133
- [49] McHugh CA, Chen CK, Chow A, et al. The xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature*, 2015, 521(7551): 232-236
- [50] Pintacuda G, Wei G, Roustan C, et al. hnRNPK recruits PCGF3/5-PRC1 to the Xist RNA B-repeat to establish polycomb-mediated chromosomal silencing. *Mol Cell*, 2017, 68(5): 955-969
- [51] Chen CK, Blanco M, Jackson C, et al. Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing. *Science*, 2016, 354(6311): 468-472
- [52] Zhang LF, Huynh KD, Lee JT. Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell*, 2007, 129(4): 693-706
- [53] Hacisuleyman E, Goff LA, Trapnell C, et al. Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(2): 198-206
- [54] Xiang JF, Yin QF, Chen T, et al. Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus. *Cell Res*, 2014, 24(5): 513-531
- [55] Wang KC, Yang YW, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, 2011, 472(7341): 120-124
- [56] Arab K, Karaulanov E, Musheev M, et al. GADD45A binds R-loops and recruits TET1 to CpG island promoters. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 217-223
- [57] Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell*, 2009, 33(6): 717-726
- [58] Mao YS, Sunwoo H, Zhang B, et al. Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(1): 95-101
- [59] Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, et al. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J*, 2012, 31(20): 4020-4034
- [60] Yamazaki T, Souquere S, Chujo T, et al. Functional domains of NEAT1 architectural lncRNA induce paraspeckle assembly through phase separation. *Mol Cell*, 2018, 70(6): 1038-1053
- [61] Wang Y, Hu SB, Wang MR, et al. Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(10): 1145-1158
- [62] Miao H, Wu F, Li Y, et al. MALAT1 modulates alternative splicing by cooperating with the splicing factors PTBP1 and PSF. *Sci Adv*, 2022, 8(51): eabq7289
- [63] Xing YH, Yao RW, Zhang Y, et al. SLERT regulates DDX21 rings associated with Pol I transcription. *Cell*, 2017, 169(4): 664-678
- [64] Wu M, Xu G, Han C, et al. lncRNA *SLERT* controls phase separation of FC/DFCs to facilitate Pol I transcription. *Science*, 2021, 373(6554): 547-555
- [65] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 2010, 142(3): 409-419
- [66] Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, et al. LincRNA-p21 activates p21 in cis to promote polycomb target gene expression and to enforce the G<sub>1</sub>/S checkpoint. *Mol Cell*, 2014, 54(5): 777-790
- [67] Jain AK, Xi Y, McCarthy R, et al. LncPRESS1 is a p53-regulated lncRNA that safeguards pluripotency by disrupting SIRT6-mediated de-acetylation of histone H3K56. *Mol Cell*, 2016, 64(5): 967-981
- [68] Lee S, Kopp F, Chang TC, et al. Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins. *Cell*, 2016, 164(1-2): 69-80
- [69] Elguindy MM, Mendell JT. NORAD-induced Pumilio phase separation is required for genome stability. *Nature*, 2021, 595(7866): 303-308
- [70] Guo CJ, Ma XK, Xing YH, et al. Distinct processing of lncRNAs contributes to non-conserved functions in stem cells. *Cell*, 2020, 181(3): 621-636
- [71] Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A, et al. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nat Plants*, 2017, 3(5): 17053
- [72] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388
- [73] Piwecka M, Glažar P, Hernandez-Miranda LR, et al. Loss

- of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, 2017, 357(6357): eaam8526
- [74] Song Y, Chen M, Zhang Y, et al. Loss of circSRY reduces  $\gamma$ H2AX level in germ cells and impairs mouse spermatogenesis. *Life Sci Alliance*, 2023, 6(2): e202201617
- [75] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22-37
- [76] Rossi F, Beltran M, Damizia M, et al. Circular RNA ZNF609/CKAP5 mRNA interaction regulates microtubule dynamics and tumorigenicity. *Mol Cell*, 2022, 82(1): 75-89
- [77] Chen CK, Cheng R, Demeter J, et al. Structured elements drive extensive circular RNA translation. *Mol Cell*, 2021, 81(20): 4300-4318
- [78] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. *Cell Res*, 2017, 27(5): 626-641
- [79] Rongvaux A, Jackson R, Harman CCD, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell*, 2014, 159(7): 1563-1577
- [80] Liu CX, Li X, Nan F, et al. Structure and degradation of circular RNAs regulate PKR activation in innate immunity. *Cell*, 2019, 177(4): 865-880.e21
- [81] Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 2009, 458(7235): 223-227
- [82] Ulitsky I. Evolution to the rescue: using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(10): 601-614
- [83] Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(10): 597-614
- [84] Zhang XO, Dong R, Zhang Y, et al. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res*, 2016, 26(9): 1277-1287
- [85] Gilbert WV, Bell TA, Schaening C. Messenger RNA modifications: form, distribution, and function. *Science*, 2016, 352(6292): 1408-1412
- [86] Paramasivam A, Vijayashree Priyadharsini J. Novel insights into m6A modification in circular RNA and implications for immunity. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(6): 668-669
- [87] Le P, Ahmed N, Yeo GW. Illuminating RNA biology through imaging. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(6): 815-824
- [88] Pownall ME, Miao L, Vejnar CE, et al. Chromatin expansion microscopy reveals nanoscale organization of transcription and chromatin. *Science*, 2023, 381(6653): 92-100
- [89] Yang LZ, Wang Y, Li SQ, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems. *Mol Cell*, 2019, 76(6): 981-997
- [90] Yang LZ, Gao BQ, Huang Y, et al. Multi-color RNA imaging with CRISPR-Cas13b systems in living cells. *Cell Insight*, 2022, 1(4): 100044
- [91] Huang Y, Gao BQ, Meng Q, et al. CRISPR-dCas13-tracing reveals transcriptional memory and limited mRNA export in developing zebrafish embryos. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 15
- [92] Guo SK, Nan F, Liu CX, et al. Mapping circular RNA structures in living cells by SHAPE-MaP. *Methods*, 2021, 196: 47-55
- [93] Townshend RJL, Eismann S, Watkins AM, et al. Geometric deep learning of RNA structure. *Science*, 2021, 373(6558): 1047-1051
- [94] Liu Z, Chen Y, Xia Q, et al. Linking genome structures to functions by simultaneous single-cell Hi-C and RNA-seq. *Science*, 2023, 380(6649): 1070-1076
- [95] Yang LZ, Min YH, Liu YX, et al. CRISPR-array-mediated imaging of non-repetitive and multiplex genomic loci in living cells. *Nat Methods*, 2024. doi: 10.1038/s41592-024-02333-3