

· 药咖论坛 ·

环状寡核苷酸的合成及应用研究进展

朱文轩^{1,2}, 吴成秋¹, 赵树华², 于丽佳^{2*}

(1. 南华大学衡阳医学院公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 国家卫生健康委职业安全卫生研究中心, 北京 102308)

[摘要] 环状寡核苷酸因其独特的拓扑学结构和酶学稳定性而具有重要的生物学功能和应用价值。综述先对环状寡核苷酸的合成方法进行系统阐述, 包括酶合成法和化学合成法。酶合成法以其温和的反应条件、良好的生物相容性和专一性受到广泛关注; 化学合成法则能够实现修饰核酸序列或核酸类似物的环合, 有效弥补了酶法环合的不足。此外, 综述还深入探讨了环状寡核苷酸在近年来的应用, 包括环状适配体、环状反义寡核苷酸、环状小干扰 RNA 和其他环状 RNA 等领域。这些研究展示了环状寡核苷酸在疾病治疗和生命科学领域中的巨大潜力, 为未来的研究提供了重要参考。

[关键词] 环状寡核苷酸; 合成; 核酸; 适配体; 疫苗

[中图分类号] Q524

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2024) 08-0592-13

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2024.08.004

Research Progress on Synthesis and Application of Cyclic Oligonucleotides

ZHU Wenxuan^{1,2}, WU Chengqiu¹, ZHAO Shuhua², YU Lijia²

(1. School of Public Health, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. National Center for Occupational Safety and Health, Beijing 102308, China)

[Abstract] Cyclic oligonucleotides have important biological functions and application value due to their unique topological structure and enzymatic stability. This review provides a systematic exposition of various synthesis techniques employed for the production of cyclic oligonucleotides, encompassing both enzymatic and chemical synthesis. Due to its gentle reaction conditions, favorable biocompatibility, and specificity, enzymatic synthesis has gained considerable interest. Meanwhile, chemical synthesis enables the cyclization of modified nucleic acid sequences or nucleic acid analogues, and effectively compensates for the shortcomings of enzymatic cyclization. This review also explores recent advancements in the application of cyclic oligonucleotides, such as cyclic aptamers, circular antisense oligonucleotides, cyclic small interfering RNA, and other circular RNAs. These studies underscore the significant potential of cyclic oligonucleotides in the realms of disease treatment and life sciences, offering valuable insights for future investigations.

[Key words] cyclic oligonucleotide; synthesis; nucleic acid; aptamer; vaccine

核酸, 作为构成生命的基石之一, 是由众多核苷酸单体聚合而成的复杂生物大分子, 普遍存在于动植物细胞和微生物中。其形态多样, 大小各异, 小到仅含数个碱基的寡核苷酸, 大到长达 3.2 cm 的染色体 DNA。寡核苷酸以多种形式存在于自然界中^[1], 根据末端的结构特征, 可以分为线性和环状寡核苷酸。线性寡核苷酸具有游离的末端, 而环状寡核苷酸是一类由磷酸二酯键首尾相连的闭环单链核酸, 缺乏 3' 末端多聚腺苷酸尾部和 5' 末端帽子^[2]。与传

统的线性寡核苷酸不同, 环状寡核苷酸分子呈封闭环状结构, 不受核酸外切酶影响, 具有结构稳定、序列保守以及在细胞或组织中特异性表达的特点, 逐渐成为研究的新焦点。这些特性不仅为癌症治疗提供了新的策略^[3], 还使环状寡核苷酸成为潜在的生物标志物^[4], 广泛用于早期癌症的检测、临床诊断、预后评估以及治疗反应的监测等。环状寡核苷酸特有的表达模式、分子稳定性以及在人体各细胞间的广泛分布, 使得它们能相对容易地通过体液活检(包括血液、痰液和尿液)进行检测和定量^[5]。

自 1976 年 Sanger 等^[6] 在植物类病毒中首次发现环状核酸分子以来, 随着高通量测序和生物信息学分析技术的飞速发展, 研究者们已在古生菌^[7]、疟原虫^[8]、果蝇^[9]、哺乳动物^[10] 乃至人类^[11] 等多

接受日期: 2024-06-17

项目资助: 国家自然科学基金 (No. 21907021)

*** 通信作者:** 于丽佳, 副研究员;

研究方向: 核酸修饰与功能分析;

E-mail: yulijia@bjmu.edu.cn

种生物中发现了大量的环状核酸。这些环状核酸分子通常较长(核苷酸长度一般超过 300 nt), 然而, 生物体内同样存在由少数核苷酸构成的环状寡核苷酸。近年来, 对于环状寡核苷酸的研究日益受到关注, 科研人员已成功设计出具有多种功能的环状寡核苷酸, 并在核酸药物、核酸探针以及 DNA 纳米结构构建等领域取得了显著的应用成果^[12-14]。

环状寡核苷酸合成方法主要包括酶法合成和化学法合成。酶法合成因酶的生物相容性好和环合产率高而成为首选方法。化学合成法则以其灵活多变的选择性脱颖而出, 通过精心设计不同的连接反应, 可实现理想产物的有效合成, 因此同样受到研究者的广泛关注。本文旨在重点综述环状寡核苷酸的合成方法, 并深入探讨其在环状适配体、环状反义寡核苷酸(cyclic antisense oligonucleotides, cASOs)、环状小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 以及其他环状 RNA 等领域中的广泛应用。

1 环状寡核苷酸的合成方法

环状寡核苷酸的来源分为两大类: 一类是天然存在的环状寡核苷酸, 如环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷、环二鸟苷酸、环二腺苷酸和环鸟苷酸腺苷酸等, 它们具有明确的结构, 并在生物体内的细胞信号传导、基因表达调控中扮演关键角色; 另一类是人工合成的环状寡核苷酸(本文所提到的环状寡核苷酸长度不局限于 20 nt 以内), 合成方法主要分为酶法合成和化学法合成^[15]。无论是天然存在还是人工合成的环状寡核苷酸, 都具有独特的结构和功能, 均可为生物医药领域的研究和应用提供新的视角和工具。本文将进一步展开讨论环状寡核苷酸的合成方法。

1.1 酶法合成环状寡核苷酸

酶法环合寡核苷酸是用酶如 T4 DNA 连接酶、T4 RNA 连接酶等直接将寡核苷酸的 5' 端和 3' 端偶联形成磷酸二酯键^[16]。这种方法的显著优势在于, 能够避免在环合产物中引入不必要的化学基团。此外, 由于酶具有生物相容性良好、反应条件温和以及连接效率高等诸多优点, 因此酶法环合寡核苷酸成为首选方法^[17]。在酶的选择上, 存在多种适用于环状寡核苷酸合成的酶, 包括 T4 DNA 连接酶 1、

T4 RNA 连接酶 1、T4 RNA 连接酶 2 和环化连接酶等。这些酶各具特色, 可根据具体需求选择相应的酶进行反应。

1.1.1 利用 T4 DNA 连接酶 1 合成环状寡核苷酸 T4 DNA 连接酶 1 以腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)为辅助因子, 可从双链 DNA、双链 RNA 或 DNA-RNA 杂交链的缺口处将序列两端连接。RNA 的环化通常以单链 RNA 为底物, 为了使这一过程顺利进行, 需要设计一段与 RNA 缺口两端序列互补的寡核苷酸(DNA 或 RNA)作为夹板序列, 也称桥梁序列, 帮助形成局部的双链结构。T4 DNA 连接酶 1 识别该杂交结构后, 催化 RNA 链的 5' 端与 3' 端形成磷酸二酯键, 从而完成 RNA 的环化。此外, T4 DNA 连接酶 1 还适用于体外环合寡核苷酸。在这一过程中, 同样需要设计夹板序列, 优选 DNA 序列。环化反应后, 可利用脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease, DNase)消化未反应的线性寡核苷酸。

早在 1995 年, Chen 等^[18]以线性 RNA 为底物, 借助 DNA 夹板, 在 T4 DNA 连接酶 1 作用下体外合成 453 nt 的环状 RNA, 该研究首次借助内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)元件实现环状 RNA 在真核细胞的翻译。尽管 T4 DNA 连接酶 1 在环化反应中以其精确性和高效性著称, 但这一过程中却存在不容忽视的挑战: 由于酶自身并不表现出显著的熵差异, 除了预期的分子内环化反应, 还可能发生分子间的环合副反应, 产生二聚体、三聚体乃至更高聚体。这些副反应的存在, 不仅可能影响环状寡核苷酸的纯度和结构, 还可能对反应的特异性和效率造成干扰。为了抑制这些分子间副反应, 研究人员已开发出多种应对策略。其中, 对反应条件的精细调控是最常见的解决方法。这包括精确控制底物的浓度、反应温度、镁离子(Mg^{2+})的浓度, 以及优化序列末端的结构。这些手段能有效减少非特异性的分子间结合, 从而提高环状寡核苷酸合成的纯度和产率。例如, An 等^[19]发现, 当线性寡核苷酸浓度分别为 5, 10, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 分子间的环合产率依次降低为 58%, 47% 和 27%, 可见浓度与分子内环合产率呈反比; 当夹板的长度增

加到 20 nt 时, 分子间的聚合显著增加, 证明夹板的长度也会影响环合产率。当同时降低线性寡核苷酸浓度和 Mg^{2+} 浓度时, 分子内环合产率会提高。

Yan 等^[20]开发了 DNA 模板支架, 通过结构合理的设计, 提高了分子内环合产率。首先使用体外筛选技术, 从随机序列 DNA 文库中搜索可连接的 DNA 适配体, 结合 T4 DNA 连接酶 1 后, 通过工程改造该适配体到通用模板 DNA 支架, 以此来指导 T4 DNA 连接酶 1 执行选择性的分子内环化。他们利用自制的模板支架 TDS1.T1, 高效制备了对大肠埃希菌特异性响应的环状脱氧核酶探针。在 10 min 内, 环合产率 Y% 为 94%, 选择性 S% 为 92%。汤新景课题组通过冷冻/冻干/环化的方法高效环合寡聚脱氧核苷酸, 使用低浓度的寡聚脱氧核苷酸和夹板序列形成分子内环状双链, 通过冻干过程维持分子内环状双链结构, 然后加入预冷的水和 T4 DNA 连接酶 1 成功将线性寡核苷酸的环化长度缩短到 20 nt, 发现其产率高达 63%^[21]。Paluzzi 等^[22]为了促进单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 的环合, 设计了一类新的哑铃型序列模板 (命名为 Hm) 以拉近环合序列 2 个末端距离, 结果表明其可提高 12~40 nt 的 ssDNA (命名为 LN) 的环合产率。Hm 链中间部分用于识别将要环合序列 (LN) 的 2 个末端序列 (约 6 nt), LN 加入后, 与 Hm 互补配对, 当加入 T4 DNA 连接酶 1 后, 拉近的序列末端环合。该哑铃型模板有效提高了单链的环合产率, 即使是短至 16 nt 的 ssDNA, 仍然可以实现序列的环合, 而且环合受序列浓度的影响较小, 即使浓度高达 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 产率仍达 97%。由此可见, 通过合理的设计优化, T4 DNA 连接酶 1 的催化效率得到了显著提高。

1.1.2 利用 T4 RNA 连接酶合成环状寡核苷酸 T4 RNA 连接酶是在寡核苷酸环合中广泛应用的酶, 它需以 ATP 作为辅助因子, 通过形成磷酸二酯键将带有 5' 磷酸末端与 3' 羟基末端的单链 RNA 连接起来。其中 T4 RNA 连接酶 1 需设计不完全互补的夹板序列, RNA 夹板需在 2 个末端位置保留 2~3 nt 的单链结构, DNA 夹板需保留较长的单链核苷酸。但是 T4 RNA 连接酶 2 序列 RNA 的环化, 需在线性 RNA 前体的 3' 端添加至少 3 个连续的碱基对, 因此可以应用于不同大小、不同结构 RNA 的环化 (见图 1)。RNA 环合的效率也会受到序列末端结构的影响。Romaniuk 等^[23]研究发现在环合 RNA 时, 末端碱基会影响 T4 RNA 连接酶 1 的连接效率, 即 3' 羟基端碱基的连接效率依次为 $A > C > G > U$, 5' 磷酸基团的连接效率依次为 $pA > pG \approx pC > pU$ 。此外, T4 RNA 连接酶 1 存在分子间连接和分子内环合的竞争关系, 但是通过优化条件, 可以提高分子内环合产率, 从而实现各种长度的寡核苷酸环合。汤新景课题组报道了环状 siRNA 的制备方法, 其中环状正义链的游离 5' 端和 3' 端通过 T4 RNA 连接酶形成磷酸二酯键, 与反义链互补形成环状 siRNA^[24]。这种方法提高了酶的稳定性并降低了脱靶效应, 成功地实现了绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和荧光素酶的基因表达的调控。Sakhabutdinova 等^[25]则利用 T4 RNA 连接酶将 ssDNA 合成环状 DNA, 用于滚环扩增 DNA。尽管滚环扩增技术通常需要 DNA 模板, 但该研究通过利用 T4 RNA 连接酶, 在无模板的情况下成功实现了滚环扩增, 且在 5%~10% 聚乙二醇 4 000 的存在下, 可以观察到环合产率最高, 其中环化的 DNA 长度为 50 nt 扩增效果最佳。

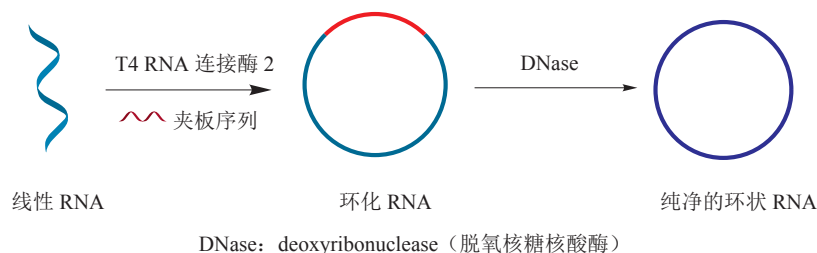


图 1 T4 RNA 连接酶 2 借助夹板序列环化 RNA 的策略图

Figure 1 Strategy of T4 RNA ligase 2 to cyclize RNA with splint sequence

1.1.3 利用环化连接酶合成环状寡核苷酸 环化连接酶为耐热的 RNA 连接酶 1, 可以用于催化 ssDNA 的连接, 但在连接时需加入夹板链以产生互补链^[26]。Li 等^[27]报道了一项创新技术, 该技术利用环化连接酶高效制备出 DNA 单环和复杂的拓扑结构, 突破了天然环化连接酶对 ssDNA 环化的限制。该技术的关键在于设计 ssDNA 末端的杂交结构, 从而引导环化连接酶参与的酶促反应由原本的熵变主导转变为焓变主导, 实现了高效(产率超过 75%)且无副产物的 DNA 单环合成。该技术不仅稳定提高了环化连接酶催化 DNA 成环的产率, 还突破了其对可环化 DNA 片段长度的限制, 已在数百碱基的长链 DNA 中得到了验证。该研究团队还利用环化连接酶预制的 ssDNA 环作为起始材料, 成功组装出高纯度的 DNA 拓扑嵌套结构。此外, Gu 等^[28]使用环化连接酶制备用于脱氧核酶选择的环状 ssDNA 文库, 发现在具有和不具有 5' 端和 3' 端杂交结构的 2 个 145 nt 文库之间的环合产率的明显差异(73% vs 26%)。然而, 环化连接酶的环合产率受 ssDNA 大小的影响, 随着靶 ssDNA 长度的增加, 其产生的环状 DNA 产率显著降低, 特别是当 DNA 超过 100 nt 长度时。尽管如此, 环化连接酶仍广泛应用于催化大于 20 nt 的寡核苷酸环合, 但其价格相对较高, 限制了其在大规模生产中的应用^[29]。

1.1.4 利用其他连接酶合成环状寡核苷酸 除上述内容外, 科研工作者还深入探索了若干能够催化寡核苷酸环化的酶类。举例来说, Ma 等^[30]通过大肠埃希菌 BL21 表达系统成功制备了 ssDNA 连接酶, 其独特之处在于无需添加夹板序列, 即可实现寡核苷酸的环化过程。这种酶特别适用于短链(如核苷酸长度分别为 16, 40 和 60 nt)环状适配体的制备。实验数据显示, 其环合产率远超 T4 RNA 连接酶 1。另外, Chakravarty 等^[31]从大肠埃希菌中分离得到相对分子质量为 45 000 的 RNA 连接酶 RtcB, 该酶与 RNA 损伤修复机制相关。RtcB 能够催化 5' 端与 3' 端的 RNA 缺口形成磷酸二酯键, 从而实现 RNA 的修复。值得一提的是, 该酶在环合过程中需要依赖鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)作为辅助因子。研究人员在不同浓度的 GTP 条件下测试了

RtcB 的环合产率, 结果显示随着 GTP 浓度的提升, 环合产率亦相应提高。

1.2 化学法合成环状寡核苷酸

化学法环合指的是通过温和、简便且高效的化学反应, 将寡核苷酸的两端进行首尾连接。尽管此方法会在环状寡核苷酸中引入非天然基团, 但它有效弥补了酶法合成产量不足的缺陷, 使得含有修饰核苷或核苷类似物的寡核苷酸序列得以环合。此外, 化学法环合连接反应具有较高的选择性, 且合成路径多样, 通过合理的设计, 可以合成出不同结构的目标环状寡核苷酸。常用的化学合成方法包括叠氮-炔点击化学反应成环、羧基和氨基酰胺化反应成环等。

1.2.1 叠氮-炔点击化学反应成环 在化学法环合寡核苷酸领域, 点击化学以其高效、低毒性的特点被广泛应用。具体而言, 点击化学利用铜离子介导催化的叠氮与炔基的环加成反应(copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC), 能迅速形成三氮唑偶联基团^[32](见图 2A)。这一反应被广泛用于标记生物大分子, 如核酸、蛋白质和多糖等^[33]。

早在 2007 年, Ravindra 等^[34]便报道了利用叠氮和炔基基团的点击化学反应来连接寡核苷酸片段。具体方法为: 将 2 条互补的寡核苷酸片段两端分别修饰叠氮和炔基, 然后进行环合反应, 最终成功构建了拟六边形双链 DNA 分子。随后, Yang 等^[35-36]提出了基于 5' 端叠氮化物和 3' 端炔基之间 CuAAC 的高效寡核苷酸环化合成路线。该方法已成功应用于反义链核酸光调控 GFP 表达中。其进一步的研究还优化了具有重复核苷酸序列的合成, 并通过改变寡核苷酸长度和光调控基团表达效果, 得到了更为优化的结构。此外, Rouhanifard 等^[37]利用原位交联点击环化技术, 成功建立了点击放大荧光原位杂交方法, 可用于检测单个核酸分子。值得一提的是, 2021 年 Alnylam 公司报道了 *N*-乙酰半乳糖胺(*N*-acetylgalactosamine, GalNAc)修饰的环状 siRNA 的合成和基因沉默评价^[38]。该方法将 GalNAc 配体修饰在正义链的 3' 末端, 同时引入炔基基团于 3' 端和叠氮基团于 5' 端。利用点击化学环

化正义链后, 通过离子交换高压液相色谱法 (high pressure chromatography, HPLC) 纯化得到环状序列, 产率约为 30%。在体外和体内评估中, GalNAc 修饰的 siRNA 表现出增强的代谢稳定性和降低的脱靶效应。

汤新景课题组通过应用点击化学方法, 成功构建了组织蛋白酶 B (cathepsin B, CB) 激活的 cASOs^[39]。这一过程中, 反义链核酸的 3' 端叠氮和 5' 端炔基被巧妙连接, 同时在中间插入了 CB 敏感的底物肽 Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG)。该课题组利用 3'-氨基修饰的固相可控微孔玻璃 (controlled pore glass, CPG) 合成了反义磷酸化寡核苷酸, 随后在其 5' 端偶联了 *N*-羟基丁二酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide,

NHS) 连接剂, 并进行了叠氮和炔基的功能化修饰。通过点击化学反应环合, 实现了预期的分子构建。为了提高环合产率, 该课题组在分子结构中引入了包含 6 个碱基配对的 loop 环结构, 有效拉近了叠氮与炔基的距离, 环合产率达到了约 65%。Ji 等^[40] 也设计合成了环状 RNA 适配体。他们通过对前期设计的线性 L-Apt.4-1c 适配体的 5' 端和 3' 端进行连接, 利用分子内点击化学反应实现了环合。同样地, 为了提高环合产率, 他们在结构中引入了 loop 配对结构, 使 5' 端和 3' 端的碱基得以配对。这一设计使得线性环合产率高达 95% (见图 2B)。由此可见, 通过拉近 5' 端和 3' 端的距离, 可以有效地提高环合产率。

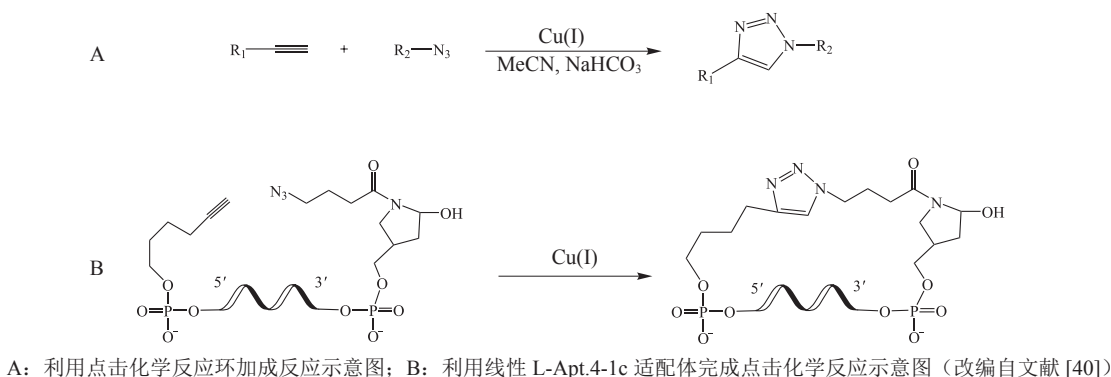


图 2 点击化学反应成环示意图

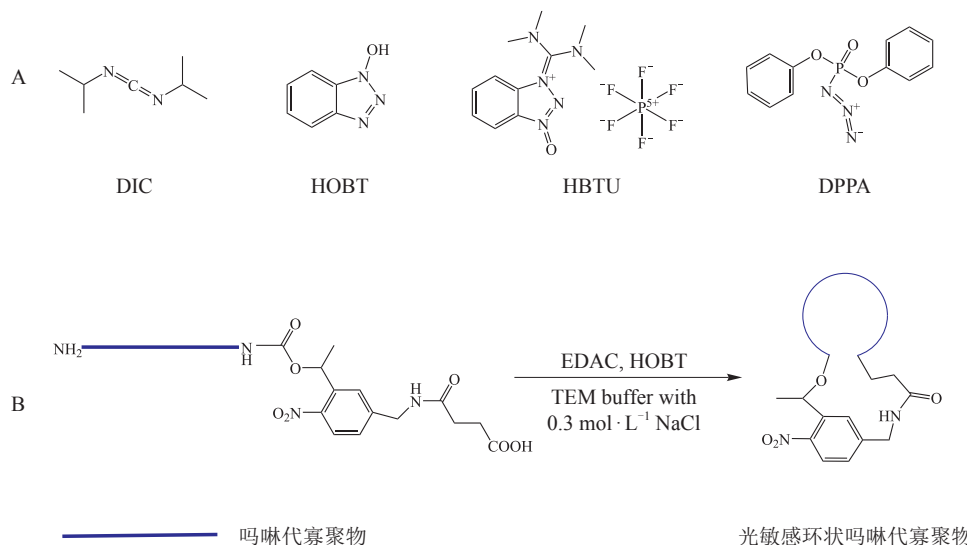
Figure 2 Diagram of cyclization by the use of click chemistry

1.2.2 羧基和氨基酰胺化反应成环 羧基与氨基酰胺化是合成环状寡核苷酸的关键手段之一, 通过此反应, 单体核苷酸得以有效连接, 形成闭环结构, 从而得到具有特定功能的环状寡核苷酸。该反应机制涉及羧基的活化及羧基与氨基的缩合反应。此过程常需添加缩合剂以促进反应进行, 常见的缩合剂有 *N,N'*-二异丙基碳二亚胺 (*N,N'*-diisopropylcarbodiimide, DIC)^[41]、1-羟基苯并三唑 (1-hydroxybenzotriazole, HOBt)、苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 [2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate, HBTU]^[42] 和叠氮磷酸二苯酯 (diphenyl phosphoryl azide, DPPA) 等^[43], 其具体结构式见图 3A。在环状寡核苷酸的合成过程中, 羧基通常修饰于核苷酸的磷酸基团, 氨基则修饰于核

苷酸的碱基部分, 这种修饰方式有助于多个核苷酸单元的有效连接, 最后形成闭环结构^[44]。

汤新景教授课题组利用酰胺反应成功合成了一系列环状寡核苷酸。2010 年, 他们采用光敏感单体将线性寡脱氧核苷酸 [其 3' 端经氨基修饰, 5' 端连接光敏感单体 1-(2-硝基苯基)-1,2-乙二醇亚磷酸酯] 连接合成了光敏感 cASOs, 产率达到 20%~40%^[45]。2012 年, 该课题组通过相同的酰胺化反应合成了光敏感环状吗啉代寡聚物 (circular morpholino oligomers, cMOs), 其中插入了光敏感基团连接 (见图 3B), 并成功实现了对斑马鱼胚胎中 β -catenin-2 基因表达的光调控^[46]。同年, 他们还设计出了一系列 cASOs, 其中线性寡核苷酸的 3' 端修饰氨基, 5' 端则修饰了羧酸, 通过酰胺反应成环; 为了研究反义链核酸中插入不同长度的连

接臂对基因表达效果的影响, 他们在序列的 10 nt 处插入了不同长度的连接臂, 并评估了基因表达效率。这些研究展示了光调节基因表达方面的良好应用前景^[47]。



A: 常见的缩合剂结构式; B: 以 HOBT 为缩合剂的核酸酰胺环合反应示意图 (改编自文献 [46])

DIC: *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (*N,N'*-二异丙基碳二亚胺); HOBT: 1-hydroxybenzotriazole (1-羟基苯并三唑); HBTU: 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯); DPPA: diphenyl phosphoril azide (叠氮磷酸二苯酯); EDAC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide [1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺]; TEM: triethylene glycol monomethyl ether (三乙二醇单甲醚)]

图3 酰胺反应成环示意图

Figure 3 Diagram of cyclization through amidation reaction

1.2.3 其他环化寡核苷酸策略 寡核苷酸的环状结构亦可通过精确组装得以实现。例如, 通过非共价键的巧妙运用, 使寡核苷酸的 3' 端与 5' 端在空间中相互靠近, 进一步利用两端的序列互补性形成碱基配对, 从而构建出 loop 结构的发夹结构和哑铃结构等多样化形态。其中, 最具代表性的案例来自 2003 年 Zapata 等^[48]的工作。他们成功地将三联吡啶配体修饰于寡核苷酸的 3' 端与 5' 端, 随后加入 Zn^{2+} 或 Fe^{2+} 离子, 通过络合作用将寡核苷酸的末端紧密连接, 形成稳定的配体-金属离子络合环状寡核苷酸。此外, 研究者还利用天然的 3', 5'-磷酸二酯键将寡核苷酸的末端进行连接, 完成了环合过程。值得一提的是, 哈佛医学院的 Whiteley 等^[49]对细菌信号核苷酸进行了系统性的生化筛选, 并发现了一类重要的 cGAS/DncV 样核苷酸转移酶 (cGAS/DncV-like nucleotidyltransferases, CD-NTases)。他们创新性地结合嘌呤与嘧啶核苷酸, 成功合成了多样化的环二核苷酸 (cyclic dinucleotides, CDNs)。此外, 他们在大肠埃希菌中鉴定了 1 个部分操纵子, 其中

dncV 基因被 1 个功能未知的基因 (命名为 *cdnE*) 所替代, 并确凿地证明了 *cdnE* 的产物为环尿苷一磷酸-腺苷一磷酸 (cyclic uridine monophosphate-adenosine monophosphate, cUMP-AMP)。这些研究不仅深化了研究者对寡核苷酸环状策略的理解, 也为未来相关领域的研究提供了宝贵的启示。

2 环状寡核苷酸的应用

相比于线性寡核苷酸, 环状寡核苷酸有其独特的拓扑学、酶学性质和生物学稳定性。这些独特的性质为研究者们提供了广阔的设计空间, 进而开发出了一系列具有多种应用价值的环状寡核苷酸, 包括环状适配体、cASOs、环状 siRNA 和其他环状 RNA。下面将逐一探讨这些环状寡核苷酸的具体应用及其潜力。

2.1 环状适配体应用

适配体是通过指数富集的配体系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术产生的短单链寡核苷酸,

它具有卓越的亲和力和特异性, 从小分子到蛋白质甚至整个细胞各类靶标分子均能与之相结合^[50]。与常规的蛋白抗体相比, 适配体展现了出色的性能, 如广泛的靶标结合能力、易于扩展的 DNA/RNA 合成、方便的适配体修饰和适配体功能化, 以及适配体传感器设计的灵活性和多功能性, 这使得适配体成为临床诊断和治疗应用的理想候选物^[51]。通过将天然核苷酸和具有特殊结构的适配体巧妙地结合, 可以进一步丰富适配体功能。然而, 未经修饰的适配体在体内并不稳定, 容易受到核酸酶的降解, 这在一定程度上限制了其应用前景。

Ji 等^[40]报道了环状 RNA 适配体, 他们通过筛选不同长度的连接臂 (20~48 个原子链), 发现随着环状序列结构的增加, 其柔性也相应提升。特别是当连接臂为 30 个原子的环状结构 (cycTBA II) 时, 形成了稳定的 G-四链体, 从而增强了结构稳定性和核酶稳定性。这表明, 适配体的结构需进一步优化其柔性连接臂长度, 以降低环状结构的刚性, 从而实现更高的靶标亲和力。Kuai 等^[52]设计了类似杠铃结构的环状二价适配体 cb-Sgc8 来提升适配体的稳定性。激光共聚焦实验发现, 花青素 5 (cyanine 5, Cy 5) 分别标记的环状结构 cb-Sgc 8 和 Sgc 8 经尾静脉注射到肿瘤模型小鼠后, cb-Sgc 8 组小鼠的肿瘤部位在注射 30 min 后即可见明显的荧光信号, 且保持至 4 h; 而 Sgc 8 组小鼠肿瘤部位在注射 1 h 后才可观察到明显的荧光信号, 且 2 h 时信号显著降低, 3 h 时信号几乎完全消失, 表明环状二价适配体 cb-Sgc8 相比于 Sgc 8 在肿瘤细胞中更加稳定。这种环状二价适配体是作为癌症诊断和治疗的开创性策略。尽管其空间结构未被进一步优化, 但其独特的结构优势仍然不容忽视。Yan 等^[19]使用体外筛选技术从随机序列 DNA 文库中搜索可结合 DNA 连接酶的 DNA 适配体, 他们将这种适配体设计成通用模板 DNA 支架 (TDS1.T1), 并成功制备了对大肠埃希菌具有特异性响应的环状脱氧核酶探针。同时探讨了该探针在诊断泌尿道感染 (urinary tract infection, UTI) 中的潜在的临床适用性, 作者通过在 20 例临床尿液样本中加入该探针, 然后通过测定荧光值来判断大肠埃希菌浓度是否超过限值, 采

用传统的细菌培养方法对同一组生物样品中的大肠埃希菌进行检测。结果表明, 细菌培养和脱氧核酶方法产生的大肠埃希菌浓度相当。此外, 该检测方法迅速, 从样品测量到获得结果的时间不到 2.5 h, 相较于传统细菌培养方法 (15 h) 大幅缩短了检测时间。

除了人工合成的环状适配体外, 还有一些经过筛选得到的适配体。Liu 等^[53]从随机文库筛选 1 个环状适配体, 相比于线性结构, 其能更有效地与艰难梭菌谷氨酸脱氢酶结合, 从而验证了环状结构在针对特定靶标分子结合方面的优势。Mao 等^[54]报道了在血清中直接结合人类蛋白质的环状 DNA 适配体的开发, 发现了名为 CTBA4T-B1 的环状适配体, 该环状结构具有独特的折叠模式, 其内部包含 1 个双层的 G-四链体结构, 该环状结构不但展示了极高的亲和力 ($K_d=19 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 而且其在血清中的稳定性也得到了提升 ($t_{1/2}=8 \text{ h}$)。

2.2 cASOs 的应用

ASOs 为单链寡核苷酸分子, 通常包含 15~25 个核苷酸残基^[55]。该序列可以与靶 RNA (多为 mRNA) 特异性互补配对。通过与靶 RNA 进行碱基配对结合的方式参与基因的表达调控^[56]。目前, 已被广泛应用的激活型 ASOs 在调控基因功能方面发挥着重要作用。其中, 刺激响应的 cASOs 维持特定的拓扑结构, 能够暂时抑制其与靶基因的相互作用。通过插入响应细胞特异性内源性刺激的连接子, cASOs 可以成为对正常细胞具有低脱靶效应的特定类型癌细胞的强大工具和潜在治疗剂^[39]。

2021 年, 汤新景课题组报道了小型 cASOs, 其因存在环状拓扑结构而大大降低了常规的脱靶效应, 同时也可减少非特异性免疫反应和种间杂交的可能性^[57]。与线性硫代寡核苷酸相比, 环状硫代寡核苷酸在诱导靶标 microRNA-21 (miR 21) 和 microRNA-222 (miR 222) 的降解方面更为有效, 进而达到上调下游人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源 (phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, *PTEN*) 基因的表达和程序性细胞死亡 4 (programmed cell death 4, *PDCD 4*) 的 mRNA 和蛋白质水平的效果。此外, 环状硫

代寡核苷酸还显著降低了由 ASOs 引起的非特异性免疫刺激效应, 这为利用环状寡核苷酸调控特定基因表达提供了新的思路。2023 年, 该课题组通过 CB 敏感的 GFLG 将线性 ASOs 的 2 个末端连接在一起, 从而开发了酶激活的 cASOs, 该底物可以被 CB 有效地释放^[39]。研究人员成功地利用可激活 CB 的 cASOs 在 mRNA 和蛋白水平上敲除了富含 CB 的 PC-3 肿瘤细胞中 2 个与疾病相关的内源性基因——翻译控制肿瘤蛋白 (translationally controlled tumor protein, *TCTP*) 基因和淋巴毒素 β 受体 (lymphotoxin β receptor, *LTBR*) 基因, 但对缺乏 CB 的人脐静脉内皮细胞, 基因沉默的影响则要小得多。此外, 与线性对照物相比, 使用 cASOs 可减少非特异性免疫刺激。进一步的体内研究表明, CB 激活 cASOs 通过下调肿瘤中 *TCTP*, 在 PC-3 肿瘤模型小鼠中表现出有效的肿瘤抑制作用。由此可见, cASOs 是有效的、具有潜力的核酸治疗药物, 具有更强的靶向基因敲除能力和更低的脱靶效应。

2.3 环状 siRNA 的应用

siRNA 在众多非编码 RNA 中脱颖而出, 成为调控基因表达的关键工具^[58]。尽管 siRNA 在介导靶 mRNA 切割时展现出高度的序列特异性, 但在细胞中仍观察到非预期的内源基因“脱靶”沉默现象, 这限制了 siRNA 的进一步应用。为解决这一问题, 研究者们对 siRNA 进行了多种化学修饰, 以期减少脱靶效应。其中, 环状结构的 siRNA 不仅增强了核酸酶的稳定性, 还克服了由反义链 RNA 引发的脱靶效应, 同时实现了高效的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 基因沉默。

Abe 等^[59]在 siRNA 的两端设计 loop 区域构建环状 siRNA, 显著提高了 siRNA 对核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 和血清的稳定性。此外, 当环状 RNA 序列结构小到一定程度时, 其空间结构弯曲导致与靶向核酸的结合能力大幅减弱, 从而失去基因沉默活性。基于这一原理, 汤新景教授课题组将 siRNA 的正义链环化, 正义链的脱靶效应得到有效解决, 并且通过使用荧光细胞和动物 (小鼠) 模型, 发现在 72 h 内, 与线性 siRNA 的 80% 的 GFP 水平相比, 环状 siRNA 的 59% 的 GFP 水平

就实现了小鼠中的基因沉默效果。此外, 将反义链环合并环状反义链中插入刺激响应基团, 如光敏感基团, 可以实现时间和空间上的调控基因表达^[23]。如果将光响应基团同时插入到正义链和反义链中, 可作为 RNAi 的前药^[60]。Yang 等^[35]利用此特性, 在哑铃型环状 siRNA 插入光响应性基团后, 实现了对基因表达的时间和空间上的调控。

Hagiwara 等^[61]通过向小鼠体内注射约 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的环状 siRNA 作为前药, 观察到该药物在肝、肾、肌肉组织中的半衰期延长, 并显著增强了基因沉默活性。然而, 高剂量的注射在实际应用中并不可行。为了提升 siRNA 的基因沉默活性, Alnylam 公司在 2021 年利用带有三价 GalNAc 配体的“点击”环化正义链, 制备了 GalNAc 修饰的环状 siRNA, 结果显示经过修饰的环状 siRNA 在体外和体内诱导沉默的功效与野生型 siRNA 相当^[38]。此外, Kumar 等^[62]的研究显示, 正义链的 5'-单磷酸基团在 siRNA 介导的基因沉默过程中具有重要作用, 通过在正义链上引入 5'-吗啉代修饰后, 可以阻断正义链的 5' 磷酸化, 降低正义链的脱靶效应, 提高 RNAi 活性。siRNA 的正义链末端修饰对 siRNA 基因沉默活性发挥具有不可忽视的影响。

经过深入研究发现, 环状 siRNA 在无法恢复线性结构的情况下, 对基因沉默功能的恢复存在显著影响。为解决这一问题, Elkayam 等^[63]在环状 siRNA 的反义链上修饰 5'-(E)-乙烯基磷酸酯 [5'-(E)-vinylphosphonate, 5'-(E)-VP], 5'-(E)-VP 修饰 siRNA 能增加代谢稳定性和提高载入 Argonaute 蛋白 (AGO2) 的能力, 是未修饰环状 siRNA 的基因沉默效率的 7 倍 (转染试剂入胞) 和 3 倍 (主动摄取入胞)。此外, 环状 siRNA 的正义链长短, 在发挥其基因沉默活性过程中起着至关重要的作用。Hagiwara 等^[61]研究发现在分别具有 15, 27 和 35 mer 的可刺激响应环状正义链的环状 siRNA 中, 具有 27 mer 的正义链的环状 siRNA 的基因沉默活性效果最佳; 同时还发现, 当反义链的 5' 端与环状正义链的 3' 端距离较近时, 其基因沉默效果更佳。然而, 如果序列过长, 其沉默能力会相应降低。这些发现为更深入地理解环状 siRNA 的作用机制提供了重要依据。

2.4 其他环状 RNA 的应用

环状 RNA 由 5' 末端磷酸根与 3' 末端羟基通过磷酸二酯键环合而成。众多生物系统中, 均可寻得其踪迹^[64]。它们大多被报道为微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 的分子“海绵”, 具有诸多未知的生物活性。

环状寡核苷酸, 作为新兴的内源性非编码 RNA, 因其抗核酸外切酶的生物稳定性, 使其在递送过程中表现更为稳定且不易被降解^[65]。其应用很广泛, 主要有 3 个方面。其一是作为预后生物标志物: ciRS-7 (circular RNA sponge for miR-7)/小脑变性相关蛋白 1 反义转录本 (antisense transcript of the cerebellar degeneration-related protein 1, CDR1as) 在瘤内基质细胞中大量存在, 已展现出强大的预后潜力, 被广泛用作结肠癌、肺癌和乳腺癌的预后因子^[66]。其二是作为诊断性生物标志物: 其在组织和细胞中的特异性使其与特定病理的关联更为紧密, 包括区分癌症亚型和临床分期的能力。这对早期癌症诊断尤为重要, 有助于提升患者生存的机会。有研究人员开发了独特的环状 RNA 检测方法, 可检测尿源性细胞外囊泡中的 5 种环状 RNA, 具有区分高级别前列腺癌和良性前列腺增生的潜力^[67]。其三是可以同时提供预后和诊断生物标志物的双重效用: 例如 circLDLRAD3 因在患者血浆中含量升高, 并与静脉和淋巴浸润密切相关, 因而被认为是胰腺癌诊断和预后的有前景的生物标志物^[68]。

在基因编辑领域, 环状寡核苷酸因其独特的环状结构而展现出高度的稳定性。这种稳定性使其能在细胞内长时间保持活性, 进而作为转录因子结合位点, 参与并调控基因的转录过程。通过与特定的转录因子结合形成复合物, 环状寡核苷酸能够有效地调节靶基因的表达水平, 为基因编辑提供了全新的途径。例如, 环状寡核苷酸通过激活下游效应蛋白来增强免疫反应, 如 III 型规律间隔成簇短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 系统中产生的环状寡核苷酸信号分子, 能够导致病毒清除、细胞休眠或死亡, 为基因编辑提供了新的工具^[69]。此外, 抗 CRISPR 蛋白的研究进一步揭示了环状寡核苷酸

信号分子在 CRISPR/CRISPR 关联蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 系统中的作用机制, 为设计更有效的 CRISPR 抑制策略提供了理论基础^[70]。

在疫苗开发领域, 环状信使核糖核酸 (messenger RNA, mRNA) 的应用也逐渐受到关注。例如: 魏文胜团队在 2021 年成功利用体外环化技术合成了针对严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 及其变异株刺突蛋白受体结合域 (receptor-binding domain, RBD) 序列的环状 mRNA 疫苗, 并证实该疫苗能在小鼠体内诱导强烈的 T 细胞免疫应答^[71]。2022 年, 该团队进一步展示了针对 SARS-CoV-2 及其变异株的环状 mRNA 疫苗的应用前景。与线性 mRNA 相比, 环状 mRNA 可以产生作用更强和更持久的抗原^[72]。此外, Li 等^[73] 通过利用脂质纳米粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 包裹环状 mRNA 进行递送, 发现环状 mRNA 相比线性 mRNA 具有更高的稳定性和更持久的蛋白质表达调控。他们通过 MC38-OVA 细胞建立免疫排斥小鼠肿瘤模型来评估 RNA-LNP 疫苗的抗肿瘤效果, 第 1 次疫苗接种后, 通过流式细胞术检测小鼠适应性免疫反应, 结果表明 RNA-LNP 疫苗能激发小鼠体内强大的抗原特异性 T 细胞应答, 且结果显示 2 剂疫苗接种后均能显著抑制肿瘤生长。这些研究结果表明, 与线性 mRNA 相比, 环状 mRNA 具有更强大的免疫激活能力, 这为开发环状 RNA 疫苗联合过继性免疫细胞疗法 (adoptive cell transfer therapy, ACT) 的治疗方法提供了新的思路, 尤其在难以治疗的恶性肿瘤中具有广阔的应用前景。

3 总结与展望

环状寡核苷酸是通过将线性寡核苷酸两端连接起来形成闭环结构而得到的, 这种结构赋予了其不同于线性寡核苷酸的独特性质。环状寡核苷酸的合成可以分为酶法合成和化学合成, 2 种合成方法各有优劣。在选择合成方法时, 需要根据具体的合成需求和应用场景进行权衡。对于要求产物纯净度高、生物相容性好的应用, 酶法合成是更好的选择; 而对于需要快速合成、成本较低或含有修饰核苷的应用, 化学法合成则更具优势。在实际应用中, 环状

寡核苷酸的合成往往需要结合酶法合成和化学法合成的优点, 以达到最佳的合成效果。例如, 可以先通过酶法合成得到纯净的环状寡核苷酸, 然后通过化学修饰引入特定的功能基团, 以满足特定的应用需求。此外, 随着合成技术的发展, 研究人员也在不断探索新的合成策略, 如光化学合成、电化学合成等, 以期在环状寡核苷酸的合成中实现更高的效率、更低的成本和更好的生物相容性。

环状寡核苷酸的未来发展充满了无限的可能性。随着科研人员对环状寡核苷酸研究的深入, 有望能够更好地理解其生物活性及其在生命体系中的作用机制。在医学领域, 环状寡核苷酸有望成为全新的治疗手段。通过精确设计和合成具有特定功能的环状寡核苷酸, 可以实现对疾病基因的精准调控, 从而达到治疗疾病的目的。此外, 环状寡核苷酸还可以作为高效的药物载体, 将药物分子准确地输送到病变部位, 提高药物的治疗效果并减少副作用^[74]。在生物技术领域, 环状寡核苷酸的应用将推动基因编辑技术的发展。通过设计具有特定功能的环状寡核苷酸, 可以实现对基因组的精确编辑, 从而实现对生命过程的精准调控。这将为基因疗法、生物工程和合成生物学等领域的发展提供新的动力。此外, 环状寡核苷酸在生物传感器和生物成像等领域也具有广泛的应用前景。通过设计具有特定识别功能的环状寡核苷酸探针, 可以实现对生物分子的高灵敏度和高特异性检测。这将为疾病诊断、环境监测和

食品安全等领域提供新的检测手段和方法。

需要指出的是, 尽管环状寡核苷酸在生物医学领域具有巨大的潜力, 但在实际应用中仍面临一系列挑战。其一, 环状寡核苷酸的合成技术仍有待进一步改进。当前的合成方法可能存在产率不高、纯度不足等问题, 这限制了其在生物医学领域的应用。为了克服这些挑战, 研究人员需要不断探索新的合成策略, 提高产率和纯度, 同时降低生产成本, 使其更具市场竞争力。其二, 对环状寡核苷酸的生物分布和代谢途径的深入研究至关重要。了解其在生物体内分布、代谢以及潜在的毒性等问题, 对于确保其安全性和稳定性具有重要意义。这需要进行长期的基础研究和临床试验, 以积累足够的数据来评估其生物相容性和潜在风险。其三, 在系统生物学和药物设计等方面的研究也必不可少。通过深入研究环状寡核苷酸与生物体内其他分子的相互作用, 以及其在疾病发生和发展过程中的作用机制, 可以为药物设计提供新的思路和方法。同时, 借助系统生物学的手段, 可以全面解析环状寡核苷酸的生物性质, 为其在疾病治疗中的应用提供更为坚实的理论基础。综上所述, 为了实现环状寡核苷酸在生物医学领域的广泛应用, 仍需克服合成技术、生物分布和代谢途径以及系统生物学和药物设计等方面的挑战。随着科研工作的深入和技术的不断发展, 环状寡核苷酸的应用前景将更加广阔, 为人类健康和生命科学的发展作出更大的贡献。

【参考文献】

- [1] Fernando M, Maud H, Fabian E. DNA length tunes the fluidity of DNA-based condensates[J]. *Biophys J*, 2021, 120(7): 1288-1300.
- [2] Holdt L M, Kohlmaier A, Teupser D. Circular RNAs as therapeutic agents and targets[J/OL]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1262[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30356745/>. DOI:10.3389/fphys.2018.01262.
- [3] Wu N, Qadir J, Yang B B. CircRNA perspective: new strategies for RNA therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28(4): 343-344.
- [4] Pisignano G, Michael D C, Visal T H, et al. Going circular: history, present, and future of circRNAs in cancer[J]. *Oncogene*, 2023, 42(38): 2783-2800.
- [5] Vo J N, Cieslik M, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer[J]. *Cell*, 2019, 176(4): 869-881. e13.
- [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] Danan M, Schwartz S, Edelleit S, et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): 3131-3142.
- [8] Broadbent K M, Broadbent J C, Ribacke U, et al. Strand-specific RNA sequencing in *Plasmodium falciparum* malaria identifies

- developmentally regulated long non-coding RNA and circular RNA[J/OL]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 454[2024-05-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465157/>. DOI: 10.1186/s12864-015-1603-4.
- [9] Westholm J O, 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.
- [10] Lu T, Cui L, Zhou Y, *et al.* Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice[J]. *RNA*, 2015, 21(12): 2076–2087.
- [11] Dubois J, Sczakiel G. The human TRAM1 locus expresses circular RNAs[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 22114[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34764360/>. DOI:10.1038/s41598-021-01548-0.
- [12] Lu Z G, Shen J, Yang J, *et al.* Nucleic acid drug vectors for diagnosis and treatment of brain diseases[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 39[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36650130/>. DOI:10.1038/s41392-022-01298-z.
- [13] Egli M, Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(6): 2529–2573.
- [14] Li C C, Wang Y, Li P F, *et al.* Construction of rolling circle amplification products-based pure nucleic acid nanostructures for biomedical applications[J/OL]. *Acta Biomater*, 2023, 160: 1–13[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36764595/>. DOI:10.1016/j.actbio.2023.02.005.
- [15] Obi P, Chen Y G. The design and synthesis of circular RNAs[J/OL]. *Method*, 2021, 196: 85–103[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33662562/>. DOI: 10.1016/j.ymeth.2021.02.020.
- [16] Chen X J, Lu Y. Circular RNA: biosynthesis *in vitro*[J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 787881[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34917603/>. DOI:10.3389/fbioe.2021.787881.
- [17] 任虹茜. 基于前药策略设计具有构象动态转化的反义核酸的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事科学院, 2021.
- [18] Chen C Y, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs[J]. *Science*, 1995, 268(5209): 415–417.
- [19] An R, Li Q, Fan Y Q, *et al.* Highly efficient preparation of single-stranded DNA rings by T4 ligase at abnormally low Mg(II) concentration[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(35): e139[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655200/>. DOI:10.1093/nar/gkx553.
- [20] Yan Y, Chang D R, Xu Y B, *et al.* Engineering a ligase binding DNA aptamer into a templating DNA scaffold to guide the selective synthesis of circular DNAzymes and DNA aptamers[J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(4): 2630–2637.
- [21] Gubu A, Wang J, Jin H, *et al.* Synthesis and "DNA interlocks" formation of small circular oligodeoxynucleotides[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(11): 12584–12590.
- [22] Paluzzi V E, Zhang C Z, Mao C D. Near-quantitative preparation of short single-stranded DNA circles[J/OL]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62(16): e202218443[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36652628/>. DOI:10.1002/anie.202218443.
- [23] Romaniuk E, McLaughlin L W, Neilson T, *et al.* The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction[J]. *Eur J Biochem*, 1982, 125(3): 639–643.
- [24] Zhang L L, Liang D W, Chen C M, *et al.* Circular siRNAs for reducing off-target effects and enhancing long-term gene silencing in cells and mice[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 10: 237–244[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499936/>. DOI:10.1016/j.omtn.2017.12.007.
- [25] Sakhabutdinova A R, Maksimova M A, Garafutdinov R R. Synthesis of circular DNA templates with T4 RNA ligase for rolling circle amplification[J]. *Mol Biol*, 2017, 51(4): 724–733.
- [26] Du X, Zhong X, Li W, *et al.* Retraining and optimizing DNA-hydrolyzing deoxyribozymes for robust single- and multiple-turnover activities[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(7): 5996–6005.
- [27] Li Q T, Zhang S, Li W, Ge Z, *et al.* Programming circiligase catalysis for DNA rings and topologies[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(3): 1801–1810.
- [28] Gu H, Furukawa K, Weinberg Z, *et al.* Small, highly active DNAs that hydrolyze DNA[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(24): 9121–9129.
- [29] Lehman I R. DNA ligase: structure, mechanism, and function[J]. *Science*, 1974, 186(4166): 790–797.
- [30] Ma Z X, Chen H, Yang Y, *et al.* Characterization of an ssDNA ligase and its application in aptamer circularization[J/OL]. *Anal Biochem*, 2024, 685: 115409[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38006953/>. DOI:10.1016/j.ab.2023.115409.

- [31] Chakravarty A K, Subbotin R, Chait B T, *et al.* RNA ligase RtcB splices 3'-phosphate and 5'-OH ends via covalent RtcB-(histidinyl)-GMP and polynucleotide-(3')pp(5')g intermediates[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(16): 6072-6077.
- [32] Meldal M, Tomøe C W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition[J]. *Chem Rev*, 2008, 108(8): 2952-3015.
- [33] Nguyen K, Fazio M, Kubota M, *et al.* Cell-selective bioorthogonal metabolic labeling of RNA[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(6): 2148-2151.
- [34] Ravindra K, Afaf E, John T, *et al.* Template-directed oligonucleotide strand ligation, covalent intramolecular DNA circularization and catenation using click chemistry[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(21): 6859-6864.
- [35] Yang L L, Kim H B, Sul J Y, *et al.* Efficient synthesis of light-triggered circular antisense oligonucleotides targeting cellular protein expression[J]. *ChemBiochem*, 2018, 19(12): 1250-1254.
- [36] Yang L, von Trentini D, Kim H, *et al.* Photoactivatable circular caged oligonucleotides for transcriptome *in vivo* analysis (TIVA)[J]. *ChemPhotoChem*, 2021, 5(10): 940-946.
- [37] Rouhanifard S H, Mellis I A, Dunagin M, *et al.* Amendments: author correction: clampfish detects individual nucleic acid molecules using click chemistry-based amplification[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(1): 102[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30605160/>. DOI:10.1038/nbt0119-102b.
- [38] Jahns H, Degaonkar R, Podbevsek P, *et al.* Small circular interfering RNAs (sciRNAs) as a potent therapeutic platform for gene-silencing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(18): 10250-10264.
- [39] Wang Z Y, Fan X L, Mu G Q, *et al.* Cathepsin B-activatable cyclic antisense oligonucleotides for cell-specific target gene knockdown *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 33: 548-558[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37588686/>. DOI:10.1016/j.omtn.2023.07.022.
- [40] Ji D Y, Lyu K X, Zhao H Z, *et al.* Circular L-RNA aptamer promotes target recognition and controls gene activity[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(13): 7280-7291.
- [41] 谢珺, 苗菁, 崔杏, 等. 2-(2-乙基-5-氟苯并咪唑-3-甲酰胺基)-4-甲基噻唑-5-羧酸的合成及活性[J]. *贵州医科大学学报*, 2023, 48(11): 1307-1314.
- [42] 廖鹏, 周灿, 刘静姿, 等. 大黄酰氨基酰胺类衍生物的合成及其抗菌活性[J]. *林产化学与工业*, 2023, 43(04): 47-52.
- [43] 彭欣华. 磷酸胺类化合物的催化合成[D]. 西安: 西北大学, 2023.
- [44] Li J X, Mostafa Mohammed-Elsabagh, Paczkowski F, *et al.* Circular nucleic acids: discovery, functions and applications[J]. *ChemBiochem*, 2020, 21(11): 1547-1566.
- [45] Tang X J, Su M, Yu L L, *et al.* Photomodulating RNA cleavage using photolabile circular antisense oligodeoxynucleotides[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(11): 3848-3855.
- [46] Yuan W, Li W, Peng W, *et al.* Manipulation of gene expression in zebrafish using caged circular morpholino oligomers[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(21): 11155-11162.
- [47] Wu L, Wang Y, Wu J Z, *et al.* Caged circular antisense oligonucleotides for photomodulation of RNA digestion and gene expression in cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(1): 677-686.
- [48] Zapata L, Bathany K, Schmitter J M, *et al.* Metal-assisted hybridization of oligonucleotides, evaluation of circular 2'-O-Me RNA as ligands for the tar RNA target[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 2003(6): 1022-1028.
- [49] Whiteley A T, Eaglesham J B, de Oliveira Mann C C, *et al.* Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 194-199.
- [50] Röthlisberger P, Hollenstein M. Aptamer chemistry[J/OL]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 134: 3-21[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29626546/>. DOI:10.1016/j.addr.2018.04.007.
- [51] Li L, Xu S J, Yan H, *et al.* Nucleic acid aptamers for molecular diagnostics and therapeutics: advances and perspectives[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(5): 2221-2231.
- [52] Kuai H L, Zhao Z L, Mo L T, *et al.* Circular bivalent aptamers enable *in vivo* stability and recognition[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(27): 9128-9131.
- [53] Liu M, Yin Q X, Chang Y Y, *et al.* *In vitro* selection of circular DNA aptamers for biosensing applications[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(24): 8013-8017.
- [54] Mao Y, Gu J, Chang D R, *et al.* Evolution of a highly functional circular DNA aptamer in serum[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(19): 10680-10690.
- [55] 朱凌峰, 王中健. 全球基因治疗药物研发现状分析[J]. *药学进展*, 2022, 46(5): 325-338.

- [56] 经男男, 王静, 汤新景. 环状寡核苷酸的研究进展[J]. 中国科学: 化学, 2018, 48(11): 1293-1306.
- [57] Gubu A, Su W B, Zhao X R, *et al.* Circular antisense oligonucleotides for specific RNase-H-mediated microRNA inhibition with reduced off-target effects and nonspecific immunostimulation[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(21): 16046-16055.
- [58] Davidson B L, McCray P B Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(5): 329-340.
- [59] Abe N, Abe H, Ito Y. Dumbbell-shaped nanocircular RNAs for RNA interference[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(49): 15108-15109.
- [60] Kimura Y, Shu Z, Ito M, *et al.* Intracellular build-up RNAi with single-strand circular RNAs as siRNA precursors[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56(3): 466-469.
- [61] Hagiwara K, Honma M, Harumoto T, *et al.* Development of prodrug type circular siRNA for *in vivo* knockdown by systemic administration[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2020, 30(6): 346-364.
- [62] Kumar P, Parmar R G, Brown C R, *et al.* 5'-Morpholino modification of the sense strand of an siRNA makes it a more effective passenger[J]. *Chem Commun*, 2019, 55(35): 5139-5142.
- [63] Elkayam E, Parmar R, Brown C R, *et al.* siRNA carrying an (*E*)-vinylphosphonate moiety at the 5' end of the guide strand augments gene silencing by enhanced binding to human argonaute-2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(6): 3528-3536.
- [64] Fan X, Zhang X, Wu X, *et al.* Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos[J/OL]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 148[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26201400/>. DOI:10.1186/s13059-015-0706-1
- [65] Wen S Y, Qadir J, Yang B B. Circular RNA translation: novel protein isoforms and clinical significance[J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28(5): 405-420.
- [66] Rahmati Y, Asemani Y, Aghamiri S, *et al.* CiRS-7/CDR1as; an oncogenic circular RNA as a potential cancer biomarker[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2021, 227: 153639[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34649055/>. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153639.
- [67] He Y D, Tao W, He T, *et al.* A urine extracellular vesicle circRNA classifier for detection of high-grade prostate cancer in patients with prostate-specific antigen 2-10 ng · mL⁻¹ at initial biopsy[J/OL]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 96[2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34301266/>. DOI:10.1186/s12943-021-01388-6.
- [68] Yang F, Liu D Y, Guo J T, *et al.* Circular RNA circ-LDLRAD3 as a biomarker in diagnosis of pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(47): 8345-8354.
- [69] Athukoralage J S, Rouillon C, Graham S, *et al.* Ring nucleases deactivate type III CRISPR ribonucleases by degrading cyclic oligoadenylate[J]. *Nature*, 2018, 562(7726): 277-280.
- [70] Jia N, Patel D J. Structure-based functional mechanisms and biotechnology applications of anti-CRISPR proteins[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(8): 563-579.
- [71] Qu L, Yi Z Y, Shen Y, *et al.* Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[CP/OL]. (2021-03-16)[2024-05-17]. <https://doi.org/10.1101/2021.03.16.435594>.
- [72] Qu L, Yi Z Y, Shen Y, *et al.* Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1728-1744.e16.
- [73] Li H J, Peng K, Yang K, *et al.* Circular RNA cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies[J]. *Theranostics*, 2022, 12(14): 6422-6436.
- [74] 陈有海, 杨海涛. 核酸药物的研发现状与应用前景展望[J]. *药学进展*, 2022, 46(5): 321-324.



【专家介绍】于丽佳：国家卫生健康委职业安全卫生研究中心，副研究员。中国科学院化学研究所分析化学博士，博士后师从北京大学医学部汤新景教授。北京市职业健康领域专家，*J Saf Sustain* 青年编委。目前研究专注于核酸修饰和功能性调控，以及分子探针合成表征等基础研究和检测方法开发。主持国家自然科学基金青年基金1项，开放课题6项，在*Mol Ther Nucl Acids*, *Biomacromolecules* 等国内外权威期刊上发表SCI论文20余篇，授权专利3项。