



RNA 合成生物学:基因回路设计与精准医疗应用

戴亦含*

(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要 RNA 合成生物学通过将 RNA 分子设计为可编程的生物调控元件, 以实现高时空精度控制, 为精准医疗提供了强大工具。本文系统综述该领域的研究进展。首先聚焦于核糖开关、RNA 温度计、Toehold 开关等核心元件的结构可编程性与功能多样性, 总结了天然元件挖掘、理性设计与化学修饰等关键技术突破, 探讨了 miRNA 响应型开关、工程化 circRNA 及 siRNA 自组装系统等合成 RNA 调控元件的设计与优化策略; 其次, 阐述逻辑门等 RNA 的合成基因回路设计原理与优化方案; 接着评述 RNA 合成系统在癌症、代谢性疾病、神经退行性疾病等重大疾病精准治疗中的应用转化案例; 最后, 探讨递送瓶颈、表达噪声、脱靶效应等关键挑战, 并展望智能化递送平台的发展方向。本综述旨在为 RNA 合成生物学的技术发展路径与临床转化应用提供理论参考。

关键词 RNA 合成生物学, RNA 元件, 基因回路, 精准医疗, 递送系统

中图分类号 Q81, Q503

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0395

CSTR: 32369.14.pibb.20250395

合成生物学是一门融合生物学、工程学和计算机科学的前沿交叉学科, 旨在通过设计、构建和优化生物系统与组件, 实现对生物功能的精确编程和重新设计。与传统生物学研究不同, 合成生物学采用工程化设计理念, 将生物系统解构为标准化的“生物砖”, 并通过标准化、抽象化和解耦化的方法, 构建具有特定功能的人工生物系统^[1]。

合成生物学的起源可以追溯到 20 世纪中期, 但其作为独立学科的形成始于 21 世纪初^[2]。这一时期的核心工作是通过基因工程手段设计和构建简单的基因回路。代表性成果包括 Collins 团队^[3]开发的遗传切换开关和 Elowitz 与 Leibler^[4]构建的振荡电路。这些尝试确立了合成生物学作为一门跨学科领域的地位。进入 21 世纪, 合成生物学领域显著扩大。2004 年, 首届国际合成生物学会议 (SB1.0) 在美国麻省理工学院召开, 吸引了来自生物学、化学、物理、工程和计算机科学领域的研究人员, 推动了该领域的国际化发展。2008 年后, 合成生物学进入快速发展期, 新工具和方法的出现显著提高了构建复杂基因回路的能力。例如: Hasty 团队^[5]开发出了具有稳定振荡行为的电路, 并实现了基于群体感应的同步振荡; Jef Boeke 教

授主导的 Sc2.0 国际合作项目首次合成真核生物基因组, 2023 年报道完成了所有 16 条染色体的设计与合成, 并成功将超过 7 条合成染色体整合到一个酵母细胞中, 合成率超过 50%^[6]。

RNA 即核糖核酸, 是一类由核苷酸通过磷酸二酯键连接而成的生物大分子, 是生物体内重要的遗传和功能分子。其基本组成单位是核糖核苷酸, 每个核苷酸包含核糖、磷酸基团和含氮碱基。RNA 作为连接基因组信息与蛋白质功能的桥梁, 在合成生物学中凭借独特优势成为构建高效基因回路的核心元件。相较于传统蛋白质元件, RNA 具有多种优势。a. 可编程性强: 局部序列的二级结构可预测性高, 能借助碱基互补配对实现精确的序列特异性识别, 便于计算机辅助设计。b. 动态响应快: 调控不依赖 DNA 结构变化和蛋白质翻译, 能在 RNA 层面快速响应信号输入, 适用于实时生物传感器构建。c. 正交性好: 可通过人工设计减少 RNA 元件与宿主天然系统的相互作用, 减少系统干扰。d. 功能多样: 可改造成传感器、调控器、执

* 通讯联系人。

Tel: 15707366068, E-mail: m15707366068@163.com

收稿日期: 2025-09-03, 接受日期: 2026-01-08

行器及支架^[7]。

RNA合成生物学的发展遵循着从基础元件到复杂回路，再到最终应用的工程化逻辑。图1总结

了这一核心框架，分别展示了本文中重点阐述的基础RNA元件的分类、功能回路的设计策略，以及这些回路在精准医疗中的前沿应用。

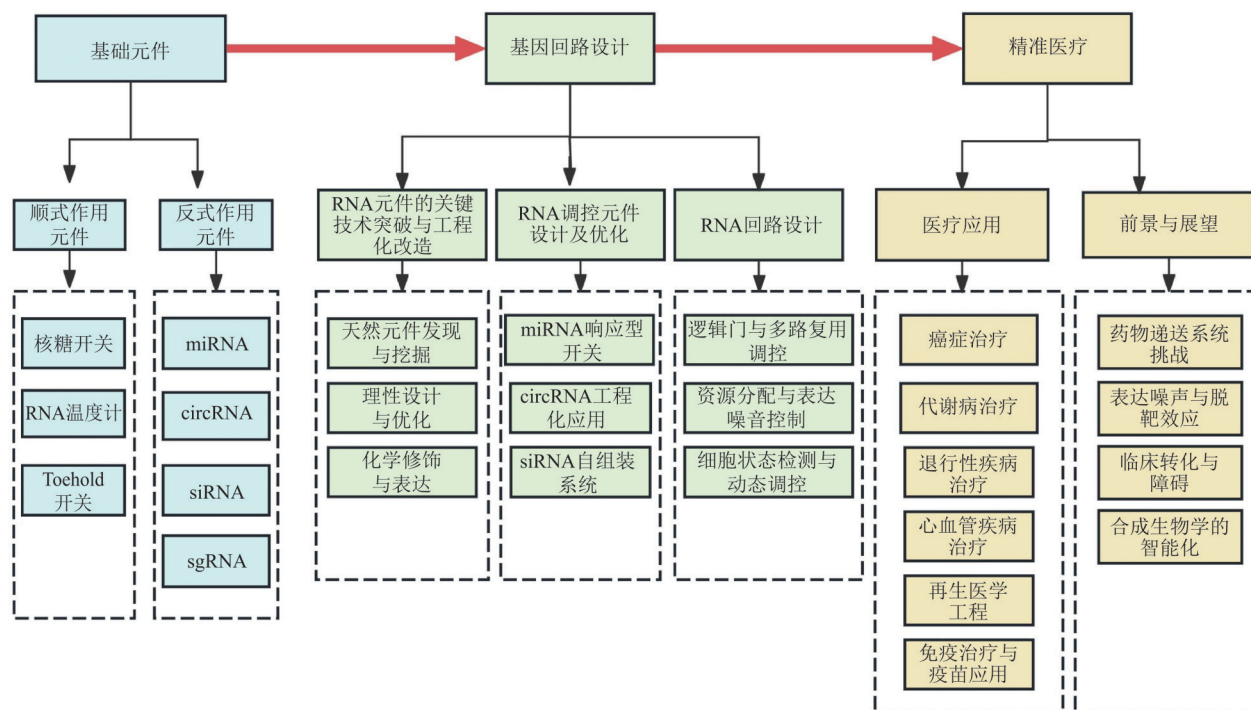


Fig. 1 Overview of classification, design and applications of synthetic biology RNA components

图1 RNA合成生物学元件分类、设计与应用概览

1 RNA工程基础

1.1 RNA在中心法则中的核心地位

经典的中心法则仅将RNA视为线性信息载体：DNA经转录生成RNA，RNA再通过翻译指导蛋白质合成。然而，Borovská等^[7]的研究证明，RNA能通过其动态折叠形成的“构象集合体”直接编码调控指令，该发现将RNA提升为基因表达的核心调控者。这种调控模式具有三大优势。a. 响应速度快：RNA的结构转换可以在细胞内快速响应环境变化，如冷激反应中RNA的快速结构调整。Borovská等^[7]的研究发现，冷激条件下，细菌RNA会发生结构重排以适应温度的变化。如*cspA*和*lpxP*的RNA结构在温度转变时表现出相对化学计量比的巨大变化，这些变化远超单纯由热力学平衡预测的范围。b. 精准性高：由于特定RNA结构能精确控制翻译的起始，RNA可以在转录后水平实现高度精准的调控。Borovská等^[7]的研究显示，

RNA的二级结构可以通过形成特定的开放阅读框（open reading frame, ORF）来调控翻译的起始。如*CKS2*和*TXNL4A*的5'非翻译区（untranslated region, UTR）中存在RNA结构开关，这些结构能够调控不同ORF的使用。c. 能量高效：RNA的结构转换通常依赖于RNA伴侣蛋白辅助，这种机制在能量利用上具有高效性。Borovská等^[7]的研究指出，冷激反应中RNA结构的调整不仅依赖于温度变化本身，还受到RNA伴侣蛋白（如CspE）的调控，在冷激条件下，CspE帮助*lpxP* mRNA从一种结构转换为另一种稳定的结构。

1.2 RNA合成生物学元件的系统分类

在RNA合成生物学中，根据其作用方式是否局限于其所在的RNA分子，可将核心RNA元件分为顺式作用元件和反式作用元件两大类。

1.2.1 顺式作用元件

顺式作用元件（*cis*-regulatory elements, CREs）是指位于DNA上的一段非编码序列，其主

要功能是通过与转录因子或其他调控分子结合来调控基因的表达。这些元件通常包括启动子、增强子和沉默子等,能够激活或抑制基因在特定时间、空间或条件下的表达,通常位于目标基因的附近区域,例如启动子通常靠近转录起始位点。它们的作用范围局限于所在的DNA分子,不会影响其他染色体上的基因^[8]。

CREs的功能由其核苷酸序列决定,这些序列包含转录因子结合位点。此外,某些元件可能通过形成特定的二级或三级结构(如茎环结构)来实现调控功能。它们以模块化形式存在,可以通过组合多个转录因子结合位点来实现复杂的表达模式。例如,增强子可以通过整合多种信号输入来调控基因表达^[8]。

RNA分子也可拥有CREs,根据其来源与作用机制,可划分为天然RNA开关与人工设计开关两大类。在天然RNA开关中,核糖开关与RNA温度计是两种最具代表性的模型,人工设计的RNA开关,其中Toehold开关是极具代表性的成果。

a. 核糖开关

核糖开关是一类位于信使RNA(messenger RNA, mRNA)非编码区域的结构化元件,能够通过结合特定的小分子代谢物来调控基因表达。这类调控元件通常存在于细菌中,但也有少数在真核生物中被发现。核糖开关由两个主要功能域组成:一个是配体结合域,负责特异性识别和结合目标代谢物;另一个是表达调控域,负责根据配体结合状态调控下游基因的转录或翻译^[8]。

核糖开关的作用机制主要包括以下几种。a. 转录终止:当配体结合时,核糖开关会形成一个转录终止信号,导致RNA聚合酶提前终止转录。b. 翻译调控:配体结合可能正向或反向调节核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)的暴露,从而调控蛋白质翻译。c. RNA剪切或稳定性调节:某些核糖开关通过改变RNA的剪切模式或稳定性来影响基因表达^[8]。

b. RNA温度计

RNA温度计是一种能够响应环境温度变化的RNA结构元件,主要通过改变其二级或三级结构来调控基因表达。这类RNA元件通常位于mRNA的5'UTR,在细菌中尤其常见,用于感知和响应温度波动。

RNA温度计的核心功能是通过温度诱导的构象变化调节翻译效率。例如,在低温条件下,某些

RNA温度计会从封闭的结构转变为开放的结构,从而允许核糖体结合并启动翻译。这种机制使得细胞能够在冷休克等应激条件下快速调整特定蛋白质的表达水平,以适应环境变化。RNA温度计的功能与其序列和结构密切相关。通过协变分析可以识别出具有功能意义的保守碱基配对。例如, cspG RNA温度计的两个构象中,某些碱基对显示出显著的协变支持($E < 0.05$),这表明这些配对在进化过程中受到选择压力,可能对其功能至关重要^[7]。

c. Toehold开关

Toehold开关是一种人工设计的原核生物核糖调控因子,能够响应具有任意序列的同源RNA以激活基因表达。与传统的核糖调控因子不同,Toehold开关利用线性-线性相互作用而非环介导的相互作用来启动RNA-RNA链置换反应。此外,它们依赖于起始密码子周围区域的隔离来抑制蛋白质翻译,避免了与RBS或起始密码子本身的任何碱基配对。因此,Toehold开关可以被设计为响应具有任意序列的触发RNA以激活蛋白质翻译,从而显著提高组件的正交性。

Toehold开关由两个RNA链组成,分别称为开关和触发器。开关RNA包含被调控基因的编码序列,其上游是一个基于发夹结构的处理模块,该模块包含一个强RBS和一个起始密码子,随后是一个通用的21 nt连接序列,编码添加到目标基因N端的低分子质量氨基酸。发夹模块的5'端有一个单链的Toehold序列,作为触发RNA链的初始结合位点。

这些特性使得Toehold开关在动态范围、正交性和可编程性方面表现出色,成为一种多功能且强大的翻译调控平台,广泛应用于分子生物学、合成生物学和生物技术领域^[9]。关于顺式作用元件中关键RNA分子分类及功能对比见表1。

1.2.2 反式作用元件

反式作用元件通常是指能够结合到基因调控区域并影响基因表达的蛋白质或RNA分子,它们通过与顺式作用元件相互作用来调节基因表达。在RNA干扰(RNA interference, RNAi)系统中,小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)能作为反式作用因子,引导RNA诱导的沉默复合体靶向mRNA上的互补序列,从而导致mRNA的降解或翻译抑制。

反式作用元件的范畴以几种关键分子为代表,如微小RNA(microRNA, miRNA)、siRNA、环

Table 1 Classification and functions of key RNA molecules in *cis*-acting components [7-9]

表1 顺式作用元件中关键RNA分子分类及功能 [7-9]

特征	核糖开关	RNA温度计	Toehold开关
类别	天然RNA元件	天然RNA元件	人工设计RNA元件
输入信号	特定小分子配体, 如焦磷酸硫胺素 (thiamine pyrophosphate, TPP)、鸟嘌呤	温度变化	特定的“触发RNA”序列
作用机制	配体结合诱导RNA构象变化	温度升高导致RNA结构熔解	触发RNA结合“Toehold”并启动链置换反应
调控方式	顺式作用 (自我调控)	顺式作用 (自我调控)	顺式作用元件, 但由反式作用的触发RNA激活
核心优势	直接感应代谢物, 调控精准, 无需蛋白质中介	无需额外因子, 直接响应物理环境变化	高度可编程, 正交性好, 可构建复杂逻辑电路
主要应用	基础研究, 理解代谢与基因调控的关联	热休克等环境应激响应的分子机制研究	合成生物学, 生物传感器, 细胞治疗, 智能诊断

形 RNA (circular RNA, circRNA) 和单链指导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 它们通过不同的机制发挥功能。

a. miRNA: 基因沉默的核心调控因子

miRNA 是一类长度约为 22 nt 的小 RNA 分子, 它们通过转录后调控的方式抑制目标 mRNA 的表达, 在多种真核生物中发挥重要作用。在哺乳动物中, 这些小 RNA 可以精细调节 mRNA 的表达。miRNA 来源于较长的 RNA 转录本, 并经过多步加工最终形成成熟的 miRNA。miRNA 在生物合成、基因组分布和生物进化等方面具有高度保守性, 且其活性受到严格调控 [10]。

b. circRNA: 闭环结构赋予的高稳定性与持续表达能力

circRNA 是一类由非经典剪接事件 (反向剪接) 产生的非编码 RNA 分子。它们通过共价键形成闭合环状结构, 具有组织特异性和细胞特异性的表达模式, 其生物发生受特定 CREs 和反式作用因子的调控。部分 circRNA 在进化上高度保守, 并通过多种机制发挥生物学功能。例如, circRNA 可作为 miRNA 或蛋白质的“海绵”分子发挥功能, 或自身作为翻译模板产生功能性肽段 [11]。

c. siRNA: RNAi 介导的靶向基因沉默

siRNA 通过 RNAi 途径介导序列特异性的基因沉默, 是合成生物学中重要的基因调控工具。Alnylam 公司开发的 GalNAc-siRNA 缀合物实现了肝脏特异性递送, 沉默效率 >90%, 并使用更加稳定和活性更高的增强稳定性化学 (enhanced stability chemistry, ESC) 平台进行升级改造 [12]。ESC 的应用使得 GalNAc-siRNA 缀合物的稳定性显著提高, 在达到相同甚至更优治疗效果的前提下,

可将给药剂量降低至原来的 1/10, 降低了药物的毒性风险。

d. sgRNA: 赋予 CRISPR 系统高度的靶向特异性

sgRNA 是一种在 CRISPR-Cas9 系统中人工设计使用的引导 RNA, 其主要功能是通过与目标 DNA 序列的特异性结合, 引导核酸酶 (如 CRISPR-Cas9 系统中的 Cas9 蛋白) 到特定的基因组位置进行切割或修饰。在 RNA 编辑领域, sgRNA 的概念被扩展为指导 RNA (guide RNA, gRNA), 用于招募内源性 RNA 编辑酶以实现目标 RNA 的精准编辑 [13]。反式作用 RNA 元件的分类及功能对比见表 2。

1.3 RNA 元件的关键技术突破与工程化改造

1.3.1 天然元件发现与挖掘

RNA 温度计的发现: Borovská 等 [7] 在大肠杆菌 *cspG*、*cspI*、*cpxP* 和 *lpxP* 等基因的 5'UTR 中发现了多个 RNA 温度计。这些 RNA 温度计能够响应冷休克并通过结构变化调控基因表达。特别值得注意的是, *lpxP* RNA 温度计是一种真正的“开-关”型温度控制开关, 具有重要的应用潜力。

真核基因 5'UTR 结构的全转录组分析方法: Borovská 等 [7] 发明了一种名为 5'UTR-MaP 的新方法, 用于全转录组范围内分析真核基因 5'UTR 的 RNA 结构。结合 DeConStruct 框架, 该方法成功揭示了 RNA 结构开关调控上游开放阅读框 (upstream open reading frame, uORF) 差异性使用的分子机制。

基于条件性指导 RNA (conditional guide RNA, cgRNA) 的逻辑门电路设计: 其能够通过多输入处理实现复杂的基因调控。OR 逻辑门由两

Table 2 Classification and functions of key RNA molecules in trans-acting components [11-13]

表2 反式作用元件中关键RNA分子分类及功能 [11-13]

名称	类别	特点	来源	功能
miRNA	调控性非编码RNA	长度约22 nt，高度保守，活性严格调控	较长RNA转录本中	基因沉默，精细调控mRNA表达
			的茎环结构区域	
circRNA	调控性非编码RNA	闭环结构，高稳定性，组织与细胞特异性表达；进化上高度保守	非经典剪接（反向剪接）	作为miRNA或蛋白质的“海绵”分子，或翻译为功能性肽段
siRNA	调控性非编码RNA	介导RNAi序列特异性基因沉默，稳定性与活性高（通过ESC平台实现），可靶向递送	化学合成	RNA干扰介导的基因沉默，用于合成生物学中的基因调控工具
sgRNA	CRISPR相关RNA	人工设计的嵌合RNA分子，包含间隔区（约20 nt）和支架区赋予CRISPR系统靶向特异性	人工设计	作为识别靶标DNA的“向导”，引导Cas蛋白到特定位点，实现基因的编辑或表达干预

个输入RNA触发，分别结合到cgRNA的不同区域，当任一输入RNA结合时，cgRNA的间隔序列通过链置换并识别目标DNA，抑制绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）的转录。AND逻辑门将触发RNA分成两部分，各自带有额外的组装域，可以杂交并形成完整的触发复合物。只有当

两个触发RNA都存在时，才能完全激活cgRNA，从而减少GFP表达。NOT逻辑门通过RNA输入A与sgRNA支架的杂交，中断gRNA-Cas蛋白相互作用^[14]。关于RNA天然元件的分类、机制与功能的详细描述见表3。

Table 3 Classification, mechanisms and functions of RNA elements [7, 14]

表3 RNA元件的分类、机制与功能 [7, 14]

名称/类别	特点	机制/原理	功能/应用
RNA温度计（如IpxP）	响应冷休克，结构变化调控基因表达，具有“开关”型温度控制特性	位于5'UTR，温度变化引起构象改变，影响翻译起始	调控基因表达，潜在应用价值高
5'UTR-MaP方法	全转录组分析真核基因5'UTR结构，结合DeConStruct框架	识别上游开放阅读框差异使用的RNA结构开关	揭示UTR结构功能，促进转录组层面RNA结构研究
cgRNA逻辑门	OR门	两输入RNA任一结合即可触发	输入RNA与cgRNA不同区域结合，通过链置换暴露间隔序列识别目标DNA，抑制GFP转录
	AND门	两输入RNA必须同时存在才触发	实现OR逻辑调控，多输入处理复杂基因表达
	NOT门	输入RNA存在时抑制输出	触发RNA分两部分带组装域，杂交形成完整复合物激活cgRNA，显著减少GFP表达
		RNA输入与sgRNA支架杂交，中断gRNA-Cas蛋白相互作用	实现AND逻辑调控，提高基因操作特异性
			实现NOT逻辑调控，用于条件性基因沉默或关闭表达

1.3.2 天然元件的理性设计

天然元件的理性设计是基于其结构-功能关系进行靶向优化，通常涉及对基因调控元件的功能和序列进行深入分析与改造。接下来以Toehold开关为例，说明如何进行天然元件的理性设计。

a. 基于机制的设计原则

Toehold开关是一种全新设计的核糖调控因子，其设计突破了传统核糖调控因子依赖环-环或环-线性RNA相互作用的限制。与天然核糖调控因子不同，Toehold开关通过线性-线性RNA相互作用触发RNA与开关RNA之间的结合，这种机制来源于体外开发的Toehold介导的链置换反应。Toehold开

关将RBS和起始密码子完全暴露在发夹结构的环中，而不是直接与这些区域配对来抑制翻译。这种设计避免了对RBS和起始密码子的直接干扰，从而显著提高了正交性和动态范围^[9]。

b. 序列的迭代优化

Toehold开关的性能提升得益于对其序列的迭代优化。Green等^[9]通过对第一代Toehold开关的详细分析，识别出影响性能的关键序列特征，并将其整合到第二代设计中。例如：增加Toehold域的长度以增强触发RNA与开关RNA之间的结合能力；调整开关RNA茎环顶部的序列和环的大小，以优化RBS区域的解折叠能量，从而提高ON状态

下的蛋白质表达水平。

c. 正交性设计与库筛选

Toehold 开关的一个重要特性是其高正交性，这使得多个开关可以在同一细胞中独立运行而不会产生显著串扰。为了实现这一点，Green 等^[9]采用了以下方法：使用 NUPACK 等核酸序列设计工具生成大量潜在的开关序列，并通过计算机模拟评估所有可能的配对组合，筛选出低串扰的正交集；在实验验证中，通过流式细胞术量化 GFP 输出，评估实际串扰水平。

d. 动态范围与热力学优化

Toehold 开关的动态范围（ON/OFF 比率）与其热力学特性密切相关。研究表明，开关 RNA 的二级结构稳定性以及触发 RNA 与开关 RNA 之间的结合自由能是影响性能的关键因素^[9]。通过调整这些参数，可以显著提高开关的动态范围。

1.3.3 化学修饰与功能增强

小非编码 RNA 的化学修饰（如甲基化）对其生物合成与功能的影响：RNA 化学修饰是表观转录组学的核心研究内容，超过 170 种化学修饰已被鉴定，其中 N6-甲基腺苷是最丰富的 mRNA 修饰。这些修饰对 RNA 的结构、稳定性及功能有重要影响，并在多种疾病中扮演关键角色。METTL1/WDR4 复合体可通过在 miRNA 的 G-四链体结构上添加 N7-甲基鸟苷（m7G）修饰来促进 miRNA 的生成，并且 METTL1 的缺失会减少 let-7 加工并促进细胞迁移^[15]。此外，METTL1 还可以通过 m7G 甲基化修饰调节特定 mRNA 的翻译效率。值得关注的是，一系列突破性研究^[16]更是揭示，RNA 可发生糖基化修饰，从而产生糖基化 RNA（glycosylated RNA, glycoRNA）。它是一种通过 N-糖链修饰 RNA 分子的化学修饰，其核心机制包括 acp3U 作为附着位点、酰胺基团的转化以及寡糖基转移酶（oligosaccharyltransferase, OST）介导的 N-糖基化。这种修饰不仅增强了 RNA 的稳定性，还赋予其调控固有免疫应答、介导细胞间通讯与黏附，以及参与肿瘤发生发展和自身免疫性疾病进程等新的生物学功能。

人工设计 RNA 修饰以增强稳定性或调控活性：人工 RNA 修饰技术通过引入非天然碱基或化学基团对 RNA 进行修饰，能够显著增强 RNA 分子的稳定性和功能。研究显示，通过核仁小 RNA（small nucleolar RNA, snoRNA）在特定 mRNA 上安装假尿嘧啶（Ψ），可生成具备增强型非天然解码能力

的 Ψ 修饰无义密码子^[17]。Ψ 修饰能够促进碱基配对、碱基堆叠并强化糖-磷酸骨架，这些特性有助于提高 RNA 的稳定性和翻译能力，还可通过降低免疫原性，减少外源 RNA 在体内引发的炎症反应，提升其在基因治疗、蛋白质表达等应用场景中的安全性与有效性。

2 合成 RNA 调控元件的设计与优化

2.1 miRNA 响应型开关

miRNA 响应型开关是合成生物学中精准调控基因表达的重要工具。通过将特定的 miRNA 结合位点嵌入 mRNA 的 3'UTR，可以创建条件性翻译激活或抑制系统。当细胞表达特定的 miRNA 时，该 miRNA 与人工设计的结合位点相互作用，导致靶 mRNA 降解或翻译抑制；相反，在目标 miRNA 缺失的细胞中，基因表达得以顺利进行^[18]。该开关在癌症治疗中具有潜在价值。

为提升其精准性与安全性，可使用定制化 miRNA 响应：如将丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV）5'UTR 中的天然 miR-122 结合位点替换为其他 miRNA（如 miR-155、let-7a、miR-20a 等）的结合位点，可以实现对不同 miRNA 的响应。这种方法允许根据目标组织或细胞类型中特定 miRNA 的表达谱来定制 circRNA 的特异性表达调控模式，仅在高表达对应 miRNA 的靶细胞中激活 circRNA 的翻译或功能发挥，从而有效规避非靶细胞的脱靶激活，显著提升基因递送系统的靶向性与生物安全性^[18]。miR-155 响应型 circRNA 设计原理见图 2。

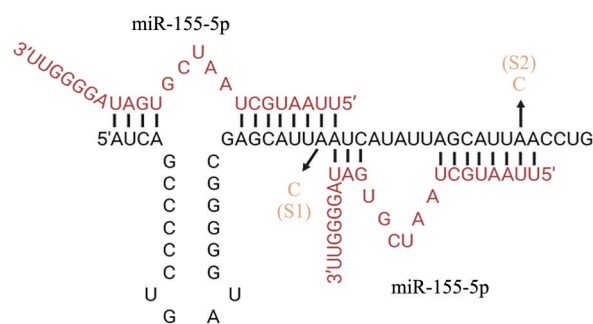


Fig. 2 Schematic diagram of miR-155-responsive circRNA design

图2 miR-155响应型circRNA设计示意图

将HCV 5'UTR中天然miR-122结合位点（S1/S2）替换为miR-155-p识别序列，实现miRNA依赖的翻译激活。红色序列为miR-155-5p，黑色序列为改造后的HCV 5'UTR。

2.2 circRNA的工程化应用

2.2.1 circRNA 携带的内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 在翻译调控中发挥重要作用

circMyc 中的 IRES 序列来源于 *c-myc* 基因的 5'UTR, 并表现出反式作用的 IRES 活性。它通过与靶 mRNA (如 *PXK* mRNA) 的 5'UTR 和 3'UTR 区域形成互补配对, 促进 mRNA 与核糖体亚基的结合, 从而增强翻译效率。此外, circMyc 的 IRES 功能独立于 miRNA 调控, 展示了其作为新型翻译调控因子的潜力^[19]。图 3 示 circMyc 结构域。

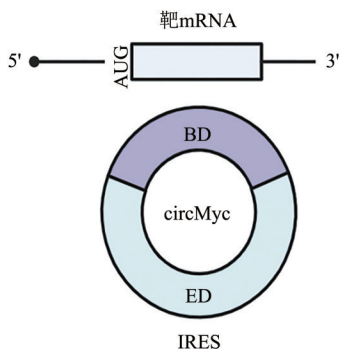


Fig. 3 Schematic diagram of the domains of circMyc

图3 circMyc的结构域示意图

该环状RNA (circMyc) 包含两个关键功能域: 内部核糖体进入位点 (IRES, 即效应域ED) 和结合域 (BD)。

2.2.2 circRNA与mRNA的相互作用调控关键蛋白质表达

circRNA 可以通过作为 miRNA 海绵来调控基因表达。研究表明, circFOXK2 可通过其 3 个 ELAVL1 结合位点, 招募 RNA 结合蛋白 ELAVL1 到细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, *CCND1*) mRNA 上, 并提高 mRNA 的稳定性^[20]。RNA 免疫沉淀实验显示, ELAVL1 能够同时拉下 circFOXK2 和 *CCND1* mRNA, 且在 circFOXK2 敲低的情况下, *CCND1* mRNA 的富集显著减少。circFOXK2 通过招募 ELAVL1 稳定 *CCND1* mRNA 的分子机制见图 4。

2.2.3 工程化优化与应用前景

优化方向在于将这些功能模块化与可编程化。通过理性设计, 可以将 IRES 元件、RBP 结合位点以及靶向特定 mRNA 的序列整合进一个人工 circRNA 骨架中, 构建出能同时增强目标 mRNA 稳

定性和翻译效率的“超级调控因子”。这种定制化的 circRNA 工具箱, 为实现对特定基因表达的精准、高效调控提供了全新的合成生物学策略^[19]。用于研究 IRES 顺式与反式翻译活性的 RNA 结构设计见图 5。

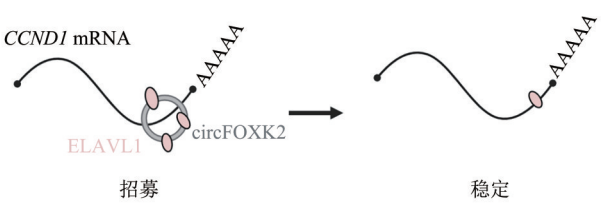


Fig. 4 Schematic diagram of the molecular mechanism by which circFOXK2 stabilizes *CCND1* mRNA through recruitment of ELAVL1

图4 circFOXK2通过招募ELAVL1稳定CCND1 mRNA的分子机制示意图

左侧展示circFOXK2通过其3个ELAVL1结合位点招募RNA结合蛋白ELAVL1, 进而结合至CCND1 mRNA; 右侧示意该过程提升了CCND1 mRNA的稳定性。

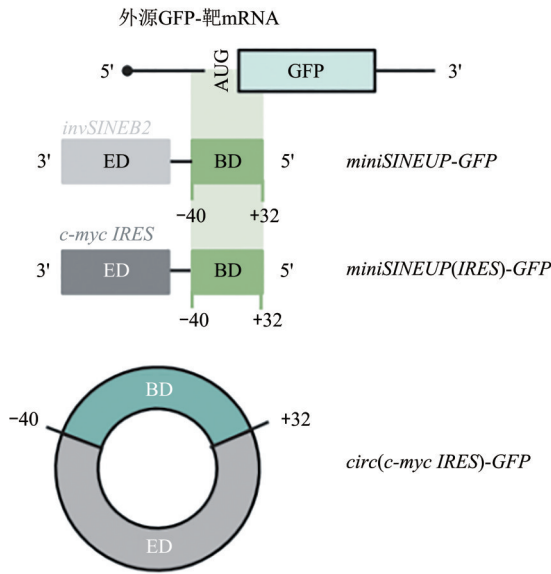


Fig. 5 RNA structure design for investigating the cis- and trans-translation activities of IRES

图5 用于研究IRES顺式与反式翻译活性的RNA结构设计 图中包含外源 GFP 靶 mRNA, 以及 3 种 SINEUP 相关构建: miniSINEUP-GFP (效应域ED为invSINEB2, 结合域BD靶向 GFP mRNA 的-40至+32区域)、miniSINEUP (IRES)-GFP (以 *c-myc* IRES 替换invSINEB2作为ED, 保留相同BD)、circ (*c-myc* IRES)-GFP (环状RNA, 含 *c-myc* IRES 作为ED及BD序列)。这些构建用于探究 IRES 在翻译调控中的作用机制。

2.3 siRNA自组装系统

siRNA 自组装系统是一种通过设计和编程将 siRNA 整合到特定结构中的纳米技术平台。它采用自下而上的组装策略,利用自然存在的 RNA 基序进行理性设计。例如, SARN3w 和 SARN5w 分别包含三向和五向支架,能够整合多个 siRNA 双链。这些系统能够自我折叠成具有特定形状和尺寸的纳米结构,从而增强其在 RNAi 应用中的效率和稳定性。通过理性设计,未来可通过在自组装骨架上引入靶向配体,实现细胞特异性递送,增强 siRNA 对特定组织或细胞类型的靶向能力,从而减少脱靶效应并提高治疗效率。还可设计对外部刺激敏感的结构元件,实现 siRNA 在特定微环境(如肿瘤低 pH 环境或昆虫肠道高酶活性区域)中的可控释放。这将显著提升递送系统的精准性和适应性^[21]。

3 合成基因回路:从逻辑运算到资源分配

3.1 逻辑门与多路复用调控

3.1.1 转录级联逻辑电路:通过设计组合开关实现细胞中不同 mRNA 翻译的调控

转录级联逻辑电路是实现基因表达精准时空调控的核心工具,其核心调控元件可依托内源性 miRNA 分子的表达差异来设计。其中, miRNA ON 和 OFF 开关可分别靶向调控靶基因 n (target gene n, Bn) 和靶基因 s (target gene s, Bs) 表达。例如, miR-21-5 ON 和 OFF 开关分别被用于特异性控制 Bn 和 Bs 的表达,进而在 HeLa 和 293FT 细胞中实现特定细胞类型的死亡^[22]。

3.1.2 miRNA 与 CRISPR 的协同:miRNA-155 和 miRNA-21 通过 AND 逻辑门实现诊断特异性

miRNA-155 通过与 crRNA 结合,能触发 Cas13a 的反式切割活性,这种活性可以切割设计好的发夹报告探针 (hairpin reporter, HR)。HR 包含一个 Cas13a/crRNA 切割区域以及一个 miRNA-21 识别序列。当 Cas13a 被 miRNA-155 激活后,HR 被切割,暴露出一个单链区域。miRNA-21 能够与该单链区域结合,并通过链置换反应将带有淬灭基团的序列从带有荧光基团的序列上替换下来,从而实现荧光信号的恢复。这种荧光恢复仅在 miRNA-155 和 miRNA-21 同时存在时发生,表明其构成了一个严谨的 AND 逻辑门。只有当 miRNA-155 和 miRNA-21 同时存在时,系统才会产生显著的荧光信号。这种双重输入的设计极大地提高了诊断的特异性,因为单一的 miRNA 无法单独触发系统的完

全激活^[23]。基于 Cas13a 和 HR 的 AND 逻辑门机制见图 6。

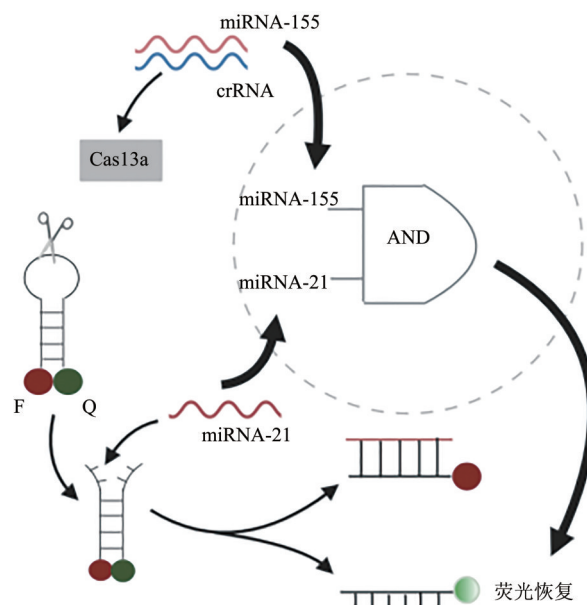


Fig. 6 AND logic gate mechanism based on Cas13a and HR

图6 基于Cas13a和HR的AND逻辑门机制

3.2 资源分配与表达噪声控制

3.2.1 MIRELLA模型

MIRELLA 模型是一种数学模型,由 Cella 等^[24]开发,旨在揭示 miRNA 在细胞内资源分配中的作用。MIRELLA 模型的核心在于其对转录后事件的定性捕捉,能够识别哺乳动物细胞中 miRNA 基础负担缓解的关键过程。模型将核糖体和核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 作为主要参与者,并通过有效反应速率来反映每个个体资源池的可用性,这些速率根据整体基因表达需求进行动态调整。此外, MIRELLA 还探讨了 miRNA 结合位点的位置对资源分配的影响。资源受限背景下的基因网络建模见图 7。

3.2.2 iFFL 电路设计:利用内源 miRNA 抑制基因表达负担以提升电路可靠性

非相干前馈环 (incoherent feed-forward loop, iFFL) 是一种经典的前馈调控回路,其核心是通过一个激活信号和一个抑制信号共同作用于目标基因,实现对输出信号的精确控制^[25]。利用内源 miRNA 作为抑制元件,可以设计出如下电路结构: a. 通过转录因子 (如 Gal4VP16) 激活目标基因的表达; b. 将目标基因的 3'UTR 设计为包含特定

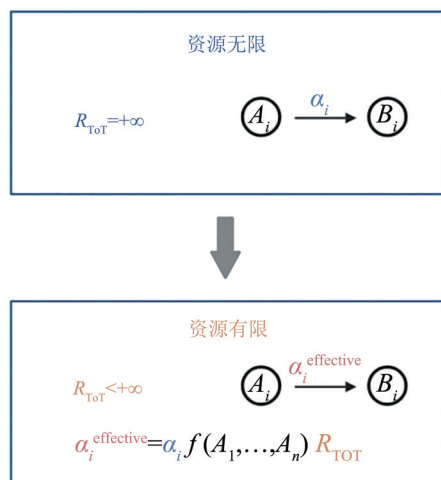


Fig. 7 Gene network modelling under resource-constrained conditions

图7 资源受限背景下的基因网络建模

左侧展示了在资源无限情况下的常规反应动力学；右侧展示了在资源有限情况下资源感知模型的预测结果。这种建模方式使得模型能够根据基因表达需求动态调整反应速率。

miRNA 的 miRNA 反应元件 (microRNA response elements, MREs)，使内源 miRNA 能够结合并抑制目标基因的表达；c. 当输入信号较强时，miRNA 介导的抑制作用可防止目标基因过度表达，从而避免细胞负担过重。该设计能在保持电路输出稳定性的同时有效缓解由于高强度表达引起的代谢负担。基于内源 miRNA 的 TALER 开关电路结构见图 8。

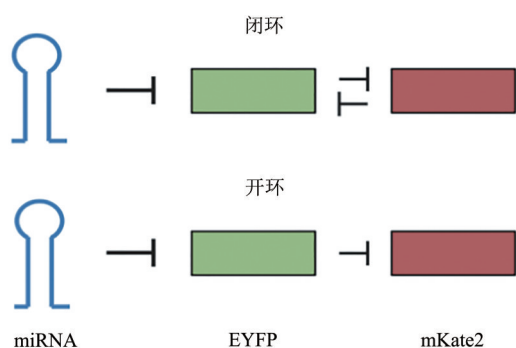


Fig. 8 TALER switch circuit architecture based on endogenous microRNA

图8 基于内源miRNA的TALER开关电路结构

闭环：Gal4VP16驱动的EYFP-TALER9与mKate2-TALER14通过相互抑制形成前馈调控回路 (iFFL)，EYFP的3'UTR含miRNA反应元件 (MREs)，内源miRNA结合MREs抑制其表达，防止目标基因过度激活；开环：展示单向信号传递 (EYFP→mKate2)，用于对比实验。

3.3 细胞状态检测与动态调控

3.3.1 miRNA开关结合荧光报告系统实时追踪细胞分化状态

通过合理设计 miRNA 开关并结合荧光报告系统，可以实现对细胞分化状态的实时追踪。miRNA 开关是一段人工设计的 mRNA 序列，其 5' 端包含一个荧光蛋白编码基因（如 *GFP*、*RFP* 等），3' 端包含一个与目标 miRNA 互补的结合位点。目标 miRNA 在细胞内会与 miRNA 开关结合，导致 mRNA 降解或翻译受抑制，从而降低荧光蛋白表达。若目标 miRNA 的表达水平高，则荧光信号减弱；如果目标 miRNA 的表达水平低，则荧光信号增强。这种荧光信号强度与目标 miRNA 表达水平的负相关关系，可间接表征细胞分化进程中 miRNA 表达谱的动态改变，进而实现对细胞分化状态的实时追踪^[26]。图 9 示 miRNA 感应开关的结构。



Fig. 9 Schematic diagram of the miRNA sensing switch structure

图9 miRNA感应开关的结构示意图

3.3.2 合成电路调控多能干细胞分泌因子，定向分化组织

人类多能干细胞具有向多种功能细胞分化的潜能，其细胞状态的精准调控是再生医学与细胞治疗领域的核心挑战。合成基因回路能够在人类多能干细胞中实现细胞状态特异性控制所需蛋白质，通过内源性 miRNA 作为分类器进行 AND 逻辑整合，并采用 miRNA 介导的输出精细调节技术 (miSFITs) 实现对输出蛋白质水平的精细控制。将靶分泌因子的编码序列嵌入该基因回路，即可借助内源 miRNA 的逻辑甄别与 miSFITs 的层级调控，实现干细胞分泌因子的时空特异性表达与分泌水平的精准管控，为未来开发针对特定细胞状态的定制化控制提供基础^[27]。合成基因回路实现 hPSC 细胞状态特异性蛋白调控见图 10。

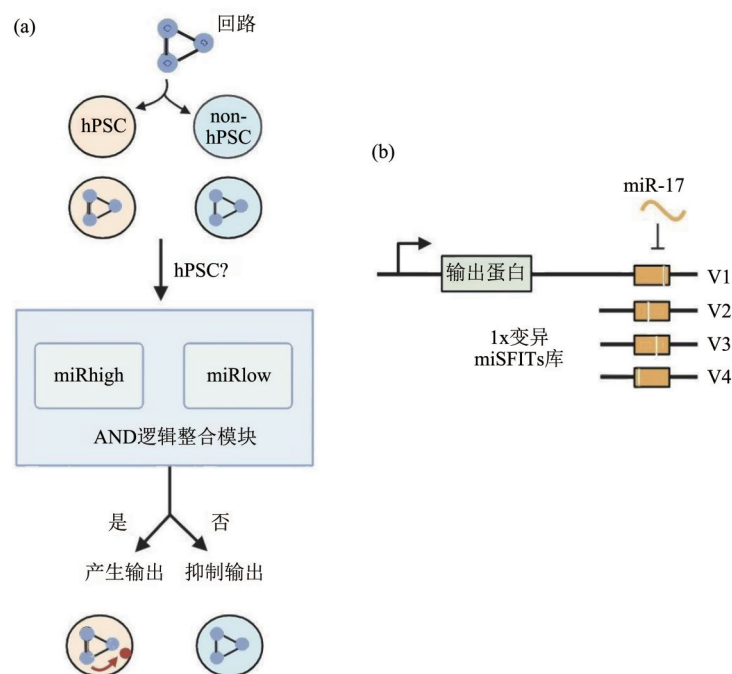


Fig. 10 Synthetic genetic circuits enable state-specific protein regulation in hPSC cells

图10 合成基因回路实现hPSC细胞状态特异性蛋白调控

(a) hPSC “ON” 回路：通过细胞状态检测（hPSC vs non-hPSC）实现逻辑分支，经AND逻辑整合（miRhigh和miRlow传感器）控制输出蛋白的产生或抑制，最终实现精细输出；(b) miSFITs输出精细调控技术：利用miR-17靶位点的突变变体（V1~V4）梯度调节输出蛋白水平。

4 治疗应用：从实验室到临床转化

4.1 癌症治疗

在癌症治疗中，RNA合成生物学回路的核心设计逻辑在于赋予治疗制剂区分癌细胞与正常细胞的能力。这主要通过两种策略实现：一是利用肿瘤微环境特异性的生物标志物（如miRNA表达谱）作为输入信号，构建逻辑门控系统以实现精准靶向；二是直接利用肿瘤特异性表达的RNA分子本身作为触发器，启动治疗性蛋白的表达。

4.1.1 溶瘤病毒与miRNA敏感性设计改造寨卡病毒

溶瘤病毒与miRNA敏感性设计的研究中，寨卡病毒被改造用于靶向中枢神经系统肿瘤，同时通过特定的基因修饰保留了对正常神经干细胞的安全性。Novaes等^[28]通过引入MRE，开发了对miRNA敏感的合成寨卡病毒，即oZIKV_2k和oZIKV_30。在正常神经干细胞中，miR-124-3p和miR-9-5p的表达水平很高。当改造后的寨卡病毒（如oZIKV_2k针对miR-124、oZIKV_30针对miR-9）进入这些细胞时，高丰度的miRNA会迅速识别并

结合到病毒基因组中插入的MRE上。miRNA结合会抑制病毒关键基因的翻译，从而有效阻断病毒复制，保护正常细胞免受损伤。反之，在中枢神经系统肿瘤细胞中，miR-124-3p与miR-9-5p的表达水平显著降低，无法有效结合病毒基因组上的MRE，病毒关键基因的翻译抑制被解除，进而得以高效复制并特异性杀伤肿瘤细胞。溶瘤病毒与miRNA敏感性设计见图11。

4.1.2 circRNA编码细胞毒性蛋白：实现癌细胞特异性杀伤

在肿瘤免疫治疗中，利用特异性触发器是激活精准免疫应答的关键策略。中山大学宋尔卫团队^[29]发现，肿瘤特异性circRNA（circFAM53B）可编码隐性抗原肽，与HLA-I/II分子高亲和力结合，并激活初始CD4⁺/CD8⁺T细胞，诱导抗原特异性抗肿瘤免疫。研究人员设计了基于circRNA的疫苗，并在黑色素瘤小鼠模型中进行了测试。结果显示，接种circRNA疫苗的小鼠中，肿瘤特异性T细胞的比例显著增加。这种疫苗不仅显著抑制了肿瘤生长，还减少了肿瘤肺转移的发生。利用肿瘤特异性circRNA作为新型抗原来源，可以开发针对患者

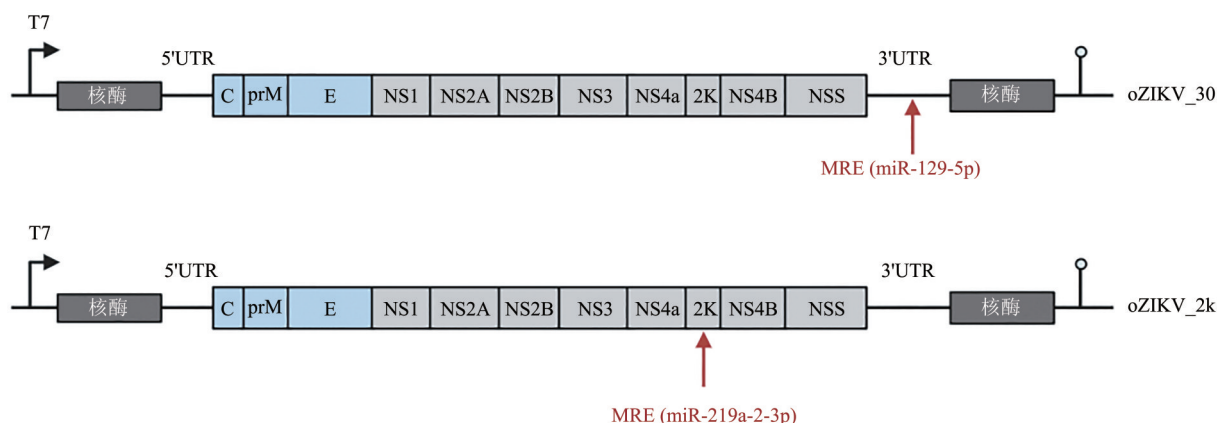


Fig. 11 Schematic diagram of the genomic structure of synthetic Zika viruses oZIKV_30 and oZIKV_30k

图11 合成寨卡病毒oZIKV_30和oZIKV_2k的基因组结构示意图

两种miRNA敏感性寨卡病毒(oZIKV_30和oZIKV_2k)的基因组结构。oZIKV_30在3'非翻译区(3'UTR)插入了针对miR-129-5p的miRNA应答元件(MRE), oZIKV_2k在2k区域插入了针对miR-219a-2-3p的MRE。

肿瘤特异性抗原的个性化免疫治疗策略。这一发现为癌症免疫治疗提供了新的方向,尤其是在低突变负荷肿瘤中具有重要意义。

4.2 代谢性疾病

在代谢性疾病的治疗中,强化设计逻辑是实现精准干预的关键。这不再局限于单一分子的递送,而是深入到对疾病病理核心机制的靶向重塑。通过将编码功能性蛋白的mRNA与递送系统相结合,编程特定器官(如肝脏)成为“生物反应器”,实现系统性代谢调节。该策略强调了对疾病机制的深刻理解与工程化设计的完美融合,为开发高效、安全的代谢性疾病疗法开辟了新路径。

4.2.1 miR-10b-5p模拟物治疗糖尿病

转录因子 Krüppel 样因子 11 (Krüppel-like factor 11, KLF11) 是调控胰岛β细胞功能的关键蛋白。它通过直接抑制下游靶基因KIT原癌基因受体酪氨酸激酶(KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase, KIT)的表达,形成了一个重要的调控通路,即KLF11-KIT通路。通过KLF11-KIT通路,miR-10b-5p模拟物在恢复胰岛β细胞功能方面具有显著疗效。具体而言,miR-10b-5p模拟物能够靶向抑制KLF11的表达,从而解除KLF11对KIT和胰岛素基因的负调控作用。该机制使得miR-10b-5p模拟物不仅能增强KIT的表达,还可以促进胰岛β细胞的增殖和功能恢复^[30]。

4.2.2 编码成纤维细胞生长因子21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 蛋白的mRNA,通过脂质纳米颗粒递送系统治疗肥胖

脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)作为递送载体,将编码人类FGF21蛋白的mRNA递送至肝脏,表达的FGF21蛋白能在体外分化脂肪细胞及体内小鼠模型中发挥功能,具体表现为激活促分裂原活化的蛋白质激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、促进葡萄糖摄取以及诱导下游基因表达,进而调控相关代谢通路^[31]。此外,肝脏中的脂肪变性显著改善,进一步说明FGF21蛋白在肝脏中发挥了代谢调节作用。

4.3 神经退行性疾病

神经退行性疾病通常与毒性蛋白的积聚密切相关。RNA合成生物学在此领域的主要设计逻辑是实现致病基因表达的精准下调。反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASO)技术是实现这一逻辑的关键,其通过序列特异性杂交,精确引导降解或抑制特定mRNA。

4.3.1 ASO技术在阿尔茨海默病中的应用

在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的研究中,靶向mRNA的ASO技术可通过直接作用于特定基因的mRNA,调节其表达水平或翻译过程,从而影响与AD相关的病理机制^[32]。一些ASO被设计用于降低毒性β淀粉样蛋白(amyloid β-protein, Aβ)的水平,例如OL-1通过靶向淀粉

样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的 mRNA 对应于 A β 第 17~30 氨基酸片段的区域降低 APP 表达, 改善了小鼠模型的认知功能和神经炎症^[33]。ASO 也被设计用于降低 tau 蛋白水平, 例如一种诱导 RNase H 酶介导降解 tau 蛋白 mRNA 的 ASO, 在 tauP301S 小鼠中显著减少了 tau 蛋白聚集、神经元损失, 并延长了生存期^[34]。此外, 还有针对糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 的 ASO, 通过抑制 tau 蛋白磷酸化和氧化应激, 改善了学习和记忆能力。ASO 还被应用于调控载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE)、组蛋白去乙酰化酶 2 (histone deacetylase 2, HDAC2) 等与 AD 相关基因的表达。例如, 靶

向 *ApoE* mRNA 的 ASO 在 APP/PS1 小鼠模型中降低了 A β 斑块负担^[35]。

4.3.2 ASO 技术在渐冻症中的应用

9 号染色体 72 号开放阅读框 (chromosome 9 open reading frame 72, *C9orf72*) 基因中的 GGGGCC 六核苷酸重复扩增是导致渐冻症的主要遗传原因。疾病机制包括 *C9orf72* 蛋白功能的部分丧失 (单倍剂量不足) 以及重复扩增引起的毒性作用。Tran 等^[36] 开发了针对 *C9orf72* 基因的 ASO, 以特异性降低含有重复扩增的转录本 V1 和 V3 的水平, 同时尽量不影响主要转录本 V2。 *C9orf72* 基因转录本变体结构及 ASO 作用机制见图 12。

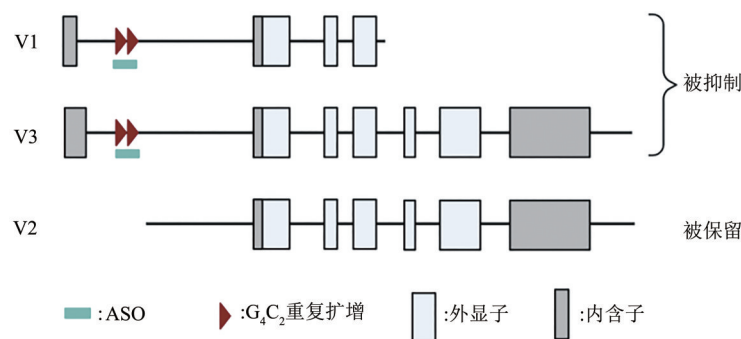


Fig. 12 Schematic diagram of the structure of *C9orf72* gene transcript variants and the mechanism of action of antisense oligonucleotides (ASOs)

图12 *C9ORF72*基因转录本变体结构及ASO作用机制示意图

C9orf72 基因转录产生 3 个变体 (V1、V2、V3), 其中 V1 和 V3 在第一内含子中包含 G4C2 六核苷酸重复扩增 (红色三角形), 而 V2 不包含该重复序列。针对重复扩增的反义寡核苷酸 (ASO, 青色条形) 特异性结合并抑制 *C9orf72* V1 和 *C9orf72* V3 的表达, 同时保留主要转录本 V2, 以避免 *C9ORF72* 蛋白功能的部分丧失。

4.4 心血管疾病

在心血管疾病的再生修复中, 先进的 RNA 回路设计可通过外泌体或自组装纳米颗粒等先进载体, 使治疗性 RNA 能够在特定的病理部位 (如心肌梗死区域、血管损伤部位等) 被智能/特异性激活或释放, 从而获得最大化疗效并最小化系统性副作用。

4.4.1 miRNA-126 封装于外泌体修复心肌梗死

研究表明, 通过电穿孔技术制备的负载 miRNA-126 修饰细胞外脂质囊泡 (extracellular lipid vesicles, ELVs), 在心肌梗死修复中表现出显著的治疗潜力^[37]。这种技术不仅提高了货物装载的可控性, 还增强了 ELVs 的稳定性和体内递送效率。

4.4.2 自组装 miRNA 开关抑制血管再狭窄

血管内皮剥脱常伴随血管平滑肌细胞异常增殖与迁移, 进而诱发血管再狭窄, 是血管介入治疗后亟待攻克的关键病理难题。自组装 miRNA 开关纳米颗粒能够有效靶向内皮剥脱区域, 抑制血管再狭窄并促进血管再生。这些纳米颗粒由合成的 miRNA 开关与阳离子两亲性细胞穿透肽 (p5RHH) 自组装而成, 尺寸小于 200 nm^[38]。该系统在体内实验中表现出对血管内皮损伤区域的高度选择性, 而不会显著影响其他器官。

4.5 再生医学工程

通过优化 *FGF18* mRNA 的 UTR 序列及化学修饰, 能延长 FGF18 蛋白在软骨中的表达时间至 6 d。LNP 递送系统实现了软骨组织靶向治疗效果, 在内

侧半月板失稳 (destabilization of the medial meniscus, DMM) 手术诱导的骨关节炎模型的 C57BL/6J 小鼠中显著减轻了软骨退变。与重组蛋白疗法相比, LNP-FGF18 mRNA 在疼痛行为和步态改善方面表现更优。此外, 该系统提升了软骨修复指标, 并克服了重组蛋白半衰期短、渗透浅的局限性, 单次注射即可实现长达 6 d 的持续治疗效果^[39]。

4.6 免疫治疗与疫苗应用

在免疫治疗与疫苗开发领域, 通过设计编码特定抗原的序列, RNA 可作为信使, 赋予免疫系统新的识别靶点; 通过设计与致病基因互补的序列, RNA 可作为向导, 精准沉默或编辑异常基因; 通过设计能折叠成特定三维结构的序列, RNA 可作为适配体, 直接调控关键免疫蛋白的活性。正是这种从“序列设计”到“功能实现”的转化逻辑, 使得 RNA 技术能够灵活地应对不同的免疫治疗挑战, 成为现代生物医药领域中极具潜力的平台。

4.6.1 个性化新抗原疫苗的开发

RNA 被广泛用于识别和递送患者特异性突变抗原, 从而激活针对肿瘤的特异性免疫反应。通过高通量外显子测序技术, 研究人员可以识别肿瘤细胞中的体细胞突变, 并预测可能引发免疫反应的新抗原。基于这些突变信息, 可以合成编码突变肽的 RNA 分子, 并将其用作疫苗。例如, Sahin 等^[40]通过个性化的新抗原表位 RNA 疫苗, 成功诱导了患者体内针对多种突变的 T 细胞免疫反应, 这些反应具有高度的特异性和多样性。

4.6.2 CRISPRa 技术中 RNA 引导的基因表达调控

sgRNA 可通过与 dCas9 蛋白结合, 将转录激活复合物 (如 VP64、p65 和 HSF1) 招募到目标基因的启动子区域, 从而实现内源性基因的高效激活。同时, 可通过设计针对多种突变基因的 sgRNA 文库, 实现对肿瘤抗原的多重靶向, 进一步增强免疫治疗的效果。如 Wang 团队^[41]设计了 mSAM 文库, 并通过 AAV 载体递送至肿瘤细胞, 验证了其在癌症免疫治疗中的潜力。

4.6.3 RNAi 技术

RNAi 技术可以通过设计 siRNA 来特异性降解病毒基因的 mRNA, 介导靶 mRNA 的特异性降解, 从而减少病毒载量并激活抗病毒免疫反应。此外 ASO 作为另一类核酸靶向工具, 同样可实现抗病毒效应。例如: 在慢性乙型肝炎治疗中, 有种名为 Bepirovirsen 的 ASO, 能够同时靶向乙型肝炎病毒

(hepatitis B virus, HBV) mRNA 和前基因组 RNA, 显著降低乙肝表面抗原和 HBV DNA 水平。类似地, RNAi 技术也可用于其他病毒感染的治疗, 通过沉默病毒复制所需的关键基因, 间接增强宿主免疫系统的清除能力^[42]。

5 前景与展望

5.1 来自药物递送系统的挑战

尽管 RNA 具有正交性好的特点, 但普通载体对 RNA 的包裹可能不彻底, 导致部分 RNA 片段暴露。如 LNP 在递送 RNA 时, 内体可能会破裂, 导致 RNA 泄漏。倘若没有有效的载体, RNA 药物就无法积累在目标组织中, 并且不能穿透到目标细胞内, 即使到达所需组织也难以进入目标细胞内部^[43]。

RNA 药物和普通载体结合时常见问题包括以下几方面。a. 非特异性细胞摄取: 普通载体易被非目标细胞摄取, 降低了治疗效果并引发副作用。b. 抗体功能受损: 传统抗体偶联方法可能影响抗体活性。c. 组装复杂性和低产率: 多步纯化和复杂组装过程增加难度, 降低产率。d. 稳定性问题: 载体-RNA 复合物在血浆中可能解离或降解, 影响递送。e. 内化效率不足: 即使靶向成功, 若内化不足, RNA 难以入胞内, 发挥作用^[44]。上述问题限制了 RNA 药物的递送效率和递送靶向性, 因此需要开发更优的递送系统。

5.2 表达噪声与脱靶效应

5.2.1 通过复合 MRE 设计或竞争性 RNA 降低非特异性结合

与强竞争 RNA 相比, 弱竞争 RNA 能够显著降低基因表达噪声 (靶基因表达的非生理性随机波动), 例如 miR-19b-3p (弱竞争 RNA) 比 miR-30a-5p (强竞争 RNA) 在高表达水平下表现出更低的噪声。而强竞争 RNA 能够显著增加非特异性结合, 导致靶基因表达噪声上升。同一 miRNA 的重复 MRE 在低表达水平下可有效降低噪声, 但在高表达水平下由于饱和效应会导致噪声显著增加。复合 MRE (由不同 miRNA 靶点组成) 在同等抑制水平下比重复 MRE 提升靶基因表达调控的精准度, 并显著减少非特异性调控引发的脱靶风险^[25]。

5.2.2 计算模型预测优化 siRNA/phasiRNA 网络

植物中的阶段性小干扰 RNA (phased small interfering RNAs, phasiRNAs) 在调控植株生长发育、响应生物与非生物胁迫等过程中发挥关键作

用,但其复杂的调控网络与合成机制的解析长期受制于传统预测工具的可靠性与适用性。phasiHunter不仅能预测 phasiRNA 网络,还能通过优化算法和多参考序列整合来增强预测的可靠性和实用性。它是一个强大的工具,适用于研究植物中 phasiRNA 的生物合成及其在发育和应激反应中的作用^[45]。

5.3 临床转化的障碍

5.3.1 合成RNA的长期毒性评估

合成RNA的长期毒性取决于多种因素,包括RNA分子的化学修饰、递送系统的生物相容性以及机体的免疫反应。研究表明,优化化学修饰(合理选用 2'-OMe、PS 骨架修饰,审慎使用 2'-F 修饰以规避其潜在毒性)、开发更安全的递送平台(如 GalNAc 偶联物),可以显著降低潜在的长期毒性。然而,即便有这些优化策略,仍需更多的临床前和临床研究,以全面评估其长期安全性^[46]。例如,尽管新型冠状病毒感染(COVID-19) mRNA 疫苗在短期内取得了巨大成功,但其 LNP 在部分人群中引发的免疫反应及极少数心肌炎等不良事件,仍凸显了对新型 RNA 疗法进行长期随访监测的必要性^[47]。

5.3.2 跨物种调控的生态风险

工程化RNA的环境释放可能引发新型生态风险,涉及非目标效应、种群动态变化、水平基因转移和长期累积效应等方面。例如,针对柑橘大实蝇设计的 dsRNA,如果被蜜蜂取食,可能对蜜蜂产生意想不到的效应,导致这种有益昆虫的生理功能受损甚至死亡,进而破坏局部生态平衡^[48]。为降低风险,应采取以下措施。a. 开发高特异性检测方法:针对不同物种设计高特异性的分子检测工具,如实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative PCR, qPCR)或微滴式数字聚合酶链式反应(droplet digital PCR, ddPCR),以避免误检相关物种基因。b. 监测转录组变化:利用环境转录组学技术,监测物种基因表达变化以评估潜在的生态影响。c. 建立标准化增强子RNA(enhancer RNA, eRNA)数据库:构建多物种及环境条件的 eRNA 参考数据库,区分正常与异常转录组模式。d. 优化样本采集保存技术:改进 eRNA 采集保存方法,如使用化学还原剂(如 2-巯基乙醇)防止 RNA 降解。e. 制定生态风险管理框架:明确 eRNA 检测结果的解读标准,结合物种生态功能及环境条件评估影响范围。f. 加强国际合作与法规建设:推动国际 eRNA 研究合作,共享技术数据资源,形成

统一风险评估标准^[49]。

5.4 未来方向:合成生物学的智能化

以 RoseTTAFoldNA 和 AlphaFold 为代表的 AI 工具,正通过提供前所未有的结构洞察力,直接应对合成生物学中的“元件可编程性受限”和“模型预测能力不足”等核心挑战。在元件可编程性方面,AlphaFold 能够以原子级精度预测单体蛋白质的三维结构,其平均 TM-score 高达 0.88 的准确性^[50],意味着研究人员现在可以基于“结构决定功能”的原则,进行理性的计算机辅助设计。他们可以在合成前预测一个全新氨基酸序列能否折叠成所需构象,从而极大地摆脱了传统依赖大规模筛选的试错模式,显著提升了功能元件(如酶或传感器)的设计成功率和效率。而在模型预测能力方面,RoseTTAFoldNA 的突破性在于能够预测蛋白质-RNA 复合物的结构,即便在没有同源序列的情况下也能保持较高精度。这为构建更宏观的系统模型提供了高保真度的关键输入,因为许多生命过程的核心正是这些分子间的相互作用。通过精确模拟这些复合物的结构,可以更准确地预测信号通路的动态行为和代谢网络的流量,从而显著提升了计算模型对整个生物系统行为的预测能力。

综上,RNA 合成基因回路已实现从单一运算向多模块逻辑运算的关键突破。核糖开关-核酶耦合回路可特异性靶向疾病标志物研究、siRNA 疗法及 RNA 智能递送系统研究在精准医疗中的应用潜力初步显现。但是当前研究领域仍面临三方面核心瓶颈:一是 RNA 元件可编程性受限,例如天然 RNA 温度计的温度响应区间较窄;二是合成基因回路在体内易受核酸酶降解,且递送载体的靶向性有待提升;三是临床转化过程中,脱靶效应的检测方法与多维度安全评估体系尚未完善。在未来,研究可围绕三个方向推进:依托表观转录组学技术优化 RNA 元件功能,构建“元件-回路-递送”一体化系统,并建立基于单细胞测序与类器官的安全评估平台,进而推动该技术在个性化肿瘤治疗、代谢疾病调控中的落地应用,最终实现基础研究与临床需求的深度耦合。

参 考 文 献

- [1] Smanski M J, Zhou H, Claesen J, *et al.* Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14**(3): 135-149
- [2] Cameron D E, Bashor C J, Collins J J. A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol*, 2014, **12**(5): 381-390

- [3] Hasty J, Dolnik M, Rottschäfer V, *et al.* Synthetic gene network for entraining and amplifying cellular oscillations. *Phys Rev Lett*, 2002, **88**(14): 148101
- [4] Elowitz M B, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, **403**(6767): 335-338
- [5] Danino T, Mondragón-Palomino O, Tsimring L, *et al.* A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 2010, **463**(7279): 326-330
- [6] Zhao Y, Coelho C, Hughes A L, *et al.* Debugging and consolidating multiple synthetic chromosomes reveals combinatorial genetic interactions. *Cell*, 2023, **186**(24): 5220-5236.e16
- [7] Borovská I, Zhang C, Dülk S J, *et al.* Identification of conserved RNA regulatory switches in living cells using RNA secondary structure ensemble mapping and covariation analysis. *Nat Biotechnol*, 2025. DOI:10.1038/s41587-025-02739-0
- [8] Wittkopp P J, Kalay G. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nat Rev Genet*, 2011, **13**(1): 59-69
- [9] Green A A, Silver P A, Collins J J, *et al.* Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. *Cell*, 2014, **159**(4): 925-939
- [10] Bartel D P. Metazoan microRNAs. *Cell*, 2018, **173**(1): 20-51
- [11] Kristensen L S, Andersen M S, Stagsted L V W, *et al.* The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet*, 2019, **20**(11): 675-691
- [12] Setten R L, Rossi J J, Han S P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(6): 421-446
- [13] Sun Y, Cao Y, Song Y, *et al.* Improved RNA base editing with guide RNAs mimicking highly edited endogenous ADAR substrates. *Nat Biotechnol*, 2025. DOI:10.1038/s41587-025-02628-6
- [14] Kang H, Park D, Kim J. Logical regulation of endogenous gene expression using programmable, multi-input processing CRISPR guide RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2024, **52**(14): 8595-8608
- [15] Luo Y, Yao Y, Wu P, *et al.* The potential role of N(7) -methylguanosine (m7G) in cancer. *J Hematol Oncol*, 2022, **15**(1): 63
- [16] Xie Y, Chai P, Till N A, *et al.* The modified RNA base acp(3)U is an attachment site for N-glycans in glycoRNA. *Cell*, 2024, **187**(19): 5228-5237.e12
- [17] Liu J, Yan X, Wu H, *et al.* RNA codon expansion via programmable pseudouridine editing and decoding. *Nature*, 2025, **643**(8074): 1410-1420
- [18] Ma Y, Mao Y, Luo S, *et al.* Development and characterization of a miRNA-responsive circular RNA expression system with cell type specificity. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2025, **36**(1): 102450
- [19] D'Agostino S, Tettey-Matey A, Volpe M, *et al.* Internal ribosome entry sites enhance translation in trans in antisense non-coding SINEUP and circular RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2025, **53**(15): gkaf788
- [20] Yi J, Du J, Chen X, *et al.* A circRNA-mRNA pairing mechanism regulates tumor growth and endocrine therapy resistance in ER-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, **122**(8): e2420383122
- [21] Xia Y, Zhang T, Ni X, *et al.* Engineered RNA nanostructures for scalable and efficient RNAi-based pesticides. *Trends Biotechnol*, 2025, **43**(12): 3172-3195
- [22] Fujita Y, Hirosawa M, Hayashi K, *et al.* A versatile and robust cell purification system with an RNA-only circuit composed of microRNA-responsive ON and OFF switches. *Sci Adv*, 2022, **8**(1): eabj1793
- [23] Yang Q, Dong M J, Xu J, *et al.* CRISPR/RNA aptamer system activated by an AND logic gate for biomarker-driven theranostics. *J Am Chem Soc*, 2025, **147**(1): 169-180
- [24] Cella F, Perrino G, Tedeschi F, *et al.* MIRELLA a mathematical model explains the effect of microRNA-mediated synthetic genes regulation on intracellular resource allocation. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(7): 3452-3464
- [25] Wei L, Li S, Zhang P, *et al.* Characterizing microRNA-mediated modulation of gene expression noise and its effect on synthetic gene circuits. *Cell Rep*, 2021, **36**(8): 109573
- [26] Hu Y, Li C Y, Lu Q, *et al.* Multiplex miRNA reporting platform for real-time profiling of living cells. *Cell Chem Biol*, 2024, **31**(1): 150-162.e7
- [27] Prochazka L, Michaels Y S, Lau C, *et al.* Synthetic gene circuits for cell state detection and protein tuning in human pluripotent stem cells. *Mol Syst Biol*, 2022, **18**(11): e10886
- [28] Novaes G M, Lima C, Longo C, *et al.* Genetically modified ZIKA virus as a microRNA-sensitive oncolytic virus against central nervous system tumors. *Mol Ther*, 2024, **32**(2): 440-456
- [29] Huang D, Zhu X, Ye S, *et al.* Tumour circular RNAs elicit anti-tumour immunity by encoding cryptic peptides. *Nature*, 2024, **625**(7995): 593-602
- [30] Singh R, Ha S E, Wei L, *et al.* miR-10b-5p rescues diabetes and gastrointestinal dysmotility. *Gastroenterology*, 2021, **160**(5): 1662-1678.e18
- [31] Bartesaghi S, Wallenius K, Hovdal D, *et al.* Subcutaneous delivery of FGF21 mRNA therapy reverses obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, **28**: 500-513
- [32] Grabowska-Pyrzewicz W, Want A, Leszek J, *et al.* Antisense oligonucleotides for Alzheimer's disease therapy: from the mRNA to miRNA paradigm. *EBioMedicine*, 2021, **74**: 103691
- [33] Farr S A, Erickson M A, Niehoff M L, *et al.* Central and peripheral administration of antisense oligonucleotide targeting amyloid- β protein precursor improves learning and memory and reduces neuroinflammatory cytokines in Tg2576 (A β PPswe) mice. *J Alzheimers Dis*, 2014, **40**(4): 1005-1016
- [34] De Vos S L, Miller R L, Schoch K M, *et al.* Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Sci Transl Med*, 2017, **9**(374): eaag0481
- [35] Farr S A, Ripley J L, Sultana R, *et al.* Antisense oligonucleotide against GSK-3 β in brain of SAMP8 mice improves learning and memory and decreases oxidative stress: involvement of

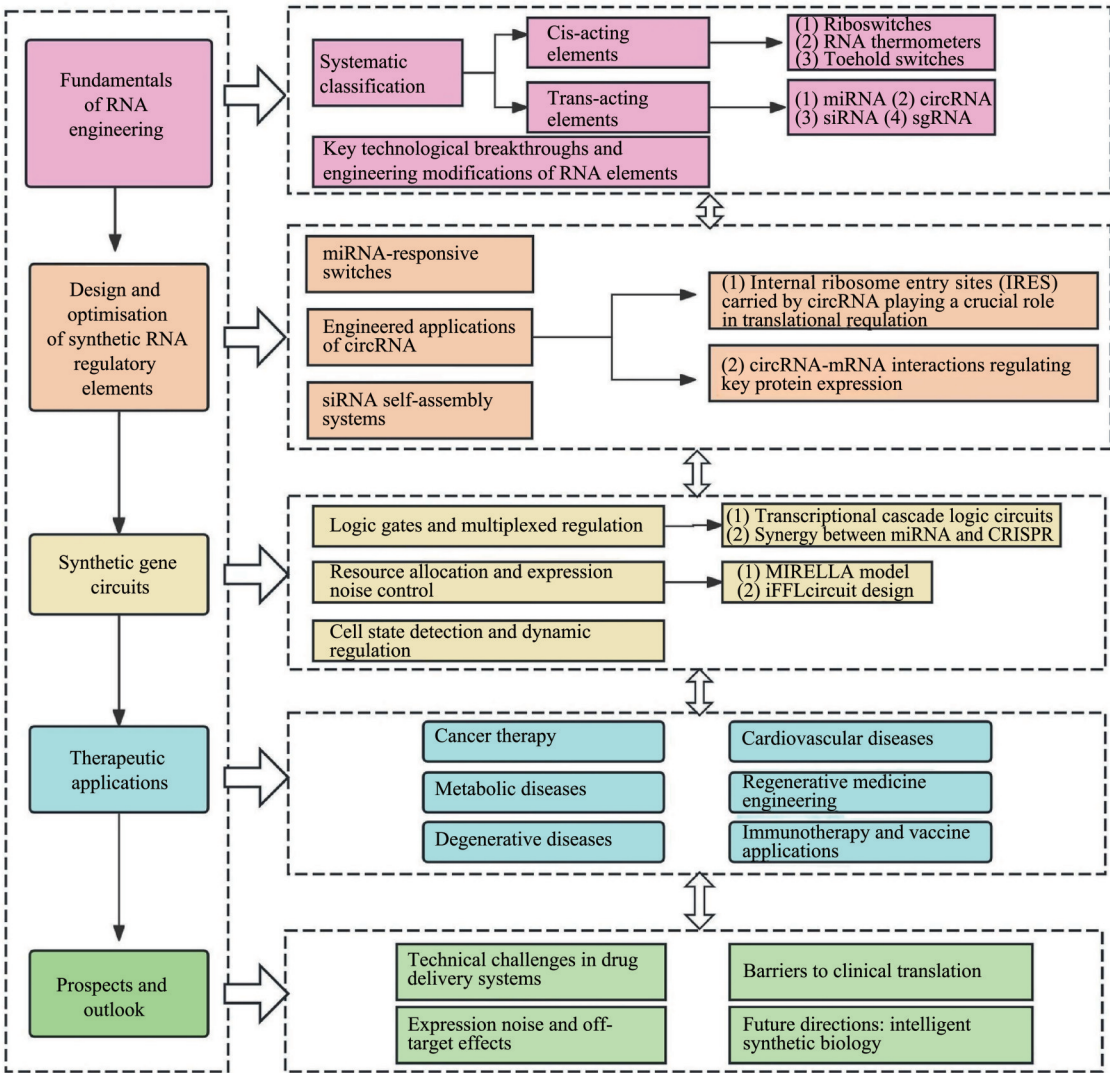
- transcription factor Nrf2 and implications for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 2014, **67**: 387-395
- [36] Tran H, Moazami M P, Yang H, *et al.* Suppression of mutant C9orf72 expression by a potent mixed backbone antisense oligonucleotide. *Nat Med*, 2022, **28**(1): 117-124
- [37] Bheri S, Brown M E, Park H J, *et al.* Customized loading of microRNA-126 to small extracellular vesicle-derived vehicles improves cardiac function after myocardial infarction. *ACS Nano*, 2023, **17**(20): 19613-19624
- [38] Lockhart J H, VanWye J, Banerjee R, *et al.* Self-assembled miRNA-switch nanoparticles target denuded regions and prevent restenosis. *Mol Ther*, 2021, **29**(5): 1744-1757
- [39] Kong K, Li B, Chang Y, *et al.* Delivery of FGF18 using mRNA-LNP protects the cartilage against degeneration *via* alleviating chondrocyte senescence. *J Nanobiotechnol*, 2025, **23**(1): 34
- [40] Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*, 2017, **547**(7662): 222-226
- [41] Wang G, Chow R D, Bai Z, *et al.* Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPRa elicits potent antitumor immunity. *Nat Immunol*, 2019, **20**(11): 1494-1505
- [42] Pan Y, Pan M, Huang Y, *et al.* Nucleic acid therapeutics for liver diseases: a decade of technological convergence and clinical challenges. *ILIVER*, 2025, **4**(3): 100178
- [43] Lokugamage M P, Gan Z, Zurla C, *et al.* Mild innate immune activation overrides efficient nanoparticle-mediated RNA delivery. *Adv Mater*, 2020, **32**(1): e1904905
- [44] Chen M Z, Yuen D, McLeod V M, *et al.* A versatile antibody capture system drives specific *in vivo* delivery of mRNA-loaded lipid nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2025, **20**(9): 1273-1284
- [45] Feng Z, Feng J, Zhang B, *et al.* PhasiHunter: a robust phased siRNA regulatory cascade mining tool based on multiple reference sequences. *Bioinformatics*, 2023, **39**(11): btad676
- [46] Ranjbar S, Zhong X B, Manautou J, *et al.* A holistic analysis of the intrinsic and delivery-mediated toxicity of siRNA therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, **201**: 115052
- [47] Banoun H. mRNA: vaccine or gene therapy? The safety regulatory issues. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(13): 10514
- [48] Chen A, Zheng W, Zheng W, *et al.* The effects of RNA interference targeting *Bactrocera dorsalis* ds-Bdrpl19 on the gene expression of rpl19 in non-target insects. *Ecotoxicology*, 2015, **24**(3): 595-603
- [49] Yates M C, Derry A M, Cristescu M E. Environmental RNA: a revolution in ecological resolution?. *Trends Ecol Evol*, 2021, **36**(7): 601-609
- [50] Baek M, McHugh R, Anishchenko I, *et al.* Accurate prediction of protein-nucleic acid complexes using RoseTTAFoldNA. *Nat Methods*, 2024, **21**(1): 117-121

Advances in RNA Synthetic Biology: Gene Circuit Design and Application in Precision Medicine

DAI Yi-Han*

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Graphical abstract



Abstract RNA synthetic biology, as a frontier interdisciplinary field, is driving the leap from fundamental research to precision medicine in life sciences through the engineered design of RNA components and the construction of genetic circuits. This paper aims to systematically outline the design principles, key technological breakthroughs, and biomedical applications of synthetic RNA genetic circuits. Building upon this foundation, it

* Corresponding author.
Tel: 86-15707366068, E-mail: m15707366068@163.com
Received: September 3, 2025 Accepted: January 8, 2026

provides an in-depth analysis of current research bottlenecks and proposes future development directions. Commencing with a foundational role in the central dogma of RNA, this paper establishes a systematic classification framework for synthetic biology RNA components. At the *cis*-acting element level, it elaborates on how components such as riboswitches, RNA thermometers, and Toehold switches achieve precise gene expression regulation by responding to specific ligands, temperatures, or trigger RNAs through conformational changes. Concerning trans-acting elements, it delves into the molecular mechanisms of miRNA-mediated gene silencing, the high stability and “sponge-like adsorption” function conferred by the closed-loop structure of circRNA, the targeting role of siRNA within the RNAi pathway, and the targeting specificity of sgRNA within the CRISPR system. The paper emphasizes that rational design, sequence optimization, and chemical modifications can significantly enhance the performance and orthogonality of these natural elements. Secondly, the paper focuses on the design and optimization strategies for synthetic RNA regulatory modules. Taking miRNA-responsive circRNA switches as an example, it elucidates the principles of customized miRNA responsiveness. The engineering applications of circRNA are explored, introducing strategies for constructing functional RNA nanostructures *via* siRNA self-assembly. Building upon this, the paper emphasizes synthetic genetic circuits: from logical operations to resource allocation, enabling advanced cellular logic and functional regulation. For instance, by combining transcriptional cascade switches or utilizing the CRISPR-Cas13a system, an AND logic gate responsive to multiple miRNAs (such as miRNA-155 and miRNA-21) was constructed, significantly enhancing the specificity of disease diagnosis. Addressing the challenges of resource competition and expression noise faced by synthetic circuits within cells, this paper introduces computational models such as MIRELLA, with particular emphasis on the design of endogenous miRNA-based iFFLs. These advanced circuits, illustrated in this paper, have been successfully applied to real-time monitoring of cellular differentiation states and regulation of stem cell-directed differentiation. For cellular state detection and dynamic regulation, miRNA switches can be integrated with fluorescent systems to track differentiation statuses in real time *via* fluorescent signal changes. Synthetic genetic circuits, meanwhile, utilize endogenous miRNA logic integration alongside miSFITs technology to achieve state-specific protein regulation in human pluripotent stem cells, laying the groundwork for customized cellular control. This approach ingeniously harnesses intrinsic cellular regulatory mechanisms to buffer gene expression burdens, thereby enhancing circuit robustness. These advanced circuits, illustrated schematically herein, have been successfully applied to real-time monitoring of cellular differentiation states and regulation of stem cell-directed differentiation. At the therapeutic translation level, the paper systematically reviews application strategies for RNA technologies across multiple fields, including cancer, metabolic diseases, neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases, regenerative medicine engineering, immunotherapy, and vaccine applications. For instance, in cancer treatment, specific killing of tumor cells is achieved by embedding targets for miRNAs specific to healthy cells within the genomes of oncolytic viruses (such as Zika virus). Within metabolic and degenerative diseases, LNP-delivered mRNA therapeutics and antisense oligonucleotide (ASO) technologies have demonstrated significant clinical progress. Finally, this paper highlights ongoing challenges in the field, including limited programmability of RNA elements, low *in vivo* delivery efficiency, and inadequate off-target risk assessment systems. It advocates for future integration of epigenomics and computational modelling to optimize element functionality, establishing an integrated “element-circuit-delivery” platform. Furthermore, leveraging single-cell sequencing and organoid technologies to develop a multidimensional safety assessment system is proposed to advance the deep integration and translation of RNA synthetic biology in personalized medicine. Consequently, RNA engineering has transcended single-dimensional regulation, evolving towards multi-layered, dynamic, and intelligent synthetic biological systems. Its deep integration with clinical needs will reshape disease diagnosis and treatment paradigms.

Key words RNA synthetic biology, RNA elements, gene circuits, precision medicine, delivery systems

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0395

CSTR: 32369.14.pibb.20250395