

## 综述

# 环状RNA研究进展

齐玉涵<sup>1, #</sup>, 刘泽鹏<sup>1, #</sup>, 张伟杰<sup>1</sup>, 石平凡<sup>2</sup>, 覃埭<sup>2</sup>, 邵志华<sup>2, \*</sup>

同济大学<sup>1</sup>口腔医学院; <sup>2</sup>医学院再生医学系, 上海 200092

**摘要:** 环状RNA (circular RNA, circRNA) 是一类不具有3'端poly(A)和5'端帽子结构的、以共价键首尾相连的单链内源闭环状RNA。CircRNA具有广泛性、多样性、稳定性和保守性等特点, 其具有转录调控和蛋白质翻译等功能。本文从circRNA的生物合成机制、分类、表达、生物学功能、与疾病的关系, 以及鉴定与分析方法等方面对近年来的研究进展作一综述, 并展望了circRNA的应用前景和研究方向。

**关键词:** 环状RNA; 生物合成; 功能; 疾病

**中图分类号:** Q28; Q74; R34

## Research advance in circular RNAs

QI Yu-Han<sup>1, #</sup>, LIU Ze-Peng<sup>1, #</sup>, ZHANG Wei-Jie<sup>1</sup>, SHI Ping-Fan<sup>2</sup>, QIN Shuang<sup>2</sup>, SHAO Zhi-Hua<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>School of Stomatology; <sup>2</sup>Department of Regenerative Medicine, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China

**Abstract:** Circular RNAs (circRNAs) are a class of endogenous, covalently closed, single-stranded RNA without 3'-poly(A) and 5'-cap structures. CircRNAs are characterized by universality, diversity, stability and conservation, and have been found to regulate mammalian transcription and be translated into proteins. In this review, we summarized the biogenesis, classification, expression, distribution, biological functions and regulation of circRNAs. In addition, we discussed the association of circRNAs with diseases and the methods for identification and characterization of circRNAs. Finally, we speculated the application prospect and research direction of circRNAs.

**Key words:** circular RNAs; biogenesis; function; disease

环状RNA (circular RNA, circRNA) 是一类闭环状的RNA分子, 主要由pre-mRNA通过可变剪切加工产生。早在20世纪70年代, circRNA在病毒内首先被发现<sup>[1]</sup>, 随后在20世纪90年代, 学者发现真核生物细胞内的小鼠精子决定基因 *Sry* (sex determining region Y) 及人 *ETSI* (ETS proto-oncogene 1) 基因可转录生成 circRNA<sup>[2, 3]</sup>。但是, 这种低表达量的RNA被认为是剪接错误的产物, 并未引起广泛关注。随着RNA测序技术和生物信息学的出现和发展, 人们发现RNA在剪接过程中可通过基因重排或反向剪接 (back-splicing) 形成 circRNA, 并且这些环状产

物在所有转录本中至少占10%的比例<sup>[4]</sup>。CircRNA具有保守性、稳定性和组织特异性。在功能方面, circRNA具有转录调控和蛋白质翻译等功能, 参与多种疾病的发生、发展过程。CircRNA的特性和功能使其成为疾病诊断与治疗的潜在新靶点。

## 1 CircRNA的特性

### 1.1 CircRNA具有广泛性、丰富性和多样性

CircRNA是内源性RNA分子, 在古细菌和动植物等多种物种中被发现<sup>[5]</sup>。研究发现大于10%的基因可以通过反向剪接等途径产生 circRNA, 其中

Received 2018-10-13 Accepted 2018-12-13

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this review.

<sup>\*</sup>Correspond author. E-mail: zhihua\_shao@163.com

部分基因的 circRNA 在细胞内累积, 其数量远远超过该基因对应的线性 mRNA<sup>[4]</sup>。Jeck 等<sup>[6]</sup>研究证实, 在人成纤维细胞中超过 25 000 种不同的 RNA 可产生 circRNA。此外, 同一个基因通过可变环化 (alternative circularization) 可以产生不同 circRNA<sup>[4,7]</sup>, 这使得一个基因来源的 circRNA 具有多样性, 丰富了 circRNA 的种类。

## 1.2 CircRNA 具有稳定性和保守性

与线性 RNA 不同, circRNA 是共价闭环环状分子, 没有 5'~3' 的极性或一个腺苷尾巴, 所以不能被核酸外切酶降解, 因此比线性 RNA 更稳定<sup>[8]</sup>。此外, circRNA 在不同物种间进化上高度保守<sup>[6,9]</sup>。多个研究团队对小鼠和人类 circRNA 保守性研究显示, 两者同源性从不到 5% 到近 30% 不等<sup>[10]</sup>, 而猪与小鼠 circRNA 的同源性从不到 15% 到近 20% 不等<sup>[11]</sup>, 小鼠与大鼠 circRNA 的同源性为 23% 或更高<sup>[12]</sup>。

## 1.3 CircRNA 与线性 RNA 的转录竞争

全基因组 RNA 共转录剪切效率测量结果显示, 高表达 circRNA 的 50 条基因的转录剪切效率明显低于其他线性转录剪切基因组<sup>[8]</sup>。为了验证 circRNA 与线性 RNA 是否存在转录竞争关系, Ashwal-Fluss 等对携带有变异的 RNA 聚合酶 II 大亚基的果蝇基因进行了转录剪切效率测量 (该变异型可抑制 RNA 聚合酶 II 的延长, 从而大大增加线性 RNA 的转录效率), 发现 circRNA 表达量明显下降, 提示两者之间可能存在竞争关系<sup>[13]</sup>。

## 1.4 CircRNA 的特异性表达

目前, 人们已经在多种真核生物 (包括植物、线

虫、果蝇、小鼠和人类等) 中发现 circRNA 的表达, 其表达具有细胞和发育的特异性<sup>[14]</sup>。根据 circBase 数据库 (<http://www.circbase.org>) 显示, 多种组织和细胞系表达 circRNA, 这些组织包括脑、嗅球、肺、肌肉和睾丸等; 细胞系包括 A549、HepG2、HeLa S3、K562、MCF-7、HEK293、H9 和 H1 等。研究显示, 神经组织比其它组织更富含 circRNA<sup>[12]</sup>, 并且 circRNA 主要定位于神经元突触和树突<sup>[15]</sup>。对果蝇不同组织和不同发育时期的研究显示大于 90% 的 circRNA 位于头部<sup>[16]</sup>; 对人和小鼠的不同组织表达谱分析同样显示 circRNA 主要在脑组织表达<sup>[8]</sup>, 并且随着大脑的发育, circRNA 表达水平逐渐上调<sup>[12]</sup>。

## 2 CircRNA 的分类与生物合成

CircRNA 可来自于基因组的任何区域, 包括外显子、内含子、基因间、非翻译区 (untranslated region, UTR) 或反义链, 长度从几百到几千个核苷酸不等。人类和小鼠 circRNA 主要来自于编码基因。根据 circRNA 分子的基因来源, 其可分为外显子 circRNA (exonic circRNA, ecircRNA)<sup>[4]</sup>、内含子 circRNA (circular intronic RNA, ciRNA)<sup>[17]</sup>、外显子-内含子 circRNA (exon-intron circRNA, EIciRNA)<sup>[18]</sup> 和基因间 circRNA (intragenic circRNA, icircRNA)<sup>[8]</sup> 四种类型 (图 1)。其中 ecircRNA 是最丰富的 circRNA, 主要定位于细胞质中<sup>[4]</sup>; 相反, ciRNA 和 EIciRNA 主要定位于细胞核中<sup>[17,18]</sup>。

CircRNA 的生物合成机制 (图 1) 包括: (1) 外显子跳跃环化 (exon-skipping circularization): 外显

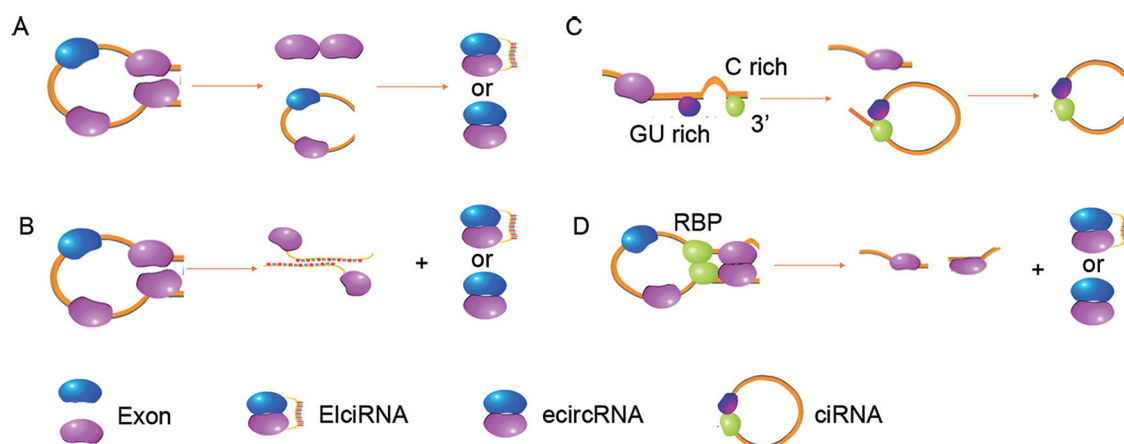


图 1. CircRNA 的生物合成机制

Fig.1. The biogenesis of circRNA. A: Exon-skipping circularization. B: Intron-pairing-driven circularization. C: Intron-lariat-driven circularization. D: RNA binding proteins (RBPs)-driven circularization. EIciRNA, exon-intron circRNA; ecircRNA, exonic circRNA; ciRNA, circular intronic RNA.

子跳跃产生一个包含外显子和内含子的套索中间体,随后经过反向剪接、删除或保留内含子序列,最终形成 *ecircRNA* 或 *EIciRNA*; (2) 内含子配对驱动的环化 (*intron-pairing-driven circularization*): 内含子配对环化发生在侧翼内含子序列含有反向重复序列或 *ALU* 重复序列的 *Pre-RNA*, 内含子配对使上游外显子的 5' 剪接位点和下游外显子 3' 剪接位点相互靠近,并通过反向剪接使其头尾连接,形成 *ecircRNA* 或 *EIciRNA*<sup>[6]</sup>; (3) 内含子套索驱动环化 (*intron-lariat-driven circularization*): 由 *Pre-RNA* 在经典剪接过程中形成的内含子套索,其内含子 5' 剪接位点富含 7 nt GU 重复,3' 分支点富含 11 nt C 重复,这种特殊序列保证了 *circRNA* 的稳定<sup>[17]</sup>,最终形成 *ciRNA*; (4) RNA 结合蛋白驱动环化 [*RNA binding proteins (RBPs)-driven circularization*]: 与内含子配对驱动的环化相似,RBP 与侧翼内含子序列相互作用,使两个侧翼内含子相互靠近,进而促进环化,并通过反向剪接使其头尾连接,形成 *ecircRNA* 或 *EIciRNA*<sup>[19]</sup>。

### 3 *CircRNA*的调控机制

#### 3.1 *CircRNA*的表达调控机制

*CircRNA* 与对应亲本基因 (*host gene*) 的 *mRNA* 来源于同一转录产物,*circRNA* 的生物合成速率明显低于对应的 *mRNA*,其形成可受反向互补序列影响,表达受顺式作用元件和反式作用因子的调控<sup>[20]</sup>。*RNA* 解旋酶 *DHX9* 能够特异性识别反向重复 *Alu* 元件,*DHX9* 缺失会导致 *RNA* 转录后剪接异常,*circRNA* 生物合成增多<sup>[21]</sup>。*NF90/NF110* (*nuclear factor 90 kDa/110 kDa*) 可以通过促进内含子互补序列的稳定促进 *circRNA* 的形成<sup>[22]</sup>。*FUS* (*fused in sarcoma*) 蛋白在神经元中调控了 *RNA* 的反向拼接,*Errichelli* 等检测了敲除 *FUS* 的神经元细胞中 136 种 *circRNA* 的表达,其中 111 种出现了表达下调<sup>[23]</sup>。干细胞中特异的 *RNA* 剪切因子 *ESRP1* (*epithelial splicing regulatory protein 1*) 调控了 *circBIRC6* 的形成过程,将 *ESRP1* 敲除后,*circBIRC6* 的表达量大幅下调,同时 *BIRC6* 对应的线性产物大量表达<sup>[24]</sup>。

*CircRNA* 的生物合成过程依赖于剪切体,但剪切体组分异常能促进 *circRNA* 的形成。*Liang* 等<sup>[25]</sup> 基于 *RNAi* 筛选,并利用果蝇细胞中构建的 *Mini* 基因报告系统,发现剪切体组分及转录终止相关的基因被干扰后 *circRNA* 的丰度显著增加。

#### 3.2 *CircRNA*的降解调控机制

目前,*circRNA* 的降解机制尚不清楚。一种假设是细胞内的 *RNA* 内切酶介导了 *circRNA* 的降解,但目前还没有实例证明。*miR-671* 介导的 *AGO2* (*argonaute 2, RISC catalytic component*) 降解 *CDR1as* 是目前研究最清楚的 *circRNA* 降解机制模型<sup>[26]</sup>,细胞内是否有其他类似的机制还需要进一步的探索。*CircRNA* 中的 *m6A* 修饰也可能参与了 *circRNA* 的降解作用<sup>[27]</sup>。

#### 3.3 *CircRNA*的出核调控机制

由于 *circRNA* 在许多非分裂细胞中广泛表达,所以 *circRNA* 的出核方式肯定不仅仅是依赖有丝分裂期间的核膜溶解。*Huang* 等人<sup>[28]</sup> 发现在果蝇 *DL1* 细胞中,*DEXH/D-box* 解旋酶 *Hel25E* 的消耗会导致长度 >800 nt 的 *circRNA* 发生核积累。人类细胞中有 *UAP56* (*DEXD-box helicase 39B, DDX39B*) 和 *URH49* (*DEXD-box helicase 39A, DDX39A*) 这两个 *Hel25E* 的同系物。当 *URH49* 被敲低时,长度 <356 nt 的 *circRNA* 累积在细胞核中;而 *UAP56* 被敲低时,长度 >1 298 nt 的 *circRNA* 累积在细胞核中<sup>[28]</sup>。这个发现提示 *circRNA* 的长度是决定 *circRNA* 出核机制的一个重要因素。

### 4 *CircRNA*的生物学功能和作用机制

随着研究的不断深入,人们已经发现 *circRNA* 有以下几种功能。

#### 4.1 细胞核相关功能

##### 4.1.1 转录调节功能

真核生物的 *mRNA* 是由 *RNA* 聚合酶 II 催化转录,而后由剪接体介导进行剪接。研究显示,*EIciRNA* 可以通过 *RNA* 相互作用和 *U1 snRNP* 形成 *EIciRNA-U1 snRNP* 复合体,此复合体进一步与 *RNA* 聚合酶 II 相互作用,并与 *EIciRNA* 亲本基因启动子区结合,调节其亲本基因的表达<sup>[18]</sup>。如 *circEIF3J* 和 *circPAIP2* 是 *EIciRNA*,其亲本基因分别为 *EIF3J* (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J*) 和 *PAIP2* [*poly(A) binding protein interacting protein 2*],利用 *RNAi* 技术敲低 *circEIF3J* 和 *circPAIP2* 的表达后,*EIF3J* 和 *PAIP2* 的转录亦降低<sup>[18]</sup>。*CiRNA* 可以直接作用于磷酸化的 *RNA* 聚合酶 II,进而调节亲本基因的表达。具有这种功能的 *ciRNA* 有 *ci-ankdr52*、*ci-mcm5* 和 *ci-sirt7* 等<sup>[17]</sup>。

##### 4.1.2 调控RNA的可变剪接

研究显示,*circRNA* 的表达量可以影响其亲本

基因 mRNA 的剪接, 典型的例子是 circMbl 对其亲本基因 pre-mRNA 的剪接的调节。MBL (muscleblind) 蛋白在果蝇的肌肉和光感受细胞中表达, 其可驱动 Mbl 第二个外显子环化为 circMbl。circMbl 含有 MBL 蛋白的结合位点, 其与 MBL 蛋白结合降低游离 MBL 蛋白的浓度。当游离的 MBL 蛋白含量较低时, pre-mRNA 进行经典的线性剪接; 相反, 当游离的 MBL 蛋白含量较高时, MBL 蛋白促进 pre-mRNA 第二外显子进行环化<sup>[13]</sup>(图 2)。

## 4.2 细胞质相关功能

### 4.2.1 miRNA 的分子“海绵”(sponges)

MiRNA 是一类 19~21 nt 长度的内源性非编码小 RNA, 通过与 mRNAs 的 3'UTRs 结合, 负调控 mRNAs 的表达。由于 circRNA 有 miRNA 结合位点, 其可以结合特定的 miRNA, 调节 miRNAs 和 mRNAs 的结合, 发挥竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 的功能<sup>[29]</sup>。此外, 由于 circRNA 的长度和序列不同, 其结合的 miRNA 分子数量和种类也各不相同。目前, ciRS-7/CDR1as、circRNA-Sry、cir-ITCH 和 circHIPK3 等(见表 1)的分子“海绵”作用已经得到证实。CiRS-7/CDR1as 具有 70 个以上 miR-7 的结合位点, 其通过吸附 miR-7a 控制 miR-7a 的靶基因 *PARP4* 和 *SPI* 的 mRNA 水平, 促进心肌梗死<sup>[30]</sup>。CircRNA-Sry 是性别决定基因的 circRNA, 在睾丸组织中高表达, 具有 16 个 miR-138 的结合位点, 通过吸附 miR-138 抑制其活性, 参与多种生理和病理过程的调控<sup>[31]</sup>。Cir-ITCH 可以与 miR-7、miR-17 和 miR-214 结合, 引起 ITCH

表达上调, 进而抑制了 WNT 信号通路<sup>[32]</sup>。CircHIPK3 可与 miR-124 等多种 miRNAs 结合, 沉默 circHIPK3 后导致细胞生长抑制<sup>[33]</sup>。

### 4.2.2 作为 RBP 蛋白的隔离剂

越来越多的证据显示, 在细胞质中表达的 circRNA 能与蛋白质结合, 进而抑制这些蛋白质向细胞核的运输。涉及此功能的典型 circRNA 是 circ-Foxo3。Du 等<sup>[40]</sup>研究显示, circ-Foxo3 在细胞质中与衰老相关蛋白 ID1 (inhibitor of DNA binding 1)、E2F1 (E2F transcription factor 1) 和低氧诱导因子 1 亚单位  $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 subunit  $\alpha$ , HIF1- $\alpha$ ) 结合, 阻止这些 RBP 蛋白的核定位, 进而导致心脏衰老; 相反, 敲低 circ-Foxo3 后这些蛋白在细胞核的定位明显增加。Circ-Foxo3 也可以结合 CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) 和 p21 (又名 CDKN1A, cyclin dependent kinase inhibitor 1A), 形成 RNA-蛋白复合物, 抑制 CDK2 和细胞周期蛋白 A 和 E 的相互作用, 进而抑制细胞增殖<sup>[41]</sup>。

### 4.2.3 编码蛋白质或多肽

真核细胞蛋白质的合成主要是通过 5' 帽依赖性翻译途径, 因为起始复合体的组装需要帽的识别。然而, 在应激等条件下, 细胞可以依赖于 IRES (internal ribosome entry site) 等调控原件启动非帽依赖性蛋白质翻译<sup>[42]</sup>。由于 circRNA 没有游离的 5' 端, 不能进行帽依赖性的蛋白质翻译, 因此曾被误认为不能合成蛋白质。但是, 近几年体外和体内的研究发现部分 circRNA 可通过非帽依赖性的翻译机制编码蛋白质。Abe 等<sup>[43]</sup>证明 circRNA 在缺乏 IRES、poly (A) 和 5' 帽结构的条件下, 可以通过 RCA (rolling circle amplification) 机制翻译蛋白质(图 3A)。Wang 等<sup>[44]</sup>发现, 在 circRNA 分子中人工引入 IRES 后, 其可在 293T 细胞中进行蛋白质翻译(图 3B)。Yang 等<sup>[45]</sup>的研究显示, 大量的 circRNA 富含甲基化修饰 m6A, 并证明这种甲基化修饰可以像 IRES 一样驱动 circRNA 翻译合成蛋白质(图 3C)。Legnini 等<sup>[42]</sup>发现 circ-ZNF609 分子上有多聚核糖体结合, 并可以在成肌细胞内直接翻译蛋白质, 该蛋白参与了肌肉的发生。Circ-ZNF609 是由基因 ZNF609 的第 2 个外显子环化而成, 其包含了 ZNF609 基因的起始密码子和终止密码子(图 3D)。Pamudurti 等<sup>[46]</sup>在对果蝇的大脑组织进行研究时发现, 有些 circRNA 可以结合核糖体, 并通过核糖体印记证明 circMbl 序列的终止密码子处有核糖体结合(图 3D)。这些研究进一步拓展了 circRNA 的功能, 并为蛋白质来源的多样性提供了理论依据。

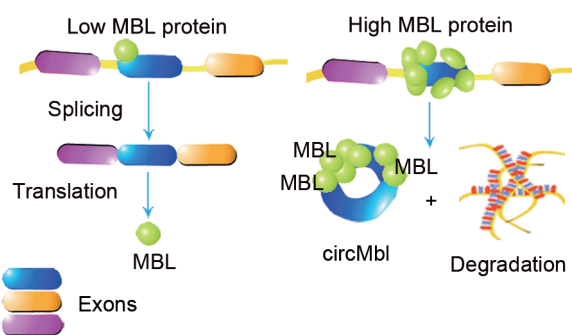


图 2. CircMbl 调控前体 mRNA 的剪接

Fig. 2. CircMbl regulates the splicing of pre-mRNA. CircMbl contains the binding site of MBL (muscleblind) protein. When the content of free MBL protein is low, pre-mRNA undergoes classical linear splicing; on the contrary, when the content of free MBL protein is high, MBL protein promotes the cyclization of the second exon of pre-mRNA.

表1. 环状RNA的分子“海绵”功能  
Table 1. The sponge function of circRNA

| Name                                    | miRNA sponged          | Host gene | References |
|-----------------------------------------|------------------------|-----------|------------|
| CiRS-7/CDR1as                           | miR-7a                 | CDR1      | [8, 31]    |
| CircRNA-CER                             | miR-136                | RNF121    | [34]       |
| CircRNA-Sry                             | miR-138                | SRY       | [31]       |
| Cir-ITCH                                | miR-7, miR-17, miR-214 | ITCH      | [32]       |
| CircHIPK3                               | miR-124                | HIPK3     | [33]       |
| CircRNA-001569                          | miR-145                | ABCC1     | [35]       |
| CircRNA-HRCR                            | miR-223                | Pwmp2a    | [36]       |
| Circ100284                              | miR-217                | CGLM      | [37]       |
| Circ-ZEB1.5, circ-ZEB1.19, circ-ZEB1.17 | miR-200a-3p            | ZEB       | [38]       |
| CircRNA-ZNF609                          | miR-150-5p             | ZNF609    | [39]       |

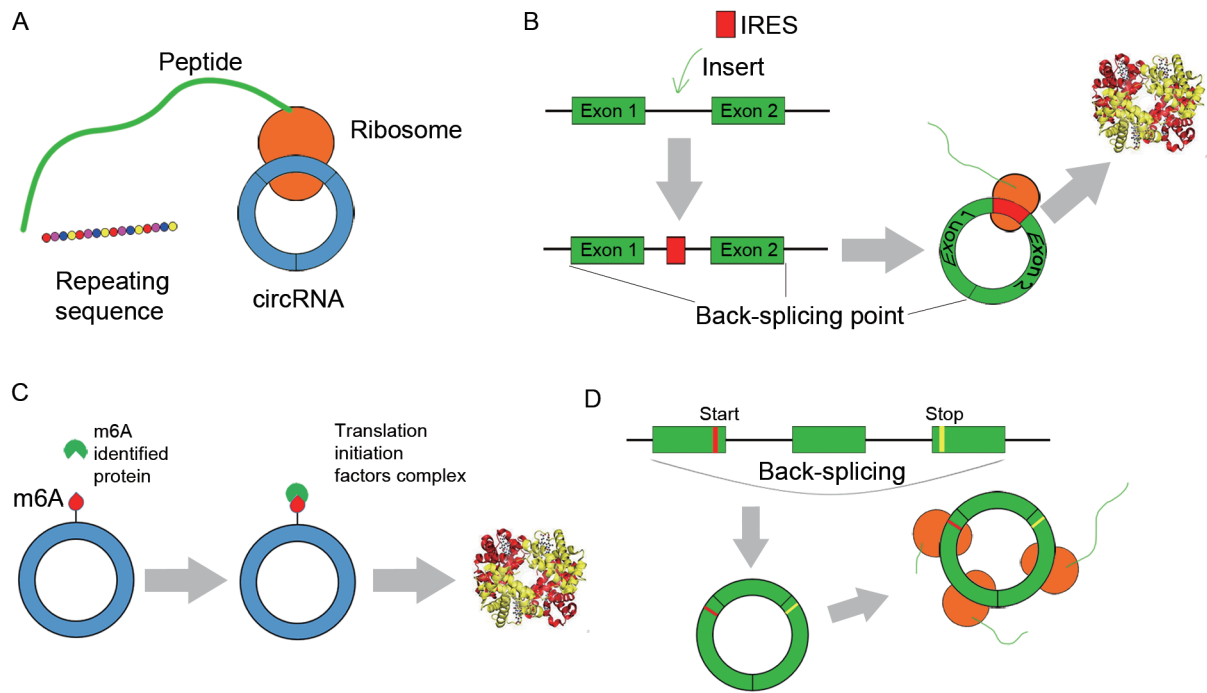


图 3. 环状RNA非帽依赖性蛋白质翻译机制

Fig. 3. Non-cap-dependent protein translation mechanism of circRNA. *A*: RCA (rolling circle amplification) mechanism<sup>[43]</sup>. This mechanism provides a long-repeating peptide sequence and enhances the productivity over a given period of time. *B*: IRES (internal ribosome entry site) driver mechanism<sup>[44]</sup>. CircRNAs that rely on this mechanism for translation contain the IRES site. *C*: m6A methylation modified driving mechanism<sup>[45]</sup>. m6A identified protein binds to the modified site of circRNA as well as recruits translation initiation factors to drive translation. *D*: Splicing dependency mechanism<sup>[42, 46]</sup>. With the back-splicing, the start codon and the stop codon are included in the circRNA so that the ribosome can identify them and finish protein translation.

## 5 CircRNA与疾病

随着研究的不断深入，人们发现 circRNA 与多种疾病的发生、发展和预后密切相关。CircRNA 与肿瘤、神经退行性疾病和心血管疾病的相关性备受关注。

### 5.1 CircRNA与肿瘤

CircRNA 与直肠癌、肺癌、胃癌、食管癌和神

经瘤等肿瘤密切相关 (见表 2)。对肿瘤组织和细胞系的研究显示，部分 circRNA 在肿瘤中的表达水平比正常组织低<sup>[47]</sup>，并且其表达水平与肿瘤的尺寸、分化程度、转移情况等临床特征相关，例如在鼻咽癌中，circRNA\_000285 在肿瘤尺寸更大 (> 3 cm)、分化程度更低、出现远处转移的病例中表达量更高<sup>[48, 49]</sup>。对不同肿瘤的研究显示，circRNA 对肿瘤

表2. 肿瘤相关环状RNA  
Table 2. Tumor-related circRNA

| Cancer                   | Related circRNA     | References |
|--------------------------|---------------------|------------|
| Neuromata                | CDR1as              | [54]       |
| Breast cancer            | circ-Foxo3          | [55]       |
| Lung cancer              | circ-BANP           | [56]       |
| Hepatocellular carcinoma | circC3P1            | [57]       |
| Gastric cancer           | hsa_circ_002059,    | [58]       |
|                          | hsa_circ_0008106,   | [59]       |
|                          | hsa_circ_0060456    |            |
| Esophagus cancer         | circ-ITCH,          | [60]       |
|                          | circRNA_001059,     |            |
|                          | circRNA_000167      |            |
| Laryngeal cancer         | hsa_circRNA_100855, | [61]       |
|                          | hsa_circRNA_104912  |            |
| Leukemia                 | f-circRNA           | [50]       |
| Bladder cancer           | circTCF25           | [62]       |
| Squamous cell carcinoma  | hsa_circ_0035381,   | [63]       |
|                          | hsa_circ_0074817,   |            |
|                          | hsa_circ_0022383    |            |
| Colorectal cancer        | circ0817, circ3204, | [64]       |
|                          | circ6229, circ7374  |            |
| Cervical cancer          | circRNA8924         | [65]       |

的发生和发展具有正负两方面的调节。如 DOCK1 circRNA 调节上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 促进肿瘤发生<sup>[19]</sup>; 染色体异位产生融合 f-circRNA, 其促进癌细胞生长<sup>[50]</sup>; CDR1as 吸附 miR-7, 进而促进 *EGFR* (epidermal growth factor receptor) 和 *Pak1* (P21 activated kinase 1) 等肿瘤相关基因的上调表达, 增强了神经胶质细胞瘤和乳腺癌的侵袭性<sup>[51, 52]</sup>; circ-Amotl1 能够通过诱导 c-Myc 入核促进肿瘤生成<sup>[53]</sup>。相反, circ-ITCH 通过抑制 WNT 信号通路, 抑制食管癌细胞系的增殖<sup>[32]</sup>。

## 5.2 CircRNA与神经、精神疾病

研究显示, circRNA 与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森综合征、多发性硬化症和抑郁症等有关。miR-7 在大脑皮层神经祖细胞高表达, 参与 AD 发病过程。CiRS-7 可通过“海绵”功能沉默 miR-7, 进而抑制 AD 的发生<sup>[66]</sup>。泛素蛋白连接酶 A (ubiquitin protein ligase A, UBE2A) 是一种吞噬蛋白, 具有清除 AD 患者细胞中淀粉样沉淀多肽的功能, 其编码基因也是 miR-7 的靶基因。UBE2A 在 AD 患者的脑组织中表达下调, 推测是由于 ciRS-7 的 miRNA “海绵”功能缺失所致。此外,  $\alpha$ -突触核蛋白也是 miR-7 的靶基因, 其过度表达与帕

金森病的发展相关。CiRS-7 和 miR-7 的相互作用可能参与了帕金森病的发生<sup>[67]</sup>。在抑郁症患者的外周血单核细胞中也发现存在明显的差异表达的 circRNA, 与正常对照相比, hsa\_circRNA\_103636 在抑郁症患者中表达明显下调, 而经过抗抑郁治疗后, 其表达水平明显上调<sup>[68]</sup>, 提示 hsa\_circRNA\_103636 可作为诊断和治疗抑郁症的分子标记。

## 5.3 CircRNA与心血管疾病

最近研究表明, circRNA 可能在心血管疾病的发生和发展中发挥重要作用。ARC (apoptosis repressor with CARD domain) 在心肌细胞肥大和凋亡过程中发挥保护作用, 而 miR-233 可通过抑制 ARC 的活性, 诱导心脏肥大和心脏衰竭等疾病<sup>[69]</sup>。HRCR (heart-related circRNA) 可直接吸附 miR-233, 抑制 miR-233 的活性, 进而使 ARC 表达增加, 抑制心脏疾病的发生<sup>[36]</sup>。

全基因组关联研究 (genome-wide association studies, GWAS) 结果显示, INK4/ARF 的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与动脉粥样硬化具有相关性<sup>[70, 71]</sup>。cANRIL (circular antisense noncoding RNA in the INK4 locus) 是 INK4/ARF 的反义链转录的产物, 其表达和组成受 INK4/ARF 的 SNPs 影响<sup>[14]</sup>。Burd 等<sup>[72]</sup>研究发现, 由于 PcG 的介导, INK4/ARF 基因的转录产物会形成 cANRIL, 从而抑制该基因的表达; 而 Song 等研究结果显示, 过表达 cANRIL 使小鼠动脉粥样硬化病情恶化<sup>[73]</sup>。关于 cANRIL 是否可以通过作用于 PcG 来影响 INK4/ARF 的表达, 还有待进一步研究。

心肌梗死是导致人类死亡的主要原因之一。在心肌梗死的发展过程中, 长期心肌缺血导致心肌细胞坏死或凋亡。PARP (poly ADP-ribose polymerase) 是 Caspase-3 的切割底物, 在 DNA 损伤修复与细胞凋亡中都发挥着重要作用, 是细胞凋亡的重要指标之一。miR-7a/b 能够直接作用于 PARP 并下调 PARP 蛋白表达, 从而在心肌细胞的缺血-再灌注损伤过程中起到保护心肌细胞、抑制心肌细胞凋亡的作用<sup>[74]</sup>。CDR1as 通过吸附 miR-7a, 控制 miR-7a 的靶基因 *PARP1* 和 *SPI* 的 mRNA 水平, 促进心肌梗死引起的细胞凋亡<sup>[30]</sup>。

## 5.4 CircRNA与其它疾病

CircRNA 对糖尿病、肾病、关节炎等疾病的发生、发展也有一定的影响。Correa-Medina 等<sup>[75]</sup>对胰腺的研究显示, ciRS-7 吸附的 miR-7 在胰腺的发

育和分化中发挥重要作用，可能是胰腺  $\beta$  细胞分化更新下降的原因，提示 ciRS-7 可能在糖尿病的发生中发挥重要作用；circRNA15698 结合 miR-185/TGF- $\beta$ 1 在糖尿病肾病发生、发展过程中使细胞的细胞外基质恶化<sup>[76]</sup>；在骨关节炎中，软骨细胞外基质相关 circRNA (circRNA-CER) 参与了软骨退变的机制<sup>[34]</sup>；circHECTD1 通过 circHECTD1/HECTD1 途径参与了矽肺的发生和发展<sup>[77]</sup>。另外，最新研究显示，circ-HIPK3 及 circ-ZNF609 RNA 的表达均与视网膜血管病变相关，沉默两者转录表达可减轻视网膜血管病变，改善眼睛血管的功能异常<sup>[78]</sup>。Li 等的研究结果显示，水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 感染的细胞中 NF90/NF110 出核，导致 circRNA 表达降低，同时更多 NF90/NF110 从 circRNA 中被释放出来，结合到病毒 mRNA 上，从而发挥抗病毒的作用<sup>[22]</sup>。

## 6 CircRNA的鉴定与分析

### 6.1 CircRNA的分析平台

随着人们对 circRNA 的深入研究，许多 circRNA 数据库和分析平台被建立 (见表 3)，这些数据库和平台提供了综合性的基因注释和特异性的分析

数据，为查询和探索 circRNA 的功能与机制奠定了基础。

### 6.2 CircRNA研究方法

自 2014 年以来，circRNA 的研究备受青睐，利用生物信息预测筛选，PCR 验证感兴趣的 circRNA，针对筛选出的 circRNA 进行细胞功能和体内验证是 circRNA 研究的经典思路。

近年来，生物信息预测 circRNA 的工具发展迅速。2017 年，Gao 等<sup>[88]</sup>对 circRNA 的算法进行系统评价，综合性评估了 11 种检测工具的灵敏度和准确性，认为 KNIFE、CIRI、PTESFinder (PF)、Segemehl (SG) 和 CIRCexplorer (CE) 是较好的五种工具算法。利用这些工具，可以实现将已获得的序列与亲本基因进行比对，通过对反向剪接位点的识别，从而获得其中的 circRNA 序列等操作<sup>[89]</sup>。

目前实验室常用的鉴定与研究 circRNA 功能的方法有 RT-PCR、荧光原位杂交 (FISH)、2D 凝胶电泳、基因敲除、Over express 等。RT-PCR 可以快速、简便地检测 circRNA 的表达水平<sup>[90]</sup>。FISH 可以用来精确分析某种 circRNA 在细胞和组织中的分布<sup>[91]</sup>。高效率敲除 circRNA 一直是棘手的问题，Zhang 等<sup>[92]</sup>实现了在人类 PA1 细胞中完全敲除 circGCN1LI。

表3. 环状RNA相关数据库  
Table 3. Databases related to circRNA

| Database        | Website                                                                                         | Contents                                                                                                                                                                 | References |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| circBase        | <a href="http://circRNA.org/">http://circRNA.org/</a>                                           | CircRNA information was collected from a variety of species including human, mouse, <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , speartail fish, etc | [79]       |
| circRNADb       | <a href="http://reprod.njmu.edu.cn/circRNADb">http://reprod.njmu.edu.cn/circRNADb</a>           | Database of circRNA that can encode proteins                                                                                                                             | [80]       |
| CircNet         | <a href="http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/">http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/</a>                   | This database integrates the sequence of circRNA, the regulatory network among circRNA, miRNA and target genes, and genome annotation of circRNA                         | [38]       |
| CircInteractome | <a href="http://circinteractome.nia.nih.gov">http://circinteractome.nia.nih.gov</a>             | The binding sites of 109 known RBPs to circRNA in circBase were predicted, and the potential binding sites of miRNAs to circRNA were predicted                           | [81]       |
| deepbase        | <a href="http://deepbase.sysu.edu.cn/">http://deepbase.sysu.edu.cn/</a>                         | About 150 000 circRNA were collected and a comprehensive expression map of circRNA was constructed                                                                       | [82]       |
| CSCD            | <a href="http://gb.whu.edu.cn/CSCD">http://gb.whu.edu.cn/CSCD</a>                               | Tumor specific circRNA database                                                                                                                                          | [83]       |
| TSCD            | <a href="http://gb.whu.edu.cn/TSCD">http://gb.whu.edu.cn/TSCD</a>                               | CircRNA database for tissue specificity in humans and mice                                                                                                               | [84]       |
| CIRCpedia       | <a href="http://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia/">http://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia/</a> | Database for circRNA alternative splicing and back splicing                                                                                                              | [85]       |
| circRNA disease | <a href="http://cgga.org.cn:9091/circRNADisease/">http://cgga.org.cn:9091/circRNADisease/</a>   | Database of circRNA related to human diseases                                                                                                                            | [86]       |
| exoRBase        | <a href="http://www.exoRBase.org">http://www.exoRBase.org</a>                                   | Database of various RNA molecules in exosomes, including circRNA                                                                                                         | [87]       |

Schneider 等<sup>[93]</sup>通过免疫共沉淀技术验证了 IMP3 蛋白复合物与亚家族 circRNPs 存在相互作用。Dahl 等<sup>[94]</sup>运用 Nanostring nCounter 技术对多种不同质量的 circRNA 进行检测,且均能准确地进行定量。

在 circRNA 的表达策略研究中, Wesselhoeft 等<sup>[95]</sup>通过在 pre-RNA 中插入间隔序列,替换不同的 IRES 序列和添加 poly(A) 尾巴提高 circRNA 的蛋白表达效率,实现了工程化 circRNA 的蛋白表达。Borchardt 等<sup>[96]</sup>应用了基于 CRISPR 同源蛋白 Csy4 的促进 RNA 环化的技术,取得较好成果。Panda 等<sup>[97]</sup>在常规的 RNase R 消化的基础上增加了去除 Poly(A) 的操作,可大大提高去除线性 RNA 的效率,诱导表达 circRNA 体系。Noto 等<sup>[98]</sup>基于 tRNA 建立了 circRNA 表达体系。

## 7 小结与展望

自从人们重新认识和研究 circRNA 以来,已经发现了几万种 circRNA。但是目前对于 circRNA 的研究尚处于起步阶段,还有很多问题等待解决,如 circRNA 的生物合成机制、circRNA 与剪接体的相互作用机制和 circRNA 调控作用机制,而关于 circRNA 降解体系的研究尚未完全建立。在生物学功能方面, circRNA 介导产生的假基因是否有未挖掘出来的生物学功能尚不得而知。在研究方法方面,需要减少实验室方法检测的假阳性率。在 circRNA 的表达策略方面,需要在现有的方法基础上进行改良,提高工程化效率。

在应用领域,由于唾液、血液和外泌体中存在大量的 circRNA, circRNA 可作为潜在的生物标志物在疾病诊断或预测方面发挥作用,尤其是对癌症的发生、发展和预后。另一方面,利用 circRNA 的 miRNA 分子“海绵”功能,针对特定的 RNA 人工合成 circRNA “海绵”,可能在治疗肿瘤等疾病方面具有应用前景。

\*                      \*                      \*

**致谢:** 本综述受国家自然科学基金项目 (No.8177-1333, 31571405)、上海市大学生创新创业训练计划项目 (No. s201814202) 和同济大学第十三期实验教学改革专项基金项目 (No. 1500104185) 资助。

## 参考文献

1 Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt

- AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73(11): 3852–3856.
- 2 Cocquerelle C, Daubersies P, Majerus MA, Kerckaert JP, Bailleul B. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *EMBO J* 1992; 11(3): 1095–1098.
- 3 Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 1993; 73(5): 1019–1030.
- 4 Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One* 2012; 7(2): e30733.
- 5 Danan M, Schwartz S, Edelheit S, Sorek R. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(7): 3131–3142.
- 6 Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* 2013; 19(2): 141–157.
- 7 Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* 2014; 159(1): 134–147.
- 8 Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 2013; 495(7441): 333–338.
- 9 Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol* 2014; 15(7): 409.
- 10 Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* 2016; 143(11): 1838–1847.
- 11 Veno MT, Hansen TB, Veno ST, Clausen BH, Grebing M, Finsen B, Holm IE, Kjems J. Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development. *Genome Biol* 2015; 16: 245.
- 12 You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, Akbalik G, Wang M, Glock C, Quedenau C, Wang X, Hou J, Liu H, Sun W, Sambandan S, Chen T, Schuman EM, Chen W. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci* 2015; 18(4): 603–610.
- 13 Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing.

- Mol Cell 2014; 56(1): 55–66.
- 14 Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. PLoS Genet 2013; 9(9): e1003777.
  - 15 Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, Jens M, Pino N, Giusti S, Hanan M, Behm M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, Herzog M, Schreyer L, Papavasileiou P, Ivanov A, Ohman M, Refojo D, Kadener S, Rajewsky N. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. Mol Cell 2015; 58(5): 870–885.
  - 16 Westholm JO, Miura P, Olson S, Shenker S, Joseph B, Sanfilippo P, Celniker SE, Graveley BR, Lai EC. Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. Cell Rep 2014; 9(5): 1966–1980.
  - 17 Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, Zhu S, Yang L, Chen LL. Circular intronic long noncoding RNAs. Mol Cell 2013; 51(6): 792–806.
  - 18 Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. Nat Struct Mol Biol 2015; 22(3): 256–264.
  - 19 Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmandis M, Phillips CA, Roslan S, Schreiber AW, Gregory PA, Goodall GJ. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. Cell 2015; 160(6): 1125–1134.
  - 20 Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. Mol Cell 2018; 71(3): 428–442.
  - 21 Aktas T, Avsar Ilik I, Maticzka D, Bhardwaj V, Pessoa Rodrigues C, Mittler G, Manke T, Backofen R, Akhtar A. DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. Nature 2017; 544(7648): 115–119.
  - 22 Li X, Liu CX, Xue W, Zhang Y, Jiang S, Yin QF, Wei J, Yao RW, Yang L, Chen LL. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection. Mol Cell 2017; 67(2): 214–227.e217.
  - 23 Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, Colantoni A, Legnini I, Caputo D, Rosa A, De Santis R, Scarfo R, Peruzzi G, Lu L, Caffarelli E, Shneider NA, Morlando M, Bozzoni I. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. Nat Commun 2017; 8: 14741.
  - 24 Yu CY, Li TC, Wu YY, Yeh CH, Chiang W, Chuang CY, Kuo HC. The circular RNA circBIRC6 participates in the molecular circuitry controlling human pluripotency. Nat Commun 2017; 8(1): 1149.
  - 25 Liang D, Tatomer DC, Luo Z, Wu H, Yang L, Chen LL, Cherry S, Wilusz JE. The output of protein-coding genes shifts to circular RNAs when the pre-mRNA processing machinery is limiting. Mol Cell 2017; 68(5): 940–954.e943.
  - 26 Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, Kjems J. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. EMBO J 2011; 30(21): 4414–4422.
  - 27 Zhou C, Molinie B, Daneshvar K, Pondick JV, Wang J, Van Wittenberghe N, Xing Y, Giallourakis CC, Mullen AC. Genome-wide maps of m6A circRNAs identify widespread and cell-type-specific methylation patterns that are distinct from mRNAs. Cell Rep 2017; 20(9): 2262–2276.
  - 28 Huang C, Liang D, Tatomer DC, Wilusz JE. A length-dependent evolutionarily conserved pathway controls nuclear export of circular RNAs. Genes Dev 2018; 32(9–10): 639–644.
  - 29 Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. Nature 2014; 505(7483): 344–352.
  - 30 Geng HH, Li R, Su YM, Xiao J, Pan M, Cai XX, Ji XP. The circular RNA Cdr1as promotes myocardial infarction by mediating the regulation of miR-7a on its target genes expression. PLoS One 2016; 11(3): e0151753.
  - 31 Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. Nature 2013; 495(7441): 384–388.
  - 32 Li F, Zhang L, Li W, Deng J, Zheng J, An M, Lu J, Zhou Y. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/beta-catenin pathway. Oncotarget 2015; 6(8): 6001–6013.
  - 33 Zheng QP, Bao CY, Guo WJ, Li SY, Chen J, Chen B, Luo YT, Lyu DB, Li Y, Shi GH, Liang LH, Gu JR, He XH, Huang SL. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. Nat Commun 2016; 7: 11215.
  - 34 Liu Q, Zhang X, Hu X, Dai L, Fu X, Zhang J, Ao Y. Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 ‘sponge’ in human cartilage degradation. Sci Rep 2016; 6: 22572.
  - 35 Xie H, Ren X, Xin S, Lan X, Lu G, Lin Y, Yang S, Zeng Z, Liao W, Ding YQ, Liang L. Emerging roles of circRNA\_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer. Oncotarget 2016; 7(18): 26680–26691.
  - 36 Wang K, Long B, Liu F, Wang JX, Liu CY, Zhao B, Zhou LY, Sun T, Wang M, Yu T, Gong Y, Liu J, Dong YH, Li N, Li PF. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223. Eur Heart J 2016; 37(33): 2602–2611.
  - 37 Xue J, Liu Y, Luo F, Lu X, Xu H, Liu X, Lu L, Yang Q,

- Chen C, Fan W, Liu Q. Circ100284, via miR-217 regulation of EZH2, is involved in the arsenite-accelerated cell cycle of human keratinocytes in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1863(3): 753–763.
- 38 Liu YC, Li JR, Sun CH, Andrews E, Chao RF, Lin FM, Weng SL, Hsu SD, Huang CC, Cheng C, Liu CC, Huang HD. CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(D1): D209–D215.
- 39 Peng L, Chen G, Zhu Z, Shen Z, Du C, Zang R, Su Y, Xie H, Li H, Xu X, Xia Y, Tang W. Circular RNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate AKT3 expression by sponging miR-150-5p in Hirschsprung's disease. *Oncotarget* 2017; 8(1): 808–818.
- 40 Du WW, Yang W, Chen Y, Wu ZK, Foster FS, Yang Z, Li X, Yang BB. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses. *Eur Heart J* 2017; 38(18): 1402–1412.
- 41 Du WW, Yang W, Liu E, Yang Z, Dhaliwal P, Yang BB. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(6): 2846–2858.
- 42 Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, Laneve P, Rajewsky N, Bozzoni I. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell* 2017; 66(1): 22–37.e9.
- 43 Abe N, Matsumoto K, Nishihara M, Nakano Y, Shibata A, Maruyama H, Shuto S, Matsuda A, Yoshida M, Ito Y, Abe H. Rolling circle translation of circular RNA in living human cells. *Sci Rep* 2015; 5: 16435.
- 44 Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *RNA* 2015; 21(2): 172–179.
- 45 Yang Y, Fan X, Mao M, Song X, Wu P, Zhang Y, Jin Y, Yang Y, Chen L, Wang Y, Wong CC, Xiao X, Wang Z. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. *Cell Res* 2017; 27(5): 626–641.
- 46 Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, Hanan M, Wyler E, Perez-Hernandez D, Ramberger E, Shenzen S, Samson M, Dittmar G, Landthaler M, Chekulaeva M, Rajewsky N, Kadener S. Translation of circRNAs. *Mol Cell* 2017; 66(1): 9–21.e27.
- 47 Greene J, Baird AM, Brady L, Lim M, Gray SG, McDermott R, Finn SP. Circular RNAs: Biogenesis, function and role in human diseases. *Front Mol Biosci* 2017; 4: 38.
- 48 Shuai M, Hong J, Huang D, Zhang X, Tian Y. Upregulation of circRNA\_0000285 serves as a prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma and is involved in radiosensitivity. *Oncol Lett* 2018; 16(5): 6495–6501.
- 49 Li S, Sun X, Miao S, Lu T, Wang Y, Liu J, Jiao W. hsa\_circ\_0000729, a potential prognostic biomarker in lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer* 2018; 9(8): 924–930.
- 50 Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, Paffenholz SV, Berry K, Naldini MM, Lo-Coco F, Tay Y, Beck AH, Pandolfi PP. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations. *Cell* 2016; 165(2): 289–302.
- 51 Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 2008; 68(10): 3566–3572.
- 52 Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res* 2008; 68(20): 8195–8200.
- 53 Yang Q, Du WW, Wu N, Yang W, Awan FM, Fang L, Ma J, Li X, Zeng Y, Yang Z, Dong J, Khorshidi A, Yang BB. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. *Cell Death Differ* 2017; 24(9): 1609–1620.
- 54 Wu DG, Wang YY, Fan LG, Luo H, Han B, Sun LH, Wang XF, Zhang JX, Cao L, Wang XR, You YP, Liu N. MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(17): 2616–2621.
- 55 Yang W, Du WW, Li X, Yee AJ, Yang BB. Foxo3 activity promoted by non-coding effects of circular RNA and Foxo3 pseudogene in the inhibition of tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 2016; 35(30): 3919–3931.
- 56 Han J, Zhao G, Ma X, Dong Q, Zhang H, Wang Y, Cui J. CircRNA circ-BANP-mediated miR-503/LARP1 signaling contributes to lung cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503(4): 2429–2435.
- 57 Zhong L, Wang Y, Cheng Y, Wang W, Lu B, Zhu L, Ma Y. Circular RNA circC3P1 suppresses hepatocellular carcinoma growth and metastasis through miR-4641/PCK1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 499(4): 1044–1049.
- 58 Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, Xiao B, Guo J. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2015; 444: 132–136.
- 59 Long Z (龙志), Xie J, Liu YP, Zhang L, Xu CG, Luo JY, Li GQ. Differentially expressed circular RNAs in human gastric cancer cells. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2018; 70(4): 384–390 (in Chinese with English abstract).
- 60 Su H, Lin F, Deng X, Shen L, Fang Y, Fei Z, Zhao L, Zhang X, Pan H, Xie D, Jin X, Xie C. Profiling and bioinformatics

- analyses reveal differential circular RNA expression in radioresistant esophageal cancer cells. *J Transl Med* 2016; 14(1): 225.
- 61 Xuan L, Qu L, Zhou H, Wang P, Yu H, Wu T, Wang X, Li Q, Tian L, Liu M, Sun Y. Circular RNA: a novel biomarker for progressive laryngeal cancer. *Am J Transl Res* 2016; 8(2): 932–939.
  - 62 Zhong Z, Lv M, Chen J. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma. *Sci Rep* 2016; 6: 30919.
  - 63 Sand M, Bechara FG, Gambichler T, Sand D, Bromba M, Hahn SA, Stockfleth E, Hessam S. Circular RNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 2016; 83(3): 210–218.
  - 64 Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, Mesteri I, Grunt TW, Zeillinger R, Pils D. Correlation of circular RNA abundance with proliferation--exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Sci Rep* 2015; 5: 8057.
  - 65 Liu J, Wang D, Long Z, Liu J, Li W. CircRNA8924 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion by competitively binding to MiR-518d-5p/519-5p family and modulating the expression of CBX8. *Cell Physiol Biochem* 2018; 48(1): 173–184.
  - 66 Lukiw WJ. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD). *Front Genet* 2013; 4: 307.
  - 67 Ghosal S, Das S, Sen R, Basak P, Chakrabarti J. Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits. *Front Genet* 2013; 4: 283.
  - 68 Cui X, Niu W, Kong L, He M, Jiang K, Chen S, Zhong A, Li W, Lu J, Zhang L. hsa\_circRNA\_103636: potential novel diagnostic and therapeutic biomarker in Major depressive disorder. *Biomark Med* 2016; 10(9): 943–952.
  - 69 Wang YS, Zhou J, Hong K, Cheng XS, Li YG. MicroRNA-223 displays a protective role against cardiomyocyte hypertrophy by targeting cardiac troponin I-interacting kinase. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35(4): 1546–1556.
  - 70 Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW, Plourde A, Matarin M, Ross-Adams H, Meitinger T, Wichmann E, Mitchell BD, Furie K, Slowik A, Rich SS, Syme PD, MacLeod MJ, Meschia JF, Rosand J, Kittner SJ, Markus HS, Muller-Myhsok B, Dichgans M; International Stroke Genetics Consortium. Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Ann Neurol* 2009; 65(5): 531–539.
  - 71 Ye S, Willeit J, Kronenberg F, Xu Q, Kiechl S. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(5): 378–384.
  - 72 Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet* 2010; 6(12): e1001233.
  - 73 Song CL, Wang JP, Xue X, Liu N, Zhang XH, Zhao Z, Liu JG, Zhang CP, Piao ZH, Liu Y, Yang YB. Effect of circular ANRIL on the inflammatory response of vascular endothelial cells in a rat model of coronary atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42(3): 1202–1212.
  - 74 Li B, Li R, Zhang C, Bian HJ, Wang F, Xiao J, Liu SW, Yi W, Zhang MX, Wang SX, Zhang Y, Su GH, Ji XP. MicroRNA-7a/b protects against cardiac myocyte injury in ischemia/reperfusion by targeting poly(ADP-ribose) polymerase. *PLoS One* 2014; 9(3): e90096.
  - 75 Correa-Medina M, Bravo-Egana V, Rosero S, Ricordi C, Edlund H, Diez J, Pastori RL. MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr Patterns* 2009; 9(4): 193–199.
  - 76 Hu W, Han Q, Zhao L, Wang L. Circular RNA circRNA\_15698 aggravates the extracellular matrix of diabetic nephropathy mesangial cells via miR-185/TGF-beta1. *J Cell Physiol* 2019; 234(2): 1469–1476.
  - 77 Zhou Z, Jiang R, Yang X, Guo H, Fang S, Zhang Y, Cheng Y, Wang J, Yao H, Chao J. circRNA mediates silica-induced macrophage activation via HECTD1/ZC3H12A-dependent ubiquitination. *Theranostics* 2018; 8(2): 575–592.
  - 78 Liu C, Yao MD, Li CP, Shan K, Yang H, Wang JJ, Liu B, Li XM, Yao J, Jiang Q, Yan B. Silencing of circular RNA-ZNF609 ameliorates vascular endothelial dysfunction. *Theranostics* 2017; 7(11): 2863–2877.
  - 79 Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA* 2014; 20(11): 1666–1670.
  - 80 Chen X, Han P, Zhou T, Guo X, Song X, Li Y. circRNADb: A comprehensive database for human circular RNAs with protein-coding annotations. *Sci Rep* 2016; 6: 34985.
  - 81 Dudekula DB, Panda AC, Grammatikakis I, De S, Abdelmohsen K, Gorospe M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biol* 2016; 13(1): 34–42.
  - 82 Zheng LL, Li JH, Wu J, Sun WJ, Liu S, Wang ZL, Zhou H, Yang JH, Qu LH. deepBase v2.0: identification, expression, evolution and function of small RNAs, lncRNAs and circular RNAs from deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(D1): D196–D202.
  - 83 Xia S, Feng J, Chen K, Ma Y, Gong J, Cai F, Jin Y, Gao Y, Xia L, Chang H, Wei L, Han L, He C. CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs. *Nucleic Acids Res* 2018;

- 46(D1): D925–D929.
- 84 Xia S, Feng J, Lei L, Hu J, Xia L, Wang J, Xiang Y, Liu L, Zhong S, Han L, He C. Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes. *Brief Bioinform* 2017; 18(6): 984–992.
- 85 Zhang XO, Dong R, Zhang Y, Zhang JL, Luo Z, Zhang J, Chen LL, Yang L. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res* 2016; 26(9): 1277–1287.
- 86 Zhao Z, Wang K, Wu F, Wang W, Zhang K, Hu H, Liu Y, Jiang T. circRNA disease: a manually curated database of experimentally supported circRNA-disease associations. *Cell Death Dis* 2018; 9(5): 475.
- 87 Li S, Li Y, Chen B, Zhao J, Yu S, Tang Y, Zheng Q, Li Y, Wang P, He X, Huang S. exoRBase: a database of circRNA, lncRNA and mRNA in human blood exosomes. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(D1): D106–D112.
- 88 Gao Y, Zhao F. Computational strategies for exploring circular RNAs. *Trends Genet* 2018; 34(5): 389–400.
- 89 Zeng X, Lin W, Guo M, Zou Q. A comprehensive overview and evaluation of circular RNA detection tools. *PLoS Comput Biol* 2017; 13(6): e1005420.
- 90 Heumuller AW, Boeckel JN. Characterization and validation of circular RNA and their host gene mRNA expression using PCR. *Methods Mol Biol* 2018; 1724: 57–67.
- 91 Zirkel A, Papanonis A. Detecting circular RNAs by RNA fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol* 2018; 1724: 69–75.
- 92 Zhang Y, Xue W, Li X, Zhang J, Chen S, Zhang JL, Yang L, Chen LL. The biogenesis of nascent circular RNAs. *Cell Rep* 2016; 15(3): 611–624.
- 93 Schneider T, Hung LH, Schreiner S, Starke S, Eckhof H, Rossbach O, Reich S, Medenbach J, Bindereif A. CircRNA-protein complexes: IMP3 protein component defines subfamily of circRNPs. *Sci Rep* 2016; 6: 31313.
- 94 Dahl M, Dugaard I, Andersen MS, Hansen TB, Gronbaek K, Kjems J, Kristensen LS. Enzyme-free digital counting of endogenous circular RNA molecules in B-cell malignancies. *Lab Invest* 2018; 98(12): 1657–1669.
- 95 Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Anderson DG. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. *Nat Commun* 2018; 9(1): 2629.
- 96 Borchardt EK, Meganck RM, Vincent HA, Ball CB, Ramos SBV, Moorman NJ, Marzluff WF, Asokan A. Inducing circular RNA formation using the CRISPR endoribonuclease Csy4. *RNA* 2017; 23(5): 619–627.
- 97 Panda AC, De S, Grammatikakis I, Munk R, Yang X, Piao Y, Dudekula DB, Abdelmohsen K, Gorospe M. High-purity circular RNA isolation method (RPAD) reveals vast collection of intronic circRNAs. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(12): e116.
- 98 Noto JJ, Schmidt CA, Matera AG. Engineering and expressing circular RNAs via tRNA splicing. *RNA Biol* 2017; 14(8): 978–984.