

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.03.0330

环状 RNA 研究进展及临床应用

孔德沛, 訾晓渊, 孙颖浩*

第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] 环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一类产生于 RNA 剪切过程的封闭环形 RNA 分子,主要由外显子和(或)内含子构成,广泛存在于真核细胞内,具有稳定性、物种保守性以及细胞、组织特异性。环状 RNA 参与细胞内 RNA 调控网络,与疾病的发生和发展密切相关,可能成为新型的生物标记物及治疗靶点。近年来,关于环状 RNA 产生、调控、生物学特性、功能及其与疾病的关系等均取得了较大的研究进展。本文综述了真核细胞内源性环状 RNA 的研究进展及其与疾病的关联。

[关键词] 环状 RNA;生成;特性;疾病;生物学标记

[中图分类号] R 349.6

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)03-0330-06

circRNA: research progress and clinical applications

KONG De-pei, ZI Xiao-yuan, SUN Ying-hao*

Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Circular RNAs (circRNAs) are a species of RNAs with covalently closed loop structure and are widely expressed in eukaryocyte. Consisting of exons and/or introns, circRNAs are generated during the process of RNA splicing and are found to be relatively stable, evolutionally conserved and tissue/cell-specific. A few studies have indicated that circRNAs may participate in the RNA-RNA regulation network or RNA-protein complex formation and thus are involved in a diversity of diseases, including cancer. Here we reviewed the currently available outcomes and progress of researches concerning circRNAs and the potential relationship between diseases and circRNAs.

[Key words] circular RNA; biogenesis; property; disease; biological markers

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(3): 330-335]

非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)在细胞各项生物过程中发挥着不可忽视的作用,被喻为生命的“暗物质”。近年随着 RNA 测序技术和生物信息学的发展,研究者发现了非编码 RNA 家族的另一重要成员——环状 RNA(circular RNA, circRNA),同时其产生机制、生物学特性和功能不断更新,相关临床研究相继开展,现已成为疾病研究的热点之一^[1]。环状 RNA 的发现已近 40 年,早在 1976 年,人们发现类病毒由环形的 RNA 分子构成^[2];1979 年, Hsu 和 Coca-Prados^[3]利用电镜在 HeLa 细胞中发现环状 RNA 占总 RNA 含量的 1%~2%;1991 年, Nigro 等^[4]在人体细胞中发现了 DCC 促癌基因存在外显子倒向连接现象,后证明这种连接方式的产物是环状 RNA^[5]。目前,环状 RNA 已由“剪切副产物”成为非编码 RNA 研究领

域的新星。本文对真核细胞内源性环状 RNA 的研究进展及其与疾病的关联作一综述。

1 环状 RNA 的生成与特性

真核细胞内源性环状 RNA 是一类环形的基因转录产物,无游离的 5'端或 3'端,核酸分子间形成闭合 3'-5'磷酸二酯键(内含子套索 RNA 成环处碱基以 2'-5'磷酸二酯键结合),构成单链环形结构。环状 RNA 通常由 1~5 个外显子或 1~2 个内含子组成,同时也可含有基因间区或非编码区成分^[6-8]。仅由内含子构成的环状 RNA 称为内含子环状 RNA(circular intron RNA, ciRNA),同时具有外显子与内含子序列的环状 RNA 称为外显子-内含子环状 RNA(exon-intron circRNAs, EIciRNAs)^[9]。在计算机辅助下,将转录本测序结果与已知基因组序列

[收稿日期] 2016-02-03 **[接受日期]** 2016-03-10

[作者简介] 孔德沛,硕士生. E-mail: 346049188@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873409, E-mail: sunyh@medmail.com.cn

相匹配,鉴别出反向剪切位点,便可预测环状 RNA 的存在^[10]。

1.1 环状 RNA 的产生及调控机制 环状 RNA 的产生机制和过程尚未彻底明确。现有研究显示,环状 RNA 由前体 mRNA(pre-mRNA)反向剪切而成(图 1A)^[8, 11-12]。在 Jeck 等^[8]提出的 RNA 成环模型中,剪切供体(splice donor)和剪切受体(splice acceptor)分别以外显子跳读(exon-skipping)和内含子互补的方式缩小空间距离,反向剪切形成环状 RNA。环状 RNA 形成受外显子侧翼序列(图 1B)或 RNA 结合蛋白(RNA binding protein, RBP,图 1C)的调控^[9, 11, 13-16]。环状 RNA 侧翼内含子长度明显高于全基因组平均值^[17],其 Alu 元件(Alu element)数量成倍增加,更易于形成互补结构。例如 ZKSCAN1 基因第 2 外显子上游的 AluSq2 元件中,有 87%的碱基能与第 3 外显子下游的 AluSz 元件互补,提高第 2、3 外显子成环效率^[18]。RNA 结

合蛋白 Quaking 属于 STAR 家族,能特异识别 NACUAAAY 核心(core)及 UAAAY 半位点(half-site)^[19],牵拉结合点相互缩小空间距离,促进成环。SMARCA5 基因第 15、16 外显子所形成的环状 RNA(编号 hsa_circ_0001445)侧翼序列中存在丰富的 UAAAY 半位点,将此类位点突变后,环状 RNA 生成显著减少。另外,RNA 剪辑因子(RNA-editing factor)ADAR1(adenosine deaminase 1)能对环状 RNA 的形成起到负性调节作用。ADAR1 可阻止外显子侧翼序列互补结构的形成,从而抑制外显子环化。实验证实,敲除 HEK293 细胞及人类成神经细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中 ADAR 基因后,多种环状 RNA 表达量均有不同程度的提高^[20]。环状 RNA 还受到 miRNA 调控,miR-671 可通过碱基互补的方式介导 AGO2 蛋白对 ciRS-7(circular RNA sponge for miR-7;由 CDR1 反义链产生的环状 RNA,可吸附 miR-7)分子进行剪切^[21]。

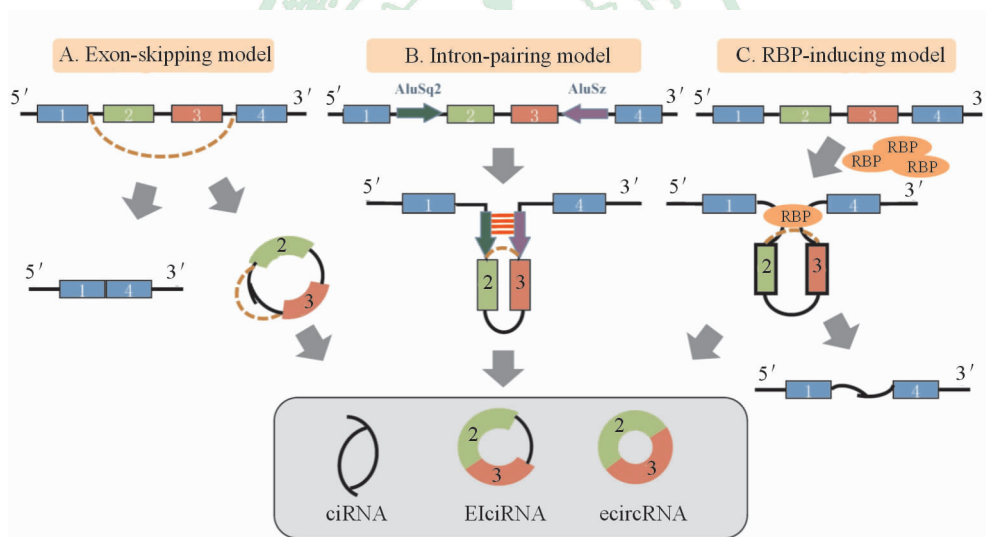


图 1 环状 RNA 形成模型

Fig 1 Models of circRNA biogenesis

A: Exon-skipping of pre-mRNA produces linear mRNAs and forms circles of the rest; B: Introns with complementary ALU repeats form circles through base-pairing; C: RNA binding proteins binding to the target sites in the flanking introns induce circularization. circRNA: Circular RNA; ciRNA: Circular intron RNA; EiciRNA: Exon-intron circRNA; ecircRNA: Circular exon RNA

1.2 环状 RNA 的生物学特性 随着研究的不断深入,环状 RNA 的诸多特性引起了人们的注意,其中受到公认及较为重要的包括以下 4 点:

(1)环状 RNA 种类繁多,广泛、大量存在于真核细胞。迄今,全球的学者已经在包括人、鼠、斑马鱼、果蝇、线虫、酵母菌、水稻在内的动植物及真菌细胞内预测出超过 10 万种环状 RNA^[6, 8, 20, 22-25]。对

小鼠的研究发现,有 20%的蛋白质编码基因能够产生环状 RNA^[26],并且部分基因可产生多种环状 RNA 亚型。Salzman 等^[23]在真核细胞内检测到环状 RNA 的含量(分子数量)占 polyA 阳性 RNA 分子的 1%,且在其线性异构体中占 5%~10%的比例。Rims2 基因产生的环状 RNA 含量甚至达到其线性 mRNA 表达量的 20 倍^[20],这有力反驳了环状

RNA 是剪切副产物的假说,标示着环状 RNA 可能在真核细胞 RNA 分子中占有不可忽视的重要地位。

(2)环状 RNA 生物学性质稳定。环状 RNA 分子的稳定性很大程度上来源于其环形结构导致的核酸酶逃逸。RNA 酶(RNase)R 是一种高效核酸外切酶,能识别 RNA 分子游离 3'端,并向 5'端水解靶 RNA,可有效水解单链线性 RNA 分子^[27]。由于环状 RNA 首尾相接,缺乏游离的 3'端,故不为 RNase R 识别并水解。此外,RNase II、多核苷酸磷酸化酶、寡核糖核酸酶等常见核酸酶均不能有效水解环状 RNA^[28]。细胞内阻断环状 RNA 的生成,其含量在一定时间内无明显下降,是环状 RNA 稳定性较高的另一证据^[8]。研究人员在人体唾液上清中检测到超过 400 种环状 RNA^[29],这些环状 RNA 的亲本基因与炎症反应、细胞骨架形成、细胞运动、T 细胞极性形成以及整联蛋白介导的信号通路等相关。此外,Li 等^[30]在人体血清外泌体中发现了超过 1 000 种环状 RNA。这些证据预示着环状 RNA 可能作为良好的信息载体,在细胞内及细胞间具有信息传递功能。

(3)环状 RNA 具有时空特异性。例如,ciRS-7 在脑组织中表达较高,而在非神经组织中表达量则较低^[31];DOCK1 基因表达的环状 RNA 在乳腺癌细胞系 MCF-7 中呈高表达,而在肺癌细胞系 A549 中则几乎不表达^[23]。在不同发育时期的线虫胚胎细胞中,环状 RNA 种类及相对表达量均存在显著差异^[26, 31]。另外,通过荧光原位杂交技术可观察到环状 RNA 的分布具有明显细胞质或细胞核聚集性,例如 ciRS-7 主要存在于细胞质,而 circEIF3J 和 ci-ankrd52 则仅聚集于细胞核^[9, 31-32]。时空特异性是环状 RNA 具有特定功能的证据,也是将其运用于开发临床疾病诊断标记物的基础。

(4)环状 RNA 具有生物进化保守性。Jeck 等^[8]在人体成纤维细胞中发现 2 121 种环状 RNA 能与小鼠基因组匹配,其中 457 个被匹配的小鼠基因能产生相同的环状 RNA。Guo 等^[33]发现能产生环状 RNA 的小鼠基因所对应的人类同源基因有 66%的可能产生环状 RNA;反之,对于不能产生环状 RNA 的小鼠基因,其人类同源基因产生环状 RNA 的比例只有 19%。尽管如此,环状 RNA 的保守性到底是基因保守的必然结果,还是因其重要功

能而受到精确调控形成,尚需进一步研究证明。

2 环状 RNA 与其他分子的相互作用及功能

2.1 环状 RNA 与 miRNA 的相互作用

环状 RNA 参与了复杂的 RNA-RNA 相互作用网络,在基因转录后调控中发挥作用。部分环状 RNA 包含若干 miRNA 结合位点,具有 miRNA 海绵功能(miRNA sponge)。来源于小鼠 Y 染色体性别决定区的环状 RNA 分子 circSry,是第 1 个被发现能与 RNA 相互作用的环状 RNA,序列分析推测该环状 RNA 能够与 16 个 miR-138 分子结合,抑制 miR-138 分子对其下游靶标的作用^[34]。另外,作为环状 RNA 的代表分子之一,小脑退行性相关蛋白基因(CDR1)反义链转录的环状 RNA 分子 CDR1as/ciRS-7 可高效吸附 miR-7,抑制其对目标基因 mRNA 的沉默^[31, 35-36],同时也受 miR-671 介导的 RNA 降解。通过生物信息学分析已发现上万种环状 RNA 具有 miRNA 吸附功能^[37],但仅有少数得到了验证,因此,笼统地将环状 RNA 的功能概括为 RNA 海绵仍缺乏充足的证据。

2.2 环状 RNA 与蛋白质的相互作用

环状 RNA 可直接与蛋白质结合,也可通过 RNA 介导间接与蛋白质发生关联,影响蛋白质功能。例如,RNA 剪切因子 MBL 可结合其亲本基因第 2 外显子,促进其环化形成 circMbl;同时,circMbl 能与 MBL 结合,降低 MBL 有效浓度,减少 circMbl 生成^[38]。内含子-外显子环状 RNA circEIF3J 与 U1 RNA 结合,促进 U1 小核核糖核蛋白(U1 snRNP)复合体与 RNA 聚合酶 II 结合,增强亲本基因转录^[9]。circ-Foxo3 与激酶抑制蛋白(p21)及细胞分裂蛋白激酶 2(CDK2)形成复合体,抑制 CDK2 对细胞分裂的促进作用,阻碍细胞周期进展^[39]。

2.3 环状 RNA 的翻译功能

水稻黄斑驳病毒 scRYMV^[40]以及人工合成的具有内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)的环形 RNA 分子在细胞内能够翻译成蛋白质^[41-43]。因此,环形结构并非影响 RNA 编码的决定性因素。但是,目前在真核细胞内尚无内源性环状 RNA 可直接翻译出蛋白质的证据:(1)未检测到环状 RNA 与核糖体结合^[8];(2)在 A549 细胞系内,蛋白质谱分析未发现与环状 RNA 序列对应的蛋白质^[44]。

3 环状 RNA 相关临床研究进展

环状 RNA 与疾病的发生和发展有密切关联^[36,45],是一种充满前景的生物标记物甚至治疗靶点^[46],成为继 miRNA 及长链非编码 RNA (LncRNA)之后又一临床疾病研究热点。有学者预测 ciRS-7 与 miR-7 的相互作用可能影响到 miR-7 靶基因(*EGFR*、*PIK3CD*、*mTOR* 等)的表达,从而与恶性胶质瘤、胃癌、肝癌等疾病的发生、发展相关联^[45-49]。Li 等^[50]发现食管癌组织中环状 *ITCH* (cir-*ITCH*)的表达量显著低于正常组织,在人工构建的荷瘤小鼠模型中,外源过表达 cir-*ITCH* 可抑制食管癌肿瘤细胞生长,证明环状 RNA 与肿瘤的发生、发展具有直接关联,为更多将环状 RNA 投入临床研究的学者树立了信心。Bachmayr-Heyda 等^[51]通过对直肠癌组织转录组测序进行分析,发现环状 RNA 表达量在肿瘤组织及肿瘤细胞系中具有整体下降的趋势,并且特定环状 RNA 与其线性异构体的比值在结直肠癌与癌旁组织中具有显著差异,这为探索肿瘤发病机制提供了新的思路。

除肿瘤外,环状 RNA 与衰老、炎症等生理、病理现象的相关研究也不断兴起^[52-53]。对环状 RNA 在疾病中差异性表达的测定及其机制的研究或许能够帮助临床研究者诊断疾病、评估疗效、分析病机及开发新药物治疗靶点。Du 等^[52]发现,circ-Foxo3 在老年患者及小鼠的心肌细胞内表达较高,干扰 circ-Foxo3 的表达可以抑制小鼠胚胎成纤维细胞的衰老。随后,更深入的研究证明 circ-Foxo3 与抗衰老相关蛋白 ID-1 和 E2F1 及抗应激蛋白 FAK 和 HIF1a 结合,抑制蛋白抗衰老功能,导致心肌衰老。此外,目前已有多项研究分别证明了如骨关节炎^[53]、大脑缺血再灌注损伤^[54]、动脉粥样硬化^[55]、子痫前期^[56]等非肿瘤性疾病的临床组织、血液样本或疾病细胞模型中存在环状 RNA 的异常表达。环状 RNA 凭借其特殊的生物学特性及功能,与肿瘤、生物标记物、衰老等研究热点相结合^[17,30,52],参与到生物与医学研究的各个环节,成为基础科研与临床研究相互转化的桥梁。

4 展望

环状 RNA 研究手段日趋成熟,目前 Circbase、

Circ2Traits、CircNet 等数据库已收录了近 10 万种环状 RNA 测序结果,并能预测 circRNA-miRNA-mRNA 相互作用,帮助研究者系统地研究环状 RNA^[57-59]。同时,人工构建环状 RNA 或干扰环状 RNA 的方法不断涌现并趋于成熟,使人为调控细胞内环状 RNA 的表达成为可能,有利于进一步探索环状 RNA 的功能^[15, 31]。分析环状 RNA 相关文献的发表情况可知,环状 RNA 与疾病的相关研究正由“提出假设”向“实践证明”转变,将环状 RNA 运用于临床诊疗工作或成为转化医学与精准医疗的新落脚点。相信随着研究技术的发展与普及,环状 RNA 将带给医学和科学界更多的惊喜与突破。

[参考文献]

- [1] 夏世金,高文,胡明冬,刘露梅,郜先桃. 环状 RNA 的研究现状及展望[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版),2014,7:670-673.
- [2] Sanger H L, Klotz G, Riesner D, Gross H J, Kleinschmidt A K. 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: 3852-3856.
- [3] Hsu M T, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells[J]. Nature, 1979, 280: 339-340.
- [4] Nigro J M, Cho K R, Fearon E R, Kern S E, Ruppert J M, Oliner J D, et al. Scrambled exons[J]. Cell, 1991, 64: 607-613.
- [5] Cocquerelle C, Mascrez B, Hétiuin D, Bailleul B. Missplicing yields circular RNA molecules[J]. FASEB J, 1993, 7: 155-160.
- [6] Salzman J, Gawad C, Wang P L, Lacayo N, Brown P O. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. PLoS One, 2012, 7: e30733.
- [7] Danan M, Schwartz S, Edelheit S, Sorek R. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: 3131-3142.
- [8] Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, Slevin M K, Burd C E, Liu J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. RNA, 2013, 19: 141-157.
- [9] Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22: 256-264.

- [10] Gao Y, Wang J, Zhao F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for *de novo* circular RNA identification[J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 4.
- [11] Barrett S P, Wang P L, Salzman J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor[J]. *Elife*, 2015, 4: e07540.
- [12] Ebbesen K K, Kjems J, Hansen T B. Circular RNAs: identification, biogenesis and function [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859: 163-168.
- [13] Vicens Q, Westhof E. Biogenesis of circular RNAs [J]. *Cell*, 2014, 159: 13-14.
- [14] Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath H T, Orejuela M R, et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals [J]. *Cell Rep*, 2015, 10: 170-177.
- [15] Conn S J, Pillman K A, Toubia J, Conn V M, Salmanidis M, Phillips C A, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. *Cell*, 2015, 160: 1125-1134.
- [16] Zhang X O, Wang H B, Zhang Y, Lu X, Chen L L, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, 159: 134-147.
- [17] Westholm J O, Miura P, Olson S, Shenker S, Joseph B, Sanfilippo P, 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: 1966-1980.
- [18] Liang D, Wilusz J E. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production [J]. *Genes Dev*, 2014, 28: 2233-2247.
- [19] Galarneau A, Richard S. Target RNA motif and target mRNAs of the quaking STAR protein[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 691-698.
- [20] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, Jens M, Pino N, Giusti S, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. *Mol Cell*, 2015, 58: 870-885.
- [21] Hansen T B, Wiklund E D, Bramsen J B, Villadsen S B, Statham A L, Clark S J, et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA[J]. *EMBO J*, 2011, 30: 4414-4422.
- [22] Chen I, Chen C Y, Chuang T J. Biogenesis, identification, and function of exonic circular RNAs [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2015, 6: 563-579.
- [23] Salzman J, Chen R E, Olsen M N, Wang P L, Brown P O. Cell-type specific features of circular RNA expression[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003777.
- [24] Wang P L, Bao Y, Yee M C, Barrett S P, Hogan G J, Olsen M N, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e90859.
- [25] Lu T, Cui L, Zhou Y, Zhu C, Fan D, Gong H, et al. Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice[J]. *RNA*, 2015, 21: 2076-2087.
- [26] You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 603-610.
- [27] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 9331-9342.
- [28] Suzuki H, Zuo Y, Wang J, Zhang M Q, Malhotra A, Mayeda A. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e63.
- [29] Bahn J H, Zhang Q, Li F, Chan T M, Lin X, Kim Y, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva [J]. *Clin Chem*, 2015, 61: 221-230.
- [30] Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. *Cell Res*, 2015, 25: 981-984.
- [31] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495: 333-338.
- [32] Zhang Y, Zhang X O, Chen T, Xiang J F, Yin Q F, Xing Y H, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51: 792-806.
- [33] Guo J U, Agarwal V, Guo H, Bartel D P. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs[J]. *Genome Biol*, 2014, 15: 409.
- [34] Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, et al. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis[J]. *Cell*, 1993, 73: 1019-1030.
- [35] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, Bramsen J B, Finsen B, Damgaard C K, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495: 384-388.
- [36] Hansen T B, Kjems J, Damgaard C K. Circular RNA and miR-7 in cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 5609-

- 5612.
- [37] Thomas L F, Sætrom P. Circular RNAs are depleted of polymorphisms at microRNA binding sites [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30: 2243-2246.
- [38] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti N R, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing [J]. *Mol Cell*, 2014, 56: 55-66.
- [39] Du W W, Yang W, Liu E, Yang Z, Dhaliwal P, Yang B B. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016 Feb 9. pii: gkw027. [Epub ahead of print]
- [40] Abouhaidar M G, Venkataraman S, Golshani A, Liu B, Ahmad T. Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 14542-14547.
- [41] Chen C Y, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs [J]. *Science*, 1995, 268: 415-417.
- [42] Perriman R, Ares M Jr. Circular mRNA can direct translation of extremely long repeating-sequence proteins *in vivo*[J]. *RNA*, 1998, 4: 1047-1054.
- [43] Conn S J, Pillman K A, Toubia J, Conn V M, Salmandis M, Phillips C A, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. *Cell*, 2015, 160: 1125-1134.
- [44] Salzman J, Chen R E, Olsen M N, Wang P L, Brown P O. Cell-type specific features of circular RNA expression[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003777.
- [45] Peng L, Yuan X Q, Li G C. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer (review)[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33: 2669-2674.
- [46] Li J, Yang J, Zhou P, Le Y, Zhou C, Wang S, et al. Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5: 472-480.
- [47] Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 132-136.
- [48] Song X, Zhang N, Han P, Moon B S, Lai R K, Wang K, et al. Circular RNA profile in gliomas revealed by identification tool UROBORUS [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016 Feb 11. pii: gkw075. [Epub ahead of print]
- [49] Qin M, Liu G, Huo X, Tao X, Sun X, Ge Z, et al. Hsa_circ_0001649: a circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16: 161-169.
- [50] Li F, Zhang L, Li W, Deng J, Zheng J, An M, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 6001-6013.
- [51] Bachmayr-Heyda A, Reiner A T, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation-exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8057.
- [52] Du W W, Yang W, Chen Y, Wu Z K, Foster F S, Yang Z, et al. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses[J]. *Eur Heart J*, 2016 Feb 11. pii: ehw001. [Epub ahead of print]
- [53] Liu Q, Zhang X, Hu X, Dai L, Fu X, Zhang J, et al. Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 'Sponge' in human cartilage degradation[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22572.
- [54] Lin S, Ye S, Long Y, Fan Y, Mao H F, Chen M T, et al. Circular RNA expression alterations are involved in OGD/R-induced neuron injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471: 52-56.
- [55] Burd C E, Jeck W R, Liu Y, Sanoff H K, Wang Z, Sharpless N E. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001233.
- [56] Zhang Y, Yang H, Long Y, Li W L. Circular RNA in blood corpuscles combined with plasma protein factor for early prediction of pre-eclampsia[J]. *BJOG*, 2016 Feb 5. doi: 10.1111/1471-0528.13897. [Epub ahead of print]
- [57] Ghosal S, Das S, Sen R, Basak P, Chakrabarti J. Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits[J]. *Front Genet*, 2013, 4: 283.
- [58] Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs [J]. *RNA*, 2014, 20: 1666-1670.
- [59] Liu Y C, Li J R, Sun C H, Andrews E, Chao R F, Lin F M, et al. CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 44(D1): D209-D215.