

环状 RNA 与人类神经系统疾病

许 飞^a, 金 磊^b, 聂志妍^a, 陈林军^b, 郑 红^{b*}

(上海健康医学院 a. 微生物与免疫教研室; b. 检验与检疫系, 中国上海 201318)

摘 要: 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是通过非经典剪接方式将 RNA 的 3' 和 5' 端通过共价键相连而形成的一种环形非编码 RNA。circRNA 的主要功能之一是作为微 RNA (microRNA, miRNA) 的“分子海绵”, 通过抑制 miRNA 的功能参与神经系统疾病、肿瘤、肥胖以及炎症等多种人类疾病的调节。越来越多的研究表明, circRNA 在人类疾病过程中起着非常重要的作用, 甚至可以作为疾病早期诊断的生物标记物之一。在此, 文章主要对 circRNA 的生物合成、特性和功能做简单概述, 并着重对 circRNA 在神经系统疾病中的研究进展予以综述。

关键词: 环状 RNA (circRNA); 非编码 RNA (ncRNA); miRNA 分子海绵; 神经系统疾病

中图分类号: Q522, R34

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)06-0496-07

Circular RNAs and Neurological Disorders

XU Fei^a, JIN Lei^b, NIE Zhi-yan^a, CHEN Lin-jun^b, ZHENG Hong^{b*}

(a. Department of Microbiology and Immunology; b. Department of Health Inspection and Quarantine, Shanghai University of Medical & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

Abstract: Circular RNAs (circRNAs) are recently discovered endogenous non-coding RNAs whose head 3' and tail 5' ends covalently bond together to result in a circular form. They have been shown to inhibit the function of microRNAs (miRNAs) as miRNA sponges in several diseases, particularly in inflammation, neurological diseases, cancer and atherosclerosis. Emerging evidences show that circRNAs play important roles in the pathogenesis of human diseases and even can act as a biomarker for early diagnosis of certain diseases. Herein, the biosynthesis, molecular characteristics and function of circRNAs were summarized, and the latest progress of circRNAs in the context of neurological diseases was highlighted.

Key words: circular RNAs (circRNAs); non-coding RNAs (ncRNAs); miRNA sponges; neurological diseases
(Life Science Research, 2018, 22(6): 496-502)

非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 领域突破性的发现为探索人类疾病的机制和治疗提供了新的视角。1976 年, 研究者在马铃薯纺锤块茎病的研究中发现, 类病毒 (viroid) 能侵染植株并导致死亡。与病毒不同的是, 类病毒没有蛋白质外壳包被, 基因组是单链、闭合的 RNA 分子^[1]。1979 年, 洛克菲勒大学的 Hsu 和 Coca-Prados 在电子显微镜下观察到, 真核细胞细胞质中有环状 RNA

的存在^[2]。这类 RNA 缺乏 5' 帽结构和 3' poly(A) 尾, 单链呈环形, 因此被称为环状 RNA (circular RNA, circRNA)。起初, circRNA 被认为是 RNA 剪接过程中的无用产物。随着高通量测序技术以及生物信息学的飞速发展, 人们才逐渐揭示 circRNA 的真正“面目”^[3]。

在正常的转录环境中, 外显子剪接使得前体 RNA 转变为成熟的信使 RNA (messenger RNA, mR-

收稿日期: 2018-05-16; 修回日期: 2018-07-16

基金项目: 2017 年上海高校青年教师培养资助计划 (ZZJK-YX16007); 2017 年上海健康医学院年种子基金资助项目 (E3-0200-17-201127); 2018 年上海健康医学院创新创业课程建设项目 (B1-0200-18-309006)

作者简介: 许飞 (1988-), 女, 上海人, 博士研究生, 讲师; * 通讯作者: 郑红 (1966-), 女, 上海人, 上海健康医学院副教授, 主要从事表观遗传学与细胞生物学研究, Tel: 021-65882870, E-mail: lll_shanghai@163.com。

NA), 但是对于环状 RNA 而言, 外显子的不规则拼接导致了环状 RNA 的形成^[4-6]。例如, 性别决定基因 *SRY* (*sex region of Y chromosome*) 在正常情况下转录翻译成 SRY 蛋白。但是, RNA 不规则拼接使得外显子转录的前体 RNA 成环, 从而导致蛋白质翻译受阻^[7]。circRNA 的环形结构可以保护其免受核酸外切酶的水解, 与其他线性 RNA 相比结构更加稳定。circRNA 的主要功能之一是作为 miRNA “分子海绵”, 吸附 miRNA, 从而抑制 miRNA 的活性^[8]。因此, circRNA 在基因表达的转录后修饰过程中起着重要的“微调(fine-tuning)”作用。越来越多的研究显示, circRNA 在肿瘤、肥胖、动脉粥样硬化以及神经系统疾病等人类疾病过程中都发挥着重要作用^[3, 9, 10]。随着高通量测序、芯片技术、生物信息学分析技术的广泛应用, circRNA 在神经系统中的功能受到越来越多的关注。circRNA 在神经系统中高度富集, 其表达的高度保守性、特异性和稳定性, 为 circRNA 作为神经系统疾病诊治的标志物提供了巨大的潜力。这里, 我们首先对 circRNA 的产生机制以及生物学功能做简单概述, 然后着重介绍 circRNA 在神经系统疾病中的研究进展。

1 circRNA 的产生机制及检测方法

目前, 有关 circRNA 的产生机制主要有 3 种模型假说: 套索驱动的内含子环化(lariat-driven circularization)、内含子配对驱动的内含子环化(intron-pairing-driven circularization)以及 RBP 配对驱动的内含子环化(RBP-pairing-driven circularization)^[11, 12]。第 1 种模型认为前体 RNA 的转录过程中由于 RNA 发生了部分折叠, 拉近了原本非相邻的外显子, 从而发生了外显子跳跃(exon skipping), 使得被跨越的区域形成了环形 RNA 中间体, 中间体则进一步通过套索剪接形成由外显子构成的环形 RNA 分子, 即外显子 circRNA (图 1)^[11]。在内含子拼接位点的短重复序列, 例如 Alu 序列, 可以通过碱基互补配对促进外显子环化^[13-15]。Aktas 等^[16]发现 RNA 解旋酶 DHX9 特异性结合反向 Alu 元件调控 RNA 加工和 circRNA 形成, DHX9 缺失会导致环状 RNA 增多, 这为反向 Alu 元件调控 RNA 转录产物加工过程提供了全新的机制模型。

第 2 种模型认为, 位于内含子区域的反向互补序列介导内含子区域配对, 从而形成内含子 circRNA (图 2)^[12]。近期有报道称, 发现了环化的外

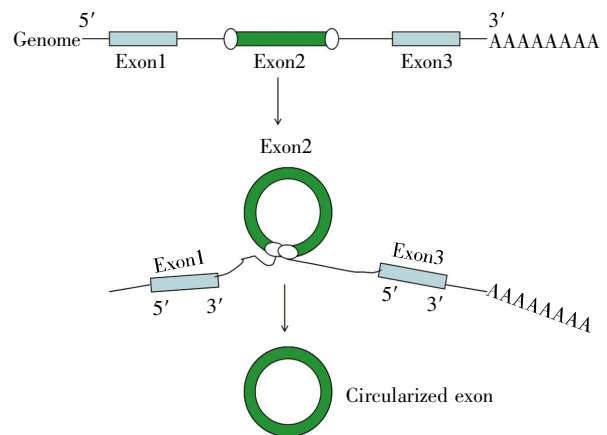


图 1 套索驱动的内含子环化^[11]

Fig.1 Lariat-driven circularization^[11]

显子中间保留内含子序列的 circRNA, 即外显子—内含子环状 RNA (exon-intron circRNA, EIciRNA), 但其发生机制尚不明确^[17]。一项研究表明, 内含子拼接位点中的反向互补重复序列(reverse complementary repeat, RCR)会增强环化效率^[18]。在进化的过程中, RCR 序列的产生源于碱基序列的随机重复。一种 RNA 编辑酶——腺苷脱氨酶 1 (adenosine deaminase that acts on RNA, ADAR1), 可抑制 RCR 的作用, 敲除 ADAR1 可显著增强 circRNA 的表达^[14]。

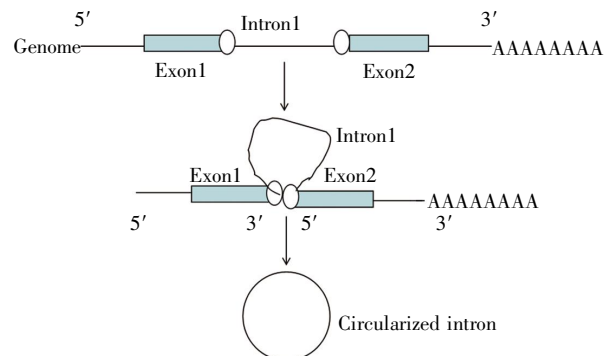
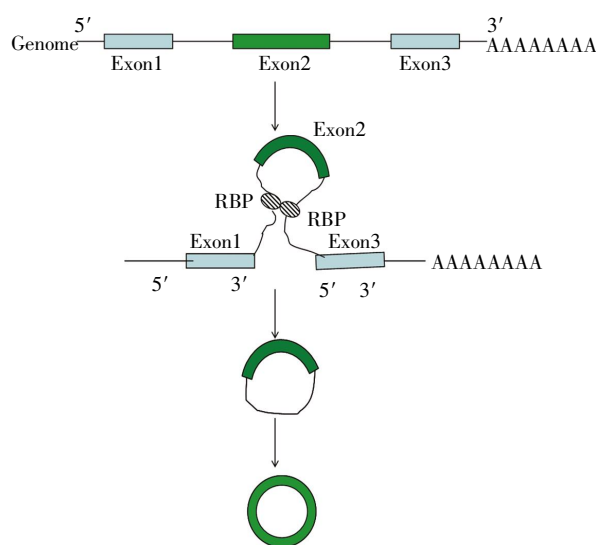


图 2 内含子配对驱动的内含子环化^[12]

Fig.2 Intron-pairing-driven circularization^[12]

第 3 种模型是依赖 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)的环化(图 3)^[19]。RBP 结合在序列的两端, 促进两端靠近、成环, 再将环中的内含子序列去除, 仅保留外显子序列。例如, 甘露糖结合凝集素(mannose binding lectin, MBL)可以作为 RNA 结合蛋白促进 circMBL 的生物合成^[9]。此外, 科学家们发现 RBP 也可能抑制 circRNA 的形成, 例如前文陈述的 ADAR1 蛋白^[14]。

上述 3 种模型并非平等存在, 实验数据显示

图 3 RBP 配对驱动的内化^[19]Fig.3 RBP-pairing-driven circularization^[19]

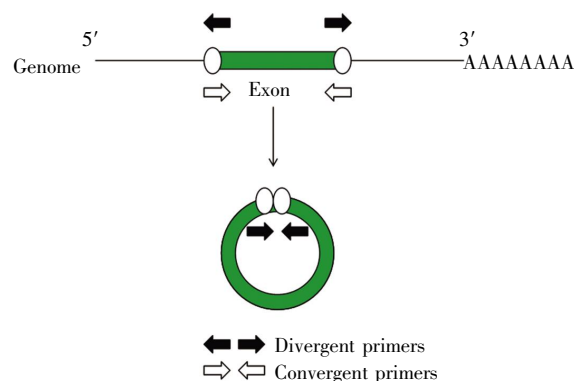
内含子配对驱动的内化往往较常发生^[5]。虽然以上 3 种模型都已被证实,但是 circRNA 的精确形成机制尚未明了。circRNA 的表达调控以及是否还有其他合成方式等问题仍需更加深入的研究。

circRNA 没有 5'端帽结构和 3'端 poly(A)尾,因此能抵抗核酸外切酶的水解。与其他 RNA 相比, circRNA 更加稳定,半衰期大约是 mRNA 的 5 倍^[15]。但是,正是由于 5'端帽结构和 3'端 poly(A)尾结构的存在, mRNA 能够从细胞核出来进入到细胞质,而缺乏这些结构的 circRNA 又是通过什么方式进入细胞质的呢?关于 circRNA 的出核机制有一些不同的理论,其中有人推测 circRNA 是在细胞分裂的时候进入细胞质的,但是在非分裂的神经元中 circRNA 也可以进入细胞质,推翻了这一猜测。因此, circRNA 的出核机制还有待深入研究。

目前常用的 circRNA 分离方法有以下几种。第 1 种是利用 RNase R 酶水解线性 RNA。用 RNase R 处理总 RNA,即可分离出 circRNA^[20]。第 2 种是利用凝胶电泳阻滞来分离 circRNA。将总 RNA 与融化的凝胶混匀,在凝固的过程中,只有 circRNA 可以与凝胶交联。凝胶凝固后,在电场的作用下,线性 RNA 迁移,一定时间后线性 RNA 全部迁移出凝胶,这样就可将凝胶中交联的 circRNA 分离出来^[21, 22]。另外,还可以利用含有 poly(T)基质的亲和层析方法,将含有 poly(A)尾的线性 mRNA 与没有 poly(A)尾的 circRNA 分离^[23]。

稳定表达的外显子 circRNA 可以通过高通量

测序进行检测。circRNA 可以用发散性引物(divergent primer)来扩增(图 4)^[24]。发散性引物不能扩增引物之间的区域,而是从引物所在位点向序列两端扩增。因此,应用此引物进行扩增时,线性 RNA 是没有扩增产物的,只有环形 circRNA 有大小一定的目的产物^[24]。

图 4 扩增 circRNA 的发散性引物^[24]Fig.4 Divergent primers used for quantitation of circRNA^[24]

此外,一些在线数据库可用于 circRNA 的信息查询。Glazar 等^[25]发表了 circBase 数据库(<http://www.circbase.org/>),这个数据库整合了目前已经报道的所有 circRNA。Ghosal 等^[26]开发了 Circ2Trait 在线工具(<http://gyanxetbeta.com/circdb/>),可以预测 circRNA 与 miRNA、circRNA 与蛋白质等的相互调控网络。最近, Dudekula 等^[27]公布了 CircInteractome 数据库(<http://circinteractome.nia.nih.gov/>),该数据库可预测 miRNA 和 circRNA 的相互作用。

2 circRNA 的生物学功能

2.1 circRNA 作为 miRNA“分子海绵”

外显子 circRNA 的主要功能是作为特定 miRNA 的“分子海绵”,抑制 miRNA 的活性,从而增强 miRNA 下游靶基因的表达^[28, 29]。这类 circRNA 主要存在于细胞质中。例如, ciRS-7 含有超过 70 个 miR-7 的结合位点,可作为 miR-7 的“分子海绵”吸附 miR-7,从而抑制 miR-7 的活性^[8]。ciRS-7 能够调节翻译小脑变性相关蛋白 1 (cerebellar degeneration-related protein 1, CDR1)的转录物,故又称之为 CDR1as (antisense to the cerebellar degeneration-related protein 1 transcript)。ciRS-7/CDR1as 与 miR-7 的结合使 miR-7 的靶基因表达得以增加^[8, 30]。在斑马鱼胚胎中过表达 CDR1as 会导致中脑缩小,与 miR-7 缺失所引起的表型类似^[30]。

与 *SRY* 基因共表达的 circRNA *Sry* 有 16 个 miR-138 结合位点, 可使 miR-138 的表达降低^[30]。另一项研究显示, *ZNF* 基因的 circRNA *ZNF91* 有 24 个 miR-23 结合位点和 7 个 miR-199 结合位点^[31]。此外, *cir-ITCH* 的序列跨越 E3 泛素连接酶的外显子序列, 可作为 miR-7、miR-17 和 miR-214 的“分子海绵”^[32]。

2.2 circRNA 与蛋白质相互结合

circRNA 不仅能与 RNA 结合, 也能与蛋白质(主要是 RBP)结合。有研究报道 circRNA 能够与 AGO 蛋白(Argonaute)以及 RNA 聚合酶 II 相互结合^[15, 30]。*MBL* 基因表达的 MBL 蛋白可以作为 RBP 结合在 *MBL* 的前体 RNA 上, 促使其环化形成 circMBL, 抑制 RNA 的翻译。而且 circMBL 又能与 MBL 蛋白结合, 抑制 MBL 蛋白的活性^[9, 33]。一些 circRNA (如 *ci-ankrd52*、*ci-mcm5* 和 *ci-sirt7*) 参与 RNA 聚合酶 II 的延伸机制, 顺式调节宿主基因的转录活性^[34]。例如, *ci-ankrd52* 可以在宿主基因的转录起始位点积累, 并参与 RNA 聚合酶 II 的延伸, 促进基因的转录^[34]。一些 EICRNA (例如 circ-EIF3J 和 circPAIP2) 可以与 U1 snRNA 相互作用促进转录^[35]。此外, circRNA 还可以调节 mRNA 的稳定性。研究报道, *CDR1as* 能通过稳定 *CDR1* 的 mRNA 促进蛋白质的表达^[21]。circRasGEF1B 可通过稳定 *ICAM-1* 的 mRNA, 正向调节 *ICAM-1* 基因的表达^[36]。

2.3 circRNA 的翻译功能

事实上, 绝大多数的 circRNA 来源于编码蛋白质的基因序列, 而且定位于细胞质中。那么这些 circRNA 是否能够有翻译的功能呢? Wang 等^[37]通过基因编辑的方法证实, 含有内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)的 circRNA 能够翻译产生多肽。最近一项研究则显示, 没有 IRES 或者经典翻译结构(5'帽结构和 3' poly(A)尾结构)的 circRNA 也存在翻译功能^[38]。有研究报道, 一些外显子 circRNA 含有起始密码子^[39]。但是相关研究显示, circRNA 的起始密码子很可能是抑制线性 mRNA 转录本的翻译, 其本身并不能编码蛋白质, 即“mRNA 陷阱(mRNA trap)”^[40]。最近, Yang 等^[28]首次报道了 circRNA 存在 N⁶-甲基腺苷化修饰(N⁶-methyadenosine, 6mA or m⁶A), 并且该修饰能促进 circRNA 的翻译。紧接着, Sebastian Kadener 的研究团队利用果蝇模型通过核糖体印迹分析(ribosome footprinting)发现了大量具有翻译

功能的 circRNA^[41]。而 Irene Bozzoni 团队则通过临床样本和小鼠模型证实 circ-ZNF609 可直接翻译蛋白质, 并且该蛋白质与肌肉发生过程有关^[42]。这些研究结果为环状 RNA 的功能研究提供了非常有价值的思路。

3 circRNA 参与神经系统疾病的调控

人体各个组织的深度测序结果显示, 脑的 circRNA 含量最高^[43]。而且在神经发育过程中, circRNA 在大脑的各个部位均有较高的表达^[44, 45]。circRNA 在神经形成、神经发育以及突触可塑性过程中的高表达, 暗示了 circRNA 在中枢神经系统中的重要作用^[46]。表 1 总结了与神经系统疾病相关的 circRNA。

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是由大脑黑质致密部的多巴胺能神经元退行性病变引起的神经系统疾病。基因水平、神经病理学水平、细胞水平的实验研究均证实, α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)是 PD 发病机制过程的关键分子^[47, 48]。 α -Syn 的过度积累会引起多巴胺能神经元的功能损伤。细胞实验结果显示, miR-7 能降低 α -Syn 的 mRNA 水平^[48]。而且, 敲减 *CDR1as* 可增加 miR-7 的活性, 抑制 miR-7 靶基因的表达。因此, *CDR1as* 和 miR-7 很可能在 PD 发病机制的调控过程中起着重要的作用^[30]。

另一种重要的神经系统疾病——阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是由 β -淀粉样蛋白过度积累造成的。这一过程也与 miRNA 有关, 包括 let-7i、miR-451、miR-338、miR-210、miR-181c、miR-146b、miR-15 和 miR-9 等^[49-52]。泛素蛋白连接酶 A (*ubiquitin protein ligase A*, *UBE2A*)是 miR-7 的一个靶基因, 在 β -淀粉样蛋白的清除过程中起着非常重要的作用。Lukiw 等^[53]发现, 与正常组织相比, AD 患者海马区 *ciRS-7* 显著下调, 从而导致 miR-7 水平增加, 过量的 miR-7 可以促进 β -淀粉样蛋白的积累, 也可促进 tau 蛋白的高磷酸化, 最后导致病变。近期一项研究显示, miR-138 可通过 *RARA* (retinoic acid receptor alpha)/GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)通路促进 tau 的磷酸化, 而且 AD 小鼠模型中 miR-138 表达上调^[54]。因此, circRNA *Sry* 和 miR-138 在 AD 中的具体调控机制也值得我们更深入的研究。

MBL 可以促进 circMBL 的生物合成, 而 circ-MBL 又可以作为 MBL 蛋白的海绵, 与 MBL 相互

结合^[33]。人类 MBL 的直系同源物 MBNL 蛋白在强直性肌营养不良(myotonic dystrophy, DM)中起着重要作用。当 DM 相关致病基因表达时, CUG 和 CCUG 重复序列会缠绕形成颈环结构, MBNL 蛋白可与这些颈环结合从而导致转录本的错误剪接, 而这些错误剪接的转录本翻译的蛋白质产物与 DM 临床病理相关^[55, 56]。因此, circMBL 很可能通过 MBL/MBNL 蛋白在 DM 的致病机理中起着关键的作用。

另外, 研究发现在重性抑郁障碍(major depressive disorder, MDD)患者的外周血单个核细胞中某些 circRNA 的表达异常^[57]。与健康对照相比, MDD 患者外周血单个核细胞中的 hsa_circRNA_103636 表达下调。但在抗抑郁治疗 8 周后, MDD 患者的 hsa_circRNA_103636 表达有显著增加。上述结果提示, hsa_circRNA_103636 很可能是 MDD 诊断和治疗的新靶点^[57]。

circRNA 不仅仅直接参与神经系统的调控, 还可以通过其他途径影响神经系统的功能^[19]。很多研究已证实, circRNA 参与多种肿瘤的发生发展, 包括消化系统肿瘤^[32, 58, 59]、乳腺癌^[60]、慢性淋巴细胞白血病^[61]等等。ciRS-7 不仅在大脑中表达, 在神经母细胞瘤和星形细胞瘤中也表达^[62]。在小鼠神经母细胞瘤模型以及恶性胶质瘤模型中, miR-7 能显著抑制肿瘤的血管生成和肿瘤增殖^[63, 64]。因此, ciRS-7 很可能参与神经系统恶性肿瘤的发病机制。Fu 等^[65]研究发现, miR-138 能通过靶基因 *RUNX3* (*Runt-related transcription factor 3*)调节 T 辅助淋巴细胞亚群的平衡。而 circRNA Sry 可抑

制 miR-138 的活性。此外, Has-circRNA 2149 只有在 CD19 阳性的淋巴细胞中表达, 在 CD34 阳性的淋巴细胞以及中性粒细胞中均不表达^[66]。综合上述分析可知, circRNA 很可能与神经系统的炎症性疾病相关。

实际上, circRNA 在神经系统疾病的精确角色还有待更加深入的探索和研究。circRNA 和神经系统疾病的关系将为疾病的机制研究和诊断提供新的思路和角度。

4 总结与展望

非编码 RNA (包括 miRNA、lncRNA 以及 circRNA 等)的研究发展迅速, 已经成为探索人类疾病机制以及诊断的热点^[67]。非编码 RNA 就像是分子促发器, 可以促发多种相关因素的发生。而 circRNA 独一无二的环状分子结构使其成为非常独特的分子标记物, 很容易与其他细胞内的分子相区分。circRNA 为疾病的靶向治疗提供了全新的视角。circRNA 作为疾病诊断工具, 具有以下几个特点^[15, 43, 45, 67-71]: 1) 序列的保守性; 2) 结构的稳定性; 3) 表达的普遍性; 4) 组织的特异性。作为比较前沿的研究领域, circRNA 的结构和功能仍然有很多有趣的问题值得研究, 比如: 影响 circRNA 表达的上游调控机制; 在不同生理和病理条件下 circRNA 的功能; 在神经组织中 circRNA 表达的动态性和亚细胞定位的生物学功能等等。

circRNA 独特的结构和功能使其成为探究疾病机制、诊断和治疗的潜在靶点。尤其是针对多种特定 circRNA 组成的特异指纹图谱的研究, 可以

表 1 神经系统疾病相关的 circRNA
Table 1 Summary of circRNAs in human neurological diseases

Diseases	circRNA	Target	Mechanisms
PD	ciRS-7	miR-7	miR-7 promotes the degradation of α -synuclein mRNA levels and reduces α -synuclein expression ^[48] .
AD	ciRS-7	miR-7	ciRS-7 is significantly reduced in AD patients and miR-7 may down-regulate AD relevant targets ^[53] .
	circRNA Sry	miR-138	miR-138 promotes tau phosphorylation by targeting the RARA/GSK-3 β pathway ^[54] .
DM	circMBL	MBNL	MBNL proteins lead to sequestration of the stem-loop structures in nuclear foci and results in mis-splicing of various transcripts ^[55, 56] .
MDD	hsa_circRNA_103636	Unknown	The expression of hsa_circRNA_103636 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of MDD patients is significantly decreased ^[57] .
Nervous malignant tumour	ciRS-7	miR-7	miR-7 can strongly reduce angiogenesis and tumour proliferation in murine glioblastoma xenografts or neuroblastoma tumour model ^[63, 64] .
Nervous inflammatory diseases	circRNA Sry	miR-138	miR-138 can balance the ratio of Th1/Th2 via targeting RTF3 ^[65] .
	hsa-circRNA 2149	Unknown	hsa-circRNA 2149 has been detected in CD19+ leukocytes but not CD34+ leukocytes, neutrophils or HEK293 cells ^[66] .

为早期诊断提供更为完善的标记。circRNA的miRNA“分子海绵”功能也有可能作为基因编辑和基因调控的新技术。关于circRNA在神经系统疾病的机制研究正飞速发展。随着生物信息学以及结构生物学的不断发展,揭示circRNA在神经系统疾病的生理学和病理学功能,将为我们建立基于circRNA的临床治疗和诊断策略提供有力的支持和帮助。

参考文献(References):

- [1] Sanger H L, Klotz G, Riesner D, *et al.* Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1976, 73(11): 3852–3856.
- [2] 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(5720): 339–340.
- [3] Floris G, Zhang L, Follesa P, *et al.* Regulatory role of circular RNAs and neurological disorders[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(7): 5156–5165.
- [4] Salzman J, Gawad C, Wang P L, *et al.* Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733.
- [5] Jeck W R, Sharpless N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(5): 453–461.
- [6] Hang Q, Isaji T, Hou S, *et al.* A key regulator of cell adhesion: identification and characterization of important *N*-glycosylation sites on integrin $\alpha 5$ for cell migration[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2017, 37(9): e00558–16.
- [7] Capel B, Swain A, Nicolis S, *et al.* Circular transcripts of the testis—determining gene *Sry* in adult mouse testis[J]. *Cell*, 1993, 73(5): 1019–1030.
- [8] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384–388.
- [9] Barrett S P, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions[J]. *Development*, 2016, 143(11): 1838–1847.
- [10] Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function[J]. *RNA*, 2014, 20(12): 1829–1842.
- [11] Li T R, Jia Y J, Wang Q, *et al.* Circular RNA: a new star in neurological diseases[J]. *The International Journal of Neuroscience*, 2017, 127(8): 726–734.
- [12] Kumar L, Shamsuzzama, Haque R, *et al.* Circular RNAs: the emerging class of non-coding RNAs and their potential role in human neurodegenerative diseases[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(9): 7224–7234.
- [13] Zhang X O, Wang H B, Zhang Y, *et al.* Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 134–147.
- [14] Ivanov A, Memczak S, Wyler E, *et al.* Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(2): 170–177.
- [15] Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141–157.
- [16] Aktas T, Avsar Ilik I, Maticzka D, *et al.* DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome[J]. *Nature*, 2017, 544(7648): 115–119.
- [17] Bonizzato A, Gaffo E, Te Kronnie G, *et al.* CircRNAs in hematopoiesis and hematological malignancies[J]. *Blood Cancer Journal*, 2016, 6(10): e483.
- [18] Starke S, Jost I, Rossbach O, *et al.* Exon circularization requires canonical splice signals[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(1): 103–111.
- [19] Van Rossum D, Verheijen B M, Pasterkamp R J. Circular RNAs: novel regulators of neuronal development[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2016, 9: 74.
- [20] Suzuki H, Zuo Y, Wang J, *et al.* Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(8): e63.
- [21] Hansen T B, Wiklund E D, Bramsen J B, *et al.* miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(21): 4414–4422.
- [22] Schindler C W, Krolewski J J, Rush M G. Selective trapping of circular double-stranded DNA molecules in solidifying agarose[J]. *Plasmid*, 1982, 7(3): 263–270.
- [23] Yang L, Duff M O, Graveley B R, *et al.* Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(2): R16.
- [24] Panda A C, Gorospe M. Detection and analysis of circular RNAs by RT-PCR[J]. *Bio-protocol*, 2018, 8(6), DOI: 10.21769/BioProtoc.2775.
- [25] Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs[J]. *RNA*, 2014, 20(11): 1666–1670.
- [26] Ghosal S, Das S, Sen R, *et al.* Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits[J]. *Frontiers in Genetics*, 2013, 4: 283.
- [27] Dudekula D B, Panda A C, Grammatikakis I, *et al.* CircInteractome: a web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs[J]. *RNA Biology*, 2016, 13(1): 34–42.
- [28] Yang Y, Fan X, Mao M, *et al.* Extensive translation of circular RNAs driven by N^6 -methyladenosine[J]. *Cell Research*, 2017, 27: 626–641.
- [29] Palla M, Cristani C, Giovannetti M, *et al.* Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts of PDO Tuscan bread sourdough by culture dependent and independent methods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 250: 19–26.
- [30] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333–338.
- [31] Guo J U, Agarwal V, Guo H, *et al.* Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs[J]. *Genome Biology*, 2014, 15: 409.
- [32] Li F, Zhang L, Li W, *et al.* Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 6001–6013.
- [33] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti N R, *et al.* circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(1): 55–66.
- [34] Zhang Y, Zhang X O, Chen T, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2013, 51(6): 792–806.
- [35] Li Z, Huang C, Bao C, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(3): 256–264.

- [36] Ng W L, Marinov G K, Liao E S, *et al.* Inducible RasGEF1B circular RNA is a positive regulator of ICAM-1 in the TLR4/LPS pathway[J]. *RNA Biology*, 2016, 13(9): 861–871.
- [37] Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs[J]. *RNA*, 2015, 21(2): 172–179.
- [38] Granados-Riveron J T, Aquino-Jarquín G. The complexity of the translation ability of circRNAs[J]. *Biochimica et Biophysica Acta—Gene Regulatory Mechanisms*, 2016, 1859(10): 1245–1251.
- [39] Begum S, Yiu A, Stebbing J, *et al.* Novel tumour suppressive protein encoded by circular RNA, circ-SHPRH, in glioblastomas[J]. *Oncogene*, 2018, 37(30): 4055–4057.
- [40] Chao C W, Chan D C, Kuo A, *et al.* The mouse *formin* (*Fmn*) gene: abundant circular RNA transcripts and gene-targeted deletion analysis[J]. *Molecular Medicine*, 1998, 4(9): 614–628.
- [41] Pamudurti N R, Bartok O, Jens M, *et al.* Translation of circRNAs[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1): 9–21.e7.
- [42] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, *et al.* Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1): 22–37.e9.
- [43] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, *et al.* Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58(5): 870–885.
- [44] Westholm J O, Miura P, Olson S, *et al.* Genome-wide analysis of *Drosophila* circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation[J]. *Cell Reports*, 2014, 9(5): 1966–1980.
- [45] You X, Vlatkovic I, Babic A, *et al.* Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nature Neuroscience*, 2015, 18(4): 603–610.
- [46] Constantin L. Circular RNAs and neuronal development[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1087: 205–213.
- [47] Lim K L, Dawson V L, Dawson T M. The cast of molecular characters in Parkinson's disease: felons, conspirators, and suspects[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, 991: 80–92.
- [48] Junn E, Lee K W, Jeong B S, *et al.* Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2009, 106(31): 13052–13057.
- [49] Hebert S S, Horre K, Nicolai L, *et al.* Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2008, 105(17): 6415–6420.
- [50] Maes O C, An J, Sarojini H, *et al.* Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2008, 129(9): 534–541.
- [51] Cogswell J P, Ward J, Taylor I A, *et al.* Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2008, 14(1): 27–41.
- [52] Maes O C, Chertkow H M, Wang E, *et al.* MicroRNA: implications for Alzheimer disease and other human CNS disorders[J]. *Current Genomics*, 2009, 10(3): 154–168.
- [53] Lukiw W J. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2013, 4: 307.
- [54] Wang X, Tan L, Lu Y, *et al.* MicroRNA-138 promotes tau phosphorylation by targeting retinoic acid receptor alpha[J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(6): 726–729.
- [55] Mooers B H, Logue J S, Berglund J A. The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102(46): 16626–16631.
- [56] Miller J W, Urbinati C R, Teng-Umuay P, *et al.* Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)*n* expansions associated with myotonic dystrophy[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(17): 4439–4448.
- [57] Cui X, Niu W, Kong L, *et al.* hsa_circRNA_103636: potential novel diagnostic and therapeutic biomarker in major depressive disorder[J]. *Biomarkers in Medicine*, 2016, 10(9): 943–952.
- [58] Bachmayr-Heyda A, Reiner A T, Auer K, *et al.* Correlation of circular RNA abundance with proliferation—exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8057.
- [59] Hsiao K Y, Lin Y C, Gupta S K, *et al.* Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(9): 2339–2350.
- [60] Huynh F C, Jones F E. MicroRNA-7 inhibits multiple oncogenic pathways to suppress HER2Delta16 mediated breast tumorigenesis and reverse trastuzumab resistance[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114419.
- [61] Berg V, Rusch M, Vartak N, *et al.* miRs-138 and -424 control palmitoylation-dependent CD95-mediated cell death by targeting acyl protein thioesterases 1 and 2 in CLL[J]. *Blood*, 2015, 125(19): 2948–2957.
- [62] Hansen T B, Kjems J, Damgaard C K. Circular RNA and miR-7 in cancer[J]. *Cancer Research*, 2013, 73(18): 5609–5612.
- [63] Liu Z, Jiang Z, Huang J, *et al.* miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways[J]. *International Journal of Oncology*, 2014, 44(5): 1571–1580.
- [64] Babae N, Bourajjaj M, Liu Y, *et al.* Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6687–6700.
- [65] Fu D, Yu W, Li M, *et al.* MicroRNA-138 regulates the balance of Th1/Th2 via targeting RUNX3 in psoriasis[J]. *Immunology Letters*, 2015, 166(1): 55–62.
- [66] Shao Y, Chen Y. Roles of circular RNAs in neurologic disease[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2016, 9: 25.
- [67] Maurer R A, Erwin C R, Donelson J E. Analysis of 5' flanking sequences and intron-exon boundaries of the rat prolactin gene[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(20): 10524–10528.
- [68] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(6): 9331–9342.
- [69] Goodrow T L, Storer R D, Leander K R, *et al.* Murine p53 intron sequences 5–8 and their use in polymerase chain reaction/direct sequencing analysis of p53 mutations in CD-1 mouse liver and lung tumors[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 1992, 5(1): 9–15.
- [70] Bougueleret L, Tekaia F, Sauvaget I, *et al.* Objective comparison of exon and intron sequences by means of 2-dimensional data analysis methods[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(5): 1729–1738.
- [71] Konopka A K, Smythers G W, Owens J, *et al.* Distance analysis helps to establish characteristic motifs in intron sequences[J]. *Gene Analysis Techniques*, 1987, 4(4): 63–74.