

环状 RNA 在乳腺癌中的研究进展

邵长春¹, 郝森森¹, 吴高淇¹, 张国君^{1,2}, Min Chen^{1,2}

(1. 汕头大学医学院长江学者实验室, 广东 汕头 515041;

2. 厦门大学附属翔安医院, 福建 厦门 361000)

摘要: 环状 RNA(circularRNA, circRNA)是一类不同于线性 RNA 的新型 RNA,其 5'与 3'端首尾相连形成共价闭合的单链环状分子。通常由基因外显子、内含子、或者两者共同组成,并且广泛存在于多种生物体中,进化上具有保守性、相对稳定、不易被核酸外切酶降解,具有组织特异性以及发展阶段特异性,在正常生理活动以及各种疾病进程中具有重要的作用,是一个潜在的疾病诊断、预后标志物,以及治疗靶点。全文主要论述环状 RNA 特性、作用机制、研究方法、在乳腺癌中的研究进展、潜在临床价值以及问题展望等。

关键词: 环状 RNA;乳腺癌;标志物;研究进展

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)11-1112-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.11.B016

Research Progress and Prospect of Circular RNA in Breast Cancer

SHAO Chang-chun¹, HAO Sen-sen¹, WU Gao-qi¹, ZHANG Guo-jun^{1,2}, Min Chen^{1,2}

(1. Changjiang Scholar's Laboratory, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China;

2. Xiang'an Hospital Of Xiamen University, Xiamen 361111, China.)

Abstract: Circular RNA (circRNA) is a novel type of RNA which is different from linear RNA. CircRNAs are the single-stranded circular molecules with a covalently closed loop structure that lack 5'-3' polarity or a polyadenylated tail. They are composed of gene exons, introns, or both, and are widely expressed in a variety of organisms. They are well conserved in sequence, relatively stable, and not easily degraded by exonucleolytic enzymes. More importantly, circRNAs have tissue specificity and developmental stage specificity, and play an important role in normal physiological activities and various disease process, indicating that circRNA are potential diagnosis and prognostic markers, and therapeutic targets for various diseases. This article mainly discusses the characteristics of circRNA, regulatory mechanism, research method, research progress, potential clinical value, and prospect of circRNA in breast cancer.

Subject words: circularRNA; breast cancer; biomarker; progress

随着高通量测序技术、生物信息学的发展以及大数据的数据库的建立,越来越多的证据表明一种新的 RNA-环状 RNA(circular RNA, circRNA)广泛存在于哺乳动物体内,并且在生物体中具有重要的功能^[1,2]。研究发现 circRNA 与糖尿病^[3]、心肌梗死^[4]、多发性硬化症^[5]、缺血性发作^[6]、神经系统变性疾病^[7]、肿瘤^[8-12]等多种疾病密切相关。目前 circRNA 的研究

主要以肿瘤中研究较为深入,涉及运动、消化、呼吸、泌尿、生殖、神经系统等器官的肿瘤。circRNA 可以通过 ceRNA 机制^[13]、调控可变剪切和转录^[14]、蛋白翻译^[15]等机制影响肿瘤进程,调控细胞增殖、侵袭、凋亡、耐药、肿瘤干性等,有望成为潜在的肿瘤诊断、预后标志物和治疗靶点。

1 环状 RNA 基本特征

目前研究发现 circRNA 在生物体中的重要功能与其基本生物学特征密切相关。①在生物体中广泛存在和表达:circRNA 在原生生物、真菌、果蝇、植物、人类等多种生物组织细胞中表达;circRNA 也存在于

基金项目: 广东省公益研究与能力建设专项基金(2014A020210026); 广东省自然科学基金研究团队项目(2016A030312008); 国家自然科学基金国际合作(81320108015)

通讯作者: Min Chen, 研究员, 博士; 汕头大学医学院长江学者实验室, 广东省汕头市金平区新陵路 22 号汕头大学医学院 (515041); 厦门大学附属翔安医院肿瘤研究中心; 福建省厦门市翔安区翔安东路 2000 号 (361000); E-mail: mchen@xah.xmu.edu.cn

收稿日期: 2018-06-07; **修回日期:** 2018-07-16

人体多种体液中,如血浆、唾液、以及外泌体等。②具有保守性:circRNA 表达谱在哺乳动物间具有保守性^[16],有些甚至在进化上相对较远的果蝇间也具有序列保守性。③具有稳定性:由于 circRNA 为 5'与 3'端首尾相连共价闭合的环状分子,可以抵抗核酸外切酶的攻击,因而比线性 RNA 转录本更加稳定^[17]。④不同细胞、组织、不同发育阶段具有特异 circRNA 表达谱。

2 circRNA 形成机制

circRNA 主要分为三种类型:外显子来源(ecircRNAs)^[18]、内含子来源(ciRNAs)^[19]、由外显子和内含子共同组成 circRNA (EIciRNAs)^[20],不同类型 circRNA 其形成机制不同,如图 1A~D 所示:①套索驱动环化;②内含子配对环化;③RNA 结合蛋白(RBPs)促进 circRNA 形成:在内含子配对环化中,一些RBPs,如 Quaking(QKI)、MBL、ADAR1 等可以结合到内含子序列的特异位点上,代替内含子中反向重复序列或者互补序列的作用,促进供体和受体序列共价结合形成环化序列。④其他调控机制:RNA 解旋酶 DXH9^[21]、剪切体组分及转录终止相关的基因^[22]、病毒感染相关因子 NF90/NF110^[23]、RNA 结合蛋白 FUS^[24]、RNA 拼接因子 HNRNPL^[25]等均与 circRNA 形成密切相关。Noto 等^[26]在古生菌和真核生物中研究发现 tRNA 在加工成熟过程中,内含子部分剪接去除,外显子相互连接形成成熟 tRNA,其中内含子去除过程中可以首尾相连,形成 tRNA 来源的 circRNA-tricRNA。

3 circRNA 调控机制

CircRNA 发挥调控作用主要通过以下几种方式进行,如图 1E~J:①ceRNA 机制:通过 ceRNA 机制吸附 miRNA,竞争性调节下游靶基因表达,进而发挥生物学功能。最经典的是神经系统中 CDR1as 即 ciRS-7,

具有 74 个 miR-7 结合位点,可以通过 ceRNA 机制吸附 miR-7,并与 miR-7 竞争结合其他 RNA,从而调控靶基因表达以及神经系统发育^[13]。②与 RNA 结合蛋白相互作用。例如 circ-Foxo3 可以与 CDK2、p21 形成复合物,抑制 CDK2 功能,阻断细胞周期进程^[27]。circ-Amotl 可以与 c-Myc、STAT3、PDK1、AKT1 结合,促进它们进入细胞核,进而影响靶基因表达^[28-30]。③调节转录和可变剪切。EIciRNAs 定位在细胞核中,参与基因的转录水平调控^[19]。EIciRNAs 如 circAnkrd52、circ-EIF3J 和 circ-PAIP2,可以与 U1 snRNP 或者 RNA 聚合酶 II 结合,调控亲本基因转录^[19,20]。④翻译蛋白。研究发现 circRNA:circ-ZNF609 包含了一个完整的开放阅读框架,并且可以与多聚核糖体结合,以剪接依赖和帽独立的方式翻译蛋白,进而特异性调节成肌细胞增殖^[31]。中山大学团队证实 circ-FBXW7 可以翻译 21kDa 的蛋白-FBXW7-185aa,该蛋白可以竞争性结合 USP28,从而促进来源基因编码的 FBXW7 对 c-Myc 蛋白的泛素化降解,从而抑制脑胶质瘤细胞的增殖和细胞周期进程^[32]。

4 circRNA 研究方法

4.1 circRNA 研究数据库

随着 circRNA 研究的不断深入,越来越多的

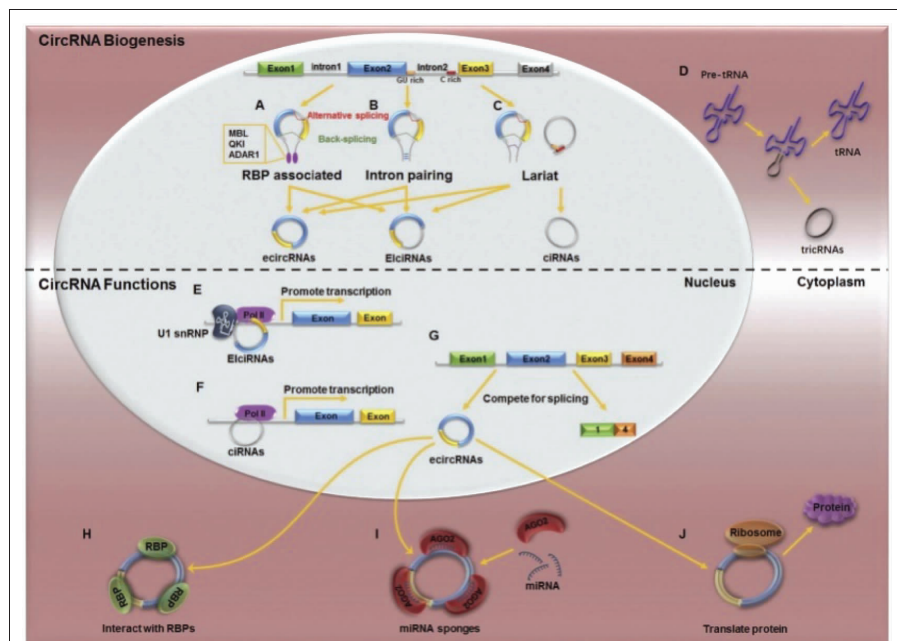


Figure 1 circRNA biogenesis and function^[22]

circRNA 研究数据库正在逐渐建立和完善,如 Table 1 所示。

4.2 circRNA 研究技术最新进展

研究发现了一种基于 CRISPR 同源蛋白 Csy4 的促进 RNA 环化的技术。该蛋白将 RNA 分子切割后,可使切割后的 5'端 RNA 产物更加稳定。基于这一特性,设计了一种 circRNA 表达体系,主要是在内含子中插入 Csy4 的识别序列,共表达该序列后,Csy4 切割该序列下游竞争性拼接信号,并稳定上游切割产物,该产物在剩下的拼接信号作用下形成环状 RNA。并通过 Cys4 依赖的荧光报告基因系统、Northern blotting、qRT-PCR 方法证实了 circRNA 的形成^[33]。

circRNA 制备技术提升:在进行 circRNA 测序前,需要去除线性 RNA,一般方法是使用 Rnase R 消化去除线性 RNA,在此基础上增加了去除 Poly(A)的步骤,结果证明可大大提高去除线性 RNA 的效率,并将该技术命名为 RPAD^[34]。

circRNA 可诱导表达体系:宾夕法尼亚大学佩雷尔曼医学院 Deirdre C. Tatomer 等团队发现了一种可诱导表达的 circRNA 体系。选用含有金属硫蛋白启动子以及具有反向互补内含子序列的质粒载体,将 circRNA 线性序列构建到内含子序列中间,借

助两端内含子序列促进 circRNA 环化,同时在细胞培养液中加入硫酸铜可以诱导质粒表达,可通过该方法进行 circRNA 过表达研究以及人工设计合成 circRNA 研究^[35]。

circRNA 绝对定量检测方法:微滴式数字 PCR (RT-droplet digital PCR, RT-ddPCR) 是最近兴起的可绝对定量的 PCR 技术,该技术具有高灵敏度、高特异性检测复杂背景下的靶标序列,所需样本量较少。宁波大学医学院郭俊明教授曾利用该技术检测胃癌患者血液中 circRNA 表达情况^[36],发现 hsa_circ_0001017 和 hsa_circ_0061276 在胃癌患者外周血中表达降低,并且表达量与胃癌远处转移密切相关,并且其低表达与不良预后密切相关;两种 circRNAs 联合诊断的曲线下面积可达 0.966,表明其可能是胃癌新的潜在标志物。研究结果表明微滴式数字 PCR 是一种新型的高灵敏度、高特异性、绝对定量的 circRNA 研究方法。

5 circRNA 在乳腺癌中的研究进展

5.1 circRNA 在乳腺癌中的功能研究

加拿大多伦多大学杨伯华等在《Cell Death & Differentiation》上发表一篇文章,结果表明 circ-Cc-

Table 1 The databases for circRNA

Name	Function	Website
CircBase	Including the source, location, sequence and samples of circRNA	http://circrna.org/
CircNet	Analysing circRNA sequence, expression in tissues and circRNA-miRNA-mRNA network	http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/
CircInteractome	Exploring sequence, the interacting miRNAs, RNA-binding proteins, primer and siRNA design of circRNA and so on	http://circinteractome.nia.nih.gov/
Deepbase v2.0	Analysing ceRNA regulatory network based on high throughput sequencing, including circRNA, lncRNA, and small RNAs	http://rna.sysu.edu.cn/deepBase/
circ2Traits	Providing circRNAs associated with disease or traits	http://gyanxet-beta.com/circdb/
starBase v2.0	Exploring the interactions between circRNAs and miRNAs	http://starbase.sysu.edu.cn/
CIRCpedia	Annotating alternative back-splicing and alternative splicing in circRNAs	http://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia
circRNADb	Analysing the function of circRNAs in encoding proteins	http://reprod.njmu.edu.cn/circrnadb
TSCD	Annotating tissue-specific circRNAs in human and mouse	http://gb.whu.edu.cn/TSCD
ORF Finder, IRESite	Prediction the possibility of circRNAs in encoding proteins by analysing open reading frame and internal ribosome entry sites	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/ , http://iresite.org/IRESite_web.php
ExoRBase	Analysing the expression of circRNA, lncRNA and mRNA based on RNA-seq data from human blood exosomes	http://www.exorbase.org/
CSCD	A cancer-specific circRNAs, prediction miRNA response element sites and RBPs sites, and the potential translation of circRNAs and the splicing events	http://gb.whu.edu.cn/CSCD
circLncRNAet	Analysing circRNA, lncRNA chip and RNA-seq data	http://app.cgu.edu.tw/circlnc/

nb1 在乳腺癌中表达降低,并且 circ-Ccnb1 可以通过 H2AX 与 Bclaf1 相互作用,抑制 p53 突变介导的促癌作用。在裸鼠模型中发现过表达 circ-Ccnb1 可以显著性抑制肿瘤细胞生长^[37]。Zhou 等^[38]在乳腺癌组织中通过 circRNA 测序,发现了 152 个差异表达 circRNA,其中 has_circ_0011946 在乳腺癌组织中表达上调。通过在乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞中敲减 has_circ_0011946 表达,发现 RFC3 表达下降,并且增殖能力、侵袭、迁移能力下降。Honglei Wang 等通过 circRNA 微阵列芯片分析发现 circRNA_000911 在乳腺癌组织中表达下调。在乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中进行 circRNA 过表达实验,发现高表达 circRNA_000911 可以抑制乳腺癌细胞增殖、克隆形成、侵袭、迁移,促进凋亡。在机制方面,通过报告基因实验和 RIP 证实 circRNA_000911 可以通过 ceRNA 机制吸附 miR449a,进而调控乳腺癌细胞增殖、侵袭能力。通过蛋白印迹、qRT-PCR 实验以及报告基因实验证实 circRNA_000911 可以通过 miR449a 进而调控 Notch1 表达,以及 NF- κ B 信号通路^[39]。Liang 等^[40]发现 circ-ABCB10 在乳腺癌组织中上升 5~10 倍;后续功能实验发现 circ-ABCB10 可以通过调控 miR-1271 进而调控乳腺癌细胞增殖和凋亡。另外一篇发表在《DNA and Cell Biology》上的文章也有类似的结论,发现 has_circ_0001982 在乳腺癌组织和细胞系中表达显著性升高,功能实验发现干扰 has_circ_0001982 可以通过靶向 miR-143,抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭,诱导凋亡^[41]。Yan 等^[42]在《Oncotarget》上发表一篇文章介绍 circRNA 在乳腺癌干细胞中的重要作用。首先通过流式细胞分析技术筛选乳腺癌干性细胞(CD44⁺CD24⁻)和非干性细胞(非 CD44⁺CD24⁻),然后通过 RNA 测序分析上述两类细胞中 circRNA 差异表达谱,结果发现 27 个差异表达的 circRNA,其中包括 19 个下调,8 个上调。研究挑选 circVRK1 进行后续研究,结果发现 circVRK1 可以抑制乳腺癌干性细胞的扩增和自我更新能力。另外一篇文献报道缺氧在调控乳腺癌细胞增殖过程中具有重要作用。在缺氧条件下的乳腺癌细胞中,该作者发现低氧诱导因子(HLF1alpha)可以调控 circDENND4C 表达,干扰 circDENND4C 可以抑制乳腺癌细胞增殖。在乳腺癌组织标本中,肿瘤体积越大,circDENND4C 表达水平越高,提示 circ-

DENND4C 与 HLF1alpha 密切相关,可以在缺氧条件下促进乳腺癌细胞增殖^[43]。上述研究可以看出, circRNA 在乳腺癌细胞的增殖、侵袭、迁移、凋亡、干性细胞特性密切相关。

5.2 CircRNA 在乳腺癌诊断和预后方面的研究

circGFRA1 表达水平与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移、以及组织学分级相关,并且组织中 circGFRA1 表达水平越高,患者 OS、DFS 更短,预后越差。功能实验证明 circGFRA1 可以促进三阴性乳腺癌细胞增殖、抑制凋亡,并且可以通过 ceRNA 机制吸附 miR-34a,调控 GFRA1 表达^[44]。因而 circGFRA1 可能是三阴性乳腺癌潜在的诊断标志物和治疗靶点。2017 年《Clinica Chimica Acta》上刊登一篇文章,通过 circRNA 微阵列芯片,筛选乳腺癌患者以及健康志愿者外周血浆中游离的差异表达 circRNA,发现 has-circ-0001785 在乳腺癌患者外周血中显著性下调,其 ROC 曲线下面积达 0.771。另外,发现 has-circ-0001785 表达与组织学分级($P=0.013$)、TNM 分期($P=0.008$)、远处转移($P=0.016$)密切相关;与术前表达水平相比,术后乳腺癌患者外周血中 has-circ-0001785 表达水平明显降低^[45]。LU 等^[46]通过 ROC 曲线评估 circRNA 在乳腺癌诊断方面的价值,结果显示 has_circ_100219 诊断价值最高,曲线下面积可以达到 0.78 (95% CI:0.69~0.88);当把 has_circ_006054、has_circ_100219、has_circ_406697 联合,ROC 曲线下面积达 0.82%(95%CI:0.73~0.90),提示 circRNA 可以作为乳腺癌潜在诊断指标。通过上述研究表明,circRNA 表达与乳腺癌临床病理特征密切相关,并且在乳腺癌诊断和预后方面具有重要的价值。

5.3 CircRNA 表达在乳腺癌化疗耐药中的作用

circRNA 微阵列芯片在乳腺癌 MCF-7 阿霉素耐药株以及敏感株中筛选 circRNA 差异表达谱,结果发现 18 个差异表达的 circRNA (其中包括 10 个上调、8 个下调),然后通过生物信息学预测以及 qRT-PCR 验证,挑选 circ_0006528 进行后续实验。结果发现,与对照组相比,circ_0006528 表达量在阿霉素耐药细胞株以及肿瘤组织中明显增加;在功能实验中,干扰 circ_0006528 表达,可以增加阿霉素耐药细胞株对阿霉素的敏感性。在乳腺癌组织中, circ_0006528 与 miR-7-5p 表达呈负相关;干扰 circ_0006528 表达,可以使 miR-7-5p 表达增加、Raf1

表达降低;过表达 miR-7-5p,可以使 Raf1 表达降低。上述实验证实 circ_0006528/miR-7-5p/Raf1 可能在乳腺癌阿霉素耐药株中具有重要的调控作用^[47]。

5.4 circRNA 表达与乳腺癌分子分型的关系

研究发现与正常乳腺组织或者细胞系相比,乳腺癌组织和细胞系中筛选出的 circRNA 数目均较少;不同分子分型的乳腺癌以及肿瘤相关的信号通路具有特定的 circRNA 表达谱,其中筛选出不同分子分型乳腺癌中共同的 circRNA 42 个,以及三阴性乳腺癌特异的 circRNA 142 个,ER+乳腺癌特异的有 164 个,Her-2+乳腺癌特异的有 245 个;在 ER+乳腺癌中,circRNA 表达可能与乳腺癌增殖呈负相关^[48]。

6 circRNA 在外泌体中的研究

研究提示 circRNA 在外周血外泌体中存在,可能具有重要作用。circRNA 在结肠癌患者血液外泌体中稳定并大量存在,可以作为结肠癌患者潜在的诊断标志物。Hanxi Xu 等发现 circRNA 在子宫内膜癌患者外周血外泌体中存在,他们提取病人以及健康志愿者外周血外泌体中 RNA,通过 RNA-seq 发现 209 个上调 circRNA,以及 66 个下调 circRNA,并通过 qRT-PCR 验证了其中两个上调的 circRNA^[49]。总之,外周血外泌体中 circRNA 表达可能与不同疾病状态密切相关,可能作为疾病潜在的诊断标志物。

7 问题与展望

CircRNA 在乳腺癌中的研究也不断深入,目前已经证实其与乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移、干细胞自我更新和扩增、化疗耐药有关,在未来可能成为乳腺癌潜在的诊断、预后标志物以及治疗靶点;但是仍然有很多问题需要进一步的深入研究:circRNA 在乳腺癌中的形成机制;circRNA 形成受到什么因素调控;什么情况下表达增加或降低;处于什么样的动态平衡之中;circRNA 与所在基因之间是否存在相互调控;除了 ceRNA 机制,乳腺癌中 circRNA 是否存在其他调控机制;是否可以翻译蛋白、与蛋白形成复合物;circRNA 为什么会在外泌体中存在,外泌体中 circRNA 表达状态是否可以代替疾病状态,是否有其他生物学功能;外泌体中 circRNA 是否可以作

为乳腺癌诊断、预后、治疗标志物;是否可以利用 circRNA 稳定存在、吸附 miRNA 等特性,人工合成 circRNA,进行乳腺癌治疗。总而言之,环状 RNA 是一类新兴的有望成为乳腺癌潜在的预测、诊断和治疗靶点的 RNA 分子,具有极高的研究潜能和价值。

参考文献:

- [1] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-148.
- [2] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(5): 870-885.
- [3] Shan K, Liu C, Liu BH, et al. Circular noncoding RNA HIPK3 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus[J]. *Circulation*, 2017, 136(17): 1629-1642.
- [4] Wang K, Gan TY, Li N, et al. Circular RNA mediates cardiomyocyte death via miRNA-dependent upregulation of MTP18 expression [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(6): 1111-1120.
- [5] Iparraguirre L, Munoz-Culla M, Prada-Luengo I, et al. Circular RNA profiling reveals that circular RNAs from ANXA2 can be used as new biomarkers for multiple sclerosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(18): 3564-3572.
- [6] Bai Y, Zhang Y, Han B, et al. Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR-143 to regulate endothelial-mesenchymal transition associated with blood-brain barrier integrity [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(1): 32-50.
- [7] Salta E, De Strooper B. Noncoding RNAs in neurodegeneration[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(10): 627-640.
- [8] Yang Z, Xie L, Han L, et al. Circular RNAs: regulators of cancer-related signaling pathways and potential diagnostic biomarkers for human cancers [J]. *Theranostics*, 2017, 7(12): 3106-3117.
- [9] Zhang Y, Liang W, Zhang P, et al. Circular RNAs: emerging cancer biomarkers and targets [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 152.
- [10] Meng S, Zhou H, Feng Z, et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 94.
- [11] Kristensen LS, Hansen TB, Venø MT, et al. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field [J]. *Oncogene*, 2018, 37(5): 555-565.
- [12] Wang F, Nazarali AJ, Ji S. Circular RNAs as potential biomarkers for cancer diagnosis and therapy [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(6): 1167-1176.
- [13] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [14] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66.
- [15] Yang Y, Gao X, Zhang M, et al. Novel role of FBXW7

- circular RNA in repressing glioma tumorigenesis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, Mar 1.
- [16] Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions [J]. *Development*, 2016, 143(11): 1838–1847.
 - [17] 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 Res*, 2006, 34(8): e63.
 - [18] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141–157.
 - [19] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792–806.
 - [20] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256–264.
 - [21] 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.
 - [22] Liang D, Tatomer DC, Luo Z, et al. The output of protein-coding genes shifts to circular RNAs when the pre-mrna processing machinery is limiting[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(5): 940–954.
 - [23] Li X, Liu CX, Xue W, et al. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection[J]. *Mol Cell*, 2017, 67(2): 214–227.
 - [24] Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, et al. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14741.
 - [25] Fei T, Chen Y, Xiao T, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(26): E5207–E5215.
 - [26] Noto JJ, Schmidt CA, Matera AG. Engineering and expressing circular RNAs via tRNA splicing [J]. *RNA Biol*, 2017, 14(8): 978–984.
 - [27] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846–2858.
 - [28] Yang ZG, Awan FM, Du WW, et al. The circular RNA interacts with STAT3, increasing its nuclear translocation and wound repair by modulating Dnmt3a and miR-17 function[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(9): 2062–2074.
 - [29] Yang Q, Du WW, Wu N, et al. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(9): 1609–1620.
 - [30] Zeng Y, Du WW, Wu Y, et al. A circular RNA binds to and activates AKT phosphorylation and nuclear localization reducing apoptosis and enhancing cardiac repair[J]. *Theranostics*, 2017, 7(16): 3842–3855.
 - [31] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37.
 - [32] Yao JT, Zhao SH, Liu QP, et al. Over-expression of CircRNA_100876 in non-small cell lung cancer and its prognostic value[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(5): 453–456.
 - [33] Borchardt EK, Meganck RM, Vincent HA, et al. Inducing circular RNA formation using the CRISPR endoribonuclease Csy4[J]. *RNA*, 2017, 23(5): 619–627.
 - [34] Panda AC, De S, Grammatikakis I, et al. High-purity circular RNA isolation method (RPAD) reveals vast collection of intronic circRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(12): e116.
 - [35] Tatomer DC, Liang D, Wilusz JE. Inducible expression of eukaryotic circular RNAs from plasmids [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1648: 143–154.
 - [36] Li T, Shao Y, Fu L, et al. Plasma circular RNA profiling of patients with gastric cancer and their droplet digital RT-PCR detection[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96(1): 85–96.
 - [37] Fang L, Du WW, Lyu J, et al. Enhanced breast cancer progression by mutant p53 is inhibited by the circular RNA circ-Ccnbl1[J]. *Cell Death Differ*, 2018, May 23.
 - [38] Zhou J, Zhang WW, Peng F, et al. Downregulation of hsa_circ_0011946 suppresses the migration and invasion of the breast cancer cell line MCF-7 by targeting RFC3[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 535–544.
 - [39] Wang H, Xiao Y, Wu L, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-000911/miR-449a pathway in breast carcinogenesis[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(3): 743–754.
 - [40] Liang HF, Zhang XZ, Liu BG, et al. Circular RNA circ-ABCB10 promotes breast cancer proliferation and progression through sponging miR-1271 [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(7): 1566–1576.
 - [41] Tang YY, Zhao P, Zou TN, et al. Circular RNA hsa_circ_0001982 promotes breast cancer cell carcinogenesis through decreasing miR-143 [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(11): 901–908.
 - [42] Yan N, Xu H, Zhang J, et al. Circular RNA profile indicates circular RNA VRK1 is negatively related with breast cancer stem cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95704–95718.
 - [43] Liang G, Liu Z, Tan L, et al. HIF1alpha-associated circ-DENND4C promotes proliferation of breast cancer cells in hypoxic environment [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 4337–4343.
 - [44] He R, Liu P, Xie X, et al. circGFRA1 and GFRA1 act as ceRNAs in triple negative breast cancer by regulating miR-34a[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 145.
 - [45] Yin WB, Yan MG, Fang X, et al. Circulating circular RNA hsa_circ_0001785 acts as a diagnostic biomarker for breast cancer detection[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, Oct 16.
 - [46] Lu L, Sun J, Shi P, et al. Identification of circular RNAs as a promising new class of diagnostic biomarkers for human breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44096–44107.
 - [47] Gao D, Zhang X, Liu B, et al. Screening circular RNA related to chemotherapeutic resistance in breast cancer[J]. *Epigenomics*, 2017, 9(9): 1175–1188.
 - [48] Nair AA, Niu N, Tang X, et al. Circular RNAs and their associations with breast cancer subtypes [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 80967–80979.
 - [49] Xu H, Gong Z, Shen Y, et al. Circular RNA expression in extracellular vesicles isolated from serum of patients with endometrial cancer[J]. *Epigenomics*, 2018, 10(2): 187–197.