

# circRNA 在急性髓系细胞白血病中的应用进展\*

吕定丰<sup>1,2a</sup>, 应琪明<sup>2a</sup>, 牧启田<sup>2b</sup> (1. 宁波大学医学院研究生部, 浙江宁波 315211; 2. 宁波市第一医院 a. 输血科, b. 干细胞移植实验室, 浙江宁波 315010)

**摘要:** 环状 RNA (circRNA) 是一类特殊的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 通过非经典反式剪切形成 3' 端和 5' 端首尾相连的环状单链 RNA。circRNA 具有多样性、普遍性、稳定性、特异性及保守性等特点。circRNA 的作用机制复杂多样, 大部分 circRNA 参与转录和转录后基因表达的调控, 在肿瘤的发生、发展、转移和治疗过程中均具有重要作用。circRNA 与急性髓系细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 的关系研究仍处起步阶段, circRNA 不仅可运用于 AML 诊断和分型, 还可用于 AML 疗效监测和风险评估。该文就 circRNA 的特征、生物功能及其对 AML 发病机制、亚型诊断和预后影响作用及检测方法等方面作一综述。

**关键词:** 环状 RNA; 急性髓系细胞白血病; 发病机制; 预后评价

**中图分类号:** R446; R557

**文献标志码:** A

急性髓系细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是以未成熟的髓系细胞异常增殖和分化受阻为特征的侵袭性血液肿瘤, 约占急性白血病的 70% ~ 80%。依据细胞形态学、免疫标记、遗传学等特点, AML 可分为不同亚型, 具有高异质性。尽管近些年 AML 治疗已经取得惊人的进展, 然而仍有相当部分患者容易复发、总体无病生存率较低<sup>[1]</sup>。AML 的发病机制尚未明确, 近年来, 随着基因分析技术及测序技术的发展, 人类相继发现了大量在 AML 发生、发展过程中具有重要作用的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 这些 ncRNA 特异性作用于转录因子或作为影响表观遗传机制的关键组分, 为诊断和预后标记 AML 提供了新的思路。环状 RNA (circRNA) 是近年来表观遗传学的研究热点, 大部分 circRNA 参与转录和转录后基因表达的调控, 现有证据证实, circRNA 在各种血液恶性肿瘤的发生、发展、转移和治疗中均具有重要作用<sup>[2]</sup>。本文重点阐述 circRNA 在 AML 发生、发展、治疗和预后中的作用, 为 AML 的诊断和治疗提供新的思路和认知。

## 1 circRNA 的形成与特点

circRNA 是一类特殊的 ncRNA, 通过非经典反式剪切形成 3' 端和 5' 端首尾相连的环状单链 RNA。circRNA 不仅是 mRNA 剪接的副产物, 而且是一种新型调控选择性剪接的产物, 在正常细胞分化和组织稳态以及疾病发展过程中均具有重要作用。

依照组成形式的不同, circRNA 可分为外显子 circRNA (ecircRNA)、内含子 circRNA、同时含有外显子和内含子 circRNA (exonintron circRNA, ElcirNA) 及基因内 circRNA (intra-

genic circRNA)。circRNA 大部分存在于细胞质中, 少部分存在于核酸中。目前已知的 circRNA 具有以下特点: (1) 相对于线性 RNA, 其表达具有多样性, 在人类基因中存在表达尤为普遍; (2) 半衰期长, 具有高度的稳定性; (3) 具有物种特异性、组织特异性、进化保守性; (4) 表达丰度与发育阶段、年龄和疾病类型密切相关。circRNA 的存在形式和特点, 使其成为疾病诊断和治疗过程中潜在的生物学标志物和治疗靶点<sup>[3]</sup>。

## 2 circRNA 的功能

**2.1 作为 microRNA (miRNA) 海绵体, 竞争抑制 miRNA 的功能** 人们最先在斑马鱼实验中发现, 小脑变性相关蛋白 1 反义转录物 (cerebellar degeneration-related protein 1 antisense, CDR1as) 具有超过 70 个 miR-7 结合位点, CDR1as 表达过高或敲除 miR-7 均会造成中脑体积缩小, 从而导致中脑发育障碍<sup>[4]</sup>。后经研究证实, circRNA 可通过阻断 miRNA 与特定基因 3' UTR 的结合, 间接调控基因表达, 发挥海绵样作用<sup>[5]</sup>。

**2.2 调节选择性剪接** circRNA 可以通过隔离翻译起始位点以调节蛋白质表达, 从而起到 mRNA “陷阱” 的作用。Ashwal-Fluss 等<sup>[6]</sup> 研究发现, 甘露糖结合凝集素 (MBL) 等剪接因子可调节 circRNA 的发生, 并调节典型剪接与选择性剪接之间平衡。

**2.3 调节 RNA 与蛋白质之间的相互作用** 在某些条件下, RNA 结合蛋白 (RBP) 可以作为 circRNA 形成的激活剂或抑制剂。QKI 蛋白和 ADAR 蛋白属于 RBP 的 STAR 家族, QKI 通过与 circRNA 侧翼的内含子结合, 促进环状结构的形成以

\* 基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY20H080001); 浙江省医药卫生科技项目 (2019KY171); 浙江省医药卫生科技项目 (2021KY283); 宁波市自然科学基金 (202003N4228)。

作者简介: 吕定丰, 1978 年生, 男, 大学本科, 主要从事临床检验诊断学研究。

通信作者: 牧启田, 主任技师, 硕士研究生导师, E-mail: muqitian@163.com。

调节 circRNA 产生, ADAR 则通过降低环状结构的形成, 减少 circRNA 的产生<sup>[7]</sup>。

**2.4 部分翻译为蛋白质发挥功能** Abe 等<sup>[8]</sup>报道大肠埃希菌无细胞系统中的 circRNA 可以通过滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)机制进行高效翻译。Legnini 等<sup>[9]</sup>报道 circ-ZNF609 可以直接编码蛋白质, 参与肌肉发育过程。随后, 又陆续有多种 circRNA 被证实具有翻译成蛋白质的功能。上述发现进一步扩展了人类对于 circRNA 功能的认知。

### 3 circRNA 在 AML 中的应用

circRNA 在造血细胞中广泛表达, 且其表达水平可随分化而改变, 并具有细胞类型特异性, 是造血细胞分化、成熟和功能的调节因子。circRNA 不仅参与 AML 等血液肿瘤的发生、发展和预后过程, 而且在血液肿瘤细胞中的表达谱相比正常细胞更为多样, 在发展不同阶段影响造血细胞的蛋白质表达水平。

#### 3.1 circRNA 参与 AML 发病机制

**3.1.1 通过 circRNA-miRNA 网络参与 AML 发病** Chen 等<sup>[10]</sup>对新发 AML 和缺铁性贫血(IDA)患者进行 circRNA 微阵列分析, 发现 AML 患者中有 282 个 circRNA 上调, 416 个 circRNA 下调。其进一步通过实时荧光定量 PCR(real time-quantitative PCR, RT-qPCR)对 87 例 AML 和 45 例 IDA 患者的队列进行分析, 证实 AML 患者中 circ-ANAPC7 显著上调。circ-ANAPC7 富含 hsa-miR-181 家族 miRNA 应答元件, 利用 KEGG 富集分析预测显示, circ-ANAPC7 可能与 hsa-miR-181 家族结合参与 AML 的发病。也有学者对 AML 和 IDA 患者的样本进行了 RNA 测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)检测, 结果发现 circ\_0009910 在 AML 患者骨髓中明显上调, 高表达的 circ\_0009910 通过“吸附”miR-20a-5p 促进了细胞增殖, 加速 AML 发生和进展<sup>[11]</sup>。

有学者<sup>[12]</sup>用生物信息学和荧光素酶分析证实, miR-203 可结合 circ\_100290 和 Rab10, 敲除 circ\_100290 后能够显著阻滞 G<sub>1</sub> 期细胞周期, 促进细胞凋亡, 并增加了细胞周期蛋白 D1、CDK4、Bcl-2 和 caspase-3 的表达水平, 提示 circ\_100290 通过“吸附”miR-203 调控 AML 细胞增殖和凋亡。

**3.1.2 f-circRNA 与 AML 肿瘤细胞基因组的不稳定性** 会引起染色体易位, 导致非同源染色体重排, 形成融合基因组。融合基因经常发生在白血病和实体肿瘤中, 是重要的肿瘤标志物。在 AML 中, t(15; 17) 易位形成 *PML-RAR $\alpha$* , 而 t(9; 11) 易位形成 *MLL/AF9*, 在 *PML/RAR $\alpha$*  和 *MLL/AF9* 融合基因形成过程中分别会形成衍生物 f-circPR 和 f-circM9, 这些 f-circRNA 与线性融合基因共同在急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)或其他亚型 AML 发生、发展过程中发挥了重要作用<sup>[13]</sup>。Greene 等<sup>[14]</sup>发现敲除 f-circM9 和 f-circPR 可逆转 t(9; 11) 和 APL 的细胞表型, 诱导细胞凋亡, 提高对砷剂或阿糖胞苷药物敏感性。以上研究结果提示, f-circRNA 参与了 AML 发生和进展。

**3.2 circRNA 表达谱与 AML 亚型密切相关** 核磷蛋白基因(*NPM1*)是 AML 最常见的突变基因之一。*NPM1* 具有原癌基因和抑癌特性, 通过编码多功能伴侣蛋白参与核糖体的生

物合成、凋亡和细胞增殖。在 AML 中, *NPM1* 基因第 12 外显子突变导致 *HOX* 基因家族异常表达, 从而促进白血病的发生<sup>[15]</sup>。Hirsch 等<sup>[16]</sup>检测了 *NPM1* 野生型和突变型 AML 患者中的 circRNA, 并对健康人对照组和 AML 患者中 circRNA 的表达进行了整体评估, 结果显示 47.9% 的高表达基因存在 circRNA 转录。其通过 RNA-Seq 分析发现, circ\_0075001 表达与 *NPM1* 表达呈正相关, 分化成熟较差的 M0 和 M1 亚型 circ\_0075001 的表达水平明显高于分化成熟较好的 M2、M4 和 M5。由此可见, circ\_0075001 表达水平与分子亚型和细胞分化成熟阶段密切相关。进一步研究显示, circ\_0075001 的高表达与 Toll 样受体(TLR)信号通路相关基因呈现负相关。TLR 不仅是先天免疫应答的重要组成部分, 也与 AML 患者白血病干细胞的存活分化中 TLR1/TLR2 通路的激活有关。而 Marcucci 等<sup>[17]</sup>研究表明, TLR 信号通路基因的表达与 AML 中 miRNA-181 家族成员的表达水平呈负相关。由于 *NPM1* 基因包含 miR-181 的结合位点, 因此可以推断, *NPM1* 可与 miR-181 家族成员相互作用, 从而影响 TLR 信号通路相关基因的表达。

为了诊断和区分 APL 患者和正常核型 AML 患者, 有学者<sup>[18]</sup>使用 Acfs 工具(accurate circRNA finder suite)分析了 AML circRNA 谱, 结果发现不同分子亚型 AML 呈现特异性 circRNA 表达谱, 表明运用 circRNA 表达谱可以鉴别 AML 特殊亚型。HIPK2 是核内转录激活因子, 在 AML 的形成和发展过程中具有重要作用, 而 circ-HIPK2 与 APL 细胞分化密切相关。Li 等<sup>[19]</sup>研究表明, 与正常对照及其他亚型 AML 相比, APL 细胞中 circ-HIPK2 的表达水平明显减低, 但经全反式维甲酸诱导分化后, circ-HIPK2 表达水平又迅速升高, 因此 circ-HIPK2 可以作为 APL 亚型标志物。

**3.3 circRNA 与 AML 的诊断** Yi 等<sup>[20]</sup>研究发现, circ-VIM 在 AML 中的表达水平较健康人对照组明显升高, 且与白细胞计数呈正相关; ROC 曲线分析显示, circ-VIM 可作为 AML 患者与健康人鉴别诊断的生物学标志物。该 circ-VIM 表达不仅可以准确区分 AML、非 APL AML 和正常核型 AML, 而且其高表达能预示患者无病生存期和总生存期较短, 也是 1 个独立的预后不良因素。

Li 等<sup>[21]</sup>对有髓外浸润(EMI)和无髓外浸润的 AML 患者以及健康志愿者同时进行了 circRNA 微阵列分析, 结果显示, 与非 EMI 患者相比, EMI-AML 患者有 253 个 circRNA 和 663 个基因明显上调, 259 个 circRNA 和 838 个基因明显下调。其进一步与健康对照者的 circRNA 表达谱比较发现, circ\_0004277 是 AML 患者最显著下调的 circRNA 之一, 可以将 AML 患者与健康个体进行区分。因此, circRNA 在 AML 中具有丰富的特异性, 也可作为 AML 潜在诊断标志物。

**3.4 circRNA 可预测 AML 的耐药和预后** Li 等<sup>[21]</sup>研究结果显示 circ\_0004277 在正常核型 AML 患者中的表达显著减低, 化疗缓解后其表达水平恢复正常, 而复发时其表达水平又迅速减低, 提示 circ\_0004277 也可作为监测 AML 病情检测的重要指标。

化疗耐药性是影响 AML 患者生存的重要原因之一。Shang 等<sup>[22]</sup>利用高通量芯片比较了 THP-1 和阿霉素耐药

THP-1(THP-1/ADM)细胞系的 circRNA 表达谱,结果显示 49 个 circRNA 在 THP-1/ADM 细胞系中呈异常表达, circ-PAN3 在难治性/复发性 AML 患者中明显上调,并证实该 circRNA 通过 circ-PAN3-miR-153-5P/miR183-5P XIAP 轴驱动 AML 耐药。

FMS 样酪氨酸激酶 3(FMS-like tyrosine kinase-3, *FLT3*) 基因已被证实与 AML 预后密切相关,无 *FLT3*-ITD 或伴有 *FLT3*-ITD 低频率突变预后良好,而伴有 *FLT3*-ITD 高频率突变预后不良<sup>[23]</sup>。近期,有学者采用 qPCR 检测证实,与非 *FLT3*-ITD-AML 患者相比, *FLT3*-ITD-AML 患者 circMYBL2 表达明显上调。其进一步研究证实, circMYBL2 可与 RNA 结合蛋白 PTBP1 结合,协助后者与 *FLT3*/*FLT3*-ITD 的相互作用,增强 *FLT3*/*FLT3*-ITD 的翻译,从而促进 AML 的进展。相反, circMYBL2 敲除后可抑制 *FLT3*-ITD-AML 的进展,并降低 *FLT3*-ITD-AML 患者的化疗耐药<sup>[24]</sup>。

#### 4 circRNA 的检测方法

自 circRNA 发现以来,人们已经开发出各种工具验证特定 circRNA 的存在,每种技术都有其各自的优缺点。

**4.1 Northern blot** Northern blot 是检测 circRNA 存在、大小和丰度最有说服力的方法,是检测 circRNA 的金标准<sup>[25]</sup>。特异性 circRNA 的检测可以通过跨越环状剪切区域的短探针或者覆盖整个环状外显子的长探针来完成,利用核糖核酸酶 R(RNase R)降解线性 RNA,探针与未被降解的 circRNA 结合。但是核小 RNA(small nuclear RNA, snRNA)和组蛋白 mRNA 对 RNase R 具有天然抗性,有 20% 以上高表达的线性 RNA 不能被降解。因此, Xiao 等<sup>[26]</sup>改良了 RNase R 纯化 circRNA 的方法,在 RNA 末端添加 poly(A) 尾及使用 Li<sup>+</sup> 取代缓冲液中的 K<sup>+</sup>,使 mRNA 被降解,从而能更有效地检测 circRNA。然而, Northern blot 操作费时费力,并且使用放射性标记的探针,不适用于中高通量筛选工作,不过,对于 1 个或几个确定的 circRNA 的综合分析,它提供了一种非常有价值的方法。

**4.2 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)** 以 RT-PCR 为基础,利用引物反向剪接位点(backsplice junction, BSJ)两侧上、下游的引物检测 circRNA,通常是验证 circRNA 的首选方法。RT-qPCR 可用于鉴定差异表达的 circRNA 的定量研究。微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)是通过阳性液滴和阴性液滴的比率来决定 circRNA 的绝对浓度,不受滚环效应影响, ddPCR 可对 circRNA 进行真正意义上的绝对定量分析<sup>[27]</sup>。ddPCR 在 circRNA 定量方面比 RT-qPCR 更为准确,特别在血浆等 circRNA 含量较少的样本检测方面,优势更为明显。但是, ddPCR 需要专门的设备且成本不菲。

**4.3 NanoString 数字化基因检测技术(NanoString technologies nCounter Analysis)** 该技术基于单分子荧光显微镜计数的原理,适用于大量 circRNA 的筛选。针对所检测 circRNA 的 BSJ,分别设计特定生物素标记的捕获探针和报告探针,每个探针的靶序列正好是 50 个核苷酸。该技术不需要使用酶,不存在与 PCR 扩增或 cDNA 合成相关的人为错

误,且可同时筛选多达 800 个 circRNA,隔夜杂交后,结果可在大约 6 h 完成。NanoString technologies nCounter 有望成为 circRNA 检测新的金标准<sup>[28]</sup>,但和 ddPCR 类似,该技术需要特定设备,检测成本较高。

**4.4 RNA 测序(RNA-seq)** RNA-seq 是发现新 circRNA 的首选方法<sup>[29]</sup>,该方法将 RNA 逆转录成 cDNA,通过对其建库、测序,获得相应 circRNA 的结构、序列及表达量。其优点是具有较高的敏感性、准确性及相当高的通量,并可以发现新的 circRNA,但它的成本很高,分析需要足够的计算能力和生物信息学专业知识。

**4.5 基因芯片** 基因芯片技术对生物信息学专业知识需求较少,是检测 circRNA 的另一种可行方法<sup>[30]</sup>。该技术将大量探针分子固定在支持物上,与目标 circRNA 进行杂交,通过检测杂交信号强度获取数据,它可以一次性对大量 circRNA 进行检测和分析,从而解决传统 Northern blot 费时费力、通量小等不足。但该方法同样成本不菲,且只能检测已知 circRNA。

#### 5 小结及展望

circRNA 具有普遍、稳定、特异等特点,并在 AML 等白血病形成和发展过程中具有重要作用, circRNA 在血液、体液中可稳定检测,对于 AML 等血液肿瘤来说,具有得天独厚的优势,不仅可运用于 AML 诊断和分型诊断,还可用于监测 AML 的疗效和预测风险。新 circRNA 的不断发现, circRNA 新的生物学作用的不断揭示,为人类认识和攻克 AML 提供了新的思路和可能。当然,人们对于 circRNA 的真正认知才刚刚起步, circRNA 在 AML 中如何进行调控,哪些 circRNA 能为哪些亚型 AML 提供精确诊断、准确预测预后以及有效治疗靶点,解决这些问题,仍需要将来广泛而深入地探索。

#### 6 参考文献

- [1] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood, 2016, 128(3):462-463.
- [2] Liu Y, Cheng ZH, Pang YF, et al. Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1):51.
- [3] Verduci L, Strano S, Yarden Y, et al. The circRNA-microRNA code: emerging implications for cancer diagnosis and treatment[J]. Mol Oncol, 2019, 13(4):669-680.
- [4] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(18):5609-5612.
- [5] Militello G, Weirick T, John D, et al. Screening and validation of lncRNAs and circRNAs as miRNA sponges[J]. Brief Bioinform, 2017, 18(5):780-788.
- [6] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing[J]. Mol Cell, 2014, 56(1):55-66.
- [7] Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. Cell, 2015, 160(6):1125-1134.
- [8] Abe N, Matsumoto K, Nishihara M, et al. Rolling circle translation

- of circular RNA in living human cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16435.
- [9] 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.e9.
- [10] Chen HL, Liu T, Liu J, *et al.* Circ-ANAPC7 is upregulated in acute myeloid leukemia and appears to target the MiR-181 family [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(5):1998-2007.
- [11] Lei P, Chen JJ, Liao CS, *et al.* Silencing of circ\_0009910 inhibits acute myeloid leukemia cell growth through increasing miR-20a-5p [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2019, 75: 41-47.
- [12] Fan H, Li Y, Liu C, *et al.* Circular RNA-100290 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in acute myeloid leukemia cells via sponging miR-203 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1-4):178-184.
- [13] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, *et al.* Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations [J]. *Cell*, 2016, 166(4):1055-1056.
- [14] Greene J, Baird AM, Brady L, *et al.* Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases [J]. *Front Mol Biosci*, 2017, 4: 38.
- [15] Döhner H, Estey E, Grimwade D, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults; 2017 ELN recommendations from an international expert panel [J]. *Blood*, 2017, 129(4):424-447.
- [16] Hirsch S, Blätte TJ, Grasedieck S, *et al.* Circular RNAs of the nucleophosmin (*NPM1*) gene in acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2017, 102(12):2039-2047.
- [17] Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, *et al.* MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(18):1919-1928.
- [18] You X, Conrad TO. Acfs: accurate circRNA identification and quantification from RNA-Seq data [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 38820-38830.
- [19] Li SF, Ma YL, Tan Y, *et al.* Profiling and functional analysis of circular RNAs in acute promyelocytic leukemia and their dynamic regulation during all-trans retinoic acid treatment [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6):651.
- [20] Yi YY, Yi J, Zhu X, *et al.* Circular RNA of vimentin expression as a valuable predictor for acute myeloid leukemia development and prognosis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4):3711-3719.
- [21] Li W, Zhong CQ, Jiao J, *et al.* Characterization of hsa\_circ\_0004277 as a new biomarker for acute myeloid leukemia via circular RNA profile and bioinformatics analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):597.
- [22] Shang J, Chen WM, Wang ZH, *et al.* CircPAN3 mediates drug resistance in acute myeloid leukemia through the miR-153-5p/miR-183-5p-XIAP axis [J]. *Exp Hematol*, 2019, 70: 42-54.e3.
- [23] Tsai CH, Hou HA, Tang JL, *et al.* Prognostic impacts and dynamic changes of cohesin complex gene mutations in de novo acute myeloid leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(12):663.
- [24] Sun YM, Wang WT, Zeng ZC, *et al.* circMYBL2, a circRNA from MYBL2, regulates FLT3 translation by recruiting PTBP1 to promote FLT3-ITD AML progression [J]. *Blood*, 2019, 134(18):1533-1546.
- [25] Schneider T, Schreiner S, Preußner C, *et al.* Northern blot analysis of circular RNAs [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1724: 119-133.
- [26] Xiao MS, Wilusz JE. An improved method for circular RNA purification using RNase R that efficiently removes linear RNAs containing G-quadruplexes or structured 3' ends [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(16):8755-8769.
- [27] Chen DF, Zhang LJ, Tan KZ, *et al.* Application of droplet digital PCR in quantitative detection of the cell-free circulating circRNAs [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2018, 32(1):116-123.
- [28] Dahl M, Daugaard I, Andersen MS, *et al.* Enzyme-free digital counting of endogenous circular RNA molecules in B-cell malignancies [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(12):1657-1669.
- [29] Glažar P, Papavasiliou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs [J]. *RNA*, 2014, 20(11):1666-1670.
- [30] Chen X, Chen RX, Wei WS, *et al.* PRMT5 circular RNA promotes metastasis of urothelial carcinoma of the bladder through sponging miR-30c to induce epithelial-mesenchymal transition [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(24):6319-6330.

(收稿日期:2021-01-10)

(本文编辑:许晓蒙)