

circRNAs 在植物中的研究进展

岳慧芳^{1,2,3}, 任永哲^{1,2,3}, 王志强^{1,2,3}, 辛泽毓^{1,2,3}, 林同保^{1,2,3*}

(1 河南农业大学 农学院, 郑州 450002; 2 河南粮食作物协同创新中心, 郑州 450002; 3 小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450002)

摘要: circular RNA (circRNA) 是一类具有闭合环状结构的内源性非编码 RNA, 广泛存在于多种真核生物中, 具有结构稳定、序列保守、表达特异性等特征。研究表明 circRNAs 可作为海绵 (sponge) 吸附 microRNA (miRNA) 并参与其表达调控过程, 也可通过与蛋白互作调控基因表达等生物过程; 发现 circRNAs 不仅参与植物激素信号转导等生理过程, 而且还能在植物响应逆境胁迫中起到重要作用。该文主要对近年来国内外有关 circRNAs 的类型、形成机制、功能及其在植物生长发育过程中的研究进展进行了综述, 并讨论了 circRNAs 的研究意义及存在的问题, 为进一步研究 circRNAs 在植物中的作用机制及其基因调控网络提供参考。

关键词: circRNAs; 基因表达; 植物; 研究进展

中图分类号: Q752; Q789

文献标志码: A

Research Progress of circRNAs in Plants

YUE Huifang^{1,2,3}, REN Yongzhe^{1,2,3}, WANG Zhiqiang^{1,2,3}, XIN Zeyu^{1,2,3}, LIN Tongbao^{1,2,3*}

(1 College of Agronomy Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2 Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops, Zhengzhou 450002, China; 3 State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: circular RNA (circRNA) is a group of endogenous non-coding RNA with closed loop structure, which widely and very stably exists in all eukaryotes. It has the features of construct stability, sequence conservative and tissue-specific expression. Prior studies have discovered that circRNAs could act as microRNA (miRNA) sponge to regulate the expression of them. Besides, some circRNAs could regulate gene expression by interacting with proteins. Some studies have shown that circRNAs are not only participated in physiological processes, such as plant hormone signal transduction, but also play an important role in the process which response to biological stress in plants. In this paper, we reviewed the classes and biogenesis of circRNAs, as well as the function of circRNAs. In addition, we discussed the undiscovered issues and the meanings of existence about circRNAs. As research continues, we believe that it can provide theoretical reference for the formation mechanism and gene regulatory networks of circRNAs in plants.

Key words: circRNAs; gene expression; plant; research progress

20 世纪 90 年代初, 人们首次发现了 circRNAs^[1]。circRNAs 是一类线性 RNA 分子通过 3' 端和其上游的 5' 端利用共价键结合形成的闭合环

状 RNA 分子。随着对 circRNAs 研究的深入, 发现人、小鼠和大鼠在不同发育阶段或病理状态下, circRNAs 与心脏发育和病理过程关系密切^[2]。通过

收稿日期: 2017-09-10; 修改稿收到日期: 2017-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31572197); 国家重点研发计划 (2016YFD0300205); 河南省自然科学基金 (162300410133)

作者简介: 岳慧芳 (1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事小麦养分高效利用研究。E-mail: yuehf1991@163.com

* 通信作者: 林同保, 教授, 博士生导师, 主要从事作物生理生态研究。E-mail: linlab@163.com

RNA-seq 分析发现在秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇、小鼠和人类等生物中 circRNAs 能够富集表达^[3-6],说明这可能是一种普遍存在的调控现象。最近几年在水稻^[7-8]、小麦^[9]、大麦^[10]和番茄^[11]中也发现存在大量的 circRNAs,其在植物方面的功能也开始逐渐浮出水面。

circRNAs 结构稳定,序列保守且具有时空表达特异性。如图 1 所示,在转录后修饰过程中除了存在正向剪接方式,还存在反向剪接,这种可变的反向剪接就形成了 circRNAs。由于 circRNAs 分子呈封闭环状结构,不易被 RNA 核糖核酸酶 R(ribonuclease R,RNase R)降解,因此比线性 RNA 更稳定^[12-13]。有研究发现在生物体内存在大量的 circRNAs,它们可以来自基因外显子区、基因间区到反义链区、5'-UTR 区到 3'-UTR 区等不同位置^[4, 14-15]。

1 circRNAs 的形成

1.1 circRNAs 的类型

circRNAs 有三大类:第一类是外显子环化形成的 circRNAs^[16];第二类是内含子套索化(intra-lariat)形成的内含子 circRNAs,又称 ciRNAs^[17];第三类是内含子与外显子共同环化成的 circRNAs(extron-intron circRNAs),即 EIciRNAs^[18]。生物信息学分析发现,circRNAs 的种类会伴随着物种进化程度而表现出多样性^[13]。

ciRNAs(仅有内含子)与 RNA 聚合酶 II 结合促进基因转录;EIciRNAs(含内含子与外显子)与小核糖体 U1SnRNP 结合形成复合体进一步与 RNA 聚合酶 II 结合促进亲本基因转录;circRNAs(仅含外显子序列)含有 miRNA 结合位点元件(MRE)可

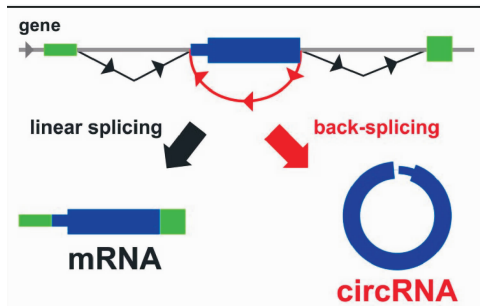
吸附 microRNA,间接调控 mRNA 表达。此外,circRNAs 可作为竞争性内源 RNA(competing endogenous,ceRNA)调控基因的表达^[19],也可在转录或转录后水平发挥调控作用^[20]。

1.2 形成机制

circRNAs 是通过非经典剪接方式进行反向剪接形成的,并大量存在于真核细胞的细胞质中。Zhang 等^[21]首次系统地分析了 circRNAs 的形成机制,提出了内含子中反向互补序列促使形成 circRNAs 的机制模型,即依赖 pre-mRNA 中邻近的 2 个内含子反向互补配对,序列碱基配对形成环状套索,拉近剪切位点,进而切除内含子,促使序列成环。此外,Ivanov 等^[22]在线虫中研究发现,与线性 RNA 分子相比,被内含子包围的 circRNAs 侧翼上富含反向互补序列(reverse complementary sequences,RCMs)。进一步研究发现这些内含子 RCMs 对 circRNAs 的形成非常关键,并且双链 RNA 编辑酶 ADAR1 也参与了该过程,当敲低 ADAR1 基因的表达量后,circRNAs 的表达显著上调,进一步研究发现,内含子间的互补配对序列通过竞争性结合的方式介导了外显子环化过程。circRNAs 的生成调节依赖于在拼接过程中的顺式调控元件和反作用因子^[23],它的外显子环化效率取决于外显子的回切位点^[24-25]。研究还表明,circRNAs 呈现组织特异性表达模式^[4-5, 20, 26]。Sun 等^[27]对拟南芥样品进行了 RNase R 与非 RNase R 处理,从 16 个拟南芥的 RNA-seq 数据中鉴定了 803 个 circRNAs。试验结果表明:规则剪接与不规则剪接都可产生 circRNAs;叶绿体是最有可能产生 circRNAs 的细胞器;互补序列不仅存在于内含子中,而且也存在于剪接位点侧翼的序列中。

1.3 circRNAs 的鉴定方法

RNA-seq 是一种对 RNA 进行高通量测序的技术,其结果可用来注释新的 RNA 种类并进行 GO 功能富集^[28]。现在多运用 circRNA-seq 高通量测序手段来研究 circRNAs,并基于测序数据与参考基因组的比对鉴定 circRNAs。circRNAs 的测序流程是:首先利用去核糖体试剂盒和核酸酶 R 从检测合格的样品中去除核糖体 RNA 和线性 RNA 分子,然后将得到的 circRNAs 进行随机打断,针对打断后的序列连接 3' 和 5' 端的接头,进而依次进行 RT-PCR、库检、PCR 扩增和电泳分离目的大小片段,建库后进行测序。将获得的序列与整个基因组进行比对锚定回原位(anchor reads),但是如果是环状的话



拼接过程中外显子顺式剪接生成 mRNAs,外显子通过反向剪接形成 circRNAs

图 1 circRNAs 与 mRNA 形成的区别^[12]

circRNAs are most commonly produced from back-splicing events, while mRNA from linear splicing events

Fig. 1 The difference between the formation of circRNAs and mRNA

就会导致这个序列的两头对比到不同方向的位置上,这样的序列被注释为 circRNAs。

通过 RT-PCR 验证可将 circRNAs 与线性 RNA 区分开,因为在验证时 circRNAs 的引物设计方向为反方向;也可通过 Northern 印迹^[29-30]对二者进行区分,以验证检测到的 RNA 是否为环状,通过这样的方法对 circRNAs 进行定量^[31]。在 circRNAs 的研究过程中,用于预测 circRNAs 的方法和软件有 CircInteractome^[32]、CircRNA finder^[33]、finder circ^[4]、CIRCexplorer^[21]和 CIRI^[34]。此外还有替代剪接检测的其他算法,如:Map Splice^[35]、Splice Map^[36]、Split Seek^[37]均可用来查找 circRNAs。其中,Chen 等^[38]开发的用于植物 circRNAs 的预测软件(称为 PcircRNA_finder)也具有运行程序快、灵敏度高的特点。

2 植物与动物中 circRNAs 的序列特征比较

Ye 等^[7]在水稻的根和拟南芥的叶中分别鉴定了 12 037 和 6 012 个 circRNAs,并比较了植物与动物 circRNA 的特征。在植物中,circRNAs 的侧翼内含子(introns flanking)序列比线性基因(linear genes)要长很多,且与动物中的 circRNAs 相比,植物中的 circRNAs 具有特有的重复元件(repetitive elements)和反向互补序列(complementary sequence)。Ye 等^[8]在水稻中鉴定了约 3 000 个具有全长序列的 circRNAs,进一步研究表明,circRNAs 的可变化是水稻的一个常见特征,该研究还发现大量水稻 circRNAs 的连接位点位于不同的非 GT/AG 剪接信号位的两侧,而人类大多数的 circRNAs 都位于标准的 GT/AG 剪接信号位。由此可知,circRNAs 不仅在植物中广泛存在,而且与动物中的 circRNAs 序列有所差异。

3 植物中 circRNAs 的鉴定

Lu 等^[39]从水稻的成熟叶和圆锥花序中共鉴定出 2 354 个 circRNAs,并对候选 circRNAs 分子进行了功能预测与验证。随着转录组测序技术的提高,Tan 等^[40]研究发现在番茄的果实(solanum lycopersicum)中确定了数千个推定的反向剪接位点,结果显示某些 circRNAs 的丰度会随着果实的成熟过程发生变化,该研究在番茄品种 Ailsa Craig 和 micro Tom 中对源自木萜合酶 1(phytoene synthase 1,PSY1)的一个 circRNAs 进行过表达,结果表明

转基因番茄果实中 PSY1 mRNA 的丰度、番茄红素和 β -胡萝卜素积累均有所变化。不仅在主要的粮食作物中鉴定到 circRNAs,而且在一些经济作物中也有所发现。Zhao 等^[41]通过测序与生物信息学分析在大豆中共鉴定了 5 372 个 circRNAs,其中约 80% 同源 circRNAs(paralogous circRNAs)是由同源基因产生,此外同源基因还可产生不同表达模式的同源 circRNAs。在不同植物中鉴定 circRNAs 的背景不同,拟南芥作为一种模式植物,相关研究还对拟南芥叶片生长与衰老过程中 circRNAs 的表达谱及其功能进行了分析^[42],在拟南芥中共鉴定了 168 个 circRNAs,其中 158 个 circRNAs 是由外显子产生的,包括在叶片中新发现的 40 个 circRNAs,该研究表明从 G 期到 M 期差异表达的 circRNAs 有 6 个,从 M 期到 S 期差异表达的 circRNAs 有 35 个。通过 GO 分析与 KEGG 通路分析表明,circRNAs 可能参与植物激素信号转导、卟啉(porphyrin)及叶绿素代谢过程,并推测 circRNAs 可能在拟南芥叶片的衰老过程中起到转录后调控的作用。

最近的研究发现,circRNAs 可能在植物响应逆境胁迫中发挥了重要的作用。Zhao 等^[43]运用 RNA-seq 测序技术和生物信息学分析了大豆对昆虫的抗性基因,对相关的 circRNAs 全基因组谱进行了分析,该研究鉴定出了 5 367 个 circRNAs,其中 3 377 个是耐药型的,而且不同感受性样品之间的 circRNAs 具有不同的表达模式,还预测某些 circRNAs 可参与昆虫抗性过程,另外预测了在大豆中有 5 356 个 circRNAs 能与 miRNA 模拟物(miRNA mimics)结合,这些 circRNAs 属于 69 个 miRNA 家族(miRNA families),miR1514 家族含有的 circRNAs 的结合位点数目最多,其次是 miR1520、miR172、miR159、miR156 和 miR395 家族。最新研究中对 circRNAs 与 miRNA 的关系进行了分析,Gang 等^[44]选取了处于不同发育时期的植物样品,并进行了 4 个胁迫处理,构建了 14 文库(strand-specific libraries),通过对拟南芥和其他物种的 circRNAs 序列相似性的分析表明,一些 circRNAs 在植物中是保守的,circRNAs 的许多亲本基因参与了植物发育、繁殖以及对逆境刺激的响应等基本生物过程,另外一小部分 circRNAs 则是潜在的 miRNA 靶标,说明这些 circRNAs 可以与 miRNA 相互作用来调控基因表达。

Ye 等^[7]分别对水稻和拟南芥在缺磷与正常条件下的转录组分析发现,circRNAs 在磷充足与磷饥

胁迫下表现出明显差异,表明 circRNAs 可能在响应磷胁迫中起到作用。在植物的自然生长环境中,除了缺磷胁迫外还有其他的生物与非生物胁迫,比如冷害胁迫、水分胁迫、低氮胁迫等。有研究在小麦的幼苗叶中发现了 88 个候选基因,其中有 6 个 circRNAs 具有相应 miRNA 的海绵功能^[9],而有 62 个 circRNAs 在干旱和对照下表现出显著差异,其中 16 个上调表达,46 个下调表达,这表明在应对干旱胁迫时,circRNAs 具有不同程度的表达特异性;还通过 KEGG 对靶 mRNA 的功能进行分析,得到了 183 个通路,其中一些通路已知的小麦或其他高等植物的抗旱性相关,说明叶片中的 circRNAs 可能参与了小麦幼苗耐旱性的响应。还有研究发现了在番茄中不仅有 163 个 circRNAs 可能对冷害做出响应^[11],而且有 104 个 circRNAs 具有 miRNA 的海绵功能。由于 circRNAs 是闭环结构,可以使其半衰期延长^[45],有些 circRNAs 可能作为生物或非生物胁迫的缓冲调节剂,通过与 DNA 形成 R-环(R-loop)来调节其亲本基因的表达,circRNAs 的这种作用方式可能是植物界的一种普遍机制。由此可知,circRNAs 不仅在植物体的生长发育中有显著的时空表达特异性,而且还可能参与了对多种生物和非生物胁迫的响应。

4 功能解析

一直以来,人们对于动物中 circRNAs 的鉴定和功能研究较多,但在植物中的研究还相对较少。通过全基因组范围内鉴定 circRNAs,并进行生物信息学分析,可预测其在植物中的功能及其参与植物体代谢的通路。circRNAs 对基因表达的过程产生影响,并间接影响生物体的发育。近来,在鉴定大麦的亲本基因时发现了参与多种细胞代谢的 circRNAs^[10],这些基因参与了激素信号转导、碳水化合物代谢、氨基酸生物合成、转录和翻译等过程。此外,circRNAs 在转录后水平上也具有很多重要的调控功能,包括 circRNAs 调控可变剪切、miRNA 海绵功能、与 RNA 结合蛋白(RBPs)及核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex)结合等,circRNAs 还具有调节宿主基因表达^[21]和顺式转录调控的功能^[17]。

Memczak 等^[4]首次提出 circRNAs 的 miRNA 海绵功能模型,研究发现 CDR1as 上存在 63 个 miR-7 的结合位点,因此称为 miRNA 海绵功能模型。在随后的多项研究中均有类似发现,比如:circ

cRNA *Sry* 基因的表面包含 16 个 miRNA-138 的结合位点^[26],但在发育成熟后主要以 circRNAs 的形式存在于细胞质中^[46];Zheng 等^[47]发现 *circHIPK3* 能够结合 9 种 miRNA 并且找到了 18 个潜在结合位点。此外,Salzman 等^[16]研究发现 circRNAs 在果蝇中普遍存在,且不同部位的 circRNAs 呈现特异性表达。为了进一步明确 circRNAs 在转录水平上的作用,Su 等^[48]开发了一种 circRNAs 体内沉淀(circRNAs in vivoprecipitation, circRIP)技术,这种技术可专门钓取目标 circRNAs 竞争性结合的 miRNA。但有关研究发现在上皮细胞-间充质细胞转型(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中,并没有具有富集到 circRNA 的 miRNA 靶位点^[49],因此对 circRNAs 与 miRNA 的功能和作用机制还需要进一步研究。目前对植物中 circRNAs 功能的研究相对较少,有关研究通过对水稻和拟南芥的模拟目标进行识别^[50-51],发现一小部分 circRNAs(水稻 6.6%、拟南芥 5.0%)具有 miRNA 的潜在目标位点,这是因为产生 circRNAs 的基因组区域含有 miRNA 的结合位点,但不明确结合位点的属性。还有研究表明部分 circRNAs 的生成会降低基因 mRNA 的表达水平^[52],那么这些 circRNAs 是否具有保守性,其在植物体内是否也存在相似的调节功能,需要进一步试验证实。动物中 E3 与 miR-7 以及 miR-214 的相互作用可提高泛化素蛋白连接酶 E3 的表达水平^[53],证明在细胞核内 ciRNAs 以及 EIciRNAs 均可调节亲本基因的表达^[54],在植物体内的泛化素蛋白发生连接的过程中,ciRNAs 与 EIciRNAs 是否也可参与调节基因表达的过程以及是否具有类似功能均有待进一步研究。

circRNAs 不仅可调节转录过程,而且还参与蛋白质合成过程,可与 RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)相结合形成 RNA 蛋白复合物(RNA-protein complexes, RPCs),通过部分碱基互补配对直接作用于靶基因^[55-56]。在蛋白水平上, RNA 结合蛋白(RBPs)也调节了 circRNAs 的形成。在人体中发现 *circ-ZNF609* 可直接翻译蛋白,且该蛋白还参与了肌肉的生成过程^[57]。Sebastian Kadener 等^[58]发现大量 circRNAs 可以翻译成蛋白或多肽,并且发现有核糖体可结合 *circMbl* 的终止密码子。另外,在水稻中的研究也发现,一个 220 nt 的 circRNAs 构成的拟病毒在感染植株后会在这种可复制的 circRNAs 分子上表达出一个 16 kD 大小

的蛋白分子^[59]。据此推测,在小麦等其他植物中可能也存在 circRNAs 翻译成蛋白的现象。此外通过对人工合成的 circRNAs 进行测试,发现合成的 circRNAs 可进入核糖体内部的翻译位点^[60],从而证明 circRNAs 具有编码蛋白质的功能。由于 circRNAs 没有 poly(A)尾结构,不易被降解,说明 circRNAs 在调控 RNA 转录和蛋白质合成上可能具有关键性的作用^[61]。

5 circRNAs 的研究存在问题及展望

基于二代测序的 RNA-Seq(RNA sequencing)技术大大提高了研究不同 RNA 分子的能力,目前已开发出了多种线性 RNA 分子中 RNA 拼接的信息学分析算法,但如何提高 circRNAs 拼接预测的精确性依然是一个富有挑战的问题。此外,样品的制备方面,还需要考虑样品纯度、RNA 和 cDNA 水

平、分子大小过滤和样品片段化处理等情况。相信随着测序技术的日益成熟和生物信息学的进一步发展,对包括 circRNAs 在内的所有 RNA 序列的测定、拼接和预测会变得越来越准确和可靠,为进一步深入研究 circRNAs 的功能奠定基础。

在人类与动物体中对 circRNAs 的功能已有较多的研究,对于 circRNAs 在植物体中的研究才刚刚起步,植物体内 circRNAs 是否也存在转录水平和蛋白水平上的调控作用?哪种是主要机制?是否也存在吸附 miRNA 的 sponge 功能?都尚未可知。但从已有文献报道结果看来,大量的 circRNAs 分子参与了植物对多种逆境胁迫的响应与生长发育的调控过程。相信随着研究的逐渐深入,circRNAs 在植物中的调控作用会越来越引起人们的重视,其调控机制也会慢慢浮出水面。

参考文献:

[1] NIGRO J M, CHO K R, FEARON E R, *et al.* Scrambled exons[J]. *Cell*, 1991,**64**(3): 607-613.

[2] WERFEL S, NOTHJUNGE S, SCHWARZMAYR T, *et al.* Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts[J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2016, 98: 103-107.

[3] KRISTENSEN L S, OKHOLM T L H, KJEMS J, *et al.* Circular RNAs are abundantly expressed and upregulated during human epidermal stem cell differentiation[J]. *RNA Biology*, 2017, 28: 1-2.

[4] MEMCZAK S, JENS M, ELEFINIOTI A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013,**495**(7 441): 333-338.

[5] 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.

[6] 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): 1 966-1 980.

[7] YE C Y, CHEN L, LIU C, *et al.* Widespread noncoding circular RNAs in plants[J]. *New Phytologist*, 2015, **208**(1): 88-95.

[8] YE C Y, ZHANG X, CHU Q, *et al.* Full-length sequence assembly reveals circular RNAs with diverse non-GT/AG splicing signals in rice[J]. *RNA Biology*, 2016, 14: 1-9.

[9] WANG Y, YANG M, WEI S, *et al.* Identification of circular RNAs and their targets in leaves of *Triticum aestivum* L. under dehydration stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 7: 2 024.

[10] DARBANI B, NOEPARVAR S, BORG S. Identification of circular RNAs from the parental genes involved in multiple aspects of cellular metabolism in barley [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 776.

[11] ZUO J, WANG Q, ZHU B, *et al.* Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016,**479**(2): 132-138.

[12] MARIELA C L, PEDRO M. Emerging function of circular RNAs[J]. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2016, 89: 527-537.

[13] ZHANG Y, XUE W, Lli X, *et al.* The biogenesis of nascent Circular RNAs[J]. *Cell Reports*, 2016,**15**(3): 611-624.

[14] RYBAK-WOLF A, STOTTMEISTER C, GLAZAR P, *et al.* Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, con-served, and dynamically expressed[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58: 870-885.

[15] YOU X, VLATKOVIC I, BABIC A, *et al.* Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nat Neuroscience*, 2015, 18: 603-610.

- [16] CHEN B, HUANG S. Circular RNA: An emerging non-coding RNA as a regulator and biomarker in cancer[J]. *Cancer Letters*, 2018, 18: 30 033-30 038.
- [17] ZHANG Y, ZHANG X O, CHEN T, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2013, **51**(6): 792-806.
- [18] GREENE J, BAIRD A M, BRADY L, *et al.* Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2017, 4: 38.
- [19] 付丽云, 胡耀仁, 郭俊明. 环状 RNA 与人类疾病[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, **31**(8): 771-778.
FU L Y, HU Y R, GUO J M. circRNA and human diseases [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, **31**(8): 771-778.
- [20] DANAN M, SCHWARTZ S, EDELHEIT S, *et al.* Transcriptomewide discovery of circular RNAs in Archaea[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(7): 3 131-3 142.
- [21] ZHANG X O, WANG H B, ZHANG Y, *et al.* Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, **159**(1): 134-147.
- [22] IVANOV A, MEMCZAK S, WYLER E, *et al.* Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals[J]. *Cell Reports*, 2015, **96**(96): 113-115.
- [23] CHEN L L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, **17**(4): 205-211.
- [24] 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.
- [25] WANG Y, WANG Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs[J]. *RNA-a Publication of the RNA Society*, 2015, **21**(2): 172-179.
- [26] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495: 384-388.
- [27] SUN X Y, WANG L, DNG J C, *et al.* Integrative analysis of *Arabidopsis thaliana* transcriptomics reveals intuitive splicing mechanism for circular RNA[J]. *FEBS letters*, 2016, 20: 3 510-3 516.
- [28] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, **10**(1): 57-63.
- [29] SCHNEIDER T, SCHREINER S, BINDEREIF A, *et al.* Northern blot analysis of circular RNAs[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 2018, 1 724:119-133.
- [30] STARKE S, JOST I, ROSSBACH O, *et al.* Exon circularization requires canonical splice signals[J]. *Cell Reports*, 2015, **10**(1): 103-111.
- [31] SALZMAN J, CHEN R E, OLSEN M N, *et al.* Cell-type specific features of circular RNA expression[J]. *PLoS Genetics*, 2013, **9**(9): e1003777.
- [32] 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.
- [33] WESTHOLM J O, MIURA P, OLSON S, *et al.* Genome-wide analysis of drosophila circularRNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation[J]. *Cell Reports*, 2014, **9**(5): 1 966-1 980.
- [34] GAO Y, WANG J, ZHAO F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for denovo circular RNA identification[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 4.
- [35] WANG K, SINGH D, ZENG Z, *et al.* MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery[J]. *Nucleic Acids Research*. 2010, **38**(18): e178.
- [36] AU K F, JIANG H, LIN L, *et al.* Detection of splice junctions from paired-end RNA-seq data by Splice Map[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**(14): 4 570-4 578.
- [37] AMEURA, WETTERBOM A, FEUK L, *et al.* Global and unbiased detection of splice junctions from RNA-seq data[J]. *Genome Biology*, 2010, **11**(3): R34.
- [38] CHEN L, YU Y, ZHANG X, *et al.* PcircRNA_finder: a software for circRNA prediction in plants[J]. *Bioinformatics*, 2016, **32**(22): 3 528-3 529.
- [39] LU T, CUI L, ZHOU Y, *et al.* Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice[J]. *RNA*, 2015, **21**(2): 2 076-2 087.
- [40] TAN J, ZHOU Z, NIU Y, SUN X, *et al.* Identification and functional characterization of tomato circRNAs derived from genes involved in fruit pigment accumulation[J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 8 594.
- [41] ZHAO W, CHEN Y, ZHANG C, *et al.* Genome-wide identification and characterization of circular RNAs by high throughput sequencing in soybean[J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 5 636.
- [42] LIU T, ZHANG LI, CHEN G, *et al.* Identifying and characterizing the circular RNAs during the lifespan of arabidopsis leaves[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1 278.
- [43] ZHAO W, ZHANG C, SHEN X J. Characterization of circRNAs associated with resistance to defoliating insects in

soybean[J]. *Oil Crop Science*, 2017, **2**(1): 23-37.

[44] CHEN G, CUI J W, WANG LI, *et al.* Genome-wide Identification of circular RNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1 678.

[45] LI Q F, ZHANG Y C, CHEN Y Q, *et al.* Circular RNAs roll into the regulatory network of plants[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, **488**(2): 382-386.

[46] LARNEY C, BAILEY T L, KOOPMAN P. Switching on sex; transcriptional regulation of the testis-determining gene *Sry*[J]. *Development*, 2014, **141**(11): 2 195-2 205.

[47] ZHENG Q P, BAO C Y, GUO W J, *et al.* Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11 215.

[48] SU X, WANG H, GE W, *et al.* An *In vivo* method to identify microRNA targets not predicted by computation algorithms: p21 targeting by miR-92a in cancer[J]. *Cancer Research*, 2015, **75**(14): 2 875-2 885.

[49] CONN S J, PILLMAN K A, TOUBIA J, *et al.* The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. *Cell*, 2015, **160**(6): 1 125-1 134.

[50] WU H J, WANG Z M, WANG M, *et al.* Widespread long noncoding RNAs as endogenous target mimics for microRNAs in plants [J]. *Plant Physiology*, 2013, **161** (4): 1 875-1 884.

[51] YE C Y, XU H, SHEN E H, *et al.* Genome-wide identification of non-coding RNAs interacted with microRNAs in soybean[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 743.

[52] 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.

[53] LI F, ZHANG L, LI W, *et al.* Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(8): 6 001-6 013.

[54] BAHN J H, ZHANG Q L, LI F C, *et al.* The landscape of microRNA, Piwi-intering RNA and circularRNA in human saliva[J]. *Clinical Chemistry*, 2015, **61**(1): 221-230.

[55] WILUSZ J E, SHARP P A. Molecular biology. A circuitous route to noncoding RNA[J]. *Science*, 2013, **340** (6 131): 440-441.

[56] TAY Y, RINN J, PANDOLFli P P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. *Nature*, 2014, **505**(7 483): 344-352.

[57] LEGNINI I, DI T G, ROSSli 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.

[58] YANG Y, FAN X J, MAO M W, *et al.* Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine[J]. *Cell Research*, 2017, **27**(5): 626-641.

[59] ABOUHAIIDAR M G, VENKATARAMAN S, GOLSHANI A, *et al.* Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2014, **111**(40): 14 542-14 547.

[60] CHEN C Y, SAMOW P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs[J]. *Science*, 1995, **268**(5 209): 415-417.

[61] WILUSZ J E, JNBAPTISTE C K, LU L Y, *et al.* A triple helix stabilizes the 3'ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails[J]. *Genes & Development*, 2012, **26**(21): 2 392-2 407.

(编辑:宋亚珍)