

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.009

前列腺癌细胞系中环状 RNA circRNA-1565 的表达及鉴定 *

时浩清 訾晓渊 张春雷 杨 琦 孙颖浩[△]

(海军军医大学长海医院 泌尿外科 上海 200433)

摘要 目的:探讨前列腺癌细胞系中的环状 RNA circRNA-1565 的表达及鉴定。**方法:**培养前列腺正常上皮细胞(RWPE-1)、4 种前列腺癌细胞(22RV1、LNCap、PC-3、DU145),提取总 RNA,采用 RT-PCR 检测不同细胞系中 circRNA-1565 的表达,并对其进行成环性验证及细胞内亚定位实验,进行差异比较。**结果:**circRNA-1565 在正常前列腺细胞系(RWPE-1)中表达量极低,在转移性前列腺癌细胞系中高表达,在非转移性前列腺癌细胞系中低表达。且 circRNA-1565 是一条主要定位于细胞质内的具有有效环状结构的 RNA 分子。**结论:**circRNA-1565 在不同前列腺癌细胞系中存在差异表达,可能会通过 miRNA sponge 途径发挥生物学作用。

关键词:前列腺癌;环状 RNA circRNA;基因表达

中图分类号:R-33;R737.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)12-2243-05

Expression and Identification of Ring RNA CircRNA-1565 in Prostate Cancer Cell Line*

SHI Hao-qing, ZI Xiao-yuan, ZHANG Chun-lei, YANG Qi, SUN Ying-hao[△]

(Department of Urology, Shanghai Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and identification of annular RNA circRNA-1565 in the cell line of prostate cancer. **Methods:** Normal prostate epithelial cells (RWPE-1), 4 kinds of prostate cancer cells (22RV1, LNCap, PC-3, DU145) were cultured, total RNA was extracted, and RT-PCR was used to detect the expression of circRNA-1565 in different cell lines. The cyclic verification and intracellular localization experiments were carried out to compare the differences. **Results:** The expression of circRNA-1565 in normal prostate cell line (RWPE-1) was very low, expressed highly in metastatic prostate cancer cell line, and low in non-metastatic prostate cancer cell line. And circRNA-1565 is a RNA molecule with an effective annular structure, which is mainly located in the cytoplasm. **Conclusion:** The expression of circRNA-1565 in different prostate cancer cell lines may play a biological role through the sponge pathway of miRNA.

Key words: Prostate cancer; circRNA circular RNA; Gene express

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2243-05

前言

前列腺癌是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率位在男性癌症发病率中占第 3 位,病死率第 6 位^[1,2]。关于前列腺癌发生、发展及转移的机制研究是肿瘤研究的难点。环状 RNAs(circular RNA, circRNA)的生物学功能的研究显示,大部分环状 RNA 分子包含若干个 miRNA 结合位点具有 miRNA sponge 功能,为一种新型的竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)^[3],circRNA 还可与 U1 snRNP、RNA 聚合酶 II 等蛋白相互作用,调控亲本基因表达^[4-8]。越来越多证据显示,circRNA 与肿瘤的发生发展有关,本课题组前期实验发现,circRNA-1565 的亲本基因为环磷鸟苷依赖的蛋白激酶 I (PRKG1, cGMP-dependent protein kinase type I),在正常前列腺细胞系(RWPE-1)中表达极低,在前列腺原位癌细胞系(22RV1)

中有表达,在前列腺骨转移癌细胞(PC3)呈高表达。在本研究中,我们拟探讨 circRNA-1565 在前列腺癌细胞系中的表达及鉴定,为寻找新的前列腺癌治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系

RWPE-1、22RV1、LNCap、PC-3、DU145 等细胞系均购自美国 ATCC 并培养于海军军医大学附属长海医院泌尿外科实验室。RWPE-1 细胞采用 PEpiCM 培养液,PC-3 细胞采用含 10% 胎牛血清、1%青-链霉素的 F12 培养液,其余细胞均采用含 10%胎牛血清、1%青-链霉素的 1640 培养液,使用 25 cm² 细胞培养瓶,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,根据细胞生长状况 2-3 d 更换培养基。

1.2 主要试剂

* 基金项目:上海市浦江人才计划项目(16PJ1411100)

作者简介:时浩清(1989-),男,博士,住院医师,研究方向:泌尿系肿瘤,电话:18521416234, E-mail: hedongli1980@163.com

△ 通讯作者:孙颖浩(1961-),男,博士,教授,研究方向:泌尿系疾病的诊治, E-mail: syhsmmu@126.com

(收稿日期:2019-04-10 接受日期:2019-04-28)

总 RNA 抽提试剂为 RNAiso Plus (Code:9109,TaKaRa);反转录试剂盒为 PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time)(Code:RR037A,TaKaRa);PCR 试剂为 Thunderbird Sybr qPCR Mix (Code:QPS-201),PCR 引物经 Gene Bank 检索,用 Primer Premier 6.0 软件设计,由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 抽提及 RT-PCR 培养细胞至汇合度约 90%,每个培养瓶内及组织标本中加入 RNAisoPlus 1 mL,严格按照实验步骤进行细胞及组织总 RNA 抽提,尽量避免 RNA 降解,获得的 RNA 用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计检测其浓度及纯度, A260/A280=1.95~2.05,琼脂糖凝胶变性电泳分析其完整性,28 s 和 18 s RNA 的比值约为 2:1。反转录使用 T100 PCR 仪,反应体系为 20 μ L,反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s。PCR 使用 Step One Plus 实时定量 PCR 仪,反应体系为 20 μ L,反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15s,60℃ 1 min,共进行 35 个循环,每个样本均行 3 个完全平行操作。以 β -actin 为内参,采用 Ct 比较法分析 PCR 结果。PCR 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳:将 PCR 产物加于 2%(20g/L)琼脂糖凝胶中,80V 恒定电压下电泳 30 min,设定适当曝光条件,紫外灯下观察电泳条带并拍照,鉴定条带大小是否正确。

1.3.2 核质分离实验 裂解细胞质:使用 RNA Isolation Kit,

ThermoFisher System 按照操作手册,将收集好的细胞用 400 μ L 预冷的 Cell Fractionation Buffer 重悬,750 $\times$ g、4℃ 离心 5 分钟后小心吸取上清,不要触碰沉淀。将其加入新的 EP 管中,即为胞质裂解产物。裂解细胞核:将沉淀用 200 μ L Cell Disruption Buffer 重悬,剧烈震荡后得到细胞核裂解产物提。

1.3.3 荧光原位免疫杂交(FISH)实验 细胞准备:细胞在盖玻片上进行培养,条件为 37℃ 和 5%的 CO₂。细胞长好后用 PBS 洗 3 次。细胞固定:吸出培养基,PBS 洗 1 次,立即用含有 1/1000 DEPC 的 PBS 溶液配置 4%甲醛溶液室温固定 1 h,蒸馏水持续冲洗。细胞预处理:PBS 洗 3 次,每次 5 min。0.4% Triton-X100 洗 15 min,增强探针的穿透力。1 g/mL 蛋白酶 K 37℃ 处理 30 min,暴露待检测 RNA。杂交:加入杂交液 400 μ L,加入 DIG-RNA 探针,保证探针的终浓度在 0.5 μ g/mL,37-40℃ 湿盒杂交过夜(12 h)。吸出杂交液,加入 2 $\times$ SSC 37℃ 洗 15 min,再加入含 20 μ g/mL RNase 的 1 $\times$ SSC 37℃ 洗 30 min,最后再用 0.5 $\times$ SSC 37℃ 洗涤 15 min 显色:PBS 洗 3 遍,加入 FITC 标记的小鼠抗 DIG 抗体,室温孵育 4 h。PBS 洗 3 遍,每次 5 min,再加入 DAPI,常温染色 3 min,PBS 洗 3 遍后避光,显微镜中观察拍照。

1.3.4 其他主要材料 序列与探针见表 1。circRNA-1565 的 FISH 探针序列为:5'-CTGGGCCTGAGAAAGGTGGGACTTG-GTATTATAGGAGGTG-3'。

表 1 主要引物序列
Table 1 The sequence of primers

Primer name	Primer sequence(5'- 3')-F	Primer sequence(5'- 3')-R
circ-PRKG1	GAGGGCTTTAACTGGGAAGG	AGCAGCATTTTTGGCAATCT
PRKG1	GGACAGGACTCATCAAGCATAC	GTCTCTTCAAGGACATCAGCAA
circ-FKBP5	TCCCTCGAATGCAACTCTCT	TGGGGCTTTCTTCATTGTTC
β -actin	CGCGAGAAGATGCCCAGATC	TCACCGGAGTCCATCACGA

1.4 统计学分析

所得数据采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理。各组资料以(mean $\pm$ SD)表示,计数资料采用卡方检验、计量资料采用 t 检验进行统计学检验, $P<0.05$ 有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 前列腺癌细胞的 RNA 抽提和质控

连续传代培养前列腺正常细胞系及前列腺癌细胞系(RWPE-1、22RV1、PC3),分别抽提其总 RNA,重复 3 次。对抽提得到的 RNA 进行质检。

2.2 RNA 的定量质控

使用 NanoDrop ND 仪测量每个样品的 RNA 浓度及纯度。RNA 量应在 20 g 以上。以 OD260/OD280 值作为 RNA 纯度指标,若 OD260/OD280 值范围在 1.9~2.1,则 RNA 纯度合格。如表 2 所示,本实验所采用的 RNA 样本的浓度及纯度均符合要求。

2.3 RNA 的完整性质控

使用琼脂糖凝胶电泳测量 RNA 连续性 & gDNA 污染。28S 和 18S rRNA 带应该是尖锐、强度高的带。28S 的强度应该

是 18S 强度的两倍。28S 带和 18S 带之间存在弥散带是正常的,可能是 mRNA 和其他异质性 RNA。低分子量 5S 带是更小的、弥散的;rRNA 和 5S rRNA 可能会出现。高分子量弥散或带迁移到 28S 上,表明存在 DNA 污染。rRNA 带弥散反应了 RNA 的降解。如图 1 所示,本实验所采用的 RNA 样本完整性均较好。

2.4 circRNA-1565 在前列腺癌细胞系中的表达

为了进一步验证 circRNA-1565 在前列腺癌细胞株中的表达丰度差异,选择合适的细胞株进行下一步实验,我们选取目前常用的 5 种前列腺癌细胞系 22RV1、LnCap、C4-2、PC3、DU145 以及正常前列腺细胞系 RWPE-1 进行常规培养。分别抽提总 RNA,并用前述方法对其 15 min 的 RNase R 消化,再用 Random6mers 作为引物进行反转录,得到的 cDNA 用 PCR 检测。

结果如图 2 所示,circRNA-1565 在正常前列腺细胞系(RWPE-1)中表达量极低,在原位前列腺癌细胞系(22Rv1),激素依赖性前列腺癌细胞系(LNCap),雄激素非依赖性前列腺癌细胞系(C4-2)均有一定的表达,在前列腺癌脑转移细胞系(DU145)中表达水平较高,在前列腺癌骨转移细胞系(PC-3)中的表达水平最高。circRNA-1565 在转移性前列腺癌细胞系中高

表达,在非转移性前列腺癌细胞系中低表达。

表 2 不同样本 RNA 的定量质控

Table 2 Quantitative quality control of different sample RNA

Samples	OD260/280	OD260/230	Concentration(ng/L)	Volume(L)	Weight(g)
1	2.04	2.38	1874	35	65.59
2	2.05	2.37	1504	35	52.65
3	2.05	2.37	1529	35	53.53
4	2.06	2.34	2213	35	77.45
5	2.07	2.31	2475	35	86.63
6	2.05	2.31	2576	35	90.14
7	2.03	2.25	2941	35	102.93
8	2.03	2.24	3049	35	106.72
9	2.04	2.24	3041	35	106.43

Note: Sample 1~3 were from RWPE-1, 4~6 were from 22RV1, 7~9 were from PC3.

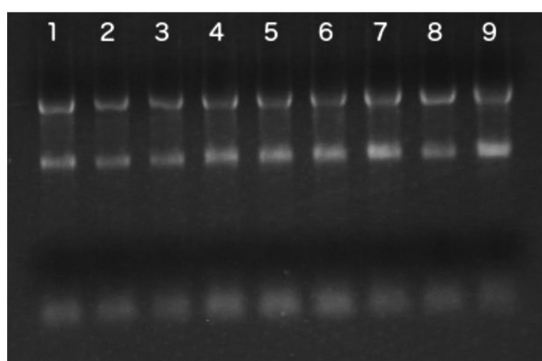


图 1 不同样本 RNA 的完整性质控

Fig.1 Control of the complete nature of different sample RNAs

Note: Sample 1~3 were from RWPE-1, 4~6 were from 22RV1, 7~9 were from PC3.

2.5 circRNA-1565 的成环性验证

circRNA 的成环机制主要包括:套索结构驱动成环^[9],内含子反向互补配对驱动成环^[10],以及依赖于 RBPs 模式的成环^[11]等。而这其中的核心就是反向配对剪切。如图 3 A 所示,正常线性分子(mRNA)是由经典的前向剪接模式剪接而成,而 circRNA 是由 RNA 前体反向剪接(下游的 3' 端与上游碱基序列的 5' 端连接)产生。由此 circRNA 产生了一些特殊的分子特性,我们利用这些分子特性来验证筛选到的这个 RNA 的成环性。

2.6 circRNA-1565 可用反向设计的引物进行扩增

由于 circRNA 是通过反向剪切配对形成的一种闭合环状碱基序列,因此除正常设计引物进行 PCR 扩增以外,在其接口处反向设计的引物亦可以对其进行 PCR 扩增。如图 3 B 所示,我们在对 PCR 产物进行电泳时发现,由 circRNA-1565 反转录而来的 cDNA 和直接抽提的基因组 gDNA 均可由正常设计的对向引物进行 PCR 扩增实验,而只有 circRNA-1565 反转录而来的 cDNA 可以由反向引物进行 PCR 扩增实验,gDNA 不能由此进行扩增,因此没有扩增产物。内参基因为 β -Actin。

2.7 circRNA-1565 不可被 RNase R 消化

与线性分子相比,circRNA 是两端闭合的环状结构,其空

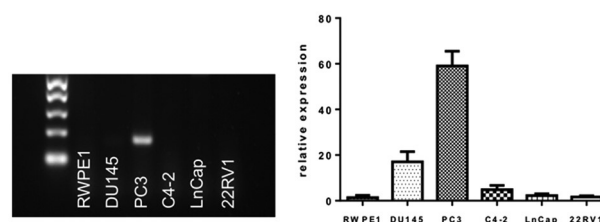


图 2 circRNA-1565 在前列腺癌细胞系中的表达

Fig.2 Expression of circRNA-1565 in prostate cancer cell lines

间稳定性较好,不易被 RNA 酶 R 消化(RNase R),而线性 RNA (mRNA)可被 RNase R 消化(两者均可被 RNase A 消化^[12])。因此在本实验中,我们对抽提得到的 RNA 进行了 15 min 的消化处理,然后分别用对向引物和反向引物对其进行 PCR 扩增,最后对扩增产物进行核酸凝胶电泳,结果如图 3 C。线性 RNA(mRNA)对 RNase R 的抗性差,用 RNase R 消化后线性 RNA 的丰度下降明显。而环状 RNA(circRNA-1565)对 RNase R 的抵抗性较高,理论上消化后丰度下降不明显,在本实验中 circRNA-1565 消化后丰度亦有些许下降,推测可能与消化时间、温度及酶的浓度有关。

2.8 circRNA-1565 不能用 Oligo(dT)作为引物进行反转录

用 Oligo(dT)作为引物进行反转录是一种对 mRNA 特异的反转录方法。大多数 mRNA 具有 Poly(A+)尾,Oligo(dT)可与其配对互补。而环状 RNA(circRNA-1565)由于是两端闭合的环状结构,没有 Poly(A+)尾,因此无法使用 Oligo(dT),只能用随机六聚体(Random 6 mers)作为反转录引物^[13]。如图 3 D 所示,线性 RNA(mRNA)可以同时应用 Oligo(dT)和 Random 6 mers 作为引物,而 circRNA-1565 只能应用 Random 6 mers 作为引物进行反转录,而应用 Oligo(dT)作为引物进行反转录后不能得到有效的 cDNA,更不能用于 PCR 检测。

我们筛选出的 circRNA(circRNA-1565)是一条有效的、具有环状结构的 RNA 分子。

2.9 circRNA-1565 的细胞内亚定位

了解一个分子的细胞内亚定位对于研究其功能有着至关

重要的提示作用。circRNA 的功能较为复杂,如可以作为内源性竞争 RNA(ceRNA),起到 miRNA sponge 的作用^[14];可以调控

可变剪切或转录过程^[15];可以调控亲本基因的表达^[16];可翻译蛋白等^[17]。因此研究 circRNA 的细胞内定位有十分关键的意义。

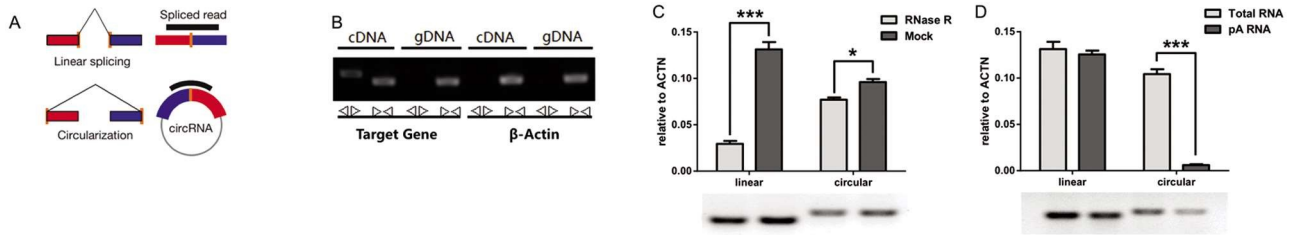


图 3 circRNA-1565 的成环性验证
Fig.3 Cyclonicity verification of circRNA-1565

我们采用核质分离实验和荧光原位杂交技术(FISH)两种试验方法在 circRNA-1565 高表达细胞系 PC3 细胞中进行实验研究。在核质分离实验中,我们首先用核质分离试剂盒将离心后的 PC3 细胞分为胞质部分和胞核部分,然后同时做反转录,最后将得到的 cDNA 分别做 circRNA-1565,相对应 mRNA,内参 β -actin 和 U6 的 PCR 定量检测。结果如图 4 所示,circRNA-1565 主要分布于胞质,在胞核中亦有较少分布。其中,

β -actin 是已知主要定位于胞质部分的 mRNA,可作为胞质定位 RNA 的阳性对照,而 U6 是定位于胞核部分的 RNA,因此作为细胞核定位 RNA 的阳性对照。

同时,为了更直观的显示其在细胞内的亚定位,我们在 PC3 细胞内做了更直观的 FISH 实验。如图 5 所示,circRNA-1565 主要分布于细胞质,结果与核质分离结果一致,以上数据说明, circRNA-1565 是主要定位细胞质内的 circRNA。因此,提示我们, circRNA-1565 可能主要通过 miRNA sponge 途径来发挥生物学作用。

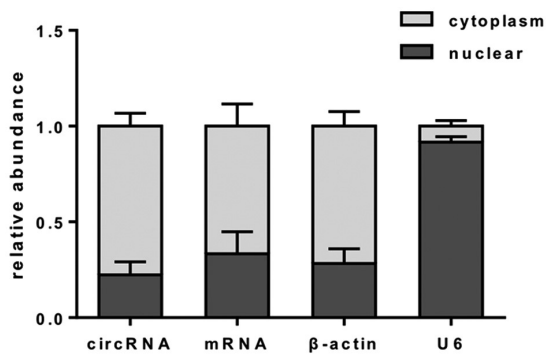


图 4 circRNA-1565 的核质分离实验
Fig.4 Nuclear separation experiment of circRNA-1565

3 讨论

前列腺癌是男性最常见的肿瘤之一,其发病率在全球范围内位居男性癌症发病率的第 3 位,病死率位居第 6 位^[1]。我国前列腺癌患者肿瘤分期晚,远处转移多^[18]。目前尚无法完全明确前列腺癌转移的作用机制,也没有明确的外周血标志物能够预测前列腺癌是否存在早期转移。前列腺癌的远处转移部位包括骨、肺和肝脏等,其转移机制尚未完全阐明^[19]。但可以肯定的是,前列腺癌是一种由复杂的多因素共同导致的恶性疾病,前列腺癌的转移是复杂的分子网络调节异常的结果。

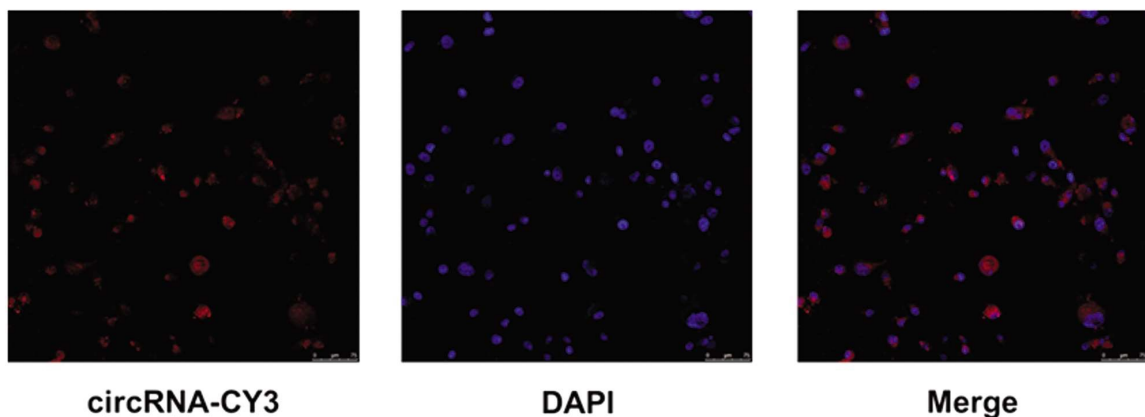


图 5 RNA FISH 检测 circRNA-1564 的细胞内亚定位
Fig.5 RNA FISH detection of intracellular sublocalization of circRNA-1564

近年来,随着科学研究的深入,RNA-Seq 等研究手段日渐成熟,非编码 RNA 的作用日益被重视。人们发现有一种新的内源性非编码 RNA 类型:环状 RNAs(circular RNA, circRNA)。它是一类具有闭合环状结构特点的非编码 RNA^[3],一些研究显

示, circRNA 在基因调控中扮演着重要角色^[20]。其具有稳定性、组织细胞和发育的时空特异性以及保守性等生物学特性^[21]。这些研究表明, circRNA 并不是细胞中的"剪切副产物",而是细胞内不可或缺的部分,具有重要的生物学功能。对 circRNA 生

生物学功能的研究显示, circRNA 参与了复杂的 RNA-RNA 调控网络。其中, 已知大部分 circRNA 包含若干个 miRNA 结合位点, 其具有 miRNA sponge 的功能, 为一种新型的竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)。另外, 也有研究显示, circRNA 可与 U1 snRNP、RNA 聚合酶 II 等蛋白相互作用, 调控亲本基因的表达^[22,23]。

研究表明 circRNAs 与多种肿瘤的发生发展关系密切, 其中包括甲状腺癌、肺癌、子宫内膜癌、结直肠癌、食管癌等^[22-27]。表达的广泛性、高稳定性及多种不同的调节作用机制使得 circRNAs 在癌症的早期诊断和治疗方面成为新的热点。有研究显示^[28,29], 某些 circRNAs 在肿瘤组织中的表达明显低于其在正常组织中的表达, 并与肿瘤的转移、临床分期, 发病年龄等指标明显有关。

虽然越来越多的证据显示, circRNAs 与肿瘤的发生发展有关, 并有望成为肿瘤的新型生物标志物甚至治疗靶点^[30]。因此, 研究前列腺癌中 circRNA 的表达特征以及其肿瘤生物学功能, 有着十分重要的科学意义和潜在的临床应用价值。

在本研究中, 我们培养了多株前列腺癌和正常前列腺细胞系。在常规细胞培养后对其 RNA 抽提并质检后进行实验操作。circRNA-1565 作为研究对象。其作为一条有效、具有环状结构的 RNA 分子, 在转移性前列腺癌细胞系中表达量高, 在非转移性前列腺癌细胞系中表达量低, 在前列腺正常正常细胞系中表达量极低。circRNA-1565 作为一条全新的 circRNA 尚未见报导, 功能机制等尚不明确。我们通过研究发现它主要定位于细胞的胞质部分, 推测其可能主要通过 miRNA sponge 途径来发挥生物学作用。但需要进一步实验来证明其在前列腺癌发生发展及转移中的作用。为诊断前列腺癌的转移提供了潜在的血浆标记物, 进一步分析前列腺癌转移的分子机制, 寻找治疗转移性前列腺癌的分子靶标提供了重要理论依据。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34
- [2] Dahm P, Wilt T. In early prostate cancer, radical prostatectomy reduced mortality more than watchful waiting at 23 years[J]. Ann Intern Med, 2019, 170(8): JC44
- [3] Atianand M K, Fitzgerald K A. Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system[J]. Trends Mol Med, 2014, 20(11): 623-631
- [4] Holdt L M, Stahringer A, Sass K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans[J]. Nat Commun, 2016, 7(8): 12429
- [5] Yao Z, Luo J, Hu K, et al. ZKSCAN1 gene and its related circular RNA (circZKSCAN1) both inhibit hepatocellular carcinoma cell growth, migration, and invasion but through different signaling pathways[J]. Mol Oncol, 2017, 11(4): 422-437
- [6] 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
- [7] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, et al. Translation of CircRNAs[J]. Mol Cell, 2017, 66(1): 9-21
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Zhang X O, Wang H B, Zhang Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. Cell, 2014, 159(1): 134-147
- [11] 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
- [12] Du W W, Fang L, Yang W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(2): 357
- [13] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong J C, et al. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations [J]. Cell, 2016, 165(2): 289-302
- [14] 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
- [15] Li Z., Huang C, Bao C, Chen L, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22, 256-264
- [16] 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]. EMBO J, 2011, 30(21): 4414-4422
- [17] Pamudurti N R, Bartok O, Jens M, et al. Translation of circRNAs[J]. Mol cell, 2017, 66(1): 9-21. e7
- [18] 孙铭强, 张建勇, 袁琰, 等. 前列腺癌患者组织中 RPL6 的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(4): 745-749
- [19] Agarwal V, Subtelny AO, Thiru P, et al. Predicting microRNA targeting efficacy in Drosophila[J]. Genome Biol, 2018, 19(1): 152
- [20] Cocquerelle C, Mascré B, Hetuin D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules[J]. FASEB J, 1993, 7(1): 155-160
- [21] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Lett, 2015, 365(2): 141-148
- [22] 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
- [23] Dou Y, Cha D J, Franklin J L, et al. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes[J]. Sci Rep, 2016, 6(11): 37982
- [24] Ahmed I, Karedath T, Andrews S S, et al. Altered expression pattern of circular RNAs in primary and metastatic sites of epithelial ovarian carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(24): 36366
- [25] Chen J, Li Y, Zheng Q, et al. Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer[J]. Cancer lett, 2017, 388(3): 208-219
- [26] Xia W, Qiu M, Chen R, et al. Circular RNA has_circ_0067934 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and promoted proliferation[J]. Sci Rep, 2016, 6(10): 35576
- [27] Yang P, Qiu Z, Jiang Y, et al. Silencing of cZNF292 circular RNA suppresses human glioma tube formation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(39): 63449-63455
- [28] Guo Q, He Y, Sun L, et al. In silico detection of potential prognostic circRNAs through a re-annotation strategy in ovarian cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 17(4): 3677-3686
- [29] Su W, Sun S, Wang F, et al. Circular RNA hsa_circ_0055538 regulates the malignant biological behavior of oral squamous cell carcinoma through the p53/Bcl-2/caspase signaling pathway [J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 76
- [30] Lu J, Zhang PY, Li P, et al. Circular RNA hsa_circ_0001368 suppresses the progression of gastric cancer by regulating miR-6506-5p/FOXO3 axis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 512(1): 29-33