

# circRNA 及其调控动物骨骼肌发育研究进展

郑婷<sup>1</sup>, 甘麦邻<sup>1</sup>, 沈林园<sup>1</sup>, 牛丽莉<sup>1</sup>, 郭宗义<sup>2</sup>, 王金勇<sup>2</sup>, 张顺华<sup>1</sup>, 朱砺<sup>1</sup>

1. 四川农业大学动物科技学院, 成都 611130

2. 重庆市畜牧科学院, 荣昌 402460

**摘要:** 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类反向剪接形成的闭环状 RNA 分子, 广泛存在于生物体内, 近年来成为非编码 RNA 中的研究热点。骨骼肌在生物体中起到协调运动的作用, 是维持体内正常代谢和内分泌的器官之一。随着测序技术和生物信息学分析技术的发展, circRNA 在动物骨骼肌发育中的功能和调控机制逐渐被揭示。本文就当前 circRNA 的分子调控机制类型、circRNA 经典研究思路及功能研究方法以及 circRNA 参与骨骼肌正常发育与骨骼肌疾病发生调控的研究进展进行了综述, 以期为进一步深入研究 circRNA 参与骨骼肌生长发育调控的遗传机制以及 circRNA 相关研究方法提供参考。

**关键词:** 环状 RNA; 骨骼肌发育; 骨骼肌疾病; RNA 测序

## circRNA on animal skeletal muscle development regulation

Ting Zheng<sup>1</sup>, Mailin Gan<sup>1</sup>, Linyuan Shen<sup>1</sup>, Lili Niu<sup>1</sup>, Zongyi Guo<sup>2</sup>, Jinyong Wang<sup>2</sup>,  
Shunhua Zhang<sup>1</sup>, Li Zhu<sup>1</sup>

1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

2. Chongqing Academy of Animal Sciences, Rongchang 402460, China

**Abstract:** Circular RNA (circRNA) is a type of closed circular RNA molecules formed by reverse splicing, which exists widely in organisms and has become a research hotspot in non-coding RNAs in recent years. Skeletal muscle plays the role of coordinating movement and maintaining normal metabolism and endocrine in organisms. With the development of sequencing and bioinformatics analysis technology, the functions and regulation mechanisms of circRNAs in skeletal muscle development have been gradually revealed. In this review, we summarize the types of molecular regulatory mechanisms, the classical research ideas and the functional research methods of circRNAs, and the research progress of circRNAs involved in normal development of skeletal muscle and regulation of skeletal muscle

收稿日期: 2020-07-06; 修回日期: 2020-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31972524), 国家现代农业产业技术体系四川生猪创新团队项目(编号: SCSZTD-3-008)和四川省科技支撑计划项目(编号: 2016NYZ0050)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31972524), Sichuan Pig Innovation Team Project of National Modern Agricultural Industrial Technology System (No. SCSZTD-3-008), and the Science and Technology Program of Sichuan Province (No. 2016NYZ0050)]

作者简介: 郑婷, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: 741377392@qq.com

通讯作者: 张顺华, 博士, 助理研究员, 硕士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: 363445986@qq.com

朱砺, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: zhuli7508@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-207

网络出版时间: 2020/12/2 15:43:23

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20201202.1335.002.html>

disease, in order to provide a reference to further study of the genetic mechanisms of circRNAs in the regulation of skeletal muscle development.

**Keywords:** circRNA; skeletal muscle development; skeletal muscle diseases; RNA-seq

骨骼肌是动物体执行运动功能的重要器官,同时也是体内重要的内分泌和代谢器官,与动物有机体的正常生长发育密切相关<sup>[1,2]</sup>。骨骼肌中肌纤维是由大量单核成肌细胞融合成多核肌管,进一步分化成熟而来。肌纤维聚集形成肌束,大量肌束和结缔组织、毛细血管等共同构成了肌肉组织<sup>[3,4]</sup>。研究表明, MRFs (myogenic regulator factors)<sup>[5,6]</sup>、MEF2 (myocyte enhance factor 2)<sup>[7]</sup>、MSTN (myostatin)<sup>[8]</sup>和 Pax 基因家族<sup>[9]</sup>参与调控骨骼肌发育的基本过程。除了这些编码基因,越来越多的非编码 RNA 也参与调控骨骼肌生长发育过程,主要包括微小 RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和环状 RNA (circular RNA, circRNA)<sup>[10-12]</sup>。

近年来, circRNA 的相关研究日益增多,这种非编码 RNA 具有表达特异性,且在生物体内不易被降解,在生物体发育和肿瘤发生过程中的生物学功能被逐渐揭示。本文归纳了 circRNA 的分子调控机制,分析了 circRNA 经典研究方法,并结合 circRNA 在骨骼肌发育调控方面的最新研究,对 circRNA 在骨骼肌正常生长发育与相关疾病发生中的调控作用进行了总结,以期为进一步阐明 circRNA 参与骨骼肌发育的遗传调控机制提供参考,为探究 circRNA 生物学功能提供研究思路。

## 1 circRNA 的产生及作用机制

### 1.1 circRNA 产生方式及特征

circRNA 通过反向剪接形成闭合环状 RNA 分子。目前发现的 circRNA 生物形成方式包括直接反向剪切、外显子跳跃、内含子的反义互补序列配对模式、依赖于 RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)的环化模式以及类似于可变剪切的可变环化模式等。Gao 等<sup>[13]</sup>对 circRNA 外显子结构和可变剪接事件进行了研究,发现 circRNA 普遍是通过可变

剪接形成的,并且大部分 circRNA 由外显子剪接形成(ecircRNAs),主要存在于细胞质(图 1A);由内含子剪接环化的 circRNA (ciRNAs)主要存在于细胞核中(图 1C);一小部分既含外显子也含内含子的 circRNA (EciRNAs),主要也存在于细胞核中(图 1B)<sup>[14-16]</sup>。circRNA 因其闭合环状的结构,在细胞中不易被 RNA 核酸外切酶降解,稳定性好。此外,大部分 circRNA 在不同物种间是进化保守的, circRNA 在不同组织或发育阶段的表达模式具有较强的组织时空特异性<sup>[17]</sup>。另外,已经有大量研究发现 circRNA 与许多疾病的发生和发展有关<sup>[18,19]</sup>,有潜力成为疾病诊断的生物标志物。

### 1.2 circRNA 功能调控机制

目前普遍认可的 circRNA 分子调控机制包括:竞争性结合 miRNA 分子;调控基因的转录;与 RBPs 互作间接调控 RNA 或 DNA;参与蛋白质翻译过程;作为蛋白质支架促进蛋白酶化学修饰(图 1)<sup>[12,20-22]</sup>。

#### 1.2.1 circRNA 竞争性吸附 miRNA

这类 circRNA 含有 miRNA 结合位点,能竞争性吸附 miRNA 进而调控 miRNA 下游靶 mRNA 表达(图 1E)。在生物体中这类 circRNA 大多是由外显子剪接而成的 ecircRNA。现已发现相当数量的竞争性内源 circRNA,如 Hansen 等<sup>[23]</sup>在人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)脑组织中发现一种高表达的 *circCDS1as*,含有至少 70 个 miR-7 的结合位点,间接调控相关靶基因表达;由性别决定基因 *Sry* (sex-determining region Y)剪接形成的 *circRNA Sry* 含有至少 16 个 miR-138 结合位点,作为 miR-138 分子海绵发挥调控作用<sup>[23]</sup>。

#### 1.2.2 circRNA 调控亲本基因转录

细胞核中的 ciRNAs 能够与 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II)相互作用,从而促进其自身编码基因的转录(图 1D),如在人细胞中首次发现的 ciRNA

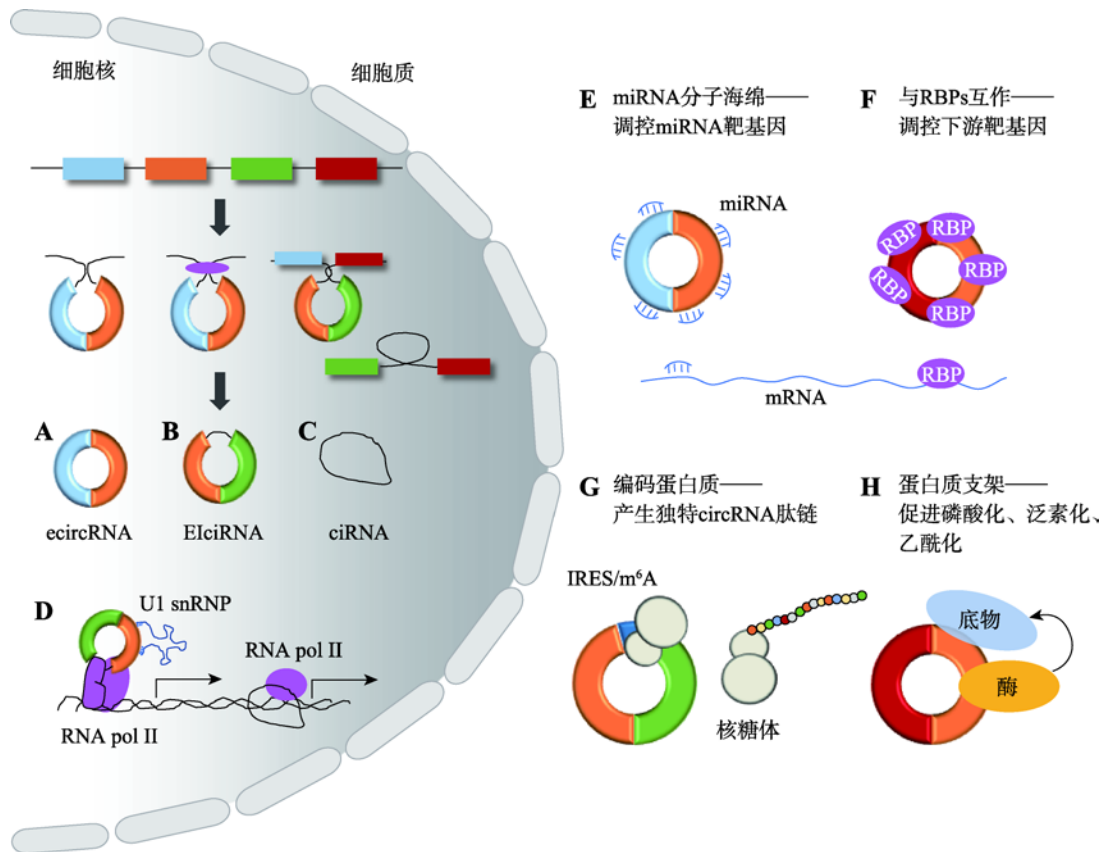


图 1 circRNA 产生的方式及生物学功能

Fig. 1 The synthesis and biological functions of circRNA

A: 外显子剪接形成的 ecircRNA; B: 既含外显子又含内含子的 EIciRNA; C: 内含子剪接形成的 ciRNA; D: circRNA 调控亲本基因转录; E: circRNA 竞争性结合 miRNA; F: circRNA 与 RBPs 互作; G: circRNA 自身翻译蛋白质; H: circRNA 作为蛋白质支架, 促进酶及其底物的共域化。参考文献[12,20~22]总结绘制。

(*ci-ankrd52*), 在亲本基因转录位点上大量积累, 发挥顺式调控作用<sup>[15]</sup>。此外, EIciRNAs 能够与 Pol II 和 U1 小核核糖核蛋白(U1 small nuclear ribonucleoproteins, snRNP)结合, 促进其亲本基因的转录(图 1D), 如 Li 等<sup>[16]</sup>发现的一种 EIciRNA (*circPAIP2*)。

### 1.2.3 circRNA 与 RBPs 结合互作

circRNA 可以直接与蛋白质相互作用形成 RNA-蛋白质复合物(RNA-protein complex, RPC), 进一步与 RNA 或 DNA 结合发挥调控作用(图 1F)<sup>[24]</sup>, 如 *circCDR1as* 能与 miRNA 效应因子 AGO 蛋白相结合<sup>[25]</sup>。另外, Ashwal-Fluss 等<sup>[26]</sup>发现在人和果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 盲肌基因 *MBL* (muscle-blind) 第二个外显子环化形成的 *circMbl*, 与 MBL 蛋白特异性结合, 平衡体内 *circMbl* 和 *MBL* mRNA 的

水平进而发挥调控作用。

### 1.2.4 circRNA 参与蛋白质翻译

有研究发现, 具有内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)的 circRNA 可以招募核糖体启动翻译机制(图 1G), 如 *circFBXW7* 编码蛋白质 FBXW7-185aa 抑制了胶质瘤细胞的增殖<sup>[27]</sup>; *circ-ZNF609* 作为一种可以翻译蛋白质的 circRNA, 在肌生成过程中也发挥调控作用<sup>[28]</sup>。

### 1.2.5 circRNA 作为蛋白质支架促进酶及其底物的共域化

*circ-Amotl1* 与 AKT1 (protein kinase B)和 PDK1 (phosphoinositide dependent protein kinase 1)结合, 促进 AKT1 的 PDK1 依赖性磷酸化, 激活 AKT1 在小

鼠模型中起到心脏保护作用<sup>[29]</sup>; *circFoxo3* 可以促进小鼠双微粒体基因 *MDM2* (murine double minute 2) 介导的 p53 突变体泛素化, 促使其靶向蛋白酶体降解<sup>[30]</sup> (图 1H)。

## 2 circRNA 研究策略

总结现有研究报道, circRNA 的经典研究思路是基于生物学问题, 通过转录组测序技术(RNA-seq)或微阵列芯片检测(Microarray)得到 circRNA 数据集, 筛选出两种或多种差异表型样本间的差异 circRNA, 接着对差异 circRNA 进行鉴定和软件分析, 补充相应的 circRNA 数据库信息, 再结合生物信息学分析手段, 预测 circRNA 生物学功能, 完成后续功能验证。

### 2.1 circRNA 的发现与鉴定手段

近年来, 研究非编码 RNA 在特定细胞或组织中某一特定时刻的表达和功能, RNA-seq 成为有力的研究工具, 也是目前 circRNA 研究中最常见的测序手段<sup>[31]</sup>。针对 circRNA 研究, RNA-seq 包括文库构建、上机测序、数据分析处理与功能预测等基本流程<sup>[32]</sup>。根据不同的研究目的与需求, 研究者通常选择全转录组测序或 circRNA 测序来实现对 circRNA 的筛选。前者可同时探究编码和非编码 RNA 的表达模式, 适用于 circRNA 生物学功能研究; 后者则适用于 circRNA 的富集, 有助于挖掘未知 circRNA。两者主要差异在于测序文库的构建, circRNA 测序文库除了要求去除绝大多数 rRNA 和 poly(A)外, 需用核糖核酸外切酶 RNase R 处理去除线性 RNA 的干扰。大多数研究报道显示去线性 RNA 后得到的 circRNA 丰度降低, 因为某些 circRNA 对 RNase R 敏感而可能被消化<sup>[33,34]</sup>。目前已发现的 circRNA 数量差异很大, 从几百到几千不等。这种可变性可能与 RNA 样本预处理的方式、测序的深度以及用于数据筛选的过滤器等因素有关。值得注意的是, circRNA 的可变剪接对区分测序结果中的正反义链来源有要求, 因此 circRNA 测序最好构建链特异性文库, 能够更准确地检测转录表达水平<sup>[35]</sup>。

得到 circRNA 测序数据后, 通常基于

find\_circ<sup>[36~38]</sup>、CIRCexplorer2<sup>[36,38]</sup>与 CIRI<sup>[36~38]</sup>等识别软件, 对 circRNA 进行预测鉴定。Hansen 等<sup>[39]</sup>建议结合使用 MapSplice 与 circRNA finder 这两个软件算法, 更能提高预测的可靠性。由于软件算法使用的要求各不相同, 假阳性率存在很大差异, 故由算法检测到的 circRNA 需要进一步验证。为鉴定 circRNA 的存在, 通常使用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)<sup>[40]</sup>、Northern 印迹杂交(Northern blot)<sup>[27]</sup>、原位杂交(*In situ* hybridization, ISH)<sup>[41]</sup>、RPAD(RNase R treatment, polyadenylation, and poly(A)+ RNA Depletion)<sup>[42]</sup>等技术检测 circRNA。

Microarray 芯片也是分析检测 circRNA 的有效工具, 在许多疾病肿瘤的临床诊断和监测中广泛应用。Microarray 的检测成本及分析难度都低于 RNA-seq, 它们主要区别在于: (1) Microarray 检测 circRNA 必须有已知参考序列, 而 RNA-seq 能检测未知 circRNA; (2) Microarray 检测的本质是核酸杂交, 可定量 circRNA 表达, 而 RNA-seq 则不能准确定量 circRNA<sup>[43]</sup>; (3) Microarray 可高效检测反向剪接位点序列, 相比 RNA-seq 可得到更大数量的 circRNA<sup>[44]</sup>。Microarray 为 circRNA 的发现提供了高灵敏度和特异性的平台, 也提供了高效的 circRNA 标记系统。然而 Microarray 检测的缺点之一是对样品进行预处理需要高的总 RNA 输入, 利用 Microarray 芯片也得不到全转录组测序所得对应的线性 RNA 数据<sup>[45]</sup>。在参考序列未知的情况下, 很多研究通常先用 RNA-seq 测得全转录组序列, 再通过 Microarray 对 circRNA 进行深入分析。

### 2.2 circRNA 生物学功能的研究策略

如图 1 所示, circRNA 的功能调控机制多样, 包括竞争性吸附 miRNA、与 RNA 结合蛋白互作、在翻译水平编码蛋白质等。研究人员通常利用实验技术调控 circRNA 表达水平, 揭示 circRNA 与其他分子的相互作用以阐明 circRNA 的功能。

#### 2.2.1 circRNA 竞争性吸附 miRNA

验证 circRNA 竞争性结合 miRNA 从而调控下游效应基因是目前 circRNA 功能研究中最常见、



且相对较为成熟的研究方向。通常情况下, 利用 RNA-seq 数据找到可能具有生物学功能的差异表达 circRNA, 分别将预测的靶 miRNA、靶 mRNA 和差异表达 miRNA、mRNA 取交集, 构建 circRNA-miRNA-mRNA 网络调控图, 再利用软件进行 GO (gene ontology) 功能注释和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路分析<sup>[46,47]</sup>, 预测相关 circRNA 的生物学功能和调控通路。结果表明, 大量 circRNA 具有 miRNA 的结合位点, 但它们的结合关系和相互作用还需要严谨的实验验证。通常利用双荧光素酶报告系统、RNA pull down 等实验技术进行结合关系的验证<sup>[48-51]</sup>, 通过 circRNA 功能获得缺失实验, 验证其对靶 miRNA 和靶基因的功能调控作用<sup>[51,52]</sup>。

### 2.2.2 circRNA 与 RBPs 互作

虽然与对应线性 RNA 相比, circRNA 与 RBPs 的结合位点很少被发现富集, 但也有不少研究证实了两者之间的功能调控关系。目前 circRNA 与蛋白的相互作用主要通过 RNA pull-down 和 RNA 免疫沉淀法(RNA immunoprecipitation, RIP)分析<sup>[53,54]</sup>。根据 circRNA 反向剪接位点(back-splice junction region, BSJ)设计探针, 获取目标 circRNA, 其相关蛋白可以利用 Western Blot 或质谱法进行分析鉴定<sup>[55,56]</sup>。另外, 为了鉴定与感兴趣的蛋白相关的 circRNA, 也可以使用针对该蛋白的抗体进行 RIP 分析<sup>[57,58]</sup>, 并使用交联免疫沉淀法(crosslinking immunoprecipitation, CLIP)定位 circRNA 上确切的蛋白结合位点<sup>[54,57]</sup>。为避免线性 RNA 的干扰, 在 RNA pull-down 和免疫沉淀之前, 必须去除线性 RNA。

### 2.2.3 circRNA 编码蛋白质

目前已发现有的 circRNAs 能够被翻译成多肽, 形成特殊的功能蛋白质。研究发现, 编码蛋白的 circRNA 具有开放阅读框(open reading frame, ORF)、内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)或 N<sup>6</sup>-甲基腺苷(N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 基序<sup>[59-62]</sup>。目前 ORFfinder<sup>[63]</sup>、IRESfinder<sup>[64]</sup>、m<sup>6</sup>Apred<sup>[65]</sup>等多种生物学工具能够辅助预测 circRNA 中潜在的 ORF、IRES 和 m<sup>6</sup>A 序列。预测 circRNA

编码潜能后, 还需从多个方面对 circRNA 的编码功能进行验证。通过深度测序结合核糖体印记技术, 可以筛选出与核糖体结合的 circRNA<sup>[66]</sup>; 在 circRNA 预测的 ORF 终止密码子上游插入特异蛋白标签, 通过检测标签蛋白免疫荧光探针来验证 circRNA 的翻译功能<sup>[27,61,67]</sup>。通过标签研究 circRNA 编码的肽段, 既能识别可能与 circRNA 衍生肽段互作的 RNA 或蛋白, 又能揭示 circRNA 肽段的亚细胞定位<sup>[27,28,68]</sup>。研究 circRNA 衍生肽的生物学功能, 通过敲低或过表达目的 circRNA 或设计特定细胞刺激, 检测 circRNA 蛋白产物水平, 分析其对基因表达谱及表型的影响<sup>[68]</sup>。

## 3 circRNA 参与骨骼肌发育调控

随着 circRNA 研究策略和方法的不断成熟, circRNA 在动物体内发挥的多种生物学功能被逐渐揭示。在动物骨骼肌发育进程中, 成肌细胞的增殖和分化、肌卫星细胞活化促进肌肉再生等一系列过程, 都离不开肌生成相关编码基因家族的调控<sup>[8,9]</sup>。同时随着研究技术与手段的更迭发展, 越来越多 circRNA 被发现与肌生成、肌纤维类型转化和骨骼肌疾病发生等过程密切相关。

### 3.1 circRNA 参与骨骼肌正常生长发育的调控

动物骨骼肌从胚胎期到出生后, 经历了骨骼肌卫星细胞活化以及成肌细胞增殖、分化、凋亡等过程<sup>[2]</sup>。研究表明, 人、模式动物和家养动物的骨骼肌中都存在 circRNA, 并且不同生长发育阶段的骨骼肌中 circRNA 呈时序表达特异性<sup>[69-71]</sup>。

#### 3.1.1 不同 circRNA 参与骨骼肌不同生长发育进程

Wei 等<sup>[72]</sup>从幼年到老年的恒河猴(*Rhesus macaque*)骨骼肌样本中鉴定出 12,007 个 circRNAs, 发现并证实其中有 5 个 circRNAs 表达水平随年龄增长而下调。同样, 猪(*Sus scrofa*)不同胚胎时期肌肉中 circRNA 也呈现动态表达, 并随着胚胎骨骼肌的生长发育进程, 部分 circRNA 表达水平显著下调<sup>[73]</sup>。这种动态表达模式提示不同 circRNA 在动物骨骼肌发育各阶段起到不同的调控作用。



表 1 circRNA 参与不同动物骨骼肌发育的调控

Table 1 circRNAs involved in the regulation of skeletal muscle development in different animals

circRNA	物种	可能作用机制	生物学功能	参考文献
<i>circZNF609</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	编码蛋白质	促进成肌细胞增殖	[28]
<i>circZNF609</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	编码蛋白质	促进成肌细胞增殖	[28]
<i>circLMO7</i>	牛( <i>Bos taurus</i> )	吸附 <i>miR-378-3p</i> , 靶基因为 <i>HDAC4</i>	促进成肌细胞增殖, 抑制分化和凋亡	[70]
<i>circRBFox2</i>	鸡( <i>Gallus gallus</i> )	吸附 <i>miR-206</i> , 靶基因为 <i>CCND2</i>	促进成肌细胞增殖	[74]
<i>circFUT10</i>	牛( <i>Bos taurus</i> )	吸附 <i>miR-133a</i> , 靶基因为 <i>SRF</i>	抑制成肌细胞增殖, 促进成肌细胞分化	[75]
<i>circSVIL</i>	鸡( <i>Gallus gallus</i> )	吸附 <i>miR-203</i> , 靶基因为 <i>c-Jun</i> 、 <i>MEF2C</i>	促进成肌细胞增殖、分化	[76]
<i>circFGFR4</i>	牛( <i>Bos taurus</i> )	吸附 <i>miR-107</i> , 靶基因为 <i>Wnt3a</i>	促进成肌细胞分化, 诱导凋亡	[49]
<i>circZfp609</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	吸附 <i>miR-194-5p</i> , 靶基因为 <i>BCLAF1</i>	抑制成肌细胞分化	[77]
<i>circHIPK3</i>	鸡( <i>Gallus gallus</i> )	吸附 <i>miR-30a-3p</i> , 靶基因为 <i>MEF2C</i>	促进成肌细胞增殖、分化	[50]
<i>circFoxO3</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	吸附 <i>miR-138-5p</i>	抑制成肌细胞分化	[78]
<i>circSNX29</i>	牛( <i>Bos taurus</i> )	吸附 <i>miR-744</i> , 靶基因为 <i>Wnt5a</i>	抑制成肌细胞增殖、促进成肌细胞分化	[79]
<i>circTMTC1</i>	鸡( <i>Gallus gallus</i> )	吸附 <i>miR-128-3p</i> , 靶基因为 <i>MSTN</i>	抑制骨骼肌卫星细胞增殖、分化	[80]
<i>circCDR1as</i>	山羊( <i>Capra hircus</i> )	吸附 <i>miR-7</i> , 靶基因为 <i>IGF1R</i>	促进骨骼肌卫星细胞成肌分化	[81]
<i>circTTN</i>	牛( <i>Bos taurus</i> )	吸附 <i>miR-432</i> , 靶基因为 <i>IGF2</i>	促进成肌细胞增殖、分化	[82]
<i>circHIPK3</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	吸附 <i>miR-124-5p</i> 和 <i>miR-379-5p</i>	促进成肌细胞分化	[83]
<i>circTUT7</i>	猪( <i>Sus scrofa</i> )	吸附 <i>miR-30a-3p</i> , 靶基因为 <i>HMG20B</i>	促进胚胎肌生成相关基因转录	[73]
<i>circINSR</i>	牛( <i>Bos taurus</i> )	吸附 <i>miR-34a</i> , 靶基因为 <i>Bcl-2</i> 、 <i>CyclinE2</i>	促进成肌细胞增殖、抑制凋亡	[51]
<i>circHUWE1</i>	牛( <i>Bos taurus</i> )	吸附 <i>miR-29b</i> , 靶基因为 <i>AKT3</i>	促进成肌细胞增殖、抑制凋亡及分化	[84]
<i>circSamd4</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	与 PUR 蛋白结合	促进成肌细胞分化	[85]

除此之外, 还有研究揭示了 circRNA 对骨骼肌生长发育的其他调控机制。2017 年, Legnini 等<sup>[28]</sup>首次利用测序数据筛选出通过参与蛋白质编码发挥调控作用的 circRNA, 将其命名为 *circZNF609*。*circZNF609* 在人和小鼠中有较高同源性, 反向剪接时形成了一个开放阅读框, 能够在应激条件下被特殊翻译成蛋白质发挥作用, 可能促进成肌细胞增殖。此外, Pandey 等<sup>[85]</sup>发现 *circSamd4* 与 PUR 蛋白相结合, 阻遏 PUR 蛋白对 *MHC*(myosin heavy chain)基因转录的拮抗作用, 从而促进成肌细胞分化, 加快骨骼肌生长发育进程。这是首次发现 circRNA 通过与 RBPs 协同作用发挥对骨骼肌生长发育的调控作用。

### 3.1.3 circRNA 参与骨骼肌纤维类型转换过程调控

不同类型骨骼肌纤维具有不同的生理学特性,

在动物骨骼肌发育过程中, 成熟分化的肌管将逐渐转变为不同功能类型的肌纤维, 包括氧化型和酵解型肌纤维, 又称慢肌和快肌纤维。目前有研究表明, circRNA 可能参与骨骼肌纤维生理功能调控及肌纤维类型转换调控。Shen 等<sup>[87]</sup>选取处于生长拐点青峪猪的腰大肌和背最长肌, 测序获得这两种类型肌肉的 mRNA、lncRNA 和 circRNA 差异表达谱, 发现氧化型和酵解型肌肉不同的生理特性与其中差异表达的 circRNA 存在相关, 这些 circRNA 的宿主基因被发现参与 ATP 代谢、快慢肌纤维转换等生理过程。值得关注的是, 其中 3 个 circRNA 是由肌纤维分型相关的 *MYH1*、*MYH2* 和 *MYH7* 基因转录形成。研究提示 circRNA 在不同类型骨骼肌发育过程中起到特异的调控功能, 并且 circRNA 还可能参与骨骼肌纤维类型转换过程的调控, 其分子机制有待深入研究。

Li 等<sup>[88]</sup>通过测序技术从猪快肌(肱二头肌)和慢肌(比目鱼肌)中分析 circRNA 差异表达谱, 找到 242 个差异表达 circRNAs, 通过 GO 和 KEGG 分析发现这些差异表达 circRNA 宿主基因也与骨骼肌纤维类型形成的相关通路和生理过程有关, 包括 cGMP-PKG 和 AMPK 信号通路, 肌肉收缩、肌肉结构发育等生理学过程。此外, 该研究还发现其中许多差异表达 circRNA 可能通过竞争性结合 *miR-499-5p*, 参与调控肌纤维类型相关的骨骼肌疾病发生过程。circRNA 在动物骨骼肌纤维发育形成及发挥生理功能上具有潜在作用, 有助于进一步理解动物骨骼肌生长发育的表观遗传机制。

3.2 circRNA 参与骨骼肌病理变化过程的调控

circRNA 可变剪接在不同组织和发育阶段受到严格的调控<sup>[89]</sup>, 其降解调控可能影响增殖信号转导、细胞凋亡、血管生成等生物学过程, 从而导致广泛的人类疾病<sup>[90]</sup>。在动物正常的骨骼肌中通常可检测到高表达的 circRNA<sup>[70,91]</sup>, 而在肌肉疾病病例中存在 circRNA 表达失调<sup>[92]</sup>。研究发现 circRNA 表达水平在肌营养不良症及心肌病等疾病中发生改变<sup>[93,94]</sup>, 这暗示了 circRNA 的表达失调可能与肌肉病理状态相关(表 2)。

杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种由于 *DMD* 基因发生移码突变, 主要是外显子缺失引起肌营养不良蛋白缺失, 从而产生肌无力等症状的疾病<sup>[95]</sup>。由 *DMD* 基因转录产物剪接生成的 circRNA 是最早在骨骼肌中被识别的环状 RNA 之一<sup>[96]</sup>。有研究表明, 由 *DMD* 基因 45~55 号外显子区域剪接产生的 circRNA, 可能使 *DMD* 基因外显子缺失的患者症状减轻<sup>[92,97]</sup>。也有研究分析了来自 DMD 患者和正常人成肌细胞的 RNA 测序结果, 发现 DMD 患者来源的成肌细胞在 circRNA 表达水平方面确实具有独特的差异特征<sup>[28]</sup>。有趣的是, 在正常成肌细胞体外分化过程中上调的 *circQKI* 和 *circBNC2* 在 DMD 患者来源的成肌细胞中表达下调<sup>[98]</sup>; 相反, 在正常成肌细胞肌生成过程中下调的编码蛋白的 *circZNF609*, 在 DMD 成肌细胞分化过程中表达水平上调<sup>[28]</sup>。另外, Song 等<sup>[99]</sup>从 DMD 模型小鼠的肌肉中鉴定出 197 个与对照组差异表达的 circRNAs; Weng 等<sup>[100]</sup>在坐骨神经损伤后的萎缩肌肉中鉴定出 236 个差异表达 circRNAs, 这些研究都表明 circRNA 与肌肉疾病病理过程有密切联系。

另一种肌营养不良症为 1 型肌强直性营养不良(myotonic dystrophy type 1, DM1)是一种由肌强直性营养不良蛋白激酶(myotonic dystrophy protein kinase,

表 2 circRNA 在肌肉病理过程的表达变化  
Table 2 The expression changes of circRNA in muscle pathology

circRNA	物种	组织/细胞	疾病类型	表达模式	参考文献
<i>circQKI</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	原代肌细胞	DMD	下调	[28]
<i>circBNC2</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	原代肌细胞	DMD	下调	[28]
<i>circZFP609</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	原代肌细胞	DMD	上调	[28]
<i>circCDYL</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	骨骼肌组织	DM1	上调	[103]
<i>circHIPK3</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	骨骼肌组织	DM1	上调	[103]
<i>circRTN4-03</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	骨骼肌/肌源性细胞	DM1	上调	[103]
<i>circZFP609</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	骨骼肌/肌源性细胞	DM1	上调	[103]
<i>circCAMSAP1</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	骨骼肌组织	DM1	上调	[102]
<i>circHIPK3</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	骨骼肌组织	DM1	上调	[102]
<i>circNFATC3</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	骨骼肌组织	DM1	上调	[102]
<i>circZfp609</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	骨骼肌组织	DM1	上调	[102]
<i>circBBS9</i>	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	骨骼肌组织	Sarcopenia	下调	[104]
<i>circCAMK2D</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	心肌组织	HCM/DCM	下调	[94]
<i>circTTN</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	心肌组织	DCM	下调	[94]

DMD: 杜氏肌营养不良; DM1: 1 型肌强直性营养不良; Sarcopenia: 老年性肌肉衰减症; HCM: 肥厚型心肌病; DCM: 扩张型心肌病。



*DMPK* 基因 3'UTR 的 CTG 重复扩增导致 mRNA 剪接异常的多系统疾病<sup>[101]</sup>。与在 DMD 患者来源成肌细胞中的结果相似, Czubak 等<sup>[102]</sup>发现 DM1 肌肉组织或细胞中, circRNA 也呈现特异性表达, 还初步发现 DM1 疾病程度与 circRNA 可变剪接变化之间的关联, 并且 circRNA 整体表达水平呈上调趋势, 在疾病个体中 *circ CDYL*、*circHIPK3*、*circRTN4\_03* 和 *circZNF609* 的环状/线性比均升高<sup>[28,103]</sup>(表 2)。目前需要对 circRNA 可变剪接相关疾病中大量表达的 circRNA 进行识别与鉴定, 以突出其在发病机制中的作用, 并开发未来的疾病治疗方法。

## 4 结语与展望

circRNA 的动态表达模式、复杂的调控机制和在不同细胞水平上扮演的新角色共同表明, 它们并不是非正常剪接的“噪声”, 而是在生物体发挥重要作用的新型调控分子。尽管大部分 circRNA 尚未被解析验证, 但已有数千个 circRNAs 在不同物种、不同组织中被识别。

目前针对动物骨骼肌 circRNA 的大量研究, 展现了 circRNA 在调控骨骼肌正常生长发育和骨骼肌相关疾病发生过程中的重要性及其分子机制的复杂性, 仍存在许多科学问题有待深入探究。已经发现相当数量的 circRNAs 作为 ceRNA 在骨骼肌细胞增殖、分化等过程发挥调控作用, 也有愈来愈多的研究者开始关注 circRNA 与骨骼肌纤维分型以及骨骼肌异常代谢发育的关系, 其在骨骼肌相关疾病诊断、监测过程中有重要意义。目前 circRNA 形成机制与 circRNA 转录后调控机制均未被完全阐明, circRNA 与蛋白质互作、调控亲本基因转录、参与编码蛋白质等一系列复杂的作用机制仍有待探索。

## 参考文献(References):

- [1] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(8): 457–465. [DOI]
- [2] Chal J, Pourqu   O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development*, 2017, 144(12): 2104–2122. [DOI]
- [3] Charg   SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 2004, 84(1): 209–238. [DOI]
- [4] Epstein HF, Fischman DA. Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science*, 1991, 251(4997): 1039–1044. [DOI]
- [5] Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, 1989, 56(4): 607–617. [DOI]
- [6] Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*, 1992, 71(3): 383–390. [DOI]
- [7] Wang YN. The roles of MEF2A in the regulation of skeletal muscle myoblasts proliferation and differentiation in Qinchuan beef cattle[Dissertation]. Northwest A&F University, 2019.  
王亚宁. MEF2A 对秦川牛骨骼肌成肌细胞增殖和分化的调控作用及机理研究[学位论文]. 西北农林科技大学, 2019. [DOI]
- [8] Whittemore LA, Song K, Li XP, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(4): 965–971. [DOI]
- [9] Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 645–673. [DOI]
- [10] Li XY, Fu LL, Cheng HJ, Zhao SH. Advances on microRNA in regulating mammalian skeletal muscle development. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(11): 1046–1053.  
李新云, 付亮亮, 程会军, 赵书红. MicroRNA 调控哺乳动物骨骼肌发育. *遗传*, 2017, 39(11): 1046–1053. [DOI]
- [11] Zhou R, Wang YX, Long KR, Jiang AA, Jin L. Regulatory mechanism for lncRNAs in skeletal muscle development and progress on its research in domestic animals. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(4): 292–304.  
周瑞, 王以鑫, 龙科任, 蒋岸岸, 金龙. LncRNA 调控骨骼肌发育的分子机制及其在家养动物中的研究进展. *遗传*, 2018, 40(4): 292–304. [DOI]

- [12] Zhang PP, Chao Z, Zhang R, Ding RQ, Wang YL, Wu W, Han Q, Li CC, Xu HX, Wang L, Xu YJ. Circular RNA regulation of myogenesis. *Cells*, 2019, 8(8): 885. [DOI]
- [13] Gao Y, Wang JF, Zheng Y, Zhang JY, Chen S, Zhao FQ. Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs. *Nat Commun*, 2016, 7: 12060. [DOI]
- [14] Shen T, Han M, Wei G, Ni T. An intriguing RNA species—perspectives of circularized RNA. *Protein Cell*, 2015, 6(12): 871–880. [DOI]
- [15] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, Zhu SS, Yang L, Chen LL. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792–806. [DOI]
- [16] Li ZY, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang XL, Zhong GL, Yu B, Hu WC, Dai LM, Zhu PF, Chang ZX, Wu QF, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu HJ, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256–264. [DOI]
- [17] Liang GM, Yang YL, Niu GL, Tang ZL, Li K. Genome-wide profiling of *Sus scrofa* circular RNAs across nine organs and three developmental stages. *DNA Res*, 2017, 24(5): 523–535. [DOI]
- [18] Shuai MX, Hong JW, Huang DH, Zhang X, Tian YQ. Upregulation of circRNA\_0000285 serves as a prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma and is involved in radiosensitivity. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6495–6501. [DOI]
- [19] Bi W, Huang JY, Nie CL, Liu B, He GQ, Han JH, Pang R, Ding ZM, Xu J, Zhang JW. CircRNA circRNA\_102171 promotes papillary thyroid cancer progression through modulating CTNNBIP1-dependent activation of  $\beta$ -catenin pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 275. [DOI]
- [20] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675–691. [DOI]
- [21] Chen LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475–490. [DOI]
- [22] Das A, Das A, Das D, Abdelmohsen K, Panda AC. Circular RNAs in myogenesis. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863(4): 194372. [DOI]
- [23] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, 495(7441): 384–388. [DOI]
- [24] Yang F, Hu AP, Li D, Wang JQ, Guo YH, Liu Y, Li HJ, Chen YJ, Wang XJ, Huang K, Zheng LD, Tong QS. Circ-HuR suppresses HuR expression and gastric cancer progression by inhibiting CNBP transactivation. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 158. [DOI]
- [25] Piwecka M, Glažar P, Hernandez-Miranda LR, Memczak S, Wolf SA, Rybak-Wolf A, Filipchyk A, Klironomos F, Cerda Jara CA, Fenske P, Trimbuch T, Zywitzka V, Plass M, Schreyer L, Ayoub S, Kocks C, Kühn R, Rosenmund C, Birchmeier C, Rajewsky N. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, 2017, 357(6357): eaam8526. [DOI]
- [26] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55–66. [DOI]
- [27] Yang YB, Gao XY, Zhang ML, Yan S, Sun CJ, Xiao FZ, Huang NN, Yang XS, Zhao K, Zhou HK, Huang SY, Xie B, Zhang N. Novel role of FBXW7 circular RNA in repressing glioma tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(3): 304–315. [DOI]
- [28] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, Laneve P, Rajewsky N, Bozzoni I. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37.e29. [DOI]
- [29] Zeng Y, Du WW, Wu YY, Yang ZG, Awan FM, Li XM, Yang WN, Zhang C, Yang Q, Yee A, Chen Y, Yang FH, Sun H, Huang R, Yee AJ, Li RK, Wu ZK, Backx PH, Yang BB. A circular RNA binds to and activates AKT phosphorylation and nuclear localization reducing apoptosis and enhancing cardiac repair. *Theranostics*, 2017, 7(16): 3842–3855. [DOI]
- [30] Du WW, Fang L, Yang WN, Wu N, Awan FM, Yang ZG, Yang BB. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ*, 2017, 24(2): 357–370. [DOI]
- [31] Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 2014, 30(9): 418–426. [DOI]
- [32] Wang J, Ren QL, Hua LS, Chen JF, Zhang JQ, Bai HJ, Li HL, Xu B, Shi ZH, Cao H, Xing BS, Bai XX.

- Comprehensive analysis of differentially expressed mRNA, lncRNA and circRNA and their ceRNA networks in the longissimus dorsi muscle of two different pig breeds. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1107. [DOI]
- [33] Dahl M, Daugaard I, Andersen MS, Hansen TB, Grønbæk K, Kjems J, Kristensen LS. Enzyme-free digital counting of endogenous circular RNA molecules in B-cell malignancies. *Lab Invest*, 2018, 98(12): 1657–1669. [DOI]
- [34] Szabo L, Salzman J. Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(11): 679–692. [DOI]
- [35] Zhang XO, Dong R, Zhang Y, Zhang JL, Luo Z, Zhang J, Chen LL, Yang L. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res*, 2016, 26(9): 1277–1287. [DOI]
- [36] Sekar S, Cuyugan L, Adkins J, Geiger P, Liang WS. Circular RNA expression and regulatory network prediction in posterior cingulate astrocytes in elderly subjects. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 340. [DOI]
- [37] Zhang QL, Ji XY, Li HW, Guo J, Wang F, Deng XY, Chen JY, Lin LB. Identification of circular RNAs and their altered expression under poly(I:C) challenge in key antiviral immune pathways in amphioxus. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 86: 1053–1057. [DOI]
- [38] Sekar S, Geiger P, Cuyugan L, Boyle A, Serrano G, Beach TG, Liang WS. Identification of circular RNAs using RNA sequencing. *J Vis Exp*, 2019, (153). [DOI]
- [39] Hansen TB, Venø MT, Damgaard CK, Kjems J. Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): e58. [DOI]
- [40] Chuang TJ, Chen YJ, Chen CY, Mai TL, Wang YD, Yeh CS, Yang MY, Hsiao YT, Chang TH, Kuo TC, Cho HH, Shen CN, Kuo HC, Lu MY, Chen YH, Hsieh SC, Chiang TW. Integrative transcriptome sequencing reveals extensive alternative trans-splicing and cis-backsplicing in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(7): 3671–3691. [DOI]
- [41] Wang LY, Long HY, Zheng QH, Bo XT, Xiao XH, Li B. Circular RNA circRHOT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by initiation of NR2F6 expression. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 119. [DOI]
- [42] Panda AC, De S, Grammatikakis I, Munk R, Yang X, Piao Y, Dudekula DB, Abdelmohsen K, Gorospe M. High-purity circular RNA isolation method (RPAD) reveals vast collection of intronic circRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(12): e116. [DOI]
- [43] Labaj PP, Leparc GG, Linggi BE, Markillie LM, Wiley HS, Kreil DP. Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatics*, 2011, 27(13): i383–i391. [DOI]
- [44] Li SS, Teng SS, Xu JQ, Su GN, Zhang Y, Zhao JQ, Zhang SW, Wang HY, Qin WY, Lu ZJ, Guo Y, Zhu QY, Wang D. Microarray is an efficient tool for circRNA profiling. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1420–1433. [DOI]
- [45] López-Jiménez E, Rojas AM, Andrés-León E. RNA sequencing and prediction tools for circular RNAs analysis. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1087: 17–33. [DOI]
- [46] Guan YJ, Ma JY, Song W. Identification of circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in gastric cancer by analysis of microarray data. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 183. [DOI]
- [47] Xiong DD, Dang YW, Lin P, Wen DY, He RQ, Luo DZ, Feng ZB, Chen G. A circRNA-miRNA-mRNA network identification for exploring underlying pathogenesis and therapy strategy of hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 220. [DOI]
- [48] Zhai ZS, Fu Q, Liu CJ, Zhang X, Jia PC, Xia P, Liu P, Liao SX, Qin T, Zhang HW. Emerging roles of hsa-circ-0046600 targeting the miR-640/HIF-1 $\alpha$  signalling pathway in the progression of HCC. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 9291–9302. [DOI]
- [49] Li H, Wei XF, Yang JM, Dong D, Hao D, Huang YZ, Lan XY, Plath M, Lei CZ, Ma Y, Lin FP, Bai YY, Chen H. CircFGFR4 promotes differentiation of myoblasts via binding miR-107 to relieve its inhibition of Wnt3a. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 272–283. [DOI]
- [50] Chen B, Yu J, Guo LJ, Byers MS, Wang ZJ, Chen XL, Xu HP, Nie QH. Circular RNA circHIPK3 promotes the proliferation and differentiation of chicken myoblast cells by sponging miR-30a-3p. *Cells*, 2019, 8(2): 177. [DOI]
- [51] Shen XM, Zhang XY, Ru WX, Huang YZ, Lan XY, Lei CZ, Chen H. circINSR promotes proliferation and reduces apoptosis of embryonic myoblasts by sponging miR-34a. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 986–999. [DOI]
- [52] Huang SL, Li XZ, Zheng H, Si XY, Li B, Wei GQ, Li CL, Chen YJ, Chen YM, Liao WJ, Liao YL, Bin JP. Loss of super-enhancer-regulated circRNA Nfix induces cardiac regeneration after myocardial infarction in adult mice. *Circulation*, 2019, 139(25): 2857–2876. [DOI]
- [53] Du WW, Zhang C, Yang WN, Yong TQ, Awan FM, Yang

- BB. Identifying and characterizing circRNA-protein interaction. *Theranostics*, 2017, 7(17): 4183–4191. [DOI]
- [54] Barra J, Leucci E. Probing long non-coding RNA-protein interactions. *Front Mol Biosci*, 2017, 4: 45. [DOI]
- [55] Abdelmohsen K, Panda AC, Munk R, Grammatikakis I, Dudekula DB, De S, Kim J, Noh JH, Kim KM, Martindale JL, Gorospe M. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol*, 2017, 14(3): 361–369. [DOI]
- [56] Du WW, Yang WN, Liu E, Yang ZG, Dhaliwal P, Yang BB. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846–2858. [DOI]
- [57] Li X, Liu CX, Xue W, Zhang Y, Jiang S, Yin QF, Wei J, Yao RW, Yang L, Chen LL. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection. *Mol Cell*, 2017, 67(2): 214–227.e217. [DOI]
- [58] Dong W, Dai ZH, Liu FC, Guo XG, Ge CM, Ding J, Liu H, Yang F. The RNA-binding protein RBM3 promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma by regulating circular RNA SCD-circRNA 2 production. *EBioMedicine*, 2019, 45: 155–167. [DOI]
- [59] Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs. *EMBO J*, 2019, 38(16): e100836. [DOI]
- [60] Kong S, Tao M, Shen XJ, Ju SQ. Translatable circRNAs and lncRNAs: Driving mechanisms and functions of their translation products. *Cancer Lett*, 2020, 483: 59–65. [DOI]
- [61] Yang Y, Fan XJ, Mao MW, Song XW, Wu P, Zhang Y, Jin YF, Yang Y, Chen LL, Wang Y, Wong CC, Xiao XS, Wang ZF. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. *Cell Res*, 2017, 27(5): 626–641. [DOI]
- [62] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, Hanan M, Wyler E, Perez-Hernandez D, Ramberger E, Shen ZS, Samson M, Dittmar G, Landthaler M, Chekulaeva M, Rajewsky N, Kadener S. Translation of circRNAs. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 9–21.e27. [DOI]
- [63] Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 2000, 28(6): 1102, 1104. [DOI]
- [64] Zhao J, Wu J, Xu TY, Yang QC, He JH, Song XF. IRESfinder: Identifying RNA internal ribosome entry site in eukaryotic cell using framed k-mer features. *J Genet Genom*, 2018, 45(7): 403–406. [DOI]
- [65] Wei LY, Chen HR, Su R. M6APred-EL: a sequence-based predictor for identifying N6-methyladenosine sites using ensemble learning. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 635–644. [DOI]
- [66] Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, 2009, 324(5924): 218–223. [DOI]
- [67] Zhang ML, Zhao K, Xu XP, Yang YB, Yan S, Wei P, Liu H, Xu JB, Xiao FZ, Zhou HK, Yang XS, Huang NN, Liu JL, He KJ, Xie KP, Zhang G, Huang SY, Zhang N. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4475. [DOI]
- [68] Zhang ML, Huang NN, Yang XS, Luo JY, Yan S, Xiao FZ, Chen WP, Gao XY, Zhao K, Zhou HK, Li ZQ, Ming L, Xie B, Zhang N. A novel protein encoded by the circular form of the *SHPRH* gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene*, 2018, 37(13): 1805–1814. [DOI]
- [69] Ling YH, Zheng Q, Zhu L, Xu LN, Sui MH, Zhang YH, Liu Y, Fang FG, Chu MX, Ma YH, Zhang XR. Trend analysis of the role of circular RNA in goat skeletal muscle development. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 220. [DOI]
- [70] Wei XF, Li H, Yang JM, Hao D, Dong D, Huang YZ, Lan XY, Plath M, Lei CZ, Lin FP, Bai YY, Chen H. Circular RNA profiling reveals an abundant circLMO7 that regulates myoblasts differentiation and survival by sponging miR-378a-3p. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3153. [DOI]
- [71] Xie YQ, Chen T, Luo JY, Xi QY, Zhang YL, Sun JJ. Mechanism of circRNA and its effect on development of animal muscles. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2018, 45(8): 2270–2275.
- 谢月琴, 陈婷, 罗君谊, 习欠云, 张永亮, 孙加节. circRNA 作用机制及其对动物肌肉发育的影响. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(8): 2270–2275. [DOI]
- [72] Abdelmohsen K, Panda AC, De S, Grammatikakis I, Kim J, Ding J, Noh JH, Kim KM, Mattison JA, De Cabo R, Gorospe M. Circular RNAs in monkey muscle: age-dependent changes. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(11): 903–910. [DOI]
- [73] Hong LJ, Gu T, He YJ, Zhou C, Hu Q, Wang XW, Zheng EQ, Huang SX, Xu Z, Yang J, Yang HQ, Li ZC, Liu DW, Cai GY, Wu ZF. Genome-wide analysis of



- circular RNAs mediated ceRNA regulation in porcine embryonic muscle development. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 289. [DOI]
- [74] Ouyang HJ, Chen XL, Wang ZJ, Yu J, Jia XZ, Li ZH, Luo W, Abdalla BA, Jebessa E, Nie QH, Zhang XQ. Circular RNAs are abundant and dynamically expressed during embryonic muscle development in chickens. *DNA Res*, 2018, 25(1): 71–86. [DOI]
- [75] Li H, Yang JM, Wei XF, Song CC, Dong D, Huang YZ, Lan XY, Plath M, Lei CZ, Ma Y, Qi XL, Bai YY, Chen H. CircFUT10 reduces proliferation and facilitates differentiation of myoblasts by sponging miR-133a. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4643–4651. [DOI]
- [76] Ouyang HJ, Chen XL, Li WM, Li ZH, Nie QH, Zhang XQ. Circular RNA circSVIL promotes myoblast proliferation and differentiation by sponging miR-203 in chicken. *Front Genet*, 2018, 9: 172. [DOI]
- [77] Wang YH, Li ML, Wang YH, Jia L, Zhang M, Fang XT, Chen H, Zhang CL. A Zfp609 circular RNA regulates myoblast differentiation by sponging miR-194-5p. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 1308–1313. [DOI]
- [78] Li XY, Li C, Y Liu ZJ, Ni W, Yao R, Xu YR, Quan RZ, Zhang MD, Li HX, Liu L, Hu SW. Circular RNA circ-FoxO3 inhibits myoblast cells differentiation. *Cells*, 2019, 8(6): 616. [DOI]
- [79] Peng SJ, Song CC, Li H, Cao XK, Ma YL, Wang XG, Huang YZ, Lan XY, Lei CZ, Chaogetu B, Chen H. Circular RNA SNX29 sponges miR-744 to regulate proliferation and differentiation of myoblasts by activating the Wnt5a/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 481–493. [DOI]
- [80] Shen XX, Liu ZH, Cao XN, He HR, Han SS, Chen YQ, Cui C, Zhao J, Li DY, Wang Y, Zhu Q, Yin HD. Circular RNA profiling identified an abundant circular RNA circTMT1 that inhibits chicken skeletal muscle satellite cell differentiation by sponging miR-128-3p. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10): 2265–2281. [DOI]
- [81] Li L, Chen Y, Nie L, Ding X, Zhang X, Zhao W, Xu XL, Kyei B, Dai DH, Zhan SY, Guo JZ, Zhong T, Wang LJ, Zhang HP. MyoD-induced circular RNA CDR1as promotes myogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(8): 807–821. [DOI]
- [82] Wang XG, Cao XK, Dong D, Shen XM, Cheng J, Jiang R, Yang ZX, Peng SJ, Huang YZ, Lan XY, Elnour IE, Lei CZ, Chen H. Circular RNA TTN acts as a miR-432 sponge to facilitate proliferation and differentiation of myoblasts via the IGF2/PI3K/AKT signaling pathway. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 966–980. [DOI]
- [83] Yao R, Yao Y, Li CY, Li XY, Ni W, Quan RZ, Liu L, Li HX, Xu YR, Zhang MD, Ullah Y, Hu SW. Circ-HIPK3 plays an active role in regulating myoblast differentiation. *Int J Biol Macromol*, 2019, 155: 1432–1439. [DOI]
- [84] Yue BL, Wang J, Ru WX, Wu JY, Cao XK, Yang HY, Huang YZ, Lan XY, Lei CZ, Huang BZ, Chen H. The circular RNA circHUWE1 sponges the miR-29b-AKT3 axis to regulate myoblast development. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 1086–1097. [DOI]
- [85] Pandey PR, Yang JH, Tsitsipatis D, Panda AC, Noh JH, Kim KM, Munk R, Nicholson T, Hanniford D, Argibay D, Yang XL, Martindale JL, Chang MW, Jones SW, Hernando E, Sen P, De S, Abdelmohsen K, Gorospe M. circSamd4 represses myogenic transcriptional activity of PUR proteins. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(7): 3789–3805. [DOI]
- [86] Nie L. Mechanism of circ-CDR1as regulating goat skeletal muscle satellite cells differentiation[Dissertation]. Sichuan Agricultural University, 2018.  
聂露. 环状RNA CDR1as 调控山羊骨骼肌卫星细胞分化的机制研究[学位论文]. 四川农业大学, 2018. [DOI]
- [87] Shen LY, Gan ML, Tang QZ, Tang GQ, Jiang YZ, Li MZ, Chen L, Bai L, Shuai SR, Wang JY, Li XW, Liao K, Zhang SH, Zhu L. Comprehensive analysis of lncRNAs and circRNAs reveals the metabolic specialization in oxidative and glycolytic skeletal muscles. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2855. [DOI]
- [88] Li BJ, Yin D, Li PH, Zhang ZK, Zhang XY, Li HQ, Li RY, Hou LM, Liu HL, Wu WJ. Profiling and functional analysis of circular RNAs in porcine fast and slow muscles. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 322. [DOI]
- [89] Feng J, Chen K, Dong X, Xu XL, Jin YX, Zhang YX, Chen WB, Han YJ, Shao L, Gao Y, He CJ. Genome-wide identification of cancer-specific alternative splicing in circRNA. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 35. [DOI]
- [90] Kristensen LS, Hansen TB, Venø MT, Kjems J. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field. *Oncogene*, 2018, 37(5): 555–565. [DOI]
- [91] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu JZ, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, 19(2): 141–157. [DOI]
- [92] Suzuki H, Aoki Y, Kameyama T, Saito T, Masuda S, Tanihata J, Nagata T, Mayeda A, Takeda SI, Tsukahara T. Endogenous multiple exon skipping and back-splicing

- at the DMD mutation hotspot. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1722. [DOI]
- [93] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, Laneve P, Rajewsky N, Bozzoni I. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37.e9. [DOI]
- [94] Khan MaF, Reckman YJ, Aufiero S, Van Den Hoogenhof MMG, Van Der Made I, Beqqali A, Koolbergen DR, Rasmussen TB, Van Der Velden J, Creemers EE, Pinto YM. RBM20 regulates circular RNA production from the titin gene. *Circ Res*, 2016, 119(9): 996–1003. [DOI]
- [95] Shieh PB. Emerging strategies in the treatment of duchenne muscular dystrophy. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(4): 840–848. [DOI]
- [96] Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Ikezawa M, Nonaka I, Matsuo M. Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(3): 493–500. [DOI]
- [97] Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Tanihata J, Saito T, Duguez SMR, Nagaraju K, Hoffman EP, Partridge T, Takeda SI. Bodywide skipping of exons 45–55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(34): 13763–13768. [DOI]
- [98] Cazzella V, Martone J, Pinnarò C, Santini T, Twayana SS, Sthandier O, D'amico A, Ricotti V, Bertini E, Muntoni F, Bozzoni I. Exon 45 skipping through U1-snRNA antisense molecules recovers the Dys-nNOS pathway and muscle differentiation in human DMD myoblasts. *Mol Ther*, 2012, 20(11): 2134–2142. [DOI]
- [99] Song ZB, Liu YM, Fang XB, Xie MS, Ma ZY, Zhong ZG, Feng XL, Zhang WX. Comprehensive analysis of the expression profile of circRNAs and their predicted protein-coding ability in the muscle of mdx mice. *Funct Integr Genomics*, 2020, 20(3): 397–407. [DOI]
- [100] Weng J, Zhang PX, Yin XF, Jiang BG. The whole transcriptome involved in denervated muscle atrophy following peripheral nerve injury. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 69. [DOI]
- [101] Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, De Jong P. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, 1992, 255(5049): 1256–1258. [DOI]
- [102] Czubak K, Taylor K, Piasecka A, Sobczak K, Kozłowska K, Philips A, Sedehizadeh S, Brook JD, Wojciechowska M, Kozłowski P. Global increase in circular RNA levels in myotonic dystrophy. *Front Genet*, 2019, 10: 649. [DOI]
- [103] Voellenkle C, Perfetti A, Carrara M, Fuschi P, Renna LV, Longo M, Sain SB, Cardani R, Valaperta R, Silvestri G, Legnini I, Bozzoni I, Furling D, Gaetano C, Falcone G, Meola G, Martelli F. Dysregulation of circular RNAs in myotonic dystrophy type 1. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1938. [DOI]
- [104] Guo MW, Qiu J, Shen F, Wang SN, Yu J, Zuo H, Yao J, Xu SN, Hu TH, Wang DM, Zhao Y, Hu YP, Shen FX, Ma XR, Lu J, Gu XJ, Xu LY. Comprehensive analysis of circular RNA profiles in skeletal muscles of aging mice and after aerobic exercise intervention. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(6): 5071–5090. [DOI]

(责任编辑: 蒋思文)