

环状RNA circTCF25通过miR-103a-3p/miR-107 调控CDK6的表达促进膀胱癌的增殖和迁移

王 敏 杨 睿 钟镇宇 陈俊霞*

(重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016)

摘要 该文旨在探讨环状RNA circTCF25对膀胱癌增殖和迁移的影响。采用RT-qPCR检测膀胱癌及癌旁组织中miR-103a-3p和miR-107的表达水平;采用Western blot和免疫组化检测膀胱癌细胞及膀胱癌和癌旁组织中CDK6的蛋白表达;将circTCF25过表达载体转染两种膀胱癌细胞后,采用RT-qPCR检测细胞中circTCF25以及miR-103a-3p和miR-107的表达水平;采用双荧光素酶报告基因实验验证circTCF25靶向结合miR-107及miR-107的靶基因*CDK6*;划痕实验检测细胞迁移能力;Edu实验检测细胞增殖能力。RT-qPCR结果表明,膀胱癌组织中miR-103a-3p和miR-107的表达明显低于癌旁组织。免疫组化和Western blot结果显示,膀胱癌组织中CDK6蛋白质水平明显高于癌旁组织。转染circTCF25过表达载体的细胞中,circTCF25的表达水平高于对照组。过表达circTCF25后,细胞中miR-103a-3p和miR-107的表达显著下降,CDK6的蛋白水平增加。双荧光素酶报告基因实验表明,circTCF25可以直接结合miR-107并降低其对靶基因*CDK6*的抑制。过表达circTCF25后,细胞迁移和增殖能力增强。该研究说明,环状RNA circTCF25可通过miR-103a-3p/miR-107调控CDK6的表达促进膀胱癌的增殖和迁移。

关键词 环状RNA; circTCF25; 膀胱癌; CDK6; 增殖; 迁移

CircRNA circTCF25 Regulates the Expression of CDK6 by miR-103a-3p and miR-107 to Promote the Proliferation and Migration of Bladder Cancer

Wang Min, Yang Rui, Zhong Zhenyu, Chen Junxia*

(College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of the present study is to investigate the effect of circRNA circTCF25 on proliferation and migration of bladder cancer. The expression of miR-103a-3p and miR-107 in cancer tissues and adjacent non-cancer tissues was determined by RT-qPCR. The expression of CDK6 in bladder cancer cell lines and cancer tissues and their adjacent non-cancer tissues was examined by Western blot and immunohistochemical staining. The circTCF25 over-expression vector was transfected into two kinds of bladder cancer cell lines, and the expression of circTCF25, miR-103a-3p and miR-107 were determined by RT-qPCR. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the combination of circTCF25 and miR-107 and the target gene *CDK6* of miR-107. The abilities of migration and proliferation of the bladder cancer cell lines were determined by wound healing assay and Edu assay, respectively. As a result, lower expression of miR-103a-3p and miR-107, while higher expression of CDK6 was

收稿日期: 2017-12-10 接受日期: 2018-04-04

国家自然科学基金(批准号: 81672536)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485868, E-mail: chjunxia@126.com

Received: December 10, 2017 Accepted: April 4, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81672536)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485868, E-mail: chjunxia@126.com

网络出版时间: 2018-06-01 14:51:44

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180601.1451.016.html>

found in bladder cancer tissues compared to their adjacent non-cancer tissues. The expression of circTCF25 in the group transfected with over-expression vector was higher than control group. After up regulation of circTCF25, the expression of miR-103a-3p and miR-107 were decreased, while the protein level of CDK6 was increased. Dual luciferase reporter gene assay showed that circTCF25 could directly bind to miR-107 and reduce the inhibition of target gene *CDK6*. And the capabilities of proliferation and migration of bladder cancer cell lines were increased after over expression of circTCF25. Taken together, circTCF25 may promote the proliferation and migration of bladder cancer through miR-103a-3p/miR-107-CDK6 axes.

Keywords circRNA; circTCF25; bladder cancer; CDK6; proliferation; migration

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一, 具有高发病率和高病死率等特点。据统计, 全球5年发病人数为1 110 265人, 其发病率居恶性肿瘤第9位, 是癌症引起的第13位主要死因^[1-2]。在中国, 膀胱癌在所有泌尿系统肿瘤中发病率最高, 死亡率在过去几十年中显著增加。尽管手术治疗、放疗和化疗应用广泛, 但侵袭性和转移性膀胱癌仍是致命疾病。在肌肉浸润性膀胱癌患者中转移发生更频繁, 并且与不良预后相关, 虽然非肌层浸润型膀胱癌患者更常见, 但是容易复发并且更可能进展为肌肉浸润性膀胱癌, 而大多数的临床化疗对晚期膀胱癌作用有限^[3]。因此, 寻找诊断和治疗膀胱癌的新的生物标志物具有重要意义。环状RNA(circular RNAs, circRNAs)是近年发现的一类不同于线性RNA且具有闭合环状结构的新型RNA分子, 广泛存在于真核生物中, 其结构稳定, 序列保守, 表达具有细胞或组织特异性^[4]。竞争性内源RNA(ceRNA)假说认为mRNA、lncRNA、假基因等转录本可以通过miRNA应答元件(microRNA response elements, MREs)竞争性地结合miRNA来相互调控各自基因表达^[5]。近年来有研究发现, 环状RNA可作为miRNA的“分子海绵”抑制其功能^[6]。有研究报道, 环状RNA与癌症相关miRNA密切相关, 并参与了癌症相关通路^[7]。因此, 环状RNA可能是疾病诊断和预后的理想生物标志物, 甚至是未来潜在的治疗靶点。然而, 环状RNA在疾病发生发展中的潜在机制仍不清楚。到目前为止, 有关环状RNA在膀胱癌中的报道尚少。

我们前期的研究发现, 环状RNA circTCF25在膀胱癌组织和细胞中高表达。本研究通过转染环状RNA过表达载体上调circTCF25的表达, 研究circTCF25在膀胱癌增殖和迁移过程中的作用, 为寻找临床膀胱癌的治疗新靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

本研究中的膀胱癌组织和癌旁组织来自重庆医科大学第一附属医院的20例膀胱癌患者, 且患者术前未进行放射治疗或化疗。所有患者均签署了知情同意书。所有样品均经过病理证实, 并在手术后立即放入液氮中。人膀胱癌细胞系EJ和T24购自ATCC。circTCF25过表达载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP和相应的空载体购自广州吉赛生物科技有限公司。psiCHECK2双荧光素酶报告基因载体购自上海汉恒生物科技有限公司。双荧光素酶检测试剂盒购自Promega公司。RPMI1640培养基购自Gibco公司。转染试剂Lipofectamine 2000(lip 2000)、M-MLV逆转录酶和TRIzol购自Invitrogen公司。EdU试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。抗体购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 膀胱癌细胞EJ、T24及293T均使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基, 37 °C、5% CO₂条件培养。使用转染试剂lip 2000按照转染说明书对细胞进行转染, 转染48 h后收获细胞。

1.2.2 载体构建 环状RNA过表达载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP购自广州吉赛生物技术有限公司, 将特殊设计的上下游环化框架插入到pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP。上游环化框架包含内源侧翼基因组序列, *EcoR* I酶切位点, 下游环化框架包含部分倒置的上游序列和*Bam*H I酶切位点。在HeLa细胞中扩增circTCF25序列, 然后将扩增片段连接到载体的上下游环化框架之间。除此之外, 同时构建了不含circTCF25序列的空载体。psiCHECK2双荧光素酶报告基因载体购自上海汉恒生物技术有限公司, 将circTCF25序列克隆到

psiCHECK2载体中,命名为psiCHECK2-circTCF25-WT,同时合成具有miR-107结合位点突变的circTCF25序列,并将其克隆到psiCHECK2载体中,命名为psiCHECK2-circTCF25-Mut。将含miR-107结合位点的CDK6 3'UTR克隆到psiCHECK2载体中,命名为psiCHECK2-CDK6-3'UTR-WT,将miR-107结合位点突变的CDK6 3'UTR克隆到psiCHECK2载体中,命名为psiCHECK2-CDK6-3'UTR-Mut。此载体以海肾荧光素酶基因为报告基因,萤火虫荧光素酶基因为内参基因。载体构建完成后经测序鉴定。

1.2.3 荧光定量PCR 使用TRIzol提取细胞和组织总RNA,琼脂糖凝胶电泳判断提取RNA的完整性,酶标仪测定其浓度和纯度。按照逆转录试剂盒说明书进行cDNA的合成,qPCR使用Bio-Rad公司的实时荧光定量PCR仪完成。circTCF25的引物序列分别为F: 5'-GAT AC A GCA GGC GCT CAC CAT-3', R: 5'-TCG GGT CTG CGG TAA TCC A-3'; β -actin的引物序列分别为F: 5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3', R: 5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'; miR-103a-3p的引物序列分别为F: 5'-GGG AGC AGC ATT GTA CAG GG-3', R: 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'; miR-107的引物序列分别为F: 5'-GGA GCA GCA TTG TAC AGG-3', R: 5'-CAG TGC GTG TCG TGG A-3'; U6的引物序列分别为F: 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3', R: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'。对于环状RNA和miRNA的定量,分别使用 β -actin和U6作内参,反应条件为: 95 °C预变性10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 60 s, 重复40个循环。每个基因设置3个复孔,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达,实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测CDK6蛋白质水平 细胞转染后培养48 h,提取细胞总蛋白质。取25 μ g样品经12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转至PVDF膜上,将膜放入封闭液中37 °C摇床上慢摇封闭2 h。封闭完成后,加一抗4 °C孵育过夜,加二抗37 °C孵育2 h,ECL化学发光显色,凝胶成像仪进行处理分析,通过计算目的蛋白与内参吸光度的比值,得出目的蛋白的相对表达量。实验重复3次。

1.2.5 免疫组化实验检测CDK6蛋白质水平 将经过4%多聚甲醛溶液固定的膀胱癌组织及癌旁组织进行石蜡包埋,5 μ m连续切片。将切片进行常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水;滴加3%过氧化氢处理切

片10 min,用以灭活内源性过氧化物酶,再将切片放入0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲液中95~98 °C加热10 min进行抗原修复;室温滴加正常山羊血清封闭20min,然后滴加CDK6一抗(1:200)于4 °C孵育过夜。用生物素标记的二抗孵育1 h,然后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液孵育20 min;配置DBA工作液使其显色;接着用苏木素复染,梯度乙醇脱水,在二甲苯中透明后用中性树胶进行封片,最后在显微镜下观察并拍照。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验 按照lip 2000说明书对细胞进行分组转染,荧光素酶活性的检测按照Promega说明书进行。以海肾荧光素酶基因发光值/萤火虫荧光素酶基因发光值(Rluc/Fluc)为相对荧光素酶活性。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移能力 细胞转染后培养48 h,待汇合度达到95%时用200 μ L的枪头划痕,换无血清培养基培养24 h后于倒置显微镜下观察,0 h划痕距离与24 h划痕距离的差值即为细胞的相对迁移能力。每组取3个视野进行分析。

1.2.8 EdU实验检测细胞增殖能力 细胞转染48 h后,将细胞接种到24孔板,使细胞汇合度达到60%。每孔加200 μ L稀释EdU溶液孵育2 h。然后按照EdU试剂盒说明书进行细胞固定、Apollo染色和DNA染色。最后在荧光显微镜下拍照。

1.3 统计分析

采用SPSS 19.0进行统计分析,两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌及癌旁组织中miR-103a-3p和miR-107的表达

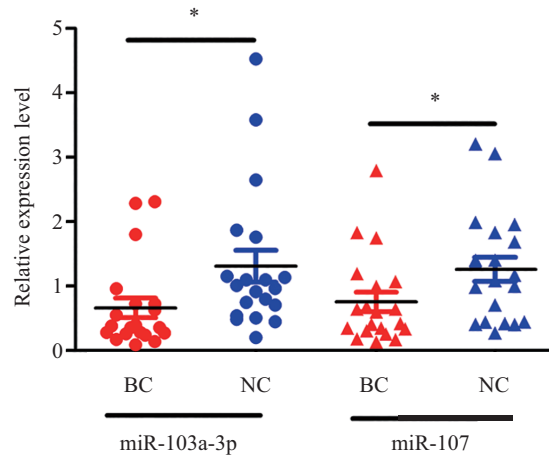
RT-qPCR检测20例膀胱癌组织和配对的癌旁组织中miR-103a-3p和miR-107的表达。结果显示,癌组织中miR-103a-3p和miR-107的水平明显低于癌旁组织($P < 0.05$)(图1)。

2.2 膀胱癌及癌旁组织中CDK6蛋白质水平

免疫组化和Western blot结果显示,膀胱癌组织中CDK6蛋白质水平明显高于癌旁组织($P < 0.05$)(图2)。

2.3 circTCF25的过表达

将circTCF25过表达载体和空载体转染EJ和T24细胞,然后分别检测其circTCF25的相对表达量。结果显示,转染过表达载体的细胞中circTCF25的相对

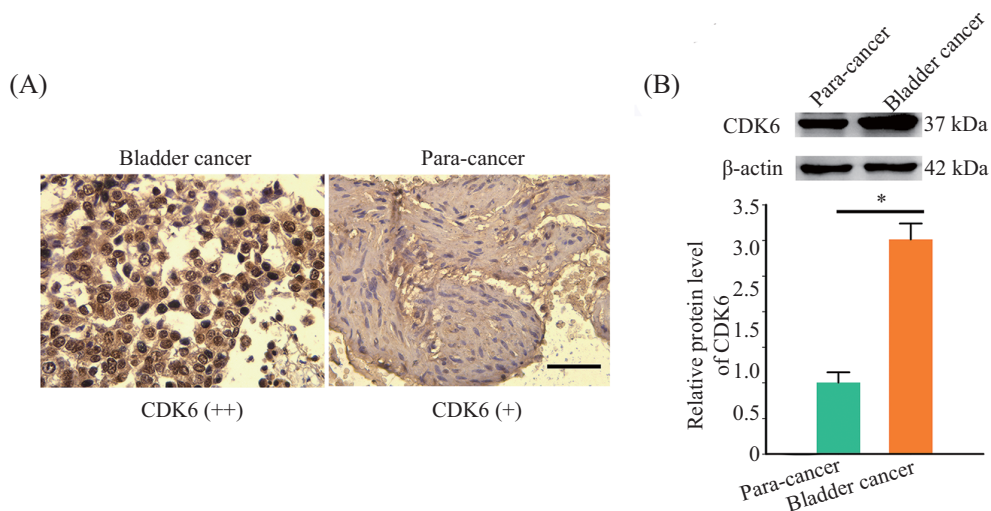


BC: 膀胱癌组织; NC: 癌旁组织。* $P < 0.05$ 。

BC: bladder cancer; NC: normal control. * $P < 0.05$ 。

图1 荧光定量PCR检测膀胱癌及癌旁组织中miR-103a-3p和miR-107的表达

Fig.1 Detection of the expression of miR-103a-3p and miR-107 in bladder cancer tissues and their adjacent non-cancer tissues by RT-qPCR



A: 免疫组化染色; B: Western blot条带及条带灰度值分析。* $P < 0.05$ 。

A: immunohistochemical staining; B: Western blot bands and the gray value analysis of the Western blot bands. * $P < 0.05$ 。

图2 免疫组化和Western blot检测膀胱癌及癌旁组织中CDK6蛋白质水平

Fig.2 Detection of the protein expression of CDK6 in bladder cancer tissues and their adjacent non-cancer tissues by immunohistochemical staining and Western blot

表达量明显高于对照组($P < 0.001$)(图3)。

2.4 上调circTCF25对细胞中miR-103a-3p和miR-107表达的影响

将circTCF25过表达载体和空载体转染EJ和T24细胞, 然后分别检测其miR-103a-3p和miR-107的相对表达量。结果显示, 转染过表达载体的细胞中miR-103a-3p和miR-107的表达显著下降($P < 0.01$)(图4)。

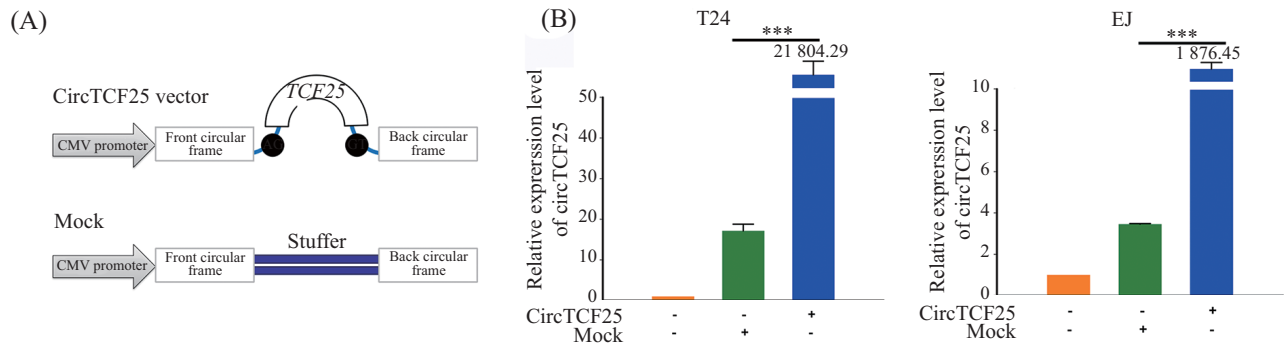
2.5 上调circTCF25对细胞中CDK6蛋白质水平的影响

将过表达载体和空载体转染EJ和T24细胞, 然

后分别检测其CDK6蛋白质水平。结果显示, 转染过表达载体的细胞中CDK6蛋白质水平明显升高($P < 0.05$)(图5)。

2.6 双荧光素酶报告基因系统验证circTCF25靶向结合miR-107调节CDK6的表达

生物信息学预测circTCF25与miR-103a-3p和miR-107分别具有一个结合位点(图6A)。用psiCHECK2-circTCF25-WT和miR-107模拟物共转染293T细胞后, 与对照组相比, 相对荧光素酶活性下降了约20%($P < 0.05$)(图6B)。用psiCHECK2-CDK6-3'UTR-WT

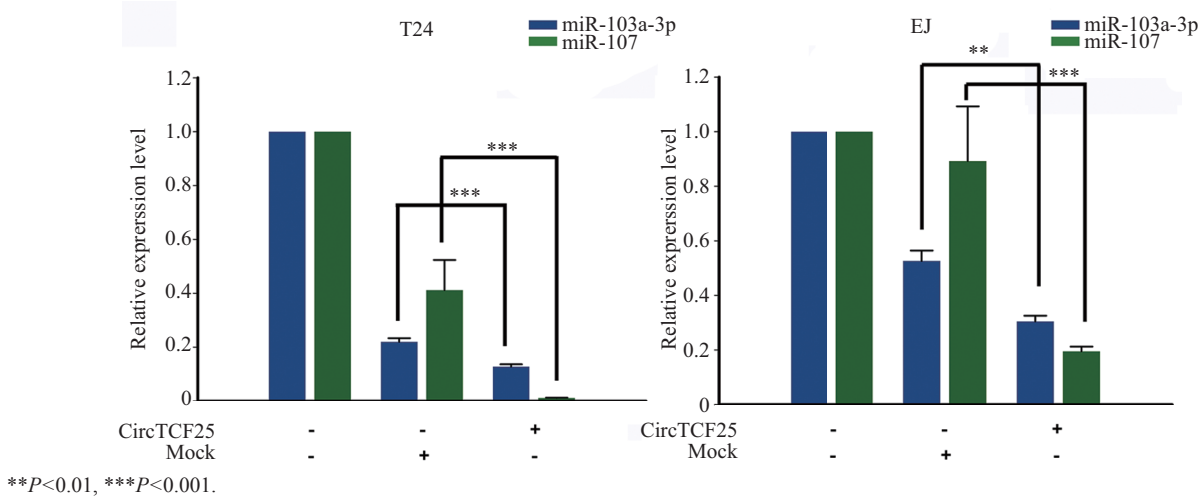


A: circTCF25过表达载体和空载体结构示意图; B: circTCF25在T24和EJ细胞中的相对表达量。*** $P < 0.001$ 。

A: the sketch of structure of circTCF25 and mock vector; B: relative expression of circTCF25 in T24 and EJ cells. *** $P < 0.001$

图3 circTCF25过表达载体与空载体结构示意图和荧光定量PCR检测膀胱癌细胞转染效率

Fig.3 The sketch of structure of circTCF25 and mock vector and detection of bladder cancer cell transfection efficiency by RT-qPCR



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 上调circTCF25对膀胱癌细胞中miR-103a-3p和miR-107表达的影响

Fig.4 Effect of up expression of circTCF25 on the expression of miR-103a-3p and miR-107 in bladder cancer cells

和miR-107模拟物共转染293T细胞后,与对照组相比,相对荧光素酶活性下降了约33%($P < 0.01$)(图6C)。

2.7 上调circTCF25对细胞迁移能力的影响

将过表达载体和空载体转染EJ和T24细胞,然后分别检测其迁移能力。划痕实验显示,上调circTCF25后,EJ和T24细胞的迁移能力增强,迁移距离明显长于对照组($P < 0.05$)(图7)。

2.8 上调circTCF25对细胞增殖能力的影响

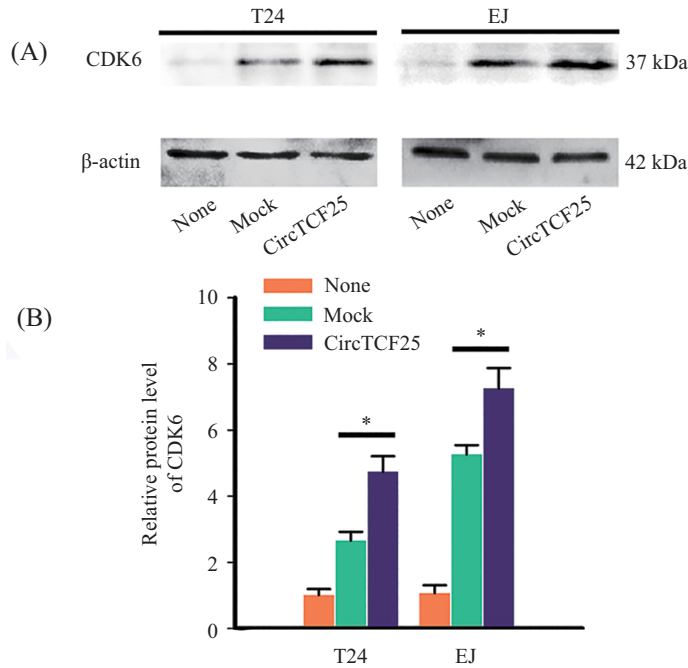
将过表达载体和空载体转染EJ和T24细胞,然后分别检测其增殖能力。EdU实验结果显示,上调circTCF25后,EJ和T24细胞增殖能力增强($P < 0.05$)(图8)。

3 讨论

在过去几年中,环状RNA被认为在自然界中很

少见,甚至被认为是“转录噪音”^[8-10]。但是,随着高通量测序和生物信息学的发展,越来越多的研究发现,环状RNA是大量且稳定存在的非编码RNA^[11]。但迄今为止,环状RNA的功能鲜有研究。

近期有研究报道,环状RNA可作为miRNA的“分子海绵”发挥作用,并与其他内源性RNA形成竞争^[12],这些能够隐藏miRNA结合位点环状RNA可能是潜在的竞争性内源RNA。例如,环状RNA CDR1as具有与miR-7匹配的保守序列,当沉默CDR1as时,miR-7靶基因的表达下降,而过表达CDR1as时则具有相反的作用^[13]。miR-7已被证实参与了许多通路,因此miR-7能够直接下调许多致癌基因,如EGFR、Raf、Pak1、Ack1、IGF1R、PIK3CD和mTOR^[14]。理论上,任何具有miRNA应答元件的RNA都可能是

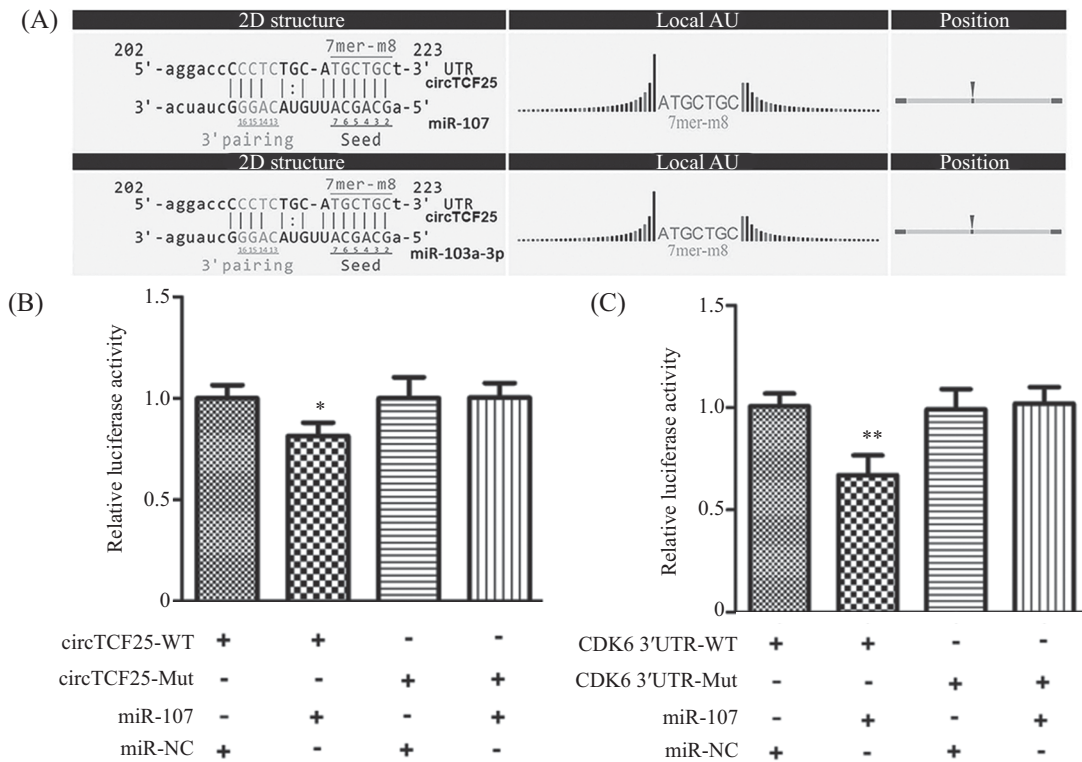


A: Western blot检测膀胱癌细胞中CDK6的表达; B: CDK6蛋白质水平条带灰度值分析。* $P < 0.05$ 。

A: the expression of CDK6 was detected by Western blot; B: the gray value analysis of the Western blot bands. * $P < 0.05$.

图5 上调circTCF25对膀胱癌细胞中CDK6蛋白质水平的影响

Fig.5 Effect of up expression of circTCF25 on the protein expression of CDK6 in bladder cancer cells

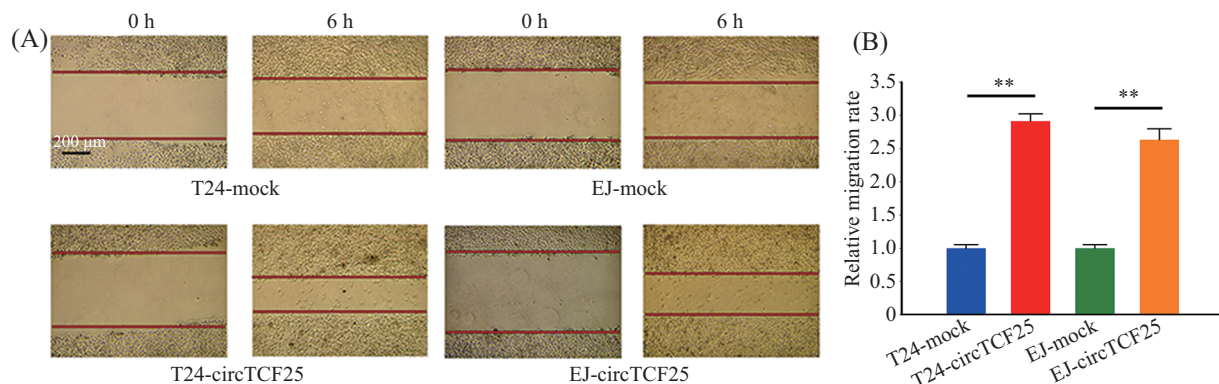


A: circTCF25与miR-103a-3p和miR-107结合位点示意图; B: 双荧光素酶报告基因实验验证circTCF25靶向结合miR-107; C: 双荧光素酶报告基因实验验证miR-107的靶基因CDK6。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the sketch of binding sites of miR-103a-3p and miR-107 on circTCF25; B: verification of circTCF25 targeting miR-107 by dual luciferase reporter gene assay; C: verification of the target gene CDK6 of miR-107 by dual luciferase reporter gene assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 双荧光素酶报告基因实验

Fig.6 Dual luciferase reporter gene assay

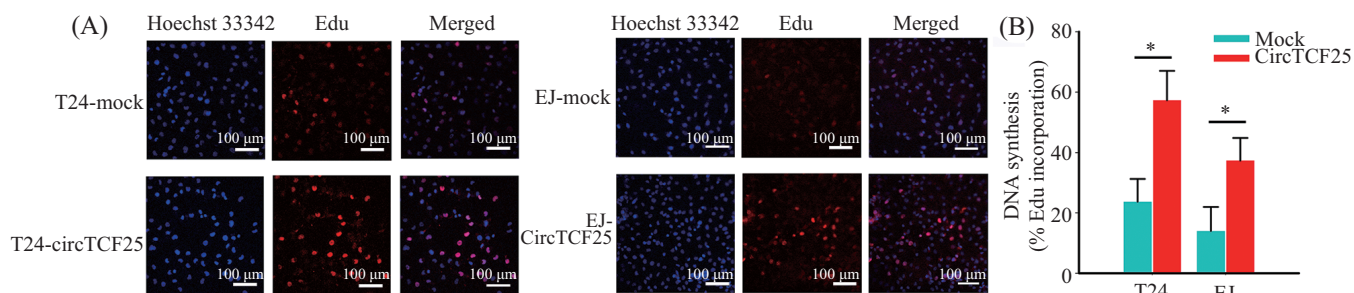


A: 划痕实验检测上调circTCF25对T24和EJ细胞迁移能力的影响; B: 膀胱癌细胞迁移率定量分析。 ** $P < 0.01$ 。

A: the effect of up expression of circTCF25 on cell migration in T24 and EJ cells detected by wound healing assay; B: quantitative analysis of relative migration rate of bladder cancer cells. ** $P < 0.01$.

图7 上调circTCF25对膀胱癌细胞迁移能力的影响

Fig.7 Effect of up expression of circTCF25 on the ability of migration of bladder cancer cells



A: EdU实验检测上调circTCF25对T24和EJ细胞增殖能力的影响; B: 膀胱癌细胞DNA合成定量分析。 * $P < 0.05$ 。

A: the effect of circTCF25 overexpression on cell proliferation in T24 and EJ cells detected by EdU assay; B: quantitative analysis of DNA synthesis of bladder cancer cells. * $P < 0.05$.

图8 上调circTCF25对膀胱癌细胞增殖能力的影响

Fig.8 Effect of up expression of circTCF25 on the ability of proliferation of bladder cancer cells

ceRNA, 当ceRNA网络的平衡被打破时, 就可能导致肿瘤发生。因此, 阐明RNA之间的相互作用能够为研究肿瘤发生的潜在机制提供新的证据, 为寻找治疗肿瘤的新方法奠定坚实的基础。在前期的研究中, 我们利用环状RNA微阵列芯片发现了膀胱癌组织与癌旁组织中差异表达的环状RNA, 并利用荧光定量PCR证实了circTCF25在膀胱癌组织中的表达显著高于对应的癌旁组织, 这提示circTCF25在膀胱癌的发生发展过程中可能具有重要的生物学功能。结合生物信息学方法我们发现, circTCF25含有miR-103a-3p和miR-107的MREs。因此, 我们推测, circTCF25可能竞争性结合miR-103a-3p和miR-107, 并解除它们对下游靶基因的抑制作用。

在本研究中, 我们成功构建了circTCF25过表达载体, 并将其转染到膀胱癌细胞EJ和T24中。研究结果显示, 上调circTCF25能够显著抑制miR-103a-

3p和miR-107的表达, 并增加CDK6的蛋白质水平, 同时促进EJ和T24细胞的增殖和迁移能力。我们还发现, 膀胱癌组织中CDK6的表达明显高于癌旁组织, 而miR-103a-3p和miR-107的表达明显低于癌旁组织。同时, 我们通过双荧光素酶报告基因系统验证了circTCF25靶向结合miR-107以及miR-107的靶基因CDK6。有研究表明, CDK6连同Cyclin D通过磷酸化RB1并使其失活, 进而引导细胞周期进程^[15]。miR-103a-3p和miR-107也被报道能够负调节CDK6和其他致癌因子^[16-17]。我们的实验结果与这些研究一致。根据生物信息学预测结果和我们的实验结果, 环状RNA circTCF25在膀胱癌中可通过miR-103a-3p和miR-107发挥重要的调控功能。

综上所述, 本研究初步确认了circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6通路在膀胱癌中的调控功能, 为进一步研究circTCF25在膀胱癌发生发展中的

功能和机制提供了重要途径并奠定了基础, 为膀胱癌治疗提供了新的潜在分子靶点。

参考文献 (Reference)

- 1 Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 2009; 27(3): 289-93.
- 2 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
- 3 Yoshino H, Seki N, Itesako T, Chiyomaru T, Nakagawa M, Enokida H. Aberrant expression of microRNAs in bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2013; 10(7): 396-404.
- 4 Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, *et al.* Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res* 2015; 25(8): 981-4.
- 5 Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell* 2011; 146(3): 353-8.
- 6 Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 2013; 495(7441): 384-8.
- 7 Zhu Q, Lu G, Luo Z, Gui F, Wu J, Zhang D, *et al.* CircRNA circ_0067934 promotes tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma through regulation of miR-1324/FZD5/Wnt/ β -catenin axis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 497(2): 626-32.
- 8 Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(11): 3852-6.
- 9 Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(3): 256-64.
- 10 Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature* 1979; 280(5720): 339-40.
- 11 Dixon RJ, Eperon IC, Hall L, Samani NJ. A genome-wide survey demonstrates widespread non-linear mRNA in expressed sequences from multiple species. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(18): 5904-13.
- 12 Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, *et al.* miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J* 2011; 30(21): 4414-22.
- 13 Xu H, Guo S, Li W, Yu P. The circular RNA Cdr1as, via miR-7 and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells. *Sci Rep* 2015; 5: 12453.
- 14 Li J, Yang J, Zhou P, Le Y, Zhou C, Wang S, *et al.* Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications. *Am J Cancer Res* 2015; 5(2): 472-80.
- 15 Choi YJ, Anders L. Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene* 2014; 33(15): 1890-903.
- 16 Kim DS, Lee SY, Lee JH, Bae YC, Jung JS. MicroRNA-103a-3p controls proliferation and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. *Exp Mol Med* 2015; 47: e172.
- 17 Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y. miR-107 targets cyclin-dependent kinase 6 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in gastric cancer cells. *Med Oncol* 2012; 29(2): 856-63.