

环状 RNA 在骨关节炎中的研究进展：从已知到未知

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3070>

许逸洋^{1,2}, 毛谷平¹, 张紫机¹, 康焱¹

2095-4344.3070

投稿日期: 2020-03-30

送审日期: 2020-04-03

采用日期: 2020-05-09

在线日期: 2020-09-25

中图分类号:

R459.9; R318; R684

文章编号:

2095-4344(2021)10-01592-07

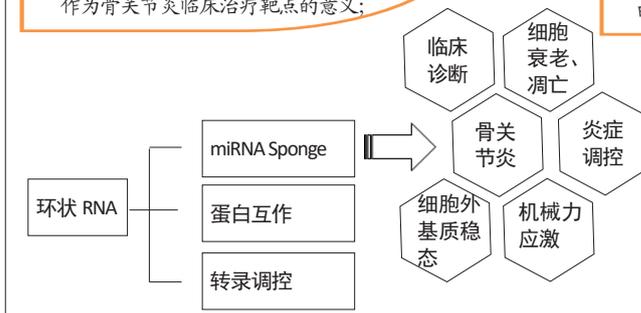
文献标识码: A

文章快速阅读:

文章亮点一

(1) 通过对于环状 RNA 的生物学特征、功能机制进行文献综述, 结合其在骨关节炎发生、发展中所起的作用, 探索其作为骨关节炎临床治疗靶点的意义;

(2) 研究尚存在一些不足, 环状 RNA 在骨关节炎领域的研究处于起步阶段, 在转录后修饰、成软骨分化、蛋白翻译等多个重要分支仍是空白, 急待进一步的研究。



文题释义:

环状RNA: 属于非编码RNA, 与传统线性RNA不同, 其呈封闭环状结构, 不易受RNA外切酶影响, 具有更加稳定的表达。目前研究揭示环状RNA功能广泛, 在多种疾病的发生、进展中发挥重要作用。

骨关节炎: 是骨科最常见的退行性疾病之一, 以持续性的关节炎症和疼痛为主要特征, 病变累及骨、软骨下骨、半月板、滑膜、韧带和肌肉等多个结构。随着骨关节炎病理机制的逐渐明晰, 基因治疗展现出巨大潜力。

摘要

背景: 环状RNA是近年来表观遗传学领域最受关注的明星分子, 已证实具有普遍性、进化保守性、结构稳定性、组织特异性和功能多样性等特征。随着骨关节炎基础研究逐步深入, 多种机制被揭示, 环状RNA在其中起重要作用。

目的: 归纳整理了环状RNA在骨关节炎研究中的进展, 综述其在骨关节炎炎症调控、软骨细胞的衰老凋亡、细胞外基质成分改变以及机械应力刺激等病理机制中的作用。

方法: 第一作者应用计算机检索PubMed数据库、Web of Science和Medline等数据库, 英文检索词“circular RNA, osteoarthritis, cartilage, chondrocyte”, 检索时间为2015年3月至2020年3月。

结果与结论: ①环状RNA是骨关节炎发生、发展的重要环节, 能够作为诊断标志物和生物治疗靶点; ②此外, 当前的研究仅局限于环状RNA作为吸附海绵、关节软骨退变和修复方面, 而环状RNA的其他功能机制以及其在间充质干细胞成软骨分化中的研究仍然是未知, 这也许是未来基础研究转化为临床成果的方向。

关键词: 骨; 关节; 骨关节炎; 环状RNA; 软骨; 干细胞; 间充质干细胞; 综述

Research progress of circular RNAs in osteoarthritis: from known to unknown

Xu Yiyang^{1,2}, Mao Guping¹, Zhang Ziji¹, Kang Yan¹

¹Department of Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ²Provincial School of Clinical Medicine of Fujian Medical University/Second Department of Orthopedics of Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Xu Yiyang, Doctoral candidate, Attending physician, Department of Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Provincial School of Clinical Medicine of Fujian Medical University/Second Department of Orthopedics of Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Corresponding author: Kang Yan, MD, Professor, Chief physician, Department of Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Circular RNA is the most concerned star molecules in the field of epigenetics in recent years, and has been proven to have such characteristics as universality, evolutionary conservatism, structural stability, tissue specificity and functional diversity. With the development of basic research on osteoarthritis, various kinds of mechanisms have been revealed, in which circular RNAs play an important role.

¹ 中山大学附属第一医院关节外科, 广东省广州市 510080; ² 福建医科大学省立临床医学院 / 福建省立医院骨二科, 福建省福州市 350001

第一作者: 许逸洋, 男, 1990年生, 福建省漳州市人, 汉族, 中山大学在读博士, 主治医师, 主要从事骨与关节损伤、修复方面的研究。

通讯作者: 康焱, 博士, 教授, 主任医师, 中山大学附属第一医院关节外科, 广东省广州市 510080

<https://orcid.org/0000-0003-2733-8012> (许逸洋)

基金资助: 国家自然科学基金资助项目 (81972051), 课题名称: 利用单细胞测序技术探讨 miR-92a-3p 对骨髓干细胞向软骨细胞分化过程影响的机制研究, 项目负责人: 康焱

引用本文: 许逸洋, 毛谷平, 张紫机, 康焱. 环状 RNA 在骨关节炎中的研究进展: 从已知到未知 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(10):1592-1598.



OBJECTIVE: To summarize the progress of circular RNAs in the research of osteoarthritis, including the regulation of inflammation, the senescence and apoptosis of chondrocytes, the change of extracellular matrix components and the mediation of mechanical stress stimulation.

METHODS: The first author used computers to retrieve PubMed, Web of Science, and Medline. English retrieval words were "circular RNA, osteoarthritis, cartilage, chondrocyte". The retrieval period was from March 2015 to March 2020.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) It is suggested that circular RNA is a pivotal link in the occurrence and progression of osteoarthritis, and can be used as diagnostic markers and biological therapeutic targets. (2) In addition, current studies are limited to circular RNA sponging, articular cartilage degeneration and repair, while other functional mechanisms and the chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells are still unknown. These may be the direction in which basic research will translate into clinical outcomes in the future.

Key words: bone; joint; osteoarthritis; circular RNA; cartilage; stem cell; mesenchymal stem cell; review

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81972051 (to KY)

How to cite this article: XU YY, MAO GP, ZHANG ZJ, KANG Y. Research progress of circular RNAs in osteoarthritis: from known to unknown. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(10):1592-1598.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种普遍性、致残性、慢性运动系统疾病，累及软骨、软骨下骨、半月板、滑膜、韧带和肌肉等多个结构。骨关节炎的发病率和严重程度逐年进展，这也意味着庞大的医疗资源占用和财政支出^[1]。目前仅有非类固醇抗炎药、类固醇等少数控制疼痛症状的药物，既缺乏针对性，也可能带来其他严重的不良反应^[2-3]。骨关节炎患者不得不经历漫长的疼痛和功能受限，最终进入中晚期后依靠手术缓解。因此，深入研究骨关节炎的发病机制，从机制上掌握其发生、发展规律，才能最终找到有效的治疗靶点。

表观遗传学主要研究基因组序列无变化前提下其表达发生可遗传性改变。得益于生物信息工程技术的高速发展，近年来在 RNA 类型、结构、功能与调控机制的研究，尤其在表观转录组学（又称 RNA 表观遗传学）领域，展现了丰富的成果^[4]。随着骨关节炎基础研究不断深入，其表观遗传学机制逐步被揭示，比如软骨细胞肥大、炎症、应力过负荷、代谢障碍、细胞衰老、凋亡及自噬等^[2,5]。

环状 RNA 是非编码 RNA 中较为特殊的一类，其 3' 尾部和 5' 起始部以共价键相连，形成闭环结构 (Closed-loop Structure)，也因此得名。20 世纪 90 年代初，NIGRO 等^[6]在人类细胞中发现抑癌基因的前体 RNA “乱序”剪接的 4 种产物证实了环状 RNA 的存在。但是，环状 RNA 一直被认为是前体 RNA 错误拼接的产物，并不具备生物学功能^[7-8]。2012 年之后，得益于转录组测序 (RNA-Seq) 的发展，环状 RNA 被证实广泛存在于真核生物基因^[9-12]。近期的研究表明，环状 RNA 对骨关节炎发生和发展的多个关键环节中都有显著影响，并且充当潜在的治疗靶点^[13]。此次综述从环状 RNA 的生物学特征和细胞学机制出发，重点综述在骨关节炎相关研究中环状 RNA 所展现的功能及对临床应用的启示。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者应用计算机检索 PubMed、Web of science、Medline 数据库中 2015 年 3 月至 2020 年 3 月出版的文献，英文检索词为“circular RNA, osteoarthritis, cartilage, chondrocyte”，结果仅限于英文文献。

1.2 入选标准

1.2.1 纳入标准 ①论述环状 RNA 形成机制、生物学特征、与疾病研究相关的文章；②论述骨关节炎发生和进展机制、

软组修复的文章；③论述干细胞成软骨分化、软组组织工程学最新研究的文章。

1.2.2 排除标准 与研究目的不相关的文章，观点陈旧且已被证伪的文章。

1.3 质量评估 通过上述计算机检索与手工检索，共检索到 205 篇英文文献。按入选标准进行人工筛选，排除与主题相关性差及重复、陈旧的文献，最终纳入 82 篇文献。纳入研究的文献包括研究原著、综述、述论等，检索流程见图 1。

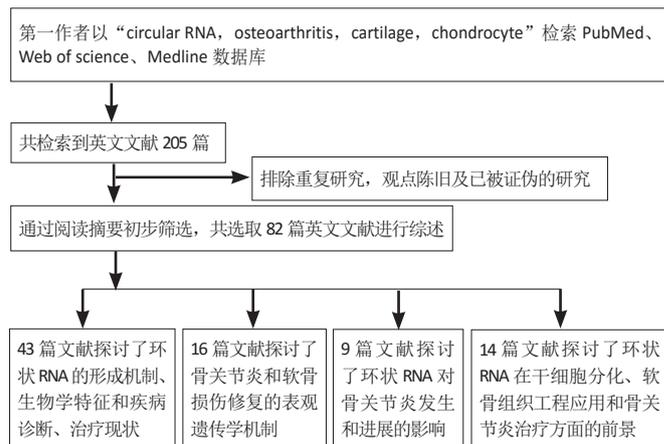


图 1 | 环状 RNA 在骨关节炎中研究进展的综述文献检索流程图

1.4 数据的提取 研究文献由相互独立的 3 人提取并通过小组多次讨论解决分歧，信息记录侧重环状 RNA 在骨关节炎领域的研究进展。

2 结果 Results

2.1 环状 RNA 的形成和调控 以环状 RNA 的来源序列进行分类，包括外显子环状 RNA、内含子环状 RNA 以及外显子-内含子环状 RNA 3 种。环状结构的形成依赖特殊的反向剪接 (Back-splicing)，即下游剪接供体反向连接至上游剪接受体，并以共价键结合。JECK 等^[10]在 2013 年提出了 2 种经典的含外显子 RNA 环化机制：内含子配对模式 (Intron-pairing) 和套索模式 (Lariat-driven)。而内含子环状 RNA 主要依赖靠近 5' 剪切位点的 GU 富集元件和 3' 分支位点的 C 富集元件互作形成类似套索结构，再由剪接体加工和 3' 尾端降解成环^[14]。此外，QKI 蛋白和盲肌样蛋白 1 等 RNA 结合蛋白也能够与侧翼内含子的特异元件结合并互相形成二聚体^[15-19]。

环状 RNA 的生成受到顺式剪接 (Cis-splicing) 和反式剪接

(Trans-splicing) 中多种剪接因子的调控^[17,20]。U2 核糖核蛋白剪接体 (U2 snRNP) 和信使 RNA 前体剪接因子 2 等线性剪切组件的下调直接抑制了剪接体功能, 进而通过可变剪接途径 (Alternative Splice) 促使外显子环化的发生^[20-21]; 可稳定内含子配对结构^[22]; 腺苷脱氨酶 1 则使腺苷转化成肌苷, 富集在环状 RNA 附近位点^[23], 它们是环状 RNA 生成的负调控因子。

环状 RNA 的形成和调控是机体生理和病理过程的重要组成部分, 无论是病因学研究, 还是临床诊断、治疗手段扩展, 它都极具启示作用; 更加全面地剖析了环状 RNA 生成、调控机制, 是干预其功能作用的前提, 也是转录组学临床转化的“利剑”。

2.2 环状 RNA 的特征 ①保守性: 环状 RNA 在不同种属间的序列有极高的保守性^[10,24-25], 表达量越高的环状 RNA 保守性更好, 不仅由于基因序列的同源性, 也有剪接位点的共享^[26]。②普遍性: 环状 RNA 广泛存在于生物体中, 占母基因转录本的 5%-10%, 甚至比线性 mRNA 的丰度更高^[27], 细胞质、细胞核、血清外泌体、唾液和其他体液中都检出有相当丰度的环状 RNA^[11,28-30]。③稳定性: 由于缺少线性 RNA 3' 末端的 poly(A) 尾, 环状 RNA 更加耐受核糖核酸外切酶 R 的降解^[31]。胞质中的环状 RNA 半衰期可超过 48 h, 远高于线性转录本的半衰期^[10]。④组织特异性: NICOLET 等^[32] 对骨髓造血细胞中环状 RNA 分布进行 k- 聚类分析, 发现其分布具有高度规律性, 并且这些环状 RNA 多数来自相同的基因, 只是在剪接位点上存在差异。而同一环状 RNA 在不同组织中也可发挥不同的作用机制^[33-34]。

环状 RNA 的生物学特征是发现、鉴定新的环状 RNA 以及验证其功能的主要参考。能否从某一类疾病为出发点, 归纳环状 RNA 在其中所表现的特征, 也许是未来该方向值得研究的问题, 也有助于挖掘其更广泛的功能作用。

2.3 环状 RNA 的功能

2.3.1 ceRNA 或 miRNAs Sponge 环状 RNA 具备多种微小 RNAs(miRNAs) 的反应元件 (MER), 能够充当竞争性内源性 RNA(ceRNA) 或者以海绵吸附方式影响 miRNA 对靶基因的作用^[35]。CiRS-7/CDR1as 首先在神经组织中被发现能够充当 miR-7 的海绵, 而 70 个结合位点也是迄今为止报道最高效的吸附能力^[36]。

2.3.2 蛋白质 Sponge 环状 RNA 与 RNA 结合蛋白的结合也被称为蛋白质 Sponge, 这类蛋白质常常与环状 RNA 生成、母基因转录等相关。circYAP 能结合翻译起始因子 4G, 与多聚腺苷结合蛋白形成复合物抑制母基因 YAP 的翻译效率^[37]。

2.3.3 蛋白质支架 (Scaffold) 环状 RNA 与酶及其作用底物一同形成复合物, 其本身并不参与催化反应, 而是稳定的结合域。circAmotl1 能同时结合磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1 和蛋白激酶 B, 随后促进蛋白激酶 B 磷酸化并转变为激活状态而入核^[38]。

2.3.4 调控转录和剪接 细胞核中, 外显子-内含子环状 RNA 已被证实可参与调控母基因的转录。CircEI3FJ 和 circPAIP2 共

定位于细胞核中, 能够在母基因启动子区域结合, 而 U1 核糖核蛋白剪接体 (U1 snRNP) 也同样结合在该区域进而形成复合体, 激活 RNA 聚合酶 II (RNA Polymerase II), 实现外显子-内含子环状 RNA 促进母基因的转录^[39]。

2.3.5 翻译蛋白 2017 年 YANG 等^[40] 首次在哺乳动物内源环状 RNA 中证实这一功能: 环状 RNA 上的 N6-甲基腺嘌呤 (m⁶A) 修饰位点募集 YTH 结构域家族蛋白 3 后利用翻译起始因子 eIF4G2 进行多肽翻译。ZHANG 等^[41] 更是首次发现人内源性环状 RNA 能够以类似病毒的重叠编码策略翻译功能蛋白。

环状 RNA 功能机制是阐释其在各种生命活动中发挥作用的重要着力点, 只有通过环状 RNA 功能的验证, 才能构建更加完善的疾病相关表观遗传学网络, 进而阐释和干预疾病的进程。

2.4 环状 RNA 与骨关节炎 国内外已有一系列的研究揭示了环状 RNA 在骨关节炎进展中的作用。这些报道涉及了骨关节炎发病机制的各个方面: 早期骨关节炎的诊断、骨关节炎炎症反应的调控、关节软骨细胞外基质稳态、关节软骨细胞衰老凋亡以及关节软骨机械应力刺激等, 见表 1。

表 1 | 软骨细胞环状 RNA 文献报道

环状 RNA	母基因	作用机制	功能	骨关节炎表达	发表时间
hsa_circ_0020014	DUSP5	-	骨关节炎早期诊断	上调	2020
hsa_circ_0032131	PRKCH	-	骨关节炎早期诊断	上调	2020
hsa_circ_0008365	SERPINE2	miR-1271 Sponge	炎症调控 细胞凋亡	下调	2019
hsa_circ_0005105	SEC24A	miR-26a Sponge	炎症调控	下调	2019
hsa_circ_0023404	RNF121	miRNA Sponge	细胞外基质	上调	2017
hsa_circ_0091702	VMA21	miR-200c Sponge	细胞外基质	上调	2017
CircRNA.33186	Umad1	miR-127-5p Sponge	细胞凋亡	下调	2019
hsa_circ_0010026	PDPN	miR-875 Sponge	机械力应激	上调	2017
hsa_circ_0058097	FN1	miR-365a-5p Sponge	机械力应激	上调	2020

2.4.1 环状 RNA 与早期骨关节炎的诊断 早期骨关节炎的性状、体征并不典型, 目前尚缺乏有效的诊断标志物进行快速鉴别。而血液、尿液、精液、关节液和唾液中都存在稳定、丰富的环状 RNA, 能够使用 PCR 进行快速筛查。在代谢综合征、2 型糖尿病、动脉粥样硬化、阿尔茨海默症以及肿瘤等疾病患者中, 也证实环状 RNA 可作为诊断、预后标志物^[42-46]。2020 年 WANG 等^[47] 利用 5 对大骨节患者和骨关节炎患者的软骨样本进行微阵列分析, 发现 1 627 个环状 RNA 在 2 组的表达有差异。将表达差异最显著的 20 个环状 RNA 进行 KEGG 和 GO 生物信息学通路分析, 进一步筛选出 circ_0020014_CBC1 可能参与骨与软骨疾病相关通路。2 组患者外周血样本中该环状 RNA 表达结果, 也提示临床医生可能可以通过血液检查鉴别大骨节病和骨关节炎。该研究组另一篇报道中, 测定 5 个备选环状 RNA 在 25 对膝关节骨关节炎患者和健康对照组的软骨与外周血中的表达量, 发现 circ_0032131_CBC1 在骨关节炎组和健康对照组的软骨与外周血中表达量均有显著差异, 而利用描述受试者特征曲线 (ROC) 分析, 也

获得有效的诊断敏感度 (AUC=0.8455); 并且在 circ_0032131_CBC1=9.365CT 时, Yoden 指数达到最大值 0.55(敏感度 0.90, 特异度 0.65)^[48]。

环状 RNA 独特的闭环结构、高稳定性以及组织、功能特异性都是作为早期骨关节炎诊断标志物的良好特征。

2.4.2 环状 RNA 参与骨关节炎炎症反应的调控 大量研究表明, 骨关节炎与低度的炎症反应相关。白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 、核因子 κ B 等多个促炎细胞因子在骨关节炎发生中起重要作用, 其信号通路下游多为基质降解酶或细胞周期效应蛋白^[49-50]。

利用白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 建立动物骨关节炎模型是最经典的炎症模型。ZHOU 等^[51]报道了使用小鼠关节软骨细胞以不同浓度白细胞介素 1 β 和不同时长处理, 发现 circRNA.33186 随浓度、时间正相关的表达变化。而 circ0008365/SERPINE2 则是在 10 μ g/L 白细胞介素 1 β 和 10 μ g/L 肿瘤坏死因子 α 分别处理 24 h 后都出现显著下降^[52]。这提示在白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 这 2 条经典炎症反应信号通路中, 环状 RNA 都有相应的作用。

尽管骨关节炎与类风湿性关节炎的病理机制有区别, 但是仍存在部分共同的炎症通路。如烟酰胺磷酸核糖基转移酶在骨关节炎和类风湿性关节炎患者外周血、关节液中较健康人群明显升高, 并且与疾病的严重程度呈正相关。这是由于关节滑膜外分泌形式烟酰胺磷酸核糖基转移酶作为促炎因素和趋化因子, 抑制软骨细胞蛋白质合成、上调基质降解酶表达, 而这一病理过程可能受到低氧诱导因子 2 α 的调控^[53]。2017 年 WU 等^[54]报道了 hsa_circ_5105 在使用白细胞介素 1 β 刺激的软骨细胞中呈现时间依赖的上调: 处理 24 h 后表达量增加至近 5 倍, 这一趋势与具有潜在结合位点的 miR-26a 表达量相反。双荧光素酶报告基因检测验证了 hsa_circ_5105 与烟酰胺磷酸核糖基转移酶都能与 miR-26a 结合。然而, 实时定量 PCR 提示转染 hsa_circ_5105 后, miR-26a 的转录并未受到影响, 但其对烟酰胺磷酸核糖基转移酶的抑制作用明显被拮抗; 并且共转染 hsa_circ_5105 的小干扰 RNA(siRNA) 后, 这种拮抗作用也被消减; 进一步随着烟酰胺磷酸核糖基转移酶在软骨细胞中表达上调, 促进了前列腺素 E2、白细胞介素 6 和白细胞介素 8 等多种炎症因子的生成。值得注意的是, 上述结果并未在 hsa_circ_5105 线性转录本过表达的实验中被重复, 提示这一功能机制是该环状 RNA 所特有。

2.4.3 环状 RNA 与关节软骨细胞外基质稳态 软骨细胞外基质稳态能够确保关节软骨维持一定范围的承重能力, 而骨关节炎软骨因蛋白聚糖的减少, 无法提供足够的组织支撑。

LIU 等^[55]在 2019 年报道了对骨关节炎和正常软骨转录组学表达谱的分析, 并构建存在显著差异的 71 个环状 RNA 和 112 mRNA 的共表达网络, 其中 circ0023404 与基质金属蛋白酶 13 都具备与 miR-136 的结合位点; 在 circ0023404 被敲降后, 基质金属蛋白酶 13 表达呈现显著下调, 而软骨细胞中 II 型胶原明显增加。在椎间盘髓核细胞外基质中也存在

相似的研究结果, 2018 年 CHENG 等^[56]发现 circVMA21 的转染明显减少了基质水解酶, 如基质金属蛋白酶 13、解聚素金属蛋白酶 4、解聚素金属蛋白酶 5, 而增加了 II 型胶原和蛋白聚糖的含量。

2.4.4 环状 RNA 与关节软骨细胞衰老、凋亡 关节周围组织衰老和骨关节炎微环境中累积的 DNA 损伤、氧化应激等改变都会软骨细胞的基因表达, 并可能由于靶向 DNA 损伤而引起端粒耗损^[50, 57]。尤其是软骨细胞这类有丝分裂后细胞, 长时间的复制间期使细胞损伤积累更为易感^[58-59]。

细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1(Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor-1, CDK11, 也称为 p21) 的上调是细胞衰老最显著的变化之一, 其通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶复合物活性调控细胞周期进程^[59]。2017 年 DU 等^[60]在多个细胞系中都证实 circFoxo3 能够与 p21、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 形成三元复合物并且介导细胞周期停滞。磷脂酰肌醇 3-激酶蛋白家族可作为锚定物促使蛋白激酶活化, 抑制糖原合成酶激酶 3 β 而调节细胞周期^[61-62]。MI 等^[63]在 2019 年利用 MC3T3-E1 细胞系过表达 circRNA AFF4, 证实其影响下游 miR-7223-5p/PI3KR1 调控轴, 抑制了细胞凋亡并增强增殖分化。

ZHOU 等^[51]在 2019 年报道了使用白细胞介素 1 β 处理后的软骨细胞增殖功能受到明显抑制, CCK8 试剂盒检测 A_{450 nm} 吸光度和 EdU 细胞成像实验均证实软骨细胞活性随处理时间延长而下降; 但是转染了 circRNA.33186 小分子干扰 RNA(siRNA) 之后, 软骨细胞活性有显著改善, 细胞凋亡比例也随之下降, 并且至少能够维持 72 h。在 CHENG 等^[52]2018 年的研究中发现, 转染 circSERPINE2 的人软骨细胞也同样部分改善了白细胞介素 1 β 引起的细胞凋亡率增加。并且, 如果将 circSERPINE2 和潜在靶点 miR-1271 一并下调, 则细胞凋亡率比单独下调 circSERPINE2 下降更为显著。

这些证据表明环状 RNA 对关节软骨细胞衰老、凋亡有调控作用, 骨关节炎的关节软骨细胞凋亡机制仍有待进一步的研究。

2.4.5 环状 RNA 参与关节软骨的机械力应激 机械应力的增加是骨关节炎发生发展的重要因素, 膝关节内、外侧间室受力不平衡造成的关节不稳可能是膝关节软骨破坏的始发因素^[1]。因此, 膝关节内侧半月板损伤与前交叉韧带切断常作为诱导小型动物骨关节炎的机械损伤模型^[64]。

LIU 等^[65]分析了膝骨关节炎患者不同损伤程度软骨区域的环状 RNA 表达谱, 有 104 个环状 RNA 在轻微损伤和严重损伤的 2 组间表达差异显著, 其中 hsa_circRNA_10026 在代表受力集中的严重损伤软骨区域显著表达, 在 GO 生物信息分析构建的共表达网络中, 它与肿瘤坏死因子 α 都与 miR-875 存在潜在结合位点。进一步的体外实验利用 FX-5000 细胞牵拉系统模拟机械应力刺激, hsa_circRNA_10026 在关节软骨的表达随着应力刺激时间延长而显著上调; 并且在对软骨细胞的 hsa_circRNA_10026 敲减后, 组织应力反应靶基因肿瘤坏死因子 α 表达量则随之下调。

相似的, XIAO 等^[66]对椎间盘终板软骨增加应力负荷后, 张力敏感的 circRNA0058097 表达上调, 而敲减该环状 RNA 后则应力负荷对细胞外基质的影响作用明显被削弱。miR-365a-5p 同时具有 circRNA0058097 和组蛋白去乙酰化酶 4 的结合位点, 而组蛋白去乙酰化酶在应力作用下对软骨细胞增殖和代谢、软骨细胞外基质降解、软骨肥大以及软骨内成骨中有广泛作用^[67-68]。这些研究结果都表明环状 RNA 可能在软骨细胞机械力应激的调控轴中扮演重要角色。

2.5 环状 RNA 在骨关节炎研究的展望 显然, 环状 RNA 从发现到逐步深入机制, 必须需要经历一段积累的时间。骨关节炎相关的环状 RNA 研究仍处于起步阶段, 无论是研究方案还是具体技术工具, 都源于 miRNA 的研究基础。基于环状 RNA 的基础研究进展, 对与骨关节炎相关、有研究价值但仍是未知的领域进行展望。

2.5.1 环状 RNA 的 m⁶A 修饰 m⁶A 修饰在 mRNA、tRNA 和 miRNA 等多种 RNA 中被广泛发现, 是影响其剪切、成熟、降解、核质转位、翻译蛋白以及 DNA 损伤的重要修饰类型^[40, 69-71]。2018 年 MIN 等^[72]报道了青年与老年人群的外周血单核细胞的 m⁶A 修饰谱差异, 随着衰老的进展, 发生 m⁶A 修饰的转录本比例增加。而其中 AGO2 的丰度与甲基化程度明显相关, 这种关系也影响了衰老相关疾病 miRNA 的表达。LI 等^[73]利用 GSE55235 和 GSE55457 两个 GEO 数据集的差异甲基化表达基因进行生物信息学分析, 发现骨关节炎患者与对照组在炎症信号通路、细胞凋亡、肿瘤坏死因子 α 信号通路以及成骨分化等多条信号通路上存在较高的甲基化差异水平。这些研究都表明 m⁶A 甲基化修饰可能在骨关节炎这类衰老疾病的病理进程中有重要作用。

在软骨发育方面, TENG 等^[74]通过条件性敲除 METTL-3 基因的小鼠, 发现 METTL-3 的缺失降低了骨量, 增加了骨髓脂肪。进一步的体外实验表明 METTL-3 的缺失使 m⁶A 甲基化调控甲状旁腺激素基因表达的功能下调, 导致间充质干细胞成骨能力下降, 成脂分化潜能增强。而实验结果也提示成软骨能力有所下降但并不显著, 这也提示了一个可能影响间充质干细胞成软骨分化的研究方向。

环状 RNA 的 m⁶A 修饰在 2016 年被首次报道, 随后的研究表明 m⁶A 甲基化修饰可促进环状 RNA 的蛋白翻译, 并且与其出核、降解、免疫等功能状态密切相关^[75-77]。到目前为止, 仍未见与软骨发育、退变以及骨关节炎发生机制相关环状 RNA 甲基化修饰的研究报道。鉴于甲基化修饰在衰老性疾病、骨关节炎病理过程中均有体现, 而 m⁶A 修饰作为研究技术最成熟的甲基化修饰, 可能成为未来关于骨关节炎的环状 RNA 研究的一个热点。

2.5.2 环状 RNA 的蛋白翻译功能 目前, 与骨关节炎相关的环状 RNA 研究均只涉及 miRNA Sponge 机制, 其他如蛋白互作在肿瘤、心血管疾病中已有少量报道^[41, 78]。这其中的原因, 一方面是 Sponge 机制的研究技术较成熟, 对实验条件的要求较低, 并且前期已有大量疾病相关的 miRNA 被报道, 公开

的数据库和上、下游靶点预测工具数量众多; 而另一方面, 环状 RNA 与蛋白互作的技术方案仍处于起步阶段, 当前采用的验证方案依然是抗原-抗体互作、凝胶电泳等传统技术, 如 RNA pull-down、RNA 结合蛋白免疫沉淀技术和电泳迁移率实验等。这些技术无法直接验证二者结合, 也未考虑蛋白质或者多肽的三维构象改变^[79]。

GARIKIPATI 等^[78]发现心肌梗死小鼠心脏中 circFndc3b 的表达显著下调, 在对其过表达后能够通过增加 RNA 结合蛋白与 FUS 相结合, 上调血管内皮生长因子 A 表达, 进而重建梗死心肌、改善心脏功能。这提示研究者骨关节炎相关环状 RNA 蛋白互作的功能研究同样值得投入关注, 可能有助于找到更为直接有效的治疗途径。

2.5.3 环状 RNA 在间充质干细胞成软骨分化的研究 得益于其获取和培养的方法简便易行、方案成熟, 将间充质干细胞应用于骨关节炎、心血管疾病和糖尿病的治疗是近年来干细胞研究的热点, 尤其以骨髓间充质干细胞和脂肪干细胞成果显著。相对而言, 脂肪干细胞在抗衰老、维持干性特征、高增殖率以及低异质质等方面具有更良好的治疗前景^[80]。

环状 RNA 对干细胞发育潜能调控的机制逐步被揭示, 可变剪接和 miRNA/RNA 结合蛋白 Sponge 在其中发挥重要作用。ZHU 等^[81]报道了 hsa_circH19 能够与多聚嘧啶序列结合蛋白 1 直接结合并抑制其功能, 下调了甾醇调节元件结合蛋白 1 的前体剪切, 使细胞核 (nSREBP1) 转位受阻, 最终抑制了脂肪干细胞成脂分化。反之, 敲除 hsa_circH19 则可显著增强脂肪干细胞成脂分化能力, 可能依此实现靶向治疗脂代谢异常疾病。CHERUBINI 等^[82]研究证实, circFOXP1 通过激活非经典的 Wnt 信号通路和表皮生长因子受体能够维持骨髓间充质干细胞多能性和分化能力。

目前尚缺乏环状 RNA 在间充质干细胞成软骨分化过程中作用的相关研究证据, 尽管成软骨分化过程已有多种 miRNA 显示交错复杂的调控机制^[13]。是否能够找到决定性作用的环状 RNA 参与其中, 并阐明其功能机制必将是下一阶段的研究热点, 这也能够给骨关节炎的软骨组织工程修复提供良好的种子细胞。

2.5.4 环状 RNA 作为骨关节炎的潜在治疗靶点 骨关节炎最主要的生物治疗策略是针对软骨退变的机械或炎性信号通路进行干预。关节软骨依靠良好的细胞状态和机械刺激而维持关节稳态, 衰老或损伤的软骨细胞功能则无法提供足够的组织支撑^[2]。环状 RNA 在软骨退变中的机制尚未完全被阐明, 但是利用其调控退变进程, 改善软骨细胞外基质组分的实验现象值得特别关注。

ZHOU 等^[51]建立了内侧半月板损伤模型小鼠, 从术后第 1 周开始以包装 circRNA.33186 的 siRNA 慢病毒株进行 1 次/周的关节腔注射, 3 周后实验组小鼠膝关节软骨细胞外基质降解酶比空白对照组明显降低, 而 II 型胶原含量却显著升高。而 SHEN 等^[52]则使用腺病毒包被后的 circ0008365/SEPINE2 注射到前交叉韧带切断诱导骨关节炎模型兔的膝关节腔, 治疗

组最终获得的国际骨关节炎协会评分显著低于对照组，而通过 Micro-CT 三维成像也提示治疗组的骨赘减少。这些实验现象表明环状 RNA 有机会成为骨关节炎治疗的潜在靶点。理论上，环状 RNA 在种群进化中序列保守性高、环状结构稳定性好、组织特异性高，能够克服传统非编码 RNA 干扰 (ncRNAi) 中运输工具高要求、脱靶效应频繁的难度，相较于 miRNA 和长链非编码 RNA 更利于研究人员将其转化为临床治疗工具。

3 总结 Summary

环状 RNA 的研究发展迅速，在骨关节炎及其相关组织、细胞中的表达特征已逐渐明晰，但对于这种表象背后的机制认知和未来的临床转化仍有很大的局限。相信随着研究的深入，环状 RNA 特殊的构造和功能特点能够在深刻掌握其规律后提供更多的科研、临床用途。

作者贡献：许逸洋、张紫机负责设计，许逸洋、毛谷平、张紫机负责收集资料，许逸洋负责成文，康焱负责审核。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金资助项目 (81972051)”的基金资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程，不存在利益冲突。

写作指南：该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019; 393(10182):1745-1759.
- [2] DIDOMENICO CD, LINTZ M, BONASSAR LJ. Molecular transport in articular cartilage- what have we learned from the past 50 years? *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(7):393-403.
- [3] ZHU Z, LI J, RUAN G, et al. Investigational drugs for the treatment of osteoarthritis, an update on recent developments. *Exp Opin Invest Drugs*. 2018;27(11):881-900.
- [4] WANG KC, CHANG HY. Epigenomics: Technologies and Applications. *Circulation Res*. 2018;122(9):1191-1199.
- [5] RAMOS YF, MEULENBELT I. The role of epigenetics in osteoarthritis: current perspective. *Curr Opin Rheumatol*. 2017; 29(1):119-129.
- [6] NIGRO JM, CHO KR, FEARON ER, et al. Scrambled exons. *Cell*. 1991; 64(3):607-613.
- [7] COCQUERELLE C, MASCREZ B, HÉTUIN D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J*. 1993;7(1):155-160.
- [8] HSU MT, COCA-PRADOS M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature*. 1979; 280(5720): 339-340.
- [9] WANG PL, BAO Y, YEE MC, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One*. 2014;9(6):e90859.
- [10] JECK WR, SORRENTINO JA, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA (New York, N.Y.)*. 2013;19(2): 141-157.

- [11] SALZMAN J, GAWAD C, WANG PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*. 2012; 7(2):e30733.
- [12] SALZMAN J, CHEN RE, OLSEN MN, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet*. 2013; 9(9):e1003777.
- [13] REYNARD LN, BARTER MJ. Osteoarthritis year in review 2019: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(3): 275-284.
- [14] ZHANG XO, DONG R, ZHANG Y, et al. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res*. 2016; 26(9):1277-1287.
- [15] CONN SJ, PILLMAN KA, TOUBIA J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*. 2015;160(6):1125-1134.
- [16] ERRICHELLI L, DINI MODIGLIANI S, LANEVE P, et al. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun*. 2017;8:14741.
- [17] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 2014;56(1):55-66.
- [18] PAGLIARINI V, JOLLY A, BIELLI P, et al. Sam68 binds Alu-rich introns in SMN and promotes pre-mRNA circularization. *Nucl Acids Res*. 2020; 48(2):633-645.
- [19] YU CY, LI TC, WU YY, et al. The circular RNA circBIRC6 participates in the molecular circuitry controlling human pluripotency. *Nat Commun*. 2017;8(1):1149.
- [20] LIANG D, TATOMER DC, LUO Z, et al. The output of protein-coding genes shifts to circular RNAs when the pre-mRNA processing machinery is limiting. *Mol Cell*. 2017;68(5):940-954.e3.
- [21] KRAMER MC, LIANG D, TATOMER DC, et al. Combinatorial control of Drosophila circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. *Genes Dev*. 2015;29(20):2168-2182.
- [22] LI X, LIU CX, XUE W, et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. *Mol Cell*. 2017;67(2): 214-227.e7.
- [23] EISENBERG E, LEVANON EY. A-to-I RNA editing- immune protector and transcriptome diversifier. *Nature reviews. Genetics*. 2018;19(8): 473-490.
- [24] GLAZAR P, PAPAVALSILEIOU P, RAJEWSKY N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA*. 2014;20(11):1666-1670.
- [25] YOU X, VLATKOVIC I, BABIC A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci*. 2015;18(4):603-610.
- [26] RYBAK-WOLF A, STOTTMEISTER C, GLAŽAR P, et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol Cell*. 2015;58(5):870-885.
- [27] DANAN M, SCHWARTZ S, EDELHEIT S, et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(7): 3131-3142.
- [28] LI Y, ZHENG Q, BAO C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res*. 2015; 25(8): 981-984.
- [29] BAHN JH, ZHANG Q, LI F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem*. 2015; 61(1):221-230.
- [30] YU F, XIE C, SUN J, et al. Circular RNA expression profiles in synovial fluid: a promising new class of diagnostic biomarkers for osteoarthritis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(3):1338-1346.
- [31] SUZUKI H, ZUO Y, WANG J, et al. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(8): e63.
- [32] NICOLET BP, ENGELS S, AGLIALORO F, et al. Circular RNA expression in human hematopoietic cells is widespread and cell-type specific. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(16):8168-8180.
- [33] OU R, LV J, ZHANG Q, et al. circAMOTL1 Motivates AMOTL1 Expression to Facilitate Cervical Cancer Growth. *Molecular therapy. Nucleic Acids*. 2020;19:50-60.
- [34] YANG Q, DU WW, WU N, et al. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. *Cell Death Differ*. 2017;24(9): 1609-1620.

- [35] TAY Y, RINN J, PANDOLFI PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature*. 2014;505(7483):344-352.
- [36] KRISTENSEN LS, OKHOLM TLH, VENØ MT, et al. Circular RNAs are abundantly expressed and upregulated during human epidermal stem cell differentiation. *RNA Biol*. 2018;15(2):280-291.
- [37] WU N, YUAN Z, DU KY, et al. Translation of yes-associated protein (YAP) was antagonized by its circular RNA via suppressing the assembly of the translation initiation machinery. *Cell Death Differ*. 2019;26(12):2758-2773.
- [38] ZENG Y, DU WW, WU Y, et al. A Circular RNA Binds To and Activates AKT Phosphorylation and Nuclear Localization Reducing Apoptosis and Enhancing Cardiac Repair. *Theranostics*. 2017;7(16):3842-3855.
- [39] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*. 2015; 22(3): 256-264.
- [40] YANG Y, FAN X, MAO M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine. *Cell Res*. 2017; 27(5): 626-641.
- [41] ZHANG M, HUANG N, YANG X, et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene*. 2018; 37(13): 1805-1814.
- [42] HAQUE S, HARRIES LW. Circular RNAs (circRNAs) in health and disease. *Genes (Basel)*. 2017;8(12). pii: E353.
- [43] HADDAD G, LORENZEN JM. Biogenesis and Function of Circular RNAs in Health and in Disease. *Front Pharmacol*. 2019;10:428.
- [44] KRISTENSEN LS, HANSEN TB, VENØ MT, et al. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field. *Oncogene*. 2018; 37(5): 555-565.
- [45] ALTESHA MA, NI T, KHAN A, et al. Circular RNA in cardiovascular disease. *J Cell Physiol*. 2019; 234(5): 5588-5600.
- [46] LU S, YANG X, WANG C, et al. Current status and potential role of circular RNAs in neurological disorders. *J Neurochem*. 2019;150(3): 237-248.
- [47] WANG Y, WU C, ZHANG Y, et al. Screening for differentially expressed circRNA between Kashin-Beck disease and osteoarthritis patients based on circRNA chips. *Clin Chim Acta*. 2020;501:92-101.
- [48] WANG Y, WU C, YANG Y, et al. Preliminary Exploration of hsa_circ_0032131 Levels in Peripheral Blood as a Potential Diagnostic Biomarker of Osteoarthritis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2019;23(10): 717-721.
- [49] SCANZELLO CR. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(1):79-85.
- [50] GREENE MA, LOESER RF. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1966-1971.
- [51] ZHOU ZB, HUANG GX, FU Q, et al. circRNA.33186 Contributes to the Pathogenesis of Osteoarthritis by Sponging miR-127-5p. *Mol Ther*. 2019;27(3):531-541.
- [52] SHEN S, WU Y, CHEN J, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(6):826-836.
- [53] STEGEN S, LAPERRÉ K, EELÉN G, et al. HIF-1 α metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. *Nature*. 2019; 565(7740): 511-515.
- [54] WU Y, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. CircRNA hsa_circ_0005105 upregulates NAMPT expression and promotes chondrocyte extracellular matrix degradation by sponging miR-26a. *Cell Biol Int*. 2017; 41(12): 1283-1289.
- [55] LIU Q, ZHANG X, HU X, et al. Circular RNA Related to the Chondrocyte ECM Regulates MMP13 Expression by Functioning as a MiR-136 'Sponge' in Human Cartilage Degradation. *Sci Rep*. 2016; 6:22572.
- [56] CHENG X, ZHANG L, ZHANG K, et al. Circular RNA VMA21 protects against intervertebral disc degeneration through targeting miR-200c and X linked inhibitor-of-apoptosis protein. *Ann Rheum Dis*. 2018; 77(5):770-779.
- [57] HARBO M, DELAISSE JM, KJAERGAARD-ANDERSEN P, et al. The relationship between ultra-short telomeres, aging of articular cartilage and the development of human hip osteoarthritis. *Mech Ageing Dev*. 2013; 134(9): 367-372.
- [58] LIU L, RANDO TA. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol*. 2011; 193(2): 257-266.
- [59] JURK D, WANG C, MIWA S, et al. Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell*. 2012;11(6):996-1004.
- [60] DU WW, FANG L, YANG W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ*. 2017; 24(2): 357-370.
- [61] LI T, WANG G. Computer-aided targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway: toxicity reduction and therapeutic opportunities. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10): 18856-18891.
- [62] JERE SW, HOURELD NN, ABRAHAMSE H. Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;50:52-59.
- [63] MI B, XIONG Y, CHEN L, et al. CircRNA AFF4 promotes osteoblast cells proliferation and inhibits apoptosis via the Mir-7223-5p/PIK3R1 axis. *Aging*. 2019; 11(24):11988-12001.
- [64] THYSEN S, LUYTEN FP, LORIES RJU. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Dis Model Mech*. 2015;8(1):17-30.
- [65] LIU Q, ZHANG X, HU X, et al. Emerging Roles of circRNA Related to the Mechanical Stress in Human Cartilage Degradation of Osteoarthritis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;7:223-230.
- [66] XIAO L, DING B, XU S, et al. circRNA_0058097 promotes tension-induced degeneration of endplate chondrocytes by regulating HDAC4 expression through sponge adsorption of miR-365a-5p. *J Cell Biochem*. 2020;121(1):418-429.
- [67] NISHIMORI S, LAI F, SHIRAISHI M, et al. PTHrP targets HDAC4 and HDAC5 to repress chondrocyte hypertrophy. *JCI Insight*. 2019;4(5). pii: 97903.
- [68] WANG H, ZHANG H, SUN Q, et al. Chondrocyte mTORC1 activation stimulates miR-483-5p via HDAC4 in osteoarthritis progression. *J Cell Physiol*. 2019;234(3):2730-2740.
- [69] XIAO W, ADHIKARI S, DAHAL U, et al. Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol Cell*. 2016;61(4):507-519.
- [70] COOTS RA, LIU XM, MAO Y, et al. m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation. *Mol Cell*. 2017;68(3):504-514.e7.
- [71] XIAO CL, ZHU S, HE M, et al. N-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome. *Mol Cell*. 2018;71(2):306-318.e7.
- [72] MIN KW, ZEALY RW, DAVILA S, et al. Profiling of m6A RNA modifications identified an age-associated regulation of AGO2 mRNA stability. *Aging Cell*. 2018;17(3):e12753.
- [73] LI Z, ZHANG R, YANG X, et al. Analysis of gene expression and methylation datasets identified ADAMT59, FKBP5, and PFKFB3 as biomarkers for osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8908-8917.
- [74] TENG H, MAO F, LIANG J, et al. Transcriptomic signature associated with carcinogenesis and aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Theranostics*. 2018;8(16):4345-4358.
- [75] YANG Y, FAN X, MAO M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N-methyladenosine. *Cell research*. 2017;27(5):626-641.
- [76] CHEN YG, CHEN R, AHMAD S, et al. N6-Methyladenosine Modification Controls Circular RNA Immunity. *Mol Cell*. 2019;76(1):96-109.e9.
- [77] CHEN RX, CHEN X, XIA LP, et al. N-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis. *Nat Commun*. 2019;10(1):4695.
- [78] GARIKIPATI VNS, VERMA SK, CHENG Z, et al. Circular RNA CircFndc3b modulates cardiac repair after myocardial infarction via FUS/VEGF-A axis. *Nat Commun*. 2019;10(1):4317.
- [79] HUANG A, ZHENG H, WU Z, et al. Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification. *Theranostics*. 2020;10(8): 3503-3517.
- [80] ZHOU W, LIN J, ZHAO K, et al. Single-cell profiles and clinically useful properties of human mesenchymal stem cells of adipose and bone marrow origin. *Am J Sports Med*. 2019;47(7):1722-1733.
- [81] ZHU Y, GUI W, LIN X, et al. Knock-down of circular RNA H19 induces human adipose-derived stem cells adipogenic differentiation via a mechanism involving the polypyrimidine tract-binding protein 1. *Exp Cell Res*. 2020;387(2):111753.
- [82] CHERUBINI A, BARILANI M, ROSSI RL, et al. FOXP1 circular RNA sustains mesenchymal stem cell identity via microRNA inhibition. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(10):5325-5340.