

# 初发系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中circ-0007385表达变化及其意义

管春平, 韩玲玲, 邢倩\*

青岛大学附属青岛市市立医院, 山东 青岛

收稿日期: 2022年10月23日; 录用日期: 2022年11月21日; 发布日期: 2022年11月28日

## 摘要

背景: 系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)是一种复杂的多器官多系统受累的自身免疫性疾病, 其病因尚未阐明。已有研究表明环状RNA (circRNA)在人体组织和器官中广泛表达, 作为内源竞争RNA (ceRNA)与微小RNA (miRNA)结合, 在SLE中发挥重要作用。课题组前期通过高通量测序分析筛查SLE患者血清circRNA提示circ-0007385表达异常, 可能参与SLE发病。目的: 本研究旨在探究SLE患者外周血单个核细胞(PBMC)中circ-0007385的表达水平并分析其意义, 为SLE的早期诊断寻找新型生物标志物。方法: 选取初发SLE患者60例(活动期34例、稳定期26例)作为SLE组, 健康人30例作为对照组。通过高通量测序分析受试者外周血PBMC中的circRNA表达水平, 采用RT-qPCR法检测所有受试者血清circ-0007385、miR-181b的表达水平, 生物信息技术构建circRNA-miRNA相互作用的网络, 采用受试者工作特征(Receiver Operating Characteristic, ROC)曲线分析血清circ-0007385、miR-181b对于初发SLE诊断的特异性、敏感度和曲线下面积(Area Under the Curve, AUC)。结果: 1) SLE患者外周血PBMC中circ-0007385较对照组显著升高( $p < 0.01$ ), 且与疾病活动度指标dsDNA抗体正相关( $r = 0.6839 p < 0.001$ )和SLE疾病活动指数(SLEDAI-2K)评分正相关( $r = 0.5933 p < 0.01$ ), 与补体C3负相关( $r = -0.6617 p < 0.05$ )。2) 生物信息技术预测circ-0007385与miR-181b特异结合位点, RT-qPCR结果显示, SLE患者外周血PBMC中miR-181b的表达量与对照组相比显著降低( $p < 0.01$ ), 并与circ-0007385表达量成负相关( $r = -0.5839 p < 0.01$ )。3) ROC曲线分析表明, 外周血PBMC中circ-0007385和miR-181b表达水平可以区分初发SLE患者与对照组, 二元逻辑回归模型表明, circ-0007385联合miR-181b可以提供最佳的诊断准确性, 曲线下面积(AUC)为0.9078 (敏感性为0.85, 特异性0.87)。结论: 本研究表明, 外周血PBMC中circ-0007385联合miR-181b在预测SLE发病中具有一定的诊断价值, 并且与初发SLE患者疾病活动度显著相关。

## 关键词

系统性红斑狼疮, 非编码RNA, circRNA-miRNA网络, ROC曲线

\*通讯作者。

# The Expression of circ-0007385 in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Primary Systemic Lupus Erythematosus and Its Significance

Chunping Guan, Lingling Han, Qian Xing\*

Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Oct. 23<sup>rd</sup>, 2022; accepted: Nov. 21<sup>st</sup>, 2022; published: Nov. 28<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

**Background:** Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disease involving multiple organs and multiple systems, and its etiology has not been clarified. Previous studies have shown that circle RNA (circRNA) is widely expressed in human tissues and organs, and plays an important role in SLE as a competitive endogenous RNA (ceRNA) binding to microRNAs (miRNA). In the early stage, the research group screened the serum circRNA of SLE patients through high-throughput sequencing analysis, suggesting that circ-0007385 expression was abnormal, which may be involved in the pathogenesis of SLE. **Objective:** This study aims to explore the circ-0007385 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with SLE. The expression level of circ-0007385 and its significance were analyzed to find new biomarkers for early diagnosis of SLE. **Methods:** 60 patients with primary SLE (34 patients in active phase, 26 patients in stable phase) were selected as SLE group, and 30 healthy people as control group. The circRNA expression level in peripheral blood PBMC of the subjects was analyzed by high-throughput sequencing. The expression level of circ-0007385 and miR-181b in serum of all subjects was detected by RTqPCR. The circRNA-miRNA interaction network was constructed by bioinformatics technology. The specificity of circ-0007385 and miR-181b in serum for the diagnosis of primary SLE was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve results of sensitivity and area under the curve (AUC). **Results:** 1) Circ-0007385 in peripheral blood PBMC of SLE patients was significantly higher than that of the control group ( $p < 0.01$ ), and was positively correlated with dsDNA antibody ( $r = 0.6839$   $p < 0.001$ ) and SLEDAI-2K score ( $r = 0.5933$   $p < 0.01$ ), negative correlation with complement C3 ( $r = -0.6617$   $p < 0.05$ ). 2) Bioinformatics predicted the specific binding sites of circ-0007385 and miR-181b. RT-qPCR results showed that the expression of miR-181b in peripheral blood PBMC of SLE patients was significantly lower than that of control group ( $p < 0.01$ ), and compared with that of circ-0007385 expression was negatively correlated ( $r = -0.5839$   $p < 0.01$ ). 3) ROC curve analysis showed that circ in peripheral blood PBMC circ-0007385 and miR-181b expression levels can distinguish patients with primary SLE from the control group. The binary logistic regression model shows that circ-0007385 combined with miR-181b can provide better diagnostic accuracy, and the area under the curve (AUC) is 0.9078 (sensitivity is 0.85, specificity is 0.87). **Conclusion:** This study shows that circ-0007385 combined with miR-181b in peripheral blood PBMC has certain diagnostic value in predicting the incidence of SLE, and is significantly related to the disease activity of patients with primary SLE.

## Keywords

Systemic Lupus Erythematosus, Non-Coding RNA, CircRNA miRNA Network, ROC Curve



## 1. 背景

系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多器官的自身免疫性疾病,其特征在于产生多种自身抗体引起慢性炎症[1]。SLE的发病机制是多因素的,遗传、环境、激素和表观遗传因素参与其发生、发展,疾病具有多样化的临床表现[2],临床工作中如何早期诊断SLE面临挑战,因此,寻求早期诊断SLE的新型生物标志物至关重要[3][4]。最近的研究进展已经开始揭示环状RNA在SLE中的作用,为SLE的发病机制提供了新的认识[5]。环状RNA(circRNA)是一种特殊的非编码RNA,由RNA聚合酶II转录形成共价闭合的单链环状RNA分子,没有5'帽和3'多(A)尾[6]。研究表明,环状RNA在人体组织和器官中广泛表达,作为竞争性内源性RNA(ceRNA)与微RNA(miRNA)结合,在转录和转录后水平上调节基因表达,与SLE的发病密切相关[7][8],本研究旨在探究SLE患者外周血单个核细胞(PBMC)中circ-0007385的表达水平并分析其与疾病活动度的关系,为SLE的早期诊断寻找新的靶点。

## 2. 实验方法

### 2.1. 样本收集

本研究选取在青岛市市立医院风湿免疫科收治的60例初发SLE患者,所有SLE患者均符合美国风湿病学会(ACR)1997年诊断标准,排除合并其他自身免疫系统疾病者,合并肝、肾、心脏功能障碍等严重疾病者,合并肿瘤、感染性疾病者,不配合医生治疗者,一个月内未服用过糖皮质激素或者免疫抑制剂者。其中男6例,女54例;年龄20~69岁,中位年龄39岁,作为SLE组。采用系统性红斑狼疮活动指数2000(Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000, SLEDAI-2k)进行评估,评分与等级的判定如下:疾病无活动(分数=0~4分)、轻度疾病活动(分数=5~9分)、中度疾病活动(分数=10~14分)、高度疾病活动(分数≥15分)并由青岛市市立医院风湿免疫科专科医生评估认定,将60例SLE患者分为两组:分为活动期组(分数>9分,34例)、稳定期组(分数<5分,26例)。选择同期在本院健康体检的志愿者30例作为对照组,其中男3例、女27例,年龄19~68岁、中位年龄38岁。各组受试者性别、年龄无统计学差异。该研究获得青岛市市立医院医学伦理委员会批准,所有参与研究的受试者均签署了同意书。

### 2.2. 血液样品制备

通过静脉穿刺采集健康人及SLE患者血液样本(5 mL),在收集样本后4小时内,使用人外周血淋巴细胞分离培养基(天津灏洋生物制品厂,中国天津)分离外周血单个核细胞(PBMC)用于定量聚合酶链反应(RT-qPCR)。

### 2.3. 高通量测序

使用Illumina HiSeq™ 2500测序平台(美国加利福尼亚州圣地亚哥市伊卢米纳)对十组样品(5组初发SLE患者对5组健康对照)进行测序,对原始序列数据进行生物信息学分析

### 2.4. 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

使用TRIzol试剂(VAZYME,美国)提取和纯化总RNA,并使用等量的总RNA(1 μg)在42℃下反应

60 分钟, 在 95℃ 下反应 3 分钟(Bio Rad, 美国)以获得 cDNA 模板, 使用 SYBR Green PCR 混合物(BeiJing TIANGEN, 中国北京)对 cDNA (1 μL)进行 qRT-PCR 扩增分析(美国应用生物系统公司), circ-0007385 引物序列 T:5' - CGTGACCCAGAAGTGC GTTCACA-3'F:5'-TGGGGGTGTATCAGTCTTTGGTT-3', GAPDH 作为内部对照, 引物序列为 Forward: 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3, Reverse: 5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3'作为。反应条件如下: 95℃ 下反应 15 分钟, 在 94℃ 下反应 20 秒, 在 60℃ 下反应 34 秒, 共 40 个循环。分析了熔解曲线, 每个样品设置三个重复孔, 相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

## 2.5. 统计分析

所有统计分析均使用 GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA)进行。定量资料以  $\bar{X} \pm S$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 有差异后进行 Turkey 检验比较每组之间的差异, 方差齐且呈正态分布的数据两组间比较采用 Student's t 检验进行比较, 非正态分布的数据两组间比较采用秩和检验进行比较, 相关性分析采用 Pearson 相关分析法。采用接收者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线)分析 circRNA 与 miRNA 用于诊断 SLE 的灵敏度与特异度。  $p < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. SLE 患者外周血 PBMC 中 circ-0007385 的表达差异及临床意义

1) 前期课题组采用高通量测序技术检测分析健康对照( $n = 5$ )、初发 SLE 患者( $n = 5$ )外周血 PBMC 中的 circRNA 表达谱, 两组 circRNA 的整体分布显示有 194 个 circRNA (100 个显著上调和 94 个显著下调)显著表达差异。本研究选取表达差异超过 2 倍的 3 个 circRNA (circ-0002416、circ-0000387、circ-0007385), 使用 RT-qPCR 进行验证, 初发 SLE 患者与对照组相比, 仅有 circ-0007385 表达量( $1.76 \pm 0.22$ )的上调具有统计学意义( $p < 0.05$ ), circ-0002416 表达量( $1.12 \pm 0.18$ )、circ-0000387 表达量( $1.08 \pm 0.16$ )与对照组差异无统计学意义( $p > 0.05$ ), RT-qPCR 结果显示活动期组、稳定期组、对照组外周血 PBMC 中 circ-0007385 表达量分别为  $1.88 \pm 0.29$ 、 $1.58 \pm 0.21$ 、 $1.07 \pm 0.38$ , 活动期组表达量显著高于稳定期组, 稳定期组表达量显著高于对照组, 两两相比,  $p$  均  $< 0.01$ 。

2) SLE 患者外周血 PBMC 中 circ-0007385 表达与 SLE 疾病活动度显著相关

将 SLE 患者外周血 PBMC 中 circ-0007385 的表达量与疾病活动期指标(抗 dsDNA 抗体、SLE 疾病活动指数 2000、补体 C3、24 h 尿蛋白定量、免疫球蛋白、抗 sm 抗体)进行相关性分析, 结果显示, circ-0007385 表达量与抗 dsDNA 抗体显著正相关( $r = 0.6839$   $p < 0.001$ ), 与 SLE 疾病活动指数 2000 (SLEDAI-2 K)评分显著正相关( $r = 0.5933$   $p < 0.01$ ), 与补体 C3 显著负相关( $r = -0.6617$   $p < 0.01$ ), 与 24 h 尿蛋白定量、免疫球蛋白、抗 sm 抗体之间没有相关性。

### 3.2. circ-0007385 可能作为内源竞争 RNA 与 miR-181b 特异性结合发挥作用

1) circRNA-miRNA 相互作用的网络构建

使用 argetscan, miRanda, PITA, RNAhybrid, and RNA22 五种方法预测 circ-0007385 与 miRNA 保守序列的潜在结合, 在超过 3000 种相互作用中鉴定出 100 个潜在结合的 miRNA。通过 PubMed 和 Embase 数据库找到与 SLE 相关的 miRNA, 将数据合并后, 确定了 67 个 miRNA。基于已有的研究, 利用 SLE 的蛋白质结合、RNA 剪接和核酸结合等基本特征对新构建的 circRNA-miRNA-SLE 数据库中的 miRNA 进行排名, 我们发现 miR-181b 在其他 67 个 miRNA 中得分最高。

2) SLE 患者外周血 PBMC 中 miR-181b 表达量显著下调

RT-qPCR 结果显示在 SLE 组与对照组外周血 PBMC 中 miR-181b 表达量分别为  $0.79 \pm 0.22$ 、 $1.0 \pm 0.23$ ,

两者相比, SLE 组显著降低( $p < 0.05$ ), 且 SLE 组 miR-181b 表达量与 circ-0007385 表达量成显著负相关( $r = -0.5839$   $p < 0.01$ )。

### 3.3. circ-0007385 联合 miR-181b 评估 SLE 患者诊断的 ROC 曲线分析

通过 ROC 曲线分析研究了外周血 PBMC 中 circ-0007385、miR-181b 作为 SLE 患者潜在诊断指标的价值, circ-0007385 用于区分 SLE 患者与健康人组的 AUC 为 0.7878 (敏感性为 0.76, 特异性 0.84,  $p < 0.01$ ), miR-181b 用于区分 SLE 患者与健康人组的 AUC 为 0.7428 (敏感性 0.81, 特异性为 0.77,  $p < 0.01$ ), 用二元逻辑回归算得在用 circ-0007385 联合 miR-181b 诊断 SLE 时其前的系数(circ-0007385 & miR-181b =  $1.112\text{circ-0007385} + 1.004\text{miR-181b}$ , ROC 分析结果显示 circ-0007385 联合 miR-181b 可以提供最佳的诊断准确率, AUC 为 0.9078 (敏感性为 0.85, 特异性 0.87,  $p < 0.01$ ), 如图 1。

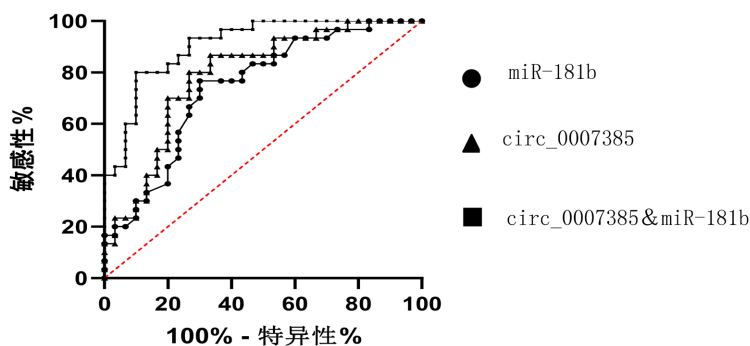


Figure 1. circ-0007385 combined with miR-181b ROC curve analysis

图 1. circ-0007385 联合 miR-181b 的 ROC 曲线分析

上述结果表明, 初发 SLE 患者外周血 PBMC 中 circ-0007385 联合 miR-181b 在预测 SLE 患者发生有一定的诊断价值。

## 4. 讨论

系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)是一种慢性全身性自身免疫性疾病, 其特征在于多个自身抗体的产生[9], 免疫复合物沉积和多个器官损伤, 早期诊断、及时治疗可预防严重并发症发生, 延长患者生存期[10]。研究表明, 失调的 circRNA 与 SLE 的发生和发展密切相关[11] [12], 有研究显示, 人全血中 circ-0004156 和 circ-0082626 明显升高, 与疾病活动性、自身抗体产生以及临床症状密切相关, 可作为 SLE 的潜在诊断及鉴别诊断标志物, 同时可作为评估疾病严重程度和活动性的指标[13]。2011 年, Salmena 等人首次提出了竞争性内源性 RNA (ceRNA)假说[14], 该假说指出, 一些 RNA 作为 ceRNA, 可以通过竞争目标 miRNA 上 mRNA 的共同结合位点来改变目标 miRNA 的功能。越来越多的研究表明, circRNA 可以作为 ceRNA, 通过竞争共享的 miRNA 来调节靶标 mRNA 的表达[15] [16]。本研究中, circ-0007385 被证实 SLE 患者的外周血 PBMC 中显著上调, 与疾病活动度指标如: 抗 dsDNA 抗体、SLEDAI2K 评分和补体 C3 显著正相关, 通过 ROC 曲线分析, 在 SLE 的诊断中, ROC 分析结果显示 circ-0007385 联合 miR-181b 的敏感性为 0.85, 特异性为 0.87, AUC 为 0.9078 ( $p < 0.05$ ), 这表明 circ-0007385 可作为辅助 SLE 诊断、评估 SLE 疾病活动性的相关指标。

近年来, 生物信息学分析被广泛用于帮助筛选关键基因, 构建调控模型[17], 选择可能参与免疫疾病发展和预后的治疗靶点, 为基础和临床研究提供指导[18], 有助于明确免疫疾病的发病机制, 指导临床治疗[19]。为了进一步研究 circ-0007385 潜在作用机制, 通过生物信息学分析构建了鉴定出一个差异表达的

circRNA-miRNA 网络, 针对 SLE 的蛋白质结合、RNA 剪接和核酸结合等基本特征对新构建的 circRNA-miRNA - SLE 数据库中的 miRNA 进行筛选, 选取特征最相关的 miR-181b 并通过 RT-qPCR 验证, 本研究结果表明, SLE 外周血 PBMC 中 circ-0007385 预测 SLE 发病具有一定的诊断价值, 与初发 SLE 患者疾病活动度有明显相关性。在 SLE 组中, 外周血 PBMC 中 miR-181b 的相对表达量与对照组相比显著降低, 并与 circ-0007385 表达量成负相关, 推测 circ-0007385 在 SLE 中的作用可能通过结合 miR-181b 来实现。

## 5. 研究局限及展望

越来越多的证据表明, circRNA 是免疫细胞发育和免疫调节多个阶段的积极参与者[20], 不仅可以作为人类自身免疫性疾病的诊断生物标志物, 还可以代表疾病的活动度或严重程度[21]。circRNA 通过充当 miRNA 海绵来调节许多生物过程, 包括 DNA 甲基化、免疫反应和炎症反应, 从而促进自身免疫性疾病的发展[22]。因此, 探究 circRNA 在系统性红斑狼疮中的表达变化具有重要意义。

本研究中, 我们已经详细介绍了 circ-0007385 与 SLE 之间的密切关系, 但对触发病变的分子机制了解甚少, 除生物信息学分析外, 尚缺乏关于 SLE 中 circ-0007385 分子机制的证据, 该环状 RNA 在 SLE 中的分子机制和功能特性需要进一步证实, 这可能会影响 circ-0007385 可以作为系统性红斑狼疮诊断生物标志物的结论的有效性和普遍性。作为内源性 miRNA 海绵的 circRNA 已经被广泛研究, 但很少有 circRNA/miRNA 相互作用在自身免疫性疾病中得到实验验证, 因此, 深入研究 circRNA 的生物发生、细胞质中的积累、转录后的修饰可能会增加对其生物学功能的理解, 有助于未来探索 circ-0007385 在 SLE 的发生发展中可能作用的分子机制。

## 参考文献

- [1] Deng, M., Wu, R., Zhou, X., *et al.* (2022) Analyses of the Clinical and Immunological Characteristics of Patients with Lupus Erythematosus. *Indian Journal of Dermatology*, **67**, Article No. 205.
- [2] Lerang, K., Gilboe, I.M., Steinar Thelle, D., *et al.* (2014) Mortality and Years of Potential Life Loss in Systemic Lupus Erythematosus: A Population-Based Cohort Study. *Lupus*, **23**, 1546-1552. <https://doi.org/10.1177/0961203314551083>
- [3] 苗青青. 环状 RNA 作为系统性红斑狼疮的生物标志物的筛选研究与鉴定[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [4] 詹皓婷, 李永哲. 系统性红斑狼疮生物标志物临床应用进展[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(9): 939-944.
- [5] 李海侠. 系统性红斑狼疮环状 RNA 表达谱研究及潜在分子标志物的筛选与鉴定[D]: [博士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [6] Chen, L.L. and Yang, L. (2015) Regulation of circRNA Biogenesis. *RNA Biology*, **12**, 381-388. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020271>
- [7] 唐国杰. 基因表达调控分子 circRNA 的研究现状及展望[D]: [硕士学位论文]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [8] Wang, X., Jian, W., Luo, Q., *et al.* (2022) CircSEMA4B Inhibits the Progression of Breast Cancer by Encoding a Novel Protein SEMA4B-211aa and Regulating AKT Phosphorylation. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 794. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05246-1>
- [9] Jin, X., Chen, J., Wu, J., *et al.* (2022) Aberrant Expansion of Follicular Helper T Cell Subsets in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article ID: 928359. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.928359>
- [10] Lee, Y.H., Choi, S.J., Ji, J.D., *et al.* (2016) Overall and Cause-Specific Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: An Updated Meta-Analysis. *Lupus*, **25**, 727-734. <https://doi.org/10.1177/0961203315627202>
- [11] Wang, X., Ma, R., Shi, W., *et al.* (2021) Emerging Roles of Circular RNAs in Systemic Lupus Erythematosus. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **24**, 212-222. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.02.028>
- [12] Wang, L., Lu, M., Li, W., *et al.* (2022) Significance of circRNAs as Biomarkers for Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of International Medical Research*, **50**, 3000605221103546. <https://doi.org/10.1177/03000605221103546>

- 
- [13] 罗清, 黄自坤, 张露, 等. 环状RNA hsa\_circ\_0004156 和 hsa\_circ\_0082626 在系统性红斑狼疮患者全血中的表达及临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(20): 2500-2505+10.
- [14] Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., *et al.* (2011) A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell*, **146**, 353-358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>
- [15] He, S., Du, H., Wang, Y., *et al.* (2021) Hsa\_circ\_0010957 Level Is Increased and Sponges microRNA-125b in CD4(+) T Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Molecular Medicine Reports*, **23**, Article No. 469. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12108>
- [16] Lei, M., Zheng, G., Ning, Q., *et al.* (2020) Translation and Functional Roles of Circular RNAs in Human Cancer. *Molecular Cancer*, **19**, Article No. 30. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1135-7>
- [17] Chen, L., Wang, C., Sun, H., *et al.* (2021) The Bioinformatics Toolbox for circRNA Discovery and Analysis. *Briefings in Bioinformatics*, **22**, 1706-1728. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa001>
- [18] Wang, T., Meng, S., Chen, P., *et al.* (2021) Comprehensive Analysis of Differentially Expressed mRNA and circRNA in Ankylosing Spondylitis Patients' Platelets. *Experimental Cell Research*, **409**, Article ID: 112895. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112895>
- [19] Li, L.J., Zhu, Z.W., Zhao, W., *et al.* (2018) Circular RNA Expression Profile and Potential Function of hsa\_circ\_0045272 in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunology*, **155**, 137-149. <https://doi.org/10.1111/imm.12940>
- [20] Patop, I.L., Wüst, S. and Kadener, S. (2019) Past, Present, and Future of circRNAs. *The EMBO Journal*, **38**, e100836. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100836>
- [21] Xu, Y.J., Zhao, J.M., Gao, C., *et al.* (2021) Hsa\_circ\_0136666 Activates Treg-Mediated Immune Escape of Colorectal Cancer via miR-497/PD-L1 Pathway. *Cellular Signalling*, **86**, Article ID: 110095. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110095>
- [22] Hong, W., Xue, M., Jiang, J., *et al.* (2020) Circular RNA circ-CPA4/Let-7 miRNA/PD-L1 Axis Regulates Cell Growth, Stemness, Drug Resistance and Immune Evasion in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, **39**, Article No. 149. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01648-1>