

# 急性病毒性心肌炎血浆外泌体Circular RNA的转录及功能分析

张琦<sup>1,2</sup>, 吴钦超<sup>1</sup>, 翟艳艳<sup>3</sup>, 褚现明<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>青岛大学附属医院心内科, 山东 青岛

<sup>2</sup>日照市人民医院急诊科, 山东 日照

<sup>3</sup>日照市人民医院麻醉科, 山东 日照

<sup>4</sup>青岛大学附属心血管病医院, 山东 青岛

收稿日期: 2023年9月17日; 录用日期: 2023年10月11日; 发布日期: 2023年10月18日

## 摘要

目的: 评估急性病毒性心肌炎(AVMC)患者外泌体circular RNA (circRNA)的表达差异并揭示其潜在功能。方法: 于2021年7月至2023年3月在青岛大学附属医院采集9例临床确诊为AVMC的患者和9例健康对照(HC)的外周血。采用RNA高通量测序检测外泌体circRNA表达。我们进行了GO及KEGG富集分析预测circRNA在外泌体中的潜在分子、生物学功能和相关信号通路。我们选取了3个外泌体中差异性表达的circRNA进行了实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)对测序结果进行了验证。结果: 以 $P < 0.05$ 和Fold Change绝对值  $> 2$ 为截断值筛选具有差异性表达的circRNA。本研究共发现了外泌体中有84个差异性表达的circRNA, 其中83个下调及1个上调。GO和KEGG富集分析结果表明, 差异表达的circRNA可能与ATP酶活动、GTP酶结合、溶酶体膜、微管、内质网蛋白质加工等有关。PCR结果表明hsa\_circ\_0001546在AVMC患者中下调, 与测序结果一致。结论: 差异性表达的hsa\_circ\_0001546可能是AVMC的潜在诊断标志物; 差异性表达的circRNA在AVMC中具有一定生物功能, 可能参与AVMC的发病机制。

## 关键词

病毒性心肌炎, 环状RNA, 外泌体

# Transcriptional and Functional Analysis of Plasma Exosomal circRNA in Acute Viral Myocarditis

Qi Zhang<sup>1,2</sup>, Qinchao Wu<sup>1</sup>, Yanyan Zhai<sup>3</sup>, Xianming Chu<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

<sup>2</sup>Emergency Department, The People's Hospital of Rizhao, Rizhao Shandong

\*通讯作者。

文章引用: 张琦, 吴钦超, 翟艳艳, 褚现明. 急性病毒性心肌炎血浆外泌体 Circular RNA 的转录及功能分析[J]. 临床医学进展, 2023, 13(10): 16339-16348. DOI: 10.12677/acm.2023.13102286

<sup>3</sup>Anesthesiology Department, The People's Hospital of Rizhao, Rizhao Shandong

<sup>4</sup>Department of Cardiology, The Affiliated Cardiovascular Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Sep. 17<sup>th</sup>, 2023; accepted: Oct. 11<sup>th</sup>, 2023; published: Oct. 18<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

**Objective:** To evaluate the differential expression profile of exosomal circular RNA (circRNA) in patients with acute viral myocarditis (AVMC) and to reveal its potential biological function. **Methods:** From July 2021 to March 2023, the peripheral blood of 9 patients clinically diagnosed with AVMC and 9 healthy controls (HC) were collected in the Affiliated Hospital of Qingdao University. CircRNA expression in exosomes was detected by high throughput RNA sequencing. We performed GO and KEGG functional analyses to predict the potential molecules, biological functions, and associated signaling pathways in exosomal circRNA. We selected three differentially expressed circRNAs in exosomes and performed quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) to verify the sequencing results. **Results:** circRNA with differential expression was screened with  $P < 0.05$  and Fold Change absolute value  $> 2$  as truncation values. In this study, 84 differentially expressed circRNAs were found in exosomes, of which 83 were down-regulated and 1 was up-regulated. GO and KEGG analysis showed that differentially expressed circRNA may be related to ATPase activity, GTPase binding, lysosomal membrane, microtubules and protein processing in endoplasmic reticulum. PCR results showed that hsa\_circ\_0001546 was down-regulated in AVMC patients, which is consistent with the sequencing results. **Conclusion:** The differentially expressed hsa\_circ\_0001546 may be potential diagnostic markers for AVMC. Differentially expressed circRNAs may have certain biological functions in AVMC and be involved in the pathogenesis of AVMC.

## Keywords

Viral Myocarditis, Circular RNA, Exosome

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

心肌炎是由多种病因引起的心肌炎症，尤其是病毒感染，病毒感染引起的心肌炎被定义为病毒性心肌炎(VMC) [1]。VMC会导致心力衰竭、心律失常，甚至心源性休克和死亡[2] [3]。然而，传统的诊断方法，包括血清心肌肌钙蛋白、心电图(ECG)、心脏磁共振成像(cMRI)和超声心动图，特异性和敏感性有限 [4] [5] [6]。心肌活检是诊断心肌炎的金标准，但由于其对心脏的损害，在临床中的应用受到严格限制[7]。因此，迫切需要探索一种特异性和敏感性高的无创心肌炎诊断方法。

外泌体几乎可由所有细胞分泌，是通过向外出芽从质膜向外释放的直径约 40~160 nm 的细胞外囊泡，内部包含多种蛋白质及核酸成分，如 mRNA、miRNA、lncRNA、circRNA 等[8] [9]。外泌体富含于各种体液，由于具有双层结构，外泌体中的 RNA 可以免受 RNA 酶降解[8]。之前研究表明，circRNA 在 VMC 中具有差异性表达[10]，但其含量在循环血液中较低且稳定性差，研究前景并不明朗[11]。近期有研究报道，外泌体具有保护心肌炎的作用[12] [13]。然而，目前尚不清楚哪个特定的外泌体成分具有保护功能。因此，本研究旨在探究外泌体 circRNA 对于 AVMC 的诊断价值及生物功能。

## 2. 方法

### 2.1. 入选病人及样本获取

于 2021 年 7 月至 2023 年 3 月在青岛大学附属医院采集 9 例 AVMC 患者外周血标本, 同时采集 9 例健康对照标本。所有 AVMC 病例诊断参考 2013 年欧洲心脏病年会心肌炎诊断[14]。排除标准如下: 冠状动脉疾病、瓣膜病、扩张型或肥厚型心肌病、先天性心脏病; 自身免疫性疾病引起的心肌炎; 以及接受糖皮质激素或免疫抑制剂治疗的 AVMC 患者。所有 >18 岁的患者均行冠状动脉造影或冠状动脉 CT 以排除冠心病的诊断。健康对照是年龄和性别与 AVMC 患者匹配的健康志愿者。AVMC 患者的基本信息及临床特征见表 1。本研究经青岛大学附属医院伦理委员会(编号: QYFY WZLL 27489)批准, 每位患者或其家长签署知情同意书。采集血样(10~15 ml)至 EDTA 抗凝管中。

**Table 1.** The basic information of AVMC patients

**表 1.** AVMC 患者基本信息

编号	年龄	性别	既往史	症状	心电图	肌钙蛋白
1	47	女	体健	疲劳、厌食、胸闷、心慌	Q 波形成	19.585
2	40	男	体健	发热、胸闷	窦性心动过速、T 波倒置	3.275
3	15	男	体健	鼻塞、流涕、胸闷	ST 段抬高	8.063
4	17	男	体健	发热、腹泻、胸痛	ST 段抬高, 窦性心动过速	4.822
5	15	男	体健	发热、胸痛	窦性心动过速	0.283
6	16	男	体健	发热、咳嗽、鼻塞、流涕、胸痛	右束支传导阻滞	0.320
7	27	男	体健	乏力、鼻塞、胸闷	ST 段压低	1.864
8	33	男	体健	发热、咳嗽、胸闷	窦性心动过速	0.810
9	19	男	体健	发热、心慌、头晕	窦性心动过速	0.937

### 2.2. 外泌体分离

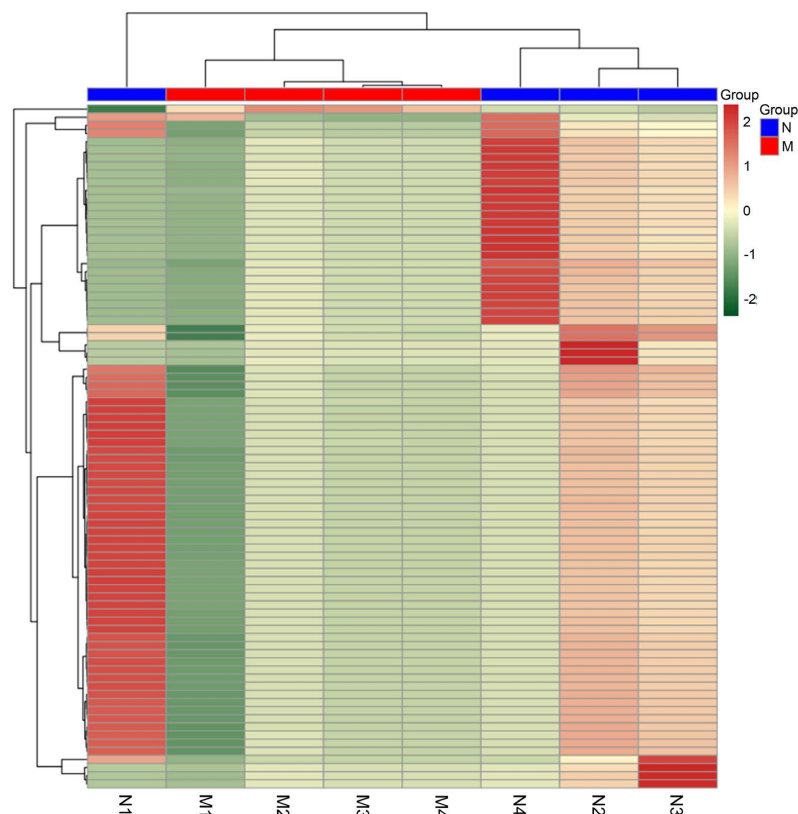
在 4°C 条件下, 通过 3 步离心从人血浆中分离出外泌体。首先将血样 4000 g 离心 15 min 后收集上清。然后将上清液 10,000 g 离心 30 min。最后将外泌体在 100,000 g 超离心 70 min。最后将外泌体在磷酸盐缓冲液(PBS)中重悬, 100,000 g 离心 70 min, 去除可溶性和分泌蛋白。应用 Qiagen 试剂盒法提取外泌体中的 RNA。

### 2.3. RNA 测序

提取好的外泌体 RNA 样本干冰运送, 进行质检, 在保证提取的 RNA 浓度和纯度合格的情况下, 使用测序仪 novaseq PE150 对外泌体中的 circRNA 进行测序。利用 R 语言 limma 包的分位数算法进行原始数据归一化, 以 Fold Change 绝对值大于 2、P 值 < 0.05 作为截断值, 初步筛选在 AVMC 中具有差异性表达且有统计学意义的 circRNA。

### 2.4. 功能分析

GO、KEGG 富集分析用于预测差异性表达的 circRNA 的潜在生物学功能及所参与的信号通路, 通过 R 语言的 clusterProfiler 包进行费歇尔精确检验从而对差异性表达的基因进行分析。



**Figure 1.** The heat map of exosomal circRNA

**图 1.** 外泌体 circRNA 热图

## 2.5. PCR 实验

为了验证测序结果，我们选择了 3 个下调的 circRNA 对 9 对样本进行了 qRT-PCR 验证实验。cDNA 的合成使用 Vazyme HiScript II cDNA Synthesis 逆转录试剂体系。qRT-PCR 采用 SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 试剂盒(Accurate Biotechnology, 中国湖南)。β-actin 作为血清外泌体 circRNA 定量的不变对照。2<sup>-ΔΔCT</sup> 法测定相对表达量，所有的反应都进行了三次。circRNA 引物序列如表 2 所示。

**Table 2.** The primer sequence for qRT-PCR

**表 2.** qRT-PCR 实验引物设计

circRNA	Forward (5'-3')	reverse (5'-3')
MEF2C-AS	CCTTTGGGGGAAGACAGAAGA	CCTTGGATACTGGATGATGCCA
CCDC180	TGGGCAAACCTCCGCTACTC	GGTCAAACCACTTCTCAAGGTG
FAM114A2	ATGTCATCGAGAAGGCAGAGAC	TGCTTCAGTTAGCAGTGGAGTC
β-actin	CTCAGGAGGAGCAATGATCT	GACCTGTACGCCAACACAGT

## 2.6. 统计学方法

应用 SPSS26.0 软件包对资料进行分析，计量资料用均数 ± 标准差表示，两组的比较采用 t 检验；计数资料的比较采用卡方检验。P 值 < 0.05 视为差异具有统计学意义。

### 3. 结果

#### 3.1. 外泌体 circRNA 的差异性表达

采用高通量测序对 AVMC 患者和 HC 组各 4 份样本进行分析。热图(图 1)和火山图(图 2)显示, 两组间外泌体 circRNA 存在表达差异。以  $P < 0.05$  和 Fold Change 绝对值  $> 2$  为临界值筛选具有差异性表达的 circRNA。总共筛选出 1 个上调和 83 个下调的外泌体来源的 circRNA。表 3 显示了 1 个显著上调和 10 个最显著下调的外泌体 circRNA。

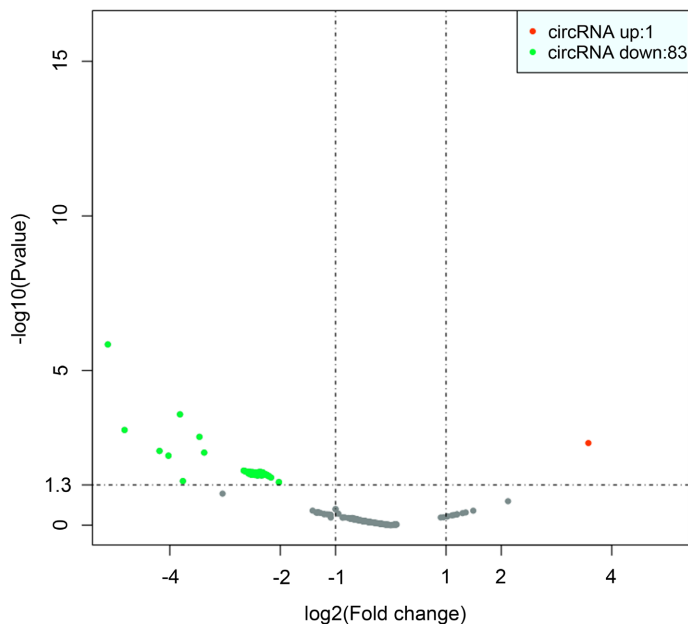


Figure 2. The volcano plot of exosomal circRNA

图 2. 外泌体 circRNA 火山图

Table 3. Top ten circrnas with down-regulated and up-regulated differences in exosome expression profiles of AVMC patients  
表 3. AVMC 患者外泌体表达谱排名前十位下调和上调差异的 circRNA

circRNA	Gene symbol	p-value	log2 (Fold Change)	表达
hsa_circ:172247533-172251541	FNDC3B	0.002213	3.57629	上调
hsa_circ:88905209-88965915	MEF2C-AS1	1.53E-06	-5.95436	下调
hsa_circ:97347314-97350555	CCDC180	2.32E-07	-5.64943	下调
hsa_circ:52412811-52414587	PHF7	1.43E-06	-5.12198	下调
hsa_circ:154033791-154034967	FAM114A2	0.000835	-4.81906	下调
hsa_circ:151116338-151127984	MED12L	0.003994	-4.18639	下调
hsa_circ:13579451-13584225	SIRT5	0.005669	-4.02466	下调
hsa_circ:10390332-10391731	MARCHF6	0.000262	-3.81578	下调
hsa_circ:108652272-108654410	CORO1C	0.037624	-3.76311	下调
hsa_circ:190900564-190924593	GLS	0.001395	-3.46358	下调
hsa_circ:156694020-156696025	TIPARP	0.004527	-3.37749	下调

### 3.2. 功能分析

我们应用 GO 和 KEGG 富集分析来预测外泌体中差异表达的 circRNA 的潜在生物学功能。GO 分析包括细胞成分、分子功能和生物过程三个部分。生物过程中，富集程度最高的 GO 分析条目是“上皮管形成”、“心室发育”和“心脏隔膜形成”。细胞成分中排名前三位的条目是“液泡膜”、“微管”和“溶酶体膜”。在分子功能方面，“ATP 酶活动”、“GTP 酶结合”和“微管结合”是三个富集程度最高的条目。同时，KEGG 通路中“内质网蛋白质加工”、“血脂及动脉粥样硬化”和“人类免疫缺陷病毒感染”等条目富集程度最高。图 3 和图 4 显示了差异性表达的外泌体 circRNA 富集程度最高的 GO 和 KEGG 条目。

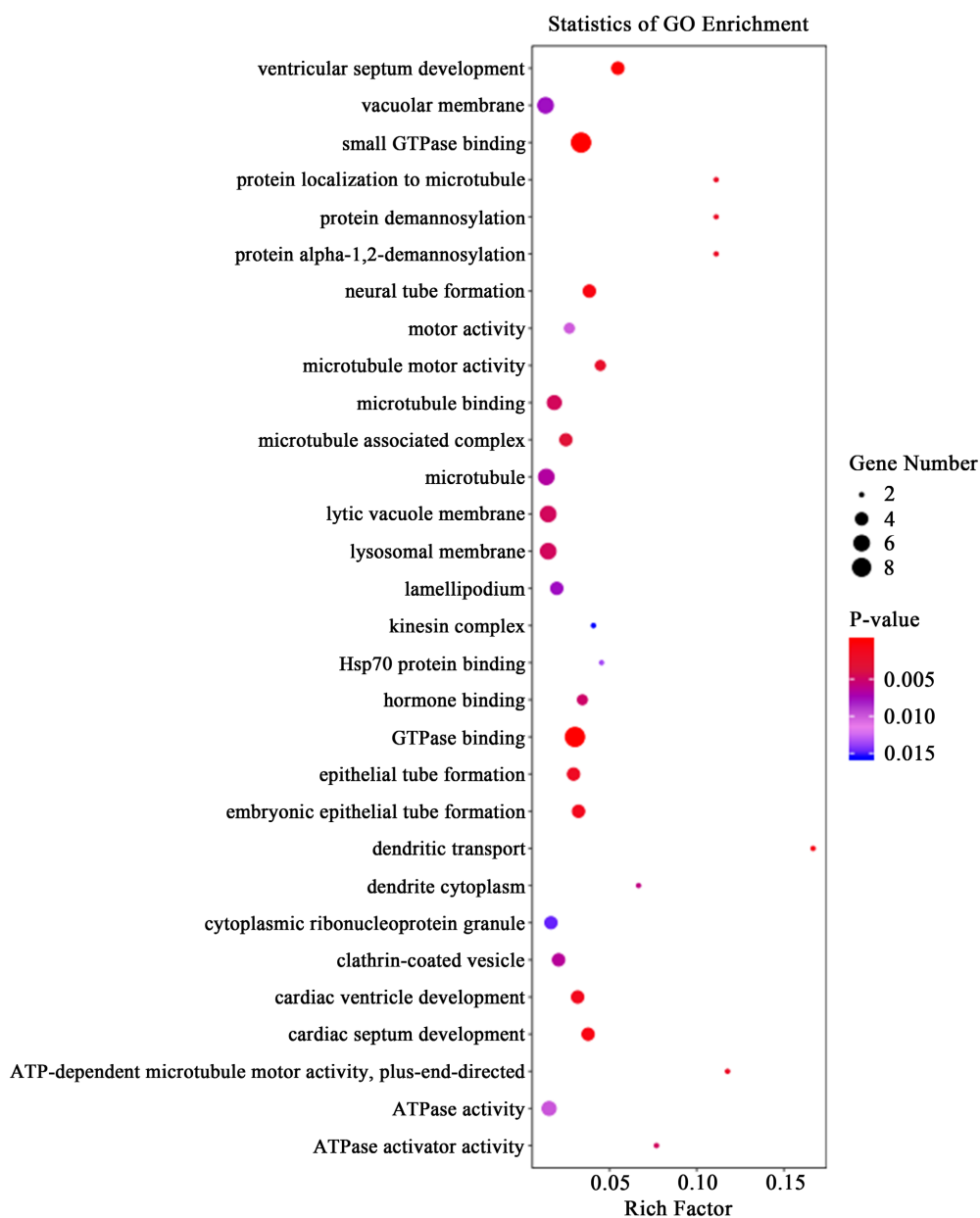
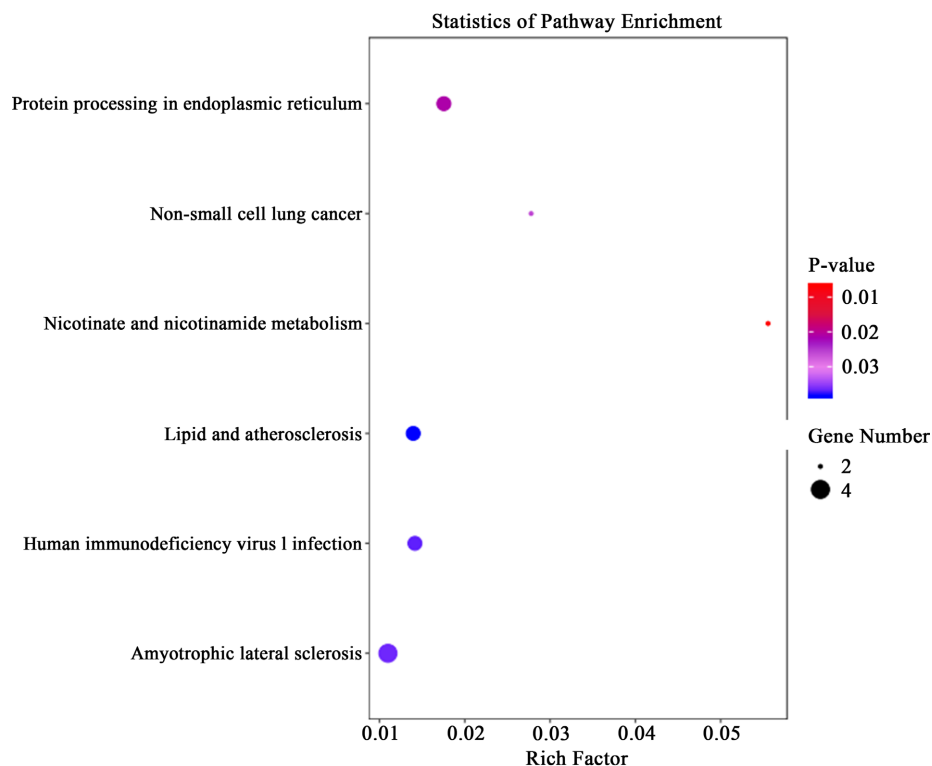


Figure 3. The GO analysis of circRNA in exosomes

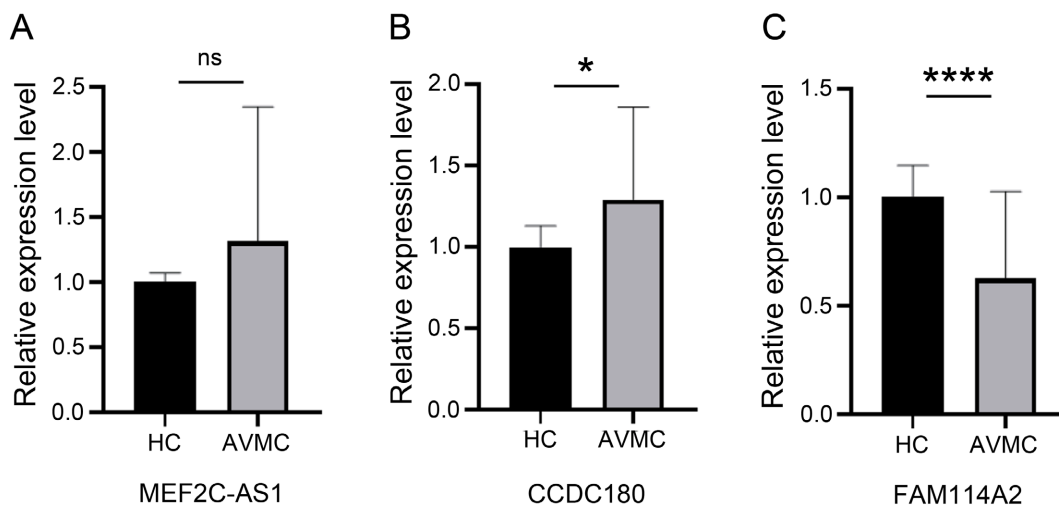
图 3. 外泌体 circRNA GO 分析



**Figure 4.** The KEGG analysis of circRNA in exosomes  
**图 4.** 外泌体 circRNA KEGG 分析

### 3.3. PCR 实验

PCR 结果显示, hsa\_circ:97347314-97350555 表达上调, hsa\_circ:154033791-154034967 (hsa\_circ\_0001546) 表达下调。两组间 hsa\_circ:88905209-88965915 的表达水平差异无统计学意义。hsa\_circ:154033791-154034967 PCR 结果与测序结果一致, 而 hsa\_circ:97347314-97350555 的表达与测序结果相反。详细信息如图 5 所示。



**Figure 5.** The qRT-PCR experiment (\* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )  
**图 5.** qRT-PCR 实验(\* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

## 4. 讨论

根据 WHO 对心肌病的分类, 心肌炎被定义为心肌的炎症性疾病[14]。心肌炎最常由病毒感染引起, 可表现为急性心力衰竭、扩张型心肌病、心律失常, 甚至心源性休克或心源性猝死[15]。然而, 受限于现有的诊断工具, 心肌炎的诊断相对困难, 迫切需要特异性和敏感性良好的无创诊断方法[4] [5] [6]。此外, AVMC 的调控机制尚未完全阐明。本研究首次证明血浆外泌体 circRNA 在 AVMC 中的差异表达谱和潜在功能。

AVMC 的诊断具有挑战性, 是一种排除性诊断[16]。AVMC 与急性冠状动脉综合征、非缺血性心肌病、瓣膜病、心包炎等有相似的临床特征。这些疾病均可引起胸痛、胸闷等不适, 肌钙蛋白、肌酸激酶等心肌酶升高, ST 段偏离、Q 波形成等心电图改变[2] [3]。然而, 传统的诊断工具在特异性或敏感性方面受到限制。在过去的几十年里, cMRI 已经成为一种安全、无创的诊断急性心肌炎炎症、水肿和坏死的工具。然而, 由于 cMRI 成本高、便利性差, 其临床应用也受到限制[17] [18]。心内膜心肌活检仍然是 AVMC 诊断的金标准, 但由于其具有侵袭性损伤, 其临床应用受到极大限制[7]。目前迫切需要寻找一种新的 AVMC 诊断生物标志物。

CircRNA 是通过反向剪接(back-splicing)机制产生的, 即 RNA 的 3'端和 5'端直接通过共价键结合, 形成环状结构[19] [20]。有研究发现 circHIPK2 通过海绵性吸附 miR-485-5p 调控 ATG101 的表达, 从而诱导自噬和细胞凋亡, 加速心肌损伤[21]。在一些病毒感染中, circRNA 与免疫反应之间的关系已逐渐得到证实。Y. Grace Chen 等报道了核酸传感器 RIG-I 对 circRNA 的识别激活了先天免疫反应, 并证实转染外源性 circRNA 的细胞增强了对病毒感染的保护作用[22]。我们的研究表明, AVMC 患者和 HC 对照之间外泌体 circRNA 的表达谱存在显著差异。我们在外泌体中发现了 84 个具有显著差异的 circRNA, 其中 1 个上调, 83 个下调。之前有研究证实的病毒感染后反式作用蛋白因子 90/110 (NF90/110)的核输出导致 circRNA 水平降低[23], 我们的研究结果与之是相吻合的。这些具有差异性表达的 circRNA 可能是 AVMC 潜在的诊断生物标志物, 但其诊断价值有待进一步扩大样本量进行 PCR 验证。

研究发现, 血清中 circRNA 在心肌炎患者中存在差异表达[10]。然而, 游离 circRNA 在循环中是不稳定的, 很容易被核糖核酸酶分解。外泌体在心血管领域引起了相当大的兴趣。外泌体的内容物包括蛋白质、脂质和 RNA, 在心血管疾病的发生发展中起重要作用。由于外泌体脂质双分子层对酶降解的保护作用, 外泌体中存在的 circRNA 相对稳定。此外, 外泌体具有良好的生物相容性, 不会被巨噬细胞吞噬。外泌体广泛存在于各种体液中, 如血液、唾液、尿液和脑脊液[8]。与游离 circRNA 相比, 外泌体 circRNA 丰富了标本采集的途径, 降低了采集标本的难度, 这一点有待于在其他体液中进一步验证。

接下来, 我们使用 GO 和 KEGG 富集分析来预测外泌体中差异性表达的 circRNA 的潜在生物学功能。富集最多的条目包括 ATP 酶活动、GTP 酶结合、溶酶体膜、微管、内质网蛋白质加工。

综上所述, 我们的研究结果首次证明了血浆外泌体 circRNA 在 AVMC 患者与 HC 之间存在差异性表达, 可能具有潜在的诊断价值。此外, 这些外泌体来源的 circRNA 可能具有一定的生物学功能, 参与了 AVMC 的发病机制。然而, 本研究存在一定的局限性。我们初步推测了血浆外泌体 circRNA 的潜在生物学功能, 外泌体 circRNA 在 AVMC 中的准确调控机制有待进一步研究。本研究筛选出的差异性表达的外泌体 circRNA 有待 PCR 实验进行进一步验证。

## 5. 结论

差异性表达的 hsa\_circ\_0001546 可能是 AVMC 的潜在诊断标志物; 差异性表达的 circRNA 在 AVMC 中具有一定生物学功能, 可能参与 AVMC 的发病机制。



## 致 谢

感谢所有参与研究的人员提供的宝贵数据，感谢褚现明教授的严格指导。

## 基金项目

本项研究由国家自然科学基金面上项目(82172574)，山东自然科学基金面上项目(ZR2020MH016)及山东省高等医学教育研究中心科研规划课题(YJKT202171)支持。

## 参考文献

- [1] Tschöpe, C., Ammirati, E., Bozkurt, B., *et al.* (2021) Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy: Current Evidence and Future Directions. *Nature Reviews Cardiology*, **18**, 169-193. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-00435-x>
- [2] Ammirati, E., Veronese, G., Bottiroli, M., *et al.* (2021) Update on Acute Myocarditis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **31**, 370-379. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2020.05.008>
- [3] Cooper, L.T. (2009) Myocarditis. *The New England Journal of Medicine*, **360**, 1526-1538. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0800028>
- [4] Olejniczak, M., Schwartz, M., Webber, E., *et al.* (2020) Viral Myocarditis-Incidence, Diagnosis and Management. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, **34**, 1591-1601. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2019.12.052>
- [5] Matshela, M.R. (2019) The Role of Echocardiography in Acute Viral Myocarditis. *Cardiovascular Journal of Africa*, **30**, 239-244. <https://doi.org/10.5830/CVJA-2018-069>
- [6] Sagar, S., Liu, P.P. and Cooper, L.T. (2012) Myocarditis. *The Lancet*, **379**, 738-747. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60648-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60648-X)
- [7] Kiamanesh, O. and Toma, M. (2021) The State of the Heart Biopsy: A Clinical Review. *CJC Open*, **3**, 524-531. <https://doi.org/10.1016/j.cjco.2020.11.017>
- [8] Kalluri, R. and Lebleu, V.S. (2020) The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes. *Science (New York, NY)*, **367**, eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- [9] Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., *et al.* (2020) Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine*, **15**, 6917-6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>
- [10] Zhang, L., Han, B., Wang, J., *et al.* (2019) Differential Expression Profiles and Functional Analysis of Circular RNAs in Children with Fulminant Myocarditis. *Epigenomics*, **11**, 1129-1141. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0101>
- [11] Zhou, W.Y., Cai, Z.R., Liu, J., *et al.* (2020) Circular RNA: Metabolism, Functions and Interactions with Proteins. *Molecular Cancer*, **19**, Article No. 172. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01286-3>
- [12] Li, Q., Jin, Y., Ye, X., *et al.* (2021) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNA-133a Restrains Myocardial Fibrosis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Viral Myocarditis Rats through Suppressing MAML1. *Nanoscale Research Letters*, **16**, Article No. 111. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03559-2>
- [13] Li, X., Yang, Z., Nie, W., *et al.* (2019) Exosomes Derived from Cardiac Progenitor Cells Attenuate CVB3-Induced Apoptosis via Abrogating the Proliferation of CVB3 and Modulating the mTOR Signaling Pathways. *Cell Death & Disease*, **10**, Article No. 691. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1910-9>
- [14] Caforio, A.L., Pankuweit, S., Arbustini, E., *et al.* (2013) Current State of Knowledge on Aetiology, Diagnosis, Management, and Therapy of Myocarditis: A Position Statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, **34**, 2636-2648, 2648a-2648d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh210>
- [15] Hang, W., Chen, C., Seubert, J.M., *et al.* (2020) Fulminant Myocarditis: A Comprehensive Review from Etiology to Treatments and Outcomes. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, Article No. 287. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00360-y>
- [16] Sagar, S., Liu, P.P. and Cooper, L.T. (2012) Myocarditis. *The Lancet (London, England)*, **379**, 738-747. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60648-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60648-X)
- [17] Eichhorn, C., Greulich, S., Bucciarelli-Ducci, C., *et al.* (2022) Multiparametric Cardiovascular Magnetic Resonance Approach in Diagnosing, Monitoring, and Prognostication of Myocarditis. *JACC: Cardiovascular Imaging*, **15**, 1325-1338. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2021.11.017>
- [18] Friedrich, M.G., Sechtem, U., Schulz-Menger, J., *et al.* (2009) Cardiovascular Magnetic Resonance in Myocarditis: A JACC White Paper. *Journal of the American College of Cardiology*, **53**, 1475-1487.

- <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.007>
- [19] Vicens, Q. and Westhof, E. (2014) Biogenesis of Circular RNAs. *Cell*, **159**, 13-14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.005>
- [20] Zhang, X.O., Dong, R., Zhang, Y., *et al.* (2016) Diverse Alternative Back-Splicing and Alternative Splicing Landscape of Circular RNAs. *Genome Research*, **26**, 1277-1287. <https://doi.org/10.1101/gr.202895.115>
- [21] Zhou, J., Li, L., Hu, H., *et al.* (2020) Circ-HIPK2 Accelerates Cell Apoptosis and Autophagy in Myocardial Oxidative injury by Sponging miR-485-5p and Targeting ATG101. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **76**, 427-436. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000879>
- [22] Chen, Y.G., Kim, M.V., Chen, X., Batista, P.J., Aoyama, S., Wilusz, J.E., Iwasaki, A. and Chang, H.Y. (2017) Sensing Self and Foreign Circular RNAs by Intron Identity. *Molecular Cell*, **67**, 228-238.e225. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.022>
- [23] Li, X., Liu, C.X., Xue, W., Zhang, Y., Jiang, S., Yin, Q.F., *et al.* (2017) Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. *Molecular Cell*, **67**, 214-227. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.023>