

焦振海, 王府建, 张丽, 等. 鸡 circSFMBT2 克隆及对 DF-1 细胞增殖的影响[J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(1): 23-30.
JIAO Zhenhai, WANG Fujian, ZHANG Li, et al. Cloning of chicken circSFMBT2 and its effect on proliferation of DF-1 cells[J]. Journal of South China Agricultural University, 2024, 45(1): 23-30.

鸡 circSFMBT2 克隆及对 DF-1 细胞增殖的影响

焦振海, 王府建, 张丽, 李国, 宾乘锋, 张为露, 郭东雪, 王晓彤, 林树带
(广东海洋大学 滨海农业学院, 广东 湛江 524088)

摘要:【目的】验证鸡 circSFMBT2 的环形结构, 探究其表达规律及功能。【方法】以麒麟鸡和 DF-1 细胞为研究对象, 根据反向剪切位点序列特征设计引物, 通过 PCR 和测序验证 circSFMBT2 的环形结构。通过 RNase R 和反转录试验分析 circSFMBT2 的基本特性, 利用 qRT-PCR 探究不同组织、不同时期 circSFMBT2 的表达水平。通过构建过表达载体, 结合 qRT-PCR、Edu 和 CCK-8 等试验, 探究 circSFMBT2 对鸡 DF-1 细胞增殖的影响。【结果】鸡 circSFMBT2 全长 827 nt, 由 SFMBT2 基因外显子 12~18 环化形成。RNase R 耐受性试验表明, circSFMBT2 不易被 RNase R 降解, 随机引物对 circSFMBT2 的反转录效率是 Oligo-d(T)₁₈ 引物的 8 倍。组织表达谱表明, circSFMBT2 在麒麟鸡 14 胎龄以及 1 周龄的肝脏和脾脏中高表达、在胸肌和腿肌中低表达。circSFMBT2 在胸肌和腿肌的时序表达谱表明, circSFMBT2 在胚胎时期表达量较高, 出生后表达量迅速下降。在 DF-1 细胞中 circSFMBT2 过表达 48 h 后, 增殖标记基因 PCNA 和 CCND1 的表达量分别较对照组上调 85% 和 92%。Edu 和 CCK-8 细胞增殖试验表明, 鸡 circSFMBT2 可以促进细胞增殖进程。【结论】circSFMBT2 是鸡 SFMBT2 基因的一个环状转录本, 可以促进 DF-1 细胞的增殖, 研究结果为深入探究鸡 circSFMBT2 的生物学功能和作用机制奠定了基础。

关键词: 鸡; SFMBT2; 环状 RNA; DF-1 细胞; 细胞增殖

中图分类号: S831

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2024)01-0023-08

Cloning of chicken circSFMBT2 and its effect on proliferation of DF-1 cells

JIAO Zhenhai, WANG Fujian, ZHANG Li, LI Guo, BIN Chengfeng, ZHANG Weilu,
GUO Dongxue, WANG Xiaotong, LIN Shudai

(College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: 【Objective】 In order to verify the circular structure of chicken circSFMBT2 and explore its expression and functions. 【Method】 Kirin chicken and DF-1 cells were used in this study. Primers were designed according to the reverse splicing site, and the circular structure of circSFMBT2 was verified by PCR and sequencing. The characteristics of circSFMBT2 were analyzed by RNase R and reverse transcription experiments. The expression levels of circSFMBT2 in different tissues and periods were explored by qRT-PCR. The effect of circSFMBT2 on proliferation of chicken DF-1 cells was investigated by qRT-PCR, Edu and CCK-8 methods. 【Result】 The full length of chicken circSFMBT2 was 827 nt and it was formed by cyclization of exons 12–18 of SFMBT2 gene. RNase R tolerance experiments indicated that circSFMBT2 was not easily

收稿日期: 2022-09-16 网络首发时间: 2023-08-25 14:10:31

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20230824.1925.006>

作者简介: 焦振海, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: jiaozhenhai2022@163.com; 通信作者: 林树带, 讲师, 博士, 主要从事家禽遗传育种和遗传资源研究, E-mail: linsd89sylvia@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31972550); 广东省自然科学基金 (2020B1515420008)

degraded by RNase R. The reverse transcription efficiency of random primers on circSFMBT2 was eight times of that of oligo d(T)₁₈ primer. The tissue expression profile exhibited that circSFMBT2 expression was high in liver and spleen of Kirin chickens at the age of 14 embryonic and one week old, and low in the pectoral and leg muscles. The temporal expression profile of circSFMBT2 in the pectoral and leg muscles indicated that circSFMBT2 expression was high in embryonic period and decreased rapidly after birth. When circSFMBT2 was overexpressed in DF-1 cells for 48 h, the expressions of *PCNA* and *CCND1* were up-regulated by 85% and 92% respectively compared with control group. The Edu and CCK-8 cell proliferation tests showed that circSFMBT2 promoted the cell proliferation process. 【Conclusion】 This study confirms the existence of circSFMBT2 as a circular transcript of chicken *SFMBT2* and circSFMBT2 can promote DF-1 cell proliferation, which lays a foundation for further exploring the biological function and working mechanism of circSFMBT2 in chicken.

Key words: Chicken; *SFMBT2*; circRNA; DF-1 cell; Cell proliferation

环状 RNA(circRNA) 是一种共价闭合环状内源性 RNA, 广泛存在于真核生物中^[1]。由于反向剪接效率不高, 因此表达水平较低^[2]。然而一旦形成 circRNA 就稳定存在, 并且具有高度保守性^[3]。与线性 RNA 相比, circRNA 不含 5'帽子和 3'尾巴, 半衰期更长, 不易被 RNase R 降解^[4]。此外, circRNA 还具有组织、时间和疾病表达特异性等特点^[5-6]。近年来的研究发现, circRNA 具有多种生物学功能, 主要包括调控基因转录, 充当 miRNA 海绵, 与蛋白质结合参与调控和编码蛋白质等生物学功能^[7-8]。研究发现, circRNA 在肌肉发育过程中发挥作用, 如 circFUT10 可作为 miR-133a 的海绵, 在牛原代成肌细胞增殖分化中发挥功能^[9], 而 circZNF609 存在开放阅读框, 并能翻译成多肽发挥促进成肌细胞增殖的作用^[10]。

SFMBT2(Scm-like with four MBT domains 2) 是多梳基因, 可以编码具有 MBT 结构域的染色质调节蛋白, 在多种基因的遗传调控中发挥作用^[11-12]。鸡 *SFMBT2* 基因定位于 1 号染色体, 含有 21 个外显子。广东海洋大学家禽育种团队的高通量测序 (BioProject 登录号: PRJNA554754) 发现 *SFMBT2* 存在环状转录本, 本研究通过 PCR 和测序技术手段验证 circSFMBT2 的环状结构, 分析其结构特征和表达规律, 并在 DF-1 细胞中初步研究其对细胞增殖的影响, 以期后续深入分析 circSFMBT2 在鸡骨骼肌发育过程中的作用及机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

麒麟鸡种蛋采购于广东省高州市万农种鸡场。DF-1 细胞系由华南农业大学家禽遗传育种团队赠

送。RNA 抽提试剂盒、RNA 反转录试剂盒、无内毒素质粒抽提试剂盒购自广州美基生物科技有限公司; 荧光定量 PCR 酶、大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞购自北京全式金公司; 环状 RNA 过表达载体 pCD2.1-ciR 购自吉赛生物科技有限公司; *Kpn* I、*Bam* H I 购自 TAKARA 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集与细胞培养 将麒麟鸡种蛋放在 37 ℃、湿度为 70% 的自动孵化箱中孵化, 分别采集 14 胚龄、16 胚龄、18 胚龄以及 1~6 周龄麒麟鸡的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸肌和腿肌等组织, 液氮速冻后迅速保存于 -80 ℃ 冰箱中, 用于组织表达规律和时序表达规律分析。

DF-1 是可以无限增殖的成纤维状细胞系, 在完全培养基 (DMEM 高糖+体积分数为 10% 的胎牛血清+体积分数为 1% 的双抗)37 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的条件下培养。

1.2.2 引物设计与 circSFMBT2 验证 针对 circSFMBT2 的成环位置, 在接头两端设计特异性引物 circSFMBT2-D, 用于 circSFMBT2 环分子的验证, 设计全长扩增引物 circSFMBT2-full, 用于克隆 circSFMBT2 的全长序列, 内参基因选用 *GAPDH*。引物通过 primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计。为验证 circSFMBT2 的连接位置, 使用 RNase R 外切酶在 37 ℃ 条件下处理 RNA 样品 30 min, 反转录成 cDNA, 分别使用 circSFMBT2-D 和 circSFMBT2-full 引物进行 PCR 扩增, 将扩增产物送生工生物技术有限公司测序。引物信息见表 1。

表 1 引物序列及用途
Table 1 Sequences and uses of primers

引物或基因名称 Primer or gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Product length	用途 Purpose
CircSFMBT2-D	F: ACAGAGGGAAGACATACAGG	56	600	环状验证
	R: GCAGCGGTGGTTGATGTA			Circular verification
CircSFMBT2-full	F: GTTTACAGATGCCCTCTCCAGA	58	827	全长克隆
	R: CTCTGCAGAGCCTGCAGCATT			Full length cloning
CircSFMBT2-V	F: CGGAATTCTAATACTTTCAG	63	867	构建过表达载体
	GTTTACAGATGCCCTCTCCAGA			Construction of overexpression vector
	R: CGGGATCCAGTTGTTCTTAC			
	CGGAATTCTAATACTTTCAG			
SFMBT2-DL	F: TCAGACAGACCTCTCTCT	60	162	线性基因定量
	R: AGTCACAGTCCACTCCAAT			Linear gene quantification
GAPDH	F: AGGACCAGGTTGTCTCCTGT	57	153	内参基因
	R: CCATCAAGTCCACAACACGG			Reference gene
PCNA	F: CTCTGAGGGCTTCGACACCT	58	133	增殖标记基因定量
	R: ATCCGCATTGTCTTCTGCTCT			Proliferative marker gene quantification
CCND1	F: AACCACCTTCCATGATCGC	58	168	增殖标记基因定量
	R: CTGTTCTTGGCAGGCTCGTA			Proliferative marker gene quantification
CDK2	F: GTACAAGGCCCGGAACAAGG	58	159	增殖标记基因定量
	R: TTCTCCGTGTGGATCACGTC			Proliferative marker gene quantification

1.2.3 组织和细胞 RNA 提取及 qPCR 试验 组织和细胞总 RNA 的提取方法参考 HiPureUnivesal RNA Mini Kit 试剂盒说明书。依据 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒说明书, 使用随机引物 (N9) 和 Oligo-d(T)₁₈ 将总 RNA 反转录为 cDNA, 反应程序为 25 ℃, 10 min; 42 ℃, 15 min; 85 ℃, 30 s。以反转录生成的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR, PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL、上、下游引物各 0.4 μL、2×SYBR Green qPCR Mix 10 μL、双蒸水 8.2 μL。PCR 反应条件为 94 ℃, 3 min; 94 ℃, 15 s, 60 ℃, 15 s, 72 ℃, 20 s, 40 个循环。溶解曲线程序为 95 ℃, 15 s; 60 ℃ 1 min; 95 ℃, 1 s。以 *GAPDH* 作为内参基因, 检测 circSFMBT2 的表达。

1.2.4 鸡 circSFMBT2 过表达载体构建 根据 circRNA 的测序数据, 通过 PCR 扩增 circSFMBT2 的全长序列, 并在其两端加上保护序列和酶切位点, 使用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切 PCR 扩增产物和 pCD2.1-ciR 载体, 酶切产物纯化后利用 T4DNA 酶连接, 16 ℃ 过夜。取连接产物转化至大肠埃希菌感受态细胞中, 转化完成后涂板, 37 ℃ 恒温培养 14~16 h, 挑取单克隆菌落, 阳性鉴定后送测序, 选取测序结果与 circSFMBT2 基因序列吻合的单克隆菌液留用。

1.2.5 细胞转染试验 将 DF-1 细胞系接种于 12 孔板, 使用 DMEM 完全培养基培养细胞至汇合度达 80% 时, 使用脂质体转染试剂 Lipofectamine@3000 转染空载体 pCD2.1-ciR 和过表达载体 pCD2.1-circSFMBT2, 转染 48 h 后收获细胞。

1.2.6 Edu 和 CCK-8 检测细胞增殖 转染空载体 pCD2.1-ciR 和过表达载体 pCD2.1-circSFMBT2 至 48 h, 参考 Edu 试剂盒说明书对细胞进行孵育、固定、通透、染色等处理, 最后在荧光显微镜下观察和拍照。

CCK-8 试验: 将细胞接种于 96 孔板, 转染空载体 pCD2.1-ciR 和过表达载体 pCD2.1-circSFMBT2, 分别在 0、12、24、36、48 和 60 h 使用 CCK-8 试剂 37 ℃ 孵育 2 h 后, 检测细胞的 $D_{450\text{ nm}}$ 。

1.2.7 生物信息学分析 利用 RNAhybird 网站在线预测 circSFMBT2 中潜在的 miRNA 结合位点, 使用 SnapGene 软件预测 circSFMBT2 编码蛋白质的能力。

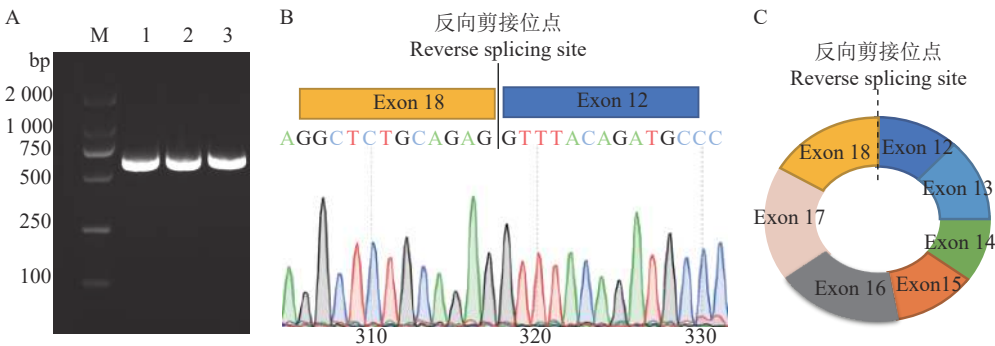
1.2.8 统计学分析 Edu 试验与基因定量检测中每个分组包含 4 个重复, CCK-8 试验中每组包含 8 个重复, 使用 GraphPad Prism9 软件进行统计学分析, 采用 *t* 检验分析数据。CircSFMBT2 时序表达规律和组织表达规律数据采用 LSD 多重比较进行分析。

2 结果与分析

2.1 鸡 circSFMBT2 成环验证

根据华南农业大学家禽遗传育种与繁殖实验室前期高通量测序结果,发现鸡 *SFMBT2* 基因可能产生一个环状转录本,为此,本研究首先对

circSFMBT2 连接成环位置设计发散引物,以 1 周龄麒麟鸡肝脏组织 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 电泳结果产生了预期目的条带(图 1A),测序结果显示, circSFMBT2连接成环的片段来源于 *SFMBT2* 基因外显子 12 和外显子 18 (图 1B、1C)。



A: circSFMBT2 环化位置扩增结果, M: DL2000 marker, 1~3: 以麒麟鸡肝脏组织 1 日龄 cDNA 模板扩增 circSFMBT2 成环位置; B: circSFMBT2 成环位置扩增测序结果; C: circSFMBT2 结构示意图
A: Amplification result of circSFMBT2 junction site, M: DL2000 marker, 1~3: Amplification of circSFMBT2 junction site with one day old cDNA template from Kirin chicken liver tissue; B: Sequencing result of circSFMBT2 junction position; C: Structure diagram of circSFMBT2z

图 1 鸡 circSFMBT2 成环验证

Fig. 1 Validation of the junction of chicken circSFMBT2

线性 RNA 在 RNase R 外切酶的作用下很容易降解,但 circRNA 具有 RNase R 耐受性。为了进一步验证 circSFMBT2 的环形结构,对麒麟鸡肝脏组织的 RNA 分别以 RNase R 未处理和处理后,采用实时荧光 PCR 定量 circSFMBT2 和 *SFMBT2* mRNA 的相对表达量,试验结果表明,使用 RNase R 处理后, *SFMBT2* mRNA 的相对表达量显著下降,而

circSFMBT2 的相对表达量无明显变化(图 2A)。另外,分别使用 Oligo-d(T)₁₈ 和随机引物(N9)反转录成 cDNA,实时荧光定量 PCR 结果表明, *SFMBT2* mRNA 在 Oligo-d(T)₁₈ 和随机引物组中的表达量无显著变化,而采用 Oligo-d(T)₁₈ 反转录的 circSFMBT2 的表达量显著低于随机引物组(图 2B)。进一步证实 circSFMBT2 具备环状分子的特点。

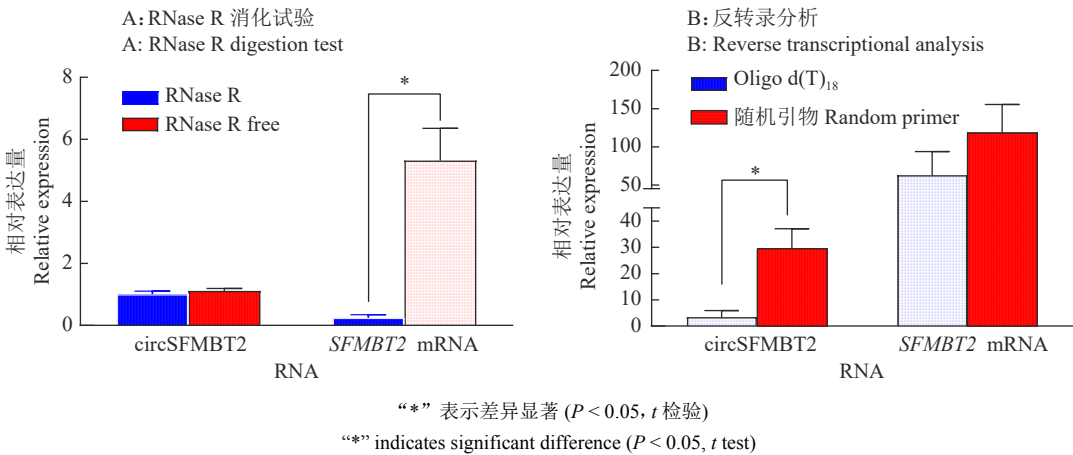
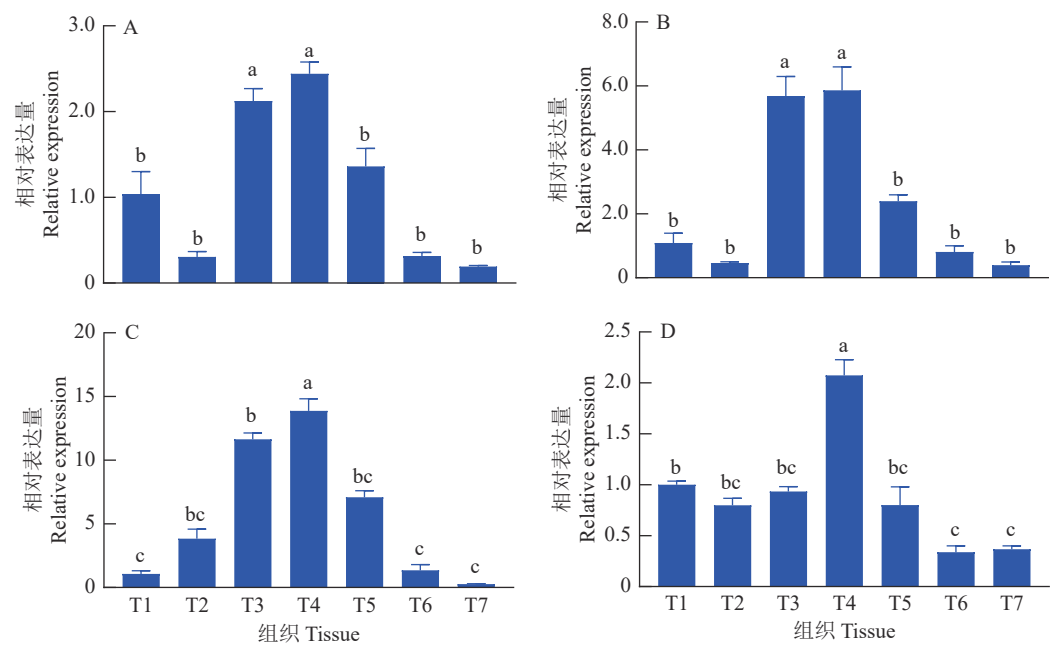


图 2 circSFMBT2 和 *SFMBT2* mRNA 对 RNase R 耐受性和反转录分析
Fig. 2 Tolerance of the chicken circSFMBT2 and *SFMBT2* mRNA to RNase R and reverse transcription analysis

2.2 鸡 circSFMBT2 的组织表达谱

分别提取麒麟鸡 14 胚龄和 1 周龄心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肺脏、胸肌和腿肌等组织 RNA,反转录成 cDNA 后,通过荧光定量 PCR 对 circSFMBT2

和 *SFMBT2* mRNA 的表达量进行对比分析。发现 circSFMBT2 和 *SFMBT2* mRNA 的组织表达规律存在一定的相似性,两者都在 14 胚龄和 1 周龄脾脏和肺脏中高表达,而在胸肌和腿肌中低表达(图 3)。



A: 14 胚龄 circSFMBT2 表达; B: 14 胚龄 *SFMBT2* mRNA 表达; C: 1 周龄 circSFMBT2 表达; D: 1 周龄 *SFMBT2* mRNA 表达; T1: 心脏, T2: 肝脏, T3: 脾脏, T4: 肺脏, T5: 肾脏, T6: 胸肌, T7: 腿肌; 各组织的 RNA 表达量为相对于 T1 的表达量; 柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, LSD 法)

A: circSFMBT2 expression of 14 embryo age; B: *SFMBT2* mRNA expression of 14 embryo age; C: circSFMBT2 expression of one week age; D: *SFMBT2* mRNA expression of one week age; T1: Heart, T2: Liver, T3: Spleen, T4: Lung, T5: Kidney, T6: Pectoral, T7: Leg muscle; The RNA expression level in each tissue is relative to the expression level in T1; Different lowercase letters on bars indicate significant differences ($P<0.05$, LSD test)

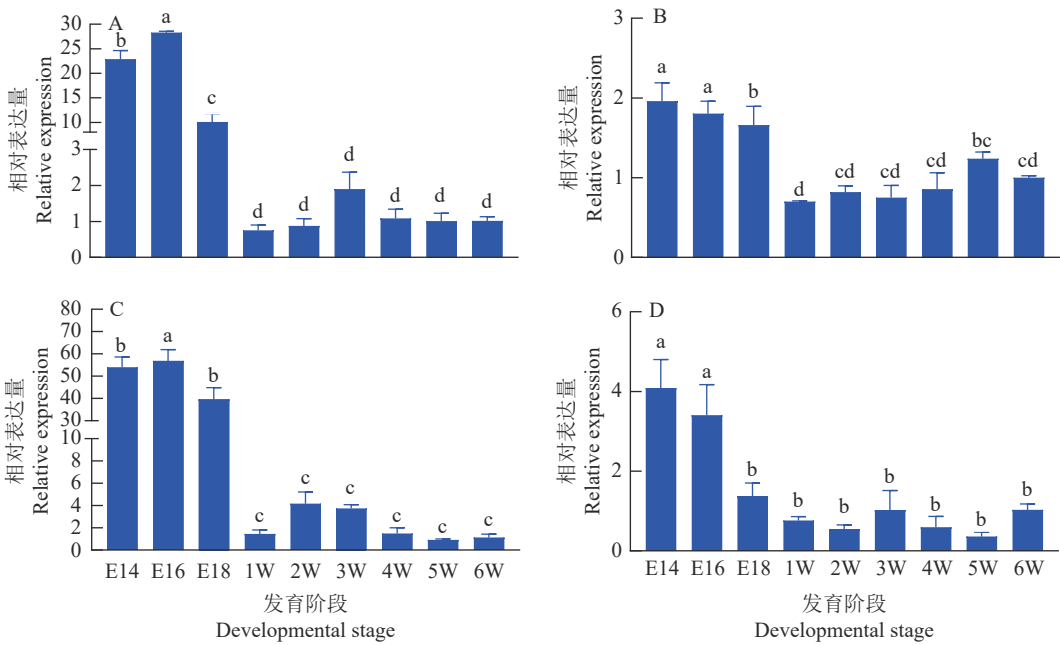
图 3 麒麟鸡 circSFMBT2 和 SFMBT2 mRNA 组织表达谱

Fig. 3 circSFMBT2 and SFMBT2 mRNA expression profiles in tissues of Kirin chickens

2.3 鸡胸肌和腿肌 circSFMBT2 时序表达规律

提取麒麟鸡不同发育阶段胸肌和腿肌组织 RNA,

反转录后定量分析的结果 (图 4) 表明, circSFMBT2 与 SFMBT2 在胚胎时期的表达量相对较高, 而出生



A: 胸肌中 circSFMBT2 表达; B: 腿肌中 circSFMBT2 表达; C: 胸肌中 *SFMBT2* mRNA 表达; D: 腿肌中 *SFMBT2* mRNA 表达; E14, E16 和 E18 分别表示 14、16、18 胚龄, 1W~6W 表示 1~6 周龄; 各阶段的 RNA 表达量为相对于第 6 周的表达量; 柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, LSD 法)

A: circSFMBT2 expression in breast muscle; B: circSFMBT2 expression in leg muscle; C: *SFMBT2* mRNA expression in breast muscle; D: *SFMBT2* mRNA expression in leg muscle; E14, E16 and E18 indicate 14, 16 and 18 embryo ages respectively, 1W~6W indicate 1 to 6 week age; The RNA expression level in each stage is relative to the expression level in the 6th week; Different lowercase letters on bars indicate significant differences ($P<0.05$, LSD test)

图 4 麒麟鸡 circSFMBT2 和 SFMBT2 mRNA 的时序表达规律

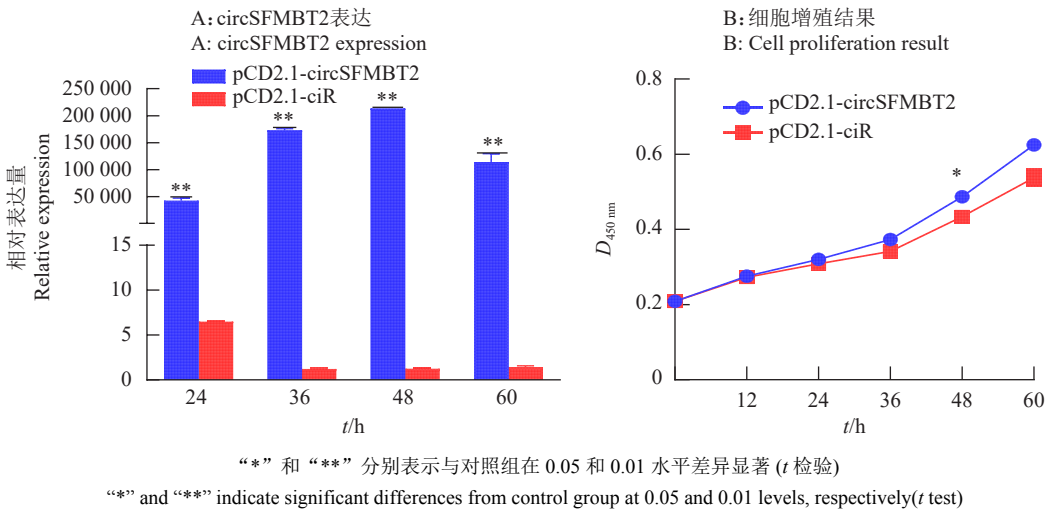
Fig. 4 Temporal expression pattern of circSFMBT2 and SFMBT2 mRNA of Kirin chickens

后两者的表达量急剧下降,同时 circSFMBT2 在胸肌的表达量下降趋势更为明显。

2.4 鸡 circSFMBT2 对 DF-1 细胞增殖的影响

2.4.1 CCK-8 试验结果 在鸡 DF-1 细胞中过表达 circSFMBT2, 荧光定量 PCR 结果证实过表达效果显著 (图 5A), pCD2.1-circSFMBT2 过表达质粒

可用于后续试验。为了验证过表达后 circSFMBT2 对细胞增殖的影响, 通过转染 pCD2.1-circSFMBT2 和 pCD2.1-ciR, 收集转染后 24、36、48 和 60 h 的细胞, 进行 CCK-8 试验, 结果显示, 与 pCD2.1-ciR 组相比, circSFMBT2 过表达 48 h 后, DF-1 细胞活力上升 (图 5B)。



“*” 和 “**” 分别表示与对照组在 0.05 和 0.01 水平差异显著 (t 检验)
“*” and “**” indicate significant differences from control group at 0.05 and 0.01 levels, respectively (t test)

图 5 过表达鸡 circSFMBT2 对 DF-1 细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of chicken circSFMBT2 overexpression on proliferation of DF-1 cells

2.4.2 Edu 试验结果 为进一步分析 circSFMBT2 对细胞增殖的影响, 在 DF-1 细胞中同时转染 pCD2.1-ciR 和 pCD2.1-circSFMBT2 质粒, 培养 48 h 后对渗入细胞总数进行分析, 结果表明过表达组 Edu 细胞渗入总数高于对照组 (图 6、7), circSFMBT2 过表达后可以促进 DF-1 增殖。

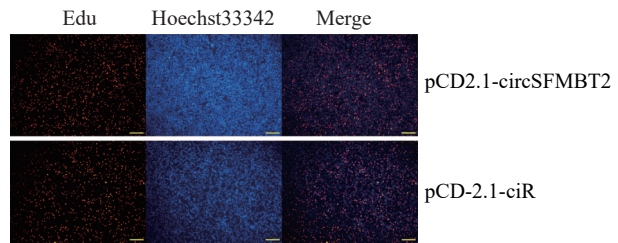
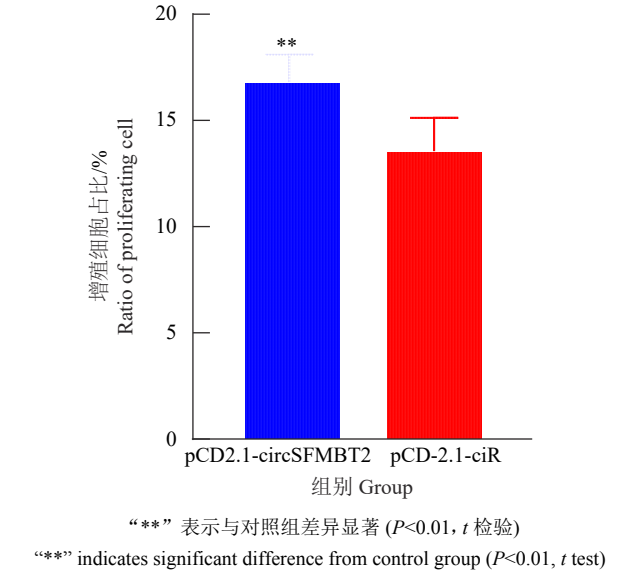


图 6 转染 pCD2.1-ciR 和 pCD2.1-circSFMBT2 后荧光显微镜下的细胞状态 (标尺=250 μm)

Fig. 6 Cell state under fluorescence microscope after transfected with pCD2.1-ciR and pCD2.1-circSFMBT2 (Scale bar=250 μm)

2.4.3 circSFMBT2 对细胞增殖标记基因表达的影响 在 CCK-8 和 Edu 试验基础上, 为了进一步验证 circSFMBT2 对 DF-1 细胞增殖的影响, 在转染 pCD2.1-ciR 和 pCD2.1-circSFMBT2 质粒 24、36、48 和 60 h 后, qRT-PCR 检测对照组和过表达组增殖标记基因 PCNA、CDK2 和 CCND1 表达趋势。结果显示试验组中增殖标记基因 CCND1 在 36 和 48 h 表达



“**” 表示与对照组差异显著 (P<0.01, t 检验)
“**” indicates significant difference from control group (P<0.01, t test)

图 7 Edu 中阳性细胞统计结果

Fig. 7 Statistical results of positive cells in Edu

量高于对照组, 并且 CCND1 和 PCNA 的表达量在 48 h 与对照组差异显著, CDK2 的表达量无明显变化 (图 8)。

2.4.4 circSFMBT2 生物学功能预测 利用 RNAhybird 在线预测 circSFMBT2 潜在的靶标位点, 发现 circSFMBT2 存在 miR-103、miR-107 和 let-7b 等靶标位点, 另外, 使用 SnapGene 软件预测 circSFMBT2 存在 1 个开放阅读框, 编码蛋白质能力得分为 0.9360, 推测其具有较强编码小肽的潜能。

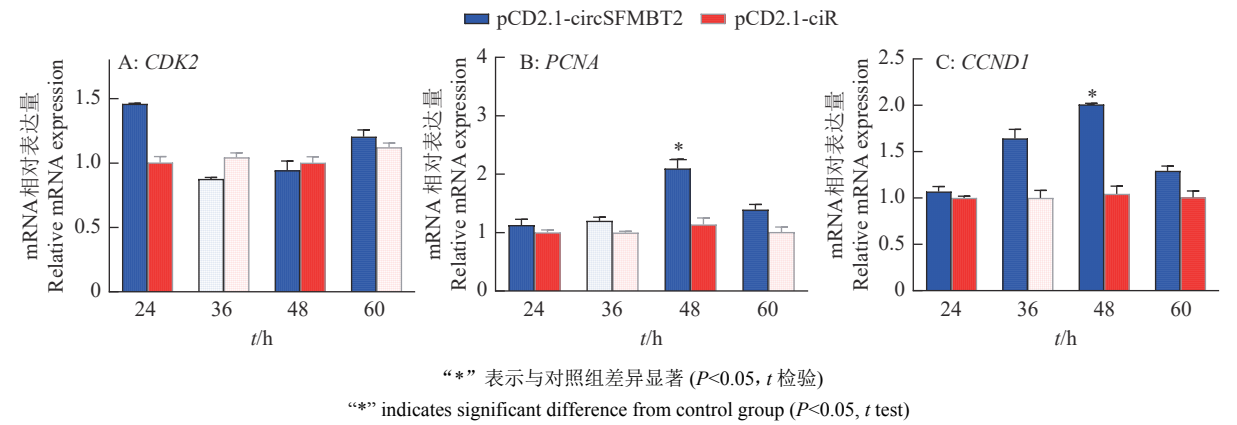


图 8 转染 pCD2.1-circSFMBT2 和 pCD2.1-ciR 后增殖标记基因表达的变化

Fig. 8 Expression changes of proliferation marker genes after transfection with pCD2.1-circSFMBT2 and pCD2.1-ciR

3 讨论与结论

在华南农业大学家禽遗传育种与繁殖实验室前期研究的基础上,本研究验证了鸡 circSFMBT2 由 *SFMBT2* 基因外显子 12 至外显子 18 反向剪切形成。查阅 circBase(<http://www.circbase.org>) 发现,人 *SFMBT2* 也存在环状 RNA,人 circSFMBT2 由亲本基因的外显子 5 至外显子 8 组成。研究发现,人 circSFMBT2 可作为 miR-182-5p 海绵调控胃癌细胞的增殖^[13],也可通过靶向 miR-7-5p 对肺癌细胞产生影响^[14]。

由于环状 RNA 的闭环结构,不易被 RNase R 降解,具有较强的稳定性。本研究发现,与线性 *SFMBT2* 相比,鸡 circSFMBT2 具有较强的 RNase R 耐受性,并且随机引物(N9)相比于 Oligo-d(T)₁₈ 引物具有更高的反转录效率,进一步说明鸡 circSFMBT2 具备环状分子的基本特征。鸡 circSFMBT2 还具有时空表达的特异性,本试验通过荧光定量发现,鸡 circSFMBT2 与线性转录本在胸肌和腿肌时序表达规律相似,其在胚胎时期表达量较高,而出身后(1~6 周)表达量迅速下降,推测可能与线性转录本低表达有关。鸡 circSFMBT2 在组织中的表达具有差异性,circSFMBT2 在 14 胚龄与 1 周龄鸡肺脏组织表达量最高,在肌肉组织表达量极低。

目前,已有大量文章报道 circRNA 在细胞中发挥调控作用,如在牛原代成肌细胞中,发现 circLMO7 能抑制成肌细胞分化促进细胞增殖^[14]。在家禽中,circSVIL 可以通过结合 miR-203 从而促进成肌细胞的增殖和分化^[15]。在细胞增殖试验中,我们发现过表达 circSFMBT2 48 h 后,增殖标记基因 *PCNA* 和 *CCND1* 的表达量升高,但 *CDK2* 的表达量无明显变化。CCK-8 与 Edu 试验表明,过表达

circSFMBT2 可促进 DF-1 细胞的增殖。

研究发现, circRNA 具有多种生物学功能。一些 circRNA 含有 miRNA 应答原件,竞争性 miRNA 结合,发挥 miRNA 海绵作用^[16], circRNA 也可在转录后调控亲本基因的表达^[17-20]。一些定位在细胞核中的 circRNA 可以与 RNA 聚合酶 II 结合调控亲本基因的转录活性^[7], 含有内含子序列的 circRNA 通过 RNA-RNA 相互作用与 U1 小核糖体蛋白结合,进一步与 RNA 聚合酶 II 结合促进亲本基因的转录^[21],也可以与 DNA 结合形成 RNA-DNA 杂交环,在剪接过程中调控亲本基因的表达^[22]。

随着 circRNA 的研究深入,人们发现有些 circRNA 具有开放阅读框,能编码蛋白质^[23]。circSFMBT2 含有 8 个外显子,利用 RNAhybird 在线预测发现 circSFMBT2 存在 miR-103 和 miR-107 等靶标位点,另外,使用 SnapGene 软件预测发现 circSFMBT2 存在 1 个开放阅读框。我们期待更深入的研究,验证 circSFMBT2 能否作为 miRNA 的海绵或编码小肽,是否调控线性基因转录,并验证其是否参与调控鸡肌肉生长发育。

参考文献:

[1] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.

[2] ZHANG Y, XUE W, LI X, et al. The biogenesis of nascent circular RNAs[J]. *Cell Reports*, 2016, 15(3): 611-624.

[3] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141-157.

[4] ZHANG C, WU H, WANG Y, et al. Circular RNA of cattle casein genes are highly expressed in bovine mammary gland[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(6): 4750-4760.

- [5] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733.
- [6] HUANG A, ZHENG H, WU Z, et al. Circular RNA-protein interactions: Functions, mechanisms, and identification[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3503-3517.
- [7] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(3): 256-264.
- [8] LI H, YANG J, WEI X, et al. CircFUT10 reduces proliferation and facilitates differentiation of myoblasts by sponging miR-133a[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(6): 4643-4651.
- [9] LEGNINI I, DI TIMOTEO G, ROSSI F, et al. Circ-ZNF609 is a circular rna that can be translated and functions in myogenesis[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1): 22-37.
- [10] KLYMENKO T, PAPP B, FISCHLE W, et al. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(9): 1110-1122.
- [11] GRIMM C, MATOSR R, LY-HARTIG N, et al. Molecular recognition of histone lysine methylation by the Polycomb group repressor dSfmbt[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(13): 1965-1977.
- [12] SUN H, XI P, SUN Z, et al. Circ-SFMBT2 promotes the proliferation of gastric cancer cells through sponging miR-182-5p to enhance CREB1 expression[J]. *Cancer Management and Research*, 2018, 10: 5725-5734.
- [13] 李长生, 张莞萍, 任中海. circ-SFMBT2 通过靶向 miR-7-5p/ADAM10 轴对非小细胞肺癌细胞生物学行为的影响[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2022, 39(2): 162-170.
- [14] WEI X, LI H, YANG J, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circLMO7 that regulates myoblasts differentiation and survival by sponging miR-378a-3p[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(10): e3153.
- [15] OUYANG H, CHEN X, LI W, et al. Circular RNA circSVIL promotes myoblast proliferation and differentiation by sponging miR-203 in chicken[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 172.
- [16] 骆甲, 王型力, 孙志超, 等. 植物环状 RNA 研究进展[J]. *遗传*, 2018, 40(6): 467-477.
- [17] RYBAK-WOLF A, STOTTMEISTER C, GLAZAR P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58(5): 870-885.
- [18] CONN V M, HUGOUVIEUX V, NAYAK A, et al. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17053.
- [19] LI X, YANG L, CHEN L L. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(3): 428-442.
- [20] CHEN X, HAN P, ZHOU T, et al. circRNADB: A comprehensive database for human circular RNAs with protein-coding annotations[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34985.
- [21] QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Letters*, 2015, 365(2): 141-148.
- [22] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI N, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(1): 55-66.
- [23] ZHOU B, YANG H, YANG C, et al. Translation of non-coding RNAs and cancer[J]. *Cancer Letters*, 2021, 497: 89-99.

【责任编辑 庄 延】