

张敏, 王芷筠, 李戡, 等. circRIPK2 在鸡骨骼肌细胞增殖分化中的调控作用 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(5): 19-26.
ZHANG Min, WANG Zhijun, LI Kan, et al. Regulatory role of circRIPK2 in proliferation and differentiation of chicken primary myoblasts[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(5): 19-26.

circRIPK2 在鸡骨骼肌细胞增殖分化中的调控作用

张 敏, 王芷筠, 李 戡, 聂庆华

(华南农业大学 动物科学学院/农业部鸡遗传育种与繁殖重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探索 circRIPK2 在鸡骨骼肌生长发育中的功能及作用机制。【方法】依据反向剪切位点设计收敛、发散引物, 并结合 Sanger 测序验证 circRIPK2 的环形结构。利用 RT-PCR 探究不同发育时期 circRIPK2 的表达水平。通过构建过表达载体, 结合 EdU、流式细胞术和 RT-PCR, 探究 circRIPK2 对鸡原代成肌细胞增殖分化的影响。【结果】PCR 电泳结果及 Sanger 测序证明 circRIPK2 环化位点真实存在。RT-PCR 结果表明, 和对照组相比, 过表达 circRIPK2 后, 对细胞增殖有抑制作用的标记基因 *p21* 的 mRNA 表达上调 20%, 对细胞增殖有促进作用的标记基因 *Cyclin B2*、*Cyclin D1*、*Cyclin D2* 和 *PCNA* 的 mRNA 表达分别下调 39%、22%、29% 和 45%; 肌分化标记基因 *MyHC*、*MYOG* 和 *Myomaker* 的 mRNA 表达分别上调了 39%、56% 和 25%。EdU 检测细胞增殖和流式细胞术检测细胞周期变化的结果表明, circRIPK2 抑制细胞增殖进程。【结论】circRIPK2 可能通过抑制成肌细胞增殖、促进成肌细胞分化, 从而影响鸡骨骼肌的生长发育过程。

关键词: circRIPK2; 鸡; 骨骼肌; 成肌细胞; 细胞增殖; 细胞分化; 环状 RNA
中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)05-0019-08

Regulatory role of circRIPK2 in proliferation and differentiation of chicken primary myoblasts

ZHANG Min, WANG Zhijun, LI Kan, NIE Qinghua
(College of Animal Science, South China Agricultural University/Key Laboratory of Chicken Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To explore the function and molecular mechanism of circRIPK2 on the growth of chicken skeletal muscle. 【Method】The convergent and divergent primers were designed according to the back-splicing site, and the circular structure of circRIPK2 was verified by Sanger sequencing. RT-PCR was used to explore the expression level of circRIPK2 at different developmental stages. The circRIPK2 overexpression vector was constructed. The effect of circRIPK2 on the proliferation and differentiation of chicken primary myoblasts were detected using EdU, flow cytometry and RT-PCR technology. 【Result】The electrophoresis of PCR product and Sanger sequencing proved the existence of circRIPK2. RT-PCR result showed that comparing with control, overexpression of circRIPK2 up-regulated the mRNA expression of cell cycle-inhibiting gene *p21*

by 20%, down-regulated the mRNA expressions of cell cycle-promoting genes *Cyclin B2*, *Cyclin D1*, *Cyclin D2* and *PCNA* by 39%, 22%, 29% and 45% respectively, and up-regulated the mRNA expressions of differentiation marker genes *MyHC*, *MYOG* and *Myomaker* by 39%, 56% and 25% respectively. The EdU assay and flow cytometry analysis also indicated that circRIPK2 inhibited cell proliferation. 【Conclusion】 CircRIPK2 may inhibit myoblast proliferation and promote myoblast differentiation, thus affecting the growth and development of chicken skeletal muscle.

Key words: circRIPK2; chicken; skeletal muscle; myoblast; cell proliferation; cell differentiation; circular RNA

人类基因组约 70%~90% 可以转录成 RNA, 然而仅有不足 2% 的基因具备编码能力^[1]。众多不具备编码能力的 RNA 都被归作转录噪音或者剪接副产物。尽管早期研究明确显示非编码 RNA(Non-coding RNA, ncRNA) 在自然界真实存在, 它们的潜在作用仍没有被充分证实^[2]。随着 20 世纪以来计算机技术的迅猛发展, 人们发现这些非编码 RNA 在不同的生理或者病理过程中发挥着重要的调控作用^[3]。环状 RNA(Circular RNA, circRNA) 是内源性非编码 RNA 家族的一员, 大概 40 年前, 研究人员逐渐关注这种具有共价闭环结构的新兴 RNA 分子。研究表明, circRNA 在细胞中广泛分布, 和线性 RNA 相比, 不易受 RNA 外切酶影响, 具有更高的稳定性^[4]。近年来有关 circRNA 的生物学功能研究受到广泛关注, 其作用方式多种多样, 包括作为 miRNA 海绵、调控亲本基因转录、和蛋白质相互作用、甚至翻译小肽等方式发挥功能^[5-8]。目前对 circRNA 生物学功能的理解仍处于早期, 除了对衰老、癌症等疾病具有重要调控作用外, circRNA 在肌肉发育过程中也具有重要作用。通过对不同动物的骨骼肌和成肌细胞进行 circRNA 测序, 发现在肌肉中高表达且具有调控作用的多个 circRNA, 例如 circFUT10、circLMO7、circRBFox2、circFGFR4 等, 它们通过结合 miRNA 参与成肌细胞的增殖分化进程^[9-12]; 另外也有研究发现 circZNF609 可以翻译微肽, 且调控成肌细胞的增殖过程^[8]。

RIPK2 是 RIP 家族的一员, RIPK2 的 N 端包含 1 个丝氨酸/苏氨酸结构域, C 端为半胱氨酸蛋白水解酶募集域^[13], 研究表明, RIPK2 在维持免疫系统稳态或者调节脂肪代谢等方面发挥重要作用^[14-15]。Ouyang 等^[11]前期对不同发育时期鸡的骨骼肌进行 circRNA 测序, 通过对测序结果的分析筛选, 发现 circRIPK2 在 3 个时期差异表达, 因此推测 circRIPK2 可能在鸡肌肉发育过程中具有重要作用。本研究利用 PCR 扩增、Sanger 测序验证 circRIPK2 的存在, 同时利用定量 PCR、EdU 试

验、流式细胞术等探究 circRIPK2 对鸡原代成肌细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

鸡胚来源于珠海市裕禾农牧有限公司。

主要试剂: DNA 抽提试剂盒购自 OMEGA 公司; RNA 反转录试剂盒购自莫纳生物科技有限公司; 荧光定量 PCR 酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 环状 RNA 过表达载体 pCD2.5-ciR 购自吉赛生物科技有限公司; 核质分离试剂盒、FastDigestBamHI、FastDigestEcoRI 购自 Thermo 公司; RNAiso Plus 购自 TAKARA 公司; 凝胶 DNA 小量回收试剂盒、低内毒素质粒抽提试剂盒均购自 Magen 公司; 转染试剂 Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司; Opti-MEM 无血清培养基、RPMI1640 细胞培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、马血清均购自 Gibco 公司; EdU 细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鸡原代成肌细胞的分离与培养 采集 11 日龄鸡胚的腿肌组织, 用手术剪刀和镊子剔除可见的骨骼和皮肤组织, 剩余肌肉组织剪至肉糜状, 然后用胰蛋白酶在 37 ℃ 培养箱内消化 15~20 min, 用完全培养基 (体积分数为 20% 的胎牛血清+体积分数为 79.5% 的 RPMI+体积分数为 0.5% 的青霉素、链霉素) 终止消化。使用 70 μm 过滤网过滤后, 1 500 r/min 离心 5 min, 用完全培养基对细胞进行重悬、并接种到无菌培养皿中、差速贴壁 2 次, 获取纯化的成肌细胞, 细胞在 37 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱内培养。

1.2.2 circRIPK2 过表达载体构建 根据 circRNA 的测序数据, 通过 Ensemble 数据库下载 circRIPK2 的基因序列, 应用 DNASTAR 软件设计全长序列的引物 (表 1)。通过 PCR 反应获得 circRIPK2 的全长序列。使用 FastDigestBamHI、

表 1 引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5' → 3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	用途 Application
C-circRIPK2-F	GCATGTCAAAATGGCGTGTCA	56	成环鉴定(收敛引物) Verification of circRIPK2 (Convergent primers)
C-circRIPK2-R	ACAAGAGCTCGATGCGGAATG		
D-circRIPK2-F	TGAATCGCCGTGTATCCACAA	56	成环鉴定(发散引物) Verification of circRIPK2 (Divergent primers)
D-circRIPK2-R	AAATCTGCAATCTGATGAGA		
CircRIPK2-F	ATTGCAGATTTTGGCATGTC	58	克隆 Cloning
CircRIPK2-R	CTGATGAGAGGATATTACACT		
QcircRIPK2-F	CGACTCAAATCTCTTCCCCAG	60	RT-PCR
QcircRIPK2-R	TCATGTTTCACACTTGCCCCG		
Cyclin B2-F	CAGTAAAGGCTACGAAAG	60	RT-PCR
Cyclin B2-R	ACATCCATAGGGACAGG		
Cyclin D1-F	CAGAAGTGCGAAGAGGAAGT	60	RT-PCR
Cyclin D1-R	CTGATGGAGTTGTCCGGTGTA		
Cyclin D2-F:	AAC TTGCTCTACGACGACC	60	RT-PCR
Cyclin D2-R:	TTCACAGACCTCCAACATC		
PCNA-F	GTGCTGGGACCTGGGTT	60	RT-PCR
PCNA-R	CGTATCCGCATTGTCTTCT		
p21-F	GAAGAGTTGTCCACGATAAGC	60	RT-PCR
p21-R	TTCCAGTCCTCCTCAGTCC		
MyHC-F	CTCCTCACGCTTTGGTAA	60	RT-PCR
MyHC-R	TGATAGTCGTATGGGTTGGT		
Myomaker-F	TGGGTGTCCCTGATGGC	60	RT-PCR
Myomaker-R	CCCGATGGGTCCTGAGTAG		
GAPDH-F	TCCTCCACCTTTGATGCG	60	RT-PCR
GAPDH-R	GTGCCTGGCTCACTCCTT		
U6-F	CAAGGACCCATCGTTCCACA	60	RT-PCR
U6-R	CCATTGGACACGCAGAATGC		

FastDigest*Eco*RI 酶切 PCR 扩增产物及 pCD2.5-ciR 载体, 酶切产物纯化后利用 T4 连接酶连接、22 ℃ 条件下放置 1 h。取 10 μL 连接产物转化至 DH5α 感受态细胞中, 转化完成后涂板, 37 ℃ 培养箱培养 12~14 h 后挑取单克隆菌落培养, 菌液鉴定后, 送擎科生物技术有限公司测序, 比对 circRIPK2 基因序列和测序序列, 选取结果吻合的单克隆菌落留用。

1.2.3 细胞转染试验 当原代成肌细胞密度(显微镜视野下的细胞占比)超 90% 时, 将细胞接种于 12 孔板, RPMI1640 完全培养基培养细胞。12 孔板细胞密度为 70%~80% 时, 使用转染试剂 Lipofectamine 3000 转染过表达载体 pCD2.5-circRIPK2 和对照空载质粒 pCD2.5-ciR, 转染 6 h 后更换培养基, 待贴壁生长细胞密度为 90%~100%

时, 使用分化培养基(体积分数为 2% 的马血清+体积分数为 97.5% 的 RPMI+体积分数为 0.5% 的青霉素、链霉素)诱导成肌细胞分化。

1.2.4 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 检测 分别取 100 mg 不同胚龄和日龄的肌肉组织样品, 加入 1 mL RNAiso Plus 试剂后研磨匀浆。同时收集增殖分化不同时期的成肌细胞, 用 RNAiso Plus 试剂吹打细胞, RNAiso Plus 处理后进行总 RNA 抽提, 然后取 0.5 μg 总 RNA, 依据 Monad 反转录试剂盒说明书将其反转录为 cDNA, 反转录程序为 37 ℃ 2 min, 55 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 min。以反转录生成的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, RT-PCR), PCR 反应体系: 上、下游引物各 0.3 μL、SYBR Green qPCR Mix 5 μL、cDNA 1 μL、双蒸水 3.5 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃ 5 min;

95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 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 *circRIPK2* 基因、细胞增殖相关标记基因及肌分化标志基因的表达。

1.2.5 EdU 试验、流式细胞术检测细胞增殖 转染过表达载体 *circRIPK2* 和 *pCD2.5-ciR*, 每组设置 6 个重复, 24 h 后收集细胞, 用流式细胞仪检测并分析细胞周期变化; 转染 48 h 后参考锐博 EdU 试剂盒说明书对细胞进行孵育、固定、通透等处理, 染色完成后加 PBS 缓冲液避光保存待用, 在荧光显微镜下观察。

1.2.6 核质定位分析 分离原代成肌细胞后用完全培养基培养, 待细胞密度达 100% 时, 使用核质分离试剂盒回收细胞核和细胞质 RNA, 然后利用 RT-PCR 技术检测 *circRIPK2* 在细胞质、细胞核中的表达量。

1.2.7 统计学分析 试验分组中每组包含 3 个重复, 采用 GraphPad Prism8 软件绘图和数据统计分析, 2 组数据比较采用 *t* 检验分析。

2 结果与分析

2.1 circRIPK2 的鉴定及细胞定位

用不同胚龄 (11 胚龄、16 胚龄、1 日龄) 杏花鸡腿肌进行高通量测序, Ouyang 等^[11] 鉴定发现了 13 377 个 *cricRNA*, 根据上述测序数据, 本研究选取在 3 个时期差异表达的 *circRIPK2* 作为候选研究基因, 描述了 *circRIPK2* 的成环来源示意图(图 1)。针对 *RIPK2* 接头序列预测位点设计收敛引物、发散引物各 1 对 (表 1), 利用反转录后的 cDNA、gDNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果显示只有以 cDNA 为模板时, 发散引物才可以扩增出明亮的条带 (图 2)。同时 Sanger 测序结果显示 *circRIPK2* 的环化位点真实存在 (图 3)。使用核质分离试剂盒, 分别回收

细胞核和细胞质 RNA, 采用 RT-PCR 对 *circRIPK2* 进行细胞定位, 结果 (图 4) 表明 *circRIPK2* 在核质中均存在, 其中细胞质占比为 72%, 细胞核占比为 28%。

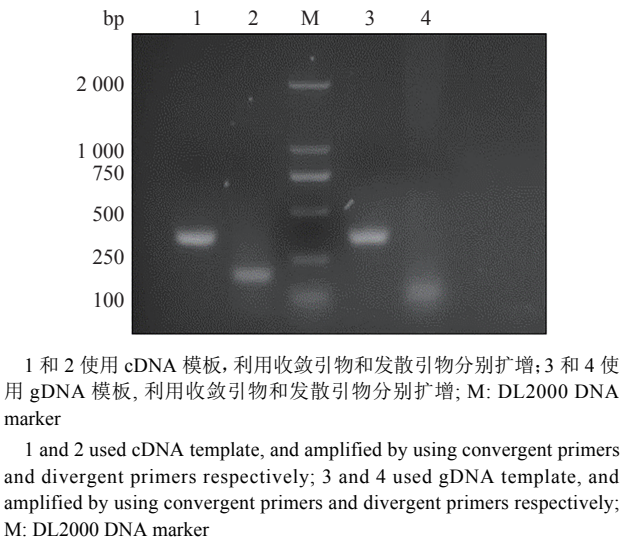


图 2 circRIPK2 收敛引物和发散引物的 PCR 扩增
Fig. 2 PCR amplification of circRIPK2 by convergent primers and divergent primers

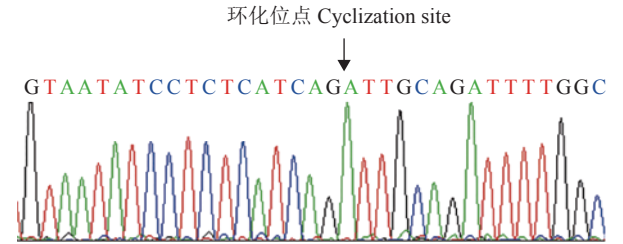
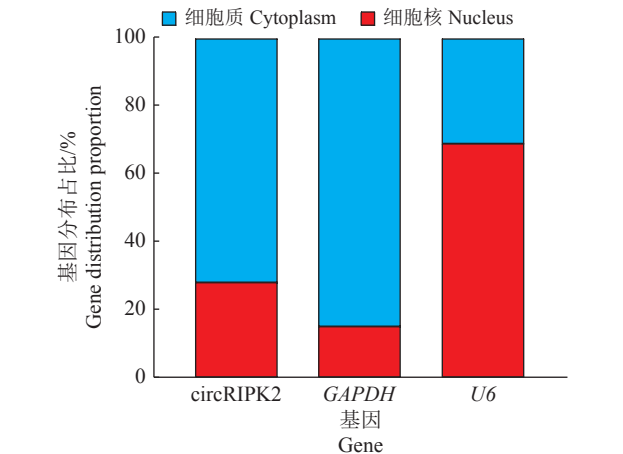


图 3 circRIPK2 发散引物扩增片段测序结果
Fig. 3 Sanger sequencing result of PCR product amplified by divergent primers for circRIPK2



GAPDH、*U6* 分别为细胞质与细胞核的标记基因
GAPDH and *U6* are the marker genes of cytoplasm and nucleus respectively

图 4 circRIPK2 在细胞核与细胞质中的分布
Fig. 4 Distribution of circRIPK2 in the nucleus and cytoplasm

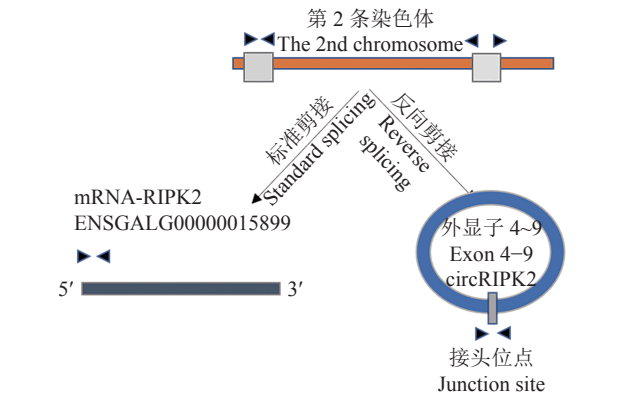


图 1 circRIPK2 成环来源
Fig. 1 The biogenesis of circRIPK2

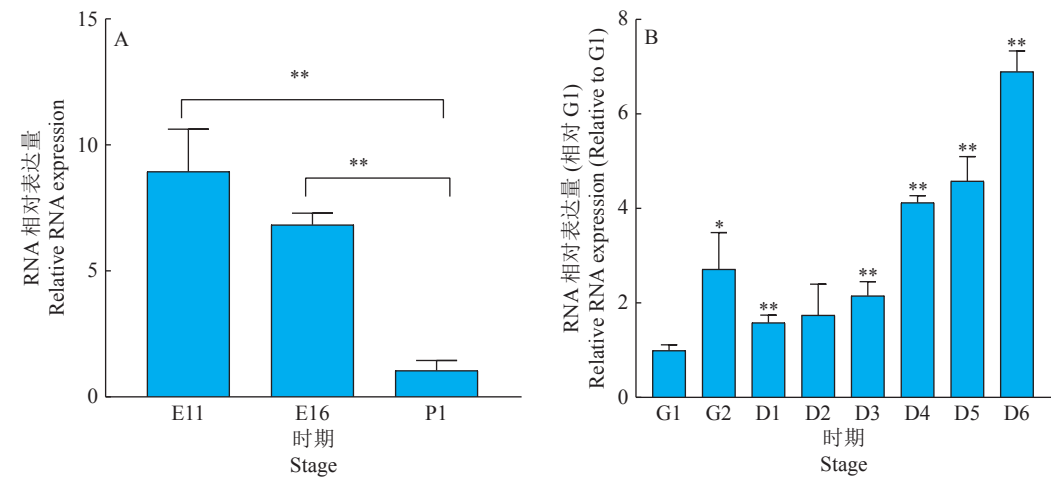
2.2 circRIPK2 的时空表达谱分析

以 11 胚龄、16 胚龄、1 日龄小鸡腿肌的 cDNA 作模板, 通过 RT-PCR 技术比较不同胚龄 circRIPK2 的表达水平变化, 发现 circRIPK2 在不同时期表达存在差异 (图 5A)。同时, 试验分析了 circRIPK2 在原代成肌细胞增殖分化不同时期的表达变化, 发现与成肌细胞密度约为 50% 的增殖期相比, 分化期第 1 天至第 6 天 circRIPK2 的表达均显著上调, 在分化期第 6 天 circRIPK2 表达达到最高水平, 这提

示 circRIPK2 可能在细胞分化过程中起重要作用 (图 5B)。

2.3 抑制原代成肌细胞增殖

在原代成肌细胞中过表达 circRIPK2, 利用 RT-PCR 技术证实过表达效果显著 (图 6A), 可进行下一步试验。转染 48 h 后, 和对照组比较, 过表达 circRIPK2 的原代成肌细胞中 *p21* 的 mRNA 表达水平上调 20%, 而 *Cyclin B2*、*Cyclin D1*、*Cyclin D2* 和 *PCNA* 的 mRNA 表达水平分别

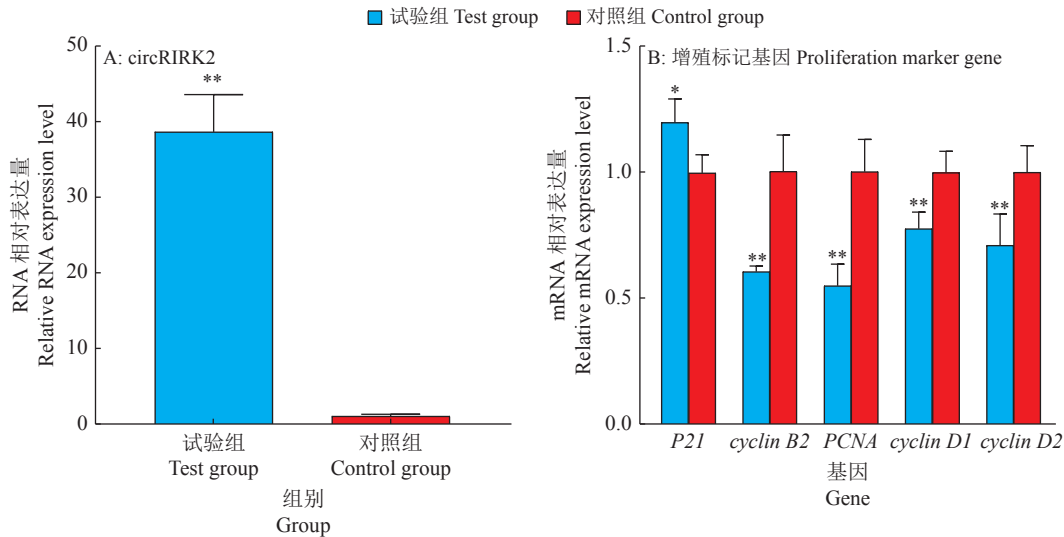


A 图中, E11: 11 胚龄, E16: 16 胚龄, P1: 1 日龄; B 图中, G1: 成肌细胞密度约为 50% 的增殖期, G2: 成肌细胞密度约为 100% 的增殖期, D1~D6: 分化期第 1 天至第 6 天; “*” 和 “**” 分别表示与 P1 (图 A) 或与 G1 (图 B) 差异达到 0.05 和 0.01 的显著水平 (*t* 检验)

In graph A, E11: 11 embryo age, E16: 16 embryo age, P1: 1-day post-hatch; In graph B, G1: Myoblast proliferation stage and the cell density was about 50%, G2: Myoblast proliferation stage and the cell density was about 100%, D1~D6: The first day to sixth day of myoblast differentiation; “*” and “**” indicate significant difference from P1 (graph A) or G1 (graph B) at 0.05 and 0.01 levels respectively (*t* test)

图 5 circRIPK2 的时空表达谱分析

Fig. 5 Analysis of the expression of circRIPK2 at different stages



“*” 和 “**” 分别表示与对照组差异达到 0.05 和 0.01 的显著水平 (*t* 检验)

“*” and “**” indicate significant difference from control group at 0.05 and 0.01 levels respectively (*t* test)

图 6 过表达 circRIPK2 后增殖相关标记基因表达量变化

Fig. 6 Expression change of proliferation marker gene after overexpression of circRIPK2

下调 39%、22%、29% 和 45%(图 6B)。此外,通过流式细胞术检测对细胞周期的影响(图 7、图 8),结果表明过表达 *circRIPK2* 后,处于 S 期细胞显著减少,处于 G2/M 期细胞显著增多(图 8);采用 EdU 染色检测细胞增殖情况(图 9、图 10),对 EdU 渗

入细胞数目进行统计、分析,结果发现过表达 *circRIPK2* 后,EdU 渗入的细胞总数明显低于对照组,细胞增殖水平受到抑制(图 10)。以上结果表明 *circRIPK2* 对成肌细胞的增殖过程具有显著抑制作用。

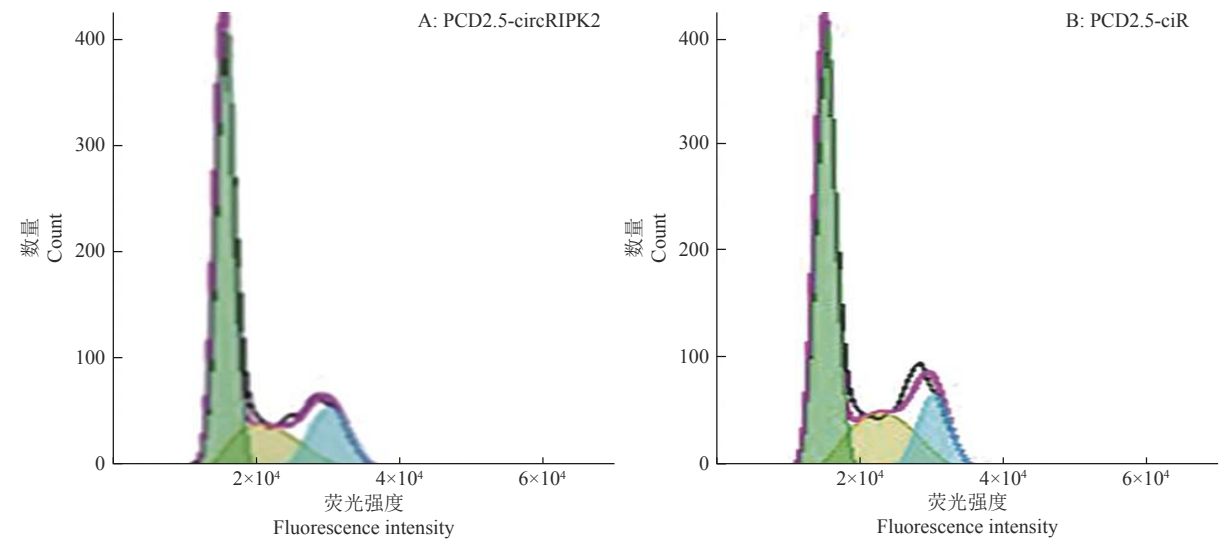
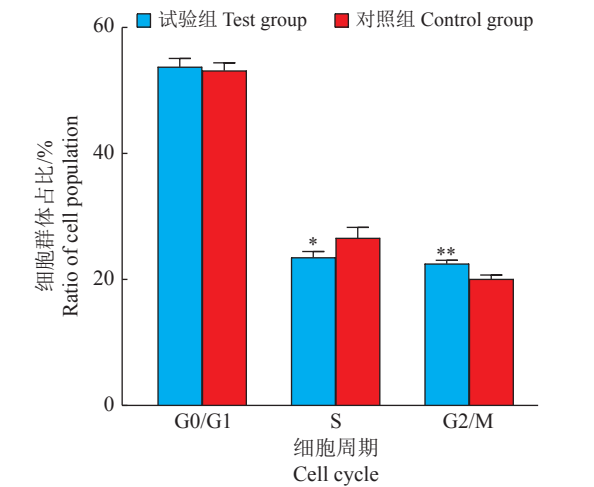


图 7 过表达 *circRIPK2* 对细胞周期的影响

Fig. 7 Effect of *circRIPK2* overexpression on cell cycle progression of chicken primary myoblasts



“*”和“**”分别表示与对照组差异达到 0.05 和 0.01 的显著水平(*t* 检验)
“*”and “**” indicate significant difference from control group at 0.05 and 0.01 levels respectively (*t* test)

图 8 过表达 *circRIPK2* 后细胞周期的统计结果

Fig. 8 Statistical results of cell cycle after overexpression of *circRIPK2*

2.4 *circRIPK2* 促进原代成肌细胞分化

转染过表达载体 pCD2.5-*circRIPK2*、pCD2.5-*ciR* 至鸡原代成肌细胞中,待细胞密度为 90%~100% 时,将培养基更换为分化培养基以诱导成肌细胞分化。诱导分化第 2 天提取细胞总 RNA 并进行 RT-PCR。试验结果显示过表达 *circRIPK2* 后

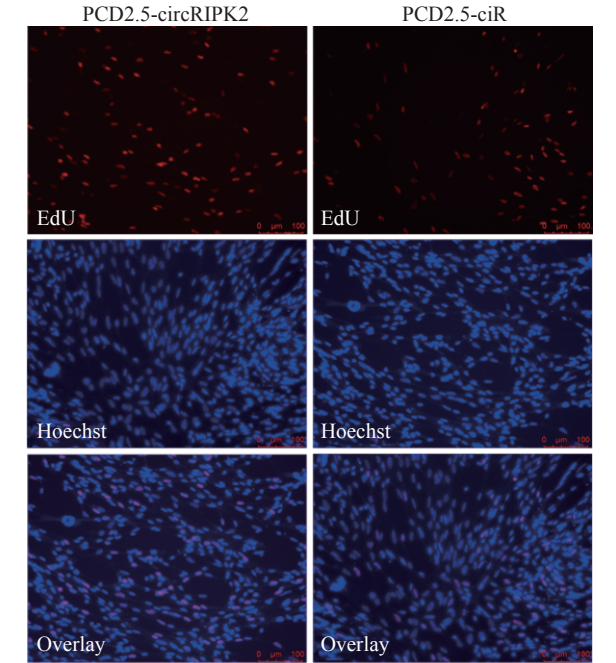


图 9 EdU 试验检测过表达 *circRIPK2* 对鸡原代成肌细胞增殖能力的影响

Fig. 9 Effect of *circRIPK2* overexpression on the proliferation rate of chicken primary myoblast detected by EdU assay

肌分化标记基因 *MyHC*、*MYOG* 和 *Myomaker* 的 mRNA 表达水平显著上调 39%、56% 和 25% (图 11)。

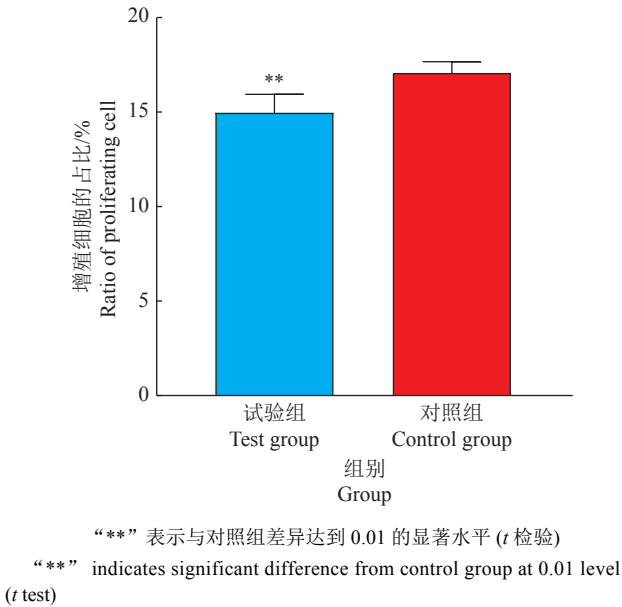


图 10 过表达 circRIPK2 后 EdU 试验的统计结果

Fig. 10 Statistical results of EdU assays after overexpression of circRIPK2

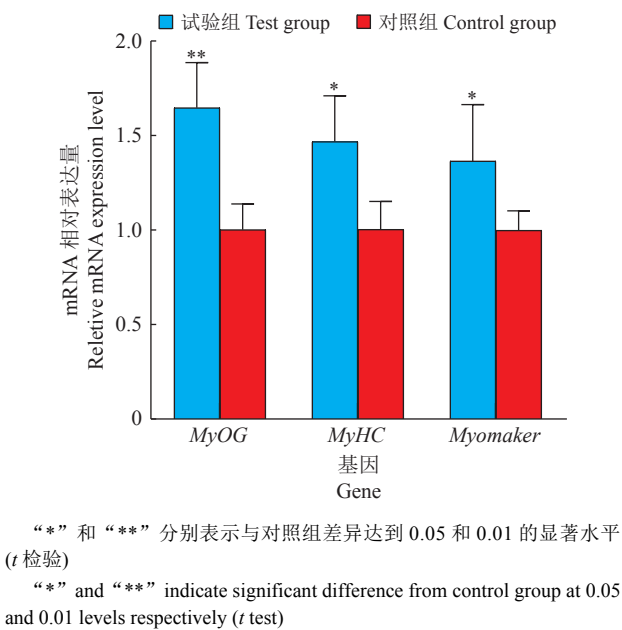


图 11 过表达 circRIPK2 后肌分化标记基因表达量变化

Fig. 11 Expression changes of the myoblast differentiation marker genes after overexpression of circRIPK2

3 讨论与结论

作为非编码 RNA 家族的重要成员, circRNA 广泛参与基因表达调控和疾病发生过程^[16-17]。有证据表明 circRNA 不但在动物骨骼肌中例如牛骨骼肌、家禽骨骼肌、小鼠骨骼肌、猪骨骼肌等大量存在, 而且具有较高的表达水平^[11, 18-21]。这表明除了生肌调控因子、成肌增强因子、PAX 家族等调控骨骼肌发育过程之外, circRNA 在调控肌肉发育过程中

也扮演重要角色^[22-24]。多项研究发现, 骨骼肌中的 circRNA 可通过作为 miRNA 海绵来调控骨骼肌的生长发育^[25]。根据前期测序, 本研究筛选出在 3 个时期差异表达的候选环状 RNA-circRIPK2, 并且通过 PCR 和 Sanger 测序等技术验证 circRIPK2 由 RIPK2 基因第 4 至第 9 外显子反向剪切形成。RT-PCR 发现 circRIPK2 在 3 个时期中差异表达, 这提示 circRIPK2 可能在鸡骨骼肌发育过程具有一定的调控作用。

有关 circRNA 对于成肌细胞的增殖已有多篇文献报道。在家禽骨骼肌中, RBFOX2 基因的不同外显子能够环化形成 circRBFOX2.2-3、circRBFOX2.2-4, 两者均可以吸附 miR-1a、miR-206 来调控鸡成肌细胞增殖过程^[11]。另外, 在牛骨骼肌中发现, circLMO7 可以充当 miR-378a-3p 海绵, 通过作为竞争性内源 RNA 来促进成肌增殖^[10]。在对 circRIPK2 研究中, 我们发现过表达 circRIPK2 后, 和对照组比较, 对细胞增殖有促进作用的相关基因 (Cyclin B2、Cyclin D1、Cyclin D2 和 PCNA) 的 mRNA 表达水平显著降低, 然而对细胞增殖有抑制作用的标记基因 (p21)mRNA 水平显著上调。同时通过流式细胞术、EdU 试验检测其对细胞周期的影响, 结果也表明 circRIPK2 抑制成肌细胞的增殖。

circRNA 除了调控肌肉细胞增殖, 它对于肌肉细胞的分化也具有重要的作用。Li 等^[12]研究发现, circFGFR4 在牛肌肉中高表达, 它可以通过作为 miR-107 的分子海绵调控 WNT3A 的表达, 从而间接促进成肌细胞的分化。在小鼠中 circZfp609 可以吸附 miR-125b 解除对下游靶基因 BCLAF1 的抑制作用, 并且通过影响 Myf5 和 MYOG 的表达间接抑制成肌细胞的分化^[26]。此外, 在羊骨骼肌中, circFOXO3 对成肌细胞的分化过程也具有抑制作用^[27]。本试验表明过表达 circRIPK2 后, 肌分化标记基因 MyHC、MYOG 和 Myomaker 的 mRNA 表达水平上调, 这证明过表达 circRIPK2 对成肌细胞的分化具有显著抑制作用。

以上结果表明 circRIPK2 在骨骼肌生长发育过程中具有调控作用, 然而 circRIPK2 参与骨骼肌调控的具体机制尚未阐释, 有待后续进一步探究。

研究表明 circRIPK2 在细胞核、细胞质中均有表达, 其中在细胞质中的占比高于在细胞核中的占比, 同时通过在鸡原代成肌细胞过表达 circRIPK2 检测相关标记基因表达, 证实 circRIPK2 可能通过抑制成肌细胞的增殖, 正向调控成肌细胞分化进程, 从而参与骨骼肌调控过程。

参考文献:

- [1] LANDER E S, LINTON L M, BIRREN B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. *Nature*, 2011, 409(6822): 860-921.
- [2] WU Q, WANG Y, CAO M, et al. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 2012, 109(10): 3938-3943.
- [3] YANG D, YANG K, YANG M, et al. Circular RNA in aging and age-related diseases[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1086: 17-35.
- [4] CHEN L, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. *RNA Biology*, 2015, 12(4): 381-388.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] HUANG A, ZHENG H, WU Z, et al. Circular RNA-protein interactions: Functions, mechanisms, and identification[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3503-3517.
- [8] 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.
- [9] 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: 4643-4651.
- [10] 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.
- [11] OUYANG H, CHEN X, WANG Z, et al. Circular RNAs are abundant and dynamically expressed during embryonic muscle development in chickens[J]. *DNA Research*, 2018, 25(1): 71-86.
- [12] LI H, WEI X, YANG J, et al. circFGFR4 promotes differentiation of myoblasts via binding miR-107 to relieve its inhibition of Wnt3a[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2018, 11: 272-283.
- [13] GONG Q, LONG Z, ZHONG F, et al. Structural basis of RIP2 activation and signaling[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4993.
- [14] MAGALHAES J G, LEE J, GEDDES K, et al. Essential role of RIP2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands[J]. *European Journal of Immunology*, 2011, 41(5): 1445-1455.
- [15] MINCHENKO D O, DAVYDOV V V, BUDREIKO O A, et al. The expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSP01*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2* genes in blood of obese boys with insulin resistance[J]. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 2015, 61(1): 10-18.
- [16] ZHOU W, CAI Z, LIU J, et al. Circular RNA: Metabolism, functions and interactions with proteins[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 172.
- [17] 高永超, 王爽, 王静, 等. 环状 RNA 在神经系统疾病中的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(29): 45-47.
- [18] 宋成创, 岳炳霖, 杨兆鑫, 等. 非编码 RNA 在牛骨骼肌发育中的研究进展[J]. *中国牛业科学*, 2018, 44(6): 75-77.
- [19] 钮广林. 小鼠骨骼肌发育相关环状 RNA 的鉴定和功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [20] 曹海港. 猪骨骼肌纤维类型关键 circRNAs 的筛选及 circMYLK4 的功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [21] MARTONE J, MARIANI D, DESIDERI F, et al. Non-coding RNAs shaping muscle[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019, 7: 394.
- [22] ZANOUE N, GAILLY P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: Interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70(21): 4117-4130.
- [23] WANG D Z, VALDEZ M R, MCANALLY J, et al. The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development[J]. *Development*, 2001, 128(22): 4623-4633.
- [24] BUCKINGHAM M, RELAIX F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2007, 23(1): 645-673.
- [25] YUE B, WANG J, SONG C, et al. Biogenesis and ceRNA role of circular RNAs in skeletal muscle myogenesis[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2019, 117: 105621.
- [26] WANG Y, LI M, WANG Y, et al. A Zfp609 circular RNA regulates myoblast differentiation by sponging miR-194-5p[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1308-1313.
- [27] LI X, LI C, LIU Z, et al. Circular RNA circ-FoxO3 Inhibits myoblast cells differentiation[J]. *Cells*, 2019, 8(6): 616.

【责任编辑 庄 延】