

王彩霞, 秦鑫鑫, 李文洁, 等. 猪卵巢颗粒细胞中 circINHBA 的鉴定及与细胞凋亡的相关性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 14-20.
WANG C X, QIN X X, LI W J, et al. Identification of circINHBA and its effect on follicular granulosa cell apoptosis in pigs [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 14-20.

猪卵巢颗粒细胞中 circINHBA 的鉴定及与细胞凋亡的相关性分析

王彩霞, 秦鑫鑫, 李文洁, 程晓龙, 张瑀格, 张金璧, 潘增祥*
(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 实验室前期通过 RNA 测序发现 1 个新的环状 RNA 分子 circINHBA, 并确定其在猪健康和早期闭锁卵泡中呈现显著差异表达。本研究旨在鉴定并分析 circINHBA 的表达模式, 探索其在猪卵泡颗粒细胞 (GCs) 凋亡中的作用, 为揭示调控猪卵泡闭锁的机制、筛选调控猪卵泡闭锁和 GCs 凋亡的靶标调节物提供依据。根据 circINHBA, 设计跨反向剪切位点的发散引物, 通过 PCR、琼脂糖凝胶电泳、Sanger 测序鉴定 circINHBA 的环状结构, 并通过使用或不使用 Rnase R 消化的实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行稳定性检验; 利用核质分离技术和荧光原位杂交技术 (FISH) 分析猪卵泡 GCs 中 circINHBA 的亚细胞定位; RT-qPCR 检测 circINHBA 在猪健康和早期闭锁卵泡中的表达情况, 通过 circINHBA 干扰试验分析其对凋亡标志基因 *BCL2* 和 *BAX* 表达的影响; 利用流式细胞术分析 circINHBA 对猪卵泡 GCs 凋亡的影响。结果: 成功验证 circINHBA 为一种新的环状 RNA 分子, 具有稳定的环状结构; 定量分析发现, circINHBA 在健康卵泡中的表达量显著高于早期闭锁卵泡, 且亚细胞定位结果表明其主要分布于细胞质; 特异性 si-RNA 干扰试验及凋亡标志基因检测发现 circINHBA 具有抑制猪卵泡 GCs 凋亡的作用。综上, 本研究证实了 1 个全新 circINHBA 分子对猪卵泡 GCs 凋亡的影响, 揭示了其在猪卵泡闭锁过程中的潜在作用, 为进一步探究环状 RNA 分子在猪卵泡闭锁过程中的调控作用及分子机制奠定了基础。

关键词: 环状 RNA; circINHBA; 猪; 卵泡闭锁; 颗粒细胞凋亡

中图分类号: S813 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)10-0014-07

Identification of circINHBA and its effect on follicular granulosa cell apoptosis in pigs

WANG Caixia, QIN Xinxin, LI Wenjie, CHENG Xiaolong, ZHANG Yuge, ZHANG Jinbi, PAN Zengxiang*
(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A new circular RNA, circINHBA, was identified by RNA sequencing in a previous study of our laboratory, and it presented significant differential expression between healthy and early atretic follicles in pigs. The aim of this study was to identify and analyze the expression pattern of circINHBA and to determine its role in apoptosis of porcine follicular granulosa cells (GCs), so as to provide a basis for unravelling the regulatory mechanism of porcine follicular atresia, and for screening the targets to regulate porcine follicular atresia and apoptosis of GCs. The divergent primers across the reverse shear site were designed, and the ring structure of circINHBA was identified by PCR, agarose gel electrophoresis, and Sanger sequencing. The stability of circINHBA was tested by qPCR with or without RNase R digestion. The subcellular localisation of circINHBA in porcine follicular GCs was analyzed using nucleoplasmic separation and fluorescence in situ hybridisation (FISH). The expression of circINHBA in healthy and early atretic follicles of pigs was detected by qPCR, and its effect on the expression of apoptosis marker genes *BCL2* and *BAX* was analyzed by circINHBA interference assay. Finally, the effect of circINHBA on the apoptosis of porcine follicular GCs was analyzed by flow cytometry. The result was that we identified a new circular RNA molecule, circINHBA, and successfully validated its circular structure and confirmed its stability. The quantitative analysis revealed that the expression of circINHBA was significantly higher in healthy follicles than that in early atretic follicles, and that subcellular localization showed that it was mainly distributed in the cytoplasm. The specific si-RNA interference assay and apoptosis marker gene detection showed that circINHBA inhibited apoptosis in porcine follicular GCs. In conclusion, our study confirmed the effect of a novel circINHBA molecule on the apoptosis of porcine follicular

收稿日期: 2024-01-27; 修回日期: 2024-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31672421, 32002175)

第一作者: 王彩霞, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 潘增祥, 副教授, 主要从事分子遗传学和生物信息学研究, E-mail: owwa@njau.edu.cn.

GCs, revealed its potential role in porcine follicular atresia, and laid the foundation for further investigation of the regulatory role and molecular mechanism of circular RNA molecules in porcine follicular atresia.

Keywords: circRNA; circINHBA; pig; follicular atresia; granulosa cell apoptosis

在卵泡发育的过程中, 颗粒细胞 (GCs) 能够为卵母细胞提供营养物质和生存的环境。此外, GCs 分泌的多种因子, 包括生长因子^[1]、细胞因子^[2]、类固醇激素^[3]等在卵泡发育和闭锁过程中发挥着重要作用, 因此挖掘和解析 GCs 增殖和凋亡的转录后分子调控机制对进一步认识和控制卵泡发育和成熟至关重要。随着测序技术和生物信息学的发展, 研究人员发现非编码 RNAs (non-coding RNA, ncRNAs) 是调控卵泡发育中多种生物学过程的关键小分子调节物, 其中环状 RNA (circRNA) 作为生物体中一类特殊的内源性非编码 RNA, 其在细胞功能的调节过程作用逐渐显现。circRNA 是由共价键相连形成的环状单链 RNA, 对 RNase R 具有抗性, 因此与线性形式相比更加稳定, 半衰期更长^[4], 具有作为特殊生理过程和诊疗标志物和治疗靶点的潜力。已知的 circRNA 功能包括最为广泛认可的 miRNA 吸附功能^[5]、与 RNA 结合蛋白 (RBP) 相互作用^[6]以及编码多肽等^[7], 除此之外, circRNA 还能够调控转录^[8]、与 mRNA 相互作用影响其表达^[9]、通过与线性 mRNA 竞争性结合相同的蛋白质从而导致 mRNA 翻译发生改变^[10]。circRNA 在雌性生殖系统中的调控机制复杂多样, 在卵巢卵泡 GCs 凋亡过程起着重要作用。例如, 研究人员预测分析了鸭卵泡中差异表达的 circRNA, 发现 aplacirc_013267 促进了鸭 GCs 的细胞凋亡; 进一步分析发现, aplacirc_013267 直接结合并抑制 apla-mir-13-013267, 增加血小板反应蛋白-1 (THBS) 的表达并上调 GCs 凋亡^[11]。circLRRC8A 在衰老 GCs 中下调, 并在间充质基质细胞衍生的外泌体 (MSCs-Exos) 中作为 GCs 在体外和体内氧化损伤保护和抗衰老的关键因子; 机制研究表明, circLRRC8A 作为内源性 miR-125a-3p 的海绵下调 NFE2L1 的表达, 而 EIF4A3 沉默降低了 circLRRC8A 的表达, 并减弱了 MSCs-Exos 对氧化损伤 GCs 的治疗作用^[12]。

实验室前期研究表明, 猪卵泡内存在丰富的 circRNA, 并且 circRNA 在健康卵泡 (HF) 与早期闭锁卵泡 (AF) 之间存在显著差异^[13], 提示 circRNA 可能是在猪卵泡闭锁过程中潜在的调控靶点。在对猪健康、闭锁有腔卵泡进行 circRNA 测序时发现了 1 个新的 circRNA, 并将其命名为 circINHBA, 初步的生物信息学分析表明该 circRNA 由基因 INHBA 2 号外显子反向剪接而成。实验室对当前数据库 (*Sus scrofa* 11.1) 进行注释分析, 揭示了健康和

早期闭锁卵泡之间 450 个显著差异表达的基因, 并对差异表达基因进行功能富集和通路分析, 结果表明, INHBA 参与了猪卵泡闭锁关键通路中的 TGF- β 信号通路^[14]。INHBA 为抑制素 (Inhibin, INH) 的亚基编码基因, INH 是一种性腺分泌的糖蛋白二聚体, 在雌性生殖系统中主要由卵巢卵泡的颗粒细胞产生。INH 通过竞争性拮抗活化素受体, 影响活化素的活性^[15], 反馈调控垂体促卵泡激素 (FSH) 和促黄体素 (LH) 的分泌, 调节卵泡的生成^[16]。本研究以猪卵泡 GCs 为研究对象, 验证猪卵泡 GCs 中 circINHBA 的环状结构和在 GCs 中的分布, 探究其在猪卵泡 GCs 凋亡和卵泡闭锁过程中的变化和调控作用, 为进一步阐明猪卵泡 GCs 凋亡的调控机理, 筛选调控 GCs 凋亡和卵泡闭锁的调节物提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养基 (货号: C11330500BT), 胎牛血清 FBS (货号: 10100147C) 和 Opti-MEM (货号: 31985070) 均来自美国 Gibco 公司; TRIzol 试剂 (货号: R401-01), HiScript II Q Select RT SuperMix 试剂盒 (货号: R312), SYBR Green Master Mix 试剂盒 (货号: Q111) 和 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒 (货号: A211-01/02) 均来自南京诺唯赞生物科技有限公司; RNase R (货号: R0300) 来自广州吉赛生物科技股份有限公司; Lipofectamine™ 2000 (货号: 11668019) 来自美国 Invitrogen 公司; NP-40 (货号: N8032) 来自北京索莱宝科技有限公司; 4% 多聚甲醛 (货号 E672002) 和荧光原位杂交所需探针均来自于武汉塞维尔生物科技有限公司

1.2 卵泡的收集与分类

从江苏淮安苏氏屠宰场获得 200 日龄左右初情期母猪, 采集猪卵巢后装于含 1% 庆大霉素的 37 °C 温热生理盐水的保温杯中, 尽快送到实验室。将卵巢置于含有 PBS 的培养皿中, 使用已清洁消毒的眼科镊和手术刀分离直径为 3~5 mm 的有腔卵泡。根据卵泡的外观、卵泡中颗粒细胞密度、孕酮 (P4) / 雌二醇 (E2) 比值筛选出健康、早期闭锁卵泡^[17]。

1.3 细胞培养与转染

猪卵巢用 37 °C 无菌生理盐水与 75% 酒精反复清洗 3 遍, 用 20 号针头的 10 mL 注射器抽取卵巢卵泡中的卵泡液。将 GCs 培养于含有 15% 胎牛血清、1%

青霉素-链霉素（青霉素、链霉素各 100 U/mL）的 DMEM/F12 培养基中，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。经过 36 h 左右，当细胞达到 50%~80% 汇合度时，根据生产商的说明，使用 Lipofectamine™ 2000 和 Opti-MEM 进行转染。circRNA 的 siRNA 和阴性对照（NC）寡核苷酸序列（表 1）由上海吉玛基因公司合成。

表 1 寡核苷酸序列

名称	序列 (5'→3')
circINHBA-siRNA	正义链: CCAGAGCAGAUGUUGACCUTT
	反义链: AGGUCAACAUCUGCUCUGGTT
NC	正义链: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义链: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

收集转染后状态稳定的 GCs，使用 TRIzol 试剂进行总 RNA 提取，并通过 NanoDrop 和琼脂糖电泳进行 RNA 浓度和完整性鉴定。RNA 样品随后用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒合成 cDNA，-20 °C 保存供后续 RT-qPCR 用。使用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix Kit 进行 RT-qPCR (ABI StepOne 系统, USA)。基因 circINHBA、INHBA 以及内参基因 U6 和 GAPDH 引物设计见表 2。

表 2 引物信息

基因	引物序列 (5'→3')
circINHBA	F: TCCGAAATCAGCACTTCGCCT
	R: GACGGCAAGGTCAACATCTG
INHBA	F: AAGTCTGTGCGACTGCTCC
	R: GAAGTGGTGGATGCCCC
GAPDH	F: GGACTCATGACCACGGTCCAT
	R: TCAGATCCACAACCGACACGT
U6	F: GCTTCGGCAGCACATATACT
	R: TTCACGAATTTGCGTGTCCAT

1.5 RNase R 消化处理

将收集的颗粒细胞样品提取的 RNA 平分为两份，1 份直接进行反转录，另 1 份在反转录前用 RNase R 处理。20 μL 消化系统，包括：5 μg RNA，2 μL 10×反应缓冲液，15 U RNase R 和 RNase-Free 水。反应在 37 °C 下进行 15 min，然后 70 °C 下进行 10 min。然后分别用 2×Vazyme Lamp Master Mix 试剂盒 (Vazyme, #R312) 进行 PCR 反应，并通过琼脂糖凝胶电泳和 Sanger 测序 (上海生物工程有限公司) 对 PCR 产物进行验证。

1.6 细胞凋亡检测

猪 GCs 凋亡的检测采用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒，在对 GCs 处理后继续培养 24 h，根据说明书步骤，对 GCs 的凋亡进行检测。凋亡细胞的百分比用流式细胞仪 (Becton Dickinson FACS Calibur, Franklin Lakes, NJ, USA) 测定。使用 FlowJo v7.6 软件分析数据。

1.7 荧光原位杂交

将猪 GCs 培养于 T25 瓶中，48 h 后转移到盖玻片上继续培养，待细胞状态稳定后使用 4% 多聚甲醛 (含 DEPC) 对细胞进行 20 min 固定处理，然后用 PBS (pH=7.4) 振荡洗涤 3 次，最后加入蛋白酶 K (20 μg/mL) 消化 5 min。合成针对 circINHBA 的特异性探针 (Sevicebio, 武汉) 并与上述固定的猪 GCs 进行杂交，同时使用 4, 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 对细胞核进行染色，所有试验操作严格按照说明书进行。最后使用尼康直立荧光显微镜 (Nikon DS-U3, Japan) 采集荧光图像。探针序列为 circ-INHBA: 5'-AACATCTGCTCTGGCTCTTCCTGAAA-3'。

1.8 细胞核质分离

采集猪卵泡 GCs 培养至猪颗粒细胞状态稳定且密度达到 90% 时，使用 PBS 清洗细胞，加入预热的胰蛋白酶进行消化，离心收集细胞后加入 500 μL 预冷 PBS，置于冰上孵育 10 min，随后加入 5 μL 的 NP-40 置于 4 °C 中充分混匀 3~5 h。12 000 g 离心 5 min，分别收集上清液 (细胞质部分) 和沉淀物 (细胞核部分) 并提取 RNA，用于细胞核和细胞质 circINHBA 的表达水平检测。

1.9 数据统计和分析

使用 GraphPad Prism 6 进行统计分析。采用双尾 *t* 检验来评估 2 组之间的差异显著性。所有数据均以至少 3 次独立试验的“平均值±标准误”表示。

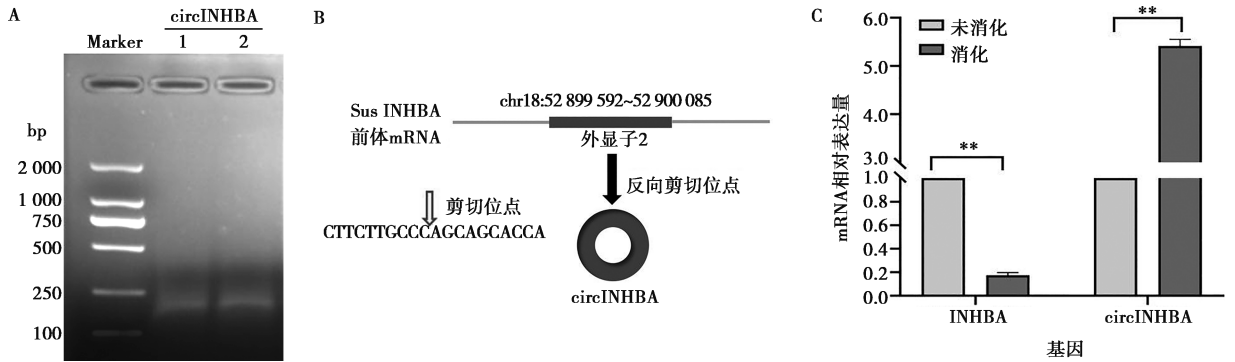
2 结果

2.1 circINHBA 的鉴别与验证

通过实验室前期的 circRNA 测序和生物信息学分析，筛选在健康卵泡和早期闭锁卵泡中差异表达的 circRNA，选择差异倍数较大且在卵泡早期闭锁过程中下调的 circINHBA 作为研究对象。circINHBA 是由抑制素亚基编码基因 INHBA 外显子 2 反向剪切所形成的 circRNA。为了阐明该 circRNA 的存在以及在猪卵泡闭锁过程中的作用，首先根据 circRNA 设计了跨剪接位点的特异性的发散引物，进行 PCR 和琼脂糖凝胶电泳，结果显示 circINHBA 的 PCR 产物的条带单一 (图 1A)。随后对 PCR 产物进一步测序，结果显示存在剪接位点 CCCAGC (图 1B)。通过 RNase R

消化来验证 circINHBA 的稳定性, 结果表明消化后线性 INHBA 表达水平显著降低, 而 circINHBA 表达量升高 (图 1C), 证实了 circINHBA 对 RNase R 具有抗

性且结构稳定。以上结果表明 circINHBA 以稳定的环状结构存在。



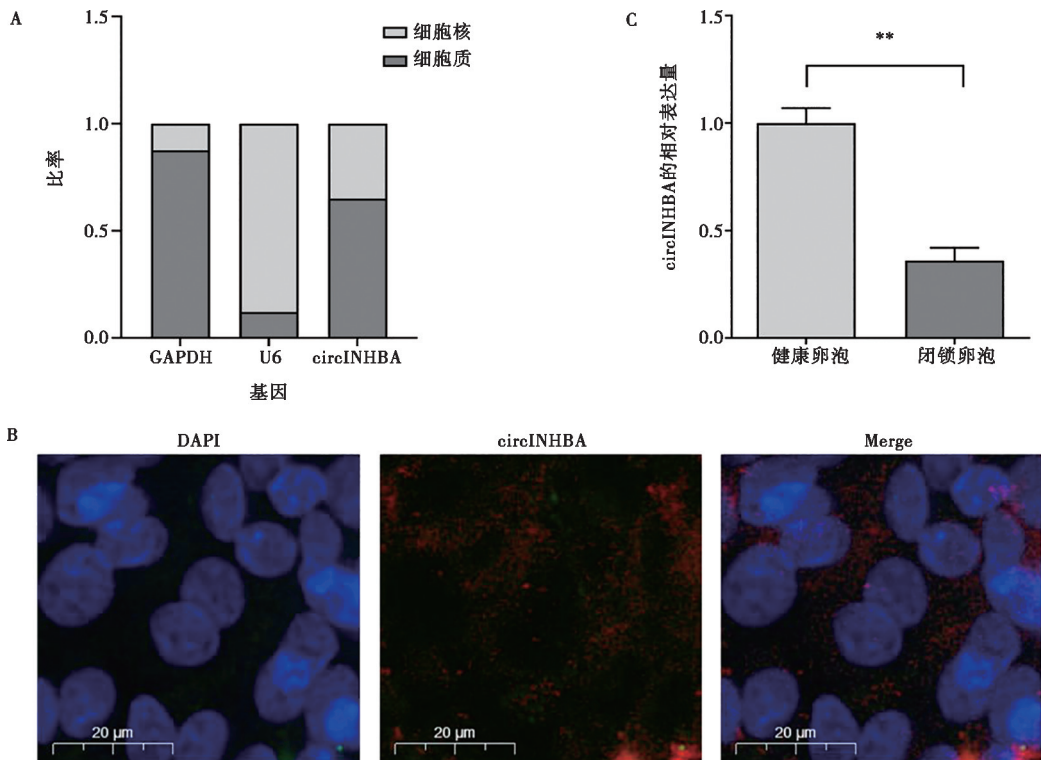
A. circINHBA 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳; B. circINHBA 结构示意图, 它由 INHBA 基因第 2 外显子反向剪接生成; C. INHBA 和 circINHBA 在 RNase R 消化和未消化情况下 mRNA 相对表达量, GAPDH 用作内参, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, 下同。

图 1 circINHBA 的鉴定与稳定性检测

2.2 circINHBA 在猪卵巢卵泡颗粒细胞中的定位与表达

为了探究 circINHBA 在猪卵泡 GCs 中的定位和表达情况, 首先通过细胞核质分离试验发现 circINHBA 大多分布在细胞质中 (图 2A)。同时, 根据 circINHBA 的剪接位点设计特异性探针进行荧光原位杂交试验, 结果同样显示 circINHBA 大多定位于细胞

质中 (图 2B)。RT-qPCR 试验发现, circINHBA 在猪卵巢卵泡中均有表达, 并且 circINHBA 在健康卵泡中的表达水平极显著高于早期闭锁卵泡 ($P < 0.01$, 图 2C)。以上结果表明 circINHBA 在猪卵巢卵泡 GCs 中主要分布于细胞质, 同时在健康和早期闭锁卵泡中的表达具有显著差异, 提示其可能在 GCs 凋亡和猪卵泡闭锁的过程中发挥一定的作用。



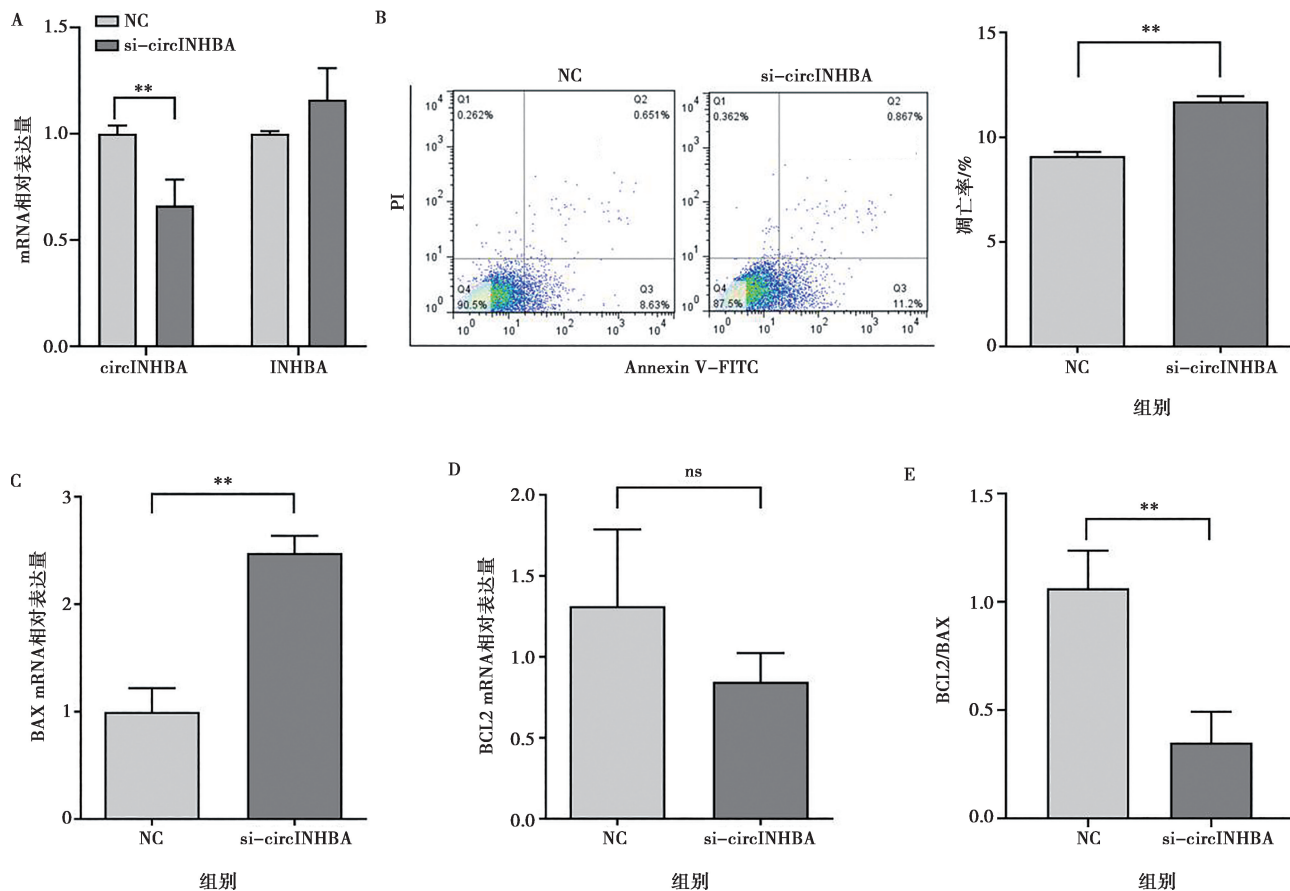
A. 通过核质分离试验检测 circINHBA 的定位; B. 通过 FISH 检测 GCs 中 circINHBA 的定位情况 (circINHBA 被红色荧光标记, 细胞核被 DAPI 蓝色染色); C. 通过 RT-qPCR 检测健康卵泡和闭锁卵泡中 circINHBA 的差异表达水平。

图 2 circINHBA 在猪卵巢卵泡颗粒细胞中的定位与表达量

2.3 circINHBA 抑制猪颗粒细胞凋亡

为了探究 circINHBA 在猪卵泡 GCs 凋亡过程中的作用, 根据 circINHBA 剪接位点设计特异性的小干扰 RNA si-circINHBA。si-circINHBA 转染 GCs 24 h 后, 定量结果显示 circINHBA 的水平显著敲低, 而线性 INHBA 的表达量不受影响 (图 3A)。si-circINHBA 转染 GCs 72 h 后, 流式细胞术 (FACE) 结果表明:

干扰 circINHBA 导致卵泡颗粒细胞的凋亡率显著升高 (图 3B), 提示 circINHBA 具有抑制 GCs 凋亡的作用。同时, 凋亡标志基因 BCL2/BAX 定量比值下调结果也表明 circINHBA 具有抑制猪卵泡 GCs 凋亡的作用 (图 3C~E)。以上结果表明, circINHBA 能够抑制猪 GCs 的凋亡。



A. RT-qPCR 检测 GCs 中转染 si-circINHBA 后 circINHBA 和线性 INHBA mRNA 的相对表达水平; B. 流式细胞术检测 si-circINHBA 转染后 GCs 的凋亡率; C~E. si-circINHBA 转染 GCs 24 h 后 BAX、BCL-2 mRNA 相对表达水平和 BCL-2/BAX 比值。

图 3 circINHBA 抑制猪卵泡颗粒细胞凋亡

3 讨论

随着 circRNA 研究技术的快速增长, circRNA 在生物过程中的作用日益被重视, 其中在生殖医学和畜牧重要经济性状方面发挥着重要的作用。多囊卵巢综合征 (PCOS) 患者体内异常表达的 circRNA 为 PCOS 的未来治疗靶点提供了新的线索^[18]; circRNA 的发现影响卵巢激素的合成与衰老过程^[19]; circRNA 在卵母细胞的发育和胚胎发育过程中也发挥重要作用^[20]。此外, 最近的一些研究表明, circRNA 可以用作畜牧生产中许多具有重要经济意义性状的生物标志物, 例如产奶量^[21]、肉质^[22]、毛囊发育^[23]等。

猪卵泡 GCs 凋亡是一个复杂的过程, 对卵泡的发育和功能起着至关重要的作用。近年来, 大量研究揭示了非编码 RNA 参与调控这些生理现象^[24]。circRNA 在调控猪卵泡 GCs 凋亡和猪卵泡闭锁等关键过程中的潜在作用引起了人们极大兴趣。该领域的研究为了解这些生理现象背后复杂的分子机制提供了宝贵的见解。根据实验室前期的 circRNA 测序和生物信息学分析, 本研究发现了一个新的 circRNA 分子 circINHBA, 并成功验证其稳定的环状结构, 其在猪卵巢卵泡 GCs 中表达, 在健康卵泡中的表达水平要显著高于早期闭锁卵泡中的表达水平, 并且显著抑制猪卵巢 GCs 的凋亡。这表明 circINHBA 可能在猪 GCs 和卵泡闭锁过

程中发挥调控作用。越来越多的证据表明, circRNA可能通过作为竞争性内源性 RNA (ceRNA), 高效结合 1 个 miRNA^[25] 或吸附多个 miRNAs^[26]。miRNA 是一类重要的内源性调控因子, 发挥 RNAi 功能的 miRNAs 主要位于细胞质中, 通过靶向靶基因的 3' UTR^[27]、5'UTR^[28] 或编码区 (CDS)^[29], 调节其稳定性或翻译。miRNA 被证明参与机体大多数基因表达转录后的调控过程, 包括细胞增殖、迁移、分化和凋亡^[30-31]。本研究发现 circINHBA 主要在猪卵巢卵泡 GCs 细胞质中表达, 表明 circINHBA 可能通过作为 miRNAs 分子海绵发挥生物学功能。

此外, 关于 circINHBA 其他方面的影响也值得进一步研究。circRNA 由前体 mRNA 反向剪接, 从下游的 5' 剪接位点连接到上游的 3' 剪接位点, 从而产生环状 RNA 分子。circRNA 因其不具有 5' 端帽子和 3' 端尾巴不易被核酸酶外切酶降解而比线性 RNA 具有更稳定的生物学功能^[32]。研究表明, circRNA 的生成与经典前体 mRNA 存在剪接竞争的关系。研究中发现的 circINHBA, 是由抑制素亚基编码基因 INHBA 外显子 2 反向剪接所形成。抑制素是转化生长因子 β (TGF- β) 家族的异源二聚体糖蛋白, 它是由 2 个亚基 α 亚基 (20 kDa) 和 β 亚基 (13 kDa) 以二硫键相连而成。其中 β 亚基有 2 种主要的形式 βA 和 βB , 从而抑制素存在 2 种主要的形式, 抑制素 A ($\alpha\beta A$) 和抑制素 B ($\alpha\beta B$)^[33]。抑制素的产生受下丘脑-垂体-性腺轴调控, 可以与活化素、卵泡抑素相互作用, 通过影响下丘脑促性腺激素释放激素 (GnRH) 的分泌以及其受体的表达, 调控卵泡刺激素 (FSH) 和促黄体素 (LH) 的分泌, 对卵泡的发育和成熟有促进作用^[34]。INH 在雌性生殖系统的发育中起着重要作用, 包括卵泡发育^[35]、排卵率^[36]、类固醇激素的合成^[22,37] 等多个方面, 进而影响动物的繁殖能力。本研究发现, circINHBA 抑制猪卵巢 GCs 凋亡, 然而在猪卵巢 GCs 凋亡过程中, circINHBA 的产生是否能够影响 INHBA 的表达及其在卵泡发育和成熟过程中的功能还需要进一步研究。

4 结论

本研究结果表明, 新发现的 circINHBA 在猪健康卵泡中表达量较高, 在猪卵泡闭锁过程中发生下调, 能够抑制猪 GCs 的凋亡。circINHBA 作用的机制可能是通过吸附 miRNA 参与调节猪卵巢 GCs 的凋亡和卵泡闭锁的过程。通过对 circRNA 复杂功能的探索, 揭示了它们参与调控猪 GCs 凋亡和卵泡闭锁的过程, 这些发现拓宽了对影响家畜生殖健康和生育能力的分子决定因素的认识。

参考文献:

- [1] ZHOU J, KUMAR T R, MATZUK M M, et al. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11 (13): 1924-1933.
- [2] MAEDA A, INOUE N, MATSUDA-MINEHATA F, et al. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries [J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53 (3): 481-490.
- [3] ROSENFELD C S, WAGNER J S, ROBERTS R M, et al. Intraovarian actions of oestrogen [J]. *Reproduction*, 2001, 122 (2): 215-226.
- [4] EBBESEN K K, HANSEN T B, KJEMS J. Insights into circular RNA biology [J]. *RNA Biol*, 2017, 14 (8): 1035-1045.
- [5] THOMSON D W, DINGER M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17 (5): 272-283.
- [6] DU W W, YANG W, LIU E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44 (6): 2846-2858.
- [7] XIAO M S, AI Y, WILUSZ J E. Biogenesis and functions of circular RNAs come into focus [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30 (3): 226-240.
- [8] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22 (3): 256-264.
- [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]. *Mol Cell*, 2017, 66 (1): 22-37.
- [10] ABDELMOHSEN K, PANDA A C, MUNK R, et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1 [J]. *RNA Biol*, 2017, 14 (3): 361-369.
- [11] WU Y, XIAO H, PI J, et al. The circular RNA aplcirc_13267 up-regulates duck granulosa cell apoptosis by the apla-miR-1-13/THBS1 signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (7/8): 5750-5763.
- [12] XING J, ZHANG M, ZHAO S, et al. EIF4A3-induced exosomal circLRR8A alleviates granulosa cells senescence via the miR-125a-3p/NFE2L1 axis [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19 (6): 1994-2012.
- [13] GUO T, ZHANG J, YAO W, et al. CircINHBA resists granulosa cell apoptosis by upregulating CTGF as a ceRNA of miR-10a-5p in pig ovarian follicles [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862 (10): 194420.
- [14] ZHANG J, LIU Y, YAO W, et al. Initiation of follicular atresia: gene networks during early atresia in pig ovaries [J]. *Reproduction*, 2018, 156 (1): 23-33.
- [15] EVANS E T, HORST B, AREND R C, et al. Evolving roles of activins and inhibins in ovarian cancer pathophysiology [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 324 (2): C428-C437.
- [16] 张博琦, 李纯锦, 陈璐, 等. 抑制素-活化素-卵泡抑素系统在哺乳动物生殖系统中的作用机制研究进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (8): 131-136.

- [17] 张金璧, 林飞, 潘增祥, 等. 猪不同程度闭锁卵泡判定方法的比较研究 [J]. 南京农业大学学报, 2013, 36 (1): 115-119.
- [18] ZHANG C, LIU J, LAI M, et al. Circular RNA expression profiling of granulosa cells in women of reproductive age with polycystic ovary syndrome [J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 300 (2): 431-440.
- [19] ZHOU X Y, LI Y, ZHANG J, et al. Expression profiles of circular RNA in granulosa cells from women with biochemical premature ovarian insufficiency [J]. Epigenomics, 2020, 12 (4): 319-332.
- [20] FU Y, JIANG H, LIU J B, et al. Genome-wide analysis of circular RNAs in bovine cumulus cells treated with BMP15 and GDF9 [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 7944.
- [21] HAO Z, ZHOU H, HICKFORD J, et al. Identification and characterization of circular RNA in lactating mammary glands from two breeds of sheep with different milk production profiles using RNA-Seq [J]. Genomics, 2020, 112 (3): 2186-2193.
- [22] YAN X M, ZHANG Z, MENG Y, et al. Genome-wide identification and analysis of circular RNAs differentially expressed in the longissimus dorsi between Kazakh cattle and Xinjiang brown cattle [J]. PeerJ, 2020, 8: e8646.
- [23] ZHENG Y, HUI T, YUE C, et al. Comprehensive analysis of circRNAs from cashmere goat skin by next generation RNA sequencing (RNA-seq) [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 516.
- [24] MENG L, ZHAO K, WANG C C, et al. Characterization of long non-coding RNA profiles in porcine granulosa cells of healthy and atretic antral follicles: implications for a potential role in apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (5): 2677.
- [25] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. Nature, 2013, 495 (7441): 384-388.
- [26] YAN X C, CAO J, LIANG L, et al. miR-342-5p is a notch downstream molecule and regulates multiple angiogenic pathways including notch, vascular endothelial growth factor and transforming growth factor beta signaling [J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5 (2): e003042.
- [27] BARTEL D P. Metazoan microRNAs [J]. Cell, 2018, 173 (1): 20-51.
- [28] ZHANG J, ZHOU W, LIU Y, et al. Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5' UTR of RUNX3 [J]. Oncol Lett, 2018, 15 (5): 7215-7220.
- [29] FORMAN J J, LEGESSE-MILLER A, COLLIER H A. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105 (39): 14879-14884.
- [30] ZHOU X, YANG P C. MicroRNA: a small molecule with a big biological impact [J]. Microna, 2012, 1 (1): 1.
- [31] MUNK R, PANDA A C, GRAMMATIKAKIS I, et al. Senescence-associated microRNAs [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2017, 334: 177-205.
- [32] 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.
- [33] LING N, YING S Y, UENO N, et al. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82 (21): 7217-7221.
- [34] MAKANJI Y, ZHU J, MISHRA R, et al. Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review [J]. Endocr Rev, 2014, 35 (5): 747-794.
- [35] 张阿婷, 刘芸. 抑制素 B 参与卵泡优势化的机制 [J]. 生殖医学杂志, 2020, 29 (8): 1105-1109.
- [36] CUI Z, LIU L, ZHAO X, et al. Analysis of expression and single nucleotide polymorphisms of INHA Gene associated with reproductive traits in chickens [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 8572837.
- [37] BAO Y, YAO X, LI X, et al. INHBA transfection regulates proliferation, apoptosis and hormone synthesis in sheep granulosa cells [J]. Theriogenology, 2021, 175: 111-122.