

鸡胰岛素降解酶基因环状转录本克隆及其表达规律

冷奇颖, 郑嘉辉, 徐海冬, Patricia Adu-Asiamah, 张颖, 杜炳旺, 张丽

广东海洋大学农学院, 湛江 524088

摘要: 本课题组前期通过高通量测序发现, 鸡胰岛素降解酶(insulin degrading enzyme, IDE)基因可能存在一个环状转录本。为确定 IDE 基因环状转录本(*circIDE*)的真实存在, 探究其表达规律, 本研究以吉林芦花鸡为研究对象, 通过 PCR 扩增和测序验证了 *circIDE* 的真实存在, 通过 RNase R 处理和反转录证实了 *circIDE* 的环形结构, 通过 qRT-PCR 分析 *circIDE* 和 IDE mRNA 的时空表达规律, 并对比分析了 *circIDE* 和线性 IDE mRNA 在正常体型芦花鸡和 GHR 突变的矮小体型芦花鸡中的表达差异。结果表明: 鸡 *circIDE* 全长为 1332 nt, 由 IDE 基因外显子 2~11 环化形成。RNase R 耐受性分析表明, 鸡 *circIDE* 具备环形分子的一般特征, 不易被 RNase R 降解。与 oligo-d(T)₁₈ 引物相比, 随机引物对 *circIDE* 具有较高的反转录效率, 进一步说明 *circIDE* 是一个不含 poly(A)的环状结构分子。组织表达谱结果表明, *circIDE* 在 1 周龄和 12 周龄正常体型芦花鸡肝脏和心脏高表达, 在胸肌和腿肌中低表达; *circIDE* 在肝脏组织的时序表达谱结果表明, *circIDE* 在鸡 6 周龄之前为低表达, 在 8 周龄以后表现为高表达; 正常与矮小体型芦花鸡品系间 *circIDE* 表达量对比分析表明, 正常体型芦花鸡 *circIDE* 表达水平高于矮小体型芦花鸡, 其中在肝脏组织中差异显著($P < 0.05$)。本研究证实了鸡 IDE 基因存在一个环状转录本 *circIDE*, 并初步揭示了 *circIDE* 的表达规律, *circIDE* 在正常体型和矮小体型芦花鸡肝脏组织中表达量存在差异, 本研究结果为深入开展鸡 *circIDE* 的生物学功能及其在鸡生长发育过程中的作用机制奠定了基础。

关键词: 鸡; 胰岛素降解酶; 环状 RNA; 可变剪接

Cloning and expression analysis of chicken circular transcript of insulin degrading enzyme gene

Qiyang Leng, Jiahui Zheng, Haidong Xu, Patricia Adu-Asiamah, Ying Zhang, Bingwang Du, Li Zhang

College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Insulin-degrading enzyme (IDE) is a highly conserved metalloproteinase that functions in the catabolism of bioactive peptides. In our previous study, we identified a putative circular transcript in that chicken insulin-degrading

收稿日期: 2019-05-30; 修回日期: 2019-11-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31672412, 31972550), 广东省自然科学基金项目(编号: 2017A030307002)和农业部鸡遗传育种与繁殖重点实验室开放项目(编号: 201501)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31672412, 31972550), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2017A030307002) and the Opening Project of Key Laboratory of Chicken Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Agriculture of China (No. 201501)]

作者简介: 冷奇颖, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: lengqiyang1995@163.com

通讯作者: 张丽, 博士, 教授, 研究方向: 家禽遗传育种与繁殖。E-mail: zhangli761101@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-157

网络出版时间: 2019/12/7 17:08:00

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20191206.0936.004.html>

enzyme (*IDE*) gene through analyzing a high throughput sequencing result. Here we set to confirm the circular transcript of *IDE* (*circIDE*) and explore its expression regularity in normal barred Plymouth chicken. The *circIDE* was confirmed by PCR amplification and sequencing. The circular structure of *circIDE* was determined by RNase R processing and reverse transcription experiments. Then we analyzed the spatiotemporal expression pattern of *circIDE* and *IDE* mRNA and compared the differential expression of *circIDE* and *IDE* mRNA in the normal barred Plymouth chicken and the dwarf ones. The results showed that the full length of chicken *circIDE* was 1332 nt, divided from exon 2-11 of the *IDE* gene. RNase R tolerance analysis showed that chicken *circIDE* had the general characteristics of circular molecule, and was highly resistant to RNase R. The random primers had higher transcription efficiency than the oligo-d(T)₁₈ primers, confirming that *circIDE* is a circular structured molecule without poly(A). *circIDE* was highly expressed in the liver and heart tissues but less in the muscle tissues of leg and breast in normal chickens at the age of 1 and 12 weeks. The expression profile of *circIDE* in liver tissue showed that *circIDE* level was lower in 1 to 6 weeks and then became higher after 8 weeks of age. The expression of *circIDE* in liver tissue was significantly higher in normal chicken than that in dwarf barred Plymouth chicken ($P < 0.05$). This study confirmed a *circIDE* structure in chicken *IDE* gene and uncovered its expression regularity. We demonstrated that the expression level of *circIDE* in the liver tissue was higher in normal barred Plymouth chicken compared to dwarf species. This study paves the way for further understanding the biological function of chicken *circIDE*, including its roles in regulating chicken growth and development.

Keywords: chicken; insulin degrading enzyme; circRNA; alternative splicing

胰岛素降解酶(insulin degrading enzyme, IDE)是一种在进化上保守的中性疏金属内肽酶,在多种细胞内的胰岛素降解过程中发挥重要作用^[1-3]。IDE对胰岛素的分解作用是胰岛素在体内分解代谢的主要途径^[4-6]。此外,研究显示IDE还具有降解 β -淀粉样蛋白、胰岛淀粉样多肽和胰高血糖素等多肽的能力^[7]。IDE通过对多肽的降解作用来维持血糖平衡。由于IDE具有降解 β -淀粉样蛋白的作用,因此也被认为是一种对抗阿兹海默病的新分子^[8,9]。

基因转录的前体 mRNA(pre-mRNA)既可以通过剪接作用形成线性 mRNA,也可以通过反向剪接作用引起 pre-mRNA 的 3'端和 5'端发生共价连接从而形成环状 RNA (circular RNA, circRNA)^[10,11]。因此, circRNA 与线性 RNA 相比, circRNA 具有不含 5'帽子及 3'尾巴结构特征^[12],这一特征使 circRNA 具有较高的稳定性^[13]。此外, circRNA 还具有时空表达特异性^[14]、序列保守性^[15]、序列来源多为外显子^[16]等特点。circRNA 的生成受多种因素调控,最新研究已经证实,内含子反向互补序列、RNA 结合蛋白、先天性免疫、细胞的全能性等一系列因素可以调控 circRNA 的生成^[17]。同时, circRNA 以多种方式

调控机体的生理活动^[18-21],其中对母源基因的调控作用是 circRNA 发挥作用的重要方式^[17]。由于基因的环状转录本和线性转录本均来源于同一个母源基因, circRNA 和 mRNA 可能存在竞争调控关系^[20]。已有证据表明, circRNA 也参与胰岛素代谢调控^[22]。

鸡 IDE 基因定位于 6 号染色体,全长 55 kb,包含 25 个外显子。本课题组前期对鸡肝脏细胞进行高通量测序(GenBank 登录号: PRJNA554754),发现 IDE 基因可能存在环状转录本(*circIDE*)。因此,本研究通过基因克隆技术验证了 *circIDE* 的真实存在,分析了其环形结构特征及组织和时序表达规律,并对比分析了其在正常体型芦花鸡和 GHR 突变的矮小体型芦花鸡中的表达差异。本研究结果为今后深入分析 *circIDE* 在胰岛素代谢和动物机体发育过程中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1 日龄正常体型芦花鸡和 GHR 基因突变而矮化

的矮小体型吉林芦花鸡均由吉林省农业科学院提供。HiPure Universal RNA Mini Kit(R4130)和 DNase On Column Kit(R4911)购自广州美基生物科技有限公司; RNase R(R0301)购自广州吉赛生物股份有限公司; PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) (RR047A, TaKaRa)和 pMD18-T 载体(6011)购自广州瑞真生物技术有限公司; TransStart Top Green qRT-PCR SuperMix 试剂盒(AQ101-03)、TransStart KD Plus DNA Polymerase(AP301-02)和 *E.coli* DH5 α 感受态大肠杆菌(CD201-01)购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 动物饲养及组织采集

1 日龄正常体型芦花鸡和矮小体型芦花鸡佩戴翅号后, 混笼饲养于广东海洋大学农学院, 采用自由采食和饮水的方式进行饲养(日粮标准见表 1), 并进行常规免疫。在 1、2、3、4、5、6、8 和 12 周龄的最后 1 d 随机抽取 6 只芦花鸡母鸡(正常/矮小鸡各 3 只)进行样品采集, 分别采集胸肌、腿肌、肝脏、十二指肠和心脏等组织, 液氮速冻后置于-80℃ 冰箱保存备用。

表 1 试验鸡只日粮营养标准
Table 1 The diet nutrition for experimental chicken

年龄(周)	能量(MJ/kg)	粗蛋白(%)	钙(%)	有效磷(%)	赖氨酸(%)	蛋氨酸(%)
0~6	11.66	19.90	1.00	0.37	0.90	0.44
7~12	11.98	18.00	0.90	0.33	0.90	0.34
12~	12.11	16.98	0.86	0.33	0.90	0.34

表 2 引物序列信息
Table 2 Sequences of the primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	复性温度(℃)	扩增产物长度(bp)	位置	用途
circIDE-D	F: AGATAAAGAACGACCACG	50	265	Exon10	环状验证
	R: CAATTCAGTCCACGATA			Exon2	
circIDE-full	F: TCTTCAGAAGGAGACAA	46	1326	Exon2	全长克隆
	R: CGAATGTTTTCTGGTC			Exon11	
circIDE-DL	F: GAAGAAGTATTGGCTGCTG	54	198	Exon11	circIDE 定量
	R: TTCCAGTCCACGATATTCTC			Exon2	
IDE-DL	F: TGGCGTATCTCAAGACCCTG	57	175	Exon22	IDE mRNA 定量
	R: GCTGGTGCCAAGTTCACATC			Exon24	
GAPDH	F: AGGACCAGGTTGTCTCCTGT	57	153	Exon7, 8	内参基因定量
	R: CCATCAAGTCCACAACACGG			Exon9	

1.3 鸡 IDE 基因环形和线性转录本引物设计

针对 *circIDE* 的环形接头位置, 在接头位置两端设计 3 对引物, 分别为(1)分散引物 circiDE-D, 用于 *circIDE* 环状分子的验证; (2)全长扩增引物 circIDE-full, 用于克隆 *circIDE* 分子全长序列; (3)定量引物 circIDE-DL 用于该分子的定量分析。此外, 在 *IDE* 基因非 *circIDE* 序列来源处设计线性 *IDE* mRNA (参考序列: XM_004942157.3)的定量引物(IDE-DL)。

内参基因为 *GAPDH*。引物均通过 primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计, 引物信息见表 2, 引物在 *IDE* 基因上的位置及扩增示意图见图 1。

1.4 芦花鸡肝脏等组织总 RNA 提取及环状性质分析

按照 HiPure Universal RNA Mini Kit 试剂盒说明书分别提取 1、2、3、4、5、6、8、10 和 12 周龄正常体型芦花鸡肝脏、胸肌、腿肌、心脏和十二指肠等组织总 RNA, 并使用 1%的变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 使用 BioTek Epoch 全波长

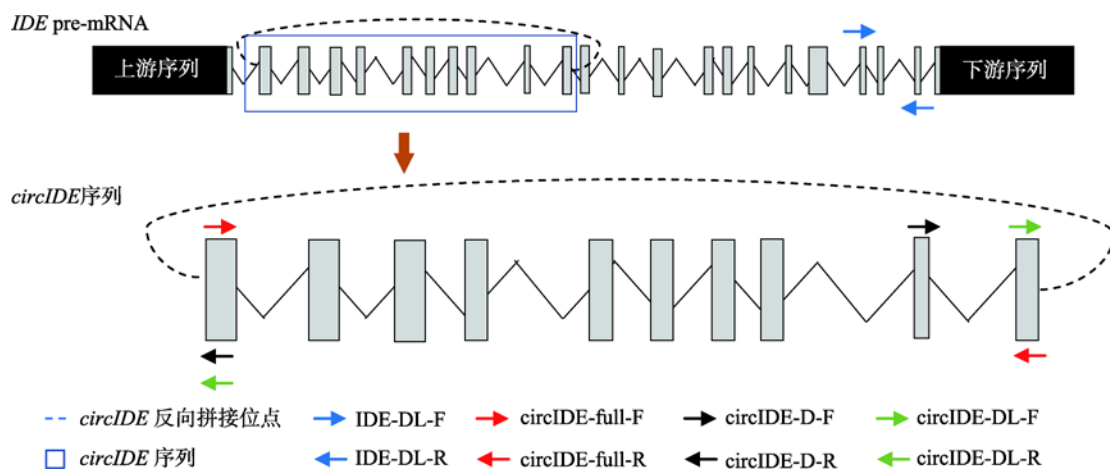


图 1 鸡 *circIDE* 来源及引物位置示意图

Fig. 1 Diagram of chicken *circIDE* gene and the locations of the primers used in this study

酶标仪检测 RNA 浓度和纯度, 依据 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒说明书, 使用随机引物(N9)将总 RNA 反转录成 cDNA。

将提取的 1 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织总 RNA 分为两份(每份 5 ng), 一份使用超纯水稀释至 20 μ L 保存备用; 另一份进行 RNase R 处理, 反应体系包括 RNA 5 ng、10 \times Reaction Buffer 4 μ L、RNase R 20 U, 最后使用去离子水将反应体系补至 20 μ L。反应程序为: 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后 85 $^{\circ}$ C 灭活 RNase R 5 s。经 RNase R 处理后的 RNA 用于 *circIDE* 环状性质特征验证。依据 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒说明书, 分别使用随机引物(N9)和 oligo-d(T)₁₈ 将未经 RNase R 处理的 1 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织总 RNA 反转录成 cDNA。随机引物反转录合成的 cDNA 用于 qRT-PCR 定量分析 *circIDE* 的表达水平; 随机引物和 oligo-d(T)₁₈ 引物反转录得到的 cDNA 用于 qRT-PCR 进行不同反转录引物的效率分析, 进一步分析 *circIDE* 的环状结构特征。

1.5 芦花鸡 *circIDE* 环状特征验证及其克隆

经 RNase R 处理的 1 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织 RNA, 通过随机引物反转录合成 cDNA, 分别使用 *circIDE* 环状验证引物(circIDE-D)和全长引物进行 PCR 扩增, 使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测并对目标产物进行回收纯化, 然后将获得的目标产物连接载体 pMD18-T 后转入感受态大肠杆菌中, 对菌

株进行阳性鉴定后由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 分析 *circIDE* 的序列信息和成环特征。

1.6 芦花鸡 *circIDE* 的表达特征分析

以 1.4 中获得的 cDNA 为模板, 采用 qRT-PCR 分析 *circIDE* 的时空表达规律及环状特征。反应体系为 20 μ L: 2 \times TransStart[®] Top Green qPCR supermix 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 去离子水 8 μ L, cDNA 1 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 59 $^{\circ}$ C 退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。每个试验样本进行 3 次重复。

1.7 数据统计与分析

使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 qRT-PCR 结果, 用 IBM SPSS 数据统计软件 19 进行显著性分析, 结果以平均数(mean) \pm 标准误(SEM)表示。

2 结果与分析

2.1 鸡 *circIDE* 连接成环验证及其全长序列分析

依据本课题组前期高通量测序结果, 本研究针对 *circIDE* 连接成环的接头位置设计特异性分散引物, 以经过 RNase R 处理后的 1 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。结果表明, 在 265 bp 位置生产了符合 *circIDE* 接头位置片段长度的预期目标的片段(图 2A), 初步

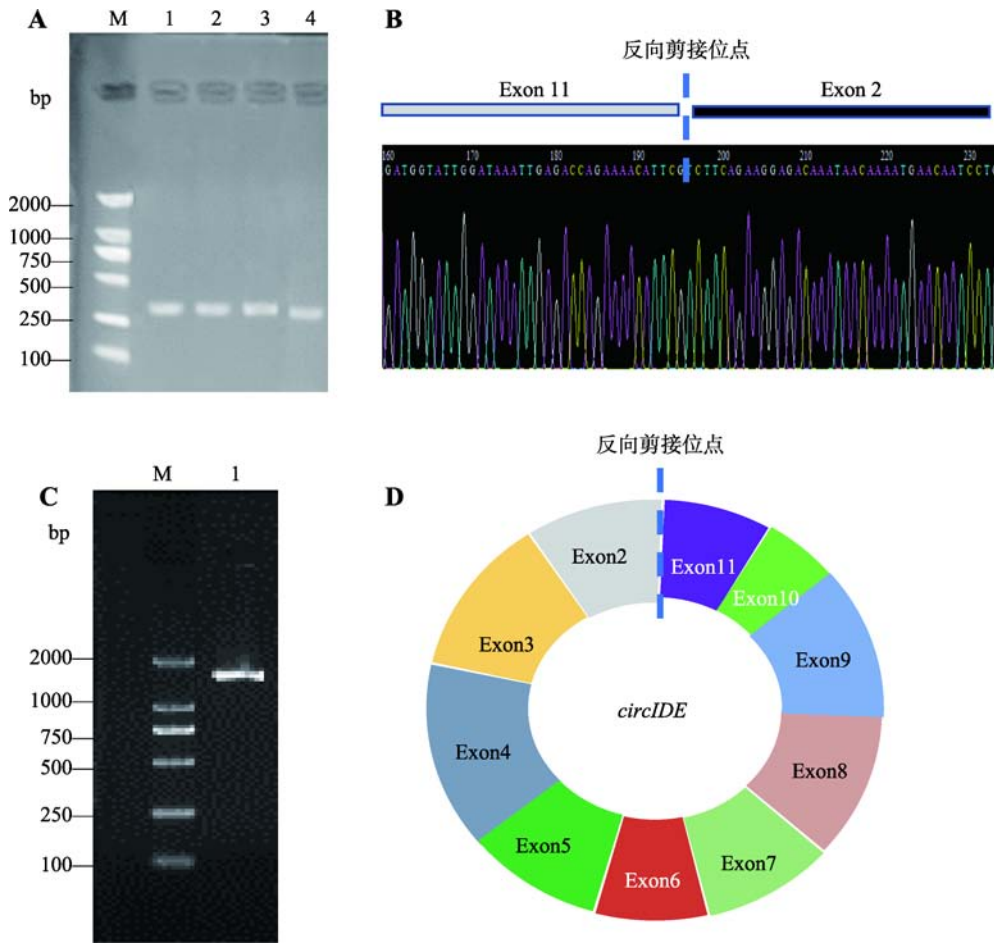


图 2 鸡 *circIDE* 全长克隆及结构验证

Fig. 2 Cloning of the full length of chicken *circIDE* gene and validation of the *circIDE* structure

A: *circIDE* 接头位置扩增结果。M: DL2000 maker; 泳道 1~4: 以 1 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织 cDNA 为模板, *circIDE*-D 引物扩增结果。B: *circIDE*-D 引物扩增产物测序结果。C: *circIDE* 全长扩增结果。M: DL2000 maker; 泳道 1: 以 1 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织 cDNA 为模板, *circIDE*-full 引物扩增产物。D: 鸡 *circIDE* 结构示意图。

表明 *IDE* 基因存在反向剪接产物。测序结果显示, *circIDE* 连接成环的接头片段序列来源于 *IDE* 基因的外显子 2 和 11 (图 2B), 说明 *circIDE* 的接头位置由 *IDE* 外显子 2 和外显子 11 共价连接形成。进一步使用 *circIDE* 全长扩增引物经 PCR 扩增和测序比对后发现, 正常芦花鸡 *circIDE* 序列包含 *IDE* 基因外显子 2~11 (图 2C), 全长为 1332 nt, 由 *IDE* 基因外显子 2 的 5'端和外显子 11 的 3'端反向剪接成环 (GenBank 登录号: MN183275)。

2.2 鸡 *circIDE* 分子 RNase R 耐受性及不同反转录引物的反转录效率分析

环形 RNA 分子具有 RNase R 耐受性, 不易被

RNase R 降解; 而线性 RNA 分子不具备 RNase R 耐受性。为了确认鸡 *circIDE* 具备环形分子的一般特征, 本研究分析了鸡 *circIDE* 的 RNase R 耐受性。以 1 周龄正常体型芦花鸡组织总 RNA 为材料, 经 RNase R 处理后, 使用随机引物(N9)反转录为 cDNA, qRT-PCR 结果显示, 使用 RNase R 处理后, *circIDE* 的表达丰度无明显下降 ($P>0.05$), 反而呈现增加的趋势, 但是线性分子 *IDE* mRNA 经 RNase R 处理后下降极显著 ($P<0.01$) (图 3A), 说明 *circIDE* 具有较强的 RNase R 耐受性。此外, 以 1 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织总 RNA 为模板, 分别使用 oligo-d(T)₁₈ 和随机引物(N9)反转录合成 cDNA, qRT-PCR 比较 *circIDE* 的反转录效率。结果表明, 用 oligo-d(T)₁₈

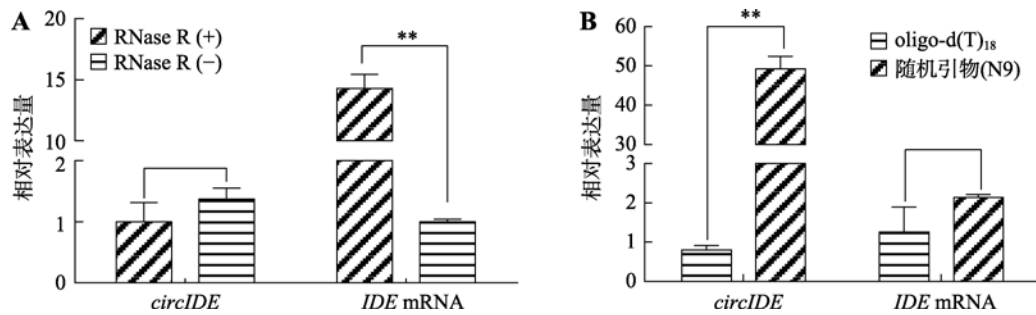


图 3 鸡 *circIDE* 和 *IDE* mRNA 对 RNase R 耐受性及反转录特征分析

Fig. 3 RNase R tolerance and reverse transcription efficiency analysis of chicken *circIDE* and *IDE* mRNA

A: RNase R 对 *circIDE* 和 *IDE* mRNA 表达丰度的影响; B: 不同反转录引物对 *circIDE* 和 *IDE* mRNA 表达丰度的影响。RNase R(-): 未经 RNase R 处理的总 RNA; RNase R(+): 经 RNase R 处理后的总 RNA; **表示 $P < 0.01$, 差异极显著。

引物反转录后 *circIDE* 的表达丰度仅为随机引物的 2%, 差异极显著($P < 0.01$)。而线性 *IDE* mRNA 的表达丰度不受反转录引物的影响(图 3B, $P > 0.05$)。因此, 与 oligo-d(T)₁₈ 引物的反转录效果相比, 随机引物对 *circIDE* 具有较好的反转录效果, 同时也说明 *circIDE* 是一个不含 poly(A)结构的环状分子。

2.3 鸡 *circIDE* 和线性 *IDE* mRNA 的时空表达规律

分别提取 1~12 周龄正常体型芦花鸡肝脏、胸肌、腿肌、心脏和十二指肠等组织的 RNA, 经反转录合

成 cDNA, 利用 qRT-PCR 对 *circIDE* 和 *IDE* mRNA 的表达量进行分析。结果表明, *circIDE* 在 1 周龄正常体型芦花鸡的肝脏和心脏组织中高表达而在腿肌和胸肌组织中低表达(图 4A), *circIDE* 在 12 周龄正常体型芦花鸡的十二指肠、心脏和肝脏中高表达, 而在胸肌和腿肌中低表达(图 4B)。通过分析 1~12 周龄正常体型芦花鸡肝脏中 *circIDE* 的时序表达量发现, *circIDE* 在鸡 6 周龄之前为低表达, 在 8 周龄以后表现为高表达(图 4C)。而鸡线性 *IDE* mRNA 在 1~12 周龄期间随鸡的生长发育表达量呈逐步上升趋势(图 4D)。

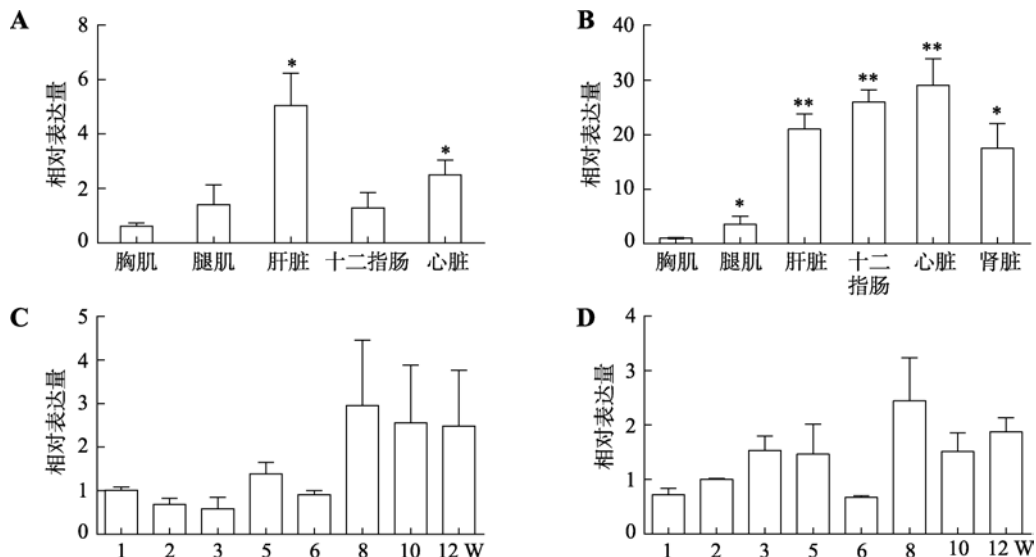


图 4 鸡 *circIDE* 和 *IDE* mRNA 的时空表达规律

Fig. 4 Spatiotemporal expression of chicken *circIDE* and *IDE* mRNA

A: 1 周龄正常体型芦花鸡不同组织中 *circIDE* 的表达规律; B: 12 周龄正常体型芦花鸡不同组织中 *circIDE* 的表达规律; C: 1~12 周龄正常体型芦花鸡肝脏组织中 *circIDE* 的表达规律; D: 1~12 周龄正常体型芦花鸡肝脏中 *IDE* mRNA 的表达规律。*表示 $P < 0.05$, 差异显著; **表示 $P < 0.01$, 差异极显著。

2.4 *circIDE* 和线性 *IDE* mRNA 在正常体型和矮小体型芦花鸡中的表达分析

以 1 周龄正常体型芦花鸡中 *circIDE* 高表达的肝脏和十二指肠组织的 cDNA 为模板, qRT-qPCR 对比分析 1 周龄正常体型芦花鸡和 1 周龄矮小体型芦花鸡 *circIDE* 和线性 *IDE* mRNA 的表达量。结果表明, *circIDE* 和线性 *IDE* mRNA 在正常和矮小体型芦花鸡品系间存在表达差异。*circIDE* 和线性 *IDE* mRNA 在正常体型芦花鸡中的表达水平均高于矮小体型芦花鸡, 其中 *circIDE* 在正常体型芦花鸡肝脏组织中表达量显著高于矮小体型芦花鸡 ($P < 0.05$) (图 5A), 而线性 *IDE* mRNA 在正常体型芦花鸡十二指肠组织中的表达量显著高于矮小体型芦花鸡 ($P < 0.05$) (图 5B)。

3 讨论

本研究克隆了鸡 *IDE* 基因的环状转录本 *circIDE*, 发现 *circIDE* 由该基因外显子 2 和外显子 11 反向剪接形成。查阅 cirBase 数据库 (<http://circrna.org/>) 发现人和小鼠的 *IDE* 基因也存在环状 RNA^[23,24]。人 *IDE* 基因产生的 28 个环状 RNA 中, 有 11 个环状 RNA 是由外显子 2 与其他外显子反向剪接形成, 其中 hsa_circ_0094470 与鸡 *circIDE* 一样, 也是由外显子 2 和 11 环化形成。与人和鸡 *IDE* 基因序列相比, 小鼠 *IDE* 基因缺少一个外显子。在 cirBase 数据库中注释的小鼠 *IDE* 基因有 6 个环状 RNA, 其中 4 个环状 RNA 是由外显子 1 与其他外显子反向剪接形成。因

此, *IDE* 基因成环的特征在鸡、人和小鼠之间具有物种保守性, 外显子 2 可能是一个保守性的反向剪接位点, 表明 *circIDE* 可能在人和动物发育过程中具有重要作用。

环状 RNA 具有不含 poly(A) 序列的闭环结构, 因此 oligo-d(T)₁₈ 引物反转录获得的 *circIDE* 丰度低于随机引物, 提示在环形 RNA 反转录时宜选用随机引物进行反转录, 同时该结果也间接表明 *circIDE* 是一个头尾相连的环状结构。RNase R 是一种靶向线性 RNA 分子并对其具有切割作用的核酸酶, 其对环形分子不敏感^[25]。本研究表明, 鸡 *circIDE* 对 RNase R 表现出较强的耐受性, 经 RNase R 处理后总 RNA, *circIDE* 表达量变化不显著, 进一步说明鸡 *circIDE* 具备环形分子的一般特征。

研究表明, 基因的环形和线性转录本的表达存在相关性^[24], 本研究通过 qRT-PCR 分析表明, 鸡 *circIDE* 的时序表达规律与其线性 *IDE* mRNA 相似。此外, 鸡 *circIDE* 的表达具有时序规律性, *circIDE* 在 1 周龄正常芦花鸡中的肝脏组织表现高表达, 而在 12 周龄正常体型芦花鸡中的十二指肠组织中表现为高表达。*IDE* 具有分解胰岛素样生长因子的作用^[2], 这可能与鸡消化系统的发育有关。鸡 *circIDE* 在多种组织均有表达, 但存在组织差异性。*circIDE* 在肝脏组织中高表达而在肌肉组织中低表达。

环状 RNA 可以通过多种模式对其母源基因或其靶基因发挥调控作用: (1) 通过与 U1 snRNP 结合, 正向调控母源的转录^[26]; (2) 直接与线性 mRNA 竞争 pre-mRNA, 调控线性 mRNA 的表达^[17]; (3) 与母源

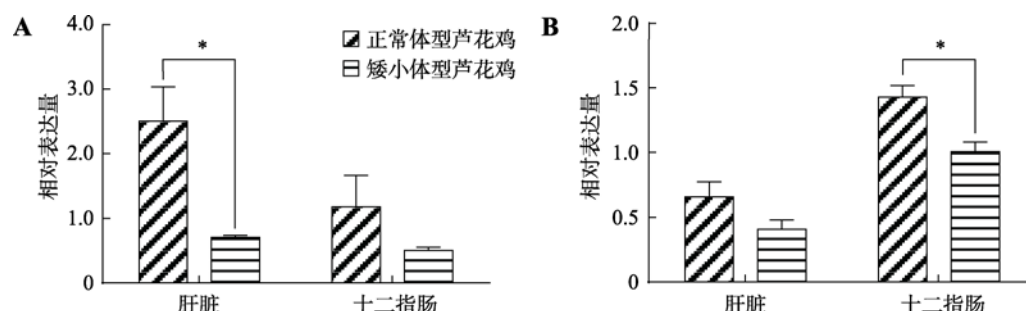


图 5 *circIDE*、*IDE* mRNA 在正常和矮小体型芦花鸡中的表达对比

Fig. 5 Comparison the expression level of *circIDE* and *IDE* mRNA between the normal barred plymouth chickens and the dwarf ones

A: 1 周龄正常体型和矮小体型芦花鸡 *circIDE* 的表达差异; B: 1 周龄正常体型和矮小体型芦花鸡 *IDE* mRNA 的表达差异。*表示 $P < 0.05$, 差异显著。

基因结合,形成 DNA-RNA 结合,抑制母源基因的转录^[19]; (4)环状 RNA 可以吸附 miRNA,发挥分子海绵功能,参与基因调控^[11]。*circIDE* 来源于 *IDE* 基因的外显子 2~11,属于外显子来源的环状 RNA,由于 *circIDE* 属于 EciRNA 环状 RNA,其序列来源不含有内含子序列,因此,*circIDE* 无法与 U1 snRNP 结合促进母源基因表达的功能^[26]。*circIDE* 基因序列包含了 *IDE* 基因的 10 个外显子,含有大量的 *IDE* 基因结合位点,推测 *circIDE* 可能通过与 *IDE* 基因结合形成 DNA-RNA 复合物,调控 *IDE* 基因的转录发挥生物学功能。此外,已有两个 circRNA 分子被证实可以通过发挥海绵机制调控胰岛素分泌,*Cdr1as* 可以发挥 miR-7 的分子海绵,调节胰岛素的代谢^[22,27,28],*circHIPK3* 也可以通过海绵机制吸附 miR-124-3p 和 miR-338-3p 调控胰岛素的代谢^[29]。在 TargetScan 数据库 (<http://www.targetscan.org>) 对鸡 *circIDE* 进行 miRNA 靶向预测,发现 *circIDE* 存在小分子 miRNA Let-7b 的结合位点,推测 *circIDE* 有可能充当 Let-7b 的分子海绵参与靶基因的调控。关于鸡 *circIDE* 的作用机制尚需进一步研究证实,以期将来挖掘鸡分子育种新靶点,精确调控鸡生长发育奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Suire CN, Nainar S, Fazio M, Kreutzer AG, Paymozd-Yazdi T, Topper CL, Thompson CR, Leissring MA. Peptidic inhibitors of insulin-degrading enzyme with potential for dermatological applications discovered via phage display. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193101. [DOI]
- [2] Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Insulin-degrading enzyme. *Clin Invest Med*, 1996, 19(3): 149–160. [DOI]
- [3] Qiu WQ, Folstein MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- β peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(2): 190–198. [DOI]
- [4] Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Grasso G, Gioia M, Coletta A, Polticelli F, Di Pierro D, Milardi D, Van Ender P, Marini S, Coletta M. Multiple functions of insulin-degrading enzyme: a metabolic crosslight?. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2017, 52(5): 554–582. [DOI]
- [5] Duckworth WC, Kitabchi AE. Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. *Diabetes*, 1974, 23(6): 536–543. [DOI]
- [6] Manolopoulou M, Guo Q, Malito E, Schilling AB, Tang WJ. Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*, 2009, 284(21): 14177–14188. [DOI]
- [7] Pivovarov O, Höhn A, Grune T, Pfeiffer AF, Rudovich N. Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? *Ann Med*, 2016, 48(8): 614–624. [DOI]
- [8] Kurochkin IV, Guarnera E, Berezovsky IN. Insulin-degrading enzyme in the fight against Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(1): 49–58. [DOI]
- [9] Xu H, Guo S, Li W, Yu P. The circular RNA Cdr1as, via miR-7 and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 12453. [DOI]
- [10] Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA*, 2014, 20(12): 1829–1842. [DOI]
- [11] Luo J, Wang XL, Sun ZC, Wu D, Zhang W, Wang ZJ. Progress in circular RNAs of plants. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(6): 467–477.
骆甲, 王型力, 孙志超, 吴迪, 张玮, 王正加. 植物环状 RNA 研究进展. *遗传*, 2018, 40(6): 467–477. [DOI]
- [12] Zhou FY, Yang Q, Zhu XC, Lan XY, Chen H. Molecular feature, action mechanism and biology function of circular RNA. *J Agric Biotech*, 2017, 25(3): 485–501.
周凤燕, 杨青, 朱熙春, 蓝贤勇, 陈宏. 环状 RNA 的分子特征、作用机制及生物学功能. *农业生物技术学报*, 2017, 25(03): 485–501. [DOI]
- [13] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu JZ, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, 19(2): 141–157. [DOI]
- [14] Zhang C, Wu H, Wang Y, Zhu S, Liu J, Fang X, Chen H. Circular RNA of cattle casein genes are highly expressed in bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, 2016, 99(6): 4750–4760. [DOI]
- [15] Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733. [DOI]
- [16] Zhang XO, Dong R, Zhang Y, Zhang JL, Luo Z, Zhang J, Chen LL, Yang L. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res*, 2016, 26(9): 1277–1287. [DOI]
- [17] Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 428–442. [DOI]
- [18] Wang H, Xiao Y, Wu L, Ma D. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-

- 000911/miR-449a pathway in breast carcinogenesis. *Int J Oncol*, 2018, 52(3): 743–754. [DOI]
- [19] Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A, Conos SA, Capovilla G, Cildir G, Jourdain A, Tergaonkar V, Schmid M, Zubieta C, Conn SJ. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nat Plants*, 2017, 3(5): 17053. [DOI]
- [20] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55–66. [DOI]
- [21] Zhang ML, Zhao K, Xu XP, Yang YB, Yan S, Wei P, Liu H, Xu JB, Xiao FZ, Zhou HK, Yang XS, Huang NN, Liu JL, He KJ, Xie KP, Zhang G, Huang SY, Zhang N. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4475. [DOI]
- [22] Xu H, Guo S, Li W, Yu P. The circular RNA Cdr1as, via miR-7 and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 12453. [DOI]
- [23] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003777. [DOI]
- [24] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, Jens M, Pino N, Giusti S, Hanan M, Behm M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, Herzog M, Schreyer L, Papavasileiou P, Ivanov A, Öhman M, Refojo D, Kadener S, Rajewsky N. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol Cell*, 2015, 58(5): 870–885. [DOI]
- [25] Vincent HA, Deutscher MP. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem*, 2006, 281(40): 29769–29775. [DOI]
- [26] Li ZY, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang XL, Zhong GL, Yu B, Hu WC, Dai LM, Zhu PF, Chang ZX, Wu QF, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu HJ, Shan G. Corrigendum: Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(2): 194. [DOI]
- [27] Zhang XF, Song H, Liu J, Zhang WJ, Yan XH, Li H, Wang Ning. Identification and analysis of ZFPM2 as a target gene of miR-17-92 cluster in chicken. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(4): 333–345.
- 张潇飞, 宋鹤, 刘静, 张文建, 闫晓红, 李辉, 王宁. 鸡 miR-17-92 基因簇靶基因 ZFPM2 的鉴定及功能分析. *遗传*, 2017, 39(4): 333–345. [DOI]
- [28] Chen YH, Guo JL, Xu CS. The roles of CDR1as in diseases. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2016, 32(9): 984–989.
- 陈延慧, 郭建林, 徐存拴. CDR1as 与疾病的相关性. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(9): 984–989. [DOI]
- [29] Stoll L, Sobel J, Rodriguez-Trejo A, Guay C, Lee K, Venø MT, Kjems J, Laybutt DR, Regazzi R. Circular RNAs as novel regulators of β -cell functions in normal and disease conditions. *Mol Metab*, 2018, 9: 69–83. [DOI]

(责任编辑: 李辉)