

小鼠生长激素受体基因环状转录本的克隆及其表达规律

张为露, 冷奇颖, 郑嘉辉, Ali Hassan Nawaz, 焦振海, 王府建, 张丽

广东海洋大学滨海农业学院, 湛江 524088

摘要: 根据文献报道并通过 circBase 数据库查找, 发现小鼠生长激素受体基因(growth hormone receptor, *GHR*)存在 8 个环状转录本。为确定 *GHR* 基因环状转录本(circGHR)的真实存在, 探究其表达规律, 本研究以昆明小鼠(*Mus musculus*)为研究对象, 通过 PCR 扩增和测序检测 circGHR 的真实存在, 并筛选出一个 circGHR 作为目标分子, 通过 RNase R 处理和反转录证实了 circGHR 的环形结构, 利用 qRT-PCR 分析 circGHR 和 *GHR* mRNA 的时空表达规律。结果表明: 小鼠 circGHR 全长为 820 nt, 由 *GHR* 基因外显子 2~8 环化形成。RNase R 耐受性分析表明, 小鼠 circGHR 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 circGHR 具有较高的反转录效率, 进一步说明 circGHR 是一个不含 poly(A)的环状结构分子。组织表达谱结果表明, circGHR 在 1 周龄和 7 周龄小鼠肝脏和肾脏高表达, 在胸肌和腿肌中低表达; circGHR 在肝脏和胸肌组织的时序表达谱结果表明 circGHR 表达无显著差异; circGHR 在腿肌组织的时序表达谱结果表明, circGHR 在小鼠 5 周龄之前为低表达, 在 7 周龄以后表现为高表达。本研究结果证实了小鼠 *GHR* 基因存在一个环状转录本 circGHR, 并初步揭示了 circGHR 的表达规律, 为后期深入开展小鼠 circGHR 的生物学功能及其在小鼠生长发育过程中的作用机制奠定基础。

关键词: 小鼠; 生长激素受体; 环状 RNA

Cloning and expression of circular transcript of mouse growth hormone receptor gene

Weilu Zhang, Qiying Leng, Jiahui Zheng, Ali Hassan Nawaz, Zhenhai Jiao, Fujian Wang, Li Zhang

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

Abstract: Based on reports in the literature and search results on the circBase database, 8 circular transcripts of the mouse growth hormone receptor (*GHR*) gene were identified. In order to confirm the existence of the circular transcripts of the *GHR* gene (circGHRs) and to explore their expression patterns, the Kunming mouse (*Mus musculus*) was used as a

收稿日期: 2021-04-27; 修回日期: 2021-07-21

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: 2020A1515011576)和粤桂联合基金(编号: 2020B1515420008)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31672412, 31972550), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2020A1515011576) and Guangdong-Guangxi Joint Fund (No. 2020B1515420008)]

作者简介: 张为露, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 178052526@qq.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.21-156

网络出版时间: 2021/8/20 15:49:02

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210819.1407.004.html>

research animal. This study detected the existence of circGHRs by RT-PCR amplification and sequencing, one of which was selected as circGHR for detailed analysis. The circular structure of circGHR was confirmed by RNase R treatment and reverse transcription. The spatiotemporal expression of circGHR and GHR mRNA was analyzed by qRT-PCR. The results showed that the full length of mouse circGHR was 820 nt, which was formed by circularization of exons 2-8 of the transcript of the *GHR* gene. RNase R tolerance analysis shows that mouse circGHR has the general characteristics of circular molecules and is not easily degraded by RNase R. Compared with oligo-d(T)18 primers, random primers have higher reverse transcription efficiency for circGHR, which further shows that circGHR is a poly(A)-free cyclic structure molecule. Tissue expression profile results show that circGHR is highly expressed in the liver and kidney of 1 week-old and 7-week old Kunming mice, but is low in pectoral muscles and leg muscles. The time-series expression profile of circGHR does not show any significant difference between the liver and pectoral muscle tissue. The circGHR expression in the leg muscle was low before 5 weeks of age but increased after 7 weeks of age. This study confirmed the existence of a circular transcript circGHR of the mouse *GHR* gene, and initially revealed the expression pattern of circGHR. The results of the study laid a foundation for in-depth developmental studies on the biological functions of the mouse circGHR and its mechanism of action regarding the growth and development of mice.

Keywords: mouse; growth hormone receptor; circular RNA

生长激素(growth hormone, *GH*)是一种由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的单一肽链蛋白质类激素。生长激素作为一种特殊的生物活性蛋白分子起着促进动物机体生长、肌肉发育、调节代谢等重要生理功能^[1]。而 *GH* 发挥生理作用的第一步是与靶细胞膜表面的 *GH* 受体(growth hormone receptor, *GHR*)结合, 由 *GHR* 介导将信号传入细胞内从而产生一系列生理效应^[2]。*GHR* 是一种单链跨膜糖蛋白, 属于细胞分裂素/血细胞生成素受体超家族(cytokine/hematopoietic receptor superfamily)^[3,4]。

环状 RNA (circRNA)属于非编码 RNA (ncRNA)的范畴, 是一个既不带 5'帽结构也不带 3'聚腺苷酸尾巴的共价闭环^[5]。1976 年, Sanger 等^[6]最先通过分离植物类病毒发现了环状 RNA, 从此环状 RNA 被人所认知。circRNA 具有一定的组织、时序特异性; 由于其是封闭环状结构, 因此具有高度保守性^[7]。与线性 RNA 相比, circRNA 更不易被 RNase R 降解, 更加稳定^[8,9], 且多数 circRNA 来源于外显子, 也有包含外显子-内含子的 circRNA (EI ciRNA)^[10-12]。环状 RNA 发挥生物学功能的作用机制包括作为海绵吸附结合 miRNA 分子和蛋白质^[13], 调控母源基因或靶基因转录^[14]和翻译蛋白质等。越来越多的证据表明环状 RNA 可以行使翻译的功能, Legnini 等^[15]首次在人类细胞中发现编码成肌细胞增殖相关蛋白

的环状 RNA—circ-ZNF609, 该分子存在包含启动子和终止子的开放阅读框, 并在体内和体外均能表达蛋白; 另有研究表明在结肠癌中 circPPP1R12A 通过编码蛋白 circPPP1R12A-aa 激活 Hippo-YAP 信号通路进而促进结肠癌的发生和转移^[16]。

由 Ensembl 数据库可知, 小鼠 *GHR* 基因位于 15 号染色体负链上, 由 11 个外显子和 10 个内含子组成, 该基因有 10 个线性转录本。本课题组前期通过查阅文献以及查找 circBase 数据库, 发现 circGHR 可以通过向后剪切反式形成 8 个环状转录本 (circGHR1~circGHR8)。经过前期筛选后, 本文选择 circGHR3 为研究对象, 通过基因克隆技术验证了 circGHR3 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, 并对该基因可能编码蛋白质进行生物信息学分析。本研究结果为今后深入分析 circGHR 在肌肉生长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 实验动物和样品采集

在 1、3、5 和 7 周龄的昆明小鼠(为本实验饲养)中各抽取 3 只雄鼠, 分别采集心脏、肝脏、胸肌、

腿肌等组织,液氮速冻后置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 目标分子筛选与确定

根据 Dong 等^[17]报道,在小鼠中共发现 7 个 circGHR;同时在 circBase 数据库中对小鼠 circGHR 进行检索,发现 1 个 circGHR 序列,共 8 个序列。生物信息学分析这 8 个 circGHR 序列和结构组成,分别针对 8 个 circGHR 的接口(junction)位置设计特异性引物,用于筛选出目标分子进行后续实验,引物均通过 primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计,引物信息见表 1。

1.3 小鼠 circGHR 和线性 mRNA 转录本定量和全长克隆引物设计

针对 circGHR 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 circGHR-D,用于 circGHR 环状分子的验证;(2)全长扩增引物 circGHR-full 用于克隆 circGHR 分子全长序列;(3)定量引物 circGHR-DL 用于该分子的定量分析。其中分散引物与定量引物序列相同。此外,在 GHR 基因非 circGHR 序列来源处设计线性 GHR mRNA

(参考序列: MGI:95708)的定量引物(GHR-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 GHR 基因上的位置及扩增示意图见图 1。

1.4 小鼠肝脏等组织总 RNA 提取及 circGHR 环状性质分析

按照 HiPure Universal RNA Mini Kit 试剂盒(广州美基生物科技有限公司)说明书分别提取 1、3、5 和 7 周龄小鼠肝脏、胸肌、腿肌、心脏等组织总 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 全波长酶标仪检测 RNA 浓度和纯度,依据 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(广州瑞真生物技术有限公司)说明书,使用随机引物(N9)将总 RNA 反转录成 cDNA。将提取的 7 周龄小鼠肝脏组织总 RNA 分装为两份(每份 5 ng),一份使用超纯水稀释至 20 μL 保存备用;另一份进行 RNase R (广州吉赛生物股份有限公司)处理,反应体系包括 RNA 5 ng、10× Reaction Buffer 2 μL、RNase R 20 U,最后使用去离

表 1 小鼠 8 个 circGHR 的特异性验证引物

Table 1 Eight specific verification primers for mouse circGHR

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
circGHR1	F: TAGTTTGACCGGGATTCGTGG	59	171	Exon7	circGHR1 环状验证
	R: GGAACGACACTTGGTGAATCG			Exon4	
circGHR2	F: GGTGAGATCCAGACAACGGA	59	134	Exon8	circGHR2 环状验证
	R: GACACTTGGTGAATCGAGGC			Exon4	
circGHR3	F: GGGATTCGTGGAGACATCCAA	59	343	Exon7	circGHR3 环状验证
	R: GACTGCCAGTGCCAAGGTTA			Exon2	
circGHR4	F: GACCGGGATTCGTGGAGACATC	61	422	Exon7	circGHR4 环状验证
	R: ACGACACTTGGTGAATCGAGG			Exon4	
circGHR5	F: CCATCCCATATGGTGGATCTGT	59	142	Intron1	circGHR5 环状验证
	R: ATGGGAAAGGAGGTGATGGC				
circGHR6	F: GCTGGACCAAAAATGTTTCACTGTT	60	176	Exon6	circGHR6 环状验证
	R: CGTTGGCTTTCCCTTTTAGCA			Exon4,5	
circGHR7	F: CAGCGAAGTCCTCCGTGTAATA	59	100	Exon8	circGHR7 环状验证
	R: CAGGGCATTCCTTTCCATTCCTG			Exon6	
circGHR8	F: CAGTCACCAGCAGCACATTTT	58	70	Exon2	circGHR8 环状验证
	R: AGGTTAAGAAGACCTGACAAAGAT				

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
circGHR-D	F: GGGATTCGTGGAGACATCCAA	59	343	Exon7	环状验证
	R: GACTGCCAGTGCCAAGGTTA			Exon2	
circGHR-full	F: GTCTCAGGTATGGATCTTTGTCAGG	57	820	Exon2	全长克隆
	R: CTTCTTCACATGCTTCCAATATGTTC			Exon8	
circGHR-DL	F: GGGATTCGTGGAGACATCCAA	59	343	Exon7	circGHR 定量
	R: GACTGCCAGTGCCAAGGTTA			Exon2	
GHR-DL	F: GGGTGAGATCCAGACAACGG	57	285	Exon8	GHR mRNA 定量
	R: TCACCTCCTCCAACCTTCCCT			Exon11	
GAPDH	F: AGGTTGTCTCCTGCGACTTCA	57	184	Exon6	内参基因定量
	R: TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC			Exon7	

子水将反应体系补至 20 μL。反应程序为: 37℃孵育 30 min 后 85℃灭活 RNase R 5 s, 经 RNase R 处理后的 RNA 用于 circGHR 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 7 周龄小鼠肝脏组织总 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 circGHR 的表达水平, 定量使用 TransStart Top Green qRT-PCR SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司); 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 circGHR 的环状结构特征。

1.5 小鼠 circGHR 全长克隆

经 RNase R 处理的 7 周龄小鼠肝脏组织 RNA, 通过随机引物反转录合成 cDNA, 分别使用 circGHR 环状验证引物(circGHR-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 (广州瑞真生物技术有限公司)后转入 *E.coli* DH5α 感受态大肠杆菌(北京全式金生物技术有限公司)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 circGHR 的序列信息和成环特征。

1.6 小鼠 circGHR 的表达特征分析

以上述 1.4 中得到的 cDNA 为模板, 采用

qRT-PCR 分析 circGHR 的时空表达规律及环状特征。反应体系为 20 μL: 2×TransStart® Top Green qPCR supermix 10 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, 去离子水 8 μL, cDNA 1 μL。反应程序: 94℃预变性 30 s; 94℃变性 5 s, 59℃退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。每个样本进行 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 IBMSPSS 数据统计软件 19 进行显著性分析, 结果以平均数(mean)±标准误(SEM)表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠 8 个环分子筛选和目的分子确定

通过分析 Dong 等^[17]结果和 circBase 中注释的小鼠 circGHR 序列信息, 本研究绘制出小鼠 8 个 circGHR 的结构示意图(图 2)。针对每个环分子设计特异引物, 用同一只 7 周龄雄鼠肝脏组织 RNA 作为模板, 反转录得到 cDNA 后用表 1 中 8 对引物进行 PCR 扩增, PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。对测序结果进行分析后, 发现引物 2、3、4、6 的测序结果序列一致, 均对 circGHR3 的接口位置进行验证, 因此后续分析选择 circGHR3 作为实验目标分子, 并命名为 circGHR。其余 7 个分子均未测序验证成功。

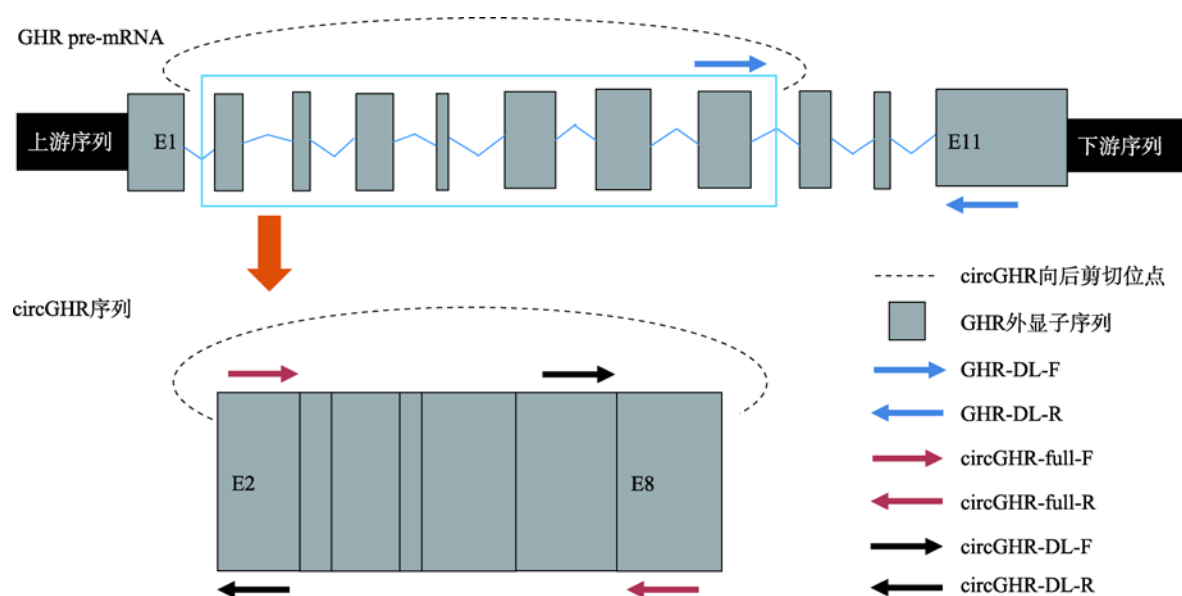


图 1 小鼠 circGHR 来源及引物位置示意图

Fig. 1 Diagram illustrating the origin of the mouse circGHR transcript and the locations of the primers used in this study

E1~E11 表示外显子 Exon1~Exon11。

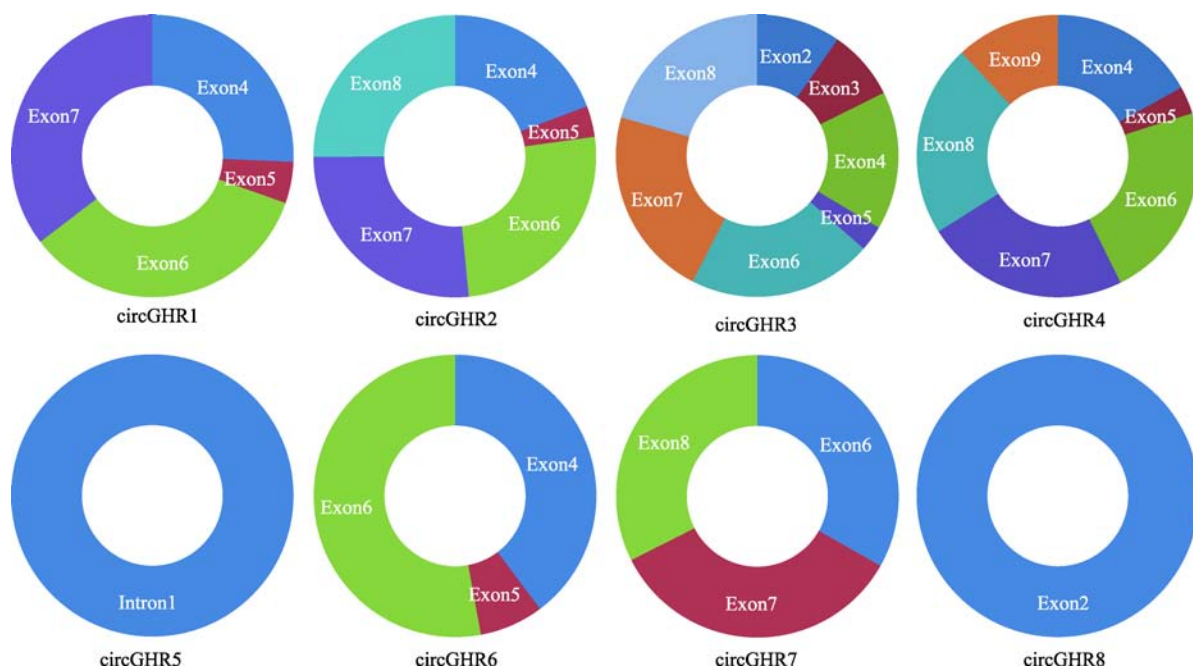


图 2 小鼠 8 个 circGHR 序列组成和结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the sequence composition and structure of eight mouse circGHR

2.2 小鼠 circGHR 连接成环验证及其全长序列分析

本研究针对 circGHR 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 7 周龄小鼠肝脏组织总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。结果表明,在 343 bp 位置产生了符合 circGHR 接头位置片段长度的预期目标片段,初

步表明 *GHR* 基因存在向后剪切产物。测序结果显示, *circGHR* 连接成环的接头片段序列来源于 *GHR* 基因外显子 2 和 8 (图 3, A 和 B), 该结果与生物信息学预测分析 *circGHR3* 分子结果完全吻合。克隆结果表明, 小鼠 *circGHR* 全长为 820 bp, 由 *GHR* 基因外显子 2~8 组成, 向后剪切位点为外显子 2 和外显子 8 (图 3, C 和 D)。

2.3 小鼠 *circGHR* 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。为了确认小鼠 *circGHR* 具备环形分子的一般特征, 本研究分析了小鼠 *circGHR* 的 RNase R 耐受

性。以 7 周龄小鼠肝脏组织总 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, *circGHR* 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 *GHR* mRNA 经 RNase R 处理后下降极显著($P<0.01$), 说明 *circGHR* 具有较强的 RNase R 耐受性。此外, 以 7 周龄小鼠肝脏组织总 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 *circGHR* 的反转录效率。结果表明, 用 oligo-d(T)18 引物反转录后 *circGHR* 的表达丰度差异极显著($P<0.01$)。因此, 与 oligo-d(T)18 引物的反转录效果相比, 随机引物对 *circGHR* 具有较好的反转录效果, 同时也说明 *circGHR* 是一个不含 poly(A)结构的环状分子。

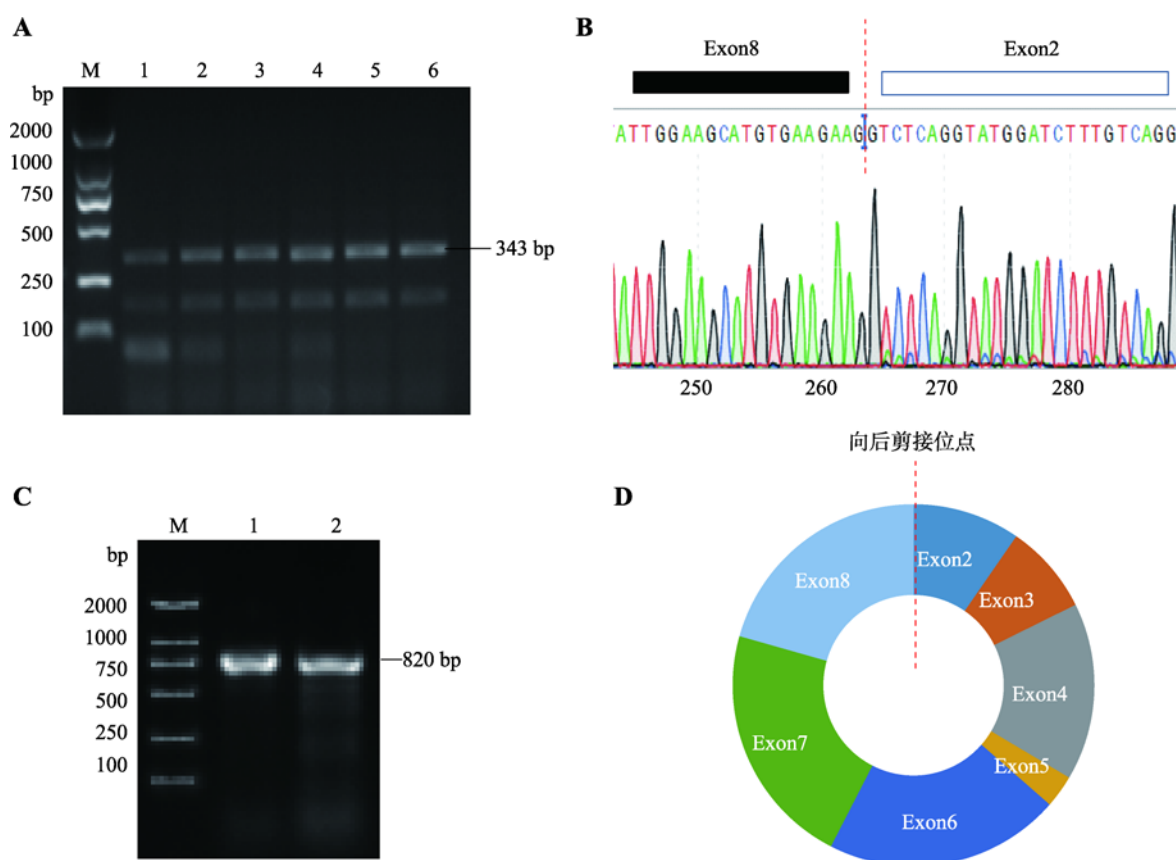


图 3 小鼠 *circGHR* 全长克隆及结构验证分析

Fig. 3 Full-length cloning and structure verification analysis of mouse *circGHR*

A: *circGHR* 接头位置扩增结果。M: DL2000 maker; 泳道 1~6: 以 7 周龄昆明小鼠肝脏组织 cDNA 为模板, *circGHR*-D 引物扩增结果。B: *circGHR*-DL 引物扩增产物测序结果。C: *circGHR* 全长扩增结果。M: DL2000 maker; 泳道 1~2: 以 7 周龄昆明小鼠肝脏组织 cDNA 为模板, *circGHR*-full 引物扩增产物。D: 小鼠 *circGHR* 结构示意图。

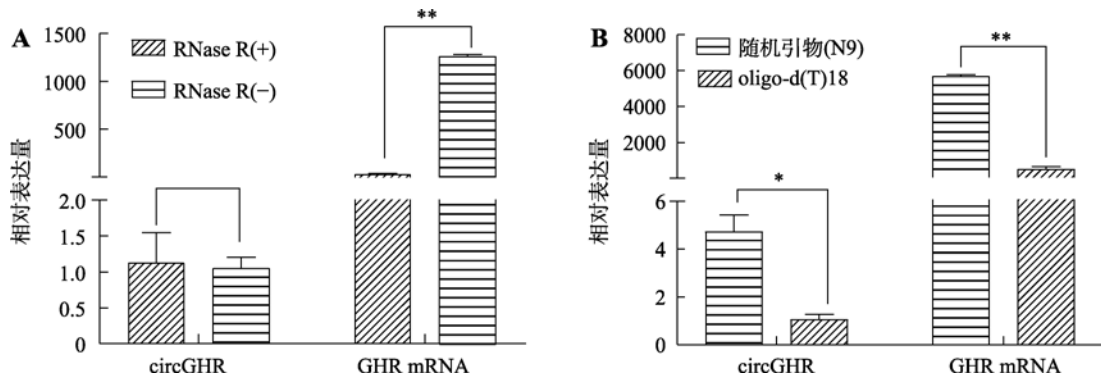


图 4 小鼠 circGHR 和 GHR mRNA 对 RNase R 耐受性及反转录特征分析

Fig. 4 Resistance of the mouse circGHR and GHR mRNA to RNase R and analysis of reverse transcription characteristics

A: RNase R 对 circGHR 和 GHR mRNA 表达丰度的影响; B: 不同反转录引物对 circGHR 和 GHR mRNA 表达丰度的影响。RNase R(-): 未经 RNase R 处理过的总 RNA; RNase R(+): 经 RNase R 处理过的总 RNA; $n=3$, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 qRT-PCR 结果; *表示 $P<0.05$, 差异显著; **表示 $P<0.01$, 差异极显著。

2.4 小鼠 circGHR 和线性 GHR mRNA 时空表达规律

分别提取 1、3、5 和 7 周龄雄鼠肝脏、胸肌、腿肌、心脏等组织 RNA, 经反转录合成 cDNA, 利用 qRT-PCR 对 circGHR 和 GHR mRNA 的表达量进行分析。通过分析发现 1、3、5 和 7 周龄小鼠肝脏、胸肌中 circGHR 和 GHR mRNA 的时序表达量规律一致, 且表达量都呈上升趋势, 有可能是 GHR 基因表达量上升导致该结果, 也暗示两种分子可能存在协同作用(图 5, A 和 B); 而在腿肌中 3 周龄以前两者呈负相关, 3 周龄以后呈正相关(图 5C)。circGHR 和 GHR mRNA 的组织表达谱显示, 两者在肝脏、肾脏以及肺组织高表达, 而在胸肌和腿肌组织低表达。结果表明, circGHR 在 1 周龄小鼠的肺和肾组织中高表达, 而在心脏、腿肌和胸肌组织中低表达(图 5D), circGHR 在 7 周龄小鼠的肾脏中高表达, 而在胸肌和腿肌中低表达(图 5F); 在 1 周龄小鼠中发现 GHR mRNA 在肝脏和肺组织中高表达, 而在脾脏、胸肌和腿肌组织低表达(图 5E); 在 7 周龄小鼠中发现 GHR mRNA 在肝脏、肺和肾组织高表达, 在脾脏、胸肌和腿肌组织低表达(图 5G)。

2.5 小鼠 circGHR 编码蛋白质的潜能分析

2.5.1 小鼠 circGHR 开放阅读框(ORF)分析

小鼠 circGHR 全长为 820 nt, 由 GHR 基因外显

子 2~8 环化形成, 使用 SnapGene 软件对该段序列进行 ORF 预测, 发现这段序列具有一个完整的 ORF 结构, 长度为 888 nt, 可能具有蛋白质编码潜能。ORF 结构从外显子 2 的第 10 个碱基开始编码(ATG), 围绕环状 RNA 编码一周后, 跨过 junction 位置, 再次在外显子 2 的第 77 个碱基处终止(TGA), 如图 6A 所示。开放阅读框编码一个长度为 295 aa 的多肽, 如图 6B 所示。

2.5.2 利用 Signal P 分析氨基酸信号肽

蛋白质合成后通过“信号肽”来实现分选或转运功能, 每一个需要运输的多肽都含有一段氨基酸序列, 称为信号肽序列(signal peptide, SP), 引导多肽至不同的转运系统。对 GHR 基因的线性 mRNA 和 circGHR 编码氨基酸序列的信号肽进行分析, 发现两者存在同一个信号肽(Sec/SPI), 即“标准”分泌信号肽(图 6B), 由 Sec 转运蛋白转运并被信号肽酶 I (Lep)切割。根据预测结果, 分析 circGHR 基因可能存在编码功能, 且合成的蛋白质与 GHR 基因编码蛋白质在核糖体合成后, 通过信号肽转运发挥作用。

2.5.3 小鼠 circGHR 内部核糖体进入位点序列(IRES)预测分析

真核 mRNA 的翻译都需要 5'帽子来介导核糖体结合, 但环状 RNA 没有帽子结构, 因此具有一段较

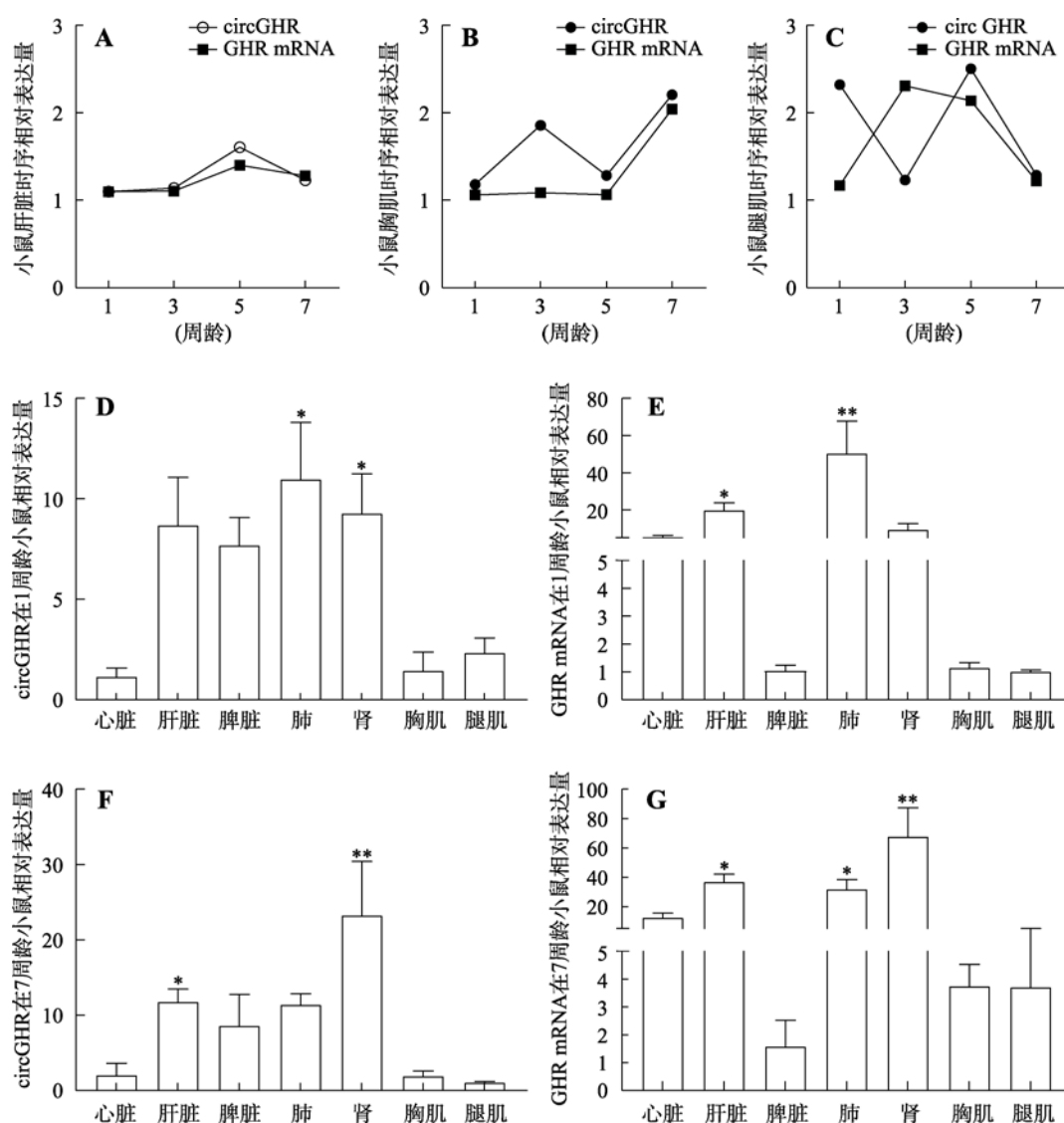


图5 小鼠 circGHR 和 GHR mRNA 的时空表达规律

Fig. 5 The spatiotemporal expression pattern of mouse circGHR and GHR mRNA

A: 1、3、5 和 7 周龄小鼠肝脏组织中 circGHR 和 GHR mRNA 的表达规律; B: 1、3、5 和 7 周龄小鼠胸肌组织中 circGHR 和 GHR mRNA 的表达规律; C: 1、3、5 和 7 周龄小鼠腿肌组织中 circGHR 和 GHR mRNA 的表达规律; D: 1 周龄小鼠不同组织中 circGHR 的表达规律; E: 1 周龄小鼠不同组织中 GHR mRNA 的表达规律; F: 7 周龄小鼠不同组织中 circGHR 的表达规律; G: 7 周龄小鼠不同组织中 GHR mRNA 的表达规律。图 A、B、C 中 $n=12$, 图 D、E 中 $n=3$, 图 F、G 中 $n=3$; 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 qRT-PCR 结果; *表示 $P<0.05$, 差异显著; **表示 $P<0.01$, 差异极显著。

短的 RNA 序列(约 150~250 bp), 这类 RNA 序列能折叠成类似于起始 tRNA 的结构, 从而介导核糖体与 RNA 结合, 起始蛋白质翻译^[18], 这段非翻译 RNA 被称为内部核糖体进入位点序列(internal ribosome entry site, IRES)。用 IRESfinder 软件对该序列进行预测, 发现小鼠 circGHR 存在多个 IRES, 其中预测分值最高的 IRES 片段如图 6B 所示。

2.5.4 对比分析小鼠 GHR 环 RNA 和线性 mRNA 编码蛋白跨膜区

利用在线软件 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对小鼠 circGHR 和 GHR mRNA 编码的蛋白跨膜区进行对比分析, 结果如图 7 所示。circGHR 跨膜螺旋氨基酸残基数量

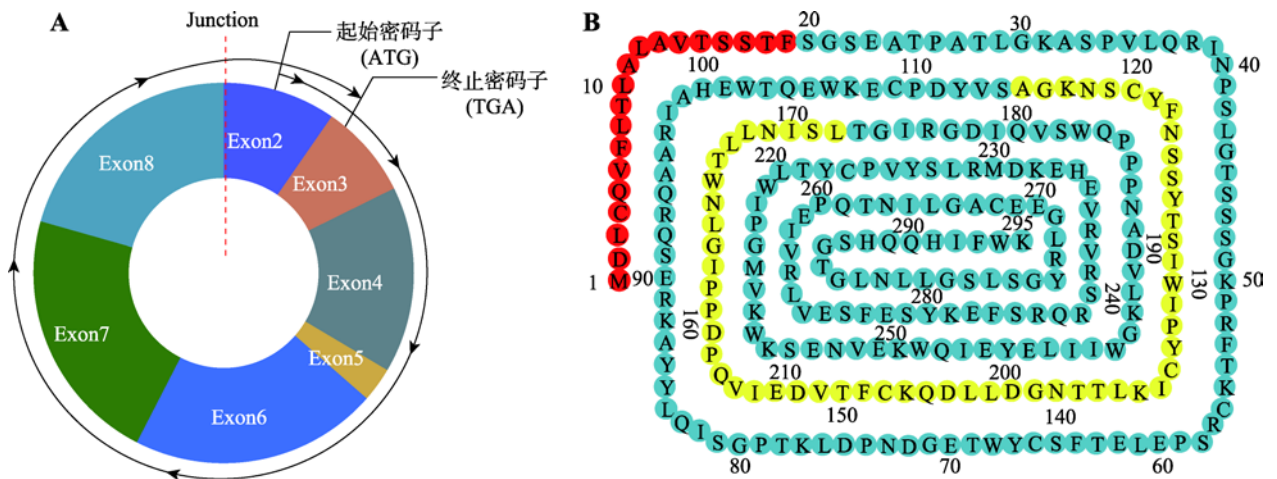


图 6 小鼠 circGHR 预测的 ORF 结构示意图及其编码的多肽功能区域分析

Fig. 6 Schematic diagram of the ORF structure predicted by mouse circGHR and analysis of the functional regions of the encoded polypeptide

A: 开放阅读框结构示意图。带箭头的黑线表示小鼠 circGHR 的 ORF, 从起始密码子开始编码, 跨过 Junction 位置到终止密码子结束;
B: 氨基酸序列和功能区域示意图。红色氨基酸表示信号肽段, 黄色表示内部核糖体进入位点序列(IRES)。

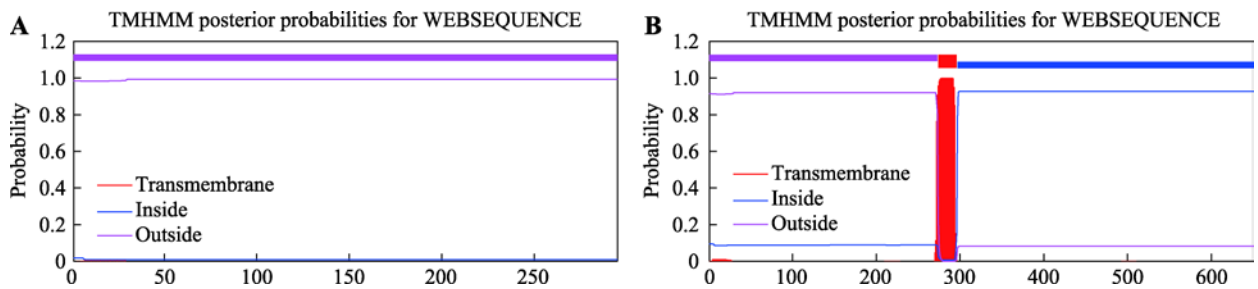


图 7 小鼠 circGHR 和 GHR mRNA 编码蛋白跨膜区对比分析

Fig. 7 Comparative analysis of transmembrane regions of mouse circGHR and GHR mRNA encoding proteins

A: circGHR 编码的蛋白跨膜区预测结果; B: GHR mRNA 编码的蛋白跨膜区预测结果。

的期望值为 0.20896, 远小于 18, 表明 circGHR 编码的蛋白不含有跨膜螺旋(图 7A), 氨基酸位于膜外侧; 而小鼠 GHR mRNA 蛋白有一个跨膜螺旋, 属于跨膜蛋白, 跨膜区位于 274~296 个氨基酸, 从 1~273 氨基酸位于膜外侧, 297~650 氨基酸位于膜内侧(图 7B)。由此分析 circGHR 编码蛋白不属于跨膜蛋白, 而是在膜外发挥作用。

3 讨论

在本课题组前期实验的基础上, 本研究筛选出 8 个 circGHR, 并设计 8 对引物对其进行扩增, 结果发现其中 4 对引物都能对 circGHR3 进行扩增, 而其他 7 个分子均未验证成功。因此 circGHR3 可能是小

鼠肝脏组织中存在最多, 最为广泛的 GHR 基因环状转录本。通过对其进行克隆, 发现 circGHR 由该基因外显子 2 到外显子 8 向后剪切形成。

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 circGHR 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 circGHR 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, 但对环形分子不敏感^[19]。本研究表明, 小鼠 circGHR 对 RNase R 表现出较强的耐受性, 总 RNA 经 RNase R 处理后, circGHR 表达量变化不显著, 进一步说明小鼠 circGHR 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^[20]。从本研究结果可以发现在肝脏和胸肌组织中, circGHR 与 GHR mRNA 的时序表达基本一致, 转录水平呈现持续上升, 表明两者可能存在相互作用, 也有可能是随着小鼠的发育整个基因组转录水平上升, 导致 circGHR 与 GHR mRNA 同时上升; 在腿肌组织中 1~3 周两者表达趋势相反, 3 周以后表达趋势相同, 推测可能是由于不同个体样本间差异较大造成, 也可能是由于基因定量的样本数少所致。此外, 小鼠 GHR mRNA 与 circGHR 广泛存在于各种组织中, 但表达具有一定的差异。有研究发现, *GHR* 基因敲除后小鼠肺部发育相关蛋白表达明显降低^[21]; 同样对 20 日龄鸡胚肺部组织进行检测, 同样也发现少量 *GHR*^[22]。本研究中, 1 周龄小鼠中 GHR mRNA 与 circGHR 都是高表达, 说明 *GHR* 可能参与早期肺部生长发育, 并与肺部的氧化保护、脂质和能量代谢以及蛋白酶体活性等生理活动有关。在患糖尿病的动物肾脏中, *GHR* 在肾脏皮质区和髓质区高表达^[23]; 在对小鼠肾脏的研究中发现, 肾脏的皮质和髓质区域存在 *GHR*^[24]。本研究中, 7 周龄小鼠 GHR mRNA 与 circGHR 在肾脏中高表达, 分析这可能与肾小管的重吸收和上皮细胞的分泌功能有关。

circRNA 具有 miRNA 海绵、调控转录、结合蛋白质和翻译等作用, 本研究通过 SnapGene 软件预测发现 circGHR 存在一个 ORF, 并且对其翻译的蛋白进行了生物信息学分析。首先对与两种蛋白进行信号肽分析, 发现两者存在同一个“标准”分泌信号肽, 这提示两种蛋白都属于分泌性蛋白, 即穿过合成所在的细胞到其他组织细胞去的蛋白质^[25]。由于环状 RNA 缺乏帽子结构, 所以环状 RNA 的翻译应通过 IRES 进行, IRES 可促进核糖体与被翻译的环状 RNA 结合^[26]。对该 ORF 进行 IRES 分析, 发现有多段 IRES, 且有两段序列可能性超过 80%, 表明该 circGHR 可能通过核糖体介入位点介导翻译, 因此可以通过检测这些 IRES 能否启动编码, 间接验证 circGHR 能否被编码, 为验证 circGHR 的编码能力提供方法。最后通过对两种蛋白跨膜区进行分析, 发现 circGHR 编码蛋白不具有跨膜结构, 氨基酸位于膜的外侧发挥作用; 而 *GHR* 基因则具有一个跨膜结构, 印证了 *GHR* 属于单链跨膜糖蛋白。通过该结

果推测 circGHR 编码的蛋白质在细胞膜外发挥作用, 与 GHR mRNA 编码的蛋白质作用位置不同。关于小鼠 circGHR 的作用机制尚需进一步研究证实, 以期将来阐述 *GHR* 涉及的调控网络及其调控动物生长发育理论奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Palmiter RD, Norstedt G, Gelin RE, Hammer RE, Brinster RL. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 1983, 222(4625): 809–814. [DOI]
- [2] Chen DB, Li QH, Li LH, Tao JG, Chai Y, Wen SP, Wang JH, Liu L, Jia JJ. Growth hormone and growth hormone receptor gene expression. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2007, 34(11): 52–54.
陈宝定, 李琦华, 李丽红, 陶金光, 柴艳, 文生萍, 王金浩, 刘丽, 贾俊静. 生长激素与生长激素受体基因的表达. 中国畜牧兽医, 2007, 34(11): 52–54. [DOI]
- [3] Ma X, Hu Y, Xiong G, He XR, Wang XQ. Overview of growth hormone receptor gene and growth hormone receptor. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 2010, 36(S1): 58–62.
马晓, 胡毅, 熊钢, 何湘蓉, 王晓清. 生长激素受体及其基因研究进展. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(S1): 58–62. [DOI]
- [4] Argetsinger LS, Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev*, 1996, 76(4): 1089–1107. [DOI]
- [5] 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]
- [6] Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(11): 3852–3856. [DOI]
- [7] 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]
- [8] Suzuki H, Zuo YH, Wang JH, Zhang MQ, Malhotra A, Mayeda A. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from

- pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(8): e63. [DOI]
- [9] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 9331–9342. [DOI]
- [10] Chen L, Shan G. Circular RNAs remain peculiarly unclear in biogenesis and function. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(6): 616–618. [DOI]
- [11] Chen L, Huang C, Wang XL, Shan G. Circular RNAs in eukaryotic cells. *Curr Genomics*, 2015, 16(5): 312–318. [DOI]
- [12] Huang C, Shan G. What happens at or after transcription: Insights into circRNA biogenesis and function. *Transcription*, 2015, 6(4): 61–64. [DOI]
- [13] Liu XQ, Gao YB, Zhao LZ, Cai YC, Wang HY, Miao M, Zhang HX. Biogenesis, research methods, and functions of circular RNAs. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(6): 469–485. 刘旭庆, 高宇帮, 赵良真, 蔡宇晨, 王汇源, 苗苗, 顾连峰, 张航晓. 环状 RNA 的产生、研究方法及功能. *遗传*, 2019, 41(6): 469–485. [DOI]
- [14] 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. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256–264. [DOI]
- [15] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, Laneve P, Rajewsky N, Bozzoni I. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37.e9. [DOI]
- [16] Zheng X, Chen LJ, Zhou Y, Wang Q, Zheng ZJ, Xu B, Wu C, Zhou Q, Hu WW, Wu CP, Jiang JT. A novel protein encoded by a circular RNA circPPP1R12A promotes tumor pathogenesis and metastasis of colon cancer via Hippo-YAP signaling. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 47. [DOI]
- [17] Dong R, Ma XK, Chen LL, Yang L. Increased complexity of circRNA expression during species evolution. *RNA Biol*, 2017, 14(8): 1064–1074. [DOI]
- [18] Zhen SL, Li L, Zhang HP. Progress on translation ability of circular RNA. *Hereditas(Beijing)*, 2020, 42(5): 423–434. 郑帅龙, 李利, 张红平. 环状 RNA 翻译能力研究进展. *遗传*, 2020, 42(5): 423–434. [DOI]
- [19] Vincent HA, Deutscher MP. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem*, 2006, 281(40): 29769–29775. [DOI]
- [20] 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]
- [21] Beyea JA, Sawicki G, Olson DM, List E, Kopchick JJ, Harvey S. Growth hormone (GH) receptor knockout mice reveal actions of GH in lung development. *Proteomics*, 2006, 6(1): 341–348. [DOI]
- [22] Beyea JA, Olson DM, Vandergriend RA, Harvey S. Expression of growth hormone and its receptor in the lungs of embryonic chicks. *Cell Tissue Res*, 2005, 322(3): 379–392. [DOI]
- [23] Landau D, Domene H, Flyvbjerg A, Grønbaek H, Roberts CT, Argov S, LeRoith D. Differential expression of renal growth hormone receptor and its binding protein in experimental diabetes mellitus. *Growth Horm IGF Res*, 1998, 8(1): 39–45. [DOI]
- [24] Giani JF, Miquet JG, Muñoz MC, Burghi V, Toblli JE, Masternak MM, Kopchick JJ, Bartke A, Turyn D, Dominici FP. Upregulation of the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis in the heart and the kidney of growth hormone receptor knock-out mice. *Growth Horm IGF Res*, 2012, 22(6): 224–233. [DOI]
- [25] Wei XF, Wang DM, Liu S, Zhou P. Signal peptide and its application in protein expression. *Biotechnol Bull*, 2006, (6): 38–42. 韦雪芳, 王冬梅, 刘思, 周鹏. 信号肽及其在蛋白质表达中的应用. *生物技术通报*, 2006, (6): 38–42. [DOI]
- [26] Zhou B, Yang H, Yang C, Bao YL, Yang SM, Liu J, Xiao YF. Translation of noncoding RNAs and cancer. *Cancer Lett*, 2021, 497: 89–99. [DOI]

(责任编辑: 单革)