

环状RNA circCapzb在早孕小鼠围植入期 子宫内膜中的表达

毛裘 张爽 李娜 刘学庆 何俊琳 陈雪梅 丁裕斌 王应雄 高茹菲*

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室,
重庆医科大学生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

摘要 环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类新型内源性非编码RNA,与多种疾病的发生、发展密切相关,但在胚胎着床的过程中罕见报道。该文旨在探讨环状RNA circCapzb在早孕小鼠围植入期子宫内膜中的表达。采用Real-time PCR检测正常妊娠小鼠孕第5天(d5)至第7天(d7)胚胎着床点及胚胎着床旁组织中circCapzb的表达水平;分别构建小鼠体内人工诱导蜕膜化模型和原代小鼠子宫内膜基质细胞体外人工诱导蜕膜化模型,采用Real-time PCR分别检测circCapzb在组织及细胞蜕膜化诱导模型中的表达;通过生物信息学预测circCapzb下游靶miRNA: miR-377-3p和miR-7005-5p,并采用Real-time PCR检测其在蜕膜化诱导模型中的表达。结果表明, circCapzb在小鼠孕第5天至第7天胚胎着床点的表达明显高于着床旁; circCapzb在组织及体内外细胞蜕膜化诱导模型中诱导组的表达明显高于未诱导组(对照组); circCapzb下游靶miR-377-3p和miR-7005-5p在组织及体内外细胞蜕膜化诱导模型中诱导组的表达明显低于未诱导组。该研究初步表明, circCapzb在小鼠早孕期胚胎着床点高表达,在组织及体内外细胞蜕膜化诱导模型中高表达,在小鼠妊娠早期子宫内膜蜕膜化过程中可能发挥作用,但具体机制有待进一步研究。

关键词 环状RNA; circCapzb; 围植入期; 子宫内膜; 蜕膜化

Expression of circCapzb in Endometrium during Peri-Implantation Period of Early Pregnancy Mice

MAO Qiu, ZHANG Shuang, LI Na, LIU Xueqing, HE Junlin, CHEN Xuemei,
DING Yubin, WANG Yingxiong, GAO Rufeif*

(Joint International Research Laboratory of Reproduction and Development, Department of Reproductive Biology,
School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract CircRNA (circular RNA), as a new class of endogenous non-coding RNAs, though closely related to the occurrence and progression of various diseases, is rarely investigated during embryo implantation. The purpose of this study was to investigate the expression of circCapzb in peri-implantation period endometrium of pregnant mice. The expression levels of circCapzb in embryo tissues in IS (implantation sites) and IIS (inter implantation sites) were detected by Real-time PCR from day 5 (d5) to day 7 (d7) of pregnancy. *In vivo* model of induced

收稿日期: 2019-09-25 接受日期: 2020-02-17

国家自然科学基金(批准号: 31571190)和重庆市教委科学技术研究计划项目(批准号: KJQN201900413)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: gao_ru_fei@cqmu.edu.cn

Received: September 25, 2019 Accepted: February 17, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571190) and the Science and Technology Research Project of Chongqing Education Commission (Grant No.KJQN201900413)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: gao_ru_fei@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5195>

decidualization in mice and *in vitro* model of induced decidualization in primary mice endometrial stromal cells were constructed respectively, and the expression of circCapzb in the models was detected by Real-time PCR. The circCapzb downstream targets miRNAs were miR-377-3p and miR-7005-5p. They were predicted by bioinformatics, and their expression in the decidual induction model was detected by Real-time PCR. The results showed that circCapzb expression was significantly higher at the implantation sites from day 5 to day 7 than at the interimplantation sites. CircCapzb expression in tissue and cell decidualization induction *in vivo* and *in vitro* model was significantly higher in the induced group than in the non-induced group. The expression of miR-377-3p and miR-7005-5p downstream targets of circCapzb in the tissue and cell decidualization induction *in vivo* and *in vitro* model was significantly lower in the induced group than in the non-induced group. This study showed that circCapzb was highly expressed in mice embryo implantation sites during early pregnancy, and in tissue and cell decidualization *in vivo* and *in vitro* induction models. circCapzb might play a role in mouse endometrial decidualization during early pregnancy, but the specific mechanism remained to be further studied.

Keywords circular RNA; circCapzb; peri-implantation period; endometrium; decidual

人类生殖是一个非常低效的过程^[1]。育龄妇女不孕问题一直困扰着人们,而胚胎植入失败是不孕的主要因素。胚胎植入是胚胎与子宫之间发生相互作用的复杂过程,是妊娠成功的关键之一^[2]。成功的植入不仅需要合格的胚胎,还需要子宫处于容受状态^[3]。小鼠子宫在妊娠第4天处于容受状态,囊胚在妊娠第4天早晨进入子宫,第4天午夜开始植入^[4]。已有研究表明,在胚胎植入这一过程中,受激素、miRNA、转录因子等因素的调节^[5]。第5天,囊胚黏附并侵入子宫内膜,子宫内膜基质细胞开始广泛增殖,发生蜕膜化。第6天形成次级蜕膜区,并逐渐完成蜕膜化这一过程^[6]。蜕膜化对妊娠的维持具有重要作用^[7]。

环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类新型内源性非编码RNA,广泛存在于真核生物中。不同于线性RNA,环状RNA是没有3'端poly(A)和5'端帽子结构的,其结构为首尾相连的共价键闭环^[8]。其结构稳定,具有组织、时序和疾病特异性^[9]。环状RNA具有多种生物学功能,调控基因的表达^[10]。环状RNA是重要的竞争性内源RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA),可以通过竞争性结合微小RNA(micro RNA, miRNA)来调控基因的表达^[11]。环状RNA除了具有miRNA海绵的功能外,还可以翻译成蛋白调控基因的表达^[12]。有研究报道,环状RNA参与的一系列的病理生理过程,提示环状RNA可能作为疾病诊断及预后的生物学标志物,甚至是潜在的治疗靶点^[13]。然而,迄今为止,环状RNA在胚胎植入及蜕膜化过程中的报道尚少。

课题组前期通过微阵列芯片检测妊娠第5天小鼠的胚胎植入点及植入点旁子宫内膜组织中环状RNA的差异表达,研究发现与植入旁子宫内膜组织相比较,植入点子宫内膜组织共有101个环状RNA显著上调,75个环状RNA显著下调^[4]。根据课题组前期芯片数据结果,环状RNA circCapzb在小鼠妊娠第5天胚胎植入点子宫内膜的表达比胚胎植入点旁显著增高。本文旨在进一步探讨circCapzb在早孕小鼠围植入期子宫内膜中的表达,为后续进一步探讨其在胚胎植入中的可能作用提供可能线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本实验动物为清洁级6~8周龄昆明雌雄小鼠,购于重庆医科大学动物实验中心([实验动物生产许可号: SCXK(渝)2017-0001,实验动物使用许可号: SCXK(渝)2017-0023]。昆明小鼠于温度为20~24 °C、相对湿度为50%~60%、12 h光照黑暗循环条件下饲养,自由饮水摄食。所有动物实验均通过重庆医科大学伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 无水乙醇、氯仿、异丙醇购于重庆锦荣化工有限公司; Trizol裂解液、逆转录试剂盒购于日本TaKaRa公司; SYBR购于美国Bimake公司; Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)购于武汉博士德生物工程有限公司; Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/Ham's F-12(DF12)培养基、雌二醇(E2)、孕酮(P4)、99%纯度玉米油、芝加哥蓝溶液均购于Sigma公司; 碳吸附血清购于

Biological Industries公司。

1.2 方法

1.2.1 动物组织收取 将昆明小鼠按雌雄比3:1于晚6点合笼;次日早8点将其分开,并根据雌性小鼠阴道处是否存在阴栓判断是否怀孕,见栓记为孕第1天(d1)。对于孕d5天小鼠,于当日早8点先从其尾静脉注射0.1 mL的1%芝加哥蓝溶液,以颈椎脱臼方法处死,收集胚胎着床点(染成蓝色)和着床点旁(不着色)的子宫组织。对于孕d6、d7天小鼠,其胚胎着床点及着床点旁组织可以肉眼分辨,分别于当天早8点以颈椎脱臼方法处死,收集胚胎着床点及着床点旁的子宫组织,于-80 °C保存。

1.2.2 Sanger测序 提取5对小鼠孕第5天胚胎着床点(implantation sites, IS)及胚胎着床旁(inter implantation sites, IIS)组织总RNA,并检测其纯度和完整性,质检合格进行下一步实验。RNA测序文库的构建、上机测序及差异基因分析均由广州吉塞生物科技有限公司提供技术服务。

1.2.3 小鼠体内人工诱导蜕膜化模型的构建 根据已报道的方法构建体内人工诱导蜕膜化模型^[15],将雌性小鼠与已结扎的雄性小鼠以3:1的比例于晚6点合笼,次日早8点检查雌性小鼠阴道处是否存在阴栓,见栓记为假孕第1天(Pd1)。在假孕Pd4天上午8时手术,构建人工诱导蜕膜化模型,子宫角一侧注射25 μ L玉米油作为诱导侧(诱导组, induced group, 即ID组),另一侧不做处理作为对照侧(对照组, non-induced group, 即IDC组)。在Pd8天早8点以颈椎脱臼方法处死小鼠,肉眼可见注射玉米油的一侧子宫角应发生蜕膜化,另一侧子宫角应没有变化,分别收取两侧子宫,即为人工诱导蜕膜化子宫组织及其对照组子宫组织,于-80 °C保存。

1.2.4 原代小鼠子宫内膜基质细胞的分离及诱导蜕膜化 根据已报道的方法原代分离小鼠子宫内膜基质细胞并进行诱导蜕膜化^[16],将小鼠子宫取出用HBSS清洗干净后剪碎,在4 °C含有胰蛋白酶的HBSS溶液中消化2 h,之后转移至37 °C继续消化0.5 h;吹打混匀,加胶原酶消化0.5 h得到基质细胞。小鼠子宫基质细胞使用含10%血清的Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/Ham's F-12(DF12)培养基培养,每天换液。小鼠子宫内膜基质细胞贴壁生长后,在培养基中分别加入雌二醇(E2 10 nmol/L)和孕酮(P4 1 μ mol/L),进行蜕膜化诱导,72 h后收集细胞,

于-80 °C保存。

1.2.5 鬼笔环肽染色 将细胞爬片上已进行蜕膜化诱导的小鼠子宫内膜基质细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次后,用4%多聚甲醛固定15 min,再用PBS清洗3次,使用Invitrogen公司的四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的鬼笔环肽(5 μ g/mL)于37 °C孵育1 h, PBS清洗3次,滴加DAPI, 37 °C染核10 min, PBS清洗后,吸去多余液体并封片,置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR) 使用Trizol法提取组织和细胞的总RNA,琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,酶标仪检测其浓度和纯度。环状RNA及蜕膜标志分子*Dtprp*,根据PrimerScript RT Master Mix (Perfect Real Time)逆转录试剂盒说明书,按照对应逆转录条件将RNA逆转录成cDNA; miRNA采用加尾法使用Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit (Clontech)试剂盒,按说明书方法进行逆转录。Real-time PCR使用Real-time PCR仪(Bio-Rad公司)、2 \times SYBR Green qPCR Master Mix试剂盒(Bimake公司),按照说明书方法测各基因表达量,引物合成序列见表1。以cDNA为模版,环状RNA及蜕膜标志分子*Dtprp*使用 β -actin作内参,反应总体积为15 μ L: SYBR 7.5 μ L、上下游引物各0.6 μ L、DEPC处理水5.1 μ L、cDNA 1.2 μ L。miRNA使用*U6*作内参,反应总体积为25 μ L: SYBR 12.5 μ L、特异性上游引物各1.0 μ L、通用下游引物1.0 μ L、DEPC处理水8.5 μ L、cDNA 2.0 μ L。扩增条件为:95 °C预变性10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 60 s,重复40个循环。每个基因设置3个复孔,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达量,实验重复3次。

1.3 统计分析

采用SPSS 22软件进行统计分析。两组之间的数据差异采用*t*检验分析。实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示。* $P<0.05$ 为差异具有显著性,** $P<0.01$ 为差异具有极显著性。

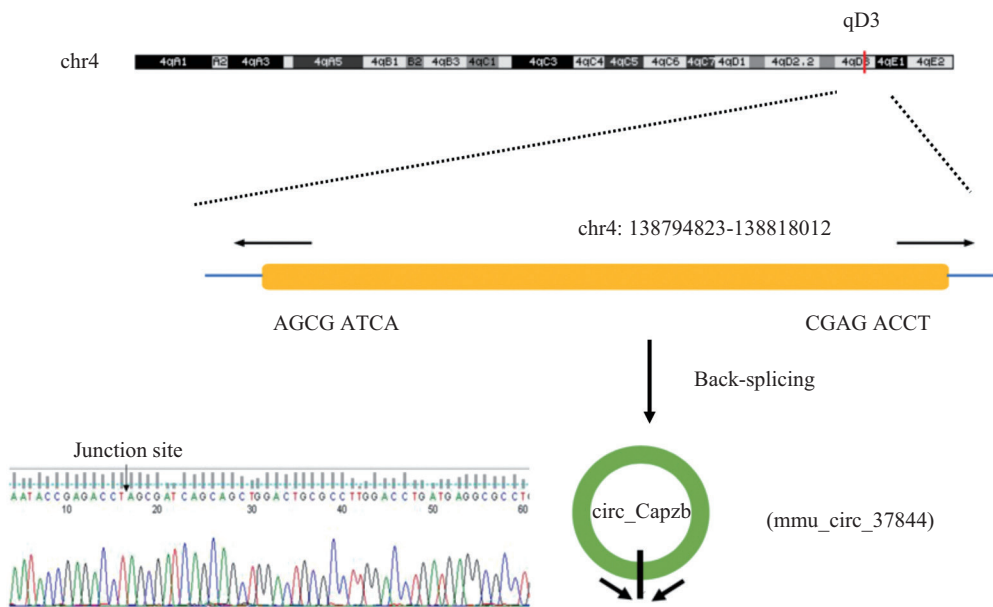
2 结果

2.1 circCapzb序列验证

本课题组前期对小鼠孕第5天胚胎着床点及胚胎着床旁组织进行芯片检测,发现mmu-circ-37844在胚胎着床点子宫内膜中的表达显著高于胚胎着床旁子宫内膜组织^[14]。为进一步验证其表达,本

表1 Real-time PCR引物序列
Table 1 The list of Real-time PCR primer

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>β-actin</i>	F: GCT TCT AGG CGG ACT GTT AC R: CCA TGC CAA TGT TGT CTC TT
circ-Capzb	F: AAT GGG CAA AGC AGA ACT CC R: TTG CTG TTG TCC ATG GAG AC
<i>Dtprp</i>	F: AGC CAG AAA TCA CTG CCA CT R: TGA TCC ATG CAC CCA TAA AA
miR-377-3p	ATC ACA CAA AGG CAA CTT TTG T
miR-7005-5p	CCT GGG GAT GGG AGG ACC AGC
<i>U6</i>	F: GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T R: CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT



circCapzb来源于4号染色体的qD3, 测序发现circCapzb是一个闭合的环状结构。

circCapzb is derived from qD3 on chromosome 4, and sequencing revealed that circCapzb is a closed ring structure.

图1 circCapzb的基因组位点

Fig.1 circCapzb genome site

文首先设计了mmu-circ-37844引物, 并对其扩增的Real-time PCR产物进行Sanger测序, 测序结果进一步证实了circRNA的背索连接。mmu-circ-37844由4号染色体的Capzb基因环化而成, 因此被命名为circCapzb(图1)。

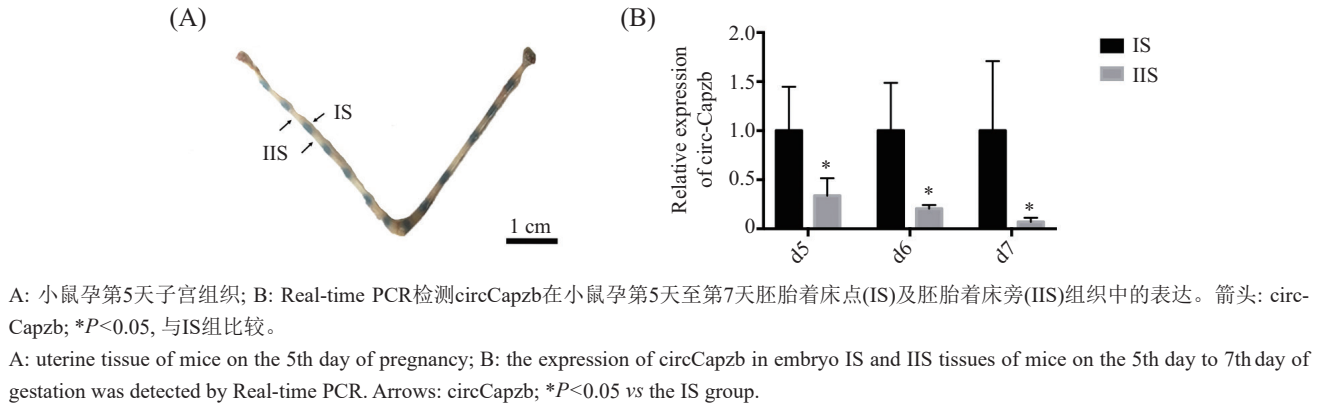
2.2 早孕小鼠子宫组织中circCapzb的表达

为进一步验证课题组前期芯片结果, 我们采用Real-time PCR检测小鼠孕第5天胚胎着床点(IS组)及胚胎着床旁(IIS组)子宫内膜组织中circCapzb的表达(图2A), 结果显示, circCapzb在小鼠孕第5天胚胎着床点组织中的表达显著高于胚胎着床旁组织中的表

达(图2B)。为了进一步了解circCapzb在早孕小鼠子宫组织中的表达规律, 用Real-time PCR检测小鼠孕第6天至第7天胚胎着床点及胚胎着床旁组织中circCapzb的表达, 结果显示, circCapzb在小鼠孕第6天至第7天胚胎着床点子宫内膜组织中的表达显著高于胚胎着床旁子宫内膜组织中的表达(图2B)。

2.3 小鼠体内人工诱导子宫蜕膜化后circCapzb的表达增加

上述结果显示, circCapzb在胚胎着床点子宫内膜组织中的表达显著高于着床旁, 提示circCapzb可能在早孕小鼠子宫内蜕膜化这一过程中发挥作

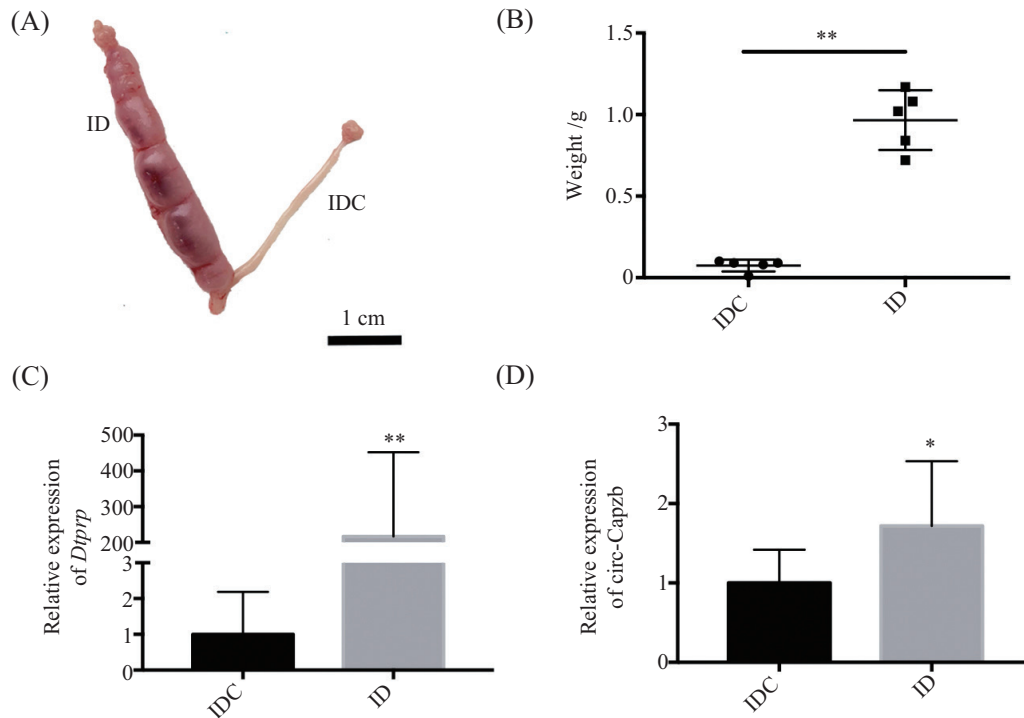


A: 小鼠孕第5天子宫组织; B: Real-time PCR检测circCapzb在小鼠孕第5天至第7天胚胎着床点(IS)及胚胎着床旁(IIS)组织中的表达。箭头: circCapzb; * $P < 0.05$, 与IS组比较。

A: uterine tissue of mice on the 5th day of pregnancy; B: the expression of circCapzb in embryo IS and IIS tissues of mice on the 5th day to 7th day of gestation was detected by Real-time PCR. Arrows: circCapzb; * $P < 0.05$ vs the IS group.

图2 Real-time PCR检测circCapzb在早孕小鼠子宫中的表达

Fig.2 The expression of circCapzb in the uterus of early pregnancy mice was detected by Real-time PCR



A: 小鼠体内人工诱导蜕膜化模型; B: 子宫质量统计图; C: Real-time PCR检测*Dtprp*在诱导组(ID)及对照组(IDC)的表达; D: Real-time PCR检测circCapzb在诱导组(ID)及对照组(IDC)的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与IDC组比较。

A: *in vivo* model of induced decidualization in mice; B: chart of uterine gravimetric; C: the expression of *Dtprp* at the ID and IDC group was detected by Real-time PCR; D: the expression of circCapzb at the ID and IDC group was detected by Real-time PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the IDC group.

图3 Real-time PCR检测circCapzb在小鼠体内人工诱导蜕膜化模型中的表达

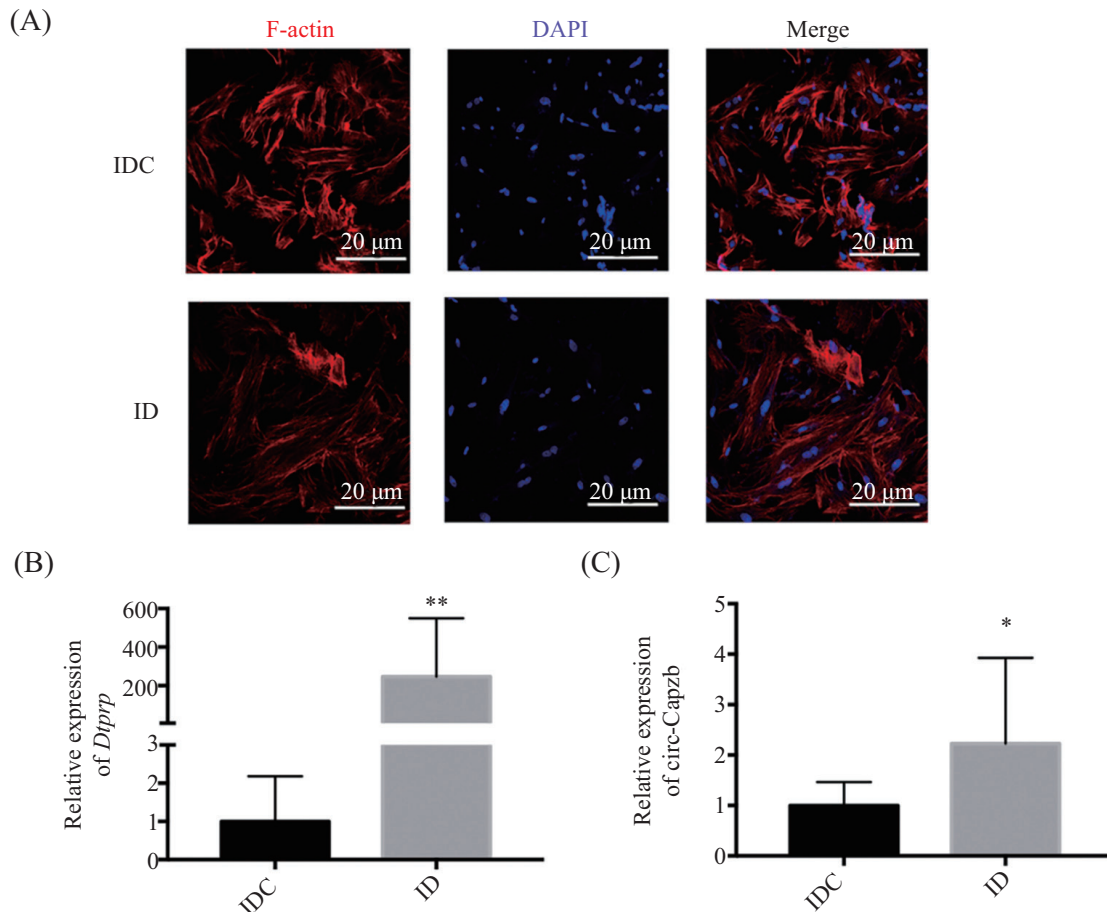
Fig.3 The expression of circCapzb *in vivo* model of induced decidualization in mice was detected by Real-time PCR

用。为了研究circCapzb在子宫内膜蜕膜化中的可能作用,我们构建了小鼠体内人工诱导子宫内膜蜕膜化模型。通过观察子宫形态、检测诱导侧子宫质量和蜕膜化标志分子*Dtprp*的表达,结果提示,小鼠体内人工诱导子宫蜕膜化模型构建成功(图3A~图3C)。Real-time PCR检测circCapzb在蜕膜化诱导侧及对照侧组织中的表达。结果显示, circCapzb在蜕膜化诱

导侧的表达显著高于对照侧(图3D)。

2.4 体外诱导原代小鼠子宫内膜基质细胞蜕膜化后circCapzb的表达增加

上述结果表明, circCapzb在小鼠体内子宫内膜人工诱导蜕膜化模型中诱导侧的表达显著高于对照侧。为了进一步研究circCapzb在蜕膜化中的作用,我们将小鼠子宫内膜基质细胞进行原代分离培



A: 四甲基异硫氰酸罗丹明标记的鬼笔环肽染色检测对照组(IDC)及诱导组(ID)细胞; B: Real-time PCR检测*Dtprp*在诱导组(ID)及对照组(IDC)的表达; C: Real-time PCR检测circCapzb在诱导组(ID)及对照组(IDC)的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与IDC组比较。

A: TRIRIC-phalloidin staining was used to detect the IDC and ID group cells; B: the expression of *Dtprp* in ID and IDC group was detected by Real-time PCR; C: the expression of circCapzb in the ID and IDC group was detected by Real-time PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the IDC group.

图4 Real-time PCR检测circCapzb在原代小鼠子宫内膜基质细胞体外人工诱导蜕膜化模型中的表达

Fig.4 The expression of circCapzb *in vitro* model of induced decidualization in primary mice endometrial stromal cells was detected by Real-time PCR

养,并用雌二醇及孕酮对其进行蜕膜化诱导。使用四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的鬼笔环肽染色,把细胞骨架的F-肌动蛋白(F-actin)染为红色;使用DAPI把细胞核染为蓝色。结果发现,对照组(IDC)细胞呈梭形,体积小,且为单核。诱导组(ID)细胞变大,呈多边形或圆形,核仁增多(图4A)。Real-time PCR检测蜕膜化标志分子*Dtprp*的表达,结果显示,蜕膜化诱导组*Dtprp*表达明显增加,提示体外蜕膜化模型构建成功(图4B)。Real-time PCR检测circCapzb在诱导组及对照组的表达。结果显示, circCapzb在诱导组的表达显著高于对照组(图4C)。

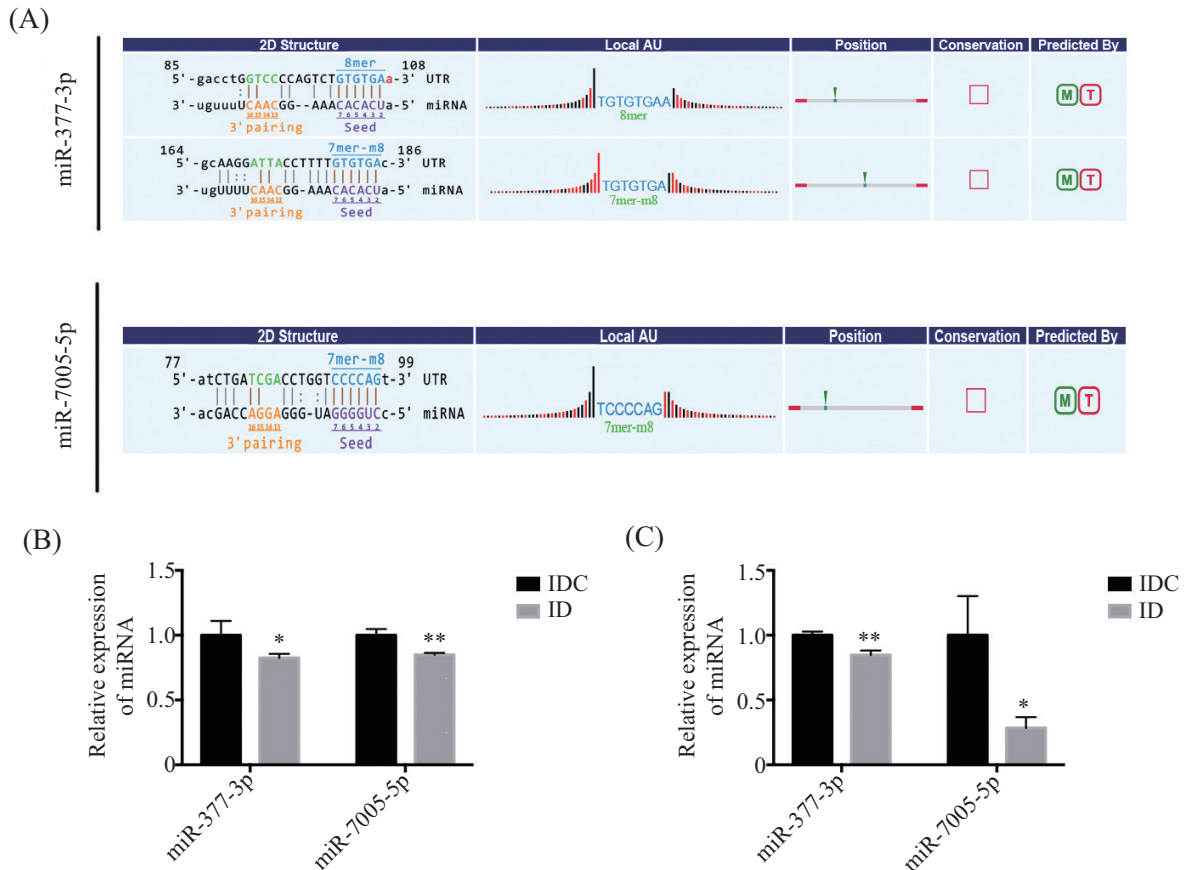
2.5 circCapzb可能作为“海绵体”吸附miR-377-3p和miR-7005-5p

运用 TargetScan 和 miRanda软件分析预测 circ-

Capzb可能会吸附 miR-377-3p 和 miR-7005-5p。此外,利用生物信息学分析预测出, circCapzb可能有与 miR-377-3p和miR-7005-5p相结合的位点(图5A)。为了进一步研究miR-377-3p和miR-7005-5p在蜕膜化中的作用, Real-time PCR检测miR-377-3p和miR-7005-5p在小鼠体内子宫内膜人工诱导蜕膜化模型和体外基质细胞诱导蜕膜化模型中的表达。结果显示体内外人工诱导蜕膜化后, miR-377-3p和miR-7005-5p的表达均明显降低(图5B和图5C)。

3 讨论

上世纪70年代,人类首次在RNA病毒中发现环状RNA^[17],随后,人们陆续在人体细胞中发现环状RNA^[18-19]。然而在当时,人们对环状RNA的了解



A: miR-377-3p和miR-7005-5p与circCapzb的结合位点; B: Real-time PCR检测miR-377-3p和miR-7005-5p在小鼠体内人工诱导蜕膜化模型中诱导组(ID)及对照组(IDC)的表达; C: Real-time PCR检测miR-377-3p和miR-7005-5p在原代小鼠子宫内膜基质细胞体外人工诱导蜕膜化模型中的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与IDC组比较。

A: binding sites of miR-377-3p and miR-7005-5p to circCapzb; B: the expression of miR-377-3p and miR-7005-5p in the ID and IDC group *in vivo* model of induced decidualization in mice was detected by Real-time PCR; C: the expression of miR-377-3p and miR-7005-5p *in vitro* model of induced decidualization in primary mice endometrial stromal cells was detected by Real-time PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the IDC group.

图5 Real-time PCR检测miR-377-3p和miR-7005-5p在小鼠体内人工诱导蜕膜化模型和原代小鼠子宫内膜基质细胞体外人工诱导蜕膜化模型中的表达

Fig.5 The expression of miR-377-3p and miR-7005-5p *in vivo* model of induced decidualization in mice and *in vitro* model of induced decidualization in primary mice endometrial stromal cells was detected by Real-time PCR

较少, 环状RNA甚至被认为是“转录噪音”^[20]。近年来, 随着高通量测序和生物信息学技术的发展, 越来越多的研究表明, 环状RNA在自然界中广泛存在, 且发挥重要功能^[21-22]。环状RNA是一类内源性非编码RNA, 大量广泛存在且结构稳定。常表现为组织发育阶段和疾病产生过程中的特异性表达, 具有多种生物学功能^[23]。近年来, 研究表明, 环状RNA的重要作用与其作为miRNA的“海绵体”有关^[24]。如在卵巢癌中circPLEKHM3通过靶向miR-9/BRCA1/DNAJB6/KLF4/AKT1轴, 在卵巢癌细胞中发挥抑癌作用^[25]; 在非小细胞肺癌中, 环状RNA circ_0074027通过miR-185-3p介导的BRD4/MADD来调节细胞增殖、凋亡和侵袭能力^[26]; 在乳腺癌中,

circPLK1高表达并可能作为一种潜在的预后生物标志物及治疗靶点等^[27]。环状RNA的作用在癌症中的研究报道较多, 但在胚胎植入过程中的研究报道甚少。

本课题组前期通过circRNA芯片技术检测环状RNA在小鼠妊娠第5天子宫内膜组织中胚胎植入点和胚胎植入点旁的表达谱特征, 并对芯片结果进行差异性表达分析, 结果提示, circCapzb在小鼠妊娠第5天子宫内膜组织中胚胎植入点中的表达升高^[4]。Real-time PCR验证结果与芯片结果一致。这提示, circCapzb在胚胎植入过程中可能具有重要的生物学功能。此外, 考虑到已有大量报道表明, 环状RNA可以作为miRNA“海绵体”来调控基因的表达, 结合生

物信息学分析我们发现, circCapzb含有miR-377-3p和miR-7005-5p的应答原件(microRNA response elements, MREs)。因此, 我们推测, circCapzb可能竞争性结合miR-377-3p和miR-7005-5p, 并解除它们对下游靶基因的抑制作用。

本研究中, 我们成功构建了小鼠体内人工诱导子宫蜕膜化模型和体外人工诱导蜕膜化模型。研究结果显示, 体内外人工诱导蜕膜化后circCapzb的表达均明显升高。同时, 我们通过生物信息学预测了circCapzb可能靶向结合miR-377-3p和miR-7005-5p, 并且通过Real-time PCR检测发现, miR-377-3p和miR-7005-5p在小鼠体内人工诱导子宫蜕膜化模型中诱导侧的表达降低。miR-377是一个新发现的与恶性肿瘤等许多疾病的发展相关的miRNA^[28]。有报道称, miR-377在非小细胞肺癌中表达降低, miR-377在体外上调可降低肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[29]。在胃癌组织中miR-377-3p表达减少, miR-377-3p可以作为肿瘤的抑制基因^[30]。虽然目前还没有关于miR-377-3p和miR-7005-5p在胚胎着床中的作用, 但因为胚胎着床过程和癌症侵袭过的分子机制相似。由此推测, miR-377-3p和miR-7005-5p可能参与胚胎着床, 但还需进一步探讨其在胚胎着床中的可能作用。本文未证实circCapz与miR-377-3p和miR-7005-5p二者之间的直接结合作用, 后续需通过荧光素酶报告基因实验进一步证明二者之间的结合关系; 并进一步探讨miR-377-3p和miR-7005-5p在蜕膜化过程中的具体作用。

综上所述, 本研究初步观察到circCapzb在早孕小鼠蜕膜化这一过程中的表达规律变化。在后续实验中, 将通过体内外实验对其可能靶向结合的miR-377-3p和miR-7005-5p进行机制研究, 并预测及分析其下游靶基因的作用及调控机制。这一结果将为进一步研究环状RNA的功能和机制奠定基础, 为不孕症的诊断和治疗提供新的思路及方向。

参考文献 (References)

- LOCKWOOD C J. Prediction of pregnancy loss [J]. *Lancet*, 2000, 355(9212): 1292-3.
- REESE J, DAS S K, PARIJA B C, et al. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 44137-45.
- CHEN Q, ZHANG Y, ELAD D, et al. Navigating the site for embryo implantation: biomechanical and molecular regulation of intrauterine embryo distribution [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(5): 1024-42.
- ZHANG S, LIN H, KONG S, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation [J]. *Mol Asp Med*, 2013, 34(5): 939-80.
- ZHANG L, ZHANG Z, WANG F, et al. Effects of melatonin administration on embryo implantation and offspring growth in mice under different schedules of photoperiodic exposure [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15(1): 78.
- FRANCO H L, JEONG J W, TSAI S Y, et al. *In vivo* analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(2): 178-86.
- LEE C H, KIM T H, LEE J H, et al. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway is required for endometrial decidualization in mice and human [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75282.
- QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: a new star of non-coding RNAs [J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-8.
- PENG L, YUAN X Q, LI G C. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 2669-74.
- FAN X, WENG X, ZHAO Y, et al. Circular RNAs in cardiovascular disease: an overview [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 5135781.
- SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: the rosetta stone of a hidden RNA language [J]? *Cell*, 2011, 146(3): 353-8.
- JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 453-61.
- TANG H, HUANG X, WANG J, et al. circKIF4A acts as a prognostic factor and mediator to regulate the progression of triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 23.
- ZHANG S, DING Y, HE J, et al. Altered expression patterns of circular RNAs between implantation sites and interimplantation sites in early pregnant mice [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(6): 9862-72.
- DING N Z, WANG X M, JIAO X W, et al. Cellular prion protein is involved in decidualization of mouse uterus [J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(2): 319-25.
- ZHANG X, FU L J, LIU X Q, et al. nm23 regulates decidualization through the PI3K-Akt-mTOR signaling pathways in mice and humans [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(10): 2339-51.
- SANGER H L, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(11): 3852-6.
- COCQUERELLE C, DAUBERSIES P, MAJERUS M A, et al. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns [J]. *EMBO J*, 1992, 11(3): 1095-8.
- ZAPHIROPOULOS P G. Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(6): 2985-93.
- HSU M T, COCA-PRADOS M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells [J]. *Nature*, 1979, 280(5720): 339-40.
- DIXON R J, EPERON I C, HALL L, et al. A genome-wide survey demonstrates widespread non-linear mRNA in expressed

- sequences from multiple species [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5904-13.
- [22] 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.
- [23] LI X, YANG L, CHEN L L. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 428-42.
- [24] HANSEN T B, WIKLUND E D, BRAMSEN J B, et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA [J]. *EMBO J*, 2011, 30(21): 4414-22.
- [25] ZHANG L, ZHOU Q, QIU Q, et al. CircPLEKHM3 acts as a tumor suppressor through regulation of the miR-9/BRCA1/DNAJB6/KLF4/AKT1 axis in ovarian cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 144.
- [26] GAO P, WANG Z, HU Z, et al. Circular RNA circ_0074027 indicates a poor prognosis for NSCLC patients and modulates cell proliferation, apoptosis, and invasion via miR-185-3p mediated BRD4/MADD activation [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 121(3): 2632-42.
- [27] KONG Y, YANG L, WEI W, et al. CircPLK1 sponges miR-296-5p to facilitate triple-negative breast cancer progression [J]. *Epigenomics*, 2019, 11(10): 1163-76.
- [28] LI B, XU W W, HAN L, et al. MicroRNA-377 suppresses initiation and progression of esophageal cancer by inhibiting CD133 and VEGF [J]. *Oncogene*, 2017, 36(28): 3986-4000.
- [29] MENG F, ZHANG L, SHAO Y, et al. microRNA-377 inhibits non-small-cell lung cancer through targeting AEG-1 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 13853-63.
- [30] SHI C, LIU T, CHI J, et al. LINC00339 promotes gastric cancer progression by elevating DCP1A expression via inhibiting miR-377-3p [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23667-74.